

## 細菌によるバイオフィルム形成阻害・分解因子に関する研究 2

今井岳志

### 1 目的

環境中に存在する多くの細菌は粘着質なバイオフィルムと呼ばれる構造を形成することで、栄養豊富な場所に留まる他、各細胞同士で役割分担のためのコミュニケーションをとるなどして、生存に有利な多細胞化を実現している。バイオフィルムの形成は細菌の環境適応において重要であるが、そのメカニズムの多くは未解明なままである。我々は、バイオフィルムに含まれる代表的なファイバーが、これまで機能未知であった特定のタンパク質(*Bacillus* 属の遺伝子 *yjbl* がコードするタンパク質を PHP (protein hydroperoxidase)とした)によってメンテナンスされていることを突き止めた。この新奇酵素反応の発見は、細菌のバイオフィルム維持のメカニズムを解き明かすと共に、感染症の抑制、素材としてのバイオフィルムの改良など、多岐にわたる分野に貢献するものである。本報告書はこれまでに支給された科研費と経常研究を併せた成果報告となる。

### 2 方法と結果・考察

#### 2. 1 PHP破壊によるバイオフィルムへの影響

*B. subtilis* は遺伝子改変が容易なことから、大腸菌に並んで多くの研究に用いられている代表的な細菌種の一つである。一方で、*B. subtilis* は MSgg 培地と呼ばれる特殊な最少培地により、バイオフィルム形成が促進されることが知られていることから、細菌が形成するバイオフィルムのモデル生物としても利用されている。報告者は過去、土壌中から単離したリグニン分解菌が *B. subtilis* の近縁種であることに着目し、*B. subtilis* の遺伝子破壊株ライブラリーを利用することでリグニン分解に関わる遺伝子のスクリーニングを実施していた。その中で、偶然に *php* 破壊株において細菌が形成するコロニー(細胞塊)が、わずかに野生株と比較して光沢を有していることに気がついた。そこで、MSgg 培地を調製し、バイオフィルムをこの遺伝子破壊株に形成させ、成熟したバイオフィルムが持つ撥水性に変化がないかを評価した。その結果、不完全なバイオフィルムを形成する *tasA* 破壊株と同様にこの遺伝子破壊株でバイオフィルム形成が不完全になっていることがわかった(図 1a)。さらに、バイオフィルムを構成する多量体ファイバーを形成するタンパク質 TasA が、当該遺伝子の破壊株では変性重合していることを、ウェスタンブロット解析(W.B.)により突き止めた(図 1b)。申請者は、これまで細胞中の酸化還元反応の研究を専門的に扱っていたことから、この不可逆なタンパク質の重合体形成が、活性酸素種(ROS)を介したジチロシン形成やミカエル付加反応の結果ではないかと考えた。そこで、当該遺伝子を大腸菌に導入し、カラム精製することで得たりコンビナントな精製 PHP と TasA を試験管内(*in vitro*)でフェントン反応下に曝露し、同様に TasA の不可逆変性した重合体が得られないか検討した。その結果、*in vitro* 条件下においても TasA が重合することや、PHP によってこの重合化が抑制されることが示された(図 1c)。このことから、PHP が細胞外のバイオフィルム中で TasA を酸化重合から保護している可能性が考えられた。そこで、この PHP が細胞外あるいは細胞表面上に局在しているかを確かめた。その結果、細胞膜上(図 1d)、とりわけ細胞表面に局在していることが明らかとなった(図 1e, f)。

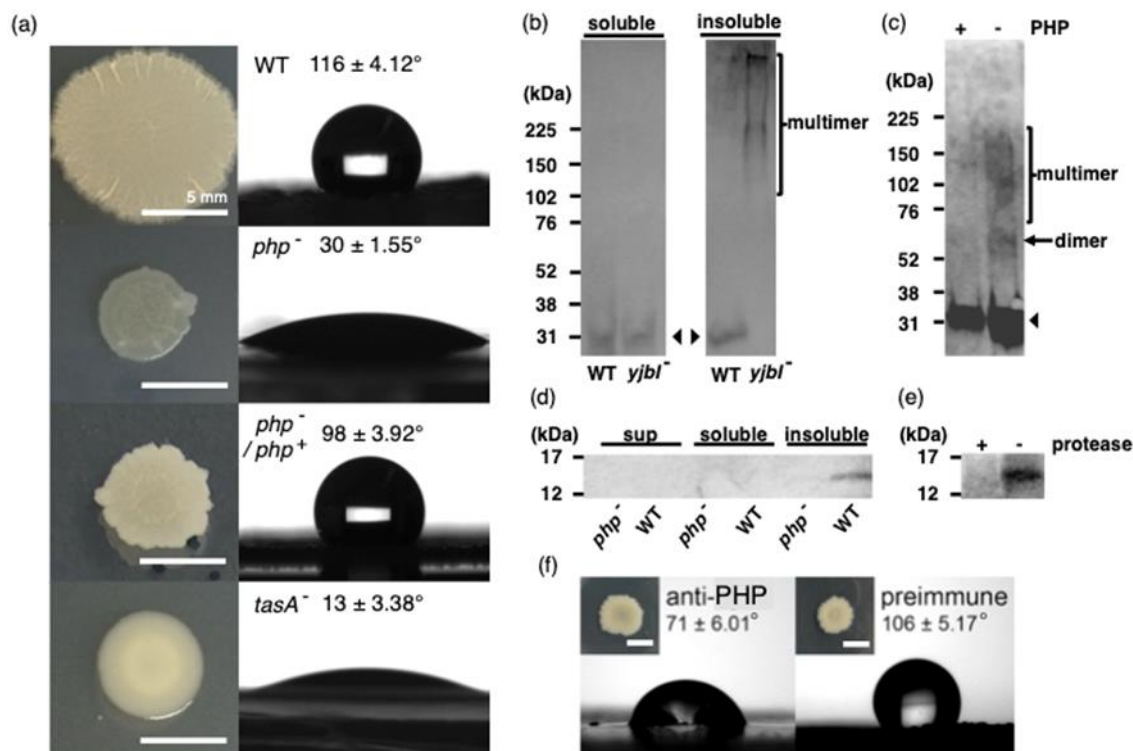


図1 *php* 遺伝子破壊によるバイオフィームへの影響

(a)各コロニーの写真とコロニー表面の撥水性評価、(b)野生株および *php* 破壊株の可溶性画分ならび不溶性画分の TasA の W.B.解析、(c)PHP による酸化的な重合反応の抑制、(d)PHP の局在解析、(f)抗体を用いた PHP の局在解析

## 2. 2 フェノタイプおよび酸化耐性への影響

次に AFM を用いてバイオフィーム表面の物性や形態の変化を調べた。その結果、破壊株においては細部表面が軟化している可能性が示された (図 2 a-c)。また、細菌の平均長軸長が破壊株では増加しており、細胞表面周辺の伸長方向への抵抗が軟化により低下していることが示唆された。さらに、生体試料用に用いられるラジカル開始剤 AAPH (2,2' - azobis [2 - aminodipropene] dihydrochloride) を添加した、酸化条件下の培地中での生育を調べたところ、高濃度の AAPH 下において当該遺伝子破壊株の増殖が顕著に抑制されることが示された (図 2d)。これは、バイオフィームへの影響に限らず、当該酵素が広く酸化損傷から細胞を守っている可能性を示唆している。また、芽胞形成に必須な *gerE* 遺伝子の破壊株でも変化がみられなかったことから、*php* 破壊株で見られるこの現象は芽胞が持つ酸化剤耐性とも無関係であることが示された。そこで、より強力な酸化剤である次亜塩素酸を用いて最少殺菌濃度を算出した。その結果、当該遺伝子破壊株では、次亜塩素酸に対して約 100 倍感度が上昇 (約 100 倍弱体化) していることがわかった。これまでの研究で、1 つの遺伝子の影響で細菌がこれほど酸化剤に対して感受性が上昇する例は知られていない。

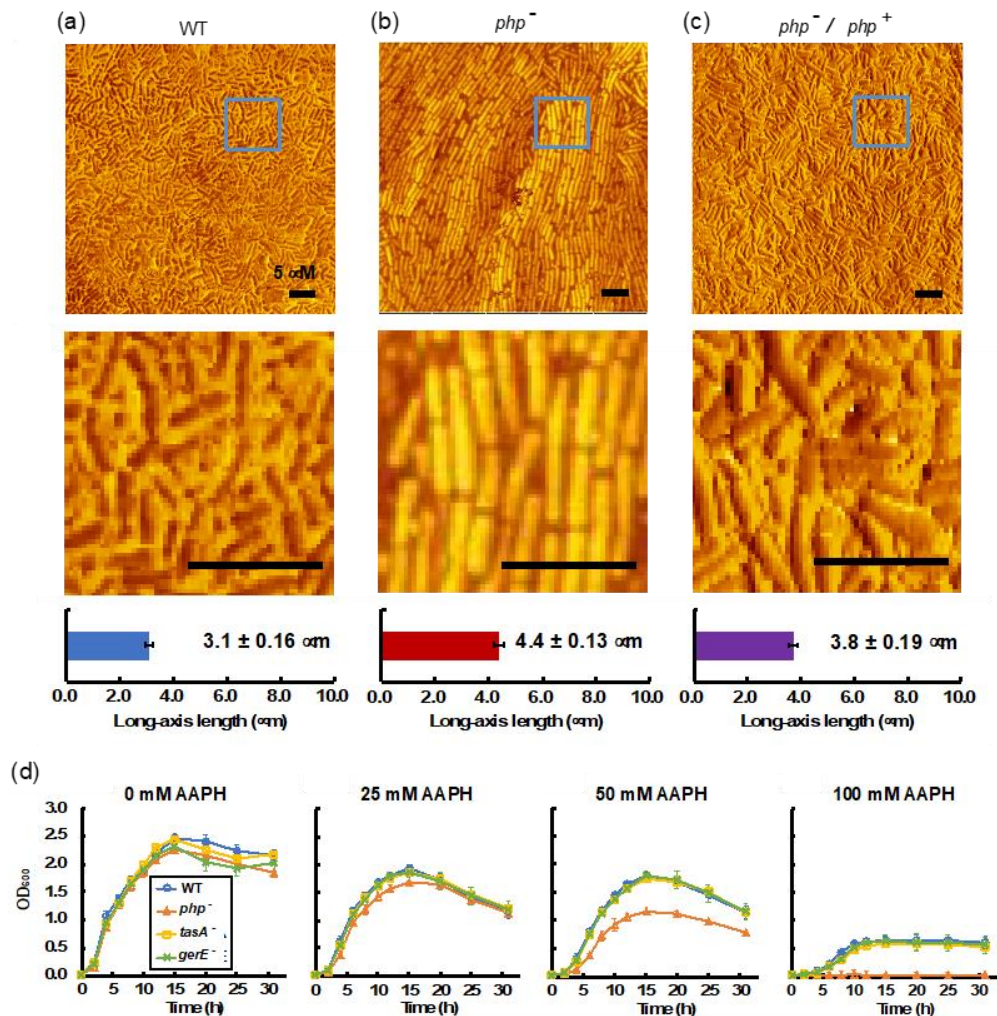


図2 *php* 遺伝子破壊によるフェノタイプおよび酸化耐性への影響

(a)、(b)、(c)野生株、*php*破壊株、*php*補完株のバイオフィルム表面のAFM解析(位相差像)結果、  
(d)AAPH存在下における各遺伝子破壊株の増殖曲線

### 2. 3 新規反応の発見

次細菌に強力な抗酸化能を付与する PHP が、実際にはどのような反応を触媒する酵素であるかを調べた。タンパク質の酸化重合は多くの場合において過酸化タンパク質の形成を介したラジカル重合あるいはマイケル付加反応によって起こる。そこで、PHP が持つヘムおよび活性中心の構造的特徴から、PHP が過酸化タンパク質を基質とする未知のペルオキシダーゼではないかという仮説を立て、検証実験を行なった。フェントン反応あるいは AAPH 処理によって BSA(ウシ血清アルブミン)から作製した過酸化タンパク質を精製し、PHP と反応させ、その後の重合化の進行が抑制されるかを評価した。その結果、いずれの酸化条件でも PHP によって重合化が顕著に抑制されることが明らかになった(図 3a, b)。さらに、キシレノールオレンジ法と呼ばれる過酸化物を定量する手法を用いて、過酸化タンパク質の濃度変化を経時的に測定したところ、過酸化タンパク質を短時間で消費していることがわかった(図 3c, d)。この反応条件では PHP は過酸化タンパク質の量と比較して 1/10 程度であるため、単純

な化学反応による減少ではなく、触媒反応すなわち酵素反応によって過酸化タンパク質を消費していることが確かめられた。また、反応後は水酸基の僅かな上昇が有意にみられたことから(図 3e)、図 3f のような還元反応が進行している可能性が示唆された。

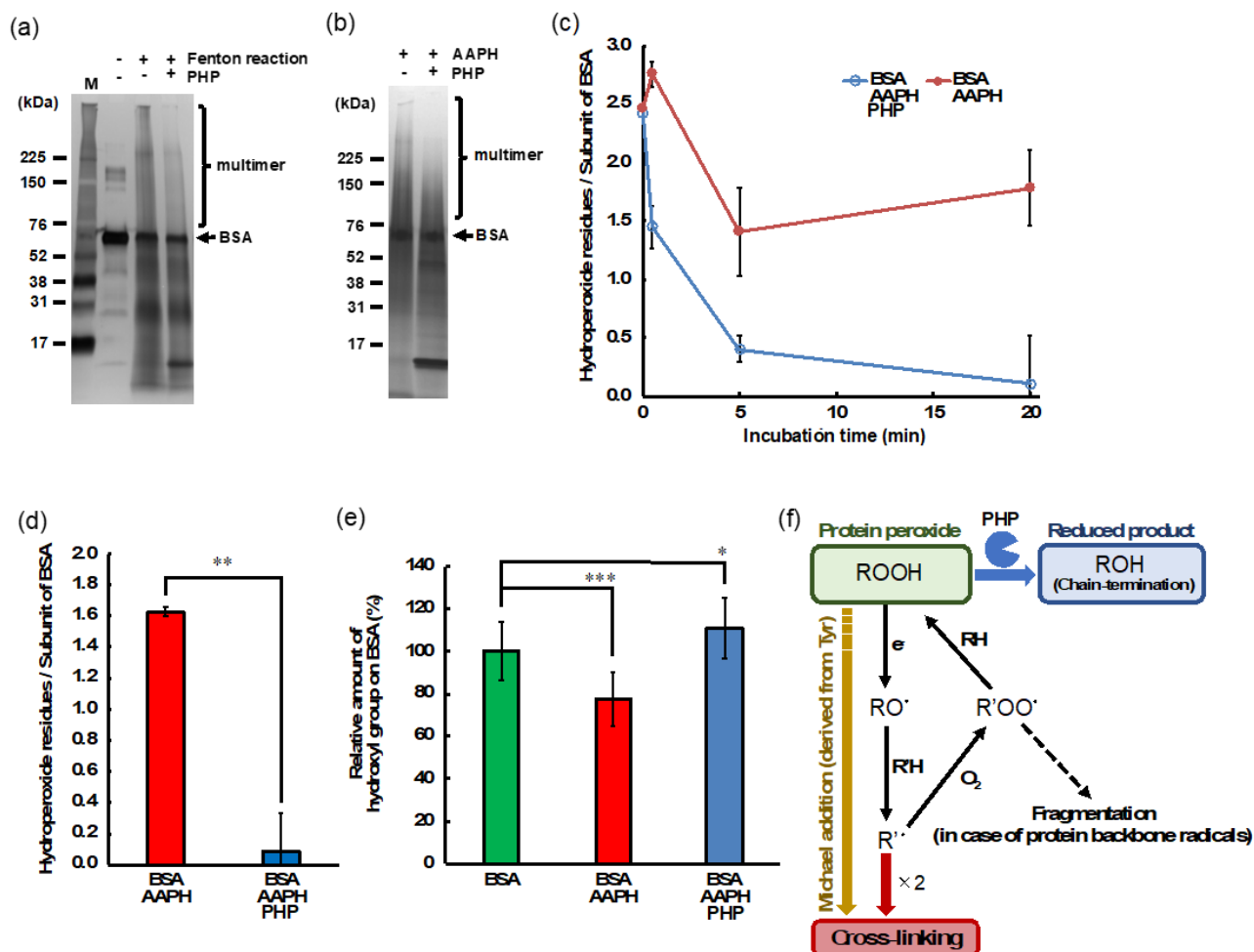


図3 PHPによる過酸化タンパク質還元反応

(a)PHPによるフェントン反応由来の酸化重合抑制、(b) PHPによるAAPH由来の酸化重合抑制、(c)PHP添加による経時的な過酸化BSAの減少、(d)事前にPHPを添加した場合の過酸化BSA形成抑制能の評価、(f)PHPがタンパク質の過酸化およびラジカル連鎖反応を停止する機序に関する概要図

このような反応はこれまで発見されておらず、他の報告からも従来のヘムタンパク質では過酸化タンパク質を基質とすることができないことが既に知られていたが、確認のため典型的なその他ヘムタンパク質であるヘモグロビン(Hb)とミオグロビン(Mb)を用いてその報告が正しいか検証した。その結果、この反応および保護効果がHbやMbではみられないことを確認した(図4)。

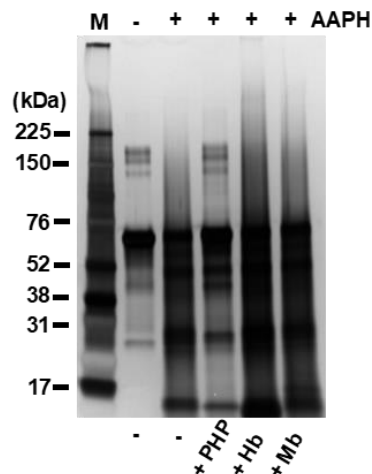


図4 その他ヘムタンパク質との比較  
PHP、ヘモグロビン、ミオグロビンの BSA 過酸化抑制能の評価

### 3 結論および応用に関して

今回のデータは、バイオフィルムの維持に関わる新たなメカニズムを解き明かしており、病理上深刻な問題を引き起こしている体内あるいは環境中でのバイオフィルム形成の阻止を目的とした応用研究に資するものであると考えている。とりわけ AAPH や次亜塩素酸等の酸化剤に対する感受性の上昇は、この PHP が創薬のターゲットとなりうることを示している。一般には次亜塩素酸は人為的に添加する消毒・殺菌剤（水道水やプールなど）のイメージがあるが、実際には細菌感染時の自然免疫応答に関わる分子で、白血球の一種である好中球から放出される殺菌成分（Respiratory Burst）の主成分でもある。この次亜塩素酸を合成する酵素ミエロペルオキシダーゼ（MPO）に変異が入ったヒトの遺伝病では、先天性の免疫不全を呈することからも、生体におけるその重要性がうかがえる。すなわち、PHP を薬剤で阻害することができれば、これまでにない、自然免疫の力を増強する新しいメカニズムで病原性細菌による感染症を制御できる可能性がある。バイオフィルムの形成も同時に阻害できる可能性があるため、これまでに治療が難しかったカテーテル関連血流感染症（CRBSI）などにも対応できる可能性がある。さらに、PHP 阻害剤単独では効果を発揮しないため、環境中に阻害剤が流出しても、従来の抗生剤のような耐性菌が出現する可能性を低く抑えられることが予想される。とりわけ、*php* のオーソログを有す *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophila* などの病原菌感染症治療への貢献が期待できる。

当該内容の詳細は投稿論文<sup>1)</sup>にてプレプリントの形で公表しており、査読後の最終版は投稿雑誌にて後日掲載予定となっている。

### 参考文献

1) Group II truncated haemoglobin Yjbl prevents reactive oxygen species-induced protein aggregation in *Bacillus subtilis*, Takeshi Imai, Ryuta Tobe, Koji Honda, Mai Tanaka, Jun Kawamoto, Hisaaki Mihara

(問合せ先 imai@hyogo-kg.jp)