

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32705

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K14024

研究課題名（和文）リステリアのバイオフィーム形成細胞化のゆらぎの明確化に関する研究

研究課題名（英文）Studies on fluctuation of biofilm formation of *Listeria monocytogenes*

研究代表者

山本 詩織 (Yamamoto, Shiori)

鎌倉女子大学・家政学部・講師

研究者番号：40795291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、食品製造環境等における *Listeria monocytogenes* のバイオフィーム形成による食品汚染が問題視されていることを踏まえ、当該形質の形成段階に顕す細胞形質に基づいた亜集団別分類を通じて、細胞構造学的及び分子代謝的観点からの形質特性について検討した。血清型1/2aの *L. monocytogenes* 菌株のバイオフィーム形成細胞では細胞の形態によるパラつきが認められると共に、このゆらぎが細胞表面構造に伴う付着強度の変動に依存する可能性が示唆された。また、菌体脂肪酸組成の変動が細胞表面特性に影響を及ぼしている可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品製造環境における *L. monocytogenes* のバイオフィーム形成は食品への持続汚染を誘起する一因と目されており、その制御が必要とされている。本研究を通じて、形成されたバイオフィーム中の付着強度別細胞群における細胞特性を分子代謝的かつ細胞構造的に比較し、当該形成に伴うゆらぎの一端を明らかにすることができた。本成果は、集団微生物学的かつ環境生態学的観点からの当該形成機構の理解につながると共に、バイオフィーム形成制御に資する重要な学術知見となり、将来的に食品衛生分野に加えて医学・環境微生物学分野においても高い意義をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in food manufacturing environments results in the contamination of food and is therefore a cause for concern. This study aimed at understanding the fluctuation of cells formed biofilm of *L. monocytogenes* through to clarify the characterizations of the sub-populated cells from biofilm. The biofilm-forming cells of *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains were observed the morphological variation, and it was suggested that this variation may be due to associate with the adhesive strength and the cell surface structure. Additionally, it was also suggested that the influence of the variation in the fatty acid composition of the cell may be a factor in the change of cell surface properties.

研究分野：食品衛生学

キーワード： *Listeria monocytogenes* バイオフィーム 環境適応 不均一性 細胞表面特性 菌体脂肪酸組成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは環境微生物における生存戦略の一つであり、生存性やストレス・薬剤等耐性の上昇を引き起こす。食品衛生分野では、バイオフィームに伴う課題として、*Listeria monocytogenes* による食品製造環境での長期的生存への寄与が想定されており、実際に過去に複数の事例が報告されている。*L. monocytogenes* は易感受性者に菌血症、敗血症、流産等の重篤な症状を呈すると共に高い致死性を顕すことが知られており、公衆衛生上、注視すべき病原体の一つである。本菌は生ハムやチーズ、魚介類加工品等の非加熱喫食食品において広く存在し、低酸素及び冷蔵温度下で増殖することが可能であるため、食品汚染を介したヒト健康被害を招く。食品製造環境での当該菌によるバイオフィーム形成は、食品への持続汚染を誘起する一因と目され、食中毒発生へとつながる危険性を有することから、この制御が必要とされている。

バイオフィーム形成は周囲の環境に応じて進行し、その影響因子の一つとして温度が挙げられる。温度変化は宿主の体内外を識別する因子であり、これに伴い EPS 生産の制御が生じること、バイオフィーム形状が大きく変化することが報告されている。研究代表者らの先行研究においても、低温環境下では *L. monocytogenes* の当該形質が有意に減少し、それには付着性因子 *dlt* オペロンが関与しているであろうことを明らかにした。また、分離の由来や菌株毎の性質によってバイオフィーム形成能が多様化していることも見出した。他の先行研究でも、血清型や培地組成、その他細菌種との共培養による同形成能のゆらぎが報告されており、バイオフィーム形成細胞の多様性、すなわち当該形質へのゆらぎが、環境に応じた生活様式の決定を担っていると考えられる。

バイオフィームは単一細胞から形成され得るが、均一に同一形質を示すとは限らず、不均一性が生じる。この細胞の不均一性の制御が環境に応じた生活様式の決定を担っていると考えられ、単一および集団微生物学的な両視点からの複合的アプローチがバイオフィーム形成細胞のゆらぎに基づく環境適応機構の分子基盤を明らかにするうえで重要とされる。バイオフィーム研究の理解として、*Pseudomonas aeruginosa* や *Staphylococcus aureus* 等のモデル細菌において深まってきたが、食品衛生分野で重要とされる *L. monocytogenes* におけるバイオフィーム形成能の誘因・形成機構について分子レベルでの理解は進んでおらず、微生物集団内で生じる不均一性やゆらぎに関する分子基盤は明らかになっていない。したがって、*L. monocytogenes* のバイオフィーム形成による環境応答・生活様式を明らかにすることが、食品衛生分野における安全性の向上につながると目される。

### 2. 研究の目的

本研究では、*L. monocytogenes* の集団細胞間コミュニケーションを標的とした当該形質の制御を目指して、バイオフィーム形成に係るゆらぎの明確化に向けた研究を行った。バイオフィーム形成時の細胞形質に基づいて亜集団別分類を行い、その細胞特性を明らかにすることで、バイオフィーム形成に伴う細胞集団の不均一性の分子基盤を理解するための基礎的知見の集積を図った。

### 3. 研究の方法

#### 1) バイオフィーム形成条件の検討

供試菌株は、血清型 1/2a の *L. monocytogenes* を用いた。当該菌株を TSBYE 培地により前培養した後、HTM 培地を用いて 25°C 又は 37°C 下で静置培養することでバイオフィームを形成させた。形成されたバイオフィームはクリスタルバイオレット染色法を用いて定量するとともに、バイオフィーム中の細胞の生存性を Live/Dead 染色によって評価した。

#### 2) バイオフィーム形成細胞の亜集団別分類方法の検討

バイオフィーム形成時の細胞を亜集団別分類するため、上記 1) によって形成されたバイオフィーム細胞をセルソーターによる細胞形状による分類、又は物理的刺激による付着強度別の分類を試みた。

#### 3) バイオフィーム形成細胞の特性解析

亜集団別分類されたバイオフィーム形成細胞の細胞特性を調べるため、集菌した細胞集団をリン酸緩衝ペプトン水で洗浄した後に、シトクロム c 結合アッセイによる細胞表面電荷の評価、Microbial adhesion to solvents (MATS) analysis による細胞表面疎水性の変化量の測定、走査電子顕微鏡 (SEM) 解析による細胞表面構造の観察、メタボローム解析による菌体脂肪酸組成の比較を行った。

#### 4) RT-PCR による遺伝子発現量の比較

KEGG Pathway 解析を通じて、菌体脂肪酸組成の変化への影響が示唆される遺伝子群を推測し

た。推測された一部の遺伝子については、primer-BLAST によりプライマーを作成し RT-PCR に供することで、亜集団別分類されたバイオフィーム形成細胞間での遺伝子発現量の差異を比較した。

#### 4. 研究成果

##### 1) バイオフィーム形成条件の比較検討

バイオフィーム中の細胞の生存性は温度によって差異が認められ、死細胞は 25°C 下よりも 37°C 下の方が多かった。形成されたバイオフィーム中の細胞は、顕微鏡観察によって形態によるバラつきが認められ、単一細胞から形成されるバイオフィームでは多様な細胞形質を示すことが確認された。また、バイオフィーム経過時間毎 (3、8、24、72 時間) に形成されたバイオフィームでは、8~24 時間の間で当該形質の増加・成熟が起っていた。したがって、以降のバイオフィーム形成細胞は培養時間 24 時間以内のものを使用することとした。

##### 2) バイオフィーム形成細胞の亜集団別分類方法の検討

バイオフィーム形成に伴う細胞集団は、セルソーティングによって亜集団化を試みたところ、浮遊細胞とバイオフィーム形成細胞間で細胞の大きさ及び形状に大きな差異が認められず、細胞形状による分類は難しいことが分かった。一方、バイオフィームを形成する細胞集団では付着性に差異が認められることから、物理的刺激によるバイオフィーム形成細胞の付着強度別分類を試みたところ、大きく 3 亜集団に分類することができた。したがって、以降の研究では付着強度により分類された 3 亜集団 (Planktonic cell [PC]、Low-adherent biofilm [L-BF]、High-adherent biofilm [H-BF]) を用いて検討を進めることとした。

##### 3) 亜集団別分類されたバイオフィーム形成細胞の特性解析

細胞表面電荷では PC よりも L-BF・H-BF の方が高く、いずれも 37°C 下の方が 25°C 下よりも全体的に高い傾向にあった。細胞表面の疎水性では有機溶媒との親和性を指標として評価しており、クロロホルムおよび酢酸エチルを用いたところ PC・H-BF よりも L-BF の方が高い親和性を示した。一方、ヘキサデカンでは温度による差異が認められ、25°C 下では PC、L-BF、H-BF の順に高いものの、37°C 下では H-BF、L-BF、PC の順に高い結果となった。SEM 解析による細胞表面構造を見ると、25°C 下における各細胞では表面の粗さ (roughness) にも差異が認められた。また、代謝学的差異を明らかにするためメタボローム解析による菌体脂肪酸組成に供したところ、付着強度別の細胞間において 12:0、anteiso-13:0、iso-14:0、16:0、anteiso-17:0、3OH-iso-14:0、2OH-14:0 に差異が認められた。特に C14:0 および C17:0 において有意差が認められ、さらに iso やヒドロキシ酸修飾されたものが増える傾向が認められた。C14:0 の KEGG Pathway 解析を行った結果、*FabF*、*FabG*、*FabZ*、*FabI*、*FabK*、*FabL* 等の遺伝子の関与が推測され、一部遺伝子については既知の遺伝子配列に基づいた RT-PCR に供したところ、付着強度が強いほど遺伝子発現量は少なくなる傾向が認められた。

以上より、*L. monocytogenes* におけるバイオフィーム形成細胞では、菌体脂肪酸組成の変動に伴って細胞表面特性に影響を及ぼし、これらが付着強度の変動、すなわち細胞の不均一性に寄与する可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 山本詩織	4. 巻 7
2. 論文標題 リステリアのバイオフィーム形成に係るゆらぎの分子基盤解明に向けて	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 47-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Shiori, Hasegawa Megumi, Iwabuchi Eriko, Asakura Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Two <i>Listeria monocytogenes</i> Strains Isolated from Raccoon Feces in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00495-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00495-22	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 -
1. 著者名 Yamamoto Shiori, Kitagawa Wataru, Nakano Motoki, Asakura Hiroshi, Nakayama Tatsuya, Iwabuchi Eriko, Sone Teruo, Asano Kozo	4. 巻 79
2. 論文標題 Prevalence and Characterization of Gentamicin Resistance Genes in <i>Escherichia coli</i> Isolates from Beef Cattle Feces in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00284-022-02913-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 山本詩織、長谷川めぐみ、岩渕絵里子、朝倉 宏	4. 巻 34
2. 論文標題 低温環境下における <i>Listeria monocytogenes</i> のバイオフィーム特性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bacterial Adherence & Biofilm	6. 最初と最後の頁 57-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Shiori, Kitagawa Wataru, Nakano Motoki, Asakura Hiroshi, Iwabuchi Eriko, Sone Teruo, Asano Kozo	4. 巻 9
2. 論文標題 Plasmid Sequences of Four Large Plasmids Carrying Antimicrobial Resistance Genes in Escherichia coli Strains Isolated from Beef Cattle in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00219-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00219-20	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 -

1. 著者名 Yamamoto S., Nakayama T., Asakura H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft genome sequence of Stenotrophomonas maltophilia CRB139-1, isolated from poultry meat in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00075-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00075-20	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山本詩織, 秋元真一郎, 迫井千晶, 山田 研, 壁谷英則, 杉山 広, 高井伸二, 前田 健, 朝倉 宏
2. 発表標題 低温調理による野生鹿肉及び猪肉での中心温度挙動と細菌不活化効果に関する検討
3. 学会等名 第43回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamamoto S., Hasegawa M., Iwabuchi E., and Asakura H.
2. 発表標題 Association between the physiological heterogeneity and surface properties of biofilm-forming <i>Listeria monocytogenes</i>
3. 学会等名 27th International ICFMH conference (FoodMicro 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本詩織、石井良和、朝倉 宏
2. 発表標題 国内流通鶏肉におけるESBL産生大腸菌並びにサルモネラ属菌の検出状況と分離菌株の遺伝的性状解析
3. 学会等名 第42回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本詩織、中山達哉、町田李香、朝倉 宏
2. 発表標題 国内の市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌の定性的・定量的評価
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 異なる調理機器を用いた低温加熱調理による微生物汚染低減効果の比較
3. 学会等名 日本食品衛生学会第116回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto S., Okada Y., Ishii S., Igimi S., Asakura H.
2. 発表標題 Prevalence and genetic characterization of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> from retail poultry meat in Japan
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies Congresses (IUMS 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本詩織、長谷川めぐみ、岩淵絵里子、朝倉 宏
2. 発表標題 低温環境下における <i>Listeria monocytogenes</i> のバイオフィルム特性
3. 学会等名 第34回バイオフィルム学会学術集会・第57回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本詩織、中山達哉、朝倉 宏
2. 発表標題 市販猪肉由来大腸菌の薬剤耐性汚染実態と分離株の遺伝特性について
3. 学会等名 第40回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 低温加熱調理を通じた鶏肉における微生物汚染低減効果に関する検討
3. 学会等名 日本食品衛生学会第115回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 鶏肉におけるカルバペネム耐性菌汚染実態及び <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 分離株のゲノム特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、川村研二、朝倉 宏
2. 発表標題 外来患者由来ESBL産生大腸菌の分子遺伝学的特性について
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------