

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590512

研究課題名(和文) 緑膿菌の多剤耐性化プロセスに着目した新規制御法の構築

研究課題名(英文) Development of new bacterial control system

研究代表者

間世田 英明 (Maseda, Hideaki)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10372343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在まで感染症の制御は、殺菌を主体に行われてきた。しかし、殺菌剤の利用とともに耐性菌が出現し、大きな社会問題となっている。現時点で全ての抗生物質や消毒剤の利用を制限することは難しく、消毒剤を利用しながらも耐性株を出さない制御法が確立されれば、人類に対する貢献度は計り知れない。そこで本研究では、多剤耐性化プロセスを明らかにし、それを抑制することで、耐性菌そのものを出さない制御法の確立を目指し、研究を行った。緑膿菌の耐性化に必須となる遺伝子およびタンパク質も同定に成功し、新たな耐性菌制御に向けた大きな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：An infection control has been carried out mainly on sterilization up to now. But as using many bactericide and antibiotics, many kinds of resistant bacteria appear and it is big social problem. It is so difficult to restrict use of all antibiotics and if the control method out of which a multi-drug resistant strain isn't taken is established, the contribution to the human race is immeasurable. So I tried to make the process clear and by restrain that process, embarking on an effort to establish new control method out of which resistant bacteria doesn't take. As a result, I identified the genes and the proteins that are indispensable to tolerization of bacteria and showed some big knowledge for establishment of new control system of resistant bacteria.

研究分野：細菌学

キーワード：多剤耐性菌 efflux pump Pseudomonas

1. 研究開始当初の背景

新興・再興感染症がしばしば新聞紙上を賑わし、効果的な対応策の開発が世界中で望まれている。その感染症の治療を難しくしている問題に、過去 50 年に及ぶ抗生物質の多用の結果として出現してきた(薬の効かない)交叉薬剤耐性菌の存在がある。その中でも、特に薬剤排出ポンプの発現に伴う交叉薬剤耐性菌の出現は重篤で、この様な菌は構造的にも作用的にも異なる多種の抗生物質を排出し、人類が見出してきた様々な抗生物質を一瞬にして無力なものにしてしまっている。そこで感染症を制御するためには、耐性株が出現してしまうような従来型の殺菌・静菌に基づく抗生剤ではなく、新たなコンセプトの薬の開発が急務とされ、最近では病原菌を殺すのではなく、その毒性そのものを抑制する薬、Quorum-sensing 抑制剤の開発が進められてきた (Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 等)。代表者も耐性菌の制御を目指し、その様な薬の開発を試みた。その結果、昨年までに数種類の阻害剤の開発に見事に成功し、特許を出願するところまで漕ぎ着けた。その阻害活性は、毒性発現を約 90%まで抑制するものであり、既存の効果の高い阻害剤と全く遜色ないものであった。しかし、作用濃度や毒性等の問題から代表者のものを含め残念ながら実用に耐え得るものはまだ開発されていない。更なる異なるコンセプトの薬の開発が求められている。そんな中、代表者は、緑膿菌の多剤耐性株の耐性機構を調べている際、緑膿菌の多剤耐性が、MexEF-OprN 薬剤排出ポンプの調節遺伝子のゲノムでの出現にあるといった極めてユニークな現象を申請者は見出した。この出現を抑えることができれば、緑膿菌の多剤耐性菌の出現を軽減でき、新しいコンセプトである“耐性株を出さない微生物制御法”を提案・開発することができる。これは、従来の耐性株の耐性要因に着目した耐性株の制御法ではなく、耐性株の出現プロセスの阻害による感染菌の制御を可能するものである。むろん現在まで、耐性株の出現プロセスそのものを明らかにした例は皆無であり、抑制する薬の開発も行われていない。

2. 研究の目的

現在まで感染症の制御は、殺菌を主体に行われてきた。しかし、殺菌剤(抗生物質や消毒剤)の利用とともに耐性菌が出現し、大きな社会問題となっている。現時点で全ての抗生物質や消毒剤の利用を制限することは難しく、消毒剤を利用しながらも耐性株を出さない制御法が確立されれば、人類に対する貢献度は計り知れない。従来、耐性菌の解析は、その耐性機構の解明が主で、“どのような機構で耐性菌が出現するのか”、その耐性化のプロセスに着目して研究を進めたものは存在しない。そこで本研究では、モデル微生物として容易に多剤耐性化を起こし臨床現場で常に問題となっている緑膿菌を用いて、緑膿菌の耐性化の過程を詳細に解析し、耐性化に必須となる遺伝子およびタンパク質を同定し、その阻害剤、つまりは耐性化の阻害剤 or 抑制剤を開発することを目的・目標としている。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子の出現に関与する遺伝子、タンパク質の同定

ヌクレオチドの欠失が起きることにより、緑膿菌は調節タンパク質を発現し、薬剤を細胞外へ排出するトランスポーターを亢進することで、多剤耐性化する。また、この現象を大腸菌でも再現することができた。そこで、このヌクレオチドの欠失を起こすのに係わる遺伝子の同定を、大腸菌の全遺伝子の網羅的欠失株 Keio collection を利用し行う。

(2) 候補遺伝子破壊緑膿菌の作成

(1)で候補に挙がったヌクレオチドの欠失に関与する遺伝子を緑膿菌ゲノム上で破壊し、その破壊株での耐性株の出現効率を測定する。これにより、ヌクレオチドの欠失の効率に影響を与える遺伝子を更に絞り込むことができると考えられる。ノックアウト出来ない場合は、強発現によりその関与遺伝子を決定していく。

(3) マイクロアレイによるクロラムフェニコールで高発現する遺伝子の同定

目的遺伝子が生育に必須な場合は、ノックアウト法である上述の(1)(2)では目的遺伝子の取得することはできない。そこで、マイクロアレイを用いた関与遺伝子の同定も試みる。すなわち、申請者は、薬剤の種類によりヌクレオチドの欠失の効率が異なり、薬剤排出トランスポーターの良い基質ほどその効率が高いという知見を既に得

ている。つまり、その条件下では、ヌクレオチドの欠失に関する遺伝子の発現は励起しているものと考えられる。そこで、最も効率の高かった抗生物質クロラムフェニコールで親株を処理し、未処理の細胞と遺伝子の発現パターンをマイクロアレイを用いて比較検討し、処理後に大きく発現してくる遺伝子の同定を行う。

(4) ターゲット DNA への変異の導入と欠失効率
緑膿菌の耐性変異株ではヌクレオチドの欠失によって、調節遺伝子が出現し耐性化している。その欠失されている部位には、特異的な配列が存在する。そこで、どの程度の特異配列が必要かを、DNA に変異を導入し検討する。

4. 研究成果

- (1) 大腸菌の一遺伝子破壊ライブラリー約 4000 株にアッセイプラスミドを導入し、ヌクレオチドの欠失に関わる因子の取得を行ったところ、欠失に必要な因子を同定することができた。
- (2) (1)の因子は、各の生物にそのホモログが存在していることが Blast サーチにより明らかになった。そこで、緑膿菌のそのホモログの人為的破壊を試みたところ、緑膿菌で破壊することはかなわなかった。
- (3) (1)で因子の同定に成功したことから、当初の計画通り、アレイでの検討は行わなかった。
- (4) 変異を導入し、ヌクレオチドの欠失に必要な配列・領域を決定したところ、完全なダイレクトリポートであることが必要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 13 件)

Akihiro Shirai, Toshiyuki Endo, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa :
Synthesis of thiazole derivatives and evaluation of their antiamebic activity and cytotoxicity, *Biocontrol Science*, Vol.18, No.4, pp.183--191, 2013. 査読有り

Tomohiro Inaba, Yuta Tokumoto, Yusuke Miyazaki, Naoyuki Inoue, Hideaki Maseda, Toshiaki Nakajima-Kambe, Hiroo Uchiyama and

Nobuhiko Nomura :

Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74.,

Applied and Environmental Microbiology, Vol.79, No.22, pp.7082--7090, 2013. 査読有り

Akihiro Shirai, Yasuko Fumoto, Tomoaki Shouno, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa :

Synthesis and biological activity of thiazolyl-acetic acid derivatives as possible antimicrobial agents,

Biocontrol Science, Vol.18, No.2, pp.59--73, 2013. 査読有り

Hideaki Maseda, Hisaharu Kusaka, Makoto Yamane, Toshiaki Isaka, Kazuhiko Tsutsumi and Shinichi Tebayashi :

Endophytic bacterial diversity in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) canes by 16S rDNA sequence analysis,

Journal of Bioindustrial Science, (URL: <http://journalvista.com/JBS/>) Vol.2, No.1, pp.8--11, 2013. 査読有り

Uwate Maki, Ichise Yu-ki, Akihiro Shirai, Takeshi Omasa, Nakae Taiji and Hideaki

Maseda :

Two routes of MexS-MexT-mediated regulation of MexEF-OprN and MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*,

Microbiology and Immunology, Vol.57, No.4, pp.263--272, 2013. 査読有り

Hideaki Maseda, Kazuya Shimizu, Yoshiaki Doi, Yuhei Inamori, Motoo Utsumi, Norio Sugiura and Michihiko Kobayashi :

MiR located in the inner membrane is essential for initial degradation of microcystin in *Sphingopyxis* sp. C-1,

Journal of Japan Biological Society of Water and Waste, Vol.48, No.3, pp.99--107, 2012. 査読有り

Kazuya Shimizu, Hideaki Maseda, Kunihiro Okano, Takumi Kurashima, Yukio Kawauchi, Qiang Xue, Motoo Utsumi, Zhenya Zhang and Norio Sugiura :
Enzymatic pathway for biodegrading microcystin LR in *Sphingopyxis* sp. C-1.,
Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.114, No.6, pp.630--634, 2012. 査読有り

Akihiro Shirai, , Hideaki Maseda, Hiroki Kourai and Takeshi Omasa :
Action of reactive oxygen species in the antifungal mechanism of gemini-pyridinium salts against yeast,
Biocontrol Science, Vol.17, No.2, pp.77--82, 2012. 査読有り

Uwate Maki, Ichise Yu-ki, Kayama Shizuo, Akihiro Shirai, Miyake Yoichiro, Takeshi Omasa, Nakae Taiji and Hideaki Maseda :
Functionalization of MexT Enhances MexEF-OprN Expression to Overcome Its Repression by MvaT in *Pseudomonas aeruginosa*,
Journal of Bioindustrial Science, (URL: <http://journalvista.com/JBS/>) Vol.1, pp.10--14, 2012. 査読有り

Hideaki Maseda, Doi Yoshiaki, Okano Kunihiro, Sugiura Norio and Kobayashi Michihiko :
Rapid and high efficiency transformation of *Sphingomonas* and *Sphingopyxis* by electroporation using frozen cell suspensions,
Journal of Bioindustrial Science, Vol.1, pp.1--4, 2012. 査読有り

Jieming Li, Kazuya Shimizu, Hideaki Maseda, Zhijiang Lu, Motoo Utsumi, Zhenya Zhang and Norio Sugiura :
Investigations into the biodegradation of microcystin-LR mediated by the biofilm in wintertime from a biological treatment facility in a drinking-water treatment plant,
Bioresource Technology, Vol.106, pp.27--35, 2012. 査読有り

Shimizu Kazuya, Hideaki Maseda, Okano kunihiro, Itayama Tomoaki, Kawaguchi Yukio, Chen Rongzhi, Utsumi Motoo, Zhang Zhenya and Sugiura Norio :
How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity,
Lakes & Reservoirs: Research & Management, Vol.16, pp.169--178, 2011. 査読有り

Hideaki Maseda, Hashida Yumiko, Akihiro Shirai, Takeshi Omasa and Nakae Taiji :
Mutation in the *sdeS* gene promotes expression of the *sdeAB* efflux pump gene and multidrug resistance in *Serratia marcescens*,
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.55, No.6, pp.2922--2926, 2011. 査読有り

(学会発表) (計 4 件)

間世田 英明:
環境および臨床由来緑膿菌の特性比較,
第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会,
2013 年 11 月 7 日, 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市)

間世田 英明:
耐性菌の一生---どこで, どのように生まれ, 淘汰されていくのか?, 第 33 回広島感染症研究会,
2013 年 5 月 24 日, エソール広島 2F 多目的ホール(広島県, 広島市)

間世田 英明:

緑膿菌多剤耐性株における mexS-mexT 遺伝子
による耐性制御,
第 41 回薬剤耐性菌研究会, 31 頁, 2012 年 10
月 26 日, 望川館会議室(岐阜県, 下呂市)

間世田 英明:

緑膿菌多剤耐性株の耐性機構の解析とその性
状,
日本生物工学会 西日本支部 第 2 回講演会,
24 頁, 2012 年 7 月 7 日, 日本生物工学会 西
日本支部 (岡山県, 岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間世田 英明 (MASEDA, Hideaki)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究
部・准教授
研究者番号: 10372343

(2) 研究分担者

大政 健史 (OMASA, Takeshi)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究
部・教授
研究者番号: 00252586