

Quorum Sensing 制御に基づくバイオフィーム形成抑制

Prevention of Biofilm Formation Based on Quorum Sensing Inhibition

池田 宰*, 諸星 知弘

TSUKASA IKEDA and TOMOHIRO MOROHOSHI

宇都宮大学大学院工学研究科物質環境化学専攻 〒321-8585 栃木県宇都宮市陽東 7-1-2

* TEL & FAX: 028-689-6157

* E-mail: tikeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

Department of Material and Environmental Chemistry, Utsunomiya University,
7-1-2 Yoto, Utsunomiya, 321-8585, Japan

キーワード : quorum sensing, バイオフィーム, グラム陰性細菌, アシル化ホモセリンラクトン

Key words: quorum sensing, biofilm, gram-negative bacteria, acylated homoserine lactone

(原稿受付 2010 年 6 月 8 日 / 原稿受理 2010 年 6 月 15 日)

1. はじめに

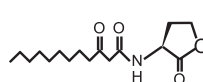
細菌が有する環境応答, 認識, 情報伝達機構の一つに, Quorum Sensing と呼ばれる細胞間情報伝達機構がある。Quorum Sensing とは, ある一定以上の菌体密度に到達したことを, その細菌特有のシグナル物質を用いて感知し, 特定の遺伝子の転写活性の促進または抑制を行なう機構である¹⁾。菌体発光, 抗生物質生産, 病原性の発現など, 様々な機能が Quorum Sensing の制御下にあることが解明されてきているが, 近年, バイオフィーム形成にも Quorum Sensing が関連していることが明らかとなってきた²⁾。そこで, Quorum Sensing を制御することによるバイオフィーム形成の抑制に関する新規な手法の開発が取り組まれている。Quorum Sensing を制御することにより, 抗生物質や抗菌剤, 殺菌剤などによらないバイオフィーム形成制御が可能になると期待されている。本総説では, グラム陰性細菌におけるシグナル物質の一つであるアシル化ホモセリンラクトンを介した Quorum Sensing とバイオフィーム形成について, その機構および制御技術の開発展望に関して紹介する。

2. Quorum Sensing

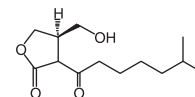
2.1. アシル化ホモセリンラクトンによる Quorum Sensing

多くの細菌は, 自らが生産するオートインデューサーと呼ばれるシグナル物質を用いて, 周囲に存在する仲間の菌体密度を感知し, 特定の遺伝子発現を制御している。この機構を Quorum Sensing と呼び, 例えば, *Vibrio fischeri* における菌体発光, 緑膿菌におけるエラスターゼやラムノリピッドの生産, セラチア菌の赤色色素 (prodigiosin) の生産などが制御されていることが明らか

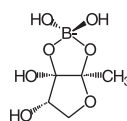
かとなっている^{1,3)}。Quorum Sensing において, 細菌は, 自らの菌体内でシグナル物質を生産し, 菌体内外に拡散させる。増殖, 集合し, 周囲の菌体密度が上昇すると, その変化をシグナル物質の濃度増加として感知する。種々の細菌におけるシグナル物質の例を図 1 に示す。グラム陰性細菌においては, 種々のアシル鎖の構造を有するアシル化ホモセリンラクトン (AHL) がシグナル物質の一つとなっている。AHL を用いたグラム陰性細菌における Quorum Sensing 機構の模式図を図 2 に示す。AHL 合成酵素により菌体内で生産された AHL は, 菌体内外に拡散していく。菌体密度の増加に伴い AHL の濃度も上昇し, ある閾値を超えると, AHL は菌体内の AHL レセプタータンパク質と結合する。形成された複合体が特定の遺伝子のプロモーターに作用することにより, 特定の遺伝子の転写が活性化される。なお, AHL レセプタータンパク質は, 図 2, および, 図 3 (A) に示したポジティブレギュレーターとして作用する場合と, 逆に, 図 3 (B) に示すように, あらかじめプロモーター部分に結合しており, AHL と複合体を形成することによ



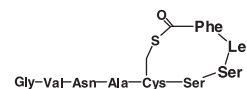
グラム陰性細菌 : AHL



Streptomyces griseus: A-factor



グラム陰性細菌 : AI-2



Staphylococcus aureus: peptide

図 1. 種々のバクテリアにおけるシグナル物質

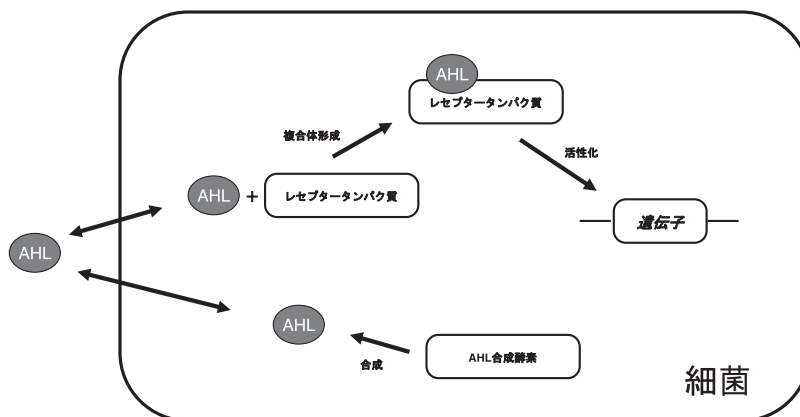


図2. グラム陰性細菌における AHL を用いた Quorum Sensing の模式図

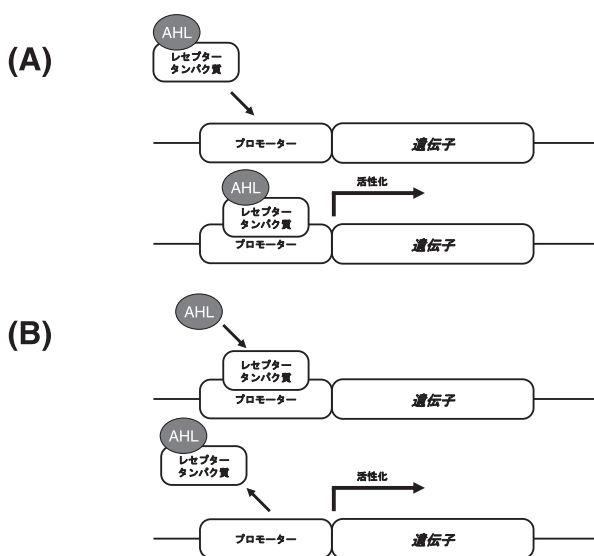


図3. AHL レセプタータンパク質の作用機序 (A) ポジティブレギュレーター, (B) ネガティブレギュレーター

り解離して転写が活性化するネガティブレギュレーターとして機能する場合もあることが明らかとなっている⁴⁾。

2.2. Quorum Sensing とバイオフィーム形成

Quorum Sensing により制御される機能は様々であるが、近年、バイオフィーム形成にも関わっていることが明らかとなってきた²⁾。細菌によるバイオフィーム形成は、ある表面に対する細菌の初期吸着とその後の菌体外多糖 (EPS) 類などの生産や立体構造体の形成という段階を経るが、Quorum Sensing は主に EPS の生産や分泌、そして立体構造形成に関与している。例えば、植物病原菌である *Pantoea (Erwinia) stewartii* や *Erwinia amylovora* は、AHL を用いた Quorum Sensing 機構を有し、EPS の生産を制御している^{4,5)}。*Pantoea stewartii* の AHL 合成酵素遺伝子 *esaI* の破壊株は EPS の生産が抑制され、バイオフィーム形成能が低下した⁴⁾。我々のグループでも、緑膿菌 PAO1 株の AHL 合成酵素遺伝子 (*lasI*, *rhlI*) 破壊株、および、セラチア菌 AS-1 株の AHL 合成酵素遺伝子 (*spnI*) 破壊株を構築したところ、両破壊株ともバイオフィーム形成能が低下し、また、対応する AHL を投与することにより、低下したバイオ

フィルム形成能が復活することを確認している^{6,7)}。さらに、植物病原菌である *Pantoea ananatis* SK-1 株の AHL 生産に関わる *eanI* の欠損株は、EPS 生産能およびバイオフィーム形成能が低下することを見出している⁸⁾。

2.3. Quorum Sensing 阻害技術

現在までに、様々な Quorum Sensing 阻害技術が研究、報告されているが、実は、人工的な阻害技術を開発する以前に、自然界の生物間において、既に Quorum Sensing の阻害機構は存在している。AHL を用いるグラム陰性細菌の Quorum Sensing に対しても、そのシグナル物質である AHL を分解する酵素が存在し、また、AHL の拮抗阻害剤として分泌される物質も存在している。自然界では、シグナル分子をはさんで、利用する側と阻害する側、それぞれの熾烈な生存戦略が、既に実行されているのである。

AHL の分解酵素は、図 4 に示す通り、AHL のラク톤環を開裂させるラクトナーゼと、アミド結合部位を切断するアシラーゼが、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌などから、単離、同定されている。この AHL 分解酵素を人工的に利用した例として、AHL 分解酵素遺伝子をジャガイモやタバコなどに組み込むことにより、AHL を用いた Quorum Sensing 機構により病原性を発現する植物感染菌への抵抗性を発現させる報告などがなされている⁹⁾。我々のグループでも、アユの腸内細菌叢において、AHL 生産菌および AHL 分解菌が共生していることを見出し、単離した AHL 合成細菌 (*Aeromonas* sp.) と AHL 分解細菌 (*Shewanella* sp.) を、疑似腸内環境下で共培養したところ、AHL 合成細菌由来のプロテアーゼ活性の減少が見られた¹⁰⁾。

海藻が分泌する AHL 拮抗阻害剤は図 5 (A) のような構造をしており、AHL を用いた Quorum Sensing 機構を有する *Erwinia* 属細菌より自身を守っている¹¹⁾。一方、人工的な AHL 拮抗阻害剤として、図 5 (B) に示すような AHL 構造類似体が種々合成されており、その Quorum Sensing 阻害効果が報告されている。我々のグループが開発した Cn-CPA (図 5 (C)) は、緑膿菌 PAO1 株におけるエラスターゼやラムノリピッドの生産、セラチア菌 AS-1 株の赤色色素 (*prodigiosin*) の生産などを著しく低下させることが可能であった^{6,7)}。

3. Quorum Sensing 阻害によるバイオフィーム形成制御

3.1. AHL 分解酵素によるバイオフィーム形成阻害

アユの腸管細菌叢から AHL 分解細菌として我々が単離した *Shwanella* sp. は、AHL 分解酵素を分泌しており、解析の結果、AHL アシラーゼ (Aac) であることを明らかにした¹²⁾。この Aac を、ビブリオ病を発病したアユより単離した魚病細菌 *Vibrio anguillarum* TB0008 株に導入した。*V. anguillarum* は AHL を生産し、AHL 受容体 VanT を介して、メタロプロテアーゼ生産、色素生産、そしてバイオフィーム形成を制御している。Aac を発現させた *V. anguillarum* TB0008 株は、その AHL 生産能が低下し、バイオフィーム形成を抑制することが可能となった。96 穴マイクロタイタプレート内に形成されるバイオフィーム量を比較した結果、図 6 に示す通り、野生株の形成するバイオフィーム量に対して、40%ほど

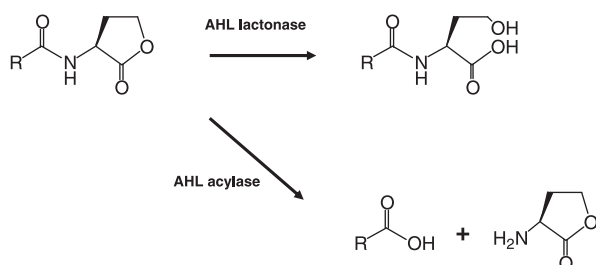


図 4. AHL 分解酵素

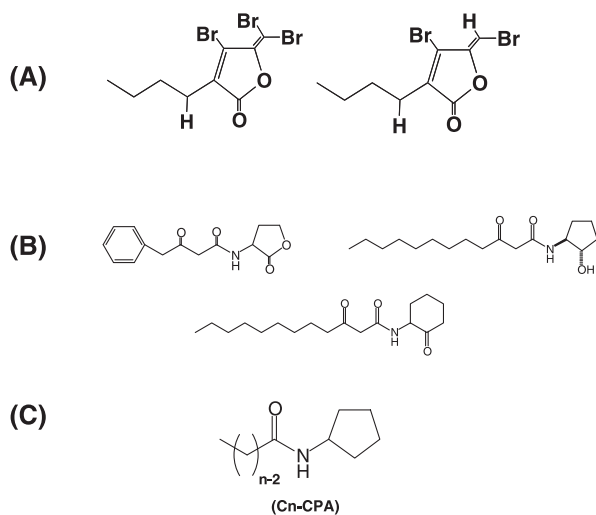


図 5. (A) 天然, (B・C) 非天然の AHL 構造類似体

に減少されることが確かめられた¹²⁾。AHL 分解酵素は、環境中から種々取得されてきており、固定化して利用するなど、今後の展開が期待されている。

3.2. AHL 構造類似体によるバイオフィーム形成阻害

2.2. 項で記載した通り、緑膿菌は Quorum Sensing によりバイオフィーム形成を制御している。そこで、Quorum Sensing 阻害剤として機能する我々が合成した AHL 構造類似体である Cn-CPA による緑膿菌におけるバイオフィーム形成阻害を試みた。フローセルを用いた実験系において、培養液中に C10-CPA を 250 μ M 添加した。その結果、緑膿菌 PAO1 株の初期吸着については阻害できないが、立体的なバイオフィームの形成は阻害できることを明らかにした (図 7)⁶⁾。

緑膿菌と同様、セラチア菌も Quorum Sensing によりバイオフィーム形成を制御している。そこで、セラチア菌 AS-1 株によるバイオフィーム形成に対する Cn-CPA の効果を検討した。96 穴マイクロタイタプレート内にセラチア菌 AS-1 株により形成されるバイオフィームは、C9-CPA を投与することにより阻害された⁷⁾。

以上のことから、AHL 構造類似体を用いてバイオフィーム形成を阻害することが可能であることが確かめられた。

4. ま と め

バイオフィームは、環境問題、医療問題、そして、工業分野においても解決を求められている課題である。バイオフィーム形成に対する Quorum Sensing の関与が明らかとなり、Quorum Sensing を阻害する種々の方法を用いて、バイオフィーム抑制の新たな技術開発の可能性が広がってきている。現在までのところ、単一菌種によ

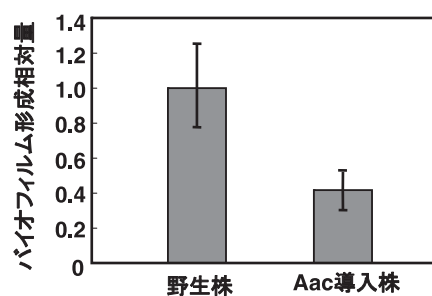


図 6. *V. anguillarum* のバイオフィーム形成能におよぼす AHL 分解酵素の影響

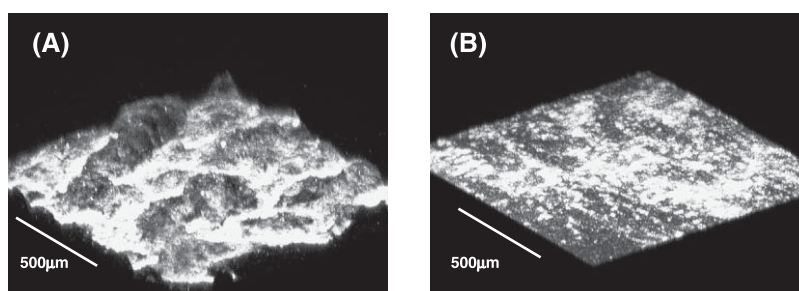


図 7. 緑膿菌 PAO1 株のバイオフィーム形成能 (A) 野生株, (B) C10-CPA 添加

るバイオフィーム形成とその制御に関する成果が得られており、今後は、複合系におけるバイオフィーム形成の制御に対する取組が求められている。より効果的かつ簡便に Quorum Sensing を制御する方法のさらなる開発と、それをういたバイオフィーム形成抑制への応用展開が期待される。

謝 辞

本総説で紹介した我々の行なった研究成果の一部は、財団法人発酵研究所助成金の援助を受けて実施されたものである。

文 献

- 1) Greenberg, E.P. 1997. Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News* 63: 371–377.
- 2) An D., Danhorn T., Fuqua C., Parsek M.R. 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3828–3833.
- 3) Horng, Y-T., S-C. Deng, M. Daykin, P-C. Soo, J-R. Wei, K-T. Luh, S-W. Ho, S. Swift, H-C. Lai, and P. Williams. 2002. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Molecular Microbiology* 45: 1655–1671.
- 4) Bodman, S.B., and S.K. Farrand. 1995. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* 177: 5000–5008.
- 5) Molina, L., F. Rezzonico, G. Defago, and B. Duffy. 2005. Autoinduction in *Erwinia amylovora*: evidence of an acylhomoserine lactone signal in the fire blight pathogen. *J. Bacteriol.* 187: 3206–3213.
- 6) Ishida, T., T. Ikeda, N. Takiguchi, A. Kuroda, H. Ohtake, and J. Kato. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by *N*-acyl cyclopentylamides. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3183–3188.
- 7) Morohoshi, T., T. Shiono, K. Takidouchi, M. Kato, N. Kato, J. Kato, and T. Ikeda. 2007. Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by the synthetic analogs of *N*-acylhomoserine lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6339–6344.
- 8) Morohoshi, T., Y. Nakamura, G. Yamazaki, A. Ishida, N. Kato, and T. Ikeda. 2007. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces *N*-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 189: 8333–8338.
- 9) Dong, Y-H., J-L. Xu, X-Z Li, and L-H. Zhang. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3526–3531.
- 10) Morohoshi, T., A. Ebata, S. Nakazawa, N. Kato, and T. Ikeda. 2005. *N*-acyl homoserine lactone-producing or -degrading bacteria isolated from the intestinal microbial flora of Ayu fish (*Plecoglossus altivelis*). *Microb. Environ.* 20: 264–268.
- 11) Manefield, M., M. Welch, M. Givskov, G.P-C. Salmond, and S. Kjelleberg. 2001. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 131–138.
- 12) Morohoshi, T., S. Nakazawa, A. Ebata, N. Kato, and T. Ikeda. 2008. Identification and characterization of *N*-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. *Biosci. Biotech. Biochem.* 72: 1887–1893.