
学位論文

緑膿菌 Quorum sensing 機構と抗菌薬抵抗性について

鹿山 鎮男

キーワード：緑膿菌, Quorum sensing system, 抗菌薬抵抗性, ofloxacin

Role for Quorum Sensing Related Genes of *Pseudomonas aeruginosa* in Ofloxacin Tolerance

Shizuo KAYAMA

Abstract: The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* causes immunocompromised individuals and patients with cystic fibrosis to serious nosocomial infections. Although we choose the most suitable antibiotics on the basis of minimum inhibitory concentration (MIC), it is often difficult to eradicate pathogen. This phenomenon is called "antibiotic tolerance", which is different from antibiotic resistance. Antibiotic tolerance is the ability of bacteria to survive but not grow in the presence of antibiotics. To understand the mechanism of antibiotic tolerance, we investigated the relation of quorum sensing system and antibiotic tolerance. With 4 x MIC or 8 x MIC of ofloxacin, the *lasR* mutant and the *lasI* mutant were killed more rapidly than the parental strain, but the survival rates of the *rhlR* mutant and the *rhlI* mutant were the same level of the parental strain. And with 8 x MIC of ofloxacin, the *lasR-rhlR* double knockout mutant and the *lasI-rhlI* double knockout mutant were killed more rapidly than the parental strain. To investigate these phenomena more detail, we measured the promoter activities of *lasR* and *rhlR* genes. The promoter activity of the *lasR* was induced with ofloxacin in the logarithmic and the stationary phase cells, but the promoter activity of the *rhlR* was not. Continuously, we measured the expression levels of *lasR*, *lasI*, *rhlR*, and *rhlI*. The expression of the *lasR* was induced with lower concentration of ofloxacin, but higher concentration of ofloxacin repressed expression of the *lasR*. And expression of *lasI*, *rhlR* and *rhlI* genes were repressed or irrelevant to the concentration of ofloxacin. In conclusion, we revealed that the *las* quorum sensing system was related to the antibiotic tolerance, and the antibiotic tolerance was promoted by the *las* quorum sensing system.

緒 言

1929年の penicillin 発見以来, 抗菌薬は目覚ましい発達を遂げた。しかし, 抗菌薬の著しい発達によっても感染症に関する諸問題は終焉を迎えることなく, むしろ新たな問題を惹起する様相を呈している。その原因には, 抗菌薬耐性 (antibiotic resistance) 及び抵抗性 (antibiotic tolerance) の問題があげられる。従来, 感染症治療にお

いては, まず起因菌を同定し, その菌に対する最小発育阻止濃度 MIC (minimum inhibitory concentration) を基準として適切な抗菌薬を選択するという方法が一般的である。しかし, MIC を基準とした適切な濃度・種類の抗菌薬を使用しても除菌が困難で難治化し, 慢性的な経過をたどる症例が存在する。MIC が低いにも関わらず菌が生き残る現象を抗菌薬抵抗性という^{1,2)}。薬剤耐性は

耐性遺伝子の獲得を通じて成立する。この際、MICは高い値を示し、薬剤の存在下においても増殖することが可能である。その結果、薬剤作用部位はやがて耐性遺伝子を獲得した細菌で占められるようになり、薬剤が効かなくなる。ところが、抗菌薬抵抗性は遺伝子の変異ではなく phenotype の変化、つまり遺伝子発現の変化であり³⁾、集団の中で一部の菌体が獲得する性質である⁴⁾。抗菌薬抵抗性を獲得した菌体はその抗菌薬の存在下で生存可能であるが発育は停止している⁵⁾。抗菌薬抵抗性についてはまだそのメカニズムはほとんど明らかにされていないが、慢性難治性感染症に対して非常に重要な役割を果たしている因子の一つと考えられている。なぜなら、抗菌薬の投与により増殖抑制が起こるのは一時的に過ぎず、完全に死滅させない限り抗菌薬の血中濃度低下や使用中止、あるいは宿主の免疫機構の低下など、細菌にとって有利な環境になると再び増殖を始めてしまい、これが臨床問題となる。この様な慢性難治性感染症の最も典型的な例として biofilm 感染症があげられる。発展途上で治療が行われている感染症の60%以上が biofilm を形成しているともいわれており⁶⁾、びまん性汎細気管支炎や cystic fibrosis などの慢性呼吸器感染症、中耳炎、慢性扁桃炎、感染性心内膜炎、壊死性筋膜炎、骨髄炎、感染性前立腺炎、留置カテーテルによる尿路感染症やコンタクトレンズの汚染などがある。歯科領域においてはう蝕、歯周病、感染根管、慢性下顎骨骨髄炎などがあげられる^{6,7)}。Biofilm は浮遊菌に比べて高い抗菌薬抵抗性を示すことが知られており、その理由として主に菌体外多糖が抗菌薬の透過を阻害することや biofilm 内の細菌の増殖速度が低下していることなどが考えられてきたが⁸⁾、実際には抗菌薬は biofilm 内部にまで到達している可能性の高いことが明らかになってきた^{9,10)}。近年、このような biofilm 形成を quorum sensing system が制御していることが分かってきた¹¹⁾。

細菌は、quorum sensing system と呼ばれる細菌間密度探知機構を利用して菌の集合体の中における個々の細菌の遺伝子発現を制御している¹²⁾。緑膿菌においては、quorum sensing system として *las* 系と *rhl* 系および PQS 系の存在が明らかになっており、転写活性化因子である LasR・RhlR タンパク質と、LasI・RhlI の代謝産物で、autoinducer である OdDHL および BHL がそれぞれ結合し、様々な病原因子の発現を制御することが報告されている。緑膿菌の病原性に深く関与する elastase や pyocyanin の産生を制御し、そのほかにも対数増殖期から定常期初期にかけての病原性に関与する遺伝子の発現を菌密度によって誘導することが知られている。これまで抗菌薬に対する細菌の感受性の評価は至適条件、すなわち発育に適した条件下でなされることが多く、環境ストレスや菌密度による生理的变化に対する抗菌薬の感受性や抵抗性についてはまだあまり分かっていないのが現状である。そこで今回、日和見感染の原因菌として知

られ、口腔内からも検出される *Pseudomonas aeruginosa* (以後、緑膿菌という) を用いて、抗菌薬抵抗性と quorum sensing system の関連性について検討した。

材料ならびに方法

1. 使用菌株およびプラスミド

使用した菌株、プラスミドを表1に示した。これらの菌株及びプラスミドの作成には Luria-Bertani (LB) broth (Invitrogen Japan K.K., Tokyo) を使用し、37℃にて培養を行った。抗菌薬の濃度は、trimethoprim, 25 µg/ml; ampicillin, 50 µg/ml; gentamicin, 15 µg/ml (*E. coli*) または 200 µg/ml (*P. aeruginosa*); tetracycline, 20 µg/ml (*E. coli*) または 200 µg/ml (*P. aeruginosa*); carbenicillin, 500 µg/ml; sucrose 5% となるよう調整した。

2. 相同組み換え変異株の作成

1) *rhlR*(-) 株の作成

制限酵素の使用や ligation, transformation などの DNA の取り扱いに関しては通法に基づいて行った¹³⁾。PCR は全て35サイクルで行い、アニーリング温度は表2に示した。緑膿菌 PAO1株の染色体上の *rhlR* 構造遺伝子内に設定したプライマー (*rhlR*-s, *rhlR*-a, 表2) を用いて PCR を行った。増幅 DNA 断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) にて精製後、pGEM-T vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) に挿入し、*E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) に transformation することにより pSKRR1 を得た。また、pACYC184 (Nippongene, Tokyo, Japan) を鋳型とし、*Bss*HIII の切断部位を付与したプライマー (*TcBss*H II -s, *TcBss*HIII-a, 表2) を用いて PCR を行い、*Tc^r* (tetracycline-resistant) カセットを得た。pSKRR1 の *rhlR* 構造遺伝子内部を制限酵素 *Bss*HIII (New England Biolabs, 以下 NEB, Massachusetts, USA) にて切断後、同酵素にて切断した *Tc^r* カセットを挿入し、pSKRR2 を得た (図1)。次いで、pSKRR2 を *Not*I (NEB) にて切断し、pMOB3 (Dr. Schweizer より供与¹⁴⁾) を *Not*I (NEB) で切断することによって得られた MOB カセット (*oriT*, *sacB*, *Cm^r*) を挿入した pSKRR3 を作成した (図1)。さらにこの pSKRR3 を *E. coli* S17-1 株に transformation することにより SKRR4 株を得た。SKRR4 株をドナーとして、PAO1 株をレシピエントとして接合伝達を行い、*Tc^r*, 5% sucrose 耐性株を作成し、相同組み換えにより染色体上の *rhlR* 遺伝子内部に *Tc^r* 遺伝子を持った変異株である SKRR1 株を作成した (図1)。また、シークエンス用プライマー (*rhlR*-2s, *rhlR*-2a 表2) を用いて PCR を行った。この PCR 断片を DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences Corp., USA) を用いてシークエンス反応を行い、ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Inc., USA) にて塩基配列の解析により、相同組み換えを確認した。

表 1 使用株菌とプラスミド

Strain and Plasmid	Relevant characteristics	Source
<i>P.aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type, Prototroph	
KMR11	<i>lasR</i> ::ΩGm ^r	This study
KMI11	<i>lasI</i> ::ΩGm ^r	This study
SKRR1	<i>rhlR</i> ::Tc ^r	This study
SKRI1	<i>rhlI</i> ::Tc ^r	This study
WR1	<i>lasR</i> ::ΩGm ^r , <i>rhlR</i> ::Tc ^r	This study
WI 1	<i>lasI</i> ::ΩGm ^r , <i>rhlI</i> ::Tc ^r	This study
PRLR1	PAO1 containing p67HSDEGFP- <i>lasR2</i>	This study
PRRR1	PAO1 containing p67HSDEGFP- <i>rhlR2</i>	This study
<i>E.coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyr98 thi-1 hsdR17 supE44 relA1F^o proAB lacZ^o ZDM15</i> Tn10 (Tet ^r)	Stratagene
S17-1	<i>thi endA recA hsdR</i> chromosome::RP4-2Tc::Mu-Km::Tn7	Tsuda M.
KMR4	S17-1 derivative harboring pKMR3	This study
KMI4	S17-1 derivative harboring pKMI3	This study
SKRR4	S17-1 derivative harboring pSKRR3	This study
SKRI4	S17-1 derivative harboring pSKRI3	This study
Plasmid		
pACYC184	Cm ^r Tc ^r	Nippon Gene
pGEM-T	general purpose TA-cloning vector, <i>ori</i> (ColE1); Amp ^r	Promega Inc.
pGEM-T easy	general purpose TA-cloning vector, <i>ori</i> (ColE1); Amp ^r	Promega Inc.
pACΩGm	pACYC184 derivative carrying Ω fragment, Gm ^r	Schweizer H.P. ¹⁶⁾
pMOB3	Km ^r Cm ^r 5% sucrose sensitive	Schweizer H.P. ¹⁴⁾
p67HSDEGFP	pMMB67HE containing EGFP coding region of pEGFP-1 with SD sequence	Murakami K.
pKMR3	pGEM-T Easy derivative carrying <i>lasR</i> :: Ω Gm ^r , MOB cassette	This study
pKMI3	pGEM-T Easy derivative carrying <i>lasI</i> :: Ω Gm ^r , MOB cassette	This study
pSKRR3	pGEM-T derivative carrying <i>rhlR</i> ::Tc ^r , MOB cassette	This study
pSKRI3	pGEM-T derivative carrying <i>rhlI</i> ::Tc ^r , MOB cassette	This study
p67HSDEGFP- <i>lasR2</i>	p67HSDEGFP containing <i>lasR</i> promoter region from nt -1011 to -1	This study
p67HSDEGFP- <i>rhlR2</i>	p67HSDEGFP containing <i>rhlR</i> promoter region from nt -1011 to -1	This study

表 2 変異株作成に使用したプライマー

Strain	Primer	Sequence	Annealing temperature (°C)
<i>lasR(-)</i> mutant	<i>lasR</i> -2s	5'-GTGGTGGTGTGCGAGATGTTTC-3'	54
	<i>lasR</i> -a	5'-AGAGAACACAGCCCCAAAACATG-3'	
	<i>lasR</i> -3s	5'-TGCGCGAGGGAAGGGCAGTCTA-3'	52
	<i>lasR</i> -6a	5'-ACTTCCTCCAAATAGGAAGC-3'	
<i>lasI(-)</i> mutant	GmBssHII-s	5'-TTGGCGCGCCAAATCACCAGCTCACCGTCTTTCA-3'	64
	GmBssHII-a	5'-TTGGCGCGCCAAACATCTTGCCCGCTGATGAA-3'	
	<i>lasI</i> -s	5'-TTTTGGGGCTGTGTTCTCTCGTGTGAA-3'	57
	<i>lasI</i> -a	5'-GGTGAAGTCAAGTACTGCGGAAAT-3'	
<i>rhlR(-)</i> mutant	<i>lasI</i> -4s	5'-ATATAGGGAAGGGCAGTTC-3'	52
	<i>lasI</i> -4a	5'-GACAAGCGGTTGTTTCATCGA-3'	
	<i>rhlR</i> -s	5'-GAGGAATGACGGAGGCTTTTGG-3'	53
	<i>rhlR</i> -a	5'-CTTCTCTGGATGTTCTTGTGG-3'	
<i>rhlI(-)</i> mutant	<i>rhlR</i> -2s	5'-CGTTTCATGGAATTGTCAAC-3'	52
	<i>rhlR</i> -2a	5'-GAGCAATTCGATCATGACCA-3'	
	TcBssHII-s	5'-TTGGCGCGCCAAGAAGTCAGCCCCATACGATA-3'	63
	TcBssHII-a	5'-TTGGCGCGCCAAGAGTGGTGAATCCGTTAGCGA-3'	
<i>rhlI(-)</i> mutant	<i>rhlI</i> -s	5'-TTGCTCTGAAATCGCTGGAAGG-3'	53
	<i>rhlI</i> -a	5'-CTGGTAGCCGGGAAGCTGATC-3'	
	<i>rhlI</i> -2s	5'-AGCATCCGATGCTGATGTCCAA-3'	54
	<i>rhlI</i> -2a	5'-GAAACGCGCTTCTCGCTACAG-3'	
PRLR1	TcEcoRI-2s	5'-GGAATTCGAAAGTCAGCCCCATACGATA-3'	58
	TcEcoRI-2a	5'-GGAATTCGAGTGGTGAATCCGTTAGCGA-3'	
PRRR1	<i>lasREcoRI</i> -sp2	5'-GGAATTCCTCCAGTTGACCCTGCCGAT-3'	61
	<i>lasRBamHI</i> -ap	5'-CGGGATCCCCGAGCGCTACGTTCTTCTTAAAC-3'	
PRRR1	<i>rhlREcoRI</i> -sp	5'-GGAATTCCTCCGTTGTCGGCGCACCTG-3'	61
	<i>rhlRBamHI</i> -ap	5'-CGGGATCCCCGTCAGTAAGCCCTGATCGAT-3'	

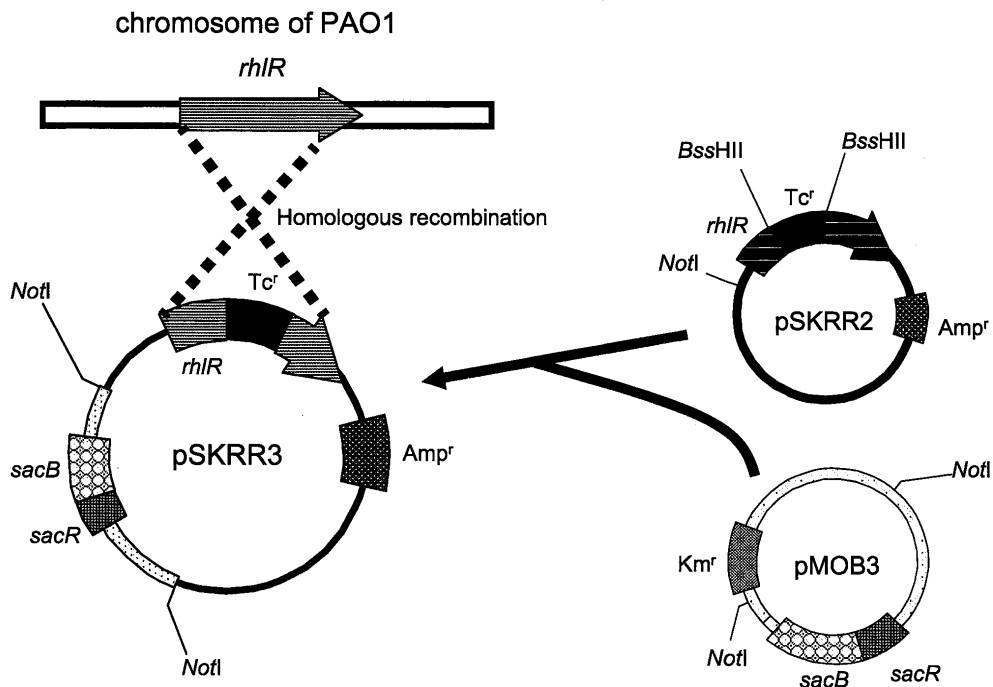


図1 *rhIR::Tc^r* vector の作成法及び *rhIR* 遺伝子相同組み換え変異株の作成法

2) *rhII(-)* 株の作成

緑膿菌 PAO1株の染色体上 *rhII* 遺伝子の構造遺伝子内に設定したプライマー (*rhII-s*, *rhII-a* 表2) を用いて PCR を行い, pGEM-T vector (Promega) へ挿入した。pACYC 184とプライマー (*TcEcoRI-2s*, *TcEcoRI-2a* 表2) にて *Tc^r* カセットを作成し, *rhIR* の場合と同様の方法で相同組み換え変異株 SKR11を作成した。プライマー (*rhII-2s*, *rhII-2a* 表2) を用いてシーケンシングを行い, 相同組み換えを確認した。

3) *lasR(-)* 株の作成

緑膿菌 PAO1株の染色体上 *lasR* 遺伝子の構造遺伝子内に設定したプライマー (*lasR-2s*, *lasR-a* 表2) を用いて同様に PCR を行い, pGEM-T easy vector (Promega) へ挿入した。pACΩGm (Dr. Schweizer より供与¹⁵⁾) を鋳型としてプライマー (*GmBssHII-s*, *GmBssHII-a* 表2) にて PCR を行い, *Gm^r* カセットを作成した。前述と同様の方法で相同組み換え変異株 KMR11を作成し, プライマー (*lasR-3s*, *lasR-6a* 表2) を用いてシーケンシングを行い, 相同組み換えを確認した。

4) *lasI(-)* 株の作成

緑膿菌 PAO1株の染色体上 *lasI* 遺伝子の構造遺伝子内に設定したプライマー (*lasI-s*, *lasI-a* 表2) を用いて同様に PCR を行い, pGEM-T easy vector (Promega) へ挿入した。pACΩGm から *EcoRI* (NEB) にて切り出した *Gm^r* カセットを作成し, 前述と同様の方法で相同組み換え変異株 KMI11を作成し, プライマー (*lasI-4s*, *lasI-4a* 表2) を用いてシーケンシングを行い, 相同組み換えを確認した。

5) *lasR(-)*, *rhIR(-)* 株の作成

pKMR3をもつ *E.coli* S17-1株である KMR4株をドナーとし, PAO1株の *rhIR(-)* 株である SKR11株をレシピエントとして接合伝達を行い, *Gm^r*, *Tc^r*, 5% sucrose 耐性株を作成し, 相同組み換えにより染色体上の *lasR* 遺伝子内部に *Gm^r* カセット及び *rhIR* 遺伝子内部に *Tc^r* カセットを持った *lasR* 及び *rhIR* の二重変異株である WR1株を作成した。

6) *lasI(-)*, *rhII(-)* 株の作成

同様に, KMI4株をドナーとし, SKR11株をレシピエントとして接合伝達を行い, 相同組み換えにより染色体上の *lasI* 遺伝子内部に *Gm^r* カセット及び *rhII* 遺伝子内部に *Tc^r* カセットを持った *lasI* 及び *rhII* の二重変異株である W11株を作成した。

3. 変異株の phenotype の検討

1) elastase 活性

3% elastin (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo) を含む LB 寒天培地に親株及び変異株をストリークして3日間培養し, コロニー周囲のハロー形成の有無を観察した。

2) gelatinase 活性

3% gelatin (Becton-Dickinson, USA) を含む LB 寒天培地に親株及び変異株をストリークして24時間培養後, 菌体を拭い取り, 飽和硫酸アンモニウム溶液を添加後, ハロー形成の有無を観察した。

3) swimming 活性

親株及び変異株をそれぞれ適切な抗菌薬を添加した LB 寒天培地に植えて12時間, 37℃にて培養したものか

らコロニーを爪楊枝にて採取し, tryptone 10g/L, NaCl 5 g/L, 0.3% agarose にて調整した培地にスポットした。クレラップ (クレハ株式会社, 東京) をかけて30℃にて14時間または24時間培養後, コロニーの直径を測定した。

4) twitching 活性

1%の寒天を含む LB-plate に菌体をスポットして37℃で7日間培養し, 培地を除去した後に0.2%クリスタルバイオレットでプレート底部を染色し, その直径を測ることによって twitching 活性を測定した。

4. 抗菌薬抵抗性の測定

1) MIC, MBC の測定

薬剤として, penicillin 系の piperacillin (PIPC, 大正富山医薬品株式会社, 東京), cefem 系の cefoperazone (CPZ, 富山化学工業株式会社, 東京), cefepime (CFPM, Bristol-Myers Squibb Co., USA), carbapenem 系の biapenem (BIPM, Wyeth Co., USA), imipenem (IPM, 万有製薬株式会社, 東京), meropenem (MEPM, 大日本住友製薬株式会社, 大阪), panipenem (PAPM, 三共株式会社, 東京), fluoroquinolone 系の ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品株式会社, 大阪), ofloxacin (OFLX, Sigma), tosufloxacin (TFLX, 大正富山医薬品株式会社), aminoglycoside 系の tobramycin (TOB, Sigma) を使用した。LB broth にて37℃で12時間培養した定常期の菌を, 生理食塩水にて希釈し, 96 well 組織培養用 U 底プレートで調整した抗菌薬連続希釈液100 μ l に 1×10^5 cfu/well になるように添加した。20時間培養後, MIC を判定した。その後, 各 well から10 μ l ずつ LB agar plate に滴下し, 37℃で24時間培養し, < 5 コロニーとなる最小殺菌濃度 MBC (minimum bacteriocidal concentration) を判定した¹⁶⁾。

2) 抗菌薬の経時的殺菌効果の判定

10ml の LB broth にて37℃で12時間培養した定常期の細菌を遠心し (1,200 \times g, 15分), 上清を取り除いた後, 同量の LB broth にて再懸濁した。抗菌薬として ofloxacin (OFLX, Sigma) を使用した。抗菌薬を添加する直前及び加えてからの経時的な生菌数を測定し, 抗菌薬を加える直前の生菌数を100%として生存率を算出し, killing curve を作成した。

5. Flow cytometry による *lasR* 及び *rhIR* プロモーター活性の測定

1) *lasR* プロモーター活性測定用緑膿菌株の作成

緑膿菌 PAO1株染色体上の *lasR* プロモーターを含む領域に設定し, 制限酵素認識部位を付与したプライマー (*lasREcoRI*-sp2, *lasRBamHI*-ap 表2) を用いて PCR を行った。増幅 DNA 断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) にて精製し, *lasR* 遺伝子のプロモーターを含む DNA 断片を得た。p67HSDEGFP 及びこの DNA 断片を *EcoRI*, *BamHI* (NEB) にて二重消化し, QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) にて精製した。こ

れらを T4 DNA Ligase (Promega) を用いて ligation し, *E.coli* XL1-Blue (Stratagene) に形質転換することにより p67HSDEGFP-*lasR*2 を得た。p67HSDEGFP-*lasR*2 を PAO1 株に transformation し¹⁷⁾, PRLR1株を得た。

2) *rhIR* プロモーター活性測定用緑膿菌株の作成

緑膿菌 PAO1株の染色体上の *rhIR* プロモーターを含む領域に設定し, 制限酵素認識部位を付与したプライマー (*rhIREcoRI*-sp, *rhIRBamHI*-ap 表2) を用いて PCR を行い, 上記と同様に得た p67HSDEGFP-*rhIR*2 を PAO1 株に transformation することにより, PRRR1株を得た。

3) Flow cytometry による *lasR* 及び *rhIR* のプロモーター活性の測定

LB broth で37℃, 12時間培養した PRLR1株及び PRRR1株培養液100 μ l を LB broth 10ml に播種して37℃にて2時間振とう培養後, その培養液50 μ l を LB broth 10ml に播種して37℃にてさらに4時間振とう培養したものを対数増殖期の菌液とした。また, LB broth で37℃, 12時間培養した PRLR1株及び PRRR1株培養液100 μ l を LB broth 10ml に播種して4時間培養したものを定常期初期の菌液とした。これらを遠心して上清を取り除き, 新しい培地を加えて ofloxacin を加える直前及び加えてからの菌液を経時的に採取した。採取した菌液を滅菌生理食塩水にて洗い, 適当な菌量になるように希釈した後, Flow cytometry EPICS XL-MCL (Beckman Coulter K.K. Japan, Tokyo) にてプロモーター活性の測定を行った。

6. Real-time PCR による *lasR*, *lasI*, *rhIR*, *rhII* 遺伝子の発現量の測定

1) 緑膿菌 total RNA の抽出及び逆転写反応

LB broth で37℃, 12時間培養した PAO1培養液200 μ l を LB broth 10ml に播種して1.5時間培養した後, 遠心して上清を取り除き, 新しい培地を加えて ofloxacin を加える直前及び加えてからの菌液を経時的に採取した。採取した菌液に RNA protect Bacteria Reagent (QIAGEN) を作用させて total RNA を安定化し, RNeasy spin column (QIAGEN) を使用し, total RNA を抽出した。次に, RQ1 RNase-Free DNase (Promega) にて DNase 処理を行い, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche diagnostics K.K., Tokyo) を用いて逆転写反応を行った。

2) Real-time PCR による遺伝子発現量の測定

Real-time PCR による遺伝子発現測定には LightCycler (Roche) を用い, 試薬は LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBRgreen I (Roche) を用いた。測定は, プライマー及び条件を表5のように適宜変更しながら行った。また, 内部 control として, *rpsL*¹⁸⁾ 遺伝子の発現量を測定し, 各遺伝子の相対定量を行い, 測定開始の発現量を100%として各時間の発現量を算出した。

表5 Real-time PCR で使用したプライマー

Primer	Sequence	Length of amplicon (bp)	Annealing temperature (°C)	Extension time (sec)
rpsL-s	5'-GCAACTATCAACCAGCTGGTG-3'	231	54	10
rpsL-a	5'-GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG-3'			
lasR-5s	5'-GACGGTTTTCTTGAGCTGGAAC-3'	460	57	19
lasR-5a	5'-CGTAGTCCTTGAGCATCCACA-3'			
lasI-3s	5'-AATTGGTCGGCGCGAAGAG-3'	411	55	17
lasI-3a	5'-ACCAGCGTCTGGATGTCGT-3'			
rhlR-s	5'-GAGGAATGACGGAGGCTTTTTG-3'	226	54	10
rhlR-4a	5'-GTTCTGCATCTGGTATCGC-3'			
rhlI-s	5'-TTGCTCTCTGAATCGCTGGAAGG-3'	244	54	10
rhlI-4a	5'-AGACGTCCTTGAGCAGGTAG-3'			

結 果

1. 親株及び変異株の phenotype の検討

1) elastase 活性

Elastin を含む LB 寒天培地に親株及び変異株をストリークして3日間培養し、コロニー周囲のハロー形成の有無によって elastin 分解能を検討した。elastin 分解能は親株では顕著である一方(図2Aの矢印)、全ての変異株で分解能はみられなかった(図2A)。

2) gelatinase 活性

Gelatin を含む LB 寒天培地に親株及び変異株をストリークして24時間培養後、菌体を拭い取り、飽和硫酸アンモニウム溶液を添加後、ハロー形成の有無によって gelatin 分解能を検討した。親株では gelatin の分解は顕著であったが(図2Bの矢印)、変異株ではみられなかった(図2B)。

3) swimming 活性

親株及び変異株のコロニーを爪楊枝にて採取し、swimming 活性測定用の培地にスポットし、30℃にて14時間または24時間培養後、コロニーの直径を測定することによって flagella の活性を検討した。親株と変異株では明らかな差がみられなかった(表3)。

4) twitching 活性

1%の寒天を含む LB-plate に菌体をスポットして培養し、培地を除去した後に0.2%クリスタルバイオレットでプレート底部を染色し、その直径を測ることによって type IV pili による twitching 活性を測定した。親株と変異株では明らかな差がみられなかった(表3)。

2. Quorum sensing system 関連遺伝子変異株の抗菌薬抵抗性の検討

1) *lasR*, *lasI*, *rhlR*, *rhlI* 各遺伝子変異株について

緑膿菌 quorum sensing system において中心的な役割をしている *lasR*, *lasI*, *rhlR*, 及び *rhlI* 遺伝子変異株を作成して、各変異株の growth curve を作成した。親株と変異株

の間で、発育速度に特に大きな差は見られなかった(図3A, B)。次に、各変異株の抗菌薬感受性を検討した。MIC が親株に比べて2~4倍の変化がみられるものがあり、ofloxacin に対する MIC は *rhlR*(-) 株において親株の8倍であった。MBC の値は全ての株において MIC の1から4倍と、特に大きな差を認めなかった(表4)。

また、これらの変異株に ofloxacin を作用させたときの生菌数を経時的に測定し、killing curve を作成した。2×MIC の ofloxacin を加えたときには親株である PAO1 株に比べて *lasR*(-) 株、*rhlR*(-) 株は生存率がやや低下した(図4A)。しかし、ofloxacin の濃度が4×MIC のときには *lasR*(-) 株の生存率は親株及び *rhlR*(-) 株に比べて大きく低下し(図4B)、8×MIC の ofloxacin を加えて4時間後には、*lasR*(-) 株の生存率は親株の約17分の1となった(図4C)。また、2×MIC の ofloxacin を加えたときには親株よりも *lasI*(-) 株及び *rhlI*(-) 株の方が抗菌薬抵抗性はやや上昇がみられたものの(図5A)、ofloxacin の濃度が4×MIC で *lasI*(-) 株の生存率は親株に比べて大きく低下し(図5B)、8×MIC の ofloxacin を加えたときの4時間後の生存率は *lasI*(-) 株の生存率が親株の約60分の1になった(図5C)。しかし、*rhlI*(-) 株は親株に比べて4時間後の生存率に特に大きな差は認められなかった。

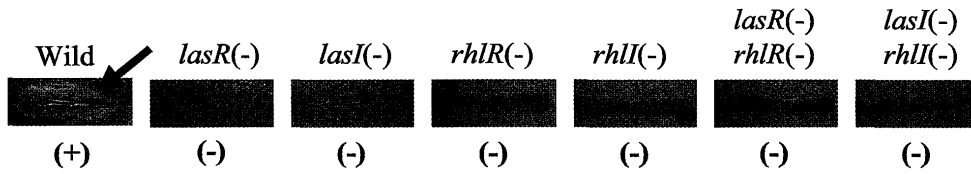
2) *lasR*(-), *rhlR*(-) 株及び *lasI*(-), *rhlI*(-) 株について

lasR(-), *rhlR*(-) 株及び *lasI*(-), *rhlI*(-) 株を作成し、まず各変異株の growth curve を作成した。親株と2つの変異株の間で成長速度に特に大きな差は見られなかった(図3C)。

次に、各変異株の抗菌薬感受性を検討した。MIC については親株に比べて変化がないか、あるいは2倍程度の差がみられるものがほとんどであった。MBC についても全ての株において MIC と変化がないか、あるいは2倍程度の差を認めた(表4)。

また、*lasR*(-), *rhlR*(-) 株及び *lasI*(-), *rhlI*(-) 株に8×

A. Elastase activity



B. Gelatinase activity

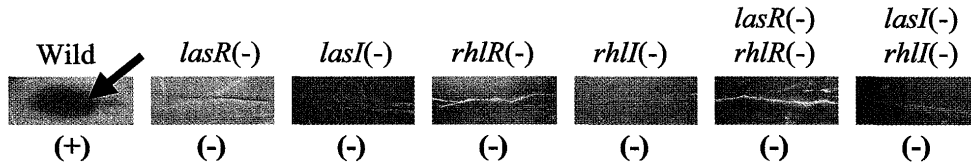


図2 PAO1株, KMR11株 (*lasR(-)*株), KMI11株 (*lasI(-)*株), SKRR1株 (*rhIR(-)*株), SKRI1株 (*rhII(-)*株), WR1株 (*lasR(-)*, *rhIR(-)*株), WII株 (*lasI(-)*, *rhII(-)*株) の elastase 活性 (A), 及び gelatinase 活性 (B) (A) 親株 (PAOI 株) のみで elastin が分解されてハロー (矢印) が形成されている。(B) 親株 (PAOI 株) のみで gelatin が分解されてハロー (矢印) が形成されている。

表3 親株及び変異株の phenotype の性状

		PAO1	<i>lasR(-)</i>	<i>lasI(-)</i>	<i>rhIR(-)</i>	<i>rhII(-)</i>	<i>lasR(-)</i> <i>rhIR(-)</i>	<i>lasI(-)</i> <i>rhII(-)</i>
Swimming	30°C,14h	8.5	8.5	8.0	8.0	8.5	8.0	7.5
	30°C,24h	14.5	14.5	13.5	12.5	14.5	12.5	12.0
Twitching	37°C,7day	12.0	10.0	11.5	11.0	12.5	9.0	8.0

(mm)

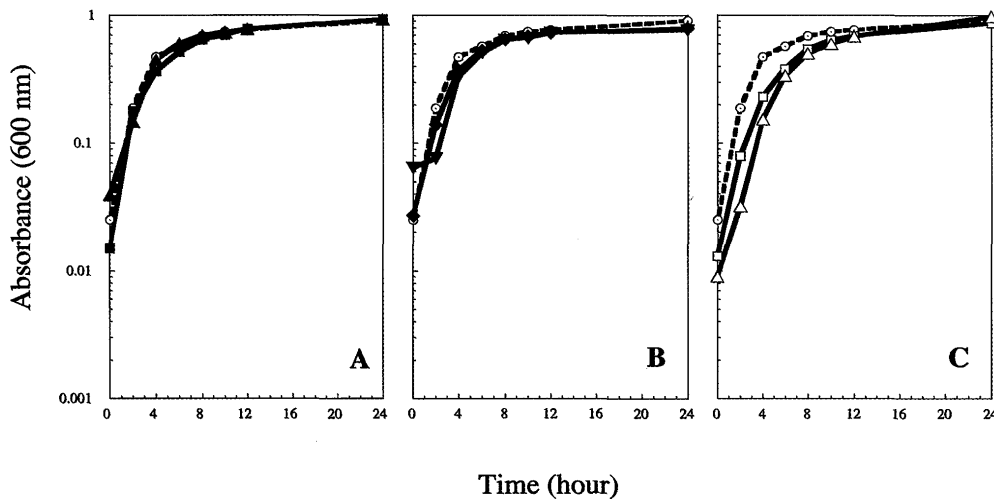


図3 KMR11株及び KMI11株 (A), SKRR1株及び SKRI1株 (B), WR1株及び WII株 (C) の growth curve
 (A) ---○--- PAO1株 —■— KMR11株 (*lasR(-)*株)
 —▲— KMI11株 (*lasI(-)*株)
 (B) ---○--- PAO1株 —◆— SKRR1株 (*rhIR(-)*株)
 —▼— SKRI1株 (*rhII(-)*株)
 (C) ---○--- PAO1株 —□— WR1株 (*lasR(-)*, *rhIR(-)*株)
 —△— WII株 (*lasI(-)*, *rhII(-)*株)

表4 親株及び変異株の抗菌薬感受性試験

	PIPC		CPZ		CFPM		BIPM		IPM		MEPM		PAPM		CPFx		OFLx		TFLx		TOB	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
PAO1	4	4	8	8	1	2	0.25	0.5	1	2	1	1	16	32	0.125	0.25	1	2	0.125	0.25	2	2
<i>lasR</i> (-)	8	8	8	8	4	8	0.5	0.5	2	2	1	1	16	32	0.25	0.5	2	4	0.25	0.5	2	4
<i>lasI</i> (-)	4	8	8	8	4	8	0.5	1	2	4	1	2	32	32	0.25	0.5	2	4	0.25	0.5	4	8
<i>rhlR</i> (-)	16	32	8	32	4	16	0.5	0.5	2	2	4	4	32	64	4	4	8	16	2	4	2	4
<i>rhlI</i> (-)	8	16	8	32	4	8	0.5	1	2	2	4	4	32	32	0.5	2	4	8	0.5	1	1	1
<i>lasR</i> (-), <i>rhlR</i> (-)	4	8	8	8	2	2	0.5	0.5	1	2	1	1	32	32	0.125	0.5	1	2	0.125	0.25	2	2
<i>lasI</i> (-), <i>rhlI</i> (-)	8	16	16	32	4	8	0.5	0.5	0.5	2	1	2	32	32	0.5	0.5	2	4	0.5	0.5	1	2

($\mu\text{g/ml}$)

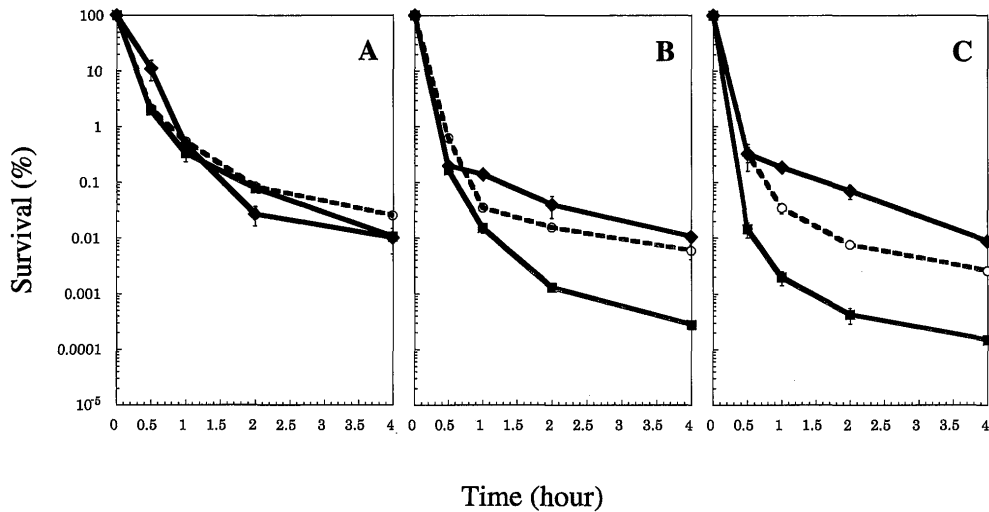


図4 KMR11株およびSKRR1株の killing curve

37°Cで培養した定常期のKMR11株 (*lasR*(-)株)とSKRR1株 (*rhlR*(-)株)に ofloxacin を2×MIC (A), 4×MIC (B), 8×MIC (C) になるよう加え, 抗菌薬を添加する直前及び加えてからの経時的な菌数を測定し, 抗菌薬を加える直前の菌数を100%として生存率を算出した。

---○--- PAO1株 —■— KMR11株 (*lasR*(-)株)
 —◆— SKRR1株 (*rhlR*(-)株)

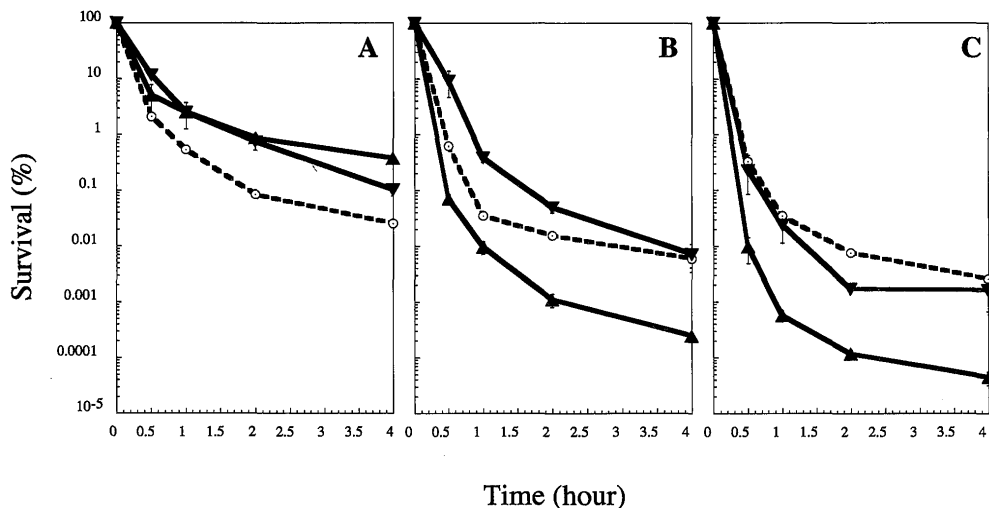


図5 KMI11株およびSKRI1株の killing curve

37°Cで培養した定常期のKMI11株 (*lasI*(-)株)とSKRI1株 (*rhlI*(-)株)に ofloxacin を2×MIC (A), 4×MIC (B), 8×MIC (C) になるよう加え, 抗菌薬を添加する直前及び加えてからの経時的な菌数を測定し, 抗菌薬を加える直前の菌数を100%として生存率を算出した。

---○--- PAO1株 —▲— KMI11株 (*lasI*(-)株)
 —▼— SKRI1株 (*rhlI*(-)株)

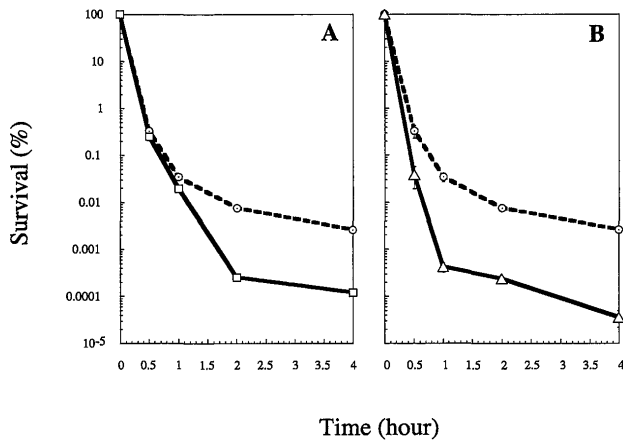


図6 WR1株 (A), WI1株 (B) の killing curve
37℃で培養した定常期の WR1株 (A), WI1株 (B) に ofloxacin を 8 × MIC になるよう加え, 抗菌薬を添加する直前及び加えてからの経時的な菌数を測定し, 抗菌薬を加える直前の菌数を100%として生存率を算出した。

- PAO1株
- WR1株 (*lasR*(-), *rhlR*(-) 株)
- △— WI1株 (*lasI*(-), *rhlI*(-) 株)

MIC の ofloxacin を作用させたときの生菌数を経時的に測定し, killing curve を作成した。8 × MIC の ofloxacin を作用させて 4 時間後の生存率は, *lasR*(-), *rhlR*(-) 株は親株の約20分の1, *lasI*(-), *rhlI*(-) 株は親株の約70分の1となった (図6 A, B)。

3. Flow cytometry を用いたプロモーター活性の測定

1) *lasR* プロモーターの活性測定

lasR 遺伝子のプロモーター活性を測定するために, p67HSDEGFP の multi cloning site に *lasR* のプロモーター配列を挿入したベクターを transformation した PRLR1株を作成した。対数増殖期における *lasR* のプロモーター活性は ofloxacin が 0.5 μg/ml のときに最も上昇し, 薬剤の作用から 4 時間後における活性の変化は control (抗菌薬なし) よりも1.4倍以上の上昇を示した (図7 A)。

一方で, 定常期初期における *lasR* のプロモーター活性は今回の実験に使用した全ての濃度の ofloxacin で control よりも上昇した (図7 B)。0.5 μg/ml の ofloxacin を作用させて 3 時間後のプロモーター活性は, control よりも1.7倍以上の上昇がみられた。しかし, 濃度との明らかな相関性はみられなかった。0.1 μg/ml の ofloxacin 作用時は, control よりもやや上昇がみられたものの, あまり大きな変化ではなかった。

2) *rhlR* プロモーター活性の測定

lasR 遺伝子と同様にして, *rhlR* 遺伝子のプロモーターを p67HSDEGFP に組み込んだベクターを持つ PRRR1株を作成した。*rhlR* のプロモーター活性は, 対数増殖期及

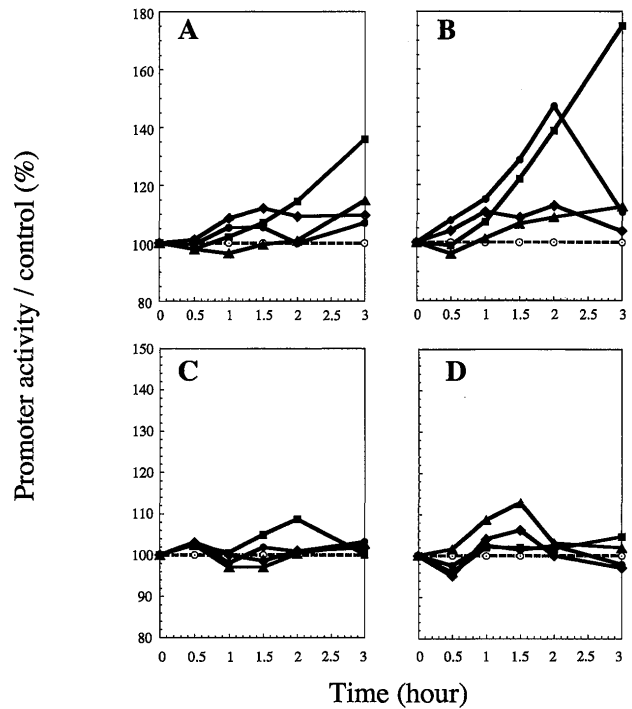


図7 PRLR1株及び PRRR1株に0.1, 0.5, 2, 8 μg/ml の ofloxacin を作用させ, logarithmic phase における *lasR* (A), stationary phase における *lasR* (B), logarithmic phase における *rhlR* (C), stationary phase における *rhlR* (D) のプロモーター活性を flow cytometry にて経時的に測定し, control を 100%として表した。

- 抗菌薬なし
- ▲— ofloxacin 0.1 μg/ml
- ofloxacin 0.5 μg/ml
- ofloxacin 2 μg/ml
- ◆— ofloxacin 8 μg/ml

び定常期初期のいずれにおいても ofloxacin によって明らかな変化はみられなかった (図7 C, D)。

4. Real-time PCR による *lasR*, *lasI*, *rhlR*, *rhlI* 遺伝子発現量の測定

対数増殖期の PAO1株に様々な濃度の ofloxacin を作用させ, LightCycler (Roche) を用いて *lasR*, *lasI*, *rhlR*, 及び *rhlI* の mRNA 量を測定した。

1) *lasR* 遺伝子の発現

Control (抗菌薬なし) における *lasR* 遺伝子の発現のピークは測定開始 2 時間後に現れ, 測定開始時の発現量の約3倍になった (図8 A)。発現のピークが現れる時間は ofloxacin を作用させても変化はみられなかった。比較的低濃度 (0.1~2 μg/ml) の ofloxacin を作用させてから 2 時間後には, control よりも発現が上昇し, その中でも0.5 μg/ml の ofloxacin 作用時に発現量の上昇が最も著しく, control に対して約1.6倍の発現量がみられ

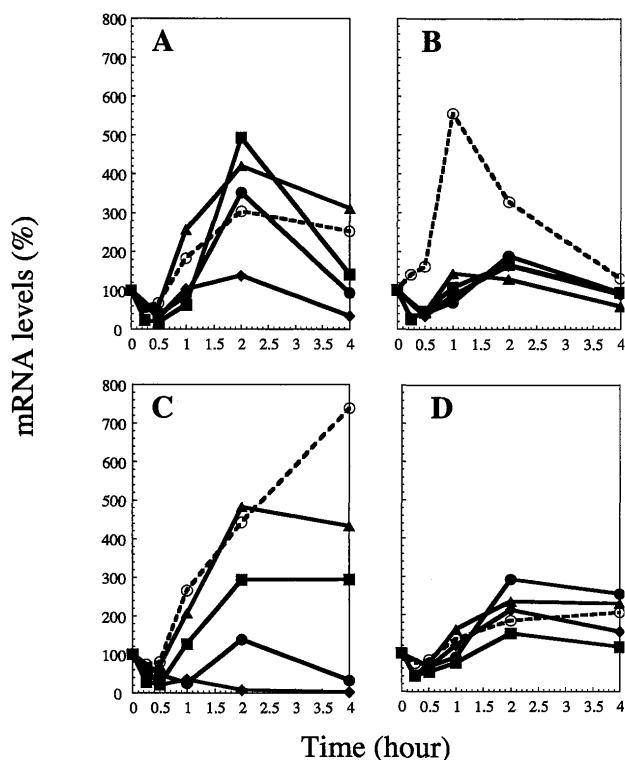


図8 PAO1株に0.1, 0.5, 2, 8 µg/mlの ofloxacin を作用させ、*lasR* (A), *lasI* (B), *rhlR* (C), *rhlI* (D) 遺伝子の発現量を Real-time PCR にて測定し、ofloxacin を添加する直前の発現量を100%として表した。

---○--- 抗菌薬なし
 ▲ ofloxacin 0.1µg/ml
 ■ ofloxacin 0.5µg/ml
 ● ofloxacin 2 µg/ml
 ◆ ofloxacin 8 µg/ml

た。また、0.1 µg/ml の ofloxacin 作用時は、0.5 µg/ml の ofloxacin 作用時よりも発現量のピークはやや低いものの、測定開始0.5時間後を除く全ての時間で control よりも発現量が上昇していた。しかし、添加する ofloxacin の濃度を 8 µg/ml まで増加すると発現は抑制され、control に比べて発現量は約2分の1にとどまった(図8 A)。

2) *lasI* 遺伝子の発現

Control における *lasI* 遺伝子の発現のピークは測定開始1時間後に現れ、測定開始時の発現量の5倍以上になった(図8 B)。ofloxacin 添加により発現のピークが現れる時間にやや変化がみられ、発現量は ofloxacin の濃度に関わらず抑制された。ofloxacin によってピーク時の発現量は最低でも約3分の1に抑制されたが、発現量の抑制と ofloxacin の濃度に相関性はみられなかった。

3) *rhlR* 遺伝子の発現

Control における *rhlR* 遺伝子の発現のピークは測定開

始後4時間経過しても現れなかった(図8 C)。*rhlR* 遺伝子の発現量は、*lasI* 遺伝子の発現と同様に ofloxacin によって抑制されたが、*rhlR* 遺伝子の発現量は ofloxacin に対して濃度依存性に低下した。最も強い抑制を受ける 8 µg/ml の ofloxacin 作用時では、薬剤の作用から4時間後の発現量が抗菌薬を作用させた時点における発現量に比べて1.8%にまで抑制された。

4) *rhlI* 遺伝子の発現

Control における *rhlI* 遺伝子の発現のピークは測定開始後4時間経過しても現れず、時間と共にわずかに上昇した(図8 D)。ofloxacin による明らかな効果はみられなかった。

考 察

感染症の治療において、MIC を基準とした適切な濃度・種類の抗菌薬を使用したにも関わらず、除菌が困難で慢性化する場合がある。MICに関わらず菌が生き残るこのような現象を抗菌薬抵抗性 (antibiotic tolerance) という^{1,2)}。しかし、感染症に対して抗菌薬が十分な効果を発揮できない原因として薬剤耐性が主に注目され、抗菌薬抵抗性に関しては抗菌薬開発から比較的早い段階でその存在が指摘されていたにもかかわらず¹⁹⁾、生存する菌の割合の少なさから薬剤耐性よりも軽視される時代が長く続いた²⁰⁾。

薬剤耐性については現在、様々なメカニズムが明らかにされている。β-lactamase などの酵素による薬剤の不活化²¹⁾ や DNA gyrase の作用点の変異による薬剤感受性の低下²²⁾、薬剤排出ポンプによる薬剤の排出²³⁾ など、複数の機序によって細菌は薬剤耐性を獲得している。このように、薬剤耐性は薬剤耐性遺伝子の獲得や遺伝子の変異による部分が大きいのが特徴であり、耐性を獲得した細菌は抗菌薬が作用している部位においても増殖が可能である。一方で、抗菌薬抵抗性は遺伝子の変異ではなく、遺伝子発現の変化であり、集団の中で一部の菌体が獲得する性質である³⁾。このような状態にある菌体は、増殖能を示さないが死滅することもない⁵⁾。

1. 抗菌薬抵抗性に関与する様々な因子について

抗菌薬抵抗性の最も典型的な例として biofilm があげられ、biofilm が抗菌薬抵抗性を獲得している原因は複数あるとされている。

1) 薬剤浸透性の低下

Biofilm に対する浸透性は薬剤によって差があり、今回の解析で用いた ofloxacin をはじめとする fluoroquinolone 系の薬剤は biofilm に比較的浸透しやすいが²⁴⁾、aminoglycoside 系の薬剤は正に帯電し、biofilm は負に帯電しているために浸透性が低い²⁵⁾。このような biofilm に対する浸透性と抗菌薬抵抗性に関する報告は多く存在し²⁶⁻²⁸⁾、Anderl らは biofilm 浸透性に優れる fluoroquinolone 系の ciprofloxacin に対しても biofilm 中の

菌は抗菌薬抵抗性を示したことから、浸透性以外にも抵抗性にはメカニズムがあることを示唆した¹⁰⁾。

2) 菌体の増殖速度の低下

Biofilm の抵抗性は、biofilm 内の低酸素状態とそれによる低い代謝状態によって惹起されるものであることや²⁹⁻³¹⁾、biofilm と発育速度が速い浮遊菌では抗菌薬に対する感受性に著しい差があること³²⁾も明らかになった。

3) barrier 効果 (免疫からの回避)

Biofilm は抗体が浸透できず³³⁾、免疫に対して抵抗性を示す。

このように、biofilm が抗菌薬抵抗性を獲得するのは主に上記3つの原因によると考えられるが、浮遊菌の抗菌薬抵抗性に関与しているのは1)と2)である。

浮遊菌と biofilm において、800以上のタンパクの発現に差があるという報告が存在することや³⁴⁾、*in vitro* における緑膿菌の抗菌薬抵抗性を対数増殖期、及び定常期の浮遊菌、biofilm で比較すると定常期の浮遊菌における抗菌薬抵抗性が biofilm よりも高いこと³⁵⁾などから、今回のように *in vitro* において抗菌薬抵抗性を検討するには biofilm よりも定常期の浮遊菌を用いる方が適切であると判断し、本実験では定常期の浮遊菌で行った。

また、抗菌薬抵抗性において前述の如く重要な役割をしている biofilm が、quorum sensing system によって形成を制御されているということが明らかになった^{11, 36)}。この quorum sensing system と抗菌薬抵抗性との関与について、著者の関心は“quorum sensing system は抗菌薬抵抗性を直接制御しているのか、或いは biofilm を制御することによって二次的に制御しているのか”という点にあった。そこで、抗菌薬作用時に集団の中で一部の菌が生き残るこの抗菌薬抵抗性という現象を、quorum sensing system で説明することはできないかと考えた。

2. Quorum sensing system について

Quorum sensing system とは、海洋微生物である *Vibrio fischeri* の luciferase 発現機構の研究過程で明らかにされた、細胞間の密度を感知する機構である^{37, 38)}。これはグラム陽性及び陰性菌に存在するが、陽性菌のものは陰性菌とやや異なる³⁹⁾。グラム陰性菌の場合は LuxR type の転写活性化因子と autoinducer によって構成されている¹²⁾。autoinducer は LuxI type タンパクによって合成され、菌密度が低いときには basal level の発現しかみられないものの、菌密度が高くなってやがて閾値に達すると autoinducer が LuxR type タンパクに結合し、活性化させる。活性化された LuxR type タンパクは quorum sensing system に制御される特定の遺伝子を活性化する。菌密度によって病原因子の発現を制御する意義として、菌密度が低い感染初期においては宿主の生体防御機構に感知されることなく、十分に菌密度が上昇してから種々の病原因子を一挙に産生して組織を破壊し、安住の場所を確保するということが考えられている⁴⁰⁾。

今回の実験で用いた緑膿菌の quorum sensing system は主に *las* 系と *rhl* 系があり、これらは病原因子に関与する多くの遺伝子の発現を制御している (図9)。*las* 系としては、LuxR type タンパクとして LasR があり、それと共に働く autoinducer である OdDHL [*N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone] が存在する。同様に、*rhl* 系としては LuxR type タンパクとして RhlR があり、それと共に働く autoinducer である BHL [*N*-butyryl-L-homoserine lactone] がある⁴¹⁾。LuxI type タンパクとして LasI と RhlI が存在し、これらはそれぞれ autoinducer である OdDHL と BHL の合成における最終段階の反応を司っている。このような緑膿菌の quorum sensing system には階級が存在し、*las* 系の方が *rhl* 系よりも優勢であり、*rhlR* は転写レベル、翻訳レベルでの調節を受けている^{41, 42)}。また、最近になって緑膿菌は *las* 系と *rhl* 系以外にも quorum sensing system に関連したシグナル分子を出していることが明らかになった。その分子は PQS [2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone] であり、これは quorum sensing system に関連した遺伝子の発現調節を行うことも明らかになり、PQS は *las* 系及び *rhl* 系に関与することが分かった⁴³⁾。緑膿菌の quorum sensing system は多くの遺伝子発現を菌密度によって誘導することが知られており、対数増殖期中期では244遺伝子、定常期初期では450遺伝子が quorum sensing system に制御されている⁴⁴⁾。

3. 親株と変異株における抗菌薬に対する感受性について

今回の実験では、quorum sensing system と抗菌薬抵抗性の関与について検討するため、quorum sensing system に主に関与する *lasR*, *lasI*, *rhlR*, *rhlI* 遺伝子についての変異株を作成し、それらの抗菌薬抵抗性の変化について検討することにした。

1) 変異株の phenotype について

緑膿菌の phenotype を検討する際によく用いられる swarming には flagella, type IV pili, rhamnolipid が必要であり⁴⁵⁾、swimming には flagella が⁴⁶⁾、twitching motility には type IV pili⁴⁷⁾ がそれぞれ必要である。Quorum sensing system が twitching motility を制御しているという説⁴⁸⁾が否定され⁴⁹⁾、現在では quorum sensing system には twitching motility と swimming は無関係であるという説が有力であり⁴⁶⁾、swarming のみ quorum sensing system に影響を受ける。すなわち、quorum sensing system は flagella, type IV pili, rhamnolipid のうちで rhamnolipid のみを制御している⁴⁶⁾。この事実は、我々が作成した変異株の swimming, twitching motility は親株と変化がみられなかったこと (表3) と一致している。また、elastase 活性と gelatinase 活性は共に *las* 系と *rhl* 系の両方から制御を受けており⁵⁰⁾、elastin 及び gelatin の分解がいずれの quorum sensing system 関連遺伝子変異株でも観察されなかった (図2) ことと一致している。以後の実験は、これらの変異株を用いて行った。

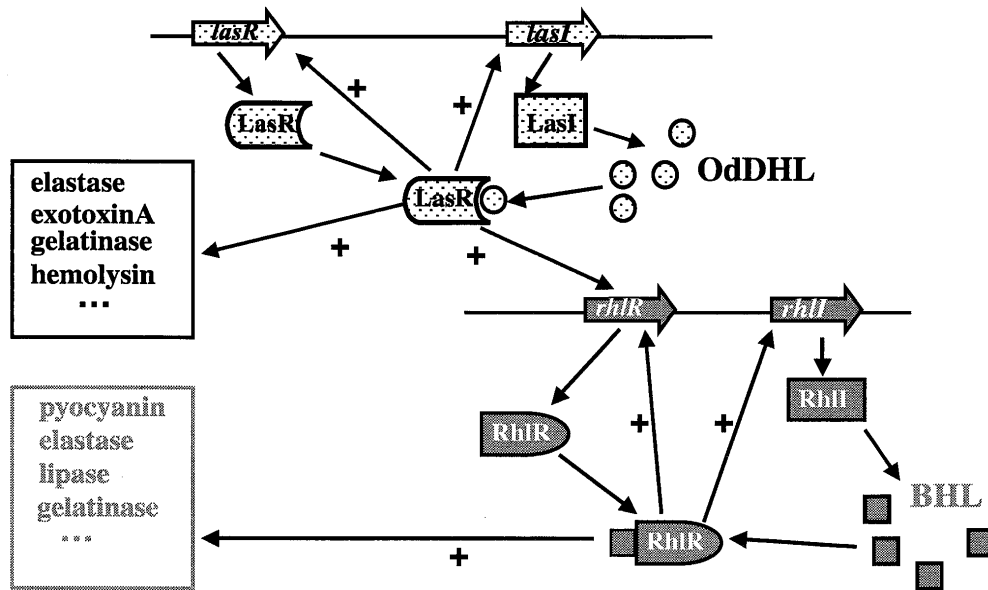


図9. Quorum sensing system のモデル図 (参考文献50より引用・改変)

2) 変異株における MIC の変化について

これらの変異株において、MIC は薬剤及び変異株によって様々な値を示した (表4)。MIC に変化がみられる原因の一つとして、薬剤排出ポンプの関与が考えられる。Quorum sensing system と薬剤排出ポンプについては BHL が MexAB-OprM の発現を上昇させるという報告⁵¹⁾があるが、表4によると quorum sensing system 関連遺伝子変異株では親株よりも MIC がやや高い値を示しており、quorum sensing system によって排出ポンプの活性が上がるという前述の報告との違いがみられた。しかし、この報告が示しているのは MexAB-OprM の発現のみであり、今回詳細に検討した fluoroquinolone 系の薬剤を例にとっても、これを基質とする薬剤排出ポンプは MexAB-OprM 以外にも MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY などが存在し⁵²⁾、これらと quorum sensing system の関係が未知であることから、これらの排出ポンプのいずれかが quorum sensing system の制御を受けていることにより MIC の変化に寄与している可能性が考えられた。

3) 親株及び変異株における Killing curve の結果について

① *lasR*(-) 株, *lasI*(-) 株, *rhIR*(-) 株, *rhII*(-) 株について

MIC を検討した薬剤の中から、biofilm に自由に浸透することができ²⁴⁾、効力が発育速度に影響を受けない fluoroquinolone 系⁵³⁾ の中でも代表的な薬剤である ofloxacin を中心に抗菌薬抵抗性を検討した。MIC, MBC の結果を詳細に検討するために killing curve を作成したところ、2 × MIC の ofloxacin を加えたときには親株に比べて *lasR*(-) 株, *rhIR*(-) 株は生存率がやや低下するのみであったが (図4 A), 4 × MIC 及び 8 × MIC の ofloxacin に対しては *lasR*(-) 株の生存率は親株及び *rhIR*(-) 株に比べて大きく低下した (図4 B, C)。また、

lasI(-) 株及び *rhII*(-) 株についても 4 × MIC 及び 8 × MIC の ofloxacin に対して *lasI*(-) 株の生存率は親株に比べて大きく低下したが (図5 B, C), *rhII*(-) 株は親株に比べて生存率に特に大きな差は認められなかった。これらの結果に加えて、fluoroquinolone 系の薬剤は 8 × MIC で最も効果を発揮すること⁵⁴⁾、8 × MIC の ofloxacin によって *las* 系変異株の抗菌薬抵抗性が低下したこと (図4 C, 5 C) から、*las* 系が抗菌薬抵抗性を制御する主たる因子であると考えられる。

しかし、2 × MIC の ofloxacin 作用時には親株よりも *lasI*(-) 株及び *rhII*(-) 株の方が抗菌薬抵抗性はやや上昇した (図5 A)。2 × MIC において *rhII*(-) 株の抗菌薬抵抗性が上昇したこの現象に関して、比較的低濃度の ofloxacin (0.1~2 µg/ml) 作用時には *lasR* の転写活性が上昇する (図8 A) ことや、ofloxacin でプロモーター活性が上昇したこと (図7 A), *rhII*(-) 株に対して 2 × MIC の ofloxacin 作用時には *las* 系の活性化が起こり、軽度の抗菌薬抵抗性を示した可能性が考えられる。しかし、*rhII*(-) 株に対する 2 × MIC の ofloxacin は 8 µg/ml であり、この濃度は親株では *lasR* 遺伝子の発現が抑制される濃度であることから (図8 A)、これだけでは説明できない。そこで、もう一つの可能性として、*rhII*(-) 株では MexAB-OprM の発現が低下し⁵¹⁾、それによって細胞外に排出される OdDHL が減少すると⁵⁵⁾、細胞内の OdDHL が増加することによって *las* 系の活性化が起こり⁵⁶⁾、抗菌薬抵抗性が上昇するという事も考えられる。

② LuxR type(-) 株と LuxI type(-) 株の実験結果の違いについて

LasR は OdDHL と結合し、RhIR は BHL と結合することによって転写活性化因子としてそれぞれに特異的な

遺伝子を制御していることから、*lasR(-)* 株と *lasI(-)* 株は ofloxacin 作用時には同等の反応を示し、同じことが *rhlR(-)* 株と *rhlI(-)* 株でもいえるのではないかということが予想された。しかし、 $2 \times \text{MIC}$ の ofloxacin 作用時、*lasR(-)* 株は親株よりも生存率がやや低下し (図 4 A)、*lasI(-)* 株の生存率は親株よりも上昇した (図 5 A)。*rhl* 系に関しても $2 \times \text{MIC}$ の ofloxacin 作用時、*rhlR(-)* 株は親株よりも生存率がやや低下し (図 4 A)、*rhlI(-)* 株の生存率は親株よりも上昇した (図 5 A)。予想に反したこの実験結果の原因として、RhlR は autoinducer の存在の有無にかかわらず DNA に結合して転写調節を行うことができること⁵⁷⁾ や、RhlR は BHL が無くても homodimer を形成し、OdDHL によってモノマーに分離されることから⁵⁸⁾、常に LuxR type タンパクと autoinducer が結合して働いている訳ではないという可能性が考えられる。しかし、これらの主張を否定する報告が存在し⁵⁹⁾、また、現在は LasR に関しては autoinducer が存在するときのみ *las box* に結合し、quorum sensing system に制御される遺伝子の転写調節を行う⁶⁰⁾ という説が有力なので、これらの説のみでこの現象は説明できない。そこで、この予想外の実験結果を考察する際にもう一つ考慮すべきものとして、QscR があげられる。緑膿菌の全ゲノム配列が明らかになったこと⁶¹⁾、LasR と RhlR の homolog として第三の LuxR type タンパクである QscR の存在が示された⁶²⁾。QscR に特異的な autoinducer を合成する酵素はゲノム上にコードされておらず、OdDHL 及び BHL が存在しない状態で QscR と LasR または RhlR がヘテロダイマーを形成すること、QscR は OdDHL 及び BHL と結合可能であること⁶³⁾、QscR によって *phz* や *lasB* などの病原性に関与する遺伝子の転写活性が抑制されることなどから、LasR、RhlR が存在しなくても OdDHL や BHL に反応して抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子の転写活性を変化させている可能性があることが示唆された。これらのことが *lasR(-)* 株と *lasI(-)* 株、または *rhlR(-)* 株と *rhlI(-)* 株で抗菌薬抵抗性にわずかな差があった原因であると考えられる。

③ *lasR(-)*、*rhlR(-)* 株及び *lasI(-)*、*rhlI(-)* 株について

lasR(-)、*rhlR(-)* 株及び *lasI(-)*、*rhlI(-)* 株は、ofloxacin に対して親株よりも生存率が低下した (図 6 A, B)。図 4, 5 の結果も含めると、この二重変異株の生存率の低下は *las* 系を欠損したことによるものであると考えられる。

④ killing curve の結果から考えられること

このような一連の killing curve の結果より、抗菌薬抵抗性において *rhl* 系よりも *las* 系のほうが重要な働きをしていると考えられた。この様な結果に関して、*lasI(-)* 株が形成する biofilm は親株や *rhlI(-)* 株のものに比べて薄く、3次元構造も異なり、sodium dodecyl sulfate (SDS) に対して非常に脆弱である¹¹⁾ ことや、biofilm 形成時の *rhlI* の発現は *lasI* よりも常に一定して低い³⁶⁾ ことと何ら

かの点において関連があると考えられる。

4. Quorum sensing system 関連遺伝子のプロモーター活性測定及び発現解析

対数増殖期の親株における *lasR* の発現は、低濃度の ofloxacin (0.1~2 µg/ml) 作用時に control (抗菌薬なし) よりも上昇し、高濃度の ofloxacin (8 µg/ml) に対しては抑制された (図 8 A)。また、対数増殖期および定常期初期における *lasR* のプロモーター活性は ofloxacin によって上昇した (図 7 A, B)。一方、*lasI* 遺伝子の発現は ofloxacin によって抑制されたが (図 8 B)、*LasI* は autoinducer そのものではなく autoinducer 合成酵素であるため、*lasI* の転写活性が低下したことですぐに autoinducer の減少が起こるわけではない。これらのことから、ofloxacin によって *las* 系は活性化されると考えられる。一方で、*rhlR* 遺伝子の発現は ofloxacin によって濃度依存的に抑制され (図 8 C)、プロモーター活性は ofloxacin による明らかな変化がみられなかった (図 7 C, D)。また、*rhlI* 遺伝子の発現は ofloxacin による明らかな変化がみられなかった (図 8 D)。ofloxacin と *rhl* 系のプロモーター活性に相関はみられないという今回の測定結果は、*rhl* 系は ofloxacin 抵抗性に大きな関与はないとする Killing curve の結果 (図 4, 5, 6) と一致するといえる。

これらの結果より、ofloxacin によって *las* 系が活性化され、*rhl* 系は抑制されるか、あまり影響されないことが明らかになった。

5. 抗菌薬抵抗性に関与する様々な因子について

1) Quorum sensing system の抗菌薬抵抗性制御について

前述の如く、biofilm を形成していない浮遊菌においても quorum sensing system の *las* 系が抗菌薬抵抗性に関与していたという結果より、quorum sensing system が biofilm の形成を制御し、それによって抗菌薬抵抗性を獲得するという経路以外に、quorum sensing system から直接抗菌薬抵抗性を制御する経路があると推察される。一方で、*lasI(-)* 株及び *rhlI(-)* 株は親株よりも過酸化水素⁶⁴⁾ や kanamycin⁶⁵⁾ に対して感受性が高いという報告があることから、今回の実験では抗菌薬抵抗性にあまり関与しないとされた *rhl* 系も、菌株の状態や用いる薬剤を変えることによって違う制御が働く可能性がある。一方で、Brooun らは親株と *lasI(-)* 株の biofilm において、SDS, ofloxacin, tobramycin に対する耐性は変化がなかったことを示している²⁷⁾。この相違について、Brooun らは biofilm を形成させるときに用いた基質の違いをあげているが、このような議論に対しても浮遊菌と ofloxacin を用いた今回の実験結果は何らかの示唆を与えるであろうと思われる。

2) ppGpp の抗菌薬抵抗性への関与について

Ofloxacin によって *las* 系が活性化した理由として (図

7 A, B, 8 A), ofloxacin に対するストレス反応によって抗菌薬抵抗性に関与する ppGpp⁶⁶⁻⁶⁹ が合成され, それによって *lasR* の転写活性が一時的に上昇したと考えられる。

3) RpoS の抗菌薬抵抗性への関与について

rpoS は, RNA polymerase の σ factor の一つである σ^{38} (σ^{38}) の構造遺伝子であり, ppGpp によって発現が誘導される。RpoS は, 栄養源の枯渇などによって発育条件が低下したときに定常期に導く σ factor として様々な遺伝子の発現を positive に制御することが知られており, ストレス環境下での生き残りに関与していることが明らかとなったが^{70, 71}, *rpoS* の biofilm や抗菌薬抵抗性に対する役割はまだ不明の部分が多い⁷²⁻⁷⁵。*rpoS* 遺伝子が quorum sensing system により制御されているという説⁷⁶と *rpoS* 遺伝子が quorum sensing system を制御しているという説⁷⁷が存在するが, 真相はまだ明らかではない。しかし, 定常期の *rpoS*(-) 株は ofloxacin に対して抗菌薬抵抗性が低下する²ことが明らかになっており, quorum sensing system を欠損させた株が *rpoS* の発現を変化させ, 今回の実験において抗菌薬抵抗性に何らかの影響を与えた可能性は非常に大きいと考えられる。

6. まとめ

本研究によって, 緑膿菌 quorum sensing system の *las* 系が抗菌薬抵抗性に深く関与しており, *rhl* 系はあまり関与していないこと, そしてその経路は biofilm 形成の経路とは独立して存在することが明らかになった。しかし, *las* 系の変異株に抗菌薬を作用させた際にも生き残る菌体が存在することは, 抗菌薬抵抗性を制御する因子が quorum sensing system の他にもまだあることを示している。他の因子としては, 抗菌薬によって起こる programmed cell death が何らかの理由で欠損した persister^{3, 78-82} という一部の集団が生き残るという説^{20, 83} や, carbapenem 抵抗性に関与する *tcp* 遺伝子 (Tolerance to Carbapenems in Planktonic cells: PA0561)¹¹, 付着時⁸⁴⁻⁸⁶の抗菌薬抵抗性に関与する *bta* (Biapenem Tolerance of Adherent cells) 遺伝子 (*psIL*)⁸⁷ の存在などが考えられる。また, 浮遊菌と成熟した biofilm において, 800を超えるタンパクの発現に差があったが⁸⁴, DNA microarray による遺伝子発現解析の結果では浮遊菌と biofilm との間で 70 遺伝子しか発現に差がなく, tobramycin を作用させた biofilm と作用させていないものでは 20 遺伝子しか発現に変化がなかった⁷³ という事実は, 浮遊菌と biofilm における発現制御の違いを解析することの難しさを示している。

Macrolide 系薬剤は緑膿菌に対してあまり殺菌・静菌作用を示さないにも関わらず, 難治性気管支感染症患者に対して macrolide 系薬剤の長期少量投与療法が奏効する⁸⁸。この現象の作用機序は不明であったが, macrolide 系薬剤である azithromycin が quorum sensing system を阻

害することが一因であると考えられ⁸⁹, quorum sensing system を阻害することで臨床において効果を発揮する可能性が示された。現在では quorum sensing system を阻害することにより感染症に効果を発揮する全く新しい概念の薬剤が開発途上である^{90, 91}。このような薬剤は殺菌作用を示さないため, 耐性菌が出現しないと考えられている。しかし, quorum sensing system そのものが関与する因子の多さから不明である部分が非常に多く, quorum sensing system そのものの解明なくして抗菌薬抵抗性との関連の全容解明は有り得ないことが示唆された。

抗菌薬開発の黎明期を支えた人々が, 数十年の月日が流れた現代においても抗菌薬に対する耐性, 抵抗性に苦しんでいる人々の姿を果たして想像できたであろうか。現在は耐性・抵抗性が現れないと考えられている“quorum sensing system 阻害剤”であるが, このような歴史的背景を鑑みるならば, “quorum sensing system 阻害剤耐性菌”が出現する日が訪れることも想像するに難くない。それまでに quorum sensing system と抗菌薬抵抗性の全貌が明らかになり, 適切な対処が行われるまでに解析が進んでいることを願って已まない。

結 論

本研究において緑膿菌の quorum sensing system と抗菌薬抵抗性の関連について検討を行った結果, quorum sensing system の *las* 系が抗菌薬抵抗性を上昇させる因子であることが明らかになった。抗菌薬抵抗性獲得に重要な biofilm の形成に *las* 系が深く関与することはこれまでも知られていたが, 本研究において biofilm を形成していない浮遊菌の抗菌薬抵抗性獲得に関しても *las* 系が関与していることが明らかになったことで, *las* 系を阻害することによって感染症治療が効果的に行われる可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御指導御高聞を賜った徳島大学大学院 HBS 研究部口腔感染症学 三宅洋一郎教授に深甚なる謝意を表しますと共に, 御高聞御助言を戴きました分子医化学分野 野間隆文教授, 分子薬理学分野 吉本勝彦教授に深謝致します。また, 本研究の実施に際し終始, 御指導を戴いた徳島大学医学部保健学科 小野恒子教授に甚大なる謝意を表しますと共に, 数々の御教示と御援助を戴いた村上圭史博士に感謝致します。また, 多くの助言を戴いた教室員の皆様と, 快く実験の補助をして戴いた医学部保健学科の片上幹子さん, 牛丸牧子さんに感謝致します。最後に, 4年間温かく見守ってくれた両親と親友に感謝します。

参考文献

- 1) Taniguchi K, Ono T, Murakami K, Viducic D, Kayama S, Hirota K, Nemoto K and Miyake Y: Novel

- Pseudomonas aeruginosa* gene that suppresses tolerance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2997-3001 (2003)
- 2) Murakami K, Ono T, Viducic D, Kayama S, Mori M, Hirota K, Nemoto K and Miyake Y: Role for *rpoS* gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiol Lett* 242, 161-167 (2005)
 - 3) Lewis K: Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)*. 70, 267-74 (2005)
 - 4) Anderl JN, Zahller J, Roe F and Stewart PS: Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1251-1256 (2003)
 - 5) Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normark S and Tuomanen E: Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 399, 590 - 593 (1999)
 - 6) Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 21, 1318-1322 (1999)
 - 7) Fux CA, Costerton JW, Stewart PS and Stoodley P: Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13, 34-40 (2005)
 - 8) Gilbert P, Collier PJ and Brown MR W: Influence on growth rate on the susceptibility to antimicrobial agents: Biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 1865-1868 (1990)
 - 9) Stewart PS: Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2517-2522 (1996)
 - 10) Anderl JN, Franklin MJ and Stewart PS: Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818-1824 (2000)
 - 11) Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW and Greenberg EP: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298 (1998)
 - 12) Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ and Salmond GP: Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25, 365-404 (2001)
 - 13) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular cloning; a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)
 - 14) Schweizer HP: Allelic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable *oriT* and the counter-selectable *Bacillus subtilis sacB* marker. *Mol Microbiol* 6, 1195-1204 (1992)
 - 15) Schweizer HP: Small broad-host-range gentamicin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Bio Techniques* 15, 831-834 (1993)
 - 16) Andrews JM: Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48, Suppl.S1, 5-16 (2001)
 - 17) Irani VR and Rowe JJ: Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg²⁺ and heat. *Bio Techniques* 22, 54-6 (1997)
 - 18) Westbrook-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warren P, Nguyen LY, Shawar RM, Folger KR and Stover CK: Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2975-2983 (1999)
 - 19) Bigger JW: Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* 11, 497-500 (1944)
 - 20) Lewis K: Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 999-1007 (2001)
 - 21) Rolinson GN: Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* 41, 589-603 (1998)
 - 22) Inoue Y, Sato K, Fujii T, Hirai K, Inoue M, Iyobe S and Mitsuhashi S: Same properties of subunits of DNA gyrase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO and its nalidixic acid-resistant mutant. *J Bacteriol* 169, 2322-2325 (1987)
 - 23) Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 382-388 (1994)
 - 24) Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H and Usui T: Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemother* 43, 340-345 (1997)
 - 25) Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ and Stewart PS: Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317-323 (2003)
 - 26) Vraný JD, Stewart PS and Suci PA: Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1352-1358 (1997)
 - 27) Brooun A, Liu S and Lewis K: A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 640-646 (2000)
 - 28) Stone G, Wood P, Dixon L, Keyhan M and Matin A: Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2458-2461 (2002)

- 29) Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ and Stewart PS: Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317-323 (2003)
- 30) Zabinski RA, Walker KJ, Larsson AJ, Moody JA, Kaatz GW and Rotschafer JC: Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 507-512 (1995)
- 31) Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock RE, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC and Hassett DJ: *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3, 593-603 (2002)
- 32) Evans DJ, Allison DG, Brown MR and Gilbert P: Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother* 27, 177-184 (1991)
- 33) de Beer D, Stoodley P and Lewandowski Z: Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by micro-injection and confocal microscopy. *Biotechnol Bioeng* 53, 151-158 (1997)
- 34) Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW and Davies DG: *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184, 1140-1154 (2002)
- 35) Spoering AL and Lewis K: Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183, 6746-6751 (2001)
- 36) De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C and Iglewski BH: Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 67, 1865-1873 (2001)
- 37) Fuqua WC, Winans SC and Greenberg EP: Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176, 269-275 (1994)
- 38) Sitnikov DM, Schineller JB and Baldwin TO: Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* 17, 801-12 (1995)
- 39) Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP and de Vos WM: Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24, 895-904 (1997)
- 40) 橋本 一: クオラムセンシング, その多様性と一般性. *臨床と微生物*31, 207-218 (2004)
- 41) Pesci EC, Pearson JP, Seed PC and Iglewski BH: Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 3127-3132 (1997)
- 42) Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P and Lazdunski A: A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21, 1137-1146 (1996)
- 43) McKnight SL, Iglewski BH and Pesci EC: The pseudomonas quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 2702-2708 (2000)
- 44) Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI and Iglewski BH: Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185, 2080-2095 (2003)
- 45) Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C and Pechère JC: Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182, 5990-5996 (2000)
- 46) Reimmann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, Krishnapillai V, Zala M, Heurlier K, Triandafillou K, Harms H, Defago G and Haas D: Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 148, 923-932 (2002)
- 47) Semmler AB, Whitchurch CB and Mattick JS: A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145, 2863-2873 (1999)
- 48) Glessner A, Smith RS, Iglewski BH and Robinson JB: Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J Bacteriol* 181, 1623-1629 (1999)
- 49) Beatson SA, Whitchurch CB, Semmler AB and Mattick JS: Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184, 3598-3604 (2002)
- 50) 館田一博, 石井良和, 山口恵三: 緑膿菌のクオラムセンシング機構—菌側病原因子発現と生体反応を制御するシステム. *臨床と微生物*31, 219-227 (2004)
- 51) Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T and Nomura N: Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and

- its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1320-1328 (2004)
- 52) Schweizer HP: Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2, 48-62 (2003)
- 53) Tanaka G, Shigeta M, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H and Usui T: Effect of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the susceptibility to antimicrobial agents: beta-lactams and fluoroquinolones. *Chemother* 45, 28-36 (1999)
- 54) Fung-Tomc JC, Gradelski E, Valera L, Kolek B and Bonner DP: Comparative killing rates of fluoroquinolones and cell wall-active agents. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1377-1380 (2000)
- 55) Pearson JP, Van Delden C and Iglewski BH: Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 181, 1203-1210 (1999)
- 56) 後藤直正, 村田 健: 緑膿菌のクオラムセンシングと異物排出システム. *臨床と微生物* 31, 271-277 (2004)
- 57) Medina G, Juárez K, Valderrama B and Soberon-Chavez G: Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol* 185, 5976-5983 (2003)
- 58) Ventre I, Ledgham F, Prima V, Lazdunski A, Foglino M and Sturgis JN: Dimerization of the quorum sensing regulator RhlR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol* 48, 187-198 (2003)
- 59) Lamb JR, Patel H, Montminy T, Wagner VE and Iglewski BH: Functional domains of the RhlR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185, 7129-7139 (2003)
- 60) Kiratisin P, Tucker KD and Passador L: LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J Bacteriol* 184, 4912-4919 (2002)
- 61) Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S and Olson MV: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964 (2000)
- 62) Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C and Greenberg EP: QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 2752-2757 (2001)
- 63) Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN and Lazdunski A: Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* 48, 199-210 (2003)
- 64) Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR, Ochsner UA, West SE, Huang CT, Fredericks J, Burnett S, Stewart PS, McFeters G, Passador L and Iglewski BH: Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 34, 1082-1093 (1999)
- 65) Shih PC and Huang CT: Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 49, 309-314 (2002)
- 66) van Delden C, Comte R and Bally AM: Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 5376-5384 (2001)
- 67) Korch SB, Henderson TA and Hill TM: Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* 50, 1199-1213 (2003)
- 68) Magnusson LU, Farewell A and Nystrom T: ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 13, 236-242 (2005)
- 69) Betzner AS, Ferreira LC, Holtje JV and Keck W: Control of the activity of the soluble lytic transglycosylase by the stringent response in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 55, 161-164 (1990)
- 70) Suh SJ, Silo-Suh L, Woods DE, Hassett DJ, West SE and Ohman DE: Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 3890-3897 (1999)
- 71) Jorgensen F, Bally M, Chapon-Herve V, Michel G, Lazdunski A, Williams P and Stewart GS: RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145, 835-844 (1999)
- 72) Xu KD, Franklin MJ, Park CH, McFeters GA and Stewart PS: Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 199, 67-71 (2001)
- 73) Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR,

- Teitzel GM, Lory S and Greenberg EP: Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860-864 (2001)
- 74) Heydom A, Ersboll B, Kato J, Hentzer M, Parsek MR, Tolker-Nielsen T, Givskov M and Molin S: Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* 68, 2008-2017 (2002)
- 75) Schembri MA, Kjaergaard K and Klemm P: Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48, 253-267 (2003)
- 76) Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P and Lazdunski A: A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21, 1137-1146 (1996)
- 77) Whiteley M, Parsek MR and Greenberg EP: Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 4356-4360 (2000)
- 78) Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y and Lewis K: Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230, 13-18 (2004)
- 79) Drenkard E and Ausubel FM: *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740-743 (2002)
- 80) Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata SI and Yoshida SI: *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 64, 3648-3655 (1998)
- 81) Yildiz FH and Schoolnik GK: *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4028-4033 (1999)
- 82) Massey RC, Buckling A and Peacock SJ: Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Curr Biol* 11, 1810-1814 (2001)
- 83) Lewis K: Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 503-514 (2000)
- 84) Miyake Y, Fujiwara S, Usui T and Suginaka H: Simple method for measuring the antibiotic concentration required to kill adherent bacteria. *Chemother* 38, 286-290 (1992)
- 85) Williams I, Venables WA, Lloyd D, Paul F and Critchley I: The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 143, 2407-2413 (1997)
- 86) Williams I, Paul F, Lloyd D, Jepras R, Critchley I, Newman M, Warrack J, Giokarini T, Hayes AJ, Randerson PF and Venables WA: Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. *Microbiology* 145, 1325-1333 (1999)
- 87) Murakami K: Stress response and antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa*. *四国歯学会雑誌* 14, 163-175 (2001)
- 88) Jaffe A, Francis J, Rosenthal M and Bush A: Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* 351, 420 (1998)
- 89) Tateda K, Comte R, Pechere JC, Kohler T, Yamaguchi K and Van Delden C: Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1930-1933 (2001)
- 90) Smith RS and Iglewski BH: *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest* 112, 1460-1465 (2003)
- 91) 堀川 学: クオラムセンシング機構阻害剤: その理論と方向性. *臨床と微生物* 31, 261-270 (2004)