

Title	細菌の情報伝達による薬剤耐性、病原性の調節に関する研究
Author(s)	平川, 秀忠
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46543">https://hdl.handle.net/11094/46543</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	平川秀忠
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第20242号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	細菌の情報伝達による薬剤耐性、病原性の調節に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人  (副査) 教授 山元 弘 教授 那須 正夫 教授 本田 武司

#### 論文内容の要旨

細菌の薬剤耐性化は感染症治療において大きな問題となっている。中でも、薬剤排出蛋白質は多くの病原細菌の潜在的な多剤耐性化の主因子であると考えられている。例えば、大腸菌においてはこのような薬剤排出システムが20種類存在していることが見出されている。しかしながら、ほとんどの排出蛋白質遺伝子はそれぞれを単独に欠損させた場合には薬剤感受性にならないことから通常環境中では発現していないと考えられてきた。本研究では、排出蛋白質がどのようにして発現が制御されており、どのようなシグナルおよび条件で発現するのかという疑問に答えようとした。

まず排出蛋白質の発現制御因子の候補として、環境感知応答システムである二成分情報伝達系に着目した。薬剤排出蛋白質が細菌にとっての生体異物からの防御因子であるということと考えると多くの排出蛋白質が二成分情報伝達系によって制御されるのは当然のことであると著者は考えた。そこで、大腸菌に存在する全二成分情報伝達系と薬剤耐性、排出蛋白質との関係を網羅的に調べた。その結果、17種類の二成分情報伝達系が薬剤耐性に関与していることを見出し、8種類の排出蛋白質遺伝子発現が5種類の二成分情報伝達系によってコントロールされていることを証明した。そして、中にはペニシリン、セファロスポリン、カルバペネム系 $\beta$ -ラクタム剤数種に対して中程度から高度な耐性に関与している二成分情報伝達系を発見することもできた。これらの結果より、二成分情報伝達系が $\beta$ -ラクタム剤の高度耐性に関与しているという事実をグラム陰性細菌ではじめて見出したことで二成分情報伝達系は抗生剤療法、薬剤耐性菌という問題とも密接に関わっていることを実験的に明らかにした。

次に、排出蛋白質の発現が実際どのようなシグナルによって誘導されるのかを検証した。本研究では、多くの細菌の代謝産物であるインドールに着目した。その結果、インドール存在下では7種類の排出蛋白質遺伝子発現が顕著に増大し、排出蛋白質依存的な薬剤耐性も誘導されていたことを突き止めた。さらに、インドールによる排出蛋白質の誘導機構を検討した結果、インドールが二成分情報伝達系依存、非依存の経路で排出蛋白質の発現を誘導することを明らかにした。現在まで排出蛋白質の誘導物質に関しては多くが明らかになっておらず、これまで本研究結果のようにひとつのシグナルが同時に複数の排出蛋白質の発現を大きく増大させる報告はなされていなかった。さらに、インドールは大腸菌のみならず多くの常在菌でもその存在が確認されている。これらの結果から、インドールシグナルは細菌の薬剤耐性化を決定するひとつのキーとなっている可能性が示唆された。

一方で、インドールは大腸菌の細胞密度とともに増大し、定常期では細胞外(培地中)に蓄積していることも知ら

れている。この事実から、次に排出蛋白質の発現と大腸菌の細胞密度との関係について調べた。その結果、過去の報告ではほとんど発現していないと考えられていた排出蛋白質は定常期では発現が顕著に増大することを見出した。さらに、定常期の大腸菌では排出蛋白質依存的な薬剤耐性も誘導されていた。それに対してインドール合成酵素（トリプトファナーゼ）遺伝子 *tnaA* を欠損させた大腸菌では定常期での排出蛋白質の発現は抑えられていた。このことより、排出蛋白質は常に発現していないのではなく定常期で細胞外に蓄積するインドールがシグナルとなって発現が誘導されるということを実験的に証明した。

次なる疑問としてインドールが薬剤耐性以外にどのようなフェノタイプに関与しているのかを検証した。その中で、インドールと病原性との関係について調べた。腸管出血性大腸菌のように宿主の腸管で感染を惹き起こす細菌は、腸管への付着効率、腸管への傷害性が感染において重要なファクターである。腸管への付着、傷害を与える病原因子として TypeIII 分泌システムが主要な因子として知られている。そこで、インドールによって TypeIII 分泌システムを介した病原性蛋白質の発現、分泌レベルが変化するか否かを調べた。この結果、インドール合成酵素を欠失させた大腸菌では TypeIII 分泌蛋白質の発現量と分泌量が顕著に減少し、それに伴い HeLa 細胞への感染効率が低下することを見出した。このことから、大腸菌はインドールシグナルを利用することで定常期での病原性蛋白質の発現増大・分泌、そして自身の薬剤耐性を増強し、結果として宿主への感染を効率的に行っていると考えられた。

さらに本研究では、インドール以外の排出蛋白質発現誘導物質を同定するため Global Screening を行った。この結果、N-acetyl-D-glucosamine、Glucose、Glucosamine といった PTS sugar を発見した。これらの PTS sugar による誘導には CRP-cAMP 依存性の Catabolite control が関与していた。PTS sugar 非存在下では CRP-cAMP が排出蛋白質の一つである MdtEF の発現を抑制し、PTS sugar 添加時においては、CRP-cAMP による発現抑制が解除されることで、結果的に MdtEF の発現が促進されることを明らかにした。

一方で、多くの薬剤排出蛋白質の発現レベルが通常低いことに着目し、排出蛋白質発現抑制因子の同定とその発現抑制機構の解析も行った。発現抑制因子をランダムノックアウト法により探索した結果、排出蛋白質 AcrD と MdtABC の発現が鉄応答性の転写制御因子 Fur によって抑制されていることを見出した。そして、鉄欠乏状態では、Fur による発現抑制が解除され、AcrD、MdtABC の発現が誘導されることもわかった。

本研究により、薬剤排出蛋白質が通常ほとんど発現していないのは、単にプロモーターの活性が低いという単純な問題ではなく、抑制性因子によって厳密に発現が抑制されており、何らかのシグナル、もしくは環境変化により発現が誘導されるということを証明した。これらの結果は、細菌の薬剤耐性化は今日までに考えられてきた単なる抗生剤の乱用で誘発されるだけでなく、細菌が自ら産生する情報伝達分子あるいは、ある種の環境変化を感知することで薬剤耐性をコントロールしていることを意味している。本研究成果は、病原細菌の薬剤耐性化や、感染発症のメカニズムをトータルに理解する上での貴重な情報になりうることで期待される。

## 論文審査の結果の要旨

異物排出遺伝子は細菌に数多く内在しているが、その大部分は通常発現していない。平川君はこの発現誘導機構について研究し、多くの論文を出版した。まず、細菌の環境感知応答システムである二成分情報伝達系によって発現誘導されることを突き止め、大腸菌の 30 種類の二成分系転写因子全てを網羅的にクローニングし、20 種類の内在性異物排出遺伝子との間でどのような発現誘導ネットワークが構築されているかという全貌を明らかにした。さらに、それらの情報伝達系を誘導するリガンドの探索を行い、アミノ酸代謝の結果生じる有害物質であるインドールが定常期の細胞間情報伝達物質として働き、異物排出遺伝子発現を誘導することを見出し、その情報伝達経路を詳しく解析した。さらに、インドールシグナルが、異物排出遺伝子だけでなく、菌の病原性に関与する遺伝子の発現をもコントロールしていることを見出した。彼の一連の研究は、異物排出タンパクが原因となる多剤耐性の克服、並びに、菌を殺さずに病原性のみを抑え無害化するという全く新しい創薬の方向性に向かったの大きな一歩として、大阪大学大学院薬学系研究科博士の学位にふさわしいものと認められる。