

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660062

研究課題名(和文)クォーラムセンシング阻害に対する耐性株の出現可能性および環境適応メカニズムの追究

研究課題名(英文) Investigation of Possibility and Environmental Adaptative Mechanism to Create a Resistance Strain for Quorum Sensing Inhibition

研究代表者

前田 憲成 (MAEDA, Toshinari)

九州工業大学・生命体工学研究科・准教授

研究者番号：00470592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クォーラムセンシング阻害は、菌を殺菌する効果を持つ抗生物質などとは異なり、菌を死滅させることなく病原性発現を抑制することができるため、次世代の感染症治療法として期待されている。

本研究では、細菌はクォーラムセンシング阻害に対する環境適応機能を持っていないのかという疑問のもと、クォーラムセンシングが働くことでアデノシンを同化できる条件下におき、クォーラムセンシング阻害に対する耐性菌の探索を行ったところ、*mexR*と*nalC*遺伝子に変異を持った緑膿菌の菌株がクォーラムセンシング阻害に対して耐性を示すことがわかった。また、緑膿菌はクォーラムセンシング阻害剤を変換することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of quorum sensing is a promising approach as a next-generation infection treatment unlike antibiotics which kill bacteria.

In this study, it was investigated if bacteria can have a certain ability to alleviate or avoid repression effect by quorum sensing inhibition. Therefore, a resistant strain to quorum sensing inhibition was screened under the condition in the presence of adenosine as a sole carbon source as utilization of adenosine is required by the function of quorum sensing. As a result, *mexR* and *nalC* genes in *Pseudomonas aeruginosa* were related to the resistance to quorum sensing inhibition and also *Pseudomonas aeruginosa* was able to biotransform a quorum sensing inhibitor.

研究分野：応用微生物学

キーワード：クォーラムセンシング阻害 環境適応機能 耐性菌株 緑膿菌 代謝変換

1. 研究開始当初の背景

クォーラムセンシングとは、簡潔に述べると菌密度の増加（具体的には、オートインデューサーの濃度増加）に依存して、遺伝子発現が活性化される仕組みである。このクォーラムセンシングは、病原因子、酵素、色素などの産生に密接に関わっているため、クォーラムセンシング機構を阻害するアプローチは、従来の抗生物質などによる細菌処理（細菌の増殖抑制や阻害などをもたらす）とは異なった病原因子抑制処理法として期待されている。なぜなら、クォーラムセンシング阻害剤による細菌処理は、細菌の増殖抑制をもたらす抗生物質などとは違い、細菌に対して選択圧を付与しない優れた細菌の病原抑制技術として考えられているためである。

2. 研究の目的

現在のところ、クォーラムセンシング阻害剤による病原処理は、細菌に対して選択性を付与したいので耐性菌などが出現しないと報告されている（文献）。本研究では、本当にクォーラムセンシング阻害剤に対して、細菌は環境適応する術を持ち合わせていないのかという疑問を追究するための取り組みである。その研究コンセプトは図1に示したとおりであり、クォーラムセンシング阻害剤に対する耐性菌の出現可能性を追究することが目的となっている。

本研究期間内で、クォーラムセンシング阻害剤に対する耐性菌株の取得、耐性に関わる遺伝子の同定、耐性機構の解明を行い、どのようにクォーラムセンシング阻害を回避できるのかなどを追究し、細菌のクォーラムセンシング阻害剤に対する環境適応機能を分子レベルで明らかにすることが本研究の最終目的であった。



図1. 本研究の基本コンセプトと研究内容

3. 研究の方法

本研究を進めるにあたり、細菌が環境していくための選択圧をかける必要がある。そこで、図2に示したように、緑膿菌のアデノシンを炭素源として利用する経路（ヌクレオシドヒドラーゼの酵素発現）がクォーラムセンシングに依存しているという知見（文献）をもとに、クォーラムセンシング阻害剤の存在下では、緑膿菌の増殖が抑制されるという

選択圧をかけ、環境適応する進化の機会を促す。通常緑膿菌がアデノシンを同化して利用するためには、ヌクレオシドヒドラーゼという酵素活性が必須であるが、この酵素の遺伝子発現がクォーラムセンシングに依存している。したがって、この条件下でクォーラムセンシングが阻害されるとヌクレオシドヒドラーゼの遺伝子発現が抑制され、結果的にアデノシン条件下で増殖できなくなる。このコンセプトを実証するために、実際にクォーラムセンシング阻害剤として知られているC-30（プロモ化フラノン化合物の一種）（文献）をアデノシン最少培地に添加して、緑膿菌の増殖を確認したところ、C-30存在下で顕著に緑膿菌 PA14 株の増殖が低下することが明らかとなり、上述の選択圧をかける研究戦略の実証に成功している状況である。



図2. QS 阻害に対する耐性菌セレクション方法

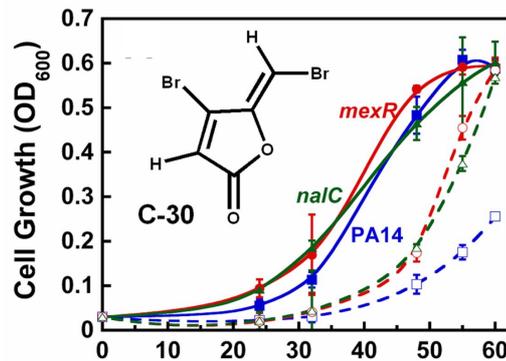


図3 探索したクォーラムセンシング阻害剤に対する耐性菌株 (*mexR*, *nalC* 変異株) によるアデノシン最少培地での増殖

本研究では、この手法を用いて、使用可能なあらゆるクォーラムセンシング阻害剤に対する耐性菌株の探索を行い、環境適応メカニズムを追究する。

具体的な研究方法は、以下の通りである。使用するクォーラムセンシング阻害剤の選択圧の確認

本研究では、クォーラムセンシング阻害剤 C-30 を用いて、選択圧の有無を確認すること。

クォーラムセンシング阻害剤に対する耐性菌株の探索

ランダムトランスポゾンなどを用いて遺伝子変異を導入して、クォーラムセンシング阻害剤に対して耐性を示す変異株や適応菌株などを探索すること。

耐性に関わる遺伝子の特定

取得したトランスポゾン変異株などから、トランスポゾン挿入部位の周辺の塩基配列を同定することで、クォーラムセンシング阻害に関わる遺伝子を明らかにすること。

クォーラムセンシング阻害の生分解

クォーラムセンシング阻害剤が緑膿菌によって変換されるのか明らかにすること。

クォーラムセンシング阻害に対する耐性メカニズムの解明

得られたクォーラムセンシング阻害に対して耐性を示す菌株を用いて、耐性メカニズムの解明を遺伝子発現レベルで行う。また、耐性の持続性やその耐性の実現可能性を実証すること。

異なったクォーラムセンシング阻害システムの構築

本研究で使用してきた拮抗阻害によってクォーラムセンシングを阻害する C-30 の他に、クォーラムセンシングシグナル分子を分解してクォーラムセンシングを阻害する AHL ラクトナーゼによるクォーラムセンシング阻害を実現するため、ラクトナーゼの発現系の構築を行った。

4. 研究成果

本研究で得られた大きな成果は次の二つである。

クォーラムセンシング阻害に対する耐性株の獲得とその環境適応メカニズム

本研究により得られた緑膿菌の増殖がアデノシン存在下ではクォーラムセンシングに依存することに着眼して、トランスポゾン変異導入手法によりクォーラムセンシング阻害剤である C-30 存在下で増殖が回復する変異株の探索を行った。その結果、数株の変異株が分離でき、遺伝子変異部位が *mexR* と *nalC* 遺伝子であることがわかった。図 3 に示したように、これらの変異株では、クォーラムセンシング阻害剤を添加したアデノシン最少培地での増殖が、野生株における阻害度合よりも回復していることがわかる。これは、クォーラムセンシングの阻害が起こりにくくなっていることを示している。次に、これらの遺伝子は、細胞内から細胞外へと排出を盲進するポンプ活性の抑制に関わる機能を持っており、C-30 による阻害効果の減少は、これらの遺伝子変異により C-30 の細胞外への排出が盲進されたことが原因であることが示唆された。

さらに、その仮説を検証するため、クォーラムセンシング阻害剤の排出盲進の割合を試験した結果、*mexR* 変異株においては、野生株と比較して、クォーラムセンシング阻害剤 C30 を細胞外への放出が盲進しており、平成 25 年度の成果で考察した「阻害剤が細胞外へ排出されることで阻害効果が低減し耐性を持つ」というメカニズムを明らかにした。

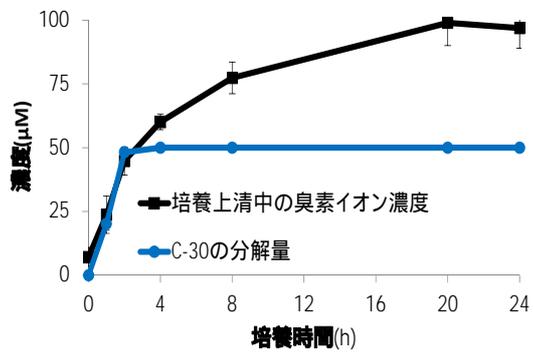


図 4. 緑膿菌によるクォーラムセンシング阻害剤 C-30 の分解と臭素イオンの放出

クォーラムセンシング阻害剤の緑膿菌による代謝変換

次に、緑膿菌野生株において、クォーラムセンシング阻害剤 C30 が代謝変換されていることを見出し、C30 の分子内にある二つのプロモ基が外れている化合物に変換されていることを明らかにした。図 4 に示したように、クォーラムセンシング阻害剤である C-30 は、緑膿菌により数時間以内で完全に変換されていることがわかった。また、同時に臭素イオンも反応液中に検出されており、特に C-30 の濃度の 2 倍量が検出された。そもそも C-30 分子の中にはプロモ基を持っており、緑膿菌による代謝の過程で、これら二つのプロモ基が外れ、臭素イオンとして反応液中に存在していることがわかった。また、GC-MS などを用いた分析により、プロモ基が一つ外れた化合物を同定し、この化合物では、依然クォーラムセンシング阻害効果が確認された。また、プロモ基が二つ外れた化合物ではクォーラムセンシング阻害効果が消失することが示唆された。

AHL ラクトナーゼ遺伝子の発現系の構築

AHL ラクトナーゼ存在下で起こるクォーラムセンシング阻害に対する耐性機構を明らかにするために、必要な過剰発現システムを構築した。今後は、ラクトナーゼ酵素の精製、およびその精製酵素を用いたクォーラムセンシング阻害効果の確認、および耐性菌の探索などを行う予定である。

< 引用文献 >

- Bjarnshorlt T., Tolker-Nielsen T., Noiby N., Givskov M., Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signaling and biofilm formation for infection control, *Expert Rev Mol Med*, 12: e11, 2010.
- Heurlier K., Denervaud V., Haenni M., Guy L., Krishnapillai V., Haas D., Quorum-sensing-negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death, *J Bacteriol*, 187: 4875-4883, 2005.
- Hentzer M., Wu H., Anderson J.B., Riedel K., Rasmussen T.B., Bagge N., Kumar N., Schembri M.A., Song Z., Kristoffersen P., Manefield M., Costerton J.W., Moln S., Eberli

L., Steinberg S., Hoiby N., Givskov M., Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors, *EMBO J.*, 22: 3803-3815, 2003.

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5件)

García-Contreras R., Perez B., Lira-Silvia E., Jasso-Charvez R., Coria-Jimenez, R., Rangel-Vega A., Maeda T., Wood T.K., Gallium induces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pathogens Disease*, Vol. 70:95-98, 2014. (査読有)
10.1111/2049-632X.12105.

García-Contreras R., Maeda T., Wood T.K., Resistance to quorum quenching compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 79:6840-6846, 2013. (査読有)
10.1128/AEM.02378-13.

García-Contreras R., Lira-Silvia E., Jasso-Chávez R., Hernández-González I.L., Maeda T., Hashimoto T., Boogerd F.C., Sheng L., Wood T.K., Moreno-Sánchez R., Isolation and characterization of Gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants, *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 303:574-582, 2013. (査読有)
doi: 10.1016/j.ijmm.2013.07.009

García-Contreras R., Martínez-Vázquez M., Villegas-Pañeda A. G., Hashimoto T., Maeda T., Quezada H., Wood T.K., Resistance to the quorum quenching compounds brominated furanone C-30 and 5-fluorouracil in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *Pathogens and Disease*, Vol. 68:8-11, 2013. (査読有)
10.1111/2049-632X.12039

García-Contreras R., Nuñez-López L., Jasso-Chávez R., Kwan B.W., Belmont J. A., Rangel-Vega A., Maeda T., Wood T. K., Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating, *ISME Journal*, Vol. 9:115-25, 2015. (査読有)
10.1038/ismej.2014.98.

[学会発表](計1件)

Takashima K., Hashimoto T., Maeda T., Investigation of biological implication for metabolism of a quorum sensing inhibitor by *Pseudomonas aeruginosa*, The 7th ISNM2013, 2013年11月7日-9日、九州工業大学、

北九州(日本)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

前田研究室ホームページ

<http://www.life.kyutech.ac.jp/~toshi.maeda/>

九州工業大学データベース

https://research02.jimu.kyutech.ac.jp/html/333_ja.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 憲成(MAEDA, Toshinari)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号: 00470592

(2)研究分担者

諸星 知広(MOROHOSHI, Tomohiro)

宇都宮大学・工学研究院・准教授

研究者番号: 90361360