



Title	コレラ菌走化性受容体Mlp2複合体の結晶構造解析
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95164
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

令和5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	2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 Mlp2 複合体の結晶構造解析				
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おり、最もポピュラーなものは MCP 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)

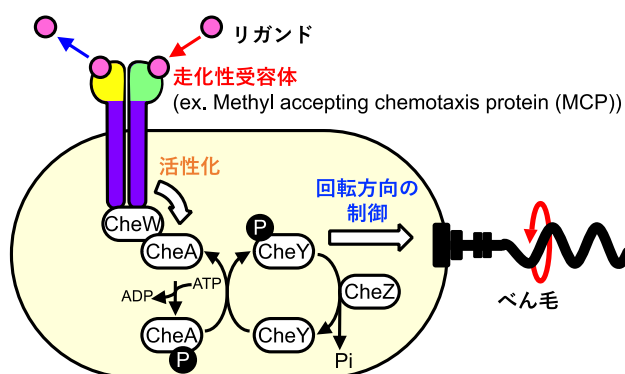


図1：細菌の走化性メカニズム

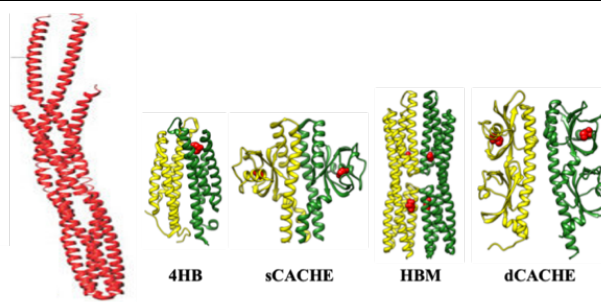


図 2：MCP の細胞質内領域（赤）およびペリプラズム領域（黄と緑）

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。本研究では当初 *V. Cholerae* の走化性受容体 Mlp2 複合体を研究対象とする予定であったが発現に問題があったため、*V. Parahaemolyticus* において Mlp2 に相当する走化性受容体 VP0183 に対象を変更した。

VP0183 は *V. parahaemolyticus* が持つ約 30 種類の MCP 様タンパク質の一つであり、ピルビン酸、乳酸、オキサロ酢酸と直接結合する。(5) *V. Cholerae* の Mlp2 と 74.8% の相同性を持ち、Mlp2 がセリン走性にも関わることから、VP0183 もセリン走性に何らかの形で関わりと予想される。VP0183 はピルビン酸複合体構造が既知であるものの、その機能や構造は未だ解明されていない部分が多い。そこで本研究では VP0183 複合体の構造解析を行い、そのリガンド認識機構を解明することでビブリオ属菌の Mlp2 様走化性受容体のリガンド認識機構を解明したいと考えた。

- 研究計画、方法、経過及び成果

VP0183 と直接結合するピルビン酸、乳酸、オキサロ酢酸のうちピルビン酸複合体の構造はすでに解明されている。(6) そのため、残りの乳酸、オキサロ酢酸のうちすでに結晶回折点画像データが得られている乳酸複合体の構造解析をまず進め、その後ピルビン酸複合体のデータが既知のものよりも高い分解能で得られたためピルビン酸複合体の構造解析を行った。

VP0183 乳酸複合体およびピルビン酸複合体の X 線結晶構造解析の流れを示す。

1. VP0183 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

このうち、VP0183 の発現、精製は長崎大学の寺島准教授、結晶化は金城学院大学の佐久間助教、大型放射光施設 SPring-8 での X 線回折データ測定は今田研究室の方に行っていただき、私はデータ処理から行った。VP0183 の結晶化条件と SPring-8 で得られた X 線回折画像をそれぞれ表 1 および図 1 に示す。なお、今回 VP0183 と結合させた乳酸は L-乳酸である。

Protein	VP0183 lactate complex	VP0183 pyruvate complex
Protein solution	28 mg/ml	28 mg/ml
Reservoir solution	25% (w/v) PEG-4000 0.1 M Tris-HCl (pH8.5) 100 mM L-lactic acid	24% (w/v) PEG-4000 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)
temperature	20 °C	20 °C
term	1 week	1 week

表 1 : VP0183 の結晶化条件

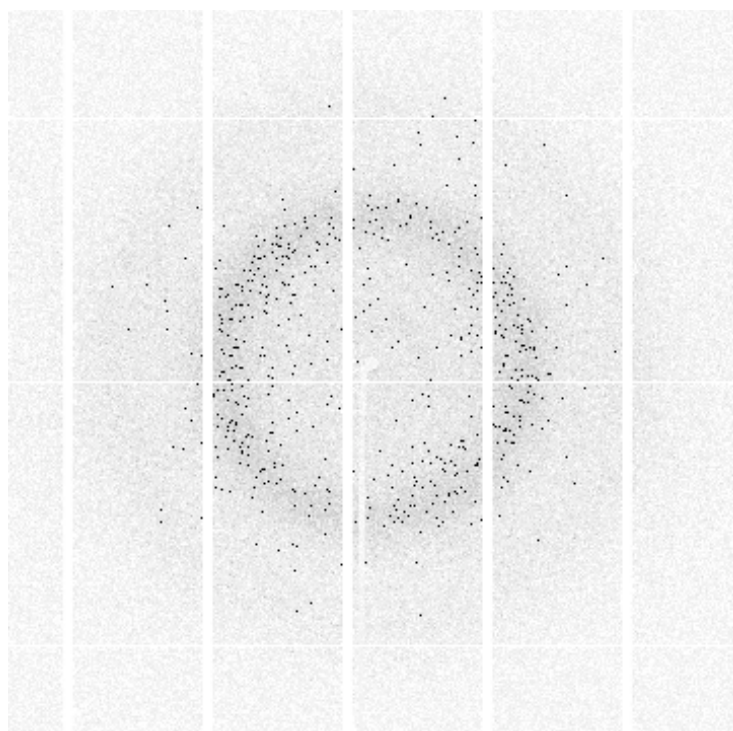


図 3 : SPring-8 BL41XU で得られた X 線結晶回折画像

この X 線回折画像データを MOSFLM で処理して回折強度データを得たあと、Phenix および Coot を用いてモデル構築と精密化を行った。その結果を表 2 に示す。

表 2 : X-ray data collection and refinement statistics

Protein	VP0183 lactate complex	VP0183 pyruvate complex
Spring-8 Beamline	BL41XU	BL41XU
Resolution limit / Å	57.89-8.97 (1.79-1.76)	39.57- 6.79(1.26-1.24)
Completeness / %	99.1 (100.0)	90.7 (99.6)
I/ σ (I)	8.9 (3.2)	8.8 (2.8)
Multiplicity	6.6 (6.6)	5.6 (5.7)
R/R _{free}	0.1627/0.1961	0.1831/0.2048
Cell dimensions a, b, c (Å) α , β , γ (°)	a=62.71 b=106.51 c=115.79	a=111.92 b=111.92 c=62.77
Space group	I222	I422
Number of used reflections	38,822	313,088
The number of molecules of the assymmetric unit	2	1
R.M.S deviations Bond length (Å) Bond angle (°)	0.0073 0.94	0.005 0.916

- 乳酸複合体構造

本研究では VP0183 の L-乳酸複合体構造を 1.76Å の分解能で明らかにした。VP0183 の乳酸複合体は結晶中でホモダイマーを形成し、各分子が 1 つの CACHE ドメインを持つ sCACHE 型の走化性受容体であった (図 4)。

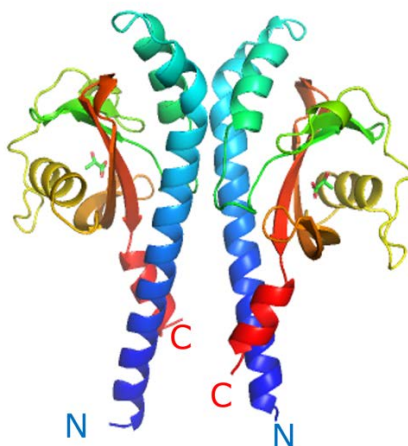


図 4 : VP0183L-乳酸複合体構造

- ピルビン酸複合体構造

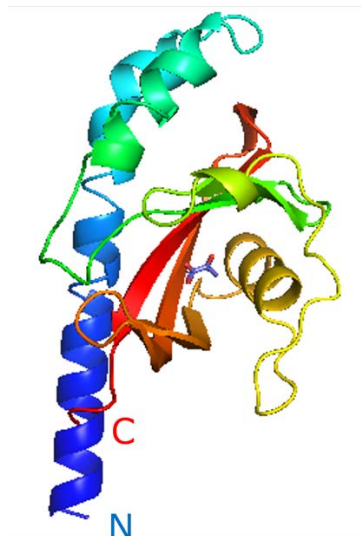


図 5 : VP0183 ピルビン酸複合体構造

本研究では VP0183 のピルビン酸複合体構造を 1.24 Å の分解能で得られた。既に PDB に登録されているピルビン酸複合体(PDB ID: 4EX0)の分解能は 1.90 Å であるため、既知のものより高い分解能での解析に成功した。

- L-乳酸複合体とピルビン酸複合体の比較

乳酸はピルビン酸と非常によく形が似ている（図6）。しかし、乳酸，ピルビン酸それぞれの2番炭素が乳酸では立体的な sp³ 軌道，ピルビン酸では平面的な sp² 軌道を持つため結合しているリガンドの電子密度図を確認することで乳酸かピルビン酸かを判別することができる。

今回 1.76 Å という高分解能で解析したリガンドの電子密度（図7）と、1.24 Å で解析したリガンドの電子密度（図8）を比較すると、図7のリガンドの電子密度は立体的であり、対して図8のものは平面的であることから、今回 1.76 Å の分解能で解析したタンパク質は確かに乳酸複合体であり、1.24 Å の分解能で解析したタンパク質はピルビン酸複合体であると判断できる。

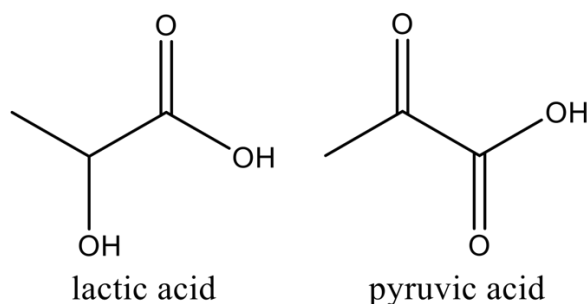


図 5 : 乳酸とピルビン酸の構造式

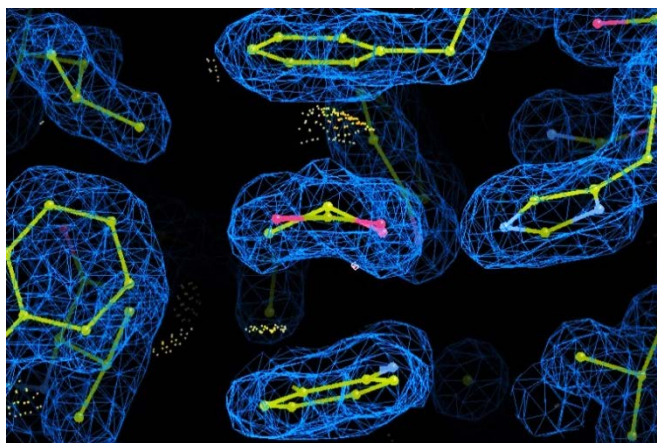


図 6：乳酸複合体のリガンド結合部の電子密度図

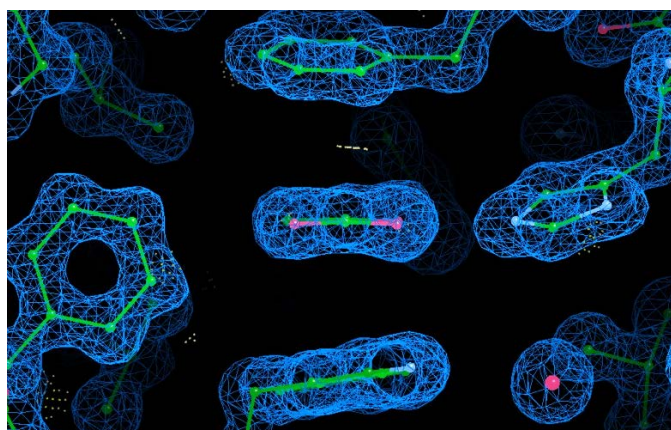


図 7：ピルビン酸複合体のリガンド結合部の電子密度図

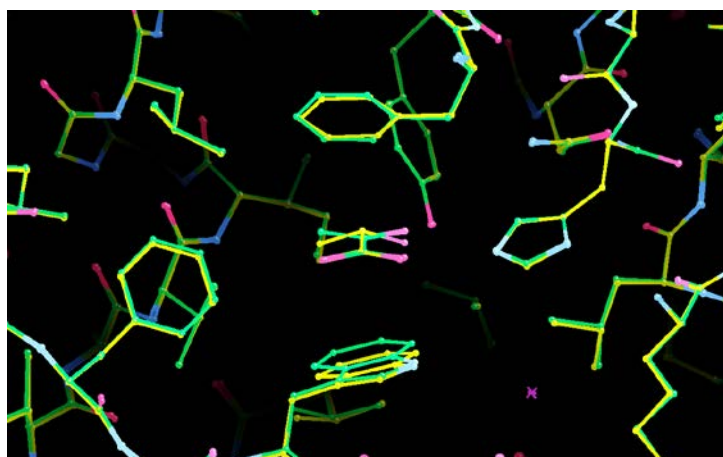


図 9：乳酸複合体+ピルビン酸複合体

色は図 7, 8 と同じ

次に、図 10 に L-乳酸複合体とピルビン酸複合体のリガンド認識に関わる残基を全体構造の二次構造を基準に重ね合わせて比較した。

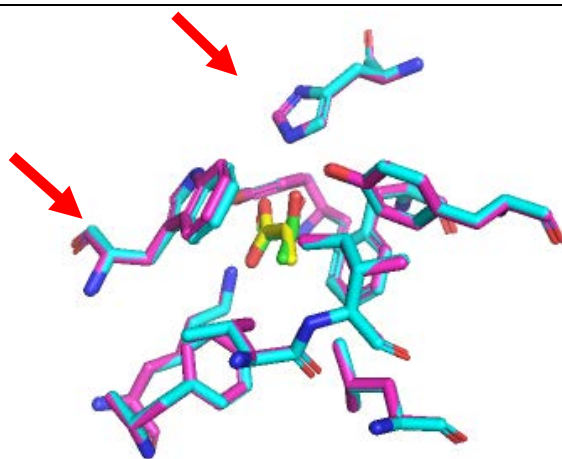


図 10：乳酸複合体とピルビン酸複合体のリガンド認識に関わる残基の重ね合わせ
 乳酸複合体：マゼンタ，ピルビン酸複合体：シアン，乳酸：黄緑，ピルビン酸：黄，
 酸素：赤，窒素：青

その結果、図 10 中に赤矢印で示している 2 つの残基が乳酸複合体とピルビン酸複合体でわずかにずれていた。これは乳酸とピルビン酸の 2 番炭素の軌道が異なることと、その影響で乳酸の 2 番炭素に結合している酸素原子の向きがわずかに変わっていることが原因だと考えられる。しかしこれらのずれはさほど大きなものではないため、VP0183 の乳酸認識機構とピルビン酸認識機構に大きな差異はないと考えられる。

また、乳酸複合体とピルビン酸複合体でリガンドとの水素結合に関わる残基はいずれも 96 番トリプトファン、100 番チロシン、109 番ヒスチジン、161 番リシンの 4 残基で変わらなかった(図 11, 12)。

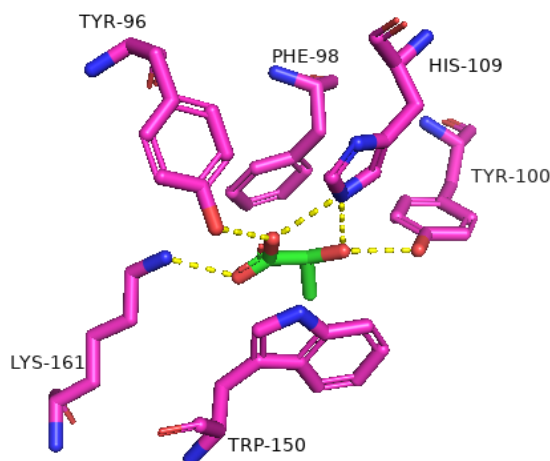


図 11：L-乳酸複合体におけるリガンドと残基の水素結合
 色は図 10 と同じ

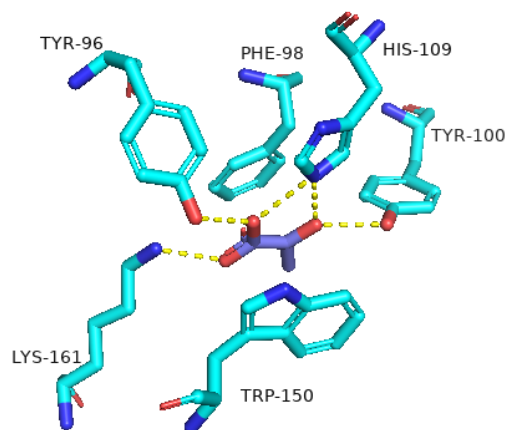


図 12：ピルビン酸複合体におけるリガンドと残基の水素結合
色は図 10 と同じ

さらに、L-乳酸複合体のリガンド結合部の電子密度からどのように VP0183 が L-乳酸と結合しているのかを明らかにした。

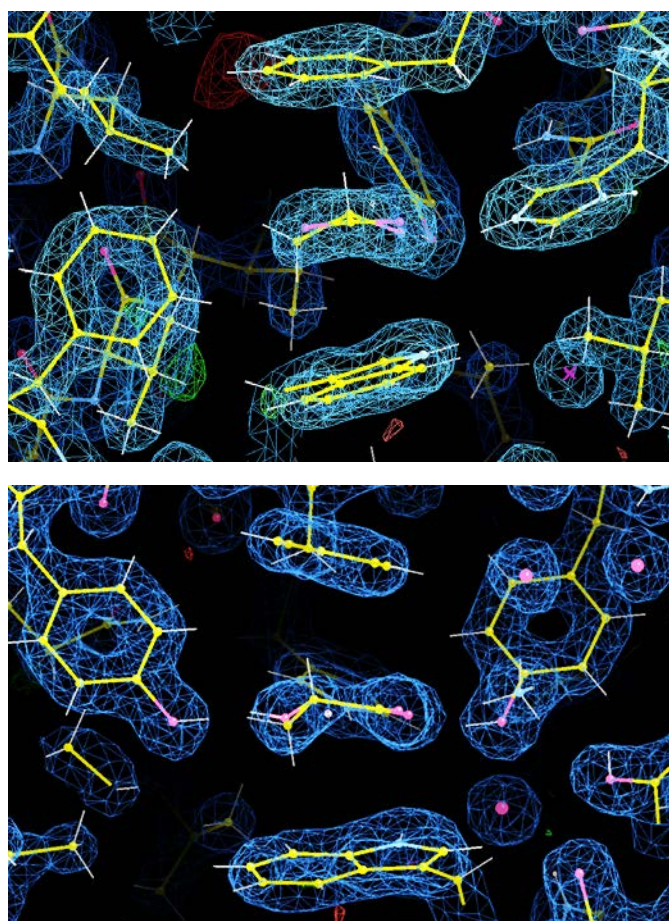


図 13：乳酸複合体のリガンドからのびる水素原子

図 13 の電子密度および分子モデルから、L-乳酸の 2 番炭素に結合している水素が垂直にフェニルアラニンに向かっていることがわかる。この水素原子はより電気陰性度の高い炭素原子と結合してい

ることによりわずかに正の電荷を持っており、それによってこの水素原子が 98 番フェニルアラニンの π 電子と CH- π 結合し、この結合が図 11 で示した水素結合に加えて存在することで VP0183L-乳酸複合体は非常に安定した構造になっていると考えられる。

対して、ピルビン酸複合体にはピルビン酸が平面的であるためリガンドとアミノ酸残基の間に CH- π 結合は存在せず、また図 8 で示した電子密度図を見ると 98 番フェニルアラニン及び 150 番トリプトファンがリガンドを挟んでいるためリガンドと π - π 結合を形成しているように見えるが、その距離が大きいので π - π 結合が存在するのは難しいと考えられる。しかし、表 1 で示すようにピルビン酸はタンパク質結晶化の際にリザーバー溶液にピルビン酸を添加せずとも VP0183 と結合し複合体を形成していることから、ピルビン酸の VP0183 に対する親和性が非常に高いことが示唆される。一方で L-乳酸が CH- π 結合を作りより安定した構造を取ることができるためピルビン酸の高い親和性にも関わらず複合体を作ることが可能になっていると推測する。

- 他の sCASH 型の化学受容体との比較

VP0183 が sCASH 型の化学受容体であることから、同じ sCASH 型で似た構造をもち、カルボン酸と直接結合する受容体タンパク質を Dali サーバーで検索、類似度の高いものと構造及びリガンド認識に関わる残基の塩基配列を比較した。

比較対象としたタンパク質は *Pseudomonas syringae* の PscD(PDB ID: 5G4Z) および *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C の Adeh_3718(PDB ID: 4K08)である。

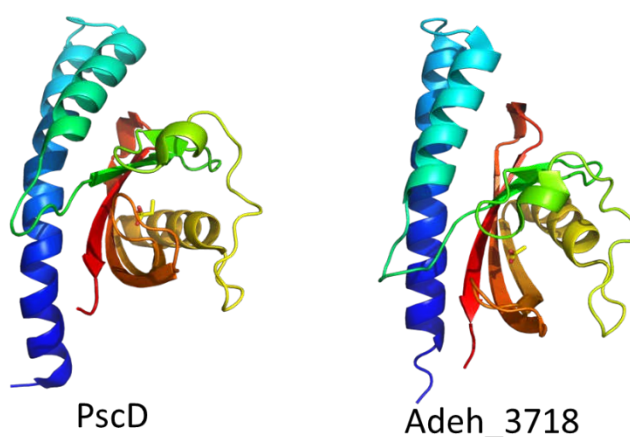


図 14 : PscD と Adeh_3718 の全体構造

VP0183	96	GYF F AYDSQGINTL H A...AVIAGLIDASQ-KGDGFLYFS W HKPTINAQAP K L	132
PscD	89	DYF W INDLRPVMIM H P...AV F NEMVALVKSKGAGMVN Y R W PKPGASEPV K K T	157
Adeh_3718	93	EYF W VNDLEPRMVM H P...L L E F Q E FVRTVVRARGSGFVD Y L W PKPGSTVPV F K I	161

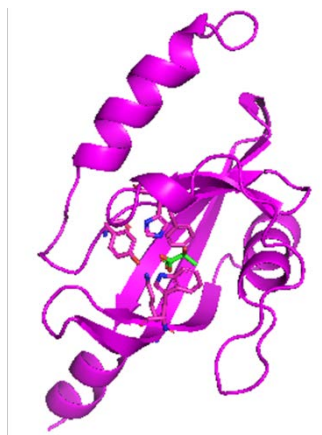
表 3 : VP0183 と PscD, Adeh_3718 のリガンド認識に関わる残基 (赤字)

図 14 と表 3 の通り、VP0183 と PscD, Adeh_3718 において全体構造は細かく異なるもののリガンド認識に関わる残基は VP0183 でもほとんど保存されており、VP0183 がカルボン酸の 1 種である L-乳酸やピルビン酸と直接結合するという結果と矛盾はない。

- アミノ酸と直接結合する受容体タンパク質との比較

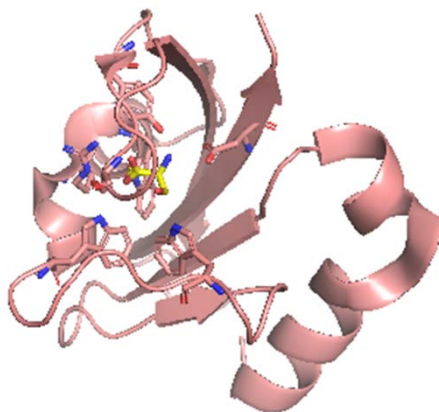
さらに、VP0183 と高い相同性をもつ *Vibrio Cholerae* の走化性受容体 Mlp2 がセリン走性に関わると考えられていることから VP0183 もセリン走性に関わると仮定し、その構造をセリンと直接結合することがわかっている同じ *Vibrio Cholerae* の Mlp37p と比較した。

まず VP0183 の L-乳酸複合体と Mlp37p の L-セリン複合体のリガンド結合部の構造を図 15 と図 16 に示す。



VP0183 L-lactate complex

図 15 : VP0183 L-乳酸複合体のリガンド結合部

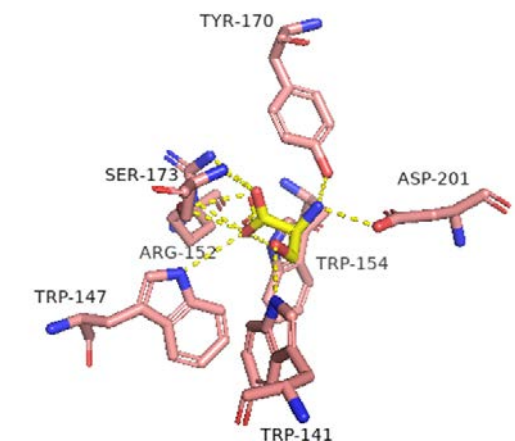


Mlp37p L-Serine complex

図 16 : Mlp37p L-セリン複合体のリガンド結合部

その結果、VP0183 と Mlp37p のリガンド結合部は大きく異なることがわかった。

Mlp37p の L-セリン複合体のリガンド結合部をさらに拡大し、リガンド認識に関わる残基のみを図 17 に示す。



Mlp37p L-Serine complex

図 17 : Mlp37p L-セリン複合体のリガンド認識に関わる残基

Mlp37p L-セリン複合体のリガンド認識に関わる残基と比較して図 11 及び図 12 に示している VP0183 の L-乳酸複合体及びピルビン酸複合体のリガンド認識に関わる残基はカルボン酸認識に関わる残基は保存されているものの、アミノ基の認識に関わる負に荷電した残基が見られないことがわかる。このことから、VP0183 はセリンのようなアミノ酸と直接結合することはできず、セリン走性に関わる場合は何らかの媒介タンパク質と協働してセリン認識をされると考えられる。

・ 今後の展望

本研究では未知であった VP0183 の乳酸複合体構造を新たに解き、既知のピルビン酸の構造と比較することで、乳酸およびピルビン酸の認識機構を明らかにすることができた。また、同じくカルボン酸と直接結合するタンパク質との構造の比較と、アミノ酸と直接結合するタンパク質との構造の比較から、VP0183 は予測通りカルボン酸とは直接結合できるがアミノ酸とは直接結合できず、アミノ酸認識に関わるには媒介タンパク質が必要であることが示唆された。今後は VP0183 のリガンド認識に関わる残基のいくつかをアラニンに変異させるとカルボン酸との結合の有無やアミノ酸走性に変化が見られるという結果も報告されていることから、そうした変異体の構造などを明らかにすることでより詳しいカルボン酸の認識機構とアミノ酸認識機構を明らかにしていきたいと考えている。また、ピルビン酸の親和性の高さについても検討していきたい。

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. Yao K. 2022. Identification of pyruvate taxis of *Vibrio Cholerae* and its receptor. 法政大学大学院理工学・工学研究科紀要. Vol.63
6. Goers Sweeney E, Henderson JN, Goers J, Wreden C, Hicks KG, Foster JK, Parthasarathy R, Remington SJ, Guillemin K. 2012. Structure and proposed mechanism for the pH-sensing *Helicobacter pylori* chemoreceptor TlpB. *Structure*. 20(7):1177-88.