

食中毒細菌Persisterの重要性, ストレス耐性とその制御について

益田, 時光
九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学研究室

<https://hdl.handle.net/2324/7236463>

出版情報 : Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 70 (8), pp.311-318, 2023-08-15. Japanese Society for Food Science and Technology

バージョン :

権利関係 : ©2023, Japanese Society for Food Science and Technology



総 説

食中毒細菌 **Persister** の重要性, ストレス耐性と
その制御について

(令和 4 年度日本食品科学工学会奨励賞)

益 田 時 光*

九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門
食料化学工学講座 食品衛生化学研究室

The recognition, control, and stress tolerance of bacterial persister cells

Yoshimitsu Masuda *

Division of Food Science and Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, 744, Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395

Bacterial persister cells are metabolically dormant cells in which cell activities such as protein synthesis and cell division are somehow drastically slowed down, so that they can survive under intensive antibiotic treatment that targets such cell activities. This review summarizes information about persister cells such as their history, definition, mechanism of formation, threats to clinical environments, and how to control them. In addition to such information, this review also introduces our recent studies on the physical stress tolerance of persister cells and their possible control in food environments. We demonstrated that some bacterial persister cells are indeed highly heat and acid tolerant compared to normal cells, although diversity was discovered in persister cell populations. We also found that indole and its derivatives or acetic acid are promising candidates for persister cell eradication in food environments. We believe that this review will aid in wider attention to and understanding of the importance of these quiet yet clever bacterial persister cells.

(Accepted Apr. 26, 2023)

Keywords : foodborn-pathogen, persister, stress tolerance, indole, acetic acid**キーワード** : 食中毒細菌, **Persister**, ストレス耐性, インドール, 酢酸1. **Persister** とは

「**Persister**」という言葉が生まれたのは 1944 年, 人類の歴史の中で最初の抗生物質であるペニシリンが世に出て間もなく, 薬剤耐性菌の出現とほぼ同時期である。名付け親は Joseph Bigger という科学者で, 当時イギリスにてペニシリンについての研究を行っていた。Bigger は, ペニシリンで黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を処理した際, 完全に溶菌した状態の培養液をプレート上に塗抹してもコロニー形成が見られることに疑問を持った。また, このコロニーから培養した菌はペニシリンに対して耐性を持っておらず, 試験管内で再び溶菌されるということを発見した。この現象は試験管内でのペニシリン処理, コロニー形成を繰り返しても, 何代にもわたって確認され, Bigger はこのような現象を「Antibiotic

Persistence」と定義し, 何らかの形で生き残ってしまう極小集団のことを **Persister** と名づけた¹⁾。薬剤耐性菌に関する研究に比べ, **Persister** についての研究の歩みは非常に遅いものであった。実際, Bigger が最初に定義してから 39 年後の 1983 年, 初めて **Persister** 関連遺伝子である *hipA* についての報告がなされた²⁾。**Persister** の形成機構などについてもそこから現在に至るまで多くのことが明らかとなってきた³⁾⁴⁾。

Persister の定義としては, 自身の代謝や細胞活性を低下させ休眠状態のようになることで抗生物質などのストレスに耐性を示す細菌細胞である。そのため, 遺伝子変異による耐性菌と違って抗生物質存在下では増殖することはない, じっと耐えている。**Persister** の特徴として, 細菌の死滅曲線をとったときに, 2 段階のカーブを描くことが言える (Fig. 1)³⁾。一般的に, 同一遺伝子を持つクローン集団であっても, 集団中

¹〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744 ウエスト 5 号館*連絡先(Corresponding author), y.masuda@agr.kyushu-u.ac.jp

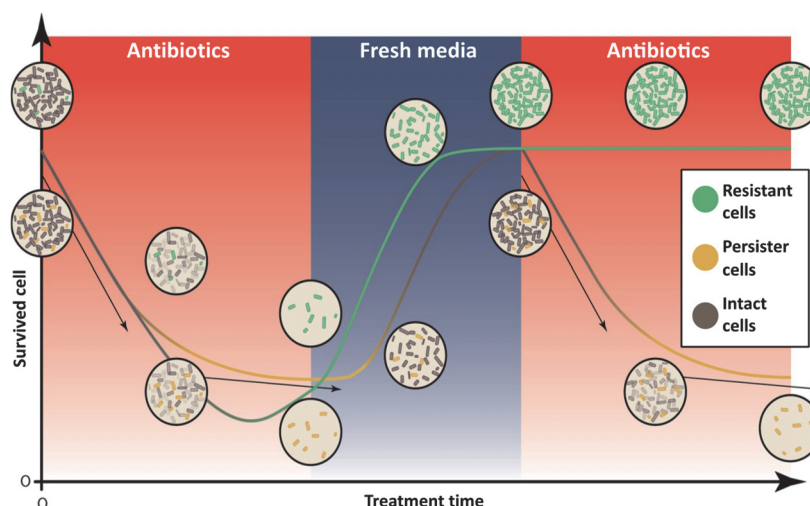


Fig. 1. The biphasic killing curve and the difference between persistence and resistance (based on Bram Van den Bergh *et al.*, 2017⁵).

には様々な細胞形態が存在しており、細菌集団が抗生物質にさらされると、集団の大部分を占める正常な菌体は死滅し、一部の Persister が生き残る。生残した Persister は、抗生物質が取り除かれ適当な栄養源を与えられると、代謝活性を回復させ、正常細胞となって増殖を再開する (Fig. 1)⁵。さらに、再び抗生物質にさらされると、大部分を占める正常な菌体は死滅するが、やはり一部の Persister は生き残ってしまい、抗生物質への曝露が繰り返され、その繰り返しの中で細菌集団中に遺伝子変異を蓄積させ、薬剤耐性菌の出現に寄与する。

2. Persister 形成機構

Persister の形成が共通性のある一つのメカニズムによって制御されているのか、もしくは複数の、個別かつ特殊な経路に沿っているのか、という議論は今なお続いているが、Persister 形成につながる個別の事象については既に複数報告されている。これまでの多くの報告によると、Persister 集団は、ストレスシグナルによって形成が誘導されており、その代表例が飢餓ストレスである。このような刺激によって生み出された Persister は、その刺激が取り除かれた後にもある程度居残ってしまう。例えば、一晚培養後の培養液では、飢餓状態による Persister が形成されており、それを新しい培地に希釈して再度培養を行なった場合でも、たとえ菌集団全体の生育が対数増殖期に至った時点においても Persister 集団は増殖を再開しておらず、休眠状態を維持している。その後、非常に長い時間をかけて増殖を再開するが、それまでは抗生物質耐性を維持したままである³⁾。

飢餓状態だけでなく多くのストレス条件が Persister 形成の引き金となる。例えば、異なる栄養源の枯渇、高い菌密度、酸ストレス、人の免疫細胞にさらされる

ことなどによって、Persister 形成が引き起こされることが報告されている (Fig. 2)⁴⁾。また、抗生物質処理によって生育が阻害されることで Persister が誘導されるという、抗生物質誘導型 Persister も報告されており、これによって、高濃度の抗生物質で処理した場合、低濃度で処理した場合よりも生残菌数が多いというパラドックス的な現象も起こってしまうため、注意が必要である。環境ストレスによって引き起こされる Persister 形成については、主に、環境ストレスに対する応答機構の一種である緊縮応答と、DNA がダメージを受けた際に働く SOS 応答の二つが対応しており、菌密度についてはクォーラムセンシングと呼ばれるシグナル物質を介した細菌細胞間コミュニケーション機構が関与している (Fig. 2)。緊縮応答は、ほぼすべての細菌種に存在するグアノシン 4 (5) リン酸 ((p)ppGpp) を介し、Persister を制御する重要な役割を担っている。大腸菌では、(p)ppGpp は、アミノ酸の不足と熱ショックによって活性化される合成酵素 RelA によって、または炭素、窒素、鉄、リン酸および脂肪酸の飢餓時に活性化される SpoT によって生産され⁶⁾、蓄積した (p)ppGpp によって Toxin-antitoxin システム (TA システム) が活性化し、Persister 形成へとつながっていく。また、SOS 応答は、抗生物質や活性酸素種などによって細菌の DNA がダメージを受けた際に、LexA や RecA などの転写制御因子を介して DNA 修復機構を活性化させる一方で、一時的に DNA 合成を含めた代謝活性を抑制させる。この際に、LexA の制御が外れた SOS 遺伝子の下流の TA システムが活性化することで代謝活性が低下し、Persister 形成に進む⁴⁾。

ストレスシグナルが引き金となる Persister 形成機構に比べて、その割合はあまり多くはないとされているが、ストレスに関係なく偶発的に Persister 形成が起こることも知られている³⁾。これはある意味、細胞が増殖する際に起こりうる事故のようなものと考え

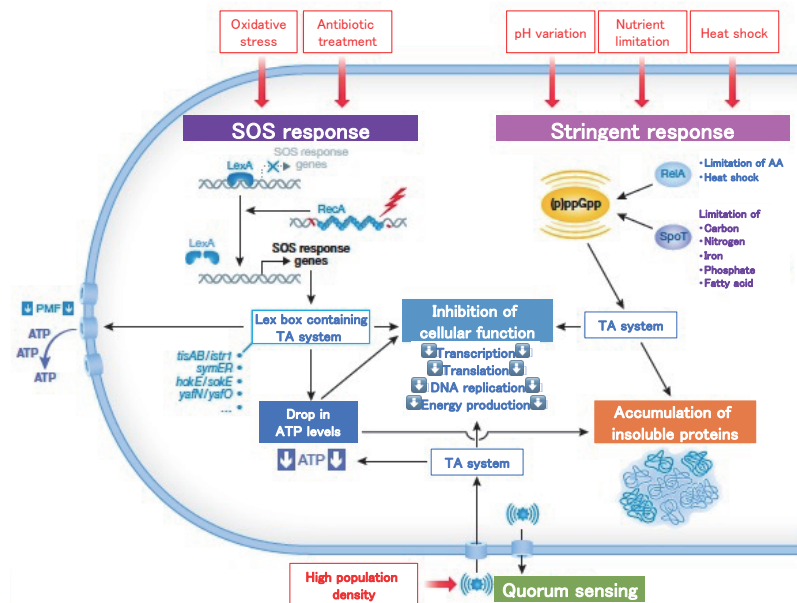


Fig. 2. Environmental triggers of antibiotic persistence and bacterial response mechanisms (based on Murkus Huemer *et al.*, 2020⁴⁾).

られる。例えば細菌の細胞分裂の際に、リボソームなどの必須成分は均等に 2 つの娘細胞へと分配されるはずだが、何らかのトラブルによってその分配が不均一となってしまった場合には、著しく必須成分が少ない方の娘細胞は代謝活性等も全て低下した Persister 状態になってしまった、という具合である。このような偶発性の Persister もストレス起因性の Persister も含め、Persister 形成は細菌におけるリスク分散またはベットヘッジングの代表例として挙げられる。この考えは、細菌集団全体において、複数の極小集団が大多数の細菌細胞とは異なる表現系を発現することで、その時点で置かれた環境中では不利な性質だとしても将来的に起こりうる環境の変化に対応し、生き残る可能性を残しておくというものである⁷⁾。Persister についても、ストレスの無い環境中では、細菌集団の勢力拡大に積極的に寄与しないが、突然降りかかる脅威、例えば抗生物質処理や活性酸素ストレスなどに晒されても、その鈍感力で生き残るため、細菌集団自体が生き残るための保険として、重要な役割を担っているのである。

3. Toxin-antitoxin システム

緊縮応答と SOS 応答の両者において、最終的に Persister 形成を直接的に制御することが報告されているのが Toxin-antitoxin (TA) システムである。TA システムは、最も簡単な系では、細菌自身に毒性を持つ toxin と、その毒性を抑制する antitoxin により構成されている⁸⁾。toxin と antitoxin はオペロンを形成し、同時に発現して、通常は複合体を形成することで toxin

の毒性を抑制しているが、様々な環境ストレスにさらされると、プロテアーゼにより antitoxin が分解され、菌体内で toxin が活性化される。活性化した toxin は生理活性を阻害することで Persister 形成を誘導する。例えば、最初に Persister 形成に関連する遺伝子として報告された *hipA* は後に HipAB という TA システムの toxin 構造遺伝子であることが明らかとなった。この HipAB の制御機構において、まず緊縮応答から産生された ppGpp によって活性化されたプロテアーゼ Lon が Antitoxin である HipB を分解することで HipA が活性状態となる。その後、活性状態の HipA はリボソーム上での翻訳を阻害することで代謝活性を低下させ、Persister 形成を促進する⁹⁾。そのほかにも、YafQ-DinJ システムは大腸菌で確認された TA システムの一つであり、toxin である YafQ は mRNA を切断するエンドリボヌクレアーゼ活性を持ち、種々の遺伝子の翻訳を阻害する。標的遺伝子の中には、リボソーム上での翻訳においてポリペプチド鎖の伸長を促進するタンパク質 EF-Tu をコードする遺伝子 *tufA* や *tufB* が含まれており、YafQ がそれらの mRNA を切断することでタンパク合成全般が阻害され、Persister 形成が誘導される¹⁰⁾¹¹⁾。また、トリプトファンからインドールを合成する酵素トリプトファンナーゼ (TnaA) をコードする遺伝子 *tnaA* も標的となっており、このインドールは細菌の運動性、バイオフィーム形成、抗生物質耐性、プラスミド安定性、病原性およびストレス応答を含む多様な生理学的プロセスを制御するシグナル分子としての報告がなされている^{12)–14)}。

4. 臨床における Persister の重要性

これまでの説明から, Persister の存在は臨床の現場においても非常に重要であることはご理解いただけたと思うが, 1944年にBiggerが提唱して以降, Persisterの存在は感染症の治療において過小評価され続けていた. Persister は大多数の細菌集団に比べれば微々たる存在であり, ヒトの免疫機構によって簡単に殺されるだろうというわけである. そもそも, 抗生物質耐性菌があつという間に出現してしまうという大問題が最優先であり, Persister は二の次にされていた. この考えが見直されたのは, バイオフィーム内の Persister 集団の存在が明らかとなったことからである. バイオフィームとは, 例えば風呂場のヌメリや歯垢などが挙げられ, これは細菌が菌体外多糖などを用いてバリエードのようなものを形成し, その中で外的ストレスから身を守る仕組みである. このため, バイオフィーム内の細菌には抗生物質が作用しにくいことになるが, これだけではバイオフィームを形成した細菌による感染症の治療が難解であることが説明できないことが示された¹⁵⁾. つまり, たとえバイオフィーム内に抗生物質が侵入して細菌の大多数を殺したとしても, Persister はその内側で生き残り, 抗生物質が取り除かれた後に, バイオフィーム内に残されていた栄養分を利用して増殖を開始し, 再発症につながってしまうのである.

感染症の治療の現場における Persister の関与を直接的に証明することは困難である. 2010年, Mulcahyらによって, 嚢胞性線維症の長期間の治療中に患者から単離した緑膿菌において Persister の割合が上昇していることが示され, これが臨床現場において Persister が関連することが示された最初の報告である¹⁶⁾. また, 尿路感染性大腸菌において, 多くの場合で *hipA* に Persister 形成が促進される遺伝子変異を保持していることも報告されている¹⁷⁾. このような Persister の存在は感染症の治療において抗生物質投与の期間を引き伸ばしてしまい, 長期にわたる抗生物質への曝露は細菌に突然変異による耐性遺伝子の獲得を促進させる結果となる. ここにおいて, Persister は結果として薬剤耐性菌という終着点に辿り着いてしまうため, その制御は薬剤耐性菌の制御と同じように重要な問題である.

5. Persister の制御方法

それでは, このような Persister をどのようにして制御することができるのか, という点について述べたいと思う. Persister の制御方法は主に, 1) 直接殺菌する方法, 2) 形成を阻害する方法, 3) Persister の代謝活性等を活性化させ抗生物質への感受性を再生させる方法, の3つに分けられる (Fig. 3)⁴⁾. 直接殺菌する

ための候補として, 細胞壁分解酵素 (エンドライシンなど) や細菌の細胞膜を直接攻撃するレチノイド誘導体などが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾. また, ADEP4 という新規の抗生物質は細胞内で ClpP プロテアーゼを異常活性状態にし, ランダムなタンパク分解を引き起こし, 他の抗生物質と併用することで Persister をも殺菌することが可能であることが示されている²⁰⁾.

Persister 形成の阻害については, 例えば, ppGpp の類似体であるレラシンは, ppGpp を介した Persister 形成に対して阻害活性を有することが知られている²¹⁾. また, インドールについても, 大腸菌において Persister 形成を阻害することが報告されている¹⁰⁾. しかしながら, Persister 形成は偶発的なものも含めて多様な経路が関与することから, ある一つの経路を阻害するだけでは Persister の形成阻害は困難である. 実際, 単一の TA システムを阻害するだけでは Persister の形成に大きな影響を及ぼさないことが報告されている⁹⁾.

Persister の感受性を再生させる方法は, 基本的に細胞の生育を促進することである. 例えば, 単糖類を Persister に添加することで糖取り込みのためのポンプが活性化され, アミノグリコシド系の抗生物質が菌体内に取り込まれるようになり, Persister の薬剤感受性が回復することが示されている²²⁾.

上述のインドールについては, その誘導体を含めて近年特に注目を集めている²³⁾. インドールは Persister 形成を阻害するだけでなく, 抗生物質との併用によって Persister を除去し得ることも報告されている. また, インドール添加によって Persister の耐熱性をも低下させることも近年明らかとなっている (Fig. 4A) が, これらの要因として, インドールが有するタンパク質フォールディング阻害活性が挙げられている (Fig. 6)²⁴⁾. さらに, ハロゲンインドールの一種であるヨードインドールに至っては, 単独で Persister に対しても強い抗菌活性を持つことが示されている²⁵⁾. このように, 前述の3つの全ての方法での制御が可能であることから, インドールは Persister 制御への応用が期待されている.

6. Persister のストレス耐性

これまでの Persister の研究は, 主に抗生物質耐性という観点で研究が進められてきた. そのため, Persister の熱耐性などのストレス耐性についての議論はほとんどなされてこなかった. 食品の殺菌処理法として加熱処理は一般的だが, 食品の風味や栄養などを保持するために加熱などの殺菌条件が緩和されると, 食品中の細菌が生残り, 食品の品質低下や食中毒の原因となる可能性がある. このため食品産業において, 食中毒細菌の熱耐性について知ることは重要な課題である. そこで筆者らは, 細菌集団における Persister の存在が細菌の熱耐性などのストレス耐性に

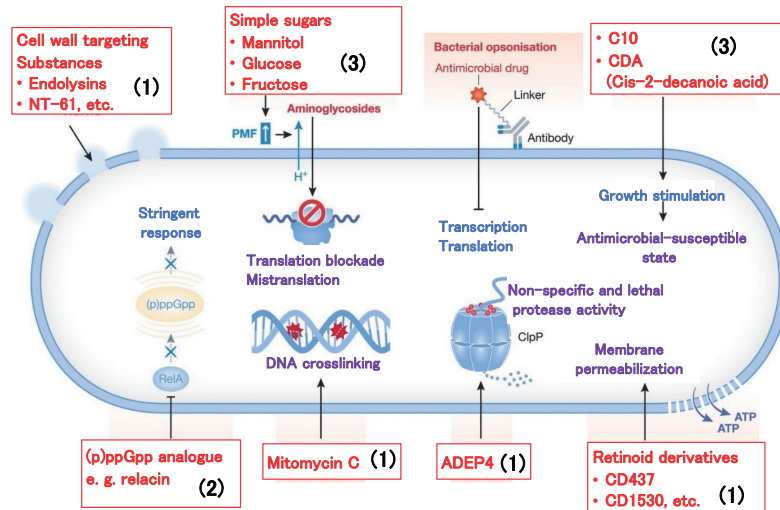


Fig. 3. New approaches to target bacterial persister cells (based on Markus Huemer *et al.*, 2020⁴).

There are three main strategies for treatment and prevention of infections associated with bacterial persisters: (1) directly targeting persister cells; (2) inhibiting formation of bacterial persisters; and (3) resuscitating persisters and sensitizing them to conventional antibiotic therapy.

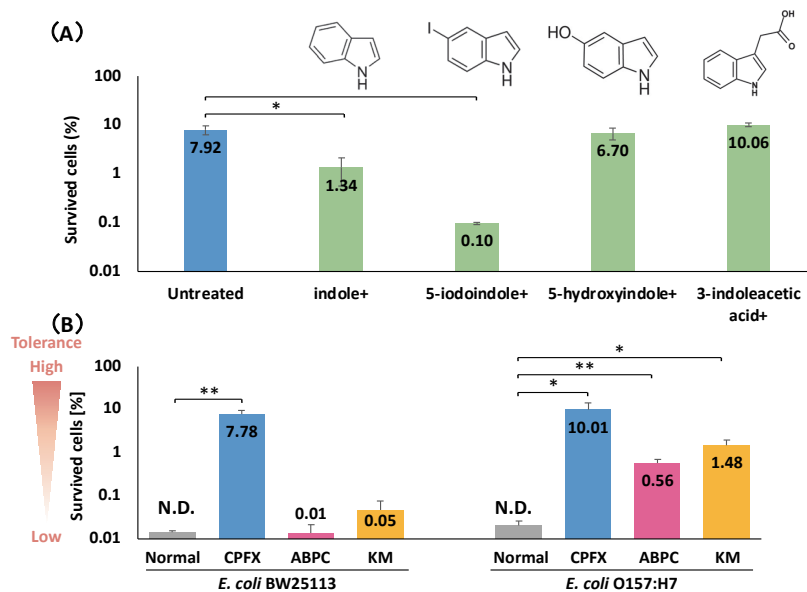


Fig. 4. Effects of indole derivatives on heat tolerance (A) and Diversity of persister subpopulations (B).

(A) Isolated persister cells of *E. coli* BW25113 was resuspended in fresh TSB with indole (2.0 mM), 5-iodoindole (0.5 mM), 5-hydroxyindole (2.0 mM), or indole-3-acetic acid (2.0 mM) to obtain approximately 10^5 CFU/ml and subjected to heat tolerance assays (57 °C, 5 min)²⁴. (B) Persister cells of *E. coli* strains were isolated using different types of antibiotics (ciprofloxacin (CPFX), ampicillin (ABPC), and kanamycin (KM)) and subjected to heat tolerance assays (57 °C, 5 min) (unpublished data by Masuda Yoshimitsu *et al.*).

Data points represent means of results from at least three independent experiments, and error bars indicate standard deviations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N.D.: not detected

及ぼす影響とその制御について研究を行ってきたので、ここで少し触れておきたい。

Persister の研究において、ある抗生物質を過度に添加したのちに一定数残存したものを Persister 集団と定義するが、Persister と言っても、その微小集団の中にもさらに状態の異なるサブグループが存在していると考えられる。つまり、細胞壁合成を阻害す

るアンピシリンで処理して単離した Persister (ABPC-Persister) では、細胞壁合成がほぼ停止しており、DNA ジャイレースを阻害することでゲノム DNA 複製を阻害するシプロフロキサシンによって単離した Persister (CPFX-Persister) では、DNA 複製がほぼ停止しているという具合である。標的となる生合成機構がほぼ停止しているため抗生物質が効きづらい状態になって

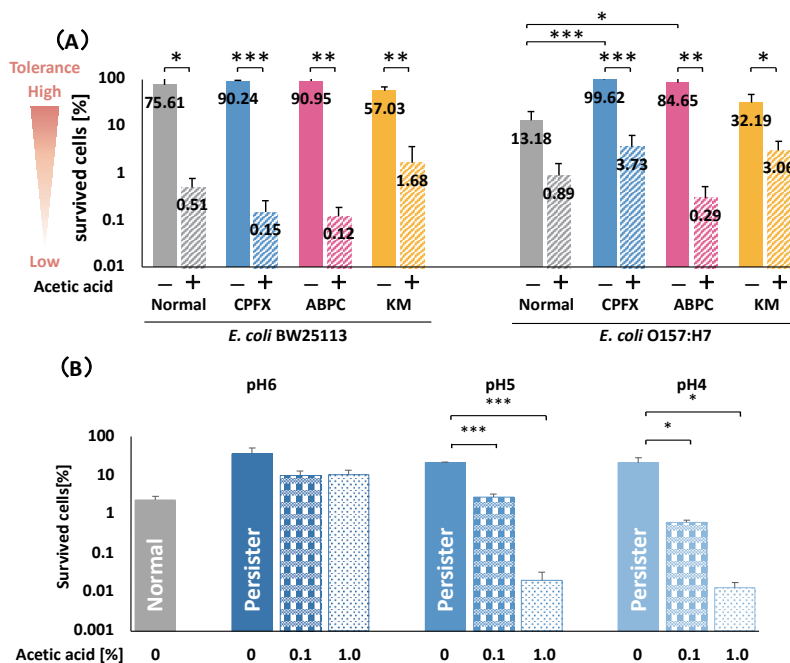


Fig. 5. Acid tolerance of persister cells (A) and Combinational effect of acetic acid and heat treatment against persister cells (B)

(A) Isolated persister cells of *E. coli* strains were resuspended in PBS (pH3) with or without 2% acetic acid to obtain approximately 10^5 CFU/ml and incubated at 25 °C, 15 min. Viable cell numbers before and after treatments were counted to evaluate survived cells (%). (B) Isolated persister cells of *E. coli* O157:H7 was resuspended in PBS (pH4, 5, or 6) containing acetic acid (0, 0.1 or 1.0 %) and subjected to heat tolerance assays (57 °C, 5 min) (unpublished data by Masuda Yoshimitsu *et al.*).

Data points represent means of results from at least three independent experiments, and error bars indicate standard deviations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

おり, Persister 単離に用いる抗生物質を変えるとストレス耐性などの特性も異なるのではないかと我々は仮定した。そこで, 異なる作用機構を持つ抗生物質によって単離した大腸菌 Persister の熱耐性について調べたところ, CPFX-Persister は正常菌体と比較して顕著に高い熱耐性を示した (Fig. 4B)。このことから, Persister のストレス耐性は, どの代謝経路が停止しているのかによって異なることが示唆され, 理由は不明であるが, その中でも CPFX-Persister は非常に高いストレス耐性を持つことが示された。さらに, 同じ大腸菌でも株が異なれば Persister の特性も異なることも示された。

熱耐性だけでなく, 酸耐性という点でも Persister は非常に高いことが示された。pH 3 の条件で処理した場合に, 前述の 3 種の抗生物質耐性を用いて分離した大腸菌 O157:H7 の Persister は正常菌体よりも有意に高い酸耐性を示した (Fig. 5A)。一方で, 大腸菌 O157:H7 だけでなく非病原性の大腸菌でも, pH3 の条件下で酢酸未添加と比較して 2 %酢酸を添加した場合, 使用した抗生物質の種類に関係なく, 全ての Persister において生存率が有意に低下したことから, 酢酸は Persister に対して殺菌的に作用することが示された (Fig. 5A)。そこで, Persister に対する熱と酸の相乗効果

について検討した。pH6 においては酢酸添加による生存率の変化が見られなかったが, pH4 または 5 において, 0.1%以上の酢酸添加で熱耐性が正常菌体と同等以下まで低下した (Fig. 5B)。

以上の結果から, 食品添加物として利用が認められているインドールや調味料として身近に使われている酢酸が, Persister を制御する上で非常に有用であることが明らかとなった。

7. お わ り に

代謝活性等が低下している Persister は, 一見すると弱者の様な振る舞いをするので, 薬剤耐性菌の様なわかりやすい脅威と比較して軽視されてしまう可能性がある。しかし, このずる賢い弱者は抗生物質に対して抵抗生 (または耐性) を持つだけでなく, 熱や酸といったストレスに対しても非常に我慢強いこと, 放っておくと薬剤耐性まで獲得してしまう可能性がある, というふうにして侮ってはいけない存在である。食品中にも当然潜伏しうするため, その制御は今後, 重要な課題になるだろう。しかし, 本稿で紹介したインドールや酢酸といった食品添加物によって, Persister を制御できる可能性も示された。この様に,

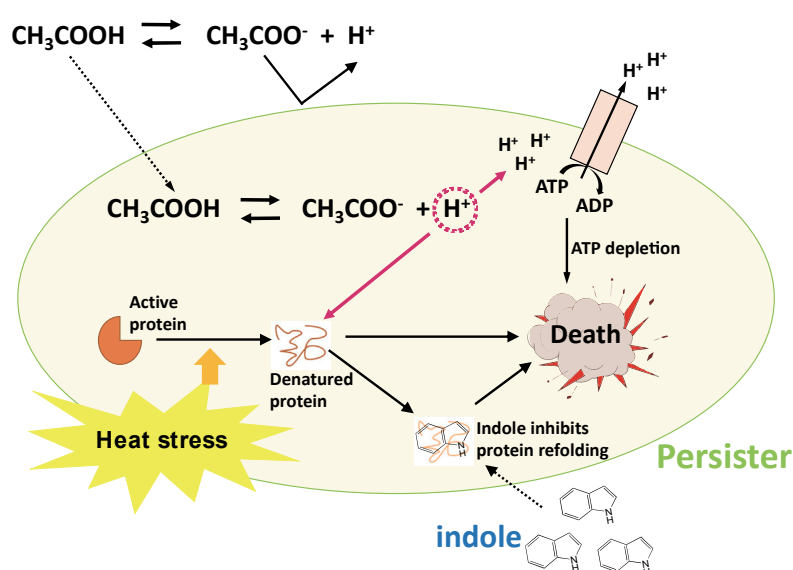


Fig. 6. Model mechanisms of indole or acetic acid to control persister cells combined with heat treatment.

食品中に残存する食中毒細菌の Persister を食品添加物で制御できる可能性が示されたことは、重篤な食中毒症状を引き起こす食中毒細菌をはじめとした感染症細菌の制御にも有効であると考えられ、今後の研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Bigger, J.W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, **244**, 497–500.
- 2) Moyed, H.S. and Bertrand, K.P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* **155**, 768–775.
- 3) Balaban, N.Q. *et al.* (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/s41579-019-0196-3.
- 4) Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S.D., and Zinkernagel, A.S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.*, **21**, 1–24.
- 5) van den Bergh, B., Fauvart, M., and Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol. Rev.*, **41**, 219–251.
- 6) Ronneau, S. and Hallez, R. (2019). Make and break the alarmone: Regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **43**, 389–400.
- 7) Veening, J.W., Smits, W.K., and Kuipers, O.P. (2008). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 193–210.
- 8) Hayes, F. and Van Melderren, L. (2011). Toxins-antitoxins: Diversity, evolution and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **46**, 386–408.
- 9) Maisonneuve, E. and Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*, **157**, 539–548.
- 10) Hu, Y., Kwan, B.W., Osbourne, D.O., Benedik, M.J., and Wood, T. K. (2015). Toxin YafQ increases persister cell formation by reducing indole signalling. *Environ. Microbiol.*, **17**, 1275–1285.
- 11) Maehigashi, T., Ruangprasert, A., Miles, S.J., and Dunham, C. M. (2015). Molecular basis of ribosome recognition and mRNA hydrolysis by the *E.coli* YafQ toxin. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8002–8012.
- 12) Hirakawa, H., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A., and Nishino, K. (2010). Indole enhances acid resistance in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, **49**, 90–94.
- 13) Kim, J., and Park, W. (2015). Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *J. Microbiol.*, **53**, 421–428.
- 14) Ma, Q., Zhang, X., and Qu, Y. (2018). Biodegradation and biotransformation of indole: Advances and perspectives. *Front. Microbiol.*, **9**, 1–18.
- 15) Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 563–75.
- 16) Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S., and Lewis, K. (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.*, **192**, 6191–6199.
- 17) Schumacher, M.A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N.B., Hansen, S., Vulić, M., Lewis, K., and Brennan, R.G. (2015). HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature*, **524**, 59–64.
- 18) Röhrig, C., Huemer, M., Lorgé, D., Luterbacher, S., Phothaworn, P., Schefer, C., Sobieraj, A.M., and

- Schmelcher, M. (2020). Targeting hidden pathogens: Cell-penetrating enzybiotics eradicate intracellular drug-resistant staphylococcus aureus. *Mbio*, **11**, 1–19.
- 19) Kim, W., Zou, G., Taylor P. A. Hari, and Mylonakis, E. (2019). A selective membrane-targeting repurposed antibiotic with activity against persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 16529–16534.
- 20) Conlon, B.P., Nakayasu, E.S., Fleck, L.E., LaFleur, M.D., Isabella, V.M., Coleman, K., Leonard, S.N., Smith, R.D., Adkins, J.N., and Lewis, K. (2013). Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*, **503**, 365–370.
- 21) Wexselblatt, E. Oppenheimer-Shaanan, Y., Kaspy, I., London, N., Schueler-Furman, O., Yavin, E., Glaser, G., Katzhendler, J., and Ben-Yehuda, S. (2012). Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response. *PLoS Pathog.*, **8**, e1002925.
- 22) Allison, K.R., Brynildsen, M.P., and Collins, J.J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, **473**, 216–220.
- 23) Song, S. and Wood, T.K. (2020). Combatting persister cells with substituted indoles. *Front. Microbiol.*, **11**, 1–9.
- 24) Masuda, Y., Sakamoto, E., Honjoh, K.I., and Miyamoto, T. (2020). Role of toxin-antitoxin-regulated persister population and indole in bacterial heat tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **86**, 1–10.
- 25) Lee, J. H., Kim, Y. G., Gwon, G., Wood, T. K., and Lee, J. (2016). Halogenated indoles eradicate bacterial persister cells and biofilms. *AMB Express*, **6**, 123.

(令和 5 年 4 月 26 日受理)