

原著論文

Halobacterium salinarum 走化性シグナル伝達機構の 生化学的解析

守谷 智恵¹⁾, 川上 賀代子¹⁾, Dieter Oesterhelt²⁾, 坪井 誠二^{1) *}

¹⁾ 就実大学薬学部生化学研究室, ²⁾ Max-Plank Institute for Biochemistry (ドイツ)

Biochemical analysis of the chemotaxis signal transduction systems in *Halobacteria salinarum*

Chie Moritani¹⁾, Kayoko Kawakami¹⁾, Dieter Oesterhelt²⁾, Seiji Tsuboi^{1) *}

¹⁾ Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

²⁾ Max-Plank Institute for Biochemistry, Germany

(Received 30 October 2015; accepted 19 November 2015)

Abstract: *Halobacteria salinarum* is a chemo- and phototactic archaeon. Chemical and light signals are received by receptors and transferred to the flagellar motor via the two-component system made up of CheA and CheY. Detailed studies of chemo- and phototaxis have been performed on a physiological and a molecular level. To further understanding of the signal transduction system of *Halobacteria*, we characterized the biochemical properties of the signal transduction components using recombinant proteins. Phosphorylated CheA was rapidly dephosphorylated by the addition of excess CheY. Dephosphorylation of CheY was simultaneously occurred without CheZ known whose function is phosphatase in *Eubacteria*. The adaptor protein CheW increased CheA autophosphorylation by about two-fold. However, addition of Car and CheW, the soluble receptor of arginine that is a chemoattractant, did not show further stimulation. This observation was different from the results that CheA phosphorylation was extensively induced by the addition of chemoreceptor in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. These results suggested that *Halobacteria* possessed the counterpart of the signaling system as known in *Eubacteria*, but the system differed in several biochemical properties.

Keywords: CheA; CheY; two-component system; phosphorylation

緒言

大腸菌は糖やアミノ酸などの栄養物質に近づくと、金属イオンなどの有害物質から遠ざかる。このような性質を走化性といい、その結果好ましい環境に移動することができる。栄養（誘引）物質や有害（忌避）物質といったシグナルが細胞膜にある受容体の細胞外ドメインで受容されると、細胞質側ドメインでヒスチジンキナーゼである CheA に伝達され CheA の自己リン酸化が誘導される。CheA のリン酸基は、応答調節因子である CheY のアスパラギン酸残基に転移される。こうしてリン酸化された CheY はべん毛モーターに結合し、外界からのシグナルをべん毛モーターに伝え、その結果大腸菌は走化性を示す。このような His-Asp リン酸リレーを介するシグナル伝達経路は二成分制御系といわれ、細菌のみならず、古細菌や真菌類、さらには高等植物でも情報伝達に用いられている^{1,2)}。

ハロバクテリアは、古細菌に属する高度好塩性の桿菌で、日当たりのよい塩湖や塩田跡など高塩環境で生息する。このハロバクテリアは走化性に加え光の波長に反応して移動する走光性を有している。これらの受容体として、細胞膜には光の受容体である sensory rhodopsin I 及び II, メチオニン, シス테인などの受容体である BasT などを、細胞質に局在するものとしてアルギニン受容体である Car を有している³⁻⁶⁾。さらに、これらのシグナルの情報伝達に関わるタンパク質として、CheA, CheY に加えて、受容体と CheA の相互作用に関わるアダプタータンパク質である CheW, シグナルに対する適応に関わるメチル基転移酵素 CheR や脱メチル化酵素 CheB などを有することが明らかとなっている（図1）⁷⁻⁹⁾。これらの遺伝子はオペロンを形成している。cheA, cheY, cheB のいずれかの遺伝子を欠損すると走化性および走光性を失うことから、これらの Che タンパク質は走化性だけでなく、走光性にも関わる事が明らかとなっている⁷⁾。また、これらの Che タンパク質は、大腸菌や枯草菌など真正細菌の

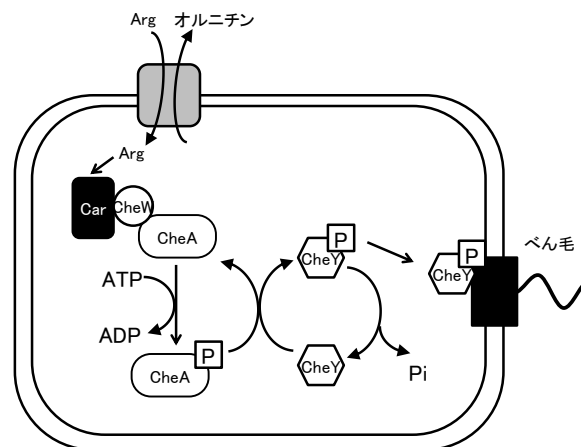


図1 ハロバクテリアにおけるアルギニンシグナルの二成分制御系による情報伝達

Che タンパク質と約 30-50%の相同性を有している^{8,9)}。以上のことから古細菌であるハロバクテリアにおいても二成分制御系により情報伝達が行われていることが示されている。

これまでに、ハロバクテリアの走性については、走光性を中心に詳細な解析が行われてきている¹⁰⁾。また、生化学的な解析としては組換えタンパク質を用いて CheA の自己リン酸化を中心に解析が進んでいる⁸⁾。本研究では、さらに二成分情報伝達系の生化学的性質を明らかにするため、CheA から CheY へのリン酸化リレー、CheW や誘引物質であるアルギニンの可溶性受容体である Car の CheA リン酸化に対する影響を解析することを目的とした。

方法

大腸菌内 CheA 発現プラスミドの構築: cheA 遺伝子を pJR4816⁷⁾ を鋳型としプライマー 5'-CCGGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACATATGCATCATCATCATCATCATATGGACGACTACCTCGAAGCG-3'および 5'-CGTGATCACGAAA AAAATTACAGCGTAGCCACGTCCAG-3'を用いて増幅し、EcoRI および BclIII で消化後 pQE12 (QIAGEN) に導入し、CheAN 末端に His-tag を導入した His-CheA 発現プラスミド pCOHAC27 を構築した。

ハロバクテリア内 CheW および Car 発現プラスミドの構築: *chew* 遺伝子は pCS1⁸⁾を鋳型としプライマー5'-GTAAATCACATATGAACCTCGAAGACGCCGACCGG-3'及び5'-ACCGGCATGCTGACCTGATTGTCGATGGTCTCGTC-3'を用い増幅した。得られた PCR 産物を *NdeI* および *SphI* で消化後 pBPHM¹¹⁾の *bop* プロモータの下流の *NdeI*, *SphI* 部位に導入し, C 末端に His-tag を導入した CheW-His 発現プラスミドである pNP23 を構築した。Car については pFS4000⁶⁾を鋳型とし, プライマー5'-GGAATTCATATGCATCACCATCACCATCAGATCCAGCATCGTCAGACATGGG-3', 5'-GAAGATCTTTACTCAACGAGTTCGTAACCATGTCTT-3'を用い *car* 遺伝子を増幅し, pBPHM の *NdeI*, *BamHI* 部位に挿入することで N 末端に His-tag を導入した His-Car 発現プラスミド pCOCarH1 を得た。

組換えタンパク質の精製: CheY および CheYD53A は Rudolph らの方法に従って精製した⁸⁾。His-CheA は, pCOHAC27 を大腸菌 M15pRep4 株に導入後, 発現誘導し, Ni-NTA レジンをを用いて精製した。His-CheA 溶出液は H buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 M KCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA) で透析後, Centricon YM-30 を用いて濃縮し, CheA タンパク質を得た。CheW-His 及び His-Car 精製には, *cheY*, *cheB*, *cheA*, *cheJ* を欠損したハロバクテリア $\Delta\Delta$ 株⁷⁾を用いた。pNP23 あるいは pCOCarH1 を $\Delta\Delta$ 株に導入し, 抗 His-tag 抗体あるいは抗 Car 抗体を用いタンパク質の発現を調べタンパク質精製用の株を選択した。選択した形質転換体を, メバロチン 12.5 μ M を含む HALO 培地 (4.3 M NaCl, 80 mM MgSO₄, 27 mM KCl, 10 mM Na₃ citrate, 1% peptone, pH 7.2) で対数増殖期後半まで培養し, Ni-NTA レジンをを用いて精製した。CheW-His あるいは His-Car 溶出液は H buffer で透析後, Centricon YM-10 を用いて濃縮し各タンパク質を得た。

CheA リン酸化実験: CheA に対し各濃度で CheW

あるいは Car を添加し, Rudolph らの方法⁸⁾に従い CheA のリン酸を測定した。反応時間は CheA のリン酸化反応が飽和しない条件を考え, 5 分間とした。

リン酸基転移実験: CheA 1.5 μ M に対し 30 μ M の CheY を用いた。まず CheA を 400 μ M ATP (cold ATP : [γ -³²P] ATP (100 TBq/mmol) を 2:1 で混合) を添加し 37°C で 45 分間 CheA をリン酸化した。続いて CheY あるいは CheY(D35A)を添加 (EDTA を添加する場合には終濃度 40 mM), 10 秒後に Laemmli buffer を添加し, 液体窒素で凍結することで反応を停止した。その後 SDS-PAGE により分離し, リン酸化 CheA あるいは CheY をオートラジオグラフィーにより検出した。

ウエスタンブロッティング: 各試料を SDS-PAGE で分離後, セミドライブロッター (Hoelzel) を用いて PVDF 膜に転写した。タンパク質の検出には, 抗 His-tag 抗体, 抗 CheA 抗体, 抗 Car 抗体を用い, ECL detection kit (Amersham) を用いて検出した。

結果・考察

CheA から CheY へのリン酸基転移: リン酸化 CheA からの CheY へのリン酸化転移, およびリン酸化 CheY の脱リン酸化は速やかに起こり, 数秒以内にほぼ完了することが明らかとなった (図 2)。CheA に比べて CheY が過剰量存在する場合には, CheA のリン酸化速度に比べ, CheY へのリン酸基転移やその脱リン酸化速度が速いため, リン酸化 CheA およびリン酸化 CheY が検出され

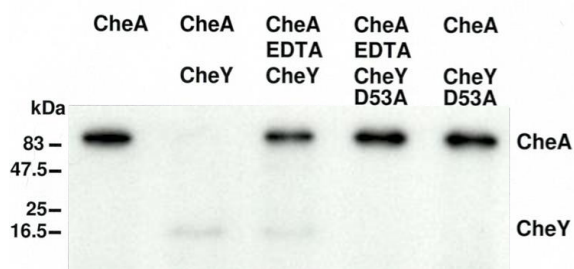


図 2 CheA から CheY へのリン酸基転移

なかったものと考えられた. EDTA を添加することで, リン酸基転移の速度は遅くなり, リン酸化 CheY もわずかであるが検出され, リン酸基の転移が行われていることが示された. 一方, リン酸化を受ける 53 番目のアスパラ酸残基をアラニンに置換した CheYD53A を用いた場合には, リン酸化 CheY は検出されず, CheA のリン酸化レベルにも変化がなかった. 大腸菌などの真正細菌では, リン酸化 CheY のすみやかな脱リン酸化にはホスファターゼである CheZ が必要であること¹²⁾, CheZ-CheY 複合体結晶構造解析から CheZ は, CheY 自身も持っている内在性の脱リン酸化活性部位に直接入り込むこみ触媒活性を示すことが報告されている¹³⁾. ハロバクテリアの CheY の脱リン酸化はすばやく進行することから, ホスファターゼの機能をもつタンパク質は必要なく, CheY 内在性のホスファターゼ活性が強いことが示唆された. このことはハロバクテリアに CheZ ホモログが存在しないこととも関連していると考えられた.

また, CheA から CheY へのリン酸基転移および CheY の脱リン酸化の一連の反応は, CheY の脱リン酸化が CheA リン酸基転移に比べて十分に速度が速いということを示している. この場合 CheA/CheY 混合物は ATPase として機能するととらえることができる. CheA の濃度を変え ATPase 活性を測定したところ, CheA 5 μ M まで濃度依存的に活性は上昇し, その活性は CheA 1 μ M 当たり約 0.044 μ M であった (データ非表示). この活性は *Salmonella typhimurium* や大腸菌に比べると約 20 分の 1 程度であった^{14,15)}. これはリン酸化速度が大腸菌に比べ遅いこととも関連していると考えられた⁸⁾.

CheA リン酸化に対する CheW 及び Car の影響:

CheW は CheA と受容体との相互作用に重要であると考えられている. まず, CheW の CheA のリン酸化に対する影響を調べた. 1:2 の比率で CheW を添加した場合に約 2 倍にリン酸化が上昇し, CheW によりリン酸化が促進されることが明ら

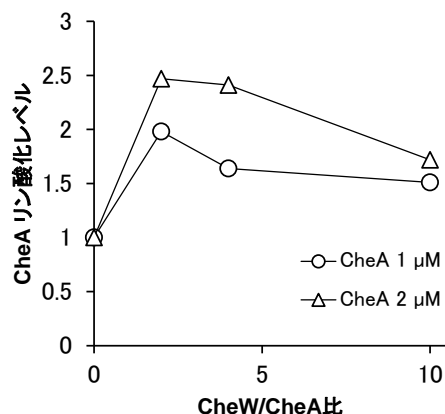


図3 CheA リン酸化に対する CheW の影響
CheA 1 あるいは 2 μ M に対して 2, 4, 10 倍濃度の CheW を添加し CheA リン酸化反応を行った.

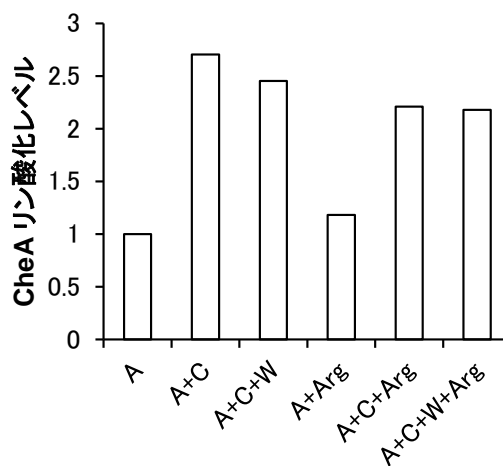


図4 CheA リン酸化に対する Car およびアルギニンの影響

CheA 2 μ M に対し, CheW 2 μ M, Car 30 μ M, Arg 5 mM を添加し, CheA リン酸化反応を行った. グラフは 2 回の実験の平均.

かとなった. それ以上 CheW の比率が大きくなると逆にリン酸化レベルは低下した (図3). 過剰量の CheW が, リン酸化に必要な CheA の二量体化に影響を与えているのかもしれない. 大腸菌においてアフィニティークロマトグラフィーで精製した CheA/CheW において, CheW 結合により CheA の ATP に対する親和性が上昇した結果リン酸化が約 16 倍に上昇したという報告があるが¹⁶⁾, ハ

ロバクテリアではそれほどの上昇は見られなかった。次に、可溶性受容体である Car の CheA リン酸化に対する影響を調べた。Car 存在下ではリン酸化レベルは約 2.5 倍に上昇した。しかしながら、Car および CheW の同時添加により、さらなる CheA リン酸化の促進は見られなかった (図 4)。CheW は Car と CheA の相互作用を安定化させ CheA のリン酸化を促進させると予測されるが、CheA のリン酸化に対して相加的な作用は示さず、大腸菌や *S. typhimurium* で受容体タンパク質添加により CheA リン酸化レベルが大きく上昇するという報告とは異なっていた^{17,18)}。また、Car のリガンドであるアルギニンの添加により、リン酸化レベルには影響が無かった。以上のように、真性細菌のようなリン酸化の上昇が見られなかったことは、CheA-CheW 間あるいは CheA-CheW-Car 間相互作用の形式や、結合による CheA 立体構造に与える影響の違いがあることを示唆するものと考えられた。これらの違いを明らかにするためには、ハロバクテリアにおける情報伝達複合体の形成や CheA リン酸化活性に与える影響について生化学的な解析が今後必要である。

CheA, CheW の共精製: CheW はハロバクテリア内で CheA と相互作用をしている可能性がある。che オペロンを有する SNOB 株で CheW-His を発現させ精製を行い、SDS-PAGE を行ったところ約 100 Da のタンパク質が検出された (図 5 (A))。分子量から CheA である可能性が考えられた。抗 CheA 抗体でウェスタンブロッティングを行ったところ抗体により検出され、CheA が CheW と共精製されることが示された (図 5 (B))。更に、この画分に ATP を添加しリン酸化を調べたところ約 100 kDa のタンパク質のリン酸化が認められた (図 5 (C))。以上のことから、CheW は細胞内において一定の割合で CheA と相互作用していると考えられた。第二のアダプタータンパク質として CheW2 の存在が明らかとなっており¹⁹⁾、最近の報告から Car と CheW2 の相互作用が示唆されている²⁰⁾。Car と CheA の相互作用については

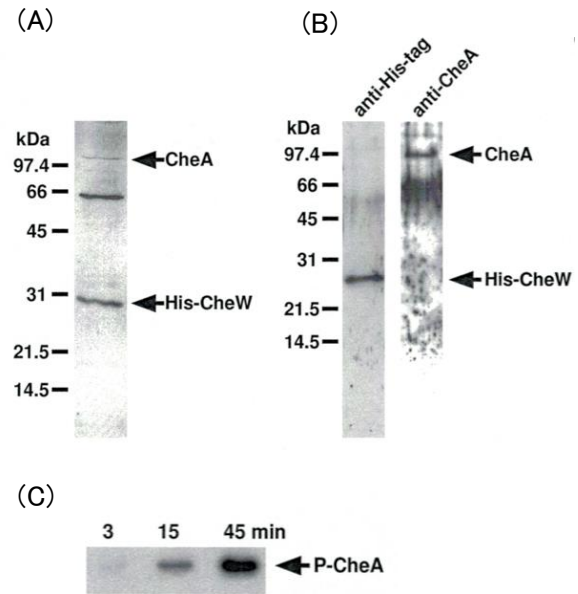


図 5 CheW/CheA の共精製

(A) 精製 CheW-His の電気泳動図 (B) 抗 His-tag 抗体あるいは抗 CheA 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析 (C) CheA のリン酸化

CheW2 の関与も今後検討する必要がある。

以上の様に、ハロバクテリアの走化性・走光性に関わる情報伝達経路の生化学的解析の特徴を明らかにすることができ、いくつかの点において大腸菌などの真正細菌の特徴と異なることが明らかとなった。ハロバクテリアでは、真性細菌と異なり走光性を有することに加え、忌避物質に対する応答性や CheY の標的であるべん毛モーターの構成タンパク質などに違いがあることが報告されており、今回得られた結果はこれらの知見と関連があるかもしれない²¹⁾。また、今回解析に用いた系に、受容体のメチル化に関わる CheB, CheR や光受容体である sensory rhodopsin I 及び II を加えることで走化性、走光性を *in vitro* で解析することができるかと期待される。

引用文献

- 1) Parkinson, J.S.: Signal transduction schemes of bacteria., *Cell*, 73 857-871 (1993)
- 2) Mizuno, T.: His-Asp phosphotransfer signal transduction., *J. Biochem.*, 123 555-563 (1998)

- 3) Marwan, W., Oesterhelt, D.: Signal formation in the halobacterial photophobic response mediated by a fourth retinal protein (P480)., *J. Mol Biol.* 195 333-342 (1987)
- 4) Spudich, J.L., Bogomolni, R.A.: Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin., *Nature*, 312(5994) 509-513 (1984)
- 5) Kokoeva, M.V., Oesterhelt, D.: BasT, a membrane-bound transducer protein for amino acid detection in *Halobacterium salinarum*., *Mol Microbiol.*, 35, 647-656 (2000)
- 6) Storch, K.F., Rudolph, J., Oesterhelt, D.: Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*., *EMBO J.*, 18, 1146-1158 (1999)
- 7) Rudolph, J., Oesterhelt, D.: Deletion analysis of the *che* operon in the archaeon *Halobacterium salinarum*., *J. Mol Biol.*, 258 548-554 (1996)
- 8) Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S.C., Oesterhelt, D.: Phosphorylation in halobacterial signal transduction., *EMBO J.*, 14 4249-4257 (1995)
- 9) Rudolph, J., Oesterhelt, D.: Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarum*., *EMBO J.*, 14 667-673 (1995)
- 10) Marwan, W., Oesterhelt, D.: Quantitation of photochromism of sensory rhodopsin-I by computerized tracking of *Halobacterium halobium* cells., *J. Mol Biol.*, 215, 277-285 (1990)
- 11) Patenge, N., Haase, A., Bolhui, s H., Oesterhelt D.: The gene for a halophilic beta-galactosidase (bgaH) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum*., *Mol. Microbiol.*, 36 105-113 (2000)
- 12) Roman, S.J., Meyers, M., Volz, K., Matsumura, P.: A chemotactic signaling surface on CheY defined by suppressors of flagellar switch mutations., *J. Bacteriol.*, 174, 6247-6255 (1992)
- 13) Zhao, R., Collins, E.J., Bourret, R.B., Silversmith, R.E.: Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ., *Nat. Struct. Biol.*, 9, 570-575 (2002)
- 14) Liu, Y., Levit, M., Lurz, R., Surette, M.G., Stock, J.B.: Receptor-mediated protein kinase activation and the mechanism of transmembrane signaling in bacterial chemotaxis., *EMBO J.* , 167, 231-240 (1997)
- 15) Boukhvalova, M.S., Dahlquist, F.W., Stewart, R.C.: CheW binding interactions with CheA and Tar. Importance for chemotaxis signaling in *Escherichia coli*., *J Biol Chem.* 277, 22251-22259 (2002)
- 16) McNally, D.F., Matsumura, P.: Bacterial chemotaxis signaling complexes: formation of a CheA/CheW complex enhances autophosphorylation and affinity for CheY., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 88, 6269-6273 (1991)
- 17) Ninfa, E.G., Stock, A., Mowbray, S., Stock, J.: Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components., *J. Biol Chem.*, 266, 9764-9770 (1991)
- 18) Borkovich, K.A., Simon, M.I.: The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis., *Cell*, 63,1339-1348 (1990)
- 19) Schlesner, M., Miller, A., Besir, H., Aivaliotis, M., Streif, J., Scheffer, B., Siedler, F., Oesterhelt, D.: The protein interaction network of a taxis signal transduction system in a halophilic archaeon., *BMC Microbiol.*, 12: 272 (2012)
- 20) Patenge, N, Berendes, A., Engelhardt, H., Schuster, S.C., Oesterhelt, D.: The *fla* gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*., *Mol Microbiol.*, 41, 653-63 (2001)
- 21) Thomas, N.A., Bardy, S.L., Jarrell, K.F.: The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 147-174 (2001)