

口腔細菌のクオラムセンシングとバイオフィーム形成

Quorum Sensing by Oral Bacteria and Biofilm Formation

吉 田 明 弘

AKIHIRO YOSHIDA

九州歯科大学保健医療フロンティア科学分野

〒 812-0018 北九州市小倉北区真鶴 2-6-1

TEL: 093-285-3091 FAX: 093-591-7736

E-mail: akihiro@kyu-dent.ac.jp

Division of Community Oral Health Science, Kyushu Dental College, 2-6-1 Manazuru, Kokurakita-ku,
Kitakyushu 803-8580, Japan

キーワード: バイオフィーム, デンタルプラーク (歯垢), クオラムセンシング (密度依存性調節), 口腔細菌, う蝕, 歯周病

Key words: biofilm, dental plaque, quorum sensing, oral bacteria, dental caries, periodontitis

(原稿受付 2010年6月29日 / 原稿受理 2010年7月5日)

1. はじめに

自然環境や生体内など, 固体表面と水が接するところにおいて, その固体表面に付着した細菌は単独で存在するのではなく, 特徴的な構造物の中で他の細菌と共同体を形成する。この環境や生態に普遍的に存在する共同体をバイオフィーム (biofilm) とよぶ¹⁾。バイオフィームは水中の細菌が固相面に付着し, 菌体外に排出した多量の多糖基質に埋め込まれた構造からなる固着性社会集団と定義されている³⁾。細菌は水環境ではプランクトン (浮遊型) かバイオフィームの形を取り, 同じ細菌でもその性質が異なることが明らかになっている。

バイオフィームは水中の固相面に有機物あるいは無機物からなる conditioning film (CF) を形成する。この CF に細菌が付着し, 菌体外多糖 (extracellular polysaccharides: EPS) を産生する。固相面上には EPS からなるマトリックスに閉じ込められた細菌のマイクロコロニーが点在し, これらのマイクロコロニー間を密度の低いポリマーが存在し, その部分を水が出入りするいわゆる water channel を形成する。バイオフィームでは細菌の付着, マイクロコロニーや水路の形成などが自発的なシグナリングで支配されている。中でも, クオラムセンシング (Quorum sensing: QS) による, 細菌間情報伝達による細菌密度に依存的な遺伝子発現制御機構の関与が示唆されている^{1,8)}。

口腔内には 700 を超えるともいわれる細菌が生息しており, これらの細菌が歯, 歯肉溝, 舌背など特有の生息場所で, 唾液などの影響を受けながらフローラを形成している⁵⁾。口腔内のバイオフィームはいわゆる歯垢やデンタルプラークと呼ばれるもので, 口腔バイオフィーム

は口腔の 2 大疾患であるう蝕と歯周病に深く関与することが明らかになってきており, これらの疾患はバイオフィーム感染症であると考えられている^{4,6)} また, 口腔バイオフィームはある種の全身疾患の発症との関連において注目されている¹⁰⁾。

現在著者らは口腔バイオフィーム内での細菌間シグナル伝達およびバイオフィーム形成, 病原性遺伝子の発現について解析している。本稿では口腔細菌の中でも, う蝕細菌である *Streptococcus mutans* の QS 系と病原性遺伝子の発現およびバイオフィーム形成についてご紹介したい。

2. バイオフィームと菌体外多糖

細菌は単細胞生物で, 単一の生命体として生存すると考えられてきたが, 孤立して存在するのはむしろ例外であることが明らかになってきている。バイオフィーム内に生存する細菌はプランクトン型の浮遊細菌と比べ, 形態学的にも生理学的にも異なる性格を有する。バイオフィームは「細菌自身が産生し菌体外に排出した多量の多糖 (菌体外多糖) に埋め込まれた状態で固体表面に付着し, 不動化された固着性社会集団」であり, 生物・非生物を問わず, その表面が水に浸っている事実上すべての物体表面にバイオフィームは形成される。このようにバイオフィームは水が流れている環境には大抵存在し, 固着性の集団社会を形成している。

バイオフィーム内にいる細菌は菌体外多糖を排出し, 菌はその中に埋め込まれているが, この菌体外多糖はバイオフィームの性質を決定する。例えば, 表 1 のような一般的な機能がこれまで報告されている。

この菌体外多糖による粘着性の高いマトリクスでバイオフィーム内が占められていることにより抗菌剤、抗生物質、免疫系など外界からの刺激に抵抗性を示す。例えば、浮遊細菌の状態では消毒剤による殺菌効果があるのに対し、バイオフィーム内の細菌に対しては殺菌効果が低いことが示されている。これは多糖体マトリクス（細胞間基質あるいは間質）により覆われているため、抗菌剤や消毒薬がバイオフィーム内の細菌に到達しにくいこととバイオフィーム内部の細菌は静止状態にあり代謝活性も低いことによる。また、細菌間ではシグナルを用いた情報伝達が行われ、毒素の産生、免疫系や抗菌薬に対する抵抗性、バイオフィームの形成などが自己誘導される。このことはバイオフィーム感染症が慢性化、難治化しやすいことを物語っている²⁾。

3. 口腔バイオフィーム

口腔内では、まず硬組織である歯がバイオフィーム形成の固相面となり、唾液タンパク質であるペリクル（獲得皮膜）を介して多様な口腔細菌が付着してバイオフィームを形成する。これがいわゆる歯垢（デンタルプラーク）であり、う蝕、歯周病は口腔バイオフィームによる感染症と考えられている⁴⁾。

歯垢は70～80%が水分で、残り20～30%が菌体やさまざまな化学物質からなる固相成分である。歯垢は微生物細胞とその間隙を埋める細胞間基質（間質、マトリクス）で構成されている。歯垢は湿重量1gあたり $1-2.5 \times 10^{11}$ (2,500億)個の微生物を含んでおり、その容量の約70%は菌体である。微生物の構成は歯垢の付着部位、成熟度などに強く影響されている。間質はタンパク質と炭水化物を主成分とし、歯面への付着や細菌の代謝産物である乳酸などを特定の場所に高濃度に保つことなどで、歯垢の病原性を決定する因子の一つとなっている。また、細菌の栄養源としても働いている。

歯垢の菌体間質はゲル様であり、電解質様の性質を帯

表1. バイオフィームにおける菌体外多糖の役割

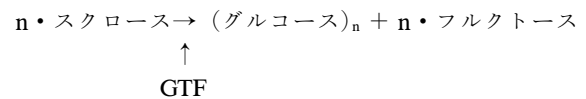
病原性を決定する因子
細菌の付着に関する物質
宿主免疫系に対する抵抗
乾燥に対する抵抗（保湿）
薬剤（抗菌剤・消毒剤）への抵抗
重金属の毒性への抵抗
有機溶媒からの保護
ファージの溶菌作用からの保護
原生生物の食作用からの保護

びているので、水、栄養素や荷電性、高分子のものの歯垢への浸透や拡散は一般に緩やかである。一方、低分子の非荷電性物質であるブドウ糖、ショ糖などの浸透・拡散速度は速い。そのため、ショ糖などの発酵性糖質が歯垢内の細菌により代謝され、乳酸を主とした有機酸が産生されpHの急激な低下をもたらす。酸産生が引き続いて起こり歯垢内での貯留が高まると、歯質の脱灰を招くことになる。歯のエナメル質表面はpH 5.5以下になると脱灰が始まり、これを臨界pHと言う。

さらに、細胞間基質の水溶性グルカンやフルクタンあるいは菌体内多糖類（アミロペクチン様多糖）はエネルギーの貯蔵庫として働き、歯垢の飢餓時には分解されて持続的な酸産生の維持を可能にしている。また、細胞間基質の、う蝕レンサ球菌由来の不溶性グルカン（ムタン）は、生じた有機酸の唾液への拡散・消失を妨げる障壁となって、歯垢中への蓄積を助長させる。よって、歯垢のう蝕病原性は、歯垢内の有機酸の産生と拡散の動態が重要な因子となる。

4. *S. mutans* のバイオフィーム形成とグルコシルトランスフェラーゼの役割

S. mutans は以下のような反応により、スクロースからグルコシルトランスフェラーゼ（GTF）を介して、グルコースのポリマーであるグルカンを合成する。



スクロースはグルコースとフルクトースが $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ 結合した2糖であり、GTFはスクロースをグルコースとフルクトースに加水分解し（スクラーゼ活性）、産生されたグルコース残基をポリマーへと結合する。ヒトから検出されるミュータンスレンサ球菌のうち、ヒトう蝕に関与する菌として*S. mutans*は3種類、*S. gordonii*は4種類のGTFを産生する。このGTFによりスクロースから水溶性および非水溶性のグルカンを合成する。GTFの種類について表2に示す。GTFがグルカンを合成する際には、反応のきっかけとして、プライマーとなる低分子のオリゴ糖や多糖が存在するとその活性が増加する場合がある。これをプライマー依存性という。それぞれのGTFのプライマー依存性について表2に示す。

表2のようにGTFの種類によりグルカンというEPSの性質が異なり、う蝕の病原性因子としての役割も異なっている。また、グルカンの結合において α -1,6結合が多いと水溶性になり、 α -1,3結合が多いと非水溶性になる。

表2. *S. mutans* のグルコシルトランスフェラーゼ

酵素名	遺伝子	局在	プライマー依存性	グルカンの水溶性	特徴
GTF-B	<i>gtfB</i>	菌体結合	なし	非水溶性	多量の非水溶性グルカンを産生
GTF-C	<i>gtfC</i>	菌体結合	なし	非水溶性	付着に重要
GTF-D	<i>gtfD</i>	培養上清	あり	水溶性	GTF-C と共存で付着性グルカンを作る

S. mutans が歯の表面に付着する際のそれぞれの GTF の関わりは図のようなものであると考えられる。まず、GTF-D の存在下で形成された GTF-C の不溶性グルカンは粘着性を持ち、*S. mutans* が歯面に付着する基礎となる。次に GTF-B が大量の非水溶性グルカンを産生することで、*S. mutans* の付着を強化し、周辺の細菌を巻き込み口腔バイオフィームであるプラークを形成する⁴⁾(図1)。

5. *S. mutans* バイオフィーム内での *gtfB* 遺伝子の発現

前述したように、GTF はバイオフィーム形成に非常に重要な役割を果たしている。しかし、*S. mutans* の不溶性グルカン合成に関与する遺伝子 *gtfB* のバイオフィーム内での発現は明らかになっていなかった。そこで我々は *gtfB* 遺伝子のプロモーターと緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) をレポーター遺伝子とした系を用いて、同遺伝子のバイオフィーム内での発現解析を行った。*gtfB* 遺伝子のプロモーターと *gfp* の融合遺伝子をもつシャトルプラスミドを *S. mutans* に形質導入した株 *S. mutans* 854S を用いて、ポリスチレンプレート上に 0.5% スクロースを炭素源としたバイオフィームを作製し、その *gtfB* 遺伝子のバイオフィーム中での発現を共焦点レーザー顕微鏡下で解析した。*S. mutans* 854S の *gtfB* 遺伝子はバイオフィーム形成の初期段階、特にマイクロコロニー形成段階で強く発現することが明らかになった¹⁴⁾ (図2)。

この *S. mutans* 854S を用いて、培地中で浮遊状態にある場合と、バイオフィームの状態にある場合で *gtfB* 遺伝子の発現の違いについてフローサイトメトリーを用いて解析したところ、バイオフィームの状態にある方が浮遊状態の場合と比較して 5 倍近く発現が増強されるこ

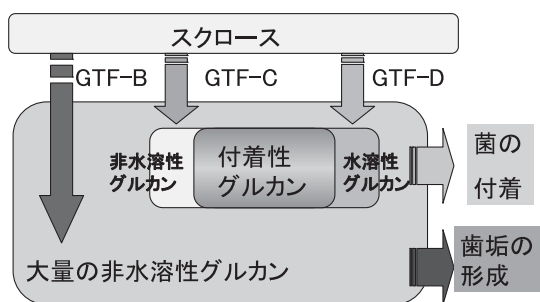


図1. *S. mutans* のグルコシルトランスフェラーゼとその役割

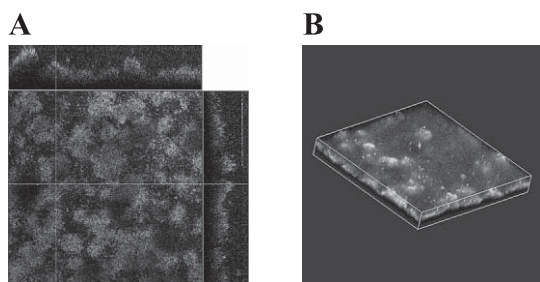


図2. *S. mutans* 854S 株のバイオフィーム A. 上から見た図および矢状断面像 B. 3次元像

とが明らかになった。これらの結果をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析したところ、バイオフィームでの *gtfB* 遺伝子の発現は、浮遊細菌の状態での 4 倍程度増強されることが明らかになった¹⁴⁾。

6. スクロース非依存的な *S. mutans* のバイオフィーム関連遺伝子

S. mutans のスクロース依存的なバイオフィーム形成に関与する遺伝子について明らかになってきたが、スクロース非依存的な *S. mutans* のバイオフィーム関連遺伝子については明らかになっていなかったため、スクロース非依存的に関与する遺伝子群について解析した。まず、*S. mutans* GS5 株の染色体 DNA 上の遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子でランダムに挿入失活した変異株ライブラリを作製した。そのライブラリからグルコースを炭素源とした、バイオフィーム形成能が減少した株を単離して、その変異株について解析した。このようにして得られた変異株の多くが、遺伝的形質転換能 (competence) に関与する遺伝子群の 1 つである、*comB* 遺伝子が不活化されたものであった。そこで、他の *com* 制御系関連遺伝子である *comA*, *comC*, *comD*, *comE* 遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子で置換した変異株を作製し、それらの変異株について同様にグルコース条件下でのバイオフィーム形成能を解析したところ、*comB* 遺伝子の場合同様、バイオフィーム形成能の低下がみられた¹³⁾ (図3)。

この *com* 系によるペプチドインデューサーのシグナル伝達機構では、*comC* 遺伝子から翻訳されるペプチドインデューサー前駆体は *comAB* によりコードされる ABC トランスポーターによりプロセッシングを受け、Competence Stimulating Peptide (CSP) として菌体外に排出されている。CSP は細菌間シグナル伝達を担う分子であり、その菌体外に放出されたシグナルペプチドは細胞膜に結合している *comD* がコードする 2 成分調節因子のセンサーキナーゼにより感知され、*comE* 遺伝子がコードするレギュレーターをリン酸化し、リン酸化さ

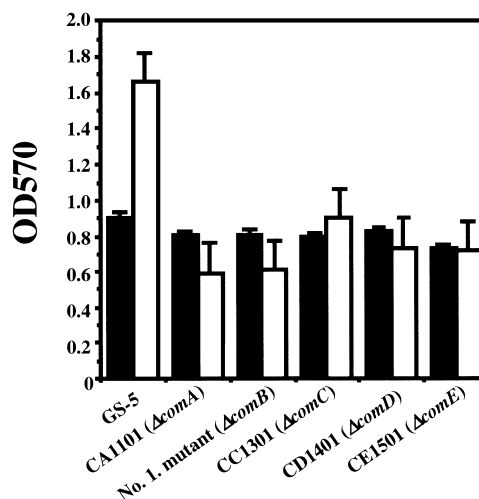
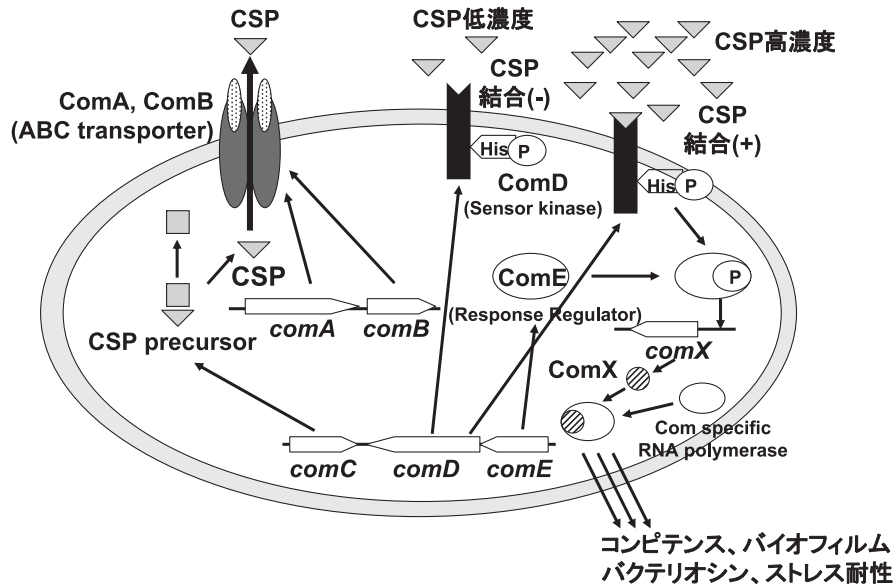


図3. *com* 制御系関連遺伝子の変異株のバイオフィーム形成量。白抜きはバイオフィーム形成量、黒抜きは成長を示す。

図4. *S. mutans* の *com* 制御系

れた ComE は *comAB* および *comCDE* オペロンの転写誘導を行う (図4)。*S. mutans* においてもペプチドインデューサーを介した QS がバイオフィーム形成に関与することが明らかとなった¹³⁾。

7. *S. mutans* のクオラムセンシングとバイオフィーム形成

このように *S. mutans* においてもペプチド性のシグナルを介した細菌間情報伝達が、バイオフィーム形成に関与することが明らかになった。これまで報告されている細菌間情報伝達系は表3の通りであるが、*S. mutans* でもオートインデューサー-2 (autoinducer-2: AI-2) とよばれる非アシルホモセリンラクトンシグナル分子による情報伝達系が存在することが報告されていたため、*S. mutans* の AI-2 を介した QS 系について解析することにした⁷⁾。LuxS は S-adenosylmethionine の異化にはたらく酵素であり、ribose homocysteine から homocysteine と AI-2 前駆体を産生する⁹⁾。そこで、*S. mutans* の LuxS をコードする *luxS* 遺伝子の欠失株を作製し、バイオフィーム形成における役割を解析した。*luxS* 遺伝子の欠失株のバイオフィーム形成能はグルコースを炭素源として培養した場合は親株とほとんど違いがないのに対し、スクロースを炭素源とした場合は著しく減少することが明らかになった¹²⁾ (図5)。また、スクロースを炭素源とした場合は *luxS* 遺伝子の欠失株と親株はバイオフィームの性状が全く異なることも明らかになった。

さらに、*luxS* 遺伝子欠失株の *gtf* 遺伝子の発現に違いがあるか確認したところ、中期対数増殖期において *gtfB*、*gtfC* 遺伝子の発現が増加することがあきらかになった¹²⁾ (図6)。このことから *luxS* 遺伝子欠失株ではスクロース条件下で、バイオフィーム形成時に *gtfBC* 遺伝子の発現が増強され、細菌塊をバイオフィーム形成の比較的初期に形成し、その細菌塊は固相面に付着するものと洗い流されるものがあり、その結果バイオフィーム

表3. 細菌間情報伝達のモデル

- | | |
|----|---|
| 1. | グラム陰性菌：アシル化ホモセリンラクトンによる同種間情報伝達 (Acylated homoserine lactone: AHL) |
| 2. | グラム陽性菌：ペプチド性シグナルによる同種間情報伝達 |
| 3. | グラム陰・陽性菌：Autoinducer-2 (AI-2) による同種間および異種間情報伝達 |

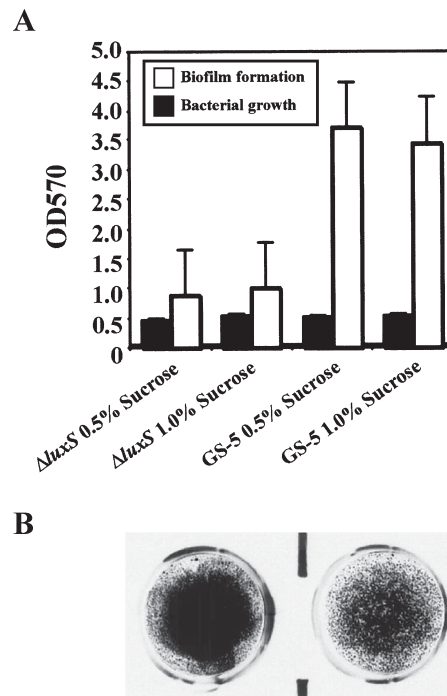


図5. スクロースを炭素源とした場合の *S. mutans luxS* 欠失株のバイオフィーム形成。A. バイオフィーム形成量。白抜きはバイオフィーム形成量、黒抜きは成長を示す。B. *S. mutans* GS5 株 (左) と *S. mutans luxS* 欠失株 (右) のバイオフィームをクリスタルバイオレットで染色したものを示す。

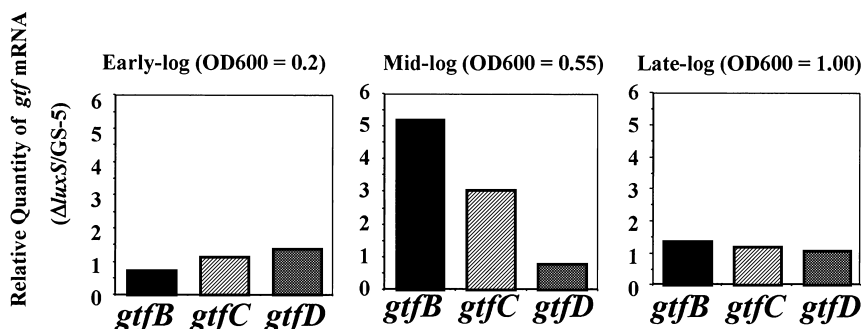


図6. リアルタイム RT-PCR 法を用いた *S. mutans gtfBCD* 遺伝子の発現解析

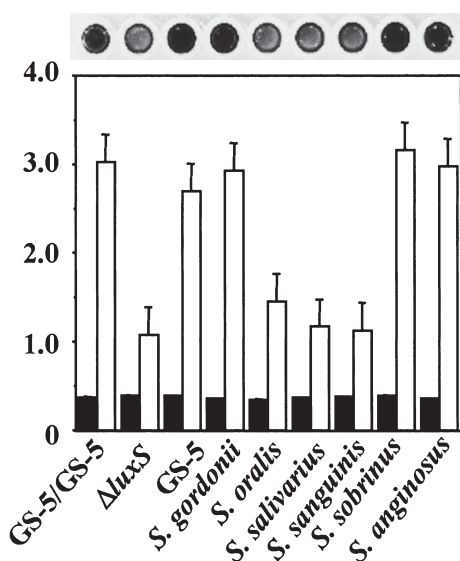


図7. 口腔細菌と共培養した場合の *S. mutans luxS* 欠失株のバイオフィーム形成。左端のポジティブコントロール以外は共培養した菌種、菌株を示す。白抜きはバイオフィーム形成量、黒抜きは成長を示す。上端は *S. mutans luxS* 欠失株のバイオフィームをクリスタルバイオレットで染色したものを示す。

形成量が親株より少なくなったと考えている。

さらに、*luxS* 遺伝子欠失株と他の口腔細菌を共培養することにより、*luxS* 遺伝子欠失株のバイオフィーム形成量に対する他の口腔細菌の影響を解析した。口腔内レンサ球菌では、*S. gordonii* DL1, *S. sobrinus* MT8145, *S. anginosus* FW73 は *S. mutans luxS* 欠失株のバイオフィーム形成量を親株のレベルまで補うことが明らかになった (図7)。これらの口腔細菌が産生する AI-2 量を *Vibrio harveyi* BB170 株をレポーター株として解析したところ、これらの AI-2 量は *S. mutans* GS5 株のそれと同等あるいはそれ以上の値を示した。また、歯周病細菌として注目されているグラム陰性菌 *Porphyromonas gingivalis*, および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* についても同様の解析を行ったところ、*S. mutans* の *luxS* 欠失株のバイオフィーム形成量をある程度まで補うことも明らかになった。さらに、*P. gingivalis* の *luxS* 欠失株と *S. mutans* の *luxS* 欠失株を共培養したところ、*S. mutans* の *luxS* 欠失株のバイオフィーム形成量は、共培養しない場合とほぼ同程度であった¹²⁾。

8. おわりに

う蝕細菌である *S. mutans* のバイオフィーム形成に関する因子について、特に QS 系との関連を中心に述べた。実験室レベルではシグナル伝達系が同細菌のバイオフィーム形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかし、口腔に存在する細菌は非常に多く、口腔環境は非常に複雑であることから、口腔バイオフィームの形成機構および病原性の解明はまだ問題が山積している。これらの諸問題をひとつひとつ解明していくことにより、う蝕、歯周病の制御に繋げていきたいと考えている。

謝 辞

第61回日本生物工学会(名古屋)でのシンポジウム発表の場を与えていただきました、生物工学会の関係者の方々およびオーガナイザーの先生方にこの場を借りて厚くお礼を申し上げます。また、本総説を発表するにあたり、大変御苦労いただきました国立環境研究所 岩崎一弘先生に厚くお礼申し上げます。これまでの研究を支えてくださった竹原直道九州歯科大学名誉教授をはじめ、九州歯科大学保健医療フロンティア科学分野の教室員の皆様に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 582-587.
- 2) Costerton, J.W. 2002. Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *Mol. Cell* 10: 699-700.
- 3) Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, and G. James. 1994. Biofilms, the customized micro-niche. *J. Bacteriol.* 176: 2137-2142.
- 4) 浜田茂幸, 大島 隆. 2006. 新・う蝕の科学. 医歯薬出版株式会社. 東京.
- 5) Kolenbrander, P.E., and J. London. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* 175: 3247-3252.
- 6) McNab, R., S.K. Ford, A. El-Sabaeny, B. Barbieri, G.S. Cook, and R.J. Lamont. 2003. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 185: 274-284.
- 7) Merritt, J., F. Qi, S.D. Goodman, M.H. Anderson, and W. Shi. 2003. Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Strepto-*

- coccus mutans*. Infect. Immun. 71: 1972–1979.
- 8) Nakayama, J., Y. Cao, T. Horii, S. Sakuda, A.D. Akkermans, W.M. deVos, and H. Nagasawa. 2001. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. Mol. Microbiol. 41: 145–154.
 - 9) 中山次郎, 吉田明弘. 2008. バイオフィルムの基礎と制御. エヌ・ティイー・エス. 東京.
 - 10) Okuda, K., T. Kato, and K. Ishihara. 2004. Involvement of priontopathic biofilm in vascular diseases. Oral Dis. 10: 5–12.
 - 11) Watnick, P., and R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. J. Bacteriol. 182: 2675–2679.
 - 12) Yoshida, A., T. Ansai, T. Takehara, and H.K. Kuramitsu. 2005. LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2372–2380.
 - 13) Yoshida, A., and H.K. Kuramitsu. 2002. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 68: 6283–6291.
 - 14) Yoshida, A., and H.K. Kuramitsu. 2002. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a *gtfB* promoter-green fluorescent protein (*PgtfB::gfp*) construct to monitor development. Microbiology 148: 3385–3394.