

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 成澤 直規

バイオフィー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。自然環境もしくは人工的環境下において、バイオフィームは単一種により構成されているのではなく、他種も存在し、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ームは、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、それらは個々の種の生存戦略であると考えられる。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、バイオフィームから構成種を分離し、それらの種間の關係性を明らかにすることで、多種共存機構を明らかにすることとした。

まず、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。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既知と同様の 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。

次に 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。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異なる 3 種のプローブを用いて FISH 解析を行った。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。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、バイオフィームの優占種として pyocyanin 耐性菌 *Raoultella* R1 株と、感受性菌 *Brevbacillus* S1 株が分離された。

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、P1 株、S1 株、R1 株の 3 種を用いて、2 種、3 種共培養による種間相互作用について解析を行った。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。

さらに、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* 遺伝子を相同組み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ームに 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 株のバイオフィーム形成における 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ームを形成した。P1 株が形成するバイオフィームへ 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ーム内において 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 株は基底層で優占化していた。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。これは基底層に存在する 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 株のバイオフィームに 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 株がバイオフィームから分散する様子が確認された。このことから、バイオフィーム内部由来の抗菌物質は、バイオフィームの局在性だけではなく、自身のバイオフィーム形成にも大きく影響するものと考えられた。

以上、本研究は、抗菌物質生産菌とそれに感受性を示す細菌が共存するバイオフィーム集団の構築に成功、このバイオフィームから分離した細菌種を用いて、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として、抗菌物質耐性菌の存在と、空間的局在性が必須であることが明らかとした。これらの知見は、学術上また応用上寄与するところが多い。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位としてふさわしいと認めた。