

## 緑膿菌のストレス耐性に関わる

### *cbb*<sub>3</sub>型シトクロム *c* 酸化酵素の機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科 新井 博之

#### 【略歴】

1995年3月 東京大学大学院農学生命科学研究科 博士課程修了  
1995年4月 理化学研究所 基礎科学特別研究員  
1996年4月 理化学研究所 研究員  
1999年5月 東京大学大学院農学生命科学研究科 助手  
2004年11月～2005年10月 米国テキサス大学ヒューストン校 客員研究員  
2007年4月 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教  
2017年5月 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

#### はじめに

緑膿菌は様々な環境中に広く存在する細菌で、日和見感染や院内感染の原因菌として知られており、抗生物質や各種ストレスに対する耐性が強いことから感染症治療の面で問題となっている。本菌は好気呼吸において酸素の水への還元反応を触媒する末端酸化酵素を複数持っており、これらを使い分けることで、感染病巣を含めた様々な環境で生育することができる。本菌は末端酸化酵素として *aa*<sub>3</sub>型と *cbb*<sub>3</sub>型のシトクロム *c* 酸化酵素と、*bo*<sub>3</sub>型とシアン耐性型のキノール酸化酵素を持っている。*cbb*<sub>3</sub>型酵素は酸素に対する親和性が高く、一般的には低い酸素濃度環境で働く酵素であるが、緑膿菌では環境中の酸素濃度によらず *cbb*<sub>3</sub>型酵素が主に働くという特徴がある。*cbb*<sub>3</sub>型酵素のような酸素高親和性酵素は、好気呼吸によるエネルギー生産だけでなく、微量の酸素を除去することで酸化ストレス耐性や、酸素に弱い酵素の保護に働くことが知られている。このため、緑膿菌は *cbb*<sub>3</sub>型酵素を主要な酵素として利用することで、ストレス環境下での耐性を獲得していると考えられる。

従来、緑膿菌は2種類の *cbb*<sub>3</sub>型シトクロム *c* 酸化酵素 (*cbb*<sub>3</sub>-1 と *cbb*<sub>3</sub>-2) を持つと考えられており、*cbb*<sub>3</sub>-1 が構成的に発現して高酸素条件で主に働き、低酸素条件では *cbb*<sub>3</sub>-2 が誘導発現して主に働くことが知られていた。緑膿菌のゲノム上には、これらの他にも、活性サブユニットのみをコードする遺伝子がさらに2つ存在するが、それらの役割は不明であった。*cbb*<sub>3</sub>型酵素は緑膿菌の感染病巣を含めたストレス環境での生存に寄与し、病原性や感染力に関わると予想されるため、その詳細な解析から緑膿菌の感染症治療につながる知見が得られることが期待される。本研究では、新たに見つかった *cbb*<sub>3</sub>型酵素の活性サブユニットの役割を中心に、*cbb*<sub>3</sub>型酵素の酵素学的性質と活性発現制御機構の解析を行った。

#### 複数の *cbb*<sub>3</sub>型シトクロム *c* 酸化酵素アイソフォーム発現機構の解析

*cbb*<sub>3</sub>型酵素は CcoN, CcoO, CcoP の3サブユニットから構成される。CcoN が活性中心のある主要サブユニットで、CcoO と CcoP は *c*型シトクロムから活性中心への電子伝達に関与している。さらに、CcoQ と呼ばれる小型のタンパク質が、酵素複合体のアセンブリまたは安定化に関与すると考えられている。緑膿菌はこれらのサブユニットをコードする2つの遺伝子群 (*ccoN1O1Q1P1* と *ccoN2O2Q2P2*) を持ち、これらの遺伝子産物である *cbb*<sub>3</sub>-1 と *cbb*<sub>3</sub>-2 が、それぞれ高酸素および低酸素環境での主要な呼吸酵素として働いている。緑膿菌のゲノム上には、CcoN と CcoQ のみをコードする遺伝子群がさらに2個(*ccoN3Q3* と *ccoN4Q4*)存在するが、それらの役割は不明であった。そこで、CcoN3 と CcoN4 が、CcoO1/CcoO2 および CcoP1/CcoP2 と複合体を形成する可能性を考え、その検証実験を行った。

複数の *ccoN*, *ccoO*, *ccoP* 遺伝子の組み合わせを変えた16種類の発現プラスミド、および、すべての好気呼吸末端酸化酵素遺伝子を欠失した七重破壊株を作製した。七重破壊株は好気条件下で生育できないが、16種類の発現プラスミドのいずれを用いて形質転換しても、好氣的生育が可能となった。これらの結果から、緑膿菌はイソサブユニットの組み合わせを変えることで、16種類の異なる *cbb*<sub>3</sub>型酵素アイ

ソフォームを生産する能力を持つことが示された。これらのアイソフォームは、活性サブユニットの種類により N1~N4 型の 4 タイプに分類された。

新たに見つかった N3 および N4 型アイソフォームの役割を解析するため、*ccoN3* と *ccoN4* の発現条件を検索した。*lacZ* との転写融合プラスミドを用いたプロモーターアッセイ、または、マイクロアレイ解析により、*ccoN3* は亜硝酸イオン、*ccoN4* はシアン化物イオンの存在時に誘導発現することが明らかになった。*CcoN3* または *CcoN4* を含む *cbb<sub>3</sub>* 型酵素が実際に野生株で発現しているかを検証するために、Blue-Native PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動で *cbb<sub>3</sub>* 型酵素複合体を分離後、*CcoN3*, *CcoN4* を特異的に認識する抗体を用いて検出を行った。その結果、亜硝酸イオンおよびシアン化物イオンの存在時に、それぞれ *CcoN3* または *CcoN4* を含む *cbb<sub>3</sub>* 型酵素複合体が野生株の膜画分に特異的に発現することを確認した。

### ***cbb<sub>3</sub>* 型シトクロム c 酸化酵素アイソフォームの酵素学的性質の解析**

亜硝酸イオンやシアン化物イオンは呼吸阻害活性があるが、緑膿菌は低酸素環境の感染病巣での生存や優占化のためにこれらの物質を自ら生産し利用している。このため、その耐性機構は緑膿菌の感染力や病原性に関係があることが知られている。N3 型および N4 型のアイソフォームは、それぞれ亜硝酸イオンおよびシアン化物イオンによって誘導発現するため、それらの物質に対する耐性への関与を、N3 型または N4 型のアイソフォームを生産しない変異株、および、それらを唯一の末端酸化酵素として発現する株を用いて調べた。その結果、N3 型および N4 型アイソフォームの欠損株は、それぞれ低酸素環境特異的に亜硝酸イオンおよびシアン化物イオンに対して感受性を示した。また、N3 型および N4 型アイソフォームを利用する株は、それぞれ他のアイソフォームを利用する株よりも亜硝酸イオンおよびシアン化物イオンに対して高い耐性を示した。これらの結果から、これらのアイソフォームは、低酸素環境でのこれらの阻害物質に対する耐性を付与することで、緑膿菌の感染病巣での生存に寄与していることが示唆された。

緑膿菌では N1 タイプ(*cbb<sub>3</sub>-1*)と N2 タイプ(*cbb<sub>3</sub>-2*)の酵素が、それぞれ高酸素と低酸素環境で主に働いているが、両タイプの酵素には酸素親和性などに違いが見られず、なぜこのような使い分けがなされているか不明である。そこで今後は、両タイプの精製酵素を調整し、酸素や ROS に対する耐性、電子供与体との反応性や反応速度などの酵素学的性質の違いについて解析を行う予定である。

### **謝辞**

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻応用微生物学研究室で行われたものであり、ご指導いただいた先生方、共同研究して下さった先生方、そして本研究に関わった大学院生、学部学生の皆様に心より感謝致します。

### **参考文献**

- Hirai T. *et al.*, Expression of multiple *cbb<sub>3</sub>* cytochrome *c* oxidase isoforms by combinations of multiple isosubunits in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 12815-12819 (2016).
- Arai H. *et al.*, Enzymatic characterization and *in vivo* function of five terminal oxidases in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, 196, 4206-4215 (2014).
- Arai H., Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Microbio.*, 2:103 (2011).
- Kawakami T. *et al.*, Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*, *Environ. Microbiol.*, 12, 1399-1412 (2010).