

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16255

研究課題名(和文) Aeromonas属菌のbiofilm形成における分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of molecular mechanism in biofilm formation of Aeromonas spp.

研究代表者

清家 総史 (Seike, Soshi)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：90806275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で、Aeromonasが形成するbiofilmのマトリックス中には多くの外膜小胞(OMVs)が含まれていることを見出していたが、その機能は不明であった。本研究では、biofilmに含有されるOMVsはbiofilmの形成促進因子として機能していることを見出した。また、それだけではなく、biofilmに含まれる外膜小胞が宿主細胞に作用し、細胞毒性を示すことを見いだした。本菌が遊離する外膜小胞が、菌の生存(biofilmを形成し、感染源となる)に関わることに、さらに、宿主に対して病原性を示す手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、本菌が遊離するOMVsがAeromonasのbiofilm形成を促進するだけでなく、病原性発現にも関与していることを見出した。OMVsの作用は多岐にわたるが、その作用の詳細は未知な点が多い。本研究が更に進展し、菌とOMVsの相互作用、OMVsの宿主細胞に対する詳細な毒性メカニズム等が明らかになれば、感染症の克服の一助になると期待できる。

研究成果の概要(英文)： Previous study has shown that Aeromonas biofilm contain many outer membrane vesicles (OMVs), but their functions have been still unknown. In this study, it was found that the OMVs contained in biofilm facilitate biofilm formation. In addition, this study also revealed that the OMVs induced cytotoxicity to host cells. It is therefore considered that the OMVs released from Aeromonas involved in both bacterial survival and pathogenicity to host.

研究分野：細菌学

キーワード：Aeromonas Biofilm バイオフィルム 外膜小胞 OMVs 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

Aeromonas は河川や汽水域に広く棲息するグラム陰性桿菌であり、*A. sobria* や *A. hydrophila* は食中毒起因菌に指定されている。しかし、これらの *Aeromonas* 属菌は食中毒のみならず、癌や肝硬変などを基礎疾患にもつ患者において、四肢の壊死を伴う劇症型感染症例も数多く報告されている。このような劇症型感染症においては適切な治療法がなく、予後も不良となるケースが多い。また、本菌は、あらゆる環境で強い接着能を示し、biofilm を形成することが報告されていることから、本研究では、菌の定着・重症化の引き金になっていると考えられている biofilm 形成とそれに関わる外膜小胞(OMVs)に着目し、新たな抗菌戦略を模索する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Aeromonas* の biofilm 形成と病原性発現に至る過程において、本菌の biofilm 内で遊離される OMVs の性状解析することを皮切りに、詳細な分子機構の解明を進め、その成果から本菌感染症劇症化に対抗する新たな治療戦略を打ち立てる研究基盤を構築することである。

3. 研究の方法

1) OMVs による biofilm 形成促進作用の解析

本菌が形成する biofilm から密度勾配超遠心法を用いて OMVs (bOMVs) の精製を行なった。調整後の *Aeromonas* に精製・単離した bOMVs を添加し、変化する biofilm のバイオマスをクリスタルバイオレット染色法を用いて解析を行なった。また、bOMVs のどの成分が biofilm 形成に影響を与えているかを検討した。

2) より強い biofilm 形成力を有する菌株を用いた解析

Aeromonas 属菌で biofilm 形成力が異なる近縁の 3 菌株を使用し、bOMVs による biofilm 形成促進作用について、より詳細に解析した。種々の菌株の biofilm から精製した bOMVs を、精製した菌株とは異なる菌株に処理し、bOMVs が biofilm 形成にどのような影響を与えるかを解析した。

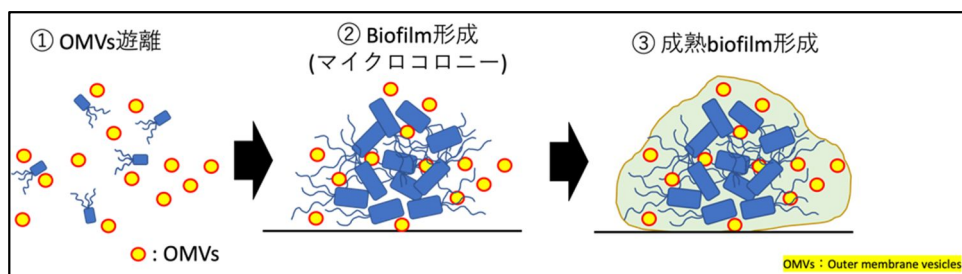
3) OMVs による宿主細胞に対する細胞毒性の検討

本菌由来の精製 bOMVs を、感受性細胞である Raw 264.7 細胞に作用させ、細胞毒性を解析した。

4. 研究成果

- 1) Biofilm から精製した bOMVs を菌体へ作用させると、プレートへの菌の付着量が増加した。しかし、菌が biofilm を形成せず、プレートへの菌の付着（接着）が増加しているだけの可能性が考えられたため、biofilm マトリックスの主要成分と報告されている eDNA、タンパク質、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を蛍光染色し、biofilm が形成されているか否かを解析した。その結果、bOMVs の添加により種々の成分 (eDNA, GlcNAc) の蛍光量が有意に増加したことから、bOMVs 処理により菌の biofilm 形成が促進されたと考えられた。次に、bOMVs のどの成分が biofilm 形成を促進させたのかを明らかにするため、タンパク質に着目した。bOMVs に Proteinase K (PK) を処理し、外膜上のタンパク質を分解した bOMVs (PK-bOMVs) を作成し、菌へ作用させた。その結果、本菌が形成する biofilm 形成量が低下した。

以上の結果より、bOMVs の膜上に存在しているタンパク質が、本菌の biofilm 形成の促進に関与している可能性が示唆された。



- 2) 最も biofilm 形成力が強く、bOMVs による biofilm 形成促進作用の影響を強く受ける菌株の ECM 成分を解析した結果、bOMVs の作用を増強する可能性のある因子を見出した。これまでは、bOMVs の成分に着目し、bOMVs による biofilm 形成促進作用の解析を行っていたが、この bOMVs の成分に加え、bOMVs が作用する菌体の性質も、大きな影響を与えることを見出した。この因子は biofilm 形成力が弱い他菌株では検出されなかったため、この因子は biofilm 形成促進の一つの因子である可能性が示唆された。今後は、この因子と、bOMVs の関係についても更に詳細に解析し、bOMVs による biofilm 形成促進作用メカニズムを明らかにする。

- 3) bOMVs の宿主細胞に対する細胞毒性を解析した。bOMVs は浮遊菌から精製した planktonic OMVs (pOMVs) と含有成分が異なる。ゆえに、bOMVs は pOMVs とは異なる細胞毒性を有する可能性が示唆された。これまでの報告では、pOMVs による細胞毒性の報告がほとんどで、biofilm から精製した bOMVs の細胞毒性については未知であった。本検討により、bOMVs は biofilm 形成を促進することで、本菌の生存戦略の一つの選択肢となっているが、その一方で、病原性を発現するために必要な因子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ueda Mitsunobu, Kobayashi Hidetomo, Seike Soshi, Takahashi Eizo, Okamoto Keinosuke, Yamanaka Hiroyasu	4. 巻 12
2. 論文標題 Aeromonas sobria Serine Protease Degrades Several Protein Components of Tight Junctions and Assists Bacterial Translocation Across the T84 Monolayer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 824547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2022.824547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Maeda Ryuto, Kobayashi Hidetomo, Higashidani Mami, Matsuhisa Tetsuaki, Sawa Akihiro, Miyake Katsushi, Tayama Yoshitaka, Kimura Kouji, Itoh Hiroyuki, Okano Taichi, Seike Soshi, Yamanaka Hiroyasu	4. 巻 4
2. 論文標題 Molecular epidemiological and pharmaceutical studies of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated at hospitals in Kure City, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Access Microbiology	6. 最初と最後の頁 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/acmi.0.000319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Seike Soshi, Kobayashi Hidetomo, Ueda Mitsunobu, Takahashi Eizo, Okamoto Keinosuke, Yamanaka Hiroyasu	4. 巻 11
2. 論文標題 Outer Membrane Vesicles Released From Aeromonas Strains Are Involved in the Biofilm Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 613650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.613650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagahama Masahiro, Seike Soshi, Ochi Sadayuki, Kobayashi Keiko, Takehara Masaya	4. 巻 12
2. 論文標題 Clostridium perfringens Epsilon-Toxin Impairs the Barrier Function in MDCK Cell Monolayers in a Ca ²⁺ -Dependent Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 286 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12050286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas由来OMVsによるbiofilm形成メカニズムの解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 秀丈, 清家 総史, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasセリンプロテアーゼのタイトジャンクションの破壊は菌の上皮バリア透過を引き起こす
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 上田 充展, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasが形成するbiofilm由来外膜小胞(bOMVs)の細胞毒性の解析
3. 学会等名 第60回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas属菌が形成するbiofilm由来OMVの作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 秀丈, 清家 総史, 高橋 栄造 , 岡本 敬の介 , 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas sobriaセリンプロテアーゼのタイトジャンクション破壊機構の解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 高橋 栄造 , 岡本 敬の介 , 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas属菌が遊離する外膜小胞の細胞毒性の解析
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 秀丈, 清家 総史, 上田 充展, 高橋 栄造 , 岡本 敬の介 , 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaのマクロファージ内生に関する研究
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 上田 充展, 高橋 栄造 , 岡本 敬の介 , 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas属菌産生する外膜小胞の細胞毒性の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 充展, 小林 秀丈, 清家 総史, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasセリンプロテアーゼによる腸管上皮細胞バリア破壊機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田 龍人, 小林 秀丈, 佐和 章弘, 東谷 麻未, 岡野 太一, 木村 幸司, 三宅 勝志, 清家 総史, 山中 浩泰
2. 発表標題 呉地区の医療施設で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas のbiofilm形成におけるOMVsの役割
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 秀丈, 清家 総史, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasセリンプロテアーゼの腸管上皮バリア破壊機構の解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永浜 政博, 和田 ほのか, 清家 総史, 小林 敬子, 竹原 正也,
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素の生物学的活性におけるアミノ酸残基の役割
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas 属菌が形成するbiofilm由来OMVの機能解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会 中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 秀丈, 清家 総史, 上田 充展, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaのマクロファージ内生に関する研究
3. 学会等名 第73回日本細菌学会 中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家 総史, 小林 秀丈, 上田 充展, 高橋 栄造, 岡本 敬の介, 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas 属菌が形成するbiofilm中のOMVの機能解析
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------