

近藤 晃 論文内容の要旨

主論文

Quorum sensing system lactones do not increase invasiveness of a MexAB-OprM efflux mutant but do play a partial role in *Pseudomonas aeruginosa* invasion

クオラムセンシング(QS)機構は緑膿菌の組織侵入性に部分的に関与するが
QS 作用物質は MexAB-OprM 排出ポンプ欠損株の組織侵入性に関与しない

近藤 晃, 平瀧洋一, 後藤直正, 福島和子, 柳原克紀, 大野秀明, 東山康仁,
宮崎義継, 西出喜代治, 野出 学, 山田恭暉, 河野 茂, 上平 憲

Microbiology and Immunology, in press.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学 専攻
(主任指導教員: 上平 憲 教授)

緒言

細菌が生育環境下で自身の置かれた状況を的確に感知してその情報を互いに伝達・交換する Quorum sensing (以下 QS) 機構は、緑膿菌を始めとする多くの病原細菌で認められる。QS 機構は主に Las, Rhl の 2 つの系があり、*lasI* 遺伝子からは 3-O-C₁₂-HSL (homoserine lactone) を、*rhlI* 遺伝子からは C₄-HSL という情報伝達物質を産生する。

一方、この情報伝達物質は、MexAB-OprM 薬剤排出 (efflux) ポンプを介して菌体外へ排出される。ところが本排出ポンプ欠損 PAO1 株 (以下 *AB11* 変異株) は、PAO1 親株 (WT) が本来有する組織侵入性を失っていることから、緑膿菌の組織侵入性に関する因子は MexAB-OprM を介して排出される QS 情報伝達物質と関連する可能性もある。

これまでに QS 機構自体と緑膿菌の病原性を左右する組織侵入性との相互関係は殆ど明らかにされていない。そこで、今回、緑膿菌の QS 機構の異常が組織侵入性へ与える影響について *lasI* 遺伝子欠損株、*rhlI* 遺伝子欠損株を用いて以下の実験を行なった。また MexAB-OprM ポンプを介して排出されるとされる 3-O-C₁₂-HSL を外来性に加えた時に、MexAB-OprM 欠損株の組織侵入性に影響を与えるについての検討も行なった。同様に C₄-HSL を外来性に加えた時の影響についても検討した。

対象と方法

緑膿菌の組織侵入性の評価は、4 日間培養して作製した MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 細胞モノレイヤーを用いて行なった。モノレイヤーの上層に 1well あたり約 3.5×10^6 cfu/ml の緑膿菌を接種した。上層からモノレイヤーを通過して下層へと移動した菌を、3 時間および 6 時間後に採取し、その中に含まれる菌数を定量して組織侵入性の評価を行なった。

QS 機構の異常が組織侵入性へ与える影響については、各々 *lasI*, *rhII* 遺伝子欠損株 (KG7001(*lasI*), KG7002(*rhII*)) を用い、モノレイヤー法にて評価した。

Efflux ポンプと組織侵入性の相互関係を明らかにするために、*mexAB-oprM* 遺伝子欠損株 (KG7019(*ABM*)) を用いて、外来性 3-O-C₁₂-HSL、C₄-HSL の添加実験を行なった。

結果

1) KG7001(*lasI* 遺伝子欠損株)の組織侵入性は感染後 3 時間で WT の 10.2%に、KG7002(*rhII* 遺伝子欠損株)のそれは 13.4%にと有意に低下していた。

2) 組織侵入性が低下した KG7001(*lasI* 遺伝子欠損株)に 100 μM の 3-O-C₁₂-HSL を添加するとその組織侵入性はほとんど回復しなかった。一方、同様に組織侵入性の低下した KG7002(*rhII* 遺伝子欠損株)に C₄-HSL を添加した場合、組織侵入性は濃度依存性に回復傾向を示し、100 μM の C₄-HSL 添加で WT のレベルにまで組織侵入性は回復した。

3) 組織侵入性が極度に低下する KG7019(*mexAB-oprM* 遺伝子欠損株)に 100 μM の C₄-HSL の単独、100 μM の 3-O-C₁₂-HSL の単独、および C₄-HSL と 3-O-C₁₂-HSL の両方の添加を行なったが、組織侵入性は低下したままで変化は認めなかった。

考察

lasI, *rhII* 遺伝子欠損株の組織侵入性は、WT と比較して有意に低下しており、QS 機構の組織侵入性への関与が示唆された。さらに、HSL の添加実験において、*rhII* 遺伝子欠損変異株に C₄-HSL を添加した場合でのみ組織侵入性が回復した理由については不明な点も多いが、C₄-HSL を介した Rhl QS 機構の方がより強く組織侵入性に強く関与することが示唆された。

3-O-C₁₂-HSL は、MexAB-OprM を介して細胞外に排出されるので、*mexAB-oprM* 遺伝子欠損株に外来性 HSL を添加したが、組織侵入性への影響はなく、QS 機構に付随する HSL 系との関係は否定的であった。

以上の結果から、QS 機構は組織侵入性の変化に影響を及ぼすが、MexAB-OprM と関連する組織侵入性の変化は QS 機構の情報伝達物質である HSL 系とは別の因子によるものと考えられた。