

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05360

研究課題名(和文)細菌バイオフィーム形成制御における植物由来天然有機化合物の作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of action of plant-derived natural organic compounds in regulating bacterial biofilm formation

研究代表者

小笠原 寛 (OGASAWARA, Hiroshi)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授

研究者番号：30535232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動植物と共生している細菌種は、外部環境変化に応じて宿主表面への付着や細菌細胞の集落形成に必要なバイオフィーム(BF)を形成する。BF形成に影響を与える環境要因は、多くが未解明のままであり、特に実験室培養条件下においては、十分に機能を発揮しておらず、断片的な知識しかなかった。これまでに我々は、大腸菌のBF形成について調べ、その形成統括制御因子CsgDの発現制御に、多種類の転写因子が関与することを明らかにしてきた。本研究では、これまでにcsgDおよびcsgB発現抑制効果を示すことが報告されている植物由来天然有機化合物の作用機序の解明を目標に研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに多くの植物由来天然有機化合物が細菌のBF形成阻害剤として報告されているが、それら作用機序については多くが未解明のままである。これら薬剤は細菌のBF形成制御に関わる転写制御機構の何れかを阻害することが考えられたことから、本研究では、BF形成細菌に対するこれら植物由来天然有機化合物の作用機序の解明が主な目的である。これまでに利用されているBF阻害剤の多くは殺菌効果は高いが、人体安全性の低いものが多いのが現状である。多くの植物由来成分は生薬の有効成分として利用されており、安全性が高いものも多いため、その作用機序の解明はBFをターゲットとした薬剤開発の新たな指針を示す極めて重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：Bacterial species can find in both plants and animals form biofilms (BFs) that are necessary for adhesion to host surfaces and the formation of colonies response to the external environmental change. The environmental factors that influence BF formation remain almost unknown, especially under laboratory culture conditions, and only fragmentary knowledge exists. We have investigated BF formation in *Escherichia coli* and revealed that many species of transcription factors involved in regulating the expression of CsgD, a master regulator for BF formation. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of action of plant-derived natural organic compounds, which have been reported to inhibit the expression of the curli genes (csgDEFG and csgBAC).

研究分野：農学

キーワード：Escherichia coli Biofilm formation CsgD Organic compounds

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上の湿度が一定に保たれた環境のあらゆる物体表面には、細菌の集落形成形態であるバイオフィルム(BF)が観察され、その内部に生息する細菌種は、お互いに固有の化学的シグナルを用いて交信し、共生していることが明らかになってきている。細菌のつくるBFの機能は多岐に亘り、外部環境ストレスに対する防御壁としてのみならず、物体表面への付着、細胞凝集による細菌同士の共生関係の安定化および遺伝情報の授受、栄養枯渇時の栄養供給源としての利用等、重要な役割を担っている。動植物と共生している細菌種については、常に宿主表面に付着する中、宿主が産生する代謝産物に晒されており、これまでに多くの天然有機化合物について、浮遊性単細胞形態形成およびBF形成に影響を与えることが報告されている。細菌のBF形成阻害効果が認められている天然有機化合物については植物由来成分が幾つか報告されており、例えばクマリン、オイゲノール、フロレチン、フィセチン等が知られているが作用機序が不明なものが多い。これまでの研究で我々は、大腸菌を用いて、宿主表面への付着や細菌細胞同士の凝集に関与する遺伝子発現制御機構の解明を目指して研究を実施し、大腸菌のBFの構成因子であるアミロイド線維タンパク質 CsgA の発現やセルロース合成に必須な中核転写因子(TF)である CsgD が、べん毛構成成分や複数の機能未知タンパク質をコードする 20 種以上の遺伝子発現制御に関与することを明らかにした。また *csgD* プロモーター上に結合する複数種の TF による協調的な *csgD* 発現制御機構を見出し、新たな *csgD* 制御因子の同定に成功した。これらのことから、BF 形成阻害に関わる化合物が、*csgD* の発現制御に関わるこれら TF に作用する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、細菌のBF形成に対する阻害効果が確認されているが、その作用機序が未だ不明な植物由来天然有機化合物に焦点を当て、その分子機構を解明することが大きな目的である。これまでに我々はモデル生物である大腸菌のBF形成統括制御因子CsgDの発現制御が多数の機能未知TFによって制御されることを明らかにしてきた。CsgDの発現が大腸菌のBF形成に大きく影響することから、CsgD発現制御機構に関わるTF群は植物由来成分の標的である可能性が示唆された。また、これまでに医療分野、工業分野等で器具の洗浄等に用いられているBF阻害剤は、殺菌効果は高く、安全性の低いものも少なくない。一方、多くの植物由来成分は生薬の有効成分として利用されており、BF形成を阻害する効果を示すものも報告されているが、それらの作用機序については未解明のものも多く、その解明はBFをターゲットとした薬剤開発において極めて重要な課題である。本研究ではBF阻害効果を示す植物由来天然有機化合物の細菌BF形成阻害の作用機序の全容解明を目指して、(1)BF形成阻害植物由来天然有機化合物の*csgD*発現抑制分子機構の解明、(2)BF形成に影響を与える新規天然有機化合物の探索、(3)線虫体内の大腸菌の生存および*csgD*発現に対する植物由来天然有機化合物の影響について、研究を行った。

3. 研究の方法

(1)BF形成阻害植物由来天然有機化合物の*csgD*発現抑制分子機構の解明

(1)-1.植物由来天然有機化合物の大腸菌BF形成への影響

大腸菌BW25113株(K-12株由来)に対する植物由来天然有機化合物のBF形成阻害効果の有無を確認するために、本研究では、これまでに病原性大腸菌O-157株においてBF形成阻害効果および*csgD*発現抑制効果が確認されているクマリン類4種、フロレチン、フィセチンについて、BF形成実験と、*csgD*、*csgB*の発現解析を実施した。さらに他の細菌種でBF形

成阻害能が確認されているフィセチン、インドール-3-カルボキシアルデヒド(ICA)、クリシン、カルコン、ピオカニン A、アントラニル酸、フィトール、オイゲノールを用いて、BF 形成実験を実施した。これら化合物の *csgD*、*csgB* 発現への影響を蛍光顕微鏡下、または蛍光プレートリーダーを用いて確認するために、これらの遺伝子のプロモーターと sfGFP または mCherry をコードする遺伝子を融合させたレポーター株を作製した。

BF 形成実験では、YESCA 培地を入れた 96 Well プレートに大腸菌 BW25113 株を植菌し、ピンプレート付きのプレート蓋を使用し、28 °C で 7 日間で培養後、ピンプレートに形成された BF をクリスタルバイオレット(CV)で染色し、吸着した CV を抽出後、吸光度を測定することで BF 形成量を測定した。*csgD* および *csgB* の発現解析では、*csgD*、*csgB* 各プロモーターと *lacZ* を融合したレポーター株を用いた。

(1)-2. *csgD* 制御 TF 欠損株における BF 形成実験

以前の我々の研究において、*csgD* プロモーターと特異的結合を示すことが新たに明らかとなった *csgD* 制御因子候補 TF27 種の欠損株を用いて、Curli 線毛形成が誘導される YESCA 培地、28 °C、7 日間培養を行い、BF 形成量の測定を行った。

(2)BF 形成に影響を与える新規天然有機化合物の探索

(2)-1. TF-SC(Transcription factor specific chemicals) screening system の構築

2 種類のプライマーのうち、片方の 5' 末端をビオチン化したプライマーを用いて PCR を行い、*csgD* プロモーター、および *csgB* プロモーターを含む DNA 断片を PCR で増幅し、ストレプトアビジンでコートされた 96 Well plate に固定化した。His-tag を付加した TF を精製後、各天然有機化合物の有無の条件において 96 well プレートに固定化された各 DNA 断片と 37 °C で 10 分間反応後、Well を洗浄し、Well に残った転写因子を HRP 標識された His-tag 抗体と TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)発色基質を用いて検出した。

(2)-2. インシリコスクリーニングによる薬剤の探索

myPresto を用いてインシリコによる薬物スクリーニングを実施した。AlphaFold2 より TF の PDB ファイルをダウンロードし、myPresto でファイルを指定した。化合物データベースとして、Ligand box より物理量・化合物 ID のファイルをダウンロード、解凍し、myPresto の Command View の Screening より化合物ファイルを指定し、実行した。

(3)線虫体内の大腸菌の生存および *csgD* 発現に対する植物由来天然有機化合物の影響

線虫は、東京女子医科大学の三谷昌平先生より供与頂いた *Caenorhabditis elegans* N2 株を用いた。大腸菌の線虫体内における定着量を測定するために、BW25113 株、*csgD* 欠損株、(1)の BF 形成実験で顕著な BF 抑制効果が確認された TF 欠損株を線虫に与え、一週間生育させた後、線虫を PBS で洗浄後、破碎し、vortex ミキサーで攪拌し、段階希釈した後、LB 寒天培地に塗布し、終夜培養後、コロニー数をカウントした。線虫腸内における大腸菌に対する植物由来化合物の影響について明らかにするために、(1)で構築した *csgD* および *csgB* プロモーターと sfGFP または mCherry をコードする遺伝子を融合させた大腸菌レポーター株を線虫に与え、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察を行った。各レポーター株を寒天培地上で培養し、*C.elegans* N2 株に餌として与え、23 °C で 24 時間生育させた後、線虫を PBS に移し、3.7%のホルムアルデヒドで固定化した線虫を顕微鏡観察の試料とした。

4 . 研究成果

(1)BF 形成阻害植物由来天然有機化合物の *csgD* 発現抑制分子機構の解明

まず最初に、病原性大腸菌 O157 に対する BF 形成阻害効果が確認されているクマリン類 4 種(クマリン、エスクレチン、ウンベリフェロン、4-ヒドロキシクマリン)、フロレチン、フィセチンについて、大腸菌 BW25113 株の BF 形成に対する影響、および *csgD*、*csgB* の発現への影響について調べた。その結果、クマリン、およびフロレチンにおいて Curli 形成が誘導される YESCA 培地使用時における BF 形成阻害効果が確認され、共に *csgB* 発現抑制効果が確認された。本研究において、クマリンおよびフロレチンによる *csgD* 発現の阻害が殆ど確認されなかったため、*csgB* 発現に必須な CsgD がこれら化合物の標的である可能性が示唆された。ゲルシフトアッセイにおいて、クマリンについては CsgD の *csgB* プロモーターに対する結合への影響は確認出来なかったが、フロレチンについては、低濃度においても著しい阻害効果が確認された。CsgD とフロレチンの相互作用について、ドッキングソフトを使用した解析を行ったところ、CsgD の Leu58, Leu86, Trp101 との疎水性相互作用が示唆された。以前の研究において、フロレチンは、O157 株の *csgB* および *csgD* 発現は抑制するが、BW25113 株の *csgB* および *csgD* 発現を誘導することが示されていた (Lee et al., *Infect Immun.* **79**, 4819-4827, 2011)。本研究においては BW25113 株の Curli 形成が誘導される YESCA 培地、28 の培養条件下で培養実験を行ったことで、CsgD に対する効果が確認できたと考えられた。

最近の研究で我々は、 Fe^{3+} と結合したエンテロバクチンの取り込みに関わる輸送体をコードする *fepD* が CsgD の支配下にあることを見出した。 Fe^{3+} 依存的な BF 形成、および Curli 形成の促進に CsgD が関与しており、クマリンは、 Fe^{3+} 依存的な BF 誘導、Curli 形成誘導、*fepD* 発現誘導を阻害することを明らかにした(松吉、小笠原、論文投稿準備中)。

フィセチン、ICA、クリシン、カルコン、ピオカニン A、アントラニル酸、フィトール、オイゲノールを用いて、BF 形成実験を実施したところ、フィセチン、ICA、クリシン、カルコン、オイゲノールで顕著な BF 形成阻害活性が示され、オイゲノールは著しい生育阻害活性を示した。一方、ICA、アントラニル酸、ピオカニン A は Curli 形成阻害効果を示し、アントラニル酸は *csgD* 発現抑制効果を示した。現在、アントラニル酸について *csgD* 制御因子への影響について調べている所である。我々の以前の研究において、*csgD* プロモーターに対する結合が示唆された TF27 種類について Curli 依存的な BF 形成への関与を調べた結果、特に *qseB*, *cytR*, *iciA* の各欠損株で BF 形成量の著しい低下が確認された。現在、これらの TF に対するアントラニル酸、ICA、ピオカニン A の影響について、調べている所である。

(2)BF 形成に影響を与える新規天然有機化合物の探索

大腸菌の BF 形成および Curli 遺伝子発現を阻害する新規天然有機化合物の探索を行うために、これらを迅速かつ大量にスクリーニングするシステムの開発に取り組んだ。まず、本研究において構築した TF-SC screening system が機能することを確認するために、CsgD の *csgB* プロモーターに対する特異的結合の確認後、(1)で CsgD の標的遺伝子への結合阻害が確認されたフロレチンを用いて実験を行った。精製 Histag-CsgD を用いて TF-SC screening を行い、CsgD の濃度依存的な *csgB* プロモーターへの結合が確認され、フロレチン添加時(43 ~ 340 $\mu\text{g}/\text{ml}$)において結合阻害効果が確認された。本スクリーニング系は、高品質の TF の大量精製を必要とするため、その精製量の確保が課題であるが、CsgD 以外の主要な *csgD* 発現制御 TF のうち、精製量の確保できた TF については、同様に実験を進める計画である。

csgB プロモーターに対する CsgD の特異的結合を阻害する新規化合物を探索するために、myPresto を用いてインシリコによる化合物スクリーニングを試みた。CsgD の PDB ファイルを myPresto で指定し、化合物データベースとして、Ligand box (LigandBox © 次世代天然物化学

技術研究組合 licensed under CC 表示-継承 4.0 国際)より物理量・化合物 ID のファイルをダウンロード、解凍し、myPresto の Command View の Screening より化合物ファイル(25276 種類)を指定し、実行した。CsgD への結合が予測された 248 個の化合物のうち、入手可能なものを選択し、CsgD による *csgB* 発現制御への影響、および Curli 線毛形成への影響について調べて行く予定である。さらに *csgD* 発現制御に関わる TF のうち、*qseB*, *cytR*, *iciA* の各欠損株においては、BF 形成量の著しい減少が確認されていることから、これら転写因子についても同様に解析を進め、それぞれ新規阻害剤の探索を継続する計画である。

(3)線虫体内の大腸菌の生存および *csgD* 発現に対する植物由来天然有機化合物の影響

大腸菌の線虫体内における定着量を測定するために、BW25113 株、*csgD* 欠損株、(1)の BF 形成実験で顕著な BF 形成量の減少が確認された *qseB* 欠損株をそれぞれ線虫に与え、一週間生育させた後、線虫体内へ定着した生菌数を測定した。その結果、大腸菌野生株と比較して *csgD* 欠損株の線虫体内での生菌数が著しく減少することが明らかとなった。一方、*qseB* 欠損株では野生株と殆ど変化はなかった。これまでの研究で、Curli 線毛の形成により、大腸菌は線虫の捕食から保護されることが示されているが(Depas *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7079-7087, 2014)、本研究において、CsgD および Curli 線毛が線虫腸内における大腸菌の定着に重要な役割を果たしていることが示唆された。

線虫腸内における大腸菌 BW25113 株の *csgD* および *csgB* 発現を確認するために、(1)で構築した *csgD* および *csgB* プロモーターと sfGFP または mCherry をコードする遺伝子を融合させた大腸菌レポーター株を線虫に与え、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。*csgD*-sfGFP を有するプラスミドで形質転換された大腸菌 BW25113 株を与えた線虫について観察したところ、*csgD*-sfGFP に起因する蛍光を確認することができなかった。線虫腸内が嫌気的条件であるかは不明であるが、嫌気/好気どちらの条件においても蛍光検出が可能な evoglow をレポーター遺伝子として使用を検討中である。一方、mCherry を *csgD* プロモーターと染色体上で融合させた BWcsgD-mCherry 株を与えた線虫を観察したところ、線虫腸内において、*csgD* 発現に起因する mCherry 由来の赤色蛍光が確認された。これらの結果より、BW25113 株において *csgD* 発現が誘導されている可能性が示唆された。

線虫腸内における植物由来有機化合物の *csgD* 発現および *csgB* 発現への影響を上記レポーター株を用いて観察するために、本研究で用いた植物由来有機化合物について、sfGFP と同じ、励起 485 nm/蛍光 535 nm および mCherry と同じ励起 544 nm/蛍光 616 nm における蛍光強度の測定を行ったところ、フロレンチンとカテキンについては、濃度依存的に励起 485 nm/蛍光 535 nm における顕著な蛍光強度の上昇が確認された。一方、励起 544 nm/蛍光 616 nm での蛍光強度の上昇は確認されなかったことから、現在、これらの化合物については、BWcsgD-mCherry 株および BWcsgB-mCherry 株を用いて調べているところである。

最近の研究で、線虫腸内における大腸菌の Vitamin B12 の蓄積に、TF である RcdA の関与が示された(Yao *et al.*, *Commun. Biol.* 6, 96, 2023)。RcdA は、*csgD*, *csgB* を始め、多様な標的遺伝子の制御に関与し(Shimada *et al.*, *Microbiologyopen*, 1, 381-394, 2012)、DNA 結合時の立体構造の詳細も明らかとなっている(Sugino *et al.*, *FEBS Lett.*, 591, 2019-2031, 2017)。そこで、RcdA が線虫腸内における大腸菌の定着に与える影響について調べるために、我々は *rcdA* 欠損株を用いて、線虫体内に定着した生菌数を測定したところ、大腸菌野生株との差は認められなかった。今後、線虫腸内における RcdA による *csgD* 発現制御機構、および *csgD* 制御における Vitamin B12 の影響について、調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sano, K., Kobayashi, H., Chuta, H., Matsuyoshi, N., Kato, Y., Ogasawara, H.	4. 巻 24
2. 論文標題 CsgI (YccT) Is a novel Inhibitor of Curli fimbriae formation in Escherichia coli preventing CsgA polymerization and curli gene expression.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24054357	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 Tomohiro Shimada, Hiroshi Ogasawara, Ikki Kobayashi, Naoki Kobayashi, Akira Ishihama	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-target regulators constitute the minority group of transcription factors in Escherichia coli K-12	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 697803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.697803	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 大山壮哉、松吉志、小笠原寛	4. 巻 7
2. 論文標題 細菌アミロイドファイバーの制御と機能性材料としての利用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 893-896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小笠原寛、大山壮哉、前川雄飛、石塚俊行、堀田修平、山路幸太郎、島田友裕、石浜明
2. 発表標題 大腸菌のアミロイド線維形成制御に関する包括的研究
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 忠田大岳、小林弘明、佐野晃太郎、小笠原寛
2. 発表標題 大腸菌Curli線毛形成阻害因子YccTの細胞内局在性に関わる分子機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小笠原寛、大山壮哉、前川雄飛、石塚俊行、堀田修平、山路幸太郎、島田友裕、石浜明
2. 発表標題 大腸菌のアミロイド線維形成制御に関する包括的研究
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大山壮哉、堀田修平、富田紗礼、前川雄飛、石塚俊行、小笠原寛
2. 発表標題 大腸菌のCurli形成を阻害する植物由来天然有機化合物の作用機序
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松吉志、小笠原寛
2. 発表標題 大腸菌バイオフィーム統括制御因子CsgDによる鉄エンテロバクチン輸送体遺伝子fepDGCの発現制御とその機能的役割
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大山壮哉、堀田修平、富田紗礼、前川雄飛、小笠原寛
2. 発表標題 大腸菌のCurli形成制御機構における植物由来成分の作用機序
3. 学会等名 第2回総合微生物学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小笠原寛、大山壮哉、松吉志、堀田修平、佐野晃太郎、石塚俊行、加藤佑輝、島田友裕、石浜明
2. 発表標題 大腸菌のCurli形成制御に関する包括的解析
3. 学会等名 第19回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松吉志、小笠原寛
2. 発表標題 大腸菌BasS/BasR-CsgDカスケードを介するFe ³⁺ 依存的なcurli合成とFe ³⁺ -シデロフォア輸送系の発現制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小笠原寛(分担)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 8
3. 書名 バイオフィーム革新的制御技術「大腸菌のバイオフィーム形成と遺伝子発現制御機構」	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アミロイドを生産可能な形質転換細胞およびアミロイドを生産する方法	発明者 小笠原寛、松吉志	権利者 国立大学法人信州大学(特許出願人)
産業財産権の種類、番号 特許、2023-017462	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------