



Title	サルモネラ異物排出トランスポーターAcrAB発現制御ネットワーク解析
Author(s)	二階堂, 英司
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58567
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏名	二階堂 英 司
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 24511号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬学専攻
学位論文名	サルモネラ異物排出トランスポーターAcrAB発現制御ネットワーク解析
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 那須 正夫 教授 高木 達也 教授 宇野 公之

論文内容の要旨

異物排出トランスポーターは多くの細菌に存在する内在性の薬剤耐性因子である。これまでにサルモネラにおいては少なくとも9種類の異物排出トランスポーターが存在することがポストゲノム解析により明らかにされている。その中でも、AcrABは最も強力に機能している異物排出トランスポーターである。近年、サルモネラAcrABは薬剤耐性のみならず、サルモネラの生育環境における適応に関係していることが明らかにされつつある。AcrABによるサルモネラの生育環境適応機構を詳細に理解するうえで、AcrABの発現制御ネットワークを明らかにする必要があると考えられた。そこで、私はサルモネラ異物排出トランスポーターAcrABの発現制御ネットワークの解析を行った。

まず、私は、AcrABがどのようなシグナルで発現制御が起こるか検討を行った。その結果、腸内に存在すると考えられる化合物のインドールがAcrABを誘導するということが分かった。そこで、私はインドールによるAcrAB誘導機構について検討を行った。サルモネラ臨床分離株および大腸菌における解析の結果、サルモネラAcrABの発現制御は、MarA、Rob、SoxS、AcrR、そして、RamAにより行われている可能性が考えられた。そこで、これら因子を欠損させたサルモネラ菌株を作製し、インドールによるAcrAB発現制御がどのようになるか考えられるか検討を行った。その結果、インドールによるAcrAB誘導にはRamAが関係していることが明らかになった。また、インドールと同様に腸内に存在すると考えられる、大腸菌代謝物や胆汁酸もサルモネラAcrABをRamA依存的に誘導することが分かった。そこで私は次に、これら物質によるRamAを介したAcrAB誘導機構の詳細に関して検討を行った。RamAは*acrA*上流の161bpから142bpにかけて結合するアクチベーターであるということが分かった。この結果から、RamAのDNA認識機構は、-AYNGCACNNWNNRYYAAAYN- (N = any base, R = A/G, W = A/T, Y = C/T)という特異性の低い配列を認識して行われていることが示唆された。そして、イン

ドールはRamAを誘導して*acrAB*を誘導するのに対し、胆汁酸はRamA発現レベルに影響を与えずRamAと結合して*acrAB*を誘導することが分かった。このことから、腸内に存在するような物質によってAcrABがRamAを介して誘導されること、そして、RamAはシグナルに応じて過剰発現、ないしは、活性化を行うことにより、*acrAB*の発現を誘導するレギュレーターであることが分かった。

次に、私は、インドールによるAcrABおよびRamAの誘導機構の検証を行った。*ramA*の上流に存在する*STM0580 (ramR)*は*ramA*の発現抑制に関与している。そこで、私は、インドールによる*ramA*および*acrAB*誘導に*ramR*が関係している可能性を考え検討したところ、インドールによる*ramA*および*acrAB*誘導にはRamRが関係していることが分かった。また、RamRは*ramA*の上流に結合して、*ramA*発現を抑制するリプレッサーであるということが分かった。インドールは細胞膜に溶解して呼吸鎖を障害しスーパーオキシドを産生することで、細菌に酸化ストレスを引き起こす化合物である。そこで私は、インドールの酸化ストレス誘起作用がRamRを介した*ramA*誘導に関係していると考え検討したが、両者に関係性は見られなかった。そして、私は、他の酸化ストレス剤がRamAやAcrAB誘導を引き起こす可能性を考え、検討を行った。パラコートは呼吸鎖に障害を与えて、スーパーオキシドを産生する。パラコートが*ramA*や*acrAB*を誘導するか検討を行ったところ、パラコートは*ramA*を誘導しないが、*acrAB*を誘導することを明らかにした。そこで、パラコートによる*acrAB*誘導機構について検討を行った。その結果、パラコートはRamAでなくSoxSを介してAcrABを誘導するということが分かった。また、パラコートとSoxSとの相互作用様式について検討を行ったところ、パラコートはSoxSを誘導するということが分かった。

最後に私は、サルモネラRamRの結晶化を行った。RamRタンパク質をアフィニティタグフリーの状態 で精製を行い、結晶化と回折実験を行ったところ、2.6Å分解能の回折強度データを取得することに成功した。分子置換による位相決定に至らなかったため、セレンを用いた多波長異常分散法を用いることにし、セレンメチオニル化RamRの結晶化と、それを用いた構造解析を行った。その結果、RamRは9個の α -helixにより構成されるダイマーで、TetR familyレギュレーターに特徴的な構造を持っていることが分かった。また、RamRは $\alpha 2$ から $\alpha 3$ にかけて、helix-turn-helix motif (HTH motif)を保存していること、そして、 $\alpha 4$ から $\alpha 9$ にかけて、基質を収容できるような空隙が存在するということが分かった。このことから、RamRはN末において、DNAと結合し、C末において基質と結合していることが推察された。次に、私は、RamRの基質複合体の構造解析を行った。色素であるrhodamine 6GおよびethidiumがRamRを介してRamA誘導に関係していることから、両化合物がRamRの基質である可能性が考えられた。そこで、私はrhodamine 6GおよびethidiumとRamRとの複合体構造解析を行った。その結果、rhodamine 6GおよびethidiumはRamRの $\alpha 4$ から $\alpha 9$ にかけて構成される空隙に結合していることが分かった。Rhodamine 6GならびにethidiumはRamRのPhe155に対して平行に配置されていたことから、両化合物はRamRのPhe155と π - π スタッキング相互作用によって結合していると考えられた。また、両化合物と水素結合をしているRamR残基も存在するということが分かった。その水素結合の組み合わせが化合物により異なることから、RamRは基質をマルチサイト結合により認識している可能性が考えられた。また、インドールによるRamRを介した*ramA*誘導にも、RamRのPhe155が関係している可能性が示唆された。

以上により、サルモネラAcrABは、インドールや胆汁酸などの環境シグナルや、rhodamine 6G、ethidium、そして、パラコートといった異物などの様々な物質により、RamAやRamRやSoxSを介して誘導されることが分かった。また、RamRの構造解析により、RamRの基質認識メカニズムが π - π スタッキング相互作用や水素結合を用いたマルチサイト結合という比較的柔軟な認識メカニズムによることが分かった。このことから、サルモネラAcrABによる環境適応は、認識AcrAB発現制御シグナルの伝達に関係する因子の使い分けや、DNA認識機構や、シグナル認識機構の柔軟さに起因するものであると考えられる。このような柔軟さを持ったシステムは環境適応に非常に有利に働いていると推測される。

論文審査の結果の要旨

平成23年2月2日の審査委員会において、二階堂英司君の博士学位論文「サルモネラ異物排出トランスポーターAcrB発現制御ネットワーク解析」について審査を行った。二階堂君は、サルモネラが環境センシングにより異物排出トランスポーターを発現誘導する現象を発見し、その制御因子としてRamA、RamRを同定し、その発現制御機構を詳細に分子レベルで解析した。さらに、制御因子RamRの結晶構造解析にも初めて成功し、マルチサイト型多剤結合因子であることを証明した。彼が第一著者のもの2報を含めてこれまでに主論文4報を世界的な学術誌に出版しており、さらに1報を執筆中である。二階堂君の論文は博士学位論文としてふさわしいものと認められた。