

氏 名 (本籍)	澤 田 勇 生 (栃 木 県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3535 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	クォラムセンシングによる緑膿菌の多剤耐性調節機構の解析

主 査	筑波大学教授	工学博士	國府田 悦 男
副 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副 査	筑波大学助教授	農学博士	中 村 顕
副 査	筑波大学教授	農学博士	前 川 孝 昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、クォラムセンシングシステムと名付けられた、微生物の細胞密度依存的な遺伝子発現制御機構が知られてきている。このクォラムセンシングシステムは、対数増殖後期から定常期に、特定のシグナル因子であるオートインデューサー (AI) を産生することで、その細胞外濃度依存的に 100 以上の遺伝子が誘導されることが明らかになってきている。緑膿菌では、AI として、*N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) と *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL) が存在し、それら AI の誘導により毒素・プロテアーゼなどが産生される。一方、緑膿菌において、その細胞膜に存在する異物排出ポンプが薬剤排出を担い、多剤耐性化を引き起こすことが明らかになってきた。本研究では、緑膿菌の多剤耐性化を制御するため、クォラムセンシングによる異物排出ポンプ遺伝子調節機構について解析をした。

まず、異物排出ポンプ遺伝子 (*mexAB - oprM* オペロン) の発現を調べるため、*mexAB - oprM* にレポーター遺伝子を組込んだ TNP090 株を構築した。その TNP090 株を基に、種々の AI 合成遺伝子破壊株や異物排出ポンプ調節遺伝子破壊株を構築することで、クォラムセンシングによる *mexAB - oprM* オペロンの発現への関与について調べた。それらの結果、*mexAB - oprM* オペロンの発現は、growth-dependent であることが明らかとなり、つまりそれがクォラムセンシングにより発現調節されていることが示唆された。そこで、クォラムセンシングのシグナル因子 C₄-HSL を 0.05mM 以上添加したところ、添加しない時に比べ *mexAB - oprM* オペロンの発現は、3 倍以上転写されることが明らかとなった。以上より、異物排出ポンプの誘導がクォラムセンシングより転写レベルで制御されていることを初めて明らかにした。

また、緑膿菌の *nfxC* 型変異株 (異物排出ポンプ遺伝子調節タンパク MexT 発現株) における菌体密度依存的な *mexAB - oprM* オペロンの転写量は、野生株のおよそ半分に低下している。そこで、TNP090 株においてプラスミド由来の MexT タンパクを過剰発現させ、C₄-HSL の添加・無添加で比較したところ、C₄-HSL 添加・無添加それぞれにおいても *mexAB - oprM* オペロンの発現は、野生株の半分に低下した。よって、MexT タンパクが、*mexAB - oprM* オペロンのクォラムセンシングシステムによる発現促進効果を抑制していることを明らかにした。

さらに、*mexAB - oprM* オペロンの発現は、その調節タンパク MexR によって転写を抑制されていること

が報告されているので、C₄-HSLを加えたときに起こる *mexAB - oprM* オペロンの誘導が MexR を介するかどうかを調べた。そこで、*mexR*, *rhlI* (C₄-HSL 合成遺伝子) を破壊したときの *mexAB - oprM* オペロンに対する C₄-HSL の添加効果を測定することで、C₄-HSL による誘導が MexR を介するか調べた。その結果、C₄-HSL の添加による *mexAB - oprM* オペロンの誘導効果が確認され、また、*mexR* 破壊株においても MexT タンパクが C₄-HSL 添加効果を打ち消すことが示唆された。よって、クオラムセンシングシステムによる *mexAB - oprM* オペロンの誘導機構は MexR を介さずに行われているものであることが示された。

本研究は、C₄-HSL が濃度依存的に異物排出ポンプの誘導を行っていることを示す初めての報告である。応用面では、AI の制御により、薬剤耐性から病原性の発現、さらには溶媒耐性の獲得といった人為的制御の可能性を強く示唆するものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、緑膿菌の多剤耐性化を制御するため、クオラムセンシングによる異物排出ポンプ遺伝子調節機構について解析することを目的として行われた。まず、クオラムセンシングによる *mexAB - oprM* オペロンの発現への関与について調べ、*mexAB - oprM* オペロンの発現が growth - dependent であることを見だし、それがクオラムセンシングによるものであることを確認している。具体的には、クオラムセンシングのシグナル因子である C₄-HSL を 0.05mM 以上添加した場合、添加しない時に比べ *mexAB - oprM* オペロンの発現が、3 倍以上転写が促進されることを明らかにしている。この結果は、C₄-HSL が濃度依存的に異物排出ポンプの誘導を行っていることを示しており、クオラムセンシングと異物排出ポンプの誘導を結びつける初めての報告をしている。さらに、異物排出ポンプ遺伝子の調節タンパク MexT が、*mexAB - oprM* オペロンのクオラムセンシングシステムによる転写促進効果を抑制することも突き止めている。また、*mexAB - oprM* オペロンの発現はその調節タンパク MexR によって転写を抑制されていることが報告されているが、本研究で見いだしているクオラムセンシングによる異物排出ポンプ誘導は、MexR タンパクを介さずに行われているものであることを明らかにした。このことは、クオラムセンシングによる *mexAB - oprM* オペロンの転写制御の重要性を示すとともに、異物排出ポンプがさらに未知の機構により複雑に制御されていることを示唆するものである。

以上のように、本研究は、クオラムセンシングと異物排出ポンプとの関係を見出し、クオラムセンシングのシグナル因子の制御が、薬剤耐性や病原性発現などの人為的制御に繋がる直接の可能性を示している。特に農学・医学分野においては、従来の抗生物質を用いる処理とは異なった方法による病原性発現の抑制のための基礎的知見を提供しており、その成果は大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。