

呼吸鎖が
緑膿菌の環境挙動に与える影響の解析

2014年2月

濱田将風

呼吸鎖が
緑膿菌の環境挙動に与える影響の解析

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

博士（農学）学位論文

濱田将風

目次

第 1 章 背景及び目的	1
第 2 章 結果	2
第 3 章 考察	3
引用文献	4

第 1 章

背景及び目的

ATP を生産する為には、呼吸鎖における電子伝達が必要とされる。真核生物においては、ミトコンドリアの内膜近傍に、呼吸鎖複合体 I (NADH : ユビキノンオキシドレダクターゼ) → ユビキノンプール → 呼吸鎖複合体 III (ユビキノール - シトクロム *c* レダクターゼ) → シトクロム *c* → 呼吸鎖複合体 IV (シトクロム *c* オキシダーゼ) の順番で呼吸鎖が構成されている。複合体 IV は「末端酸化酵素」とも呼称される。酸素などの最終電子受容体の還元をもって電子の伝達を終結させる。

呼吸鎖は ATP 生産の支持という生理的機能を有するが、実はそれだけにとどまらない。一般的に、真核生物はヘム *a*、*a*₃ で構成された末端酸化酵素 Aa3 をもつ。Aa3 は呼吸鎖における電子伝達の末端反応に寄与する。その一方、Aa3 が自発的細胞死 (アポトーシス) の誘導に寄与することが明らかとなってきた。アポトーシスとは、組織や器官の正常な発生または恒常性の維持のために能動的かつ自律的に行う細胞死プログラムである。アポトーシスの誘導機構として、ミトコンドリアからのシトクロム *c* の漏出を介した経路が知られている (5)。シトクロム *c* がアポトーシスを誘導する為には Aa3 によって酸化されなければならない (3)。すなわち、真核生物の呼吸鎖を構成する Aa3 は ATP 生産だけでなく細胞運命決定にも寄与するといえる。一方、多くの原核生物 (細菌) の呼吸鎖について ATP 生産以外の細胞挙動への寄与はこれまでにあまり知られていない。

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は酸素を用いる好気呼吸と窒素酸化物を用いる嫌気呼吸 (脱窒) を行う (2)。好気呼吸には、保有する 5 つの末端酸化酵素 (Cyo、Cio、Aa3、Cbb3-1、Cbb3-2) が寄与する。特に、Cbb3 は緑膿菌の好気呼吸に強く寄与する。一方、興味深いことに、嫌気脱窒条件下において二つの Cbb3 は Cyo、Cio、Aa3 と比較して非常に高い転写発現を示すことがわかった (6)。この結果は緑膿菌における Cbb3 の多機能性を示唆する。緑膿菌は嫌気環境下で脱窒により増殖することが可能である。好気環境下との代謝系の相違は環境中での緑膿菌の様々な挙動に変化を生じさせる (7, 8)。特に、脱窒における中間代謝産物の NO が緑膿菌の細胞生理に強く影響する。

細菌呼吸鎖の生理的機能は電子受容体の還元を通じた ATP 生産の支持にとどまらなると考えられる。その多機能性を検証する為には、緑膿菌の呼吸鎖を構成する Cbb3 に着目した。本研究では、緑膿菌の嫌気環境下における様々な挙動に対する Cbb3 の影響及びその機構の解析を行った。

第 2 章 結果

緑膿菌の嫌気環境下における様々な挙動に対するCbb3の関与を調べた。まず、Cbb3が嫌気環境下における生育及び脱窒活性に影響することが示された。その脱窒経路において、Cbb3がNO蓄積を誘導していることが示された。NO蓄積はDNA合成阻害による細胞伸張に導いた。細胞伸張及び細胞外DNA放出により、成熟したバイオフィーム形成が促進された。これまで、緑膿菌のCbb3が嫌気脱窒条件下で転写発現を示すことが知られていたが (6)、その条件下における生理的機能は未知であった。本研究より、Cbb3が脱窒を介して嫌気環境下におけるバイオフィーム形成を促進することが新規に示された。

第 3 章 考察

緑膿菌の Cbb3 は好気条件下だけでなく嫌気脱窒条件下において転写発現する。また、その発現量は緑膿菌のもつ他の末端酸化酵素と比較して非常に高い (6)。近年、緑膿菌の嫌気脱窒条件下特有の生態が解明されつつある (7, 8)。このことから、Cbb3 の転写発現には何らかの意味合いがあると考えられてきたが、解明が進んでいないのが現状であった (6)。

緑膿菌においては、好気環境下で、Cbb3 が電子受容体の酸素の還元を通じて ATP 生産を支持する (1)。その為、Cbb3 の欠損は好気環境下における生育能及びバイオフィーム形成能の低下につながる。一方、本研究より、Cbb3 の欠損は嫌気環境下における生育能の増加及びバイオフィーム形成能の低下につながることがわかった。つまり、Cbb3 は嫌気環境下における生育をあえて抑制することでバイオフィーム形成を促進していることになる。実際に、Cbb3 は脱窒経路における中間代謝産物 NO の蓄積を誘導していた。Cbb3 による NO 蓄積は細胞伸張及び成熟したバイオフィーム形成に強く寄与した。これらの結果は ATP ではなく NO が嫌気環境下における Cbb3 の効果を決める重要な因子であることを示している。総合すると、Cbb3 が周囲の環境条件に依存して異なる生理的機能を発揮するといえる。

プロテオバクテリア門に属する細菌の多くが Cbb3 をもつとされている (4)。その中には、*Paracoccus denitrificans* のような代表的な脱窒菌も含まれている。Cbb3 が嫌気環境下における他の脱窒菌の挙動に関与するか興味深い。

引用文献

1. Alvarez-Ortega, C., and Harwood, C.S. (2007) Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol Microbiol* **65**: 153-165.
2. Arai, H. (2011) Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **2**: 103.
3. Brown, G.C., and Borutaite, V. (2008) Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome *c*. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 877-881.
4. Cosseau, C., and Batut, J. (2004) Genomics of the *ccoNOQP*-encoded *ccb₃* oxidase complex in bacteria. *Arch Microbiol* **181**: 89-96.
5. Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2009) Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* **11**: 1050-1062.
6. Kawakami, T., Kuroki, M., Ishii, M., Igarashi, Y., and Arai, H. (2010) Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**: 1399-1412.
7. Lee, K.M., Go, J., Yoon, M.Y., Park, Y., Kim, S.C., Yong, D.E., and Yoon, S.S. (2012) Vitamin B₁₂-mediated restoration of defective anaerobic growth leads to reduced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **80**: 1639-1649.
8. Yoon, M.Y., Lee, K.M., Park, Y., and Yoon, S.S. (2011) Contribution of cell elongation to the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* during anaerobic respiration. *PLoS One* **6**: e16105.