

コレラ菌走化性受容体ホモログの機能解析系の構築

岡部, 紘輝 / OKABE, Hiroki

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

55

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2014-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00010395>

コレラ菌走化性受容体ホモログの機能解析系の構築

IDENTIFICATION OF NOVEL CHEMORECEPTORS IN *VIBRIO CHOLERA*
USING A NEWLY DEVELOPED FUNCTIONAL ASSAY SYSTEM

岡部 紘輝

Hiroki Okabe

指導教員 川岸 郁朗

法政大学大学院理工学研究科専攻修士課程

Vibrio cholerae, the causative agent of cholera, shows chemotaxis to survive in various environments. The bacterium has 44 MCP-like proteins (MLPs) and three Che-related systems. This laboratory showed that Mlp24 and Mlp37 mediate attractant response to amino acids. However, other MLPs have been largely uncharacterized. A preliminary experiments suggest that the amino acid chemoreceptor Mlp24 can be coupled to CheA2 of *V. cholerae* in an *Escherichia coli* strain lacking all MCPs. If this is the case, the functions of *V. cholerae* MLPs can be employed in *E. coli*. Here I aimed at developing such a functional assay system. An *E. coli* strain lacking all MCPs as the histidine kinase CheA and the adaptor CheW was used to avoid undesirable cross-talk, if any, between *V. cholerae* MLP and *E. coli* CheA. Co-expression of Mlp24 with CheA2 and CheW1 of *V. cholerae* mediated responses to the repellent glycerol and the attractants arginine, glycine and serine. We then examined Mlp28 and Mlp29, and found that they also mediate repellent and attractant responses to these chemicals. However, Mlp28 and Mlp28 showed no methylation in the presence of these amino acids. Using this heterologous expression system, I also examined Che system III, the physiological significance of which is not known. *E. coli* cells co-expression Mlp45 with CheA3, CheW2 and CheW3 swarmed faster than control cells only under anaerobic conditions, a result consistent with the fact that anaerobic growth of *V. cholerae* cells induces polar localization of CheA3-GFP, raising the possibility that this signaling system functions under anaerobic conditions.

Keywords: anaerobicity, chemotaxis, signal transduction, two-component regulatory system

1. 緒言

コレラ菌 *Vibrio cholerae* は環境からの刺激に対し適切に応答する走化性という性質をもつ。この応答の出力は運動器官であるべん毛の回転方向である。大腸菌の場合、刺激は5種の膜貫通型走化性受容体(MCP)で受容され、細胞質のCheタンパク質群による情報処理を経て最終的にべん毛の回転方向が制御される。このシグナル伝達の分子機構は大腸菌でよく研究されている[1]。一方、コレラ菌は40以上の受容体様タンパク質MLPsと、3組のCheタンパク質群をもつ。これらは3つのCheシステムを構成すると推測され、その中でシステムIIのみが直接走化性に関与することが示されている[2]。

Mlp24とMlp37はアミノ酸受容体として同定されており、Mlp28、Mlp29もアミノ酸受容体であることが示唆されている[3, 4]。しかし、多くのMLPの機能はわかっていない。

コレラ菌受容体機能解析が遅れている要因の一つに、受容体を40以上もつためそれらの欠失株を作製し、機能を解析することが困難なことが挙げられる。当研究室でコレ

ラ菌システムII因子とMlp24を共発現させた菌を構築し、忌避物質を加えるとタンブル頻度が上昇し、誘引物質を加えるとタンブル頻度が低下するという予備的な結果を得ている。このことは、コレラ菌シグナル伝達系を大腸菌内で再構成できること、すなわちMlp24がコレラ菌CheA2または大腸菌CheAと共役し、大腸菌のCheYへシグナル伝達が行われうることを示唆している。大腸菌内でMLPとコレラ菌CheA、CheWが共役し、シグナル伝達が行われれば、簡便にMLPの機能解析を行うことができる。ひいては、機能未知のSystem I,IIIの機能解析にも使える可能性がある。

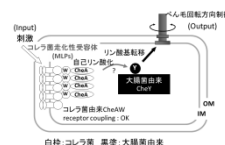


図1 大腸菌走化性因子欠失株中でのコレラ菌CheAWとMLPの共発現による機能解析系

本研究では、新たな MLP 機能解析系を確立するために、大腸菌全受容体, CheA, CheW を欠失させた株 UU2682 にコレラ菌の CheA, CheW と MLP を共発現させた (図 1)。共発現させた菌に対し、様々な化学物質に対する応答を調べることで、MLP 解析系の構築を目指した。

2. 実験方法

大腸菌全走化性因子欠失株 UU2682 (Δ MCPs Δ cheAW Δ aer) にコレラ菌システム II 因子 (CheW1, CheA2, CheB1) とシステム II に属している Mlp24, Mlp28, Mlp29 を共発現させた。また、全走化性受容体および全 Che タンパク質欠失株 UU2806 (Δ MCPs Δ cheAWYZ Δ aer) にシステム III 因子 (CheW2, CheW3, CheA3, CheY4) とシステム III に属している Mlp01, Mlp44, Mlp45 を共発現させた。各化学物質に対する応答を顕微鏡で観察した。初めに刺激がない状態の泳ぎを観察した。次に 10% グリセロールを加え、タンブル頻度が上昇するのか、誘引物質を加えタンブル頻度が低下するのかを調べた。

3. 実験結果と考察

まず、MLP を共発現させた菌を用いて誘引物質または忌避物質に対する応答を調べた。Mlp24 を共発現させた菌は 10% グリセロールを加えるとタンブル頻度が約 4 1/s 上昇し、1 mM セリンを加えるとタンブル頻度が約 3 1/s 低下した。Mlp28 または Mlp29 を共発現させた菌は、どちらも 10% グリセロールを加えることで、タンブル頻度が約 2 1/s 上昇し、1 mM セリンを加えるとタンブル頻度が約 1/s 低下した (図 2)。同様にグリシン、アルギニン、アスパラギンを加えてもタンブル頻度は低下した (データは省略)。以上のことから、大腸菌内で MLP と CheW1, CheA2 は共役して大腸菌 CheY へとシグナルを伝達できることが示唆された。また、Mlp28 と Mlp29 はいくつかのアミノ酸に対する誘引応答を媒介することが示唆された。

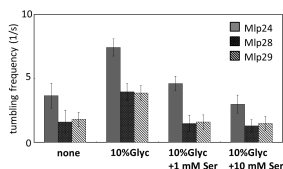


図 2 MLP とシステム II 因子共発現菌のセリン (Ser), グリセロール (Glyc) に対する応答。

Host : UU2682 (Δ MCPs Δ cheAW Δ aer)

また、コレラ菌の主要なアミノ酸受容体 Mlp24 には可逆的なメチル化を受けるグルタミン酸残基があり、誘引物質が存在すると、メチル化が進行する [4]。Mlp28 と Mlp29 のアミノ酸配列にも同様の残基が保存されていたことから、誘引物質存在下でメチル化が進行する可

能性がある。

そこで、Mlp28 と Mlp29 を発現させた菌を用いてメチル化レベルを調べた。具体的には、コレラ菌アミノ酸受容体 Mlp24, Mlp37 に加え、大腸菌酸化還元走性に関わる Aer ホモログである Mlp32 の遺伝子を欠失させた株 Vmlp304 に、FLAG タグを付加した Mlp28 または Mlp29 を過剰発現させた。誘引物質候補として、今回観察時に加えたアミノ酸を加え、イムノプロットングで移動度の変化を調べた (メチル化が進行すると移動度が上昇する)。その結果、どの物質を添加しても Mlp28 と Mlp29 のメチル化は変化しなかった (図 3)。

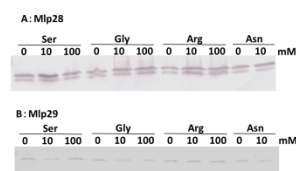


図 3 Mlp28 および Mlp29 のメチル化パターン
Host : Vmlp304 (Δ mlp24 Δ mlp32 Δ mlp37)

システム III 因子を共発現させた菌に対しても同様の実験を行った結果、Mlp45 を発現させた菌のみベクターを移入した菌よりもタンブル頻度が上昇しなかったが、嫌気条件下でのみベクターを移入した菌よりも僅かながら有意に大きなスウォームリングを形成した (図 4)。これらのことから、Mlp45 は嫌気条件下でのみ機能することが示唆された。

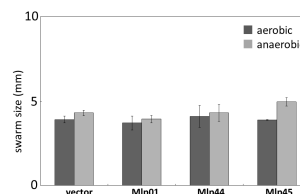


図 4 MLP とシステム III 因子共発現菌の好気条件/嫌気条件下でのスウォームアッセイ。

Host : UU2806 (Δ MCPs Δ cheAWYZ Δ aer)

4. 結言

大腸菌内で MLP とコレラ菌 CheA, CheW は共役し、大腸菌 CheY へシグナルが伝達できる。この方法を用いることで、簡便に MLP の機能解析を行うことができる。

参考文献

- 1) Falke, J. J. *et al.* (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 457-512.
- 2) Gosink, K. *et al.* (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 1767-1771.
- 3) Nishiyama, S. *et al.* (2012) *Infect. Immun.* **80**, 3170-3178.
- 4) 岩崎良祐 (2012) 修士論文 法政大学大学院工学研究科