

コレラ菌のバイオフィーム形成と生きているが 培養できない (VNC) 状態への移行

Biofilm Formation and VNC (viable but nonculturable) State of *Vibrio cholerae*

水之江 義 充

Yoshimitsu Mizunoe

東京慈恵会医科大学細菌学講座

要 旨 細菌は飢餓や低温等のストレス下で生存するために種々の適応戦略を有している。代表的なものはグラム陽性菌では芽胞の形成である。一方、グラム陰性菌ではバイオフィームの形成や生きているが培養できない (VNC: viable but nonculturable) 状態への移行などが考えられる。コレラ菌は飢餓等のストレスが加わると、通常見られる平滑な(スムーズ)コロニーからしわのよった(ルゴース)コロニーに変化することを見出した。ルゴースコロニーはバイオフィームを形成し、酸化ストレスや高浸透圧のストレスに抵抗を示した。また、コレラ菌を低温や低栄養の培地中で長期間培養すると、培養能が徐々に低下し寒天培地上でほとんどコロニーを形成しなくなった。つまり VNC 状態へ移行した。VNC 状態の菌をカタラーゼ等の抗酸化剤を含む培地に播種することにより蘇生(コロニー形成)に成功した。コロニー形態の相変異や VNC への移行はコレラ菌のストレスに適応するための重要な戦略と考えられる。

キーワード：コレラ菌，バイオフィーム，相変異，ルゴースコロニー，生きているが培養できない状態 (VNC)

1. はじめに

自然環境中では、細菌は、種々のストレスに曝されている。細菌がある環境から他の環境へ移った場合、温度、栄養状態、塩濃度、pH などの変化に直面する。多くの病原細菌や常在菌は環境と宿主の間を移行し、宿主の免疫ばかりでなく、栄養状態の突然の変化に適応しなければならない。細菌は環境の変化のもとで生存するために、多くの適応メカニズムを進化させてきた。芽胞の形成もその一つであるが、芽胞を形成しない細菌は、エネルギーや栄養の欠乏した(飢餓)状態で生存するために、種々の適応プログラムを有している。その一つが相変異である。相変異は、ある遺伝子のスイッチが周期的に ON あるいは OFF になることでおこる。鞭毛、線毛、外膜タンパク、菌体外多糖 (EPS: exopolysaccharide) などが相変異を起こすことが知られている。我々は、コレラ菌が飢餓などの環境ストレスに反応し、通常透明なスムーズコロニーからルゴース(皺のよった)コロニーに変異することを見いだした^{1,2)}。ルゴース株はスムーズ株に比べ、大量の EPS を産生し、浸透圧の変化や酸化ストレスに抵抗性を示し、バイオフィーム形成を促進する。バイオフィームは、細菌が存在するあらゆる環境表面(自然、工場、生態系、感染症)で形成される。バイオフィームは生態学の立場から見ると細菌の生存に有利な環境といえる。

生きているが培養できない (viable but nonculturable: VNC) 状態もまた、きびしい環境下での細菌による適応戦略と考えられている³⁾。VNC 状態の細菌は通常の培養法では増殖しない。しかし、細胞は代謝・呼吸活性を有し、膜のインテグリティも保たれ、特殊な mRNA の転写が行われている^{4,5)}。

本稿では、コレラ菌のストレス下での生存戦略をバイオフィーム形成と VNC 状態への移行に焦点を絞り述べる。

2. バイオフィーム

細菌はそのライフサイクルにおいて浮遊細胞としてよりも何かの表面に固着した共同体(バイオフィーム)として存在している期間が長いと考えられる。バイオフィーム形成は微生物の分化に結びつけられ、広い意味では多細胞生物の分化システムに関連づけられる。発生はいわゆる高等生物に限られてはいないともいえる。細菌の発生過程の例としては単個細胞の分化 (*Caulobacter crescentus* の遊走細菌から有茎細菌への移行) と枯草菌の芽胞形成などが含まれる。コレラ菌等のグラム陰性菌のバイオフィームの形成過程は4つの段階に分けられる。1) 鞭毛による遊走と表面への軽度の付着、2) 線毛によるより強固な定着、3) 増殖・マイクロコロニーの形成、4) 成熟 (EPS の産生と高次構造の構築) (図 1)。形成過程の根幹は多くの微生物に共通であると思われるが、正確な分子メカニズムは菌により異なる。コレラ菌のバイオフィーム形成は、コロニー形態の相変異に密接に関連しており、大腸菌等のバイオフィーム形成とはやや異なった様相を呈している。

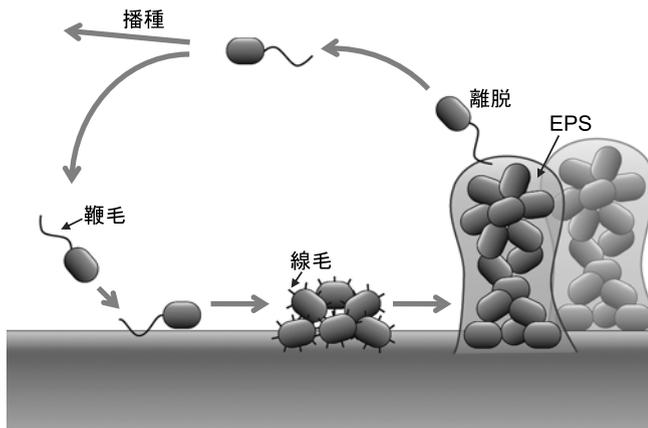


図1 グラム陰性菌のバイオフィーム形成過程

EPS: exopolysaccharide (菌体外多糖)

細菌は鞭毛で個体表面に遊走し、付着する。線毛を発現し強固に付着し、増殖する。EPSを分泌し、マッシュルーム様の成熟したバイオフィームを形成する。

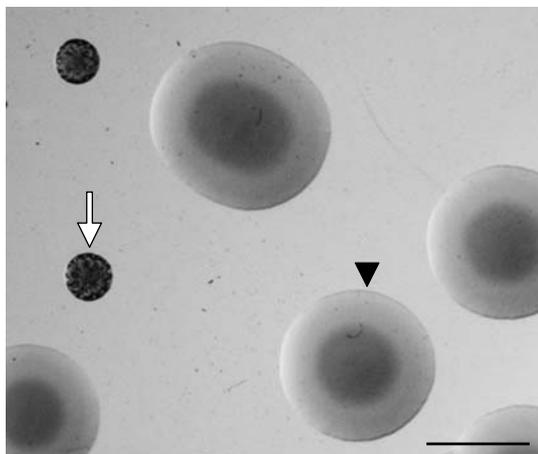


図2 O1型コレラ菌のコロニーの相変異

⇨:ルゴースコロニー

▶:スムーズコロニー

—: 2 mm

2.1 コレラ菌の相変異

これまで血清型がO1のコレラ菌のみがコレラの流行を起こしてきたが、1992年、血清型がO1とは異なるO139コレラ菌による流行が起こった⁶⁾。O1コレラ菌とO139コレラ菌を低温・低栄養状態に曝すとスムーズコロニーからルゴースコロニーに相変異することを見いだした(図2)。他のストレス(高浸透圧, 高濃度の抗生物質, 酸や凍結)も、コレラ菌の相変異を誘導した。

2.2 コレラ菌のルゴース株によるEPS産生とバイオフィーム形成

ルゴース株は多量のEPSを産生することが判明した^{1,2)}。EPSは種々の細菌種においてバイオフィームの形成に関与していることが報告されている(大腸菌のコラン酸や緑膿菌のアルギン酸など)。コレラ菌のEPS産生とバイオフィーム

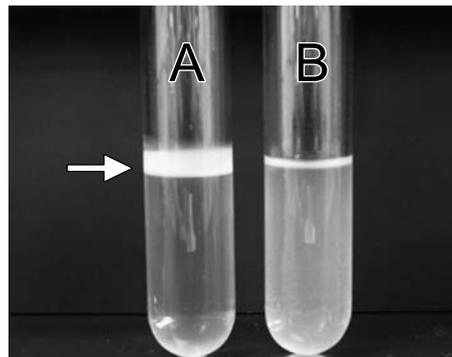


図3 コレラ菌のルゴース株によるバイオフィーム形成

A:ルゴース株

B:スムーズ株

⇨:バイオフィーム

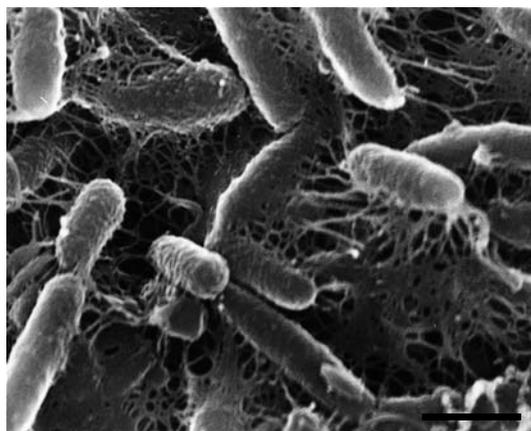


図4 コレラ菌のバイオフィーム(走査電子顕微鏡像)

コレラ菌とバイオフィームマトリックスが観察される。菌と菌は細いチューブ(ナノチューブ)で連結されている。

—: 1 μm

形成の関連性を検討した。O1およびO139ルゴース株は試験管の壁と培地表面に膜状のバイオフィームを形成した。一方、スムーズ株はバイオフィームを形成しなかった(図3)。走査電子顕微鏡の観察では、菌がバイオフィームマトリックスに埋め込まれた像が見られた(図4)。菌と菌は細いフィラメント状の線維(ナノチューブ)で連結している。最近の研究では、ナノチューブを介して同菌種間および異菌種間で様々な物質(DNA, RNA, タンパク)を交換していることが示された⁷⁾。興味深いことに、バイオフィーム内の一部の菌はねじれた長いフィラメント状や球菌状の形態を呈している(図5)。通常私たちが知っているコレラ菌は少しねじれたコマ型の単桿菌であるが、これは栄養豊富な液体培地中で培養された結果であり、むしろ人工的な形態かもしれない。培養2日後および4日後のバイオフィーム内の菌と浮遊細菌の超薄切片を観察すると、バイオフィーム内の菌は正常な内部構造を維持しているが、浮遊細菌の大多数はインテグリティを失い死んでいるように見える(図6)。バイオフィーム内の菌は飢餓などのストレスに対し抵抗性を示すと考えら

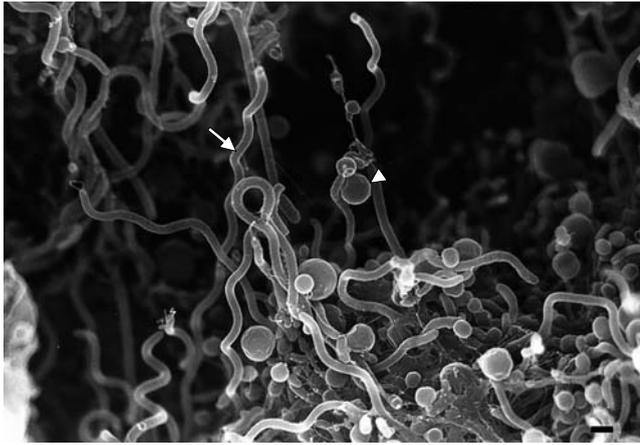


図5 バイオフィーム内のコレラ菌の形態(走査電子顕微鏡像) フィラメント状(⇔)や球菌状(▷)の形態をしたコレラ菌が観察される。
—: 1 μm

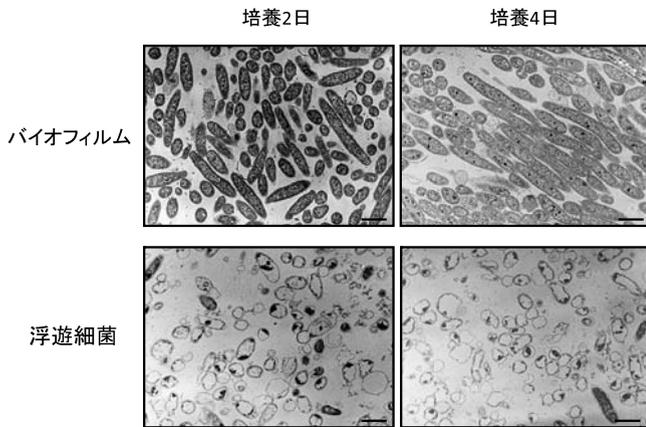


図6 バイオフィーム内のコレラ菌と浮遊コレラ菌の超薄層切片電子顕微鏡像
—: 1 μm

れる。また、バイオフィーム内のフィラメント状の菌は捕食細胞からの食事に抵抗しているのではないかと考えられる。これは尿路病原性大腸菌の研究でも示されている⁸⁾。バイオフィーム形成とそれに関連した形態学的変化(フィラメント状変化等)は、宿主および環境中での細菌の生存に有利であると思われる。

O139 コレラ菌はO1 コレラ菌以外で初めてコレラの流行を起こした菌である。O1 コレラ菌に既に感染したヒトは、O139 の感染に交差防御(免疫)を示さなかった。それは2つのコレラ菌のリポ多糖抗原が違うからである。一方、ルゴース型O1 コレラ菌の産生するEPSに対する抗体はルゴース型O139 コレラ菌のEPSと交差反応を示した²⁾。O1 コレラ菌とO139 コレラ菌のEPSの分子生物学的研究は、この2つの菌に共通したワクチンの開発に繋がる可能性がある。

3. VNC (viable but nonculturable) 状態

コッホ以来100年以上に亘って培養可能であるということが細菌が生きていることの定義であった。しかし近年生きているが培養できない(VNC)状態の細菌の存在が報告されるようになった。VNCとは、通常の培養条件では増殖が認められないものの、菌体が何らかの生物活性を維持している状態を示す。コレラや腸管出血性大腸菌の感染は、汚染された食品や、井戸水等の飲料水を介して起こることが知られているが、感染源の特定は容易ではない。検体中、特に水中では、低温・低栄養状態に曝され原因菌が培養不能(VNC)状態になっている可能性が考えられる。

VNC状態の菌は温度の上昇や動物通過により蘇生され感染を起こす可能性があることが示されているので、公衆衛生上大きな関心事になっている⁹⁾。しかしながら、VNC状態が飢餓へのプログラムされた適応反応であるという概念は論争的となっており、菌体細胞の変質のため培養不能となり、結果として瀕死の状態になっているという説もある¹⁰⁾。コレラ菌や腸炎ビブリオは環境からの分離頻度は夏期より冬期の方がずっと低くなるが、Colwellらは、低温の水系環境で細菌は培養されないが存在していることを示した³⁾。この培養能の低下がVNC状態へ移行しているためであると考えられ^{11,12)}、現在まで少なくとも30種の細菌のVNCへの移行が報告されている¹²⁾。VNCは芽胞を形成しない細菌のストレス環境中での生存反応とも考えられる¹¹⁾。低栄養と低温がVNCへの誘導の主な原因ということが示されている^{11,13)}。腸炎ビブリオ、コレラ菌は低温でVNCへ誘導され、菌液の温度を上げて10数時間培養(temperature upshift)した後寒天培地に播種するとコロニーが形成され、培養能が回復し蘇生されることが示された^{12~14)}。しかしながら、この蘇生が真の蘇生か、検出を免れて生存していた少数の培養可能細菌の増殖によるものかは判定が困難である^{12,13)}。かように液体培地中で行われる蘇生法は常に多くの論争を巻き起こしてきた。temperature upshiftとは違った方法を用いたVNC細菌の蘇生の試みについて述べる。

3.1 コレラ菌のVNC

コレラ菌は大量の下痢を起こす病原細菌であり、その感染源は川や池、井戸等のような自然環境の表層水である。しかしながら、流行地では自然環境からコレラ菌を検出することは必ずしも容易ではない。Colwellらは、コレラ菌はVNCへ移行することを示唆した³⁾。Waiらはコレラ菌を低温低栄養で数十日間培養することによりVNC状態へ誘導した後、非常に短い熱ショック処理をし寒天培地に播種するとVNC細菌の真の蘇生が観察されたと報告した¹⁵⁾。Kellらは蘇生に関する31の報告をレビューした結果3つの報告が真の蘇生であり、コレラ菌の熱ショックによる蘇生はその内の1つと結論づけた¹⁶⁾。熱ショックにより、VNC状態の菌が培養能を回復するメカニズムは明らかでない。細菌が、高温などのストレスに曝されると、一過性にある一群のタンパクの発現が

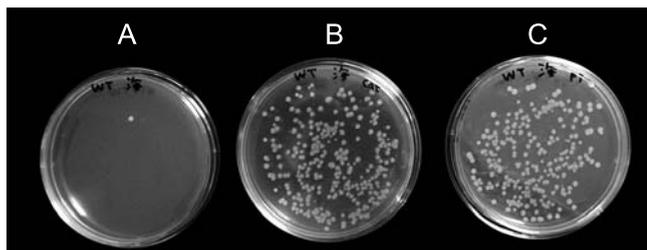


図7 VNC細菌の寒天培地上での蘇生

人工海水中で数十日間培養しVNC状態に誘導されたコレラ菌を普通寒天培地上に100 μl播種し、37°Cで24時間培養した。(A)普通寒天培地。(B)カタラーゼ添加普通寒天培地。(C)ピルビン酸添加普通寒天培地。

誘導されることが知られているが、誘導されたタンパクがコレラ菌のVNCからの蘇生に関与している可能性がある。これまでなされてきたほとんどの研究は真の蘇生とわずかばかり残っていた増殖可能な菌の再増殖(regrowth)との鑑別が困難である。そこで我々は今まで行われてきた温度の上昇やある特別な培養液を用いた方法ではなく、直接寒天培地上に播種し蘇生させる方法を考案した。著者等は、VNC状態の腸管出血性大腸菌や腸炎ビブリオなどをカタラーゼやピルビン酸などの過酸化水素を分解するような化合物を添加した寒天培地に播種することにより、培養能を回復することに成功した^{17,18)}。VNC状態のコレラ菌についても同様の蘇生結果を得た(図7)。飢餓状態におかれた培養不能菌は、酸化ストレスに感受性となっており、突然栄養豊富な培地に移されると、代謝により発生した活性酸素を処理できず、菌の増殖が認められない。すなわち、過酸化水素感受性であることがVNC細菌の生理学的状態の一端であると考えられる。

4. 結 語

ストレスに対する細菌の適応は広範な細胞の生理学的変化を伴っている。バイオフィルムの形成は様々な環境中での生存の重要な要素である。我々はコレラ菌がルゴースコロニーに相変異し多量の菌体外多糖を分泌しバイオフィルム形成を促進することを示した。また、ルゴース株は浸透圧や酸化ストレスに抵抗を示した。VNC状態もまた、悪条件下での生存戦略と考えられている¹⁹⁾。VNC状態は遺伝的にプログラ

ムされた生存型であり、適切な環境に出会うと再び増殖する可能性がある。今後、バイオフィルム形成やVNC状態に関わる分子生物学的解析が医療や公衆衛生の観点からも必要だと考えられる。

文 献

- 1) Wai, S.N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. and Yoshida, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3648–3655 (1998)
- 2) Mizunoe, Y., Wai, S.N., Takade, A. and Yoshida, S.I.: *Infect. Immun.*, **67**, 958–963 (1999)
- 3) Colwell, R.R. and Huq, A.: in Kaye, T. (Ed.), *Vibrio cholerae and Cholera*, ASM Press, Washington D.C., 117–133 (1994)
- 4) Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P.A., Russek-Cohen, E. and Colwell, R.R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3573–3578 (1994)
- 5) Lledó, M.M., Pierobon, S., Tafi, M.C., Signoretto, C. and Canepari, P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4564–4567 (2000)
- 6) Waldor, M.K. and Mekalanos, J.J.: *J. Infect. Dis.*, **170**(2), 278–283 (1994)
- 7) Dubey, G.P. and Ben-Yehuda, S.: *Cell*, **144**, 590–600 (2011)
- 8) Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J. and Hultgren, S.J.: *Science*, **301**, 105–107 (2003)
- 9) Colwell, R.R.: in Colwell, R.R. and Grimes, D.J. (Eds.), *ASM Press, Nonculturable Microorganisms in the Environment*, Washington D.C., 325 (2000)
- 10) Desnues, B., Cuny, C., Grégori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H. and Nyström, T.: *EMBO Rep.*, **4**, 400–404 (2003)
- 11) Oliver, J.D.: in Kjelleberg, S. (Ed.), *Starvation in a Bacteria*, Plenum Press, New York, 239–272 (1993)
- 12) Oliver, J.D.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, **133**, 203–208 (1995)
- 13) Ravel, J., Knight, I.T., Monahan, C.E., Hill, R.T. and Colwell, R.R.: *Microbiology*, **141**, 377–383 (1995)
- 14) Brayton, P.R., Tamplin, M.L., Huq, A. and Colwell R.R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2862–2865 (1987)
- 15) Wai, S.N., Moriya, T., Kondo, K., Misumi, H. and Amako, K.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, **136**, 187–191 (1996)
- 16) Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R. and Barer, M.R.: *Antonie. Van. Leeuwenhoek.*, **73**, 169–187 (1998)
- 17) Mizunoe, Y., Wai, S.N., Ishikawa, T., Takade, A. and Yoshida, S.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, **186**, 115–120 (2000)
- 18) Mizunoe, Y., Wai, S.N., Takade, A. and Yoshida, S.: *Arch. Microbiol.*, **172**, 63–67 (1999)
- 19) Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 95–108 (2004)