

## 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成に及ぼすオーバーフロー代謝の影響評価

○鮎澤優希・奈須野恵理・加藤紀弘（宇都宮大工）

**Evaluation of the Influence of Overflow Metabolism on Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*** (School of Engineering, Utsunomiya University) AYUSAWA, Yuki; NASUNO Eri; KATO Norihiro

メチシリン耐性を獲得した Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)の出現により、黄色ブドウ球菌による感染症が深刻化している。*S. aureus* は宿主への感染を有利にするためバイオフィーム (BF) を形成し、BF に取り込まれた細菌は周囲の薬剤や宿主免疫系から保護されることで薬剤耐性が向上する。BF は菌体及びタンパク質、細胞外 DNA、多糖類などの細胞外高分子物質 (Extracellular Polymeric Substances: EPS) をマトリックスとして保水しスライム状に形成する。その EPS 組成は BF の形成段階や環境に応答して異なることが報告されている。一般に細菌は好気条件においてエネルギー産生効率の高い呼吸を、嫌気条件では発酵経路を選択した代謝を行う。これに対し *S. aureus* はグルコース存在下においては、好気条件でも発酵が選択されるオーバーフロー代謝 (overflow metabolism) が利用されることが明らかにされている。オーバーフロー代謝によりオートリシスが活性化すると自らの集団の一部が死滅し、死菌及び細胞外 DNA の増大により強固な BF が形成する。本研究では、*S. aureus* ATCC 12600 株をモデル細菌として、グルコース代謝の培養時間依存性、オートリシス関連遺伝子の発現量、BF 形成量を多面的に追跡しキャラクター化することを目的とした。培養には BHI 培地あるいは 1 wt% グルコースを添加した BHIg 培地を試験した。

*S. aureus* ATCC 12600 株の前培養液を 96 穴プレート中の BHI あるいは BHIg 培地に分注し 15 h インキュベート (37 °C) し BF を形成した。上清を除去し洗浄した BF 内の菌体を Crystal violet (CV) 染色した後に、塩酸/エタノールによる CV 溶出液の吸光度 ( $A_{595}$ ) 測定により BF 形成量を見積もった (Fig. 1)。1 wt% グルコースの添加条件で BF 形成量は約 8 倍に増大した。オーバーフロー代謝でグルコースは、ピルビン酸を経て酢酸に変換される。21 mM グルコースを添加した TSB 培地を用いて 12600 株を培養 (37 °C) した際のグルコースの濃度変化を酵素法で追跡し水溶性 WST-1 ホルマザンの吸光度変化 ( $A_{450}$ ) で評価すると、培養 3, 6 h におけるグルコースは 5.5, 0.18 mM まで低下している。

そこでグルコース存在下における BF 形成に及ぼす EPS の寄与を、BF 形成開始時に DNase I あるいは Proteinase K を 96 穴プレートに添加して評価した (Fig. 2)。DNase I、Proteinase K の添加により BF 形成量はそれぞれ 27%、15%まで減少しており、BF マトリックスとしてタンパク質と DNA の寄与が大きいことが示唆された。

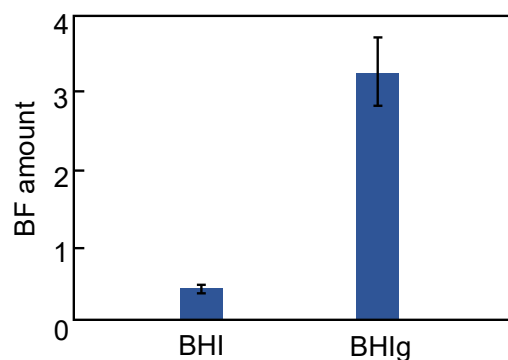


Fig. 1 Effect of glucose addition to the medium on *S. aureus* BF formation (BHIg containing 1 wt% glucose, 37 °C, 24 h).

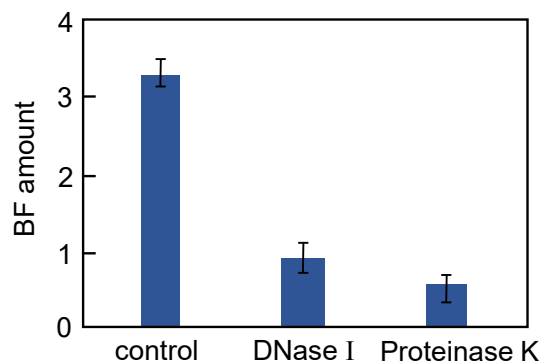


Fig. 2 Effect of pre-addition of EPS hydrolase on BF formation in the presence of 1 wt% glucose (BHIg, 24 h).