

細菌

緑膿菌 Azithromycin 感受性における *Pseudomonas* quinolone signal 生合成遺伝子の役割

東山康仁 今村圭文 柳原克紀 宮崎義継 大野秀明 迎 寛 河野 茂

目的

緑膿菌はのう胞性線維症 (CF)¹⁾ やビマン性汎細気管支炎 (DPB)²⁾ などの慢性気道感染症における重要な原因菌である。MIC 測定などでは極めて高い MIC 値を示すにも関わらず、マクロライド系薬が DPB などの緑膿菌による慢性気道感染症に臨床的効果があることが示されている³⁾。マクロライド系薬であるアジスロマイシン (AZM) は、CF 患者に対して効果があることも欧米で最近報告されている^{4,5)}。この主な作用機序はマクロライド系薬の宿主細胞に対する免疫調節作用や⁶⁾、緑膿菌の病原因子の抑制が報告されているが⁷⁾、マクロライド系薬の抗緑膿菌作用自体については不明である。

一方、緑膿菌には、定数感知機構 (Quorum sensing system; QSS) と呼ばれる遺伝子発現調節機構が存在し、その病原因子の産生調整をしている⁸⁾

(図 1)。この QSS には、*las* QSS と *rhl* QSS と呼ばれる 2 種類の QSS が、5,000 ある緑膿菌全遺伝子の 600 遺伝子の発現調節に関わっていることも報告されている⁹⁾。

今回の検討で、マクロライド系薬に対する感受性と緑膿菌 QSS が大きく関わっていることが明らかになったので、報告する。

材料および方法
菌株

緑膿菌の wild strain である PAO1 株と、その QSS 欠損株 PAOJP1 (*lasI*-), PDO100 (*rhlI*-)¹⁰⁾ を使用した。また、WHITELEY らが同定した QSS control gene 欠損株の 47 株¹¹⁾ と Wagner らが同定した QSS control gene の欠損株の緑膿菌 PA14 を親株とする 37 株⁹⁾ を使用した。

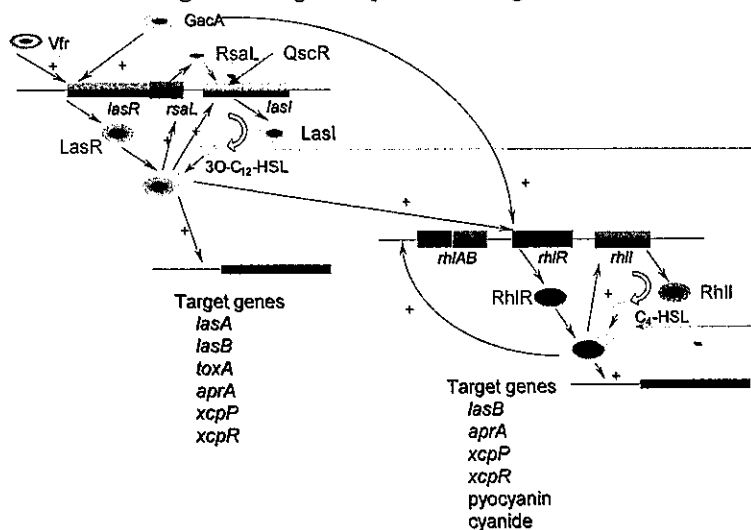
Fig. 1. *P. aeruginosa* quorum-sensing circuits.

Fig. 2. AZM-susceptibility of PAO1 and its quorum sensing system deleted derivatives during logarithmic or stationary phase growth.

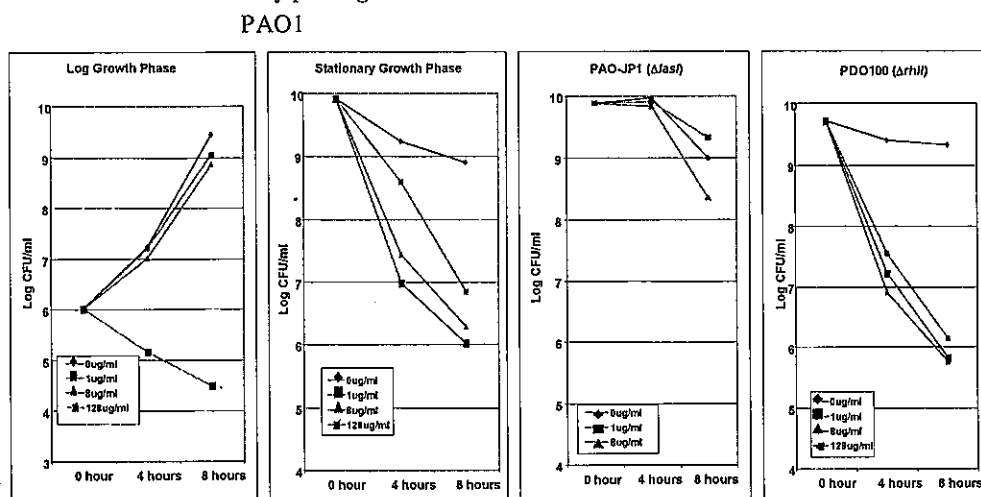


Table 1. Transposon insertion mutant libraries.

1. EZ::TN transposon insertion library

Screen 5,000 mutants

2. 47 transposon insertion mutants in genes controlled by QSS (Whitely et al)

Triple mutants (*lasI-rhlI*-, + QSS controlled gene-)

3. 37 transposon insertion mutants in genes controlled by QSS in DNA chip (Wagner et al)

Background; PA14

PAO1のtransposonによる遺伝子欠損株ライブラリーの作成

EZ::TN Transposoma (EPICENTRE, Madison, WI) を使用して、キットのマニュアル通りに作成し、テトラサイクリン耐性により transposon insertion mutant を分離した。どの遺伝子が欠損しているかについては、テトラサイクリン耐性遺伝子の flanking の遺伝子配列を確認し、transposon が挿入されている遺伝子を同定した。

AZM感受性試験

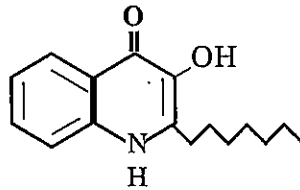
対数増殖期の AZM 感受性に関しては、 10^6 cfu/ml

になるように菌液を調整した後、AZM を含む PTSB 培地で 37 度で振盪培養を行い、経時的に菌数を定量した。定数増殖期の AZM 感受性に関しては、 10^6 cfu/ml になるように調整した菌液を 16 時間培養後、定数増殖期の菌液に AZM を加え、その後定量的に緑膿菌の生菌数を定量した。

結果

対数増殖期と定数増殖期での緑膿菌 PAO1 株の AZM に対する感受性

PAO1 の対数増殖期と定数増殖期での AZM 感受性を Fig. 2 に示した。PAO1 は MIC が $128 \mu\text{g/ml}$ を示

Fig. 3. *Pseudomonas* Quinolone signal (PQS).

2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone

PQS induces *lasB* expression.
 PQS production is required *lasR* (*las* QSS).
 PQS bioactivity is required *rhlR*.
 PQS has no bactericidal activity

すのと同様に対数増殖期では、1, 8 μ g/mlの低濃度では菌の増殖を抑えることは出来なかった。それに比較して、定数増殖期では、極めて低濃度である1 μ g/mlの濃度のAZMでさえ、優位に生菌数を減らした。

Las QSSとAZM感受性との関わり

定数増殖期のAZM感受性をQSS欠損株 (*lasI*-, *rhlI*-) を検討したところ、*lasI*欠損株ではAZM耐性を示したが、*rhlI*欠損株では、wild typeのPAO1と同様に感受性であった (Fig. 2)。

AZM感受性に関わる遺伝子の同定

以上の結果から、*las* QSSにコントロールされている遺伝子がAZMの定数増殖期における感受性に関与することが予想された。そこで、我々は、すでに報告されているQSSによりコントロールされていることが分かっている遺伝子の欠損株ライブラリーの定常期でのAZM感受性を検討すると共に、我々が作成したPAO1のtransposon insertion mutants 5, 000株のAZM感受性も検討した (Table 1)^{9,11)}。その結果、*Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) 生合成に関わる遺伝子である*pqsA*, や*pqsH*の遺伝子欠損株が定数増殖期においてもAZM耐性を示した。

考察

緑膿菌は、現在の抗菌化学療法の標準的的感受性

評価法であるMICでは、マクロライド系薬に対して耐性とされる。しかしながら、この検査方法では、菌の対数増殖期での評価に過ぎず、バイオフィルムを形成し菌の増殖が止まっているような慢性気道感染症に代表される定数増殖期では、抗菌薬に対する感受性は異なる。この違いは、薬剤の抗菌機序による違いも考えられるが、緑膿菌の遺伝子発現の対数増殖期と定数増殖期における違いによるものも考えられる。緑膿菌では、Quorum sensing systemが定数増殖期では働き、遺伝子発現がまったく違った菌である⁹⁾。今回の検討では、定数増殖期におけるAZM感受性に*las* QSSが関わっていることが明らかになり、また、遺伝子欠損株のライブラリーを検討した結果、*Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) の生合成遺伝子が関わっていることが明らかになった。このPQSは第3のquorum sensing systemと呼ばれるautoinducerであり、キノロン環を有することからPQSと呼ばれている (Fig. 3)¹²⁾。このPQS産生は、*las* QSSに依存していることが報告されていることから、AZM感受性はPQSの産生を介して*las* QSSに依存していることが示唆された。すでに、CF患者ではPQSを含むautoinducerの発現が*in vivo*で認められることも報告されている^{13,14)}。また、小児のCF患者から分離される菌株でのPQS産生はPAO1に比較して高いが、年齢と共にPQS産生は低下してくることも示されているので¹⁵⁾、AZM治療を早期から積極的に行うことの必要性が示唆される。

文 献

- 1) GOVAN J. R., DERETIC V. : Microbial pathogenesis in cystic fibrosis : mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60 : 539~574, 1996
- 2) HOMMA H. : Diffuse panbronchiolitis. *Jpn. J. Med.* 25 : 329~334, 1986
- 3) NAGAI H., SHISHIDO H., YONEDA R., *et al.* : Long-term low-dose administration of erythromycin to patients with diffuse panbronchiolitis. *Respiration* 58 : 145~149, 1991
- 4) JAFFE A., FRANCIS J., ROSENTHAL M., *et al.* : Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* 351 : 420, 1998
- 5) EQUI A., BALFOUR-LYNN I. M., BUSH A., *et al.* : Long term azithromycin in children with cystic fibrosis : a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet* 360 : 978~984, 2002
- 6) LABRO M. T., ABDELGHAFAR H. : Immunomodulation by macrolide antibiotics. *J. Chemother.* 13 : 3~8, 2001
- 7) MIZUKANE R., HIRAKATA Y., KAKU M., *et al.* : Comparative *in vitro* exoenzyme-suppressing activities of azithromycin and other macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 : 528~533, 1994
- 8) DE KIEVIT T. R., Iglewski B. H. : Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 68 : 4839~4849, 2000
- 9) WAGNER V. E., BUSHNELL D., PASSADOR L., *et al.* : Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons : effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185 : 2080~2095, 2003
- 10) PESCI E. C., PEARSON J. P., SEED P. C., *et al.* : Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179 : 3127~3132, 1997
- 11) WHITELEY M., LEE K. M., GREENBERG E. P. : Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96 : 13904~13909, 1999
- 12) PESCI E. C., MILBANK J. B., PEARSON J. P., *et al.* : Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96 : 11229~11234, 1999
- 13) MIDDLETON B., RODGERS H. C., CAMARA M., *et al.* : Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol. Lett.* 207 : 1~7, 2002
- 14) COLLIER D. N., ANDERSON L., MCKNIGHT S. L., *et al.* : A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol. Lett.* 215 : 41~46, 2002
- 15) GUINA T., PURVINE S. O., YI E. C., *et al.* : Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 : 2771~2776, 2003