研究成果報告書

1．研究課題名：*Acinetobacter baumannii* の高病原化および抗菌薬等環境ストレス適応メカニズムの解析

2．研究代表者氏名：鴨志田 剛

3．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

1. 大塚 翼，鴨志田 剛他 *Acinetobacter baumannii* のバイオフィルム依存的薬剤耐性の解析 第 108 回日本細菌学会関東支部総会
2. 大塚 翼，鴨志田 剛他 *Acinetobacter baumannii* のバイオフィルム形成メカニズム解明と薬剤耐性化への寄与 日本薬学会第 146 年会
3. 齋藤 優，鴨志田 剛他 従来法では捉えられないバイオフィルム耐性を評価する新規抗菌薬感受性試験法の開発 日本薬学会第 146 年会 学生優秀発表賞受賞
4. 鴨志田 剛他 最小発育阻止濃度では捉えられないバイオフィルム耐性を評価する新規抗菌薬感受性試験法の開発 第 74 回日本化学療法学会総会

4．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

本研究では，臨床分離 *Acinetobacter baumannii* から見出したバイオフィルム（biofilm：BF）形成制御因子 AGC（申請時仮称）を起点として，BF 形成の分子機構と，BF 形成が抗菌薬効果に及ぼす影響について解析を進めた．研究開始時には，AGC の機能喪失によって BF 形成が増強すること，およびその背景にセカンドメッセンジャーを介した制御機構が存在する可能性を想定していた．その後，解析対象を複数の遺伝的背景へ拡張した結果，AGC 機能変化の表現型出力が菌株背景によって異なるという新たな現象を見出した．さらに，AGC とは異なる新たな BF 形成制御因子候補 nHK を見出し，これらの遺伝学的解析を利用することで BF 形成能が段階的に異なる実験系を構築した．また，この実験系を最小バイオフィルム殺菌濃度（minimum biofilm bactericidal concentration：MBBC）測定へ展開し，通常の薬剤感受性試験では捉えにくい BF 内菌に対する抗菌薬効果を評価する基盤を構築した．以下に主な成果を示す．

【1．AGC による BF 形成制御が菌株背景に依存することの発見】

本研究の出発点となった臨床分離株では，同一患者から分離された遺伝的に近縁な菌株間で BF 形成能が大きく異なっており，高 BF 形成株において膜貫通型アデニル酸/グアニル酸シクラーゼドメインを有する（AGC）をコードする遺伝子の機能喪失型変異を認めた．低 BF 形成株を背景として AGC を人工的に破壊すると BF 形成能が増加したことから，AGC の機能変化が BF 表現型に関与することを確認した．

そこで，この現象が *A. baumannii* に一般的なものかを検討するため，異なる複数の遺伝的背景へ解析を展開した．その結果，同じ方向の AGC 機能変化を与えても，BF 形成能が明瞭に変化する菌株背景と，BF 形成量にほとんど変化を認めない菌株背景が存在することが明らかとなった．すなわち，AGC はすべての *A. baumannii* において一律に BF 形成量を規定するのではなく，AGC 機能変化が BF 表現型として現れる程度は菌株の遺伝的・生理的背景に依存することが示唆された．

この結果は，当初想定していた「AGC 機能喪失によって BF 形成が増強する」という単純なモデルを発展させるものである．同じ遺伝子の機能変化であっても，それを BF 表現型へ変換する細胞内状態や制御ネットワークが菌株によって異なる可能性が考えられる．現在，BF 形成量だけでなく BF 形成初期段階における表面付着についても解析を進めている．さらに，AGC 機能変化に応答する細胞内ネットワークを明らかにするため，複数の遺伝的背景を用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析に加え，DIA 法による定量プロテオーム解析を実施する計画である．これらを統合することで，AGC 機能変化が BF 表現型へ反映される菌株と反映されない菌株の違いを規定する分子基盤を明らかにすることを目指している．

【2．新たな BF 形成制御因子候補 nHK の発見】

AGC を起点とした解析を進める過程で，AGC とは異なる新たな BF 形成制御因子候補を見出した．この因子はヒスチジンキナーゼドメインを有する機能未知タンパク質であり，本研究では nHK と仮称して解析を進めている．

nHK の機能を欠損させた菌株では，親株と比較して BF 形成能が増加した．一方，その BF 形成量は AGC 機能喪失株とは異なるレベルを示した．このことから，AGC と nHK という異なる遺伝的変化を利用することで，同一の遺伝的背景上に BF 形成能の異なる菌株群を構築することが可能となった．これは単に新たな BF 関連遺伝子を見出したというだけでなく，BF 形成量そのものが抗菌薬効果にどのような影響を及ぼすのかを，遺伝的背景をできるだけ揃えた条件で解析するための重要な実験基盤となった．

nHK については，現時点では BF 形成を増強する表現型を見出した段階であり，その下流でどのような遺伝子群や生理機能が変化するかについては解析を継続している．今後，遺伝学的検証と網羅的発現解析を組み合わせ，AGC とは異なる BF 制御経路として成立するかを検証する予定である．

【3．BF 形成能の違いを抗菌薬効果へ接続する MBBC 評価基盤の構築】

BF は抗菌薬に対する抵抗性を高めることが知られているが，臨床で一般的に用いられる最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration：MIC）は浮遊状態の菌を対象とするため，すでに形成された BF 内部の菌に対する抗菌薬効果を十分に反映できない．そこで本研究では，形成済み BF に抗菌薬を作用させた後に生残菌の再増殖を評価する MBBC 測定系を用い，BF 形成能と抗菌薬殺菌効果との関係を解析した．

まず，同一患者由来で BF 形成能が低・中・高と異なる臨床分離 variant を用いて解析したところ，アミカシンに対する通常の MIC には大きな違いが認められない一方，MBBC は BF 形成能の増加に伴って段階的に上昇することを見出した．すなわち，浮遊菌を対象とする通常の薬剤感受性試験ではほぼ同等に感受性と判定される菌株であっても，形成済み BF 内では抗菌薬による殺菌に必要な濃度が大きく異なることが示された．この傾向はすべての抗菌薬で一様ではなく，抗菌薬の種類によって BF 形成の影響を受ける程度が異なる可能性も示唆された．

さらに，自然に得られた variant 間には BF 形成能以外の遺伝的差異が存在する可能性があるため，本研究で得られた AGC および nHK の人工変異株を利用し，同一遺伝背景上で BF 形成能が低・中・高と異なる isogenic BF-gradient panel を構築した．現在，この菌株群について MIC に加え，浮遊菌に対する殺菌効果を示す MBC，BF 形成阻害を評価する MBIC，形成済み BF 内菌に対する殺菌効果を示す MBBC を同一条件で取得し，浮遊菌と BF 内菌における抗菌薬効果の乖離を定量的に評価する系へ発展させている．

この評価系の確立により，「BF を形成すると抗菌薬が効きにくくなる」という一般的な現象を示すだけではなく，BF 形成程度の違いが抗菌薬の発育阻止効果および殺菌効果にどの程度影響するかを定量的に比較することが可能となった．特に，通常の MIC だけでは検出できない BF 内殺菌効果の低下を MBBC によって捉えられることは，デバイス関連感染など既形成 BF が問題となる感染症に対する治療評価を考える上で重要である．

【4．本助成研究によって得られた成果と今後の展開】

以上，本助成研究では，当初申請時に見出していた AGC を起点として研究を発展させた結果，第一に，AGC 機能変化による BF 表現型の出現が菌株背景に依存するという新たな知見を得た．第二に，ヒスチジンキナーゼドメインを有する新たな BF 形成制御因子候補 nHK を見出した．第三に，AGC および nHK の解析から得られた BF 形成能の異なる菌株を利用して，BF 形成程度と BF 内抗菌薬殺菌効果を結び付けて評価する MBBC 解析基盤を構築した．

これらの成果は，BF 形成の分子機構を解明する基礎研究と，BF 関連感染における抗菌薬効果を評価する応用研究を接続するものである．特に，同一の制御因子の機能変化であっても菌株背景によって BF 表現型への反映が異なることは，臨床分離株における BF 形成能の多様性を理解する上で重要な課題となった．今後は，複数遺伝背景を用いた RNA-seq および DIA 定量プロテオーム解析によって AGC の株背景依存的な表現型出力を規定する分子基盤を解析するとともに，nHK の BF 制御機構についても検証を進める．

また，MBBC 評価系については，BF 内でも比較的抗菌活性を保持する薬剤を基軸として，既存抗菌薬や BF 構造へ作用する化合物との併用条件を探索する．これらを通じて，*A. baumannii* の BF 形成機構の理解と，通常の MIC のみでは評価困難な BF 関連感染に対する治療評価基盤の構築を進めていく．