

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06235

研究課題名(和文) 薄膜型酸素センサーを用いたアメフラシからの環境に優しいバイオフィーム抑制剤の探索

研究課題名(英文) Search of environmentally friendly anti-biofilm molecules using planar oxygen optode

研究代表者

神尾 道也 (Michiya, Kamio)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：30578852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は海洋生物が体表を清潔に保つために用いるバイオフィーム付着阻害物質を解明し、環境に優しい付着阻害剤の開発に貢献することである。本研究ではまず、既存の薄膜型酸素センサー(オプトード)に改良を加えてバイオフィーム呼吸阻害活性測定装置を確立した。この装置を用いて、アメフラシの皮膚分泌物のバイオフィーム呼吸抑制活性を試験し付着阻害活性を確認した。また、カミクラゲの化学防御機構である皮膚分泌物(直鎖のアルデヒド)に強い呼吸抑制活性を見出した。これらの結果は海洋生物の皮膚分泌物には多くのバイオフィーム阻害活性物質が含まれることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義の一つは2次元的な広がりを持つ海洋性バイオフィームの呼吸の一斉観測を経時的に行う技術を開発したことである。この技術により、試薬を添加した地点からその遠方までの影響を一つの画面上で確認でき、時系列変化を追跡できるようになった。さらにアメフラシおよびカミクラゲという系統的に遠い生物がどちらもバイオフィームの生育を抑える物質を分泌して体表を守っていることを示唆し、その物質を同定したことである。これらの成果は船底、発電所の取水口、水中カメラなどの海中の人工物表面を生物付着から守るための基礎知識を提供するため社会的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to identify antibiofilm compounds in marine organisms to develop eco-friendly antifouling agents. We developed a device to detect antibiofilm agent. The device is developed using optic planar oxygen sensor, optode. Using this device we found that the extract of sea hare skin has antibiofilm activity. Furthermore, we found that defensive molecule released from a hydrozoan jellyfish Spirocodon saltatrix has antibiofilm activity. Our results indicate that secretion from skin of marine organisms contain variety of antifouling compounds including antibacterial compounds. These molecules will be seed molecules of antifouling agents.

研究分野：水圏生命化学

キーワード：バイオフィーム阻害剤 酸素センサー 海洋天然物化学 化学生態学 付着阻害

1. 研究開始当初の背景

海水中には付着するための基質を求める様々な付着生物が漂っており、海に生息する全ての生物は常に付着の危険にさらされている。そのため、比較的大型の生物は自分の体表上に付着生物が定着しないように何らかの方法で身を守っている。自己清掃に用いることが出来る手足をもつ生物や、体表を砂などにこすりつけて清掃できる生物は物理的に付着生物を除去しているが、物理的な清掃が出来ない生物は化学物質を体表に分泌して付着生物を除去すると予想され、ウミウシ、カイメン、ホヤなどからフジツボの幼生などに対する付着阻害活性を持つ物質が発見されてきた。しかし、どの例でも生物の皮膚から阻害活性物質が分泌されることを確認した例は無かった。本 k ン級で用いたアメフラシはインク腺とオパリン腺から様々な化合物を放出して捕食から身を守る化学防御に長けた生物であり、また、捕食者から攻撃を受けた際に皮膚から複数の化合物を放出することが明らかとなっていた。カミクラゲはやはり捕食者からの攻撃を受けた時に皮膚から複数の化合物を放出することが明らかとなっていた。

研究対象とされてきた付着生物は船底などに嵩高く蓄積するフジツボやイガイなどの比較的大型の生物が多く、新しい人工物が水中に沈められたときに初めに付着すると考えられている微生物の集合体であるバイオフィルムの付着阻害研究は比較的少なかった。大型の海洋生物が用いているバイオフィルム阻害物質を明らかにすることは、環境に優しい付着阻害剤の開発へとつながると期待された。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は海洋生物が持つバイオフィルム付着阻害のための化学防御機構を明らかにし、それを応用して環境に優しい付着阻害剤を開発することである。そのためまず、緩やかなバイオフィルム生育阻害活性を観測する装置の構築を第一の目的とした。この装置は分担者である Glud 教授らが海底の底質中の酸素分布を調べるために用いていた平板型酸素センサーオプトードを装置の中心的な技術として使い、周辺機器をバイオフィルム阻害化成試験用に最適化してバイオフィルムの呼吸量変化を経時的に調べる装置を開発する計画を建てた。この装置は酸素センサーであるため、呼吸と光合成の両方を観測でき、また各々についての阻害剤の探索に用いることが出来ると期待された。次に、このバイオフィルム生育阻害活性評価装置を用いて、物理的な付着阻害機構を持たない海洋生物であるアメフラシとカミクラゲが皮膚から化学防御物質を放出して体表を清潔に保つこと、またそれに用いる化合物群を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

バイオフィルム呼吸活性測定装置は平板型酸素センサーオプトードを核として構築された。センサー本体であるオプトード膜は酸素感受性色素と内部標準蛍光色素そして増感剤として用いられる酸化チタン粉末の組み合わせをポリスチレンのマトリックスに埋め込むことで調整された。初めに各色素の濃度の調整を行い、条件が確立していったが、酸化チタン粉末が膜の作成中に凝集するという問題が生じた。そこで、この問題に対処するために、その濃度と膜の厚さの検討が行われたが、最終的には酸化チタンの凝集の程度が低いうちに膜を乾燥させることで解決でき、平板型酸素センサー本体の作成は完了した。さらに、この膜に対して蛍光励起用の光源を作成し、必要な波長の光のみを撮影するために設計した蛍光撮影用のカメラを特注し、カメラと光源を制御した上で、RGB 画像を 3 食に分けて抽出する制御装置を入手し、すべてを組み合わせるバイオフィルム呼吸活性測定装置を完成させた。この装置を用いて海洋生物が体表から放出する化合物のバイオフィルム抑制活性の研究を進めた。アメフラシの皮膚分泌物のバイオフィルム呼吸抑制活性を試験したところ、活性が見られたため、分泌物を液-液分配、ゲル濾過クロマトグラフィー、脱塩装置、逆相クロマトグラフィー等を用いて精製を進め、複数の活性成分が存在することを見出した。カミクラゲの分泌物の分析は GC-MS を用いて行った。一部化合物の構造は核磁気共鳴装置および質量分析装置を用いて解析した。また、活性試験時に油状の化合物がオプトード膜を溶かしてしまうことが観察されたので、試料と膜かとの距離を変えて実験方法を検討した。

4. 研究成果

まず本研究の一つの成果として 2 次元的な広がりを持つ海洋性バイオフィルムの呼吸の一斉観測を経時的に行う装置を開発できた。この装置により、広がりがあるバイオフィルム上に試薬を添加した時に、添加地点からその遠方までの影響を一つの画面上でまとめて確認でき、さらに時系列変化を追跡することが可能になった。この装置を用いて、さらにアメフラシおよびカミクラゲという進化系統学的に遠い海洋生物がどちらもバイオフィルムの生育を抑える物質を皮膚か

ら分泌して体表を守っていることを示唆する結果を得ることが出来た、そのうちの一部の物質を同定することが出来た。これらの成果は船底、発電所の取水口、水中カメラなどの海中の人工物表面を生物付着から守るための基礎知識を提供するため社会的にも意義がある。図にカミクラゲの放出する物質のバイオフィルム呼吸阻害活性試験結果を示す。

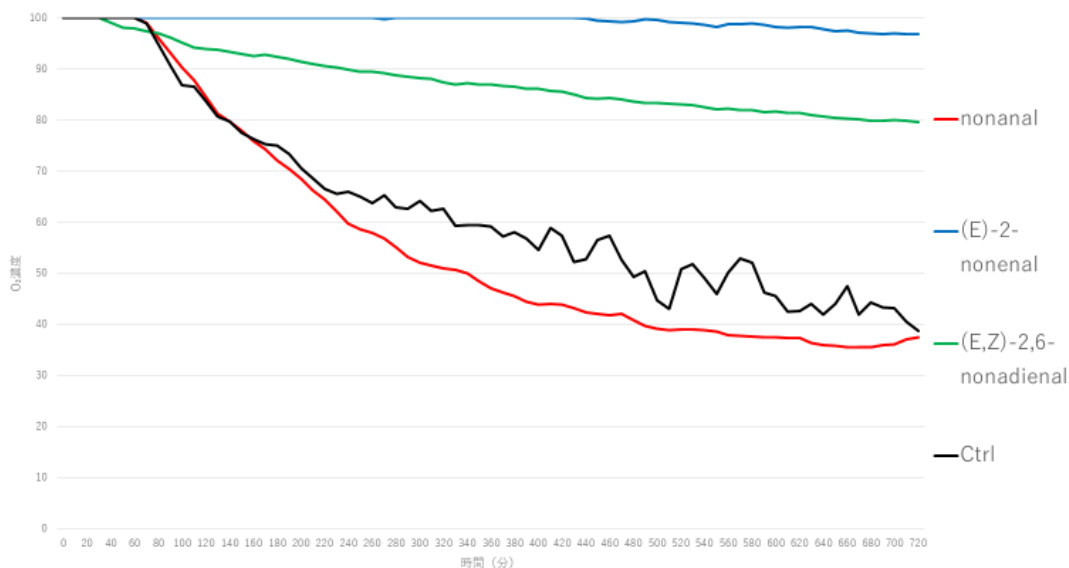


図 nonanal、(E)-2-nonenal、(E,Z)-2,6-nonadienal の海洋性バイオフィルムの呼吸阻害活性試験。コントロールのセルでは、バイオフィルム観察実験と同様に酸素濃度の低下がみられた。対して、(E)-2-nonenal を染みこませたペーパーディスクを載せたセルでは、硫酸銅(Ⅱ)と同様に酸素濃度がほとんど低下しなかった。また、(E,Z)-2,6-nonadienal を染みこませたペーパーディスクを載せたセルでは、徐々に酸素濃度が低下したが、コントロールと比較して呼吸速度の低下がみられた。nonanal を染みこませたペーパーディスクを載せたセルでは、コントロールと同様に徐々に酸素濃度が低下した。コントロール、(E)-2-nonenal、(E,Z)-2,6-nonadienal、nonanal それぞれの 12 時間後の平均酸素濃度は、38.8%、96.7%、79.6%、37.5%であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiono Katsuhiko, Koshide Akiko, Iwasaki Kazunari, Oguri Kazumasa, Fukao Takeshi, Larsen Morten, Glud Ronnie N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Imaging the snorkel effect during submerged germination in rice: Oxygen supply via the coleoptile triggers seminal root emergence underwater	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2022.946776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀 洸太、○安永幸太、神尾道也、塩野克宏、小栗一将、Anni Glud, Ronnie N. Glud
2. 発表標題 バイオフィルム観測用の改良型薄膜酸素センサー
3. 学会等名 日本付着生物学会2023年度研究集会 2023年3月28日（火）（東京）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神尾道也・鈴木瞭冴・堀洸太・安永幸太・永井宏史
2. 発表標題 カミクラゲが放出する化合物群の防御活性
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会 2023年3月28-30日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ronnie N Glud
2. 発表標題 Life and element cycling in the deepest trenches on Earth.
3. 学会等名 Invited talk at University of British Columbia, Canada 8 Sept (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀 洸太、安永幸太、神尾道也、塩野克宏、小栗一将、Anni Glud, Ronnie N. Glud
2. 発表標題 薄膜型酸素センサーを用いたバイオフィルムの観測
3. 学会等名 日本付着生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	グルッド ロニー (Ronnie Glud) (60814978)	東京海洋大学・学術研究院・教授 (12614)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------