

Vibrio choleraeセリン走性に関わる可溶性受容体と膜貫通型トランスデューサーをコードする遺伝子の発現調節

TAI, Chieh-Ming / 戴, 節明

(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/10.15002/00025415>

Vibrio cholerae セリン走性に関わる可溶性受容体と膜貫通型トランスデューサーをコードする遺伝子の発現調節

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE *VIBRIO CHOLERA*E GENES
ENCODING A SOLUBLE RECEPTOR AND A TRANSMEMBRANE TRANSDUCER FOR SERINE TAXIS

戴節明

Chieh-Ming TAI

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 cholerae, the causative agent of cholerae disease, migrates by rotating a polar flagellum towards various amino acids. Multiple amino acids including L-serine are sensed by the major chemoreceptors Mlp24 and Mlp37, both of which are supposed to play important roles in infection. However, a double mutant lacking the *mlp24* and *mlp37* genes still shows weak but significant responses to L-serine, suggesting that the bacterium has other amino acid receptor(s). Further studies identified an amino acid sensing system of *V. cholerae* consisting of a transmembrane transducer Mlp3 and a periplasmic soluble receptor named SatA. In this study, I found that the *satA* promoter is activated under nutrient-poor conditions, whereas the *mlp3* promoter is activated under nutrient-rich conditions. Cells cultured under either conditions did not show significant serine responses. Other factors (e.g., other carbon sources, temperature, oxygen availability) may have to be tuned for the SatA-Mlp3 sensing system.

Key Words : chemotaxis , gene expression , chemoreceptor , signal transduction

1. 緒言

コレラ病原菌である *Vibrio cholerae* は、細胞極に 1 本のべん毛をもち、それを回転させて液体中を泳ぎ回り、走性を示す[1]. 誘引物質等の刺激の感知に関わるのは、45 種類の methyl-accepting chemotaxis protein-like proteins (MLPs) というタンパク質である。そのうち、Mlp24 と Mlp37 がアミノ酸への誘引反応を媒介する主要な化学受容体であることを明らかにした。しかし、*mlp24* と *mlp37* の二重欠失株 ($\Delta mlp24 \Delta mlp37$) も、アミノ酸に対して弱い有意な応答を示した[2, 3]. その後の解析により、*V. cholerae* 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 Mlp3 が同定され、その過剰発現株でセリン、スレオニン等 R 基の小さいアミノ酸に対する応答が増強されること、そしてこの応答は ABC トランスポーターの推定アミノ酸結合タンパク質 SatA との共発現によりさらに増強され、Mlp24, Mlp37 の媒介する応答と遜色ない程度に達することが示された[4] (Fig. 1). 本研究では、*mlp3* と *satA* の発現誘導条件を探索する目的でプロモーターアッセイを行った。また、その条件下で本当に Mlp3-SatA システムが走性応答を示すかどうかについても調べた。

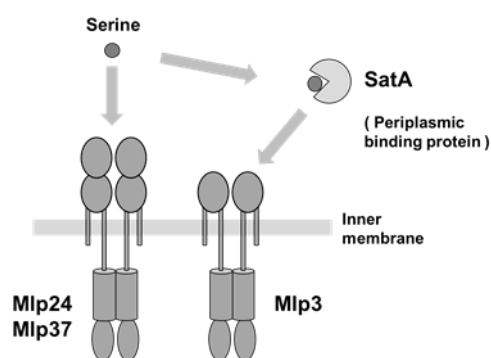


Fig.1 Mlp3 - SatA 共役予想模式図

2. 実験方法

プラスミドや菌株の構築、キャピラリアッセイ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。メチル化アッセイは、Mlp3-FLAGを発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting での移動度の違いとして検出した。SatA-HA との共発現も試みた。

3. 実験結果と考察

上述の通り $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ 株はセリンに対して弱い誘引応答しか示さない。そこで、*satA* プロモーターが活性化される条件を探索した。通常の TG で培養すると *satA* プロモーター活性はほとんど上がらないが、最小培地 M9-glycerol で培養すると、活性が著しく上昇した (Fig. 2)。一方、Mlp3 プロモーター活性は、培地の栄養源が少ないほど低下した。つぎに、 $\Delta mlp24 \Delta mlp37$ 株を TG で培養すると弱いながらもセリン走性が見られるのに対し、M9-glycerol で培養するとセリン走性はほとんど見られなかった。これは、Mlp3 の発現量低下によるものと考えられたが、*satA* と *mlp3* の発現量が近い M9-glucose で培養しても上昇は見られなかった (Fig.3)。以上の結果により、SatA-Mlp3 システムの発現には、培養時の栄養条件が影響するものの、M9-glucose も M9-glycerol も機能には最適ではないと結論された。

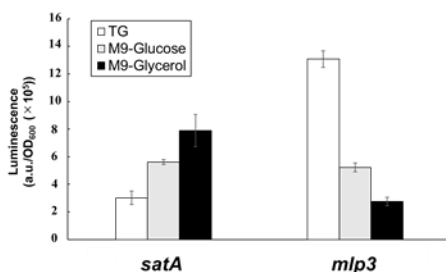


Fig. 2 培養時の栄養条件による *satA* および *mlp3* プロモーター活性の変化

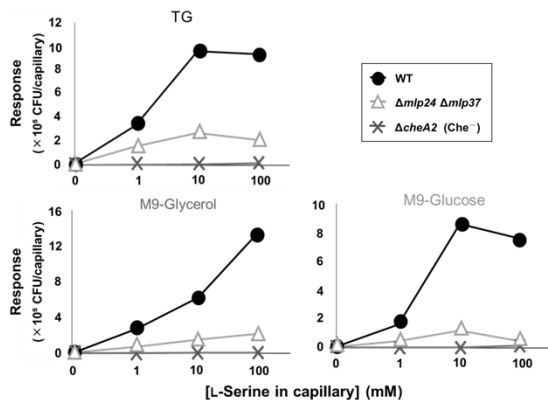


Fig. 3 培養時の栄養条件による *V. cholerae* セリン走性応答変化

つぎに、Mlp3 の SatA 要求性を調べるために、Mlp3 と Mlp3-SatA を用いてメチル化アッセイを行った。Mlp3 は TMN buffer で保温すると、誘引物質を加えなくてもメチル化される可能性が見出された。また、アッセイ時の炭素源をグリセロールに置き換えると、セリン添加によるメチル化の進行が検出された (Fig. 4)。しかし、Mlp3 単独発現菌でも Mlp3-SatA 共発現菌でも、セリンを含めたアミノ酸を与えても、Mlp3 のメチル化レベルに明確な差は見られず、菌回収時の wash 時に SatA が分解されることが見出さ

れた(not shown)。一方、Mlp3 のメチル化部位を 2 つの候補を見出した。それぞれをアラニンに置換してメチル化アッセイを行った結果、実際に両方の残基ともに Mlp3 のメチル化部位であることが示された (Fig. 4)。

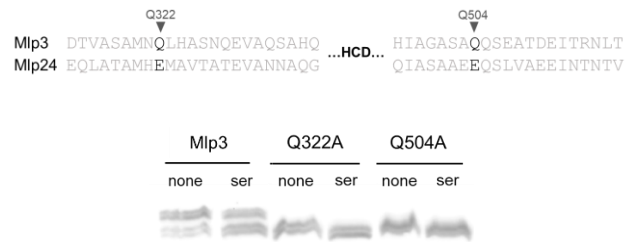


Fig. 4 Mlp3 メチル化部位の同定

さらに、上述の最適条件を探るために、*mlp3* と *satA* の上流領域に系統的な欠失導入を行った。現時点ではプロモーター配列の同定には至っていないが、当初クローニングした領域の 3' 側領域にあることが判明し (Fig. 5)、さらに絞り込んでいる。

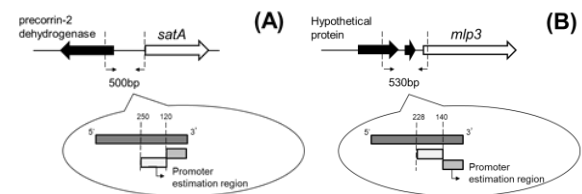


Fig.5 *satA* (A), *mlp3* (B) プロモーター領域の絞り込み

4. 結言

本研究では、*mlp3* と *satA* のプロモーター活性が、培養時の栄養条件によって全く反対の制御を受けることを見出した。*satA* プロモーター活性が最高になり、*mlp3* プロモーター活性が最低になる貧栄養条件下では、Mlp3-SatA システムによるセリン応答はほとんどみられなかった。一方、*satA* プロモーター活性が最低になり、*mlp3* プロモーター活性が最高になる富栄養条件下では、弱いながらもセリン応答が見られた。

参考文献

- 1) Kojima, S. et al. (1999) The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na⁺ motive force. *J. Bacteriol.* **181**, 1927-1930.
- 2) Nishiyama S. et al. (2012) Mlp24 (McpX) of *Vibrio cholerae* implicated in pathogenicity functions as a chemoreceptor for multiple amino acids. *Infect. Immun.* **80**, 170-3178.
- 3) Nishiyama, S. et al. (2016) Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants. *Sci. Rep.* **6**, 20866.
- 4) 山元季実子 (2015) 博士論文, 法政大学大学院工学研究科.