

環境変化に応じた大腸菌異物排出トランス ポーターの転写誘導と三量体形成

KASHIHARA, KENICHIRO / 榎原, 賢一郎

(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. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

63

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2022-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00025414>

環境変化に応じた大腸菌異物排出トランスポーターの 転写誘導と三量体形成

TRANSCRIPTIONAL INDUCTION AND TRIMER FORMATION
OF THE *ESCHERICHIA COLI* EFFLUX TRANSPORTERS IN RESPONSE TO ENVIRONMENTAL STIMULI

榎原賢一朗

KENICHIRO KASHIHARA

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

The resistance-nodulation-cell division (RND) tripartite complexes are the major xenobiotic efflux systems in *Escherichia coli*. Each consists of an inner membrane transporter, a membrane fusion protein, and the common outer membrane channel TolC. Among five such systems, only the AcrAB-TolC complex exists constitutively, and some other transporter genes, including *acrD* and *mdtBC*, is induced by indole via the two-component system BaeSR. This laboratory found that deletion of *tolC* induces *AcrD*, but further deletion of the tryptophanase gene *tnaA* abolishes this induction. Here I constructed a series of chimeric BaeS with other sensor kinases. The results suggest that BaeS senses the increase in the intracellular indole concentration. I also performed single molecule imaging of other transporters MdtBC, encoded in the same operon as *baeSR*, and found that they form heterodimers preferentially in the presence of substrates.

Key Words : gene expression, two-component regulatory system, transporter

1. 諸言

大腸菌は多くの異物排出システムをもち、その中でも RND (resistance-nodulation-cell division) 型のものは、大腸菌を含むグラム陰性菌の主要な異物排出システムである。大腸菌において 5 種類が同定されており、それらは内膜トランスポーター、膜融合タンパク質、外膜チャネルで三者複合体を構築し、外膜チャネル TolC は 5 種全てで共有されている [1]。これらの内で構造的に発現しているのは AcrAB-TolC 複合体のみであり、AcrD、MdtBC をはじめ一部の RND 型トランスポーターは、インドールによってその発現が誘導される (図 1) [2]。インドールは、トリプトファンがトリプトファンゼ TnaA により代謝されることで産生される。インドール刺激の受容と伝達には二成分制御系 BaeS-BaeR が関与し、結果として *acrD*、*MdtBC* の発現を誘導する。インドールの排出に関与する *tolC* の欠失により、*acrD* の発現が誘導されることが確認され、細胞内インドール濃度の上昇を BaeS が感知することで *acrD* の発現が誘導されることが示唆された [4]。しかし、BaeS がどの領域でインドールを感知しているかは判明していない。

そこで本研究では BaeS はどの領域でインドールの刺激を感知しているかを決定することを目的に、periplasmic domain を欠失した BaeS、および BaeS の periplasmic domain

を NarX、EnvZ のものに置き換えたキメラタンパク質を構築し、ルシフェラーゼアッセイを用いて、*acrD* のプロモーター活性を測定した。また二成分制御系により発現した MdtBC がどのような条件下で三量体を形成するのかを蛍光タンパク質を用いた分子イメージングで観察した。

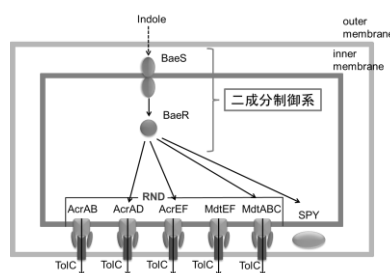


図 1 RND 型異物排出遺伝子の発現誘導

2. 実験方法

プラスミドや菌株の構築は標準的な手法で行った。プロモーター活性は、ルシフェラーゼアッセイを用い、菌の集団の発光強度をプレートリーダーで測定した。また、MdtBC の挙動は、それぞれに色の異なる蛍光タンパク質を融合させ、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) を観察した。

3. 実験結果と考察

はじめに, *acrD* プロモーター領域をルシフェラーゼコード領域と融合したのプロモーターアッセイプラスミド pParcD を構築した. これを $\Delta baeSR$ 株, $\Delta baeSR \Delta tolC$ 株に移入した. さらに, periplasmic domain を欠失した BaeS, および BaeS の periplasmic domain を NarX, EnvZ のものに置き換えたキメラタンパク質 (図 2) を野生型 BaeR とともにコードするプラスミドを構築した. それらのプラスミドを $\Delta baeSR/pParcD$ 株および $\Delta baeSR \Delta tolC/pParcD$ 株に移入した. その結果, cytoplasmic domain 欠失体または EnvZ-BaeS-223 キメラを発現する菌では, どの条件下においても野生型 BaeS 発現菌以上の発光が見られた. これは変異型またはキメラ型 BaeS が constitutively active であるためと推定された. これに対し, NarX-BaeS-269 キメラ発現菌の活性は, *tolC* を欠失させていない, つまり細胞内にインドールが蓄積していないと考えられる状態の菌体において, $\Delta tolC$ 株中に比べて大きく低下した. すなわち, BaeS の cytoplasmic domain さえあればインドールを感知できると考えられた. また, その菌体に外部からインドールを添加した場合も AcrD の発現誘導には変化が見られなかった. これは「BaeS が細胞内インドールを感知する」という仮説とよく一致する性質である. 一方で EnvZ-BaeS-158 キメラ発現菌では, *acrD* プロモーター活性が $\Delta tolC$ 株で低く, 野生株で高く, インドール添加で低下するという, NarX-BaeS-269 キメラ発現菌と全く逆の誘導が見られた. つまり, このキメラは, 細胞内インドール刺激は感知できるが, アウトプットは逆転したものと解釈できる.

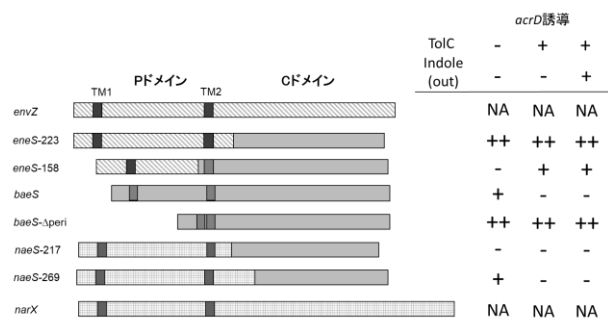


図2 キメラ発現菌における *acrD* 誘導

次に, 細胞内インドールを感知した BaeSR により発現が誘導される MdtABC (BaeSR と同じオペロンにコードされる) は, どのような複合体を形成するのかを調べた. 通常 RND 型トランスポーターはホモ三量体を形成するが, MdtABC は MdtB と MdtC という異なる二種類のトランスポーターから構成される点で特徴的である [3]. これまでの解析から, MdtB は単独でホモ三量体を形成・TolC と結合できるが, MdtC, MdtB との共発現時にのみヘテロ三量体を形成し, TolC と結合して輝点が固定されることが示唆されている. そこで, MdtABC の基質であるノボビオシン存在下で MdtC の輝点が固定されるかを調べた. その結果, ノボビオシン非存在下では 41 の輝点数のうち, 固定

された輝点は 24 でその割合は 58%であった (表 1). 一方, ノボビオシン存在下では, 62 の輝点数のうち, 固定された輝点は 48 でその割合は 77%であった. つまり基質の存在により, MdtC は MdtB とヘテロ三量体を形成して TolC と安定な複合体を形成する傾向が強くなると示唆された.

以上の結果をまとめると, インドール感知から RND 型三者複合体形成まで, 以下のような制御が見出された (図 3). すなわち, *tolC* 欠失により細胞内にインドールが蓄積する. それを BaeS が cytoplasmic domain で感知し, 内膜トランスポーター遺伝子 *acrD*, *mdtBC* の発現が誘導される. 合成された AcrD タンパク質はホモ三量体を形成し, AcrA (構成的) とともに, TolC と三者複合体を形成する. 一方, MdtB と MdtC は優先的にヘテロ三量体を形成して, MdtA (誘導) とともに, TolC と三者複合体を形成する. この複合体は, 基質により安定化されるというものである.

表 1 基質存在下での MdtC の MdtB との共局在

基質*	輝点数	固定された輝点
—	41	24 (58%)
+	62	48 (77%)

*3.17 μ g/ml novobiocin

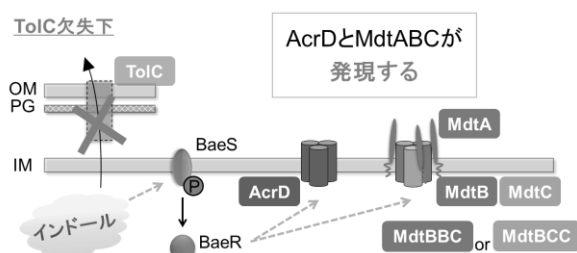


図3 細胞内インドールによる内膜トランスポーター AcrD, MdtBC の発現誘導と三量体形成

4. 結言

本研究では以下のことを見出した. *tolC* 欠失による *acrD* の構成的発現は, 細胞内にインドールが蓄積することによる. そのインドールは, BaeS 細胞質ドメインで感知される可能性が高い. MdtC は MdtB とヘテロ三量体を形成して機能する. その三量体を基質により安定化される.

参考文献

- 1) Aires, J.R., Nikaido, H. (2005) J. Bacteriol., **187**, 1923-1929.
- 2) Hirakawa, H. (2005) Mol. Microbiol., **55**, 1113-1126
- 3) Kim, H. S., (2010) J. Bacteriol., **192**, 1377-1386
- 4) Yamamoto, K. (2016) Doctoral Dissertation, Hosei University