

Title	Ligand recognition mechanism of dCACHE type chemoreceptors of <i>Vibrio cholerae</i>
Author(s)	高橋, 洋平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72673">https://doi.org/10.18910/72673</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 ( 高橋 洋平 )

論文題名

Ligand recognition mechanism of dCACHE type chemoreceptors of *Vibrio cholerae*  
(コレラ菌dCACHE型走化性受容体のリガンド認識機構)

論文内容の要旨 (9ポイント、明朝体、1200字程度)

[背景、目的]

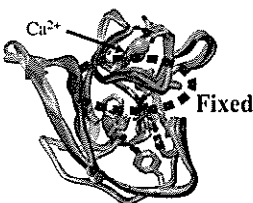
多くの細菌は周囲の化学物質の濃度勾配を感知し、望ましい環境へ近づく走化性という性質を持つ。走化性において、細菌外の情報感知及び細菌内への情報伝達は、細胞膜を貫く走化性受容体が担う。私は*Vibrio*属コレラ菌(*V. cholerae*)の走化性受容体に注目した。*V. cholerae*は養分に富んだ環境下でのみ毒素を産生するが、養分は走化性受容体により感知されるため、*V. cholerae*の走化性受容体研究は薬理学的にも重要である。遺伝子解析の結果、*V. cholerae*は44種類以上の走化性受容体を持つことがわかり、MCP-like proteins (MLPs)と名付けられた。大半のMLPsの機能は未解明であるが、Mlp24は*V. cholerae*の走化性の他に毒素産生にも関わり、Mlp37は走化性、バイオフィーム形成に関与する。Mlp24と37はアミノ酸配列の相同性が高く、共にアミノ酸を広く認識するが、その親和性は互いに異なる。Mlp24は各アミノ酸に対する親和性にばらつきがある一方、Mlp37は様々なアミノ酸に強い親和性をもち、さらにタウリンも認識する。私はこの差が生じる原因を解明するため、Mlp24, 37の細胞外領域(Mlp24p, Mlp37p)の結晶構造解析を行い、比較した。

私はさらにMlp8にも注目した。Mlp8はMlp24, や37と類似した構造をもつと考えられるが、それらとは異なりアミノ酸ではなく、ムチンやGalactose-6-sulfateに対する*V. cholerae*の走化性に関わる。またMlp8はAcfCとよばれる蛋白質とオベロンを形成することから、AcfCと協同でリガンドを認識すると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。私はAcfCの結晶構造解析に加えて、Mlp8p (Mlp8の細胞外領域)、AcfC、リガンドを用いたpull-downアッセイ、ITCを行い、Mlp8のリガンド認識機構解明を目指した。

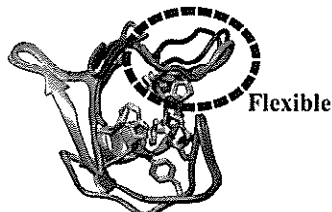
[結果]

Mlp24pはリガンド非結合状態と5種類のリガンド結合状態の構造、Mlp37pは3種類のリガンド結合状態の構造を2 Å程度の分解能で明らかにすることで、Mlp24p, 37pの詳細なりガンド認識機構を解明した。さらに構造比較により、リガンド結合部位周囲のループコンフォメーションの違いが、Mlp37とMlp24でリガンドに対する親和性が異なる原因となっていることを明らかにした。

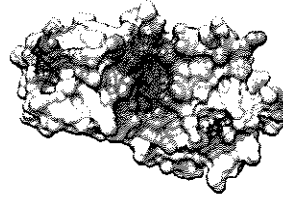
AcfCの構造情報から、AcfCは、D-malate結合によりその周囲の電荷が電気的中性に近づくことがわかった。またAcfCはD-malate結合状態でのみMlp8に結合することがpull-downアッセイ、ITCにより明らかになったことから、Mlp8とAcfCの結合にはAcfCの表面電荷が関わりと考えられる。またGalactose-6-sulfateはAcfCとは結合せず、その有無がMlp8とAcfCの結合に影響しないことから、D-malateとは異なる様式でMlp8に認識されると考えられる。



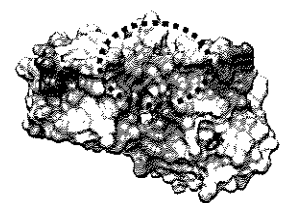
Mlp24p



Mlp37p



ligand-free AcfC



AcfC-D-malate complex

Mlp24pとMlp37pのリガンド認識部位。

Mlp24pはCa<sup>2+</sup>の配位により周囲のループコンフォメーション(赤破線)が固定される一方、Mlp37pはリガンドに合わせてコンフォメーションを変化(紺破線)させ、リガンドと相互作用する。Mlp24と37pで各リガンドに対する親和性が異なるのは、この違いが原因であると考えられる。

AcfCの表面電荷。

青が正電荷、赤が負電荷を示す。

AcfCはD-malate結合により、その周囲(赤破線)の電荷が強い正から中性に近づく。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 高 橋 洋 平 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	今田 勝巳
	副 査	教授	中川 敦史
	副 査	教授	栗栖 源嗣

## 論文審査の結果の要旨

細菌は生育に適した環境を求めて移動したり、周囲の環境を感知して性質を変えたりする。このとき外環境を感知するセンサーの役割を果たすのが走化性受容体である。コレラの原因菌である *Vibrio cholerae* は 40 種類以上の走化性受容体を持つが大半の機能は不明である。

本論文は、コレラ菌の走化性受容体のうち、リガンドが判明した Mlp24, Mlp37, Mlp8 の 3 種類の受容体について構造・機能解析を行い、リガンド認識の構造基盤を解明した。これら 3 種はいずれも dCACHE 型に属する相同な受容体であるが、リガンドおよび親和性は異なる。また、Mlp24 はコレラ毒素産生に関わり、Mlp37 はバイオフィーム形成に関わることから、リガンド認識機構の解明が待望されていた。

申請者は Mlp37 ペリプラズムドメインと L-アルギニン、L-セリン、タウリンとの複合体構造の解析から、基質側鎖認識に関わるループのコンフォメーションがリガンドに合わせて変化することを発見し、Mlp3 が異なる基質を同程度の親和性で認識する構造基盤を明らかにした。また、リガンド認識ポケットの側鎖側に隙間があることから蛍光リガンドをデザインし、生きた細菌にリガンドが結合する様子を蛍光顕微鏡で捉えることに成功した。

次に申請者は Mlp24 ペリプラズムドメインの ligand free 構造、L-アルギニン、L-アスパラギン、グリシン、L-プロリン、L-セリンとの複合体構造の解析から、基質側鎖認識ループがカルシウムの結合により特異なターン構造をもつことを発見し、Mlp37 との構造比較から両者のリガンド親和性の違いを解き明かした。また、カルシウムが Mlp24 のリガンド結合親和性を変化させることで細菌の走化性応答が変化することを発見し、細菌の行動がカルシウムにより変化することを初めて実証した。

さらに申請者は Mlp8 と協同でリガンド認識を行う AcfC との相互作用解析、AcfC の構造を明らかにし、AcfC の分子表面電荷がリガンド結合により変化することで Mlp8 と結合することを発見した。

このように、本論文はコレラ菌走化性受容体の基質認識の多様性の構造基盤の解明のみならず、リガンド結合の *in vivo* 観察を可能にし、カルシウムによる親和性調節機構の発見といった、大きな波及効果をもたらす成果も上げている。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。