

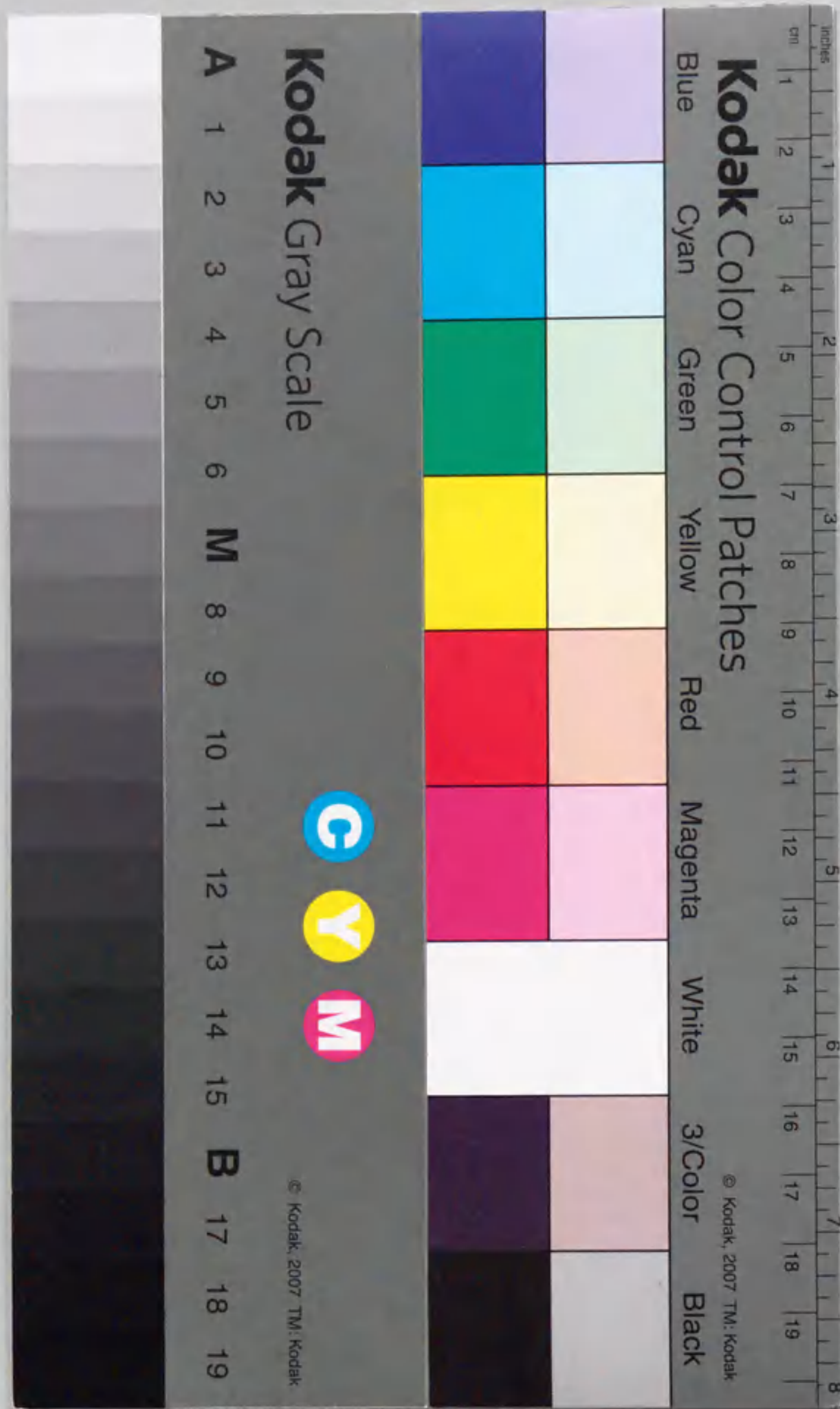
学位論文

バクテリアの化学感覚受容体の研究

名古屋大学理学研究科分子生物学専攻

山本公子

1993年



報告番号 乙第 4371 号

①

学位論文

主論文

バクテリアの化学感覚受容体の研究

名古屋大学理学研究科分子生物学専攻

山本公子

1993年

0781

目 次

要 旨	1
第 1 章 序 論	3
第 2 章 材料と方法	15
第 3 章 大腸菌のフェノール応答に 関与する受容体の同定	18
第 4 章 サルモネラ菌の新しい種特 異的化學受容体の同定	33
第 5 章 考 察	49
引用文献	59
付 記	61
謝 辞	62

要 旨

細菌の化学感覚受容体と呼ばれる1群の膜貫通性蛋白質は、外界の刺激物質の濃度変化の感知と膜を介した情報伝達を通して走化性として知られる行動の発現に重要な役割をになっている。大腸菌やサルモネラ菌の化学感覚受容体については、分子レベルの解析が進められており、その構造や機能についてかなりの点が明らかになりつつある。大腸菌にはアスパラギン酸応答用のTar、セリン応答用のTsr、リボース用のTrg、ジベプチド用のTapと4種受容体の存在が明らかとなっているが、近縁のサルモネラ菌にもTar、Tsr、Trgの存在が知られている。これらの受容体は類似性が非常に高く、それぞれの受容体の認識する化学刺激物質の種類やその濃度もほぼ一致している。しかしながら、大腸菌とサルモネラ菌はいくつかの刺激物質に対して異なった反応をする。即ち、大腸菌はマルトース、ジベプチド、フェノールに対して誘引応答し、クエン酸には反応しないのに対して、サルモネラ菌は、フェノールに対し忌避応答、クエン酸に対し誘引応答を行ない、マルトース、ジベプチドには応答しない。これらの差異のうち、マルトース応答の違いはそれぞれのTar受容体の違いに起因し、大腸菌のジベプチド応答は大腸菌に存在する種特異的な受容体Tapによることがわかっている。しかし、クエン酸及びフェノールに対する応答の違いの原因は不明である。

そこで、本研究において、私は、大腸菌とサルモネラ菌の化学感覚受容機構の解明をめざし、両種におけるフェノール応答メカニズム及びサルモネラ菌のクエン酸応答メカニズムの解析を行なった。

大腸菌に存在する4種の受容体のうち、Tarがフェノールの正の受容体であることが知られていた。しかし、Tarが欠損した株では、弱いフェノール忌避応答が観察される。そこで、この応答がどの受容体により仲介されるのかを解析した結果、Trgがフェノールの負の受容体であることを明らかにした。さらに、残る受容体TsrとTapもフェノールにより比較的弱い忌避シグナルを産生することがわかった。したがって、大腸菌におけるフェノール応答機構は、4種の受容体が関与し、最終的な菌の振る舞いは産生されたシグナルの総和で決定される複雑なものであることが明らかとなった。

一方、サルモネラ菌では、大腸菌の場合と同様にTarがフェノールを誘引物質とみなすにも関わらず、菌は忌避応答を示す。また、サルモネラ菌は、クエン酸を誘引物質として認識する。これらの性質は、サルモネラ菌の持つ既

知の受容体、Tar、Tsr、Trgの産生するシグナルの組み合わせからは説明できず、サルモネラ菌は、大腸菌とは異なる未知の化学感覚受容体を持っていないわけではない。そこで、この新しい受容体のクローニングを試み、今までに知られていなかった、新しいサルモネラ菌の化学感覚受容体を発見した。この新しい受容体は、クエン酸及びクエン酸-メタル複合体を強い誘引物質として、また、フェノールを強い忌避物質として認識することが明らかとなった。そこで、この受容体をTcp (Taxis to Citrate and away from Phenol) と名付けた。さらに、サルモネラ菌Trg、Tsrのクローニングも行ない、大腸菌の場合と同様、いずれもフェノールの忌避シグナルを産生していることを確かめた。したがって、サルモネラ菌においては、Tcp、Trg、Tsrからのフェノール忌避シグナルの和がTarからの誘引シグナルを上回り、その結果、菌はフェノールに対し忌避応答すると考えられる。

クローニングしたtcp遺伝子の核酸塩基配列の決定を行なったところ、すでに核酸塩基配列の報告されているTar受容体と相同性が非常に高いことがわかった。また、配列から予想される蛋白質分子量は、58,947Daで、他の化学感覚受容体と良い一致を示した。Tcpは、他の受容体と同じく、刺激物質への適応に伴い、多重メチル化を受けることもわかった。したがって、Tcpは、MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein) と呼ばれる走化性化学感覚受容体の新しい一員であることが明らかとなった。

本研究で新たに発見されたTcpは、サルモネラ菌に種特異的な受容体であり、原因が不明であったフェノールとクエン酸に関する大腸菌とサルモネラ菌間の走化性応答の差異を創り出している。この受容体の発見は、今までに報告されている両種のTarの違い（マルトース応答能の有無）と大腸菌に種特異的なTap（ジペプチド応答）についての所見と合わせて、両種間の走化性応答の違いを矛盾なく説明するものであり、細菌の走化性メカニズムの研究に新しい知見を付け加えるものである。また、TcpとTarの相同性が高いことは、これらの受容体がクエン酸とアスパラギン酸という一部共通構造を持つ化合物を受容することと関連して、受容体の基質認識機構の解明にも重要な役割を果たすと期待される。

第1章 序論

1.1 細菌の行動

細菌は、全長 $1\sim 2\mu\text{m}$ 程度の原核単細胞生物であり、その生命維持メカニズムは、より高等な動物や植物のような多細胞真核生物に比べるとかなりシンプルである。にもかかわらず、多くの運動性細菌は高等生物と同様に、外部環境の変化を敏感に感知しそれに対応した行動をとることができる。例えば、液体培地中の細菌は、アミノ酸やオリゴペプチドなどの栄養物質濃度の高い方へ向かって集合したり、逆に重金属イオンなどの有害物質から逃れようとする。また、大腸菌 (*Escherichia coli*) やサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) は温度変化にも応答でき、環境中に温度勾配ができると温度の高い方へ向かって泳ぎだす。あるいは、好塩菌のあるものでは特定波長の光をエネルギー源として利用しており、その波長の光のあたる領域に集合する性質がある。このような、細菌の環境変化に対応した一連の行動は、それぞれ反応する刺激の種類により走化性、走熱性、走光性等と呼ばれている。それらの刺激受容から細胞内のシグナル伝達にいたる感覚応答の分子メカニズムについては、高等生物の感覚機構のモデルシステムとしても興味深く、詳しい研究解析が行われてきている(1-3)。

1.2 細菌の走化性システム

細菌感覚応答システムの中で、もっとも古くから分子レベルの研究が進められているのは走化性についてであり、主として大腸菌とサルモネラ菌を利用して遺伝子工学的手法を駆使した解析が行われてきた。現在までに、原形質膜上に存在する化学刺激の受容体から細胞内情報伝達分子、鞭毛および駆動系にいたる多くの走化性遺伝子とその産物が決定されており、それらの特性の解析も進められつつある。

大腸菌などの周毛性の細菌では、菌体表面に直径 20nm 、長さ約 $10\mu\text{m}$ のらせん状の鞭毛を数本~十数本もつ。しかし、真核生物の鞭毛とは異なり、細菌の鞭毛そのものに運動能はない。そのかわり、鞭毛基部の原形質膜中に鞭毛モーターが埋め込まれており(図1-1a)、鞭毛をスクリュウのように回転させ、液体培地中で菌体を推進する(1,4)。鞭毛は左(counter clockwise, CCW)にも

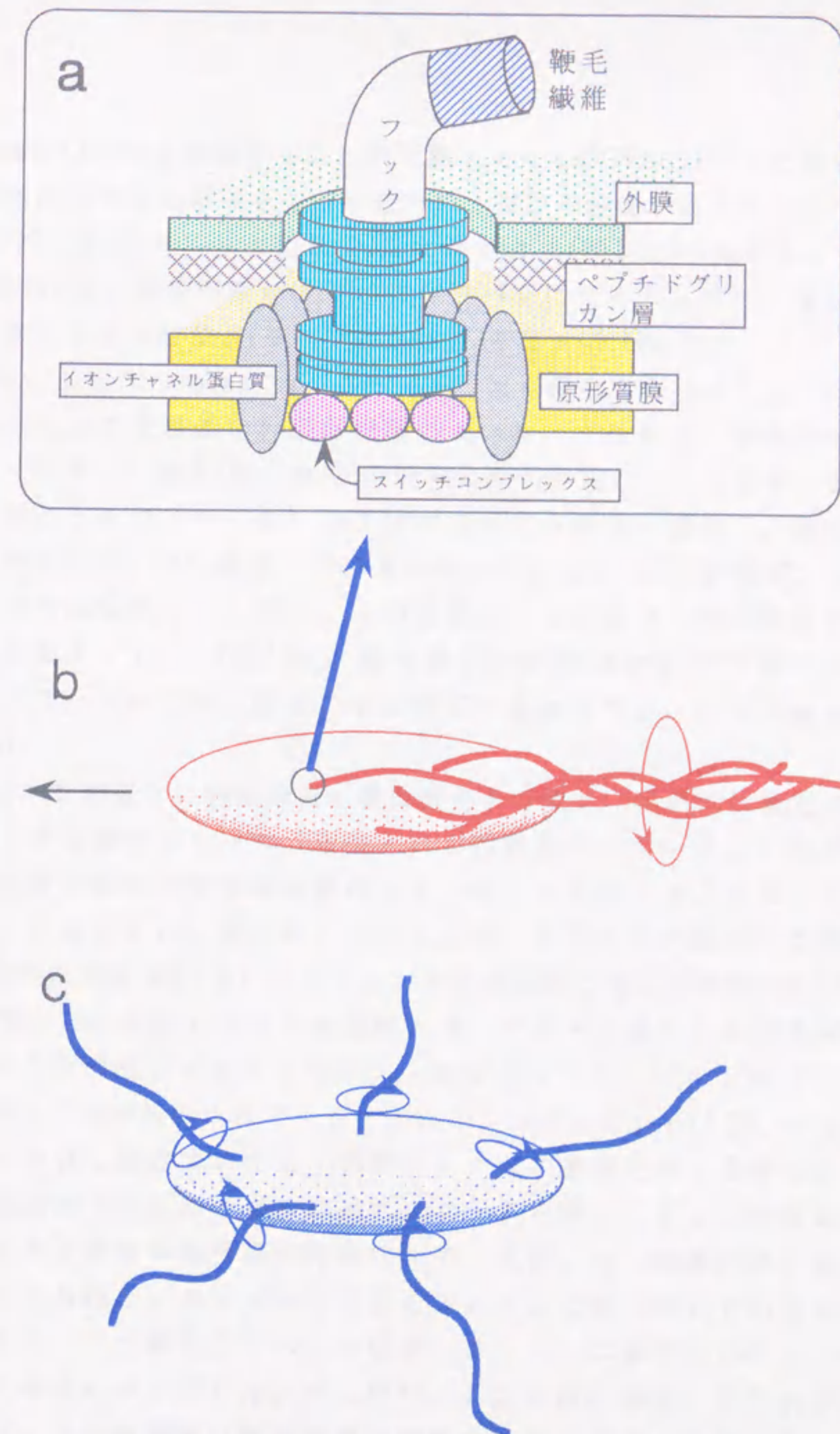


図 1-1 鞭毛モーターの回転方向と遊泳パターンとの関係。 a, ネズミチフス菌鞭毛モーターの模式図。モーターは4枚のリングを持ち、上から順に、L、P、S、Mリングと名付けられている。最下部のMリングは原形質膜中に埋め込まれている。Mリングの下の原形質膜中には回転方向の制御に関係するスイッチ蛋白質が、側方にはエネルギー変換に関係するイオンチャネル蛋白質が存在するはずであるが、今のところそれらの構造はわかっていない。 b, モーターがCCWに回転している場合。鞭毛繊維は束になって回転し、菌はまっすぐ泳ぐ。 c, CWに回転している場合。菌はその場で方向転換するような動きを示す。

右(clockwise, CW)にも回転することが可能である。CCWに回転した場合には、鞭毛線維が左らせんの形状をしているため、複数の鞭毛が束となって回転し、菌はまっすぐ泳ぐ(スムーズに泳ぐ)ことができる(図1-1b)。しかし、CWに回転した場合には、鞭毛の束がほどけてバラバラになってしまい、菌はその場で方向転換するような動き(タンブルな泳ぎ)を見せる(図1-1c)。

細菌は、この2つの泳ぎのパターンをうまく組み合わせることによって、前項で述べたような複雑な行動を実現している。すなわち、液体培地中に、菌にとって好ましい物質(誘引物質)の濃度勾配が存在している場合、濃度の高い方向へ進むときは、モーターはCCWに回転する頻度が増加し、まっすぐ泳ぐ時間が長くなる。逆に濃度の低い方へ向かうときにはCWの頻度がたかくなり、すぐに方向転換してしまう。その結果として、菌は、誘引物質の濃度の高い領域に集まっていく(図1-2a)。菌の嫌う物質(忌避物質)が存在する場合にはこの逆のことがおこり、菌は、その領域から逃げだすことができるのである(図1-2b)。

細菌は、このように刺激物質の濃度変化を感覚し、最終的に鞭毛モーターの回転方向を制御することで、走性という行動を行っている。したがって、細菌にも刺激物質の感覚機構が備わっていることがわかる。また、この運動様式からわかるように、菌が感じているのは、化学物質の絶対的な濃度ではなく、空間的な濃度勾配(菌にとっては、自分の周囲の濃度の時間変化)である。多くの研究から、細菌の化学感覚機構には、受容体と基質との結合解離で説明できるような単純なシステムの他に、適応(アダプテーション)を含むかなり複雑なメカニズムが付加されていることがわかってきている(1-3)。すなわち、刺激物質が存在し続けていても、時間がたてば刺激前と同じ状態に戻り、新たな刺激を認識可能になるような適応システムを持つことで、時間的に変化する刺激のみを感知する行動が可能になる。実際、何も刺激の無い状態の菌は、スムーズな泳ぎとタンブルな泳ぎをランダムに繰り返しているが、誘引物質を加えると、一時的にすべての菌が、スムーズに泳ぐ。しかし、数分後には、またもとのランダムな泳ぎに戻り、この刺激に適応してしまう。つまり、細菌は、自分の周囲の刺激物質の濃度を、常に直前の濃度と比較し、それによって、自分の行動を決定しているのである。

この場合、菌は濃度の高い方へ移動する。これは、菌が刺激物質の濃度の高い方へ移動する能力を示している。この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。

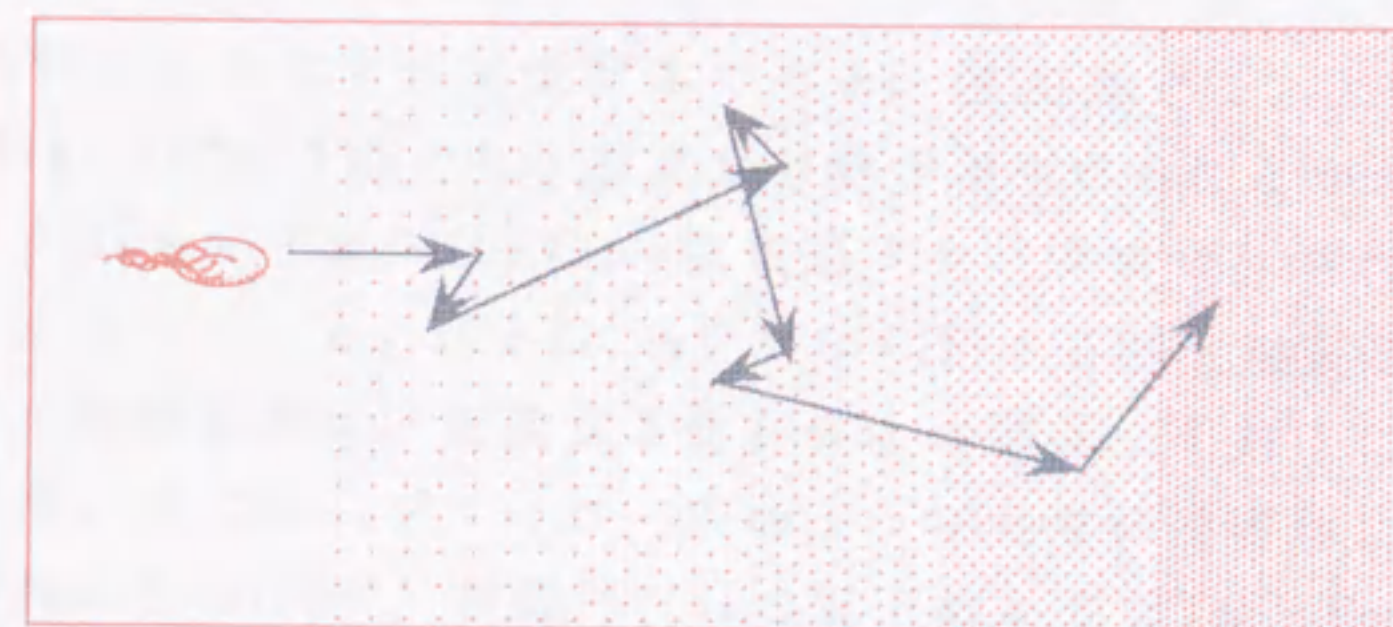
この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。

この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。

この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。

この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。この能力は、菌の生存に重要な役割を果たしている。菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、生存に必要な栄養素や酸素を得ることができる。また、菌は、刺激物質の濃度の高い方へ移動することで、競争的な環境で生存することができる。

a



b

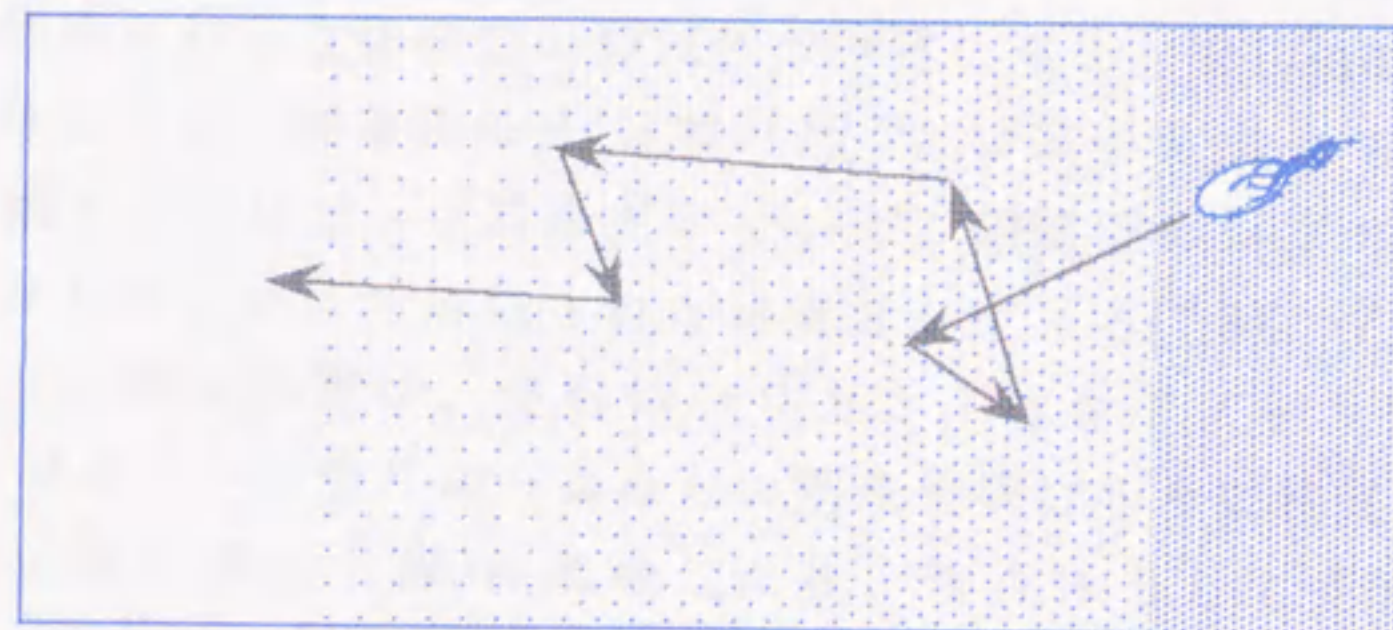


図 1-2 刺激物質の濃度勾配下における菌の行動。誘引物質 (a)、または、忌避物質 (b) の場合。右側が濃度大。

1.3 細菌の化学感覚受容体

細菌の走化性発現メカニズム中で主要な役割を果たしているのが、原形質膜上に存在する化学感覚受容体である。現在までに、大腸菌の場合、Tar、Tsr、Trg、Tapの4種の化学感覚受容体が存在することがわかっている。これらは、何れも分子量約60KDaの膜貫通タンパク質で、それぞれ認識する刺激物質が決まっている。表1-1に各受容体に対する刺激物質をまとめて示した。これらの刺激物質は、認識する受容体との関係が1対1に決まっているものが多いが、中には、グリセロールのように全ての受容体によって忌避物質と認識されるもの(5)や、細胞内pHの低下のようにTsrとTarの2つによって感知されるが、Tarには誘引刺激、Tsrには忌避刺激となるようにその認識のされ方が逆のものもある(6)。

これら4種の受容体の遺伝子はすでに核酸塩基配列が決定されており、それから推定される立体構造の類似性は非常に高い。図1-3aに示すように、何れの受容体も2本の膜貫通部分(N端の近くとほぼ中央)をもち、細胞外で化学物質の認識を行うリガンド結合ドメインと、細胞内のシグナル産生ドメインが1本の α ヘリックスで連結された構造をしている(7,8)。アスパラギン酸やセリンなどの刺激物質は、受容体のリガンド結合ドメインに直接結合するが(9,10)、マルトースやリボースなどの刺激物質は各々に特異的な結合タンパク質(各々の輸送系の1部)に結合した後、複合体として受容体に認識される(11-13)。受容体はどの基質に対しても輸送活性を持たず、その刺激を誘引または忌避情報として細胞内に伝える機能のみを持っている。

1.4 適応と化学感覚受容体のメチル化

1.2で述べたように、細菌は、誘引/忌避刺激に対し、適応を起こす。この適応現象についても分子レベルの解析が行われており、受容体の細胞内部分の特定のグルタミン酸残基(4-5個)の可逆的メチル化が、この適応現象に重要な役割を果たしている(14)。誘引刺激に適応するときには受容体のメチル化がおき、忌避刺激の適応の場合には脱メチル化が起きる。この時の反応には、メチルトランスフェラーゼ(CheR)、メチルエステラーゼ(CheB)が関与していることがわかっている(図1-3b)(15-17)。受容体は刺激の無い状態でもある程度メチル化を受けており、刺激物質を認識すると高次構造が変化し、誘

表 1-1 これまでの研究で明らかとなっている大腸菌の化学感覚受容体と、それらが認識する主な誘引及び忌避物質

受容体	分子量	誘引物質	忌避物質
Tsr	57,483	セリン	ロイシン グリセロール
Tar	59,965	アスパラギン酸 マルトース フェノール	Ni ²⁺ グリセロール
Trg	57,965	リボース ガラクトース	グリセロール
Tap	57,645	ジペプチド	グリセロール

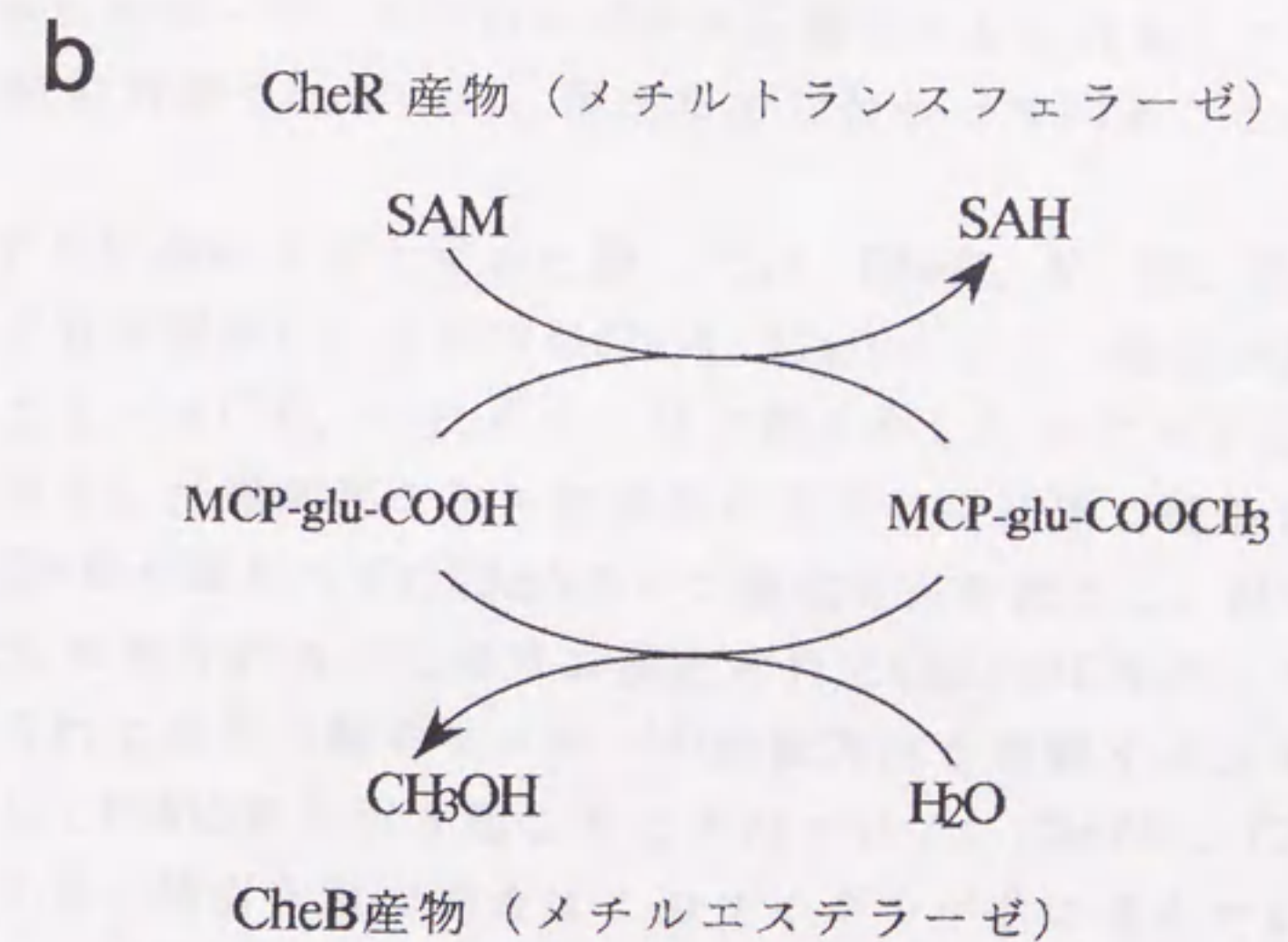
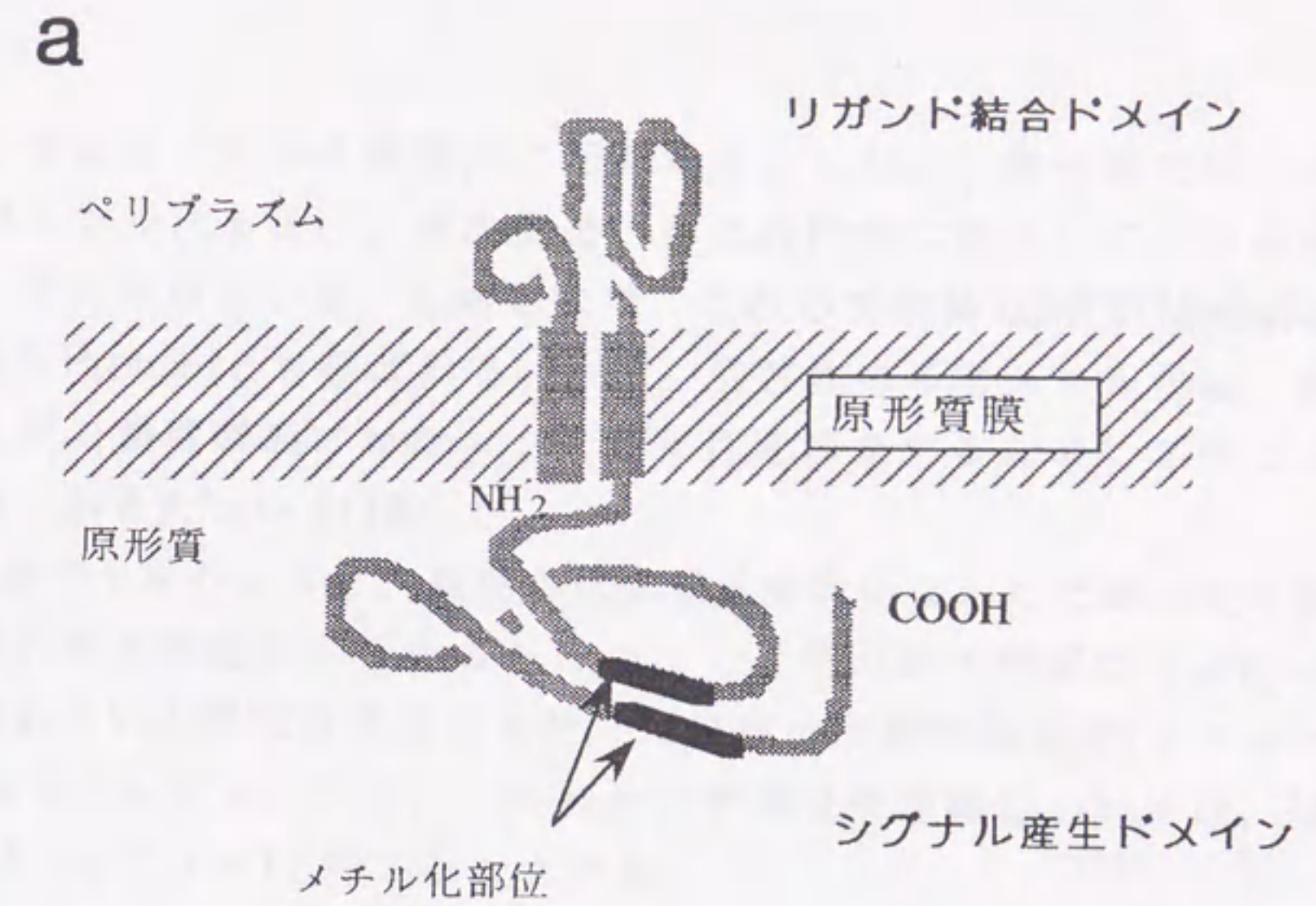


図 1-3 細菌化学感覚受容体の構造と適応現象に関与する可逆的メチル化反応 **a**, 受容体の構造の模式図。 **b**, 受容体(MCP)のメチル化反応。SAMはS-アデノシルメチオニン、SAHはS-アデノシルホモシステインをあらわす。

引ないし忌避シグナルを細胞内に伝達する。しかし、数分後には、メチル化または脱メチル化を受け、高次構造がもとの状態に戻りシグナルの産生を停止すると考えられている。この意味で、これら受容体はMCP(Methyl-accepting Chemotaxis Protein)とも呼ばれる。また、受容体の多重メチル化は、刺激物質の非常に広い濃度範囲にわたって、走化性応答をするために必須であることが理論的に示されている(18)。

以上述べてきたように、細菌の化学感覚受容体は、ただ単に化学刺激を受容してそのまま細胞内に伝えるだけでなく、その分子内部に可逆的メチル化による適応という情報処理能力を持った高度の情報変換装置(トランスデューサー)であるといえる。以後、これらの化学感覚受容体については、MCPまたは受容体(レセプター)と呼ぶことにする。

1.5 細菌細胞内での走化性シグナル伝達のメカニズム

受容体からモーターまでのシグナル伝達のメカニズムについては、本論文の直接の研究対象ではないが、現在までにわかっていることを簡単にまとめておく。

シグナル伝達のメカニズムに関しては、CheA、Y、W、Zと呼ばれる走化性タンパク質が関与し、そのうちCheAとCheYにはリン酸化が起きることが明らかにされている(19)。これらタンパク質を介したシグナル伝達経路を図1-4に簡単に示す。忌避刺激を与えた場合に生ずる受容体の構造変化というシグナルは、CheWの関与の下にCheAのリン酸化を引き起こし、続いてそのリン酸基がCheYに転移される。このリン酸化されたCheYがCWのシグナルそのものだと考えられており、鞭毛モーターの回転方向を制御するスイッチ複合体に直接結合してCW回転を引き起こすとされている。CheZは、CheYの脱リン酸化を促進する。誘引刺激の場合はこのサイクルが逆に進んでいると考えれば良い。現在、受容体とCheWの相互作用のメカニズムやCheYがモーターの回転方向を制御する仕組みについては解析が進められているところである。

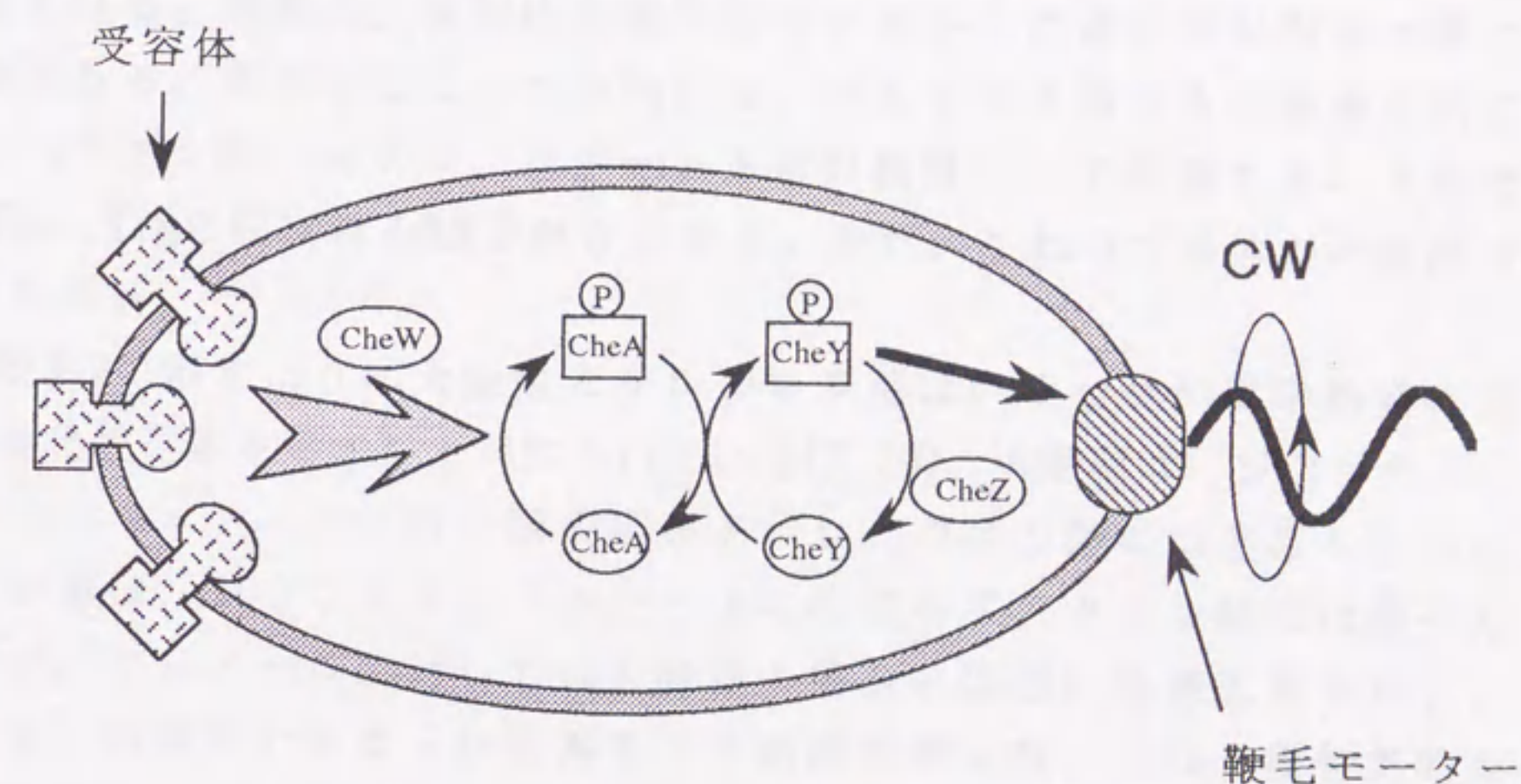


図 1-4 細菌細胞内における走化性シグナル伝達の模式図。矢印はシグナルの伝わる経路を示す。この図では、受容体は忌避シグナルを出していると仮定している。

1.6 大腸菌とサルモネラ菌における走化性の差異；フェノールとクエン酸に対する応答

大腸菌とサルモネラ菌は近縁の種であり、双方の走化性メカニズムも非常によく似ている。実際に、走化性発現に関与する多くの遺伝子が両者の間で交換可能である。受容体についても同様に、サルモネラ菌にも大腸菌と同じく、アスパラギン酸、セリン、リボースを誘引物質として認識する、それぞれTar、Tsr、Trgと呼ばれるMCPが存在する。また、これら受容体の両種間での相同性も高い。

一方、表1-2に示すように大腸菌とサルモネラ菌はいくつかの化学物質に対し異った走化性応答を示すことが知られている(3, 20)。大腸菌は、ジペプチド、マルトース、フェノールに対し誘引応答を示し、クエン酸には応答しない。サルモネラ菌は、ジペプチド、マルトースに応答せず、クエン酸には誘引応答を示すが、フェノールに対しては大腸菌の場合とは逆に忌避応答を示す。このような、両種間で異なった応答を示す刺激物質に対しては、種特異的な受容体が存在している可能性が考えられる。実際、大腸菌ではジペプチドに対する受容体、Tapの存在が明らかになった(21)が、ジペプチドに応答しないサルモネラ菌ではTapに対応するMCPは見つかっていない。それに対して、サルモネラ菌にはTipと呼ばれるMCP様のタンパク質の存在が報告された(22)。しかし、Tipはフェノールやクエン酸応答には関与しないことが示され(23；山本ら、未発表)、サルモネラ菌に特異的な刺激物質の受容体である可能性は低いので、別に特異的な受容体が存在している可能性が高い。

クエン酸に関しては、以前からサルモネラ菌と大腸菌の識別に用いられるほど走化性応答以外にも両者ではっきりした違いがある。その原因は、サルモネラ菌にはクエン酸の輸送系が存在しクエン酸を利用できる(24-26)が、大腸菌には輸送系がなく利用不可能である点である。大腸菌がクエン酸に応答しない理由がこの輸送系の欠如である可能性が考えられたが、大腸菌にサルモネラ菌クエン酸輸送系遺伝子を導入し、クエン酸を輸送可能にしても走化性は発現されないことが示された(27, 28)。したがって、クエン酸受容体は輸送系の一部ではなく、サルモネラ菌に特異的な化学感覚受容体として独立に存在していると思われるが、現在のところその実体については明らかになっていない。

また、大腸菌とサルモネラ菌の示す走化性の違いの中で、フェノール応答の

表 1-2 大腸菌とサルモネラ菌で異なる走化性応答の例

刺激物質	大腸菌	サルモネラ菌	受容体
マルトース	誘引応答	応答なし	Tar _E
ジペプチド	誘引応答	応答なし	Tap
クエン酸	応答なし	誘引応答	?
フェノール*	誘引応答	忌避応答	Tar _E , Tar _S ?

(添字E、Sは、それぞれ大腸菌、サルモネラ菌の受容体であることを示す)

* 大腸菌、サルモネラ菌の双方とも、Tarはフェノールに対して誘引シグナルを產生するが、最終的な応答は逆であるので、未知の受容体の存在が考えられる。

差は特に興味深い。ジベプチドに対する応答の違いは、特異的な受容体の有無で簡単に説明できるが、フェノールに対する両者の応答は全く逆であり、そこには複雑な感覚応答メカニズムの存在が考えられる。大腸菌においてはTarがフェノールに対する誘引シグナルの産生に必須である(20)が、サルモネラ菌のTarもフェノールに対して同様に誘引シグナルを出すことが報告された(20)。したがって、サルモネラ菌が、フェノールに対して忌避応答を示すためには、Tarの誘引シグナルよりも強い忌避シグナルを出す種特異的な受容体の存在が示唆される。

1. 7 本研究の目的

以上に述べてきたように、細菌の化学感覚受容体は、走化性システムの中で、重要な役割を果たしている。その高次構造も推測され、刺激物質の受容や適応に関する分子レベルのメカニズムもかなり明らかにされつつある。しかし、まだ不明な点もあり、クエン酸やフェノールに対する受容体や刺激応答メカニズムについてもわからないことが多い。そこで、本研究において、私は、大腸菌とサルモネラ菌の化学刺激応答の差異に注目し、種特異的な化学受容体の同定をめざし、以下の研究を行った。

1)大腸菌のTar欠損株がフェノールに対して弱い忌避応答を示す報告(20)に注目し、この忌避応答にTar以外の感覚受容体が関与するかどうかを遺伝子工学的手法を利用して解析した。

2)サルモネラ菌における強いフェノール忌避応答に関与する化学感覚受容体の探索のために、その遺伝子のクローニングとDNA配列の決定を試みた。

3)サルモネラ菌のクエン酸誘引応答に関与する化学感覚受容体の同定を試みた。

第2章 材料と方法

2.1 菌株及びプラスミド

本研究において用いた菌株は、大腸菌 (*Escherichia coli*) K-12 株及び、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) LT-2 株由来のものである。使用した菌株とプラスミドの詳細は表 2-1 に示した。

2.2 培養条件

0.5%グリセロールを含むトリプトン培地 (1%トリプトン、0.5% NaCl) を用い、30℃で振盪培養を行った。必要に応じ、リボース応答に必要なリボース結合蛋白を誘導するため、27 mM リボースを加えた(34)。また、プラスミドを持つ菌の培養は、アンピシリン (50 µg/ml) 存在下で行った。

2.3 走化性応答の測定

菌は、対数増殖期後期まで培養した後、遠心法により集菌し、運動培地 (10 mM リン酸カリウム pH7, 0.1 mM EDTA, 10 mM 乳酸ナトリウム) でよく洗い、0.1 mM L-メチオニンを含む同じ培地に懸濁した。実験によっては、運動培地の pH を 6.0 及び 7.4 に合わせた。懸濁液を 1 滴とりスライドグラス上において、暗視野顕微鏡で菌の行動を観察し、必要に応じ VTR により録画した。

定量的な解析を行う場合は、録画した菌の遊泳画像をモニターに表示し、1 秒露出で写真撮影した後、菌の軌跡を調べ、スムーズな泳ぎの軌跡の割合を算出した(5)。この割合が高いほど誘引応答が強く、逆に低いほど忌避応答が強いとして解析を行った。

また場合により、テザードセル法を用いた。ピペッティングにより鞭毛を短く切った菌を抗鞭毛血清によりスライドグラス上に固定し、菌体が回転可能な (1 本の鞭毛によりスライドグラスに固定されている菌) を探し、回転方向の変化を観察し、走化性応答の解析を行った。

表 2-1 本研究で使した菌株とプラスミド

菌株または プラスミド	Genotype	Reference
菌株 (大腸菌)		
RP487	<i>che</i> ⁺	(29)
RP4324	Δ (<i>tar-tap</i>)5201	(29)
AW660	<i>tsr-12 tar trg-1</i>	(30)
AB1200	Δ (<i>tar-tap</i>)5201 Δ <i>tsr</i> 7028	(6)
HCB339	Δ (<i>tar-tap</i>)5201 Δ <i>tsr</i> 7028 <i>trg::Tn 10</i>	(31)
CP474	Δ <i>trg</i> 100(pCP31)	(32)
(サルモネラ菌)		
ST1	<i>che</i> ⁺	(33)
プラスミド		
pCP31	<i>trg</i> ⁺	(32)
pCP32	<i>trg-19</i>	(32)
pCP33	<i>trg-8</i>	(32)
pAK101	<i>tar</i> ⁺	(6)
pNM33 ^a	<i>tsr</i> ⁺	
pVB8 ^b	<i>lacI</i> ^q <i>P</i> _{tac} <i>tap</i>	
pRK41	<i>tar</i> ⁺ (<i>Salmonella</i>)	(8)

^a Provided by N. Mutoh of Aichi Prefectural Colony Research Institute.

^b Provided by M. D. Manson of Texas A&M University, College Station.

2.4 受容体のメチル化レベルの測定

受容体のメチル化レベルの測定は、vapor-phase equilibrium 法 (35) により行った。菌を、200 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを含む運動培地に懸濁し、[メチル- ^3H] メチオニン (10 μM , 0.5 Ci/mmole, New England Nuclear 社) を加え 30 $^{\circ}\text{C}$ で 35 分間保温した後、誘引物質または忌避物質を加え、時間を追ってサンプリングした。懸濁液中の菌は、ニトロセルロースフィルターにより濾過して集め、氷温の 5 %トリクロロ酢酸で洗浄後、フィルターをエッペンドルフチューブに入れた。0.2 ml の NaOH (1M) を加え、あらかじめ 2.4 ml の ACS II を入れておいたシンチレーションバイアルにチューブごと移し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 夜保温した後、液体シンチレーションカウンター (ALOKA LSC-701N) で放射活性を測定した。

2.5 メチル化受容体の電気泳動バンドパターンの解析

[メチル- ^3H] メチオニン (2 μM , 12 Ci/mmole) 存在下で、40 分間 30 $^{\circ}\text{C}$ に保温し、受容体をメチル化した後、誘引または忌避物質を加え、さらに 10 ~ 15 分間保温した。0.5 ml の懸濁液を取り、5 %トリクロロ酢酸により反応を停止させ、遠心し、得られた沈澱をサンプルバッファー (62.5 mM トリス塩酸バッファー pH 6.8, 12 % SDS, 10 % グリセロール, 14.5 % β メルカプトエタノール, 20 % ショ糖, 0.01 % ブロモフェノールブルー) に懸濁し、さらに 2 M トリスを加えて中和後、7.5 % のゲルを用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、ゲルを EN 3 HANCE (New England Nuclear 社) 処理して乾燥した後、-80 $^{\circ}\text{C}$ で X 線フィルムに露光してフルオログラムを作成した (36)。

2.6 受容体のクローニング及び核酸塩基配列の決定

受容体のクローニングの詳細は第 4 章に示す。サザンハイブリダイゼーションは、ECL ジーンデテクションシステム (Amersham 社) を使用して行った。

核酸塩基配列の決定は、ダイデオキシ法により、シーケナーゼ ver. 2.0 DNA シーケンシングキット (東洋紡)、キロシーケンスシステム (タカラ)、及び、[α - ^{32}P] dCTP (3000 Ci/mmole, Amersham 社) を使用して行った。

第3章 大腸菌のフェノール応答に関与する受容体の同定

3.1 Trgによるフェノール忌避応答

第1章で述べたように、大腸菌野生株では、Tarがフェノールを誘引物質として認識する(20)。そのため、菌はフェノールに対し誘引応答を示す。しかし、Tarを欠損した株について調べてみると、フェノールに対し弱い忌避反応を示すことがわかった。そこで、まず、この忌避反応がMCPを介した反応であるかどうかを確かめるため、MCPの全部または大部分を欠損した突然変異株についてフェノールに対する応答を調べた。

図3-1aは、全MCPを欠損したHCB339株のフェノール応答性を示したものであるが、5mMのフェノールを加えても、全く応答を示さなかった。したがって、フェノール忌避応答は、他の多くの誘引/忌避物質に対する走化性応答と同じく、MCPを介して行われていると考えられる。これに対し、Trgのみを持つ変異株、AB1200は、5mMフェノールに対し、弱いながら忌避応答を示した(図3-1b)。しかし、適応現象はほとんど見られなかった。また、これらの忌避応答は、Trgの誘引物質であるリボースを加えることで抑制された。この結果は、大腸菌(Tar欠損株)のフェノール忌避応答において、Trgが重要な役割を果たしていることを示唆している。

一般に、大腸菌における各MCPの割合は、Tar、Tsrが大部分を占め、Trgはそれらの1/10~1/5であることが知られている(37)。実際、図3-1bに示されるように、AB1200株のフェノール忌避応答はそれほど強くない。そこで、Trgをコードするマルチコピープラスミド、pCP31を全MCPを欠損したHCB339株に導入し、菌体内のTrgの発現量を増加させてフェノール応答性をしらべた(図3-1c)。その結果、予想されるように、HCB339(pCP31)株は、5mMフェノールに対し、AB1200株の場合よりも強い忌避反応を示した。この忌避応答は、AB1200株の場合と同様1mMリボースによって抑制されたが、他のMCPの誘引物質であるセリン(Tsrに対する)、アスパラギン酸(Tarに対する)、グリシルロイシン(Tapに対する)を各1mM加えても忌避応答の抑制は起こらなかった。これらの応答で注目すべき点は、pCP31をもつ菌でもAB1200株と同様に、フェノールに対してほとんど適応を示さないことである。

さらに、データは示さないが、HCB339(pCP31)株のフェノール応答性を、テザード菌体法により1個のモーターの回転方向制御についても解析した。

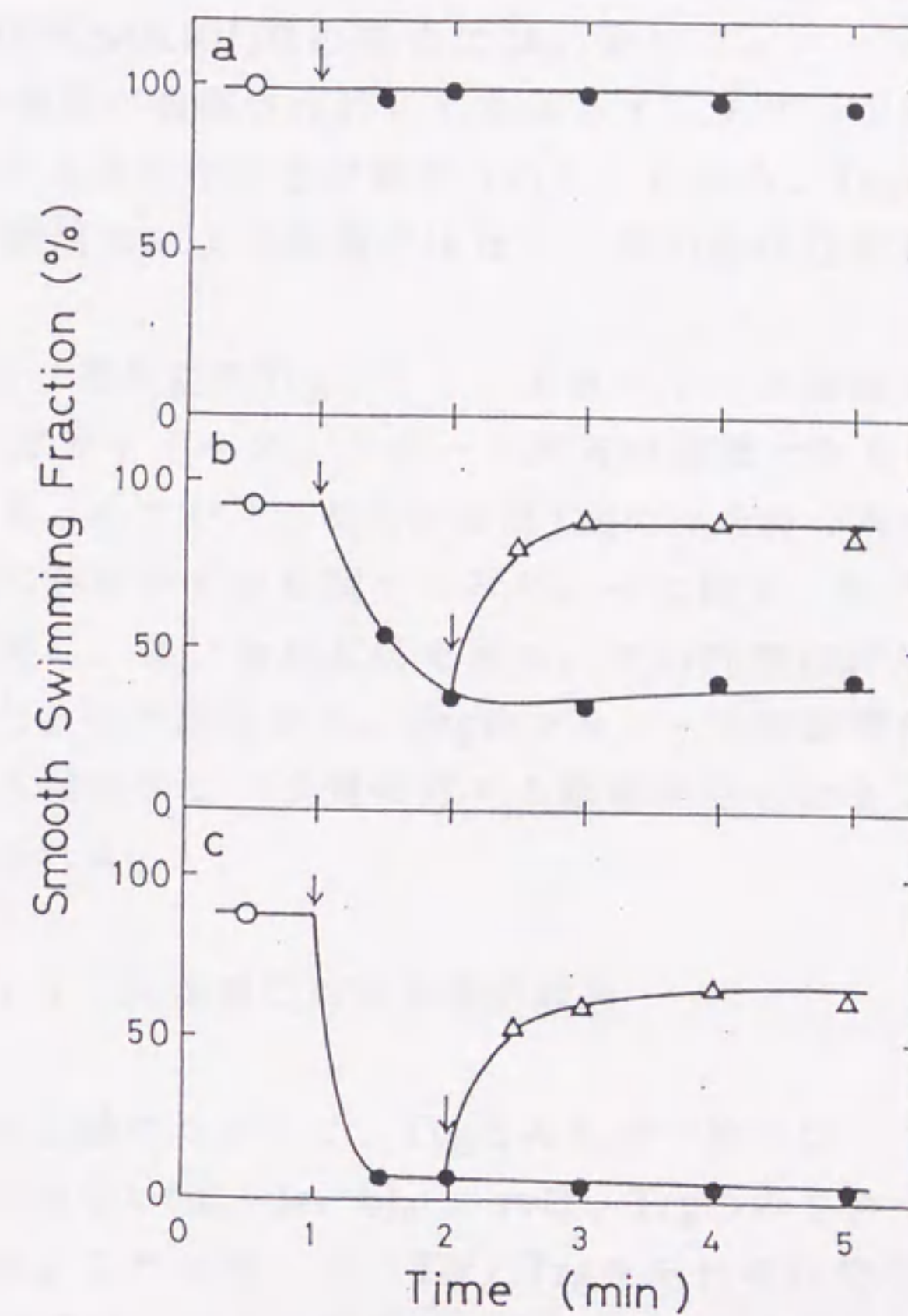


図 3-1 フェノール忌避応答における Trg の役割。最初の矢印で示した時刻に、5 mM フェノールを(●)、2 つめの矢印で 1 mM リボースを(△)加えた。a, HCB339。b, AB1200。c, HCB339(pCP31)。

HCB339(pCP31)株は、刺激のない状態ではCCWに回転しているが、5mMフェノールを添加すると明かにCW回転が増加し、続いて1mMリボースを加えると、CCW回転の回復が観察された。フェノールを誘引物質として認識するTarのみを持つHCB339(pAK101)株の場合には、逆にフェノール添加による一時的なCCW回転の増加が観察された。したがって、テザード菌体法によってもフェノールに対する走化性応答が観察されたことから、Trgのフェノール忌避応答が、菌の運動阻害による誤認ではなく、真の走化性応答であることが確認された。

Parkらは、突然変異Trgとして、ガラクトース認識のみが欠損しているもの(trg-19)とガラクトース、リボース両方が認識できないもの(trg-8)の2つを分離している。そこで、これらの変異Trgのみを持つ株が、フェノールに対してどういう応答を示すかを調べてみた。その結果、双方とも0.5 mM以上のフェノールに対し、強い忌避反応を示し、その行動は野生株と区別することができなかった。この結果から、Trgのフェノール認識部位はリボース、及び、ガラクトース結合タンパク質に対する認識部位とは全く異なった場所にあることが示唆される。

3.2 フェノール刺激に対する適応現象

3.1 で少し触れたように、Trgのみを持つ株では、フェノール応答の適応現象が観察されない(図3-1a, b)。これは、Trgのみを持つ菌の特異的な性質のように見える。これに対して、TsrとTrgをそれぞれ野生株レベルで持つ株、RP4324におけるフェノール応答性を調べたところ、図3-2aに示すようにある程度の適応が起こることがわかった。しかし、この適応現象は、RP4324株にpCP31プラスミドを導入してTrgの量を増加させた場合には、観察されなかった。これらの結果は、Trgそのものにはフェノール刺激に適応する機能が無いが、他のMCPが存在すると適応が可能になることを示唆している。

そこで、全てのMCPが存在する条件、即ち、野生株と同じ状態でのTrgの適応現象について調べてみることにした。しかし、野生株ではTarが存在し、そのフェノールに対する誘引応答がTrgのフェノール忌避応答に優先するため、Trgを介した走化性応答を観察することはできない。そこで、Trgのみを欠失したCP474株にpCP31を導入し、Trgの発現量を増大させて実験を行った。その結果、pCP31を持たないCP474株では、5 mMフェノールの添加により一時

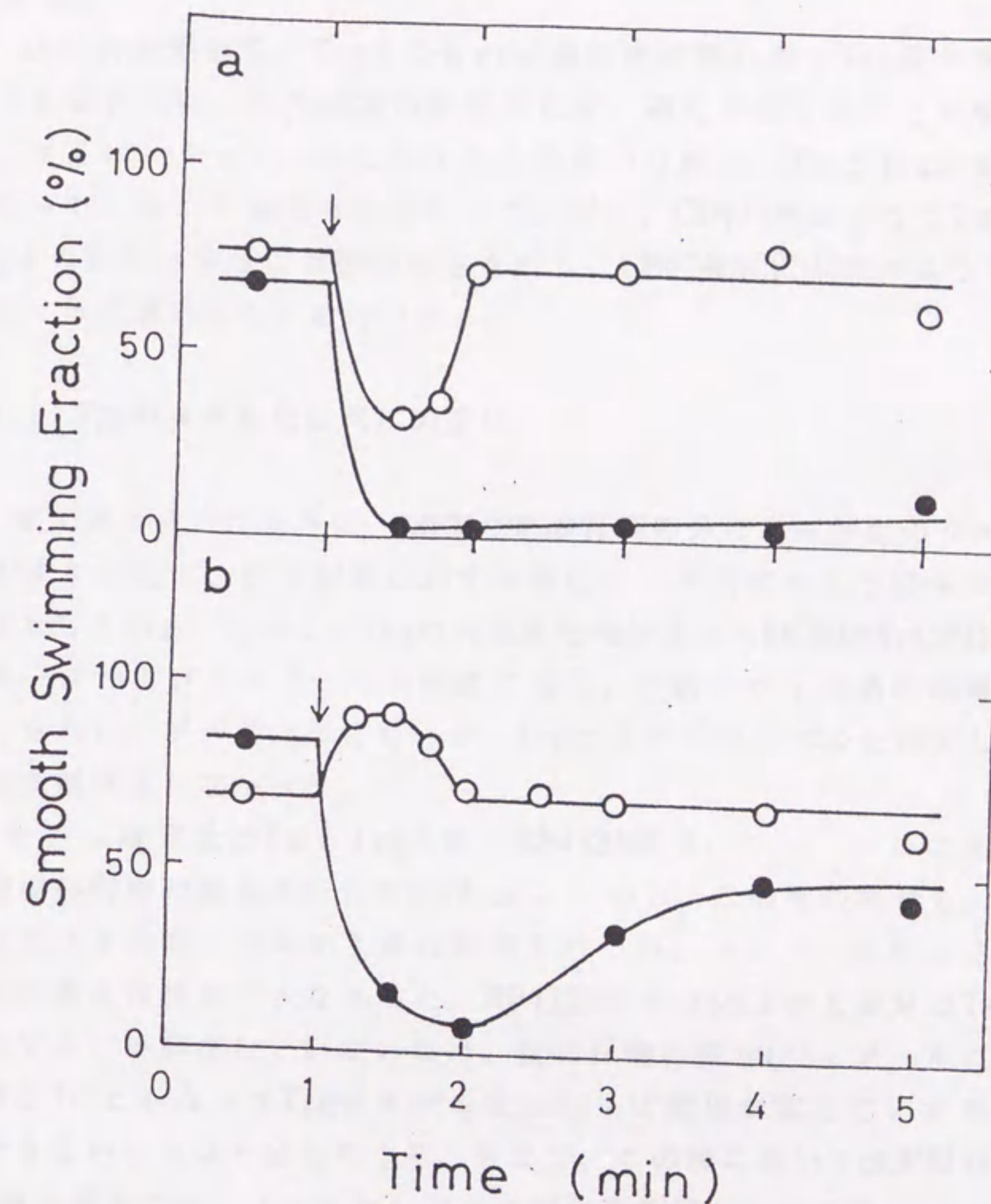


図 3-2 T_{rg} の適応現象におけるフェノール忌避応答における T_{sr} 及び T_{ar} の影響。矢印で示した時刻に 5 mM フェノールを加えた。a, RP4324(○)及びRP4324(pCP31)(●)。b, RP487(○)及CP474(pCP31)(●)。

的な誘引応答が見られるのに対し、CP474(pCP31)では、5 mMフェノールに対し強い忌避応答と、完全ではないものの、それに続く適応現象が観察された(図3-2b)。

以上の結果から、Trgそのものは適応能が弱い、Trg量が増大しているような場合でも、他のMCPが存在すれば、適応が起こることが明らかになった。さらに、フェノールに対する大腸菌の行動は、TarとTrgの量比によって決まっていることも明らかとなった。即ち、CP474株のようにTarの絶対量がTrgよりも多い場合には誘引応答を示し、CP474(pCP31)株のようにTrgが多い場合には忌避応答をするのである。

3.3 Trgのメチル化レベルの変化

第1章で述べたように、MCPの原形質側部分にある特定のグルタミン酸残基のメチル化は、化学刺激に対する適応システムにおいて非常に重要な役割を果たしている。しかし、Trgの発現量を増加させたHCB339(pCP31)株の場合、リボースおよびフェノールの刺激に対し、行動レベルの適応現象が起こらない。さらに、データは示さないが、Trgのメチル化レベルを測定しても、全く変化が観察されなかった。

一方、通常量のTsrとTrgを持つRP4324株は、フェノールによる刺激にある程度の行動の適応を示した(図3-2a)。しかし、この株の場合も、セリン添加によるメチル化レベルの上昇は観察されたが、フェノールによるメチル化レベルの変化は検知できなかった。RP4324株中のMCPの大部分はTsrでありTrgはわずかしかな存在していないため、仮に行動の変化(フェノールに対する部分的適応)にともなってTrgのメチル化レベルに変化が起きていても、変化が検出できないことは十分ありうる。そこで、この株においてpCP31の導入によりTrg量を増加させてメチル化レベルの変化を測定したところ、フェノールの添加によるメチル化レベルの明かな減少と、リボースによるその増加が観察された(図3-3)。

Trgのメチル化レベル変化をさらに詳しく解析するため、HCB339(pCP31)株についてMCPバンドパターンの解析を行った(図3-4)。Trgは、刺激のない状態でも、ある程度メチル化されており、いくつかのバンドとして観察された(レーン1)。しかし、その分布領域は他のMCPに比べ、かなり狭かった(レーン4、5)。フェノール(5mM)により、忌避刺激を与えた場合には、ゲル下方のメ

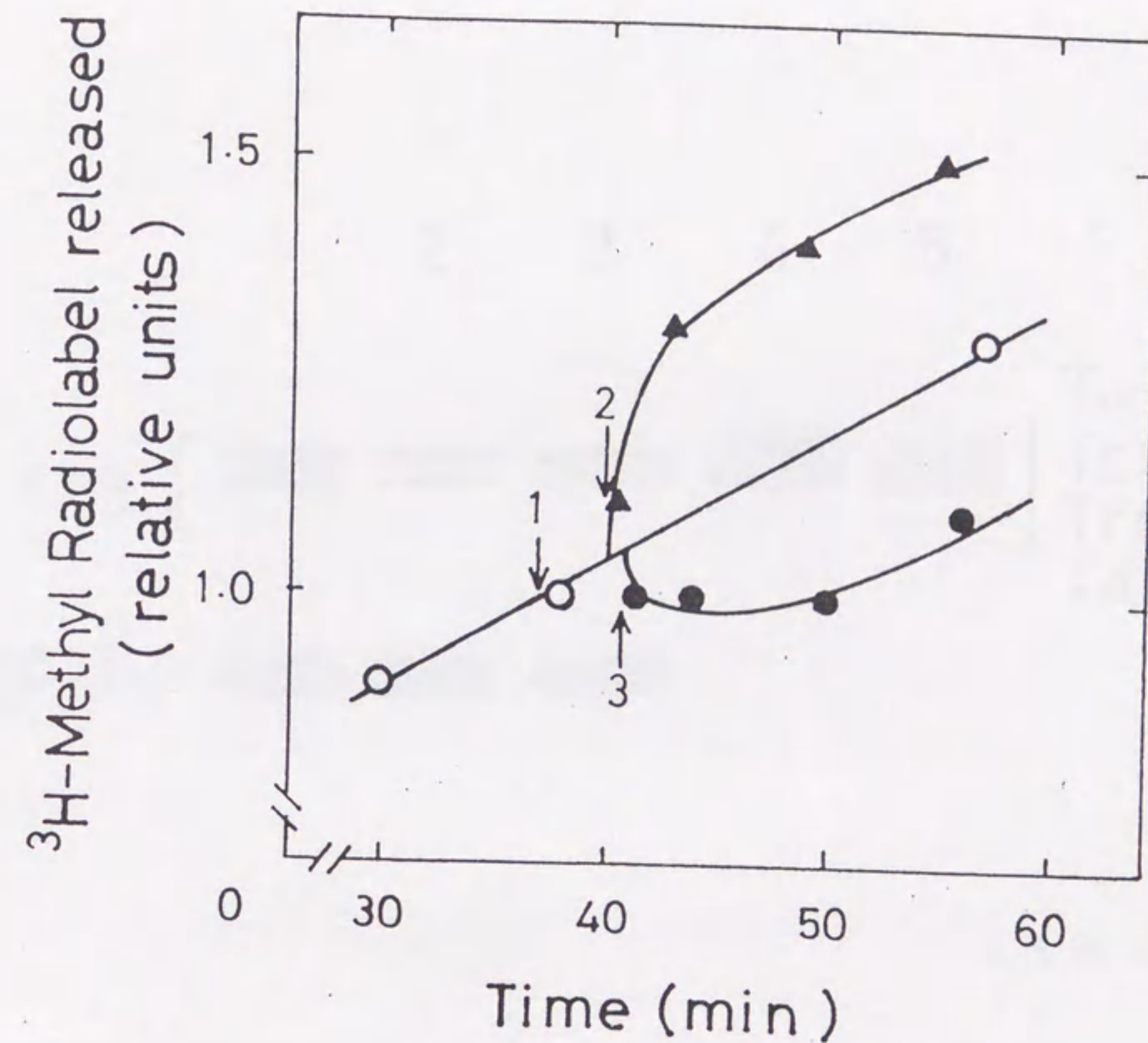


図 3-3 フェノールによる受容体メチル化レベルの変化。Tarを欠損している菌株に於てTrgの発現量を増加させ(RP4324[pCP31])、フェノールによる受容体メチル化レベルの変化を測定した。矢印1、2、3で示した時刻に、それぞれ蒸留水(○)、10mMリボース(▲)、10mMフェノール(●)を加えた。

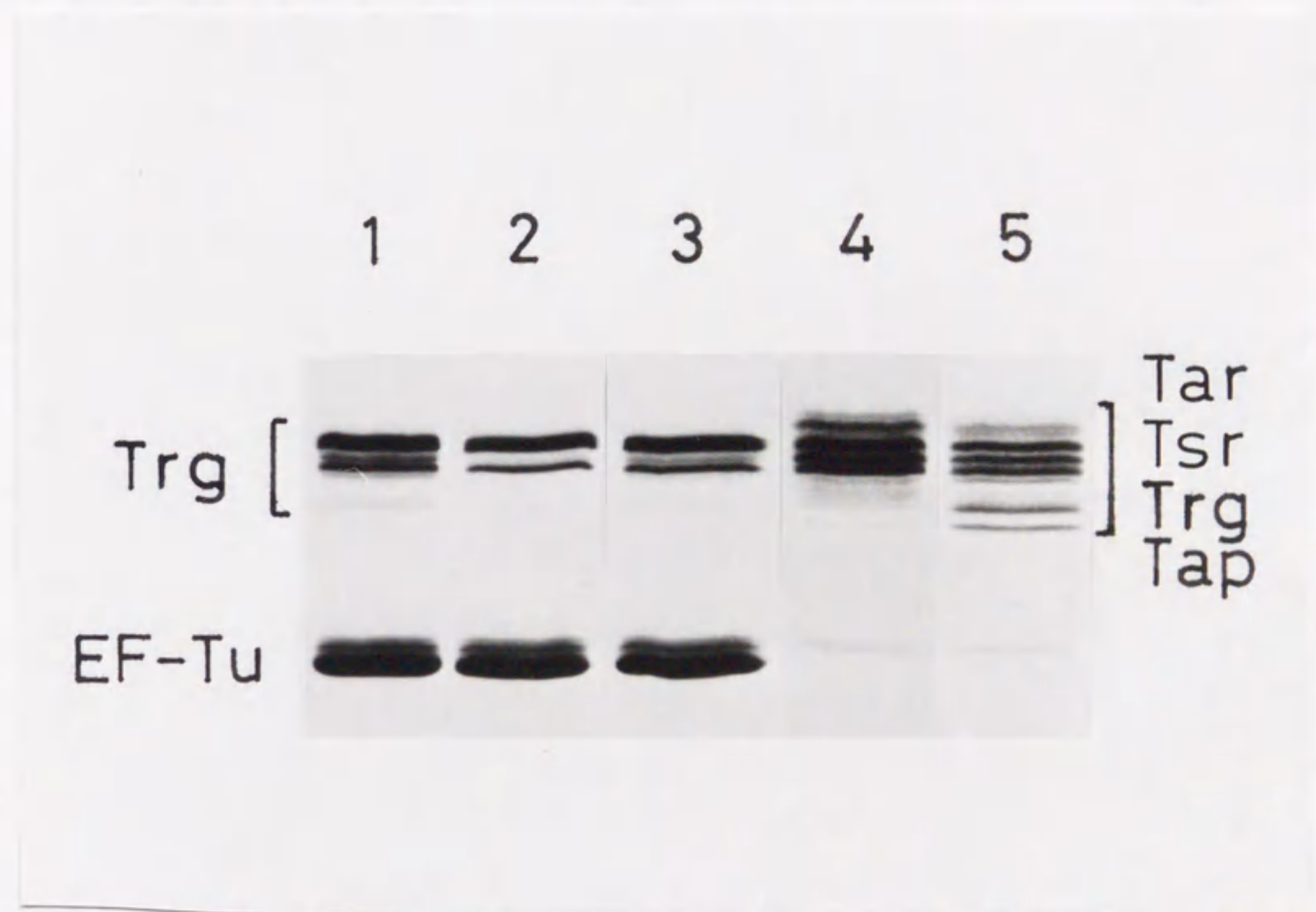
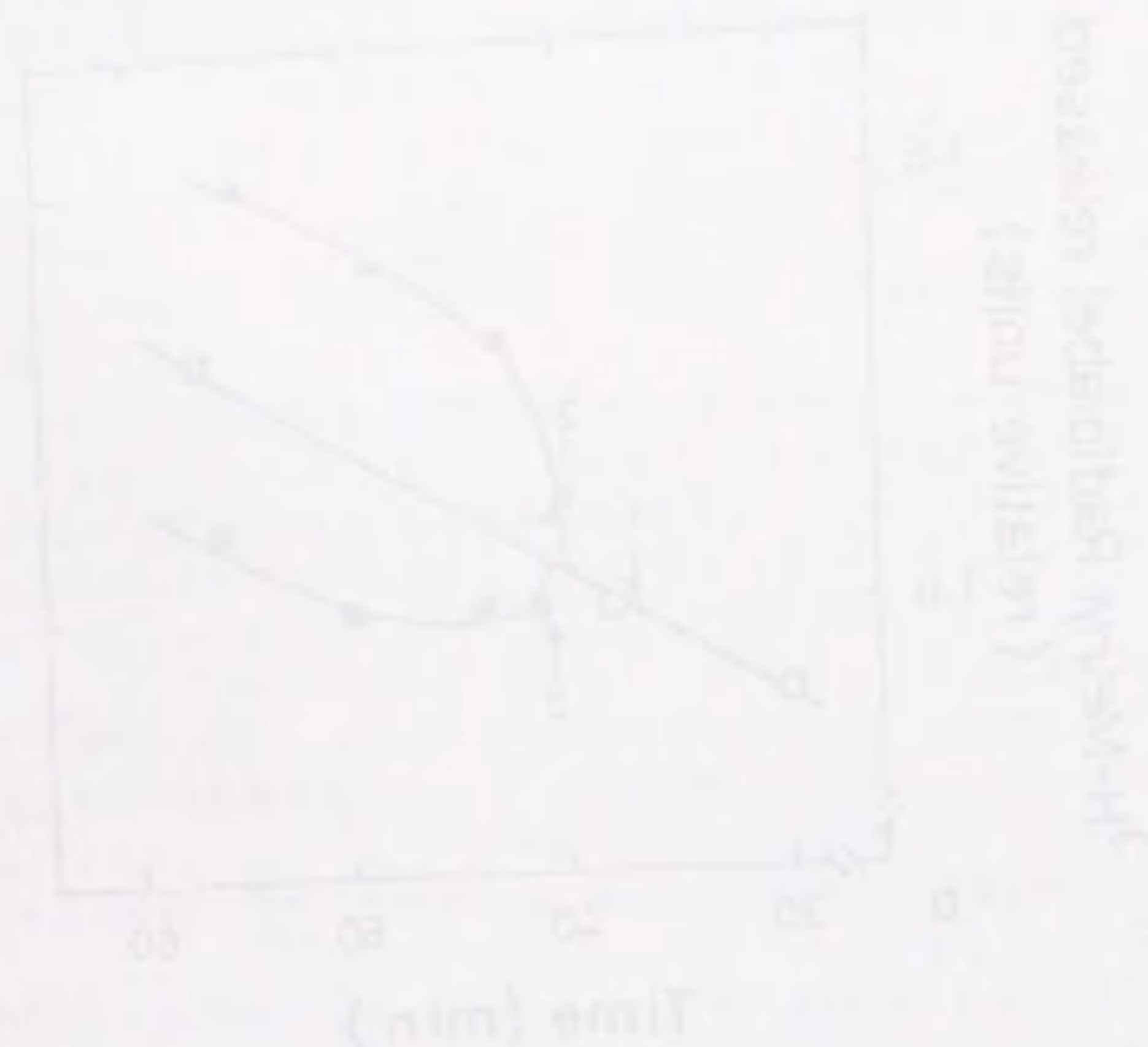


図 3-4 フェノール及びリボースによるメチル化されたTrgのバンドパターン変化。HCB339(pCP31)を用い、Trgを放射性同位元素標識した後、蒸留水（レーン1）、5mMフェノール（レーン2）、フェノール添加5分後に10mMリボース（レーン3）を添加した。レーン4、5、RP487(WT)及びCP474の刺激のない状態における受容体のメチル化バンドパターン。

チル化されたTrgのバンドが消失するが(レーン2)、続けてリボース(1mM)を加えて誘引刺激を与えると、再び現れた(レーン3)。したがって、HCB339(pCP31)株におけるTrgは、刺激に応じてメチル化レベルの変化を起こしているが、その絶対的な変化量はかなり少ないことがわかった。

さらに、他のMCP存在下でのTrgのメチル化レベルの変化を調べるために、RP4324株(通常量のTsrとTrgを持つ)中のTrg量をpCP31の導入により増加させて実験をおこなったところ、図3-5、レーン4に示されるように、フェノールの添加によるメチル化レベルの減少がはっきりと観察された。したがって他のMCPが存在する場合には、Trg発現量が増幅されていても脱メチル化が起きることが明らかになった。この時のバンドパターンの変化は、特定のバンドのみでなく、全てのMCPバンドにわたるメチル化レベルの減少ないしはバンドの消失として観察された。そして、続くリボースの添加により、これらのバンドが再び現れた(レーン5)。さらに、Tsrの誘引物質であるセリンを加えた場合(レーン2)とTrgの誘引物質であるリボースを加えた場合(レーン3)では、セリンによる方がよりメチル化レベルが高くなるものの、MCP全体のメチル化レベル変化のパターンは非常によく似ていた。

3.4 TapとTsrによるフェノール応答

以上の実験により、大腸菌においては、Trgがフェノールの忌避応答を仲介する受容体であることが明らかになった。しかし、Tar、Tsr、Trgを欠損したAW660株が、フェノールに対してわずかながら忌避反応を示すことが報告されている(20)。この株が持っているTapがフェノール応答に関与している可能性が考えられるので、フェノールを添加後、Tapの誘引物質であるグリシルロイシンを添加したところ、忌避応答が抑制されることがわかった。この点をさらに確かめるために、HCB339株にtap遺伝子をコードしたプラスミド、pVB8を導入し、Tap量が最大になるような条件下(イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド存在下)で培養して、実験を行った。

図3-6aに示すように、HCB339(pVB8)株はフェノールに対する強い忌避反応を示したが、この忌避応答は1mMのグリシルロイシンにより抑制された。よって、Tapもフェノールの忌避応答受容体であると考えられる。ただし、Tapの場合、強い忌避応答を示すのに要するフェノール濃度は3mM以上と、Trgの場合(0.5mM)に比べかなり高いことがわかった。したがって、TapはTrg

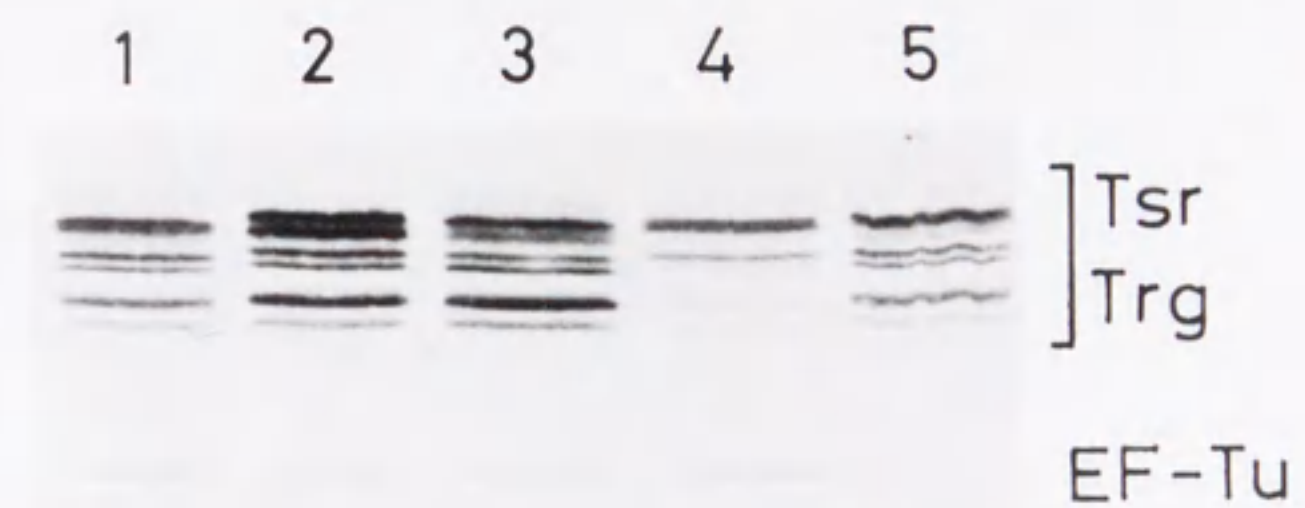


図 3-5 Tsr と Trg を持つ菌株 (RP4324[pCP31]) に於ける受容体のメチル化バンドパターン。レーン1、蒸留水。レーン2、10 mM セリン。レーン3、10 mM リボース。レーン4、5 mM フェノール。レーン5、フェノール添加5分後に10 mM リボースを添加。

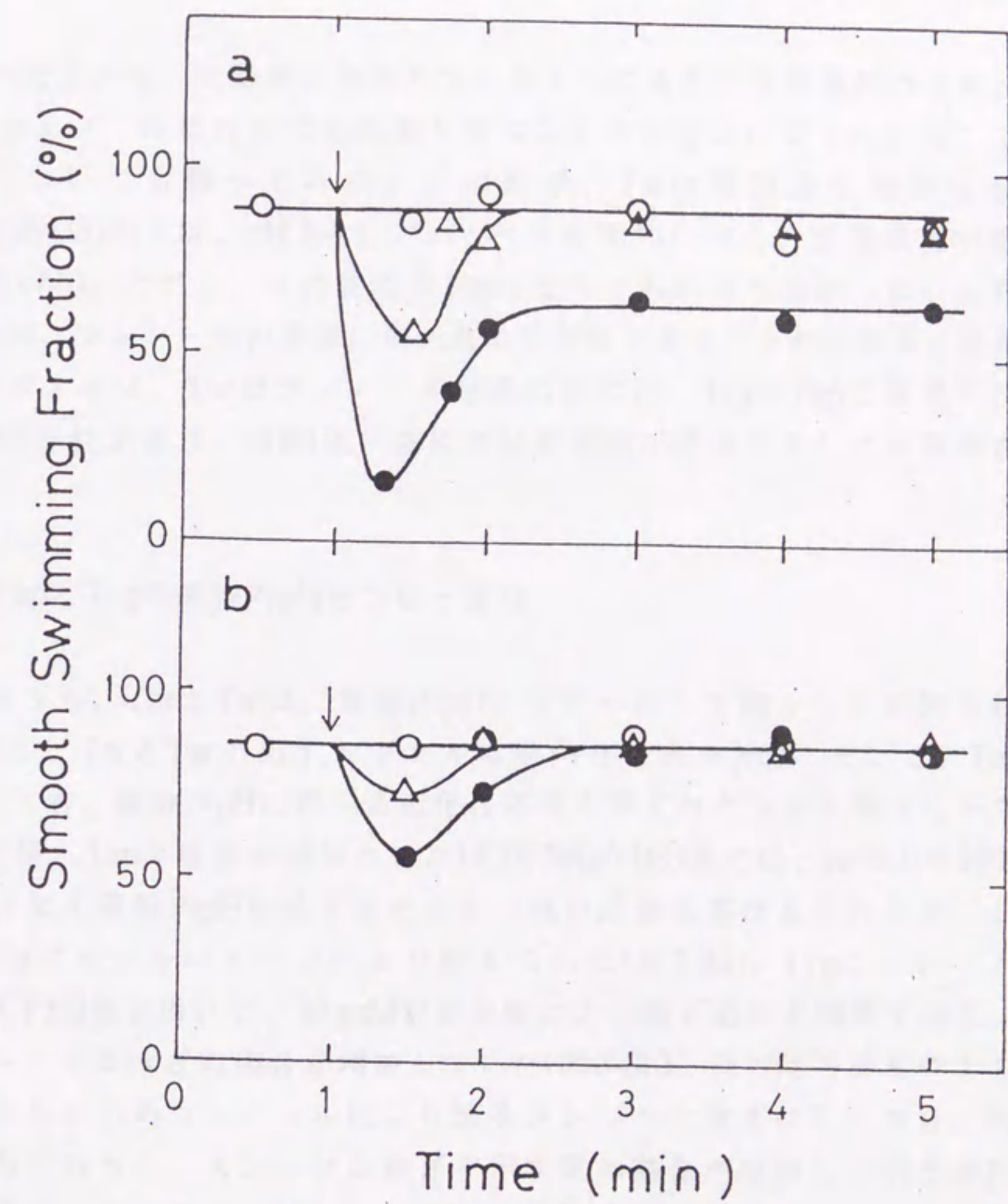


図 3-6 Tap 及び Tsr によるフェノール忌避応答。矢印で示された時刻に 1 (○)、3 (△)、5 mM (●) のフェノールを添加。a, HCB339(pVB8)。b, HCB339(pNM33)。

に比べて、忌避シグナルの産生量は少なく、数分の1程度ではないかと思われる。

以上の結果から、大腸菌の知られている4つの走性化学受容体のうち、3つまでがフェノールに対して応答能を持つことが明らかになった。そこで、残るTsrについても調べてみた。その結果、Tsrの発現量を増加させたHCB339(pNM33)株では、pH 7.4でフェノールの添加に対し、忌避反応が観察された(図3-6b)。ただし、その反応はTapと比べてもかなり弱かった。したがって、Tsrは、フェノールの非常に弱い負の受容体であることがわかる。また、図3-7に示すように、Tsrのフェノール忌避応答には、TrgやTapでは見られなかったpH依存性があり、pHが低い条件では応答能が消失することが観察された。

3.5 TapとTrgの細胞内pHセンサー活性

MCPのうち、TarとTsrは、細胞内pHセンサーとして働くことが知られている(ただし、TsrとTarの出すシグナルは逆向きである)(6)。そこで、TapとTrgについても、細胞内pHに対する走化性応答を示すかどうかを調べてみた。

その結果、Tap発現量を増加させたHCB339(pVB8)株では、pH 6.0で10 mM安息香酸を加え細胞内pHを低下させると、強い忌避応答が見られたが、この応答は1mMグリシルロイシンにより抑えられた(図3-8a)。Trgについても、HCB339(pCP31)株を用いて、10 mM安息香酸による菌の応答を観察すると、わずかにスムーズな泳ぎの割合が増加していた(図3-8b)。菌の応答を見やすくするため、あらかじめフェノールにより菌をタンブルな泳ぎにしておき、同様な実験をおこなうと、スムーズな泳ぎを示す菌の割合が増加し、明らかに誘引応答が起こっていることがわかった(図3-8b)。データは示さないが、pH 7.4においてはどちらの株も安息香酸の添加に対して行動の変化を見せないため、上記の反応は安息香酸そのものに対する反応ではなく、細胞内pHが低下したことに対する応答であると考えられる。以上の実験より、TapはTsr型の、TrgはTar型の細胞内pHセンサーであることが明らかになった。

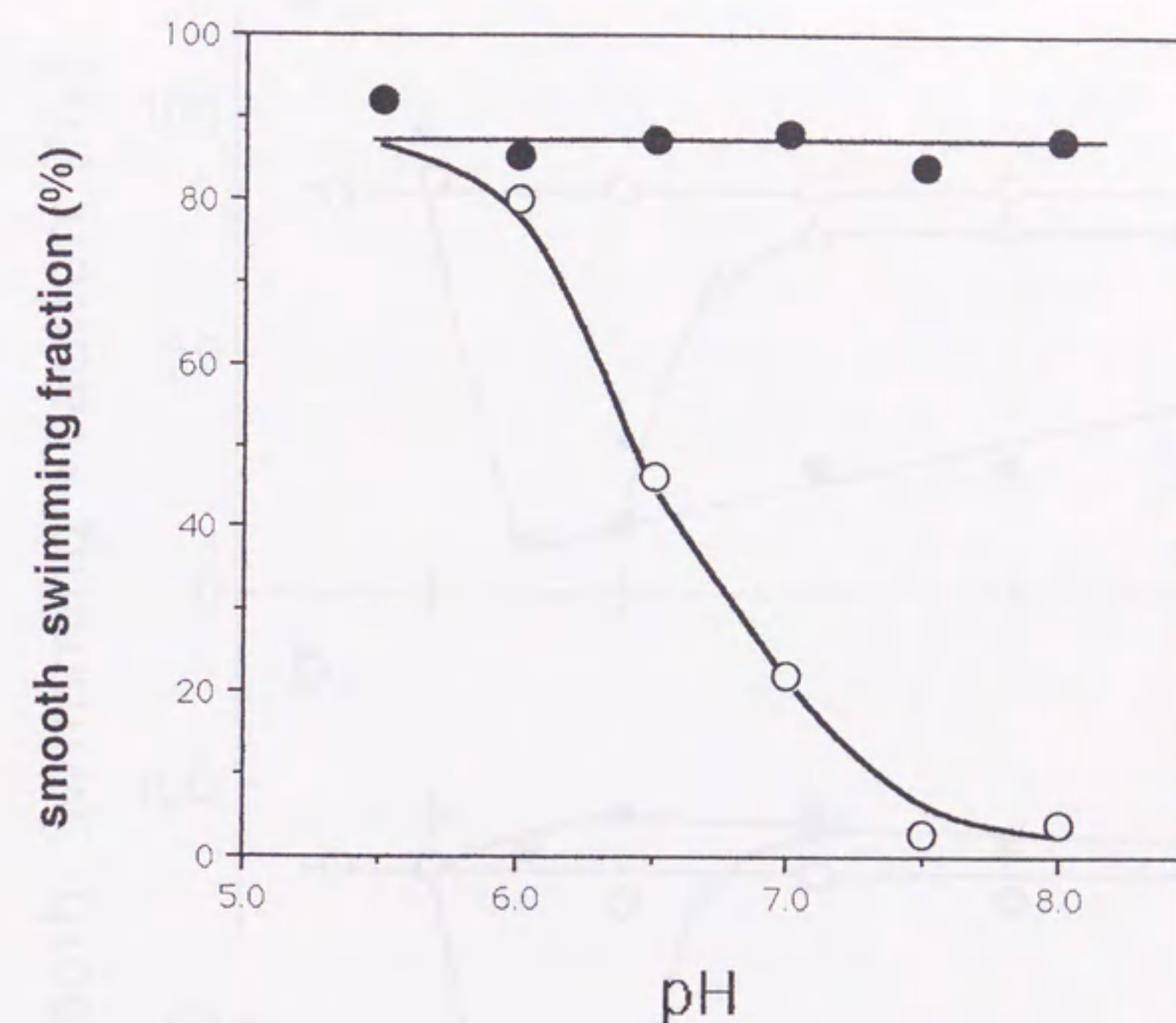


図 3-7 Tsr によるフェノール忌避応答の pH 依存性。Tsr のみを持つ株 (HB339[pCS20]) のフェノール忌避応答を溶液の pH を変化させて測定した。○、5 mM フェノールに対する応答。●、コントロール。

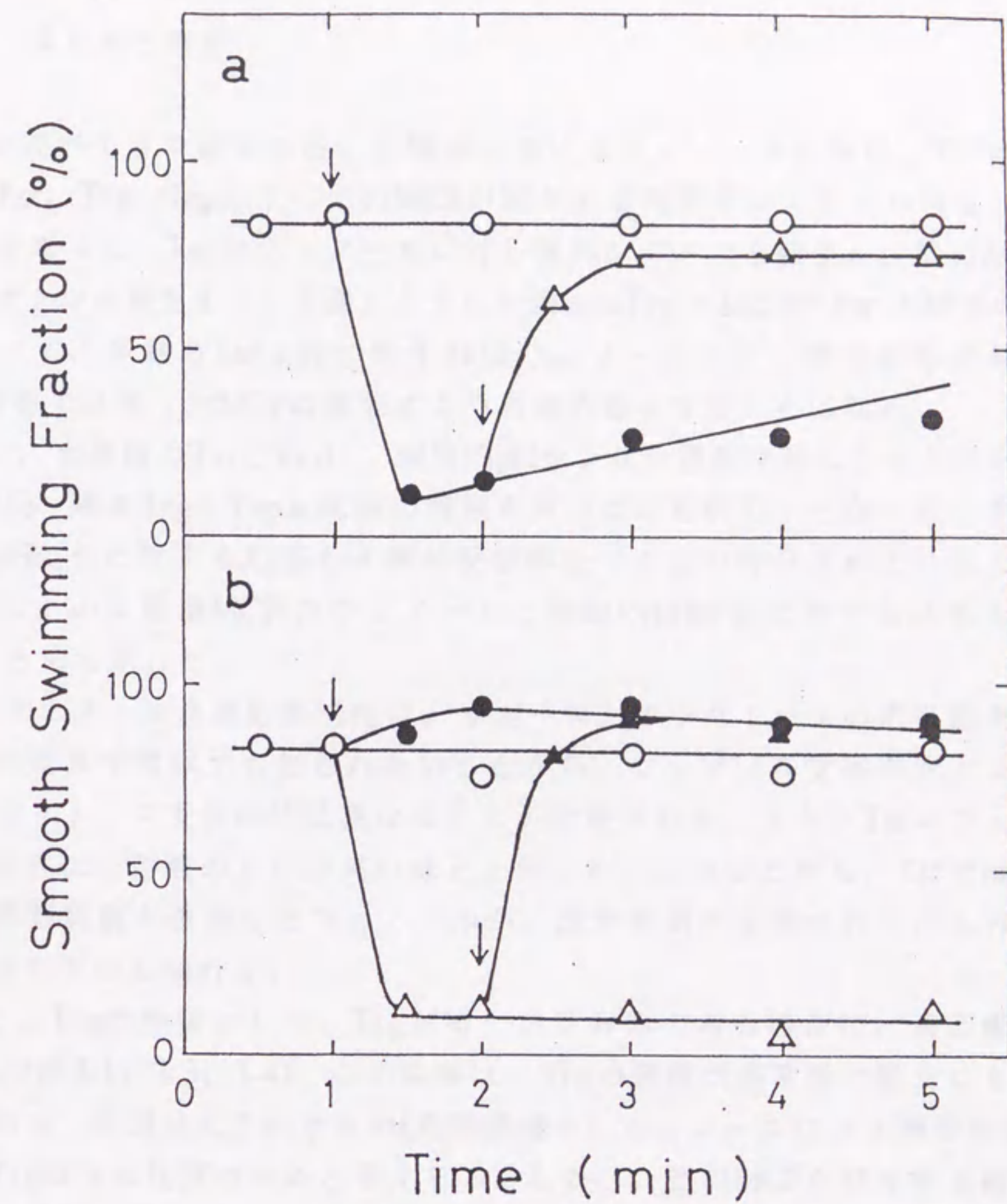


図 3-8 Tap と Trg の細胞内 pH センサー活性。a, HCB339(pVB8)。最初の矢印で 10 mM 安息香酸(●)、2 つめの矢印で 1 mM グリシルロイシンを加えた。(○)、コントロール。b, HCB339(pCP31)。最初の矢印で 10 mM 安息香酸(●)、1 mM フェノール(△)を、2 つめの矢印で 10 mM 安息香酸(▲)を加えた。(○)、コントロール。

3.6 まとめと考察

以上に述べてきた結果から、大腸菌におけるフェノール応答は、Tarのみでなく、Tsr、Trg、TapのすべてのMCPが関与する複雑なシステムであることが明らかとなった。Tarはフェノールに対し誘引シグナルを産生し、他のMCPは忌避シグナルを産生する。忌避シグナルの強さは $\text{Trg} > \text{Tap} \gg \text{Tsr}$ の順である。したがって、多量のTarを持つ野生株はフェノールに対し誘引応答するが、Tar欠損株では残ったMCPの機能により忌避応答をすることになる。

さらに、大腸菌のTsrとTarは、細胞内pHセンサー機能を持つことが知られていたが(6)、残るTrgとTapも同様の機能を持つことも明らかとなった。即ち、細胞内pH変化に対する応答も4種の受容体全てにより仲介されていることになる。以上の大腸菌MCPのフェノールと細胞内pH変化に対する応答を図3-9にまとめて示した。

Trgのフェノール忌避応答活性は、リボース、ガラクトースの応答能を欠損した突然変異受容体でも失われないことから、フェノール受容部位とリボース、ガラクトース受容部位は異なることが示唆される。また、Tsrのフェノール応答活性は、溶液のpHが高いほど上昇した。このことから、Tsrでは拡散により原形質膜を透過したフェノールが、原形質側で受容されている可能性が考えられるかも知れない。

さらに、Trgの性質として、Trgが唯一の受容体である場合に、適応能が非常に弱い(図3-1、3-3、3-4)。この現象は、Trgの発現が通常量の場合にも起こることから、原因は人為的なもの(発現量過多、フェノールによる障害等)ではなく、Trg固有の性質であると考えらる。しかし、他のMCPが存在する場合には、ある程度の適応能が現れることが明らかになった(図3-2、3-5)。この結果は、適応に関して、受容体間になんらかの相互作用が存在することを示唆しており、以前から提唱されている受容体間のcross-talkの考え方(38, 39)を直接支持するものと考えられる。

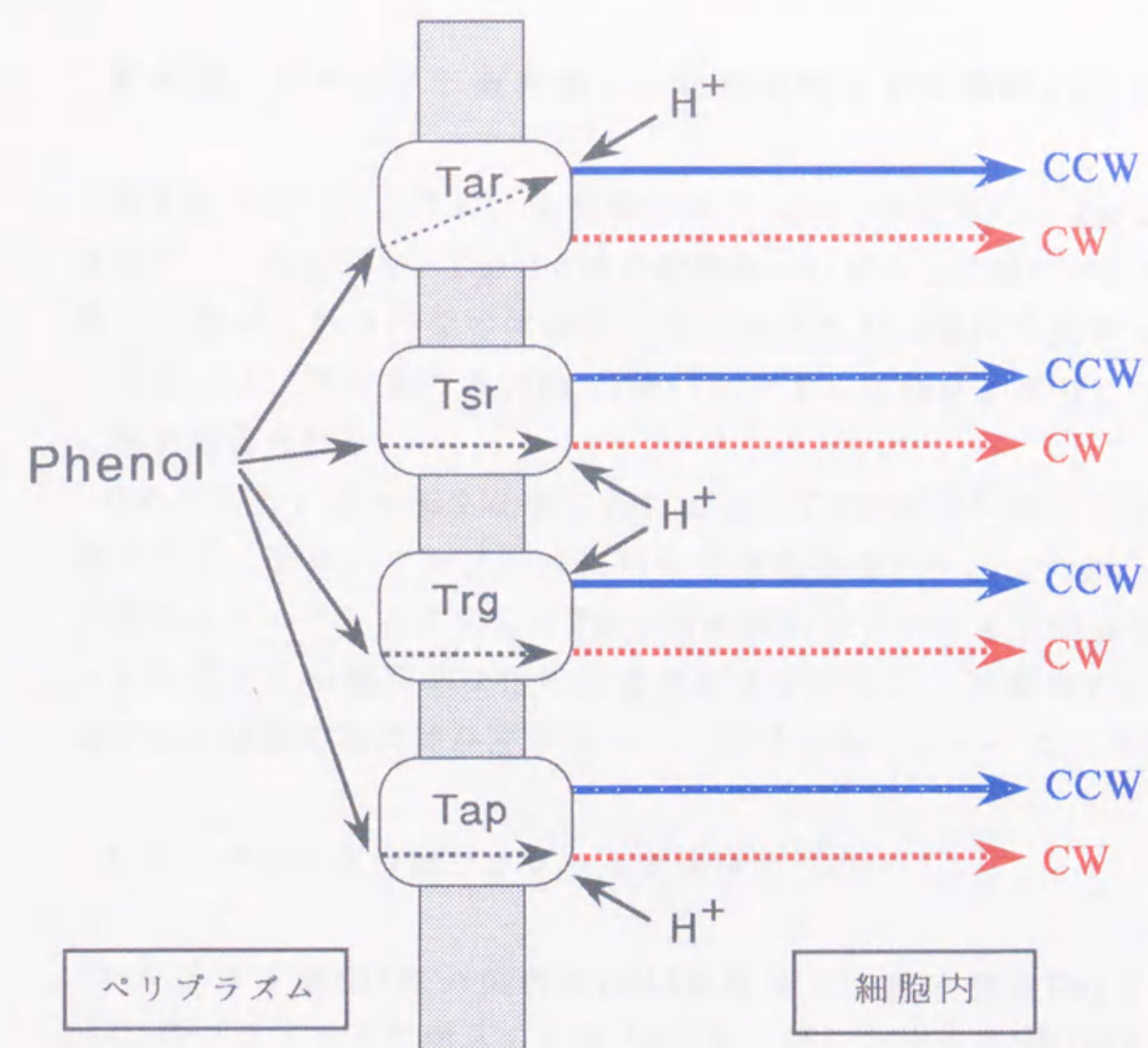


図 3 - 9 Tar, Tsr, Trg, Tap のフェノール応答、pH センサー機能のまとめ。→ は誘引シグナルを は忌避シグナルを示す。

第4章 サルモネラ菌の新しい種特異的化學受容体の同定

第3章で述べたように、大腸菌ではフェノールに対し、Tarは誘引シグナルを産生し、Trg、Tsr、Tapの3種の受容体がいずれも忌避シグナルを産生する。菌の行動はこれらの受容体の産生するシグナルの総和で決まるため、野生株の場合には、絶対量の多いTarの誘引シグナルが優位となり、フェノールに対し誘引応答を行う。

これに対し、サルモネラ菌においては、Tarが誘引シグナルを産生するにも関わらず、菌は、フェノールに対し忌避応答を示す。したがって、サルモネラ菌は、フェノールに対してTarの出す誘引シグナルを上回る強力な忌避シグナルを産生する特異的な化學感覺受容体を持つことが期待される。そこで、まずこの忌避応答に関与するフェノール受容体のクローニングを試みた。

4.1 サルモネラ菌フェノール受容体のクローニング

サルモネラ菌ST1株の染色体DNAの断片を、制限酵素PstIで切断した後、pUC119プラスミドに挿入し、全MCPを欠損した大腸菌HB339株に導入した。得られた変換体の混合溶液をアンピシリンを含んだトリプトン半流動培地に塩菌し、30℃で1夜培養した。HB339株は、本来、走化性を示さないため半流動培地上ではスワームを形成しない。しかし、導入したプラスミドが何らかの化學受容体遺伝子を含んでいれば、その変換体の泳ぎの方向転換頻度(モーターの回転方向の変換頻度)が上昇するため、走化性応答の有無に関わらず半流動培地上である程度スワームを形成するはずである。そこで、スワームを形成したすべての変換体を分離し、その各々について、いくつかの誘引/忌避物質に対する反応を調べた。その結果、セリン、アスパラギン酸、リボース(各々Tsr、Tar、Trgの誘引物質)のいずれにも応答を示さず、フェノールにたいして明らかな忌避反応を示す変換体を得られた。この変換体から、14Kbのサルモネラ菌染色体DNA断片を含んだプラスミドを分離し、pKYP2と名付けた。

次に、14KbのDNA断片中でのフェノール化學受容体遺伝子の位置を確定するため、この断片中に、図4-1に示すような各種の欠損をもつプラスミドを作成し、pKYP21、pKYP24、pKYP31、pKYP32、pKYP33と名付けた。これらの

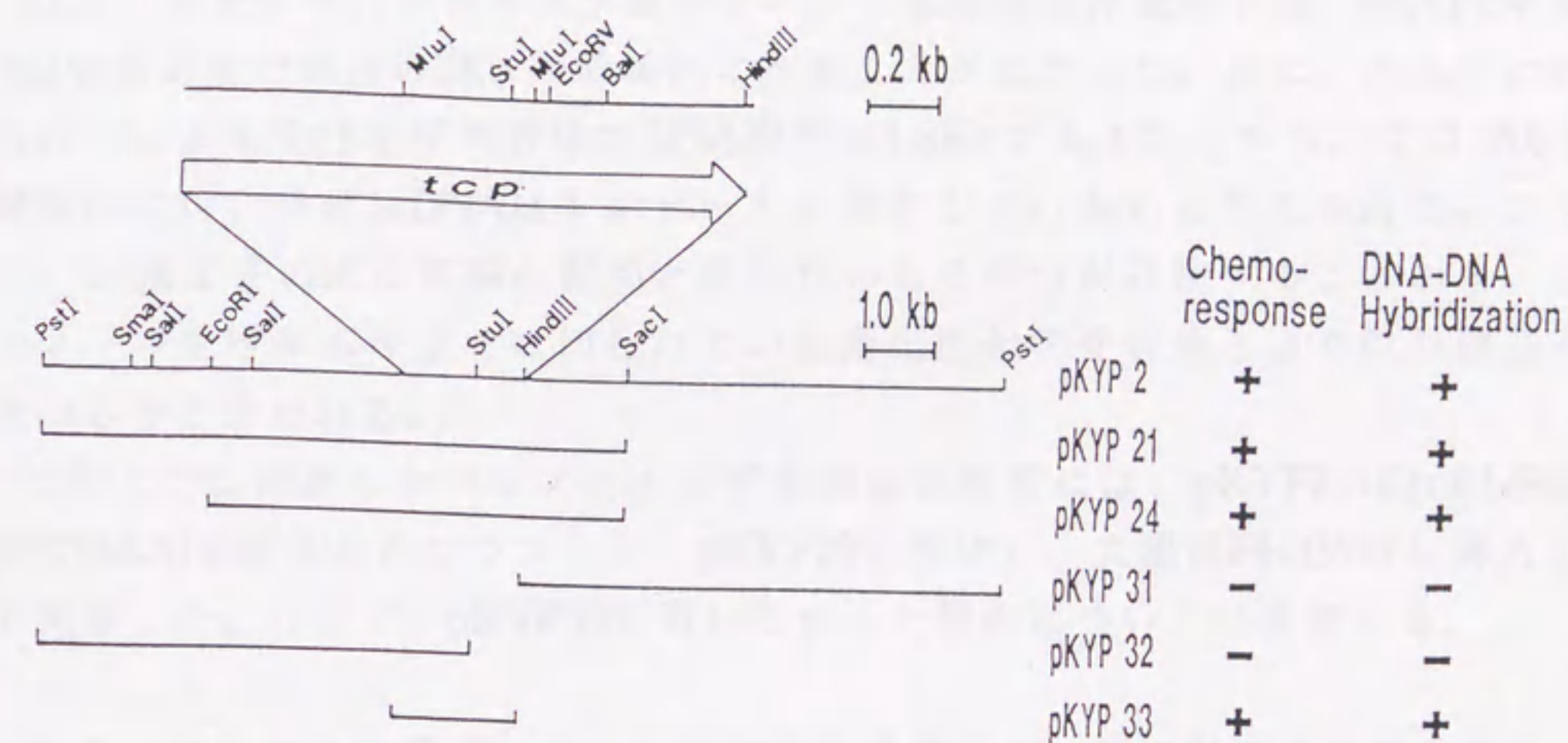


図 4-1 クローニングしたDNA断片と作成したプラスミドの制限酵素地図、及びその表現型。フェノール応答能については、HCB339株に各プラスミドを導入し、5 mMフェノールに対して応答が見られるものを+、応答しないものを-であらわした。DNA-DNAハイブリダイゼーションはサルモネラ菌 *tar* 遺伝子の3'側半分をプローブとして用い、ハイブリッドが形成されるものを+、されないものを-とした。

プラスミドをHB339株に導入し、フェノール応答性を調べた。その結果、pKYP21、24、33を持つ菌株はフェノールに対して忌避反応を示したが、pKYP31、32は応答を示さなかった(図4-1)。

さらに、知られている走化性化学受容体遺伝子配列中で相同性が高い部分をプローブとして用い、DNA-DNAハイブリダイゼーションテストを行なった。プローブとして使用したのは、サルモネラtar遺伝子の3'側半分(受容体の原形質側ドメインに対応する)である。その結果、pKYP21、24、33ではバンドが検出されたがpKYP31、32では検出されなかった(図4-1)。

以上の結果から、サルモネラ菌フェノール化学受容体遺伝子は、pKYP2中のStuI切断部位の周辺の2Kbの領域内にあることがわかった。また、今までに知られている走化性化学受容体のDNA配列は1.8Kbであることから、この2Kbの領域内には、受容体DNAは1コピーしか存在していないと考えられる。さらに、tar遺伝子の原形質側の配列と相同性のある部分が存在することから、フェノール受容体も今までに知られている走化性化学受容体とよく似た構造を持つものと思われる。

このように同定したフェノール化学受容体の解析には、pKYP2のEcoRI-SacI断片(6Kb)を挿入したプラスミド、pKYP29を作成し、大腸菌HB339株に導入して使用した。ここで、pKYP33を用いなかった理由については後述する。

4.2 サルモネラ菌フェノール化学受容体とクエン酸に対する化学受容体の同一性

pKYP29を導入した大腸菌HB339株では、前述したpKYP2を導入した菌と同様、フェノールに対して明らかな忌避応答が観察される。一方、セリン、アスパラギン酸、リボースに対しては全く応答性を示さない。さらに、Tapの誘引物質とされるジペプチドにも反応しなかった。これらの結果は、サルモネラ菌フェノール受容体は、現在までに報告されているTsr、Tar、Trg、Tap、Tipのいずれとも異なる、全く新しい走化性化学受容体であることを示している。ところで、Tip以外の既存の化学受容体は、全てサルモネラ菌にとって代謝可能な基質を誘引物質として認識し、菌の生育に有利となるような機能を果たしている。したがって、フェノール受容体も、何らかの誘引物質の認識に第1義的に使用されている可能性は大きい。

第一章で述べたようにサルモネラ菌は、クエン酸を炭素源として利用可能で

あり、また、クエン酸に対して正の走化性応答を示すことができる。したがって、サルモネラ菌には種特異的受容体としてクエン酸受容体の存在が示唆されるが、同定はなされていない。そこで、サルモネラ菌で新しく見いだしたフェノール受容体が、クエン酸応答にも関与している可能性について調べてみた。

HB339(pKYP29)は、図4-2に示すように、5mMのフェノールに対して数分間の忌避応答を示すが、そこに1mMのクエン酸を添加すると、速やかに強い誘引応答が観察され、ほとんどすべての菌がスムーズな泳ぎを回復した。さらに、フェノールが存在しない条件でクエン酸のみを添加した場合にも、スムーズな泳ぎの増加が見られた。一方、10mMのセリン、アスパラギン酸、リボースを添加した場合には、菌の行動に変化は見られなかった。また、同様の実験を、図4-1の各プラスミドを導入したHB339株について行なったところ、pKYP21、24、33を導入した菌はクエン酸応答を示したが、pKYP31、32は反応しなかった。したがって、フェノール受容体とクエン酸に対する走化性応答を司っている化学受容体が同一のものであると考えられる。そこで、今回発見した新しいサルモネラ菌走化性化学感覚受容体をTcp(Taxis to Citrate and away from Phenol)と名付けることにした。

4.3 Tcpのメチル化

図4-1に示した、TcpのDNA-DNAハイブリダイゼーションによる解析結果から、Tcpは、その1部にTarの原形質側部分とほぼ同じアミノ酸配列を持つと考えられ、その部分がレセプター機能としても共通性を持つ可能性が高い。Tar、Tsrなどの現在までに知られている大腸菌、サルモネラ菌の走化性化学受容体は、原形質側部分に適応に関するカルボキシメチル化を受ける特定のグルタミン酸残基を持つ(14)。そこで、Tcpもメチル化を受けるMCPの1つである可能性を調べた。

HB339(pKYP29)の蛋白質のメチル化反応を、蛋白合成を阻害した条件下でL-[メチル-³H]-メチオニンによる標識とSDSポリアクリルアミド電気泳動による解析を行なった結果を図4-3に示す。刺激のない状態でもある程度のメチル化された蛋白質が存在するが、分子量60KDaのメチル化された蛋白質のバンドは誘引物質であるクエン酸添加によりメチル化レベルが増加し、逆に、忌避物質により低下するという、菌の行動変化に対応した、典型的なメチル化

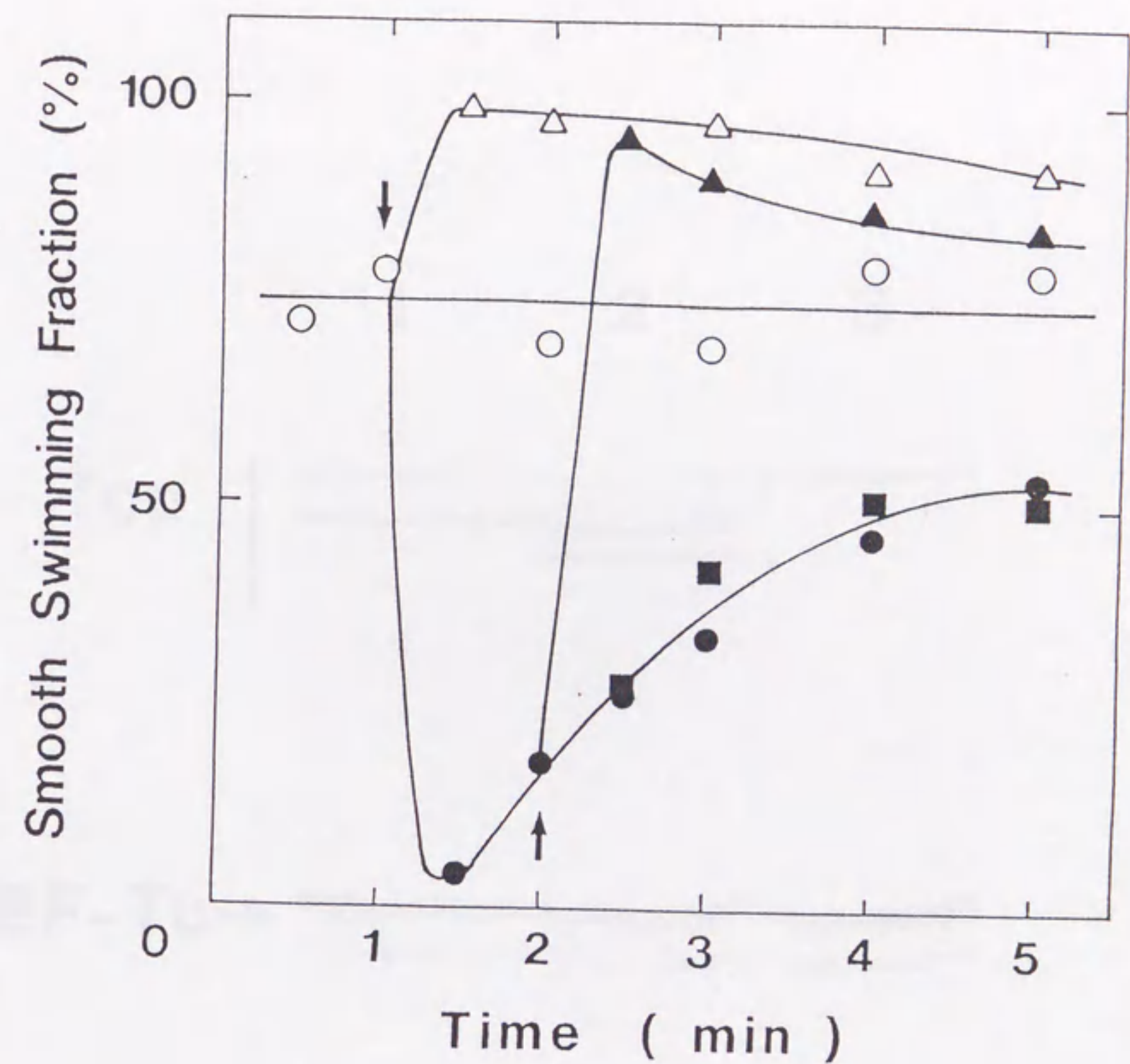


図 4-2 HCB339(pKYP29)株のフェノール、クエン酸、その他の化学刺激物質に対する応答。○、コントロール。●、5mM フェノール。△、1 mMクエン酸。▲、5 mMフェノール添加後、1 mMクエン酸添加。■、5 mM フェノール添加後、アスパラギン酸、セリン、リボースの混合溶液を添加。

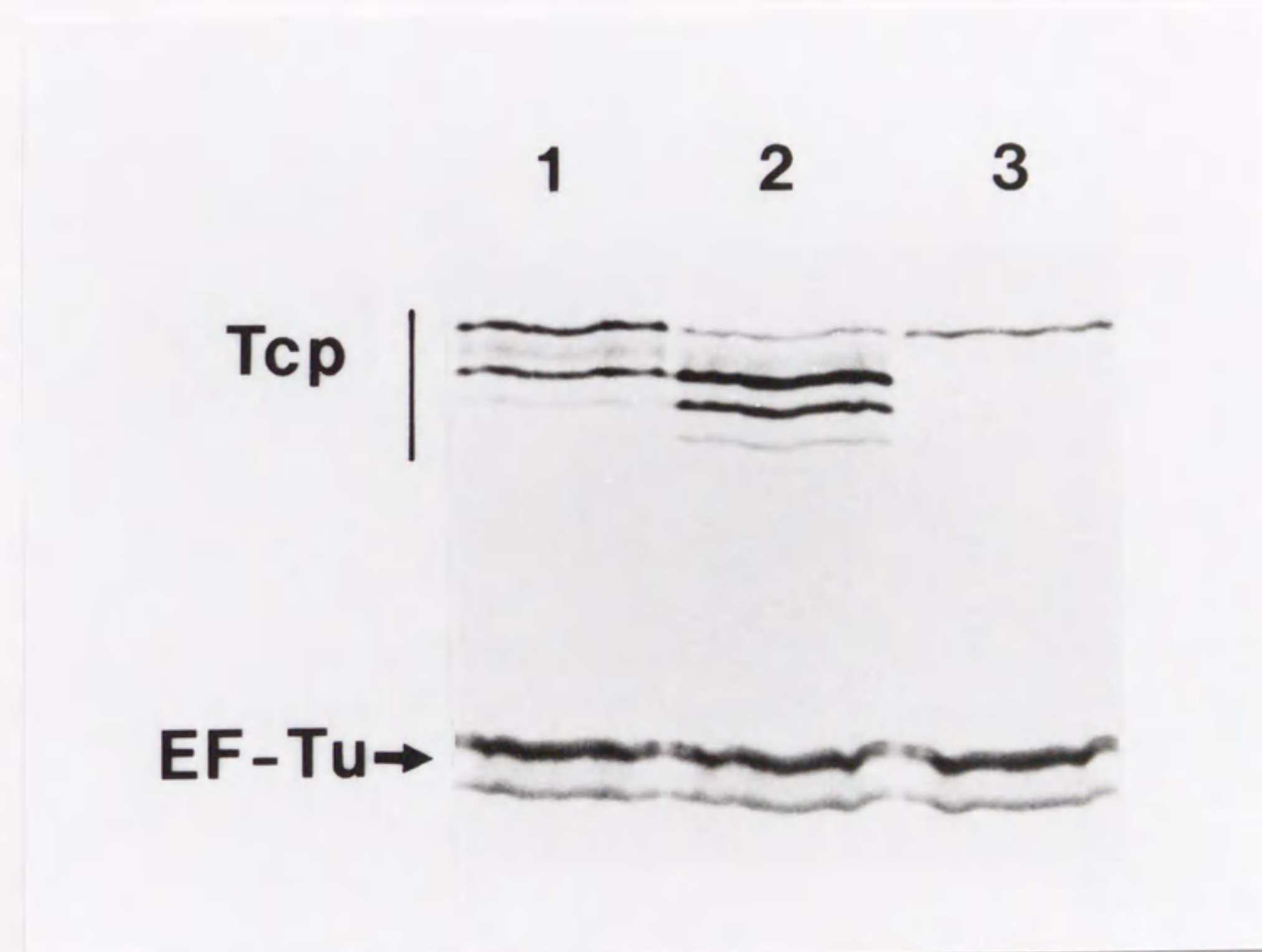
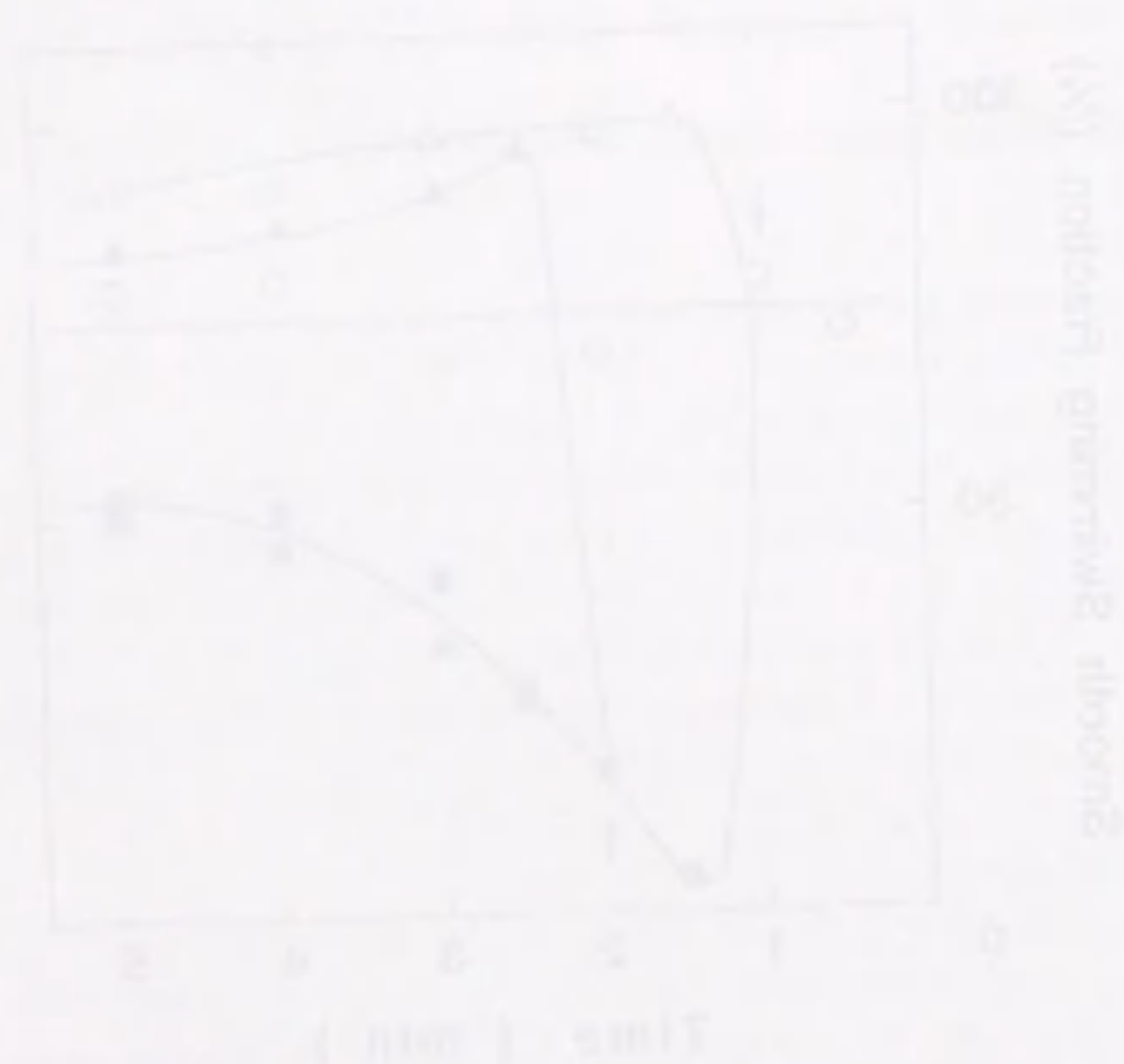


図 4-3 Tcp のメチル化バンドパターン。レーン 1、蒸留水。レーン 2、10 mM グルタミン酸。レーン 3、5 mM フェノール。

レベルの変化を示した。これらの結果は、TcpがあきらかにMCPの1つであることを示している。また、この泳動距離より推測されるTcpの分子量約60KDaは他のMCPと良い一致を示している。

4.4 Tcpのその他の性質

Tcpのクエン酸誘引応答の濃度依存性を示したのが、図4-4である。図からわかるように、HB339(pKYP29)株が50%の誘引応答を示すのに必要な濃度は約 $20\mu\text{M}$ であり、これは野生株のサルモネラ菌がクエン酸に応答するのに必要な濃度と一致している(40)。一方、クエン酸の誘導体であり、弱い誘引物質として報告されているイソクエン酸(40)は、 10mM 添加しても全く反応がみられなかった。また、他のクエン酸誘導体についても調べてみたが、オキザロ酸、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、フマル酸、スクシニル酸(各 2mM)のいずれに対しても応答を示さなかった。EDTA (2mM)も行動に変化を与えなかった。

サルモネラ菌のクエン酸に対する反応に関して、クエン酸とメタル-クエン酸複合体が異なった誘引物質として作用するという報告がある(40, 41)。そこで、Tcpがメタル-クエン酸複合体を誘引物質として認識するかどうかについても調べてみた。まず、HB339(pKYP29)株を 10mM クエン酸存在下で10分間保温し、適応させ、クエン酸に対する応答を飽和させておく。そこに、 5mM フェノールを添加し、菌をタンブルな状態にした後、クエン酸または MgCl_2 (ともに 1mM)を加えて菌の行動変化を観察した。その結果、クエン酸を添加した場合には(すでにクエン酸に対する応答は飽和しているため)、なんの変化も観察されなかったが、 MgCl_2 を加えた場合には、スムーズな泳ぎの回復が見られた。クエン酸をあらかじめ添加せずに MgCl_2 のみを加えても、スムーズな応答は見られなかった。これらの結果は、クエン酸に適応させてから見られる MgCl_2 による誘引応答が、Tcpにより Mg^{2+} -クエン酸複合体が誘引物質として認識された結果であることを示している。 CaCl_2 、 NiSO_4 、 ZnSO_4 によっても MgCl_2 と同様な結果が得られたが、 NaCl には反応を示さなかった。したがって、Tcpは、メタル-クエン酸複合体をクエン酸とは異なった誘引物質として認識していると考えられる。したがって、以前報告されていた、サルモネラ菌がこれら2つを別の誘引物質として反応する行動は、Tcpの特性によっていることがわかった。

Tcpの忌避物質については、フェノールの他に、インドール(1mM)が弱いタ

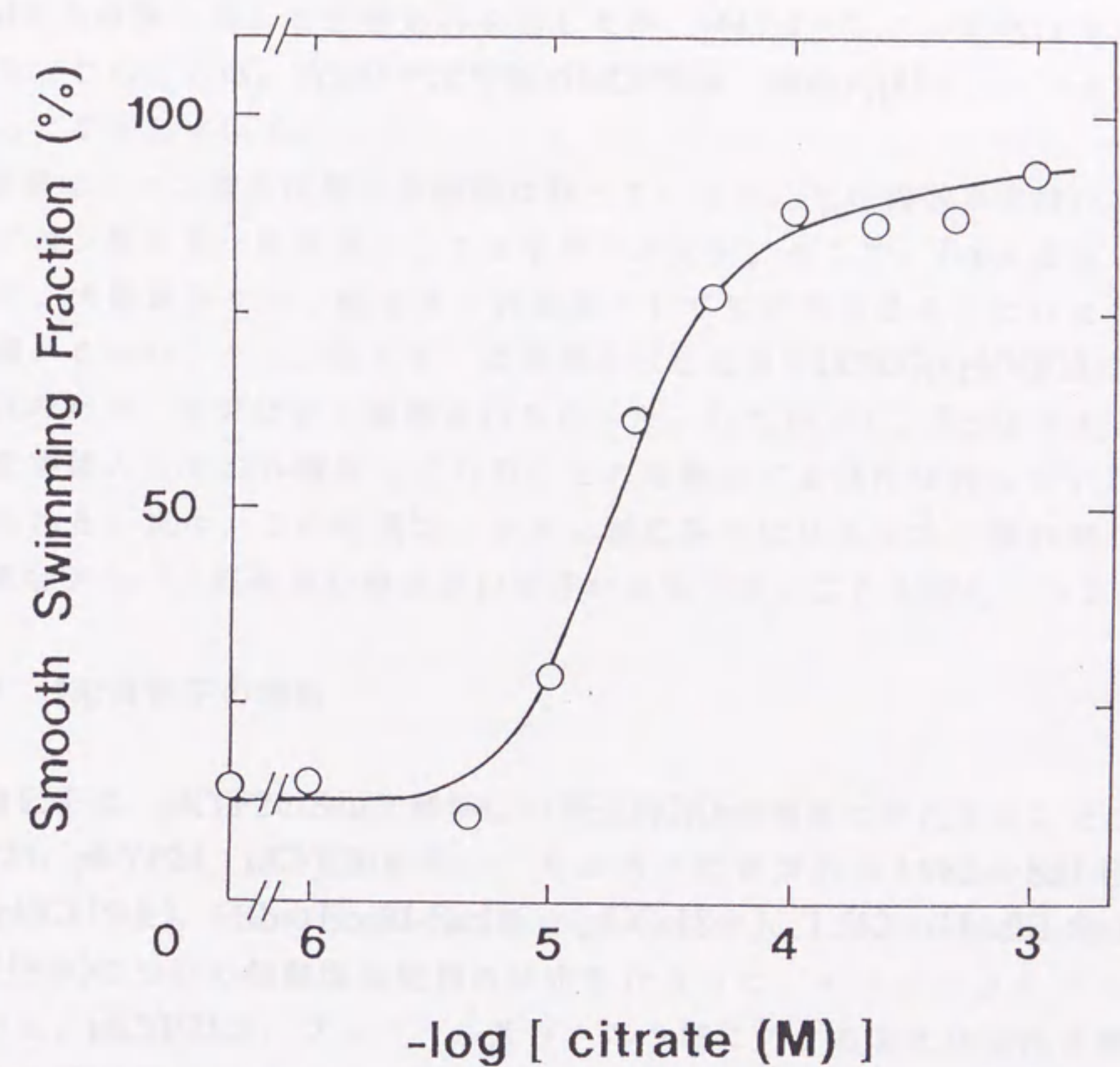


図 4-4 T c p のクエン酸に対する応答の濃度依存性。HCB339(pKYP29) 株を 0.5 M グリセロールによりタンブルな状態にした後、クエン酸に対する応答を測定した。

ンブルな泳ぎを誘起することがわかった。また、他のMCPと同じく0.5Mのグリセロールに対して忌避応答を示した。さらに、pH 6.0で、30mM酢酸または10mM安息香酸に対して忌避応答を示したが、pH 7.4ではこの反応は見られなかった。このことは、Tcpがやはり他のMCP同様、細胞内pHセンサーの機能を持つことを示している。

大腸菌はクエン酸を代謝する機能は持っているが、その輸送系を持たないため、クエン酸を単一炭素源としては生育できない。そこで、Tcpを産生させた条件で、大腸菌がクエン酸を単一炭素源として生育できるようになるかどうかを調べるため、クエン酸を単一炭素源とした培地でHCB339(pKYP29)株の培養を試みたが、生育は全く観察されなかった。したがって、Tcpはクエン酸の化学受容体としてのみ機能しており、それを輸送する活性は持っていないと考えられる。また、この結果は、クエン酸応答にはサルモネラ菌の持つクエン酸結合タンパク質を含む輸送系の存在が必要でないことも示している。

4.5 tcp遺伝子の解析

tcp遺伝子は、pKYP2のStuI切断部位の周辺約2Kbの領域に存在する。そこで、pKYP23、pKYP24、pKYP26を用い、その各々に含まれる3.9KbのSalI-HindIII断片(pUC119中)、6KbのEcoRI-SacI断片(pUC118中)、1.5KbのHindIII-SacI断片(pUC118中)について核酸塩基配列の決定を行なった。4.1 および4.2で述べたように、pKYP33は、フェノール及びクエン酸に対する走化性活性を持つ最も小さなDNA断片を含んでいる。そこで、最初にこの断片を用いて塩基配列の決定を行なった。しかし、この断片にはtcp遺伝子が完全には含まれておらず、HindIII切断部位の下流に欠けている部分があることがわかったので、この下流約80bpの配列をさらに決定し、完全なtcp遺伝子のDNA配列を決定した(図4-5)。

図4-5の配列中には、2つのATGコドンが存在するが、シャイン-ダルガーノ配列が正確な位置(16-13bp上流)に存在することから、2番目のATGが開始コドンであると考えられる。停止コドン(TAA)は、開始コドンの1,644bp下流にあり、tcp遺伝子は、547アミノ酸残基をコードしていることになる。これから計算される分子量は58,947Daで、図4-3に示したSDSポリアクリルアミド電気泳動から予測された60KDaとよく一致している。また、フラジェラ・オペロンには、特異的なプロモーター配列が存在する(図4-6)が、Tcpの場合にも、開

S. flgK	TCAA	GTCCACGTAGTCGCT	GCCGGAAT
E. fliD	TAAA	CTTTGCGCAATTCAG	ACCGATAA
S. fliD	TAAA	CTTTGCCCTCCAGATT	GCCGATAA
E. fliC	TAAA	GGTTGTTTTACGACA	GACGATAA
S. fliC	TAAA	GTTTCGAAATTCAGGT	GCCGATAC
S. fljB	TAAA	GTTTATGCCTCAACT	GTCGATAA
E. motA	TAAA	CTTTCCCAGAATCCT	GCCGATAT
E. tar	TAAA	GTTTCCCCCCTCCTT	GCCGATAA
S. tar	TAAA	GTTATCGCCGCAGGT	GCCGATAA
E. trg	TAAG	TAATTACCGTCAAGT	GCCGATGA
E. tsr	TAAA	GTTTTTCCTTTCCAG	GCCGAAAA
Consensus	(TAAA)	N15	GCCGATAA
S. tcp	TAAG	GTTAATTTTTATCCA	ACCGATAT

図 4-6 フラジェラ・オペロンに特異的な上流のコンセンサスシーケンスとTcpで見いだされた類似シーケンスの比較。Eは大腸菌を、Sはサルモネラ菌の遺伝子をあらわす。

始コドンの上流61bpおよび39bpの位置にこのプロモーターのコンセンサス配列(TAAG及びACCGATA)が存在していた。

pKYP33を作成するのに用いたHindIII切断部位(図4-1)は、停止コドンの2bp上流に位置しており、その結果pKYP33にコードされたTcpはC末の配列がSer(546)-Leu-Ala-COOHとなった変異蛋白質であるはずである。一方、正しいTcpのC末配列は、Ser(546)-Phe-COOHである。pKYP33を導入した菌はクエン酸、フェノールの双方に応答可能であるが、適応はほとんど観察されなかった。このことは、TcpのC末残基(Phe547)は、基質認識には必要ないが、適応現象にPhe547の欠損が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

核酸塩基配列から予測されたTcpのアミノ酸配列は、Tarの配列に類似性が高く、相同性は約54%であった(図4-7)。また、膜貫通部分と考えられる2つの疎水性領域もtarとほぼ同じ位置に存在する。特に、C末側の原形質部分は非常によく似ており(72%相同)、Tarの4ヶ所のメチル基を受容するグルタミン酸残基はTcpにおいても保存されていた。

以上に述べてきた結果から、Tcpは、現在までに知られていたTsr、Tar、Tap、Trg、Tipと同様の構造と特性(メチル化を受け、誘引物質や忌避物質を認識する)を持つ、走化性化学受容体またはMCPとよばれる膜貫通性蛋白質の新たな一員であることが明らかになった。

4.6 サルモネラ菌TrgとTsrのクローニング

サルモネラ菌のMCPのうち、Tarはクローニングされ、塩基配列も決定されている(8)が、他の受容体についてはクローニングが行われていなかった。本研究において、Tcpのクローニングの過程で、Trg及びTsrのクローニングも行った。

クローニングは、4.1に述べたのと同様の方法で行なった。ただし、Tcpのクローニングの場合は、染色体DNAの切断にPstIを用いたのに対し、Trgの場合はHindIIIを、Tsrの場合はKpnIを使用した。その結果、Trg、Tsrについて、6.2 Kb、8.2 KbのDNA断片を含んだプラスミドをそれぞれ分離し、pKYH-1、及びpKYK-1と名付けた。

サルモネラ菌のTrg、Tsrがどのようなフェノール応答をするのかを調べるため、上記のプラスミドをHCB339株に導入してフェノールに対する応答を調べた。その結果、データは示さないが、いずれの場合も大腸菌と同様、フェノ

Tcp MKN- IKVITGV IATLGIFSA LLLVTGILFY SAVSSDR LNFQNASALSYQQ
 Tar: MFNRI RVVTM LMMVLGVFALLQLVSGGLLF SSLQHNQQGFVISNELRQQQ

QELGGSFQTLIETRV TIRVAIRMLKNQRPASLDAMNTLLITNAGASLNE
 SELTSTWDLMLQTRINLSRSAARMMDASNQQSSAKT-DLLQNAKTTLAQ

AEKHFNINYNSEAIAGKDPALDAQAEASFQMYDVLQQSIHYLKADNYAA
 AAAHYANFKIMTPLPAMAEASANVDEKYQR.YQAALAE LIQFLDNGSINMDA

YGNLDAQKAQDDMEQVYDQWLSQNAQLIKLASDQNSSTQMOWTLGILL
 YFAQPTQGMQNALGEALGNVARS EILYRQTFDQS AHDYEFQWQLGVLA

LIVLIVLAFIWLGLQRVLLRPLQRIMAHIQTIADGDLTHEIEAGRSEMG
 VVLVLILMVVWFGIRHALLNPLARVITHIREIASGDLAKTLTVSGRNGIG

QLAAGLKTMQQSLIRTVSAVRDNADSIYTGAGEISAGSSDLSSRTEQQAS
 ELAGTVEHMQRSLIDTVTQVREGSDATYSGTSEIAAGNTDLSSRTEQQAS

ALEETAASMEQLTATVRQNTDNARQATGLAKTASETARKGGRVVDNVVST
 ALEETAASMEQLTATVKQADNARQASQLAQSASETARHGGEVVDGVVIT

MNDIAESSEKIVDITSVIDGIAFQTHILALNAAVEAARAGEQGRGFVVA
 MHEIADSSKIIADIISVIDGIAFQTHILALNAAVEAARAGEQGRGFVVA

GEVRTLASRSAQAAKEIKVLIENSVSRI DTGSTQVREAGETMKEIVNAV
 GEVRNLASRSAQAAKEIKALIEDSVSRVDTGSVLVESAGETMTDIVNAV

RVTDIMGEIASASDEQSKGIEQVAQAVSEMDSVTQQNASLVEESAAAAA
 RVADIMGEIASASDEQSRGIDQVALAVSEMDRVTTQQNASLVQESAAAAA-

LEDQANELRQAVAAFRIQKQPRREASPTT-LSK---GLTPQ-PAA-EQA
 LEEQASRLTQAVSAFRLASRPLAVNKPENRLSVNAQSGNTTPQSLAARDDA

NWESF*
 NWETF*

図4-7 TcpとTarのアミノ酸配列の比較。●印をつけた部分は両者の配列が等しいことを示している。また、枠で囲った部分は、膜貫通領域を示す。

ールに対して忌避応答を示し(Tsrの場合は非常に弱い)、Trg、Tsrともフェノールの負の受容体であることが明らかになった。

また、サルモネラ菌には、機能不明のMCP様蛋白質としてTipが存在することが知られているが、今回クローニングしたtrgの制限酵素地図をtipのものと比較したところ、相同性があることがわかった。

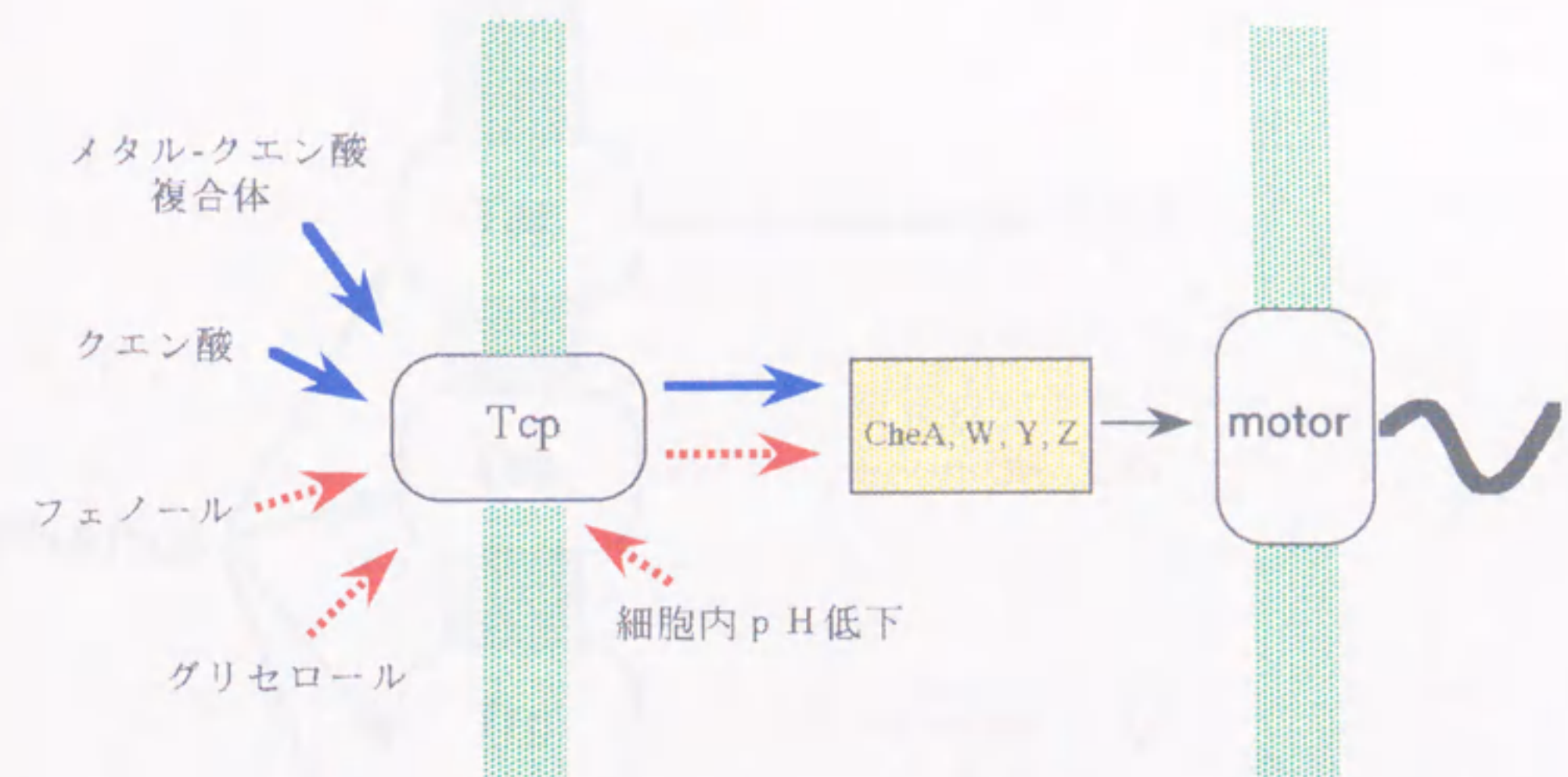
4.7 まとめと考察

サルモネラ菌のフェノール応答においては、大腸菌の場合と同じくTarがフェノールに対し誘引シグナルを産生するにも関わらず、菌は忌避応答を示す。したがって、サルモネラ菌には、今までに知られていない強力なフェノール忌避シグナルを産生する受容体の存在が予想された。本研究では、この新しい受容体のクローニングに成功し、その核酸塩基配列を決定した。この新しい受容体の解析から、この受容体は、サルモネラ菌の誘引物質であるクエン酸の正の受容体であることも明らかとなり、Tcpと名付けた。



また、他のMCPの場合と同じく、Tcpはその基質(クエン酸)の輸送活性を持たないこともわかった。さらに、Tcpは、クエン酸とメタルクエン酸複合体の双方を誘引物質として認識し、これらの一方の刺激に適応した後でも、他方の刺激に応答することが可能である。おそらく、Tcpは、クエン酸とメタルクエン酸複合体を全く別種の誘引物質として認識していると考えられる。以上のTcpの機能をまとめた模式図を図4-8に示す。

また、サルモネラ菌のtrg及びtsrのクローニングも行い、それらが大腸菌の対応する受容体と同じく、フェノールに対し忌避応答を示すことがわかった。

したがって、サルモネラ菌においては、Tarが大腸菌と同じく誘引シグナルを、Tcp、Trgが忌避シグナルを、Tsrが弱い忌避シグナルを産生する。菌体内におけるTcpの発現量は不明であるが、TcpとTrgの忌避シグナルの和(Tsrのシグナルは非常に弱く無視しうる)が、Tarの誘引シグナルを上回り、その結果として菌はフェノール忌避応答をすると考えられる。図4-9に、サルモネラ菌フェノール応答機構の概要をまとめた。



誘引物質	クエン酸、メタル-クエン酸複合体
忌避物質	フェノール、グリセロール、細胞内 pH 低下

図 4-8 サルモネラ菌 Tcp 受容体の機能。  は誘引物質（シグナル）、 は忌避物質（シグナル）を示す。

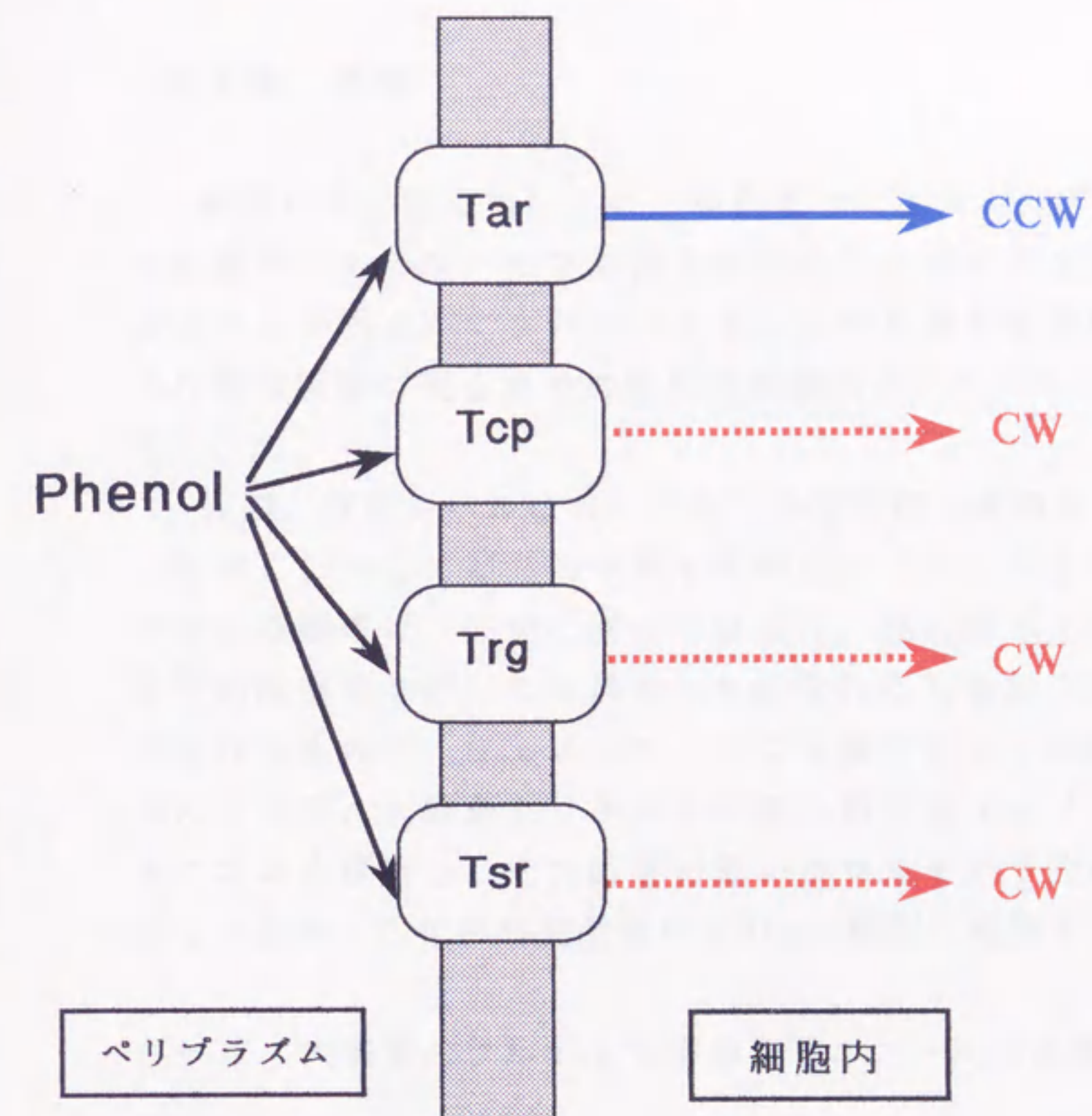


図 4 - 9 サルモネラ菌MCPのフェノール応答のまとめ。 は誘引信号を は忌避信号を示す。

第5章 考察

細菌の走化性については、現在までに、多くの研究者により大腸菌及びその近縁種であるサルモネラ菌を材料として解析が進められ、分子レベルのメカニズムが明らかにされつつある。この2種の細菌は、走化性刺激の受容から行動の制御に至るまでの走化性機構において多くの類似点を持つ(第1章参照)。

実際、行動レベルにおいてもこの類似性は観察され、セリンやアスパラギン酸などに対してどちらの菌も同様のレスポンスを示す。しかし、この両者の走化性機構は、完全に同一ではなく、既に述べたようにいくつかの特定の化学刺激物質に対しては異なった走化性応答を起こす(表1-1参照)。そのうち代表的なものが、フェノールとクエン酸である。本論文では、3、4章に述べたように、大腸菌とサルモネラ菌におけるフェノール及びクエン酸応答メカニズムを解析し、その応答の違いがサルモネラ菌のみが持ち、今まで知られていなかった化学感覚受容体、Tcpの機能に起因することを明らかにした。

5.1 大腸菌とサルモネラ菌のフェノール応答機構

野生株大腸菌は、フェノールに対しTarにより仲介される誘引応答を示すが、Tar欠損株では逆に忌避応答を示す(20)。全てのMCPを欠損した株では、フェノールに対する応答能は全く観察されない(第3章参照)ため、この現象も、MCPに起因していると考えられた。第3章で述べたように、本研究では、大腸菌におけるこの複雑なフェノール応答機構を解析し、Tar以外のMCP、即ちTsr、Trg、Tapの全てが関与する複雑なものであることを明らかにした。この大腸菌におけるフェノール応答のメカニズムをまとめたものを図5-1に示す。

それぞれの受容体が産生する忌避シグナルの強さは、Trgがもっとも強く、Tapがそれにつぎ、Tsrがもっとも弱い。一方、野生株大腸菌での受容体の絶対量はTar、Tsrが多く、Trg、Tapは、その1/10~1/5程度しか存在しない(3)。菌の最終的な行動は、各受容体が産生したシグナルの総和、即ち、受容体の量×シグナルの強さの和により決まると考えると、野生株や各種受容体欠損株の走化性応答の違いがうまく説明できる。野生株のフェノール応答では、絶対量が多くシグナルも強いTarの活性が他の受容体による忌避シグナルに打ち勝ち、最終的にフェノールに対する誘引応答行動となって現れると考えら

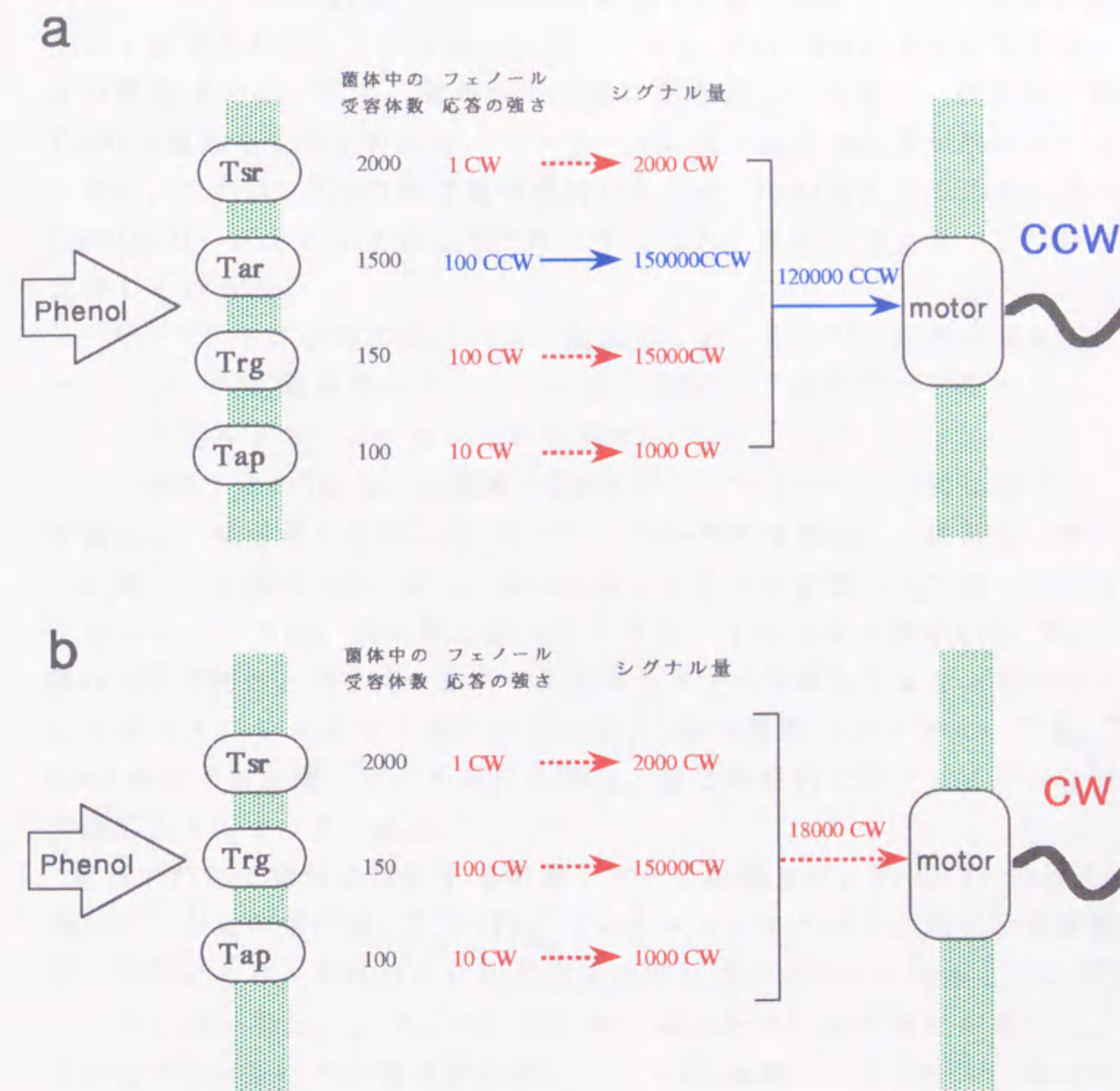


図 5-1 大腸菌野生株(a)、及びTar欠損株(b)のフェノール応答。実線の矢印は誘引シグナル、破線の矢印は忌避シグナルを示す。応答の強さは、1つの受容体分子が出すシグナル量を推定して示した。最終的な菌の行動は、各受容体からのシグナルの総和で決まる（野生株では、誘引応答を示す）。

れる。一方、Tar欠損株では、他の受容体の忌避シグナルによる応答が行動レベルで観察されるようになる。ただし、Trg、Tap、Tsrの産生する忌避シグナルの総量は少ないため、菌の示す忌避行動も弱い。実際に、野生株大腸菌でTrgの発現量を上昇させると、フェノールに対する忌避応答が観察されるようになる。これは、Trgの絶対量が増加したため、その産生する忌避シグナルがTarの誘引シグナルを上回ったためと考えられ、上記の考え方が正しいことを支持している。

一方、サルモネラ菌の場合には、菌はフェノールに対し忌避応答を示し、そのフェノール応答機構も異なっている。図5-2に、本研究で明らかとなったフェノール応答メカニズムをまとめて示す。

サルモネラ菌のTarも、大腸菌のTarと同じくフェノールに対し誘引シグナルを産生し、発現量も多い(20)。しかし、サルモネラ菌は、大腸菌には存在しない、新しい受容体Tcpを持ち、強い忌避シグナルを産生していることが明らかとなった。さらに、第4章に述べたように、サルモネラ菌のTrg、Tsrも大腸菌の対応受容体と同じくフェノール忌避シグナルを産生することもわかった。したがって、サルモネラ菌においては、Tarの誘引シグナルに、Tcp、Trg、Tsrの産生する忌避シグナルが打ち勝ち、菌は最終的にはフェノールに対し、忌避応答を行なうのである。

それぞれの受容体の産生する忌避シグナルの強さは、TcpとTrgで強く、Tsrのシグナルは非常に弱い(このTrg、Tsrのシグナルの強さの順は、大腸菌の場合と同じであり、両種の走化性受容体の類似性が高いことを示している)。サルモネラ菌の場合、それぞれの受容体の発現量の比は不明であるが、メチル化される蛋白量からの推定や忌避シグナルがTarの誘引シグナルに優占することから、Tcpの発現量はTarと同程度と考えられる。

以上に述べてきたように、大腸菌においても、サルモネラ菌においてもフェノールの化学応答機構には、すべてのMCPが関与しており、菌の最終行動は、それぞれの菌の受容体により産生されるシグナルの総和で決定されることが明らかとなり、両種間のフェノール応答の違いはサルモネラ菌が種特異的受容体Tcpを持つことに起因することがわかった。

5.2 サルモネラ菌の種特異的化學受容体Tcp

第4章で述べたように、Tcpはクエン酸の正の受容体でもあることが、本研

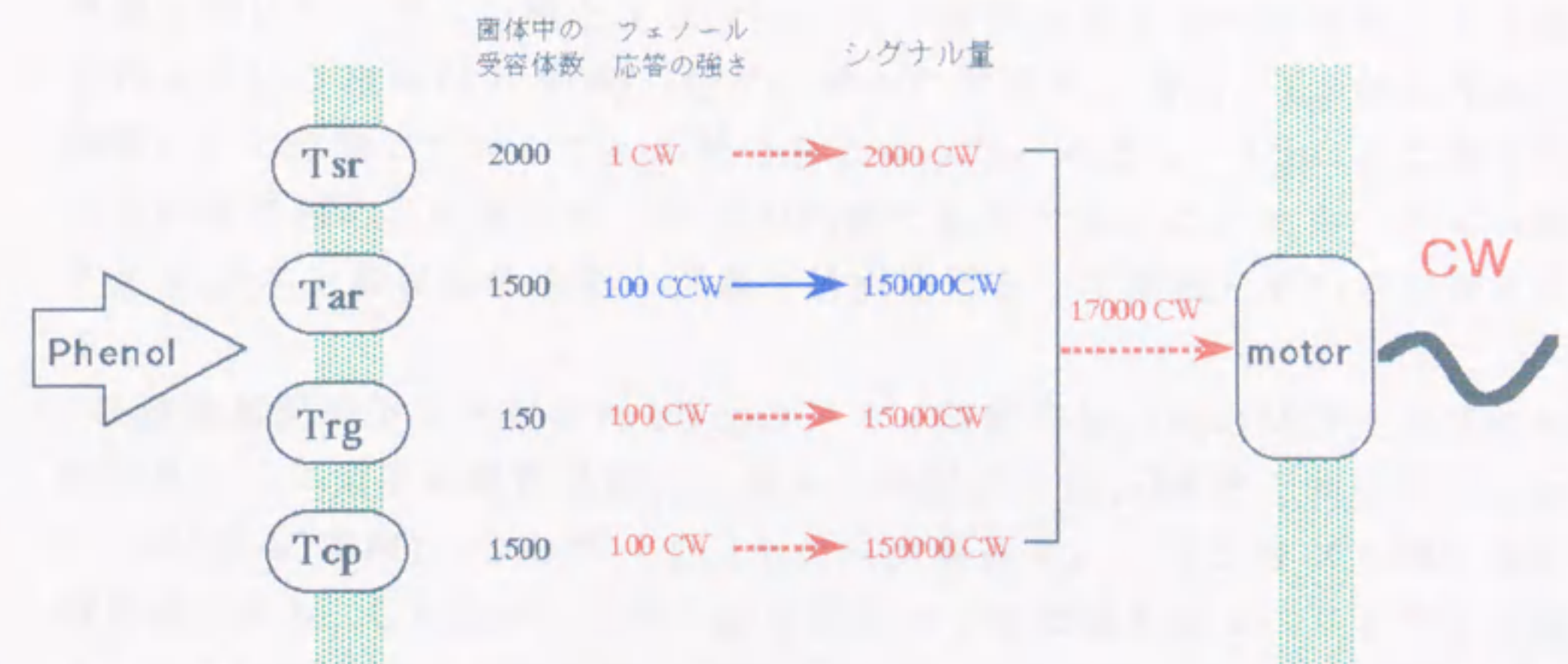


図 5-2 サルモネラ菌のフェノール応答メカニズム。実線の矢印は誘引シグナル、破線の矢印は忌避シグナルを示す。サルモネラ菌では、菌体あたりの各受容体の数さは不明であるが、大腸菌と同様と仮定し、また、TcpについてはTarと同様と想定した。最終的な菌の行動は、各受容体からのシグナルの総和で決まる（野生株では、忌避応答を示す）。

究により明らかとなった。大腸菌は、クエン酸輸送系を持たず(代謝は可能)、クエン酸を炭素源として利用できないが、サルモネラ菌には輸送系が存在し利用可能である。したがって、サルモネラ菌のみがTcp受容体を持つことは合目的であり理解できる。Tcpの機能は感覚受容のみであり、基質の輸送活性は持たないが、この点も既知のMCPの場合と同様である。さらに、サルモネラ菌において、クエン酸とメタル-クエン酸複合体が別の受容体により認識されるという報告がある(40, 41)が、単一の受容体、即ち、Tcpが双方を誘引物質として認識していることが明らかとなった。ただし、Tcpは、これらの一方の刺激に適応した後でも、他方の刺激に応答できることから、クエン酸とメタル-クエン酸複合体を全く別種の誘引物質として認識していると考えられる。

核酸塩基配列から予測されるTcpのアミノ酸配列は、他のMCPと非常に相同性が高く、2箇所の膜貫通部分と思われる配列を他のMCPと同じ位置に持っている(図4-7参照)。したがって、その高次構造も、ペリプラズム側に基質受容部位があり、C末側のシグナル産生部位と1本の膜貫通 α ヘリックスで連結されるというMCPに共通の3次元構造(図1-3a参照)をとると考えられる。実際、他のMCPと共通の機能(シグナル産生、適応)を持つC末側(膜貫通部分以降)のアミノ酸配列が、Tarと非常に相同性が高く(70%以上)、基質に応じた構造をとると思われるN末側の相同性は比較的低い事実もこの考えと一致するものである。

大腸菌Tarの基質結合ドメインの変異株による解析(42-44)や、X線結晶回折による3次元構造の研究(45)から、アスパラギン酸の α -カルボキシル基がArg64、Arg69により、アミノ基がThr154によりそれぞれ認識されると考えられている(図5-3)。Tsrにおいてもこれらの3残基は保存されており(図5-4)、セリンのカルボキシル基、アミノ基の認識に関与することが示唆されている。Tcpの場合には、2つのArg残基は保存されており、やはりカルボキシル基のうちの1つ認識に関与すると考えられる。一方、Thr残基は保存されていないが、これは、クエン酸にはアミノ基が存在せず、この位置にThrは必要ないことと一致しているように見える。

さらに基質認識に関して、基質結合部位近傍のLI-1と呼ばれる部分の配列を較べてみると、Tsr、Tar、Tcpで、それぞれ3、4、5個の正電荷を持っている(図5-5a)。面白いことに、これはそれぞれの基質のカルボキシル基(負電荷)が1個(セリン)、2個(アスパラギン酸)、3個(クエン酸)であるのと符合し

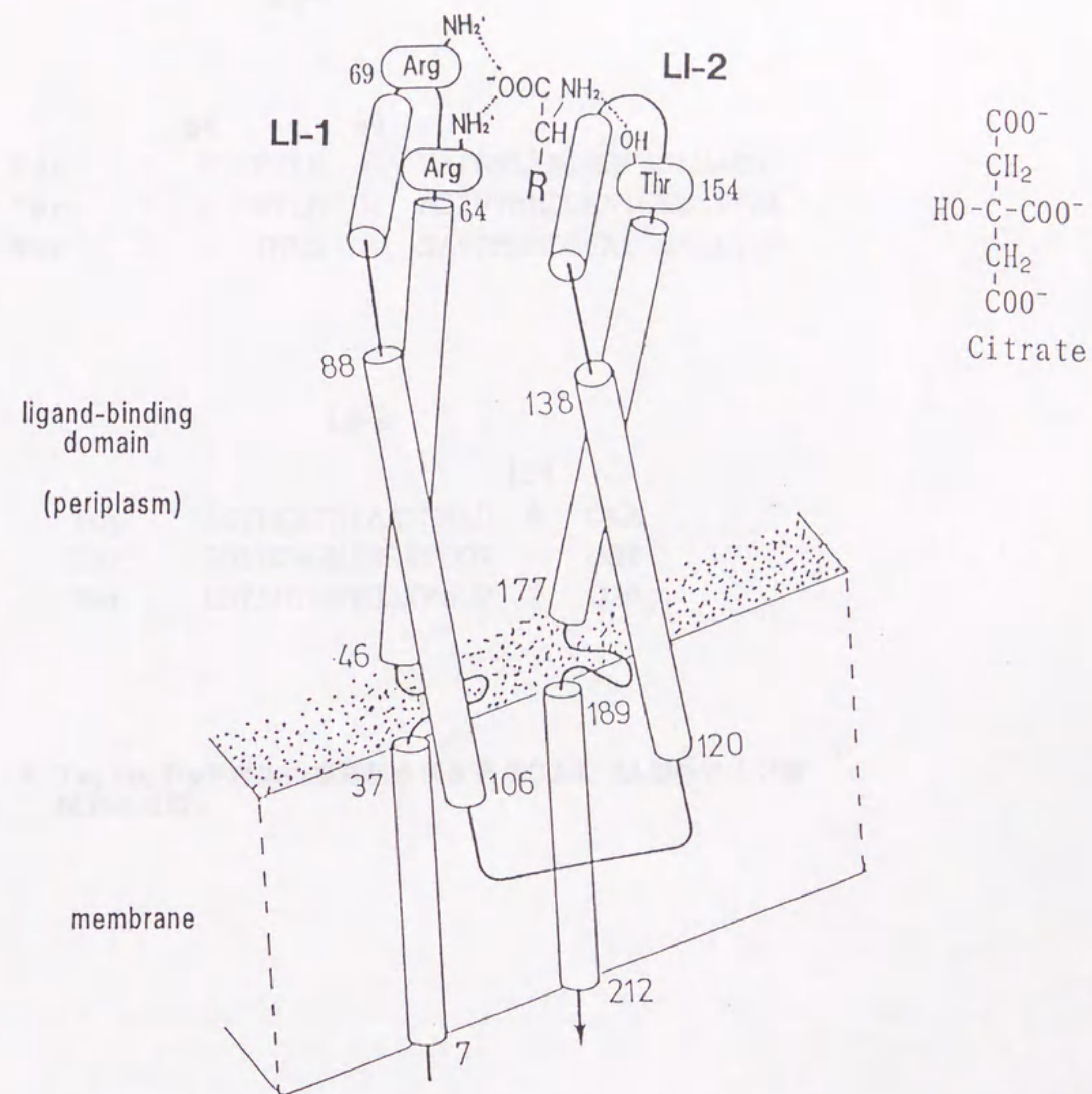


図 5 - 3 Tar受容体の3次元構造の模式図。基質結合部位近傍にLI-1およびLI-2と呼ばれる部分があり、そこに存在するArg64、Arg69、Thr154が、基質の結合に関与すると考えられている。

LI-1

		64		69	
Tcp	T	R	VTIN	R	VAIRMLKNQORDPASLDAMNT
Tsr	T	R	NTLN	R	AGIRYMMDDONNIGSGSTVAE
Tar	T	R	INLS	R	SAVRMMMDSSNQOSNAKV-E

LI-2

		154	
Top	IHYLKADNYAAYGNLD	A	QKA
Tsr	IQLLGAGKINEFFDQP	T	QGY
Tar	IDYLDYGNTGAYFAQP	T	QGM

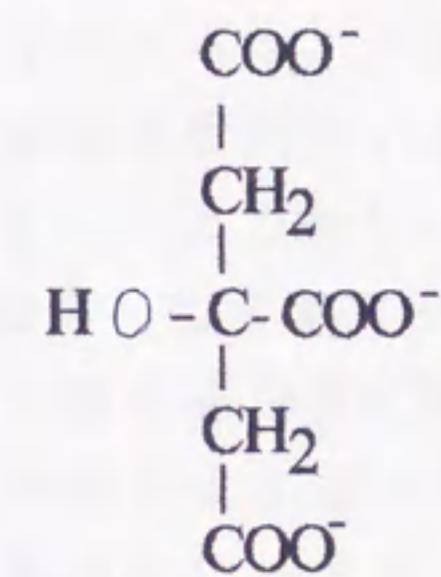
図 5 - 4 Tar, Tsr, Tcp受容体の基質結合部位近傍(LI-1、LI-2)のアミノ酸配列の比較。

a

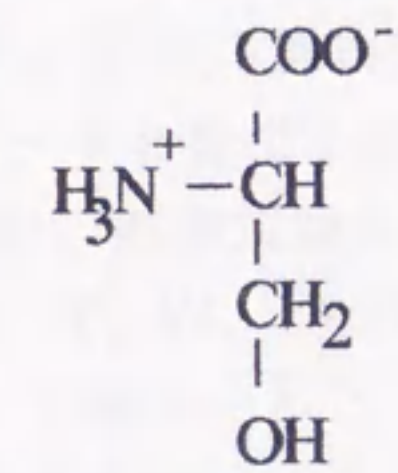
LI-1

		64		69	
Tcp	T	<u>R</u>	VTIN	<u>R</u>	VAI <u>R</u> ML <u>K</u> N <u>R</u> DPASLDAMNT
Tsr	T	<u>R</u>	NTLN	<u>R</u>	AGI <u>R</u> YMMDONNIGSGSTVAE
Tar	T	<u>R</u>	INLS	<u>R</u>	SAV <u>R</u> MMMDSSNQGSNA <u>K</u> V-E

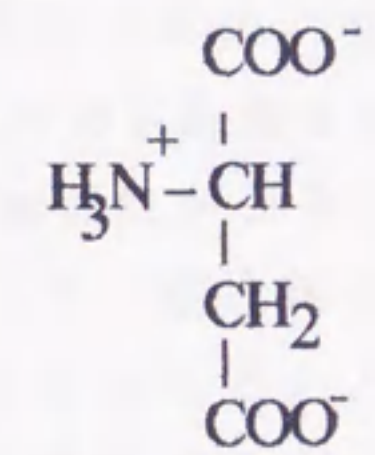
b



クエン酸



セリン



アスパラギン酸

図 5-5 受容体基質結合部位近傍の正電荷の数と基質との関係。a, Tcp、Tsr、Tarの基質結合部位近傍のアミノ酸配列。下線で示した残基は、正電荷を持つ。b, Tcp、Tsr、Tarの基質の構造式。

ている(図5-5b)。したがって、このLI-1部分の正電荷がカルボキシル基の認識に関与している可能性があるかもしれない。

5.3 総括

以上に記述してきたように、本研究では、サルモネラ菌に種特異的な受容体T_{cp}を発見し、大腸菌とサルモネラ菌のフェノール化学応答のメカニズム、及びサルモネラ菌のクエン酸応答のメカニズムを明らかにした。この結果、大腸菌、サルモネラ菌について、知られている主な化学刺激物質に対する応答メカニズムは、矛盾なく説明が可能になった。さらに、今回決定されたT_{cp}の核酸塩基配列は、基質と受容体蛋白質の基質結合部位の構造との関係を解析していく上で新しいデータを提出したという点でも意義をもつと考えられる。

細菌の化学感覚機構は、原形質膜上の受容体蛋白がシグナルを産生し、それを4種の蛋白質(CheA、Y、W、Z)が鞭毛モーター複合体に伝達し、その回転方向を変化させるという極めてシンプルなものである。この中で、受容体は刺激の入口であり、基質を結合しシグナルを産生するが、その時点で既に誘引刺激であるか忌避刺激であるかは決定されている。その意味で、受容体が細菌の化学感覚機構中で果たす役割は非常に重要であるといえる。

受容体の原形質側のシグナル産生部分はいずれも相同性が高く、ペリプラズム側は対応する刺激物質に応じた構造をとり、相同性は低い。この点は今回発見したT_{cp}についても同様であった。細菌の化学応答機構は、受容体のN末側半分のみが刺激に対応した固有の構造をもち、受容体のC末側半分以降の経路は、適応まで含めて刺激によらない固定されたシステムであるといえる。即ち、受容体のN末側半分を変化させさえすれば、無数の刺激に対応することが可能なシステムであるといえる。細菌は、進化の途上で、種々の環境に適応するために、このような効率的なシステムを構築してきたのだと考えられる。したがって、大腸菌やサルモネラ菌には、既知の刺激物質と受容体の対応関係からこれ以上の受容体は存在しないと考えられるが、これらとは異なる環境で生育する細菌には、当然、異なる刺激物質に応答する未知の受容体(MCP)が存在するはずである。

細菌の化学感覚機構は、以上のようにシンプルであるが、高等動物の化学感覚機構は非常に複雑であり、味や臭いなどの化学刺激が、どのような受容体で感覚されるのかもまだよくわかっていない。ただ、その研究を進めるうえ

引用文献

1. 今榮康雄 (1990) 岩波講座-分子生物化学 7 : エネルギーの生産と運動、香川靖雄編 (岩波書店)、pp. 93-119.
2. Macnab, R. M. (1987) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, ed. Niedhart, F. C. (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC), pp. 732-759.
3. Hazelbauer, G. L., Yaghamai, R., Burrows, G. G., Baumgartner, J. W., Dutton, D. P., and Morgan, D. G. (1990) *Soc. Gen. Microbiol. Symp.* 46, 107-134.
4. Macnab, R. M. (1987) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, ed. Niedhart, F. C. (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC), pp. 70-83.
5. Oosawa, K. and Imae, Y. (1984) *J. Bacteriol.* 157, 576-581.
6. Krikos, A., Conley, M. P., Boyd, A., Berg, H. C., and Simon, M. I. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1326-1330.
7. Krikos, A., Mutoh, N., Boyd, a., and Simon, M. I. (1983) *Cell* 35, 615-622.
8. Russo, A. F. and Koshland, Jr., D. E. (1983) *Science* 220, 1016-1020.
9. Hedblom, M. L. and Adler, J. (1980) *J. Bacteriol.* 155, 1453-1466.
10. Wang, E. A. and Koshland, Jr., D. E. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7157-7161.
11. Koiwai, O. and Hayashi, H. (1979) *J. Biochem.* 86, 27-34.
12. Manson, M. D. and Kossman, M. (1986) *J. Bacteriol.* 165, 34-40.
13. Hazelbauer, G. L. and Harayama, S. (1979) *Cell* 16, 617-625.
14. Goy, M. F., Springer, M. S., and Adler, J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4964-4968.
15. Springer, W. R. and Koshland, Jr., D. E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 533-537.
16. Stock, J. B. and Koshland, Jr., D. E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3659-3663.
17. Yonekawa, H., Hayashi, H., and Parkinson, J. S. (1983) *J. Bacteriol.* 156, 1228-1235.
18. Asakura, S. and Honda, H. (1984) *J. Mol. Biol.* 176, 349-367.
19. Stock, J. B., Ninfa, A. J., and Stock A. M. (1989) *Microbiol. Rev.* 53, 450-490.
20. Imae, Y., Oosawa, K., Mizuno, T., Kihara, M., and Macnab, R. M. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 371-379.
21. Manson, M. D., Blank, V., Brade, G., and Higgins, C. F. (1986) *Nature* 321, 253-256.
22. Clegg, D. O. and Koshland, Jr., D. E. (1985) *J. Bacteriol.* 162, 398-405.
23. Russo, A. F. and Koshland, Jr., D. E. (1986) *J. Bacteriol.* 165, 890-895.
24. Daron, H. H. and Gunsalus, I. C. (1962) *Methods Enzymol.* 5, 622-633.
25. Imai, K., Iijima, T., and Hasegawa, T. (1973) *J. Bacteriol.* 114, 961-965.
26. Kay, W. W. and Cameron, M. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 270-280.
27. Ishiguro, N., Sato, G., and Yoshikawa, M. (1981) *J. Bacteriol.* 148, 383-385.
28. Widenhorn, K. A., Boos, W., Somer, J. M., and Kay, W. W. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 883-888.
29. Slocum, M. K. and Parkinson, J. S. (1983) *J. Bacteriol.* 155, 384-399.
30. Kondoh, H., Ball, C. B., and Adler, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 260-264.

31. Wolfe, A. J., Conley M. P., and Berg, H. C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6711-6715.
32. Park, C. and Hazelbauer, G. L. (1986) *J. Bacteriol.* 167, 101-109.
33. Ashwad, D. and Koshland, Jr., D. E. (1975) *J. Mol. Biol.* 97, 225-235.
34. Koman, A., Harayama, S., and Hazelbauer, G. L. (1979) *J. Bacteriol.* 138, 739-747.
35. Stock, J. B., Clarke, S., and Koshland, Jr., D. E. (1984) *Methods. enzymol.* 106, 310-312.
36. Slonczewski, J. L., Macnab, R. M., Alger, J. R., and Castle, A. M. (1982) *J. Bacteriol.* 152, 384-399.
37. Hazelbauer, G., L. and Engstrom, P. (1981) *J. Bacteriol.* 145, 35-42.
38. Sanders, D. A. and Koshland, Jr., D. E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8425-8429.
39. Hazelbauer, G. L., Park, C., and Nowlin, D. M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1448-1452.
40. Kihara, M. and Macnab, R. M. (1979) *J. Bacteriol.* 140, 297-300.
41. Ingolia, T. D. and Koshland, Jr., D. E. (1979) *J. Bacteriol.* 140, 798-804.
42. Lee, L. and Imae, Y. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 377-382.
43. Wolff, C. and Parkinson, J. S. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 4509-4515.
44. Gardina, P., Conway, C., Kossman, M., and Manson, M. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 1528-1536.
45. Jancarik, J., Scott, W. G., Milligan, D. L., Koshland, Jr., D. E., and Kim, S. H. (1991) *J. Mol. Biol.* 221, 21-24.

付 記

本論文の第3、4章の内容の一部は既に下記の論文として発表済みである。

1. Yamamoto, K., Macnab, R. M., and Imae, Y. (1990) Repellent Response Functions of the Trg and Tap Chemoreceptors of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 383-388.
2. Yamamoto, K. and Imae, Y. (1993) Cloning and Characterization of the *Salmonella typhimurium*-Specific Chemoreceptor Tcp for Taxis to Citrate and from Phenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 217-221.

謝 辞

大学院及び研究生時代を通じて多くの適切な助言及び指導をしていただいた今栄康雄教授に心から感謝いたします。

いろいろな議論と助言をしてくださった川岸郁朗博士に深く感謝いたします。また、有意義で楽しい学生生活を過ごせたことに関して、第4講座の先輩後輩及び分子生物学科の皆様に感謝いたします。尚、本論文を仕上げるにあたりハードとソフトの両面でお世話になった杉山滋博士に心から感謝いたします。

[副論文]

1. Yamamoto, K., Macnab, R. M., and Imae, Y. (1990) Repellent Response Functions of the Trg and Tap Chemoreceptors of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 383-388.
2. Yamamoto, K. and Imae, Y. (1993) Cloning and Characterization of the *Salmonella typhimurium*-Specific Chemoreceptor Tcp for Taxis to citrate and from Phenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 217-221.