

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19380189  
 研究課題名（和文） バイオフィーム形成分子機構を切り口とした微生物未知機能の解明  
 研究課題名（英文） Analyses on the molecular mechanisms of biofilm formation that reveal unknown functions of microorganisms  
 研究代表者  
 森川 正章（MORIKAWA MASAOKI）  
 北海道大学・大学院地球環境科学研究院・教授  
 研究者番号：20230104

研究成果の概要（和文）：微生物が固体表面に付着して形成する高次構造体をバイオフィームと呼ぶ。バイオフィームでは細胞が高密度に存在するため、細胞間コミュニケーションが頻繁に起こり、個々の細胞が培養液中に浮遊した状態とは異なる挙動を示す。本研究課題では、環境微生物がバイオフィーム形成に伴って発現するユニークな特徴を発見し、その分子機構を解析した。さらに、バイオフィーム形成によって獲得するストレス耐性を各種環境汚染物質分解細菌に適用し、地球にやさしい持続的環境修復技術の基盤開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Biofilms are highly structured community of surface attached microorganisms. Cell density in biofilms is so high enough to enable the member cells to communicate each other very effectively and express specific genes. Experimental results unveiled several unique characteristics of the biofilm cells and molecular mechanisms behind. Moreover, applying high stress-tolerance of the biofilm cells to pollutant degrading bacteria was successful in constructing base of sustainable environmental biotechnology.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：細胞間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

私達は油田細菌 *Pseudomonas* sp. MIS38 が分泌する界面活性剤（バイオサーファクタント）の活性発現機構およびその合成遺伝子の解析において世界をリードし、研究を推進してきた実績を有する「Arthrofactin 合成反応の分子メカニズム」（科学研究費補助金基盤研究(C)H17-H18年度）。そのなかで、Arthrofactin 合成反応が非常にユニークなものであることを実証し、Arthrofactin 分子

が細菌の固体表面への付着に関与することを見出した（発表論文⑩その他）。また、海洋性細菌において固体表面に付着した場合のみタンパク質分解酵素を分泌生産する現象を見出した（遺伝子発現解析の後に論文⑧として発表）。一方、新規環境汚染物質分解細菌を7属12種取得しそれぞれの諸特性解析結果を25報の論文で発表し、ある種の環境汚染物質分解細菌がバイオフィームを形成することを予備的に確認していた（その特性を詳細に

検討した成果を論文(⑤として発表)。さらに論文の有環境細菌の総説論文(⑥)として発表( Morikawa M. (2006) *J. Biosci. Bioeng.* 101, 1-8)。以上の背景と準備状況から、本研究課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

バイオフィルムの形成は、微生物が固着して形成する高次構造体である。この構造体は、細胞の集合体であり、細胞間の相互作用が強く、環境に対して高い生存力を持つ。本研究は、尿素分解酵素阻害剤を用いて、バイオフィルムの形成を抑制することを目指す。阻害剤の効果を評価するために、バイオフィルムの形成量と浮遊細胞量を測定する。阻害剤の種類と濃度による影響を調べ、最適な阻害剤と濃度を特定する。また、阻害剤が細胞の生育を阻害しないことを確認する。

## 3. 研究の方法

本研究は、尿素分解酵素阻害剤を用いて、*Staphylococcus T-02* のバイオフィルムの形成を抑制することを目指す。阻害剤の種類と濃度による影響を調べ、最適な阻害剤と濃度を特定する。また、阻害剤が細胞の生育を阻害しないことを確認する。阻害剤の種類と濃度による影響を調べ、最適な阻害剤と濃度を特定する。また、阻害剤が細胞の生育を阻害しないことを確認する。

## 4. 研究成果

本研究の結果、尿素分解酵素阻害剤を用いて、*Staphylococcus T-02* のバイオフィルムの形成を抑制することができた。阻害剤の種類と濃度による影響を調べ、最適な阻害剤と濃度を特定した。また、阻害剤が細胞の生育を阻害しないことを確認した。

本研究の結果、尿素分解酵素阻害剤を用いて、*Staphylococcus T-02* のバイオフィルムの形成を抑制することができた。阻害剤の種類と濃度による影響を調べ、最適な阻害剤と濃度を特定した。また、阻害剤が細胞の生育を阻害しないことを確認した。

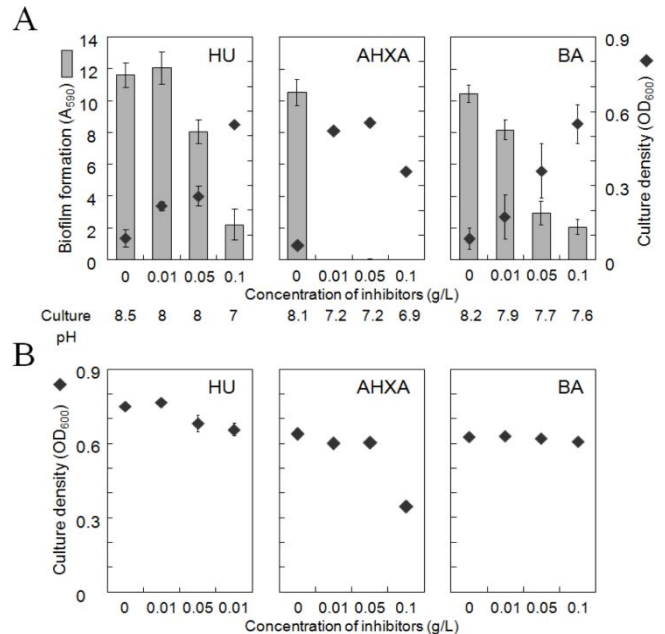


図 1. 尿素分解酵素阻害剤による *Staphylococcus T-02* バイオフィルム形成の抑制効果

- A. バイオフィルム形成量  
HU, hydroxyurea; AHXA, acetohydroxamic acid; BA, boric acid
- B. 浮遊細胞量 (各阻害剤が細胞の生育を阻害しないことを確認)

(3)水質が良好な養殖魚水槽の底泥表面に形成されたバイオフィルムから、残餌分解に関係すると予想されるタンパク質分解酵素高生産菌 SB-B1を単離した。本細菌は *Pseudoalteromonas* 属と同一種とされた。SB-B1のタンパク質分解酵素生産性について培養条件を検討したところ、振とうフラスコによらず、静置フラスコによるバイオフィルム培養で細胞外に著量の酵素活性が認められた。当該遺伝子を同一種と動して、その発現が明らかとなった。これはある種の海洋性細菌では、底泥に付着したとき、泥成分であるタンパク質を効率よく分解する制御機構が備わっていること、水質浄化細菌の有効活用は栽培漁業の高度化に貢献する可能性がある(図2;論文⑧)。

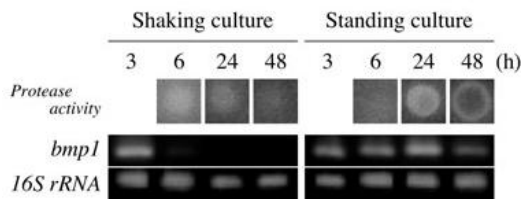


図2. *Pseudoalteromonas* SB-B1のタンパク質分解酵素活性(上)と同遺伝子 *bmp1* 発現量(下)の経時変化比較(左); 振とう培養(右); 静置培養(バイオフィーム)

一方、微生物はバイオフィームを形成することによって、外部ストレスに対して高い抵抗性を示す。例えば、食中毒細菌バイオフィームについてその加熱殺菌耐性を浮遊細胞と比較したところ、いずれにおいても約10℃の耐性温度差が認められた。

近年、汚染物質分解微生物を利用した環境浄化技術が注目されているが、汚染現場へ導入した有用微生物の定着率の低さや分解活性の低下など持続性に関する問題点が指摘されている。そこで、本研究課題ではバイオフィーム形成によって獲得するストレス耐性を各種環境汚染物質分解細菌に適用し、地球にやさしい持続的環境修復技術の基盤を開発した。

(4) 研究室保有の石油分解細菌6種を比較検討したところ、多環式芳香族化合物を分解する *Pseudomonas stutzeri* T102株が最も高いバイオフィーム形成能を示した。続いてナフタレンを基質としてバイオフィーム細胞と浮遊細胞の分解能力を比較したところ、前者は分解開始までに4時間程度のラグタイム(遅延時間)が存在するものの、その後は浮遊細胞よりも高速に分解が可能であり、70%分解に必要な時間は10時間であった。これに対して浮遊細胞では26時間を要した。また実際の原油汚染土壌中におけるT102株の定着率を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により解析したところ、バイオフィーム細胞は浮遊細胞よりも明らかに高く、2ヶ月後においても分解活性のある細胞が維持されていた。さらに、驚いたことに、バイオフィーム細胞自身のナフタレン分解活性は浮遊細胞に比べてむしろ低く、バイオフィームから遊離してくる細胞の活性が劇的に高いことが判明した。以上の結果から、バイオフィームは高活性細胞を持続的に供給する要塞の役割を果たしており、その利用によって効率的かつ持続的な汚染物質分解が可能であることが示された(図3; 論文投稿中)。

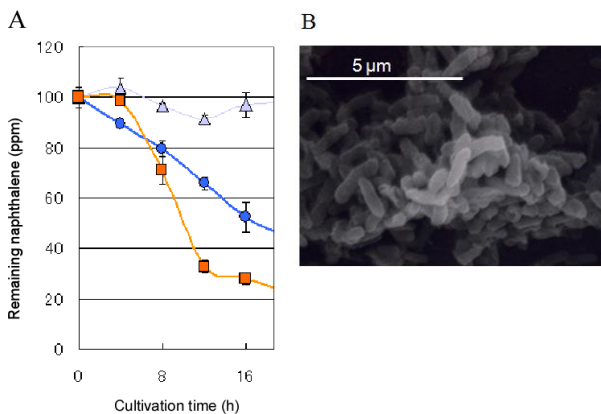


図3. A. *Pseudomonas stutzeri* T102によるナフタレン分解活性の比較(■); バイオフィーム(●); 浮遊細胞(▲); 細胞なし

## B. バイオフィーム電子顕微鏡観察

また、バイオフィーム形成に関する基礎的な知見として、*Pseudomonas* 属細菌が生産する Arthrofactin 合成遺伝子制御に関して多くの成果を得た。具体的には、Arthrofactin 合成反応の最終段階を触媒するチオエステラーゼは2種類あり、両者が共に機能することで高い生産性が実現されていることを明らかにした(論文⑭)さらに、Arthrofactin の細胞外への輸送に重要な働きをするトランスポーターを発見しその機能解析を行なった(論文⑨)。トランスポゾン Tn5を用いたランダム突然変異株ライブラリーを作成した。ライブラリーから Arthrofactin 合成活性を欠損したものを選択したところ、これまでに報告されていない新たな合成遺伝子発現制御系を発見した(論文②)。以上の研究成果により、環境微生物のバイオフィーム形成機構に関する理解を深めると共にその利用範囲の拡大に大きく貢献した。

## 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 15 件)

- ① Morikawa M, Dioxygen activation responsible for oxidation of aliphatic and aromatic hydrocarbon compounds: current state and variants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 査読有、2010年、印刷中
- ② Washio K, Lim SP, Roongsawang N, Morikawa M, Identification and characterization of the genes responsible for the production of the cyclic lipopeptide arthrofactin by *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有、2010年、印刷中
- ③ Oki K, Washio K, Matsui D, Kato S, Hirata Y, Morikawa M. The Role of Urease Activity on Biofilm Formation by *Staphylococcus* sp. T-02 Isolated from the Toilet Bowl. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有、74巻、2010年、pp. 583-589
- ④ Kato T, Miyanaga A, Kanaya S, Morikawa M, Gene cloning and characterization of an aldehyde dehydrogenase from long-chain alkane degrading *Geobacillus thermoleovorans* B23. *Extremophiles*, 査読有、14巻、2010年、pp. 33-39
- ⑤ Morikawa M, Development of bioremediation by utilizing biofilms. *IFO Res Commun*, 査読有、23巻、2009年、pp. 99-115
- ⑥ Hosokawa R, Nagai M, Morikawa M, Okuyama, H, Autochthonous bioaugmentation and its possible

- application to oil spills. *World J Microbiol Biotechnol*, 査読有、25 巻、2009 年、pp.1519-1528
- ⑦ Kato T, Miyanaga A, Kanaya S, Morikawa M, Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23. *BMC Microbiology*, 査読有、25巻、2009 年、pp.9-60
- ⑧ Iijima S, Washio K, Okahara R, Morikawa M, Biofilm formation and proteolytic activities of *Pseudomonas* bacteria that were isolated from fish farm sediments. *Microbial Biotechnol*, 査読有、2巻、2009年、pp.361-369
- ⑨ Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas* sp. MIS38. *J Appl Microbiol*, 査読有、107 巻 2009 年、pp.157-166
- ⑩ Ito H, Hosokawa R, Morikawa M, Okuyama H, A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. *Int Biodeter Biodegr*, 査読有、61 巻、2008 年、pp223-232
- ⑪ Takei D, Washio K, Morikawa M, Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. *Biotechnol Lett*, 査読有、30 巻、2008 年、pp1447-1452
- ⑫ Thaniyavarn J, Chianguthai T, Sangvanich P, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Thaniyavarn S, Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有、72 巻、2008 年、pp2061-2068
- ⑬ 森川正章、バイオフィルムの功罪、食品衛生学雑誌、査読有、48 巻、2007 年 pp J389-J396
- ⑭ Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, In vivo characterization of tandem C-terminal thioesterase domains in arthrofactin synthetase. *Chem Bio Chem*, 査読有、8 巻、2007 年、pp501-512
- ⑮ Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Functional analysis of a pyoverdine synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有、71 巻、2007 年、pp2002-2007
- ① 坂上景子、伊東義兼、松本光史、鷺尾健司、森川正章 *Nitrosomonas europaea*のアンモニア酸化活性に影響を与える従属栄養細菌、日本農芸化学会2010、2010年3月28日、東京大学駒場キャンパス
- ② 鷺尾健司、Siew Ping Lim、Niran Roongsawang、森川正章、(p)ppGpp の合成・代謝酵素 SpoT による環状リポペプチドの生産制御、日本農芸化学会 2010、2010 年 3 月 29 日、東京大学駒場キャンパス
- ③ 伊東義兼、松本光史、鷺尾健司、森川正章、フロックを形成するアンモニア酸化細菌の単離ならびにその諸性質、日本農芸化学会2010、2010年3月28日、東京大学駒場キャンパス
- ④ 鈴木和也、山賀文子、鷺尾健司、森川正章、ウキクサから単離したアルカン分解根圏細菌の評価、日本農芸化学会 2010、2010 年 3 月 29 日、東京大学駒場キャンパス
- ⑤ 森川正章、*Pseudomonas*属細菌の環状リポペプチド生産制御機構、北海道大学シンポジウム『北大の研究者達がつむぐ微生物の世界』、2009年12月18日、北海道大学
- ⑥ 森川正章、ウキクサと根圏細胞の相利共生作用による汚染浄化法、日本水処理生物学会第46回大会、2009年11月12日、高知市文化プラザかるぼーと
- ⑦ 石川絵理奈、伊東義兼、鷺尾健司、松本光史、森川正章、火力発電所硝化槽より単離した新規メタノール資化細菌の諸特性解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸ポートアイランド
- ⑧ 阿形朋子、鷺尾健司、金井保、跡見晴幸、今中忠行、森川正章、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来細胞表在タンパク質Slpの機能解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド
- ⑨ K. Washio, M. Morikawa, Biofilm formation and effective production of menaquinone-7 (Vitamin K2) by *Bacillus subtilis*: Lost of the world in environmental bacteria. Japan-Argentina Workshop, 2009年8月3日、アルゼンチン・ブエノスアイレス
- ⑩ 森川正章、バイオフィルムに見られるナフトレン分解活性遅延の理由、環境バイオテクノロジー学会2009、2009年6月23日、東京大学弥生講堂
- ⑪ 菅田曜、岩崎一弘、大川恵、森川正章、宮崎英男、坂間至朗、微生物によるジクロロメタン分解に関する研究、環境バイオテクノロジー学会2009、2009年6月23日、東京大学弥生講堂
- ⑫ M. Morikawa, Genetic analysis of synthetic regulation and transportation of lipopeptide type biosurfactant. Workshop at Vietnamese Academy of

[学会発表] (計 34 件)

- ① 坂上景子、伊東義兼、松本光史、鷺尾健

- Science and Technology, 2009年4月28日-29日、ベトナム、ハノイ
- ⑬ 森川正章、微生物から見た界面の世界・バイオサーファクタントとバイオフィルム、日本化粧品技術者会、2009年4月17日、薬業年金会館（大阪市）
  - ⑭ 羽山亨、山賀文子、鷺尾健司、森川正章、根圏細菌 *Acinetobacter* sp. P23株のバイオフィルム形成遺伝子の探索、日本農芸化学会2009、2009年3月29日、福岡国際会議場
  - ⑮ 高橋康徳、嶋田恒平、鷺尾健司、森川正章、バイオフィルム形成能の高いアルカン分解細菌の探索、日本農芸化学会2009、2009年3月29日、福岡国際会議場
  - ⑯ 森川正章、バイオフィルム利用の将来展望、日本農芸化学会2009、2009年3月28日、福岡国際会議場
  - ⑰ 山崎和彦、相原悠、大胡康、鷺尾健司、森川正章、枯草菌バイオフィルムによるメナキノンの菌体外生産、日本農芸化学会2009、2009年3月29日、福岡国際会議場
  - ⑱ 東條ふゆみ、伊東義兼、鷺尾健司、岡部聡、森川正章、Anammox細菌のグラニュール形成に関するプロテオミク解析、日本農芸化学会2009、2009年3月29日、福岡国際会議場
  - ⑲ Morikawa M, Sustainable Bioremediation Technology by Utilizing Biofilms. 招待講演、2009年2月25日、全南大学（韓国・光州市）
  - ⑳ 鷺尾健司、リムシューピン、ルーンサワンニラン、森川正章、環状リポペプチド、アルスロファクチンの産生を制御する (p)ppGpp合成・代謝酵素、SpoTの機能解析、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会（BMB2008）、2008年12月10日、神戸ポートアイランド
  - ㉑ 大木海平、松井大悟、平田善彦、鷺尾健司、森川正章、*Staphylococcus* 属細菌のバイオフィルム形成における尿素分解酵素（ウレアーゼ）の役割、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会（BMB2008）、2008年12月10日、神戸ポートアイランド
  - ㉒ 森川正章、「バイオフィルム研究の様々な切り口ー分子、細胞、生態ー」バイオフィルムを利用した持続的環境浄化技術の基盤開発、日本微生物生態学会第24回大会 シンポジウム、2008年11月17日、北海道大学
  - ㉓ Morikawa M, Advances in Biofilm Research to Inhibit Biocorrosion, AROWorkshop, 2008年9月22日、(アメリカ、ダラス)
  - ㉔ Volta R. T. Gurning, 鷺尾健司、森川正章、新規アゾ染料分解脱色細菌の探索、環境バイオテクノロジー学会2008、2008年6月25日、文部科学省研究交流センター
  - ㉕ H. Aibara, K. Washio, M. Morikawa, Biofilm formation by *Bacillus subtilis* 168, incompatible function of sfp. ASM General Meeting 108<sup>th</sup>, 2008年6月4日、ボストンコンベンションセンター（アメリカ・ボストン）
  - ㉖ K. Shimada, K. Washio, M. Morikawa, Efficacy of biofilm formation by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology, ASM General Meeting 108<sup>th</sup>, 2008年6月2日、ボストンコンベンションセンター(アメリカ・ボストン)
  - ㉗ Morikawa M, A lipopeptide biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. MIS38, characterization and functional analyses of the synthetase gene A lipopeptide biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. 招待講演、2008年5月20日、華東理工大学（中国・上海）
  - ㉘ Morikawa M, Efficacy of biofilm formation by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology, BIT's 1st Annual World Congress of ibio2008, 2008年5月19日、New Century Grand Hotel（中国・杭州）
  - ㉙ 鷺尾健司、Siew Ping Lim、Roongsawang Niran、森川正章、*Pseudomonas* sp. MIS38株の成長相とバイオサーファクタント生産、生化学会、2007年12月12日、パシフィコ横浜
  - ㉚ Siew Ping Lim、Niran Roongsawang、鷺尾健司、森川正章、*Pseudomonas* sp. MIS38株由来の二つの環状リポペプチド類ABC-トランスポーター、生化学会、2007年12月12日、パシフィコ横浜
  - ㉛ 森川正章、相原悠、山崎和彦、鷺尾健司、環境微生物の生存戦略、生化学会北海道支部シンポジウム、2007年7月6日、北海道大学百年記念会館
  - ㉜ 嶋田恒平、片岡剛文、鷺尾健司、森川正章、*Pseudomonas stutzeri* バイオフィルムのナフタレン分解活性と土壌安定性、環境バイオテクノロジー学会、2007年6月26日、大阪大学吹田キャンパス
  - ㉝ 東條ふゆみ、佐藤禅、鷺尾健司、森川正章、細菌バイオフィルムと浮遊細胞の耐熱性比較、環境バイオテクノロジー学会

会、2007年6月26日、大阪大学吹田キャンパス

- ④ Lim S P, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Genes Responsible for the Transportation of Arthrofactin (Arf) in *Pseudomonas* sp. MIS38. ASM General meeting 107<sup>th</sup>, 2007年5月25日, メトロトロントコンベンションセンター (カナダ・トロント)

〔図書〕(計3件)

- ① 森川正章、地人書館、バイオフィルム—微生物の生存戦略を生かす 福井作蔵・秦野琢之編「微生物増殖学の現在・未来」2009年、pp444-454
- ② 鷺尾健司、森川正章、株式会社 エヌティーエス、バイオサーファクタントを利用したバイオフィルムの形成と阻害ブッカーズ編「バイオフィルムの基礎と制御」2008年、pp278-287
- ③ 森川正章、他46名、株式会社 エヌティーエス、将来展望 バイオフィルムがもたらすブレイクスルーの可能性ブッカーズ編「バイオフィルムの基礎と制御」2008年、pp389-399

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

- ①  
名称：キノン類の製造方法  
発明者：森川正章、大胡康  
権利者：北海道大学、(株)日清ファルマ  
種類：特願  
番号：2009-179141  
出願年月日：2009年7月31日  
国内外の別：国内
- ②  
名称：新規水草根圏微生物  
発明者：森川正章、鷺尾健司、山賀文子  
権利者：北海道大学  
種類：特願  
番号：2008-099213  
出願年月日：2008年4月7日  
国内外の別：国内

○取得状況(計1件)

- ①  
名称：新規水草根圏微生物  
発明者：森川正章、鷺尾健司、山賀文子  
権利者：北海道大学  
種類：特開  
番号：2009-247279  
取得年月日：2009年10月29日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/morikawalab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 正章 (MORIKAWA MASA AKI)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究所・教授  
研究者番号：20230104

(2) 研究分担者

鷺尾 健司 (WASHIO KENJI)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究所・助教  
研究者番号：50241302

(3) 連携研究者

なし