

Vibrio cholerae タウリン走性受容体遺伝子 mlp37 の温度依存的転写制御

山内, 那津 / YAMAUCHI, Natsu

(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/10.15002/00025422>

Vibrio cholerae タウリン走性受容体遺伝子 *mlp37* の 温度依存的転写制御

TEMPERATURE-DEPENDENT TRANSCRIPTIONAL REGULATION
OF THE TAURINE CHEMORECEPTOR GENE *MLP37* OF *VIBRIO CHOLERA*

山内那津

Natsu YAMAUCHI

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 etiological agent of cholera, has a chemoreceptor named Mlp37 that mediates attractant responses to several amino acids and taurine, a component of bile. The promoter activity of *mlp37* increased drastically at 37°C. This temperature-dependent regulation of *mlp37* requires the transcription factors ToxR and TcpP, which are responsible for the expression of cholera toxin and other virulence genes, suggesting the involvement of Mlp37 in infection. Here I measured the promoter activity of *mlp37* by luciferase assay to identify cis-acting elements for the expression of *mlp37*. The results indicate that expression of *mlp37* requires an inverted repeat sequence (IR), located upstream of the *mlp37* coding region.

Key Words : electrophoretic mobility shift assay (EMSA), mRNA, promoter, transcription factor

1. 緒言

コレラの病原菌 *Vibrio cholerae* (以下コレラ菌) は、ヒトに感染すると小腸に留まり、コレラ毒素を産生する。この感染過程に走化性が関係することが示唆されている。コレラ菌主要走化性受容体として Mlp24 と Mlp37 が同定されており、いずれも多くのアミノ酸を誘引物質として認識する。また、Mlp37 は胆汁の構成成分であるタウリンも認識する [1]。Mlp37 をコードする遺伝子 (*mlp37*) の転写は、菌を 37°C で培養すると 30°C で培養したときに比べて劇的に増加する [2]。Mlp37 がタウリン走性を媒介すること、ヒト体温と同じ 37°C で発現が増加することから、Mlp37 は感染過程に働くと推測された。実際、病原性遺伝子群の転写制御因子 ToxR, TcpP [3] は *mlp37* の転写を 30°C で抑制する。しかし、*mlp37* の上流に ToxR・TcpP の結合配列はみられない。本研究では、*mlp37* の温度依存的転写制御機構の解明を目指し、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたプロモーターアッセイを行った。

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。加えて、転写因子の関与を調べるためにゲルシフトアッセイ (EMSA) を使用した。

3. 結果と考察

(1) mRNA 二次構造形成の検証

mlp37 の温度依存的転写制御が mRNA 二次構造によるものかを調べた。はじめに、centroidfold を使用して mRNA の二次構造予測を行った (図 1)。

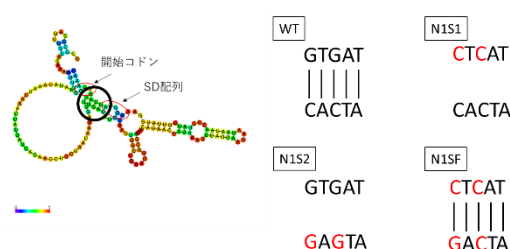


図 1 mRNA 二次構造予測と塩基置換導入パターン

次に、予想された二次構造をもとに温度依存性に関与すると考えられる塩基対に対して塩基置換を行い、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性の変化を調べた (図 2)。この実験では *mlp37* の mRNA が二次構造を形成することを裏付けることはできなかった。また、N1SF において 37°C でのプロモーター活性が上昇したことは、SD 配列や開始コドンの近くであることが関係していると考えられる。二次構造予測によると、今回塩基置換を導入した配列以外にも塩基対形成が存在し、その塩

基対形成が温度依存的転写制御に関与する可能性が十分考えられる。そのため、現段階では mRNA 二次構造形成が温度依存的制御に関与するかどうか断言できない。

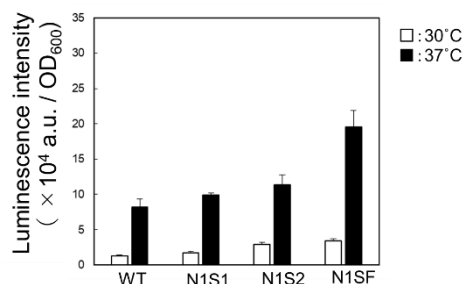


図2 塩基対形成によるプロモーター活性の変化

(2) 高コピープラスミドを用いた転写因子の捕獲

私は、これまでの研究結果をもとに、30°Cにおいて転写を抑制する因子が存在すると仮定した。そこで、*mlp37* 上流領域をクローニングした低コピープラスミド pLUX プラスミドをもつコレラ菌に、同じく *mlp37* 上流領域をクローニングした高コピープラスミド pUC18 を移入してリプレッサーの titration out を試みた (図3)。しかし、30°C 培養時におけるプロモーター活性の上昇は見られなかった。ただし、ここから 30°C で働くリプレッサーがないとは結論できない。もし存在しても、その分子数が十分多いためこの程度のコピー数の比では titration out されない可能性があるからである。

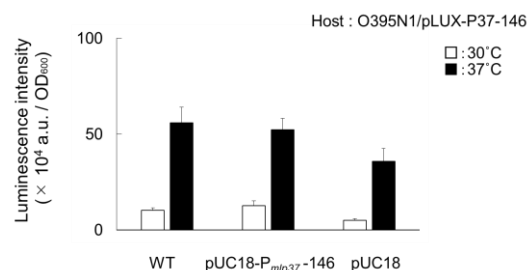


図3 *mlp37* 上流領域をクローン化した高コピープラスミド移入時の *mlp37* プロモーター活性の変化

(3) EMSA 法による転写因子関与の検証

温度依存的転写制御に転写因子が関与するかを調べた。*mlp37* の転写が ToxR 依存的であり、さらに Δ toxR 株において *mlp37* のプロモーター活性が 30°C で上昇することから、今回の実験では 30°C で培養した野生株と Δ toxR 株を用いて EMSA 解析を行った (図4)。その結果、わずかなではあるものの Δ toxR 株においてバンドの移動度が低下した。この結果は転写が抑制されている WT では存在しない転写因子が Δ toxR 株において存在することを示唆する。つまり、アクチベーターの存在を示唆する可能性がある。

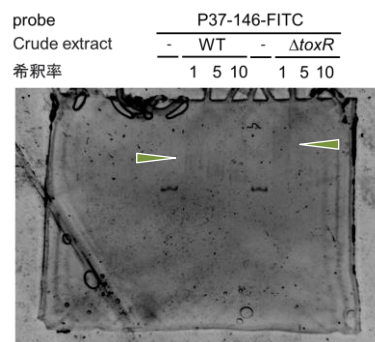


図4 野生株と Δ toxR 株を用いた EMSA 解析

(4) 大腸菌内でのプロモーターアッセイ

mlp37 の温度依存的転写制御がコレラ菌内でのみ起こるものか検討するために、*mlp37* 上流領域をクローニングした pLUX プラスミドを大腸菌野生株である W3110 に移入しルシフェラーゼアッセイを行った (図5)。その結果、大腸菌においては *mlp37* のプロモーター活性がほとんどみられなかった。このことは *mlp37* の転写がコレラ菌特有の転写因子を必要とすることを示唆する。

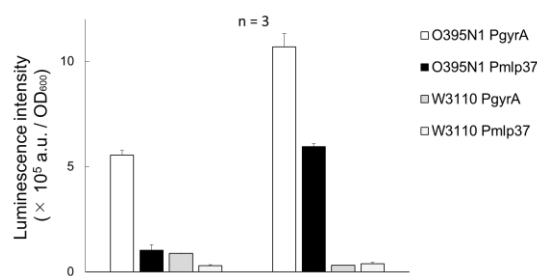


図5 *mlp37* プロモーターの大腸菌内での活性

4. 結言

本研究では以下のことを見出した。*mlp37* mRNA において、開始コドンと SD 配列付近に塩基対形成が起こると推定されたが、温度依存的制御に関与する可能性は低い。また、*mlp37* の転写を促進するコレラ菌特異的な転写因子が存在する可能性がある。

参考文献

- 1) Nishiyama, S. et al. : Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acid as attractants. Sci. Rep., Vol. 6, 20866, 2016
- 2) Onogi, S.: Temperature control of chemoreceptor gene expression via pathogenicity-regulated transcription factor in *Vibrio cholerae*. 修士論文, 法政大学大学院理工学研究科, 2015
- 3) Childers, B. M., Klose, K. E. : Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: The ToxR regulon. Future Microbiol., Vol. 2, pp. 335-344, 2007