

山口大学グリーン社会推進研究会 バイオ・リサイクル部会第1回セミナー

バイオフィルムの除去と制御

山口大学 大学研究推進機構
先進科学・イノベーション研究センター
中高温微生物研究センター

阿座上 弘行

病原微生物が動植物に感染するためには、宿主の表面に付着し、そこで**定着**しなければならない。微生物は宿主の防御機構に打ち勝って付着するための付着因子を有している。また、微生物は環境中でお互いに**コミュニケーション**しながら**バイオフィルム**と呼ばれる複合コミュニティを形成し、定着する。

私たちの研究室では、歯周病菌をモデルとして病原微生物の付着と定着に関する研究を行ってきた。

研究内容:

病原微生物の付着と定着のメカニズムの解明

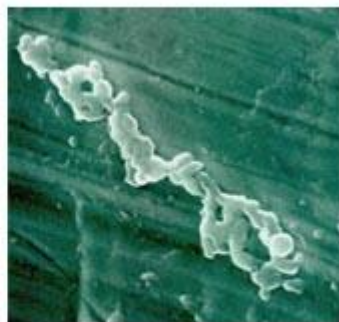
微生物の付着・定着を抑制する成分の検索と応用

微生物間のコミュニケーションとその応用

バイオフィルムって聞いたことがありますか？

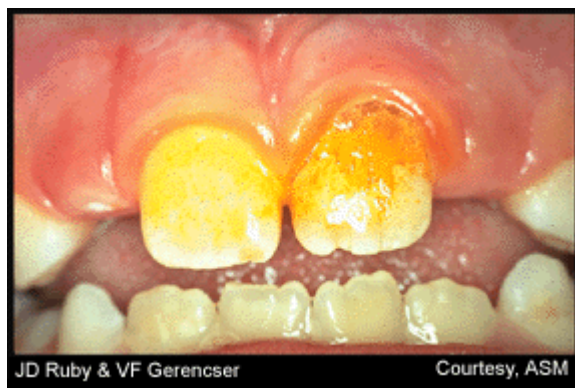


こんなところにもバイオフィルムが



Intrauterine Device (IUD) colonized by biofilm bacteria. IUDs have resulted in chronic infections and pelvic inflammatory disease.

医療用インプラント



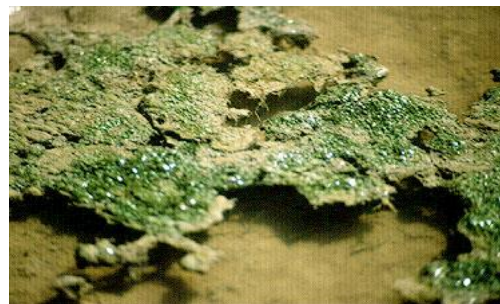
JD Ruby & VF Gerencser

Courtesy, ASM

デンタルプラーク



工業用パイプラインの詰まり



水辺の

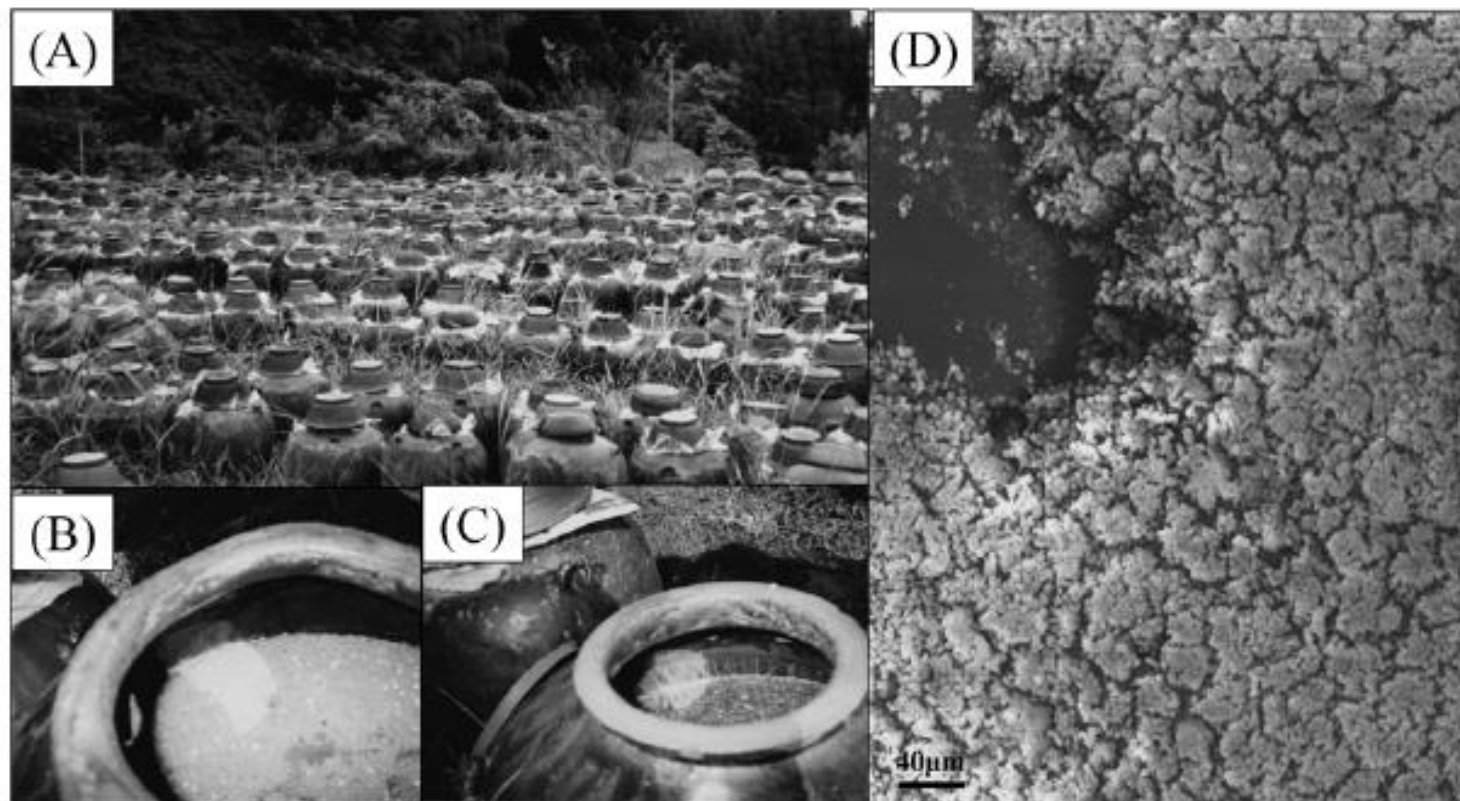


図 1 福山酢の醸造風景と発酵プロセス，及び複合バイオフィルム

A：発酵風景， B：発酵初期（表面には振り麴がある）， C：発酵中期（振り麴が沈み，酢酸菌膜が形成）， D：福山酢分離乳酸菌と酵母菌による複合バイオフィルムのSEM写真.

（古川壮一：日本農芸化学会受賞講演要旨集2014年度、31ページ）

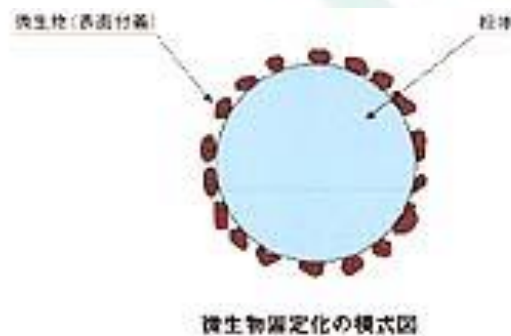
伝統的醱酵生産ではバイオフィルムは重要



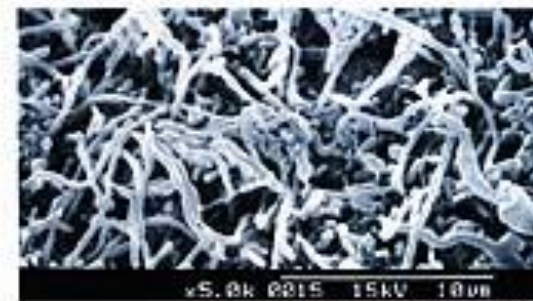
下水処理場

水処理における活性汚泥

これらの分野でもバイオフィルムは重要
効率化のため、うまく制御してやる必要

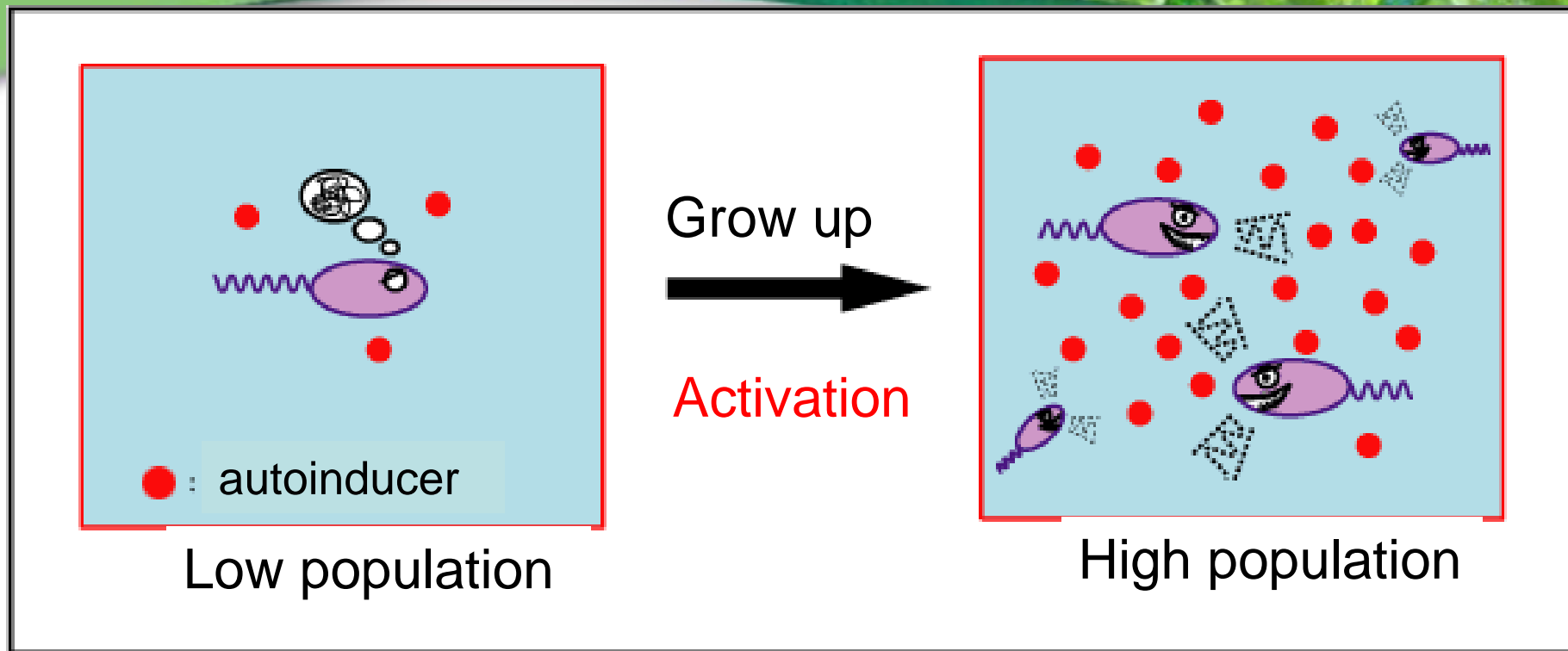


バイオフィルムの担体



担体表面の付着微生物の電子顕微鏡写真

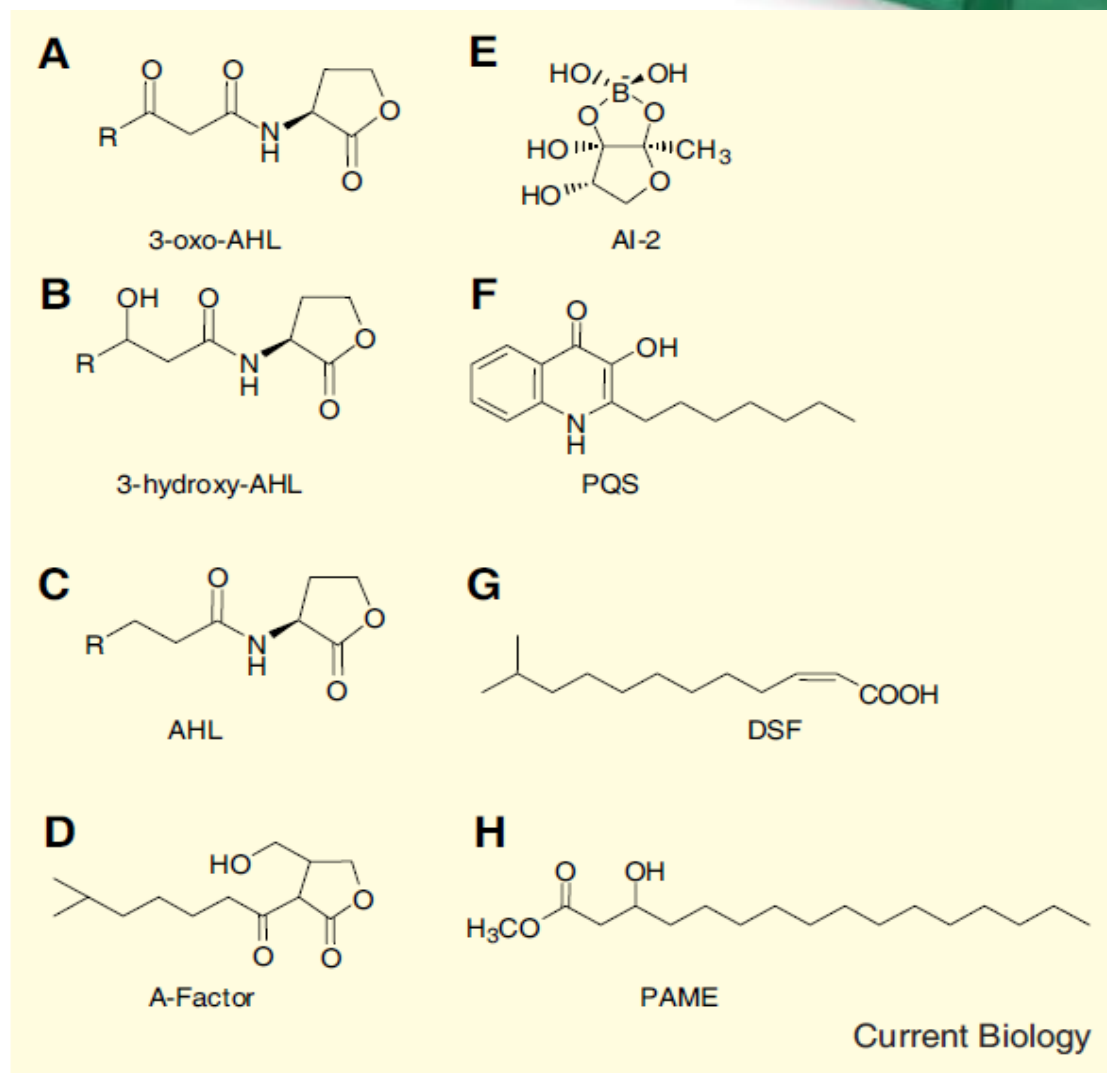
担体に固定化された微生物



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

仲間が少ないときには、バクテリアはおとなくしている。仲間が集まると一気に集団で悪さを始める。

Autoinducers



B.L. Bassler, Cell 421-424 (2002)

当研究室では

バイオフィルムの代表例として

口腔内のデンタルプラークを

モデル微生物として

歯周病菌を使って研究

バイオフィルムの制御・抑制法

(Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozman USA 引用改変)

液相のフロー

浮遊細菌

細胞の分裂・増殖
バイオフィルムの成長期

付着細菌

フィルムの剥離・遊離の促進

多剤併用, 薬剤浸透性の促進

細菌間のシグナル伝達
(クオラムセンシング) 阻害剤

凝集・マトリックス産生阻害剤

付着を抑制するコーティング剤

クオラムセンシングをターゲットとした バイオフィルム阻害剤の開発

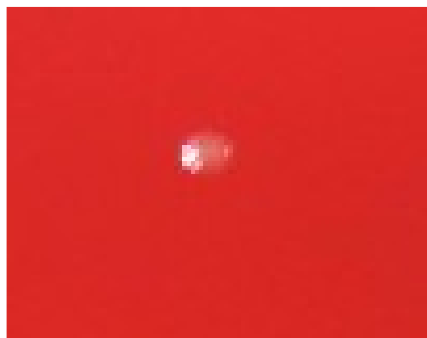
1、食品成分(茶カテキンやキノコ抽出物)、微生物生産物
によるバイオフィルムの阻害

Eikenella corrodens

歯周病患者の病変部から頻繁に分離

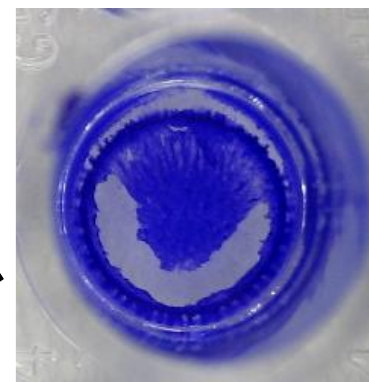
無菌ラットへの単一感染により、重度の歯周病を惹起

アテローム硬化症や心内膜炎、髄膜炎などの全身疾患に関与する病原菌

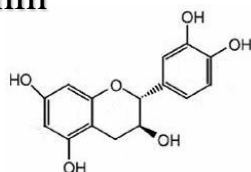


E. corrodens の中でも病原性の強い1073株

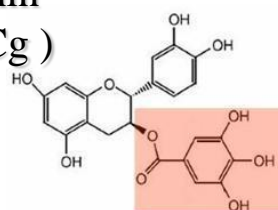
ポリスチレン表面に形成した*E. corrodens* のバイオフィルム
(Azakami et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(2), 441-446, 2006)



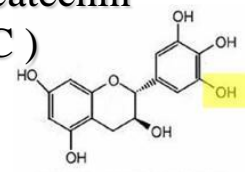
(+)-Catechin
(C)



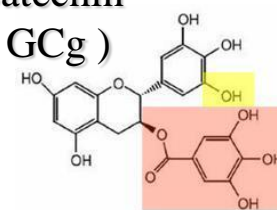
(-)-Catechin
gallate (Cg)



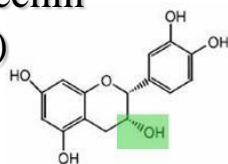
(-)-Gallocatechin
(GC)



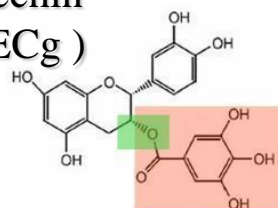
(-)-Gallocatechin
gallate (GCg)



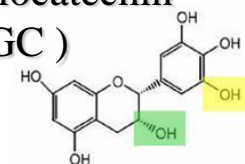
(-)-Epicatechin
(EC)



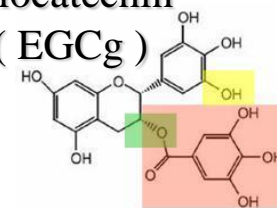
(-)-Epicatechin
gallate (ECg)



(-)-Epigallocatechin
(EGC)

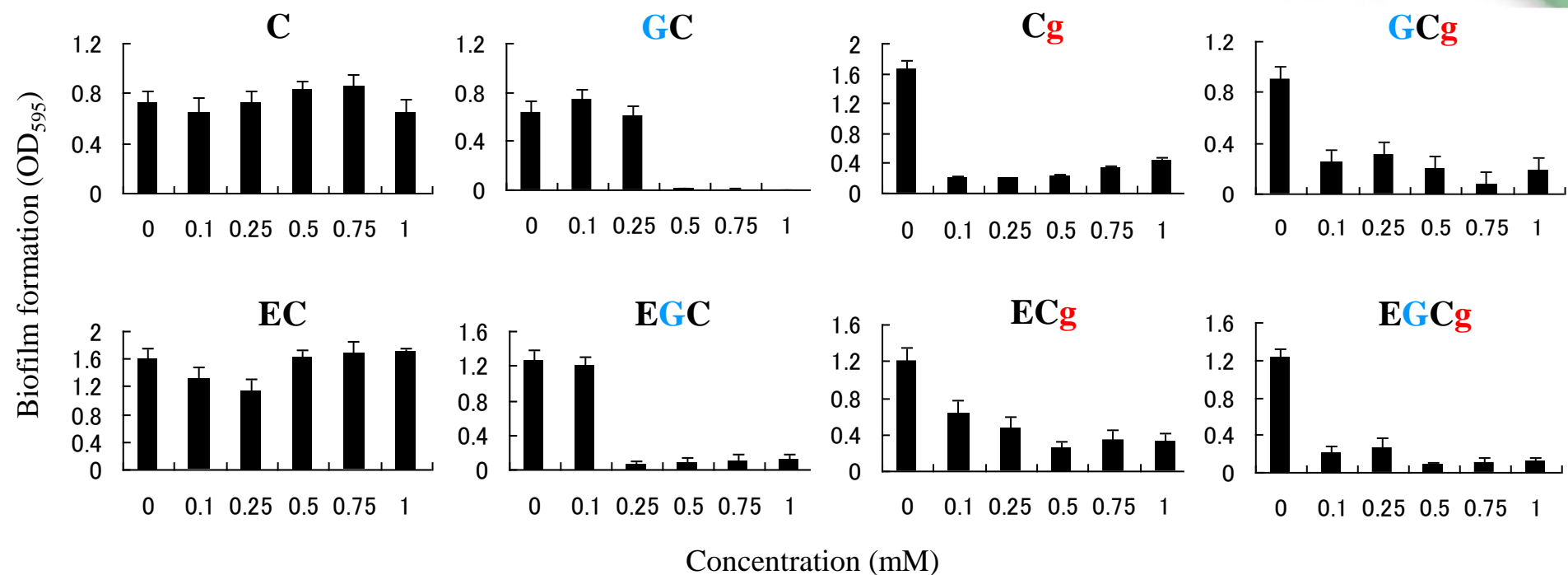


(-)-Epigallocatechin
gallate (EGCg)



本研究で用いたカテキン類の構造

カテキン類のバイオフィルム阻害効果

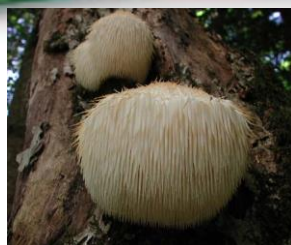


MIC(最小生育阻害濃度)以下の濃度でバイオフィルムを抑制

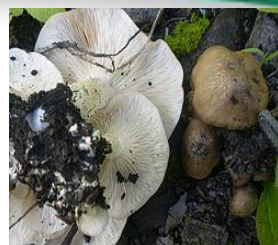
バイオフィルム形成抑制効果が見られたキノコ



シイタケ



ヤマブシタケ



シメジ



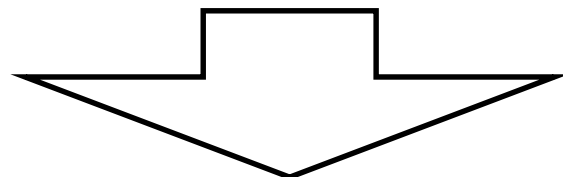
エノキ



たもぎたけ



ナラタケ



水抽出物

シイタケ



ヤマブシタケ



エノキ

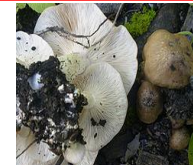


メタノール抽出物

シイタケ



シメジ



エノキ



Conclusion 1

ある種の構造をもつカテキン類が最小生育阻害濃度以下の濃度において *E. corrodens* のバイオフィルムを抑制。

その阻害にはクオラムセンシングが関与？

その他、きのこに含まれるタンパク質や低分子化合物がバイオフィルムを抑制

大豆に含まれるイソフラボンやその類似化合物によってもバイオフィルムを抑制

植物内生放線菌の培養上清からの バイオフィルム阻害物質のスクリーニング



カヤツリグサ (*Cyperus microiria* Steud.)

Strains name	Percentage of Actinomycetes supernatant	
	10%	4%
34-128	+++ (62%)	++ (40%)
14-51	+++ (55%)	+++ (55%)
25-2a	+++ 60%	+++ 50%
48-(A)4	+++ 68%	+++ 68
17-56	+++ 97%	-
17-58	+++ 89%	-
35-2a	+++ 56%	+ (19%)
35-2b	+++ 58%	+ (22%)
35-3b	+++ 67%	+ (29%)
35-3c	+++ 56%	+++ (72%)
73-188	+++ 80%	+++ 82.5%
78-184	+++ 75%	+++ 82%
78-185	+++ 78%	+++ 64%
98-183	+++ 63%	++ 30%
18-2-2-1	+++ 93.63%	-
88-206	+++ 82%	-

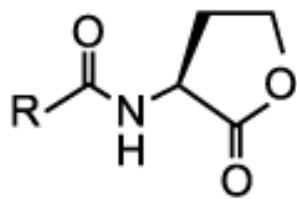
南極大陸から分離した微生物の培養上清からの バイオフィルム阻害物質のスクリーニング

クオラムセンシングをターゲットとした バイオフィルム阻害剤の開発

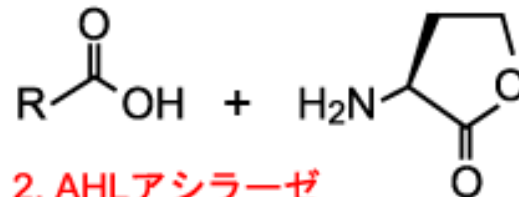
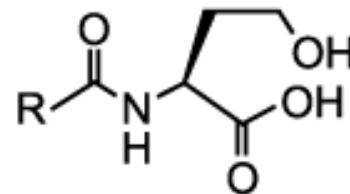
2、クオラムクエンチングによるバイオフィルムの阻害

クオラムクエンチング

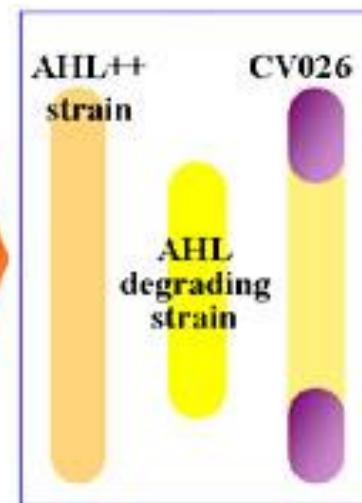
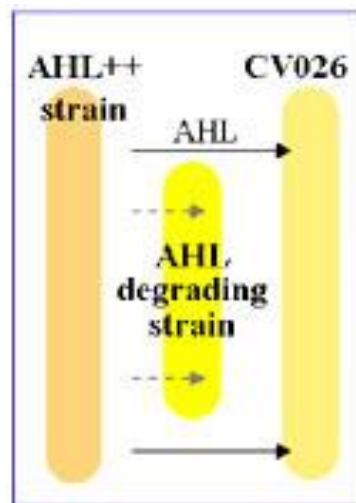
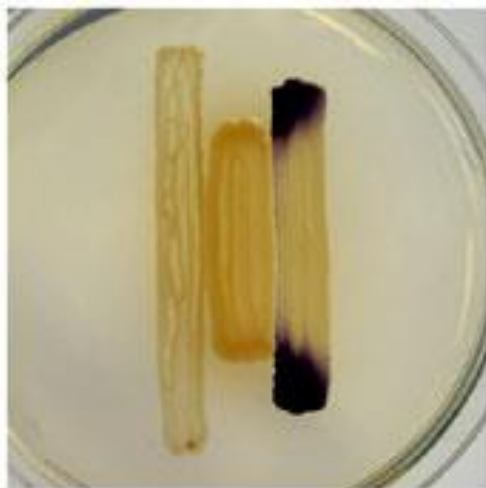
アシルホモセリンラクトン



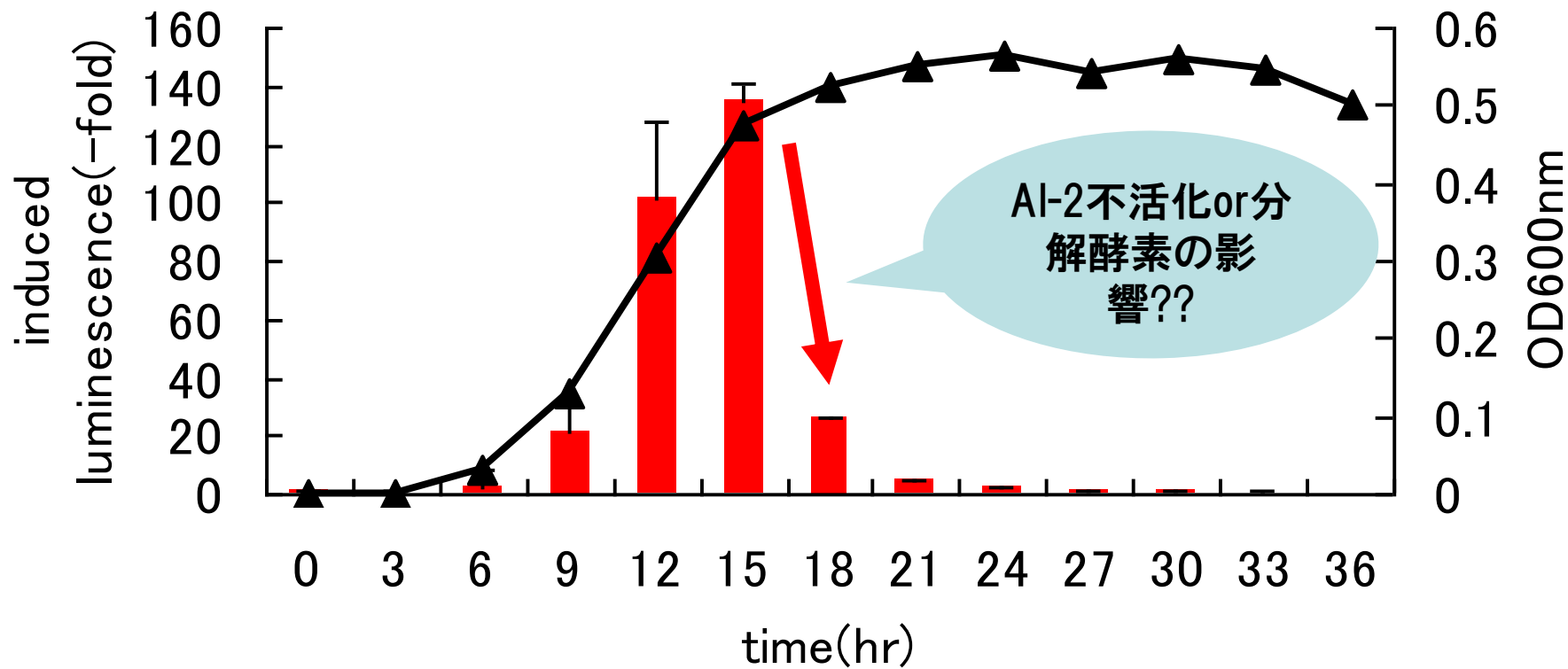
1. AHLラクトナーゼ



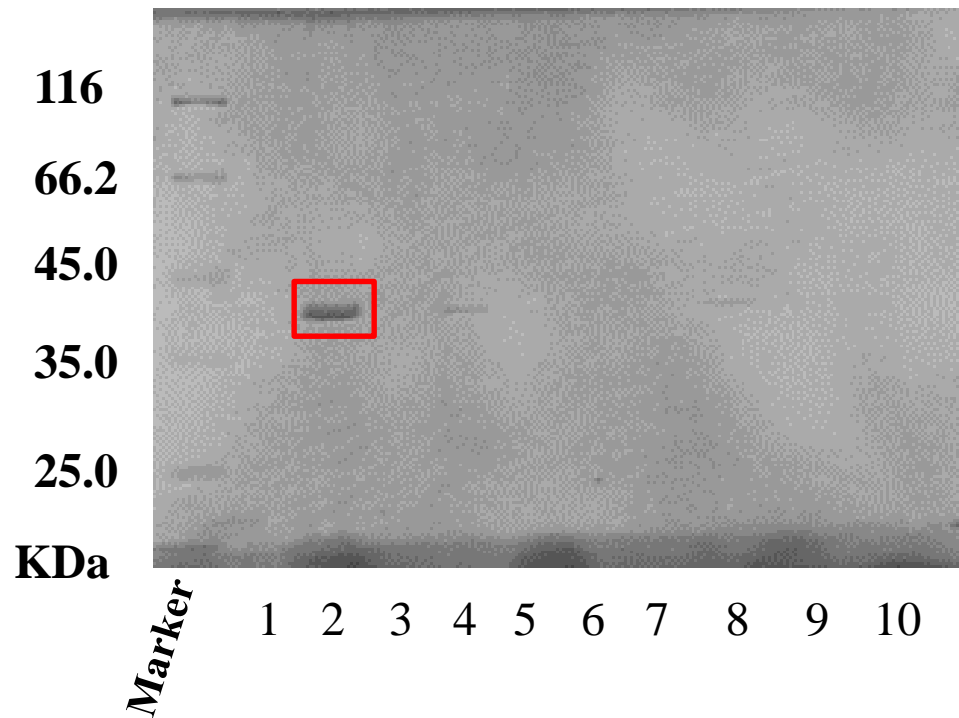
2. AHLアシラーゼ



■ AI-2 production ▲ Growth 1073



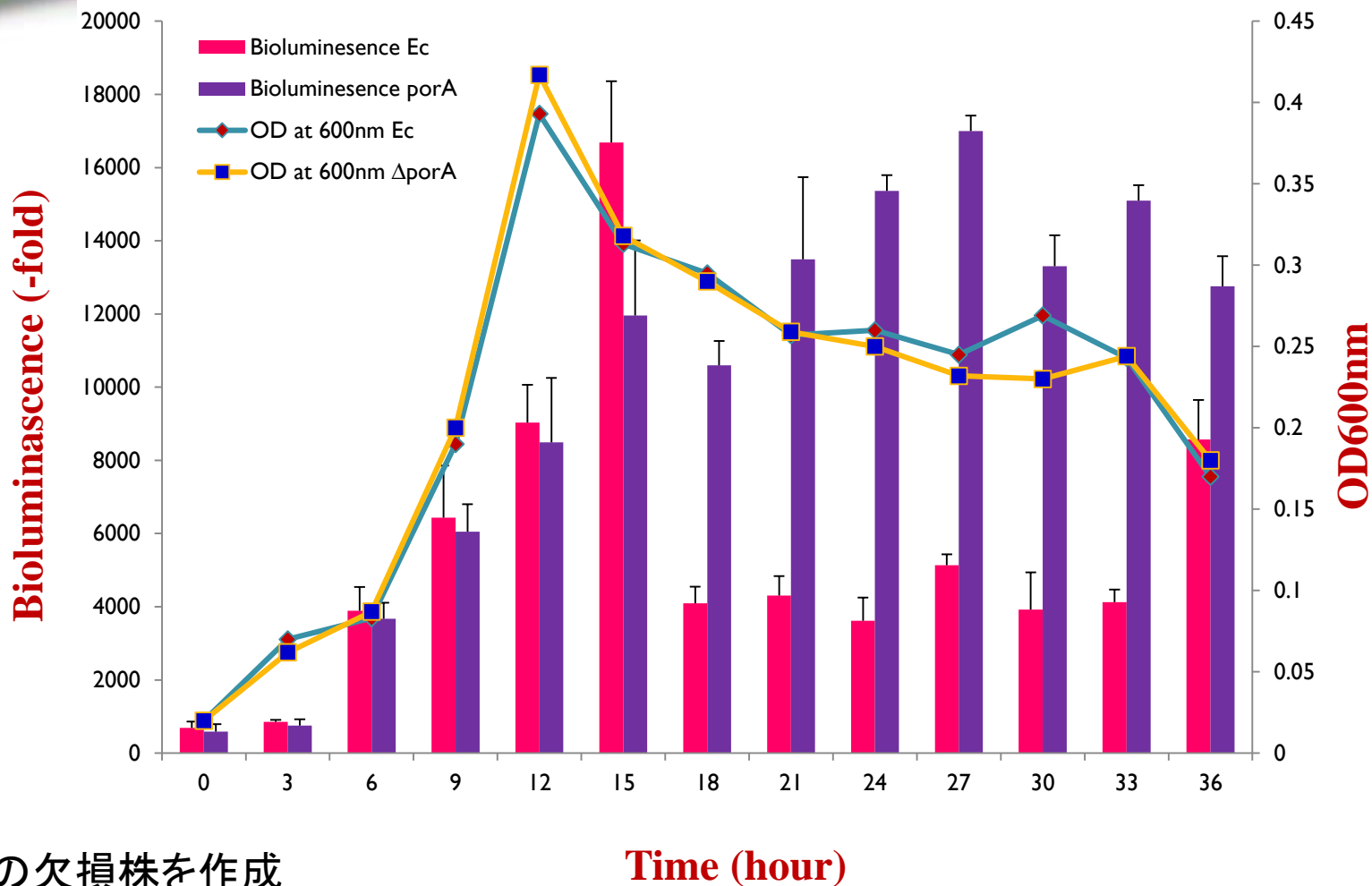
10% SDS-PAGE



AI-2を不活化する約40kDaのタンパク質が精製できた

SDS-PAGE of each fraction after Q-Sepharose Chromatography

精製されたタンパク質のN末端アミノ酸配列を解析したところ、このタンパク質は外膜ポーリンであることがわかった。



ポーリンの欠損株を作成

AI-2 production and growth curve at different time interval

欠損株では定常期におけるAI-2の不活化が見られなかった。
→ポーリンがAI-2の不活化に関与

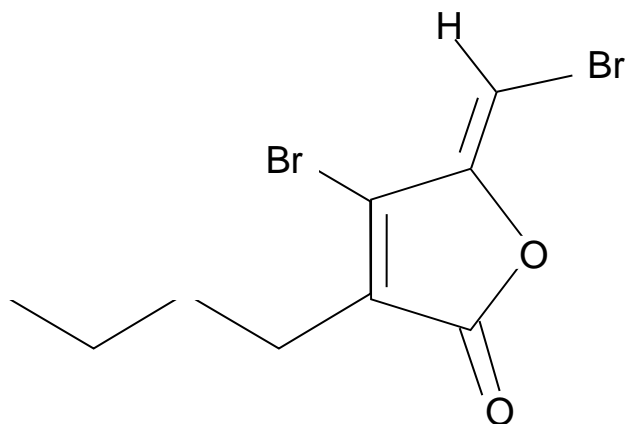
クオラムセンシングをターゲットとした バイオフィルム阻害剤の開発

3、オートインデューサーのアンタゴニストによるバイオフィルムの阻害

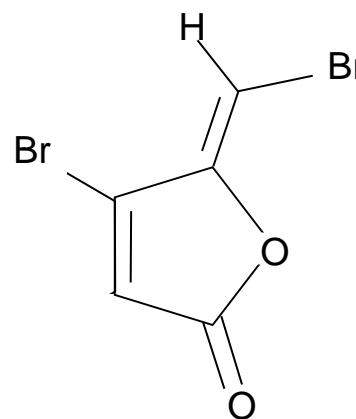


Delisea pulchra

(A) 紅藻類の1種が産生



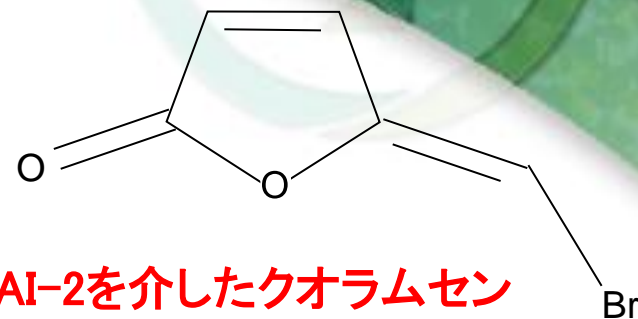
(B)



AHLのアンタゴニストとしてバイオフィルムを抑制

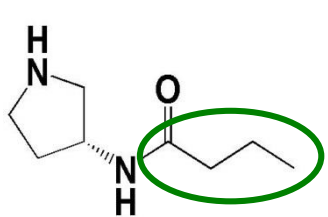
(A) 4-Bromo-5-bromomethylene-3-butyl-5H-furan-2-one、(C) (Z)-5-bromomethylene-2(5H)-furanone
 (B) 4-Bromo-5-bromomethylene-5H-furan-2-one

(C)

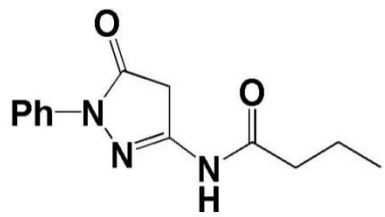


AI-2を介したクオラムセンシングを阻害

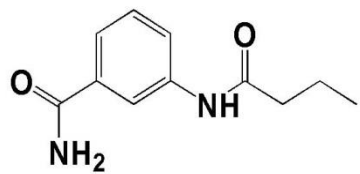
各種のN-acyl HSL類似化合物



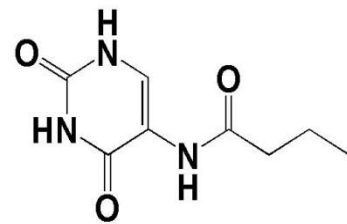
No. 1



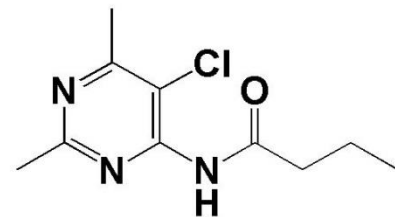
No. 2



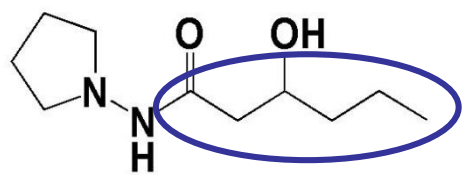
No. 3



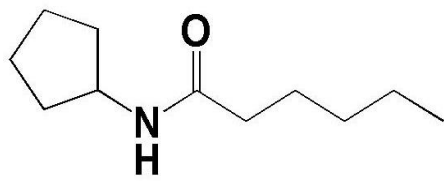
No. 4



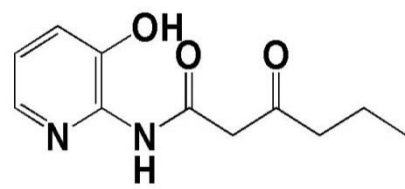
No. 5



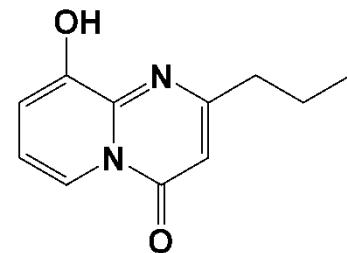
No. 6



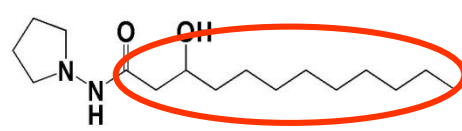
No. 7



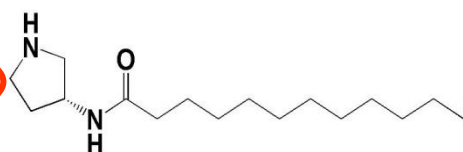
No. 8



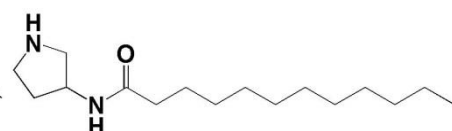
No. 9



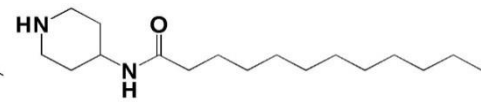
No. 10



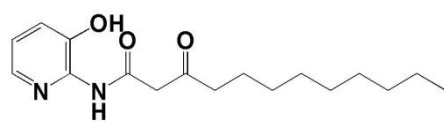
No. 11



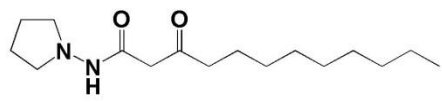
No. 12



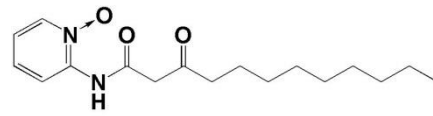
No. 13



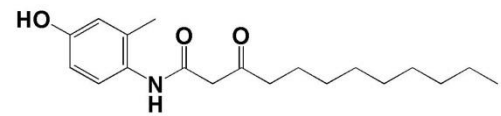
No. 14



No. 15

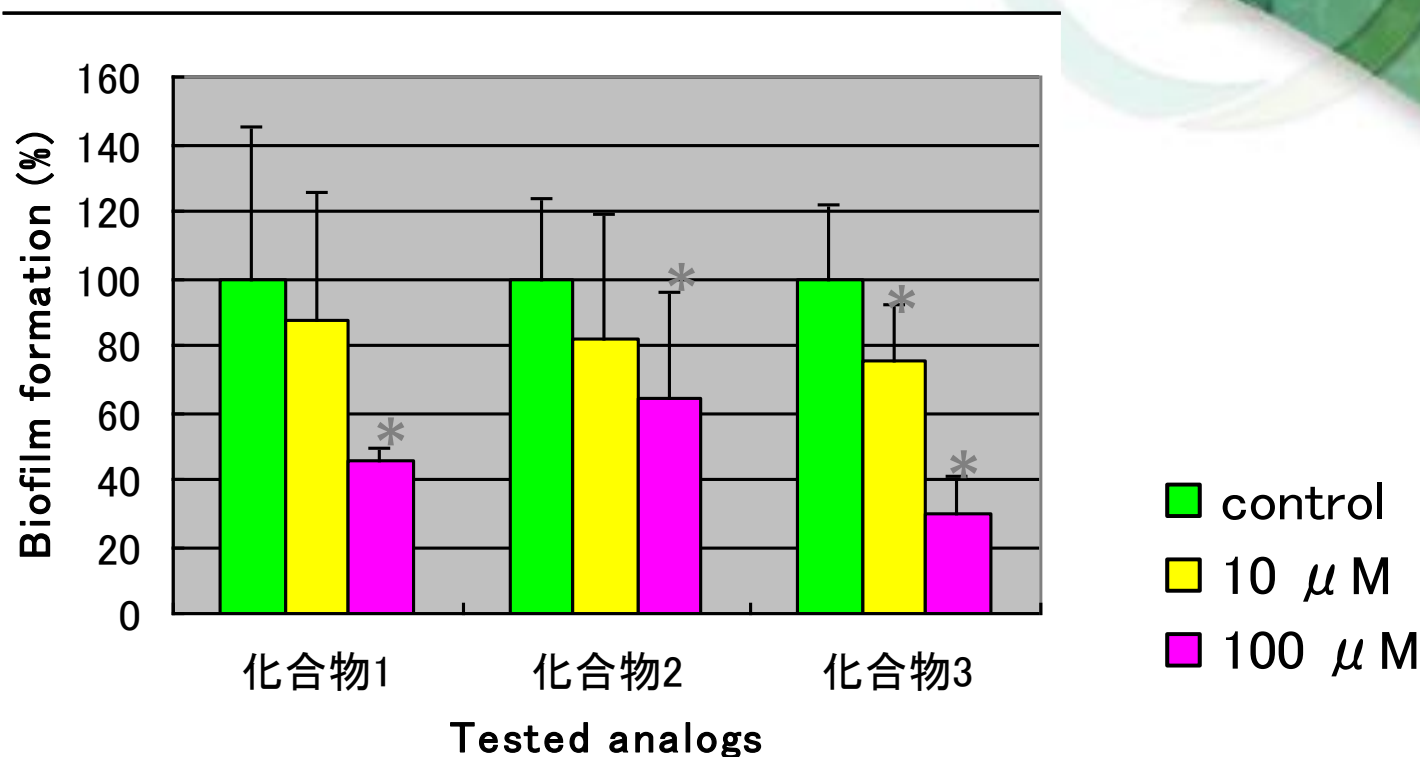


No. 16



No. 17

*P. gingivalis*のバイオフィルム形成において3種のAHL類似化合物がバイオフィルム形成量を抑制



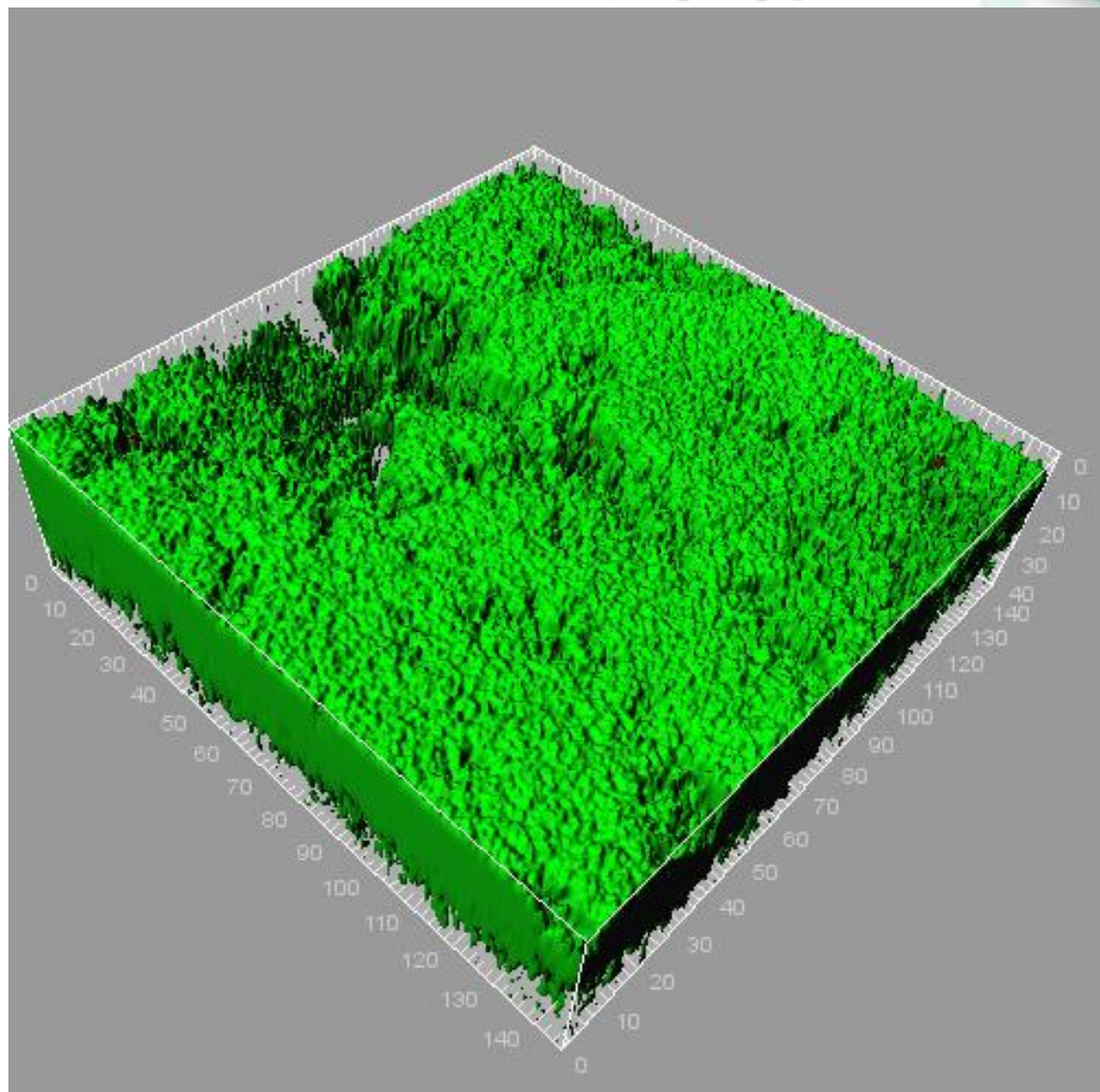
(* P < 0.05)

20種類のAHL類似化合物を供試

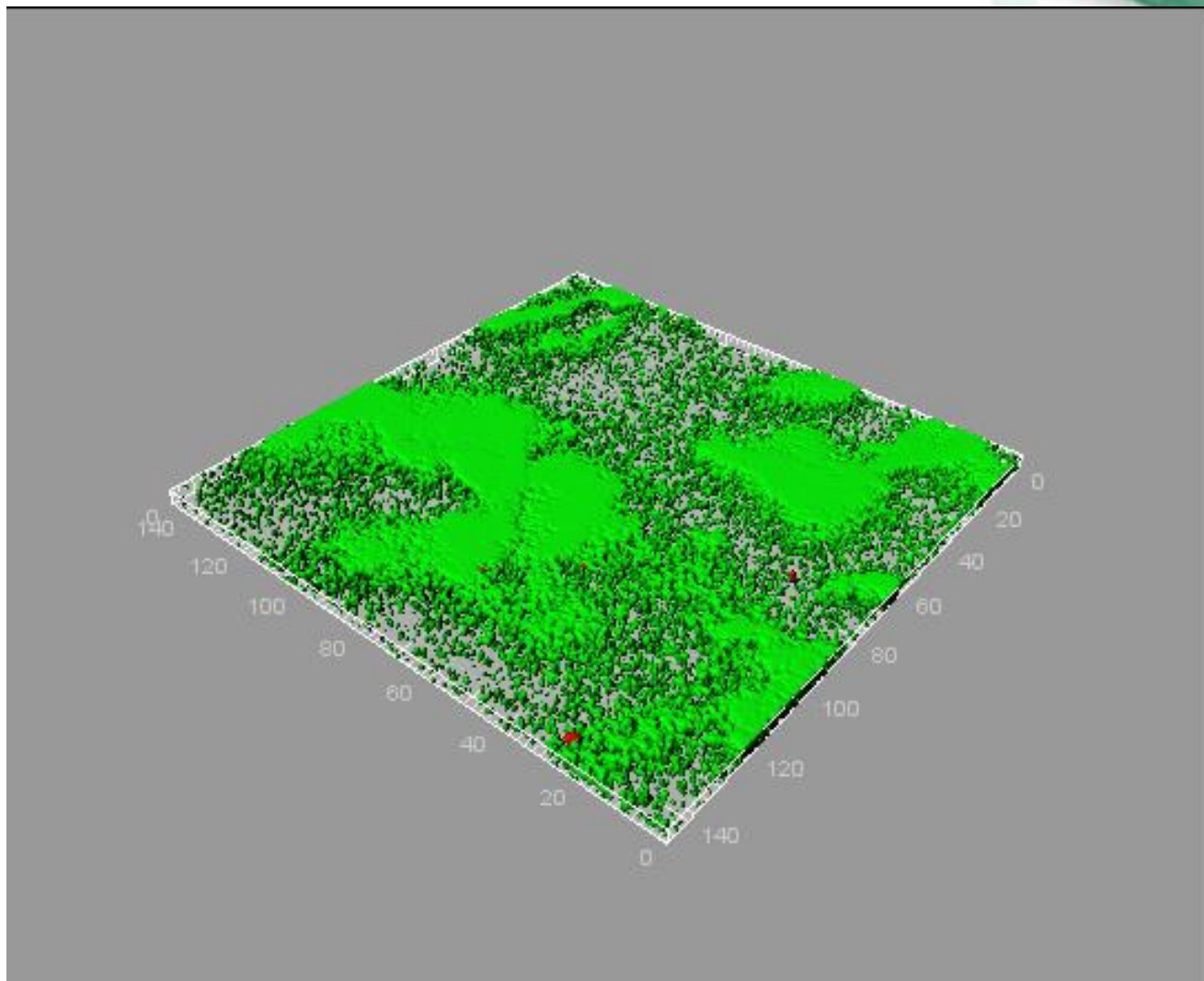
→ 3種のAHL類似化合物においてバイオフィルム形成が抑制された

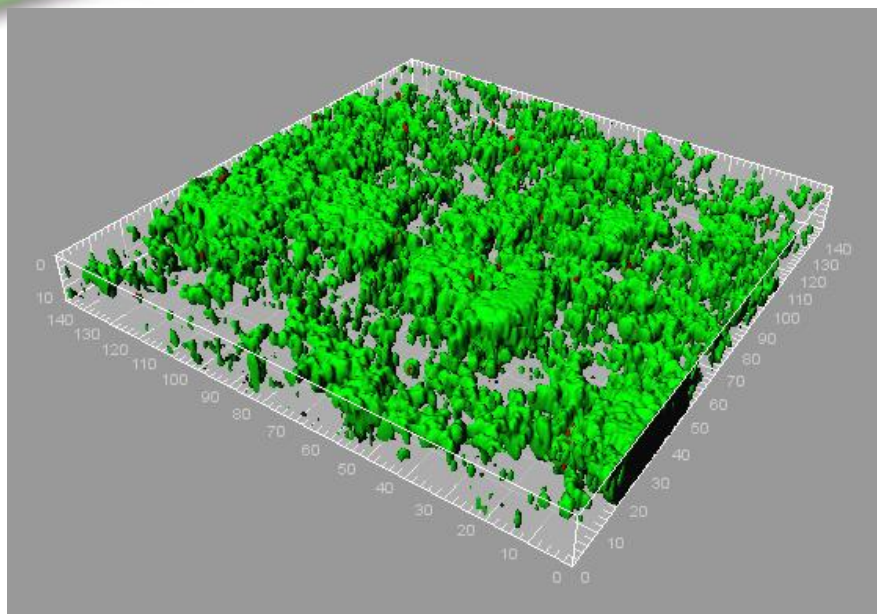
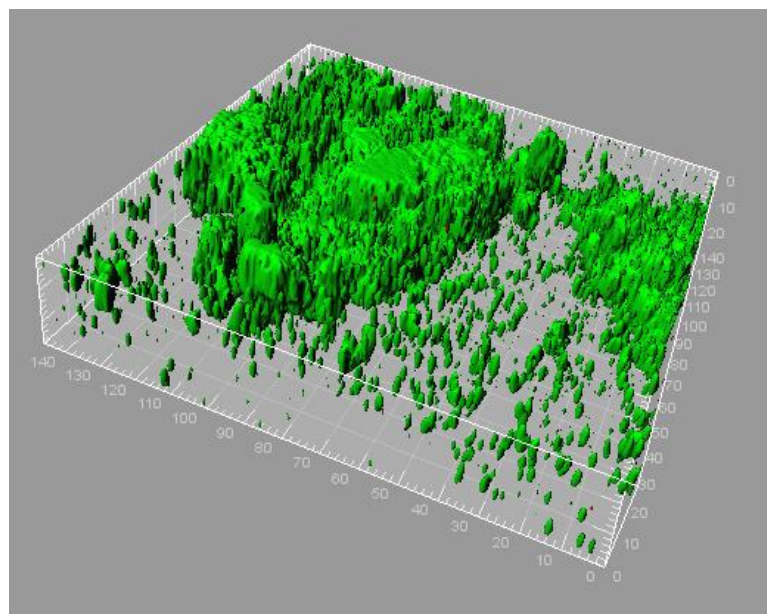
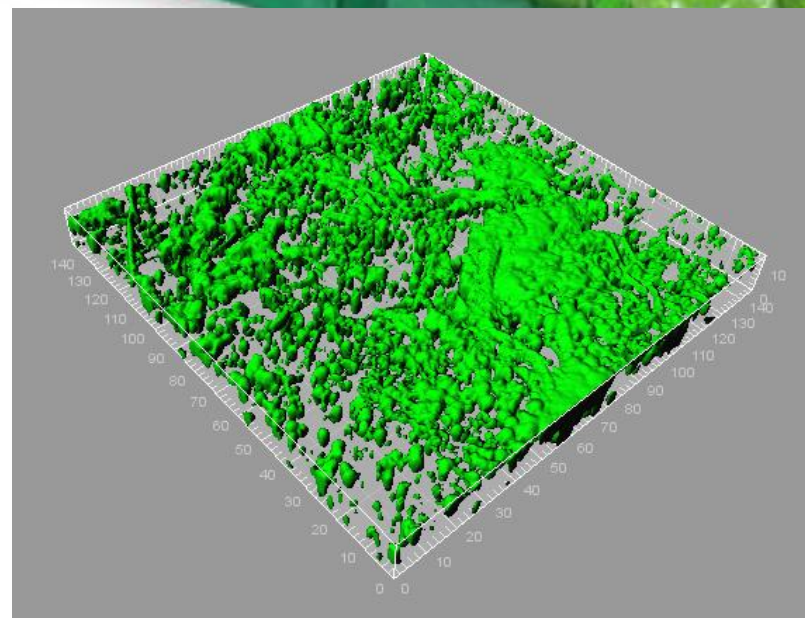
バイオフィルム内の細菌の生死および立体構造 に及ぼす影響

Control



化合物10(100 μ M)



化合物1 (100 μM)化合物6 (100 μM)化合物10
(10 μM)

バイオフィルムの各段階を物理的、化学的に制御

微生物の除去

感染制御 病気の予防・治療

農作物の管理

醗酵生産の効率化・多機能化
バイオリアクターへの応用

水処理の効率化
バイオレメディエーション技術への応用



発見し・はぐくみ・かたちにする 知の広場

