

令和元年6月26日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11537

研究課題名(和文)細胞外核酸, ナノファイバー, シャペロンによる病原性バイオフィーム形成の検討

研究課題名(英文) Study of pathogenic biofilm formation by extracellular nucleic acid, nanofiber and chaperone

研究代表者

泉福 英信 (Senpuku, Hidenobu)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：20250186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：S. aureus, C. albicans などの日和見菌とS. mutansのような口腔バイオフィーム形成菌との複合微生物バイオフィーム形成や単独菌によるバイオフィーム形成において、細胞外 DNA、ナノファイバーやシャペロンがどのように関わるかを明らかにすることを目的として検討を行った。日和見菌と口腔常在菌との複合菌バイオフィーム形成に、細胞外DNAとGTFが付着した膜小胞との複合体の存在やナノファイバーの形成が重要に関わることが明らかとなった。シャペロンの関わりは認められなかった。このバイオフィームの抑制方法には、抗菌物質の濃度調節が重要であることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のように誤嚥性肺炎や心臓疾患などの全身疾患に関わる日和見菌を含む口腔微生物による複合菌バイオフィーム形成のメカニズムの一部を明らかにしたことで、本研究の研究成果は口腔ケアにおける新たな薬剤の開発や口腔ケアの方法の確立に寄与していく。新たに有効な口腔ケアが確立されれば、要介護高齢者や施設内患者、長期入院患者の口腔または全身の健康を維持していくことに繋がり、国民の健康を守る新たな医療の確立に関わっていくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：How are extra cellular DNA, nanofiber and chaperone associated with the biofilm formation in complex microorganisms biofilm formation by oportunic pathogens such as S. aureus and C. albicans, and oral biofilm bacteria such as S. mutans, and single bacteria? We investigated this question as a purpose in a study project. Complex of extra cellular DNA and membrane vesicles associated with GTF, and nanofiber formation were associated with complex microorganisms biofilm formation by oportunic pathogens and oral biofilm bacteria very well. However, chaperone did not associate with the complex microorganisms biofilm formation. In inhibition to the complex microorganisms biofilm formation, it was clearly observed that regulation of concentration of anti-bacterial agents was important.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：Biofilm 膜小胞 日和見菌 口腔常在菌 フローセル Streptococcus mutans Staphylococcus aureus 細胞外DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

高齢者になると糖尿病, 癌, HIV 感染症などの全身疾患を有する患者が増えると同時に, 歯周病の発症, 日和見菌感染症の増加, 口腔粘膜疾患, 感染性心内膜炎, 誤嚥性肺炎など口腔微生物を介する疾患も増えてくる. しかしこれらのような疾患に関わる病原性口腔バイオフィルム形成メカニズムは詳細に明らかになっていない. 例えば, 誤嚥性肺炎の原因の一つと考えられている黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) がどのようなメカニズムで口腔バイオフィルム形成をしているのか明らかになっていない.

(2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

近年, *Streptococcus mutans* が放出する細胞外 DNA (eDNA), 重要なバイオフィルムの構成成分であることが明らかとなった. これは, グルカンがなくても eDNA を利用してバイオフィルムを形成できることを意味している. また近年, eDNA がナノファイバーの形成に関与し, それが強固なバイオフィルム形成を誘導することが明らかとなった. さらに膜シャペロンが eDNA を制御しバイオフィルム形成に関わっていることも明らかとなった. よって, eDNA, ナノファイバーやシャペロンは, それぞれが関係し, グルカン依存しない他菌の取り込みや結合に寄与する可能性がある.

2. 研究の目的

S. aureus などの日和見菌と *S. mutans* のような口腔バイオフィルム形成菌との複合微生物バイオフィルム形成や単独菌によるバイオフィルム形成において, eDNA, ナノファイバーやシャペロンがどのように関わるかを明らかにすることを目的とする.

3. 研究の方法

(1) eDNA, eRNA, ナノファイバー, シャペロンに関わる遺伝子の変異株の作製

1) *S. mutans* UA159 用いたクオラムセンシングに関わる遺伝子変異株の作製

クオラムセンシングに関わるバイオフィルム形成実験に使用された *S. mutans* UA159 変異株を含む Com 依存遺伝子変異株 (*comC*, *comD*, *comE*, *comX*, *comR*, *comS*) の変異株や LuxS 依存遺伝子群 (*luxS*, *luxR*) の変異株はすでに作製されているので, これらを実験に使用する.

2) *S. mutans* UA159 用いた YidC1 および YidC2 の変異株の作製

シャペロンに関わる YidC1 および YidC2 遺伝子の変異株を作成する.

3) 電子顕微鏡による親株および変異株の特性の確認

作製された変異株における細胞表面の eDNA を, Live/Dead による染色による共焦点レーザー顕微鏡により観察する. ナノファイバーは, プレート表面にブドウ糖 TSB にて菌を培養し, 固着したバイオフィルム上のナノファイバーを電子顕微鏡にて観察する.

(2) 親株, 変異株を用いた単独, 混合微生物によるバイオフィルム形成実験

作製された *S. mutans* 変異株を利用して, 単独, 複合微生物 (*S. aureus* を含む) のバイオフィルム形成実験を 96 穴マイクロタイタープレートおよびフローセルシステムを用いて行う.

2) バイオフィルム形成実験

ヒト唾液をセルやプレートにコートし PBS にて洗浄後, 作製した変異株や親株などを単独接種ならびに *S. aureus* との混合菌接種をセル表面へ行う. ブドウ糖を含む TSB 培地を用いて培養を行う. 16 時間培養後のバイオフィルム形成の評価は, LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Viability Kit で染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により蛍光強度を定量的に検討する. LIVE/DEAD を用いた染色も生菌および死菌染色のため行う. eDNA のバイオフィルム形成における依存度を観察するために, DNase で処理し, バイオフィルムの変化を測定する.

(3) バイオフィルム抑制物質の検討

上述のバイオフィルム形成実験モデルに, ポリペプチド系抗生物質, カテキン, フルクトナーゼ, ポリピロールなどの既存の阻害物質を投与し, バイオフィルム形成阻害効果を観察する. バイオフィルム形成を形成していない浮遊菌とバイオフィルム菌への効果の比較も行う.

4. 研究成果

(1) クオラムセンシングと混合細菌バイオフィーム形成との関連性

S. mutans UA159とすでに作製された*S. mutans* UA159.Com依存遺伝子変異株(*comC*, *comD*, *comE*, *comX*, *comR*, *comS*, *comYA*)の変異株やLuxS依存遺伝子群(*luxS*, *luxR*)の変異株を用いて*S. aureus*

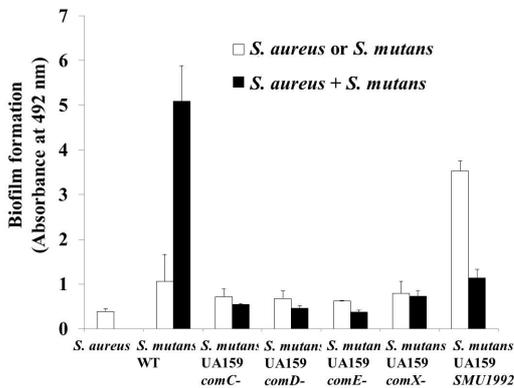


図1 *S. mutans*と*S. aureus*による混合バイオフィームにおけるクオラムセンシングの効果

との混合菌BF形成実験をヒト唾液コート96穴マイクロタイタープレートを用いて行った。その結果、混合菌BF形成量は、Com変異株群(図1)やLuxS変異群で親株UA159よりも減少することが明らかとなった。これらの結果は、ComやLuxSのようなクオラムセンシングに関わるシステムが混合菌バイオフィーム形成に参与している事を示している。クオラムセンシングが働かなくなると、菌が破壊されずDNAが露出されなくなる。*S. aureus*のような日和見菌との混合バイオフィーム形成には、菌を破壊してDNAを露出させるクオラムセンシング(QS)システムが必要であることが明らかとなった。

(2) 抽出DNAのバイオフィーム形成能の検討

S. mutans から粗DNAと完全サイズDNAを抽出し、それらを非水溶性グルカン合成能を欠落した*S. mutans* UA159.gtfBC株に加えバイオフィーム形成量を検討すると、粗抽出DNAが完全

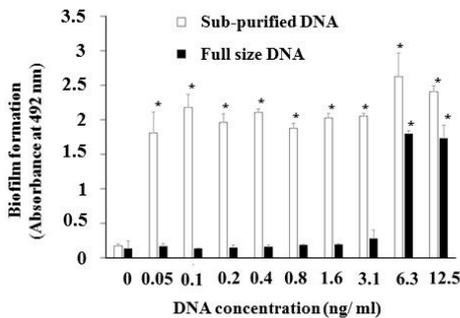


図2 蛋白が付着した粗抽出DNAと完全サイズ精製DNAの*S. mutans* gtfBCのバイオフィーム形成への効果

サイズ精製DNAよりもバイオフィーム形成を強く誘導することが明らかとなった(図2)。

この粗抽出短いサイズのDNAには、蛋白質が多く含まれていた(図3)。この蛋白質にはGTFが多く含まれていた(図4)。粗抽出DNAによる非水溶性グルカン合成能が欠落した*S. mutans* UA159.gtfBC変異株のバイオフィーム形成メカニズムは、GTF依存的事であることが明らかとなった。粗抽出DNAにGTFが含まれていることが示

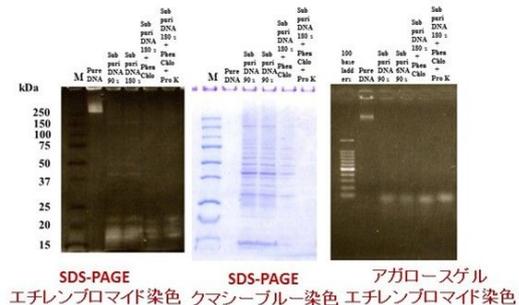


図3 蛋白が付着した粗抽出DNAと完全サイズ精製DNAを用いた観察

Sub-purified DNA: 粗抽出DNA
Full size DNA: 完全サイズ精製DNA
Short size DNA: 粗抽出DNAプロテナーゼK処理

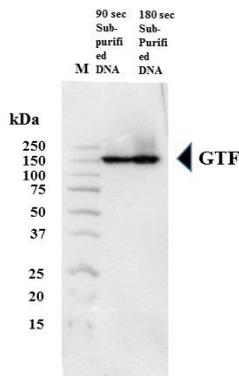


図4 粗抽出DNAにおける抗GTF抗体を用いたウエスタンブロット

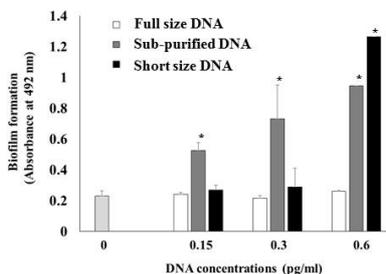


図5 粗抽出DNA、完全サイズ精製DNAおよび短いサイズ精製DNAを用いた*S. mutans* gtfBCのバイオフィーム形成実験

唆された。そこで、プロテナーゼKを用いて膜小胞を除きGTFの関与を失くすと、DNAは、それでも一定の濃度で*S. mutans* UA159.gtfBC変異株のバイオフィーム形成を誘

導した(図5)。この短いサイズのDNAは、グルカンに依存しないバイオフィーム形成に重要であることも明らかとなった。

(3) 膜小胞のバイオフィーム形成能の検討

粗抽出DNAを電子顕微鏡で観察すると、小胞のような小さな粒が付着していることが明らか

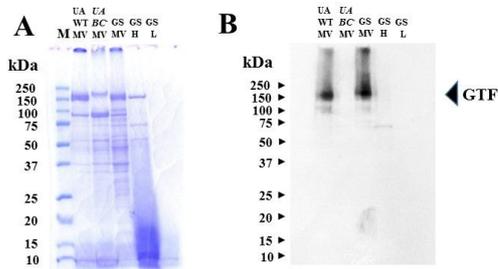


図6 膜小胞におけるGTFの存在の確認

A: SDS-PAGE, クマシーブルー染色

M: マーカー

UAWTMV: *S. mutans* UA159 膜小胞(MV)

UABC MV: *S. mutans* UA159. *gtfBC* MV

GS MV: *S. mutans* GS-5 MV

GS H: *S. mutans* GS-5 培養上清, 10 kDa以上

GS L: *S. mutans* GS-5 培養上清, 10 kDa以下

B: 抗GTF抗体を用いたウエスタンブロット

となった. *S. mutans*の培養上清から超遠心にて小胞を抽出し, この小胞にはグルコシルトランスフェラーゼ(GTF)の存在が確認された(図6). GTF付着小胞が粗抽出DNAに結合することで, 粗抽出DNAにバイオフィルムを形成する能力が備わった

表 1 MVによる様々な口腔細菌のバイオフィルム形成への効果

Strains		None	UA159 MV	UA159.gtfBC MV	Activity
<i>S. mitis</i>	ATCC 903	0.241 ± 0.027	1.370 ± 0.101*	0.242 ± 0.048	UP
	ATCC 6249	0.411 ± 0.045	0.432 ± 0.082	0.473 ± 0.082	—
<i>S. oralis</i>	ATCC 35037	0.149 ± 0.012	0.685 ± 0.079*	0.127 ± 0.002	UP
<i>S. sanguinis</i>	ATCC10856	1.147 ± 0.256	2.029 ± 0.082*	1.430 ± 0.240	UP
	ST 205	0.270 ± 0.035	1.164 ± 0.221*	0.356 ± 0.044	UP
	ST 134	0.175 ± 0.006	0.255 ± 0.044	0.160 ± 0.030	—
<i>S. gordonii</i>	ATCC 10858	0.406 ± 0.018	1.727 ± 0.341*	0.398 ± 0.005	UP
<i>S. anginosus</i>	ATCC 33397	1.256 ± 0.254	1.175 ± 0.026	1.115 ± 0.581	—
<i>S. intermedius</i>	ATCC 27335	0.153 ± 0.010	0.330 ± 0.070	0.150 ± 0.036	—
<i>S. pyogenes</i>	33	0.289 ± 0.011	0.377 ± 0.182	0.358 ± 0.163	—
	K32	0.574 ± 0.107	0.484 ± 0.091	0.529 ± 0.330	—
<i>S. pneumoniae</i>	GTC 261	0.178 ± 0.015	0.127 ± 0.010	0.212 ± 0.133	—
<i>S. salivarius</i>	JCM5907	0.492 ± 0.018	0.584 ± 0.020	0.566 ± 0.012	—
	ATCC 9759	0.124 ± 0.021	0.299 ± 0.070	0.163 ± 0.020	—
	HT9R	0.222 ± 0.029	0.277 ± 0.005	0.244 ± 0.007	—
<i>A. naeslundii</i>	s600	0.415 ± 0.092	1.916 ± 0.582*	1.059 ± 0.423*	UP
<i>A. oris</i>	MG1	1.087 ± 0.222	2.264 ± 0.207*	0.998 ± 0.157	UP
<i>N. cinerea</i>	23-1	0.344 ± 0.018	0.261 ± 0.011	0.339 ± 0.011	—
<i>N. flavescens</i>	ATCC 13120	0.353 ± 0.012	0.231 ± 0.044	0.376 ± 0.010	—
<i>N. mucosa</i>	16-2	1.889 ± 0.260	1.333 ± 0.133*	1.590 ± 0.172	DOWN
<i>N. subflava</i>	#2	1.071 ± 0.101	1.318 ± 0.237	1.301 ± 0.208	—
<i>C. albicans</i>	SC5314	0.393 ± 0.046	0.292 ± 0.063	0.433 ± 0.181	—
	SC5312	0.178 ± 0.029	0.288 ± 0.049	0.171 ± 0.015	—
<i>S. aureus</i>	Cowan I	0.283 ± 0.004	0.328 ± 0.018	0.262 ± 0.043	—
	209P	0.211 ± 0.036	0.269 ± 0.036	0.208 ± 0.010	—

UP and DOWN: MVを加えることによりバイオフィルム形成が上昇した場合UP, 下降した場合DOWN.

ことが考えられた. また, 小胞は膜由来産物である可能性が高く, このGTFが付着した膜小胞がDNAと複合体を形成し, 様々な口腔細菌のバイオフィルム形成を誘導することが考えられた. 膜小胞による*S.*

*aureus*や*C. albicans*のバイオフィルム形成

誘導能について検討すると, それらの誘導能は低かった(表1). 膜小胞が結合した粗抽出DNAは, 歯表面初期付着菌である*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*のGTFに依存的なバイオフィルム形成を強く誘導した(表1).

(4) QSシステム関連遺伝子のcomX, comR, SMU2065, SMU940やペプチドグリカン合成遺伝子のSMU832, SMU833, シャペロン関連遺伝子のYidC1, YidC2の変異株を作製し, それらの膜小胞を抽出, バイオフィルム実験に加えた. その結果, comRやSMU940変異株膜小胞にはGTFが多く見られまたバイオフィルムを強く誘導し, 一方comXとSMU832, SMU833にはGTFもバイオフィルム形成量も減少した. このQSが, バイオフィルムを誘導する調節システムであることが示唆された. 一方, シャペロン関連遺伝子の変異株での親株との違いは認められなかった.

(5) フローセルシステムを用いた混合細菌バイオフィルム形成

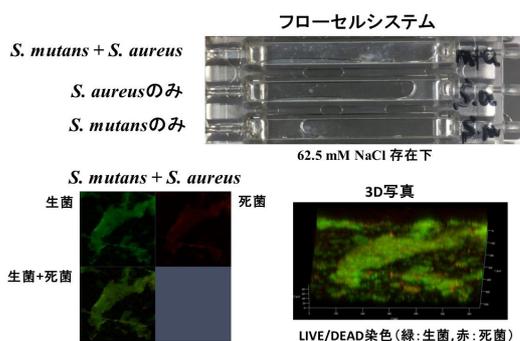


図7 混合菌におけるフローセルバイオフィルム形成実験

S. mutans UA159と*S. aureus*との混合バイオフィルム形成について, フローセルシステムを用いて実験を行うと, 62.5mM NaCl存在下培養16時間で有意なバイオフィルムを形成した(図7). このバイオフィルムにおいて, ナノファイバーの存在が観察された.

(6) バイオフィルム形成抑制物質の検討

ポリペプチド系抗生物質であるバシトラシンに対して*S. mutans*は耐性を示した. その結果, MICの1/4のバシトラシン濃度でバイオフィルム形成促進能が観察された. ポリピロールは630 µg/ml

以上の濃度で, バイオフィルム抑制が認められたが, それよりも低濃度でバイオフィルム形成が認められた. 日和見菌と口腔常在菌との複合菌バイオフィルム形成に, eDNAとGTFが付着した膜小胞との複合体の存在やナノファイバーの形成が重要に関わることが明らかとなった. シャペロンの関わりは認められなかった. このバイオフィルムの抑制方法には, 抗菌物質の濃度調節が重要であることも明らかとなった.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Ryo Nagasawa, Tsutomu Sato, Hidenobu Senpuku. Raffinose induces biofilm formation by

- Streptococcus mutans* in low concentrations of sucrose by increasing production of extracellular DNA and fructan. Applied Environmental Microbiology. 2017. 83(15) pii: e00869-17.
2. Yusuke Suzuki, Ryo Nagasawa, Hidenobu Senpuku. Inhibiting effects of fructanase on competence-stimulating peptide-dependent quorum sensing system in *Streptococcus mutans*. Journal of Infection and Chemotherapy, 2017. 23(9):634-641.
 3. Hidenobu Senpuku, Hideo Yonezawa, Saori Yoneda, Itaru Suzuki, Ryo Nagasawa, and Naoki Narisawa. SMU.940 regulates dextran-dependent aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. Molecular Oral Microbiology, 2018, 33: 47-58.
 4. Aya Iwamoto, Tomoyo Nakamura, Naoki Narisawa, Yukimasa Kawasaki, Hidenobu Senpuku and Fumio Takenaga. The Japanese fermented food natto inhibits sucrose-dependent biofilm formation by cariogenic streptococci. Food Science and Technology Research, 24: 129-137, 2018.
 5. Itaru Suzuki, Takehiko Shimizu, Hidenobu Senpuku. Role of SCFAs for fimbriin-dependent biofilm formation of *Actinomyces oris*. Microorganisms. 2018, 6(4). pii: E114.
 6. Hidenobu Senpuku, Shota Mohri, Mamiko Mihara, Toshiaki Arai, Yusuke Suzuki, Yoji Saeki. Effects of 7S globulin 3 derived from the adzuki bean [*Vigna angulans*] on the CSP- and eDNA-dependent biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Archives Oral Biology, 102: 256-265, 2019.

〔学会発表〕(計17件)

1. 永沢亮, 泉福英信, *Streptococcus mutans* の eDNA 依存的バイオフィーム形成に対するラフィノースの影響, 30 回日本バイオフィーム学会, 東京, 2016 年, 7 月.
2. 鈴木雄祐, 荒井俊明, 小倉直美, 近藤壽郎, 泉福英信, *Streptococcus mutans* における Fructanase の CSP 依存的 Quorum sensing への影響, 第 58 回歯科基礎医学会, 札幌, 2016 年 8 月.
3. 泉福英信, 永沢亮, 鈴木雄祐, 大西真, *Streptococcus mutans* のグルカン依存およびグルカン非依存バイオフィーム形成へのポリピロールの効果, 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017 年 3 月. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017 年 3 月.
4. Suzuki I, Shimizu T, Senpuku H. Effects of SCFAs on attachment and biofilm of *Actinomyces oris*. 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, San Francisco, USA, March 22-25, 2017.
5. Nagasawa R, Sato T, Senpuku H. Raffinose induces extracellular DNA-dependent biofilm formation of *Streptococcus mutans*. 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, San Francisco, USA, March 22-25, 2017.
6. 泉福英信, 平野浩彦, 枝広あや子, 白部麻樹, 角田衣理加, 花田信弘, 富永燦, 武内博朗, 西山佳秀, 高齢者の口腔常在菌に対するヨーグルト摂取習慣の効果, 第 66 回日本口腔衛生学会, 山形, 2017 年 5 月 30 日.
7. 泉福英信, 永沢亮, 細胞外 DNA による *Streptococcus mutans* バイオフィーム形成メカニズムの解明, 第 31 回日本バイオフィーム学会, つくば, 2017 年 7 月 7 日.
8. 泉福英信, NaCl による *Staphylococcus aureus* を含む複合菌バイオフィーム形成の誘導, 第 59 回歯科基礎医学会, 塩尻, 2017 年 9 月 16 日 ~ 18 日.
9. 泉福英信, 有家巧, 丸岡豊, 富永燦, 宇佐美雄司, 吉村和久, HIV 感染者における唾液 M-CSF と口腔微生物量の意義, 第 31 回日本エイズ学会学術総会, 東京, 2017 年 11 月.
10. 泉福英信, 中尾龍馬, 大西真, *Streptococcus mutans* からのメンブレンヴェジクルによる口腔細菌バイオフィームの確立, *Streptococcus mutans* の黄色色素産生に関する検討, 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡, 2018 年 3 月 27 日 ~ 29 日.
11. 石川正夫, 村田貴俊, 泉福英信, 花田信弘, 渋谷耕司, ブラッククミンおよび殺菌剤の *Fusobacterium nucleatum* のメチルメルカプタン産生に及ぼす影響, 第 67 回日本口腔衛生学会, 札幌, 2018 年 5 月 30 日.
12. 泉福英信, ヴェジクルを利用したさまざまな口腔細菌によるバイオフィーム形成戦略, 第 67 回日本口腔衛生学会, 札幌, 2018 年 5 月 30 日.
13. Ishikawa M, Senpuku H, Murata T, Hanada N, Shibuya K. Antibacterial effects of black cumin seed components on Fusobacterium Biofilm. 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, London, UK, July 25-28, 2018.
14. Senpuku H, Tominaga A, Nakao R. Effects of membrane vesicles from *Streptococcus mutans* on the biofilm formation and mucosal immunity. 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, London, UK, July 25-28, 2018.

15. Suzuki I, Shimizu T, Senpuku H. Roles of fimbriae for SCFAs-dependent initial attachment of *Actinomyces oris*. 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, London, UK, July 25-28, 2018.
16. 泉福 英信, 中尾龍馬, 膜小胞-細胞外 DNA 複合体の病原性と粘膜免疫による IgA 抗体の誘導, 第 60 回歯科基礎医学会, 福岡, 2018 年 9 月 5 日~7 日.
17. 泉福 英信, バイオフィルムが創りだす不思議な世界, 第 30 回日本臨床微生物学会, 2019 年 2 月 2 日.

〔図書〕(計 3 件)

1. 泉福英信, 共同編集: 歯科発アクティブプロモーション 21;健康増進からフレイル予防まで、監修花田信弘, デンタルダイヤモンド社, 2017 年.
2. 泉福英信, 口腔バイオフィルムの特殊性と制御法の現状, 監修松村吉信, バイオフィルム制御に向けた構造と形成過程, - 特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ-, シーエムシー出版, 11 月 30 日, 2017 年.
3. 泉福英信, 単独編集: デンタルスタッフの口腔衛生学・歯科衛生統計, 医歯薬出版, 2018 年 2 月.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中尾龍馬

ローマ字氏名: RYOMA NAKAO

所属研究機関名: 国立感染症研究所

部局名: 細菌第一部

職名: 主任研究官

研究者番号 (8 桁): 10370959

研究分担者氏名: 成澤直規

ローマ字氏名: NAOKI NARISAWA

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 生物資源科学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 90632034

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 尾花 望

ローマ字氏名: OHANA NOZOMU

研究協力者氏名: 野村暢彦

ローマ字氏名: NOMURA NOBUHIKO

研究協力者氏名: 小方頼昌

ローマ字氏名: OGATA YORIMASA

研究協力者氏名: 永沢 亮

ローマ字氏名: NAGASAWA RYO