

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760643

研究課題名(和文) 病原性阻害技術への応用を目指した高機能アシル化ホモセリンラクトン分解酵素の探索

研究課題名(英文) Identification and characterization of a novel functional acylhomoserine lactone-degrading enzyme for preventing bacterial infection

研究代表者

諸星 知広 (Morohoshi, Tomohiro)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90361360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アシル化ホモセリンラクトン(AHL)分解系を利用したクオラムセンシング阻害技術は、新しい病原性阻害技術として注目されている。本研究では、好熱菌 *Thermaerobacter marianensis* ゲノム上に既知のAHLラクトナーゼの相同遺伝子が存在するを見出し、この遺伝子を *aiiT* と命名した。精製した *AiiT* タンパク質によるAHL分解の最適温度を調べたところ、既知のAHLラクトナーゼが50℃付近であるのに対し、*AiiT* は70℃付近と非常に高いことが明らかとなった。さらに、*AiiT* は80℃、10分間の熱処理でも50%程度の活性を維持していたことから、熱安定性も高いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： *Thermaerobacter marianensis* is an extremely thermophilic bacterium. N-Acylhomoserine lactone (AHL) is a quorum-sensing signal molecule used by many gram-negative bacteria. We found AHL-degrading gene homologue (designated *aiiT*) in the genome sequences of *T. marianensis* JCM 10246. *AiiT* has 59.7%, 21.2, and 11.2% identities with AhIS from *Solibacillus silvestris*, *AiiA* from *Bacillus cereus*, and *AidC* from *Chryseobacterium* sp., respectively. Purified *AiiT*, as a maltose-binding fusion protein, showed high AHL-degrading activity against all tested AHLs at the temperatures ranging from 40 to 80 °C. *AiiT* displayed its maximal activity at high temperature range, 60 to 80 °C, and showed higher thermostability than the other AHL lactonases.

研究分野：分子生物学

キーワード：クオラムセンシング アシル化ホモセリンラクトン *Thermaerobacter* ラクトナーゼ 分解

1. 研究開始当初の背景

細菌のような単細胞生物も、化学物質を介して互いに連携を取り、集団として行動していることが明らかになってきた。このような機構の一つにクオラムセンシングがある。クオラムセンシングとは、細菌が増殖し、ある一定の菌体密度に達すると、特定の遺伝子発現を活性化するためのコミュニケーション機構である。クオラムセンシングでは、オートインデューサーと呼ばれるシグナル物質を用いて菌体密度を認識している。細菌の中でも特にグラム陰性細菌は、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) をオートインデューサーとして使うことが知られている。クオラムセンシング機構を持つ多くの病原性細菌では、クオラムセンシングにより病原性の発現が制御されていることから、クオラムセンシングを阻害することにより、病原性を抑制する技術に注目が集まっている。これまでに、様々な手法による Quorum Sensing 阻害技術が提案、研究されてきた。その中の一つに、AHL 分解酵素を用いる手法がある。近年、AHL の分解能力を有する細菌が数多く発見され、様々な AHL 分解遺伝子がクローニングされてきた。これらの AHL 分解機構には主に 2 種類が知られており、AHL のラクトン環を加水分解して開裂する AHL ラクトナーゼと、AHL のアミド結合を切断して脂肪酸とホモセリンラクトンに分解する AHL アシラーゼが代表的な AHL 分解酵素である。これらの AHL 分解酵素を用いることにより、病原性細菌のクオラムセンシングを阻害し、病原性発現を抑制することが可能である。その一方で、実用的に安定な AHL 分解酵素に関する研究例は少なく、特に高度な耐熱性を有する AHL 分解酵素については、報告例が限られている。安定な AHL 分解酵素の研究は、長期的に AHL 分解活性を持続させる必要がある素材表面への固定化など、幅広い分野への応用例が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、高温環境下でも安定した AHL 分解活性を有するような新規 AHL 分解酵素を取得するために、好熱性細菌から新規 AHL 分解遺伝子をクローニングし、AHL 分解酵素の発現系を構築するとともに、酵素の熱安定性や至適温度を詳細に解析することで、工学的応用に向けた基礎データを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Thermaerobacter* 属細菌の染色体抽出及び AHL 分解遺伝子のクローニング

Thermaerobacter marianensis JCM 10246 株、*Thermaerobacter composti* JCM 15650 株、*Thermaerobacter nagasakiensis* JCM 11223 株は、Marine Broth 2216 (日本 BD) を用いて 75 °C で 1 週間培養した。遠心分離により集菌し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて染色体を抽出した。AHL 分解遺伝子

ホモログある *aiiT* を増幅するためのプライマーとして、*aiiT*-1 (5'-ATG TCC GTG CGG ATG AAA CTG TAC-3') および *aiiT*-2 (5'-CAT GGG AAC GAA GGT GAA GAC CAC-3') を使用した。PCR 増幅の DNA ポリメラーゼには Blend Taq (東洋紡) を使用し、熱サイクルは 94 °C で 30 秒、60 °C で 30 秒、74 °C で 1 分を 27 サイクルで行った。PCR 断片は pGEM-T easy system I キット (プロメガ) を用いてクローニングし、BigDye Terminator ver. 3.1 sequencing キット及び ABI 3500 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を使用して塩基配列の決定を行った。

(2) *AiiT* タンパク質発現プラスミドの構築

T. marianensis JCM 10246 株由来 *AiiT* の酵素精製を行うために、*AiiT* をマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-*AiiT*) として発現させるプラスミドの作成を行った。*aiiT* 遺伝子は複数のレアコドンを含んでいたため、コドンの最適化を行うとともに、*aiiT* 遺伝子の前後に制限酵素サイトを付与した人工遺伝子を作成した (DDBJ/ENA/GenBank アクセッション番号 AB935246)。 *aiiT* 遺伝子は、制限酵素 *Bam*HI と *Hind*III を用いて切断し、同じく制限酵素 *Bam*HI と *Hind*III で切断した MBP 融合タンパク質発現ベクター pMAL-c2x とライゲーションさせた。このプラスミドを pMAL-*aiiT* と命名した。

(3) *AiiT* タンパク質の発現及び精製

T. marianensis JCM 10246 株由来 *aiiT* 発現プラスミド pMAL-*aiiT*、過去の研究で作成した *Bacillus cereus* 由来 AHL ラクトナーゼ *AiiA* 発現プラスミド pMAL-*aiiA*、*Solibacillus silvestris* 由来 AHL ラクトナーゼ *AhIS* 発現プラスミド pMAL-*ahIS*、*Chryseobacterium* sp. 由来 AHL ラクトナーゼ *AidC* 発現プラスミド pMAL-*aidC*、及びネガティブコントロールである pMAL-c2x ベクターを形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) 株を液体培地に接種し、37 °C で一晩前培養を行った。坂口フラスコに作成した 100 mL の LB 液体培地に前培養液を 1 mL 接種し、37 °C で 2 時間培養を行った後、100 mM IPTG を 1 mL 加えてタンパク質発現を誘導した。さらに 12 時間培養を行い、50 mL チューブに集菌して細胞溶解液 BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) を 5 mL 加えて懸濁し、超音波破碎を行った。細胞破碎液は遠心分離し、上清を 0.2 μm メンブレンフィルターディスクでろ過することでタンパク質サンプルとした。タンパク質の精製は、クロマトグラフィーシステム ÄKTA prime plus 及び MBPTrap アフィニティークロマトグラフィーカラム (GE ヘルスクエア) を用いて行った。カラムはカラムバッファー (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.4) で平衡化し、タンパク質サンプルを通過させて MBP 融合タンパク質を結合させた。

MBP 融合タンパク質は 10 mM マルトース溶液を流すことで遊離させ、フラクションをマイクロチューブに集めることで精製した。精製タンパク質の確認は、SDS-PAGE でバンドを確認することで行った。

(4) AHL レポーター株を用いた AHL 分解活性の検出

外部の AHL に応答して紫色色素を生産する AHL バイオセンサー *Chromobacterium violaceum* VIR07 株を使用し、精製タンパク質の AHL 分解活性の検出を行った。基質の AHL として、*N*-デカノイルホモセリンラクトン (C10-HSL) を使用した。50 μ L の精製タンパク質溶液、49 μ L のカラムバッファー、1 μ L の 10 mM C10-HSL を混合し、40、60、80 で 30 分間インキュベートを行った。VIR07 株の一晚培養液を LB 寒天培地に混合したプレートを作成し、その上にペーパーディスクを配置し、AHL 分解サンプルを 50 μ L スポットし、30 で一晚インキュベートを行った。AHL 分解活性は、ペーパーディスク周りの紫色色素生産の有無から判断した。

(5) HPLC による至適 AHL 分解温度の比較

各種 AHL 分解酵素の至適 AHL 分解温度を調べるため、様々な温度で AHL を分解させ、その反応混合液を逆相カラムを用いた HPLC によって解析した。AHL 分解反応を行うために、1 μ L の酵素溶液、146.5 μ L のカラムバッファー、2.5 μ L の 200 mM C10-HSL を混合し、30、40、50、60、70、80、90 で 5 分間インキュベートを行った。AHL 分解反応は 300 μ L のアセトニトリルを混合することで停止した。Crestpak C18T-5 逆相カラム (日本分光) を取り付けられた HPLC システムは、移動相である水/アセトニトリル/酢酸 (32/68/0.2) で平衡化した。20 μ L のサンプルをインジェクトし、移動相を 1 mL/min の流速で送液し、波長 205 nm の紫外吸収を測定し、C10-HSL のピーク面積を計算することで 5 分間の分解量を計算した。各精製タンパク質で最も高い活性を示した温度の値を 100% とし、各温度の活性を相対値として比較した。

(6) HPLC による熱安定性の比較

各種 AHL 分解酵素の熱安定性を調べるため、様々な温度で酵素を熱処理し、その熱処理酵素と AHL を反応させ、熱処理後の残存活性を測定した。まず、精製酵素溶液 50 μ L を 30、40、50、60、70、80、90 で 10 分間インキュベートした。AHL 分解反応を行うために、1 μ L の熱処理酵素溶液、146.5 μ L のカラムバッファー、2.5 μ L の 200 mM C10-HSL を混合し、各酵素の至適反応温度付近で 5 分間インキュベートを行った。C10-HSL 分解量は、(5) と同様に HPLC を用いて検出し、熱処理を行っていないサンプルの活性を 100% とし、各温度で処理後の活性を相対値と

して比較した。

4. 研究成果

(1) 好熱菌由来 AHL 分解遺伝子の探索

過去の研究により、ジャガイモ葉由来 *Solibacillus silvestris* StLB046 株から、メタロ- β -ラクタマーゼファミリーに属する AHL ラクトナーゼ遺伝子 (*ahIS*) をクローニングすることに成功している。そこで、*AhIS* のアミノ酸配列を基に相同性検索を行ったところ、海洋性好熱細菌 *T. marianensis* JCM 10246 株のゲノム上に *ahIS* 相同性遺伝子が存在することが明らかになった。さらに、PCR を用いて他の *Thermaerobacter* 属細菌のゲノムからも *ahIS* 相同性遺伝子のクローニングを行ったところ、*T. composti* JCM 15650 株および *T. nagasakiensis* JCM 11223 株からも *ahIS* 相同遺伝子のクローニングに成功した。これらの遺伝子を、*aiiT* (auto-inducer inactivation gene from genus *Thermaerobacter*) と命名した。

(2) AiiT による AHL 分解活性の確認

AiiT の AHL 分解活性を酵素レベルで解析するために、AiiT を MBP との融合タンパク質として発現、精製を行った。MBP 融合タンパク質発現プラスミド pMAL-c2x に *aiiT* を導入したプラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) に導入してタンパク質発現を誘導した。MBP 融合タンパク質はアミロースレジンカラムに結合させ、マルトース溶液を用いて遊離させ、精製を行った。SDS-PAGE 解析により、予想された分子量サイズにバンドが確認できたことから、以後の実験では、これらの精製タンパク質を使用した。精製したタンパク質と C10-HSL を混合し、残存 C10-HSL を AHL レポーター株である VIR07 株を用いて検出した。その結果、ネガティブコントロールである MBP-LacZ α は AHL 分解活性を示さず、AiiT との融合タンパク質は AHL 分解活性を示したことから、AiiT が AHL 分解酵素として機能することが明らかとなった (図 1)。さらに、AiiT は 80 の反応温度でも C10-HSL の分解活性を示したことから、耐熱性 AHL 分解酵素として機能することが明らかとなった。

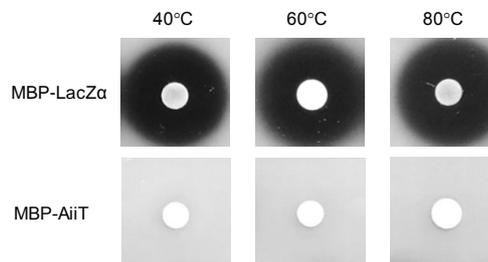


図 1. MBP-AiiT の AHL 分解活性の確認

(3) AiiT の至適反応温度の解析

AiiT 及びメタロ- β -ラクタマーゼファミリーに属する各 AHL ラクトナーゼの精製タンパ

ク質を用い、AHL 分解の至適反応温度の解析を行った。至適 AHL 分解温度を調べるために、C10-HSL を様々な温度で精製タンパク質により処理し、残存 C10-HSL 濃度を HPLC により定量することで AHL 分解活性を測定した。その結果を図 2 に示す。酵素活性の至適温度は、AiiA と AidC が 40 付近、AhIS が 50 付近であったのに対し、AiiT は 70 付近と他の酵素と比較して非常に高いことが明らかとなった。

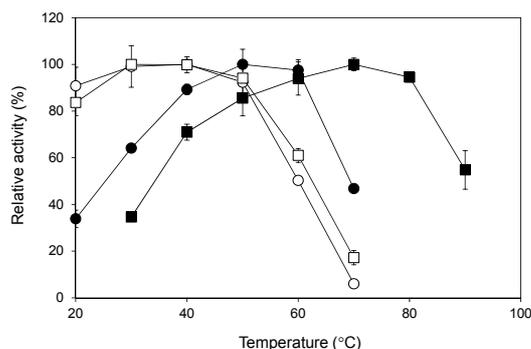


図 2. AiiT (○) AhIS (□) AiiA (●) 及び AidC (■) における AHL 分解の至適温度

(4) AiiT の熱安定性の解析

(3)と同様に、AiiT 及び各 AHL ラクトナーゼの精製タンパク質を用い、様々な温度で 10 分間ブレインキュベート後の残存 AHL 分解活性を測定することで、酵素の熱安定性を調べた。その結果を図 3 に示す。AiiT 以外の酵素は、70 以下のブレインキュベートでほぼ活性が消失してしまうのに対し、AiiT は 70 のブレインキュベートでも 80%程度の活性が残存しており、さらに 80 のブレインキュベートでも 50%程度の活性が残存していた。以上より、AiiT は他の AHL 分解酵素と比較して、高い熱安定性を有することが明らかとなった。

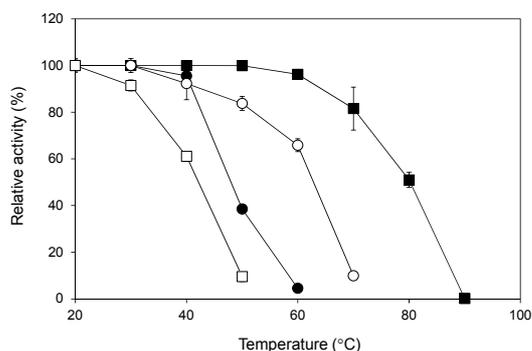


図 3. AiiT (○) AhIS (□) AiiA (●) 及び AidC (■) における AHL 分解の熱安定性

(5) 結言

本研究により、海洋性好熱細菌である *Thermaerobacter* 属細菌は、既知の AHL ラクトナーゼ遺伝子と相同性を示す *aiiT* 遺伝子を有しており、AiiT は耐熱性 AHL 分解酵素と

して機能することが明らかとなった。高温でも活性を有する AHL ラクトナーゼの報告は本研究が初めてであり、安定的に Quorum Sensing を阻害することが可能な技術の開発に繋がるものと期待される。

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. Morohoshi, Y. Tominaga, N. Someya, T. Ikeda, Characterization of a novel thermostable *N*-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium *Thermaerobacter marianensis*. J. Biosci. Bioeng., in press 査読有

[学会発表](計 8 件)

諸星知広, 菊池沙緒里, 染谷信孝, 池田宰, *Lysinibacillus* 属細菌由来新規アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の機能解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2015 年 3 月 26 ~ 29 日 (岡山大学)

諸星知広, 池田宰, Quorum Sensing シグナル物質分解遺伝子の多様性と応用, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 9 ~ 11 日 (札幌コンベンションセンター)

T. Morohoshi, R. Sato, T. Yamaguchi, N. Someya, T. Ikeda, Identification and characterization of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading gene from the coagulase-negative staphylococci (CNS), 5th ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, October 18-21, 2014 (San Antonio, USA)

諸星知広, 富永良昭, 池田宰, 好熱性 *Thermaerobacter* 属細菌由来アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の機能解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 27 ~ 30 日 (明治大学)

富永良昭, 国場有希子, 滝本啓, 池田宰, 染谷信孝, 諸星知広, 新規アシル化ホモセリンラクトン分解酵素 AhIS ファミリーの機能解析, 第 29 回日本微生物生態学会大会, 2013 年 11 月 23 ~ 25 日 (鹿児島大学)

諸星知広, 植物共生細菌における Quorum Sensing シグナリングの解析と病原性抑制技術への応用, 日本細菌学会 第 7 回若手研究者育成のためのワークショップ「若手研究者によるバイオフィルム研究ワークショップ」, 2013 年 6 月 2 日 (国立感染症研究所)

諸星知広, 王文昭, 染谷信孝, 池田宰, ジャガイモ根由来 CFB 細菌

Chryseobacterium sp. から単離した新規
アシル化ホモセリンラクターゼの解
析, 第 28 回日本微生物生態学会大会,
2012 年 9 月 19~22 日 (豊橋技術科学大
学)

W. Z. Wang, T. Morohoshi, N. Someya,
T. Ikeda, AidC, a novel
N-acylhomoserine lactonase from the
potato root-associated
Chryseobacterium sp. StRB126, a
member of *Cytophaga-Flavobacteria-
Bacteroides* (CFB) group, The 14th
International Symposium on Microbial
Ecology (ISME14), August 19-24, 2012
(Copenhagen, Denmark)

〔その他〕

生物工学研究室ホームページ

[http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/
bio/](http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/bio/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸星 知広 (MOROHOSHI TOMOHIRO)

宇都宮大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90361360

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし