

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380056

研究課題名（和文） 複合微生物系における細胞間シグナルによる呼吸代謝調節の解析と応用

研究課題名（英文） Analyses of regulation of respiration by bacterial signals

研究代表者

野村 暢彦（NOMURA NOBUHIKO）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60292520

研究成果の概要（和文）：微生物シグナルの一種である PQS が異種細菌の生育に与える影響を調べたところ、PQS が緑膿菌以外の様々な細菌の生育を抑制することが明らかとなった。その機構は PQS を添加した培地に鉄を添加するといずれの実験においても生育が回復したことから、PQS による鉄のキレートが関与していることが示唆された。微生物シグナルが他の細菌の呼吸を制御し生育をコントロールするという新しい発見に至った。

研究成果の概要（英文）： Regulation of bacterial growth is generally studied in relation to physicochemical conditions; however, how a bacterial community regulate itself remains obscure. Recently, it was demonstrated that cell-to-cell communication molecules regulate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. To gain more insight into how growth is regulated in the presence of other bacterial species, the effect of a *P. aeruginosa* produced cell-to-cell communication molecule on the growth of other bacteria was studied. In conclusion, bacterial signals seem to be a multifunctional molecule affecting other bacterial species; furthermore, this cell-to-cell communication molecule may influence the bacterial community development by regulating bacterial growth, for which physicochemical factors are important.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,600,000 | 1,980,000 | 8,580,000 |
| 2010年度 | 4,500,000 | 1,350,000 | 5,850,000 |
| 2011年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：呼吸

1. 研究開始当初の背景

パスツールが微生物の存在を証明して以来、分離培養可能な単一微生物種を純粋培養することが応用微生物学の主となってきた。しかし、自然界の多くの微生物は様々な環境下で、多様な相互関係を維持しながら共存し

て複合微生物系を形成しており、その多くは単一微生物では得られない多様な機能を有していることが明らかとなってきた。例えば、清酒製造の並行腹式発酵、廃棄物処理のメタン発酵、水処理の活性汚泥、医学分野では感染症あるいは口腔内バイオフィームなど、多

くの複合微生物系では、種・属を越えて相互のコミュニケーションが存在し機能している。しかし、それらの制御においては、「経験」あるいは pH、温度、酸素濃度などの工学的アプローチが主流であり、複合微生物系の制御は自然の域を脱していないのが現状で、よって、新しい制御法が望まれている。生き物にとって生育に欠かせないことはエネルギーの獲得である。細菌の一つの特徴として挙げられるのは、そのエネルギー獲得形式の多様性であり、大きく分けて醗酵と呼吸、光合成の三つに分けられる。特定微生物のエネルギー獲得のためのそれら一次代謝を制御出来れば、複合微生物系における特定微生物の生育制御が可能になると考えられる。

一方、近年の微生物研究における革新的な発見として、微生物が産生する低分子化合物（細菌シグナル）を介した微生物間情報伝達が急発展している。申請者は、初めて細菌間シグナルが、生育に必要な呼吸（一次代謝）を制御することを報告し、細菌間シグナルの制御による微生物複合系の特異的な微生物の生育制御への糸口を見つけた。よって、本申請では、細菌間情報伝達に注目し、複合微生物系（バイオフィーム）における細菌間シグナルを介した呼吸代謝制御機構を明らかにすることで、細菌の集団および群集の新たな制御への一つの扉を開くことを目的とする。

2. 研究の目的

細菌間情報伝達に注目し、複合微生物系（バイオフィーム）における細胞間シグナルを介した呼吸代謝制御機構を明らかにする。まず、細胞間シグナル AHL, PQS により呼吸が制御される種々細菌の検索を行い、その作用メカニズムを生化学・遺伝子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

Pseudomonas putida AC10、*Deltia acidovorans* NBRC 14950T、*Pseudomonas stutzeri* Zobell、*Comamonas terrigena* NBRC 1311T、*Escherichia coli* K12 および *P. aeruginosa* PA01。土壌サンプルは大学構内から回収した。

(2) 培養条件

LB 培地を用いて、本培養は初期菌体濃度が OD600=0.01 となるように植菌した。*P. aeruginosa*、*P. putida* および *E. coli* は 37 °C で培養した。それ以外の株については 30°C で培養を行なった。特に断りが無い限り培養は好気条件下で行なったものとする。PQS は 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) にそれぞれ溶解して、20 mM 溶液を調整した。

PQS を添加した場合の対照として DMSO を適宜添加した。土壌サンプルを用いた実験には Nutrient broth (NB) あるいは 1/10NB を用いた。シデロフォア生産の検出には 1 L あたりに 5 g sodium succinate, 2 g NH₄Cl₂, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.3 % casamino acids を含む培地に微量金属類(1L あたり 10 mg CaCl₂ · 2H₂O, 5 mg MnSO₄ · 4H₂O, 2 mg CuSO₄ · 7H₂O, 2 mg ZnSO₄ · 7H₂O)を加えて用いた。

(3) シデロフォアの検出

シデロフォアの検出のために 1 L あたり 5 g コハク酸ナトリウム、2 g NH₄Cl₂、0.2 g KH₂PO₄、0.2 g MgSO₄ · 7H₂O、0.3 % カザミノ酸に微量金属(10 mg CaCl₂、5 mg MnSO₄ · 4H₂O、2 mg CuSO₄ · 7H₂O、2 mg ZnSO₄ · 7H₂O)を含む合成培地を用いて行なった。白金耳で植菌した後定常期に達した培養液の上清を回収して、その pH を 0.2 N HCl によって 6.5 以下に調整した。得られた上清を Chrome azurol S (CAS) アッセイに供して、シデロフォアを検出した。シデロフォア検出の際は、15 分間反応させた。

4. 研究成果

(1) シグナルが異種細菌の生育に与える影響

P. aeruginosa が産生する細胞間コミュニケーション物質の一種である PQS が異種細菌の生育に与える影響を明らかにするために PQS を培地に添加し、*P. aeruginosa* と同様の環境で生育することが知られている細菌群の生育を測定した (Fig. 4-1)。その結果、用いた菌株のうち、*Pseudomonas putida* AC10、*Deltia acidovorans* NBRC 14950T、*Pseudomonas stutzeri* Zobell、*Comamonas terrigena* NBRC 1311T で生育の抑制が観察された。その中で特に *Comamonas terrigena* は顕著に生育を抑制された。一方で *Escherichia coli* K12 では生育の抑制は観察されなかった。

(2) PQS による異種細菌の生育抑制は鉄のキレートが関与する

PQS は鉄をキレートすることが報告されており、*P. aeruginosa* の脱窒がこの PQS のキレート活性を介して阻害されることが本研究によって明らかとなった。そこで、PQS の異種細菌の生育への影響は鉄のキレートを介して行なわれているのではないかと考えた。これを検証するために PQS を添加した培地にさらに鉄を添加して培養 12 時間後に生育量を測定したところ、いずれの細菌においても鉄の添加によって生育が回復することが明らかとなった。これらの結果より PQS は鉄をキレートすることによって異種細菌の生育

を抑制することが示唆された。

(3) PQS が土壌細菌群の生育に与える影響

PQS がどのような細菌群の生育を抑制するのかさらに明らかにしていくために、次に土壌サンプルを用いて PQS の影響を解析した。土壌懸濁液を寒天培地上に添加して、形成されたコロニー数を PQS を添加した培地と添加していない培地で比較したところ、PQS を添加した培地では一日目に形成されたコロニー数が PQS を添加していない培地に比べて約 1/10 に減少していることが明らかとなった。PQS を添加した培地にさらに鉄を加えるとコロニー形成数は PQS を添加しなかった培地と同等に回復することから、PQS によるコロニー形成の抑制は鉄のキレートを介して行われると考えられる。培養を続けていくと、2 日目には PQS を添加したプレートに形成されたコロニー数は PQS を添加しなかったプレートのコロニー形成数に追いついた。したがって、PQS は細菌がコロニーを形成するかしないかに関わっているのではなくコロニー形成の速度に関わっていることが考えられる。

(4) PQS 感受性株、非感受性株の同定

PQS によって生育が阻害される細菌群にはどのような特徴があるのか調べるために 16S rDNA の一部の塩基配列を決定した。その後、得られた塩基配列(約 600bp)を National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースを用いて相同性検索に供することによって細菌種を同定した。その結果を Table 4-1 に示す。相同性検索の結果、PQS によって生育が抑制される細菌はグラム陽性菌が多数を占めていた。また、グラム陰性菌に対しても PQS が生育を抑制していることが明らかとなっており、PQS はグラム陰性菌、陽性菌問わず幅広い細菌種の生育を制御していることが示された。これまでの研究により、グラム陰性菌の *P. aeruginosa* において PQS は細胞膜に局在しており、特にグラム陰性菌に特有の細胞膜構造物であるリポ多糖 (LPS) と結合することが報告されていた。また、PQS は細胞に作用して呼吸を阻害することが示された。これらの結果より、PQS はグラム陰性菌においては、細胞膜に直接作用して呼吸を阻害している可能性が考えられる。細胞壁の構造が異なるグラム陽性菌について同様の生育阻害機構が働いているのか今後明らかにしていきたい。

(5) シデロフォア生産と PQS 感受性の関係について

P. aeruginosa は鉄制限環境下で好気培養を行なったときにシデロフォアを生産する能力を欠損した株は PQS によって生育が抑制される。この結果は、シデロフォアの生産が

PQS による生育の制御に関与していることを示している。そこで、PQS 非感受性株と感受性株の間にはシデロフォア生産能力の違いがあるのではないかと考え、これまで用いた株がシデロフォアを生産することができるかどうか調べた。最少培地にて各株を生育させてその上清を回収し、一般的に用いられている CAS アッセイ法によってシデロフォアを含めた鉄をキレートする化合物の生産を調べた。しかし、予想に反して PQS 非感受性株において鉄をキレートする化合物を生産しない株 (PQS-7、-12) が確認され、反対に PQS 感受性株の中にも鉄をキレートする化合物を顕著に生産する株 (PQS-2、-8、-13) が確認された。したがって、シデロフォアのような鉄キレーター以外の因子が PQS の感受性に関与していることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1) Tashiro Y, Uchiyama H, Nomura N*. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* (2011) in press (Review) (査読有)

2) Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N*. Social behaviours under anaerobic conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Microbiology* (2011) in press (Review) (査読有)

3) Toda K, Yawata Y, Setoyama E, Fukuda J, Nomura N, Suzuki H. Continuous monitoring of ammonia removal activity and observation of morphology of microbial complexes in a microdevice. *Applied Environmental Microbiology* 77(12):4253-5. (2011) (査読有)

4) Tashiro Y, Inagaki A, Shimizu M, Ichikawa S, Takaya N, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H, Nomura N*. Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75(3):605-7. (2011) (査読有)

5) Tashiro Y, S Ichikawa, N Nomura*. (他 5 名 8 番目) Variation of physicochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*.

Applied Environmental Microbiology 76(11):3732-9 (2010) (査読有)

6) Yawata Y, K Toda, H Suzuki, N Nomura. * (他 3 名 7 番目) Monitoring Biofilm Growth in a Microfluidic Device by a Modified Confocal Reflection Microscopy Method. Journal of Bioscience and Bioengineering 110(3):377-80 (2010) (査読有)

7) Yawata Y, H Uchiyama, N Nomura. * Visualizing the Effects of Biofilm Structures on the Influx of Fluorescent Material Using Combined Confocal Reflection and Fluorescent Microscopy. Microbes and Environments 25:49-52 (2010) (査読有)

8) Toyofuku M, T Nakajima-Kambe, H Uchiyama, N Nomura. * The Effect of a Cell-to-Cell Communication Molecule, Pseudomonas Quinolone Signal (PQS), Produced by *P. aeruginosa* on Other Bacterial Species. Microbes and Environments 25:1-7 (2010) (査読有)

9) Tashiro Y, M Toyofuku, N Nomura *. (他 2 名 5 番目) Bicy clic compounds repress membrane vesicle production and Pseudomonas quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters 304:123-130 (2010) (査読有)

10) 八幡穰, 戸田憲輔, 瀬戸山恵里香, 福田淳二, 鈴木博章, 稲葉知大, 内山裕夫, 野村暢彦 *. バイオフィーム研究技術の新展開. 環境バイオテクノロジー学会誌 (2010) (総説) (査読有)

11) Tashiro Y, R Sakai, N Namura. * (他 4 名 7 番目) Outer membrane machinery and alginate synthesis regulators control membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 191: 7509-7519 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 4 件)
(招待講演のみ)

1) 野村暢彦 : 「バイオフィームの基礎研究から臨床への展開へ」、小林 宏行先生メモリアルセミナー「病原微生物のバイオフィームと疾病の関わりー基礎と臨床展望ー」、第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総

会・合同学会 (ホテルメトロポリタン山形)、2011 年 10 月 27 日 (招待講演)

2) 野村暢彦 : 「微生物集合体バイオフィーム内の細胞外 DNA の役割」、細胞外核酸の動態: 医科学・環境科学での新しい観点からの研究・応用展開、第 84 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館)、2011 年 9 月 24 日 (招待講演)

3) 野村暢彦 : 「マイクロデバイス技術と新規イメージング技術の融合による新しい微生物解析技術の開発 - 微生物のありのままの非破壊・非侵襲的かつ経時的な解析」、「ゲノム微生物学会ワークショップーゲノムで繋がる微生物研究の新展開ー」、2011 年度ゲノム微生物学会大会 (東北大学)、2011 年 8 月 20 日 (招待講演)

4) 野村暢彦 : 「細菌のバイオフィーム形成と治療薬の開発」、第 84 回日本感染症学会総会 (京都国際会議場)、2010 年 4 月 6 日 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

八幡穰, 内山裕夫, 野村暢彦 *. バイオフィーム研究の基盤技術. 臨床と微生物 近代出版 36 巻 (2009) 399-404

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Method for treating wastewater containing ammonia nitrogen

発明者: Nomura N., et al.

権利者: 住友重機械工業 (株)

種類: 環境

番号: PCT/JP2010060219

出願年月日: 07, 02, 2012

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 暢彦 (NOMURA NOBUHIKO)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 60292520

(2) 研究分担者

内山 裕夫 (UCHIYAMA HIROO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 00185042