

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21860057

研究課題名（和文） 大腸菌アクチンタンパク質の制御によるバイオフィーム形成の抑制

研究課題名（英文） Repression of biofilm formation of *Escherichia coli* by regulating the actin protein

研究代表者

尾島 由紘 (OJIMA YOSHIHIRO)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号：20546957

研究成果の概要（和文）：大腸菌のアクチン様タンパク質をコードする *yggE* 遺伝子の欠損が接着性に与える影響を検討したところ、*yggE* 欠損株においてポリ塩化ビニル(PVC)やポリプロピレン(PP)などのプラスチック表面に対して、野生株の約 6 倍以上の接着量を示した。この接着量増加のメカニズムとして、*yggE* 欠損株において鞭毛の形成と回転に関連する遺伝子の発現量が約 10 倍以上増加していることと、それに付随して高い運動性を示すことが確認された。また接着した *yggE* 欠損株を走査型電子顕微鏡により観察したところ、野生株と比較して数倍の鞭毛数が観察され、それらの鞭毛が細胞と固体表面または細胞どうしを接続していることが判明した。これらの結果より、アクチン様タンパク質が鞭毛ならびにバイオフィーム形成に深く関連していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The knockout of *yggE* gene, which encodes the actin-like protein of *E. coli*, showed the strong attachment of cells on the solid surface (such as polyvinyl chloride (PVC) and polypropylenes (PP)) compared with the wild type of *E. coli*. As a mechanism of attachment, it was confirmed that the expression of flagella-related genes in *yggE* knockout mutant were 10 times higher than that of wild type and motility rate increased by three times. In addition, the observation of attached cells of *yggE* knockout mutant by using the scanning electron microscope revealed that the number of flagellum increased by several times compared with the wild strain, and those flagellums connected the cell with the solid surface or the cells each other. These results suggest that the actin-like protein of *E. coli* is deeply related to the flagellum and the biofilm formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：大腸菌, バイオフィーム, アクチンタンパク質, 鞭毛

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日常生活における抗菌・殺菌に対する関心の高まりや、従来にはなかった病原性

細菌による様々な感染症が各地で発生し大きな社会問題となっている。このような感染症を引き起こす微生物の多くは、バイオフィ

ルムと呼ばれる付着状態で生育することが近年明らかとなってきたが、バイオフィルム形成に伴う特定遺伝子の動態に関しては、不明な点が多いのが現状である。

大腸菌の Ygg クラスター遺伝子群（以下 Ygg クラスター）は、機能未知を含んだ平均 700 bp と比較的塩基配列の短い全 24 遺伝子から成り、染色体上においてこのクラスターのすぐ上流には中枢代謝に関連した機能既知遺伝子群と、下流には病原性島と呼ばれる鳥類への感染性大腸菌において感染に関与する遺伝子群があり、その中間に位置する。申請者らはこれまでに、二酸化チタン光触媒による殺菌に関する一連の研究過程において、殺菌作用に対する耐性株を発見し、耐性株細胞の中枢代謝が極めて嫌気的であることと、Ygg クラスターの 3 つの遺伝子 (*yggB*, *yggE*, *yggG*) の高発現が深く関与していることを発見した。3 つの遺伝子のうち *yggB* に関しては、機械受容チャネルタンパク質をコードする遺伝子 (*mscS*) であり、細胞の浸透圧調整を行なう重要な遺伝子であることが判明している。*yggG* 遺伝子に関しては、これまでの申請者の検討により、大腸菌の飢餓ストレスを制御する因子であり、その過剰発現がフェニルアラニン生産大腸菌における酢酸生成を抑制し、フェニルアラニン効率を向上させることを見出した。これらの結果より、Ygg クラスター遺伝子は大腸菌細胞活性に非常に重要な要素であることが推察される。*yggE* 遺伝子に関しては、現在のところ、遺伝子配列相同性検索 BLAST version 2.2.15 ([http://blast.ddbj.nig.ac.jp/to\\_p-j.html](http://blast.ddbj.nig.ac.jp/to_p-j.html)) により、アクチンタンパク質をコードすると推定されている。原核生物におけるアクチンは真核生物と同様に、重合してフィラメント状の F-アクチンとなり、病原性細菌が感染した宿主細胞中を移動する際の‘疑似足’として機能することが報告されている。感染症を引起こす *Yersinia* 菌や、食中毒の原因となる *Salmonella* 菌、魚類であるナマズへ感染する *Edwardsiella* sp では、感染中または運動中に *yggE* 遺伝子の発現量が大幅に増加するとの報告がある。一方で申請者も、大腸菌細胞において強い酸化力によって細胞外膜に損傷を与えるモノアミンオキシダーゼの反応による生存率の低下が、*yggE* の過剰発現によって大幅に回復することを見出しており、*yggE* 発現が大腸菌のストレス耐性にも重要な役割を担っていることが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は、大腸菌のアクチンタンパク質によるバイオフィルム形成機構の解明とその抑制である。現状では、*yggE* 遺伝子は大腸菌細胞のストレス耐性と細胞表面特性に関与することが予備的に検証されている。したがって、大腸菌細胞のバイオフィルム形成能を以下の 3 つの項目、①殺菌作用に対する耐性、②ゲル中培養における細胞の運動性、③固体表面への接着性、を測定することで評価し、*yggE* 遺伝子の発現量が与える影響を解析する。また同時に細胞内での *yggE* 遺伝子の発現制御因子の探索と、一定の発現量がある細胞においてバイオフィルム形成能を細胞外から抑制する要因の特定を行う。その後、得られた結果を基に、アクチンタンパク質の発現と機能抑制により大腸菌のバイオフィルム形成を低下させる新たなバイオコントロール手法の確立へと展開する。

## 3. 研究の方法

大腸菌と大腸菌の *yggE* 遺伝子が欠損した *yggE* 欠損株を用いて実験を行った。また実験目的に応じて複合的ストレス制御因子である *rpoS* 遺伝子が欠損した *rpoS* 欠損株も使用した。

検討項目として、大腸菌細胞のバイオフィルム形成能を評価するために、①殺菌作用に対する耐性、②ゲル中培養における細胞の運動性、③固体表面への接着性、をそれぞれの大腸菌株において測定した。また細胞の内面情報として、遺伝子発現量をリアルタイム PCR により確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 殺菌作用に対する耐性

代表的な殺菌作用である熱処理、過酸化水素の添加、アルカリ処理などを行ったが、*yggE* 遺伝子の発現量と殺菌作用に対する耐性力には相関性が見られなかった。

### (2) ゲル中培養における細胞の運動性

軟寒天中での各大腸菌株の運動速度を算出した。この時に、既に運動速度が増加するとの報告がある *rpoS* 遺伝子の欠損株をポジティブコントロールとして用いた。結果として、図 1 に示すように、*yggE* 欠損株 (*yggE* 発現なし) では、野生株に比べて約 4 倍程度の運動速度の増加が確認された。*yggE* 遺伝子の欠損により顕著な運動性の増加が引き起こされたことで、バイオフィルム形成との関連性が示唆された。

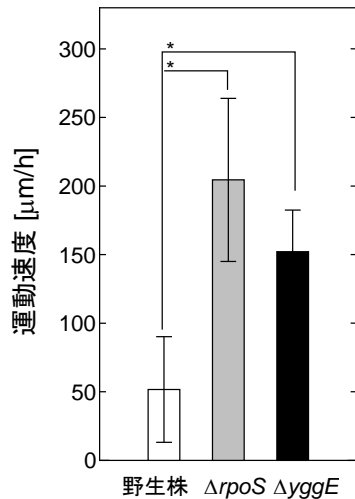


図1 各大腸菌株の運動速度

\*  $p < 0.05$

また、同じく本研究の目的である *yggE* 遺伝子発現制御因子の探索を行うため、*rpoS* 欠損株において *yggE* 発現量を確認したところ、野生株と比べて特に増殖期後期で約 3 分の 1 に減少していることが判明し、*yggE* 遺伝子の発現の大部分は、複合的ストレス制御因子である *rpoS* によって制御されていると結論づけられた。*rpoS* 欠損株と *yggE* 遺伝子欠損株の両株の運動性が増加していることから、これらの遺伝子間に関連性がある可能性が高いと考えられる。以上の検討より得られた結果から、大腸菌のアクチン様タンパク質をコードする遺伝子 *yggE* の発現は、複合的ストレス制御因子である *rpoS* の発現低下により抑制されることが示され、環境中における *yggE* 遺伝子の発現制御に関して、非常に有益な結果であると言える。

### (3) 固体表面への接着性

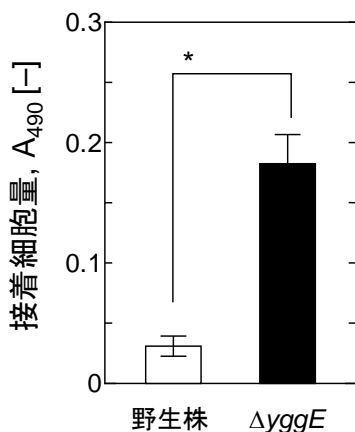


図2 各大腸菌株のポリ塩化ビニル表面へ接着細胞量 \*  $p < 0.01$

*yggE* 遺伝子欠損が大腸菌の接着性に与える影響を検討したところ、図2に示すように、*yggE* 欠損株が、野生株と比較してのポリ塩化ビニル(PVC)表面への約6倍から7倍の接着性を示すことを明らかにした(2010年化学工学会秋季大会発表)。さらに、ポリスチレン(PS)やポリプロピレン(PP)などの複数種のプラスチック表面に対しても同様の接着量の増加を示した。この結果を引き起こした原因として、*yggE* 欠損株において鞭毛の形成と回転に関連する遺伝子の発現量が約10倍以上に高くなっていることと、鞭毛活動に付随して高い運動性を示すことが確認された。また接着した *yggE* 欠損株を走査型電子顕微鏡により観察したところ、野生株と比較して数倍の鞭毛数が観察され、それらの鞭毛が細胞と固体表面また細胞どうしを接続していることが判明した。これらの結果は、培地などの培養条件にあまり左右されず、アクチン様タンパク質の欠損が鞭毛形成ならびにバイオフィーム形成を促進することを示唆している。

以上の検討により得られた研究成果は、本研究の最終目的であるバイオフィーム形成の抑制を図る上で貴重な手掛かりを与えるだけでなく、微生物が固体表面に能動的に接着する際の機構解明の基礎的知見を与えるものである。新規性の高い内容として、学会発表等による研究成果報告を行った(2010年 The 8th International Symposium on Membrane Stress Biotechnology, 2011年化学工学会学生発表会)。

### 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 Yoshihiro Ojima, Nobuya Shirasaka, Yuto Fukuda, Mizuho Komaki, Masahito Taya, 'The influence of *yggG* gene deficiency on the production and assimilation of acetate in *Escherichia coli*', Annals of Microbiology, 査読有, 印刷中(DOI: 10.1007/s13213-011-0203-z)

[学会発表] (計4件)

①河田晃良, 尾島由紘, 田谷正仁, '大腸菌の遺伝子欠損による接着性制御に関する検討' 第13回化学工学会学生発表会, 2011年3月5日, 神戸

② Yoshihiro Ojima, Masahito Taya, 'Novel membrane-associated proteins of *Escherichia coli* responsive to oxidative stress', The 8th International Symposium on Membrane Stress Biotechnology, 2010年9月23日, 大阪

③ Nguyen Hong Minh, Yosuke Nishinoue, Yoshihiro Ojima, Masahito Taya, 'Effect of *yggE* gene deficiency on motility and attachment of *Escherichia coli* cells', 第42回化学工学秋季大会, 2010年9月6日, 京都

④尾島由紘, 田谷正仁, '二酸化チタン光触媒反応が誘引する微生物機能の発現と利用', 第2回化学工学3支部合同北九州大会, 2009年10月31日, 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾島 由紘 (OJIMA YOSHIHIRO)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教  
研究者番号: 20546957

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: