

細菌間情報伝達機構は呼吸代謝にも関与する

Involvement of Intercellular Signal Molecules in Respiratory Regulation

豊福 雅典, 内山 裕夫, 野村 暢彦*

MASANORI TOYOFUKU, HIROO UCHIYAMA and NOBUHIKO NOMURA

筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻 〒305-8572 つくば市天王台1-1-1

*TEL/FAX: 029-853-6627

*E-mail: nomunobu@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Department of Life Sciences and Bioengineering, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: 細胞間情報伝達, 呼吸, 脱窒, アシル化ホモセリンラクトン, 緑膿菌, バイオフィーム

Key words: cell-to-cell communication, respiration, denitrification, acyl-homoserine lactone, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm

(原稿受付 2008 年 10 月 21 日 / 原稿受理 2008 年 10 月 30 日)

1. はじめに

21 世紀が直面している問題として、環境、医療、食料問題が挙げられる。これらの全ての分野において細菌はこれまでに深く関わっている。したがって、細菌を深く理解していくことは、これらの問題に貢献していくことだと思われる。細菌の生態を考える際に重要となってくるのはその場でその細菌が生育できるか否かであり、細菌のエネルギー生産を制御する因子として酸素濃度、温度、pH などの物理化学的な環境要因がこれまでに研究されてきた。これら物理化学的なマクロな環境の他に、細菌を取り巻く環境には周囲の細菌の存在というミクロな環境が形成されると考えられる。しかしながら、周囲に細菌が存在することによる細菌間情報伝達機構によってエネルギー生産にどのような変化がおこるのかについてはほとんど研究されていない。

近年、細菌間の情報伝達という全く新しい概念が提唱され細菌学の歴史が一変した。これに端を発して、様々な細菌で細胞間の情報伝達が発見されると同時にいままでの研究も見直され、抗生物質についても情報伝達としての役割が提唱されている²⁾。細菌間の情報伝達とは一体何なのか、研究者によって若干見解が異なるものの、大方の研究者は細胞外に排出された低分子化合物が他細胞の受容体によって受け取られ、遺伝子の転写調節に影響を与える現象のことを指していると思っ差し支えないだろう。

この細菌間の情報伝達は 1970 年初頭に *Vibrio* 属細菌を用いた発光の研究により始まった。発光は試験管を用いて培養を行うと、対数増殖期後期から定常期にかけて増幅することが観察されていたが、定常期の培養上清を添加すると、対数増殖期初期で発光が誘導された。そこ

で、上清中に発光を誘導する化合物が生産されていると仮定され、その後の研究によってそれはアシル化ホモセリンラクトン (AHL) の一種であることが明らかとなった³⁾。この AHL の発見以降様々なグラム陰性菌で側鎖のアシル基が異なる AHL が発見され、それぞれの AHL と特異的に結合する受容体も同定された。現在ではグラム陰性菌、陽性菌を問わず様々な細菌で情報伝達物質が発見されており、その構造も多岐にわたる¹⁴⁾。また、細菌の持つ情報網も同種間から異種間、さらには動植物との間にまで広まって来ている。今後、さらにこのよう化合物を介した情報伝達は増えていくことが予想される。

長い間、多細胞生物は様々な細胞が集合して組織、個体を形成しているのに比べ、細菌は集団の中でそれぞれの細胞が独立して生活していると考えられてきたが、このような情報伝達物質を介して細菌が集団生活を営んでいることが明らかとなってきている¹²⁾。一部の細菌では集団となることにより、毒素生産、抗生物質耐性などが変化することが報告されており、集団を形成することは様々な環境への適応、動植物への感染などに密接に関与していると考えられている¹¹⁾。このように、細菌の集団中としての挙動を解明していくことは細菌の生態を深く理解し、また制御していく上でとても重要であると思われる。例えば細菌はバイオフィームとよばれる細菌の家のような構造物を形成するがその形成過程においても、情報伝達物質が重要であることが多数報告されている¹²⁾。

しかし、これまでに細菌間情報伝達は宿主に感染する際に重要であることが明らかとなっている一方で、病原性以外との関連についてはあまり分かっていない。そこで、我々は細菌間情報伝達が宿主への感染のみならず

様々な役割を果たしていると考え、生物の根幹的な基礎代謝であるエネルギー生産のための呼吸に着目し研究を進めている。それは、環境中の細菌の生態を理解するために重要であり、環境分野への細菌間情報伝達概念の礎となるはずである。

2. *Pseudomonas aeruginosa* における細菌間情報伝達機構

P. aeruginosa は様々な環境に存在する環境常在菌で、日和見感染菌としても医学分野で着目されており、細菌間情報伝達あるいはバイオフィルムの研究のモデル細菌として世界中で研究が盛んに行われている。そのような背景より、その全ゲノムの解読また種々のマイクロアレイ解析など、多くの有用なデータが蓄積されている。*P. aeruginosa* の細菌間情報伝達においては、2種類のAHLに加えてキノロン系の化合物である *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) が同定されている。また、ペプチド系の情報伝達物質が同定されている⁸⁾。

一方、*P. aeruginosa* は嫌気呼吸能も有しており、様々な環境に対応することができる。そこで我々は、本細菌をモデルとして細菌間情報伝達と嫌気呼吸能の関係について詳細に研究を進めた。

2.1. *P. aeruginosa* における AHL を用いた細菌間情報伝達機構

P. aeruginosa が生産する AHL の一つは *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-l-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) であり¹³⁾、LasI が 3-oxo-C12-HSL の合成過程の最後の反応を触媒し、転写調節タンパクである LasR が 3-oxo-C12-HSL と結合して複合体を形成することにより転写調節を行う。もう一方の AHL は *N*-butanoyl-l-homoserine lactone (C4-HSL) であり¹³⁾、RhlI が合成過程の最後の反応を触媒し、RhlR-C4-HSL 複合体が転写調節を行う。最近では様々な AHL を認識する受容体、QscR も同定されており、異種間との情報伝達での役割が推定されている¹⁰⁾。ところで、細菌間情報伝達物質の中では濃度依存的に働くものが多く含まれ、AHL もその一つである。AHL は自身の生産を促進し、その濃度は菌体密度が高ければ高い程上昇するため、AHL によって菌体密度をモニタリングしていると考えられる。これら菌体密度に応答する機構はクォラムセンシングと呼ばれている⁵⁾。*P. aeruginosa* においては AHL により 300 以上の遺伝子が制御を受けていることが網羅的な解析により示唆されており²²⁾、毒素生産に大きく関与していることから、クォラムセンシングは *P. aeruginosa* が動植物に感染する際に重要であると考えられている。

2.2. *P. aeruginosa* における PQS を用いた細胞間情報伝達

PQS については、その受容体として PqsR が同定されており、機能未知であるが PqsE も PQS への応答に関与していることが明らかとなった⁹⁾。PQS の前駆体である 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) も培養上清に生産されており、PqsR とともに遺伝子の発現制御を行うことからその情報伝達物質としての役割が考えられている。興

味深いことに、HHQ は *P. aeruginosa* 以外の細菌も生産することが確認されており、異種間の情報伝達物質として注目を浴びている³⁾。この HHQ の合成には *pqsA-D* オペロンが関与しており、HHQ から PQS への変換は *pqsA-D* オペロンとゲノム上離れた位置に存在する *pqsH* によって行われる。したがって、*pqsA-D* と *pqsH* は異なる制御を受けており、*pqsA-D* は PQS 自身によって誘導されるのに対して、*pqsH* は las システムによって制御されている。さらには、PQS は rhl システムを制御しており AHL と PQS を用いた情報伝達機構はお互いを制御している²¹⁾。

3. *P. aeruginosa* における細菌間情報伝達機構による呼吸の制御

我々は、細菌が集団あるいは群集を形成したときの呼吸制御を明らかにするために細菌間情報伝達に着目し、細菌間情報伝達物質の呼吸への影響を解析した。将来的な応用を見据え、脱窒をモデルに細菌間情報伝達物質による呼吸の制御について研究を行なった¹⁸⁾。

3.1. *P. aeruginosa* の脱窒機構

脱窒は酸素 (O_2) の代わりに最終電子受容体として硝酸 (NO_3^-) や亜硝酸 (NO_2^-) などの窒素酸化物を用いて行う呼吸である。*P. aeruginosa* は NO_3^- から N_2 までの還元に関与する NAR, NIR, NOR, NOS の4つの末端酸化酵素を持つ完全脱窒菌であり、脱窒のモデル生物として広く研究されている。その *P. aeruginosa* においては酸素によって脱窒が阻害されることが明らかとなっており、酸素濃度の低いところでは、脱窒と酸素呼吸の両方を同時に行う¹⁷⁾。ここで、酸素を感知して脱窒関連遺伝子発現の制御を行っているのは ANR 転写調節因子である。ANR は Fe-S クラスターを持つことから、酸素を感知すると考えられており、ANR を欠損させた株は脱窒条件下で生育することができない¹⁾。その ANR は硝酸を亜硝酸に還元する NAR の発現を誘導し、脱窒に関与する他の制御因子の発現を介して NIR や NOR を誘導する。したがって、ANR が脱窒における主要な制御因子であると言える。この他にも ANR はグローバルな制御因子として、嫌気条件下で様々な遺伝子の発現を調節していることが明らかとなってきている。

P. aeruginosa における脱窒関連遺伝子は、ANR を介して酸素濃度に依存して発現することを述べたが、酸素の他に窒素酸化物によって制御されている。多くの細菌の環境応答には二成分制御系が関与するが、*P. aeruginosa* においても二成分制御系 NarX/L によって硝酸、亜硝酸が感知される。硝酸や亜硝酸に応答して NarL は硝酸呼吸関連遺伝子や転写制御因子 DNR、また亜硝酸呼吸に関与する *nirQ* の発現を促進する。DNR は O_2 を感知する ANR と NO_3^- , NO_2^- に応答する NarXL によって発現が誘導されるが、DNR 自身も NO や NO_2^- に応答し、NAR, NIR, NOR の誘導を行う¹⁵⁾。

以上のように脱窒は O_2 と NO_3^- , NO_2^- や NO のような窒素酸化物によって制御されていることがこれまでに明らかになっている。このような制御は *P. aeruginosa* に限定されたものではなく、硝酸呼吸を行なう細菌も含

めて幅広い種に保存された調節機構である。

3.2. AHL による脱窒の制御

前述したように *P. aeruginosa* は脱窒過程において、 NO_3^- を N_2 まで還元する。そこで、AHL が脱窒を制御しているか詳しく調べるために、 $\Delta rhII$ 株 (C4-HSL を生産できない株) および $\Delta lasI$ 株 (3-oxo-C12-HSL を生産できない株) を用いて、 NO_3^- の消費量ならびに N_2 の生産量を測定した。その結果、 $\Delta rhII$ 株および $\Delta lasI$ 株の両株は親株の PAO1 株よりも高い NO_3^- の還元能ならびに N_2 の生産能を示した (図 1A)。それぞれの変異株に AHL を添加し、相補実験を試みたところ、C4-HSL は $\Delta rhII$ 株の NO_3^- の還元を 50% まで抑制し、 N_2 生産に至っては顕著な抑制が観察された。3-oxo-C12-HSL を $\Delta lasI$ 株に添加したところ、C4-HSL 程の添加効果は観察されなかったが、 NO_3^- 還元ならびに N_2 生産の抑制が観察された。以上の結果より、細菌間情報伝達で用いられる AHL 類によって脱窒が抑制されることが示された。 $\Delta lasI$ 株は親株よりも顕著に脱窒活性が上昇していたにも関わらず、3-oxo-C12-HSL の添加効果がそれほど顕著に観察されなかったのは 3-oxo-C12-HSL の膜透過性によるものと考えられる。

脱窒は細菌にとっては呼吸であるため、窒素酸化物の還元は呼吸鎖の活性と関連している。前述の実験結果より AHL 類が *P. aeruginosa* の窒素酸化物の還元を抑制することが示されたが、呼吸鎖の活性を調べることにより、実際に呼吸が AHL 類によって抑制されているのかを検証した。硝酸呼吸において、複合体 I が NADH より電子を受取り、電子伝達を開始され、最終的に NAR を介して電子が NO_3^- に渡される。そこで、硝酸呼吸活性を測定するために細胞の膜画分を採取し、NADH を電子供与体として用いて NO_3^- の還元産物である NO_2^- を定量した。硝酸呼吸が測定出来ているか否かは複合体

I の阻害剤であるロテノンの添加により確かめられた。ロテノンを膜画分に添加したところ NO_2^- の生産が 70% に抑制されたことから、この実験系により呼吸鎖の活性が測定されていることが確認された。 $\Delta rhII$ 株の硝酸呼吸活性は親株と比較して 1.4 倍上昇し、C4-HSL を添加して培養を行なうと、硝酸呼吸活性は 50% に抑制された (図 1B)。また、 $\Delta lasI$ 株の硝酸呼吸活性は 3.5 倍上昇しており、3-oxo-C12-HSL を添加して培養を行なうことによって活性が 70% 抑制された。これらの結果により、AHL 類による NO_3^- 還元の抑制は呼吸鎖と結びついていることが明らかとなり、AHL 類によって脱窒が抑制されることが明らかとなった。

冒頭で述べたように AHL 類はそれぞれ特異的な受容体を持っており、受容体と複合体を形成することによって様々な遺伝子の転写制御を行っている。*P. aeruginosa* においては、C4-HSL は RhlR、3-oxo-C12-HSL は LasR によってそれぞれ受容される。AHL 類による脱窒の制御はこれら受容体を介したものであるか調べるために、受容体および AHL 生産を欠損させた二重遺伝子欠損株 ($\Delta rhII \Delta rhIR$ 株、 $\Delta lasI \Delta lasR$ 株) を作製し、AHL 類の影響を解析した。 $\Delta rhII \Delta rhIR$ 株、 $\Delta lasI \Delta lasR$ 株においてそれぞれ C4-HSL あるいは 3-oxo-C12-HSL を添加して培養を行ったところ、脱窒の抑制は観察されなかった (図 2)。このことは、AHL 類がそれぞれの受容体を介して脱窒の制御を行なうことを示している。さらに調べるため、受容体 (RhlR、LasR) をコードする遺伝子を pUCP24 プラスミドに導入し (pUCP-rhlR、pUCP-lasR)、各遺伝子欠損株に対して相補実験を試みたところ、C4-HSL あるいは 3-oxo-C12-HSL による脱窒の抑制が観察された。以上の結果より、AHL 類は受容体を介して脱窒を抑制することが明らかとなった。興味深いことに、 $\Delta rhII \Delta rhIR$ 株に pUCP-rhlR を導入した株では C4-HSL が存在していないにも関わらず、脱窒が抑制された。これはプラスミド上で *rhlR* を過剰発現させたために観察された可能性が高く、このような現象が自然条件下で起きているかどうかは不明ではある。しかしながら、RhlR がある一定量存在すれば、C4-HSL 非存在下で単独で脱窒を制御すること示している。RhlR 単独により遺伝子発現の調節は他にも報告されており、脱窒関連遺伝子の調節も同様な制御を受けている可能性がある。

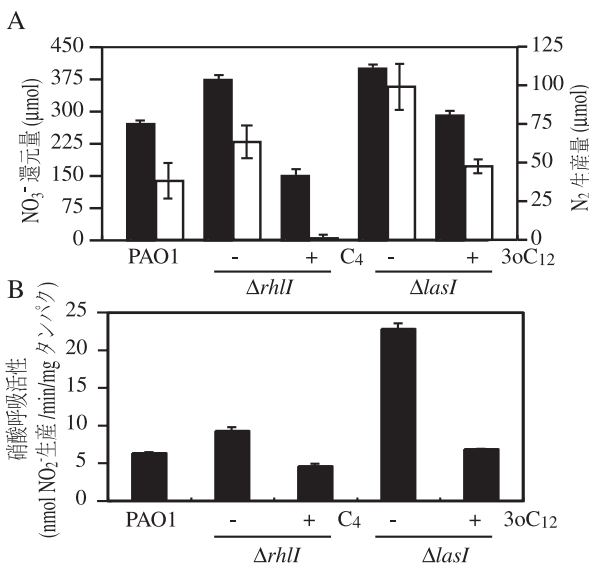


図 1. AHL 類が脱窒に与える影響¹⁸⁾
(A) ■, AHL 類の NO_3^- 還元への影響; □, AHL 類の N_2 生産への影響。(B) AHL 類の硝酸呼吸活性への影響。C4-HSL、3-oxo-C12-HSL はそれぞれ 10 μM 、1 μM の濃度になるように添加した。

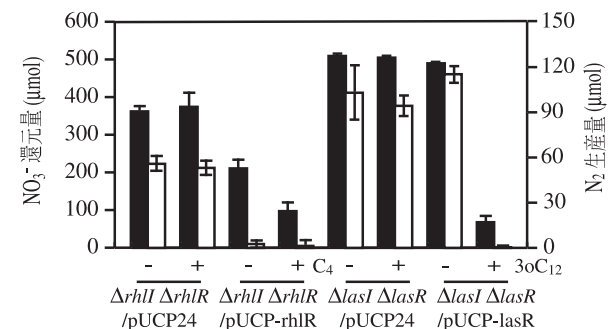


図 2. RhlR, LasR 転写調節因子が脱窒に与える影響¹⁸⁾
■, NO_3^- 還元量; □, N_2 生産量。C4-HSL、3-oxo-C12-HSL はそれぞれ 10 μM 、1 μM の濃度になるように添加した。

C4-HSLを情報伝達物質として用いる *rhl* システムと 3-oxo-C12-HSLを情報伝達物質として用いる *las* システムの細菌間情報伝達機構は、お互いの転写を正に制御していることが我々（未発表データ）やこれまでの研究によって明らかとなっている¹³⁾。したがって、C4-HSLと 3-oxo-C12-HSLによる脱窒の制御はどちらかがもう一方のシステムを介して行われている可能性が考えられる。そこで、 $\Delta rhl \Delta lasI$ の二重遺伝子欠損株を用いて C4-HSLと 3-oxo-C12-HSLの脱窒への影響を解析した（図3A）。 $\Delta rhl \Delta lasI$ 株に C4-HSLを添加したところ、脱窒が抑制されたのに対して、3-oxo-C12-HSLを添加しても脱窒の抑制は観察されなかった。以上の結果より、*rhl* システムと *las* システムの細菌間情報伝達機構のうち、C4-HSLを情報伝達物質として用いる *rhl* システムは *las* システムを介さずに脱窒を制御し、一方の 3-oxo-C12-HSLによる脱窒の制御は、3-oxo-C12-HSLにより誘導された *las* システムがさらに *rhl* システムの転写を誘導して、その結果脱窒を抑制していることが示された。

脱窒過程において、 NO_3^- は4つのステップを経て、 N_2 まで還元される。その各ステップに関わっているのは、NAR, NIR, NOR, NOSの4つの末端酸化酵素であり、それぞれの酵素はゲノム上の独立したオペロンによってコードされている。そこで、情報伝達物質による脱窒の制御は脱窒過程のどのステップで起きているのか、各末端酸化酵素の転写を測定することによって解析を試みた。それぞれのオペロンのプロモーター領域 (*narkI*, *nirS*, *norC*, *nosR*)を pMEX9 プラスミドにクローニングし、プロモーター活性に応じて転写される *xyIE* 遺伝子の産物のカタコール 2,3-ジオキシゲナーゼ活性を測定した。コントロールとして、プロモーターを導入して

いない pMEX9 プラスミドを用いた。各プラスミドを $\Delta rhl \Delta lasI$ 株に導入し、C4-HSL および 3-oxo-C12-HSL の影響を解析したところ、C4-HSL によって、*narkI*, *nirS*, *norC*, *nosR* のすべてのプロモーター活性が抑制された（図3B）。一方、図3Aの結果と同様に、 $\Delta rhl \Delta lasI$ 株に対して 3-oxo-C12-HSL を添加しても脱窒関連遺伝子の抑制は観察されなかった。以上のように、C4-HSL は転写レベルで脱窒に関わる4つの酵素を抑制していることが示された。この結果は、以前に示された、*rhlR* 破壊株で NAR, NIR, NOR 酵素の活性が親株よりも上昇しているという結果とも相関性がとれるものとなった²⁾。

以上、*P. aeruginosa* において AHL が脱窒に関与することが生化学レベルおよび遺伝子レベルで示された。

3.3. AHL による脱窒制御のバイオフィーム形成への関与

AHL による脱窒の制御はどのような状況で重要であるかを考えたとき、細菌の集合体であるバイオフィームが思い浮かぶ。そこで、AHL による脱窒の制御がバイオフィーム形成に与える影響について次に調べてみた。まず、フローセルシステムによりバイオフィームを形成させた結果、硝酸の培地への添加によりバイオフィーム形成は促進され、脱窒がバイオフィーム形成に関与していることが示された。ここに AHL による脱窒の制御に関与しているのか調べた結果、C4-HSL (Δrhl) を生産しない株は親株 (PAO1) よりも2倍量のバイオフィームを形成した（図4A）。さらに、脱窒がこのバイオフィーム形成の違いに関与しているかどうか検証するために両株のバイオフィーム中での *nirS* 遺伝子の発現を測定

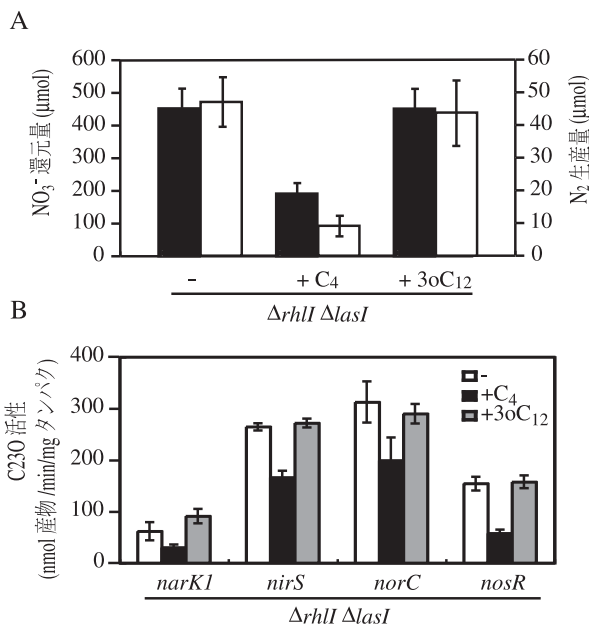


図3. 脱窒制御における AHL 間の関係¹⁸⁾

(A) AHL が $\Delta rhl \Delta lasI$ 株の脱窒活性に与える影響。■, NO_3^- 還元量; □, N_2 生産量。(B) AHL が $\Delta rhl \Delta lasI$ の脱窒関連遺伝子の転写に与える影響。C4-HSL, 3-oxo-C12-HSL はそれぞれ 10 μM , 1 μM の濃度になるように添加した。

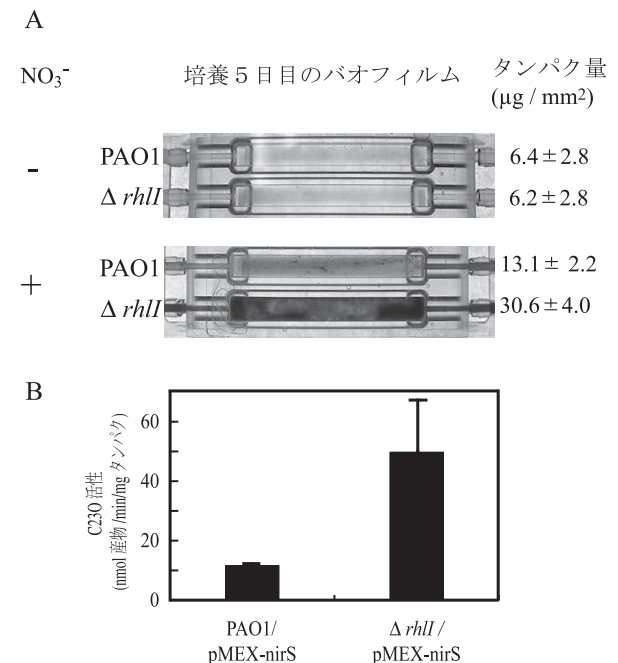


図4. AHL による脱窒制御のバイオフィーム形成への関与

(A) Δrhl 株および PAO1 株によるバイオフィーム形成。(B) Δrhl 株および PAO1 株バイオフィームにおける *nirS* の発現量。

したところ、 $\Delta rhII$ 株の方が親株に比べ高い転写量を示した (図 4B)。一方で、硝酸を加えなかった培地では $\Delta rhII$ 株と親株の間にバイオフィーム形成量の差はみられなかったため、 ΔrhI 株によるバイオフィームの過剰形成には脱窒が関与していることが考えられる。以上より、AHL は脱窒を介して *P. aeruginosa* のバイオフィーム形成に影響を与えることが示唆された。当研究室ではバイオフィーム形成とその脱窒活性を同時にモニタリングできる新規手法を最近開発しており²⁴⁾、今後のさらなる解析が期待される。

4. おわりに

P. aeruginosa において、細菌間情報伝達に利用される情報伝達物質 C4-HSL および 3-oxo-C12-HSL がエネルギー生産に関与する基礎代謝である呼吸の一つである脱窒を抑制することが明らかとなった。我々は、*P. aeruginosa* の生産するもう一方の細菌間情報伝達物質である PQS が AHL とは別の機構により硝酸呼吸を阻害することも見出しており¹⁹⁾、それについての詳細は別に報告させて頂く。

これまで細菌間情報伝達が呼吸を制御していることを明らかにした論文はなく、今後、他の細菌においてもこのような制御が行われているのか興味深いところである。いくつかの細菌においては、細菌間情報伝達が生育に影響を与えることが観察されており、例えば、*Serratia* や *Gluconacetobacter* で醗酵が制御されていることが報告されている^{9,20)}。また、*Rhizobium* においても細菌間情報伝達の生育への影響が観察されているが、その機構は明らかにされていない^{7,23)}。

本研究は嫌気条件下において行なわれたが、Wagner らによるマイクロアレイの結果²²⁾、好気条件下においても脱窒関連遺伝子が AHL 類によって制御されていることが示唆されており、脱窒は好気、嫌気問わず AHL 類によって制御されている可能性がある。また、細菌はバイオフィームとよばれる集合体を形成することが明らかとなっているが、好気条件下で形成されたバイオフィームにおいても内側は O_2 が消費されており、嫌気的な場が作り出されている。図 4 で示したように C4-HSL を生産しない株のバイオフィーム形成が好気条件下においても NO_3^- の添加によって変化することが明らかとなった。これに関連して、バイオフィーム形成において NO が関与していると報告されており、Yoon らは AHL 類が NO の生産を調節しており、それを介してバイオフィーム形成に影響を与えることを明らかにしている²⁵⁾。以上の結果より、AHL 類による脱窒の制御は集団を整えるために用いられていると考えられる。

C4-HSL の生産は *P. aeruginosa* 以外にも *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* や *Serratia liquefaciens* で報告されており^{4,16)}、今後、複合微生物系で AHL をはじめ他のシグナルによる呼吸制御の役割を解析することは複合微生物系の制御の面からも興味深いと思われる。

謝 辞

本研究の一部は筑波大学生命環境科学研究科准教授・高谷直樹博士ならびに藤井達也博士のご協力のもとで行

なわれました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Arai, H., T. Kodama, and Y. Igarashi. 1997. Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 25: 1141–1148.
- 2) Davies, J., G.B. Spiegelman, and G. Yim. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 445–453.
- 3) Diggle, S.P., P. Lumjiaktase, F. Dipilato, K. Winzer, M. Kunakorn, D. A. Barrett, S.R. Chhabra, M. Cámara, and P. Williams. 2006. Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem. Biol.* 13: 701–710.
- 4) Eberl, L., M.K. Winson, C. Sternberg, G.S. Stewart, G. Christiansen, S.R. Chhabra, B. Bycroft, P. Williams, S. Molin, and M. Givskov. 1996. Involvement of *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* 20: 127–136.
- 5) Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269–275.
- 6) Gallagher, L.A., S.L. McKnight, M.S. Kuznetsova, E.C. Pesci, and C. Manoil. 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184: 6472–6480.
- 7) He, X., W. Chang, D.L. Pierce, L.O. Seib, J. Wagner, and C. Fuqua. 2003. Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J. Bacteriol.* 185: 809–822.
- 8) Holden, M.T., S. Ram Chhabra, R. de Nys, P. Stead, N.J. Bainton, P.J. Hill, M. Manefield, N. Kumar, M. Labatte, D. England, S. Rice, M. Givskov, G.P. Salmond, G.S. Stewart, B.W. Bycroft, S. Kjelleberg, and P. Williams. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 33: 1254–1266.
- 9) Iida, A., Y. Ohnishi, and S. Horinouchi. 2008. Control of acetic acid fermentation by quorum sensing via *N*-acylhomoserine lactones in *Gluconacetobacter intermedius*. *J. Bacteriol.* 190: 2546–2555.
- 10) Lee, J.H., Y. Lequette, and E.P. Greenberg. 2006. Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol. Microbiol.* 59: 602–609.
- 11) Morohoshi, T., Y. Nakamura, G. Yamazaki, A. Ishida, N. Kato, and T. Ikeda. 2007. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces *N*-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 189: 8333–8338.
- 12) Parsek, M.R., and E.P. Greenberg. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13: 27–33.
- 13) Pesci, E.C., J.P. Pearson, P.C. Seed, and B.H. Iglewski. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179: 3127–3132.
- 14) Ryan, R.P., and J.M. Dow. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* 154: 1845–1858.
- 15) Schreiber, K., R. Krieger, B. Benkert, M. Eschbach, H. Arai, M. Schobert, and D. Jahn. 2007. The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J. Bacteriol.* 189: 4310–4314.
- 16) Swift, S., A.V. Karlyshev, L. Fish, E.L. Durant, M.K. Winson, S.R. Chhabra, P. Williams, S. Macintyre, and G.S. Stewart. 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aero-*

- monas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* 179: 5271–5281.
- 17) Thomas, K.L., D. Lloyd, and L. Boddy. 1994. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 181–186.
 - 18) Toyofuku, M., N. Nomura, T. Fujii, N. Takaya, H. Maseda, I. Sawada, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2007. Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 189: 4969–4972.
 - 19) Toyofuku, M., N. Nomura, E. Kuno, E. Tashiro, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2008. Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190: 7947–7956.
 - 20) Van Houdt, R., P. Moons, M. Hueso Buj, and C.W. Michiels. 2006. *N*-acyl-l-homoserine lactone quorum sensing controls butanediol fermentation in *Serratia plymuthica* RVH1 and *Serratia marcescens* MG1. *J. Bacteriol.* 188: 4570–4572.
 - 21) Wade, D.S., M.W. Calfee, E.R. Rocha, E.A. Ling, E. Engstrom, J.P. Coleman, and E.C. Pesci. 2005. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187: 4372–4380.
 - 22) Wagner, V.E., D. Bushnell, L. Passador, A.I. Brooks, and B.H. Iglewski. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185: 2080–2095.
 - 23) Wilkinson, A., V. Danino, F. Wisniewski-Dye, J.K. Lithgow, and J.A. Downie. 2002. *N*-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* 184: 4510–4519.
 - 24) Yawata, Y., N. Nomura, and H. Uchiyama. 2008. Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5429–5435.
 - 25) Yoon, S.S., R.F. Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. DeKievit, P.R. Gardner, U. Schwab, J.J. Rowe, B.H. Iglewski, T.R. McDermott, R.P. Mason, D.J. Wozniak, R.E. Hancock, M.R. Parsek, T.L. Noah, R.C. Boucher, and D.J. Hassett. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* 3: 593–603.