

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 岸井粒太

細菌は栄養分・化学物質・抗菌剤など様々な刺激を histidine kinase を用いて感知し、その情報を response regulator と呼ばれる蛋白質に伝達している。Response regulator は対応する遺伝子の発現量を調節することで、様々な外部環境変化に順応し、細菌の効率的な生存に大きく寄与している。これら2つの蛋白質が関与する情報伝達経路は「二成分情報伝達系」と呼ばれており、細菌が有する主要なシグナル伝達システムである。これまでに多くの二成分情報伝達系が発見されているが、中でも大腸菌が浸透圧変化に対して応答する EnvZ-OmpR-OmpF/C 系は細菌情報伝達系のモデル蛋白質として広く研究が行われている。本研究では、このシグナル伝達のモデル蛋白質系を用い、histidine kinase の情報伝達に必須である HAMP linker domain の解析、および EnvZ の制御下にある OmpF が細菌の生育と抗菌薬耐性に及ぼす影響という2つの側面からの解析を行った。

以下に、申請者が提出した論文の内容を説明する。第1章は、「EnvZ HAMP linker domain の解析」である。Histidine kinase は刺激を感知するセンサーとして働き、その立体構造を変化させることによって感知した情報を下流に伝達するスイッチのような役割を果たすことが明らかになっている。一方で histidine kinase 分子内で情報が流れるメカニズムは知られていない点が多い。中でも「HAMP linker」と呼ばれる domain は histidine kinase の分子内情報伝達に必要不可欠であり、その2次構造予測から様々な細菌の蛋白質種間で共通の立体構造が保存されていることが判明している。しかしながら HAMP linker は可溶性蛋白質として単離・精製が非常に困難であり、その構造や機能などの性状解析が遅れているのが現状である。申請者は、histidine kinase の中でも最も周辺情報が多い蛋白質の一つである EnvZ を用い、さらに Tag 蛋白質の利用などいくつかの方策を用いることで HAMP linker を生化学的に可溶性蛋白質として単離することに成功した。得られた蛋白質の構造に関して circular dichroism (CD) を用いて解析を試みたところ、これまでの研究の通り HAMP linker は非常に不安定であり、linker のみを単独で単離した場合、linker は random coil 構造を呈していた。一方 linker にその C 末側の domain を加えた蛋白質を設計し、更に linker 部分に1箇所疎水性アミノ酸変異(A193L)を導入して linker の分子内あるいは分子間の疎水的相互作用をより強くして発現・精製を行ったところ、変異 EnvZ の linker domain は 86.7% が α -helix 構造を示す helix rich な構造であることが明らかとなった。シグナル情報伝達において機能性蛋白質としての役割を担う部分が random coil である可能性は低く、また様々な蛋白質の2次構造予測および古細菌蛋白質の NMR 解析から、linker は helix rich であることが示唆されている。よって EnvZ HAMP linker domain は本来 helix 構造をとる性質を有するものの、精製蛋白質として存在す

るときには helix 構造を保持することが不可能であることが示唆された。この A193L 変異を導入した場合、情報伝達は常に高浸透圧側の状態でロックされていたことから、変異の導入により高・低浸透圧という構造上のスイッチの切り替えが働かずに高浸透圧側に構造が固定化され、結果として構造解析が可能となったことが考えられる。こうしたことから変異部位は分子内あるいは分子間相互作用に関わっており、EnvZ の情報伝達には α -helix 同士の疎水的相互作用が重要であることが示唆される。今回用いられた HAMP linker の単離・精製技術は、今後 EnvZ だけでなく linker を持つ様々な蛋白質の構造解析への応用が期待される。また、細菌の二成分情報伝達系は毒素産生や抗菌薬耐性、有用物質の産生などに関与しており、HAMP linker はその情報伝達において重要な役割を担っていることが明らかになっている。HAMP linker に結合する小分子が見出された場合、菌の情報伝達を小分子の添加により人工的に ON/OFF 制御することで、抗菌薬耐性の克服や有用物質の効率的な産生などに応用できる可能性が考えられ、本研究はそうした小分子を探索する系の構築にも資するものと思われる。

第 2 章は、「外膜蛋白質 *ompF* の発現とキノロン耐性の関係」である。大腸菌の OmpF は外膜で porin と呼ばれる小孔を形成しており、低浸透圧における菌の恒常性維持に寄与している。同時に OmpF はキノロンをはじめとする様々な抗菌剤が細菌内部へ侵入する経路となっていることから、OmpF が減少した変異株はこれらの抗菌剤に対して耐性となることが明らかになっている。通常、細菌は薬剤耐性を獲得すると、その代償として生育に不利な性質も同時に獲得する。こうした不利な性質は fitness cost と呼ばれ、様々な薬剤耐性に対する fitness cost が報告されている。しかしながら OmpF 減少の fitness cost は未だ明らかにされていない。申請者は OmpF が減少する変異によって感受性が低下する抗菌剤の中から大腸菌感染症の治療にも汎用されているキノロンを用い、*ompF* が減少し *gyrA* (キノロンの標的酵素 DNA gyrase をコード) に変異が入った菌株を取得し、その *in vitro* および *in vivo* における fitness cost の測定を行った。まず、キノロンを用いた耐性菌の選択により、*ompF* 減少株・*gyrA* 変異株・*ompF* 減少かつ *gyrA* 変異した株の 3 種類を取得した。培地中での菌の生育を測定したところ、これらの変異株は野生株と同等の生育能力を有していることが明らかになった。続いてマウス上向き尿路感染モデルを用いて腎臓中の菌数の増加を経時的に測定したところ、*ompF* 減少 *gyrA* 変異株は野生株と同じ増殖パターンを示すことが明らかになった。よって大腸菌は *ompF* 減少によりキノロンに対する感受性が低下するにも関わらず、実験条件下では菌の生育は *in vitro*, *in vivo* の両方で野生株と変わらないことが明らかになった。これらのことから *ompF* 減少変異の fitness cost は無い、もしくは非常に小さいことが示唆される。一方、臨床分離株のキノロンに対する MIC および *ompF* の発現量を調べたところ、*ompF* が減少した株が数多く認められ、臨床での蔓延が明らかになった。また、キノロンに対して感受性、低度耐性、高度耐性と耐性度が上昇するに従って *ompF* の発現量が減少している株が多く認められた。大腸菌のキノロン高度耐性化へのステップとして *ompF* 減少変異は重要な役割を担っていることが示唆された。

申請者は EnvZ-OmpR-OmpF/C 系という二成分情報伝達系のモデル蛋白を材料として、2つの方向からの解析を行った。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 domain に関して一般細菌で可溶性蛋白としての発現に初めて成功した。Tag 蛋白の利用・疎水性アミノ酸の導入・linker と隣接する domain との共発現などを行うと、HAMP linker は helix rich な構造をとることが明らかになった。EnvZ HAMP linker の構造の一端が明らかになったことで、他の様々な蛋白の構造解析への応用が期待される。二成分情報伝達系は毒素の産生や抗菌薬耐性、有用物質の産生など細菌の多くの活動に関与していることから、そうした蛋白の構造を明らかにすることは大きな意味がある。また、linker に結合する小分子化合物は、情報伝達の ON/OFF を司る linker の働きを人工的に制御できる可能性がある。様々な情報伝達関連蛋白の linker を安定な状態で精製することが可能となれば、そうした小分子のスクリーニングなどへの道が開かれるものと思われる。第 2 章では OmpF 蛋白と抗菌剤耐性の関係を、キノロンを例にとりて解析を行った。キノロン耐性臨床分離株において、ompF 減少変異株が広く蔓延していること、さらに ompF 減少変異株は *in vitro*・*in vivo* の両方で野生株と同様に増殖が可能であることが明らかになった。通常細菌は、抗菌薬耐性変異を得る代償として何らかの生存する上での足枷、すなわち fitness cost を有する。本研究により、ompF が減少する変異は必ずしも fitness cost を伴わない、あるいは cost が非常に小さいことが示唆された。ompF の減少した株は野性株に比べてキノロン耐性となることから、大腸菌のキノロン高度耐性へのステップとして ompF 減少は重要であることが示唆される。二成分情報伝達系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細菌の生態を理解する上で重要と思われる。

以上、申請者が提出した論文は、生化学、微生物学に対して著明な貢献をした、と評価できる。したがって、本審査委員会は、申請者が、博士(薬学)の学位を受けるにふさわしいと結論した。