

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05413

研究課題名(和文)大腸菌のバイオフィーム形成及びバイオフィーム内細胞死制御因子の解明

研究課題名(英文) Mechanism of biofilm formation and cell death mediated with MqsA in Escherichia coli

研究代表者

山口 良弘 (Yamaguchi, Yoshihiro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00737009

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)：MqsAのDNA結合能は運動性およびバイオフィーム形成促進に必須であること、運動性およびバイオフィーム形成促進は異なる経路を介して誘導されること、運動性促進はcurli線毛や多糖類の減少に起因することが示唆された。そこで、アミロイド繊維 curli 線毛の発現が MqsA によって抑制されることを利用し、MqsA によって curli 線毛発現が抑制されない変異株の取得を試みたが、関連遺伝子の同定には至らなかった。curli線毛発現の制御因子csgDの欠損株を用いてMqsA発現後の運動性を解析した結果、予想とは異なり、curli線毛はMqsAによる運動性促進に関与しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィームは固体表面などの付着微生物集合体の総称である。バイオフィーム細胞の抗生物質耐性は非常に高く、バイオフィームの研究は、多剤薬剤耐性菌の抑制に重要である。また、バイオフィーム内部はほぼ死細胞だが、その細胞死誘導機構は不明である。

本研究ではYgiT(MqsA)による運動性およびバイオフィーム形成促進機構並びにバイオフィーム内細胞死制御機構の解明を目的として研究を行なった。その結果、MqsAを介した運動性誘導にはMqsAのDNA結合が重要であること、MqsAは運動性およびバイオフィームを異なる経路で促進することが示された。これらの結果は、薬剤耐性菌の抑制に寄与できる可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：It was suggested that the DNA-binding ability of MqsA is essential for the promotion of motility and biofilm formation, that the promotion of motility and biofilm formation is induced via different pathways, and that the promotion of motility is due to the reduction of curli and/or polysaccharides. Then, I attempted to obtain mutant strains in which curli expression is not suppressed by MqsA however we were unable to identify the relevant genes. csgD, a regulator of curli cilia expression, was deleted from the strains to analyze motility after MqsA expression. The analysis suggested that, contrary to our expectation, curli is not involved in the promotion of motility by MqsA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Toxin-antitoxin system Biofilm Escherichia coli

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Toxin-antitoxin (TA) system は、原核生物において自殺遺伝子 (toxin) を制御するシステムである。Toxin はストレス環境下で誘導され、生育を停止し休眠状態にすることで細胞のストレス耐性に寄与することが示唆されている。

バイオフィームは固体表面及び界面で形成される付着微生物集合体の総称である。バイオフィーム細胞の抗生物質耐性は浮遊細胞に比べて数百倍高く、また、バイオフィーム内部はほぼ死細胞だが、その細胞死誘導機構及び生理的役割は不明である。バイオフィーム細胞の性質解明は、多剤薬剤耐性菌を抑制するために非常に重要である。

私は、MqsR と下流の YgiT 遺伝子が TA system であり、MqsR toxin が新規 GCU 配列特異的 RNA 分解酵素であることを証明した。さらに予備実験において、MqsR ではなく YgiT antitoxin が運動性を誘導しバイオフィーム形成を促進することを見出した。よって、YgiT はバイオフィーム形成を促進し、MqsR toxin はバイオフィーム内細胞死を制御する "TA system によるバイオフィーム制御機構" が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) YgiT によるバイオフィーム形成促進機構 (2) MqsR によるバイオフィーム内細胞死誘導機構 (3) MqsR-YgiT TA system によるバイオフィームの薬剤耐性機構を解明し、バイオフィーム形成及び細胞死に係る TA system の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

MqsA の DNA 結合が大腸菌の運動性およびバイオフィーム形成に与える影響 MqsA の DNA 結合能に着目し、MqsA のアミノ酸配列の 97 番目のアスパラギン残基および 101 番目のアルギニン残基がアラニン残基に置換され DNA 結合能が著しく低下した MqsA 変異体 (MqsA N97A/R101A) による大腸菌の運動性およびバイオフィーム形成への影響を解析した

YgiT 発現後の鞭毛量および細胞外多糖類の解析 既に申請者は、YgiT の発現が大腸菌の運動性を促進することを見出した。そこで、YgiT 誘導後の鞭毛発現量および細胞外多糖類を測定した。

YgiT を介した運動性制御に関する遺伝子の同定 MqsA を介した大腸菌の運動性およびバイオフィーム形成促進に関与する遺伝子を同定するために以下 2 つの実験を行った。

(1) *mqsRA* オペロンと同様に回文配列を 5'-UTR に持ち、この抑制機構を経て運動性およびバイオフィーム形成に影響を与えている遺伝子の探索を行なった。

(2) Congo red は細菌のアミロイド線毛 curli に吸着する赤色の線染料である。MqsA を高発現させた大腸菌は、curli の減少により Congo red を含む寒天培地上で白いコロニーを形成することが示唆された。ゲノム DNA ライブラリーを作成し、MqsA との共発現条件下において Congo red を含む寒天培地上で赤色コロニーを形成する大腸菌を選択し、選択した大腸菌に含まれるゲノム DNA ライブラリーの解析を行なった。

4. 研究成果

MqsA 変異体による大腸菌の運動性への影響 DNA 結合能を失った MqsA N97A/R101A 変異体の発現による大腸菌の運動性への影響を解析した。その結果、MqsA の発現は大腸菌の運動性を 1.3 倍促進した。一方、DNA 結合能を失った MqsA 変異体の発現は大腸菌の運動性を促進しなかった。よって、MqsA による大腸菌の運動性促進機構には、MqsA の DNA 結合能が重要であることが示された。

MqsA 変異体による大腸菌のバイオフィーム形成への影響の解析 MqsA N97A/R101A 変異体の発現による大腸菌バイオフィーム形成への影響を解析した。その結果、MqsA の発現は大腸菌によるバイオフィーム形成を約 1.3 倍促進した一方で、DNA 結合能を失った MqsA 変異体の発現はバイオフィーム形成に影響しなかった。よって、MqsA によるバイオフィーム形成促進機構には運動性と同様に MqsA の DNA 結合が重要であることが示された。

MqsA を介した運動性およびバイオフィーム形成促進に関する遺伝子の同定 MqsA は DNA 結合を介して大腸菌の運動性およびバイオフィーム形成を促進することが示唆された。そこで、MqsA 結合配列を 5'-UTR に持ち、運動性およびバイオフィーム形成に影響を与える遺伝子の探索を行なった。その結果、5 つの遺伝子 (*fimL*, *rpoS*, *tynA*, *yagL* および *ydaG*) を同定し、それぞれの欠損株における MqsA 発現後の運動性およびバイオフィーム形成量を解析した。その結果、 $\Delta yagL$ において運動性の促進が、 $\Delta ydaG$ においてバイオフィーム形成の促進がそれぞれ消失した。よって、MqsA は運動性およびバイオフィーム形成を異なる経路で誘導することが示唆された。一方で、Congo red を含む寒天培地上でのコロニーの色を指標とし、ゲノム DNA ライブラリーを用いて遺伝子スクリーニングを行ったが、得られた配列に共通して存在する遺伝子は同定されなかった。

MqsA による運動性・バイオフィーム形成促進機構と curli 線毛との関連性

MqsA を高発現させた大腸菌は、curli 線毛の減少によって Congo red を含む寒天培地上で白いコロニーを形成すると考えられた。しかし、Congo red によって着色される大腸菌の因子は他にも存在する。そのため、MqsA の高発現株における Congo red 培地上での白色コロニー形成が curli 線毛の発現量の減少によるものか疑問が持たれた。そこで、MqsA 高発現時と同様に、Congo red 寒天培地上で白色コロニー形成に関与する遺伝子をトランスポゾンを用いて探索した結果、curli 線毛の転写を制御する *csgD* の転写因子である *mlrA* および *ompR* が同定された。この 2 つの遺伝子が MqsA を介した運動性およびバイオフィーム形成促進に関与するかを調べた結果、これら遺伝子の欠損株では MqsA の発現は運動性およびバイオフィーム形成を促進しないと予想されたが、MqsA による促進は誘導された。よって、本スクリーニングで同定された *mlrA* および *ompR*、また curli 線毛の発現に必要な転写制御因子である *csgD* は、MqsA による運動性およびバイオフィーム形成促進には関与しないことが示された。よって、curli 線毛は MqsA による運動性およびバイオフィーム形成促進に影響しないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 良弘
2. 発表標題 病原菌における生育制御因子 toxin-antitoxin system の役割
3. 学会等名 第4回抗酸菌研究会（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------