

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 3 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560956

研究課題名(和文) マイクロ流体デバイスを用いたバイオフィilmモデルの作成とバイオレメディエーション

研究課題名(英文) Model biofilm fabricated by microfluidic device and its control method applicable to the bioremediation

研究代表者

加藤 紀弘 (KATO, Norihiro)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00261818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： マイクロ流体デバイスを用いて作製した高分子カプセルの内部に、モデルバイオフィilmを作成した。緑膿菌のバイオフィilm形成は、シグナル分子を介した細胞間情報伝達機構であるクオラムセンシング(QS)により制御されている。シグナル分子加水分解酵素の生産菌とQS菌をカプセル内部で共培養することで、QS機構が効果的に抑制されることを示した。

シグナル分子の加水分解酵素をカプセル内部に封入することで、緑膿菌のバイオフィilm形成を効果的に抑制可能となることを実証した。マイクロカプセルを培養容器として利用し、環境修復に利用可能なモデルバイオフィilm、QS機構抑制によるバイオフィilm形成阻害技術を開発した。

研究成果の概要(英文)： A model biofilm could be formed inside polymer microcapsules fabricated by using a microfluidic device. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is regulated by bacterial cell-cell communication termed as quorum sensing (QS). By co-culturing quorum quenching bacteria with the QS bacteria inside polymer capsules, the QS could be effectively inhibited. The enzymatic hydrolysis of the QS signal can block the target gene expression that depends on the signal concentration. The hydrolase was overexpressed and purified from *Escherichia coli*, and then immobilized on the polymer matrix. It was demonstrated that the biofilm formation of *P. aeruginosa* was successfully inhibited only by coexisting immobilized hydrolase inside the capsule.

The model biofilm is applicable to the bioremediation. The effective method for biofilm inhibition was also developed by using model biofilm.

研究分野：バイオテクノロジー、機能性高分子

キーワード：細胞間情報伝達機構 バイオフィilm マイクロ流体デバイス マイクロカプセル クオラムセンシング
クオラムクエンチング ヒドロゲル

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオフィルムの形成が多くの産業分野で問題となっている。細菌の付着や増殖に由来する金属の腐食、家庭の水廻りの衛生、菌体分離膜におけるバイオフィリングによる濾過速度の低下、医療器具を介した感染症、歯周病など、多くの分野に共通してバイオフィルム形成阻害技術の確立が望まれている。阻害技術の確立には、簡便なバイオフィルム評価系が必要であり、再現性良いモデルバイオフィルムを効率良く作成する技術が重要となる。

バイオフィルムは、水を浄化する環境修復(バイオレメディエーション)に利用が可能であり、モデルバイオフィルムの簡便な作成が可能となれば、環境修復技術への利用も可能となる。

(2) バイオフィルムの形成に細菌の細胞間情報伝達機構であるクオラムセンシング(Quorum Sensing: QS)機構が関与する例が報告されている。モデルバイオフィルムを用いて、QS機構の制御を原理とするバイオフィルム形成阻害効果を明らかにできると考えられる(図1)。

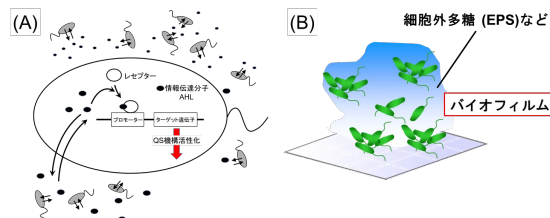


図1 (A) 細胞間情報伝達機構(クオラムセンシング: QS)のモデル図。菌体密度の増大に伴い細胞間情報伝達物質AHL濃度が上昇する。(B) QS機構によりバイオフィルム形成が誘導される。

2. 研究の目的

(1) マイクロ流体デバイスを用いて単分散性高分子ゲルビーズを調製し、更に内部が空洞な高分子カプセルの作成法を確立する。

(2) マイクロカプセルを培養容器として目的細菌を培養する培養技術を確立する。カプセル内部で、QS機構を有するモデル細菌の培養試験を行い、カプセル内部の狭小空間でQS機構が活性化されることを明らかとする。更に、QS機構の活性化を検査する非破壊技術を構築する。

QS機構を不活性化するQSシグナル分解細菌を、QS機構を有するモデル細菌と共培養するQS機構阻害法を試験する。カプセル内部でQS機構を抑制可能なことを明らかにする。

(3) マイクロカプセル内部で緑膿菌をモデル細菌とするバイオフィルム形成試験を行う。カプセル内部でQS機構を抑制するバイオフィルム形成阻害法を構築する。

3. 研究の方法

(1) ガラスキャピラリーとポリジメチルシロ

キサン(PDMS)を用いて同軸型3次元マイクロ流体デバイスを作成し、2台のシリンジポンプを用いる2液混合法により高分子ゲルビーズを調製する。pH応答によりゲル化するコラーゲン、Ca²⁺イオンとの接触によりゲル化するアルギン酸など種々の高分子を試験し、後処理により内部を空洞化させたカプセルの作成技術を確立する。

(2) QS機構を有するモデル細菌としてグラム陰性細菌の共通の情報伝達物質N-アシルホモセリンラクトン(AHL)を生産するセラチア菌(*Serratia marcescens* AS-1)を用いて、マイクロカプセルを培養容器とする培養法を確立する。QS機構の活性化により赤色色素prodigiosinを生産するAS-1株を用いることで、カプセルの色調を分光測色計で非破壊測定し、QS機構の活性化を追跡する評価系を確立する。

酵素法によるAHLの不活化がQS機構を抑制する効果を試験する。遺伝子工学的手法により取得した、AHLのラクトン環部位を加水分解するAHLラクトナーゼ(AiiA)を過剰発現する大腸菌*Escherichia coli* DH5a (pMAL-*aiiA*)をカプセル内部で上記セラチア菌と共培養試験する。

(3) 遺伝子工学的手法により作成した緑色蛍光タンパク質GFPを発現する緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (*gfpuv*⁺)をカプセル内部に播種しモデルバイオフィルムの作成を試験する。バイオフィルムの形成状態は蛍光顕微鏡観察により実施する。更に、精製したAHLラクトナーゼを用いるバイオフィルム形成阻害効果を調査する。酵素の熱安定性を向上させるために、ポリビニルアルコール(PVA)水溶液に混合し、これを15-25 kVの電圧印加条件で電界紡糸し酵素固定化PVA不織布を調製する。PVA間の架橋反応により不織布に耐水性を付与し、粉碎した不織布(酵素固定化PVAファイバー)をカプセル内部に包括し、QS機構抑制に伴うバイオフィルム形成阻害効果を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 同軸型マイクロ流体デバイスを作成し試験したところ、単分散アルギン酸カルシウムゲルビーズからマイクロカプセルを作成する方法を確立した。得られたゲルビーズをポリカチオンであるポリリジン(polyLys)水溶液に浸漬し洗浄する。次にポリアニオンであるアルギン酸ナトリウム水溶液(Na-Alg)に浸漬する。この操作を繰り返しゲル表面にポリイオンコンプレックスを形成させることで力学的強度を向上させた。クエン酸ナトリウム水溶液に浸漬し、Ca²⁺イオンを除去するとアルギン酸鎖は溶解し、内部が空洞な高分子マイクロカプセル(平均径510 μm, CV<5%)が形成した(図2A)。カプセルのサイズはマイクロ流体デバイスの運転条件(コ

ア溶液とシーブ溶液の流量比) に依存し可変である。

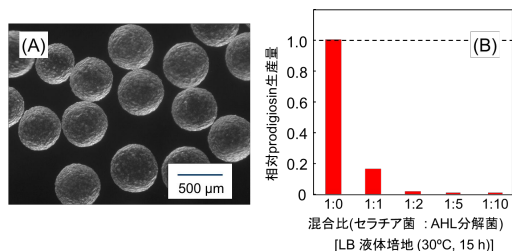


図2 (A) アルギン酸/ポリリジン ポリイオンコンプレックスで形成したマイクロカプセル。(B) AHL濃度依存性QS機構を有するセラチア菌とAHL分解菌の共培養試験。AHL分解菌の混合比増大によりQS機構依存性prodigiosin生産は減少する。

(2) カプセル調製時に *Serratia marcescens* AS-1 株を播種し、カプセルを LB 液体培地に浸漬して振盪培養 (25°C) すると、時間経過と共にカプセルは赤変していく。カプセル内部においても QS 機構は活性化されることが示唆された。AHL 加水分解酵素 (AiiA) を生産する AHL 分解菌 *E. coli* DH5α (pMAL-*aiiA*) と AS-1 株を共培養すると、AHL 分解菌の混合比が増大するほど、赤色色素 prodigiosin 生産は抑制される (図 2B)。共培養開始時に添加する AHL 分解菌溶液の濁度(OD₆₀₀)をセラチア菌濁度の 2 倍に設定すると、QS 機構依存性 prodigiosin 生産を 5%未満に維持可能であった。

QS 機構活性化の指標として prodigiosin 生産量の追跡は簡便である。分光測色計の反射率測定を利用すれば、カプセルの色調変化を 1-2 s で定量化可能となる(図 3A)。

カプセルの反射率測定結果を $L^*a^*b^*$ 表色系に変換し、赤色の指標である色度 a^* により評価した(図 3B)。AS-1 株単独の control に比較して、AHL 分解細菌との共培養では a^* の増大は低く抑えられている。

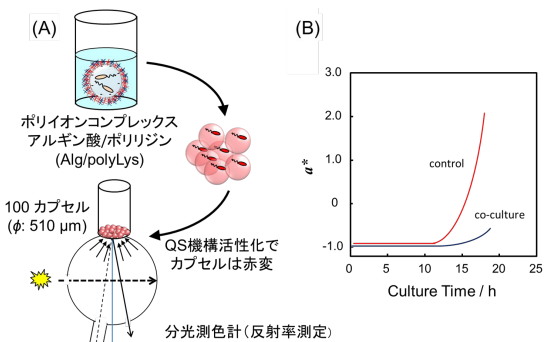


図3 (A) Alg/polyLysマイクロカプセル内部での共培養試験。QS機構を有するセラチア菌とAHL分解菌を封入。マイクロカプセル100個の色調変化を分光測色計を用いて非破壊測定。QS機構が抑制されると赤色色素 prodigiosinの生産が抑制され、 a^* 値の上昇は抑えられる。(B) $L^*a^*b^*$ 表色系における赤色の指標 a^* の培養時間依存性 (30°C)。

分光測色計を用いる本法では、非破壊で 100 カプセルを同時測定し、その平均値として a^* を算出可能となる。バイアル瓶 1 本の培養で、QS 機構抑制効果の再現性 ($n=100$) を評価可能であり、AHL 分解細菌のスクリーニングを高効率で行うことが可能となる。カプセル内部での培養試験に伴うマイクロカプセルの崩壊、溶解は認められない。

(3) マイクロカプセルの作成時に *P. aeruginosa* PAO1 (*gfpuv*⁺) を播種しカプセル内部にバイオフィームを形成可能であった。LB 液体培地を満たしたバイアル瓶中に、複数のカプセルを浸漬しバイアル瓶全体を振盪すると、カプセルが転がるために特定面のみではなくカプセル全体にバイオフィームが形成するものと推察される(図 4)。培養時間が長くなるとバイオフィームの厚みの増大も確認された。

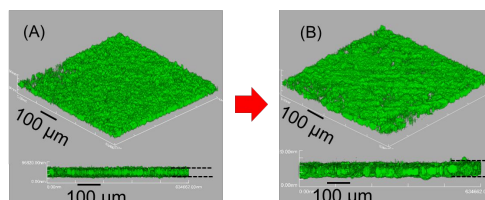


図4 モデルバイオフィームの構築 [*P. aeruginosa* PAO1(*gfpuv*⁺)]. (A) 24 h, (B) 48 h (30°C)。

次にモデルバイオフィームを用いて、QS 機構抑制を原理とするバイオフィーム抑制試験を実施した。セラチア菌を用いた QS 機構抑制試験では、AHL 加水分解酵素を生産する AHL 分解菌の共培養を試験したが、AHL 分解菌の堆積もバイオフィーム形成の一因となり得る。そこで本研究では、AHL 分解酵素を単離精製し、更に酵素活性を長期間保持するために固定化酵素の調製を行った。精製を容易にするためマルトース結合タンパク質(Maltose binding protein: MBP)をタグとする融合タンパク質を発現させ、アミロースレジソカラムを用いるアフィニティクロマトグラフィーで精製し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて目的分子量付近にシングルバンドを得た。

結晶性が高くエレクトロスピニングファイバーの形成が容易なポリビニルアルコール(PVA)を例として選択し、PVA/AHL ラクトナーゼ水溶液を電解紡糸しファイバー不織布を得た。2,4-ジイソシアン酸トリレンを用いて PVA 鎖間を架橋したところ、PVA ファイバーに耐水性を付与可能であり、酵素の漏洩も認められない。そこでファイバーを粉碎し、カプセル内部に包括させ *P. aeruginosa* PAO1 (*gfpuv*⁺) のバイオフィーム形成を試験した(図 5)。

培養 3 日目で比較しても AHL ラクトナーゼを共存させるだけでバイオフィーム形成量は有意に減少することが確認された。

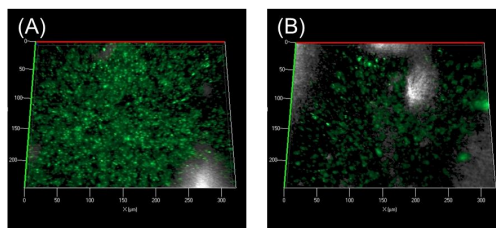


図5 カプセル内表面のバイオフィーム観察。(A) Control, (B) AHLラクトナーゼ共存系 (30°C, 3 days)。

マイクロ流体デバイスの利用は、単分散性の高分子マイクロカプセルを連続して安定供給可能とする。本研究で提案したマイクロカプセルを用いる共培養試験は、1回の培養、1回のQS機構活性化測定で100検体の平均を1-2sの短時間で、カプセル非破壊で評価可能とした。新規AHL分解細菌のスクリーニングに有効な技術であり、1検体30min程度を必要とする従来のprodigiosin抽出法よりも高効率なスクリーニングを可能とする。

再現性が良く安定した性状のバイオフィルムの構築は、バイオフィルム阻害剤のスクリーニング、バイオフィルム形成阻害試験を安定して実施可能とする。バイオフィルム構成細菌を用いて環境中の水を浄化するバイオレメディエーションには、安定した性状のバイオフィルムの供給が望まれる。今後は、異なる細菌群からのバイオフィルム形成に研究を展開することで、環境修復材料の簡便な作成法として利用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Naoyuki Takahashi, Eri Nasuno, Yukiko Tsuda Matsunaga, Norihiro Kato, Enzymatic quorum quenching using complex microbial system in polymer microcapsules fabricated by microfluidic device, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 査読有, **39(4)**, 401-405 (2014).

DOI: <http://doi.org/10.14723/tmrj.39.401>

Eri Nasuno, Chigusa Okano, Ken-ichi Iimura, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Norihiro Kato, Quick detection of cell-to-cell communication in gram-negative bacteria by color change of polymer matrix entrapping reporter bacteria, *Materials Research Innovations*, 査読有, **18(34)**, S4-879 ~ S4-883 (2014).

DOI: 10.1179/1432891714Z.000000000795

〔学会発表〕(計 11 件)

Rei Kawakami, Eri Nasuno, Ken-ichi Iimura, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Norihiro Kato, Hydrolysis of signal molecules for bacterial cell-cell communication using encapsulated quorum quenching bacteria, The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2014), 2014年12月2-5日, つくば国際会議場(茨城県つくば市).

Yuka Tsunematsu, Eri Nasuno, Ken-ichi Iimura, Norihiro Kato, Suppressive effect of immobilized hydrolase for the quorum sensing signal using polymer fibers fabricated by microfluidic device, 2nd International Conference of Young Researchers on Advanced Materials (IUMRS - ICYRAM 2014), 2014年10月24-29日, 海南(中華人民共和国).

Naoyuki Takahashi, Eri Nasuno, Yukiko Tsuda Matsunaga, Norihiro Kato, Suppression of bacterial cell-cell communication in microcapsules prepared by co-axial microfluidic device, International Union of Materials Research Societies - International Conference in Asia (IUMRS-ICA2014), 2014年8月24-28日, 福岡大学(福岡県福岡市).

Rei Kawakami, Eri Nasuno, Naoyuki Takahashi, Ken-ichi Iimura, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Norihiro Kato, Inhibitory control of quorum sensing due to enzymatic degradation of autoinducers by encapsulated bacteria, XIV International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies (IUMS2014), 2014年7月27日~8月1日, モントリオール(カナダ).

高橋尚之、奈須野恵理、松永行子、加藤紀弘、マイクロ流路デバイスを用いて調製したマイクロカプセル内部におけるクオラムセンシングシグナルの不活化、第23回日本MRS年次大会、2013年12月9-11日、波止場会館(神奈川県横浜市).

高橋尚之、奈須野恵理、加藤紀弘、マイクロ流路デバイスで作成した高分子カプセルを反応場とする Quorum Quenching、2013年度バイオフィルムと複合微生物系研究会、2013年12月7-8日、宇都宮大学(栃木県宇都宮市).

Naoyuki Takahashi, Eri Nasuno, Ken-ichi Iimura, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Norihiro Kato, Suppression of bacterial cell-cell communication using cyclodextrin-immobilized microgel particles prepared by microfluidic device, The 7th Asian Cyclodextrin Symposium (ACC2013), 2013年11月27-29日、バンコク(タイ).

Naoyuki Takahashi, Takuto Umemura, Takahisa Nakada, Eri Nasuno, Ken-ichi Iimura, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Norihiro Kato, Properties of thermo-responsive hydrogel prepared by microfibrillar collagen, 9th SPSJ International Conference (IPC2012), 2012年12月11-14日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市).

奈須野恵理、新井麻梨奈、諸星知広、池田宰、加藤紀弘、*Serratia marcescens* のクオラムセンシングレセプターSpnRとシグナル分子のバイオアフィニティ解析、2012年度バイオフィルムと複合系研究会、2012年10月13-14日, 花王霞ヶ浦研修所(茨城県稲敷郡三浦村).

Takuto Umemura, Takahisa Nakada, Naoyuki Takahashi, Eri Nasuno, Ken-ichi Iimura, Norihiro Kato, Rapid deswelling of thermo-responsive collagen hydrogel containing microfibrils, GelSymposium 2012, 2012年10月9-12日, つくば国際会議場(茨城

県つくば市).

高橋尚之、梅村拓登、中田貴久、奈須野
恵理、飯村兼一、加藤紀弘、アテロコラー
ゲンフィブリルゲルの熱誘導収縮、第 22
回日本 MRS 学術シンポジウム、2012 年 9
月 22-26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横
浜市).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：束状構造を有するゲルファイバー集合
体の製造方法

発明者：松永行子、高橋悠太、加藤紀弘

権利者：東京大学、宇都宮大学

種類：特許

番号：特願 2013-038720

出願年月日：2013 年 02 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 紀弘 (KATO Norihiro)

宇都宮大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00261818

(2) 研究分担者

松永 (津田) 行子 (MATSUNAGA, TSUDA
Yukiko)

東京大学・生産技術研究所・特任講師

研究者番号：00533663