HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	環境での病原細菌の生存戦略 ： 繊毛虫を介した大腸菌間の遺伝子伝播とクオラムセンシングの誘導
Author(s)	小栗, 聡
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第12291号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12291
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61740
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Oguri.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

環境での病原細菌の生存戦略: 繊毛虫を介した大腸菌間の遺伝子伝播とクオラムセンシングの誘導

小　栗　　聡

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

２０１５年度

【目次】

【要約】 ..... - 4 -
【第一章】 序論　細菌の生存戦略 ..... - 7 -
1.1 概要 ..... - 7 -
1.2 緒言 ..... - 7 -
1.3 細菌の遺伝子獲得機構 ..... - 8 -
1.4 クオラムセンシング ..... - 9 -
1.5 結論 ..... - 10 -
1.6 参考文献 ..... - 10 -
1.7 第一章図 ..... - 13 -
【第二章】 先行研究①：繊毛虫との共培養下における大腸菌 SM10λ 株のプラスミド伝播頻度 ..... - 16 -
2.1 概要 ..... - 16 -
2.2 緒言 ..... - 16 -
2.3 方法 ..... - 17 -
2.4 結果 ..... - 19 -
2.5 考察 ..... - 19 -
2.6 結論 ..... - 20 -
2.7 参考文献 ..... - 21 -
2.8 第二章図 ..... - 23 -
【第三章】 先行研究②：繊毛虫との共培養下における ESSBL 産生大腸菌株の接合伝達頻度 ..... - 28 -
3.1 概要 ..... - 28 -
3.2 緒言 ..... - 28 -
3.3 方法 ..... - 29 -
3.4 結果 ..... - 29 -
3.5 考察 ..... - 30 -
3.6 結論 ..... - 31 -
3.7 参考文献 ..... - 31 -
3.8 第三章図 ..... - 32 -
【第四章】 繊毛虫共培養下における大腸菌の AI-2 蓄積現象 ..... - 35 -
4.1 概要 ..... - 35 -
4.2 緒言 ..... - 35 -
4.3 方法 ..... - 36 -
4.4 結果 ..... - 39 -
4.5 考察 ..... - 41 -

4.6　結論 ..... - 42 -
4.7　参考文献 ..... - 42 -
4.8　第四章図表 ..... - 44 -
【第五章】　結論 ..... - 56 -
5.1　微小生態系における細菌の生存戦略モデルの提唱 ..... - 56 -
5.2　今後の展開 ..... - 56 -
5.3　参考文献 ..... - 57 -
5.4　第五章図 ..... - 58 -
【謝辞】 ..... - 59 -
【業績リスト】 ..... - 60 -

【要約】

細菌は自然環境中に広く分布し、原生動物や真菌などと微小生態系を構築している。過酷な環境に適応を可能とする細菌の遺伝子突然変異は、母細胞から娘細胞への垂直方向に伝播するだけではなく、接合を主体とした水平方向にも伝播して行く。この様に、接合は細菌の適応進化で重要な役割を担っているが、実際に高頻度に接合が起こる環境条件に関しての報告は少ない。そこで先行研究では、細菌が原生動物に捕食されて高密度に集積する現象に着目し、原生動物と細菌の共培養条件下における細菌プラスミドの伝播頻度を検討した。その結果、原生動物の繊毛虫と、実験室で汎用され、高頻度で接合を起こす大腸菌 SM10 λ*pir*$^{+}$株を 30℃で 24 時間共培養した場合に、大腸菌単独培養と比較してプラスミド伝播頻度は有意に上昇し、微小生態系をモデルとした *in vitro* 実験方法の確立に成功した。本法では、臨床分離された ESBL 産生大腸菌の薬剤耐性遺伝子を有したプラスミドも高頻度で伝播した。また、繊毛虫に蛋白合成阻害やアクチン重合（食胞形成）阻害を行うと、大腸菌のプラスミド伝播頻度は有意に抑制され、捕食によって大腸菌が集積する食胞内が接合の場である可能性が示唆された。

このように、繊毛虫の食胞内で細菌が高密度で存在している場合、細菌の遺伝子制御システムであるクオラムセンシングが発動している可能性が考えられる。クオラムセンシングとは、細菌がオートインデューサーと呼ばれるシグナル分子を利用し、菌密度の上昇を感知して遺伝子発現（病原性に関わる遺伝子も含む）を制御する機構である。細菌は、このクオラムセンシングによって刻々と変化する環境に対して有効な遺伝子を転写・翻訳して対応していると考えられる。そこで、本研究の主要課題は、繊毛虫と大腸菌の共培養下でクオラムセンシングのシグナル分子の 1 つである AI（オートインデューサー）-2 がどのように変化するか検討を行うこととした。その結果、大腸菌単独培養と比較して共培養の培養上清中の AI-2 濃度は有意に上昇しており、クオラムセンシングが発動している可能性が示唆された。この現象は、AI-2 産生の責任遺伝子である *luxS* 遺伝子を欠損させた菌株を使用した場合には認められず、繊毛虫との共培養に対する大腸菌の特異的反応であると考えられた。また、共培養下で繊毛虫 1 個体中に形成される食胞数を算定した結果、AI-2 量と食胞数の間に相関が認められた。この興味深い現象の機序を解明するため、*luxS* 遺伝子や菌内から AI-2 を排出するトランスポーターの責任遺伝子である *ydgG* 遺伝子の発現量の検討を行ったが、これらの遺伝子の発現量に上昇は認められず、培養上清中の AI-2 の増加は産生や排出の亢進ではないと考えられた。一方、大腸菌を生染色して共培養下の動態を観察した結果、大腸菌は繊毛虫食胞内に高密度に集積しており、一部の大腸菌は繊毛虫の消化作用によって溶菌している像が観察された。また、培養上清には大腸菌が集積した大量の食胞が放出されており、その食胞の一部は崩壊して内容物が漏れ出している像も観察された。これらの結果から、繊毛虫の消化によって大腸菌内の AI-2 が食胞内に充満し、AI-2 が充満した食胞が繊毛虫から放出され、AI-2 が食胞内から漏れ出すことによって培養上清

中で AI-2 濃度の上昇が起こっていると推察された。

先行研究と本研究を通して繊毛虫と大腸菌を共培養する *in vitro* 微小生態系を構築し、大腸菌の生存戦略である接合頻度とクオラムセンシングの起動に関わる AI-2 量の変化について検討した。その結果、共培養下では大腸菌の接合頻度は上昇し、培養上清中の AI-2 濃度の上昇からクオラムセンシングも発動している可能性が示唆された。本研究の研究成果として、繊毛虫を介した細菌の新たな生存戦略が明らかになった。具体的には、細菌が捕食という生存の危機をも利用して遺伝子の水平伝播を活発化させ、さらに消化された細菌内から放出されるシグナル分子を利用してクオラムセンシングを発動させる可能性が示唆され、これらの所見は実際の自然環境での微小生態系中での細菌の生存戦略を紐解くための重要な足掛かりであると考えられる

【第一章】

序論　　細菌の生存戦略

【第一章】　序論　細菌の生存戦略

1.1　概要

土壌や湖沼などの自然環境中や動物の腸管などでは、真核生物の原生動物や真菌、原生動物である細菌が普遍的に微小生態系を構築し生存競争を行っている。微生物が生存競争に勝つための戦略の例として、宿主への寄生や片利共生、相利共生がある。ウシやヤギなどの反芻動物の腸管には、セルロースを主体とした食物繊維を反芻動物が利用できる酢酸や酪酸などの低級脂肪酸に分解する微生物が相利共生している。しかし、宿主の栄養状態の悪化によって腸内 pH が低下すると相利共生関係が破綻し、腸内微生物によって感染症を発症する場合もある(1)。このように、変化していく環境に対して微生物は周囲に存在する多種多様な微生物との相互作用を介して様々な生存戦略を駆使して適応すると予想されるが、複雑故に理解は進んでいない。そこで、複雑な微小生態系を理解するためにはシンプルな *in vitro* 微小生態系[原生動物(繊毛虫)と大腸菌]を構築し、その中で細菌がどのような生存戦略を駆使しているか解明することが足掛かりとなると考えた。本研究では、その *in vitro* 微小生態系における微生物の生存戦略を、細菌間の遺伝子伝播と病原遺伝子発現制御機構の 1 つクオラムセンシングの誘導に着目して検討を行った。第一章では、既存の報告に基づいて細菌の遺伝子獲得機構とクオラムセンシングについて紹介し、私が本研究に至った経緯を述べる。

1.2　緒言

我々を取り巻く自然環境中には、真核生物の原生動物や真菌、原生動物の細菌が微小生態系を構築し生存競争を行っており、様々な生存戦略を駆使しているが、その根本は生存に有利な遺伝子の獲得と効率的な遺伝子の発現に集約される。遺伝子の多様性は突然変異によって起こり、生存に有利に働く遺伝子は母細胞から娘細胞へと伝播していくが、細菌は接合などによって遺伝子を水平伝播させる機構も有している(2-5)。接合では IV 型分泌装置によって細菌同士が密着し、性線毛内をプラスミドやトランスポゾンと呼ばれる遺伝子群が通過していく。この接合は、現在行われている遺伝子組換え実験の基本操作となっており、その分子生物学的研究が進められてきた。しかし、自然環境中における接合が起こる場の探索は遅れている。接合によって伝播するプラスミド上には、近年深刻化する基質拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生遺伝子などの薬剤耐性遺伝子がコードされている場合があり、微小生態系内における接合の場の発見は、薬剤耐性菌の拡散を防ぐためにも急務である。微小生態系では原生動物によって捕食された細菌が食胞内に高密度で存在しており、食胞内では細菌が生存していることが報告されている（6-9）。そこで、先行研究の第二章と第三章では、原生動物の食胞内に集積した細菌間で接合が起こる可能性に着目し、原生動物と細菌を共培養する *in vitro* 微小生態系を構築し、*in vitro* 微小生態系内でプラスミド伝播頻度がどのように変化するか検討を行った。

次に、細菌の生存戦略としてクオラムセンシングに着目した。クオラムセンシングは細菌が産生するシグナル分子が環境中に蓄積し、閾値に達した際にフィードバック作用を起こして特定の遺伝子発現を活性化させる機構であり、バイオフィルム形成(10)や鞭毛形成(11)、III 型分泌装置(12)、IV 型分泌装置(13)などが制御されている。この制御機構は、海洋性発光細菌の *Photobacterium*（*Vibrio*） *fischeri* が増殖する過程で蛍光発光量が増加する現象として発見された（14)。その後、*V. fisheri* が増殖する際にオートインデューサー（AI）と呼ばれるシグナル分子が環境中に蓄積することでルシフェラーゼの合成が亢進することが判明し（15)、この制御機構はクオラムセンシングと命名された(16)。その後、様々なシグナル分子が発見される中、幅広い菌種間でも作用する AI-2 が発見された(17)。これらの発見から、長い間菌体レベルで生存戦略を諮っていると考えられてきた細菌が、実は菌密度を感知して遺伝子発現を変化させ、群れとして生存戦略を展開していることが判明した。しかし、遺伝子水平伝播やクオラムセンシングが微小生態系のどのような場で起こるのか理解されていない。そこで、原生動物(繊毛虫)の捕食により、細菌が食胞内で局所的に集積している現象に着目し、菌密度を感知するクオラムセンシングが発動している可能性を検討することを本研究の主要テーマとした。

第一章では、細菌の遺伝子水平伝播機構および遺伝子制御機構のクオラムセンシングについて既存の報告をもとに概説し、本研究を行った背景と目的について述べる。

1.3　細菌の遺伝子獲得機構

貧栄養環境や原生動物による捕食などの過酷な条件下で生存競争を行っている細菌は、生命活動の根幹である遺伝子を多様化し共有する機構を発達させてきた。細菌遺伝子の多様性に関しては、自然環境の好酸性バイオフィルムをサンプルとしたショットガン・シークエンス法によって、多様な変異が認められる Ferroplasma type II 遺伝子が確認され、細菌の適応進化の証拠として報告された(18)。遺伝子の多様性は、恒常的に発生する点突然変異やミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、フレームシフト突然変異によって起こり、大腸菌では遺伝子変異頻度が静止期（分裂率と死滅率が平衡となり生菌数が一定となる時期）で上昇する(19)。これらの突然変異の内、生存に有利に働く遺伝子は母細胞から娘細胞へと伝播していく。更に原核生物の細菌では、菌株間や菌種間で遺伝子が水平伝播して環境中に拡散して行く。遺伝子水平伝播の様式には、遊離した DNA を取り込む形質転換、バクテリオファージが DNA の運び手となる形質導入、細菌同士の接触でプラスミド DNA の受け渡しを行う接合が知られており（図 1-1)、細菌が多様な遺伝子を獲得するために遺伝子水平伝播が重要な役割を担っていると考えられている(2-5)。また、現在行われている遺伝子組換え実験は細菌の接合が基本操作となっており、接合に関する研究が進められてきた。接合は菌体間で環状 DNA のプラスミドやトランスポゾンと呼ばれる遺伝子群が受け渡しされるが、このような高分子化合物を受け渡しするためには分泌装置と呼ばれる特殊な筒状構造が必要となる。初めに接合に関与する分泌装置の候補として注目されたのはⅣ型

分泌装置であり、この分泌装置をノックアウトした変異株では接合が起こらないことが報告された(20)。その後、Ⅳ型分泌装置が電子顕微鏡によって撮影され、その結晶構造が解明されたことによりその働きが解明されつつある(21,22)。しかし、研究の進展により、接合におけるⅣ型分泌装置の働きは菌体同士の接着であり、実際に DNA の受け渡しを行うのは性線毛であることが判明した(20)。性線毛を合成するための遺伝子群はプラスミド上にコードされており、これまで不和合性(宿主となる細菌内での複製の程度)により F プラスミドや P プラスミド、I プラスミドの 3 つの型が報告されている(20)。このように、接合に関する分子生物学的な解明が進む一方で、自然界における細菌の接合が起こる場についての研究は遅れている。接合によって伝播するプラスミド上には、近年深刻化する基質拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生遺伝子などの薬剤耐性遺伝子がコードされている場合があり、微小生態系内における接合の場の発見は急務である。接合では細菌同士が接触することが不可欠であり、一般的な接合実験は供与菌と受容菌の混合菌液を固形培地に滴下し、細菌同士の接触頻度を高めている。一方、微小生態系では原生動物によって捕食された細菌が食胞内に高密度で存在しており、食胞内では細菌が生存していることが報告されている（6-9）。そこで、先行研究の第二章と第三章では、細菌が原生動物に捕食され、原生動物の食胞内に集積することによって細菌同士の接触頻度が高まる可能性に着目し、食胞内をも接合の場として生存戦略に利用している可能性を検討した。

1.4　クオラムセンシング

微小生態系の微生物は、それぞれ個として増殖・複製を行っていると考えられていた。しかし、1928 年にフレミングはアオカビによって産生されたペニシリンがブドウ球菌の発育を抑制することを発見した(23)。また、大村智氏は放線菌 *Streptomyces avermitilis* が産生するアベルメクチンの発見(24)に始まり、イベルメクチンの開発によってオンコセルカ症などの糸状虫感染症の治療に多大な貢献をし、2015 年のノーベル生理学・医学賞を受賞した。このように、微小生態系内では、他個体の増殖を抑制する化学物質が分泌され熾烈な生存競争が行われていることが分かっている。ペニシリンを始めとした抗生物質は、感染症治療向上のために探索や作用機序の研究が進展していった。一方、1970 年に海洋性発光細菌の *Photobacterium*（*Vibrio*） *fischeri* が増殖する課程で蛍光発光量が増加する現象が報告された（14）。その後、*V. fisheri* が増殖する際にオートインデューサー（AI）と呼ばれるシグナル分子が環境中に蓄積することでルシフェラーゼの合成が亢進することが判明し、AI の分子構造が解析された（15）。これらの発見により、細菌密度に応じた情報伝達が行われていることが証明され、クオラムセンシングと命名された(16)。クオラムセンシングは細菌が産生する AI が環境中に蓄積し、閾値に達した際にフィードバック作用を起こして特定の遺伝子発現を活性化させる機構であり、バイオフィルム形成(10)や鞭毛形成(11)、Ⅲ型分泌装置(12)、Ⅳ型分泌装置(13)などが制御されている（図 1-2）。これまでの研究により、グラム陽性球菌のブドウ球菌では主にペプチドを(25)、グラム陰性桿菌ではアシルホモセリンラクト

ン類（AHL）を AI として利用していることが報告された(15)。さらに、菌株間のみならず菌種間でも作用する AI としてオートインデューサー2（AI-2）が発見され(25)、AI-2 の構造解析(26)および AI-2 の産生責任遺伝子である *luxS* 遺伝子の同定(27)が完了し、微小生態系の複雑な相互作用の一端が解明されつつある。大腸菌も AI-2 を産生し、産生された AI-2 は YdgG トランスポーターによって菌体外に排出される(28-30)。これまで述べてきた通り、クオラムセンシングは細菌が菌密度を感知して遺伝子発現を変化させることによって環境に適応する重要な機構である。微小生態系では原生動物の細菌の捕食により、食胞内で局所的な高密度化が起こっておりクオラムセンシングが発動している可能性が考えられる。本論文の主要研究である第四章では、原生動物の捕食によって食胞内で細菌が高密度化し、AI-2 が蓄積してクオラムセンシングが起動している可能性を検討した。

1.5 結論

微小生態系における細菌の接合を介した遺伝子水平伝播の研究は、細菌の適応進化を理解し、深刻化する薬剤耐性菌を制御するためにも重要な課題である。また、微小生態系中で細菌がどのようにクオラムセンシングを利用しているか解明することも、感染症の予防や治療の観点から重要な課題である。本研究では、原生動物と細菌を共培養する *in vitro* 微小生態系を構築し、原生動物の捕食によって食胞内に細菌が高密度に集積した場合、細菌間の接合頻度がどのように変化し、クオラムセンシングが発動しているか検討を行うことを目的とした。

1.6 参考文献

1. Russell JB, Rychlik, JL (2001) Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292: 1119-1122.
2. Dröge M, Pühler A, Selbitschka W (1998) Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *J Biotechnol* 17: 75-90.
3. Heinemann JA. (1998) Looking sideways at the evolution of replicons. In Horizontal Gene Transfer. In: Kado CI, Syvanen M(Eds.). Interational Thomson Publishing, London, pp. 11-24.
4. Nielsen KM, Bones AM, Smalla K, van Elsas JD (1998) Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria--a rare event? *FEMS Microbiol Rev* 22: 79-103.
5. Smith JM, Feil EJ, Smith NH (2000) Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 22: 1115-1122.
6. Barker J, Brown MR (1994) Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140: 1253-9.
7. Brandl MT, Rosenthal BM, Haxo AF, Berk SG (2005) Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl Environ Microbiol* 71: 1562-9.
8. Gourabathini P, Brandl MT, Redding KS, Gunderson JH, Berk SG (2008) Interactions between

food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* 74: 2518-25.

9. Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17: 413-33.
10. Solano C, Echeverz M, Lasa I (2014) Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol* 18: 96–104.
11. Verma SC, Miyashiro T (2013) Quorum sensing in the squid-*Vibrio symbiosis*. *Int. J. Mol. Sci* 14: 16386–16401.
12. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2: 1051–1060.
13. Leung KY, Siame BA, Snowball H, Mok YK (2011) Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication. *Curr Opin Microbiol* 14: 9–15.
14. Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104: 313-22.
15. Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20: 2444-2449.
16. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-275.
17. Kuo A, Blough NV, Dunlap PV (1994) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 176: 7558-7565.
18. Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovev VV, Rubin EM, Rokhsar, DS, Banfield JF (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428: 37-43.
19. Loewe L, Textor V, Scherer S (2003) High deleterious genomic mutation rate in stationary phase of *Escherichia coli*. *Science* 302: 1558-1560.
20. Chandran V (2013) Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochem Soc Trans* 41: 17-28.
21. Chandran V, Fronzens R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* 462: 1011-1015.
22. Fronzes R, Schafer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 323: 266-268.
23. Fleming A (1929) On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzæ*. *Br J Exp Pathol* 10: 226-236.
24. Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S (1979) Avermectins, new

family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother* 15: 361-367.

25. Le KY, Otto M (2015) Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol* 6: 1174.
26. Surette MG1, Miller MB, Bassler BL (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1639-1644.
27. Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczer I, Bassler BL, Hughson FM (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545-549.
28. Herzberg M, Kaye IK, Peti W, Wood TK (2006) YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *J Bacteriol* 188: 587–598.
29. Pereira CS, Santos AJ, Bejerano-Sagie M, Correia PB, Marques JC, Xavier KB (2012) Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates detection and processing of the quorum sensing signal autoinducer-2. *Mol Microbiol* 85: 93–104.
30. Rettner RE, Saier MH Jr (2010) The autoinducer-2 exporter superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 18: 195–205.

1.7　第一章図

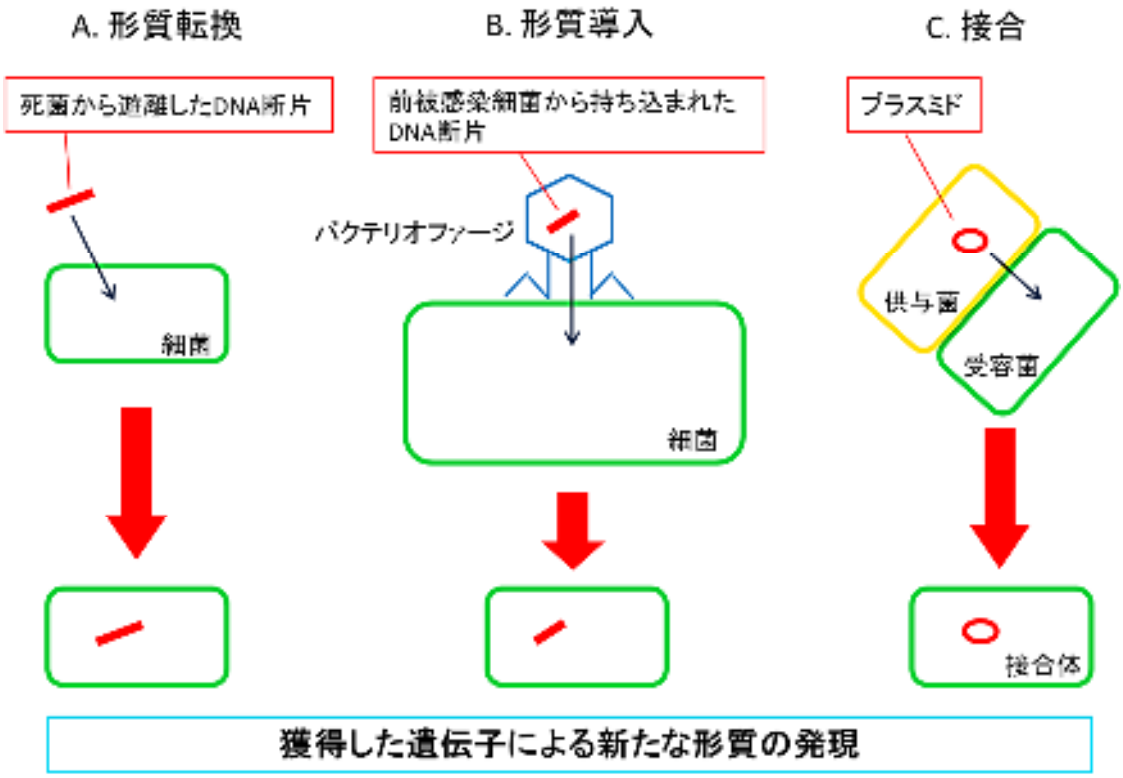


図 1-1　細菌の遺伝子水平伝播の 3 様式

細菌の遺伝子水平伝播の 3 様式を示した。A は遊離 DNA の取込みで起こる形質転換。B は細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージをベクターとした形質導入。C は先行研究のテーマとなる、細菌の接触によってプラスミドを受け渡す接合。

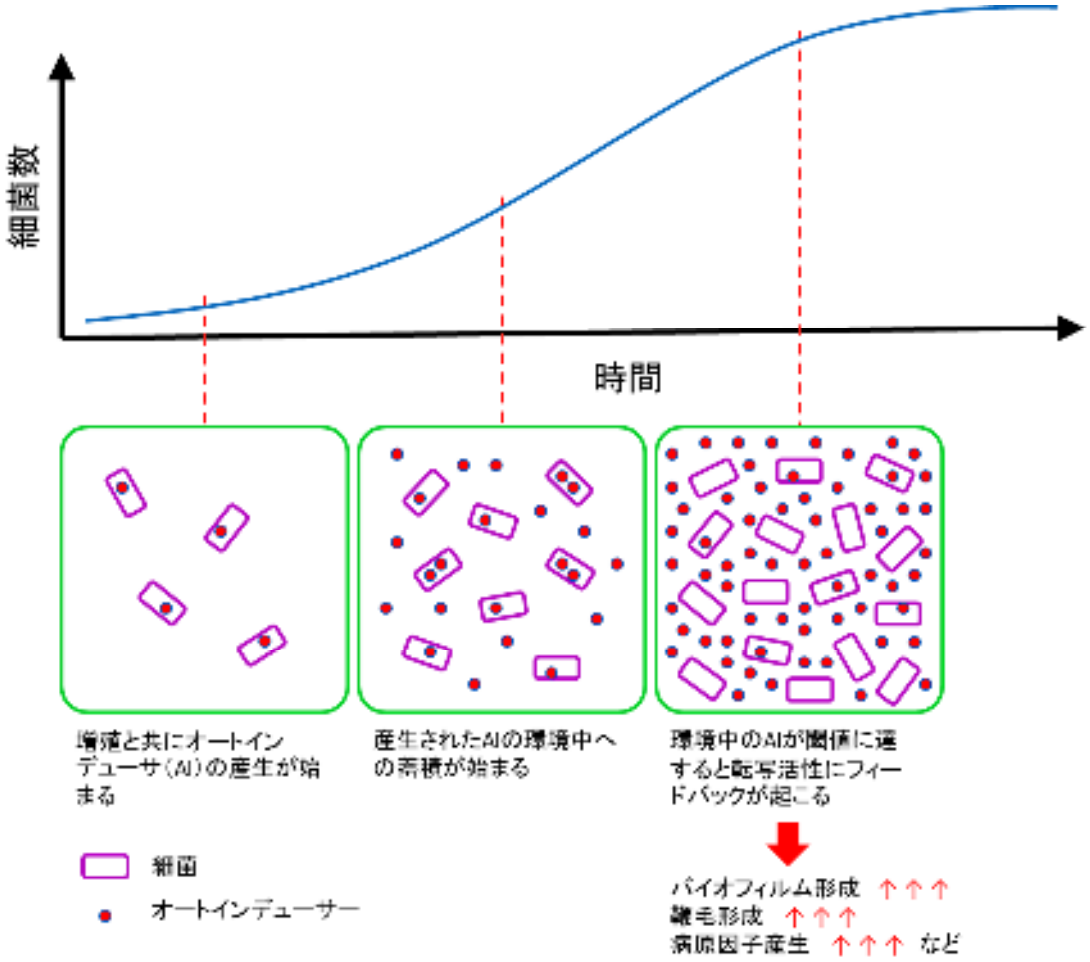


図 1-2　細菌のクオラムセンシング概略

細菌のクオラムセンシングの概略を示した。上部 S 字状グラフは細菌の増殖曲線を表す。緑四角は増殖曲線中の各時点における、細菌密度とオートインデューサー量を模式化している。

【第二章】

先行研究①：繊毛虫との共培養下における
大腸菌 SM10λ株の接合伝達頻度

Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol* (2010) 161:711-719.

【第二章】　先行研究①：繊毛虫との共培養下における大腸菌 SM10λ 株のプラスミド伝播頻度

2.1　概要

先行研究の第二章では、細菌の生存戦略である遺伝子水平伝播の場を探索した。着目したのは、原生動物の捕食によって細菌が食胞内に集積して生存する現象である(1-13)。細菌が食胞内に集積することにより、細菌同士の接触頻度が増加し、接合の場となり得る可能性がある。そこで、原生動物の繊毛虫（*Tetrahymena thermophila* と *T. pyriformis*）、自由生活性アメーバ（*Acanthamoeba castellanii* C3）、細胞性粘菌（*Dictyostelium discodeum*）を使用し、プラスミド供与菌は接合実験で汎用される大腸菌 SM10λ*pir*$^{+}$、プラスミド受容菌はシプロフロキサシン耐性（CPFX-R）大腸菌を使用して、原生動物と細菌の共培養を行い、プラスミド伝播頻度の変化を検討した。その結果、細菌を活発に捕食する繊毛虫と共培養した場合に、大腸菌単独培養と比較してプラスミド伝播頻度が有意に上昇することが判明した。この現象は、繊毛虫やプラスミド供与菌を加熱処理して殺してしまうと認められなくなり、生きた繊毛虫の活動が要因となって大腸菌間の接合が惹起されていると考えられた。また、共培養液に真核生物特異的蛋白合成阻害剤の cycloheximide や、食胞形成を阻害するアクチン重合阻害剤の cytochalasin D および latrunculin B を添加した場合でも、プラスミド伝播頻度が有意に抑制され、繊毛虫の捕食による食胞形成が、プラスミド伝播頻度の重要な要因であることが示唆された。さらに、緑色蛍光発光大腸菌と赤色蛍光で生染色した大腸菌を使用して繊毛虫との共培養を行い、蛍光顕微鏡にて食胞の観察を行った結果、食胞内には 2 菌株が集積している像が観察されるとともに、培養上清と比較して部分精製した繊毛虫食胞内でのプラスミド伝播頻度が有意に高いことが確認された。以上の結果より、大腸菌間の接合が繊毛虫の食胞内で促進することが明らかになった。大腸菌は繊毛虫に捕食される危機をも遺伝子水平伝播の場として利用している可能性がある。また繊毛虫と大腸菌を使用した簡便な *in vitro* 微小生態系の構築に成功した。

2.2　緒言

第一章で述べたように、原生動物による捕食活動で細菌は食胞内に高密度に集積し、食胞内で細菌は生存することが確認されている(1-13)。そこで、食胞内で細菌が集積している状態では細菌の接触頻度が上昇し、接合頻度も上昇するのではないかと考えた。本章では先行研究として原生動物はそれぞれ繊毛虫、自由生活性アメーバ、細胞性粘菌を使用し、接合実験で汎用される大腸菌 SM10λ*pir*$^{+}$株と臨床分離された大腸菌株を共培養し、大腸菌間のプラスミド伝播頻度の変化を検討し、*in vitro* 実験方法の確立を試みた。共培養後のプラスミド伝播頻度の指標は薬剤耐性を使用し、プラスミド供与菌の大腸菌 SM10λ*pir*$^{+}$株はカナマイシン耐性（KM-R）、シプロフロキサシン感受性（CPFX-S）であり、プラスミド受容菌の大腸菌臨床分離株は KM-S、CPFX-R である。大腸菌 SM10λ*pir*$^{+}$株のプラスミド上には KM

耐性遺伝子があり、接合によって移行する。一方、大腸菌臨床分離株の CPFX 耐性遺伝子は染色体上にコードされており、接合によって移行しない。したがって、接合によって生じる接合体は KM-R、CPFX-R となり、両薬剤を添加した培地で選択培養が可能となる。さらに、原生動物またはプラスミド供与菌を熱処理した場合と、蛋白合成阻害剤やアクチン重合阻害剤（食胞形成阻害）を添加した場合のプラスミド伝播頻度への影響を検討し、共培養下の接合が原生動物の食胞内で行われているか否かについて検証を試みた。

2.3 方法

原生動物

自然界に広く分布する原生動物の中から、繊毛虫 *Tetrahymena thermophila*[菅井博士(茨城大学)より分与]および *T. pyriformis*[園部博士(兵庫大学)より分与]、ATCC から購入した自由生活性アメーバ *Acanthamoeba castellanii* C3（ATCC50739）、細胞性粘菌 *Dictyostelium discodeum*[斎藤博士(上智大学)より分与]を使用した。原生動物の培養は PYG 培養液[0.75%(w/v) peptone、0.75%(w/v) yeast extract、1.5%(w/v) glucose]を使用し、30℃湿潤条件下で培養した。

細菌

プラスミド供与菌は接合実験に汎用される KM-R 大腸菌 SM10λ*pir*$^{+}$（Tn*phoA*; Km^{R} 含 pRT733）である。プラスミド pRT733 は KM 耐性遺伝子を含んだトランスポゾン領域（Tn）に細菌性アルカリフォスファターゼ遺伝子（*phoA*）を挿入して作製されたプラスミドである(14)。プラスミド受容菌は CPFX-R 大腸菌（北海道大学病院検査・輸血部より分与）を使用した。また、蛍光顕微鏡下で繊毛虫食胞内に集積する大腸菌を可視化するために、アンピシリン耐性（ABPC-R）遺伝子を含むプラスミド pGLO^{+}に緑色蛍光蛋白（GFP）合成遺伝子を挿入して作製した ABPC-R 緑色蛍光発光大腸菌を使用した(21)。大腸菌の培養は LB 培地[1%(w/v) NaCl,、1%(w/v) peptone、0.5%(w/v) yeast extract、1.5%(w/v) agarose]を使用し、KM-R 大腸菌には KM 50μg/mL、CPFX-R 大腸菌には CPFX 5.0μg/mL、ABPC-R 大腸菌は ABPC 100μg/mL を添加して 37℃で培養した。

原生動物との共培養下における KM-R 大腸菌と CPFX-R 大腸菌の接合実験

培養した 4 種の原生動物を PAS（Page's amoeba saline; Na_2HPO_4 0.142g/L、KH_2PO_4 0.136g/L、NaCl 0.12g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04g/L、$CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.04g/L、pH 6.8）で洗浄し、それぞれ 0、10^3、10^4、10^5、10^6/0.5mL に調製した（図 2-1）。KM-R 大腸菌および CPFX-R 大腸菌は PAS 0.5mL に約 10^9 CFU（colony-forming units）ずつ入るように調製した（図 2-1）。CFU とは、固形培地で培養した場合の 1 つのコロニーが、元々1 個体の細菌が増殖して形成されることから、細菌の生菌数を表す単位として使用される。調整した原生動物浮遊液と大腸菌菌液を混和し、4℃にて 2500×g で 10 分間の遠心を行い、上清を除去して PAS 0.5mL に再浮遊させた。混合液は 15℃、30℃、37℃の 3 条件にて 24 時間培養し、ボルテックスミキサーで 3 分間振盪してガラスビーズで原生動物を破砕した（図 2-1）。KM 50μg/mL・CPFX 5.0μg/mL 添加 LB

培地で接合体を、CPFX 5.0μg/mL 添加 LB 培地で受容菌を選択培養し、CFU 算定を行った（図 2-1）。プラスミド伝播頻度（Average frequency of transfer event）は接合体菌数を受容菌菌数で除して求めた（図 2-1）。

プラスミド伝播阻害実験

原生動物は繊毛虫 *T. pyriformis* または *T. thermophila* 10^5/0.5mL で、プラスミド供与菌は KM-R 大腸菌を、プラスミド受容菌は CPFX-R 大腸菌を 10^9 CFU/0.5mL で混和し、前述の接合実験方法にてプラスミド伝播頻度を検討した。本検討で観察される現象に繊毛虫の活動および生菌同士の接合が関与していることを確認するために、繊毛虫および供与菌を 90℃ 10 分間で熱処理して死滅させ、それぞれのプラスミド伝播頻度への影響を検討した。また、本研究で観察される現象が繊毛虫の捕食を含めた生命活動に起因するか確認するために、混和した繊毛虫と大腸菌を再浮遊させる PAS へ真核生物の蛋白合成を網羅的（非特異的）に阻害する cycloheximide（Sigma）を添加して繊毛虫の生命活動を大きく阻害した場合と、アクチン重合を阻害する cytochalasin D（Sigma）や latrunculin B（Sigma）(15)を添加してアクチン重合によって起こる食胞形成を大きく阻害した場合が、プラスミド伝播頻度へどのように影響するか検討した。Cytochalasin D と latrunculin B の溶媒である dimethyl sulfoxide（DMSO）(Sigma)は細胞毒性を有するため、これらの薬剤の比較対象のために PAS に DMSO を添加する系も測定した。薬剤濃度は、cycloheximide が 0.1μg/mL と 1.0μg/mL、cytochalasin D は 5.0μg/mL と 40μg/mL、latrunculin B は 5μg/mL とした。

繊毛虫食胞内への大腸菌 2 菌株の集積像観察

大腸菌の食胞内への集積を可視化するために、繊毛虫 *T. pyriformis* を 10^5/0.5mL と、大腸菌は ABPC-R 緑色蛍光発光大腸菌および CPFX-R 大腸菌を 10^9 CFU/0.5mL で混和した。また、CPFX-R 大腸菌は取扱説明書に則り PKH-67(Sigma)で赤色蛍光に生染色した。30℃で 24 時間共培養し、試料をホルマリン固定して蛍光顕微鏡にて観察した。

共培養上清中大腸菌間と食胞内大腸菌間の経時的なプラスミド伝播頻度の比較

繊毛虫 *T. pyriformis* または *T. thermophila* を 10^5/0.5mL で使用し、プラスミド供与菌は KM-R 大腸菌、プラスミド受容菌は CPFX-R 大腸菌を 10^9 CFU/0.5mL で使用した。30℃で共培養を行い、0、0.5、1、2、8、24 時間後に試料を回収した。回収した試料は速やかに Hisopaque（Sigma）と混和して室温、400G で 10 分間遠心し、沈渣（繊毛虫食胞）と培養上清に分離した(16)。得られた沈渣および培養上清を、ボルテックスミキサーで 3 分間振盪してガラスビーズで原生動物を破砕した。KM 50μg/mL・CPFX 5.0μg/mL 添加 LB 培地で接合体を、CPFX 5.0μg/mL 添加 LB 培地で受容菌を選択培養し、CFU 算定を行った。プラスミド伝播頻度は接合体菌数を受容菌菌数で除して求めた。

統計処理

独立した 3 回以上の実験結果をスチューデント *t* 検定で評価し、危険率（p）が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

2.4 結果

原生動物との共培養下における KM-R 大腸菌と CPFX-R 大腸菌の接合実験

A. castellanii と *D. discodeum* を使用した接合実験では、いずれの条件においてもプラスミド伝播頻度は 10^{-7} 未満となり、原生動物非添加条件との間に有意差は認められなかった（図 2-2、C と D）。一方、*T. thermophila* を 10^4～10^6/0.5mL 使用して 30℃で培養した場合と、10^5/0.5mL 使用して 15℃で培養した場合にプラスミド伝播頻度は有意に増加した（図 2-2、B）。また *T. pyriformis* では、10^5/0.5mL 添加して 30℃および 37℃で培養した場合と、10^6/0.5mL 添加して 30℃で培養した場合にプラスミド伝播頻度は有意に増加した（図 2-2、A）。以上の結果から、原生動物と大腸菌を共培養すると、原生動物の種類や量、培養温度に依存して大腸菌間のプラスミド伝播頻度が上昇することが明らかになった。

プラスミド伝播阻害実験

繊毛虫または供与菌を加熱処理した場合では、プラスミド伝播頻度が有意に低下した（図 2-3）。真核生物蛋白合成阻害剤 cycloheximide とアクチン重合阻害剤 latrunculin B を添加した場合にプラスミド伝播頻度が有意に低下した（図 2-3）。一方、アクチン重合阻害剤 cytochalasin D では、高濃度添加時以外は有意な低下は認められなかった（図 2-3）。また、今回の結果に繊毛虫間に差異は認められなかった。以上の結果から、共培養下で起こるプラスミド伝播は、繊毛虫の蛋白合成や異物の取り込みに関与するアクチンの重合といった生命活動に依存して起こることから、大腸菌間のプラスミドの受け渡しが繊毛虫の食胞内で行われている可能性が示唆された。

繊毛虫食胞内への大腸菌 2 菌株の集積像観察

蛍光顕微鏡にて共培養後の繊毛虫を観察した結果、ABPC-R 緑色蛍光発光大腸菌と赤色蛍光に生染色した CPFX-R 大腸菌が同一食胞内に集積している像が観察された（図 2-4、A）。したがって、食胞内に集積したプラスミド供与菌と受容菌が接合を行うことができることを示唆している。

共培養上清中大腸菌間と食胞内大腸菌間の経時的なプラスミド伝播頻度の比較

繊毛虫の種類に関わらず、共培養 0.5～2 時間まで沈渣のプラスミド伝播頻度が培養上清のプラスミド伝播頻度より有意に上昇していた（図 2-4、B）。しかし、共培養 8 時間以降においもプラスミド伝播頻度は上昇しているものの、両者に有意差は認められなかった（図 2-4、B）。この結果は、共培養直後から、繊毛虫食胞中で効率良く接合体が誘導され、時間とともにその接合体が培養上清中に蓄積していく可能性があることを示唆している。

2.5 考察

KM-R 大腸菌と CPFX-R 大腸菌間では、使用した原生動物のうち *A. castellanii* と *D. discodeum* でプラスミド伝播頻度に変化は認められなかった。一方、*T. thermophila* と *T. pyriformis* ではプラスミド伝播頻度は有意に増加した。プラスミド伝播頻度は原生動物の種

類と培養温度によって差が認められ、この差異は以下の 2 つの要因が影響していると考えられる。まず、原生動物が細菌を捕食する速度である。繊毛虫の捕食速度は 200～5000 CFU/hour と報告されており、*A. castellanii* や *D. discodeum* と比較して非常に活発である(17)。2 つ目は、培養温度である。繊毛虫の至適培養温度は 30～37℃であり(18)、至適環境下では繊毛虫が活発に捕食活動を行い、食胞内に集積した供与菌と受容菌間で接合頻度が上昇したと考えられる。以上から、繊毛虫 *T. thermophila* を 10^5/0.5mL 使用し、30℃で 24 時間共培養を行う条件を、本研究の至適混合培養条件とした。

共培養によって上昇したプラスミド伝播頻度は、本当に繊毛虫と大腸菌との相互作用に由来するのであろうか。まず、繊毛虫または供与菌を熱処理した場合でプラスミド伝播頻度が有意に抑制され、共培養下におけるプラスミド伝播には生きた繊毛虫の活動が必要であると共に、生菌同士が必要である事が証明された。次に、繊毛虫の活動を cycloheximide によって蛋白合成阻害した場合と、latrunculin B でアクチン重合阻害した場合にプラスミド伝播頻度が有意に抑制された。繊毛虫は活発に運動して捕食活動を行い、細胞口と呼ばれる器官から食物を取り込んでいる。その際に、細胞骨格の 1 つであるアクチンが重合して細胞膜で食物を包み込み、食胞として体内に取り込んでいる(19)。したがって、アクチン重合阻害剤の latrunculin B でプラスミド伝播頻度が抑制されたことは、大腸菌の接合が繊毛虫の食胞内で起こっていることを示唆する結果である。一方、latrunculin B と同様にアクチン重合を阻害する cytochalasin D では、プラスミド伝播頻度は若干抑制されたのみで、高濃度添加時以外では有意な低下は得られなかった。これは、cytochalasin D のアクチン重合阻害作用が latrunculin B より弱いことが要因であると考えられる(20)。

繊毛虫の食胞内が接合の場となる可能性を可視化するために、蛍光発色させた 2 種類の大腸菌と繊毛虫を共培養して蛍光顕微鏡で観察した。その結果、繊毛虫の食胞内には 2 種類の大腸菌が混在しており、両者が接触して接合を起こす可能性は十分に考えられた。また、至適混合培養条件した試料を繊毛虫食胞と培養上清に分離し、それぞれのプラスミド伝播頻度を比較した結果、共培養 2 時間後までは繊毛虫食胞のプラスミド伝播頻度が有意に上昇していた。この結果も、接合が繊毛虫食胞内で起こっていることを示唆する結果ではある。しかし、共培養 8 時間以降で両者のプラスミド伝播頻度は均一に上昇する結果となった。この現象は、繊毛虫の死滅などによって体内の大腸菌が放出された可能性があり、原因追究のためにさらなる実験が必要である。

以上の結果から、大腸菌は繊毛虫による捕食という危機をも利用して、集積した食胞内を接合の場としていることが示唆された。

2.6 結論

原生動物の繊毛虫と大腸菌を共培養した場合にプラスミド伝播頻度が上昇した(至適混合培養条件は繊毛虫 10^5/0.5mL と供与菌と受容菌をそれぞれ 10^9CFU/0.5mL 混和し 30℃で 24 時間培養した場合にその頻度は最大になった)。また、蛋白合成阻害剤やアクチン重合阻害

剤で繊毛虫の捕食活動を阻害した場合にプラスミド伝播頻度も抑制され、繊毛虫食胞と培養上清を分離比較した結果、共培養 2 時間後までは繊毛虫食胞のプラスミド伝播頻度が有意に上昇していたことから、共培養下における接合は繊毛虫の食胞内で行われていることが示唆された。また、蛍光顕微鏡による観察の結果、繊毛虫食胞内に 2 種類の大腸菌が混在する像が得られ、食胞内が接合の場となり得ると考えられた。第三章では、この興味深い現象が異なる大腸菌をプラスミド供与菌として使用しても起こる現象であるか確認するために、至適混合培養条件下において臨床分離された多剤耐性大腸菌の R プラスミドも伝播するか検討を行った。

2.7 参考文献

1. Abd H, Saeed A, Weintraub A, Nair GB, Sandström G (2007) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 33-39.
2. Adékambi T, Ben Salah S, Khlif M, Raoult D, Drancourt M (2006) Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* 72: 5974-5981.
3. Akya A, Pointon A, Thomas C (2009) Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba spp*. *FEMS Microbiol Ecol* 70: 20-29.
4. Barker J, Brown MR (1994) Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140: 1253-1259.
5. Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba spp. Appl Environ Microbiol* 64: 279-286.
6. Bouyer S, Imbert C, Rodier M, Héchard Y (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol* 9: 1341-1344.
7. Brandl, MT, Rosenthal BM, Haxo AF, Berk SG (2005) Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne Tetrahymena species. *Appl Environ Microbiol* 71: 1562-1569.
8. Gourabathini PM, Brandl T, Redding KS, Gunderson JH, Berk SG (2008) Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* 74: 2518-2525.
9. Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17: 413-433.
10. King CH, Shotts EB Jr, Wooley RE, Porter KG (1988) Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* 54:3023-3033.
11. La Scola B, Raoult D (2001) Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect* 7: 75-79.
12. McCuddi ZP, Carlson SA, Rasmussen MA, Franklin SK (2006) *Klebsiella* to *Salmonella* gene

transfer within rumen protozoa: implications for antibiotic resistance and rumen defaunation. *Vet Microbiol* 114: 275-284.

13. Licht TR, Christensen BB, Krogfelt, KA, Molin S (1999) Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* 145: 2615-2622.
14. Taylor RK, Manoil C, Mekalanos JJ (1989) Broad-host-range vectors for delivery of TnphoA: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 171: 1870-1878.
15. Sugita M, Nakano K, Sato M, Toyooka K, Numata O (2009) The roles of actin cytoskeleton and microtubules for membrane recycling of a food vacuole in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil Cytoskeleton* 66: 371-377.
16. Pinheiro MD, Power ME, Butler BJ, Dayeh VR, Slawson R, Lee LE, Lynn DH, Bols NC (2007) Use of *Tetrahymena thermophila* to study the role of protozoa in inactivation of viruses in water. *Appl Environ Microbiol* 73: 643-649.
17. Bott TL (1995) Microbes in food webs. *ASM News* 61: 580-585.
18. Suhr-Jessen PB, Orias E (1979) Mutants of *Tetrahymena thermophila* with temperature sensitive food vacuole formation. II. Physiological and morphological studies. *Exp Cell Res* 124: 317-327.
19. Shiozaki N, Nakano K, Kushida Y, Noguchi TQ, Uyeda TQ, Wloga D, Dave D, Vasudevan KK, Gaertig J, Numata O (2013) ADF/cofilin is not essential but is critically important for actin activities during phagocytosis in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot Cell* 12: 1080-1086.
20. Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED (1987) Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* 213: 316-318.
21. Matsuo J, Oguri S, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Hayashi Y, Kawaguchi K, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H (2010) Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol* 161:711-719.

2.8　第二章図

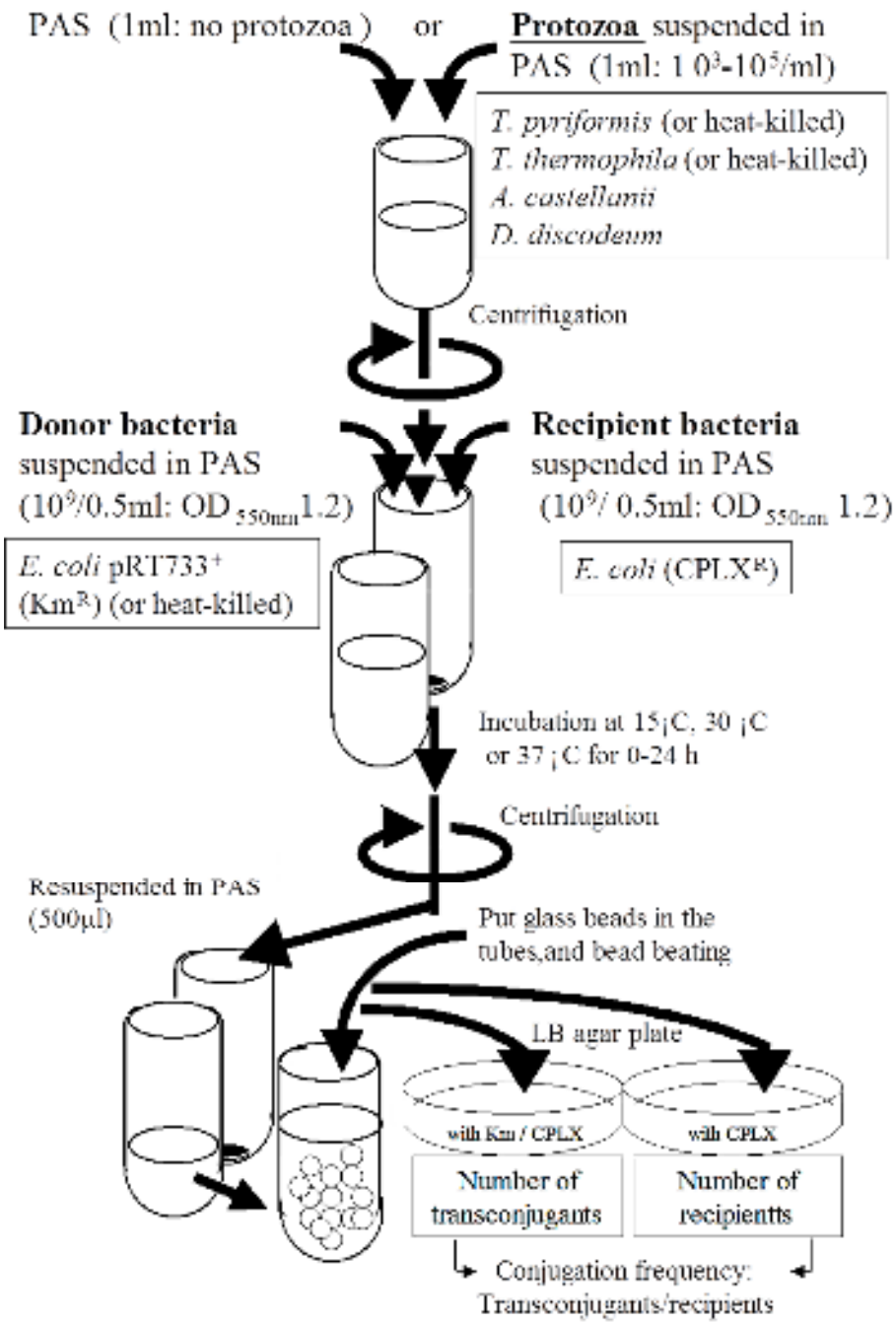


図 2-1　原生動物との共培養下における大腸菌間のプラスミド伝播実験方法

原生動物は繊毛虫 *T. pyriformis* と *T. thermophila*、アメーバ *A. castellanii*、細胞性粘菌 *D. discodeum* を使用した(21)。プラスミド供与菌は KM-R 大腸菌、受容菌は CPFX-R 大腸菌を使用した(21)。原生動物と 2 種の大腸菌を混和し、15・30・37℃で 24 時間培養した(21)。ガラスビーズにて原生動物を破砕し、接合体と受容菌数を算定した(21)。プラスミド伝播頻度は接合体数を受容菌菌数で除して求めた(21)。

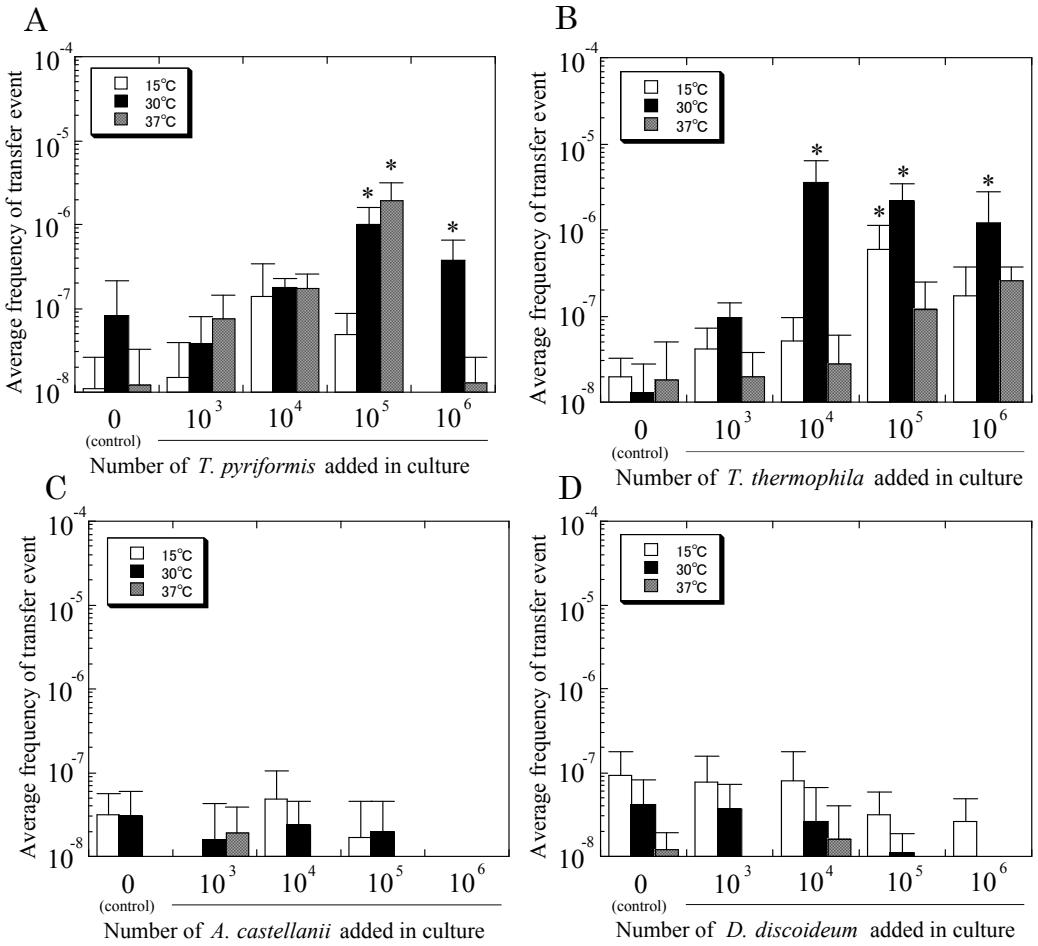


図 2-2　原生動物との共培養下における KM-R 大腸菌と CPFX-R 大腸菌間のプラスミド伝播頻度

原生動物は繊毛虫 *T. pyriformis*（A）と *T. thermophila*（B）、アメーバ *A. castellanii*（C）、細胞性粘菌 *D. discodeum*（D）を使用し、KM-R 大腸菌および CPFX-R 大腸菌と共培養を行い、プラスミド伝播頻度（Average frequency of transfer event）を算出した(21)。培養温度別に白が 15℃、黒が 30℃、網掛けが 37℃を表す(21)。*は原生動物を加えなかったコントロール（横軸‘0’）に対して、プラスミド伝播頻度が有意に上昇した（$p<0.05$）条件を表す(21)。

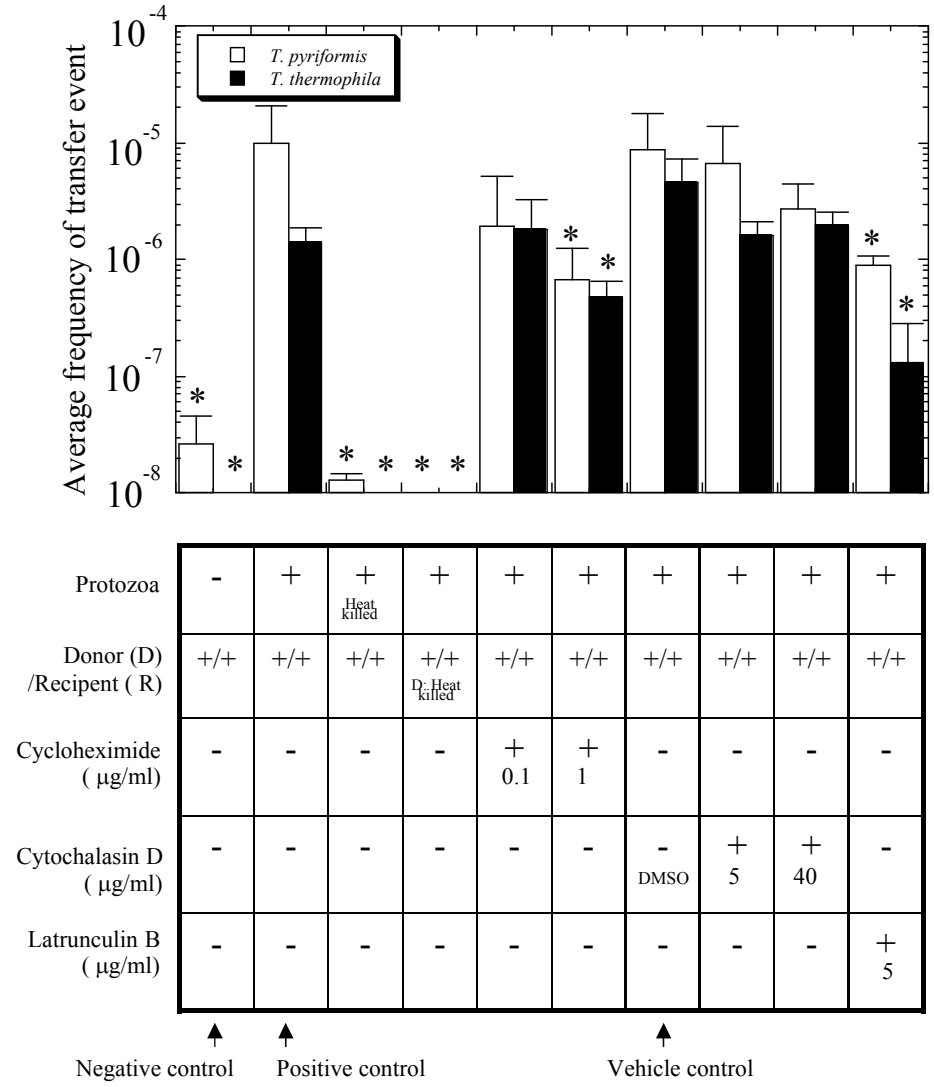


図 2-3　加熱処理および薬剤添加が繊毛虫との共培養下における KM-R 大腸菌と CPFX-R 大腸菌間のプラスミド伝播頻度に与える影響

繊毛虫 *T. pyriformis*（白）または *T. thermophila*（黒）を使用し、KM-R 大腸菌と CPFX-R 大腸菌を 30℃で共培養して算出したプラスミド伝播頻度（Average frequency of transfer event）(20)。同様の条件で、加熱処理（90℃、10 分間）および蛋白合成阻害薬 cycloheximide、アクチン重合阻害薬 cytochalasin D と latrunculin B がプラスミド伝播頻度に与える影響を検討した(21)。Negative control と加熱処理、cycloheximide の*は、Positive control のプラスミド伝播頻度に対して有意な低下（$p<0.05$）を示した条件を表す(21)。cytochalasin D と latrunculin B の*は、細胞毒性を持つ溶媒の DMSO を添加した Vehicle control のプラスミド伝播頻度に対して有意な低下（$p<0.05$）を示した条件を表す(21)。

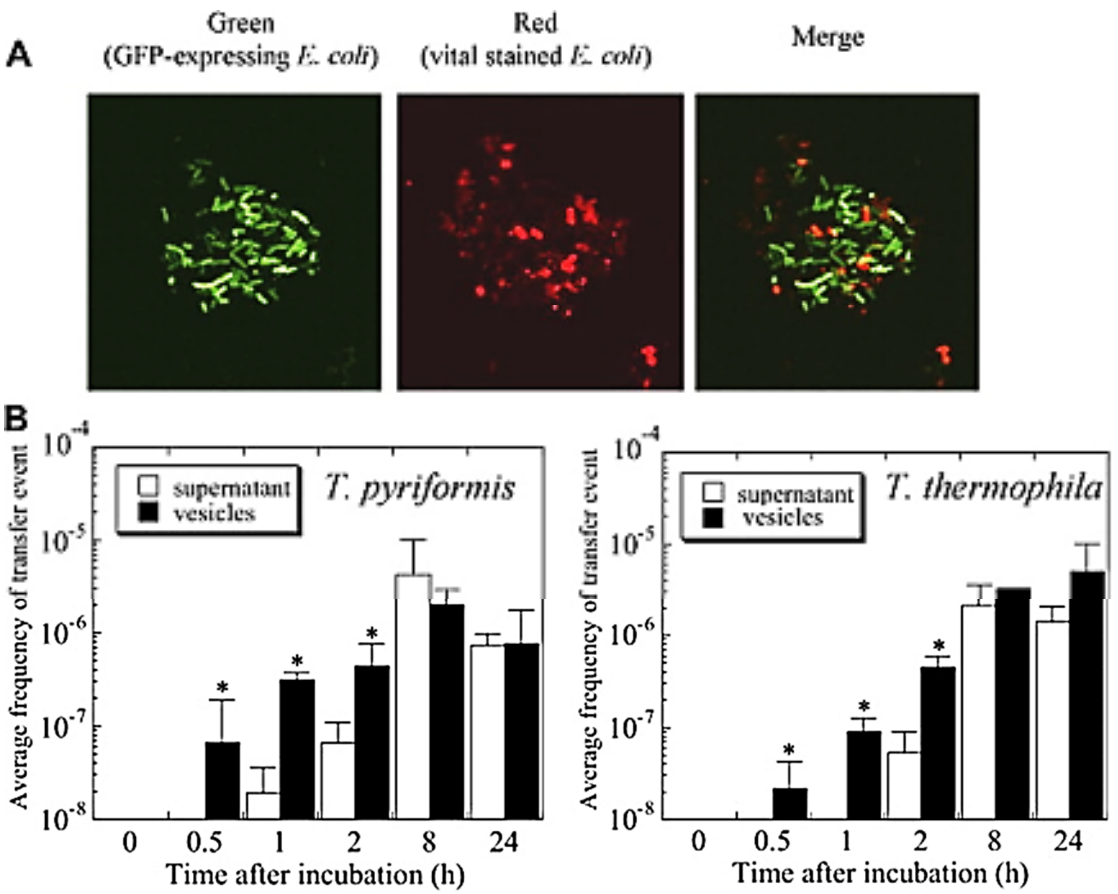


図 2-4　繊毛虫食胞内への大腸菌 2 菌株の集積像観察と共培養上清中大腸菌間と食胞内大腸菌間の経時的なプラスミド伝播頻度の比較

A は ABPC-R 緑色蛍光発光大腸菌および赤色蛍光に生染色した CPFX-R 大腸菌を使用し、繊毛虫 *T. pyriformis* と 30℃で 24 時間共培養後に蛍光顕微鏡（共焦点レーザー顕微鏡）で繊毛虫の食胞を観察（×1000）した(21)。写真左は ABPC-R 緑色蛍光発光大腸菌、写真中は CPFX-R 大腸菌、写真右は写真右と写真中を合成した画像である。B は繊毛虫 *T. pyriformis*（左図）または *T. thermophila*（右図）を使用し、KM-R 大腸菌と CPFX-R 大腸菌を 30℃で共培養して算出したプラスミド伝播頻度（Average frequency of transfer event）(21)。試料は 0、0.5、1、2、8、24 時間後に回収し、Histpaque を使用して繊毛虫食胞（黒）と培養上清（白）を遠心分離し、ガラスビーズにて破砕処理してプラスミド伝播頻度を算出した(21)。*は、それぞれの回収時間における培養上清と繊毛虫食胞を比較し、プラスミド伝播頻度が有意に上昇（$p<0.05$）した場合を表す(21)。

【第三章】

先行研究②：繊毛虫との共培養下における ESSBL 産生大腸菌株の接合伝達頻度

Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum β-lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* (2011) 66: 527-530.

【第三章】　先行研究②：繊毛虫との共培養下における ESSBL 産生大腸菌株の接合伝達頻度

3.1　概要

第二章では、繊毛虫に捕食され食胞内に集積した大腸菌が接合を活発に行っていることを発見した。この現象は、微小生態系内で原生動物の食胞内が細菌の遺伝子水平伝播の場であることを示唆しており、非常に興味深い知見である。しかし、第二章でプラスミド供与菌に使用した大腸菌 SM10λ*pir*$^{+}$株は接合実験に汎用されるラボ菌株であり、他の菌株(臨床分離株など)を使用した場合でもプラスミド伝播頻度が上昇するか検討する必要がある。そこで、プラスミド供与菌に多剤耐性臨床分離株の基質拡張型 β-ラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌を使用し、第二章で確立した *in vitro* 微小生態系で菌株に関係なく、多剤耐性遺伝子までも水平伝播するか検討した。その結果、ラボ菌株同様に使用した臨床分離株 ESBL 大腸菌においてもプラスミド伝播頻度が有意に上昇することが確認できた。また、繊毛虫を熱処理（90℃ 10 分）した場合、真核生物特異的蛋白合成阻害剤（cycloheximide）を添加した場合、食胞形成を阻害するアクチン重合阻害剤（cytochalasin D、latrunculin B）を添加した場合にプラスミド伝播頻度が有意に低下し、大腸菌の接合が繊毛虫食胞内で起こっていることが示唆された。以上の結果から、繊毛虫の食胞内では菌株に関わらず接合頻度が上昇し、多剤耐性遺伝子までも効率よく水平伝播することが判明した。

3.2　緒言

第二章では、プラスミド供与菌に実験室で接合実験に汎用される大腸菌 SM10λ*pir*$^{+}$株を使用し、繊毛虫との共培養下でプラスミド伝播頻度が上昇する興味深い現象を認めた（1)。しかし、この現象が異なる大腸菌株をプラスミド供与菌として使用しても起こるのか更なる検討が必要である。そこで、耐性遺伝子がプラスミド上に存在し、接合によって耐性遺伝子の移行が可能な ESBL 産生菌をプラスミド供与菌の候補とした。ESBL 産生菌は 1980 年代から分離報告が始まった第三世代セファロスポリンやセファマイシン、カルバペネムに耐性を示す多剤耐性菌である。ESBL 産生菌による感染症は近年増加の一途を辿っており、2014 年に WHO が発表したサーベイランスでは、2012 年までに日本で分離された大腸菌の 16.6%が ESBL 産生菌であった(2)。また、ESBL 産生菌の拡散はヒトに留まらず、ペットや家畜などの動物にまで広がりをみせている（3-6)。本章では、このように臨床的意義も大きい ESBL 産生大腸菌をプラスミド供与菌として使用し、共培養後のプラスミド伝播頻度は薬剤耐性を指標として検討を行った。プラスミド供与菌の ESBL 産生大腸菌はセフォタキシム耐性（CTX-R)、シプロフロキサシン感受性（CPFX-S）であり、プラスミド受容菌の CPFX-R 大腸菌株（第二章で使用した菌株）は CTX-S、CPFX-R である。供与菌のプラスミド上にコードする ESBL 産生遺伝子は接合によって移行するが、受容菌の CPFX 耐性遺伝子は染色体上にコードしており接合によって移行しない。したがって、接合によって生じる接合体は

CTX-R、CPFX-R となり、両薬剤を添加した培地で選択培養が可能となる。本章は、第二章で確立した繊毛虫との至適混合培養条件下で、プラスミド供与菌を変更してもプラスミド伝播頻度が上昇するか否かについて検証した。

3.3 方法

原生動物

前章 2.2 で記載した繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* を使用した。培養は PYG 培養液で、30℃湿潤条件下で行った。

細菌

プラスミド供与菌は ESBL 産生大腸菌（CTX-M-27）（北海道大学病院検査・輸血部より分与）を使用した。プラスミド受容菌は前章 2.2 で記載した CPFX-R 大腸菌を使用した。大腸菌の培養は LB 培地を使用し、ESBL 産生大腸菌には cefotaxime（CTX） 2.5μg/mL、CPFX-R 大腸菌には CPFX 5.0μg/mL を添加して 37℃で培養した。

繊毛虫との共培養下における ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌の接合実験

繊毛虫 *T. thermophila* 10^5/0.5mL、ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌が 10^9 CFU/0.5mL ずつ入った大腸菌菌液を使用し、前章の至適混合培養条件（30℃、24 時間）にてプラスミド伝播頻度を検討した（図 3-1）。接合体は CTX 2.5μg/mL・CPFX 5.0μg/mL 添加 LB 培地で、受容菌は CPFX 5.0μg/mL 添加 LB 培地で選択培養し、CFU を算定した（図 3-1）。プラスミド伝播頻度（Average frequency of transfer event）は、接合体菌数を受容菌菌数で除して求めた（図 3-1）。

プラスミド伝播阻害実験

原生動物は繊毛虫 *T. thermophila* 10^5/0.5mL で、プラスミド供与菌は ESBL 産生大腸菌、プラスミド受容菌は CPFX-R 大腸菌を 10^9 CFU/0.5mL で使用し、前章の至適混合培養条件にてプラスミド伝播頻度を検討した。また、繊毛虫の熱処理を 90℃で 10 分間行い、プラスミド伝播頻度への影響を検討した。混和した繊毛虫と大腸菌を再浮遊させる PAS へ真核生物の蛋白合成を特異的に阻害する cycloheximide、食胞形成時のアクチン重合を阻害する cytochalasin D や latrunculin B(14)を添加し、プラスミド伝播頻度への影響を検討した。薬剤濃度は、cycloheximide が 0.1μg/mL と 1.0、5.0μg/mL、cytochalasin D は 5.0μg/mL、latrunculin B は 5.0μg/mL とした。

統計処理

独立した 3 回以上の実験結果をスチューデント *t* 検定で評価し、危険率（p）が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

3.4 結果

繊毛虫との共培養下における ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌の接合実験

プラスミド伝播頻度は、大腸菌単独培養が約 1.0×10^{-10} であったのに対して、繊毛虫との

共培養では 4.2×10^{-6} と有意に上昇した（図 3-2）。同じ条件で行った第二章の KM-R 大腸菌のプラスミド伝播頻度は、大腸菌単独培養が約 1.0×10^{-8}、繊毛虫との共培養では約 1.2×10^{-6} であった(1)。大腸菌単独培養のプラスミド伝播頻度と比較して、KM-R 大腸菌の場合は約 200 倍、ESBL 産生大腸菌の場合は約 400 倍上昇しており、繊毛虫との共培養下で大腸菌のプラスミド伝播頻度が上昇する現象は KM-R 大腸菌に特異的な現象ではなく、どの大腸菌菌株を使用しても起こる可能性が高いと考えられる。

プラスミド伝播阻害実験

無処理の共培養下におけるプラスミド伝播頻度に対して、繊毛虫を加熱処理した場合のプラスミド伝播頻度は約 1/600 となり、有意に低下した（図 3-2、Heat-killed ciliates）。また、無処理の共培養下におけるプラスミド伝播頻度に対して、蛋白合成阻害剤 cycloheximide 5.0μg/mL を添加した場合のプラスミド伝播頻度は約 1/60、アクチン重合阻害剤 latrunculin B 5.0μg/mL、cytochalasin D 5.0μg/mL を添加した場合のプラスミド伝播頻度は共に約 1/80 となり、有意な低下が認められた（図 3-2）。第二章の KM-R 大腸菌を使用した同様の実験では、無処理の共培養下におけるプラスミド伝播頻度に対して繊毛虫を加熱処理した場合は約 1/200、cycloheximide 1.0μg/mL を添加した場合は約 1/50、latrunculin B 5.0μg/mL を添加した場合は約 1/100 の有意な低下が認められている(1)。第二章の cytochalasin D の添加ではプラスミド伝播頻度の有意な低下は認められていないが、第二章と本章のプラスミド伝播阻害実験は概ね同じ結果であった。このように、繊毛虫存在下で誘導される接合伝達頻度の促進は、多剤耐性 ESBL といった臨床分離株でも確認することができた。

3.5 考察

第二章で確立した至適共培養条件下にて、プラスミド供与菌を ESBL 産生大腸菌とした場合でもプラスミド伝播頻度は有意に上昇した。また、繊毛虫または供与菌を熱処理した場合や繊毛虫を cycloheximide によって蛋白合成阻害した場合、latrunculin B および cytochalasin D でアクチン重合阻害した場合にプラスミド伝播頻度が有意に抑制された。これらの結果は、第二章と同じく ESBL 大腸菌が繊毛虫の食胞内で接合を行っていることを示唆している。

ESBL 産生菌は院内感染対策上、注意すべき耐性菌の 1 つである。実際の院内環境で繊毛虫のような原生動物を介して実際に多剤耐性菌の耐性菌遺伝子の伝播が促進しているのか否かについては良くわかっていない。その一方で、院内の乾燥した床や水回りから多数の原生動物(アカントアメーバ)の株化に成功している(未発表データ)。原生動物は、土壌や水系など自然環境のみならず、建物の中まで人の生活環境に広く生息している可能性がある。それ故に、院内感染対策では、主に医療従事者や医療器具を介した伝播に重点を置いた対策を行っているが、本研究の結果は保菌者による環境汚染に対しても対象環境中の原生動物のモニタリングや積極的な除菌治療などの対策を行う必要性があることを示唆している。

3.6 結論

至適共培養条件下では、実験室株と同様に ESBL 産生大腸菌の接合頻度も上昇し、効率良く薬剤耐性遺伝子が伝播することが明らかになった。蛋白合成阻害剤やアクチン重合阻害剤で繊毛虫の捕食活動を阻害した場合にプラスミド伝播頻度が抑制されたことから、この接合伝達も共培養下における接合は繊毛虫の食胞内で行われていることが示唆された。

3.7 参考文献

1. Matsuo J, Oguri S, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Hayashi Y, Kawaguchi K, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H (2010) Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol* 161:711-719.
2. WHO (2014) Antimicrobial resistance global report on surveillance. p.87.
3. Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T (2007) Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 73: 6686-90.
4. Briñas L, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Porrero MC, Domínguez L, Torres C (2005) Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1262-4.
5. Carattoli A, Lovari S, Franco A, Cordaro G, Di Matteo P, Battisti A (2005) Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 833-5.
6. Machado E[1], Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L (2004) Emergence of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Portugal: report of an *Escherichia coli* isolate harbouring *bla* CTX-M-14. *Clin Microbiol Infect* 10: 755-7.
7. Oguri S, Matsuo J, Hayashi Y, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H (2011) Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum β-lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* 66: 527-530.

3.8 第三章図

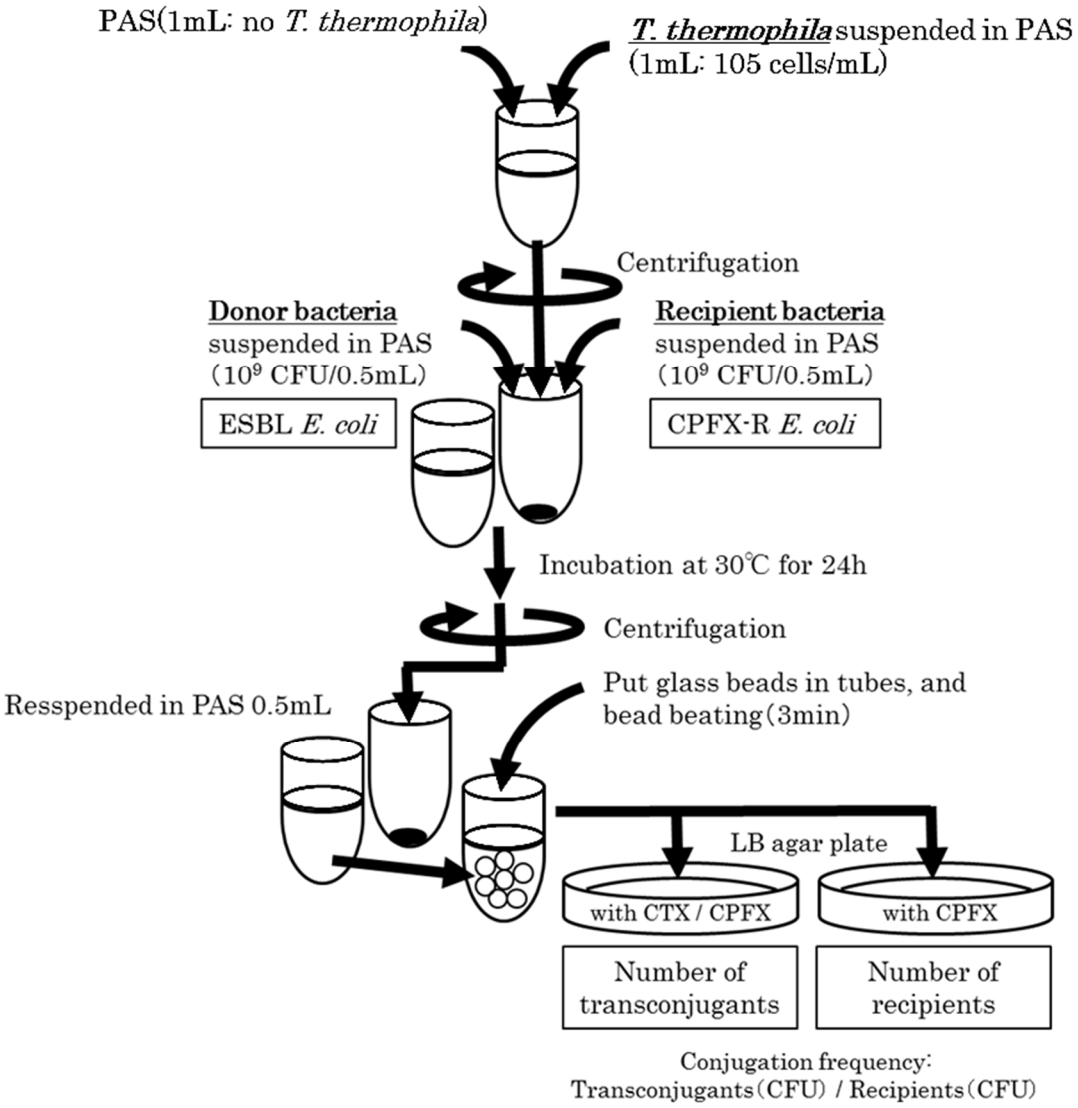


図 3-1　繊毛虫を介したプラスミド伝播実験方法

調製した繊毛虫と ESBL 産生大腸菌、CPFX-R 大腸菌を混和した。30℃にて 24 時間培養後、ガラスビーズにて原生動物を破砕し、接合体と受容菌数を算定した(7)。プラスミド伝播頻度は接合体数を受容菌菌数で除して求めた(7)。

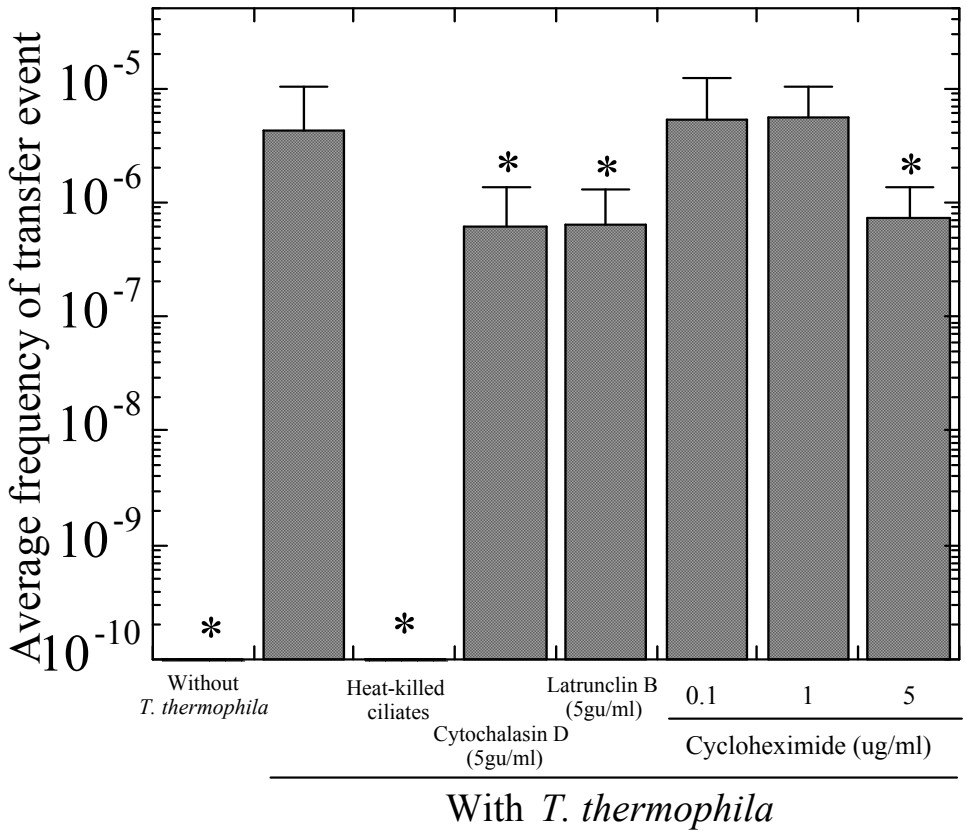


図 3-2　繊毛虫との共培養下における ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌間のプラスミド伝播頻度と加熱処理および薬剤による阻害がプラスミド伝播頻度に与える影響

30℃で 24 時間、繊毛虫と ESBL 産生大腸菌および CPFX-R 大腸菌を共培養、および大腸菌単独培養を行いプラスミド伝播頻度（Average frequency of transfer event）を算出した(7)。また、繊毛虫に対して加熱処理（90℃、10 分間）および蛋白合成阻害薬 cycloheximide、アクチン重合阻害薬 cytochalasin D と latrunculin B を添加してプラスミド伝播頻度に与える影響を検討した(7)。*は大腸菌菌液に繊毛虫添加した条件におけるプラスミド伝播頻度に対して、有意な低下（$p<0.05$）を示した条件を表す。

【第四章】

繊毛虫共培養下における大腸菌の AI-2 蓄積現象

Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol* (2015) 61: 203-210.

【第四章】　繊毛虫共培養下における大腸菌の AI-2 蓄積現象

4.1　概要

第二章と第三章の先行実験から、大腸菌は繊毛虫に捕食されて食胞内に集積することで接合を効率良く行っていることが判明した。このように繊毛虫の食胞内に大腸菌が集積した状況では、菌密度を感知して発動する細菌のクオラムセンシング（遺伝子発現制御機構）が働いている可能性がある。そこで、先行実験で構築した *in vitro* 微小生態系を使用し、培養上清中でクオラムセンシングシグナル分子の 1 つであるオートインデューサー（AI）-2 量の変化を検討した結果、共培養下で AI-2 量の有意な増加が認められた。また、繊毛虫と大腸菌の共培養による AI-2 量の変化と繊毛虫 1 個体に形成される食胞数の間には相関が認められ、大腸菌は食胞内に集積することによって AI-2 を放出していることが示唆された。この現象の機序を解明するために、共培養下における *luxS* 遺伝子（AI-2 産生責任遺伝子）と *ydgG* 遺伝子（AI-2 トランスポーター責任遺伝子）の発現量変化を測定した結果、これらの遺伝子の発現量に増加は認められず、AI-2 の増加は産生や汲出しの亢進ではないことが判明した。次に、大腸菌を赤色蛍光で生染色して共培養し、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡にて繊毛虫食胞内への大腸菌の集積を観察した結果、大腸菌は食胞内に高密度に集積しており、一部の大腸菌は繊毛虫の消化作用で破壊されていた。また、培養液中には大腸菌が集積した多数の食胞が繊毛虫から放出され、さらに繊毛虫外の食胞は崩壊して内容物が漏れ出していた。これらの結果から、共培養による AI-2 量の上昇は、食胞内に破壊された大腸菌中の AI-2 が充満し、この食胞が繊毛虫外に放出されて崩壊することによって AI-2 が培養上清中に拡散したと推察された。本章の結果から、繊毛虫と大腸菌の共培養下では、培養上清中の AI-2 量が上昇してクオラムセンシングが発動している可能性が示唆された。

4.2　緒言

第二章と第三章の先行研究にて、繊毛虫に捕食されながらも大腸菌が接合によって遺伝子を水平伝播させていることが判明した。微小生態系においてもこの現象が起こっているとすれば、細菌の生存に有利な遺伝子は原生動物を介して効率良く菌株間や菌種間に拡散させることが可能であり、有効な生存戦略であると考えられる。一方、繊毛虫の食胞内という限られた場所ではあるが、大腸菌が集積している状況では、菌密度を感知するクオラムセンシングが機能している可能性が考えられる。第一章で述べた通り、クオラムセンシングは細菌密度を感知して状況に有効な遺伝子の発現を調整する機構であり、細菌の生存戦略で重要な役割を担っている。

本章では、共培養下でクオラムセンシングが機能している可能性を検討するために、まず先行研究で構築した繊毛虫と大腸菌の至適混合培養を行い、クオラムセンシングのシグナル分子の 1 つである AI-2 量の変化を測定した。共培養上清中の AI-2 量測定には、AI-2

の増加に反応して蛍光発光量を増強させる *Vibrio harveyi* BB170 株を使用し、その相対発光量（RLU : relative light unit）として定量した。また、生物発光に基づく測定では使用する繊毛虫や細菌が原因でアーチファクトが混入する可能性があるために、使用する大腸菌株の *luxS* 遺伝子（AI-2 産生責任遺伝子）を欠損させた変異株を作製し、同じ共培養条件で AI-2 量を測定した。さらに、共培養下の AI-2 量の変化には繊毛虫が形成する食胞内に大腸菌が集積することが密接に関係していると考えられるため、アガローススライドゲル法によって繊毛虫 1 個体中に形成される食胞数を算定し、食胞数の側面から AI-2 量との相関を検討した。次に、AI-2 量の変化を遺伝子発現の側面から検討するために、共培養下における大腸菌の *luxS* 遺伝子および *ydgG* 遺伝子（AI-2 トランスポーター産生責任遺伝子）の RNA 発現量変化を qRT-PCR（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction）で定量測定した。最後に、共培養下で繊毛虫食胞内へ大腸菌が集積していることを観察するために、大腸菌を赤色蛍光に生染色して共培養を行い、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

これらの実験から得られる結果から、繊毛虫との共培養下において大腸菌がクオラムセンシングを発動している可能性を検討し、さらに AI-2 量の変化機序を究明することが本章の主題である。

4.3 方法

原生動物

第二章 2.2 で記載した繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* を使用した。培養は PYG 培養液で、30℃湿潤条件下で行った。

細菌

第三章 3.2 で記載した ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌を使用した。大腸菌の培養は LB 培地を使用し、ESBL 産生大腸菌には cefotaxime（CTX） 2.5μg/mL、CPFX-R 大腸菌には CPFX 5.0μg/mL を添加して 37℃で培養した。AI-2 測定には、*Vibrio harveyi* BB170 株[神谷博士（杏林大学）より分与]を使用した(1,2)。*V. harveyi* BB170 株は AI-2 量の増加とともに蛍光発光量を増強させる菌株であり、試料中の AI-2 量は *V. harveyi* BB170 株の蛍光発光量を測定することによって定量が可能となる。*V. harveyi* BB170 株の培養は、1％(w/v) NaCl 添加 LB 培地にて 30℃で行った。

luxS 遺伝子欠損変異株の作成

生物発光による定量測定では、使用する繊毛虫や大腸菌、*V. harveyi* BB170 株の状態の影響を受け、非特異的アーチファクトを含んだ測定結果となる危険がある。そのため、測定系の特異性を保証するために *luxS* 遺伝子欠損変異株を作製し、測定系の妥当性を検証する必要がある。そこで、使用する ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌の *luxS* 遺伝子欠損変異株の作成を、杏林大学医学部感染症学講座の花輪博士に依頼した。ESBL 産生大腸菌は *E. coli* NA114 株と *E. coli* SE15、CPFX-R 大腸菌は *E. coli* K12 株の *luxS* 遺伝子配列を基にプライマ

ーを設計した（表 4-1）。図 4-1 は、*luxS* 遺伝子欠損フラグメントの作製までのプライマー設計位置を示している。まず、ESBL 産生大腸菌の 5'末端に EcluxS-F1/R1-3、3'末端に EcluxS-F3/R3 を、CPFX-R 大腸菌の 5'末端に EcluxS-F1/R1、3'末端に EcluxS-F2/R2 を使用して *luxS* 遺伝子の両末端をわずかに含む *luxS* 遺伝子近傍のフラグメントを合成した（図 4-1）。合成したフラグメントに対して ESBL 産生大腸菌は EcluxS-F1/R3、CPFX-R 大腸菌は EcluxS-F1/R2 を使用して overlap extension PCR 法(1)を行うことにより、わずかに含まれている *luxS* 遺伝子断片も欠落し *luxS* 遺伝子が欠損したフラグメントが得られた（図 4-1）。図 4-2A は、*luxS* 遺伝子欠損フラグメント作製後の工程も含めて図解している。作製した *luxS* 遺伝子欠損フラグメントを制限酵素 BamHI と SphI で処理し、プラスミド pYAK1(3)に導入した(4)（図 4-2、A）。これらのプラスミドを CPFX-R 大腸菌は pYAK1c、ESBL 産生大腸菌は pYAK1e と命名し、大腸菌 SM10λpir 株(5)へ導入後、接合によって ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌それぞれに伝達させ、*luxS* 遺伝子欠損変異株の ESBL 産生大腸菌 *ΔluxS* と CPFX-R 大腸菌 *ΔluxS* を 2 株ずつ作製した（図 4-2、A）。得られた ESBL 産生大腸菌 *ΔluxS* および CPFX-R 大腸菌 *ΔluxS* に対して、*luxS* 遺伝子領域の欠損を確認するための PCR を行った。CPFX-R 大腸菌 *ΔluxS* に対してはプライマーEcluxS-F1/EcluxS-R2 および EcluxS-CHF/EcluxS-CHR を使用した。ESBL 産生大腸菌 *ΔluxS* に対してはプライマーEcluxS-F1/EcluxS-R3 および EcluxS-CHF/EcluxS-CHR を使用した。検討した 4 株全てで野生株（WT）の分子サイズより *luxS* 遺伝子の 420bp 分小さい PCR 産物が得られた（図 4-2、B）。以上から、*luxS* 遺伝子欠損変異株の作製は、成功したと考えられた。

繊毛虫共培養下における培養上清中の AI-2 量

繊毛虫の捕食によって食胞内に集積した大腸菌が菌密度を感知してクオラムセンシングを発動している可能性を検討するため、繊毛虫と大腸菌の共培養上清中の AI-2（クオラムセンシングシグナル分子）量の変化を測定した。繊毛虫は PAS に 10^2、10^3、10^4、10^5 /0.5mL となるように調製した。ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌は PAS 0.5mL に 600nm における細菌濁度（bacterial turbidity）0.001、0.025、0.050、0.100、0.250、0.500、1.000、1.500、2.000 ずつとなるように調製した（図 4-3）。繊毛虫浮遊液と大腸菌菌液を組み合わせて混和し、30℃で 24 時間の培養を行い、0.2μm フィルターを通して上清を回収した（図 4-3）。1.0% NaCl 添加 LB 培地にて培養した *V. harveyi* BB170 株は autoinducer bioassay（AB）液体培地 [3.7%(w/v) brain-heart infusion、1.25%(w/v) NaCl、1.23%(w/v) $MgSO_4$、0.1M L-arginine]に 600nm における細菌濁度 1.000 となるように調製し、AB 液体培地にて 5000 倍希釈して測定用菌液とした（図 4-3）。測定用菌液 135μL と上清 15μL を混和し、30℃、180rpm で 5 時間の振盪培養を行い、100μL を用いて Luminescencer-JNRII AB-2300（アトー株式会社）にて蛍光発光量を測定した（図 4-3）。また、測定間の蛍光発光量の補正のため、残りの菌液を 1.0% NaCl 添加 LB 培地に塗沫して 30℃にて培養を行い、得られた CFU で蛍光発光量を除した（図 4-3）。したがって、本測定法で得られる AI-2 量は、「相対発光量（RLU）＝*V. harveyi* BB170 株 1×10^5CFU/mL が発した蛍光発光量」として求めている。

本研究で検討する AI-2 量の変化が、繊毛虫との共培養による大腸菌の特異的な反応であることを確認するため、繊毛虫 10^2/0.5mL と 600nm における細菌濁度 0.05 に調製した ESBL 産生大腸菌、CPFX-R 大腸菌、およびそれらの *luxS* 遺伝子欠損変異株を組み合わせて共培養した試料を上記 AI-2 測定法にて測定した。

アガローススライドゲル法による食胞数算定

繊毛虫の捕食により大腸菌が食胞内に集積することが AI-2 量の変化に関連している可能性があるため、共培養下における繊毛虫 1 個体内に形成される食胞数の算定を行った。繊毛虫を光学顕微鏡下で観察すると、繊毛虫内の食胞は重なり合っているために数えることができない。一方、アガローススライドゲル法は、スライドガラス上に薄く展開したアガロースゲルに繊毛虫を滴下し、アガロースゲルの吸水によって繊毛虫を破裂させてゲル平面上に食胞を展開させることによって、食胞数の算定を可能とする方法である(6)。繊毛虫は PAS に 10^2、10^3、10^4、10^5/0.5mL となるように調製した。ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌は PAS 0.5mL に 600nm における細菌濁度（bacterial turbidity）0.001、0.025、0.050、0.100、0.250、0.500、1.000、1.500、2.000 ずつとなるように調製した。繊毛虫浮遊液と大腸菌菌液を組み合わせて混和し、30℃で 24 時間の培養を行った後に、繊毛虫を PAS で洗浄した。スライドガラスに 2%(w/v) agarose LB 培地を厚さ約 2 mm となるように展開し、試料を 20～50μL 滴下してカバーガラスを乗せ、室温にて 5 分間静置して繊毛虫をゲル上で破裂させた。繊毛虫 100 個体について、繊毛虫 1 個体中に形成された食胞数（Number of vacuoles per ciliates）を光学顕微鏡で算定した。

繊毛虫共培養下における生染色した大腸菌の動態観察

共培養下で繊毛虫の食胞内に大腸菌が集積しているか可視化するために、使用する大腸菌を赤色蛍光に生染色し、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。ESBL 産生大腸菌を PAS 0.5mL に 600nm における細菌濁度（bacterial turbidity）0.500 となるように調製し、生染色には PKH-26 labeling kit(MINI26; Sigma)を使用した(7)。PKH は、蛍光発光部位と脂質親和性部位から構成され、脂質親和性部位が細胞膜に固定されることにより、細胞の表面で長期間安定して強い蛍光発光が得られる（http://www.sigmaaldrich.com/japan/lifescience/cell-biology/pkh.html）。また、PKH は細胞毒性がなく、標識した細胞は正常通りの増殖や生体反応を行う（http://www.sigmaaldrich.com/japan/lifescience/cell-biology/pkh.html）。調製した ESBL 産生大腸菌を 5000rpm で 5 分間遠心して上清を除去し、Diluent C 250μL にピペッティングにて再浮遊させて 2×Cell suspension とした。Diluent C 250μL に PKH26 ethanolic dye solution 1μL を添加し、2×Dye solution に調製した。2×Cell suspension 250μL を 2×Dye solution に添加し、ピペッティングで混和して 3 分間静置後、1% BSA 500μL を添加して 1 分間の静置で染色を停止させた。洗浄のため 5000rpm で 5 分間遠心し、上清を除去して PAS 1mL に再浮遊させる操作を 2 回繰り返し、PAS 0.5mL に再浮遊させて使用菌液とした。使用菌液に繊毛虫 10^3/0.5mL を添加し、30℃で 24 時間の培養を行った。培養後、PAS にて繊毛虫を洗浄し、蛍

光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡にて ESBL 産生大腸菌の繊毛虫食胞内への集積像を観察した。

繊毛虫共培養下における大腸菌の *luxS* 遺伝子および *ydgG* 遺伝子の発現量

AI-2 が培養上清中に蓄積するには、大腸菌が AI-2 を産生し、トランスポーターを介して菌体外に輸送しなければならない。したがって、AI-2 が蓄積する過程では、AI-2 産生責任遺伝子である *luxS* 遺伝子と AI-2 トランスポーター責任遺伝子である *ydgG* 遺伝子が高発現していると推測される。そこで、繊毛虫との共培養下で、これらの遺伝子の発現量を測定し、AI-2 量の変化に関与しているか検討を行った。繊毛虫は PAS に 10^3/0.5mL、ESBL 産生大腸菌は PAS 0.5mL に 600nm における細菌濁度（bacterial turbidity）0.500 となるように調製した。30℃にて共培養および大腸菌単独培養を行い、6 時間後と 24 時間後に High Pure RNA Isolation Kit（Roche）にて RNA の抽出を行った。得られた RNA は ReverTraAce qPCR RT Master Mix（東洋紡）にて cDNA へ逆転写し、SYBR Green Real-time PCR Master Mix（東洋紡）を使用して *luxS* 遺伝子および *ydgG* 遺伝子について qRT-PCR を実施した。発現量解析のために、細胞の維持に不可欠で常に一定量の発現が認められるハウスキーピング遺伝子として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ合成の責任遺伝子である *gst* 遺伝子(8)および大腸菌のシャペロン（蛋白が高次構造へ変化するのを介助する蛋白）GroEL 蛋白合成の責任遺伝子である *groEL* 遺伝子(9)について qRT-PCR を実施した。使用したプライマーは表 4-1 に示した。

統計処理

独立した 3 回以上の実験結果をスチューデント *t* 検定で評価し、危険率（p）が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。食胞数と AI-2 量の相関係数を求め、相関関係を検討した。

4.4 結果

繊毛虫共培養下における培養上清中の AI-2 量

大腸菌単独培養下では、検討した全ての細菌濁度で AI-2 の増加は認められなかった（図 4-4、Without ciliates）。これは、培養液が無栄養の PAS であり、培養中に大腸菌の増殖が起こらなかったためと考えられる。一方、繊毛虫との共培養下では、AI-2 量は細菌濁度に非依存的に増加し、繊毛虫数に関わらず細菌濁度 0.500 付近で最大となり、大腸菌単独培養と比較して有意に増加していた（図 4-4）。共培養下における AI-2 最大値は 4,000 RLU に達し、大腸菌単独培養と比較して 20 倍以上となった（図 4-4）。以上から、繊毛虫と大腸菌との共培養系では培養液中の AI-2 濃度が増加しており、クオラムセンシングが発動している可能性が示唆された。

一方、野生株の ESBL 産生大腸菌（CTX-M ESBL *E. coli*）および CPFX-R 大腸菌（CPFX-R *E. coli*）、*luxS* 遺伝子欠損変異株である ESBL 産生大腸菌 *ΔluxS*（CTX-M ESBL *E. coli* Δ*luxS*）および CPFX-R6 大腸菌 *ΔluxS*（CPFX-R *E. coli* Δ*luxS*）を組み合わせて繊毛虫と共培養した結果、野生株同士を使用した場合と比較して ESBL 産生大腸菌 *ΔluxS* と CPFX-R 大腸菌、*luxS*

遺伝子欠損変異株同士を組み合わせた場合で AI-2 の有意な減少が認められた（表 4-2）。また、野生株と *luxS* 遺伝子欠損変異株を組み合わせた場合の AI-2 量を比較すると、ESBL 産生大腸菌の共培養下における AI-2 供給能が約 3 倍高いことが推測された（表 4-2）。ESBL 産生大腸菌と CPFX-R 大腸菌 *ΔluxS* を組み合わせた場合では、野生株同士の場合と比較して有意な減少は認められなかったのは、野生株間の AI-2 供給能の差であると考えられる。一方、*luxS* 遺伝子欠損変異株同士を組み合わせた共培養では AI-2 の産生が認められなかった（表 4-2）。このように繊毛虫と大腸菌との共培養溶液から検出された AI-2 は、アーチファクトではなく繊毛虫と共培養したことにより大腸菌から特異的に産生誘導されたことがうかがえた。

アガローススライドゲル法による食胞数算定

アガローススライド上で繊毛虫は破裂するが、繊毛虫 1 個体は顆粒状類円形として鑑別できた（図 4-5、A）。また、繊毛虫 1 個体中の食胞は黒色円形の小胞として観察でき、平面上に拡散して算定が可能であった（図 4-5、A 黄矢印）。

共培養下では、繊毛虫が形成する食胞数は大腸菌数に依存して増加傾向を示した（図 4-5、B）。繊毛虫単独培養の食胞数と比較して多くの細菌濁度で有意な増加が認められ、平均食胞数の最大値は約 20 個に達した（図 4-5、B）。繊毛虫と大腸菌の共培養では、AI-2 量と食胞数が細菌濁度に依存して増加しており、両者は関連した現象であると推察されることから相関関係を検討することとした。また、グラフ中で示している標準誤差が大きいことから、共培養下の繊毛虫の捕食活動は個体間差が大きいことが示唆された（図 4-5、B）。

食胞数と AI-2 の相関

繊毛虫と大腸菌の共培養下で AI-2 量と食胞数が細菌濁度に依存して増加する現象が認められたことから、両者の相関関係を検討した。結果は、相関係数（r）=0.626 と AI-2 量と食胞数の間に相関が認められた（図 4-6）。この結果から、共培養下における AI-2 量の増加は、繊毛虫の捕食に対する大腸菌の反応であることが推察された。

繊毛虫共培養下における生染色した大腸菌の動態観察

図 4-7A の上段は繊毛虫の位相差顕微鏡像で、繊毛虫 1 個体は顆粒類円形として観察され、内部に黒色円形の食胞が 3 個観察された。中段は赤色蛍光に生染色した大腸菌の蛍光顕微鏡画像である。下段は、上段と中段の画像を合成した画像であり、繊毛虫食胞内に大腸菌が集積していることが観察できた。

図 4-7B は繊毛虫の食胞を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像である。食胞内に高密度に集積した大腸菌が鮮明に観察でき、白矢印で示したように、一部の大腸菌は断片化していた。これは、繊毛虫の消化によって大腸菌が溶菌したためと考えられる。

図 4-8 の上段は位相差顕微鏡像であり、星印（白）で示した繊毛虫の周囲に複数の黒色円形の食胞が放出されている像が観察された。中段は大腸菌の蛍光顕微鏡画像である。下段は、上段と中段の画像を合成した画像である。繊毛虫外に放出された食胞内にも大腸菌の集積が認められ、青矢印で示した食胞は崩壊が始まっており、拡大図（enlarged）では食胞

の内容物が漏れ出していることが確認された。第二章にて、繊毛虫食胞と培養上清を分離して、それぞれのプラスミド伝播頻度の経時的変化の検討を行ったが、共培養 8 時間後から両者のプラスミド伝播頻度が均一化する現象が観察された。今回の結果から、この均一化は放出された食胞内で生存した接合体が、食胞の崩壊と共に培養上清に拡散したと考えられる。

これまでの結果から、共培養溶液中の AI-2 量の増加は、繊毛虫の食胞内への大腸菌の集積と、それに伴う菌体破壊、さらにそれらを包含した食胞の繊毛虫から培養液中への放出が関与していると考えられた。

繊毛虫共培養下における大腸菌の *luxS* 遺伝子および *ydgG* 遺伝子の発現量

繊毛虫と共培養（Tth）した場合の *luxS* 遺伝子相対発現量（左図：*luxS*/*gst* 遺伝子、右図：*luxS*/*groEL* 遺伝子）は、大腸菌単独培養（－）した場合と比較して培養 24 時間後に有意な上昇は認められなかった（図 4-9、A）。同じく、繊毛虫と共培養した場合の *ydgG* 遺伝子相対発現量（左図：*ydgG*/*gst* 遺伝子、右図：*ydgG*/*groEL* 遺伝子）は、大腸菌単独培養した場合と比較して培養 6 時間後および 24 時間後共に有意な上昇は認められなかった（図 4-9、B）。*luxS* 遺伝子は AI-2 産生の責任遺伝子、*ydgG* 遺伝子は AI-2 トランスポーターの責任遺伝子であり、共培養下においてこれらの遺伝子発現量が上昇しないということは、AI-2 量の増加が AI-2 の産生や汲出しの亢進とは異なる機序で起こっていることを示唆している。

4.5 考察

今回の検討で、繊毛虫と大腸菌との共培養条件下において、細菌濁度に非依存的にクオラムセンシングシグナル分子の AI-2 が増加する現象が観察された。この現象は *luxS* 遺伝子変異株を使用した共培養では認めらなかったことから、繊毛虫による捕食に対する大腸菌の特異的な反応であると考えられる。また、共培養下で繊毛虫内に形成される食胞数と培養上清中 AI-2 量との間に相関が認められ、繊毛虫の捕食によって大腸菌が食胞内に集積することが要因となり、AI-2 量が増加することが裏付けられた。この AI-2 の培養液中の蓄積現象の誘発には、大腸菌と繊毛虫の最適な濃度の組み合わせが必要なのかもしれない。

では、共培養下で認められた AI-2 量の増加現象は、どのような機序で起こるのだろうか。共培養下において大腸菌の AI-2 合成責任遺伝子である *luxS* 遺伝子と、産生された AI-2 を菌体外に排出するトランスポーター責任遺伝子の *ydgG* 遺伝子の発現量増加は認められなかった。今回の検討は共培養 6 時間後と 24 時間後だけであるため、共培養早期（0～6 時間）での両遺伝子の発現量を検討する必要があるが、今回の結果からは培養上清中の AI-2 増加が産生と汲出しの亢進とは異なる機序で起こっていると考えられた。次に検討を行った共培養下の大腸菌の動態観察では、繊毛虫の食胞内に高密度に取り込まれた大腸菌が観察され、一部の大腸菌は溶菌している像が認められた。さらに、培養上清中には繊毛虫から放出された食胞が多数認められた。これらの結果から、共培養下における AI-2 の増加は、まず繊毛虫食胞内で大腸菌が溶菌することによって大腸菌内の AI-2 が食胞内に蓄積する。次

に、繊毛虫が培養上清中に食胞を放出し、食胞内に蓄積した AI-2 が培養上清中に拡散することによって起こると考えられた。

これまでのクオラムセンシングに関する研究は、菌密度の増加を感知する細菌の反応として捉えられてきた。しかし、本研究の結果から、細菌が障害されても環境中の AI-2 量が増加し、クオラムセンシングが起動する新たな側面が示唆された。では、今回構築した *in vitro* 微小生態系で大腸菌がクオラムセンシングによってどのような生存戦略を展開できるであろうか。繊毛虫の消化によって大量の大腸菌が死滅して放出される AI-2 は環境中に蓄積し、繊毛虫の周囲に存在する大腸菌のクオラムセンシングを起動させる。まず、AI-2 の増加を感知した大腸菌は *mqsR* 遺伝子を転写して司令塔因子 MqsR を合成する(11)。MqsR は *qseBC* 遺伝子を転写させ、合成された応答制御因子 QseB とセンサーキナーゼ QseC によって鞭毛合成のための転写カスケード（*flhDC*→*fliA*→*fliC*＋*motA*）が開始する(11)。鞭毛を合成した大腸菌の運動能は向上し、繊毛虫の捕食を回避できる可能性が高まると推測できる。また、MqsR はバイオフィルムの形成も促進させることが報告されており(11)、バイオフィルムの物理障壁によって繊毛虫の捕食を妨害できると考えられる。このように、大腸菌がクオラムセンシングを危機感知センサーとして利用しているとすれば、共培養下で大腸菌の生存性が向上すると推測できる。では、この *in vitro* 微小生態系で確認された現象が、実際に自然環境でも起こっていると仮定してみよう。AI-2 はグラム陽性・陰性菌問わず多くの菌種がクオラムセンシングのシグナル分子として利用している(11)。つまり、菌種を問わず AI-2 を産生できる細菌が大量に原生動物によって消化されれば、原生動物の周囲に存在する細菌のクオラムセンシングが発動し、その生存率を向上させていることが考えられる。また、多くの菌種が AI-2 を産生するために *luxS* 遺伝子を保存おり、クオラムセンシングで細菌の生存性向上に関連する遺伝子が制御されている事実は、自然環境中でクオラムセンシングを菌密度感知だけで使用しているのではなく、危機感知としても利用しているためではないだろうか。

4.6 結論

繊毛虫と大腸菌の共培養下で、クオラムセンシングのシグナル分子である AI-2 濃度の上昇が認められた。しかし、*luxS* 遺伝子と *ydgG* 遺伝子の発現量に変化は認められず、この現象は繊毛虫の消化によって大腸菌が溶菌し、菌体内の AI-2 が培養上清中に拡散することによって起こると考えられた。本研究成果は、微小生態系におけるクオラムセンシングの新たな発動機序を示唆している。

4.7 参考文献

1. Aharoni R, Bronstheyn M, Jabbour A, Zaks B, Srebnik M, Steinberg D (2008) Oxazaborolidine derivatives inducing autoinducer-2 signal transduction in *Vibrio harveyi*. *Bioorg. Med Chem* 16: 1596–1604.

2. Anand SK, Griffiths MW (2003) Quorum sensing and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J Food Microbiol* 85: 1–9.
3. Kodama T, Akeda Y, Kono G, Takahashi A, Imura K, Iida T, Honda T (2002) The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. *Cell Microbiol* 4: 213-22.
4. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77: 61-8.
5. Miller VL, Mekalanos JJ (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J Bacteriol 170: 2575-83.
6. Schlimme W, Baur B, Hanselmann K, Jenni B (1995) An agarose slide method to follow the fate of bacteria within digestive vacuoles of protozoa. *FEMS Microbiol Lett* 133: 169–173.
7. Wallace PK, Tario JD Jr, Fisher JL, Wallace SS, Ernstoff MS, Muirhead KA (2008) Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry A* 73: 1019–1034.
8. Mith H, Clinquart A, Zhiri A, Daube G, Delcenserie V (2015) The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 362: 1–7.
9. Teng LJ, Hsueh PR, Wang YH, Lin HM, Luh KT, Ho SW (2001) Determination of *Enterococcus faecalis groESL* full-length sequence and application for species identification. *J Clin Microbiol* 39: 3326–3331.
10. Medellin-Pena MJ, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths MW (2007) Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 73: 4259–4267.
11. González Barrios AF, Zuo R, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK (2006) Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* 188: 305-316.
12. Oguri S, Hanawa T, Matsuo J, Ishida K, Yamazaki T, Nakamura S, Okubo T, Fukumoto T, Akizawa K, Shimizu C, Kamiya S, Yamaguchi H (2015) Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol* 61: 203-210.

4.8　第四章図表

表 4-1　使用したプライマーリスト

Primer	Sequence (5'>3')	Reference
For establishment of *luxS* mutants		
EduxS-F1	*ggccggatcc§CGG CGA AGC GTA TCA GA	This study
EduxS-R1	tctctttcggcagtgcca CTG CAG GCG CTTC CAT CC	This study
EduxS-F2	ggatggaagcgcctgcag TGG CAC TGC CGA AAG AGA	This study
EduxS-R2	ggccgcatgc TTG CCA CCG GAA CGA CTG	This study
Ec luxS-R1-3	ttcttcgttgctgttgatgc CTG CAG GCG CTT CCA TCC	This study
EduxS-F3	ggatggaagcgcctgcag GCA TCA ACA GCA ACG AAG AA	This study
EduxS-R3	ggccgcatg ACC GGG TATG GGC AAA GA	This study
EduxS-CHF	TTG CGG TGT GGC TGG AAA AAC	This study
EduxS-CHR	GAC GCA ACA GCA GGC ATCA GG	This study
For detection of *luxS* gene expression		
luxS-F	GAT CAT ACC CGG ATG GAA G	10
luxS-R	AGA ATG CTA CGC GCA ATA TC	
For detection of *ydgG* gene expression		
ydgG-F	CCC TAT CGC TCA GGT ACT GG	This study
ydgG-R	TGT TCA AGC GCA ATT TTG AC	This study
House keeping genes (*gst* and *groEL*)		
gst-F	CTT TGC CGT TAA CCC TAA GGG	8
gst-R	GCT GCA ATG TGC TCT AAC CC	
groEL-F	GGN GAC GGN ACN ACN ACN GCA ACN GT	9
groEL-R	TCN CCR AAN CCN GGY GCN TTN ACN GC	

*はクローニングのリンカーを、§は制限酵素の切断箇所を表す(12)。

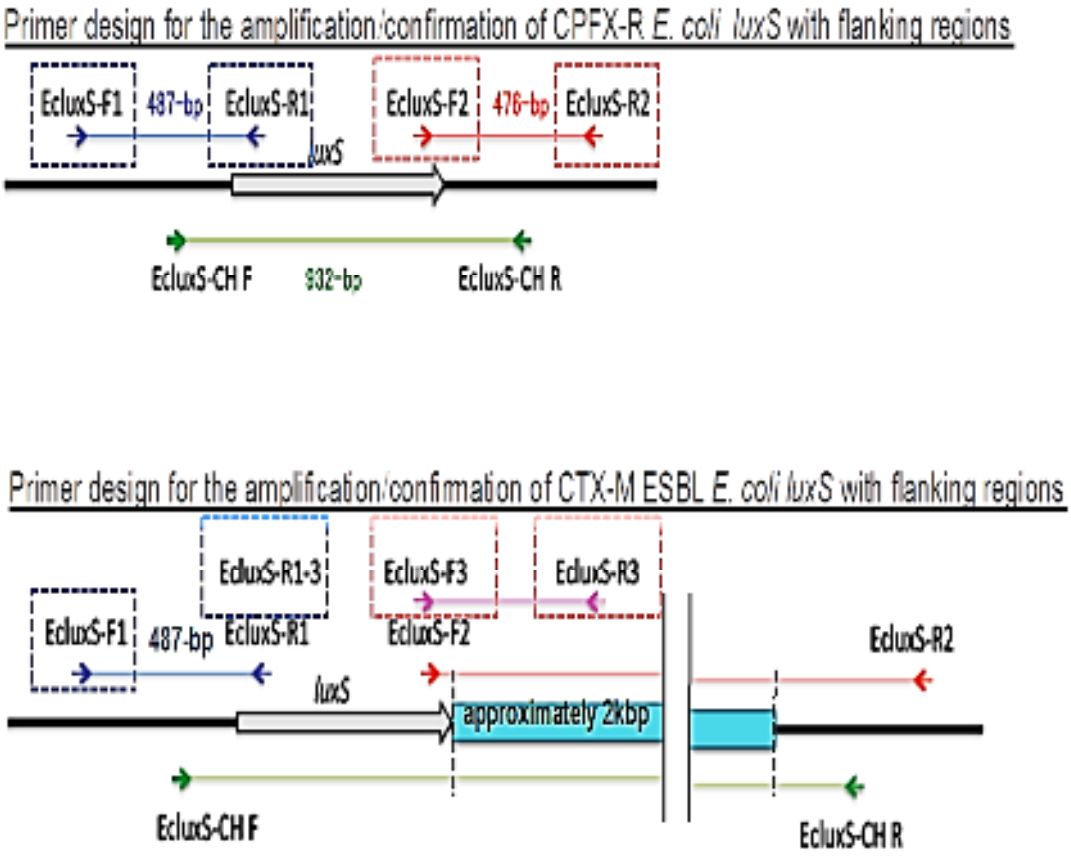


図 4-1　*luxS* 遺伝子欠損フラグメント作製のためのプライマー設計位置

luxS 遺伝子欠損フラグメント作製のために設計したプライマーの概略を示す。まず、青色と赤色の点線枠のプライマーセットを使用し、*luxS* 遺伝子の両端近傍のフラグメントを作製した(12)。次に緑矢印で示したプライマーセットを使用して overlap extension PCR 法(1)を行い、*luxS* 遺伝子欠損フラグメントを作製した(12)。

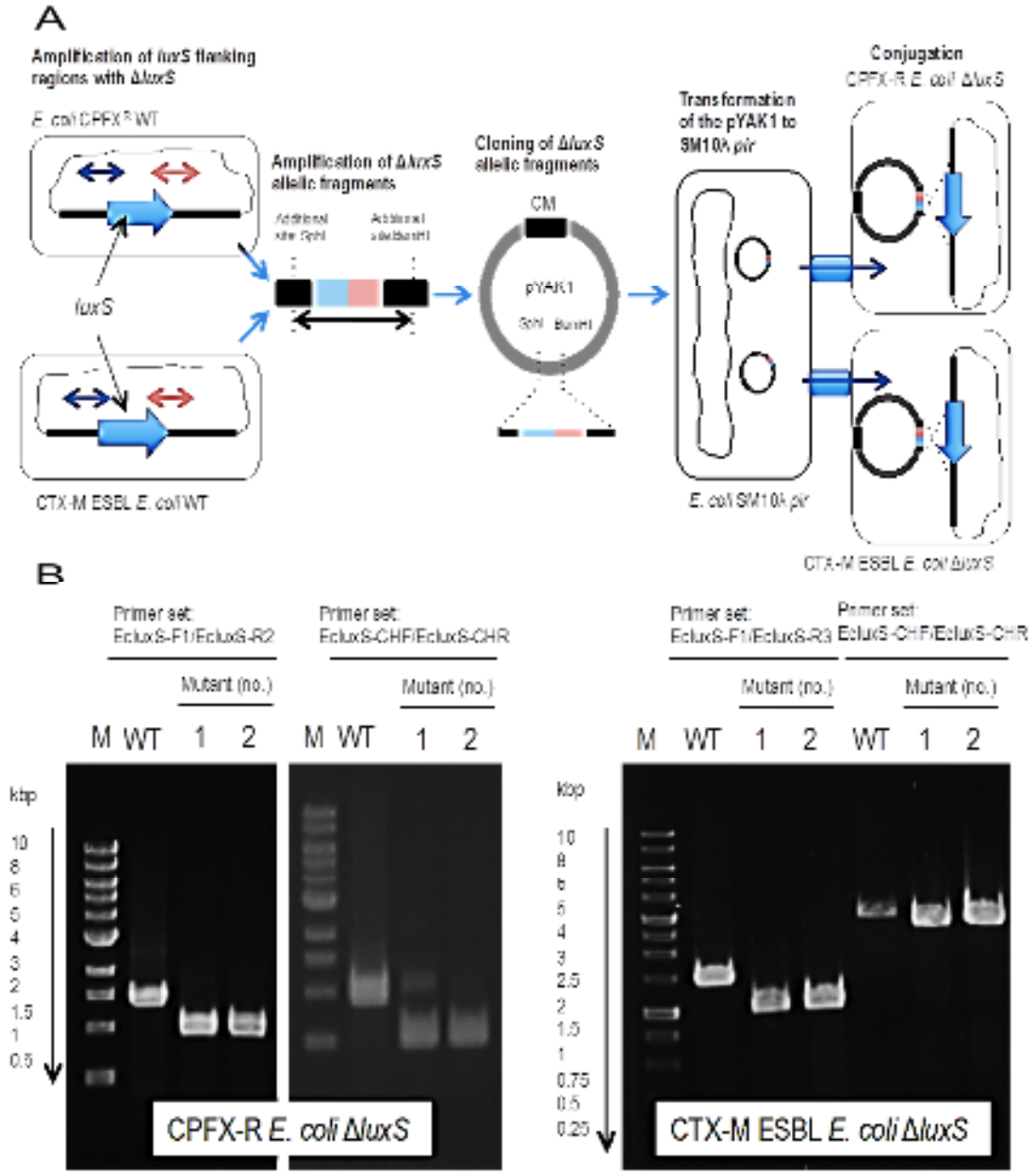


図 4-2　*luxS* 遺伝子欠損株作製の概略と PCR による *luxS* 遺伝子欠損の確認

A は *luxS* 遺伝子欠損株作製の概略である(12)。overlap extension PCR 法(1)で作成した *luxS* 遺伝子欠損フラグメントを制限酵素でプラスミド pYAK1 に組み込み、大腸菌 SM10 λ pir $^{+}$株に導入した(12)。接合によってそれぞれ ESBL 産生大腸菌野生株と CPFX-R 大腸菌野生株に *luxS* 遺伝子欠損フラグメントを含むプラスミドを移行した(12)。B は作製した *luxS* 遺伝子欠損株の PCR による確認結果である(12)。M は分子マーカー、WT は野生株を表す(12)。確認を行った 4 株とも野生株の PCR 産物より *luxS* 遺伝子 420bp 分小さな PCR 産物が認められ、*luxS* 遺伝子欠損株の作製が成功したことが確認された(12)。

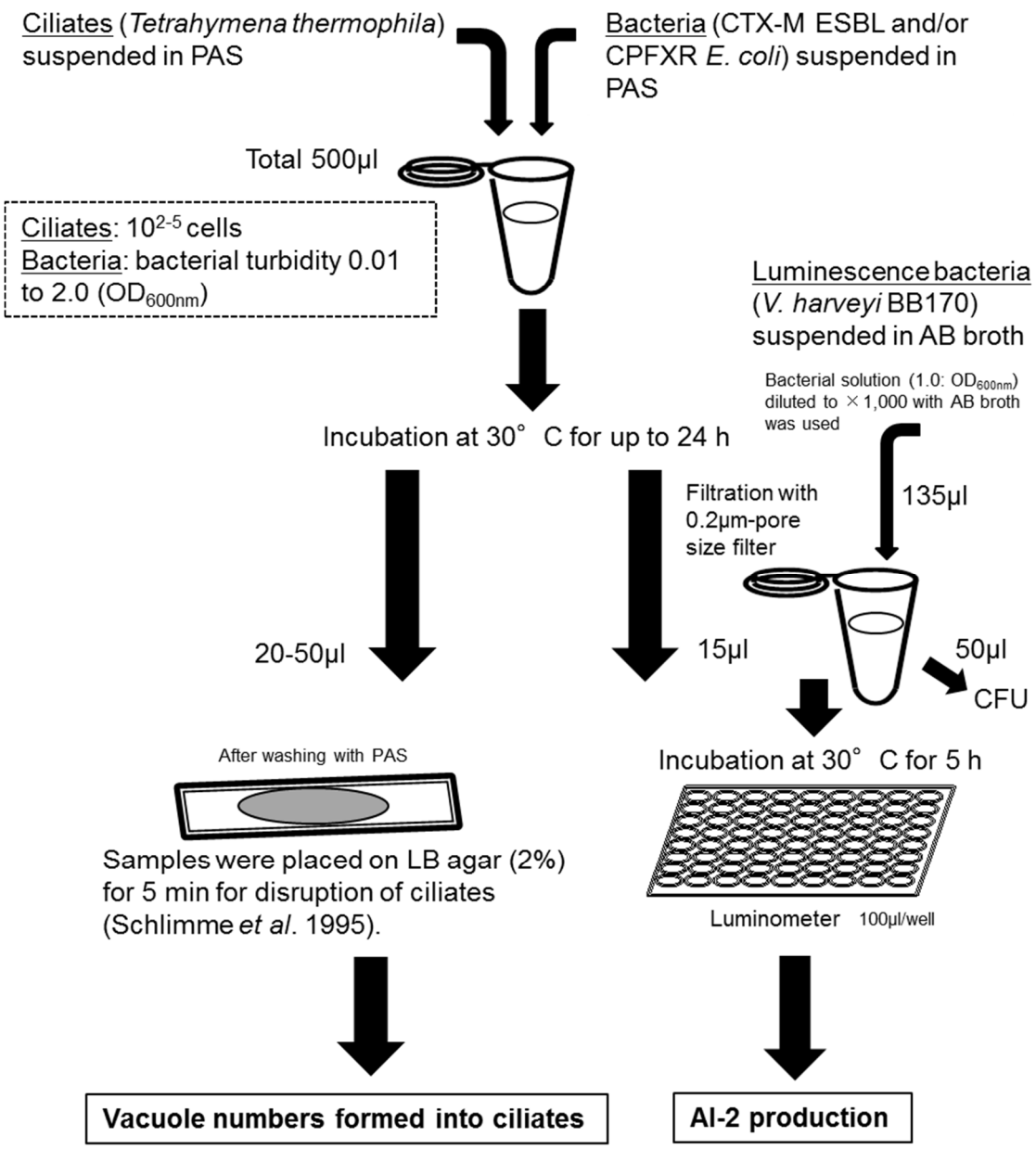


図 4-3　繊毛虫共培養下における食胞数算定と培養上清中の AI-2 測定の実験方法

調製した繊毛虫と供与菌の ESBL 産生大腸菌、受容菌の CPFX-R 大腸菌を組み合わせて混和した(12)。30℃にて 24 時間培養後、アガローススライドゲル法によって食胞数を算定した(12)。また、培養上清を *V. harveyi* BB170 株菌液に添加し、その蛍光発光量から AI-2 量を測定した(12)。

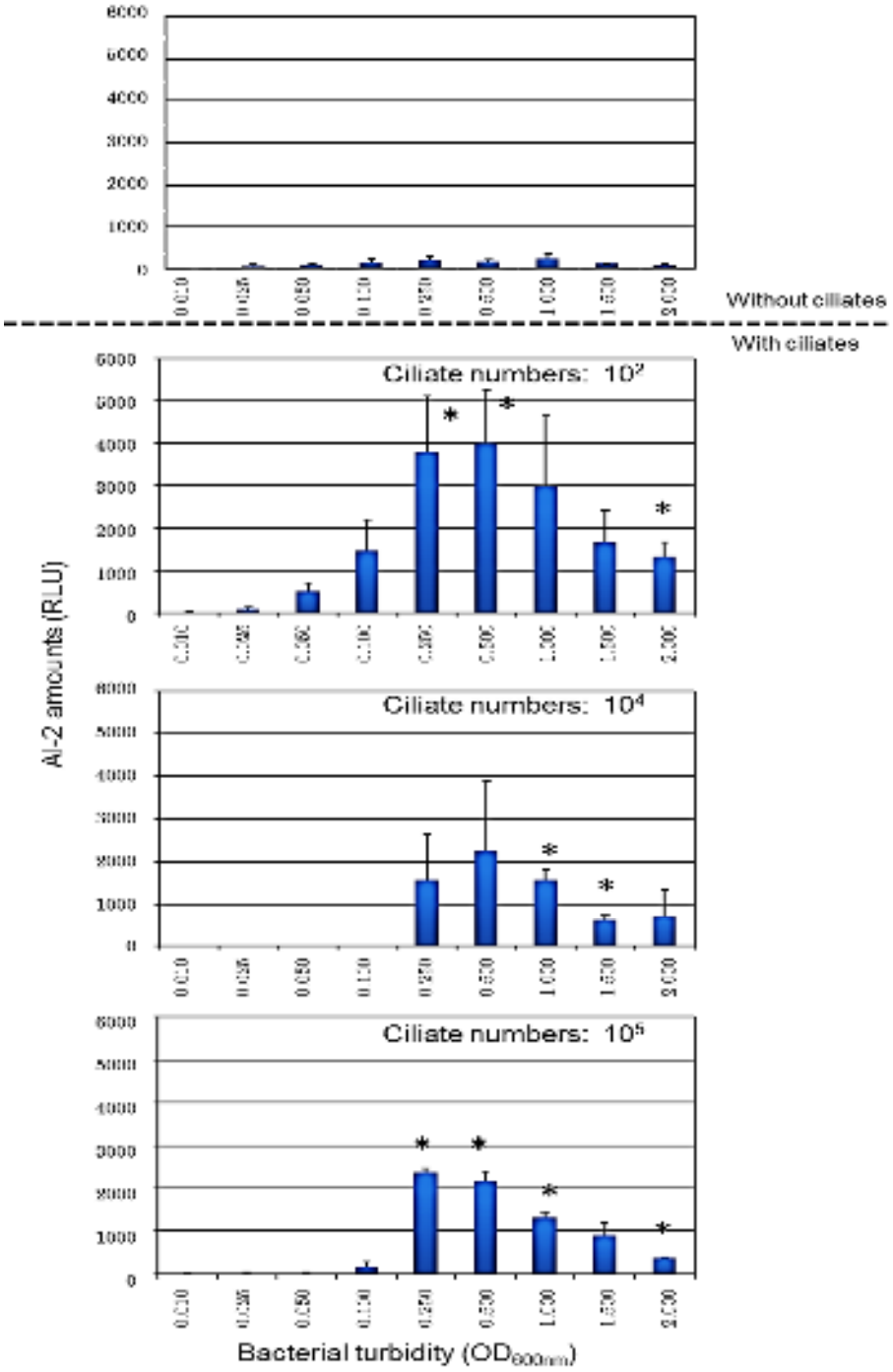


図 4-4　繊毛虫共培養下における培養上清中の AI-2 量

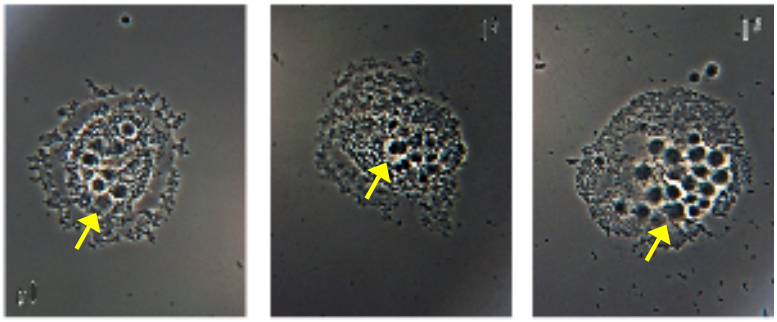
繊毛虫（Ciliate）と大腸菌を共培養し、培養上清を試料として *V. harveyi* BB170 株による AI-2 測定を行った(12)。グラフは上から大腸菌単独培養、繊毛虫 10^2/0.5mL、10^4/0.5mL、10^5/0.5mL と共培養した AI-2 量[AI-2 amounts（RLU）]である(12)。*は大腸菌単独培養の AI-2 量と比較して、有意な（$p<0.05$）上昇を認めた条件を示す。

表 4-2　繊毛虫共培養下における *luxS* 遺伝子欠損変異株を使用した培養上清中の AI-2 量

Strain(s)	n*	AI-2 amount (fold change)¶	*p* value
With ciliates: 10^2			
CTX-M ESBL *E. coli*・CPFX-R *E. coli*	3	4.96 ± 2.21	§
CTX-M ESBL *E. coli*Δ*luxS*・CPFX-R *E. coli*	3	1.15 ± 1.15	< 0.05
CTX-M ESBL *E. coli*・CPFX-R *E. coli* Δ*luxS*	3	3.46 ± 1.84	
CTX-M ESBL *E. coli*Δ*luxS*・CPFX-R *E. coli* Δ*luxS*	3	0.02 ± 0.04	

n は試行回数、¶は共培養 24 時間後の AI-2 量を共培養 0 時間後の AI-2 量で除した値であることを表し、§は有意差ありを表す。

A



B

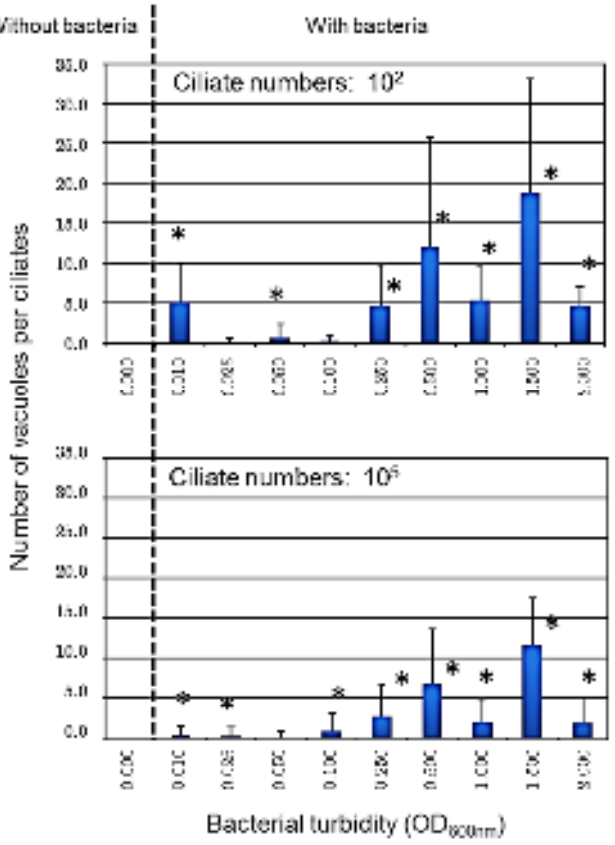


図 4-5　共培養下における繊毛虫の食胞数算定

A はアガローススライドゲル法の光学顕微鏡写真である。顆粒状類円形が繊毛虫 1 個体であり、食胞はその内部の黒い円形（黄矢印）として観察された(12)。B は繊毛虫（Ciliates）単独培養後および、共培養後に繊毛虫 100 個体について 1 個体中に形成された食胞数を算定した平均値（Number of vacuoles per ciliates）である(12)。*は、繊毛虫単独培養の食胞数と比較して、有意な（$p<0.05$）増加が認められた場合を表す(12)。

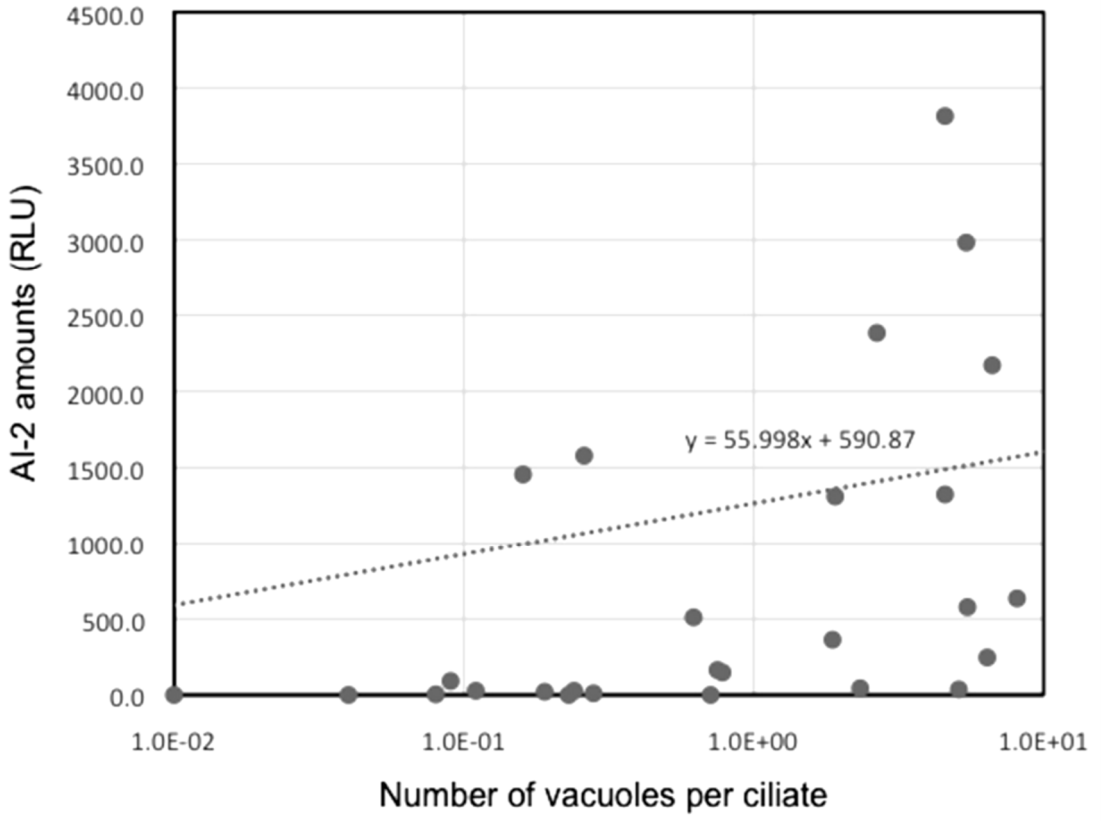


図 4-6　共培養下における培養上清中の AI-2 量と繊毛虫の食胞数の相関

共培養後の培養上清中 AI-2 量（AI-2 amounts（RLU））と繊毛虫 1 個体に形成された平均食胞数（Number of vacuoles per ciliate）の相関を示した(12)。相関係数（r）は 0.626 であった(12)。

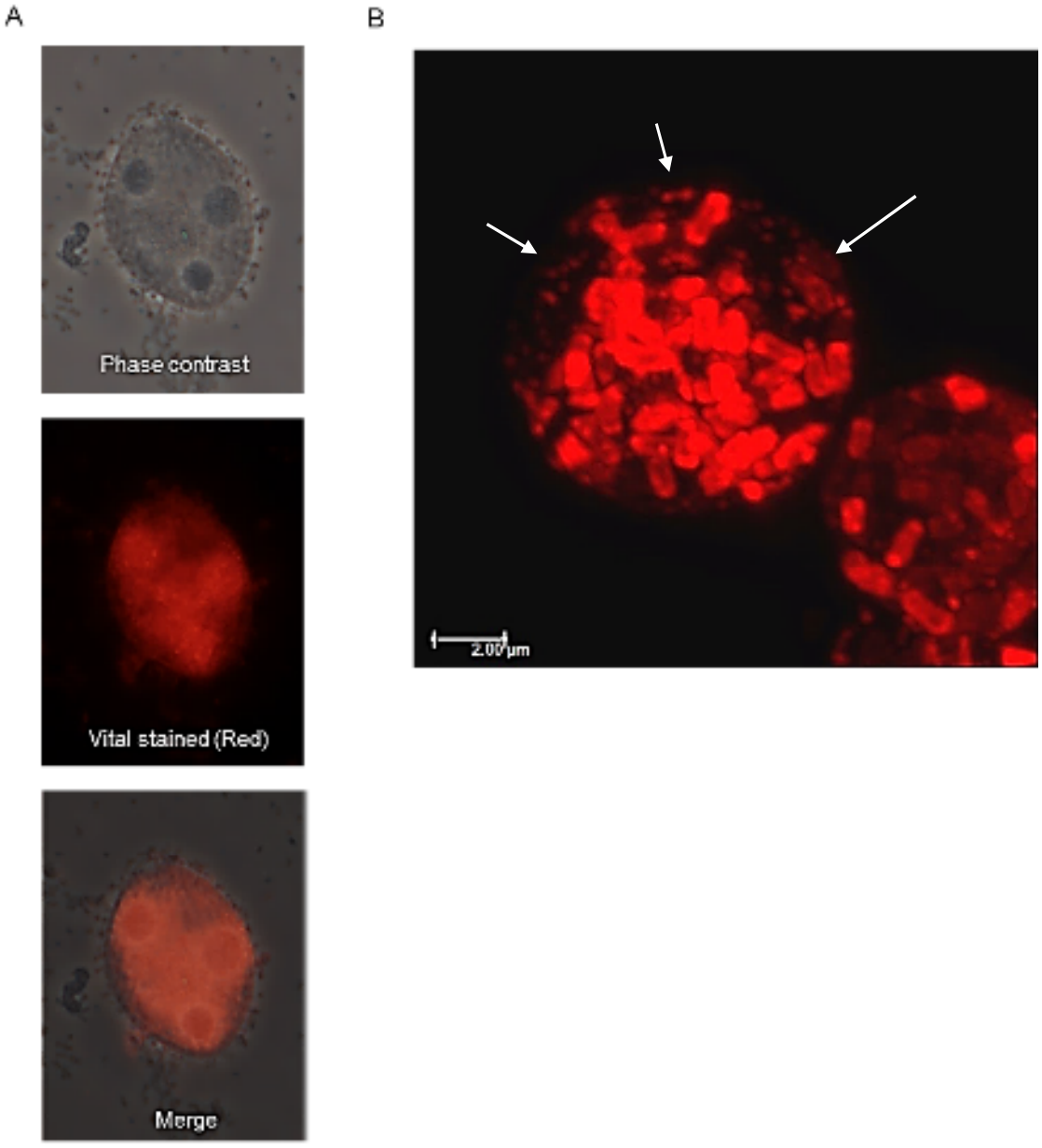


図 4-7　共培養下における大腸菌の動態

A の上段は繊毛虫の位相差顕微鏡像であり、顆粒状類円形が繊毛虫 1 個体でその中に 3 個の食胞（黒色円形）が認められた(12)。中段は赤色蛍光に生染色した大腸菌の蛍光顕微鏡像である(12)。下段は、上段と中段の画像を合成した画像で、食胞内に大腸菌が集積していることが観察された(12)。B は共焦点レーザー顕微鏡による食胞の画像である(12)。白矢印で示した部分では大腸菌が断片化しており、繊毛虫の消化によって溶菌が起こっていると考えられた(12)。

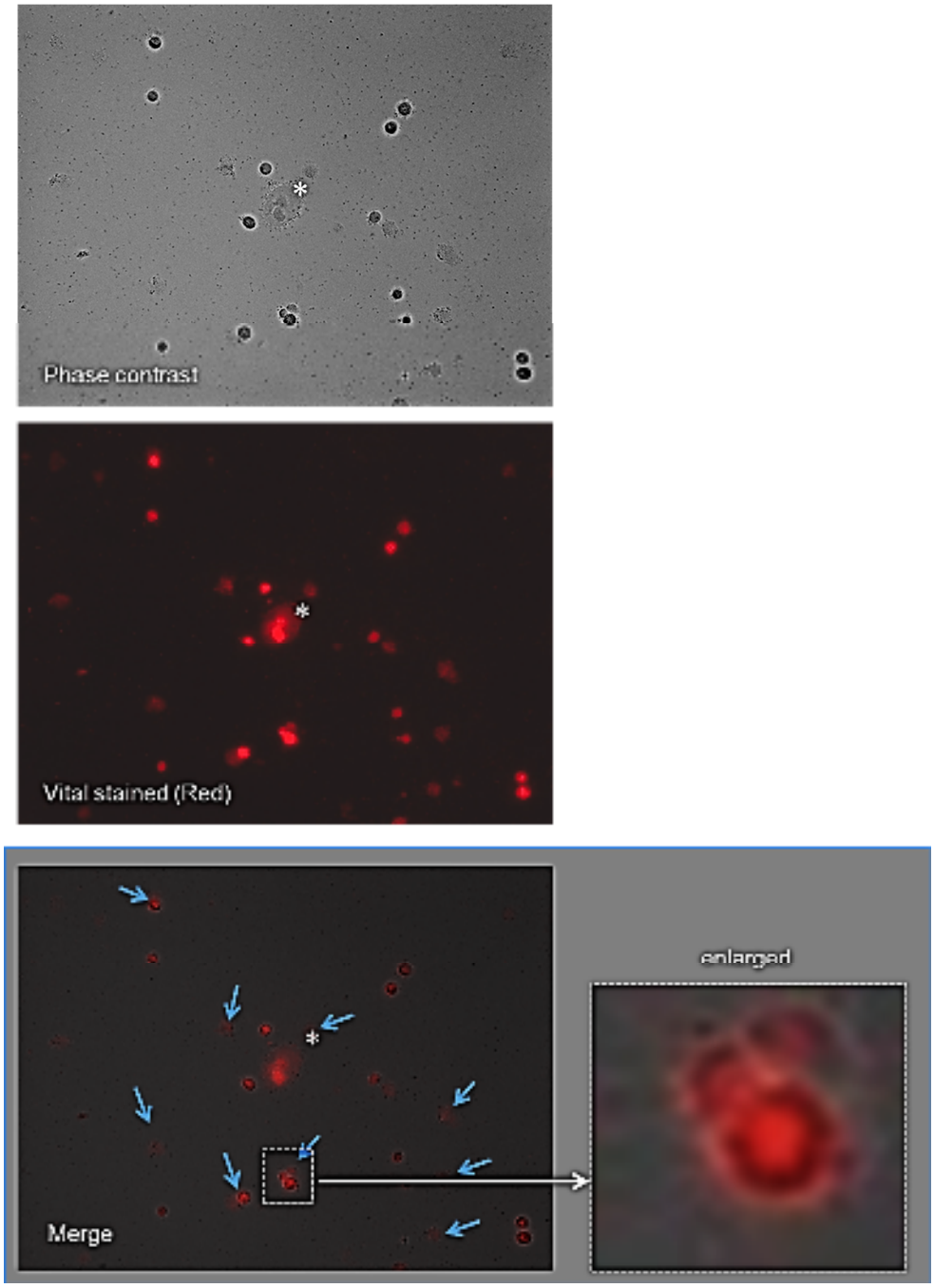


図 4-8　共培養上清中に認められた繊毛虫外の食胞

上段は位相差顕微鏡像であり、繊毛虫は星印（白）で示した(12)。また、繊毛虫の周囲には繊毛虫から排出された多数の食胞（黒色円形）が観察された(12)。中段は赤色蛍光に生染色した大腸菌の蛍光顕微鏡像である(12)。下段は、上段と中段の画像を合成した画像で、繊毛虫内外に関わらず食胞内に大腸菌集積していることが観察された(12)。また、繊毛虫外の食胞の一部は崩壊が始まっており（青矢印）、拡大像（enlarged）では内容物が漏れ出している像が認められた(12)。

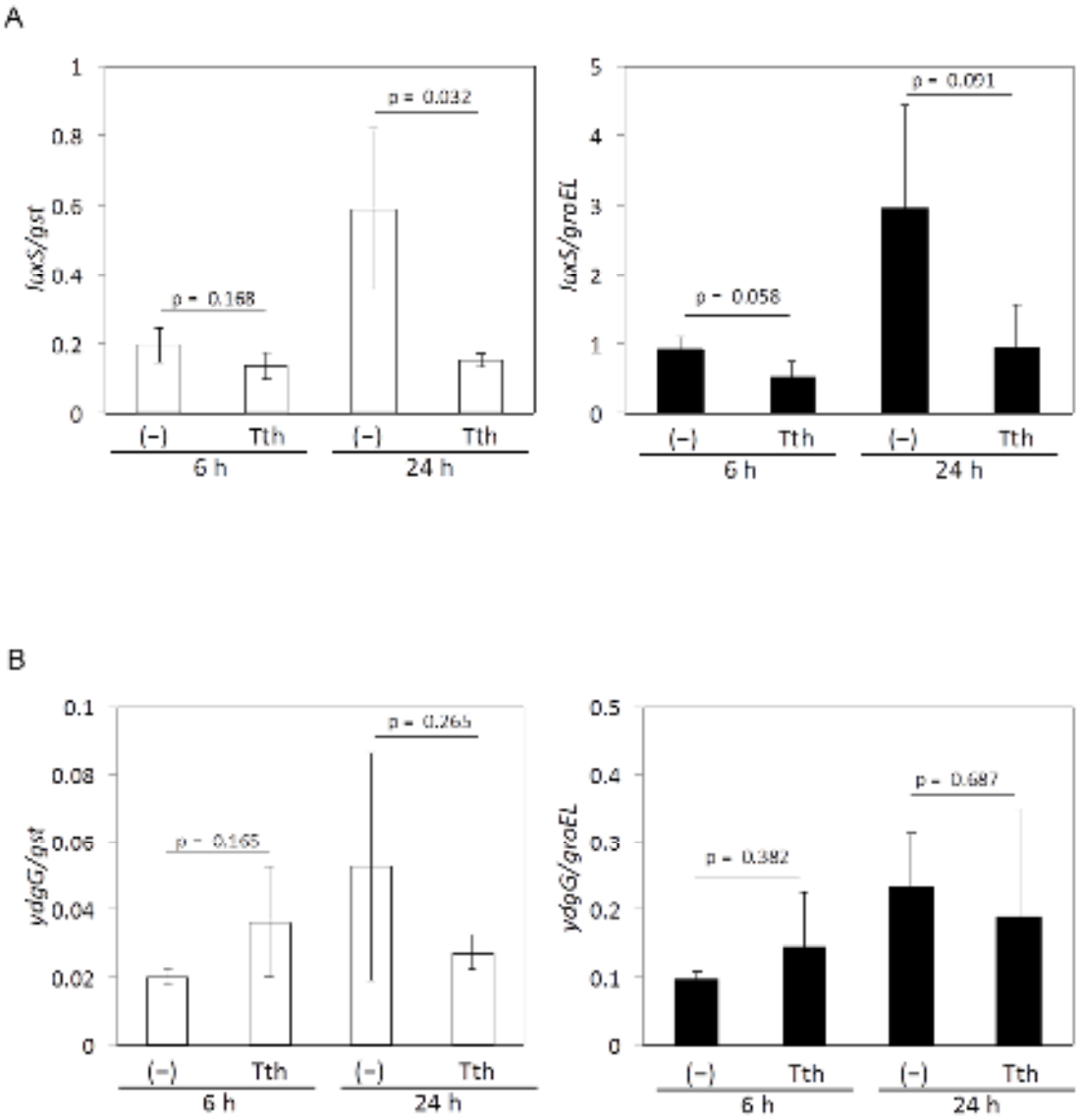


図 4-9　繊毛虫共培養下における大腸菌の *luxS* 遺伝子および *ydgG* 遺伝子の発現量

繊毛虫と ESBL 産生大腸菌を共培養し、6 時間後と 24 時間後に RNA を回収して qRT-PCR を実施した。A は AI-2 産生責任遺伝子の *luxS* 遺伝子の発現量であり、左グラフは *gst* 遺伝子と、右グラフは *groEL* 遺伝子との相対発現量を示す(12)。（−）は大腸菌単独培養、Tth は繊毛虫との共培養の結果である(12)。B は AI-2 トランスポーター責任遺伝子の *ydgG* 遺伝子の発現量であり、左グラフは *gst* 遺伝子と、右グラフは *groEL* 遺伝子との相対発現量を示す(12)。p 値はそれぞれ大腸菌単独培養と共培養と比較した値である。

【第五章】

結　論

Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol* (2010) 161:711-719.

Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum β-lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* (2011) 66: 527-530.

Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol* (2015) 61: 203-210.

【第五章】　結論

5.1　微小生態系における細菌の生存戦略モデルの提唱

まず先行研究を通して、繊毛虫の捕食活動によって大腸菌間のプラスミド伝播頻度が上昇することを証明した(1,2)。また、プラスミド伝播頻度を上昇させる条件は、繊毛虫の捕食活動が活発となる 30℃で共培養を行うことが重要となる。また、アクチン重合阻害剤の添加によってプラスミド伝播頻度が抑制され、接合が繊毛虫の食胞内で起こっていることが示唆された。さらに共培養下では、近年深刻化する多剤耐性遺伝子である基質拡張型 β-ラクタマーゼ産生遺伝子も効率良く伝播することが判明した。これら結果から、耐性菌保菌者を介して環境中に拡散した耐性菌から、非耐性菌が土壌や水系環境に普遍的に生息する繊毛虫を介して容易に薬剤耐性を獲得する可能性があることが示唆された。

本学位論文の主研究では、繊毛虫と大腸菌との共培養下でクオラムセンシングのシグナル分子である AI-2 濃度が増加する現象が認められた(3)。この現象は AI-2 の産生や汲出しの亢進とは異なり、繊毛虫の消化によって菌体内の AI-2 が培養上清中に拡散するためと考えられた。これら結果は、細菌が菌密度の感知だけにクオラムセンシングを使用しているのではなく、原生動物による捕食の危険を察知するのにも利用していることを示唆している。つまり、原生動物の捕食によって上昇した AI-2 によって危険を感知した細菌は、クオラムセンシングの発動によって鞭毛やバイオフィルムあるいは毒素を合成して生存性を高めているのではないだろうか。

これまでに *in vitro* 微小生態系を構築し、細菌の生存戦略として接合とクオラムセンシングに着目して研究を進めてきた。得られた興味深い知見をもとに、自然環境の微小生態系における細菌の生存戦略モデルを提唱する（図 5-1)。まず原生動物に捕食され食胞内に集積した細菌のうち、生存している細菌は高密度化を利用して接合を活発に行う（図 5-1、A)。一方、繊毛虫に消化された細菌からは AI-2 が放出されて食胞内に充満する（図 5-1、B)。AI-2 が充満した食胞の一部は原生動物から環境中に放出されて崩壊し、AI-2 は環境中に蓄積する（図 5-1、C)。AI-2 の上昇を感知した細菌は、クオラムセンシングを発動させて鞭毛やバイオフィルムさらに毒素を合成し、原生動物の捕食を回避している可能性があり、さらにそれら形質の変化はヒトへの起病性にも関連しているのかもしれない。いずれの知見も興味深く、細菌の”したたかさ”を再認識することとなった。本研究成果が、微小生態系の複雑な相互作用を介した細菌の生存戦略を解明する一助となることを期待したい。

5.2　今後の展開

共培養下における接合実験の結果から、耐性遺伝子の水平伝播を制御するために、本現象を抑制する物質の探求を行っていきたい。抑制物質は、環境への影響が小さい物質が理想である。近年、多種多様な細菌が共存している動物腸管内で、上皮細胞から接合を抑制する物質が分泌されている可能性が報告されており、注目している(4)。

また、共培養下で AI-2 濃度が上昇した現象に対しては、実際にクオラムセンシングが発

動し、細菌の生存性が向上しているか確認が必要である。共培養後の細菌生存数や運動能の変化、クオラムセンシングによって制御されている遺伝子の発現量変化について検証を行いたい。また、実際の環境中においてもこの現象が起こっているか確認が必要である。土壌などの環境試料を使用し、AI-2 量の測定や *luxS* 遺伝子、*ydgG* 遺伝子の発現量を測定し、両遺伝子の発現量増加を伴わない AI-2 量の増加が確認できれば、環境中においても同じ現象が起こっていることを証明できると思われる。

5.3 参考文献

1. Matsuo J, Oguri S, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Hayashi Y, Kawaguchi K, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H (2010) Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol* 161:711-719.
2. Oguri S, Matsuo J, Hayashi Y, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H (2011) Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum β-lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* 66: 527-530.
3. Oguri S, Hanawa T, Matsuo J, Ishida K, Yamazaki T, Nakamura S, Okubo T, Fukumoto T, Akizawa K, Shimizu C, Kamiya S, Yamaguchi H (2015) Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol* 61: 203-210.
4. Machado AM, Sommer MO (2014) Human intestinal cells modulate conjugational transfer of multidrug resistance plasmids between clinical *Escherichia coli* isolates. PLoS One 9: e100739.
5. Brandl, MT, Rosenthal BM, Haxo AF, Berk SG (2005) Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne Tetrahymena species. *Appl Environ Microbiol* 71: 1562-1569.

5.4　第五章図

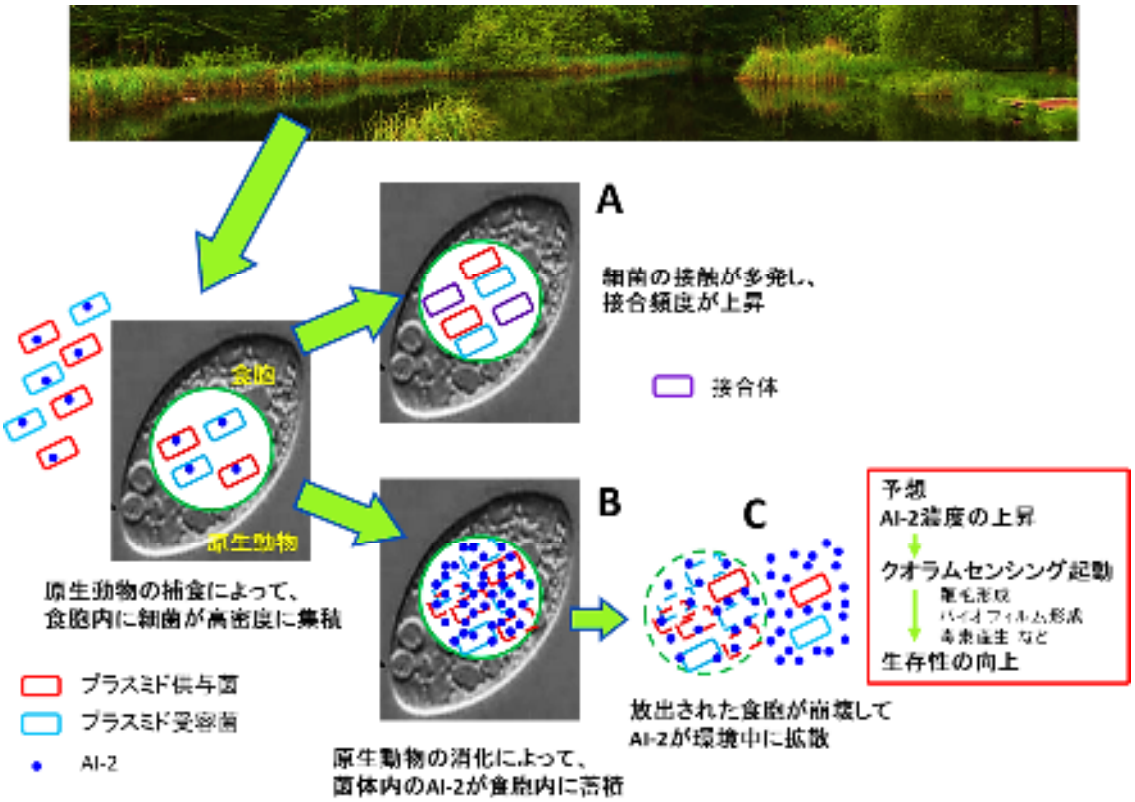


図 5-1　微小生態系における細菌の生存戦略モデル

微小生態系では原生動物によって細菌が捕食されて食胞内に集積している。A は、食胞内で生存している細菌の接合頻度が上昇するモデルを表している。B は、原生動物の消化作用によって細菌が破壊され、細菌内の AI-2 が食胞内に蓄積するモデルを表している。C は、繊毛虫から放出された食胞が崩壊し、食胞内の AI-2 が環境中に拡散するモデルを表している。湖沼画像は https://pixabay.com/ja/ムーア-荒れ地-沼-自然保護-湿地-自然保護区-池-神秘的な-793618/、原生動物の画像は(5)から引用した。

【謝辞】

先行研究および本研究を通して直接ご指導、ご鞭撻を賜った北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野・感染制御検査学教室の山口博之教授ならびに松尾淳司講師に深く感謝致します。

AI-2 測定および *luxS* 欠損変異株作成にご協力いただいた杏林大学医学部感染症学講座の神谷茂教授ならびに花輪智子講師に厚く御礼申し上げます。

北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野の千葉仁志教授には、長期に渡り AI-2 測定における機器の共用を快諾していただいたことを感謝致します。

進学に関して快諾と御助力いただいた北海道大学病院検査・輸血部の清水力部長ならびに澁谷斉技師長に深く感謝致します。また、研究や学会発表などでご配慮いただいた細菌検査室の秋沢宏次副技師長ならびに遺伝子染色体検査室の藤澤真一副技師長をはじめとする職員の皆様に御礼申し上げます。

最後に、病態解析学分野・感染制御検査学教室の皆様からは多大なご協力をいただき感謝致します。

今後は、本研究を通して得られた興味深い知見を更に展開していきたいと思います。また、在学中に培った研究設計などの力を応用し、臨床検査の発展に寄与できればと思っております。

【業績リスト】

１．学術論文（下線太字は本人）

1. Matsuo J, **Oguri S**, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Hayashi Y, Kawaguchi K, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H (2010) Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol* 161:711-719.
2. **Oguri S**, Matsuo J, Hayashi Y, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H (2011) Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum β-lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* 66: 527-530.
3. **Oguri S**, Hanawa T, Matsuo J, Ishida K, Yamazaki T, Nakamura S, Okubo T, Fukumoto T, Akizawa K, Shimizu C, Kamiya S, Yamaguchi H (2015) Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol* 61: 203-210

計 3 編

２．国内学会発表（下線太字は発表者）

1. **小栗聡**、松尾淳司、秋沢宏次、清水力、山口博之. 繊毛虫を介した大腸菌プラスミド伝播頻度に繊毛虫と菌数の混合比が与える影響. 第 86 回日本感染症学会学術講演会. 長崎. 4 月,2012.
2. **小栗聡**、松尾淳司、花輪智子、清水力、神谷茂、山口博之. 繊毛虫内で促進する大腸菌プラスミド伝播頻度とクオラムセンシング. 第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学療法学会総会合同学会. 横浜. 6 月,2013.
3. **小栗聡**、松尾淳司、花輪智子、秋沢宏次、澁谷斉、重松明男、清水力、神谷茂、山口博之. 繊毛虫共培養下で大腸菌から産生誘導されるクオラムセンシングシグナル分子 AI-2 について. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月,2014

計 3 回

３．その他

1. 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）

   2012 年 4 月-2013 年 3 月、70 万円

   「繊毛虫が細菌間の遺伝子水平伝播を促進する分子メカニズムについて」

   課題番号：24933005

   総額 70 万円