

微生物由来バイオフィーム抑制物質の探索

共培養を用いた抑制効果の評価技術

- 共培養によりバイオフィーム抑制効果を簡便に検出
- クォラムセンシング(QS)を標的に、効率的にバイオフィーム阻害菌を分離
- 培養液上清中にバイオフィーム阻害活性を持つ4菌株を取得

研究のねらい

微生物の形成するバイオフィーム(BF)は、薬剤耐性化に伴う医療器具の汚染や感染症の重篤・難治化、膜や配水管の腐食・閉塞などの原因となり、医療分野や産業分野において莫大な経済的損失をもたらしています。そのため、効果的なBFの制御技術の確立は重要な課題であり、既存の抗生物質に代わる新たなBF防除剤の開発が望まれています。本研究では、BF形成微生物(*Pseudomonas aeruginosa*)と環境分離株の共培養によるBF生成量の変化を評価することで、BF抑制物質を生産する菌株の取得を試みました。

研究内容

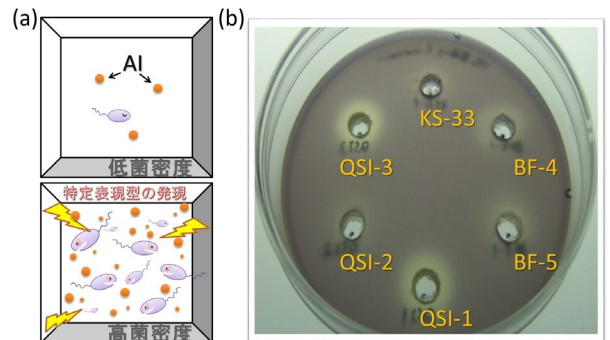
細菌のBF形成には細菌間情報伝達機構(QS)が深く関与しています(上図(a))。そのため、QSは効果的なBF阻害剤の標的として期待されています。QS阻害については、検定菌である *Chromobacterium violaceum* NBRC 12614 (QS制御により紫色色素violaceinを生産)に対する阻止円形成により、容易に判別できます。そこで本研究では、まず種々環境サンプルを分離源としてQS阻害菌株の分離を試みました。その結果、QS阻害活性を示す6菌株(KS-33, BF-4, BF-5, QSI-1, QSI-2, QSI-3)を取得できた(上図(b))。<1次スクリーニング>

次に、上記6菌株について、①菌液、②培養液上清、③酢酸エチル抽出物が *P. aeruginosa* NBRC 12689のBF形成に及ぼす影響を調査しました(下図)。その結果、菌液(共培養)あるいは上清の添加により、NBRC 12689株のBF形成を減少させる4菌株(BF-5, QSI-1, QSI-2, QSI-3)の選抜に成功しました。<2次スクリーニング>

以上のことから、QS阻害菌やBF阻害菌の分離に共培養を利用することで、標的菌株に対するBF抑制物質生産菌を効率よく取得できることが示唆されました。

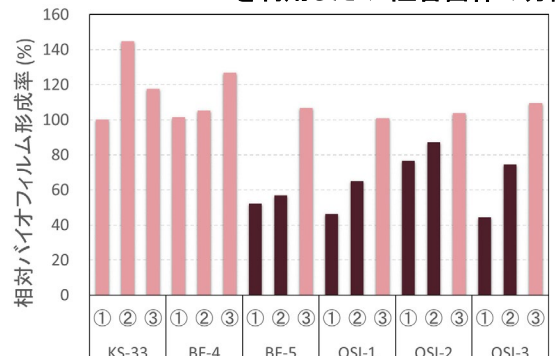
将来への技術展開

本評価技術により獲得したBF阻害菌株は、生菌剤やBF抑制物質の安価な供給源としての利用が期待できます。



(a) QSにおいて各細菌は、自己誘導因子(AI)を介して周囲の菌密度を感じ、それに応じてBFや病原因子の生産など特定の表現型を発現する。(b) 紫色素生産菌NBRC 12614株を702寒天培地に1%接種で混釈しプレートを作製した。形成したウェルに試験菌液を分注し、27°Cで1日培養した。

C. violaceum NBRC 12614を利用したQS阻害菌株の分離



QS阻害株(KS-33, BF-4, BF-5, QSI-1, QSI-2, QSI-3)の①菌液、②培養液上清、③酢酸エチル抽出物を用いて、以下の条件で相対BF形成率(NBRC 12689株単独で形成したBF量を100とした)を調査した。
 ① NBRC 12689と各菌株の共培養(各菌株の初発OD_{660nm}=0.1)
 ② QS阻害株の培養液上清を等量で混合した培地にて培養
 ③ 抽出物を上清中と等濃度で分散させた培地にて培養
 いずれの場合においてもBFは、27°Cに24時間静置して形成させた。バイオフィーム形成量はクリスタルバイオレット染色法により定量した。
QS阻害分離株が*P. aeruginosa* NBRC 12689のBF形成に及ぼす影響

大阪産業技術研究所

生物・生活材料研究部(森之宮センター)

田中 重光、永尾 寿浩

連絡先：脂質工学研究室 s-tanaka@omtri.or.jp

