

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462787

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達物質 c-di-GMP に着目した抗菌薬抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanisms of antibiotic tolerance focusing on intracellular signaling substance c-di-GMP.

研究代表者

村上 圭史 (MURAKAMI, Keiji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・准教授

研究者番号：10335804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は、浮遊状態から固層に付着し、菌体外多糖を産生し、バイオフィルムを形成する。バイオフィルムに起因する感染症は、慢性で難治性を示すが、その原因は抗菌薬抵抗性であると考えられている。本研究では、細菌は固層への付着により、菌体内のc-di-GMP濃度が上昇し、psl遺伝子の発現が誘導された結果、抗菌薬抵抗性を獲得し、バイオフィルム形成が誘導されることが分かった。c-di-GMPは新たな感染症治療のターゲットとなることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Floating bacteria attach to the solid surface and form biofilms after producing extracellular polysaccharides. Infectious diseases caused by biofilms are chronic and refractory, but the cause is considered to be antibiotic tolerance. In this study, we showed that the psl genes, which are activated by surface adherence through elevated c-di-GMP levels, confer antibiotic tolerance.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 抗菌薬抵抗性 c-di-GMP 付着

1. 研究開始当初の背景

細菌は、浮遊状態から固層に付着し、マイクロコロニーを形成後、Exopolysaccharide (EPS:菌体外多糖)を産生することにより、バイオフィームを形成し、定着する。バイオフィームに起因する感染症は、慢性で難治性を示す事が知られており、この主たる原因として抗菌薬抵抗性が注目されている。

我々は、最小発育阻止濃度 (MIC) に対する最小殺菌濃度 (MBC) の比が、浮遊菌に比べ、バイオフィームでは著しく高く、付着菌でも同様に高い値を示す事を見出しており、この MIC と MBC との乖離が、抗菌薬抵抗性であると考えている。さらに、EPS 産生に關与する *psl* 遺伝子が、バイオフィーム形成のみならず、この抗菌薬抵抗性に深く關与している事を見出している。

また、近年、細菌のライフサイクルを制御する新規細胞内セカンドメッセンジャー 'c-di-GMP' が、非常に注目を集めている。細菌は、この菌体内の c-di-GMP 濃度が上昇すると、運動性が低下し、バイオフィーム産生が亢進するが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内シグナル物質である c-di-GMP に着目し、緑膿菌における抗菌薬抵抗性獲得メカニズムを解明することを目的とし、慢性難治性感染症であるバイオフィーム感染症に対する、新たな治療薬のターゲットを見出すことを目標としている。

バイオフィームは、抗菌薬に対し抵抗性を示すことから、除菌が困難であることは知られているものの、そのメカニズムは不明である。我々はこれまでに、バイオフィーム形成以前の付着菌が既に抗菌薬抵抗性を獲得している事を見出している。本研究では、細菌のライフサイクルを制御している、細胞内セカンドメッセンジャー c-di-GMP と付着菌における抗菌薬抵抗性との関連を解析することにより、抗菌薬抵抗性メカニズム解明を目指し、実験を行う。

3. 研究の方法

(1) 細菌のバイオフィーム形成における第1段階である付着に着目し、付着を認識するシステムとして、2成分制御系に着目し、欠損株を作製し、付着に關連する2成分制御系を検索する。また、c-di-GMP の合成、または分解に直接關与する遺伝子についても同様に、欠損変異株を作製し、付着菌での抗菌薬抵抗性に關与するかを検討する。さらに、浮

遊菌と付着菌の遺伝子発現の違いをマイクロアレイで比較し、付着によるシグナル伝達を網羅的に解析する。

(2) 抗菌薬抵抗性が低下した株について、マウスによる感染実験を行い、*in vivo* での抗菌薬に対する抵抗性を評価する。

(3) c-di-GMP に対するモノクローナル抗体を作製し、ELISA による、簡便な c-di-GMP 濃度の測定方法を樹立する。c-di-GMP は、低分子であり、細胞内での濃度も非常に低いために、その定量は非常に困難である。LC/MS により定量法は報告されているが、高価な機器を必要とするため、簡便な定量法の確立は非常に重要である。

4. 研究成果

(1)

付着菌における抗菌薬抵抗性に c-di-GMP が關連しているかどうかを検討するため、プラスミドにより c-di-GMP 分解酵素を強発現した株 PA01/pJN2133 株を作成し、付着菌での抗菌薬抵抗性を測定したところ、コントロール株では付着菌の MBC が付着菌の MIC の 1.28 倍と高い抵抗性を示すのに対し、低 c-di-GMP 株では 4 倍と、抵抗性が大きく低下していることが明らかとなった。この結果、付着菌における抗菌薬抵抗性の上昇には、菌体内 c-di-GMP の上昇が不可欠であることが判明した。

緑膿菌はゲノム情報から約 60 個の 2 成分制御系をもつと考えられており、その多くが病原性や抗菌薬耐性に關わっていると推測されているものの、付着や抗菌薬抵抗性への関連についてはほとんど報告されていない。そこで、10 個の 2 成分制御系について、緑膿菌 PA01 株を親株として in-frame 変異株を作成し、付着菌における抵抗性を測定したところ抵抗性の低下した変異株は認められなかった。

また、c-di-GMP の合成や分解に關連するドメインをもつ遺伝子が 37 個存在することが分かっているものの、個々の機能については不明な点が多い。そこで、付着菌の c-di-GMP の上昇に關連する c-di-GMP の合成、分解關連遺伝子について、15 個の in-frame 変異株と 1 個の 2 重欠損株を作製し、付着菌における抵抗性を測定したが、抵抗性の低下した株を見出すことは出来なかった。

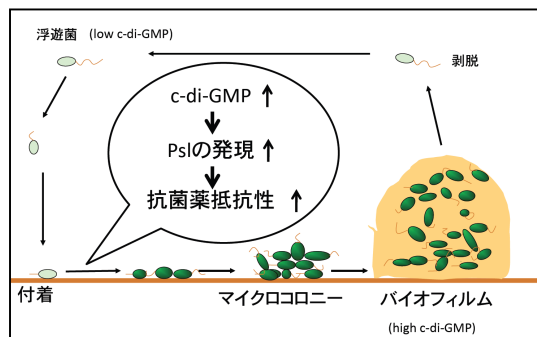
付着菌における遺伝子発現を解析するためにマイクロアレイを行うことを計画して

いたが、マイクロアレイを実施するのに必要な RNA 量を、付着細菌から精製することが困難であったため、*psl* 遺伝子に加え、これまでの研究において、トランスポゾンライブラリーから検索を行っていた、付着菌やバイオフィーム形成菌における抗菌薬抵抗性に関する 21 個の遺伝子について、RT-PCR を用いて、付着菌での発現量を浮遊菌と比較した。その結果、5 倍以上発現が上昇していた遺伝子が 8 個見出された。また *psl* 遺伝子も 5 倍発現が上昇していた。

(2) c-di-GMP に制御されている *psl* 遺伝子が抗菌薬抵抗性に重要な働きをしていることを見出しており、本研究では、PAO1 株、*psl* 欠損株それぞれの染色体上に、*lux* 遺伝子を挿入することにより発光緑膿菌を作製した。マウス大腿部緑膿菌感染モデルにより、それぞれの発光緑膿菌を感染させ、ピアペナムを投与し、経時的に細菌量を、リアルタイムイメージング法により観察した。その結果、*psl* 欠損株では、PAO1 株に比べ、ピアペナム投与 10 時間後の菌量が少ないことが明らかとなった。*In vitro* での抗菌薬抵抗性が、*in vivo* の実験計においても反映されたことにより、*psl* 遺伝子の重要性が確認された。

(3) ELISA による c-di-GMP 定量法を確立するために、モノクローナル抗体を作成することを試みた。c-di-GMP にキャリアタンパク質を付与し、マウスに免疫を行ったものの、結局 c-di-GMP に対する抗体を作製することはできなかった。そこで、リボザイムを応用した、c-di-GMP の定量法の開発を試みた。リボザイムとは触媒として働く RNA 分子のことで、本実験では、標的物質である c-di-GMP と特異的に結合し、結合すると、RNA 分子の立体構造が変化し、GFP 発色団由来の非蛍光性の小分子である DFHBI (3' 5'-ジフルオロ-4-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン) を取り込み、強い蛍光を示すようになる、"Spinach" と称される RNA 分子を利用した。その結果、緑膿菌 PAO1 株を用いて、培養液からの抽出サンプルを用いて、サンプル中の c-di-GMP 量を蛍光強度により定量することに成功した。しかしながら、付着細菌における c-di-GMP の定量を行うには、細菌数が少なすぎるため定量する事が出来なかった。現在、検出感度を改善する方法を検討している。

以上の結果から、緑膿菌は付着により、菌体内 c-di-GMP の濃度が上昇し、*psl* 遺伝子の発現が誘導された結果、抗菌薬抵抗性が上昇することが明らかとなった。c-di-GMP は、バイオフィーム感染症治療薬の開発において、新たなターゲットとなることが判明した。



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 4 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

Viducic D, Murakami K, Amoh T, Ono T and Miyake Y: Interplay between the quorum sensing regulator VqsR and the *Pseudomonas* quinolone signal in mediating carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. Research In Microbiol 168: 450-460, 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

Viducic D, Murakami K, T. Amoh, Ono T and Miyake Y: RpoN modulates carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* through *Pseudomonas* quinolone signal and PqsE. Antimicrob Agents Chemother 60: 5752-5764, 2016, 査読有り

[学会発表](計 6 件)

村上圭史, 緑膿菌呼吸器感染症における抗菌薬抵抗性の臨床的重要性について, 第 9

0 回の本細菌学会総会，2017
村上圭史，緑膿菌呼吸器感染症における抗
菌薬抵抗性の重要性について，第1回バイ
オフィーム研究者若手ワークショップ，
2016
村上圭史，付着菌およびバイオフィーム形
成菌の抗菌薬抵抗性とそのメカニズム，第
89回日本細菌学会総会，2016
村上圭史，クラリスロマイシンによる緑膿
菌 c-di-GMP の誘導，第50回緑膿菌感染
症研究会，2016
上田舞，リボザイムを応用した c-di-GMP
定量法の開発，第39回徳島県医学検査学
会，2015
村上圭史，緑膿菌 *psI* 遺伝子が抗菌薬抵抗
性に及ぼす影響，第63回日本化学療法学
会西日本支部総会，2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

三宅 洋一郎 (MIYAKE, Yoichiro)
徳島文理大・保健福祉学部・教授
研究者番号：80136093

(3) 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

(4) 連携研究者

狩山 玲子 (KARIYAMA, Reiko)
岡山学院大学・人間生活学部・教授
研究者番号：40112148

(5) 研究協力者

天羽 崇 (AMOH, Takashi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：00803545