

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10408

研究課題名（和文）グラム陰性菌に特異的に作用する細菌由来の新規抗菌物質の探索

研究課題名（英文）Search for novel antibiotics that specifically kills Gram-negative bacteria.

研究代表者

佐々木 美穂（Sasaki, Miho）

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：70581031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤耐性菌や新たな感染症原因菌の出現は世界的な脅威であり、有効な対策が求められている。本研究では、単離源としてこれまで用いられることが多かった土壌や環境水以外に、昆虫や植物なども対象として、グラム陰性菌に選択的な抗菌活性を示す抗生物質生産菌の単離を試みた。大腸菌や大腸菌とサルモネラ菌に対してのみ抗菌活性を示す抗生物質生産菌を複数単離することができた。池の水から単離した1,008菌株を用いた抗菌活性試験の結果、大腸菌に選択的な抗菌活性を示した菌株は8個あり、これらの菌株が生産する抗生物質は抗菌タンパク質である可能性が高いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新しい作用機序を示す、副作用が小さい、薬剤耐性菌が出現しにくいなどの有用な特徴をもった抗菌物質が天然物からほとんど見つかっていない。また、新規抗生物質を生産する細菌の一般的なスクリーニング方法では、既知の物質や生産菌が高頻度で単離されてしまう。本研究では、昆虫を中心にした生物の共生細菌をターゲットにし、初期スクリーニングの培養条件を工夫することで、大腸菌に選択的な抗菌活性を示す抗生物質生産菌を複数単離することができた。得られた知見は、新たな抗生物質生産菌を効率よく選抜できる手法につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The emergence of drug-resistant bacteria and new infectious disease-causing bacteria is a worldwide threat, and effective countermeasures are needed. In this study, we attempted to isolate antibiotic-producing bacteria that exhibit antibacterial activity selective for Gram-negative bacteria from insects and plants, in addition to soil and environmental water, which have often been used as sources of isolation. We were able to isolate several antibiotic-producing bacteria that showed antibacterial activity only against *Escherichia coli*, or *E. coli* and *Salmonella* sp.. The results of antibacterial activity tests using 1,008 strains isolated from the pond indicated that 8 strains showed selective antibacterial activity against *E. coli*. These antibiotics produced by these strains are likely to be antibacterial proteins.

研究分野：応用微生物学

キーワード：新規抗生物質 菌の単離 グラム陰性菌 薬剤耐性

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性 (antimicrobial resistance: AMR) とは、微生物に対して特定の薬剤が効かなくなる現象である。1980 年以降、環境やヒトに対する抗菌物質の不適切な使用などの背景により、畜舎・養殖場や病院内を中心に薬剤耐性菌が増加しており、2013 年の AMR による世界的死者数は約 70 万人とされている (Jim O'Neill, The Review on Antimicrobial Resistance, 2016)。また、多剤耐性・超多剤耐性結核、耐性マラリア等も世界的に拡大しており、このまま何も対策を取らなければ、2050 年には全世界で薬剤耐性菌による死者数が 1,000 万人へと爆発的に増加するといわれている。特に、何十年にも渡り、グラム陰性菌に対して有効な新規抗菌物質が発見、開発されていないことが懸念されている (Martin et al. Cell. 181:1518-1532, 2020)。2017 年に World Health Organization (WHO) は『新規抗菌物質の研究、発見、開発を推進するための世界的に優先すべき多剤耐性菌のリスト』を作成し、12 種を早急に対処すべき多剤耐性菌とした。このリストに掲載されている 12 種のうち 9 種がグラム陰性菌である。このように、グラム陰性菌の多剤耐性獲得が問題視されており、多剤耐性を獲得したグラム陰性の腸内常在細菌から、自然界の細菌へ耐性が伝播する可能性も危惧されている。また、現在使用されているグラム陰性菌に有効な抗菌物質は、すでに副作用が大きいことや耐性菌の出現などの問題が報告されている。

1960 年以降から 2020 年までに新しい作用機序を示した天然物由来の抗菌物質は 8 つであり、そのうちグラム陰性菌に対して作用するものはわずか 3 つのみである (Kim Lewis, Cell. 181:29-45, 2020)。これまでに、微生物から単離された抗菌物質の 3 分の 2 が放線菌由来であることから (Subramani & Sipkema, Mar Drugs. doi:10.3390/md17050249, 2019)、放線菌は豊富な抗菌物質の単離源と言える。しかし、近年では放線菌から新規抗菌物質を発見することが困難になってきている。

### 2. 研究の目的

身近な水・土壌環境を単離源とした場合や、一般的によく用いられる条件 (pH 中性・中温) を用いて培養した場合は、グラム陰性菌に対して選択的な抗菌活性を示す化合物生産細菌の発見率は非常に低い。そこで、効率良く新規の抗生物質生産菌を取得するための新たな単離源の開拓と新たなスクリーニング手法の開発は重要な課題である。

本研究の目的は、効率よく新たな抗生物質生産菌を取得するための単離源と単離条件を明らかにし、グラム陰性菌に特異的に作用する新規抗生物質を取得することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試菌株

グラム陰性菌の *Escherichia coli* NBRC3972、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275、*Pseudomonas syringae* ATCC19310、*Rastonia solanacearum* JCM10489、*Rhizobium radiobacter* JCM20371、*Salmonella* Typhimurium NBRC13245、*Xanthomonas campestris* ATCC33913 とグラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* NBRC13276、*Bacillus subtilis* 168、*Staphylococcus epidermidis* NBRC100911、*S. aureus* ATCC35591 (MRSA)、*Cutibacterium acne* NBRC107605、*Streptococcus mutans* NBRC13955 を用いた。

#### (2) 抗生物質生産菌株の単離源と培養方法

採取してきた土壌、環境水、昆虫や植物は、必要に応じて 90% エタノールで表面を殺菌後、滅菌乳鉢と乳棒で破碎し、滅菌生理食塩水に懸濁し適宜段階希釈した。寒天またはゲランガムで固化した LB 培地、MH 培地、SCD 培地、R2A 培地、YSG 培地、Horikoshi 培地あるいはこれらの培地を 10 倍や 100 倍希釈した培地を使用し、培養温度 (25°C, 30°C, 37°C, 50°C, 70°C) と組み合わせた複数の条件で混釈培養を行った。MH 培地で培養した *E. coli* NBRC3972 あるいは *P. aeruginosa* NBRC13275 の培養液の濁度 (OD<sub>630</sub> 値) を 0.03 に調整後、各混釈培地に塗抹し 25°C で培養し、抗菌活性のハローを確認した。

#### (3) 抗菌活性試験

供試菌株の培養液の濁度 (OD<sub>630</sub> 値) を 0.03 に調整後、MH 寒天培地に塗抹した。乾燥後の培地上に単離した菌株の 20 倍濃縮培養液を 2 μL スポットした。培養後、目視でハローの有無を確認した。

#### (4) 菌の同定

候補株の 16S rRNA 遺伝子配列の一部を増幅させ、DNA シーケンシングを行った後、EZ Bio Cloud による相同性検索を行った。

### (5) 抗生物質の特性評価

熱安定性試験、分画分子量の推定、プロテイナーゼ K 処理後の活性の有無、有機溶媒（メタノール、エタノール、アセトニトリル、ブタノール、酢酸エチル、ヘキサン）耐性試験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 抗生物質生産菌の探索

様々な単離源と培養条件を組み合わせることでグラム陰性菌に選択的な抗菌活性を示す菌株の単離を試みた結果、昆虫から 3 菌株、植物から 1 菌株、哺乳動物の皮膚から 1 菌株が単離された。これらの単離菌株は全て *E. coli* NBRC3972 に抗菌活性を示し、昆虫由来の 1 菌株は *S. Typhimurium* NBRC13245 にも活性を示した。

### (2) 池の水由来菌株の抗菌活性試験結果

一次スクリーニングとして 1 mL スケールの MH と LB 培地に池の水由来の 1,008 菌株を植菌し、20 倍濃縮した培養液を *E. coli* NBRC3972、*P. aeruginosa* NBRC132754、*S. aureus* NBRC13276、*B. subtilis* 168 の 4 菌株に対してスポットし、その結果を Fig. 1a に示した。4 菌株の中で、*P. aeruginosa* NBRC132754 に対して活性を示したものは 1 番少なかった。培地の違いで *E. coli* NBRC3972 に対して活性を示した菌数に差は見られなかった。LB 培地で培養すると *S. aureus* NBRC13276 に対して活性を示した菌数は MH 培地よりも多くなった。4 菌株の中で、*B. subtilis* 168 に対して活性を示した菌数は一番多く、両方の培地で活性を示した菌数も多かった。1 mL スケールの網羅的な抗菌活性の結果をベン図にまとめた (Fig. 1d)。LB 培地で培養した方が、MH 培地で培養した時よりもグラム陽性菌にのみ活性を示した菌数が多くなった。LB 培地で培養した時、4 菌株全てに活性を示した菌が 2 株確認された。LB 培地で培養した時、グラム陰性菌の *E. coli* NBRC3972 と *P. aeruginosa* NBRC132754 のみに活性を示す菌が 2 株確認された。一次スクリーニングの際に特異的に活性を示した菌数をグラフで示した (Fig. 1b)。LB 培地で培養すると *S. aureus* NBRC13276 に対して活性を示した菌数は MH 培地よりも多くなった。4 菌株の中で、*B. subtilis* 168 に対して特異的に活性を示した菌数が最も多く、両方の培地で活性を示した菌数も多かった。二次スクリーニングでは、*P. aeruginosa* NBRC132754 に対してのみ活性を示した菌株はなかった。培養スケールを変えると活性を示す菌数が変化した。8 菌株が *E. coli* NBRC3972 に対してのみ活性を示した (Fig. 1c)。

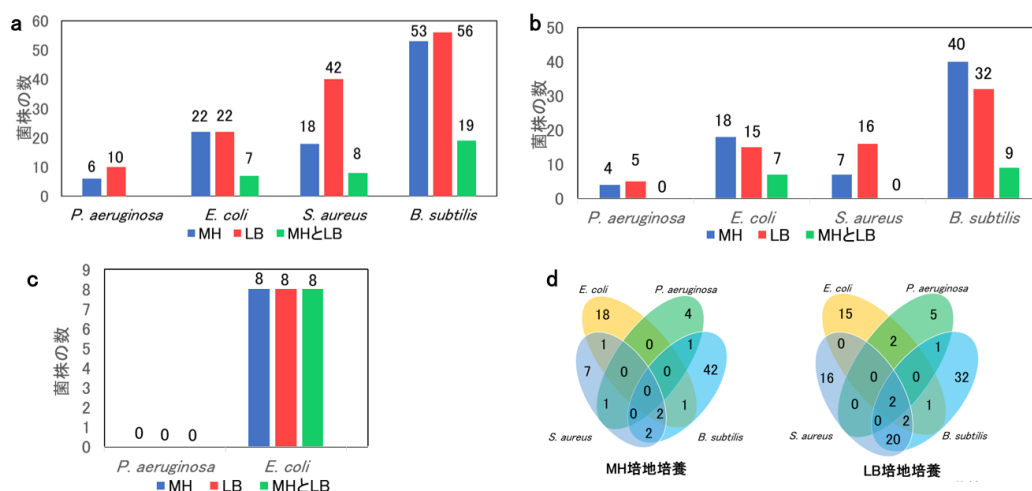


Fig. 1 池から単離された菌株の抗菌活性試験結果

a: 一次スクリーニングで抗菌活性を示した菌数、b: 一次スクリーニングで特異的な抗菌活性を示した菌数、c: 二次スクリーニングで特異的な活性を示した菌数、d: 一次スクリーニングで抗菌活性を示した菌数 (ベン図)

### (3) 抗生物質の特性評価

*E. coli* NBRC3972 に特異的な抗菌活性を示した 8 菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を用いた EZBioCloud による相同性検索の結果、*Kosakonia oryzendophytica* (No. 1, 2, 3, 7) が 4 菌株、*Pectobacterium aroudearum* (No. 6)、*Pectobacterium carotovorum* (No. 8)、*Pectobacterium versatile* (No. 5)、*Escherichia ruysiae* (No. 4) と高い相同性を示した。これらの菌株が生産する抗生物質の推定分画分子量は、No. 1 が 3~10 K、No. 2 から 8 が 10 K 以上であった。プロテイナーゼ K 処理後は No. 6 のみが活性を示し、No. 1 から 7 は活性を示さなかった。有機溶媒耐性試験では、No. 2, 3, 5, 8 が全ての有機溶媒に対して耐性を示さなかった。熱に弱い、分子量が大きい、プロテイナーゼ K 処理後に活性が消失する、ゲノムアノテーション解析の結果を総合して、8 菌株の抗生物質は抗菌タンパク質であり、特に NO. 1, 3, 5, 6, 8 は Colicin A や D などの既知の抗生物質を生産している可能性が示された。

本研究でグラム陰性菌に特異的に抗菌活性を示す菌の単離に成功した培地と培養条件は、富栄養の MH 培地か LB 培地を用いて 25℃で培養した条件であった。本研究で得られた知見は、新たな抗生物質生産菌を効率よく選抜できる手法につながると考えられる。また、グラム陰性菌に選択的な抗菌活性を示す菌株として、新種を含む複数の属の菌株が取得できたことから、新たな感染症の脅威に備えるためのライブラリーとしての役割も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Negar Shahsavari, Boyuan Wang, Yu Imai, Miho Mori, Sangkeun Son, Libang Liang, Nils Bohringer, Sylvie Manuse, Michael F. Gates, Madeleine Morrisette, Rachel Corsetti, Josh L. Espinoza, Chris L. Dupont, Michael T. Laub, Kim Lewis | 4. 巻<br>13      |
| 2. 論文標題<br>A Silent Operon of <i>Photobacterium luminescens</i> Encodes a Prodrug Mimic of GTP   | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>mBio   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1128/mbio.00700-22   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中田陽、佐々木美穂、松村吉信                 |
| 2. 発表標題<br>グラム陽性菌における抗菌性陽イオン界面活性剤の作用機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2023年度大会                |
| 4. 発表年<br>2024年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>今井優、Son Sangkeun、Liang Libang、Gates Michael、森美穂、Chiglieri Meghan、Honrao Chandrashekar、Ma Xiaoy、Guo Jason、Lewis Kim |
| 2. 発表標題<br>線虫共生細菌 <i>Photobacterium kharii</i> から発見された緑膿菌に選択的な活性を示す抗生物質 ADC58   |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会第75回大会  |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中田陽、佐々木美穂、松村吉信                 |
| 2. 発表標題<br>グラム陽性菌における抗菌性陽イオン界面活性剤の作用機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本防菌防黴学会第50回年次大会               |
| 4. 発表年<br>2023年                           |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>朝生紗希、下川春香、佐々木美穂、城島透      |
| 2. 発表標題<br>各種細菌のヒノキチオールに対する耐性化の比較検討 |
| 3. 学会等名<br>日本防菌防黴学会第50回年次大会         |
| 4. 発表年<br>2023年                     |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>北村幸輝、城島透、森美穂         |
| 2. 発表標題<br>抗菌物質生産菌の効率の良い単離方法の検討 |
| 3. 学会等名<br>日本防菌防黴学会第49回大会       |
| 4. 発表年<br>2022年                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小松華子、小谷真世、福永望美、湖山啓介、稲谷岳人、新光秀行、城島透、森美穂 |
| 2. 発表標題<br>野菜の薬剤耐性菌数の調査と低減効果に関する研究               |
| 3. 学会等名<br>日本防菌防黴学会第48回大会                        |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>井口恒輝、下川春香、中井彩瑛、堀越匡、森美穂、城島透     |
| 2. 発表標題<br>ヒノキチオールの連続使用による大腸菌の薬剤耐性化に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>日本防菌防黴学会第48回大会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|