

博士(工学)伊藤暁信

学位論文題名

Significance and roles of *rpoS* for formation of *Escherichia coli* biofilms

(大腸菌バイオフィルム形成過程における *rpoS* の重要性と役割)

学位論文内容の要旨

近年、微生物の集合体であるバイオフィルムによって引き起こされる様々な問題が生じている。下水道の配管の腐食、水処理用分離膜のファウリング、工業施設の冷却水用配管における熱伝導効率の低下などである。さらに医療分野においても、病原性微生物が体内に形成するバイオフィルムによって引き起こされる感染症の増加が問題となっている。これらのバイオフィルムは抗生物質などの薬剤に対して高い耐性を持ち、その耐性は浮遊状態の菌と比較して 100~1,000 倍以上の報告もあるが、微生物研究の主流は浮遊状態の菌を扱ったものであり、バイオフィルムの薬剤耐性メカニズムについては未解明な部分が多く残されている。このようなことから、バイオフィルムを直接用いた薬剤耐性メカニズムの解明を進める必要があるが、環境中のバイオフィルムは複雑な微生物コミュニティーとして存在し、構成する種や個々の微生物の代謝活性が多種多様なため、その解析は非常に困難である。

本研究では、このような背景のもと、*Escherichia coli* をモデル微生物として用い、バイオフィルム形成メカニズムや薬剤耐性メカニズムを遺伝子発現レベルで解明することを目的とした。バイオフィルムと浮遊系の遺伝子発現パターンの違いを解析し、転写調節因子 *rpoS* がバイオフィルム、浮遊系それぞれの *Escherichia coli* に及ぼす影響を特定した。さらに、蛍光タンパク質を用いて *in situ* でバイオフィルムを観察することで、バイオフィルム形成や薬剤耐性に対する *rpoS* の寄与を明らかにした。

本論文の各章の内容は以下のようになっている。

第 1 章では、バイオフィルムによって引き起こされる問題や環境中のバイオフィルムを対象とした研究例、従来の浮遊系を用いた研究の限界についてまとめた上で、モデル微生物を用いたバイオフィルム研究の重要性を述べた。さらに、これまで行われてきた *Escherichia coli* などのモデル微生物を用いたバイオフィルム研究や転写調節因子 *rpoS* について言及し、本論文の目的と構成について述べた。

第 2 章では、*rpoS* を欠損させた *rpoS* 変異株を作成し、バイオフィルム形成能や遺伝子発現パターンについて、*rpoS* を持つ野性株と比較することで、*rpoS* のバイオフィルム形成における重要性やその役割について検討した。野性株が 40 μm 以上の成熟したバイオフィルムを形成する一方、*rpoS* 変異株が形成するバイオフィルムは 5 μm 以下であった。*rpoS* 変異株が形成するバイオフィルムの遺伝子発現パターンが野性株のそれとは大きく異なり、野性株のように成熟したバイオフィルムを形成するためには、代謝活性が低下した状態に移行することが重要であることを明らかにし

た。さらに、*rpoS* はエネルギー生成や鞭毛合成などの運動性に関する遺伝子の発現を抑制し、ストレス応答や EPS 合成に関する遺伝子を誘導することで、バイオフィルム形成過程後期の成熟段階に寄与していることを明らかにした。

第3章では、バイオフィルム形成過程における *rpoS* の発現を *in situ* で観察し、バイオフィルム内における局所的な *rpoS* の発現が他の遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。緑色蛍光タンパク質発現遺伝子を *Escherichia coli* ゲノム上の *rpoS* 下流に組み込み、*rpoS* の発現と同時に緑色蛍光タンパク質を発現する *Escherichia coli* 変異株を作成し、バイオフィルム形成過程における *rpoS* の発現を *in situ* で観察した。*rpoS* はバイオフィルム形成過程初期における付着段階から発現し、バイオフィルム形成過程後期における成熟段階においては、バイオフィルムの表層部でのみ発現していた。また、バイオフィルム表層部では深部より *rpoS* 発現量が 4 倍以上高く、細胞の接着に関する遺伝子や、ストレス応答に関する遺伝子、薬剤などの異物を細胞外に排出するタンパク質の合成に関する遺伝子の発現量が増加していた。一方、深部では遺伝子発現量が全体的に低下し、代謝活性が著しく抑制された状態であった。これらのことから、バイオフィルムが成熟する過程で *rpoS* の発現に伴い、バイオフィルム深部において *Escherichia coli* が様々なストレスに応答可能な状態に移行することを明らかにした。

第4章では、バイオフィルムの形成過程における *Escherichia coli* の薬剤耐性の獲得について、薬剤感受性や遺伝子発現パターンを浮遊系と比較することで検討した。異なる作用機序を持つ抗生物質であるアンピシリン、カナマイシン、オフロキサシンを用いて薬剤感受性試験を行い、バイオフィルム形成過程における付着段階、増殖段階、成熟段階における遺伝子発現解析を行った。従来行われてきたバイオフィルムの薬剤感受性試験においては、酸素、基質の枯渇や EPS などのバイオフィルム構成成分による薬剤に対する防御機構と微生物個々の薬剤耐性とを区別して評価することが出来なかった。本研究では、これらの要因を排除し、バイオフィルムの深部の細胞のみを対象とした実験手法を確立し評価を行った。カナマイシン、オフロキサシンはバイオフィルム内の *Escherichia coli* に対しても有効であったが、アンピシリンについては、バイオフィルム深部に感受性が著しく低下するコロニーが形成され、バイオフィルムの再増殖が生じた。また、アンピシリンに対する感受性の低下はバイオフィルム形成過程後期の深部において誘導され、この感受性の低下に *rpoS* が関与していることを明らかにした。バイオフィルム形成過程初期は浮遊系の増殖期と、バイオフィルム形成過程後期は浮遊系の安定期と近い遺伝子発現パターンを示し、バイオフィルム形成過程後期ではストレス応答に関する遺伝子や薬剤などの異物を細胞外に排出するタンパク質の合成に関する遺伝子が主に誘導された。用いた抗生物質の作用機序の違いから、バイオフィルム深部において感受性が低下するコロニーは、増殖活性が低下する一方、何らかの代謝活性を維持している状態であることを明らかにした。

第5章では、本論文の結論と今後の展開、課題について述べた。

本研究は、*Escherichia coli* のバイオフィルム形成過程における転写調節因子 *rpoS* の重要性とその役割を明らかにした。バイオフィルム形成過程後期において、*rpoS* の発現量が増加し、代謝活性の低下やストレス応答能の誘導が生じることによってバイオフィルムが成熟する。*rpoS* はバイオフィルム形成過程初期より発現するが、形成過程後期においてはバイオフィルム表層部でのみ発現し、*rpoS* の発現に伴ってストレス応答可能な状態に移行し、抗生物質耐性能を獲得するコロニーがバイオフィルム深部で形成される。*rpoS* がバイオフィルム形成、薬剤耐性双方において重要であることが明らかとなり、バイオフィルムの制御法を確立する上で有望なターゲットになり得ることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査教授 岡部 聰
副査教授 船水 尚行
副査教授 長野 克則

学位論文題名

Significance and roles of *rpoS* for formation of *Escherichia coli* biofilms

(大腸菌バイオフィルム形成過程における *rpoS* の重要性と役割)

細菌は単独で存在することも可能ではあるが、多くの場合、ありとあらゆる固体表面に付着し“バイオフィルム”を形成して存在することから、バイオフィルムが細菌の最も効率的な生息形態であると考えられる。生理学的特徴の違いにかかわらず、ほぼ全ての細菌がバイオフィルムを形成することが可能である。バイオフィルム形成により、様々な問題が生じる。例えば、配水管内の病原性微生物による汚染、下水管の腐食、水処理用分離膜のファウリング、冷却水用配管の熱伝導効率の低下などである。さらに、医療分野でも多くの問題が生じている。細菌感染症の多くは、病原性微生物が体内に形成するバイオフィルムによって引き起こされる。一度、バイオフィルムが形成されると、抗生素などの薬剤に対して高い耐性(浮遊細菌の耐性の100-1000倍)を持つ。このように、バイオフィルム形成は水環境分野および医療分野などにおいて極めて重要であるが、これまでの研究の主流は、浮遊細菌を対象としたものであり、バイオフィルム形成に係わる遺伝子発現や薬剤耐性メカニズムの獲得については未解明な部分が多く残されている。このような背景から、遺伝子発現レベルでのバイオフィルム形成メカニズムやバイオフィルムの薬剤耐性メカニズムを解明する必要がある。しかしながら、水環境中および生体内のバイオフィルムは、複雑な微生物コミュニティーとして存在し、構成する細菌種や個々の代謝活性が多種多様なため、その解析は非常に困難である。

本研究では、このような背景のもと、*Escherichia coli* をモデル細菌として用い、バイオフィルム形成メカニズムや薬剤耐性獲得メカニズムを遺伝子発現レベルで解明することを目的としている。本研究では、DNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析技術を駆使し、バイオフィルムと浮遊状態における *E. coli* の遺伝子発現パターンを解析し、転写調節因子 *rpoS* がバイオフィルム、浮遊系それぞれの *E. coli* に及ぼす影響を特定した。さらに、緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いて *in situ* でバイオフィルムを観察することで、バイオフィルム形成や薬剤耐性に対する *rpoS* の寄与を実験的に明らかにしたものである。

本論文の各章の内容は以下のようになっている。

第1章では、バイオフィルムによって引き起こされる問題や水環境中のバイオフィルムを対象とした研究例、従来の浮遊系を用いた研究の限界についてまとめた上で、モデル微生物を用いたバイオフィルム研究の重要性を述べている。さらに、これまで行われてきた *E. coli* などのモデル細菌を用いたバイオフィルム研究や転写調節因子 *rpoS* について言及し、本論文の目的と構成について述べている。

第2章では、*rpoS* を欠損させた *rpoS* 変異株を作成し、バイオフィルム形成能や遺伝子発現パターンについて、*rpoS* を持つ野性株と比較することで、*rpoS* のバイオフィルム形成における重要性やその役割について検討している。実験結果として、野性株が 40 μm 以上の成熟したバイオフィルムを形成する一方、*rpoS* 変異株が形成するバイオフィルムは 5 μm 以下であった。*rpoS* 変異株が形成するバイオフィルムの遺伝子発現パターンが野性株のそれとは大きく異なり、野性株のように成熟したバイオフィルムを形成するためには、代謝活性が低下した状態に移行することが重要であることを明らかにしている。さらに、*rpoS* はエネルギー生成や鞭毛合成などの運動性に関与す

る遺伝子の発現を抑制し、ストレス応答や EPS 合成に関する遺伝子を誘導することで、バイオフィルム形成に寄与していることを明らかにしている。

第3章では、バイオフィルム形成過程における *rpoS* の発現を *in situ* で観察し、バイオフィルム内における局所的な *rpoS* の発現が他の遺伝子の発現に及ぼす影響を検討している。緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を *E. coli* のゲノム上の *rpoS* 下流部に組み込み、*rpoS* の発現と同時に緑色蛍光タンパク質が発現する *E. coli* 変異株を作成し、バイオフィルム形成過程における *rpoS* の発現を *in situ* で観察した。*rpoS* はバイオフィルム形成過程初期における付着段階から発現し、バイオフィルム形成過程後期における成熟段階においては、バイオフィルムの表層部でのみ発現していることを発見している。また、バイオフィルム表層部では深部より *rpoS* 発現量が 4 倍以上高く、細胞の接着に関する遺伝子や、ストレス応答に関する遺伝子、薬剤などの異物を細胞外に排出するタンパク質の合成に関する遺伝子の発現量が顕著に増加していた。一方、深部では遺伝子発現量が全体的に低下し、代謝活性が著しく抑制された状態であった。これらのことから、バイオフィルムが成長する過程で *rpoS* の発現に伴い、バイオフィルム深部において *E. coli* が様々なストレスに応答可能な状態に移行することが重要であることを明らかにしている。

第4章では、バイオフィルムの形成過程における *E. coli* の薬剤耐性の獲得メカニズムについて、薬剤感受性や遺伝子発現パターンを浮遊系と比較することで検討している。異なる作用機序を持つ抗生物質であるアンピシリン、カナマイシン、オフロキサシンを用いて薬剤感受性試験を行い、バイオフィルム形成過程における付着段階、増殖段階、成熟段階における遺伝子発現解析を行った。従来行われてきたバイオフィルムの薬剤感受性試験においては、酸素、基質の拡散律速や EPS などのバイオフィルム構成成分による薬剤に対する防御機構と細菌個々の薬剤耐性とを区別して評価することが出来ていない。本研究では、これらの要因を排除することにより、バイオフィルムの深部の細胞のみを対象とした実験手法を確立し評価を行っている。その結果、カナマイシン、オフロキサシンはバイオフィルム内の *E. coli* に対しても有効であったが、アンピシリンについては、バイオフィルム深部に感受性が著しく低下する群集が形成され、これらが生存、再増殖し、バイオフィルムの再増殖が生じた。また、アンピシリンに対する感受性の低下はバイオフィルム形成過程後期の深部においてのみ誘導され、この感受性の低下に *rpoS* が関与していることを明らかにしている。バイオフィルム形成過程初期は浮遊系の増殖期と、バイオフィルム形成過程後期は浮遊系の安定期と近い遺伝子発現パターンを示し、バイオフィルム形成過程後期ではストレス応答に関する遺伝子や薬剤などの異物を細胞外に排出するタンパク質の合成に関する遺伝子が主に誘導されていた。使用した抗生物質の作用機序の違いから、バイオフィルム深部において感受性が低下する群集は、増殖活性が低下する一方、何らかの代謝活性を維持している状態であると結論付けている。

第5章では、本論文全体の結論と今後の展開、課題について述べている。

これを要するに、著者は、*Escherichia coli* のバイオフィルム形成過程において網羅的な遺伝子発現解析を行い、バイオフィルム形成における転写調節因子 *rpoS* の重要性およびその役割を遺伝子発現レベルで明らかにしたものであり、環境微生物工学および水環境工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。