



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 村西 和佳

審査担当者	主査	教授	村上 洋太
	副査	教授	大利 徹
	副査	教授	茂木 文夫
	副査	教授	石森 浩一郎
	副査	准教授	内田 毅

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)

本学位論文はコレラ菌における鉄代謝関連蛋白質に対する転写因子である Ferric uptake regulator (VcFur) の機能解析と、その VcFur を介して発現する Polymyxin 耐性を利用した抗菌薬の開発への指針をまとめたもので、全 5 章からなる。

第 1 章では、まず、本学位論文での研究の背景として、新たな抗菌薬開発の社会的要請やその現状について述べ、病原菌の鉄獲得機構を標的とする抗菌薬開発の必要性と可能性を示し、次いで本論文で研究対象となるコレラ菌における鉄代謝機構を制御する代表的な転写抑制因子である Fur について、その機能的、構造的特徴をまとめ、Fur による鉄代謝制御機構における課題を提示している。

第 2 章では、Fur が制御する遺伝子群の中に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 vca1098-vca1101 が存在することに注目し、鉄だけではなく、ニッケルも Fur の制御因子として機能するかどうか検討している。VcFur とその標的遺伝子配列である Fur box との結合を、蛍光ラベル Fur box 配列を用いた蛍光偏光解消度測定によって追跡したところ、2 価鉄存在下では Fur box と特異的に結合するのに対して、2 価ニッケル存在下では配列非特異的に DNA と結合したことから、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と結論付けた。さらに、この 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を見出し、そのトリプトファン残基の蛍光を用いたヘム滴定からヘムの解離定数を求めたところ、ヘムを活性中心とする蛋白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と同程度の解離定数であったことから、VCA1098 がヘム輸送を担う蛋白質であることを示唆している。以上の結果から、コレラ菌は鉄枯渇時には VcFur を介して vca1098 の発現量を増大させ、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提案している。このことはコレラ菌の鉄代謝機構における新たな知見であり、その機構解明に貢献すると考えられる。

一方、第 3 章では、第 2 章においてヘム輸送体と示唆された VCA1098 について、抗菌薬の創薬標的としての可能性を検討している。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蛍光消光法により評価したところ、ヘムは VcFur と特異的に結合し、さらに蛍光偏光解消度測定からは、このヘム結合により Fur は Fur box から解離することから、細胞内ヘム濃度の上昇により、VCA1098 が発現することを提案している。このことは、Fur box 下流遺伝子である vca1098 の mRNA 発現量が、ヘムの添加に伴って増大することからも確認でき、以上の結果は、VCA1098 の発現によって細胞内へのヘムの輸送量が増大すると、VcFur の Fur box からの解離がより進行し、その結果 vca1098 の発現量がさらに増大することで、ヘムの取り込みが加速的に促進されることを意味している。このようなヘムによる加速的な vca1098 発現量の増大は、創薬標的としては大量の薬剤が必要となることとなり、効果的ではないことから、第 4 章では、遺伝子配列上では vca1098-vca1102 の直下に存在する eptA に着目している。この eptA は、培地へのヘム添加によってその転写量が 2 倍に増大したことから、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機構を提案している。この機構の妥当性を検討するため、コレラ菌の Polymyxin 感受性をディスク拡散試験により評価したところ、培地へのヘム添加によって阻止円が縮小したことから、細胞内ヘム濃度の上昇により、コレラ菌の Polymyxin 耐性増大を確認している。このような 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) 基が反発することによって獲得されたと推測できることから、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、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 に置換したところ、このような化合物は 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。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ている。

第 5 章は、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、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、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* の役割を解明するという新たな創薬戦略を提案している。

本学位論文による成果はコレラ菌の鉄獲得機構に新たな視点をもたらすとともに、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指針につながる知見ともなることから学術的に意義のある重要な内容であり、博士（理学）の授与に値すると判断する。