

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19510081
 研究課題名（和文）細胞間情報伝達機構制御に基づくバイオフィーム形成制御技術の開発

研究課題名（英文）Studies on Control Methods of Biofilm Formation by Control of Bacterial Intercellular Communication Mechanism

研究代表者

池田 宰（IKEDA TSUKASA）

宇都宮大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40151295

研究成果の概要（和文）：環境問題、医療問題などを引き起こすバイオフィームは、細菌が行なう細胞間情報伝達機構により形成、制御されている。そこで、バイオフィーム形成の阻害を細胞間情報伝達機構を制御することにより行なった。我々が新たに開発した細胞間情報伝達機構シグナル物質構造類似体は、緑膿菌の培養液中に投与することにより、緑膿菌によるバイオフィーム形成を抑制することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：Bacterial biofilm formation is controlled by bacterial intercellular communication mechanism. Bacterial intercellular signal compound analogues were synthesized to inhibit bacterial biofilm formation. These compounds showed the inhibition effects on bacterial biofilm formation by adding bacterial culture medium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：バイオフィーム、バクテリア、細胞間情報伝達機構、クォーラムセンシング、N-アシル-L-ホモセリンラクトン、阻害剤、グラム陰性細菌、遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームとは、生物が形成する生物膜であり、特に微生物が形成するバイオフィームは、工場や家庭の給排水配管の内面や排水口付近、洗濯槽内、洗い場など、多くの場所に発生し、汚染や給排水効率の低下を引き起こしている。一方、医療面では、口腔や気道、尿路などの生体内や、カテーテルやドレ

ーン内などの医療器具内にも形成され、重度な感染を引き起こす温床として、治療上、非常に大きな問題になっている。以上のように、バイオフィームは、環境的、工業的にも、そして医療上においても解決しなければならない問題である。しかしながら、これらバイオフィームの除去は、現在のところ、強力な洗浄剤や殺菌剤の使用、またはブラシなどに

よる物理的な洗浄以外に方法が無く、新たな手法の開発が望まれていた。

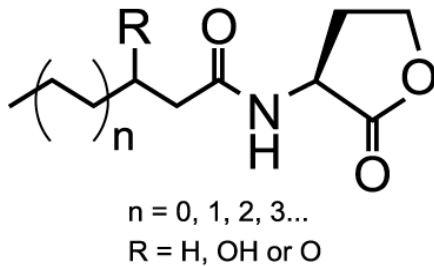
2. 研究の目的

バイオフィーム形成を制御する新技術として、近年、新たな微生物群制御手法として注目されている、細胞間情報伝達機構を制御することによる技術開発を、本研究課題における目的とした。

3. 研究の方法

① AHL 構造類似体を用いたバイオフィーム形成制御

グラム陰性細菌の細胞間情報伝達機構であるクォーラムセンシングは、シグナル物質として、アシル化ホモセリンラクトン (AHL: 図1) を用いている。種々の細菌



は、クォーラムセンシングを用いて、病原

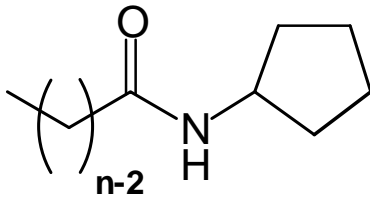


図2 Cn-CPAの構造

性の発現やバイオフィーム形成を制御していることが明らかとなってきている。そこで、クォーラムセンシングを制御することにより、バイオフィーム形成制御が可能であることが期待される。この、グラム陰性細菌のクォーラムセンシングに対して制御効果を示すAHL構造類似体、アシルシクロペンチルアミド (Cn-CPA: 図2) について、研究代表者は既に報告している。そこで、Cn-CPAの作用機序の詳細な解明を行ない、より効果的なバイオフィーム形成制御への応用指針を検討することとした。用いる菌種は、緑膿菌やセラチア菌とし、バイオフィーム形成実験は、マイクロタイタプレートを用いた静置培養系と、フローセルを用いた系の両方を実施した。まず、96穴タイタプレート上で緑膿菌を培養し、培養条件を種々変化させることによる、タイタプレート穴内でのバイオフィーム形

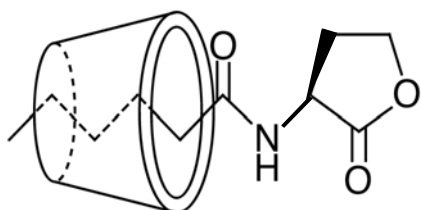


図3 CD-AHL複合体模式図

成の変化を検討した。続いて、最適条件において、Cn-CPAを添加し、バイオフィーム形成能の変化を追跡した。続いて、フローセル系における実験系の構築を図った。フローセルを用いた実験系の確立を行なった後、培養液に対するCn-CPAの添加効果について検討した。緑膿菌に対する検討の後、セラチア菌に対する検討も行なった。

② AHL 包接化合物を用いたクォーラムセンシング制御

クォーラムセンシング制御の新たな手法として、AHLと包接複合体を形成する能力を有する環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CD) の活用を検討した。CD類は、水溶液中でAHLと包接複合体を形成できる(図3)ことから、培養液中に投与することにより、細菌が生産するAHLの濃度を低減する効果が期待される。緑膿菌およびセラチア菌の培養液中に、種々のCD類を添加し、それぞれのQuorum Sensingへの効果を検討した。

4. 研究成果

① AHL 構造類似体を用いたバイオフィーム形成制御

グラム陰性細菌のQSに対して制御効果を示すAHL構造類似体であるCn-CPAがグラム陰性細菌によるバイオフィーム形成に対してどのような効果を示すか、フローセルを用いた実験系を構築して検討した。その結果、Cn-CPAは緑膿菌によるバイオフィーム形成を著しく阻害することが明らかとなった。また、マイクロタイタプレートを用いた実験系においても同様な効果が確かめられた。また、セラチア菌に対しても、Cn-CPAのQS阻害効果が明らかになった。

② AHL 包接化合物を用いたクォーラムセンシング制御

CD類とAHLとの包接複合体形成は、水溶液中の¹H-NMR測定により明らかとなり、また、緑膿菌のQSを著しく抑制することも確かめられた。さらに、セラチア菌のQSも同様に阻害することが確かめられた。CD類は、その疎水性空洞内にAHLを包接することが可能であり、このAHLトラップ効果により、各種菌体のQSを阻害していることが明らかとなった。

このように、微生物のQSを阻害する有効な化合物が種々確かめられてきたことにより、これらを用いたバイオフィーム形成阻害の手法が新たに開発できることが確かめられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計19件)

- ① T. Morohoshi, N. Someya, T. Ikeda, Novel *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 73, 2124-2127, 2009
- ② T. Morohoshi, Y. Yokoyama, M. Ouchi, N. Kato, T. Ikeda, Motility and the expression of the flagellin protein *FliC* are negatively regulated by quorum sensing in *Edwardsiella tarda*, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 108, 314-318, 2009
- ③ N. Someya, T. Morohoshi, N. Okano, E. Otsu, K. Usuki, M. Sayama, H. Sekiguchi, T. Ikeda, S. Ishida, Distribution of *N*-acylhomoserine lactone-producing fluorescent *Pseudomonads* on the phylloplane and in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Microb. Environ.*, 査読有, 24, 305-314, 2009
- ④ N. Kato, A. Kobayashi, H. Motohahsi, Y. Ozonoe, T. Morohoshi, T. Ikeda, Development of a novel hydrogel to prevent bacterial infectious diseases, *Prog. Colloid. Polym. Sci.*, 査読有, 136, 155-162, 2009
- ⑤ D. Rong, K. Usui, T. Morohoshi, N. Kato, M. H. Zhou, T. Ikeda, Symbiotic degradation of polyvinyl alcohol by *Novosphingobium* sp. and *Xanthobacter flavus*, *J. Environ. Biotech.*, 査読有, 9, 131-134, 2009
- ⑥ 染谷信孝、諸星知広、池田宰、阿久津克己、土屋健一、生物防除の成否を左右する微生物間相互作用について - 植物-病原体相互作用の理解に基づく病害制御の新視点、植物感染生理談話会論文集, 査読有, 45, 1-10, 2009
- ⑦ 池田宰、諸星知広、植物および魚類におけるバイオフィルム感染症と Quorum Sensing, *J. Germfree Life and Gnotobiology*, 査読有, 39, 25-28, 2009
- ⑧ 池田宰、諸星知広、特集: バイオフィルム感染症 基礎編・御病細菌および植物病菌のバイオフィルム形成能、臨床と微生物, 査読無, 36, 29-33, 2009
- ⑨ T. Morohoshi, S. Nakazawa, A. Ebata, N. Kato, T. Ikeda, Identification and characterization of *N*-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 72, 1887-1893, 2008
- ⑩ T. Morohoshi, M. Kato, K. Fukamachi, N. Kato, T. Ikeda, *N*-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472, *FEMS Microbiol. Lett.*, 査読有, 279, 124-130, 2008
- ⑪ W. Wang, T. Morohoshi, T. Ikeda, L. Chen, Inhibition of Lux quorum-sensing system by synthetic *N*-acyl-L-homoserine lactone analogues., *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 査読有, 40, 1023-1028, 2008
- ⑫ G. Nakagami, H. Sanada, J. Sugama, T. Morohoshi, T. Ikeda, Y. Ohta, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signals in an infected ischemic wound: An experimental study in rats, *Wound Repair Regen.*, 査読有, 16, 30-36, 2008
- ⑬ Y. Tao, T. Morohoshi, N. Kato, T. Ikeda, H. Zhuang, The function of *SpnR* and the inhibitory effects by halogenated furanone on quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1, *Acta Microbiol. Sin.*, 査読有, 48, 391-397, 2008
- ⑭ N. Kato, Y. Ozonoe, E. Umebayashi, T. Morohoshi, T. Ikeda, Artificial control of the bacterial cell-to-cell communication with autoinducer recognition gel, *Adv. Sci. Tech.*, 査読有, 57, 94-98, 2008
- ⑮ T. Ishida, T. Ikeda, N. Takiguchi, A. Kuroda, H. Ohtake, J. Kato, Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by *N*-acyl cyclopentylamides, *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, 73, 3183-3188, 2007
- ⑯ T. Morohoshi, T. Shiono, K. Takidouchi, M. Kato, N. Kato, J. Kato, T. Ikeda, Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by the synthetic analogs of *N*-acylhomoserine lactone, *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, 73, 6339-6344, 2007
- ⑰ T. Morohoshi, Y. Nakamura, G. Yamazaki, A. Ishida, N. Kato, T. Ikeda, The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces *N*-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing, *J. Bacteriol.*, 査読有, 189, 8333-8338, 2007
- ⑱ N. Kato, T. Tanaka, S. Nakagawa, T. Morohoshi, K. Hiratani, T. Ikeda, Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 査読有, 57, 419-423, 2007

- ⑬ 仲上豪二朗、真田弘美、須釜淳子、諸星知広、池田幸、感染虚血性創傷における細菌数とクオラムセンシングシグナルの関係、日本褥瘡学会誌、査読有、9、165-170、2007

[学会発表] (計71件)

- ① T. Ikeda, T. Morohoshi, S. Ito, N. Kato, Quorum sensing quenching in gram-negative bacteria using synthetic AHL analogues and cyclodextrins, 日本農芸化学会 2009 年度大会依頼講演、2010 年 3 月 30 日、東京大学
- ② 池田幸、諸星知広、魚病細菌および植物感染菌のバイオフィーム形成と Quorum Sensing、第 83 回日本細菌学会総会シンポジウム依頼講演、2010 年 3 月 29 日、横浜パシフィコ
- ③ T. Ikeda, W. Z. Wang, T. Sato, S. Ito, N. Kato, T. Morohoshi, Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria using AHL analogues and modified cyclodextrins, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009, 2009 年 11 月 26 日、神戸国際会議場
- ④ 池田幸、諸星知広、Quorum Sensing 制御に基づくバイオフィーム形成抑制、日本生物工学会 2009 年度大会シンポジウム依頼講演、2009 年 9 月 25 日、名古屋大学
- ⑤ 池田幸、諸星知広、Quorum Sensing とバイオフィーム形成、日本防菌防黴学会第 36 回年次大会招待講演、2009 年 9 月 15 日、千里ライフサイエンスセンター
- ⑥ 池田幸、伊藤智志、佐藤智哉、富永みのり、諸星知広、加藤紀弘、化学工学会第 74 年会、2009 年 3 月 19 日、横浜国立大学
- ⑦ 池田幸、諸星知広、魚病細菌および植物感染菌のバイオフィーム形成と Quorum Sensing およびその制御方法の開発、第 82 回日本細菌学会依頼講演、2009 年 3 月 13 日、名古屋国際会議場
- ⑧ 池田幸、諸星知広、植物および魚類におけるバイオフィーム感染症とクオラムセンシング、第 42 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会シンポジウム依頼講演、2009 年 1 月 23 日、住友クラブ
- ⑨ 池田幸、第 52 回日本薬学会関東支部大会依頼講演、2008 年 10 月 4 日、東京理科大学
- ⑩ 池田幸、諸星知広、アユ腸内フローラにおける細胞間情報伝達機構の解析、日本生物工学会 2008 年度大会依頼講演、2008 年 8 月 27 日、東北学院大学
- ⑪ T. Ikeda, T. Morohoshi, N. Kato, Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria using cyclodextrins, 14th International

Cyclodextrin Symposium 招待講演、2008 年 5 月 10 日、同志社大学

- ⑫ 池田幸、諸星知広、中澤成寿、加藤紀弘、アユ腸内細菌由来アシル化ホモセリンラクトン分解酵素によるバイオフィーム形成阻害、Bacterial Adherence & Biofilm 第 21 回学術集会依頼講演、2007 年 7 月 7 日、東邦大学
- ⑬ 池田幸、諸星知広、江幡淳、中澤成寿、加藤紀弘、アユ腸内共生細菌における Quorum Sensing シグナリングの解析、環境バイオテクノロジー学会 2007 年度大会、2007 年 6 月 27 日、大阪大学

[図書] (計2件)

- ① 小宮山真、池田幸 (分担)、自己組織化ハンドブック第1編第1章第1節5. 分子認識系、NTS、2009
- ② 諸星知広、加藤紀弘、池田幸 (分担)、バイオフィームの基礎と制御、第1編第1章第2節「微生物間コミュニケーション (クオラムセンシング)」、NTS、2008

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: シクロデキストリン誘導体、シクロデキストリン誘導体の製造方法、及びクオラムセンシングの阻害方法

発明者: 伊藤智志、諸星知広、池田幸、加藤紀弘

権利者: 宇都宮大学

種類: 特願

番号: 2008-135674

出願年月日: 2008 年 5 月 23 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 幸 (IKEDA TSUKASA)

宇都宮大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 40151295