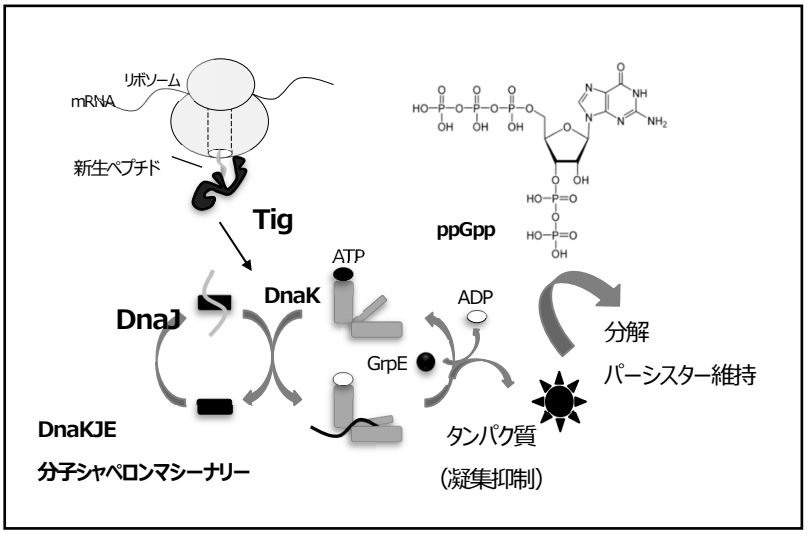
37　分子シャペロンによるpersister制御の分子基盤	高屋　明子

【目的】均一なゲノムをもつ細菌集団の一部に存在するパーシスター（persister cells）は、抗菌薬曝露によるストレスに応答することで生じ、耐性因子は獲得しないにもかかわらず高濃度の抗菌薬存在下でも生存することができる。そして、抗菌薬を取り除くと再び増殖する。DnaKJ 分子シャペロンマシーナリーは凝集タンパク質を脱凝集することでパーシスター制御に関わることが示唆されている。本研究では、基質と相互作用する因子 DnaJ、Tig の寄与について検討した。

【方法】グラム陰性病原細菌であるサルモネラ分子シャペロン遺伝子変異株を用いて、フルオロキノロン系抗菌薬シプロフロキサシン処理によるパーシスター形成について調べた。また、パーシスター形成時の凝集タンパク質の蓄積について調べた。

【結果】サルモネラの DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーは、パーシスター形成に重要であった。DnaJ 単独欠損株は CPFX 処理 5 時間までは DnaKJ 欠損株と同等の感受性であったが、24 時間では野生株の 0.05%が生存していた。また、Tig 欠損株は 24 時間でも野生株よりも少ないもののパーシスター形成がみられた。このことから DnaJ は初期の基質運搬に関わり、Tig は補助的な役割を担うことが示唆された。パーシスター形成の初期には凝集タンパク質が蓄積するが、凝集タンパク質を分解するプロテアーゼはパーシスター形成に必須ではなかった。以上より、DnaJ、Tig はパーシスター形成に関わるタンパク質の凝集抑制に関わる可能性が示唆された。

DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーによるタンパク質凝集抑制を介したパーシスター制御



37. 分子シャペロンによる persister 制御の分子基盤

高屋　明子

*千葉大学 大学院薬学研究院 免疫微生物学研究室

Key words：DnaK 分子シャペロン，パーシスター，凝集タンパク質

緒　言

薬剤耐性菌による感染症の増加は、世界的に深刻な医療問題の一つである。薬剤耐性菌の出現には、均一なゲノムをもつ細菌集団の一部に存在するパーシスター（persister cells）の寄与が示唆されている［1］。パーシスターは、抗菌薬曝露によるストレスに応答することで生じ、耐性因子は獲得しないにもかかわらず高濃度の抗菌薬存在下でも生存することができる。そして、抗菌薬を取り除くと再び増殖する。これまで大腸菌の遺伝子欠損株を用いた研究からパーシスターの出現を制御する因子として、分子シャペロン DnaK の寄与が示唆されていたが［2］、その分子機構については不明であった。

抗菌薬で処理された細胞では、細胞内 ATP が低下し、細胞内タンパク質が凝集する。そのため、パーシスターでは凝集タンパク質が蓄積するが、この蓄積量が再増殖の決定に関わる。DnaK はパーシスターでの凝集タンパク質の脱凝集に寄与することが示唆されている［3］。DnaK はコシャペロン DnaJ、GrpE と共同した DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーとして、脱凝集を担う。このうち DnaJ は基質と相互作用し、ATPase 活性を有する DnaK に運搬する。また、DnaK-DnaJ への基質の運搬には、リボソーム結合型分子シャペロンであるトリガーファクターTig が寄与することもある［4］。しかしながら、DnaK によるパーシスター制御における DnaJ、Tig の寄与については明らかでない。本研究では、グラム陰性病原細菌であるサルモネラの遺伝子変異株を用いて、パーシスター制御における DnaJ、Tig の寄与について検討した。

方　法

1. サルモネラ変異株

サルモネラ変異株は、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium χ3306 を野生株として作製した。

2. パーシスターアッセイ

サルモネラの一晩培養液を LB 液体培地 5 mL にて OD_{600} が 0.05 になるように希釈し、フルオロキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシン（CPFX）を終濃度 1 μg/mL になるように添加後、37℃にて培養した。各時間にて菌液の一部を PBS で適宜希釈し、LB 寒天培地に塗布し、37℃で 18 から 24 時間培養した。目視できるコロニーを計測し、各時間における菌液の濃度 Colony Forming Units（CFU）/mL を求めた。

3. 細胞内凝集タンパク質の観察

凝集タンパク質に集積する IbpA を指標にするため、染色体の *ibpA* 遺伝子に *gfp*^{mut} 遺伝子を融合させ IbpA::GFP を産生する株を構築した。CPFX に曝した培養液から菌体を、4%パラホルムアルデヒドで固定し、20 μg/mL FM4-64、Hoechst 33342 で膜および染色体 DNA を染色した。染色した細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 Olympus FV1000 にて観察した。

*現在の所属：千葉大学 大学院薬学研究院 活性構造化学研究室

結果および考察

1. パーシスター制御における DnaJ および Tig の影響

まず、サルモネラのパーシスター形成における DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーの関与について、野生株及び DnaKJ 欠損株のパーシスター形成を比較した（図 1）。野生株では CPFX 処理後 4 時間までコロニー数の減少がみられるが、その後 24 時間までのコロニー数はほとんどかわらず、死滅曲線は二相性を示した。パーシスターは薬剤感受性が高い細胞に比べて薬剤感受性が低くなることから、死滅曲線は二相性を示す［1］。*dnaK* 遺伝子は *dnaJ* 遺伝子とオペロンを構成しているため、*dnaK* にクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入した株では、DnaK、DnaJ の両方の産生が欠失している［5］。この DnaKJ 欠損株を CPFX で処理すると、5 時間まで野生株に比べて顕著なコロニー数の低下がみられ、24 時間後にコロニーは観測できなかった。このことから、サルモネラの DnaKJ シャペロンはパーシスター形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーによるパーシスター制御における DnaJ、Tig の寄与を調べるため、サルモネラ DnaJ 欠損株、Tig 欠損株を構築し、パーシスター形成を調べた（図 1）。その結果、DnaJ 欠損株は 5 時間までは DnaKJ 欠損株と同様に著しいコロニー数の低下がみられたが、24 時間には野生株の 0.05%であり、DnaKJ 欠損株ほど低下しなかった。このことから、DnaJ は初期の薬剤感受性には関わることが示唆された。また、Tig 欠損株は 4 時間までのコロニー低下は野生株と同等であり、24 時間後では野生株よりもコロニー数は 0.2%に低下したものの、顕著な低下ではなかった。このことから、Tig による DnaKJ 分子シャペロンへの基質運搬は、パーシスター形成においては補助的に働く可能性が考えられた。そこで、DnaJ 及び Tig の相加効果を調べるため二重欠損株を構築したところ、液体培地での増殖が著しく抑制された。培養を繰り返したところ、増殖が回復した株が分離された。増殖が抑制された株では細胞増殖が阻害されたようなフィラメント化した細胞であったが、増殖が回復した株は通常の細胞と同じ大きさに回復していた。パーシスター形成に関する因子としてグアノシン 4 リン酸 ppGpp がある［6］。細胞分裂が回復した株では ppGpp に応答する遺伝子に変異が生じていた。ppGpp 量は細胞分裂に影響を与えることから、DnaJ、Tig は共同して ppGpp 量制御に関わる可能性が考えられた。そこで、細胞内の ppGpp 量を比較するため、細胞を破砕し HPLC での分離を行ったが検出できなかった。DnaJ、Tig によって ppGpp 量は変動するものの、ppGpp 細胞内代謝は極めて速いものと考えられる。

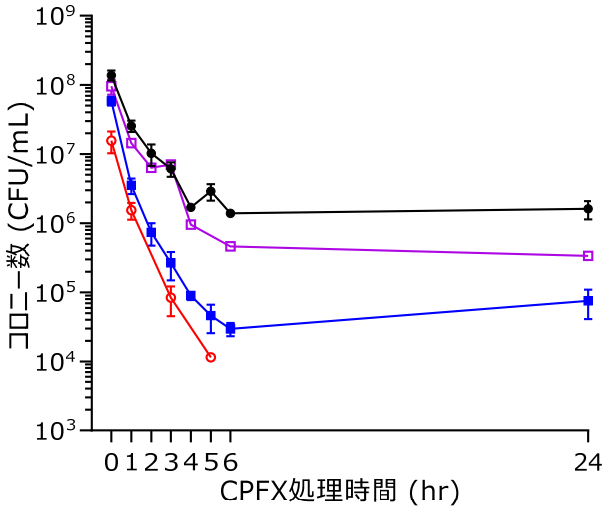


図1. DnaJまたはTig欠損によるパーシスター形成への影響

野生株（黒）、DnaKJ 欠損株（赤）、DnaJ 欠損株（青）、Tig 欠損株（紫）を CPFX 存在下で 24 時間培養した時に観測された、経時的なコロニー数変化を示す。実験は 3 回以上行った。各点は、Mean±SEM を示している。

2. パーシスター形成細胞での凝集タンパク質の蓄積

パーシスター形成細胞での凝集タンパク質変化を観測するため、凝集タンパク質に蓄積する small heat shock proteins の一つである IbpA に green fluorescent protein（GFP）を融合した株を構築した。構築した株を CPFX で処理したが、1 時間、5 時間でもほとんど凝集タンパク質は観測されなかった（図 2、＋）。そこで、凝集タンパク質を分解するプロテアーゼが発現しない株で検討した（図 2、－）。その結果、CPFX 処理後 1 時間で多くの細胞に凝集タンパク質が観測された。このことから、CPFX に曝露されたときに短時間でタンパク質凝集が生じるものの、プロテアーゼによって分解されることが示唆された。更に CPFX 処理後 5 時間の細胞を観測したところ、凝集タンパク質が蓄積していた。しかしながら、一細胞あたりの凝集タンパク質の蛍光強度は 1 時間とほぼ同等であった。凝集タンパク質を分解するプロテアーゼを発現させなくてもパーシスター形成は観測されたことから、プロテアーゼによって分解される凝集タンパク質はパーシスター形成に直接影響しないことが示唆された。DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーはタンパク質凝集の阻害および凝集タンパク質の脱凝集に寄与する［7］。DnaJ、Tig は凝集タンパク質と直接相互作用することで凝集タンパク質を DnaK に運搬する。パーシスターアッセイの結果から、DnaJ 及び Tig はパーシスター形成に影響することが示唆された。以上の結果から DnaJ および Tig は抗生物質曝露初期において、パーシスター形成及び維持に必要なタンパク質を DnaK に運搬することで、パーシスター形成に関わるタンパク質の凝集阻害または脱凝集を抑制し、その結果、ppGpp の代謝を適切に制御する可能性が考えられる。今後、DnaJ、Tig による凝集タンパク質の影響を明らかにすることで、パーシスター形成に関わる制御因子の解明につながることが期待できる。

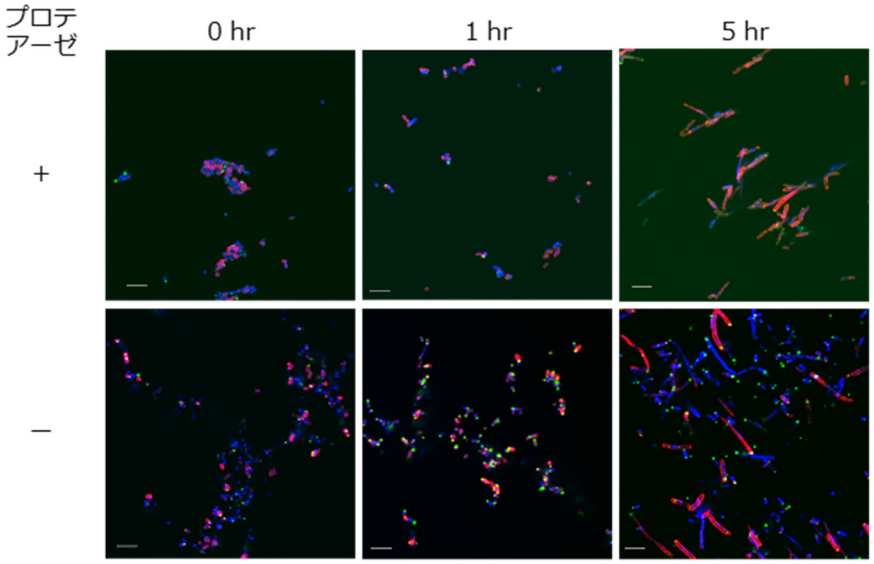


図2. CPFX処理後の凝集タンパク質の変化

凝集タンパク質分解に関わるプロテアーゼを発現株（＋）と非発現株（－）に *ibpA*::*gfp* を導入し、CPFX 処理前（0hr）、処理後 1 時間、5 時間の凝集タンパク質の蓄積を観察した結果を示す。IbpA::GFP（緑）、細胞膜（FM4-64、赤）、DNA（Hoechst、青）。
スケールバー：5μm。

文　献

1) Gollan B, Grabe G, Michaux C, Helaine S. Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing. Annu Rev Microbiol. 2019 Sep 8. 73:359-385. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31500532. DOI: 10.1146/annurev-micro-020518-115650.

2) Hansen S, Lewis K, Vulic M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Aug 52(8):2718-26. Epub 2008 Jun 2. PMID: 18519731 DOI: 10.1128/AAC.00144-08.

3) Pu Y, Li Y, Jin X, Tian T, Ma Q, Zhao Z, Lin S, Chen Z, Li B, Yao G, Leake MC, Lo C, Bai F. ATP-dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance. Mol Cell. 2019 Jan 3. 73(1):143-156.e4. Epub 2018 Nov 21. PMID: 30472191 DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.022.

4) Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Annu Rev Biochem. 2013 82:323-55. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23746257 DOI: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.

5) Takaya A, Tomoyasu T, Matsui H, Yamamoto T. The DnaK/DnaJ chaperone machinery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is essential for invasion of epithelial cells and survival within macrophages, leading to systemic infection. Infect Immun. 2004 Mar 72(3):1364-73. PMID: 14977940 DOI: 10.1128/iai.72.3.1364-1373.2004.

6) Eisenreich W, Rudel T, Heesemann J, Goebel W. Persistence of intracellular bacterial pathogens-with a focus on the metabolic perspective. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Jan 14 10:615450. PMID: 33520740 DOI: 10.3389/fcimb.2020.615450. eCollection 2020.

7) Mogk A, Bukau B, Kampinga HH. Cellular handling of protein aggregates by disaggregation machines. Mol Cell 2018 Jan 18 69(2):214-226. PMID: 29351843 DOI: 10.1016/j.molcel.2018.01.004.