

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580101
 研究課題名（和文）マルチ遺伝子型Sha対向輸送体が定常期移行に関わる分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文）Analysis of the multigene-type Na⁺/H⁺ antiporter (Sha) which is involved in the transition to the stationary phase in bacteria.
 研究代表者
 古園 さおり（KOSONO SAORI）
 独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員
 研究者番号：90321760

研究成果の概要：

マルチ遺伝子型 Na⁺/H⁺ 対向輸送体である Sha 輸送体は、緑膿菌の病原性に関与する。そのメカニズムを定常期移行との関わりから明らかにすることを目標とした。Sha 欠損株では、定常期シグマ因子 RpoS 及びクオラムセンシングの活性化が NaCl 依存的に阻害された結果、その制御下にある病原性遺伝子の発現も抑制されることを明らかにした。このことは、緑膿菌 Sha 欠損株の病原性の低下に寄与していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物学

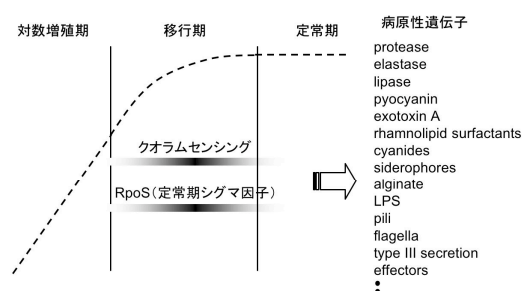
1. 研究開始当初の背景

Sha輸送体は、7ないしは6つの遺伝子クラスターにコードされる、構造的にユニークな特徴を持つマルチ遺伝子型Na⁺/H⁺対向輸送体である。Sha輸送体の欠損は、他のイオン輸送体には見られない著しいpHないしは塩感受性をもたらすことから、細菌のpH/塩環境適応に重要な役割を果たしている。これまでに、Sha輸送体は枯草菌(*Bacillus subtilis*)や緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)のNa⁺恒常性を担う主要な因子である

ことを明らかにしている。枯草菌のSha欠損株は、低濃度NaClの存在により孢子形成がほぼ完全に欠損する。その原因を追求したところ、孢子形成開始期（移行期）の転写を司るシグマ因子であるSigHやSigBの活性化がNaCl依存的に阻害されることを見いだした。このことは、Sha輸送体による厳密な細胞内Na⁺調節が定常期転写を司るシグマ因子の活性化、ひいては定常期移行に重要であることを示唆している。

日和見感染菌として知られる緑膿菌は、

嚢胞性繊維症や重度な免疫疾患を持つ患者の病状悪化と関わっており、また代表的な院内感染菌でもある。細菌が宿主に侵入して感染を成立させていく過程では、pHや塩濃度などの環境変化に適応していくことが必要となる。そうした観点から、Na⁺恒常性の中心的役割を担うSha輸送体が感染因子になりうるのではないかと考え、実際にマウスを用いた感染実験において、Sha輸送体が緑膿菌の病原性に必要であることを明らかにした。ところで、緑膿菌の病原性遺伝子は定常期に誘導されるものが多く、その誘導には定常期シグマ因子RpoSとクオラムセンシングが関与する。枯草菌ではSha輸送体が定常期移行と関連したことを考慮し、緑膿菌においてもSha輸送体欠損株では定常期移行が阻害されており、その結果として病原性が低下した可能性が考えられた。以上をまとめると、緑膿菌と枯草菌では共通して定常期移行におけるSha輸送体の重要性が認識されつつあるが、その具体的な分子メカニズムは明らかではなかった。



緑膿菌における病原性遺伝子の発現誘導機構

2. 研究の目的

本研究では、定常期移行という観点から、Sha輸送体が緑膿菌の病原性に関わるメカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には、*lacZ*リポーターアッセイやGeneChip解析により、Sha欠損株においてNaCl依存的に観察される定常期の遺伝子発現パターン変化(病原性遺伝子を含む)を検討する。枯草菌では、定常期特異的シグマ因子の活性化がSha欠損変異の影響を受けることが分かっている。そこで緑膿菌でも定常期シグマ因子に注目して、RpoSの活性化制御の詳細なメカニズムの解明と、Sha欠損変異がどの部分に影響を及ぼしているかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株と培養条件

Pseudomonas aeruginosa PAO1 株を野生株として用いた。Sha 欠損株として TR18 株 (*sha* 遺伝子のうち、最大である *shaAB* 遺伝子を Sm^R カセットを用いて破壊)を用いた。培養温度は 30°Cで行った。

(2) GeneChip 解析

野生株及び Sha 欠損株を LB 培地で培養し、対数期の終点 (OD₆₀₀ が 1.0~1.3、培養開始後約 4 時間) で終濃度が 0.3 M となるように NaCl を添加し、さらに 2 時間培養した菌体から RNA を調製した。対照実験には、等量の水を加えた。12- μ g の精製 RNA を用いて逆転写反応により cDNA 合成を行い、アフィメトリクス社の *P. aeruginosa* GeneChip にハイブリさせた。各サンプルにつき 2 回のハイブリ実験を行い、4 組の比較データのうち 3 組で発現レベルの増加あるいは低下の傾向が一致したものをポジティブとした。

(3) エラスターゼ活性、ピオシアニン産生、バイオフィームアッセイ

エラスターゼ活性測定には、30°Cで 12 時間培養した上清を 0.45- μ m フィルターでろ過したサンプルを用いた。0.05-ml のろ過サンプルと 2 mg/ml の elastin congo-red を 37°C で 3 時間反応させ、反応停止後、上清の A₄₉₅ を測定した。ピオシアニン産生は、0.5-ml の上記のフィルターろ過サンプルに対し、0.3-ml のクロロホルムで抽出を行い、0.1-ml の 0.2 N HCl を添加して発色後の A₅₂₀ を測定した。バイオフィームアッセイは、NaCl を含まない LB 培地で培養した菌体を同じ培地で OD₆₀₀ が 0.1 となるように調製し、90- μ l の各濃度 NaCl を含む培地と 10- μ l の上記の菌体懸濁液を 96-well プレートで良く混合し、30°Cで 12 時間培養した。200- μ l の 0.1%クリスタルバイオレットを加えて室温で 1 時間染色し、良く洗浄したあと、95%エタノールで溶出して A₅₉₅ を測定した。

4. 研究成果

(1) 定常期シグマ因子RpoSの発現に関する検討

緑膿菌Sha欠損株は、0.3 M NaClを含むLB培地で野生株と同等の対数増殖を示すが、対数期からはずれるとOD₆₀₀の増加が見られなくなる。この条件下で、定常期シグマ因子RpoSの発現を転写及び蛋白レベルで調べた。Sha欠損

株では、*rpoS-lacZ*はポスト対数増殖期において誘導されず、またRpoSタンパク質の蓄積も認められなかった。NaClを含まないLB培地で培養し、対数増殖の終点で0.3 M NaClを添加しても同様の阻害効果が認められたが、その2時間後の添加では、もはや阻害効果は認められなかった(図1)。0.3 M KClでは阻害効果は認められなかった。RpoD発現量には影響が無かったことから、NaClの影響はRpoS特異的であると考えられた。Sha欠損株に対し、*sha*クラスター遺伝子をプラスミドにおいて相補させると、ポスト対数期のOD₆₀₀上昇、*rpoS-lacZ*発現、RpoSタンパク質の蓄積が全て野生株と同等に回復したことから、上記の表現型はSha欠損によるものと考えられた。これらの結果から、Sha輸送体はNaCl存在下でのRpoS誘導に必要であると考えられた。

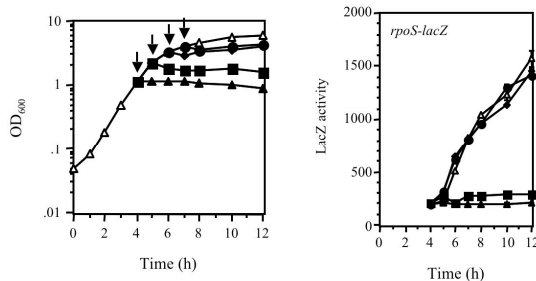


図1 Sha欠損株での*rpoS-lacZ*発現に与える0.3 M NaCl添加効果。(左)増殖曲線、(右)*rpoS-lacZ*。△: NaCl無添加、▲: 対数増殖期の終点で添加、■: 終点より1時間後に添加、◆: 終点より2時間後に添加、●: 終点より3時間後に添加。

(2)クオラムセンシング(QS)の誘導に関する検討

緑膿菌における病原性遺伝子の発現誘導には、定常期シグマ因子RpoSとともに、クオラムセンシングであるLas及びRhlシステムが重要な役割を果たしている。緑膿菌Sha欠損株では、*rpoS-lacZ*の場合と同様、0.3 M NaClの添加により*lasR-lacZ*及び*rhIR-lacZ*の誘導が著しく阻害された。*rpoS*の場合と同様に、阻害効果を示すNaCl添加のタイミングを検討したところ、いずれも対数増殖期の終点の添加で完全な阻害効果があり、さらに2時間後のNaCl添加では阻害効果はあまり見られなかった。これらの結果は、(1)の結果と併せて、増殖定常期への移行期に起こるRpoS及びQSの活性化には、NaClの影響を受けやすい反応もしくは分子メカニズムが関与していることが示唆された。この傾向は枯草菌の場合と一致して

いた。

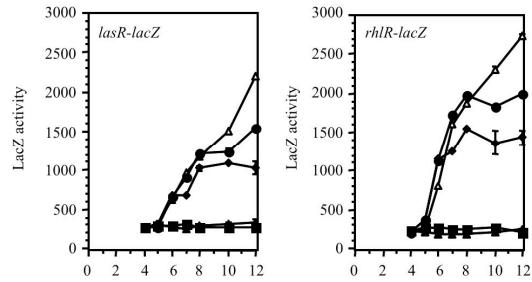


図2 *lasR-lacZ* (左) 及び *rhIR-lacZ* (右) 発現に与える0.3 M NaCl添加効果。△: NaCl無添加、▲: 対数増殖期の終点で添加、■: 終点より1時間後に添加、◆: 終点より2時間後に添加、●: 終点より3時間後に添加。

(3) GeneChip解析

Sha欠損が定常期の遺伝子発現に与える影響を網羅的に調べるため、GeneChip解析を行った。野生株及びSha欠損株をNaClを含まないLB培地で培養し、対数増殖期の終点で0.3 M NaClを添加後、さらに2時間培養した菌体より回収したRNAサンプルを用いた。野生株と比較して1966の遺伝子の発現に変化が認められ、1163の遺伝子が野生株と比べて低下、803の遺伝子(12のtRNAを含む)が上昇していた。予想通り、RpoS及びQS制御下にある多数の遺伝子の転写が低下していることを見いだした。その中には(リポ)多糖合成、走化性、運動性と付着、分泌性酵素や毒素等の病原性遺伝子が含まれていた。

また、56のうち54のリボソームタンパク質遺伝子及び12のtRNA遺伝子の発現上昇が認められ、一方で、定常期リボソームの貯蔵に関わる*rmf*の発現低下が認められた。これらの結果は、定常期に移行しても翻訳機能が活発化したままであることを示唆している。転写装置については、主要シグマ因子をコードする*rpoD*、熱ショックシグマ因子をコードする*rpoH*の発現が上昇しており、それに対応して*rpoH*レギュロンである*hslVU*、*dnaKJ-grpE*、*ftsH*、*groEL*の発現も上昇していた。一方、*rpoS*の発現低下はGeneChip解析でも確認できた。

(4) エラスターゼ活性、ピオシアニン産生、バイオフィーム形成の検討

GeneChip解析により、Sha欠損株では病原性遺伝子の発現がNaCl依存的に低下していることが確認できたので、それらの病原性遺伝子

が関与するエラスターゼ産生、ピオシアニン産生、バイオフィーム形成について検討した。

エラスターゼ及びピオシアニン生産はそれぞれ、LasR と RhlR が支配する QS の制御下にあることが知られている。0.3 M NaCl 存在下での Sha 欠損株のエラスターゼ活性は、野生株に比べて著しく低下していた (図 3)。ピオシアニン産生について、LB 培地では野生株でも微量な産生しか認められなかったが、FAB 培地では 0.3 M NaCl 存在下で野生株に比べて産生が著しく阻害されていた。いずれも同モルの KCl では阻害効果は認められなかった。バイオフィーム形成には QS 及び RpoS の両方が関与することが知られている。Sha 欠損株のバイオフィーム形成は、0.2 M 以上の NaCl により阻害された (図 3)。以上の結果は GeneChip 解析結果と良く一致しており、NaCl 存在下では Sha 欠損株の RpoS 及び QS 活性化が阻害され、その制御下にある病原性遺伝子の産生やバイオフィーム形成が著しく阻害されることを示すことができた。

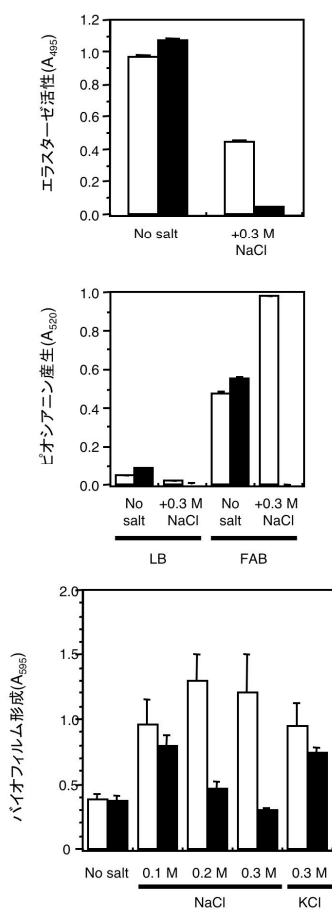


図3 野生株とSha欠損株のエラスターゼ活性

、ピオシアニン産生とバイオフィーム形成。

ここまでの結果は、緑膿菌が土壌細菌であることを考慮して、培養温度を30°Cで行っていた。しかし感染が起こる生体内環境を考慮して、37°C培養で同様の実験を行ったところ、これまで観察されていた増殖、*rpoS-lacZ*発現、病原性因子産生、バイオフィーム形成に対する0.3M NaClの阻害効果が見えなくなった。37°C培養では30°Cに比べてSha欠損株のNaCl感受性が緩和されており、0.4 MまでNaClを添加しないと阻害効果が観察されないことが分かった。30°C培養でのNaCl添加によるSha欠損株の定常期移行阻害は、再現性を確認しており間違いない。しかしながらSha欠損株の定常期移行阻害は、生体温度(37°C)では必ずしも病原性低下の主要な原因とはならない可能性が出てきた。今後、温度と緑膿菌の耐塩性、RpoS及びQS活性化との関係について明らかにすることが、課題として残された。

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1件)

- ① Kajiyama, Y., Otagiri, M., Sekiguchi, J. Kosono, S., Kudo, T. Complex formation by the *mrpABCDEF* gene products, which constitute a principal Na⁺/H⁺ antiporter in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 189 7511-7514 (2007) (査読有)

[学会発表] (計1件)

- ① 古園 さおり Disruption of a multigene-type Na⁺/H⁺ antiporter (Sha) causes the defect in the expression of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa*. ASM conference on *Pseudomonas* 2007 2007年8月28日シアトル(アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古園 さおり (KOSONO, Saori)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：90321760