

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19451

研究課題名（和文）異種細菌間の競合・協調と宿主環境適応機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Bacterial Competition and Coordination: Adaptation to Hostile Environments

研究代表者

西野 邦彦（Nishino, Kunihiro）

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：30432438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：異種細菌間の情報伝達ネットワークを同定し、ネットワークを形成している分子と、情報伝達物質や宿主環境に存在する物質との相互作用を明らかにし、異種細菌間の競合・協調の機構や、存在する物質の検出・同定を目指す。宿主環境への適応や、異種細菌が存在する中での生存に関与している異物排出トランスポーターについて、異種細菌に存在する数百個ものトランスポーターについて系統発生に関する解析を進め、菌種ごとのトランスポーターの役割の違いを明らかにし、胆汁酸や脂肪酸抵抗性への関与を解明した。また、腸内で一部の細菌が産生するインドールについて、従来の抽出や濃縮に頼らない方法で検出することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細菌の異物排出トランスポーターは、耐性を理解するため研究が進められてきた。本研究により、胆汁酸や脂肪酸への抵抗性に関与していることが明らかになり、様々な細菌が生存している環境において、環境に応答するためにもトランスポーターが必要であることが分かった。さらに、数百種におよぶ系統解析は、他細菌や生物種に存在する未知のトランスポーターをより簡便に分類するためのツールとして役立つ。また、宿主環境適応におけるトランスポーターの生理的役割を理解する上でも役立つものである。さらに、腸内細菌が産生するインドールを簡便に検出する方法を開発した。成果は、細菌恒常性を破綻させることのできる創薬にもつながる。

研究成果の概要（英文）：This project aims to identify the signaling networks among heterologous bacteria and to elucidate the interactions between the molecules forming the networks and the signaling molecules and substances present in the host environment, and to detect and identify the mechanisms of competition and cooperation among heterologous bacteria and the substances present in them. In this study, regarding the drug efflux pumps that are involved in adaptation to the host environment and survival in the presence of heterologous bacteria, we conducted analyses on phylogenetic development of hundreds of pumps in heterologous bacteria, clarified the different roles of the pumps in different bacterial species, and elucidated their involvement in bile acid and fatty acid resistance. We also succeeded in detecting indole, which is produced by some bacteria in the intestine, by a method that does not rely on conventional extraction or enrichment.

研究分野：細菌学・薬学

キーワード：腸内細菌 異物排出 トランスポーター インドール 胆汁酸 脂肪酸 サルモネラ 大腸菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、臨床現場において難治性の様々な細菌性感染症が出現し、感染症は未だに医療従事者が直面する重要な問題である。細菌培養法の確立は、細菌を単離して病気の原因を同定するコッホの原則の確立につながった。その後、微生物学が発展し、分子生物学の進歩に伴い、細菌の病原性や薬剤抵抗性等に關与する遺伝子が同定され、これらフェノタイプを分子レベルで理解することが可能になってきた。しかし、これまで細菌によって引き起こされる様々な現象は、単一菌種を分離した上で解析されることが多く、純粋培養だけでは説明ができない様々な現象が存在している。これら腸内細菌には、食物の消化やビタミンの合成、ヒトの免疫系の教育など、様々な有益な役割があることが分かってきたが、異種細菌間や細菌宿主間でどのような競合・協調作用があるのか、あまり分かっていない。

これまで、細胞間コミュニケーションが同菌種だけで行われるのではなく、異菌種間でも起こっている可能性を考えて、研究を進めてきた。その結果、腸内フローラが産生するインドールが、インドール非産生菌であるサルモネラの病原性と運動性を抑制していることを見出した。最近の研究によって、微生物コミュニティにおける情報伝達物質としてのインドールの機能が注目され、インドールが大腸菌の遺伝子発現を制御することを明らかにしてきたが、今回、新たに、インドール非産生病原細菌サルモネラにもインドールが影響をおよぼす事実を明らかにした。腸内には、大腸菌以外にも、複数のインドール産生菌が存在しており、これら腸内フローラによって産生されるインドールが、病原細菌による感染を未然に防御していることが明らかになり、感染防御の観点からも新たな視点が生まれつつある。また、予備的実験の結果、インドールにตอบสนองする制御ネットワークの一部が、宿主環境物質を認識して、細菌の病原性・薬剤抵抗性といったフェノタイプを調節していることが分かりつつある。異種細菌が存在する腸内等の環境において細菌が産生する情報伝達物質を検出・同定することや、宿主内における細菌の環境適応機構を明らかにすることが、重要な課題になってきた。

2. 研究の目的

人体には、自身の細胞数の約10倍にあたる数の細菌が生息しているが、これまでの細菌学では、歴史的に、シャーレを用いて単一種の細菌を分離する純粋培養にもとづく解析がほとんどであったため、異種細菌間の競合・協調ならびに複数種の細菌と宿主間の相互作用についての理解が進んでいない。本計画は、異種細菌が存在している腸内等の環境において細菌が産生している情報伝達分子の検出・同定を行うとともに、細菌の宿主環境適応機構解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 異種細菌が存在する宿主内での環境適応に細菌の異物排出トランスポーターが關与する可能性を考え、160種以上の異なる細菌種のトランスポーターについて、系統樹解析を行った。また、これらトランスポーターの内、進化的に古いものと新しいものを選択し、宿主中に存在する化合物も含めて基質として認識されるかどうかについて、細菌株を構築し解析を行った。

(2) また、異種細菌間の情報伝達物質にも関係し、異物排出トランスポーターによっても輸送されることが知られているインドールについて、簡便に検出・同定することのできる方法について検証を行った。

(3) さらに、腸内細菌科に属する複数の細菌がどのようにして脂肪酸の存在する環境で生存できるのか、その機構を明らかにする目的で、研究を進めた。脂肪酸は、静菌作用や殺菌作用を發揮し、細菌の増殖や生存を抑制するが、細菌がそれに適応するための機構を解明するための実験を行った。

4. 研究成果

(1) 近年の研究から大腸菌をはじめとする細菌のRND型薬剤排出ポンプAcrBが、宿主環境への適応や、異種細菌が存在する中での生存に關与していることが明らかになりつつある。そこで、本研究では、異種細菌に存在する数百個ものRND型薬剤排出ポンプについて系統発生に關する解析を進めた。

その結果、インフルエンザ菌の多剤排出ポンプAcrB (AcrB-Hi) が、進化上、比較的古い排出ポンプであることを明らかにし、新しいポンプである大腸菌AcrB (AcrB-Ec) との機能を比較して解析を行った。様々なポンプ阻害剤が開発されているが、本研究では、これら阻害剤が進化的に古いインフルエンザ菌のポンプに効力を示さない等、全てのRND型の多剤排出ポンプを阻害できない可能性があることが分かった。また、排出ポンプAcrBに加えて、外膜タンパク質OmpP2との組み合わせで、インフルエンザ菌の β -ラクタム系抗菌薬感受性が決定されていることを分子的に証明し、新たな知見を提供することができた。インフルエンザ菌の多剤排出ポンプAcrB

(AcrB-Hi) が、と大腸菌 AcrB (AcrB-Ec) は、共通して多くの抗菌薬を認識する能力があったが、異なる点として、AcrB-Ec は胆汁酸塩を認識し本菌の胆汁中での生育に参与するのに対して、AcrB-Hi は胆汁酸塩の認識能を有していなかった。この基質認識性の違いは、菌の生育環境に依存していることが考えられ、大腸菌が腸内環境で生存するためにも胆汁に耐性を持つことが必要であり、AcrB-Ec が胆汁酸認識能力を持つことになったことが示唆された。数百種類にもおよび排出ポンプの系統解析は、これまでに研究されていなかった他の細菌や生物に存在する排出ポンプの機能と分類を予測するのにも役立つと考えられる[1]。

(2) 腸内等の異種細菌が存在する環境の中で、インドール産生菌を判別するための技術開発に取り組んだ。細菌が産生するインドールはトリプトファンに由来するシグナル分子であり、細菌の呼吸ガスに存在する。インドールは、細菌の増殖に影響を与えるだけでなく、炎症へのプラスの効果や病原体からの保護など、人間の健康にも影響をおよぼす。細菌が産生するインドールを分析するには、その収集と検出が必要である。従来の方法では、サンプルからインドールを抽出する必要がある。今年度の研究では、細菌から直接ガス含有量を特定する可能性を考えその方法を確立し、遠心分離や抽出を必要とせずに細菌種やその遺伝型の違いを区別することを目的とした。液体培養物の上に配置された吸収シートを使用して、細菌から直接ガス含有量を収集することができた。分析には GC-MS を使用した。結果は、野生型大腸菌のインドールに起因する明確なピークを示す一方で、トリプトファンからインドールを産生するのに参与するタンパク質 TnaAB をコードする遺伝子を欠損させた株からは検出されなかった。インドールは、低 nmol 範囲で存在することが測定された。この方法は、細菌ゲノムに *tnaAB* 遺伝子が含まれているかどうかを識別でき、細菌培養物からガス化合物を迅速かつ簡単に収集するために使用できる[2]。

(3) 腸内細菌科に属する複数の細菌がどのようにして脂肪酸の存在する環境で生存できるのか、その機構を明らかにする目的で、研究を進めた。脂肪酸は、静菌作用や殺菌作用を発揮し、細菌の増殖や生存を抑制する。細菌は、これらの抗菌効果を克服するために、未定義のメカニズムによって環境に適応している。グラム陰性菌では、薬物排出系が様々な物質に対する耐性と関連していることが知られており、これまでの研究により大腸菌やサルモネラにおいて複数の排出系が同定されている。本研究では、これらの細菌の脂肪酸耐性に薬物排出系が寄与しているかどうかを調べた。サルモネラおよび大腸菌の薬物排出トランスポーターの欠失株と過剰発現株を用いて、脂肪酸に対する感受性を測定した。その結果、サルモネラでは *acrAB*, *acrEF*, *emrAB*, *toIC* が脂肪酸に対する抵抗性に寄与することが明らかとなった。さらに、ToIC とともに機能することが知られている *EmrAB* は、ToIC とは独立した形サルモネラの脂肪酸耐性に寄与しているが明らかになった。注目すべきは、通常、*EmrAB* は ToIC 依存的に抗菌薬耐性に参与しているが、脂肪酸耐性には、ToIC 非依存的に参与していることが判明し、*EmrAB* による ToIC 利用が基質依存的であることが示されたことである[3]。

<引用文献>

- [1] Zwama M, Yamaguchi A, Nishino K. Phylogenetic and functional characterization of the *Haemophilus influenzae* multidrug efflux pump AcrB. *Commun Biol*. 2019 Sep 13;2:340. doi: 10.1038/s42003-019-0564-6.
- [2] Koga N, Hosomi T, Zwama M, Jirayupat C, Yanagida T, Nishino K, Yamasaki S. Identification of genetic variants *via* bacterial respiration gas analysis. *Front Microbiol*. 2020 Nov 16;11:581571. doi:10.3389/fmicb.2020.581571.
- [3] Yoneda T, Sakata H, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, Nishino K. Analysis of multidrug efflux transporters in resistance to fatty acid salts reveals a ToIC-independent function of *EmrAB* in *Salmonella enterica*. *PLoS One*. 2022 Apr 14;17(4):e0266806. doi: 10.1371/journal.pone.0266806.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoneda Tomohiro, Sakata Hiroki, Yamasaki Seiji, Hayashi-Nishino Mitsuko, Nishino Kunihiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Analysis of multidrug efflux transporters in resistance to fatty acid salts reveals a TolC-independent function of EmrAB in Salmonella enterica	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0266806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0266806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muller Anja, Sakurai Keisuke, Seinige Diana, Nishino Kunihiko, Kehrenberg Corinna	4. 巻 12
2. 論文標題 Mutations in the Phenicol Exporter Gene fexA Impact Resistance Levels in Three Bacterial Hosts According to Susceptibility Testing and Protein Modeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 794435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.794435	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
1. 著者名 Koga Naoki, Hosomi Takuro, Zwama Martijn, Jirayupat Chaiyanut, Yanagida Takeshi, Nishino Kunihiko, Yamasaki Seiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Genetic Variants via Bacterial Respiration Gas Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 581571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.581571	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 西野邦彦、山崎聖司、中島良介	4. 巻 1-2-13
2. 論文標題 多剤排出ポンプの機能と阻害機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 膜タンパク質工学ハンドブック	6. 最初と最後の頁 83-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zwama Martijn, Yamaguchi Akihito, Nishino Kunihiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Phylogenetic and functional characterisation of the Haemophilus influenzae multidrug efflux pump AcrB	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0564-6	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 Matsumoto Takashi, Nakashima Ryosuke, Yamano Akihito, Nishino Kunihiko	4. 巻 518
2. 論文標題 Development of a structure determination method using a multidrug-resistance regulator protein as a framework	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 402 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.070	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 Raspoet R., Eeckhaut V., Vermeulen K., De Smet L., Wen Y., Nishino K., Haesebrouck F., Ducatelle R., Devreese B., Van Immerseel F.	4. 巻 98
2. 論文標題 The Salmonella Enteritidis ToIC outer membrane channel is essential for egg white survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 2281 ~ 2289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3382/ps/pey584	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

1. 著者名 Yamasaki Suguru, Nakashima Ryosuke, Sakurai Keisuke, Baucheron Sylvie, Giraud Etienne, Doublet Benoit, Cloeckert Axel, Nishino Kunihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of the multidrug resistance regulator RamR complexed with bile acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36025-8	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

1. 著者名 Raspoet R, Eeckhaut V, Vermeulen K, De Smet L, Wen Y, Nishino K, Haesebrouck F, Ducatelle R, Devreese B, Van Immerseel F	4. 巻 98
2. 論文標題 The Salmonella Enteritidis ToIC outer membrane channel is essential for egg white survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 2281 ~ 2289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3382/ps/pey584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Akihito Yamaguchi, Kunihiko Nishino	4. 巻 34
2. 論文標題 Analysis and inhibitor development against bacterial multidrug efflux transporters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 83-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 西野邦彦
2. 発表標題 細菌薬剤排出ポンプと耐性菌新規判別手法
3. 学会等名 第56回 緑膿菌感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kunihiko Nishino
2. 発表標題 Function and Regulation of Bacterial Multidrug Efflux Pumps
3. 学会等名 Croucher Advanced Study Institute 2020 Metals in Biology and Medicine: From Molecular Image to Drug Resistance (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西野邦彦
2. 発表標題 抗菌薬標的としての細菌薬剤排出ポンプ
3. 学会等名 日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Yamasaki, R. Nakashima, K. Sakurai, S. Baucheron, E. Giraud, B. Doublet, A. Cloeckaert, K. Nishino
2. 発表標題 Crystal structure of the multidrug resistance regulator RamR complexed with bile acids
3. 学会等名 8th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Nishino
2. 発表標題 Bacterial adaptation to the gut environment: a constant fight against bile and drugs
3. 学会等名 Taiwan-Japan Joint Seminar for biomedical informatics and engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Antibiotic-Resistant Bacteria: Biggest Threats and Data
2. 発表標題 K. Nishino
3. 学会等名 The 1st AIRC-ISIR International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Antibiotic-Resistant Bacteria: Biggest Threats and Data
2. 発表標題 K. Nishino
3. 学会等名 8th inec Handai International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西野邦彦
2. 発表標題 細菌多剤排出トランスポーターの機能と制御 Bacterial Multidrug Efflux Transporters - not just for resistance
3. 学会等名 大阪大学微生物病研究所 Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野邦彦
2. 発表標題 細菌薬剤排出ポンプの機能と制御
3. 学会等名 第30回微生物シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野邦彦
2. 発表標題 細菌薬剤排出システムの機能と制御
3. 学会等名 第6回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム 第33回生体機能関連化学部会若手フォーラム 第5回バイオテクノロジー部会若手フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kunihiko Nishino
2. 発表標題 Function and Regulation of Bacterial Multidrug Efflux Pumps
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野邦彦
2. 発表標題 多剤耐性菌の脅威と新たな治療戦略
3. 学会等名 人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミックアライアンス生命機能物質・デバイスシステムG3分科会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kunihiko Nishino
2. 発表標題 Regulation of Bacterial Multidrug Efflux System Involved in Multidrug and Bile Resistance
3. 学会等名 The 22nd SANKEN International Symposium The 17th SANKEN Nanotechnology International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西野邦彦
2. 発表標題 細菌の多剤耐性化における排出システムの役割
3. 学会等名 ライフ&メディカルイノベーションプロジェクトシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学産業科学研究所
<https://www.sanken.osaka-u.ac.jp>
生体分子制御科学研究分野（西野研）
https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/organization/thi/thi_06/

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

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			
ベルギー	ゲント大学			
フランス	国立農学研究所			
ドイツ	ユストゥス・リープヒヒ大学 ギーゼン			
中国	香港大学			