

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15689

研究課題名(和文) 緑膿菌クオラムセンシング機構の総体的理解に向けたAHLレセプターの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of AHL receptors toward comprehensive understanding of the quorum sensing mechanism in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

老沼 研一 (Oinuma, Ken-Ichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20635619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、緑膿菌のクオラムセンシング(QS)機構の総体的理解を目指し、本機構において中心的な役割を果たすRhIRとQscRの分子機能解析および作用機序の解析を行った。特に、組換え大腸菌を用いたRhIRの機能解析に重点的に取り組んだ結果、本タンパク質の疎水性アミノ酸残基に富むN末端領域がタンパク質全体の安定性に与える影響、安定性と機能性の相関等について、多くの重要な知見が得られた。QscRに関しては、その直接の支配下にある遺伝子の働きを介してQSを抑制していることが判明したため、それら遺伝子の機能解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日和見感染菌である緑膿菌は、病原因子の産生をQS機構によって制御している。従って、QSを阻害すれば本菌を無毒化・弱体化できるという考えの下、多くの研究者が、QS阻害剤の開発に向けた基礎・応用研究に取り組んでいる。今回の研究成果は、QS阻害剤の実現に向けた基礎研究の進展に寄与するものであり、特に、RhIRの研究において最大の障壁となっているタンパク質調製の難しさの問題に解決の糸口をもたらした点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, aiming to develop a comprehensive understanding of the quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*, we performed molecular characterization and functional analyses of RhIR and QscR, which play central roles in the system. We especially focused our energy on an analysis of RhIR using recombinant *E. coli* and, as a result, obtained many important data regarding the influence of the highly hydrophobic N-terminal region of RhIR on its stability and the relationship between the stability and functionality of the protein. As for QscR, since it has recently been revealed that it represses quorum sensing via the function of genes that are under its direct control, we conducted a functional analysis of these genes.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 クオラムセンシング AHLレセプター RhIR QscR

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 緑膿菌の病原性とクオラムセンシング

緑膿菌は、免疫不全者や高齢者に難治性の感染症を引き起こす重要な日和見感染菌である。特に、白人に多く見られる嚢胞性線維症に関しては、本菌による呼吸器の慢性感染が重症度と予後に大きく影響することから、黄色ブドウ球菌と並び最重要の病原菌と位置づけられている。本菌は、クオラムセンシング(QS)と名付けられた細胞間情報伝達機構により、自身の密度に応じて病原性を制御している。即ち、自身の細胞密度が低い状態ではほとんど病原性を示さないが、細胞密度が一定の閾値に達すると QS 機構の転写因子が活性化し、周囲と同調するように一斉に病原因子の産生を開始する。

本菌の QS には、2 種のアシルホモセリンラクトン(AHL)合成酵素(LasI, RhlI)と、3 種の AHL レセプター(LasR, RhlR, QscR)が関与している。AHL (LasI が合成する 3OC12-HSL と RhlI が合成する C4-HSL) は常時産生・分泌されており、その濃度は菌の密度と連動している。AHL が一定濃度に達すると、それを結合したレセプターが転写因子として機能し、結果として病原因子の産生が開始される。各制御因子は互いに干渉し合いながら、全体として複雑な制御ネットワークを形成している。LasR は QS のマスターレギュレーターであり、RhlR を含めた多くの病原遺伝子の発現を、直接的または間接的に正に制御している。このことから、殺菌や静菌ではなく「病原性の抑制」を目的とした全く新しい薬剤の標的分子として、LasR の研究が特に重点的に行われてきた。

### (2) 近年の研究データに基づくパラダイムシフトと RhlR 研究の重要性

従来、LasR は QS 機構の最上位に位置する制御因子であり、宿主への感染と定着に欠かせないものと考えられてきた。ところが近年、嚢胞性線維症患者を含む慢性的緑膿菌感染症の症例から高い頻度で LasR の欠損株が単離されることが明らかとなり、その医学的・生物学的意義と影響に注目が集まっている。比較的最近の研究により、LasR の欠損株は必ずしも QS の機能を失うわけではなく、RhlR が LasR の働きを相補することにより、野生株と同様に病原因子を産生し得ることが判明した(文献 )。更に、2,650 株の嚢胞性線維症患者由来の緑膿菌株を用いた大規模実験では、少なくとも一部の LasR 欠損株においては、RhlR が LasR による制御から完全に独立し、最上位の制御因子として振る舞うことが示された(文献 )。このような背景から、QS 研究における RhlR の重要性・注目度は急速に高まっている。

### (3) QscR の病原性抑制因子としての機能と医学的重要性

LasR や RhlR とは対照的に、QscR は菌の病原性を抑える働きを持つことが示されている(文献 )。qscR 遺伝子の破壊株は、QS のスイッチが入るタイミングが野生株よりも早く、強毒性を示す。QscR の解析は、緑膿菌 QS の理解に必須であるだけでなく、菌固有の抑制機能を利用した革新的な病原性抑制薬の開発に結び付く可能性もある。このことから、QscR は基礎・応用の両面から非常に重要かつ興味深い研究対象であると言える。

## 2. 研究の目的

RhlR と QscR は、LasR と比べいくつかの点で解析が大きく遅れている。例えば、RhlR はこれまで構造と機能を保持した「ネイティブな状態」で精製・解析された例がなく、その性質は未だ明らかとなっていない。QscR に関しては、分子レベルの解析は進んでいるが、臨床分離株における普遍性や生理的役割、作用機序に関して不明な点が多い。そこで、RhlR に関しては組換え大腸菌を用いた発現方法の検討と機能解析に取り組むこととした。一方、QscR に関しては、本課題への取り組みを開始する直前に、米国・ワシントン大学の研究者らと共同で進めた研究により、その作用機序に関する革新的な知見が得られた(文献 )。即ち、これまで、QscR は多数の遺伝子の発現を直接制御し、結果として QS の抑制が起こると考えられていたが、本研究により、QscR の直接の制御下にある遺伝子は PA1895, PA1896, 1897 の 3 つ(以降、PA1895-1897 と表記)のみである可能性が示唆されるとともに、QscR による QS の抑制はこれら 3 遺伝子の発現を介して起こることが明確となった。そこで、当初は普遍性や生理的役割に焦点を当てる計画であったが、作用機序の解明を優先させるべきと判断し、PA1895-1897 の機能解析に取り組むこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸菌を用いた RhlR の発現と機能解析

RhlR の大腸菌を宿主とした発現と精製、および、精製タンパク質に対する機能解析を試みた。まず、pET システムによる大腸菌発現系を構築し、発現条件の検討を行った。発現条件として、特に、発現誘導温度の影響とアシルホモセリンラクトンの添加の効果を検討した。また、N 末端配列がタンパク質の安定性に及ぼす影響を検証するため、N 末端を一部切り縮めた形での発現を試みた。可溶性画分への発現に成功した N 末端短縮型 RhlR については、精製とゲルシフトアッセイによる DNA 結合能の検討を行った。次に、完全長または N 末端短縮型 RhlR の転写促進因子としての活性をレポーターアッセイにより検証した。本実験では、pJN105-rhlR (アラビノース誘導型プロモーターの下流に rhlR を配置した RhlR 発現用ベクター) と、pQF50-P<sub>rhlA</sub> (rhlA プロモーターの下流に lacZ 遺伝子を配置したプラスミド) を保持する大腸菌 DH5α株を

使用し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの蓄積量により RhlR の活性を評価した。更に、N 末端領域の機能とその存在が RhlR の安定性に与える影響をより詳細に調べるため、N 末端を 1 残基ずつ異なる長さで切り縮めた N 末端短縮バリエーションの作製と解析を試みた。

## (2) PA1895-1897 の機能解析

PA1895-1897 の解析を進めるにあたって、まず、これらの既知タンパク質との類似性に着目した。PA1896 のアミノ酸配列には機能を類推できるような既知モチーフは見出されなかったが、PA1895 と PA1897 はそれぞれ fatty acid desaturase、fatty acid hydroxylase と相同性を有しており、これらの脂質関連酵素としての働きを介して QS の阻害が起こるものと考えられた。そこで、PA1895-1897 の QS 阻害メカニズムに関する仮説として、PA1895-1897 が 3OC12-HSL に直接作用し分解または修飾する可能性（仮説）PA1895-1897 が LasI 阻害物質の産生に参与する可能性（仮説）を考え、それらの検証を行った。仮説の検証実験では、PA1895-1897 を大腸菌(DH5 $\alpha$  pJN105-PA1895-1897)または緑膿菌(PAO1  $\Delta lasI$ ,  $\Delta rhII$ , pJN105-PA1895-1897)内で発現させたのち、菌体ごと 3OC12-HSL に作用させた。反応後の 3OC12-HSL 残存量を、pJN105-*lasR*（アラビノース誘導型プロモーターの下流に *lasR* を配置した LasR 発現用ベクター）と、pQF50-*P<sub>lasI</sub>*（*lasI* プロモーターの下流に *lacZ* 遺伝子を配置したプラスミド）を保持する大腸菌 DH5 $\alpha$  株を用いたレポーターアッセイにより定量し、3OC12-HSL が酵素的な分解または変換を受けるかを検証した（分解・変換を受ければ LasR との親和性が低下し、レポーター株の応答が消失または低下すると仮定した）。仮説の検証実験では、緑膿菌が培養初期から中期にかけ PA1895-PA1897 の機能を介して産生すると予想される LasI 阻害物質の検出を試みた。実際には、*lasI* を導入することにより 3OC12-HSL 合成能を付与した大腸菌株(DH5 $\alpha$  pJN105-*lasI*)を使用し、その 3OC12-HSL 合成活性が、PAO1 培養上清の培地への添加により阻害されるかを検証した。なお、阻害物質が細胞内に局在する可能性も否定できないが、本実験では特に放出が起こる可能性に照準を合わせ検証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 組換え大腸菌を用いた RhlR の発現と機能解析

**pET システムによる RhlR 発現の試み:** まず、pET システムを用いて RhlR 高発現大腸菌株 (Rosetta 2(DE3)pLysS pET24a(+)-*rhlR*) を作製の上、発現条件の検討を行った。一般に、組換え大腸菌によるタンパク質発現実験では、発現量と可溶性画分への発現の成否は発現誘導温度により大きく左右される。また、AHL レセプターはリガンド非結合状態では極度に不安定なため、可溶性画分への発現には、培地への AHL の添加を必要とすることが知られている（文献）。以上のことを踏まえ、2 つの発現温度(37°C, 16°C)と培地への C4-HSL の添加の効果を検討したが、いずれの条件においても、RhlR は不溶性画分のみ発現し、可溶性画分への蓄積は認められなかった。

**RhlR の N 末端配列に関する考察と N 末端短縮型 RhlR の発現実験:** RhlR の不溶性の原因を探るべく、本タンパク質のアミノ酸配列を精査したところ、RhlR の配列は、LasR や QscR に比べ N 末端側に 6~8 残基分突出しており、かつ、N 末端付近に疎水性アミノ酸残基の連続する特徴的な領域を持つことを発見した。そこで、この突出した N 末端配列が RhlR の不溶性の一因であると推察し、2~8 番目の残基を欠失させた状態での発現を試みた。結果、興味深いことに、当該タンパク質（N 末端短縮型 RhlR）は、C4-HSL の培地への添加の有無にかかわらず、37°C での誘導で可溶性画分に顕著に発現することを発見した。

**N 末端短縮型 RhlR の精製と DNA 結合活性の検討:** 大腸菌無細胞抽出液からの N 末端短縮型 RhlR の単離・精製に取り組んだ。結果、硫酸沈殿による分画と複数のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることで、本タンパク質を高純度に精製することに成功した。次に、本精製標品を用いて、ゲルシフトアッセイによる DNA 結合活性の検出を試みた。しかし、反応液への AHL の添加の有無に関わらず、精製標品に目的の活性は検出されなかった。

**レポーターアッセイによる転写促進活性の検証:** 完全長、および、N 末端短縮型 RhlR の転写促進因子としての活性を、大腸菌レポーターアッセイにより比較・検討した。結果、完全長の RhlR は C4-HSL 依存的に顕著な活性を示したのに対し、N 末端短縮型 RhlR は C4-HSL の添加の有無にかかわらず全く活性を示さなかった。以上のことから、RhlR の N 末端の数残基は、本タンパク質の転写促進因子としての機能に不可欠であることが示された。一般に、AHL レセプターの転写促進機能は、AHL の結合、二量体化、DNA との結合、RNA ポリメラーゼとの相互作用という段階的な結合反応を経て発揮される。今回作製・解析した N 末端短縮型が活性を示さなかった理由として、N 末端領域の欠失により上記プロセスのいずれかに支障が生じた可能性が考えられた。なお、系統的に RhlR に近縁な大腸菌の SdiA においては、6 番目と 7 番目の両フェニルアラニン残基は二量体形成に参与することが示されている（文献）。RhlR においてこれらの残基に対応するのは 7 番目のフェニルアラニン残基(Phe7)と 8 番目のロイシン残基(Leu8)であり、それらの残基を失い二量体化できなくなったことが、N 末端短縮型が活性を示さなかった原因であると推察した。

**N 末端短縮バリエーションの作製と解析:** 上記の結果を受け、RhlR の N 末端配列に関し更に一歩踏み込んだ解析を行う必要があると考え、N 末端を 1 残基ずつ切り縮めた一連のバリエーションの作製と解析に取り組んだ。結果、2~5 番目の残基を除去した分子種はいずれも極度の不溶性と正常な転写促進活性を示したのに対し、6 番目以降の残基を削除した分子種には高い可溶性と活性の消失が認められた。これにより、活性と不溶性には正の相関があることが明らかとなった。このような現象が観察される理由として、N 末端短縮バリエーションの活性の有無が二量体化するか否かで決まるという仮説の下、二量体化自体が凝集の引き金になっている可能性があるものと推察した。

## (2) PA1895-1897 の機能解析

**PA1895-1897 が AHL に直接作用し分解または修飾する可能性 (仮説) の検証:** まず、宿主として DH5 $\alpha$ 、ベクターとして pJN105 を用いてアラビノース誘導型の PA1895-1897 発現大腸菌を作製した。次に、PA1895-1897 を誘導発現させたのち、菌体を 3OC12-HSL に作用させ、分解または修飾が起こるかを検討した。結果、休止菌体反応液から回収された 3OC12-HSL の総量は PA1895-PA1897 を保持しない菌体で同様の操作をした場合とほとんど差がなく、本仮説を支持するデータは得られなかった。次に、大腸菌内で PA1895-PA1897 が正常に発現・機能しない可能性を考え、緑膿菌 PAO1 のシグナル合成酵素欠損株である PAO1  $\Delta lasI$ ,  $\Delta rhII$  を宿主として同様の実験を行った (なお、本実験では、緑膿菌が自ら産生する AHL の影響を排除するため AHL 合成酵素の欠損株を用いた)。結果、大腸菌を用いて行った実験と同様、PA1895-PA1897 発現株と非発現株の間に大きな差は見られず、仮説は立証できなかった。

**PA1895-1897 が LasI 阻害物質の産生に関与する可能性 (仮説) の検証:** まず、大腸菌 DH5 $\alpha$  に pJN105-*lasI* を導入することにより、3OC12-HSL 産生能を有する大腸菌株を作製した。次に、緑膿菌の培養上清中に LasI 阻害物質が含まれるかを、本菌株を用いて検証した。具体的には、菌を一定の濁度に達するまで MOPS (pH7.0)-LB 液体培地で培養後、PAO1 培養上清の添加の有・無の 2 条件で 3OC12-HSL の産生を誘導し、一定時間培養を継続したのち、培養液中の 3OC12-HSL 蓄積量を測定・比較した。結果、PAO1 培養上清を添加した場合に 3OC12-HSL 産生量の若干の低下が見られたものの、LasI 阻害物質以外の成分が間接的に引き起こした差異である可能性等を否定しきれず、仮説の立証には至らなかった。

## (3) 総括と今後の展望

今回、我々は、緑膿菌の QS の総体的理解に向け、重要であるがこれまで十分に解析が行われてこなかった RhlR と QscR に着目し研究を行った。RhlR に関しては、特に特徴的な N 末端領域に着目して解析を進めた結果、本領域がタンパク質全体の安定性に与える影響、安定性と機能性の相関等について、多くの新しい知見が得られた。今後は、Phe7、Leu8 のアミノ酸置換変異体を作製・解析することなどにより上述した二量体化と凝集の関係に関する仮説を検証するとともに、AHL の結合が RhlR の性質に与える影響等の解析を実施するため、活性を維持した状態で RhlR を調製する方法の検討を進めていきたい。PA1895-PA1897 の作用機序に関しては、2 つの仮説について検証を行ったが、それらを支持するデータは得られなかった。ただし、今回の結果は仮説を完全に否定するものではなく、結論を導くには異なる方法を用いた更なる検証が必要となる。また、上記仮説の他にも、例えば、3OC12-HSL の生合成の前駆物質である 3OC12-acyl carrier protein を枯渇させることにより、本 AHL の合成を抑制する可能性、細胞膜の脂質組成を変化させることにより 3OC12-HSL の細胞内外への透過性を低下させる可能性など、検証すべき仮説は多く残されている。あらゆる可能性が考えられる中で真実を突き止めることは簡単ではないが、PA1895-PA1897 の作用機序の解明に向け粘り強く研究に取り組んでいきたい。

### <引用文献>

- Dekimpe V. and Déziel E. "Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors" *Microbiology*, **155**, 712-723, 2009.
- Feltner J.B., Wolter D.J., Pope C.E., Groleau M.C., Smalley N.E., Greenberg E.P., Mayer-Hamblett N., Burns J., Déziel E., Hoffman L.R. and Dandekar A.A. "LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*" *mBio*, **7**, e01513-16, 2016.
- Chugani S.A., Whiteley M., Lee K.M., D'Argenio D., Manoil C. and Greenberg E.P. "QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 2752-2757, 2001.
- Ding F., Oinuma K., Smalley N.E., Schaefer A.L., Hamwy O., Greenberg E.P. and Dandekar A.A. "The *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum sensing signal receptor QscR regulates global quorum sensing gene expression by activating a single linked operon" *mBio*, **9**, e01274-18, 2018.
- Oinuma K. and Greenberg E. P. "Acyl-homoserine lactone binding to and stability of the orphan

*Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal receptor QscR” *J. Bacteriol.*, **193**, 421-428, 2011.  
Kim T., Duong T., Wu C.A., Choi J., Lan N., Kang S.W., Lokanath N.K., Shin D., Hwang H.Y. and Kim K.K. “Structural insights into the molecular mechanism of *Escherichia coli* SdiA, a quorum-sensing receptor” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 694-707, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ding F, Oinuma K, Smalley NE, Schaefer AL, Hamwy O, Greenberg EP, Dandekar AA	4. 巻 9
2. 論文標題 The <i>Pseudomonas aeruginosa</i> orphan quorum sensing signal receptor QscR regulates global quorum sensing gene expression by activating a single linked operon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01274-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 老沼 研一, 矢守 志穂, 松岡 俊佑, 金子 幸弘
2. 発表標題 緑膿菌クオラムセンシング制御因子RhIRの組換え大腸菌を用いた機能解析
3. 学会等名 第54回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken-Ichi Oinuma
2. 発表標題 Molecular characterization of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quorum sensing signal receptor RhIR
3. 学会等名 ERATO-MiCS International Symposium on Sociomicrobiology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 老沼 研一, 秦 大樹, 金子 幸弘
2. 発表標題 緑膿菌クオラムセンシングシグナルレセプター-RhIRの大腸菌による発現と解析
3. 学会等名 第33回バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪市立大学大学院医学研究科細菌学 ホームページ  
<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/bacteriology/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	金子 幸弘  (Kaneko Yukihiro)		