

シンポジウム

細菌の Quorum-Sensing 機構 —— 病原因子発現と生体反応を制御するシステム ——

館 田 一 博

東邦大学医学部微生物学教室

キーワード：緑膿菌，クオラムセンシング，ホモセリンラクトン，病原因子

要 旨

細菌の産生するホルモン様物質 (autoinducer) を介した情報伝達機構，すなわちクオラムセンシング (Quorum-sensing) が注目されている。これはビブリオ属細菌で見つかった現象であるが，その後，多くの病原細菌が本機構を用いて病原因子発現をコントロールしていることが明らかとなっている。また最近では，この autoinducer 分子が生体細胞に対しても多彩な影響を及ぼしていることが報告され，クオラムセンシング研究に新しい展開がみられている。

1. はじめに

最近になって，菌は環境の変化，特に自身の存在環境における密度を適確に感知し，その濃度変化に応じて病原因子遺伝子の発現を巧妙に制御していることがわかってきた。細菌の産生するホルモン様物質 (autoinducer) を介した情報伝達機構，すなわちクオラムセンシング (Quorum-sensing) と呼ばれるシステムである。これはビブリオ属細菌 *Vibrio fischeri* の培養において，菌の増殖に応じて蛍光物質の産生が見られるという現象から見つかったものであり¹⁾，その後，緑膿菌をはじめとする多くの病原細菌が本システムを用いて病原因子発現をコントロールしているという事実が明らかとなっている。これまでに菌体外毒素の産生か

らバイオフィルム形成まで多くの病原因子の発現が本機構によりコントロールされていることが報告されている。さらに最近では，この autoinducer 分子が生体細胞に対しても多彩な影響を及ぼしていることが明らかとなり，感染病態における炎症反応・免疫応答の視点からも注目を集めている。ここでは緑膿菌のクオラムセンシング機構に焦点を当て，その基本構造と特徴を概説するとともに，本機構の感染病態形成における役割について述べてみたい。

2. 緑膿菌のクオラムセンシング機構

緑膿菌のクオラムセンシング機構は大きく I-遺伝子，R-遺伝子，およびターゲット遺伝子の3つの遺伝子より構成されている。I-遺伝子は autoinducer 合成酵素，R-遺伝子は転写活性化因子をコードしている。Autoinducer 合成酵素によりホモセリンラクトン (homoserine lactone : HSL) と呼ばれる autoinducer が合成される。本物質は細菌の外膜を自由に通過できる分子であり，環境中の細菌濃度が低い場合には希釈され生物活性を示さない。ところが，細菌の増殖が進み環境中の菌密度が高まるに従い菌内外の autoinducer 濃度も高まり，これがある一定の閾値に達したとき，HSL と R-遺伝子産物 (転写活性化因子) の結合が加速する。この複合体がターゲット遺伝子の転写制御領域に結合し，各種病原因子な

ドターゲット遺伝子の発現を促進することになる。

3. クオラムセンシングによる病原因子発現調節

緑膿菌はピオシアニンをはじめとする色素、バイオフィーム形成に重要な菌体外多糖 (alginate) に加え、細胞・組織障害性に直接関係する各種菌体外毒素 (エラスターゼ, プロテアーゼ, エクソトキシンなど) を産生することが知られており、これらが本菌感染症の発症病態に深く関わっている。そしてこれら病原因子の発現の多くがクオラムセンシング機構により制御されていることがわかってきた。緑膿菌では Las および Rhl の 2 つのクオラムセンシング機構が重要であり、それぞれ I-遺伝子 (*lasI*, *rhlI*), R-遺伝子 (*lasR*, *rhlR*) および病原因子遺伝子から構成されている。I-遺伝子産物である autoinducer 合成酵素によりそれぞれ 3-oxo-C₁₂-HSL, C₄-HSL が合成され、これが転写活性化因子 LasR, Rhl-R に結合し、菌体外酵素、色素などの病原因子の発現を調節している。3-oxo-C₁₂-HSL-LasR 複合体は Rhl-R の発現を調節しているようであり、これらクオラムセンシング機構は複雑な遺伝子発現サーキットを形成していると考えられている。1999 年に Whiteley らは緑膿菌の 39 遺伝子が 3-oxo-C₁₂-HSL または C₄-HSL により制御され、これは全遺伝子の約 1% に相当することを報告した²⁾。また 2003 年になって、DNA マイクロアレイ法によりクオラムセンシングと関連する遺伝子発現について検討した論文が 3 報発表されており、これによると 163-388 の遺伝子発現がクオラムセンシングに関連して変化することが報告されている。さらに最近になって、HSL とは異なる分子による第 3, 第 4 のクオラムセンシング機構の存在が報告され注目されている。これらは *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) および cyclic dipeptide を autoinducer とするシステムであり、前者は

Las, Rhl 系に対して positive に作用することが報告されており、その役割・特徴・重要性が次第に明らかになっている。

4. In-vivo 病原性からバイオフィーム形成まで

クオラムセンシング機構の緑膿菌感染症発症病態への強い関与を示唆するデータが in vitro および in vivo 実験系において次々に報告されている。Wu らはマウスを用いた緑膿菌肺炎モデルにおいて、感染に伴い肺内から HSL が検出されることを大腸菌によるバイオアッセイ法で確認している³⁾。また、幼若マウスを用いた肺炎モデル⁴⁾、およびマウス火傷感染モデルにおいて⁵⁾、クオラムセンシング系の各種変異株は親株に比べ病原性が低下していることが報告されている。Storey らは、緑膿菌による気道感染を合併した嚢胞性肺線維症患者において、喀痰中の LasR mRNA 量が本菌病原因子 LasA, LasB および ToxA mRNA 量と関連することを報告している⁶⁾。緑膿菌による慢性気道感染症あるいはカテーテル感染症においては、感染部位におけるバイオフィーム形成が難治化・慢性化要因として重要である。特に本菌感染症におけるバイオフィーム形成には緑膿菌の産生する alginate と呼ばれる糖物質が重要な役割を果たしていることが知られており、その産生過程にクオラムセンシング機構が関与している⁷⁾。Davies らは、*lasI* 欠損株を用いた実験により緑膿菌によるバイオフィームの形成・分化にクオラムセンシング・システムが必須であることを示した⁸⁾。その後同じグループの Singh らは、本菌のバイオフィーム形成には HSL 濃度に加え、3-oxo-C₁₂-HSL と C₄-HSL のバランスが重要であることを示している⁹⁾。緑膿菌のバイオフィーム形成とクオラムセンシング機構の関連に関してはまだまだ多くの疑問が残されているが、臨床における緑膿菌感染症の重篤化・難治化のメカニズムを考える上で大変重要なテーマである。

5. クオラムセンシング分子の生体細胞に及ぼす影響

クオラムセンシング系の感染症発症病態への関与におけるもう1つの話題は、菌の産生するHSL分子が生体細胞に対しても重要なシグナルを送るという事実である¹⁰⁾。DiMangoらは、ヒト肺胞上皮細胞におけるIL-8産生を検討し、緑膿菌の菌体成分であるpilinやflagellinなどととも本菌の産生するHSL分子が強くIL-8産生を誘導することを報告した¹¹⁾。またTelfordらは、3-oxo-C₁₂-HSLがマウスマクロファージ培養系においてTNF- α およびIL-12の産生を抑制することを見出し、本物質が感染病態におけるTh1-Th2バランスに関与している可能性を指摘している¹²⁾。また最近になって、3-oxo-C₁₂-HSLによるIL-8産生誘導は転写活性化因子NF- κ BおよびAP-2により制御されていることが報告された¹³⁾。さらに同グループは、3-oxo-C₁₂-HSLをマウスの皮下に注入することによりプロスタグランジン産生の重要な酵素であるcyclooxygenase-2活性が亢進するという事実を報告している¹⁴⁾。これら一連の報告は、緑膿菌の産生するautoinducer分子の生体細胞に対する直接作用を示すものである。我々も合成HSLを用いて生体細胞への影響を検討したところ、3-oxo-C₁₂-HSLのマウス骨髄由来マクロファージに対するMIP-2誘導作用に加え、20-50 μ Mという濃度において強いアポトーシス誘導作用が存在することを報告した¹⁵⁾。興味深いことに、このアポトーシス誘導作用はマクロファージ・好中球といった貪食細胞において観察されたが、上皮細胞・線維芽細胞においては認められなかった。なぜHSLによるアポトーシス誘導が細胞によって異なるのか、3-oxo-C₁₂-HSLに対する受容体（あるいは特異的標的分子）が存在するのか、など多くの疑問が未解決のままである。最近になって、ヒトの気道上皮細胞が3-oxo-C₁₂-HSLを特異的に分解する作用を有していることが報告され

た¹⁶⁾。その意味・役割は不明であるが、上皮細胞が細菌のautoinducer分子を分解しなければならない必然性を考えると興味深い。今後、クオラムセンシング研究がどのような展開を見せるのか、大変興味深い。

6. 文 献

- 1) Kaplan, H. B., and E. P. Greenberg. (1985): Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**, 1210-4.
- 2) Whiteley, M., K. M. Lee, and E. P. Greenberg. (1999): Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13904-9.
- 3) Wu, H., Z. Song, M. Hentzer, J. B. Andersen, A. Heydorn, K. Mathee, C. Moser, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, and M. Givskov. (2000): Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146** (Pt 10), 2481-93.
- 4) 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**, 4331-4.
- 5) Rumbaugh, K. P., J. A. Griswold, B. H. Iglewski, and A. N. Hamood. (1999): Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* **67**, 5854-62.
- 6) Storey, D. G., E. E. Ujack, H. R. Rabin, and I. Mitchell. (1998): *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* **66**, 2521-8.
- 7) Parsek, M. R., and E. P. Greenberg. (2000):

- Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8789-93.
- 8) Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. (1998): The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-8.
- 9) Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg. (2000): Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**, 762-4.
- 10) Smith, R. S., and B. H. Iglewski. (2003): *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.
- 11) DiMango, E., H. J. Zar, R. Bryan, and A. Prince. (1995): Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* **96**, 2204-10.
- 12) Telford, G., D. Wheeler, P. Williams, P. T. Tomkins, P. Appleby, H. Sewell, G. S. Stewart, B. W. Bycroft, and D. I. Pritchard. (1998): The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**, 36-42.
- 13) Smith, R. S., E. R. Fedyk, T. A. Springer, N. Mukaida, B. H. Iglewski, and R. P. Phipps. (2001): IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol* **167**, 366-74.
- 14) Smith, R. S., S. G. Harris, R. Phipps, and B. Iglewski. (2002): The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* **184**, 1132-9.
- 15) Tateda, K., Y. Ishii, M. Horikawa, T. Matsumoto, S. Miyairi, J. C. Pechere, T. J. Standiford, M. Ishiguro, and K. Yamaguchi. (2003): The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* **71**, 5785-93.
- 16) Chun, C. K., E. A. Ozer, M. J. Welsh, J. Zabner, and E. P. Greenberg. (2004): Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3587-90.

連絡先： 鎗田 一博

〒143-8540

大田区大森西 5-21-16

東邦大学医学部 微生物・感染症学講座

TEL 03-3762-4151(2396) FAX 03-5493-5415

e-mail: kazu@med.toho-u.ac.jp