

令和元年9月3日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11446

研究課題名(和文)メタボローム解析による抗菌薬の殺菌メカニズムとしての酸化ストレスの解明

研究課題名(英文)A study on oxidative stress as bactericidal mechanism of antibacterial agents by metabolome analysis

研究代表者

三宅 洋一郎 (Miyake, Yoichiro)

徳島文理大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：80136093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌はピアペナム、オフロキサシン、トブラマイシンなどの抗菌薬の添加により、酸化ストレスを受け、その結果、活性酸素種の1つであるH2O2が菌体内に発生する可能性が示された。またこのH2O2に対する抵抗性が、細菌の生存、つまり抗菌薬抵抗性に深く関わっており、この抵抗性には、psl遺伝子が重要な役割を果たしていることも明らかとなった。さらに、抗菌薬は細菌の遺伝子発現や、菌体内の代謝経路にも様々な影響を与え、酸化ストレスをはじめとするストレス応答を誘導し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

抗菌薬抵抗性は感染症の難治化の原因の一つであり、高齢者や基礎疾患を持った患者等の易感染性宿主が増加している現在、医療の現場では大きな問題となっている。従来よりこの抗菌薬抵抗性のメカニズムについて検討を行っており、いくつかのストレス反応が働いていることを見出してきた。今回の検討により細菌細胞内の酸化ストレスが重要なメカニズムの一つであることが新たに判明した。細菌の抗菌薬抵抗性メカニズムの解明は、抗菌化学療法の効果を高め、適切な抗菌化学療法を行う上で重要な示唆を与えるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that *Pseudomonas aeruginosa* was oxidatively stressed by the addition of antibacterial agents such as biapenem, ofloxacin and tobramycin. As a result of it, H2O2, one of reactive oxygen species, was generated in the cell. H2O2 tolerance could be closely related to antibiotic resistance, and the psl genes play an important role in these tolerance. Furthermore, it was revealed that antibacterial agents have various effects on bacterial gene expression and metabolic pathways in cells, and induce stress responses including oxidative stress.

研究分野：微生物学

キーワード：難治性感染症 緑膿菌 抗菌薬 抗酸化能 トランスクリプトーム解析 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

細菌が抗菌薬から生き残る戦略としては、“進化”と“適応”の2つの方法が考えられる。“進化”とは、耐性遺伝子の獲得という、遺伝的変異を伴う現象であり、耐性遺伝子を獲得した耐性菌は、抗菌薬存在化で増殖することが出来るため、難治性感染症を引き起こす。一方、“適応”とは、遺伝的変異を伴わない、遺伝子発現の変化による一過性の状態であり、抗菌薬存在下では増殖出来ないものの死滅しないため、抗菌薬が無くなると再び増殖を始めるという現象であり、抗菌薬抵抗性と呼ばれている。この典型例が、バイオフィームであり、これまで、感受性菌であるにも関わらず抗菌薬が効果を発揮できない理由として、菌体外多糖(EPS)が抗菌薬の侵入を阻害するという、バリアー効果のためである、と信じられてきたが、現在では、バリアー効果ではなく、バイオフィーム内部の細菌が、抗菌薬抵抗性を獲得したためであると考えられている。バイオフィームなどの慢性感染症の原因として、抗菌薬抵抗性の重要性は認識されているものの、その詳細なメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、バイオフィームなどの難治性感染症に対する新たな抗菌薬を開発するために、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。我々はこれまでに、緑膿菌 *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報告しているが、今回、抗菌薬の新たな殺菌メカニズムとして酸化ストレスに着目し、トランスクリプトーム解析と、近年注目されている手法であるメタボローム解析を応用して、臨床分離株も使用しながら、酸化ストレスと抗菌薬抵抗性、*psl* 遺伝子との関連について解析し、抗菌薬抵抗性をターゲットとする、新たな感染症治療薬を開発することを目標としている。

3. 研究の方法

(1) 抗菌薬添加による H_2O_2 発生の検討と *psl* 遺伝子の関連

抗菌薬添加による活性酸素種(ROS)の1つである過酸化水素(H_2O_2)の発生について、ピアペネム、オフロキサシン、トブラマイシンを用いて検討を行った。PA01株と、*psl* 遺伝子欠損株、緑膿菌臨床分離株の中で、抗菌薬抵抗性が低い5株を選び H_2O_2 発生について検討した。また、この5株について *pslA* 遺伝子の有無をPCRにより確認した。

(2) 抗菌薬抵抗性と H_2O_2 抵抗性の検討

ピアペネム、オフロキサシン、 H_2O_2 を用いて浮遊菌における殺菌試験を行い、抗菌薬抵抗性と、 H_2O_2 抵抗性との関連について検討を行った。

(3) CE-MS を用いたメタボローム解析

PA01株を用いて、ピアペネム、オフロキサシン、トブラマイシン添加後のCE-MSによる菌体内のメタボローム解析を実施した。

(4) 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、ピアペネム、オフロキサシン、トブラマイシン添加後の遺伝子発現の変動をGeneChipを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

(5) HPLC による ROS の検出

ピアペネム、オフロキサシン、トブラマイシン添加におけるROSの発生について、直接的な検出を行うため、dihydroethidium (DHE)を用いて、スーパーオキシド特異的産物である、2-OH-ethidium (2OH-E)の産生について、HPLCでの検出方法の確立を検討した。

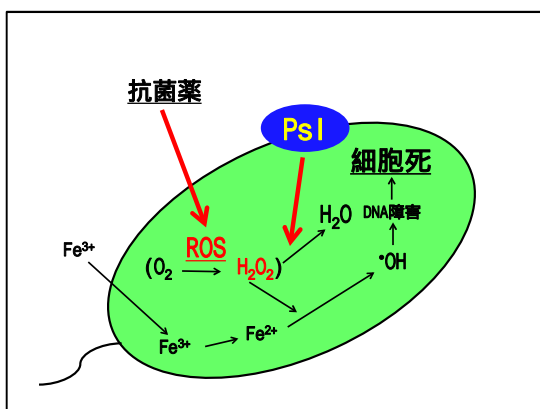
4. 研究成果

(1) PA01株において、ピアペネム、オフロキサシン、トブラマイシンいずれの抗菌薬においても、抗菌薬未添加のコントロールと比較し、約5倍程度 H_2O_2 の発生量が増加した。また *psl* 遺伝子欠損株でも3倍程度の増加がみられた。この結果から、抗菌薬の添加により、ROS

の1つである H_2O_2 の菌体内での発生が確認された。また臨床分離株においては、特に増加が認められない株も1株存在したが、残りの4株では程度の差は認められたものの、いずれも H_2O_2 の菌体内での発生が確認された。また PCR の結果、全ての株において、*psl* 遺伝子は検出されなかった。

- (2) ビアペネムとオフロキサシンに対し、*psl* 遺伝子欠損株では抗菌薬添加後の生存率が大きく低下することを報告してきたが、臨床分離株においても、ビアペネムについては、PA01株と比較して、その生存率はいずれの臨床分離株においても明らかに低かった。オフロキサシンについては、2株では、PA01株とほとんど変わらない生存率を示したものの、残り3株については、生存率は低かった。 H_2O_2 抵抗性については、1株では、PA01株と同程度の生存率であったが、他の4株では生存率は低く、抵抗性が低いことが明らかとなった。
- (3) CE-MS を用いたメタボローム解析では、アミノ酸の変動については、抗菌薬未添加のコントロールと比較し、ビアペネム、オフロキサシン、トブラマイシン添加サンプルにおいて、大きく変動したものは少なかった。その中で、トブラマイシンの添加により、アルギニン量が2.5倍程度大きく上昇していた。アスパラギンはいずれの抗菌薬でも1.5~2倍程度上昇していた。また、その他の代謝産物については、ビアペネムとトブラマイシンの変動がかなり近いパターンを示しており、逆にオフロキサシンではかなりそのパターンが異なっていた。オフロキサシンでは、ピルビン酸、乳酸などが3倍程度上昇していた。また、 NAD^+ や $NADP^+$ の量も変動しており、酸化ストレスを受けている可能性が示唆された。
- (4) GeneChip を用いたマイクロアレイ解析により、抗菌薬添加により発現が変動した遺伝子を網羅的に解析したところ、メタボローム解析の結果と異なり、ビアペネムとオフロキサシン添加後のサンプルでは、共通に発現が上昇している遺伝子がいくつか認められたものの、トブラマイシンの場合は、共通な遺伝子がほとんど無かった。ほとんどは機能未知の遺伝子であるため、酸化能との関連についてはもう少し詳細な検討が必要である。
- (5) HPLC による、抗菌薬添加後のスーパーオキシド特異的産物 20H-E の検出については、そのピークが確認された。その定量性については、まだ不安定な部分もあるため、定量法の確立のためには、プロトコールの改変がもう少し必要であるため、現在検討中である。

以上の結果から、緑膿菌は抗菌薬の添加により、酸化ストレスを受け、ROS の1つである H_2O_2 が菌体内に発生することが示された。またこの H_2O_2 に対する抵抗性が、抗菌薬抵抗性つまり、細菌の生存に大きく関わっており、この抵抗性には、*psl* 遺伝子が重要な役割を果たしていることも示唆された。さらに、抗菌薬は細菌の遺伝子発現や、菌体内の代謝経路にも様々な影響を与え、酸化ストレスをはじめとするストレス応答を誘導していることが明らかとなった。この細菌の酸化能は、バイオフィームなどの慢性感染症治療薬の開発において、新たな作用点となる可能性が示された。



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 2 件)

Murakami K, Ono T, Viducic D, Somiya Y, Kariyama R, Hori K, Amoh T, Hirota K, Kumon H, Parsek MR and Miyake Y: The role of *psl* genes in antibiotic tolerance of adherent *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 61: e02857-16, 2017 , 査読有り

Murakami K, Ono T, Noma Y, Minase I, Amoh T, Irie Y, Hirota K and Miyake Y: Explorative gene analysis of antibiotic tolerance related genes in adherent and biofilm cells in *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Chemother 23: 271-277, 2017 , 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

村上圭史, 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 , 第 9 2 回日本細菌学会総会 , 2019

村上圭史, 緑膿菌臨床分離株における抗菌薬抵抗性と抗酸化能との関連について , 第 5 3 回緑膿菌感染症研究会 , 2019

村田梨菜, 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 , 第 4 2 回徳島県医学検査学会 , 2018

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

弘田 克彦 (HIROTA, Katsuhiko)

高知学園短期大学・医療衛生学科・教授

研究者番号 : 60199130

(2) 研究分担者

村上 圭史 (MURAKAMI, Keiji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号 : 10335804

(3) 研究分担者

馬渡 一諭 (MAWATARI, Kazuaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号 : 40352372