

好温性アメーバの光活性化cAMP合成酵素NgPAC3の解析

—新たな理科実験ツールの開発に向けて—

安川 洋生*・佐藤 彩**

(2013年11月14日受理)

Hiro YASUKAWA, Aya SATO

Molecular Analysis of Photoactivated Adenylylcyclase NgPAC3 Encoded by *Naegleria gruberi*

— For Development of Novel Experimental Tools for Bioscience —

要旨

近年、ミドリムシ等から発見された光活性化cAMP合成酵素は、細胞機能を光操作できる次世代の生命科学実験ツールとして期待されている。筆者らは、好温性アメーバの一種であるネグレリア グルベリのタンパク質 NgPAC3について解析し、これが光活性化cAMP合成酵素であり、光活性化には Try¹²³が重要な役割を果たしていることを実験により示した。また、低発現プロモータを利用することで過剰発現によるバックグラウンドを抑制することができ、精度の高い結果が得られる実験系を構築できることを示した。今後、低発現プロモータを利用して NgPAC3に関する精緻な解析をすることにより次世代生命科学実験ツールを開発できると思われる。細胞機能の光操作が可能な新規生命科学実験ツールは、児童生徒の理科離れを防ぎ、理科教育の高度化に資すると期待される。

1. 緒言

生物は環境の変化に迅速に対応して適切に生理状態を変化させて適応している。これは細胞外の情報細胞内に伝達し、細胞内で情報をリレーのように伝達して遺伝子の発現を適切に調節するシ

ステムが存在するためである。このシステムの中で、細胞内の情報を伝達する物質の一つが環状アデノシンリン酸 (cAMP) である。cAMPは細胞内情報伝達において極めて重要な物質であり、さまざまな細胞機能がcAMPによって調節されている。そのため、細胞内のcAMP量を人為的に変化させることができれば、細胞機能を操作できる可能性がある。

細胞内では、cAMPはcAMP合成酵素の酵素反応により生成される。そのため、cAMP合成酵素の酵素活性を人為的に調節できれば細胞内のcAMP量を変化させることができるが、これまでそのような実験方法は開発されていなかった。従来の実験系では細胞内のcAMP量を変化させるために培養液にcAMPを添加するか、cAMP分解酵素の阻害剤を添加する方法がとられていたが、細胞内に移行するcAMP量を制御できない、培養ディッシュ内の細胞全てに作用するため一部の細胞のみにピンポイントで作用させることができない、動植物に適用できない、等の欠点があった。そのため、細胞内cAMP量を精密に、かつ自在に変化させることのできる実験ツールが望まれていた。

近年、光により活性化してcAMPを合成する光

* 岩手大学教育学部, ** 富山大学大学院理工学 (現・株式会社池田模範堂)

活性化cAMP合成酵素が発見され注目を集めている。この酵素は、理科教材でよく利用されるミドリムシから最初に発見され (Iseki et al. 2002), その後の研究によりミドリムシの近縁種 (Koumura et al. 2004), 硫黄細菌の一種 (Ryu et al. 2010; Stierl et al. 2011), ネグレリア属アメーバ (Fritz-Laylin et al. 2010; Yasukawa et al., 2012; Yasukawa et al., 2013) からも見つかった。研究対象としている生物に光活性化cAMP合成酵素を導入し、光を照射すると細胞内でcAMPが合成され細胞機能を変化させることができると考えられる。光はビーム状に細く絞り込むことができるため、任意の一細胞のみに照射してピンポイントで細胞内cAMP量を上昇させることが可能である。また、光の強さや照射時間を任意に設定できるため細胞内cAMP量をさまざまに変更できる。このため光活性化cAMP合成酵素は、細胞機能を光操作できる次世代の生命科学実験ツールとして期待されている。

筆者らはこれまでに、硫黄細菌の一種から見つかった光活性化cAMP合成酵素 (BsPAC) と、ネグレリア属アメーバであるネグレリア グルベリ及びネグレリア オーストラリエンシスから見つかった光活性化cAMP合成酵素 (NgPAC1, NgPAC2, NaPAC1, NaPAC2) について解析し報告した (Yasukawa et al., 2012; Yasukawa et al., 2013)。本稿では、ネグレリア グルベリが有する別の光活性化cAMP合成酵素 (NgPAC3) について解析した結果を記載する。

2. 材料と方法

2.1. DNAとプラスミド

NgPAC3をコードする塩基配列はデータベース検索により見つけ (XM_002674325), この塩基配列のうちMet¹⁰⁰からCys⁴⁸⁹に対応する塩基配列を合成した。Try¹²³をPheに置換した部位特異的変異体を構築するためにTry¹²³に対応するコドンTATをTTTに置換した塩基配列を合成した。Try¹²³をTrpに置換した部位特異的変異体を構築するためにTry¹²³に対応するコドンをTGGに置換した塩基配列を合成した。発現ベクターpColdI

(タカラバイオ)とpSPORT1 (インビトロジェン)は購入して用いた。低発現ベクターpLIP2はpSPORT1から当研究室にて構築した。pColdIのNdeI-XbaIに合成した塩基配列を挿入し、完成したプラスミドをpNgPAC3とした。pLIP2のNdeI-XbaIに合成した塩基配列を挿入し、完成したプラスミドをpLNpPAC3とした。ネグレリア オーストラリエンシスDNAの全ゲノム増幅 (WGA) に関しては既に報告した論文に記載した (Yasukawa et al., 2013)。

2.2. 大腸菌株

プラスミド構築には大腸菌XL1-Blue株を用いた。本株の培養は25 µg/ml テトラサイクリンを含むLB培養液またはLB寒天培地にて行った。XL1-Blue株を宿主としてプラスミドを導入した大腸菌の培養は25 µg/ml テトラサイクリンと50 µg/ml アンピシリンを含むLB培養液またはLB寒天培地にて行った。ホスホマイシン感受性試験には大腸菌JW3778株を用いた。本株はcyaAを破壊した大腸菌であり、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から提供された。JW3778株の培養は50 µg/ml カナマイシンを含むLB培養液またはLB寒天培地にて行った。JW3778株を宿主としてプラスミドを導入した大腸菌の培養は50 µg/ml カナマイシンと50 µg/ml アンピシリンを含むLB培養液またはLB寒天培地にて行った。

2.3. 大腸菌のホスホマイシン感受性試験

大腸菌懸濁液 (マックファーランド No.1) をミュラーヒントン寒天培地に塗布した後、ホスホマイシン (10 µg) を染み込ませた試験紙を配置し終夜培養した。培養温度は27°Cとした。明条件のためにはLC-LED470B (タイテック) を用いて5 µmol/m²s, 10 µmol/m²s または20 µmol/m²s に設定して行った。培養後、試験紙の周囲に形成された阻止円のサイズを測定し、ホスホマイシンに対する大腸菌の感受性を評価した。

3. 結果と考察

3.1. 光活性化cAMP合成酵素活性のバイオアッセイ

構築した pNgPAC3 を大腸菌 JW3778 株に導入して遺伝子組換え大腸菌 JW3778 (pNgPAC3) を樹立した。光活性化に重要と予想されるアミノ酸 Try¹²³ を Phe に置換した部位特異的変異体 NgPAC3Y123F, 及び Try¹²³ を Trp に置換した部位特異的変異体 NgPAC3Y123W の活性を確かめるために、これらを発現するプラスミドを導入した遺伝子組換え大腸菌 JW3778 (pNgPAC3Y123F) と JW3778 (pNgPAC3Y123W) を樹立した。対照実験のために pColdI を大腸菌 JW3778 株に導入して遺伝子組換え大腸菌 JW3778 (pColdI) を樹立した。光活性化cAMP合成酵素活性はこれらの大腸菌のホスホマイシン感受性を指標に調べた。

ホスホマイシンは大腸菌の細胞壁合成の初期過程を阻害する抗菌薬であり、大腸菌の表面に存在する GlpT 輸送体と UhpT 輸送体で菌体内に移行することが知られている (Kahan et al., 1974; Lemieux et al., 2004)。これらの輸送体の発現は細菌内の cAMP により正に調節されている。そのため、細胞内 cAMP レベルが低い場合は両輸送体の発現量が少なく、ホスホマイシンの菌体内移行量が少なくなり大腸菌は当該薬剤に対して感受性が低くなる。一方、細胞内 cAMP レベルが高い場合は両輸送体の発現量が多く、ホスホマイシンの菌体内移行量が多くなるため大腸菌は当該薬剤に対して感受性が高くなる。したがって、NgPAC3 が光活性化cAMP合成酵素活性を有していれば

JW3778 (pNgPAC3) は暗条件ではホスホマイシン低感受性であり、明条件では高感受性となることが予想される。

ホスホマイシン感受性はディスク法により試験した。試験菌を寒天培地に塗布した後、抗菌薬を染み込ませた円形の試験紙を配置し培養した。抗菌薬は試験紙から寒天培地に浸透するため試験紙の位置で最も抗菌薬濃度が高く、試験紙から離れるにしたがって低くなる。抗菌薬濃度が高い場所では大腸菌は増殖できず、寒天培地の表面に菌は見られないが、抗菌薬濃度が低い場所では大腸菌は増殖できる。そのため、試験紙の周囲には菌の増殖しない円形のゾーン(阻止円)が形成される。抗菌薬に対して試験した大腸菌の感受性が高い場合は阻止円が大きく、感受性が低い場合は阻止円が小さい。したがって、阻止円のサイズを測定すれば、その抗菌薬に対する大腸菌の感受性を評価することができる。

独立に2回行った感受性試験の結果を表1に示す。JW3778 (pNgPAC3) は暗条件に比べて明条件では阻止円が大きくなっており、ホスホマイシンに対して感受性が亢進したことが示された。JW3778 (pNgPAC3Y123W) では明暗条件での阻止円のサイズには差がみられなかったためホスホマイシン感受性に変化がないことが分かった。本稿ではデータを示さないが、JW3778 (pNgPAC3Y123F) においても同様の結果が得られた。以上の結果より、NgPAC3は光活性化cAMP合成酵素活性を有していること、アミノ酸 Try¹²³が光活性化に重要であることが明らかとなった。

3.2. 低発現プロモータを用いた NgPAC3発現プラスミドの構築

上述の実験結果において、NgPAC3の活性が暗条件でもみとめられた。これはベクターのプロモータ活性が高いため NgPAC3が過剰に作られたためと考えられた。このベクターでは大腸菌コールドショック遺伝子 *cspA* の発現調節を利用して、低温で遺伝子発現が誘導される一方、27°C や37°Cでは遺伝子発現が抑制される。しかし、実

表1. NgPAC3発現大腸菌のホスホマイシン感受性

Test cell	PPFD ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	Inhibition zone (mm)	
		Test 1	Test 2
JW3778 (pColdI)	0	6.0	6.0
	5	6.0	6.0
JW3778 (pNgPAC3)	0	20.5	21.5
	5	29.5	29.5
JW3778 (pNgPAC3Y123W)	0	17.8	18.0
	5	18.0	18.3

なり、ホスホマイシンに対して感受性が充進したことが分かった。光条件 $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ では活性が見られなかったのはNgPAC3の発現量が少ないためと思われる。

3.4. NgPAC3のオーソログの探索

ネグレリア オーストラリエンシスがコードするNgPAC3オーソログを探索した。微量のネグレリア オーストラリエンシスのDNAを全ゲノム増幅法(WGA法)により増幅し、表3のプライマーを用いてインバースPCRを行い、オーソログをコードする塩基配列をスクリーニングした。WGA法の過程で塩基配列に誤り(DNA合成酵素による複製エラー等)が起きる可能性があるため、得られた塩基配列を基に新たにプライマーを設計し、WGAをしていないネグレリア オーストラリエンシスDNAを鋳型として当該塩基配列をPCR法にて増幅し塩基配列の再解析を行った。

このようにして決定した新規の塩基配列に関して、その翻訳産物をNaPAC3と名付けデータベースに登録した(AB851805)。当該塩基配列および周辺領域の制限酵素地図を図2に示す。NaPAC3

をコードする塩基配列は4つのエクソンより成る。筆者らは既にネグレリア オーストラリエンシスの光活性化cAMP合成酵素としてNaPAC1とNaPAC2を発見していたが、これらをコードする塩基配列にはイントロンは存在しない。

NaPAC3をコードする遺伝子の下流にはNaPAC2をコードする塩基配列が配置しており、これらが1つの転写単位となっている可能性がある。また、筆者らの解析により、NaPAC1をコードする塩基配列の上流にも別の光活性化cAMP合成酵素がコードされていることが分かった(未発表データ)。したがって、ネグレリア オーストラリエンシスには少なくとも4種の光活性化cAMP合成酵素がコードされており、これらは2遺伝子ずつタンデムに配置していることが明らかとなった。4種の光活性化cAMP合成酵素にはどのような機能上の違いが有るのか、ネグレリア オーストラリエンシスはどのようにこれらを使い分けているのか、非常に興味深い。また、ネグレリア属の進化の過程における光活性化cAMP合成酵素の分子進化に関してもたいへんに興味深い。

表3. 使用したプライマー

Name	Sequence (5'→3')	Description
P1	TGTGTNMRGGAYATGTTYTTTCARATYATTG	degenerate primer
P2	CCATCAAARTRNMMCATTACACARTCACCAAT	degenerate primer
P17	ATACACCAATCAGGGAATATCTCTCACTT	primer for 1st PCR in inverse PCR for NaPAC3
P18	TAACCGAAAAGTTGTCAAAAACAAGAAAGC	primer for 1st PCR in inverse PCR for NaPAC3
P19	ATAATGTCTTTTATCCTTTAAAATGTTGTG	primer for nested PCR in inverse PCR of the gene for NaPAC3
P20	GTGGTCGAAATTTTAAACAAATTCCTTTGGT	primer for nested PCR in inverse PCR of the gene for NaPAC3
P21	CTACTTTTATTTCCAACCGATAACACAACC	primer for PCR of the full length of the gene for NaPAC3
P22	ACTAAGCAACAATTAAGGAAATAATGAGCC	primer for PCR of the full length of the gene for NaPAC3

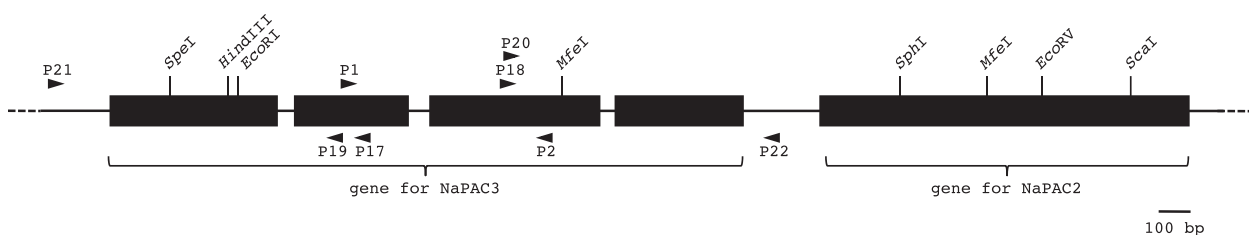


図2. NaPAC2およびNaPAC3をコードする遺伝子の制限酵素地図。矢頭はプライマーのアニール部位を示している。NaPAC3をコードする遺伝子の下流にはNaPAC2をコードする塩基配列が配置している。

4. 結言

本研究により NgPAC3が光活性化 cAMP 合成酵素であり、光活性化には Try¹²³が重要な役割を果たしていることが示された。また、低発現プロモータを利用することで過剰発現によるバックグラウンドを抑制することができ、精度の高い結果が得られる実験系を構築できることが示された。今後はこのベクターを用いて NgPAC3の部位特異的変異体の解析や NgPAC3による細胞機能の精密な光操作を行う予定である。NgPAC3を出発材料として新たな生命科学実験ツールが開発されれば、これを用いた細胞機能の光操作実験が可能となり、児童生徒の理科離れを防ぎ、理科教育の高度化に貢献できると思われる。

なお、本稿に記載したような大腸菌を用いた遺伝子組換え実験の実施にあたっては病原体等取り扱いに関する法令（感染症法等）と遺伝子組換え実験に関する法令（カルタヘナ法等）を熟知し、これらを遵守しなければならない。

本稿に示した大腸菌株は病原性が極めて低く比較的安全なものであるため感染事故の危険性は低い。遺伝子組換え実験を行わない場合は通常の微生物実験室（バイオセーフティーレベル1）で培養し観察に供することができる。ただし病原性が低いといえども微生物取り扱い作業の基本に従い、法令や安全管理規則を遵守しながら行う必要が有る。微生物を取り扱う実験は、教員本人の安全はもとより、児童生徒の安全を守るために十分な知識と手技を身につけてから取り組むべきである。

また、遺伝子組換え実験を行う際には拡散防止区分がどれに該当するか、実験室はそのための設備を備えているかを検討して、十分な知識と手技を有する指導者のもとで行う必要が有るので注意されたい。

謝辞

本研究は渡辺正勝博士（光産業創成大学院大学）、伊関峰生博士（東邦大学薬学部）、八木田健司博士（国立感染症研究所寄生動物部）の協力を

得て行われた。心から感謝申し上げる。また、本研究の一部は富山大学大学院理工学教育部の野本洸介氏（現・株式会社廣寛堂）、米道毅氏（現・日東メディック株式会社）、鳥崎真吾氏（現・東亜薬品株式会社）、山守漠氏（現・株式会社ニッポンジーン）、上松和徳氏（現・愛媛県警察）、梶野隆嗣氏（現・アース環境サービス株式会社）、辻晋一氏（現・第一薬品工業株式会社）、喜多彩香氏（現・辰巳化学株式会社）、今野法子氏（現・富士化学工業株式会社）、羽根田ゆかり氏（現・株式会社鹿島塾）の協力により行われた。ここに感謝の意を記す。

参考文献

- Fritz-Laylin, L. K., Prochnik, S. E., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Carpenter, M. L., Field, M. C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grigoriev, I. V., Cande, W. Z., Fulton, C., Rokhsar, D. S. and Dawson, S. C. (2010) *Cell*, 140, 631-642.
- Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T. and Watanabe, M. (2002) *Nature*, 415, 1047-1051.
- Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J. and Knopp, H. (1974) *Ann. New York Acad. Sci.*, 235, 364-386.
- Koumura, Y., Suzuki, T., Yoshikawa, S., Watanabe, M. and Iseki, M. (2004) *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 580-586.
- Lemieux, M. J., Huang, Y. and Wang, D. N. (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14, 405-412.
- Ryu, M. H., Moskvina, O. V., Siltberg-Liberles, J. and Gomelsky, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 41501-41508.
- Stierl, M., Stumpf, P., Udvari, D., Gueta, R., Hagedorn, R., Losi, A., Gartner, W., Peterleit, L., Efetova, M., Schwarzel, M., Oertner, T. G., Nagel, G. and Hegemann, P. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 1181-1188.

Yasukawa, H., Konno, N., Haneda, Y., Yamamori, B., Iseki, M., Shibusawa, M., Ono, Y., Kodaira, K., Funada, H. and Watanabe, M. (2012) J. Gen. Appl. Microbiol., 58, 183-190.

Yasukawa, H., Sato, A., Kita, A., Kodaira, K., Iseki, M., Takahashi, T., Shibusawa, M., Watanabe, M. and Yagita, K. (2013) J. Gen. Appl. Microbiol., 59, 361-369.

関連法令等

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）

<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H10/H10HO114.html>

実験室バイオセーフティー指針 - 第3版 -

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety3_j.pdf

Biorisk management: 実験施設バイオセキュリティガイダンス

http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_EPR_2006.6_jpn.pdf

病原細菌のBSLレベル

http://www.nacos.com/jsbac/img/bsl_level.pdf

カルタヘナ法説明書（文部科学省作成）

http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/carta_expla.html

遺伝子組換え生物の第二種使用等について

http://www.lifescience.mext.go.jp/files/pdf/n815_01.pdf

責任筆者：安川洋生（E-mail: hiroys@iwate-u.ac.jp）