

総 説 (一般)

緑膿菌によるクォーラムセンシング阻害剤 C-30 の代謝変換と阻害効果の追及

Metabolism of a Quorum Sensing Inhibitor C-30 by *Pseudomonas aeruginosa*

橋本 卓宏¹, 前田 憲成^{1*}, 門上希和夫², Rodolfo Garcia-Contreras³, Thomas K. Wood⁴, 尾川 博昭¹
TAKAHIRO HASHIMOTO¹, TOSHINARI MAEDA^{1*}, KIWAO KADOKAMI², RODOLFO GARCÍA-CONTRERAS³, THOMAS K. WOOD⁴ and HIROAKI I. OGAWA¹

¹ 九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻 〒808-0196 福岡県北九州市若松区ひびきの 2-4

² 北九州市立大学国際環境工学部 〒808-0135 福岡県北九州市若松区ひびきの 1-1

³ 国立心臓学研究所生化学研究科 〒14080 メキシコシティ メキシコ

⁴ ペンシルバニア州立大学化学工学科 〒16802 ユニバシティパーク ペンシルバニア州 アメリカ

* TEL: 093-695-6064 FAX: 093-695-6005

* E-mail: toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

¹ Department of Biological Functions and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology,

2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu 808-0196, Japan

² Faculty of Environmental Engineering, The University of Kitakyushu,

Hibikino 1-1, Wakamatsu-ku, Kitakyushu 808-0135, Japan

³ Department of Biochemistry, National Institute of Cardiology, 14080 Distrito Federal, Mexico city, Mexico

⁴ Department of Chemical Engineering, Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

キーワード: クォーラムセンシング, ハロゲン化フラノン, 代謝変換, *Pseudomonas aeruginosa*

Key words: Quorum sensing, Halogenated furanone, Metabolic conversion, *Pseudomonas aeruginosa*

(原稿受付 2012 年 10 月 16 日/原稿受理 2012 年 11 月 22 日)

1. はじめに

クォーラムセンシングは、定足数 (quorum) を感知 (sensing) するシステムとして命名された機構であり、多くのグラム陰性菌^{3,5)}、グラム陽性菌¹⁰⁾ において様々な遺伝子の発現調節システムを持つことが報告されている⁴⁾。オートインデューサー (autoinducer: AI) と呼ばれるシグナル分子を介することで細菌がその周辺に同種の菌がどの程度の数、密度で存在するかを感知して様々な物質の産生やバイオフィームの形成などを行う。クォーラムセンシングを行う代表的な細菌には、発光細菌の一種である *Vibrio fischeri* や日和見感染症の原因となる緑膿菌などが挙げられる。これらの細菌と病原性などとの関連性が注目されており^{12,16,19,22)}、近年ではクォーラムセンシングを阻害して病原性を抑えるという志向の研究が多くなされている¹⁾。クォーラムセンシング阻害方法の確立は大きな可能性を秘めており、次世代の病原治療法の一つとして期待されている¹⁸⁾。緑膿菌のクォーラムセンシングでは、2 種類のアシルホモセリナクトン (AHL) を産生し、これらのシグナル分子を介して情報伝達が行われ、エラスターゼ産生、ラムノリピッド産生、バイオフィーム形成や運動性などが活発となる。

海藻の一種である *Delisea pulchra* から抽出されるハロゲン化フラノン化合物は、一部の細菌に対しクォー

ラムセンシング阻害剤として働くことが知られている¹¹⁾。特に (Z)-4-プロモ-5-(プロモメチレン)-2(5H)-フラノン (以後、C-30) は、図 1-a のような分子構造をしているプロモ化フラノン化合物である。この C-30 はマウスの肺感染症モデルにおける研究において、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* に対しクォーラムセンシングを阻害する効果を持つことが報告されている⁶⁾。通常は、AI と受容体タンパク質 (ここでは LasR) が結合すると、転写活性化し、それに伴い遺伝子産物の合成が盛んになるが、C-30 は AI と受容体の結合を阻害することで、クォーラムセンシング阻害を引き起こすといわれている (図 1-b)。当研究室では、C-30 による *P. aeruginosa* PA14 株のクォーラムセンシング阻害効果の持続性を追究する過程で、C-30 が PA14 株により変換されていることを見出した。本研究では、PA14 株によるクォーラムセンシング阻害効果を持つプロモ化フラノン化合物 C-30 の代謝を行い、代謝変換後の物質の同定と代謝経路を追究した。

2. C-30 のクォーラムセンシング阻害効果

クォーラムセンシングを行う細菌は同菌種間、他菌種間に関わらず側鎖の炭素数が違う数種の AHL を産生することが知られている¹⁵⁾。一方で AHL と異なった感知方法、異なった構造の AI-2 や AI-3 の存在も報告されて

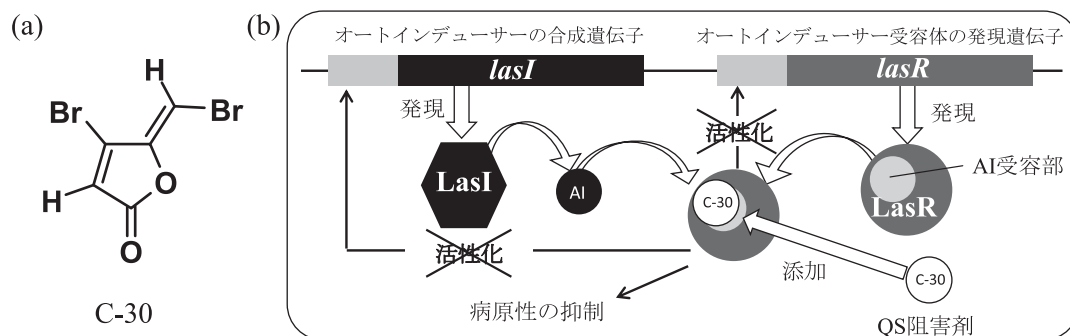


図1. C-30の構造 (a) およびクォーラムセンシングの阻害機構 (b)。

(a) クォーラムセンシング阻害剤 C-30 の構造, (b) クォーラムセンシングの遺伝子的機構とクォーラムセンシング阻害剤 C-30 による阻害機構を示した。

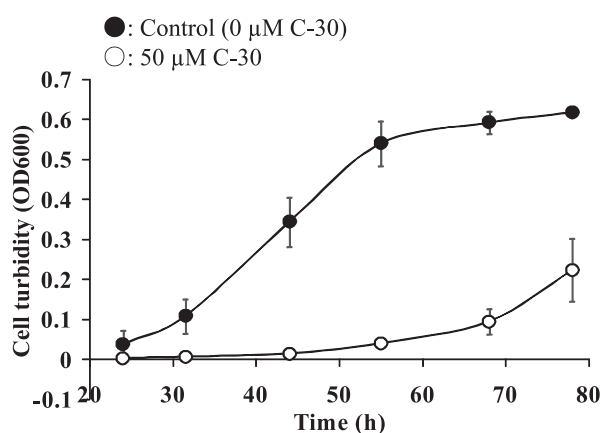


図2. 緑膿菌 PA14 株の 0.1% アデノシンを含む OS 最少培地における C-30 存在下, 非存在下での増殖。0.1% アデノシンを含む OS 最少培地を用いて PA14 株を 50 μM の C-30 存在下, 非存在下でそれぞれ 37°C, 好気状態で連続培養し, 逐次 600 nm の波長で分光光度計を用いて菌濁度を測定した結果をプロットした。

いる⁹⁾。本研究では, はじめにクォーラムセンシング阻害剤として知られている C-30 の阻害効果の有無を下記の手法を用いて確認した。

P. aeruginosa のクォーラムセンシング機構に関わる遺伝子として, *las* や *rhl* などが同定されている^{13,14,17,20,21)}。アデノシンの生分解に関わるヌクレオシド分解酵素の発現は, *las* システムの転写制御因子 LasR によって制御されているため, ヌクレオシド分解酵素を産生した緑膿菌はアデノシンを炭素源として利用することができる²²⁾。したがって, アデノシンを用いた最少培地における増殖は上述の機能に基づき, クォーラムセンシング経路に依存的であり, 菌の生育を観察することで可視的にクォーラムセンシングの消長を確認することができる。そこで 0.1% (w/v) のアデノシンを含む最少培地中で C-30 の有無による PA14 株の増殖を観察した。

アデノシンを含む OS 最少培地²⁾を用いて PA14 株を 50 μM の C-30 存在下および非存在下でそれぞれ 37°C, 好気状態で培養し, 逐次 600 nm の波長で分光光度計を用いて菌濁度を測定した。その結果, アデノシン最少培地中での PA14 株の 48 時間後の濁度は 50 μM の C-30 存在下では非存在下の場合と比較して 5 ± 1 倍の減少が

見られた (図2)。一方で LB 培地を用いた同様な培養において, C-30 存在下でも増殖阻害は見られなかった。したがって, 従来の報告の通り, C-30 がクォーラムセンシング経路に作用し PA14 株の生育を阻害したことが分かる。

3. C-30 代謝物の同定

C-30 のクォーラムセンシング阻害効果の持続時間を観察する過程で, C-30 は PA14 株によって性質が異なる化合物に変換されることが分かった。C-30 によってクォーラムセンシングが阻害されている環境に細菌が適応して生じた現象であると考えれば非常に興味深い現象であると考えられる。そこでこの現象の意義を明らかにするために, 代謝変換物の構造の同定を行った。

M9 緩衝液を用いて PA14 株を 50 μM の C-30 存在下で 37°C, 好気状態で 2 時間培養し, 培養前及び培養後の上清に対し高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による機器分析を行ったところ, C-30 のピークが減少し, リテンションタイムが C-30 のものより短い新規ピークが出現した (図3)。

この代謝物の同定を行うため, ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) による測定を行った。その結果, m/z 174 と 176 にほぼ 1 : 1 のイオンを持つピークが得られた (図4)。これは代謝物の構造内に 1 つの臭素が含まれていることを意味している。したがって, 図5に示したように, C-30 の構造内にある 2 個の臭素のうち, 一つが脱離した構造が推定された。しかしながらこの段階では代謝物が図5のどちらの構造かを同定できなかったため, 筆者らは推定された構造のうち 1 つの構造 C-56 を合成した⁷⁾。この C-56 に対しても HPLC と GC-MS による機器分析を行った (図6, 7)。C-56 と C-30 の代謝変換物の HPLC クロマトグラム及び GC-MS のリテンションタイムとマススペクトルの比較を行ったところ, これらが一致したことから C-30 の代謝産物が C-56 の構造と一致することが明らかになった。

C-56 はまだクォーラムセンシング阻害効果を持つことがすでに報告されており⁷⁾, 現在 C-30 と C-56 のどちらが高い阻害効果を持つか検討中である。

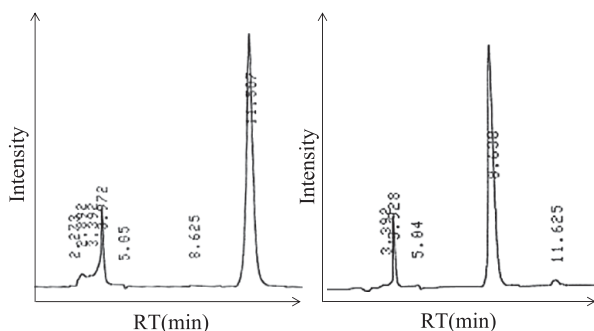


図3. C-30と代謝物のHPLCクロマトグラム (左) 培養前,(右) 2時間培養後。
M9緩衝液を用いてPA14株を50 μ MのC-30存在下で37°C, 好気状態で2時間培養し, 培養前及び培養後の上清に対しHPLCによる機器分析を行った結果を示した。左が培養前, 右が2時間培養後の上清に対するHPLCクロマトグラムである。

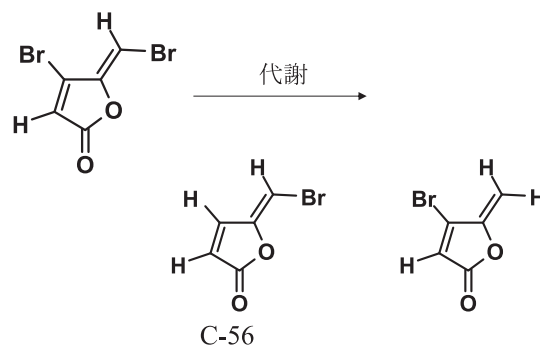


図5. GC-MSによって推測された代謝経路。
図3, 図4から推測されるクォーラムセンシング阻害剤C-30のPA14株による代謝変換後の構造式を示した。

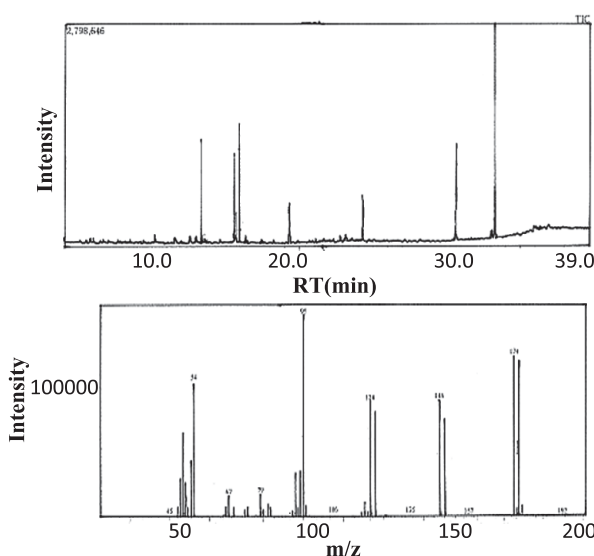


図4. C-30の代謝物のGC-MS測定結果 (上) GCクロマトグラム, (下) MSスペクトル。
図3で得た上清から塩化メチレンに抽出し, GC-MSによって測定を行った結果を示した。上がGCクロマトグラム, 下がMSスペクトルである。

4. C-30代謝物のさらなる代謝の可能性の追求

C-30はPA14株によってC-56に代謝変換されることが明らかになった。細菌による化合物代謝は一般に段階的に水溶性の高い化合物に分解されていくため, 今回の現象についても同様のことが起こり得ると考えられる。そこでここではC-30の代謝物であるC-56がさらに代謝変換される可能性を追求するため, PA14株にC-56を曝露させ, HPLCを用いて構造変化が生じるかを観察した。

M9緩衝液を用いてPA14株を50 μ MのC-56存在下で37°C, 好気状態で培養し, 培養前の上清と2, 24時間培養後の上清に対しHPLCによる機器分析を行ったところ, 2時間培養後の上清ではピークに変化は見られなかったものの, 24時間培養後の上清ではC-56の

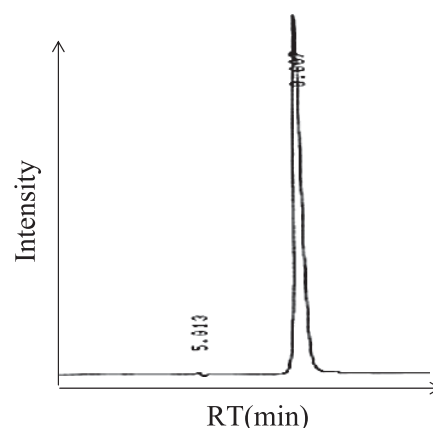


図6. C-56のHPLCクロマトグラム。
PA14株によるクォーラムセンシング阻害剤の代謝変換産物として推測された構造のうちの一つC-56に対しHPLCによって成分分析を行った結果を示した。

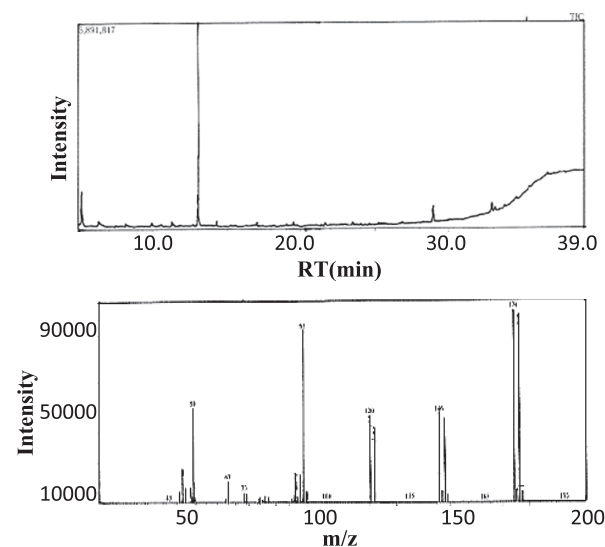


図7. C-56のGC-MS測定結果 (上) GCクロマトグラム, (下) MSスペクトル。
C-56に対しGC-MSによって測定を行った結果を示した。上がGCクロマトグラム, 下がMSスペクトルである。

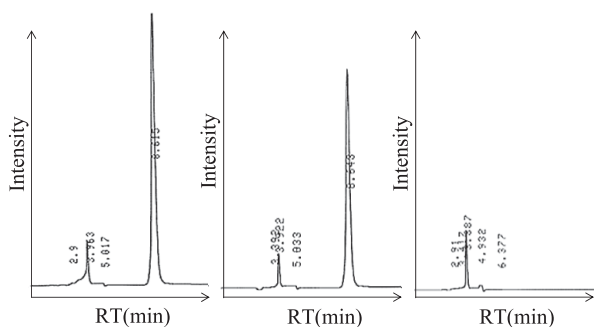


図 8. C-56 の HPLC クロマトグラム (左) 培養前, (中) 2 時間培養後, (右) 24 時間培養後。

M9 緩衝液を用いて PA14 株を 50 μ M の C-56 存在下で 37°C, 好気状態にて培養し, 培養前の上清と 2, 24 時間培養後の上清に対し HPLC による機器分析を行った結果を示した。左が培養前, 中が 2 時間培養後, 右が 24 時間培養後の上清に対する HPLC クロマトグラムである。

ピークが減少し, さらにリテンションタイムが短い新規ピークが出現した (図 8)。これは C-56 が代謝変換されたということであり, C-30 の二次代謝物が存在する可能性を示唆している。この二次代謝産物は, 素早くさらに分解される, もしくは水中における安定性が低いため微量にしか検出されず, 現在のところこの化合物の単離には至っていない。今後この化合物の単離, 同定を行っていきたいと考えている。

5. 臭素イオンの定量

C-30 が PA14 株により代謝されるとその構造内に存在する 2 つの臭素のうち 1 つが脱離した構造に変換されることが分かった。また, 代謝産物 C-56 も代謝されることから, 全ての臭素が最終的に C-30 の構造から脱離していることが予想された。そこで C-30 の代謝経路をさらに実証するために, C-30 代謝変換後の上清における臭素イオンの定量を行った。

M9 緩衝液を用いて PA14 株を 50 μ M の C-30 存在下で 37°C, 好気状態にて連続培養し, 1, 2, 4, 8, 20, 24 時間培養後の上清に対し HPLC による逆相クロマトグラフィーを用い臭素イオンの定量を行った。その結果, 実験開始直後から 2 時間時点まで臭素イオンの急激な濃度増加が見られ, この時点で約 50 μ M であった。その後 20 時間まで緩やかに濃度が増加しており, 最終的に約 100 μ M に達した。このことから, 2 時間までに素早い C-30 の分解が起こり, その後緩やかに二次代謝物へと変換されたと考えられる。また 50 μ M の C-30 に対し 2 倍量の 100 μ M の臭素イオンが検出されたことから, 二次代謝物は C-30 が構造内に持つ 2 つの臭素が全て脱離した構造を持つものと考えられる。

6. ま と め

シュードモナス属細菌は, これまでの報告から有機塩素化合物などの生分解に対して優れた機能を発揮しており, バイオレメディエーション技術を支える立役者の一つといえる。今回筆者らが用いたクォーラムセンシング

阻害剤 C-30 は, PA14 株によりすばやく代謝変換されることが確認された。代謝物は C-30 の構造内にある 2 つの臭素のうち, 一つが脱離した化合物 C-56 に変換されることが同定された。すなわち, 緑膿菌が保持する脱ハロゲン化反応によるものと考えられる。その一方, C-56 はまだ QS 阻害効果を持つこと, 及び緑膿菌によって C-56 はさらに変換されることが明らかになった。現在 C-30 と C-56 のどちらが高い阻害効果を持つか追究しているところである。仮に C-56 に変換されることでクォーラムセンシング阻害効果が減少していた場合, 菌が防御機構として C-30 を代謝変換する働きを行った可能性がある。クォーラムセンシング阻害は殺菌せずに病原性のみを抑制する手法であるため, 一般にクォーラムセンシング阻害は耐性を獲得しにくいと考えられている。従ってこれは菌の環境適応能力という観点から考えると非常に興味深い現象であり, 医療分野への応用, 実用化に向けて重要な情報と成り得ると考えている。

謝 辞

臭素イオンの定量は化学物質評価研究機構より実験器具の貸与を受けて行ったものであり, ここに深謝いたします。本研究は, 日本学術振興会のご支援 (21-7007) で得られた研究成果です。

文 献

- 1) Bjarnsholt, T., T. Tolker-Nielsen, N. Hoiby, and M. Givskov. 2010. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev. in Mol. Med.* 12: e11.
- 2) Diggle, S.P., A.S. Griffin, G.S. Campbell, and S.A. West. 2007. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial population. *Nature* 450: 411–414.
- 3) Eberl, L. 1999. *N*-acyl homoserinylactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 493–506.
- 4) Fiuqua W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269–275.
- 5) Greenberg, E.P. 1997. Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News* 63: 371–377.
- 6) Hentzer, M., H. Wu, J.B. Andersen, K. Riedel, T.B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M.A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, and J.W. Givskov. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo. J.* 22: 3803–3815.
- 7) Hentzer, M., K. Riedel, T.B. Rasmussen, A. Heydorn, J.B. Andersen, M.R. Parsek, S.A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology-Sgm.* 148: 87–102.
- 8) Heurlier, K., V. Denervaud, M. Haenni, L. Guy, V. Krishnapillai, and D. Haas. 2005. Quorum-sensing-negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J. Bacteriol.* 187: 4875–4883.
- 9) Kendall, Melissa M., David A. Rasko, and Vanessa Sperandio. 2007. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3 an epinephrine in a luxS mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 75: 4875–4884.

- 10) Kleerebezem, M., L.E. Quadri, O.P. Kuipers, and W.M. de Vos. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895–904.
- 11) Kjelleberg, S., P.D. Steinberg, M. Givskov, L. Gram, M. Manefield, and R. de Nys. 1999. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquat. Microb. Ecol.* 13: 85–93.
- 12) Nealson, K.H., T. Platt, and J.W. Hastings. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104: 313–322.
- 13) Ochsner, U.A. and J. Reiser. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6424–6428.
- 14) Passador, L., J.M. Cook, M.J. Gambello, L. Rust, and B.H. Iglewski. 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260: 1127–1130.
- 15) Pearson, J.P., C.V. Delden, and B.H. Iglewski. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181: 1203–1210.
- 16) Pearson, J.P., M. Feldman, B.H. Iglewski, and A. Prince. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* 68: 4331–4334.
- 17) Pearson, J.P., E.C. Pesci, and B.H. Iglewski. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179: 5756–5767.
- 18) Rasko, David A. and Vanessa Sperandio. 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 9: 117–128.
- 19) Rumbaugh, K.P., J.A. Griswold, and A.N. Hamood. 2000. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes. Infect.* 2: 1721–1731.
- 20) Whiteley, M., K.M. Lee, and E.P. Greenberg. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13904–13909.
- 21) Winson, M.K., M. Camara, A. Latifi, et al. 1995. Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9427–9431.
- 22) Winzer, K. and P. Williams. 2001. Quorum-sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 131–143.