

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860294

研究課題名(和文) 創薬を指向した新規バイオフィルム形成阻害物質の作用機序研究

研究課題名(英文) Study on the mechanism of action of novel biofilm inhibitor

研究代表者

奥田 賢一 (OKUDA, Kenichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70624245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌は医療デバイスの表面にバイオフィルムを形成し、難治性感染症の原因となる。本研究では黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を阻害する化合物であるAnti-biofilm compound-JK1 (JK1)の作用機序を解析した。JK1には酸素呼吸を上昇させる活性があり、この活性がバイオフィルム形成阻害に重要であることが示された。さらに、アミノグリコシド系抗菌薬に対する感受性を誘導することが明らかになった。また、JK1は黄色ブドウ球菌の細胞壁分解に関与するLytMと特異的に結合することが明らかになった。変異体を用いた解析により、JK1はLytMの活性中心に結合することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* is involved in chronic medical device-associated infections. In this study, the mechanism of action of anti-biofilm compound-JK1 (JK1), a compound that inhibits biofilm formation by *S. aureus*, was analyzed. It was indicated that JK1 increases oxygen respiration activity of the cells and the activity is important for biofilm inhibition. Furthermore, JK1 increased susceptibility of *S. aureus* to aminoglycosides. It was also revealed that JK1 specifically binds to LytM, which is involved in cell wall turnover of *S. aureus*. Analysis using LytM mutants suggested that JK1 binds to the active center of LytM.

研究分野：細菌学

キーワード：バイオフィルム 黄色ブドウ球菌 低分子化合物 感染症 スクリーニング 細胞壁合成

### 1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、細菌が固体表面または気液界面において形成する構造体である。バイオフィーム形成能を有する細菌は、多糖、タンパク質、核酸、脂質など多様な成分から構成される細胞外高分子複合体であるマトリックスを産生し、それを足場として物質表面への付着や細胞間の結合を行う (Fig. 1)。バイオフィーム形成に起因する感染症はバイオフィーム感染症と呼ばれ、外科、内科、整形外科、泌尿器科など広範囲の診療科で問題となっている。各種医療用カテーテル、ペースメーカー、人工関節等の医療用デバイス表面においてバイオフィームが形成されると、局所における細菌感染はもとより、持続的に排菌が起こることで全身性の感染症へと進行する危険性が高い。また、バイオフィームを形成した細菌は抗菌薬や生体防御機構に対して抵抗性を示すために治療が困難となり、現状では原因となっているデバイスを除去するほかに効果的な治療法は存在しない。バイオフィーム感染症は患者へ多大な負担を与えるだけでなく、治療期間の延長や医療費の増大にもつながる問題であり、根本的な治療法・予防法の開発が急務である。

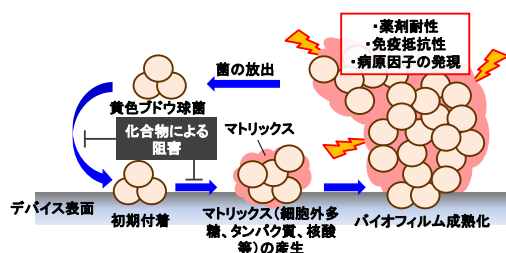


Fig. 1. バイオフィーム感染症

申請者はこれまでに、細菌が生産する抗菌性ペプチドであるバクテリオシンがバイオフィーム感染症の主要な原因菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のバイオフィームを効果的に殺菌することを明らかにしている<sup>2)</sup>。バクテリオシンによる殺菌法は即効性があり、デバイス上で形成されたバイオフィームの殺菌において有効であると考えられる。しかし、バイオフィーム内のすべての細菌を死滅させることはできず、殺菌処理後に数パーセントの細菌が生存するという課題が残された。そこで、バイオフィーム形成を選択的に阻害する低分子化合物を使用したバイオフィーム感染症制御技術の開発を着想した。これまでに、東京大学創薬機構が保有する低分子化合物ライブラリーに含まれる 9600 化合物をターゲットとしたハイスループットスクリーニングを行い、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害する化合物である Anti-biofilm compound (ABC)-JK1 (以下 JK1) を取得した。JK1 はマトリックス構成成分の一つである細胞外多糖の産生と繊維状構造の形成を抑制することが示唆されたが、その詳細な作用機序は不明であった。

### 2. 研究の目的

バイオフィームを形成する細胞の多くは休眠状態にあり、代謝活性は低く保たれている。それゆえ、黄色ブドウ球菌のバイオフィームは代謝活性依存的に作用する抗菌薬の作用から逃れる性質を持つ<sup>3)</sup>。このような性質は薬剤寛容性とも呼ばれ、遺伝的変異による耐性因子の獲得とはメカニズムを異にする細菌の生存戦略である。本研究では、未だ根本的な治療法が確立されていないバイオフィーム感染症に対する画期的な制御技術の開発を目的として、基礎的・応用的研究を展開する。申請者が新たに取得した化合物 JK1 によるバイオフィーム形成阻害機序の解明を行うことで、バイオフィーム感染症治療薬の開発に繋がる重要な情報を得ることを目的とする。また、将来的な臨床応用を見据え、複数の細菌種に対する活性スペクトル、抗菌薬との相乗効果、*in vivo* 感染防御効果を検証する。

### 3. 研究の方法

(1) JK1 によるバイオフィーム形成阻害メカニズムの解析

#### ① トランスクリプトーム解析

JK1 の存在・非存在下でバイオフィームを形成させた黄色ブドウ球菌の菌体からトータル RNA を調製し、マイクロアレイ (Affimatrix : GeneChip) を用いて遺伝子発現プロファイルを取得した。コントロール検体と JK1 処理検体で比較解析を行うことで、JK1 存在下で発現に変化が認められる遺伝子を同定した。同定した遺伝子については、遺伝子発現量の経時変化をリアルタイム PCR により解析した。

#### ② ケミカルプルダウン法による標的分子の同定

ナノ磁性ビーズ (多摩川精機 : FG beads) の表面に JK1 を固定化し、ケミカルプルダウン法による標的分子の同定を行った。JK1 の固定化にはアミンカップリング法を用い、固定化条件の最適化を行った。その後、バイオフィーム条件で培養した黄色ブドウ球菌の細胞抽出画分と相互作用させ、JK1 固定化ビーズと特異的に相互作用する分子を精製した。精製した分子を LC-MS/MS で解析することで、JK1 の標的分子の同定を行った。

#### (2) JK1 の分子作用機序の解明

##### ① 黄色ブドウ球菌遺伝子破壊株の作製

JK1 存在下で発現が変動した遺伝子や JK1 と相互作用を示すタンパク質をコードする遺伝子に関して、黄色ブドウ球菌の遺伝子破壊株を作製し、同定された遺伝子がどの程度バイオフィーム形成に寄与しているかを評価した。遺伝子破壊株の作製には、黄色ブドウ球菌の遺伝子破壊用に開発された pKOR1 システム<sup>4)</sup>を使用した。JK1 の推定標的タンパク質については、大腸菌内での大量発現と

精製を行い、機能を解析した。

## ②構造活性相関研究

東京大学創薬機構が保有する化合物ライブラリー中から JK1 の構造類縁体の提供を受け、バイオフィーム形成阻害活性を評価することで、活性を発揮する上で重要な構造情報を明らかにした。また、化合物の構造的差異が各種の表現型に与える影響についても評価した。

## (3) 臨床応用を見据えた活性および安全性評価試験

### ①JK1 および類縁体の活性スペクトル評価

これまでの研究により、JK1 は Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) を含む複数の黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害することが明らかになっている。バイオフィーム形成阻害における活性スペクトルを評価することは、感染症制御技術としての臨床応用を想定する上で重要である。そこで、バイオフィーム感染症の原因となり得る複数の細菌種（緑膿菌、コレラ菌、大腸菌）に対する JK1 の活性スペクトルを解析した。

### ②抗菌薬感受性に与える影響の評価

細菌はバイオフィームを形成することで種々の抗菌薬に対して高い抵抗性を示すことが知られている<sup>3)</sup>。JK1 はバイオフィーム形成を阻害することから、抗菌薬感受性を向上させる効果を示すことが期待される。種々の抗菌薬の黄色ブドウ球菌に対する最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) を JK1 の存在・非存在下で測定することで、抗菌薬感受性に与える影響を評価した。

### ③カイク感染モデルを使用した *in vivo* 試験

黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成は病原性と関係することが報告されている。*In vivo* において JK1 が黄色ブドウ球菌の病原性に与える影響を、カイク感染モデルを用いて評価した。カイクの背脈管から黄色ブドウ球菌を投与することで感染させ、直後に JK1 を単独あるいは抗菌薬と併せて投与し、生存率を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) JK1 によるバイオフィーム形成阻害メカニズムの解析

#### ①トランスクリプトーム解析

バイオフィーム条件下で 24 時間培養を行った菌体からトータル RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った結果、JK1 存在下において、酸素呼吸に関与する *qox* 遺伝子群の発現が特に上昇することが分かった。また、リアルタイム PCR によって、本遺伝子群の発現が 5~10 倍上昇することを確認した (Fig. 2)。次に、JK1 が他の呼吸鎖遺伝子の発現に与える影響についても評価を行った。

黄色ブドウ球菌の呼吸鎖には *qox* の他にも酸素呼吸に関与する *cyd* や硝酸呼吸に関与する *nar* の存在が知られている。異なる培養時間 (4、8、24 時間) における *qox*、*cyd*、*nar* 遺伝子群の発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、*qox* の発現は 24 時間後においてのみ上昇しており、その他の時間ではコントロールとほぼ同等であった。また、*cyd* の発現はすべての時間でコントロールとほぼ同等であった。一方、*nar* の発現は 4 時間において 3~7 倍上昇しており、その他の時間ではコントロールとほぼ同等であった (Fig. 2)。これらの結果から、JK1 には細胞増殖期によって異なる呼吸鎖遺伝子の発現を上昇させることが明らかとなった。

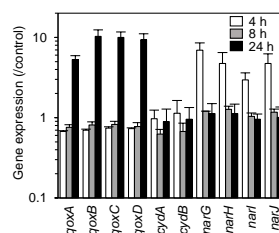


Fig. 2. JK1 存在下における呼吸遺伝子の発現

### ②ケミカルプルダウン法による標的分子の同定

JK1 をビーズ表面にアミンカップリングにより固定化し、標的分子の精製を試みた。ビーズに結合したタンパク質を SDS-PAGE によって解析し、JK1 を固定化ビーズに強く結合するタンパク質のバンドを得た。しかしながら、LC-MS/MS による同定を行ったところ、このタンパク質は黄色ブドウ球菌に由来するタンパク質ではなく、細胞質画分を調製する過程で添加した細胞壁分解酵素リゾスタフィンであった。黄色ブドウ球菌はリゾスタフィンと相同性を示すタンパク質として、同じく細胞壁分解に関与する LytM を保持している。そこで、大腸菌内で大量発現させた LytM を精製して結合試験を行ったところ、JK1 と強く結合することが示された (Fig. 3A)。さらに、LytM の活性中心に変異を導入した LytM 改変体を精製し、同様に結合試験を行ったところ、溶菌活性を示さない LytM 改変体 (Y204N を除く改変体) では JK1 に対する結合性も消失することが分かった (Fig. 3A, B)。これらの結果から、JK1 は LytM の活性中心に結合することが強く示唆された。

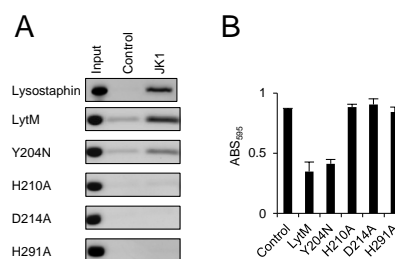


Fig. 3. LytM および変異体の JK1 に対する結合性 (A) と溶菌活性 (B)

## (2) JK1 の分子作用機序の解明

### ①黄色ブドウ球菌遺伝子破壊株の作製

JK1 存在下において発現が上昇した *qox* と *nar* 遺伝子群の破壊株を作製し、それらの表現型を調べた。各破壊株のバイオフィーム形成能および JK1 に対する感受性を調べたところ、ともに野生株と比較して大きな変化は認められなかった。この結果からは、呼吸鎖関連遺伝子の発現上昇とバイオフィーム形成阻害活性には関連がないように思われた。一方で、呼吸活性とバイオフィーム形成阻害活性の関連を示唆する実験結果も得られた。呼吸鎖における電子伝達体である酸化型メナキノン (MK) を培地に添加すると、濃度依存的にバイオフィーム形成阻害活性が阻害された (Fig. 4A)。また、フローサイトメーターを用いた呼吸活性の測定により、JK1 存在下において呼吸活性が上昇すること、MK を併せて添加することにより低下することが分かった (Fig. 4B)。よって、JK1 による呼吸活性の亢進はバイオフィーム阻害活性を発揮する上で重要であることが示唆された。呼吸鎖遺伝子の破壊株に対して JK1 が活性を示すメカニズムは未だ不明だが、利用可能な呼吸鎖の発現を上昇させることで呼吸活性を上昇させている可能性が考えられる。

JK1 の推定標的分子である *LytM* についても遺伝子破壊株を作製し表現型を解析した。*lytM* 破壊株は野生株と同等のバイオフィーム形成能を有し、バイオフィーム形成は野生株同様に JK1 によって阻害された。よって、*LytM* との結合は JK1 によるバイオフィーム形成阻害に直接関与するものではないと考えられた。細胞壁分解酵素である *LytM* はペプチドグリカンの Gly-Gly 間の結合を切断することが報告されている<sup>5)</sup>。よって JK1 は細胞合成に何らかの刺激を与え、それによりバイオフィーム形成の低下が誘導される作用機序が示唆された。

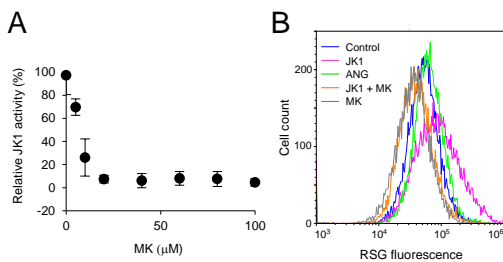


Fig. 4. MK が JK1 のバイオフィーム形成阻害活性 (A) と呼吸亢進作用 (B) に与える影響

### ②構造活性相関研究

JK1 の構造類縁体についてバイオフィーム形成阻害活性を調べたところ、構造内のメチル基を欠いた類縁体 (ANG) では活性が消失することが明らかとなった。また ANG の存在下においては呼吸鎖遺伝子の発現上昇や呼吸活性の亢進は見られなかった。JK1 が活性を発揮する上で重要な構造の情報を得ることができた。

## (3) 臨床応用を見据えた活性および安全性評価試験

### ①JK1 および類縁体の活性スペクトル評価

JK1 は使用したすべての黄色ブドウ球菌 (8 株) と表皮ブドウ球菌 (2 株) のバイオフィーム形成を阻害し、ブドウ球菌属に対して幅広い活性スペクトルを有していることが明らかになった。一方で、ANG は活性黄色ブドウ球菌 1 株に弱い活性を示したもののその他の株には活性を示さなかった。グラム陰性菌である緑膿菌、コレラ菌、大腸菌のバイオフィームに対する形成阻害効果を調べたが、いずれに対しても JK1 は活性を示さなかった。

### ②抗菌薬感受性に与える影響の評価

JK1 の存在・非存在下で黄色ブドウ球菌に対する抗菌薬の MIC を測定し、JK1 が薬剤感受性に及ぼす影響を調べた。その結果、JK1 存在下ではアミノグリコシド系抗菌薬に対する感受性が大きく上昇した (Table 1)。アミノグリコシド系抗菌薬は呼吸活性によって形成されるプロトン駆動力依存的に細菌の細胞内に取り込まれ殺菌的に作用することが分かっている。JK1 存在下において呼吸活性が亢進することにより、プロトン駆動力が形成され、アミノグリコシドに対する感受性上昇につながったものと考えられる。

Table 1. JK1 が抗菌薬感受性に与える影響

	MIC (μg/ml)			
	Control	JK1	ANG	
アミノグリコシド	Gentamycin	16	2	8
	Neomycin	64	8	16
	Kanamycin	64	8	32
Ampicillin	1	0.25	0.25	
Oxacillin	1	0.5	0.5	
Cefazolin	1	0.5	1	
Cefmetazole	2	2	2	
Cefotaxime	4	2	2	
Fosfomycin	32	32	16	
Erythromycin	0.25	0.125	0.25	
Tetracycline	0.5	0.5	0.5	
Vancomycin	8	4	4	

### ③カイコ感染モデルを使用した *in vivo* 試験

当初の計画では線虫を用いた *in vivo* 試験を行う予定であったが、抗生物質による治療効果を確認できることや、ED50 がマウスとほぼ一致するという利点から<sup>6)</sup>、カイコを使用して *in vivo* における JK1 の効果を評価した。その結果、抗菌薬として使用したゲンタマイシンは感染治療効果を示したが、JK1 に効果は見られなかった。また、JK1 とゲンタマイシンを併用した場合においても治療の相乗効果は認められなかった。*In vivo* での効果が見られなかった理由としては、JK1 の体内動態に問題がある可能性が考えられる。JK1 を活性を保持した状態で物質表面にコーティングすることができれば、カテーテル等の医

療デバイスに抗バイオフィルム活性を付与し、バイオフィルム感染症の予防に応用できるかもしれない。

<引用文献>

1. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8:623-33, 2010
2. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 5572-9, 2013
3. *Nature*, 473:216-20, 2011
4. *Plasmid*, 55, 58-63, 2006
5. *Sci. Rep.* 5:14833, 2015
6. *YAKUGAKU ZASSHI*, 132:79-84, 2012

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)

1. Okuda K, Nagahori R, Yamada S, Sugimoto S, Sato C, Sato M, Iwase T, Hashimoto K, Mizunoe Y: The Composition and structure of biofilms developed by *Propionibacterium acnes* isolated from cardiac pacemaker devices. *Front Microbiol.* 9: 182, Feb. 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00182. 査読有
2. Yoshii Y, Okuda K, Yamada S, Nagakura M, Sugimoto S, Nagano T, Okabe T, Kojima H, Iwamoto T, Kuwano K, Mizunoe Y: Norgestimate inhibits staphylococcal biofilm formation and resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 3: 18, Jul. 2017. doi: 10.1038/s41522-017-0026-1. 査読有
3. 水之江義充, 杉本真也, 奥田賢一: バイオフィルム感染症制圧に向けての展望. *家畜感染症学会誌.* 5(4): 113-120, Dec. 2016. 査読無
4. Sugimoto S, Okuda K, Miyakawa R, Sato M, Arita-Morioka K, Chiba A, Yamanaka K, Ogura T, Mizunoe Y, Sato C: Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Sci Rep.* 6: 25889, May. 2016. doi: 10.1038/srep25889. 査読有
5. Koyama R, Okuda K, Matsushita K, Beppu M, Mizunoe Y: Antimicrobial and antibiofilm effects of ozonated water for prevention and treatment of bone and joint infections. *J. St. Marianna Univ.* 6(1): 1-7, Jun. 2015. doi: 10.17264/stmarieng.6.1. 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 奥田賢一, 山田聡美, 吉井悠, 水之江義充: 黄色ブドウ球菌によるバイオフィルム形成を阻害する低分子化合物の作用機序研究. 第91回日本細菌学会総会. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市) 2018/3/27~29

2. 吉井悠, 奥田賢一, 山田聡美, 永倉茉莉, 杉本真也, 長野哲雄, 岡部隆義, 小島宏建, 岩本武夫, 水之江義充: Norgestimateは黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を阻害し  $\beta$ -ラクタム薬感受性を誘導する. 第91回日本細菌学会総会. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市) 2018/3/27~29
3. 奥田賢一, 吉井悠, 山田聡美, 永倉茉莉, 杉本真也, 長野哲雄, 岡部隆義, 小島宏建, 岩本武夫, 桑野和善, 水之江義充: プロゲスチンの新たな効果の発見—黄色ブドウ球菌に対するバイオフィルム形成阻害と  $\beta$ -lactam系抗菌薬への感受性向上効果. 第134回成医学会総会. 東京慈恵会医科大学 (東京都港区) 2017/10/12~13
4. Okuda K: High-throughput screening of biofilm inhibitors. *Pasteur - Jikei Joint Symposium.* 2017/4/24~26
5. 奥田賢一, 山田聡美, 梶山茉莉, 吉井悠, 長野哲雄, 岡部隆義, 小島宏建, 水之江義充: 黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成阻害物質のスクリーニングと活性評価. 第90回日本細菌学会総会. 仙台国際センター (宮城県仙台市) 2017/3/19~21
6. 奥田賢一: 抗バイオフィルム感染症薬の開発に向けた化合物スクリーニングと作用機序研究. 第4回創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム (平成28年度). 東京都千代田区. 2016/12/7 ※招待公演
7. 奥田賢一: ケミカルバイオロジーによるバイオフィルム形成機構の解明と抗バイオフィルム感染症薬開発に向けた試み. 第1回バイオフィルム研究者若手ワークショップ. 早稲田大学 (東京都新宿区) 2016/7/1
8. 吉井悠, 奥田賢一, 山田聡美, 永倉茉莉, 杉本真也, 長野哲雄, 岡部隆義, 小島宏建, 水之江義充: 黄色ブドウ球菌のバイオフィルムの形成を阻害する低分子化合物の作用機序解析. 第89回日本細菌学会総会. 大阪府大阪市. 2016/3/23~25

[図書] (計1件)

吉井悠, 奥田賢一, 杉本真也: 4-28 鼻咽腔と咽頭の微生物. *食と微生物の事典*. 朝倉書店. 総ページ数 512. 2017

[その他]

東京慈恵会医科大学細菌学講座ホームページ  
([http://www.jikei.ac.jp/academic/course/11\\_saikin.html](http://www.jikei.ac.jp/academic/course/11_saikin.html))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 賢一 (OKUDA, Kenichi)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70624245