

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590055

研究課題名 (和文) 異物排出蛋白質の多彩な生理的役割の解明

研究課題名 (英文) Physiological functions of bacterial efflux transporters

研究代表者

平田 隆弘 (HIRATA TAKAHIRO)

城西国際大学・薬学部・教授

研究者番号：90333450

研究成果の概要：

約20種もある大腸菌異物排出蛋白質のいくつかは、未知の薬剤耐性以外の役割を持つに違いない。実際、鉄獲得に関与するエンテロバクチンが AcrD と MdtABC により菌体外放出されることを観察した。EntS 輸送体が内膜から、AcrD と MdtABC がペリプラズムから TolC を経由し、連携して菌体外へ排出している。また、新しいアプローチとして、マクロライド排出活性を持つ MacB が、大腸菌で極局在することを、GFP 融合蛋白質を利用して発見した。新しい生理的役割と関連づけることができれば興味深い。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	690,000	3,690,000

研究分野：薬学、生物化学、微生物学、化学療法学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細菌、異物排出蛋白質、感染症、GFP

## 1. 研究開始当初の背景

細菌が持つ異物排出蛋白質は、これまで抗菌薬が効かなくなる薬剤耐性因子として捉えられていた。その遺伝子の発現制御は、二成分情報伝達系、グローバルな制御因子、増殖期依存的な制御因子など非常に多様な因子で巧妙に制御されていることがわかってきたが、それが実際に大腸菌にとってどういう意味があるのかについては、情報量が増え

たにもかかわらず依然としてわかっていなかった。ひとつの菌種内にも20種類以上の数多くの異物排出蛋白質が存在し、それらが複雑かつ巧妙に制御されている事実は、全ての異物排出蛋白質が単に薬剤耐性因子として存在しているとは考えにくく、その中のいくつかはまだ明らかにしていない何らかの大腸菌にとっての生理的役割があるに違いないとの考え方が主流になってきていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、大腸菌の異物排出蛋白質の多彩な生理的役割を明らかにするステップとして、ひとつは異物排出蛋白質に焦点を絞った比較的実現性の高い課題(1)、それに加えて異物排出蛋白質を含むトランスポーター全体としての生理的に重要な新しい役割について別の視点からアプローチを行う2種類(2), (3)、の発展的課題を追求した。すなわち、

- (1) 異物排出蛋白質 AcrD と MdtABC の鉄獲得における役割
  - (2) トランスポーターのバイオフィーム形成における機能探索
  - (3) 蛋白質の局在をもとにした異物排出蛋白質の新機能の探索
- の3種類である。
- (1) については、その制御機構の解析から、鉄獲得に関連する制御因子 Fur で制御されている知見をヒントに、エンテロバクチンの排出に注目して、菌体外放出の役割を調べた。
  - (2) については、トランスポゾン挿入により、バイオフィーム形成能力の低下した菌株をスクリーニングし、バイオフィーム形成に関わるトランスポーターの発見を試みた。
  - (3) に関しては、細菌用の GFP 融合ベクターを作成し、異物排出蛋白質と GFP の遺伝子をつなぎ、キメラ蛋白質の局在をその蛍光を利用して調べて、生理的役割の推定を試みた。

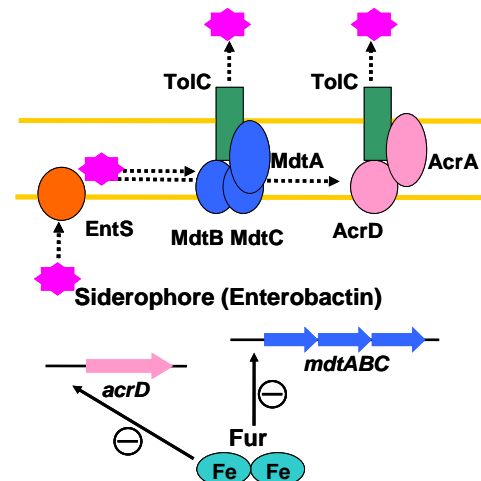
## 3. 研究の方法

- (1) 異物排出蛋白質 AcrD と MdtABC の鉄獲得における役割  
tolC あるいは *acrDmdtABC* 欠損株の培地中から酢酸エチル層に鉄キレート物質、エンテロバクチンを抽出し、TLC 法及び高速液体クロマトグラフィー法により培地中量の変動を調べた。
- (2) トランスポーターのバイオフィーム形成における機能探索  
バイオフィーム形成能を持つ大腸菌 TG1 株を用いて、その染色体上に Tn5 由来のトランスポゾン挿入し、バイオフィーム形成が低下した株をスクリーニングした。その株からクロモゾームを単離し、適当な制限酵素処理後、トランスポゾンプラスミドとして回収しシーケンスによりその挿入位置を決定した。異物排出蛋白質だけでなく、トランスポーター関連蛋白質、情報伝達関連遺伝子すべてに着目して、研究を進めた。
- (3) 蛋白質の局在をもとにした異物排出蛋白質の新機能の探索  
細菌用の GFP 蛍光蛋白質融合ベクターの構築を行った。trc プロモーターを利用して強度が異なるものを2種類作成した。これに *macB* 遺伝子を挿入し、GFP-MacB あるいは、

MacB-GFP を作成し、大腸菌で発現させた後、蛍光顕微鏡下でその局在を観察した。カルジオリピン欠損株である JW1241 株は NBRP 大腸菌事業 (NIG) により分与して頂いた。ここに記して感謝申し上げる。

## 4. 研究成果

- (1) 異物排出蛋白質 AcrD と MdtABC の鉄獲得における役割  
異物排出蛋白質、AcrD と MdtABC に関しては発現制御機構を解析することで、生理的役割の推定が可能になった数少ない例である。すなわち、通常条件下では発現が低い、あるいは発現していないこれらの蛋白質に対して、今までに知られていない負の制御因子をトランスポゾン挿入による発現上昇を基準に探索したところ、鉄獲得のための鍵となる制御因子、Fur が AcrD と MdtABC を負に制御していることを発見していた。実際、両異物排出蛋白質の二重欠損株は低い鉄濃度の培地で増殖が遅くなっていた。本研究では、異物排出蛋白質の鉄獲得における役割を直接的に証明するために、鉄獲得分子であるシデロフォア (エンテロバクチン) を両異物排出蛋白質がペリプラズムから菌体外へ排出しているという可能性を検討した。菌体外エンテロバクチン量を測定した結果、*tolC* 欠損株においては培地中エンテロバクチン量が約 50% に低下していた。これは、他グループの報告と一致した。同条件下で  $\Delta \text{acrD} \Delta \text{mdtABC}$  同時欠損株を調べたところ、エンテロバクチン濃度が *tolC* 欠損株と同レベルまで低下していた。従って、AcrD と MdtABC 異物排出蛋白質の本来の生理的役割がエンテロバクチンの菌体外への放出である可能性を示した。薬剤耐性と鉄獲得という2種類の異なる役割を果たしていることになる。内膜には、EntS という輸送体がエンテロバクチンを排出していることが知られているので、両異物排出蛋白質は、ペリプラズムから菌体外へ TolC を経由してエンテロバクチンを排出する役割を担っているものと考えられた。



### (2) トランスポーターのバイオフィーム形成における機能探索

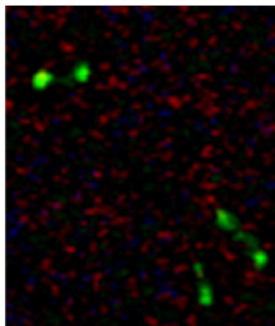
大腸菌のバイオフィーム形成株を用いてトランスポゾン挿入法により7種の新規バイオフィーム形成能低下株を得た。そのうち6種において one-step PCR 法を用いて遺伝子欠損株を作成し、少なくとも3種の遺伝子についてはその欠損によってバイオフィーム形成能が50%以下になることを確認した。

当該遺伝子が本当にバイオフィーム形成に関与することを示すには相補性実験が必須である。ここでは、課題とは少し異なるが、推定トランスポーター (GudP) 欠損による低下株よりもより強力にバイオフィーム形成が低下していたアミノ酸合成に関与する遺伝子の *ilvA* 欠損株に注目した。相補性実験の結果、*ilvA* だけでなく制御因子である *ilvY* も相補性に関与することが示された。*ilvY* は、*ilvA* の下流の逆方向に位置するが、*ilvA* の欠損により、*ilvY* 遺伝子の転写終結が影響されたことが考えられた。

### (3) 蛋白質の局在をもとにした異物排出蛋白質の新機能の探索

局在を調べるための材料作りに着手した。すなわち、市販ベクターは動物細胞用に最適化されているので、自身で細菌用の GFP 蛍光蛋白質融合ベクターの構築を行った。*trc* プロモーターを利用して強度が異なるものを2種類作成した。予備的に GFP だけを発現する株を構築し十分な蛍光強度を持つことを確認した。このベクターを使用して異物排出蛋白質遺伝子と融合させ蛍光蛋白質を発現させることが可能になった。

次に AcrB, MacB などの異物排出蛋白質を GFP と融合させ、実際に融合蛋白質の局在を蛍光を利用して調べたところ、GFP-MacB が大腸菌細胞の極に局在することが示された。さらにバイオフィーム形成株においても、バイオフィーム中でも GFP-MacB が極に局在していることが示された。



**GFP-MacB was localized at both cell poles in *E. coli***

局在する理由として、細胞極に局在している細菌特有の脂質であるカルジオリピンと MacB とが蛋白質-脂質相互作用することによる極への共在を仮定し、大腸菌 BW25113 株由来のカルジオリピン合成酵素遺伝子 (*cls*) 欠損株である JW1241 株を用いて調べた。実際に *cls* 遺伝子が欠損していることは、染色体の *cls* 遺伝子部分の PCR による増幅で確認した。マクロライド耐性を与える活性を保持している、緑色蛍光タンパク質融合 GFP-MacB をプロモーター強度を低くした pTrc99A プラスミド (pTH2023) により発現させ、局在が変化しているかどうかを調べた。今まで調べていた *E. coli* TG1 株と異なる BW25113 株に pTH2023 を導入した GFP-MacB も TG1 株と同様に極に局在しており、GFP-MacB の極への局在は菌株に依存しなかった。BW25113 株由来カルジオリピン欠損株 JW1241 で GFP-MacB を発現させた場合にも極に局在している像が観察された。予想に反して、極への局在は脂質カルジオリピンとの相互作用とは関係のないあるいは低い可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Hirakawa H, Takumi-Kobayashi A, Theisen U, Hirata T, Nishino K, Yamaguchi A   AcrS/EnvR represses expression of the *acrAB* multidrug efflux genes in *Escherichia coli*  
*Journal of Bacteriology* 190 6276-6279 (2008) 査読有

② Hirakawa H, Inazumi Y, Senda Y, Kobayashi A, Hirata T, Nishino K, Yamaguchi A   N-acetyl-D-glucosamine induces the expression of multidrug exporter genes, *mdtEF*, via catabolite activation in *Escherichia coli*  
*Journal of Bacteriology* 188 5851-5858 (2006) 査読有

③ Kobayashi A, Hirakawa H, Hirata T, Nishino K, Yamaguchi A   Growth phase-dependent expression of drug exporters in *Escherichia coli* and its contribution to drug tolerance  
*Journal of Bacteriology* 188 5693-5703 (2006) 査読有

〔学会発表〕（計5件）

①平田 隆弘 他 Polar localization of a drug efflux transporter, MacB, in *Escherichia coli*, 109th American Society of Microbiology General Meeting 2009年5月18日 米国フィラデルフィア

②平田 隆弘 他 大腸菌異物排出蛋白質 MacAB の極への局在 大腸菌研究会 2007年7月18日 静岡

③王 麗媛、平田 隆弘 他 大腸菌バイオフィルム形成機構に関する新規遺伝子産物に関する研究  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 2007年12月14日 横浜

④平川 秀忠、平田 隆弘 他 The regulatory mechanism of the AcrAB and AcrEF multidrug exporter system by AcrS, in *Escherichia coli*  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 2007年12月14日 横浜

⑤ 平田 隆弘 他 大腸菌薬剤排出タンパク質の細胞内局在 日本薬学会第128年会 2008年3月28日 横浜

〔図書〕（計1件）

平田隆弘 他（分担執筆）廣川書店  
薬学領域における病原微生物学・感染症学・化学療法学（2007）575 ページ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jiu.ac.jp/faculty/pc/bogyo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平田 隆弘 (HIRATA TAKAHIRO)  
城西国際大学・薬学部・教授  
研究者番号：90333450

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし