

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04844

研究課題名（和文）グラム陽性細菌の自己誘導ペプチドを捕捉するクオラムセンシング阻害技術の開発

研究課題名（英文）Development of quorum sensing inhibition technology by capturing autoinducing peptides of gram-positive bacteria

研究代表者

加藤 紀弘（Kato, Norihiro）

宇都宮大学・工学部・教授

研究者番号：00261818

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：情報伝達分子としてグラム陽性細菌が分泌する自己誘導ペプチドは、標的遺伝子の発現を活性化する。本研究では細胞間情報伝達機構であるクオラムセンシングを細胞外から阻害する手法を検討した。環状あるいは直鎖状の自己誘導ペプチドをそれぞれ生産する *Staphylococcus aureus*、*Streptococcus mutans* において、自己誘導ペプチドと添加分子が細胞外で複合体を形成することで、クオラムセンシングに依存した病原性因子の発現は阻害された。自己誘導ペプチドと添加分子の分子間相互作用は水晶振動子マイクロバランス法により定量的に解析し、病原性因子の発現との相関を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌による病原性因子の発現に伴う感染症の発症、水と接触する固体表面に形成するバイオフィルムの形成過程などに、細胞間情報伝達機構であるクオラムセンシング機構の関与が多く報告されている。物理的な相互作用に起因する固体表面への細菌の初期付着を抑制することは難しいことから、本研究では関連遺伝子の発現を細胞外部から遠隔操作し病原性を封じ込める手法を着想し、その効果を実証した。試験した黄色ブドウ球菌は薬剤耐性遺伝子を有する例も多く病原性の封じ込め技術は重要となる。ミュータンス連鎖球菌は口腔内でう蝕を誘導することからバイオフィルムの形成阻害、病原性の封じ込めの技術は良好な口腔衛生状態の維持に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Autoinducing peptides secreted by gram-positive bacteria activate the expression of target genes. This project proposed an extracellular inhibition method for this intercellular signaling system called quorum sensing. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* were studied as the model bacteria that produce cyclic- and straight-chain peptides as quorum sensing signals. The virulence factor expression involved in quorum sensing was effectively inhibited by forming a complex between autoinducing peptide and the molecule added extracellularly. The relationship between the added inhibitor and pathogenicity expression level was quantitatively determined by the quartz crystal microbalance method.

研究分野：生物工学

キーワード：クオラムセンシング 自己誘導ペプチド 機能性高分子 グラム陽性細菌 水晶振動子マイクロバランス法

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗生物質に対する耐性を獲得した細菌の出現、複数の薬剤の効力を無効化可能な多剤耐性菌の出現は、人類の健康を脅かす脅威として広く認知されている。2015年の世界保健総会で薬剤耐性に関するグローバル・アクション・プランが採択され、適切な薬剤を必要とすのみ適切な量を使用する対策がグローバルに展開されるに至った。感染菌の封じ込めは重要課題であるものの、薬剤の利用は常に薬剤耐性菌が出現するリスクを伴う。

その一方で、細菌感染症の発現、細菌が形成する生物膜であるバイオフィルムの形成に細胞間情報伝達機構が関与する例が多く報告されている。細胞間情報伝達機構の情報伝達分子(シグナル物質)は細菌により生産されると細胞外へ放出され、増殖に伴う菌体密度の上昇によりその局所濃度は上昇する。そのため高菌体密度において、細菌の有するレセプターと情報伝達分子の複合体形成が容易となり、この複合体形成をトリガーとして標的遺伝子の発現が活性化される。このクオラムセンシング(QS)機構は病原性因子の発現に関わる例がこれまでに多く知られている。本研究ではQSに依存した病原性因子の発現機構の人為的な制御が新たな細菌感染症予防策として利用できる着想を得た。これらの細菌の周囲からシグナル物質を除去し低濃度条件を維持すれば、病原性因子の生産は起こらない。本研究で提案するQS阻害法では、薬剤を用いて菌体を殺すことなく、病原性のみを封じ込め可能となる。

多くのグラム陰性細菌における病原性因子の発現は、アミノ酸誘導体である*N*-アシルホモセリンラクトン(AHL)をシグナル物質とするQSを介して制御されていることが知られる。これに対し多くのグラム陽性細菌のQSにおいては、数残基程度の直鎖あるいは環状のペプチドがシグナル物質として利用されており自己誘導ペプチド(Autoinducing peptide: AIP)と呼ばれる。AHLに比べ分子量の大きいシグナル物質の受容体は膜タンパク質として存在する。本研究ではグラム陽性細菌のQSを阻害する素材のスクリーニング、新技術の創製を着想した。

2. 研究の目的

本研究はグラム陽性細菌の細胞間情報伝達機構QSのシグナル物質である自己誘導ペプチドと親和性を有する素材をスクリーニングし、菌体外部でシグナル物質を捕捉することでQS機構を阻害可能であることを明らかにすること、効果的なQS阻害技術を明らかにすることを目的とした。

モデル細菌として固有の一次構造を有する自己誘導ペプチドを生産する黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、ミュータンス連鎖球菌 *Streptococcus mutans* を用い、シグナル分子の捕捉によるそれぞれのQS阻害効果を明らかにする。*S. aureus* 及び *S. mutans* はそれぞれ環状ペプチドであるAIP-I (YSTCDFIM thiolactone: C4-M8)、直鎖ペプチドである18-CSP (SGSLSTFFRLF NRSFTQA) を利用するQSを有する。*S. aureus* のAIP-Iを水晶振動子マイクロバランス(QCM)法のセンサー電極に固定化した修飾電極を作製し、QS阻害物質との分子間相互作用を解析した。

S. aureus においては *agr* 系QSにより発現が活性化される *hla* 遺伝子由来の α -ヘモリシンをヒツジ赤血球(SRBC)の溶血アッセイにより評価しQSの活性化指標とした。*S. mutans* においては *comDE* 系QSの活性化により発現が活性化される *smbA*, *smbB* 遺伝子由来のバクテリオシン SmbA, SmbB による *Streptococcus* Indicator Rp66 株の増殖阻止円の形成をQSの活性化指標とした。

S. mutans の18-CSP受容体である膜タンパク質 ComD には三つの細胞外 Loop A, B, C の存在が知られており、そのうち Loop B と Loop C が18-CSPと相互作用することが報告されている。そこでQCMセンサー電極に18-CSPペプチド、Loop Bペプチド、あるいはLoop Cペプチドを固定化した修飾電極を作製し、QS阻害物質との分子間相互作用を解析した。

3. 研究の方法

(1) *S. aureus* のQS活性化指標: Luria-Bertani (LB)培地を用いて前培養(37°C, 15 h)した *S. aureus* 培養液の菌体密度を、600 nmにおける濁度(OD₆₀₀)が0.3となるように希釈し、所定量のAIP捕捉担体を浸漬したLB培地(4 mL)に1%植菌し所定時間振とう培養した。遠心分離した培養上清に含まれる α -ヘモリシンに由来するSRBCの溶血アッセイを行った。ヒツジ脱繊維血液に等量の生理食塩水を混合して遠心分離し、沈降した赤血球を洗浄し緩衝液に懸濁させた。所定量の α -ヘモリシン含有上清を混合して1 h インキュベート(37°C)し溶血を促した。遠心分離した上清の543 nmにおける吸光度によりヘモグロビン溶出濃度を見積もり、Triton X-100による溶血率を基準に α -ヘモリシンによる溶血率を相対評価した。

(2) *S. mutans* のQS活性化指標: Mitis-Salivarius (MS)寒天培地の *S. mutans* GS5 のコロニーをBrain Heart Infusion (BHI)培地に植菌し5% CO₂ 雰囲気下で培養(37°C, 24 h)した。菌体密度を調整した培養液をBHI寒天培地のウェルに40 μ L 添加し静置培養(5% CO₂, 37°C, 24 h)した。同時に *Streptococcus* Indicator Rp66 株を5% CO₂ 雰囲気下で培養(37°C, 24 h)し、菌体密度を調整した培養液(OD₆₀₀ = 0.003)を約50°Cの1.5% BHI寒天ゾルに5%混合し、GS5株を培養した寒天プレートに重層シゲルを形成させた。これを静置培養(5% CO₂, 37°C, 24 h)すると、GS5株が生産したバクテリオシンが存在する領域ではRp66株の増殖阻害が起こり透明なハローが現れる。ハローのサイズからQS依存性のバクテリオシン生産阻害効果を評価した。

(3)AIP 捕捉担体の合成：脱水したジメチルスルホキシド 5 mL に所定量のポリビニルアルコール(PVA)、トリエチルアミン、クロロギ酸コレステロールを添加し窒素雰囲気下で 18 h 反応させた (25 °C)。ヘキサソ 5 mL を添加し混合した後に遠心分離したヘキサソ相を除去する洗浄を 3 回実施した。透析により精製した後に凍結乾燥することでコレステリル化 PVA(CL-PVA)を得た。所定量の CL-PVA を超純水に懸濁させると疎水性のコレステリル基の疎水性相互作用により高分子ミクロスフェアが形成される。PVA へのコレステリル基導入量は酵素反応によりコレステロールを遊離させた後にコレステロールオキシダーゼを用いる反応で生じる H₂O₂ を発色定量する HDL-コレステロール E-テストワコーを用いて評価した。

アルギン酸(Alg)カルシウムゲルファイバーを以下の方法で調製した。3 wt% アルギン酸ナトリウム水溶液を同軸型マイクロ流体デバイス(内径：340 μm、外径 840 μm)の内管(18 mL/h)に、2 wt% 塩化カルシウム水溶液を外管(150 mL/h)に所定時間だけ通液することで Alg ヒドロゲルファイバーを得た。

(4) QCM 法による 18-CSP と CL-PVA 及びオリゴ糖の分子間相互作用解析：測定には共振周波数 27 MHz の AT-cut 水晶振動子を用い、ネットワークアナライザーによりコンダクタンスの周波数依存性を計測するアドミッタンス解析法を用いた。

4. 研究成果

(1) CL-PVA を用いる *S. aureus* の α-ヘモリシン生産阻害効果の評価

0~1 wt% CL-PVA(コレステリル基 35.7 mg/g-PVA)添加条件で LB 培地を用いて *S. aureus* IF012732 株を 8 h 培養(37 °C)した上清に含まれる α-ヘモリシン量を評価した。SRBC 溶血アッセイを行うと 0.2 wt% より高濃度の CL-PVA を添加すると溶血はほぼ完全に阻害される良好な結果となった。

そこで QCM センサー電極に COOH 末端の自己組織化膜を作成し、水溶性カルボジイミドと *N*-ヒドロキシスクシンイミドを用いて NeutrAvidin を固定化した。そこへ N 末端を Biotin 化した AIP-I を Biotin-Avidin 結合により固定化した。ここへ CL-PVA を添加した際の共振周波数変化(ΔF_s)をネットワークアナライザーを用いてアドミッタンス解析し、質量項変化(ΔF₂)、粘性項変化(ΔF_w)を追跡すると、CL-PVA と AIP-I との相互作用が示された。

同様の方法で *S. mutans* のシグナル物質である 18-CSP の N 末端を Biotin 化し Biotin-Avidin 結合により 18-CSP 固定化 QCM センサー電極を作製した。18-CSP 未固定の control と比較して評価すると 18-CSP/CL-PVA 間の特異的相互作用の発現が明らかとなった。CL 修飾しない PVA と比較すると、CL-PVA の 18-CSP 捕捉能は約 200 倍増大している。

これらの結果は、コレステリル基を導入した PVA が水中で形成するミクロスフェアは、アミノ酸 8 残基の環状ペプチドである AIP-I、18 残基の直鎖ペプチド 18-CSP を捕捉可能であり、培養液中に存在するシグナル物質を低濃度に維持し QS を阻害できることを示している。試験した QS のシグナル物質を図 1a に、作成した QCM 修飾電極を図 1b に示す。

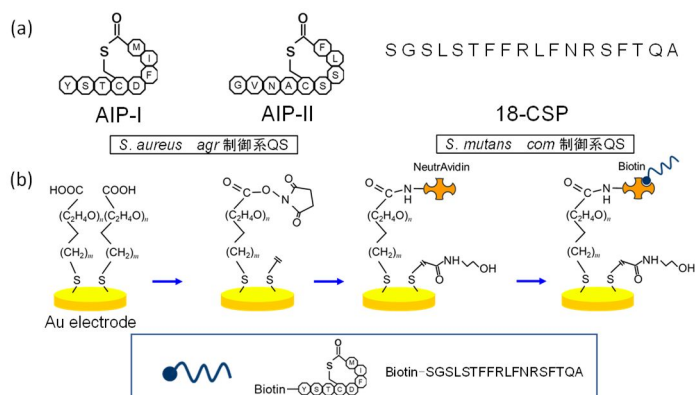


図 1 (a) QS 機構の自己誘導ペプチド. (b) Biotin-Avidin 結合により作成した自己誘導ペプチド固定化 QCM センサー電極.

(2) Alg ヒドロゲルを用いる *S. aureus* の α-ヘモリシン生産阻害効果の評価

シグナル物質として AIP-I を生産する *S. aureus* ATCC12600 株を LB 培地で培養 (10 h、37 °C) する際に Alg ヒドロゲルを乾燥重量換算で 0~1 wt% 添加した。培養上清に含まれる α-ヘモリシン量を SRBC 溶血アッセイで評価すると、Alg ヒドロゲルの添加量が増大するにつれて溶血率は低下した。1 wt% Alg ヒドロゲル添加時の ATCC12600 株、ATCC29213 株 (AIP-II 生産株) における溶血率は、それぞれ 5 % 程度まで抑制され、どちらの株においても α-ヘモリシン生産量は効果的に抑制されている。次に Alg ヒドロゲル未添加で 10 h 培養(37 °C)した培養液に 0~1 wt% Alg ヒドロゲルを浸漬し、遠心分離した上清の溶血活性を

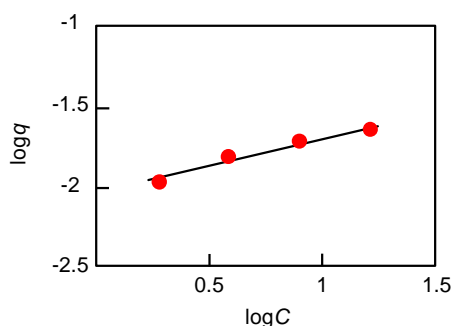


図 2 Alg ヒドロゲルに対する AIP-I の吸着量と濃度の関係 (25 °C).

試験した。培養液に存在する α -ヘモリシンの Alg ヒドロゲルへの吸着に由来する溶血率の低下を評価すると、 α -ヘモリシンが Alg ヒドロゲルへ捕捉される効果は小さい。そこで培養液上清に含まれるタンパク質の発現量を、Alg ヒドロゲルの添加の有無で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価した。Alg ヒドロゲル未添加の Control では α -ヘモリシン由来のバンドが 35 kDa 付近に現れたのに対し、添加条件の培養上清から当該バンドは消失している。Alg ヒドロゲルに AIP が捕捉されることで QS の不活性状態が維持し α -ヘモリシンの発現が抑制されたことが示唆される。

そこで Biotin-AIP-I 水溶液に Alg ヒドロゲルを浸漬する AIP-I の捕捉試験 (25 °C、2 h) を実施した。前述の方法で NeutrAvidin 固定化 QCM 電極を作製し、Alg ヒドロゲル浸漬溶液に残存する AIP-I 量を見積もった。Alg ヒドロゲルの浸漬量に依存して、浸漬前後の QCM 測定により数十%の AIP-I が Alg ヒドロゲルに捕捉されたことが明らかとなった。異なる初期濃度の Biotin-AIP-I 水溶液に Alg ヒドロゲルを浸漬し吸着平衡後の AIP-I 濃度を QCM 法で見積もり Freundlich 吸着等温式で解析した (図 2)。平衡濃度 C に対し吸着量 q をプロットした直線より吸着容量は $K_f = 4.5$ 、親和力は $1/n = 2.9$ と決定された。

(3) *S. mutans* の ComD 細胞外 Loop とシグナル物質 18-CSP の QCM 相互作用解析

う蝕を誘導するミュータンス連鎖球菌 *S. mutans* の ComDE 系 QS では *comC* の発現により合成された 46-CSP が細胞外へ放出されプロセッシングを受けて 21-CSP を経て QS 活性な 18-CSP となる。18-CSP が膜受容体である ComD と複合体を形成するとリン酸化された ComE が標的遺伝子の発現を活性化する。この QS の活性化によりバクテリオシン SmbA、SmbB が誘導される (図 3a)。先行研究により ComD には細胞外に LoopA~C が存在し 18-CSP との親和性は LoopB、C が高いことが示唆されている (図 3b)。試験した *S. mutans* GS5 株における LoopB 及び LoopC のアミノ酸配列はそれぞれ、IIFVILDGNQGI VMDSS、IESYNVIPTLTKFRK であることが報告されている。

本研究では、18-CSP と ComD 細胞外 Loop の親和性を QCM 法により評価した。図 1b に示した方法で、LDGNQK-Biotin (LoopB)、Biotin-IESYNVIP TLKFRK (LoopC) を Biotin-Avidin 結合で QCM センサー電極に固定化した。QCM アドmittance 解析すると質量項 ΔF_2 の変化により、外部添加した 18-CSP は固定化 LoopB ペプチド、LoopC ペプチドと相互作用し、18-CSP は双方の Loop と同程度の親和性を有する結果が示された。

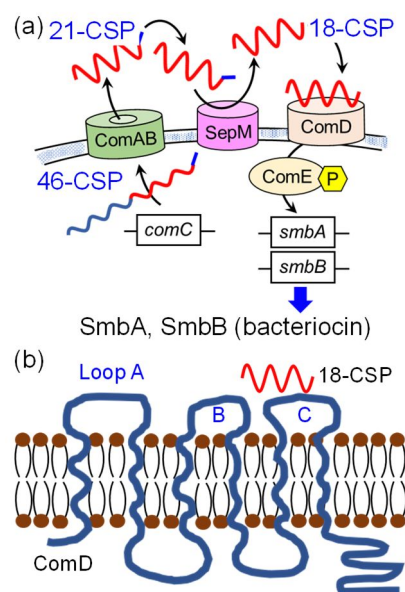


図 3 (a) *S. mutans* の ComDE 系 QS 機構. (b) ComD に存在する細胞外 Loop.

(4) *S. mutans* の ComDE 系 QS を抑制するシクロデキストリンの効果

S. mutans の comDE 系 QS の活性化制御にシクロデキストリン (CD) 誘導体が有効であることを見出した。*S. mutans* は 18-CSP を介した QS の活性化により *smbA*、*smbB* 遺伝子の発現を誘導しバクテリオシンを生産する (図 3a)。Rp66 株の増殖阻害試験を用いて外部添加された CD がバクテリオシン生産に及ぼす効果を試験した。-CD あるいは -CD の添加条件で増殖阻止円 (ハロー) の直径が小さくなり増殖阻害効果が観測された。18-CSP を固定化した QCM センサー電極を作製し、各種 CD 誘導体との親和性を評価すると、親和性が高い順に -CD、-CD、-CD となることが明らかとなった。LoopC ペプチド固定化センサー電極を用いて CD 誘導体の親和性を QCM 法により評価すると、LoopC との親和性が高い順に -CD、-CD、-CD となることが明らかとなった。これらの結果は、外部添加した -CD は主に自己誘導ペプチド 18-CSP との複合体形成により QS を抑制する可能性を示唆する。これに対し -CD は膜受容体 18-CSP と相互作用し、18-CSP の結合を阻止するブロッカーとして作用し QS を抑制する可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryohei Sakai, Kota Sawaguchi, Yuriko Takayama, Eri Nasuno, and Norihiro Kato
2. 発表標題 Interaction Analysis of a Quorum Sensing Signal in Streptococcus mutans with Polymer Assemblies Using a Quartz Crystal Microbalance
3. 学会等名 Federation of Asian Polymer Societies Polymer Congress, Polymers for Cutting-Edge Technological Innovations (FAPS2019 Polymer Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukasa Hirose, Yuta Orimo, Ryohei Sakai, Yuriko Takayama, Eri Nasuno, and Norihiro Kato
2. 発表標題 Inhibitory Effects of Pectin Gel for Hemolysis Activity in Staphylococcus aureus
3. 学会等名 Federation of Asian Polymer Societies Polymer Congress, Polymers for Cutting-Edge Technological Innovations (FAPS2019 Polymer Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山友理子、上村卓美、織茂裕太、奈須野恵理、加藤紀弘
2. 発表標題 ポリビニルアルコール会合体を用いるStaphylococcus aureusの病原性抑制
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲垣瑠妃、織茂裕太、奈須野恵理、加藤紀弘
2. 発表標題 Staphylococcus aureusのクオラムセンシングに依存した病原性発現に対する酸性多糖ゲルの抑制効果
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉香乃、圓通賢隆、坂井稜平、奈須野恵理、加藤紀弘
2. 発表標題 ミュータンス連鎖球菌の膜受容体とクオラムセンシング阻害剤 -シクロデキストリンのQCM相互作用解析
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口瑞稀、清水あかり、高山友理子、奈須野恵理、加藤紀弘
2. 発表標題 シクロデキストリンを用いたヒドロゲル表面のSwarming運動性制御
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奈須野 恵理 (Nasuno Eri) (80709329)	宇都宮大学・工学部・助教 (12201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------