

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658079

研究課題名(和文) ポリアミン取り込み阻害を利用したバイオフィーム形成阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of Inhibitors of Biofilm Formation Using Inhibition of Polyamines

研究代表者

鈴木 秀之 (Suzuki, Hideyuki)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・教授

研究者番号：10202136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌のバイオフィーム(BF)形成にスベルミジンが必須であることを示した。スベルミジンアセチルトランスフェラーゼを欠失させた株で、培地にスベルミジンを添加すると、スベルミジンはアセチルスベルミジンに代謝されないため、菌体内のスベルミジン濃度が上昇し、それに伴ってBF形成量も増大した。スベルミジンを合成できない株で、スベルミジンインポーターPotABCDを欠失した株が、スベルミジンを取り込み、それをプロレスシントランスポーターとされていたPotFGHIがになっていることを明らかにした。さらにスベルミジンだけでなくPotDタンパク質が存在することがBF形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路感染症やカテーテルを介した感染において病原菌がバイオフィームを形成すると難治性に陥りやすく、バイオフィーム形成を阻害する薬剤は重要である。本研究成果は、バイオフィーム形成を阻害する薬剤開発のターゲットとしてPotDタンパク質が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have shown that spermidine is essential for E. coli biofilm formation. In a strain lacking spermidine acetyltransferase, when spermidine was added to the medium, spermidine was not metabolized to acetylspermidine, so that the concentration of spermidine in the cells increased, and the amount of biofilm formed increased accordingly. It was revealed that a strain that could not synthesize spermidine and lacked the spermidine importer PotABCD took up spermidine and became PotFGHI, which was considered to be a spermidine transporter. Furthermore, it was clarified that the presence of PotD protein as well as spermidine is essential for biofilm formation.

研究分野：農学

キーワード：ポリアミン プロレスシン スベルミジン 大腸菌 バイオフィーム トランスポーター

様式 C-19、F-19、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌には、バイオフィームを形成することにより、抗生物質や生体防御機構から免れ、難治性感染症を引き起こすものが知られている。そこで、細菌のバイオフィームの形成を特異的に阻害する選択毒性の高い医薬が囑望されている。

2. 研究の目的

ポリアミンがバイオフィーム形成に重要であることが報告されていた。しかし、ポリアミンはヒトの細胞増殖に必須であり、ポリアミンの合成阻害剤は選択毒性がなく、医薬として用いることはできない。研究代表者らは、「ポリアミンがバイオフィーム形成に関与するクオラムセンシングのシグナル伝達物質であるオートインデューサーとして機能しているのではないか」という仮説をたてている。そこで、ポリアミンをオートインデューサーとして取り込む大腸菌のポリアミントランスポーターを特定し、大腸菌をモデルにそのトランスポーターの特異的阻害剤を化合物ライブラリーから選抜することを目的として研究を行った。ヒトは細菌のポリアミントランスポーターと相同性の高いトランスポーターを持っていないことから、このトランスポーター阻害剤は選択毒性の高いバイオフィーム形成阻害剤として、医薬のリードとなることが期待される。

3. 研究の方法

ポリアミンの測定

陽イオン交換樹脂を充填した TSKgel Polyaminepak (4.6 X 50 mm, 東ソー) カラムを装着した HPLC (LC-20A, 島津製作所) でポリアミンを分離し、ポストカラム法により *o*-フタルアルデヒドで修飾し、励起波長 340 nm、蛍光波長 470 nm に調節した蛍光検出器で発生した蛍光強度を測定し、定量した。

バイオフィームの形成実験

M9 0.2%ガラクトース培地で 37°C, 140 min⁻¹ で 1 晩振盪培養した。25°C で集菌し、培地を捨てた後、M9 0.2%ガラクトース培地に再懸濁した。本培養開始時の Abs₅₉₀ = 0.05 となるように M9 0.2%ガラクトース培地で希釈し、Polystyrene 製のマイクロプレートのウェルに 100 μL ずつ植菌し (8 連)、30°C で 24 時間、静置培養した。

バイオフィーム量の測定

マイクロプレート内で 24 時間培養後、上清を別のマイクロプレートに移し、培養液の吸光度 (Abs₅₉₀) をプレートリーダー (VERSAmix, Molecular Devices) を用いて測定した。培養に用いたマイクロプレートに付着したバイオフィームを 0.1% クリスタルバイオレットで染色、PBS で洗浄したのち、バイオフィームをエタノール : アセトン (= 4:1) の混合液で溶解し、溶解液の Abs₅₉₀ を測定した。

4. 研究成果

どのポリアミンがバイオフィーム形成に重要か

プトレッシン、カダベリンの合成遺伝子 (それぞれ、*speAB*, *C*, *F* と *cadA*, *ldcC*) を欠失したポリアミン合成欠損株を作成し、この菌株を、最少培地、最少培地にプトレッシン、カダベリン、スペルミジンそれぞれ添加した培地を用いてバイオフィーム形成量を比較した。

いずれの場合も、培地に添加したポリアミンが菌体内に観察され、プトレッシン添加時にはスペルミジンも観察された。一方、バイオフィームの形成はプトレッシンあるいはスペルミジンを添加した場合にのみ、見られた。プトレッシンがバイオフィーム形成を促進しているのか、取り込まれたプトレッシンから菌体内で合成されたスペルミジンがバイオフィーム形成を促進しているのか判断できない。

そこで、上記の変異に加え、プトレッシンからスペルミジンを合成するスペルミジンシンターゼの遺伝子 (*speE*) 欠失を上記の菌株に導入した。この株をプトレッシン添加条件で培養すると、菌体内のプトレッシン濃度は上昇したがスペルミジンは検出されず、バイオフィーム形成も見られなかったことから、スペルミジンのみが、バイオフィーム形成を促進できると結論づけた。

mdtJ +/- の違いによるバイオフィーム形成量の比較

MdtJI はスペルミジンエキスポーターであると報告されている。そこで、野生株に *mdtJ* 欠失を導入した。培地にスペルミジンを添加した場合の菌体内スペルミジン量とバイオフィーム形成量を MdtJ +/- 株で比較したが、違いは見られなかった。少なくともバイオフィーム形成条件下では MdtJI は働いていないのではないかと考えられた。

スペルミジンアセチルトランスフェラーゼとグルタチオニルスペルミジンシンセターゼ/アミダーゼのバイオフィーム形成に及ぼす影響

前述のようにバイオフィーム形成にスペルミジンが必須であることが分かった。大腸菌は菌体内濃度が高くなりすぎた際には、その生合成を抑えるとともにスペルミジンをアセチル化して不活化することが知られている。また、スペルミジン濃度の調節機能としてグルタチオンと結合させグルタチオニルスペルミジンを合成したり分解したりすることが知られている。*speA, B, C, F* 遺伝子欠失株をさらにこれらの酵素の遺伝子である *speG* と *gss* を欠失にした株を作成し、培地にスペルミジン添加、無添加条件下でバイオフィーム形成実験を行った。*speG*⁺株では菌体内にスペルミジンとアセチルスペルミジンが観察され、バイオフィーム形成が見られた。一方、 Δ *speG* 株では *gss*⁺に関わらず、著しいスペルミジンの蓄積が見られ、バイオフィーム量が顕著に増大した。バイオフィーム生成条件下では *Gss* は機能しておらずもっぱら *SpeG* によって菌体内のスペルミジン濃度を調節しており、*speG* 欠失により菌体内のスペルミジン濃度が上昇するとバイオフィーム形成量も上昇することが分かった。さらに、菌体内のスペルミジン濃度が上昇しても菌体外からのスペルミジンの取り込みに制御がかからないことも分かった。

スペルミジントランスポーター欠失の影響

speA, B, C, E 遺伝子欠失株にスペルミジントランスポーターの遺伝子 *potABCD* の欠失を導入し、培地にスペルミジン添加、無添加条件下でバイオフィーム形成実験を行った。培地にスペルミジンを添加した場合、驚いたことに Δ *potABCD* 株も *potABCD*⁺株と同程度のスペルミジンを菌体内に取り込んでいた。しかし、*potABCD*⁺株でのみバイオフィームの形成が見られた。

Δ potABCD 株においてスペルミジンを菌体外から取り込むトランスポーターについて

speA, B, C 遺伝子欠失で、さらに Δ *potABCD* とこれまでに明らかになっているプトレッシンインポーター5種類の内いずれか1つを除いてすべてを欠失した株を作成して、スペルミジン添加、無添加条件下でバイオフィーム形成実験を行った。*PotFGHI* だけが+の株が、*PotABCD* だけが+の株と同程度のスペルミジンを菌体内に蓄積していた。*PotFGHI* はプトレッシンに特異的なトランスポーターであるとされていたので、*PotFGHI* がスペルミジンも取り込むことは新しい知見である。しかし、*PotFGHI* だけが+の株はバイオフィームを形成しなかった。このことから、バイオフィーム形成には単に菌体内にスペルミジンが存在している以外に *PotABCD* のタンパク質が必要であることが示唆された。

speAB, C, F, cadA, ldcC 株でかつ Δ *potD* となった株を作成した。*potD* 遺伝子は *potABCD* オペロンの最後の遺伝子であり、この Δ *potD* は *PotC* まだが発現するように設計されている。*PotD* はスペルミジントランスポーターのペリプラズミックバインディングタンパク質であるが、他の遺伝子の制御も担っているのではないかと報告されている。メカニズムは不明であるが、*PotD* タンパク質がバイオフィーム形成に重要であることが明らかとなった。

結論

PotD タンパク質に結合して離れなくなるような物質がバイオフィーム形成を強く阻害すると考えられ、そのような物質の検索が必要である。

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 5 件) (全て査読有)

1. K. Thongbhubate, Y. Nakafuji, R. Matsuoka, S. Kakegawa, and H. Suzuki. Effect of spermidine on biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, 203(10), e00652-20 (2021). DOI: 10.1128/JB.00652-20
2. Y. Terui, S. D. Saroj, A. Sakamoto, T. Yoshida, K. Higashi, S. Kurihara, H. Suzuki, T. Toida, K. Kashiwagi, K. Igarashi. Properties of putrescine uptake by *PotFGHI* and *PuuP* and their physiological significance in *Escherichia coli*. **Amino Acids**, 46(3), 661-670 (2014). DOI: 10.1007/s00726-013-1517-x
3. R. Kibe, S. Kurihara, Y. Sakai, H. Suzuki, T. Ooga, E. Sawaki, K. Muramatsu, A. Nakamura, A. Yamashita, Y. Kitada, M. Kakeyama, Y. Benno, and M. Matsumoto. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. **Scientific Reports**, 4, article number 4548 (2014). DOI: 10.1038/srep04548.
4. S. Kurihara, Y. Sakai, H. Suzuki, A. Muth, O. Phanstiel, and P. N. Rather. Putrescine importer *PlaP* contributes to swarming motility and urothelial cell invasion in *Proteus mirabilis*. **Journal of**

Biological Chemistry, 288(22), 15668-15676 (2013).

DOI: 10.1074/jbc.M113.454090

5. N. Nemoto, S. Kurihara, Y. Kitahara, K. Asada, K. Kato, and H. Suzuki. Mechanism for regulation of the putrescine utilization pathway by the transcription factor PuuR in *Escherichia coli* K-12.

Journal of Bacteriology, 194(13), 3437-3447 (2012). DOI: 10.1128/JB.00097-12

〔学会発表〕 (計 13 件)

1. 掛川苑美、鈴木秀之. 大腸菌におけるバイオフィーム形成とポリアミンの関係. 第3回日本ポリアミン学会年会 (さいたま市民会館おおみや、大宮、1/26/12) .
2. 坂井友美、栗原新、松本光晴、木邊量子、辨野義己、鈴木秀之. 大腸菌をモデル生物としたヒト腸内ポリアミン濃度を調節する手法の確立. 平成24年度日本農芸化学学会大会 (京都女子大学、京都; 3/25/12) .
3. 鈴木秀之、栗原新. モデル生物としての大腸菌のポリアミン代謝. 平成24年度日本農芸化学学会大会 シンポジウム (京都女子大学、京都; 3/25/12) .
4. 栗原新、鈴木秀之、Philip N. Rather、辨野義己. 細菌における細胞外シグナルとしてのポリアミンとそのトランスポーター. 平成24年度日本農芸化学学会大会 シンポジウム (京都女子大学、京都; 3/25/12) .
5. S. Kakegawa, and H. Suzuki. Spermidine is required for biofilm formation in *Escherichia coli*. International Congress on "Polyamines Biological and Clinical Perspectives". Istanbul Kültür University Istanbul, Turkey. September 2nd-7th, 2012.
6. 鈴木秀之、掛川苑美、栗原新. 細菌のポリアミントランスポーターとその生理的役割. 平成25年度日本農芸化学学会大会 シンポジウム (東北大学、仙台; 3/27/13) .
7. 掛川苑美、鈴木秀之. 大腸菌におけるバイオフィーム形成とポリアミンの関係. 「ポリアミンと核酸の共進化」第12回合同シンポジウム (慈恵医大、東京; 11/9/13) .
8. 掛川苑美、鈴木秀之. 大腸菌のバイオフィーム形成に及ぼすプトレッシンインポーター PlaP とスペルミジンの影響. 日本ポリアミン学会. (千葉科学大、銚子; 1/23/14) .
9. 古道紗斗里、鈴木秀之. 大腸菌におけるプトレッシン生産能の向上. 日本ポリアミン学会. (千葉科学大、銚子; 1/23/14) .
10. 栗原新、鈴木秀之、Otto Phanstiel IV、Philip N. Rather. 細菌の細胞外シグナル分子としてのポリアミンとその輸送. 日本ポリアミン学会. (千葉科学大、銚子; 1/24/14) .
11. 古道紗斗里、鈴木秀之. 大腸菌におけるプトレッシン生産法の開発. 2014年度日本農芸化学学会大会. (明治大、生田キャンパス、川崎; 3/30/14) .
12. 掛川苑美、鈴木秀之. 大腸菌におけるバイオフィーム形成とポリアミンの関係. 2014年度日本農芸化学学会大会. (明治大、生田キャンパス、川崎; 3/28/14) .
13. 栗原新、松本光晴、鈴木秀之、辨野義己. 腸内細菌がつくり出すシンビオジェニック因子ポリアミン～その機能と生産最適化～. 2014年度日本農芸化学学会大会、シンポジウム. (明治大、生田キャンパス、川崎; 3/30/14) .

〔図書〕 (計 2 件)

1. H. Suzuki, and S. Kurihara. Polyamine catabolism in prokaryotes. *In Polyamines: A universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism*. Ed. by T. Kusano, and H. Suzuki, *in press*, Springer, Tokyo (2014). [総ページ数未定]
2. S. Kurihara, and H. Suzuki. Bacterial polyamine transporters. *In Polyamines: A universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism*. Ed. by T. Kusano, and H. Suzuki, *in press*, Springer, Tokyo (2014). [総ページ数未定]

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木秀之 (SUZUKI HIDEYUKI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：10202136