

平成21年 4月10日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592115
 研究課題名（和文） 緑膿菌のバイオフィーム形成と抗菌薬抵抗性について
 研究課題名（英文） The relationship between biofilm formation and antibiotic tolerance
 in *Pseudomonas aeruginosa*
 研究代表者
 三宅 洋一郎 (MIYAKE YOUICHIROU)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
 研究者番号：80136093

研究成果の概要：

本研究では、バイオフィーム形成のモデルとしてよく研究されている緑膿菌を用いた。*psl* クラスターがバイオフィーム形成する過程において近年、cyclic-di-GMP (c-di-GMP) と呼ばれるセカンドメッセンジャーの関与が明らかになってきた。c-di-GMP とバイオフィーム形成の関与を探索するにあたり、c-di-GMP の産生に関与する Wsp 領域の検討を行うことにした。pMMB67HE のマルチクローニングサイトに *wspF* ORF を含む領域を挿入したものを PAO1 株に導入することにより、表現型にもたらす影響について検討した。親株に *wspF* 遺伝子を導入することにより、Vogel-Bonner 最小培地にて観察されるコロニーがムコイド状に変化した。これは細胞内 c-di-GMP 量の減少によるものと推察された。また、親株ではバイオフィームを形成する以前の物理的な付着状態の段階でカルバペネム系抗菌薬のピアペネムに対して抗菌薬抵抗性が上昇するが、*wspF* 遺伝子をプラスミドにて導入した株では付着による抗菌薬抵抗性の著しい上昇はみられなかった。これらの結果より、付着菌の抗菌薬抵抗性の上昇には、c-di-GMP が関与することが推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目： 歯学・形態系基礎歯科学
 キーワード： 口腔細菌学・バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

バイオフィーム感染症は抗菌薬を用いた治療を行っても除菌することは困難であり、薬剤耐性や院内感染が社会問題化している現代医療にとって深刻な影響をもたらしている。

緑膿菌はヒトにも常在菌として分布しており、呼吸器や尿路における感染症・日和見感染の起炎菌として問題になっている。歯科領域においては誤嚥性肺炎を引き起こすことでも知られており、緑膿菌はバイオフィーム感染症の原因菌として最も重要な細菌の一つである。申請者らは、これまでにバイオフィーム形成以前の単に固層に付着しただけの細菌においても抗菌薬に抵抗性を示すことを明らかにし、この抵抗性に関与する遺伝子を見いだした。しかし、この遺伝子はバイオフィーム形成に関与する遺伝子群 *psl* クラスターの一部であることが近年、明らかにされた。その後、この *psl* クラスターがバイオフィーム形成において *pel* 遺伝子群及び cyclic-di-GMP (c-di-GMP) と並び非常に重要な役割を担っていることが明らかになりつつあるが、そのメカニズムについてはまだほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

psl クラスターがバイオフィームを形成する過程において近年、c-di-GMP と呼ばれるセカンドメッセンジャーの関与が明らかになってきた。本研究では c-di-GMP に着目し、バイオフィーム形成機構と菌体付着時の抗菌薬抵抗性について明らかにしていくことを目的とする。c-di-GMP の産生及び分解をする GGDEF 領域や EAL 領域を保持する Wsp ドメインに着目し、解析をすすめる。

3. 研究の方法

本研究では、バイオフィーム形成のモデルとしてよく研究されている緑膿菌を用いた。c-di-GMP と *psl* がバイオフィーム形成に関与する機構を探索するにあたり、c-di-GMP の産生に関与する Wsp 領域の検討を行うことにした。

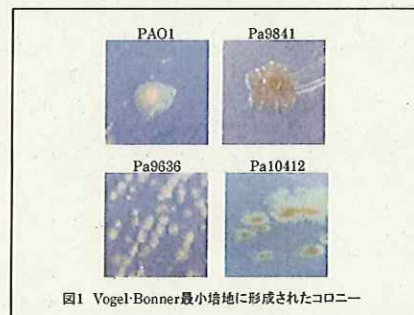
本研究において、Wsp 領域のバイオフィーム形成機構を明らかにするため、*wspF* 遺伝子強制発現株を作製し、バイオフィーム形成に関する様々な表現形の観察を行った。また、バイオフィーム形成に関与することが明らかになっている遺伝子群の発現を解析し、バイオフィーム形成と Wsp 領域の関与について検討した。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成の検討に使用する臨床分離株の選択

バイオフィーム形成に対する Wsp 領域の関与を検討するために、まず臨床分離株 30 株に対してバイオフィーム形成試験を行った。講座所有緑膿菌臨床分離株 30 株を LB 培地にて 14 時間培養した菌液を希釈後、96 穴プレートに播種して 30°C にて 10 時間培養した。これを 1% クリスタルバイオレットにて染色後、数回洗浄し、吸光度を測定することによりバイオフィーム形成能を測定した。その結果、バイオフィーム形成能が高かった Pa9636 株、Pa9841 株、Pa10412 株を選択した (データ略)。

次に、Vogel-Bonner 最小培地にてこれらの株のコロニー性状を観察した。この結果、しわ状のコロニーを形成した Pa9841 株が c-di-GMP 産生能が高い可能性が強いと思われるため、今後の実験で使用することにした (図 1)。



(2) *wspF* 遺伝子強制発現プラスミドの作製及び臨床分離株への導入

シャトルベクター pMMB67HE のマルチクローニングサイトに *wspF* 遺伝子 ORF を含む領域を挿入し、*wspF* 遺伝子強制発現プラスミドである pMMB-*wspF* を作製した。このプラスミドを、親株である PA01 株及び前述の臨床分離株 3 株に形質転換し、これらの株について再度 Vogel-Bonner 最小培地にてコロニー性状を観察した (図 2)。この結果、PA01 株、Pa10412 株はコロニー性状にあまり変化はみられなかった。しかし、Pa9636 株は *wspF* 強制発現プラスミド導入により、コロニー形態がやむこいド状に変化し、Pa9841 株に関してはコロニー形態が大きく変化した。また、PA01 株と Pa9841 株については pMMB67HE を導入したベク

ターコントロール株についてもコロニー形態を観察したが、野生株とあまり変化はみられなかった。c-di-GMP 産生能を低下させる機能がある *wspF* 遺伝子の導入により、コロニー形態がムコイド状に変化したことから、Pa9841 株のバイオフィーム形成能の高さ及びしわ状のコロニー形態は、c-di-GMP の産生能の高さによるものであると強く示唆された。

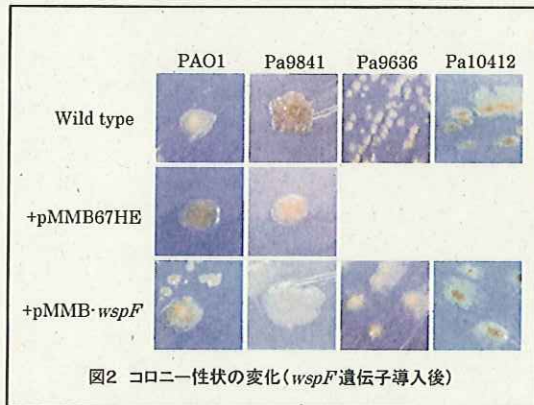


図2 コロニー性状の変化 (*wspF* 遺伝子導入後)

(3) *wspF* 遺伝子導入後のバイオフィーム形成能の変化

野生株及び *wspF* 遺伝子導入株に対して、バイオフィーム形成能を測定した (図3)。PAO1 株及び Pa9841 株では、*wspF* 遺伝子強制発現によりバイオフィーム形成能の低下がみられた。一方で、Pa9636 株及び Pa10412 株においては *wspF* 遺伝子強制発現後も、バイオフィーム形成能の変化はみられなかった。

この結果により、Pa9841 株のバイオフィーム形成能の高さは c-di-GMP 産生能が高いためであることが強く示唆された。

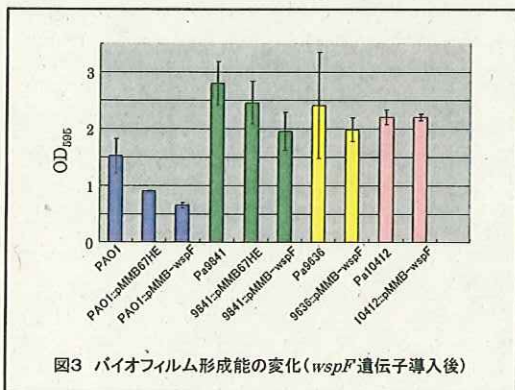


図3 バイオフィーム形成能の変化 (*wspF* 遺伝子導入後)

(4) *wspF* 遺伝子導入による MBC^{AD} (付着時 MBC) の変化

以前の我々の実験より、バイオフィームを形成する以前の物理的な付着状態の段階で

カルバペネム系抗菌薬のピアペネムに対して抗菌薬抵抗性が上昇するという現象が明らかになっている。しかし、*wspF* 遺伝子を強制発現させた Pa9841 株では、MBC^{AD} (付着時 MBC) の上昇は若干みられたものの、野生株ほどの著しい上昇はみられなかった (表1)。また、(3) の実験より、バイオフィーム形成能は高いが c-di-GMP 産生能は高くないと考えられる Pa10412 株は、野生株と *wspF* 遺伝子強制発現株で MBC^{AD} の差がみられなかった。このことから、ピアペネム使用時における MBC^{AD} の上昇には、c-di-GMP が必要であることが強く示唆された。

	BIFM			
	MBC	MBC	MBC ^{AD}	MBC ^{AD}
PAO1	0.25	0.5	0.25	32
PAO1::pMMB67HE	0.25	0.5	0.25	16
PAO1::pMMB-wspF	0.25	0.5	0.25	8
Pa9841	0.125	0.25	0.125	16
Pa9841::pMMB67HE	0.25	0.25	0.125	16
Pa9841::pMMB-wspF	0.25	0.25	0.25	4
Pa9636	0.5	2	0.5	32
Pa9636::pMMB-wspF	0.5	2	0.5	2
Pa10412	0.25	1	0.5	32
Pa10412WFpMMB-wspF	0.25	1	1	32

(μg/ml)

表1 付着菌の抗菌薬抵抗性

(5) 付着時の遺伝子発現測定

対数増殖期の菌を希釈後、6穴プレートにて遠心し、菌体を付着させた状態で RNA を回収したサンプルを付着菌のものとし、菌液の RNA をそのまま回収したものを浮遊菌のものとした。そのサンプルにて Real-time PCR を行い、遺伝子発現を測定した (図4)。抗菌薬抵抗性に関与が強い *ipoS* 遺伝子について、付着菌における発現は浮遊状態のものよりも強く発現しており、*wspF* 遺伝子を強制発現させた際の付着菌の発現は浮遊菌のものに変化がみられないか、むしろ低下していた。アルジネート産生で知られる *algC* 遺伝子についても同様に付着で発現が上昇し、*wspF* 遺伝子の強制発現で発現が低下していた。これらの結果から、バイオフィームを形成する以前の物理的な付着による遺伝子発現変化と c-di-GMP の関与が認められた。

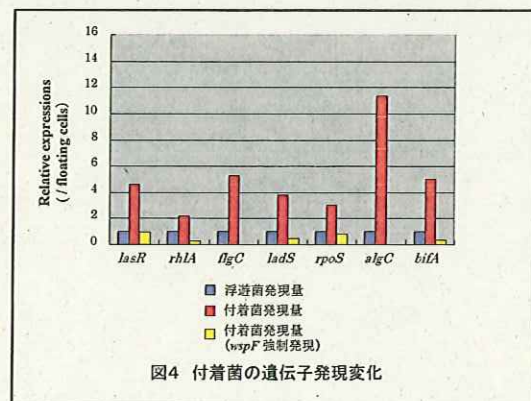


図4 付着菌の遺伝子発現変化

(6) まとめ

付着菌の抗菌薬抵抗性の上昇には、c-di-GMP が関与することが強く示唆される結果であった。また、付着時の遺伝子発現の変化によってバイオフィーム形成の前駆状態となり、抗菌薬抵抗性が上昇する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 鹿山鎮男、三宅洋一郎 緑膿菌の抗菌薬抵抗性に影響を与える因子について 四国歯誌 21(2) 421-422 2009 査読あり

[学会発表] (計5件)

- ① 谷口友伯、鹿山鎮男、山本明毅、小野恒子、弘田克彦、三宅洋一郎、長宗秀明 緑膿菌臨床分離株の付着菌表現型における cyclic-di-GMP の関与について 第82回日本細菌学会総会 平成21年3月13日 名古屋
- ② 谷口友伯、鹿山鎮男、小野恒子、山本明毅、弘田克彦、三宅洋一郎 緑膿菌臨床分離株の付着時性状における cyclic-di-GMP の関与について 第56回日本化学療法学会西日本支部総会 平成20年12月6日 広島
- ③ 鹿山鎮男、弘田克彦、小野恒子、三宅洋一郎 付着状態における緑膿菌の抗菌薬抵抗性と遺伝子発現について Bacterial Adherence & Biofilm 第22回学術集会 平成20年7月4日 淡路
- ④ 鹿山鎮男、弘田克彦、小野恒子、三宅洋一郎 付着状態における緑膿菌の抗菌薬抵抗性と遺伝子発現について 第81回日本細菌学会総会 平成20年3月26日 京都
- ⑤ 鹿山鎮男、小野恒子、弘田克彦、劉大力、Heni Susilowati、三宅洋一郎 緑膿菌 Quorum sensing 機構と biapenem 抵抗性について 第60回日本細菌学会中国・四国支部総会 平成19年10月14日 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 洋一郎 (MIYAKE YOUICHIROU)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：80136093

(2) 研究分担者

弘田 克彦 (HIROTA KATSUHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・講師

研究者番号：60199130

根本 謙 (NEMOTO KEN)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：10218274

小野 恒子 (ONO TSUNEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：40035514

鹿山 鎮男 (KAYAMA SHIZUO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：50432761