

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09535

研究課題名（和文）2成分制御系を中心としたバイオフィーム形成菌における抗菌薬抵抗性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of antibiotic tolerance in biofilm cells, focusing on the two-component regulatory systems

研究代表者

村上 圭史（Murakami, Keiji）

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：10335804

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）：生体内に形成されたバイオフィームは、慢性感染症を引き起こす。この原因として、抗菌薬抵抗性が注目されており、そのメカニズムを解明することを目的として、2成分制御系を中心に研究を行った。

cbrBやphoB欠損株では、バイオフィーム形成後、抗菌薬抵抗性が非常に低下していた。CHIP-seq解析により直接制御する遺伝子を見出そうとしたが、達成することはできなかった。また、環境ストレスにより抗菌薬抵抗性が上昇することが明らかとなり、2成分制御系の関与が示された。緑膿菌はバイオフィーム形成などの環境ストレスにより、抗菌薬抵抗性を獲得し、その中で2成分制御系が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑膿菌バイオフィームによる感染症は、慢性呼吸器感染症をはじめとして、医療の現場では問題となることが多い。現在の治療薬では十分な効果が得られないものの、新たな治療薬の開発の停滞は、世界的にも大きな問題となっており、感染症を取り巻く現状は非常に厳しい。我々の研究はまだ基礎的な段階であるものの、新たな治療薬の創出に向け、これまでになかった薬剤のターゲットが存在することを示唆しており、新規治療薬の開発に大きく貢献することができるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Biofilms formed in the body cause various chronic infections. Antibiotic tolerance has attracted attention as a reason why antibiotics are ineffective. We have reported that two-component regulatory systems also play important roles. To clarify the mechanism of antibiotic tolerance, we focused on the two-component regulatory systems, such as cbrA-B and phoB-R. Compared to the PA01, the cbrB and phoB-deficient mutant showed low antibiotic tolerance in biofilm cells. We attempted to find genes directly controlled by the cbrA-B and phoB-R systems by CHIP-seq analysis, but could not achieve these results in this time. It was also revealed that antibiotic tolerance increased by environmental stress. These results indicate that *P. aeruginosa* acquires antibiotic tolerance due to environmental stresses such as biofilm formation, and that the two-component regulatory systems play an important role in this process.

研究分野：細菌学

キーワード：バイオフィーム 抗菌薬抵抗性 2成分制御系 緑膿菌

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬抵抗性とは遺伝子の変異を伴う耐性菌とは異なり、遺伝子発現の異なる細胞が一時的に抗菌薬の殺菌作用から免れる現象である。単細胞生物である細菌があたかも多細胞生物のように振る舞い、バイオフィームなどの集団の中で一部のもが生き残る非常に高度な生存戦略であると考えられている。しかし、そのメカニズムについてはほとんど明らかになっていない。生体内に形成されたバイオフィームは除去することが困難であり、呼吸器疾患、尿路感染症、副鼻腔炎など様々な慢性感染症を引き起こす。バイオフィーム形成菌に対し、抗菌薬は十分な効果を示さないものの、そこから分離した細菌は、薬剤感受性試験では抗菌薬に対し“感受性”を示すことが知られている。この理由として、長い間バイオフィームの物理的なバリアー効果のためであると考えられて来たが、近年一部の抗菌薬を除き、ほとんどの抗菌薬はバイオフィーム内部に浸透することが明らかとなり、抗菌薬が効かない理由として、抗菌薬抵抗性が注目されている。

これまでに、慢性感染症や難治性感染症の原因となる緑膿菌において、RNA ポリメラーゼ σ 因子、*c-di-GMP* や *psl* 遺伝子が抗菌薬抵抗性に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらに、2成分制御系なども重要な役割を担っていることを報告してきた (K. Murakami*, T. Ono, Y. Noma, I. Minase, T. Amoh, Y. Irie, K. Hirota and Y. Miyake. Explorative gene analysis of antibiotic tolerance related genes in adherent and biofilm cells in *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Chemother, 23 (5), 271-277, 2017)。2成分制御系は、細胞膜に存在するセンサータンパク質と細胞質内に存在するレギュレータータンパク質からなり、細胞外からの環境ストレスなどの刺激を、リン酸化により細胞内に伝達し、標的遺伝子の発現を制御するシステムであり、緑膿菌では69個のセンサーと、89個のレギュレーターの存在が推測されているが、その多くは詳細な機能が明らかとなっていない。今回、この2成分制御系に着目して研究を実施した。

2. 研究の目的

抗菌薬抵抗性メカニズムを解明することを目的として2成分制御系研究を中心にその解析を行った。これまでにトランスポゾン変異株を用いたスクリーニングにより、2成分制御系である *cbrA-B* や *phoB-R* がバイオフィーム形成菌における抗菌薬抵抗性に重要な働きをしていることを報告している。そこで、*cbrA-B* や *phoB-R* 系を中心とした、2成分制御系に着目し、これらの情報伝達経路を明らかにし抗菌薬抵抗性メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) *cbrB*, *phoB* 遺伝子欠損株、相補株の作製とバイオフィーム形成菌における抗菌薬抵抗性の測定

cbrB, *phoB* 遺伝子の in-frame 欠損株を作製し、pJN109 を使用した相補株を作製する。これらの株を使用し、ペグバイオフィームシステムを利用し、バイオフィーム形成菌に、ピアペネムを作用させた後、生存菌数を測定し、抗菌薬抵抗性を測定する。

(2) 抗 CbrB および抗 PhoB ポリクリナル抗体の作製

cbrB, *phoB* 遺伝子を pQE-1 に導入し、His-tag 融合 CbrB および PhoB タンパク質を、大腸菌に発現させる。次に、Ni-Ti カラムを用いて精製を行い、ウサギに免疫し、抗 CbrB および抗 PhoB ポリクリナル抗体を作製する。

(3) CHIP-seq 解析

コロニーバイオフィーム法を用いて、バイオフィームを作製し、得られた菌体を架橋反応によりタンパク質の DNA へのクロスリンクを行い、菌体の溶解後、ソニケーションにより DNA の断片化を行う。その後、抗 CbrB および抗 PhoB 抗体を用いて免疫沈降し、CbrB や PhoB タンパク質と結合している DNA を回収する。精製後、次世代シーケンサーを用いて、DNA の塩基配列を決定し、CbrB および PhoB タンパク質が直接制御する遺伝子を検索する。

(4) 2成分制御系欠損変異株の作成とストレスによる抗菌薬抵抗性

cbrA-B や *phoB-R* 系に加え、*gacS/retS/ladS-gacA*, *wspR-E*, *cpxA-P-R*, *eraR-S*, *copR-S*, *rocA2-S2*, *irlR*, *pprA* などの2成分制御系の欠損変異株を作成し、ペグバイオフィームや加圧に

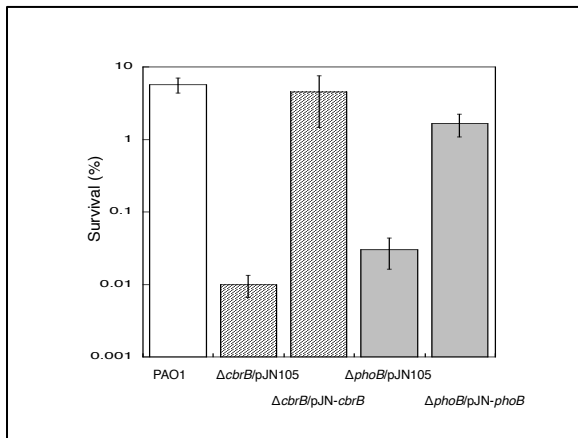
よるストレスによる抗菌薬抵抗性の変化について検討した。

(5) マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

PA01 株を用いて、2 成分制御系に関わる遺伝子について、抗菌薬添加後の遺伝子発現の変動を GeneChip を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) PA01 株と比べ、*cbrB* および *phoB* 欠損株では、バイオフィーム形成後、ピアペネムに 6 時間作用させた後の生菌数は、約 1/1000 程度にとどまり、抗菌薬抵抗性が非常に低下していることが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子の相補株では、生菌数はほぼ親株と同程度まで回復していた。ピアペネム添加前の生菌数は、いずれも親株と同程度であったことから、*cbrB* および *phoB* 遺伝子が、バイオフィームにおける抗菌薬抵抗性に重要な役割を担っていることが確認された。



(2) His-tag 融合 CbrB および PhoB タンパク質の、大腸菌での大量発現に成功し、精製を行った。Ni-Ti カラムを用いた精製では、様々な条件検討を行ったが、完全な単一タンパク質としての精製は困難であった。そこで、SDS-PAGE、CBB 染色後、アクリルアミドゲルから、切り出すことにより、タンパク質を回収した。回収したタンパク質をウサギに免疫し、ポリクロナール抗体を作製した。得られたポリクロナール抗体について、ウェスタンブロッティングを行い、得られたポリクロナール抗体が、CbrB や PhoB タンパク質に反応することを確認した。

(3) コロニーバイオフィーム から回収した緑膿菌について、CHI-Seq 解析を実施した。しかしながら、CbrB および PhoB タンパク質結合 DNA 配列を特定することが出来なかった。CHIP-seq 解析では、多くのステップが存在するため、様々な条件で検討を実施したものの、DNA の回収に成功することが出来なかった。今後はこの抗体を用いて、さらに条件検討を行い、CbrB および PhoB タンパク質が直接制御する遺伝子を解析したいと考えている。

(4) *cbrA-B* や *phoB-R* 系以外の 2 成分制御系に着目し、10 個の in-frame 欠損変異株の作製に成功した。それらの株について、ペグバイオフィーム システムを用いて、バイオフィーム形成後の抗菌薬抵抗性について検討したものの、抗菌薬抵抗性が大きく低下した株は見つからなかった。続いて、加圧ストレスを加えた菌の抗菌薬抵抗性について検討したところ、PA01 株では、ストレスにより、抗菌薬抵抗性が大きく上昇する現象が確認された。そこで、2 成分制御系の欠損変異株について検討したところ、*cbrA-B*、*gacS/retS/ladS-gacA*、*cpxA-P-R* 系が、抗菌薬抵抗性に関与していることが分かった。

(5) マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析では、抗菌薬添加後の 2 成分制御系遺伝子の発現について検討したが、明かに大きく変動した遺伝子を見出すことは出来なかった。今後は、抗菌薬添加後の経時的な変動も含め、詳細な検討を実施する予定である。

以上の結果から、緑膿菌はバイオフィルム形成などの環境ストレスにより、抗菌薬抵抗性を獲得し、その中で2成分制御系が重要な役割を担っていることが明らかとなった。今後さらなる詳細なメカニズムの検討が必要であるが、2成分制御系はバイオフィルム感染症治療薬の開発において、新たなターゲットとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Pahlevi Muhammad Reza, Murakami Keiji, Hiroshima Yuka, Murakami Akikazu, Fujii Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 pruR and PA0065 Genes Are Responsible for Decreasing Antibiotic Tolerance by Autoinducer Analog-1 (AIA-1) in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 773 ~ 773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics11060773	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 Kim Seryoung, Masai Satomi, Murakami Keiji, Azuma Momoyo, Kataoka Keiko, Sebe Mayu, Shimizu Kazuya, Itayama Tomoaki, Whangchai Niwooti, Whangchai Kanda, Ihara Ikko, Maseda Hideaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Characteristics of Antibiotic Resistance and Tolerance of Environmentally Endemic <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1120 ~ 1120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics11081120	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 Mizuki Abe, Keiji Murakami, Yuka Hiroshima, Takashi Amoh, Mayu Sebe, Keiko Kataoka, Hideki Fujii	4. 巻 11
2. 論文標題 Autoinducer Analogs Can Provide Bactericidal Activity to Macrolides in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> through Antibiotic Tolerance Reduction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics11010010	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 M. Azuma, K. Murakami, R. Murata, K. Kataoka, H. Fujii, Y. Miyake and Y. Nishioka	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinical significance of carbapenem-tolerant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolated in the respiratory tract	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 626-626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics9090626.	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 CR. Armbruster, CK. Lee, J. Parker-Gilham, J. de Andra, K. Zhao, K. Murakami, BS. Tseng, LR. Hoffman, F. Jin, CS. Harwood, GC. Wong, MR. Parsek	4. 巻 8
2. 論文標題 Heterogeneity in surface sensing suggests a division of labor in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> populations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLIFE	6. 最初と最後の頁 e45084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.59154.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村上圭史、瀬部真由
2. 発表標題 緑膿菌におけるバイオフィーム形成とその制御
3. 学会等名 第57回緑膿菌感染症研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村田梨菜、村上圭史、藤猪英樹、佐藤雅美、笹田倫子、井上みなみ、平尾早紀、別所将弘、東桃代、櫻井明子、片岡佳子
2. 発表標題 呼吸器感染症患者由来緑膿菌の抗菌薬抵抗性と抗酸化能との関連について
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上圭史
2. 発表標題 緑膿菌における抗菌薬抵抗性のメカニズムとその意義
3. 学会等名 第42回徳島県医学検査学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上圭史、天羽崇、片岡佳子、藤猪英樹
2. 発表標題 緑膿菌における抗菌薬抵抗性と抗酸化能との関連について
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上圭史、藤猪英樹
2. 発表標題 緑膿菌におけるc-di-GMPによるバイオフィーム形成の制御
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上圭史、村田梨菜、土屋浩一郎、片岡佳子、藤猪英樹
2. 発表標題 緑膿菌における抗菌薬添加による酸化ストレスについて
3. 学会等名 第53回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上圭史
2. 発表標題 バイオフィームの制御による治療の可能性
3. 学会等名 第58回緑膿菌感染症研究会（招待講演）
4. 発表年 2024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	天羽 崇 (Amoh Takashi) (00803545)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・特任助教 (16101)	
研究 分担者	藤猪 英樹 (Fujii Hideki) (50356250)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

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