

環境変化に応じた大腸菌遺物排出システムの制御

山本, 健太郎 / YAMAMOTO, Kentaro

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

57

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

4

(発行年 / Year)

2016-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00012871>

環境変化に応じた大腸菌異物排出システムの制御

REGULATION OF XENOBIOTIC EFFLUX SYSTEMS IN *ESCHERICHIA COLI* IN RESPONSE TO ENVIRONMENTAL CHANGES

山本健太郎

Kentaro YAMAMOTO

指導教員 川岸郁朗

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻生命機能学領域博士後期課程

The RND-type efflux system of bacteria plays a major role in multidrug resistance. However, it has been unclear how an RND-ternary complex is assembled and the expression of genes encoding its components is regulated under physiological conditions. In this study, I asked how newly synthesized transporter molecules assemble into a ternary complex and how indole acts as a signaling molecule for the expression of the inducible transporter gene *acrD*. I demonstrated that the expression of new transporter molecules can destabilize preexisting RND-type efflux complexes to facilitate transporter exchange. This exchange is suppressed by substrates of the transporter that is already in the complex. Moreover, I found that the expression of *acrD* is induced by the intracellular accumulation of indole via the two-component regulatory system BaeSR. These mechanisms may enable the bacterium to rapidly acquire the resistance to a newly encountered toxic compound. Next I examined the cellular protein imaging using labeling methods other than fluorescent proteins. I demonstrated that FIAsh a fluorescently labeled ligand (Ser-FAM) for the amino acid chemoreceptor are useful for imaging signaling components in *Vibrio cholerae*.

Key Words: antibiotic resistance, fluorescent labeling, gene expression, molecular imaging, transporter

1. 緒言

近年、抗生物質の使用の増加とともに、薬剤耐性菌、特に多剤耐性菌の出現が世界的な社会問題となっている。グラム陰性菌の多剤耐性化の主要な要因の一つは RND (resistance-nodulation-cell division) 型異物排出システムによる薬剤の能動的排出である [1]。このシステムは以下の 3 つのコンポーネントから構成される。細胞内膜に局在し、基質を捕獲・輸送する「内膜トランスポーター」、外膜に局在し、内膜トランスポーターから輸送される基質の輸送通路である「外膜チャネル」、両者を繋ぐ「膜融合タンパク質」である。内膜トランスポーターは特殊な基質結合ポケットにより化学的構造・性質の異なる複数の薬剤を認識可能な多剤排出トランスポーターである [2]。大腸菌は RND 型異物排出システムを 5 種類もつ。そのうち、内膜トランスポーター AcrB、膜融合タンパク質 AcrA、外膜チャネル TolC からなる AcrB-AcrA-TolC 複合体 (図 1) のみが構成的に発現しており、他の複合体の多くは、外環境からの刺激に応答して発現が誘導される [3]。特に AcrB ホモログである AcrD は AcrB と同様に AcrA、TolC と共に AcrD-AcrA-TolC 複合体を作ることが知られてい

る [4]。では、環境刺激により新たに合成されたトランスポーターは、どのような過程を経て複合体が構築され、機能を発揮するのだろうか。本論文第二章では、緑色蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) を用いてトランスポーターの膜内動態を解析し、異物排出タンパク質複合体の構築と機能を解析した。

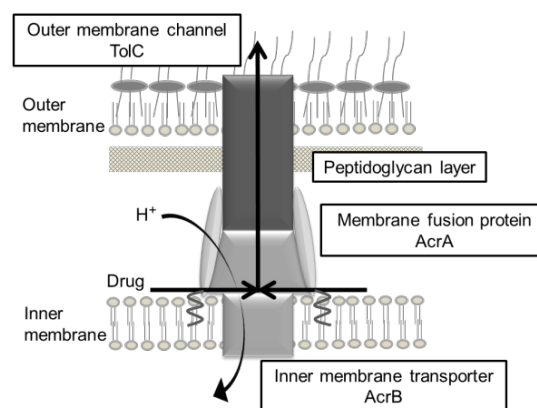


図 1. 大腸菌主要 RND 型異物排出タンパク質複合体

異物排出システムの誘導を引き起こす刺激としてよく知られているものにインドールがある。インドールは環境中に広く分布しており、長い間細菌の分類や感染症における診断検査の指標として用いられてきた。現在、大腸菌を始めとして85種類以上の病原性細菌がインドールを産生することが知られている。大腸菌において、インドールは細胞質でトリプトファナーゼ TnaA がトリプトファンを還元することで生合成され、この生合成過程は生育環境の pH や温度、細胞密度などにより制御を受ける [5]。また、インドールは細菌の病原性の発揮や、薬剤耐性化、細胞形態の維持、運動性、クオラムセンシングなど細菌の生理学的活性の調節に重要な役割を果たしている [5]。前述した内膜トランスポーター AcrD の発現も二成分制御系 BaeS-BaeR を介してインドール刺激により発現が誘導される [6]。実際に、本論文第二章では、大腸菌染色体上から AcrD-GFP を発現する株を構築し、高濃度のインドールに晒すことで AcrD-GFP の発現を検出できた。この解析の過程で、外膜チャンネル TolC の非存在下ではインドールの添加なしで AcrD-GFP が発現することを見出した。これは、異物排出系誘導が実際にどのようなシグナルによって引き起こされるのかを理解するうえで興味深い。そこで、本論文第三章では、細胞内インドールの蓄積と TolC の関係に着目し、この現象をさらに詳しく解析した。

標的タンパク質を蛍光標識し観察する手法は、細胞生物学の分野では広く使われてきた手法である。とくに GFP などの蛍光タンパク質を用いた標識法は簡便に生細胞における標的タンパク質の動態や局在を観察することができる。しかし、蛍光タンパク質は一般に分子サイズが大きく、それにより標的タンパク質の機能を阻害し、正しい動態を反映しないこともしばしば起こり得た [7]。そこで本論文第四章では、コレラ菌走化性シグナル伝達系を対象に、蛍光タンパク質に代わる標識法を試し、大腸菌異物排出系への適用も試みた。

2. 実験方法

(1) AcrB の細胞膜内動態解析

内膜トランスポーター AcrB と緑色蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質 AcrB-GFP 発現株を構築し、全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescent microscope, TIRFM) を用いて AcrB-GFP の細胞膜内動態を解析した。トランスポーター交換モデルの検証は AcrB-GFP 発現株に AcrB ホモログである AcrD をコードしたプラスミドを導入、もしくは高濃度インドールにより発現を誘導し、動態を解析することで行った。さらに、培養時に AcrB の基質薬剤を加えることで AcrB 動態に対する基質の影響を解析した。

(2) インドール濃度の測定

コバック試薬を用いて、540 nm における吸光度とイン

ドール濃度との検量線を作成、線形性が得られた範囲内でインドール濃度の測定を行った。細胞内インドール濃度の測定は培養した菌体を遠心分離でペレットにし、コバック試薬により溶菌させることで計測した。

(3) FIAsH 試薬と Ser-FAM を用いた蛍光ラベル

FIAsH 染色は TMN バッファーで懸濁した菌体を還元剤とともに 30°C で 1 時間染色した。Ser-FAM による蛍光ラベルは菌体を Ser-FAM が入った TMN バッファーで懸濁後、37°C で 30 分染色した。また、競合実験では、Ser-FAM の 10 倍濃度の非蛍光リガンドを同時に加えて染色を行った。

3. 実験結果と考察

(1) 基質依存的

異物排出トランスポーター交換モデル

まず、内膜トランスポーター AcrB の大腸菌染色体上の遺伝子を *acrB-gfp* に組み換えた株を構築し、AcrB の *in vivo* イメージング、および動態観察と平均二乗変位 (mean square displacement, MSD) の解析を行った。その結果、外膜チャンネル TolC 存在下では AcrB-GFP は細胞膜中ではほぼ固定されているのに対し、TolC 非存在下では激しく動き回っていた (図 2)。

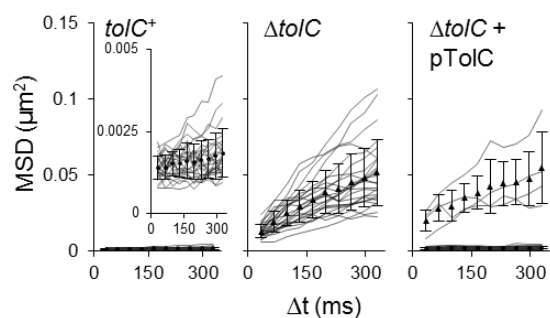


図 2. 細胞膜中における AcrB-GFP の動態

次に、AcrB-GFP 発現菌において TolC-Cys 置換体を SH 基特異的蛍光試薬で染色すると、AcrB と TolC の共局在が観察された。また、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) の測定により AcrB-GFP と TolC-Cys 置換体の薬剤排出活性を調べたところ、どちらも野生型と同等の活性を保持していた。以上の結果から、AcrB は TolC と複合体を形成することにより細胞膜中に固定されることが示唆された。これは、TolC が強固な構造をもつペプチドグリカン層を貫通しているためと考えられた。

AcrB のホモログであり、インドールにより発現が誘導される内膜トランスポーター AcrD は、AcrB と同様に、AcrD-AcrA-TolC 三者複合体を形成する。そこで、AcrB-GFP 発現菌をインドール添加培地で培養することで *acrD* を発現させ AcrB-GFP の動態に対する影響を調べ

た。その結果、インドール添加時には固定されている AcrB-GFP の割合は大きく減少した (図 3A) 。さらに、arabinose により発現量の調節ができるプラスミドを用いて *acrD* の発現量が AcrB-GFP の動態に与える影響を調べた。その結果、AcrD の発現レベルが上昇するにつれて、AcrB-GFP は動き出し固定された AcrB-GFP の割合が減少する結果が得られた (図 3B) 。これは AcrD が AcrB-GFP と置き換わることによって、AcrB-GFP の輝点が動き出すことを示唆している。すなわち、AcrB と AcrD は競争的に TolC と結合し、一つの TolC に対して AcrB と AcrD の交換が起こる可能性を示している。この仕組みを「トランスポーター交換」メカニズムと名付けた。

さらに、AcrB の動態に対する基質薬剤の影響を調べるため、AcrB-GFP と AcrD が共発現している菌の培養液中に AcrB の基質であるクロラムフェニコール (CP) とミノサイクリン (MINO) を添加した。その結果、*acrD* 発現条件下でも基質を加えた状態では AcrB-GFP の拡散係数は小さく、多くが固定されていた (図 3C) 。このことから、基質を排出している駆動状態では AcrB-AcrA-TolC 複合体全体が安定化され、AcrB の AcrD との交換が抑制されていると考えられた。

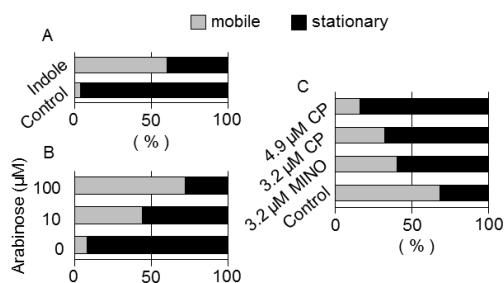


図 3. AcrB-GFP の動態に対する AcrD 発現および基質の影響

(2) 細胞内インドールの蓄積による *acrD* 発現誘導

まず、実際にインドールにより *acrD* の発現が起こることを調べるため、大腸菌染色体上の *acrD* 遺伝子を *acrD-gep* に置き換えた株を構築した。この菌の培養液中に 4 mM インドールを添加し蛍光顕微鏡で観察した。すると、細胞膜中に AcrD-GFP の輝点が観察された。また、この解析の過程で、外膜チャネル TolC 遺伝子の欠失株は、インドールを添加しなくても *acrD-gfp* を発現した。そこで、インドール合成酵素をコードする *tnaA*、もしくはインドール刺激を受容する二成分制御系 *baeSR* をさらに欠失させると、*acrD-gfp* の構成的発現は見られなくなった。つぎに、TolC の有無により細胞内のインドール濃度に差があるかどうかを調べた。すると、野生株ではインドール濃度は 330 μM であったのに対し、*tolC* 欠失株では 990 μM と高いことがわかった (図 4) 。このことから、TolC が細胞外へのインドールの排出に関与する可能性が示唆された。さらに、インドール排出に TolC が単体で関与す

るのか、RND 型の内膜トランスポーターと複合体を作り機能するのを調べるため、トランスポーターと結合できない TolC 変異体 (TolC Δ loop) を構築しインドール排出能を比較した。その結果、TolC 変異体発現菌においても *tolC* 欠失株と比べ細胞内インドール濃度の低下が見られた。本研究で得られた *tolC* 欠失株における細胞内インドール濃度は生理的条件下で産生可能な量である [8]。これらの結果から TolC は単体でインドール排出に関与し、大腸菌は細胞外ではなく細胞内のインドール濃度の変化により遺伝子発現を調節し、様々な環境への適応を行っていると考えられた。

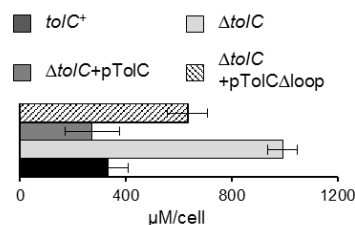


図 4. 細胞内インドール濃度に対する TolC の影響

(3) 内外膜タンパク質の蛍光標識法の検討

まず、コレラ菌ヒスチジンキナーゼ CheA1 の局在制御に着目した。CheA1-GFP 融合体は細胞質全体に拡散するが、静置培養 (微好気条件) やアジ化ナトリウム (NaN_3) の存在下では細胞の極と側面に局在を示した。これは、これまで不明であった CheA1 を含むシグナル伝達系の機能を知る上で重要な発見であるが、GFP によるアーティファクトの可能性が排除できていなかった。そこで、FIAsh (fluorescein arsenical hairpin binder) 試薬による染色を行った。FIAsh は TC-tag (tetracycline-tag) と呼ばれる 6 アミノ酸の短いペプチドを認識し、共有結合することで初めて蛍光を発するようになる。そのため、その特異性の高さから背景光と、タグによるタンパク質の機能阻害を抑制することができると期待された。CheA1-TC を構築して、FIAsh 染色を行ったところ、 NaN_3 の有無により、GFP 融合体と同様の局在変化が観察された (図 5) 。このことから、培養条件による CheA1-GFP の局在変化は、本来の挙動を反映していると考えられた。

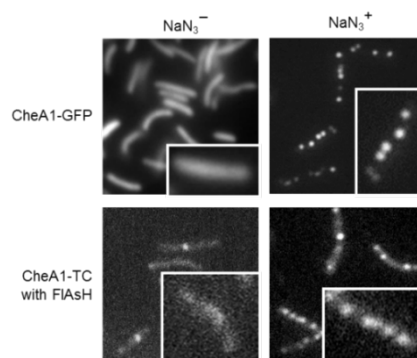


図 5. NaN_3 が与える CheA1 局在への影響

また、外膜チャネルタンパク質 TolC の細胞外ループ領域に TC-tag を挿入し、FIAsH 染色を行ったところ薬剤排出能を損なうことなく、細胞膜への局在を観察することができた (図 6)．外膜タンパク質を機能阻害なく蛍光観察を行うことは困難なことが多いため、FIAsH による蛍光ラベルは非常に有用であると言える．ただし、赤色蛍光を発する ReAsH (resorufin arsenical hairpin binder) では効率よく染色できないなどの問題も見出された．

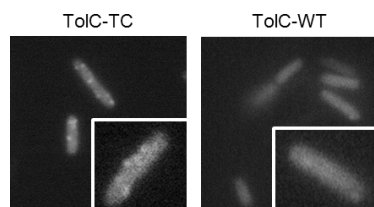


図 6. TolC-TC の FIAsH ラベリング

つぎに、走化性受容体リガンドのイメージングを試みた．環境応答や膜輸送の動態解析にはリガンド／基質のイメージングが重要であるが、細菌を対象とした *in vivo* 解析法は確立されていない．そこで、コレラ菌アミノ酸受容体 Mlp37 に着目した．このアミノ酸受容体は大腸菌のものと異なり、ほとんどのアミノ酸を認識する．その構造的基盤として、リガンド結合ポケットにアミノ酸 R 基を通せる程度の穴が空いていることが見出された．このことを利用し、Mlp37 の誘引物質であるセリンのヒドロキシル基に蛍光色素フルオレセインを融合させた Ser-FAM (serine 5(6)-carboxyfluorescein ester) を用いて可視化を行った．すると、Ser-FAM で処理した Mlp37 発現菌において細胞の極に蛍光ドットが観察された (図 7)．さらに、蛍光標識していないセリン、またはセリンと同様に強い誘引物質であるタウリンを Ser-FAM と共処理すると、蛍光ドットの数著しく減少した．一方で、誘引物質としての作用が極端に弱いグルタミン酸で共処理しても蛍光ドットの数に変化はなかった (図 7)．これらの結果から、Ser-FAM が Mlp37 の結合ポケットに結合していると考えられた．すなわち、細菌の受容体へのリガンド結合を直接かつ簡便に可視化することができた．原理的には、もっと強い蛍光を発する標識を使えば一分子観察も可能であり、輸送基質にも適用できることから、この手法は、受容体や輸送体の機能解析のための新しいツールとして利用が期待される．

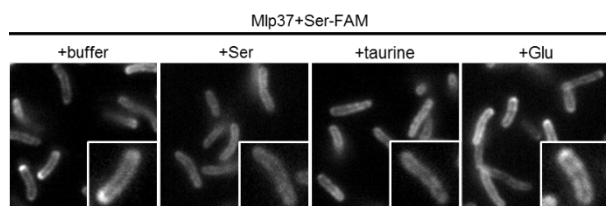


図 7. Ser-FAM を用いた Mlp37 の蛍光観察

4. 結言

本研究において、細菌の多剤耐性化を引き起こすトランスポーターの発現が細胞外だけでなく細胞内の環境変化を受容し誘導され、トランスポーター交換というダイナミックなシステムにより外環境に応じて柔軟に有害物質に対する耐性を示すことが示唆された．これらは我々が細菌感染症に対応するための知見として有用であると期待される．また、本研究を通して発展させた live-cell イメージングの技術は、細菌の生理機能の解析において広く利用できる重要な技術であると考えられる．

引用文献

- 1) Paulsen, IT. et al. : Proton-dependent multidrug efflux systems, *Microbiol Rev*, Vol.60, pp.575-608, 1996
- 2) Murakami, S. et al. : Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism, *Nature*, Vol.443, pp.173-179, 2006
- 3) Sulavik, MC. et al. : Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol.45, pp.1126-1136, 2001
- 4) Aires, JR. Nikaido, H. : Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, Vol.187, pp.1923-1929, 2005
- 5) Lee, JH. Lee, J. : Indole as an intercellular signal in microbial communities, *FEMS Microbiol Rev*, Vol.34, pp.426-444, 2010
- 6) Hirakawa, H. et al. : Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, Vol.55, pp.1113-1126, 2005
- 7) Swulius, MT. Jensen, GJ. : The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-Terminal yellow fluorescent protein tag, *J Bacteriol*, Vol.194, pp.6382-6386, 2012
- 8) Li, G. Young, KD. : Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan, *Microbiology*, Vol.159, pp.402-410, 2013