

大腸菌異物排出系遺伝子の発現制御とMdtBC トランスポーターの形成機構

山崎, 萌 / YAMAZAKI, Megumi

(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)

57

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2016-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00013458>

大腸菌異物排出系遺伝子の発現制御と MdtBC トランスポーターの形成機構

GENE EXPRESSION AND ASSEMBLY
OF THE XENOBIOTIC EFFLUX TRANSPORTERS OF *ESCHERICHIA COLI*

山崎萌

Megumi YAMAZAKI

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生命機能学領域修士課程

Escherichia coli has five RND-type xenobiotic efflux systems. Among them, only the AcrAB-TolC complex is constitutively expressed. The MdtABC-TolC complex is unique in that it has two inner membrane transporters MdtBC. The expression of the *mdt* operon is regulated by the two-component system BaeS-BaeR that senses indole. Here I measured mRNA levels of *mdtA* and *baeS* in the presence or absence of the outer membrane channel TolC. The mRNA levels of both genes in the *tolC*-deleted strain were higher than those in the *tolC*⁺ parent, suggesting that the accumulation of indole in the cytosol, which presumably results from the lack of TolC, induces the expression of these genes. Next I visualized how the MdtB and MdtC transporters are assembled *in vivo* using green fluorescent protein (GFP) and red fluorescent protein (TagRFP). When expressed alone, MdtB-GFP formed a homotrimer, whereas MdtC-TagRFP did not. When co-expressed, a heterotrimer consisting of two MdtB-GFP molecules and one MdtC-TagRFP molecule was formed predominantly. These results suggest that MdtB and MdtC favor to form the 2:1 heterotrimer, which has been proposed, by the study on tandem-linked trimers, to have the highest drug efflux activity among all possible trimers.

Key Words : drug resistance, gene expression, molecular imaging, transporter, two-component system

1. 緒言

細菌の多剤耐性化は、異物排出システムによる薬剤の能動的排出により引き起こされる。RND (resistance nodulation cell division) 型異物排出システムは大腸菌を含むグラム陰性菌の主要な異物排出機構である。それらは「内膜トランスポーター」、「膜融合蛋白質」、「外膜チャンネル」で三者複合体を構築し、プロトン駆動力を用いて基質となる物質を細胞外へと排出する。大腸菌においては5種類が同定されているが、外膜チャンネル TolC は全てで共有されている。5種の内膜トランスポーター／膜融合蛋白質のうち構成的に発現しているのは AcrAB のみであり、その他のものは外環境からの刺激により発現が誘導される [1]。RND 型異物排出システムの内膜トランスポーターは通常ホモ三量体を形成するが、MdtABC-TolC 複合体は内膜トランスポーター-MdtB2 分子、MdtC1 分子がヘテロ三量体を形成することで最も高い排出活性をもつということが非常に特徴的である [2] (図1)。MdtBC は膜融合蛋白質 MdtA および二成分制御系 BaeSR

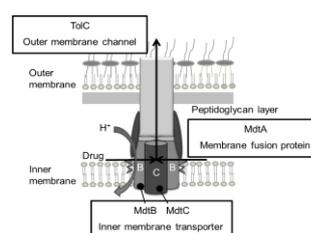


図1 RND型異物排出システム MdtABC-TolC 複合体

と同一オペロンにコードされ、一連の遺伝子群はインドールにより誘導される [3]。また、TolC の欠失により細胞内にインドールが蓄積することが示唆されている [4]。本研究では、これらのことを利用して、*mdtABC* の発現条件、および BaeS のインドール刺激受容の仕組みの解明を目指した。また、発現した MdtB、MdtC が細胞内でどのようなトランスポーターを形成するのかを調べた。

2. 実験方法

mdtABC の発現条件および、BaeS のインドール刺激受容の仕組みの解明は、リアルタイム RT-PCR により mRNA

量を測定することで行った。また、MdtB と MdtC を緑色蛍光蛋白質 GFP, 赤色蛍光蛋白質 TagRFP で標識し, 全反射蛍光顕微鏡を用いてその細胞内動態および, 輝度を解析することで, トランスポーター形成機構を調べた。

3. 実験結果と考察

まず, *mdtA*, *baeS* の mRNA 量を解析した。すると, *tolC* 欠失株では野生株と比べて *baeS* と *mdtA* の発現量が増加した。また, *tolC* 欠失株においても, インドールを感知する二成分制御系 *baeSR* を欠失させると *mdtA* の発現誘導は起こらなかった。当研究室での先行研究において, TolC はインドールの排出に関与することがわかっている [4]。以上のことから, TolC がいないと細胞内に蓄積したインドールが排出できず, その濃度変化を BaeS が感知することで一連の発現が起こると示唆された。

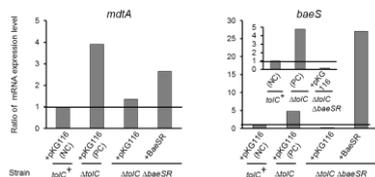


図 2 *mdtA*, *baeS* の mRNA 量

つぎに, MdtAB-GFP, MdtAC-GFP 発現菌における動態観察を行った。すると, MdtB-GFP は細胞膜中で多くの輝点が固定されており, TolC と結合することが示唆された。一方, MdtC-GFP はほとんどの輝点が細胞膜中を動いており, 単独では TolC と結合しないことが示唆された(図 3)。

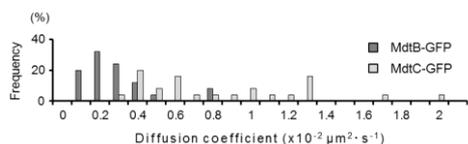


図 3 MdtB-GFP, MdtC-TagRFP の拡散係数

さらに, MdtB-GFP, MdtB-TagRFP の蛍光褪色過程を解析した結果, GFP 1 分子の輝度は約 4,700, TagRFP 1 分子の輝度は約 1,300 であると推定された(図 4)。

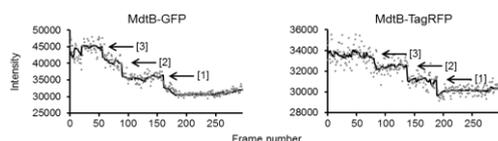


図 4 MdtB-GFP, MdtB-TagRFP の蛍光褪色

この数値と MdtB-GFP, MdtC-TagRFP の輝点の輝度とを比較すると, MdtB-GFP は GFP 3 分子分の輝度を示す輝点が多く, MdtB は細胞内で多くがホモ三量体を形成し TolC と結合することで細胞膜中に固定されていたと推測された。一方, MdtC-TagRFP は TagRFP 1 分子, もしくは 2 分子分の値を示す輝点が多かったことから, MdtC の多くが

単体では三量体を形成せず, TolC とは結合できずに細胞膜中を動いていたのではないかと考えられた(図 5)。

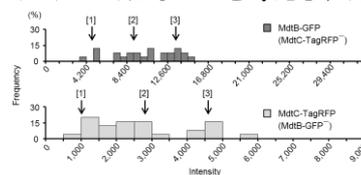


図 5 MdtB-GFP, MdtC-TagRFP 単独発現時の輝度分布

つぎに, MdtB-GFP と MdtC-TagRFP を同一細胞内で発現させて観察すると, MdtB-GFP と MdtC-TagRFP の一部は共局在し細胞膜中で固定されていた。また, この共発現菌において輝度解析を行うと, MdtB-GFP, MdtC-TagRFP ともに 3 分子分の輝度に相当する輝点はほとんど存在しなかった。これは, MdtB, MdtC 両方が存在するときはそれぞれのホモ三量体は形成されにくいことを示している。また, 蛍光強度の分布から MdtBBC, MdtBCC どちらのヘテロ三量体も形成されるが, MdtBBC の方が安定的で形成されやすいということが示唆された(図 6)。以上の結果から, MdtB と MdtC は細胞内でより排出活性の高いヘテロ三量体を形成すると考えられた。

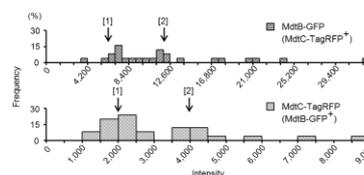


図 6 MdtB-GFP, MdtC-TagRFP 共発現時の輝度分布

4. 結言

baeS, *mdtA* の mRNA 量測定により, *mdtABC* は *tolC* 欠失下で発現が誘導され, その発現誘導は *tolC* 欠失により細胞内に蓄積したインドールの刺激によるものであることが示唆された。また, 細胞内動態解析および輝度解析により, MdtB は単独ではホモ三量体を形成するが, MdtC との共発現下では, 最も高い排出活性をもつ MdtBBC ヘテロ三量体を優先的に形成すると考えられた。

参考文献

- 1) Nishino, K. Yamaguchi, A. : EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the *yhiUV* multidrug transporter in *Escherichia coli*. J Bacteriol, Vol.184, pp.2319-2323, 2002
- 2) Kim, H.S. et al. : Multiple efflux pump MdtBC of *Escherichia coli* is active only as a B₂C heterotrimer. J Bacteriol, Vol.192, pp.1377-1386, 2010
- 3) Nagakubo, S. et al. : The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. J Bacteriol, Vol.184, pp.4161-4167, 2002
- 4) Yamamoto, K., unpublished