

## 論文の内容の要旨

論文題目 大腸菌の情報伝達系 EnvZ-OmpR および  
それに制御される外膜蛋白質 OmpF の解析

氏名 岸井 粒太

### 背景

細菌は外部環境が変化すると二成分情報伝達系(TCS)と呼ばれるシグナル伝達系が作用し、様々な遺伝子発現を調節する。この TCS によって細菌は外部環境の変化にも適応し生存することができる。これまで様々な TCS が発見されているが、中でも浸透圧変化に応答する大腸菌の EnvZ-OmpR システムはシグナル伝達のモデルとして古くから研究が進められている。大腸菌は浸透圧変化を EnvZ により感知し、OmpR を介して下流の遺伝子 *ompF* と *ompC* の発現を制御する。OmpF と OmpC は外膜で異なる大きさの pore を形成しており、低浸透圧では OmpF、高浸透圧では OmpC が増える。大腸菌はこれら2つの蛋白質の発現により、様々な浸透圧条件下でも恒常性を維持することが可能である。更に OmpF は、浸透圧変化だけでなくキノロン、テトラサイクリン、 $\beta$  ラクタム等様々な抗菌剤の細菌内部への侵入口となっており、OmpF 減少変異株は多剤耐性となる。

本研究では EnvZ-OmpR-OmpF/C というモデル系を用い、EnvZ の分子内情報伝達および OmpF の薬剤耐性への関与の解明を行った。

### 1. EnvZ HAMP domain の解析

EnvZ の構造はいくつかの domain に分かれているが、このうち linker と呼ばれる domain は histidine kinase 以外にも様々なシグナル伝達関連蛋白質が共通して持っており、HAMP linker と総称される。興味深いことに HAMP linker のアミノ酸配列の相同性は細菌種や蛋

白間で低いものの、その二次構造予測を行うと保存された helix-loop-helix 構造を有している。更に多くの変異導入試験により HAMP linker はシグナルの正常な伝達に必須であることが判明している。

その重要性にも関わらず、linker の研究は他の domain に比べて遅れているのが原状である。要因の一つとして linker が可溶性蛋白として発現困難なことが挙げられる。そこで私は HAMP linker を可溶性蛋白として発現させ、物理化学的解析を行うことを目的として研究を行った。

まず発現が困難という問題を解決するため、可溶性が高い蛋白を Tag として共発現するなどいくつかの方策をとった。その結果、linker の C 末に隣接する domain A の一部もしくは全長を含む L<sub>RK</sub> および L<sub>ARK</sub> の 2 つを可溶性蛋白として発現することに成功した。L<sub>RK</sub> および L<sub>ARK</sub> の蛋白 2 次構造を CD により解析した。その結果、L<sub>RK</sub> および L<sub>ARK</sub> の linker 部分は明確な 2 次構造を持たず random coil が最も多いことが明らかになった。しかしながら、random coil では常に同じ構造をとることができず正確なシグナル伝達ができない、EnvZ を含む様々な蛋白の 2 次構造予測および近年発表された好熱古細菌蛋白の NMR 解析より HAMP linker は helix rich であることが示唆される、といった理由から、得られた linker は生体内とは異なる構造を有することが考えられた。

これまでに、様々な点変異を EnvZ HAMP domain に導入することにより EnvZ の表現型が変化することが明らかになっている。例えば Ala193 を疎水性の高いアミノ酸に置換すると EnvZ が常に高浸透圧状態にロックされる。そこで疎水性の高いアミノ酸へ置換すれば、分子内・分子間の疎水的相互作用を強固にし、構造を安定にすることが可能ではないかと考えた。そこで Ala193 を Val もしくは Leu (A193V, A193L) に置換した L<sub>RK</sub> および L<sub>ARK</sub> を発現・精製し CD 解析を行った。その結果、L<sub>RK</sub>[A193V]、L<sub>RK</sub>[A193L]、L<sub>ARK</sub> [A193V] の 3 つは変異を導入しても変化が無いものの L<sub>ARK</sub> [A193L] は明らかな 2 次構造変化が起こり、特に 222nm におけるピークが顕著であった。A193L 変異が L<sub>RK</sub> には影響せず L<sub>ARK</sub> でのみ構造変化する現象は、domain A の安定な構造が L<sub>ARK</sub> [A193L] の HAMP domain の安定化に寄与していることが考えられる。L<sub>ARK</sub> [A193L] の linker 部分は helix 構造が 86.7% となり、変異前と比べて 41.2% の上昇が認められた。これらの結果は、EnvZ HAMP domain は helix 構造を形成する傾向にあるものの、それ自身で存在する場合は安定した構造をとることが出来ないことを示している。

本研究では、細菌の情報伝達において重要であるものの、発現・精製が困難なために古細菌でしか構造が分からなかった HAMP linker に関して、モデル蛋白 EnvZ を用いて可溶性蛋白の精製に成功した。CD 解析より HAMP linker は C 末に隣接する安定な domain A を結合したとしても非常に不安定であるが、分子内・分子間相互作用に重要と思われる部位に 1 箇所疎水性アミノ酸変異を導入して構造を固定化したところ helix rich な構造となることが判明した。本系で用いた蛋白発現技術は他の発現困難な蛋白にも応用できるほか、モデル蛋白 EnvZ の構造の一端が明らかになったことで他の細菌の蛋白の解析へ発展が期

待される。

## 2. 外膜蛋白質 *ompF* の発現とキノロン耐性の関係

外膜蛋白質 OmpF はグラム陰性細菌に幅広く存在しており、高浸透圧下での菌の生育に寄与している。更に細菌は OmpF 減少によりキノロンをはじめとする様々な抗菌剤に耐性となることが明らかになっている。一般に菌は変異株よりも野生株の方が生存に適しており、薬剤へ耐性変異すると薬剤存在下での生存と引き換えに通常状態の生育が抑制される可能性が考えられる(fitness cost)。しかしながら細菌の OmpF 減少が菌の増殖に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで OmpF 減少大腸菌の fitness cost を測定し、OmpF 減少株の臨床における広がりについて考察を行った。

臨床分離株 134 株をキノロンに対する MIC から感受性株、低度耐性株、高度耐性株に分け、各群から 5~8 株を以降の試験に供した。まずキノロンの標的酵素の QRDR (キノロン耐性決定領域)のシーケンス解析を行った。その結果 QRDR の変異の数に比例して高度耐性化することが明らかになった。続いてこれらの株の *ompF* 発現量を real time PCR により測定したところ、感受性株では標準株 KL-16 と比較して発現量は 35.3~78.7%であった。一方、感受性株で最低の 35.3%だった株に比べて多くのキノロン耐性株は発現量が低く、低度・高度と耐性度が上昇するのに伴って *ompF* 発現量減少株が増加していた。臨床株は様々な遺伝的背景を有しており、感受性株の中だけでも *ompF* 発現量は多様性があるが、本研究により、耐性化するほど *ompF* の発現量が減少した株が認められることが明らかになった。このことから大腸菌の高度耐性化には QRDR 変異だけでなく *ompF* 発現量減少が寄与していることが示唆された。

臨床における *ompF* 減少株の蔓延の原因を明らかにするため、*ompF* 減少株の fitness cost を野生株と比較した。まず野生株 KL-16 とそのキノロン耐性株(*ompF*減少株、*gyrA*変異株、*ompF*減少 *gyrA*変異株)を用い、*in vitro*における増殖を比較した。その結果、株間で増殖能に差が認められなかった。

続いてマウス上向き尿路感染モデルを用いて *in vivo*における fitness cost を測定した。KL-16 系統の株はマウスに安定して生着できなかったため、KL-16 系統と同じ方法で感染株 KU3 を親株としたキノロン耐性株(*ompF*減少 *gyrA*変異株)を取得し、マウス感染モデルに供した。その結果、感染当日から 2 日、4 日と時間の経過に伴い腎臓内の菌数は上昇したが、株間で有意差は認められなかった。*ompF*減少 *gyrA*変異株は動物に感染した後も野生株と同様に増殖が可能であり、これら変異による fitness cost は小さいことが明らかになった。

本研究より、臨床において *ompF* 減少株は特にキノロン耐性株の間で広く存在することが明らかになった。*ompF*変異によりキノロンに対する MIC は上昇する。*In vitro*、*in vivo*で野生株と同様に増殖可能であることが臨床での耐性株の蔓延に寄与していることが示唆された。大腸菌は段階的に様々な変異が起こることでキノロン高度耐性を獲得することが既に明らか

になっている。*ompF*変異は高度耐性化のステップとして重要であることが示唆される。

## 総括

私は TCS のモデル蛋白 EnvZ-OmpR-OmpF/C 系を用いた研究を行った。第 1 章では細菌の情報伝達において重要であるもののこれまで古細菌でしか構造が分からなかった HAMP linker に関して可溶性蛋白としての発現に初めて成功した。EnvZ HAMP の構造の一端が明らかになったことで、他の細菌の蛋白の構造・機能解析にも応用できる可能性がある。今後は毒素産生や抗菌剤耐性に関与する情報伝達蛋白の linker の構造解析などへの発展が考えられる。第 2 章ではキノロン耐性臨床分離株における *ompF* 減少株の蔓延、*ompF* 減少変異株が *in vitro*・*in vivo* 両方で野生株と同様に増殖することを示した。これらのことから *ompF* 減少はキノロン高度耐性のステップとして重要であることが示唆される。TCS は細菌が様々な環境で生育する上で必要不可欠であり、モデル蛋白を用いた研究は TCS ひいては細菌の生態を理解する上で重要と思われる。