

発表番号 38

## 好塩菌の新しい利用法の開発 ——好塩菌の高い異物耐性をささえる異物排出ポンプに関する研究

Masao Tokunaga, Matsujiro Ishibashi, Hiroko Tokunaga and Mayumi Miyauchi  
Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

当研究室では自然界から分離した多数の好塩菌を保有しているが、興味深いことに、これらの中には重金属やエチジウムブロマイド(ETBr)のような菌にとっては毒物(異物)に対して高い耐性を示す菌が含まれている。またその耐性の強さは、共存する塩の濃度に依存するという現象が観察される。例えば、多くの場合培地中の塩濃度が高いほど多くの抗生物質に対してより耐性になる。

構造的、機能的に関連のない幅広い毒物に対して幅広く耐性を獲得する機構としては、細菌から高等動物まで広くその存在が知られている「異物排出ポンプ(Xenobiotic extrusion pump)」が大きな役割を果たしていると予想できる。これは、細胞膜に存在し、侵入してきた異物をエネルギーを使って細胞外へ汲み出す transport pump である。

我々は高塩分濃度環境の利用をめざし、好塩菌を用いた廃棄物処理や、劣悪な環境におけるバイオレメディエーションへの応用を考えているが、好塩菌にとって悪条件の中での生育を可能にするこれら好塩菌が持つ「異物排出ポンプ」の分子メカニズムを明らかにすることは大変興味深く、また異物耐性のさらなる強化を可能にすればその利用範囲も広がるものと考えられる。本研究は、好塩菌が持つ「異物排出ポンプ」について分子レベルで解明することを目的とした。

当研究室で自然界から分離した中度好塩菌数株について毒物に対する感受性を調べたところ、もともと高い耐性を示すものもみられた。そこでさらに耐性の株を得るため、これら野生株を ofloxacin 含有培地に撒き、自然耐性変異株を取得した。これらの変異株の異物耐性は2~16倍高くなっていた。この耐性のメカニズムを調べたところ、異物排出ポンプ活性が亢進していることが判明した。そこでこの異物排出ポンプを構成しているタンパク質を分析したところ、みかけの分子量 58 kDa の外膜タンパク質(Omp58 と名付けた)が一構成成分であると推定された。このタンパク質の一次配列情報から primer を作成し、PCR 法でこのタンパク質をコードする遺伝子断片を増幅、取得した。塩基配列から全一次配列を推定したところ、局所的に大腸菌外膜タンパク質 TolC と相同性が認められた。この TolC は、大腸菌においてタンパク質や薬剤を細胞内から細胞外にくみ出すときのトンネルを形成している分子であり、Omp58 の推定機能と良く一致していた。omp58 遺伝子破壊株は異物に対して、高い感受性を示した。今後排出ポンプの全容を解明し、「異物排出ポンプ強化型好塩菌」創製をめざして、さらに研究を発展させたい。



## 25

助成番号 0225

好塩菌の新しい利用法の開発——好塩菌の  
高い異物耐性をささえる異物排出ポンプに関する研究

助成研究者：徳永正雄（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

共同研究者：石橋松二郎（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

共同研究者：徳永廣子（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

共同研究者：宮内まゆみ（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

## 1. 目的

当研究室では自然界から分離した多数の好塩菌を保有しているが、興味深いことに、これらの中には重金属やエチジウムブロマイド(EtBr)のような菌にとっては毒物（異物）に対して高い耐性を示す菌が含まれている。またその耐性の強さは、共存する塩の濃度に依存するという現象が観察される。例えば、多くの場合培地中の塩濃度が高いほど多くの抗生物質に対してより耐性になる。

構造的、機能的に関連のない幅広い毒物に対して幅広く耐性を獲得する機構としては、細菌から高等動物まで広くその存在が知られている「異物排出ポンプ（Xenobiotic extrusion pump）」が大きな役割を果たしていると予想できる。これは、細胞膜に存在し、侵入してきた異物をエネルギーを使って細胞外へ汲み出す transport pump である。

我々は好塩菌を用いて EtBr の排出を予備的に調べたところ、エネルギー依存的な「排出ポンプ」の存在が明確に示された。最近、好塩菌は油井や森林等高塩濃度環境以外からも分離されたという報告がなされ、その自然界での生息分布も注目されている。

我々は高塩分濃度環境の利用をめざし、好塩菌を用いた廃棄物処理や、劣悪な環境におけるバイオレメディエーションへの応用を考えているが、好塩菌にとって悪条件の中での生育を可能にするこれら好塩菌が持つ「異物排出ポンプ」の分子メカニズムを明らかにすることは大変興味深く、また異物耐性のさらなる強化を可能にすればその利用範囲も広がるものと考えられる。本研究では、好塩菌が持つ「異物排出ポンプ」について分子レベルで解明することを目的とした。

## 2. 方法

今回使用した菌株は、当研究室で自然界から分離した中度好塩菌 *Chromohalobacter* sp. や *Halomonas* sp. で、通常の生育培地は、NB(1% beef extract, 1% polypeptone)-2M NaCl を用いた。これらの菌株の同定は、16S ribosomal RNA 遺伝子の塩基配列決定とデータベースとの比較で行った。

ofloxacin (OFLX)耐性変異株は、0.4 $\mu$ g/ml の OFLX を含む NB-2M NaCl 培地に  $5 \times 10^8$  個の菌を撒いて、自然耐性変異株を分離した。

様々な異物に対する最小生育阻止濃度は、2 M NaCl と様々な濃度の異物をふくむ Muller-Hinton agar 培地を用いて測定した。 $5 \times 10^3$  個の菌をスポットし、生育を観察した。

有機溶媒耐性の測定は、約  $10^8$  個の細胞を 3 %濃度の様々の有機溶媒を含んだ培地で 37 度 15 分処理し、生き残った細胞数を計測した。

EtBr の細胞内への蓄積量は、蛍光測定で行った。対数増殖期の細胞を洗浄後  $A_{600}=0.5 \sim 1.0$  に懸濁し、37.5 $\mu$ M の EtBr を加え、励起光 520 nm で 590nm の蛍光強度を時間を追って測定した。また、エネルギー供給を止めるためには、uncoupler である carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)を加えた。

外膜、内膜の分離は、界面活性剤を用いた可溶化法を用いた。集菌後、菌体を超音波破碎し、超遠心分離により全膜画分を集め、洗浄後、1% N-lauroylsarcosine を加え、可溶化された画分を内膜画分とした。残りの部分に 2.5% octylglucoside を加え、可溶化された画分を外膜画分とした。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)は、Laemmli の方法を用いた。

Western-blotting は、ニトロセルロース膜を用いて、定法どうり行った。

蛋白量は、Lowry 法を用いて定量した。

Lipopolysaccharide (LPS)も定法どうり、分離、定量した。

N-末端アミノ酸配列は、ABI492 protein sequencer で決定した。内部アミノ酸配列は、SDS-PAGE 後の当該タンパク質バンドを染色後切り取り、これを lysyl endopeptidase もしくは、endoproteinase Glu-C で消化後、SDS-PAGE, ProBlott 膜への転写を行い、各ペプチドバンドのアミノ酸配列を決定した。

DNA の操作は、Maniatis らの方法を用いた。

サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションは、ECL Direct もしくは AlkPhos Direct 法を用いた。

DNA の塩基配列は、BigDye terminator cycle sequencing kit を用いた。

外膜蛋白 Omp58 遺伝子のクローニングは、部分アミノ酸配列情報から mixed primer を作成し、当該菌株のクロモソーム DNA を鋳型にした PCR で部分 DNA 断片を取得し、これを用いてサザンハイブリダイゼーションにより全長を分離した。

中度好塩菌での *omp58* 遺伝子の発現は、当該遺伝子を中度好塩菌—大腸菌シャトルベクター pHS15 に組み込み、まず大腸菌 S17-1 株に形質転換し、これを当該中度好塩菌と接合させ、プラスミドを含んだ中度好塩菌を塩濃度とストレプトマイシン耐性で選択し、分離した。

大腸菌と好塩菌の接合は、SW 培地を用いて定法どうり行った。

*omp58* 遺伝子破壊株は、*omp58* 遺伝子の中央にストレプトマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを大腸菌で作成し、これを中度好塩菌に接合により導入し、クロモソーム DNA 上の *omp58* 遺伝子とこの破壊遺伝子が置き換わった株をストレプトマイシン耐性で選択し、サザンハイブリダイゼーションで検証した。

抗 Omp58 抗体は、ウサギに大腸菌で発現させた GST-Omp58 融合タンパク質を抗原として注射し作成した。

### 3. 研究結果 及び 考察

#### 3.1. 自然界から分離した中度好塩菌の分類学的同定

菌株の同定は菌生理学的同定法に加え、最終的には 16S ribosomal RNA 遺伝子の塩基配列を決定して行った。ここでは#40, #560 株についての結果を Fig. 1 に示した。他に #43, #160, #593 などについても検討した。これらの解析により#40 は *Halomonas* 属、#560 は *Chromohalobacter* 属に分類された。

#### 3.2. ofloxacin 耐性変異株の分離

自然界から分離した中度好塩菌の抗菌剤 OFLX に対する生育阻止濃度 (MIC) は 0.19 µg/ml であったので、0.4 µg/ml の OFLX を含む寒天培地に菌を撒き、自然耐性変異株(R)を多数分離した。野生株と耐性変異株の抗菌剤、抗生物質、発ガン剤(EtBr) に対する MIC を Table 1 に示した。まず、40 株は、EtBr に対して高い自然耐性を示し、極めて興味深い結果である。好塩菌のバイオレメディエーションへの利用を想起させるきっかけとなった実験結果である。耐性変異株は、様々な異物に対してそれぞれ野生株の 2 ～ 16 倍の耐性を示し、特に 40 株から分離された変異株は高い耐性を示した。また分離された変異株の利用を考え有機溶媒耐性についても検討したところ、Table 2 に示すように、野生株に対して毒性を示す炭素数 6 個の炭化水素である Hexane にも変異株は高い耐性を示した。また野生型 40 株は 560 株に比べ、EtBr の場合と同様に Hexane や Heptane に対しても元々高い耐性を示した点が注目される。

#### 3.3. 薬剤排出ポンプ活性の検討

一般的に細胞が異物に対する耐性を獲得するメカニズムには、（１）受容体、取り込み輸送体、タンパク質以外の膜成分の変化等々も含めた膜系の物質流入系の低下方向への変異、（２）薬剤が働く標的サイトの変異による非感受性の獲得、および（３）異物排出ポンプ系の活性化による細胞内異物有効濃度の低下方向への変異、等が考えられる。この中で（３）の機構は、あらゆる生物の細胞膜に存在し、エネルギーを使って細胞内に侵入してきた異物を排出する生体防御機構の一種である「異物排出ポンプ」の活性上昇によるもので、構造的に共通性のない異物にたいして広く作用することが知られている。今回分離

できた変異株は、様々な種類の抗菌物質や抗生物質、また発ガン剤に耐性を示すいわゆる多剤耐性変異株であるので、（3）の機構による耐性獲得の可能性がもっとも高いと推定し、異物排出ポンプ活性を測定することとした。測定原理は、発ガン剤 EtBr と細胞をインキュベートし、細胞内に流入する EtBr 量を蛍光強度で測定するものである。細胞内に流入し、DNA 分子に結合した EtBr は 590nm に強い蛍光を発する。結果は、Fig. 2 に示した。縦軸が蛍光強度であり、これが低いほど細胞内 EtBr が少ないことを現している。変異株 40R, 560R はいずれも野生株に対して、低い細胞内濃度を保っている。（3）の機構の特徴は「エネルギー依存性」であり、それを確かめるための実験結果をそれぞれの図内の挿入図に示した。矢印の時間に、エネルギー供給をストップさせる uncoupler である CCCP を加えたもので、排出ポンプが作動しなくなるので、EtBr の細胞内濃度は一気に上昇した。これらの結果から、今回分離できた変異株は薬剤排出ポンプの活性が亢進されていることが証明できた。また、野生株どうしを比べてみると、#40 はやはり元々高い排出ポンプ活性を持っていることがわかり、これは他の菌株、たとえば *Pseudomonas aeruginosa* 株などよりも高い活性を示しており、中度好塩菌の利用について高いポテンシャルを示している。

### 3. 4. 中度好塩菌膜タンパク質の分析

今回用いた中度好塩菌はグラム陰性菌で、内膜および外膜の2種類の膜系を持っている。2種類の可溶化力の異なる界面活性剤を利用して、内膜、外膜を分離し、SDS-PAGE でタンパク質を分析した。結果は Fig. 3 に示した。図の2～7が内膜画分、9～14が外膜画分である。2と3はコントロールとして用いた *Pseudomonas* 株のサンプルであり、以下、4, 5が40株の野生株と耐性変異株、6, 7が560株の野生株と耐性変異株である。9～14も同様の並びである。矢印で示したように、13, 14を比較した時、耐性変異株で量が増加しているみかけの大きさが58kDaの外膜タンパク質を検出した。ここには示さないが他の耐性変異株においても、同様の結果が得られた。そこでこのタンパク質を Omp58 (outer membrane protein 58kDa) と名付け、さらに詳細に分析することとした。ちなみに、薬剤侵入時に透過障壁となると考えられている外膜成分 LPS についても分析したが、野生株、耐性変異株間で違いはなく、獲得された耐性に関わっていないことが判明した。

### 3. 5. Omp58 タンパク質の分析と omp58 遺伝子のクローニング

Omp58 タンパク質を SDS-PAGE から切り出し、N 末端アミノ酸配列、および内部部分配列を決定した。この情報をもとに数種類の mixed primer を作成し、分離した中度好塩菌クロモソーム DNA を鋳型にして PCR 反応を行い、増幅された omp58 遺伝子の一部とみられる DNA 断片を分離した。この断片をプローブとして定法どおりサザンおよ

びコロニーハイブリダイゼーションを行い、全長の *omp58* 遺伝子を含む DNA 断片を分離した。この遺伝子は、分子量約5万のタンパク質をコードしており、Omp58 タンパク質の部分アミノ酸配列をすべて正しく含んでいた。見かけの分子量 58,000 よりも実際の分子量が小さいのは、好塩性菌から分離される好塩性タンパク質の特徴であり、高い酸性アミノ酸含量に起因する SDS-PAGE 上での移動度の異常から来るものと考えられる。

データベースとの相同性の比較を行うと、全体の配列で高い相同性を示すものはなかったが大腸菌を代表とするグラム陰性菌の外膜タンパク質 TolC と部分的に高い相同性が認められた (Fig. 4A)。TolC は、分泌タンパク質や細胞外から侵入してきた異物を排出する輸送体の外膜に存在する一構成成分であることが知られている (Fig. 4B)。よって、Omp58 タンパク質も TolC 同様、中度好塩菌外膜に存在する異物排出ポンプの構成成分であることが強く示唆された。

### 3. 6. *omp58* 遺伝子破壊株の作成

Omp58 タンパク質が予想どおり異物排出ポンプの一構成成分として機能しているかどうかを確かめるために、*omp58* 遺伝子を破壊した遺伝子破壊変異株を作成することを試みた。まず、*omp58* 遺伝子を大腸菌-好塩菌シャトルベクター pHS15 に組み込み pHS-*omp58* 発現ベクターを作成した (Fig. 5A)。これを中度好塩菌に接合により形質転換して、その細胞粗抽出液を SDS-PAGE で分析し、確かに Omp58 タンパク質バンドが増加していることを確認した。次に *omp58* 遺伝子の中央部にストレプトマイシン耐性遺伝子を挿入した pHS- $\Delta$ *omp58* ベクターを構築し (Fig. 5B)、これを相同組み替えにより *omp58* 遺伝子と置き換えた *omp58* 遺伝子破壊株を作成した。この破壊株はねらいどおり、Omp58 タンパク質を作っていないかった (Fig. 6, lane 3)。確かに Omp58 タンパク質が異物排出ポンプとして機能しているなら、これを欠損した破壊株は薬剤により感受性になっているはずである。野生株と Omp58 破壊株の OFLX に対する MIC を調べたところ、Table 3 に示すように、破壊株は確かにより感受性になっていた。このことから、Omp58 タンパク質は薬剤耐性に関与し、局在性と相同性から薬剤排出ポンプの外膜成分であることが証明された。

## 4. 今後の課題

本助成研究によって異物排出ポンプの外膜成分が明らかになったが、内膜に存在すると予想されるエネルギーとカップルして実際に薬剤をくみ出しているポンプ分子はいまだ未解明である。これら異物排出ポンプの分子機構全体を明らかにし、実際にバイオレメディエーションにより適した「強化型好塩菌」の創製をめざして、さらに研究を発展させたい。

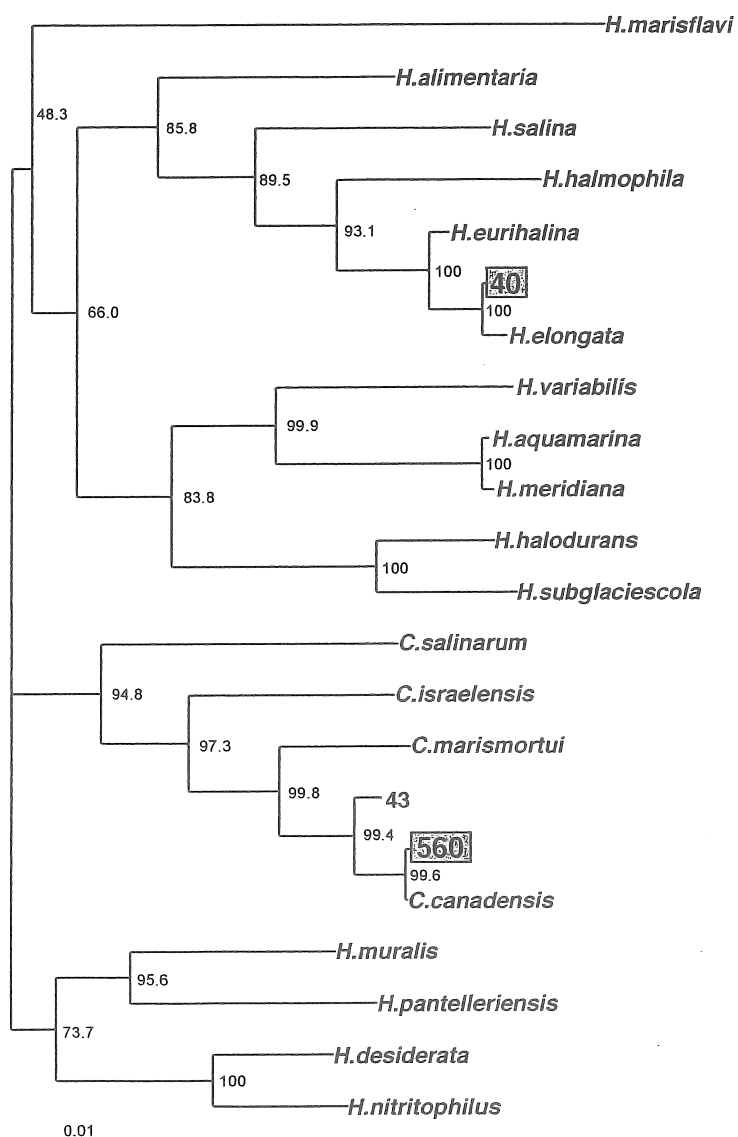


Fig. 1. Phylogenetic tree of strains reconstituted from the nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes.



Table 1 MICs of parents and mutants.

Strains	MIC( $\mu$ g/ml)				
	OFLX	CFS	CP	TC	EtBr
40	0.19	6.25	6.25	12.5	>1000
40R	3.12	25	25	100	>1000
560	0.39	3.12	3.12	1.56	62.5
560R	0.78	6.25	6.25	3.12	500

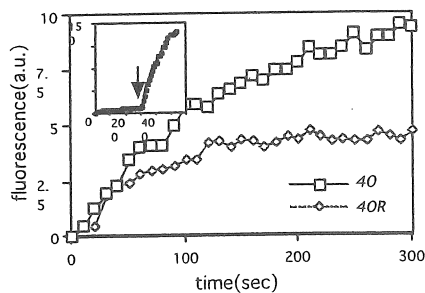
Abbreviations used were OFLX, ofloxacin; CFS, cefsulodin; CP, chloramphenicol; TC, tetracycline; EtBr, ethidium bromide. 40 and 560 were parent strains and 40R and 560R were mutants.

Table 2. Cell numbers after organic solvent treatment.

strains	control	decane (6.0)	octane (4.9)	heptane (4.4)	hexane (3.9)	p-xylene (3.1)
40	$2.0 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$8.0 \times 10^5$	0
40R	$2.6 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$	0
560	$2.3 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$3.3 \times 10^7$	$1.5 \times 10^3$	0
560R	$2.6 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$	$2.9 \times 10^4$	0

After incubation with organic solvent, the cells were enumerated by serial dilution. The number of cells per ml of culture is described. The log  $P_{ow}$  value is shown in parentheses.

A. 40 & 40R



B. 560 & 560R

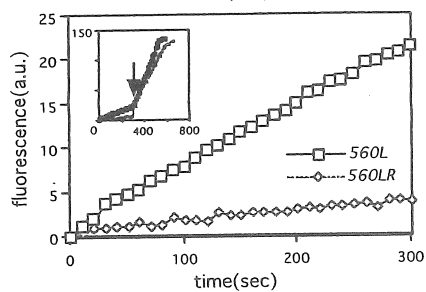


Fig. 2. Determination of cell-associated ethidium bromide.

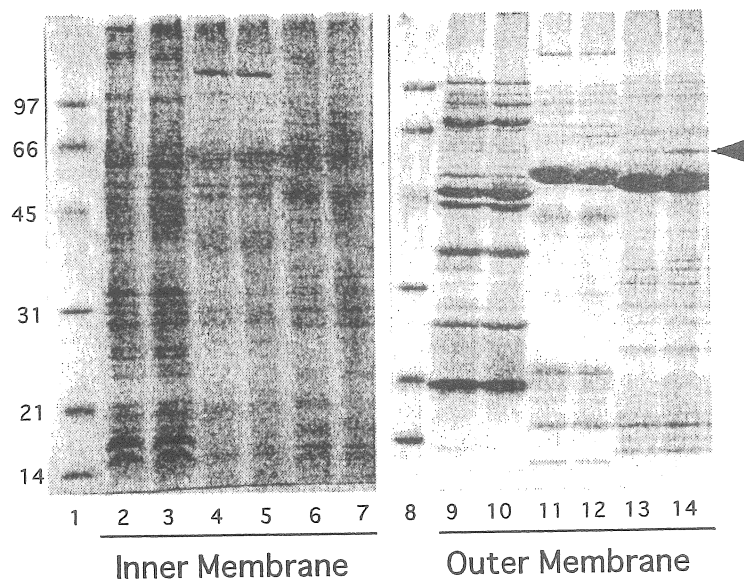


Fig. 3. SDS-PAGE of membrane proteins.

**A**

Omp58: AIKRQLDQAQEQFNVGLVATTDVNEAQASYD  
TolC : AIYRQLDQTTQRFNVGLVAITDVQNARAQYD  
\* \* \* \* \*

Omp58: SVEAQRQAIVSNR SALEATRS GYEVGTRNIVDVLDA  
TolC : SINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTRTIVDVLDA  
\* \* \* \* \*

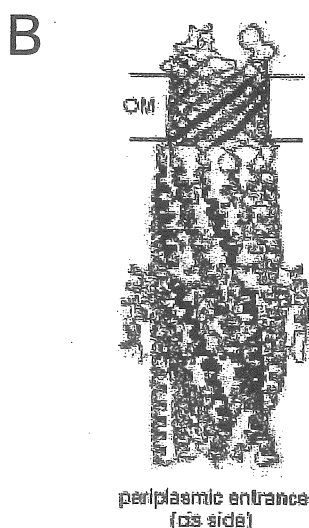


Fig. 4A. Sequence similarity of Omp58 and TolC.

Fig. 4B. TolC structure from X-ray crystallography.

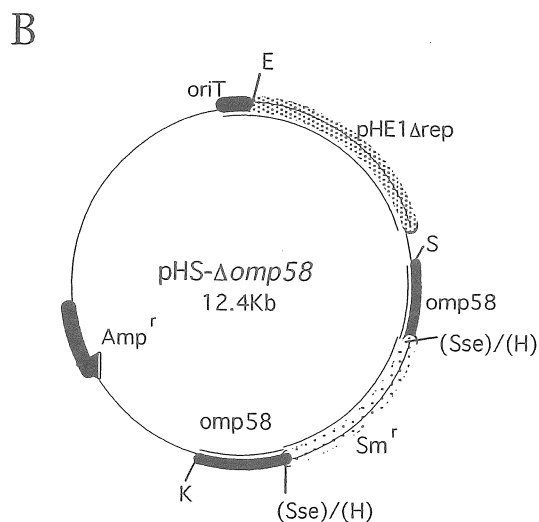
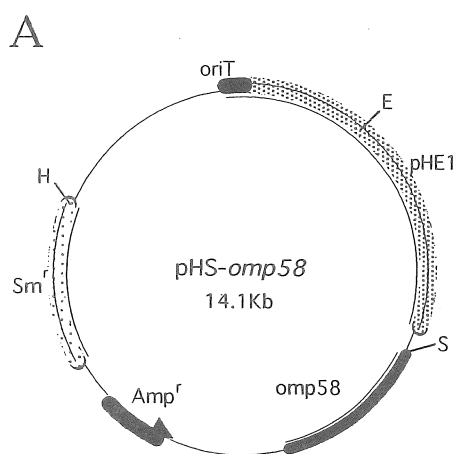


Fig. 5A. Structure of Omp58-expression vector.

Fig. 5B. Structure of gene-disruption vector.

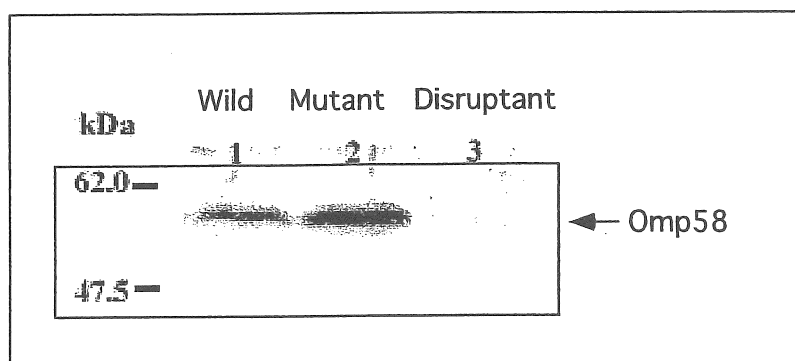


Fig. 6. Western blotting of Omp58.

Table 3. MIC of wild type and disruptant cells.

Strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
	OFLX
Wild	0.19
Disruptant	0.045

New application of halophilic bacteria: molecular characterization of xenobiotic resistance of halophilic bacteria.

Masao Tokunaga, Matsujiro Ishibashi,

Hiroko Tokunaga and Mayumi Miyauchi

Faculty of Agriculture, Kagoshima University

Summary

We have isolated many halophilic bacterial strains from natural habitats, and found that some of them exhibited high resistance to biocides, such as heavy metals and ethidium bromide (EtBr). We attempted to elucidate the molecular mechanisms of the observed high resistance and to explore the possible application of halophilic bacteria for bioremediation.

We recently isolated spontaneous ofloxacin resistant mutants of moderately halophilic bacteria, which showed a 2 to 16-fold increased resistance to structurally diverse compounds such as antimicrobial agents and EtBr compared with the wild type strain. These mutants exhibited a more efficient energy-dependent extrusion of EtBr than did the wild type cells. These mutants also showed tolerance to organic solvents and were found to produce an elevated level of 58 kDa outer membrane protein. We have cloned *omp58* gene encoding this 58 kDa protein and found that the deduced amino acid sequence of Omp58 possessed a limited degree of sequence similarity to that of *E. coli* TolC. The *E. coli* TolC is a periplasm/outer membrane tunnel protein of *E. coli* multi-drug extrusion pump that has been extensively characterized. Disruption of the *omp58* gene rendered the cells more susceptible to several biocides. Thus, Omp58 is the first isolated outer membrane component of xenobiotic extrusion pump from moderately halophilic eubacteria.