

緑膿菌バイオフィルムを抑制または促進物質の探索

B(生命・人間・ロボティクス)研究部門 ⑫安全・安心に資する科学技術

俣木歩実*1、松村吉信*2

(*1院生) (*2化学生命工学部 生命・生物工学科 教授)

研究概要・成果

概要

バイオフィルム(BF)は、多種多様な細菌が高密度で生息している集団である。BFの構成成分はほとんどが水ではあるが、他には、タンパク質や脂質、糖などの多様な高分子基質が含まれている。そのため、BFは固体表面への強力な付着や、薬剤耐性の上昇といった個々の細菌の単なる足し算を超えた特徴を示し、殺菌・除去が困難となっている。BF形成過程を観察すると、物体への付着やBFの脱離に関与する細胞の運動性やバイオフィルム生産等が細胞の機能として重要であると報告されている。これまで、当研究室で自然環境から単離・保存している様々な微生物を用いて、単一菌株培養系および二菌株混合培養系で形成するBF形成能を比較し、BF形成を抑制または促進する組み合わせを探索した。その結果、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1株のBF形成を促進および抑制する培養液として、それぞれ、B24株およびA13株培養の上清が確認された。本研究では、A13株およびB24株のBF形成の促進および抑制に関わる要因物質の探索を行った。その結果、要因物質は熱耐性し、PAO1の運動性を変化させることが明らかとなった。

方法

培養条件: TSB培地37°C、120 rpm BF形成: 37°C、静置

BFの定量: クリスタルバイオレット染色法を用いてA_{570nm}値で評価

培養上清の回収: 遠心分離(4,000rpm, 10min)後、0.20 μmのフィルターでろ過

成果

1. PAO1株のBF形成に影響を及ぼす因子の生産量調査

A13株およびB24株を1~24時間培養した後、上清を回収してPAO1培養液に添加し、BF形成量増加率を比較した(図1)。

BF増加率(%) = PAO1にA13, B24の上清を加えた培養液A₅₇₀ /

{(PAO1単一培養でのA₅₇₀ + A13, B24上清のA₅₇₀) / 2} × 100 - 100

A13株は12時間培養上清においてBF形成抑制、B24株は2時間培養上清においてBF形成促進に最も作用した。

2. A13株およびB24株培養上清中のBF形成抑制・促進要因物質の耐熱性試験

A13株およびB24株の培養上清を100°C、30分間加熱し、PAO1培養液に添加し、0.5, 1.0, 2.0時間におけるBF形成量を未加熱の上清と比較した(図2)。A13, B24株ともに加熱の有無はBF形成に大きな変化はなかった。

⇒要因物質は熱に耐性を持ち、比較的低分子であると考えられる。

3. A13, B24株培養上清を添加したPAO1運動性の変化

固形物への付着やBFの成熟化や脱離には鞭毛や線毛を用いた運動性が関与している。液体中の運動性Swimming、半固体表面上の運動性Swarming、固体表面上での運動性Twitchingを評価し、A13, B24株培養上清を添加したPAO1株細胞の運動性の変化を調査した。

各寒天プレートの中にPAO1株培養液(A₆₀₀=0.3)を爪楊枝で植菌し、培養2日後の様子を観察した(図3)。

使用培地: 培養液上清添加TSB寒天培地(培養液上清を20%添加)

Swimming測定: 0.3%, Swarming測定: 0.5%, Twitching測定: 1.0%寒天

培養条件: 30°C、2日間

A13株およびB24株で0.5%寒天培地において運動性が向上した。

⇒Swarmingに関する鞭毛やバイオフィルム生産量が変化した可能性が高い。

今後の方針

要因物質の単離・精製と構造決定

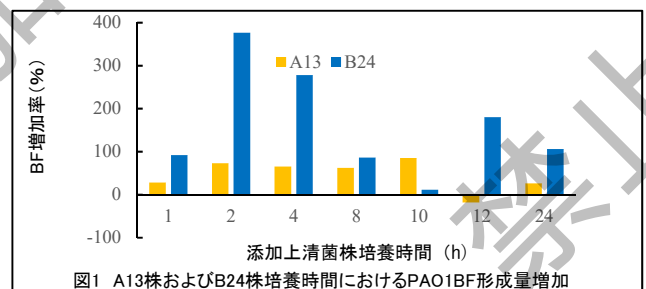


図1 A13株およびB24株培養時間におけるPAO1BF形成量増加

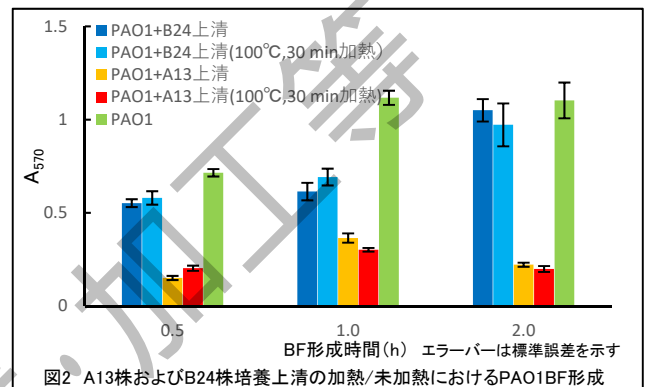


図2 A13株およびB24株培養上清の加熱/未加熱におけるPAO1BF形成

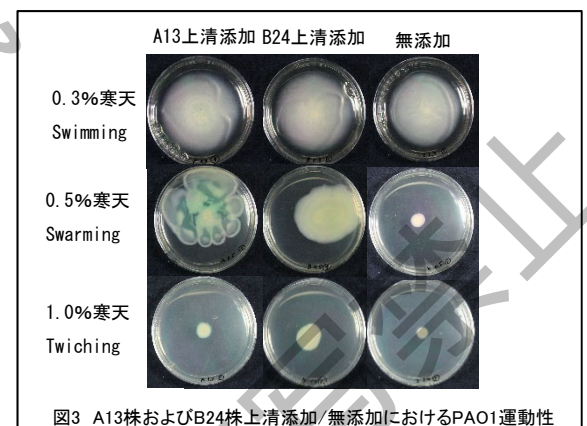


図3 A13株およびB24株上清添加/無添加におけるPAO1運動性

応用分野、実用化可能分野

食品工場、医療現場におけるBF除去法の構築

問合せ先: 関西大学 化学生命工学部 松村吉信 E-mail: ymatsu@kansai-u.ac.jp

関大ORDIST

先端科学技術推進機構

社会連携部 産学官連携センター、知財センター、イノベーション創生センター