

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：36301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22790140  
 研究課題名（和文）日和見感染菌におけるシデロフォアの病原学的意義とその作用機構に関する研究  
 研究課題名（英文）Physiological roles of siderophores produced by 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）：日和見感染菌であるアシネトバクター・ヘモリティカスは鉄欠乏状態に応答してシデロフォアとしてアシネトフェリンを産生する。本研究において、アシネトフェリンの生合成及び輸送に関与する遺伝子群として *acbABCD* と *actBCAD* をそれぞれ同定した。これらの遺伝子群はオペロンを形成しており、*acbA* の上流に存在する Fur box を介して鉄制御を受けることを示した。各種変異株と相補性試験の結果から *AcbA* がアシネトフェリンの生合成に関与していることを明らかにし、その生合成経路について示した。さらに、*ActA* がアシネトフェリンに対する外膜受容体として、また、*ActD* がアシネトフェリンの排出に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906(T) is known to produce the siderophore acinetoferrin under iron-limiting conditions. Here, we show that an operon consisting of eight consecutive genes, named *acbABCD* and *actBCAD*, participates in the biosynthesis and transport of acinetoferrin, respectively. Transcription of the operon was found to be iron-regulated by a putative Fur box located in the promoter region of the first gene, *acbA*. Homology searches suggest that *acbABCD* and *actA* encode enzyme proteins involved in acinetoferrin biosynthesis and an outer-membrane receptor for ferric acinetoferrin, respectively. Mutants defective in *acbA* and *actA* were unable to produce acinetoferrin or to express the ferric acinetoferrin receptor under iron-limiting conditions. These abilities were rescued by complementation of the mutants with native *acbA* and *actA* genes. Compared to the parental ATCC 17906(T) strain, the *actD* mutant displayed about a 35 % reduction in secretion of acinetoferrin, which was restored by complementation with *actD*, suggesting that *ActD* acts as an exporter of the siderophore.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 環境・衛生系薬学

キーワード：シデロフォア, 鉄, アシネトバクター

## 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、また生体内ではトランスフェリンやラクトフェリンなどの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ตอบสนอง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。一方で、鉄欠乏ストレスは毒素や酵素などの病原因子やある種の転写因子の発現を促進させるシグナルとして機能する。鉄欠乏ストレスにตอบสนองして鉄獲得系や病原因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な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。

アシネトバクター属菌は主に土壌、水環境に常在しているグラム陰性桿菌であるが、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、カテーテルを挿入している患者において尿路感染を惹起することがあり、外傷感染、手術部位感染、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日和見感染菌である。その中でも、臨床現場で最も高頻度で分離されるアシネトバクター・バウマニー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。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、病原性を示すのか、そ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、増殖に必要な鉄の獲得については

不明な点が多い。そこで、本研究では日和見感染菌の 1 つであるアシネトバクター属菌の鉄獲得機構について解析を行った。

## 2. 研究の目的

アシネトバクター・バウマニー並びにアシネトバクター・ヘモリティカスは鉄欠乏ストレスにตอบสนองしてアシネトバクチンと命名されたカテコール構造を有するシデロフォアを産生する。アシネトバクチン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、三価鉄との複合体を形成して、特異的な外膜受容体(BauA)を介して菌体内部へと取り込まれる。一方、アシネトフェリンは hydroxamate 型に属するシデロフォアであるアシネトフェリンを産生するが、その生合成や輸送、排出に関与する遺伝子は同定されておらず、その生合成経路も不明のままであった。そこで、本研究ではアシネトフェリンの生合成及び輸送に関与する遺伝子群を同定し、各種変異株の解析から、その機能を明らかにした。

## 3. 研究の方法

アシネトバクター・ヘモリティカス ATCC17906 より鉄制御遺伝子を単離するために FURTA (Fur titration assay) を用いた。本法により単離した鉄制御遺伝子断片の塩基配列を決定し、相同性検索からシデロフォアの生合成酵素に相同性を示す遺伝子断片を得た。遺伝子断片よりプローブを調製し、サザンハイブリダイゼーションにより約 13 kbp のアシネトフェリン関連遺伝子領域を同定し、クローニング後、全塩基配列を決定した。各種菌株の増殖は LB 培地で行った。鉄制限条件は LB 培地に 150  $\mu$ M のビピリジルを添加した。外膜画分は鉄豊富及び鉄欠乏条件で 12 時間培養した菌体からザルコシル不溶性画分を調製し、SDS-PAGE により分析した。各種変異株はアプラマイシン耐性カセットを相同性組換えにより導入することにより作成した。相補性試験は pRK415 をプラスミドベクターとして用いた。アシネトフェリン産生量は HPLC により C8 逆相カラムを用いて分析した。

## 4. 研究成果

FURTA 法によりアシネトバクター・ヘモリティカスより鉄制御遺伝子断片を単離し、そのうちアシネトバクター・バウマニーの hydroxamate 型シデロフォア生合成酵素遺伝子と 73 %一致する領域 (915 bp) を相同性検索により検出した。この遺伝子断片からシデロフォア関連遺伝子群の全長をクローニングし、全塩基配列を決定した。8 つの遺伝子の存在が明らかとなり、相同性検索の結果から

シデロフォアの生合成に関与すると推測される *acbABCD* とシデロフォアの輸送や排出に関与すると推測される *actBCAD* を含んでいた。*acbABCD* から推測されるアミノ酸配列は他菌種の産生するシデロフォアであるリゾバクチン 1021 の生合成酵素 *rhbCDEF* と 34~41% の相同性を示した。また、興味深いことに、アシネトバクター・バウマニー ATCC17978 においても同様に高い配列類似性のある領域を検出した。アシネトフェリンとリゾバクチン 1021 はその化学構造の多くが共通している (図. 1) ことから、単離した遺伝子群がアシネトフェリンの生合成及び輸送遺伝子であると推測し、さらに解析を進めた。

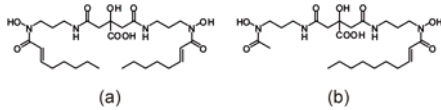


図. 1 アシネトフェリン (a) とリゾバクチン (b) の化学構造

*actA* 遺伝子はシデロフォアの受容体に特徴的な TonB 依存性の受容体遺伝子群と相同性を示した。さらに、SDS-PAGE による外膜画分の解析と N 末端アミノ酸配列の解析から 79.3 kDa の鉄制御外膜タンパク質 (図 1. 矢印) の N 末端アミノ酸配列 10 残基は *actA* 遺伝子から推測される N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。また、*actA* 遺伝子変異株は 79.3 kDa 外膜タンパク質の発現が欠損しており (図 2. レーン 4)、相補性試験によりその発現が回復した (図 2. レーン 5)。

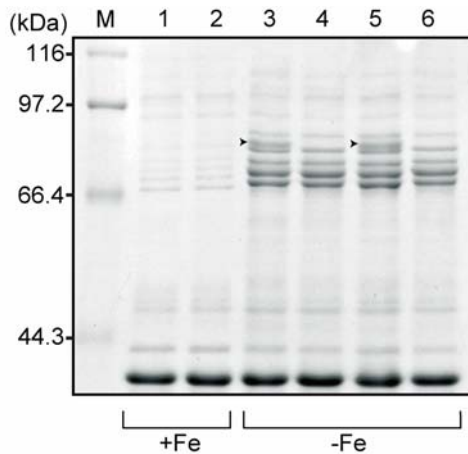


図. 2 アシネトバクター・ヘモリティカスの鉄制御外膜タンパク質の分析

*acbA* 遺伝子変異株 TF-*acbA* を作成し、アシネトフェリン産生量を HPLC により測定したところ、鉄欠乏条件下の培養液中で検出されなかったが、相補株においてはその産生が回復した。このことから、*AcbA* はアシネトフェリンの生合成に関与する酵素を構成していると

考えられた。一方、*actD* 遺伝子は相同性検索からシデロフォアの排出系遺伝子と推測され、同様に HPLC 分析を行ったところ *actD* 遺伝子変異株 TF-*actD* はアシネトフェリンの産生量が 35% 程度まで減少したことからアシネトフェリンの排出に関与していることが明らかとなった。

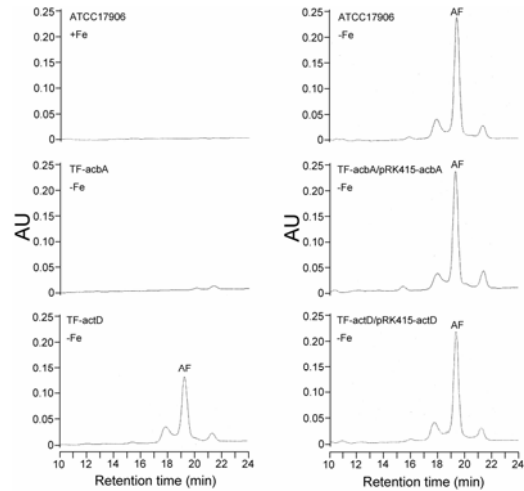


図. 3 アシネトフェリン産生量の HPLC 分析

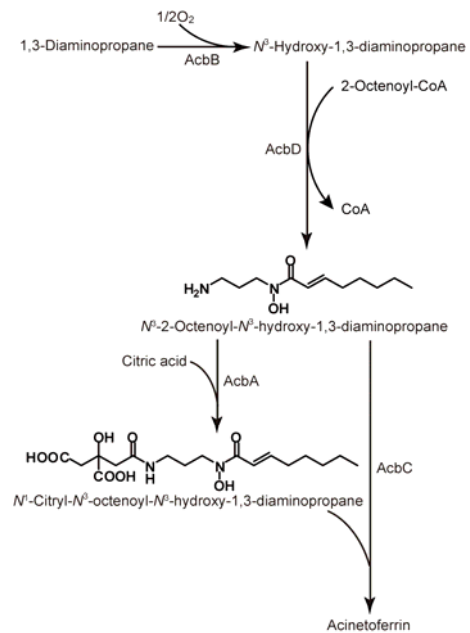


図. 4 予想されるアシネトフェリンの生合成経路

また、これらアシネトフェリン遺伝子群がオペロンとして転写レベルで鉄制御を受けていることを明らかにするために RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、*acbA* 遺伝子の上流に存在する推定の Fur box より鉄制御を受け、オペロンとして転写されることを明らかにした。これらの解析からアシネトフェリンの生

合成経路は1,3-ジアミノプロパンを出発物質として図.4に示した経路で行われることを示した。現在、本菌におけるアシネトバクチン遺伝子群の解析を進めている。

#### 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7件)

① Tatsuya Funahashi, Tomotaka Tanabe, Jun Maki, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, and Shigeo Yamamoto. Identification and characterization of a cluster of genes involved in biosynthesis and transport of acinetoferrin, a siderophore produced by *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup>. *Microbiology*, 159, 678-690, 2013. (査読有り)

② Tatsuya Funahashi, Tomotaka Tanabe, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, Jun Maki, and Shigeo Yamamoto. Characterization of a gene encoding the outer membrane receptor for ferric enterobactin in *Aeromonas hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup>. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77, 353-360, 2013. (査読有り)

③ Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Keiichi Shiuchi, Noriyuki Okajima, Hiroshi Nakao, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, and Shigeo Yamamoto. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore. *Microbiology*, 158, 2039-2049, 2012. (査読有り)

④ Tatsuya Funahashi, Tomotaka Tanabe, Kazutoshi Mihara, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, Shigeo Yamamoto. Identification and characterization of an outer membrane receptor gene in *Acinetobacter baumannii* required for utilization of desferricoprogen, rhodotorulic acid, and desferrioxamine B as xenosiderophores. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 753-760, 2012. (査読有り)

⑤ Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Noriyuki Okajima, Hiroshi Nakao, Yasuo Takeuchi, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo and Shigeo Yamamoto. The *Vibrio parahaemolyticus* *pvuA1* gene (formerly termed *psuA*) encodes a second ferric vibrioferrin receptor that requires *tonB2*. *FEMS Microbiology Letters*, 324, 73-79, 2011. (査読有り)

⑥ Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo and Shigeo Yamamoto. Identification of genes, *desR* and *desA*, required for utilization of

desferrioxamine B as a xenosiderophore in *Vibrio furnissii*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 570-574, 2011. (査読有り)

⑦ Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, yong-Hwa Moon, Eiji Tamai and Shigeo Yamamoto. Identification and characterization of a *Vibrio mimicus* gene encoding the heme/hemoglobin receptor. *Microbiology and Immunology*, 54, 606-617, 2010. (査読有り)

[学会発表] (計3件)

① ○ 舟橋達也, 田邊知孝, 牧純, 宮本勝城, 辻坊裕, 山本重雄 「*Aeromonas hydrophila*におけるエンテロバクチン受容体遺伝子の同定と解析」日本薬学会第133年会, 2013年3月30日 (パシフィコ横浜, 横浜)

② ○ 舟橋達也, 大内雄, 田邊知孝, 宮本勝城, 辻坊裕, 山本重雄 「*Acinetobacter haemolyticus*におけるacinetoferrin生合成及び輸送に関する遺伝子群の解析」日本薬学会第132年会, 2012年3月31日 (北海道大学, 札幌)

③ ○ Tatsuya Funahashi, Tomotaka Tanabe, Shigeo Yamamoto, Genetic organization of the region encoding biosynthesis and transport of acinetoferrin, a siderophore produced by *Acinetobacter haemolyticus*. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, 2011 September 7 (Sapporo Convention Center, Sapporo)

[図書] (計1件)

① 「腸炎ビブリオ第IV集」本田武司監修, IX. 腸炎ビブリオの生理・遺伝 1.腸炎ビブリオの鉄獲得戦略 (近代出版, 東京) pp312-325, 2013年6月1日

#### 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