



Title	コレラ菌走化性受容体Mlp24p のリガンド認識機構
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101266
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	いいだりりか 飯田莉梨香	学部 学科	理学部化学科	学年	3年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	今田勝巳	所属	理学研究科高分子科学専攻		
研究課題名	コレラ菌走化性受容体 Mlp24p のリガンド認識機構				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

- 研究目的、背景

細菌は化学物質の濃度勾配を感知し、自身にとって好ましい環境に集まり、好ましくない環境からは逃避する走化性と呼ばれる性質を持つ(1)。多くの細菌はべん毛と呼ばれる器官を使って運動し、べん毛モーターの回転方向を調節することにより望ましい環境へ近づく。細菌の走化性には、センサー膜蛋白質である走化性受容体、細胞内情報伝達蛋白質、べん毛モーターが関与する。外界からの様々な刺激は走化性受容体によって受容され、その情報をべん毛モーターに伝達することにより刺激に対して応答を示す。(図1)(2,3) つまり、走化性受容体は走化性メカニズムの最上流に位置している。

走化性受容体のうち最もポピュラーなものは MCP(methyl accepting chemotaxis protein)である。MCP の細菌内領域は類似した長いコイルドコイル構造を持つ一方、細胞外領域の構造は多様であり、それぞれ異なる様式でリガンドを認識する。(図2)(4)

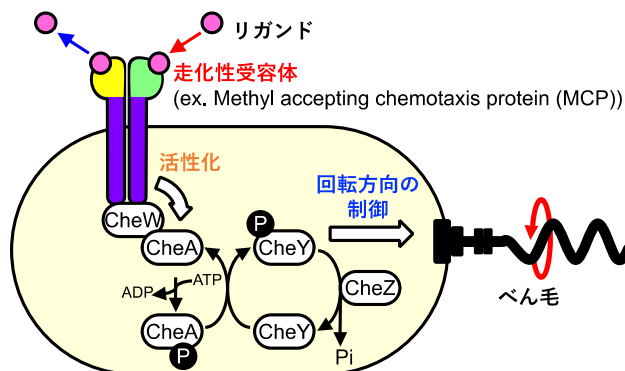


図1: 細菌の走化性メカニズム

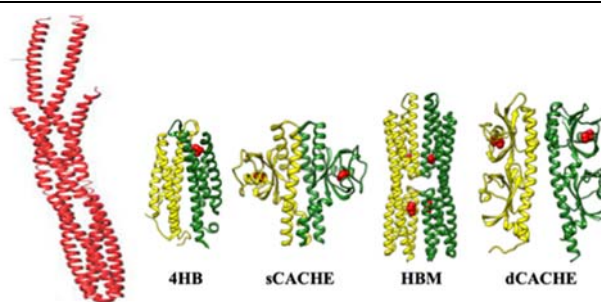


図 2:MCP の細胞質内領域(赤)およびペリプラズム領域(黄と緑)

ビブリオ属菌は通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、単一の極べん毛をもつ。代表的なビブリオ属菌として細菌感染症コレラの病原菌である *Vibrio Cholerae*, 人食いバクテリアとして知られる *Vibrio Vulnificus*, 感染症腸炎ビブリオの病原菌である *Vibrio Parahaemolyticus* などがあげられる。本研究では *V. Cholerae* の走化性受容体を研究対象とした。

V. Cholerae は養分に富んだ環境下でのみ毒素を産生し、養分は走化性受容体によって感知されることから、走化性受容体が深く毒素産生に関わっていると考えられる。遺伝子解析の結果、*V. cholerae* は 44 種類以上の MCP 様蛋白質を持つことがわかり、MCP-like proteins (Mlps) と名付けられた。44 種類を超える Mlp のうち大半のものの機能は未解明であるが、いくつかの Mlp で認識するリガンドやその詳細な構造が明らかになってきた。例えば、本研究で扱った Mlp24 は *V. cholerae* の走化性に関与し、L-アルギニンや L-セリンをはじめ多くのアミノ酸と結合することが先行研究により解明された。Mlp24p 複合体のうち、ligand free、L-アルギニン、L-アスパラギン、グリシン、L-プロリン、L-セリン複合体の構造は既に解析されており、その結果から Mlp24p はアミノ酸結合によってリガンド認識部位の口が閉じるような構造変化をすることがわかった(5)。また、Mlp24p のリガンド結合部位上部にあるループ(UJ loop)はその上部への Ca^{2+} の配位によってコンフォメーションが固定されることもわかった。ITC 測定により Ca^{2+} 非存在下では各リガンドに対する親和性が低下することがわかり、*V. cholerae* の走性も減少することから、Mlp24p のリガンド認識には Ca^{2+} の配位による UJ loop の固定が必要であることも明らかになった。このことから、 Ca^{2+} がいない場合は UJ loop のコンフォメーションを安定に保つことができず、リガンド認識部位の構造を維持できないと考えられる。しかし、最近の研究で Mlp24 が直接結合すると既に知られているアミノ酸に加えて GABA、L-オルニチン、L-シトルリンと直接結合し、かつ L-オルニチンと L-シトルリンに関しては Ca^{2+} 存在下では Mlp24 と結合しなくなるという既知のものと矛盾する結果が得られたことが報告された。そこで、本研究ではこれらリガンドを結合した Mlp24 のペリプラズム領域の構造を X 線構造解析により解明し、カルシウムイオンの Mlp24 のリガンド認識における役割を解明することを目的とした。

- 研究計画, 方法, 経過及び成果

本研究では目的の Mlp24p を大腸菌を用いて発現させ、精製し GABA・オルニチン・シトルリンとそれぞれ共結晶化することで複合体結晶を得て X 線結晶構造解析を行うことにより構造を決定した。

タンパク質結晶構造解析の流れを示す。

1. 目的タンパクの発現・精製・結晶化
2. X 線回折データ測定(大型放射光施設 SPring-8)
3. X 線回折画像データの処理
4. 位相決定・分子モデル構築・精密化

今回は GABA 複合体結晶についてのみ 4.位相決定・分子モデル構築・精密化まで行い、L-オルニチン複合体結晶は 3. X 線回折データの処理、L-シトルリン複合体結晶については結晶化までとなった。

まず、Mlp24p の発現及び精製の流れを示す。

1. Mlp24p を発現するプラスミドを組み込んだ大腸菌を培養し、Mlp24p を大量発現
2. 発現後、培養した菌を回収し破碎
3. 破碎した菌の上清をグルタチオンセファロースカラムに流し目的の Mlp24p を分離
4. 分離した Mlp24p に Precision protease を添加し、一晚透析を行いながらタグを切断
5. タグを切断した Mlp24p をサイズ排除クロマトグラフィーにより分離・精製

1～4 を行った後のそれぞれのステップのサンプルを回収し、SDS PAGE により目的の Mlp24p が発現し分離できたことを確認した(図 3)。

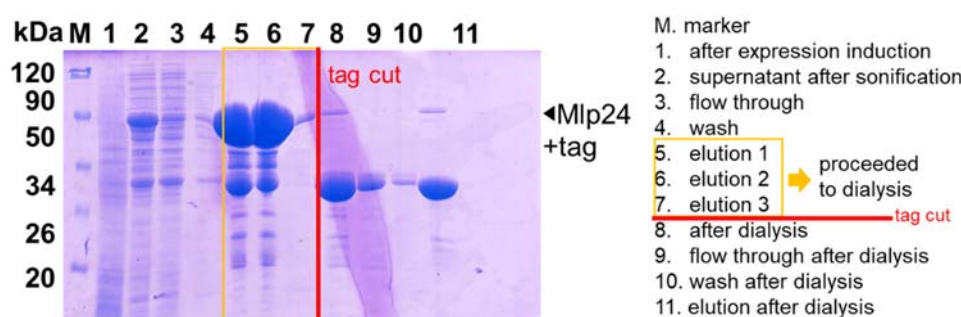


図 3 : Mlp24p 発現・分離後の SDS PAGE

レーン 7 までは Mlp24p 分離のためのタグが Mlp24p に結合している状態、レーン 8 以降はタグが切断され Mlp24p のみが取り出された状態である。レーン 5,6,7 で 52kDa 付近に存在する大きなバンドは 24kDa の Mlp24p に 28kDa のタグが結合したものであり、レーン 8 以降で 28kDa 付近に存在する大きなバンドがタグが切り離された Mlp24p である。

発現・分離後にサイズ排除クロマトグラフィーで精製した結果を図 4 に示す。

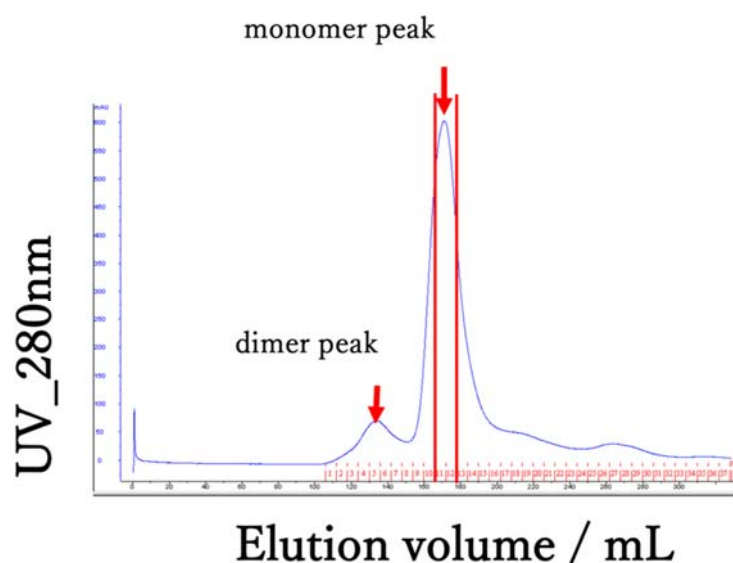


図 4 : サイズ排除クロマトグラフィーの結果

モノマーとダイマーの 2 本のピークが確認できる。2 本目のピークにあたる 8 番から 16 番のフラクションの SDS-PAGE の結果を図 5 に示す。

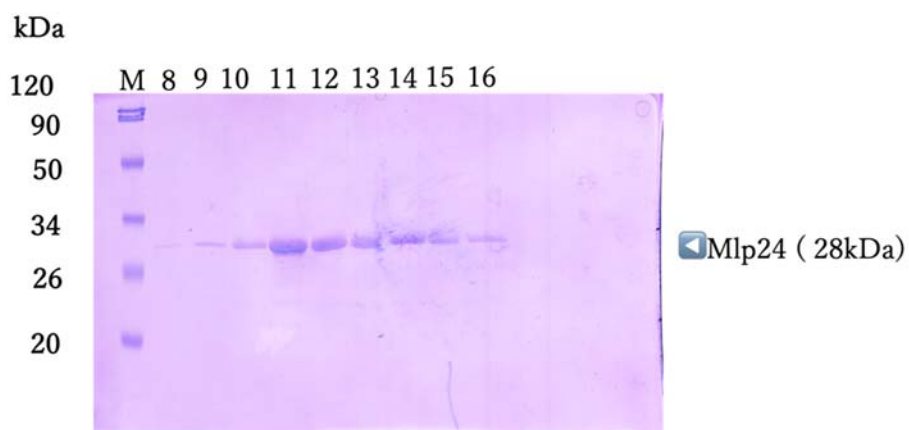


図 5 : フラクション 8-16 の SDS PAGE

Mlp24p の大きさである 24kDa 付近にバンドが確認でき、たしかに Mlp24p が精製できたことが確認できた。

Mlp24p の L-オルニチン、L-シトルリン、GABA それぞれとの複合体結晶は結晶化条件がまだわからないためスクリーニングを行った。手法、濃度、使用したスクリーニングキットなどは表 1 に示す。

表 1 : スクリーニング条件

method	sitting drop vapor diffusion
Protein concentration	15.0 mg/mL, 20.0 mg/mL
Ligand concentration	10 mM
Screening kit	Wizard Classic I , II , III , and IV (Rigaku Reagents, Inc.) Crystal Screen I and II (Hampton Research) Crystal Screen Cryo I and II (Hampton Research)
Drop: protein sol. reservoir sol.	0.5 μ L 0.5 μ L
Temperature	20°C
term	1 week

各複合体で GABA 複合体 384 条件、L-オルニチンと L-シトルリンでは 576 条件のスクリーニングを行い、結晶が得られた条件は L-オルニチンで 16 条件、L-シトルリンで 12 条件、GABA で 9 条件だった。しかし L-シトルリンの結晶のほとんど全てが小さな結晶で X 線回折データ測定に適したものではなく、データ測定ができなかった。L-オルニチン複合体結晶と GABA 複合体結晶のうち今回 X 線回折デー

タを得て解析に進んだ結晶のリザーバー溶液の組成及び結晶の写真を表 2 と図 6 に示す。

表 2 : L-オルニチン複合体および GABA 複合体結晶のリザーバー条件

ligand	buffer	precipitant	additive
10 mM Ornithine	100 mM MMT buffer pH 8.5	25 % (v/v) PEG-1500	
10 mM GABA	100 mM Tris pH 8.5	30 % (v/v) PEG-4000	200 mM MgCl ₂

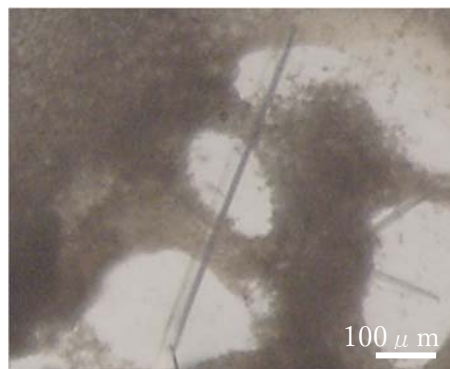


図 6 : X 線結晶回折データを得られた L-オルニチン結晶 (左) と GABA 複合体結晶 (右)

- GABA 複合体結晶

GABA 複合体結晶で得られた回折像を図7に示す。

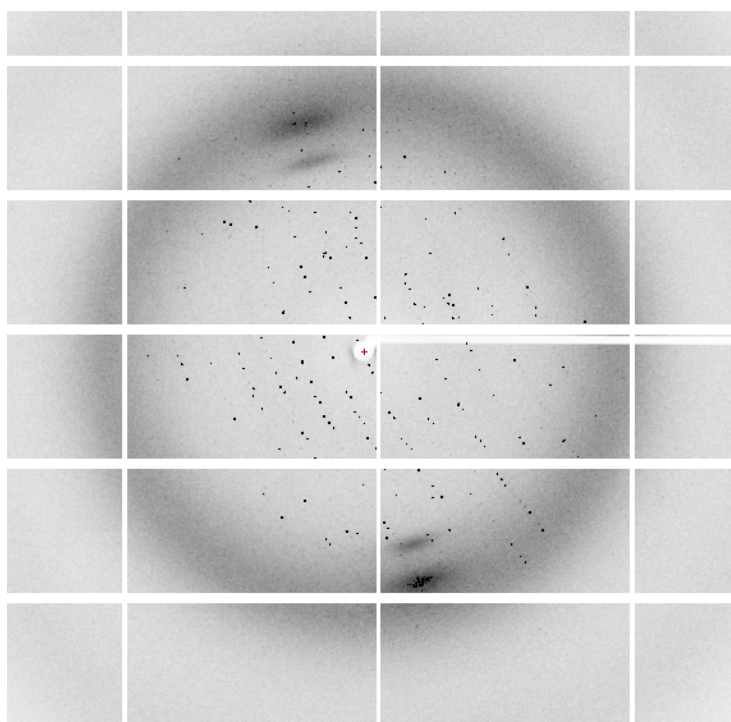


図 7 : Mlp24pGABA 複合体結晶の結晶回折点画像

回折画像データは 360 枚、360°分撮影した。この回折データを処理し、格子定数と空間群、非対称単位中の分子数を決定した。得られた結果を表3に示す。

表 3 : Mlp24pGABA 複合体 X 線回折データ処理の結果

SPring-8 beamline	BL41XU
Resolution limit / Å	57.06 – 2.45
Space group	$P 2_1 2_1 2_1$
Cell dimensions a (Å) b (Å) c (Å) β (°)	36.4 114.1 123.6 90
Content per ASU	2

- Mlp24pGABA 複合体構造

処理したデータから位相決定・モデル構築・精密化を行い決定した Mlp24pGABA 複合体の全体構造を図8に示す。

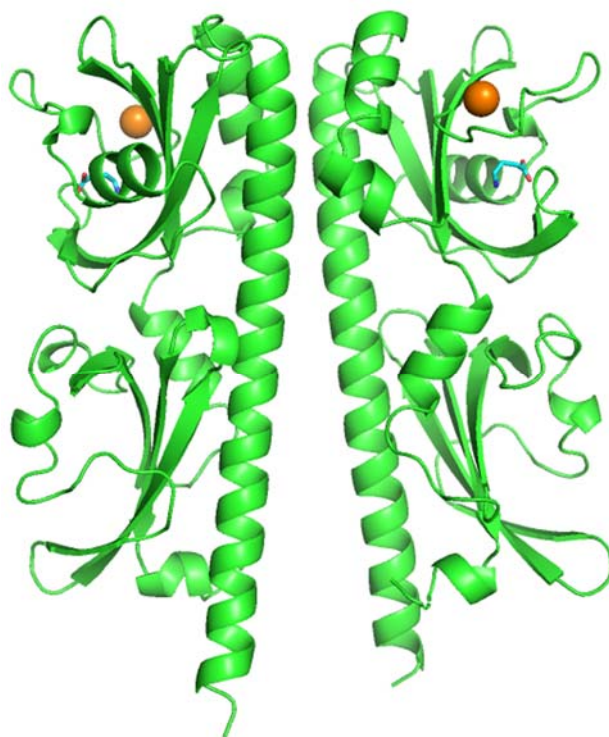


図 8 : Mlp24pGABA 複合体の全体図

オレンジ色はカルシウムイオン、シアンは GABA である。既知の Mlp24p 複合体結晶と同様に CACHE ドメインを 2 つもつ double CACHE 型であり、ダイマーを形成する。カルシウムイオンが結合する点も変わらない。

図9に、カルシウムイオンの結合に関わる残基のみを抽出した図を示す。

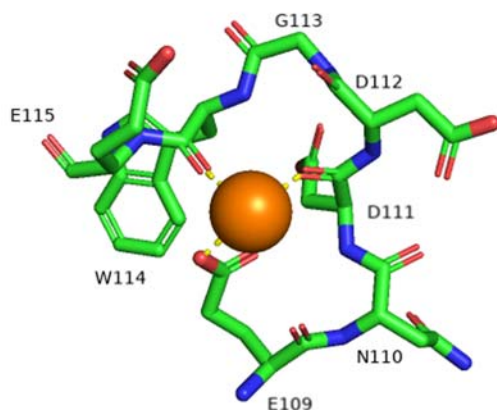


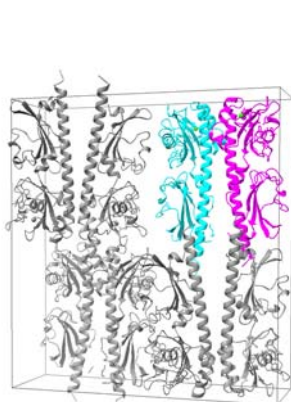
図 9 : Mlp24pGABA 複合体のカルシウムイオン結合部

カルシウムイオンは他の複合体と同様に 109 番グルタミン酸, 111 番アスパラギン酸, 114 番トリプトファンと結合している。

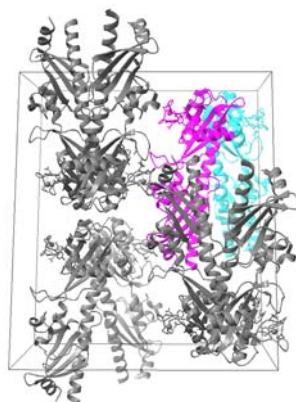
Mlp24pGABA 複合体と他のアミノ酸複合体との格子定数およびパッキングの様式を比較する。

表 4 : 各アミノ酸複合体の空間群と格子定数

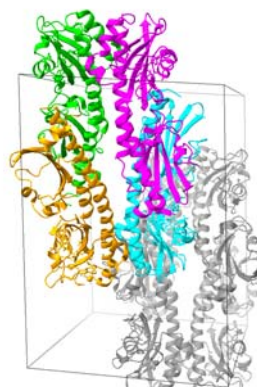
ligands	none	L-arginine	L-asparagine	glycine	L-proline	L-serine	GABA
Space group	<i>C</i> 2	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>I</i> 222	<i>I</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions							
a (Å)	104.1	64.5	91.9	53.4	59.1	52.7	36.4
b (Å)	88.4	102.8	101.4	64.6	111.2	62.3	114.1
c (Å)	88.4	93.4	128.4	136.6	113.3	73.2	123.6
β (°)	64.5	94.5	90.0	90.0	90.0	105.6	90
Content per ASU	2	4	4	1	1	2	2



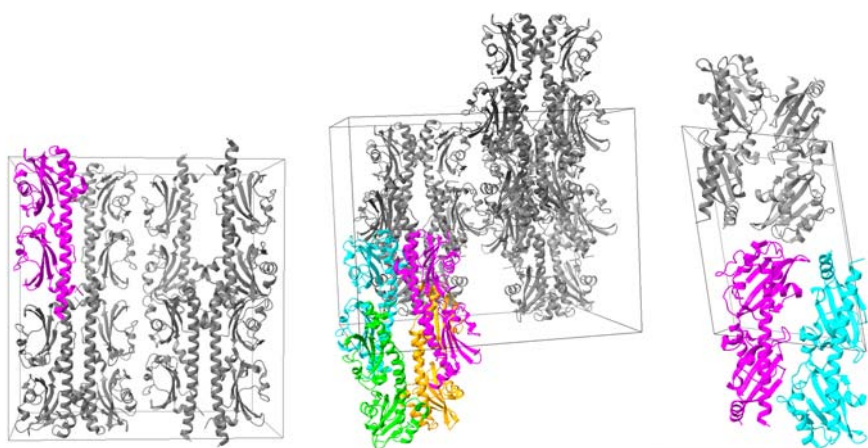
GABA



no ligand



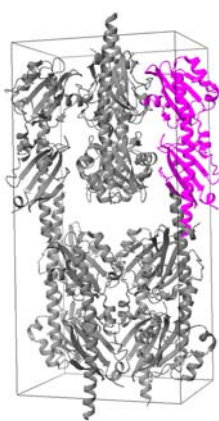
L-アルギニン



L-プロリン

L-アスパラギン

L-セリン



グリシン

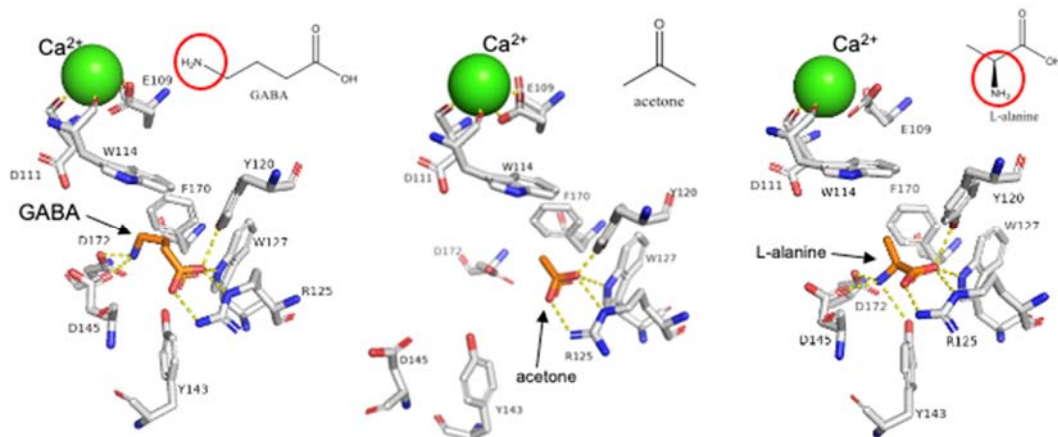
図 8:各アミノ酸複合体単位格子中の分子の詰まり方

マゼンタ,シアン,オレンジ,ライム:非対称単位中の分子

グレー:非対称単位中の分子と対象で関係つく分子

Mlp24pGABA 複合体の空間群は $P2_12_12_1$ であり、非対称単位中の分子数は2であることがわかった。空間群はL-アスパラギン複合体のものと同様であるが、非対称単位中の分子数や格子定数が異なるため単位格子中での分子のパッキングが異なることがわかる。

GABA 複合体と他の既知の複合体のリガンド認識に関わる残基を抽出した図を図9に示す。



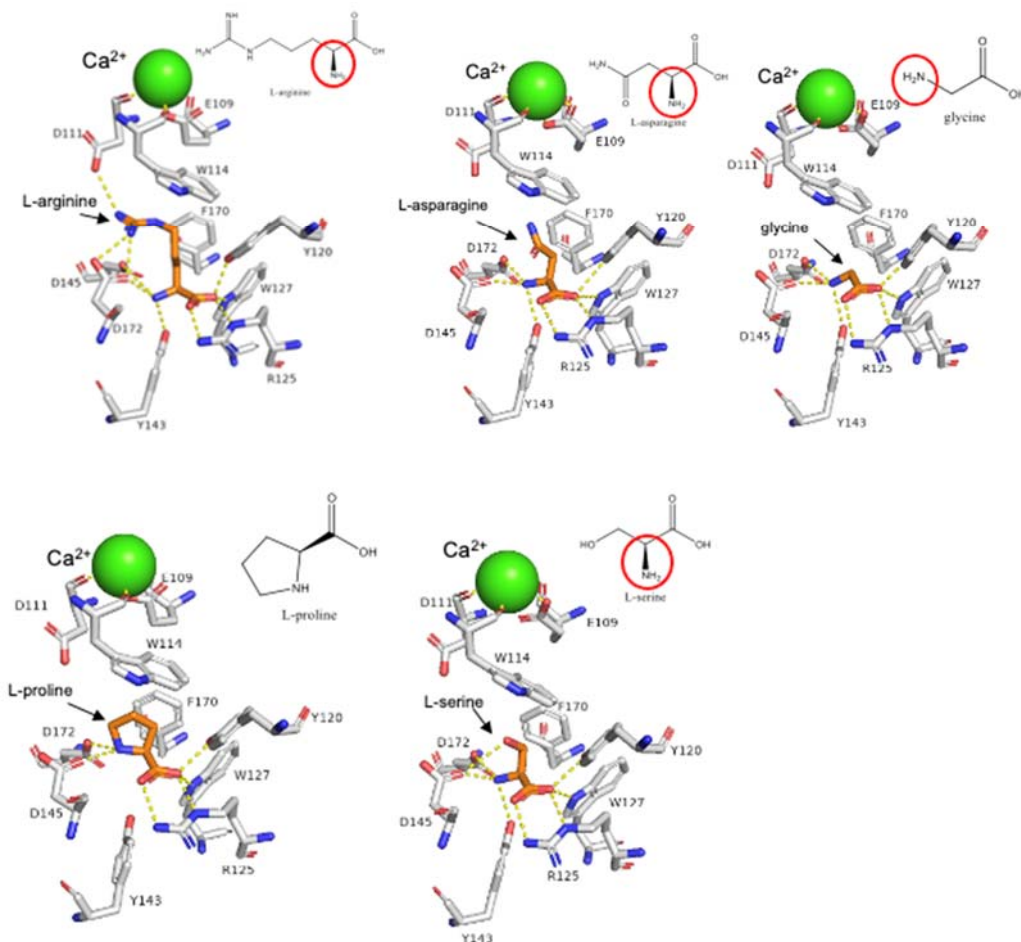
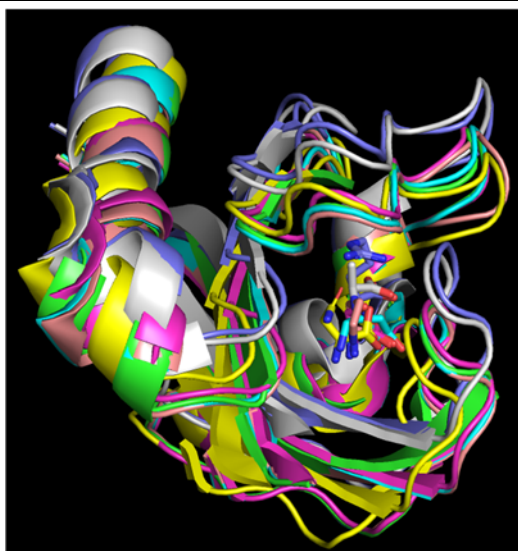


図 9:各アミノ酸複合体のリガンド認識に関わる残基とその結合

各リガンドの NH_2 を構造式中に赤丸で囲って示している。GABA のアミノ基はカルボキシ基から遠く、通常のアミノ酸では側鎖位置にあたるため、アルギニンのグアニジノ基やアスパラギンのアミド基を認識する残基で認識されそうである。しかし構造を見ると、GABA は折り畳まれて通常のアミノ酸のアミノ基を認識する残基である 145 番と 172 番のアスパラギン酸に主に認識されていることがわかった。このことから GABA が強く結合できるのは、アミノ酸主鎖を認識できる残基と相互作用できるように折り畳みが可能な構造をもつ分子だからと考えられる。

GABA 複合体のリガンド結合部を拡大し、それを他のアミノ酸複合体のものと重ねた様子を図 10 に示す。



ライム：GABA，白：no ligand，シアン：グリシン，紫：L-アルギニン，
黄色：L-アスパラギン，薄橙：L-プロリン，マゼンタ：L-セリン

図 10:Mlp24p の各アミノ酸複合体のリガンド結合部重ね合わせ

Mlp24p GABA 複合体でも既知の複合体と同様にリガンド結合部が顎のような形になっていることがわかった。また他のアミノ酸複合体のリガンド結合部と重ね合わせた図から、GABA 複合体のリガンド結合部の構造はグリシン・プロリン・アスパラギンの構造に近く、リガンドが結合することにより本来より閉じた形になっていることがわかった。

- L-オルニチン複合体結晶

L-オルニチン複合体結晶で得られた線回折点画像を図 11 に示す。

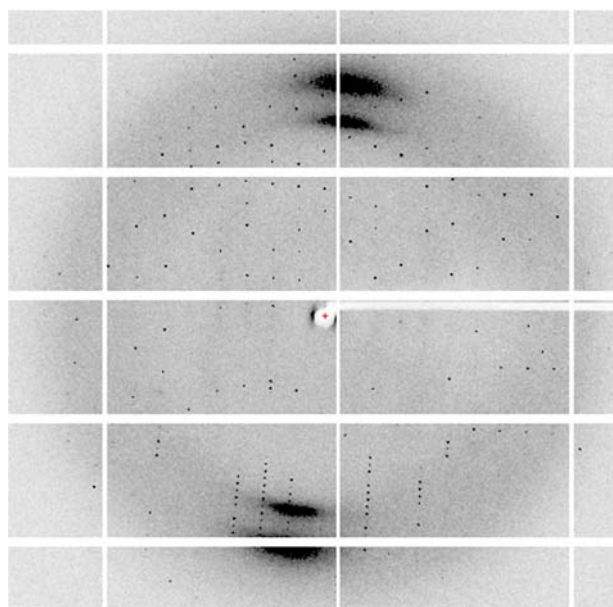


図 11 : Mlp24p オルニチン複合体結晶の結晶回折点画像

回折画像データは 720 枚、720°分撮影した。この回折データを処理し、格子定数と空間群、非対称単位中の分子数を決定した。得られた結果を次に示す。

表 5 : Mlp24p オルニチン複合体 X 線回折データ処理の結果

SPring-8 beamline	BL41XU
Resolution limit /Å	62.09 – 2.20
Cell dimensions a, b, c (Å) α, β, γ (°)	33.80 111.18 124.18 90.00 90.00 90.00
Space group	$P2_12_12_1$
Content per ASU	2

・ 今後の展望

L-オルニチン複合体結晶は現在得られているデータの解析をさらに進め、構造を決定することで GABA 複合体結晶との比較を行いその違いを考察していきたい。L-シトルリン複合体結晶は構造決定に必要な X 線回折データがまだ得られていないため、回折データを得るのにより適した結晶を得るために結晶化条件の最適化を進めていく。また、L-オルニチン複合体および GABA 複合体に関してもより分解能の高いデータを得るために精製・結晶化の方法を見直していく。今回の結果から他のアミノ酸よりも長い構造をもつ GABA が結合できるのは折り畳み可能な構造であることがわかった。このことから、L-オルニチンと L-シトルリンがカルシウムイオン存在下では Mlp24p と結合しないのはカルシウムイオンが結合した状態では上手く結合部に収まることができないからだと予想される。

参考文献

1. Parkinson JS, Hazelbauer GL, Falke JJ. 2015. Signaling and sensory adaptation in Escherichia coli chemoreceptors: 2015 update. Trends Microbiol 23:257-66.
2. Sourjik V. 2004. Receptor clustering and signal processing in E. coli chemotaxis. Trends in Microbiol 12(12):569-76.
3. Cluzel P, Surette M, Leibler S. 2000. An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. Science 287(5458):1652-5.
4. Marvin JS, Corcoran EE, Hattangadi NA, Zhang JV, Gere SA, Hellinga HW. 1997. The rational design of allosteric interactions in a monomeric protein and its applications to the construction of biosensors. Proc Natl Acad Sci U S A 94(9):4366-71.

5. Yohei Takahashi, So-ichiro Nishiyama, Ikuro Kawagishi, Katsumi Imada. 2020. Structural basis of the binding affinity of chemoreceptors Mlp24p and Mlp37p for various amino acids. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 523, Issue 1, 2020, Pages 233-238, ISSN 0006-291X, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.055>.