

機関番号：36301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790124

研究課題名 (和文) 日和見感染菌の病原性発現に関する鉄獲得機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis on iron acquisition mechanisms and pathogenicity of opportunistic pathogens

研究代表者

舟橋 達也 (FUNAHASHI TATSUYA)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：60343646

研究成果の概要 (和文)：

日和見感染菌の 1 つに分類されている *Acinetobacter baumannii* は鉄欠乏条件下、*acinetobactin* と命名されたシデロフォア (低分子量鉄輸送キレーター) を産生する。*Acinetobactin* は三価鉄と結合し、*BauA* と命名された特異的な外膜受容体を介して菌体内部へ鉄を輸送する。本研究で、本菌が *acinetobactin* を介した系だけでなく、鉄源として他の菌種が産生するシデロフォアを利用して増殖することを明らかにした。また、細菌によるバイオフィーム形成は細菌感染で有利に作用すると言われており、鉄と *acinetobactin* 濃度が本菌のバイオフィーム形成に影響を与えていると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

In response to iron starvation, nosocomial *Acinetobacter baumannii* produces the siderophore, *acinetobactin*, and can transport *acinetobactin*-bound iron into the periplasm via its specific outer membrane receptor, *BauA*. In this study, I showed that *A. baumannii* was also capable of utilizing a variety of xenosiderophores produced by other microorganism as an iron source. Biofilms consist of bacteria attached to surfaces and encased in a polymeric matrix. I showed that iron and *acinetobactin* appear to mediate the control of biofilm formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：衛生微生物学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：鉄、シデロフォア、細菌、日和見感染菌、*acinetobactin*、バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

鉄 (イオン) は必須元素であり、生物は必ず外界から獲得しなければならない。しかし、好気性環境下では鉄は水に不溶性の三価鉄水酸化物として存在し、また私たちの体内ではタンパク質に強固に結合した鉄として、あ

るいはヘム鉄として存在し、細菌が自由に利用できる遊離の鉄は皆無に等しい。それゆえ、このような鉄制限に打ち勝って鉄を獲得する能力は細菌の増殖を促し、その結果、宿主生体内で病原性を発現することになる。すなわち、鉄獲得能力は病原性発現の必要条件の

一つである。多くの病原細菌は鉄欠乏ストレスに応答し、宿主の鉄結合蛋白質と効果的に競合するシデロフォア（低分子量鉄輸送キレーター）を産生し、鉄獲得を図る。さらに他菌種の産生するシデロフォアを横取りする能力（鉄の海賊行為）を持っており、これは厳しい生態系での生き残り戦略の一つと考えられている。他方、鉄欠乏ストレスは毒素や酵素などの病原因子をコードする遺伝子やある種の転写因子遺伝子の発現を促進させるシグナルとして機能する。鉄制限ストレスに応答して鉄獲得系遺伝子群や病原因子遺伝子が同調的に発現することは、鉄レギュロンと呼ばれ、この鉄レギュロンの統括的転写制御蛋白質として **Fur** (**Ferric uptake regulation**)が知られている。**Fur**は鉄豊富条件下では二価鉄と複合体を形成し、鉄制御遺伝子のプロモーター領域に存在する **Fur box** に結合し、当該遺伝子の転写を抑制する。しかし、鉄欠乏条件ではこれらの転写抑制は解除されると同時に、他の転写調節因子が関与して鉄制御遺伝子の転写が活性化される場合も知られており、細菌は鉄欠乏ストレスを即応的に感知して、その生存を図るため種々の因子を発現し対応している。*Acinetobacter* 属菌は重い基礎疾患を有し人工呼吸器を使用している患者において肺炎、血管カテーテルを挿入している患者において菌血症を起因することがあり、外傷感染、手術部位感染、尿路感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、腹膜炎などの起因菌としても分離されている。そのうち、臨床現場で最も高頻度で分離される *A. baumannii* は従来より各種の抗菌剤に多剤耐性を示す傾向があり、臨床的に問題となっている。*A. baumannii* は、染色体性のセファロsporinを産生して多くのセファロsporinに本来的な耐性を示し、薬剤修飾酵素の産生や薬剤透過性の低下によりアミノグリコシド、フルオロキノロンなどに多剤耐性を示すことが知られている。本菌には最近、様々なβ-ラクタマーゼをプラスミド依存性に産生し、広域セフェム系やセファマイシン系、カルバペネム系抗生物質に耐性を示すものが各地から報告され、イミペネムなどのカルバペネムに耐性を獲得した耐性菌の出現とそれによる院内感染の発生に対し警戒が必要になっている。日本を含む世界各地で高度耐性菌の出現が報告されているにもかかわらず、本菌がどのようにしてヒト体内に定着、増殖し、病原性を示すようになるのかについての詳細なメカニズムは未だ明らかにされておらず、特に生存、増殖に必須な鉄の獲得機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

尿路感染やカテーテル感染の原因菌として分離され、抗生物質多剤耐性化が問題となっ

ている *A. baumannii* は鉄制限ストレスに応答して鉄獲得系を発現する。本菌は鉄欠乏状態に反応して **acinetobactin** と呼ばれるシデロフォアを産生する(Yamamoto et al., Arch. Microbiol., 162, 249-254 (1994))。Acinetobactin は鉄結合蛋白質であるトランスフェリンやラクトフェリンから鉄を奪取し(Yamamoto et al., J. Health Sci., 45, 297-302 (1999))、三価鉄と acinetobactin との複合体を形成して、特異的な外膜受容体 (**BauA**)を介して取り込むと考えられていた。そこで、所属する研究グループでは acinetobactin 生合成に関与する遺伝子群を単離し、その塩基配列を決定した(Mihara et al., Microbiology, 150, 2587-2597 (2004))。16 種の鉄獲得に関与すると思われる遺伝子の存在とそれらの遺伝子が全て転写レベルで **Fur-Fe²⁺**による負の制御を受けることを明らかにした。その中には他の細菌で明らかになっている三価鉄とシデロフォアとの複合体に対する受容体と相同性を示す **BauA** が存在しており、78 kDa の鉄制御外膜蛋白質の N 末端アミノ酸配列と完全に一致する領域を同定し、acinetobactin に対する外膜受容体であることを挿入変異株を用いた解析により明らかにした。本研究では鉄欠乏条件下でのみ発現している 5 種の鉄制御外膜蛋白質のうち、**BauA** 以外の 4 種についてその機能解明を目指す。そのうち、1 種については既知のシデロフォア受容体に対する相同性が既に明らかにされており、外因性シデロフォア利用能に関与する可能性があり極めて興味深い。また、シデロフォアと病原性発現との関連性について acinetobactin 生合成酵素遺伝子について挿入変異株を作製し、バイオフィーム形成を指標として定着能への影響を評価し、本菌における鉄獲得系の病原学的意義を究明する。

3. 研究の方法

A. baumannii ATCC19606 株を 200 μM もしくは 225 μM dipyriddy (合成鉄キレーター) を添加して鉄欠乏条件下とした LB 培地で培養し、sarcosyl 不溶性外膜蛋白質を調製する。一次元電気泳動において 5 種類の鉄制御外膜蛋白質を確認している。しかし、これら 5 種類の鉄制御外膜蛋白質は分子量が 75 ~ 80kDa の範囲にあり、一次元電気泳動装置による分離には限界がある。そこで、二次元電気泳動装置を用いて明確に分離した。また、本菌自身が産生するシデロフォアだけでなく、他菌種で産生されるシデロフォア (enterobactin, aerobactin, coprogen, ferrichrome など) を添加して利用能を調べた。5 種類の鉄制御外膜蛋白質については N 末端アミノ酸配列を決定し、FURTA 法により単離したシデロフォア受容体遺伝子から推測

される N 末端アミノ酸配列と一致するものを検索した。一致するものについては全長遺伝子を単離し、その塩基配列を決定後、挿入変異株を作製し、シデロフォア利用能の変化を調べた。挿入変異株作製法は Magnet により構築された方法を利用する (Magnet et al., Antimicrob. Agents Chemother., 45, 3375-3380(2001))。すなわち、Electroporation 法により pBluescript II に連結した当該遺伝子断片を *A. baumannii* ATCC19606 株に導入して、挿入変異を導入したい遺伝子と相同性組換えを生じさせ、抗生物質 ticarcillin によりスクリーニングして挿入変異株を得る方法である。この方法により 5 種類の鉄制御外膜蛋白質について、その機能を解明する。acinetobactin 生合成酵素遺伝子について kanamycin 耐性カセットを、coprogen に対する受容体遺伝子 (*fhuE*) については apramycin 耐性カセットを用いて挿入欠失株をそれぞれ作成した。

A. baumannii には多剤耐性化しているものも含め、多数の臨床分離株が存在する。しかも多剤耐性の獲得はプラスミド性である例も報告されており、鉄制御外膜蛋白質においても菌株間での多様性が推測された。そこで、これら臨床分離株についても鉄欠乏条件下で培養し、鉄制御外膜蛋白質の発現及び鉄制御外膜蛋白質遺伝子の存在を PCR 法により検出し、菌株間で比較した。臨床分離株における鉄制御外膜蛋白質の解析からも鉄獲得と病原性発現との関連性を調べた。

A. baumannii ATCC19606 株の鉄制御外膜蛋白質発現及び acinetobactin 産生がバイオフィーム形成を促進して本菌の定着に寄与しているかについて明らかにする。本菌は鉄欠乏条件においてバイオフィーム形成を促進させることが知られている (Tomaras et al., Microbiology, 149, 3473-3484 (2003)) が、鉄獲得とバイオフィーム形成に関する機構については明らかにされていない。バイオフィーム形成は菌が病原性を発現する上で必要な定着に寄与する因子であり、本菌の病原性発現とも関連している。Acinetobactin 受容体遺伝子や acinetobactin 生合成酵素遺伝子に対する挿入変異株と野生株間でポリスチレンとポリプロピレンチューブでのバイオフィーム形成能を比較した。具体的には、試験菌株をポリスチレンとポリプロピレンチューブで一定時間培養後、クリスタルバイオレットで染色し、エタノールを用いて形成したバイオフィームを溶解する。各試料について 580 nm での吸光度を測定し、バイオフィーム生成量を比較した。

4. 研究成果

作成した acinetobactin 生合成酵素遺伝子 *basD* 挿入欠失変異株及び coprogen に対する

外膜受容体遺伝子 *fhuE* 挿入欠失変異株を作成した。作成した変異株は PCR 法により抗生物質耐性カセットの挿入と遺伝子の欠失を確認した (Fig.1)。

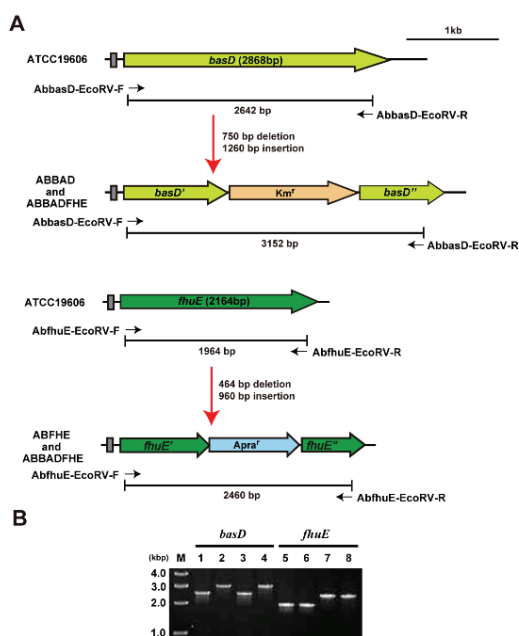


Fig. 1. Physical maps of the regions inserted in the *basD* and *fhuE* genes in *A. baumannii* ATCC19606 (A) and Confirmation of the regions inserted in the *basD* and *fhuE* genes by PCR (B). M, kilobase ladder; *A. baumannii* ATCC19606 (lane 1 and 5); ABBAD (lane 2 and 6); ABFHE (lane 3 and 7); ABBADFHE (lane 4 and 8).

basD 変異株は 225 μ M dipyrindyl 存在下、12 時間後でも増殖が認められないのに対し、いずれの外因性シデロフォアの添加によっても、その増殖は回復した (Fig.2)。

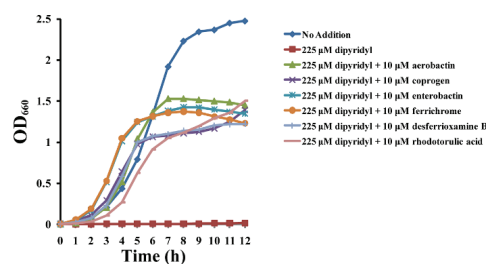


Fig. 2. Utilization of heterologous siderophores by *A. baumannii* ABBAD (*basD* insertion mutant of ATCC19606). Stationary-phase cells were inoculated to an OD₆₀₀ of 0.005 into fresh LB medium in the absence or presence of 225 μ M dipyrindyl and in the presence of both 225 μ M dipyrindyl and 10 μ M siderophore, and were incubated at 37 °C in the presence of 40 μ g/mL kanamycin with shaking. A representative of three independent experiments is shown.

fhuE 変異株について解析したところ、*fhuE* 変異株は鉄源として coprogen と rhodotorulic acid を利用できなくなっており (Fig. 3)、相補性試験により coprogen と rhodotorulic acid 利用能は回復した。また、RT-PCR により *fhuE* は転写レベルで鉄制御されていることも明らかにした。SDS-PAGE でも FhuE の存在を確認できた (Fig.4) こ

とから、本菌においても外因性シデロフォア coprogen と rhodotorulic acid に対する受容体として機能していることが明らかとなった。

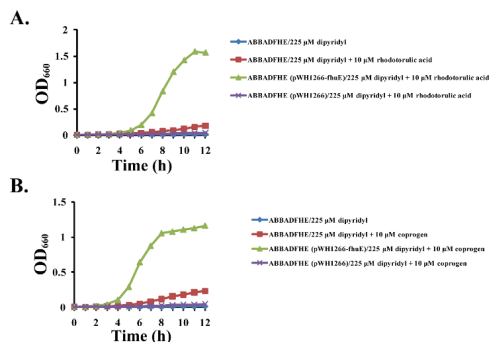


Fig. 3. Utilization of rhodotorulic acid (A) and coprogen (B) by ABBAFHE and ABBADFHE complemented pWH1266-fhuE. A representative of three independent experiments is shown.

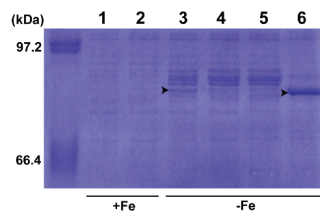


Fig. 4. SDS-PAGE of the iron-repressible outer membrane proteins from the wild type *A. baumannii* ATCC19606 (lane 1 and 3), its *fhuE* mutant ABFHE (lane 2 and 4), a mutant ABFHE complemented with an empty plasmid pWH1266 (lane 5), and a mutant ABFHE complemented with pFHE containing the wild-type *fhuE* gene (lane 6). The arrows in lane 3 and 6 indicate FhuE.

一方、臨床分離株 29 株についてシデロフォア産生の有無とその分類を行ったところ、22 株においてシデロフォア産生が認められ、11 株では acinetobactin の産生が検出された。その他、7 株では catechol 系シデロフォア、4 株では hydroxamate 系シデロフォアの存在が検出され、本菌におけるシデロフォア産生の多様性が示唆された。

A. baumannii ATCC19606株は200 μM dipyrldyl存在下、LB培地で30℃、12時間培養した場合、ジピリジル非存在下と比較して細菌数当たりのバイオフィーム形成が増加した。合成培地の場合でも鉄キレート剤存在下ではバイオフィーム形成が増加し、塩化鉄溶液の添加によりバイオフィーム形成が減少したことから本菌のバイオフィーム形成に鉄濃度が重要であることが示唆された。また、シデロフォア生合成酵素変異株の場合は細菌数当たりのバイオフィーム形成が減少したが、シデロフォアに対する受容体変異株の場合には細菌数当たりのバイオフィーム形成が増加した。このことから、本菌のバイオフィーム形成において鉄と acinetobactin は重要な因子であり、acinetobactin はバイオフィーム形成を促進する作用のあることが示唆された。今

後は本菌のバイオフィーム形成における鉄と acinetobactin の寄与について分子レベルでその詳細なメカニズムを明らかにしていきたい。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 舟橋達也、鉄輸送キレーター (シデロフォア) の産生とその関連遺伝子群の検出による *Acinetobacter* 属菌臨床分離株の解析、第 32 回 日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、2008 年 9 月 13 日、青森県

② 舟橋達也、*Acinetobacter baumannii* における外因性シデロフォア利用能の解析、フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー、2009 年 11 月 5 日、沖縄県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟橋 達也 (FUNAHASHI TATSUYA)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：60343646