

学位論文
Doctoral Thesis

分子シャペロンDnaKを標的とする低分子化合物によるバイオフィルム形成阻害
(Inhibition of biofilm formation by small molecules targeting molecular chaperone DnaK)

有田 健一

Ken-ichi Arita

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子細胞制御学

指導教員

小椋 光 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子細胞制御学

2015年3月

目次

- 1) 要旨
- 2) 発表論文リスト
- 3) 謝辞
- 4) 略語一覧
- 5) 研究の背景と目的
 - 5)-1 バイオフィルム
 - 5)-1-1 バイオフィルムと感染症
 - 5)-1-2 バイオフィルムの形成
 - 5)-1-3 Curli 依存的なバイオフィルム
 - 5)-1-4 Curli の発現に重要な *csg* 遺伝子
 - 5)-2 DnaK シャペロン
 - 5)-2-1 DnaK の多彩な機能
 - 5)-2-2 DnaK シャペロンシステム
 - 5)-2-3 DnaK 阻害剤
 - 5)-3 研究の目的
- 6) 実験方法
 - 6)-1 大腸菌株および培養液
 - 6)-2 プラスミド
 - 6)-3 バイオフィルムアッセイ
 - 6)-4 コンゴレッドプレートアッセイ
 - 6)-5 ウエスタンブロッティング
 - 6)-6 透過型電子顕微鏡を用いた細胞外アミロイドの観察
 - 6)-7 DnaK 阻害剤を用いたバイオフィルム阻害アッセイ
 - 6)-8 温度感受性試験
 - 6)-9 蛍光顕微鏡による FtsZ リングの観察
 - 6)-10 蛍光顕微鏡による大腸菌の大腸菌の膜の観察及び BODIPY-VAN の観察
 - 6)-11 VAN 感受性試験
- 7) 実験結果
 - 7)-1 大腸菌一遺伝子欠損株を用いたバイオフィルム形成における網羅的解析
 - 7)-2 大腸菌一遺伝子欠損株を用いた *curli* 産生の解析
 - 7)-3 DnaK 阻害剤を用いたバイオフィルム形成の抑制
 - 7)-4 *in vivo* における Myricetin による DnaK の機能阻害
 - 7)-5 Myricetin 添加時における大腸菌へのバンコマイシンの有効性
 - 7)-6 Myricetin による黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成の抑制

8) 考察

8)-1 バイオフィルム形成における分子シャペロンの重要性

8)-2 *csg* 遺伝子群の発現における DnaK シャペロンの重要性

8)-3 慢性感染症と DnaK 阻害剤

9) 結語

10) 参考文献

1) 要旨

バイオフィームは微生物の集合体であり、細菌が固体表面に接着し、それらの細菌が産生する細胞外マトリクスに覆われながら菌膜(バイオフィーム)を形成している。このようなバイオフィームに守られた細菌は、抗生物質や免疫宿主に耐性になるため、バイオフィームは慢性感染症の原因となりうる。このようなバイオフィームを根絶させるためには、より効果的な抗生物質やバイオフィームの形成メカニズムに基づいた阻害薬開発の戦略が必要になってきている。この論文では、網羅的な解析から分子シャペロン DnaK が大腸菌のバイオフィームの形成に重要であることを見出し、DnaK の活性を抑える低分子化合物によって、バイオフィーム形成を抑制できるか検証した。

遺伝子学的、微生物学的、分子生物学のおよび電子顕微鏡を用いた解析から、大腸菌のバイオフィーム形成に重要な細胞外アミロイドである curli の産生に DnaK が必要であることを見出した。さらに、DnaK の阻害剤の中から Myricetin, Telmisartan, Pancuronium bromide, Zafirlukast を用いて curli 依存的なバイオフィーム形成を抑制できるか検証した。すると植物由来のフラボノイドである Myricetin だけが、大腸菌の増殖を阻害せず濃度依存的にバイオフィーム形成を抑制できることを見出した。さらに透過型電子顕微鏡を用いた観察から、Myricetin を用いることで curli の産生が抑制されていることが明らかになった。また、Myricetin 添加時には温度感受性を示す、細胞骨格タンパク質である FtsZ のリング構造が異常になり細胞が長くなる、熱ショック転写因子である RpoH の量が増加するなど、*dnaK* 欠損株と同様の表現型が観察されたことから、Myricetin は DnaK の機能を阻害することで curli に依存したバイオフィームの形成を抑制することが示唆された。また、Myricetin を添加することでグラム陰性菌には効かないとされていた抗生物質であるバンコマイシンが有効になることが明らかになった。

さらに Myricetin により、Methicillin 耐性株を含むグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成も抑えることを示した。この場合も大腸菌の時と同様、黄色ブドウ球菌の増殖には影響しなかった。これらのことから、バイオフィーム形成における DnaK の重要性を明らかにし、DnaK がグラム陰性菌のみならずグラム陽性菌の抗バイオフィーム薬の標的となりうることを示された。

2)発表論文リスト

1. K. Arita-Morioka, K. Yamanaka., Y. Mizunoe, T. Ogura, S. Sugimoto. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 633-641, 2015
2. Noi, K., Yamamoto, D., Nishikori, S., Arita-Morioka, K., Kato, T., Ando, T., and Ogura, T. High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97. *Structure* 21, 1992-2002, 2013.

3) 略語一覧

AAA: ATPases associated with diverse cellular activities

ADP: adenosine 5'-diphosphate

ATP: adenosine 5'-triphosphate

BODIPY: boron-dipyrromethene

CBB: Coomassie brilliant blue

csg: curli specific gene

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: dimethyl sulfoxide

EPS: extracellular polymeric substance

GFP: Green Fluorescent Protein

kDa: kilodalton

NBD: nucleotide-binding domain

Myr: Myricetin

Pan: Pancuronium bromide

PBS: phosphate buffered saline

rpm: revolutions per minute

SBD: substrate binding domain

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Tel: Telmisartan

TEM: Transmission Electron Microscope

VAN: vancomycin

Zaf: Zafirlukast

アミノ酸 1 文字表記

D=アスパラギン酸

L=ロイシン

N=アスパラギン

V=バリン

Y=チロシン

4) 謝辞

本研究は、熊本大学発生病学研究所分子細胞制御分野において、小椋 光教授、山中邦俊准教授および東京慈恵会医科大学細菌学講座の杉本真也講師の指導のもと行なわれたものである。

本研究で用いた Keio クローンを提供していただきましたナショナルバイオリソースプロジェクトに感謝します。本研究は、リーディング大学院の HIGO の支援を受けました。

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始丁寧かつ熱心なご指導、ご鞭撻をいただきました小椋 光教授、山中邦俊准教授、実験を行うにあたり数多くのご指導をいただきました杉本真也講師、適切なお指導をいただきました江崎雅俊助教に心から感謝の意を申し上げます。

また、東京慈恵会医科大学の遠藤翠氏、宮川玲奈氏にご助力をいただきました。

当研究室の諸先輩方、研究生活において大変お世話になりました研究室の皆様に深く感謝します。

5) 研究の背景と目的

5)-1 バイオフィルム

5)-1-1 バイオフィルムと感染症

20世紀前半からパスツールやコッホらによって次々と伝染病の病原菌が発見されてきた。その後、液体培地における浮遊細菌を対象にした微生物の生理学的な研究が盛んに行われ、抗菌剤の発見につながってきた。これらの抗菌剤は細菌の急性感染症に対しては機能し、人類を救ってきた。つまり、対数増殖期の菌に対しては機能したのである。しかし、このような浮遊細菌は、地球上における全細菌の0.1%にも満たないことがこれまでの研究から分かってきており、大部分の細菌は、増殖停滞期の状態であり、細胞外マトリックスに囲まれたバイオフィルムを形成していることが判明してきた。多くの細菌は、自己の生息にとって不利な環境の場合、菌体表面に細胞外マトリックスである多糖・タンパク質・DNAなどの Extracellular Polymeric Substance (EPS)を産生し、バイオフィルムを形成する。バイオフィルムは細菌が固体表面に付着し、増殖後に形成する集合体であり、バイオフィルム内で多層にわたり細胞が付着し、マトリックスの保護作用により、極端な温度・pH や紫外線などの環境ストレスだけでなく(Stoodley et al., 2002)、抗菌薬や宿主の免疫機構から細菌を守っている(Costerton et al., 1999)。バイオフィルムを形成した細菌が抗菌薬や宿主の免疫に抵抗性を示す機序として、この他にもバイオフィルム内での細菌の遺伝子発現の変化や増殖速度の低下、EPSによる細菌表面のマスキング、persister(一時的に抗生物質が効きにくくなった細菌の一部の集団)の出現などが考えられている(Leszczynska et al., 2013)。したがって、いったん生体組織や医療機器(カテーテル、固定器具、コンタクトレンズや人工心臓弁など)にバイオフィルムができると(図1)、化学療法では取り除くのが難しくなり、難治性感染症・慢性持続感染症を引き起こす。その他にも生体組織にバイオフィルムが形成されると、う蝕、歯周病、中耳炎、細菌性前立腺炎や嚢胞性線維症肺炎などを引き起こすことが知られている。特にカテーテルによる血液の感染症や、人工関節・人工心臓の感染症が取り扱いが難しく今後の課題となっている(De Pozo and Patel, 2009)。バイオフィルムに関連する感染症を根絶するためには、より効果的な抗菌薬やバイオフィルムの形成メカニズムに基づいた戦略(例えば細胞外マトリックスの形成遺伝子を制御するような化学物質の開発)が必要になっている。

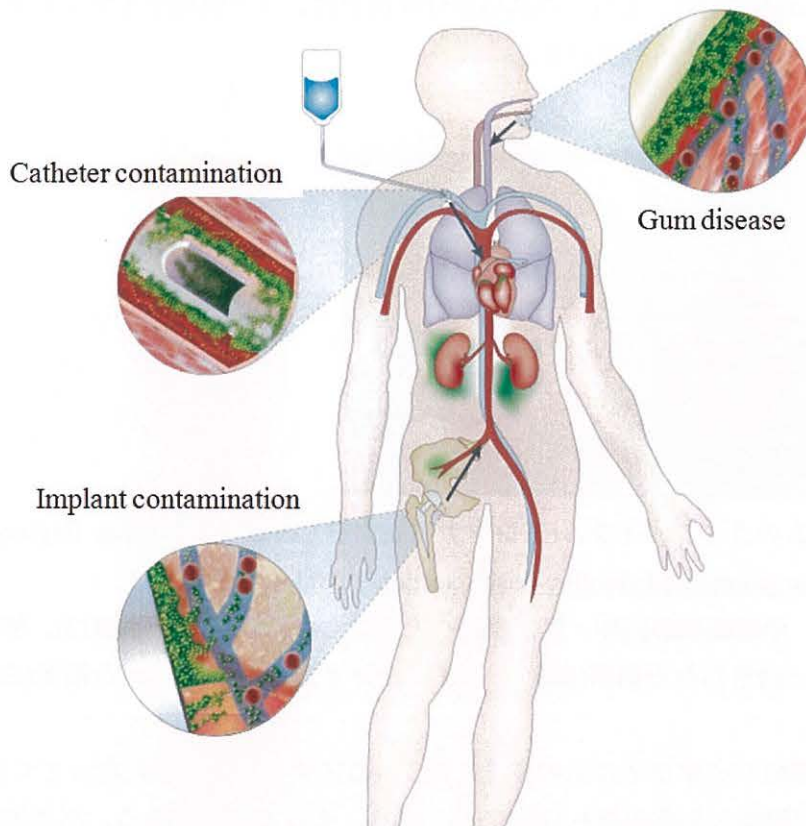


図1 生体内におけるバイオフィルム感染症の例(Hall-Stoodley et al., 2004 より一部改変して引用)

矢印(紺色)は、バイオフィルム(緑色)から拡散した細菌が、どのように体内を広がっていくのかを示している。バイオフィルムから拡散した細菌や塞栓(赤色)により、血流(水色)が悪くなる。

(脚注 Gum disease: 歯周病)

5)-1-2 バイオフィルムの形成

バイオフィルムの構造研究は、走査型共焦点顕微鏡を用いた研究から明らかになり始めてきた(Caldwell et al., 1992)。これまでの研究により、細胞外多糖から成るマトリックスに閉じ込められた細菌のマイクロコロニーが存在し、マイクロコロニーの形成により細菌間コミュニケーションシステム (quorum-sensing system) が働きだす。Quorum-sensing system は菌の密度を感知し、細菌間で低分子物質をやり取りすることにより、細菌の遺伝子発現を変化させ、EPS 産生を開始させる。また、マイクロコロニー間は密度の低いポリマーによって埋められており、そこが水が自由に動ける water channel を作っているということも明らかになりつつある(Lawrence et al., 1991)。細胞外マトリックスの主成分は水であり、含水率が 97%以上だという報告もある(Zhang et

al.,1998; Yamamoto et al., 2005)。これらの高い水分保持率は、自然環境で乾燥から微生物を守る働きをしていると考えられている。



図2 バイオフィルムのライフサイクル(モンタナ州立大学 Center for Biofilm Engineering HP <http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics-section-1.html> より引用)

バイオフィルムは、浮遊細菌が固体・生体表面へと結合し(1)、そこで成熟後(2)、解離する(3)。単独で自由に動き回れる細菌(赤色)、バイオフィルムを形成している細菌(白色)。

このような細菌のバイオフィルムの発達には3つのステップが必要になってくる(図2)。それは、最初の固体・生体表面への結合と、成熟、そして解離である。バイオフィルムを形成するバクテリアはEPSを産生し(Flemming and Wingender, 2010)、これらのEPSが最初の固体表面への結合や細胞同士の接合に重要な役割を果たしている。EPSの組成や量は、成育環境(栄養状態、温度や塩濃度)、遺伝的背景によって決まってくる(Mika and Hengge, 2014)。例えば、大腸菌の場合LB培地で30°C以下で培養すると、 \square 型線毛依存的なバイオフィルムを形成するが、YESCA培地で30°C以下で培養するとcurli依存的なバイオフィルムを形成することが報告されている(Cegelsk et al., 2009)。そして、バイオフィルムの成熟後には、EPSを破壊する物質(例えばD-アミノ酸、プロテアーゼ、Phenol-Soluble Modulinなど)を出したりするが、バイオフィルムの分離が起こるメカニズムはよく分かっていない。最終的に、分離した細菌が体内の違う部位や、異なる環境に移動し、増殖していく。

5)-1-3 Curli 依存的なバイオフィルム

EPSの構成成分である、I型線毛(Pratt and Kolter, 1999)、コラン酸(Dense et al., 2000)、セルロース(Zogaj et al., 2001)、poly-N-acetylglucosamine(Itoh et al., 2005)、curliなどが固体表面や細胞同士の最初の接着に重要であると言われている。そのなかでもcurliは細菌における機能性細胞外アミロイドであり、大腸菌やサルモネラ菌などの多くの腸内細菌が産生する(Mika and Hengge, 2014)。Curliは1980年代の終わりに最初に見つかり、細胞接着分子であるフィブロンネクチンや細胞膜にある表面抗原である主要組織適合遺伝子複合

体などの様々な宿主の因子に結合することで知られている(Collinson et al., 1993; Herwald et al., 1998)。近年、curli に依存したバイオフィーム形成が尿路感染症に深くかかわっていることが分かってきた(図 3)(Kai-Larsen et al., 2000; Bian et al., 2000; Kudinha et al., 2013)。

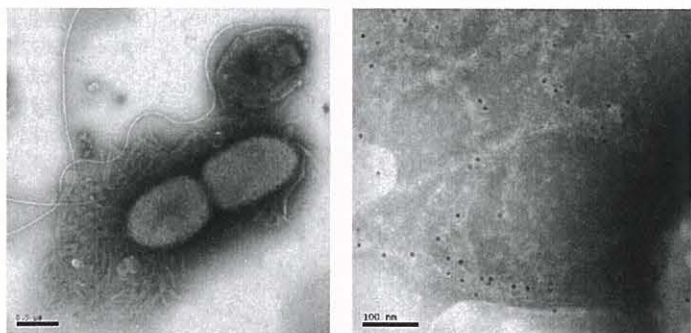


図 3 尿路感染症の患者から検出した curli を産生した大腸菌(左)と curli(右)(Kai-Larsen et al., 2010 より引用)

興味深いことに Curli は、アルツハイマー病、パーキンソン病や狂牛病などの神経変性疾患で見られる多くのアミロイド線維と生化学的・物理化学的特徴が似ていることが知られている(Chapman et al., 2002; Hammer et al., 2007; Wang et al., 2007)。アミロイド線維の例として、もっともよく知られているのがアルツハイマー病の原因タンパク質である A β のアミロイド線維である。この線維を電子顕微鏡で観察すると、数~十数 nm のゆるやかならせん構造をとっており、 β シート構造を認識する蛍光色素であるチオフラビン T やコンゴレッドが結合することがよく知られている (Naiki et al., 1989; Levine et al., 1997)。Curli の場合も同様、生化学的な解析から、このような構造をとっていることが示唆されてきた(Hammer et al., 2007; Wang et al., 2007)。このような特徴を持つアミロイド線維は、プロテアーゼ K などのタンパク質分解酵素や SDS のような界面活性剤にも極めて安定であり、curli の場合も同じような特性をもつことが示唆されている(Collinson et al., 1999)。よって curli に依存したバイオフィームは、 \square 型線毛やセルロースに依存したバイオフィームに比べて取り除くことが難しいことが考えられており、curli 依存的なバイオフィームを化学物質によって制御することが非常に重要になってきている。

5)-1-4 Curli の発現に重要な *csg* 遺伝子

Curli 線維の産生は、*csgBAC* オペロンと *csgDEFG* オペロンの 2 つの特異的なオペロンによって高度に制御されていることが知られている(Hammar et al., 1995; Romling et al., 1998)。CsgD は curli 発現におけるマスターレギュレーターであり、*csgBAC* オペロンの発現に必須である。また、*csgDEFG* オペロンの発現は増殖停滞期特異的なシグマ因子である RpoS(Arnqvist et al., 1994; Olsen et al., 1993)や RpoS の活性化因子である Crl(Arnqvist et al., 1992; Bougdour et al., 2004; Chirwa et al., 2003)などによって制御されている。

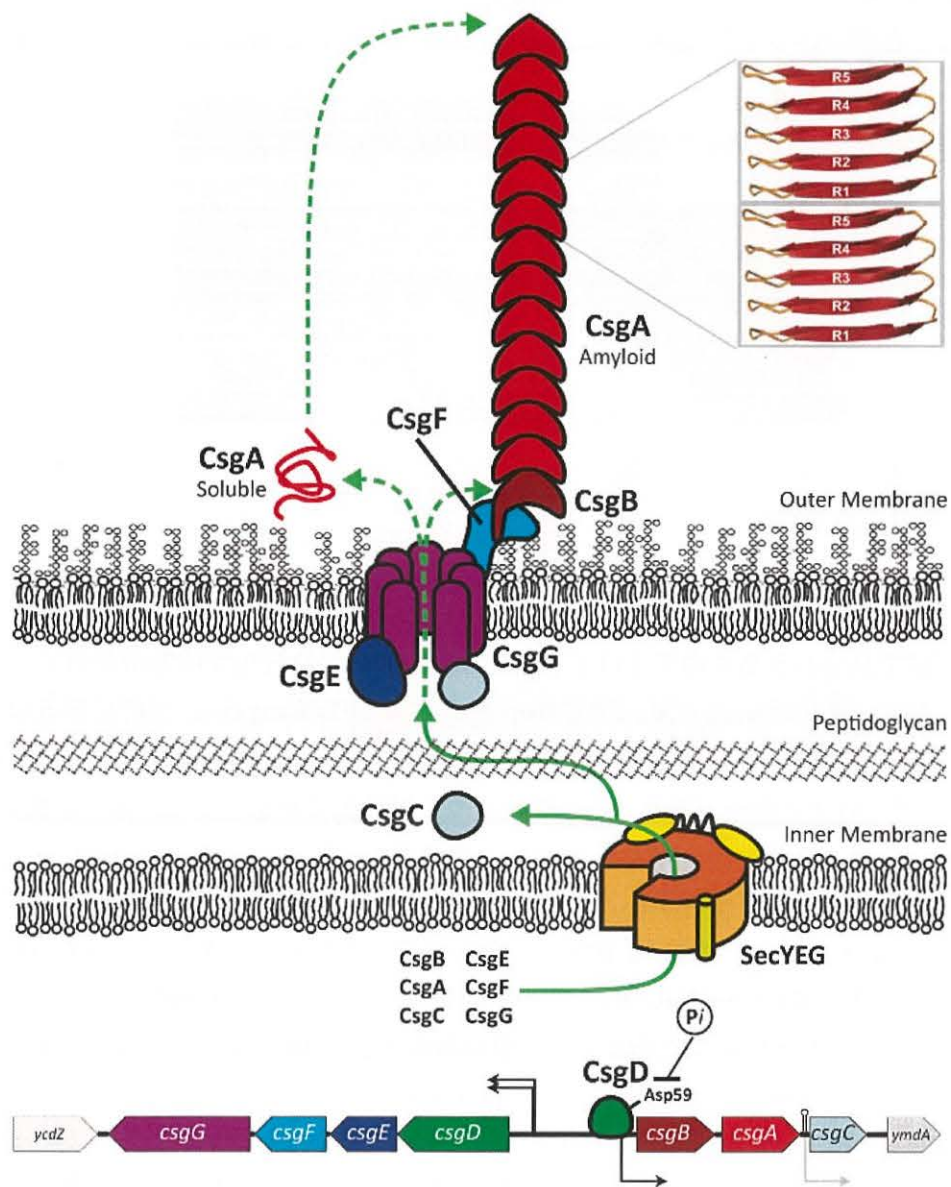


図4 Curli 形成のモデル図 (Blanco et al., 2012 より引用改変)

CsgD を除くすべての遺伝子は SecYEG を通って、Curli の産生に参与する。下に Curli の発現に重要な 2 つのオペロンを示す。CsgD は、*csgBAC* オペロンのポジティブレギュレーターである。

CsgD を除くすべての curli 遺伝子は Sec 輸送シグナルを持っており(Barnhart and Chapman, 2006; Karp et. al., 2007)、内膜からペリプラズムに移行するのを可能にしている

(Barnhart and Chapman, 1992; Karp et al., 2007)。細胞質で合成されアンフォールドした状態の CsgA と CsgB が内膜に存在する膜通過チャネルである SecYEG を経由し、ペリプラズムを通過して、外膜に局在する CsgG チャネルを通過して細胞外に輸送される。CsgE と CsgF は CsgG に結合し、CsgA と CsgB の輸送を手助けすると言われている(図 4)(Epstein et al., 2009; Robinson et al., 2006)。輸送された CsgB は、外膜でアンカーとなり、そこに CsgA が重合し curli を形成する。この際、細胞外にでた CsgB が外膜に結合するのに CsgF が必要であると言われている(Hammer et al., 2007, Nenninger et al., 2009)。また、CsgC は、curli の形成に必須ではなく不明な点が多いが、CsgC の変異体では curli 線維が太くなるとの報告もある(Gibson et al., 2007)。このように CsgC を除くすべての curli 遺伝子は、curli の形成に必要であり、これを制御する *csg* オペロンの発現には、少なくとも 2 つの制御タンパク質である CsgD と増殖停滞期のシグマ因子である RpoS が必須であり、CsgD や RpoS のような curli の産生を正に制御する因子をターゲットにすることで、バイオフィーム阻害剤のターゲットになる可能性を持つ。

5)-2 DnaK シャペロン

5)-2-1 DnaK の多彩な機能

分子シャペロン DnaK(Hsp70)は、熱ショックタンパク質として知られており、一般的な機能としてタンパク質のフォールディングを助けるという重要な役割を担っている(Hartl, 1996)。DnaK は最も豊富な分子シャペロンで(細胞内濃度 $\sim 30 \mu\text{M}$)、様々な細胞ストレスに応答して発現する(Genevaux et al., 2007)。

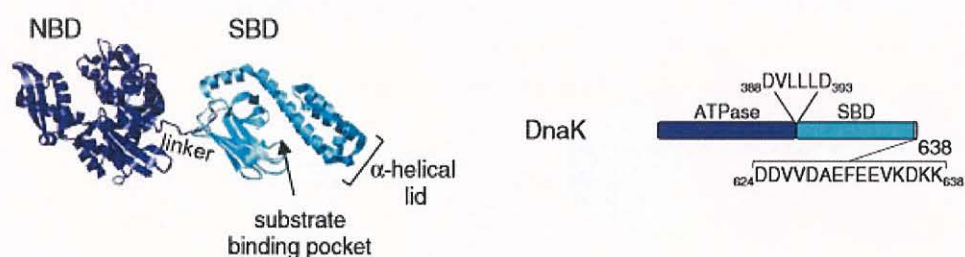


図 5 DnaK の結晶構造(左)とアミノ酸配列(右)。(Castainie-Cornet et al., 2014 より引用改変)

DnaK は、638 アミノ酸残基から構成され、N 末端の 41 kDa のヌクレオチド結合ドメイン(Nucleotide Binding Domain: NBD)と C 末端の 26 kDa の基質結合ドメイン(Substrate Binding Domain: SBD)の 2 つから成り立っている(図 5)(Mayer and Bukau, 1998)。NBD は、4 つのサブドメイン I A, II A, I B, II B に分けられ、それぞれに ATP 結合部位がある。(Harrison et al., 1997)。NBD と SBD は、よく保存されたリンカー部位(aa 381-397)でつながっており、特徴的な $_{388}\text{DVLLLD}_{393}$ という疎水的な領域を持ち、これは NBD と SBD のアロステリックな構造変化に必須であることが知られている (Mayer et al., 2005; Swain et al., 2007; Vogel et al., 2006)。さらに、DnaK の C 末端にもよく保存された配列部位(aa

624-638) があり、アンフォールドした基質への結合において補助的な役割を果たす (Smock et al., 2011)。通常、DnaK は疎水性の高いアミノ酸領域を含む部位に結合し (Gragerov et al., 1994; Rudiger et al., 1997)、この結合により新生ポリペプチド鎖や変性タンパク質の誤った疎水的結合を阻害することにより、タンパク質の凝集を防ぎ、ネイティブ構造に導くと考えられている。

DnaK シャペロンシステムは、変性状態にあるタンパク質の選択的分解にも関与している。通常、変性状態にある細胞内タンパク質の分解は、ClpXP/AP や Lon, HslUV, FtsH などの AAA(ATPases associated with diverse cellular activities)プロテアーゼによって行われていると考えられているが、この分解活性は DnaK シャペロンシステムに変異があると大幅に変化する (Straus et al., 1990; Tatsuta et al., 1998; Loewen et al., 1998)。

また、生体内において様々なストレスにより生じた凝集タンパク質は、AAA シャペロン ClpB と DnaK システムにより、元の活性のある状態に修復できる。このとき ClpB は、ポリペプチド鎖を中央の孔に通しながら、凝集体から引き抜く (図 6)。この作用には ATPase 活性と共に中央の孔で保存された芳香族残基が必須である (Weibezahn et al., 2004; Schlieker et al., 2004)。DnaK は、ClpB より先に凝集タンパクに結合し、ClpB をリクルートする (Sayffer et al., 2010; Winkler et al., 2010)。ClpB は、2つの AAA ドメインを持ち、その間に脱凝集に必須であるとされるコイルドコイル構造をした Middle(M)ドメインを持つ。DnaK はこの M ドメインに結合し、ClpB を活性化していると言われている (Sayffer et al., 2012)。変性タンパク質は、シャペロンによる修復・再活性化とプロテアーゼによる分解という運命をたどると考えられ、DnaK は積極的かつ協調的な働きで変性タンパク質の修復・分解を行っていると考えられている (Gottesman et al., 1997)。

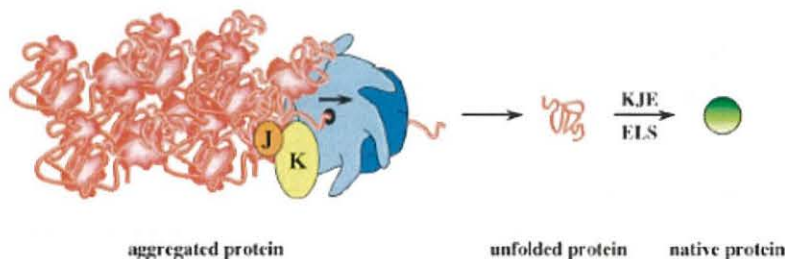


図 6 ClpB による脱凝集作用 (Weibezahn et al., 2004 から引用)。

ClpB が DnaK シャペロンシステムと協力してアモルファスな凝集体を解きほぐすモデル図。

青: ClpB, 黄色: DnaK, 橙色: DnaJ

このように DnaK は様々な細胞内プロセスに関与しているため、*dnaK* 欠損株は、20°C 以下や 35°C 以上で生育速度が遅くなったり (Bukau and Walker, 1989)、栄養飢餓 (Spence et al., 1990) や浸透圧ストレス (Meury and Kohiyama, 1991) に感受性になることが知られている。特に、DnaK は熱ショック応答においてすべての熱ショックタンパク質の発現に関わ

る RpoH の安定性に関与していることで有名である(Mogk et al., 2011)。

5)-2-2 DnaK シャペロンシステム

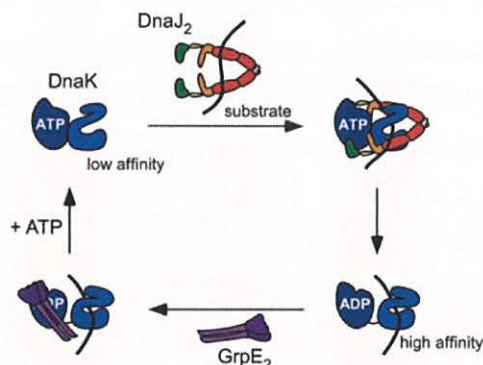


図 7 DnaK シャペロンシステムのモデル図
(Genevaux et al., 2007 より引用)

青:DnaK, 橙色: DnaJ, 紫色: GrpE

DnaK は、コシャペロン DnaJ や GrpE と協同して DnaK シャペロンシステムとして働いていることが知られている(Mayer and Bukau, 1998)。特にこれらのコシャペロンは、DnaK のヌクレオチドサイクルに関与しており、DnaJ は、DnaK の I A, II A サブドメインに結合することにより DnaK の ATPase 活性を上昇させるが(Grassler et al., 1998; Jiang et al., 2007)、ADP の解離速度は制限されている。GrpE は DnaK の I B, II B サブドメインに結合し ADP の解離を促進する(Langer et al., 1992, Harrison et al., 1997)。DnaK は単独でも弱い ATPase 活性を持つが、これら 2 つのコシャペロンと協働することでその活性は 10-100 倍に増大することが知られている(Liberek et al., 1991; McCarty et al., 1995; Chang et al., 2011)。このように DnaK の活性化にはこれらのコシャペロンが必須であるがために、*dnaJ* や *grpE* の欠損株も *dnaK* 欠損株と同様の表現型を示す(Ang et al., 1986; Sell et al., 1990)。このような表現型は DnaK と DnaJ が結合できなくなった場合にも示される(Grassler et al., 1998)。これらコシャペロンが同時に働くことで、DnaK のヌクレオチド状態が DnaK-ATP→DnaK-ADP→DnaK- nucleotide free へと容易に変化する。基質と DnaK の結合は、ヌクレオチド状態によって変化するため(Bukau and Horwich, 1998)、DnaK と基質の相互作用状態も結合→安定→解離となる。DnaK は、ATP と結合した状態では基質との結合も速いが解離も速い。ADP が結合した状態では結合も解離も遅くなる。この結合力の違いは、ヌクレオチドの状態によって DnaK の基質結合ドメイン近くの構造が変化することにより実現されている。

5)-2-3 DnaK 阻害剤

上にも述べたように、DnaK-DnaJ 相互作用をなくすことで DnaK シャペロンシステムの機能は、破たんする。特に、DnaK-DnaJ の相互作用は DnaK-GrpE よりも弱く(Harrison et al., 1997; Ahmad et al., 2011; Slepnev et al., 2002)、この部位を阻害する阻害剤を見つけることは、難しいと考えられている。近年、DnaK-DnaJ 相互作用や DnaK-GrpE 相互作用を特異的に阻害する薬剤がスクリーニングによって見つかった(Cesa et al., 2013)。

Myricetin (Myr)と Zafirlukast (Zaf)は、DnaK-DnaJ 相互作用を阻害し、Telmisartan (Tel)と Pancuronium bromide (Pan)は DnaK-GrpE 相互作用を阻害する。Zaf は、DnaK の ADP 結合フォームに結合し、基質との結合力も高める。また、Tel は DnaK のサブドメインである I B に結合し、可逆的に GrpE の活性を抑える(Cesa et al., 2013)。また、Myr は DnaK の I B と II B のサブドメインに結合し、DnaJ との相互作用を防ぐ働きがあることが知られている(図 8)(Chang et al., 2011)。これらの部位は、DnaK-DnaJ の相互作用の部位から 20-30 Å 離れており、なぜ影響するのか明らかになっていない。I と II のドメインは ATP の加水分解の間に貝のような動きをしており、Myr により I B と II B の動きが妨げられることにより、I A と II A の距離に違いが出ることで DnaK と DnaJ との結合が弱くなっているのではないかとというモデルが提唱されている。

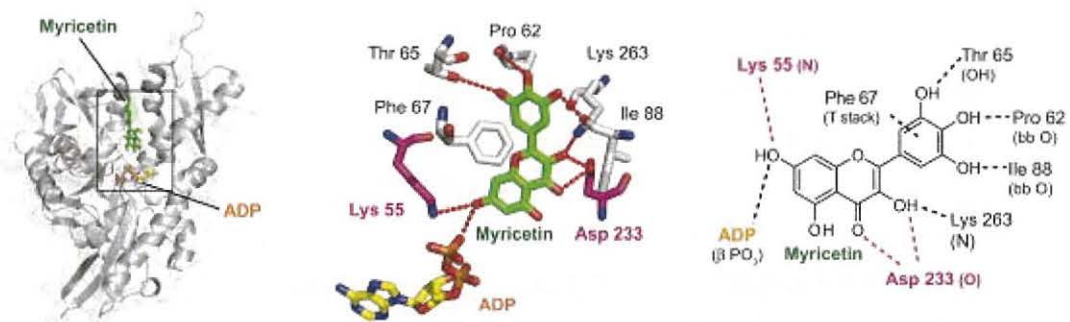


図 8 Myricetin の DnaK への結合部位(Chang et al., 2011 より引用)

Myr は DnaK の NBD の I B と II B のサブドメインに結合する。結合部位は NMR により同定した。

5)-3 研究の目的

バイオフィームにより様々な難治性の慢性感染症を引き起こすことが問題になっているがそのメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、バイオフィーム形成における分子シャペロンの機能に着目し研究を開始した。これまでの分子シャペロンの研究の大部分は対数増殖期を対象としたものであり、バイオフィームのような停滞増殖期を対象にした研究は少ない。そこで、バイオフィーム形成に関わる分子シャペロンを見出すため、大腸菌の Keio クローン(大腸菌一遺伝子欠損株)を用いて、バイオフィームに関わる分子シャペロンを網羅的に解析した。これらの 23 株の分子シャペロン欠損株のうち、最もバイオフィーム形成量が少なかった $\Delta dnaK$ 株に着目し、バイオフィーム形成における DnaK をターゲットにした新規バイオフィーム阻害剤の開発と DnaK 機能解明を目的に、この研究を開始した。

本研究では、バイオフィーム阻害剤の新規ターゲットとして分子シャペロン DnaK に着目し、以下の実験を行った。

- (1) 大腸菌の curli 依存的なバイオフィルムアッセイ系の構築
- (2) DnaK 阻害剤を用いたバイオフィルム阻害剤としての評価
- (3) DnaK 阻害剤が大腸菌内(*in vivo*)で効いていることの証明

6)実験方法

6)-1 大腸菌株および培養液

本研究で使用した菌株を表 1 に示した。

大腸菌の前培養には、基本的に LB 培地(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.4)を使用した。薬剤耐性マーカーによる選択のために、必要に応じて 20 µg/ml カナマイシンを培養液に添加した。

バイオフィルムを形成させる際には、YESCA 培地(1% Casamino acids, 0.1% yeast extract)を用いた。

表 1 使用した菌株

大腸菌株	遺伝子型
BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rmB-3), \Gamma, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$ K-12 wild type strain
JW0013	BW25113 $\Delta dnaK::Km^R$
JW1025	BW25113 $\Delta csgA::Km^R$
JW1024	BW25113 $\Delta csgB::Km^R$
JW4277	BW25113 $\Delta fimA::Km^R$
JW4283	BW25113 $\Delta fimH::Km^R$

菌株は、ナショナルバイオリソースから分与された。

6)-2 プラスミド

pFtsZ-GFPuv プラスミド(Sugimoto et al., 2010)は、細胞分裂タンパク質 FtsZ の局在を調べるために用いた。

6)-3 バイオフィルムアッセイ

大腸菌

シングルコロニーから、30°C で LB 培地で一晩前培養した。前培養液を YESCA 培地に 1/1000 希釈し、96 穴プレートで 30°C で 7 日間培養した。必要に応じて、YESCA 培地に 1% DMSO および DnaK 阻害剤を添加した。培養液を取り除き、PBS で洗浄した。0.2%クリスタルバイオレットで 5 分間染色した。再び PBS で 2 回洗浄した。70%エタノールで染色したバイオフィルムから抽出し、595 nm の吸光度を測定した。

ブドウ球菌

ブドウ球菌は 37°C で Brain heart infusion 培地で一晩前培養した。前培養液を 3% の NaCl と 0.5% のグルコースを含む tryptic soy 培地で 37°C で 24 時間置きバイオフィルムを形成させた。必要に応じて、この培地に 1% DMSO および Myr を添加した。培養液を取り除き、PBS で二回洗浄した。0.05% クリスタルバイオレットで 1 分間染色した。再び PBS で 1 回洗浄した。70% エタノールで染色したバイオフィルムから抽出し、595 nm の吸光度を測定した。

6)-4 コンゴレッドプレートアッセイ

シングルコロニーから、30°C で一晩前培養した。前培養液を 2% のアガロース、10 µg/ml Congo red、10 µg/ml CBB(G-250) を含む YESCA プレートに 5 µl スポットし、30°C で 2 日間培養した。コロニーの画像は Epson 社のスキャナー(GT-X970)を用いて取り込んだ。

6)-5 ウェスタンブロッティング

RpoH の解析は以下のように行った。シングルコロニーから、30°C で一晩前培養した。前培養液を YESCA 培地に 1/1000 希釈し、30°C で 2 日間培養した。必要に応じて、YESCA 培地に 1% DMSO および Myr を添加した。OD₆₀₀ で菌体量を合わせ、培養液を遠心して集菌し(8000×g, 15 min, 4°C)、ペレットを 2×sample buffer に懸濁し 10 min ボイルした。サンプルを 5%-20% グラジエントゲルで電気泳動した。ウェスタンブロッティングは、Tatsuta et al., (1998) に従った。

CsgA の解析は以下のように行った。シングルコロニーから、30°C で一晩前培養した。前培養液を 2% アガロースを含む YESCA プレートに前培養液を 500 µl 取り、プレートに広げた。30°C で 3 日間培養した後、スクレイパーを用いて回収し、PBS に懸濁した。集菌後(8000×g, 15 min, 4°C)、菌体 5 mg あたり 50 µl のギ酸(90%)を加え、ボルテックス後、氷浴中で 30 分インキュベートした。真空乾燥機を用いてギ酸を除いた後、8 M urea で溶解し、2×sample buffer に懸濁し 10 min ボイルした。サンプルを 5%-20% グラジエントゲルで電気泳動した。ウェスタンブロッティングは Chiba et al., (2014) に従った。

6)-6 透過型電子顕微鏡を用いた細胞外アミロイドの観察

シングルコロニーから、30°C で一晩前培養した。2% アガロースを含む YESCA プレートに前培養液を 5 µl 取り、30°C で 2 日間培養した後、菌体回収し、PBS に懸濁した。PBS 5 µl をカーボンコート銅グリッドに乗せ、3 分インキュベートした。2% の酢酸ウラニルで 1 分間染色後、Hitachi 社の TEM (H-7500)を用いて 100 kV で観察した。

6)-7 DnaK 阻害剤を用いたバイオフィルム阻害アッセイ

Myricetin (Myr), pancuronium bromide (PaBr), telmisartan (Tel), and zafirlukast (Zaf) は、

それぞれ東京化成、Santa Cruz Biotechnology, AK scientific, Cayman Chemical で購入した。ストックとしてそれぞれが 100 mM になるように 100% DMSO に溶かし調製した。必要に応じて、100 倍希釈時(1% DMSO)に最適な濃度になるように DMSO で希釈したそれぞれのストックを調製した。

6)-8 温度感受性試験

シングルコロニーから、30°C で一晩前培養した。前培養液を LB 培地で 10 倍になるよう希釈していった。それぞれの菌液を 1%アガロースおよび 1% DMSO、必要に応じて Myr を含む LB プレートに 5 μ l ずつスポットし、30°C および 44°C で 36 時間培養した。

6)-9 蛍光顕微鏡による FtsZ リングの観察

大腸菌の野生株に pFtsZ-GFPuv をトランスフォーメーションした。その後、LB 培地 30°C で Myr 添加時/非添加時において、一晩培養した。培養液を室温で 10,000 \times g で 5 分遠心分離し、2 μ g/ml の DAPI を含む PBS に懸濁した。染色した大腸菌をスライドに乗せ、蛍光顕微鏡で観察した。

6)-10 蛍光顕微鏡による大腸菌の膜の観察及び BODIPY-VAN の観察

大腸菌の野生株と $\Delta dnaK$ 株を LB 培地で 30°C で一晩前培養した。前培養液を LB 培地に 1/1000 となるように加え、OD₆₆₀ が 0.5 になった時に培養液を室温で 10,000 \times g で 5 分遠心分離し、1.5 μ M FM4-64 および 2 μ g/ml DAPI 及び 40 μ M BODIPY (boron-dipyrrromethene)-VAN を含む PBS に懸濁した。30°C で 20 分インキュベート後蛍光顕微鏡で観察した。BODIPY-VAN の観察の際には、結合していない BODIPY-VAN を除くため PBS で洗浄後観察した。

6)-11 VAN 感受性試験

大腸菌の野生株と $\Delta dnaK$ 株を Myr 添加時/非添加時において、30°C で一晩前培養した。前培養液を Myr 添加/非添加の LB 培地に 1/1000 となるように加え、VAN を加えた。それから 30°C で 24 時間培養し、10 倍となるよう希釈した培養液を 5 μ l を LB プレートにスポットし、30°C で 24 時間培養した。

7)実験結果

7)1 大腸菌一遺伝子欠損株を用いたバイオフィーム形成における網羅的解析

序論で述べたように、大腸菌のバイオフィームの主要な細胞外構造体の種類は、培養条件に依存する。これまでの研究では $\Delta dnaK$ 株は大腸菌のバイオフィーム形成にほとんど影響がないと言われており、curliの産生にもDnaKは重要でないと言われていた(Niba *et al.*, 2007)。Niba *et al.*, 2007の研究では、数多くの大腸菌の一遺伝子欠損株を用いて、LB培地、25°C、24hという条件でバイオフィームを形成させているが、このような条件ではcurliでなくI型線毛依存的なバイオフィーム形成が起きていると考えられる(Niba *et al.*, 2007; Cegelski *et al.*, 2009)。また、curliの産生の確認はCongo redプレートによる解析のみであるので(Niba *et al.*, 2007)、ウエスタンブロッティングやTEM観察による直接的にcurliの産生を確認する手法が必要であると考えられる。そこで、Cegelski *et al.*, 2009の手法を用いて(YESCA培地、30°C)、大腸菌の一遺伝子欠損株におけるバイオフィームの形成量を比較した。この条件下では、curliの産生に必要な遺伝子の欠損株である $\Delta csgA$ 株や $\Delta csgB$ 株ではバイオフィームが形成されず、type I型線毛の産生に必要な遺伝子の欠損株である $\Delta fimA$ 株や $\Delta fimH$ 株でバイオフィームが形成されていることから(図9)、curli依存的なバイオフィームが形成されていると思われる。この条件下で、分子シャペロン遺伝子欠損株23株を用いて網羅的にバイオフィーム形成能を比較したところ $\Delta dnaK$ 株においてバイオフィーム形成能が著しく低下することが分かった(未発表データ)。また、プラスミド相補実験により、curliの産生にDnaKが必須であることを確認した(data not shown)。これらの結果より分子シャペロンDnaKがcurliの産生において重要な役割を担っていることが示唆された。

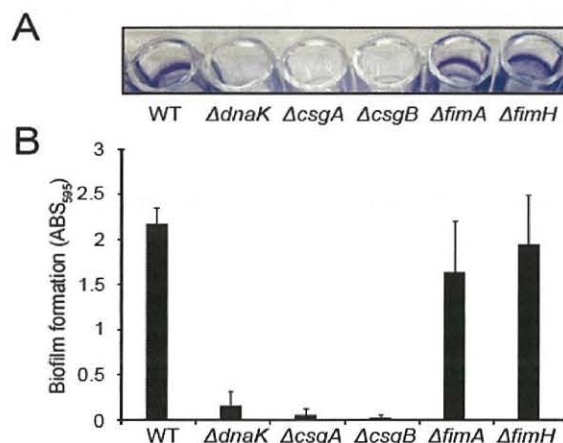


図9 DnaKはcurli依存的なバイオフィームの形成に重要である。(A)大腸菌一遺伝子欠損株(Keioクローン)を用いてYESCA培地で30°Cで7日間培養し、curli依存的なバイオフィームを形成させた。その後、バイオフィームをクリスタルバイオレットで染色した。(B)クリスタルバイオレットを70%エタノールで抽出し、595nmの吸光度を測定することでバイオフィーム量を定量した。

7)-2 大腸菌一遺伝子欠損株を用いた curli 産生の解析

次に、これらの菌株における curli の産生を Congo red プレートを用いて解析した(図 10A)。curli を産生しているコロニーは赤色となることが知られている(Hammer *et al.*, 1995)。WT や $\Delta fimA$ 株、 $\Delta fimH$ 株ではコロニーが赤色となった。しかし、 $\Delta csgA$ 株や $\Delta csgB$ 株ではコロニーは白色であった。このことからこれまでの報告と同様(Hammer *et al.*, 1995)、curli を産生しない菌株ではコロニーは赤くならないことを示した。この条件では、これまでの報告と異なり(Niba *et al.*, 2007)、 $\Delta dnaK$ 株ではほとんど curli が出ていることが示唆された。さらに、curli の産生を評価するため、CsgA のペプチド抗体を用いて CsgA の量をウエスタンブロッティングにより評価した(図 10B)。アミロイド線維である curli は、ギ酸処理によって解離する。CsgA のモノマーは WT や $\Delta fimA$ 株、 $\Delta fimH$ 株では検出されたが、 $\Delta dnaK$ 株および $\Delta csgA$ 株、 $\Delta csgB$ 株では検出されなかった。

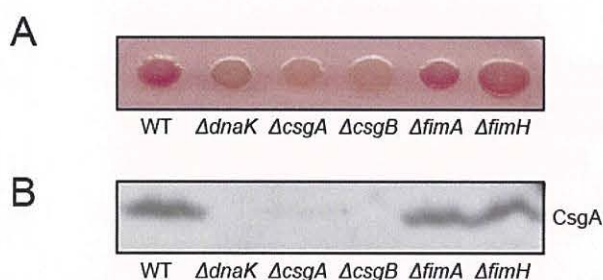


図 10 Curli の産生には DnaK が必須である。(A)Congo red プレートを用いて、大腸菌を 30°C で 2 日間培養し、curli の産生を確認した。(B) 大腸菌を YESCA プレートで 30°C で 3 日間培養し、curli の産生させた後、curli をギ酸処理により脱会合させた後、ウエスタンブロッティングにより CsgA

の量を確認した。

また、curli の産生を評価するため大腸菌一遺伝子欠損株(Keio クローン)における細胞外構造体を TEM で観察した(図 11)。図 10 の結果と同様、WT や $\Delta fimA$ 株、 $\Delta fimH$ 株では curli が観察されたが、 $\Delta dnaK$ 株および $\Delta csgA$ 株、 $\Delta csgB$ 株では curli が観察されなかった。

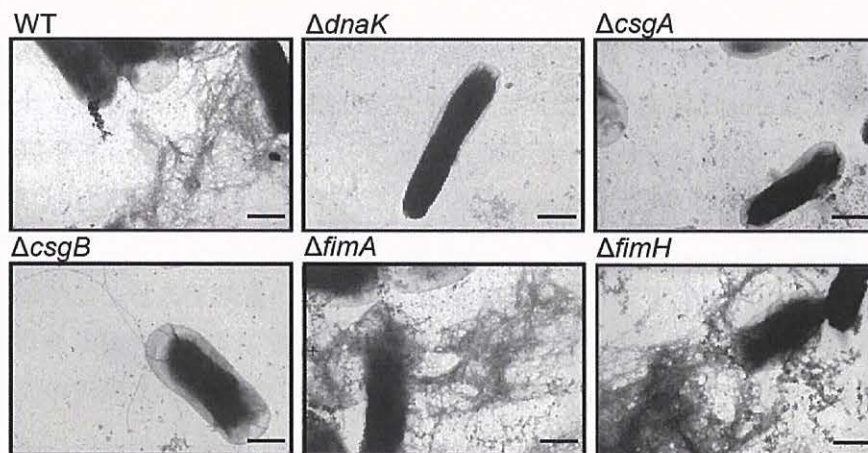


図 11 DnaK は curli の産生に必要である。YESCA プレートで 30°C で 2 日間培養後、

大腸菌一遺伝子欠損株(Keio クローン)における curli の産生を TEM を用いて観察した (Scale bar 500 nm)。

7)・3 DnaK 阻害剤を用いたバイオフィーム形成及び curli の抑制

図 9-11 の結果より、curli 依存的なバイオフィーム形成および curli の産生において DnaK が必須であることが示された。そこでこれまでに *in vitro* で DnaK の機能を阻害することが分かっている小分子化合物(Myricetin, Telmisartan, Pancuronium bromide, Zafirlukast)を用いて(Cesa *et al.*, 2013)、curli 依存的なバイオフィーム形成および curli の産生が抑制できるか検証した。Myr と Zaf は DnaK の NBD に結合し、DnaK・DnaJ 複合体になるのを防ぐが、DnaK・GrpE 複合体形成には影響しない。また、PaBr と Tel は DnaK・GrpE 複合体形成のみを阻害する(Cesa *et al.*, 2013)。阻害剤を加え、大腸菌を YESCA 培地で 30°C、7 日間培養させバイオフィームを形成させるという実験系では、Myr のみがバイオフィーム形成阻害効果を示した(図 12)。

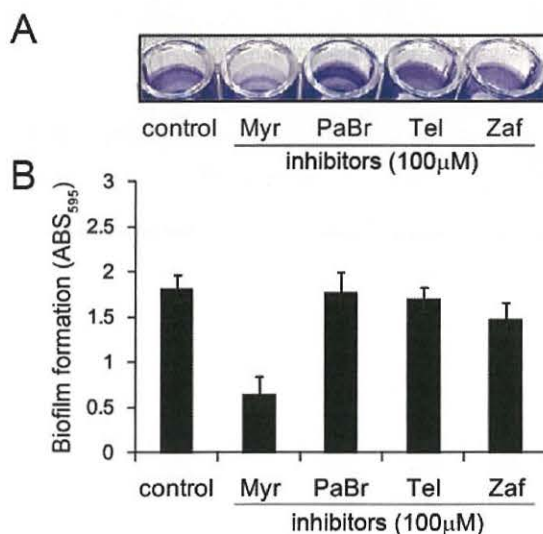


図 12 Myr は curli 依存的なバイオフィームの抑制に有効である。(A)1% DMSO を含む YESCA 培地に DnaK 阻害剤を加えて 30°C で 7 日間培養し、バイオフィームを形成させ、クリスタルバイオレットで染色した。(B) クリスタルバイオレットを 70%エタノールで抽出し、595 nm の吸光度を測定することでバイオフィーム量を定量した。

Curli 依存的なバイオフィームには Myr (図 13A)が有効であることが示唆されたので(図 12)、Myr の濃度依存的にバイオフィーム形成を抑制するか検証した(図 13B, C)。Myr は濃度依存的にバイオフィーム形成量を抑制し(図 13B, C)、大腸菌の成育には影響を与えないことを確かめた(図 13D)。

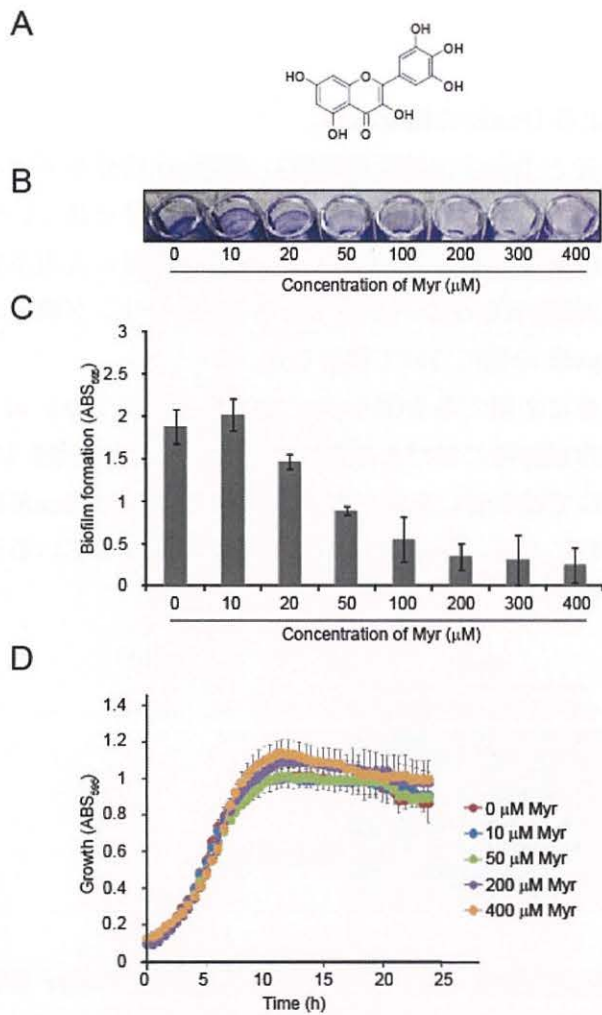


図13 Myrの濃度依存的に curli 依存的なバイオフィルムを抑制する。(A)Myr の化学構造。(B) 1% DMSO を含む YESCA 培地で Myr を加えて 30°C で 7 日間培養し、バイオフィルムを形成させた。バイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色した。(C) クリスタルバイオレットを 70%エタノールで抽出し、595nm の吸光度を測定することでバイオフィルム量を定量した。(D)YESCA 培地中に各濃度の Myr 添加時の大腸菌の増殖曲線を示した。

また、Myr 添加時の curli の産生を確かめるために Myr 添加時あるいは非添加時の curli の産生を TEM で観察した(図 14)。Myr により、curli の産生が抑制されることが示された。

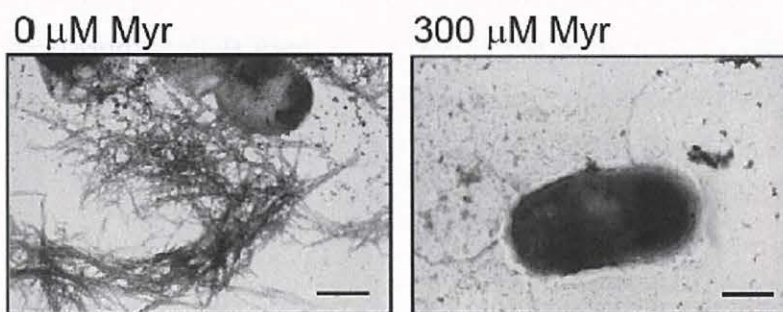


図 14 Myr は、curli の産生を抑制する。Myr 非添加時(左)および添加時(右)において YESCA プレートで 30°C で 2 日間培養後、野生株における curli の産生を TEM を用

いて観察した (Scale bar 500 nm)。

7)・4 *In vivo* における Myricetin による DnaK の機能阻害

Myr は、*in vitro* の実験で DnaK と DnaJ の結合を阻害し ATPase 活性を下げるこ
とが知られているが(Cesa *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2011)、*in vivo* における詳しい解析
はされていない。そこで野生株の大腸菌が Myr 添加時に $\Delta dnaK$ 株と同様の表現系を示
すか確かめるため、①温度感受性、②細胞骨格タンパク質である FtsZ のリング構造の局
在、③熱ショック転写因子である RpoH の量について解析した。

DnaK は、大腸菌の高温での生育に必須である(Itikawa *et al.*, 1979; Peak *et al.*,
1987)。そこで、Myr 添加時および非添加時における高温での生育を確認した(図 15)。
その結果、Myr 添加時において 30°C では生育に影響がないが、44°C では $\Delta dnaK$ 株と
同様に成育できなくなっていた。これにより、Myr が DnaK の機能を阻害している可能
性が示唆された。

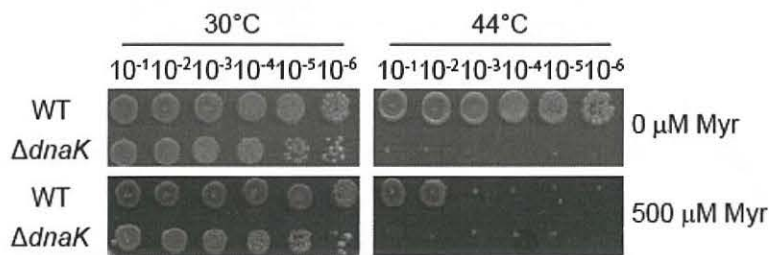


図 15 Myr 添加により大腸菌は温度感受性を示す。野生株と $\Delta dnaK$ 株を Myr を含む
あるいは含まない LB プレートで、30°C で 36 時間培養した。大腸菌は一晩前培養した
ものを、10 倍ずつ希釈し、スポットした。

熱応答における転写因子である RpoH は、DnaK の基質であることが知られている。
DnaK は、AAA プロテアーゼである FtsH による分解を促進するため、 $\Delta dnaK$ 株では
野生株より RpoH の量が増加する(Tatsuta *et al.*, 1998)。そこで、YESCA 培地中におけ
る RpoH の量を野生株と $\Delta dnaK$ 株で比べると、 $\Delta dnaK$ 株では RpoH の量がおよそ二
倍になっていた(図 16A)。また、Myr 非添加時と添加時における RpoH の量を比較して
も Myr 添加時には、RpoH の量がおよそ二倍になっていた(図 16B)。このことから、Myr
が DnaK の機能を阻害している可能性を示唆した。

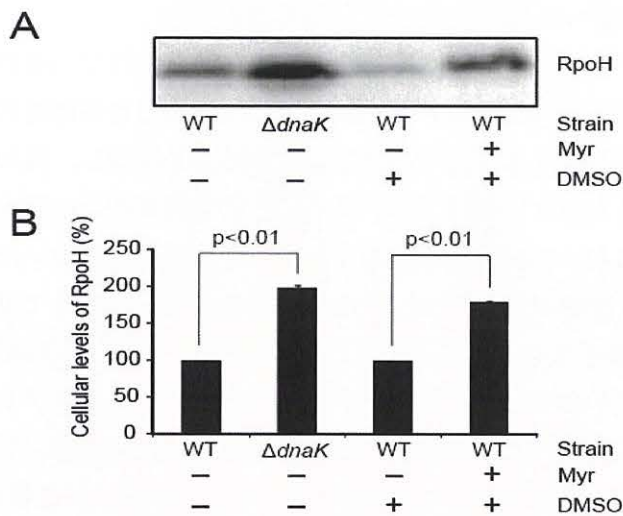


図 16 細胞内 RpoH の量は、Myr の添加によって増加する。(A) 野生株と $\Delta dnaK$ 株あるいは、Myr 非添加時と添加時における RpoH の量を RpoH 抗体によって検出した。(B) A におけるバンドの強度を ImageJ によって、定量した。野生株あるいは Myr 非添加時におけるバンド強度を 100%として計算した。

これまでに DnaK の機能が働かなくなると、細胞分裂が異常になることが知られている (Bukau *et al.*, 1989; Sugimoto *et al.*, 2008)。また、多くのバクテリアでは細胞骨格タンパク質である FtsZ は細胞分裂において重要な役割をしている。通常、分裂面に Z リングと呼ばれるリング状の構造をとることが知られている。しかし、 $\Delta dnaK$ 株や DnaK の機能が働かなくなった株では FtsZ の構造が異常になる (Sugimoto *et al.*, 2008)。そこで Myr 非存在下および存在下における細胞分裂を観察した。すると Myr 存在下でも、FtsZ の構造が異常になり、細胞分裂もおかしくなっていた (図 17)。このことから Myr は DnaK の機能を *in vivo* で阻害していることが示唆された。

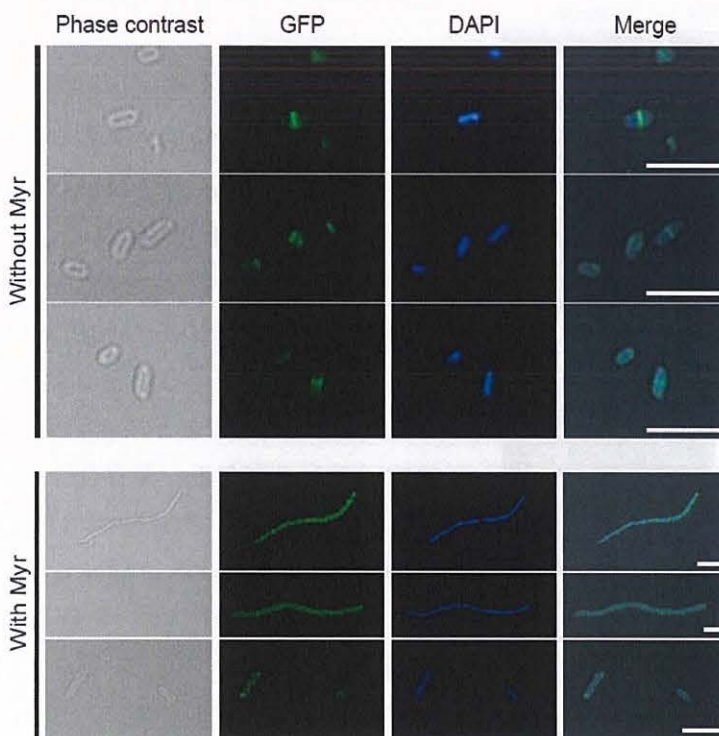


図 17 細胞分裂と FtsZ の局在は、Myr によって阻害される。FtsZ の局在を明らかにするため、野生株に FtsZ-GFPuv を発現させる株を作製し、Myr 非存在下および存在下において、蛍光顕微鏡で観察した。DNA は DAPI で染色した。(Scale bar 5 μ m)

7)5 Myricetin 添加時における大腸菌へのバンコマイシンの有効性

通常、バンコマイシン(VAN)はグラム陽性菌には殺菌薬として有効とされているが、大腸菌のようなグラム陰性菌には効かないとされている。VAN は、細胞壁合成酵素の基質である D-アラニル-D-アラニンに結合することで、細胞壁合成酵素を阻害し、菌の増殖が抑えられる。しかし、このようなアミノグリコペチド系の抗生物質はその巨大な分子サイズのため、グラム陰性菌においては外膜を通過できず、細胞壁に届かないため有効でない。今回の研究により、大腸菌の野生株は膜の染色試薬である FM-464 で染色されるが、 $\Delta dnaK$ 株はこの試薬で染色されないことを発見した(図 18 A)。この現象は、DnaK の機能が膜の形成をも担っている可能性が考えられる。実際に、マイクロアレイ解析から膜の形成に関する遺伝子の発現レベルが減少していた(data not shown)。このことから、 $\Delta dnaK$ 株では異常な外膜構造のため VAN が結合できるのではないかと考え、蛍光プローブでラベルしたバンコマイシン(BODIPY-VAN)を用いて、大腸菌との結合を確認した(図 18B)。野生株では、蛍光が確認できなかったが、 $\Delta dnaK$ 株では強い蛍光を示した。この結果により、 $\Delta dnaK$ 株では BODIPY-VAN は外膜を通過し、ペリプラズ

ムに局在する脂質に結合できることが示された。このことから、 $\Delta dnaK$ 株に VAN を作用させたところ有意に増殖を阻害した(図 18 C)。また、この効果は野生株に Myr を作用させた時にも有効であった(本実験は、東京慈恵会医科大学の杉本真也講師が実施)。

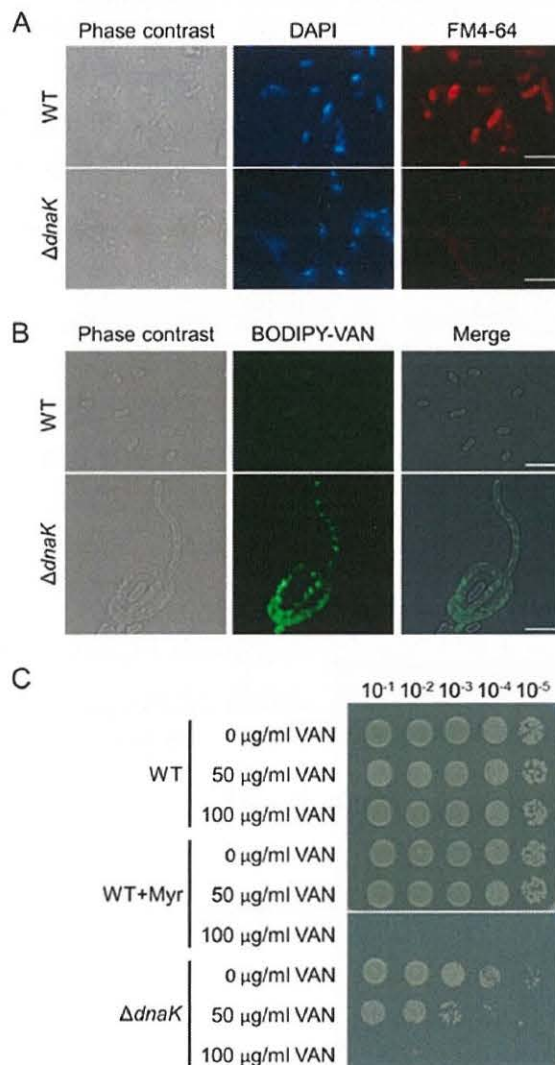


図 18 Myricetin の添加により、バンコマイシンが大腸菌にも効果的になる。(A)WT と $\Delta dnaK$ 株は膜の染色試薬である FM-464 で染色した。DNA は DAPI で染色した。(B)対数増殖期における WT と $\Delta dnaK$ 株を BODIPY-VAN により染色した(Scale bar 5 μ m). (C) WT と $\Delta dnaK$ 株をバンコマイシンの存在下、非存在下において LB 培地で 30°C で 24 時間培養した。その際、必要におい時 Myr を添加した。培養後、10 倍ずつ希釈し、LB アガロースプレートにスポットし、30°C で 24 時間培養した。

7)-6 Myricetin による黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成の抑制

黄色ブドウ球菌はカテーテル感染症で見つかる主要な細菌である。そこで、Myrが大腸菌のバイオフィーム形成と同様に黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を抑えるか調べた。これまでに SH1000 株では、バイオフィーム形成に DnaK が重要であることが報告されている (Singh et al., 2012)。MR-2 は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の臨床分離株であり、同様にバイオフィームを形成する。これらの株で、Myr が生育に影響しない濃度で、濃度依存的にバイオフィーム形成を抑制できることを見出した (図 19)。(本実験は、東京慈恵会医科大学の杉本真也講師が実施)。

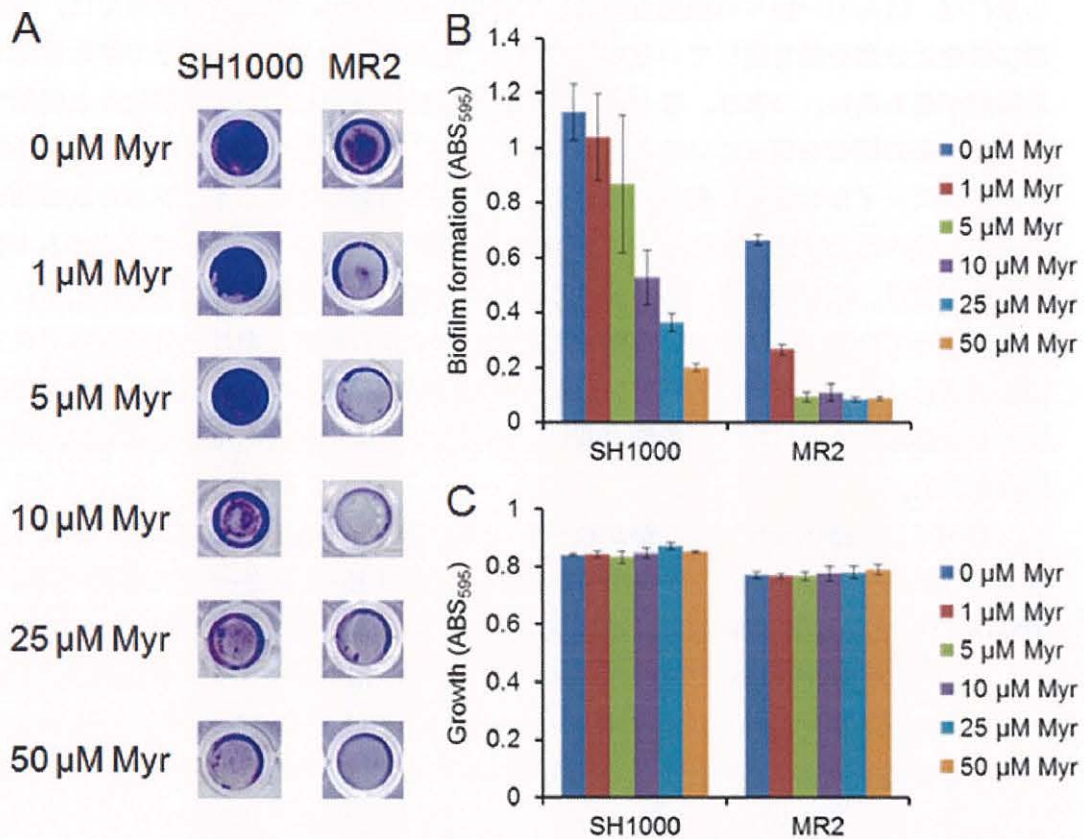


図 19 Myricetin は黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成も阻害する。(A)黄色ブドウ球菌のバイオフィームは TSBNG 培地で 37°C で 24 時間培養した。必要に応じて Myr をそれぞれの濃度で添加した。バイオフィームは 0.05%のクリスタルバイオレットで染色した。(B)A におけるバイオフィーム量を定量した。(C)ブドウ球菌の成育における Myr の影響を調べた。

8)考察

8)1 バイオフィーム形成における分子シャペロン研究の重要性について

細菌における分子シャペロンの研究は、熱ショック応答の発見からタンパク質フォールディングを介添えするという概念の提唱に至るまでの重要な発見を成し遂げてきた。さらに近年では、様々な細胞機能の制御においても分子シャペロンが重要な役割を果たしていることが明らかとなり、分子シャペロンの概念の拡大に繋がっている。

しかし、これらの研究の成果ほとんどが、盛んに分裂を繰り返している対数増殖期の細胞という限られた研究対象を用いて得られたものであり、細菌のライフスタイルから見れば、ほんの一握りの機能を解析してきたに過ぎない。実際に自然界では、細菌は常に活発に分裂を繰り返しているのではなく、貧栄養やストレス環境下で耐え忍んでいる時期が最も長い。つまり、ほとんどの細菌は増殖停滞期において虎視眈々と増殖や宿主への感染の機会を伺っていると考えられている。このような増殖停滞期における細菌のライフスタイルのうち、細菌学および医学的に重要なのがバイオフィームである。序論でも述べたように、実際に水中に存在する細菌の90%以上がバイオフィームで存在するされており、医学的にもバイオフィームにより様々な慢性感染症を引き起こすことが問題になっている。このことからバイオフィーム形成における分子シャペロンの機能解明は、これまでに知られていなかった増殖停滞期における分子シャペロンの機能や分子機構が明らかになる可能性が高いだけでなく、医学的にも重要な発見につながる可能性が高い。

我々は、尿路感染症に深くかかわっているとされる *curli* 依存的なバイオフィーム形成に関わる分子シャペロンを見出すため、大腸菌の Keio クローン(大腸菌一遺伝子欠損株)を用いて、*curli* 依存的なバイオフィームに関わる分子シャペロンを網羅的に解析した。使用した23株の分子シャペロン欠損株のうち、最もバイオフィーム形成量が少なかった Δ *dnaK* 株に着目し、バイオフィーム形成における DnaK の機能に着目した。DnaK の機能を阻害する低分子化合物を用いることでバイオフィーム形成が抑えられることが示された。今回のバイオフィームを形成させた条件は細胞外アミロイドである *curli* に依存したものであり、今後、I型線毛依存的なバイオフィームを形成する条件や多糖依存的なバイオフィームを形成する条件で同様の解析を行えば、バイオフィーム形成における新たなメカニズムの発見や分子シャペロンの新たな機能が見つかるかもしれない。分子シャペロンの多くは、成育に必須でないのでこれらの分子シャペロンをターゲットにした阻害剤を用いることで耐性菌が出現し難いバイオフィーム阻害剤の開発につながっていくと考えられる。

8)2 *csgBAC* 遺伝子の発現における DnaK シャペロンの重要性

Curli は腸内細菌である大腸菌やサルモネラ菌の主要な細胞外構造体である。我々は DnaK が *curli* の産生に重要であることを初めて示した。しかし、DnaK シャペロン

がどのように curli の産生メカニズムにかかわっているのか分かっていない。序論にも述べたように curli は CsgB が外膜に結合し、そこに CsgA が重合しポリマーを形成することで線維となる。これらを構成する CsgA と CsgB の発現にはマスターレギュレーターである CsgD が必要になってくる。これまでの研究から、DnaK は curli の産生に重要な因子である CsgD のフォールディングに重要であることが PURE system を用いた網羅的な *in vitro* の研究から示唆されている(Niwa et al., 2012)。このことから一つの可能性として、DnaK が CsgD のフォールディングに関わっている可能性がある。Niwa et al., 2012 によると PURE system の系では CsgD 単独よりも DnaK シャペロンシステムを加えた方が可溶性の CsgD の量は六倍まで上昇する。また、もう一つの可能性として CsgD の発現における正の制御因子である RpoS の分解抑制にも DnaK が関わっているとの報告がある(Rockbrand et al., 1998)。この報告によれば、大腸菌の増殖停滞期において $\Delta dnaK$ 株では RpoS の量が野生株に比べて大幅に減少する。 $\Delta dnaK$ 株にプラスミドで DnaK を相補すると RpoS の量が増加することから、ClpXP による RpoS の分解を DnaK が抑制しているのではないかとということが予測されている(Rockbrand et al., 1998; Studemann et al., 2003)。これらのことから、DnaK は curli の産生経路において、2 つの重要な因子のフォールディングや安定性に関わっていることが予想される(図 20)。また、Myr を用いた解析からも、DnaK の機能を特異的に阻害することで curli の産生を抑制し、バイオフィーム形成が抑えられることから、DnaK の機能が curli の産生に関わっていることが示唆された。Myr は、DnaK と DnaJ の結合阻害する活性を持つため、DnaJ もバイオフィーム形成に関わっている可能性がある。実際に、 $\Delta dnaJ$ 株はバイオフィーム形成量が大幅に減少し(data not shown)、RT-PCR の結果からも curli の産生に関わる遺伝子の mRNA 量が少なくなっていることが示唆されている(data not shown)。また、 $\Delta dnaK$ 株にプラスミドとして DnaK を相補した場合には、WT と同程度にバイオフィーム形成量が回復するが、DnaK の Y¹⁴⁵N¹⁴⁷D¹⁴⁸ をすべてアラニンに変えた(DnaK-YND)変異体を相補した場合には野生型 DnaK を相補した場合に比べてバイオフィーム形成量は半減する(data not shown)。これらのことから、DnaK だけでなく DnaK シャペロンシステムが、RpoS や CsgD の安定性に関わっており、curli の産生およびバイオフィーム形成に必須となっていることが考えられる。現在、DnaK がそれぞれにどう関わっているのか解析中である。

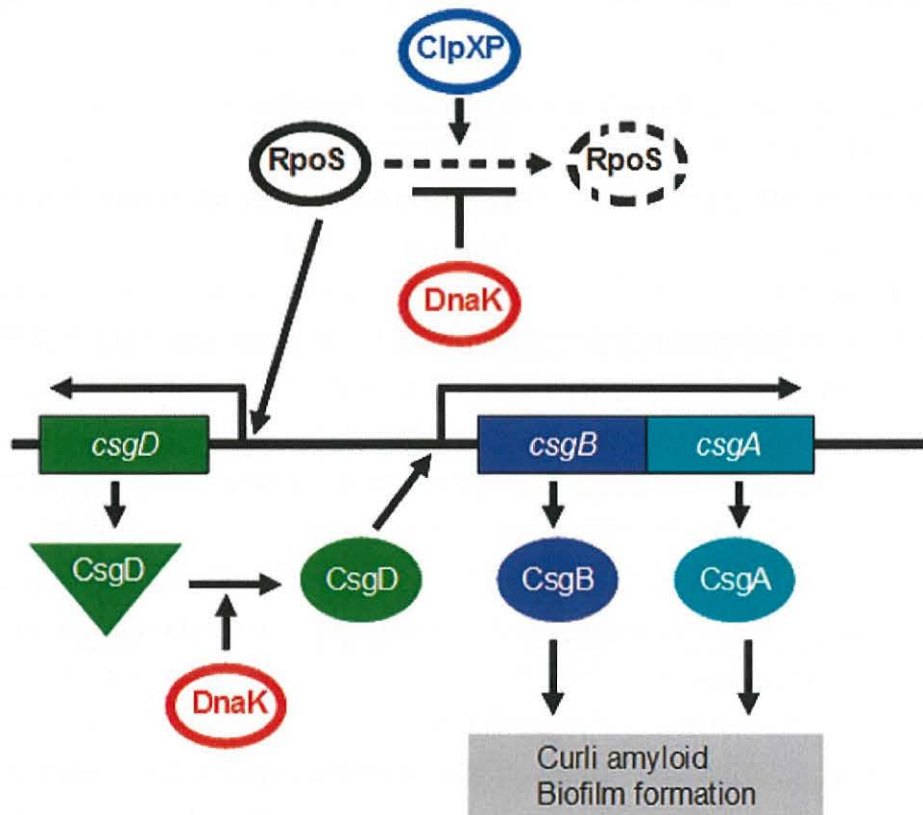


図 20 予想される curli 産生経路における DnaK の機能。

DnaK は、*csgBA* オペロンのレギュレーターである CsgD のフォールディングや、CsgD の正の制御因子である RpoS の ClpX による分解を抑えている可能性が考えられる。

8) -3 慢性感染症と DnaK 阻害剤

これまでのバイオフィーム阻害剤の研究は、EPS を分解する酵素に注目されてきた。例えば、たとえば glycolytic 酵素である dispersinB や、プロテアーゼの一種であるセリンプロテアーゼ Eps、DNA 分解酵素である DNase I などが様々なバクテリアにおけるバイオフィーム破壊因子として注目されてきた。さらに、低分子化合物により特異的な EPS 形成阻害をするものが報告されてきた。例えば、I 型線毛の形成を阻害するものや(Cumano et al., 2011; Lo et al., 2014)、curli の形成を阻害するものである(Cegelski et al., 2009; Andersson et al., 2013)。また、最近の新たなバイオフィームの阻害法として、バイオフィームの発達に重要な分子である(p)ppGpp を阻害する抗バイオフィームペプチドが見つかった(de la Fuente-Nunez et al., 2014)。(p)ppGpp はバイオフィーム形成に重要な因子であり、これが働らなくなることで、バイオフィーム形成が阻害される。また、ADEP4 と呼ばれる低分子化合物により、ClpP プロテアーゼを活性化させて

やることで、大腸菌内のタンパク質分解を促進させ、細胞内の必須なタンパク質をも分解することで、菌を殺菌し、様々な抗生物質と組み合わせる方法でバイオフィルム中の *persister* をも殺菌する方法が報告されている(Colon et al., 2013)。このように、バイオフィルム形成を制御している上流の因子を阻害するという手法や他の薬剤と組み合わせるなど、バイオフィルム感染症を防ぐ新たな手法が開発されつつある。今回報告したような、*curli* の上流遺伝子の調整を担うタンパク質の品質管理に関わっていることが示唆される *DnaK* をバイオフィルム形成阻害のターゲットにするという新たな戦略は、今後もバイオフィルム感染症の新たな予防法として考えられていこう。

Myr に代表されるようなフラボノイドは、アミロイド形成を阻害したり、アミロイドを破壊したりするという報告がある。フラボノイドの一つである EGCG は、 α -synuclein や $A\beta$ のアミロイド形成を阻害することや形成した線維を破壊することが報告されている(Bieschke et al., 2010)。*Myr* は、*DnaK* の機能を阻害して *curli* の産生を阻害するだけでなく、*Myr* が直接 *curli* の形成を阻害したり、*curli* の線維を破壊する可能性も考えられる。*Myr* が *curli* の線維を破壊する可能性を考え、*curli* 依存的なバイオフィルムを形成させた後に *Myr* を加えるという実験を行った。この結果、*Myr* 添加により *curli* 依存的なバイオフィルムが破壊させるという結果は得られなかった(data not shown)。しかし、この実験では、*curli* 以外の EPS、例えば多糖などによって *curli* が保護されている可能性もあるので、*curli* のアミロイド線維破壊に *Myr* が効果があるかは、*in vitro* での解析が必要になってくる。今後、*CsgA* を精製し *curli* のアミロイド線維形成への影響やアミロイド線維への *Myr* の効果を調べることにより、*Myr* は *DnaK* だけに効いているのか、*DnaK* だけでなく *curli* 形成にも直接効いているのか明らかになるであろう。

DnaK は外膜の正常性を保つのに重要であることが示唆された(図 18 A)。また、*DnaK* を阻害することで外膜を異常な構造にすることにより、グラム陰性菌には効かないとされていたバンコマイシンが有効になることを見出した(図 18 C)。この機構の発見は、その他のアミノグリコペプチド系の抗生物質がグラム陰性菌にも有効になるかも知れないことを示唆するものであり、今後さらなる実験が必要になってくる。

また、*persister* と呼ばれる休眠状態にある細菌の集団はバイオフィルム中で生育していると考えられている。これらの細胞は、代謝が低いために抗生物質などが効きにくく、感染症において問題になっている。これまでに網羅的な解析から *persister* にも *DnaK* が重要であると示唆されている(Hanse et al., 2008)。我々の結果から、*Myr* は *DnaK* の機能を *in vivo* で阻害することが示唆された(図 15-18)。よって、*Myr* により *DnaK* を阻害することで *persister* の出現率を減らすのにも効果的かもしれないと考え、Maisonneuve et al., 2013 らの手法を参考にして、実験を行った。いくつかの抗生物質を用いて *Myr* により *persister* が抑制されるか確認したが、有意差があったのは一部の抗生物質のみであった(data not shown)。今後、*DnaK* が重要であると示唆されている条件(Hanse et al.,

2008)を用いて、再度実験を行っていきたいと考えている。

Myrは大腸菌のバイオフィーム形成だけでなく、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成も抑制した。黄色ブドウ球菌はカテーテル感染で見つかる主要な細菌であり、問題になっている。黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成のメカニズムは、あまりよくわかっていないが、Myrが黄色ブドウ球菌のEPSをも減らす可能性があることが示唆された。

今後はミリセチンをリード化合物としたより活性が高く、より汎用性でかつ低毒性の薬の開発が重要になってくる。たとえば、Myr-DnaK複合体をもとに*in silico*予測などが重要になってくる。これらの情報を元に*in vitro*でのATPase活性測定やコシャペロンとモデル基質との相互作用、*in vivo*での機能解析後にバイオフィームやpersisterの抑制剤として開発れていこう。

9) 結語

本研究において、遺伝子学的、微生物学的、分子生物学および電子顕微鏡を用いた解析から、大腸菌のバイオフィルム形成に重要な細胞外アミロイドである curli の産生に DnaK が必要であることを見出した。さらに、DnaK の機能を阻害する低分子化合物である Myr を用いることで curli の産生および curli 依存的なバイオフィルムを抑制できることを見出した。さらに、Myr によりブドウ球菌のバイオフィルム形成も抑えることができることを示唆した。また、Myr を用いることでグラム陰性菌には効かないとされていた抗菌薬である VAN が有効になることを見いだした。

ヒトの培養細胞を用いた実験では、Myr は高濃度で毒性を示すため(Chen et al., 2014)、今後の臨床応用に向けて、より活性が高くかつ低毒性の化合物の開発が必要になってくる。すでに Myr の類似体で DnaK の機能を *in vitro* で阻害するものがいくつか報告されているので、これらの化合物を用いてバイオフィルム形成を抑制できるかを今後検証していきたい。

10) 参考文献

Andersson, E. K., C. Bengtsson, M. L. Evans, E. Chorell, M. Sellstedt, A. E. Lindgren, D. A. Hufnagel, M. Bhattacharya, P. M. Tessier, P. Wittung-Stafshede, F. Almqvist, and M. R. Chapman. 2013. Modulation of curli assembly and pellicle biofilm formation by chemical and protein chaperones. *Chem. Biol.* 20:1245-1254.

Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2:2006.0008.

Bian, Z., A. Brauner, Y. Li, and S. Normark. 2000. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* 181:602-612.

Bigger, J. W. 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* 244:497–500.

Blanco, L. P., M. L. Evans, D. R. Smith, M. P. Badtke, and M. R. Chapman. 2012. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends. Microbiol.* 20:66-73.

Boles, B. R., and A. R. Horswill. 2008. *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS. Pathog.* 4:e1000052.

Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbio.* 9:671-680.

Bukau, B., and G. C. Walker. 1989. Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli dnaK* gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. *J. Bacteriol.* 171:2337-2346.

Cegelski, L., J. S. Pinkner, N. D. Hammer, C. K. Cusumano, C. S. Hung, E. Chorell, V. Aberg, J. N. Walker, P. C. Seed, F. Almqvist, M. R. Chapman, and S. J.

Hultgren. 2009. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat. Chem. Biol.* 5:913–919.

Cesa, L. C., S. Patury, T. Komiyama, A. Ahmad, E. R. Zuiderweg, and J. E. Gestwicki. 2013. Inhibitors of difficult protein-protein interactions identified by high-throughput screening of multiprotein complexes. *ACS. Chem. Biol.* 8:1988-1997.

Chakrabarti, S., N. Sengupta, and R. Chowdhury. 1999. Role of DnaK in in vitro and in vivo expression of virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 67:1025-1033.

Chang, L., Y. Miyata, P. M. Ung, E. B. Bertelsen, T. J. McQuade, H. A. Carlson, E. R. Zuiderweg, and J. E. Gestwicki. 2011. Chemical screens against a reconstituted multiprotein complex: myricetin blocks DnaJ regulation of DnaK through an allosteric mechanism. *Chem. Biol.* 18:210-221.

Chiba, A., S. Sugimoto, F. Sato, S. Hori, and Y. Mizunoe. 2014. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb. Biotechnol.* doi:10.1111/1751-7915.12155.

Conlon, B. P., E. S. Nakayasu, L. E. Fleck, M. D. LaFleur, V. M. Isabella, K. Coleman, S. N. Leonard, R. D. Smith, J. N. Adkins, and K. Lewis. 2013. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 503:365-370.

Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.

Cusumano, C. K., J. S. Pinkner, Z. Han, S. E. Greene, B. A. Ford, J. R. Crowley, J. P. Henderson, J. W. Janetka, and S. J. Hultgren. 2011. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci. Transl. Med.* 3:109.

Danese, P. N., L. A. Pratt, and R. Kolter. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J.*

Bacteriol. 182: 3593-3596.

de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE. 2014. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* 10:e1004152.

De Pozo JL, Patel R. 2009. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N. Engl. J. Med.* 361:787-794.

Dubin G, Chmiel D, Mak P, Rakwalska M, Rzychon M, Dubin A. 2001. Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* 382:1575-1582.

Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623-633.

Gässler CS, Buchberger A, Laufen T, Mayer MP, Schröder H, Valencia A, Bukau B. 1998. Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95:15229-15234.

Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Römling U. 2010. Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 192:456-466.

Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsén A, Normark S. 1995. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 18:661-670.

Hammer ND, Schmidt JC, Chapman MR. 2007. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:12494-12499.

Hansen S, Lewis K, Vulić M. 2008. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2718-2726.

Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, Hartl F, Kuriyan J. 1997. Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* 276:431-435.

Itikawa H, Ryu J. 1979. Isolation and characterization of a temperature-sensitive *dnaK* mutant of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* 138:339-344.

Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF 3rd, Romeo T. 2005. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* 187:382-387.

Kai-Larsen Y, Lüthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm A, Kádas L, Hedlund KO, Johansson J, Chapman MR, Jacobson SH, Römling U, Agerberth B, Brauner A. 2000. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS. Pathog.* 6:e1001010.

Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragnath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK, Ramasubbu N. 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J. Bacteriol.* 186:8213-8220.

Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328:627-629.

Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. 2013. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 32:543-548.

Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356:683-689.

Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J, Bukau B. 1999. Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U S A. 96:5452-5457.

Lemos JA, Luzardo Y, Burne RA. 2007. Physiologic effects of forced down-regulation of *dnaK* and *groEL* expression in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 189:1582-1588.

Lo AW, Van de Water K, Gane PJ, Chan AW, Steadman D, Waksman G, Remaut H. 2014. Suppression of type 1 pilus assembly in uropathogenic *Escherichia coli* by chemical inhibition of subunit polymerization. J. Antimicrob. Chemother. 69:1017-1026.

Ma X, Ehrhardt DW, Margolin W. 1996. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93:12998-13003.

Marrie TJ, Costerton JW. 1984. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. J. Clin. Microbiol. 19:687-693.

Mayer MP, Bukau B. 1998. Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. Biol. Chem. 379:261-268.

Mika F, Hengge R. 2014. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. RNA Biol 11:494-507.

Niba ET, Naka Y, Nagase M, Mori H, Kitakawa M. 2007. A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. DNA. Res. 14:237-246.

Niwa T, Ying BW, Saito K, Jin W, Takada S, Ueda T, Taguchi H. 2009. Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of *Escherichia coli* proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 106:4201-4206.

Paek KH, Walker GC. 1987. *Escherichia coli dnaK* null mutants are inviable at high temperature. J. Bacteriol. 169:283-290.

Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach TH, Tan VY, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M. 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 109:1281-1286.

Pratt LA, Kolter R. 1999 Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Curr. Opin. Microbiol. 12:598-603.

Rockabrand D, Livers K, Austin T, Kaiser R, Jensen D, Burgess R, Blum P. 1998 Roles of DnaK and RpoS in starvation-induced thermotolerance of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180: 846-854.

Sheldrick GM, Jones PG, Kennard O, Williams DH, Smith GA. 1978. Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. Nature 271:223-225.

Shi W, Zhou Y, Wild J, Adler J, Gross CA. 1992. DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174:6256-6263.

Singh VK, Syring M, Singh A, Singhal K, Dalecki A, Johansson T. 2012. An insight into the significance of the DnaK heat shock system in *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 302:242-252.

Sugimoto S, Abdullah-Al-Mahin, Sonomoto K. 2008. Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties. J. Biosci. Bioeng. 106:324-336.

Sugimoto S, Saruwatari K, Higashi C, Sonomoto K. 2008. The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. Microbiology. 154:1876-1885.

Sugimoto S, Yamanaka K, Nishikori S, Miyagi A, Ando T, Ogura T. 2010. AAA+ chaperone ClpX regulates dynamics of prokaryotic cytoskeletal protein FtsZ. J. Biol. Chem. 285:6648-6657.

Tatsuta T, Tomoyasu T, Bukau B, Kitagawa M, Mori H, Karata K, Ogura T. 1998.

Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of sigma32 in vivo. *Mol. Microbiol.* 30:583-593.

Vida TA, Emr SD. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell. Biol.* 128:779-792.

Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487.

Yura T, Nagai H, Mori H. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 47: 321-350.

Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39: 1452-1463.