

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08629

研究課題名(和文) 抗酸菌の情報伝達系を介したバイオフィーム形成機構の解明と除去剤の開発

研究課題名(英文) Elucidation of biofilm formation mechanism via signal transduction system of mycobacteria

研究代表者

西内 由紀子 (Nishiuchi, Yukiko)

広島大学・学術・社会連携室・特任准教授

研究者番号：00333526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸菌の *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) は低酸素にするとバイオフィーム(BF)を形成するので、MAHが低酸素を感知してBF形成遺伝子群を発現していると考えた。この形成機構を解明するために、低酸素および大気下の遺伝子発現を比較した結果、低酸素を感知する2成分制御系の受容体遺伝子 MAV_RS11960 を同定した。本遺伝子の過剰発現株やBF形成の異なる環境分離3株の遺伝子発現の解析を実施し成果発表段階である。MAHのBF構造や病原性解析の成果も発表し、これらの研究実績は環境や生体内での抗酸菌の動態を明白にして予防や治療戦略の基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺非結核性抗酸菌症は日本だけでなく世界中で増加しているので、その対策が望まれています。抗酸菌は環境でバイオフィームを形成して環境から感染すること、生体内でも形成されていると考えられているので、抗酸菌のバイオフィームの構造や形成機構を明らかにすることが重要ですが、ほとんどわかっていませんでした。本研究で抗酸菌の *Mycobacterium avium* のバイオフィームの構造と低酸素受容体を介した形成機構について明らかにすることができました。これらの研究成果から環境や生体内での抗酸菌のバイオフィーム動態が明らかになり、感染源のバイオフィームの除去や新たな治療方法の開発につながることを期待されます。

研究成果の概要(英文)：Since one of the non-tuberculous mycobacteria, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) forms a biofilm when exposed to hypoxia, we hypothesized that MAH senses hypoxia and expresses a group of biofilm-forming genes. To elucidate the mechanism of biofilm formation, we compared gene expression under hypoxia and atmosphere then identified a receptor gene MAV_RS11960, a two-component regulatory system that senses hypoxia. Comprehensive analysis of gene expression of over-expression strains of this gene and three environmental isolates with different ability of biofilm formation has been conducted and is ready for publication of results. The results of biofilm structure and virulence analysis of MAHs have been published, and these research results will provide the basis for prevention and treatment strategies by clarifying the mycobacterial dynamics not only within the environment but also within hosts.

研究分野：非結核性抗酸菌の環境内動態および病原性

キーワード：非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* バイオフィーム 2成分制御系 低酸素 トランスクリプトーム解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 非結核性抗酸菌 (NTM) による感染症は世界的に増加しており、これらの菌は多くの一般的な抗生物質に対して本質的に耐性であるため、治療が困難であることが知られている。NTM は多様であり、環境中の水系や土壌に遊離型やバイオフィルムを形成して広く分布している (Nishiuchi et al., 2017)。中でもヒトに深刻な肺非結核性抗酸菌症を引き起こし、本邦で増加し続けているのは、*Mycobacterium avium* や *Mycobacterium intracellulare* などの通称 MAC 菌 (*Mycobacterium avium* complex) である。*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) は最も多い起因菌である。
- (2) 環境から感染することが知られているこれらの菌の感染を防御するためには、環境中の分布や菌の増殖の条件、バイオフィルムの構造や形成機構の解明が重要である。しかしながら、これらの報告はまだ少なく不明な点が多い。研究者は MAC 菌が浴室や (Nishiuchi et al., 2007, 2009) 河川 (Arikawa et al., 2019) に分布していることを報告し、浴室が感染源のひとつであることを明らかにしてきた。また、MAC 菌は NTM のなかでも消毒剤に対して強い抵抗性を示し、バイオフィルムを形成するといっそう抵抗性が増すことを明らかにした (西内ら 2015, Nishiuchi et al., 2017)。
- (3) MAH は、低酸素条件下で液体培地の気液界面に菌膜状のバイオフィルムを形成することを見出した (Nishiuchi et al., 2017)。この事実は、MAH が低酸素条件を感知し、バイオフィルムを形成する遺伝子を活性化してバイオフィルム形成につなげていることを示唆している。そこで網羅的に遺伝子発現を解析すれば、バイオフィルム形成メカニズムを解明できると考えた。

<引用文献>

- Nishiuchi, Y. et al., (2017). Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Front Med (Lausanne)* **4**: 27.
- Arikawa, K., et al. (2019). Genetic relatedness of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from bathrooms of healthy volunteers, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas. *Infect Genet Evol* **74**: 103923.
- Nishiuchi, Y., et al. (2009). *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Jpn J Infect Dis* **62**(3): 182-186.
- Nishiuchi, Y., et al. (2007). The recovery of *Mycobacterium avium*-*intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clin Infect Dis* **45**(3): 347-351.
- 西内ら (2015). 抗酸菌およびそのバイオフィルムに対する次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素ガス溶存液の殺菌効果. *環境感染誌* **30**(4): 243-248.

2. 研究の目的

- (1) NTM 感染症の増加を妨げるために、MAH を用いて環境中のバイオフィルムの構造や実態、またバイオフィルム形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。
- (2) (1)の研究をとおして得られた MAH の新たな生存メカニズム、すなわち MAH が宿主の細胞に接着して増殖する知見について詳細に解析して解明することを目的とした。
- (3) (1)で明らかにするバイオフィルムの構造や、形成メカニズムをもとに、環境中の MAH の分布を制御する具体的な方法を提言する。

3. 研究の方法

- (1) 環境サンプルと in vitro 実験で環境中のバイオフィルムの構造や実態を観察した。

環境サンプルは MAH が存在している浴室の無生物表面上に自然形成されたバイオフィルムをフィルターで拭き取り、電子顕微鏡を用いて観察した。MAH 単培養して形成したバイオフィルムも同様に観察・解析した。

- (2) MAH は、低酸素条件下で液体培地の気液界面に菌膜状のバイオフィルムを形成することから、バイオフィルム形成条件と自由浮遊している菌が増殖する条件で RNA を抽出し、遺伝子発現を RNA seq 法を用いて網羅的に比較解析してバイオフィルム形成に必要な遺伝子について調べた。
- (3) (1, 2)の研究をとおして MAH が宿主の細胞に接着して増殖することをみいだしたので、宿主細胞を用いた *in vitro* 実験を行い、その細胞外増殖メカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) 感染源である浴室に自然に形成されたバイオフィルム（MAH を含む多菌種が形成）と実験的に MAH 単培養で形成したバイオフィルムの構造と特徴について明らかにした (Nishiuchi, 2021)。MAH バイオフィルムは薄膜状の ECM とその間に小桿菌が存在するミルフィーユ様の重層構造をもつ平坦な構造であることがわかった。この MAH 特有の構造は、水流や殺菌剤への耐性、成長の早い競合菌の排除に適していると考えられ、バイオフィルム中の小細胞はバイオエアロゾルの形成や感染に寄与している可能性がある。

浴槽の注水口に自然形成されたバイオフィルムは、フィルターを使って拭いとって電子顕微鏡を用いて観察すると、球菌と短・長桿菌が細胞外マトリックス (ECM) で結合した多層構造であった(図 1A)。一方で、マイコバクテリウム特有の形状をした桿菌がフィルター上に散在しているのが観察された(図 1B)。

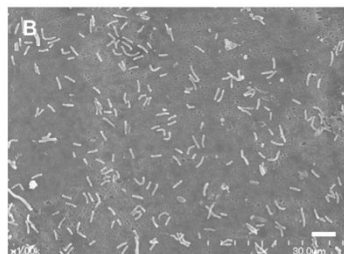
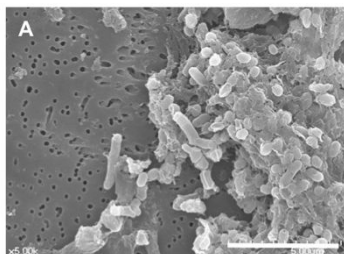


図 1. 住宅浴槽の注水口に自然形成されたバイオフィルム。多層に形成されたバイオフィルムは、ECM 内に桿菌や球菌が埋め込まれている（青矢印）(A)。散在する細胞は、マイコバクテリア特有の形態を示す桿菌で、ECM に包埋されていない(B)。

これは、フィルターを使って拭き取った時、または電子顕微鏡観察をするための準備段階でバイオフィルムが壊れたり、ECM が除かれたりしたのかもしれない。すなわち、MAH が多いバイオフィルムは、物理的な力によって接着面からはがれやすくバラバラになりやすいことを示唆しているとおもわれる。次に、MAH 単培養で無生物表面上に形成されるバイオフィルムの構造について検討した。In vitro でマイクロコロニーから形成したバイオフィルムは、平坦な重層構造を示した。すなわち薄いフィルム状の ECM 膜が数層形成され、その膜の間に多数の小さな桿菌（長さ $0.76 \pm 0.19 \mu\text{m}$ ）が観察された。小桿菌は ECM に包埋されなかった(図 2)。この平坦な重層構造は、環境から分離した MAH 2 株で得られたこと、その外観は細長 (OCU806)、および円形(OCU746)と、株によって異なっていた。このことから、平坦な重層構造と小さい菌の形状は、MAH バイオフィルムに共通の構造であると思われる。低酸素状態で気液界面に形成されるバイオフィルムについても同様に膜状の ECM に覆われていることが観察され、桿菌の長さも短かった。

(2) MAH は、低酸素条件にすると液体培地の気液海面に菌膜状のバイオフィルムを形成する。培養条件を1つ換えることで菌膜を形成する事実は、変更した環境ガス濃度、すなわち低酸素を感知するセンサーと感知したシグナルを菌膜状バイオフィルム形成に繋げるレスポンスレギュレータ及びターゲット遺伝子群(レギュロン)が存在していることを示唆している。そこで低酸素条件で変動する遺伝子群を明らかにすることを目的として mRNA の発現量を通常培養と低酸素条件とで比較するトランスクリプトーム解析を行った。今回供試菌株は、バイオフィルムを形成し、ゲノム配列がわかっている3株(MAH 104, MAH OCU464, MAH OCU873)を用いた。今までに MAH のゲノム系統解析から5つのクレイドに分かれることを報告している (Yano et.al., Genome Biol. Evol. 9:2403, 2017) が、この3株はそれぞれ別のクレイドに属している。バイオフィルム形成条件と自由浮遊している菌が増殖する条件

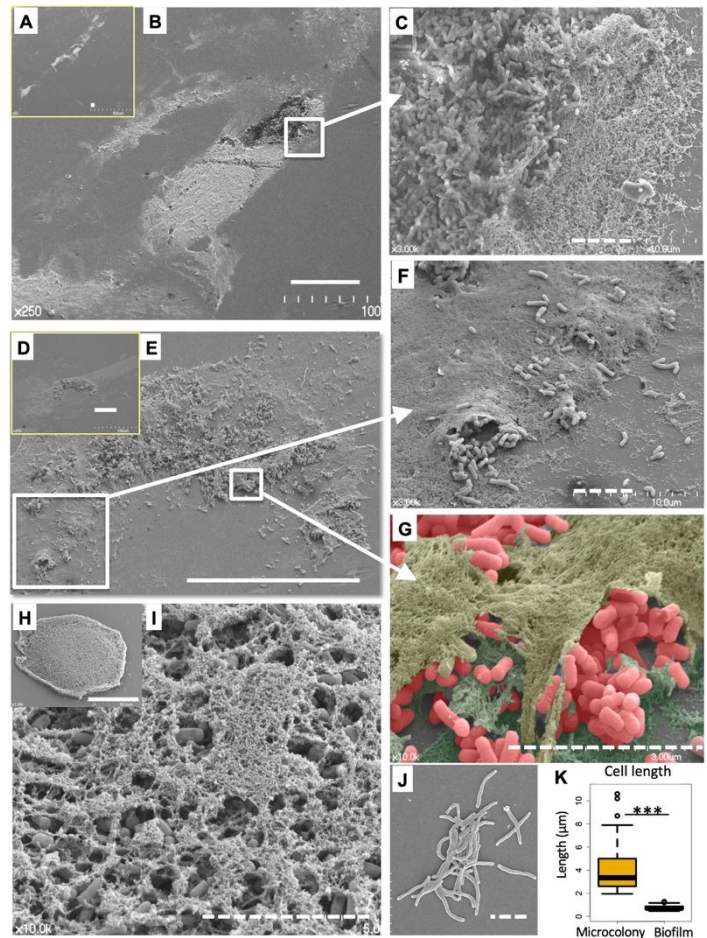


図2. マイクロコロニーから実験的に発現させた MAH バイオフィルム。3週間培養した MAH OCU806 のマイクロコロニー (A, B, C, D, E, F, G) と2週間培養した MAH OCU746 のバイオフィルム (H, およびI)。バイオフィルム形成前のマイクロコロニー (J)。スケールバーの実線と破線はそれぞれ 50µm と 5µm を示す。マイクロコロニーおよびバイオフィルム中の MAH 細胞の長さを箱ひげ図で表した(K)。* は Wilcoxon rank-sum 検定による差の有意性を示す、*** P < 0.0001。

で RNA を抽出し、遺伝子発現を RNA seq 法を用いて網羅的に比較解析してバイオフィルム形成に必要な遺伝子について調べた。

その結果、全ての解析結果は Q30(%) (塩基の信頼性 99.9%の割合) が 92%以上であり、高い精度であった。MAH104 について2回(biological replicant)実施したところ再現性は高かった。MAH 104, MAH OCU464, MAH OCU873 に共通した発現変動遺伝子を探索したところ、 $|\log_2FC| > 1$ かつ FDR < 0.05 の有意に発現量が変化した遺伝子は 250、うち 141 遺伝子の発現が増加、109 遺伝子の発現が減少した (図 3)。MAH104 のゲノムには 17 組の二成分制御系が認められている。これらのうち、結核菌の DosS/DosR オルソログに相当する遺伝子(MAV_RS19700/MAV_RS19705)の発現量は変化しなかった。発現量が増加したのは結核菌にはないセンサーヒスチジンキナーゼ遺伝子 (MAV_RS11960) である(図 4)。この遺伝子はオープン遺伝子で対となるレギュレータ遺伝子は不明である。MAV_RS11960 は低酸素を感知する PAS ドメイン構造を有し、DosS と相同性の高いヒスチジンキナーゼを有している。このことから、RS11960 は、低酸素を感知するセンサー分子である可能性があるが、結核菌の DosS とは異なる機能を有することが示唆された。センサー分子やそのドメイン構造の違いは表現型の違い、すなわち MAH ではバイオフィルムを形成するが、結核菌群では増殖を抑制することに関わっていると思われる。

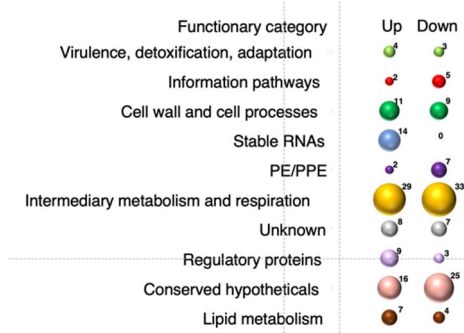


図 3. 機能カテゴリーごとの発現量が変化した遺伝子数を示す。

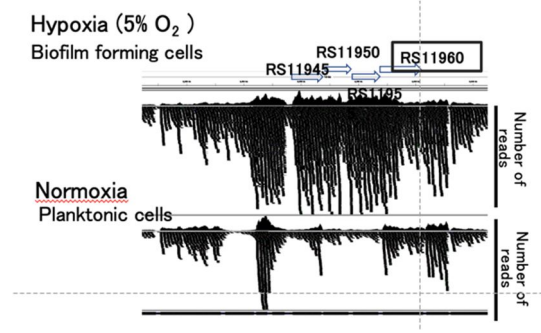


図 4. MAV_RS11945 から RS11960 までの遺伝子の発現は低酸素条件下で有意に増加した。

(3) MAH の新規生存機構を見出した(Nishiuchi et al., 2022). 抗酸菌は、環境中では遊離型やバイオフィーム形成のほかにアメーバの細胞内に寄生して増殖することが知られている。また、ヒトに感染すると、マクロファージ内で増殖する細胞内寄生菌であることが知られている。今回、新たに MAH は、赤血球に接着して相互作用し、細胞外増殖をすることを見出した。この生存機構は、環境中でアメーバだけでなくその他の原生物に接着して細胞外で増殖している可能性を示唆しており、MAH が多様でさまざまな生存機構で世界中の環境に適応していると思われる。

この機構発見の発端は、赤血球と MAC 菌が共存していることを見出したことである。*M. avium* と *M. intracellulare* に感染したマウス 5 匹と、MAH に感染したヒト患者の肺組織サンプルを採取した。顕微鏡で観察したところ、マウスとヒトの肺組織の毛細血管と肉芽腫（免疫細胞の塊）の両方で、赤血球がマイコバクテリアと共存していることが判明した(図 5A)。マイコバクテリアとヒト赤血球の関係を調べるため、赤血球がある場合とない場合でマイコバクテリアの増殖を観察した。その結果、MAH は赤血球の存在下でより速く増殖し、血球の濃度に依存した速度で増殖することがわかった。その指数関数的な増殖は、マクロファージ内の MAH の増殖よりもさらに速かった。この増殖は、MAH が赤血球の膜に直接接着して赤血球の細胞外で起きていることを確認した(図 5B)。これらの結果は、赤血球が MAH の旺盛な増殖を促したことを示している。さらに、一般にマイコバクテリアが寄生先として狙うマクロファージは、MAH が付着した赤血球を優先的に取り込んでいることもわかった。MAH が赤血球に結合することで、ATP というエネルギーが放出され、それがマクロファージを刺激して、感染細胞を取り込むようになったと思われる。

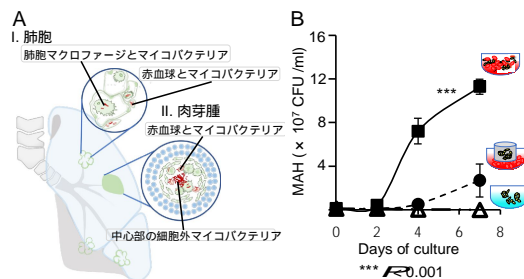


図 5. マイコバクテリアの赤血球を利用した細胞外増殖。A). マイコバクテリア感染肺の模式図。マイコバクテリアは、マクロファージ内と細胞外に多く存在し、毛細血管内の赤血球や、肉芽腫内の赤血球と共存していた。B). マイコバクテリアは赤血球に直接接着して増殖する。マイコバクテリアは赤血球と一緒に培養すると活発に増殖した()が、セルインサートを使って両者を分けたり()、赤血球を除くと()増殖しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yukiko Nishiuchi	4. 巻 36
2. 論文標題 Ultrastructure of the Mycobacterium avium subsp. hominissuis Biofilm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes Environ.	6. 最初と最後の頁 ME20218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME20128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishiuchi, Y., Tateishi, Y., Hirano, H., Ozeki, Y., Yamaguchi, T., Miki, M., Kitada, S., Maruyama, F., Matsumoto, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct attachment with erythrocytes augments extracellular growth of pathogenic Mycobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e02454-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.02454-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西内由紀子、大田篤、矢野大和、岩本朋忠、阿戸学、松本壮吉、大原直也、丸山史人
2. 発表標題 抗酸菌のバイオフィルム形成と休眠時遺伝子発現比較
3. 学会等名 第33回バイオフィルム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiuchi, Y., Ota, A., Iwamoto, T., Ato, M., Matsumoto, S., Ohara, N., Maruyama, F
2. 発表標題 Detection of Differential Gene Expression in Biofilm-Forming versus Planktonic Populations of Mycobacterium avium subsp. hominissuis MAC菌のバイオフィルム形成時の遺伝子発現変動解析
3. 学会等名 第92回細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西内 由紀子, 岩本 朋忠, 有川 健太郎, 吉田 志緒美, 丸山 史人, 田丸 亜貴, 藤吉 奏
2. 発表標題 河川水の非結核性抗酸菌と自由生活性アメーバとの関係
3. 学会等名 第93回細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yano, H., Maruyama, F., Nishiuchi, Y., Iwamoto, T.
2. 発表標題 Local diversification of MAC lung disease agent Mycobacterium avium
3. 学会等名 第93回細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大原 直也 (Ohara Naoya) (70223930)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------