

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 16 年度博士課程 入学  
氏 名 成澤 直規  
指導教員名 五十嵐 泰夫

## 論文題目

バイオフィルムにおける微生物間相互作用に関する研究

バイオフィルムとは固体表面上に付着した微生物のフィルム状構造体であり、その構成種は菌体外成分に覆われ密集した状態で存在している。自然環境下において、バイオフィルムは普遍的に観察される微生物の存在状態である。バイオフィルムに固定化された微生物は、抗生物質等の薬剤や物理的処理に対して高い抵抗性を示すことから、バイオフィルムによる感染・汚染は医療や食品現場において問題視されている。一方、肯定的な側面では廃水処理施設で用いられる生分解システムにおいて、バイオマスを高濃度に保持するための基盤的要因として着目されている。近年では、実験室株を用いてバイオフィルム形成過程に寄与する遺伝子・タンパク質の同定が進んでいる。このように、単一微生物によるバイオフィルム形成メカニズムについては明らかになりつつあるが、自然環境もしくは人工的環境下において、バイオフィルムは単一種により構成されているのではなく、多種も存在し、それらとの相互作用が強く影響を受けていることが予想される。

自然界のバイオフィルムは、異なる代謝機能を持つ多様な個体群からなる微生物集団によって構成されており、基質の供給が限定されたような環境ではこれら微生物が階層構造をとって共生していることが観察されている。一方、敵対的關係も知られており、中でも抗菌物質生産による他菌の排除機構は最も有効な戦略の 1 つであると考えられる。このような拮抗的關係性

があるにも関わらず、バイオフィーム内部では多種多様な種が共存していることが明らかとなっている。本研究では、土壌環境から抗菌物質生産菌を分離し、本菌が形成するバイオフィームにどのような種が共存可能となるのか解析を行うこととした。また、構築されたバイオフィームから構成種を分離し、それら種間での関係性を明らかにすることでバイオフィームの多種共存機構を明らかにすることとした。

#### 1) 抗菌物質 pyocyanin 生産菌 *Pseudomonas aeruginosa* P1 株の分離・同定

本研究においてバイオフィームの形成には、Tryptic soy broth、37°C の条件にて培地を連続的に供給する flow cell システムを用いた。土壌を分離源として構築したバイオフィームからグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を有する P1 株を分離した。16S rRNA、および 16S-23S spacer region 塩基配列の結果から、本菌は *P. aeruginosa* と高い相同性を有することが確認された。一般に、*P. aeruginosa* は pyocyanin と呼ばれるグラム陽性菌に対して強い生育阻害効果を発揮する抗菌物質を生産することが知られている。P1 株の抗菌活性フラクションを MS 解析に供した結果、本菌の生産する抗菌物質は pyocyanin であることが同定された。P1 株は、flow cell に 2 日培養でバイオフィームを形成することが確認され、また、6 日培養までその形成が維持されていた。

#### 2) P1 株を含む複合系バイオフィームの構築

P1 株のバイオフィームと共存可能となる微生物種を特定するため、flow cell 内に P1 株をあらかじめ 2 日間培養してバイオフィームを作製し、そこへ土壌懸濁液の導入を行った。ここで用いた土壌懸濁液は P1 株を分離したものとは異なるもので、pyocyanin 生産菌が含まれないことを確認している。土壌懸濁液導入後 2 日目、4 日目のバイオフィームについて FISH 解析を行った。ここでは、P1 株、グラム陽性菌、およびこれらを含むすべてのバクテリアを検出する 3 種のプローブを用いた。その結果、土壌懸濁液導入 2 日目から 4 日目まで P1 株がバイオフィームの基底部に優占化していることが確認された。一方、グラム陽性菌を示す蛍光は導入後 2 日培養では確認されなかったのに対し、導入後 4 日培養においてその存在が確認された。この時の flow cell の outflow 培養液は、グラム陽性菌に対して生育阻害活性を有することが確認された。PCR-DGGE 法によりバイオフィーム構造を経時的に解析した結果、導入後 2 日培養で P1 株とグラム陰性菌 *Raoultella* 属細菌の存在が明らかとなった。また、4 日培養ではこれら 2 細菌に加えてグラム陽性菌 *Brevibacillus* 属細菌の存在が明らかとなった。この結果は、上記 FISH 解析の結果を反映しているものと考えられた。土壌懸濁液導入後 4 日目のバイオフィームから構成種の分離を行った。その結果、DGGE 解析で明らかとなった細菌種 *Raoultella* R1 株、

*Brevibacillus* S1 株に加え、複数種の細菌が分離された。pyocyanin の抗菌メカニズムは、活性酸素種の産生を介して行われることが明らかとなっている。そこで、各単離菌の P1 株由来の pyocyanin に対する MIC、カタラーゼ、SOD 活性を測定した。その結果、S1 株を含む 4 種のグラム陽性菌は低濃度の pyocyanin に対して感受性を示し、それを裏付けるようにカタラーゼ活性、SOD 活性も低い値を示した。一方、グラム陰性菌である 2 種の *Raoultella* 属細菌は、pyocyanin に対して耐性を示した。以上の結果から、バイオフィームにおいて pyocyanin 生産菌と感受性菌が共存していることが明らかとなった。

Table 1. 複合系バイオフィームから分離された細菌

Strain	Closest relative	16S rRNA gene identification (%)	MIC of pyocyanin ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	catalase activity (U/mg protein) <sup>b</sup>	SOD activity (U/mg protein) <sup>b</sup>
P1 <sup>c</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.8	N.T. <sup>d</sup>	N.T.	N.T.
R1 <sup>c</sup>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99.7	>20	355±12	140±7
R2	<i>Raoultella planticola</i>	99.8	>20	289±7	93±3
S1 <sup>c</sup>	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	100	0.92	22±2	18±1
S2	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.7	1.01	45±5	19±5
S3	<i>Bacillus lentus</i>	97.0	1.31	87±6	28±3
S4	<i>Bacillus subtilis</i>	99.6	1.08	43±2	21±2

<sup>a</sup> 96 穴タイタープレートを用いた 590 nm の吸光度値により評価。 <sup>b</sup> 対数増殖期後期に 2.5  $\mu\text{g}$  /ml の pyocyanin を添加した時の活性値。 <sup>c</sup> PCR-DGGE 法により検出された細菌。 <sup>d</sup> N.T., not tested

### 3) pyocyanin 生産菌と感受性菌の共存メカニズムの解析

pyocyanin 生産菌と感受性菌の共存メカニズムについて明らかにするため、上記複合系バイオフィームの優占種である pyocyanin 生産菌 *Pseudomonas* P1 株、感受性菌 *Brevibacillus* S1 株、耐性菌 *Raoultella* R1 株の 3 種を用いて 2 種、3 種共培養実験を行った。これら 3 種は単独培養条件で 2 日以内にバイオフィームを形成することが確認された。また、液体培養条件において、これら 3 種は共存することができず、S1 株が系内から駆逐されることが確認された。

初めに、flow cell 内に P1 株が形成するバイオフィームへ R1 株もしくは S1 株を単独で導入した際の P1 株へ及ぼす影響について評価した。ここでは各細菌に特異的なプローブを用いた FISH 法により評価を行った。この結果、P1 株のバイオフィーム形成、および pyocyanin 生産性に他菌種導入の影響は見られなかった。また、4 日培養の間、S1 株は単独で P1 株のバイオフィーム上で定着・増殖することはできなかった。

次に、S1 株のバイオフィーム形成に及ぼす P1 株由来の pyocyanin の影響について評価するため、pyocyanin 合成遺伝子の 1 つである *phzM* 遺伝子を相同組換えにより破壊した pyocyanin 非生産株 PHZ201 株を作製した。本菌は、単独で P1 株と同等のバイオフィーム形成能を持つ

ことが確認された。PHZ201 株が形成するバイオフィルムに S1 株を単独で導入した結果、培養初期において 2 種の共存が確認された。このことから、S1 株と P1 株の間には、pyocyanin を介した拮抗的相互作用の存在が証明された。

S1 株のバイオフィルム形成における R1 株の役割について解析を行った。S1 株と R1 株を 1 : 1 の割合で調製した混合液を flow cell に導入した結果、培養 2 日目以降 2 種がランダムに存在するバイオフィルムを形成した。P1 株が形成するバイオフィルムへ S1 株と R1 株の混合液を導入し、培養を行った結果、導入 2 日培養のバイオフィルム内において S1 株の出現は確認されなかったのに対し、導入後 4 日培養では S1 株の出現が確認された。この時、P1 株は基底部で優占化していた。また、この時 S1 株が存在する局所は R1 株に覆われた構造を有していた。これは基底部に存在する P1 株由来 pyocyanin だけではなく、培養液中に含まれる pyocyanin からも保護されているものと考えられた。一方、PHZ201 株のバイオフィルムに S1 株と R1 株の混合液を導入した結果、2 日目では各細菌がランダムに存在しており、また培養時間の延長に伴い PHZ201 株がバイオフィルムから分散する様子が確認された。このことから、バイオフィルム内部由来の抗菌物質は、バイオフィルムの局在性だけではなく、自身のバイオフィルム形成にも大きく影響するものと考えられた。

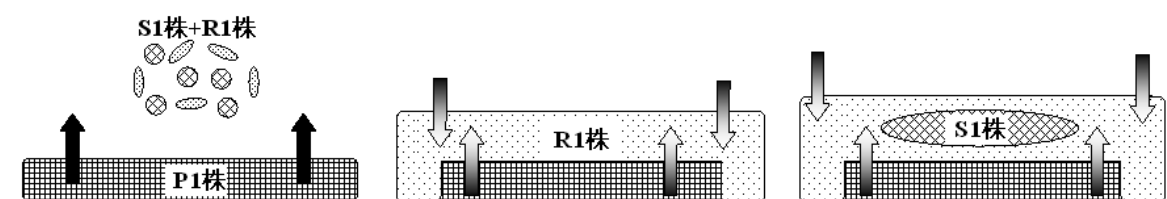


図 1 バイオフィルム内における pyocyanin 生産菌と感受性菌の共存モデル

図内矢印は pyocyanin を示す

#### 本研究のまとめ

本研究において、バイオフィルム内での抗菌物質生産菌と感受性菌の共存する系の再構築に成功し、その共存メカニズムを明らかにした。それには、種間の様々な相互作用の存在が必須であると考えられ、このことが種多様性の維持につながるものと考えられた。従来、微生物の抗菌物質生産は抗菌作用のみが強調されてきた。本研究より、複合系バイオフィルムの解析から、抗菌物質の新たな役割が示唆された。