

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成20年度博士課程 進学  
氏 名 山本 京祐  
指導教員名 五十嵐 泰夫

論文題目 好気性細菌の菌膜形成に関する生理・生態学的研究

好気性微生物の中には静的環境において気液界面に pellicle (菌膜) を形成するものが多数存在する。pellicle 形成は、気液界面に細胞を保持し生育に有利な好気環境のニッチを獲得するための戦略であると考えられており、様々な自然/人工環境中に見出される。しかし、固液界面に形成されるバイオフィームと同様のものと見なされることが多く、pellicle 細胞固有の生理的特徴や pellicle 形成過程については不明な部分が多い。また、pellicle 形成の適応効果を実験的に評価した例はほとんどなく、特に、pellicle 形成が液相の個体群を含めた系全体としての個体群・群集動態に与える影響を評価した例はない。そこで本研究では、pellicle の形成機構や pellicle 細胞の生理学的特徴を明らかにし、気液界面ニッチを巡る個体群間・種間相互作用を解析することで、pellicle の生理生態学的な特徴づけをおこなうことを目的とした。

本研究では、バイオフィーム研究のモデル生物である通性好気性細菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を主に用いて実験をおこなった(静置条件、LB 培地、37 °C)。なお、pellicle の定量には、本研究で新規に考案した簡便な pellicle 特異的採取法 (methanol 重層法) を適用し、総タンパク量ベースで測定した。

### <pellicle 形成に影響を及ぼす環境因子>

Pellicle はその構造が気相に直接接していることが大きな特徴であり、したがって気相ガス組成は pellicle 形成に大きく影響すると考えられた。培養時の気相酸素濃度を変化させたところ (20-0%)、酸素濃度の低下に伴い pellicle 形成量は減少した。一方、気相 CO<sub>2</sub> 濃度を 8%

に維持したところ、pellicle 形成量は増加した。

次に液相の溶存因子の影響を評価した。pH 上昇は pellicle 形成を抑制することがわかり、前述の気相高 CO<sub>2</sub> の効果は液相に溶解し pH の上昇を抑制する作用によることが示唆された。また、硝酸添加 (40 mM NaNO<sub>3</sub>) によって液相での *P. aeruginosa* の嫌気脱窒生育を促進したところ、pellicle 形成量が減少した。脱窒遺伝子の変異株では添加効果はみられず、嫌気生育個体群の存在が好気 pellicle 個体群の生育を抑制すると考えられた。硝酸による形成抑制効果は鉄添加 (50 μM FeSO<sub>4</sub>) によってみられなくなり、好気および嫌気生育個体群間での鉄競合が pellicle 形成を抑制したと考えられた (Fig. 1)。

#### <pellicle 細胞の遺伝子発現パターン>

定常期の浮遊細胞 (OD<sub>600</sub>=1.4) を対照として pellicle 細胞 (24 h、mature pellicle) の比較トランスクリプトーム解析をおこなったところ、全 ORF の 10% 弱、541 遺伝子が発現変化していた (fold change >2)。主な特徴を以下に示す。

- ① 嫌気代謝関連遺伝子群：大幅に発現低下しており (-8 ~ -303)、pellicle 細胞ではほぼ好気代謝のみおこなわれていることが示された。バイオフィーム細胞では嫌気代謝の一定の寄与が知られており、これは pellicle 細胞固有の特徴であると考えられた。
- ② 鉄取り込み関連遺伝子群：大幅な発現上昇がみられ (+4 ~ +65)、鉄欠乏状態にあることが示唆された。好気条件下では、細胞外の鉄はほとんどが難溶性の Fe (III) として存在するとみられ、鉄取り込み系の発現が生育に重要であると考えられた。
- ③ その他：運動性関連遺伝子、酸化ストレス応答系、anthranilate 分解系などが発現変化していた。

このように、pellicle 細胞では、酸素獲得の効率化と引き換えに鉄の利用性が減少するという栄養獲得のトレードオフが存在することが示唆された (Fig. 1)。

#### <pellicle 形成に関わる遺伝因子>

各種遺伝子破壊株を作製し pellicle 形成能を評価したところ、細胞外多糖 (EPS) 非産生株 (*ΔpelAΔpslAB*) では pellicle 形成能が顕著に低下し、EPS は pellicle 細胞外マトリックスの主要構成物であることが示された。ピリ線毛破壊株 (*Δpila*) では特に影響はなかったが、鞭毛破壊株 (*ΔfliC*) では形成が遅れ、pellicle 形態が不均一なものに変化した。鞭毛・線毛 2 重破壊株 (*ΔfliCΔpila*) では、pellicle 形成量は低下したが、形態は均一なものに戻った。Quorum sensing シグナル分子のひとつである pseudomonas quinolone signal (PQS) の非産生株 (*ΔpqsAB*) では pellicle 形成量が増加し、PQS が pellicle 形成に抑制的に作用することが示唆された。したがって、pellicle 形成には EPS 産生や運動・付着性が寄与しており、細胞間シグナル物質の関与も示唆された。

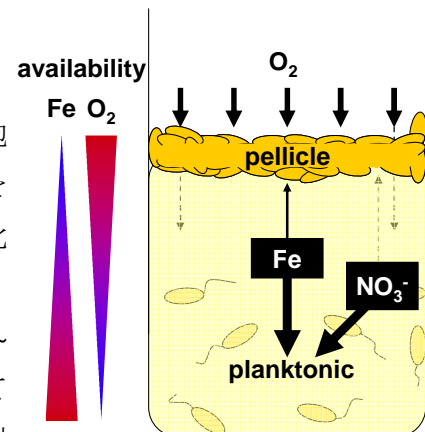


Fig. 1. Schematic view of spatial distribution of cells and substrates

### <pellicle 形成の適応効果>

静置環境での生育に対する pellicle 形成能の寄与を評価するため、EPS 非産生株 (pellicle 低形成株、 $\Delta pelA\Delta pslAB$ ) と野生株の生育 (菌数・バイオマス量) を比較した。その結果、最終的な生育量には差がなかったが、変異株では最大生育量を得るまでにより長い時間を要した。したがって、pellicle 形成は静置環境での生育を促進することが示された。次に、pellicle 形成が適応度に与える影響をみるため、上二者の競合実験 (共培養) をおこない、各々の CFU 変化 (両株は蛍光標識の有無で区別) から相対適応度 (relative fitness\*,  $w$ ) を算出、比較した。振盪条件では変異株のほうがわずかに高い相対適応度を有し ( $w=1.08$ )、EPS 生産能の欠損が振盪条件では適応度低下につながらないことが示された。一方、静置条件では変異株の相対適応度は大幅に減少した ( $w=0.37$ )。また、嫌気ニッチの存在が pellicle 形成能の適応効果に与える影響を評価するため、硝酸添加系で同様に実験をおこなったが、変異株の適応度は低いままであった ( $w=0.35$ )。これらのことから、pellicle 形成は静置環境における適応的挙動であることが示された。

競合実験系の pellicle 個体群について解析をおこない、pellicle 内の両株の存在比を定量 PCR で推定したところ、変異株は 6%以下であり系全体 (約 10%、CFU ベース) よりも低い優占率であった。このように pellicle 内に変異株の存在が確認されたため、pellicle を共焦点レーザー顕微鏡によって観察し、変異株が pellicle の空間構造に与える影響を評価した。その結果、変異株は pellicle 内に一様に分布していたが、培養が進むと pellicle 内に多数の空隙が形成され、野生株単独の pellicle より早く崩壊した。これは EPS 非産生株が共存することで pellicle の強度が低下したためと考えられ、pellicle 形成種にとってマトリックス形成に寄与しない種・細胞の存在は、pellicle 構造の維持に阻害的に作用することが示唆された。

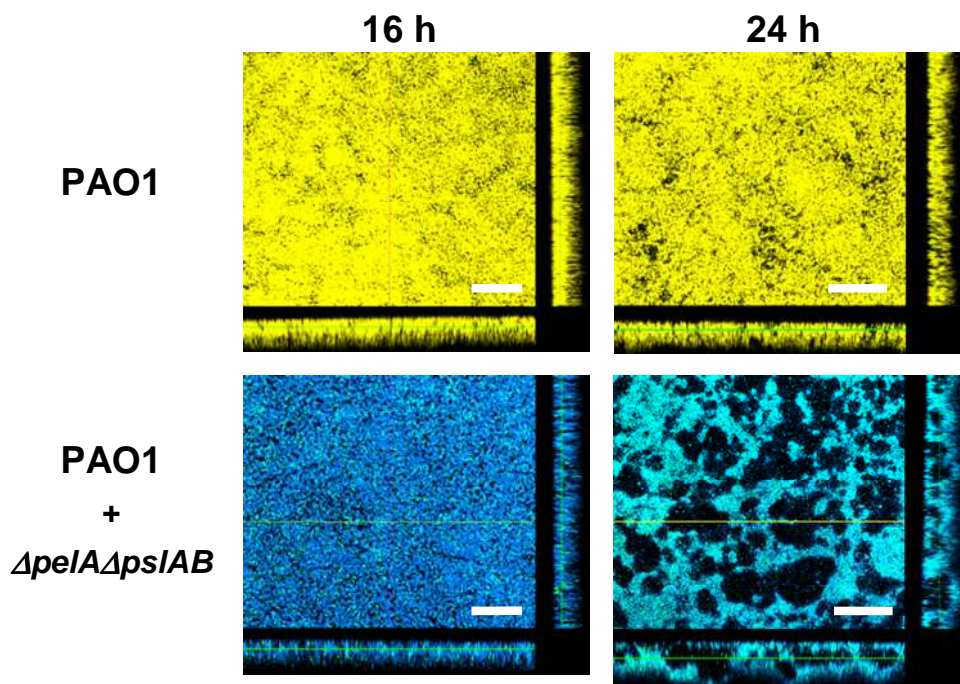


Fig. 2. Spatial structure of pellicle. Bars = 50  $\mu$ m

次に pellicle 形成種間の相互作用を評価するため、静置環境から分離した 2 種の pellicle 形成細菌 M1-3 株（通性好気性、系全体に分布）および M1-5 株（偏性好気性、気液界面に局在）を用いて実験をおこなった（PCS 培地\*\*、50 °C）。静置条件で共培養し、生菌数（MPN）推移をみたところ、M1-3 株は M1-5 株を駆逐した。Fluorescence *in situ* hybridization 解析によって pellicle 特異的に両者の変遷を追跡すると、初期には M1-5 株が優占するものの、後から M1-3 株が侵食していく様子がみられた。多孔質膜を用いた分離共培養では M1-5 株の生育阻害がみられなかったことから、抗菌性物質や培地成分の競合が原因ではないと考えられた。一方、気相に酸素を通気しながら静置共培養をおこなったところ、M1-5 株は駆逐されず一定の生菌数を維持したことから、pellicle における酸素競合の結果として M1-5 株が排除されることが強く示唆された。

#### <総括>

モデル微生物 *P. aeruginosa* および環境分離株を用いて pellicle 形成に関する解析をおこなった結果、pellicle 形成に関わる遺伝因子や環境要因を同定し、pellicle 固有の生理学的特徴（酸素-鉄間における栄養獲得トレードオフなど）の存在を明らかにした。また、pellicle 形成の適応効果を評価し、静置環境における適応的挙動であることを実験的に示したことで、その生態学的意義についても重要な知見を得た。さらに、pellicle 形成株-変異株間、pellicle 形成種間の相互作用を見出し、気液界面を巡る微生物間相互作用の一端を明らかにした。

\*  $w = m_{\text{mutant}}/m_{\text{WT}}$ ,  $m = \ln(N_t/N_0)$ ,  $N_t$  は時間  $t$  における生菌数（CFU）

\*\* peptone 5 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.2

発表論文：Yamamoto K, Haruta S, Kato S, Ishii M, Igarashi Y (2010) "Determinative factors of competitive advantage between aerobic bacteria for niches at the air-liquid interface" Microbes Environ. 25: 317-320.