バイオフィルムの形成メカニズムの理解と制御

杉本　真也

バイオフィルムとは，微生物が動植物や人工物などの表面に付着して形成する構造体であり，微生物が自身の産生する細胞外マトリクスに覆われながら形成される．近年，地球上の微生物の大部分がバイオフィルムを形成して生存していることが明らかとなってきており，その生態学的・生物工学的重要性に注目が集まっている[1]．自然界では，土壌，河川および湖沼の底泥，植物の根圏などに存在し，炭素や窒素などの元素の循環に重要な役目を果たしている．また，バイオフィルムは，排水処理・海洋の石油汚染分解・土壌の浄化・発酵食品の製造などに利用されている．一方，金属の腐食・配水管の汚染・船底の生物汚損など，人類の営みに悪影響をもたらすことも知られている．特に，医学・歯学領域では，バイオフィルムによる医療器具の汚染や歯垢の形成がさまざまな感染症や疾患の原因となり，問題視されている[2]．バイオフィルムの内部の微生物は，代謝活性が著しく低下した状態になり，加えて，細胞外マトリクスのバリア機能により，抗菌物質や宿主免疫に耐性を示す．そのため，バイオフィルムがカテーテルやペースメーカーなどの医療器具の表面に形成されると，難治性の感染症を引き起こす．このようなバイオフィルムに起因する種々の問題に対処するためには，第一に，バイオフィルムの形成メカニズムを十分に理解し，次に，それをもとにして重要な成分を狙い撃ちにするといった対策を立てることが重要だと考えられる．本稿では，黄色ブドウ球菌と大腸菌のバイオフィルム形成のメカニズムと制御法について，近年得られた筆者らの成果を紹介したい．

バイオフィルムと細胞外マトリクス

細胞外マトリクスの構成成分と機能　バイオフィルムにおいて，微生物を包み込む細胞外マトリクスは，主に微生物自身が細胞外に産生する細胞外ポリマー（extracellular polymeric substances，EPS）によって構成される[3]．さまざまな菌種において共通するEPSとして，細胞外多糖・タンパク質・細胞外DNA（extracellular DNA，eDNA）が知られている．これらの組成は，菌種レベルだけでなく，菌株レベルでも大きく異なり，生育環境によっても組成が変化する．細胞外マトリクスは，菌体同士の凝集や固体表面への菌の接着に重要な役割を果たす．

細胞外マトリクスの解析法の開発　細胞外マトリクスの組成は，バイオフィルムの性質（強固さや形成量）に深く関与する．そのため，その全容の解明は，バイオフィルムの性状や形成メカニズムを理解するうえできわめて重要である．これまでに，界面活性剤（SDSやTriton X-100）やエチレンジアミン四酢酸などを用いた細胞外マトリクスの回収法が提案されていたが，これらの方法はバイオフィルムに含まれる微生物の細胞膜を損傷するため，細胞質の成分（細胞質タンパク質・ゲノムDNA・RNAなど）や膜タンパク質を漏出させてしまう．ゆえに，これらの方法では細胞外マトリクスに含まれる成分のみを正確に分析することは困難である．そこで筆者らは，より細胞障害性が低く，簡便で，応用範囲の広い細胞外マトリクス解析法の開発を試みた．細胞外マトリクスに含まれるEPS（細胞外多糖，タンパク質，eDNA）は，主に静電的な相互作用によって菌体表面に結合していると予想されたため，高濃度の塩化ナトリウ

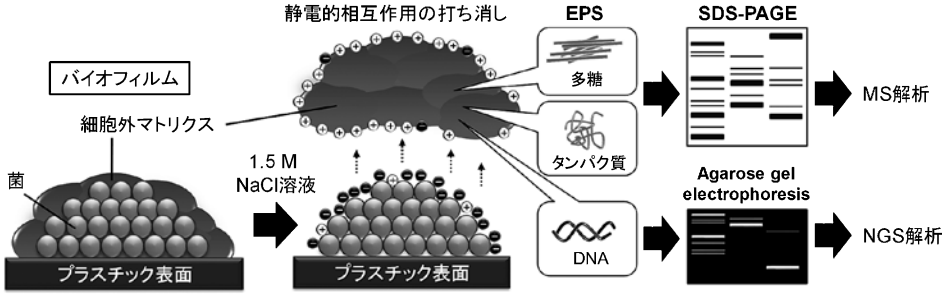

図1．高濃度塩溶液を用いた細胞外マトリクスの回収

著者紹介　東京慈恵会医科大学医学部細菌学講座およびバイオフィルム研究センター　E-mail: ssugimoto@jikei.ac.jp
JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 微生物間相互作用グループ（研究員）

ム水溶液を用いてバイオフィルムを懸濁することで，菌体表面から細胞外マトリクスを剥離することが可能であると考えた．遠心分離によって上清とペレットに分離すれば，細胞外マトリクスは上清画分に回収されるはずである．予想通り，1 M塩化ナトリウム水溶液を用いることで，黄色ブドウ球菌のバイオフィルムから細胞外マトリクスに含まれるタンパク質を回収することに成功した[4]．細胞外マトリクスに含まれたタンパク質は，そのままSDS-PAGEによって解析することが可能であり，プロテインシーケンサーや質量分析器を用いて同定することも可能である．筆者らは，さらに本手法の最適化を行い，1.5 M塩化ナトリウム水溶液を用いることで，溶菌を起こさずに，迅速に，さまざまな菌種（ブドウ球菌，大腸菌，緑膿菌など）のバイオフィルムから複数の細胞外マトリクスの構成成分（eDNA，タンパク質，細胞外多糖）が回収できるようになった（図1）[5]．

黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成メカニズム

黄色ブドウ球菌とバイオフィルム　黄色ブドウ球菌は，グラム陽性球菌であり，ブドウの房状の集塊を形成する．約3割の健常人の鼻腔に生息している常在菌であるが，皮膚化膿症，食中毒，心内膜炎，髄膜炎，敗血症などを引き起こし，ブドウ球菌属の中では病原性が高い菌として知られている．近年では，メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）による院内感染のみならず，若年者を中心とした市中での感染も危惧されている．医療現場では，血管内留置カテーテルや人工関節などの医療器具の表面に形成された黄色ブドウ球菌のバイオフィルムが，難治性の感染症を引き起こすことがさまざまな診療科において問題となっている．

黄色ブドウ球菌臨床分離株のバイオフィルム形成能　筆者らは，東京慈恵会医科大学付属病院において，患者から分離された23株のMRSAと24株のメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*，MSSA）の合計47株の臨床分離株を用い，バイオフィルム形成能を解析した[6]．まず，ブドウ球菌のバイオフィルムの研究で汎用されているbrain heart infusion（BHI）培地およびtryptic soy broth（TSB）培地を用い，バイオフィルム形成に与えるグルコースと塩化ナトリウムの影響を調べた．バイオフィルムの形成は，96ウェルポリスチレンプレートを用いて37 °C，24時間，静置培養で実施した．プレートの底面に形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色した後，プレートリーダーを用いて吸光度（595 nm）を測定した．その結果，ほとんどの株（47株中42株）のバイオフィルム形成が，グルコースを添加した培地において増加することがわかった．一方，塩化ナトリウム添加時にバイオフィルム形成が増加する株は，MRSAでは23株中1株であったのに対し，MSSAでは24株中15株であった．塩化ナトリウムの添加は，細胞外多糖（polysaccharide intercellular adhesin，PIA）に依存したバイオフィルムの形成を誘導することから[7]，MRSAよりもMSSAのほうがPIAに依存したバイオフィルムを形成しやすいと考えられる．

黄色ブドウ球菌臨床分離株の細胞外マトリクス成分　次に，バイオフィルムの形成に重要な細胞外マトリクスの構成成分を明らかにするために，DNase I，Proteinase K，Dispersin B（PIA分解酵素）に対するバイオフィルムの感受性（バイオフィルム形成が阻害されるか，または，いったん形成されたバイオフィルムが破壊されるか）を調べた．その結果，ほとんどの株のバイオフィルムがDNase Iに感受性を示し，次いでProteinase Kに感受性を示した株も多くみられた．一方，Dispersin Bに感受性を示す株はごく少数であった．さらに，独自に開発した細胞外マトリクスの解析法[5]を用いて，バイオフィル

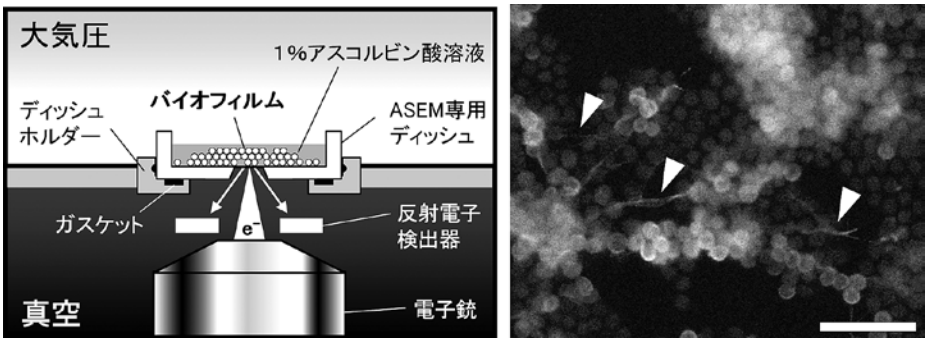

図2．ASEMを用いたバイオフィルムの観察．（左）ASEMの概略図．（右）MRSAバイオフィルムの底面に存在する細胞外DNAの線維構造（矢印：細胞外DNA．スケール：5 μm）．

ムに含まれる成分を調べたところ，すべての株の細胞外マトリクス中に，eDNAが含まれ，その存在量は菌株や培養条件によって異なることを確認した．また，溶液中での電子顕微鏡観察が可能な大気圧走査電子顕微鏡（atmospheric scanning electron microscopy，ASEM）[8]を用いてバイオフィルムの構造を詳細に観察したところ，バイオフィルムの底面にeDNAの線維構造が観察された[9]（図2）．一方，これまで黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成においてもっとも重要だと考えられていたPIAを産生する株は少数であり，一部の株においてNaClの添加によってPIAの産生量が増加することが確認された．これらの結果は，eDNAが固体表面への菌体の付着において，もっとも普遍的で重要な役割を果たすことを示している[6]．今後，より広範なバイオフィルムを阻害・除去するためには，eDNAとPIAなど複数の細胞外マトリクス成分を標的としたバイオフィルム制御法の確立が必要である．

細胞外マトリクス成分のRedundantな機能　従来のバイオフィルムの研究では，特定の遺伝子の欠損株を作製し，親株に対するバイオフィルム形成量の低下を確認することで，バイオフィルム形成に重要な成分（遺伝子）が同定されてきた．一方，細胞外マトリクスの構成成分を出発点として，バイオフィルム形成メカニズムを明らかにしていく研究は稀であった．また，複数の細胞外マトリクス成分の関係性（協調性・相補性・相互作用など）については，よくわかっていなかった．

これまでの研究で筆者らは，MRSA臨床分離株であるMR23株がタンパク質を主成分とする強固なバイオフィルムを形成し，細胞外マトリクスに分泌タンパク質であるExtracellular adherence protein（Eap）を多量に含むことを明らかにしていた[4]．また，精製したEap組換えタンパク質を培地に添加するとバイオフィルム形成が促進されることを見いだしていた．そのため，MR23株のバイオフィルム形成において，Eapが重要な役割を果たすと予想した．しかし，MR23株において*eap*遺伝子を欠損させてもバイオフィルム形成量は低下しなかったことから，MR23株にはEap以外にもバイオフィルム形成に重要な役割を果たすタンパク質が存在すると推察された．そこで，MR23株を親株として種々のバイオフィルム関連遺伝子の欠損株を作製し，バイオフィルム形成量が低下する遺伝子欠損株を探索した．その結果，細胞壁アンカータンパク質の一種である*Staphylococcus aureus* surface protein G（SasG）をコードする遺伝子の欠損は，MR23株のバイオフィルム形成量に影響を与えないが，*eap sasG*二重遺伝子欠損株において，優位にバイオフィルム形成量が低下することを発見した．また，SasGは細胞壁に共有結合した状態でバイオフィルム形成に寄与すること，SasGはeDNAに結合し，eDNAの分解を抑制することを見いだした．次に，共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィルムの構造を観察したところ，野生株やΔ*sasG*株では分厚く凹凸の大きいバイオフィルムが観察されたのに対し，Δ*eap*株では厚く平坦なバイオフィルムが観察され，Δ*eap* Δ*sasG*株では薄く平坦なバイオフィルムが観察された．さらに，ASEMを用いてバイオフィルム形成の初期段階を観察した結果，野生株やΔ*sasG*株では高度に凝集した菌の集塊が固体表面に付着しており，Δ*eap*株やΔ*eap* Δ*sasG*株では分散した状態で表面に付着している様子が観察された．これらの結果は，Eapが菌の凝集を強く誘導することで，複雑なバイオフィルムの構造形成に寄与することを示している．

以上より，EapとSasGはバイオフィルムの形成量を規定するうえではRedundantに機能するが，バイオフィルムの立体構造構築の点では異なる機能を有することがわかった[10]．本知見は，黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成において，細胞外マトリクスを構成する分泌タンパク質と細胞壁タンパク質の関係性を示した初めての報告である．今後，さまざまな菌種のバイオフィルムにおいて，異なる種類の細胞外マトリクス成分の役割やそれらの相互作用の様式などが明らかになり，バイオフィル形成メカニズムをより深く理解できるようになると考えられる．

大腸菌のバイオフィルム形成メカニズムと制御

機能性アミロイドとバイオフィルム　アミロイド線維はβシート構造を多く含む線維状のタンパク質凝集体であり，尿素やSDSのような変性剤に難溶性で，プロテアーゼでも分解されないきわめて安定な構造体である．よって，アミロイド線維が生体内で形成されると分解・除去することは困難であり，アルツハイマー病・プリオン病・ハンチントン病といった重篤な神経変性疾患の発症と深く関わっている．興味深いことに，アミロイド線維は動植物のみならず微生物においても見つかっており，それらの多くは細胞外に作られ，バイオフィルム形成や宿主への感染・定着に重要な役割を果たす．このように何らかの機能を持つアミロイド線維は，疾病に関連するアミロイド線維と対比して，“機能性アミロイド”と呼ばれている．微生物が産生する機能性アミロイドの中で，もっとも研究が進んでいるのが，大腸菌やサルモネラなどの腸内細菌科細菌によって産生されるカーリー（Curli，カーリーヘアに由来する）である[11]．近年の研

究により，カーリーが菌体表面で作られる基本的な仕組みについてはわかってきたが，細菌が誤ってカーリーを細胞の中に作らないように制御する仕組みは謎であった．カーリーのようなアミロイド線維が細胞の中に作られると，毒性が高く，菌の生育が著しく阻害されるため，そのような危機を回避するための制御機構が存在すると予想される．

分子シャペロンDnaKとカーリー　筆者らは，大腸菌の非必須遺伝子欠損株ライブラリーであるKeioコレクション[12]を用いて，カーリーの形成に必須な遺伝子を探索した．カーリーの産生はコンゴーレッドを含むYESCA寒天培地（1 % casamino acids, 0.1 % yeast extract, 2 % agar）を用い，コロニーの色（カーリーを産生する場合は赤，産生しない場合は白～ピンクとなる）や透過型電子顕微鏡（transmission electron microscopy, TEM）を用いて評価した．その結果，細胞質に局在する分子シャペロンDnaKがカーリーの形成に必須であることを見いだした[13]．次に，大腸菌BW25113野生株と*dnaK*欠損株について，カーリーの産生に関わる遺伝子の発現をマイクロアレイやリアルタイムPCRで比較した．その結果，*dnaK*欠損株ではカーリーの産生に関わる*curli-specific gene*（*csg*）遺伝子群（*csgABCDEFG*）の転写量が有意に低下することがわかった．そこで，主に*csgDEFG*オペロンの発現を正に制御する定常期特異的なシグマ因子RpoS（またはσ^S）の総タンパク質量と可溶性タンパク質量を解析した．その結果，*dnaK*欠損株では可溶性のRpoSタンパク質量が顕著に減少することがわかった．また，*dnaK*欠損株では*csgBAC*オペロンの発現を正に制御する転写制御因子CsgDの可溶性タンパク質量も大幅に減少した．PURE System[14]を用いた試験管内タンパク質合成・凝集体形成実験においても，CsgDのフォールディングにDnaKシャペロンシステム（DnaK/DnaJ/GrpE）が重要であることが示された．次に，大腸菌のペリプラズムにおいても蛍光を発するsuper folder GFP（sfGFP）をC末端側に融合したCsgA（CsgA-sfGFP）を用いて，細胞内でのCsgAの局在と凝集体形成を可視化した．BW25113野生株では菌の縁に蛍光が観察され，大部分のCsgA-sfGFPがN末端のシグナル配列が切断された状態でペリプラズムに局在することがわかった．一方，*dnaK*欠損株では，細胞質に多数の輝点が観察され，凝集体が蓄積することがわかった．PURE Systemを用いた解析から，DnaKはCsgAの凝集を抑制するが，別の分子シャペロンであるGroELやSecBは影響しないことがわかった．これらのことから，CsgAはリボソームで合成された後，細胞質で凝集しないようにDnaKによって保護されていると考えられる．さらに，変異体解析，表面プラズモン共鳴解析，およびペプチドスキャン解析の結果，DnaKはCsgAのシグナル配列のうち，特にN末端の数アミノ酸残基を認識して結合することで，細胞質におけるCsgAの凝集を抑制することが示された．以上より，カーリーの形成には，細胞質分子シャペロンDnaKが多面的に機能することが重要であることが明らかとなった[15]（図3）．

DnaKを標的とした新たなバイオフィルム制御法　上記の研究により，DnaKの機能を阻害すれば，カーリーの産生がなくなり，バイオフィルムの形成を抑制できる

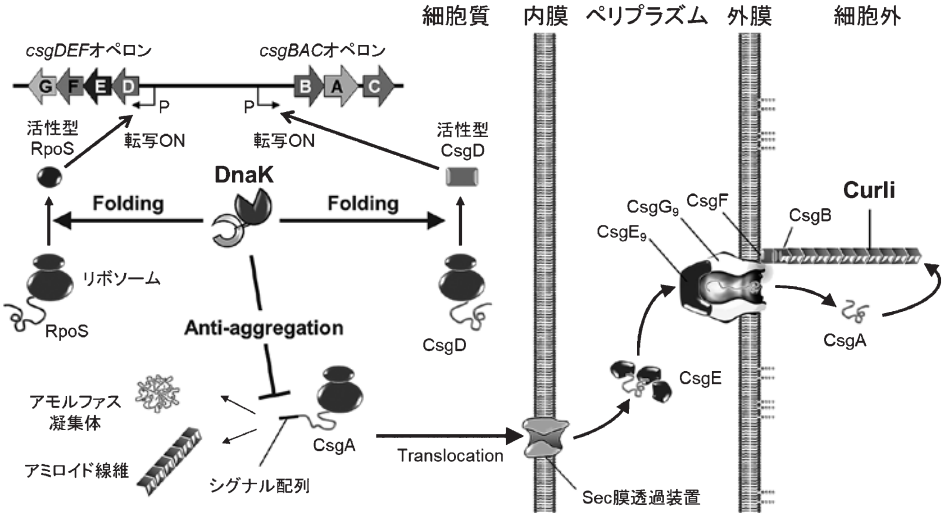

図3．細胞質分子シャペロンDnaKによるカーリー形成の調節機構．DnaKはカーリーの構成因子・輸送体などの遺伝子発現に必須なRpoSとCsgDのフォールディングを助ける．また，DnaKはCsgAのシグナル配列を認識して結合することで，CsgAが細胞質で凝集しないように保護する．これらの作用により，カーリーは適切なタイミングと場所（細胞外）で作られる．

と予想された．そこで筆者らは，*in vitro*においてDnaKの機能を阻害する複数の低分子化合物を用いて，大腸菌BW25113株のバイオフィルム形成を抑制するかを調べた[13]．その結果，ラズベリーに豊富に含まれるフラボノールの一種であるミリセチンが，カーリーの産生とバイオフィルムの形成を抑制することを発見した．ミリセチンがバイオフィルムの形成を50 %阻害する濃度（IC_{50}，50 % inhibitory concentration）を調べたところ，46.2 μMであった．また，ミリセチンを添加すると，①大腸菌が高温で生育できないようになる，②細胞内RpoH（またはσ^{32}）の量が増加する，③細胞分裂が部分的に阻害されて細胞が長くなる，といった*dnaK*欠損株と同様の形質の変化が見られた．これらの間接的な観察結果から，少なくとも一部のDnaKの機能がミリセチンによって阻害されたと考えられる．さらに，ミリセチン添加時には，外膜の頑強性が損なわれることで，グラム陰性菌には効果がないバンコマイシンに対して感受性を示すこともわかった．本知見は，既存の抗菌薬の適用範囲を拡張する点においても重要である．

次に，ミリセチンをリード化合物として，より効果的な化合物の探索を行った[16]．その結果，緑茶に多く含まれるカテキンの一種，エピガロカテキンガレート（Epigallocatechin Gallate，EGCG）がミリセチンより低濃度で作用することを見いだした（EGCGのIC_{50}は5.9 μM）．また，EGCGは病原性大腸菌O157のバイオフィルム形成も抑制した．TEMを用いて細胞外構造体を観察したところ，EGCGは低濃度でカーリーの産生を抑制することが示された．次に，カーリーの産生に関わる遺伝子とタンパク質の発現を解析したところ，EGCGの添加によって*csgA*（カーリーの構造遺伝子）および*csgD*（転写制御因子）のmRNA量が減少し，それに伴ってCsgAとCsgDのタンパク質量も減少することがわかった．興味深いことに，EGCGの添加でカーリーの産生に必須な*rpoS*（定常期特異的シグマ因子）の転写は影響を受けないが，RpoSのタンパク質量が減少することがわかった．これは，EGCGの添加によりClpXPプロテアーゼに依存したRpoSの分解が亢進するためであった．

以上より，ミリセチンよりも効果的にカーリーに依存した大腸菌のバイオフィルム形成を抑制するEGCGを見いだし，その作用機序の一端を解明した[16]．

まとめと今後の展望

本稿では，黄色ブドウ球菌と大腸菌のバイオフィルム形成メカニズムと，それらに基づいたバイオフィルムの制御法について紹介した．いずれの場合においても，微生物を包み込む細胞外マトリクスの構成成分がバイオフィルムの形成に重要であり，その生合成機構やマトリクス成分そのものがバイオフィルム阻害剤の標的になりうることが示された．このようなメカニズムに基づいた阻害剤開発の場合，標的分子をあらかじめ設定するので，阻害剤の作用機序の特定が比較的容易であるといったメリットがある．今後，eDNAや細胞外多糖とは異なる新しい細胞外マトリクス成分を発見できれば，バイオフィルム形成のメカニズムをより深く理解でき，より効果的なバイオフィルム制御技術の開発への道が拓けると期待される．

謝　辞

本研究は，文部科学省の科学研究費補助金若手研究（A）（15H05619），国際共同研究強化（A）（18KK0429），文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「バイオフィルム感染症制圧研究拠点の形成」（平成24–28年度），科学技術振興機構ERATO野村集団微生物制御プロジェクト（JPMJER1502），および熊本大学発生医学研究所が推進する「発生医学の共同研究拠点」制度に基づく共同研究の一環として行われたものです．本研究にご協力いただいた東京慈恵会医科大学医学部細菌学講座の金城雄樹教授，奥田賢一博士，千葉明生博士，米本圭吾博士，自靖会親水クリニックの水之江義充博士（東京慈恵会医科大学医学部細菌学講座前教授），熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野の小椋光教授，山中邦俊准教授，福岡歯科大学機能生物化学講座感染生物学分野の有田健一博士，産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門構造生理グループの佐藤主税博士をはじめとする多くの共同研究者の方々に感謝申し上げます．

文　献

1) Flemming, H. C. and Wuertz, S.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 247 (2019).
2) Hall-Stoodley, L. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 95 (2004).
3) Flemming, H. C. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 563 (2016).
4) Sugimoto, S. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **195**, 1645 (2013).
5) Chiba, A. *et al.*: *Microb. Biotechnol.*, **8**, 392 (2015).
6) Sugimoto, S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 2254 (2018).
7) O'Neill, E. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1379 (2007).
8) Nishiyama, H. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **172**, 191 (2010).
9) Sugimoto, S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 25889 (2016).
10) Yonemoto, K. *et al.*: *Infect. Immun.*, **87**, e00894-18 (2019).
11) Chapman, M. *et al.*: *Science*, **295**, 851 (2002).
12) Baba, T. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008 (2006).
13) Arita-Morioka, K. *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 633 (2015).
14) Shimizu, Y. *et al*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751 (2001).
15) Sugimoto, S. *et al.*: *Commun. Biol.*, **1**, 52 (2018).
16) Arita-Morioka, K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 8452 (2018).