

微生物間相互作用の遮断と抗生物質耐性を紐付ける 未知微生物群ならびに両機能性酵素の発見

草田 裕之^{1,2}・玉木 秀幸^{3*}

はじめに一抗生物質の多面的機能一

2015年、抗生物質「エバメクチン」に関する研究で大村智先生がノーベル生理学・医学賞を受賞され、世界中で大きなニュースになったのは記憶に新しい。抗生物質研究の歴史は比較的長く、1928年に世界初の抗生物質であるペニシリンがFlemingにより発見され、これが契機となり本研究分野の幕が開けた。ペニシリンは当時世界的に問題となっていた結核の治療に貢献したことから、20世紀における、もっとも重要な発見の一つに位置付けられている。このペニシリンの発見以降、特に1940年代から1960年代は抗生物質探索研究の黄金期であり、放線菌を中心とした環境微生物から抗菌スペクトルが広い新規な抗生物質が続々と発見され、種々の病原菌を制御する特効薬として医療や農業など幅広い分野で我々の生活に多くの恩恵をもたらしてきた。

一般的に抗生物質は「微生物が産生し、他の微生物の生育を阻害する天然物質」と定義されている。しかしながら、長らく認識されてきたこの抗生物質の定義が今、大きく変わろうとしている。それは近年の研究により、抗生物質は単なる武器ではなく、実は微生物間コミュニケーションを支える「シグナル物質」である、とする新たな機能が見いだされつつあることによる。これは、“antibiotic-as-beneficial-signal hypothesis”とも呼ばれ、環境中に存在する低濃度の抗生物質は、本来は細菌の細胞間でやりとりされるコミュニケーションの手段として利用されているとの仮説である¹⁻⁴⁾。実際に、生育を抑制しないレベルの低濃度の抗生物質は、緑膿菌の運動性や毒素生産、バイオフィーム形成といった表現系を正あるいは負に制御することが報告されている^{4,5)}。つまり、我々が普段から見聞きしている「抗生物質が細菌を殺す」という機能は、実験室という“Unnatural”な人工環境で生み出された抗生物質の側面のみを見ているとも言える。

一方で、シグナル物質の研究に目を向けると、上記で示した緑膿菌の毒素生産やバイオフィーム形成などの生物機能は、アシル化ホモセリンラクトン（以下、AHL）

と呼ばれるシグナル物質によって媒介される微生物間コミュニケーション機構（Quorum Sensing⁶⁾）により制御されていることが広く知られている。AHLは自然環境中において極低濃度でシグナル物質として働くことが一般的であるが、実はこのAHLも実験室環境下で高濃度（通常の抗生物質の使用濃度）に加えた場合、抗生物質のように細菌（黄色ブドウ球菌）の生育を著しく抑制することが報告されている⁷⁾。

以上の研究背景から、筆者らは「抗生物質」と「シグナル物質」が表裏一体の関係である可能性に興味を持ち、これまでに微生物間相互作用という新たな観点から抗生物質耐性菌の生理生態機能の解明を目指して研究を遂行してきた。その過程において、環境中から新規AHL分解菌の純粋分離に成功し、本細菌株が多剤耐性能を併せ持つこと、また本菌から単離した新規なAHL分解酵素が、Quorum-Sensing機構を遮断するだけでなく、抗生物質をも分解することで宿主細菌の多剤耐性能にも重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて明らかにしている。本稿では、このAHL分解能を持つユニークな新規多剤耐性菌群の系統と生理機能とともに、本菌から単離した未知酵素の新たな生物機能について概説する。

多剤耐性とAHL分解活性を併せ持つ

未知環境細菌の分離培養化と系統学的多様性の解明

筆者らははじめに、抗生物質耐性能とAHL分解能の両機能を併せ持つ新規微生物の分離培養に取り組んだ。まず、抗生物質生産工場の排水処理システムからペニシリンへの耐性能を持つ細菌の獲得を試みた結果、20株のペニシリン耐性菌の単離に成功した。次に、このペニシリン耐性菌について、シグナル物質であるAHL異性体（OC₁₂-HSL）の分解能を評価したところ、20株中7株のペニシリン耐性菌がOC₁₂-HSLの分解活性をも有していることが判明した。また、これら7株のAHL分解に対する基質特異性を評価した結果、OC₁₂-HSLのみならず、炭素数6-14のさまざまなAHL異性体を分解可能であることが明らかとなった⁸⁾。一般的にはAHL分解

*著者紹介 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門（研究グループ長） E-mail: tamaki-hideyuki@aist.go.jp

¹国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門（研究員）

²JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 不均一性グループ（研究員）

³JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト ゲノム生化学グループ（サブグループリーダー）

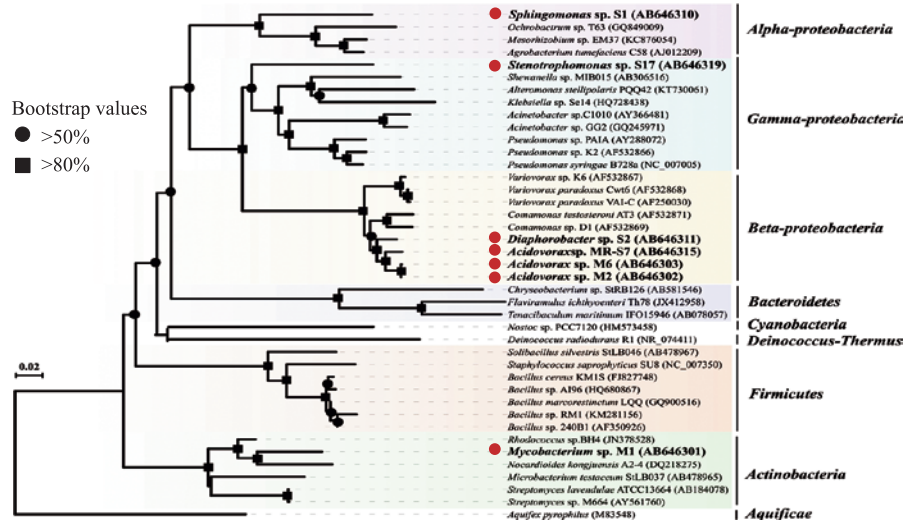


図1. 16S rDNA 遺伝子に基づく新規 AHL 分解菌の分子系統解析 (文献8より改変転載)

菌は自身でも AHL を生産していることが知られているが、本研究で単離した AHL 分解菌はいずれも AHL を生産しないことから、これらの単離株は他の微生物のコミュニケーションの遮断に特化した能力を有する可能性が示唆された。

16S rDNA 遺伝子に基づく系統解析の結果、これら7株の AHL 分解菌は *Alphaproteobacteria* 綱 (*Sphingomonas* 属), *Betaproteobacteria* 綱 (*Acidovorax* 属, *Diaphorobacter* 属), *Gammaproteobacteria* 綱 (*Stenotrophomonas* 属), *Actinobacteria* 門 (*Mycobacterium* 属) に属することが判明した⁸⁾(図1)。これまで系統的に多様な AHL 分解菌が分離されてきているが、*Acidovorax* 属と *Mycobacterium* 属に分類される AHL 分解菌は初めての報告であり、抗生物質耐性能に着目することで従来捕捉されてこなかった新規な AHL 分解菌の単離につながる可能性が示された。

次に、分離した AHL 分解菌のβラクタム系抗生物質に対する耐性能を評価した。その結果、これら7株はコントロールの大腸菌と比較して、7種類の異なるβラクタム系抗生物質(ペニシリンG・アンピシリン・アモキシシリン・カルベニシリン・ピペラシリン・セファレキシシン・セファドロキシル)に対する最小生育阻止濃度が2.0–62.5倍も高い値を示し、多剤耐性能を有することが明らかとなった⁸⁾。特に、これら7株はすべて500 μg/mL以上のアンピシリンに対して耐性を示すことが判明し、単離した7株の AHL 分解菌が多様なβラクタム系抗生物質に対して非常に高い耐性能を有することが明らかとなった。このように、「AHL分解能」と「多剤耐性能」という2つの異なる微生物機能を併せ持つ細菌の知見は、きわめて限られており、本研究以外では *Pseudomonas*

aeruginosa PAO1株のみしか報告されていない。本研究で示した通り、上記2つの機能を併せ持つ細菌群が2門4綱と系統的に多岐にわたっていることから(図1)、「AHL分解能」と「多剤耐性能」を持つ細菌は環境中に広く生息している可能性がある。

分離株の AHL 分解遺伝子の同定と AHL 分解機構の解明

AHL 分解酵素には、AHL のラクトン環とアシル鎖を結ぶアミド結合の切断反応を触媒する AHL-acylase と、AHL のラクトン環の開環反応を触媒する AHL-lactonase という2種類のタイプが存在している。分離した新規な AHL 分解菌7株の AHL 分解機構を調べたところ、AHL-acylase 活性のみを持つ細菌が4株、AHL-lactonase 活性のみを持つ細菌が1株、両方の AHL 分解活性を持つものが2株であった。中でも、*Acidovorax* sp. MR-S7株は、分離株の中でもっとも多様な AHL を AHL-acylase 活性により分解したことから、本株から新規な AHL-acylase 遺伝子の単離と同定を試みた。

まず、本株のゲノム解析⁹⁾から AHL-acylase の候補遺伝子 (*macQ*) を見いだした。*In silico* 解析から、*MacQ* は *Deinococcus radiodurans* R1 由来の機能解析済みの AHL-acylase と非常に低い相同性 (39%) を示すことが明らかとなった。次に、大腸菌を宿主とした *macQ* 遺伝子の高発現系の構築および酵素の精製を行い、組換え *MacQ* 酵素の機能解析を実施した。GC-MS を用いて AHL の分解産物を分析した結果、本酵素は AHL のアミド結合の切断反応を触媒する AHL-acylase 活性を示すことが判明した¹⁰⁾。また、*MacQ* の基質特異性を調べたところ、本酵素は既知の AHL-acylase の中でもっとも基質特異

性が広く、アシル鎖長が6から14のきわめて多様なAHL異性体を分解可能であることが明らかとなった¹⁰⁾。

次に、バイオアッセイ系を用いて、MacQが*in vivo*においてQuorum-Sensing機構を遮断するかどうかを検証した。植物病原菌である*Pectobacterium carotovorum*はAHLを介したQuorum-Sensing機構により植物細胞壁の分解酵素(セルラーゼやペクチナーゼ)を生産し、植物に病害を及ぼすことが知られている¹¹⁾。興味深いことに、MacQを高発現する組換え大腸菌と共培養することで*P. carotovorum*の病原性が顕著に抑制されることが明らかとなった¹⁰⁾。この現象は、MacQのAHL分解活性により*P. carotovorum*のQuorum-Sensing機構が遮断され、その結果、セルラーゼなどの生産が抑えられたためであると考えられる。MacQの基質特異性の広さを考慮すると、本酵素は植物病原性の他にもQuorum-Sensing機構により制御されているさまざまな微生物機能の制御技術の開発(たとえば、バイオフィーム形成阻害剤など)に寄与することが期待される。

AHL-acylaseの新たな機能の発見

上述のように、MacQは基質特異性の広い新規なAHL-acylaseであった。筆者らは、AHL-acylaseがβラクタム系抗生物質の分解酵素であるPenicillin-acylaseと構造的・機能的に類似している点(同じ酵素ファミリーに属し、共にアミド結合の切断反応を触媒する)に着目し、AHL-acylaseはβラクタム系抗生物質をも分解し、宿主細菌の抗生物質耐性能にも寄与しているのではないかと、という仮説を立てた。この仮説を実証するため、まずMacQがペニシリンG(代表的なβラクタム系抗生物質)を分解できるか機器分析により調べたところ、本酵素は確かにペニシリンGのアミド結合の切断反応を触媒するPenicillin-acylase活性を有することが判明した。次に、MacQが抗生物質耐性に寄与するか否かを明らかにするため、MacQを高発現する組換え大腸菌の抗生物質耐性能を調べた。その結果、MacQを高発現する組換え大腸菌は対照区の大腸菌と比較して、6種のβラクタム系抗生物質に対する最小生育阻止濃度が2-16倍向上していた。この結果は、MacQが宿主大腸菌に抗生物質耐性能を付与したことを意味している¹⁰⁾。

以上より、MacQはAHL-acylaseとPenicillin-acylase活性を併せ持つ『両機能性酵素』であり、本酵素が宿主細菌においてQuorum-Sensing機構の遮断と抗生物質耐性という2つの重要な機能に寄与するという新たな生物学的役割を明らかにした(図2)。興味深いことに、MR-S7株における*macQ*遺伝子の転写は、AHLもしくは

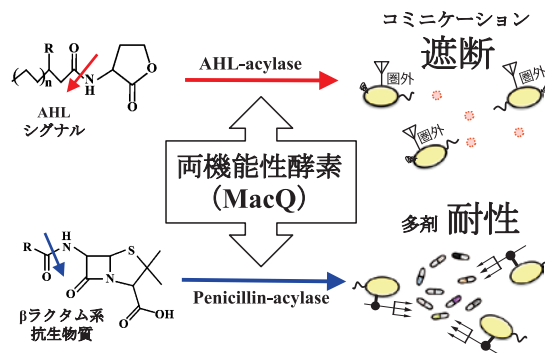


図2. 両機能性アシラーゼの概念図

は抗生物質の存在下で強力に誘導されることから、MR-S7株はこの両機能性酵素を駆使することで競合する他の微生物間のコミュニケーションを攪乱すると同時に、抗生物質の暴露から自身を守ることで、環境中でニッチを獲得している可能性が考えられる。実際に、MR-S7株が分離された環境(抗生物質生産工場の排水処理システム)は高濃度のβラクタム系抗生物質が存在するとともに、菌体密度が高く競合微生物が多く存在する環境であった。このような過酷な環境に適応するための生存戦略として、本菌はAHLと抗生物質を同時に分解できるよう進化してきたのかもしれない。

両機能性酵素の多様性解析

先行研究において、MacQと同様に両機能性を示す酵素が4つ報告されているが(AhIM, *Streptomyces* sp. M664: KcPGA, *Kluyvera citrophila* DSM2660: AtPVA, *Agrobacterium tumefaciens* ATCC33970: PaPVA, *Pectobacterium atrosepticum* DSM20186)¹²⁻¹⁵⁾、その生物学的役割ならびに分子系統学的な多様性について未解明であった。そこで既知のAHL-acylaseとPenicillin-acylaseのアミノ酸配列を用いて分子系統解析を実施したところ、これらの酵素は大きく4つの系統群(2つのAHL-acylase groupと2つのPenicillin-acylase group)に分類され、この中で両機能性酵素は3つの系統群に分散して分類された(図3)。このように両機能性酵素は系統的に広範に分布していることから、この両機能性という機能は特定の微生物にのみ保存された特異な生物機能ということではなく、さまざまな環境微生物において広く保持されうる機能であると考えられる。事実、データベース上の機能未知遺伝子の中には両機能性酵素に高い相同性を示すものが存在することから¹⁰⁾、筆者らはこのような機能未知遺伝子を持つ細菌群を、これまで見過ごされてきた「多剤耐性菌の候補細菌群」と位置付けることができるのではないかと考えている。今後、これまで

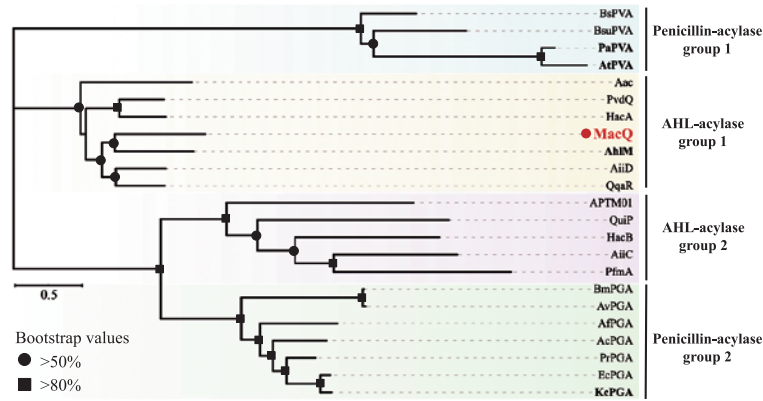


図3. 両機能性酵素 MacQ の分子系統解析

の抗生物質耐性に関する研究では盲点であった「微生物間コミュニケーションの遮断」という生物機能に着目することで、未知未培養の抗生物質耐性菌の探索手法の開発や臨床現場における多剤耐性菌の検出・モニタリング手法の開発にもつながることが期待される。

おわりに—今後の展望—

本研究では、両機能性を持つ新規な微生物の発見と両機能性酵素の機能解明により、同一の酵素が「微生物間コミュニケーションの遮断」と「抗生物質耐性」という、まったく異なると考えられてきた2つの重要な生物機能に寄与することを世界に先駆けて明らかにした。本発見により、従来ではAHL分解という側面でのみ捉えられてきた微生物（AHL分解菌）や酵素（AHL-acylase）が、昨今世界中で問題となっている「多剤耐性菌」や「抗生物質分解酵素」と実は表裏の関係である可能性が見いだされた。このように、従来とは異なる視点から抗生物質の生物機能を俯瞰することにより、これまで未解明であった多剤耐性菌の耐性メカニズムや、抗生物質耐性遺伝子の伝搬機構、さらには耐性菌の進化や起源の解明にも一歩迫ることができるのではないかと期待している。最後に、本稿で紹介した筆者らの一連の研究が、歴史ある抗生物質研究に少しでも新たな知見をもたらすことができたら幸いである。

謝 辞

本稿で紹介した研究はJST ERATO野村集団微生物制御プロジェクト（JPMJER1502）および科学研究費助成事業（19K16633, 19H05679）の一環として実施されたものである。

文 献

- 1) Fajardo, A. and Martínez, J. L.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 161 (2008).
- 2) Ratcliff, W. C. and Denison, R. F.: *Science*, **332**, 6029 (2011).
- 3) Yim, G. et al.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **362**, 1195 (2007).
- 4) Linares, J. F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19484 (2006).
- 5) Shen, L et al.: *J. Microbiol.*, **46**, 4 (2008).
- 6) Fuqua, W et al.: *J. Bacteriol.*, **176**, 2 (1994).
- 7) Qazi, S. et al.: *Infect. Immun.*, **74**, 910 (2006).
- 8) Kusada, H. et al.: *Front. Microbiol.*, **10**, 455 (2019).
- 9) Miura, T. et al.: *Genome Announc.*, **1**, e00412-00413 (2013).
- 10) Kusada, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, 13 (2017).
- 11) Sjöblom, S. et al.: *Mol. Microbiol.*, **60**, 6 (2006).
- 12) Park, S. Y. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5 (2005).
- 13) Mukherji, R. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **56**, 1 (2014).
- 14) Avinash, V. S. et al.: *J. Struct. Biol.*, **193**, 2 (2016).
- 15) Sunder, A. V. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 6 (2017).