

氏名（本籍） 草田 裕之 （ 埼玉県 ）

学位の種類 博 士（ 農学 ）

学位記番号 博 甲 第 6939 号

学位授与年月日 平成26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 生命環境科学研究科

学位論文題目

Genetic and Biochemical Analyses of Cell-to-Cell Communication System in Multidrug Resistant-Bacterium *Acidovorax* sp. Strain MR-S7

(多剤耐性菌 *Acidovorax* sp. MR-S7 株の細菌間コミュニケーション機構の遺伝学的・生化学的解析)

主査	筑波大学教授（連携大学院）	博士（理学）	花田 智
副査	筑波大学教授	農学博士	佐藤 誠吾
副査	筑波大学教授	博士（工学）	野村 暢彦
副査	産業技術総合研究所 主任研究員	博士（農学）	木村 信忠

論 文 の 要 旨

抗生物質生産工場の工場廃液を処理する活性汚泥中から様々なβラクタム系抗生物質に耐性を示す*Acidovorax* sp. MR-S7株が発見された。分離されたMR-S7株はβラクタム系抗生物質を分解するだけでなく、バクテリアの細胞間コミュニケーション（クオラム・センシング）に用いられる低分子化合物のN-アシルホモセリンラクトン（AHL）も分解する能力を有していた。βラクタム系抗生物質とAHLという互いに異なる機能を持つ低分子化合物の分解に、*Acidovorax* sp. MR-S7株のどのような酵素が関わっているのか詳細に調べた研究をまとめたものが本論文である。加えて、これら異なる基質のどちらも分解可能な両機能的酵素（bi-functional enzymes）を新たに発見し、その複機能的性の獲得や進化プロセスについても考察している。

βラクタム系抗生物質の分解酵素として知られているβラクタムアシラーゼの遺伝子配列に相同性を示す遺伝子（*macQ*）をMR-S7株内に発見し、組換え大腸菌を用いた大量発現系にて精製酵素（MacQ）を得た。本酵素MacQはペニシリンGだけではなくセフェム系など多様なβラクタム系抗生物質を分解し得るとともに、AHL異性体の分解活性も有する両機能的酵素であることを明らかにした。また、X線結晶構造解析から、MacQが従来知られているβラクタムまたはAHLアシラーゼと構造的に異なり、本来であれば翻訳後に切断除去される配列（Spacer peptides）を含んでおり、従来知られている二量体構造が更に結合した四量体を形成することが明らかとなった。また、残存しているSpacer peptidesのC末の残基が触媒反応部位のごく近くに位置していることも分かった。このような高次構造を含む構造上の変化が、両機能的性（の獲得）に深く関係していると考えられている。また、アミノ酸配列に基づく両機能的酵素の系統的解析は、本酵素はもともとAHLアシラーゼであったものが、構造を変化させることにより両機能性を獲得した可能性が高いことを示唆した。

両機能性のアシラーゼだけではなく、βラクタム系抗生物質のβラクタム環やAHLのラクトン環の開裂反応を触媒する酵素もMR-S7株中に新たに見出された。BlaA、BlaB、BlaD、BlaEと名付けられた四酵素は、βラクタマーゼとして様々なβラクタム系抗生物質を分解できるだけでなく、AHLラクトナーゼ活性を有し、多様なAHL異性体をも分解した。これらは皆、metallo-β-lactamase familyに分類される酵素であったが、四つのうち二つの酵素（BlaDとBlaE）は既存の酵素と系統的に離れているのみならず、このFamilyに特徴的なZn²⁺-binding motifと呼ばれる亜鉛結合配列を保存していないことが明らかとなった。このmotifを欠くものがβラクタム環やAHLのラクトン環の開裂反応を触媒することは今まで知られておらず、新たな知見と言える。類似の既知酵素との系統的解析から、βラクタム環やラクトン環の開裂酵素の祖先型酵素の性質が両機能性であっ

た可能性を示唆された。

上記のような酵素による分解だけではなく、バイオフィーム形成も抗生物質に対抗する有効な手段の一つである。MR-S7株は β ラクタム系抗生物質の添加によってバイオフィーム形成が誘導されるが、その誘導は様々なAHL異性体によっても起こることが観察された。また、緑膿菌で見られるアデノシンによるバイオフィーム形成阻害がMR-S7株でも見られることが確認された。バイオフィーム形成に関わるアデノシンと β ラクタム系抗生物質、AHLの相互作用は明らかにされて来なかったが、MR-S7株においてアデノシンの脱アミノ化を触媒するAdenosine deaminaseの転写活性が β ラクタム系抗生物質またはAHLの添加によって著しく上昇することを突き止めた。MR-S7株のバイオフィーム形成は β ラクタム系抗生物質またはAHLにより直接誘導されるのではなく、それらの添加がAdenosine deaminaseの転写を誘導し、その酵素活性によりアデノシンが分解され細胞内のアデノシン濃度が低下することによりバイオフィーム形成阻害が解除されるという、間接的誘導によりコントロールされている可能性がある。このような間接的なバイオフィーム形成誘導経路モデルは本研究により初めて示されたものである。

β ラクタム系抗生物質及びAHLを分解できる両機能性酵素を複数持つことは、抗生物質生産工場廃液を処理する活性汚泥中でのMR-S7株の生育を有利な方向に導いたに違いない。廃液中の抗生物質を分解できただけではなく、活性汚泥中でAHLを介したクオラム・センシングに基づいて生きる競争相手の成長を攪乱することも可能だからだ。そして、これら物質によってバイオフィーム形成誘導される性質もまた、廃液に含まれる抗生物質の影響を和らげ、且つ拡散や流出を最小限に抑え排水処理システム中で優先的に生残することに寄与したと考えられる。

審 査 の 要 旨

本研究により発見された五つの新規酵素は β ラクタム系抗生物質とAHLを分解できるという両機能性を有するという特筆すべき特徴を有していた。両機能性を示すアシラーゼに関しては、すでに*Streptomyces*属細菌で報告されているが、AHLを介したクオラム・センシングを行うものが多く存在する*Proteobacteria*門での発見は大変意義深いことである。また、ラクタマーゼやラクトナーゼのような開環酵素で両機能性酵素活性を示す酵素が見出されたのは世界で初めてのことであり、価値のある大きな成果と言えよう。また、バイオフィーム形成に関わる研究で提案されたアデノシンを介しての間接的な誘導経路は斬新で魅力的なモデルであり、バイオフィーム研究の方向性の拡大につながる有用な情報となることに疑いはない。

平成26年1月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。