



食品関連微生物が形成するバイオフィルムの制御と利用に関する研究

日本大学生物資源科学部食品生命学科 食品微生物学研究室 古川 壮一

はじめに

バイオフィルムとは、固液や気液界面に形成されるフィルム状の微生物集落を指す。バイオフィルムは、液体培地中の浮遊細胞や固体培地上のコロニーとは異なる第三のライフスタイルであり、その形成メカニズムや性質などについては未解明の点が多い。また、バイオフィルムは多くの産業における微生物汚染源として広く知られ、特にその薬剤耐性や洗浄・殺菌耐性の高さが問題視されてきた。しかし、バイオフィルム形成能は多くの微生物が普遍的に有しており、人間生活に寄与してきた側面もあると考えられる。

我々は、これまでに有害バイオフィルムの制御と、伝統発酵食品中の有用微生物が形成するバイオフィルムの利用という二つの視点から、特に複数菌種の共培養系において形成される複合バイオフィルムを中心に研究を展開してきた。現在までに新規なバイオフィルム形成阻害因子や二菌種の共培養系で形成される特異な複合バイオフィルムを見出し、バイオフィルムの制御法や利用法について産業応用可能な知見を報告してきた。ここでは、それらについて簡単に述べたい。

① 有害微生物の複合バイオフィルム形成とその制御

まず、バイオフィルム形成制御を目的に研究を行った。多数の病原菌を含む38種類の微生物(36種の細菌と2種の酵母菌)を用いて二菌種複合培養系におけるバイオフィルム形成を検討した結果、複合培養時に有害細菌のバイオフィルム形成を抑制する細菌を複数見出し、微生物間相互作用を利用してバイオフィルム形成を制御可能なことを示した。次に、16種類の口腔内微生物を用いた二菌種複合培養系でう触原因菌(*Streptococcus mutans*)のバイオフィルム形成を阻害する微生物をスクリーニングした。その結果、*S. salivarius*が*S. mutans*のバイオフィルム形成を阻害し、その阻害因子が*S. salivarius*が産生するフルクタンナーゼであることを明らかにすることができた。

上記の結果は大変興味深いものではあったが、これらの微生物を食品分野のバイオフィルム制御に応用することは困難を伴うと予想された。そこで次に、食品添加物(約30種)及び香辛料(約60種)によるバイオフィルム形成制御を検討した。なお、天然の多くのバイオフィルムは複数種の微生物で形成されていると考えられるが、ここでは系を単純化するために単独培養系で実験を行った。その結果、乳化剤であるショ糖脂肪酸エステルや香辛料の中に、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌やリステリア菌のバイオフィルム形成に対して強力な阻害活性を有するものがあることを明らかにすることができた。

② 有用微生物の複合バイオフィルム形成とその利用

②-1 酵母菌と乳酸菌の複合バイオフィルム形成

我々は、上記の38種類の微生物を用いた複合バイオフィルム形成実験の過程で、酵母菌と乳酸菌の複合培養系でバイオ

フィルム形成が増加する組み合わせがあることを見出した。その後、十数種類の酵母菌と乳酸菌の複合培養系におけるバイオフィルム形成について検討した結果、幾つかの組み合わせでバイオフィルム形成が増加することを見出すことができた。このような酵母菌と乳酸菌の相互作用はそれまで知られておらず、世界初の知見であった。

酵母菌と乳酸菌の共存は多くの伝統的発酵で見出される。そこで、上記のような酵母菌と乳酸菌の複合培養時におけるバイオフィルム形成が、実際の伝統的発酵においても見出すことができるのか否かを検討することとした。その結果、鹿児島県で約200年に亘り製造されている福山酢の製造工程より分離した酵母菌と乳酸菌の中から、共培養時に顕著な複合バイオフィルムを形成する出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Y11-43)と乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* ML11-11)の組み合わせを見出すことができた(図1)。福山酢は、壺に原料を仕込んだ後、人工的管理を行うことなく数カ月間静置するという特徴的なプロセスで製造される(図1)。我々はその発酵過程での菌叢や各成分の変遷について解析する過程で、もろみより上記菌株を分離した。なお、福山酢もろみサンプルは合資会社伊達醸造様よりご提供いただいた。

上記の乳酸菌ML11-11と出芽酵母が形成する複合バイオフィルムの微細構造を電子顕微鏡やFISHにより観察すると、基底部に主として乳酸菌が存在し、その上に乳酸菌と酵母菌が集積して、分厚い構造体を形成していることが明らかとなった(図2)。さらに、ML11-11は出芽酵母と顕著な共凝集を起こし、その共凝集は乳酸菌表層のレクチン様タンパク質と酵母表層のマナン糖鎖を介して行われることが示された。その結果、本複合バイオフィルム形成には、乳酸菌と酵母菌の共凝集が重要な役割を果たしていることが明らかになった。なお、乳酸菌表層の接着因子は現在同定中であるが、それはマンナンを

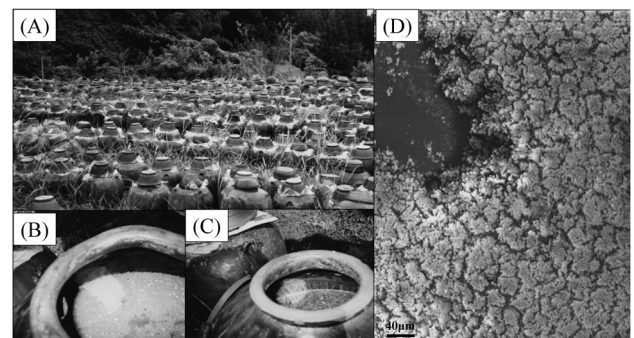


図1 福山酢の醸造風景と発酵プロセス、及び複合バイオフィルム

A: 発酵風景, B: 発酵初期(表面には振り麹がある), C: 発酵中期(振り麹が沈み、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。

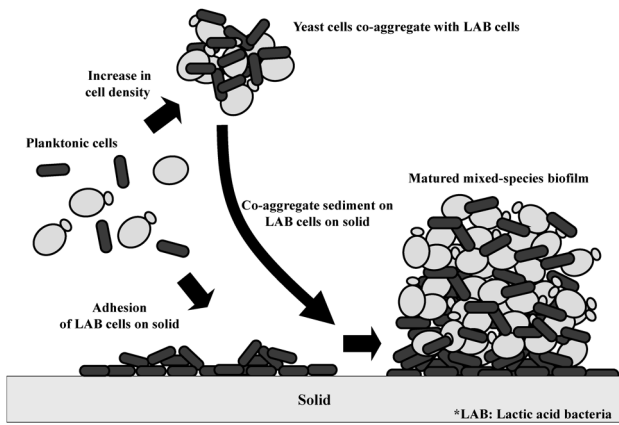


図2 福山酢分離酵母菌と乳酸菌の複合バイオフィーム形成

認識するタンパクで、マンナン糖鎖の側鎖部分を認識して結合することを強く示唆する結果を得ている。これらのことから、上記の酵母菌と乳酸菌は細胞表層の分子同士で相手を認識しながら凝集・増殖し、その結果として分厚く強固な複合バイオフィームを形成しているものと考えられた。

次に、酵母菌・乳酸菌複合バイオフィームの固定化菌体としての利用を検討した。当該複合バイオフィームは洗浄耐性が高く、セルロースビーズなどに形成させたものは、一月以上の連続的な発酵に用いることができ、ロバスト性に優れていることを明らかにすることができた。このロバスト性は、自己複製により自律的にバイオフィームを再生産可能なこと、ならびに、共存乳酸菌による乳酸などの抗菌物質の産生や培養pHの低下によりコンタミネーション耐性を有することに起因していると考えられた。なお、乳酸発酵が並行して起こるため、アルコール発酵収率の低下が懸念されたが、酵母の単独系に比較して収率の低下はわずかであった。簡易な菌体固定化が可能なことやコンタミネーション耐性の利点を考えると、本系は開放系でのバイオマスリファイナリーなどに適した軽装備の発酵システムとして優れた特徴をもっているものと考えられる。

②-2 酵母菌・乳酸菌・酢酸菌の3菌種複合系におけるバイオフィーム形成

福山酢より分離した酢酸菌 (*Acetobacter pasteurianus* A11-10) と乳酸菌 ML11-11 との複合培養についても検討したところ、グルコースを炭素源として共培養すると、酢酸菌膜（ペリクル、気液界面のバイオフィーム）の形成が顕著に促進されるという新規な現象を見出すことができた。さらに、酵母菌と乳酸菌の共培養系に酢酸菌を添加した3菌種複合系では、酵母菌と酢酸菌の2菌種複合系に比べて効率的に酢酸発酵が進行することを見出し、その原因は、乳酸菌が生成する乳酸によって酢酸菌の生育が促進され、その結果として酢酸菌膜が旺盛に形成されることによるものであることを明らかにすることができた（図3）。

我々は、以上のように、酵母菌、乳酸菌、酢酸菌の相互作用によって生み出される巧みな共役系が、福山酢の簡易でありながら安定かつ効率的な発酵システムを支えていることを明らかにすることができた。

③ モデル微生物をもちいたバイオフィーム形成機構の解明

これまでに述べた複合培養系におけるバイオフィーム形成に

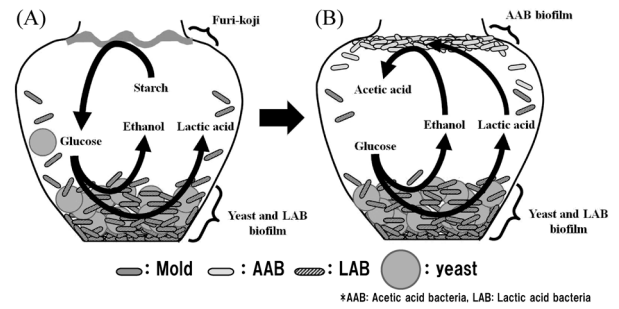


図3 酢酸菌、酵母菌、乳酸菌の複合発酵におけるバイオフィーム形成と福山酢の発酵形式
A：発酵前期（振り麹がある状態）、B：発酵後期（酢酸菌膜が形成されている状態）。

関する研究と並行して、我々は、大腸菌 *Escherichia coli* K-12 株を用いたバイオフィーム形成機構解明に関する検討も並行して行ってきた。そこでは、*E. coli* K-12株のバイオフィーム形成細胞と浮遊細胞を用い、それらのトランスクリプトーム及びプロテオームによる比較解析を行い、併せてトランスポゾンライブラリーからバイオフィーム形成変異株をスクリーニングした。その結果、細胞内アミノ酸濃度、特にトリプトファン濃度の低下がバイオフィーム形成を誘導する傾向にあること、ならびにトリプトファン添加がバイオフィーム形成の抑制と崩壊を引き起こすことを明らかにすることができた。また、細胞内核酸、特にUMPの濃度がバイオフィーム形成に深く関与していることを明らかにすることができた。加えて、多剤耐性ポンプがバイオフィーム形成に寄与していること、及び高浸透圧下で伸長化した大腸菌細胞がバイオフィームを形成することを見出し、さらに、バイオフィーム形成量をその構成菌数で評価する方法を開発することができた。

まとめ

以上の結果より、有害菌バイオフィームの制御技術及び有用菌バイオフィームの利用技術の基盤を確立することができ、同時に大腸菌を用いたバイオフィーム形成機構解明に関する重要な知見を得ることができた。今後、更に研究を進めたい。

謝辞 本研究は、日本大学生物資源科学部・食品生命科学科・食品微生物学研究室において行われたものです。本研究の遂行に際しまして多くのご指導を賜りました食品微生物学研究室前教授（東京大学名誉教授）・山崎眞狩先生、ならびに同研究室現教授・森永 康先生に衷心より感謝申し上げます。また、研究当初から一貫してご支援を賜りました同食品衛生学研究室・荻原博和教授には、心より感謝申し上げます。なお、本研究の遂行に際しましては、元・日本大学生物資源科学部教授（東京大学名誉教授）・別府輝彦先生をはじめ、日本大学生物資源科学部内外の共同研究者の方々をはじめとする多くの方々から多大なるご支援を賜りました。心より感謝申し上げます。さらに、学生時代にご教授頂きました、九州大学農学部食糧化学工学科の故・藤尾雄策先生、早川 功先生、下田満哉先生はじめ多くの先生方には、心よりお礼申し上げます。最後に、本研究の成果は、日本大学・食品微生物学研究室の大学院生・学部学生の皆さまのご努力の賜物であります。謹んで感謝の意を表します。