

令和 3 年 10 月 7 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08842

研究課題名(和文) コレラ菌ToxRレギュロンは走化性受容体をどこまで支配するのか

研究課題名(英文) Expression controls of Vibrio cholerae chemoreceptors by the ToxR regulatory network

研究代表者

西山 宗一郎 (So-ichiro, Nishiyama)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：30343651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ菌のToxR/TcpP制御ネットワークは温度などの様々な環境因子を検知し、それに応じて病原因子の発現を調節する。コレラ菌は胆汁成分のタウリンへの走化性を示すが、その走性が高温培養時に上昇することから、ToxR/TcpPの関与が疑われる。本研究ではタウリン走性を担う走化性受容体Mlp37がToxR/TcpP制御下にあるのか、またToxR/TcpP制御下にあるが解析が進んでいない走化性受容体Mlp7・Mlp8の機能解明を目的として研究を進めた。結果、種々の解析によりmIp37の発現が実際にToxR/TcpP制御下にあることが強く示唆された。またMlp7のリガンドを複数同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレラ菌のToxR/TcpP制御ネットワークは外的な環境要因により病原因子の発現制御を行うが、本研究により走化性能の精密なコントロールも行っていることが明らかとなり、このネットワークは従前考えられていたよりも更に巨大な制御回路を形成していることが示された。この知見はコレラ菌の病原性と走化性の関連性をより一層補強するものであり、コレラの新たな予防・治療法へ結びつくことが期待される。関連走化性受容体の新規リガンド同定及びその応答については、上記ネットワークの精妙さを裏付けると共に、受容体の刺激受容とシグナル伝達機構の分子メカニズムに関して、従来の常識に一石を投じ新たな展望を拓く重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Vibrio cholerae, the etiological agent of cholera, is attracted to bile and its component, taurine. We have already identified Mlp37 as a chemoreceptor for taurine. We also found that V. cholerae shows stronger taurine chemotaxis when cultured at 37 degree Celsius than cultured at 30 degree Celsius. It's been known that V. cholerae constitutes a regulatory network, named ToxR regulon, to control expressions of virulence genes upon environmental stimuli, such as temperature. The aim of this study is to elucidate involvement of the ToxR network in mlp37 expression and function of other chemoreceptors (Mlp7 and Mlp8) that are controlled by the network. We found that ToxR-related mutants failed to repress taurine response at 30 degree Celsius, suggesting that the ToxR network actually play roles in the regulation of mlp37. We also succeeded in identifying a couple of ligands for Mlp7. Temperature regulation of mlp37 expression and function of Mlp7 were at least partly elucidated.

研究分野：細菌走化性

キーワード：コレラ菌 走化性 環境応答 病原因子

1. 研究開始当初の背景

コレラは現在でも発展途上国を中心に流行を繰り返しており、人類が被っている人的・経済的損失は甚大である。起因菌であるコレラ菌の病原メカニズムの解明はコレラ予防及び治療のためにも重要な課題である。コレラ菌はアミノ酸などの種々の栄養物質に誘引される走化性を示し、そのセンサーとして40種以上という極めて多数の走化性受容体ホモログ（MCP-like proteins, MLPs）をもつ。それらのうち、私達は病原性との関連が強く示唆されている Mlp24・Mlp37 がいずれもセリンなど多数のアミノ酸への走性を媒介すること、アミノ酸と直接結合することを見出している^{1),2)}。またコレラ菌は胆汁成分のタウリンに対しても走性を示すが、Mlp37 がアミノ酸だけでなくタウリン受容体としても機能することも見出している²⁾。私達はコレラ菌を高温（37°C）で培養するとタウリン走化性が著しく増強されること、Mlp37 のタンパク量が增加すること、それが転写レベルでの制御に依ることを見出している。しかし *mlp37* の温度依存的な発現制御が具体的にどのような分子メカニズムで成立するのかは不明である。温度による発現制御で第一に注目されるのは、温度や pH 等の様々な環境因子に応答し種々の病原因子の転写をコントロールする ToxR/TcpP 制御ネットワークである。しかしこれが先述の *mlp37* の発現制御に関与するかどうかは未解明である。一方、ToxR/TcpP ネットワークが制御する走化性受容体としては Mlp7・Mlp8 が知られているが、その機能の詳細が分かっていない。

2. 研究の目的

本課題では、コレラ菌走化性受容体ホモログ（MLPs）のうち上記3種（Mlp37・Mlp7・Mlp8）に着目し、Mlp37 については ToxR/TcpP ネットワークの制御下にあるかどうかを検討することを目的とした。一方 Mlp7・Mlp8 についてはその機能、特に何がリガンドとなっているか解明することを目指した。

3. 研究の方法

本課題では遺伝学的アプローチを主体とし、機能解析のためにコレラ菌の走化性能を定量的に評価するキャピラリアッセイ、コレラ菌の走化性コンポーネントを大腸菌内で発現させ菌の走化性応答をダイレクトに観察する大腸菌再構成系を用いた。生化学的手法としては ITC による走化性受容体とリガンドとの結合解析、及びウェスタンブロッティングによる応答解析を用いた。走化性受容体は一般に刺激に対する適応時にメチル化／脱メチル化を受け、SDS-PAGE でのバンドの移動度が変化するため、ウェスタンブロッティングによりそれを検知することが可能である。

4. 研究成果

(1) Mlp37 の発現制御における ToxR/TcpP 制御ネットワークの関与

toxR や *tcpP* の欠失株 ($\Delta toxT \cdot \Delta tcpP$) を用いて培養温度を変えた場合のタウリン走性応答を調べたところ、野生型で見られる 30°C 培養時のタウリン応答の抑制が外れ、37°C 培養時に匹敵するタウリン走化性応答を示すことを示した。この結果は、*mlp37* が実際に ToxR/TcpP ネットワークにより制御されている可能性を強く示唆する。そこで次に ToxR/TcpP の下流にある転写因子 ToxT の遺伝子欠失株 ($\Delta toxT$) を新たに作製し解析したところ、 $\Delta toxT$ 株は $\Delta toxR$ 株や $\Delta tcpP$ 株と類似した表現型を示した。即ち 30°C 培養時においてもタウリン走化性応答は大きく上昇していた。しかしその一方で、プロモーターアッセイによる解析では $\Delta toxR$ 株・ $\Delta tcpP$ 株で *mlp37* の転写活性が 30°C 培養時に上昇していたのに対し、 $\Delta toxT$ 株では転写抑制が残っていた。これらの結果、及び *mlp37* 上流領域に ToxT の結合配列 (Tox box) が見当たらないことから、*mlp37* 遺伝子の発現制御に ToxR/TcpP/ToxT が実際に関与していること、また ToxT が直接結合して制御されるのではなく、ToxT 以降の下流の因子が関わっている可能性が示唆された。

その他、関連する成果としては、Mlp37 と近縁である Mlp24 はカルシウムイオンが存在すると結合ポケットの構造が安定化し、複数のアミノ酸に対する Mlp24 の親和性及び Mlp24 媒介性の走化性能が大きく上昇することを見出した。一方、Mlp37 のアミノ酸走性媒介能はカルシウムイオンの影響を受けなかった^{3),4)}。Mlp24 及び Mlp37 のリガンド共結晶の構造解析及び *in vivo* での走化性アッセイの結果から、Mlp37 の場合は Mlp24 と異なり、結合ポケットを構成する特定のループの配置が結合するリガンドにより変化することでカルシウムイオン非依存的に多種のリガンドに対し高い親和性を保っていることを見出した⁴⁾。

(2) Mlp8・Mlp7 の機能解析

Mlp8 はペリプラズムタンパク質 AcfC と協同して機能すると予想されている。近年 AcfC の構造が明らかになり、その構造情報では AcfC に D-リンゴ酸が結合していた。そこで D-リンゴ酸が Mlp8-AcfC の誘引物質になるか検討したが、自分たちの解析系 (大腸菌再構成系・コレラ菌の Mlp8-AcfC 過剰発現株) では積極的な証拠は得られなかった。また近年他研究室からコレラ菌のムチン走性が Mlp8-AcfC を介している⁵⁾という報告があったため検討したが、こちらも自分たちの解析系では再現できなかった。大腸菌再構成系では Mlp8-AcfC を発現させた場合は高濃度グリセロールに対する忌避応答 (Mlp8 単独で媒介される走化性応答) は検出されたため、Mlp8 経路のシグナル伝達経路が確立されていることを確認できたが、D-リンゴ酸やムチンに対しての誘引応答は見られなかった。AcfC の発現も確認済であるが、大腸菌再構成系ではコレラ菌由来である AcfC のペリプラズム間隙への輸送に問題がある可能性がある。他方コレラ菌での解析系の場合、野生型では弱いながらも認められる D-リンゴ酸やムチンへの走化性応答が Mlp8-AcfC 過剰発現株では逆に減弱するという結果が得られた。Mlp8-AcfC が D-リンゴ酸やムチンを誘引刺激として受容するのであるなら、これらの実験結果を単純に説明できない。今後の検証には AcfC の *in vitro*

での結合解析や, *mlp8* や *acfC*, 或いは両方の遺伝子欠失株の作製が必須と思われる。

一方, Mlp7 の機能解析については最終年度に大きな進展があり, 新規アミノ酸受容体である可能性が強く示唆された。現在 *mlp7* 欠失株を作製中であるが, 並行して *in vitro* での結合解析も検討中である。

<引用文献>

- 1). Nishiyama S, Suzuki D, Itoh Y, Suzuki K, Tajima H, Hyakutake A, Homma M, Butler-Wu SM, Camilli A, Kawagishi I. 2012. Mlp24 (McpX) of *Vibrio cholerae* implicated in pathogenicity functions as a chemoreceptor for multiple amino acids. *Infect Immun* 80:3170-8.
- 2). Nishiyama S, Takahashi Y, Yamamoto K, Suzuki D, Itoh Y, Sumita K, Uchida Y, Homma M, Imada K, Kawagishi I. 2016. Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants. *Sci Rep* 6:20866.
- 3). Takahashi Y, Nishiyama S, Kazumasa S, Kawagishi I, Imada K. 2019. Calcium ion modulates amino acid sensing of the chemoreceptor Mlp24 of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 201: e00779-18.
- 4). Takahashi Y, Nishiyama S, Kawagishi I, Imada K. 2020. Structural basis of the binding affinity of chemoreceptors Mlp24p and Mlp37p for various amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 523: 233-8.
- 5). Valiente E, Davies C, Mills DC, Getino M, Ritchie JM, Wren BW. 2018. *Vibrio cholerae* accessory colonisation factor AcfC: a chemotactic protein with a role in hyperinfectivity. *Sci Rep* 8:8390.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuki Yamanaka, Rickson S Winardhi, Erika Yamauchi, So-ichiro Nishiyama, Yoshiyuki Sowa, Jie Yan, Ikuro Kawagishi, Akira Ishihama, Kaneyoshi Yamamoto	4. 巻 293
2. 論文標題 DNA-binding protein H-NS is required for gene silencing and stiffened nucleoprotein filament formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 9496-9505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA117.001425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 川岸郁朗, 田島寛隆, 山本健太郎, 西山宗一郎	4. 巻 4
2. 論文標題 コレラ菌のタウリン走性とその受容体	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 タウリンリサーチ	6. 最初と最後の頁 9-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yohei Takahashi, So-ichiro Nishiyama, Kazumasa Sumita, Ikuro Kawagishi, Katsumi Imadaa	4. 巻 201
2. 論文標題 Calcium Ions Modulate Amino Acid Sensing of the Chemoreceptor Mlp24 of <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Bacteriol.	6. 最初と最後の頁 e00779-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00779-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yohei Takahashi, So-ichiro Nishiyama, Ikuro Kawagishi, Katsumi Imadaa	4. 巻 523
2. 論文標題 Structural basis of the binding affinity of chemoreceptors Mlp24p and Mlp37p for various amino acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun	6. 最初と最後の頁 233-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.12.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawagishi Ikuro, Nishiyama So-ichiro	4. 巻 1593
2. 論文標題 Chemotactic behaviors of vibrio cholerae cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 259-271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-6927-2_21	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西山宗一郎, 高橋洋平, 今田勝巳, 川岸郁朗	4. 巻 57
2. 論文標題 コレラ菌タウリン・アミノ酸走性受容体の同定とそのリガンド認識機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 291-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.57.291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西山宗一郎, 田島寛隆, 小野木 汐里, 浦上弘, 川岸 郁朗
2. 発表標題 The regulatory network controls expression of the taurine chemoreceptor Mlp37 in Vibrio cholerae
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山宗一郎, 小野木汐里, 曾和義幸, 浦上弘, 川岸 郁朗
2. 発表標題 Temperature-dependent gene expression of the taurine sensor Mlp37 of Vibrio cholerae
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山宗一郎, 小野木汐里, 浦上弘, 川岸郁朗
2. 発表標題 コレラ菌タウリン走性の温度依存性は走性受容体Mlp37の発現制御でコントロールされている
3. 学会等名 第52回ヒブリオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 宗一郎、小野木 汐里、川岸 郁朗
2. 発表標題 コレラ菌タウリン走性受容体遺伝子の温度依存的発現制御
3. 学会等名 日本細菌学会第91回総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishiyama So-ichiro, Onogi Shiori, Kawagishi Ikuro
2. 発表標題 Temperature-dependent control of a taurine chemoreceptor Mlp37 of Vibrio cholerae
3. 学会等名 2017年度べん毛交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 宗一郎、佐川貴志、佐藤花、小嶋寛明、大岩和弘、川岸郁朗
2. 発表標題 大腸菌温度感覚レセプターTar-Tapキメラ体の温度受容能
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小野木 汐里、佐越紀秋、西山宗一郎、曾和義幸、川岸郁朗
2. 発表標題 コレラ菌タウリン走性受容体Mip37遺伝子の温度による発現制御
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関