

## インドール型オートインデューサーと大腸菌の社会活動

### Indole Auto-inducer and Social Behavior in *Escherichia coli*

平川 秀忠<sup>1\*</sup>, 富田 治芳<sup>2,3</sup>

HIDETADA HIRAKAWA<sup>1\*</sup> and HARUYOSHI TOMITA<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22

<sup>2</sup> 群馬大学医学系研究科細菌学 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22

<sup>3</sup> 群馬大学医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22

\* TEL: 027-220-7975 FAX: 027-220-7909

\* E-mail: hirakawa@gunma-u.ac.jp

<sup>1</sup> Advanced Scientific Research Leaders Development Unit, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

<sup>2</sup> Department of Bacteriology, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

<sup>3</sup> Laboratory of Bacterial Drug Resistance, Gunma University, Graduate School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

キーワード: インドール, 社会活動, クオラムセンシング, 薬剤耐性, 病原性

Key words: Indole, Social behavior, Quorum sensing, Drug resistance, Virulence

(原稿受付 2015 年 2 月 21 日 / 原稿受理 2015 年 2 月 27 日)

### 1. はじめに

細菌は様々な環境において集団を形成し、オートインデューサーと呼ばれる言語様化学物質を介してお互いにコミュニケーションを行っている。細菌の集合体はしばしば「バイオフィーム」と呼ばれ、「病原細菌による慢性感染部位 (気道・膀胱・皮膚上皮細胞内外や歯のプラーク)」や、「カテーテルのつまり」、「排水溝にできるぬめり」、「土壤中」、「植物内にできる根瘤など」我々にとって身近に観察される。近年、細菌の集団活動 (社会活動) を取り扱う学問は、Sociology (社会学) と Microbiology (微生物学) の融合分野として「Sociomicrobiology (社会微生物学)」と呼ばれるようになった<sup>1)</sup>。細菌の社会活動を担うコミュニケーション物質であるオートインデューサーは、細菌密度がある閾値を超えた時に爆発的に産生され、個々の細菌の遺伝子発現パターンとそれに伴う表現型を変動させる。従って、細菌の社会活動は、菌密度に依存していることから、「Quorum Sensing (クオラムセンシング)」とも呼ばれている<sup>2)</sup>。クオラムセンシングが最初に発見されたのは、海洋細菌による生体発光現象からであるが、その後、多くの細菌からもクオラムセンシング現象が発見され、その役割は生体発光に留まらず、二次代謝制御、DNA の取り込み・伝達、バイオフィーム形成、抗生物質耐性、病原細菌の毒素産生に関連するものなど多岐に渡っており、クオラムセンシングは基礎生物学から医学まで幅広い分野で注目を浴びてきた。

### 2. 大腸菌が産生するインドール型オートインデューサー

従来からオートインデューサーには、主に「アシルホモセリンラクトン型」「DPD (4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione) 型」「オリゴペプチド型」の 3 つのファミリーが知られてきた<sup>1)</sup>。

近年、これらの 3 ファミリーに加えて、様々な細菌から新規のオートインデューサー分子が同定されている。オートインデューサーの共通の特徴として、1) 菌密度がある閾値を超えた時に爆発的に産生される。2) シグナルとして特異的なレセプターに作用し、それ自身もしくは下流の転写制御因子を活性化させる。3) 活性化された転写制御因子が標的遺伝子のプロモーターに結合し、転写活性を増減させる。4) オートインデューサー合成遺伝子も標的遺伝子であるため、その転写がオートインデューサー自身によって活性化される (オートレギュレーション)。が挙げられる。

以前に著者らのグループは、インドールという化合物が、大腸菌群の社会活動を担うオートインデューサーであることを見出した<sup>3)</sup>。インドールは、大腸菌が持つトリプトファンゼ (Tryptophanase EC4.1.99.1) によってトリプトファンから生合成されるが、これまではトリプトファンからピルビン酸へと代謝される過程で生じる代謝副産物であると考えられてきた。一方で、インドールは大腸菌を含む特定の腸内細菌科の検出マーカーとしても利用されているが、インドール産生の生理的意義や役割に関してはほとんど明らかになっていなかった。著者らの実験において、様々な大腸菌株 (非病原性、病原

性株)の生育段階におけるインドール産生を調べたところ、インドール産生は対数増殖期後期以降に促進されることが分かった(図1A)。さらに、インドール産生量は基質となるトリプトファンの添加量を増やすことで、最大2 mM近くまで増大した(図1B)。しかしながら、トリプトファン欠損遺伝子(*tnaA*)欠損株では、定常期においてもインドール産生は観察されなかった。**TnaA**

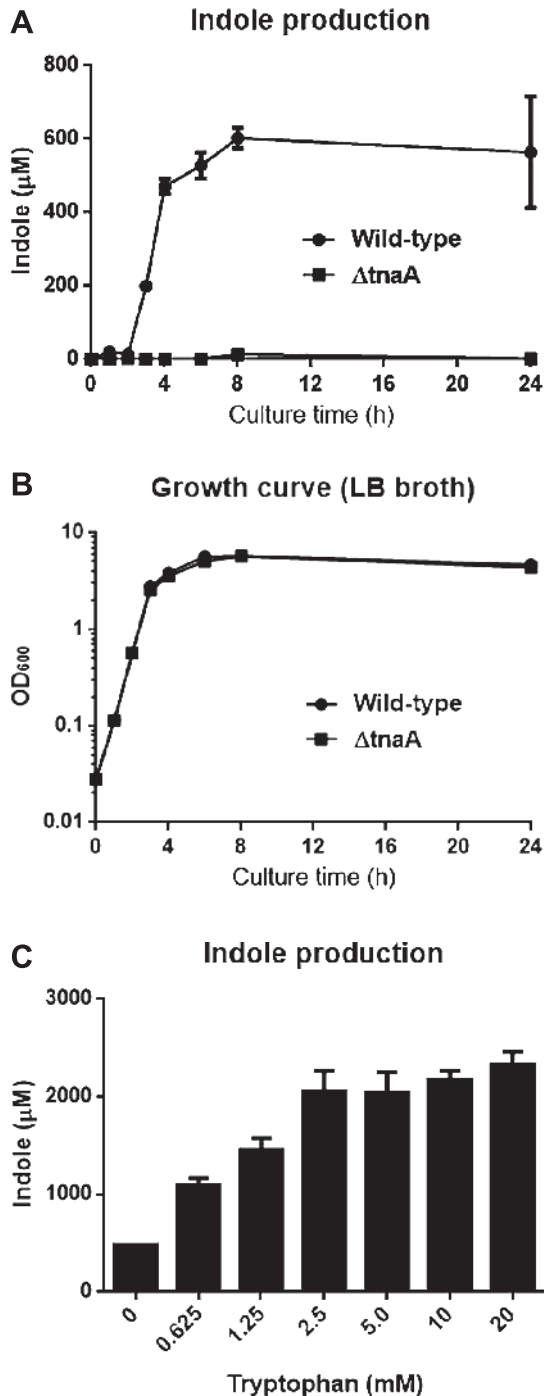


図1. 大腸菌のインドール産生

A. 野生株大腸菌 (Wild-type) のトリプトファン欠損 (**TnaA**) 依存的なインドール産生 B. 野生株大腸菌 (Wild-type) と *tnaA* 欠損株 ( $\Delta tnaA$ ) の生育 C. トリプトファン添加による野生株大腸菌 (Wild-type) のインドール産生量の影響

の発現自体はインドールによって誘導されるため、インドール産生は対数増殖期以降において正のフィードバックを受けている。このような産生機構は、「アシルホモセリンラクトン型」など他のオートインデューサーと非常に類似している。さらに、著者らのグループは、このインドールが大腸菌群の薬剤耐性と病原性を増大させることも発見した。以下の項目で、インドールオートインデューサーと、大腸菌群が行うインドール型社会活動の役割と仕組みについて解説を行う。

### 3. 大腸菌群のインドール型社会活動と薬剤耐性

著者らのグループは以前に、大腸菌の異物排出遺伝子の発現誘導条件を調べていた過程で、幸運にもインドールがそれらの発現を誘導する物質であることを発見した。

異物排出蛋白質とは、細胞内に取り込まれた様々な薬物や毒物を細胞外へと排出する、細菌を含む生物が普遍的に持つ生体防御因子の一つである。とりわけ、細菌にとっての異物排出蛋白質は、抗菌剤の排出も行うことから抗菌剤に対する自然抵抗性因子としての側面を持っている<sup>15)</sup>。大腸菌には約20種類の異物排出遺伝子が存在しているが、通常の培養条件下では数種類を除いて、ほとんど発現していないことが分かっていた<sup>16,18)</sup>。著者らは、各異物排出遺伝子のプロモーター活性をLacZ レポーターによって測定する系を構築し、様々な培養条件下においてプロモーター活性の変化量を調べた。その実験過程で、野生株において排出遺伝子のうち *mdtEF* のプロモーター活性が対数増殖期後期以降に飛躍的に増大することがわかった(図2A)<sup>11)</sup>。一方、*tnaA* 欠損株 (インドール非産生株) の *mdtEF* プロモーター活性は、対数増殖期後期以降に幾分増大はするものの、その活性は野生株と比べて有意に低かった(図2A)。このことは、対数増殖期後期以降における *mdtEF* の発現誘導に、部分的ではあるがインドール型オートインデューサーが関与していることを示している。著者らは、インドールによる他の排出遺伝子の発現誘導についても検討を行った結果、前述の *mdtEF* に加えて *acrD*, *emrK* など数種類の排出遺伝子の発現を5~7倍増大させることを見出した<sup>5,11)</sup>(図2B)。実際に、インドールによって前述の排出遺伝子の発現が亢進した時に、これらの基質であるローダミン6G, クリスタルバイオレット, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), カルベニシリンに対する耐性度が増大することを確認した。

さらに著者らは、インドールによる *acrD* の発現誘導は、二成分情報伝達系の *BaeSR* と *CpxAR* を介して行われていることも明らかにしている<sup>9)</sup>。二成分情報伝達系とは、細菌に備わっている環境感知応答システムであり、栄養成分や温度、浸透圧など様々な環境変化を感知するレセプター蛋白質 (センサーキナーゼ) とそれらの環境変化に適応するために遺伝子発現パターンを変化させる転写制御因子 (レスポンスレギュレーター) から構成されている。*baeSR*, *cpxAR* それぞれの単独欠損株では野生株で観察されたインドールによる *acrD* の誘導は部分的に消失し、*baeSRcpxAR* 二重欠損株においては、誘導能は完全に消失した。元々、*BaeSR* と *CpxAR* は膜ストレスに対して感知応答する二成分情報伝達系として

知られていたが、著者らの実験結果から本システムはインドールの感知も行っていることが示唆される。別グループの報告によると、高濃度のインドール（約 4 mM 以上）は細胞膜に酸化様ストレスを与える<sup>3)</sup>。著者らの実験で用いたインドール濃度は（1~2 mM）と生理的な濃度であるため、膜ストレスの可能性を完全に排除することはできないものの、別の機構で BaeSR と CpxAR に作用しているのではないかと推測している。一方、*mdtEF* や *emrK* といったインドールによって発現誘導される他の排出遺伝子は *baeSRcpxAR* 二重欠損株でも、野生株同様発現誘導は観察されたことから、BaeSR と CpxAR とは異なる誘導経路があることが示唆された。これまでに、少なくとも *mdtEF* の発現誘導に関しては、RNA シャペロン蛋白質である Hfq をコードする遺伝子を欠損させるとその誘導は完全に消失することは突き止めているが、この誘導経路の最上流に位置するレセプターの同定には至っていない。

ごく最近著者らは、排出系以外にもインドール型社会活動によって薬剤耐性が增強される機構も明らかにしている。後述する著者らの一連の実験において、腸管出血性大腸菌 O157 (Enterohaemorrhagic *E. coli*: EHEC) の

ホスホマイシンに対する自然抵抗性にインドール型社会活動が寄与していることを証明した<sup>10)</sup>。

ホスホマイシンは、O157 のグリセロール 3 リン酸輸送体 (GlpT) とグルコース 6 リン酸輸送体 (UhpT) によって菌体内へと取り込まれ、細胞壁合成酵素 (MurA) の働きを阻害することで抗菌活性を示す<sup>13)</sup>。本抗菌剤は、現在医療の現場で中心的に用いられているベータラクタム系やキノロン系抗菌剤に対して耐性化した菌 (耐性菌) にも有効であることから、その有用性が再認識されている。加えて後述のように、O157 感染症に対しては、溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症リスクを抑えるという報告があり、O157 感染症治療薬の一つとしても期待されている<sup>8)</sup>。しかしながらホスホマイシンは、相対的に抗菌活性が弱いことが知られている。著者らは一つの仮説として、細菌はホスホマイシンに対する何らかの自然抵抗性因子を保持しているのではないかと考えてきた。著者らの実験データから、インドールは、前述の CpxAR を活性化させ、*glpT* と *uhpT* の遺伝子発現を抑制することで、ホスホマイシン取り込み能を低下させることがわかった。著者らは、CpxAR を恒常的に活性化させた変異体 (*cpxAR\**) と外部からインドールを添加した株で実験を行ったところ、これらの株はインドール非産生親株 (Parent) と比較して、*glpT* と *uhpT* の mRNA 量と細胞内のホスホマイシン蓄積量が約 50 倍低い値を示した (図 3A, B)。これらの株の間でホスホマイシン処理による生存率比較を行った結果、CpxAR 活性化株はインドール非産生親株よりも約 10 倍高い生存率を示した (図 3C)。もともとホスホマイシンは、*Streptomyces fradiae* や *Pseudomonas putida* などの土壌細菌によって産生されることが知られている<sup>4)</sup>。実際に、インドール非産生親株と CpxAR 恒常活性化株をそれぞれ *S. fradiae* と 24 時間共培養を行ったところ、インドール非産生親株では単独培養時と比べて CFU (Colony Forming Unit) が約 2% であったのに対し、CpxAR 恒常活性化株は約 17% であった (図 3D)。このことから、O157 のインドール型社会活動は、自然環境中 (家畜の糞便中、その付近の土壌) において、ホスホマイシン産生土壌細菌に対する自然抵抗性 (生体防御) の役割を担っていると考えられる。

インドールは、産生菌 (大腸菌群) 自らに作用するだけでなく、インドールを産生しない他の菌種にも作用することが、他のグループによって報告されている<sup>12,19)</sup>。インドールが緑膿菌のバイオフィーム形成を阻害し、サルモネラ菌の抗生物質耐性を増大させる。従って、大腸菌群によって産生されるインドールは大腸菌自身が社会活動を行うためのコミュニケーション物質以外にも他の種族の細菌にとっての社会活動にも影響を及ぼしているのかもしれない。

#### 4. インドール型社会活動と腸管出血性大腸菌の病原性

細菌の社会活動に関する研究が開始されて以来、細菌の社会活動が病原性に関係しているという報告が、緑膿菌を皮切りに様々な菌種からなされてきた。その中で著者らは、インドール型社会活動が腸管出血性大腸菌 O157 の病原性に寄与することを発見した<sup>9)</sup>。O157 は、

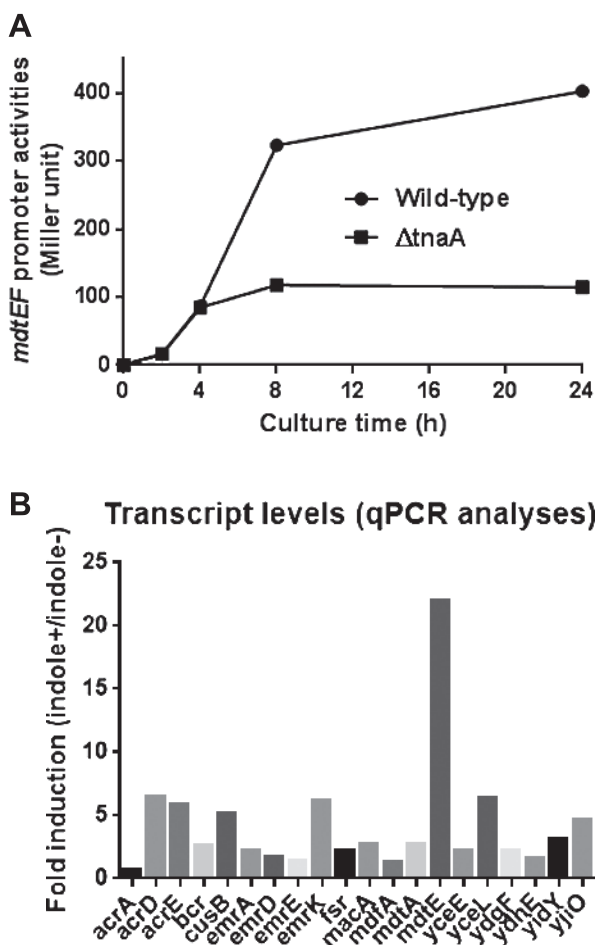


図 2. インドールオートインデューサーによる大腸菌異物排出遺伝子の誘導

A. 野生株大腸菌 (Wild-type) と *tnaA* 欠損株 ( $\Delta$ *tnaA*) の生育に伴う *mdtEF* プロモーターの活性変化 B. インドール添加による排出遺伝子 mRNA の変動 (定量的リアルタイム PCR 法により定量)

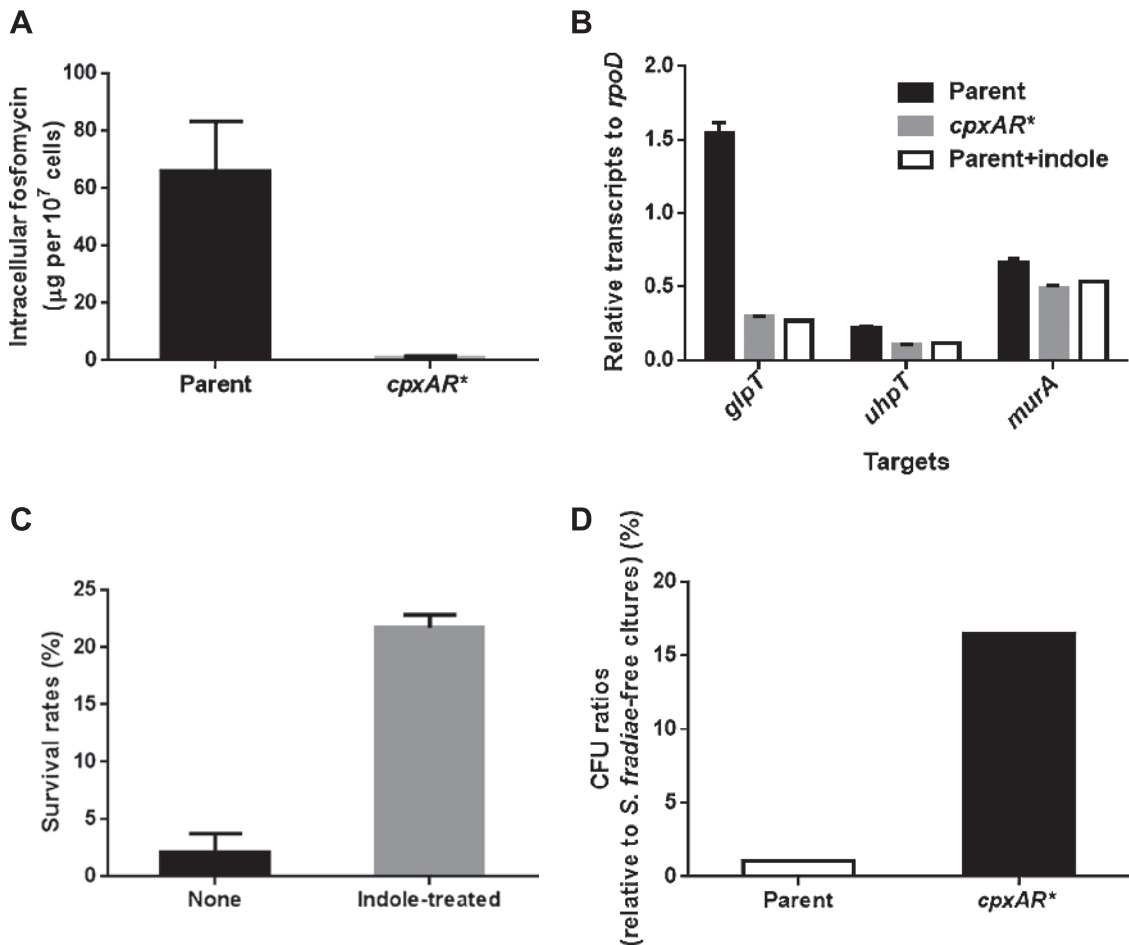


図3. O157 のホスホマイシン自然抵抗性におけるインドール社会活動の役割

A. *tnaA* 欠損親株 (Parent) と CpxAR 活性化株 (*cpxAR\**) における菌体内ホスホマイシン蓄積量の比較 B. *tnaA* 欠損親株 (Parent) と CpxAR 活性化株 (*cpxAR\**), インドール添加による *glpT*, *uhpT*, *murA* mRNA の変動 (定量的リアルタイム PCR 法により定量) C. インドール非添加, 添加時におけるホスホマイシン処理後の生存率比較 D. *tnaA* 欠損親株 (Parent), CpxAR 活性化株 (*cpxAR\**) と *S. fradiae* との共培養 24 時間後の CFU (Colony Forming Unit) の割合 (%) (単独培養後を 100% とした時)。

III 型分泌蛋白質とペロ毒素という 2 種類の代表的な病原性蛋白質を産生し, 宿主の細胞に傷害を与えることが知られている<sup>9,14</sup>。前者は, ニードル型構造を持つ蛋白質複合体を介して分泌され宿主の腸管上皮細胞へ作用し, Attaching and Effacement (A/E) lesion と呼ばれるアクチン集積を起こさせる。その結果, 宿主に重篤な下痢症状を惹き起こさせる。後者は, 宿主の蛋白質合成を阻害し, 出血性の下痢に加え, 致死性の溶血性尿毒症症候群 (HUS) と呼ばれる病態を惹き起こす。著者らの実験において, O157 野生株 (インドール産生株) を HeLa 細胞に感染させたところ, HeLa 細胞 100 個当たりの A/E lesion 形成数 (アクチン集積頻度) は,  $14 \pm 3$  個であった。一方, *tnaA* 遺伝子欠損 O157 株 (インドール非産生株) を感染させたときには, A/E lesion 形成数が,  $6 \pm 2$  個と野生株感染時と比べて約半数であった (図 4A)。しかしながら, *tnaA* 欠損株をインドール存在下で培養を行った後, HeLa 細胞に感染させると, 野生株感染時とほぼ同程度のアクチン集積頻度を示した ( $18 \pm 3$  個)。

III 型分泌蛋白質をコードする遺伝子は, ニードル型分泌装置をコードする遺伝子と共に, LEE (Locus of

Enterocyte Effacement) と呼ばれる染色体上の遺伝子クラスター中に存在している<sup>14</sup>。その中で, アクチン集積を起こさせる主要な分泌蛋白質として EspB と Tir (Effector) が, これらを宿主細胞内へ輸送するために必須な EspA (Translocator) が詳細に研究されている。著者らの実験から, インドール添加によって, *espA*, *espB* を含む LEE4 オペロンのプロモーター活性が 2.66 倍増大した (図 4B)。次いで, LEE1 オペロンのプロモーター活性が 2.05 倍増大した。LEE1 には各 LEE プロモーターを正に制御する転写制御因子 Ler をコードする遺伝子 *ler* が含まれている。一方, *tir* 遺伝子を含む LEE5 や分泌装置を形成する構造蛋白質をコードする遺伝子が存在する LEE2, LEE3 のプロモーター活性はインドールによって有意に増大しなかった。野生株, *tnaA* 欠損株をインドール存在, 非存在下で培養し, EspA, EspB の菌体外 (分泌画分) と菌体内量をウェスタンブロッティングにより調べた結果, *tnaA* 欠損株は野生株より EspA, EspB いずれの量も少ない傾向を示し, インドール添加によって増大が見られた。以上の結果から, インドール型社会活動は, O157 の III 型分泌蛋白質依存的な病原性 (宿主細胞のアクチン集積能) に寄与している



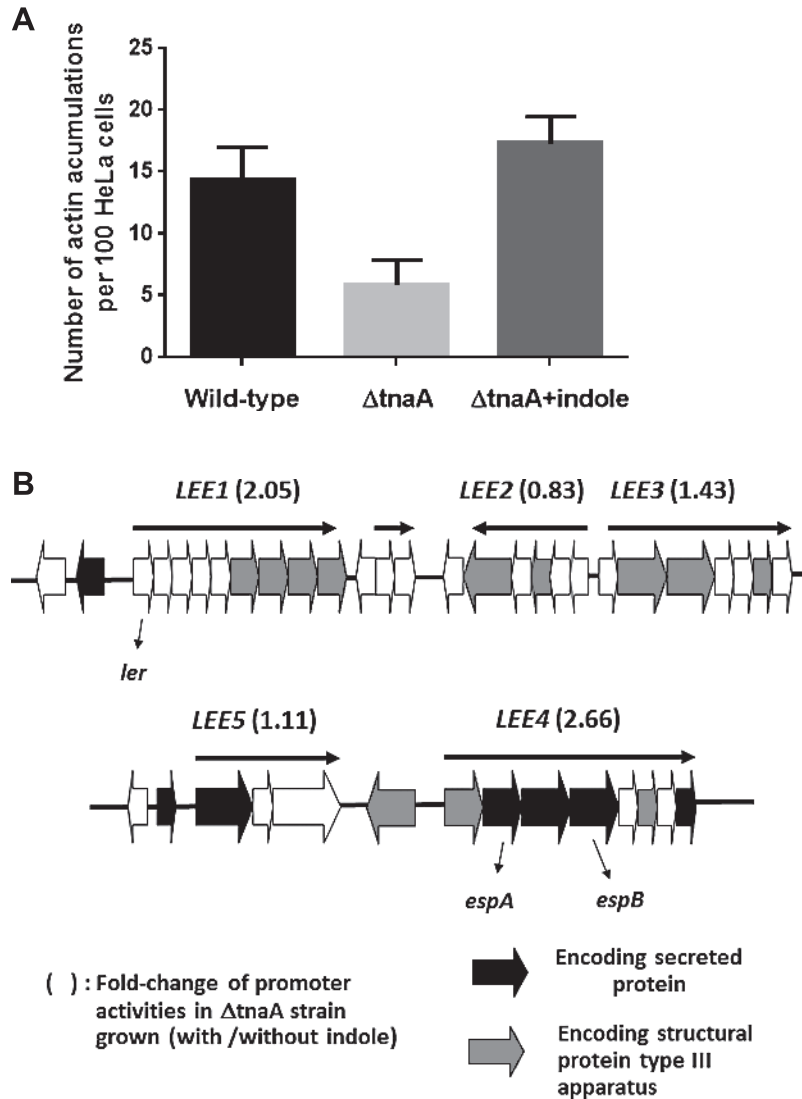


図4. インドールオートインデューサーによるO157のIII型分泌蛋白質依存的な病原性誘導

A. 野生株 (Wild-type) および, *tnaA* 欠損株 ( $\Delta tnaA$ ) をインドール非存在, 存在下で培養・HeLa 細胞感染後のアクチン集積頻度 (感染 HeLa 細胞 100 個あたりのアクチン集積数) B. *tnaA* 欠損株 ( $\Delta tnaA$ ) をインドール非存在, 存在下で培養後の LEE 遺伝子群のプロモーター活性変化

ことが示された。

尚, O157 のもう一つの主要な病原因子であるペロ毒素産生量の定量 (VTEC-RPLA「生研」を利用したラテックス凝集反応法により) も行ったが, *tnaA* 欠損, インドール添加いづれによっても影響を受けなかった。

何故, インドール型社会活動が III 型分泌蛋白質依存的な病原性を高めるのかその正確な理由は未だ不明であるが, III 型分泌蛋白質は, 腸管上皮細胞のアクチンを集積させることで下痢を起こさせることができるため, 著者らは, O157 が腸管感染部位において Competitor となる腸内常在細菌を便と共に強制的に排除, もしくは O157 自身が宿主の免疫系から逃れるために腸管からの離脱を行っているのではないかと推測している。

## 5. おわりに

細菌は, 単細胞生物であるが, 実際は様々な環境中で集団を形成している。彼らはただ漠然と凝集しているわ

けではなくオートインデューサーと呼ばれる細菌の言語様物質を介して社会活動を行い, あたかも多細胞生物であるかのように振る舞っている。集団の中にいる個々の細菌の社会活動の仕組みをより詳細に明らかにしていくことで, 環境中における細菌の振る舞いや生命活動をより深く理解することに繋がると期待される。

オートインデューサーは, 「アシルホモセリンラクトン型」「DPD 型」「オリゴペプチド型」の 3 大ファミリーが知られてきたが, 近年, 著者らのグループが発見したインドールなど, 上記のファミリーに属さないユニークなものが報告されつつあり, 細菌の社会活動研究の未来はさらなる可能性が広がっている。これまでに, 著者らが明らかにしたインドール型オートインデューサーを介した大腸菌群の社会活動の役割と推測される生理的意義については, 改めて図 5 にまとめて掲載している。

近年, 細菌の社会活動を人為的に制御する試みがなされている<sup>7)</sup>。なぜなら, 細菌の社会活動は, 細菌の病原性, 薬剤耐性などの制御に関与しているため, 新たな抗

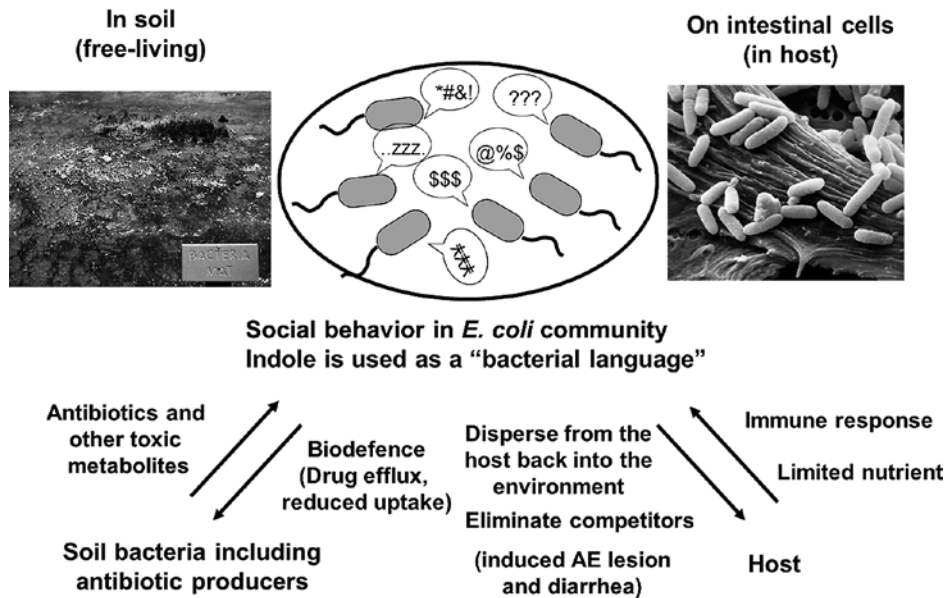


図5. 大腸菌のインドール型社会活動の役割と生理的意義

菌剤や感染抑制・防止剤となりうる有力な候補である。そのため、将来人為的に細菌の社会活動をコントロールする手法が確立できれば、これまで治療が困難であった薬剤耐性菌や強毒性病原細菌による感染症の克服も可能になると期待される。

## 文 献

- Bassler, B.L. 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109: 421–424.
- Fuqua, 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.
- Garbe, T.R., M. Kobayashi, and H. Yukawa. 2000. Indole-inducible proteins in bacteria suggest membrane and oxidant toxicity. *Arch. Microbiol.* 173: 78–82.
- Grif, K., M.P. Dierich, K. Pfaller, P.A. Miglioli, and F. Allerberger. 2001. In vitro activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 209–217.
- Hirakawa, H., Y. Inazumi, T. Masaki, T. Hirata, and A. Yamaguchi. 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 55: 1113–1126.
- Hirakawa, H., T. Kodama, A. Takumi-Kobayashi, T. Honda, and A. Yamaguchi. 2009. Secreted indole serves as a signal for expression of type III secretion system translocators in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology.* 155: 541–550.
- Hirakawa, H. and H. Tomita. 2013. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 4: 114.
- Ikeda, K., O. Ida, K. Kimoto, T. Takatorige, N. Nakanishi, and K. Tataru. 1999. Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clin. Nephrol.* 52: 357–362.
- Karmali, M.A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 15–38.
- Kurabayashi, K., Y. Hirakawa, K. Tanimoto, H. Tomita, and H. Hirakawa. 2014. Role of the CpxAR two-component signal transduction system in control of fosfomycin resistance and carbon substrate uptake. *J. Bacteriol.* 196: 248–256.
- Kobayashi, A., H. Hirakawa, T. Hirata, K. Nishino, and A. Yamaguchi. 2006. The growth phase-dependent expression of drug exporters in *Escherichia coli* and its contribution to the drug tolerance. *J. Bacteriol.* 188: 5693–5703.
- Lee, J., A. Jayaraman, and T.K. Wood. 2007. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* 7: 42.
- Michalopoulos, A.S., I.G. Livaditis, and V. Gougoutas. 2011. The revival of fosfomycin. *Int. J. Infect. Dis.* 15: e732–e739.
- Nataro, J.P. and J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142–201.
- Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853–5859.
- Nishino, K. and A. Yamaguchi. 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 5803–5812.
- Parsek, M.R. and E.P. Greenberg. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13: 27–33.
- Sulavik, M.C., C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, et al. 2001. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump-genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1126–1136.
- Vega, N.M., K.R. Allison, A.N. Samuels, M.S. Klemperer, and J.J. Collins. 2013. *Salmonella typhimurium* intercepts *Escherichia coli* signaling to enhance antibiotic tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 14420–14425.