

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790079
 研究課題名（和文）
 緑膿菌多剤排出系 MexXY 抗菌薬誘導性に関する遺伝子 PA5471 に関する研究
 研究課題名（英文）
 Characterization of the PA5471 gene involved in the antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*.
 研究代表者
 森田 雄二（MORITA YUJI）
 愛知学院大学薬学部・講師
 研究者番号：00454322

研究成果の概要（和文）：緑膿菌の主要な抗菌薬耐性因子 MexXY 多剤排出系は、リボソームを標的とする抗菌薬によって誘導される機能未知 PA5471 遺伝子産物を介して誘導される。PA5471 の約 250 塩基対上流領域に、13 アミノ酸残基の読み枠（PA5471.1）が存在し、その翻訳抑制が PA5471（すなわち MexXY）の転写誘導に関与する。PA5471.1 の転写終結が Rho 因子依存的事であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The multidrug efflux system MexXY which is one of major antimicrobial resistant determinants in *Pseudomonas aeruginosa* is induced via the PA5471 gene product which is inducible by ribosome-targeting antimicrobial agents. A 13-amino-acid open reading frame (PA5471.1) is c.a. 250 bp upstream of the PA5471 coding sequence and its translational repression leads transcriptional inducibility of the PA5471 (or MexXY). The transcriptional termination of the PA5471.1 was implied to be the Rho-factor dependent.

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：遺伝子・抗生物質・細菌

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は本能的に抗菌薬に感受性が低く、日和見感染症・菌交代症の代表的な起因菌である。特に抗緑膿菌薬にも耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌に対する治療薬は、ほとんどないのが現状である。

緑膿菌の主要な抗菌薬耐性因子の1つである多剤排出系 MexXY はリボソームを標的とする抗菌薬によって誘導される。最近私は、同じくリボソームを標的とする抗菌薬によって誘導される PA5471 遺伝子産物が、MexXY 誘導性に関与することを発見した。

しかしながら PA5471 は未解析タンパク質ファミリー0027 に属する機能未知タンパク質であり、PA5471 遺伝子産物の機能は良く分かっていない。

2. 研究の目的

PA5471 遺伝子産物の機能及び遺伝子発現に関して解析し、新しい知見を得ることにより、緑膿菌の MexXY による抗菌薬耐性機構を理解する。

3. 研究の方法

MexXY 発現プラスミド pSport1::*mexXY* を主要な多剤排出系遺伝子 *acrB* の欠損した大腸菌変異株 KAM3 に導入した形質転換株を用いてメタボローム解析を行った。大腸菌から Hanahan 法によりコンピテント細胞を調製し、形質転換することによりプラスミドを導入した。メタボローム解析は、代謝産物を調製し、CE-MS (キャピラリー電気泳動 - 質量分析計) で解析した。CE-MS 解析は、慶応義塾大学先端生命科学研究所の首我教授・斉藤講師にお願いした。代謝産物調製法は斉藤講師の確立した方法に従って行った。

PCR により緑膿菌 PA01 株染色体 DNA から PA5471 のコード領域を増幅した DNA 断片をプラスミド pET23a(+) に導入し、N 末端に 6 つの連続したヒスチジン残基を持つ PA5471 (以下 PA5471-his) を構築し、大腸菌 BL21(DE3) /pLysS に導入した。DNA ポリメラーゼとして KOD (東洋紡) を用い、アプライドバイオシステムのサーマルサイクラー 2720 を用いて PCR を行った。プライマーは Integrated DNA Technologies, Inc. によって合成された。大腸菌 BL21(DE3) /pLysS は外来性タンパク質を分解するプロテアーゼ OmpT が欠損し、さらに pET23a の遺伝子発現制御を厳密に行うことが可能なため、タンパク質の大量発現に適した大腸菌変異株である。塩基配列決定により PCR エラーがないことを確認した。塩基配列は Pseudomonas genome project (www.pseudomonas.com) で利用できる PA01 株のものと比較した。塩基配列決定はキャピラリー電気泳動装置ジェネティックアナライザー 3130 (アプライドバイオシステム) を用いて BigDye® Dye Terminator 法で行った。形質転換株の全タンパク質分画をソニケーション法により調製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で PA5471-his タンパク質を分離し、抗 6X His 抗体により検出した。抗 6X His 抗体は医学生物学研究所より購入したものをを用いた。

PCR により緑膿菌 PA01 株及び PA01 株由来で PA5471.1 の 3 番目グルタミン残基にアンバー変異の入った変異株から、約 370 塩基対

からなる PA5471 上流領域 (この領域に PA5471 及び PA5471.1 自体のプロモーターは含まない) を増幅し、T7 プロモーターを持つプラスミド pSport1 の T7 プロモーター下流に導入した。塩基配列決定により PCR エラーがないことを確認した。こうしてできたプラスミドを制限酵素 *EcoRI* と *BamHI* で消化し、アガロースゲル電気泳動で各断片を分離し、T7 プロモーターと PA5471 上流領域からなる DNA 断片を抽出し、Wizard® SV Gel & PCR Clean-up System (プロメガ) を用いて精製した。精製したものを MEGAscript® (Ambion) を用いて添付文書に従って *in vitro* 転写アッセイを行った。RNeasy® Plus Mini Kit (キアゲン) を用いて RNA を精製し、ホルムアルデヒドゲル電気泳動により転写産物を観察した。

緑膿菌 PA01 株染色体 DNA から PCR により、*mexXY* 遺伝子の上流逆向きに存在するリプレッサー遺伝子 *mexZ* 及び *mexZ* と *mexXY* の遺伝子間を含む領域を増幅し、MexXY 発現プラスミドに導入し、*mexZ-mexXY* を含むプラスミドを構築した。プラスミドの不和合性を利用して、*mexZ-mexXY* を含むプラスミドと PA5471 を含むプラスミド両方を、大腸菌変異株 KAM3 に導入した。リボソームを標的とする抗菌薬であるエリスロマイシンの最小生育阻止濃度を測定し、MexXY 依存的な活性が PA5471 の発現により上昇するかを観察した。病原性大腸菌 CFT0073 株の PA5471 ホモログも PCR によりクローニングし、ホモログ遺伝子が PA5471 同様に MexZ の MexXY 転写抑制を解除するか否か検討した。

DNA 解析ソフト DNAMAN ver. 4.11 を用いて PA5471 上流領域を解析し、読み枠の有無、GC 含量などを解析した。プロモーター配列の予測は Berkeley Drosophila Genome Project の Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) を用いて行った。

緑膿菌細胞内で厳密な遺伝子発現制御可能な系を構築した。ラクトースオペロンのリプレッサー LacI の改良型 LacI^q と改良型 T7 プロモーターからなる DNA 領域 (以下 *lacI^q-P_{T7}*) を、緑膿菌インテグレーションベクタープラスミド mini-CTX-1 に導入した (pYM101 と命名)。さらに pYM101 に ガラクトシダーゼ LacZ のコード領域を組みこんだ。こうして得られたプラスミドを用いて *lacI^q-P_{T7}-lacZ* をインテグレーションにより緑膿菌染色体上の部位特異的組換え部位 *attB* に組み込んだ。インテグレーションはインテグレーションプラスミドを接合伝達により緑膿菌 PA01 株に導入し、プラスミドの抗菌薬耐性マーカーであるテトラサイクリン存在下で培養することにより行った。緑膿

菌のガラクトシダーゼ活性を測定し、*lacI^q-P_{T7}-lacZ*を持つものとプロモーターのない *lacZ* を持つ緑膿菌のものと比較した。また誘導剤である IPTG (Isopropyl

D-1-thiogalacto- pyranoside) の影響を観察した。ガラクトシダーゼ活性は Miller の方法を用いて行った。

rho 遺伝子を pYM101 に組み込み (*lacI^q-P_{T7}-rho*) さらにインテグレーションで緑膿菌の *attB* に組み込んだ。*lacI^q-P_{T7}-rho* を持つ緑膿菌からオリジナルの *rho* 遺伝子を *sacB* を用いた相同組換え法により IPTG 存在下で破壊した。

こうして得られた緑膿菌の *rho* 遺伝子条件的破壊株を、L 寒天培地 37 好気性条件下で生育させ、18 時間後及び 36 時間後の結果を観察した。さらに L 液体培地 37 好気性条件下で振とう培養し、2 時間おきに 8 時間後まで濁度を測定することにより観察した。またそれらの生育における IPTG の影響も観察した。

緑膿菌 *rho* 因子条件的遺伝子破壊株に、PA5471 の転写リポータープラスミドを導入し、PA5471 の転写における *rho* 因子の影響を観察した。

4. 研究成果

メタボローム解析の結果、MexXY 発現によりホモセリンやメチオニンなどの細胞内蓄積量が減少していた。それらは MexXY の基質として考えられる。リボソームを標的とする抗菌薬によりタンパク質合成が阻害されると、緑膿菌細胞はアミノ酸系の化合物を細胞内に蓄積させ、それらが細胞毒性を引き起こす危険性を回避させるため、MexXY が発現誘導され、それらを排出していると考えられる。抗菌薬現在 PA5471、MexXY、MexZ に関する一連の緑膿菌遺伝子破壊株を用いて解析を行っている。

PA5471-his の大量生産用プラスミドを構築した。IPTG の添加により大量の PA5471-his の産生が確認された。さらに PA5471-his の精製の最適条件について検討する必要がある。

PA5471 の上流領域 (約 350 塩基対) を T7 プロモーターの下流に導入し、*in vitro* 転写システムを構築した。その結果 T7 プロモーター依存的な転写活性が観察された。現在それに *in vitro* 翻訳システムを組み合わせた *in vitro* 転写翻訳共役システムを構築したい。

緑膿菌細胞内だけでなく、大腸菌細胞内でも PA5471 依存的にリプレッサー MexZ を介した排出系 MexXY の転写抑制解除が起こり、

MexXY による抗菌薬耐性が観察された。したがってリボソームを標的とする抗菌薬によって誘導される PA5471 を介した MexXY 誘導性を大腸菌細胞内で再現することに成功した。興味深いことに、病原性大腸菌の PA5471 ホモログでは、MexXY 誘導性は観察されなかった。その理由は現時点では良く分かっていない。

約 200 塩基対からなる PA5471.1 と PA5471 の遺伝子間領域の塩基組成は、GC 含量は 65% である。この値は、緑膿菌 PA01 ゲノムの GC 含量 66.6% と同程度であるが、さらに詳細に見るとシトシン基の割合が 41% と多く、逆にグアニン基が 24% と少なく、PA5471.1 と PA5471 の遺伝子間領域の塩基組成が偏っていることが分かった。この特徴は、大腸菌の Rho 転写終結因子依存的な配列の特徴と一致している。緑膿菌の Rho 因子に関する実験的知見は全くないが、緑膿菌ゲノム上に大腸菌の Rho 因子と 92% の類似性を示す遺伝子 PA5239 が存在する。

PA5471.1 の転写終結が Rho 因子依存的であることを実験的に証明するために、PA5239 遺伝子破壊株を構築することが有用である。しかしトランスポゾンライブラリーには PA5239 遺伝子破壊株が存在しないこと、大腸菌の *rho* 遺伝子が生育に必須であることから、PA5239 遺伝子も生育に必須な遺伝子である可能性が高い。そこで Rho 因子など緑膿菌の必須遺伝子を条件的に破壊する系を開発し、PA5239 条件的遺伝子破壊株などを構築した。この株では IPTG などの誘導剤が存在しないと PA5239 の遺伝子発現がほぼ 0 となり生育しなかった。なお、Rho 因子のような必須遺伝子を破壊する系は緑膿菌ではほとんどなく、緑膿菌の必須遺伝子条件的破壊株構築法を確立したことに関して、微生物学の方法論に関する国際ジャーナルに投稿し受理された。現在 PA5471.1 の転写終結が Rho 因子依存的であるかどうか検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Yuji Morita, Shi-Ichiro Narita, Junko Tomida, Hajime Tokuda, Yoshiaki Kawamura, Application of an inducible system to engineer unmarked conditional mutants of essential genes of *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Microbiological Methods, 査読有り, 印刷準備中

[学会発表](計1件)

森田 雄二ら、緑膿菌必須遺伝子条件的破壊株構築法の開発、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27 日、横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 雄二 (MORITA YUJI)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：00454322

(1) 研究協力者

Poole, Keith

カナダクィーンズ大学・微生物部門・教授

Schweizer, Herbert

米国コロラド州立大学・微生物学部門・教授

Suh, Sang-Jin

米国 Auburn 大学・生物科学部門・準教授

斉藤 菜摘

慶應義塾大学・先端生命科学・講師