

令和元年6月5日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07681

研究課題名(和文) 酸応答性センサーの活性化機構の解析

研究課題名(英文) Activation mechanism of an acid-responding sensor

研究代表者

江口 陽子 (Eguchi, Yoko)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：30757422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大腸菌の酸性pHセンサーEvgSの活性化機構を検討した。EvgSはpH 4.5から6の弱酸性下で活性化し、菌の酸耐性化に関わる多くの遺伝子の発現を誘導する。培地(細胞外)をpH5.7にしても、培地への有機酸の添加や嫌気状態での培養によってEvgS活性が阻害されることから、細胞内外のpH差がEvgS活性化に必要であると仮定した。ところが、pH差が存在しても少量の有機酸の添加によってEvgSは不活化した。さらに、嫌気状態での不活化はユビキノンがEvgSのPASドメイン内システイン残基間S-S結合を切断するためだと考えられ、ユビキノンを介したEvgSの新規活性化メカニズムを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では大腸菌の酸性pHセンサーEvgSの活性化機構を検討した。病原性大腸菌は優れた酸耐性能を有しており、そのため少数の菌数でも食中毒などを引き起こすものと考えられている。EvgSは酸耐性化に関わる遺伝子群の発現制御を行い、その活性化機構を解明することは食中毒予防に貢献する。本研究ではEvgSが酸性pH以外に酸化還元状態にも応答することを見出した。さらに、酢酸や安息香酸などの有機酸によってEvgSが不活化するのは、単に細胞内外でのpH勾配の喪失では説明できないことが判明した。有機酸によるEvgSの不活化機構をさらに解析することで、細菌に対する有機酸の影響のより深い理解が期待される。

研究成果の概要(英文)： EvgS is an acid pH-responding sensor in Escherichia coli. When this sensor is activated by mild acidic pH (4.5 - 6), expression of various acid resistance genes is induced and renders the cells acid resistant. Since addition of organic acids to the culture or proliferation under anaerobic environment inhibited EvgS activation even when the culture was adjusted to pH5.7, our initial hypothesis was that a pH gradient across the cell membrane was required for EvgS activation. However, addition of a small amount of organic acid, that did not disrupt the pH gradient, also inactivated EvgS. Thus, other factors beside the disruption of the pH gradient were involved in the EvgS inactivation. Furthermore, inactivation of EvgS under anaerobic condition was caused by the lack of oxidized ubiquinone within the cell membrane. We propose a novel 'EvgS activation model' that requires oxidized ubiquinones for the formation of disulfide bonds between the cysteine residues in the EvgS PAS domain.

研究分野：微生物学、分子生物学

キーワード：酸応答 ヒスチジンキナーゼ EvgS センサー 酸化還元

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二成分制御系 (Two-component signal transduction system, TCS) は細菌において特に発達している情報伝達系であり、シグナルを認識するヒスチジンキナーゼ (HK) と HK の対となるレスポンスレギュレーター (RR) から構成される。HK がシグナルによって活性化すると ATP 依存的に自己リン酸化し、このリン酸基が RR へと転移し、リン酸化した RR により適応に必要な遺伝子群の発現が制御される。TCS は病原菌の病原性、バイオフィーム形成、増殖などにも深く関与し、病原菌を制御するための新奇な標的として注目される。特に、TCS の HK 中のシグナル認識領域は各 HK に特有であり、この領域を標的にすれば特異性の高い阻害剤が期待される。ところが、膜タンパク質である HK の活性がどのようなシグナルによってどのようにコントロールされるかについての情報は少ない。HK の活性化機構を解明することは、HK の阻害剤探索において非常に重要な知見になりうる。

本研究では、大腸菌の酸耐性能を誘導する TCS である EvgS/EvgA 系の HK である EvgS について検討した。研究開始当初には、EvgS が弱酸性 pH によって活性化して酸耐性遺伝子群の発現を誘導することと、EvgS が酸性 pH を認識して活性化するにはペリプラズム領域と細胞質領域の両者が必要であることが判明していた (Eguchi Y & Utsumi R, *J. Bacteriol.*, **196**, 3140-3149 (2014))。細菌がもつ他の酸センサーの例では、酸性 pH をペリプラズム領域で認識するものや、細胞質領域で認識するものが報告されていたが、細胞内外の両方が必要であるものは報告されていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、大腸菌の酸応答性センサー EvgS の活性化機構を明らかにすることを目的とする。酸性 pH に接するのは、細胞外、すなわちペリプラズム領域であるため、細胞質領域が EvgS の活性化に何故必要であるかの解明を試みた。また、EvgS/EvgA 系が活性化すると、65 アミノ酸残基の小さな膜タンパク質であるコネクター SafA を介して PhoQ/PhoP 系が活性化する。SafA が他の TCS とも相互作用して情報ネットワークが形成されているか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1) センサー EvgS の活性化機構を解析するために pH 感受性 GFP (pHluorin) を菌体内で発現させて細胞内 pH を測定し (Miesenbock et al., *Nature*, **394**, 192-195 (1998), Morimoto et al., *PLoS ONE*, **6**, e19598 (2011)), EvgS 活性と細胞内外 pH との関連を検討した。EvgS 活性測定には、EvgS/EvgA 系のレギュロンである *ydeP* および *emrKY* のプロモーター活性に対するレポーター株 (MG1655 Δ *lacZ ydeP-lacZ*, MG1655 *ydeP-lacZ*, MG1655 *emrKY-lacZ*) を使用した。これらのレポーター株を LB 培地で対数増殖期まで培養し (EvgS 不活性化条件)、その後、培地を EvgS 活性化培地 (M9 pH5.7 + 100 mM KCl, pH は塩酸で調整) に入れ替えて振とう培養を行って活性化開始とし、ガラクトシダーゼ活性を測定することで EvgS/EvgA 系の活性を測定した。酸化還元状態を検討する場合は、振とう培養の代わりに静置培養および嫌気培養 (ネジ蓋付き試験管に培養液を満たして蓋を閉めて静置培養) を行った。

(2) EvgS のどの領域が活性化に関わるかを検討するために、EvgS の細胞質領域のみを発現するプラスミド (pBAD EvgS558-1197)、EvgS PAS ドメインの部位特異的変異体を発現するプラスミド (pBAD EvgS C663A, pBAD EvgS C671A, pBAD EvgS C683A) を作成して *evgS* を欠失させたレポーター株 (MG1655 Δ *evgS ydeP-lacZ*) に導入して測定に用いた。ユビキノン欠失株、メナキノン欠失株には、それぞれの生合成系のなかの遺伝子である *ubiA* および *menA* の欠失株 (MG1655 Δ *ubiA ydeP-lacZ*, MG1655 Δ *menA ydeP-lacZ*) を作成して測定に用いた。

(3) EvgS/EvgA 系と他の TCS との関連を検討するために、EvgS/EvgA 系レポーター株から *envZ*, *ompR*, *rstB*, *rstC*, *rstD* をそれぞれ欠失させた株を作成し、EvgS/EvgA 系の活性化を測定した。また、EvgS/EvgA 系および EnvZ/OmpR 系のレポーター株内で pBADsafA を用いて SafA を過剰発現させ、活性を測定した。タンパク質間の相互作用は、Bacterial two-hybrid assay (Karimova et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5752-5756 (1998)) を使用した。

4. 研究成果

(1) 細胞内外の pH 差と EvgS 活性化

EvgS 活性化培地中で大腸菌を振とう培養すると EvgS は活性化するのに対し、静置培養では活性化の程度が減少し、嫌気培養では全く活性化しなくなる。この時の細胞内 pH を測定すると、振とう・静置培養では細胞内 pH が 7 より低くなるのに 2 時間以上の培養が必要であったのに対し、嫌気培養では 1 時間後にすでに pH 7 より低くなっていた。また、予備実験では、M9 培地の pH を酢酸で pH 6 まで下げて 100mM KCl を添加した培地では、振とう培養でも EvgS の活性化は認められず、細胞内 pH は 6 近くまで低下した。そこで、EvgS の活性化と細胞内 pH との関連をより詳細に検討するために、EvgS 活性化培地に安息香酸を添

加して測定した。安息香酸のような有機酸を加えると、細胞内外の pH が平衡化しやすくなり、十分量を加えると細胞内は細胞外の培地と同じ pH5.7 まで下がる。安息香酸カリウムを 0.0025 mM から 10 mM の濃度で培地に添加して測定した結果(図1), 0.01 mM から EvgS 活性の低下が認められ, 0.025 mM では活性化が完全に阻害された。一方, 細胞内 pH は 0.5 mM まで pH 7.5 が維持され, 1 mM 以上で低下が始まった。以上の結果より, 細胞内外の pH 差が存在しても, 安息香酸カリウムの添加で EvgS 活性化が阻害されることが明らかになり, 予備実験で観察された酢酸の添加による EvgS 活性化の阻害も安息香酸カリウムと同じ原理で生じたものであると考えられた。そこで, EvgS の抑制シグナルとして, 安息香酸を新たに見出した。EvgS が酸性 pH をどの領域で感知するかの答は出なかったが, 細胞内外の pH 差では説明できないことが明らかとなった。

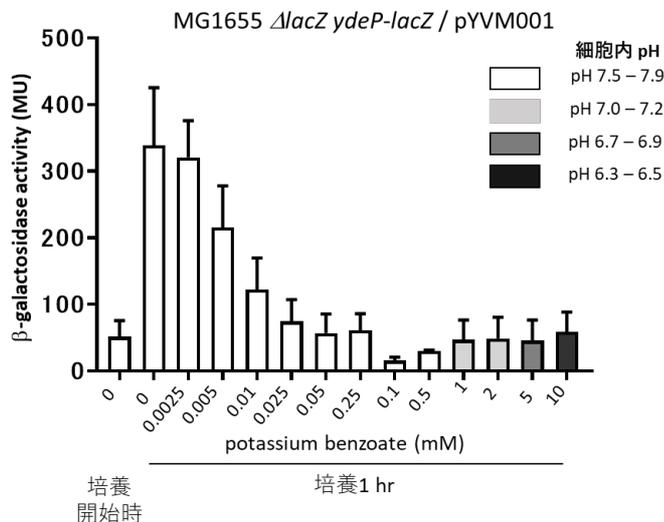


図1 安息香酸添加による EvgS 活性と細胞内 pH

(2) 酸化還元状態と EvgS 活性化

(1)での振とう、静置、嫌気培養では細胞内 pH は異なっていたものの、EvgS 活性の差を説明できるものではなかった。そこで、大腸菌が置かれた酸化還元状態が EvgS 活性に影響を及ぼすと仮定して検討した。その結果、嫌気状態では EvgS/EvgA 系の活性化は阻害され、この阻害は、RR の EvgA によるものではなく、EvgS によるものであることを確認した。さらに、EvgS を膜から切り離した細胞質領域のみを用いて測定すると、嫌気状態でも活性化が認められた。そのため、嫌気状態による EvgS の不活性化には EvgS が細胞膜に局在する必要がある。大腸菌の嫌気センサーである ArcB (HK) は、細胞膜内の電子伝達系で働く補酵素のユビキノンやメナキノンによって酸化還元状態を感知する。そこで、EvgS においてもこれらの補酵素の影響を検討した結果、EvgS の活性化にメナキロンは不要だが、ユビキノンは必須であることを見出した。また、EvgS の細胞質側に存在する PAS ドメイン内の3つのシステイン残基のアラニン変異体を作成して検討した結果、EvgS が嫌気状態下で不活性化するには C671 と C683 が関与することを見出した。C671A および C683A 変異体では嫌気状態において EvgS の不活性化が認められず、C671 と C683 での S-S 結合(組合わせは不明)の解離によって EvgS は不活性化すると考えられた。C671A や C683A では、システイン残

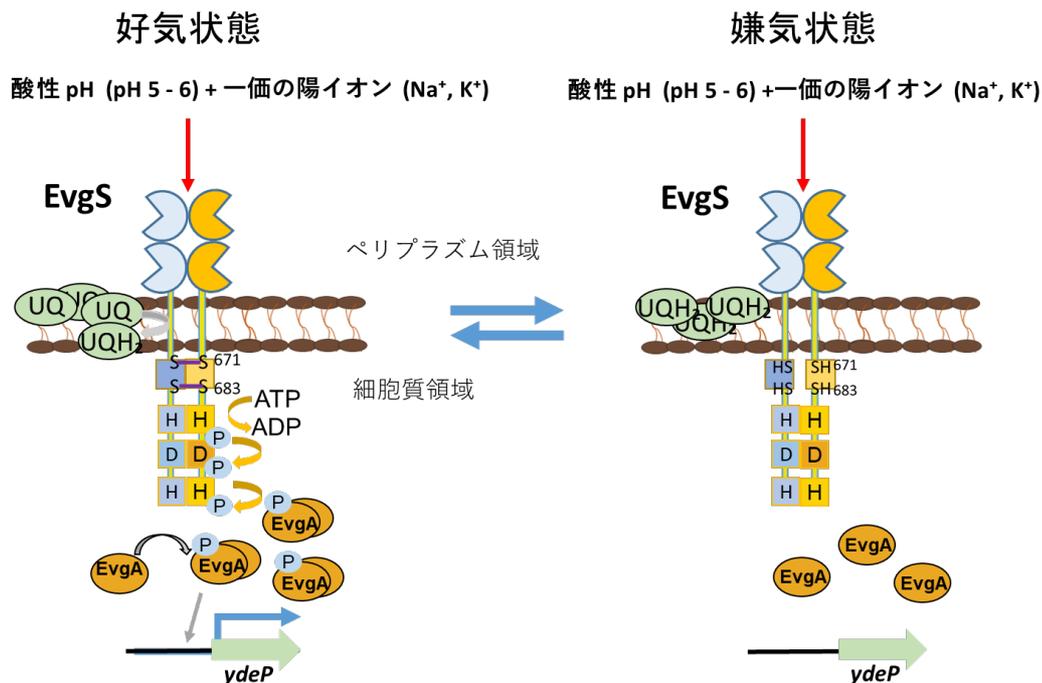


図2 EvgS 活性化モデル

基がアラニンに代わることで側鎖が短くなり、活性化型の S-S 結合に近い立体構造に変わることが示唆された。C671A および C683A 変異体は、EvgS 活性化に必要なユビキノンが存在しない状態でも活性化することも確認している。以上の結果より EvgS 活性化モデルを図2に示した。これらの知見は、センサー EvgS の活性化メカニズムとして新奇なものであり、論文としてまとめ投稿する予定である。

(3) SafA による EvgS のフィードバック阻害

EvgS/EvgA 系が活性化すると、アミノ酸残基数が65という小さな膜タンパク質である SafA が、PhoQ/PhoP 系のセンサー PhoQ に直接結合して PhoQ を活性化して TCS 間で情報を伝える。SafA が PhoQ/PhoP 系以外の TCS にも作用するかどうかを Bacterial two-hybrid assay で検討した。その結果、大腸菌の30種のHKの中で SafA と相互作用を示したのは、PhoQ 以外に EnvZ, EvgS, RcsD であった。そこで、EvgS/EvgA 系および EnvZ/OmpR 系のレポーター株で SafA を過剰発現したところ、EvgS/EvgA 系の活性化に対して明らかな抑制が認められた。従って、EvgS/EvgA 系の活性化によって発現が誘導される SafA は、EvgS に結合することで EvgS 活性を抑制し、フィードバック阻害を行っていることが示唆された。EnvZ/OmpR 系に対しては、SafA は EnvZ に結合するものの、本研究の測定条件下では EnvZ/OmpR 活性に大きな影響は与えなかった。envZ あるいは ompR を欠失させた EvgS/EvgA 系のレポーター株を用いて EnvZ/OmpR 系の EvgS/EvgA 系に及ぼす影響も検討したが、こちらも明らかな影響は認められなかった。RcsC/RcsD/RcsB 系に関しては、EvgS/EvgA 系の活性化に RcsB が必須であることを確認したので、今後、RcsD に対する SafA の結合による影響を検討していきたい。本研究で得られた知見を加えた、EvgS/EvgA 系を中心とした TCS 情報ネットワークモデルを図3に示した。

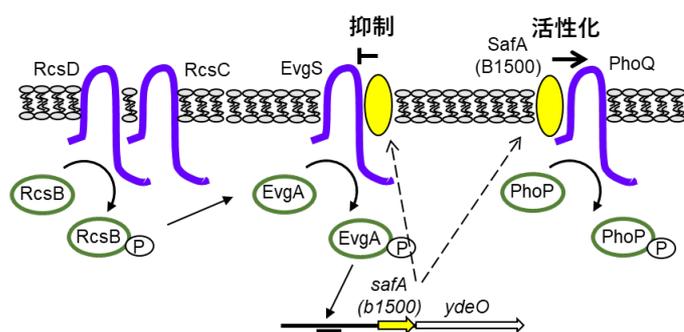


図3 SafA による EvgS 活性のフィードバック阻害

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

K. Yoshitani, E. Ishii, K. Taniguchi, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Akiyama, A. Kato, R. Utsumi, and **Y. Eguchi**. Identification of an internal cavity in the PhoQ sensor domain for PhoQ activity and SafA-mediated control. *Biosci Biotech Biochem*, 査読有, **83**, 2019, 684-694. DOI: 10.1080/09168451.2018.1562879 (責任著者)

A. Kato, S. Ueda, T. Oshima, Y. Inukai, T. Okajima, M. Igarashi, **Y. Eguchi** and R. Utsumi. Characterization of H-box region mutants of WalK inert to the action of waldiomycin in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 査読有, **63**, 2017, 212-221. DOI: 10.2323/jgam.2016.10.007

江口陽子, 内海龍太郎. 「細菌情報伝達ネットワークと阻害剤」, *食品加工技術*, 査読無, **37**, 2017, 32-40. (第一著者、責任著者)

Y. Eguchi, T. Okajima, N. Tochio, Y. Inukai, R. Shimizu, S. Ueda, S. Shinya, T. Kigawa, T. Fukamizo, M. Igarashi and R. Utsumi. Angucycline antibiotic waldiomycin recognizes common structural motif conserved in bacterial histidine kinases. *J. Antibiotics (Tokyo)*, 査読有, **70**, 2017, 251-258. DOI: 10.1038/ja.2016.151 (第一著者)

S. Miwa, E. Kihira, A. Yoshioka, K. Nakasone, S. Okamoto, M. Hatano, M. Igarashi, **Y. Eguchi**, A. Kato, N. Ishikawa, M. Sekine, N. Fujita, Y. Kanasaki, H. Yoshikawa and R. Utsumi. Identification of the three genes involved in controlling production of a phytotoxin tropolone in *Burkholderia plantarii*. *J. Bacteriol.* 査読有, **198**, 2016, 1604-1609. DOI:

〔学会発表〕(計16件)

○吉谷亘平, 石井英治, 谷口勝英, 杉本宏, 城宜嗣, 秋山芳展, 加藤明宜, 内海龍太郎, 江口陽子. 大腸菌 PhoQ センサードメインの SD ポケットの構造と機能. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年

○Y. Eguchi, K. Yoshitani, E. Ishii, R. Utsumi. The internal cavity in the PhoQ sensor domain targeted by SafA. Gordon Research Conference on Microbial Stress Response (国際学会) 2018 年

○江口陽子, 道裏ひかる, 杉岡千尋, 大川幹弘, 中川和弥. Campylobacter 特異的バクテリアオフアージの単離と形態観察. カンピロバクター研究会 2018 年

○稲田慎也, 江口陽子, 芦田久. 酸化還元ストレスによる酸応答性センサー EvgS の活性化制御. 近畿大学大学院サイエンスネットワーク 2018 第 8 回院生サミット 2018 年

道裏ひかる, 杉岡千尋, 大川幹弘, 中川和弥, ○江口陽子. Campylobacter 特異的バクテリアオフアージの単離と形態観察. 第 39 回日本食品微生物学会学術総会 2018 年

○稲田慎也, 内海龍太郎, 芦田久, 江口陽子. 酸化還元ストレスによる酸応答性センサー EvgS の活性化制御. 日本分子生物学会総会 (横浜) 2018 年

○稲田慎也, 内海龍太郎, 芦田久, 江口陽子. ヒスチジンセンサー EvgS の活性化に対する酸化還元状態の影響. 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年

○稲田慎也, 江口陽子, 内海龍太郎, 芦田久. 大腸菌ヒスチジンキナーゼ EvgS の活性化機構. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年

稲田慎也, 金田彰文, ○江口陽子. カンピロバクター菌の株間における酸耐性能の比較. 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会 2017 年

○稲田慎也, 江口陽子, 芦田久. 大腸菌ヒスチジンキナーゼ EvgS 活性化機構. 近畿大学大学院サイエンスネットワーク 2017 第 7 回院生サミット 2017 年

○江口陽子. 細菌情報伝達ネットワークと阻害剤. 第 27 回食の機能と安全研究会 (招待講演) 2017 年

○稲田慎也, 江口陽子. カンピロバクターの株間における酸耐性能の比較. 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年.

○江口陽子. 酸応答性ヒスチジンキナーゼセンサーの活性化と酸耐性誘導機構. 第 89 回日本生化学会大会シンポジウム「バクテリアの環境応答: 見え始めた 2 成分系リン酸化シグナル分子の新たな側面」2016 年

○木下英司, 木下恵美子, 江口陽子, 小池透. 大腸菌ハイブリッドセンサーキナーゼにおけるリン酸基転移反応様式の検証. 第 89 回日本生化学会大会 2016 年

○Y. Eguchi, T. Okajima, N. Tochio and R. Utsumi. Angucycline antibiotic waldiomycin recognizes common structural motif conserved in bacterial histidine kinases. Gordon Research Conference on Microbial Stress Response (国際学会) 2016 年

○江口陽子, 内海龍太郎. 酸応答性ヒスチジンキナーゼの活性化機構の解析. 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会 2016 年

〔図書〕(計1件)

Y. Eguchi, R. Utsumi. Chapter 16.3 Two-component systems in sensing and adaptation to acid stress in *Escherichia coli* (pp 927-934) in “Stress and Environmental Control of

Gene Expression in Bacteria”, F. F. de Bruijn Ed., Wiley-Blackwell Publisher, 2016

6 . 研究組織

本研究は研究代表者単独で行った。