

### 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>

法政大学審査学位論文

細菌走化性に関わる膜透過系因子の役割

山元 季実子

法政大学大学院工学研究科生命機能学専攻

2015年3月

## 要旨

細菌が環境中の化学物質を感知し、その濃度勾配に従って自ら移動する性質を走化性とよぶ。外部環境からの走化性物質による刺激は、内膜を貫通するメチル基受容走化性タンパク質 (methyl-accepting chemotaxis protein, MCP) に受容されるが、環境中での細菌の挙動を考える際には、化学物質と受容体との関係だけでなく、細胞膜への化学物質の輸送を促進させる因子や、化学物質と結合して受容体に作用し走性を媒介する因子などの役割を考えることも重要である。本研究では、コレラ菌 *Vibrio cholerae* classical biotype (O395N1 株)、汚染物質分解細菌 *Burkholderia* sp. NK8 株について、それぞれの走化性誘引応答に関する膜透過関連因子の存在を明らかにした。*V. cholerae* classical biotype (O395N1 株) のアミノ酸走性を媒介する新規走化性トランスデューサー2種 (Mlp2, Mlp3) を同定し、これらの過剰発現株で各種アミノ酸に対する応答の範囲が異なること、ABC トランスポーターを介したアミノ酸の内膜透過システムに関与すると考えられる推定アミノ酸結合タンパク質 SatA が、Mlp3 の媒介によるセリン走性応答を顕著に増強させることを示した。また、*Burkholderia* sp. NK8 株において、3-クロロ安息香酸 (3CB) 分解産物である  $\beta$ -ケトアジピン酸に外膜ポリン遺伝子が関与し、この遺伝子の発現が走化性誘引物質である 3CB それ自身によって誘導されることを明らかにした。これらの結果から、環境細菌が膜透過因子の発現を増減させることによって自らの走化性応答を適切に調節していることが示唆された。

## 略語表記

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
3CB	3-chlorobenzoate
3CC	3-chlorocatechol
4CC	4-chlorocatechol
ABC	ATP-binding cassette
AP	alkaline phosphatase
BSM	basal salts medium
GST	glutathione <i>s</i> -transferase
HAMP	<u>h</u> istidine kinases, <u>a</u> denylyl cyclases, <u>m</u> ethyl-accepting proteins and <u>p</u> hosphatases
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IPTG	isopropylthiogalactoside
ITC	isothermal titration calorimetry
LB	Luria-Bertani
LBD	ligand binding domain
MCP	methyl-accepting chemotaxis protein
MLP	MCP-like protein
ORF	open reading frame
PCB	polychlorinated biphenyl
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinylidene difluoride
RCI	relative chemotaxis index

RT-PCR	reverse transcription PCR
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TM1	the first transmembrane domain
TM2	the second transmembrane domain

## 目次

要旨 .....	i
略語表記 .....	ii
目次 .....	iv
第 I 章 緒言 .....	1
第 II 章 <i>V. cholerae</i> classical biotype O395N1 株のアミノ酸走性を媒介する新規 の走性トランスデューサー Mlp2, Mlp3 の同定, および Mlp3 に作用する推定セ リン結合タンパク質 SatA の同定 .....	7
1. 背景および目的 .....	7
2. 材料と実験手法 .....	10
3. 結果 .....	13
4. 考察 .....	16
第 III 章 クロロ安息香酸分解菌 <i>Burkholderia</i> sp. NK8 株の 3-クロロ安息香酸分 解産物に対する走性に関与する推定ポリン遺伝子 <i>omp<sub>NK8</sub></i> .....	30
1. 背景および目的 .....	30
2. 材料と実験手法 .....	32
3. 結果 .....	36
4. 考察 .....	40
第 IV 章 総合考察 .....	55
第 V 章 結論 .....	57
謝辞 .....	58
参考文献 .....	59
成果の公表 .....	67

## 第1章 緒言

人間活動に由来する有機化学物質による海洋や土壌の汚染は、私たちの健康をおびやかす重要な問題である。

一方で、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は、しばしば、それらの物質を分解・資化できる微生物が分離されている。このような生物の能力を利用して、環境浄化を行う試みがバイオレメディエーション（生物環境浄化）である。有機化学物質のバイオレメディエーションにおいては、それらの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条件解明が求められている。

細菌が環境中の化学物質を感知し、その濃度勾配に従って自ら移動する性質が「走化性」である。栄養源となる化学物質は土壌などの環境中で一様に分布しているわけではない。限られた栄養のリソースに誰よりも早くたどり着くことが、微生物の生存を左右する。走化性は細菌の環境応答において大きな役割を担っており、宿主体内の病原性発現に最適な環境へ到達したことを病原菌に知らせたり、貧栄養の環境中で効率的に栄養を摂取したりするために役立つと考えられている。ナフタレン分解細菌 *Pseudomonas putida* G7 株では、この菌の走化性がナフタレンの脱着と分解の効率を増加させたという報告がある (Law & Aitken, 2003)。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。

走化性の研究は大腸菌 (*Escherichia coli*) やサルモネラ属細菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) を用いた実験によって詳しく進められてきた (Eisenbach *et al.*, 2004)。大腸菌は菌体あたり数本のべん毛をもち、このべん毛の回転は水素イオンの流入によって駆動される (Larsen *et al.*, 1974)。大腸菌は細胞表面に生えているべん毛を高速で回転させることによって液体中を泳ぎ回り、べん毛の回転方向を変えることによって、直進と方向転換という2種類の動きを作り出している。周囲に走化性の刺激が何もないとき、直進と方向転換は常にランダムに切り替わる。誘引物質を感知すると、方向転換頻度は減少し、直進移動距離が増加する。刺激強度の変化に応じてランダムウォークに偏りが生じることで、細菌はより誘引物質濃度の高い領域（つまり、より生存に適した環境）に移動する確率を高めていくことができる。

大腸菌以外の運動性細菌では、べん毛の本数やそれらを駆動するイオンの種類、べん毛回転運動の切り替え様式等が異なる場合があるものの、菌の方向転換の頻度が走化性物質による刺激に応じて制御される点は大腸菌の場合と同様である。例えば、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) のべん毛は1本の長いらせん状で、細胞の片極から生えている。このべん毛の回転はナトリウムイオンの流入によって駆動されており (Kojima *et al.*, 1999)、回転方向の切り替えによって細胞の前進・後退が起こり、ランダムウォークをする。

外部環境からの走化性物質による刺激は、内膜を貫通するメチル基受容走化性タンパク質 (methyl-accepting chemotaxis protein, MCP) に受容される (Alexander & Zhulin, 2007)。MCPの1次構造はFig. I-1のように：アミノ基末端から、第1膜貫通領域(TM1)、ペリプラズムにおけるリガンド結合ドメイン、第2膜貫通領域(TM2)、HAMP (histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting proteins and phosphatases)ドメイン (Aravind & Ponting, 1999)、キナーゼコントロ

ールモジュール，という共通した膜トポロジーをもつ。大腸菌の走化性シグナル伝達経路を Fig. I-2 に示した。リガンド結合ドメインには走化性誘引物質そのもの，あるいは誘引物質とタンパク質の複合体が結合する。この結合により，受容体の立体構造がわずかに変化することで，べん毛モーターの回転を制御するヒスチジンキナーゼ CheA の活性が阻害される。これによってレスポンスレギュレータ CheY のリン酸化レベルが低下し，べん毛モーターは反時計回りに回転し，菌は直進する。MCP が負の刺激（誘引物質濃度の低下あるいは忌避物質）を感知すると，CheA が活性化され，自己リン酸化した CheA は CheY にリン酸基を受け渡す。リン酸化された CheY はべん毛モーターに結合して時計回り回転を誘発し，菌は方向転換する (Falke & Hazelbauer, 2001; Hazelbauer *et al.*, 2008)。

また，脱リン酸化酵素 CheZ はリン酸化型 CheY からリン酸基を除去し，CheY が CheA からのリン酸基を再び受け取れるようにしている。メチルトランスフェラーゼ CheR は，MCP の細胞質ドメインにある可逆的メチル化部位にメチル基を付加し，CheA を活性化させ方向転換の頻度を増大させる。さらに，CheA に対応するもう 1 つのレスポンスレギュレータである CheB は，CheA からリン酸基を受け取って活性化され，MCP を脱メチル化する。MCP が脱メチル化を受けると，CheA の活性は阻害され，方向転換の頻度は減少する。このように，CheR, CheZ, CheB による制御により，菌は少し前の刺激の強さと現在の刺激の強さを比較しながら，濃度勾配に応じて適切に応答できる。この現象を走化性における「適応」とよぶ。

大腸菌以外の細菌でも，走化性の基本的なシステムにはこれらの Che タンパク質が関わると考えられているが，環境中での細菌の挙動を考える際には，化学物質と受容体との関係だけでなく，細胞膜への化学物質の輸送を促進する因

子や、化学物質と結合して受容体に作用し走化性を媒介する因子などの役割を  
考えることも重要である。

例えば、大腸菌のペリプラズムにおけるマルトース結合タンパク質 MalE は、  
マルトースの取り込みに関与する。すなわち、MalE は、内膜を貫通するパーミ  
アーゼ MalF および MalG と細胞質側の ATP 加水分解酵素 MalK からなる ABC  
トランスポーターに基質を受け渡す(Davidson *et al.*, 1992)。一方、MalE は走化  
性誘引物質であるマルトースの一次受容体としても働く。すなわち、MalE とマ  
ルトースの複合体は、マルトース走性トランスデューサーとして働く MCP で  
ある Tar に作用してマルトースへの誘引応答を引き起こす (Kossmann *et al.*,  
1988; Manson & Kossmann, 1986)。この応答にはマルトースの内膜透過は必要な  
い。

また、ペリプラズムへの誘引物質の透過を促進させ走化性に関与する因子と  
して、グラム陰性細菌の外膜で低分子物質の透過を行うチャンネルタンパク質、  
ポリンの存在があげられる。例えば、大腸菌のマルトースおよびマルトデキス  
トリンの外膜透過には、特異的なポリン LamB が関与するが、この LamB はマ  
ルトース走性にも関与している (Hazelbauer, 1975)。また、大腸菌における 2 種  
の主要なポリン OmpF と OmpC の遺伝子をともに欠失させるとアミノ酸走性が  
ほぼ完全に欠失する (Ingham *et al.*, 1990)。

本研究では、病原細菌における病原性発現の制御や汚染物質分解細菌によ  
るバイオレメディエーションの促進のため、これらの細菌における走化性誘引  
物質認識機構の解明を目指して、病原細菌であるコレラ菌 *V. cholerae* classical  
biotype O395N1 株、環境汚染物質ポリ塩化ビフェニル (PCB) の分解産物である  
クロロ安息香酸の分解細菌 *Burkholderia* sp. NK8 株の走性を解析し、誘引応答の  
調節に関与する膜透過系因子の役割について報告する。

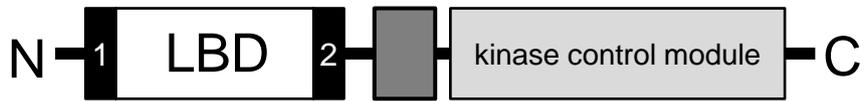


Fig. I-1. MCPのドメイン構造

N, C N末端, C末端

1 2 膜貫通領域 (TM1, TM2)

リガンド結合ドメイン (LBD, Ligand binding domain)

HAMPドメイン

キナーゼコントロールモジュール

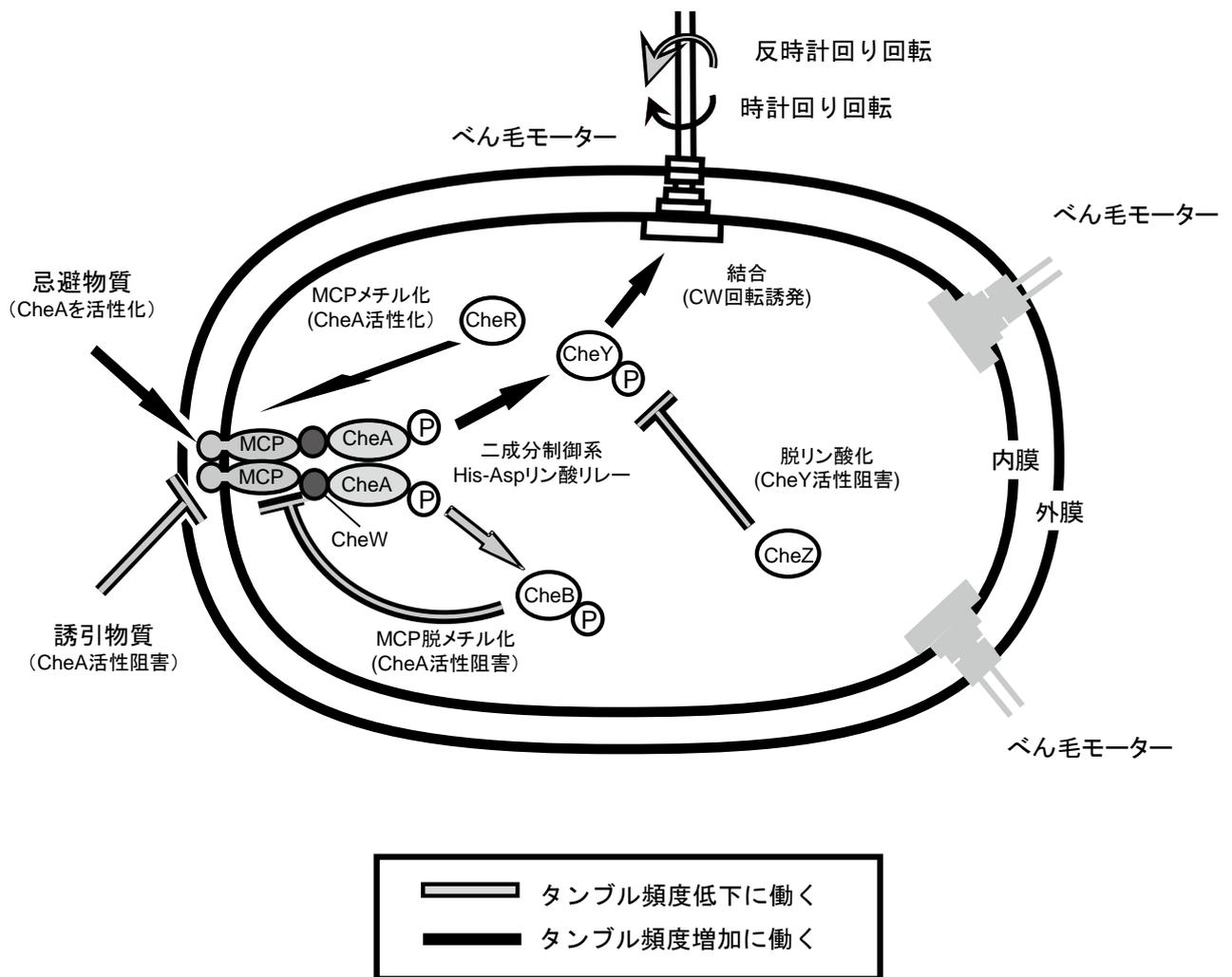


Fig. I-2. 大腸菌の走化性シグナル伝達経路

## 第 II 章 *V. cholerae* classical biotype O395N1 株のアミノ酸走性を媒介する新規の走性トランスデューサー Mlp2, Mlp3 の同定, および Mlp3 に作用する推定セリン結合タンパク質 SatA の同定

### 1. 背景および目的

大腸菌, サルモネラ属細菌などの腸内細菌は, アミノ酸 (Adler, 1966; Melton *et al.*, 1978), 糖類 (Adler *et al.*, 1973; Melton *et al.*, 1978), ジペプチド (Abouhamad *et al.*, 1991) などの走化性誘引物質を MCP によって感知している。MCP のキナーゼコントロールモジュールにおいて, 走化性シグナルを伝達するヒスチジンキナーゼ CheA との相互作用部位の配列は非常に保存性が高い (Alexander & Zhulin, 2007)。このキナーゼコントロールモジュールの配列類似性から発見されたホモログの中には, 誘引物質と結合するリガンド結合部位をもたないもの, 細胞質で酸化還元状態をセンシングするもの, メチル基の受容を行わないものなど, 一般的な MCP とは異なるタイプのセンサーも含まれることから, これらのホモログ全体を一括して MLP (MCP-like protein) と呼称する。大腸菌の MLP は 5 種類 (MCP 4 種と酸化還元走性受容体 1 種) である。

Che タンパク質群と MCP (MLP) による走化性シグナル伝達系は, 他の細菌でも基本的には同じしくみが使われている。近年, 多くの細菌ゲノムが解読されるにつれて, 大腸菌以外の細菌ではさらに多くの走化性コンポーネントをもつのが一般的であることが明らかになった (Lacal *et al.*, 2010)。例えば, コレラの病原菌であるコレラ菌のゲノムは, 大腸菌とほぼ変わらないサイズ (約 4 Mb) であるにもかかわらず, 3 組の Che システムと 44~45 種という多数の MLP をコードしている (Chun *et al.*, 2009)。コレラ菌の走化性に直接関与するのは Che シ

システム II のみで (Hyakutake *et al.*, 2005), システム I, システム III がどのような細胞機能に関与しているかについては, 現在のところ不明である。

真正細菌ゲノムがコードする全 MLP の推定リガンド結合領域の配列情報解析結果 (Lacal *et al.*, 2010)によると, 世界中で集中的に研究されてきた大腸菌走化性受容体タイプのセンサードメインをもつものは全体の 1.7%に過ぎない。88.7%はドメイン構造のアノテートもされておらず, 機能もほとんどわかっていない。

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。コレラ菌の毒素生産関連遺伝子の発現には, アミノ酸による刺激や (Miller & Mekalanos, 1988), アミノ酸走性受容体 Mlp24 が関与するという報告 (Lee *et al.*, 2001)がある。これに関連して, 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 (Nishiyama *et al.*, 2012), Mlp37 (Nishiyama *et al.*, in preparation) が同定されている。コレラ菌のアミノ酸走性における主要な走化性受容体はこの 2 種であるが, 二重欠失株 ( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ ) にはセリンを含む各種アミノ酸に対する走化性が残存するため, これら以外にもアミノ酸応答を媒介する MLP を最低 1 種類は保持していると考えられている。なお, MLP の中でも, 誘引物質と直接結合するタイプのものを「受容体」, 基質結合タンパク質と基質との複合体が MLP に結合するタイプのものを「トランスデューサー」と呼ぶ。

コレラ菌における既知のアミノ酸受容体 Mlp24, Mlp37 (PDB ID: 3C8C)のペリプラズム領域は, 4 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなる大腸菌走化性受容体のタイプ (Milburn *et al.*, 1991)とは異なり, 低分子物質の結合と刺激の受容に関わる PAS-like ドメインが 2 個タンデムに繋がった構造をしている (Lacal *et al.*, 2010)。これに対して, ペリプラズム領域に PAS-like ドメインを 1 個もつタイプの MLP

も存在し、近縁種 *V. parahaemolyticus* の Mlp1 (PDB ID: 4EXO)の構造が決定されている (Fig. II-1)。後者に属するコレラ菌 MLPs のうち、Mlp2 がセリン走性に関与する可能性がある (Itoh, 2005)。

Mlp2 のように比較的短いペリプラズム領域をもつ MLP について、これまでアミノ酸走性を媒介するという報告はなかったが、これら短いペリプラズム領域をもつタイプの MLP における PAS-like ドメインにも誘引物質としてセリン等のアミノ酸が結合するのではないかと考えた。Mlp2 ホモログの中でクローニング後に発現が確認された Mlp2, Mlp3, Mlp26 の3種について、主要アミノ酸受容体遺伝子二重欠失株 ( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ ) を用いて、アミノ酸走性への関与を検討した。

## 2. 材料と実験手法

### 菌株とプラスミド

実験に用いた菌株を Table II-1 に、プラスミドを Table II-2 に示した。また、本研究でプラスミドの作成に用いたプライマーを Table II-3 に示した。アミノ酸との結合試験に用いるため、Tajima ら (2011) の方法に従って、Mlp2, Mlp3 の TM1, TM2 に挟まれた領域の遺伝子配列の C 末端側に His<sub>6</sub>-tag 配列を付加して、制限酵素サイト *Bam*HI と *Eco*RI とをそれぞれ含んだプライマーペアで増幅し、この PCR 産物をタンパク質発現ベクター pGEX-6P-2 の *Bam*HI-*Eco*RI 部位に挿入することによって、GST (グルタチオン *s*-トランスフェラーゼ) と Mlp2, Mlp3 のペリプラズムフラグメントおよび His<sub>6</sub> タグとの融合タンパク質を発現するプラスミド (pGEX-Mlp2p, pGEX-Mlp3p) を構築した。

また、コレラ菌 (O395 株) のゲノムデータベースで periplasmic amino acid-binding protein 遺伝子としてアノテートされていた 5 種の推定アミノ酸結合タンパク質遺伝子のうち、近傍に ABC トランスポーター構成因子の遺伝子が同じ向きに存在し、オペロンを形成すると推定される VC0395\_0202, VC0395\_A0975, VC0395\_A1454 の 3 遺伝子について、プラスミドベクター pSU18 へのクローニングを行った。

大腸菌へのプラスミドの導入にはヒートショック法を、コレラ菌への導入にはエレクトロポレーション法を用いた。

## 定量的キャピラリー・アッセイ

Nishiyama ら (2012) のキャピラリー・アッセイに従って各種アミノ酸水溶液に対する走化性誘引応答を定量化した。具体的には、2  $\mu\text{l}$  ガラスキャピラリーの一端をバーナーの炎で封じ、誘引物質を含んだバッファを吸引させ、これを 30°C で 1 時間静置した菌懸濁液 ( $\text{OD}_{600} = 0.1$ ) に浸して 1 時間後に、キャピラリーの内部に入り込んだ菌の数を LB (Lennox, 1955) 平板培地に形成されたコロニー数から算出した。

## メチル化アッセイ用サンプルの調製

キャピラリー・アッセイと同じ方法で培養し、バッファで洗浄した菌懸濁液を  $\text{OD}_{600} = 0.5$  に調整して、最終濃度 10 mM になるようにセリンを加え、30°C で 30 分間インキュベートした後、5 分間遠心して上清を除いた。この菌体ペレットに 6  $\times$  SDS サンプルバッファ 20  $\mu\text{l}$ , 2-メルカプトエタノール 10  $\mu\text{l}$ , 滅菌蒸留水 90  $\mu\text{l}$  を加え、100°C で 5 分間ボイルして氷上に静置した。

## MLP ペリプラズムフラグメントの精製

MLP ペリプラズムフラグメントの精製には Tajima ら (2011) の方法を参照した。GST 融合タンパク質を MCP 欠失株である大腸菌 HCB436 株で過剰発現させ、超音波破碎した菌溶解液から低速遠心および超遠心によって菌体と不溶性画分を除いた。グルタチオンカラムでトラップした後、プロテアーゼで GST との結合を切断することにより、ペリプラズムフラグメントを精製した。

## MLP 全長を含む膜小胞の調製

プラスミド pMlp2 あるいは pMlp3 の導入によって各 MLP の全長を発現させた大腸菌 HCB436 株の終夜培養液を、0.1 mM IPTG を添加した新鮮な LB 培地に植え継ぎ、30°C で 8 時間振盪培養した。遠心により回収してリン酸バッファで 2 回洗浄した細胞を超音波破碎し、低速遠心で未破碎細胞等を除去した後、超遠心で沈降させた膜小胞に cleavage buffer を加えてホモジナイザーにより再懸濁した。

## ウエスタンブロッティング

調製した全細胞抽出試料 (5~15  $\mu$ l) を 15%アクリルアミドゲルにアプライし、SDS-PAGE (20 mA, 100~150 分間)を行った。この泳動ゲルからタンパク質を PVDF 膜に転写 (100 mA, 60 分間) し、アルカリフォスファターゼ染色による抗原抗体反応の検出を行った。メチル化アッセイの際は一次抗体に anti-FLAG mouse antibody (1/4,000), 二次抗体に AP-labeled anti-mouse IgG goat (1:4,000)を用いた。また、MLP ペリプラズム領域の発現確認の際は一次抗体に anti-GST rabbit (1:4,000), 二次抗体に AP-labeled anti-rabbit (1:4,000)を用いた。

## 等温滴定熱量測定(ITC)による結合解析

各 MLP のペリプラズムフラグメントあるいは全長とセリンとの滴定は VP-ITC マイクロカロリメーター (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA)を用いて行った。データ解析には Origin-ITC (MicroCal Inc.)を用いた。

### 3. 結果

#### Mlp2, Mlp3 によるセリン走性応答の媒介

主要アミノ酸受容体遺伝子欠失株 *Vmlp201* 中で MLP を発現させ、アミノ酸走性を調べた。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 (Fig. II-2)。Mlp26 過剰発現株ではセリン走性の増強は見られなかったため、これ以降の解析対象から除外した。

#### メチル化アッセイの結果

キャピラリー・アッセイによる誘引応答が Che システムを介した走化性によるものであることを MLP のメチル化実験によって確かめることとした。誘引物質による刺激が継続するとき、メチルトランスフェラーゼ CheR は、MLP にメチル基を付加していく。メチル基が付加された MLP タンパク質をウエスタンブロッティングで検出すると、メチル基が付加されていない同じタンパク質よりもバンドの移動度が上昇することが知られている。これは、メチル基の付加による疎水度の増加によると考えられ、MLP のメチル化の簡易検出指標として利用されている (Shiomi *et al.*, 2002)。

MLP のメチル化レベルをウエスタンブロッティングにより検出した。具体的には、MLP 過剰発現株に誘引物質 (1 mM セリン) を与え、MLP タンパク質バンドの移動度の変化を調べた (Fig. II-3)。実験の結果、セリン添加による Mlp2 バンド移動度の上昇が認められた。Mlp3 については、明瞭な移動度の変化は認められなかったが、セリンの有無に関わらず複数のバンドが検出された。

これら移動度の大きいバンドがメチル化に由来することを確かめるため、大腸菌メチル化酵素・脱メチル化酵素遺伝子欠失株 HCB436 に各 MLP およびコ

レラ菌メチル化酵素 CheR2 を共発現させ、コレラ菌におけるバンドパターンと比較した。その結果、Mlp2 については、セリン処理区における MLP バンド移動度の上昇がメチル化に起因することが強く示唆された。Mlp3 については、セリンの有無に関わらずメチル化が進行していることが示唆された。

### 各種アミノ酸に対する走性応答の媒介

Mlp2, Mlp3 過剰発現株について、他の全てのアミノ酸に対する走性を調べた。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 (Fig. II-4)。すなわち、Mlp3 は、R 基が比較的小さいアミノ酸に対する走性を担うことが示唆された。

### Mlp2, Mlp3 とセリンの結合解析

Mlp2, Mlp3 のペリプラズムフラグメント (10  $\mu$ M) と 10 mM セリンの相互作用を ITC を用いて測定した。セリンとの結合の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、このようにセリン添加に伴う熱の出入りは検出できなかった (Fig. II-5)。また、全長 Mlp2, Mlp3 を含む膜小胞を用いた場合でも、有意な熱量変化は検出されなかった (Fig. II-6)。

### 推定セリン結合タンパク質 SatA による Mlp3 過剰発現株セリン応答の増強

Mlp2, Mlp3 のペリプラズム領域がアミノ酸と直接結合する結果が得られなかったことから、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。例えば大腸菌では、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 (Kossmann *et al.*, 1988)。そこで、コレラ菌 (Classical biotype O395) のゲノムデータベースにおいて periplasmic amino acid-binding protein 遺伝子としてアノテートされていた 5 種の ORF のうち、VC0395\_0202, VC0395\_A0975, VC0395\_A1454 の 3 種についてプラスミドベクター pSU18 へのクローニングを行った。これらの ORF の近傍には、それぞれの結合タンパク質が受容する基質の ABC トランスポーターのサブユニットをコードすると推定される ORF が存在していた。

これらの推定アミノ酸結合タンパク質を Vmlp201 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 (Fig. II-7)。この遺伝子を *satA* (serine ABC transporter) と名付け、Mlp2 または Mlp3 と共発現させて、セリンに対する走化性応答を解析した。その結果、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 (Fig. II-8)。

#### 4. 考察

キャピラリ・アッセイおよびメチル化アッセイの結果から、Mlp2 がセリン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ことが強く示唆された。Mlp3 では、セリンの有無に関わらず見られた移動度の高いバンドがメチル化によるものと一致した。今後、Mlp3 のメチル化を確認し評価するためには、タンパク質の分解を抑える工夫や、ウエスタンブロッティングの検出に用いるタグを変更するなどの対策に加え、SatA との共存条件下での解析が必要と考えている。

Fig. II-4 の実験条件では、すでに同定されたアミノ酸受容体である Mlp24 (Nishiyama *et al.*, 2012), Mlp37 (Nishiyama *et al.*, in preparation) の過剰発現株と比べて、Mlp2, Mlp3 の過剰発現株の応答範囲は比較的狭い範囲のアミノ酸に限られることがわかった(Fig. II-9)。Mlp3 過剰発現株が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。また、コレラ菌の走化性野生株が強く応答するアルギニン (Nishiyama *et al.*, 2012) に対して、Mlp2, Mlp3 過剰発現株は共に全く誘引されなかった。

SatA・Mlp3 の共発現系における走性応答は、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、あるいは他の MLPs の発現・機能が低下す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。

実際、当研究室の最近の研究により、*mlp3* の発現は、*mlp24* や *mlp37* に比べて低い、*mlp37* の発現が抑制される 23°C で、やや上昇することが見出されて

いる (Onogi, 2015)。 *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 (Moorthy & Watnick, 2005) 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 (Kan *et al.*, 2004) 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けるようにしているのかもしれない。

本研究では、コレラ菌のセリン走性を媒介する *Mlp2*, *Mlp3* という新たな走性トランスデューサーを同定した。また、 *Mlp3* については、おそらくセリン結合タンパク質である *SatA* と協調して働くトランスデューサーであること、 *SatA* についてはその推定オペロン構成から、セリン輸送に関与する ABC トランスポーターとも相互作用する可能性が示唆された。

前述の通り、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 種類の環境を行き来する複雑な生活環をもつ。コレラ菌は多くのアミノ酸を複数の受容体で重複して感知できるが、この冗長性は、それぞれの環境に最適な応答を行う上で選択されてきた結果かもしれない。また、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。コレラ菌の走化性に多様性をもたらす膜輸送関連因子の重要性を改めて強調したい。

Table II-1. 使用菌株

種名 バイオタイプ	菌株	表現型または用途	由来
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$	cloning host	Grant <i>et al.</i> , 1990
	HCB436	$\Delta$ MCP $\Delta$ <i>cheRB</i>	Wolfe & Berg, 1989
<i>V. cholerae</i> O1 classical biotype	O395N1	$\Delta$ <i>ctxA</i> , wild type for chemotaxis	Mekalanos <i>et al.</i> , 1983
	Vmlp201	O395N1 $\Delta$ <i>mlp24 <math>\Delta</math><i>mlp37</i></i>	Nishiyama <i>et al.</i> , 2012

Table II-2. 使用プラスミド

プラスミド名	特性	由来
pAH901	Expression vector, pTWV228 (Takara Bio.) + FLAG; Ap <sup>r</sup>	Nishiyama <i>et al.</i> , 2012
pMlp24	pAH901 + <i>mlp24</i>	Nishiyama <i>et al.</i> , 2012
pMlp37	pAH901 + <i>mlp37</i>	Kawagishi Lab.
pMlp2	pAH901 + <i>mlp2</i>	Kawagishi Lab.
pMlp3	pAH901 + <i>mlp3</i>	Kawagishi Lab.
pMlp26	pAH901 + <i>mlp26</i>	Kawagishi Lab.
pUC18	Expression vector; Ap <sup>r</sup>	Takara Bio.
pMM32	pUC18 + <i>cheR2</i> of <i>V. cholerae</i>	Kawagishi Lab.
pGEX-6P-2	GST-fusion vector; Ap <sup>r</sup>	GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom
pGEX-Mlp24p	pGEX-6P-2 + periplasmic region of <i>mlp24</i>	Nishiyama <i>et al.</i> , 2012
pGEX-Mlp2p	pGEX-6P-2 + periplasmic region of <i>mlp2</i>	This study
pGEX-Mlp3p	pGEX-6P-2 + periplasmic region of <i>mlp3</i>	This study
pSU18	Expression vector; Cm <sup>r</sup>	Bartolomé <i>et al.</i> , 1991
p0202	pSU18 + VC0395_0202	This study
pA0975 (= pSatA)	pSU18 + VC0395_A0975	This study
pA1454	pSU18 + VC0395_A1454	This study

Ap<sup>r</sup>, アンピシリン耐性 ; Cm<sup>r</sup>, クロラムフェニコール耐性

Table II-3. 本研究で用いたプライマー

PCR プライマー	配列 (5' → 3')*
Cloning periplasmic region of <i>mlp02</i> in pGEX-6P-2	
GST-Mlp2PF2	CGCG <u>GATCCA</u> ATTATCAGAGTGGGTTATCTAC
GST-Mlp2PR-His	CCGGA <u>AATTC</u> CTAatgatgatgatgatgGGAGATCA TTTGATCGTAG
Cloning periplasmic region of <i>mlp03</i> in pGEX-6P-2	
GST-Mlp3PF2	CGCG <u>GATCCA</u> AAGATTATCGACAA GATCTGATG
GST-Mlp3PR-His	CCGGA <u>AATTC</u> CTAatgatgatgatgatgTGAGCTCAG GCGCTGCATC
Cloning of VC0395_0202 into <i>Sma</i> I site of pSU18	
VC0395_0202-F	ATGCAATTATTCGGACAACG
VC0395_0202-R	TTACTGACCTGAGGCGATCT
Cloning of VC0395_A0975 into <i>Sma</i> I site of pSU18	
VC0395_A0975-F	ATGGCGAATAAACTCACTGT
VC0395_A0975-R	TTAACGGATAGGTGGTGCGT
Cloning of VC0395_A1454 into <i>Sma</i> I site of pSU18	
VC0395_A1454-F	ATGGATATGAAAAAGTGGTT
VC0395_A1454-R	TTATTCACCGTAAACGTC

\*実線の下線は *Bam*HI 部位，点線の下線は *Eco*RI 部位，  
小文字で示した塩基配列は His<sub>6</sub>-tag のコードを示す。

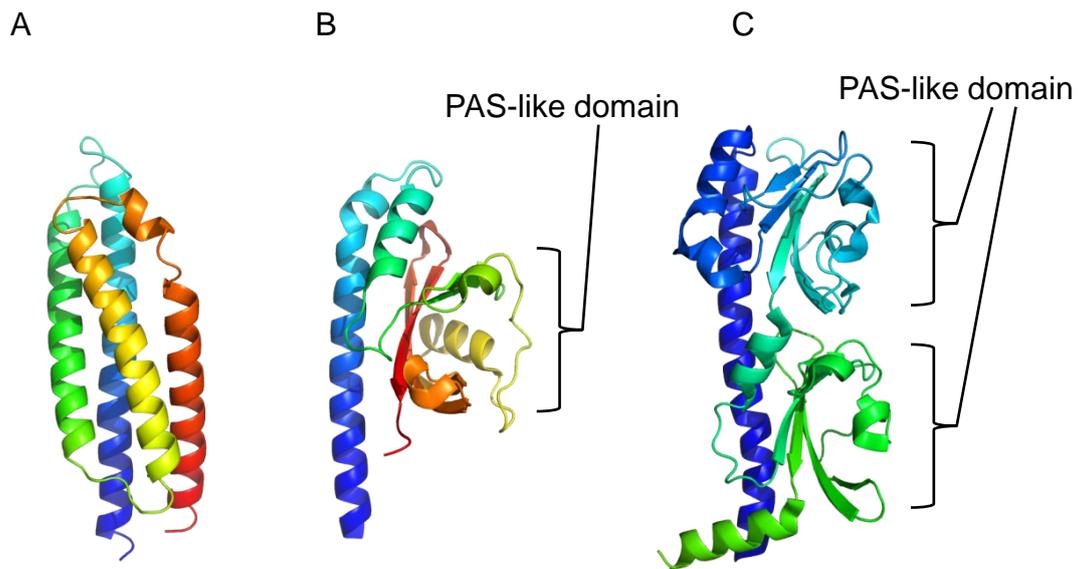


Fig. II-1. MLPペリプラズム領域の立体構造

(A) 大腸菌走化性受容体Tar (PDB: 2ASR)

(B) *V. parahaemolyticus*のMlp1 (PDB: 4EXO)

(C) コレラ菌(El Tor biotype)のMlp37 (PDB: 3C8C)

全てホモダイマーを形成するが、比較しやすいようモノマーの構造を示す。

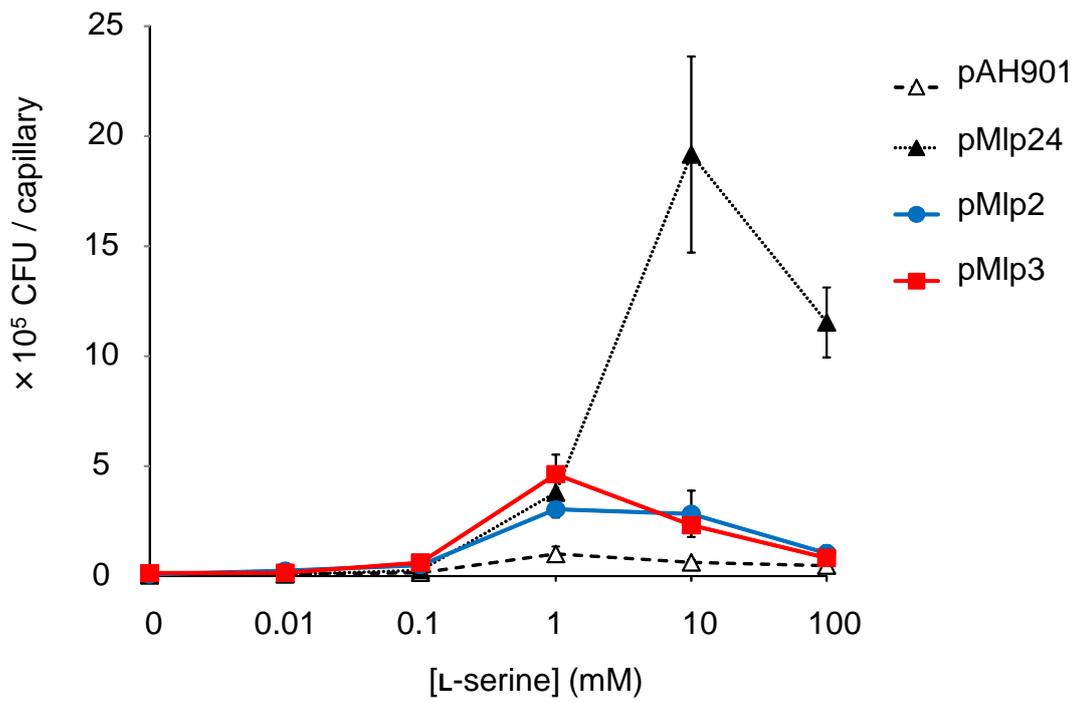


Fig. II-2. Mlp2またはMlp3過剰発現によるセリン走性の増強

宿主はVmlp201株 ( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ )

エラーバーは標準誤差 (n = 3)

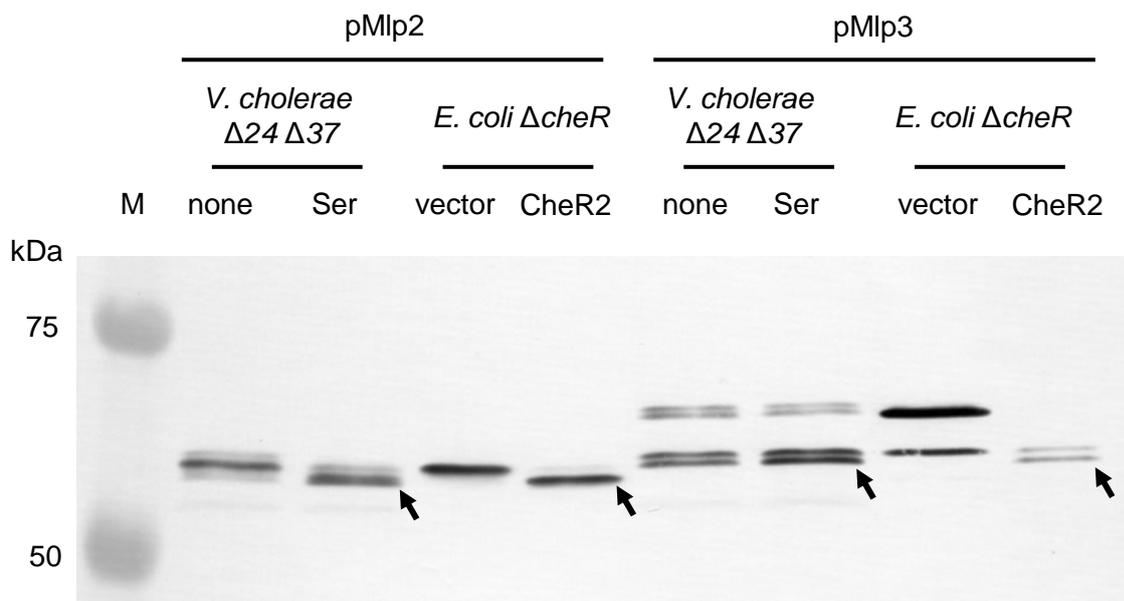


Fig. II-3. セリンによるMLPメチル化レベルの亢進

矢印はメチル化を受けたと推定されるバンド

none, セリン処理なし ;

Ser, 10 mMセリン処理 ;

vector, pUC18を導入 ;

CheR2, pMM32を導入

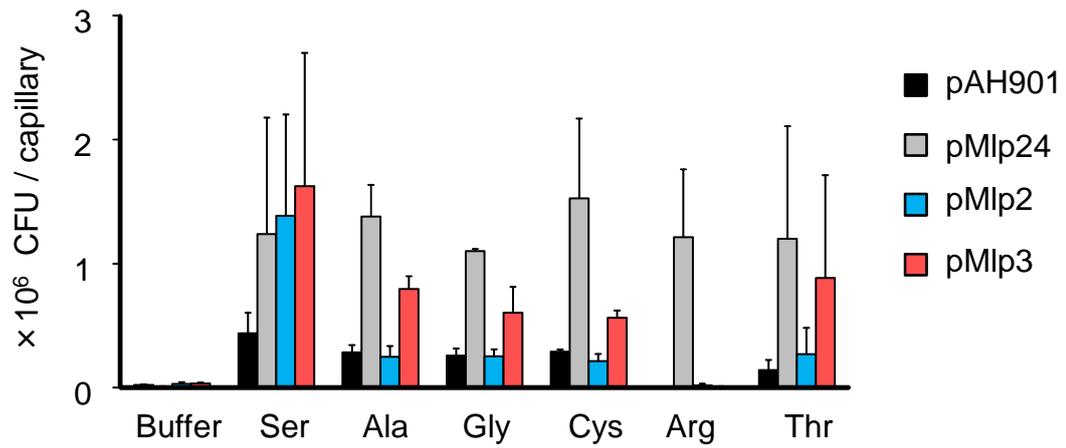


Fig. II-4. Mlp2またはMlp3を過剰発現させたコレラ菌の  
各種アミノ酸に対する走性応答

宿主はVmlp201株 ( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ )  
 キャピラリ内アミノ酸濃度は1 mM  
 エラーバーは標準誤差 (n = 3)

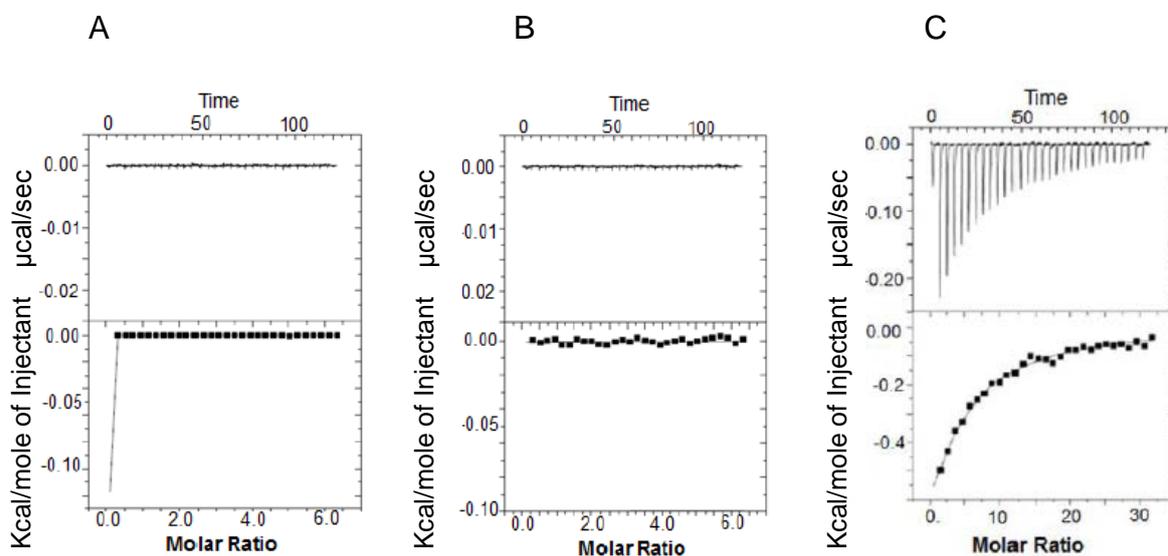


Fig. II-5. ITCによるMLPペリプラズム領域とセリンの結合解析

- (A) Mlp2のペリプラズム領域
- (B) Mlp3のペリプラズム領域
- (C) Mlp24のペリプラズム領域

上側パネルは時間あたりの熱量変化,

下側パネルはタンパク質とセリンとのモル比あたりの熱量変化を表す

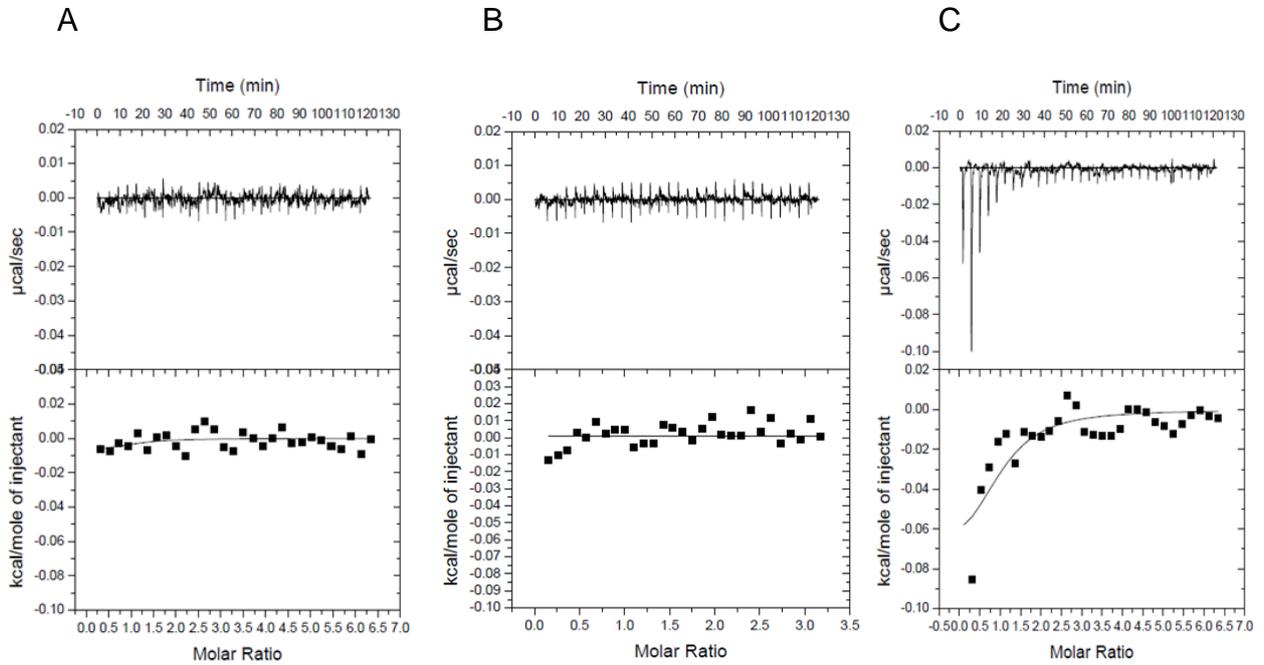


Fig. II-6. ITCによる全長MLPを含む膜小胞とセリンの結合解析

- (A) Mlp2全長を含む
- (B) Mlp3全長を含む
- (C) Mlp37全長を含む

上側パネルは時間あたりの熱量変化,

下側パネルはタンパク質とセリンとのモル比あたりの熱量変化を表す

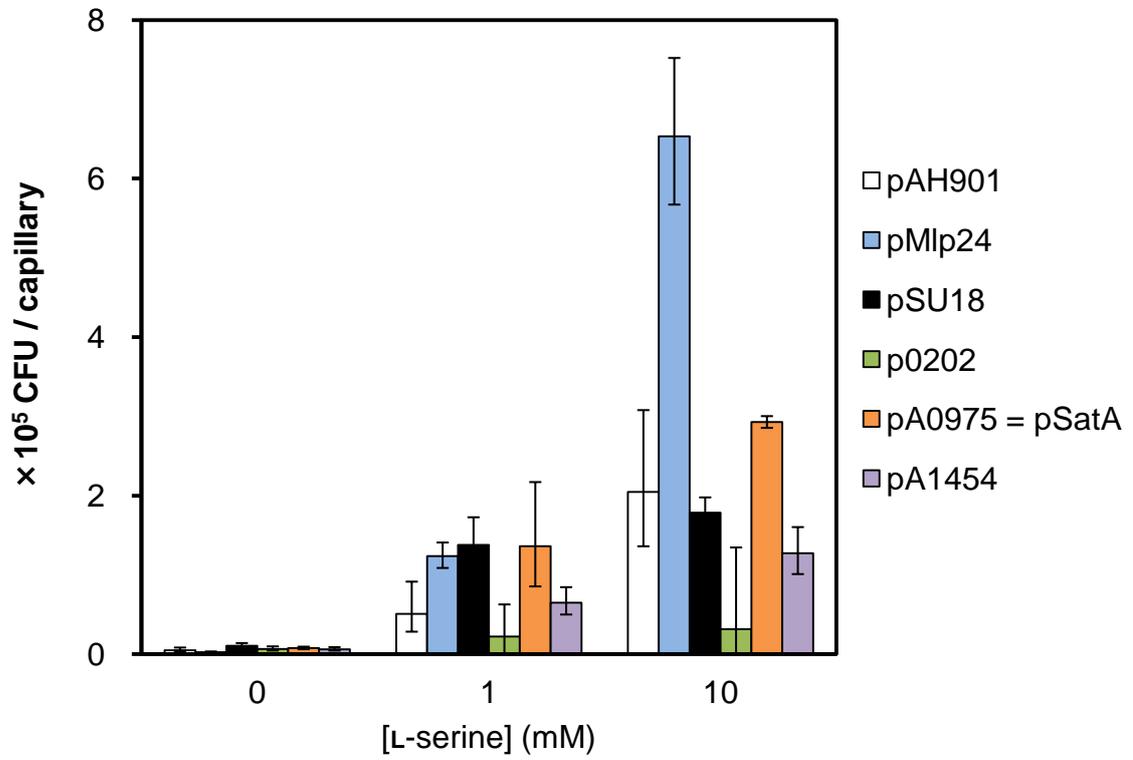


Fig. II-7. セリン誘引応答に対するSatAの影響

宿主はVmlp201株 ( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ )

エラーバーは標準誤差 (n = 3~6)

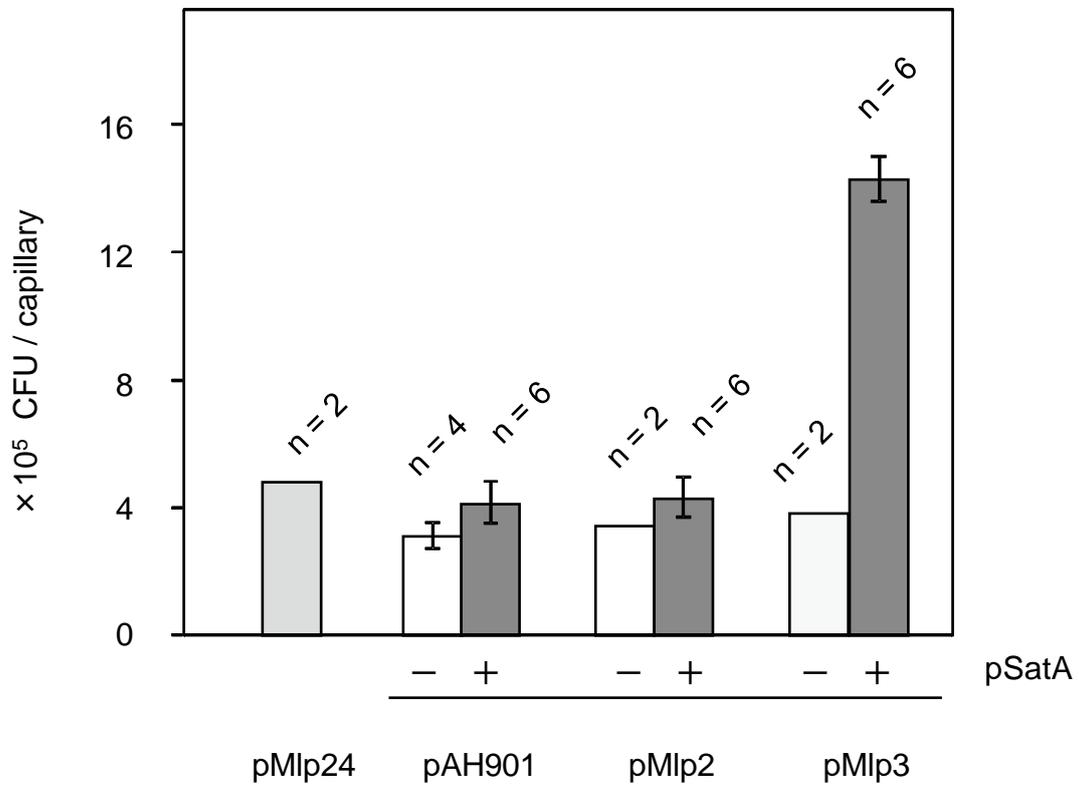


Fig. II-8. セリン誘引応答に対するSatA・MLP共発現の影響

宿主はVmlp201株 ( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ )

キャピラリ内セリン濃度は10 mM

エラーバーは標準誤差

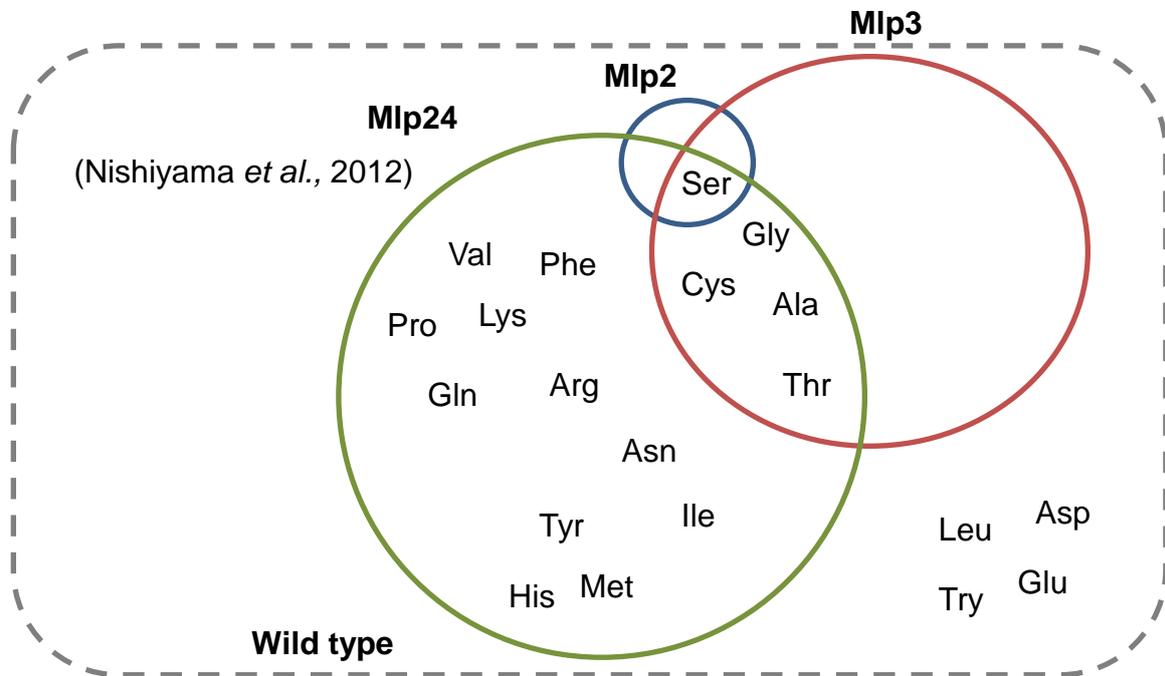


Fig. II-9. Mlp2, Mlp3, Mlp24が走性を媒介するアミノ酸誘引物質の比較

宿主はVmlp201株 ( $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ )

円内は各MLPの過剰発現による

走化性誘引応答の増強が認められた各種アミノ酸の範囲を表す

### 第 III 章 クロロ安息香酸分解菌 *Burkholderia* sp. NK8 株の 3-クロロ安息香酸分解産物に対する走性に関する推定ポリン遺伝子 *omp<sub>NK8</sub>*

#### 1. 背景および目的

人間活動に由来する難分解性の芳香族化合物による環境汚染の例として、芳香族炭化水素や塩素化芳香族化合物、ニトロ化芳香族化合物による土壌や地下水の汚染があげられる (Pandey & Jain, 2002)。*Burkholderia* 属は (べん毛をもたない *B. mallei* を除いて)、通常 1 本の極べん毛をもつ運動性の土壌細菌である。本属菌は芳香族化合物に対する幅広い分解能力を示し (Pérez-Pantoja *et al.*, 2012)、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 (Leungsakul *et al.*, 2005)。土壌には植物由来のリグニン等の分解産物として芳香族化合物が豊富に存在しており (Zimmermann, 1990)、*Burkholderia* 属などの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。現在、微生物機能を用いた環境浄化技術の開発が多くの研究者によって試みられているが、有機化合物の分解細菌が走化性を介して汚染箇所に集積されることによって、汚染物質である有機化合物の微生物分解を促進できることが期待されている。

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 (Unterman, 1996)。

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完全分解できる。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 (Francisco *et al.*, 2001)。NK8 株は染色体にクロロ安息香酸分解遺伝子クラスタ *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 *tfdT-CDEF* (Liu *et al.*, 2001) をもつ。*tfdT-CDEF* クラスターの 5 種の遺伝子は、それぞれ *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus necator*) JMP134 株の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 分解プラスミド pJP4 の *tfdT-CDEF* クラスター中の対応する遺伝子 (Perkins *et al.*, 1990) と、推定タンパク質のアミノ酸配列において高い類似性 (79~88% amino acid identity) をもつ。*tfdT* は LysR-type の転写調節レギュレータ, *tfdC* はクロロカテコール 1,2-ジオキシゲナーゼ, *tfdD* はクロロムコン酸シクロイソメラーゼ, *tfdE* はジエンラクトンヒドロラーゼ, そして *tfdF* はマレイル酢酸レダクターゼをコードする。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 (Fig. III-1)。

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を調べることにした。

## 2. 材料と実験手法

### 菌株およびプラスミド，培養条件

実験に用いた菌株とプラスミドは Table III-1 に示した。NK82 株 (3CB<sup>-</sup>, 3CC<sup>-</sup> and 4CC<sup>-</sup>) は，富栄養培地での継代培養によってメガプラスミド pNK8 が脱落したため，3CB を単一炭素源として生育できなくなった変異株である（現・静岡大学 小川直人教授より分譲）。*Burkholderia* 属菌株は BSM 培地 [1 L あたり: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.1 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.29 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9 g; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.1 g; MnSO<sub>4</sub>•4~6H<sub>2</sub>O, 0.025 g; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.005 g; L-ascorbic acid, 0.005 g] (Ogawa & Miyashita, 1995) に単一炭素源として 10 mM コハク酸を加えて培養した。*E. coli* 株は K-12 の派生株である DH5α [F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1] を用い，LB 培地で培養し，必要に応じてカナマイシン (50 μg/ml) またはストレプトマイシン (50 μg/ml) を添加した。平板培地作製の際は各培地に 1.5%の寒天を加え固化させた。

### 接合伝達による形質転換

*Burkholderia* 属菌株へのプラスミドの導入には *E. coli* S17-1 λpir (Tp<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> recA thi pro hsdR-M+RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7 λpir) (Biomedal S. L., Sevilla, Spain) をドナーとして用いた。*E. coli* と *Burkholderia* 間のプラスミド接合伝達には，両菌株の培養液を混合し，LB 平板上に静置したニトロセルロース膜上に滴下して 28°C，24 時間インキュベートした。接合伝達による形質転換体は 0.2%リビトールを単一炭素源とし，カナマイシン (50 μg/ml) を加えた BSM 平板を用いて，28°C で培養して選抜した。*E. coli* はリビトールを単一炭素源として利用できないため，この方法で *Burkholderia* のコロニーのみを得ることができる。

## プラスミドの構築

*omp<sub>NK8</sub>* 遺伝子の推定プロモーター領域(ATG 開始コドンの 670 bp 上流まで)を含むコーディング領域を, 制限酵素サイト *EcoRI* と *BamHI* とをそれぞれ含んだプライマーペアで増幅した (Table III-2)。この PCR 産物 (1,987 bp) を広域宿主ベクター pKT230 (Bagdasarian *et al.*, 1981) の *EcoRI*–*BamHI* 部位に挿入して, プラスミド pOmpNK8 とした。

## スイミングプレート・アッセイ

既報の方法 (Grimm & Harwood, 1997; Tso & Adler, 1974) に以下の改変を加えてスイミングプレート・アッセイを行った。対数増殖期後期 ( $OD_{610} = 1.0\sim 1.5$ ) まで 28°C で振盪培養した 150 ml の培養液を遠心し, 炭素源を含まない BSM 培地で 2 回洗浄した後, 0.2% Bacto agar (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を加えた同じく炭素源を含まない BSM で再懸濁して 25 ml にメスアップした。この細胞懸濁液を分注したシャーレの中心部に, 500 mM の誘引物質またはポジティブコントロールとして 20%カザミノ酸, ネガティブコントロールとして炭素源を含まない BSM を 20  $\mu$ l 染みこませた滅菌濾紙ディスク(直径 8 mm)を置き, 室温 (24~26°C) で 6 時間静置した。全てのアッセイは独立に 2 回繰り返し, 再現性を確認した。

## 定量的キャピラリー・アッセイ

第 II 章のキャピラリー・アッセイの手順に準じつつ, 以下の改変を行った。1  $\mu$ l ガラスキャピラリーの一端をバーナーの炎で封じ, 誘引物質を含んだバッファ (10 mM HEPES-KOH, pH 7.0) を吸引させ, これを 28°C で 4 時間静置した菌懸濁液 ( $OD_{610} = 0.1$ ) に浸して 30 分後に, キャピラリーの内部に入り込んだ菌の数

を、カナマイシン (50 µg/ml) を加えた LB 平板培地に形成されたコロニー数から算出した。なお、カナマイシン耐性プラスミドをもたない NK8 株には 5 mM 3CB を、NK82 株には 10 mM コハク酸を単一炭素源とする BSM 培地をコロニー計数に用いた。

異なる菌株間で走性応答を比較する際は、相対走化性指数 (Relative chemotaxis index, 以降 RCI と略す) を誘引物質を含まないコントロールキャピラリと各試験区のキャピラリにおける細胞数の比で表した。なお、同じ菌株間でキャピラリ内の細胞数を比較する際には、RCI ではなく細胞数を用いた。

### 統計ソフトウェアと解析前の処理

本研究におけるデータ処理、計算、グラフの描画には R ver. 2.15.0 (R Development Core Team, 2008) または ver. 3.1.1 (R Core Team, 2014) を用いた。キャピラリ・アッセイの結果を統計処理する前には RCI および細胞数に対して対数変換を行った。これは走化性誘引応答の値が対数正規分布を示すためであり、グラフで描画する際には再び真数に戻して表記した。

### 半定量 RT-PCR

定常期 ( $OD_{610} = 1.0\sim 3.2$ ) の培養液 10 ml から Isogen II (Nippon Gene, Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて全 RNA を抽出し、DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega Co., Madison, WI, USA) で夾雑 DNA の分解を行った。サンプルから可能な限り DNA を除くため、分解酵素処理を 2 回繰り返した。逆転写には 1 サンプルあたり 100 ng/µl の全 RNA を鋳型として cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として PCR を行った。標的配列の検出に用いたプライマーセットを Table III-2 に示した。異なるサンプル間で *omp<sub>NK8</sub>* 遺伝子の転写レベルを比較するための PCR 条件

は以下の通りとした。(1)NK8/pKT230 : 94°C・2分 (1 サイクル) ; 94°C・1分, 59.5°C・30秒, 72°C・40秒 (40 サイクル)。(2)NK82/pOmpNK8 : 94°C・2分 (1 サイクル) ; 94°C・1分, 59.5°C・30秒, 72°C・40秒 (30 サイクル)。内部コントロールとして 16S rRNA を用いた際には, 上記の条件に対して鋳型 cDNA は上記の 1/10 量とし, 増幅回数は 25 サイクル, アニーリング温度は 52.8°C とした。プライマーの特異性を確認するため, ゲノム DNA (< 20 ng)を鋳型として同様に PCR を行った。PCR 産物は DNA マーカー (GeneDireX, Taipei, Taiwan) と一緒に 1%アガロースゲルで泳動し, バンドは SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) で染色してゲルイメージャーで撮影し, デジタル画像として保存した。画像中の各バンドの輝度を ImageJ 1.45s (Schneider *et al.*, 2012) で定量し, *omp<sub>NK8</sub>* 遺伝子の相対発現量(%)を, 全 RT-PCR バンド輝度の合計値に対する各バンド輝度の比 × 100 で表した。データの代表値は独立 3 回実験の平均値とし, 10 mM コハク酸培養菌における *omp<sub>NK8</sub>* 遺伝子の相対発現量をコントロールとしてダネットの検定 (Dunnett, 1955 & 1964)を行った。

### 生育速度のモニタリング

菌株間の生育速度を比較するため, 異なる濃度の β-ケトアジピン酸 (0.5 mM, 5.0 mM) および 10 mM コハク酸を単一炭素源として, BSM 培地 (カナマイシン 50 µg/ml を添加) における OD<sub>600</sub> 値の変化を OD モニター C & T (TAITEC Co., Saitama, Japan) を用いて経時的に測定し, 対数増殖期における倍加時間を算出した。

### 3. 結果

#### スライディングプレートにおける菌の応答

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。pNK8 の脱落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 (Fig. III-2)。

#### クロロカテコール分解プラスミド pSL1 導入による走化性誘引応答の回復

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に、以下の実験を行った。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 pNK8 脱落株に導入して、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有意な誘引応答を示した (Fig. III-3, III-4)。 $\beta$ -ケトアジピン酸に対する応答は変異株で著しく低下した一方で、pSL1 導入株では顕著に増強された (Fig. III-4)。このことから、クロロカテコール分解遺伝子群を含む 9.0 kb の断片上に、 $\beta$ -ケトアジピン酸への誘引応答に関与する因子が存在すると考えられた。

#### $\beta$ -ケトアジピン酸への走化性応答に関与する推定ポリリン遺伝子 *omp<sub>NK8</sub>*

pSL1 上の 9.0-kb 断片について、新たに配列解析を行ったところ、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* の近傍に未報告の ORF

(380 aa) が存在した (Fig. III-5A)。この ORF とその推定プロモータ領域 (670 bp) 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 (Fig. III-5B)。この結果から、この ORF が  $\beta$ -ケトアジピン酸への走性に関与することが示された。なお、推定プロモータ領域の塩基配列中には、既知の推定アミノ酸配列データベースと高い配列類似性を示す ORF は認められなかった。

Genbank のデータベースを BLAST P 2.2.29<sup>+</sup> (Altschul *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 2001) を用いて検索した結果、この ORF は *Bordetella pertussis* Tohama I の外膜ポリリン BP0840 (Uniplot: Q04064) (Armstrong *et al.*, 1986) と 30%の、*Delftia acidovorans* の陰イオン選択性ポリリンである OMP32 (Uniplot: P24305) (Gerblrieger *et al.*, 1992) とは 27%のアミノ酸配列同一性を示した。グラム陰性細菌の  $\beta$ -バレル構造をもつ外膜タンパク質データベース OMPdb (Tsirigos *et al.*, 2011) を検索した結果、この推定タンパク質は細菌ポリリンファミリー (Saier, 2000) に属することが予想された。さらに SOSUIsignal (Gomi *et al.*, 2004) によって、N 末端に 19 残基のシグナル配列 (MKRCLKAFLTCILVSCSIA) をもつこと、TMBETA-NET (Gromiha & Suwa, 2005) によって少なくとも 15 個の膜貫通  $\beta$ セグメントをもつことが推定された。よって、Omp<sub>NK8</sub> は外膜貫通型タンパク質であると考えられた。以上の結果から、この ORF をポリリン遺伝子と推定し、omp<sub>NK8</sub> (DDBJ accession number, AB731476) と名付けた。Omp<sub>NK8</sub> と BP0804, OMP32 との配列比較を Fig. III-6 に示した。本報告は、ポリ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。

### バッチカルチャーにおける *omp<sub>NK8</sub>* 変異株の生育速度

*Omp<sub>NK8</sub>* が  $\beta$ -ケトアジピン酸の外膜透過に関与するのであれば、*Omp<sub>NK8</sub>* の発現株では  $\beta$ -ケトアジピン酸の細胞内取り込みが促進される可能性が考えられた。よって、野生株 NK8/pKT230, 変異株 NK82/pKT230, *omp<sub>NK8</sub>* 遺伝子導入株 NK82/p*Omp<sub>NK8</sub>* について、 $\beta$ -ケトアジピン酸 (0.5 または 5.0 mM) あるいはコハク酸 (10 mM) を単一炭素源として培養し、生育速度を比較した。低濃度 (0.5 mM) の  $\beta$ -ケトアジピン酸で培養した際、NK82/p*Omp<sub>NK8</sub>* の倍加時間は pNK8 脱落株 NK82/pKT230 と比べて有意に短縮された (Fig. III-7)。0.5 mM  $\beta$ -ケトアジピン酸濃度では野生株 NK8/pKT230 の倍加時間が最も長かった。この現象は、野生株における  $\beta$ -ケトアジピン酸輸送の抑制を示唆する。なお、高濃度 (5.0 mM) の  $\beta$ -ケトアジピン酸や 10 mM コハク酸で培養した場合には、これら 3 菌株の倍加時間に有意な差は認められなかった。よって、*Omp<sub>NK8</sub>* は  $\beta$ -ケトアジピン酸が低濃度の時に、 $\beta$ -ケトアジピン酸の細胞内への取り込みを促進することが示唆された。

### 野生株 NK8/pKT230 における 3CB による *omp<sub>NK8</sub>* 転写の誘導

野生株における 10 mM コハク酸培養時の *omp<sub>NK8</sub>* 転写量は非常に弱く、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 (Fig. III-8)。一方、相補株 NK82/p*Omp<sub>NK8</sub>* において、プラスミドから発現した *omp<sub>NK8</sub>* の転写量は培養基質の影響を受けなかった (Fig. III-9)。このことから、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。

### メガプラスミド脱落株 NK82 における 3CB による走化性誘引応答の誘導

予備実験において、NK8 株の 3CB に対する走化性は 3CB 自身によって誘導された (data not shown)。しかしながら、*omp<sub>NK8</sub>* をもたない NK82 株においても、生育培地に 3CB が存在することによって 3CC および 4CC への走化性が誘導されるという結果となった (Fig. III-10)。クロロカテコールへの走性は  $\beta$ -ケトアジピン酸への走性とは独立に存在し、その誘引応答は 3CB によって誘導されることが示唆された。

#### 4. 考察

バッチカルチャーにおける生育試験の結果からは、Omp<sub>NK8</sub>がβ-ケトアジピン酸の細胞内への取り込みに関与することが示唆されたが、3CB および他の 3CB 分解産物の透過にも関与するかについては未だに明らかではない。グラム陰性細菌の外膜ポリンは一般的に低分子の親水性物質の分子フィルターとして働くことが知られている。一方で、ポリンの中には疎水性の物質の外膜透過を促進するものも報告されている。例えば、*P. putida* F1 株の TodX (Wang *et al.*, 1995) および *R. pickettii* PKO1 株の TbuX (Kahng *et al.*, 2000) はトルエンの透過に関与する。しかしながら Omp<sub>NK8</sub> の推定アミノ酸配列は TodX, TbuX とは明らかな類似性をもたず、*D. acidovorans* の陰イオン選択性ポリンである OMP32 と高い類似性を示した (Fig. III-6)。

β-ケトアジピン酸 (0.5 mM) を単一炭素源とした際に、野生株 NK8/pKT230 の倍加時間が最も長かったことから、β-ケトアジピン酸輸送が野生株で抑制されていることが示唆された。β-ケトアジピン酸の輸送が抑制される例は土壤に生息する *Pseudomonas* 属でも広く認められている (Ondrako & Ornston, 1980)。

*Burkholderia* sp. NK8 株においても、メガプラスミド pNK8 の脱落によって β-ケトアジピン酸の輸送や分解に関わる調節因子の機能が失われ、β-ケトアジピン酸の取り込みが増大した可能性が考えられた。

半定量 RT-PCR の結果から、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、β-ケトアジピン酸の外膜透過が促進されることが示唆された。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ると考えられる。

芳香族化合物の感知に関与する MLPs としては、これまでに *P. putida* G7 株のナフタレンへの走化性に必要な NahY (Grimm & Harwood, 1999), *P. fluorescens* KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸への誘引応答に関与する NbaY (Iwaki *et al.*, 2007), *P. putida* DOT-T1E 株のトルエン等の芳香族炭化水素への応答を媒介する McpT (Lacal *et al.*, 2011), *Acidovorax* sp. JS42m 株の 2-ニトロトルエンの応答に関与する NtdY (Rabinovitch-Deere & Parales, 2012), *P. aeruginosa* PAO1 株の 4-ニトロトルエンとカテコールへの誘引応答に関与する CtpL (Vangnai *et al.*, 2013) が報告されている。しかしながら、これらの MLP と芳香族化合物が直接結合しているのか、介在する結合タンパク質等が存在するのかについて詳しいことは分かっていない。クロロ安息香酸とその分解産物に対する走性の調節機構の解明には、さらなる研究が必要である。

3CB とその分解産物が走化性応答に及ぼす影響については、注意深く考察する必要がある。クロロカテコール分解性を失った NK82 株においてもクロロカテコール走性が誘導されたことから (Fig. III-10), クロロカテコールと  $\beta$ -ケトアジピン酸への走性には異なる機構が関わっていると考えられた。クロロカテコール走性には染色体上にその因子がある。例えば, *P. aeruginosa* PAO1 において 4-クロロアニリンおよびカテコールへの応答を媒介する MLP である CtpL の遺伝子は染色体上に存在している (Vangnai *et al.*, 2013)。NK82 株の染色体上には, CtpL のようなクロロカテコール走性を媒介する MLP がコードされているのであろう。分解細菌がもつ巨大プラスミド上には数多くの分解・代謝に関わる遺伝子が存在しており, これらの影響を除外するためにも, 以降の遺伝子機能解明にはプラスミド脱落株だけでなく, 相同組換えなどを用いた *omp<sub>NK8</sub>* 欠失株の作出が必要である。

MLP やポリンの他に芳香族化合物への走化性に関与する因子として、内膜トランスポーターであるパーミアーゼの例が報告されている。*R. eutropha* (*Cupriavidus necator*) JMP134 株の pJP4 プラスミド *tfd* 遺伝子クラスタには 2,4-D のパーミアーゼをコードする *tfdK* が存在し、この遺伝子が 2,4-D 自体への走性にも関与することが報告されている (Leveau *et al.*, 1998)。また、*P. putida* PRS2000 株の *pcaK* 遺伝子は 4-ヒドロキシ安息香酸に対する走性に関与する (Nichols & Harwood, 1997)。これらのパーミアーゼは 2,4-D と 4-ヒドロキシ安息香酸の分解に関与する、それぞれの芳香族化合物分解遺伝子クラスター近傍に存在している。ある基質を特異的に透過させる膜輸送体の遺伝子が、同じ物質を分解する遺伝子の近傍に存在することで物質の取り込みや栄養源の感知が促進され、貧栄養条件における生存を有利にするかもしれない。分解プラスミドにコードされたポリン遺伝子が芳香族の取り込みに関与する例が、*m*-キシレン (Kasai *et al.*, 2001), 4-トルエンスルホン酸 (Mampel *et al.*, 2004), ナフタレン (Neher & Lueking, 2009) のポリンについて報告されており、NK8 株の OmpNK8 も同じように、 $\beta$ -ケトアジピン酸や他の安息香酸類分解産物の輸送に寄与すると考えられる。

Table III-1. 供試菌株とプラスミド

菌株／プラスミド	特性	由来
菌株		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	Cloning host	Grant <i>et al.</i> , 1990
S17-1 $\lambda$ pir	Plasmid mobilization strain	Biomedal S. L.
<i>Burkholderia</i> sp.		
NK8	3CB <sup>+</sup> , 3CC <sup>+</sup> , 4CC <sup>+</sup>	Francisco <i>et al.</i> , 2001 *MAFF311271
NK82	A plasmid-deficient strain of NK8; 3CB <sup>-</sup> , 3CC <sup>-</sup> , 4CC <sup>-</sup>	*MAFF 311272
プラスミド		
pKT230	Broad-host-range vector; Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
pSL1	9-kb fragment containing <i>tfdT-CDEF</i> inserted at the <i>Bam</i> HI site of pKT230; Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	Liu <i>et al.</i> , 2001
pOmpNK8	<i>omp</i> <sub>NK8</sub> + predicted promoter region (670 bp upstream ATG) inserted in the <i>Bam</i> HI– <i>Eco</i> RI site of pKT230; Km <sup>r</sup> , Sm <sup>s</sup>	This study

Km<sup>r</sup>, カナマイシン耐性 ; Sm<sup>r</sup>, ストレプトマイシン耐性 ;

Sm<sup>s</sup>, ストレプトマイシン感受性 ; 3CB<sup>+</sup>, 3CB を単一炭素源とする ;

3CC<sup>+</sup>, 3CC を単一炭素源とする ; 4CC<sup>+</sup>, 4CC を単一炭素源とする ;

3CB<sup>-</sup>, 3CB を単一炭素源としない ; 3CC<sup>-</sup>, 3CC を単一炭素源としない ;

4CC<sup>-</sup>, 4CC を単一炭素源としない

\*カルチャーコレクション番号 (農業生物資源ジーンバンク,

<https://www.gene.affrc.go.jp/about-micro.php>)

Table III-2. クローニングと標的配列の検出に用いたプライマー

PCR プライマー	目的	配列 (5' → 3')*
Pro-Ompf	Cloning <i>omp<sub>NK8</sub></i> in pKT230	CGCGGATCCGCAAAGTTGATGTC CTTACTTC
Ompr-His	Cloning <i>omp<sub>NK8</sub></i> in pKT230	CCGGAATTCTTAatgatggtggtgatg GAACAAGTGCCGCAAACC
CpoI_2373f	Detection of 523 bp in <i>omp<sub>NK8</sub></i>	TCGTTCTCGAAAGCGGATTC
24R	Detection of 523 bp in <i>omp<sub>NK8</sub></i>	TAGAGCCTTGCATCGATTCC
NK8-16S-225f	Detection of 16S rRNA gene	TGGGGTAAAGGCCTACCAAG
NK8-16S-433r	Detection of 16S rDNA gene	AGGGCGATGGTTTTCTTTCC

\*実線の下線は *Bam*HI 部位, 点線の下線は *Eco*RI 部位, 小文字で示した塩基配列は His<sub>6</sub>-tag のコードを示す。

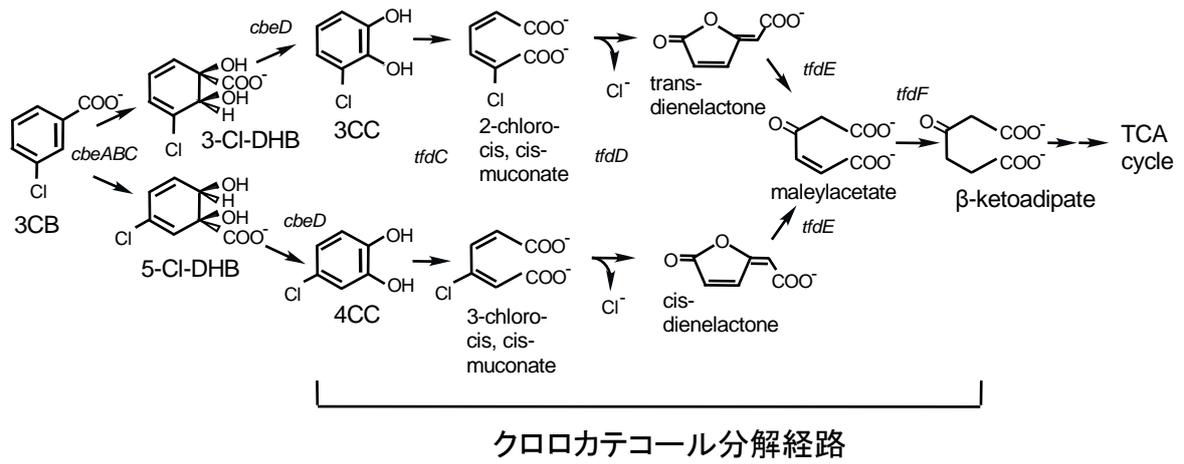


Fig. III-1. *Burkholderia* sp. NK8株の推定3CB分解経路

3-Cl-DHB, 3- chlorodihydroxybenzoate;  
 5-Cl-DHB, 5- chlorodihydroxybenzoate

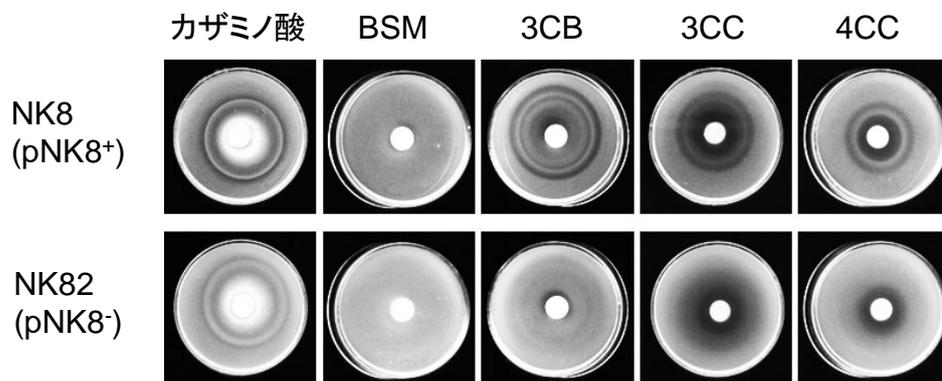


Fig. III-2. スイミングプレート中の走化性反応円の形成

NK8, 野生株 (クロロカテコール分解プラスミドpNK8を持つ) ;  
 NK82, pNK8脱落株

カザミノ酸濃度, 20% ;

BSM, 炭素源を含まない無機塩培地 ;

3CB, 3CC, 4CC濃度, 500 mM ;

軟寒天培地 (0.2% Bacto-agar), 室温, 6時間後に撮影

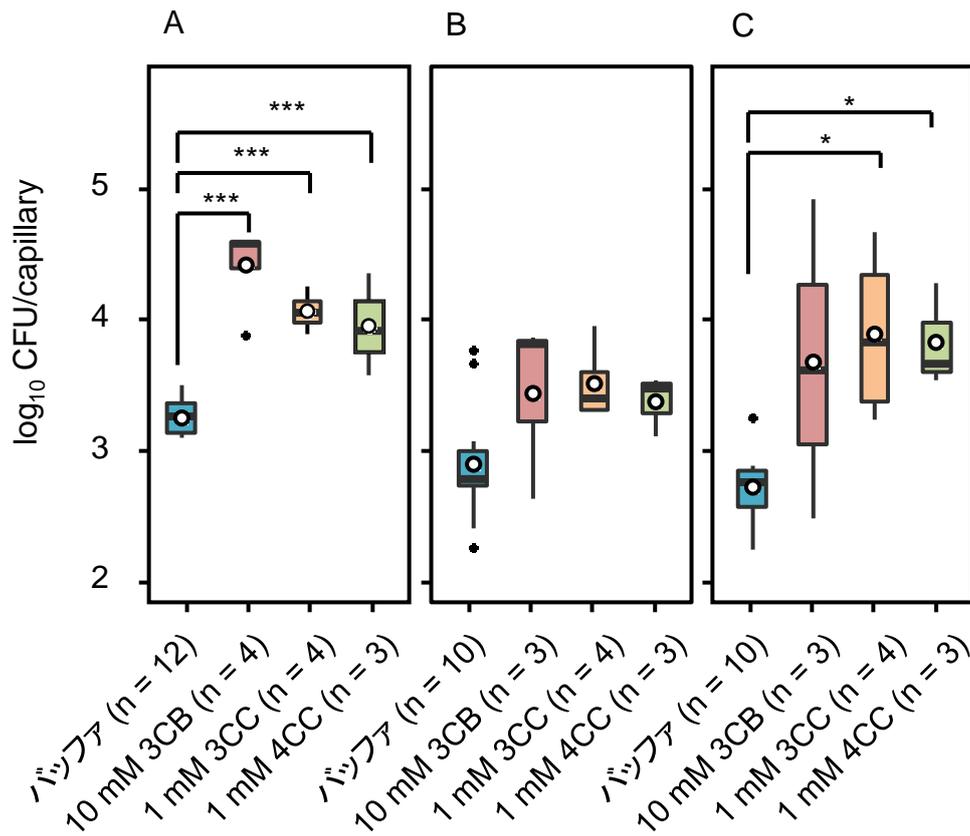


Fig. III-3. 野生株, pNK8脱落株, pSL1導入株の3CBおよびその分解産物に対する走化性応答

(A) NK8

(B) NK82/pKT230

(C) NK82/pSL1

白丸は幾何平均値, 黒丸は外れ値,  
箱の範囲は四分位範囲, 縦棒は最小~最大値,  
箱中の横線は中央値を表す

nは独立実験の回数

Dunnett's test, \* $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$

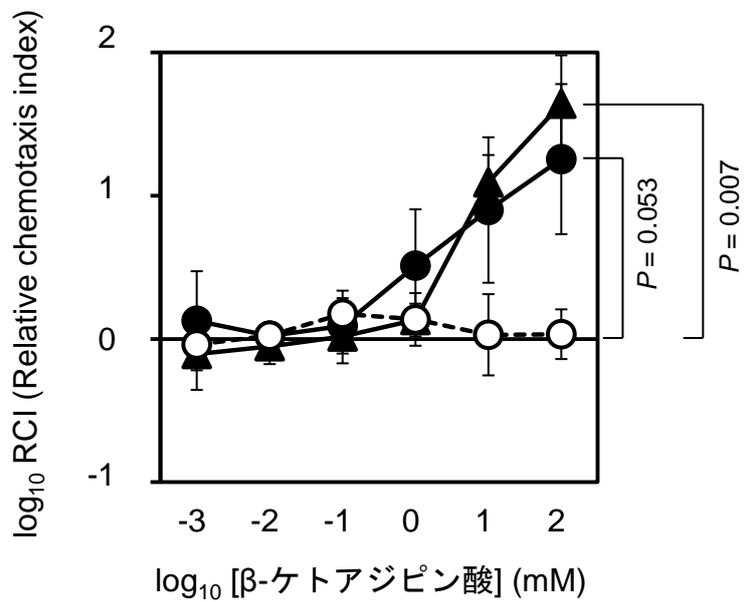


Fig. III-4. 野生株, pNK8脱落株, pSL1導入株の  
β-ケトアジピン酸に対する走化性応答

●はNK8, ○はNK82/pKT230, ▲はNK82/pSL1

プロットは3回の独立実験の幾何平均

エラーバーは標準誤差を表す

P値はStudent's *t*-testによる

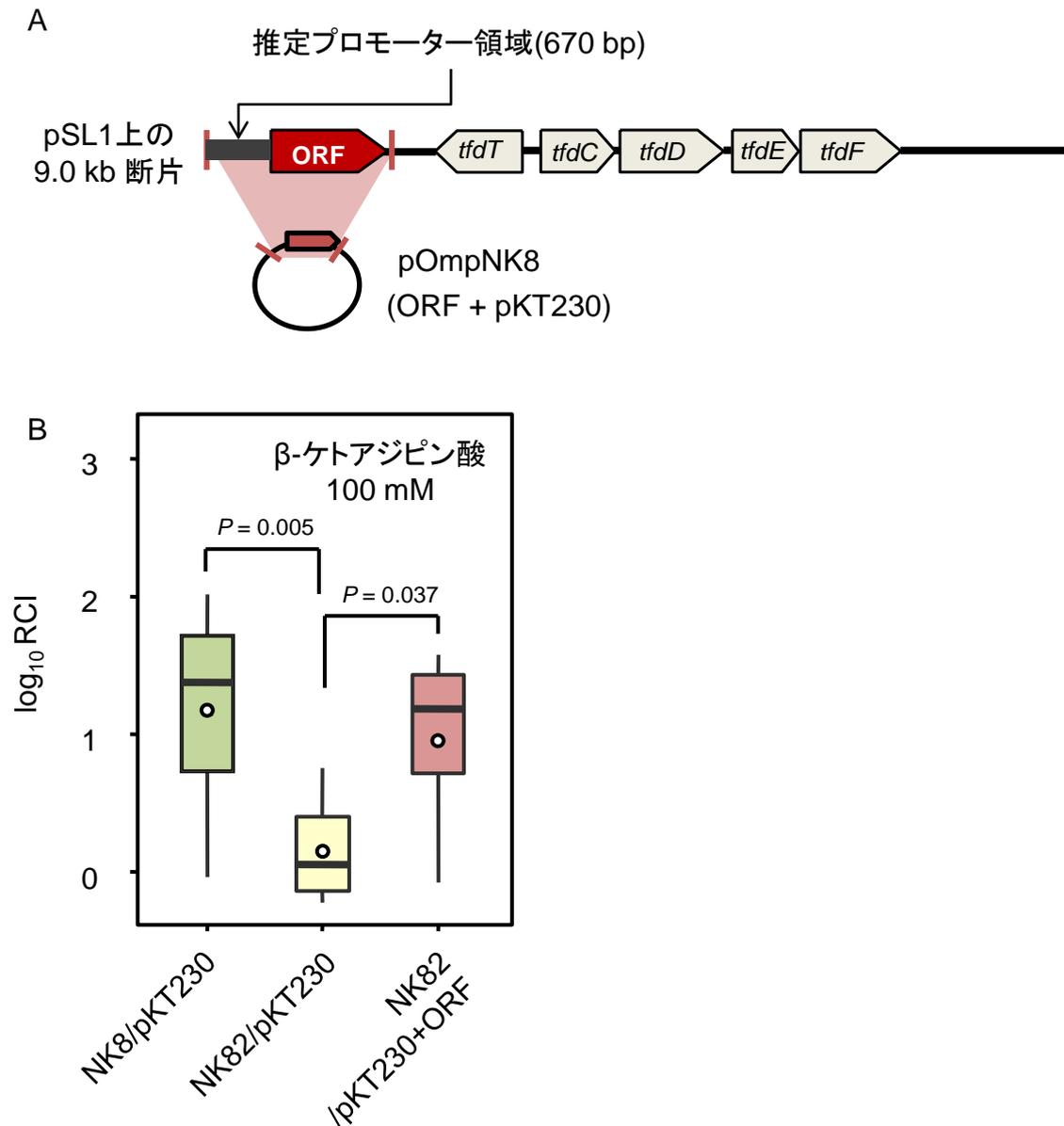


Fig. III-5. 推定ポリン遺伝子 *omp<sub>NK8</sub>* の  $\beta$ -ケトアジピン酸走性への関与

(A) 供試プラスミドにおける *tfdT-CDEF* クラスタを含む9.0-kb領域の構成

(B) *omp<sub>NK8</sub>* の再導入による走性の回復

白丸は幾何平均値，黒丸は外れ値，箱の範囲は四分位範囲，  
縦棒は最小～最大値，箱中の横線は中央値を表す  
キャピラリー内  $\beta$ -ケトアジピン酸濃度は100 mM  
 $P$ 値はStudent's *t*-testによる

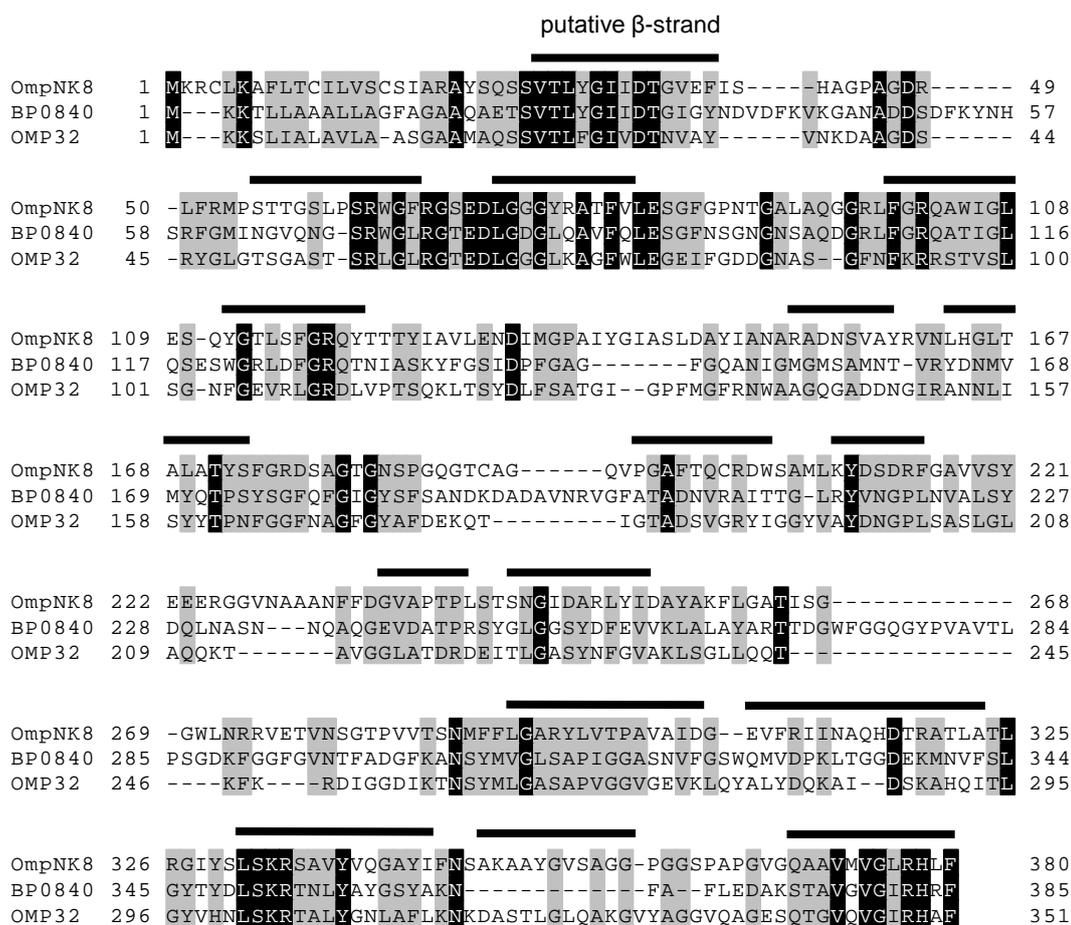


Fig. III-6. Omp<sub>NK8</sub>と既知のポリンのアミノ酸配列比較

BP0804, *B. pertussis* Tohama-1のポリン ;

OMP32, *D. acidovorans*の陰イオン選択性ポリン

黒背景はアミノ酸identity, 灰背景はsimilarityを表す

黒線は*D. acidovorans*のOMP32トポロジーに基づく

推定膜貫通領域 ( $\beta$ -strand) を表す

Sequence alignment, ClustalW algorithm; Protein weight matrices, 'Gonnet';

Gap opening, 10; extension parameters, 0.2

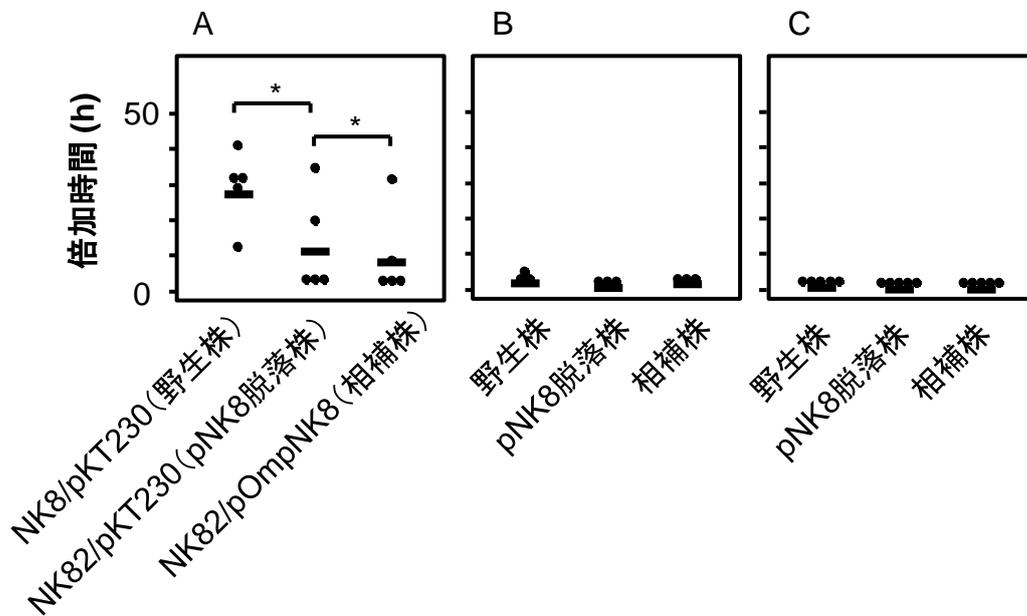


Fig. III-7. 異なる単一炭素源を用いた培養における増殖速度の比較

(A) 0.5 mM  $\beta$ -ケトアジピン酸

(B) 5.0 mM  $\beta$ -ケトアジピン酸

(C) 10 mM コハク酸

各菌株の増殖速度を倍加時間(h)で表す

各プロットは1回の独立実験で得られた値

水平線は幾何平均値を表す

Paired Wilcoxon's signed-rank test, \* $P < 0.05$

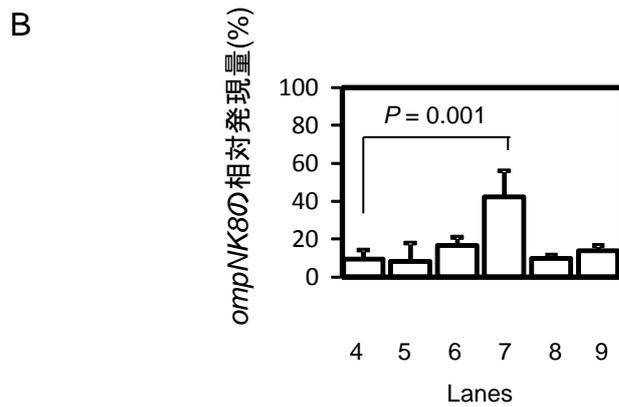
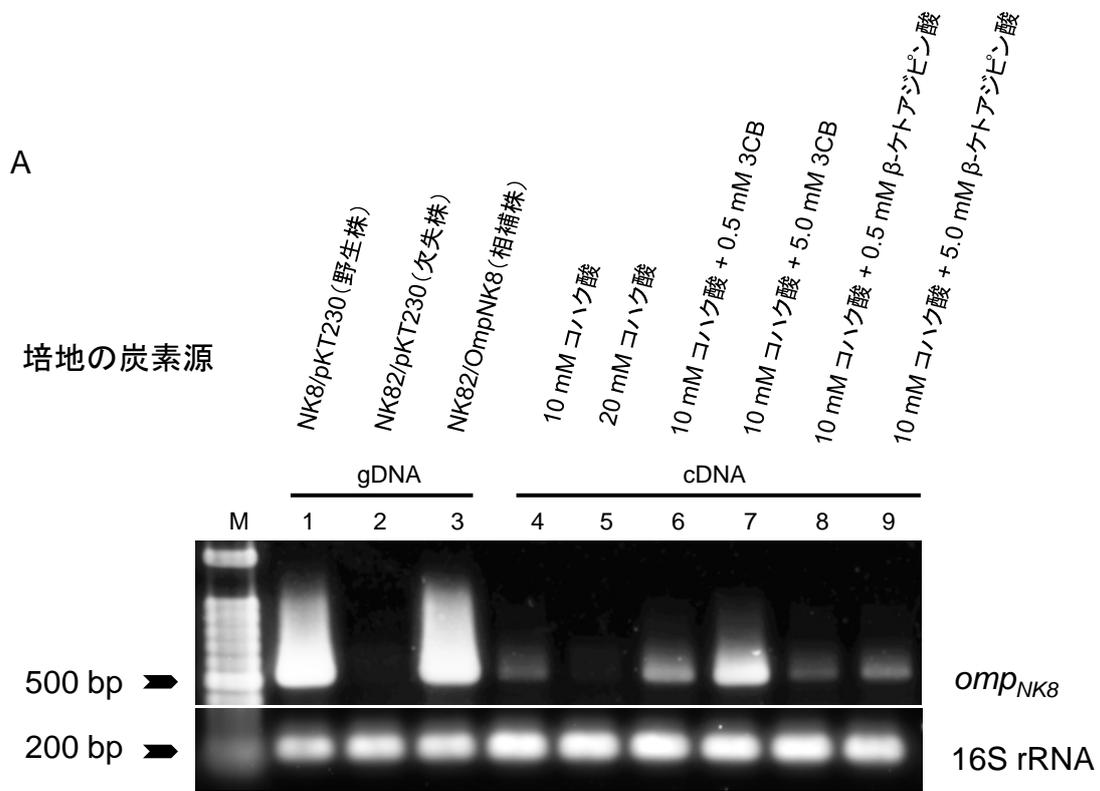


Fig. III-8. 野生株における3CBによる*omp*<sub>NK8</sub> 転写の誘導

(A) RT-PCRの泳動結果

各レーンにおけるPCRテンプレート：

- 1, 野生株NK8/pKT230のゲノムDNA
- 2, 変異株NK82/pKT230のゲノムDNA
- 3, 相補株NK82/pOmpNK8のゲノムDNA
- 4-9, 各単一炭素源で培養した野生株NK8/pKT230由来のcDNA

(B) *omp*<sub>NK8</sub> の相対発現量(%)

3回独立実験の平均値, エラーバーは標準偏差

*P*値はDunnnett's testによる

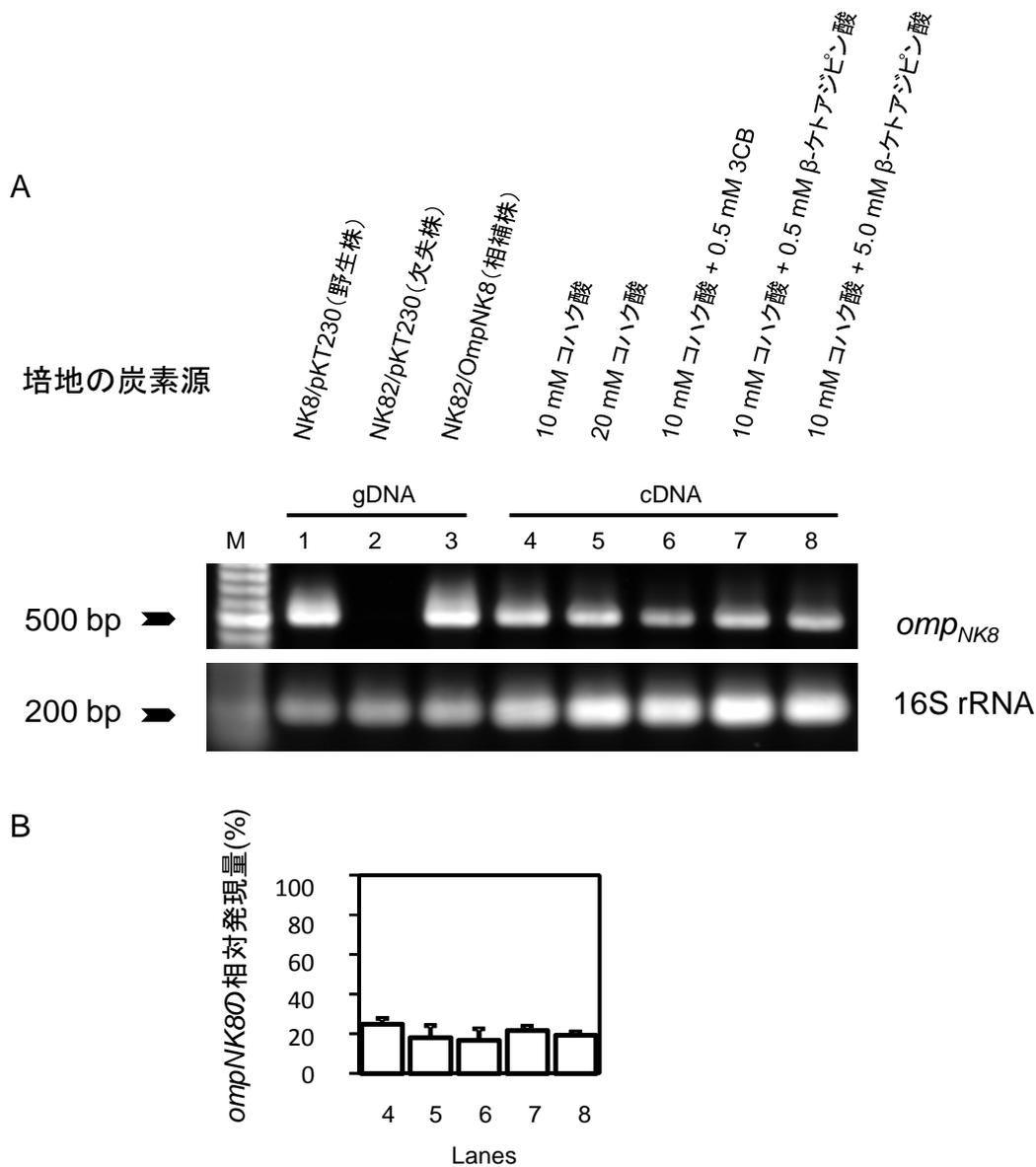


Fig. III-9. 相補株における*omp*<sub>NK8</sub> 転写制御の消失

(A) RT-PCRの泳動結果

各レーンにおけるPCRテンプレート：

- 1, 野生株NK8/pKT230のゲノムDNA
- 2, 変異株NK82/pKT230のゲノムDNA
- 3, 相補株NK82/pOmpNK8のゲノムDNA
- 4-8, 各単一炭素源で培養した野生株NK8/pKT230由来のcDNA

(B) *omp*<sub>NK8</sub> の相対発現量(%)

3回独立実験の平均値, エラーバーは標準偏差

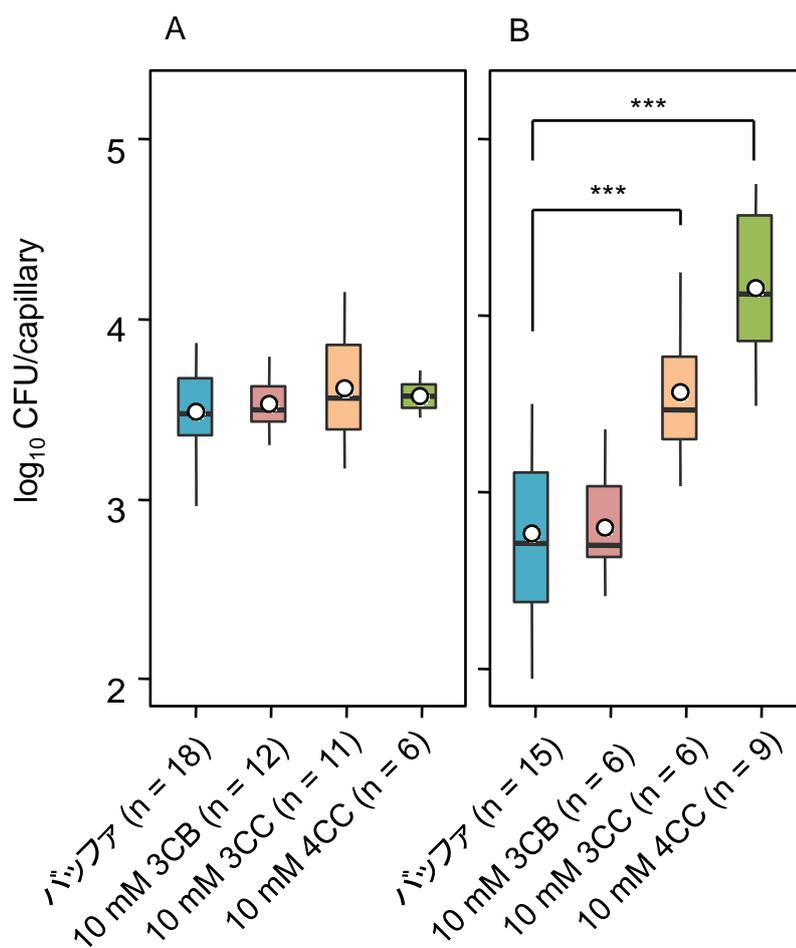


Fig. III-10. NK82株における3CB培養によるクロロカテコール走化性の誘導

(A) 10 mM コハク酸を基質として培養

(B) 5 mM コハク酸+2.5 mM 3CBを基質として培養

注) 誘導による応答の差を明瞭にするため、  
比較的走化性応答の弱い対数増殖期初期の細胞を使用した。

nは独立実験の回数

Dunnett's test, \*\*\* $P < 0.001$

## 第 IV 章 総合考察

細菌の行動は物質の取り込みや代謝，細胞内外のストレスなどによって大きな影響を受ける。細菌の走化性を人為的に制御するためには，誘引物質と走化性受容体という 1:1 の関係だけではなく，その間に干渉するさまざまな細胞機能に対する広い知識が必要となる。

本研究は，コレラ菌において PAS-like ドメインを 1 つしかもたないタイプの MLP である Mlp2, Mlp3 がアミノ酸への走化性応答を媒介することを明らかにした。また，このタイプの MLP が推定アミノ酸結合タンパク質と共発現する条件でさらに強いアミノ酸への誘引応答を引き起こすことを示した。PAS-like ドメインを 1 つしかもたない Mlp2, Mlp3 のようなタイプの MLP がどのような機構によって誘引物質を感知し，走化性応答を媒介しているかについては他の報告例がまだない。一方，PAS-like ドメインを 2 つもつタイプについてこれまで調べられた限りでは，内膜から遠い側のドメインのみがリガンド結合に関わる。したがって，両タイプを比較解析することは MLP によるシグナル伝達の機構を知る上で有用と考えられる。さらに，同じアミノ酸走性に関わる両タイプの MLPs が，どのように使い分けられているのか，その生理学的・生態学的意義についても興味のもたれるところである。MLP のペリプラズム領域の多様性は非常に高く，今まで知られていないような機構で細胞機能に関わる MLP が手つかずのまま残されている可能性は高い。

さらに本研究では，*Burkholderia* sp. NK8 株の  $\beta$ -ケトアジピン酸走性に対する推定ポリン遺伝子の関与を明らかにした。これまでも  $\beta$ -ケトアジピン酸の膜透過関連因子が土壌細菌の走化性に関与するという報告は存在したが (Karimian & Ornston, 1981)，その正体は内膜トランスポーターとして予想されて

おり、今回のように外膜ポリンの関与が明らかになったのは初めての報告である。なお、クロロ安息香酸を感知する真の走化性受容体の存在は未だに不明である。今後、NK8 株の全ゲノム解析を行うことができれば、クロロ安息香酸とその分解産物に対する走化性応答の複雑さを解明するための強力なツールとなるであろう。

以上で明らかのように、環境中における細菌の走化性応答の解明と制御を目指すためには、走化性センサーだけでなく、基質結合タンパク質や ABC トランスポーター、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が重要である。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期待される。

## 第 V 章 結論

本研究は、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。本研究で得られた主たる結論は、以下の 4 点である。

- (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、その分解産物である 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。
- (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。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたって、広島大学の加藤純一先生には芳香族化合物に対する細菌の走化性応答の検出手法に関して手厚いご指導をいただきました。また、静岡大学の小川直人先生におかれましては、(独)農業環境技術研究所にお勤めの当時から、菌株やプラスミドのご分譲をいただき、また大学院への進学相談にも快く応じてくださいました。さらに、法政大学 蛋白質科学研究室の常重アントニオ先生におかれましては、ITC 解析機器の利用にご協力をいただきました。ここに感謝の念を表します。

指導教授の川岸郁朗先生、そして西山宗一郎博士をはじめとする法政大学細胞機能学研究室のスタッフ及び学生メンバーの皆さまには、私が走化性応答の定量法に行き詰まりべん毛研究会に単身参加した頃から現在に至るまでの長きにわたって、たいへんお世話になりました。大学という異なる場所での研究の進め方、グループ討論の方法を学ぶことで多くの経験を得ることができました。特に、コレラ菌の新規走性トランスデューサーと介在タンパク質について、共に探索を進めて下さった川口徹也氏には、ここに改めて感謝を捧げます。未熟な研究者ではございますが、受入れて下さった川岸先生とスタッフの皆さまに感謝の言葉は尽きません。皆さまとよりよい交流が続くことを楽しみに研究を続けてまいります。今後とも、なにとぞ宜しくお願い申し上げます。

細菌の走化性という、興味深い一方で農業研究としては出口の見えづらい課題について、常にアイデアとアドバイスを下さり応援して下さった農環研の藤井毅領域長と北本宏子 RP リーダーに、そして度々統計解析手法について相談に伺う私の疑問に快く答えて下さった三輪哲久博士と大東健太郎氏に、また、優れた手業と緻密な仕事で実験をサポートして下さった山崎祥子氏に、さらに、大学への通学を許可し、学びの機会を与えて下さった農環研に、また、その他有形無形のご支援を賜った全ての方々に、この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

## 参考文献

- Abouhamad WN, Manson M, Gibson MM, Higgins CF (1991) Peptide-transport and chemotaxis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* - Characterization of the dipeptide permease (Dpp) and the dipeptide-binding protein. *Mol Microbiol* **5**: 1035-1047
- Adler J (1966) Chemotaxis in bacteria. *Science* **153**: 708-716
- Adler J, Hazelbauer GL, Dahl MM (1973) Chemotaxis toward sugars in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **115**: 824-847
- Alexander RP, Zhulin IB (2007) Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2885-2890
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Aravind L, Ponting CP (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* **176**: 111-116
- Armstrong SK, Parr TR, Jr., Parker CD, Hancock RE (1986) *Bordetella pertussis* major outer membrane porin protein forms small, anion-selective channels in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* **166**: 212-216
- Bagdasarian M, Lurz R, Ruckert B, Franklin FC, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247
- Bartolomé B, Jubete Y, Martinez E, Delacruz F (1991) Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**: 75-78

Chun J, Grim CJ, Hasan NA, Lee JH, Choi SY, Haley BJ, Taviani E, Jeon YS, Kim DW, Lee JH, Brettin TS, Bruce DC, Challacombe JF, Detter JC, Han CS, Munk AC, Chertkov O, Meincke L, Saunders E, Walters RA, Huq A, Nair GB, Colwell RR (2009) Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15442-15447

Davidson AL, Shuman HA, Nikaido H (1992) Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2360-2364

Dunnett CW (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc* **50**: 1096-1121

Dunnett CW (1964) New tables for multiple comparisons with control. *Biometrics* **20**: 482-491

Eisenbach M, Lengeler JW, Varon M, Gutnick D, Meili R, Firtel RA, Segall JE, Omann GM, Tamada A, Murakami F (2004) Bacterial chemotaxis. In *Chemotaxis*, Eisenbach M (ed), 3. Bacterial chemotaxis, pp 53-215. London: Imperial College Press

Falke JJ, Hazelbauer GL (2001) Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci* **26**: 257-265

Francisco P, Jr., Ogawa N, Suzuki K, Miyashita K (2001) The chlorobenzoate dioxygenase genes of *Burkholderia* sp. strain NK8 involved in the catabolism of chlorobenzoates. *Microbiology* **147**: 121-133

Gerblrieger S, Engelhardt H, Peters J, Kehl M, Lottspeich F, Baumeister W (1992) Topology of the anion-selective porin Omp32 from *Comamonas acidovorans*. *J Struct Biol* **108**: 14-24

Gomi M, Sonoyama M, Mitaku S (2004) High performance system for signal peptide prediction: SOSUisignal. *Chem-Bio Informatics Journal* **4**: 142-147

Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649

Grimm AC, Harwood CS (1997) Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4111-4115

Grimm AC, Harwood CS (1999) NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *J Bacteriol* **181**: 3310-3316

Gromiha MM, Suwa M (2005) A simple statistical method for discriminating outer membrane proteins with better accuracy. *Bioinformatics* **21**: 961-968

Hazelbauer GL (1975) Maltose chemoreceptor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **122**: 206-214

Hazelbauer GL, Falke JJ, Parkinson JS (2008) Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci* **33**: 9-19

Hyakutake A, Homma M, Austin MJ, Boin MA, Hase CC, Kawagishi I (2005) Only one of the five CheY homologs in *Vibrio cholerae* directly switches flagellar rotation. *J Bacteriol* **187**: 8403-8410

Ingham C, Buechner M, Adler J (1990) Effect of outer membrane permeability on chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 3577-3583

Itoh Y (2005) Characterization of amino acid chemotaxis of *Vibrio cholerae* and identification of the relevant chemoreceptors. M.Sc. Thesis, Graduate School of Science, Nagoya University

Iwaki H, Muraki T, Ishihara S, Hasegawa Y, Rankin KN, Sulea T, Boyd J, Lau PCK (2007) Characterization of a pseudomonad 2-nitrobenzoate nitroreductase and its catabolic pathway-associated 2-hydroxylaminobenzoate mutase and a chemoreceptor involved in 2-nitrobenzoate chemotaxis. *J Bacteriol* **189**: 3502-3514

- Kahng HY, Byrne AM, Olsen RH, Kukor JJ (2000) Characterization and role of *tbuX* in utilization of toluene by *Ralstonia pickettii* PKO1. *J Bacteriol* **182**: 1232-1242
- Kan B, Habibi H, Schmid M, Liang W, Wang R, Wang D, Jungblut PR (2004) Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Proteomics* **4**: 3061-3067
- Karimian M, Ornston LN (1981) Participation of the beta-ketoadipate transport system in chemotaxis. *J Gen Microbiol* **124**: 25-28
- Kojima S, Yamamoto K, Kawagishi I, Homma M (1999) The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na<sup>+</sup> motive force. *J Bacteriol* **181**: 1927-1930
- Kossmann M, Wolff C, Manson MD (1988) Maltose chemoreceptor of *Escherichia coli*: interaction of maltose-binding protein and the Tar signal transducer. *J Bacteriol* **170**: 4516-4521
- Lacal J, Garcia-Fontana C, Munoz-Martinez F, Ramos JL, Krell T (2010) Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions. *Environ Microbiol* **12**: 2873-2884
- Lacal J, Munoz-Martinez F, Reyes-Darias JA, Duque E, Matilla M, Segura A, Ortega-Calvo JJ, Jimenez-Sanchez C, Krell T, Ramos JL (2011) Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **13**: 1733-1744
- Larsen SH, Adler J, Gargus JJ, Hogg RW (1974) Chemomechanical coupling without ATP : source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1239-1243
- Law AM, Aitken MD (2003) Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5968-5973
- Lee SH, Butler SM, Camilli A (2001) Selection for *in vivo* regulators of bacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6889-6894

- Lennox ES (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage-P1. *Virology* **1**: 190-206
- Leungsakul T, Keenan BG, Smets BF, Wood TK (2005) TNT and nitroaromatic compounds are chemoattractants for *Burkholderia cepacia* R34 and *Burkholderia* sp. strain DNT. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 321-325
- Leveau JH, Zehnder AJ, van der Meer JR (1998) The *tfdK* gene product facilitates uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *J Bacteriol* **180**: 2237-2243
- Liu S, Ogawa N, Miyashita K (2001) The chlorocatechol degradative genes, *tfdT-CDEF*, of *Burkholderia* sp. strain NK8 are involved in chlorobenzoate degradation and induced by chlorobenzoates and chlorocatechols. *Gene* **268**: 207-214
- Manson MD, Kossmann M (1986) Mutations in tar suppress defects in maltose chemotaxis caused by specific *malE* mutations. *J Bacteriol* **165**: 34-40
- Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GD, Harford N, Groyne F, de Wilde M (1983) Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* **306**: 551-557
- Melton T, Hartman PE, Stratis JP, Lee TL, Davis AT (1978) Chemotaxis of *Salmonella typhimurium* to amino acids and some sugars. *J Bacteriol* **133**: 708-716
- Milburn MV, Prive GG, Milligan DL, Scott WG, Yeh J, Jancarik J, Koshland DE, Jr., Kim SH (1991) Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science* **254**: 1342-1347
- Miller VL, Mekalanos JJ (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations : osmoregulation of outer-membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**: 2575-2583
- Moorthy S, Watnick PI (2005) Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol* **57**: 1623-1635

Nichols NN, Harwood CS (1997) PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **179**: 5056-5061

Nishiyama S-i, Suzuki D, Itoh Y, Suzuki K, Tajima H, Hyakutake A, Homma M, Butler-Wu SM, Camilli A, Kawagishi I (2012) Mlp24 (McpX) of *Vibrio cholerae* implicated in pathogenicity functions as a chemoreceptor for multiple amino acids. *Infect Immun* **80**: 3170-3178

Ogawa N, Miyashita K (1995) Recombination of a 3-chlorobenzoate catabolic plasmid from *Alcaligenes eutrophus* NH9 mediated by direct repeat elements. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3788-3795

Ondrako JM, Ornston LN (1980) Biological distribution and physiological role of the beta-ketoadipate transport system. *J Gen Microbiol* **120**: 199-209

Onogi S (2015) Temperature control of chemoreceptor gene expression via pathogenicity-regulated transcription factor in *Vibrio cholerae*. M.Sc. Thesis, Graduate School of Science and Engineering, Hosei University

Pérez-Pantoja D, Donoso R, Agulló L, Córdova M, Seeger M, Pieper DH, González B (2012) Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environ Microbiol* **14**: 1091-1117

Pandey G, Jain RK (2002) Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: Role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5789-5795

Perkins EJ, Gordon MP, Caceres O, Lurquin PF (1990) Organization and sequence-analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J Bacteriol* **172**: 2351-2359

R Core Team. (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

R Development Core Team. (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rabinovitch-Deere CA, Parales RE (2012) Three types of taxis used in the response of *Acidovorax* sp. strain JS42 to 2-nitrotoluene. *Appl Environ Microbiol* **78**: 2306-2315

Saier JMH (2000) Families of proteins forming transmembrane channels. *Journal of Membrane Biology* **175**: 165-180

Schaffer AA, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, Koonin EV, Altschul SF (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* **29**: 2994-3005

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* **9**: 671-675

Shiomi D, Homma M, Kawagishi I (2002) Intragenic suppressors of a mutation in the aspartate chemoreceptor gene that abolishes binding of the receptor to methyltransferase. *Microbiology* **148**: 3265-3275

Tajima H, Imada K, Sakuma M, Hattori F, Nara T, Kamo N, Homma M, Kawagishi I (2011) Ligand specificity determined by differentially arranged common ligand-binding residues in bacterial amino acid chemoreceptors Tsr and Tar. *J Biol Chem* **286**: 42200-42210

Tsirigos KD, Bagos PG, Hamodrakas SJ (2011) OMPdb: a database of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins from Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* **39**: 324-331

Tso WW, Adler J (1974) Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **118**: 560-576

Unterman R (1996) A history of PCB biodegradation. In *Bioremediation: Principles and Applications*, Crawford RL, Crawford DL (eds), 7, pp 209-253. Cambridge: Cambridge University Press

Vangnai AS, Takeuchi K, Oku S, Kataoka N, Nitisakulkan T, Tajima T, Kato J (2013) Identification of CtpL as a chromosomally encoded chemoreceptor for 4-chloroaniline and catechol in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **79**: 7241-7248

Wang Y, Rawlings M, Gibson DT, Labbe D, Bergeron H, Brousseau R, Lau PC (1995) Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol Gen Genet* **246**: 570-579

Wolfe AJ, Berg HC (1989) Migration of bacteria in semisolid agar. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6973-6977

Zimmermann W (1990) Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology* **13**: 119-130

## 成果の公表

本学位論文における第 I 章の内容の一部は、以下の総説として出版されている。

山元季実子, 西山宗一郎, 川岸郁朗. (2013). 細菌の走化性とその調節の分子機構. *化学療法の領域* **29**: 91-99.

本学位論文における第 III 章の内容は、以下の原著論文として出版されている。

**Yamamoto-Tamura K, Kawagishi I, Ogawa N, Fujii T. (2015).** A putative porin gene of *Burkholderia* sp. NK8 involved in chemotaxis toward  $\beta$ -keto adipate.

*Biosci Biotech Biochem* DOI: 10.1080/09168451.2015.1006571 (Published online: 4 Feb 2015)