

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590132
研究課題名（和文） 転写因子 FFRP 群による緑膿菌クロラムセンシングの新たな発現制御機構の解析
研究課題名（英文） New quorum sensing mechanism by transcription factor FFRPs in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者
荒牧 弘範 (ARAMAKI HIRONORI)
第一薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：20221054

研究成果の概要：

毎年の多剤耐性緑膿菌 (MDRP) による院内感染の新聞報道に、いつものことながら、病原菌対策の重要性を痛感させられる。緑膿菌は、多様な環境下に生育するグラム陰性細菌であるが、深刻な院内感染を引き起こすが如く、その適応能力を発展させている場合もある。一方、あたかも多細胞真核生物のように、シグナルを介して菌集団全体での協調した遺伝子発現制御機構が存在する。これは、細菌細胞間の低分子物質を介した情報伝達機構を利用したものであり、その一部はクロラムセンシングシステム (QS system) として知られている。我々は、この QS system に転写因子グループ FFRP タンパク質群 (Feast/Famine Regulatory Proteins) が関与していることを見出した。さらに、QS system で発現制御されている病原性因子でもある第二次代謝物・ピオシアニン色素の産生における FFRP 群の転写制御の関与について研究を行った。すなわち、FFRP 群によるピオシアニンの産生量の変化を HPLC で測定し、RT-PCR 法による mRNA の発現を解析した。その結果、8 種の FFRP のうち 3 種がピオシアニン色素の産生経路の最終酵素の産生量を減少させていることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物科学・クロラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

(1) 平成18年10月埼玉医大病院において、入院して死亡した4人から多剤耐性緑膿菌(MDRP)の感染が確認され、毎年のMDRPの報道に、いつものことながら、病原菌対策の重要性を痛感している。

緑膿菌は、多様な環境下(水中、土壌、植物、動物組織)に生育するが、深刻な院内感染を引き起こすが如く、その適応能力を発展させている場合もある。一方、あたかも多細胞真核生物のように、シグナルを介して菌集団全体での協調した遺伝子発現制御機構が存在する。これは、細菌細胞間の低分子物質を介した情報伝達機構を利用したものであり、その一部はクロラムセンシングシステム(QS system)として知られている。QS systemは、その病原因子エステラーゼ遺伝子*lasB*の発現制御の研究の中で発見され、その発現に必須な転写因子LasRが報告されたことによる。その後、QS systemに関与する転写因子RhIRが発見され、緑膿菌にはLas系およびRhI系のQS systemが存在すると言われている。このような緑膿菌の「異常さ」は、共通して、その高度な転写調節機構に起因すると考えられている。

我々は、上述のような緑膿菌の「異常さ」、環境の変化への応答、増殖ならびに細胞間情報伝達の転写機構を解明する目的で、ひとつの転写因子グループFFRPタンパク質群(Feast/Famine Regulatory Proteins)をターゲットに研究を進めている。

FFRPという区分は、大腸菌のLrp(Leucine-Responsive Regulatory Protein)の機能を総括する饗宴—飢餓制御

(Feast/Famine Regulation)という言葉を用いている。その役割は大腸菌Lrpで示されているように広範な遺伝子群を多様に制御していることである(Calvo, J. M., and Matthews, R. G. Microbiol. Rev. 58, 466-490 (1994))。このような多くの遺伝子群を支配するFFRPを、我々は公開されている緑膿菌PA01のゲノム塩基配列をもとに8種類突き止めた。この数は、真正細菌中では最多で(ちなみに、大腸菌3種、結核菌3種)、緑膿菌の「異常さ」によく対応する(Suzuki M., Aramaki H., and Koike H. Proc. Japan Acad. 79B, 242-247 (2003))。

(2) 最近、我々は、緑膿菌FFRP群が病原因子の産生を制御しているQS systemの発現制御に関連していることを緑膿菌PA01のDNAチップを用いて、初めて見出した(投稿準備中)。すなわち、FFRP群が、QS systemにおけるLas系の*lasI*, *rpaL*, *mvaT*, *lasA*, *toxA*, *aprA*遺伝子、ならびにRhI系の*rhIR*, *dksA*, *lasB*, *aprA*, *toxA*遺伝子の転写量を増減させていることを示唆した。

これらLas系およびRhI系のQS systemに関して、分子生物学的な解析が進んでいるにも関わらず、Las系およびRhI系に対する阻害剤の開発はなされていない。その理由のひとつに、LasRやRhIRの立体構造の解明が不可欠であるが、それらのタンパク質の精製ができていない現状がある。また、毎年のように起きる大学病院での多剤耐性緑膿菌(MDRP)の出現とも併せて、感染症対策に関する新たな研究アプローチが求められている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、病原菌対策の一環として、まず、DNA チップより得られた QS system の発現制御に関与している転写因子 FFRP 群について、Las 系および Rh1 系の遺伝子群に対する新たな転写制御機構を解明することを目的とする。

(2) FFRP が代謝経路を調節する転写因子でもあることから、代謝中間産物をはじめとする低分子性リガンド（特にアミノ酸類に注目）の特定を目指す。幸運にも、FFRP の立体構造の解明の研究が始まっており、本研究での成果が創薬のためのリード化合物とのドッキングスタディへの知見として提供され、緑膿菌感染対策の一環としての薬剤開発への道を拓くことが可能になると確信する。

3. 研究の方法

(1) 多剤耐性の獲得等で問題となっている緑膿菌は 8 種の FFRP を持ち、この数は真正細菌中、最多である。8 種の FFRP のそれぞれを過剰発現する緑膿菌株を作製した。

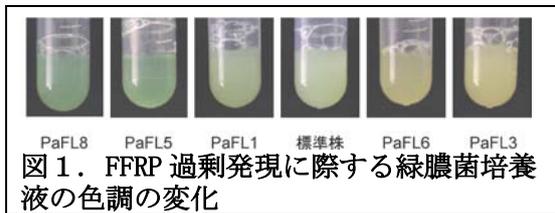
(2) QS system に関与するピオシアニンがそれぞれの緑膿菌株での生産量を測定するため、ピオシアニンを合成して特異的吸収波長 (690nm) での逆相液体クロマトグラフィー上の流出位置を確認する。これにより、FFRP によるピオシアニン産生の寄与を解析する。

(3) RT-PCR 法により生合成に関与する酵素群の mRNA 量を各過剰生産株について解析する。

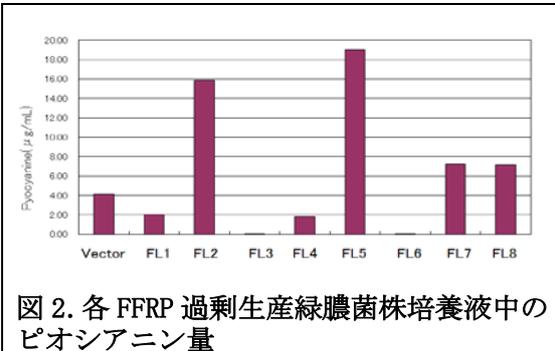
(3) 上記で明らかになった FFRP とピオシアニン合成経路の化合物との相互作用を MALS (多角度光散乱法) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 多剤耐性の獲得等で問題となっている緑膿菌は 8 種の FFRP を持ち、この数は真正細菌中、最多である。8 種の FFRP のそれぞれを過剰発現する緑膿菌株を作ったところ、LB 培養液 (以下培養液) の色調が様々に変化する事が明らかになった (図 1)。8 種のうち、PaFL2、5、7、8 過剰生産株の培養液は濃い青緑色に変化し、一方、PaFL3、6 過剰生産株の培養液は黄褐色になった。PaFL1、4 過剰生産株の培養液の色調は標準株と大きな違いがなかった。



(2) 培養液色調の差異は緑膿菌が持つ色素、ピオシアニンの量を反映する事が明らかになった (図 2)。ピオシアニンを合成して特



異的吸収波長 (690nm) や逆相液体クロマトグラフィー上の流出位置を確認後、過剰発現株の培養液を逆相液体クロマトグラフィーで分析し、ピオシアニンが流出する位置での 690nm の吸収を測定したところ、青緑色の PaFL2、5、7、8 過剰生産株培養液は標準株培養液の 1.75-4.75 倍のピオシアニンを含むことが明らかになった (図 2)。黄褐色の PaFL3、6 過剰生産株培養液はピオシアニンをほとんど含まず、PaFL1、4 過剰生産株培養液は標準株の半分程度のピオシア

ニンを含んでいた (図 2)。

ピオシアニン¹は緑膿菌のクオラムセンシング機構 (周囲の同種細菌数を感知して、これが一定数[クオラム]を超えると特性が変化) に関与し、宿主ミトコンドリアの呼吸や気道粘膜の繊毛運動を阻害する病原性因子 (毒物) である。ピオシアニン¹はコリスミ酸から生合成される (図 3)。

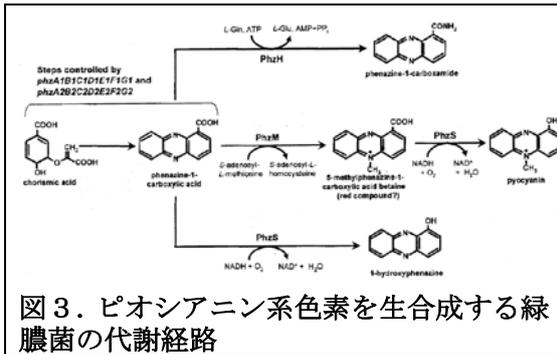


図 3. ピオシアニン系色素を生合成する緑膿菌の代謝経路

(3) RT-PCR 法により生合成に関与する酵素群の mRNA 量を各過剰生産株について解析した (図 4)。

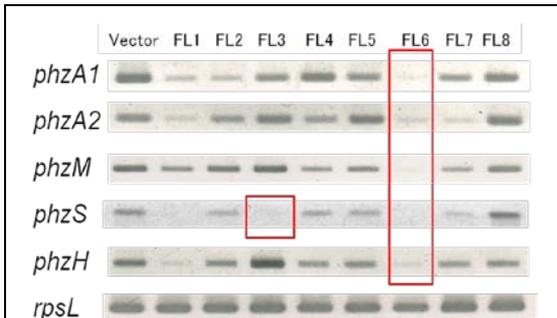


図 4. ピオシアニン合成に関与する緑膿菌酵素遺伝子群の転写

RT-PCR 法により、mRNA から合成、増幅した DNA のバンドを示す。*rpsL* はコントロールとしてリボソームたんぱく質遺伝子の転写量。

その結果、PaFL6 過剰生産株では、コリスミ酸からの合成経路を司る、*phzA-G* オペロン 1、2、*phzM*、*phzS*、さらには、ファナジン-1-カルボン酸からファナジン-1-カルボキシアミドへと脇にそれる *phzH* などの遺伝子全ての転写が抑制されている事が明らかになった。PaFL3 過剰生産株では、最終段階で 5-メチルファナジン-1-カルボン酸

ベタインからピオシアニンを合成する *phzS* 遺伝子の転写が抑制されていた。PaFL2、5、7、8 過剰生産株では、コリスミ酸からピオシアニンを生合成する経路での大きな転写活性化はなく、合成量増加の原因は特定できなかった。

(4) 緑膿菌 FFRP とピオシアニン系色素やアミノ酸との相互作用を解析したところ、PaFL3 などの緑膿菌 FFRP が 1-ヒドロキシフェナジンと相互作用する事が明らかになった。ロイシンあるいはイソロイシン存在下に PaFL3 の会合度は三〜四量体程度 (アミノ酸非存在下) から六量体程度 (アミノ酸存在下) に上昇するが、ロイシンに加えて 1-ヒドロキシフェナジンが存在すると、八量体へと会合度が上がり (図 5a)、イソロイシン存在下に 1-ヒドロキシフェナジンが存在すると、逆に四量体へと下がる (図 5b)。1-ヒドロキシフェナジンだけでは、会合度の顕著な変化はみられなかった。

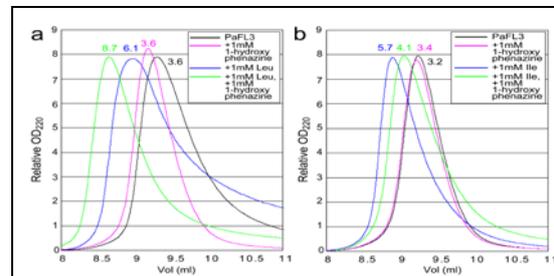


図 5. PaFL3 のサイズ・エクスクルージョン HPLC

MALS (多角度光散乱法) で決定した見掛けの分子量から計算した会合度は、a では 8.7 (緑)、6.1 (青)、3.6 (ピンク)、3.6 (黒)、b では 5.7 (青)、4.1 (緑)、3.4 (ピンク)、3.2 (黒)。

緑膿菌 FFRP がピオシアニンの生合成を制御するとともにピオシアニン系色素と相互作用して FFRP の会合状態が変化する事は、相互作用を介してピオシアニン系色素と緑膿菌 FFRP が転写制御のネットワークを形成している可能性を示唆する。

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)

T. Kawashima, H. Aramaki, T. Oyamada, K. Makino, M. Yamada, H. Okamura, K. Yokoyama, S. A. Ishijima and M. Suzuki, Transcription Regulation by Feast/Famine Regulatory Proteins, FFRPs, in Archaea and Eubacteria, *Biological & Pharmaceutical Bulletin, Reviews*, **31**:173-186 (2008)

[学会発表] (計2件)

- ① 石岡裕美、荒牧弘範、緑膿菌の FFRP 蛋白質群の発現解析、第24回日本薬学会九州支部大会、福岡、2007年12月8日
- ② 荒牧弘範、緑膿菌 FFRP による転写制御、第128回日本薬学会年会シンポジウム、横浜、2008年3月26日

[図書] (計1件)

- ① 荒牧弘範、緑膿菌 FFRP による転写制御、遺伝、2巻、321-324 (2007)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
なし
- 取得状況 (計0件)
なし

[その他]

ホームページ:
<http://www.daiichi-cps.ac.jp/kenkyu/sites/bunsi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒牧 弘範 (ARAMAKI HIRONORI)
第一薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：20221054

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし