

# 大腸菌表層Tol-Pal系はべん毛形成に関与するか

NISHIOKA, Kohei / 西岡, 晃平

---

(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/10.15002/00025420>

# 大腸菌表層 Tol-Pal 系はべん毛形成に関与するか

IS THE CELL ENVELOPE TOL-PAL SYSTEM OF *ESCHERICHIA COLI* INVOLVED IN FLAGELLATION?

西岡晃平

Kohei NISHIOKA

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

Uropathogenic *Escherichia coli* invades host cells to form biofilm-like intracellular bacterial community (IBC), which requires flagellar motility. Recently, *tolB* has been found to be involved in IBC formation. TolB is a periplasmic component of the Tol-Pal system implicated in the integrity of the bacterial envelope. Further analyses suggested that TolB is responsible for efficient formation or maintenance of the flagella. In this study, I examined whether TolB is directly involved in flagellation. I examined whether TolB affect the outer rings of the flagellar basal body and whether TolB localizes in the vicinity of the flagellar basal body.

**Key words:** cell envelope, flagella, molecular imaging, protein translocation and assembly

## 1. 緒言

尿路病原性大腸菌（以下 UPEC）は宿主細胞内に侵入し、細胞内マイクロコロニーを形成する。このバイオフィルムの形成にはべん毛運動が重要である。最近、トランスポゾン変異導入によるスクリーニングから、バイオフィルム形成に関与する新たな遺伝子として *tolB* が同定された。この変異もべん毛の形成を低下させるものであった。

[1]TolB は外膜の安定性の維持などに寄与している Tol-Pal 系の構成因子であり、Pal, TolA, OmpA や Lpp とも相互作用する。[2]UPEC の解析から、TolB はべん毛形成には必須ではないものの、べん毛の効率よい形成もしくは維持に関与することが示唆された。もしこれが直接的なものであれば、TolB はべん毛基部と相互作用すると推測される。本研究では、まず、TolB が外膜・ペプチドグリカン層に存在するべん毛基部リング構造に影響するか検討した。つぎに、TolB の細胞内局在を調べた。TolB-sfGFP 融合体、およびべん毛固定子 MotB と mCherry の融合体などを構築し、全反射照明顕微鏡 (TIRF) で観察することで、TolB がべん毛基部近傍に局在するかどうか検討した。

## 2. 実験方法

プラスミド、菌株は標準的手法により構築した。sfGFP 等融合タンパク質の細胞内局在は全反射照明顕微鏡 (TIRF) により観察した。

## 3. 実験結果と考察

### (1) $\Delta tolB$ 株を用いた、フックタンパク質 FlgE 過剰発現条件下での Swarm assay

FlgH はべん毛基部の L リング（外膜に局在）を構成するタンパク質である。*flgH* 遺伝子が欠損するとべん毛形成が基部体までで停止する。しかし、フックタンパク質 FlgE を過剰発現させると、頻度は低いものの、不完全なべん毛基部上にフックフィラメントの構造ができる[3]。もし *tolB* の欠失により外膜の安定性が低下し、L リング形成効率が低下していると仮定すると、FlgH または FlgE を過剰発現させることで、 $\Delta tolB$  株の遊泳能が回復する可能性がある。しかし、*tolB* 欠失株に FlgE を過剰発現させても、べん毛運動能形の向上は見られなかった（図 1）。

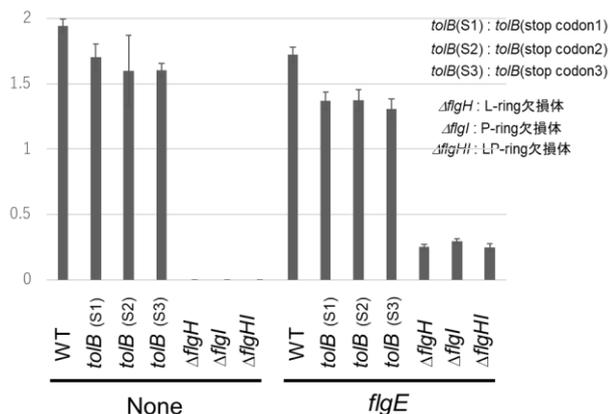


図 1. *tolB* 欠失株の運動能欠損に対する FigE 過剰発現の影響 運動能は swarm assay で調べた。

## (2) Tethered cell を用いた TolB-sfGFP の局在解析

つぎに、TolB がべん毛基部体と共局在するかどうか調べた。このために、TolB-sfGFP のコーディング領域をアラビノース誘導可能なプロモーター下流に配置したプラスミドを構築し、 $\Delta tolB$  株に移入した。形質転換体は野生株と同程度の運動能をもっていたことから、sfGFP は TolB 機能を阻害しないことが示された。そこで、同じプラスミドを  $\Delta tolB fliC^{st}$  株に移入した。この株は、べん毛繊維がガラスに付着しやすい変異フラジェリン FliC<sup>st</sup> を発現する。この菌を用いて tethered cell assay を行った。TolB-sfGFP がべん毛基部体と共局在するならば、回転中心に輝点が観察されるはずである。ただし、Tol-Pal 系タンパク質は菌体極に集まる性質をもつ。そのため、今回は観察条件として、菌体の極を中心として回転しているものは観察対象から排除した。回転を観察した細胞のうち、6.45%で回転中心に輝点が観察された (図 2)。

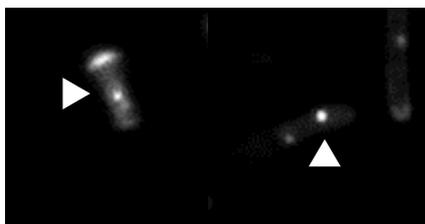


図 2. テザードセル回転中心 TolB-sfGFP の局在

このことから、TolB がべん毛基部体周辺に局在していることが示された。

## (3) TolB-sfGFP と MotB-mCherry の共局在観察

つぎに、TolB がべん毛固定子タンパク質 MotB と共局在するかどうか調べた。このために、TolB-sfGFP 発現プラスミドと共存可能で、MotB-mCherry のコーディング領域を IPTG 誘導可能なプロモーター下流に配置したプラスミドを構築した。細胞極以外の領域に観察された TolB-sfGFP の輝点のうち、7.5%には MotB-mCherry が共局在していた (図 3)。この結果も、TolB がべん毛基部体周辺に局在していることを示すものである。今後は、L リングタンパク質との共局在や相互作用についても検討する必要がある。

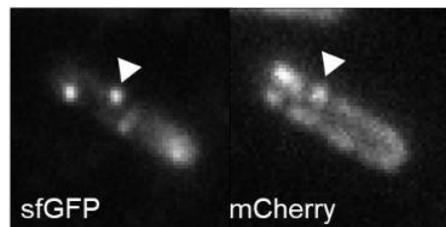


図 3. TolB-sfGFP と MotB-mCherry の共局在

## 4. 結言

TolB-sfGFP 融合体の蛍光顕微鏡観察実験から、TolB はべん毛基部体近傍に局在していることが示された。

## 参考文献

- 1) Hidetada, H. et al.: The Tol-Pal System of Uropathogenic *Escherichia coli* is responsible for optimal internalization into and aggregation within bladder epithelial cells, colonization of the urinary tract of mice, and bacterial motility. *Front. Microbiol.*, Vol. 10, pp. 1827-1841, 2019
- 2) Walburger, A. et al.: The Tol/Pal system function requires as interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Molecular Microbiology*, Vol. 44, pp. 695-708, 2002
- 3) Ohnishi, K. et al.: Formation of flagella lacking outer rings by *flaM*, *flaU*, and *flaY* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Vol. 169, pp. 1485-1488, 1987