

サルモネラ属細菌走化性受容体Tcpによるクエン酸認識機構

城井, 哲也 / SHIROI, Tetsuya

(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/10.15002/00010396>

サルモネラ属細菌走化性受容体 Tcp による クエン酸認識機構

MECHANISM UNDERLYING CITRATE RECOGNITION
BY THE CHEMORECEPTOR Tcp OF *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM

城井哲也

Tetsuya Shiroy

指導教員 川岸郁朗

法政大学大学院工学研究科生命機能学専攻修士課程

Salmonella enterica serovar Typhimurium, unlike closely related *Escherichia coli*, shows taxis toward citrate. This response is mediated by the salmonella-specific chemoreceptor Tcp, which are supposed to sense citrate and metal cation-citrate complex as distinct attractants. In this study, I aimed at understanding the molecular mechanism of ligand recognition by Tcp. First, I examined whether divalent cation is required for citrate response. *E. coli* cells expressing Tcp, which otherwise lack chemoreceptors, responded to citrate, but the response was dramatically decreased in the presence of EDTA, suggesting that divalent cation is prerequisite for citrate response. I then constructed and purified a periplasmic fragment of Tcp to carry out isothermal titration calorimetry measurements. The fragment bound Mg^{2+} as well as citrate in the presence of Mg^{2+} , but not in its absence. Based on these results, I propose a new model of ligand binding to Tcp. Binding of endogenous divalent cation at one of the two ligand-binding pockets of the Tcp dimer allows citrate binding to output attractant signal. Negative cooperativity of divalent cation can be overcome by the addition of exogenous divalent cation, thereby allowing citrate binding to the second pocket to produce attractant signal again.

Key Words : chemoreceptor, ligand recognition, citrate, divalent cation

1. 緒言

サルモネラ属細菌は、外界の化学物質の濃度勾配を感知し、より好ましい環境へ移動する走化性という性質をもつ。その応答を媒介するのは、細胞膜に局在する走化性受容体である。走化性受容体は、刺激物質の結合に応じて細胞質のヒスチジンキナーゼ CheA の活性を調節し、最終的にはべん毛モーターの回転方向が制御され、菌は好ましい環境へと移動する (図1)。

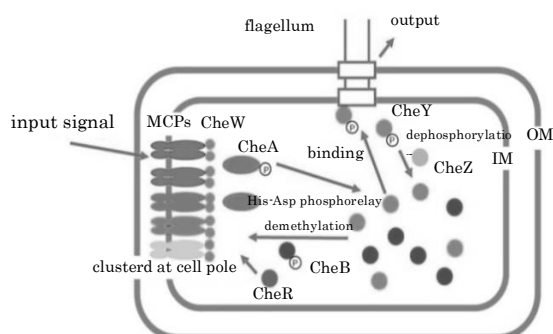


図1 サルモネラ属細菌の走化性シグナル伝達系。

サルモネラ属細菌の走化性受容体は二回膜貫通型タンパク質でアミノ酸、糖、金属イオン、pH や温度などさまざまな刺激を受容する多機能センサーである。走化性受容体 Tcp はクエン酸およびクエン酸-二価金属イオン複合体に対する誘引応答を、フェノールに対する忌避応答を媒介する。大腸菌はクエン酸に対して応答を示さず、クエン酸を炭素源とできないためクエン酸輸送系を持たない。しかし、大腸菌株に Tcp を発現させるとクエン酸に対して誘引応答を示す。したがって、Tcp がクエン酸に直接結合すると思われる。Tcp の特徴的な点は、Tcp 発現菌がクエン酸に反応し適応した後、二価金属イオンを加えるとまた誘引応答を媒介するという点である。二価金属イオンだけに対する応答は示さないことから、Tcp はクエン酸とクエン酸-二価金属イオン複合体を異なる誘引物質として認識することが考えられている。Tcp の Asn-67 を様々なアミノ酸に置換するとクエン酸およびクエン酸-二価金属イオン複合体応答 (Cit, Mec) において (i) $Cit^+ Mec^+$ (ii) $Cit^+ Mec^-$ (iii) $Cit^- Mec^+$ (iv) $Cit^- Mec^-$ という考えられる4種類すべての表現型が得られた。この結果から、リガンド識別に

ついて2つのモデルを提唱している(図2)。本研究では、これら2つのリガンド識別モデルの検証を試みた。

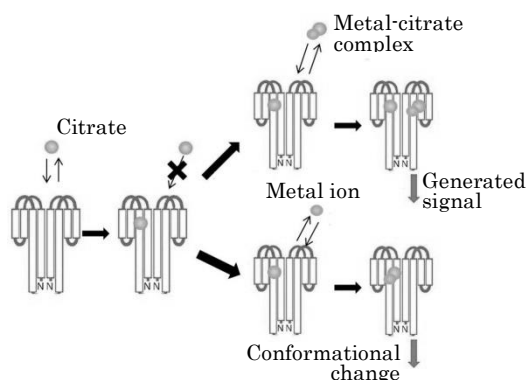


図2 リガンド識別機構のモデル。

2. 実験方法

Tcpを大腸菌 (Δ MCPs Δ cheRB)株に発現させ、EDTA存在下あるいは非存在下におけるクエン酸およびクエン酸二価金属イオン複合体に対する応答を temporal stimulation assay により解析した。また、Tcpがクエン酸と結合するのに二価金属イオンが必須かどうかを調べるために、田島ら[2]の方法に従ってTcpのペリプラズムフラグメントを精製し、等温滴定型熱量計測定 (ITC)を行った。

3. 実験結果と考察

Tcpを発現した大腸菌はクエン酸およびクエン酸二価金属イオン複合体に誘引応答した。しかし、クエン酸応答は、溶液中のEDTAの濃度が高ければ高いほど低下した(図3)。Mg²⁺などの二価金属イオンが菌懸濁液から完全に除去することが困難であることを考えると、図3の結果は、Tcpのクエン酸応答に二価金属イオンが必須であることを示唆している。

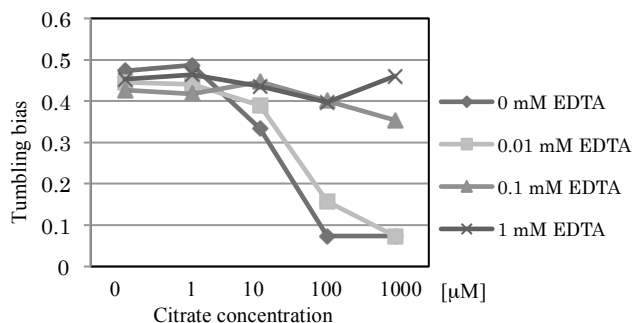


図3 Tcp発現菌のクエン酸応答に対するEDTAの影響

そこで、Tcpが二価金属イオン非存在下でクエン酸に結合するかどうかを直接検討した。具体的には、Tcpフラグメント(アミノ酸残基25-189)を精製し、様々な条件下でITC測定を行った。その結果、Tcpフラグメントとクエン酸の結合熱は、二価金属イオン存在下でのみ検出された(図4)。

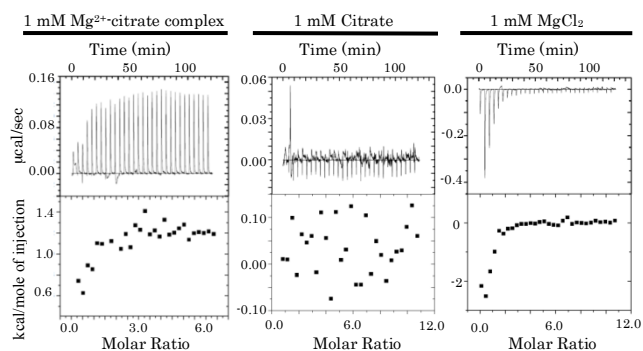


図4 Tcp periplasmic fragmentを用いたITC解析。Tcpとクエン酸-二価金属イオン複合体(左)、クエン酸(中央)、二価金属イオン(右)の結合を検討した。

4. 結論

以上の結果から、Tcpはクエン酸に対する応答を媒介するが、Tcpがクエン酸に結合するためには二価金属イオンが必須であること、二価金属イオンはクエン酸がなくてもTcpに結合しうることが示唆された。これを踏まえて、Tcpのクエン酸応答に関する新たなモデルを提唱する(図5)。このモデルでは、クエン酸が結合したときのみシグナル発生が起こる。すなわち、リガンド結合ポケットのうちの1つに内在性の二価金属イオンが結合することで、外から与えたクエン酸の結合が可能となり、サブユニット1からシグナルが発生する。この二価金属イオンまたはクエン酸の結合によりもう一方の結合ポケットの二価金属イオン親和性が低下する(負の協同性)が、高濃度の二価金属イオンを加えると結合でき、(すでに外液中に存在する)クエン酸が結合可能となるため、サブユニット2からシグナルが発生する。

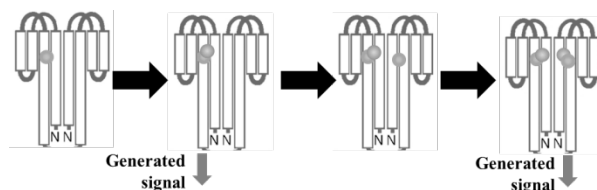


図5 Tcpのリガンド認識に関する新しいモデル

参考文献

- 1)Iwama, T., Ito, Y., Aoki, H., Sakamoto, H., Yamagata, S., Kawai, K. and Kawagishi, I. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 17727-17735.
- 2)Tajima, H., Imada, K., Sakuma, M., Hattori, F., Nara, T., Kamo, N., Homma, M. and Kawagishi, I. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 42200 - 422105.
- 3)Yamamoto, K. and Imae, Y. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 217-221.
- 4)Iwama, T., Nakano, K., Nakazono, H., Yamagata, S., Homma, M., Kawagishi, I. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 1437-1441.