

海洋細菌Vibrio alginolyticusアミノ酸走性
トランスデューサーと可溶性受容体

門間, 万里子 / MOMMA, Mariko

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(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

(巻 / Volume)

60

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2019-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022109>

海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* アミノ酸走性 トランスデューサーと可溶性受容体

NOVEL TRANSDUCER AND SOLUBLE RECEPTOR FOR AMINO ACID CHEMOTAXIS OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS*

門間 万里子

Mariko MOMMA

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修士課程

Vibrio alginolyticus, a Gram-negative marine bacterium, has two types of flagella; the polar flagellum (Pof) constitutively expressed for swimming in liquid, and the lateral flagella (Laf) induced in viscous environments for swarming over surfaces. Both types of cells exhibit chemotactic responses to L-cysteine mediated by a single Che signal transduction pathway, but the response of the swarmer cell is weaker than that of the swimmer cell. Here I demonstrated that a transmembrane protein named VaMlp9 (*V. alginolyticus* methyl-accepting chemotaxis protein-like protein) mediates chemotactic responses to amino acids, including cysteine. In spite of its weaker cysteine response, the swarmer cell expressed VaMlp9 at a higher level. Methylation of VaMlp9, by contrast, is less stimulated by cysteine in the swarmer cell. I therefore suspect that the cysteine response involves some periplasmic binding protein(s). I identified CtpA, an ABC transporter component as a periplasmic cysteine receptor by demonstrating that the *ctpA* deletion abolished the cysteine response. Overexpression of both CtpA and VaMlp9 in a *V. cholerae* strain lacking the major amino acid chemoreceptors gave the ability to respond strongly to cysteine, suggesting that CtpA functions as a soluble chemoreceptor coupled to VaMlp9 to mediate taxis to cysteine.

Key Words: cell differentiation, chemoreceptor, periplasmic binding protein, signal transduction

1. 緒言

海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* は外環境に合わせて極毛 (Pof) と側毛 (Laf) を外環境に合わせて使い分けるグラム陰性菌である。海水中では1本の極毛を用いて遊泳運動し、水生生物の体表面など粘性の高い環境では菌の伸長と共に多数の側毛を生やし這うように進む[1]。前者の細胞をスイマー細胞、後者の細胞をスウォーマー細胞とよぶ。どちらの細胞も、より好ましい環境へと移動する走化性応答を示す。その細胞質シグナル伝達系(Che システム)は共通であるにもかかわらず、スイマー細胞ではシステイン応答能が高いのに対しスウォーマー細胞ではシステイン応答能は低い[2]。この原因として、システインを感知する走化性受容体の発現が抑制されているからと考えた。そこでシステイン走性受容体の候補である VaMlp9 の遺伝子を欠失させ、システイン走性応答を解析した。*vamp9* の欠失によりシステインに対する誘引応答は弱くなった。しかし、VaMlp9 の発現量を比較すると、スイマー細胞よりスウォーマー細胞の方が多くことがわかった。以上の結果を踏まえて、VaMlp9 の媒介するシステイン走性応答に

は、ペリプラズムの結合タンパク質 CtpA が可溶性受容体として関与する可能性を検討した。

2. 実験方法

V. alginolyticus 138-2 株の染色体 DNA 上からスーサイドベクターを用いて VaMlp9, CtpA の遺伝子を欠失させた[3]。138-2 株の染色体 DNA を鋳型として VaMlp9, CtpA のコーディング領域を増幅・クローン化し、上述の欠失株に移入して発現させた。セリン、システイン走性応答は、キャピラリアッセイによって解析した。また、VaMlp9 の発現は、抗 Mlp24 peri 抗体や抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検出した。

3. 実験結果と考察

V. alginolyticus のシステイン走性応答に必要な MLP の候補として、*V. cholerae* 主要アミノ酸受容体 Mlp24, Mlp37 と同様に PAS-like domain を2つもつ膜貫通型蛋白質 VaMlp9 に着目した。まず、*vamp9* 遺伝子欠失株を構築して解析したところ、システイン走性応答が低下した(図

1) . このことから, VaMlp9 がシステイン走性応答に関与することが明らかになった. なお VaMlp9 はセリン走性応答にも関与する (not shown).

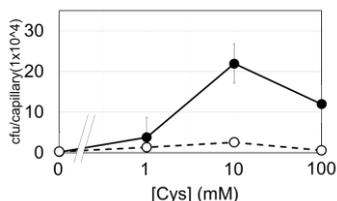


図1 vamlp9 欠失のシステイン応答に対する影響

スイマー細胞とスウォーマー細胞のシステイン応答性の違いは VaMlp9 の発現量によるものと考えた. そこで VaMlp9 の発現量を比較するため, 抗 Mlp24 peri 抗体を用いたウェスタンブロッティングで染色体 DNA から発現される VaMlp9 を検出した. しかし, システイン走化性応答が低下するスウォーマー細胞の方が VaMlp9 を発現量が高いことが明らかとなった (not shown). すなわち, VaMlp9 発現量の違いでは応答性の違いを説明できない.

受容体 (もしくは走化性トランスデューサー) は誘引刺激によってメチル化される. では, システイン存在下で VaMlp9 のメチル化は進行するのだろうか. スイマー細胞とスウォーマー細胞の両方で調べた (図2). セリン存在下でメチル化された VaMlp9 の量は, スイマー細胞とスウォーマー細胞で同程度であった. これに対し, システイン添加時には, スイマー細胞では VaMlp9 のメチル化を検出することができた. しかし, スウォーマー細胞では VaMlp9 のメチル化の進行度合いは著しく小さかった. このことから, システイン走性は, スウォーマー細胞で発現が抑制される他の因子を必要とすることが示唆された

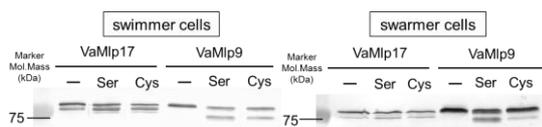


図2 vamlp9 欠失のシステイン応答に対する影響

コレラ菌 Mlp3 は, ペリプラズム領域に存在し ABC トランスポーターとしてはたらく SatA と共役しセリン走化性応答を媒介する [4]. そこで, システイン走性応答に必要なとされる可溶性受容体遺伝子の候補を *V. alginolyticus* 138-2 株ゲノム配列から探索した結果, ABC トランスポーターの結合タンパク質 (推定) をコードする *ctpA* を見出した. *ctpA* 欠失株を作製し, キャピラリアッセイで解析すると, システイン走性応答が低下した. これは, CtpA がシステイン走化性応答に必須であることを示唆している (図3).

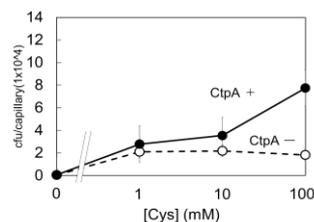


図3 ctpA 欠失のシステイン応答に対する影響

そこで, CtpA が可溶性受容体となって VaMlp9 のシステイン応答を媒介するかを調べるため, *vamlp9*, *ctpA* 遺伝子をクローニングし, *V. cholerae* 主要アミノ酸走性受容体遺伝子欠失株 ($\Delta mlp24 \Delta mlp37$) に過剰発現させた. キャピラリアッセイの結果, VaMlp9 と CtpA を共発現する菌は, システインに対し強く誘引応答を示した (図4). このことは, CtpA が VaMlp9 と共役してはたらく可溶性受容体であることを示唆している.

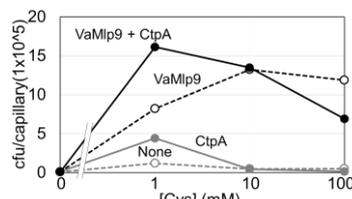


図4 コレラ菌主要アミノ酸受容体欠失株のシステイン走性応答に対する VaMlp9, CtpA 共発現の影響

4. 結言

膜蛋白質 VaMlp9 がセリン, システイン走性応答に関わる MLP であることを明らかにした. システイン走性応答には, VaMlp9 だけではなく, ペリプラズム蛋白質 CtpA が必要である. CtpA と VaMlp9 の共発現によりシステイン応答が強くなることから CtpA が可溶性受容体として VaMlp9 と共役することが示唆された. しかし, CtpA の発現が本当にスウォーマー細胞で抑制されるかどうかはまだ不明である. 今後は, スイマー, スウォーマー両細胞での *ctpA* 発現パターンを解析する必要がある.

参考文献

- 1) McCarter, L. & Silverman, M. (1990) *Mol Microbiol* 4:1057-1062
- 2) 小西学 (2010) 修士論文 法政大学大学院工学研究科
- 3) Le Roux *et al*, (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 777-784
- 4) Yamamoto-Tamura, K. (2015) 博士論文 法政大学大学院工学研究科