

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590157

研究課題名(和文)膜破壊型殺菌消毒剤を活用した細菌の多剤耐性獲得に関する転写調節因子の分子機構解明

研究課題名(英文) Study on molecular mechanism of transcription factors relating to multidrug resistance in bacteria using cell membrane-disrupting biocides

研究代表者

前田 拓也 (MAEDA, Takuya)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：40270300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜破壊型殺菌消毒剤である第四アンモニウム塩に対する大腸菌耐性株のプロテオーム解析を行い、野生株に比べ耐性株に特異的に発現量が増大したタンパク質を複数確認した。これらのタンパク質が大腸菌の多剤耐性を担うmarオペロンの転写調節因子と相互作用している可能性がある。バイオインフォマティクス解析により、marオペロンの転写抑制因子MarRの点変異が立体構造を変化させ、標的のmarOとの結合性が変化して、結果として耐性化因子の発現活性化を引き起こすことが示唆された。以上から、marOと親和性が高いDNA結合性の物質によりmarオペロンの転写を抑制し、多剤耐性菌の出現を制御できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The proteomic analysis was done for Escherichia coli resistant to quaternary ammonium compounds (QAC), cell membrane-disrupting biocides. It showed that acquiring the resistance to QAC leads to overexpression of various stress proteins that may correlate to transcription factors in mar operon closely relating to multidrug resistance in E. coli. Furthermore, bioinformatic analysis revealed that several point mutations found in marR gene of the resistant strains bring a steric alteration in MarR, transcription repressor in mar operon and inhibit binding to marO, operator in mar operon, resultantly lead to high-level resistance to biocide. Therefore, DNA-binding substances, which have high affinity to marO, could repress transcription of mar operon, and consequently control multidrug resistant bacteria.

研究分野：衛生薬学

キーワード：殺菌消毒剤 多剤耐性 転写調節因子 marオペロン 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

これまでに研究代表者は、典型的な界面活性剤系の膜破壊型殺菌消毒剤である第四アンモニウム塩に関する構造活性相関、新規化合物の分子設計、病原性細菌の耐性化試験等を行ってきた。その過程で膜破壊型殺菌消毒剤に対する細菌の耐性化機構として、排出システムとともに外膜透過障壁、特に薬剤との疎水的相互作用が重要であることを見出した (Maeda, T. *et al.*: *Biocontrol Sci.*, **10**, pp.139-145 (2005)、前田拓也ら: 食品のストレス環境と微生物 (サイエンスフォーラム), pp.289-292 (2004))。しかしながら、疎水的相互作用を制御する細菌の薬剤ストレス応答システムに関する情報はほとんどない一方で、界面活性剤系殺菌消毒剤は逆性石鹼として汎用されており、耐性菌が多く検出されているにも関わらず耐性化機構は未解明である。またその耐性菌は、多剤耐性の傾向を示し、臨床的に重大な問題を引き起こしている。

一方、細菌の薬剤耐性化機構において、MarA のような転写調節因子が深く関わっていることが知られている (Alekshun, M. N. and Levy, S. B.: *Cell*, **128**, 1037 (2007))。MarA は、大腸菌の多剤耐性を担う *mar* オペロンのメンバーとして同定され、通常は、同じオペロンの他の因子 MarR によって負の制御を受けているが、MarR が *marR* 遺伝子の変異 (Alekshun, M. N. and Levy, S. B.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2067 (1997)) や化学物質との相互作用 (Alekshun, M. N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **181**, 4669 (1999)) により不活化されると、MarA を含む *mar* オペロンの発現が活性化され、薬剤耐性に関わる様々な因子の発現に関与していることが明らかになっている。

研究代表者らの検討でも、大腸菌の MarA 高発現株において、通常株に比較して膜破壊型殺菌消毒剤である第四アンモニウム塩に対する耐性化が確認され、また一方で膜破壊型殺菌消毒剤の耐性株 (実験室で取得) が多剤耐性を示し、また *marR* 遺伝子に自身の発現を不活化する変異を確認した (前田拓也ら: 日本生物工学会平成 13 年度大会講演要旨集 P.348、前田拓也ら: 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集 P.158、前田拓也ら: 日本防菌防黴学会 2005 年度秋季合同シンポジウム要旨集 P.41)。さらに、報告されている MarR 変異体の解析結果と我々のバイオフィーマティクス解析によるドッキング・シミュレーション結果から、*mar* オペロンの転写調節因子の個々のアミノ酸残基の多剤耐性獲得に及ぼす役割を調べることが可能であることが明らかになった。

MarR は二量体構造で、殺菌消毒剤 P-12 (塩化ドデシルピリジニウム) は二量体界面に安定に結合していると推定される。P-12 は固定した α -ヘリックス上の

Ala70Thr(*soxQ1*)の変異により嵩高くなり、立体反発で結合できなくなるが、Asp67 は柔軟なループ上に位置しているため P-12 の結合に影響しない。

そこで、本研究では、これらの知見から膜破壊型殺菌消毒剤がいわば *mar* オペロンに対する活性化因子として振舞っていることに着目し、いかにして膜破壊型殺菌消毒剤が細菌の多剤耐性獲得に寄与しているのか、特に、*mar* オペロンのメンバーである転写調節因子の分子機構を解明し、得られた知見から多剤耐性菌の新規制御法を提案することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌の多剤耐性獲得に関する転写調節因子の役割を、膜破壊型殺菌消毒剤との相互作用に着目して、分子生物学的およびタンパク化学的手法やバイオフィーマティクスの手法により明らかにし、さらに得られた知見をもとに新規制御法を提案することである。

そこで、研究期間内に以下の(1)~(7)のような各テーマを設定し、順次遂行することを計画した。

(1)膜破壊型殺菌消毒剤に対する大腸菌耐性株を実験室内で取得し、その微生物学的性質を確認する。

(2)プロテオーム解析により耐性獲得への関与が考えられる特異的タンパク質群を同定する。

(3)アフィニティークラムを用いて転写調節因子と親和性のあるタンパク質を同定する。

(4)遺伝子破壊実験により、耐性獲得に関与し転写調節因子と親和性のタンパク質を同定する。

(5)上述タンパク質と *mar* オペロンの転写調節因子との相互作用解析およびドッキング・シミュレーションによるバイオフィーマティクス解析を行う。

(6)成果を総括して細菌の膜破壊型殺菌消毒剤に対する耐性化機構の全体像を明らかにする。

(7)得られた知見から多剤耐性菌の新規制御法を提案する。

3. 研究の方法

(1)平成 23 年度:

大腸菌の染色体を鋳型にして PCR 法で *mar* オペロンメンバー: MarR、MarA、MarB の遺伝子を取得、分子生物学的手法により高発現株を作製する (担当: 前田、佐藤)。次に、それらのタンパク質を単離、アフィニティークラムを作製する (担当: 前田)。以降の分子生物学的実験は、PCR 装置 (現有設備)、クリーンベンチ (現有設備)、恒温培養器 (現有設備)、吸光度計 (現有設備) を用いて実施する。

被検菌について、実験室内で各種の膜破壊型殺菌消毒剤の存在下で馴養培養しながら薬剤感受性を測定することにより耐性株の取得を行う(担当:前田)。耐性化実験には、クリーンベンチ(現有設備)、恒温振盪培養器(現有設備)、恒温培養器(現有設備)、吸光度計(現有設備)を用いて行う。膜破壊型殺菌消毒剤としては、カチオン性の第四アンモニウム塩である塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、両イオン性のアルキルジ(アミノエチル)グリシンなどを使用する。

薬剤に対する耐性株および野生株のプロテオーム解析を、タンパク質電気泳動システム(申請設備:等電点電気泳動装置、スラブ型電気泳動装置)、電気泳動ゲル撮影装置(申請設備:プリントグラフ)、アミノ酸配列解析などにより行い、両者で相違が見られ耐性獲得に関連していると考えられる特異的なタンパク質群を単離、同定する(担当:前田)。

(2)平成 24 年度:

膜破壊型殺菌消毒剤に対する耐性株の菌体破砕物(膜、細胞質内に分画)を超音波破砕機(現有設備)、遠心機(現有設備)で調製する(担当:前田)。

その試料を作製した*mar*オペロンメンバーのアフィニティーカラムを用いて、液体クロマトグラフィー装置(FPLC、現有設備)にかけ、各転写調節因子と親和性のある物質を単離、同定する。カラムの操作は低温室(現有設備)で行う(担当:前田)。

プロテオーム解析およびアフィニティーカラム実験の結果から、*mar*オペロンの転写調節因子と相互作用している可能性のあるタンパク質の主なものをピックアップし、大腸菌においてそのタンパク質の遺伝子破壊株を作製する(担当:前田、佐藤)。

遺伝子破壊株の作製が成功した場合は、膜破壊型殺菌消毒剤に対する耐性化試験を行う(担当:前田)。

遺伝子を破壊して耐性化しない実験データが得られた場合、その遺伝子のコードするタンパク質を耐性獲得に關与するタンパク質として同定する。一方、遺伝子破壊株の作製が成功しなかった場合は、遺伝子破壊の候補としたタンパク質を耐性獲得に關与するタンパク質として扱う(以上、担当:前田、佐藤)。

(3)平成 25 年度:

耐性化に關与していると考えられるタンパク質と*mar*オペロンの転写調節因子と

の相互作用を分子間相互作用解析装置(現有設備)で解析する(担当:前田、佐藤)。

そのタンパク質と*mar*オペロンの転写調節因子との結合、また転写調節因子とオペレーター*marO*との結合状態を、コンピューター・モデリングによるドッキング・シミュレーションによりバイオインフォマティクス解析を行う。さらに、転写調節因子と*marO*との結合を阻害するようなペプチドの分子設計を行う(以上、担当:佐藤)。

得られた成果を総括して、細菌の膜破壊型殺菌消毒剤に対する耐性化機構の全体像を明らかにするとともに、多剤耐性菌の新規制御法を提案する(担当:前田)。

4. 研究成果

平成 23 年度は、膜破壊型殺菌消毒剤であるカチオン性の第四アンモニウム塩の存在下で馴養培養しながら薬剤感受性を測定することにより大腸菌耐性株の取得を行った。結果、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウムについて耐性株を取得することが出来た。その他、タンパク質電気泳動システムを用いてプロテオーム解析を実施する準備を行った。

平成 24 年度は、得られた耐性株および野生株を用いてタンパク質電気泳動システムを用いてプロテオーム解析を開始した。またプロテオーム解析を含むバイオインフォマティクス解析システムの構築も同時に行った。その他、*mar* オペロンメンバー:MarR、MarA、MarB の高発現株の作製準備を行った。

平成 25 年度は、平成 24 年度に開始した耐性株のプロテオーム解析を継続し、また、同年度に構築を試みたバイオインフォマティクス解析システムの、耐性化因子の作用機作解析への適用を試みた。その他、*mar* オペロンメンバー高発現株、遺伝子破壊株の作製準備を行った。

平成26年度は、継続中の耐性株のプロテオーム解析の結果、野生株に比して耐性株に特異的に発現量が増大したタンパク質を複数確認することができた。さらに鮮明な電気泳動像を得て、詳細に解析するために、タンパク質試料の精製など改善の余地があったため、プロテオーム解析を継続実施した。他に高発現株、遺伝子破壊株の作製準備および耐性化因子に關係するタンパク質を取得するためのアフィニティーカラムの作製準備を行った。また平成25年度に構築を試みたプロテオーム解析を含むバイオインフォマティクス解析システムを用い、大腸菌の多剤耐性を担う*mar*オペロンの転写調節因子の一つである転写抑制因子MarRの複数の変異体に見出された点変異の多剤耐性獲得に及ぼす影響を調べた。その結果、MarR変異体の点変異が染色体DNA上のオペレーター配列である*marO*との結合部位として知られている領

域にある場合、MarR上のmarOとの結合部位の立体構造が直接変形することにより、それ以外の領域にある場合、marOとの結合部位以外のMarR上の二次構造が変形することによりmarOとの結合部位の立体配置が変化することにより、それぞれMarRとmarOとの結合性が変化し、marオペロンの転写の抑制が弱まり、結果として転写が活性化され、主にMarAの高発現から様々な多剤耐性に関与する耐性化因子の発現活性化を引き起こすことが示唆された。

以上から、marOと親和性が高い、DNA結合性の物質（例えばタンパク質）によりmarオペロンの転写の抑制を行うことにより、多剤耐性菌の出現を制御できる可能性が示された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takuya Maeda, Takao Sato, Role of mar operon in acquisition of resistance to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*, Journal of Food Science and Engineering, 査読有, 2, 2012, P.531

〔学会発表〕(計 4 件)

Takuya Maeda, Takao Sato, What a role do transcription factors, MarA and MarR, play in acquisition of resistance to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*?, 第36回日本分子生物学会年会, 2013/12/5, 神戸ポートピアホテル(神戸市中央区)

Takuya Maeda, Takao Sato, Bioinformatic analysis of interaction of transcription repressor MarR in *Escherichia coli* with quaternary ammonium compound, Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology 2012, 2012/10/15, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

高橋淑恵、乾早織、佐藤(美甘)江利子、西原力、佐藤孝雄、前田拓也, 大腸菌の界面活性剤系消毒剤に対する耐性化機構の解明, 日本薬学会第24回微生物シンポジウム, 2012/9/3, 常翔学園大阪センター(大阪市北区)

6．研究組織

(1)研究代表者

前田 拓也(MAEDA, Takuya)
兵庫医療大学・薬学部・准教授
研究者番号: 40270300

(2)研究分担者

佐藤 孝雄(SATO, Takao)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号: 80243731