

令和元年6月12日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06908

研究課題名（和文）緑膿菌の抗菌薬抵抗性に対する新規化合物の作用機序の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanisms of a new compound on antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

天羽 崇 (AMOH, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・特任助教

研究者番号：00803545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：難治性慢性感染症の要因の一つとして抗菌薬抵抗性の獲得が考えられる。緑膿菌クオラムセンシング（QS）のシグナル分子オートインデューサーのアナログである新規化合物が、抗菌薬抵抗性を減少させること、その作用機序の一つとしてrpoS遺伝子の発現を抑制することを見出した。新規化合物の作用機序をより明らかにするため、rpoS遺伝子の制御機構の解明を試みた結果、二成分制御系にかかわる遺伝子がrpoS遺伝子の制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌が抗菌薬抵抗性を獲得するメカニズムはまだ解明されておらず、そのため抗菌薬抵抗性に作用する物質の報告はほとんどされていない。本研究で用いた新規化合物はQSオートインデューサーのアナログでありながらQS抑制効果を持たないものの、抗菌薬抵抗性を減少させるという点で非常に面白い物質である。この化合物の作用機序を解明することは、抗菌薬抵抗性のメカニズムを明らかにするうえで有意義な取り組みであり、難治性感染症に対する新たな治療法開発に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Antibiotic tolerance is considered to be one of the reasons of chronic and refractory infection. A new compound, which is the analog of autoinducer of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, decreased antibiotic tolerance by the suppression of rpoS gene expression. The aim of this study is to investigate the mechanism of the new compound. Results indicated that the genes, which are related to two component system, may regulate the expression of rpoS gene.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 抗菌薬抵抗性 rpoS遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症が慢性化する要因の一つとして、抗菌薬抵抗性が着目されている。抗菌薬抵抗性は、耐性遺伝子の獲得や遺伝子変異による、いわゆる「薬剤耐性」とは異なり、環境の変化などに対応した一時的な遺伝子発現の変化によるものと言われている。しかしながら、その獲得メカニズムは未だ明らかにされていない。

これまでに、発光性緑膿菌株を用いたマウス大腿部緑膿菌感染モデル実験において、緑膿菌クオラムセンシング(QS)機構のシグナル分子、オートインデューサーのアナログである新規化合物(以下、*autoinducer analog-1*: AIA-1)が、単独では緑膿菌に対し抗菌活性を示さないものの、カルバペネム系抗菌薬ピアペネム(BIPM)と併用することによって、その抗菌効果を増強させることを見出した。加えて、*in vitro*での殺菌試験においても、BIPMとAIA-1を併用することにより、BIPM単独使用に比べ生存率が大きく減少していることが示された。この併用効果は、作用機序の異なるキノロン系抗菌薬(レボフロキサシン)やアミノグリコシド系抗菌薬(トブラマイシン)との併用においても見出された。AIA-1併用による各種抗菌薬の最小発育阻止濃度(MIC)には変化がなかったことから、AIA-1は抗菌薬抵抗性を減少させることで抗菌薬の効果を高めていると推察された。

この化合物の作用機序を明らかにするため、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行ったところ、AIA-1はオートインデューサーのアナログではあるが、QS関連遺伝子の発現には影響を及ぼさなかった。加えて、ピオシアニンやエラスターゼといったQSに直接制御される病原因子の産生を抑制しなかったことから、この化合物はQSに直接影響を及ぼすものではないと考えられた。その他の遺伝子の発現状況について確認したところ、細菌のストレス応答に關与する*rpoS*遺伝子を経時的に抑制していることが明らかとなった。

そこで、*rpoS*遺伝子が抗菌薬抵抗性に影響しているか確認するため、*rpoS*遺伝子欠損株を作製し、抗菌薬単独使用での殺菌試験を行った。その結果、抗菌薬単独においても、*rpoS*遺伝子欠損株では野生株に比べると生存率が減少したが、AIA-1併用時のように大きく減少しなかった。このことから、AIA-1には*rpoS*遺伝子の発現抑制に加えて、他の遺伝子に作用する経路が存在すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、緑膿菌の抗菌薬抵抗性に対する新規化合物AIA-1の作用機序を解明することを目的とする。まず、AIA-1が発現を抑制している*rpoS*遺伝子について検討する。緑膿菌では、*rpoS*遺伝子は定常期において約700個の遺伝子を制御していると報告されているが、*rpoS*遺伝子自体の制御機構は良く知られていない。この制御機構を明らかにするため、トランスポゾンライブラリを作製し、*rpoS*遺伝子の制御に關与する遺伝子を特定する。

また、*rpoS*遺伝子欠損株を用いた殺菌試験の結果より、AIA-1併用時の生存率の減少は*rpoS*遺伝子発現の抑制効果単独での結果ではないと考えられることから、AIA-1によって発現に影響を受ける遺伝子をマイクロアレイや次世代シーケンシングにて網羅的に解析する。それらの遺伝子の欠損株を作製後、その菌株を用いて殺菌試験を行い、野生株よりも生存率が減少する菌株を特定する。これらの方向から、AIA-1の作用機序を明らかにするとともに抗菌薬抵抗性に關与する遺伝子を特定し、抗菌薬抵抗性獲得のメカニズム解明と、新たな感染症治療薬のターゲットとなる遺伝子の特定を目指す。

3. 研究の方法

(1) *rpoS*遺伝子制御機構の解明:

リアルタイムPCRの結果から、AIA-1は*rpoS*遺伝子の発現を抑制することが示されている。そこで*rpoS*遺伝子の制御機構の解明を目的とし、実験を行う。まず、緑膿菌野生株PA01株を親株とし、*rpoS*遺伝子のプロモーターと発光遺伝子*luxCDABE*を染色体上に組み込んだ発光性緑膿菌株を作製する。この発光性緑膿菌株の発光強度を確認後、これを親株としてトランスポゾンライブラリを作製する。得られた菌株をそれぞれ液体培地で24時間培養後、プレートリーダーにて発光強度を測定する。親株である発光性緑膿菌株と比べて発光強度が著しく減少している株は、*rpoS*プロモーターの活性が低下していると考えられるため、その株を選択しトランスポゾン挿入部位を決定する。トランスポゾン挿入部位が決定した後、その遺伝子の欠損株を作製し、リアルタイムPCRにて*rpoS*遺伝子の発現状態を確認する。加えて、それぞれの欠損株を用いて抗菌薬単独使用での殺菌試験を行う。

(2) 抗菌薬抵抗性に關与する遺伝子の探索:

AIA-1併用による抗菌薬抵抗性の減少が、*rpoS*遺伝子発現抑制単独の効果ではないことが示唆されたため、*rpoS*遺伝子以外のAIA-1のターゲットとなる遺伝子の特定を行う。はじめに、AIA-1作用後においてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う。緑膿菌PA01株を前培養後、

新しい液体培地に植えつき、対数増殖期まで培養した後に AIA-1 を添加する。AIA-1 を添加し 4 時間後の RNA を採取し、AIA-1 未処理群と比較して発現が増減している遺伝子のスクリーニングを行う。候補遺伝子を決定後、それぞれの遺伝子欠損株を作製し、各菌株を用いて抗菌薬単独もしくは AIA-1 を併用した殺菌試験を行う。また同時に RNA-seq による網羅的解析を行い、候補遺伝子を追加する。

(3) 他の AIA 化合物の活性評価：

AIA-1 以外の新規化合物を 15 種類保有していることから、これらの化合物において、AIA-1 よりも効果の高い化合物を発見することを目的とし実験を行う。まず、QS に制御される病原因子（ピオシアニン、エラストーゼ、ラムノリピッド）の産生抑制効果を検討する。次いで、QS 関連遺伝子（*lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*, *pqsA* など）の発現抑制効果をリアルタイム PCR を用いて判定する。化合物の作用時間は、AIA-1 で有意差が確認された時間で行う。特に、AIA-1 同様 *rpoS* 遺伝子の発現抑制が確認されるか着目する。また、AIA-1 と同様に浮遊菌での殺菌試験を行い、抗菌薬単独使用に比べ、化合物併用による生存率の減少が認められるか検討する。

(4) 緑膿菌以外の細菌に対する AIA-1 併用効果の検討：

緑膿菌以外の細菌に対しても AIA-1 の併用効果が有効であるか確認するため、近年問題となっているカルバペナム耐性腸内細菌科細菌（CRE）を対象に実験を行う。方法としては、微量液体希釈法による薬剤感受性試験により、化合物併用による抗菌薬の MIC の変化を確認する。抗菌薬はメロペネム（MEPM）を使用し、AIA-1 単独の MIC も同時に測定する。

4 . 研究成果

(1) *rpoS* 遺伝子制御機構の解明：緑膿菌 PA01 株染色体上に、*rpoS* 遺伝子プロモーターと発光遺伝子 *luxCDABE* を組み込むことにより、定常期において高い発光強度を示す株を得ることができた。この株を親株とし、トランスポゾンライブラリを作製した。各菌株を液体培地で培養後、プレートリーダーを用いて発光強度を測定した結果、親株よりも著しく発光強度が減少した株が数個得られた。発光強度が減少した菌株を用いてトランスポゾン挿入部位の決定を試みたが、なかなかうまくいかなかった。その理由を確認するため発光遺伝子内部を PCR にて増幅した結果、用いた菌株において該当バンドが検出されなかったことから、発光遺伝子が欠落していることが推察された。そのため、残りの候補株全てにおいて発光遺伝子内部の PCR を行ったところ、3 株ほど発光遺伝子の残存を確認することができた。これらの株においてトランスポゾン挿入部位の決定を行った結果、2 株のサンプルにおいてトランスポゾン挿入部位を決定でき、それぞれ二成分制御系機構のセンサーに關与する遺伝子にトランスポゾンの挿入が確認された。今後は、これらの遺伝子が *rpoS* 遺伝子に及ぼす影響を確認するため、各遺伝子の欠損株を作製し、リアルタイム PCR による *rpoS* 遺伝子発現状況の確認、ならびに欠損株を用いた殺菌試験を行う。また、残り 1 株においてトランスポゾン挿入部位の決定を行う。

(2) 抗菌薬抵抗性に關与する遺伝子の探索：マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果から、AIA-1 作用時に遺伝子発現の増減が確認された遺伝子のうち 13 個を選択し、各遺伝子の欠損株を作製した。それぞれの菌株を用いて抗菌薬単独での殺菌試験、ならびに抗菌薬と AIA-1 併用の殺菌試験を行ったが、それぞれの実験においても野生株 PA01 株と比べて生存率に差は見られなかった。欠損株を作製した候補遺伝子のうち、7 個についてはリアルタイム PCR にて AIA-1 作用時の遺伝子発現解析を行ったが、コントロール群と比較しても遺伝子発現に差は認められなかった。このことから、今回選択した遺伝子は抗菌薬抵抗性に關与していないと考えられた。今後 RNA-seq による解析結果と合わせて、候補遺伝子を追加する。

(3) 他の AIA 化合物の活性評価：AIA 化合物 15 種類を用いて浮遊菌での殺菌試験を行った結果、AIA-1 同様に抗菌薬との併用により生存率が減少する化合物を 1 種見出した。この化合物は、QS に直接制御される病原因子の産生を抑制しなかった。また、化合物作用後の遺伝子発現解析をリアルタイム PCR にて行った結果、AIA-1 同様に QS 関連遺伝子には影響を与えず、*rpoS* 遺伝子発現を経時的に抑制することが確認された。

(4) 緑膿菌以外の細菌に対する AIA-1 併用効果の検討：カルバペネマーゼ産生遺伝子を保有する肺炎桿菌や大腸菌を用いて薬剤感受性試験を行ったところ、緑膿菌では AIA-1 併用による抗菌薬の MIC が変化しなかったが、CRE では MEPM の MIC の低下が確認された。このことから、AIA-1 は緑膿菌とは異なった機序で CRE に作用していると考えられた。また AIA-1 単独の MIC も緑膿菌と比べ低かった。

以上の結果から、新規化合物 AIA-1 は QS オートインデューサーのアナログであるが直接的に

QS 機構には影響せず、緑膿菌の二成分制御系機構を介して *rpoS* 遺伝子に作用し、抗菌薬抵抗性を減少させている可能性が示唆された。二成分制御系は緑膿菌の病原性や抗菌薬耐性に関わっていると推測されているが、抗菌薬抵抗性との関連性はほとんど報告されていない。

今後は、今回見出された遺伝子に加え、RNA-seq での結果を踏まえて候補遺伝子を増やし、細菌が抗菌薬抵抗性を獲得するメカニズムを明らかにしたい。また、CRE に対しても AIA-1 併用が効果的であると考えられることから、この作用機序を明らかにすることで、CRE 感染症に対する新たな治療法開発につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 村上圭史, 天羽崇, 狩山玲子, 公文裕巳, 藤猪英樹. 緑膿菌のマクロライド感受性に及ぼす新規化合物の影響, 第 66 回日本化学療法学会西日本支部総会, 2018
2. 天羽崇, 村上圭史, 狩山玲子, 弘田克彦, 公文裕巳, 三宅洋一郎, 藤猪英樹. 浮遊菌とバイオフィーム形成菌の抗菌薬抵抗性における *rpoS* 遺伝子の役割, 第 32 回日本バイオフィーム学会学術集会, 2018
3. 天羽崇, 村上圭史, 狩山玲子, 弘田克彦, 三宅洋一郎, 藤猪英樹. 緑膿菌 *rpoS* 遺伝子が抗菌薬抵抗性に及ぼす影響, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018
4. 村上圭史, 天羽崇, 狩山玲子, 弘田克彦, 三宅洋一郎, 藤猪英樹. 緑膿菌オートインデューサーアナログのマクロライドに対する影響, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018
5. 阿部みずき, 妹尾成美, 村上圭史, 天羽崇, 藤猪英樹, 佐藤雅美, 笹田倫子, 菅崎幹樹, 森本悠里, 平尾早紀, 櫻井明子, 片岡佳子. オートインデューサーアナログ (AIA) の緑膿菌に及ぼす影響, 第 41 回徳島県医学検査学会, 2017
6. 天羽崇, 村上圭史, 狩山玲子, 弘田克彦, 三宅洋一郎, 藤猪英樹. *rpoS* 遺伝子が緑膿菌の抗菌薬抵抗性に及ぼす影響, 第 70 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。