

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861593

研究課題名(和文) 菌体外マトリックス関連遺伝子がバイオフィルムの抵抗性に及ぼす影響の検索

研究課題名(英文) Evaluation on the effect of extracellular matrix-related gene on the resistance of biofilm

研究代表者

山本 れいこ (Yamamoto, Reiko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：70636133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は *Porphyromonas gingivalis* 等の微生物によるバイオフィルム形成が原因の口腔感染症である。先行研究では、最小発育阻止濃度以下のマクロライド系抗菌薬が *P. gingivalis* バイオフィルムを減少させること、さらに、枯草菌の遺伝子 *sinR* のオルソログ PGN_0088 が *P. gingivalis* バイオフィルムの菌対マトリックスの構成要素のうちの糖成分の合成を抑制することを報告した。本研究では、この遺伝子による菌体外マトリックス中の糖成分の減少が、マクロライド系抗菌薬のバイオフィルム内の浸透率やバイオフィルムの機械的強度に影響を及ぼすことを解明した。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a serious oral infection that is initiated by the formation of biofilms by *Porphyromonas gingivalis*. Our previous studies revealed that subminimal inhibitory concentrations (subMIC) of two macrolide antibiotics (azithromycin, AZM and erythromycin, ERY) reduced *P. gingivalis* biofilms. Furthermore, we demonstrated that the *Bacillus subtilis* *sinR* orthologue (PGN_0088) inhibits the synthesis of carbohydrates that are components of EPS in *P. gingivalis* biofilms. Here, we constructed a novel *sinR* mutant from *P. gingivalis* ATCC 33277 and reveal that the increased abundance of carbohydrate in extracellular polymeric substances (EPS) of the mutant led to a reduced infiltration rate of AZM and ERY through EPS, and consequently elevated biofilm resistance to these macrolides. Detailed elucidation of the interaction between the product of the *sinR* gene and EPS will assist in the development of novel approaches that target EPS to prevent and inhibit the formation of biofilms.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 バイオフィルム *Porphyromonas gingivalis* 菌体外マトリックス 糖 マクロライド系抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームとは固体と液体、あるいは気体の界面に形成される微生物集落のことで、バイオフィーム中の微生物は自身で産生した菌体外マトリックスに被覆されている。歯や口腔軟組織に形成されたバイオフィームはう蝕や歯周炎などの口腔感染症の主因であり、歯科領域と密接な関わりを持つ。また、難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外からは頻りにバイオフィームが検出され、根尖性歯周炎の難治化にはこの根尖孔外バイオフィームが関与していることが明らかとなった (Noiri *et al*, *J Endodon* **28**, 679-83, 2002)。そして、偏性嫌気性のグラム陰性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* が難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外バイオフィームから高頻度で同定され、根尖性歯周炎の難治化に強く関与することが明らかとなった (Noguchi *et al*, *Appl Environ Microbiol* **71**, 8738-43, 2005)。本菌は、重度辺縁性歯周炎患者の歯周ポケット全域より検出されることが報告されており (Noiri *et al*, *J Periodont Res* **80**, 1930-34, 1997, *J Dent Res* **83**, 941-5, 2004)、辺縁性歯周炎の病原性細菌の 1 種として病態形成に重要な役割を果たしている。

菌体外マトリックスに被覆され、浮遊細菌とは異なる遺伝子発現を示すバイオフィーム形成細菌は抗菌薬に対して抵抗性を示し (Stewart *et al*, *Lancet* **358**, 135-8, 2001)、機械的除去が難しい部位に形成されたバイオフィームの制御を困難なものにしている。緑膿菌のバイオフィーム細菌と浮遊細菌の遺伝子発現をマイクロアレイ法により比較した結果、約 1% の遺伝子の発現量に有意差があることが報告され、細菌は棲息様式の相違により種々の遺伝子発現を変化させることが示された。近年、バイオフィーム細菌と浮遊細菌の遺伝子発現の相違に着目し、遺伝子工学的知見に基づいたバイオフィームの制御を目指した研究が行われている。申請者のグループも、*P. gingivalis* のうち全ゲノム解析が終了した ATCC 33277 株を用いてバイオフィーム形成細菌の遺伝子発現を経時的に解析し、バイオフィーム形成の後期 (9-14 日) にバイオフィーム形成量が顕著に増加し、その時期に一致して発現変動遺伝子の数が最多となることを明らかにした (Yamamoto *et al*, *Appl Environ Microbiol* **77**, 6733-6, 2011)。

バイオフィーム形成後期に発現が顕著に減少した遺伝子の 1 つ PGN_0088 は、グラム陽性菌 *Bacillus subtilis* でバイオフィーム形成において菌体外マトリックス産生を制御していることが報告されている *sinR* (Lopez *et al*, *FEMS Microbiol Rev* **33**, 152-63, 2009) のオルソログである。申請者らは PGN_0088 の欠損株を通法に従い作製してバイオフィームを形成させて野生株と比較

することにより、PGN_0088 は菌体外マトリックス中の糖成分の合成を抑制することを見出した (Yamamoto R *et al*, *PLoS One* **8**, e56017, 2013)。一方、*P. gingivalis* のバイオフィーム中の菌体外多糖の割合と、バイオフィームの超音波刺激に対する抵抗性の間には関連性があることを示唆する報告 (Kuboniwa *et al*, *BMC Microbiol* **9**, 105, 2009) や、バイオフィーム形成細菌は自身が産生する菌体外マトリックスに被覆されることにより抗菌薬の菌体への浸透を阻害し、そのことがバイオフィーム形成細菌が抗菌薬に対して抵抗性を示す原因の 1 つであると推定する報告 (Stewart *et al*, *Lancet* **358**, 135-8, 2001) などから、物理的・化学的刺激に対するバイオフィームの抵抗性には、菌体外マトリックスの構成成分が何らかの影響を与えていると推察される。しかしながら、PGN_0088 による菌体外マトリックス中の糖成分の変化がバイオフィームの抵抗性に具体的にどのように作用しているのかについては未だ不明である。

2. 研究の目的

PGN_0088 の菌体外マトリックスに対する作用に着目して新規のバイオフィーム制御法を開発するため、先行研究 (Yamamoto R *et al*, *PLoS One* **8**, e56017, 2013) とは異なる耐性カセットの挿入により PGN_0088 の欠損株を作製してバイオフィームを形成させて野生株と比較することにより、菌体外マトリックス中の糖成分の変化がバイオフィームの物理的・化学的抵抗性に及ぼす影響について検索する。

3. 研究の方法

1) PGN_0088 欠損株および相補株の作製

P. gingivalis ATCC 33277 株の PGN_0088 の上流配列および下流配列の間にクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) を挿入したプラスミドをエレクトロポレーション法により ATCC 33277 株に導入し PGN_0088 欠損株を作製した。また、遺伝子機能について確認するため、シャトルベクターである pTCB (Nagano *et al*, *J Med Microbiol* **56**, 2007) に PCR を用いて増幅した *P. gingivalis* ATCC 33277 株の PGN_0088 配列を挿入したプラスミドを構築後、上記の欠損株に接合伝達法を用いて導入することにより相補株を作製した。

2) PGN_0088 による糖成分抑制作用の確認

上記 1) 項で作製した PGN_0088 欠損株および相補株の性状が、先行研究 (Yamamoto *et al*, *PLoS One* **8**, e56017, 2013) と相違ないかを以下の方法で確認した。

a) バイオフィームの微細形態学的観察と定量的解析

野生株および上記 1) 項で作製した PGN_0088 欠損株と相補株の菌液を用いてバイオフィルムを形成し、一部の試料は走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-6390LV; 日本電子社製、現有設備) および透過型電子顕微鏡 (TEM, H-7650; 日立社製、現有設備) 観察に供した。さらに、残りの試料のバイオフィルム中のタンパク質及び糖の濃度を、BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific 社製)、およびフェノール硫酸法を用いて測定し、菌体当りのタンパク質及び糖の量を算出した。

b) バイオフィルム構成成分の 3 次元的検索

野生株および上記 1) 項で作製した PGN_0088 欠損株と相補株の菌体を 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen 社製) で染色後、2-a) 項と同一の方法でバイオフィルムを作製し、Fluorescein isothiocyanate で標識した Concanavalin A (Invitrogen 社製) および Wheat germ agglutinin (Invitrogen 社製) で処理することにより菌体外マトリクス中の糖を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM, LSM510; Carl Zeiss 社製、現有設備) 観察に供した後、画像解析ソフト (Image J 1.42q; National Institutes of Health 社製、および Imaris 5.0.1; Bitplane AG 社製、現有設備) にて画像解析を行った。

3) PGN_0088 による糖成分の変化がバイオフィルムの抵抗性に及ぼす影響の検索

a) バイオフィルムの超音波抵抗性の検討

12 穴マイクロプレートを用いて野生株および上記 1) 項で作製した PGN_0088 欠損株と相補株を用いてバイオフィルムを形成し、携帯型超音波発生装置 (Handy Sonic UR-20P; TOMY 社製、現有設備) を用いて超音波を発生させ、処理群の非処理群に対するバイオフィルム残存率を測定した。

b) バイオフィルムの抗菌薬抵抗性の検索

96 穴マイクロプレートを用い、野生株および上記 1) 項で作製した PGN_0088 欠損株と相補株のアジスロマイシン (AZM) および エリスロマイシン (ERY) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) および最小バイオフィルム抑制濃度 (MBIC) を測定した。

c) バイオフィルムへの人工胃液の浸透性の評価

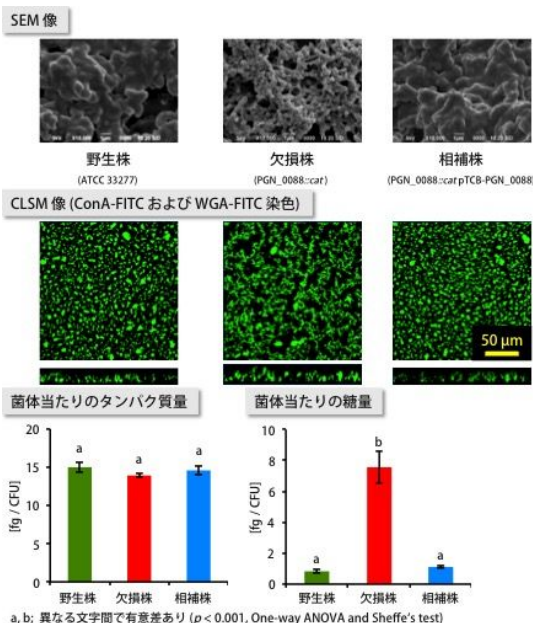
寒天培地に設置した多孔質のメンブランフィルター (直径, 25 mm; 孔径, 0.22 μ m; Millipore 社製) 上に野生株および上記 1) 項で作製した PGN_0088 欠損株と相補株のバイオフィルムを作製した。バイオフィルムが付着したメンブランフィルターを 0、30、あるいは 250 mg/ml の AZM または ERY 含有した寒天培地上に設置し、その上に多孔質のメンブランフィルター (直径, 13 mm; 孔径, 0.22 μ m; Millipore 社製) とペーパー

ディスク (直径, 6.35 mm; 厚さ, 0.8-0.9 mm; Difco 社製) を置き、37 $^{\circ}$ C 微好気的条件下で 2 時間培養した。その後、フィルターおよびバイオフィルムを介して人工胃液が浸透したペーパーディスクを回収し、*P. gingivalis* ATCC 33277 株の培養液を塗抹した寒天培地上に設置し、37 $^{\circ}$ C 嫌気的条件下で 3 日間培養し、形成された阻止円の半径を測定した。

4. 研究成果

1) PGN_0088 による糖成分抑制作用の確認

SEM 観察において、欠損株のバイオフィルムは野生株および相補株に比べ、起伏に富んだ構造をしていた (下図)。また、CLSM 観察では、欠損株のバイオフィルムは網目様の糖構造を示した (下図)。さらに、バイオフィルム中の菌体当りの糖成分の量は欠損株において、野生株および相補株と比べて有意に増加した (下図)。



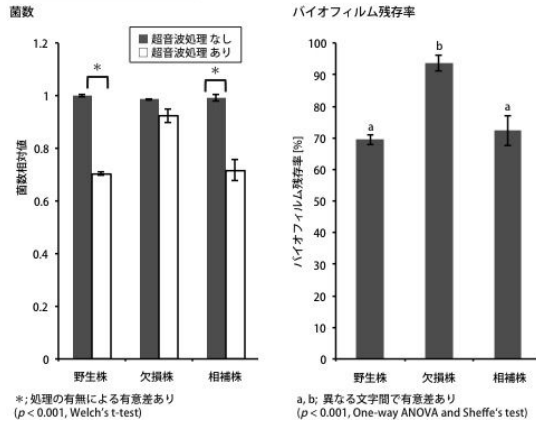
これらの結果より、PGN_0088 欠損株作製に用いる耐性カセットを、*ermF* (先行研究 (Yamamoto *et al*, *PLoS One* 8, e56017, 2013) で使用) から *cat* (本研究で使用) に変更しても、欠損株の性状には影響しないことが確認できた。

2) PGN_0088 による糖成分の変化がバイオフィルムの抵抗性に及ぼす影響の検索

a) バイオフィルムの超音波抵抗性の検討

欠損株は野生株および相補株に比べ、超音波処理群の非処理群に対するバイオフィルム残存率が有意に高く (次頁左上図)、欠損株におけるバイオフィルム中の糖成分の増加がバイオフィルムの物理的抵抗性を促進していると推察された。

超音波に対する抵抗性の検討



b) バイオフィルムの抗菌薬抵抗性の検索

AZM および ERY に対する MIC は全菌株においてそれぞれ 0.5 および 0.25 $\mu\text{g/ml}$ となり (下図)、浮遊細菌において *cat* の挿入によるマクロライド系抗菌薬に対する耐性獲得は起こらないことが確認できた。一方、野生株や相補株よりも糖成分の多い欠損株において、AZM および ERY に対する MBIC はそれぞれ 0.25, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ となり、野生株および相補株 (両菌株ともそれぞれ 0.125, 0.0625 $\mu\text{g/ml}$) と比較して高い値を示し (下図)、PGN_0088 遺伝子の欠損によるバイオフィルム中の糖成分の増加が、マクロライド系抗菌薬に対する抵抗性を亢進させていると推察された。

MICs			
	野生株 (ATCC 33277)	欠損株 (PGN_0088::cat)	相補株 (PGN_0088::catPTCB-PGN_0088)
AZM	0.5	0.5	0.5
ERY	0.25	0.25	0.25

($\mu\text{g/ml}$)

MBICs			
	野生株 (ATCC 33277)	欠損株 (PGN_0088::cat)	相補株 (PGN_0088::catPTCB-PGN_0088)
AZM	0.125	0.25	0.125
ERY	0.0625	0.125	0.0625

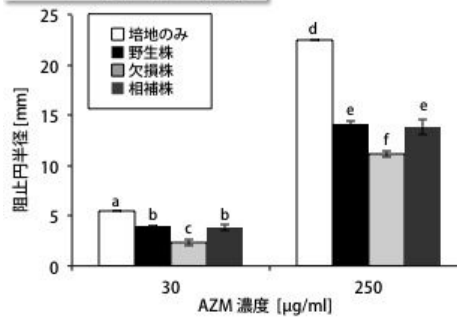
($\mu\text{g/ml}$)

c) 浮遊細菌およびバイオフィルムへの人工胃液の浸透性の評価

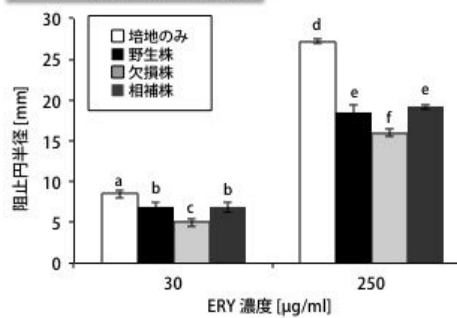
培地の場合および全菌株において、0 $\mu\text{g/ml}$ の AZM および ERY に対する阻止円は形成されなかった(データ示さず)。

30, 250 $\mu\text{g/ml}$ の AZM および ERY に対する阻止円半径は全菌株において培地の場合と比較して有意に低下しており (右上図)、バイオフィルムの存在によりマクロライド系抗菌薬の浸透率が低下することが示唆された。さらに、今回遂行した全ての条件において、欠損株の阻止円半径は野生株および相補株と比較して有意に低下し、(右上図)、PGN_0088 遺伝子の欠損によるバイオフィルム中の糖成分の増加が、マクロライド系抗菌薬のバイオフィルム内の浸透率を低下させていると推察された。

AZM のバイオフィルム浸透性



ERY のバイオフィルム浸透性



a-f; 異なる文字間で有意差あり (p < 0.001, One-way ANOVA and Sheffe's test)

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 4 件)

1) 山本れいこ, 野村由一郎, 高橋直紀, 山崎和久, 恵比須繁之, 林美加子: *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムは人工胃液耐性を有する. *Bacterial adherence & Biofilm*, 査読無, *in press*, 2015.

2) Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S, Hayashi M: Inhibition of polysaccharide synthesis by the *sinR* orthologue PGN_0088 is indirectly associated with the penetration of Porphyromonas gingivalis biofilms by macrolide antibiotics. *Microbiology*, 査読有, **161**: 422-429, 2015.

3) Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono H, Nakano T, Hayashi M, Ebisu S: Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Appl Environ Microbiol*, 査読有, **80**: 3804-3810, 2014.

4) Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S: Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol*, 査読有, **116**: 1164-1171, 2014.

〔学会発表〕(計 1 件)

1) **山本れいこ**，野杵由一郎，高橋直紀，山崎和久，恵比須繁之，林美加子：
Porphyromonas gingivalis バイオフィルムは人工胃液耐性を有する．第 29 回日本バイオフィルム学会学術集会，07，蒲都市，2015 年 7 月．

6．研究組織

(1)研究代表者

山本れいこ (Yamamoto,Reiko)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号：70636133