



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterizations of Ferric Uptake Regulator (Fur) and Development of Antimicrobial Agents Based on Fur-mediated Polymyxin Resistance in <i>Vibrio cholerae</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	村西, 和佳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15404号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89836
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MURANISHI_Kazuyoshi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

氏名 村西 和佳

学 位 論 文 題 名

Characterizations of Ferric Uptake Regulator (Fur) and Development of Antimicrobial Agents
Based on Fur-mediated Polymyxin Resistance in *Vibrio cholerae*

(コレラ菌におけるFerric uptake regulator (Fur) の機能解析と
Furを介して発現するPolymyxin耐性を利用した抗菌薬の開発)

本学位論文は5章によって構成されており、第1章では本学位論文での研究の背景を述べている。近年、既存の抗菌薬に対する薬剤耐性菌の数が爆発的に増加しており、2050年頃には薬剤耐性菌感染症が死因の第1位になることが危惧されている。そこで、新たな抗菌薬開発のアプローチが必要とされており、その標的の1つとして病原性細菌の微量元素の代謝機構が注目されている。微量元素の中でも特に鉄は、原核細胞から真核細胞に至るまで多様な細胞において酸化還元反応を担うタンパク質などの活性中心として必須の元素であり、その細胞内への取り込み機構は細菌によって異なることが知られている。多くの常在菌は遊離鉄を獲得するのに対して、腸管出血性大腸菌 O157 や赤痢菌、結核菌、コレラ菌などの経口感染する病原性細菌は、宿主が保有するヘムを分解して鉄を獲得する。したがって、ヘムの獲得やその鉄の利用機構を創薬標的とすることで、病原性細菌の増殖を特異的に阻止するだけでなく、既存の抗菌薬で問題となる腸内細菌叢の攪乱や薬剤耐性菌の増大を抑制する画期的な抗菌薬の開発が期待できる。そこで本論文では、近年でも世界的に流行しており、その収束の目処がたたないコレラ菌に特有の鉄代謝機構に着目した。コレラ菌においては、細胞外から遊離鉄を取り込むだけでなく、鉄錯体であるヘムを取り込み分解して鉄源とすることが知られているものの、これまでヘムの取り込み機構を標的とした抗菌薬の開発は成功していない。そこで本論文ではヘム取り込みタンパク質の転写調節因子とそれによって発現される2つのタンパク質に着目して創薬標的の探索を行った。

鉄やヘムの代謝機構を制御する代表的な転写抑制因子である Ferric uptake regulator (Fur) は、一部の生物種において、細胞内の鉄濃度のシグナル伝達分子としても注目されているヘムを結合することから、ヘムが Fur による転写の調節を通してコレラ菌の鉄代謝を制御する機構に注目した。申請者は、この *VcFur* の結合配列である Fur box の下流に菌の生育に必須なヘム輸送体と想定される ABC 輸送体をコードする遺伝子 *vca1098-vca1101* が存在していることだけでなく、カチオン性ポリペプチド抗菌薬 Polymyxin B,E の耐性遺伝子 *mcr-1* の相同体である phosphoethanolamine-transferase (*eptA*) が存在していることを見出した。そこで、本学位論文では、*VcFur* が宿主腸内環境下で増殖する際に必須なヘムの細胞内への取り込みに応答して、このような下流遺伝子の転写を制御することを確認し、その結果として発現が促進される *vca1098-vca1101* と *eptA* の産物の機能を阻害することで、コレラ菌に対して有効な新規抗菌薬開発ができると着想した。

第2章では、まず、*vca1098-vca1101* について、この遺伝子がコードするアミノ酸残基配列が大腸菌においてニッケルの取り込みを担う ABC 輸送体 *Nik operon* (*nikA-E*) と相同性が高いことから、*vca1098-vca1101* の発現を制御するために鉄またはニッケルのどちらが *VcFur* を標的配列である Fur box に結合させるのかを検討した。*VcFur* の Fur box との結合を蛍光ラベル Fur box 配列を用いた蛍光偏光消滅度測定によって追跡したところ、 Fe^{2+} 存在下では Fur box と特異的に結合するのに対して、 Ni^{2+} 存在下では配列非特異的に DNA と結合したことから、下流に存在する *vca1098-vca1101 operon* はニッケルではなく鉄によって Fur を介して発現調節されることが示唆された。さらに興味深いことに、*vca1098-vca1101 operon* を構成する *vca1098* の産物である VCA1098 はヘムを結合することが見いだされたため、VCA1098 のトリプトファン残基の蛍光を用いたヘム滴定を行ったところ、ヘム解離定数は $K_d = 1.1 \mu\text{M}$ であった。この解離定数の値は、ヘムを活性中心として結合するタンパク質の解離定数よりも 100 倍程度大きく、細菌類のヘム輸送体である大腸菌 ChuX のヘム解離

定数 $K_d=2.0\mu\text{M}$ に近いことから、VCA1098 がヘム輸送を担うタンパク質であることが示唆された。以上の結果より、コレラ菌は鉄枯渇時には *VcFur* を介して *vca1098* の発現量が増大し、ヘム輸送を活発化させることで、菌体内へのヘム取込量を増加させると考えられる。

第3章では、第2章においてヘム輸送体である可能性が示唆された VCA1098 について、抗菌薬の創薬標的としての可能性を検討した。腸管内等で細胞内ヘム濃度が上昇した場合における VCA1098 の発現条件を明らかにするために、*VcFur* に対するヘム結合を評価した。*VcFur* のチロシン残基の蛍光を用いたヘム滴定を行ったところ、ヘムは *VcFur* と $K_d=0.97\mu\text{M}$ で結合し、この結合によりヘムは *VcFur* を Furbox から解離させることが蛍光偏光解消度測定から明らかになり、*VcFur* は細胞内のヘム濃度に応じて下流遺伝子の発現を調節することが示唆された。さらに、Fur box 下流遺伝子である *vca1098* の mRNA 発現量は、ヘムの添加に伴って増大した (Fig. 1 左)。これらの結果から、コレラ菌は細胞内のヘム濃度を感知して Fur box 下流の遺伝子を制御することが示され、第2章で述べたように *vca1098* がヘム輸送体として機能する場合、細胞内のヘム濃度の上昇に伴い、そのポジティブフィードバックによって *vca1098* の発現量が増大し、ヘムの取り込みを促進することが示唆された。しかし、このようなヘムによる *vca1098* 発現量の増大は、そのヘム輸送の遮断に大量の薬剤を必要とすることを意味し、創薬標的として効果的ではないと考えた。

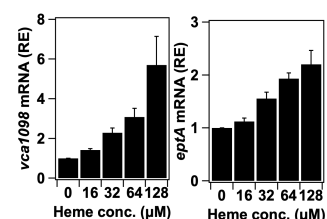


Fig. 1 *vca1098*, *eptA* の mRNA 発現解析

一方、第4章では、遺伝子配列上では *vca1098-vca1102* の直下に存在する *eptA* に着目した。この *eptA* 発現のヘムによる応答を検討したところ、*eptA* は培地へのヘム添加によってその転写量が2倍に増大した (Fig. 1 右)。この結果は、宿主腸内環境でコレラ菌の細胞内ヘム濃度が上昇すると、ヘムが *eptA* の転写を誘導し、その産物である EptA が Polymyxin 耐性遺伝子 *mcr-1* の作用機序と同様に細菌の外膜を構成する負電荷の Lipid A に対して正電荷のホスホエタノールアミンを修飾することで、コレラ菌の外膜電荷を正に転化し、正電荷の Polymyxin に対する耐性が増大することを示唆している。そこで、コレラ菌の Polymyxin 感受性を検討するためにディスク拡散試験を行ったところ、培地へのヘム添加によって阻止円が縮小し (Fig. 3●)、このことは想定通り、細胞内ヘム濃度の上昇により、コレラ菌の Polymyxin 耐性が増大したことを意味している。この Polymyxin 耐性は、正電荷に転化したコレラ菌外膜と Polymyxin における5つの正電荷官能基である2,4-ジアミノ酪酸 (Dab) 基 (Fig. 2 P1-P5) が反発することによって獲得されたと推測されることから、Polymyxin の正電荷を弱めることで Polymyxin 耐性コレラ菌にも有効な薬剤を設計できると考えた。そこで、Polymyxin の5つの Dab 基のうちの1つのアミノ基を負電荷である N-2-aminoethylguanidyl (Fig. 2 左下) に置換したところ、新たに合成した薬剤は Polymyxin B と比べてヘム添加時により大きな阻止円を形成した (Fig. 3●)。以上の結果から、ヘム取り込みにより Polymyxin 耐性が誘導されたコレラ菌に対して Polymyxin B よりも有効性が高い薬剤の候補を提示することに成功した。

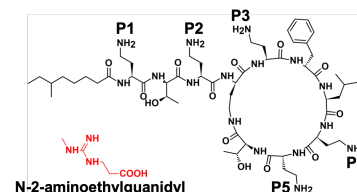


Fig. 2 Polymyxin B と N-2-aminoethylguanidyl の構造式

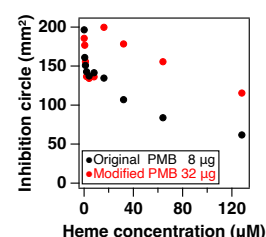


Fig. 3 薬剤感受性試験結果

第5章では、本学位論文において明らかになった点や今後の展望をまとめた。本学位論文では、病原性細菌であるコレラ菌に対する有効性の高い抗菌薬を開発することを目的として創薬標的の探索を行うため、鉄やヘムの代謝遺伝子の制御因子である Fur の金属選択性や細胞内へのヘムの取り込みによるフィードバック制御の解明と、その下流遺伝子である *vca1098-1101* と *eptA* の役割を解明した。コレラ菌は腸管内のようなヘムが豊富に存在する場所においては、その増殖のためヘムを取り込み、細胞内ヘム濃度を上昇させる一方、コレラ菌が感染した宿主の自然免疫システムからカチオン性の抗菌ペプチドによる攻撃を受ける。そこでコレラ菌はその細胞内ヘム濃度に応じて外膜電荷を変化させることでカチオン性ペプチドへの耐性を獲得するが、申請者は、この機構を利用して弱正電荷をもつ新規カチオン性ペプチド類似化合物である Polymyxin 誘導体を作成することで、コレラ菌の生体防御機構を回避する新たな作用機序をもつ有効性が高い抗菌薬の設計を達成した。本学位論文による成果はコレラ菌に対する新たな抗菌薬を提案するだけでなく、Polymyxin 耐性遺伝子を獲得した薬剤耐性菌に対する新たな治療方針への展開も期待される。