

平成30年6月7日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340068

研究課題名(和文) 複合系微生物群の制御によるバイオフィルム・バイオフィアウリング抑制技術の開発

研究課題名(英文) The development of inhibition technology against biofilm formation and biofouling with controlling the activities of complex microbes

研究代表者

池田 宰 (IKEDA, TSUKASA)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40151295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィルムやバイオフィアウリングの抑制技術開発を、これまでの単独菌種モデル系から、現実的な複合共生系を用いて進めた。

その結果、他種との共存によりバイオフィルム形成が増強される事象を解析した。また、実バイオフィルム試料から、グラム陰性細菌のQuorum Sensing (QS) シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を合成する細菌、および、AHLを分解する細菌の取得に成功した。

異種間での連携やQSとQuorum Quenching (QQ) の共存が明らかとなったことから、AHL分解細菌を用い、QQ能力を強化することで、複合系でのバイオフィルム形成阻害を実現できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The inhibition technology against biofilm formation and biofouling has been developed with controlling the activities of complex microbes.

N-acyl homoserine lacton (AHL), a signal molecule of quorum sensing in gram negative bacteria, producing bacteria and also AHL degradation bacteria were isolated from the same biofilm sample. Bacterial biofilm formation and biofouling are regulated by QS. For these reasons, quorum quenching (QQ) bacteria and enhancement there QQ activities should be useful for inhibition of biofilm formation and biofouling under complex microbes condition.

Moreover, several QQ techniques to inhibit biofilm formation have been developed.

研究分野：生物有機化学、

キーワード：バイオフィルム バイオフィアウリング 複合共生微生物 Quorum Sensing Quorum Quenching アシル化ホモセリンラクトン 活性汚泥

## 1. 研究開始当初の背景

微生物群によるバイオフィルムの形成やバイオフィリングに代表される環境汚染は、医療、食品など、人間の健康に係る分野から、配管や装置の腐食、膜の目詰まりなど、工業的分野まで、その対策が広く求められている。これまで、このようなバイオフィルムやバイオフィリングへの対策技術の開発は、主に、単独菌種のモデル系において検討が行われてきていた。しかし、実環境中の微生物群は、単独で生育するよりも、複数の属、種が集合した共生系において有効な生存戦略をとっていると考えられてきており、環境中の微生物群の90%以上は、お互いの物質のやり取りを行うことが可能なバイオフィルムを形成しているという報告は、これを裏付けるものとなっている。

申請者は、これまで、環境バイオフィルムへの対策として、微生物間情報伝達機構である Quorum Sensing (QS) の制御に焦点をあてた研究展開を進めてきた。平成14年度～平成17年度の基盤研究(C)「バクテリアのクォラムセンシング機構阻害物質の合成とその機能解析」、平成19年度～平成21年度の基盤研究(C)「細胞間情報伝達機構制御に基づくバイオフィルム形成制御技術の開発」、平成22年度～平成24年度の基盤研究(C)「バイオフィルム形成阻害を目指したバクテリアのシグナル物質分解技術の開発」において、世界に先駆けて QS 阻害によるバイオフィルム形成制御に取り組み、成果をあげてきている。これまで、QS は、主に、単独菌種間での情報伝達として研究が進められてきているが、同一シグナル物質の他菌種間におけるやり取りの存在も指摘されている。また、QS の阻害 (Quorum Quenching (QQ)) を行うシグナル物質分解菌も、さまざまな環境中で共存していることが報告されてきている。また、QS のシグナル物質以外の物質のやり取りによる機能制御の存在も報告されている。すなわち、環境中の多くの細菌は、多様な QS、QQ、そして、多種多様な物質の授受をも伴った、複合共生関係にあることが明らかとなってきている。そこで、単独種間の QS シグナル物質の授受から対象を広げ、多様な物質の、同種、または、異種間での授受を制御することによる複合系微生物群における活性制御技術の開発の必要性もまた重要となってきている。しかし、これまで、QS のシグナル物質も含め、複合系微生物群における物質の授受を制御することによる活性制御の研究例は非常に少ない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、複合微生物群における物質の授受、特に QS シグナルを把握し、それを制御し、複合系微生物群の活性を制御する技術を開発することにより、バイオフィルム

やバイオフィリング抑制に活用可能な技術の確立を到達目標とした。

## 3. 研究の方法

複合系微生物群における微生物制御技術を確認し、バイオフィルムおよびバイオフィリング抑制技術への応用を図るために、複合系微生物群における QS および QQ 活性を有する細菌種の探索と、得られた知見によるバイオフィルムおよびバイオフィリング抑制技術への適用、という段階を経て、本研究課題を遂行する。さまざまな環境中の QQ 活性を有する細菌種の探索を行う。一方、共培養によるバイオフィルム形成への影響を調査する。

## 4. 研究成果

(1) 種々のバイオフィルム試料内から、グラム陰性細菌における QS シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を合成する細菌を取得することに成功した。一方、同じ試料から AHL アシラーゼ活性を有する AHL 分解細菌の取得にも成功した。以上の結果から、バイオフィルム内の複合微生物群において、AHL の合成と分解が共存していること、すなわち、QS と QQ の共存が示唆された。

(2) 家庭内の水周りに形成されたピンク色のバイオフィルムから QS によりバイオフィルム形成を制御している *Methylobacterium* 属細菌を、多数、単離、同定することに成功した。単離した *Methylobacterium* 属細菌のバイオフィルム形成能力を解析したところ、特定の種の *Methylobacterium* 属細菌は単独培養時よりも、多種との混合培養時に、厚く、密度の高いバイオフィルムを形成することが明らかとなり、これは、バイオフィルム形成時に、種間でのシグナリングが働いていることを示唆していることを発見した。

(3) 複合共生微生物で成り立っている活性汚泥中や複数微生物種が共存している冷却水循環システムより QS を行う細菌および QQ 能力を有する細菌の取得に種々成功した。

(4) 研究室レベルでの実験系において、QQ 能を有する細菌との共培養により、QS によりバイオフィルム形成を行う細菌のバイオフィルム形成能を抑制できることが示めされた。

(5) 以上、本研究課題の成果として、異種間での連携や QS と QQ の共存が明らかとなったことから、AHL 分解細菌を用い、QQ 能を強化することで、複合系でのバイオフィルム形成阻害を実現できることが示された。

## 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6件)

T. Morohoshi, N. Sato, T. Iizumi, A. Tanaka, and T. Ikeda, Identification and

characterization of a novel *N*-acyl-homoserine lactonase gene in *Sphingomonas ursincola* isolated from industrial cooling water systems, *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 569-575 (2017) 査読有

DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.12.010

T. Morohoshi, N. Okutsu, X. Xie, and T. Ikeda, Identification of quorum-sensing signal molecules and a biosynthetic gene in *Alicyclophilus* sp. isolated from activated sludge, *Sensors*, 16, 1218 (2016) 査読有

DOI:10.3390/s16081218

T. Morohoshi and T. Ikeda, Complete genome sequence of *Methylobacterium populi* P-1M, isolated from pink-pigmented household biofilm, *Genome Announc.*, 4, e00458-16 (2016) 査読有

DOI:10.1128/genomeA.00458-16

N. Okutsu, T. Morohoshi, X. Xie, N. Kato, and T. Ikeda, Characterization of *N*-acylhomoserine lactones produced by bacteria isolated from industrial cooling water systems, *Sensors*, 16, 44 (2016) 査読有

DOI:10.3390/s16010044

N. Okutsu, T. Morohoshi, and T. Ikeda, Draft genome sequence of *Alicyclophilus* sp. B1, an *N*-acylhomoserine lactone-producing bacterium, isolated from activated sludge, *Genome Announc.*, 3, e00424-15 (2015) 査読有

DOI: 10.1128/genomeA.00424-15

S. Ochiai, S. Yasumoto, T. Morohoshi, and T. Ikeda, AmiE, a novel *N*-acylhomoserine lactone acylase belonging to the amidase family, from the activated sludge isolate *Acinetobacter* sp. Ooi24, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 6919-6925 (2014) 査読有

DOI:10.1128/AEM.02190-14

〔学会発表〕(計 15 件)

T. Ikeda, T. Morohoshi, N. Kato, Quorum quenching techniques using cyclodextrin, The 9th Asian Cyclodextrin Conference, Invited lecture, Singapore, 2017 年 12 月 14 日~17 日

茂呂亮汰、池田室、諸星知広、水回りのピンク汚れ原因菌 *Methylobacterium populi* における Quorum Sensing 機構の解析、第 69 回日本生物工学会大会、早稲田大学、2017 年 9 月 11 日~14 日

池田室、諸星知広、伊藤智志、加藤紀弘、シクロデキストリンによるグラム陰性細菌の Quorum Sensing 阻害効果、第 34 回シクロデキストリンシンポジウム、招待講演、愛知学院大学、2017 年 8 月 31 日~9 月 1 日

N. Sato, T. Iizumi, A. Tanaka, T. Ikeda, T. Morohoshi, Identification and characterization of a novel *N*-acyl-homoserine lactonase gene in *Sphingomonas ursincola* isolated from industrial cooling water systems、International Unions of Microbiological Societies (IUMS) 2017、シンガポール、2017 年 7 月 17 日~21 日

諸星知広、池田室、水回りに発生するバイオフィーム構成細菌の機能解析、日本細菌学会関東支部インターラボセミナー2016 in 栃木、自治医科大学、2016 年 11 月 22 日

諸星知広、池谷謙太、池田室、家庭内使用タオルに生息する細菌によるバイオフィーム形成の解析、第 68 回日本生物工学会大会、富山国際会議場、2016 年 9 月 28~30 日

諸星知広、池田室、Quorum Sensing 阻害技術の開発と微生物制御への応用、日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌コンベンションセンター、2016 年 3 月 27 日~30 日

我妻隆樹、石塚美和、池田室、諸星知広、活性汚泥処理水に存在するバイオフィーム形成細菌における Quorum Sensing 機構の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌コンベンションセンター、2016 年 3 月 27 日~30 日

池田室、伊藤智志、奈須野恵理、諸星知広、加藤紀弘、緑膿菌バイオフィーム形成に対する Quorum Sensing 阻害剤としてのシクロデキストリンの効果、第 50 回緑膿菌感染症研究会、招待講演、東京、2016 年 2 月 4 日~6 日

T. Ikeda, T. Morohoshi, N. Kato, S. Ito, Quorum quenching techniques using modified cyclodextrins, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 2015 年 12 月 15 日~20 日

奥津徳也、秋山直輝、諸星知広、加藤紀弘、池田室、半導体工場排水処理汚泥における細菌叢及び Quorum Sensing の解析、第 67 回日本生物工学会大会、鹿児島、2015 年 10 月 26 日~28 日

S. Ochiai, K. Yamada, T. Azuma, M. Ishizuka, T. Morohoshi, T. Ikeda, Quorum sensing and biofilm formation of *Aeromonas hydrophila* isolated from activated sludge treatment system, 11th International Symposium on Southeast Asian Water Environment (SEAWA), Bangkok, Thailand, 2014 年 11 月 26 日~28 日

S. Ochiai, S. Yasumoto, T. Ikeda, T. Morohoshi, AmiE, a novel *N*-acylhomoserine lactone acylase belonging to the amidase family, from the activated sludge isolate *Acinetobacter* sp. Ooi24, 5th ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, San Antonio, USA, 2014 年 10 月 18 日~21 日

池田宰、諸星知広、Quorum Sensing に基づくバイオフィウリング抑制技術の開発、化学工学会第 46 回秋季大会、招待講演、九州大学、2014 年 9 月 17 日～19 日

M. Ishizuka, T. Morohoshi, T. Ikeda, Identification of signal molecules in bacterial quorum sensing related to foulant production resulting in biofouling, IWA Specialist Conference on Advances in Particle Science and Separation, 北海道大学, 2014 年 6 月 15 日～18 日

〔図書〕(計 2 件)

池田宰、工学領域におけるバイオフィルム、臨床と微生物 45 巻 1 号、2018 年

池田宰(監修: 松村吉信) バイオフィルム制御に向けた構造と制御過程 - 特長・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ - 2.4 Quorum sensing によるバイオフィルム制御、CMC 出版、2017 年

〔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 宰 (IKEDA TSUKASA)  
宇都宮大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 40151295