

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16633

研究課題名（和文）微生物間相互作用から紐解く多剤耐性菌由来 β -ラクタマーゼの新機能

研究課題名（英文）Microbial interaction sheds light on the new functions of beta-lactamase from multidrug resistant bacteria

研究代表者

草田 裕之（Kusada, Hiroyuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：00827537

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、世界中の医療現場で近年問題となっている多剤耐性病原菌の抗生物質耐性機構を司る鍵酵素 β -ラクタマーゼの未だ知られざる新機能を明らかにするとともに、本酵素の新たな生理生態学的機能の解明を目指して研究を実施した。具体的には、多剤耐性能と微生物間コミュニケーション機構の遮断という一見すると全く異なる微生物機能に対して同時に寄与する両機能性 β -ラクタマーゼを発見し、その酵素学的諸性質や基質特性決定に関わる分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで抗生物質耐性という視点でのみ研究が進められてきた β -ラクタマーゼの未知なる生物機能を微生物間コミュニケーション機構の遮断という独自の視点から紐解いた点に学術的意義がある。また、抗生物質耐性能と微生物間コミュニケーション機構の遮断という2つの重要な微生物機能に寄与する両機能性 β -ラクタマーゼを発見したことで、近年世界中で問題となっている多剤耐性菌の更なる理解やそれらの制御に繋がる新たな洞察をもたらす成果である。

研究成果の概要（英文）： β -Lactamase, the commonest antibiotic resistance enzyme, is highly related to worldwide emergence and spread of multidrug-resistant pathogens. In the present study, we isolated novel β -lactamases with extended substrate specificity that contribute to two distinct biological functions (antibiotic resistance and cell-cell communication disruption), and characterized their enzymatic properties including substrate specificity.

研究分野：細菌学

キーワード：多剤耐性菌 抗生物質耐性 微生物間コミュニケーション 新生物機能 酵素

1. 研究開始当初の背景

近年、抗生物質が有効な効果を示さない多剤耐性を有する病原菌が世界各国の医療機関において出現しており、これら増え続ける多剤耐性病原菌の脅威に我々はどう立ち向かうかという大きな問題に直面している。英国研究機関の報告によると、多剤耐性菌に起因する死者数は少なくとも世界で年間 70 万人と推定され、もし何も効果的な対策が講じられない場合、2050 年には死者数が 1000 万人まで増加すると予測され、それに加えて、莫大な経済的損失も予測されている。その一方で、1980 年代から新規な抗菌薬の研究開発は世界的に大きく停滞していることから、既存の抗菌薬を使用し続けなければならない状況となり、その結果として耐性菌が増加し続けるという負のスパイラルに陥っているのが現状である。近年では、多剤耐性菌への切り札として期待された β -ラクタム系広域抗菌薬であるカルバペネムでさえも全く効果を示さない超耐性菌「スーパーバグ」の存在が報告されており、実際に世界保健機構が公表している「新規抗菌薬開発の緊急性が高い多剤耐性菌のリスト」に掲載されている多くが β -ラクタム系抗生物質に対する耐性菌であった。これら問題となっている多くの多剤耐性菌は抗生物質分解酵素（特に β -ラクタマーゼ）を生産することで抗生物質を不活化し耐性能を獲得している。従って、この多剤耐性に関わる酵素の機能を正確に理解することが耐性菌問題を解決に導く鍵になると考えられており、古くから世界各国で β -ラクタマーゼの研究が進められてきた。しかしながら、これまでに様々な多剤耐性菌から β -ラクタマーゼが発見されてはいるものの、未だ多剤耐性菌の制御に直結するような発見には至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

研究代表者は、 β -ラクタム系抗生物質が微生物間コミュニケーションに使用されるシグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトンと構造的に似通っている点（環状構造と側鎖がアミド結合で繋がった共通の化学構造）に着目しており、 β -ラクタム系抗生物質の分解酵素は多剤耐性に寄与するだけでなく、実は微生物間コミュニケーションを司るシグナル物質をも同時に分解することで微生物間コミュニケーション機構の遮断にも重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで本研究課題では、多剤耐性能と微生物間コミュニケーション機構の遮断という 2 つの重要な微生物機能に寄与する「両機能性の β -ラクタム系抗生物質分解酵素」の発見と機能解析を通じて、 β -ラクタム系抗生物質分解酵素の新たな生理生態学的機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) β -ラクタム系抗生物質分解酵素をコードする候補遺伝子の選抜

分離培養化した多剤耐性菌のゲノム配列および公共のデータベースに登録されている遺伝子情報をもとに β -ラクタム系抗生物質分解酵素をコードする候補遺伝子配列情報の選抜を実施した。具体的には、抗生物質耐性（特にペニシリン系やセフェム系 β -ラクタム系抗生物質）があることが確認された *Pseudomonadota* (旧 *Proteobacteria*) 門細菌のゲノム情報および環境メタゲノムデータから抽出した遺伝子情報をもとに、各種配列解析ツール (NCBI BLAST、Uniprot BLAT、InterproScan、Pfam 等) を活用したドメインサーチとホモロジーサーチを実施することで候補遺伝子の絞り込みを行った。選抜した β -ラクタム系抗生物質分解酵素の候補遺伝子に関しては、相同性検索および系統解析により新規性や系統学的位置を明らかにした。さらに、遺伝子情報処理ソフトウェアを用いて、配列データの各種解析（組成分析・プロモーター部位予測・等電点予測・二次構造予測等）を実施した。

(2) 組換え酵素の異宿主発現系の構築

選抜した候補遺伝子を用いて、大腸菌を宿主にした各種組換え酵素の高発現系の構築と精製酵素の調整法の検討を実施した。具体的には、選抜した β -ラクタム系抗生物質分解酵素の候補遺伝子を高発現用のベクターにクローニングした遺伝子発現用ベクターを個別に作製し、タンパク質発現用大腸菌コンピテントセルで形質転換することで組換え酵素の高発現系を構築した。組換え酵素はニッケルが配位したレジンを利用したアフィニティークロマトグラフィー法により精製し、透析によるバッファー交換および限外濾過フィルターにより濃縮後に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製酵素のサイズと純度を明らかにした。

(3) 精製酵素の活性測定および生化学的諸性質の解明

精製した各組換え酵素の活性測定は、基質となる化合物（抗生物質や微生物間コミュニケーション物質）を各酵素と反応させ、その分解産物をガスクロマトグラフィー質量分析法および高速液体クロマトグラフ法により検出・同定することにより評価した。加えて、組換え酵素の機能評価は、微生物間コミュニケーション物質の存在下で紫色色素や緑色蛍光タンパク質を生産するセンサー微生物を用いたバイオアッセイにより評価した。さらに、 β -ラクタム系抗生物質に対する耐性能は、各組換え酵素を高発現する組換え大腸菌に対して、定法に倣いペーパーディスク法や最小生育阻止濃度を測定することで評価した。活性が確認された酵素に関しては、それらの生化学的特徴を明らかにするため、各種組換え酵素の至適温度や至適 pH、阻害剤の影響等を解析するとともに、既存の類縁酵素とこれらの特徴を比較することで新規性を明らかにした。

(4) 変異体酵素の作製と基質特異性決定メカニズムの解析

in silico 解析により、各種酵素の三次元立体構造モデリングおよび酵素と反応基質とのドッキングシミュレーションを実施し、基質認識部位を推定するとともにアミノ酸変異導入部位を設計した。テンプレートとなる関連酵素の三次元立体構造情報は Protein Data Bank のデータベースから入手した。次に、上記の解析により推定した酵素の基質認識部位を構成するアミノ酸を置換した変異酵素をデザインし、(2)で示した方法により大腸菌を宿主にした各種組換え酵素の高発現系を構築し、アフィニティークロマトグラフィー法により精製した変異体酵素を調整した。同様に、調整した変異体酵素は(3)で示した方法により活性を評価し、野生型酵素と活性および基質特異性の違いを比較解析した。

4. 研究成果

まずは、 β -ラクタム系抗生物質分解酵素をコードする候補遺伝子の選抜を実施した。候補遺伝子の選抜方法としては「多剤耐性能と微生物間コミュニケーションを遮断する能力を併せ持つ細菌の中には、両機能性の β -ラクタム系抗生物質分解酵素を持つ細菌がいるのではないか」との仮説のもと、既に分離に成功している複数のアシル化ホモセリンラクトンに対して分解能を有する β -ラクタム系抗生物質耐性菌 (Kusada et al., *Appl Environ Microbiol*, 2017; Kusada et al., *Front Microbiol*, 2019) のゲノム情報、または世界各国の医療現場から分離されている多剤耐性病原菌由来のゲノム情報や環境ゲノム情報をもとに、各種配列解析ツールを活用したドメインサーチとホモロジーサーチを実施し、候補遺伝子の絞り込みを行った。これら候補遺伝子は、特に世界中の医療現場で問題となっている多剤耐性の *Pseudomonadota* 門細菌 (中でも *Betaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱に属する細菌) 由来の遺伝子を中心に選抜を行い、実際に既知の β -ラクタム系抗生物質分解酵素に有意な相同性を示し、且つ本酵素ファミリーに特徴的なモチーフやドメイン構造を保持する候補配列を複数見出した。また、分子系統解析手法を用いて既知の β -ラクタム系抗生物質分解酵素群と比較解析を実施し、候補配列の系統的位置や新規性を明らかにした。次に、選抜した各候補遺伝子を高発現用ベクターにクローニングした発現用ベクターを作製し、大腸菌を宿主とした組換え酵素の高発現系を構築することに成功した。さらに、タンパク質の精製手法に関して各種の条件検討を実施し得られた知見・ノウハウを駆使することで、各種精製組換え酵素を複数獲得することにも成功している。

次に、精製した各種 β -ラクタム系抗生物質分解酵素の活性測定および生化学的諸性質の解明を実施した。ガスクロマトグラフィー質量分析法と高速液体クロマトグラフ法による分解産物の解析結果から、精製した組換え酵素が β -ラクタム系抗生物質と微生物間コミュニケーション物質を同時に分解可能である両機能性を有することを明らかにした。また、これら組換え酵素が真に微生物の抗生物質耐性能と微生物間コミュニケーション機構の遮断という 2 つの微生物機能に寄与するかを詳にするため、バイオアッセイにより評価を実施した。その結果、本酵素を高発現する組換え大腸菌はコントロールとなる酵素非生産の大腸菌と比較して有意な抗生物質耐性を示した。さらに、微生物間コミュニケーション物質存在下で紫色色素や緑色蛍光タンパク質を生産する微生物センサーを用いたバイオアッセイにより、精製した新規酵素が微生物間で使用されるシグナル物質をも分解することで微生物機能 (色素や蛍光タンパク質の生産能) を遮断することを明らかにした。

最後に、両機能性酵素の基質認識に関わる分子メカニズムの解明に迫るため、*in silico* による三次元立体構造モデリングとドッキングシミュレーションを実施し、基質認識部位を推定するとともにアミノ酸変異導入部位を設計した。実際に基質認識部位に関わると推定したアミノ酸に変異を導入した変異酵素では、野生型酵素と比較して基質特性に一部違いが見られており、現在は詳細な解析を進めている。以上のように、遺伝子発現系から組換え酵素の機能評価までの一連の研究プラットフォームを構築することで、 β -ラクタム系抗生物質分解に関わる重要な酵素の新たな機能の一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kusada Hiroyuki、Morinaga Kana、Tamaki Hideyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Bile Salt Hydrolase and Bile Salt Resistance in a Probiotic Bacterium <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131T	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1011 ~ 1011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9051011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kusada Hiroyuki、Arita Masanori、Tohno Masanori、Tamaki Hideyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Isolation of a Highly Thermostable Bile Salt Hydrolase With Broad Substrate Specificity From <i>Lactobacillus paragasseri</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 810872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.810872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kusada Hiroyuki、Arita Masanori、Tohno Masanori、Tamaki Hideyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Bile salt hydrolase degrades β -lactam antibiotics and confers antibiotic resistance on <i>Lactobacillus paragasseri</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 858263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.858263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morinaga Kana、Kusada Hiroyuki、Tamaki Hideyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Bile Salt Hydrolases with Extended Substrate Specificity Confer a High Level of Resistance to Bile Toxicity on Atopobiaceae Bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10980 ~ 10980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231810980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草田裕之、有田正規、遠野雅徳、玉木秀幸
2. 発表標題 胆汁酸耐性と抗生物質耐性をもたらす乳酸菌由来両機能性酵素の発見
3. 学会等名 日本細菌学会第15回若手コロッセウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草田裕之
2. 発表標題 微生物間相互作用が切り開く抗生物質研究の新展開
3. 学会等名 日本細菌学会第91回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 草田裕之、有田正規、遠野雅徳、玉木秀幸
2. 発表標題 胆汁酸分解と抗生物質耐性に関わる両機能性酵素によるプロバイオティクス
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 草田 裕之, 玉木 秀幸	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本生物工学誌	5. 総ページ数 4
3. 書名 微生物間相互作用の遮断と抗生物質耐性を紐付ける未知微生物群ならびに両機能性酵素の発見	

1. 著者名 草田 裕之, 玉木 秀幸	4. 発行年 2022年
2. 出版社 月刊バイオインダストリー誌	5. 総ページ数 8
3. 書名 耐熱性プロバイオティクス乳酸菌由来の新規な耐熱性胆汁酸塩加水分解酵素の発見	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------