

## ナフタレン誘導体による運動性抑制を介した緑膿菌バイオフィルムの制御

### Control of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm through Inhibition of Swarming Motility by Naphthalene Derivatives

大浦 啓, 田代 陽介, 豊福 雅典, 中島 敏明, 内山 裕夫, 野村 暢彦\*

HIROMU OURA, YOSUKE TASHIRO, MASANORI TOYOFUKU, TOSHIKI NAKAJIMA-KAMBE, HIROO UCHIYAMA and NOBUHIKO NOMURA

筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒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

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,

Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: ナフタレン誘導体, 運動性, バイオフィルム

Key words: naphthalene derivatives, motility, biofilm

(原稿受付 2011年10月17日/原稿受理 2011年12月2日)

#### 1. はじめに

近年, 環境中の微生物の多くは浮遊状態ではなく, 物質表面に付着してバイオフィルムという集団形態をとって存在することが分かってきた<sup>7,9)</sup>. バイオフィルムとは, 物質表面に付着した微生物と微生物が生産する多糖などのEPS (extracellular polymeric substances) から構成される三次元構造体のことである。バイオフィルムは我々を取り巻くあらゆる環境において形成されるが, そのなかには人間の社会活動と密接な関係性を持つものが多くみられる。例えば, 水道管などの工業用配管中に形成されたバイオフィルムは, 配管内部の詰まりや金属腐食の誘発によって各設備の性能低下を引き起こすことが知られている<sup>42)</sup>. また, 医療器具内やヒトの肺上皮に形成されたバイオフィルムは, 高い抗生物質耐性や物理的剥離の困難性から感染症治療の難治化を引き起こす<sup>7,11)</sup>. 加えて近年では, う触や歯周病とバイオフィルムの深い関係性が報告されており<sup>41)</sup>, バイオフィルムの制御は口腔治療の分野においても重要なトピックとなっている。

このような負の側面が多く報告されているバイオフィルムではあるが, その一方で工業的に有効利用されているケースも多い。例えば, 排水処理に用いられる活性汚泥や発酵工業で使われる麹などは, 微生物が高密度で集合したバイオフィルム中でみられる高い物質変換能力を活用したものである<sup>40)</sup>. このように, バイオフィルムは正負両面において我々と深いつながりを持つ存在であることから, その理解と制御は近年の微生物学において一層重要なものとなってきている。そこで本稿では, バイオフィルムの形成および脱離と密接に関与する運動性に着目し, バイオフィルム制御へつながら新規知見について報告する。

#### 2. 緑膿菌のバイオフィルム形成における運動性の役割

バイオフィルム研究のモデル微生物の一つである緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は, ヒトの肺気道上や傷口といった生物的表面のみならず, コンタクトレンズやカテーテルといった非生物表面に対してもバイオフィルムを形成する。興味深いことに, バイオフィルムを形成した緑膿菌は, 浮遊状態と比較して抗生物質耐性が上昇することや, 代謝活性が変化すること, 変異株の出現率が上昇することなどが報告されており, 明らかに浮遊状態とは全く異なる細胞状態であることが分かってきた<sup>7,17)</sup>. そのため近年では, 浮遊状態の研究に加えて, バイオフィルム形成時の挙動に関する研究が盛んに行われている。

緑膿菌のバイオフィルムは, 浮遊状態の細胞が物質表面に付着し, 多糖やDNAなどの細胞外マトリクスを分泌しながらマイクロコロニーを形成するという過程を経て成熟化する (図1)。そして, バイオフィルムの成熟にもなって生じる内部での栄養塩の枯渇や一酸化窒素などの代謝産物の蓄積によって緑膿菌細胞の脱離が誘導され<sup>1,2)</sup>, 脱離した浮遊菌は別の場所に新たなバイオフィルムを形成する。このような緑膿菌のバイオフィルム形成には, 細胞外多糖や細胞外DNAなどで構成されるEPSと, 鞭毛やIV型線毛を介した運動性が密接に関与することが報告されている<sup>20)</sup>. 本稿では, この両者のうち運動性に着目し, バイオフィルム制御に関する新規の知見を述べる。

緑膿菌における運動性は, 鞭毛を必須とするSwimming (液体中を泳ぐ運動性) とSwarming (半固体表面における集団での運動性), そしてIV型線毛を必須とするTwitching (固体表面を這う運動性) の3つが知ら

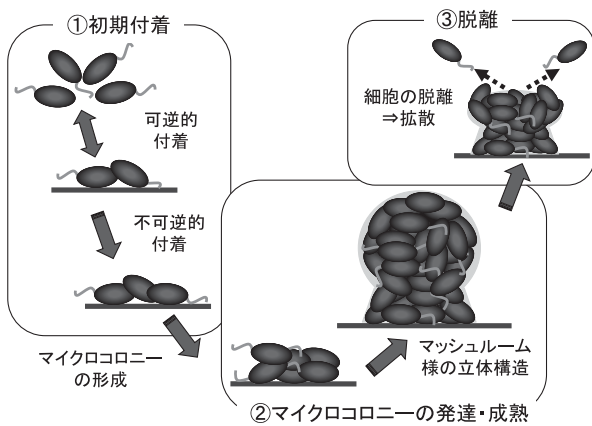


図1. 緑膿菌バイオフィルムの生活環。  
固体表面への付着, 成熟, 脱離の3段階で構成される。

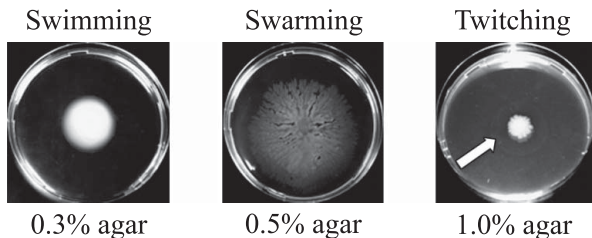


図2. 寒天培地上において緑膿菌が示す3タイプの運動性。  
左からSwimming (0.3% agar), Swarming (0.5% agar), Twitching (1.0% agar)。

れている (図2)。これらの運動性は、緑膿菌のバイオフィルム形成および脱離の各段階と密接に関与している。まず、バイオフィルム形成の初期段階において、緑膿菌は鞭毛やIV型線毛を用いた運動性によって物質表面に近づく。鞭毛やIV型線毛は物質表面に対しての反発的な力を相殺するため、菌体の基質表面への相互作用の段階で重要な働きをする。さらに、鞭毛は物質表面に対して物理化学的な力によって可逆的に付着 (reversible attachment) した後には生じる、強固な不可逆付着 (irreversible attachment) に必要であることが報告されている<sup>20)</sup>。また、IV型線毛による Twitching は緑膿菌バイオフィルムにみられるマッシュルーム型の立体構造の形成に関与することが報告されている<sup>20)</sup>。さらに、鞭毛を介する Swarming は、緑膿菌細胞がEPSで覆われた成熟バイオフィルム内部から外部へと脱離する際に重要な働きをすることが示されており、Swarming能の高い変異株では野生株と比較してバイオフィルムの脱離が早期に誘導されることが報告されている<sup>9)</sup>。また、近年の研究において、バイオフィルム形成とSwarmingは、細胞内セカンドメッセンジャーである3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP)濃度を介して逆の制御を受けることが報告されている<sup>6)</sup>。具体的には、細胞内のc-di-GMP濃度の高い時にはSwarming活性が低下する一方で、バイオフィルム形成に重要な役割を果たす細胞外多糖の生産が誘導されることにより、バイオフィルム形成が促進される<sup>6)</sup>。その一方で、一酸化窒素などの脱離を促す環境シグナルに応答してc-di-GMP濃度が低下すると、Swarm-

ing能の上昇によってバイオフィルムからの脱離が促されることが報告されている<sup>2)</sup>。バイオフィルムからの脱離は、栄養塩の枯渇や代謝産物の蓄積によって条件の悪化したバイオフィルム内部から、より条件の良い場所へと移動する微生物の環境適応である一方、ヒト体内における全身への感染拡大や環境分野における微生物汚染の拡散といった負の側面も持つため、その制御は医療・環境分野を中心に広く求められている。

### 3. Swarming motility について

バイオフィルムからの脱離と密接に関与する Swarming motility は、半固体表面における微生物の急速な運動性 (数  $\mu\text{m/s}$ ) と定義されている<sup>36)</sup>。これまで、緑膿菌の他に *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* などのグラム陰性菌、そして *Bacillus subtilis* などのグラム陽性菌においてその存在が報告されている。緑膿菌を始めとした Swarming 能を有する微生物において、Swarmingには機能的な鞭毛とともに微生物が生産する界面活性剤であるバイオサーファクタントが必須であることが報告されている<sup>34)</sup>。Swarming細胞はバイオサーファクタントの生産によって細胞と培地との間に生じる表面張力を低下させ、半固体表面における移動を可能にしている。緑膿菌ではラムノリピド、*S. marcescens*ではセラウエッチン、*B. subtilis*においてはサーファクチンといったバイオサーファクタントがその役割を果たすことが知られている<sup>36)</sup>。緑膿菌のラムノリピド生産は細胞密度依存的遺伝子発現制御機構であるクオラムセンシングによって正に制御されることが知られている<sup>25)</sup>。クオラムセンシングとは、微生物が低分子のシグナル物質 (アシル化ホモセリンラクトン; AHL など) の濃度変化を介して周囲の菌体密度を感知し、それに応じて遺伝子発現を制御する機構のことである<sup>3)</sup>。緑膿菌では、*rhlII* 遺伝子によって合成されるシグナル物質である *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) と、その同族のレギュレーター遺伝子である *rhlR* の複合体によってラムノリピド生産が正に制御されることが報告されている<sup>25)</sup>。このようなクオラムセンシング依存的な Swarming の制御に加えて、炭素源の違いや炭素源量と窒素源量の比率によっても Swarming パターンが変化するという先行研究も存在する<sup>27,38)</sup>。また、Overhageらは緑膿菌 PAO1 株のトランスポゾンによるランダムな遺伝子破壊により36株の Swarming 欠損株を取得しているが、その変異箇所は鞭毛やIV型線毛合成に関わる遺伝子の他に転写因子やアミノ酸代謝に関わる遺伝子など非常に多様であったことを報告している<sup>23)</sup>。さらに、Tremblayらは Swarming プレート上の中央の細胞と外縁部の細胞では、遺伝子発現のプロファイルが顕著に異なるという報告を行っており、Swarming細胞は均一な集団ではないことが示唆されている<sup>32)</sup>。他にも、Swarming細胞は浮遊細胞と比較して抗生物質への耐性や毒素生産関連遺伝子の転写が上昇することが報告されている<sup>16,22)</sup>。このように、Swarmingは緑膿菌における一運動性という位置付けのみならず、周囲の菌体密度や栄養塩に依存してそのパターンが変化し、さらに複数の遺伝子が関与する非常に複雑な運動性と言える。

緑膿菌において、Swarming はヒト体内での感染拡大や環境中での微生物汚染の拡大に繋がるバイオフィルムの脱離と密接に関与するため<sup>9)</sup>、その阻害活性を持つ化合物の探索は既に複数なされている。その例として分岐鎖脂肪酸やプロアントシアニジンなどが報告されているが<sup>15,19)</sup>、それらの Swarming 阻害剤がバイオフィルムに対しても脱離抑制効果を示すことを立証した報告は、我々の知る限り未だ存在しない。そのため、Swarming 阻害のみならずバイオフィルムに対しても脱離抑制効果を示す化合物の探索は、緑膿菌バイオフィルムの制御において非常に重要な課題であると考えられる。

#### 4. ナフタレン誘導体による緑膿菌の Swarming motility の阻害

##### 4.1. 種々のナフタレン誘導体が緑膿菌の Swarming motility に与える影響

前述のとおり、Swarming motility の阻害は緑膿菌のバイオフィルム形成および脱離を制御するうえで非常に重要な課題であると考えられた。このような背景から、我々は緑膿菌の Swarming に対して阻害活性を示す化合物をターゲットとしたスクリーニングを行った結果、1-ナフトールに代表されるナフタレン誘導体にその活性があることを見出した。そこで、緑膿菌の基準株として汎用される *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株<sup>14)</sup> を供試菌株としてナフタレン誘導体の Swarming に対する影響を詳細に解析することとした。まず、ナフタレンおよびその誘導体 (図 3A) が緑膿菌の増殖に与える影響を評価するため、それらの濃度を振って培地に添加した際の増殖曲線を得た。その結果、本研究で使用した各種ナフタレン誘導体は 500  $\mu\text{M}$  までの濃度範囲内において (ただ

し、1,2-ジヒドロキシナフタレンは 250  $\mu\text{M}$  まで)、緑膿菌の増殖を阻害しないことが分かった (投稿準備中)。この結果から、以下の実験では各種ナフタレン誘導体を終濃度 500  $\mu\text{M}$  (1,2-ジヒドロキシナフタレンのみ 250  $\mu\text{M}$ ) で培地に添加して行った。次に、緑膿菌の増殖に影響を与えない濃度で各種ナフタレン誘導体を添加した Swarming 用の 0.5% 寒天培地を Tremblay らの方法<sup>33)</sup> に従って作製し、その中央に OD660=3.0 に調整した緑膿菌の前培養液を 5  $\mu\text{l}$  植菌後、30°C で 12 時間培養した。その結果、各種ナフタレン誘導体の溶媒として用いた dimethyl sulfoxide (DMSO) のみを加えたコントロール培地では寒天培地中央の植菌地点から同心円上に菌が移動したのに対し、1-ナフトール、1,2-ジヒドロキシナフタレン、2,3-ジヒドロキシナフタレン及び 1-アミノナフタレンを添加した培地では、中央の植菌地点から菌が全く移動しなかった。プレート上に広がった細胞の移動直径を 3 連で定量した結果を図 3B に示す。このナフタレン誘導体の添加による Swarming の阻害は 24 時間以上培養を継続しても見られたため、運動性の遅れによる現象ではないことが確かめられた (投稿準備中)。Swarming 阻害効果のあった複数のナフタレン誘導体のうち 1-ナフトールを例に解析を進めたところ、1-ナフトール濃度依存的な Swarming 阻害が見られ、50  $\mu\text{M}$  以上の濃度において Swarming 能が完全に失われることが分かった (投稿準備中)。また、官能基を持たないナフタレンや、1-ナフトールと水酸基の位置のみが異なる 2-ナフトールでは Swarming 阻害活性が見られなかったため、水酸基やアミノ基などの官能基の存在やその位置が重要であることが示唆された。さらに、Swarming 中の細胞が 1-ナフトールに近づいた際に Swarming 状態にある細胞の運動性が阻害されるかを確認するため、O'May らの方法<sup>19)</sup> に従って 1-ナフトールを添加したペーパーディスクを Swarming 培地上に静置し、Swarming 細胞の挙動を確認した。その結果、1-ナフトールを含んだペーパーディスクに近づいてきた Swarming 細胞はディスクを避けるような移動パターンを示した (投稿準備中)。このことから、1-ナフトールは既に Swarming 能を示している細胞に対しても Swarming 阻害活性を持つことが示唆された。またこの結果から、1-ナフトールによる Swarming の阻害 (細胞が Swarming プレートの中央から全く移動しない現象) は、1-ナフトールに対する正の走化性が原因ではないことが示された。

##### 4.2. 1-ナフトールが緑膿菌の 3 つの運動性に与える影響

前述した通り、緑膿菌には Swarming の他に Swimming と Twitching の 2 つの運動性があることが報告されている。Swarming 阻害活性を示したナフタレン誘導体が他の 2 つの運動性に対しても同様に阻害活性を示すか否かは非常に興味深く、Swarming 阻害のメカニズムを解明するうえでも重要と考えられた。そこで、Swarming 阻害効果を示した 1-ナフトールを例に、Swimming や Twitching に対しても同様に阻害効果を示すか否かを確認することとした。その結果、1-ナフトールは Swimming 及び Twitching にはほとんど影響を及ぼさず、Swarming 特異的に阻害活性を示すことが分かった (投

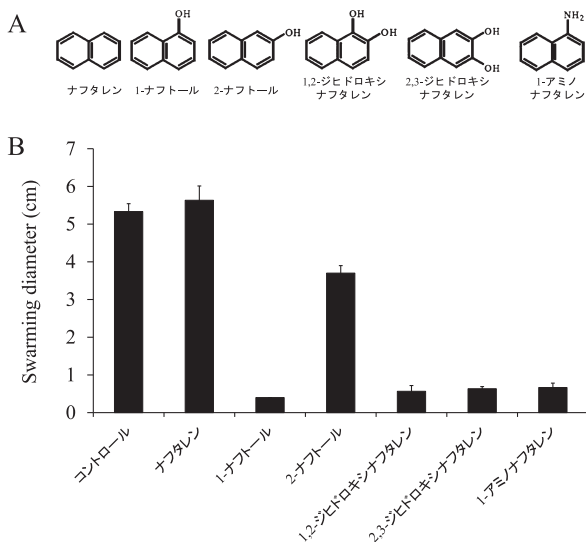


図 3. 各種ナフタレン誘導体とそれらが緑膿菌の Swarming motility に与える影響。(A) 本研究で使用したナフタレン誘導体。(B) 各種ナフタレン誘導体を添加した際の Swarming アッセイ。M9 最小培地 (0.2% グルコース, 0.5% カザミノ酸), 30°C, 12 時間培養後に 3 連で測定した Swarming 細胞の移動直径 (mm)。

稿準備中)。先行研究において *Swimming* には鞭毛, *Twitching* には IV 型線毛がそれぞれ必須とされているが, 1-ナフトールがこれら 2 つの運動性に影響を与えなかったことから, 鞭毛や IV 型線毛の機能は阻害されていないことが示唆された。また, 1-ナフトールの添加により *Swarming* 阻害を受けている細胞を, 液体培地や新たな *Swarming* 培地に植え継いだ実験においても, 活発な運動性が観察された。

## 5. 1-ナフトールはバイオフィルムの脱離を抑制する

緑膿菌のバイオフィルムが成熟すると, その内部で生じる栄養塩欠乏などの環境ストレスによって, 緑膿菌細胞のバイオフィルムからの脱離が誘導される。バイオフィルムの脱離は, ヒト体内における感染拡大や環境分野における病原菌の拡散を誘導するため, その制御は医療・環境分野を中心に広く求められている。Boles らの先行研究において, 緑膿菌バイオフィルムの脱離はラムノリピドを介した *Swarming* によって正に誘導されることが報告されている<sup>9)</sup>。今回, 1-ナフトールが顕著な *Swarming* 阻害活性を示したため, それに伴い *Swarming* によって誘導されるバイオフィルムの脱離も同様に抑制されることが推測された。そこで, バイオフィルム形成途中にあたる培養 6 時間の時点で 1-ナフトール添加することによって, バイオフィルムの脱離が抑制されるかを確認することとした。バイオフィルム形成実験およびその定量は, O'Toole らの手法<sup>21)</sup> に従って行った。ポリ塩化ビニル製の 96 穴マイクロタイタープレートに菌液を分注し, 37°C で静置培養を行うことによりバイオフィルムを形成させた。その後, 経時的にサンプリングしたバイオフィルムをクリスタルバイオレット (CV) 溶液によって染色し, 染色されたバイオフィルムを 99.5% エタノールで溶出した後の吸光度 (OD<sub>595</sub>) を測定することによって定量化を行った。

その結果, 6 時間の時点で 1-ナフトールの溶媒として用いた DMSO のみを添加したコントロールでは, 培養 9 時間の時点でバイオフィルム形成量が最大となり, 培養 12 時間において劇的な脱離を示した。それに対し, 培養 6 時間の時点で 1-ナフトールを添加した場合, 培養 9 時間で最大形成量に達したのち, コントロールにおいて脱離がみられた培養 12 時間においても脱離がみられず, 少なくとも 24 時間までバイオフィルム形成を続けた。培養 9 時間をバイオフィルム形成の最大値として, 脱離がみられた培養 12 時間において残存しているバイオフィルムの割合を算出した結果, 1-ナフトール添加区で顕著にバイオフィルムが残存していた (図 4)。

上記で行ったクリスタルバイオレット染色によるバイオフィルムの定量は, 細胞のみならず溶菌細胞由来の細胞残渣等を含んだ簡易的定量法であるため, より詳細に細胞を解析するため, 共焦点顕微鏡を用いたバイオフィルムの可視化および画像定量を行うこととした。コントロールにおいてバイオフィルムの脱離が観察された培養 12 時間におけるバイオフィルムの三次元画像を共焦点顕微鏡によって取得し<sup>24,39)</sup>, COMSTAT プログラム<sup>13)</sup> によってバイオフィルムのバイオマスを画像定量した。その結果, コントロールでは  $0.02 \pm 0.005$  ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) で

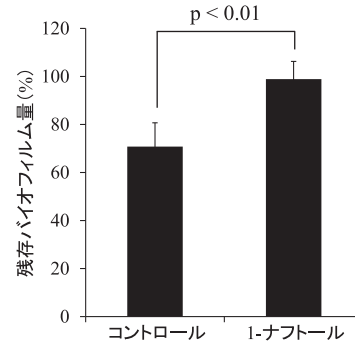


図 4. 培養 12 時間において脱離せず, 残存しているバイオフィルムの割合。コントロールにおいてバイオフィルムの脱離が観察された培養 12 時間の時点で, 最大形成時 (9 時間) と比較して残存しているバイオフィルムの割合 (%)。

あったのに対し, 1-ナフトールを添加すると  $0.3 \pm 0.02$  ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) と 10 倍以上バイオフィルムが残存していた。また, *Swarming* 抑制効果を示さないネガティブコントロールとして用いたナフタレンでは脱離抑制がみられず, COMSTAT によるバイオフィルムの定量結果でも  $0.006 \pm 0.002$  ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) とバイオフィルムの残存はコントロールと同様に少なかった。これらの結果から, 1-ナフトールは *Swarming* 阻害活性を持つだけでなく, *Swarming* によって誘導されるバイオフィルムからの脱離に対しても, 顕著な抑制効果を示すことが分かった。

## 6. 1-ナフトールを例にした *Swarming* 阻害メカニズムの解析

### 6.1. 1-ナフトールは *Swarming* 細胞への分化を抑制する

ナフタレン誘导体による *Swarming* 阻害のメカニズムを解析するなかで, *Swarming* プレート上でみられる細胞形態の変化に着目した。先行研究において, *Swarming* 能を有する多くのバクテリアにおいて, *Swarming* 状態にある細胞は浮遊細胞と比較して細胞が伸長し, 鞭毛数が増加することが報告されている<sup>12,35)</sup>。緑膿菌においても, *Swarming* 状態にある細胞の長さは, 通常細胞と比較して約 2 倍伸長しており, 通常細胞では 1 本のみの鞭毛が, *Swarming* 細胞では 2 本 (またはそれ以上) 存在する事が報告されている<sup>26)</sup>。本稿では, このように *Swarming* 状態で細胞が伸長し, 鞭毛数が増加した細胞を *Swarming* 細胞と定義させていただく。これまでの先行研究において, 緑膿菌ではポリリン酸キナーゼ (*ppk*) の欠損株において *Swarming* 能が失われるが, この欠損株では *Swarming* プレート上における細胞伸長がみられない<sup>26)</sup>。他にも, *P. mirabilis* の *Swarming* はポリフェノールの一種であるレスベラトロールによって阻害されるが, この際 *Swarming* 培地上において通常観察される細胞の伸長が顕著に抑制されることが報告されている<sup>37)</sup>。これらの先行研究から, 1-ナフトールは緑膿菌の *Swarming* 細胞において通常観察される細胞伸長の抑制を介して *Swarming* を阻害している可能性が考えられた。そこで, コントロール培地で活発な *Swarming* を

行っている細胞と、1-ナフトールを加えて Swarming が抑制されている状態の細胞形態を観察し、その長さを比較することとした。

1-ナフトールの有無において 12 時間培養した Swarming プレート上の細胞を回収し、共焦点顕微鏡によって細胞形態を観察した。その結果、DMSO のみを加えたコントロール培地においては振盪培養時の約 2 倍程度 ( $3.8 \pm 0.65 \mu\text{m}$ ) に細胞が伸長していたのに対し、1-ナフトール添加区では振盪培養時と同等の長さ ( $1.6 \pm 0.88 \mu\text{m}$ ) であった。さらに、Swarming 抑制効果を示さないネガティブコントロールとして用いたナフタレンを含んだ Swarming 培地における細胞長 ( $3.5 \pm 0.42 \mu\text{m}$ ) は、コントロールの細胞長とほぼ同等であった。また、1-ナフトールは液体振盪培養状態での細胞形態には影響を与えなかった。これらの結果から、1-ナフトールは通常の栄養細胞から Swarming 細胞への分化 (細胞伸長) の抑制を介して、Swarming を阻害していることが示唆された。

## 6.2. 1-ナフトールによる Swarming 阻害にクオラムセンシングやラムノリピドは関与しない

前述した通り、緑膿菌の Swarming には糖脂質型のバイオフィームファクターであるラムノリピドが必須であり、その生産はクオラムセンシングによる正の制御を受ける。緑膿菌においては、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) をシグナル物質として用いる 2 つのクオラムセンシングシステム (Rhl および Las システム) とキノロン骨格を有するシグナル物質である *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) を介したクオラムセンシングシステムの存在が報告されており、ラムノリピドの生産は C4-HSL をシグナル物質とする Rhl システムを介したクオラムセンシングによって正に制御されている。また一方で、我々のグループでは 1-ナフトールが緑膿菌特異的シグナル物質である PQS を介したクオラムセンシングを抑制することを見出している<sup>29)</sup>。緑膿菌では PQS を介したクオラムセンシングシステムがラムノリピド生産を正に制御する Rhl システムの上流に存在することが報告されているため<sup>10,18)</sup>、1-ナフトールによる Swarming 阻害は PQS 生産抑制に伴って生じる Rhl システム及びラムノリピドの生産抑制を介することが推測された。そこで、Swarming 阻害活性を示した 1-ナフトールが、Rhl システム及びラムノリピド生産を抑制するか否かを確認することとした。

まず、1-ナフトールが Rhl システムに関与する遺伝子群の転写活性に与える影響の評価を、Rhl システムを構成する C4-HSL 合成酵素遺伝子 (*rhII*) とその同族のレギュレーター遺伝子 (*rhIR*) のプロモーター活性測定によって行った。Swarming プレートから回収した細胞を用いた活性測定の結果、1-ナフトール添加時の *rhII* および *rhIR* の転写活性はコントロールとほとんど変化しなかった (投稿準備中)。このことから、1-ナフトールは PQS 生産を阻害するが、その下流の Rhl システムの転写活性には影響を及ぼさないことが示された。

また、液体振盪培養において 1-ナフトールを添加した際のラムノリピド生産量を、オルシノールアッセイ<sup>4)</sup>によって定量したところ、コントロール (1-ナフトール

非添加区) と顕著な差は見られなかった (投稿準備中)。また、Swarming プレートではラムノリピドのハローが細胞の外側で形成されることが報告されているが<sup>38)</sup>、1-ナフトール添加区でもコントロール区と同程度ラムノリピドのハローが形成されていた (投稿準備中)。さらに、1-ナフトールを添加した Swarming 培地に対し、緑膿菌が定常期に生産する量に近いラムノリピド ( $0.5 \text{ g/L}$ ) を含んだ上清画分 (ジエチルエーテルによってラムノリピドを含む成分を抽出し、乾燥後に滅菌水で溶解させたもの) を外部添加することで 1-ナフトールによる Swarming 阻害が回復するかを確かめた。この結果 Swarming の回復がみられれば、1-ナフトールによる Swarming 阻害はラムノリピドの不足によるものであることが推測されたが、この条件では Swarming の回復はみられなかった。これらの結果から、1-ナフトールによる Swarming 阻害はこれまで Swarming に必須とされてきた Rhl システムやその制御下にあるラムノリピドの生産抑制を介したのではないことが強く示唆された。

## 7. 総括と今後の展望

これまでの解析結果から、1-ナフトールによる Swarming 阻害は、これまで Swarming に必須であるとされてきた鞭毛の機能や、Rhl システムおよびラムノリピドの生産抑制を介したのではないことが示唆された。その一方で、Swarming 細胞で通常観察される細胞伸長が 1-ナフトールによって抑制されることを見出すことが出来たため (図 5)、現在は細胞分裂に関わる因子などを中心に解析を進めている。また、Swarming 阻害に関与する細胞伸長以外の因子として、細胞内セカンドメッセンジャーである c-di-GMP にも着目している。先行研究では、細胞内の c-di-GMP 濃度が高いときに Swarming が抑制され、反対に低いときには Swarming が促進されることが報告されている<sup>6)</sup>。Bernier らは、ア

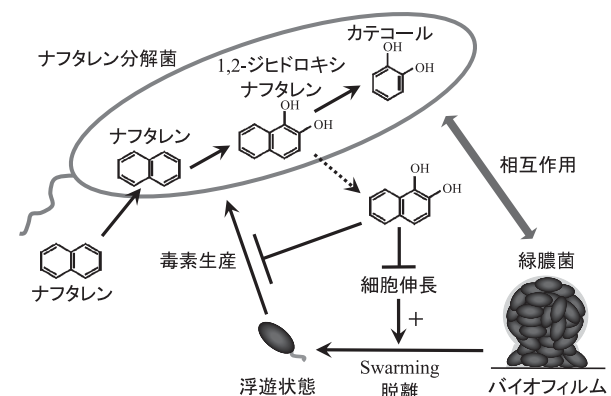


図 5. ナフタレン誘導体を介した緑膿菌のナフタレン分解菌との相互作用のモデル図。

ナフタレン誘導体は、緑膿菌のクオラムセンシングの阻害を介して毒素生産を抑制する一方、Swarming に重要とされる細胞伸長の阻害を介して、Swarming およびバイオフィームからの細胞脱離を抑制する。また、本研究で用いたナフタレン誘導体の一つである 1,2-ジヒドロキシナフタレンは、ナフタレン分解の中間代謝産物であるため、ナフタレン分解菌による緑膿菌の毒性および運動性の抑制も推測される。

ルギニンなどのアミノ酸を細胞外から添加することによって **Swarming** が阻害されることを示しているが、その際に細胞内の **c-di-GMP** 濃度が上昇することを示している<sup>4)</sup>。また、**Swarming** 制御と密接に関与する **c-di-GMP** の合成酵素、または分解酵素をコードする遺伝子は、環境中のシグナル ( $O_2$  濃度など) を受容するセンサードメインを有することが報告されている。これらのセンサードメインの多くは細胞膜上に局在することが知られているため、微生物はこのセンサーによって細胞外の環境変化を感知し、それに応じて細胞内の **c-di-GMP** 濃度を変化させることにより、あらゆる環境に適応する機構が推測される。このような知見に基づいて、今回みられたナフタレン誘導体による **Swarming** 阻害について再考してみると、緑膿菌がナフタレン誘導体を環境シグナルの一つとして認識し、細胞内の **c-di-GMP** 濃度をコントロールしている可能性が推察される。つまり、緑膿菌は細胞膜上のセンサータンパク質を介してナフタレン誘導体を環境シグナルの一つとして認識し、続いて生じる細胞内の **c-di-GMP** 濃度の増加によって **Swarming** が阻害されていることが考えられる。そのため、ナフタレン誘導体添加時における細胞内の **c-di-GMP** 濃度の定量や、ナフタレン誘導体を認識するセンサータンパクの探索等にも興味もたれる。

また、本研究で用いたナフタレン誘導体のうち 1,2-ジヒドロキシナフタレンは、多くのナフタレン分解菌においてみられる中間代謝産物の一つとして知られている。環境中では複数種の微生物がバイオフィーム内部で共存することが推測されるため、環境常在菌である緑膿菌はナフタレン分解菌とともにバイオフィームを形成していることも想定される。そのような複合バイオフィームの内部において、ナフタレン分解菌は細胞外に 1,2-ジヒドロキシナフタレンを排出することによって緑膿菌の運動性やクオラムセンシングを抑制し、共存を可能する機構が有るのかも知れない (図 5)。このような視点も踏まえ、今後はナフタレン誘導体の作用機序解析とともに、緑膿菌とナフタレン分解菌の環境中における相互作用という点にも着目し、更に解析を進めていきたい。これまで我々は、緑膿菌特異的シグナル物質である PQS が緑膿菌のみならず、その受容体をもたない異種の微生物に対して増殖抑制や細胞外小胞 (メンブランベシクル) の生産促進という効果を持つことを報告してきた<sup>28,30,31)</sup>。これらの知見は、異種微生物間におけるシグナル物質を介した相互作用の存在を強く示唆しているが、本研究がそのような緑膿菌と異種微生物における代謝産物を介した相互作用の新たな一例となれば非常に興味深い。そして、このような緑膿菌と異種微生物間における相互作用を解析していくなかで、実環境中における微生物どうしの関わり合いを紐解くヒントが見出されれば幸いである。

今回の解析において主として用いた 1-ナフトールは、**Swarming** 能が野生株と比較して顕著に高い尿路由来の臨床分離株に対しても高い **Swarming** 阻害活性を示したため、動物細胞に対する毒性の低い類似化合物の開発によって臨床現場への応用が期待出来る。このような応用を目指し、我々は現在 DNA マイクロアレイによる 1-ナフトール添加時の **Swarming** 細胞における遺伝子発現変

化の網羅的解析を試みており、これによってナフタレン誘導体の作用機序の解析が進むとともに、新規の **Swarming** 制御系の発見が期待される。

緑膿菌バイオフィームの制御という観点における本研究の意義は、病原性微生物の体内や環境中での拡散を防止することが期待できる点が挙げられる。それに加え、今後ナフタレン誘導体の作用機序が解明され、緑膿菌以外の微生物に対してもバイオフィームの脱離抑制効果がみられた場合には、次のような応用も考えられる。例えば、バイオレメディエーションを効率的に行う上で分解菌の汚染サイトへの定着は重要な要素の一つであるが、その際にナフタレン誘導体を分解菌バイオフィームの脱離抑制剤として用いることにより、分解菌の現場への定着促進効果が期待出来るだろう。このように、ナフタレン誘導体を病原性微生物の拡散防止という側面だけではなく、有用バイオフィームの保持等に利用することができれば、本研究の意義は非常に高まると思われる。そのような応用も踏まえ、今後更にナフタレン誘導体の作用機序解析を解析していくことが重要と考えられる。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省からの科学研究費補助、科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (CREST) および先端的低炭素化技術開発 (ALCA) の補助を受けて行われました。この場を借りて感謝いたします。

## 文 献

- 1) Barraud, N., D.J. Hassett, S.H. Hwang, S.A. Rice, S. Kjelleberg, and J.S. Webb. 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188: 7344-7353.
- 2) Barraud, N., D. Schleheck, J. Klebensberger, J.S. Webb, D.J. Hassett, S.A. Rice, and S. Kjelleberg. 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J. Bacteriol.* 191: 7333-7342.
- 3) Bassler, B.L. 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109: 421-424.
- 4) Bernier, S.P., D.G. Ha, W. Khan, J.H. Merritt, and G.A. O'Toole. 2011. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res. Microbiol.* 162: 680-688.
- 5) Boles, B.R., M. Thoendel, and P.K. Singh. 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* 57: 1210-1223.
- 6) Caiazza, N.C., J.H. Merritt, K.M. Brothers, and G.A. O'Toole. 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 189: 3603-3612.
- 7) Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- 8) Davey, M.E., N.C. Caiazza, and G.A. O'Toole. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 185: 1027-1036.
- 9) Davey, M.E. and G.A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- 10) Diggle, S.P., K. Winzer, S.R. Chhabra, K.E. Worrall, M.

- Cámara, and P. Williams. 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* 50: 29–43.
- 11) Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881–890.
  - 12) Harshey, R.M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 249–273.
  - 13) Heydorn, A., A.T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B.K. Ersbøll, and S. Molin. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146 (Pt 10): 2395–2407.
  - 14) Holloway, B.W., V. Krishnapillai, and A.F. Morgan. 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43: 73–102.
  - 15) Inoue, T., R. Shingaki, and K. Fukui. 2008. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 281: 81–86.
  - 16) Lai, S., J. Tremblay, and E. Déziel. 2009. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environ. Microbiol.* 11: 126–136.
  - 17) Mah, T.F., B. Pitts, B. Pellock, G.C. Walker, P.S. Stewart, and G.A. O'Toole. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426: 306–310.
  - 18) McKnight, S.L., B.H. Iglewski, and E.C. Pesci. 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182: 2702–2708.
  - 19) O'May, C. and N. Tufenkji. 2011. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 3061–3067.
  - 20) O'Toole, G. A. and R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295–304.
  - 21) O'Toole, G.A., L.A. Pratt, P.I. Watnick, D.K. Newman, V.B. Weaver, and R. Kolter. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310: 91–109.
  - 22) Overhage, J., M. Bains, M.D. Brazas, and R.E. Hancock. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 190: 2671–2679.
  - 23) Overhage, J., S. Lewenza, A.K. Marr, and R.E. Hancock. 2007. Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J. Bacteriol.* 189: 2164–2169.
  - 24) Paddock, S. 2002. Confocal reflection microscopy: the “other” confocal mode. *Biotechniques* 32: 274, 276–278.
  - 25) Pearson, J.P., E.C. Pesci, and B.H. Iglewski. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179: 5756–5767.
  - 26) Rashid, M.H. and A. Kornberg. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4885–4890.
  - 27) Shrout, J.D., D.L. Chopp, C.L. Just, M. Hentzer, M. Givskov, and M.R. Parsek. 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.* 62: 1264–1277.
  - 28) Tashiro, Y., S. Ichikawa, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. *Pseudomonas* quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also gram-positive bacteria. *Microbes Environ.* 25: 120–125.
  - 29) Tashiro, Y., M. Toyofuku, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. Bicyclic compounds repress membrane vesicle production and *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 123–130.
  - 30) Toyofuku, M., T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. The effect of a cell-to-cell communication molecule, *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), produced by *P. aeruginosa* on other bacterial species. *Microbes Environ.* 25: 1–7.
  - 31) Toyofuku, M., N. Nomura, E. Kuno, Y. Tashiro, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2008. Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190: 7947–7956.
  - 32) Tremblay, J. and E. Déziel. 2010. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 11: 587.
  - 33) Tremblay, J. and E. Déziel. 2008. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J. Basic Microbiol.* 48: 509–515.
  - 34) Tremblay, J., A.P. Richardson, F. Lépine, and E. Déziel. 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9: 2622–2630.
  - 35) Turner, L., R. Zhang, N.C. Darnton, and H.C. Berg. 2010. Visualization of Flagella during bacterial swarming. *J. Bacteriol.* 192: 3259–3267.
  - 36) Verstraeten, N., K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant, and J. Michiels. 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 16: 496–506.
  - 37) Wang, W.B., H.C. Lai, P.R. Hsueh, R.Y. Chiou, S.B. Lin, and S.J. Liaw. 2006. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *J. Med. Microbiol.* 55: 1313–1321.
  - 38) Xavier, J.B., W. Kim, and K.R. Foster. 2011. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 79: 166–179.
  - 39) 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.
  - 40) Zhu, G., Y. Peng, B. Li, J. Guo, Q. Yang, and S. Wang. 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 192: 159–195.
  - 41) 太田寛行, 鳥井康広. 1998. 菌と微生物. 森崎久雄, 大島広行, 磯辺賢治 (編), バイオフィーム. サイエンスフォーラム.
  - 42) 仁加保務. 1998. 食品機器・配管系における防止技術. 森崎久雄, 大島広行, 磯辺賢治 (編), バイオフィーム. サイエンスフォーラム.