

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14603  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24580113  
研究課題名(和文) 枯草菌のバイオフィーム形成開始機構の解明  
  
研究課題名(英文) Analysis of *B. subtilis* biofilm formation  
  
研究代表者  
小林 和夫 (Kobayashi, Kazuo)  
  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
  
研究者番号：70324978  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌のバイオフィーム形成に必要なBsIAの機能解析を行い、BsIAがバイオフィーム表面でポリマーを形成し、撥水層を形成する両親媒性のタンパク質であることを明らかにした。また、枯草菌が、植物が病原菌に侵された際に分泌するシグナル物質であるサリチル酸メチルに应答して、抗菌物質に対するバリアーとして機能するポリグルタミン酸や抗生物質を生産することを明らかにした。これらの発見は、枯草菌の自然環境下での抗菌物質に対する耐性機構や植物との相互作用を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that BsIA was an amphiphilic protein that formed a repellent, protective layer on the surface of biofilms. We also show that *B. subtilis* responds to methyl salicylate, which is a plant signal that induces defense response in plants in response to infection of plant pathogens. In the presence of methyl salicylate, *B. subtilis* produced poly- $\gamma$ -glutamic acid and antibiotics. Poly- $\gamma$ -glutamic acid formed capsules, which protected cells against antimicrobials. These findings reveal the resistance mechanism of *B. subtilis* biofilms and plant-*B. subtilis* interaction.

研究分野：微生物学

キーワード：Bacillus subtilis biofilm

### 1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、多糖などで覆われた微生物の集合体であり、微生物は、自然環境下では多くの場合、バイオフィームを形成している。バイオフィームは、微生物のストレスや薬剤耐性、病原性と密接に関係するため、多くの微生物で解析が進められている。しかし、バイオフィーム形成に必要な因子やその制御機構等、依然不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

枯草菌のバイオフィーム形成は、比較的解析が進んでいる。しかし、自然環境下でのバイオフィームの役割という観点からの解析が不十分である。本研究では、枯草菌の自然環境下でのバイオフィーム形成を念頭に置き、その誘導シグナルや枯草菌の棲息場所のひとつである植物根圏でのバイオフィーム形成機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) *bsIA* は、我々が以前に枯草菌のバイオフィーム形成に必要な遺伝子として同定した。しかし、その機能は不明であった。そこで、その機能を遺伝学的、生化学的に探った。

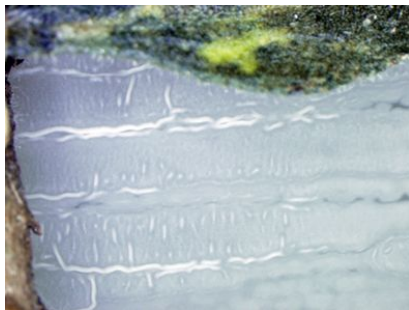


図1 ヒダ状のコロニー構造体

(2) 枯草菌は、植物と共培養するとヒダ状の構造体をもったコロニーを形成する。そのため、植物が枯草菌のコロニー形態に影響する化合物を分泌している可能性が考えられた。そこで、その化合物を市販の植物由来の化合物より同定し、その化合物の枯草菌への影響を遺伝学的、生化学的に探るとともに、植物、枯草菌の相互作用の可能性を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 枯草菌のコロニーやバイオフィームは、水や低濃度のアルコールなどに対し撥水性

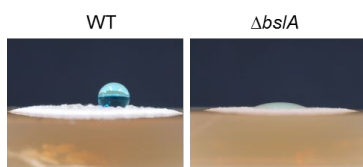


図2 コロニーの撥水性

を示すが、*bsIA* の欠損株は、コロニーやバイオフィームの撥水性を失っていた。精製した BslA タンパク質をオリーブオイルと一緒に激しく懸濁すると、BslA タンパク質は、油滴を覆うポリマーを形成し、油滴を安定化した。また、その溶液を激しく泡立てて、気体・液体の界面を多く形成すると、ポリマーを形成

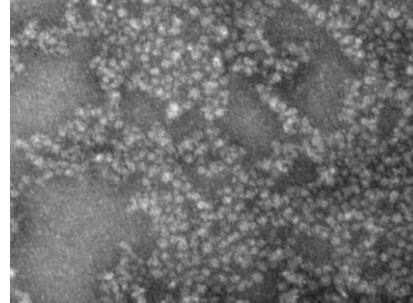


図3 BslA ポリマーの電子顕微鏡観察

した。これらのことから、BslA は、界面活性剤のような両親媒性の性質を持つことが推測された。さらに、BslA のバイオフィーム中の局在を調べると、BslA は、バイオフィーム表面を覆う層を形成していた。両親媒性の

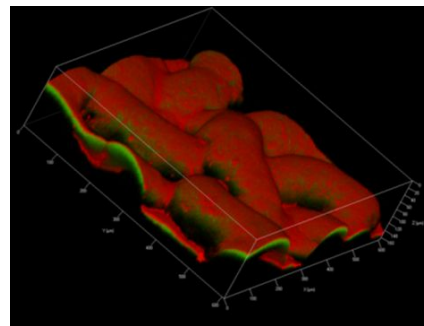


図4 BslA のバイオフィーム表面への局在 BslA (赤) 細胞 (緑)

性質を失った変異型 BslA は、ポリマーを形成できず、バイオフィームの表面に局在できなかった。また、変異型 BslA のバイオフィームは撥水性を失っていた。以上の結果から、このタンパク質を BslA (Biofilm surface layer) と名づけた。BslA は、分子内に疎水性、親水性の面を持ち、疎水性の面を表に向けてポリマーを形成し、バイオフィーム表面を覆う撥水層を形成すると考えられる。

撥水性のバイオフィームを形成する枯草菌を土壌中に添加することで、土壌改良などに利用できる可能性がある。また、BslA は疎水化剤として、新規素材の開発に利用できる可能性も考えられる。

(2) 枯草菌のコロニー形態に影響する化合

物を探索した結果、サリチル酸メチル存在下で枯草菌を培養するとムコイド状のコロニーを形成することが明らかになった。

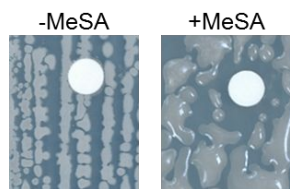


図5 ムコイドコロニー

サリチル酸メチルは、植物が病原菌に感染した際に分泌するシグナル物質である。サリチル酸メチルの枯草菌への影響を調べた結果、サリチル酸メチルが枯草菌の2成分制御系DegSUを活性化し、ポリグルタミン酸の高生産させることで、ムコイドコロニーを形成させることが明らかになった。また、ポリグル

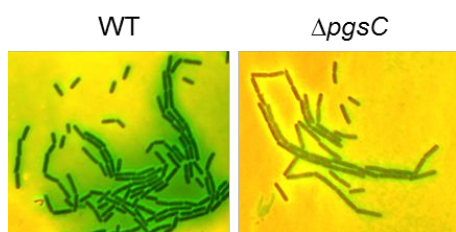


図6 莢膜による蛍光物質の侵入阻害 位相差(緑) 蛍光(赤)の合成像

タミン酸は、枯草菌の細胞を包む莢膜を形成し、抗菌物質の侵入を防ぐバリアーとして機能することがわかった。植物は、病原菌感染時にサリチル酸メチルだけでなく抗菌物質も分泌する。ポリグルタミン酸の莢膜は、植物の抗菌物質から枯草菌を守っている可能性が考えられた。さらに、サリチル酸メチルは、DegSUの活性化を介して、抗生物質バシリス、フェンジシンの生産を誘導していた。

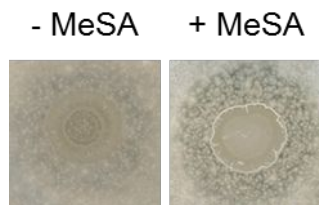


図7 枯草菌が作る抗生物質によるフサリウム菌の抑制

このことから、枯草菌は、病原菌の感染という宿主植物の危機を、サリチル酸メチルを介して感知し、自身を守る莢膜を形成するだけでなく、抗生物質を分泌して、宿主植物を病原菌から守っている可能性が考えられた。

枯草菌を土壌に添加することで、病原菌を抑制できることは知られていたが、我々の発見は、この作用の裏にサリチル酸メチルを介した植物、枯草菌、植物病原菌の相互作用があることを示している。また、サリチル酸メチルによる抗生物質生産の誘導は、実験室で用いた枯草菌株だけでなく、天然の植物根圏から単離した枯草菌および近縁のバシラス属細菌でも見られた。そこで、サリチル酸メチル存在下で抗生物質生産能の高い微生物を探索することで、高い防除活性を持つ菌株を単離できる可能性が考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kobayashi K. Plant methyl salicylate induces defense responses in the rhizobacterium *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol.* 査読有、Vol.17、No.4、2015、pp.1365-76.  
DOI: 10.1111/1462-2920.12613.

Kobayashi K., Iwano M. BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol Microbiol.* 査読有、Vol.85、No.1、2012、pp.51-66.  
DOI:10.1111/j.1365-2958.2012.08094.x.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

小林 和夫 (KOBAYASHI, Kazuo)  
奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイ  
エンス 助教  
研究者番号：70324978

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし