

Prevotella intermedia の GroEL と DnaK が バイオフィーム形成に及ぼす影響

堀池 周司 山中 武志 福島 久典
ほり いけ しゅうじ やま なか たけし ふくしま ひさのり

抄録：細菌の heat shock proteins (HSPs) は、細胞内で分子シャペロンとして働くのみならず、細胞外に分泌され接着分子として働くことや、宿主免疫細胞のレセプターに結合し、様々な免疫反応を引き起こすことも近年の研究で明らかにされている。今回、*Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) が菌体外多糖を産生してバイオフィームを形成する際の HSPs の役割について検討するため、まず、リコンビナント GroEL (rGroEL) を用いて家兎抗 GroEL 抗体を作製し、*P. intermedia* GroEL が菌体外に放出されていることをウェスタンブロットングにて確認した。バイオフィーム形成に及ぼす影響については、rGroEL、リコンビナント DnaK (rDnaK) タンパクを用いて、crystal violet microplate assay で検討した。また、*P. intermedia* のバイオフィーム形成調節遺伝子を明らかにするため、バイオフィーム形成株と非形成株間で、GS-Junior system 次世代シーケンサーを用いた変異解析もあわせて行った。特異抗体を用いたウェスタンブロットングの結果、*P. intermedia* strain 17 の培養上清には GroEL が含まれることが確認された。バイオフィームアッセイでは、培地に加えた rGroEL、rDnaK は、バイオフィームを形成する strain 17 のバイオフィーム形成を完全に抑制した。逆に、バイオフィームを形成しない strain 17-2 と ATCC 25611 は、これらの HSPs 添加培地中で明瞭なバイオフィーム形成性を示した。rGroEL、rDnaK でコートしたプレート上では、strain 17-2 のみが凝集塊をつくってバイオフィームを形成し、strain 17、ATCC 25611 はバイオフィームを形成しなかった。Strain 17-2 のゲノム配列の変異解析を行った結果、chromosome I 上の TaqI-like C-terminal specificity domain protein とアノテーションされた PIN 17_0430 遺伝子と、glucose/galactose transporter 遺伝子 (PIN 17_A 1569) に変異が確認された。今回の研究では、*P. intermedia* の GroEL、DnaK が strain 17 のバイオフィーム形成を抑制し、バイオフィーム非形成株のポリスチレンプレートへの接着を促進したことから、*P. intermedia* が外部環境に定着し、バイオフィーム形成を開始する際に重要な役割を果たしていることが示唆された。バイオフィーム非形成株と親株のゲノムマッピングでは、2つの遺伝子で変異が確認された。これら遺伝子の詳しい機能は不明であるが、*P. intermedia* バイオフィーム形成に関与するものと考えられる。

緒言

血液寒天培地上で黒色色素を産生する嫌気性グラム陰性桿菌である *Prevotella intermedia* (以下、*P. intermedia* と略す) は、歯周疾患を含め身体各部の感染症との関連が示唆されている。^{1~5} 我々は *P. intermedia* がもつバイオフィーム形成性に注目しており、マイクロアレイを用いた解析では、バイオフィーム形成菌株において、GroEL、DnaK など、複数の heat shock proteins (以下、HSPs と略す) の発現が mRNA レベルで上昇していることを明らかにしている。⁶ また古川ら⁷ は、バイオフィ

ームを形成する臨床分離の *Prevotella nigrescens* における HSPs の発現上昇を、2次元電気泳動により確認している。

HSPs は原核生物から真核生物まで高次に保存されたストレス抵抗因子で、常時細胞質内に存在し、生命現象に必要なタンパクの新生から機能的立体構造の形成、輸送、分解、傷害タンパクの修復を介助し、生体に加わったストレスを軽減する分子機構としての役割も担っている。^{8~10} 近年の研究によると、balneotherapy などでもたらされる治療効果は、適度な体温上昇により HSP60、HSP70 が増加し、細胞内の傷害タンパク修復が促進さ

れるためであることも明らかになりつつある.^{11~13}

細菌 HSPs についても多くの知見が得られており、細胞内分子シャペロンとしての働きに加え、細菌細胞間で、あるいは宿主細胞に対して、多様な moonlight function を示すことが明らかにされつつある.^{8, 14} *Lactobacillus johnsonii* La1 の GroEL は菌体表層にも分布し、*Helicobacter pylori* (以下、*H. pylori* と略す) を凝集させることが知られている。¹⁵ *Salmonella typhimurium* の 66 kD HSP は、腸管粘液層との結合因子として働いており、¹⁶ *Haemophilus ducreyi* GroEL の発現は DnaK に依存的で、GroEL の発現増加がヒト上皮細胞や線維芽細胞への接着を増強することが報告されている。^{16, 17} *Legionella pneumophila* (以下、*L. pneumophila* と略す) と *H. pylori* の GroEL, DnaK が菌体表層に局在し、これを欠く菌株では HeLa 細胞への侵入が 1/1,000 程度に低下すること、^{18, 19} *Clostridium difficile*,²⁰ *Escherichia coli*²¹ の GroEL も細胞接着に関与していることが示唆されている。*Mycobacterium tuberculosis* (以下、*M. tuberculosis* と略す) の GroEL, DnaK と CD43 や CCR5 との結合が、*M. tuberculosis* のマクロファージ内への侵入の際に重要であること、^{22, 23} 菌体表層の GroEL 発現が強い *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* の菌株は上皮細胞の増殖誘導能が高いこと、^{24, 25} *Plesiomonas shigelloides* においても、GroEL が菌体表層に局在し、病原性を発揮するために必須となる粘膜上皮細胞への付着を誘導していることが示されている。²⁶

P. intermedia の HSPs がバイオフィーム形成時に果たす役割を追究する目的で、すでに本山ら²⁷ が *P. intermedia* GroEL のリコンビナントタンパクを、柳瀬ら²⁸ は DnaK のリコンビナント化と特異抗体の作製を行っているので、本研究ではまず、*P. intermedia* GroEL に対する特異抗体の作製を行うとともに、これら HSPs とバイオフィーム形成の関わりを検討した。また、*P. intermedia* のバイオフィーム形成時に多くの HSPs 遺伝子の発現上昇が認められる点について、遺伝子発現調節機構を明らかにする一助として、バイオフィーム形成株と非形成株間で次世代シーケンサーを用いた変異解析もあわせて行った。

実験材料および方法

1. 供試菌

大阪歯科大学細菌学講座で保存している臨床分離の *P. intermedia* strain 17 (以下、strain 17 と略す)、²⁹ strain

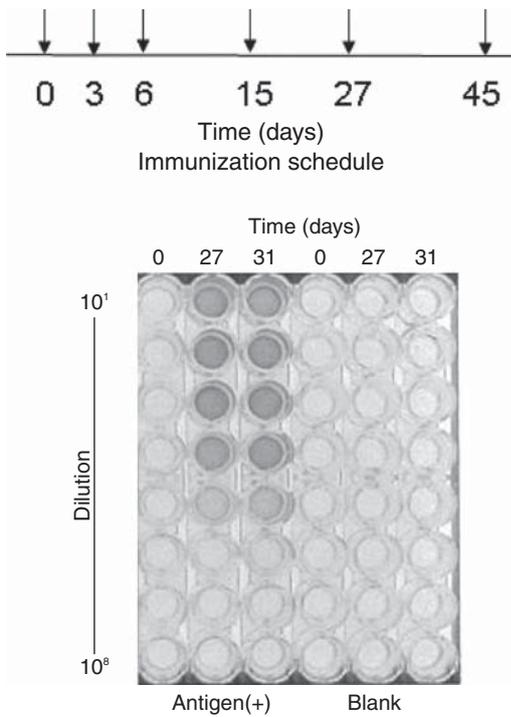
17 のバリエーションでバイオフィーム形成能の消失した strain 17-2,⁶ 標準菌株の ATCC 25611 を用いた。供試菌の使用に際しては、 -80°C で保存した菌株を Centers for disease control and prevention 処方 嫌気性菌用血液寒天培地 (以下、ABAP と略す) に塗抹し、嫌気条件下 (80% N_2 , 10% H_2 , 10% CO_2 ; Hirasawa anaerobic chamber ABX-3, ヒラサワ, 東京) で 37°C , 24 時間培養した。グラム染色性および小幡ら³⁰ の方法に準じて polymerase chain reaction (以下、PCR と略す) により増幅した 16 S rRNA 遺伝子配列の相同性から純培養であることを確認した。

2. 菌体外多糖 (exopolysaccharide; 以下、EPS と略す) 産生性の評価

供試菌株の EPS 産生性については、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope: 以下、SEM と略す) 観察と粘度測定により確認した。各菌株を 24 時間 ABAP で嫌気培養し、得られたコロニーより Yamane ら³¹ の方法に従って試料を作製し、S-4800 型顕微鏡 (日立製作所, 東京) を用いて観察した。培養菌液の粘度測定のため、各供試菌株を 5 mg/L hemine, 400 mg/L L-cystine, 10 mg/L vitamin K₁ および 0.5% yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を含む trypticase soy broth (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA; 以下、enriched-TSB と略す) に接種し、24 時間嫌気培養後、波長 620 nm の吸光度が 0.1 となるよう調製した。培養菌液をポリスチレン 96 穴マルチウェルプレート (IWAKI, 東京) にそれぞれ 200 μL ずつ分注し、24 時間、48 時間嫌気的に静置培養し、アントンパール DMA 4100 自動微量粘度計 (Anton Paar, Graz, Austria) を用いて、メーカープロトコールに従って粘度を測定した。

3. リコンビナント GroEL 特異的家兎ポリクローナル抗体の作製

本山ら²⁷ によって作製されたりコンビナント GroEL タンパク (以下、rGroEL と略す) 0.335 mg を Freund's complete adjuvant (日本ベクトン・ディキンソン, 東京) とともに家兎 (日本白色種, 雄, 13 週齢) 背部に、Fig. 1 A のスケジュールに沿って、計 6 回接種し、初回、21 日、31 日目に抗体価の上昇を ELISA 法にて確認し、全採血を行った。なお、家兎への免疫から血清の調製までは、タカラバイオ (抗体・プロテオーム部門, 大津市) に依頼した。得られた抗血清より Protein A IgG Purification Kit (タカラバイオ) を用いて、メーカープロトコールに従って IgG 画分を精製し、以下の実験に



ELISA for anti-GroEL antibodies

Fig. 1 Immunization schedule and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies against *Prevotella intermedia* GroEL. To obtain antibodies against *P. intermedia* GroEL, the recombinant *P. intermedia* GroEL protein was subcutaneously injected into the rabbit back skin (0.335 mg/injection) a total of six times. Antibody titers were measured by ELISA at days 0, 27 and 31.

用いた。

4. 抗体の反応性の確認

得られた家兔ポリクローナル抗体（以下、抗 GroEL 抗体と略す）と、strain 17 培養上清、菌体破砕物ならびに精製 rGroEL タンパクとの反応性をウエスタンブロット法により検討した。Strain 17 の 24 時間培養菌液 10 mL を遠心 (3,000 rpm, 20 分; O5PR-22, 日立工機, 東京) し、回収した菌体は超音波ホモジナイザー (US-50; 日本精機, 東京) 処理後に、波長 550 nm の吸光度が 1.0 になるよう 0.1 M リン酸緩衝液に再懸濁した。この際に得られた培養上清は 10 倍濃縮し、菌体破砕物、精製 rGroEL とともに 10% ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Japan, 東京) に泳動し、PVDF 膜 (Sequi-Blot, 15 cm × 15 cm; Bio-Rad Japan) に 0.1% SDS 添加の Towbin の転写バッファー (25 mM トリス, 192 mM グリシン, 20% メタノール, pH 8.3) を用いて転

写した。なお、転写装置には Trans-Blot SD Cell (Bio-Rad Japan) を用い、転写条件は 25 V, 80 分とした。プロットティングは抗 GroEL 抗体 (2,000 倍希釈) を 1 次抗体として、Fast Western Kit (Thermo Scientific Japan, 横浜市) のプロトコールに従って行った。

5. GroEL, DnaK がバイオフィルム形成に及ぼす影響

供試菌株のバイオフィルム形成性と、バイオフィルム形成における GroEL, DnaK の影響については、マルチウェルプレートバイオフィルム形成試験²² により評価した。

1) 供試菌株のマルチプレート上でのバイオフィルム形成

まず、HSPs 未添加条件で、各菌株のポリスチレンマイクロプレート上でのバイオフィルム形成能を評価するため、供試菌を enriched-TSB に接種し、24 時間嫌気培養後、波長 620 nm の吸光度が 0.1 となるよう調製し、マルチウェルにそれぞれ 200 μL ずつ分注し、24 時間、48 時間嫌気的に静置培養した。バイオフィルム形成の評価は、クリスタルバイオレット染色による観察と、クリスタルバイオレット染色後のウェルに純エタノールを加え、溶出する色素量を波長 570 nm での吸光度を測定することで評価した。

2) GroEL, DnaK のバイオフィルム形成に与える影響

P. intermedia GroEL, DnaK のバイオフィルム形成に与える影響を検討するため、rGroEL および柳瀬ら²⁸ が作製したリコンビナント DnaK (以下、rDnaK と略す) を enriched-TSB に加え、2 倍希釈系列を準備した (80 ~ 2.5 μg/mL)。各濃度の培地 100 μL をマイクロウェルに分注し、ここに波長 620 nm の吸光度が 0.2 となるよう調製した 24 時間培養菌液を 100 μL ずつ接種し、24 ~ 48 時間、嫌気条件下で静置培養した。浮遊細菌と培地をピペッティングにより除去し、クリスタルバイオレット染色を施してバイオフィルム形成状態を観察した。

3) 固相化 GroEL, DnaK がバイオフィルム形成に与える影響

次に、マイクロプレート上に rGroEL, rDnaK を固相化し、供試菌株のバイオフィルム形成に及ぼす影響について検討した。上述の rGroEL および rDnaK を 40 μg/mL 濃度で 0.1 M リン酸緩衝液に加え、2 倍ずつ希釈し、0.31 mg/mL までの 2 倍希釈系列を準備した。各濃度の希釈液を 200 μL ずつマルチウェルに分注し、保湿箱中で 12 時間、4°C にて静置した。溶液を除去し、0.1 M リン酸緩衝液でウェルを洗浄後、波長 620 nm の吸光度が 0.1 となるよう調製した各供試菌株の 24 時間培

養菌液を 200 μ L ずつ接種し、24~48 時間、嫌気条件下で静置培養した。バイオフィルム形成の観察は上述の方法で行った。

6. Strain 17-2 と strain 17 のゲノム比較

1) Strain 17-2 ゲノム DNA の精製

Strain 17-2 を enriched-TSB に接種し、24 時間嫌気培養後、菌体を遠心回収 (3,000 rpm, 20 分; 05 PR-22, 日立工機) した。菌体より G NOME DNA isolation kit (Q · BIOgene Inc., Irvine, CA, USA) を用い、水川ら³³ の方法に準じてゲノム DNA を回収し、得られたゲノム DNA はトリスホウ酸 EDTA アガロース (1% ; ナカライテスク, 京都) 電気泳動にて確認した。

2) ゲノムライブラリーの作製

Strain 17-2 のゲノム DNA を Rapid Library Preparation Kit (Roche Diagnostics, 東京) に含まれる Rapid Library Nebulizers を使用してランダムに断片化した。MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen, 東京) にて DNA 断片を精製したのち、Rapid Library Preparation Kit を用いてエンドリペアした。DNA 断片に Rapid Library アダプターをライゲーション後、AMPure ビーズ (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) を用いて夾雑物ならびに短断片を除去し、strain 17-2 のゲノムライブラリーとした。

3) Emulsion PCR

精製した strain 17-2 のゲノムライブラリーを鋳型として emulsion PCR を行った。GS Junior emPCR Kit (Roche Diagnostics) のプロトコルに従って、キャプチャービーズと鋳型 DNA を混合後、emulsion を調製した。PCR は 94°C, 4 分間の熱変性後、94°C, 30 秒間の熱変性、58°C, 4 分 30 秒間のアニーリング、68°C, 38 秒間の伸長反応を 50 回繰り返した。Kit のプロトコルに従ってイソプロパノールにより emulsion を破壊し、エンリッチメント磁性ビーズに増幅した DNA のみを結合させ、マグネットスタンドを用いて DNA 増幅ビーズのみを選別 (エンリッチメント) した。

4) パイロシークエンシングと変異の探索

エンリッチメントしたビーズを定量し、Allegra (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) を用いて pico titer plate (Roche Diagnostics) に充填した。Pico titer plate をゲノムシークエンサー (GS Junior, Roche Diagnostics) にセットし、パイロシークエンス法により塩基配列を決定した。得られた配列データをもとに、GS Reference Mapper (Roche Diagnostics) により、National Center for Biotechnology Information (以下、NCBI と

略す) データベース上の strain 17 の全ゲノム配列 (accession number PRJNA 175) にマッピングし、strain 17 と 17-2 間での変異探索を行った。

5) 変異部位のサンガー法シークエンシング

Strain 17-2 のゲノム配列を、親株である strain 17 にマッピングしたところ、複数の変異部位が存在した。このうち 2 か所以上の変異が認められた遺伝子 (PIN 17_0430, PIN 17_A 1569) に絞って、遺伝子配列を含む領域を PCR 増幅し、サンガー法によりダイレクトシークエンシングした。NCBI データベース上の *P. intermedia* strain 17 PIN 0430, PINA 1569 遺伝子配列をもとに特異的プライマーペア (PI 430-F 1: 5'-GATTTGATAACA CGCTACA-3', PI 430-R 1: 5'-AAGAGATTCTTATATCA GAACTC-3'; PINA 1569 F1: 5'-ACAAAATCAAGGCG TCTTTAGTATCTG-3', PINA 1569 R 1: 5'-TGCTTTCTT TGCAGAAAATAAATTGCTAA-3') をデザインした。PCR チューブに、上述の方法で準備した strain 17, 17-2 のゲノム DNA 溶液 (1 ng/reaction), KOD Dash ポリメラーゼ (1.25 units/reaction; TOYOBO, 大阪市), dNTPs (0.2 mM), プライマー (0.5 μ M), KOD Dash buffer (10 \times ; TOYOBO) を加え、超純水で最終量を 50 μ L とした。サーマルサイクラーには Takara PCR Thermal Cycler MP (Takara, 大津市) を用い、予熱 94°C, 2 分間ののち、熱変性 94°C, 1 分間、アニーリング 56°C, 1 分間、伸長 72°C, 1 分間を 30 サイクル、追加伸長を 72°C, 5 分間行った。

6) PCR 増幅産物のダイレクトシークエンシングと相同性解析

PCR 産物を 2% トリスホウ酸 EDTA アガロースゲルにて電気泳動し、目的サイズの単一バンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) を用いて、メーカープロトコルに従い、DNA フラグメントを精製した。精製 PCR 産物を鋳型として、増幅プライマーを用いてサンガー法でダイレクトシークエンシングした。シークエンシング反応には Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ライフテクノロジーズ・ジャパン, 東京) を、シークエンシングには Applied Biosystems 3130 xl ジェネティック アナライザー (ライフテクノロジーズ・ジャパン) を用いた。得られた遺伝子配列は GENETYX Ver. 7 program (Genetyx Ltd., 東京) を用いてアッセンブルし、DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 三島市) の BLAST により相同性解析を行った。

結 果

1. 抗 GroEL 抗体の作製と反応性

rGroEL を家兔に免疫したところ, rGroEL に対する抗体価の上昇が確認できた (Fig. 1). 抗血清より精製した抗 GroEL 抗体 (IgG 画分) は, strain 17 の菌体破砕物と培養上清中の約 60 kD タンパクと特異的に反応した (Fig. 2).

2. 供試菌株の細胞表層構造

Strain 17, 17-2, ATCC 25611 の細胞表層構造を SEM 観察したところ, strain 17 ではバイオフィーム形成菌に特徴的な網目様構造が確認されたが (Fig. 3 A), strain 17-2 では認められなかった (Fig. 3 B). ATCC 25611 では菌体周囲に網目様構造がみられたが, strain 17 と比べるとわずかであった (Fig. 3 C). 今回実験に供試した菌株は, これまでに我々が報告したフェノタイプ^{29, 30, 34, 35} を維持していることが確認された. なお, 供試菌が *P. intermedia* であることは, 小幡ら³⁰ の方法に準じて 16 S rRNA 遺伝子の相同性解析により確認した.

3. 供試菌のポリスチレンマイクロプレート上でのバイオフィーム形成性

HSPs を加えない enriched TSB に各菌株を接種し, ポリスチレンプレート上で 24~48 時間培養したのち, バイオフィーム形成状態をクリスタルバイオレット染色

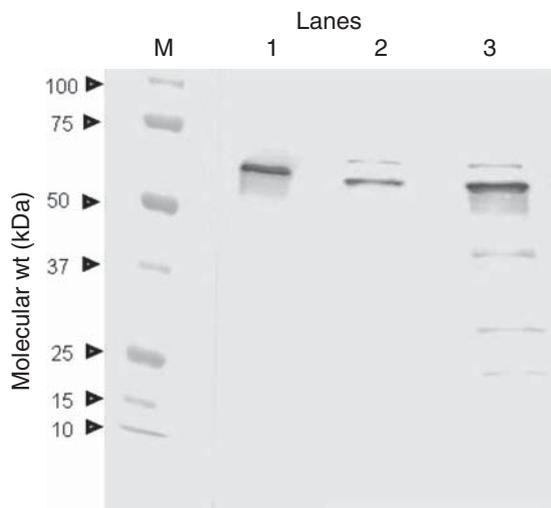
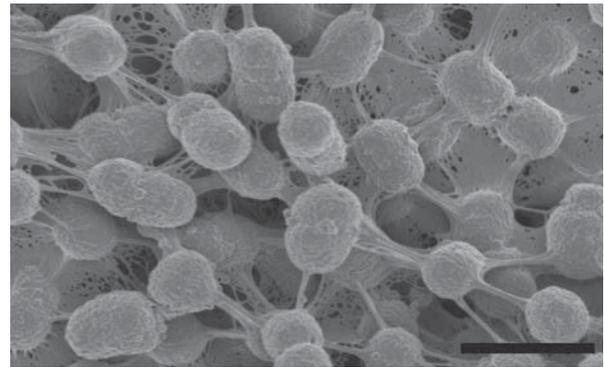
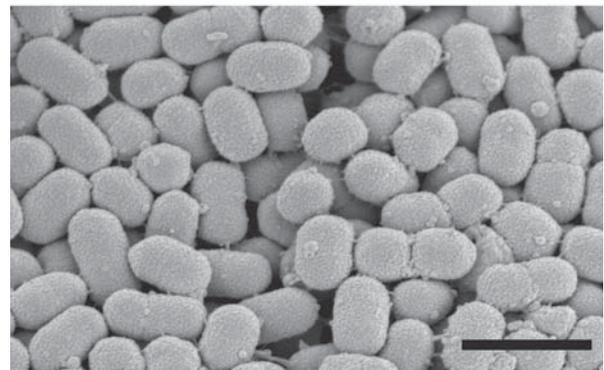


Fig. 2 Western blots with polyclonal anti-GroEL antibodies against recombinant *Prevotella intermedia* GroEL (Lane 1), culture supernatant of *P. intermedia* strain 17 (Lane 2) and sonicates of *P. intermedia* strain 17 cells (Lane 3) separated by 10% polyacrylamide gel. Lane M: protein standards.

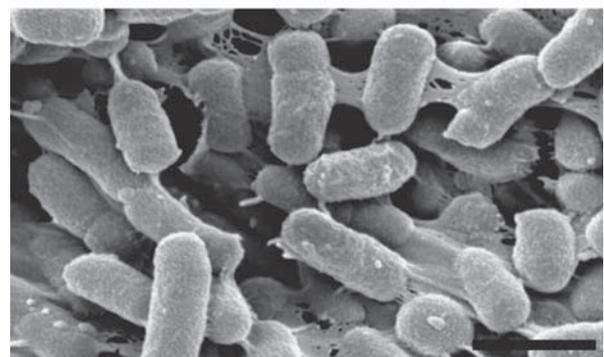
にて観察したところ, strain 17 のバイオフィーム形成が最も顕著で, クリスタルバイオレット溶出量を比較しても, その違いは明瞭であった (Fig. 4). この時の培養菌液の粘度を測定した結果, strain 17 の粘度が 2.4 mPa·s と極めて高く, strain 17-2 と ATCC 25611 株の



Prevotella intermedia strain 17



Prevotella intermedia strain 17-2



Prevotella intermedia ATCC 25611

Fig. 3 Scanning electron micrographs showing the cell surface structures of *Prevotella intermedia* strains 17, 17-2 and ATCC 25611. Although strain 17 had dense meshwork-like structures surrounding the cell surfaces, the other two strains lacked this phenotype.

Bars = 1 μ m.

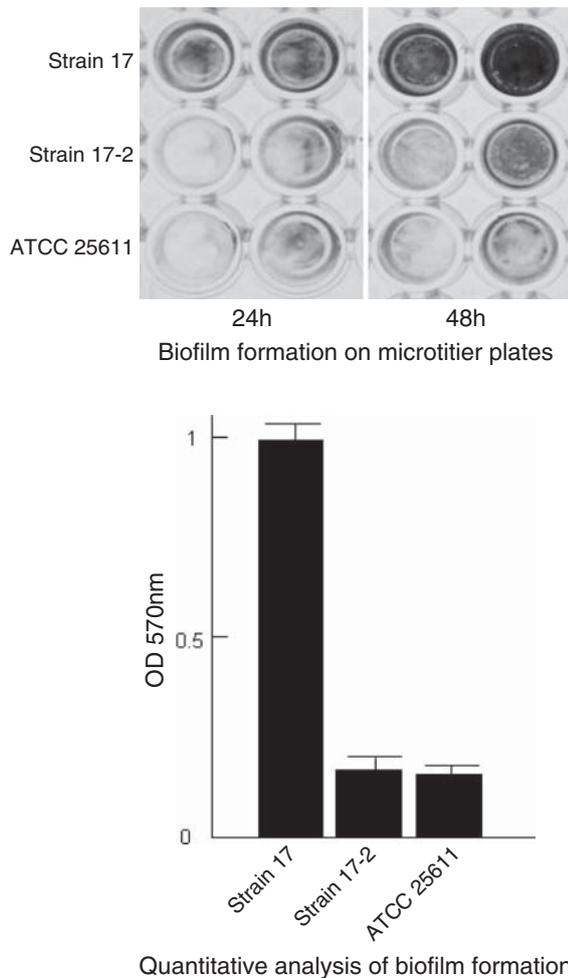


Fig. 4 Biofilm formation on microtiter plates and the quantitative analysis of biofilm production. Biofilm production of *Prevotella intermedia* strains 17, 17-2 and ATCC 25611 was checked on polystyrene microtiter plates. A representative pair of microtiter plate wells from each experiment was stained with 0.1% crystal violet solution after 24 h and 48 h of incubation. The quantitative analysis of biofilm production was obtained by measuring the optical density of destained biofilms at 570 nm. Bars indicate standard deviations.

粘度は細菌未接種の培地と同程度であった (Fig. 5)。これらの結果から、strain 17 が EPS を産生し、ポリスチレン上でバイオフィームを形成することが確認された。

4. GroEL, DnaK がバイオフィーム形成に与える影響

培地に異なる濃度 (40~1.25 $\mu\text{g/mL}$) の rGroEL, rDnaK を添加し、24, 48 時間後のポリスチレンプレート上でのバイオフィーム形成状態を観察したところ、strain 17 のバイオフィーム形成が顕著に抑制され、逆に、HSPs 未添加の条件ではバイオフィームを形成しな

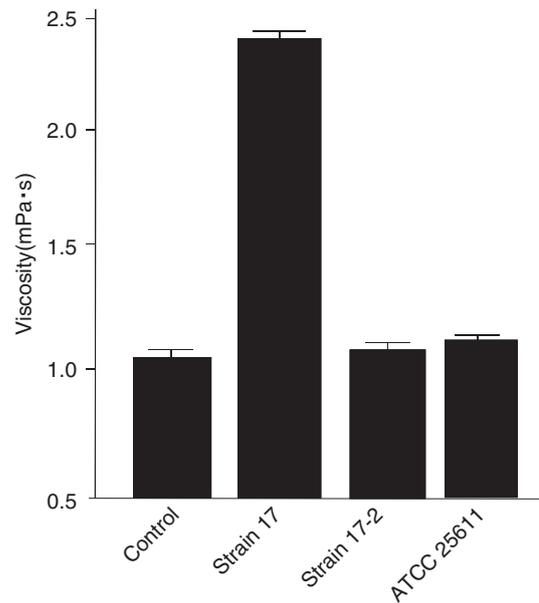


Fig. 5 Viscosities of the spent culture media of *Prevotella intermedia* strains 17, 17-2 and ATCC 25611. Viscosities of the spent culture media obtained from *P. intermedia* strains 17, 17-2 and ATCC 25611 were measured by an automated microviscometer. The viscosity of the enriched-TSB medium was measured as a control.

い strain 17-2 と ATCC 25611 がバイオフィーム形成性を示した (Fig. 6)。rGroEL, rDnaK でコートしたポリスチレンプレート上では、strain 17 と ATCC 25611 は明瞭なバイオフィームを形成せず、strain 17-2 のみが凝集塊を形成した (Fig. 7)。

5. Strain 17-2 と strain 17 のゲノム比較

パイロシークエンシングにより得られた配列を strain 17 のゲノムシークエンスにマッピングしたところ、chromosome I で 17 か所の変異が存在し、そのうち 12 か所の変異は PIN 17_0430 (TaqI like C-terminal specificity domain protein) に集中していた。データベース上の配列よりデザインしたプライマーを用いて strain 17, strain 17-2 のゲノム DNA をテンプレートに本遺伝子領域を PCR 増幅し、サンガー法でシークエンシングしたところ、strain 17-2 において、遺伝子中間部分に多くの変異部位が存在することが確認された (Fig. 8)。Chromosome II では 36 か所の変異がパイロシークエンシングとマッピングの結果認められ、このうち複数の変異がみられた遺伝子領域 (PIN 17_A 1569: transporter, major facilitator family protein) についてサンガー法でシークエンシングしたところ、4 か所の変異があり、アミノ酸配列に変換して相同性解析した結果、*Prevotella* 属で

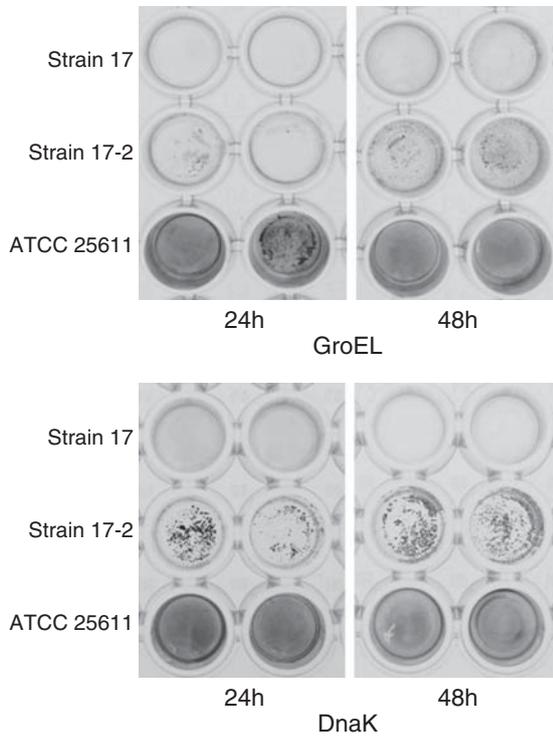


Fig. 6 Biofilm formation on microtiter plates with recombinant GroEL and DnaK at 20 µg/mL. Biofilm production of *Prevotella intermedia* strains 17, 17-2 and ATCC 25611 was checked on polystyrene microtiter plates. A representative pair of microtiter plate wells from each experiment was stained with 0.1% crystal violet solution after 24 h and 48 h of incubation.

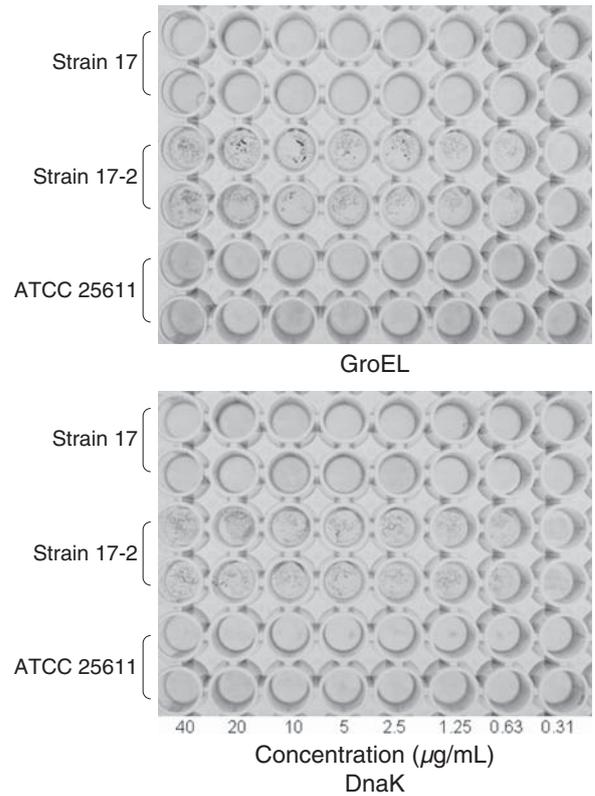


Fig. 7 Biofilm formation on microtiter plates coated with recombinant GroEL and DnaK. Biofilm production of *Prevotella intermedia* strains 17, 17-2 and ATCC 25611 was checked on polystyrene microtiter plates. A representative pair of microtiter plate wells from each experiment was stained with 0.1% crystal violet solution after 48 h of incubation.

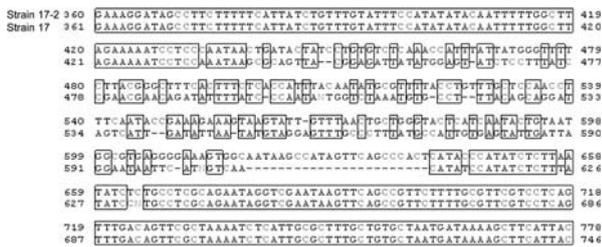


Fig. 8 Partial sequence alignment of a gene encoding *Prevotella intermedia* strain 17 TaqI-like C-terminal specificity domain protein (PIN 0430) and the PCR amplicon from *P. intermedia* strain 17-2 genomic DNA.

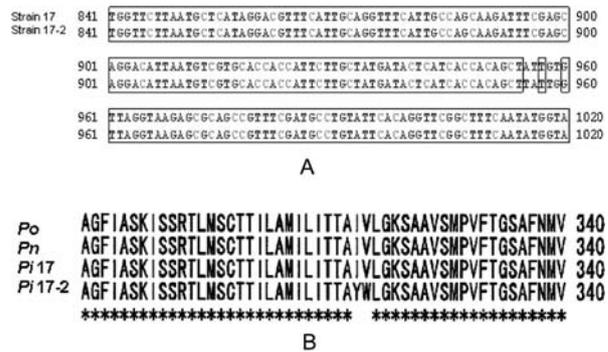


Fig. 9 Partial DNA (A) and protein (B) sequence alignments of a gene encoding *Prevotella intermedia* strain 17 transporter major facilitator family protein (PINA 1569). The PCR amplicons were generated from *P. intermedia* strains 17 (*Pi* 17) and 17-2 (*Pi* 17-2) genomic DNA and sequenced (A). Conserved amino acid residues are indicated by asterisks (B). *Po*: *Prevotella oris* C 735; *Pn*: *Prevotella nigrescens* ATCC 33563.

高度に保存された配列のうち、イソロイシン、バリンの配列が strain 17-2 においてチロシン、トリプトファンへと置換していることが明らかとなった (Fig. 9).

考 察

近年の分子生物学的手法ならびにメタゲノム解析結果より、*P. intermedia* の口腔内への定着は幼少期からみられ、歯周組織健康者の口腔に、従来考えられていたよりも高い比率で存在することが明らかとなった。³⁶ 清掃した歯面に最も早く定着して microcolony を形成する、いわゆる initial colonizers の一員として働いていること、³⁷ 歯肉縁下プラークにおいても歯面に橋頭堡を形成し、他の細菌の定着を促すこと³⁸ が明らかとなっている。歯周疾患と冠動脈疾患を併発した患者においては、*P. intermedia* が唯一、有意に増加している歯周病原細菌であるとの報告³⁹ や、腸管の Prevotellaceae はメタン産生 Archaea と連動して肥満に関与している可能性が示唆されており、⁴⁰ ヒト常在細菌叢の一員としての *Prevotella* 属は多方面から注目を集めている。

これまでに臨床分離の *P. intermedia* がマンノースを主とする EPS からなる密な網目様構造を菌体周囲に形成すること、これがヒト好中球の貪食に対する抵抗因子として働くことを報告している。^{30, 41} また大量に EPS を産生する strain 17 のマウスにおける膿瘍形成誘導能を、これをもたない *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, 381, W 83 と比較したところ、strain 17 の膿瘍形成誘導能が 100 倍から 1,000 倍強いことも報告している。⁴²

グラム陰性細菌のバイオフィーム形成調節機構には、quorum sensing system を用いる系⁴³ と、 σ 因子を介した熱ショック応答を主としたストレス応答による系^{44~46} が存在し、グラム陰性菌は環境の違いによって、これらのバイオフィーム形成調節機構を使い分けているようである。Strain 17 のバイオフィーム形成について検討した限りでは、培養期間前半に HSPs 遺伝子の転写亢進がみられ、^{6, 47} この変化はバイオフィーム非形成バリエーションでは認められないことから、後者の熱ショック応答を介したバイオフィーム形成調節機構が、実験環境では優位に働いていると推定している。細菌の HSPs は、先にも述べたが、宿主への定着・侵襲因子としても重要な役割を果たしている。DnaK/DnaJ を不活化した *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni* は培養環境では増殖できるが、宿主組織内に定着・増殖する能力を欠く^{48, 49} ことから、*Prevotella* 属のバイオフィーム形成における

HSPs 発現上昇^{7, 35} は、本菌が宿主内に侵入し、マイクロコロニーを形成して定着、さらには安定して増殖するための重要な組織侵襲因子であると推定している。

今回の研究では、培地に添加した rGroEL, rDnaK が、バイオフィーム形成株である strain 17 のポリスチレンプレート上へのバイオフィーム形成を阻害し、strain 17-2 と ATCC 25611 (通常の培養条件ではバイオフィーム非形成) に対しては促進的に働く結果を得た。培地に添加した rGroEL, rDnaK が菌体とポリスチレンプレートの接着およびバイオフィーム形成にどのように介在するのは今のところ不明である。これまでに我々が得た研究結果では、バイオフィーム非形成株である strain 17-2 の GroEL, DnaK 遺伝子の転写量は培養期間中ほとんど変化せず、低レベルで推移し、strain 17 では培養後 6~12 時間で相対的に 10 倍程度の転写亢進がみられる⁴⁷ ことから、バイオフィーム形成株では自前の HSPs を培養上清と菌体周囲に供給でき、非形成性の strain 17-2 は自身の HSPs を十分に産生できないことが推測される。外部から加えた rGroEL, rDnaK が、HSPs を自給してバイオフィームを形成する strain 17 のバイオフィーム形成を抑制し、逆に非形成株のポリスチレンプレート上でのバイオフィーム形成を促進したことから、これら HSPs が、*P. intermedia* が外部環境を検知し、バイオフィームモードで長期に生存するための調節因子である可能性が示唆される。他菌の産生する HSPs が外部環境に存在した場合、strain 17 が接着からバイオフィーム形成を行わない理由についても、今のところまったく不明である。しかし、培養菌液の粘度は高値を示すので、EPS 産生は持続的に行われているようである (未発表データ)。

特異抗体を用いたウエスタン・ブロッティングの結果、strain 17 の GroEL, DnaK は培養上清中にも存在することが確かめられた。恐らく、腸管病原性大腸菌、⁵⁰ *H. pylori*,⁵¹ *L. pneumophila*,¹⁹ *Mycobacterium avium*⁵² の DnaK と同様に、菌体表層や菌体外に分泌/輸送され、接着分子として働くと考えられる。これまでのところ、HSPs もしくはストレス調節因子をコードする遺伝子にシグナル配列や分泌に関与するモチーフの存在は報告されていないので、細菌の HSPs の細胞周囲への局在は、他の細胞が溶解して放出されたものが、細胞壁に結合したとする考え方が一般的である。しかしながら、近年の *L. pneumophila* における Hsp 60 の細胞表層への局在に関する研究では、DNA やタンパク輸送に関わる *dot/icm* 遺伝子を含む領域が、Hsp60 の輸送と細胞壁への

表出に重要であることが示されている。¹⁹ 今回行った、バイオフィルム形成株 (strain 17) から得た非形成バリアント (strain 17-2) の変異解析では、chromosome I 上の TaqI-like C-terminal specificity domain protein とアノテーションされた遺伝子 (PIN 17_0430) に変異が集中していることが明らかとなった。本遺伝子は、恐らく基質の認識と DNA への結合ならびに DNA の切断を担っている制限酵素をコードする遺伝子と推測されるが、詳細は不明である。また chromosome II 上の glucose/galactose transporter とアノテーションされた遺伝子 (PIN 17_A 1569) にも 4 か所の変異が存在し、アミノ酸配列に変換すると、親株ではイソロイシン、バリンのアミノ酸残基がチロシン、トリプトファンへと変異していることが明らかとなった。こちらも詳しい機能は不明であるが、親水性アミノ酸への置換が、トランスポーターとしての機能にどのような影響を与えているのか、今後の検討課題である。

先にも述べたが、多くの細菌の GroEL, DnaK が細胞表層に局在⁵³ し、接着分子としても働いていることから、今後はさらに詳細に、*P. intermedia* GroEL と DnaK の細胞表層における局在と外部環境センシングとの関わりについて検討する予定である。これまでに報告されている、CD91 分子^{54, 55} や CD43 分子を介した宿主免疫系の活性化^{23, 56} や、ケモカインレセプターの 1 つである CCR5 を介した宿主自然免疫細胞の刺激²² についても、リコンビナントタンパクを用いて検討する予定である。これまで考えられていた以上に、細菌 HSPs と宿主免疫系の応答は複雑であることが明らかになりつつあるが、*P. intermedia* GroEL, DnaK が strain 17 のバイオフィルム形成を抑制したことから、HSPs をターゲットにした抗菌因子^{57, 58} としての可能性も含めて、*P. intermedia* HSPs の多様な機能を解明することで、本細菌によるバイオフィルム感染の制御に繋がりたいと考えている。

本研究を遂行するにあたり、直接ご指導賜りました大阪歯科大学細菌学講座の山根一芳講師ならびに大阪歯科大学中央歯学研究所の堀 英明氏に厚く感謝致します。また、ご助言、ご助力を賜りました大阪歯科大学細菌学講座の皆様にご心より感謝の意を表します。なお、本研究の一部は大阪歯科大学共同研究助成 B 08-01 により、大阪歯科大学中央歯学研究所 (形態系研究施設、画像処理施設、歯科生物学施設および低温実験施設) を使用して行った。

本論文の用紙は第 539 回大阪歯科学会例会 (2013 年 6 月 8 日、枚方市) において発表した。

引用文献

1. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae K-S, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 1999; **25**: 413-415.
2. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1999; **32**: 204-210.
3. Dahlén GG. Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; **6**: 181-192.
4. Duerden BI. Black-pigmented gram-negative anaerobes in genito-urinary tract and pelvic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; **6**: 223-227.
5. Brook I. *Prevotella* and *Porphyromonas* infections in children. *J Med Microbiol* 1995; **42**: 340-347.
6. Yamanaka T, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Yamane K, Sugimori C, Nambu T, Mori N, Nishikawa H, Walker CB, Leung K-P, Fukushima H. Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17. *BMC Microbiol* 2009; **9**: 11.
7. 古川智代, 山中武志, 福島久典. *Prevotella nigrescens* の exopolysaccharide 高産生性回復と関連タンパク解析. *歯科医学* 2005; **68**: 34-44.
8. Henderson B, Allan E, Coates ARM. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect Immun* 2006; **74**: 3693-3706.
9. Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J* 2008; **27**: 328-335.
10. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones—cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed* 2002; **41**: 1098-1113.
11. Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S. Beneficial effects of cellular stress response in traditional spa treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Lab* 2009; **55**: 235-241.
12. Oláh M, Koncz A, Fehér J, Kálmánchey J, Oláh C, Balogh S, Nagy G, Bender T. The effect of balneotherapy on C-reactive protein, serum cholesterol, triglyceride, total antioxidant status and HSP-60 levels. *Int J Biometeorol* 2010; **54**: 249-254.
13. Bathaie SZ, Jafarnejad A, Hosseinkhani S, Nakhjavani M. The effect of hot-tub therapy on serum Hsp 70 level and its benefit on diabetic rats: a preliminary report. *Int J Hyperthermia* 2010; **26**: 577-585.
14. Goulhen F, Grenier D, Mayrand D. Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; **14**: 399-412.
15. Bergonzelli GE, Granato D, Pridmore RD, Marvin-Guy LF, Donnicola D, Corthésy-Theulaz IE. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2006;

- 74: 425-434.
16. Engraber M, Loos M. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun* 1992; **60**: 3072-3078.
 17. Parsons LM, Limberger RJ, Shayegani M. Alterations in levels of DnaK and GroEL result in diminished survival and adherence of stressed *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* 1997; **65**: 2413-2419.
 18. Garduño RA, Garduño E, Hoffman PS. Surface-associated Hsp 60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* 1998; **66**: 4602-4610.
 19. Hoffman PS, Garduno RA. Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; **7**: 58-63.
 20. Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A-J, Collignon A, Barc M-C, Bourlioux P, Karjalainen T. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiol* 2001; **147**: 87-96.
 21. Zhu H, Lee C, Zhang D, Wu W, Wang L, Fang X, Xu X, Song D, Xie J, Ren S, Gu J. Surface-associated GroEL facilitates the adhesion of *Escherichia coli* to macrophages through lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Microbes Infect* 2013; **15**: 172-180.
 22. Floto RA, MacAry PA, Boname JM, Mien TS, Kampmann B, Hair JR, Huey OS, Houben ENG, Pieters J, Day C, Oehlmann W, Singh M, Smith KGC, Lehner PJ. Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp 70 is mediated through CCR5. *Science* 2006; **314**: 454-458.
 23. Hickey TBM, Ziltener HJ, Speert DP, Stokes RW. *Mycobacterium tuberculosis* employs Cpn 60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface. *Cell Microbiol* 2010; **12**: 1634-1647.
 24. Paju S, Goulhen F, Asikainen S, Grenier D, Mayrand D, Uitto V. Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **182**: 231-235.
 25. Zhang L, Koivisto L, Heino J, Uitto VJ. Bacterial heat shock protein 60 may increase epithelial cell migration through activation of MAP kinases and inhibition of alpha 6 beta 4 integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **319**: 1088-1095.
 26. Tsugawa H, Ito H, Ohshima M, Okawa Y. Cell adherence-promoted activity of *Plesiomonas shigelloides* groEL. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 23-29.
 27. 本山浩司, 山中武志, 福島久典. *Prevotella intermedia* 由来リコンビナント GroEL タンパクの作製. 歯科医学 2008; **71**: 156-164.
 28. 柳瀬 香, 山中武志, 福島久典. *Prevotella intermedia* 由来リコンビナント DnaK タンパクの作製. 歯科医学 2011; **74**: 56-65.
 29. Fukushima H, Moroi H, Inoue J, Onoe T, Ezaki T, Yabuuchi E, Leung K-P, Walker CB, Sagawa H. Phenotypic characteristics and DNA relatedness in *Prevotella intermedia* and similar organisms. *Oral Microbiol Immunol* 1992; **7**: 60-64.
 30. 小幡 登, 山中武志, 福島久典. Exopolysaccharide を産生する黒色色素産生グラム陰性桿菌について—その同定, 病原性および exopolysaccharide の化学組成—. 歯科医学 2005; **68**: 241-252.
 31. Yamane K, Yamanaka T, Yamamoto N, Furukawa T, Fukushima H, Walker CB, Leung K-P. A novel exopolysaccharide from a clinical isolate of *Prevotella nigrescens*: purification, chemical characterization and possible role in modifying human leukocyte phagocytosis. *Oral Microbiol Immunol* 2005; **20**: 1-9.
 32. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; **72**: 3658-3663.
 33. 水川健司, 山中武志, 福島久典. 難治性根尖性歯周炎病巣から分離したバイオフィルムを形成する *Escherichia hermannii* の粘性物質産生に関わる遺伝子クラスター. 歯科医学 2007; **70**: 151-160.
 34. 中谷祐子, 福島久典. *Prevotella intermedia* の産生する粘性物質について. 歯科医学 1992; **55**: 283-293.
 35. 森 直樹, 山中武志, 福島久典. *Prevotella intermedia* の菌体外多糖産生に関連する遺伝子発現. 歯科医学 2006; **69**: 139-150.
 36. Keijsers B, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008; **87**: 1016-1020.
 37. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer Jr RJ, Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 2837-2848.
 38. Ammann TW, Gmür R, Thurnheer T. Advancement of the 10-species subgingival Zurich biofilm model by examining different nutritional conditions and defining the structure of the *in vitro* biofilms. *BMC Microbiol* 2012; **12**: 227.
 39. Nonnenmacher C, Stelzel M, Susin C, Sattler AM, Schaefer JR, Maisch B, Mutters R, Flores-de-Jacoby L. Periodontal microbiota in patients with coronary artery disease measured by real-time polymerase chain reaction: a case-control study. *J Periodontol* 2007; **78**: 1724-1730.
 40. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 2365-2370.
 41. Yamanaka T, Yamane K, Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Leung K-P, Fukushima H. Exopolysaccharide productivity and biofilm phenotype on oral commensal bacteria as pathogenesis of chronic periodontitis. Pathogenesis and Treatment of Periodontitis, Nurcan Buduneli (Ed), ISBN: 978-953-307-924-0, InTech 2012.
 42. Yamanaka T, Yamane K, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Sugimori C, Nambu T, Obata N, Walker CB,

- Leung K-P, Fukushima H. Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organisms. *BMC Infect Dis* 2011; **11** : 228.
43. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005; **13** : 27-33.
44. Schurr MJ, Yu H, Martinez-Salazar JM, Boucher JC, Deretic V. Control of AlgU, a member of the σ^E -like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J Bacteriol* 1996; **178** : 4997-5004.
45. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; **13** : 34-40.
46. 福島久典. 口腔感染症におけるバイオフィルム形成菌の役割. 日本歯科医師会雑誌 2005; **58** : 1153-1164.
47. 加藤秀治, 山中武志, 福島久典. Quantitative real-time RT-PCR 法による *Prevotella intermedia* heat shock protein 関連遺伝子の発現解析. 歯科医学 2008; **71** : 147-155.
48. Köhler S, Teyssier J, Cloeckert A, Rouot B, Liautard JP. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U 937-derived phagocytes. *Mol Microbiol* 1996; **20** : 701-712.
49. Konkel ME, Kim BJ, Klena JD, Young CR, Ziprin R. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1998; **66** : 3666-3672.
50. de Jesus MC, Urban AA, Marasigan ME, Barnett Foster DE. Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. *J Infect Dis* 2005; **192** : 1430-1440.
51. Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp 70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998; **66** : 4061-4067.
52. Ratnakar P, Rao SP, Catanzaro A. Isolation and characterization of a 70 kDa protein from *Mycobacterium avium*. *Microb Pathog* 1996; **21** : 471-486.
53. Carrió MM, Villaverde A. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol* 2005; **187** : 3599-3601.
54. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD 91 is a common receptor for heat shock proteins gp 96, hsp 90, hsp 70, and calreticulin. *Immunity* 2001; **14** : 303-313.
55. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Jr. Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Letters* 2007; **581** : 3689-3694.
56. Tobian AAR, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD 8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol* 2004; **172** : 5277-5286.
57. Chesnokova LS, Slepnev SV, Witt SN. The insect antimicrobial peptide, L-pyrrolicorin, binds to and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK. *FEBS Lett* 2004; **565** : 65-69.
58. Otvos L, Jr, O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 2000; **39** : 14150-14159.

Effect of *Prevotella intermedia* GroEL and DnaK proteins on biofilm formation

Shuji Horiike, Takeshi Yamanaka and Hisanori Fukushima

Department of Bacteriology, Osaka Dental University, 8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata-shi, Osaka 573-1121, Japan

Abstract Recent studies have demonstrated that bacterial heat shock proteins (HSPs) play a role not only as intracellular molecular chaperons, but also as adhesion molecules and stimuli against the host immune system. We examined the effect of recombinant GroEL and DnaK proteins of *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) on the biofilm formation of this organism. The recombinant GroEL was also used as an immunogen to obtain rabbit antibodies against the wild-type GroEL of this organism. In addition to the biofilm assay, the genome sequence of *P. intermedia* strain 17-2 (which is a naturally occurring variant without biofilm-forming capacity) was obtained by using the 454 pyrosequencing technology and mapped on that of the biofilm-forming parent strain 17.

The rabbit polyclonal antibodies recognized 60 kD proteins which had a molecular weight corresponding to that of the wild-type GroEL in the sonicate of strain 17 cells as well as in the culture supernatant. Although recombinant GroEL and DnaK in the culture media inhibited the biofilm formation of strain 17, it enhanced those of strain 17-2 and ATCC 25611 (a type strain for *P. intermedia*). The genome mapping of strain 17-2 on its parent strain genome revealed that a few genes of strain 17-2 contained extensive mutations. The data obtained in this study suggest that the extracellular GroEL and DnaK of *P. intermedia* both play a role in the biofilm formation of this organism, and may also suggest that genes highlighted in this study might be responsible for its biofilm formation. **Shika Igaku (J Osaka Odontol Soc) 2013 ; September ; 76(2) : 89–100.**

Key words : *Prevotella intermedia* ; Biofilm ; Heat shock proteins ; GroEL ; DnaK