

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

(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)

56

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

8

(発行年 / Year)

2015-03-24

細菌走化性に関わる膜透過系因子の役割

INVOLVEMENT OF MEMBRANE TRANSPORTER COMPONENTS IN BACTERIAL CHEMOTAXIS

山元季実子

Kimiko YAMAMOTO

指導教員 川岸郁朗

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻博士後期課程

Bacterial chemotaxis has been recognized as one of the key properties in pathogenicity and bioremediation. Here I studied on roles of membrane transporter components in chemotaxis of two species, the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae* (classical biotype) strain O395N1 and the pollutant-degrading soil bacterium *Burkholderia* sp. NK8. First, I found that two *V. cholerae* proteins, Mlp2 and Mlp3, with similarities to the major amino acid chemoreceptors, mediate responses to L-serine and amino acids with small R groups, respectively. Mlp3 did not bind L-serine but co-expression of a putative serine-binding protein (named SatA) with Mlp3 increased responses to L-serine, suggesting that SatA is a primary receptor and Mlp3 is a transducer to mediate serine response. Second, I found that 3-chlorobenzoate (3CB)-degrading *Burkholderia* sp. NK8 is attracted to 3CB and its degradation products, 3- and 4-chlorocatechol (3CC, and 4CC), and β -ketoadipate. These tactic abilities were abolished by curing of the megaplasmid pNK8. Taxis to β -ketoadipate was complemented by the introduction of a putative outer membrane porin gene *omp_{NK8}* found in pNK8, suggesting that the porin facilitates chemotaxis to β -ketoadipate.

Key Words: chemotaxis, porin, transducer, transporter

1. 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、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。

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。

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。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取得したりするために役立つと考えられている。ナフトレン分解細菌 *Pseudomonas putida* G7 株では、この菌の走化性がナフト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[1]。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。

細菌は、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る。多くの細菌では、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、つねにランダムに切り替わっている。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。

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。MCP に誘引物質が結合すると、ヒスチジinkinase CheA の活性が阻害さ

れ、これによってレスポンスレギュレータ CheY のリン酸化が進まないために、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、レスポンスレギュレータ 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。

その他の代表的な Che タンパク質群の機能として、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 が再び CheA からのリン酸基を受け取れるようにしている。また、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。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。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 タンパク質が関わりとされている。

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。本研究では、病原細菌や汚染物質分解細菌の化学物質認識機構の解明を目指し、病原菌であるコレラ菌 *Vibrio cholerae* classical biotype O395N1 株、汚染物質分解細菌である *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。

2. *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) 導入

大腸菌、サルモネラ属細菌などの腸内細菌は、アミノ酸[2, 3]、糖類[3, 4]、ジペプチド[5]などの走化性誘引物質を MCP によって感知している[6]。MCP の 1 次構造は、アミノ基末端、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, adenyl cyclases, methyl-accepting proteins and phosphatases)ドメイン[7]、キナーゼコントロールモジュールによって構成される。キナーゼコントロールモジュールと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。この部位の配列類似性から発見された MCP 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持たないもの、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、MCP 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 MCP ホモログである酸化還元走性受容体 1 種）である。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一般にさらに多くの MLP をもつことが明らかになっている。とくに、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であるにもかかわらず、44~45 種という多数の MLP をコードしている（表 1）。

表 1 細菌における MLP 数の例

グループ	種/菌株	MLP 数	ゲノムサイズ (MB)
大腸菌	<i>Escherichia coli</i> K12	5	4.0~4.7
コレラ菌	<i>Vibrio cholerae</i> O1		
	classical biotype O395	44	4.1
	El Tor biotype N16961	45	4.0
海洋細菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	25	5.2
	ATCC 17749		
芳香族化合物分解細菌	<i>Burkholderia</i> sp. Y123	15	8.9
	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	27	6.2

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ものは全体の 1.7%に過ぎない。また、推定リガンド結合領域の 88.7%はアノテートされておらず、その機能もほとんどわかっていない[8]。MLP の中でも、誘引物質と直接結合してシグナルを伝えるタイプのものを「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（図 1）。

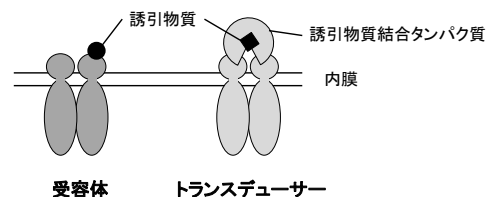


図 1 走性受容体とトランスデューサー

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[9]、アミノ酸走性受容体 Mlp24 が関与するという報告[10]がある。これに関連して、当・細胞機能学研究室では、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[11]、Mlp37 を同定している。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 (Δ mlp24 Δ 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。

当研究室におけるこれまでの研究から、Mlp2 がセリン走化性に関与する可能性が示されている (Ito, 2005 年度修士論文)。Mlp2 のホモログである *V. parahaemolyticus* の Mlp1 (PDB ID: 2QHK) の構造から、Mlp24, Mlp37 (PDB ID: 3C8C) のペリプラズム領域が 2 個の PAS-like ドメインをもつものに対して、Mlp2 のペリプラズム領域は比較的短く、PAS-like ドメインも 1 個と推定されている (図 2)。

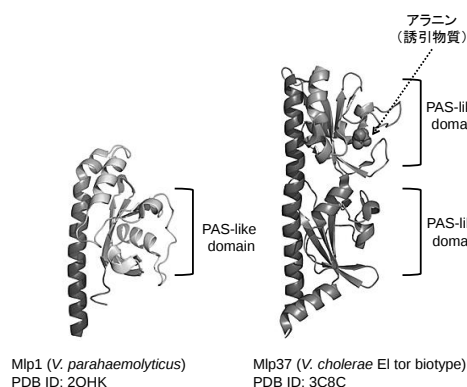


図 2 *Vibrio* 属菌における PAS-like ドメインをもつ MLP ペリプラズム領域の結晶構造

Mlp2 のように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、これらの PAS-like ドメインにも誘引物質のアミノ酸が結合するのではないかと考えた。そこで、Mlp2 ホモログの中でサブクローニング後にタンパク質の発現が確認できた Mlp2, Mlp3, Mlp26 の 3 種について、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。

(2) 実験方法

a) 菌株およびプラスミド

供試菌株およびプラスミドを表 2、3 に示した。

表 2 供試菌株一覧

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 α	cloning host	[12]
<i>V. cholerae</i> O1 classical biotype	HCB436	$\Delta MCP \Delta cheRB$	[13]
	O395N1	$\Delta ctxAB$, wild type for chemotaxis	[14]
	Vmlp201	O395N1 $\Delta mlp24 \Delta mlp37$	[11]

表 3 供試プラスミド一覧

プラスミド名	特性	由来
pAH901	Expression vector, pTWV228 (Takara Bio.) + FLAG; Ap ^r	[11]
pMlp24	pAH901 + <i>mlp24</i>	[11]
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 ^r	Takara Bio.
pMM32	pUC18 + <i>cheR2</i> of <i>V. cholerae</i>	Kawagishi Lab.
pGEX-6P-2	GST-fusion vector; Ap ^r	GE Healthcare

プラスミド名	特性	由来
pGEX-Mlp24p	pGEX-6P-2 + periplasmic region of <i>mlp24</i>	[11]
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 p0202	Expression vector; Cm ^r pSU18 + VC0395_0202	[15] This study
pA0975(= pSatA)	pSU18 + VC0395_A0975	This study
pA1454	pSU18 + VC0395_A1454	This study

Ap^r アンピシリン耐性、Cm^r クロラムフェニコール耐性

アミノ酸との結合試験に用いるため、Tajima らの方法 [16] に従って、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) と Mlp2, Mlp3 の TM1~TM2 に挟まれた領域 (ペリプラズムフラグメント) 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。

b) キャピラリー・アッセイ

走化性応答の定量は、Nishiyama らのキャピラリー・アッセイ [11] 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調べた。具体的には、2 μ 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、これを菌懸濁液 (OD₆₀₀ = 0.1) に浸して一定時間後に、キャピラリーの内部に入り込んだ菌の数を平板培地に形成されたコロニー数から算出した。

c) 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。

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 OD₆₀₀ = 0.5 に調整し、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 μ l、2-メルカプトエタノール 10 μ l、滅菌蒸留水 90 μ l を加え、100°C で 5 分間ボイルして氷上に静置した。

d) 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 らの

方法[16]を参考にした。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。

e) 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。

f) ウエスタンブロッティング

全菌体サンプルを 15%アクリルアミドゲルに 5~15 μ l アプライし、SDS-PAGE (300 V, 20 mA, 100~150 分間)を行った。この泳動ゲルからタンパク質を PDVF 膜に転写(300 V, 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。

g) 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)を用いて行った。データ解析には Origin-ITC (MicroCal Inc.)を用いた。

(3) 結果および考察

a) 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 (図 3)。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、これ以降解析を行わなかった。

b) メチル化アッセイの結果

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 (図 4)。その結果、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、複数のバンドが検出された。

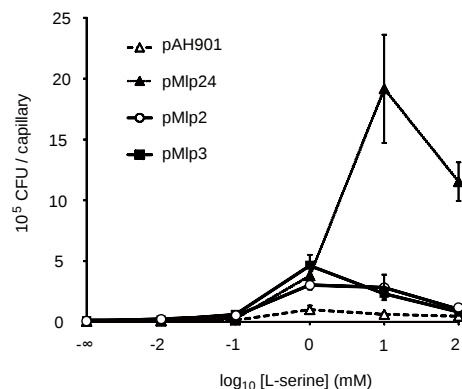


図 3 Mlp2 または Mlp3 を過剰発現させたコレラ菌 Vmlp201 株 ($\Delta mlp24 \Delta mlp37$) のセリン走性応答。

エラーバーは標準誤差 ($n = 3$)。

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 CheR によるメチル化によることが強く示唆された。したがって、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、などの対策が必要と考えている。

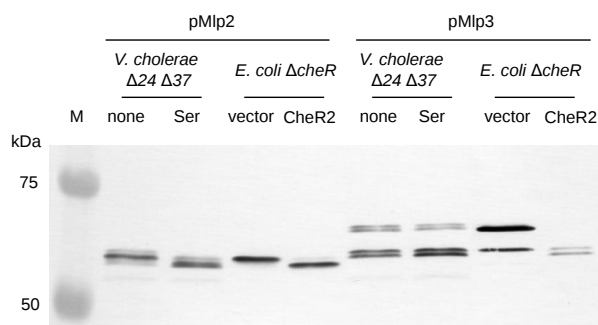


図 4 セリンによる MLP メチル化レベルの亢進

c) 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、他のすべ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 (図 5)。Mlp3 過剰発現株が誘引されたアミノ酸は、側鎖 R が比較的小さいグループであった。今回の実験条件では、すでに同定されたアミノ酸受容体である Mlp24, Mlp37 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小さい範囲のアミノ酸に限

られることがわかった。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[11]に対して、Mlp2, Mlp3 過剰発現株は共に全く誘引されなかった。

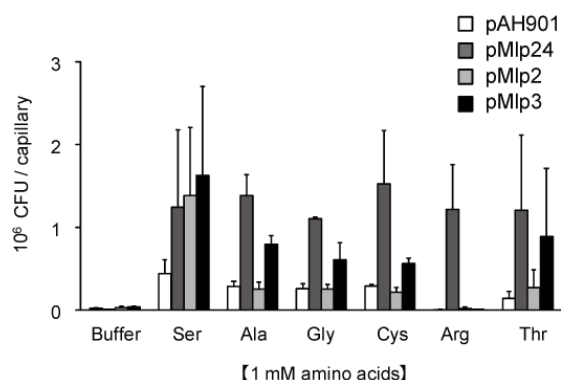


図5 Mlp2 または Mlp3 を過剰発現させたコレラ菌 Vmlp201 株の各種アミノ酸に対する走性応答
エラーバーは標準誤差 ($n=3$)。

d) 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(図6)。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(data not shown)。

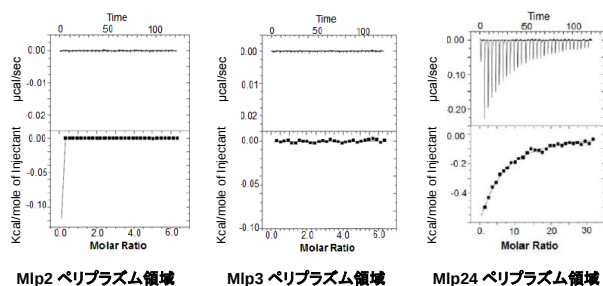


図6 ITC による MLP ペリプラズム領域とセリンの結合解析

e) 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しないことを示唆する結果から、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。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 periplasmic amino acid-binding protein 遺伝子としてアノテートされていた 5 種の配列のうち、VC0395_0202,

VC0395_A0975, VC0395_A1454 の 3 種についてプラスミド pSU18 へのクローニングを行った。これらの遺伝子の近傍には、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膜貫通ドメインおよび細胞質 ATP 結合ドメインをそれぞれ別々のポリペプチドとしてコードすると考えられる遺伝子が存在していた。

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(data not shown)。

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確かめた。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(図7)。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。

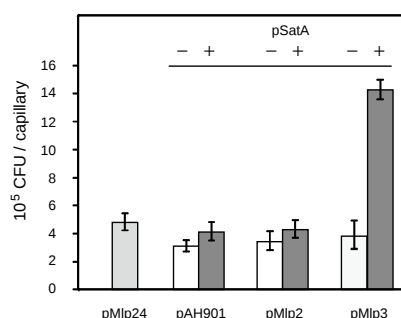


図7 コレラ菌 Vmlp201 株のセリン誘引応答に対する SatA・MLP を共発現させた影響
キャピラリー内セリン濃度は 10 mM。
エラーバーは標準誤差 ($n=2\sim6$)。

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[17]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[18]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、セリン輸送に参与する 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 2 種類の環境を行き来する複雑な生活環を持つ。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知れない。また、さまざまな MLP の機能を適切に使分けするために、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あらためて強調したい。

3. クロロ安息香酸分解菌 *Burkholderia* sp. NK8 株の 3CB 分解産物に対する走性に関する推定ポリン遺伝子

(1) 導入

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[19]。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持ち、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 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 β-ケトアジピン酸まで分解される (図 8)。

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を調べることにした。

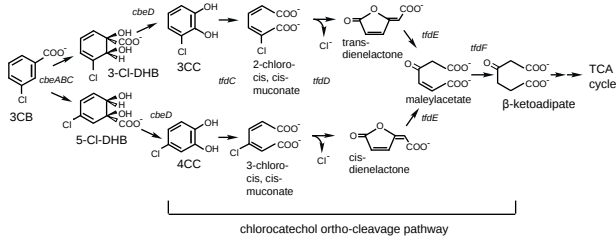


図 8 *Burkholderia* sp. NK8 株による 3CB 推定分解経路 3-Cl-DHB, 3-chlorodihydrodihydroxybenzoate; 5-Cl-DHB, 5-chlorodihydrodihydroxybenzoate.

(2) 実験方法

a) 菌株およびプラスミド

実験に用いた菌株とプラスミドは表 4 に示した。

表 4 供試菌株およびプラスミド一覧

菌株/プラスミド	特性	由来
菌株		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Cloning host	[12]
S17-1 λpir	Plasmid mobilization strain	Biomedical S. L.
<i>Burkholderia</i> sp.		
NK8	3CB ⁺ , 3CC ⁺ , 4CC ⁺	[20], MAFF311271
NK82	A plasmid-deficient strain of NK8; 3CB ⁺ , 3CC ⁺ , 4CC ⁺	MAFF 311272
プラスミド		
pKT230	Broad-host-range vector; Km ^R , Sm ^R	[21]
pSL1	9-kb fragment containing <i>tfdT-CDEF</i> inserted at the <i>Bam</i> HI site of pKT230; Km ^R , Sm ^R	[22]
pOmpNK8	<i>omp_{NK8}</i> + predicted promoter region (670 bp upstream ATG) inserted in the <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI site of pKT230; Km ^R , Sm ^S	This study

Km^R, カナマイシン耐性; Sm^R, ストレプトマイシン耐性; Sm^S, ストレプトマイシン感受性; 3CB⁺, 3CB を単一炭素源とする; 3CC⁺, 3CC を単一炭素源とする; 4CC⁺, 4CC を単一炭素源とする; 3CB⁻, 3CB を単一炭素源としない; 3CC⁻, 3CC を単一炭素源としない; 4CC⁻, 4CC を単一炭素源としない。

b) スイミングプレート・アッセイ

対数増殖期後期(OD₆₁₀ = 1.0~1.5)まで 28°C で振盪培養した菌体を BSM 培地[23]で 2 回洗浄し、再懸濁した。この菌懸濁液を分注したシャーレの中心部に 500 mM の誘引物質を染みこませた滅菌濾紙ディスク(直径 8 mm)を置き、室温で 6 時間静置した。

c) キャピラリー・アッセイ

2-(2)-b) の手順に準じて行った。異なる菌株間で走化応答を比較する際には、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ーと各試験区のキャピラリーにおける細胞数の比で表した。

d) 半定量 RT-PCR

定常期(OD₆₁₀ = 1.0~3.2)の菌体から全 RNA を抽出し、DNase で夾雑 DNA の分解を行った。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。

(3) 結果と考察

a) スイミングプレートにおける菌の応答

スイミングプレート・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 (図 9)。

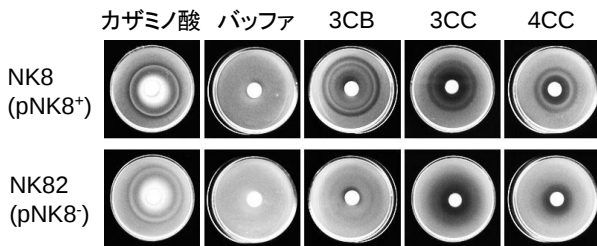


図 9 スイミングプレート中の走化性反応円の形成

b) 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

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 走化性が菌の持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認するため、野生株、変異株、pSL1 導入株について、それぞれ 3CB、3CC、4CC、 β -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 β -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、 β -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 (図 10)。

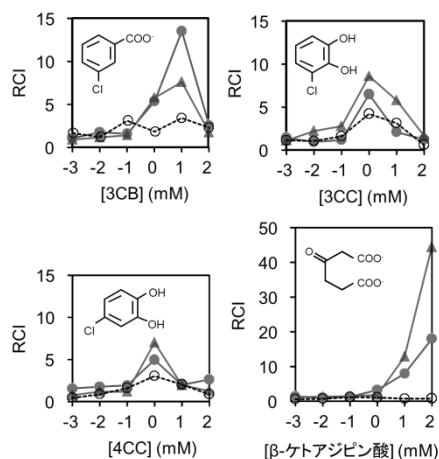


図 10 3CB およびその分解産物に対する走化性応答

●NK8, ○NK82/pKT230, ▲NK82/pSL1

b) β -ケトアジピン酸への走化性応答に関する推定ポリン遺伝子 *omp_{NK8}*

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、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、 β -ケトアジピン酸への走化性が顕著に回復した (図 11)。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、外膜ポリンと高い類似性を示した。よって、この ORF を *omp_{NK8}* と名付けた。

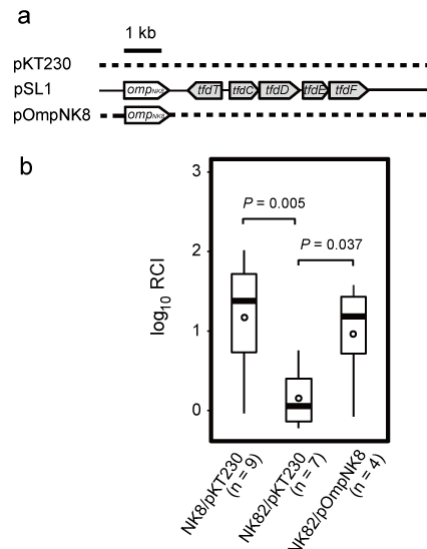


図 11 β -ケトアジピン酸に対する走化性応答

(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_{NK8}* の再導入による走化性の回復

キャピラリー内 β -ケトアジピン酸濃度は 100 mM。

P 値は Student's t-test による。

Omp_{NK8} の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* タンパク質とはアミノ酸配列で 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 β -strand 領域も保存されていた。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。

c) NK8/pKT230 (野生株) における 3CB による *omp_{NK8}* 転写の誘導

培養時に 3CB を添加すると、野生株の *omp_{NK8}* 遺伝子の転写が著しく活性化された (図 12)。

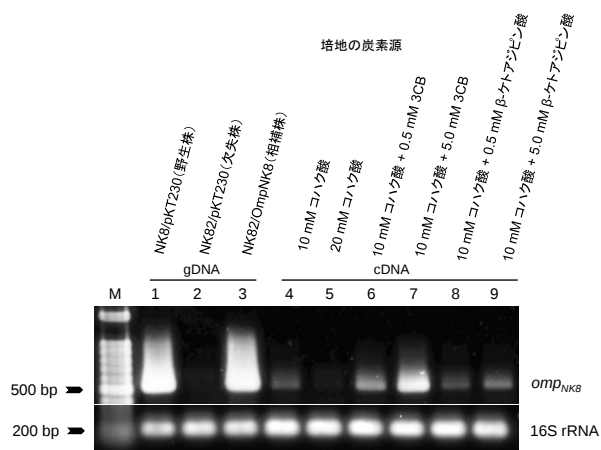


図 12 3CB による *omp_{NK8}* 転写の誘導

このような転写誘導は *omp_{NK8}* 相補株 (pOmpNK8 移入株) では認められなかったため、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_{NK8} 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。

4. まとめ

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。

謝辞：本研究を遂行するにあたって、広島大学の加藤純一教授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ご指導をいただいた。静岡大学の小川直人教授からは、*Burkholderia* sp. NK8 株とプラスミドのご提供をいただいた。また、著者が所属する（独）農業環境技術研究所の藤井毅領域長には実験計画へのアドバイス等、本課題の初期からご支援をいただいた。統計解析手法については同研究所の三輪哲久博士と大東健太郎氏に、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、長年にわたるご指導、実験法のレクチャーおよび討論に多くの時間を割いて下さっ

た法政大学細胞機能学研究室の川岸教授、スタッフおよび学生の皆様方、特に、コレラ菌走性トランスデューサーの結合解析および推定セリン結合タンパク質と Mlp との共発現試験に多大なご協力をいただいた川口徹也氏に、この場を借りて厚く御礼を申し上げる。

参考文献

- 1) Law, A.M. and M.D. Aitken: Appl Environ Microbiol, Vol. 69, pp 5968-73, 2003
- 2) Adler, J.: Science, Vol. 153, pp 708-716, 1966
- 3) Melton, T., *et al.*: J Bacteriol, Vol. 133, pp 708-716, 1978
- 4) Adler, J., *et al.*: J Bacteriol, Vol. 115, pp 824-847, 1973
- 5) Abouhamad, W.N., *et al.*: Mol Microbiol, Vol. 5, pp 1035-1047, 1991
- 6) Alexander, R.P. and I.B. Zhulin: Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 104, pp 2885-2890, 2007
- 7) Aravind, L. and C.P. Ponting: FEMS Microbiol Lett, Vol. 176, pp 111-116, 1999
- 8) Lacal, J., *et al.*: Environ Microbiol, Vol. 12, pp 2873-2884, 2010
- 9) Miller, V.L. and J.J. Mekalanos: J Bacteriol, Vol. 170, pp 2575-2583, 1988
- 10) Lee, S.H., *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 98, pp 6889-6894, 2001
- 11) Nishiyama, S.-i., *et al.*: Infect Immun, Vol. 80, pp 3170-3178, 2012
- 12) Grant, S.G., *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 87, pp 4645-4649, 1990
- 13) Wolfe, A.J. and H.C. Berg: Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 86, pp 6973-6977, 1989
- 14) Mekalanos, J.J., *et al.*: Nature, Vol. 306, pp 551-557, 1983
- 15) Bartolomé, B., *et al.*: Gene, Vol. 102, pp 75-78, 1991
- 16) Tajima, H., *et al.*: J Biol Chem, Vol. 286, pp 42200-42210, 2011
- 17) Moorthy, S. and P.I. Watnick: Mol Microbiol, Vol. 57, pp 1623-1635, 2005
- 18) Kan, B., *et al.*: Proteomics, Vol. 4, pp 3061-3067, 2004
- 19) Unterman, R.: Bioremediation: Principales and Applications, R.L. Crawford and D.L. Crawford, Editors. 1996, Cambridge University Press: Cambridge. p. 209-253.
- 20) Francisco, P., Jr., *et al.*: Microbiology, Vol. 147, pp 121-133, 2001
- 21) Bagdasarian, M., *et al.*: Gene, Vol. 16, pp 237-247, 1981
- 22) Liu, S., *et al.*: Gene, Vol. 268, pp 207-214, 2001
- 23) Ogawa, N. and K. Miyashita: Appl Environ Microbiol, Vol. 61, pp 3788-3795, 1995