



東京大学大学院農学生命
科学研究科応用生命工学
専攻・助教
博士（農学）
新井博之

平成元年 東京大学農学部卒業
平成7年 東京大学大学院農学生命
科学研究科博士課程修了
平成7年 理化学研究所基礎科学特
別研究員
平成8年 理化学研究所研究員
平成11年 東京大学大学院農学生命
科学研究科助手
平成19年 現職

緑膿菌における呼吸酵素の発現調節に関する研究

はじめに

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は土壌、海水、淡水中に広く存在しているグラム陰性細菌であり、日和見感染を起こす病原菌としても知られている。緑膿菌の感染力は低いですが、遺伝病である嚢胞性繊維症患者への重篤な慢性感染の原因となる。また、近年では抗生物質が効かない多剤耐性緑膿菌による院内感染が大きな問題となっている。緑膿菌は通性好気性菌であり、酸素が存在する好気条件では好気呼吸によって生育する。好気呼吸とは、摂取した栄養源を酸素によって酸化分解することで生育に必要なエネルギー(ATP)の生産を行う方法である。栄養源の酸化によって生じる電子は、細胞膜中の電子伝達系を經由して最終的に酸素に渡される。この過程でプロトンが細胞質から排出され、細胞膜内外にプロトン濃度勾配が形成される。排出されたプロトンは膜中のATP合成酵素を通過して細胞内に戻るが、この際に化学浸透圧エネルギーを使ってATPが生産される。緑膿菌は酸素の存在しない嫌気条件でも嫌気呼吸の一種である異化型硝酸呼吸(脱窒)によって生育することができる。この際には酸素の代わりに窒素酸化物が最終電子受容体となる。さらに、酸素や硝酸などの電子受容体が存在しない条件でも、嫌気発酵によってエネルギーを得ることができる。これらの多様なエネルギー獲得機構は、緑膿菌が様々な環境に遍く生息できることや、その病原性や感染力に寄与していると考えられる。

好気呼吸鎖の末端で酸素から水への還元反応を触媒する酵素は末端酸化酵素と呼ばれている。ヒトなどの高等真核生物のミトコンドリアでは末端酸化酵素は1種類しか存在しないが、好気性細菌は一般的に複数の末端酸化酵素を持っている。緑膿菌は特に高度に分岐した呼吸鎖を持ち、末端酸化酵素を5種類持っていることが、全ゲノム解析や生化学的解析から明らかになっている(図1)。緑膿菌における好気条件と嫌気条件でのエネルギー代

謝の転換は、主に酸素を感知する転写制御因子 ANR と、一酸化窒素 (NO) を感知する転写制御因子 DNR によって転写レベルで制御されていることが、これまでの研究から分かっている (1)。

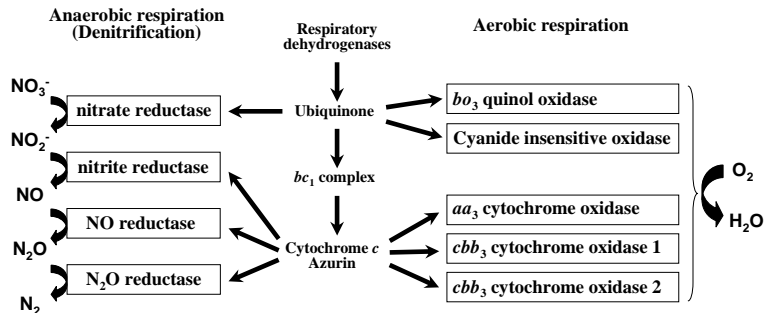


図1 緑膿菌の高度に分岐した呼吸鎖電子伝達系

しかし、好気条件下にお

ける末端酸化酵素の機能分担と発現制御に関しては不明な点が多い。これらは環境中の酸素濃度や各種ストレス条件等に応じて、その環境条件下に最も適した性質を持つ酵素が発現するように制御されていると考えられ、個々の酵素の性質と、その制御系に興味を持たれる。本研究では、緑膿菌における複数の末端酸化酵素の生化学的特徴および発現調節機構を明らかにすることで、本菌における呼吸制御の全体像を理解することを最終的な目的としている。呼吸代謝は生物の生存にとって極めて重要な部分であり、その制御の全体像を把握することは、感染症治療等の緑膿菌のバイオコントロールにとって必要であるだけでなく、他の多くの好気性細菌および真核生物の呼吸代謝に対しても有用な知見を提供できると期待される。

好気呼吸鎖末端酸化酵素の発現様式

緑膿菌の5種の末端酸化酵素のうち、3種がシトクロムオキシダーゼ (aa_3 oxidase, 2つの cbb_3 oxidase)、2種がキノールオキシダーゼ (bo_3 oxidase、cyanide insensitive oxidase) である。シトクロムオキシダーゼは還元型キノンからシトクロム bc_1 複合体とシトクロム c を経由して電子を受け取り、キノールオキシダーゼは還元型キノンから直接電子を受け取る。各末端酸化酵素は、酸素親和性、エネルギー生産効率 (プロトン排出効率)、各種ストレス (呼吸阻害剤、栄養飢餓、温度等) に対する耐性などが異なり、環境条件に応じてそれらを使い分けていると予想される。 aa_3 oxidase (Aa3) はミトコンドリアの末端酸化酵素と類似の酵素であり、一般的に酸素親和性が低く、多くの細菌では高酸素濃度の環境下で主に働くことが知られている。 cbb_3 oxidase は非常に酸素親和性が高く、根粒菌の共生窒素固定時や、ヘリコバクターなどの偏性微好気性細菌が生育する低酸素環境で働くことが知られている。緑膿菌は cbb_3 oxidase を2セット持っており (Cbb3-1, Cbb3-2)、これらの遺伝子はゲノム上に隣接して存在している。 bo_3 oxidase (Cyo) は大腸菌が高酸素条件下で生育する際に使用する酵素と類似である。以上の4つの末端酸化酵素は活性中心にヘムと銅を持つヘム-銅末端酸化酵素ファミリーに属するのに対し、cyanide insensitive

oxidase (CIO)はタイプが異なり、呼吸阻害剤であるシアン（青酸）に対して耐性がある。本研究ではまず、これらの5種の末端酸化酵素の役割分担についての知見を得るため、様々な培養条件での各酵素遺伝子の発現量変化を調べた。

各末端酸化酵素遺伝子のプロモーター領域と β -ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)との転写融合断片をそれぞれゲノムに組み込んだ転写活性のレポーターアッセイ株を作製し、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を指標に各遺伝子の発現パターンを観察した(2)。さらに、DNAマイクロアレイ(Affymetrix GeneChip)により、種々の培養条件での末端酸化酵素を含めた呼吸関連遺伝子を中心に、全遺伝子の発現パターンの変化を網羅的に解析した。遺伝子発現解析の結果から明らかになった各酵素遺伝子の発現様式を以下にまとめて示す。

(i) Cbb3-1

5種の末端酸化酵素遺伝子の中で、Cbb3-1の遺伝子の発現量が最も高く、培養条件によらずほぼ恒常的に発現していた。緑膿菌の好気呼吸では主に働く酵素と考えられた。

(ii) Cbb3-2

好気培養条件では対数期後期から定常期にかけて発現量が増加した。低酸素(2% O₂)で最も高い発現量を示し、微好気条件で主に働く酵素と考えられた。

(iii) Aa3

*aa*₃タイプの末端酸化酵素は一般的に高酸素条件で主に働く酵素であるが、緑膿菌のAa3は通常の培養条件ではほとんど発現しなかった。しかし、炭素源制限、窒素源制限、または、鉄欠乏条件で高い発現量を示し、栄養飢餓条件で働く酵素であると考えられた。この飢餓応答には、定常期特異的シグマ因子 RpoS が関与していた。

(iv) Cyo

通常の培養条件での発現量は比較的低いが、鉄欠乏条件で高発現した。鉄濃度を感知する転写調節因子 Fur (ferric uptake regulator)の制御下にあると予想される。鉄不足条件での呼吸に寄与していると考えられた。

(v) CIO

呼吸阻害剤であるシアンの存在時、および、銅欠乏状態で高発現した。CIOはヘム-銅末端酸化酵素ファミリーに属さず、活性に銅を必要としないため、銅不足時の呼吸に寄与していると考えられた。また、他の末端酸化酵素が機能しないときに特異的に誘導発現する補助的な酵素であると考えられた。

好気呼吸鎖末端酸化酵素の発現を制御する調節因子

呼吸の制御に関わっていると予想される転写制御因子(ANR, RoxSR)の遺伝子欠損株についても同様に末端酸化酵素遺伝子の発現解析実験を行い、これらの因子の果たす役割とその範囲についても調べた(図2)。ANRは酸素濃度を感知し、低酸素や嫌気条件で活性化さ

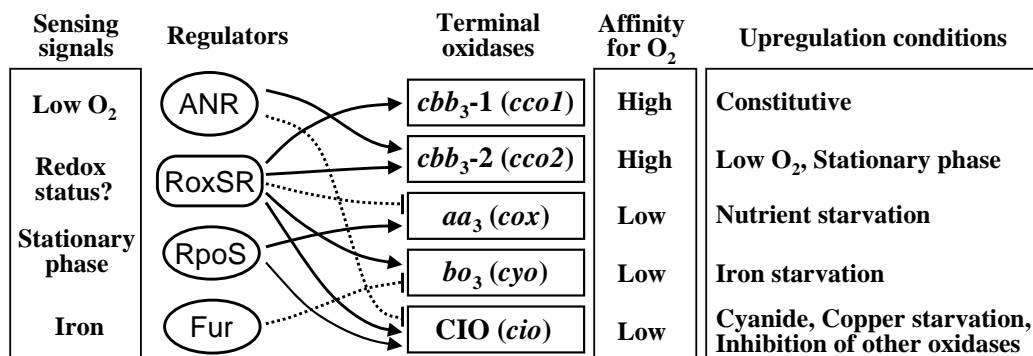


図2 緑膿菌における末端酸化酵素の発現調節ネットワーク

れる調節因子であり、脱窒遺伝子を含め、嫌気代謝に関わる多くの遺伝子の発現調節を行っている。RoxSRは紅色光合成細菌の光合成遺伝子発現に関与しているPrrBA(RegBA)と相同な二成分制御系であり、呼吸鎖の電子フローやキノンの酸化還元レベルを感知すると予想される。ANRはCbb3-2の発現に必要であり、低酸素条件でのCbb3-2に誘導発現を主に制御していることが分かった。逆にCIOの発現はANRにより負に制御されており、他の末端酸化酵素が活発に酸素消費を行っているときにCIOに発現を抑える役割があると考えられた。RoxSRはすべての末端酸化酵素の発現調節に関与しており、Cbb3-1、Cbb3-2、Cyo、CIOはRoxSRによって正に、Aa3は負に制御されていた。

好気呼吸鎖末端酸化酵素の機能解析

5種の末端酸化酵素は、それぞれ独特の酵素学的特徴と機能を持つと考えられるが、1つの細胞内に複数の酵素が同時に発現するため、これまでは個々の酵素の生理的役割を解析することは困難であった。本研究では、末端酸化酵素を1種のみ発現する四重変異株を作製し、各酵素のプロトン排出効率(H⁺/O比)と酸素親和性を調べた。

Aa3を利用する呼吸鎖が最もH⁺/O比が高く、飢餓条件で効率的にエネルギー生産を行うために適していることが分かった。富栄養条件では却って酸化還元バランスが崩れるために発現が抑えられていると予想された。また、CIOを利用する呼吸鎖のH⁺/O比が最も低かった。酸素親和性については、Cbb3-1とCbb3-2は他菌の*cbb₃* oxidaseと同様に高親和性であり、Aa3、Cyo、CIOは低親和性であった。緑膿菌は細胞外にアルギン酸からなる多糖の夾膜を形成し、細胞への酸素透過性を低くしたり、バイオサーファクタント(界面活性剤)を分泌して培地への酸素溶解効率を下げたりなど、自ら好気環境を形成していると予想される。これにより、高酸素濃度でも高親和性のCbb3-1が主に発現していると考えられた。また、低酸素条件では病原因子の分泌量が増大することが知られており、緑膿菌の好気的な代謝生理は病原性と大いに関係あると考えられた。

おわりに

本研究では緑膿菌の5種の末端酸化酵素について、各酵素の発現様式と生化学的解析から、その生理的役割を明らかにした。緑膿菌は感染時にバイオフィルムを形成し、その内部は酸素透過性が低く微好気や嫌気状態になっていると考えられる。また、低酸素条件下では病原性因子の分泌量が増大したり、抗生物質耐性が高くなったりすることが知られている。本研究の結果から、緑膿菌は高酸素条件下でも細胞内では微好氣的なエネルギー代謝系が機能しており、より微好気環境に適した形質を持っていることが示唆された。この形質は、緑膿菌の感染や感染病巣での生存に有利に働くと予想される。本研究で明らかになった末端酸化酵素の特徴や発現制御機構は、今後緑膿菌のエネルギー代謝系を感染症治療の標的とする上で重要な知見になると期待される。

参考文献

- (1) H. Arai, T. Kodama, and Y. Igarashi (1997). Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, **25**, 1141-1148.
- (2) T. Kawakami, M. Kuroki, M. Ishii, Y. Igarashi, and H. Arai (2010). Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.*, **12**, 1399-1412.

謝辞

本研究を助成して頂きましたサッポロ生物科学振興財団、ならびに、共同研究者の川上卓郎氏、黒木美帆氏、長村達也氏に深く感謝いたします。