

# 細菌走化性に関わる膜透過系因子の役割

山元, 季実子 / YAMAMOTO, Kimiko

---

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

67

(発行年 / Year)

2015-03-24

(学位授与番号 / Degree Number)

32675甲第355号

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2015-03-24

(学位名 / Degree Name)

博士(理工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00010926>

博士学位論文  
論文内容の要旨および審査結果の要旨

|         |                                          |
|---------|------------------------------------------|
| 氏名      | 山元 季実子                                   |
| 学位の種類   | 博士（理工学）                                  |
| 学位記番号   | 第 571 号                                  |
| 学位授与の日付 | 2015 年 3 月 24 日                          |
| 学位授与の要件 | 本学学位規則第 5 条第 1 項(1)該当者(甲)                |
| 論文審査委員  | 主査 教授 川岸 郁朗<br>副査 教授 佐藤 勉<br>副査 教授 山本 兼由 |

細菌走化性に関わる膜透過系因子の役割

1. 論文内容の要旨

本論文は、病原細菌と土壌細菌の走化性において、刺激物質の取り込み系の関与およびその制御の重要性を見出したものである。本学位論文請求者は、もともとバイオレメディエーション（生物環境浄化）のための基礎研究を行ってきた。バイオレメディエーションとは、流出原油や廃プラスチック、難分解性の芳香族化合物などによって汚染された場所から分離される、汚染物質を分解・資化できる微生物の能力を利用した環境浄化の試みである。その過程で、有機化学物質分解微生物の能力を汚染環境中でよりよく発揮させるための重要な条件として、走化性に着目した。汚染物質分解菌の走化性を高めることができれば、分解菌が汚染箇所への優占的に定着することを助け、バイオレメディエーションの効率を高めることができるであろう。同様に、感染症対策にも走化性は重要である。すなわち、病原菌の走化性を制御できれば、薬剤耐性菌を発生させない感染防御法や治療法を開発できる可能性がある。本論文では、病原細菌としてコレラ菌 *Vibrio cholerae* classical biotype O395N1 株、汚染物質分解能をもつ土壌細菌として *Burkholderia* sp. NK8 株を用いて、それぞれの走性を解析し、膜透過系因子の関与を見出した。

本論文は、全 5 章から構成される。各章の概要は以下に示す。

第 I 章では、本研究の背景と目的が記述されている。まず、バイオレメディエーション、感染防御、バイオマス利用などにおける走化性の意義について、これまでの報告を元に考察している。つぎに、細菌走化性の分子機構に関する知見が概説された後、本研究で用いる細菌に関する知見が記述されている。最後に本研究の目的と概要が述べられている。

第 II 章では、コレラ菌アミノ酸走性に関する研究の背景、材料と方法、結果と考察が記述されている。コレラ菌は、栄養源に乏しい水圏と、アミノ酸などの栄養分に富む宿主の腸管内という 2 つの対照的な環境を行き来して生活する。すでに、セリンをはじめとする各種アミノ酸に対する走性を媒介する受容体として Mlp24, Mlp37 が同定されている。この Mlp24 は毒素生産関連遺伝子の発現に関与するという報告があり、Mlp37 は胆汁構成成分タウリンの受容体としても働くことから、走性と病原性には密接な関係があると示唆されている。主要アミノ酸走性受容体遺伝子欠失株( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ ) もある程度のセリン走性を示すことから、アミノ酸走性を媒介する受容体を最低もう 1 種類はもつと推定された。Mlp24, Mlp37 ペリプラズム領域は、刺激受容などに関与する PAS-like ドメインを 2 個含んでおり、そのうち細胞膜から遠い方がアミノ酸感知に必須である。コレラ菌ゲノムを探索すると、PAS-like ドメインを 1 個もつような走化性受容体ホモログ(MLP)が複数コードされていた。このタイプの MLP 3 種 (Mlp2, Mlp3, Mlp26)について、それぞれを二重欠失株( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ )に導入し、キャピラリー・アッセイを用いてアミノ酸に対する走化性応答を評価した。その結果、Mlp2 または Mlp3 過剰発現株ではセリンに対する誘引応答が促進された。Mlp26 過剰発現株ではセリン走性の増強は見られなかった。Mlp2, Mlp3 過剰発現株について、他のすべてのアミノ酸に対する走性を調べたところ、Mlp2 過剰発現株はセリンにのみ誘引応答を示したが、Mlp3 過剰発現株はセリンをはじめとしてアラニン、グリシン、システイン、トレオニンに誘引された。したがって、Mlp2 はセリンに対する走性を、Mlp3 はセリンを含む、側鎖 R が比較的小さいアミノ酸に対する走性を媒介する受容体またはトランスデューサーであると示唆された。

Mlp2, Mlp3 のペリプラズムフラグメントとセリンの相互作用を ITC を用いて測定した。ポジティブコントロールである Mlp24 のペリプラズムフラグメントでは結合熱の発生が検出されたが、Mlp2, Mlp3 のフラグメントでは、セリン添加に伴う熱の出入りは検出できなかった。また、全長 Mlp2, Mlp3 を含む膜小胞を用いた場合でも、Mlp2, Mlp3 のサンプルにおいて有意な熱量変化を検出することはできなかった。この結果から、Mlp2, Mlp3 はアミノ酸を直接結合しないこと、アミノ酸の認識に他の因子が関与することが示唆された。

たとえば、大腸菌では、ペリプラズムにある可溶性の結合タンパク質 MalE がマルトース走性の一次受容体として働く。そこで、コレラ菌(Classical biotype O395)のゲノムデータベースから ABC トランスポーターのアミノ酸結合蛋白質遺伝子を探索した。候補遺伝子を  $\Delta mlp24 \Delta mlp37$  二重欠失株に発現させて、セリンに対する走化性応答を調べたところ、VC0395\_A0975 発現株でセリンに対する応答がわずかに増強された。この遺伝子を serine ABC transporter にちなんで *satA* と名付け、Mlp2 または Mlp3 の過剰発現株で共発現させて、セリンに対する走化性応答を調べたと

ころ、Mlp3 と SatA の組み合わせで、セリンに対する誘引応答が著しく増強された。この走性応答は、アミノ酸に対して強い走性を媒介する Mlp24 を単独で発現させた場合よりも明らかに強かった。このことから、Mlp3 のセリン走性への貢献度は必ずしも低くなく、SatA と共に発現が誘導されるような環境条件下では、菌のセリン応答の主要部分を担う可能性がある。SatA・Mlp3 系の感知できるアミノ酸の範囲の狭さを考えると、環境によってコレラ菌が誘引物質として感知すべきアミノ酸のセットが異なり、発現調節によってアミノ酸感受性を調節しているのかもしれない。

Mlp3 については、固体表面におけるバイオフィーム形成時に遺伝子転写量が増大するという報告が、SatA については、好氣的条件でその発現が増加するという報告がある。コレラ菌は野外ではプランクトンなどに固着してバイオフィームを形成することがあり、このとき Mlp3 と SatA はバイオフィーム表層の好氣的な環境条件で発現して、アミノ酸を感知した際に、細胞がすぐに外界へ泳ぎだしていきけるようにしている可能性が考えられる。コレラ菌は、さまざまな MLP の機能を適切に使い分けるために、膜透過関連因子と協調して発現の程度を調節する機構を進化させてきたことも考えられる。走化性に多様性をもたらす膜輸送関連因子の重要性があらためて強調されている。

第 III 章では、クロロ安息香酸分解細菌 *Burkholderia* sp. NK8 株のポリ塩化ビフェニル類(PCB)およびその分解産物に対する走性に関する研究の背景、材料と方法、結果と考察が記述されている。土壌には植物由来のリグニン、ポリフェノールの分解産物として、芳香族化合物が豊富に存在する。土壌細菌は植物由来の芳香族化合物を資化し、ときにそれらの化合物に走化性を示す。汚染物質分解細菌はおそらく植物由来の芳香族化合物のアナログとして、人為由来の難分解性芳香族化合物に誘引され、それらの分解を行うと考えられている。

ポリ塩化ビフェニル類(PCB)は、過去に農薬や絶縁油などとして用いられ、現在も環境中に残留している。環境中の PCB 分解細菌によって分解された PCB からはクロロ安息香酸類が生じるが、さらなる分解産物として生じるクロロカテコールやプロトアネモニンは多くの PCB 分解細菌にとって有毒であり、このことが微生物による PCB 分解のボトルネックとなっている。クロロ安息香酸分解菌はクロロカテコール分解遺伝子をもち、微生物にとって有害な中間産物を速やかに分解できる。このクロロ安息香酸分解細菌の能力を利用して、環境中における PCB の完全分解を円滑に進める研究が行われてきた。

*Burkholderia* sp. NK8 株は 3-クロロ安息香酸(3CB)を単一炭素源として効率よく分解・利用できる。NK8 株は染色体にクロロ安息香酸分解遺伝子クラスター *cbeABCD*, 巨大プラスミド pNK8 にクロロカテコール分解遺伝子クラスター *tfdT-CDEF* を持つ。3CB はクロロ安息香酸分解酵素群によって 3-または 4-クロロカテコール(3CC,

4CC)に変換され、クロロカテコールはクロロカテコール分解酵素群によって  $\beta$ -ケトアジピン酸まで分解される。土壌細菌である *Burkholderia* 属は、芳香族化合物に対する幅広い分解能力を示し、ニトロ芳香族化合物に対して走化性を示すことも報告されている。バイオレメディエーションのための研究対象として、本菌株の 3CB とその分解産物に対する走化性が調べられた。

スライディングプレート・アッセイにおいて、野生株は 3CB だけでなく、3CC, 4CC に対しても反応円を形成した。メガプラスミド pNK8 の欠失によってクロロカテコール分解能力を失った変異株 NK82 では、3CB, 3CC, 4CC に対する反応円の形成が微弱となり、クロロカテコール分解能の欠失による走化性応答能の低下が認められた。

クロロカテコール分解遺伝子群を含む 9.0 kb の断片を広域宿主ベクター pKT230 に挿入した分解プラスミド pSL1 を欠失株に導入して、3CB 走化性が菌のもつクロロカテコール分解能力のみに依存しているかどうかを確かめるため、野生株、変異株、pSL1 導入株について、それぞれ 3CB, 3CC, 4CC,  $\beta$ -ケトアジピン酸への誘引応答を調べた。野生株は 3CB とその分解産物に対して濃度勾配に応じた誘引応答を示した。変異株では、とくに  $\beta$ -ケトアジピン酸に対する応答が著しく低下した。pSL1 導入株では、 $\beta$ -ケトアジピン酸への走化性誘引応答が顕著に増強された。

pSL1 上の 9.0-kb 断片を新たに調べたところ、クロロカテコール分解遺伝子クラスタ中の転写調節遺伝子 *tfdT* 遺伝子の近傍に未報告の ORF が存在した。この ORF とその推定プロモータ領域を含む断片をベクターに挿入して変異株に導入したところ、クロロカテコール分解遺伝子クラスタを含まなくても、 $\beta$ -ケトアジピン酸への走化性が顕著に回復した。この ORF の DNA 配列は細胞外膜で低分子物質の透過に関わるチャネルタンパク質であるポリンの遺伝子と高い類似性を示した。推定アミノ酸配列には、*Delftia acidovorans* において陰イオン選択的な外膜透過性に関与する Omp32 タンパク質と 28.5%の identity が認められ、このタイプのポリンタンパク質に特徴的な 16 個の推定  $\beta$ -strand 領域も保存されていた。よって、この ORF は *omp<sub>NK8</sub>* と名付けられた。本報告は、ポリンの発現が芳香族化合物の分解物に対する走化性に関与する例として初めてのものである。

つぎに、*omp<sub>NK8</sub>* 遺伝子の転写産物の解析が行われた。培養時に 3CB を添加すると、野生株の *omp<sub>NK8</sub>* 遺伝子の転写が著しく活性化された。この転写誘導は *omp<sub>NK8</sub>* 相補株 (pOmpNK8 移入株) では認められなかったことから、3CB による転写誘導を調節する因子は巨大プラスミド pNK8 にコードされていると推定された。NK8 株が 3CB の刺激を受けると Omp<sub>NK8</sub> ポリンの生産が誘導され、 $\beta$ -ケトアジピン酸の外膜透過が促進される。この刺激によって、未知の走化性受容体あるいは誘引物質結合タンパク質が働き、走化性シグナルが細胞質側に出力されと考えられた。

第 IV 章では、第 II 章、第 III 章の結果をもとに総合的な考察がなされている。

とくに、環境中における細菌の走化性応答の解明と制御をめざすためには、走化性センサー（受容体やトランスデューサー）だけでなく、ペリプラズム領域の基質結合タンパク質や細胞膜の ABC トランスポーター、外膜のポリンなどの膜透過に関与する因子についても調べていくことの重要性が強調されている。また、感染症対策やバイオレメディエーションなどへの応用には、センサーの感知能力をより高める工夫として、誘引物質結合タンパク質を細胞内で共発現させたり、チャンネル・トランスポーターによる基質の膜透過を促進させたりする技術の開発が必要であろうと結論づけている。

第 V 章では、結論として、本研究で得られた成果が要約・総括されるとともに、今後の課題と展望についても述べられている。

## 2. 審査結果の要旨

本学位請求論文は、細菌の走性応答が、膜貫通型センサーを中心としたシグナル伝達系に加えて、環境中の物質を細胞内に取り込むための膜透過系因子を利用して、感知できる刺激のレパートリーを拡げていることを示したものである。具体的には、病原細菌としてコレラ菌のアミノ酸走性、汚染物質分解能をもつ土壤細菌として *Burkholderia* sp. NK8 株の 3-クロロ安息酸走性に着目し、それぞれ、能動輸送系 ABC トランスポーターの基質結合蛋白質、外膜チャネルであるポリンが関与することを見出した。審査の結果、以下の点について、学術的な新規性が優れていることが認められた。

- (1) コレラ菌セリン走性を媒介する Mlp2, Mlp3 という新規走性トランスデューサーを同定した。それぞれが感知できるアミノ酸の種類の違いから、既知のアミノ酸受容体とは異なる生理的役割が推定された。
- (2) Mlp3 と協調して働く推定セリン結合タンパク質 SatA を同定した。SatA は、ペリプラズム領域においてセリンと結合し、その複合体が Mlp3 と結合することによりセリン走性が引き起こされると推定された。
- (3) クロロ安息香酸分解土壤細菌 *Burkholderia* sp. NK8 株が、3-クロロ安息香酸 (3CB)だけでなく、3-または 4-クロロカテコール(3CC, 4CC),  $\beta$ -ケトアジピン酸に誘引されることを見出した。さらに、
- (4) この走性に必須な因子としてメガプラスミドにコードされる新規外膜ポリン Omp<sub>NK8</sub> を同定した。さらに、omp<sub>NK8</sub> 遺伝子の転写が 3CB に誘導されること、この転写制御に関わる因子がメガプラスミドにコードされていることを見出した。

よって、本審査小委員会は全会一致をもって、提出論文が博士（理工学）の学位に値するという結論に達した。