

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 13159 号
------	---------------

氏 名 古市 吉秀

### 論 文 題 目

高付着性・凝集性細菌*Acinetobacter* sp. Tol5の付着・バイオフィ  
ルム形成過程の記述

(Description of the adhesion and biofilm formation process by the  
highly adhesive and autoagglutinating bacterium *Acinetobacter*  
sp. Tol 5)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	堀 克敏
委員	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	教授	片山 新太
委員	名古屋大学	講師	中谷 肇

## 論文審査の結果の要旨

古市吉秀君提出の論文「高付着性・凝集性細菌*Acinetobacter* sp.Tol5の付着・バイオフィーム形成過程の記述」は、凝集性ナノファイバータンパク質AtaAによるアシネトバクテラ属細菌Tol5の従来とは異なるバイオフィーム(unconventional biofilm)の形成プロセスを明らかにした論文である。四つの章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第1章では、本論文の研究背景と研究目的について述べられている。まず、これまでに広く共通認識されているバイオフィームの形成プロセスを整理している。既存のバイオフィーム形成プロセスでは浮遊細胞が単菌として面へ付着することが前提となっており、凝集性細菌のバイオフィーム形成プロセスはほとんど議論されていない事を問題提起している。次に、微生物の付着と凝集を説明する理論について説明したあと、研究題材となる高付着性・凝集性細菌Tol5と凝集因子であるナノファイバータンパク質AtaAに関する先行研究を紹介し、Tol5がAtaAを介して短時間かつ非培養条件下でEPSを合成せずにunconventional biofilmを形成することを述べている。最後に、高付着性・凝集性細菌Tol5のAtaAを介したunconventional biofilm形成プロセスが、既知のバイオフィーム形成プロセスと同様に、単菌として付着してからバイオフィームを形成するのか、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本論文の目的として明示している。

第2章では、Tol5の初期付着の挙動を独自に設計・作成したフローセルを用いて連続的に細胞を流すことで検証している。特に、Tol5の初期付着における凝集塊形成の重要性について明らかにすることを目的としている。まず、層流環境下におけるTol5の付着・凝集の特徴を調べ、ある特定の剪断応力下においてTol5細胞が大きな凝集塊を形成して付着することを示し、それより弱い剪断応力下では大きな凝集塊が形成されず、強い剪断応力下では大きな凝集塊を形成するが流れにより剥がれてしまうことを示した。そして、このような特定の剪断応力下で大きな凝集塊を形成する理由が、付着した凝集塊の下流側で発生する双子渦(twin vortex)によることを、蛍光顕微鏡で流れを可視化することで説明している。さらに、Tol5の初期付着挙動をデジタル顕微鏡で観察し、付着した凝集塊の経時的な成長変化を画像解析で定量化することで、Tol5の流れ環境における初期付着では単菌よりも凝集塊が多く付着し、付着した凝集塊に流れの中の細胞が凝集することで大きな凝集塊へ成長することを示している。これら結果は、凝集性細菌Tol5の流れ環境における初期付着では凝集塊の形成が重要で、付着した凝集塊の影響で特異な流れが作り出され、この流れが凝集塊の成長に大きな役割を果たすことを示した新しい知見である。

第3章では、Tol5の細胞同士の凝集プロセスおよび凝集塊の成長とunconventional biofilmの形成プロセスを理論的・実験的に検証している。まず、デジタル顕微鏡による観察から、Tol5がブラウン運動で凝集し成長した凝集塊が沈降することでunconventional biofilmを形成することを示した。さらに、Tol5の凝集塊の成長プロセスはコロイド様で、ブラウン運動によりランダムにぶつかり合って成長し、自己相似的(フラクタル)で多くの空隙を持つ凝集塊を形成することを、共焦点顕微鏡でunconventional biofilmの形態的特徴を定性的・定量的に解析することで示している。次に、凝集塊形成の最初のステップとなる細胞同士の凝集プロセスを、soft particle理論で微生物細胞の表面電位を計算し、コロイドの凝集・分散性を記述するDerjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(DLVO)理論で記述している。特に、Tol5細胞表面がコロイド様のsolidな連続表面(continuous surface)ではなく、実際にはAtaAファイバータンパク質で構成された非連続表面(discontinuous surface)であることを考慮することで、Tol5の凝集挙動を理論的に記述でき、その結果が実験的にも一致して妥当であることを示した。これら結果は、凝集性細菌が新規バイオフィーム形成プロセスを示すだけでなく、AtaAのような付着性・凝集性のファイバータンパク質を持つ微生物が、低塩濃度環境においても付着・凝集できるメカニズムをモデル化した「ピアスモデル」の妥当性を初めて示しており、非常に重要な知見である。

第4章では、本研究の結論を与えている。冒頭で確認した目的に対する結論として、凝集性細菌Tol5によるunconventional biofilm形成プロセスは、既知のバイオフィーム形成プロセスのように単菌が面に付着してから形成するのではなく、細胞同士が凝集して大きく成長した凝集塊が沈降することで形成される、全く新しいプロセスであることを明らかにした。

以上のように本論文では、多様な顕微鏡技術、画像解析、理論計算により凝集性細菌Tol5のAtaAを介した新規バイオフィーム形成プロセスを明らかにしている。これらの評価方法並びに得られた結果は、微生物工学分野に新しいバイオフィーム形成プロセスの知見を与えただけでなく、AtaAによる固定化微生物触媒法への応用を実現するために重要であり、工学の発展に寄与するところが大きいと判断できる。よって、本論文の提出者である古市吉秀君は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格があると判断した。