3S-Dp05 クオラムセンシング機構抑制のための材料界面の機能化：バイオフィーム制御に向けて

○寺田 昭彦
(農工大院・工)
akte@cc.tuat.ac.jp

細菌細胞が固体表面に付着し高密度化すると、細胞間の自己誘導因子 (Auto Inducer (AI)) の濃度が閾値を超え、様々な機能を制御する。このような細菌細胞間の情報伝達に基づくクオラムセンシング (QS) 機構によるバイオフィーム形成は、医療・衛生分野で多くの先行研究がなされてきたが、環境分野においてもその重要性が報告されはじめている。特に、近年では QS を遮断する試みが微生物学および材料的な観点から行われている。そこで、バイオフィームが形成される固体表面に着目し、この表面を化学的に改質することにより、QS を遮断する機能を付与できないかと考えた。表面改質の方法として、ポリマー材料の物理化学的特性をダイナミックに変化させることが可能な放射線グラフト重合 (Radiation Induced Graft Polymerization (RIGP)) 法に着目した。RIGP 法を応用することで、細菌細胞の付着を抑制しつつ、バイオフィームが形成される材料表面上で QS 機構を遮断可能な新しい材料表面の作製を目指した。

N-アシルホモセリンラクトン (AHL) を AI のモデルとし、AHL のアミド結合を切断可能な酵素 Acylase I をポリマー表面に固定化した。具体的には、ポリエチレンシートにエポキシ基を有するグリシジルメタクリレートでグラフトした後、親水性が高いベタインの一種である N,N-ジメチル-γ-アミノブチル酸塩 (DMGABA) を導入した。その後、Acylase I で DMGABA の高分子鎖に吸着させ、グルタルアルデヒドで固定化した酵素固定化材料を作製した。基礎検討の結果により、DMGABA の導入により親水性が向上し、モデル細菌である *Agrobacterium tumefaciens* の初期付着が大幅に抑制されること、Acylase I を固定化した材料には AHL の一つである C6-HSL の分解活性があること、分解活性は繰り返し性能があることを示した。この材料をフローセルに付与して、*A. tumefaciens* のバイオフィームを形成させたところ、Acylase I を固定化した材料において、もとのポリエチレンシートと比較して約 80% バイオフィームの形成が抑制された。一方で、Acylase I を固定後、熱処理を施し酵素を失活させた材料では、*A. tumefaciens* のバイオフィームの抑制能は消失した。この結果により、AHL を分解可能な Acylase I により *A. tumefaciens* のバイオフィームの形成が抑制されている可能性が示された。

このコンセプトを水・排水処理におけるろ過膜に適用し、膜の目詰まり抑制の可能性および長期耐性を検討している段階である。また、QS を遮断する酵素のみならず、細胞外ポリマーを分解する酵素を固定化した複合酵素固定化ろ過膜の開発を行っており、この材料のコンセプトとバイオフィームの形成抑制効果に関しても併せて発表する。

【謝辞】

本研究は、JST A-STEP 探索タイプ (AS242Z03370M) により実施された。RIGP 法に関して、千葉大学の斎藤恭一教授、早稲田大学の常田聡教授に、AHL の定量に関して宇都宮大学の池田宰教授、諸星知広准教授にご指導頂いた。記して感謝の意を表する。

Functionalization of a substratum capable of quorum quenching: Towards biofilm control

○Akihiko Terada
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words biofilm, quorum sensing, quorum quenching, surface functionalization

3S-Dp06 可動性遺伝因子を介した微生物のコミュニケーション

○新谷 政己
(静大・工・化学バイオ)
tmshint@ipc.shizuoka.ac.jp

自然環境中では、多種多様な微生物が生息しているが、近年、そうした微生物どうしが様々な手法でコミュニケーションを取っていることが明らかになりつつある。可動性遺伝因子は、異なる微生物間を移動可能で、受け取った細胞に新たな表現型を与える。従って、微生物は可動性遺伝因子の授受により、生息する環境に合わせて進化・適応してきたと考えられる。これは遺伝因子を介した微生物間のコミュニケーションの結果と考えられる。我々は、このような可動性遺伝因子のうち、接合伝達性のプラスミドについて、どのような条件下で、どのような微生物を、どの程度行き来するのか、また、プラスミドをもつ微生物がどの程度生残するのか明らかにするために研究を行ってきた。

pBP136 は *Proteobacteria* 門に属する多種類の微生物に接合伝達可能な接合伝達性プラスミドであり、pCAR1 は、主として *Pseudomonas* 属細菌の宿主にカルバゾールという含窒複素環式化合物の代謝能を与える接合伝達性のプラスミドである。これらのプラスミドが、実環境を模して作製したモデル土壌・環境水、あるいは実際の土壌・環境水中で、どのような種類の細菌に接合伝達するのか調べた。pBP136 を用いた実験では、プラスミドをもつ供与菌と、プラスミドを受け取る受容菌とを 1 種類ずつ準備し、濾過滅菌した湖沼水に接種してその挙動解析を行った。その結果、同じ *Pseudomonas* 属細菌であっても、種の異なる供与菌・受容菌の組合せによって、接合伝達頻度が変化することが示された。一方、pCAR1 については、モデル土壌を用いた場合には接合伝達が認められず、モデル環境水内でのみ接合伝達が認められた。また pCAR1 の接合伝達には、二価の陽イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+}) が必須なことが、供与菌の種類を変えることで、*Pseudomonas* 属細菌どうしの接合伝達性が変化することも明らかになった^{1,2)}。

さらにこれら 2 種類のプラスミドについて、土壌より抽出した細菌集団を受容菌候補とし、プラスミドの接合伝達後に GFP が発現するシステムを導入後、その蛍光を指標として、接合完了体を培養せずに、フローサイトメトリーのソーティング機能により分離した。ソーティング後、分離した細胞のゲノム DNA を、phi29 ファージ由来の DNA ポリメラーゼによって増幅した。増幅後の DNA を用いて、分離した細胞がプラスミドをもつことを PCR で確認し、16S rRNA 遺伝子配列を決定して、プラスミドを受け取った細菌種を調べた。その結果、pBP136 は *Proteobacteria* 門の他に、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門に属する細菌に、pCAR1 については *Pseudomonas* 属細菌とは別の細菌綱に属する、*Delftia* 属細菌に伝達することが示唆された³⁾。これらは、培養法に依存する従来法では接合完了体として得られなかった細菌種であった。

現在は、汽水湖や土壌、発酵槽など他の複合微生物系における接合伝達性や、水の動きのある場における接合伝達頻度についても調べており、可動性遺伝因子を介した微生物のコミュニケーションについて総合的に理解することを目指している。

(1) Shintani et al., 2008, Appl Microbiol Biotechnol, 80:485 (2) Shintani et al., 2010, Biosci Biotechnol Biochem, 74:343 (3) Shintani et al., 2014, Appl Environ Microbiol, 80:138.

Bacterial communication with mobile genetic elements

○Masaki Shintani
(Dept. Mater. Sci. Chem. Eng., Fac. Eng., Shizuoka Univ.)

Key words plasmid, horizontal gene transfer, single-cell analysis, bacterial consortium