

報告番号	甲 第 13159 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 高付着性・凝集性細菌 *Acinetobacter* sp.Tol 5 の付着・バイオフィーム形成過程の記述
(Description of the adhesion and biofilm formation process by the highly adhesive and autoagglutinating bacterium *Acinetobacter* sp. Tol 5)

氏 名 古市 吉秀

論 文 内 容 の 要 旨

微生物は固体表面に付着するとバイオフィームを形成する。バイオフィームは、感染症や医療機器の汚染、産業設備へのスライム形成や金属腐食など、我々の健康、生活、産業活動を脅かす。しかしその一方で、排水処理や環境浄化、腸内フローラ、産業用微生物による物質合成など、種々の分野でバイオフィームによる恩恵を我々は受けている。したがって、これら脅威を最小化して恩恵を最大化するために、バイオフィームの形成メカニズムを理解し、それをコントロールすることは非常に重要である。

微生物によるバイオフィーム形成のメカニズムは、これまで多くの研究者により理解が進められてきた。典型的なバイオフィーム（本論文では conventional biofilm とよぶ）の形成プロセスでは、固体表面上に有機物やイオンが吸着してコンディショニングフィルムが形成されると、鞭毛運動やブラウン運動により浮遊細胞が固体表面に接近して可逆的に付着する。可逆的に付着した微生物細胞は、細胞表層構造や分泌した細胞外マトリックス成分（EPS）を介し、固体表面へ非可逆的に付着する。非可逆的に付着した微生物細胞は、細胞分裂を繰り返してマイクロコロニーを形成し、EPS を分泌して成熟したバイオフィームへと成長する。そして、一部の微生物細胞は成熟バイオフィームから脱離（dispersal）し、浮遊状態に移行した微生物細胞は新たな環境に付着して次のバイオフィームを形成する。しかしながら、これら一連の conventional biofilm の形成プロセスは、単細胞が固体表

面に付着して始まるプロセスである。凝集性細菌のバイオフィーム形成プロセスについては、これまでほとんど議論されていない。

Acinetobacter 属細菌 Tol 5 は、排ガス処理装置より得られたトルエン分解菌で、高い付着・凝集性を有している。これら付着・凝集性は、Tol 5 の細胞表面を覆うファイバー状タンパク質 AtaA に起因しており、疎水性のプラスチックから親水性のガラス、さらには金属まで様々な非生物表面に対して高い付着性を示す。AtaA は三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) ファミリーのタンパク質で、260 nm という長さのホモ三量体ナノファイバーを形成する。これまで、*ataA* 遺伝子を他の微生物に組み込み発現させることにより、付着・凝集性を本来は示さない菌体に、Tol 5 と同様の性質を付与することに成功した。また、固定化した AtaA 発現株を純水で洗浄することにより、剥離して微生物の付着性を制御し、固定化に用いる担体を再利用できることが示された。したがって、AtaA を有用微生物に発現させて固定化機能を付与することで、AtaA による固定化微生物触媒として応用活用することが期待されている。このように、AtaA を介した付着やバイオフィーム形成のプロセスを理解することは生物工学的に重要であるが、そのメカニズムについては十分に明らかにされていない。

本論文では、高付着・凝集性細菌 Tol 5 のバイオフィーム形成プロセスについて調べた。特に、conventional biofilm を形成する微生物と同様に、Tol 5 も単菌として付着してから凝集するのか、凝集して細胞塊を形成してから付着するのか、あるいは全く別のプロセスなのか、これら一連のバイオフィーム形成プロセスを明らかにすることを目的とした。なお、バイオフィームという用語は、conventional biofilm やフロックなど、その意味する範囲は研究者により様々であるが、本論文では固体表面に付着している微生物細胞塊を広義のバイオフィームとして定義する。

本論文は 4 部構成である。第 1 章では、研究の背景となるバイオフィーム形成の概要、研究対象とする Tol 5 の先行研究、本論文の目的と構成について述べた。

第 2 章では、流れ環境下における Tol 5 のバイオフィーム形成には、AtaA による凝集性が重要な役割を果たすことを明らかにした。流れ環境下で凝集性微生物のバイオフィームを観察・定量するのに適したフローセル装置を独自作成し、Tol 5 は単菌よりも細胞塊を形成してガラス管の底面に付着することを示した。本研究の層流環境下では、ガラス面に付着した細胞塊の下流側に、剥離流に起因する双子渦 (twin vortex) が発生することを確認した。この双子渦の影響により、流れの中の小さな細胞塊が、ガラス面に付着している細胞塊の下流側で凝集した。流れの中の細胞塊がガラス面に付着している細胞塊とさらに凝集し、付着している細胞塊は下流側へ細胞塊を成長させ、大きく安定した流線型のバイオフィームを形成した。双子渦が発生しない弱い流れ環境下では、細胞塊はほとんど成長しなかった。一方、強い流れ環境下では、細胞塊が流れの影響を受けて剥離し、バイオフィーム様の細胞塊は形成されなかった。また、このような流れ環境下において、Tol 5 *ataA* 欠損株はバイオフィームを形成せず、*Acinetobacter* 属細菌 ADP1 の *ataA* 遺伝子導入株は、

同様に流線型バイオフィルムを形成することも確認した。

第3章では、Tol 5 のバイオフィルムは、AtaA を介して細胞同士が凝集し、細胞塊同士がさらに凝集する Cluster-cluster aggregation モデルにより成長し、成長した細胞塊が面に沈降することで形成されることを明らかにした。顕微観察により、Tol 5 が形成するバイオフィルムは、非増殖環境下において 30 分という非常に短い時間で EPS を合成せずに形成され、空隙 (void) 構造を持つ unconventional biofilm であることを示した。同様の構造は、18 時間培養した増殖条件下においても同様であった。Unconventional biofilm は、ブラウン運動により細胞同士が凝集して成長した細胞塊が面に沈降し、コロイド凝集塊様のフラクタル構造をもつことを示した。また、細胞同士の相互作用は、コロイドの付着・凝集理論である Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) 理論を用いて調べた。DLVO 理論では、微生物細胞の表面構造の複雑性を考慮し、柔らかい粒子理論と、新たに取り入れた、細胞体同士と“非連続表面 (discontinuous surface)”を形成する AtaA ファイバーの先端同士の相互作用を独立して考える概念 (ピアモデル) を取り入れた。これらを考慮して DLVO 理論で計算された凝集予測は、実際の実験結果と一致することを示した。

第4章では、本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べた。本研究で明らかにした凝集性ナノファイバータンパク質 AtaA を介した unconventional biofilm の形成プロセスは、他の凝集性微生物のバイオフィルム形成プロセスを解明する上で、微生物学的に有益な知見となる。また、今回得られた知見は、AtaA で有用微生物を固定化して微生物触媒として応用する際に、付着やバイオフィルム形成をコントロールするために役立つことが期待される。