

Paracoccus denitrificans における集団形成メカニズムの解析

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

森永 花菜

第 1 章 序論	1
1-1 細胞間コミュニケーションとは.....	1
1-2 バイオフィームとは.....	1
1-3 メンブレンベシクルとは	3
1-4 <i>Paracoccus denitrificans</i> における集団形成とその制御	4
1-5 本研究の目的	5
第 2 章 方法	6
2-1 菌株及び材料.....	6
2-2 培養条件.....	6
2-3 欠損株の作製及びプラスミドの導入.....	6
2-4 凝集体形成の観察	6
2-5 MV への長鎖 AHL の吸着性試験	6
2-6 バイオフィーム形成及び観察	7
2-7 寒天培地下における細菌の増殖の経時的な観察.....	7
2-8 コロニーバイオフィームの形成及び観察	7
2-9 <i>bapA</i> 及び <i>pmx</i> の発現の Real-Time PCR による測定	7
2-10 デバイスの作製方法.....	8
2-11 2D チャンバーにおける細菌の培養および観察方法	8
2-12 3D 流路デバイスにおける細菌の培養および観察方法	8
2-13 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) 観察.....	8
2-14 凝集体の生死判定	9
第 3 章 結果・考察.....	10
3-1 MV を介した多様な AHL の伝達	10
3-1-1 多様な AHL の凝集体形成に対する影響とその閾値.....	10
3-1-2 短鎖 AHL と長鎖 AHL の組み合わせによる凝集体形成への影響.....	11
3-1-3 MV による長鎖 AHL の伝達	11
3-1-4 多様な AHL のバイオフィームに対する影響.....	12
3-2 <i>P. denitrificans</i> におけるバイオフィーム形成因子とその制御	12
3-2-1 <i>P. denitrificans</i> の BF 形成過程	12
3-2-2 2 種の付着因子 BapA と <i>pmx</i> の役割.....	13
3-2-3 2 種の付着因子の細胞間コミュニケーション制御	14
3-3 細胞間コミュニケーションによって制御されるバイオフィームの機能解析	15
3-3-1 2 次元平面下での細胞の広がりを与える細胞間コミュニケーションの影響... 15	

3-3-2 3次元流路内でのバイオフィーム形成に与える細胞間コミュニケーションの影響	16
3-3-3 凝集体形成のデメリット	18
第4章 総括	19
参考文献	43
謝辞	47

図目次

図 1 多様な側鎖の AHL による凝集体形成への影響	23
図 2 様々な側鎖の AHL に対する <i>P. denitrificans</i> の応答	24
図 3 凝集体形成を抑制する長鎖 AHL の閾値濃度	25
図 4 C16-HSL の凝集体形成抑制に対する短鎖 AHL の影響	26
図 5 MV の長鎖 AHL の伝達性	27
図 6 様々な側鎖の AHL のバイオフィーム形成への影響	28
図 7 様々な側鎖の AHL のバイオフィーム量に対する影響	29
図 8 2色の細胞由来のバイオフィーム形成	30
図 9 寒天培地下での細胞の生育過程	31
図 10 QS を介した凝集体抑制への <i>pmx</i> 及び BapA の影響	32
図 11 QS を介したコロニー形態の変化への <i>pmx</i> 及び BapA の関与	33
図 12 <i>pmx</i> と BapA のバイオフィーム形態への影響	34
図 13 <i>pmx</i> と BapA のバイオフィーム形成における役割	35
図 14 C16-HSL による <i>pmx</i> の発現制御	36
図 15 C16-HSL による <i>bapA</i> の発現制御	37
図 16 2D チャンバーの形態	38
図 17 2D チャンバー内で培養させた細菌の様子	39
図 18 3D 流路デバイス内で培養させた細菌の集団形態	40
図 19 ASEM で観察したバイオフィーム形態	41
図 20 凝集体内の生菌及び死菌	42

本論文は下記の文献で発表されている。

Kana Morinaga, Tatsuya Yamamoto, Nobuhiko Nomura and Masanori Toyofuku.
Paracoccus denitrificans can utilize various long-chain *N*-acyl homoserine lactones and sequester them in membrane vesicles. Environ Microbiol Rep. 2018 Dec;10(6):651-654.
doi: 10.1111/1758-2229.12674.

論文概要

多くの細菌はシグナル分子を介して情報伝達をする。特に、菌体密度依存的なシグナル伝達機構をクォーラムセンシング (QS) と呼ぶ。最も多くの細菌で報告されている QS シグナルとして、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) が挙げられる。AHL はラクトン環とアシル基からなり、側鎖の長さが C4 から C20 までが報告されている。QS は、シグナル分子が受容されることで誘導されるため、シグナル分子の拡散性に依存する。従来の QS モデルでは、シグナル分子が自由拡散すると考えられていたが、先行研究によって、*Paracoccus denitrificans* は、自身が産生する膜小胞 (メンブレンベシクル; MV) に拡散性が低いシグナル分子 (C16-HSL) を内包させることによって、シグナル伝達を行っていることが明らかとなった。さらに、*P. denitrificans* は C16-HSL を介して凝集体形成及びバイオフィーム形成を抑制することも明らかとした。凝集体の形成には、細胞外物質の生産に関与する遺伝子 *pmx* (*Paracoccus extracellular matrix*) が寄与することが示唆されている。一方で、先行研究により、*P. denitrificans* のバイオフィーム形成には、付着因子である BapA が寄与することが明らかとなっている。しかしながら、これらの集団形成因子の関係性、さらに、QS がどのようにバイオフィーム形成を制御しているかについての詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では、*P. denitrificans* の QS によるバイオフィーム形成制御メカニズムを明らかにすることを目的とし、QS 機構とバイオフィーム形成を解析した。

まず、*P. denitrificans* の AHL 伝達機構に関して更に詳しく解析するため、MV を介した異種細菌との相互作用の可能性について解析を行った。*P. denitrificans* は短鎖の AHL には応答しない一方で、C12 以上の長鎖の AHL に応答することが明らかとなった。また、AHL レポーター株を用いて解析を行った結果、*P. denitrificans* の MV は長鎖 AHL を吸着し、*P. denitrificans* に伝達することが示された。さらに、長鎖 AHL によって、C16-HSL と同様に、バイオフィーム形成が抑制されることも明らかとなった。

続いて、バイオフィームの形成機構を明らかにするために、変異株のバイオフィームを観察したところ、BapA は基質の付着因子として、*pmx* の生産物は細胞間及び細胞と基質間の付着因子として働くことが示された。また、*P. denitrificans* は *pmx* の発現を QS によって抑制することが、Real-Time PCR より示唆された。マイクロデバイスを用いて、QS によるバイオフィーム形成の抑制がどのように行われているのかを詳細に調べたところ、WT は菌体間距離を保ちながら増殖する一方で、C16-HSL 非生産株は密に増殖し、細胞間同士が近接していることがわかった。このことより、*P. denitrificans* は QS を介して菌体間距離を保つことが示唆された。さらに、マイクロデバイスを用いた経時的な観察により、*P. denitrificans* は QS を介して基質上に整列し、一層を保つことも明らかとなった。

本研究によって、*P. denitrificans* は、QS を介して細胞外物質の生産に関わる *pmx* の発現を抑制することで、集団形成を抑制することが示唆された。このような調節機構により、菌体間距離を保って広がり、さらに菌体密度が高まった際には整列し一層を保つことで、栄養の取り合いなどの種内間の競合を回避することが考えられる。また、*P. denitrificans* は、自身が生産する MV を介して、異種細菌の生産する長鎖 AHL の伝達、利用を可能にすることが示唆された。このことは、自身が生産する C16-HSL が QS 閾値に達しない場合でも、異種細菌の AHL を利用して QS を起こしうることを示唆している。*P. denitrificans* は複合微生物系内で、MV を用いて情報伝達を行うことで、QS において優位性を得ていると考えられる。

第1章 序論

1-1 細胞間コミュニケーションとは

多くの細菌は、単独で生育しているのではなく、お互いに相互作用し存在している。相互作用には、代謝産物のやりとりや物理的な作用が挙げられるが、近年注目を浴びているのが、「細菌間の会話」とも考えられる細菌間コミュニケーションである。細菌間コミュニケーションでは、低分子化合物を用いることで、遺伝子の発現の制御を行い、その結果形質が変化する。このうち、菌体密度依存的な細菌間コミュニケーションをクォーラムセンシング(QS)と呼ぶ。QSは1970年代にNealsonらにより最初に発見され、ダンゴイカに寄生する*Vibrio fischeri*が、菌体密度が高まることで発光することが報告された(1)。その後、多様な細菌種において同様の現象が発見され、1994年にFuquaらにより、このような現象はクォーラムセンシングと名付けられた(2)。「Quorum」は元来、議会における定足数を意味する言葉である。細菌がある一定の菌体密度に達すると挙動を変化させることを、議会が定足数に達し議事が進むことに準えてこの名が付けられた。QSによって細菌の様々な集団的挙動が制御されており、運動性や、バイオフィーム形成、毒素生産などが一例として挙げられる。QSに用いられるシグナルは菌種によって多様で、グラム陽性細菌ではペプチドシグナルが用いられ、グラム陰性細菌では、アシル化ホモセリンラクトン(AHL)が最も多くの細菌で挙げられる。AHLは、ラクトン環とアシル基からなり、アシル基の長さは炭素数が4から20までが報告されている。また、アシル基の3位に、カルボニル基やヒドロキシ基を含有するものも報告されている。一般にQSシステムは、これらのシグナルを合成する合成酵素と、シグナルを受容するレセプタータンパク質から構成され、シグナルとレセプタータンパク質の複合体が転写制御因子として働く。シグナル合成酵素及びレセプタータンパク質も、それら自身によってポジティブフィードバックがかかっていることより、QSにはシグナル濃度の閾値が存在し、シグナルがある一定の濃度に達すると一斉に遺伝子発現が変動する。これまでに環境中からは、AHLの合成能を有する細菌が200種以上報告されている(3,4)。これらのことより、環境中で多様な細菌がQSを行っており、同種間さらには異種間でも相互作用を行っていることが予想される。そのため、QSを理解することは環境中の細菌の生態を理解する上でも重要であると言える。

1-2 バイオフィームとは

QSで制御される形質の代表的な例として、微生物の集合体であるバイオフィームが挙げられる。バイオフィームとは、菌体及び菌体が生産した細胞外物質からなる集合体である。これらの集合体は基質に付着して存在する。また、基質に付着せず自己凝集した菌体及び細胞外物質で形成させる自己凝集体や、気液界面に形成されたフィルム状のペリクルと呼ばれる構造体も、バイオフィームに含まれる。細菌種や栄養源、環境条件によって、バイオフィームを構成する物質や構造は異なる。また、高次構造をとるバイオフィーム内には、流路が形成されており、その流路が栄養の通り道として働く例も知られている(5)。

バイオフィルムの形成には、細菌にとって多くのメリットが存在する。例えば、捕食者から捕食されづらくなることや、抗生物質や熱などの外的ストレスへの抵抗性が増すことなどが報告されている (6)。また、バイオフィルム中では、多様な突然変異株が出現することも報告されている (7, 8)。このことは、細菌が環境の変化にさらされた際に、元来存在していた細菌には耐性がない場合でも、出現した耐性を有する変異株が生き残ることで、結果として集団としての生存率を高めることに繋がる。このように細菌は、バイオフィルムを形成することで、環境の変化に対して種としての生存率を高めていることが考えられる。

一方で、細菌によるバイオフィルムの形成は、ヒトの生活に携わる産業分野や医療分野において、有益な面や逆に有害な面も存在する。廃水処理に用いられる細菌は自己凝集をするため、処理された水と菌体を分離する固液分離の過程が容易になる。また、廃水処理に用いられる細菌の強固な凝集体であるグラニューールの内部では、酸素の濃度勾配が生じる。このため、嫌気条件下で活性が上昇する細菌が、好気条件下で働く細菌と共存することができ、廃水処理効率が向上することも考えられる。一方で、細菌のバイオフィルム形成は、食品工場や医療現場、多くの現場で有害なものとして扱われる。食品工場での細菌のバイオフィルム形成は、殺菌剤への耐性の向上より、細菌の排除を困難にさせる。また、医療面ではカテーテルなどの医療器具に細菌がバイオフィルムを形成することにより、駆除を困難にさせる。さらに、細菌感染症そのものも、細菌がバイオフィルムを形成することで、抗生物質耐性能が向上するなど、病気の難治化の要因ともなる。

バイオフィルムの形成には、その形成初期から、細菌がバイオフィルムから離脱する脱離までのライフサイクルが存在することが、多くの細菌で報告されている (9)。浮遊細胞は基質に付着し、初期段階では、付着した細菌が再び浮遊細胞に戻りうる可逆的な付着をする。その後、不可逆的な付着に移行し、分裂を繰り返しながらマイクロコロニーを形成する。さらに、細胞外物質を放出し、それらで覆われた成熟したバイオフィルムとなる。成熟したバイオフィルムから再び浮遊状態へ戻る脱離と呼ばれる現象も存在する。これらの過程のうちいくつかの段階においては、QS が大きく寄与することもわかっている。例えば *P. aeruginosa* PAO1 は、厚く構造的なバイオフィルムを形成する一方、QS シグナルの合成遺伝子を欠損した株では、薄くフラットなバイオフィルムを形成する (10)。QS はバイオフィルムの構造を保つ役割を担っていることが示唆される。また、PAO1 は、QS を介して細胞外 DNA の放出を促進しており、この細胞外 DNA は、バイオフィルムの構造を保ち、バイオフィルムを強固にする働きを有する (11)。*P. aeruginosa* PA14 においては、QS により、細胞外多糖の放出を誘導し、このことによって、構造的なバイオフィルムを形成することが報告されている (12)。このように、バイオフィルムのライフサイクルに関する研究は、*P. aeruginosa* などの運動性細菌に関して多数報告がある一方で、非運動性細菌に関する知見は少ない。多くの非運動性細菌も、バイオフィルムを形成することより、非運動性細菌のバイオフィルム形成におけるライフサイクルの解明が求められる。

バイオフィルムを強固にする構成要素として重要なものが、菌体が放出する細胞外物質である。バイオフィルムを構成する細胞外物質は、バイオフィルムを形成する細菌種によって、主要な成分が異なっており、代表的に挙げられるのが、細胞外多糖、タンパク質、脂質、DNA、RNA である。*P. aeruginosa* のバイオフィルムを構成する細胞外多糖はグルコースを豊富に含む Pel や、マンノースを豊富に含む Psl などが知られている (13)。

また、細胞外物質は、バイオフィルムを強固にするだけでなく、菌体が基質に付着するためにも重要である。基質への付着因子として、アミロイドファイバーであるカーリー繊維毛や Bap (biofilm associated protein) などが広く研究されている (14)。Bap は、I 型分泌装置を介して排出される細胞外タンパクであり、細胞が基質に付着する際に働く。Bap の配列は菌種によって異なるものの、多くがアミノ酸のリピート配列を有しており、疎水性の高いタンパク質として細菌間で広く保存されている (15, 16)。以上の様に、バイオフィルムの形成因子及びその制御の理解は、細菌の生態を理解するだけでなく、人間の産業、工業、医療分野の発展に寄与しうる重要な研究である。

1-3 メンブレンベシクルとは

近年細菌は、細胞膜から構成されるメンブレンベシクル (MV) を放出することがわかってきた。MV は直径 20 から 400 nm の膜小胞である。細菌の外膜から形成されるため、グラム陰性細菌において多く研究がされてきた。しかし、近年、外膜だけでなく内膜から形成される MV の存在や、固い細胞壁を有するグラム陽性細菌からも MV が生産されることが報告されており、多様な細菌が MV を生産することがわかってきた (17)。菌体から放出された MV は水環境中で拡散し、細菌間、さらには異種生物に伝達されることで、様々な機能を発揮する。MV 中には、細胞の構成成分、例えば DNA、RNA、タンパク質などが含まれており、菌種によって MV 中に含まれる物質は異なる。このことより、MV の機能も多様であることが予想される。*P. aeruginosa* や病原性大腸菌は MV に毒素を内包することで、MV を毒素のキャリアーとして用いることが示されている (18)。また、*Clostridium perfringens* の MV はマウスのマクロファージ細胞のサイトカインの誘導、つまり免疫を誘導することが示されている (19)。これらのことより、MV は細菌と宿主間の相互作用にも利用されることが考えられる。これらのことを利用した MV による物質の運搬や、ドラッグデリバリーシステムへの応用なども検討されている。

MV は細菌同士や動物や植物との相互作用に用いられることが明らかにされつつあるが、近年、*P. aeruginosa* の MV に QS シグナルである PQS が運搬されることが報告され、さらには、*Paracoccus denitrificans* を含むいくつかのグラム陰性細菌においては AHL が含まれていることが明らかにされた。これらの結果より、MV は QS シグナルのキャリアーとして用いられることが示唆されている (20-22)。環境中から MV が検出されることから、環境中での同種間さらには異種間の QS に MV が関与することが予想される (23, 24)。しかしながら、MV の QS への寄与は未だ解明されていない部分が多い。

1-4 *Paracoccus denitrificans* における集団形成とその制御

土壌脱窒細菌として知られる *P. denitrificans* は、非運動性のグラム陰性細菌である。*P. denitrificans* は、QS シグナルとして、長鎖 AHL の一種である C16-HSL を生産する (25)。C16-HSL は疎水性が高く、拡散性が低いことより、どのように細胞間を伝達するのかは、疑問とされてきた。*P. denitrificans* の培養液中に含まれる C16-HSL の半分が培養上清に排出されずに細胞に蓄積していることより (25)、細胞膜から構成される MV に着目したところ、MV1 粒子中には、C16-HSL が QS の閾値以上に含まれていることが明らかになった (23)。このことより、*P. denitrificans* は MV を 1 粒子受け取ると、QS を起こすことが可能であると考えられる。また、*P. denitrificans* が生産する MV には宿主に選択性が存在する (23)。*P. denitrificans* 自身には付着しやすい一方で、異種の細菌には付着しづらい。これらのことより、*P. denitrificans* は QS シグナルの伝達ツールとして MV を用いており、MV を用いることで、同種間で C16-HSL を効率的に伝達することを可能にしていると考えられる。*P. denitrificans* は生息環境である土壌や活性汚泥中では、同種間だけでなく、異種細菌とも相互作用をしていることが予想される。しかしながら、MV が異種間でのシグナル伝達にも寄与するのか、さらには、*P. denitrificans* はそれを利用しうるのかは未だ不明な点である。

P. denitrificans は薄いバイオフィームを形成することが報告されている (15)。さらに、バイオフィームの QS による制御に関しては、一部が明らかとされている。*P. denitrificans* の Wild-type (WT) は非凝集性である一方で、C16-HSL 非生産株である $\Delta pdnI$ (森永修論においては $\Delta luxI$ と呼んでいる) は、強凝集性を示すことより、C16-HSL は凝集体形成を抑制することが示唆される (23, 26)。また、凝集体形成因子として、推定多糖合成遺伝子である Pden_0842 が同定されている (26)。本論文では Pden_0842 を *pmx* (*Paracoccus extracellular matrix*) と呼ぶ。RNA-seq の結果より、*pmx* は C16-HSL によって発現が抑制されることが予想されている。これらのことより、*P. denitrificans* は C16-HSL によって細胞外物質の生産に関わる *pmx* の発現を抑制することにより凝集体形成を抑制することが考えられる。また、同様のメカニズムでバイオフィーム形成も抑制することが明らかとなっている (26)。

一方で、*P. denitrificans* において、バイオフィームの形成には基質への付着に関わるタンパク質、BapA が必須であることも明らかとされている (15)。*bapA* の欠損株は疎水性が低下し、基質への付着力が低下することより、バイオフィームの形成能を失う。このように、*P. denitrificans* のバイオフィーム形成に関しては、C16-HSL による *pmx* の発現抑制を介したバイオフィーム形成の抑制や、バイオフィーム形成に重要な因子である BapA の存在などが明らかにされつつある。しかしながら、集団形成に寄与するこれら 2 つの因子の集団形成における関係性、さらに、それらの QS による制御に関しては、未解明な部分が多く残る。

1-5 本研究の目的

これまでの研究によって、*P. denitrificans* は QS を介して凝集体形成を抑制することがわかっている。さらに、その制御下には、推定多糖合成遺伝子 *pmx* の発現抑制が関わっている。本研究ではまず、さらに詳細に *P. denitrificans* における QS 様式を解析することを目的とした。また、集団形成に関与する因子である BapA にも着目し、BapA 及び *pmx* の集団形成における関係を明らかにすることを目的とした。さらに、*P. denitrificans* が QS によって抑制される集団形成の機能を解析する。

第2章 方法

2-1 菌株及び材料

本章で用いた菌株、プラスミドを表1に、プライマーを表2にまとめた。

2-2 培養条件

P. denitrificans の培養には、特別な記載がない場合、固体培地は Luria-Bertani (LB、nacalai tesque) 寒天培地で 37°C、液体培養は TSB (BD) 4 ml に植菌し、30°C または 37°C で振盪培養した。*Escherichia coli* の培養は、固体培地は LB 寒天培地で 37°C、液体培養は LB 4 ml に植菌し、37°C で振盪培養した。必要な場合には、カナマイシンは 50 µg/ml、リファンピシンは 100 µg/ml 添加し、培養を行った。

2-3 欠損株の作製及びプラスミドの導入

$\Delta bapA$ より *pdnI* を欠損する場合には、以下の論文を参考に行った (27)。pK18-Pdn-luxI を保持した *E. coli* S17-1 を用い、接合伝達により、*P. denitrificans* $\Delta bapA$ より、*pdnI* を欠損させた ($\Delta pdnI \Delta bapA$)。

pBBPdentdTomato は、以下の様に作製した。プロモーターには、常発現であることが予想されるポーリンをコードする Pden_2763 の上流領域を用いた。P2763F と P2763_tdTomaR を用いて、*P. denitrificans* の染色体より、Pden_2763 の上流部分を PCR により増幅した。また、ptdTomato より、P2763_tdTomaF と tdTomaR のプライマーセットを用いて、*tdTomato* の ORF を増幅した。各断片を P2763nestF と tdTomanestR のプライマーセットを用いて PCR により融合、増幅させた。さらに、pBBRML と相同な領域を付加させるため、P2763nest_pBBRF と tdTomanest_pBBRR のプライマーセットを用いて再度 PCR を行った。pBBPML は HindIII と XbaI を用いて切断し、PCR 産物を HiFi DNA Assembly Master Mix (NEBuilder) を用いて融合させた (pBBPdentdTomato)。pBBPdentdTomato を保持させた *E. coli* Mach1 とヘルパーストレインである *E. coli* MM294/pRK2013 を用いて、接合伝達により *P. denitrificans* に導入した。

2-4 凝集体形成の観察

凝集アッセイは以下の論文を参考にした (23)。 $\Delta pdnI$ の前培養液を OD600 が 0.01 になるように希釈し、150 rpm で振盪培養した。培養 16 時間後に写真を撮影した。

2-5 MV への長鎖 AHL の吸着性試験

$\Delta pdnI$ の培養上清に 5 µM の長鎖 AHL を添加し、15 分間室温で反応させた。その後、MV を、超遠心機 (Beckman coulter) を用いて 150,000 g で 1 時間遠心し、回収した。上清及び上清から MV を除いた画分、MV 画分を、AHL レポーター株 (*P. denitrificans* $\Delta pdnI/pPLlas$) に元の培養液中の濃度の 10 分の 1 になるように希釈して添加した。添加

後、AHL レポーター株を 16 時間振盪培養した。培養液を回収し、PBS で洗浄、懸濁した後、プレートリーダーを用いて GFP の蛍光及び OD600 を測定した。

2-6 バイオフィーム形成及び観察

バイオフィームの形成は以下の論文を参考にした (15)。15×10 mm に切断したポリスチレン片を立て掛けた 24 ウェルマイクロプレート (Iwaki) に 1 ml の TSB を添加し、前培養液の OD600 が 0.05 になるように植菌した。植菌後、30°C で 48 時間培養をした。バイオフィームの観察には、Chameleon Vision laser system (Coherent) 及び Airyscan Fast モジュールを搭載した LSM880 共焦点顕微鏡 (CarlZeiss) を用いた。バイオフィーム内の細胞の観察には、5 µM の SYTO9 (Thermo Fischer Scientific) による染色 (15 分間)、あるいは、蛍光タンパク質を導入することによって行った。二種類の異なる蛍光色のタンパク質でラベルをした株を混合しバイオフィームを形成させる際には、二色の蛍光ラベルを施した株の前培養液を 1:1 になるように混合した後、OD600 が 0.05 になるように希釈し、培養を開始した。

2-7 寒天培地における細菌の増殖の経時的な観察

異なる蛍光色のタンパク質を発現する *P. denitrificans* の前培養液を 1:1 になるように混合し、OD600 が 0.1 になるように PBS を用いて希釈した。希釈した培養液 2 µl を 1.5% 寒天培地に垂らした。菌液を垂らした面が下を向くように寒天培地をガラスボトムディッシュに置き、20 分置きに撮影を行った。観察には LSM780 蛍光顕微鏡 (CarlZeiss) を用いた。

2-8 コロニーバイオフィームの形成及び観察

前培養液を OD600 が 0.1 になるように調整した。希釈した培養液 10 µl を LB 寒天培地上にスポットし、30°C で 2 日間培養した。コロニーバイオフィームの観察には、Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss) を用いた。

2-9 *bapA* 及び *pmx* の発現の Real-Time PCR による測定

前培養液を OD600 が 0.01 になるように TSB 培地に植菌をし、振盪培養させた。RNA の抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いた。抽出した試料に DNase I を添加し、37°C に設定した恒温器で 30 分間温め、DNA を分解した。さらに、フェノールクロロフォーム法及びエタノール沈殿法を用いて RNA を精製した。500 ng に調整した RNA は、SuperscriptIII (Invitrogen) 及びランダムプライマー (Invitrogen) を用いて cDNA 化した。Real-Time PCR に用いたプライマーは表 2 に記した。Real-Time PCR は SYBER®Premix Dimer Eraser™ (Perfect Real Time) (TaKaRa) の試薬を用い、

StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied biosystems) の機器を用いて行った。*bapA* 及び *pmx* の発現量は *rpoZ* の発現量により補正した。

2-10 デバイスの作製方法

デバイスは KMPR (Microchem) で作成した型に polydimethylsiloxane (PDMS) を流し込み作製した。Sylgard 185 silicone elastomer kit (Dow Corning Toray) のベースと硬化剤を 10:1 の割合で 3 分間混合した。混合後、脱気を行い、デバイス型に流し入れた。その後、70°C で 12 時間保温した。固まった PDMS を型から切り出し、チューブを結合させるための穴を開けた後、PDMS 及びカバーガラスをプラズマクリーナー PR500 (Yamato) を用いて 30 W で 20 秒間酸素プラズマ処理を行った。PDMS 及びガラスのプラズマ処理を行った面を結合させ、70°C で 12 時間保温した。作製したデバイスの高さの測定は、3D Laser Scanning Confocal Microscope VK-X150 controller 及び VK-X160 Measuring Unit (KEYENCE) を用いて行った。

2-11 2D チャンバーにおける細菌の培養および観察方法

P. denitrificans の前培養液を、OD600 が 0.01 になるように希釈し、30°C で 8 時間、振盪培養した。 $\Delta pdnI$ は、凝集体の形成を防止するため C16-HSL を 5 μ M 添加して培養した。培養液を OD600 が 0.01 になるように再度希釈し、各チャンバーに数菌が入るように植菌した。TSB 培地は、流速が 100 μ l/h になるように流した。2D デバイスは 30°C に設定したサーモプレート (Tokai hit) 上に固定し保温した。観察には、Axio Observer. Z1 (Carl Zeiss) を用い、5 分おきに撮影をした。

2-12 3D 流路デバイスにおける細菌の培養および観察方法

P. denitrificans の前培養液を、OD600 が 0.01 になるように希釈し、30°C で 8 時間、振盪培養した。培養液は、培地の流れを止めた後に、各視野に数菌が付着するように植菌した。TSB 培地は、2 本の流路からそれぞれの流速が 50 μ l/h になるように流した。デバイスは 30°C に設定したサーモプレート上に固定し保温した。観察には、Axio Observer. Z1 を用い、5 分おきに撮影をした。培養後のサンプルは 5 μ M の Syto9 で染色をし、Airyscan モジュールを搭載した LSM780 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

2-13 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) 観察

大気圧走査電子顕微鏡で観察する試料の調整は以下の論文を参考に行った (28)。*P. denitrificans* の前培養液を、OD600 が 0.05 になるように希釈し、薄膜ディッシュ (日本電子) に 1 ml 植菌した。*P. denitrificans* のバイオフィームは気液界面付近に形成されるため、ディッシュの薄膜部分が気液界面になるよう、ディッシュを傾けて 30°C で 48 時間培養した。培養後は、培地を取り除き、1% グルタルアルデヒドを 1 ml 添加し、室温で 10 分間固

定した。その後グルタルアルデヒド溶液を取り除き、50 mM の NH₄Cl 溶液 1 ml を入れ、室温で 10 分間クエンチングを行った。その後、NH₄Cl 溶液を取り除き、滅菌水を用いて 3 回洗浄した。洗浄後の試料に金粒子 (Nanoprobes) を添加し、20 分間室温で反応させた。本工程を再度繰り返し、試料に金増感試薬 (GoldEnhance EM # 2113、Nanoprobes) を添加した後、滅菌水を用いて 2 回洗浄した。試料に 1% アスコルビン酸を添加した後、大気圧走査電子顕微鏡 (ClairScope JASM-6200、日本電子) を用いて観察を行った。

2-14 凝集体の生死判定

P. denitrificans の前培養液を OD₆₀₀ が 0.01 になるように希釈し、振盪培養した。培養 32 時間後に試料を 2.5 μM の Syto9 及び 10 μM の PI (Thermo Fischer Scientific) で 15 分間染色し、LSM780 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

第3章 結果・考察

3-1 MVを介した多様なAHLの伝達

3-1-1 多様なAHLの凝集体形成に対する影響とその閾値

*P. denitrificans*はシグナル合成遺伝子 *pdnI*を介して C16-HSL を合成することがわかっている (25)。一方で近年、外部添加した C6-HSL が脱窒活性に影響を与えることが報告された (29)。また、長鎖 AHL に対する凝集体形成の影響を調べたところ C12 から C16 の長鎖 AHL 添加時に凝集体形成が抑制されることも明らかにされた (26)。しかしながら、長鎖 AHL の凝集体形成の抑制を誘導する閾値や、バイオフィーム形成への影響に関しては、未だ明らかとされていない。本章では、まず、C4 から C18 の AHL が、凝集体形成へ影響を与える閾値や伝達様式、さらにバイオフィーム形成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

WT は凝集体を形成しない一方で、 $\Delta pdnI$ は凝集体を形成し、試験管の縁に付着性を示す。C4 から C18 の AHL が C16-HSL と同様に、 $\Delta pdnI$ の凝集体形成を抑制するかを確かめるため、 $\Delta pdnI$ に C4 から C18 の AHL を 5 μM 添加すると、C12 から C18 の長鎖 AHL 添加時に、凝集体形成が抑制されることが示された (図 1)。一方で、C4 から C10 の AHL は $\Delta pdnI$ の凝集体の形成に影響を与えなかった。さらに、長鎖 AHL による凝集体形成の抑制が、遺伝子発現を介して行われているかを確かめるため、 $\Delta pdnI$ におけるシグナルレポーター株 ($\Delta pdnI/pPLlas$) に各 AHL を添加し、その応答を、蛍光を指標に測定した。AHL レポーター株は C4 から C10 の短鎖 AHL 添加時には応答性を示さなかった (図 2)。一方で、C12 から C18 の長鎖 AHL 添加時には、蛍光量が非添加区と比べて有意に高いことが明らかとなった。このことより、長鎖 AHL による凝集体形成の抑制は、遺伝子発現の制御を介したものであることが示唆される。

QS には、AHL 濃度にある一定の閾値が存在する。そのため、続いて $\Delta pdnI$ の凝集体形成を抑制する各長鎖 AHL の閾値濃度を明らかとすることとした。 $\Delta pdnI$ に、様々な濃度の AHL を添加した。C16-HSL は、10 nM で $\Delta pdnI$ が凝集体を形成するのに対し、20 nM 以上の濃度添加時には、凝集体の形成は見られなかった (図 3)。以前の報告にあるように、C16-HSL の凝集体形成を抑制する閾値濃度は 10 から 20 nM であることが示唆された (23)。また、C12-HSL、C14-HSL、C18-HSL は、それぞれ 100 nM、3 μM 、40 nM で、 $\Delta pdnI$ で凝集体の形成が観察される一方で、凝集体の形成が観察されなくなる閾値濃度は、それぞれ 200 nM、4 μM 、50 nM であることが示唆された。これらの結果より、*P. denitrificans* は自身が生産する C16-HSL に感度良く応答し、それ以外の長鎖 AHL においては、側鎖の鎖長に応じて応答性が異なることが示唆された。側鎖の鎖長によって閾値が異なることは、AHL が側鎖の長さによって物性が異なるためであると考えられる (30)。また、C14-HSL を $\Delta pdnI$ に 4 μM 添加した際には、非添加区よりも凝集体度合いが高まることが観察された。このことより、C14-HSL は、濃度によって凝集体形成に異なる影響を与えることが示唆された。

3-1-2 短鎖 AHL と長鎖 AHL の組み合わせによる凝集体形成への影響

Chromobacterium violaceum ATCC12472 は、*P. denitrificans* のように多様な側鎖の長鎖 AHL に応答し、紫色の色素を生産することが知られている。一方で、短鎖 AHL は拮抗的に作用する。長鎖 AHL 添加と同時に短鎖 AHL を *C. violaceum* に添加すると、長鎖 AHL への応答が阻害される (31)。そこで、*P. denitrificans* においても同様に短鎖 AHL が長鎖 AHL に対して拮抗作用があるのかを調べることにした。 $\Delta pdnI$ に対し、10 nM の C16-HSL のみや 10 μ M の C6-HSL を単独で添加した場合には、凝集体の形成が観察される。一方で、10 μ M の C6-HSL を 10 nM の C16-HSL と一緒に添加した際には、凝集体形成が抑制された (図 4)。同様に、50 μ M の C4-HSL 単独で $\Delta pdnI$ に添加した場合には、凝集体が形成される一方で、50 μ M の C4-HSL と 10 nM の C16-HSL を同時に添加した際には、凝集体形成の抑制が確認された。高濃度の C6-HSL 及び C4-HSL は、C16-HSL と同時に存在する場合には、C16-HSL の QS 応答を促進することが示唆された。一方、50 nM の C16-HSL を単独で $\Delta pdnI$ に添加した際には凝集体の形成が抑制されるが、同時に 5 μ M の C10-HSL を添加した際には、凝集体の形成が確認された。同様に、50 μ M の C10-HSL を添加した際には、凝集体の形成が確認された。よって、C10-HSL 及び C8-HSL は、長鎖 AHL の凝集体形成の抑制に対して拮抗して働くことが示唆された。

環境中では、様々な側鎖の AHL を生産する細菌が存在する。*P. denitrificans* は、異種細菌と共存することで、自身の QS に異種細菌のシグナルを利用していることが考えられ、その効果は、シグナルの種類によって異なることが予想される。

3-1-3 MV による長鎖 AHL の伝達

P. denitrificans は C16-HSL を MV に内包し、伝達することがわかっている (23)。そこで、*P. denitrificans* の MV が他の長鎖 AHL も MV に吸着し、伝達に使用するのかを確かめることにした。 $\Delta pdnI$ の培養上清に 5 μ M の長鎖 AHL を添加した後、MV を回収し、*P. denitrificans* を用いた AHL レポーター株に対して、回収した MV を添加した。AHL レポーター株は WT の MV を添加した際と同様に、長鎖 AHL と混合した MV に応答し、蛍光を示した (図 5)。このことより、*P. denitrificans* が生産した MV は、培養上清中に存在する長鎖 AHL を吸着し、*P. denitrificans* に伝達することが示唆された。また、培養上清から MV を除いた画分を添加した際にも、AHL レポーター株は応答性を示した。このことより、*P. denitrificans* は MV を介さないシグナルの伝達方法も有している可能性が考えられる。先行研究により、*P. denitrificans* の MV は *P. denitrificans* 自身に付着しやすいことが明らかとなっている (23)。このことより、自然環境中では、*P. denitrificans* は MV を用いて異種細菌の生産した AHL を奪い、自身で使用する事が考えられる。この方法を用いることで、自身が生産する C16-HSL が QS の閾値に達さない場合でも、異種細菌の生産する AHL を利用して、自身の QS を活性化させることが可能となると考えられる。

3-1-4 多様な AHL のバイオフィームに対する影響

P. denitrificans は C16-HSL によって、凝集体形成と同様にバイオフィーム形成も抑制することが明らかとなっている (26)。そこで、続いて様々な側鎖の AHL がバイオフィームの形成も抑制しうるかを確かめることとした。様々な鎖長の AHL を *P. denitrificans* に添加し、バイオフィームを観察した。先行研究と同様に、WT は薄いバイオフィームを形成する一方で、 $\Delta pdnI$ は厚いバイオフィームを形成した (図 6)。また、それらの高さを画像解析により測定したところ、WT は最大 24.1 μm である一方で、 $\Delta pdnI$ は最大 53.9 μm であった (図 7A)。また、 $\Delta pdnI$ に C16-HSL を添加し培養したところ、WT と同様に薄いバイオフィームを形成した。先行研究と同様に、*P. denitrificans* は C16-HSL を介してバイオフィーム形成を抑制することが示唆された。さらに、 $\Delta pdnI$ は C4 から C8 の AHL 添加時には非添加時と同様に、分厚いバイオフィームを形成する一方で、C12 から C18 の AHL 添加時には、WT と類似した薄いバイオフィームを形成した (図 6)。また、C10-HSL の添加時には、非添加時に比べると、少し薄いバイオフィームを形成した。 $\Delta pdnI$ への C12 から C18 の AHL 添加時は非添加時に比べて、バイオフィームの厚さ及び基質に対する表面被覆率において、顕著な差があることが示された (図 7A、B)。さらに、バイオフィームの体積も長鎖 AHL 非添加時に比べて添加時には減少することが示された (図 7C)。これらの結果より、*P. denitrificans* において、長鎖 AHL はバイオフィーム形成を抑制することが示唆された。

3-2 *P. denitrificans* におけるバイオフィーム形成因子とその制御

3-2-1 *P. denitrificans* の BF 形成過程

多くの運動性細菌において、バイオフィームには、付着、成熟、脱離などの生活環が存在する。しかしながら、非運動性細菌のバイオフィーム形成過程は多くが未解明である。そこでまず、*P. denitrificans* のバイオフィーム形成過程を明らかにすることとした。*P. denitrificans* は、ポリスチレン上で、薄いバイオフィームを形成し、 $\Delta pdnI$ は厚いバイオフィームを形成することがわかっている。このような形態がどのような過程を経て形成されるのかを調べるため、蛍光タンパク質でラベルした色の異なる株を混合させ、バイオフィームを形成させた。WT 同士を混合させた場合、2 色の株が混ざり合わずにマイクロコロニーが隣接した形で、薄いバイオフィームを形成することが観察された (図 8)。また、 $\Delta pdnI$ 同士を混合させた場合にも、2 色の株は、混ざり合わずにマイクロコロニー同士が隣接した状態で、分厚いバイオフィームを形成していることが観察された。一方で、WT と $\Delta pdnI$ を混合させて形成させたバイオフィームは WT 同士で形成させたバイオフィームと類似した薄いバイオフィームを形成する様子が観察された。WT と $\Delta pdnI$ の混合バイオフィームが薄い形態を示したことは、WT が生産した C16-HSL を $\Delta pdnI$ が受容して、バイオフィームの形成を抑制したためだと考えられる。以上の結果より、*P. denitrificans* のバイオフィームはマイクロコロニー同士が混ざり合わず、隣接した状態から形成されることが考えら

れる。この仮説を証明するため、マイクロコロニーの形成過程を経時的に観察することとした。そのため、2色の蛍光タンパク質でラベルした株を混合させ、寒天培地下での生育の様子を観察した。WT同士を混合させ培養したところ、1個の細胞から分裂が繰り返された後に、各色の株は混ざり合わずに隣接している様子が観察された(図9A)。また、 $\Delta pdnI$ においても同様の傾向が観察された(図9B)。これらのことより、*P. denitrificans*のバイオフィルムは、1細胞が分裂して形成されたマイクロコロニーが拡大した後、混ざり合わずに隣接して形成されることが示唆された。

3-2-2 2種の付着因子 BapA と *pmx* の役割

先行研究において、BapAが*P. denitrificans*のバイオフィルム形成に必要であることが示された(15)。BapAは細胞の表層に局在し、細胞を基質に付着させる働きを持つことが示唆されている。一方で、細胞外物質の生産に関与する遺伝子である*pmx*が凝集体形成及びバイオフィルム形成に関与することも、明らかとしている(26)。BapAおよび*pmx*、これら2つの因子はいずれも集団形成に深く関与する一方で、バイオフィルム形成においてそれらの関係性及びQSによるそれら因子の制御には未解明な部分が残る。そこで、本章では、集団形成に関与する因子であるBapA及び*pmx*のバイオフィルム形成における役割と、そのQS制御を明らかにすることを目的とした。

*pmx*を高発現している $\Delta pdnI$ は凝集体を形成する一方で、*pmx*低発現のWTは凝集体を形成しない。つまり*P. denitrificans*は*pmx*の発現を抑制することで、凝集体形成を抑制していることが予想される。一方で、BapAの凝集体形成への関与は未解明であるため、まず凝集体形成に、BapAが関与するのかを調べることにした。凝集体を形成する $\Delta pdnI$ において*bapA*の欠損株を作製し($\Delta pdnI\Delta bapA$)、液体培地中で振盪培養した。以前の報告と同様に $\Delta pdnI$ が凝集する一方で、 $\Delta pdnI\Delta pmx$ はWTと同様に非凝集性を示した(図10)。一方、 $\Delta bapA$ はWTと同様に非凝集性を、 $\Delta pdnI\Delta bapA$ は $\Delta pdnI$ と同様に凝集体形成を示した。このことより、BapAは凝集体の形成には関与しないことが示唆された。

また、 $\Delta pdnI$ はしわ状のコロニー形態を示す一方で、WTはスムーズなコロニー形態を示すことがわかっている。 $\Delta pdnI\Delta pmx$ においてはスムーズなコロニー形態を示すことより、*P. denitrificans*はC16-HSLによって*pmx*の発現を抑制することで、コロニー形態をスムーズ型に制御していることが示唆される。コロニー形態におけるBapAの役割を調べるため、 $\Delta bapA$ 及び $\Delta pdnI\Delta bapA$ のコロニーバイオフィルムの形態を観察した。 $\Delta bapA$ はWTと同様にスムーズなコロニーを形成する一方で、 $\Delta pdnI\Delta bapA$ は、しわ状のコロニーを形成した(図11)。このことより、BapAは、コロニー形態に影響を与えないことが示唆された。

続いてBapA及び*pmx*のバイオフィルム形成への影響を調べるため、ポリスチレン上にバイオフィルムを形成させ、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。先行研究と同様に、WTは薄いバイオフィルムを形成し、 $\Delta pdnI$ は厚いバイオフィルムを形成した(図12)。一方で、 Δpmx 及び $\Delta pdnI\Delta pmx$ はWTと同様に薄いバイオフィルムを形成した。よって、*pmx*は

バイオフィルムの厚さに関与することが示唆された。また、先行研究によって、BapA は細胞が基質に付着する際に必要とされるため、 $\Delta bapA$ はバイオフィルムを形成しないことがわかっている ((15)、図 3)。しかしながら、 $\Delta pdnI\Delta bapA$ は基質に付着し、 $\Delta pdnI$ と同様に分厚いバイオフィルムを形成した。 $\Delta pdnI$ は *pmx* が高発現していることより、 $\Delta pdnI\Delta bapA$ は、*pmx* の働きにより基質への付着力が増加し、分厚いバイオフィルムを形成したのではないかと考えた。よって、*pmx* は凝集体形成や厚いバイオフィルムの形成に寄与する、つまり細胞間の付着に寄与するだけでなく、細胞と基質との付着性にも関与することが考えられた。この仮説を証明するため、各破壊株において *pmx* の過剰発現株を作製し、バイオフィルム形成を観察した。バイオフィルムを形成しない $\Delta bapA$ を含めたいずれの破壊株においても、*pmx* を過剰発現させると、基質に付着し、厚いバイオフィルムを形成した (図 12)。これらのことより、*pmx* は細胞間の付着だけでなく、細胞と基質の付着にも関与することが示唆された。

BapA は細胞と基質の、*pmx* は細胞間及び細胞と基質の付着に関わることが示唆されたが、これらの付着因子が、本条件下で形成させたバイオフィルムにおいて主にどのような働きをしているのかを確かめるため、各破壊株を混合し、バイオフィルムを形成させた。 $\Delta pdnI\Delta bapA$ 及び $\Delta pdnI$ 、つまり、BapA を発現せずに *pmx* を高発現する株と BapA を発現し *pmx* も高発現する株を混合し、ポリスチレン上にバイオフィルムを形成させた。 $\Delta pdnI$ はポリスチレン上に付着し厚いバイオフィルムを形成し、 $\Delta pdnI\Delta bapA$ は $\Delta pdnI$ が形成したバイオフィルム中に混ざり込むように存在することが観察された (図 13)。また、 $\Delta pdnI\Delta bapA$ と $\Delta pdnI\Delta pmx$ 、つまり BapA を発現せずに *pmx* を高発現する株と BapA を発現するが、*pmx* を発現しない株を混合し、同様にバイオフィルムを形成させると、 $\Delta pdnI\Delta pmx$ はポリスチレン上にバイオフィルムを形成し、 $\Delta pdnI\Delta pmx$ は $\Delta pdnI\Delta pmx$ に覆われながら、 $\Delta pdnI\Delta pmx$ の層の上で凝集している様子が観察された。これらの結果より、*P. denitrificans* は、バイオフィルム形成時には、BapA を基質表面の付着因子として、*pmx* を細胞間の付着因子として用いていることが示唆された。

タンパク質と多糖は、異種細菌においてもバイオフィルム形成において、使い分けがなされていることが報告されている。例えば *Vibrio cholera* は、Bap1/RbmC タンパク質により、細胞が基質に付着する (32)。さらに細胞の極に存在する RbmA タンパク質は細胞間の接着に関わり、バイオフィルム内で細胞を蜜に配置するために働く (33)。そして VPS と呼ばれる多糖はバイオフィルムの成熟に必要であり、また上述のタンパク質がバイオフィルム内に蓄積するためにも必須である。このように、*P. denitrificans* も異なる物質を、基質との付着力及び細胞間の付着力を高めるために使い分けをしていると考えられる。

3-2-3 2種の付着因子の細胞間コミュニケーション制御

pmx が各培養段階において、C16-HSL によってどのように制御されるのか、また、C16-HSL の濃度によって抑制の度合いが異なるのかを調べるため、Real-Time PCR を用いて

pmx の転写量を比較した。その結果、どの生育段階においても、WT に比べて $\Delta pdnI$ において *pmx* は高い発現量を示した (図 14A)。さらに、 $\Delta pdnI$ に C16-HSL を加えて培養すると、*pmx* の発現量は、どの生育段階においても WT と同程度まで減少した。よって、*pmx* は生育のどの段階においても、C16-HSL によって発現が抑制されることが示された。

また、C16-HSL の濃度を振って $\Delta pdnI$ に添加し、*pmx* の発現量を比較した。その結果、C16-HSL を 50 nM 以上添加した際に、*pmx* の発現量が非添加時と比較して有意に減少していることが明らかとなった (図 14B)。*pmx* の発現を抑制するための C16-HSL の濃度の閾値は 5 から 50 nM であることが示唆された。C16-HSL の凝集体形成を抑制する閾値濃度が 10 から 20 nM であることから (図 3)、*pmx* の発現が抑制されることによって、凝集体形成が抑制されることが示唆される。

一方で、BapA もバイオフィルムの形成に重要な役割を果たすことより、QS による *bapA* の発現制御を検証した。Real-time PCR の結果、*bapA* の発現量も、 $\Delta pdnI$ において WT より高い値を示した (図 15)。また、 $\Delta pdnI$ に C16-HSL を添加すると、*bapA* の発現量が低下することが示された。*bapA* も *pmx* と同様に、C16-HSL によって発現が抑制される遺伝子であることが示された。

P. aeruginosa PAO1 や *Serratia liquefaciens*、*Burkholderia cenocepacia* H111 は QS によってバイオフィルム形成を促進する (10, 34, 35)。このように、多くの細菌において、QS は細胞外マトリクスや運動性の調節を介して、バイオフィルム形成を促進することがわかっている。一方で、*P. denitrificans* においては、QS によって付着因子の発現を抑制しており、その結果、バイオフィルム形成が抑制されることが明らかとなった。このような QS によるバイオフィルムの抑制は、いくつかの菌でも報告がある。*Staphylococcus aureus* や *Staphylococcus epidermidis* は、QS によりバイオフィルムの脱離を促進することが報告されている (36, 37)。これら 2 種の細菌は *P. denitrificans* と同様、非運動性細菌である。バイオフィルム形成の抑制メカニズムは異なるものの、QS による集団化の抑制は、非運動性細菌が高菌体密度状態を回避する方法の 1 つであるかもしれない。

3-3 細胞間コミュニケーションによって制御されるバイオフィルムの機能解析

3-3-1 2次元平面下での細胞の広がりを与える細胞間コミュニケーションの影響

これまでの研究より、*P. denitrificans* は QS を介して *pmx* の発現を抑制することで、凝集体形成やバイオフィルム形成を抑制することが明らかとなった。多くの細菌において QS はバイオフィルム形成の促進など、集団的挙動を促進する一方で、*P. denitrificans* は反対の制御機構を持つことが示唆された。そこで、QS による制御のさらに詳細な解明、また、本現象が *P. denitrificans* にとってどのような意味を持ちうるのかを検証することとした。しかしながら、細菌の集団形態は 3次元の立体的な高次構造をとるため解析が複雑であり、1細胞レベルでの経時的観察を行うことが難しい。そこで、1細胞レベルで経時的に観察を行うため、マイクロ流体デバイスを用いて解析を行うこととした。まず、細菌の集団行動を

モノレイヤーで観察するために、2D チャンバーを用いた。2D チャンバーは PDMS で作製されており、高さが 1.3 μm に制限されている (図 16)。そのため、細菌の増殖を一層で観察することが可能となる。チャンバー内で、 $\Delta pdnI$ は密に増殖し、隣接する一方で、WT は菌体間距離を保ちながら、チャンバー内に広がっていく様子が観察された (図 17)。また、 $\Delta pdnI$ に C16-HSL を添加し培養すると、WT と同様にチャンバー内に広がり、コロニー面積が大きくなるのが観察された。これらの結果より、*P. denitrificans* は、QS を介して細胞間距離を制御していることが示唆された。さらに、凝集体形成因子である *pmx* を欠損した株 (Δpmx 、 $\Delta pdnI \Delta pmx$) も WT と同様に細胞間距離を保ちながらコロニーを形成することが観察された。QS による菌体間距離の制御も、制御下の因子として *pmx* の生産物による細胞間の接着性が寄与していることが考えられる。また、基質への付着因子である $\Delta bapA$ は、基質に付着せずに増殖するため、コロニーの形成は観察されない一方で、 $\Delta pdnI \Delta bapA$ は、一部の細菌が基質に付着し、コロニーを形成した。*pdnI* を欠損した株は *pmx* を高発現していることより、 $\Delta pdnI \Delta bapA$ は *pmx* の生産物を用いて、基質への付着能を獲得したことが予想される。本結果からも、3-2-2 で述べたように、*pmx* の生産物は、細胞間の付着性のみならず、細胞と基質との付着にも寄与することが考えられる。

バイオフィーム等の菌体の高密度化やバイオフィームの過度な成長は、栄養の枯渇や代謝産物の蓄積などをもたらす。特に *P. denitrificans* が生息する土壌などの砂と砂の間では、バイオフィームの成長により水の流れが弱まってしまうことより、栄養の獲得効率が低下することが考えられる (38, 39)。バイオフィームや凝集体が大きく形成しつづけると、同種間での栄養や酸素の奪い合いの結果、内部では死細菌が増えることが報告されている (40)。多くの細菌は、このような密度の問題を回避するために、運動性を用いてバイオフィームから脱離する。非運動性細菌である *P. denitrificans* は、高菌体密度になった場合に、QS によって細胞外物質の量を調節し、菌体間距離を保つことで、高密度になることによる問題を回避することが可能になることが考えられる。また、細胞外物質生産量の制御によって、菌体間距離を保ちながら広がることで、異種細菌が入り込まずに、基質上での被覆面積、つまり生息域を拡大することが可能になると考えられる。

3-3-2 3次元流路内でのバイオフィーム形成に与える細胞間コミュニケーションの影響

QS が *P. denitrificans* の集団行動に与える影響をさらに詳細に解析するため、高さの制約をなくし、3次元方向に幅の存在するマイクロ流体デバイス内での細胞の増殖を観察した。WT を流路内に植菌し、経時的に観察すると、流路底面に薄く広がることが観察された (図 18A)。また、 $\Delta pdnI$ は分厚く積もることが観察された (図 18B)。また、本培養条件下で、*P. denitrificans* は桿菌状態である一方で、分裂を繰り返し、高菌体密度になった条件下では、丸い形態の細胞が、綺麗に整列することが観察された。一方で、 $\Delta pdnI$ はランダムな方向を向き付着していることが観察された。このことより、*P. denitrificans* は QS によって、薄いバイオフィーム状態に保ち、綺麗に整列することが示唆された。

WT が丸く整列している状態は、細胞形態が桿菌状から球菌状に変化したのではなく、細胞の極部分で付着していることが予想された。そこで、共焦点顕微鏡を用いて流路上の細胞を 3 次元的に観察した。その結果、細胞が極で付着し、立っているような様子が観察された (図 18C)。 $\Delta pdnI$ は明視野での観察において、桿菌状の細胞が、ランダムな方向を向いていることから、*P. denitrificans* は、QS を介して整列することが示唆された。細胞が極で付着し立つ現象が、細胞同士が支え合うことによって成り立っているのかを調べるため、電子顕微鏡観察を行った。一般的な走査電子顕微鏡 (SEM) 観察の工程には、サンプルを固定する際に脱水の工程を含むため、SEM 観察を行うと、細胞間に隙間が存在した際に、隙間はサンプル調整に由来するものであるか、元々存在したものであるのかの判断がし難い。そこで、細胞の脱水処理を必要としない大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) を用いて観察を行った。流路上で観察される細胞の整列は、バッチ条件下でバイオフィルムを形成させた場合でも観察されるため、ASEM に用いるディッシュ上でも同様の条件で培養し、観察を行った。その結果、細胞は共焦点顕微鏡観察時と同様に極を支点に立ち、整列している様子が観察された (図 19)。さらに、細胞は隣接する細胞と支え合い立っているのではなく、隣接細胞と付着せず自立していることが観察された。*P. denitrificans* は、QS を介して整列し、その細胞は自立していることが示唆される。

P. denitrificans が整列をする本構造は、自己組織化の一つであると言える。一般的に、自己組織化は、ある要素が相互作用することにより、外部からの力によらずに、システム全体として秩序のある構造を生み出すことを指す。自己組織化の研究は、比較的新しい分野であり、とりわけ生物学における自己組織化は、そのメカニズムや意義を含め未解明な部分が多い。一部の真核生物において、例えば、*Distyostelium discoideum* (キイロタマホコリカビ) は集合し、アメーバ状の形態を示すことや (41)、ハニカム構造をとるミツバチの巣が自己組織化を利用して作られていることなどが報告されており (42)、数種の生物において自己組織化が報告がされている。生物自身が自己組織化をすることで、しばしば、1 個体では得られなかった機能を獲得する。*P. denitrificans* の整列時に観察された 1 つの円 (細胞) の周りに 6 つの円が配置される構造は、六方最密構造と呼ばれ、六方最密構造は、面積あたりに最も充填率高く円を配置することができる並びである。つまり、*P. denitrificans* はこの構造をとることで、基質あたりに最も多く細胞を付着させることができる。また、1 層を維持することで、バイオフィルム中のどの細菌も均等に栄養を受け取ることが可能であり、代謝産物の蓄積も軽減されると考えられる。さらに、細胞は基質上に極を付着させ立っている状態であることにより、分裂時には、隣接する細菌にぶつからず、各細菌が周囲の細菌からの干渉を受けずに娘細胞を放出することができるというメリットが生まれることが考えられる。

V. cholerae は、立体的なバイオフィルムを形成するが、その底面部の細菌は、立っていることが知られている (32)。また、*Caulobacter crescentus* はストークと呼ばれる器官を

用いて強固に基質に付着し、立つことが知られている (43)。また、*P. aeruginosa* は、培養液中で、周囲に存在するポリマーと細胞のエンタルピーが増加することで、細胞の長軸面が付着し整列することがわかっている (44)。いずれも基質に直立するまたは、整列する現象ではあるが、*P. denitrificans* が立つメカニズムとは異なるメカニズムを有することが予想される。*P. denitrificans* の BapA の破壊株は基質に付着しないことより、細菌の自立にも BapA が関与している可能性が考えられ、詳細なメカニズムは今後解析する必要がある。

3-3-3 凝集体形成のデメリット

多くの細菌は、QS によって集団化を促進する一方で、*P. denitrificans* は QS を介して集団化を抑制する。これは、*P. denitrificans* にとって、集団化が何らかのデメリットとなるためであることが考えられる。凝集体が大きくなると、内部から死菌が出現することが報告されていることより (40)、*P. denitrificans* も凝集体を形成することで、死菌の割合が多くなると予想した。そのため、凝集体が大きくなったタイミングで、細胞の生死を顕微鏡観察によって判定した。凝集体を形成しない WT 及び Δpmx は多くの細菌が緑に蛍光する、つまり生菌である一方で、 $\Delta pdnI$ の凝集体内部では、マゼンダ蛍光を示す細菌、つまり死菌が多く存在していた。本株から凝集体形成因子を欠損させた $\Delta pdnI \Delta pmx$ は、WT や Δpmx と同様に、多くが生菌であった。 $\Delta pdnI$ は凝集体を形成することによって、死菌の割合が増加することが示唆された。このことより、*P. denitrificans* は凝集体形成による死菌の出現を、QS によって回避していることが考えられる。

第4章 総括

多くの細菌は、QS を介して集団化を促進する一方で、*P. denitrificans* は QS を行うことにより集団化を回避することが示された。さらに、*P. denitrificans* は、QS によって、細胞間及び細胞と基質の付着因子である *pmx*、さらに細胞と基質の付着タンパク質をコードする *bapA* の発現を抑制することで集団化を抑制することも明らかとなった。このように *P. denitrificans* は、2 種の付着因子の発現を調整することで、環境中では多様な集団形態を示していることが考えられる。

P. denitrificans においては、低菌体密度の場合には、様々な外部ストレスから身を守るため、バイオフィームを形成し、一方で、高菌体密度になった場合に、QS によって菌体間距離を保っていることが考えられる。このような、シグナリングによる菌体間距離の調整は、QS の新たな役割であると考えられる。C16-HSL を生産しない $\Delta pdnI$ は凝集体を形成することで、WT と比べて死菌の割合が増加することも明らかとなった。非運動性細菌である *P. denitrificans* は脱離の能力を有しないと考えられる一方で、QS による集団化回避の機構を用いることで、菌体密度を過剰に高めることなく、種内競争を回避することが可能になることが予想される。

また、今回、マイクロ流体デバイスを用いた実験において、*P. denitrificans* は QS を介して綺麗に整列する、自己組織化をすることが明らかとなった。自己組織化を QS で制御しているという報告はこれまでに例がなく、新規の知見であると言える。このような自己組織化状態は、上述したように、各細胞に栄養が均等に行き渡るというメリットが存在することが考えられる。また、厚いバイオフィームは、流れの影響を受けやすく、そのため、厚いバイオフィームを形成することで、基質から剥がれる可能性が高まる。一方で、バイオフィームを薄い状態に保つことで、流れの影響が低下し、集団として流される確率が減少することも予想される。*P. denitrificans* における自己組織化のメカニズム及びその生態的意義は、今後解析する必要がある。

先行研究より、MV は 1 粒子に QS を誘導するために十分なシグナル量を含んでいることがわかっている (23)。多くの細菌において、QS はバイオフィーム形成を促進することが報告されている。この場合、バイオフィームの形成に伴って、菌体密度が増加することで、QS シグナルも蓄積し QS はより働きやすい状況になる。一方で、今回、*P. denitrificans* は、QS によって、集団状態においても一定の菌体間距離を保っていることが、2D チャンバーや ASEM の観察によって明らかとなった。このような形態では、菌体密度は増加せず、シグナルは蓄積し辛いことが予想される。*P. denitrificans* は MV を用いることで、バイオフィームが QS シグナルを蓄積しないような形態の場合でも、QS を誘導することを可能にしていることが考えられる。

また、*P. denitrificans* は、異種細菌が生産する AHL も自身の QS に利用しうることが示唆された。さらに、それらの長鎖 AHL を自身が生産する MV に吸着させ、利用することが可能であることも明らかとなった。複合微生物系などの異種細菌が存在する場合に

は、*P. denitrificans* は MV を用いることで、異種細菌のシグナル奪うことが可能になると考えられる。このことによって、自身の QS の促進さらには、異種細菌の QS の阻害が可能となる。*P. denitrificans* は、QS によって集団化を抑制し、多くの細菌は集団化を促進する。多様な細菌から形成されるコミュニティで、*P. denitrificans* が MV を介して異種細菌からシグナルを奪うことで、高菌体密度下において異種の QS を阻害、同種の QS を促進し、異種同種の細菌の分散を促すことが可能になり、高菌体密度化の回避をしていることが予想される。

表 1 本章で用いた菌株とプラスミド

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>P. denitrificans</i>		
Pd1222	Wild type strain (WT)	(45)
$\Delta pdnI$	Pd1222 mutant with a deletion in the <i>pdnI</i> gene	(26)
Δpmx	Pd1222 mutant with a deletion in the <i>pmx</i> gene	(26)
$\Delta pdnI\Delta pmx$	Pd1222 mutant with a deletion in the <i>pdnI</i> and <i>pmx</i> gene	(26)
$\Delta bapA$	Pd1222 mutant with a deletion in the <i>bapA</i> gene	(15)
$\Delta pdnI\Delta bapA$	Pd1222 mutant with a deletion in the <i>pdnI</i> and <i>bapA</i> gene	This study
<i>E. coli</i>		
S17-1	Mobilizer strain	(46)
Mach1	Cloning host	TaKaRa
MM294	F- endA1 hsdR17 supE44(AS) rfbD1 spoT1 thi-1	(47)
Plasmids		
pBBPML	pBBR1MCS-2 lacking <i>lac</i> promoter and fused to the terminators of Pden_0055 and Pden_0893	(48)
pBBPpmx	pBBPML carrying <i>pmx</i> ORF and upstream 305 bp	(26)
pBBPdenzsGreen	pBBPML carrying <i>zsGreen</i> fused to the promoter region of Pden_2763	(48)
pBBPdentdTomato	pBBPML carrying <i>tdTomato</i> fused to the promoter region of Pden_2763	This study
pK18-Pdn-luxI	<i>pdnI</i> deletion cassette in pK18mobsacB	(23)
pRK2013	Mobilization helper plasmid, Km ^r	(49)
ptdTomato	pUC19 carrying <i>tdTomato</i>	TaKaRa

表 2 本章で用いたプライマー

Primer	Sequence	Source or reference
P2763F	5'-CTGGCGTTCCACAGGTATTTG-3'	This study
P2763_tdTomaR	5'-ACCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGATGTT TCCCTCTTGTC-3'	This study
P2763_tdTomaF	5'-GACAAGAGGGAAACATCATGGTGAGCAA GGGCGAGGAGGT-3'	This study
tdTomaR	5'-AGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTC-3'	This study
P2763nestF	5'-CATTTCCGCCTGTGCGTGCCCTGGTGTCC CCCGGATCGTC-3'	This study
tdTomanestR	5'-CCAAGCTCAGCTAATTAAGCCTACTTGTA CAGCTCGTCCA-3'	This study
P2763nest_pBBRF	5'-ACGGTATCGATAAGCTTCTGGTGTCCCC GGATCGTC-3'	This study
tdTomanest_pBBRR	5'-GTGGCGGCCGCTCTAGACTACTTGTA AGCTCGTCC-3'	This study
realPden_0842F	5'-CGGCCGATGATGATCGA-3'	This study
realPden_0842R	5'-CGTTGCGATCCGAGATCTG-3'	This study
realbapAF	5'-CAGTACGGTTCGCCTTCCAT-3'	This study
realbapAR	5'-CCGAATGATCTCACCCGAGTT-3'	This study
realrpoZF	5'-TCGCGACAACGACAAGAATC-3'	This study
realrpoZR	5'-CTGCTGGGCCTCGATCAT-3'	This study

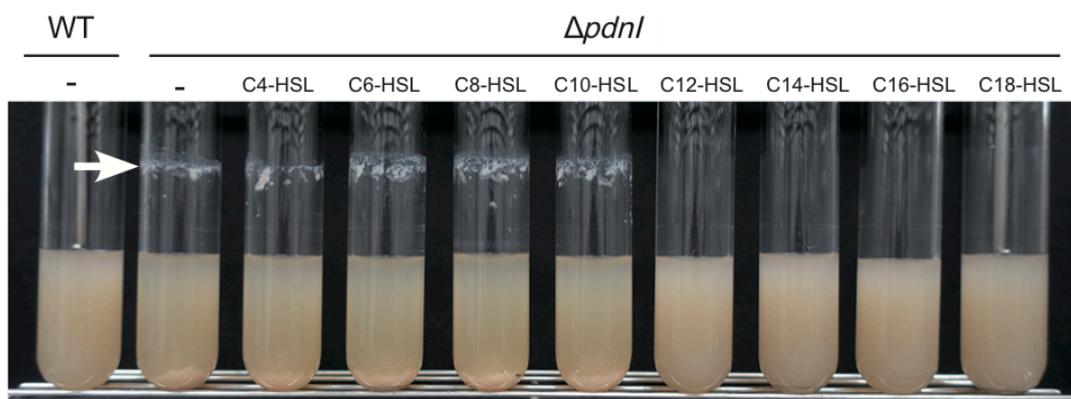


図 1 多様な側鎖の AHL による凝集体形成への影響

WT 及び $\Delta pdnI$ は試験管で 16 時間振盪培養した。各 AHL は 5 μM になるように培養液に添加した。白色の矢印は試験管に付着した凝集体を示す。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。

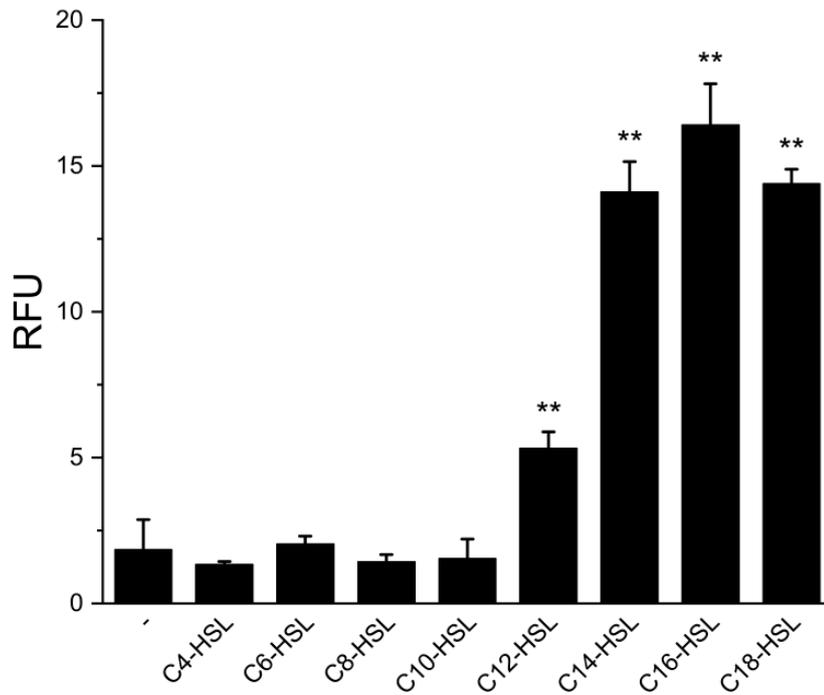


図 2 様々な側鎖の AHL に対する *P. denitrificans* の応答

それぞれの AHL を *P. denitrificans* の AHL のレポーター株 (*P. denitrificans* Δ *pdnI*/pPLlas) に 5 μ M ずつ添加した。レポーター株は 16 時間振盪培養させた。培養後、培養液を PBS で洗浄、懸濁後、プレートリーダーを用いて蛍光値及び OD600 を測定した。RFU は蛍光値を OD600 で割った値を示す。**は $p \leq 0.01$ を示す (Post-hoc Dunnett's test)。

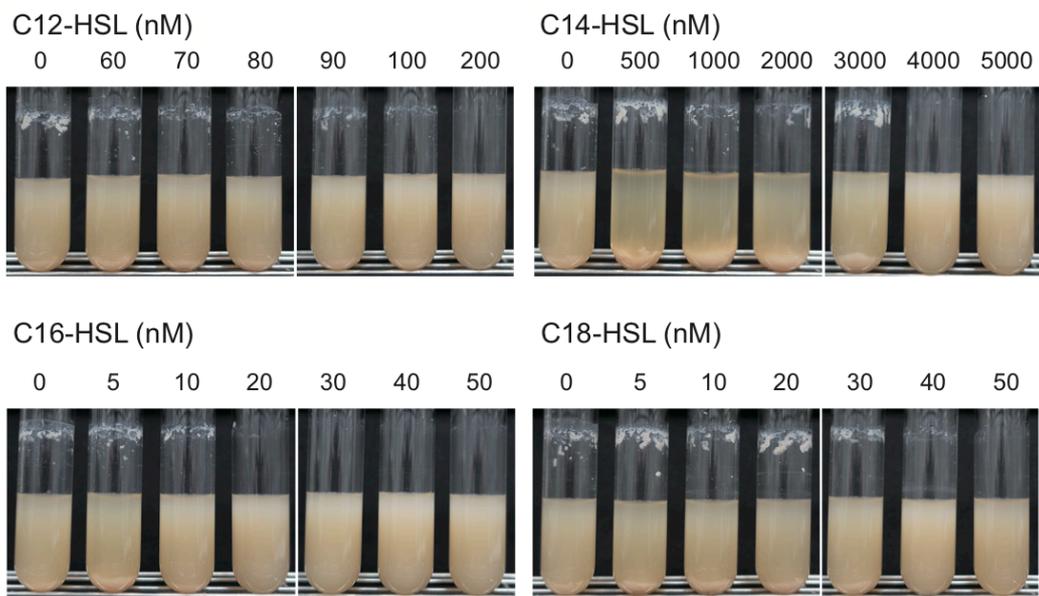


図 3 凝集体形成を抑制する長鎖 AHL の閾値濃度

$\Delta pdnI$ を 16 時間振盪培養した。全ての条件は生物学的な 3 連で試験を行った。

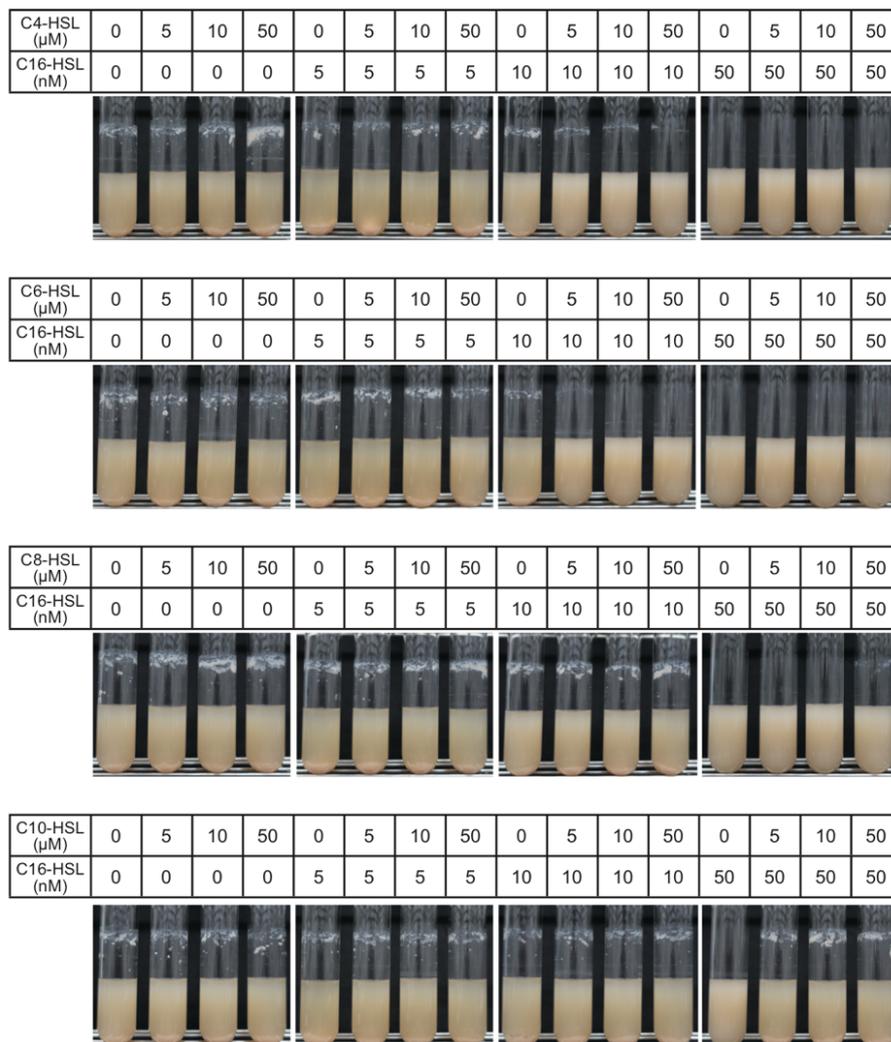


図 4 C16-HSL の凝集体形成抑制に対する短鎖 AHL の影響

$\Delta pdnI$ を 16 時間振盪培養した。全ての条件は生物学的な 3 連で試験を行った。

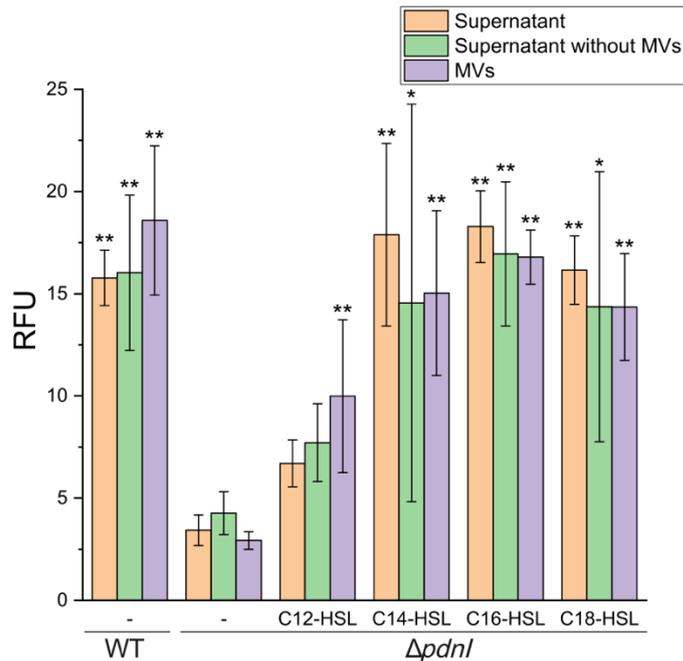


図 5 MV の長鎖 AHL の伝達性

上清、上清から MV を除いた画分、MV 画分を、AHL レポーター株 (*P. denitrificans* $\Delta pdnI$ pPLlas) に元の培養液濃度の 10 分の 1 になるように希釈して添加した。レポーターの培養液を PBS で洗浄、懸濁し、プレートリーダーを用いて蛍光値及び OD600 を測定した。RFU は蛍光値を OD600 で割った値を示す。エラーバーは 5 回の独立した実験の標準偏差を示す。**は $\Delta pdnI$ の非添加系の各画分と比較した際の $p \leq 0.01$ 、* $p \leq 0.05$ を示す (Post-hoc Dunnett's test)。オレンジは上清、緑は上清から MV を除いた画分、紫は MV 画分の添加系を示す。

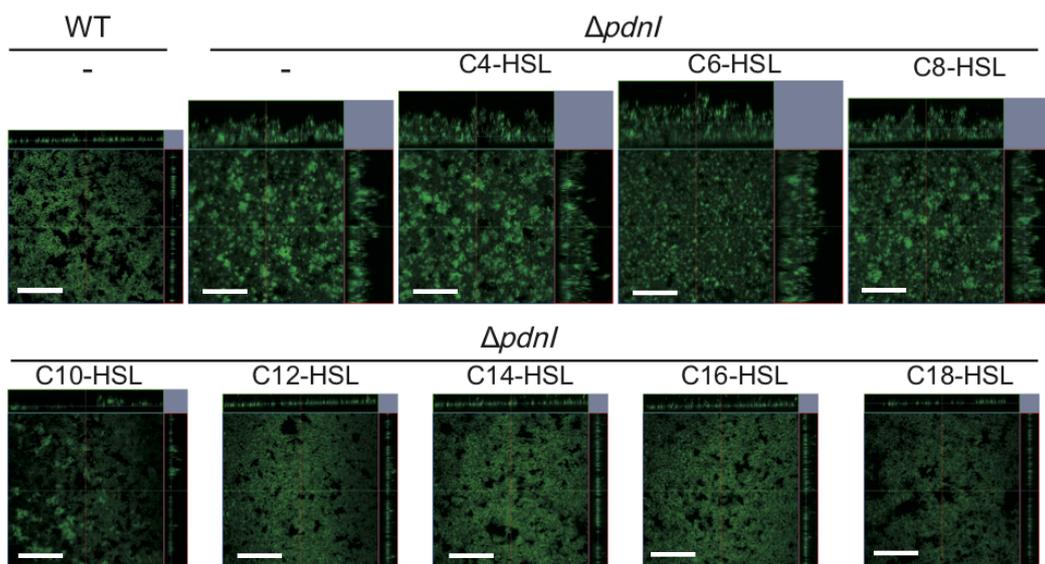


図 6 様々な側鎖の AHL のバイオフィルム形成への影響

バイオフィルムは静置条件下で 48 時間培養し形成させた。各 AHL は培養液に 5 μM ずつ添加した。*zsgreen* をもたせた株 (Pd1222/pBBPdenzsGreen、 $\Delta pdnI$ /pBBPdenzsGreen) を用いてバイオフィルムを形成させた。バイオフィルムは、カメレオンビジョンレーザーシステムを搭載した LSM880 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 50 μm を示す。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。

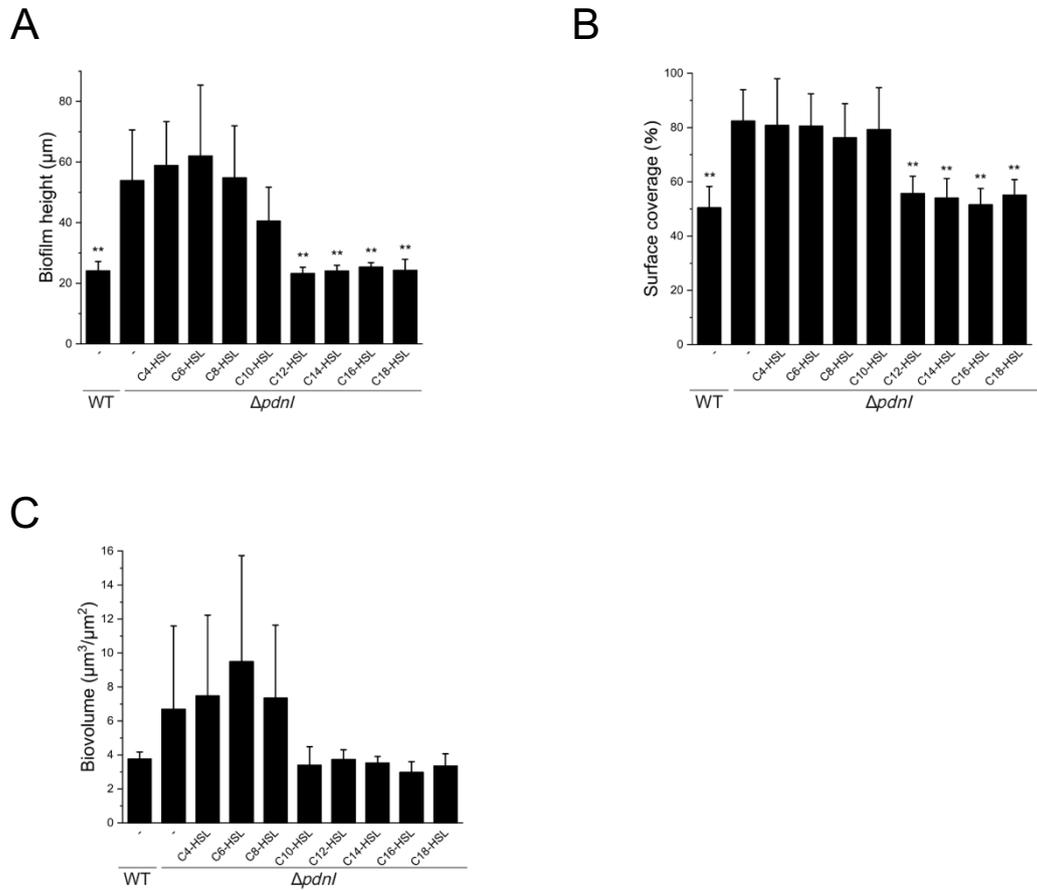


図 7 様々な側鎖の AHL のバイオフィルム量に対する影響

(A) バイオフィルムの最大の厚みは、図 6 で取得した顕微鏡画像より IMARIS8.20 (Bitplane, Inc.) を用いて算出した。6 視野の画像を用いて計算を行った。エラーバーは標準偏差を示す。**は $\Delta pdnI$ の AHL 非添加系と比較した際の、 $p \leq 0.01$ を示す (Post-hoc Dunnett's test)。(B) バイオフィルムの表面被覆率は図 6 で取得した顕微鏡画像より ImageJ を用いて算出した。6 視野の画像を用いて計算を行った。エラーバーは標準偏差を示す。**は $\Delta pdnI$ の AHL 非添加系と比較した際の、 $p \leq 0.01$ を示す (Post-hoc Dunnett's test)。(C) バイオフィルムの体積は、図 6 で取得した顕微鏡画像より IMARIS8.20 を用いて算出した。6 視野の画像を用いて計算を行った。エラーバーは標準偏差を示す。

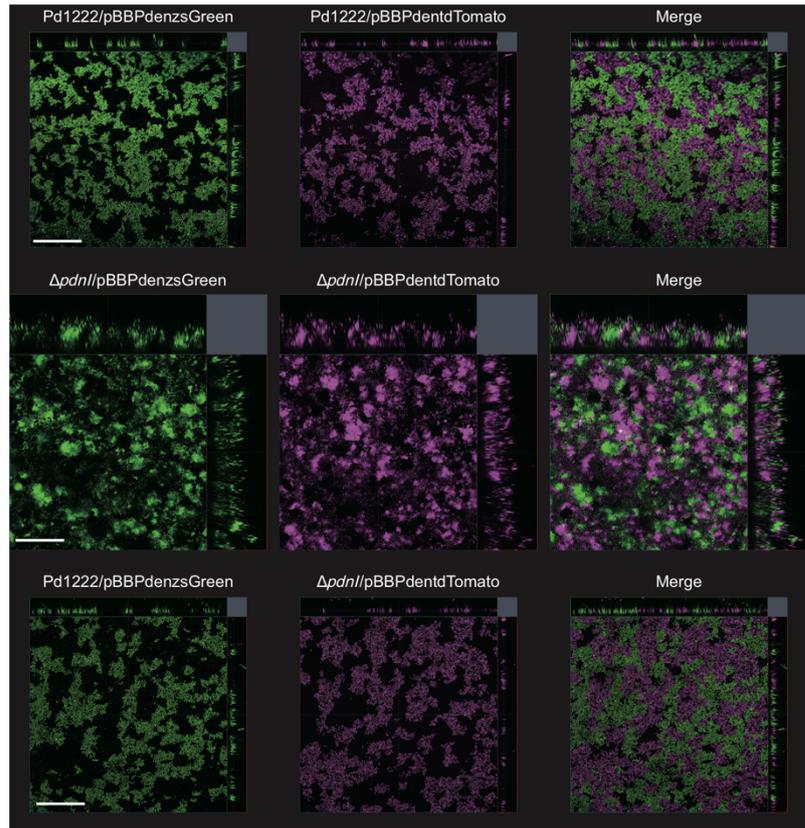


図 8 2 色の細胞由来のバイオフィルム形成

ZsGreen または tdTomato の蛍光を有する株を 1:1 になるように混合し植菌した。バイオフィルムは静置条件下で 48 時間培養した。写真は、Airyscan fast モジュールを搭載した LSM880 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 50 μm を示す。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。

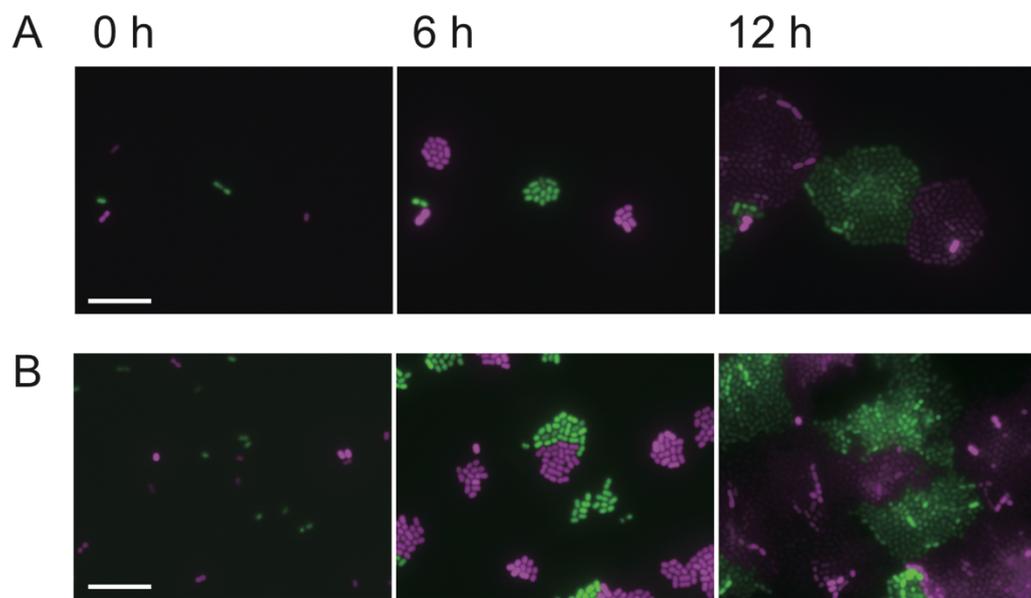


図 9 寒天培地下での細胞の生育過程

ZsGreen または tdTomato の蛍光を有する株を 1:1 になるように混合し、OD600 が 0.1 になるように希釈し植菌した。植菌した細菌は、寒天培地下で生育させ、20 分おきに LSM780 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。写真は代表的な 0、6、12 時間目の画像を示す。スケールバーは 10 μm を示す。(A) WT/pBBRPdentdTomato と WT/pBBRPdenzsGreen を混合したもの。(B) $\Delta pdn/pBBRPden$ tdTomato と $\Delta pdn/pBBRPdenzsGreen$ を混合したもの。

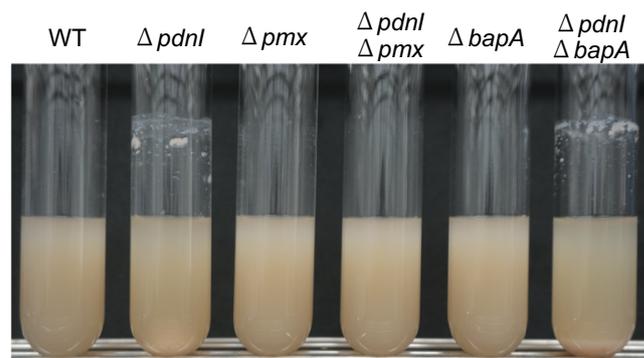


図 10 QS を介した凝集体抑制への *pmx* 及び BapA の影響

WT 及び $\Delta pdnI$ は 16 時間振盪培養した。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。

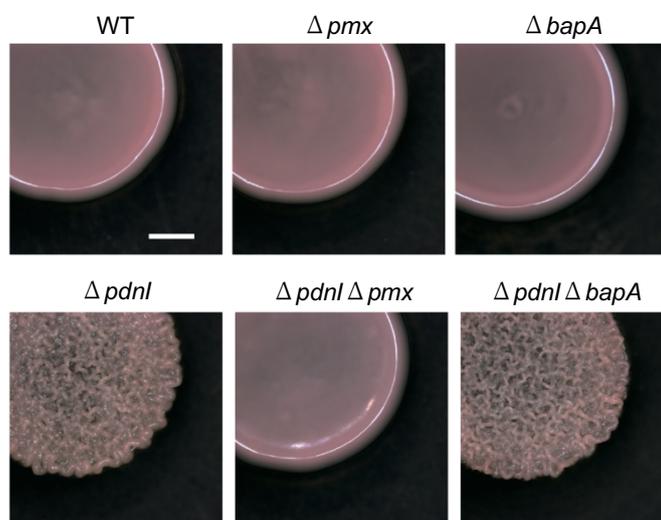


図 11 QS を介したコロニー形態の変化への *pmx* 及び BapA の関与
コロニーは LB 寒天培地上で 48 時間、30°C で培養した。スケール
バーは 2 mm を示す。全ての条件を生物学的な 3 連で行った

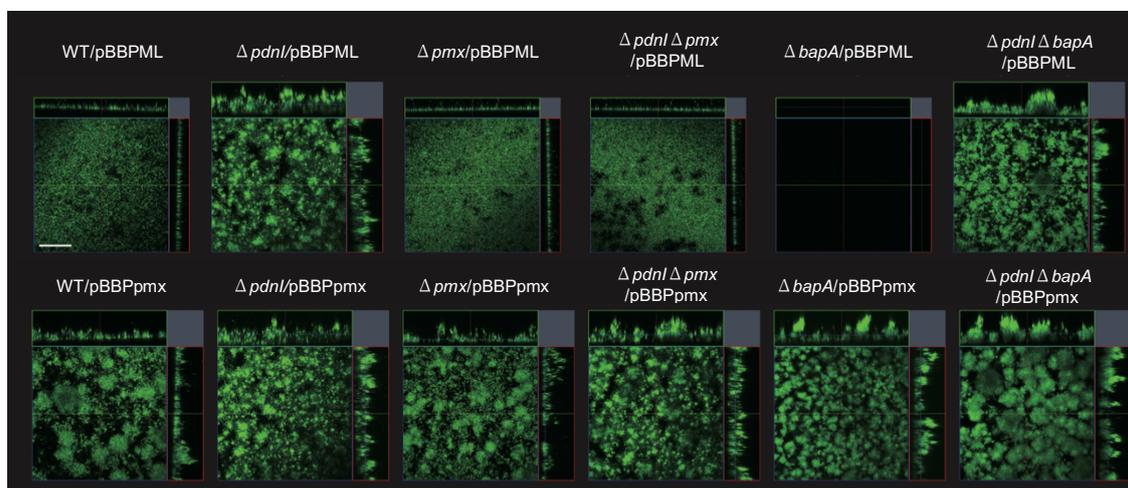


図 12 *pmx* と BapA のバイオフィルム形態への影響

バイオフィルムは静置条件下で 48 時間培養し形成させた。形成させたバイオフィルムは 5 μM の SYTO9 で染色をした。写真は、カメレオンビジョンレーザーシステムを搭載した LSM880 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 50 μm を示す。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。

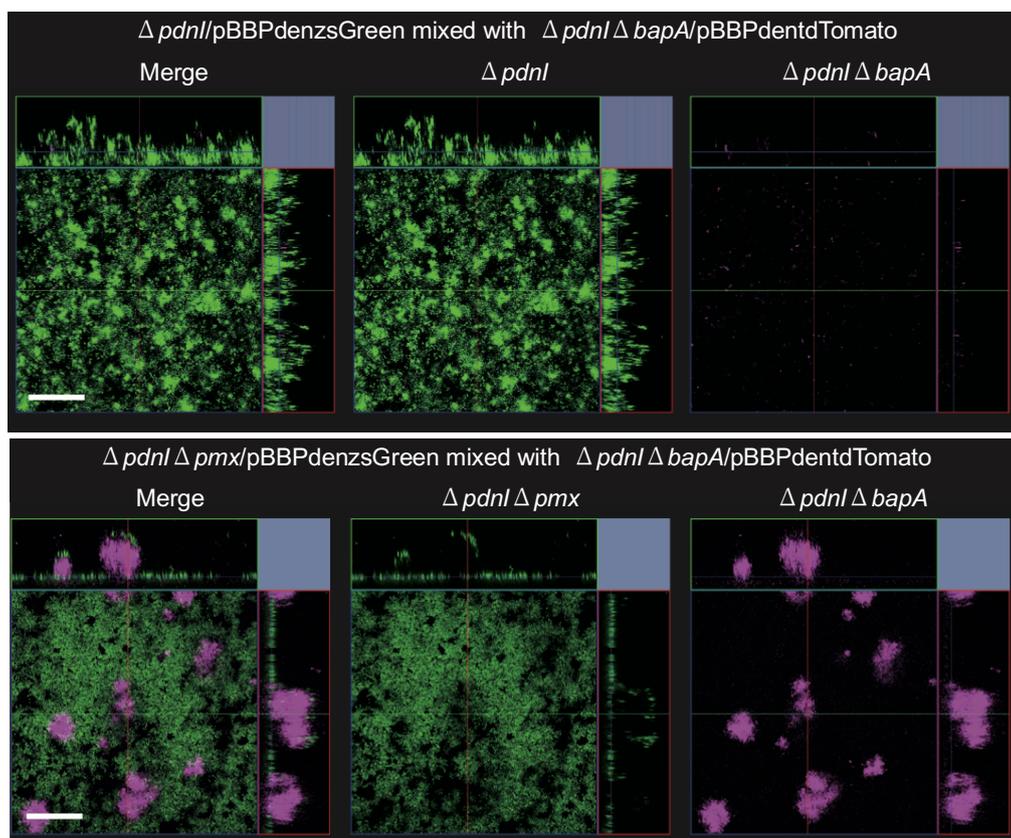
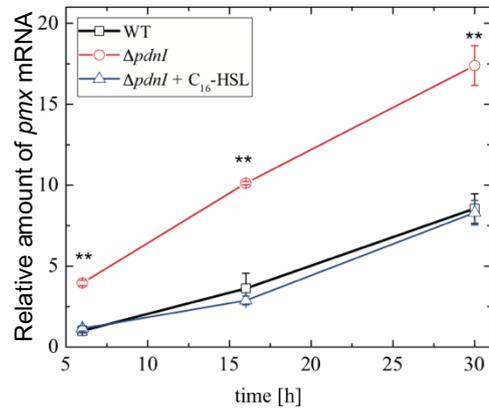


図 13 *pmx* と BapA のバイオフィーム形成における役割

ZsGreen または tdTomato の蛍光を有する株を 1:1 になるように混合し植菌した。バイオフィームは静置条件下で 48 時間培養した。写真は、カメレオンビジョンレーザーシステムを搭載した LSM880 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 50 μm を示す。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。

A



B

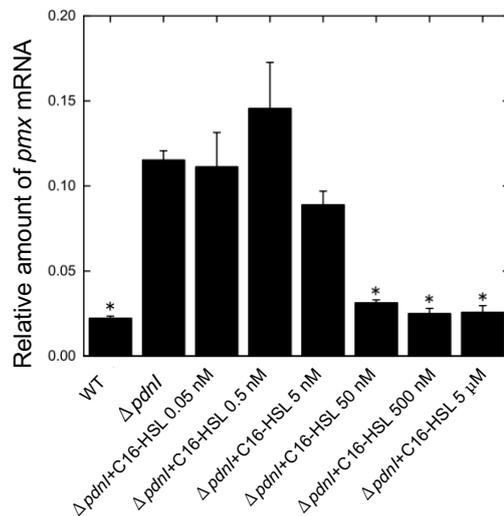


図 14 C16-HSL による *pmx* の発現制御

pmx の発現量は real-time PCR を用いて測定した。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。*pmx* の発現量は *rpoZ* で補正した。(A) 生育段階における *pmx* の発現の変化。RNA は培養 6、16 及び 30 時間目に分取した細胞から抽出した。C16-HSL は培地に 5 μM 添加した。**は $p \leq 0.01$ を示す (Student t-test)。(B) C16-HSL の濃度による *pmx* の発現の変化。RNA は 16 時間培養した細胞から抽出した。*は $p \leq 0.05$ を示す (Student t-test)。

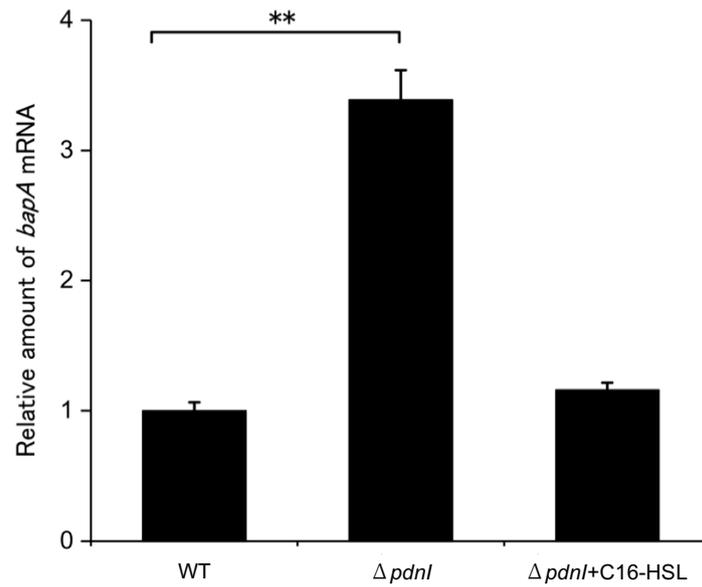


図 15 C16-HSL による *bapA* の発現制御

bapA の発現量は real-time PCR を用いて測定した。全ての条件を生物学的な 3 連で行った。*bapA* の発現量は *rpoZ* で補正した。C16-HSL は培地に 5 μ M 添加した。**は $p \leq 0.01$ を示す (Student t-test)。

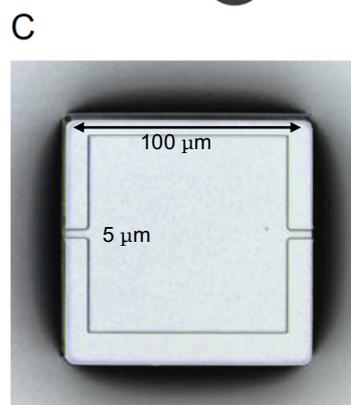
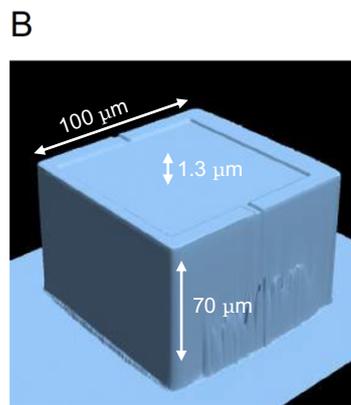
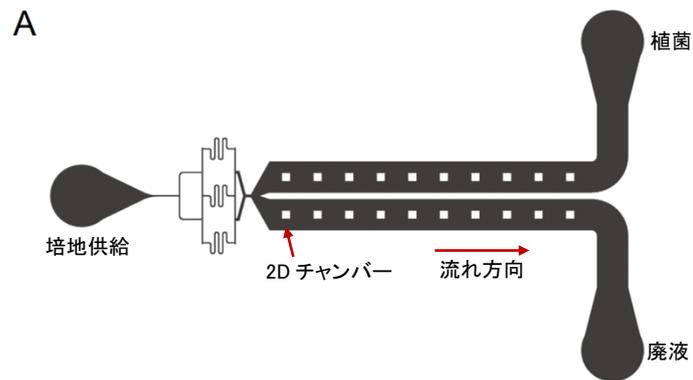


図 16 2D チャンバーの形態

(A) 2D チャンバーを並べたマイクロ流路の全体像 (B) 2D チャンバーの 3 次元構造 (C) 2D チャンバーを上部から観察した際の 2 次元構造

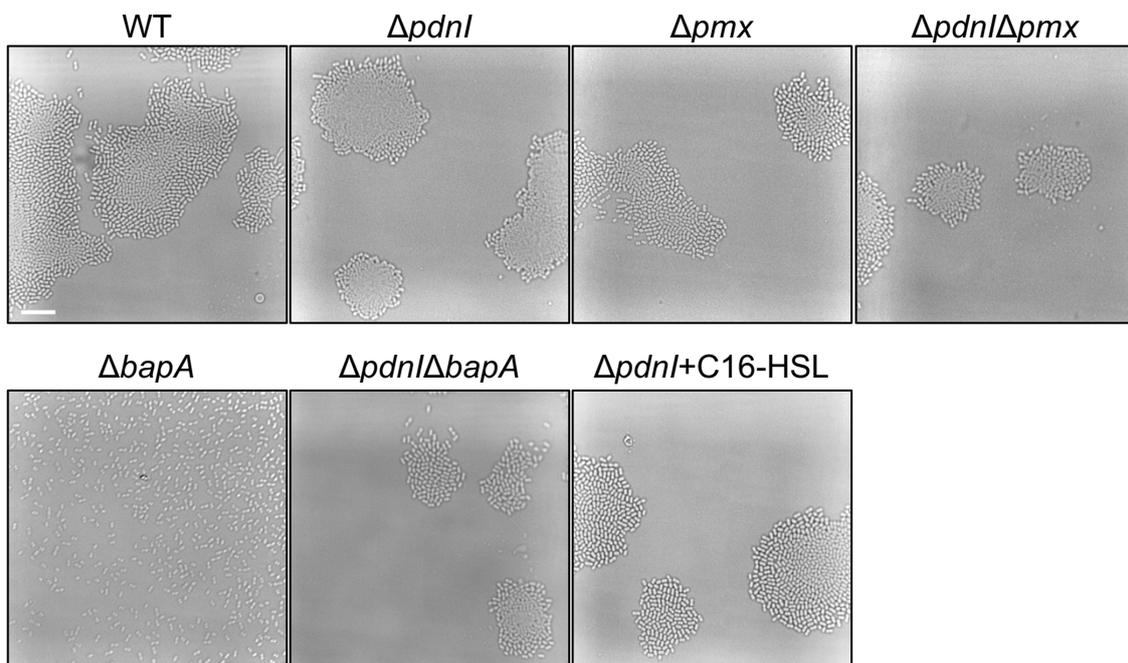


図 17 2D チャンバー内で培養させた細菌の様子

各株を1つのチャンバーに数菌が入るように植菌し、TSB培地を100 $\mu l/h$ で流し、培養させた。培養12時間目の代表的な写真を示す。スケールバーは10 μm を示す。C16-HSLは5 μM になるように添加した。

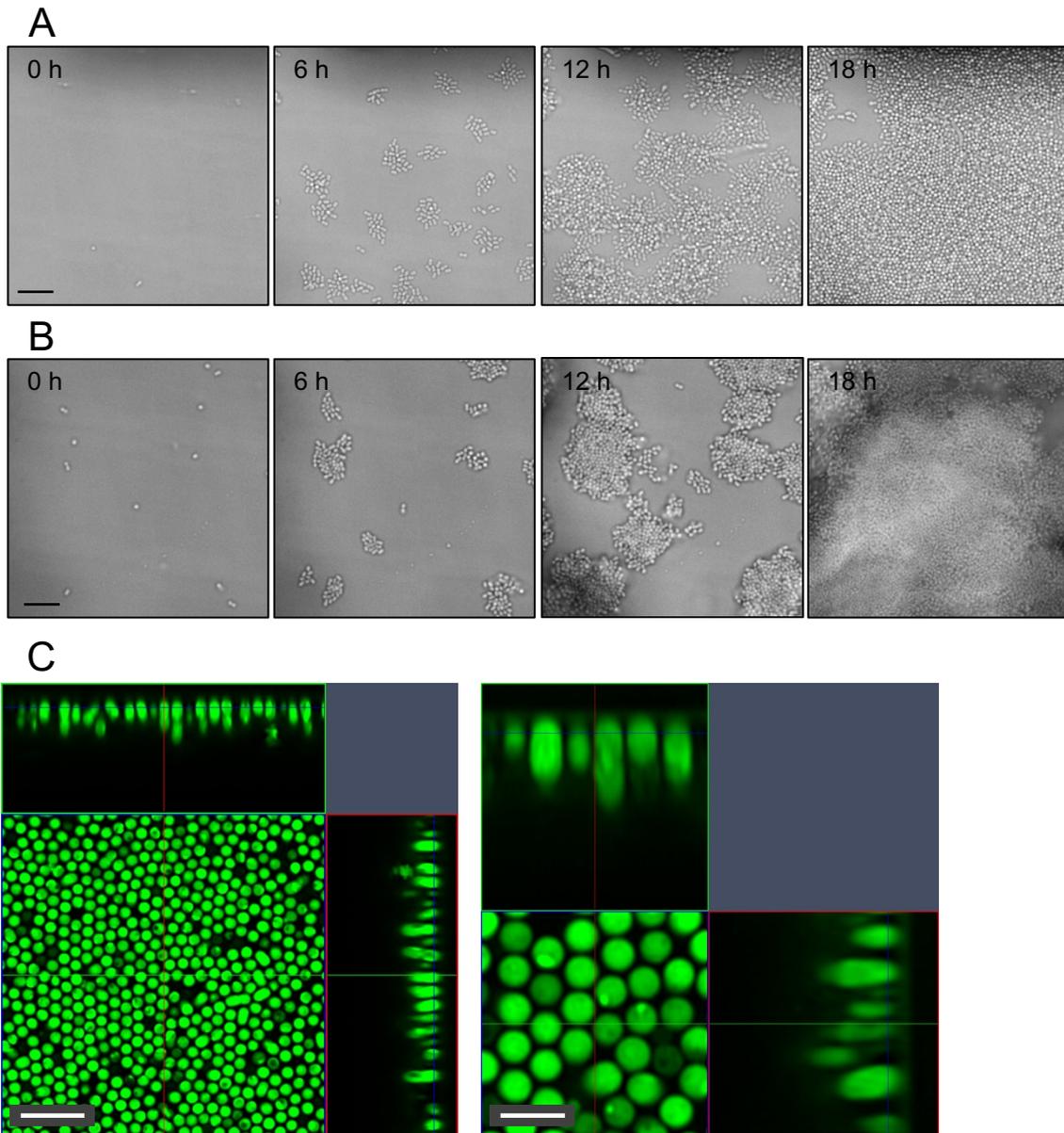


図 18 3D 流路デバイス内で培養させた細菌の集団形態

(A)(B) 3D 流路デバイス内の細菌を経時的に観察したもの。写真は代表的な 0、6、12、18 時間目の画像を示す。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ を示す。(A) WT、(B) $\Delta pdnI$ (C) 培養後の細菌を Syto9 で染色し観察を行ったもの。観察は Airyscan モジュールを搭載した LSM780 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。右の画像は左の画像を拡大して表示したもの。スケールバーはそれぞれ $5\ \mu\text{m}$ 、 $2\ \mu\text{m}$ を示す。

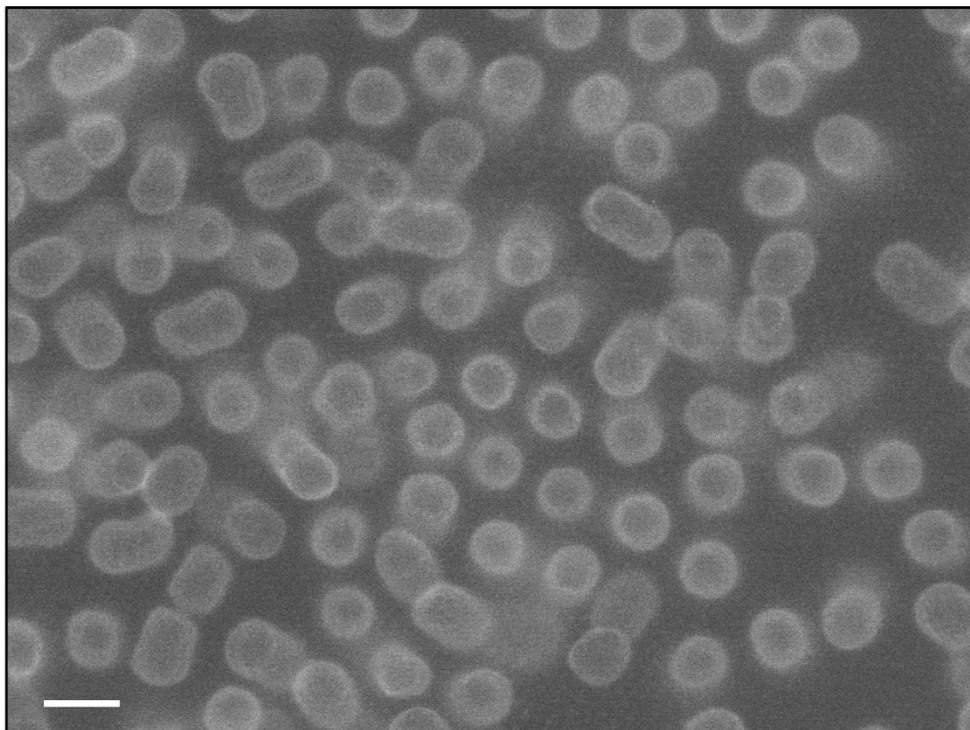


図 19 ASEM で観察したバイオフィルム形態

バイオフィルムは静置条件下で 24 時間培養した。ナノゴールドで染色した細胞を、大気圧走査電子顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 1 μm を示す。

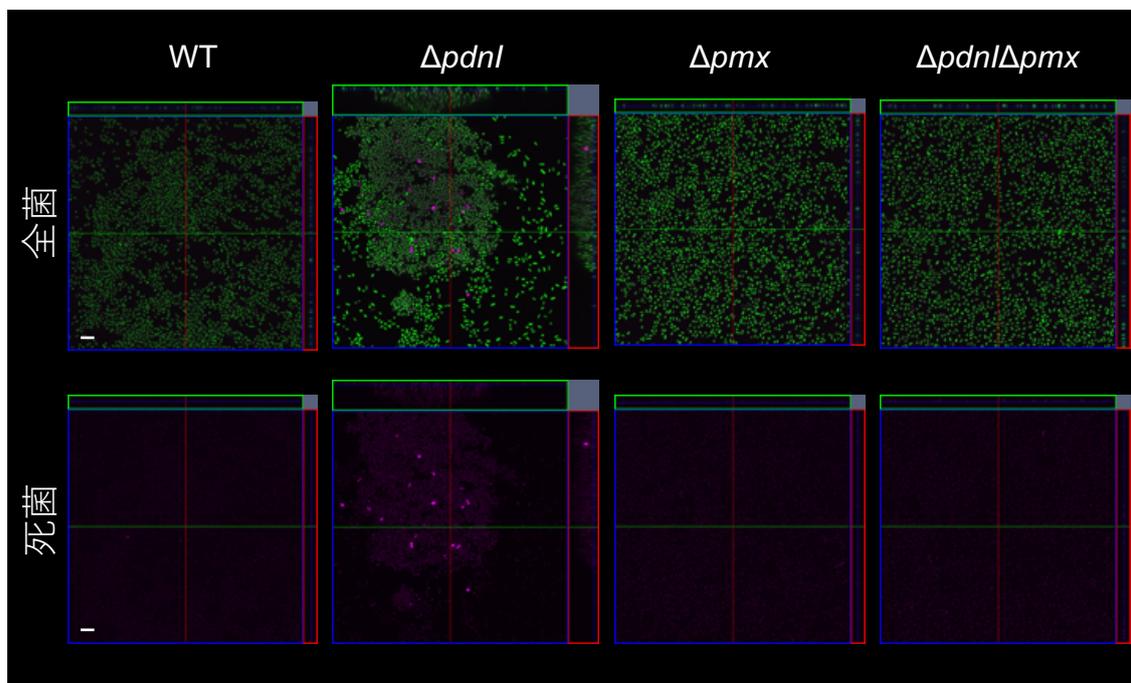


図 20 凝集体内の生菌及び死菌

32 時間培養させた液体培養液を Syto9 及び PI で染色した。観察は LSM780 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。緑は全菌を、マゼンダは死菌を示す。スケールバーは 5 μm を示す。

参考文献

1. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313-22.
2. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269-75.
3. Wagner-Dobler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, Ebner S, Hennig A, Pukall R, Schulz S. 2005. Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem* 6:2195-206.
4. Ochiai S, Morohoshi T, Kurabeishi A, Shinozaki M, Fujita H, Sawada I, Ikeda T. 2013. Production and degradation of *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules in bacteria isolated from activated sludge. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:2436-40.
5. Wilking JN, Zaburdaev V, De Volder M, Losick R, Brenner MP, Weitz DA. 2013. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:848-52.
6. Davey ME, O'toole GA. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:847-67.
7. Boles BR, Thoendel M, Singh PK. 2004. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16630-5.
8. Boles BR, Singh PK. 2008. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12503-8.
9. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184:1140-1154.
10. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295-8.
11. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59:1114-28.
12. Sakuragi Y, Kolter R. 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:5383-6.
13. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 10:644-8.

14. Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* 39:649-69.
15. Yoshida K, Toyofuku M, Obana N, Nomura N. 2017. Biofilm formation by *Paracoccus denitrificans* requires a type I secretion system-dependent adhesin BapA. *FEMS Microbiol Lett* 364.
16. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183:2888-96.
17. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. 2018. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* 17:13-24.
18. Avila-Calderon ED, Araiza-Villanueva MG, Cancino-Diaz JC, Lopez-Villegas EO, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodriguez A. 2015. Roles of bacterial membrane vesicles. *Arch Microbiol* 197:1-10.
19. Obana N, Nakao R, Nagayama K, Nakamura K, Senpuku H, Nomura N. 2017. Immunoactive Clostridial Membrane Vesicle Production Is Regulated by a Sporulation Factor. *Infection and Immunity* 85.
20. Li J, Azam F, Zhang S. 2016. Outer membrane vesicles containing signalling molecules and active hydrolytic enzymes released by a coral pathogen *Vibrio shilonii* AK1. *Environ Microbiol* 18:3850-3866.
21. Mashburn LM, Whiteley M. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437:422-5.
22. Brameyer S, Plener L, Muller A, Klingl A, Wanner G, Jung K. 2018. Outer membrane vesicles facilitate trafficking of the hydrophobic signaling molecule CAI-1 between *Vibrio harveyi* cells. *J Bacteriol* doi:10.1128/JB.00740-17.
23. Toyofuku M, Morinaga K, Hashimoto Y, Uhl J, Shimamura H, Inaba H, Schmitt-Kopplin P, Eberl L, Nomura N. 2017. Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *ISME J* 11:1504-1509.
24. Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, Chisholm SW. 2014. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* 343:183-6.
25. Schaefer AL, Taylor TA, Beatty JT, Greenberg EP. 2002. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J Bacteriol* 184:6515-21.
26. 森永花菜. 2016. *Paracoccus denitrificans* におけるクオラムセンシングを介した凝集体抑制メカニズムの解明. 修士論文.

27. Shearer N, Hinsley AP, Van Spanning RJM, Spiro S. 1999. Anaerobic growth of *Paracoccus denitrificans* requires cobalamin: Characterization of *cobK* and *cobJ* genes. *Journal of Bacteriology* 181:6907-6913.
28. Sato C, Kinoshita T, Memtily N, Sato M, Nishihara S, Yamazawa T, Sugimoto S. 2017. Correlative light–electron microscopy in liquid using an inverted SEM (ASEM), p 187-213, *Correlative Light and Electron Microscopy III* doi:10.1016/bs.mcb.2017.03.015.
29. Cheng Y, Zhang Y, Shen Q, Gao J, Zhuang G, Zhuang X. 2017. Effects of exogenous short-chain *N*-acyl homoserine lactone on denitrifying process of *Paracoccus denitrificans*. *J Environ Sci (China)* 54:33-39.
30. Davis BM, Richens JL, O'Shea P. 2011. Label-free critical micelle concentration determination of bacterial quorum sensing molecules. *Biophys J* 101:245-54.
31. Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T. 2008. *N*-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett* 279:124-30.
32. Yan J, Sharo AG, Stone HA, Wingreen NS, Bassler BL. 2016. *Vibrio cholerae* biofilm growth program and architecture revealed by single-cell live imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E5337-43.
33. Berk V, Fong JC, Dempsey GT, Develioglu ON, Zhuang X, Liphardt J, Yildiz FH, Chu S. 2012. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science* 337:236-9.
34. Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 186:692-8.
35. Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S, Eberl L. 2001. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147:2517-28.
36. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. 2000. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182:1688-93.
37. Vuong C, Kocianova S, Yao Y, Carmody AB, Otto M. 2004. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J Infect Dis* 190:1498-505.
38. Cunningham AB, Characklis WG, Abedeen F, Crawford D. 1991. Influence of Biofilm Accumulation on Porous-Media Hydrodynamics. *Environmental Science & Technology* 25:1305-1311.

39. Coyte KZ, Tabuteau H, Gaffney EA, Foster KR, Durham WM. 2017. Microbial competition in porous environments can select against rapid biofilm growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E161-E170.
40. Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M, Kjelleberg S. 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 185:4585-92.
41. Maree AF, Hogeweg P. 2001. How amoeboids self-organize into a fruiting body: multicellular coordination in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3879-83.
42. Narumi T, Uemichi K, Honda H, Osaki K. 2018. Self-organization at the first stage of honeycomb construction: Analysis of an attachment-excavation model. *PLoS One* 13:e0205353.
43. Lasker K, Mann TH, Shapiro L. 2016. An intracellular compass spatially coordinates cell cycle modules in *Caulobacter crescentus*. *Curr Opin Microbiol* 33:131-139.
44. Secor PR, Michaels LA, Ratjen A, Jennings LK, Singh PK. 2018. Entropically driven aggregation of bacteria by host polymers promotes antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:10780-10785.
45. de Vries GE, Harms N, Hoogendijk J, Stouthamer AH. 1989. Isolation and characterization of *Paracoccus denitrificans* mutants with increased conjugation frequencies and pleiotropic loss of a (nGATCn) DNA-modifying property. *Archives of Microbiology* 152:52-57.
46. Simon R, O'Connell M, Labes M, Puhler A. 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* 118:640-59.
47. Meselson M, Yuan R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110-4.
48. Morinaga K, Yamamoto T, Nomura N, Toyofuku M. 2018. *Paracoccus denitrificans* can utilize various long-chain *N*-acyl homoserine lactones and sequester them in membrane vesicles. *Environ Microbiol Rep* 10:651-654.
49. Figurski DH, Helinski DR. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1648-52.

謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導いただき、また研究に対する心構えを一から教えてくださいました筑波大学生命環境系野村暢彦教授に心から感謝致します。

筑波大学大学院生命環境科学研究科微生物機能利用学研究室の皆様には多大なご支援を頂きました。特に、豊福雅典助教には、研究の組み立て方からまとめ方まで多くのご教示を賜りました。Andrew S. Utada 准教授には、マイクロ流体デバイスに関する実験において多くのご教示を賜りました。筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センターの尾花望助教には、実験操作や発表の仕方など、細部までご教授を賜りました。加えまして、ERATO 事務室の皆様、技術職員の古川理恵様には研究が円滑に進むようご支援賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、ご指導を頂きました筑波大学大学院生命環境科学研究科の中村幸治教授、高谷直樹教授、橋本義輝准教授に深く感謝いたします。

東京慈恵医科大学医学科細菌学講座の杉本真也准教授には大気圧走査電子顕微鏡の扱いを大変丁寧にお教え頂きました。心から感謝申し上げます。

資金面で多大なる援助を頂きました JSPS 学術振興会若手研究者育成制度に感謝致します。

最後に、これまで支えてくださいました家族と友人たちに、厚く御礼申し上げます。