

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	緑膿菌感染症におけるQuorum sensing 機構の制御に関する基礎的研究
作成者(著者)	太田, 登志子
公開者	東邦大学
発行日	2020.12.24
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 宮内 正二 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲982号
学位記番号	甲第129号
学位授与年月日	2020.12.24
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28178892

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

論文要旨

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は生体の防御機能が低下した易感染者において、呼吸器感染症、尿路感染症、創傷感染、敗血症などの致死的な転帰をもたらす日和見感染症の原因菌である。緑膿菌感染症の治療を困難にする要因として、抗菌薬耐性や宿主要因だけでなく、患者の病態に影響する病原因子に関与する Quorum-sensing (QS) と呼ばれる細胞密度依存的な遺伝子発現制御機構の存在が報告されている。緑膿菌の QS では、主に acyl homoserine lactone (AHL) をシグナル物質とする Las 系と Rhl 系と呼ばれる 2 つの主要な経路が複雑に関与し、病原因子の発現等を制御している。

本研究では緑膿菌臨床分離株について、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異、培養性状や病原因子の産生を菌株間で比較し、QS 機構との関連をゲノム解析と遺伝子相補により確認した。更に、QS 機構阻害剤の探索研究より得られた化合物による緑膿菌病原因子産生への影響を解析し、臨床応用の可能性を検討した。

1. 緑膿菌臨床分離株サーベイランスによる同一患者由来株の比較

同一患者から継続的に分離された緑膿菌 16 株について、分子疫学解析、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異解析、QS 機構に関与する病原因子産生の比較を行った。PCR-Based ORF Typing (POT) 法による分子疫学解析では 16 株のスコアは全て一致し、同じ遺伝子型であると判定された。薬剤耐性に関しては、カルバペネム系とアミノグリコシド系薬に対する MIC 値に検体受領日の時系列的な偏りや傾向はみられなかった。一方、キノロン系薬シプロフロキサシンに対しては 3 株 (No. 280、286、297) が、15.6 µg/mL と他の株に比べて突出して高い MIC 値を示した。これら菌株では、キノロン標的分子 GyrA、薬剤排出ポンプの転写調節因子 MexR、MexS、MexT をコードする遺伝子に変異が生じていた。QS 機構に関与する病原因子の産生を検証するために、スキムミルク培地、アデノシン培地上での生育を比較ところ、シプロフロキサシン耐性を示した菌株と異なる 3 株 (No. 219、240、296) で良好な生育が認められ、これらの株は Las 系の QS 機能で制御されるプロテアーゼとヌクレアーゼの生産が多いと考えられた。また、感染状態では緑膿菌の QS 機構は活性化されていると想定されたが、他の菌株ではこれらの培地上での生育が不良であり、Las 系の QS 機構による病原因子の産生は低いことが示唆された。

2. No286 のコロニー分離株間のゲノム解析および病原因子の比較

臨床分離株 No. 286 は他の緑膿菌株と異なり、LB 寒天培地上でコロニー表面が smooth と rough の性状が混在し、赤色の色調を呈した (Fig. 1)。そこで、No. 286 から smooth 性状を示す S 株の 1S3、2S1、rough 性状を示す R 株の 1R、2R を分離した (Fig. 2)。これらの菌株において、POT 法におけるバンドパターンは完全に一致した。S 株と R 株のド

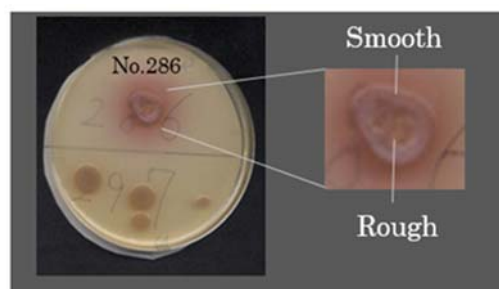


Fig. 1 No. 286 株

ラフトゲノム配列を比較した結果、コアゲノム検出対象となった 5,887,102 base 中に 10 箇所 の 1 塩基変異 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) が確認された。その内の 1 箇所は QS 機構の主要な転写制御因子である LasR をコードする *lasR* にあり、R 株では 94 残基目がグルタミンであるの対して、S 株はストップコドンとなっており、C 末端側の 145 残基が欠損していると考えられた。緑膿菌の病原因子の一つであるエラスターゼの活性を比較すると、S 株は R 株より低かった (Fig. 2)。また、バイオフィーム形成量は S 株が R 株よりも高かった (Fig. 3)。エラスターゼとバイオフィームの形成は QS 機構を介して制御されていることから、これらの事象は *lasR* のナンセンス変異に関連することが示唆された。

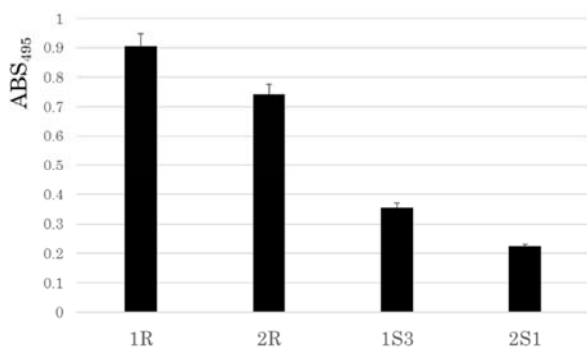


Fig. 2 R 株と S 株のエラスターゼ活性の比較

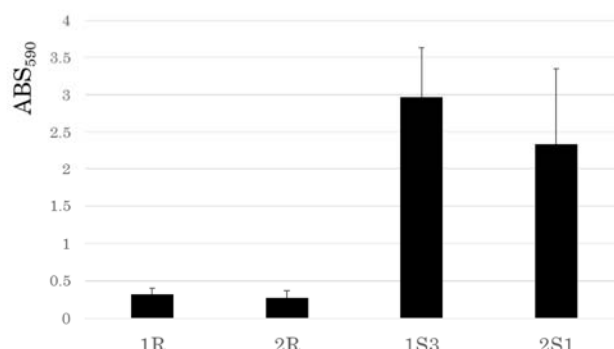


Fig. 3 R 株と S 株のバイオフィーム形成量の比較

3. *lasR* 遺伝子変異株への遺伝子相補による表現型の影響

lasR 遺伝子にナンセンス変異のあった S 株へ遺伝子配列に変異のない R 株由来の *lasR* 遺伝子を挿入し、*lasR* 遺伝子変異による表現型の影響を調べた。緑膿菌汎用ベクター pMMBapr8 (10.1 kb) に R 株由来の *lasR* 領域 (1.4 kb) を挿入し、*lasR* 相補用プラスミド pRlasR-1、pRlasR-2 を作成した。*lasR* の挿入向きにより、pRlasR-1 の *lasR* は自身のプロモーターと pMMB67EH の *tac* プロモーター、pRlasR-2 の *lasR* は自身のプロモーターによる転写が期待できる。各プラスミドを *E. coli* ET12567/pUZ8002 からの接合伝達により S 株である 2S1 へ導入した。

S 株では R 株よりもエラスターゼの産生低下が見られたが、R 株由来の *lasR* を相補した

2S1/pRlasR-1 では R 株と同等のエラスターゼの産生が見られた(Fig. 4)。エラスターゼの合成酵素である LasA、LasB は、緑膿菌の QS 機構に関与する転写活性化因子 LasR の発現を必要とする代表的な Las 系の病原因子であることから、S 株の LasR の C 末端側の欠損がエラスターゼの産生を抑制し、*lasR* の相補により変異が生じていない LasR が発現することでエラスターゼの産生能が回復したと考えられた。緑膿菌感染症において宿主の組織を攻撃するエラスターゼの活性に対して Las 系の阻害が有効であることが見出されたことは、緑膿菌感染症の治療または予防に寄与すると考えられる。

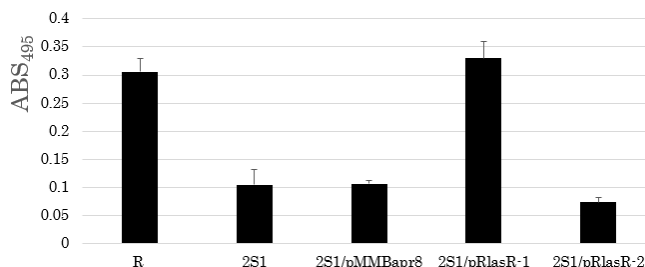


Fig. 4 *LasR*相補株のエラスターゼ活性の比較

4. QS 阻害活性物質のスクリーニングと緑膿菌病原因子に対する影響

既存の抗菌薬には必ず耐性菌が出現し、多剤耐性緑膿菌による感染症も深刻な問題となっている。薬剤耐性菌は耐性に関与する遺伝子の変異や伝播が生じたところに、抗菌薬による選択圧が加わることによって顕在化する。そのため、近年、QS 機構を阻害することで細菌の生存には影響を与えずに病原因子の発現を制御する QS 阻害剤が注目されている。緑膿菌臨床分離株 No. 286 の検証により、LasR を介した QS 機構がエラスターゼ産生を制御していることが示されたことから緑膿菌感染症においても QS 阻害剤が有効性を示すことが期待できる。そこで、当研究室で保有している放線菌代謝産物ライブラリーから新たに QS 阻害活性をもつ化合物の探索を行った。まず、識別が容易な *Chromobacterium violaceum* CV026 を用いたスクリーニング系で評価した。AHL 合成酵素遺伝子 *cvil* が欠損している *C. violaceum* CV026 は AHL である *N*-hexanoyl-L-homoserinelactone (*N*-HHL) 添加すると QS 機構により紫色色素 violaceine を産生するため、violaceine の産生を指標に QS 阻害を確認できる。322 サンプルを評価した結果、Fig. 5 に示した 5 種類の化合物に QS 阻害活性を認めた。また、QS 阻害様式を確認するために *N*-HHL との競合を Checker board 法により確認したところ、No. 1、No. 74、No. 130 では *N*-HHL との濃度依存的な競合阻害活性が認められたが No. 29-2、No. 48 では部分的であった。

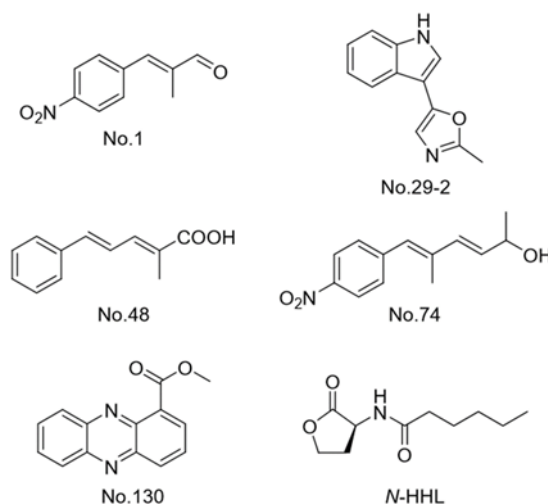


Fig. 5 QS 阻害活性物質および *N*-HHL の構造式

QS 阻害活性が見られた 5 つの化合物について緑膿菌の色素生産やエラスターゼ産生への影響を検証した結果、No. 1、No. 74、No. 130 は緑膿菌 *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Fig. 7) ならびに臨床分離株 1R、2S1 の蛍光色素産生を抑制し、No. 29-2、No. 48 は高エラスターゼ活性株 1R のエラスターゼ活性を低下させる傾向を見せた。

これらの化合物の *C. violaceum* CV026 ならびに *P. aeruginosa* ATCC 27853 の増殖への影響を確認したところ、*C. violaceum* CV026 に対しては、No.74 で僅かな増殖抑制が見られ、No. 48 と No. 130 は培養中期から後期(6~12 時間)の増殖を促進した。一方、*P. aeruginosa* ATCC 27853 の増殖に対して、これら 5 つの化合物はいずれも影響を与えなかった。さらに、黄色ブドウ球菌 *S. aureus* ATCC 25923、大腸菌 *E. coli* ATCC 25922 に対してもこれら 5 つの化合物は抗菌活性を示さなかった。

同一患者より分離された緑膿菌株の解析や *lasR* 遺伝子の相補実験などにより

QS 機構の阻害が緑膿菌感染症の治療に寄与する可能性を見出した。また、QS 阻害剤のスクリーニングにより選別された抗菌活性をもたない化合物は、新たな QS 阻害剤を開発するための潜在的なリード化合物として期待される。

対象論文

Ohta T, Fukumoto A, Iizaka Y, Kato F, Koyama Y, Anzai Y. Quorum Sensing Inhibitors against *Chromobacterium violaceum* CV026 Derived from an Actinomycete Metabolite Library. *Biol. Pharm. Bull.* 43,179-183 (2020).

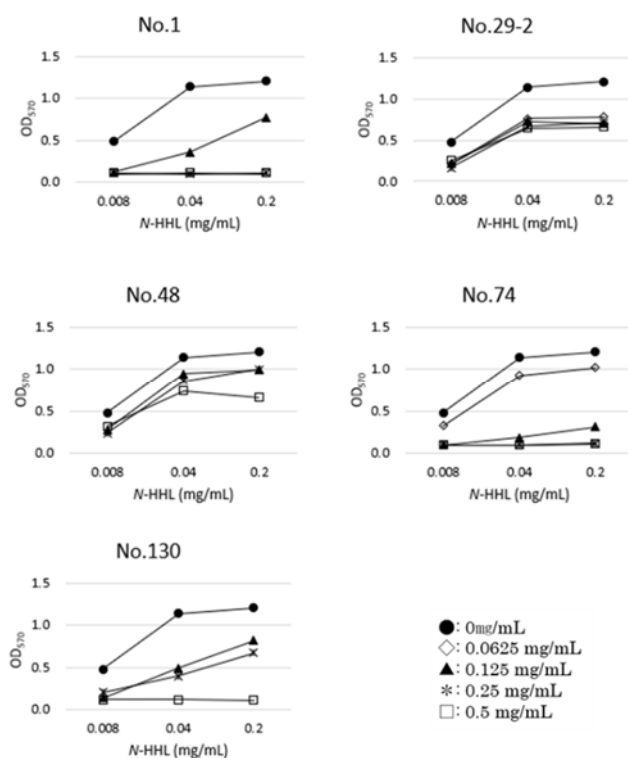


Fig. 6 QS 阻害活性物質の Checker board assay

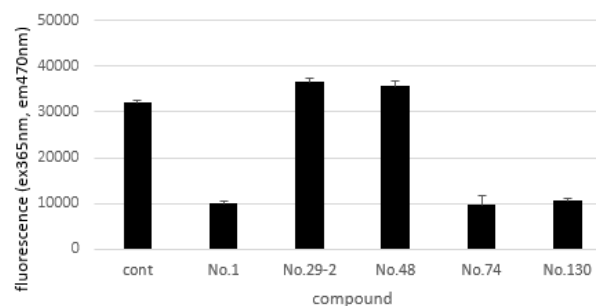


Fig. 7 QS 阻害活性物質の蛍光色素生産阻害の比較

学位論文審査報告書

報告書記載： 2020年 11月 6日

学位申請者名	太田 登志子
論文題目	緑膿菌感染症におけるQuorum-sensing機構の制御に関する基礎的研究
審査担当者名	主査 宮内 正二 副査 石井 敏浩 副査 伊関 峰生

学位論文の審査結果の要旨：

緑膿菌は、日和見感染の原因細菌の一つであり、治療が大変困難である細菌の一つである。その理由として、緑膿菌が自然に多剤耐性を獲得した細菌に属し、長年の研究にかかわらず、その特效薬は未だ見つかっていないことが挙げられる。太田氏は、本審査論文において東邦大学大橋病院で2011年に日和見感染を治療した患者から単離した耐性緑膿菌約300株の菌株ライブラリーを用いて耐性メカニズムの詳細な解析を行った。その結果、主要な耐性因子が、従来の耐性とは異なる Quorum-sensing (QS) 機構の変異であることを新たに発見した。QS 機構とは、細胞間情報伝達の機構の一つでバイオフィーム形成など集団形成に関係するものである。特に着目した緑膿菌耐性株 No. 286 株は多剤排出輸送担体から DNA 複製に関する酵素に変異を有している耐性菌である。一方、主要な耐性機構が QS シグナル物質、AHL (acyl homoserine lactone) の産生酵素系の活性化転写因子の一つ、LasR の変異によるバイオフィームの形成促進であることを突き止めた。更に、放線菌代謝産物ライブラリーを用いて QS 機構を阻害する化合物スクリーニングを行い、候補化合物の幾つかを単離した。これら化合物を QS 阻害薬のリード化合物として用いた新たな耐性菌の治療薬の開発が期待され、本審査論文の新規性は非常に高いものとなっている。基礎薬学観点からも、臨床的観点からも非常に意義のあるものであると評価できる。

更に、各審査委員との面接において、太田氏の研究の進め方、研究の妥当性、研究に対する姿勢および本領域の学識に関しても審査が行われた。太田氏は、耐性を引き起こす機構が形態形成であることを突き止めるまでにはかなり時間を要したようである。当初、多剤排出ポンプの変異、DNA 複製に関わる酵素変異など網羅的に検討を重ねてきたが、これら耐性因子の関与は明確に認められなかった。そこで、太田氏は関係する遺伝子を網羅的かつ丹念に解析し、再現性のある耐性のメカニズムとして、形態形成、即ちバイオフィーム形成促進機構であることを突き止めることに成功した。審査委員全員、本論文の内容および審査面接を通して、太田氏の科学に対する実直な姿勢、誠実さ、また、緑膿菌耐性に関する研究分野の学識を十分博している点を高く評価している。特筆すべきは、耐性獲得のメカニズムが明らかにされたのは一部で有り、バイオフィーム形成の耐性獲得機構には未だ解明されていないシグナル伝達が存在することをデータとして示しており、本審査論文は今後の研究の進展が期待できる点である。この点も、論文審査委員が全員一致で高く評価している。

以上、本審査において、太田登志子氏の審査論文は、博士（薬学）論文として質、量共に十分値するものであると評価する。