

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790315
 研究課題名（和文） 緑膿菌感染における菌体付着機構と代謝酵素発現制御因子との関連解析
 研究課題名（英文） Relationship between adhesion and catabolite enzyme expression factors in *Pseudomonas aeruginosa*.
 研究代表者 中田 裕二
 （NAKADA YUJI）
 藍野大学・医療保健学部・准教授
 研究者番号：60388692

研究成果の概要：緑膿菌は生活環境に広く分布し、日和見感染症や院内感染の起因菌として最も重要な細菌の一つである。消毒薬や抗生物質に抵抗性があり、基礎疾患等で感染防御能が低下した患者にとって重篤な症状を引き起こす緑膿菌は、高い環境適応能力を備える特徴がある。今回、環境変化に伴う代謝機構や形態変化を制御している調整因子について関係を解析したところ、一部機能を共有し、易感染に貢献している可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,500,000	0	2,500,000
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	150,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：緑膿菌，2成分制御，ポリアミン，線毛，病原性

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は生活環境に広く分布し、日和見感染症や院内感染の起因菌として最も重要な細菌の一つである。内毒素（LPS）やエクソトキシンAをはじめとする外毒素、エステラーゼ、プロテアーゼ等を産生し、生体障害を与えることが知られている。基礎疾患等で感染防御能が低下した多くの患者にとって、消毒薬や抗生物質に抵抗性があり重篤な症状

を引き起こす緑膿菌は、以前から注意を払わなければならない感染症として認識されていたが、近年多剤耐性緑膿菌（MDRP）の出現により、さらにその重要性が増してきている。

本菌は感染時においてバイオフィルムを形成し、薬剤抵抗を増大させるため、感染が持続・反復し完治が困難となることが知られている。感染予防にはバイオフィルム形成の解明が重要であり、近年はクォーラムセンシ

ングによるバイオフィーム形成因子の発現制御解析等が盛んであるが、未だ明らかでない点も多い。

一方、緑膿菌は環境適応能力が高い細菌としても知られている。環境中の広範囲の化合物を炭素・窒素源として利用可能な低栄養要求性や、消毒薬・抗生物質抵抗性も備えている。緑膿菌では、これらの環境変化に対し迅速に応答する機構として、“2成分制御因子による対応遺伝子の発現調整”を特に多く備えている特徴がある。2成分制御因子による環境適応は、ヒトへの感染・定着においても密接に関与していると考えられている。

2. 研究の目的

本研究は、感染に関与するバイオフィームを形成する細菌が、バイオフィーム形成時に形態変化のみならず代謝経路をも変化させているとの報告に着目した。

緑膿菌における形態変化の中で、定着因子の一つであり、バイオフィーム形成に重要な役割を果たす線毛(Type pili)は、40以上の遺伝子産物で形成され、その主要な構成成分である *PilA* の発現は、*PilS*、および *PilR* の2成分制御システムにより制御されていることが知られている。

一方、緑膿菌は一般細菌に比べ多数の代謝経路・酵素遺伝子を持ち、これらを2成分制御機構や *CRC* などにより発現調整することで、環境変化に対し効率よく応答している。炭素利用に関わる代謝制御因子 (*CbrA*、*CbrB*) および窒素利用に関わる代謝制御因子 (*NtrB*、*NtrC*) は代謝に関与する代表的な2成分制御因子であり、環境中の基質の変化に素早く応答し、適切な代謝経路を動かすことが可能である。

2成分制御機構は、環境変化を感知するセンサーキナーゼと、これによりリン酸化され

ることで活性化し、遺伝子発現を調整する応答制御因子によって構成されている。また、2成分制御因子による発現は、シグマ因子として σ^{54} を要求する特徴があり、このシグマ因子は生育にストレスがかかる場合に発現する遺伝子群との関係が深い事でも知られている。

緑膿菌の医療現場分離株における菌体附着因子の詳細、代謝酵素発現制御因子機構の詳細および形態制御と代謝制御との関係を解明することで、バイオフィーム形成をはじめとする感染関連因子を抑制し、感染を予防するための基礎的な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 線毛の発現における基質の影響

各遺伝子破壊株の作製

緑膿菌は標準菌株として PA01 株を用い、これを親株として以下の各遺伝子破壊株を作製し供試菌株とした。

2成分制御因子の応答制御因子であり、線毛の主要な構成成分である *PilA* の発現制御因子 *pilR* 破壊株、代謝酵素発現制御因子の応答制御因子である *cbrB* *ntrC* 破壊株、更に *pilR* との2重破壊株を各種抗生物質耐性遺伝子のカセットを挿入して作製した。

pilA 発現解析用プラスミドの構築

線毛の主要な構成因子である *PilA* の発現量を測定するため、*pilA* プロモーターと *lacZ* を連結させたプラスミドを構築した。PA01 ゲノムを鋳型とし、*pilA* の上流 232bp のプロモーター領域を PCR で得、この PCR 産物を *lacZ* 遺伝子を持つ大腸菌 - 緑膿菌シャトルベクター pME6013 の *HindIII* サイトに導入することで、*pilA* プロモーターアッセイ用プラスミド pINN401 を作製した。

pilA 発現測定

上述で作製した *pilA* 発現測定用プラスミ

ド pINN401 を各供試菌株に導入後、基質を変えた最小培地 (MMP 培地) で培養し *piIA* 発現量の測定を行った。

基質には各種アミノ酸および糖類を中心とした炭素・窒素源を選択した。

(2) 医療設備内分離緑膿菌における定着因子の特性

医療機関での施設内環境サーベイランスを行い、得られた分離株と、緑膿菌感染症患者由来株との間で特徴的な差があるのか、線毛運動性に注目して研究を行った。

大阪府下の A 病院において浴室、ナースステーションシンク、病室を月に一度サーベイし、医療施設内環境分離緑膿菌を得、緑膿菌感染症患者由来菌株との線毛運動性の比較を Twitching Motility (TM) により測定した。

(3) ポリアミン存在下における薬剤感受性への影響

緑膿菌は培地中へポリアミンを添加すると薬剤感受性が変化することが知られているが、その機構は未だ明らかになっていない。

緑膿菌のスペルミン、スペルミジン、ブトレシンを代表とするポリアミンの代謝は、2 成分制御因子による代謝酵素発現調整を受けている。これまでにスペルミンの代謝はオペロン構造をとり、トランスポーターを含め CbrAB の制御下に有ることを明らかにしている。今回は *cbrB* 破壊株を用い、スペルミジン輸送を止めた状態で薬剤感受性を測定することで、薬剤感受性変化作用がスペルミジンの菌体内存在下で生じる結果か、菌体外での作用かを明らかにした。

(4) 代謝酵素発現制御因子の制御機構解析

緑膿菌の代表的な代謝酵素発現制御因子である CbrAB、NtrBC は、菌体付着因子である線毛の発現制御因子 (PiIRS) と同じ 54 依存性の 2 成分制御因子であるが、その詳細な制御機構は未だ十分に解析されていない。

そこでヒスチジン代謝オペロンをモデルとした制御因子の DNA 結合解析を、フットプリンティング、プロモーターアッセイで行った。

4. 研究成果

(1) 線毛の発現における基質の影響

各遺伝子破壊株の作製

緑膿菌の標準菌株として PA01 株を用い、*piIR* 破壊株 (PA04805; *piIR::Sm/spc*)、*ntrC* 破壊株 (PA04806; *ntrC::Gm*)、*cbrB* 破壊株 (PA04807; *cbrB::Km*)、*piIR* および *ntrC* 破壊株 (PA04808; *piIR::Sm/spc*、*ntrC::Gm*)、*piIR* および *cbrB* 破壊株 (PA04809; *piIR::Sm/spc*、*cbrB::Km*) を作製した。

線毛の発現に影響を与える栄養素の検討

PA01 株および各遺伝子破壊株に pINN401 を導入した菌体について、基質を変えた培地で培養し、*piIA* 発現量の変化を測定した (表 1)。PA01 株では、緑膿菌にとって良好な炭素・窒素源であるコハク酸 + 塩化アンモニウムで培養した場合 3285 nmolONPG/min/mg-protein と最も発現活性が高い結果となった。PiIA の直接の発現調整因子である *piIR* 破壊株 (PA04805) では、コハク酸 + 塩化アンモニウムで培養した場合、PA01 株に比べ約 1/40 にまで減少し、83 nmolONPG/min/mg-protein となった。しかし、同株をグルタミン酸培地で培養した場合、214 nmolONPG/min/mg-protein と減少率がとどまり、更に *piIR* と *cbrB* との二重変異株 (PA04809) では 67 nmolONPG/min/mg-protein と、再びコハク酸 + 塩化アンモニウムレベルまで低下した。このことから、グルタミン酸培地では *cbrB* による補助的な制御を認めることが出来た。しかしながら、他の炭素・窒素源となる基質の種類を変えた培地 (各種アミノ酸、糖類) で各供試菌株を培養し、PiIA の発現量を解析した結果、培地成分による明らかな影響は見ら

れなかった。*ntrC*破壊株でも同様な結果を示し、予想された強いクロストークは確認されず、培地成分と線毛発現との連動は他の要因が主であることが示唆された。今後、他の2成分制御因子を含めた代謝との関連解析を進めていく予定である。

表1. 各応答制御因子破壊株における *pilA* 発現測定

Growth conditions	-galactosidase (nmol ONPG/min/mg-protein)			
	PAO1 (wild type)	PAO4805 (<i>pilR</i>)	PAO4807 (<i>AcbrB</i>)	PAO4809 (<i>ApilR, AcbrB</i>)
Suc+NH ₃	3285	83	2142	88
Glu	2505	214	2262	67
His	2078	226	n.g.	n.g.

Cells harboring pINN401 (*PpilA::lacZ*) were grown in MMP medium supplemented with 20mM carbon and nitrogen sources.

(2) 医療設備内分離緑膿菌における定着因子の特性

医療機関での施設内環境サーベイランスを行った結果、27菌株の医療施設内環境分離緑膿菌を得ることが出来た。

得られた医療施設内環境分離株と、患者由来株との間で特徴的な差があるのか、線毛運動性に注目して研究を行った結果、TMが高い菌株が、医療施設内環境分離株で約15%、患者由来株では約55%に見られ、線毛運動性が感染に有利に働いていることが推測された。今後、生育環境の違いにおける線毛発現能について関係解析を進めていく。

(3) 緑膿菌のポリアミン存在下における薬剤感受性への影響

cbrB 破壊株によるスベルミジンの輸送を止めた菌株での薬剤感受性変化を検討した結果、MICが1/16まで低下し、野生株と変わらぬ感受性変化を示した(表2)よって、ポリアミン添加による薬剤感受性変化は、ポリアミンの菌体内への移行に伴う現象ではなく、菌体外に存在するだけで生じることを明らかにした。今後、線毛を含めた菌体外の

ポリアミンから直接影響を受ける箇所の特定について定着因子を中心に解析を進めていく。

表2. *cbrB*破壊株における薬剤感受性変化

Growth conditions	MIC (μg-carbenicillin/ml-medium)	
	PAO1 (wild type)	PAO4507 (<i>AcbrB</i>)
MMPE	64	64
MMPE + Spd	4	4

Spd: Spermidine (20 mM)

(4) 代謝酵素発現制御因子の制御機構解析
緑膿菌のヒスチジン代謝オペロンをモデルとした2成分制御因子の応答制御因子によるDNA結合解析を行った結果、*hutU*転写開始点の190-220上流にNtrCとの特異的な結合領域があること明らかにした。今後、CbrBでの解析を継続していく予定である。

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1件)

Nakada Y. and Matsusita T., Twitching motility prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in medical facilities, Aino Journal, 査読有, Vol.7, In press, (2008)

[学会発表](計3件)

中田裕二、北村多見、佐藤瞳、緑膿菌の線毛発現と代謝酵素発現制御因子との関連解析、日本農芸化学会、2009年度大会 大会要旨集 p.276、(2009年3月・マリンメッセ福岡)

中田裕二、高木晶子、大澤仲昭、ポリアミンによる *Pseudomonas* 属の薬剤感受性への影響、日本ポリアミン研究会、23回研究発表会 大会要旨集 p.16、(2009.1)

月・藍野大学)

中田裕二、伊藤義文、緑膿菌の2成分制御因子によるヒスチジン代謝制御機構解析、日本細菌学会 2006年度 関西支部会講演要旨集 p.17、(2006.10月・大阪医科大学)

〔図書〕(計1件)

Yoshifumi Itoh Takayuki Nishijyo and Yuji Nakada, Pseudomonas Volume 5, A Model System in biology: Histidine catabolism and catabolite regulation. P371-395, Springer, London, (2007)
ISBN 978-1-4020-6096-0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 裕二 (NAKADA YUJI)

藍野大学・医療保健学部・准教授

研究者番号：60388692

(2) 研究協力者

伊藤 義文 (ITO YOSHIFUMI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70135127