

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590447

研究課題名 (和文) クォラムセンシング機構を利用した多剤耐性病原菌の制御剤の開発と解析

研究課題名 (英文) Development of quorum quenchers for the control of multidrug resistant strains

研究代表者

間世田 英明 (MASEDA HIDEAKI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10372343

研究成果の概要 (和文) : 抗生物質の広範な使用とともに、多剤耐性菌の蔓延が世界中で問題となっており、抗生物質を使わない新たな制御法の確立が求められている。近年の研究から、細菌では、多剤耐性から毒素発現までを、quorum-sensing 機構と言われるシグナル伝達機構が制御していることが明らかになってきた。そこで、このシステムの制御が、新たな多剤耐性菌の制御法として注目されている。我々は、この QS 機構のインヒビターをスクリーニングする方法を構築し、その阻害剤の開発を行った。コンピューターを用いてモデリングし、25 種の新たな候補阻害剤を合成したところ、その一つに QS 機構の C4-HSL 系および 3oxoC12-HSL 系を主に特異的にかつ強く阻害する活性があることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : With the widespread appearance of antibiotic-resistant bacteria, there is an increasing demand for novel strategies to control infectious diseases. The discovery that many bacteria use quorum-sensing (QS) systems to coordinate virulence has pointed out a new, promising target for antimicrobial drugs. We constructed a screening system of QS inhibitor, which enabled us to identify a number of novel QSIs among synthetic 25 compounds by computer modeling. The most active one had inhibited C4-HSL and 3oxoC12-HSL dependent virulences in *Pseudomonas aeruginosa* specifically and strongly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

抗生物質の広範な使用とともに、多剤耐性菌の蔓延が世界中で問題となっており、抗生物質を使わない新たな制御法の確立が求められている。近年の研究から、細菌では、多剤耐性から毒素発現までを、quorum-sensing

機構と言われるシグナル伝達機構が制御していることが明らかになってきた。そこで、このシステムの制御が、新たな多剤耐性菌の制御法として注目されている。

2. 研究の目的

quorum-sensing 機構の阻害剤を開発して、多

剤耐性菌を含めた感染症の原因菌の新たな制御剤の開発を行う。

3. 研究の方法

エラスターゼ活性の測定法

被検菌を LB 培地 5 ml に接種し、37 °C、190 rpm、14 h 培養したものを新しい LB 培地 5 ml に 1/100 量 (50 µl) 加えた。さらに終濃度 1 mM になるように DMSO で溶解させた薬剤を添加し、37 °C、170 rpm、10 h 本培養 (PERSONAL-11 TAITEC) した。本培養液 200 µl を 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し、高速遠心機 (Centrifuge 5424 eppendorf) で遠心分離 (15,000 rpm、2 min) した。エッペンドルフチューブにエラスチンコンゴレッド 0.0030 g (20 mg/ml)、上清 100 µl および Tris-HCl buffer 50 µl をそれぞれ加え、37°C、800 rpm、2 h 反応 (LD-40 LABINCO) させた。その後、反応液 60 µl と sodium phosphate 40 µl をエッペンドルフチューブに混合することで反応を停止させ、遠心分離 (15,000 rpm、5 min) した。その上清の吸光度 495 nm を測定 (U-1900 Spectrophotometer HITACHI) し、エラスターゼ活性とした。

ピオシアニン産生量の測定法

被検菌を LB 培地 5 ml に接種し、37 °C、190 rpm、14 h 培養したものを新しい LB 培地 5 ml に 1/100 量 (50 µl) 加えた。さらに終濃度 1 mM になるように DMSO で溶解させた薬剤を添加し、37 °C、170 rpm、10 h 本培養した。本培養液 1 ml を 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し、高速遠心機で遠心分離 (15,000 rpm、5 min) した。上清 600 µl をエッペンドルフチューブに移し、クロロホルム 360 µl と十分混合させた後、遠心分離 (15,000 rpm、3 min) した。上清を除き、クロロホルム層 300 µl をエッペンドルフチューブに移し、0.2 N HCl 100 µl と十分混合させた後、遠心分離 (15,000 rpm、1 min) した。上層 (HCl 層) の吸光度 520 nm を測定し、ピオシアニン相対産生量とした。

4. 研究成果

① 阻害活性を示す化合物をスクリーニング

構築した QS 機構阻害剤のスクリーニングシステムを用いて、合成した薬剤の阻害活性を目視で測定した。その結果 Fig. 1 に見られる様に、目視において明らかに、**Fig. 1 QS 阻害活性** QS 機構を阻害する化合物の合成に成功した。合成した薬剤のうち、少なくとも 12 種において、阻害活性が認められた。



② 阻害経路の同定

阻害活性の認められた化合物について、そ

の阻害経路を明らかにするために、緑膿菌の 2 つの QS 機構の内、一つだけを欠損させた、 $\Delta lasI$ 株および $\Delta rhII$ 株を構築し、それぞれを用いて、阻害活性を測定した。その結果、化合物 6、7、8、9、10 において、 rhI 系阻害活性が著しく高いことが示された (Fig. 2)。

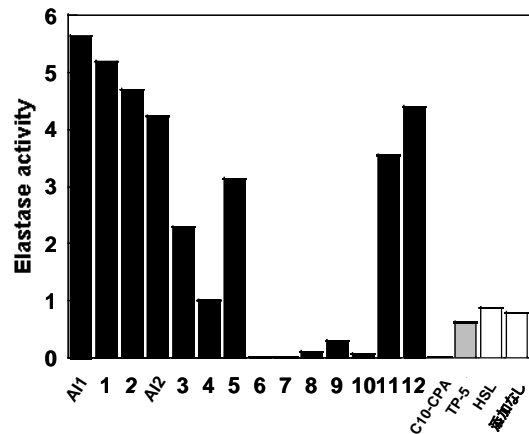
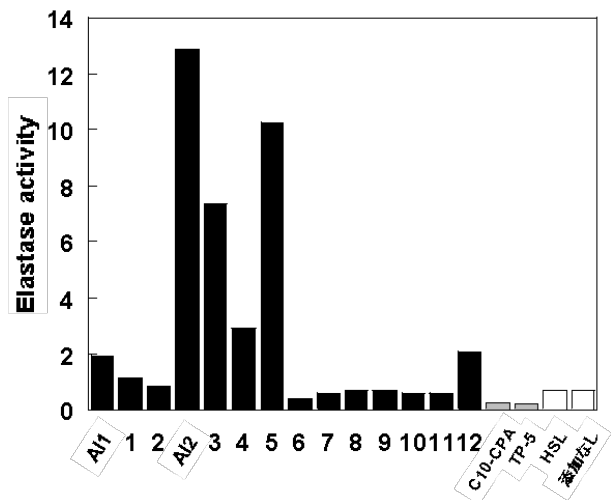


Fig. 2 PA01- $\Delta lasI$ 株でのエラスターゼ活性

Fig. 3 PA01- $\Delta rhII$ 株でのエラスターゼ活性



一方、化合物 6 において、 las 系阻害活性が高いことが示された (Fig. 3)。一方、予想しないことであったが、合成薬剤において、 Rhl 系や Las 系の活性高める薬剤も確認された。このことは、コンピューターによる解析で基質の結合ポケットには結合するが、活性のない薬剤の合成を目指したため、抑制せずに活性だけを上げてしまったためと思われる。以上のことから、合成した薬剤のうち化合物 6 が Las 系も Rhl 系も活性をよくする効果があることが明らかになり、Quorum-sensing の効果的な新規の薬剤であることが示された。

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 8 件)

1. Maseda H., Uwate M., and Nakae T.: Transcriptional regulation of the *mexEF-oprN* multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in *nfxC*-type mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS microbiology letters, 311:36-43(2010) 査読有
2. 白井昭博, 森下裕生, 間世田英明, *高麗寛紀: ジェミニ型第四アンモニウム化合物を担持させた無機-有機ハイブリッド抗菌剤の開発
防菌防黴誌, 38:133-142 (2010) 査読有
3. Maseda H., Hashida Y., Konaka R., Shirai A., Kourai H.: Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53:5230-5235 (2009) 査読有
4. Yawata Y, Maseda H., Okabe S., Ito A., Sawada I., Kurashima H., Uchiyama H., and *Nomura N.: The Response of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Efflux Pump-Defective Mutants to N-Octanoyl-L-Homoserine Lactone
Microbes and Environments, 24:338-342 (2009) 査読有
5. Shirai A., Sumitomo T., Kurimoto M., Maseda H., and *Kourai H.: The mode of the antifungal activity of gemini-pyridinium salt against yeast. Biocontrol science, 14:13-20 (2009) 査読

有

6. Okano K., Shimizu K., Kawauchi Y., Maseda H., Utsumi M., Zhang Z., Neilan BA., and *Sugiura N.: Characteristics of a Microcystin-Degrading Bacterium under Alkaline Environmental Conditions. 査読有
Journal of Toxicology, 2009: Article ID 954291, 8 pages (2009)
7. Sugimura M., Maseda H., Hanaki H., and *Nakae T.: Macrolide antibiotic-mediated downregulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy 52: 4141-4144 (2008) 査読有
8. 白井昭博, 住友倫子, 岡村菜穂, 大久保彰洋, 湯浅明彦, 間世田英明, *高麗寛紀: 銀担持アクリル繊維を含む抗菌紙の魚病原因細菌に対する殺菌特性
防菌防黴誌 36: 579-585 (2008) 査読有

[学会発表] (計 42 件)

1. Akihiro Shirai, Yasuko Fumoto, Hideaki Maseda and Hiroki Kourai : Synthesis and biological properties of novel anionic surfactant, potassium acetate salt of (5-alkyl-2-methyl-1,3-thiazole)s, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010)*, No. 04-ORGN-1613, p.139, Honolulu, Dec. 16 2010.
2. Toshiyuki Endoh, Kanae Sakaguchi, Hideaki Maseda, Hiroki Kourai, Akihiro Shirai and Takeshi Omasa : Development of new antimicrobial agents: synthesis and biological properties of hybrid-type quaternary ammonium salts as a safe antimicrobial agent, *The 16th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC)*, No. F-13, p. 72, Taoyuan, Nov. 2010.
3. Akihiro Shirai, Yuki Ohtsu, Yasunori Kuboyama, Hideaki Maseda, Hiroki Kourai and Takeshi Omasa : Water disinfection system based on the combined use of gemini-quaternary ammonium salt and ultraviolet (A)-light emitting diode, *The 16th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC)*, No. F-17, p. 74, Taoyuan,

Nov. 2010.

4. Jimbo Yasuo, Okano Kunihiro, Shimizu Kazuya, Hideaki Maseda, Utsumi Motoo and Sugiura Norio : Quantification and Seasonal Change of Microcystin-Degrading Bacteria by Real-Time PCR, *Journal of Water and Environment Technology*, Vol.8, No.3, pp.193--201, Ishinomaki, Jan. 2010.

5. 板山朋聡, 岩見徳雄, 清水和也, Niwoot Whangchai, Chayarat Pleumsumran, Sirapran Fakrajang, Suttida Wannoo, Ruekeaw Praphrute, Korntip Kammika, 間世田英明, 古澤文章, 杉浦則夫 : タイ国北部の養魚池における有害藍藻類の発生状況, *日本水処理生物学会誌*, No. 30, 26 頁, 2010 年 11 月.

6. 清水和也, 星麻里恵, 伊藤聡, 間世田英明, 岡野邦宏, 陳榮志, 内海真生, 張振亜, 杉浦則夫 : Microcystin 分解産物の特性解析, *日本水処理生物学会誌*, No. 30, 29 頁, 2010 年 11 月.

7. 石橋学, 清水和也, 小林弘明, 白井昭博, 大政健史, 杉浦則夫, 間世田英明 : ミクロシスチンの分解に関わる MlrD タンパク質の関与, *日本水処理生物学会誌*, No. 30, 28 頁, 2010 年 11 月.

8. 久保山泰典, 白井昭博, 室巻良彦, 間世田英明, 高麗寛紀 : 栄養体およびシストアメーバに対する抗アメーバ性試験法とその評価法の確立, *第 37 回日本防菌防黴学会年次大会*, No. 2PP-17, 215 頁, 2010 年 9 月.

9. 白井昭博, 庄野知明, 布本泰子, 室巻良彦, 間世田英明, 高麗寛紀 : 新規チアゾール系抗菌剤の合成とその抗菌特性, *第 37 回日本防菌防黴学会年次大会*, No. 1PA-07, 58 頁, 2010 年 9 月.

10. 白井昭博, 伊藤優花, 間世田英明, 高麗寛紀 : ジェミニ型第四アンモニウム化合物を吸着させた無機-有機ハイブリッド抗菌剤の開発, *日本化学会第 90 春季年会(2010)*, No. 1G7-03, 95 頁, 2010 年 3 月.

11. Hideaki Maseda : Determination of Membrane Topology of the Microcystin-degrading Enzyme, MlrA, and Construction of its High-level Expressing Cells, Chiang Mai, Dec. 2009.

12. Akihiro Shirai, Yasuko Fumoto, Shou Nashino, Hideaki Maseda and Hiroki Kourai : Synthesis and antimicrobial properties of novel anionic heterocyclic surfactant derivatives of 5-alkyl-2-methyl-1,3-thiazole, *42nd IUPAC Congress: Chemistry Solutions*, Glasgow, Aug. 2009.

13. 布本泰子, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : 新規アニオン性界面活性剤の開発, *日本防菌防黴学会 2009 年度若手の会*, 2009

年 12 月.

14. 坂口香苗, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : 新規ハイブリッド型第四アンモニウム塩の合成と抗菌特性, *日本防菌防黴学会 2009 年度若手の会*, 2009 年 12 月.

15. 白井昭博, 谷村賢一, 遠藤聡志, 間世田英明, 高麗寛紀 : 徐放性を付与したポリマー型固定化殺菌剤の構築, *日本防菌防黴学会 2009 年度若手の会*, 2009 年 12 月.

16. 室巻良彦, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : Gemini 型第四アンモニウム塩の最適構造の検討, *日本防菌防黴学会 2009 年度若手の会*, 2009 年 12 月.

17. 白井昭博, 大徳桃子, 大平匡彦, 間世田英明, 高麗寛紀 : 対称・非対称型ジェミニ新規抗菌剤の合成と抗菌機能, *日本防菌防黴学会 2009 年度若手の会*, 2009 年 12 月.

18. 白井昭博, 富脇真理, 室巻良彦, 間世田英明, 高麗寛紀 : 抗菌タイマー機能を付与したジェミニ型第四アンモニウム塩の構築, *日本防菌防黴学会 2009 年度若手の会*, 2009 年 12 月.

19. 大平匡彦, 白井昭博, 三宅洋一郎, 間世田英明, 高麗寛紀 : Gemini 型第四アンモニウム塩結合型菌種特異的ペプチドの合成と生物学的特性, *第 61 回日本生物工学会大会*, 2009 年 9 月.

20. 白井昭博, 黒木祐輔, 間世田英明, 高麗寛紀 : 新規 gemini 型ペプチドの合成とその殺菌特性, *第 36 回日本防菌防黴学会年次大会*, 2009 年 9 月.

21. 坂口香苗, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : 新規ハイブリッド型第四アンモニウム塩の合成とその生物学的特性, *第 36 回日本防菌防黴学会年次大会*, 2009 年 9 月.

22. 筒井舞子, 白井昭博, 室巻良彦, 間世田英明, 高麗寛紀 : Gemini 型第四アンモニウム塩による環境病原性アメーバの制御, *第 36 回日本防菌防黴学会年次大会*, 2009 年 9 月.

23. 室巻良彦, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : Gemini 型第四アンモニウム塩の抗菌活性および細胞毒性評価, *第 36 回日本防菌防黴学会年次大会*, 2009 年 9 月.

24. 橋田裕美子, 間世田英明, 白井昭博, 高麗寛紀 : 多剤耐性 *Serratia marcescens* の抗菌剤耐性に関与する遺伝子の同定, *第 82 回日本細菌学会総会*, 2009 年 3 月.

25. 上手麻希, 間世田英明, 白井昭博, 高麗寛紀 : 緑膿菌多剤排出ポンプ MexEF-OprN の発現制御の解析, *第 82 回日本細菌学会総会*, 2009 年 3 月.

26. 間世田英明 : クォラムセンシング機構と異物排出システム, *第 43 回緑膿菌感染症研究会*, 2009 年 2 月.

27. Shimizu Kazuya, Okano Kunihiro, Amemiya Takao, Hideaki Maseda, Utsumi

Motoo and Sugiura Norio : Effect of Cyclic Microcystin and Its Degradation Products on Transcription of the Gene Encoding Microcystin Degrading Enzymes, *1st Japan-China Graduated Forum*, Tsukuba, Oct. 2008.

28. Shimizu Kazuya, Okano Kunihiro, Hideaki Maseda, Amemiya Takao, Utsumi Motoo and Sugiura Norio : Effect of Cyclic Microcystin and Its Degradation Products on Transcription of the Gene Encoding Microcystin Degrading Enzymes, *12th International Symposium on Microbiol Ecology*, Cairns, Aug. 2008.

29. 渡部稔, 山城考, 佐藤高則, 大橋眞, 間世田英明, 續木章三, 英崇夫 : 高大連携事業「高校生の大学研究室への体験入学型学習プログラム」実施報告, 第120回徳島生物学会会報, 17頁, 2008年12月.

30. 橘あゆみ, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : 真菌類に対するジェミニ型第四アンモニウム塩の作用機構, *日本防菌防黴学会2008年度若手の会*, 2008年11月.

31. 森下裕生, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : 無機/有機ハイブリッド抗菌剤の収着・徐放性に関する研究, *日本防菌防黴学会2008年度若手の会*, 2008年11月.

32. 室巻良彦, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : ジェミニ型第四アンモニウム塩の安全性評価, 第121回徳島生物学会, 2008年11月.

33. 清水和哉, 岡野邦宏, 間世田英明, 雨宮崇, 内海真生, 杉浦則夫 : 藍藻由来生物毒 microcystin 分解酵素遺伝子の転写制御に関する研究, 第45回日本水処理生物学会大会プログラム, No. 27, 2008年11月.

34. 上手麻希, 間世田英明, 白井昭博, 高麗寛紀 : 緑膿菌多剤排出ポンプ MexEF-OprN の発現に及ぼす mvaT 遺伝子の効果, 第61回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2008年10月.

35. 橋田裕美子, 間世田英明, 白井昭博, 高麗寛紀 : 多剤耐性 *Serratia marcescens* の抗菌剤耐性に関する遺伝子の同定, 第61回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2008年10月.

36. 大徳桃子, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : 新規ハイブリット型第四アンモニウム塩の合成, 第35回日本防菌防黴学会年次大会, 2008年9月.

37. 富脇真理, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : エステル結合型疎水性基を有する新規抗菌剤の合成と抗菌活性, 第35回日本防菌防黴学会年次大会, 2008年9月.

38. 谷村賢一, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : 徐放型固定化殺菌剤の合成とその特性, 第35回日本防菌防黴学会年次大会,

2008年9月.

39. 森下裕生, 室巻良彦, 白井昭博, 間世田英明, 高麗寛紀 : ジェミニ型第四アンモニウム塩の毒性・抗菌活性の定量的構造活性相関解析, 第35回日本防菌防黴学会年次大会, 2008年9月.

40. 室巻良彦, 白井昭博, 森下裕生, 間世田英明, 高麗寛紀 : ジェミニ型第四アンモニウム塩の環境毒性および抗菌性の評価, 第35回日本防菌防黴学会年次大会, 2008年9月.

41. 白井昭博, 小野勉, 間世田英明, 高麗寛紀 : 新規 gemini 型 グリシンベタインの合成とその抗菌特性, 第35回日本防菌防黴学会年次大会, 2008年9月.

42. 間世田英明 : Quorum-sensing 機構の制御と薬剤排出ポンプ, 第22回 *Bacterial Adherence & Biofilm* 学術集会, 2008年7月.

〔図書〕(計1件)

1. 間世田英明 : 安心・安全・信頼のための抗菌材料, 米田出版, 2010年3月. P154

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間世田 英明 (MASEDA HIDEAKI)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・准教授
研究者番号 : 10372343

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし