

Regulation of xenobiotic efflux systems in *Escherichia coli* in response to environmental changes

YAMAMOTO, Kentaro / 山本, 健太郎

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

89

(発行年 / Year)

2016-03-24

(学位授与番号 / Degree Number)

32675甲第376号

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2016-03-24

(学位名 / Degree Name)

博士(生命科学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00013049>

博士学位論文
論文内容の要旨および審査結果の要旨

論文題目	環境変化に応じた大腸菌異物排出システムの制御
氏 名	山本 健太郎
学位の種類	博士（生命科学）
学位授与年月日	2016 年 3 月 24 日
学位授与の条件	法政大学学位規則第 5 条第 1 項第 1 号該当者（甲）
論文審査委員	主 査 川岸 郁朗 教授 副 査 佐藤 勉 教授 副 査 山本 兼由 教授 副 査 阿部 章夫 教授（北里大学）

2016 年 2 月 6 日

学位論文審査委員会

委員長 佐藤 勉 殿

学位論文審査小委員会

主査 教授 川岸 郁朗 

副査 教授 佐藤 勉 

副査 教授 山本 兼由 

副査 北里大学 教授 阿部 章夫 

試問による学識確認の報告

法政大学学位規則第 19 条により、山本 健太郎 氏について、その論文を中心に関連する学問領域の試問を行った結果、合格と判定した。

以 上

(報告様式 I)

2016 年 2 月 6 日

学位論文審査委員会

委員長 佐藤 勉 殿

学位論文審査小委員会

主査 教授 川岸 郁朗 

副査 教授 佐藤 勉 

副査 教授 山本 兼由 

副査 北里大学 教授 阿部 章夫



山本 健太郎 氏 提出学位請求論文

「環境変化に応じた大腸菌異物排出システムの制御」

論文内容の要旨と審査結果の要旨（報告）

（報告様式Ⅱ）

論文内容の要旨

抗生物質の使用の増加とともに、薬剤耐性菌、とくに多剤耐性菌の出現が世界的な保健衛生上の問題となっている。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。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「膜融合蛋白質」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異物(多剤)排出トランスポーターである。モデル生物である大腸菌は、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, 膜融合蛋白質 AcrA, 外膜チャネル TolC からなる AcrB-AcrA-TolC 複合体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。とくに、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。では、AcrD は環境刺激によりどのように合成され、どのような過程を経て複合体を構築し、機能を発揮するのだろうか。本論文は、このような疑問に答えるため、おもに分子イメージングの手法を用いた解析を行い、新たに合成された内膜トランスポーターが、既存の異物排出複合体のものと入れ替わる現象「トランスポーター交換」を見出した。また、AcrD などの内膜トランスポーター遺伝子発現の誘導に際して、真の刺激が細胞内でのインドールの蓄積であることを見出した。さらに、異物排出系に適用されたイメージングの技術をコレラ菌環境応答系の解析に適用し、培養条件に応じたシグナル伝達蛋白質の局在変化や受容体へのシグナル分子の結合の可視化に成功した。

本論文は、英文で記された全 6 章からなる。英文タイトルは、“Regulation of xenobiotic efflux systems in *Escherichia coli* in response to environmental changes”である。第 1 章では、本研究の背景と目的が述べられている。抗生物質や薬剤耐性細菌の歴史的経緯から説き起こし、異物排出系に関する現在までの知見を手際よくまとめている。さらに、シグナル分子としてのインドールや分子イメージングの手法にも言及しつつ、RND 型異物排出系の発現調節・複合体構築・機能発現に関する問題提起をしている。

第 2 章では、緑色蛍光蛋白質 GFP を用いてトランスポーターの膜内動態を解析し、異物排出蛋白質複合体の構築と機能を解析した。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の解析を行った。その結果、外膜チャネル TolC 存在下では AcrB-GFP は細胞膜中で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る結果が得られた。また、TolC を蛍光リガンドにより標識すると AcrB-GFP と TolC の共局在が観察されたことから、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。さらに、この固定された AcrB-GFP の割合は、AcrD の発現量依存的に減少することがわかった。これは AcrB と AcrD が競争的に TolC と結合し、一分子の TolC に対して AcrB と AcrD の交換が起こる可能性を示している。このしくみを「トランスポーター交換」メカニズムと名付けた。さらに、この交換は AcrB の基質薬剤の添加により抑制されることから、基質薬剤のトランスポーターへの結合が複合体全体の安定化をもたらしていると考えられた。このような RND 型異物排出システムのダイナミクスに注目した研究は今までに無く、外的刺激に応答して適切な複合体が構築されるという本研究結果は、細菌の抗生物質耐性化の全体像解明に迫るものである。

第3章では、前述した内膜トランスポーターAcrD の発現がインドールにより誘導される現象に焦点を当てている。インドールは、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す。インドール刺激が二成分制御系 BaeS-BaeR を介して AcrD の発現を誘導する。実際に、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、外膜チャネル TolC の非存在下ではインドールの添加無しで AcrD-GFP が発現することを見出した。これは、異物排出系誘導が本当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、この現象をさらに詳しく解析した。先の *tolC* 欠失株において、インドール合成酵素をコードする *tnaA*, もしくは *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、*tolC* 欠失株では野生型に比べて細胞内インドール濃度が約3倍高いことがわかった。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 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か、それ以外のトランスポーターと協働して関与するのかを調べるため、内膜トランスポーターと結合できない TolC 変異体を構築し、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。これらの結果から、TolC は単体または物理的に複合体を形成しないトランスポーターとの協働でインドールを透過可能であり、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すると結論された。この成果は、今で重要性が指摘されているながら理解の遅れていたシグナル伝達物質としてのインドールの作用メカニズムの解明に向けた重要な成果である。

第4章では、コレラ菌走化性シグナル伝達系を対象に、蛍光蛋白質に代わる標識法を試し、大腸菌異物排出系への適用を試みた。標的蛋白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 などの蛍光蛋白質を用いた標識法は簡便に生細胞における標的蛋白質の動態や局在を観察することができる。しかし、蛍光蛋白質は一般に分子サイズが大きく、それにより標的蛋白質の機能を阻害し、正しい動態を反映しないこともしばしば起こり得た。このことは、コレラ菌ヒスチジンキナーゼ

CheA1 の局在制御に関する解析では、大きな問題となっていた。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。しかし、CheA1 は機能不明であり、GFP 融合体が機能を保持しているかどうか解析不可能であった。そこで、FlAsH (fluorescein arsenical hairpin binder) 試薬による染色を行った。FlAsH は TC-tag と呼ばれる 6 アミノ酸の短いペプチドを認識し、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、特異性が非常に高く、バックグラウンドの蛍光を抑制することができると期待された。CheA1-TC を構築して、FlAsH 染色を行ったところ、アジ化ナトリウムの有無により、GFP 融合体と同様の局在変化が観察された。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。また、この手法を用いて、外膜チャネル蛋白質 TolC の可視化も試みた。TolC 細胞外ループ領域に TC-tag を挿入し、FlAsH 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。ただし、赤色蛍光を発する ReAsH では効率よく染色できないなどの問題も見出された。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 基を通す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 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。さらに、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が増加した。一方で、非誘引物質である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。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る。このように、細菌の受容体を直接、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。

第 5 章では、本研究で得られた結論をまとめ、第 6 章では、本研究で用いた実験材料と手法について詳細に記述している。

1. 審査結果の要旨

本学位請求論文は、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を示したもの

である。これらの知見は、細菌感染症への対応に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分子イメージングの技術により、細菌環境応答・異物排出の理解が深まると期待される。審査の結果、以下の点について、学術的な新規性が優れていることが認められた。

- (1) 大腸菌 RND 型異物排出トランスポーターAcrB のイメージングに初めて成功し、別のトランスポーターAcrD が発現すると、複合体内の AcrB が外れて AcrD と置き換わる現象を見出し、トランスポーター交換という概念を提唱した。
- (2) 大腸菌 RND 型異物排出トランスポーターAcrD の発現誘導に、細胞内インドールの蓄積が関与することを初めて明らかにした。
- (3) コレラ菌走化性類似シグナル伝達蛋白質 CheA1 が、エネルギー代謝低下条件下でのみ細胞極に局在することを証明した。
- (4) コレラ菌アミノ酸走性受容体への蛍光標識セリン結合を証明し、細菌環境応答センサーへの刺激の入力を初めて可視化した。

よって、本審査小委員会は、全会一致をもって提出論文が博士（生命科学）の学位に値するという結論に達した。

(報告様式Ⅲ)