

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25350968

研究課題名(和文) 病原性環境菌の細胞間情報伝達物質によるバイオフィーム形成機構

研究課題名(英文) Biofilm formation mechanism by intercellular signaling molecule of environmental pathogen

研究代表者

西内 由紀子(Nishiuchi, Yukiko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00333526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：最近、日本で増えている感染症に肺MAC症があります。この病気は環境にいるMAC菌を吸い込んで感染します。MAC菌は環境中や体の中でバイオフィームを形成してMAC菌の除去を難しくしていると考えられていますが、その生態やバイオフィーム形成を制御する方法など不明な点が多くあります。本研究はバイオフィームを形成しているメカニズムを解明するために行いました。MAC菌のバイオフィームは低い酸素濃度と十分な栄養があるところで形成され、細胞壁の糖脂質が重要な役割を果たしている事を明らかにしました。これらの知見を生かして環境中や生体内のMAC菌を除く方法を探索していきます。

研究成果の概要(英文)：The incidence of pulmonary Mycobacterium avium complex (MAC) disease is increasing in Japan. This disease is generally developed by inhalation of MAC organisms occurring in the environment. MAC forms biofilm in the environment and hosts, and the biofilm can function to shelter MAC itself. Thus, the formed biofilm makes it difficult to eliminate MAC organisms from the infection sources and hosts. However, the biology and the regulatory mechanism of biofilm formation of MAC still remain unknown. The aim of this research is to elucidate these pending issues with the biofilm formation of MAC. We were able to demonstrate that the ambient hypoxia and eutrophic conditions promote MAC biofilm formation, and that glycolipids existing on the envelope of MAC, such as glycopeptidolipid, trehalose dimycolate, and trehalose monomycolate, are greatly involved in the formation of biofilm. Based on these findings, we are trying to find out measures that can effectively disinfect MAC organisms.

研究分野：細菌学

キーワード：非結核性抗酸菌 バイオフィーム トリ型結核菌 グリコペプチドリッド 低酸素 トレハロースジマ
イコレート

1. 研究開始当初の背景

環境から感染する病原性菌が病原性を発現する時にはバイオフィームが寄与していると考えられています。即ち、感染源ではバイオフィームが形成され、患者となる宿主細胞への定着や侵入過程にバイオフィームが関わっていることが知られてきました。ひとたびバイオフィームを形成すると消毒剤・抗生剤に対して抵抗性が増すために感染源における菌の除去や患者の治療が困難になっています。環境から感染する病原性菌のバイオフィームについては、接着から成熟化の過程、クオラムセンシング、細胞間伝達物質、2成分制御系などの形成・維持・病原性の発現などについてわかってきました。

非結核性抗酸菌のうち *Mycobacterium avium* complex (MAC) は環境から感染する病原性菌のひとつで、最近日本で肺感染症が増加しているのが公衆衛生上や医療上の重要な問題になってきています。ところが、MAC などの非結核性抗酸菌はシャワーヘッドや浴槽の給水口などに存在してバイオフィームを形成していることがわかっていますが、接着から成熟化の過程、クオラムセンシング、細胞間伝達物質、2成分制御系などのメカニズムはほとんどわかっていません。さらにバイオフィームの生態や形成を促す条件も十分にはわかっていませんでした。

2. 研究の目的

MAC菌のひとつ *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) のバイオフィームの生態や形成を促す条件を明らかにして、その成果をもとに細胞間情報伝達物質を単離同定してクオラムセンシングの制御機構を解明することを目的としました。

3. 研究の方法

(1) バイオフィーム形成因子の検討 1: バイオフィームの形成を促す条件は菌種によって異なります。MAH や非結核性抗酸菌は、水系の環境、浴室の浴槽の給水口、シャワーヘッドや水道管の中などでバイオフィームを形成することがわかっています。水道水は貧栄養ですから、貧栄養がバイオフィームの形成を引き起こす因子ではないかと考えて、通常の培地 (Middlebrook 7H9 broth、富栄養) から炭素や窒素源を通常の 10%、0%、水の条件で気液界面に形成される菌膜形成 (バイオフィームの一形態です) を指標に検討しました。また、MAH の類縁菌である結核菌は環境中の酸素濃度の変化によって休眠することが知られていることから、酸素濃度の変化も検討しました。

(2) バイオフィーム形成因子の検討 2: 抗酸菌は豊富な糖脂質が細胞壁を覆っていて、乾燥や化学的、物理的な攻撃を受けにくいことが知られています。抗酸菌以外の菌ではバイオフィーム形成に多糖が大きな役割を果たしていることが知られていますが、抗酸菌

では糖脂質がその役割を果たしている可能性があると考えました。まず、MAH で最も豊富な糖脂質である glycopeptidolipid (GPL) の欠損株を自然発生的に得たので、バイオフィーム形成能について GPL 産生株と非産生株の違いを検討しました。次にバイオフィームを形成していない時の菌 (浮遊菌) とバイオフィームを形成した菌の GPL 産生量を比較しました。また、GPL 非産生株に GPL を添加してバイオフィーム形成条件で培養するとどうなるか検討しました。さらに、GPL の産生能によって形態が異なるバイオフィームは消毒剤に対する耐性能も異なるかどうか、殺菌性の次亜塩素酸ナトリウム 1000 mg/L に曝露して効果を検討しました。

(3) バイオフィーム形成時の糖脂質組成の変化: その他の糖脂質もバイオフィーム形成に関与している可能性があるため、浮遊菌とバイオフィーム形成菌の脂質を抽出して、乾燥菌体 1 g あたりから抽出した総脂質を 2 次元 TLC 法で 3 通りの展開溶媒で展開して網羅的に比較検討しました。

(4) 低栄養条件におけるバイオフィーム形成: Middlebrook 7H11 平板で 2-3 日間培養して形成したマイクロコロニーをプラスチック板に接着させました。このプラスチック板を低栄養液体培地に浮かせて、マイクロコロニーがバイオフィームを形成するかどうか走査型電子顕微鏡をもちいて観察しました。

(5) 細胞間情報伝達物質の探索: 当初の実験計画では、タンパク質を含まない低栄養条件下でバイオフィームを形成させて培地中に遊離される細胞間情報伝達物質を硫酸沈殿、疎水性相互カラム、逆相カラムで精製し質量分析で同定をこころみました。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成因子の検討 1: 低酸素、富栄養条件にすると MAH は気液界面に厚い菌膜、すなわちバイオフィームを形成しました。それ以外の条件では形成されませんでした (図 1)。富栄養条件でバイオフィーム形成が起きることは予想に反していましたが、低栄養条件では異なるメカニズム

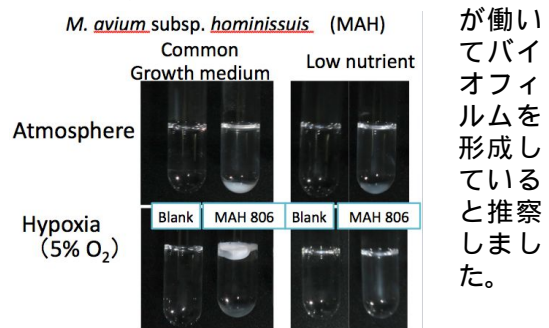


図 1. 環境から分離した MAH の

バイオフィーム形成

(2) バイオフィーム形成因子の検討 2 : GPL 産生株は厚いバイオフィームを形成し、非産生株は薄い菌膜とガラス壁を遡上する形状を示しました。環境から分離した菌 OCU806 株は、バイオフィーム形成時に GPL の産生量が増加していました。また、GPL 非産生株に GPL を添加するとバイオフィームが肥厚化しました。バイオフィームを形成すると消毒剤に耐性になることが知られています。浮遊菌は消毒剤次亜塩素酸ナトリウムの殺菌作用に対して一時間以内に完全に殺菌されましたが、バイオフィームを形成すると、GPL 産生の有無にかかわらず、同様に耐性になり 1 時間曝露しても殺菌されませんでした。以上の結果から、GPL が厚いしかりとした菌膜形成に重要であることが明らかになりました。一方 GPL を産生しない株が形成する薄い菌膜とガラス壁を遡上するような形態も同様の消毒剤耐性能をもつバイオフィームであることがわかりました。

(3) バイオフィーム形成時の糖脂質組成の変化 : 網羅的に検討した結果、trehalose dimycolate (TDM), trehalose monomycolate (TMM) の含有量が浮遊菌に比べてバイオフィーム形成菌では有意に減少していることがわかりました。、 から抗酸菌である MAH のバイオフィーム形成には、糖脂質代謝が変化することが必要であることがわかりました。

(4) 低栄養条件下におけるバイオフィーム形成 : 低栄養条件下では異なるメカニズムが働いてバイオフィームを形成していると推察されたので、低栄養条件下でプラスチック板に接着したマイクロコロニーの成熟過程を観察しました。すると、抗酸菌に特徴的な長い桿菌の一部は細胞質が細胞外に放出されて、細胞壁エンベロープが抜け殻のようになっていました。同時に 1 μm 未満の長さの小桿菌が多く認められ、活発に細胞分裂を起こしていることがわかりました。この抜け殻様の細胞壁エンベロープは富栄養条件下で形成される菌膜では認められませんでした。従って、MAH は低栄養条件下におかれると、一部の菌が死滅して残りの菌に栄養を提供して菌の生き残り増殖に寄与している、即ち異なるメカニズムでバイオフィームが形成されていると考えられました。

(5) 細胞間情報伝達物質の探索 : 当初の予定通り実験を進めましたが、期待通りの細胞間情報伝達物質は精製できませんでした。その後、 の実験結果から、細胞質内のすべての成分が培養液中に放出されていることがわかったので、本方法では細胞間情報伝達物質を特定することが困難であることがわ

かりました。

(6) 結論 : 気液界面に形成されるバイオフィーム (菌膜) は低酸素・富栄養条件下で形成され、その形成には糖脂質が関与していることが明らかになりました。一方、低栄養条件下でも一部の菌が栄養を提供することで増殖が進行して異なるメカニズムでバイオフィームが形成されることが判明しました。このように抗酸菌のバイオフィームの新たな生態や形成を促す新たな因子を明らかにしました。今後、これらの研究成果をさらに発展させてバイオフィーム形成時における遺伝子発現の変化を網羅的に検討して MAH のバイオフィーム形成制御システムを明らかにして環境中や生体内の抗酸菌を除く方法を開発していきます。

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 10 件)

Ozeki Y, Igarashi M, Doe M, Tamaru A, Kinoshita N, Ogura Y, Iwamoto T, Sawa R, Umekita M, Enany S, Nishiuchi Y, Osada-Oka M, Hayashi T, Niki M, Tateishi Y, Hatano M, Matsumoto S. A new screen for tuberculosis drug candidates utilizing a luciferase-expressing recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. Plos One 2015. 10(11): e0141658. DOI: 10.1371 (査読有)

西内由紀子, 田丸亜貴, 戸谷孝洋. 抗酸菌およびそのバイオフィームに対する次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素ガス溶存液の殺菌効果. 環境感染誌. 2015. 30 (4) 243-28. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsei/30/4/30_14-064/pdf (査読有)

馬場恒子, 野阪美貴子, 西内由紀子. バイオカップ麺に含まれる飽和脂肪酸およびトランス脂肪酸の分析 J. Fac. Human Sci. Kobe Shoin Womens Univ. 2015. 4 1-9. <http://id.nii.ac.jp/1044/00001666> (査読有)

Tsuda, S., Yoshiya, T., Mochizuki, M., Nishiuchi, Y. Synthesis of cysteine-rich peptides by native chemical ligation without use of exogenous thiols. *Org. Lett.*, 2015. **17**, 1806-1809. Doi: 10.1021 (査読有)

Nishiuchi, Y, Tamaru, A., Suzuki, Y., Kitada, S., Maekura, R., Tateishi, Y., Niki, M., Ogura H., Matsumoto S. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J. Water Health. 2014. 12(2)211-9. Doi:10.2166/wh.2013.007 (査読有)

Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nishiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino Y, Yoo H, Park YK, Saito H, Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in

Mycobacterium avium subsp. *hominissuis*. Infect. Genet. Evol. 2014. 21, 479-483. Doi: 10.1016 (査読有)

西内由紀子、松本壮吉. 抗酸菌の細菌学的特徴と病原性. 感染症内科 2014. 2, (1) 8-14 2, (1) 8-14 (査読無).

Mochizuki, M., Taichi, M., Hibino, H., Takuwa, A., Yoshida, T., Ohkubo, T., Nishiuchi, Y. Chemical synthesis of human adiponectin(19-107) bearing post-translational glycosylation. *Tetrahedron Lett.*, 2014. 55, 3073-3076. Doi:10.1016 (査読有)

Fukuda, T. Matsumura, T. Ato, M. Hamasaki, M. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, Y. Yoshimori, T. Matsumoto, S. Kobayashi, K. Kinoshita, T. Morita, Y.S. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *mBio* 2013. 4(1) e00472-12. Doi: 10.1128 (査読有)

Nagata, S., Hatakeyama, K., Asami, M., Tokashiki, M., Hibino, H., Nishiuchi, Y. Kuwasako, K., Kato, J., Asada, Y., Kitamura, K. Big angiotensin-25: A novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013. 441, 757-762. Doi: 10.1016 (査読有)

〔学会発表〕(計 18 件)

Nishiuchi, Y. Pathogenic slow growers—environmental niches and biofilm formation—. ASM Microbe 2016. Symposium “Non-tuberculous mycobacteria” 招待講演. 2016.6.18 ボストン (アメリカ). 予定

西内由紀子、立石善隆、金子幸弘、松本壮吉. 非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成における細胞壁糖脂質の役割. 第 91 回日本結核病学会 2016.5.26 石川県立音楽堂/ホテル日航金沢 (石川県金沢市)

尾関 百合子, 山口 雄大, Shymaa Enany, 五十嵐 雅之, 西内由紀子, 岡 真優子, 岩本 朋忠, 小椋 義俊, 林 哲也, 立石 善隆, 西山 晃史, 松本 壮吉. ルシフェラーゼ発現リコンビナント BCG による新規結核薬の迅速スクリーニング系の確立と実践. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016.3.23 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

岩本 朋忠, 矢野 大和, 西内由紀子, 有川 健太郎, 中島 千絵, 鈴木 定彦, 丸山 史人. *Mycobacterium avium* の系統分岐に伴う大規模なゲノム構造の変化. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016.3.25 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

西内由紀子, 戸谷孝洋, 立石善隆, 金子幸弘, 松本壮吉. 非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成における Glycopeptidolipid の役割. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016.3.24 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

有川健太郎、岩本朋忠、西内由紀子. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016.3.24 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

Nishiuchi, Y., Totani, T., Tateishi, Y., Kaneko, Y., Matsumoto, S. Characteristics of nontuberculous mycobacterial biofilm formation. US-JAPAN Cooperative Med. Sci. Prog. 2016.1.13. ベセスダ(アメリカ).

西内由紀子, 前倉 亮治. 浴室より分離された *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* のバイオフィルム形成における環境因子の検討. 第 46 回 結核・非定型抗酸菌症治療研究会. 2015.12.6 笹川記念会館 (東京都港区)

Nishiuchi, Y. Diversity in Mycobacteria: Distribution, host, morphology and genome. symposium Microbial pathogen ecology—Life is beautiful— 招待講演. 第 30 回 日本微生物生態学会 2015.10.18 土浦亀城プラザ (茨城県土浦市)

西内由紀子, 戸谷孝洋, 金子幸弘, 松本壮吉. バイオフィルム形成と環境中気体組成. 第 29 回 バイオフィルム学会 2015.7.10 ホテル竹島 (愛知県蒲郡市)

西内由紀子, 金子幸弘, 松本壮吉. 環境から分離した非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成促進因子. 第 90 回日本結核病学会. 2015.3.28 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

金子幸弘, 井上学, 仁木満美子, 西内由紀子, 松本壮吉, 掛屋弘. 結核免疫に及ぼす血清脂質の影響. 第 90 回日本結核病学会. 2015.3.28 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

戸谷孝洋, 西内由紀子, 金子幸弘, 松本壮吉. *M. avium* のバイオフィルム形成時の特徴. 第 88 回日本細菌学会総会. 2015.3.27 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

戸谷孝洋, 西内由紀子, 北中博美, 金子幸弘, 松本壮吉. 非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成時の特徴. 第 28 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会. 2014.7.9 都市センターホテル (東京都千代田区)

戸谷孝洋, 西内由紀子, 松本壮吉. 非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* のバイオフィルム形成解析. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014.3.26 タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

戸谷孝洋, 西内由紀子. 非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成解析. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会. 2013.11.16 大阪大学微生物研究所 (大阪府吹田市)

Nishiuchi, Y., Matsumoto, S. *Mycobacterium avium* infects human erythrocytes in vitro. US-JAPAN Cooperative Med. Sci. Prog. 2013.8.17 (北海道札幌市)

戸谷孝洋, 西内由紀子, 松本壮吉. 非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成因子.

第27回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術
集会. 2013.7.12 東京ガーデンパレス
(東京都文京区)

〔図書〕(計 1 件)

西内由紀子. 非結核性抗酸菌とバイオフィ
ィルム - お風呂は感染源か? 倉島篤行/小川
賢二 編. 肺 MAC 症 診療 UP to Date 2013.
南江堂. 259 (41-44)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departmen
ts/toshi-toneyama.shtml](http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departmen
ts/toshi-toneyama.shtml)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西内 由紀子 (NISHIUCHI, Yukiko)
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 00333526

(2) 研究分担者

西内 祐二 (NISHIUCHI, Yuji)
大阪市立大学・大学院医学研究科・学外研
究員
研究者番号: 30132814

松本 壮吉 (MATSUMOTO, Sohkiichi)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 30244073