

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790486

研究課題名（和文） 新規バイオフィルム破壊因子と宿主との相互作用の解析

研究課題名（英文） Analysis of biofilm destruction factor and host interaction

研究代表者

田嶋 亜紀子（TAJIMA AKIKO）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70317973

研究成果の概要（和文）：

黄色ブドウ球菌が分泌するバイオフィルム破壊因子の解析を行った。菌の培養上清画分には、自身のバイオフィルムに対する破壊活性をもつ画分と他の黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを破壊する画分が存在したことから、バイオフィルムを介した菌間の相互作用の可能性が示唆された。遺伝子解析のためのトランスポゾンによる変異株作成系を確立した。バイオフィルムに影響する宿主因子として血清タンパクであるアルブミンが形成促進作用を示した。

研究成果の概要（英文）：

Analysis of biofilm destruction factor from culture supernatant of *Staphylococcus aureus* revealed that there were two type factors, destruction activity for self-biofilm and for other staphylococci biofilm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：バイオフィルム、ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

細菌は、長い間、個々の細胞が単体で生活していると考えられてきたが、近年になり、細菌は何らかの表面に付着して、細胞外多糖などのマトリックスを産生しながら集合体を形成していることが明らかになってきた。この細菌の集合体は、バイオフィームと呼ばれ、自然界や生体内など幅広い場所で見られるが、表面がマトリックスで覆われた構造をしているため外的環境から守られた状態にある。このように細菌は、バイオフィームという集合体として生きる場合と単体として自由に生きる場合の2つの形態から成るライフサイクルを持つと考えられるようになってきた。しかしどのようなメカニズムでこの二つの形態間を行き来するのか、ヒトの生体内においてそれぞれの形態がどのような役割をしているのかについて、まだ不明な点が多い。

バイオフィーム感染症の原因菌の一つである、黄色ブドウ球菌は、生体内に留置された、カテーテルなどの医療素材上にバイオフィームを形成すると、抗生剤や宿主の免疫に抵抗性をもつため、治療が困難になることが報告されている。しかしこれまでに効果的なバイオフィーム感染症の予防法や治療法は見つかっていない。我々は、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を調べる過程で、自身が因子を産生して短時間にバイオフィームを破壊することを見出した。このバイオフィーム破壊因子は、低分子で、プロテアーゼKで失活しない水溶性の物質であった。このことから細菌は環境に応じて、集合体であるバイオフィームから単体へと形態を変化させていることが考えられる。このような生活形態の変化は、細菌が自由になって新しい場所へ拡散していくための戦略、またはバイオフィームというシェルターのような構造から離れて単体とな

った細菌を宿主が駆逐するための戦略というようにも捉えられる。本研究では、バイオフィーム破壊因子とその破壊メカニズムについて明らかにし、バイオフィーム感染症治療薬の開発を目指すとともに細菌の生活形態変化（単体、バイオフィーム）と宿主との関係について解析を行う。

2. 研究の目的

我々は、バイオフィーム感染症の原因菌として知られている、黄色ブドウ球菌が自身のバイオフィームを破壊する因子を産生することを見出した。本研究では、

(1)破壊因子と破壊メカニズムを明らかにし、それを元にバイオフィーム感染症治療薬の開発を目指す。

バイオフィーム破壊因子の同定：

これまでの研究から、菌が産生するバイオフィーム破壊因子は、1kDa以下の低分子で、プロテアーゼKで失活しない水溶性の物質であると分かっている。そこで菌の培養上清から、破壊因子を同定し、その性状を解析することによりバイオフィーム破壊メカニズムを解明する。

(2)細菌の生活形態の変化（単体、バイオフィーム）と宿主との相互作用について明らかにする

バイオフィーム形成に対する宿主環境の影響：バイオフィーム形成に影響を与える宿主因子を探索する。

3. 研究の方法

(1)バイオフィーム破壊因子の同定

黄色ブドウ球菌の培養上清を添加するとバイオフィームは破壊され、その効果は添加後、数分で見られた。また破壊因子は、耐熱性で1kDa以下の水溶性物質、プロテアーゼKで

失活しないことがわかっている。そこで黄色ブドウ球菌の培養上清から、1 KDa 以下の画分を回収し、クロロフォルム処理で脂溶性物質を除き、水溶性画分を作製する。HPLCを用いて、破壊活性をもつ因子を分離した。

(2) バイオフィーム破壊因子の発現機構の解析

黄色ブドウ球菌にトランスポゾンを導入し、菌の培養上清を調べることで破壊因子産生能を失った変異株をスクリーニングする。エンテロコッカスが保持する Tn918 を黄色ブドウ球菌に導入させるために、2 菌を共培養後、集菌し選択培地で培養した。Tn918 を持つと考えられるコロニーが効率よく得られ、これらのコロニーについて inverse PCR によりゲノムに挿入されていることを確認した。

(3) バイオフィーム形成に対する宿主環境の作用

バイオフィーム形成に影響を与える宿主因子を探索するため、96 ウェルプレートに培地、黄色ブドウ球菌、宿主成分を添加して一晩培養後、プレートを洗浄し形成されたバイオフィームを染色してその量を測定した。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム破壊因子について

培養上清中の破壊因子を精製するため、1 KDa 以下の画分を回収し、クロロフォルム処理後の水溶性画分を用いて以下の検討を行った。

黄色ブドウ球菌のバイオフィームマトリックスは、タンパク、多糖、DNA などからなると考えられており、菌株によってバイオフィームのプロテアーゼ、dispersinB, DNase への感受性が異なる。低分子水溶性画分は、自

身が作る多糖性のバイオフィームを破壊するとともに、他の黄色ブドウ球菌が作るタンパク・DNA 性のバイオフィームも破壊した。このことから、2 種類以上の作用の異なる破壊因子が存在する可能性が示唆された。

陽・陰イオン交換カラム、逆相カラム (C18)、順相カラム、親水性相互作用カラム (HILIC) を用いて破壊因子の結合を検討したところ、多糖性のバイオフィームに対する破壊因子 (破壊因子 1) は HILIC に、タンパク・DNA 性のバイオフィームに対する破壊因子 (破壊因子 2) は C18 カラムに結合した。破壊因子 2 については分画を進めており、破壊因子 1 については、C18 非結合画分を HILIC にかけてところ、破壊活性は 2 箇所に見られ、これらをさらに分画し現在同定を行っている。

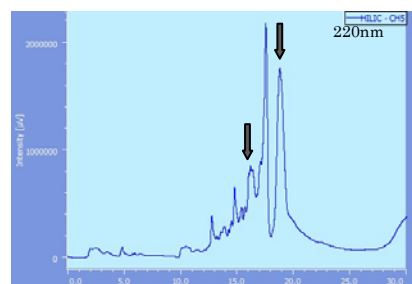


図 1 HILIC での破壊因子分画

多糖性または、タンパク・DNA 性のバイオフィームに対する破壊活性を含むそれぞれの画分は、30分でバイオフィームの破壊を引き起こした。このような短時間での効果についての報告はほとんどみられず、バイオフィーム感染症に対するあらたな治療法の開発に繋がると考えられる。また黄色ブドウ球菌が、自身のバイオフィームを破壊するだけでなく他の菌のバイオフィームに対する破壊因子を産生していることが示唆されたことから、菌間でのバイオフィームを介した相互作用が存在するのかもしれない。

今後は、その観点も含めバイオフィーム破壊

メカニズムについて明らかにしていきたい。

(2) バイオフィーム破壊因子の発現機構の解析

バイオフィーム破壊因子産生に必要な遺伝子(転写因子、合成系の因子、代謝系の因子)を明らかにするため、トランスポゾンによる変異導入系を作成した。比較的高率にトランスポゾンの挿入が起こる系であり、多数の変異株についてスクリーニングが可能と考えられる。

今後は、この系を用いて、破壊因子を産生しない変異株のスクリーニングを行い、トランスポゾン挿入部位の同定、遺伝子解析を行い、破壊因子産生に関与する遺伝子を同定していく。

(3) バイオフィーム形成に対する宿主環境の作用

バイオフィーム形成に作用する宿主成分として血清の関与が報告されているが、詳細は明らかになっていない。そこで血清中に多く含まれるタンパク成分、アルブミンについて検討した。

いくつかの黄色ブドウ球菌株を BHI 培地、BHI+グルコース±アルブミン (0.5%) の条件で培養しバイオフィーム量を測定したところ、アルブミンの添加によりバイオフィーム形成の増加が見られた。培地にアルブミンを加えただけではその作用はみられず、バイオフィーム形成を誘導するグルコースの存在下においてアルブミンによる促進作用がみられた。血中に多量に含まれる成分であることから、生体内で細菌と作用する可能性は高いであろう。アルブミンが細菌の凝集を促進するという報告はあるが、バイオフィーム形成との関連については調べられていない。

今後はその機構を解析するとともにさらなるバイオフィーム形成に作用する宿主因子の探索を行っていく。

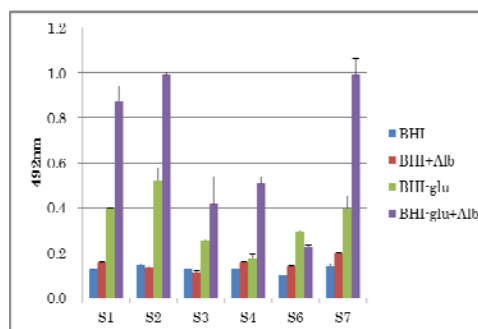


図2 アルブミンのバイオフィーム形成への影響

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田嶋 亜紀子 (TAJIMA AKIKO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70317973