

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14369

研究課題名(和文) 抗生物質分解能を併せ持つAHLスカベンジャー細菌の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of AHL scavenger bacteria with the antibiotics' degradability

研究代表者

奈須野 恵理 (Nasuno, Eri)

宇都宮大学・工学部・助教

研究者番号：80709329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：一部のグラム陰性細菌は、アシル化ホモセリンラクトン(AHL)と呼ばれるシグナル分子の細胞内濃度に依存して病原因子の生産やバイオフィーム形成などに関わる遺伝子の発現を集団で制御するクオラムセンシング(QS)機構を有する。本研究では3種類のRoseomonas属細菌を対象に、ラクタム系抗生物質耐性とAHL分解活性の高さの関連性を解析した。活性汚泥から単離したRoseomonas sp. TAS13株のみセフトロキシム以外の抗生物質への高い耐性を示した。Roseomonas属細菌のゲノムからそれぞれクローニングしたペニシリンGアシラーゼのAHL分解活性もTAS13株が最も高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AHL加水分解細菌や分解酵素を利用してQS機構を人為的に阻害するクオラムクエンチング技術が注目されている。これまでにペニシリンGアシラーゼがAHLを基質として加水分解可能であることが報告されているものの、構造類似性が低いラクタム系抗生物質とAHLを両方分解する能力の生態的意義は未だ解明されていない。本研究の成果により、多様な細菌で構成される活性汚泥から単離されたTAS13株は、他のRoseomonas属細菌とは異なりアシル鎖長が比較的長いAHLに対する高い分解活性が示されたことから、細菌コミュニティ内の共生細菌のQS機構を不活性化するAHLスカベンジャー(清掃者)としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Some gram negative bacteria possess quorum sensing (QS) system which controls the expression of genes involved in such as virulence factor production and biofilm formation, depending on the intracellular concentration of the signal molecules called as acylated homoserine lactones (AHLs). In this study, we analyzed the relationship between β -lactam antibiotic resistance and high AHL degrading activity in three species of Roseomonas. Only Roseomonas sp. TAS13 isolated from the activated sludge showed high resistance to antibiotics other than cefadroxil. Among the penicillin G acylases subcloned from the genome of each strain of Roseomonas, the acylase of TAS13 strain had the highest AHL-degrading activity.

研究分野：微生物生態学および遺伝子工学

キーワード：クオラムセンシング ペニシリンGアシラーゼ 活性汚泥 Roseomonas属細菌 N-アシルホモセリンラクトン ラクタム系抗生物質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アシル化ホモセリンラクトン(AHL)と呼ばれるシグナル分子を介したクオラムセンシング(QS)機構を有する細菌は、プロテオバクテリア門を中心にこれまで 100 種類以上報告されている。これらの細菌は QS 機構を利用して病原性因子や色素の生産やバイオフィルムの形成に関わる遺伝子の発現を制御している。自然環境中では、AHL 生産菌と、分解酵素を生産し AHL を不活性化する細菌が共生・競合しており、AHL のアミド結合部位を切断する AHL アシラーゼと、ラクトン環部位を開裂する AHL ラクトナーゼが AHL 分解細菌から多数同定されている。

申請者が活性汚泥から単離した AHL アシラーゼ活性を示す *Roseomonas* sp. TAS13 株は、AHL ラクトナーゼ活性を示す *Roseomonas* sp. B5 株に次いで *Roseomonas* 属細菌では 2 つ目の AHL 分解報告例である。TAS13 株のドラフトゲノムを決定したところ、既知の AHL アシラーゼとアミノ酸配列相同性が高い CDS が複数同定された。このうちペニシリン G アシラーゼ(PGA)が TAS13 株の AHL 分解活性に寄与していると仮説を立て、PGA と推定される CDS をゲノム内に有する他の *Roseomonas* 属細菌と TAS13 株の抗生物質耐性および AHL 分解活性を比較することで TAS13 株独自の QS 阻害機能の解明と応用を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Roseomonas* 属細菌の AHL 分解機構を解明すること、および AHL と β ラクトラム系抗生物質を両方分解するペニシリン G アシラーゼ(PGA)の進化上の起源を明らかにすることである。それぞれ空気と池の水から単離された *Roseomonas aerilata* と *Roseomonas stagni* のゲノムには TAS13 株の PGA (AirP) とアミノ酸配列相同性が高い PGA (RaPGA, RsPGA) が存在する。TAS13 株に加えてこの 2 菌株の AHL と β ラクトラム系抗生物質の分解活性を比較し、様々な自然環境中の微生物複合コミュニティで *Roseomonas* 属細菌が AHL スカベンジャーとしての役割を担っている可能性を推察する。

3. 研究の方法

(1) *Roseomonas* sp. TAS13 株の AHL および β ラクトラム系抗生物質分解機構の解明

分解可能な AHL と β ラクトラム系抗生物質の特定

Roseomonas sp. TAS13 株の培養開始時にアシル鎖長の異なる各種合成 AHL (C6 ~ C12) を培地に添加し、所定時間振とう培養して加水分解を促した。外部添加した短鎖あるいは長鎖 AHL に応答して紫色色素 Violacein を生産する AHL レポーター株 *Chromobacterium violaceum* CV026 株または VIR07 株を用いて、分解前後の AHL 量の差から各 AHL に対する相対的な分解活性を評価した。また、96 ウェルプレートの各ウェルに異なる濃度(8 ~ 16,384 $\mu\text{g/mL}$)の β ラクトラム系抗生物質(ペニシリン G (Pen G)、アンピシリン(Amp)、カルペニシリン(Cab)、セファドロキシル(CDX)) をそれぞれ含む培地を分注し、TAS13 株を植菌して所定時間振とう培養した。培養液の 600 nm における濁度(OD₆₀₀)が 0.1 未満となった濃度を最小発育阻止濃度(MIC)と決定し、TAS13 株の各抗生物質に対する耐性を評価した。

AHL の分解に寄与する PGA のクローニング

TAS13 株のゲノムから同定された PGA のうち、既知の PGA とアミノ酸配列相同性が高いものを AirP と命名した。この AirP をコードする遺伝子配列を増幅する PCR プライマーを設計し、増幅断片をクローニングベクターヘライゲーションして大腸菌 DH5 α へ形質転換した。airP 断片をベクターから切り出し、マルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として発現させるベクター-pMAL-c2x へ入れ替えることで AirP の大量発現系を構築した。遺伝子組換え大腸菌から MBP-AirP を抽出・精製し、上述した AHL レポーター株を用いる方法でアシル鎖長が C6 ~ C12 の AHL に対する分解活性を試験した。

(2) *Roseomonas* 属細菌における AHL 分解能の生態的意義の解明

異なる AHL の添加培養条件における *Roseomonas* sp. TAS13 株の全タンパク質発現パターンと AirP の遺伝子発現量の比較

C6 ~ C12 の AHL、またはアンピシリンをそれぞれ添加して培養した TAS13 株の培養液から可溶性タンパク質を抽出した。二次元電気泳動により pI と分子量の違いでタンパク質を分離し、AHL やアンピシリン未添加のコントロールと比較して発現量が有意に増加あるいは減少するタンパク質を特定した。

C6 ~ C12 の AHL またはアンピシリンを含む 4 種類の β ラクトラム系抗生物質を所定濃度添加して培養した TAS13 株培養液から全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。AirP をコードする配列または *Roseomonas* 属細菌の 16S rRNA を対象としたプライマーを用いてリアルタイム PCR を実施した。参照遺伝子(16S rRNA)と標的遺伝子の Ct 値の差 (ΔCt)を求め、さらにコントロール条件の ΔCt 値との差 ($\Delta\Delta\text{Ct}$)を算出し、相対比 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)とすることで AHL または抗生物質を添加した各試料間での標的遺伝子発現量を比較定量した。

Roseomonas 属細菌間での AHL と β ラクトラム系抗生物質分解能比較

R. aerilata と *R. stagni* を対象として、4 種類の β ラクトラム系抗生物質に対する耐性を TAS13 株と比較した。また、これらの細菌はドラフトゲノム配列が NCBI データベースに登録されていることから、AirP とアミノ酸配列相同性の高い PGA (RaPGA, RsPGA) をコードする遺伝子配列を

PCR 増幅し、AirP と同様にクローニングし大量発現系を構築した。MBP タグを融合した RaPGA と RsPGA について C6 ~ C12 の AHL の分解活性を評価した。

4. 研究成果

(1) *Roseomonas* sp. TAS13 株の AHL および β ラクトム系抗生物質分解機構の解明

Pen G, Amp, Cab, CDX それぞれに対する *Roseomonas* sp. TAS13 株の MIC は、CDX のみ有意に低かった。共通して高い耐性を示した Pen G, Amp, Cab は、アシラーゼによりアミド結合が加水分解されると 6-Aminopenicillanic acid (6-APA) が生じるのに対して、CDX は 7-amino-3'-desacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) が生じる(図1)。TAS13 株の保有する PGA はこの 6-APA のチアゾリジン環と 7-ADCA のジヒドロチアジン環の構造の違いを認識し、基質として選択していると推察される。一方、TAS13 株の AHL 分解活性はアシル鎖長が C12 以外の AHL に対して高いことが示された。この AHL 分解活性は TAS13 株のゲノムから同定された PGA の 1 つである AirP に起因するのかどうかを確かめるため、MBP タグ融合 AirP を大量取得して同様に AHL 分解活性を評価した。その結果、AirP の分解活性は C12 の AHL で最大となり、続いて C10, C6, C8 の AHL の順となった。TAS13 株自体は C12 の AHL の分解活性は高くないことから、細胞内では AirP と親和性がより高い他の基質が存在し、C12 の AHL に対する分解活性が抑制されていることが考えられる。

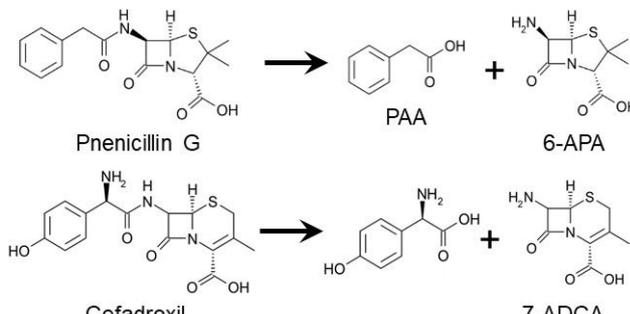


図1. β ラクトム系抗生物質に対する TAS13 株の基質選択性

(2) *Roseomonas* 属細菌における AHL 分解能の生態的意義の解明

基質未添加のコントロールと AHL または Amp 添加時で TAS13 株の全タンパク質発現パターンを比較した。Amp 添加 (Amp (+)) または未添加 (Amp (-)) 時のタンパク質発現パターンを図2に示す。AirP (797 aa) の pI と分子量の理論値はそれぞれ 6.3 と 84.5 kDa であるが、図2の丸で囲った位置に AirP 由来と推定される明確なスポットはなかった。細胞内での AirP の発現量がそもそも低いか、培養時間が長いために Amp に応答して発現量が増加したタイミングを逃している可能性が考えられる。したがって、AirP を含むタンパク質の発現量の変化を経時的に追跡する必要がある。一方、各アシル鎖長の AHL をそれぞれ添加して TAS13 株を培養した場合は、コントロールと比べて発現量が2倍以上に増加、あるいは減少したタンパク質が複数存在した。AHL の添加に応答した長期的な AirP 発現量の増加を期待したが、これらの発現量に変化が見られたタンパク質の中に AirP は含まれていなかった。AirP 発現量の変化が予想以上に小さかったことから、AHL または β ラクトム系抗生物質添加時の mRNA レベルでの変化を評価した。その結果、コントロール条件と比べて C6 ~ C10 の AHL 添加条件では AirP の転写量が減少し、C12 の AHL 添加条件では 2.1 倍に増加した。また、Amp 添加では AirP の転写量がコントロールよりも少なかったのに対して Pen G 添加では 1.6 倍に増加した。

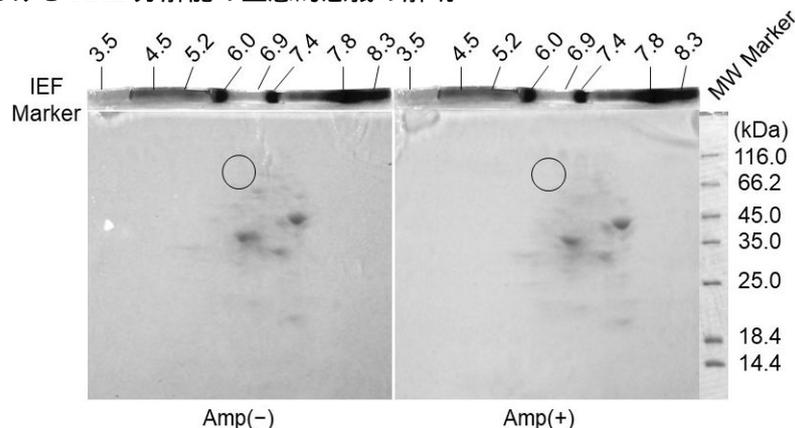


図2. アンピシリンの添加または未添加条件で培養した TAS13 株のタンパク質発現パターン

R. aerilata と *R. stagni* の抗生物質耐性と AHL 分解活性は共に低く、MBP 融合タンパク質として大量取得した RaPGA と RsPGA の AHL 分解活性も TAS13 株と比べて低いことが示された。これらの結果は、抗生物質耐性の高さと AHL 分解活性の高さには相関があり、これらの表現型にそれぞれの細菌が有する PGA の分解活性の高さが関与している可能性を示唆している。AHL と β ラクトム系抗生物質を両方加水分解することによって、「抗生物質耐性能」と「共生細菌の QS 機構の阻害能」を同時に獲得する「二機能性」を有するアシラーゼはこれまでに AirP を除きわずか 3 例しか報告されていない。これらの二機能性を有するアシラーゼのアミノ酸配列相関性は低く、基質選択性や基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基の種類にも明確な共通点がない。しかし、構造も細菌生態における役割も大きく異なる AHL と抗生物質をどちらも基質とし得る点で基質選択性は低いことが考えられるため、今後は AHL または抗生物質をリガンドとして AirP を含む二機能性アシラーゼのドッキングシミュレーションを実施し、共通点を見出す

ことが重要となる。同じ superfamily に属する酵素間での基質の多様性や交差反応性は、機能的および進化的な関連性を示していることから、PGA と AHL アシラーゼの交差反応性を説明し得る共通点を見出すことができれば、自然環境中に生息している細菌の生態における二機能性の進化的な意義を明確にする一助となることが期待される。また、二機能性アシラーゼの特徴を有する PGA は AHL を基質として加水分解可能と推定されるため、NCBI データベースから二機能性 PGA を特定し、この二機能性 PGA を保有する細菌を TAS13 株と同様に AHL スカベンジャー候補として QS 阻害技術へ応答可能となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関篤也、奈須野恵理、加藤紀弘
2. 発表標題 Roseomonas属細菌由来Penicillin GアシラーゼのN-acylhomoserine lactone分解活性の評価
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奈須野恵理、佐々木裕哉、関篤也、鈴木智大、加藤紀弘
2. 発表標題 Roseomonas属細菌のN-アシルホモセリンラクトン分解特性とPenicillin G acylaseの関連性解析
3. 学会等名 細菌学若手コロッセウムin岡山
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木裕哉、奈須野恵理、加藤紀弘
2. 発表標題 グラム陰性細菌のQuorum sensingを阻害するPenicillin G acylase AirPのキャラクタリゼーション
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奈須野恵理、佐々木裕哉、鈴木智大、加藤紀弘
2. 発表標題 活性汚泥由来 Roseomonas sp. TAS13株のQuorum sensing関連遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----