

有田 健一 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

分子シャペロン DnaK を標的とする低分子化合物によるバイオフィーム形成阻害

(Inhibition of biofilm formation by small molecules targeting molecular chaperone DnaK)

バイオフィームは微生物の集合体であり、細菌が固体表面に接着し、それらの細菌が産生する細胞外マトリクスに覆われながら菌膜(バイオフィーム)を形成している。バイオフィーム中の細菌は、抗生物質や宿主免疫に耐性になるため、バイオフィーム形成は慢性感染症の原因となりうる。このようなバイオフィームを根絶させるためには、より効果的な抗生物質やバイオフィームの形成メカニズムに基づいた阻害薬開発の戦略が必要になってきている。この論文では、網羅的な解析から分子シャペロン DnaK が大腸菌のバイオフィームの形成に重要であることを見出し、DnaK の活性を抑える低分子化合物によって、バイオフィーム形成を抑制できるか検証した。

遺伝学的、微生物学的、分子生物学的解析および電子顕微鏡を用いた解析から、大腸菌のバイオフィーム形成に重要な細胞外アミロイドである curli の産生に分子シャペロン DnaK が必要であることを見出した。さらに、DnaK の阻害剤の中から Myricetin、Telmisartan、Pancuronium bromide、Zafirlukast を用いて curli 依存的なバイオフィーム形成を抑制できるか検証した。すると植物由来のフラボノイドである Myricetin だけが、大腸菌の増殖を阻害せず濃度依存的にバイオフィーム形成を抑制できることを見出した。さらに透過型電子顕微鏡を用いた観察から、Myricetin を用いることで curli の産生が抑制されていることが明らかになった。また、Myricetin 添加時に大腸菌は温度感受性を示す、細胞骨格タンパク質である FtsZ のリング構造が異常になり細胞が長くなる、熱ショック転写因子である RpoH の量が増加するなど、*dnaK* 欠損株と同様の表現型が観察されたことから、Myricetin は DnaK の機能を阻害することで curli に依存したバイオフィームの形成を抑制することが示唆された。また、Myricetin を添加することでグラム陰性菌には効かないとされていた抗生物質である vancomycin が有効になることが明らかになった。

さらに Myricetin により、Methicillin 耐性株を含むグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成も抑えることを示した。この場合も大腸菌の時と同様、黄色ブドウ球菌の増殖には影響しなかった。これらのことから、バイオフィーム形成における DnaK の重要性を明らかにし、DnaK がグラム陰性菌のみならずグラム陽性菌の抗バイオフィーム薬の標的となりうることが示された。

審査では、1) DnaK の基質特異性について、2) Δ *grpE* 株におけるバイオフィーム形成能について、3) DnaK-Gr pE 相互作用阻害によるバイオフィーム形成への影響について、4) バイオフィームのメカニズム及びその構成成分について、5) 培地の違いによる細胞外構造体の違いについて、6) *In vivo* における大腸菌の curli と I 型線毛の産生の相互排他性について、7) 外膜形成阻害によるバイオフィーム形成への影響について、8) *In vivo* で Myricetin 以外の薬剤が効かない理由について、9) 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成における Myricetin の作用メカニズムについて、10) 黄色ブドウ球菌の methicillin 耐性株と感受性株における Myricetin の効果に差について、11) バイオフィーム阻害剤の中で今回の阻害剤は何が新しいのか、12) 他の薬剤が DnaK を阻害する可能性はあるのか、13) DnaK が薬剤のターゲットとなるのは初めてなのか、などについて質疑がなされ、申請者より概ね的確な回答がなされた。

本研究は、細菌のバイオフィーム形成における分子シャペロンの新しい作用機序を明らかにするとともに、それを標的としたユニークな抗菌・消毒法開発への展開の可能性を示した優れた研究として、学位の授与に値すると評価された。

審査委員長 微生物学担当教授

澤 智裕