



近畿大学農学部 内海 龍太郎

細菌情報伝達ネットワークの分子機構と情報伝達阻害型薬剤の開発

はじめに

微生物、特に細菌細胞には、ヒト等の高等生物とは異なる情報伝達機構 (two-component signal transduction system, TCS) が発達している。このような TCS によって、動植物病原細菌の病原性、酸耐性、イオン制御、薬剤耐性、細胞分裂・増殖、クオラムセンシング、バイオフィーム形成等が制御されている。細菌細胞は数十種類の TCS を保持し、多様な環境変化に対応して、生育している。また、激変する環境変化に迅速に対応適応するために、各 TCS 間は互いに連結した情報伝達ネットワークの分子機構を発達させてきた。本研究では、ゲノムサイエンスならびに分子生物学的研究方法を駆使して、細菌情報伝達ネットワークの分子機構を解明し、微生物バイオテクノロジー、バイオサイエンスの新しいパラダイムを切り拓いた。これらの研究成果をもとに、開発された細菌情報伝達阻害型薬剤はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 等の多剤耐性細菌に有効であることを示しただけでなく、環境調和型農薬としての用途も可能であることを示し、21世紀、抗生物質にかわる細菌情報伝達阻害型薬剤の医薬、農薬のモデルを提示した。

I 細菌情報伝達機構と情報伝達ネットワークの分子機構の解明

(1) 細菌情報伝達機構

TCS は細菌膜上に存在する受容体 (センサーキナーゼ、ヒスチジンキナーゼ, HK) と対をなして働くレスポンスレギュレーター (RR) から、構成されている。HK のセンシングの機構を解明するために、キメラ受容体, Taz (センシングドメイ

ンを Tar, 細胞内キナーゼドメインは EnvZ) を用いて、実際に細胞外に存在するアスパラギン酸を感知した Taz が RR である OmpR を介して、外膜遺伝子の発現を制御する一連のシグナル伝達経路のモデルシステムを構築することに成功した。本成果は、TCS センサーキナーゼが環境刺激を受容して、リン酸リレーによって、標的遺伝子まで、情報伝達することを証明した最初の成果である。この成果をもとに、大腸菌における2種の情報伝達系, EvgS/EvgA, PhoQ/PhoP において、センサー, EvgS, PhoQ の活性化機構ならびに細胞内遺伝子発現制御の詳細な分子機構が明らかにされた。

EvgS/EvgA 情報伝達システムは、大腸菌に酸耐性を誘導する主要な分子機構であることを明らかにした。すなわち、EvgS のペリプラズム領域で、低 pH を感知し、リン酸化された EvgS から EvgA へのリン酸リレーを介して、リン酸化された EvgA による大腸菌の酸耐性遺伝子群の発現制御機構である。その誘導システムは図1に示すような YdeO, GadE の転写因子を介する転写カスケード機構とコネクター分子 SafA の制御による PhoQ/PhoP 情報伝達システムの活性化である。

大腸菌細胞外の  $Mg^{2+}$  イオンに反応する遺伝子発現制御機構として、PhoQ/PhoP 情報伝達システムを同定した。外界の  $Mg^{2+}$  イオン濃度に応じて、リン酸化された PhoQ は PhoP のリン酸基転位反応を促進して、リン酸化された PhoP は 10 種以上の標的遺伝子群を同時に制御する。リン酸化 PhoP の標的遺伝子のプロモーターに共通に存在するダイレクトリピート構造を見出して、PhoP の直接結合部位 (PhoP box) であることを明らかにした (図1)。このような外界の金属イオン濃度を感知す

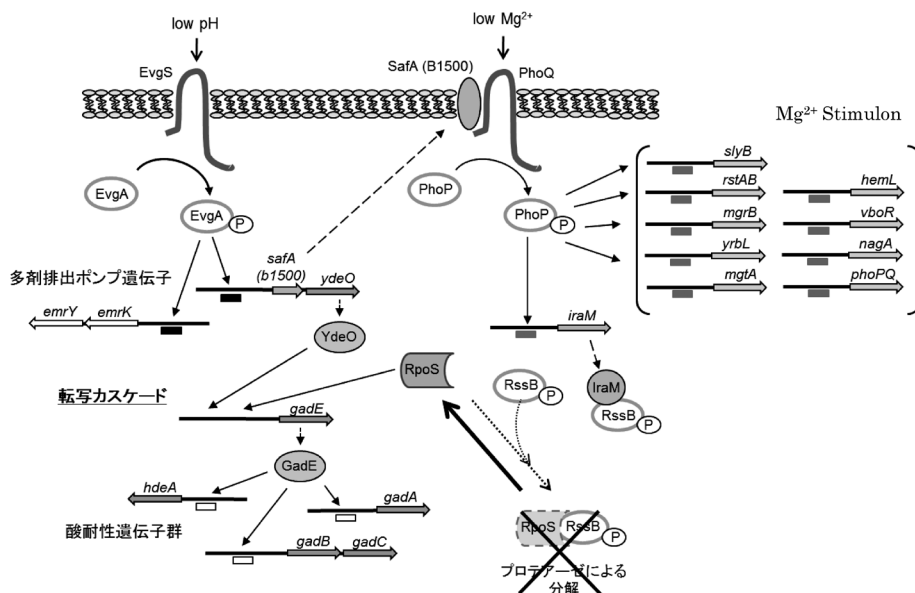
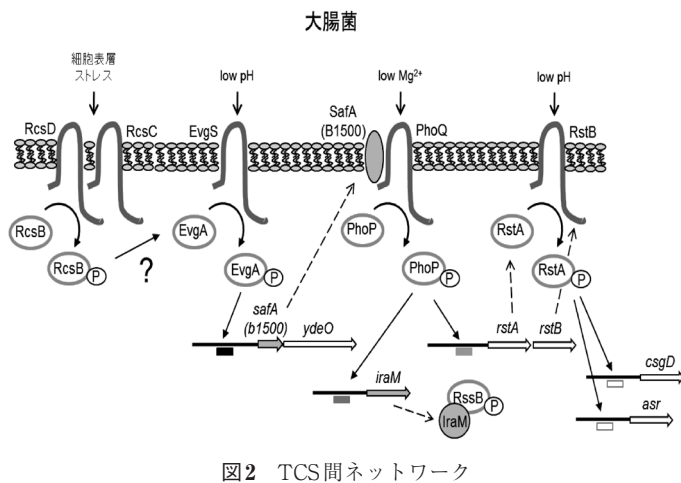


図1 EvgS/EvgA系を起点とした酸耐性遺伝子の制御ネットワークと  $Mg^{2+}$  Stimulon



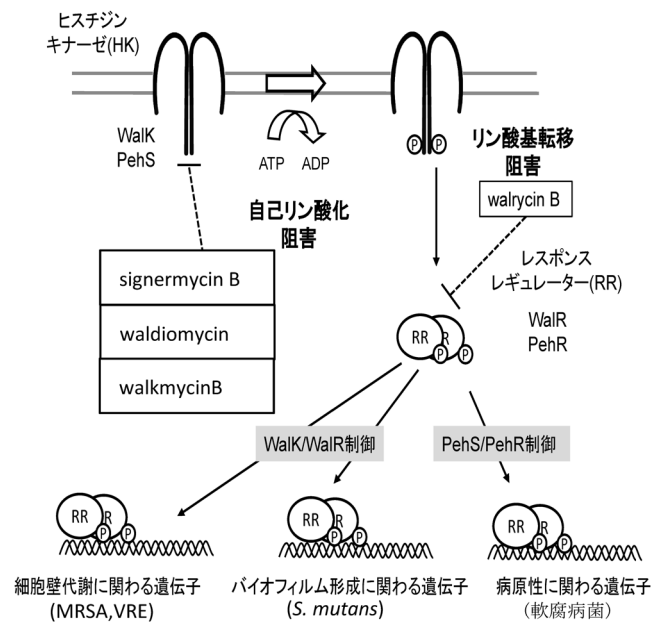
る情報伝達システムは  $Mg^{2+}$  Stimulon と命名され、細菌の金属イオン応答の分子機構の雛形となった。このように、EvgS/EvgA, PhoQ/PhoP 情報伝達の研究成果は細菌情報伝達も高等動物における情報伝達に勝るとも劣らない精緻な分子機構を有していることを示した。

## (2) 細菌情報伝達ネットワークの分子機構：コネクター分子 SafA の発見

TCS ネットワークを解明するために、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、特に、EvgS/EvgA を活性化すると同時に PhoQ/PhoP 制御下の遺伝子群が変動することが明らかになった。EvgS/EvgA 情報伝達システムと PhoQ/PhoP 情報伝達システムを連結するコネクター遺伝子の探索を行った結果、機能未知の B1500 を同定した。B1500 は 65aa からなる細胞膜蛋白質で、PhoQ のセンサーキナーゼ活性を制御する機能を見出し、SafA (sensor associating factor) と命名された。EvgS/EvgA の活性化によって、safA 遺伝子発現が誘導され、細胞膜中に移動して、PhoQ のペリプラズム領域に結合して、PhoQ の HK 活性を制御することにより、PhoQ/PhoP 制御下の遺伝子群が制御される新しい情報伝達ネットワークの分子機構が明らかにされた(図2)。さらに、SafA は PhoQ のペリプラズム領域に結合して、構造変化を促し、細胞内ヒスチジンキナーゼドメインの活性が制御されていることを示した。その後、SafA 様のコネクター分子の存在が報告されており、コネクター分子を介する細菌情報伝達ネットワーク分子機構は、細菌情報伝達ネットワークの基本的な分子機構と理解された。

## II 細菌情報伝達阻害型薬剤の開発：WalK/WalR 情報伝達機構を標的にした新規抗生物質の発見

代表的なグラム陽性多剤耐性細菌である MRSA や VRE は増殖に必須な WalK (HK)/WalR (RR) TCS を保持している(図3)。WalK/WalR TCS を標的にした阻害剤は、既存の抗生物質と全く異なる作用機序によって、MRSA や VRE 等の多剤耐性細菌を死滅させることが期待された。最初に、分子生物学ならび構造生物学的研究を行い、WalK, WalR はそれぞれ、ホモ二量体構造をとることが情報伝達に重要であることを示した。その研究成果に基づいて、WalK, WalR を標的にする選択的な単離方法を開発した。これらの選択方法を用いて、3種の新規な WalK (ヒスチジンキナーゼ) 阻害剤と1種の WalR 阻害剤 (walrycin B) を見出した。3種の WalK 阻害剤はいずれも、



WalK 二量体ドメイン (ATP 結合部位ではない) に結合して、自己リン酸化活性を阻害し、MRSA や VRE を死滅させる新規抗生物質として signermycin, waldiomycin, walkmycin と命名した。本研究において、細菌情報伝達ネットワークの分子機構研究の展開のなかで、その情報伝達素過程を阻害する細菌情報伝達阻害型薬剤が種々の多剤耐性細菌に有効な薬効を示すだけでなく、病原性を抑制し、その病害防除を可能にする優れた戦略であることを見出した。これらの研究成果をもとに、21世紀、細菌情報伝達阻害型薬剤がヒト感染症治療ならびに植物病害防除に貢献することが期待される。

謝辞 本研究は近畿大学農学部バイオサイエンス学科ならびに農芸化学科生物化学研究室(旧)において、行われたものである。博士課程修了生、山本兼由、加藤明宣、江口陽子、渡邊崇史、皆川周、小笠原寛、古田英司、余豊年、岡田在郎、後藤恭宏、岡本尚、土井章弘、石井英治、Md. Fakhruzzaman ならびに共同研究いただいた方々に感謝申し上げます。また、最初に分子生物学研究への道をご指導いただいた京都大学名誉教授 駒野徹先生、生物化学研究室において、いつも適切なご助言、励ましの言葉をいただいた姫野道夫先生、酒井裕先生、森田潤司先生(同志社女子大学)、fic 遺伝子の発見で、共同研究してきた川向誠先生(島根大学)に心より感謝申し上げます。近畿大学農学部において、終始暖かく、研究の進展を見守り、ご指導いただいた故野田万次郎先生、本研究対象になった細菌情報伝達研究へのご指導いただいた井上正順先生(米国ロバートウッドジョンソン医科大学)に深く感謝申し上げます。さらに、細菌情報伝達阻害型薬剤開発においては、生研センター異分野融合研究支援事業の成果で、三沢典彦(石川県立大学)、岡島俊秀(大阪大学)、田中康雄(大洋香料株式会社)、微生物化学研究所第2生物活性研究部長 五十嵐雅之氏はじめ研究所の皆さまのご協力で深謝いたします。最後に、ご支援いただきました日本農芸化学会ならびに関西支部の皆さまに厚く御礼申し上げます。