

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山本 京祐

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、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く、pellicle 形成の適応効果を実験的に評価した例はほとんどない。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、バイオフィル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。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) を適用した。

< pellicle 形成に影響を及ぼす環境因子 >

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 CO₂ 濃度を 8% に維持したところ、pellicle 形成量は増加した。pH 上昇は pellicle 形成を抑制したことから、CO₂ の効果は pH の上昇抑制によることが示唆された。また、硝酸添加 (40 mM NaNO₃) によって 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、嫌気生育個体群の増加が好気 pellicle 個体群の生育を抑制すると考えられた。硝酸の効果は鉄添加 (50 μM FeSO₄) によって解消され、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。

< pellicle 細胞の遺伝子発現パターン >

定常期の浮遊細胞 (OD₆₀₀=1.4) と pellicle 細胞 (24 h) とで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)。pellicle 細胞では嫌気代謝、運動性、酸化ストレス応答関連遺伝子群の発現量は低く、鉄取り込み系、anthranilate 分解系は高発現していた。したがって、pellicle 細胞は好気代謝が主要で、鉄欠乏状態にあることが示された。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。

< 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) 非産生株では pellicle 形成能が顕著に低下し、EPS は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。ペリ線毛破壊株では特に影響はなかったが、鞭毛破壊株では形成

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 PQS の非産生株では pellicle 形成量が増加した。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。

< 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) と野生株の生育 (菌数・バイオマス量) を比較した。その結果、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、上二者の競合実験をおこない、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 (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 ($w=1.08$)、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 ($w=0.37$)。このことから、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 内の両株の存在比を定量 PCR で推定したところ、変異株は 4% 前後であり系全体 (約 10%、CFU ベース) よりも低い優占率であった。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。

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。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。FISH 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。

以上、本研究はモデル微生物 *P. aeruginosa* および環境分離株を用いて、その pellicle 形成に関して多くの新知見を得、さらに生態学的意義や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ものであり、学術上・応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。