

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02106

研究課題名(和文)環境細菌の走化性センサーはどのようにして多種類・多数のアミノ酸を感知できるか？

研究課題名(英文)How can chemotaxis sensors in environmental bacteria sense multiple amino acids?

研究代表者

加藤 純一 (KATO, Junichi)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・教授

研究者番号：90231258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：Pseudomonas protegens CHA0のアミノ酸走化性センサーCtaBのA144をAspに変換させたCtaB A144Dを構築した。CtaB A144Dは本来のリガンドである4アミノ酸に対する応答は大幅に減退したものの、Argに対する応答が創出された。A144をGlu、Lys、Argに変換した変異体はいずれのアミノ酸も感知しなかった。CtaB A144DのArgへの結合では、Argのグアニジノ基、カルボキシル基が必要であることが分かった。分子ドッキングモデリングから、CtaB A144Dではこれまで知られてきたアミノ酸の結合方向と反対の配向性で結合していることが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

100年以上にわたり原核生物の走化性応答が調べられてきたが、そのうち誘引物質として最も多いのはアミノ酸である。21世紀に入り、アミノ酸に対する走化性が植物感染や根圏定着に寄与することが示されてきており、アミノ酸走化性が増殖基質の探索のみならず、生態学的また実用的にも重要な生物相互作用に関わっていることが分かってきた。となれば、走化性を制御することで植物感染や植物-微生物共生といった生物相互作用を制御できるのではないかと本研究を行った。そして、アミノ酸走化性センサーのリガンド結合サイトのアミノ酸残基を改変することで、新たなアミノ酸応答を創出できることを示すことができたことは大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We introduced a site-directed mutagenesis to A144 of CtaB, an amino acid chemotaxis sensor of Pseudomonas protegens CHA0, to construct CtaB A144D. CtaB A144D did not respond to the original 4 amino acid ligands, but it obtained the ability to respond to Arg. CtaB mutants, CtaB A144E, A144K, and A144R, did not respond to any amino acids. Chemotaxis assays to Arg analogs revealed guanidine group and carboxyl group are essential to recognition by CtaB. Molecular docking model analysis predicted that Arg binds to CtaB A144D in the opposite orientation of amino acid ligands.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ケモセンサー 物質認識機構 走化性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特定の化学物質(走化性リガンド)の濃度勾配を感知して集積する走化性は、増殖基質の探索並びに共生や感染などの生物相互作用の開始に資する環境応答と捉えられる。細菌の走化性において最も主要な走化性リガンドはアミノ酸である。アミノ酸は良好な炭素源・窒素源になり得ること、また宿主生物が分泌する主要成分のひとつであることがその理由なのであろう。走化性リガンドを感知する走化性センサーは膜貫通型のホモダイマーである。ペリプラズムに突き出たリガンド結合ドメイン(LBD)に走化性リガンドが結合し、走化性シグナルが細胞質の走化性シグナル伝達系に伝達される。アミノ酸走化性センサーはLBDの形状により2つのグループに分かれる。ひとつは4つの α -ヘリックスで構成される4-ヘリックスバンドル(4-HB)グループである。古くから研究がなされている大腸菌の Tar や Tsr がこのグループに属する。このグループの特徴はリガンド特異性が高く1~3種類のアミノ酸のみを感知する。もうひとつは二つの団子状構造を有するダブル PDC(PhoQ/DcuS/CitA)グループである(図 2b)。 *Pseudomonas aeruginosa* の PctA(Kuroda, et al. 1995)がその代表となろう。ダブル PDC グループのアミノ酸走化性センサーの特徴は 4-HB グループとは対照的に多数のアミノ酸を感知できることである。PctA(*P. aeruginosa*)、McpC(*Bacillus subtilis*)、McpU(*Sinorhizobium meliloti*)、McpA(*Ralstonia solanacearum*)は18~20の天然アミノ酸を感知できる。ダブル PDC 型アミノ酸走化性センサーはプロテオバクテリア全般、フィルミクテス、シアノバクテリア、アクチノバクテリアに広範に分布していることから、4-HB グループよりも原初のセンサーグループであり、また細菌が生態系で生息していく上で大きな貢献を与えていると推測できる。ダブル PDC 型アミノ酸走化性センサーの発見から25年が経つが、いまだにどのようにして側鎖構造が異なる多数のアミノ酸を感知しているのかについては不明のままである。

2. 研究の目的

ダブル PDC 型アミノ酸走化性センサーがどのようにして多数の種類のアミノ酸を感知できるか、分子レベルで解明する。本研究で主に対象とするのは *Pseudomonas protegens* のアミノ酸走化性センサーである。植物成長促進根圏細菌(PGPR)である *P. protegens* は4つのアミノ酸走化性センサーを有し、いずれもがダブル PDC グループである。このうち CtaA および CtaD はそれぞれ20および11種類の天然アミノ酸を感知する。それに対し CtaA のLBDのアミノ酸配列と45~50%の相同性を持つ CtaB と CtaC は4種類のアミノ酸しか感知できない。本研究では：

ctaA 遺伝子に位置特異的変異を導入して変異型 CtaA を構築し、そのアミノ酸感知能を評価することで、アミノ酸感知に関与するアミノ酸残基を明らかにする。

ctaB もしくは *ctaC* 遺伝子に位置特異的変異を導入して得られた変異型センサーのアミノ酸感知能の評価から、リガンド特異性が拡大する変異を特定する。

および の結果に基づきモレキュラードッキング解析を行う。

ことにより、*P. protegens* CtaA がどのようにして多種類・多数のアミノ酸を感知できるかを分子レベルで解明する。研究が順調に進んだ場合、*P. aeruginosa* (PctA、PctB、PctC)や *R. solanacearum* (McpA)のアミノ酸走化性センサーについても変異体を作成し、*P. protegens* での結果の一般性について検討する。

アミノ酸走化性は増殖基質としてのアミノ酸の探索だけでなく、生物相互作用の相手の探

索とアプローチにも寄与していることが分かっている(Oku, et al. 2012)。PGPR である *P. protegens* や *P. fluorescens* などは宿主の植物の根圏にアプローチして定着することで初めて植物成長促進効果を発揮できる。したがって、本研究の成果は単にアミノ酸走化性センサーのリガンド特異性の広さの仕組みを理解するだけではなく、PGPR を効率的に宿主植物の根圏に定着させるための育種にも活用できよう。この課題は次期の宿題である。
Oku, et al. *Microbes Environ.* 27, 462-469 (2012).

3. 研究の方法

部位特異的変異導入：まず標的遺伝子をプラスミドベクターにクローニングする。その後、変異を導入したプライマーを用いた PCR を行って環状化し、変異遺伝子を持つプラスミドを構築する。適切な変異が導入されたかは、DNA シーケンシングにより確認する。

走化性測定：コンピュータ支援キャピラリーアッセイ(Nikata, et al. 1992)で走化性を測定した。上記の部位特異的変異を導入したアミノ酸走化性センサーおよび野生型の走化性センサーのアミノ酸感知能は、それぞれの遺伝子を *Pseudomonas aeruginosa* PCT2 株にプラスミドで導入して評価した。*P. aeruginosa* PCT2 株は、アミノ酸走化性センサーである PctA, PctB および PctC の遺伝子を欠失した株である(Taguchi, et al.1997)。

Nikata, et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2250-2254 (1992).

Taguchi, et al. *Microbiology* 143, 3223-3229 (1997).

分子ドッキングモデリング解析：Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)を用いて蛋白質の三次元構造を推定した。Auto Dock Vina(<https://vina.scripps.edu/>)を用い、分子ドッキングモデリング解析を行った。

4. 研究成果

【部位特異的変異の標的とするアミノ酸残基】*Vibrio cholerae* の多数のアミノ酸を感知する走化性センサー Mlp37 の構造解析から、リガンドであるアミノ酸のカルボキシル基およびアミノ基の結合に関与するアミノ酸残基が 6 つ特定されている。*P. protegens* CHA0 が有する 4 つのアミノ酸走化性センサーのリガンド結合部位(LBD)は Mlp37 のそれと相同性を示す。これら 5 つの走化性センサーの LBD について相同性検索を行うと、

Mlp37	Y121	R152	W154	Y170	D172	D201	
CtaA(19)	Y	R	W	Y	D146	D	
CtaB(4)	Y	R	W	Y	A144	D	
CtaC(2)	Y	R	W	Y	A171	D	
CtaD(7)	Y	R	W	Y	W164	D	カッコ内はリガンド数

Mlp37 のアミノ酸結合に関与するアミノ酸残基の 5 つはすべての走化性センサーで保存されているが、Mlp37 D172 に対応する残基は 19 のアミノ酸を感知する CtaA では保存されているものの、他のセンサーは異なる残基であった。そこで、Mlp37 D172 に対応する残基の感知アミノ酸数への影響を調べるべく、この部位の変異蛋白質を構築し、評価を行った。

【走化性センサーの変異体の評価】まず、CtaA D144A を構築し、CtaA の D146 が必須であるか確認した。CtaA D146A 変異体はいずれのアミノ酸に対する応答も低下し、CtaA の D146 がアミノ酸感知に必須であることが確認された。次いで、CtaB の A144 を Asp に変換した CtaB A144D を構築した。CtaB A144D は本来のリガンドである Asn, Gln, Met, Ser に対する応答は大幅に低下した。しかし、野生型 CtaB が応答しなかった Arg を感知できるようになっていた(図 1)。側鎖が無極性な Ala から酸性側鎖の Asp に変換することでこれらの変化が生じたことから、酸性側鎖の Glu、塩基性側鎖の His, Lys, Arg に変換した CtaB 変異体を作成したが、いずれも本来のリガンドに対する応答がなくなるだけで、Arg への応答の創出は起こらなかった。CtaB A144D は Arg のホモログであるアグマチン、オルニチン、シトルリンには応答しないことから、CtaB A144D の Arg の感知には、Arg のグアニジノ基およびカルボキシル基が必要であることが推察された。

【分子ドッキングモデル解析】CtaB の A144 の Asp への変換でどのようにして Arg を感知できるようになったかを、分子ドッキングモデル解析で解析した。野生型の CtaB と CtaB A144D の三次元構造を Phyre2 で推定した。その推定構造を用いて AutoDock Vina で Arg に対する分子ドッキングシミュレーションを行った。野生型の CtaB と Arg とでは有意な結合は見出されなかった。一方、CtaB A144D では D144 が Arg のグアニジノ基とイオン結合する結合様式が示された(図 2)。面白いのは、CtaA の D146 はリガンドアミノ酸のアミノ基とイオン結合しているが、CtaB A144D では D144 は Arg 側鎖のグアニジノ基にイオン結合してことである。すなわち、CtaA におけるリガンドアミノ酸の結合の配向性と、CtaB A144D における Arg の結合の配向性は逆の方向になっている。

CtaA の D146 はアミノ酸の感知に必須で Ala に変換すると機能が失われることが上記試験から

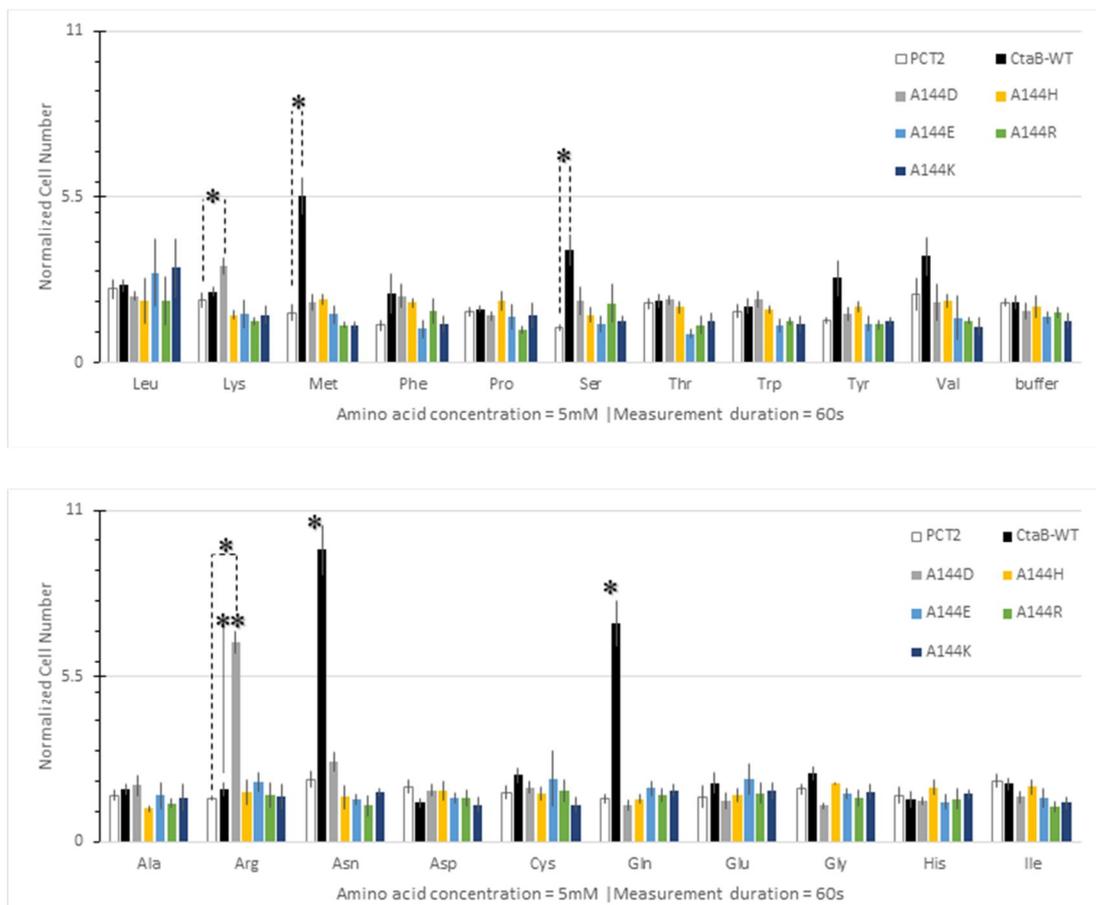


図1 CtaB およびその部位特異的変異体のアミノ酸認識

それぞれの遺伝子を持つプラスミドを *P. aeruginosa* PCT2 に導入し 5mM のアミノ酸に対する走化性応答を計測した。縦軸は走化性強度。*は PCT2 の応答と有意 ($P < 0.05$) な差がある応答。

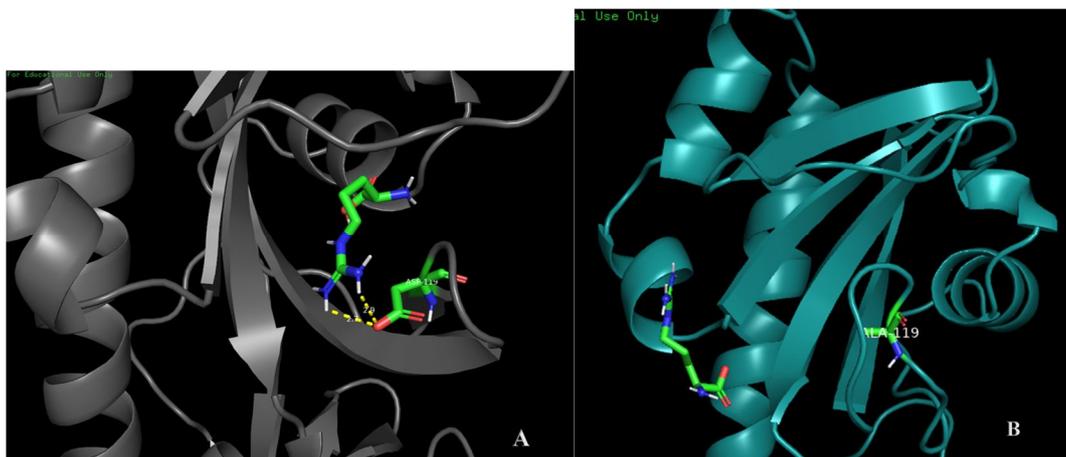


図2 CtaB A144D(A)および野生型 CtaB(B)と Arg の分子ドッキングモデル解析の結果 Arg 分子と CtaB A144D では D144 側鎖、野生型 CtaB では A144 側鎖が表示されている。

示された。一方、CtaB では CtaA の D146 に相当する残基は Ala(A144) で機能している。さらに、A144 を Asp に変換すると本来のリガンドの認識能は喪失した。この結果は、CtaA と CtaB におけるリガンドアミノ酸の結合様式が多少異なっていることを示唆するものである。Phyr2 で予測した CtaA の D146 の側鎖と CtaB A144D の D144 の側鎖を比較したところ、CtaA の D146 の側鎖は結合ポケットの方に伸びてリガンドアミノ酸のアミノ基とイオン結合が可能になっているが、CtaB A144D の D144 の側鎖は結合ポケットから離れるように伸びており、そのためリガンドアミ

ノ酸のアミノ基と相互作用しにくい状態になっていた。それに対し CtaB の A144 の側鎖はリガンドアミノ酸のアミノ基と水素結合することが推定された。

【考察】Mlp37 で明らかにされたリガンドアミノ酸のアミノ基およびカルボキシル基への結合に関与するアミノ酸残基の保存が多数のアミノ酸認識につながると考え、CtaB A144D を構築して走化性応答を調べたところ、本来のリガンドへの応答はほぼ消失していた。分子ドッキングモデル解析を通じ、CtaB A144D の Asp 残基はリガンド結合ポケットから離れるように配置していることが予想され、それ故本来のリガンドの結合力が弱まったと推定された。となると、Mlp37 の D172 に相当するアミノ酸残基の周辺のアミノ酸残基が多数のアミノ酸を感知できるかどうか大きな影響を持つと想定し得る。Mlp37 の D172 に対応する残基の周辺をアライメントする下

Mlp37	TAPYADSAS	
CtaA(19)	TEPYIDLAS	
CtaB(4)	TPPYMAAVG	網掛けは、Mlp37 の D172 に対応する残基
CtaC(2)	TEPYIAASS	赤字はすべてのセンサーもしくは4つのセンサーで保存されている残基
CtaD(7)	TEAYYWASD	

記のようになる。上流の Thr、Pro、Tyr 残基はほぼ保存されているので、“D172”より下流の残基を(CtaA では D146 より下流の残基)を Ala スキャンニング等により解析すればこの可能性を評価できよう。

CtaB の A144D の変異導入で新に Arg に応答できるようになった。面白いのは、Mlp37 や CtaA でのリガンドアミノ酸の結合方向と CtaB A144D での Arg の結合方向は真逆であることが予想できることである。このように、簡単な変異(1アミノ酸残基の置換)で新たな機能を獲得できることが明らかになった。走化性センサーの進化を考える上で重要な知見といえよう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nasrullah Harino Al Ghifari, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Junichi Kato
2. 発表標題 Analysis of ligand recognition mechanism of chemotactic receptors for amino acids in Pseudomonas protegens CHA0
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021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
---------	---------