#### 研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 5 年 6 月 2 2 日現在

機関番号: 32675 研究種目: 若手研究 研究期間: 2019~2022

課題番号: 19K16655

研究課題名(和文)コレラ菌は45種ものMLPをどのように活用しているか

研究課題名(英文)How does Vibrio cholerae use 45 MLPs depending on the cases?

#### 研究代表者

田島 寛隆 (Tajima, Hirotaka)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号:40642468

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1.900.000円

研究成果の概要(和文): 本研究では,コレラ菌V. choleraeの誘引物質を複数,新たに見出した.また,いくつかの誘引物質については,それを感知するMLPを同定した.MIp2は,糖新生の基質であるピルビン酸およびオキサロ酢酸を結合し,誘引応答を媒介した.またMIp2はセリンも感知するが,結合はしなかった.MIp2のリガンド認識については投稿準備中である.また,腸内で豊富なある物質が誘引物質であることを新奇に見出しており,感染との関連が推定される.さらに,コレラ菌の忌避物質はこれまでフェノールのみが知られていたが,あるアミノ酸に対して忌避応答を示すことを新たに見出した.

研究成果の学術的意義や社会的意義本研究では糖新生の基質や,腸内に豊富に存在する物質にコレラ菌が誘引応答を示すことを見出した.コレラ菌の走化性は,病原性発現と密接に関連していることが知られており,そのメカニズム解明が期待できる.これらの物質の感知に関わると同定したMLPは,これまでに報告されている走化性受容体と異なる.これらのMLPを精査し,すでに知られているものと比較することで,コレラ菌の複雑な走化性メカニズムの理解を進めることができるであろう.

。 また,本研究で新たに忌避物質として見出したアミノ酸はこれまでに知られていたフェノールより毒性が低い と考えられ,コレラ菌の走化性,ひいては感染メカニズム解明の促進が期待できる.

研究成果の概要 (英文): In this study, we found out several attractants of V. cholerae. Moreover, we identified the MLPs that sense some of the new attractants. MIp2 bound pyruvate and oxaloacetate, substrates for glycosylation, and mediated the attractant response. MIp2 also sensed, but did not bind serine. The ligand recognition of MIp2 is in preparation for submission. We also found that a certain substance abundant in the intestine is a novel attractant. This characteristic was presumed to be associated with the infection of V. cholerae. Furthermore, we newly found that V. cholerae shows a repellent response to a certain amino acid, although phenol is the only known repellent.

研究分野: 生物物理

キーワード: 走化性 シグナル認識

#### 1.研究開始当初の背景

コレラは発展途上国を中心に毎年,多数の罹患者が発生している感染症である.コレラ感染症の原因菌であるコレラ菌 Vibrio cholerae はアミノ酸など様々な化学物質に対して走化性を示す.コレラ菌の病原性は走化性と深く関連することが知られている.細菌の走化性は大腸菌で良く研究されており,大腸菌は化学物質を感知する走化性受容体(MCP)を5種もつ.一方,コレラ菌では40種以上の走化性受容体ホモログ(MCP-like proteins, MLP)が見つかっている.しかし,これらの MLP のうち多くは機能や発現条件などがわかっていなかった.

### 2. 研究の目的

本研究の目的はコレラ菌の MLPs の機能と発現調節メカニズムを解明することであった.走化性に関わるものは感知する刺激を特定し,病原性との関連の理解を目指した.特にヒト体内で豊富な物質を感知するものや,ヒト体内に近い環境で発現が誘導される MLP の同定を目的とした.また,コレラ菌の走化性研究はキャピラリアッセイなどの煩雑な手法が採用されている.そこで,より簡便な手法の開発と,そのための忌避物質の探索を行った.

### 3.研究の方法

走化性応答調節因子 CheY3 を過剰発現させて方向転換頻度を上昇させたコレラ菌走化性野生株 O395N1 に様々な化学物質を与え,方向転換頻度が低下し誘引応答を示すかを顕微鏡下で観察した.それぞれの物質の感知に関わる MLP の同定にはメチル化アッセイを行った.MLP は誘引物質を感知するとメチル化レベルが上昇し ,SDS-PAGE での移動度が上昇する .各 MLP をクローニングして O395N1 で発現させ,誘引物質を与えて SDS-PAGE での移動度の変化を調べた.また,ペリプラズムドメインフラグメントをプラスミドから発現,精製し,ITC を用いて結合するかどうかを測定した.

## 4.研究成果

(1) 本研究ではコレラ菌の誘引物質を複数,新たに見出した.コレラ菌は糖新生の基質であるピルビン酸に対して誘引応答を示した.一方で,TCA 回路の基質であるコハク酸やフマル酸には誘引応答を示さなかった.ピルビン酸走性に関与する MLP を同定するためにメチル化アッセイを行ったところ,ピルビン酸の添加により Mlp2 の SDS-PAGE での移動度が上昇し,これらの物質に対する走性に関与していると考えられた.Mlp2 は当研究室のこれまでの研究によりセリン走性にも関与することが推定されていた.そこで,Mlp2 のペリプラズムドメインフラグメントを構築し ITC アッセイを行ったところ,ピルビン酸は結合したが,セリンは結合しなかった(図 1).したがって Mlp2 はピルビン酸の走化性受容体であり,また,セリンに対しては受容体ではなくトランスデューサーであると考えられた.

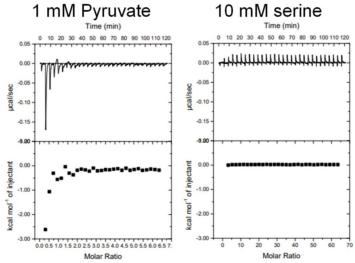


図 1: Mlp2 のペリプラズムドメインフラグメントを用いた ITC アッセイ . 10 mM のフラグメントタンパク質に各物質を滴定し,熱変化を測定した.

- (2) コレラ菌は腸内に豊富に存在する,ある化学物質 X に対して誘引応答を示すことを見出した.また,メチル化アッセイにより X の感知に関与する MLP を同定した.X は生理活性物質であり,この物質に対する走化性はコレラ菌の感染サイクルにおいて重要であることが推測される.
- (3) 忌避物質を利用することで誘引応答を明確に観察することができる.しかし,これまでに知られていたコレラ菌の忌避物質はフェノールのみであり,フェノールは菌体にダメージを与えるため利用が難しかった.本研究では新たにあるアミノ酸に対してコレラ菌が忌避応答を示すことを見出した.詳細な解析はできていないが,このアミノ酸を感知する MLP は複数存在する.このアミノ酸は菌体にダメージを与えないと推定され,利用することでコレラ菌の走化性研究の進展が期待できる.

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)
1.発表者名 田島寛隆,竹中陽菜,浅岡草太朗,八尾和輝,川岸郁朗
2.発表標題 コレラ菌の忌避応答
3.学会等名 2022年度べん毛研究交流会
4.発表年 2023年
1.発表者名 田島寛隆,八尾和輝,西山宗一郎,川岸郁朗
2 . 発表標題 Vibrio choleraeピルビン酸走性受容体の同定
3 . 学会等名 第54回ビブリオシンポジウム
4 . 発表年 2022年
1.発表者名 田島寛隆,八尾和輝,川口徹也,山元季実子,川岸郁朗
2.発表標題 コレラ菌ピルピン酸 / オキサロ酢酸走性受容体の同定と解析
3.学会等名 2021年度べん毛研究交流会
4 . 発表年 2022年
1.発表者名 田島寛隆,八尾和輝,福島千晃,西山宗一郎,川岸郁朗
2. 発表標題 コレラ菌のピルビン酸・オキサロ酢酸走性受容体の同定
3.学会等名 第95回 日本細菌学会総会
4.発表年 2022年

1	びキセク	
- 1	<b>平太石石</b>	

Chieh-Ming Tai, Shiori Onogi, Hirotaka Tajima, Tetsuya Kawaguchi, Kimiko Yamamoto, So-ichiro Nishiyama, Ikuro Kawagishi

# 2 . 発表標題

Identification and characterization of an attractant-sensing system of Vibrio cholerae consisting of a periplasmic receptor and a transmembrane transducer

#### 3 . 学会等名

第102回日本細菌学会関東支部総会

### 4.発表年

2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6.研究組織

٠.	W120MT1140		
	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

	司研究相手国	相手方研究機関
--	--------	---------