

3S-Dp03 Quorum Sensing シグナル物質分解遺伝子の多様性と応用

○諸星 知広, 池田 宅
(宇都宮大院・工)
morohoshi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

多くのグラム陰性細菌は、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) をシグナル物質とした細胞間情報伝達機構 Quorum Sensing を有しており、色素生産、病原性発現、バイオフィルム形成など、様々な機能を Quorum Sensing により制御している。その一方で、AHL を分解する能力を有する細菌の存在も明らかとなってきており、AHL のラクトン環を加水分解する AHL ラクトナーゼ、AHL のアミド結合を切断する AHL アシラーゼの 2 種類の分解機構が主に知られている。本研究では、様々な環境中における AHL 分解遺伝子の多様性を明らかにするとともに、これらの AHL 分解遺伝子を用いた Quorum Sensing 制御技術について検討を行った。

まず植物環境からは、ジャガイモを単離源として、新規 AHL 分解細菌のスクリーニングを行った。その結果、*Solibacillus*属細菌、*Chryseobacterium*属細菌から Metallo- β -lactamase superfamily に属する AHL ラクトナーゼを、*Microbacterium*属細菌からは、 α/β hydrolase fold family に属する AHL ラクトナーゼを新規に単離することに成功した。さらに、これらの AHL ラクトナーゼ遺伝子をジャガイモ軟腐病菌に導入すると、AHL の自己分解により Quorum Sensing が阻害され、ジャガイモ腐敗活性が消失することが明らかとなった。*Solibacillus*属細菌から単離した AHL ラクトナーゼである AhIS は新しいサブファミリーに属する可能性が示唆され、AhIS のアミノ酸配列を基にした BLAST 解析により、好熱性 *Thermalobacter*属細菌から高い熱安定性を有する AHL ラクトナーゼ AiiT を単離することに成功した。また、ahIS 相同遺伝子は、コアグラーゼ陰性 *Staphylococcus*属細菌にも存在することが明らかとなり、表皮に生息する *Staphylococcus*属細菌が、外部から侵入した病原性細菌の Quorum Sensing を阻害するバリヤーの役割を果たす可能性が示唆された。

次に、活性汚泥から AHL 分解活性を有する細菌のスクリーニングを行ったところ、その多くが *Acinetobacter*属細菌であることが明らかとなり、その中でも AHL 分解活性が高い *Acinetobacter* sp. Ooi24 株は AHL アシラーゼ活性を有する可能性が示唆された。Ooi24 株のゲノムライブラーから AHL 分解遺伝子のスクリーニングを行った結果、アミダーゼ遺伝子 *amiE*が AHL 分解活性を有することが明らかとなった。*amiE*は系統的に異なる一部の *Acinetobacter*属細菌しか有しておらず、また、その周辺配列に多くのトランスポザーゼ遺伝子が存在していたことから、*amiE*を含むトランスポゾンを介して AHL 分解能が活性汚泥中の *Acinetobacter*属細菌に伝播した可能性が示唆された。

Diversity and applications of quorum sensing signal-degrading genes

○Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda
(Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words quorum sensing, acyl homoserine lactone, lactonase, acylase

3S-Dp04 実環境におけるバイオフィルムの構造解明と制御

○矢野 剛久, 宮原 佳子, 橋畠 綾治, 花井 淳也, 松尾 申達,
平塚 純美, 岡野 哲也, 久保田 浩美
(花王)
yano.takehisa@kao.co.jp

実環境に存在するバイオフィルムは、モデル実験系として実験室で作成されるバイオフィルムと比べて圧倒的に多様で複雑である。従って、その制御を行う為には実環境のバイオフィルムの特性を正確に理解した上で、その実態に即した制御方法を構築することが欠かせない。本発表では、我々の身の回りの生活環境に存在するバイオフィルムを対象として、その詳細な実態解明から制御法構築まで取り組んだ例を報告する。

弊社の調査 (N=283) により、浴室で見られる汚れの中で生活者が気になる汚れとしては、黒カビ汚れに次いでピンク色の汚れが多いことが明らかになった。そこで、実際に家庭を訪問して 42 サンプルのピンク汚れを回収して解析に供した。各家庭ですぐに固定処理を施した後で走査型電子顕微鏡観察した他、一部のサンプルについては、同様に培養することなく直接固定処理を行って Fluorescence *in situ* hybridization に供することでその菌叢を解析した。その結果、ピンク汚れの色は *Methylobacterium*属細菌に由来する可能性が示唆された。

浴室は栄養源に乏しいことが考えられるだけでなく、乾燥と湿潤が繰り返されること、激しい水流がること等、微生物が定着、増殖する上で過酷な条件と考えられる。しかし、実験室で調製したバイオフィルムから上清を除くことで乾燥条件に曝した場合であっても *Methylobacterium*属細菌は 1 ヶ月以上生残した上、その生残菌数も殆ど減らなかった。さらに、浴室洗浄剤として使用される様々な界面活性剤に対しても耐性が高かったことから、このような性質が *Methylobacterium*属細菌の浴室での生残性に影響したと考察した。

次にその制御については、界面活性剤の一例として塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride : BAC) に対する耐性に着目した。諸々の検討により特に短時間の処理条件において *Methylobacterium*属細菌は BAC に対する耐性が高かった。そこで、蓄積を促進させる方法として浸透促進剤の併用を試みた。一般的に界面活性剤は様々な有機溶剤と併用することでその抗菌効果が向上することが知られている為、実際に様々な溶剤を併用することで BAC 剤の蓄積促進を目指した。その結果、幾つかの溶剤について蓄積促進効果が確かめられた。実際に、それらの溶剤については、BAC と併用することで、*Methylobacterium*に対して短時間で高い抗菌効果を発揮した。こうした効果はモデル系として作成したバイオフィルムでも、さらに実際の浴室のピンク汚れに対しても実証されたことから、*Methylobacterium*属細菌の有効な制御方法になる可能性が示唆された。

Structural analysis of biofilms in actual environment and the regulation

○Takehisa Yano, Yoshiko Miyahara, Ryoji Yokohata, Junya Hanai,
Shinryou Matsuo, Emi Hiratsuka, Tetsuya Okano, Hiromi Kubota
(Kao Corp.)

Key words biofilm, fluorescent microscopy, antibacterial