

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590627

研究課題名（和文）緑膿菌の抗菌薬抵抗性獲得機構に関する遺伝子発現ネットワークの解明

研究課題名（英文）Regulatory Network for Expression of Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

小野 恒子（ONO TSUNeko）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40035514

研究成果の概要（和文）：緑膿菌の quorum sensing(QS)遺伝子 *lasR*, *lasI* および定常期シグマ因子 *rpoS* 遺伝子は抗菌薬抵抗性を正に制御しており, Las 系によって誘導される *rpoS* が直接的な発現制御を担っていることが示唆された。PQS-QS 遺伝子 *pqsA*, *pqsE*, *pqsR* および *rpoN* 遺伝子は抗菌薬抵抗性を負に制御しており, さらに PQS 系遺伝子による抵抗性発現抑制は *vqsR* によって負に制御されていることが明らかになった。また, 新たに付着時およびバイオフィーム形成時の抗菌薬抵抗性に影響する遺伝子をそれぞれ 14 および 11 種明らかにした。

研究成果の概要（英文）： It has been suggested that *lasR*, *lasI* and *rpoS* genes of *Pseudomonas aeruginosa* involved in ofloxacin tolerance and the tolerance induced in Las quorum sensing system was regulated by *rpoS* gene. Conversely, *rpoN* gene and PQS quorum sensing genes, *pqsA*, *pqsE*, and *pqsR*, negatively affected the antibiotic tolerance. In addition, we have isolated 14 and 11 mutants decreased antibiotic tolerance in adherent cells and in biofilm cells, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：緑膿菌、バイオフィーム感染症、抗菌薬抵抗性、*rpoS*, *rpoN*, quorum sensing, PQS, c-di-GMP

1. 研究開始当初の背景

口腔レンサ球菌やブドウ球菌, 緑膿菌などの細菌は義歯や人工関節, 人工弁, 尿路カテーテルなどの人工医用デバイスに付着・定着しバイオフィームを形成し, 各種の抗菌薬や生体の免疫機構に抵抗性を獲得し, 易感染宿主に慢性難治性感染症を惹起する。

Biofilm形成能を有する細菌の抗菌薬抵抗性の主たるメカニズムは菌体外に形成される多糖体 glycocalyx によって抗菌薬透過障害と発育速度の遅滞によると考えられていた。しかし我々は glycocalyx 形成前の固相表面に付着しただけの菌においても抗菌薬抵抗性を示し, おそらく細菌は

付着時の何らかのシグナルによって、抗菌薬抵抗性が誘導される可能性が高いことを明らかにしてきた。本研究はBiofilm 形成能が高く、口腔・中耳・副鼻腔等に常在し、呼吸器・耳鼻咽喉腔・尿路系等の慢性疾患を惹起する緑膿菌を用いて、付着時およびその他のストレス下での抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子を検出し抵抗性発現機構を明らかにすることを目的とする。これまでに2種の抗菌薬抵抗性に関与している遺伝子 *tcp* および *psII(bta)* を明らかにし、さらに、*rpoS*, *rpoN* や *pvdS* などストレス応答系のグローバル制御遺伝子もまた抗菌薬抵抗性に関与していることを明らかにしてきた。このようなストレス応答系や quorum sensing 系は多数の遺伝子発現の制御に関わっており、極めて多様な遺伝子間の相互作用が存在していることが判明している。従って、抗菌薬抵抗性の発現は、環境シグナルを感知した細菌が如何なる経路によって、その生存を維持するに至るか、バイオフィーム形成菌のダイナミックなライフスタイルの変換機構に包含されると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオフィーム形成能が高く慢性難治性感染症を惹起する緑膿菌の抗菌薬抵抗性発現機構について、これまで明らかにしているストレス応答系や quorum sensing に関与する遺伝子群の発現制御のネットワークを明らかにし、バイオフィーム感染症の予防と治療法開発への糸口を見いだすことである。

特に環境適応能が高い緑膿菌の抗菌薬抵抗性はライフスタイルの変化を担う遺伝子群が深く関わっていると推察されることから、本研究ではこれまでに知られているグローバル制御系に加えて、付着やバイオフィーム形成時の抵抗性に関与する未知の遺伝子を探索し、より詳細な抵抗性発現機構の解明を目的とした。

さらに、臨床検査の分野においては、臨床的には重要であるにもかかわらず、抗菌薬抵抗性菌の検出は全く行われていない現状から、より有効な抗菌薬投与を行うことを目的とした薬剤感受性検査法への応用を目指したものである。

3. 研究の方法

[抗菌薬抵抗性発現におけるストレス応答系グローバル制御遺伝子間相互関連性]

- ① AHL 系 quorum sensing の抗菌薬抵抗性への関与と *rpoS* との階層性の解析
 - quorum sensing 調節遺伝子 (*lasR*, *rhlR*) および autoinducer 合成酵素遺伝子 (*lasI*, *rhlI*) ノックアウト変異株を作製し、キノロン作用後の生存率 (CFU) を測定
 - *lasR* 変異株に plasmid 上に *rpoS* 遺伝子を挿入し *rpoS* 強制発現株を作成し、キノロン抵抗性発現経路の階層性について解析
- ② PQS quorum sensing と *rpoN* および *vqsR* の

抗菌薬抵抗性に対する相互関連性

- PQS 合成系オペロン遺伝子 *pqsA*, *pqsE*, 制御遺伝子 *pqsR* および *vqsR* 欠失変異株を作製し、抗菌薬抵抗性の解析
- *pqs* 変異による *vqsR* 転写に及ぼす影響を qRT-PCR 法を用いて解析
- *pqs*, *vqsR* および *rpoN* 間の複数の二重欠失変異株を作製し、抗菌薬抵抗性と病原因子発現における相互関連性の解析

[セカンドメッセンジャーと抗菌薬抵抗性]

- ① 環境シグナルを感知し緑膿菌のライフスタイルの変化を担っているセカンドメッセンジャー c-di-GMP の合成能が亢進した株は皺状の小型の集落 (wrinkly small colony variant: WSCV) を形成する。臨床分離株より WSCV を示す株を分離し、キノロンおよびカルバペネム抵抗性の解析。
- ② WSCV を示す株の変異遺伝子を同定し、標準株 PAO1 株由来変異株を作製し、抗菌薬抵抗性への影響を解析。

[ライフスタイルと抗菌薬抵抗性]

- ① 緑膿菌標準株 PAO1 株由来 miniTn5 挿入変異株ライブラリーを作製
- ② 付着時抗菌薬抵抗性低下変異株の分離
 - Tn5 挿入変異株ライブラリーより付着時の抗菌薬に対する抵抗性 (付着時 MBC) が低下した株を探索し、変異部位の塩基配列により、付着時抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子を同定する。
- ③ バイオフィーム形成時抗菌薬抵抗性低下変異株の分離
 - Tn5 挿入変異株を Peg-Biofilm 法によりバイオフィームを形成させた後、抗菌薬に対する抵抗性が低下し Peg バイオフィームの生菌数が減少した株を分離し、変異遺伝子を同定する。

4. 研究成果

[抗菌薬抵抗性発現における副次的 σ 因子および quorum sensing 関連遺伝子間相互関係]

- ① *lasR*, *lasI*, *rpoS* 変異株はいずれもキノロン抵抗性が低下する (図1)。しかし、*lasR* 変異株に *rpoS* 遺伝子を *tacP* 下流に挿入した plasmid を形質転換した株は IPTG により *rpoS* 遺伝子を強発現させることにより、抗菌薬抵抗性が復帰した (図2)。したがって、Las quorum sensing system は *rpoS* を介して抗菌薬抵抗性に導く経路を担っていることが判明した。

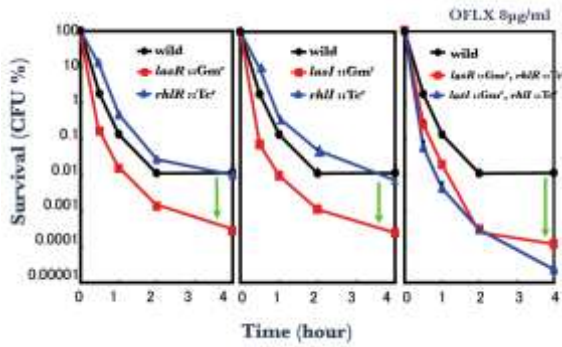


図1. *lasR*および*rhlR*変異株のofloxacin存在下における生存率

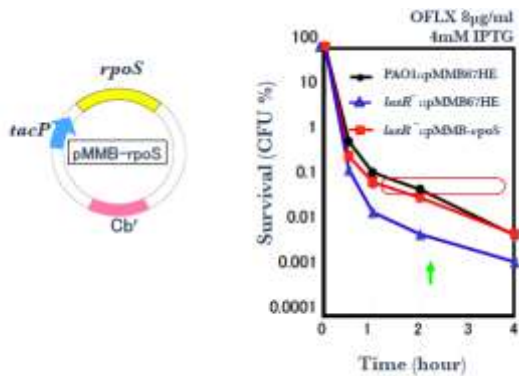


図2. *lasR*変異株における*rpoS*強発現のofloxacin抵抗性に及ぼす影響

② PQS quorum sensing を担う autoinducer 合成系オペロン遺伝子 *pqsA*, *pqsE*, *pqsR* を欠失した変異株はいずれも親株に比べカルバペネム作用後の生存率が 2~5 倍高く、抵抗性が上昇した。一方 PQS QS 制御因子をコードする *vqsR* 欠失変異株はカルバペネム抵抗性が親株の 1/10 に低下した。*vqsR* と *pqsA*, *pqsE*, *pqsR* との二重変異株はいずれも生存率が上昇し、*vqsR* 変異による抵抗性の低下が抑制された。また、*pqsA* および *pqsE* 変異は *rpoN* 変異株のカルバペネム抵抗性を低下させる。このことから、*vqsR* は PQS 系 QS 関連遺伝子の発現にネガティブに影響を及ぼしていると推察される (図 3)。

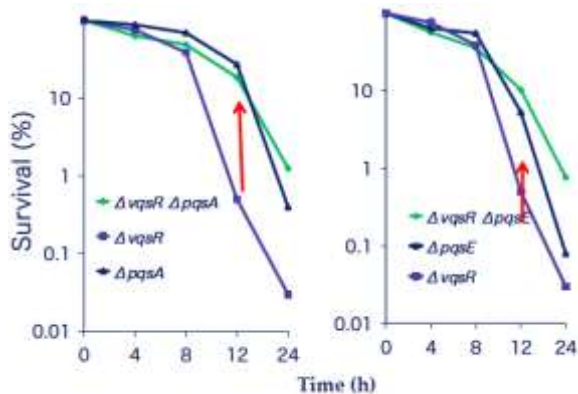


図3. *pqsA*, *pqsE* および *vqsR* 変異株の抗菌薬抵抗性に及ぼす影響

[c-di-GMP と抗菌薬抵抗性]

③ 恒常的に細胞内 c-di-GMP が高濃度に蓄積される

wspF 変異株はカルバペネムに対する抵抗性が高く、*wspF* 変異株にプラスミドにより *wspF* を相補した株および c-di-GMP 分解酵素遺伝子 PA2133 を導入した株はカルバペネム抵抗性が低下することから c-di-GMP が抗菌薬抵抗性に深く関与していることが明らかになり、この抵抗性が c-di-GMP により発現調節されている菌体外多糖 Psl による可能性が推察されたため、*wspF* 変異株に *psl* 欠失変異を導入した二重変異株を作製しその影響を調べた。その結果、*wspFpsl* 二重変異株は親株に比べ抗菌薬抵抗性が 100 分の 1 以下に低下したことから、c-di-GMP を介して発現誘導される Psl が直接的な抗菌薬抵抗性因子であることが示唆された (図 4)。

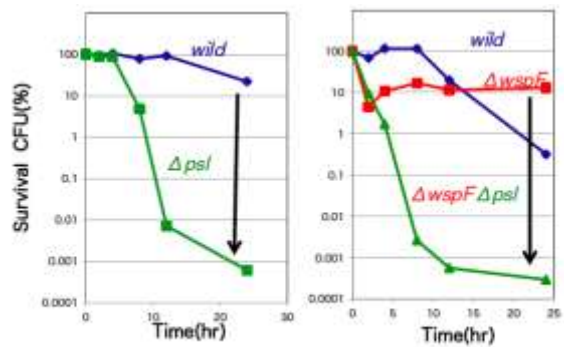


図4. *psl* and *wspF* 遺伝子の ofloxacin 抵抗性に及ぼす影響

④ 細菌は種々の環境要因に応答し多数の遺伝子発現を変化させることによってその環境に適応するシステムを有している。抗菌薬も環境ストレスの一つであると考えられることから、抗菌薬による c-di-GMP 蓄積の指標となる小さな皺状集落 (rugose small colony variants: RSCVs) 形成に及ぼす影響を検討した。その結果、クラリスロマイシンおよびトブラマイシンが RSCVs を誘導することが判明し、この現象は c-di-GMP 分解酵素遺伝子を導入した株では誘起されないことから、抗菌薬は c-di-GMP 合成を誘導しバイオフィーム形成へと向かうシグナルとして作用していること推察される。

[付着時およびバイオフィーム形成時の抗菌薬抵抗性関連遺伝子]

① 緑膿菌標準株 PAO1 株に miniTn5 を挿入した変異株ライブラリーを約 8000 株作製し、その中から 14 株の付着時 MBC (MBCAD) が低下した株および 11 株のバイオフィーム形成時の抗菌薬抵抗性が低下した変異株を分離した (表 1, 図 5)。バイオフィーム形成時の抵抗性が低下した株は 1 株のみバイオフィーム形成能が低下しており、バイオフィームの主要な菌体外マトリクス合成系オペロンに属する *pslIJ* 内の挿入変異であることが判明した。その他 8 種の遺伝子にはチトクローム系および電子伝達系を担うタンパクをコードするものが複数存在しており、酸化ストレスとの関連性が

推察された。またライフスタイルの変換に関わるシグナル伝達系 *cbrA/B* のセンサー遺伝子 *cbrA* 変異株が2株含まれていた。さらにバイオフィーム形成能が親株レベルであり抗菌薬抵抗性が低下した変異株は浮遊時および付着時の抗菌薬抵抗性には影響を及ぼしておらず、また、逆に付着時抵抗性低下株はいずれもバイオフィーム形成能が低下していることから、バイオフィームの抗菌薬抵抗性を担う遺伝子はバイオフィーム形成過程と強くリンクしており付着時および浮遊時の抵抗性とは異なったメカニズムが存在することが示唆された。

表1 付着時抗菌薬抵抗性低下 T₀ 挿入変異株

Strain	RIIC ^{wt}	RIIC ^{mut}	Katio ^{wt}	Gene	Function
PA01 (wild type)	0.0	32	66		
PA526	0.0	8	16	PA2555	probable MBP-binding Protein
PA530	1	4	4	PA4072	probable amino acid permease
PA540	2	4	2	PA2040	probable glutamine synthetase
PA5139	0.0	4	8	PA4949	Afa, MafL
PA5169	1	1	1	PA2852	
PA5180	1	2	2	PA0668.1, PA4280.2, PA4690.1, PA5269.1	23S ribosomal RNA
PA5184	0.0	8	16	PA5054	heat shock protein HSP10
PA5185	0.0	4	8	PA0236	probable transcriptional regulator
PA5192	1	8	8	PA3495	
PA5207	1	4	4	PA0306	probable acyl-CoA dehydrogenase
PA5223	0.0	4	8	PA4039	
PA5449	0.0	4	8	PA4942	
PA5472	0.25	2	8	PA1519	probable transporter
PA5473	0.0	4	8	PA2949	

*Ratio: RIIC^{wt}/RIIC^{mut}

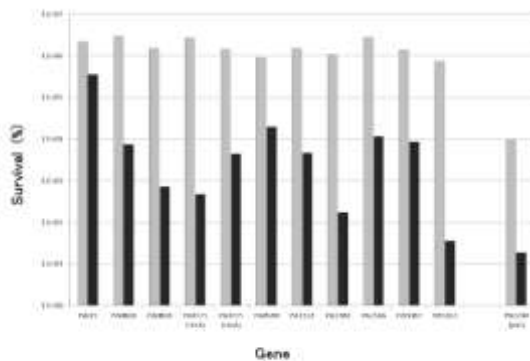


図5 バイオフィーム形成時の抗菌薬抵抗性低下変異株

[抗菌薬抵抗性関与する遺伝子発現ネットワーク]

以上の研究成果およびこれまでの著者らのより、図6に示す抗菌薬抵抗性発現に至る遺伝子間のネットワークモデルが示唆された。

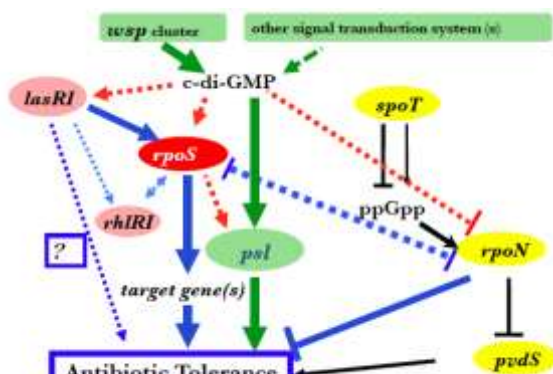


図6. 抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子ネットワーク

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2件)

① 小野 恒子, 村上 圭史, 三宅 洋一郎, *Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィーム形成と抗菌薬抵抗性に関する遺伝子ネットワーク, 日本細菌学雑誌, 査読有, 67 巻, 2012, 227-243

② Kayama S., Murakami K., Ono T., Ushimaru M., Yamamoto A., Hirota K., Miyake Y., The role of *rpoS* gene and quorum-sensing system in ofloxacin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett., 査読有, 298, 2009, 184-192, DOI: FML1717 [pii] 10.1111/j.1574-6968.2009.01717.x

[学会発表] (計16件)

① 村上 圭史, 緑膿菌における抗菌薬抵抗性関連遺伝子の探索, 第59回日本化学療法学会西日本支部総会, 2011.11.25, 奈良県新公会堂 (奈良市)

② 水瀬 一生, バイオフィーム形成菌での抗菌薬抵抗性獲得メカニズムについて, 第44回中国四国医学検査学会, 2011.11.5, アステイ徳島 (徳島市)

③ 西田 みなみ, クラリスロマイシンが及ぼす緑膿菌コロニー性状への影響, 第44回中国四国医学検査学会, 2011.11.5, アステイ徳島 (徳島市)

④ 曾宮 葉子, 緑膿菌 *psl* 遺伝子の抗菌薬抵抗性への関与について, 第44回中国四国医学検査学会, 2011.11.5, アステイ徳島 (徳島市)

⑤ 野間 保喜, 付着緑膿菌のピアペネム抵抗性関連遺伝子の探索, 第44回中国四国医学検査学会, 2011.11.5, アステイ徳島 (徳島市)

⑥ 野間 保喜, 付着緑膿菌における抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子の検討, 第64回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2011.10.22, 岡山大学津島キャンパス (岡山市)

⑦ Viducic Darija, The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal plays a dual role in the response to antimicrobial agents, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.9, Sapporo Convention Center (Sapporo)

⑧ Murakami Keiji, *Pseudomonas aeruginosa* *psl* genes play an important role in biapenem tolerance, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.9, Sapporo Convention Center (Sapporo)

⑨ Murakami Keiji, The involvement of *psl* genes and the second messenger c-di-GMP in antibiotic tolerance of adherent *Pseudomonas aeruginosa*, EUROBIOFILMS 2011 -Second

European Congress on Microbial Biofilms-Basic and Clinical Aspects-, 2011.7.7, The Panum Institute (Copenhagen)

⑩ 村上 圭史, 緑膿菌における c-di-GMP と抗菌薬抵抗性との関連について, 第 58 回日本化学療法学会西日本支部総会, 2010. 11. 25, 大分全日空ホテル (大分市)

⑪ 水瀬 一生, 緑膿菌 *ladS* 遺伝子の抗菌薬抵抗性への影響について, 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010. 10. 16, 松山大学 (松山市)

⑫ 村上 圭史, 緑膿菌臨床分離株における RSCV の分離と抗菌薬抵抗性について, 第 58 回日本化学療法学会学術講演会, 2010. 6. 3, 長崎ブリックホール (長崎市)

⑬ 鹿山鎮男, 緑膿菌 QS Las-system とシグマ因子が抗菌薬抵抗性に及ぼす影響について, 第 83 回日本細菌学会総会, 2010. 3. 29, パシフィコ横浜 (横浜市)

⑭ 山本明毅, 緑膿菌シグマ因子が抗菌薬抵抗性に及ぼす影響, 第 57 回日本化学療法学会西日本支部総会, 2009. 11. 27, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

⑮ 谷口友伯, 緑膿菌の cyclic-di-GMP と表現型変化の関与について, 第 62 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2009. 10. 16, 広島大学広仁会館 (広島市)

⑯ 鹿山鎮男, 付着緑膿菌における抗菌薬抵抗性と cyclic-di-GMP の関与について, Bacterial Adherence & Biofilm 第 23 回学術集会, 2009. 7. 11, 第一三共本社ビル (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 恒子 (ONO TSUNEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 40035514

(2) 研究分担者

三宅 洋一郎 (MIYAKE YOICHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 80136093

村上 圭史 (MURAKAMI KEIJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 10335804

(H22, H23 研究分担者)

桑原 知巳 (KUWAHARA TOMOMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 60263810

(H21, H22 研究分担者)

吉永 哲哉 (TETSUYA YOSHINAGA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 40220694

鹿山 鎮男 (SHIZUO KAYAMA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 50432761

(H21 研究分担者)

(3) 連携研究者