

Zhu, J. and J. J. Mekalanos

Quorum Sensing-Dependent Biofilms Enhance Colonization in *Vibrio cholerae*
Develop. Cell 5: 647–656.

クオラムセンシング依存で形成された
バイオフィームは *Vibrio cholerae* のコロニー形成を強化する

Vibrio cholerae は、発展途上の多くの地域で発生する重篤な伝染性の下痢性疾患コレラの原因細菌である。*V. cholerae* の病原性の発達過程には不明な点が多いが、バイオフィームと呼ばれる複雑な表面付着性の細菌群集を形成することが知られる。また、以前の研究で、*V. cholerae* の病原性遺伝子がクオラムセンシング (QS) によって調節されていることが発見された。バイオフィーム中の細菌は宿主の免疫反応と抗生物質に影響されにくいという点で、バイオフィームは臨床的に重要である。そこで本研究ではバイオフィーム形成において QS が制御する機構の特徴を示し、*V. cholerae* の病原性におけるバイオフィーム形成の役割を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

本研究では、ストレプトマイシン抵抗性 *V. cholerae* EI Tor C6706 株を用いた。HapR 調整遺伝子 VC0920, VCA0880, VCA0223 のインフレーションの削除はクロスオーバーPCR で作成した。緑色蛍光タンパクで標識された株は *Plac-gfp* を *V. cholerae* の染色体上の *lacZ* 座に導入して作成した。LB 寒天培地上で成長した *V. cholerae* のコロニーを LB 培養液内で波長 600 nm における濁度 (OD) が 0.6 までの範囲で再懸濁し、これを 1/100 に希釈し、培養した。MRC-1024 共焦点顕微鏡 (Bio-Rad), 電子顕微鏡 (Autoscan Etec) を用いて観察した。*V. cholerae* 株は *Plac-gfp* を染色体上の *lacZ* 座に導入して蛍光を発するようにし、共焦点顕微鏡で観察した。バイオフィームは 1 mL の LB 培養液の入った 10 × 75 mm ホウケイ酸ガラスチューブ内で形成させた。バイオフィームに含有されている細菌は 1 mL の LB 培養液の中でガラス玉を用いて再懸濁した。浮遊性細胞とバイオフィームに含まれていた細菌の浮遊細胞については Lux 刺激を分析し、発光は Berthold LB9507 ルミノメーターで検出した。VC0920 の 45 ヌクレオチドプローブとコントロールとして *V. cholerae* の 16S rRNA の 45 ヌクレオチドプローブを用いて mRNA による S1 定量分析を実行した。p³² でラベルされた 500 ピコグラムのオリゴヌクレオチドは 10 mg のすべての RNA と 12 時間掛け合わせられ、S1 ヌクレアーゼの 250 ユニットによって 37°C で 12 時間消化させた。その後エタノールにより反応を促進し、0.1 M の NaOH 5 μl で再懸濁し、ホルムアミドローディングダイ 5 μl を加えた。各サンプル 5 μl は 18% 変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズ分画され、Storm phosphoimager を用いて定量化した。LB 寒天培地上で増殖したコロニーは LB 培養液内で波長 600 nm における OD が 0.6 までの範囲で再懸濁した。この懸濁液の 1/100 希釈はその後 2 ml の LB 培養液と 10 mg のガラスビーズが入った 100 × 15 mm のポリスチレンのペトリ皿に接種され、毎分 10 回の振とう下において 22°C で 24 時間培養された。ガラスビーズ上に形成されたバイオフィームは pH 7 または pH 4.5 の 5 ml の LB 培養液を加え、37°C でゆっくりとした振とう下で培養した。バイオフィーム構造を崩壊させるために、細菌の培養を 1 分間大きいガラス玉 (1 mm) の存在下で試験管攪拌機を用いて攪拌した。その後、生残細胞は段階希釈と LB 寒天培地上の培養により計数した。剥離分析はバイオフィームで覆われたガラスビーズを LB 培養液内で再懸濁し 22°C で培養して行った。乳児期マウスへのコロニー形成の分析は生後 6 日の乳児マウスごとに約 10⁵ の *V. cholerae* を接種して行った。コロニーを形成させた後に腸の破砕物を集め、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシドを含む LB 寒天培地上で培養して、2 つの株の比率 (拮抗実験) または細菌数 (長期コロニー形成分析) を測定した。

QS 突然変異体のバイオフィーム表現型の検査、全ゲノムマイクロアレイ分析、浮遊性・バイオフィーム性細菌株のオリゴベースの S1 ヌクレアーゼプロテクションアッセイの結果から、QS が、細胞密度が高いときに *Vibrio* 属の多糖類合成 (*vps*) オペロンを抑制することで *V. cholerae* のバイオフィーム形成を制御することがわかった。また、酸性化した培地にさらした後の浮遊性とバイオフィーム性の細菌の増殖能力を査定した結果、バイオフィームの物理的構造が酸の衝撃に対する防御になっていることがわかった。以上から、胃内での酸の衝撃から守るため、宿主の消化管への侵入の際にはバイオフィーム構造が重要であることが示唆された。

田村航士