

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780064

研究課題名（和文）複合培養系における黄色ブドウ球菌バイオフィルムの形成抑制機構解明

研究課題名（英文） Mechanism of inhibition of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* in mixed-culture

研究代表者

古川 壮一 (FURUKAWA SOICHI)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号 40339289

研究成果の概要：*Yersinia intermedia* 培養上清中の *Staphylococcus aureus* バイオフィルム形成抑制因子は、分子量 3,000 以下の耐熱性物質であることを明らかにすることができ、また、同時に当該物質は両親媒性物質であることを示唆する結果が得られた。そこで、数十種類の食品添加物について、*S. aureus* の BF 形成抑制に関してスクリーニングを行ったところ、界面活性剤として使用されているショ糖脂肪酸エステルが極めて高い活性を有していることを発見することが出来た。次に、*Y. intermedia* 同様、*Escherichia coli* の培養上清も *S. aureus* の BF 形成抑制活性を有するので、*E. coli* のランダムトランスポゾン変異株ライブラリーを構築し、16,704 株のスクリーニングを行ったものの、残念ながら、現在までに当該活性を有さない株は得られていない。このことから、当該物質の生産に関わる遺伝子が成育にとって必須である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：バイオフィルム、複合系、黄色ブドウ球菌

## 1. 研究開始当初の背景

バイオフィルムの研究は従来、概ね単独の微生物で形成されるものを中心に研究が進められてきた。しかしながら、自然界に見られるバイオフィルムは複合系であるため、我々は複合バイオフィルム形成に興味をもって、各種細菌の 2 菌種混合系でのバイオフィルム形成を調べてきた。その過程で、各種病原菌のバイオフィルム形成が、複合系にお

いて抑制される場合があることを幾つも見出すことができた。また、同時に病原菌同士の複合培養において、バイオフィルム形成が増加する場合があることも見出すことができた。バイオフィルムは、感染症研究におけるホットトピックスであり、実際、多くの感染症にはバイオフィルムが関与していることが示唆されている。また、食品衛生上も、バイオフィルムは殺菌・洗浄しにくいことか

ら重要な汚染原因と認識されつつある。従って、複合系における病原微生物のバイオフィルム形成に関する研究は、現実には多種多様な微生物が存在する環境における微生物制御を考えた場合、重要な意味を持つものといえる。そこで、複合系における病原微生物のバイオフィルム形成について、更なる検討を行うこととした。特に、今回はバイオフィルム形成抑制に焦点を当て、複合系における病原菌のバイオフィルム形成抑制機構に関して研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

先に述べたように、我々は、各種細菌の2菌種混合系でのバイオフィルム形成を調べてきた(図1)。本検討では、感染症及び食中毒に関するグラム陽性及び陰性細菌それに乳酸菌(細菌:計36株)および酵母(計2株)を加えた合計38種類の微生物を用い、1株ずつ組み合わせながら2菌種複合培養系におけるバイオフィルム形成について検討を行ってきた。図1における赤及びオレンジは複合培養にけるバイオフィルム形成量増加を示し、水色青は減少を示しており、濃い色はその傾向が顕著であることを表している。この研究から、複合培養系ではバイオフィルムの形成量は増加する傾向にあることが明らかになったが、同時に病原菌のバイオフィルムを減少させる組み合わせもいくつか発見した。そのなかで、高いバイオフィルム形成を指名していた黄色ブドウ球菌

(*Staphylococcus aureus*)を大腸菌群の微生物と複合培養すると、そのバイオフィルム形成が抑制されるということを発見した(図2)。黄色ブドウ球菌は感染症原因菌として広く研究されていると同時に、食中毒原因菌としても食品衛生上重要な微生物である。そこで、黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成抑制を目的として、複合培養時におけるバイオフィルム形成抑制機構について研究を行うこととした。

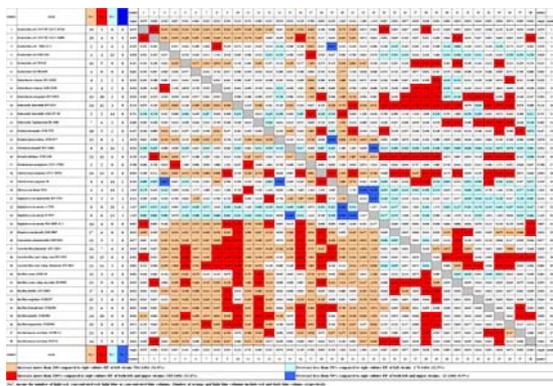


図1 複合微生物系におけるバイオフィルム形成。

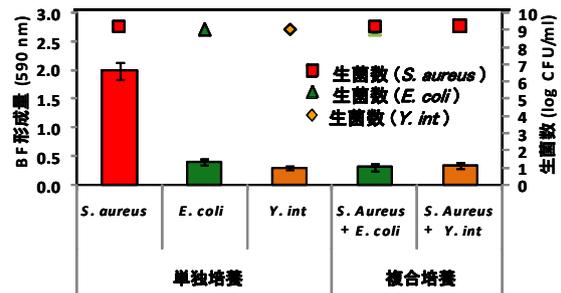


図2 *S. aureus* と *E. coli* 及び *Y. intermedia* の単独・複合培養時 BF 形成量

## 3. 研究の方法

バイオフィルムの形成は一般に行われているタイタープレート法に拠った。すなわち、96穴 microtiter plate well 内で 30°C, 24 時間静置培養後、well 内に付着した菌体を crystal violet により染色し、その付着色素量を測定することにより評価した。

また、バイオフィルム形成因子の分離・精製には限外ろ過膜、種逆相クロマトグラフィー担体及び UPLC/MS/MS システムを用いた。

ランダムトランスポゾン変異株ライブラリーのスクリーニングには、変異導入微生物として大腸菌 (*Escherichia coli*) を用い、トランスポゾン Tn5 を挿入することにより、ランダムトランスポゾン変異株ライブラリーを構築した。

二次元電気泳動後蛋白質の同定には、二次元電気泳動システムと、イオントラップ型の LC/MS/MS システムを用いた。

## 4. 研究成果

以前の検討から、*Y. intermedia* 培養上清中の *S. aureus* のバイオフィルム形成抑制活性物質は、インイオン交換体に吸着したことから、負に荷電した極性物質または等電点 7.5 以下の両性物質であることが明らかになっていた。また、耐熱性かつ分子量が 10,000 以下であることが明らかになっていた。そこで、さらに限外ろ過を行い検討したところ、活性物質は分子量 3,000 以下の物質であることを明らかにすることができた(図3)。

次に、*Y. intermedia* 培養上清中の活性物質が本バイオフィルム形成に及ぼす影響を、疎水性及び親水性プレートを用いて検討した。なお、疎水性プレートとは、現在使用しているポリスチレン製プレートを指し、親水性プレートとは、コロナ放電処理によりポリスチレン製プレートの表面に親水基を導入した細胞培養用のプレートを指す。検討の結果、疎水性プレートにおいてのみ、*Y. intermedia* 培養上清添加によりバイオフィ

ルム形成が抑制されることが明らかになった (図 4)。

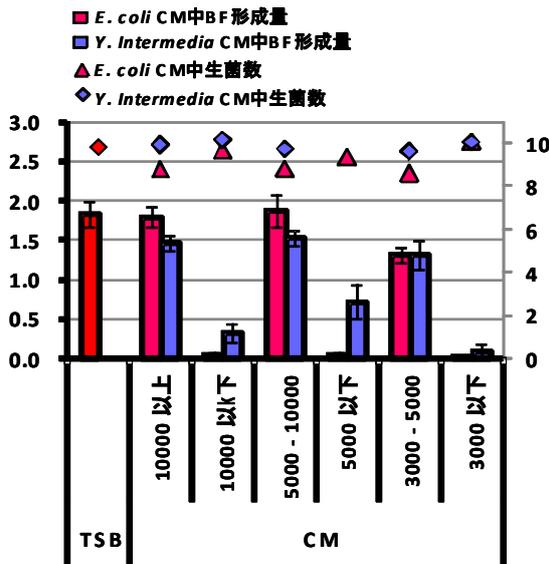


図 3 *Y. Intermedia* 培養上清中活性因子の限外濾過画分の BF 形成抑制作用

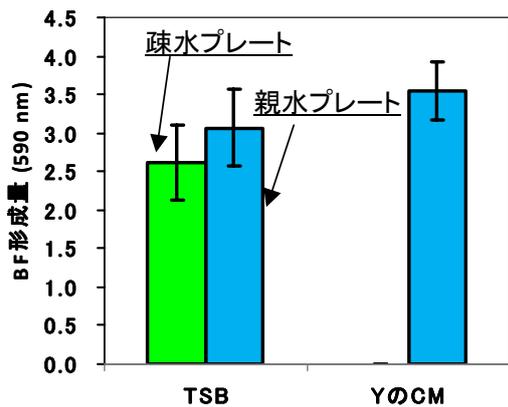


図 4 疎水性及び親水性担体における、*Y. Intermedia* 培養上清中活性因子による *S. aureus* バイオフィーム形成抑制

このことから、*Y. intermedia* 培養上清中の活性物質は、疎水性担体に、*S. aureus* よりも強固に吸着する性質を持っており、その結果、*S. aureus* のバイオフィーム形成を抑制していることが示唆された (図 5)。このことから、*Y. intermedia* 培養上清中の活性物質は、極性若しくは電荷を有する物質であるものの、同時に疎水性領域も有する両親媒性物質ではないかと考えた。

そこで次に、限外ろ過サンプルを UPLC/MS/MS システムを用いて解析を行ったところ、早い溶出時間帯で、活性画分に幾つか小さいながらも特徴的なピークを観察す

ることが出来た。UPLC/MS/MS システムでは、逆走カラムを UPLC に使用しており、このことから、当該物質は弱いながらも疎水性領域を有しているのではないかとということが示唆された。そのため、当該物質を UPLC/MS/MS システムでさらに効果的に分離できるようにするため、活性物質を強く吸着可能な逆相系のカラムを見つけることを目指して検討を行ったが、残念ながら、現在までに有効な担体を見出すに到っておらず、結果的に同定には到っていない。ただ、今後とも検討を続けて行きたいと考えている。

なお、現在までの検討から、*Y. intermedia* 培養上清中の活性物質の作用モデルを、以下のように推定している (図 5)。ここでは、*S. aureus* 表面には親水性と疎水性の領域が存在していることを想定しているが、現実には菌体表面はそのような状態と考えて差し支えないと考えている。このことから、微生物そのものが、一種の両親媒性コロイドともいえるような性質を有していることが示唆された。

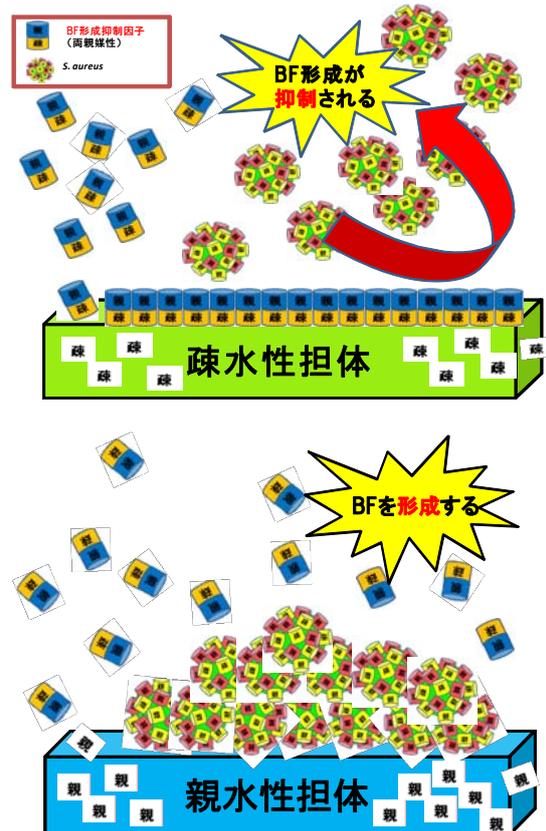


図 5 疎水性及び親水性担体における、*Y. intermedia* 培養上清中活性因子による *S. aureus* バイオフィーム形成抑制モデル

ところで、食品取扱い環境における病原菌のバイオフィーム形成抑制を考えた場合、食品添加物を用いてバイオフィームの形成を

行うことが出来れば望ましい。そこで、数十種類の食品添加物について、*S. aureus*のBF形成抑制に関してスクリーニングを行ったところ、特に、界面活性剤として使用されているシヨ糖脂肪酸エステルが極めて高い活性を有していることを発見した(図6)。この物質は、シヨ糖に脂肪酸が結合している構造を有しているが、この脂肪酸鎖長が長いほど、低濃度で活性を示すことが明らかになった。このことは、先の*Y. intermedia*培養上清中活性因子が両親媒性物質ではないかと推定していたことを裏付けるものである。同時に、一種の両親媒性コロイドともいえるような性質を有していると考えられる微生物の付着阻害、すなわちバイオフィーム形成の初期段階の阻害には、両親媒性物質、すなわち界面活性剤が有効であることが改めて明らかになった。

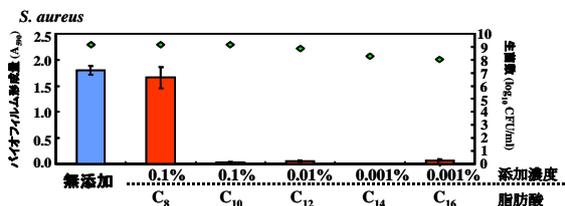


図6 脂肪酸鎖長の異なるシヨ糖脂肪酸エステルによる *S. aureus* バイオフィーム形成抑制

さらに、*Y. intermedia*同様、*E. coli*の培養上清も *S. aureus*のBF形成抑制活性を有するので、*E. coli*のランダムトランスポゾン変異株ライブラリーを構築し、*S. aureus*のBF形成抑制活性を有さない変異株の取得を目指して、16,704株のスクリーニングを行ったものの、残念ながら、現在までに目的とする株は得られていない。このことから、当該物質の生産に関する遺伝子が成育に必須の遺伝子であるか、当該遺伝子にはトランポゾンが挿入され難い何らかの理由があるか、のいずれかが原因であると考えている。なお、当該物質の生産に関する遺伝子が成育必須遺伝子である場合には、一次代謝に関わる遺伝子である可能性が高く、当該活性物質が一次代謝産物である可能性もある。なお、過去の検討から、当該活性物質は混合有機酸発酵の産物ではないことが明らかになっている。

加えて、*S. aureus*を単独及び *Y. intermedia*の培養上清中にて培養を行い、それぞれからタンパク質を抽出して二次元電気泳動を行った。その結果、両者のタンパク発現プロファイルは異なっており、特徴的な発現をしていることが確認できた。そこで、当該タンパクについてLC/MS/MS解析を行っ

たところ、グルコースの取り込みやストレス応答に関与するタンパクなどが、培養上清中で培養した際に強く発現していることが明らかになった。

以上のことから、*Y. intermedia*培養上清中の *S. aureus*のバイオフィーム形成抑制活性物質は、耐熱性で分子量3,000以下の物質であり、かつ両親媒性物質である可能性が示唆された。また、実際に両親媒性をもつシヨ糖脂肪酸エステルのような界面活性剤は効果的に *S. aureus*のバイオフィーム形成を抑制していた。このことから、バイオフィーム形成の抑制には界面活性剤が有効であることが改めて明らかになった。また、当該物質生産に関わっている遺伝子は、成育に必須であることが強く示唆された。

本研究遂行に於いて、実験に従事して頂いた入江文子さん、Lukito Fennyさん、サポートを頂いた河原井武人博士、それから研究遂行上、色々の御配慮を賜った日本大学生物資源科学部の森永康教授、荻原博和准教授、日本大学大学院総合科学研究科の山崎真狩教授に深甚の謝意を表したい。更にバイオフィーム形成抑制因子の精製に関し御指導頂き、種々御助力を賜った日本大学大学院総合科学研究科の別府輝彦教授、日本大学生物資源科学部の上田賢志准教授、高野英晃助手、天野昭一研究員に心からの感謝の意を表したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び研究連携者には下線)

- [雑誌論文] (計 2 件)
- ① 古川壮一・河原井武人・成澤直規・吉田可奈子・荻原博和・森永康・山崎真狩：バイオフィームの新領域, *Journal of Applied Glycoscience*, in press. (査読あり)
  - ② 古川壮一・秋吉裕子・Lukito Fenny・荻原博和・森永康：食品におけるバイオフィームの形成と制御, 日本清涼飲料研究会「第18回総会・研究発表会」講演集, p. 89-91 (2008). (査読なし)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 古川壮一・荻原博和・山崎真狩・森永康：複合系におけるバイオフィーム形成、第82回日本細菌学会総会講演要旨集(シンポジウム)(名古屋)p. 35 (S03-4). (2009/3/12)
- ② 古川壮一・秋吉裕子・Lukito Fenny・小

- 森谷茉衣・荻原博和・森永康：食品添加物による食品関連細菌バイオフィルムの形成制御，日本缶詰協会第 57 回技術大会（仙台），p. 10（2008/11/06）
- ③ 古川壯一・秋吉裕子・Lukito Fenny・荻原博和・森永康：食品におけるバイオフィルムの形成と制御，日本清涼飲料研究会「第 18 回総会・研究発表会」（東京），p. 17（2008/10/22）
- ④ 秋吉裕子・Lukito Fenny・小森谷茉衣・古川壯一・荻原博和・森永康：黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成制御及びその洗浄・殺菌，日本食品科学工学会第 55 回大会講演要旨集（京都），p. 100（2008/09/07）
- ⑤ 秋吉裕子・古川壯一・荻原博和・山崎眞狩・森永康：食品添加物による *Staphylococcus aureus* のバイオフィルム形成阻害，日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集（名古屋）p. 157.（2008/03/27）
- ⑥ 古川壯一・荻原博和・森永康：食品の非加熱殺菌機構と微生物制御に関する最近の話題、(社) 日本缶詰協会 チルド食品研究会，（2008/03/24）
- ⑦ Soichi Furukawa, Ayako Irie, Yuko Akiyoshi, Hirokazu Ogihara, Yasushi Morinaga, and Makari Yamasaki, Decrease of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in the mixed culture, Abstract of the 3rd ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria (Austin, Texas, USA), p. 51 (2007).（2007/10/9）
- ⑧ 古川壯一・河原井武人・荻原博和・山崎眞狩：バイオフィルムの新領域、日本応用糖質科学会平成 19 年度大会（第 56 回）講演要旨集（藤沢）p. 49（2007/8/30）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 壯一 (FURUKAWA SOICHI)  
日本大学・生物資源科学部・講師  
研究者番号：40339289