

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18760588
 研究課題名 (和文) クオラムセンシングシグナルの分解系を用いた細菌病制御技術の開発
 研究課題名 (英文) Prevention of bacterial infection by degradation of quorum-sensing signal compounds.
 研究代表者
 諸星 知広 (MOROHOSHI TOMOHIRO)
 宇都宮大学・工学研究科・助教
 研究者番号：90361360

研究成果の概要:ある種の病原性細菌はアシル化ホモセリンラクトン(AHL)をシグナル物質とした情報伝達機構(クオラムセンシング)により病原性の発現を制御している。本研究では、AHL分解細菌 *Shewanella* sp. MIB015 株から AHL 分解遺伝子(*aac*)のクローニングに成功し、病原性細菌に *aac* 遺伝子を導入すると、病原性細菌が AHL を生産できなくなり、病原性因子の発現が極度に低下することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	600,000	0	600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

研究分野：微生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：クオラムセンシング、アシル化ホモセリンラクトン、アシラーゼ、阻害技術、*Shewanella* 属細菌、quorum sensing、acylhomoserine lactone、quorum-quenching

1. 研究開始当初の背景

細菌は単独で活動するだけでなく、周囲の細菌とコミュニケーションを取り合い、集団として様々な挙動を示すことが明らかとなってきた。このような細胞間コミュニケーションの一つにクオラムセンシングと呼ばれる機構がある。クオラムセンシングとは、細菌がオートインデューサーと呼ばれる情報伝達シグナル物質を菌体外に放出し、オートインデューサー濃度の上昇を個体密度の増加として感知し、個体密度がある一定値を超えると、様々な遺伝子の発現を活性化する機構のことである。特にグラム陰性細菌の場合、

オートインデューサーとして様々な構造のアシル化ホモセリンラクトン(AHL)を用いていることが明らかとなっている。クオラムセンシングに制御される機能は様々であるが、特に病原性細菌の場合、その病原性因子の発現がクオラムセンシングにより制御される例が多数報告されている。これらの病原性細菌の AHL 合成遺伝子を破壊すると、クオラムセンシングが活性化せず、病原性因子の発現が極度に低下することから、クオラムセンシングを人為的に阻害することによる病原性抑制技術が注目を集めている。

近年、環境中から AHL を分解する能力を有

する細菌の存在が報告され、これらの細菌が2種類のAHL分解機構を有することが明らかとなった。1つはAHLの基本骨格であるホモセリンラクトン環部位を加水分解することで開裂させるAHLラクトナーゼであり、もう1つはAHLのアシル鎖とホモセリンラクトンの結合部位であるアミド結合を切断するAHLアシラーゼである。これらのAHL分解酵素により分解されたAHLはシグナル物質として認識されないため、個体密度が上昇してもクオラムセンシングは活性化しない。このAHL分解酵素や遺伝子を利用することにより、病原性細菌の病原性発現を大きく低下させることが可能である。

2. 研究の目的

これまでに、様々な研究グループにより、多様なAHL分解細菌やAHL分解遺伝子が単離されてきたが、環境中には未だに発見されていない数多くのAHL分解遺伝子が眠っていると考えられる。本研究グループでは、環境中に存在する多様な細菌群の中から、未知のAHL分解資源の探索を行ってきた。その中で、これまでにAHL分解細菌の単離源として全く注目されていなかった淡水魚(アユ)の腸内フローラから、AHL分解能を有する *Shewanella* sp. MIB015 株を単離する事に成功した。そこで本研究では、MIB015 株から未知のAHL分解遺伝子のクローニングを行い、取得したAHL分解遺伝子の機能解析を行うとともに、AHL分解遺伝子を用いて魚病細菌のクオラムセンシングを阻害する事による感染症予防技術を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Shewanella* sp. MIB015 株からのAHL分解遺伝子のクローニング

本実験に先駆けて、ゲノムが既に解読された *Shewanella* 属細菌である *S. oneidensis* MR-1 株には、既知のAHLアシラーゼと相同性の高い遺伝子(aculeacin A acylase; *aac*)が存在することを明らかにした。そこで、MR-1 株の *aac* 塩基配列を基に、MIB015 株の *aac* homolog を縮合PCRとインバースPCRを用いて取得を試みた。縮合PCRには、プライマーDG-F4(5'-CAAGCYGAYAACYTAGAAAGCYTWGGTTTGGTAG-3')とDG-R4(5'-TTYTCGGCRTACATAGTGTRTTGAARATRACSCC-3')、またはDG-F1(5'-TTTAACAAAGAYTTAGCNTGGACYCATACCTTCTC-3')とDG-R3(5'-AAGYTCACCGCCATCATCCAACCTNGAACRTAACG-3')を用い、DNAポリメラーゼにはGo Taq(プロメガ)を使用した。熱サイクルは、94°Cで1分間を1サイクル、94°Cで1分間、53°Cで45秒間(1サイクル毎に0.5°C下げる)、72°Cで2分間を10サイクル、94°Cで1分間、45°Cで45秒間、72°Cで2分間を25サイクルで行った。取得したPCR増幅産物は、

pGEM-T easy ベクター(プロメガ)を用いてクローニングし、BigDye Terminator v.3.1 キット(Applied Biosystems)およびABI prism 3100(Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。

次に、*aac* の周辺配列を取得するためのインバースPCRには、テンプレートとしてMIB015 株染色体を制限酵素 *DraI* で消化後、セルフライゲーションしたものを用いた。プライマーには *aac* の部分配列をもとに設計した *inv1*(5'-CCAAAGTACATAGAACGCTGAGAGTTGGCC-3')、*inv2*(5'-GCCACCTTCGCTCGCACCTTTTGGTTGGGA-3')、*inv3*(5'-TACATGGCGAGAAGTACGTCAGTGGCTCG-3')、*inv4*(5'-GCCTCAGGCATGACGGCCAAGGTTACCAA-3')を用いた。DNAポリメラーゼにはGo Taqを使用し、熱サイクルは、98°Cで5秒間、68°Cで15分間を27サイクルで行った。取得したPCR増幅産物は、pGEM-T easy ベクターにクローニングし、同様に塩基配列を決定した。MIB015 株由来 *aac* の全長はPCRにより増幅した。プライマーには、*aacMIB-F*(5'-TCGTGCATCAGGAAGCGACATACGACTATTGCTCC-3')と *aacMIB-R*(5'-CCAAGCACCTAAGTTGCACATCGACATGTCGTCG-3')を用い、DNAポリメラーゼにはGo Taq(プロメガ)を使用した。熱サイクルは、94°Cで2分間を1サイクル、94°Cで45秒間、50°Cで45秒間、72°Cで3分間を27サイクルで行った。取得したPCR増幅産物は、pGEM-T easy ベクターにクローニングし、pGMB15 と命名した。

(2) MIB015 株由来 *aac* のAHL分解能の解析

作製したpGMB15を *Escherichia coli* BL21(DE3)に形質転換し、LB培地に於て一晩前培養した。新しいLB培地に前培養液を1%(v/v)植菌し、2時間振とう培養した後にIPTGを添加し、さらに5時間振とう培養して *aac* の発現を誘導した。次に各種AHL(C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL)を最終濃度10 μMとなるように添加し、30分毎に120分まで培養上清を採取した。培養上清中のAHLの検出には、AHLに応答して紫色色素を生産する *Chromobacterium violaceum* レポーター株(CV026 株またはVIR07 株)を用いた。各時間に採取した培養上清は、AHLレポーター株含有LB寒天培地に5 μl スポットし、紫色色素の応答ゾーンの直径を測定した。残存AHL濃度は、既知濃度のAHLを用いて作製した検量線と比較することで計算した。

(3) MIB015 株由来 *aac* によるAHL分解産物の構造解析

AHL分解産物の構造解析の基質としてC10-HSLを用いた。*E. coli* BL21(DE3)のpGMB15形質転換体をIPTG存在下で24時間振とう培

養後、培養液 500 μ l を遠心分離し、生理食塩水 1 ml に再懸濁後した。C10-HSL を 500 μ M となるように添加し、37°C にて 7 時間インキュベート後、遠心分離して上清を回収した。上清はメンブレンフィルターで濾過した後、等量の 0.8 mg/ml *o*-フタルアルデヒド (OPA) 溶液と混合した。サンプルは展開溶媒に 20 mM 酢酸ナトリウム、0.009% トリエチルアミン、20% アセトニトリル、20% メタノールを用いた HPLC により、波長 340 nm の吸光度を測定することで解析した。

(4) *Vibrio anguillarum* TB0008 株へ MIB015 由来 *aac* の導入とバイオフィーム形成の解析

魚病細菌 *V. anguillarum* TB0008 株は、栃木県水産試験場においてビブリオ病で死亡したアユから単離したものをを用いた。この TB0008 株に MIB015 株由来 *aac* を導入するため、広範囲宿主ベクターである pJN105Z への *aac* のクローニングを行った。まず、両末端に制限酵素 *Sac*I サイトを有する *aac* を増幅するため、プライマー *aac*MIB-*Sac*I-F (5'-GAGCTCGAAGCGACATACGACTATTGCTCC-3') と *aac*MIB-*Sac*I-R (5'-GAGCTCAGTTGCGACATCGACATGTCGTCG-3') をを用いた PCR を行った。DNA ポリメラーゼには Go Taq を使用し、熱サイクルは、95°C で 2 分間を 1 サイクル、95°C で 45 秒間、50°C で 45 秒間、72°C で 3 分間を 27 サイクルで行った。取得した PCR 増幅産物は pJN105Z の制限酵素 *Sac*I サイトに挿入し、pJN105Zaac プラスミドとした。pJN105Zaac およびコントロールプラスミド pJN105Z は、エレクトロポレーション法により TB0008 株に導入した。

MIB015 株由来 *aac* の導入が TB0008 株の AHL 生産に及ぼす効果を調べるために、TB0008 (pJN105Zaac) 株および TB0008 (pJN105Z) 株を LB 培地にて一晩培養後、培養上清 5 μ l を VIR07 株含有 LB 寒天培地にスポットし、紫色色素の応答により培養上清中の AHL を検出した。次に、バイオフィーム形成への影響を調べるため、30°C で一晩前培養した TB0008 株を、新しい LB 培地で 100 倍希釈し、ポリプロピレン製丸底 96 穴マイクロタイタープレートに 200 μ l ずつ分注し、30°C、24 時間静置培養した。培養後、1 wt% クリスタルバイオレット溶液を加えて 15 分静置した後、蒸留水により洗浄し、エタノール 200 μ l を加えてバイオフィームを溶解した。溶解後 150 μ l をポリスチレン製平底 96 穴マイクロタイタープレートに移し、波長 570 nm の吸光度を測定することでバイオフィーム形成量を測定した。

4. 研究成果

(1) *Shewanella* sp. MIB015 株からの AHL 分解遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

ゲノムが解読されている *Shewanella oneidensis* MR-1 株の *aac* 配列を基に、PCR により MIB015 株から *aac* ホモログの取得を試みたところ、アミノ酸 856 残基からなる ORF の取得に成功した。この MIB015 株由来 *Aac* ホモログと、他の菌株の AHL アシラーゼホモログのアミノ酸配列と比較したところ、*S. oneidensis* MR-1 株の *AAC*、*Ralstonia* sp. XJ12 B 株の *AiiD*、*P. aeruginosa* PA01 株の *PvdQ* とそれぞれ 95.6%、31.9%、31.9% の相同性を有することが明らかとなった。*Shewanella* sp. MIB015 株由来 *aac* の塩基配列は国際塩基配列データベースにアクセッション番号 A B306517 で登録した。

(2) MIB015 株由来 *Aac* の基質特異性

MIB015 由来 *Aac* の AHL 基質特異性を調べるため、*Aac* を発現させた *E. coli* BL21 (DE3) を用いて各種 AHL に対する分解活性を測定した。その結果、アシル鎖が 8 以上の AHL は時間経過に伴って残存量が減少し、アシル鎖長が長くなるほど速く分解された (図 1)。アシル基の 3 位に酸素原子が置換した AHL の場合、3-oxo-C12-HSL のみが分解されたが、無置換の C12-HSL と比較して分解活性は低下していた。また、C4-HSL や C6-HSL のような短アシル鎖を有する AHL の場合は全く分解されなかった。これらの結果は、これまでに報告されている既知の AHL アシラーゼの特徴と類似していた。

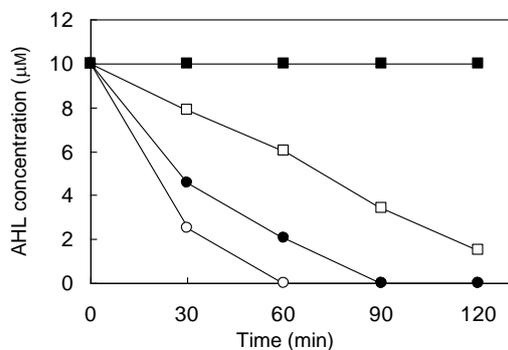


図 1 MIB015 由来 *aac* 導入大腸菌による C6-HSL (■), C8-HSL (□), C10-HSL (●), C12-HSL (○) 分解の経時変化

(3) MIB015 株由来 *Aac* の AHL 分解機構

MIB015 株由来 *Aac* による AHL 分解機構を調べるために、*Aac* を発現させた *E. coli* BL21 (DE3) による C10-HSL 分解物の構造解析を HPLC により行った。サンプルは OPA と混合し、OPA 誘導体とした後に HPLC 解析を行った。その結果、保持時間 7.5 分から 8.5 分の間に 2 つのピークが検出された。比較として、ホモセリンラクトンの OPA 誘導体についても解析を行ったところ、同じ保持時間に 2 つのピークが検出された。これらのピークに関しては、検出時間の早いピークはホモセリンラクト

ンが開裂したホモセリンであり、後に現れるピークはホモセリンラクトンであることが過去の報告から明らかになっている。また、Aac を発現させていない *E. coli* BL21 (DE3) に C10-HSL を添加したサンプルについても解析を行ったが、これらの2つのピークは観察されなかった (図2)。以上の結果より、MI B015 株由来 Aac は AHL をアシル鎖とホモセリンラクトンに分解する AHL アシラーゼであることが明らかとなった。

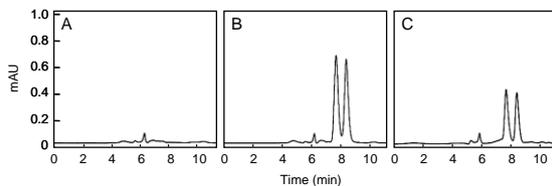


図2 MIB015 株由来 Aac による C10-HSL 分解物の OPA 誘導体に対する HPLC 解析。(A) Aac を発現させていない大腸菌サンプル (B) Aac を発現させた大腸菌サンプル (C) ホモセリンラクトン標品

(4) *Vibrio anguillarum* TB0008 株への MI B015 株由来 *aac* の導入とクオラムセンシング阻害

魚病細菌 *V. anguillarum* 株は、AHL を介したクオラムセンシングにより、プロテアーゼ生産、バイオフィーム形成など、種々の病原性因子の発現を制御していることが報告されている。そこで、MIB015 株由来 *aac* を *V. anguillarum* に導入して AHL を自己分解させることで、病原性因子の発現が抑制されるか検証を行った。まず、広範囲宿主ベクター pJN105Z に *aac* をクローニングして TB0008 株に導入し、培養上清中の AHL の存在を AHL レポーター株である VIR07 株を用いて検出した。その結果、コントロールベクターである pJN105Z を導入した TB0008 株では AHL 生産が見られたのに対し、*aac* を導入すると AHL 生産が完全に消失することが明らかとなった (図3)。

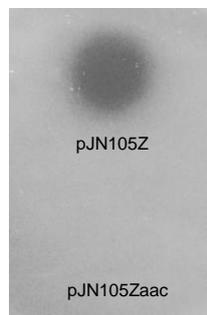


図3 pJN105Z または pJN105Zaac を導入した *V. anguillarum* TB0008 株により生産された AHL の VIR07 レポーター株による検出

次に、各菌株のバイオフィーム形成能を調

べたところ、pJN105Z を導入した TB0008 株のバイオフィーム形成量に対し、pJN105Zaac を導入した TB0008 株のバイオフィーム形成量は約 40%程度にまで低下することが明らかとなった (図4)。これは、*aac* の導入により AHL が自己分解されたことでクオラムセンシングが活性化せず、クオラムセンシングに制御されるバイオフィーム形成が抑制されたものと考えられる。

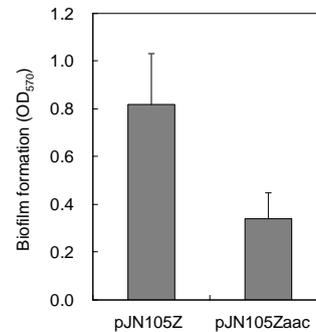


図4 pJN105Z または pJN105Zaac を導入した *V. anguillarum* TB0008 株によるバイオフィーム形成量

(5) 結言

本研究では、アユ腸内フローラ由来 *Shewanella* sp. MIB015 株から新規 AHL アシラーゼ遺伝子である *aac* のクローニングに成功し、*aac* を魚病細菌 *V. anguillarum* に導入することで、AHL 生産およびバイオフィーム形成を阻害することに成功した。本研究を通じて、環境中には *aac* 以外にも未だに発見されていない新規 AHL 分解遺伝子が数多く存在する可能性が示唆され、それらを利用することで、より効果的な細菌病制御技術に繋がることが予想される。また、AHL 分解細菌の環境中での役割を詳細に調べることで、複合微生物系における AHL の役割や、異種細菌間シグナリングの解明に繋がり、天然の複合微生物系の生態を知る上でも非常に重要であると考えられる。

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4件)

- ① T. Morohoshi, S. Nakazawa, A. Ebata, N. Kato, T. Ikeda, Identification and characterization of *N*-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015, Biosci. Biotech. Biochem., 72, 1887-1893 (2008) 査読有り
- ② T. Morohoshi, M. Kato, K. Fukamachi, N. Kato, T. Ikeda, *N*-Acylhomoserine lactone regulates violacein production

in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. FEMS Microbiol. Lett., 279, 124-130 (2008) 査読有り

- ③ T. Morohoshi, T. Shiono, K. Takidouchi, M. Kato, N. Kato, J. Kato, T. Ikeda, Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by the synthetic analogs of *N*-acylhomoserine lactone, Appl. Environ. Microbiol., 73, 6339-6344 (2007) 査読有り
- ④ 諸星知広, 加藤紀弘, 池田幸, 魚類腸内フローラにおけるクォラムセンシングシグナリング, 日本生物工学会誌, 84, 436-439 (2006) 査読なし

[学会発表] (計 12 件)

- ① 諸星知広, 深町勝正, 岡野修也, 池田幸, *Chromobacterium violaceum* を用いた新規アシル化ホモセリンラクトンレポーター株の構築と応用, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 27~29 日 (マリンメッセ福岡)
- ② 池田幸, 諸星知広, アユ腸内フローラにおける細胞間情報伝達機構の解析, 日本生物工学会 2008 年度大会, 2008 年 8 月 27~29 日 (東北学院大学)
- ③ 深町勝正, 諸星知広, 加藤紀弘, 池田幸, *Chromobacterium violaceum* の株間における紫色色素生産の Quorum Sensing による制御機構の比較解析, 日本生物工学会 2008 年度大会, 2008 年 8 月 27~29 日 (東北学院大学)
- ④ 諸星知広, 深町勝正, 加藤正史, 加藤紀弘, 池田幸, 新規アシル化ホモセリンラクトンレポーター株を用いた環境中の微生物間シグナリングの解析, 環境バイオテクノロジー学会 2008 年度大会, 2008 年 6 月 25~27 日 (文部科学省研究交流センター)
- ⑤ 諸星知広, 中澤成寿, 江幡淳, 加藤紀弘, 池田幸, アユ腸内フローラ由来アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子を用いた魚病細菌制御, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2008 年 3 月 26~29 日 (名城大学)
- ⑥ T. Morohoshi, M. Kato, K. Fukamachi, N. Kato, T. Ikeda, Long-chain acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, in contrast to well-known CV026 biosensor, 3rd ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, October 7-10, 2007 (Austin, USA)
- ⑦ 池田幸, 諸星知広, 中澤成寿, 加藤紀弘, アユ腸内細菌由来アシル化ホモセリンラクトン分解酵素によるバイオフィーム形

成阻害, Bacterial Adherence & Biofilm 第 21 回学術集会, 2007 年 7 月 7 日 (東邦大学)

- ⑧ 池田幸, 諸星知広, 江幡淳, 中澤成寿, 加藤紀弘, アユ腸内共生細菌における Quorum Sensing シグナリングの解析, 環境バイオテクノロジー学会 2007 年度大会, 2007 年 6 月 26~27 日 (大阪大学)
- ⑨ 諸星知広, 滝童内聖美, 李欺怡, 加藤紀弘, 加藤純一, 池田幸, アシル化シクロペンチルアミドによる日和見病原菌 *Serratia marcescens* の Quorum Sensing 阻害効果, 日本農芸化学会 2007 年度大会, 2007 年 3 月 24~27 日 (東京農業大学)
- ⑩ 加藤正史, 深町勝正, 諸星知広, 加藤紀弘, 池田幸, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 株における Quorum Sensing 機構の解析と長鎖 AHL バイオセンサーへの応用, 日本農芸化学会 2007 年度大会, 2007 年 3 月 24~27 日 (東京農業大学)
- ⑪ 鈴木克枝, 中澤成寿, 諸星知広, 加藤紀弘, 池田幸, アユ腸内フローラ由来アシル化ホモセリンラクトン分解酵素の機能解析, 日本生物工学会平成 18 年度大会, 2006 年 9 月 11~13 日 (大阪大学)
- ⑫ 諸星知広, 江幡淳, 中澤成寿, 鈴木克枝, 加藤紀弘, 池田幸, 複合微生物系からのクォラムセンシングシグナル分解遺伝子の単離, 環境バイオテクノロジー学会 2006 年度大会, 2006 年 6 月 27~28 日 (東京大学)

[図書] (計 1 件)

- ① 諸星知広, 加藤紀弘, 池田幸, エヌ・ティー・エス, バイオフィームの基礎と制御, 第 1 編第 1 章第 2 節「微生物間コミュニケーション (クォラムセンシング)」, 38-45 (2008)

[その他]

生物工学研究室ホームページ

<http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸星 知広 (MOROHOSHI TOMOHIRO)

宇都宮大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 90361360

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし