

氏名	久 富 敦
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (環境共生学)
学位記番号	甲 第 865 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 20 日
学位論文題目	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> の産生するシデロフォアの化学構造と特性の解明
論文審査委員	主査 教 授・博士 (農芸化学) 武 田 晃 治 教 授・博士 (農芸化学) 古 庄 律 教 授・博士 (農芸化学) 田 中 尚 人 准 教 授・博士 (バイオサイエンス) 志 波 優 客員教授・農 学 博 士 鈴 木 健一朗

論文内容の要旨

序 論

多くの細菌は鉄飢餓状態の環境下で難溶性の三価鉄と親和性のあるシデロフォアを産生して菌体外に放出し、菌体周辺で形成された鉄とシデロフォアの錯体を回収することで鉄を獲得できる。シデロフォアの種類は基本的に系統群 (属や種) 毎に共通しており、各生物種はそれぞれのシデロフォアの化学構造に特異的なトランスポーターを用いて優先的に錯体を取り込む。一般にシデロフォアの産生や取り込みは病原性やバイオフィーム形成といった他の挙動と関連する特性も知られている。

Stenotrophomonas maltophilia は院内感染で注視される多剤耐性日和見感染細菌であるが、糞や海綿、石油の汚染地帯や魚など幅広い環境に棲息している。本種では鉄が病原性因子を誘導する 1 つであると報告はあるが、その鉄の取り込みに重要なシデロフォアについての研究報告は少ない。また、特に自然環境の棲息域は鉄の量は限られており、シデロフォアを産生しやすく、産生シデロフォアが複合的な微生物生態系に影響を及ぼす可能性が考えられる。したがって、*S. maltophilia* のシデロフォアの研究は感染予防や創薬へのアプローチと自然環境の生態系の理解の一助となると考えられる。そのため、本研究では *S. maltophilia* が産生するシデロフォアの化学構造とシデロフォアとしての特性を明らかにすることを目的とした。

第 1 章 *S. maltophilia* 菌株の再同定

Stenotrophomonas maltophilia はグラム陰性・好気性桿菌である日和見多剤耐性菌として知られているが、臨床菌株の他に糞や魚、冷凍食品、海洋環境からの分離株も報告されている。本種は *Pseudomonas* 属の中でマルトース資化性とメチオニン要求性を分別性状として分類され、その後、再分類により *Stenotrophomonas* 属とされた。また、以前より、種内

の性状の多様さが指摘され、実際に同種株にはメチオニン要求性を示さない株も含まれており、要求株を Biovar I 群、非要求株を Biovar II 群に区別することが提唱されている。このように、*S. maltophilia* は分類学的にまだ課題のある菌種である。また、*Stenotrophomonas* 属は 2010 年前後から新種が多く提唱されており、これまで本種とされていた株がそのいずれかの種に該当する可能性もある。そのため、本研究で供試する *S. maltophilia* 菌株を確認するため再同定することとした。

S. maltophilia として報告のある 13 供試菌株を各種資化性や要求性などの生理・生化学的性状試験や比較ゲノム解析、進化系統解析により同定した結果、基準株を含む 5 株が Biovar I 群であり 8 菌株が Biovar II 群であった。そして Biovar II 群の菌株は多くが *S. maltophilia* ではなく *Stenotrophomonas lactitubi* や *Stenotrophomonas terrae* と同定された。さらに、新種である可能性が高い菌株も確認された。全ての臨床菌株は Biovar I 群であった。以上のことから本研究では基準株が属する Biovar I 群の菌株を *S. maltophilia* とし、Biovar II 群の菌株を Biovar I 群の比較対象株として供試することとした。以降、いずれの菌株も種名は便宜上 *S. maltophilia* と表記する。

第 2 章 *S. maltophilia* の産生するシデロフォアタイプの同定

植物や微生物が鉄を取り込むために産生するシデロフォアの構造は多岐にわたり、500 種ほどが報告されている。これらは活性部位の構造によりカテコール型、フェノール型、ヒドロキサム酸型、カルボン酸型の 4 種類に分けられる。シデロフォアの応用研究は多岐に渡り、キレート作用を活かした農業分野での土壌中の鉄をはじめとする金属の植物への供給物質として、環境分野では重金属を回収する物質として利用されている。また、生物が取り込む物質である特性を利用して、病原菌の薬剤の取り込みを誘導するためにシデロフォアと薬剤の複合体の開発が研究されている。

S. maltophilia は生息域が広く、本種のシデロフォアは様々な分野への応用が期待できるが、先行研究で報告されていることは Biovar I 群に属する臨床菌株の K279a がカテコール型シデロフォアを産生することのみであり、*S. maltophilia* 各供試菌株のシデロフォアの産生能やタイプについては詳細に知られていない。そこで、はじめに供試菌株のシデロフォア産生能およびその型（タイプ）を比色分析によって調べた結果、全ての菌株が鉄飢餓環境下でカテコール型シデロフォアを産生し、ヒドロキサム酸型シデロフォアやカルボン酸型シデロフォアは非産生であった。カテコール型については Biovar I 群が高い吸光値を示し、Biovar II 群でも産生が確認されたが極めて低い吸光値であった。一方、Biovar II 群では少量ながらフェノール型シデロフォアを産生する株も確認した。

第 3 章 *S. maltophilia* の産生するカテコール型シデロフォアの構造決定

供試菌株がカテコール型シデロフォアを産生することが明らかとなったため、次にその構造を決定することとした。先行研究で使用された臨床菌株 *S. maltophilia* K279a を含む Biovar I 群および Biovar II 群の菌株を鉄飢餓培地 (MM9 培地) にて培養し、カテコール基を有する物質を精製する方法でイオン交換クロマトグラフィーと逆相 HPLC により培養液からカテコール型シデロフォアを精製した。収量の多かった *S. maltophilia* K279a のカテコール型シデロフォアを NMR で構造解析したところ、2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) であることが明らかになった。そして、DHBS を標準物質として LCMS 解析により他の供試菌株のカテコール型を解析したところ、Biovar I 群では全ての菌株で DHBS が検出されたが、比色分析で極めて産生量が少なかった Biovar II 群では DHBS や他のカテコール型が検出されなかった。これは検出限界以下の濃度であることや DHBS とは異なる LCMS 内のデータベースに登録されていないシデロフォアである可能性も考えられた。

第 4 章 *S. maltophilia* K279a の DHBS 合成関連遺伝子と合成経路の推定

S. maltophilia K279a はゲノム上に大腸菌などが産生するカテコール型シデロフォアである DHBS の三量体であるエンテロバクチンの合成関連遺伝子群があるものの、前述の LCMS 解析でエンテロバクチンは検出されなかった。また、既知のエンテロバクチンの合成経路の中間体に DHBS はないことから、エンテロバクチン合成経路周辺に新規な DHBS 合成経路があると考えられた。そこで、本章では *S. maltophilia* K279a 株の DHBS 合成経路をゲノム解析により推定することとした。

S. maltophilia K279a 株の全ゲノムデータを解析した結果、コリスミ酸からエンテロバクチンを合成する代謝に関連する遺伝子のうち *entABCEF* 遺伝子は存在したものの、*entD* 遺伝子のみが欠失していた。EntD は 3 分子の 2,3-dihydroxybenzoate (DHB) を修飾し環化させてエンテロバクチンを合成するために必須である。したがって、DHB は DHBS 合成経路に何かしら関与していると考えられる。

他の Biovar I 群の菌株 (臨床菌株、糞や海綿由来の分離株) のゲノムも解析したところ同様の結果であったが、Biovar II 群の菌株ではこれら遺伝子群が検出されなかった。したがって、DHBS 産生能は Biovar I 群の特徴であり、Biovar II 群のカテコール型シデロフォアは DHBS ではないと推定される。

第 5 章 *S. maltophilia* K279a の DHBS 取り込み

DHBS を *S. maltophilia* K279a がシデロフォアとして利用するか 2 つの実験で検証した。鉄飢餓条件下と FeCl_3 が存在する条件下、DHBS が存在する条件下、DHBS-Fe 複合体が存在する条件下における 4 つの条件で生育を比較した。その結果、DHBS-Fe 複合体が存在する

条件下で最も生育速度が速く、DHBS をシデロフォアとして利用している傾向が観察された。そこで、細胞内への DHBS の取り込みを調べるため、上記 4 条件のうち FeCl_3 が存在する条件と DHBS-Fe 複合体が存在する条件の菌体の DHBS を LCMS によって定量したところ、DHBS-Fe 複合体が存在する条件の菌体から多くの DHBS が検出された。したがって、*S. maltophilia* K279a は鉄の取り込みに DHBS を利用することが明らかとなり、そのトランスポーターはゲノム解析により CirA または Fiu であることが推定された。

第 6 章 DHBS の微生物生態系への影響

S. maltophilia 以外の細菌で DHBS 産生の報告はこれまでにないが、*S. maltophilia* とは主な棲息域が異なる腸内細菌科が産生するエンテロバクチンの加水分解物としては知られている。したがって、少なからず鉄が制限された環境では DHBS が存在する可能性があり、実際に *S. maltophilia* のみならず、同系統群の γ -Proteobacteria 細菌の一部は DHBS をシデロフォアとして利用することが報告されている。この系統群には環境微生物も多く属する。

シデロフォアは鉄の取り込み以外に細胞の挙動に様々な影響を及ぼすことが知られている。*S. maltophilia* の DHBS による挙動については報告はないが、先行研究では鉄がバイオフィーム形成を誘導することが報告されている。そこで鉄と DHBS によるバイオフィーム形成を Fe 培地と DHBS 培地、Fe-DHBS 培地で調べたところ、DHBS 培地でのバイオフィーム形成は認められなかったものの、先行研究と同様に鉄による形成誘導が確認され、鉄と DHBS の共存下ではさらに産生量が増加した。そのため、DHBS は鉄の取り込みによるバイオフィーム形成をさらに促進する特性を有していると考えられた。本章では DHBS がその他の菌種にもバイオフィーム形成を誘導して微生物生態に影響するという仮説を立て、その検証をすることとした。

モデルケースとして土壌と水試料に DHBS を添加し、試料中のバイオフィーム形成およびバイオフィームを構成する菌株の特性を検討した。DHBS を添加した試料と無添加の試料をそれぞれ 4 週間集積培養したところ、土壌と水試料のいずれも添加条件下のみでバイオフィームが形成された。DHBS 添加により形成されたバイオフィームと無添加条件の上清から分離・同定したところ、両者の間で種が全く異なった。バイオフィームの構成株は γ -Proteobacteria 細菌である *Pseudomonas* 属の種が大半を占め、その構成株は DHBS を利用するとともにバイオフィーム形成能試験により K279a と同様 DHBS によってバイオフィーム形成が促進される特性を持つことが明らかとなった。また、バイオフィームからそのシデロフォアを利用する菌株が高い割合で分離されたため、DHBS はバイオフィーム形成を誘導または促進することによって微生物生態系への影響を及ぼすことが考えられた。

シデロフォア添加しバイオフィームを形成する集積培養はシデロフォア利用株の選択的

な分離に応用できる可能性があると考えられる。しかし、そのためにはターゲットとした菌種や系統群が利用するシデロフォアの種類の情報が必要であり、その解決にはショットガンメタゲノム解析等により環境中の棲息する菌種推定やシデロフォア合成遺伝子、シデロフォアトランスポーターの遺伝子およびバイオフィーム合成関連遺伝子の同定と発現ネットワークを推定するとともにコミュニティをなす複合的なバイオフィーム形成にシデロフォアや細胞間のシグナル等の他の因子がどのように関与しているか明らかにすることが今後の課題であると考えられる。

本研究では *S. maltophilia* の産生するシデロフォアが 2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serine であること、および本種の中でも Biovar I 群における特有のシデロフォアであることを初めて明らかにした。これら知見は臨床分野においては DHBS 合成代謝やトランスポーターをターゲットとした本種の感染症治療薬の創薬開発への展開、また、微生物生態に対してはバイオフィーム形成を誘導・促進することからシデロフォアを利用した選択分離の新たな技術開発への一助となるものである。

審査報告概要

本研究は、臨床環境から自然環境にまで棲息し日和見感染菌でもある *Stenotrophomonas maltophilia* が産生する鉄の取り込みや病原性に関与するシデロフォアが 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) であることおよびその新規生合成経路の存在を明らかにし、本種に対する抗菌剤開発への基礎的な知見を得た。一方、DHBS が本種のみならずバイオレメディエーションでも知られる *Pseudomonas* 属のバイオフィーム形成を誘導する特性をもつことも明らかにした。土壌とビオトープ水を環境試料として DHBS による環境試料中の *Pseudomonas* 属のバイオフィーム形成誘導と菌叢変化を実証し、菌叢制御や選択的分離への DHBS の応用の可能性を示した。

これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査委員一同は博士（環境共生学）の学位を授与する価値があると判断した。