

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19113

研究課題名(和文)細菌由来シグナル分子AI-2が原生生物の代謝及び病原性に与える影響の解明

研究課題名(英文)Effect of bacterial signal molecule AI-2 on the metabolism and pathogenicity of protozoa

研究代表者

大久保 寅彦 (Okubo, Torahiko)

北海道大学・保健科学研究所・講師

研究者番号：90762196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌はシグナル分子AI-2を介して周囲の細菌と情報交換を行なっている。本研究室では以前、原生生物と細菌を共培養するとAI-2濃度が上昇する現象を発見し、微生物間相互作用においてAI-2量の変動が起こることを明らかにした。一方、AI-2が原生生物に対してどのような影響を与えるかは知られていない。本研究ではAI-2添加下でアメーバおよび繊毛虫を培養し、非添加下と性状を比較した。その結果、固体(寒天培地)上ではアメーバの運動速度が上昇することが明らかとなり、アメーバはAI-2濃度を感知して自身の運動性を上昇させることが示された。

研究成果の概要(英文)：AI-2 is a bacterial signal molecule which is used for bacterial cross talk. In our previous studies, we reported that co-cultivation of bacteria and protozoa causes the raise of AI-2 concentration in the solution. However, the effect of AI-2 on protozoa was not reported. In this study, we compared phenotypic characteristics of protozoa under the presence or absence of AI-2. Our results showed that AI-2 causes the raise of mobility of amoeba cells in a concentration dependent manner on solid agar surfaces. This suggests that amoeba can detect AI-2 concentration and control its mobility. We showed cross-Kingdom effect of AI-2 on protozoa for the first time.

研究分野：細菌学

キーワード：微生物間相互作用 薬剤耐性菌 原生生物

1. 研究開始当初の背景

細菌由来のシグナル分子 AI-2 は、細菌同士の情報伝達システム「クオラムセンシング」を担っており、微生物の共通言語と目されている。細菌は AI-2 を介してクオラムセンシングを行なうことで、バイオフィームの形成や協調的移動（スウォーミング）などを効率的に制御しており、感染症発生時の病原性にも直結している。

本研究室では以前、微生物間相互作用を探る実験の中で、大腸菌と原生生物（繊毛虫）を共培養すると、培養液中の AI-2 濃度が有意に上昇することを明らかにした。一方、自然界において原生生物と細菌の間には捕食

被食関係があることから、AI-2 は原生生物にも何らかの影響を及ぼすと予想されるが、AI-2 が原生生物に与える影響はこれまで全く知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、細菌由来のクオラムセンシング分子 AI-2 が、繊毛虫やアメーバなどの原生生物に与える影響を検証することで、原生生物と細菌の間で生じる微生物間相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず、既報のデータを再現できるかを確認するために、薬剤耐性菌と繊毛虫の相互作用を検証した。临床上の意義が大きいカルバペネム耐性大腸菌 (NDM-5 産生株および IMP-1 産生株) をドナーとし、大腸菌の近縁細菌 (カルバペネム感受性大腸菌・サルモネラ) または 大腸菌と遠縁の細菌 (カルバペネム感受性エロモナス [*Aeromonas caviae*]) への接合伝達実験を、繊毛虫の存在下・非存在下でそれぞれ行ない、結果を比較した。

(2) AI-2 が原生生物の増殖速度に与える影響を検証するため、AI-2 (4,5-Dihydroxy-2,3-pentandione, OMM Scientific 製) 0uM - 100uM 添加時のアメーバおよび繊毛虫の増殖速度を培養法で算出した。

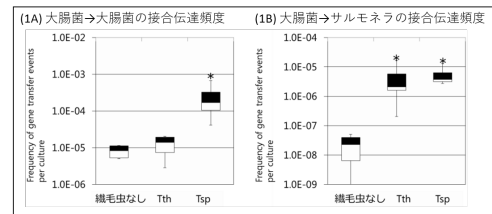
(3) AI-2 が原生生物の貪食作用に与える影響を検証するため、AI-2 0uM - 100uM 添加下でアメーバと繊毛虫を培養しておき、FITC 標識ビーズを添加して、細胞内に取り込まれたビーズ数をカウントした。

(4) AI-2 が原生生物の運動性に与える影響を検証するため、AI-2 0uM - 100uM 添加下でアメーバを培養し、アメーバ細胞の移動性を液体培地中で観察した。また、同様の実験を固体培地中でも観察し、移動距離を算出した。

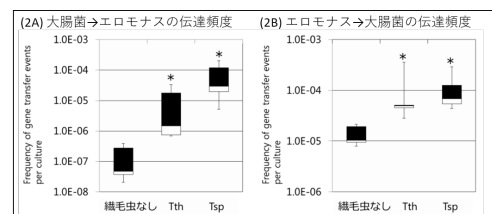
4. 研究成果

(1) 繊毛虫の存在が薬剤耐性遺伝子の接合伝達に与える影響を検証した。図 1A・1B に示す通り、繊毛虫 (Tth, Tsp の 2 種類) の存在

下では非存在下と比べてカルバペネム耐性遺伝子 (*bla*NDM-5) の接合伝達頻度が有意に上昇した。この結果は本研究室の既報の再現ではあるが、繊毛虫が臨床的意義の高いカルバペネム耐性遺伝子についても接合伝達を促進することが改めて示された。



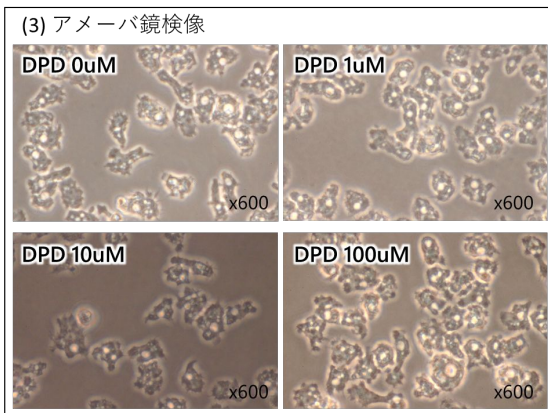
また、大腸菌から遠縁なエロモナスへとカルバペネム耐性遺伝子 (*bla*IMP-1) の接合伝達を行ない、さらにこの過程で作出したカルバペネム耐性エロモナスから大腸菌への接合伝達実験を行なった。図 2A, 2B に示す通り、いずれの場合においても繊毛虫 (Tth, Tsp の 2 種類) の存在下では非存在下と比べて有意に伝達頻度が上昇した。このことから、繊毛虫は耐性遺伝子の異菌種間伝達を双方向に促進することが示された。繊毛虫とエロモナスは河川や湖沼などの水系環境に広く存在する環境微生物でもある。そのため、いったん野外環境に薬剤耐性遺伝子が拡散した場合、繊毛虫が仲介して環境細菌に耐性遺伝子が蔓延し、さらにそれが大腸菌などの病原性細菌にも広まってしまうおそれが示された。



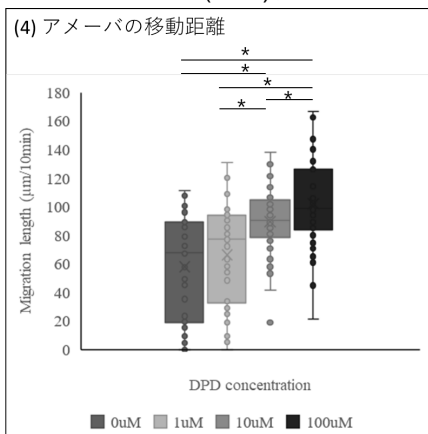
(2) AI-2 が原生生物の増殖速度および貪食作用に与える影響を検討した。アメーバ・繊毛虫ともに液体培地 (PYG 培地または Page's Amoeba Saline [PAS]) で、100uM まで濃度を上昇させて観察を行なったが、陰性対照と比較して有意な差は認められなかった。

(3) AI-2 が原生生物の運動性に与える影響をアメーバ・繊毛虫ともに液体中で観察したが、100uM まで濃度を上昇させても影響はみられなかった。

(4) 上記 (2) (3) に述べたように、液体中においては AI-2 が原生生物に与える影響をみる事ができなかったため、固体上での検証に切り替えた。アメーバを AI-2 (0uM - 100uM) に曝露してから寒天培地上にスポットし、30 秒ごとのタイムラプス撮影で細胞の移動距離を算出した。AI-2 に曝露した後のアメーバ細胞を観察したところ、その形態には差がみられなかった (図 3、DPD は 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandione の略称で AI-2 のこと)。



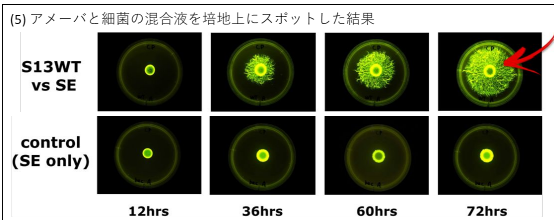
アメーバ細胞の移動距離を算出したところ、添加量を増やすにつれて濃度依存的に移動距離が増加した(図4)。



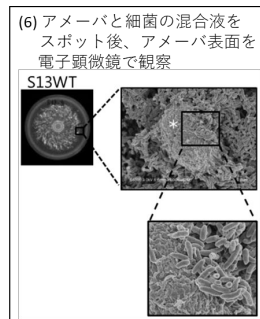
このことから、アメーバは細菌由来の AI-2 を認識して運動性を上昇させることが示された。原生生物にとって細菌は捕食対象であり、AI-2 は「獲物のニオイ」に相当する。そのため、AI-2 を感知したアメーバは運動性を上昇させ、細菌を盛んに探すようになった、という仮説が提起された。

一方、(2)(3)に示した通り、この作用は液体中では観察されないものであった。アメーバは野外環境では主に土壌などの固体条件に付着して生息していることから、液体中での実験系は本来の反応を観測するのに適していない可能性がある。その一方、アメーバと細菌の相互作用を検証した過去の研究は、ほぼ全てが実験上の利便性向上のために液体中での実験で行なわれてきた。本研究の成果は、微生物間相互作用を検証するためには実験を固体上でも行なう必要があることを示している。

(5) (4)の通り、アメーバと細菌を固体上で相互作用させると、これまでに見られなかった可能性が示された。そこで、アメーバと細菌(GFP 発現サルモネラ)の混合液を寒天培地上にスポットし、そのまま培養して経過観察した。その結果、培養時間が経過するにつれて、培地上に細菌が拡散し、花が開くようなパターンが描出された(図5)



また、このように培養したアメーバの細胞表面を電子顕微鏡で観察したところ、アメーバ表面に多数の細菌が付着している様子が観察された(図5)。このことから、細菌を付着させたアメーバが寒天培地上



を移動し、その際に培地に播種された細菌が発育して、先に示した花のようなパターンが描出されたと考えられた。同様の現象は緑膿菌や *Stenotrophomonas maltophilia* など、他のグラム陰性菌でも観察することができたが、*Staphylococcus aureus* や *Bacillus subtilis* などのグラム陽性菌では再現できなかった。

以上の結果から、

主目的であった AI-2 が原生生物に与える影響の検証については、固体においてアメーバの運動性を上昇させる効果が見いだされた。メカニズムの検証には至らなかったが、アメーバ運動は細胞骨格アクチンの移動に依存することが知られていることから、AI-2 濃度は何らかの経路を介してアメーバのアクチン発現に影響を及ぼしていると予想された。

また、アメーバと細菌を混合してから寒天培地上にスポットすると、細菌が独特の発育をすることが明らかになった。この現象自体が興味深いのに加え、これまでの研究で用いられてこなかった「固体上での原生生物の挙動」を対象とする実験により、全く新しい微生物間相互作用に光を当てることができる可能性が示された。

繊毛虫に関しては、アメーバと異なり固体上での培養ができないため、アメーバのような検証方法で AI-2 の影響を調べることはできなかった。一方、既報の再現を兼ねて行なった薬剤耐性菌の接合伝達試験により、繊毛虫の存在は近縁菌種間のみならず異菌種間でも接合伝達を促進させることが明らかになった。水系環境に耐性菌・耐性遺伝子がいったん散逸した場合、繊毛虫を介した細菌間伝播により、耐性遺伝子が広範に拡散してしまうことが危惧される。これまでの薬剤耐性菌モニタリングはヒトや家畜などの生体試料のみで実施されているが、今後は環境中の耐性菌モニタリングも必要だと考えられる。

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2件)

Okubo T, Matsushita M, Nakamura S, Matsuo J, Nagai H, Yamaguchi H. Acanthamoeba S13WT relies on its bacterial endosymbiont to backpack human pathogenic bacteria and resist Legionella infection on solid media. Environ Microbiol Rep 10:344-354, 2018. doi: 10.1111/1758-2229.12645. 査読あり

Okubo T, Matsushita M, Ohara Y, Matsuo J, Oguri S, Fukumoto T, Hayasaka K, Akizawa K, Shibuya H, Shimizu C, Yamaguchi H: Ciliates promote the transfer of plasmid encoding blaNDM-5 from Escherichia coli, isolated from a hospital in Japan, to other human pathogens. Int J Antimicrob Agents 49:387-388, 2017. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.003. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

松下瑞江, 松尾淳司, 大久保寅彦, 山口博之. 繊毛虫はヒト病原細菌と水系環境細菌を双方向的な薬剤耐性プラスミドの接合伝達の促進作用を介して結ぶ. 第91回日本細菌学会総会, 2018.

松下瑞江, 大久保寅彦, 松尾淳司, 中村眞二, 山口博之. 共生細菌依存的なアメーバによるヒト病原細菌の運搬現象について. 第84回日本細菌学会北海道支部学術総会, 2017.

Okubo T, Matsushita M, Matsuo J, Nakamura S, Yamaguchi H. Aboebae backpack human pathogenic bacteria on solid-agar plate, depending upon the amoebal endosymbiont, Neochlamydia. ASM Microbe 2017, New Orleans, USA, 2017.

大久保寅彦, 松下瑞江, 松尾淳司, 山口博之. 北海道大学病院にて分離されたNDM産生大腸菌の性状解析と繊毛虫によるプラスミド伝達の促進. 第90回日本細菌学会総会, 2017.

松下瑞江, 松尾淳司, 大久保寅彦, 山口博之. 共生細菌に依存したアメーバによるヒト病原細菌の運搬現象について. 第90回日本細菌学会総会, 2017.

大久保寅彦, 松下瑞江, 松尾淳司, 山口博之. 北海道大学病院にて分離されたニューデリー・メタロラクタマーゼNDM-5産生大腸菌の性状解析. 第83回日本細菌学会北海道支部学術総会, 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保寅彦 (OKUBO, Torahiko)
北海道大学・大学院保健科学研究院・講師
研究者番号: 90762196

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者

山口博之 (YAMAGUCHI, Hiroyuki)
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号: 40221650

松尾淳司 (MATSUO, Junji)

北海道大学・大学院保健科学研究院・講師
研究者番号: 50359486

中村眞二 (NAKAMURA, Shinji)

順天堂大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40207882

(4)研究協力者

松下瑞江 (MATSUSHITA, Mizue)

秋沢宏次 (AKIZAWA, Kouji)

早坂かすみ (HAYASAKA, Kasumi)

福元達也 (FUKUMOTO, Tatsuya)

岩崎澄夫 (IWASAKI, Sumio)