

2Ha05 種々条件下における乳酸菌バイオフィルムの構造解析

○和田 達樹¹, 八幡 稜¹, 野村 暢彦¹, 久保田 浩美^{1,2},
千田 昌子², 徳田 一², 内山 裕夫¹
(¹筑波大院・生命環境, ²花王株式会社 安全性評価研究所)

乳酸菌は食品分野において重要な微生物として認識されている。しかし、一方では、食品等の製造において危害菌としての側面もあわせもつ。最近、微生物の集団つまりバイオフィルムに着目が集まってきている。微生物がバイオフィルムを形成することで様々な耐性能を獲得することが明らかになってきている。しかし、危害菌としての乳酸菌バイオフィルムについての知見はほとんどない。そこで我々は、種々の乳酸菌のバイオフィルムについて、ストレス耐性への影響などを調べてきた。本研究では、種々の条件下で乳酸菌バイオフィルムの構造を解析することで、種々環境因子がバイオフィルム構造に与える影響について調べた結果を報告する。具体的には、*L. plantarum* 等の各種乳酸菌を使用し、種々条件下でそれらのバイオフィルム形成を調べた。バイオフィルム形成においては、ディッシュプレートを用いた静置培養法によるものと、フローセルチャンパーを用いた流下培養法それぞれの方法を用いた。それらの手法を用いた、種々条件下でのバイオフィルム形成能とそれらの構造について解析した結果を発表する。

Biofilm formation by lactic acid bacteria under various conditions.

○Tatsuki WADA¹, Yutaka YAWATA¹, Nobuhiko NOMURA¹,
Hiromi KUBOTA^{1,2}, Syouko SENDA², Hajime TOKUDA²,
Hiroyo UCHIYAMA¹
(¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ²Kao Safty Evaluation Lab.)

Key words lactic acid bacteria, biofilm

2Ha07 ポリフェノール類による歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィルム抑制効果

○松永 哲郎, 中原 彩, 加藤 昭夫, 阿座上 弘行
(山口大・農・生物機能)

歯周病の原因であるデンタルプラークは約500種以上の口腔細菌からなるバイオフィルムである。*Eikenella corrodens* は歯周病患者の病変部から頻繁に分離され、無菌動物への単一感染により重度の歯周炎を惹起する歯周病原性細菌の一つである。本菌は菌体表面にGalNAc特異的レクチンを有しており、これが本菌の病原性に大きく関与することが考えられている。最近、本菌が単一でGalNAc特異的レクチンに依存してバイオフィルムを形成すること、タイプ2クオラムセンシングが本菌のバイオフィルム形成に関与することを報告した。これらのことから本菌のバイオフィルム形成を抑制することにより、デンタルプラークの抑制、さらには歯周病の予防や治療への応用への可能性が期待できる。本研究では、カテキン類やフラボノイド類などのポリフェノールによる本菌のバイオフィルム形成に及ぼす影響について調べた。まずカテキンとエビガロカテキンガレート (EGCg) を1mMずつ添加し、本菌のバイオフィルム形成を調べたところ、1mM EGCgの添加によりバイオフィルム形成が25%以下まで抑制された。添加量を変えて抑制効果を調べたところ、0.1mM以上のEGCgの添加により効果的にバイオフィルム形成が抑制された。さらにEGCgの添加による増殖を調べたところ、増殖阻害は見られなかった。また同様にフラボノイド類の添加によっても本菌のバイオフィルム形成が抑制された。したがってEGCgなどのポリフェノールは増殖を阻害するのではなく、バイオフィルム形成を阻害することが示唆された。

Effect of polyphenols on biofilm formation of periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*

○Tetsuro MATSUNAGA, Aya NAKAHARA, Akio KATO,
Hiroyuki AZAKAMI
(Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ.)

Key words biofilm, polyphenol, *Eikenella corrodens*, dental plaque

2Ha06 有明海干潟泥中の細菌相解析

○田中 重光¹, 田代 幸寛¹, 中園 唯², 光武 奈緒子²,
小林 元太¹, 加藤 富民雄², 神田 康三²
(¹佐賀大・有明海プロ, ²佐賀大・農)

【目的】宝の海と呼ばれる有明海では古くから漁業や養殖業が活発に行われている。しかし、近年では漁獲量の減少やノリの色落ちによる被害などが報告されており、生態系の変化が危惧されている。本研究では、有明海干潟に生息する細菌相の変遷を解析することによって有明海における生態系変化に関する知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】平成18年4,7,10月、平成19年1月に、佐賀県有明海の干潟（ノリ非養殖漁場地点及びノリ養殖漁場地点）から泥を採取し、試料として用いた。それらの試料から細菌DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV2-V3領域をターゲットとしたDGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）解析を行った。その結果、どの地点にも共通するバンドや、地点と時期に特異的なバンド等が検出された。特に、ノリ養殖期にあたる冬季（平成18年10月、平成19年1月）においては、ノリ養殖漁場地点の試料中に、スミノリ病の病原菌である*Flavobacterium*属細菌に高い相同性を示すバンドが検出された。このことから、*Flavobacterium*属細菌の有明海における季節的動態と、ノリの養殖が密接な関係にあることが示唆された。現在、*Flavobacterium*属細菌をターゲットとしたリアルタイムPCR法による定量解析を行っている。

Analysis of bacterial flora in Ariake Sea tideland

○Shigemitsu Tanaka¹, Yukihiro Tashiro¹, Yui Nakazono²,
Naoko Mitsutake², Genta Kobayashi¹, Fumio Kato², Kohzo Kanda²
(¹ASRP, Saga Univ., ²Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words Ariake Sea tideland, Bacterial flora, DGGE

2Ha08 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー2の精製と解析

○阿座上 弘行, 久本 達裕, 小野 光香, 赤壁 善彦, 加藤 昭夫
(山口大・農・生物機能)

Eikenella corrodens は歯周病患者の病変部から頻繁に分離され、無菌動物への単一感染で重度の歯周炎を惹起する歯周病原性細菌の一つである。また、近年アテローム硬化症や心内膜炎などの全身疾患への関与も報告されている。最近、我々は本菌が単一でバイオフィルムを形成し、その形成にオートインデューサー2 (AI-2) を介したクオラムセンシング (QS) が関与することを示した。本研究では、QSと歯周病原性との関係を明らかにするために、培養上清からAI-2を精製し、その機能を解析することにした。*E. corrodens*のAI-2合成に必須な*luxS*遺伝子の欠損株を作成したところ、欠損株では野生株に比べてバイオフィルム内の死菌の割合が高くなり、疎なバイオフィルムを形成していた。*Vibrio harveyi* をセンサー株としたアッセイにより、*E. corrodens*の対数増殖期後期の培養上清からAI-2が検出された。培養上清から酢酸エチルにて抽出した画分を、薄相クロマトで展開することによってAI-2の精製を行った。*V. harveyi*を発光させる画分が得られたので、これをGC-MSやNMRにより構造解析を行った。また、精製したAI-2を*E. corrodens*の野生株および*luxS*欠損株の培養液に添加したところ、*luxS*欠損株においてバイオフィルム形成の増加が見られた。これらの結果から、AI-2を介したクオラムセンシングが本菌のバイオフィルム形成に関与することが示唆された。

Purification and characterization of autoinducer-2 of periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*.

○Hiroyuki AZAKAMI, Tatsunori HISAMOTO, Mitsuka ONO,
Yoshihiko AKAKABE, Akio KATO
(Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ.)

Key words biofilm, quorum sensing, periodontopathogenic bacteria, *Eikenella corrodens*