

## 水処理微生物を機能制御する素材開発戦略

### Material Development Strategy to Control Microbes for Wastewater Treatment

加藤 紀弘<sup>1,\*</sup>, 岡野 千草<sup>2</sup>, 高山友理子<sup>1</sup>, 奈須野恵理<sup>1</sup>, 飯村 兼一<sup>1</sup>, 諸星 知広<sup>1</sup>  
NORIHIRO KATO<sup>1,\*</sup>, CHIGUSA OKANO<sup>2</sup>, YURIKO TAKAYAMA<sup>1</sup>, ERI NASUNO<sup>1</sup>, KEN-ICHI IIMURA<sup>1</sup> and TOMOHIRO MOROHOSHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 宇都宮大学大学院工学研究科 〒321-8585 栃木県宇都宮市陽東 7-1-2

<sup>2</sup> 宇都宮大学地域共生研究開発センター 〒321-8585 栃木県宇都宮市陽東 7-1-2

\* TEL & FAX: 028-689-6154

\* E-mail: katon@cc.utsunomiya-u.ac.jp

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering, Utsunomiya University, 7-1-2, Yoto, Utsunomiya, Tochigi 321-8585, Japan

<sup>2</sup> Collaboration Center for Research and Development, Utsunomiya University,  
7-1-2, Yoto, Utsunomiya, Tochigi 321-8585, Japan

キーワード: クオラムセンシング, バイオフィーム, アシルホモセリンラクトン, 活性汚泥

Key words: quorum sensing, biofilm, acylhomoserine lactone, activated sludge

(原稿受付 2017年3月29日 / 原稿受理 2017年4月27日)

#### 1. はじめに

都市下水や工業排水などの水質改善に利用される活性汚泥法は、完成度の高い技術として多くの地方自治体、企業で利用されている。原水に含まれる有機、無機物質組成の影響に加えて、屋外に設置された活性汚泥施設は気温などの季節変動の影響を受けやすいことから、汚泥の細菌叢は変化し処理性能にも反映する。年間を通じて安定した処理性能を維持し、活性汚泥細菌の個々のポテンシャルを最大限に引き出すためには、まだ多くの挑戦的な課題が残されている。硝化細菌、脱窒細菌などの処理活性に関する基礎、応用研究は進められているものの、汚泥に存在する個々の微生物の機能を制御する研究開発はこれまでにそれほど多くはなく、水処理微生物の

機能制御技術は大きな可能性を有している。環境に適応し生存する細菌は、個体間のシグナリングにより集団としてある特定遺伝子の発現を誘導し、集団としての微生物機能をコントロールする例も報告されている<sup>1)</sup>。このクオラムセンシング (QS) 機構は、物質生産、病原性、バイオフィーム形成などの多様な機能に関与している (図 1)<sup>2,3)</sup>。

多様な細胞間情報伝達物質が報告されるなか、*N*-アシルホモセリンラクトン (AHL) は、多くのグラム陰性細菌で利用される共通の分子骨格を有するシグナル分子として生産されている<sup>4)</sup>。活性汚泥からも AHL シグナルが検出されるため、この細菌群集の中には、AHL 生産菌が存在する。興味深いことに AHL 分解能を有する細菌も共存しており、活性汚泥では複雑なシグナリン

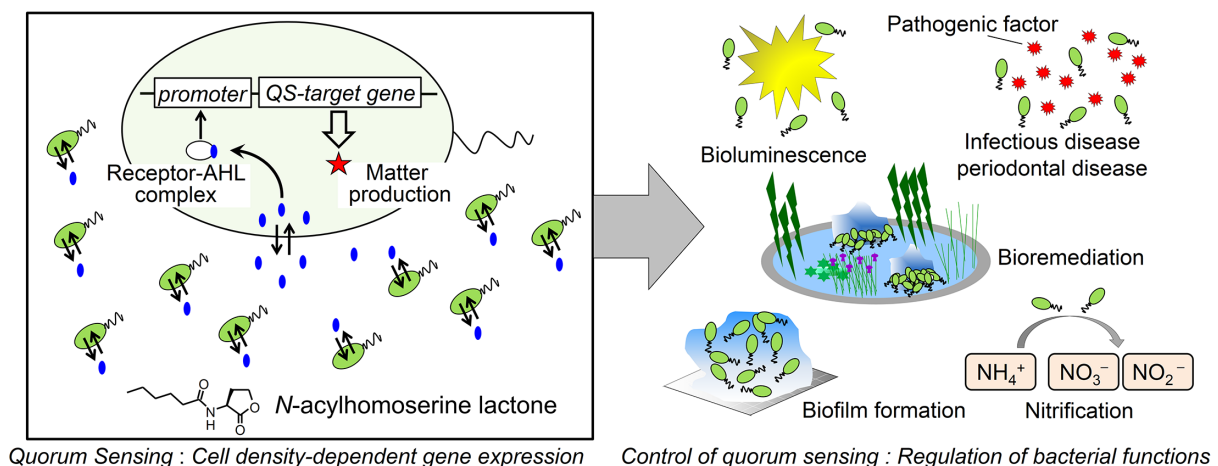


図 1. シグナル分子を介した微生物間コミュニケーションによる機能制御。

グが行われている。栃木県内の生活排水を処理する複数の浄化センターから採取したすべての活性汚泥試料から AHL 合成細菌と AHL 分解細菌が単離されている。単離された AHL 合成細菌 107 株中 102 株は *Aeromonas* 属細菌であるのに対し、単離された AHL 分解細菌 46 株中 21 株は *Acinetobacter* 属細菌であった<sup>9)</sup>。

これまでに AHL シグナルを基質とする微生物由来の酵素としては、ホモセリンラクトン部位を開環する Lactonase, アミド結合部位を加水分解し有機酸とホモセリンラクトンを得る Acylase に加え、アシル鎖に結合したカルボニル基と反応する酸化還元酵素の存在も知られている<sup>6,7)</sup>。AHL-acylase の反応により得られるホモセリンラクトン, AHL-lactonase の反応により得られる *N*-アシルホモセリンは、どちらも AHL レセプターとの親和性が激減するため、これらの酵素反応は AHL シグナルの不活化に有効である。ただし AHL-lactonase による加水分解は、溶液全体を酸性条件へと pH 変化させることでエステル形成反応が化学的に進行可能であるため、再びホモセリン部位を脱水縮合し AHL シグナルの QS 活性が復活することがあり得る。活性汚泥から単離した *Acinetobacter* 属細菌は AHL-acylase を生産している<sup>8)</sup>。

AHL を細菌同士のシグナル分子として生産し、代謝機能を制御する細菌群を人為的にコントロールする素材を設計するには、QS 機構の活性化過程において細胞内で起こる現象を分子レベルで理解することが重要となる。

## 2. クオラムセンシングシグナルの分子間相互作用

海洋性細菌 *Vibrio fischeri* は *N*-(3-oxohexanoyl)-homoserine lactone (3oxoC6HSL) をシグナル分子として生産し、レセプター LuxR と複合体を形成することで QS 機構を活性化する<sup>9)</sup>。LuxR はその N 末端ドメインでシグナル分子と、C 末端ドメインで標的遺伝子プロモーターと相互作用する二つの結合サイトを有するレセプターである。AHL をシグナル分子とする複数のグラム陰性細菌において、LuxR とアミノ酸シーケンスの相同性が高いレセプターの存在が知られ LuxR family と呼ばれている。本解析では LuxR family に属する SpnR を生産する *Serratia marcescens* AS-1 をモデル QS 細菌として選択し、*N*-hexanoylhomoserine lactone (C6HSL), 標的遺伝子プロモーター *spn box*, 遺伝子工学的手法により単離、精製した SpnR の三者間の分子間相互作用を水晶振動子

マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance: QCM) 法を用いて評価した (図 2)<sup>10,11)</sup>。精製タグとしてマルトース結合タンパク質 (MBP) を N 末端に付与した MBP-SpnR (70.5 kDa) を大量発現し、アフィニティカラムで分取し実験に供した。カップ型セルの底面に設置した金電極表面にカルボキシル基末端を有する自己組織化膜を調製し、アシル鎖末端で C6HSL を固定化した修飾センサーを作製した。同様に自己組織化膜にアビジンを固定化し、ビオチン修飾した *spn box* をバイオフィニティにより吸着させた DNA 修飾センサーを作製した。解析にはネットワークアナライザーを用い、セルへ外部から添加した MBP-SpnR と固定化 C6HSL 間の親和性, MBP-SpnR と固定化 *spn box* 間の親和性をアドミッタンス解析した<sup>12)</sup>。どちらの試験でも、修飾センサーへ MBP-SpnR を添加した直後から共振周波数の減少 ( $\Delta F$ ) が見られ、電極表面へ MBP-SpnR が取り込まれていく経時変化が追跡可能であった。

QS 関連分子が複合体を形成する際の安定度定数を QCM 法で見積ると、SpnR は *spn box* に対しネガティブレギュレーターとして機能することが示唆される。低菌体密度で AHL シグナルが低濃度の QS 不活性状態において、レセプター SpnR は *spn box* に結合し存在している。増殖に伴い QS 機構の活性化が起こる AHL の閾値濃度は、SpnR が AHL と複合体を形成し *spn box* からの解離が起こる条件であると推察される。QS 機構の制御機構としては、LuxR family のレセプターがポジティブレギュレーターとして機能する例も報告されており<sup>13)</sup>、代謝機能を人為制御したい細菌の QS 機構の作用機序は単一ではない。しかし、どちらの制御様式でも AHL 濃度の上昇が代謝機能発現のトリガーとなっており、担体への捕捉や酵素分解により AHL を低濃度に維持することで、人為的に QS 機構の不活性状態を維持可能となる。

## 3. 微生物を機能制御する素材開発

### 3.1 素材開発のストラテジー

細胞間情報伝達機構を有する細菌群の代謝機能を人為的にコントロールするには、この細胞間コミュニケーションを遮断し、個々の微生物細胞の孤立環境を人為的に構築すれば良い (図 3)。本機構では“Quorum”の文字通り、仲間の数が増え定足数に達したか否かを、シグ

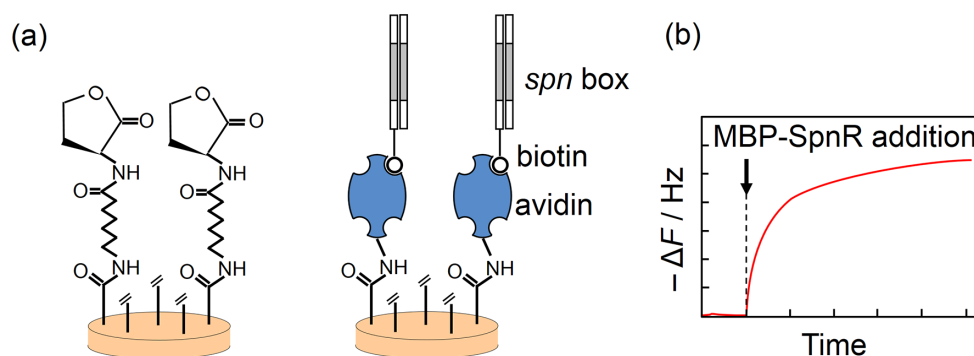


図 2. QCM 法を用いる分子間相互作用解析。(a) AHL 固定化電極 (左), DNA プロモーター固定化電極 (右)。(b) センサーグラムイメージ。

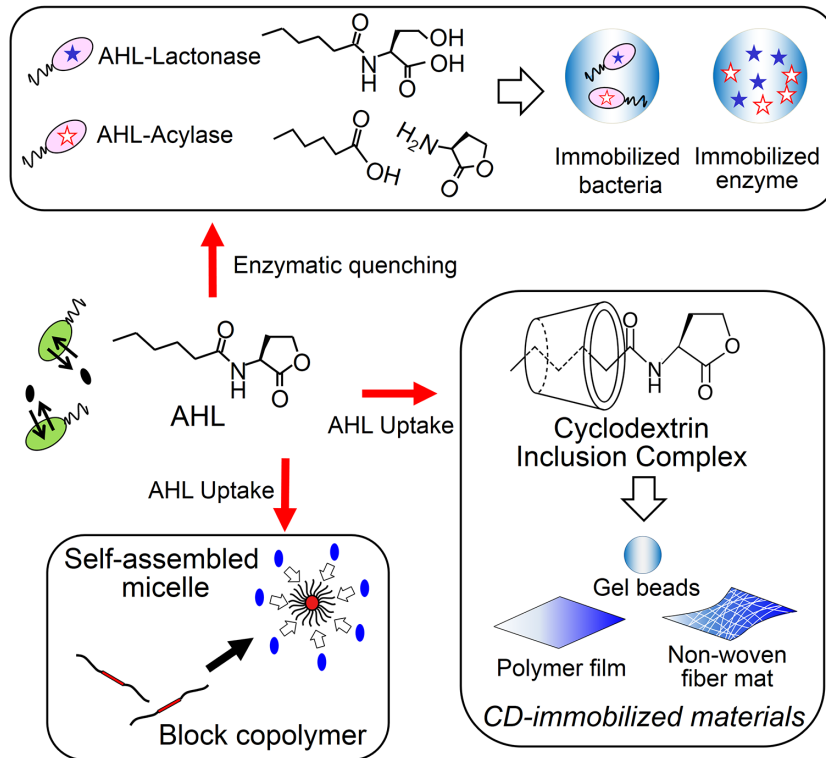


図 3. QS シグナルの遮断による細胞間コミュニケーションの制御素材。

ナル分子の濃度をインターフェースとしてセンシングしている。グラム陰性細菌の場合、細胞内外の AHL 濃度が一定値を超えると、レセプターと AHL の複合体が安定となり標的遺伝子のプロモーター部位と相互作用する。その結果として、下流遺伝子の発現が誘導される。このシークエンシャルな過程を攪乱し、遺伝子発現を阻害する最もシンプルな手法は、AHL シグナルのみを系外に除去することである。細胞間情報伝達機構のシグナル分子を細胞外部でトラップする手法は、QS に依存した代謝機能の不活性化状態を維持する共通の戦略となる<sup>14)</sup>。細胞間シグナルとして AHL を利用する細菌が多々存在することから、AHL シグナルと高い親和性を有する素材は、多くの菌種に汎用的に効果が期待されるため、微生物複合系の機能制御にも適している。

細胞間コミュニケーションを遮断する第二の方法は、酵素反応による選択的なシグナル分子の不活化であり、AHL を基質とするクオラムクエンチング (Quorum quenching) 細菌の利用や、細菌由来の酵素の工学的利用が期待される<sup>15)</sup>。優れた固定化酵素の開発は、細胞間コミュニケーションの阻害に有効である。

第三の方法は、シグナル分子の拮抗阻害剤による QS 阻害法であり、これまでも多くの AHL アンタゴニストが試験されている<sup>16,17)</sup>。本稿では、AHL トラップ素材の設計、クオラムクエンチング細菌を利用する酵素法に関し解説することとする。

### 3.2 シグナル分子の捕捉

AHL 分子は水溶液中で水素結合部位を有するホモセリンラクトン環と疎水性を示すアシル鎖からなるノニオン性界面活性剤の構造となっており、水溶液への溶解度

はアシル鎖長に大きく依存する。比較的疎水性の強い低分子化合物を捕捉し、ときには放出も可能とする担体は QS 機構の人為制御に効果的で、これまで開発されてきた薬物輸送システム (Drug delivery system: DDS) の薬物キャリアはシグナル分子の捕捉に利用できる可能性が高い。そこで本研究では、疎水性空孔に疎水基を包接し水溶液へ分散させるナノカプセルとして利用されるシクロデキストリン (CD) および自己組織化高分子ミセルの利用を検討した。

CD は  $\alpha$ -1,4-glucopyranose が 6 から 8 分子結合したオリゴ糖で、それぞれ  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CD と呼ばれる環状分子である。生体への安全性も高いオリゴ糖であることから、DDS における利用のみではなく、香り成分のトラップ剤として食品添加物としても利用され、多くの国々でその利用が認可されている。市販されている CD は例えばコーンスターチなどを原料としており、様々な産業分野で利用実績のある素材の利用は、水処理微生物の制御に適用する際に、浄化する水の安全を担保する面からも重要である。

低コストの素材を設計するには、CD の分離、再利用を視野にいたれた固定化素材が鍵となる。水中での利用となることからヒドロゲルビーズや親水性高分子フィルム、大量生産を視野に入れた高分子ファイバー不織布、耐圧性および耐久性を視野にいたれたポリスチレンマイクロスフェア表面への固定化など多様な素材を調製し、QS 機構の抑制効果を示した<sup>18)</sup>。固定化 CD を用いた AHL シグナルのトラップは、バイオフィルムの形成阻害にも効果を発現する。MF 膜や UF 膜を用いる膜分離活性汚泥法 (Membrane Bioreactor: MBR) や、二次処理水の RO 膜処理プロセスではバイオフィロリングに起因する

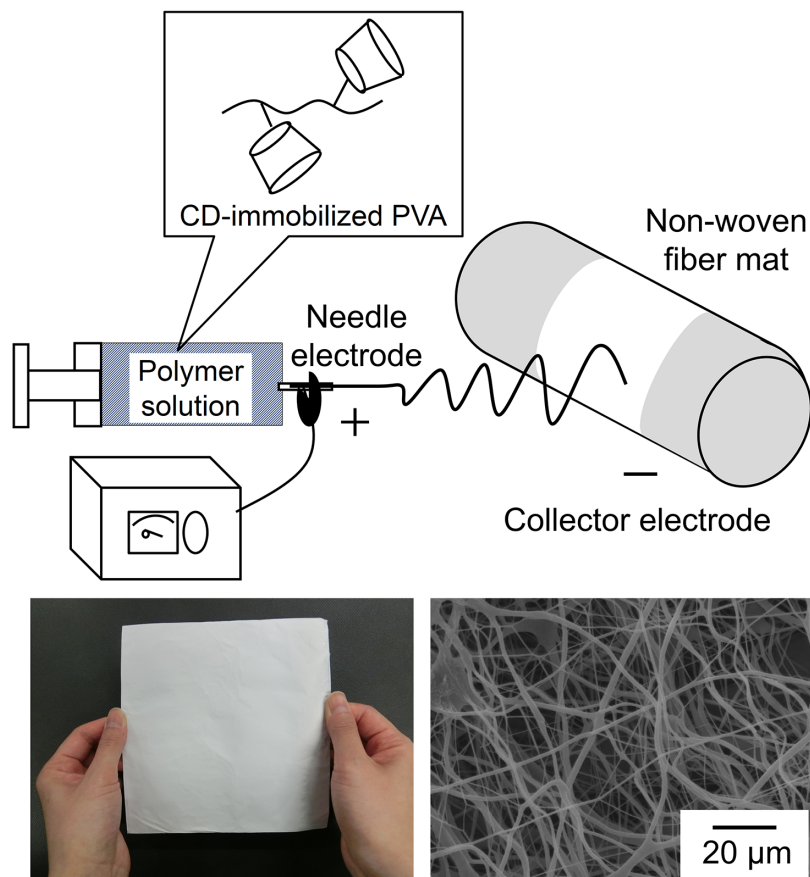


図4. エレクトロスピンニング法を用いた CD 固定化不織布の調製。

分離性能の低下を解決することが重要な課題である。耐久性の高い CD 固定化素材は、長期連続使用を念頭に置いた水処理プロセスへの利用には重要となる。

CD への AHL シグナルのトラップは核磁気共鳴 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 測定により確認し、形成した複合体の安定性は、前述した QCM 法を用いた物理化学的な解析により結合定数を定量的に求め評価可能である<sup>19)</sup>。QCM の金電極上に作製した自己組織化膜にアミノ基を導入した  $\beta$ -CD を固定化し、外部添加した C6HSL との相互作用を追跡すると、共振周波数の減少が観測されることから包接複合体の形成が示唆される。異なる基質濃度におけるセンサーグラムを速度論的解析によりカーブフィットし速度定数を見積もり、固定化  $\beta$ -CD と C6HSL の結合定数 ( $K$ ) を算出すると  $K=7 \times 10^2 \text{ (M}^{-1}\text{)}$  である。AHL レセプターである SpnR と C6HSL の結合定数とは桁違いに小さいものの、ナノモルオーダーで生産されるシグナル分子を捕捉するには実用レベルとなる。

エレクトロスピンニング法を用いることで高分子水溶液からファイバー不織布を調製可能である (図4)。結晶性の高い高分子が溶解した溶液を、ニードル電極から吐出し 10~20 kV の電圧を印加することで、溶液ジェットは静電的引力によりコレクター電極へと飛行する。その間に溶媒である水が蒸発し、高分子鎖間に強い物理的相互作用が働くことで形成した乾燥ファイバーは、コレクター電極上に回収される。例えば  $\alpha$ -CD を固定化したポリビニルアルコール (PVA) の水溶液を電界紡糸し得られたファイバー不織布は、培養液中の C6HSL および

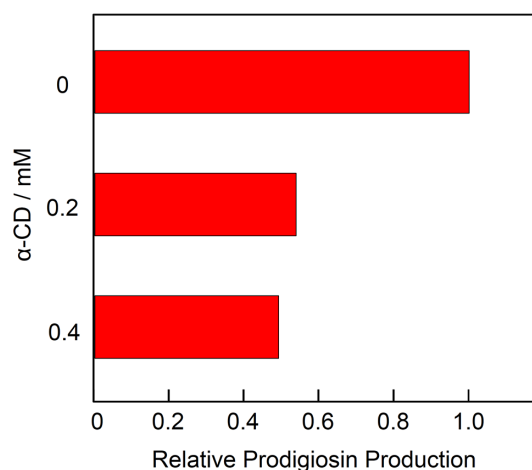


図5. CD 固定化不織布を用いる *S. marcescens* AS-1 の Prodigiosin 生産阻害。

3oxoC6HSL を捕捉し *S. marcescens* AS-1 の QS 機構を介した Prodigiosin 生産の誘導を効果的に阻害する (図5)<sup>20)</sup>。

AHL の捕捉には、ブロックコポリマーの自己組織化により形成される高分子ミセルも利用可能である。生体安全性の高いポリエチレンオキシド (EO) とポリプロピレンオキシド (PO) から構成される EO-PO-EO 型トリブロックコポリマーは、Poloxamer と呼ばれプルロニックの商品名でも知られる<sup>21)</sup>。水溶液中では PO が疎

水性ドメインとして働くため両親媒性分子として機能し、臨界ミセル濃度 (CMC) よりも高濃度の条件では安定なミセルを形成する。分子量 12.6 kDa の Poloxamer 407 を Luria-Bertani (LB) 培地に分散させ動的な光散乱法 (DLS) で流体力学的直径を、静的な光散乱法で見かけの分子量を計測すると、約 10 分子が集積した 18 nm のミセルが観測される<sup>22)</sup>。CMC 未満まで希釈すると、DLS 測定時のピークは消失し Poloxamer 分子の脱会合も追跡される。*S. marcescens* AS-1 の培養液に自己組織化ミセルを共存させることで、AS-1 株の Prodigiosin 生産は有意に阻害されミセルへの AHL シグナルの捕捉効果が観測される。更に、この AHL をトラップしたミセルを含む培地から AS-1 株を除き、AHL 合成遺伝子破壊株である *S. marcescens* AS-1  $\Delta$ spnI 株を植菌した。Poloxamer の CMC 未満まで培地を希釈すると、AHL 生産能の無い AS-1  $\Delta$ spnI 株において Prodigiosin 生産が誘導されることから、ミセルからの AHL の放出による QS 機構の活性化も操作可能である (図 6)<sup>23)</sup>。このように微生物のシグナル分子と相互作用する機能性ナノ粒子を AHL 捕捉担体として用い、細胞機能の発現をコントロールする新しいテクノロジーの発展が期待できる。

### 3.3 シグナル分子の不活化

活性汚泥から単離された AHL 分解活性を有する *Acinetobacter* sp. の菌体をアルギン酸ナトリウム水溶液に懸濁させ、ゲル化剤となる CaCl<sub>2</sub> 水溶液に滴下することで容易にゲルビーズを作製可能であり、クオラムセンシングに利用する固定化微生物を調製できる。AHL の分解活性を試験するため、*S. marcescens* AS-1 株を植菌した LB 培地に固定化ゲルビーズを浸漬し所定時間振とう培養すると、Prodigiosin の生産阻害が観測される。緑色蛍光タンパク質 GFPuv を発現する *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *gfpuv*<sup>+</sup> を植菌した LB 培地にカバーガラスを浸漬し、ガラス表面に形成されたバイオフィームを B 励起蛍光観察した (図 7)。GFP 蛍光で菌体を含むバイオフィームの分布状態を可視化すると、control では

全体に広がるバイオフィームが観察されるのに対し、*Acinetobacter* sp. を固定化したゲルビーズを共存させると有意にバイオフィーム量は少ない。活性汚泥槽から単離したクオラムセンシング細菌を利用して、バイオフィームの形成阻害を誘導可能である。

## 4. 二次処理水の抱えるリスク

一方、活性汚泥二次処理水を RO 膜分離により工業用水などを得る膜分離プロセスでは、RO 膜に形成されるバイオフィームに起因するファウリングが問題となる。そこで、都市下水を処理する広島県の浄化センターから提供いただいた二次処理水をガラスフィルターで濾過した後に AHL 生産が確認される細菌を単離し、16S rRNA 系統解析を行った。AHL 生産の確認は *Chromobacterium violaceum* VIR07 をセンサー株とするバイオアッセイにより、アシル鎖長が C8 から C14 の長鎖 AHL の生産を評価した (表 1)<sup>24)</sup>。同定されたのはすべて *Pseudomonas chlororaphis* あるいは *Pseudomonas veronii* である。ポリスチレン製のマイクロタイタープレートで、それぞれの培養液を 30°C で 18 h インキュベートしバイオフィーム形成試験を行った。所定時間後にクリスタルバイオレット (CV) 染色液を混合した。菌体を染色した CV をエタノール抽出し 570 nm における吸光度測定によりバイオフィーム量を評価すると、単離株はどれも *P. aeruginosa* PAO1 株と同等のバイオフィーム形成能を示している。二次処理水にはバイオフィーム形成能を有する長鎖 AHL 生産株が複数残存しており、これを膜分離するプロセスではバイオフィームの要因の一つとなり得ることが示された。更に興味深いことに、C4~C8 のアシル鎖長を有する短鎖 AHL の生産株は単離されないにもかかわらず、二次処理水からは短鎖 AHL が検出される。複雑な生態系を有する活性汚泥で排水の COD 成分、窒素分を除外した後は、菌体が互いに通信したシグナル分子が微量ながらも混入している。菌体密度が低い二次処理水であっても、豊富なシグナル分子を抱え

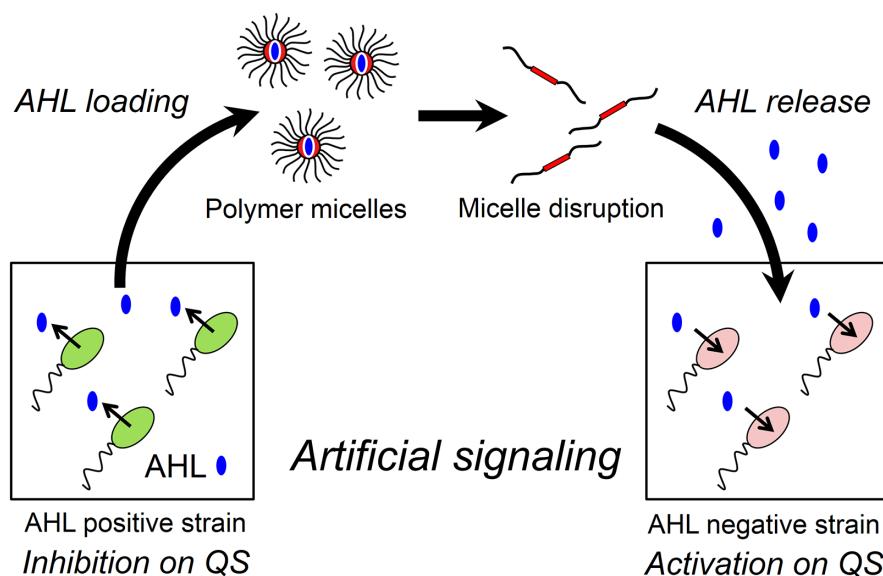


図 6. 高分子ミセルを用いるクオラムセンシングの抑制と活性化。

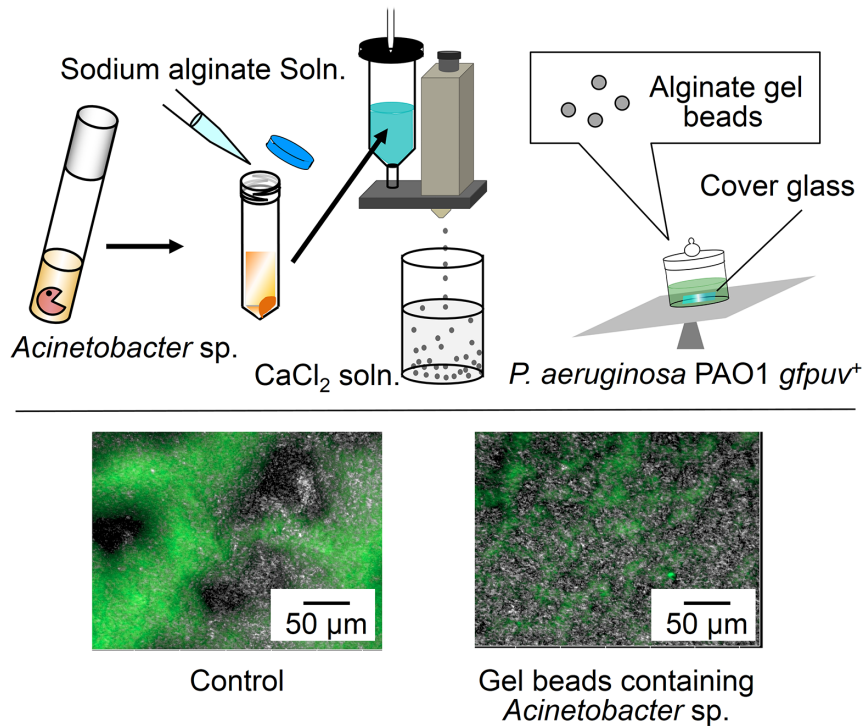


図7. クオラムクエンチング細菌固定化ゲルビーズを用いるバイオフィーム阻害試験。

表1. 二次処理水から単離した細菌の AHL とバイオフィーム生産能

菌種名	株番号	長鎖 AHL 分解能 <sup>a</sup>	バイオフィーム形成能 ( $A_{570}$ ) <sup>b</sup>
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1	+++	0.20
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2	++	0.34
Not identified	4	+	0.53
<i>Pseudomonas veronii</i>	6	+++	0.26
<i>Pseudomonas veronii</i>	9	+++	0.20
<i>Pseudomonas veronii</i>	10	+++	0.42
<i>Pseudomonas veronii</i>	13	+++	0.20
<i>Pseudomonas veronii</i>	14	+++	0.18

<sup>a</sup> +++: <24 h, ++: 24 ~ 72 h, +: >72 h

<sup>b</sup> Incubation (30°C, 18 h), CV staining

ることで、バイオフィーム形成のリスクは増大している。二次処理水を用水として有効利用し、設備トラブルを未然に防ぐには、これらのシグナル分子の不活化が新たな戦略として期待される。

## 5. おわりに

複雑な生態系を形成する活性汚泥には、細胞間の情報伝達機構により集団として生物機能を制御する細菌群、そしてシグナル分子を酵素反応により不活性とする細菌群が混在している。本稿では、QS 機構を人為的にコントロールする素材開発の指針を解説した。例えば、QS 機構の作用機序を考えれば、QS 抑制によりバイオフィームの発達を阻害する効果は十分に見込める。しかし、菌体の固体表面への初期付着は QS 機構とは無関係に生じるため、決して万能の方策ではない。二次処理水などのシグナル分子が蓄積し易い系では、設備トラブルの回避に QS シグナルの不活化技術の導入は有効かもしれない。

い。微生物のシグナル分子と相互作用する機能性担体の開発は、細胞機能の発現をコントロールする新しいテクノロジーの発展につながる。

## 謝 辞

本研究は JST CREST 「持続可能な水利用を実現する革新的な技術とシステム」研究領域、「ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合による革新的な水処理微生物技術の開発」の研究助成を受けたものである。二次処理水の提供、共同研究を推進した広島大学環境安全センター、西嶋渉博士、大野正貴博士に感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Papenfort, K. and B.L. Bassler. 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 576–588.

- 2) Flemming, H.-C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S.A. Rice, and S. Kjelleberg. 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 563–575.
- 3) Schuster, M., D.J. Sexton, S.P. Diggle, and E.P. Greenberg. 2013. Acyl-homoserine lactone quorum sensing: From evolution to application. *Annu. Rev. Microbiol.* 67: 43–63.
- 4) Bassler, B.L. and R. Losick. 2006. Bacterially speaking. *Cell.* 125: 237–246.
- 5) Ochiai, S., T. Morohoshi, A. Kurabeishi, M. Shinozaki, H. Fujita, I. Sawada, and T. Ikeda. 2013. Production and degradation of *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules in bacteria isolated from activated sludge. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 2436–2440.
- 6) Fetzner, S. 2015. Quorum quenching enzymes. *J. Biotechnol.* 201: 2–14.
- 7) Uroz, S., S.R. Chhabra, M. Cámara, P. Williams, P. Oger, and Y. Dessaux. 2005. *N*-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology.* 151: 3313–3322.
- 8) Ochiai, S., S. Yasumoto, T. Morohoshi, and T. Ikeda. 2014. AmiE, a novel *N*-acylhomoserine lactone acylase belonging to the amidase family, from the activated-sludge isolate *Acinetobacter* sp. strain Ooi24. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 6919–6925.
- 9) 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.
- 10) Takayama, Y., E. Nasuno, K. Iimura, T. Morohoshi, and N. Kato. 2015. Quartz crystal microbalance analyses of SpnR binding constants as a negative regulator of *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1. *Chem. Lett.* 44: 955–957.
- 11) Takayama, Y. and N. Kato. 2016. *In Vitro* analysis of essential binding sites on the promoter of the *Serratia marcescens* *spn* operon with the quorum-sensing receptor SpnR. *Biotechnol. Bioeng.* 113: 2513–2517.
- 12) Itoh, A. and M. Ichihashi. 2011. Separate measurement of the density and viscosity of a liquid using a quartz crystal microbalance based on admittance analysis (QCM-A). *Meas. Sci. Technol.* 22: 015402.
- 13) Zhu, J. and S.C. Winans. 1999. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 4832–4837.
- 14) Kato, N., T. Tanaka, S. Nakagawa, T. Morohoshi, K. Hiratani, and T. Ikeda. 2007. Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57: 419–423.
- 15) Dong, Y.-H., L.-H. Wang, and L.-H. Zhang. 2007. Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1201–1211.
- 16) Passador, L., K.D. Tucker, K.R. Guertin, M.P. Journet, A.S. Kende, and B.H. Iglewski. 1996. Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. *J. Bacteriol.* 178: 5995–6000.
- 17) Morohoshi, T., T. Shiono, K. Takidouchi, M. Kato, N. Kato, J. Kato, and T. Ikeda. 2007. Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of *N*-acylhomoserine lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6339–6344.
- 18) Okano, C., E. Nasuno, K. Iimura, and N. Kato. 2016. Cyclodextrin-immobilized microspheres for uptake of the quorum-sensing signaling molecule *N*-acylhomoserine lactone. *J. Appl. Polym. Sci.* 133: 43198.
- 19) Okano, C., M. Arai, E. Nasuno, K. Iimura, T. Morohoshi, T. Ikeda, and N. Kato. 2012.  $\beta$ -Cyclodextrin interaction with *N*-hexanoyl homoserine lactone as quorum sensing signal produced in Gram-negative bacteria. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 37: 315–318.
- 20) Nasuno, E., T. Umemura, T. Ogi, C. Okano, T. Kawanago, K. Iimura, T. Morohoshi, T. Ikeda, and N. Kato. 2012. Inhibitory effects of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by electrospun polyvinyl alcohol fibers immobilized with cyclodextrin. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 37: 593–596.
- 21) Kabanov, A.V., E.V. Batrakova, and V.Y. Alakhov. 2002. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Control. Rel.* 82: 189–212.
- 22) Okano, C. and N. Kato. 2016. Suppressive effects of self-associated triblock copolymers on quorum sensing-mediated phenazine antibiotic production. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 41: 163–168.
- 23) Okano, C. and N. Kato. 2015. Inhibition and induction of quorum sensing using complexes between *N*-acylhomoserine lactone and self-assembled polymer micelles. *Chem. Lett.* 44: 1544–1546.
- 24) Nasuno, E., Y. Abe, K. Iimura, M. Ohno, T. Okuda, W. Nishijima, and N. Kato. 2016. Isolation of biofilm-forming bacteria from the secondary effluent of the wastewater treatment plant and its ability to produce *N*-acylhomoserine lactone as quorum sensing signal. *Appl. Mechanics Mater.* 863: 135–140.