

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450110

研究課題名(和文)細菌のトキシン-アンチトキシン遺伝子群のバイオフィーム形成における役割

研究課題名(英文)The role of bacterial toxin-antitoxin genes on biofilm formation

研究代表者

中島 信孝(Nobutaka, Nakashima)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70357622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィーム(生物膜)とは、微生物が細胞外多糖などと共に、界面や固体物表面に高密度に存在している構造体を示す。本申請では、バイオフィームの形成と抗生物質に抵抗性を示すために重要な役割を果たしている、細菌のトキシン-アンチトキシン(TA)遺伝子群について、分子生物学の手法を用いて研究した。その結果、トキシン遺伝子の機能が相当部分で重複していて、バイオフィーム形成に複雑に寄与していることが示唆された。さらにトキシン遺伝子の活性化によって、バイオフィーム形成に関与する遺伝子が発現変動していることも判明した。

研究成果の概要(英文)：Biofilm is a structure in which microorganisms are present at high density on the interface and solid surface together with extracellular polysaccharides etc. In this application, we studied the bacterial toxin - antitoxin (TA) gene system playing an important role in biofilm formation and acquisition of resistance to antibiotics using molecular biology techniques. As a result, it was suggested that the function of the toxin gene overlapped in a substantial part and contributed to biofilm formation. Furthermore, it was revealed that the expression of the gene involved in biofilm formation is differentially regulated following the activation of the toxin gene.

研究分野：微生物学

キーワード：バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

研究目的(概要)

バイオフィーム(生物膜)とは、微生物が細胞外多糖などと共に、界面や固体物表面に高密度に存在している構造体を示す。バイオフィームは、食品の腐敗、医療器具(カテーテルなど)の汚染、人体組織表面(歯など)における疾病の原因となることが知られている。また、バイオフィーム内の微生物は抗生物質や各種化学物質、加熱に対して抵抗性を示し、その除去が困難である。そこで、有効な除去法の開発にむけた、バイオフィームに関する基礎研究が必要である。

本申請では、バイオフィームの形成と抗生物質に抵抗性を示すために重要な役割を果たしている、細菌のトキシン-アンチトキシン(TA)遺伝子について、分子生物学の手法を用いて研究する。

2. 研究の目的

バイオフィームは、発酵工業の分野などでは人類に対して有益なこともあるが、食品や医療の分野で負の面も多く持ち合わせる。従って、バイオフィーム形成を自由に調節する方法や、完全に除去する方法を開発する必要があるが、その形成過程や微生物細胞以外の包含物質に不明な点も多く、方法を確立するための障壁となっている。それでも近年、細菌のTA遺伝子がバイオフィーム形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、注目されている。

TA遺伝子とは、細菌が天然にゲノム上に持つもので、ほとんどの場合でトキシン遺伝子(T遺伝子)とアンチトキシン遺伝子(A遺伝子)が近接して存在している。T遺伝子はその名の通り、細胞に毒性のあるタンパク質(以下、pTとする)をコードしている。一方、A遺伝子はpTを中和する抗毒素タンパク質(以下、pAとする)か、T遺伝子mRNAに対するごく短いアンチセンスRNAをコードしている。A遺伝子がpAをコードする場合、両遺伝子がオペロンとして転写されるものが非常に多い。細菌が盛んに増殖している状況下では、pTはpAと複合体を形成しており、pTの毒性は発揮されない。しかし、細胞が抗生物質にさらされた場合や、アミノ酸飢餓に陥った場合など特定の状況下では、pAがプロテアーゼによる分解を受け、pTが毒性を発揮し、細胞は増殖を停止するか細胞死を起こす。アンチセンスRNAの場合は、pTの発現をサイレンシングしていると予想されているが、まだ解析があまり進んでいない。

TA遺伝子の存在は細胞にとって、ある種の「時限爆弾」を抱えているようにも見える。しかし驚くべきことに、大腸菌K12株はゲノム上に少なくとも36対ものTA遺伝子を持つ(Yamaguchi and Inouye, 2011, Nat Rev Microbiol 9:779-)。TA遺伝子は、細胞が増殖に適さない状況にある時、pTを機能させて一時的に休眠状態にし、外部環境に耐える

バイオフィームなどの細胞状態を作り出すために存在すると考えられる。あるいは、細胞群集の一部を死や溶菌に追いやり、群集全体の利益を確保しているとも考えられる。他にもTA遺伝子の考えられる機能として、「利己的な遺伝子」「ゲノムの安定化機構」「ファージへの感染防御機構」などが挙げられている。

大腸菌のTA遺伝子に関して、以下の現象が知られている(Wang and Wood, 2011, Appl Environ Microbiol 77:5577-)。(1) T遺伝子のmqsRは、浮遊細胞に比べてバイオフィーム内の固着細胞での発現が亢進している、(2) T遺伝子のいくつかは、欠損することでバイオフィーム形成が抑制され、過剰発現されるとバイオフィーム形成が亢進する、(3) T遺伝子であるyafQが欠損した細胞では、野生型細胞に比べて、静菌的抗生物質にさらされた時2,000倍多く細胞死に至る。これら3つのことから、TA遺伝子がバイオフィーム形成や、バイオフィーム内での抗生物質耐性機構に深く関わっていることが示唆されるが、その解析はまだ始まったばかりで不明な点も多い。特に、36ものTA遺伝子がゲノム中に存在しており、機能が相当重複していること、また、T遺伝子の毒性があまりに高く、プラスミドベクターへのT遺伝子単独でのクローニングが困難、などの理由で解析が進まないことがある。そこで本申請では、大腸菌TA遺伝子群のバイオフィーム形成における役割を知るために、アンチセンスRNAを用いた遺伝子サイレンシング法によって、TA遺伝子群を包括解析する。

3. 研究の方法

アンチセンスRNAを用いたA遺伝子サイレンシング法(後述)と、T遺伝子の過剰発現法によって、TA遺伝子がバイオフィームに与える影響を包括的に解析した。大腸菌が持つ36対のTA遺伝子の内、比較的研究が進んでいるtypeIIの19遺伝子に絞って研究を行なった。

本申請者らは2006年から2009年にかけて、発現ベクターからアンチセンスRNAを誘導的に発現させることによって、大腸菌の遺伝子発現をコンディショナルに高効率でサイレンシングする方法を発表している(Nakashima et al, 2006, Nucleic Acids Res 34:e138、Nakashima and Tamura, 2009, Nucleic Acids Res 37:e103)。アンチセンス法では、標的mRNAに相補的な配列を持つアンチセンスRNAを発現させ、標的mRNAにハイブリダイズさせる。これによって標的mRNAは翻訳が妨げられ、RNaseによる分解を受けやすくなる。本法は、増殖に必須な遺伝子に対しても適用可能で、かつ作業が迅速で包括解析に向いている。本申請者らの開発した方法では、アンチセンスRNAの形状が工夫されており、従来法よりも20倍以上効率よくサイレンシングすることができる。

次いで、RNA-seq によって、T 過剰発現後のトランスクリプトーム解析を行ない、どのような発現変化が起こるか検証した。

4. 研究成果

初年度はまず、大腸菌 K12 の II 型トキシン遺伝子を過剰発現するベクター19 個を作成した。作成の元となったベクターは、ドキシサイクリンにて発現誘導が可能なベクターpHN1271 である。作成したベクターを大腸菌 K12 に導入し、過剰発現させたところ、目論見通り多くの遺伝子で生育阻害がみられた。当初予定では、アンチトキシン遺伝子に対する、アンチセンス RNA サイレncシングによって同様の表現型を生成する予定であったが、残念ながら抑制効率の問題だろうが、予想通りの表現型を生成できず、代替として上記のような過剰発現によることとなった。

次いで、上記の過剰発現がバイオフィルムに対してどのような影響をおよぼすかどうかについて検討した。バイオフィルム形成の実験条件については、様々な培養容器(つまりバイオフィルムを形成させる表面)を用意し、最もバイオフィルム形成能が優れているプラスチック製のマイクロタイタープレートを探しだした。予想通り、いくつかの遺伝子でバイオフィルム形成に正の影響が現れた。

2 年目は、それらベクターで T 遺伝子を過剰発現し、細胞を半致死状態に置いた時に、どのような大腸菌宿主遺伝子がどのような発現調節を受けるかを解析した。具体的には、T 遺伝子を過剰発現した細胞としなかった細胞を用意し、双方から mRNA を精製して、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析(RNA-seq)に供した。その結果、多数の遺伝子が T 遺伝子によって発現調節を受けていることが判明した。中でも、ストレス応答因子、セルエンベロープに関する遺伝子が多数調節されていた。また、複数の T 遺伝子で共通して発現調節される遺伝子が多数存在していたことから、T 遺伝子の機能が相当部分で重複している可能性が示唆された。

3 年目は、RNA-seq のデータをバイオフィマティクスの技法により詳細に解析した。その結果、通常の大腸菌と比較して、T 遺伝子を過剰発現させた大腸菌ではバイオフィルムの形成量が増加あるいは変化しないに関わらず、膜タンパク質や膜輸送タンパク質をコードする遺伝子の発現量が増加している事が分かった。加えて、T 遺伝子の過剰発現によってバイオフィルムの形成量が増加しない大腸菌においては、酸化還元酵素をコードする遺伝子の発現量も増えていることが分かった。これは、バイオフィルム内外で大腸菌同士が細胞間シグナルを伝達する為に、膜タンパク質や酸化還元酵素が活発に発現しているのではないかと考えられる。

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 1 件)

1. Nakamura Y, Yamamoto N, Kino Y, Yamamoto N, Kamei S, Mori H, Kurokawa, K, Nakashima N. Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016 100(16):7263-7279. 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 中村 祐哉, 山元 奈緒, 木野 裕太, 森 宙史, 中島 信孝 バイオフィルム形成時、非形成時の時系列遺伝子発現変動の解析 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 2016 年 03 月 03 日 東京

2. 赤嶺 佑佳, 木村 達哉, 中村 祐哉, 森 宙史, 黒川 顕, 中島 信孝 川崎工科高等学校の土壌に潜む微生物種の解析 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 2016 年 03 月 04 日 東京

3. 亀井 翔太, 中島 信孝, 黒川 顕 大腸菌 toxin-antitoxin 遺伝子群のバイオフィルム形成における役割の解析 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 2016 年 03 月 04 日 東京

4. 木野 裕太, 中島 信孝 アンチセンス核酸による配列特異的な殺菌 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 2016 年 03 月 03 日 東京

5. 木野 裕太, 黒川 顕, 中島 信孝 アンチセンス核酸による微生物群集での特異的な殺菌 日本微生物生態学会 2015 年 10 月 18 日 茨城・土浦

6. 中村 祐哉, 森 宙史, 黒川 顕, 中島 信孝 環境試料 RNA の大量シーケンシングと経時解析による有用遺伝子の大規模検索 第 67 回 日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26 日 鹿児島・鹿児島

7. 中村 祐哉, 森 宙史, 黒川 顕, 中島 信孝 環境試料 RNA の大量シーケンシングと経時解析による有用遺伝子の大規模検索 日本農芸化学会 2016 年度札幌大会 2016 年 03 月 30 日 札幌

8. 中島 信孝, 秋田 紘長, 星野 保 大腸菌における遺伝子発現の低コスト化と生育必須遺伝子の操作方法 第 67 回 日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26 日 鹿児島・鹿児島

9. Nobutaka Nakashima. Discovery of

valuable genes by massive sequencing and time lapse analysis of environmental RNAs.

日本生物工学会年会（招待講演）（国際学会）

2016年09月30日 富山・富山

10. 木野 裕太, 中島 信孝 アンチセンス核

酸による配列特異的な殺菌 日本生物工学会

年会 2016年09月29日 富山・富山

11. 中村 祐哉, 森 宙史, 黒川 顕, 中島

信孝 環境試料 RNA の大量シーケンシング

と経時解析による有用遺伝子の大規模検索

日本生物工学会年会 2016 年 09 月 29 日 富

山・富山

12. 山元 奈緒, 中島 信孝 新規抗生物質の

開発に向けた微生物群集の単離培養を伴わ

ないスクリーニング手法の確立 日本生物工

学会年会 2016 年 09 月 30 日 富山・富山

13. Nobutaka Nakashima. Microbial

production of valuable compounds and

microbial diversity. The Korean Society

for Microbiology and Biotechnology Annual

Meeting（招待講演）（国際学会）2016 年 06

月 23 日 韓国・太田

14. 早川 聖香, 加藤 碧, 中村 祐哉, 森

宙史, 中島 信孝, 根塚千晶 土壌微生物叢の

経年及び外部刺激による変化 ゲノム微生物

学会年会 2017 年 03 月 02 日 神奈川・藤沢

15. 伊藤 匡志, 新堀 将也, 山元 奈緒,

森 宙史, 中島 信孝, 根塚千晶 抗生物質を

産生する土壌微生物の検出 ゲノム微生物学

学会年会 2017 年 03 月 02 日 神奈川・藤沢

16. 中島 信孝, 中村 祐哉, 山元奈緒 微生物

を集団として解析し、利用する デザイン

生命工学研究会（招待講演） 2017 年 03 月

21 日 神戸

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 信孝（Nakashima Nobutaka）

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70357622

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()