

Stenotrophomonas maltophilia の
産生するシデロフォアの
化学構造と特性の解明

2022 年

久富 敦

Stenotrophomonas maltophilia の産生するシデロフォアの
化学構造と特性の解明

目次

諸言

第1章 *S. maltophilia* 菌株の再同定

序文

第1節 16S rDNA 部分塩基配列による簡易同定

第2節 表現性状試験

第3節 全ゲノム配列の比較解析

第4節 オーソログ遺伝子に基づく進化系統解析

小括

第2章 *S. maltophilia* の産生するシデロフォアタイプの同定

序文

第1節 鉄無添加培地における生育

第2節 シデロフォア産生の確認

第3節 カテコール型シデロフォアとフェノール型シデロフォア

第4節 ヒドロキサム酸型シデロフォア

第5節 カルボン酸型シデロフォア

第6節 鉄無添加継代培養時の生育について

第7節 鉄無添加継代培養時に産生されるシデロフォアタイプについて

小括

第3章 *S. maltophilia* の産生するカテコール型シデロフォアの構造決定

序文

第1節 シデロフォアの一次精製と LC/MS による検出

第2節 シデロフォアの二次精製と LC/MS による検出

第3節 NMR によるシデロフォアの構造決定

小括

第4章 *S. maltophilia* K279a の DHBS 合成関連遺伝子と合成経路の推定

序文

第1節 エンテロバクチン生合成経路関連遺伝子の探索

第2節 エンテロバクチントランスポーター生合成経路関連遺伝子の探索

小括

第5章 *S. maltophilia* K279a の DHBS 取り込み

序文

第1節 生育測定を用いた DHBS 取り込み能試験

第2節 細胞内 DHBS 量測定による DHBS 取り込み能試験

小括

第6章 環境微生物のバイオフィーム形成へのシデロフォアが及ぼす影響

序文

第1節 環境サンプルのバイオフィーム形成能

第2節 環境サンプル由来微生物の生菌数

第3節 環境サンプル由来微生物の分離同定

第4節 分離株の系統解析

第5節 分離株の DHBS の利用能

第6節 分離株の DHBS によるバイオフィーム形成能

第7節 分離株の DHBS 産生能

小括

第7章 総括

Summary

謝辞

参考文献

研究業績等

緒言

S. maltophilia は海洋や土壌、臨床環境など幅広い環境からの分離報告がある⁽¹⁾。また、本種は肺炎や尿路感染症、髄膜炎、眼感染症、敗血症など様々な感染症を引き起こす日和見感染菌としても知られている⁽²⁾。

本種は *Pseudomonas* 属の中でマルトース資化性とメチオニン要求性を分別性状として分類され、その後、新属である *Stenotrophomonas* と再分類された。以前より、種内の性状の多様さが指摘され、実際に同種株にはメチオニンを必須要求する Biovar I 群と必須要求しない Biovar II 群に暫定的に区別されてきた。このように、*S. maltophilia* は分類学的にまだ課題のある菌種である。また、*Stenotrophomonas* 属は 2010 年前後から新種が多く提唱されており、これまで本種とされていた株がそのいずれかの種に該当する可能性もある。

本種は環境中より鉄を獲得するため用いられるシデロフォアの産生が報告されている^(3,4)。シデロフォアとは、主に三価の鉄に高親和性を示す金属キレート物質である。植物や微生物の一部は鉄欠乏環境下でシデロフォアを産生する。その構造は活性部位の構造よりカテコール型、フェノール型、ヒドロキサム酸型、カルボン酸型の 4 種類に分けられ、2 種以上の活性部位を持つ複合型も見つかっており、多種多様である⁽⁵⁾。この多種多様な構造に合わせた独自のトランスポーターやレセプターを用いて、生体内の代謝に必要な鉄の取り込みを優先的かつ効率的に行うことができる⁽⁵⁾。

シデロフォアの産生やその錯体の取り込みは生育の向上のみならず、バイオフィーム形成とも連動することが報告されている^(6,7)。バイオフィームは多糖やタンパク質からなる高次構造体であり、バイオフィーム内はそのバイオフィームを形成する限られた菌種が占めている⁽⁸⁾。また、バイオフィームは医療器具に

形成されることで院内感染の要因となることが報告されている^(9,10)。したがって、病原菌のシデロフォアの産生やその錯体の取り込みを制御することで院内感染の制御に期待ができる。その他にもシデロフォアの応用は多岐に渡り、シデロフォア構造を明らかにすることでそのシデロフォアと薬剤を結合し、感染の制御をする研究がある⁽¹¹⁾。また、キレート作用を生かした農業分野での土壌中の鉄をはじめとする金属の植物への供給物質として⁽¹¹⁾、環境分野では重金属を回収する物質として利用されている⁽¹¹⁾。よってシデロフォア構造を解明することで様々な応用への期待ができる。

*S. maltophilia*は、カテコール型シデロフォアを産生するが⁽¹²⁾、その他のタイプに関しては知見がない。また、ゲノムの情報からカテコール型シデロフォアであるエンテロバクチン合成の遺伝子群が予測されていたが⁽¹³⁾、その後の研究により、*S. maltophilia*はエンテロバクチンの産生や利用をしないことが明らかとなった⁽¹⁴⁾。以上のことから *S. maltophilia* の産生や取り込みに関わるシデロフォアの構造と性質は未だ明らかではない。*S. maltophilia* の産生するシデロフォア構造を解明することで *S. maltophilia* のバイオフィルム形成や感染を制御する応用研究に期待ができる。

そこで本研究では *S. maltophilia* が産生するシデロフォアタイプや構造を明らかにし、そのシデロフォア応用法を検討することとした。

第1章 *S. maltophilia* 菌株の再同定

序文

S. maltophilia はグラム陰性・好気性桿菌で、当初 *Pseudomonas* 属の1種として提案されたが、1981年に *Xanthomonas* 属の1種として再分類された。その後、本種は1993年にその表現性から独立した属として *Stenotrophomonas* 属に再分類された⁽¹⁵⁾。本属は近年相次ぐ新種提唱によって、提唱時に1種 *S. maltophilia* のみであった構成種が12種まで拡大している。基準種である *S. maltophilia* は院内感染を引き起こす日和見感染菌として多数検出され、欧米諸国ではその感染性が問題視されている⁽²⁾。分類学的には、メチオニンを要求する Biovar I 群とメチオニン非必須要求である Biovar II 群の2群として暫定的に区別されるなど本種は表現型・遺伝型において種内で多様性を示すことが報告されている⁽¹⁶⁾。

さらに近年、*S. maltophilia* とされてきた株の中に他種に近縁の株が存在することが確認されており、分類学的に問題になっている⁽¹⁷⁾。本種の多様性・有用性を検証する上でも、それらの株の遺伝型・表現型について検討し、再分類を行うことが *S. maltophilia* の研究を行うために重要であると考えられる。

以上より本研究では、*S. maltophilia* の分類学的位置と多様性を明らかにし、シデロフォアの研究対象として適切な株を選抜することを目的に、再同定を行うこととした。

第1節 16S rDNA 部分塩基配列による簡易同定

供試菌株は *S. maltophilia* として報告されており⁽¹⁶⁾、本研究室に保存されている Biovar I 群 8 株と、Biovar II 群 5 株、未分類株 1 株を供試菌株として使用した (Table 1-1-1)。供試菌株を簡易的に同定するために細菌の同定法として一般的である 16S rDNA の部分塩基配列による同定を行った。

Table 1-1-1 *S. maltophilia* 供試菌株

グループ	菌株	分離源
Biovar I	IAM12423 ^T	口腔がん
Biovar I	GN12873	臨床
Biovar I	KMM349	海綿
Biovar I	KMM365	海綿
Biovar I	KMM3045	ヒトデ
Biovar I	NCB0306-284	臨床
Biovar I	IAM1566	糲
Biovar I	JCM1976	糲
Biovar II	IAM12672	魚
Biovar II	JCM1979	下水
Biovar II	JCM1980	魚
Biovar II	JCM1987	家畜糞尿施用土壌
Biovar II	JCM1988	家畜糞尿施用土壌
未分類	K279a	臨床

【実験方法】

DNA を抽出するために供試菌株を NB 培地 (Nutrient Broth, Difco) 2 ml を用いて 24 h, 30°C, 160 rpm の条件で培養した。培養液 1 ml を 5,725xg で 3 min 遠心分離し、上清を除去した。1 ml の TE buffer を加え懸濁後、同様に遠心分離し上清を除去した (菌体洗浄)。TE Buffer 500 μ L と乾熱滅菌済みのガラスビーズ 0.1 g を加え 15 min 間攪拌し、粗 DNA を含む上清を回収した。粗 DNA を鋳型として、PCR (Polymerase Chain Reaction) により 16S rDNA を増幅した。PCR は Bio-rad MJ Research PTC-200 PCR Thermal Cycler を用いた。16S rDNA を増幅するために使用した反応液の組成を Table 1-1-2、用いたプライマーを Table 1-1-3、反応条件を Table 1-1-4 に示す。

Table 1-1-2 16S rDNA PCR 組成液

10 \times PCR buffer	2.5 μ L
dNTP mix	2.0 μ L
primer F (50 pmol/ μ L)	0.2 μ L
primer R (50 pmol/ μ L)	0.2 μ L
Ex-taq	0.1 μ L
Milli-Q water	20.0 μ L
Template DNA	1.0 μ L
Total volume	26 μ L

Table 1-1-3 プライマー

primer 9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (塩基位置 9~27)
primer 1541R	GTATTACCGCGGCTGCTG (塩基位置 1541~1522)

Table 1-1-4 16S rDNA の PCR 反応条件

1	94°C	30 sec
2	55°C	30 sec
3	72°C	90 sec
4	1~3 を 34 回繰り返す	
5	72°C	2 sec
6	4°C	Forever

PCR 産物の精製は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いた。PCR 反応液に等量の Membrane binding buffer を加え、混合した。付属のカラムに添加し 1 min 静置後 9,860xg で 1 min 遠心分離した。カラムに 700 μ l の Membrane washing solution (Table 1-1-5) を加え、9,860xg で 1 min 遠心分離した。廃液を捨て、更に 500 μ l の Membrane washing solution を加えて 9,860xg にて 5 min 遠心分離をした。カラムを新しいチューブに移し 50 μ l Nuclease free water を加え、1 min 静置した。その後、9,860xg で 1 min 遠心分離した。その後、回収した DNA と Table 1-1-6 の反応液を用いて Table 1-1-7 の条件にて PCR をした。

Table1-1-5 Membrane washing 溶液

KAc (pH 5.0)	10 mM
Et-OH	80%
EDTA (pH 8.0)	16.7 μ M

Table 1-1-6 サイクルシーケンス反応液

5 × sequence buffer	1.8 μ L
primer F または R (1.6 pmol/ μ L)	0.5 μ L
Big Dye Terminator 3.1	0.2 μ L
Milli-Q water	7 μ L
Template DNA	0.5 μ L
Total volume	10 μ L

Table 1-1-7 サイクルシーケンス反応条件

1	96°C	1 min
2	96°C	10 sec
3	50°C	10 sec
4	60°C	4 min
5	2~4 を 25 回繰り返す	
6	4°C	Forever

PCR 反応液 10 μ L に 3M NaAc を 1 μ L, 99% の Et-OH を 25 μ L 加えタッピングし 15 min 静置後、20,000xg, 20 min, 4°C の条件で遠心分離をした。上清を捨て 70% Et-OH 125 μ L を加え転倒混和し 20,000xg, 20 min, 4°C の条件で遠心分離後、上清を捨て 5 min 減圧乾燥した。減圧乾燥させたサンプルに Hi-Di を 10 μ L を加えピペッティングし SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) にてシーケンシング後、得られた塩基配列を用いて EZ BioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) にて評価し、98% 以上の相同性を示した種と同種と判断した。

【結果と考察】

供試菌株の 16S rDNA 遺伝子である約 500 の部分塩基配列をキャピラリーシーケンス SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により決定した。Table 1-1-8 に示した表の括弧内は相同値であり全ての供試菌株は複数の種と 98%以上の相同値を示した。よって、本種は複数の近縁種と類似していることが考えられ、供試菌株の 16S rDNA 遺伝子に基づく同定は困難であることが考えられた。また、全ての Biovar I 群は同定結果に *S. maltophilia* や *S. lactitubi* が含まれることから、この群は *S. maltophilia* 株以外にも *S. lactitubi* 株などが含まれる可能性が考えられた。

Table 1-1-8 16S rDNA による同定結果

菌株	同定結果
IAM 12423 ^T	<i>S. maltophilia</i> (98.91), <i>S. lactitubi</i> (98.25), <i>S. pavanii</i> (98.03)
GN 12873	<i>S. maltophilia</i> (98.66), <i>S. lactitubi</i> (98.00)
KMM 349	<i>S. maltophilia</i> (99.55), <i>S. lactitubi</i> (99.33), <i>S. pavanii</i> (98.43), <i>S. indicatrix</i> (98.21)
KMM 365	<i>S. maltophilia</i> (99.55), <i>S. lactitubi</i> (99.33), <i>S. pavanii</i> (98.43), <i>S. indicatrix</i> (98.43)
KMM 3045	<i>S. lactitubi</i> (99.08), <i>S. pavanii</i> (98.85), <i>S. indicatrix</i> (98.85), <i>S. maltophilia</i> (98.62)
NCB 0306-284	<i>S. pavanii</i> (99.34), <i>S. maltophilia</i> (99.12), <i>S. lactitubi</i> (98.46), <i>S. indicatrix</i> (98.03)
IAM 1566	<i>S. indicatrix</i> (99.78), <i>S. lactitubi</i> (99.33), <i>S. pavanii</i> (98.88), <i>S. maltophilia</i> (98.65)
JCM 1976	<i>S. indicatrix</i> (99.77), <i>S. lactitubi</i> (99.33), <i>S. pavanii</i> (98.87), <i>S. maltophilia</i> (98.65)
IAM 12672	<i>S. terrae</i> (98.90), <i>S. nitritireducens</i> (99.56), <i>S. humi</i> (98.68), <i>S. acidaminiphila</i> (98.02)
JCM 1979	<i>S. chelatiphaga</i> (99.76), <i>S. tumulicola</i> (99.52), <i>S. lactitubi</i> (99.52), <i>S. indicatrix</i> (99.52), <i>S. maltophilia</i> (99.04), <i>S. pavanii</i> (99.04), <i>S. rhizophila</i> (98.57)
JCM 1980	<i>S. nitritireducens</i> (99.53), <i>S. terrae</i> (99.30), <i>S. humi</i> (98.60)
JCM 1987	<i>S. terrae</i> (100.00), <i>S. nitritireducens</i> (98.86)
JCM 1988	<i>S. terrae</i> (99.78), <i>S. nitritireducens</i> (98.68)
K279a	<i>S. lactitubi</i> (99.77), <i>S. pavanii</i> (98.36), <i>S. maltophilia</i> (99.30), <i>S. tumulicola</i> (99.30), <i>S. chelatiphaga</i> (99.07), <i>S. indicatrix</i> (98.83), <i>S. indicatrix</i> (98.83), <i>S. deajeonensis</i> (98.59), <i>S. acidaminiphila</i> (98.13)

第2節 表現性状試験

供試菌株の多くはメチオニンの要求性により Biovar I 群と II 群に分けられているが細かい性状については知られていない。そこで、本章ではグラム陰性桿菌の同定に用いられる検査キットである API20NE (BIOMERIEUX 20050) を用いた性状試験を行い、Table 1-1-1 に示した供試菌株の簡易的な同定を行った。

【実験方法】

供試菌株を NB 培地にて 24 h, 30°C, 160 rpm の条件で振とう培養後、1.2%の寒天を添加した NB 培地に塗抹し 24 h, 30°C の条件で静置培養した。その後、0.85%滅菌生理食塩水 2 mL にコロニー1~4 個を懸濁しマクファーランド濁度が 0.5 になるように調整した。各試験項目のカップやアピ AUX 培地に菌液を約 200 μ L 接種し、24 h, 30°C 静置培養した。培養後、NIT1, NIT2 液を 1 滴ずつ NO₃ 試験項目のカップに滴下した。5 min 後に赤色を呈すれば陽性と判断した。陰性の場合には ZN 試薬を 2~3 mg カップに添加し 5 min 後に無色であれば陽性、ピンク~赤色になれば陰性と判断した。また、JAMES 試薬を 1 滴 TRP 試験項目のカップに添加しピンク色に呈色すれば陽性、無色であれば陰性と判断した。NO₃ 試験と TRP 試験後、試薬を吸い取りミネラルオイルをカップの上部が凸状になるまで添加し、24 h, 30°C 静置培養した。培養後、Table 1-2-1 の判別表に従い目視で色の分別を確認した。

Table 1-2-1 API 20 NE Identification

テスト項目	基質	反応 / 酵素	成績	
			陰性	陽性
NO ₃	硝酸カリウム	硝酸塩の亜硝酸塩への還元	NIT 1+NIT 2 / 5分 無色 ピンク色-赤	
		硝酸塩のN ₂ ガスへの還元	ZN / 5分 ピンク色 無色	
TRP	L-トリプトファン	インドール産生(トリプトファン)	JAMES / 直後に判定 無色 ピンク色 薄緑色 / 黄	
GLU	ブドウ糖	発酵 (グルコース)	青色から緑	黄色
ADH	L-アルギニン	アルギニンジヒドロラーゼ	黄色	オレンジ色 / ピンク色 / 赤色
URE	尿素	ウレアーゼ	黄色	オレンジ色 / ピンク色 / 赤色
ESC	エスクリン	加水分解 (β-グルコシダーゼ) (エスクリン)	黄色	灰色 / 茶色 / 黒色
GEL	ゼラチン	加水分解 (プロテアーゼ) (ゼラチン)	変化なし	黒色素の拡散
PNPG	p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド	β-ガラクトシダーゼ (パラ-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシダーゼ)	無色	黄色
[GLU]	ブドウ糖	同化 (グルコース)	透明	不透明
[ARA]	L-アラビノース	同化 (アラビノース)	透明	不透明
[MNE]	D-マンノース	同化 (マンノース)	透明	不透明
[MAN]	D-マンニトール	同化 (マンニトール)	透明	不透明
[NAG]	N-アセチル-D-グルコサミン	同化 (N-アセチル-グルコサミン)	透明	不透明
[MAL]	マルトース	同化 (マルトース)	透明	不透明
[GNT]	グルコン酸カリウム	同化 (グルコン酸カリウム)	透明	不透明
[CAP]	n-カプリン酸	同化 (カプリン酸)	透明	不透明
[ADI]	アジピン酸	同化 (アジピン酸)	透明	不透明
[MLT]	dl-リンゴ酸	同化 (リンゴ酸塩)	透明	不透明
[CIT]	クエン酸ナトリウム	同化 (クエン酸三ナトリウム)	透明	不透明
[PAC]	酢酸フェニル	同化 (酢酸フェニル)	透明	不透明
OX	(添付文書中のオキシダーゼ試験参照)	チトクロムオキシダーゼ	(添付文書中のオキシダーゼ試験参照)	

引用元: https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/16200AMY00195000_A_01_09/

【結果と考察】

API20NEにより表現性状を確認した結果、Table 1-2-2に示すようにNCB 0306-284株を除くBiovar I群内の株とK279a株は*S. maltophilia*基準株と同一の性状を示した。対してBiovar II群では硝酸還元能、 β -ガラクトシダーゼによる触媒、リンゴ酸やブドウ糖の同化等、すべての株が基準株と異なる性状であった。また、Biovar I, II群は近縁種ともそれぞれ異なる性状を示した。以上から性状試験の結果からはNCB 0306-284株を除くBiovar I群やK279a株は*S. maltophilia*基準株と同定され、Biovar II群は群内でBiovar I群や近縁種でもない別種、もしくは亜種が含まれていることなどが考えられた。また以降は、*S. maltophilia*基準株と同一の性状を示したK279a株をBiovar I群として試験をした。

Table 1-2-2 API による性状試験

試験項目	Biovar I IAM 12423 [†]	Biovar I NCB 0306284	Biovar I KMM 349	Biovar I GN 12873	Biovar I KMM3045	Biovar I KMM 365	Biovar I JCM 1976	Biovar I IAM 1566	Uncategorized K279a	Biovar II JCM 1988	Biovar II JCM 1979	Biovar II JCM 1987	Biovar II IAM 12672	<i>S. nitritireducens</i> 13311 [†]	<i>S. terrae</i> 18941 [†]
硝酸塩の亜硝酸への還元能	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
硝酸塩の窒素への還元能	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
インドール産生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
発酵性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アルギニンジヒドラーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尿素分解能	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -グルコシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
プロテアーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
β -ガラクトシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
ブドウ糖の同化	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
アラビノースの同化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マンノースの同化	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
マンニトールの同化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アセチルグルコサミンの同化	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マルトースの同化	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
グルコン酸カリウムの同化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
カプリン酸の同化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アジピン酸の同化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
クエン酸ナトリウムの同化	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
酢酸フェニル	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
チトクロムオキシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第3節 全ゲノム配列の比較解析

第1節の16S rDNAの部分塩基配列では種の同定が不十分であったため、ゲノムの全塩基配列を使う DNA-DNA 交雑実験法を行った。Average Nucleotide Identity (ANI) 法は断片化された全ゲノムの相同性検索を行い、その相同値の平均値から類似度を求める手法であり、同定判断に使用される⁽¹⁸⁾。NCBI に保存されている *S. maltophilia* 近縁種の全ゲノム配列と Table 1-1-1 に示した供試菌株の全ゲノム配列を用いて ANI 解析をした。

【バイオインフォマティクス解析】

ゲノム DNA 抽出は NucleoSpin Microbial DNA キットを用いた。得られたゲノム DNA はナノポアシーケンサーである MinION (Oxford Nanopore Technologies) を用いて全ゲノムシーケンス解析に供した。ライブラリー調整を Rapid Barcoding Sequencing Kit (SQK-RBK004) により行い、得られたライブラリーを MinION システム上の R9.4 フローセルでシーケンスした。これらの操作は製造元のプロトコルに従って行った。シーケンスから得られた FASTQ ファイルを入力として *De novo* アセンブルを行った。アセンブルは分子微生物学科サーバ上に構築された微生物ゲノム・メタゲノム解析パイプライン (<http://microbiology.nodai.ac.jp/fujita/index.html>) 上の「Unicycler パイプラインによる NGS データのアセンブル」機能を利用して実施した。アセンブルから得られたコンティグ配列 (genomic.fna ファイル) を入力として、ゲノムアノテーションを DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/dfc/>) を用いて行い、予測された遺伝子領域の配列とその機能予測を得た。

Average Nucleotide Identity (ANI) 法を用いて全ゲノム配列の類似度を計算

した。ANIの計算は前述の解析パイプライン上の「ゲノムの平均塩基一致度 (ANI)による種の判別」機能を利用して実施した。得られたコンティグ配列を queryとし、NCBIのデータベースに登録されている近縁種のゲノム配列を subjectとして解析を行った。

【結果と考察】

ANI解析では95%以上の相同性を示した株を同種と判定する⁽¹⁸⁾。解析をした結果、Table 1-3-3に示すようにBiovar I群の株において臨床現場由来であるGN 12873株と基準株が同種と判定されたため、GN 12873株のみ*S. maltophilia*種と判別された。また、海綿から分離された KMM 349株とKMM 365株、臨床環境由来のK279a株は同種と判別された。さらに、靱から分離されたJCM 1976株とIAM 1566株がそれぞれ同種と判定された。同種と判定された各株は分離源が同一である傾向があり、分離源により検出される菌種に差が出ることが考えられた。また、JCM 1976株とIAM 1566株は近縁種である*S. lactitubi*と同種と判別された。その他の株は基準株や近縁種との相同性が低く、Biovar I群内においても別種や亜種が存在する可能性が考えられた。また、Biovar I群内には95%以上の相同性を示さないものの90%~95%の相同性を示す株があった。JCM 1976株とIAM 1566株を除くBiovar I群の株は基準株と90%以上の相同性を示したことから、これら菌株も基準株と同定される可能性が考えられた。

Biovar II群の株において JCM 1979 株、JCM 1980 株、JCM 1987 株は互いに同種と判定された。また、JCM 1988 株は *S. terrae* と同定された。しかし、その他の Biovar II群の株は *S. maltophilia* 基準株や近縁種、Biovar II群内の株との相同性が 95%よりも低く、別種や亜種に分類される可能性が考えられた。

Table 1-3-4 に示すように、Biovar I群と Biovar II群との群間の相同性は低

く、ゲノム解析の側面からもこれら2つの群に分かれる結果となった。

Table 1-3-3 相同性試験

	Biovar I											Biovar II					
	JCM 1976	IAM 1566	K279a	KMM 365	KMM 349	KMM 3045	GN 12873	IAM 12423	NCB 306-284	JCM 1988	JCM 1987	JCM 1980	JCM 1979	IAM 12672			
JCM 1976	*		98	86.95	86.95	86.9	86.8	86.71	86.79	78.08	77.77	77.77	77.76	77.52			
IAM 1566	97.93 *			86.89	86.91	86.86	86.67	86.66	86.66	78.02	77.85	77.85	77.84	77.56			
K279a		86.91	86.87 *	98.19	98.21	92.45	90.59	90.61	90.28	77.74	77.72	77.74	77.73	77.39			
KMM 365		86.94	98.18 *	99.97	99.97	92.52	90.54	90.57	90.3	77.79	77.8	77.8	77.81	77.31			
KMM 349		86.89	86.86	99.97 *	99.97 *	92.46	90.57	90.6	90.25	77.7	77.72	77.7	77.71	77.31			
KMM 3045		86.66	86.75	92.39	92.42 *		92.03	91.98	91.29	77.81	77.72	77.74	77.72	77.43			
GN 12873		86.86	86.81	90.75	90.76	92.3 *	97.86 *	97.97	91.7	78.03	77.92	77.93	77.91	77.65			
IAM 12423		86.62	86.64	90.59	90.61	90.62			91.47	77.97	78.04	78.01	78.03	77.37			
NCB 306-284		86.77	86.73	90.39	90.41	91.56	91.67	91.58 *		78.09	77.95	77.92	77.94	77.58			
JCM 1988		78.01	77.95	77.96	77.96	78.08	78.07	78.12	78.13 *		87.47	87.49	87.49	85.73			
JCM 1987		77.86	77.82	77.93	77.89	77.99	77.96	78.09	77.97	87.39 *		99.96	99.95	84.24			
JCM 1980		77.8	77.82	77.87	77.91	77.92	77.93	78.07	77.94	87.4	99.96 *		99.94	84.33			
JCM 1979		77.97	78.04	78.13	78.08	78.16	78.19	78.28	78.2	87.5	99.95	99.94 *		84.44			
IAM 12672		77.55	77.53	77.63	77.59	77.62	77.77	77.73	77.57	85.85	84.4	84.4	84.39 *				

Table 1-3-4 近縁種との相同性試験

	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. rhizophila</i>	<i>S. pictorum</i>	<i>S. humi</i>	<i>S. nitrinudens</i>	<i>S. terrae</i>	<i>S. ginsengisoli</i>	<i>S. dejeuensis</i>	<i>S. koreensis</i>	<i>S. chelidophaga</i>	<i>S. javani</i>	<i>S. pictorum</i>	<i>S. acidaminiphila</i>	<i>S. panachurmi</i>	<i>S. indicatrix</i>	<i>S. lactitubi</i>	<i>S. cyclodanopsidis</i>	<i>S. bentonitica</i>	<i>S. tumulicola</i>
JCM 1976	86.72	80.95	79.3	77.89	79.36	78.03	75.78	79.43	75.69	81.67	86.57	78.43	79.38	77.83	93.44	96.22	86.79	80.91	81.25
IAM 1566	86.6	81	79	77.72	79.13	77.98	75.77	79.56	75.66	81.56	86.48	78.35	79.1	77.66	93.29	95.04	86.83	80.86	81.37
K279a	90.55	80.81	79.2	77.67	79.32	77.71	75.55	79.39	75.6	81.6	89.91	78.32	79.4	77.68	86.91	86.91	87.11	80.8	81.13
KMM 365	90.55	80.79	79.04	77.74	79.48	77.77	75.68	79.38	75.72	81.7	89.87	78.31	79.38	77.82	86.93	86.91	87.1	80.78	81.13
Bovar I KMM 349	90.61	80.86	79.17	77.63	79.27	77.72	75.44	79.46	75.57	81.53	89.95	78.34	79.41	77.65	86.91	86.89	87.11	80.84	81.11
KMM 3045	91.91	80.73	79.17	77.69	79.99	77.84	75.96	79.46	75.78	81.46	90.54	78.47	79.58	77.74	86.68	86.7	87.11	81.05	81.71
GN 12873	97.98	80.87	79.22	77.82	79.45	77.94	75.75	79.63	75.62	81.52	90.92	78.38	79.48	77.83	86.53	86.58	87.17	80.84	81.21
IAM 12423	99.94	80.8	79.43	77.93	79.73	77.91	75.75	75.69	75.67	81.47	90.83	78.82	79.65	77.8	86.44	86.56	87.16	80.91	81.36
NCB 0306-294	91.54	81.02	79.31	77.83	79.64	78.02	75.88	79.76	75.69	81.57	93.09	78.48	79.73	78.11	86.58	86.65	87.25	81.02	81.36
JCM 1988	78.13	78.46	83.54	82.98	82.23	97.29	76.05	81.81	75.98	77.5	78.09	83.07	81.68	78.13	78.07	77.93	78.19	78.48	77.34
JCM 1987	78.16	78.19	83.4	82.7	82.41	82.27	75.79	81.77	75.76	77.47	77.93	82.97	81.71	78.16	77.86	77.71	77.91	78.39	77.29
Bovar II JCM 1980	78.06	78.24	83.41	82.76	82.55	87.23	75.88	81.86	75.73	77.42	77.96	83.03	81.78	78.06	77.87	77.6	77.99	78.35	77.26
JCM 1979	78.29	78.43	83.44	82.83	82.57	87.34	75.98	81.8	75.96	77.7	78.16	83.11	82	78.29	78.06	77.86	78.22	78.6	77.5
IAM 12672	77.75	78.16	82.56	82.27	81.59	85.82	75.71	81.45	75.9	77.19	77.68	82.05	81.34	77.75	77.55	77.51	77.78	77.96	76.96

第4節 オーソログ遺伝子に基づく進化系統解析

第3節で抽出した全ゲノム DNA の情報をもとにオーソログ遺伝子のアミノ酸配列を用いて最尤法によって系統樹を作成し、供試菌株の同定をした。系統樹作成には、*S. maltophilia* の基準株である IAM 12423^T 株を含む Table 1-1-1 の供試菌株と、外群として *Xanthomonas oryza* ICMP 3125^T 株を用いた。

【バイオインフォマティクス解析】

DFAST で得られた各株の遺伝子アミノ酸配列 (protein.faa ファイル) を入力として、前述の解析パイプライン上の「複数のゲノムからのオーソログ遺伝子の抽出」機能を利用してオーソログ遺伝子の抽出を行った。

得られたオーソログ遺伝子を入力としたゲノム系統解析を前述の解析パイプライン上の「オーソログ遺伝子によるゲノム系統解析 (拡張 MLSA)」機能を利用して行った。得られた系統樹ファイルを MEGA (<https://www.megasoftware.net>) に入力し系統樹を作成した。

【結果と考察】

オーソログ遺伝子に基づく系統解析をした結果、Figure 1-3-1 に示すように供試菌株は8つのクラスターを形成していた。クラスターA~Eは Biovar I 群に分類される群であり、クラスターF~Hは Biovar II 群に分類される群であったことから系統解析によっても2つの群に分かれる結果となった。クラスターAは NCB 0306-284 株と *S. pavanii* からなるクラスターであり、NCB 0306-284 株は *S. pavanii* と同定されることが考えられた。クラスターBは基準株と GN 12873 株のみであり、その他菌株は異なるクラスターを形成した。よって、GN

12873 株のみ *S. maltophilia* と同定されることが考えられた。クラスターCは KMM 3045 株のみを含むクラスターであり、本株は新種である可能性が考えられた。クラスターDは KMM349 株、KMM365 株、K279a 株からなり、近縁種を含まないクラスターであることからこれら菌株も新種である可能性が考えられた。クラスターEは IAM 1566 株と JCM 1976 株、*S. lactitubi* を含むことから、これら供試菌株は *S. lactitubi* と同定されることが考えられた。クラスターFは IAM 12672 株のみで構成されており本株は新種であることが考えられた。クラスターGは JCM 1980 株、JCM 1981 株、JCM 1979 株を含むクラスターであり近縁種が含まれないことから本菌株は新種であることが考えられた。クラスターHは JCM 1988 株と *S. terrae* とクラスターを形成したため、本株は *S. terrae* と同定されることが考えられた。以上より Biovar I 群やII群は種内において形成されるグループではなく、それぞれが複数の種からなるグループであると考えられた。

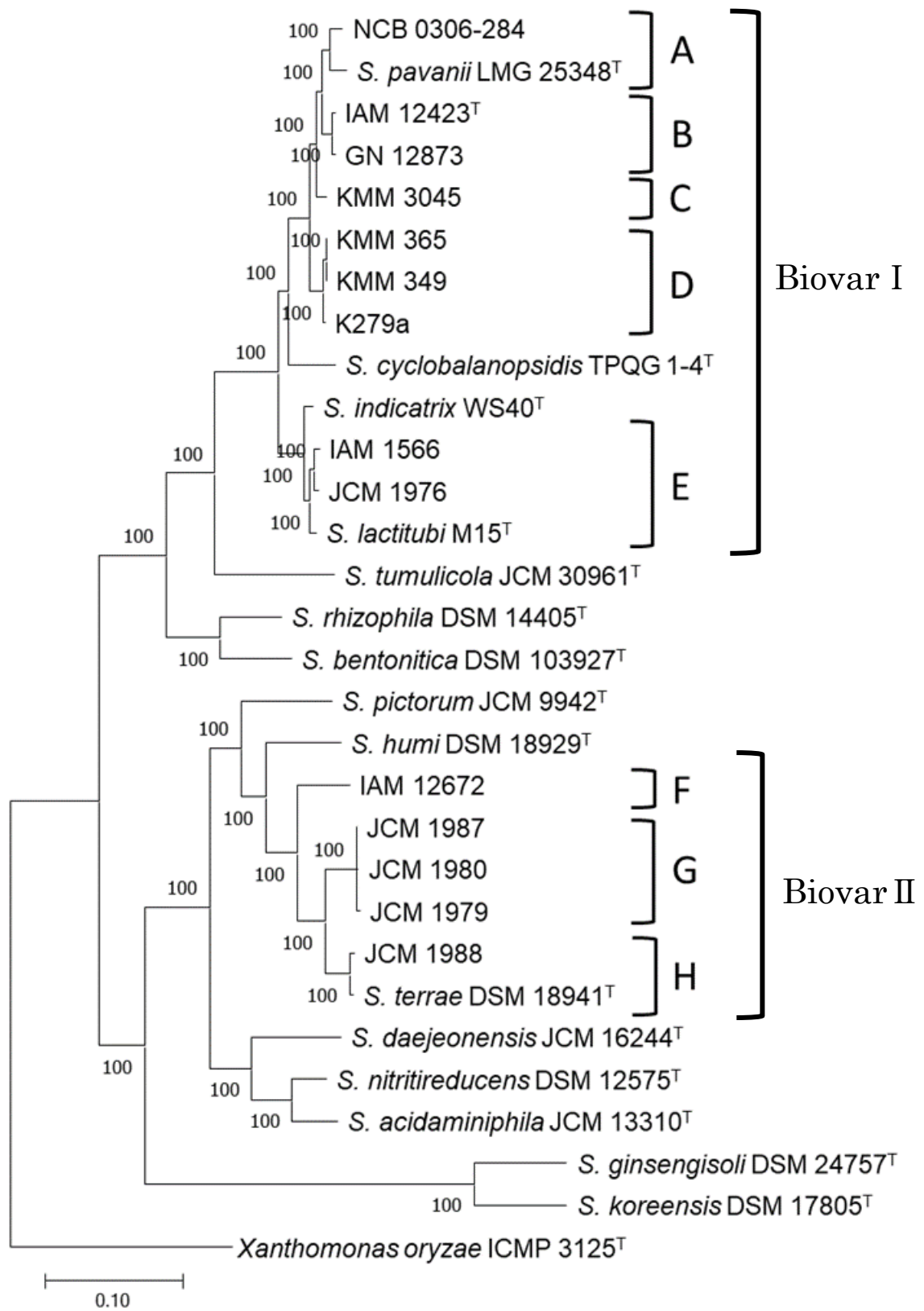


Figure 1-3-1 オーソログ遺伝子に基づく系統解析結果

小括

本章では *S. maltophilia* を表現性状やゲノムの情報から再同定した。16S rDNA 遺伝子の塩基配列を決定した結果、全ての菌株は複数の近縁種に同定されたことから 16S rDNA に基づく簡易同定法では菌種の同定には及ばなかった。また、API による性状試験や ANI による相同性試験、オーソログ遺伝子に基づく系統解析において、Biovar I 群と Biovar II 群の 2 つの群に分かれる結果となった。Figure 1-3-1 に示すようにクラスターA に分類された NCB 0306-284 株は *S. pavanii* と非常に近縁であるが ANI による相同性試験の結果では別種と示唆される結果となった。また、Biovar I 群内において本菌株のみ API による性状試験の結果が異なることから、新種である可能性が考えられた。クラスターB は基準株を含むクラスターであり、GN 12873 株は性状試験や ANI の結果からも *S. maltophilia* と同定された。クラスターC に分類された GN 3045 株は ANI 解析において基準株や近縁種との相同性が低く、本クラスターは新種である可能性が考えられた。クラスターD に分類された KMM 365 株と KMM 349 株、K279a 株は ANI 解析の結果から相互に高い相同性を示し同種であると判定された。しかし、基準株や近縁種との相同性が低かったことから、本クラスターは *S. maltophilia* ではない新種の可能性が考えられた。クラスターE は *S. lactitubi* M15^T を含むクラスターであり、IAM 1566 株や JCM 1976 株は ANI 解析において *S. lactitubi* M15^T との相同性は高いことから本 2 株は *S. lactitubi* と同定した。上記のクラスターC を除くクラスターA~E は API による性状試験により同一の結果が得られた。よって、Biovar I 群の多くは表現性状では同種と判断されるが、ゲノム情報から比較すると別種とされる株が存在する結果となった。Biovar II に分類されるクラスターF に分類された IAM 12672

株は性状試験や ANI による相同性試験においても同種の存在が確認できず、新種である可能性が考えられた。クラスターGに分類された JCM 1979, JCM 1980, JCM 1987 各株はクラスター内での相同性は高いものの、同種と判別される菌種は確認できなかった。本クラスター内の菌株においても新種である可能性が考えられた。クラスターHに分類された JCM 1988 株は *S. terrae* と同じクラスターを形成した。また、API による性状試験においても *S. terrae* と硝酸還元能以外すべて同じ結果となり、ANI による相同性試験においても *S. terrae* と同定された。

Biovar I 群に属する菌株の内 *S. maltophilia* 以外の種に分類される菌株として IAM 1566 株と JCM 1976 株のみ *S. lactitubi* と同定した。また、NCB 0306-284 株のみ Biovar I 群と表現性状が異なり、*S. pavanii* と非常に近縁であったがその基準株とは ANI 値が低かったため、本菌株は新種である可能性を示した。また、その他の全ての菌株は *S. maltophilia* として分類できないことから、本群に属する菌株は *Stenotrophomonas* 属に分類される新種である可能性が考えられた。

以上から、*S. maltophilia* として収集された株は現在のゲノム解析では複数の種から構成されることが明らかとなった。本研究ではこれら供試菌株を広義の *S. maltophilia* として扱い、これら菌株の産生するシデロフォアについて知見を深めることで院内感染の問題や、バイオフィルム形成のメカニズム解明の材料とした。

第2章 *S. maltophilia* の産生するシデロフォア

序文

植物や微生物が鉄を取り込むために産生するシデロフォアの構造は多岐にわたり、500種ほどが報告されている⁽⁶⁾。これらは活性部位の構造によりカテコール型、フェノール型、ヒドロキサム酸型、カルボン酸型の4種類に分けられる。これらシデロフォア型を明らかにすることで精製の手掛かりとなる。シデロフォアの応用研究は多岐に渡り、キレート作用を活かした農業分野での鉄を始めとする金属の植物への供給物質として、環境分野では重金属を回収する物質として利用されている⁽¹¹⁾。また、生物が取り込む物質である特性を利用して、病原菌の薬剤取り込みを誘導するためのシデロフォアと薬剤の複合体の開発について研究されている⁽¹¹⁾。

S. maltophilia は生息域が広く、本種のシデロフォアの様々な分野への応用が期待できるが、先行研究で報告されていることは Biovar I 群に属する臨床環境由来株の K279a がカテコール型シデロフォアを産生することのみであり⁽¹²⁾、本種が産生するシデロフォアの詳細は不明である。そこで本章では *S. maltophilia* のシデロフォア産生能やその型を比色分析によって調べた。第1章では *S. maltophilia* として収集した菌株は現在の分類では *Stenotrophomonas* 属の複数の種にわたっていることが明らかとなったが、シデロフォアの研究対象としてはこれらを広義の *S. maltophilia* としてその分布や生産するシデロフォアの多様性を明らかにすることができると考え、収集したすべての株を本賞の研究対象とした。

第1節 鉄無添加培地における生育

細菌のシデロフォア産生を誘導するために鉄無添加培地が利用される⁽³⁾。そこで供試菌株を用いて *S. maltophilia* が鉄無添加培地にて生育をするかその確認をした。

【実験方法】

対象菌株は第1章で使用した Table 1-1-1 にある 14 株とした。2 ml の NB 培地にて 30°C, 24 h, 160 rpm の条件で前培養した。以降、使用した全てのガラス器具を 6 N HCl で洗浄し、残留する遊離鉄を除去した。前培養した供試菌株を 5,725xg, 3 min の条件で遠心分離後、0.85%の生理食塩水に懸濁することで菌体の洗浄をした。鉄を取り除くためにこの操作を3回繰り返した後、1% 当量を 2ml MM9 培地 (Table 2-1-1) に接種し 30°C, 24h, 160 rpm の条件で培養した。また、鉄添加条件として 556 $\mu\text{g/ml}$ の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加した MM9 培地を使用した。培養後、生育を Abs 660 nm により測定した。

Table 2-1-1 MM9 培地

Na ₂ HPO ₃	0.6 g
KH ₂ PO ₃	0.03 g
NaCl	0.05 g
NH ₄ Cl	0.1 g
Tris HCl	0.3 g
※1 1M MgSO ₄	100 μl
※2 2M glucose	560 μl
※2 1% vitamineB ₁	100 μl
※1 1M CaCl ₂	10 μl
DL-methionine	5 mg
10% casamino acid	3 ml
Milli-Q water	100 ml
	pH 6.8
※3 FeSO ₄ 7H ₂ O	55.6 mg

※1 滅菌したものをオートクレーブ後に添加

※2 滅菌フィルターを通し、オートクレーブ後に添加

※3 鉄添加 MM9 培地に使用

【結果と考察】

Figure 2-1-1 に示すように全ての株が鉄無添加条件においても生育を示した。また、全ての株は鉄添加条件でより良好な生育を示した。鉄の存在の有無により生育に差が生じることが考えられた。

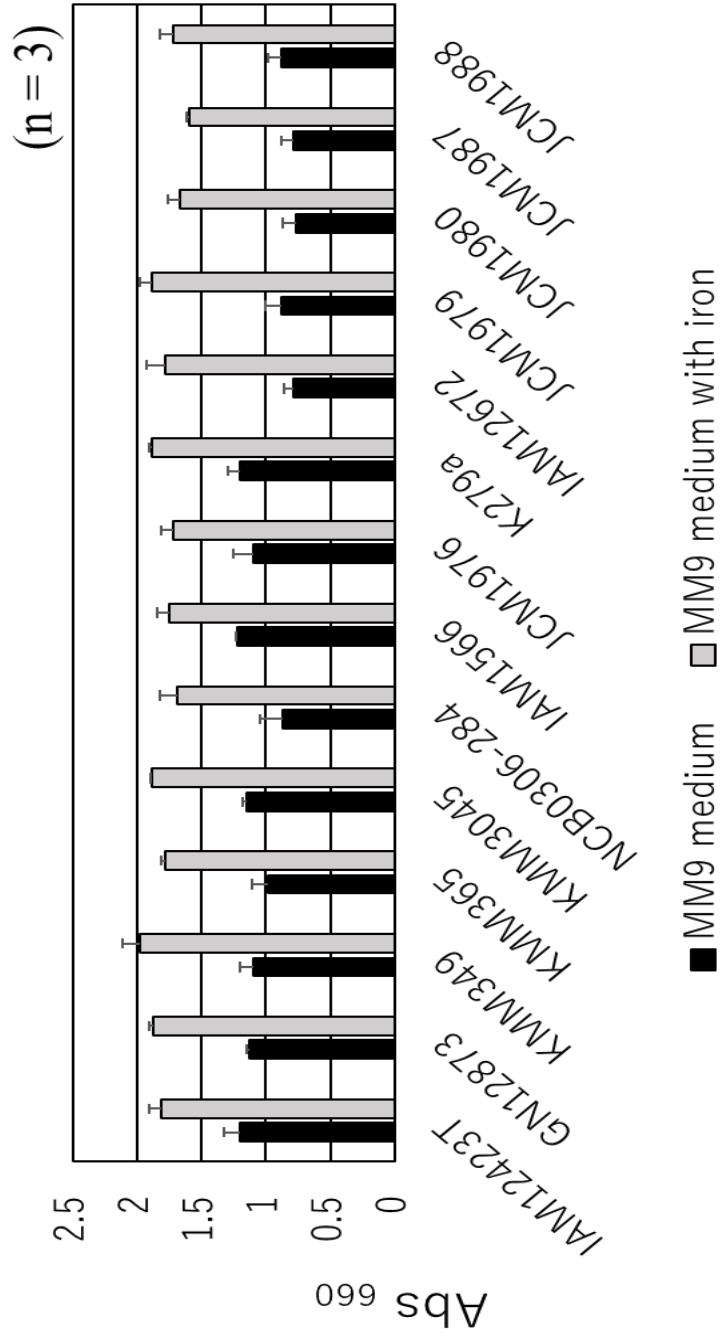


Figure 2-1-1 MM9 培地での供試菌株の生育

第2節 シデロフォア産生の確認

S. maltophilia K279a 株がシデロフォアを産生することは知られているがその他の供試菌株のシデロフォア産生能については知られていない。そこで本節では供試菌株のシデロフォア産生能を評価した。

【実験方法】

供試菌株を 2 ml の NB 培地にて 30°C, 24 h, 160 rpm の条件で前培養した。前培養した供試菌株を 5,725xg, 3 min の条件で遠心分離後、0.85%の生理食塩水に懸濁することで菌体の洗浄をした。鉄を取り除くためにこの操作を 3 回繰り返した後、1% 当量を 2ml MM9 培地 (Table 2-1-1) に接種し 30°C, 24h, 160 rpm の条件で培養した。また、鉄添加条件ではシデロフォアは産生されないことを利用し、Negative Control には 556 $\mu\text{g/ml}$ の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加した MM9 培地を使用した。培養後、12,880xg, 10 min の条件で遠心分離し、培養上清を得た。この培養上清を粗シデロフォアサンプルとした。シデロフォア活性を測定するために CAS 溶液を用いた。CAS 溶液は青色のキレート化合物であり、シデロフォアを加えることで CAS に結合している鉄が除去され青色が脱色する⁽¹⁹⁾。

CAS 溶液は以下の手順で作成したものを用いた。10 mM HDTMA (Hexadecyltrimethylammonium bromide, SIGMA, H9151) 6 ml と Milli-Q water 30 ml を混合する(A液)。次に Iron(III) solution (1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HCl) 1.5 ml と 2 mM chrome azrol S (FUJIFILM 154982) 7.5 ml を別容器で混合し、これを A 液に攪拌しながらゆっくり加える(B液)。Anhydrous piperazine 4.307 g を 10 ml の Milli-Q water で溶解し、12 N HCl 6.25 ml をゆっくり添加する(C液)。B 液に C 液を加え、100 ml にメスアップする(CAS 溶液)。粗シデロフォア

アサンプル 500 μ l と CAS 溶液 500 μ l を混合し、Abs 630 nm の吸光度で測定した。シデロフォア産生量は未接種培地の吸光度から接種培地の吸光度の値を差し引くことで求めた。

【結果と考察】

Figure 2-2-1 に示すように全ての株において鉄添加条件よりも鉄無添加条件においてシデロフォア活性が高いことから、全株がシデロフォアを産生することが分かった。さらに、Biovar II 群は全ての株において Biovar I 群よりも吸光度が低く、シデロフォア産生量が少ないことが考えられた。

(n = 3)

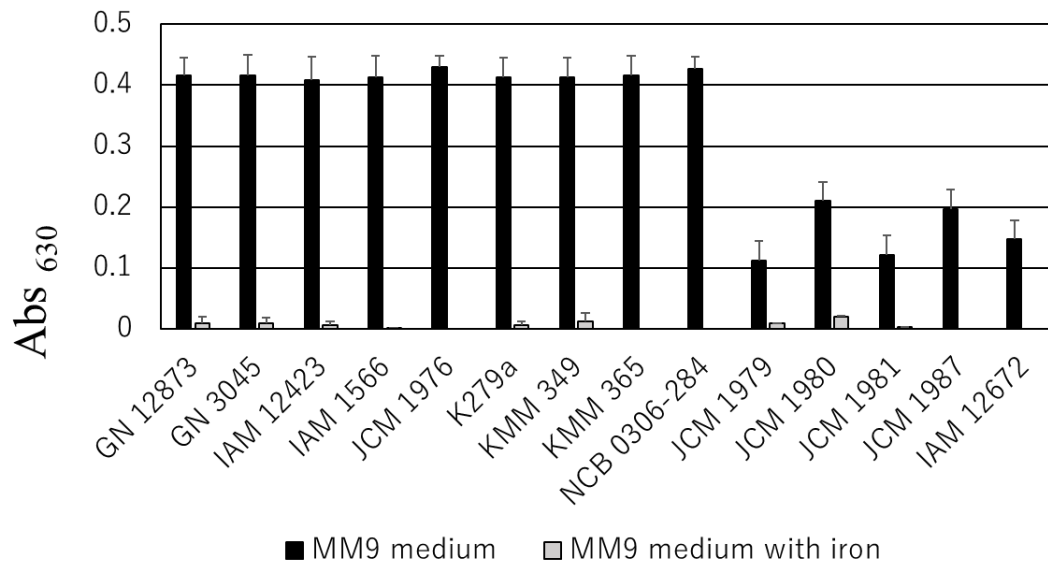


Figure 2-2-1 CAS assay によるシデロフォア検出

第3節 カテコール型シデロフォアとフェノール型シデロフォア

S. maltophilia K279a 株がカテコール型シデロフォアを産生することが知られているがその他供試菌株のカテコール型シデロフォア産生能については知られていない。また、*S. maltophilia* のフェノール型シデロフォアの産生能については知見がない。そこで、本節では供試菌株のカテコール型シデロフォアやフェノール型シデロフォアの産生能を評価した。

【実験方法】

カテコール型シデロフォアとフェノール型シデロフォアの推定を行うにあたり、Arnow assay を用いた⁽²⁰⁾。本試験を用いてカテコール型とフェノール型の判別を目視によって行った。また、カテコール型シデロフォアは Abs 510 nm を、フェノール型シデロフォアは Abs 450 nm の波長を用いて測定し、Abs 510 nm/Abs 450 nm の値を算出し、カテコール型とフェノール型のどちらを主に産生しているのか確認した。本章第1節と同様に粗シデロフォアサンプルを得て試験を行った。カテコール型シデロフォアの Positive control には 0.05 M の 4-tert-butylcatechol を、フェノール型シデロフォアの Positive control には 0.05 M の Dimethoxyphenol を用いた。粗シデロフォアサンプル 1 ml と 0.5 N HCl を混合し、Nitrite-molybdate reagent (sodium nitrite 0.1 g/ml, sodium molybdate 0.1g/ml) を 1 ml 加えた。その後、1 N NaOH を 1 ml 加え色を確認した。Abs 510 nm, Abs 450 nm の条件で測定し未接種培地も同様に測定し、全ての吸光度から差し引くことでその活性を求めた。

Table 2-3-1 Arnow assay 識別表

compound	0.5 N HCl	Nitrite- molybdate	1 N NaOH
Catecholate type	無色	黄色	赤色
Phenolate type	無色	黄色	黄色

【結果と考察】

鉄無添加条件において Biovar I 群の全ての株の反応が赤色に進んだ。Biovar II 群の JCM 1979 株や JCM 1987 株では反応が淡い黄色に進んだ。また全ての供試菌株において鉄添加条件では反応が進まなかった。吸光値を算出した結果、Figure 2-3-1, 2-3-2, 2-3-3 に示すように Biovar I 群の全ての株がカテコール型シデロフォアを主に産生していることが明らかとなった。よって、*S. maltophilia* K279a 株以外の供試菌株に関しても鉄獲得のためにカテコール型シデロフォアを産生することが考えられた。また、Biovar II 群の JCM 1979 株や JCM 1987 株はフェノール型シデロフォアを主に産生することが明らかとなった。*S. maltophilia* がフェノール型シデロフォアを産生する報告はなく、新規シデロフォアである可能性も考えられた。

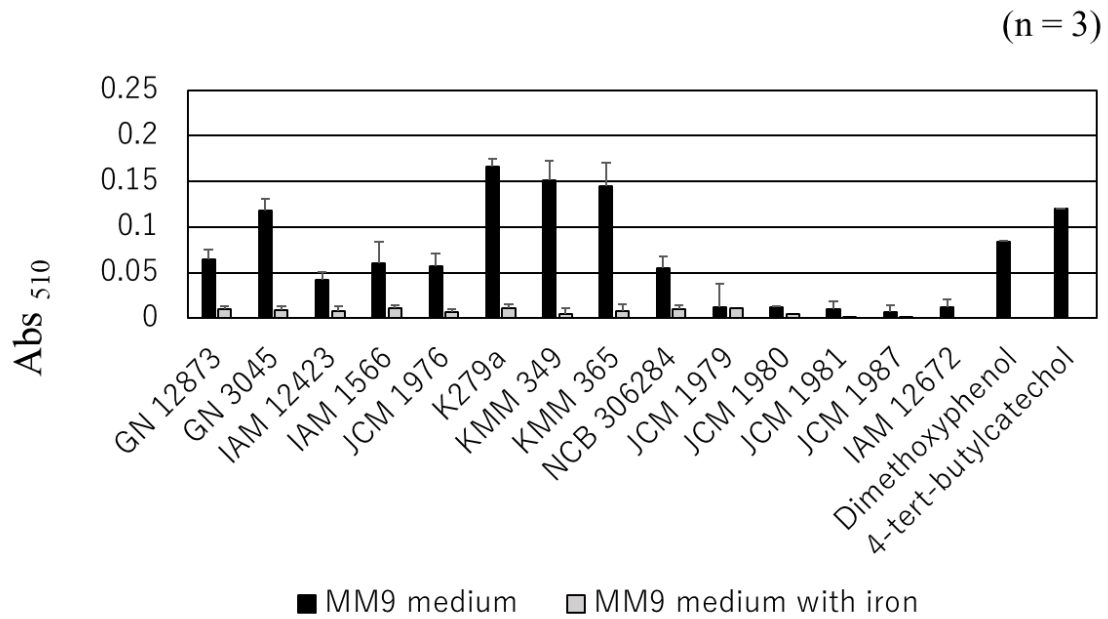


Figure 2-3-1 Arnow assay カテコール型シデロフォア検出結果

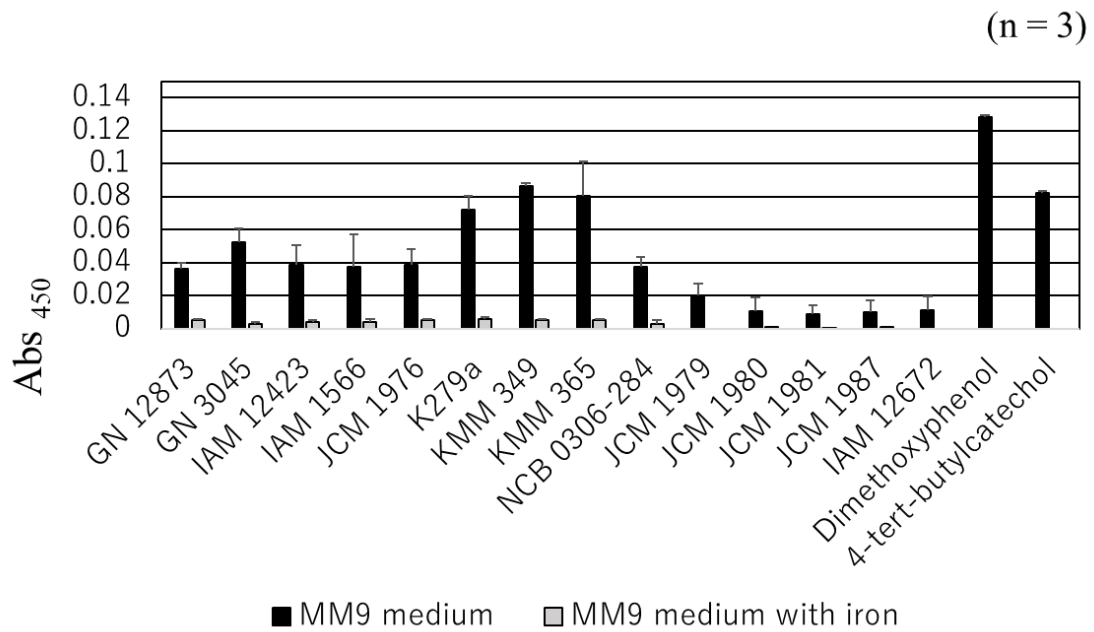


Figure 2-3-2 Arnow assay フェノール型シデロフォア検出結果

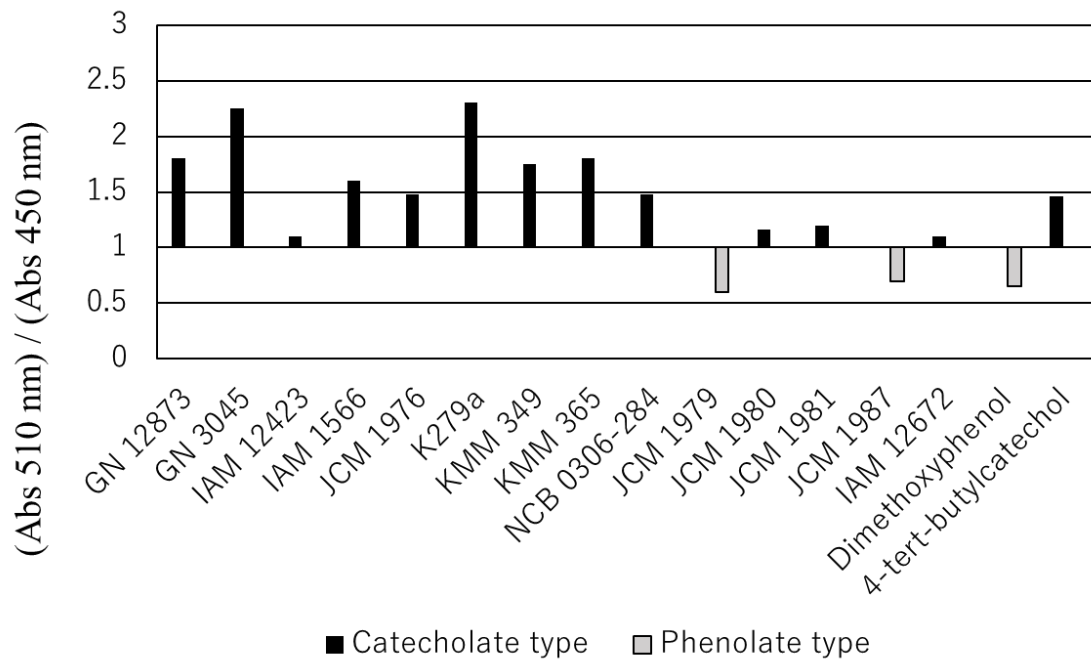


Figure 2-3-3 Arnow assay 吸光度比算出結果

第4節 ヒドロキサム酸型シデロフォア

S. maltophilia K279a 株はヒドロキサム酸型シデロフォア非産生株であることが知られている。しかし、その他供試菌株のヒドロキサム産型シデロフォアの知見はない。そこで、本節では供試菌株のヒドロキサム酸型シデロフォアの産生能を評価した。

【実験方法】

ヒドロキサム酸型シデロフォアの推定を行うにあたり、Csaky assay を用いた⁽²¹⁾。本試験は反応する色の違いによりヒドロキサム酸型シデロフォアを確認することができる。第1節と同様に粗シデロフォアサンプルを得て試験を行った。粗シデロフォアサンプル 1 ml と 1 ml スルファニル酸溶液（10 g のスルファニル酸を 1L の 30%酢酸に溶解）を混合し 0.5 ml ヨウ素溶液（1.3 g のヨウ素を 100 ml の酢酸に溶解）を添加後 3 min 静置した。1 ml ヒ素ナトリウム溶液（2 g のヒ素ナトリウムを 100 ml の Milli-Q water に溶解）を添加し 1 ml α ナフチルアミン溶液（3 g のナフチルアミン溶液を 1L の 30%酢酸に溶解）を添加し 20 min 静置後、Abs 520 nm で吸光度を測定した。

【結果】

Figure 2-4-1 に示すように全ての株において鉄無添加条件においても鉄添加条件においても同程度の吸光値を示した。シデロフォアは鉄無添加条件でのみ産生されることが知られていることから、本研究に使用した *S. maltophilia* はヒドロキサム酸型シデロフォアを産生しないことを確認した。

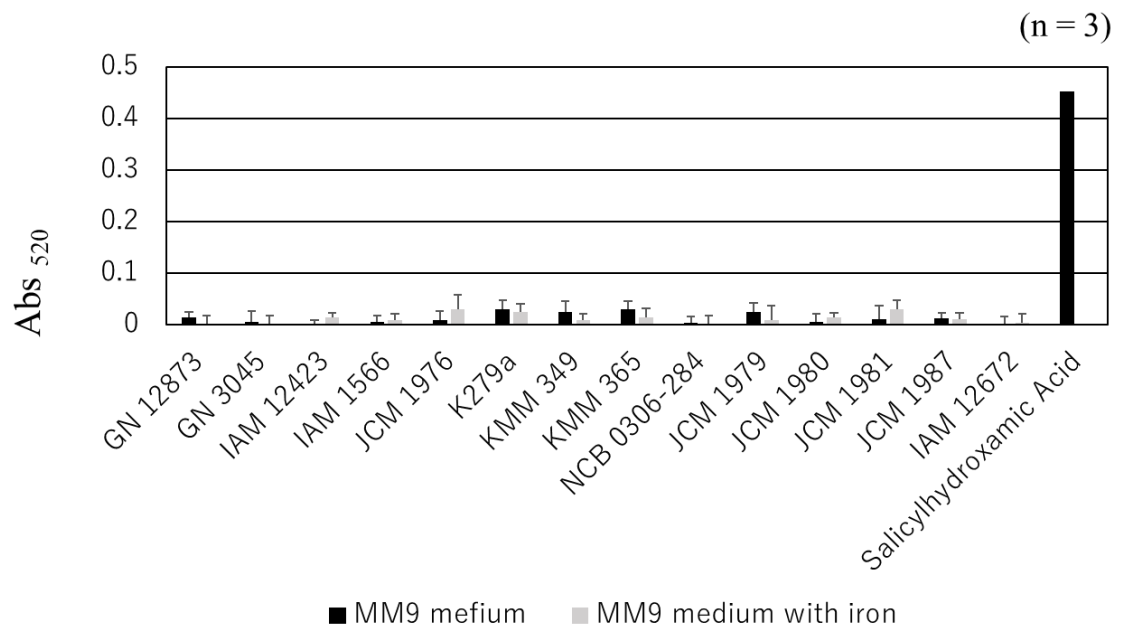


Figure 2-4-1 Csaky assay 検出結果

第5節 カルボン酸型シデロフォア

S. maltophilia のカルボン酸型シデロフォア産生能については知見がない。そこで、本節では供試菌株のカルボン酸型シデロフォアの産生能を評価した。

【実験方法】

カルボン酸型シデロフォアの推定を行うにあたり、Chemical test を用いた⁽²²⁾。本試験は酸性であるカルボン酸型シデロフォアがフェノールフタレインの赤色を脱色することで確認することができる。また吸光度での活性の比較も行った。第2節と同様に粗シデロフォアサンプルを得て試験を行った。0.5 N NaOH 3 ml とフェノールフタレイン液 1 ml を混合し粗シデロフォアサンプルを加え、Abs 280 nm により吸光度を測定した。

【結果】

Figure 2-5-1 に示すように全ての株において鉄無添加条件においても鉄添加条件においても同程度の吸光値を示した。シデロフォアは鉄無添加条件でのみ産生されることが知られていることから、本研究に使用した *S. maltophilia* はカルボン酸型シデロフォアを産生しないことを確認した。

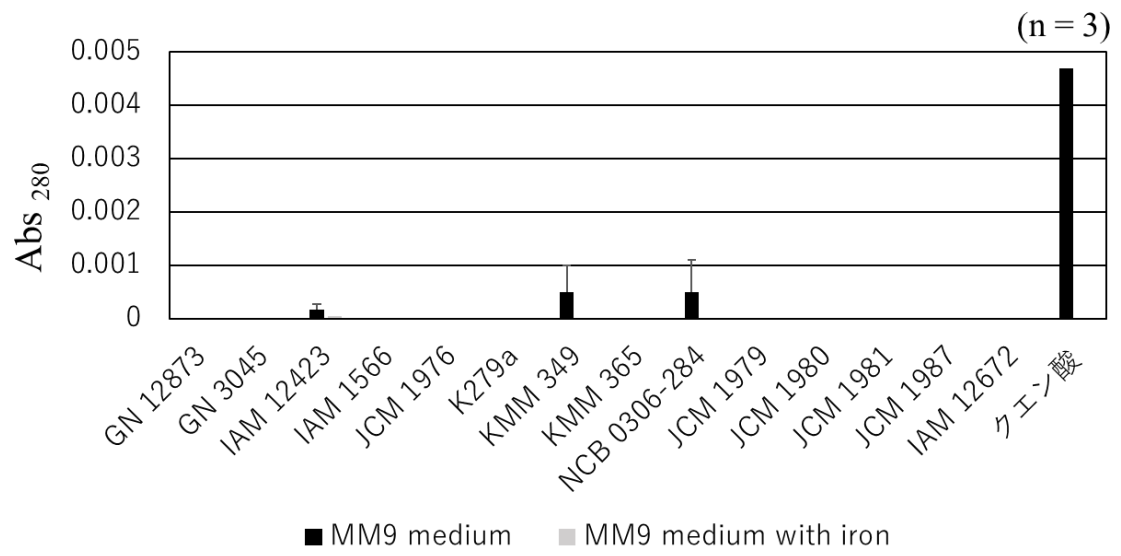


Figure 2-5-1 Chemical test 結果

第6節 鉄無添加継代培養時の生育について

第1節において鉄無添加培地における生育を確認したが、より鉄飢餓状態が継続された条件での生育については知見がない。そこで、鉄無添加培地による鉄飢餓継代培養時の生育を確認した。

【実験方法】

2 ml の NB 培地にて 30°C, 24 h, 160 rpm の条件で前培養した。前培養した供試菌株を 5,725xg, 3 min の条件で遠心分離後、0.85%の生理食塩水に懸濁することで菌体の洗浄をした。この操作を3回繰り返した後、1% 当量を 2ml MM9 培地 (Table 2-1-1) に接種し 30°C, 24h, 160 rpm の条件で培養した。培養後の菌液 1% 等量を鉄無添加培地に接種し培養した。この操作を繰り返して計5回継代培養を行い Abs 660 nm により生育を測定した。

【結果と考察】

Figure 2-6-1 に示すように全ての供試菌株において鉄無添加条件での継代培養を繰り返すことで生育が低下した。しかし、5回の継代培養においては依然として生育することから、試験管内に少量の鉄が残留していることなどが生育を示す要因であると考えられた。

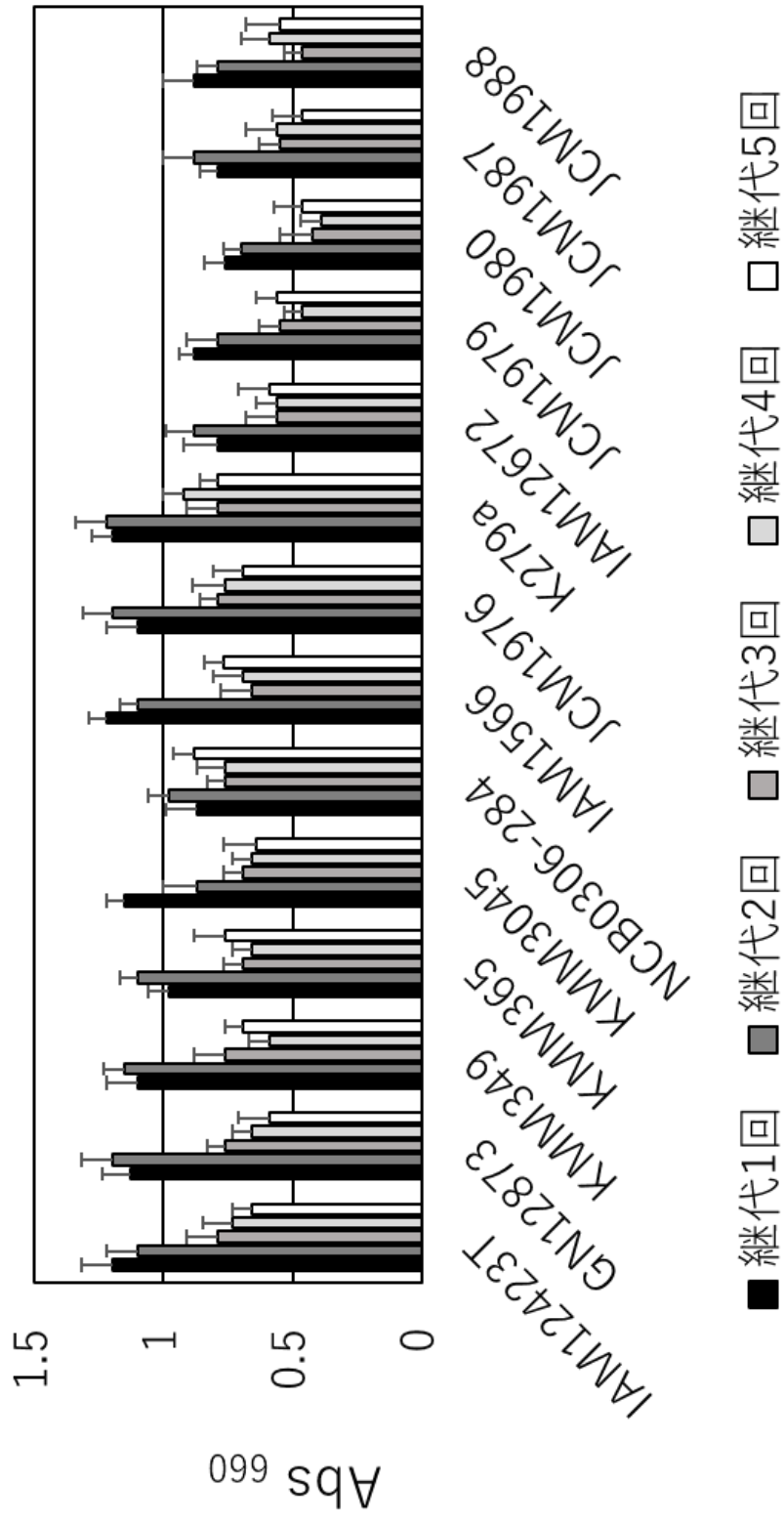


Figure 2-6-1 鉄飢餓継代培養時の生育結果

第7節 鉄無添加継代培養時に産生されるシデロフォアタイプについて

鉄無添加培地において継代培養を繰り返すことで産生されるシデロフォアタイプに影響を及ぼすか評価をした。

【実験方法】

本章第5節と同様に前培養や菌体洗浄後、MM9培地に接種し30℃、24 h、160 rpmの条件で培養した。培養後、1%当量をMM9培地に接種し30℃、24 h、160 rpmの条件で培養した。この操作を繰り返して計5回継代培養をした。また、継代ごとに本章2節、3節、4節、5節で用いた各試験をした。

【結果と考察】

Table 2-7-1に示すようにCAS assayを行った結果、全ての継代培養時において全ての株でシデロフォア活性を確認した。加えて、Arnow assayを行った結果、継代1~4回は第2節と同様の結果が得られたが継代5回目はKMM 365株、IAM 1566株、IAM 12423株がフェノール型シデロフォアを産生した。第3節と同様にカテコール型シデロフォアとフェノール型シデロフォアの活性比を算出した結果、これらの株はフェノール型シデロフォアを主に産生していることが明らかとなった。よって、鉄飢餓状態が続くことがシデロフォア構造に影響を与えることが考えられた。一方、ヒドロキサム酸型やカルボン酸型シデロフォアは産生しなかった。

Table 2-7-1 鉄飢餓継代培養結果

菌株	1~4 回継代培養時の シデロフォアタイプ	5 回継代培養時の シデロフォアタイプ
IAM 12423 ^T	カテコール型	フェノール型
GN 12873	カテコール型	カテコール型
KMM 349	カテコール型	カテコール型
KMM 365	カテコール型	フェノール型
KMM 3045	カテコール型	カテコール型
NCB 0306-284	カテコール型	カテコール型
IAM 1566	カテコール型	フェノール型
JCM 1976	カテコール型	カテコール型
K279a	カテコール型	カテコール型
IAM 12672	カテコール型	カテコール型
JCM 1979	フェノール型	フェノール型
JCM 1980	カテコール型	カテコール型
JCM 1987	フェノール型	フェノール型
JCM 1988	カテコール型	カテコール型

小括

本章では *S. maltophilia* の産生するシデロフォア活性やそのタイプを明らかにした。シデロフォア活性は Biovar II 群よりも Biovar I 群が強く、全ての株が鉄無添加条件において CAS 溶液を脱色した。また、Biovar I 群の全ての株がカテコール型シデロフォアを主に産生していた。一方、Biovar II 群にはカテコール型シデロフォアやフェノール型シデロフォアを主に産生する株を確認した。本研究によって全ての供試菌株はヒドロキサム酸型シデロフォアやカルボン酸型シデロフォアを産生しないことを確認した。以上より *S. maltophilia* はカテコール型シデロフォアやフェノール型シデロフォアを主に産生する菌種であることを明らかにした。

また、*S. maltophilia* KMM 365 株、IAM 1566 株、IAM 12423 株は鉄無添加条件にて繰り返し継代培養することで、Arnow assay ではフェノール型シデロフォアを主に検出した。同時にカテコール型シデロフォアの活性が低くなることから、鉄飢餓が続くことでカテコール型シデロフォア産生が減少し、主にフェノール型シデロフォアを産生することが明らかとなった。本研究により新しく *S. maltophilia* がフェノール型シデロフォアを産生することを明らかにしたが、大量精製の技術は未だ確立していない。*S. maltophilia* の産生するフェノール型シデロフォアを大量精製する手法開発や、その生合成遺伝子を解明することがシデロフォア構造の解明につながることを考えられた。

第3章 *S. maltophilia* K279a 株の産生する

カテコール型シデロフォアの構造決定

序文

前章にて *S. maltophilia* が産生するシデロフォアタイプが明らかとしたが、その他の情報は不足している。特に *S. maltophilia* K279a が産生するカテコール型シデロフォアに関しては構造の予測などの研究がなされているが、未だ明らかではない⁽³⁾。シデロフォア構造を明らかにすることで、薬剤の開発などの応用につながる可能性がある。そこで本項目では *S. maltophilia* が産生するカテコール型シデロフォアの構造決定を行う。

第1節 シデロフォアの一次精製と LC/MS による検出

S. maltophilia の産生するカテコール型シデロフォア構造を決定するために大量培養法により多量のシデロフォアを回収した。また、一次精製によりシデロフォアを精製し LC/MS 解析によってその構造を推定した。

【実験方法】

供試菌株を 2 mL の NB 培地に接種し、30°C、160 rpm で 24 h 培養した。その後、培養液 300 μ l を 30 mL の NB 培地に接種し、30°C、160 rpm で 24 h 培養した。細胞を生理食塩水で洗浄し、30 ml の生理食塩水に懸濁した。懸濁液の 1 ml を 100 ml の MM9 培地と鉄添加 MM9 培地に接種し、30°C、160 rpm で 24 h 培養した。最後に、1,000 ml の MM9 培地と鉄添加 MM9 培地で、30°C、160 rpm で 48

h 培養した。22,540xg で 30 min 遠心分離して菌体を除去し、0.2 μ m フィルター (ADVANTEC 25CS020AN) を用いて菌体をさらに濾過した。

大量培養法によって得たシデロフォア試料 1 L を 6 N 塩酸で pH 5 に調整し、XAD4 (Amberlite 102426639) を充填したカラムに添加した。添加後、110 mL の Milli-Q water でカラムを洗浄し、シデロフォアを 50% メタノール 110 ml で溶出した⁽²³⁾。これら全ての操作は流速 8 mL/min で行った。CAS assay に反応したメタノール画分を回収し、エバポレーターを用いて濃縮した。

一次精製したシデロフォア試料の精製度と質量は、LC/MS を用いて分析した。カラムは Scherzo SM-C18 (Imtakt, Kyoto, Japan) を 40°C の温度条件で使用した。測定は、Agilent G6530B Q-TOF LC/MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。水系溶媒にはギ酸 (0.1%, Milli-Q-water で希釈) を、有機系溶媒にはアセトニトリルを用いた。測定は、3.0 μ L の注入量で行い、溶出は 0.1% ギ酸 (A) とアセトニトリル (B) を用いて行った。分析条件を Table 3-1-1, Table 3-1-2 に示す。

Table 3-1-1 LC/MS 分析条件

分析機器	Agilent G6530B Q-TOF LC/MS System (Agilent Technologies 社)
溶離液 A	0.1% ギ酸 (Milli-Q water を希釈)
溶離液 B	アセトニトリル
サンプル注入量	3.0 μ L
カラム	Discovery HS F5 (2.1 mm x 250 mm)
イオン検出モード	Negative

Table 3-1-2 溶媒条件

Flow time (min)	A	B	Flow
0.0~2.00min	95.0%	5.0%	0.200ml/min
2.00~12.00min	5.0%	95.0%	0.200ml/min
12.00~17.00min	0.0%	100%	0.400ml/min
17.00~17.10min	0.0%	100%	0.400ml/min
17.10~23.00min	95.0%	5.0%	0.400ml/min

【結果と考察】

Figure 3-1-1, 3-1-2, 3-2-3 に示すように、クロマトグラムにおいてピークが数種類検出され、精製が不十分であることが考えられた。質量分析と分子式推定をした結果、全ての Biovar I 群において 5.1 min のリテンションタイムに既知のシデロフォアである 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) とデータベース上で推定される $m/z = 240$ のピークを確認した (Figure 3-1-4)。一方、Biovar II 群のピークからはシデロフォアは検出されなかった (Figure 3-1-5)。これはシデロフォアの濃度が LC/MS の検出限界以下であることや、LC/MS 内のデータベースには登録のないシデロフォアであることが考えられた。

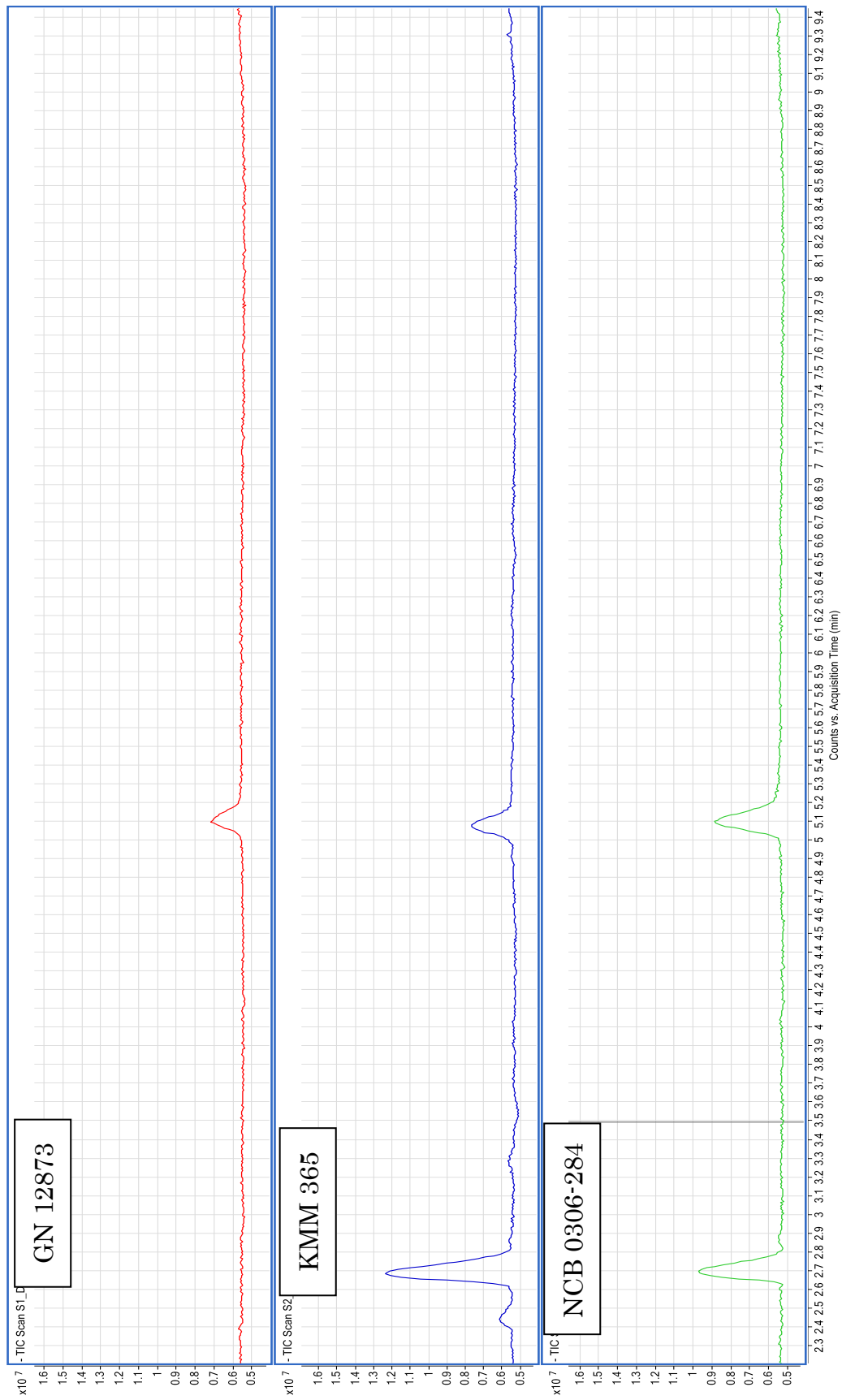


Figure 3-1-1 Biovar I 群の産生するシデロフォアの LC/MS 解析

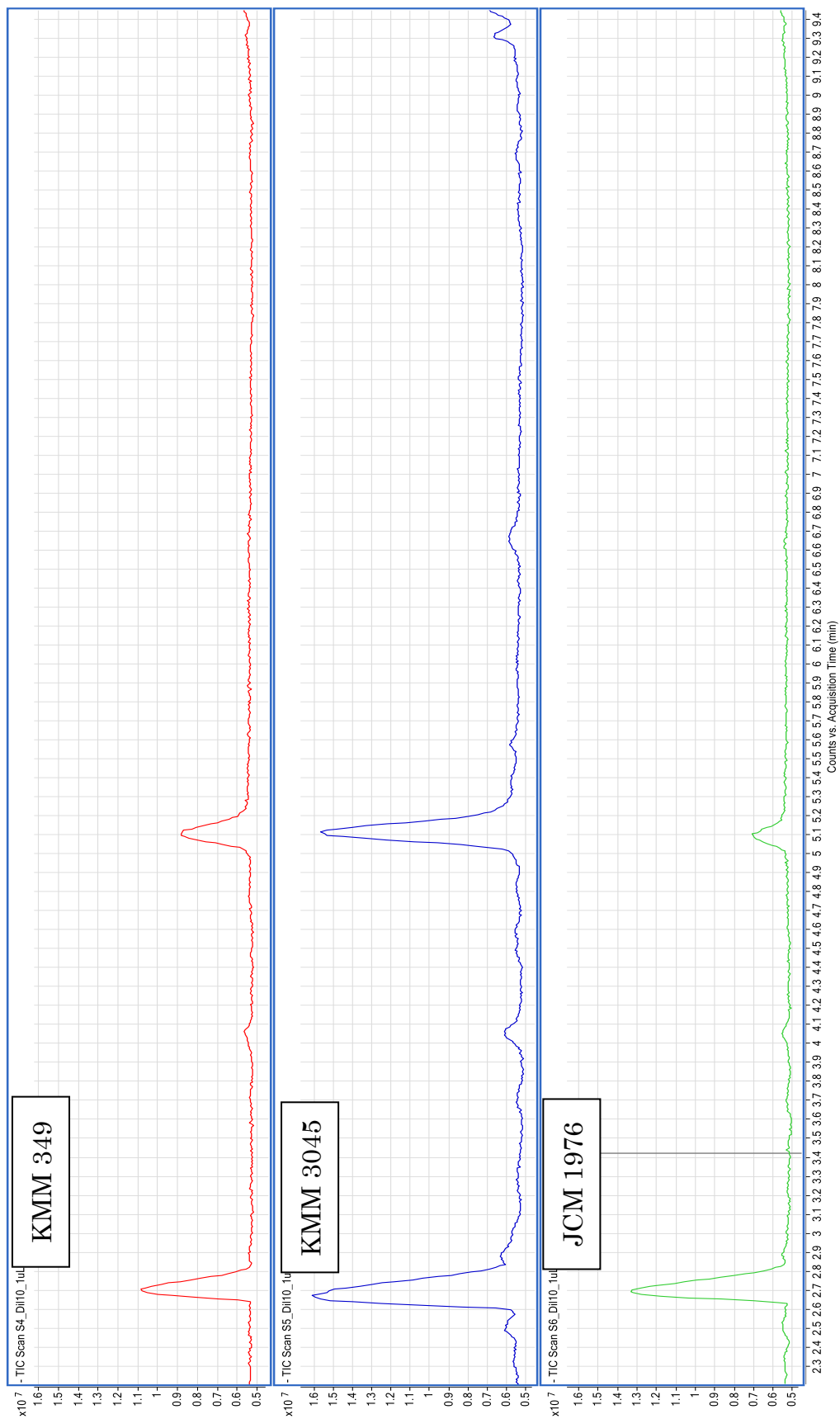


Figure 3-1-2 Biovar I 群の産生するシデロフロアの LC/MS 解析

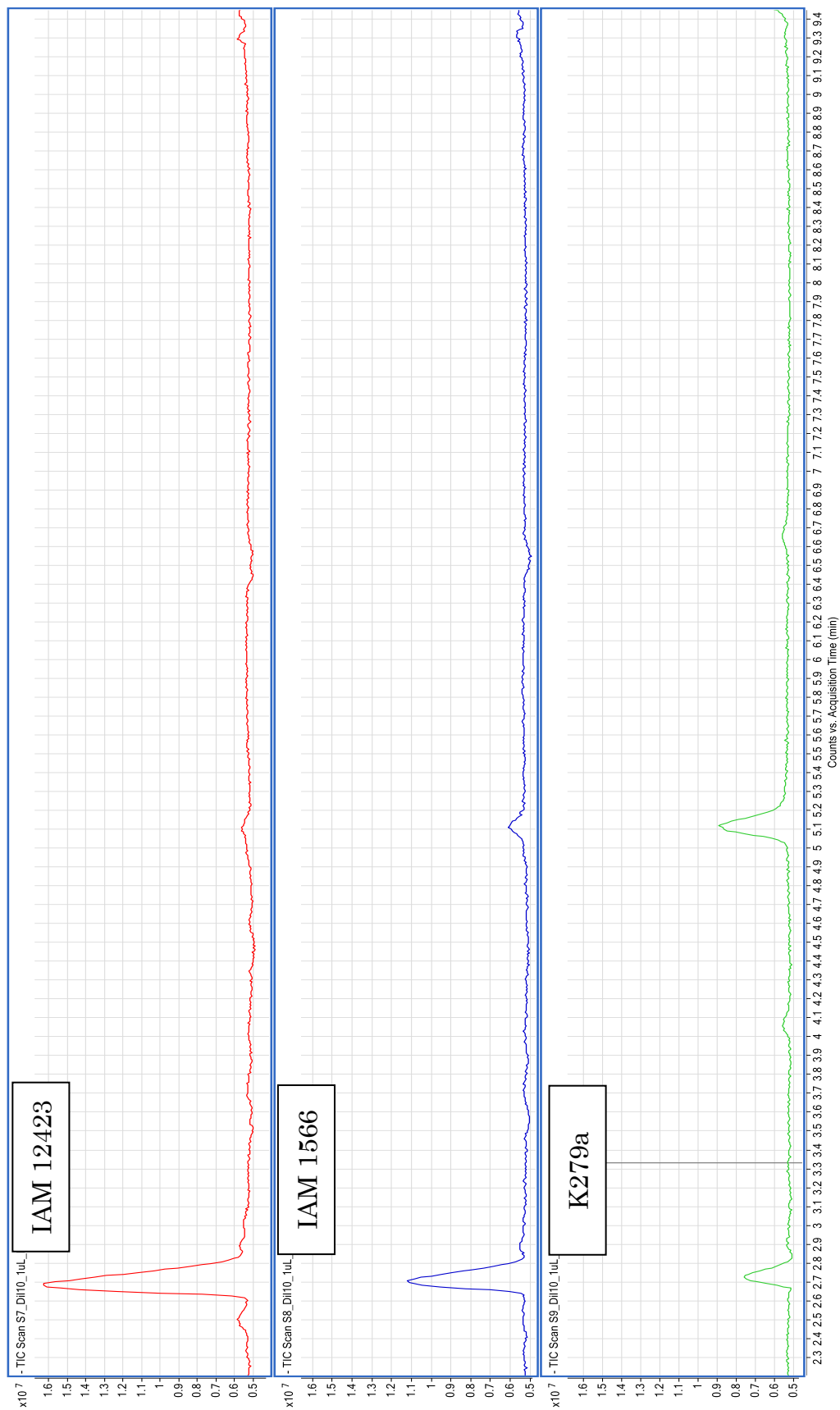


Figure 3-1-3 Biovar I 群の産生するシデロフォアの LC/MS 解析

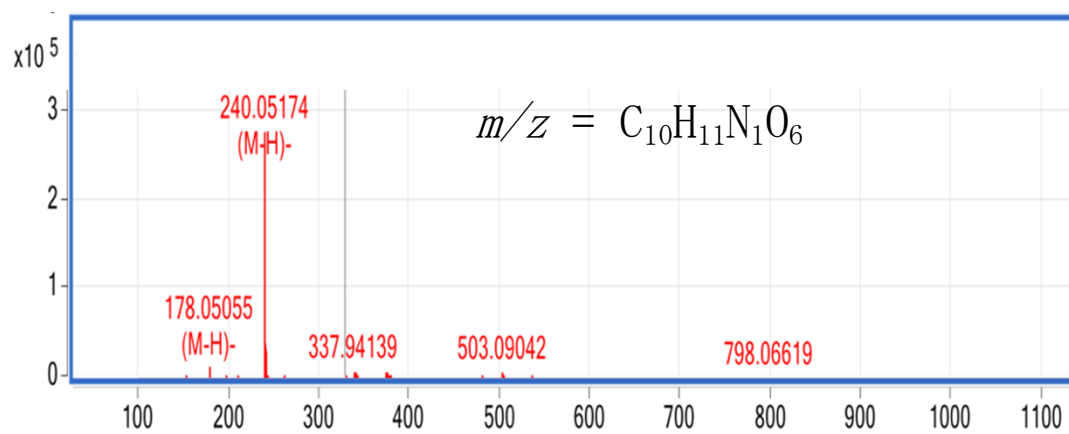


Figure 3-1-4 Biovar I 群の産生するシデロフォア質量 (RT 5.1 min)

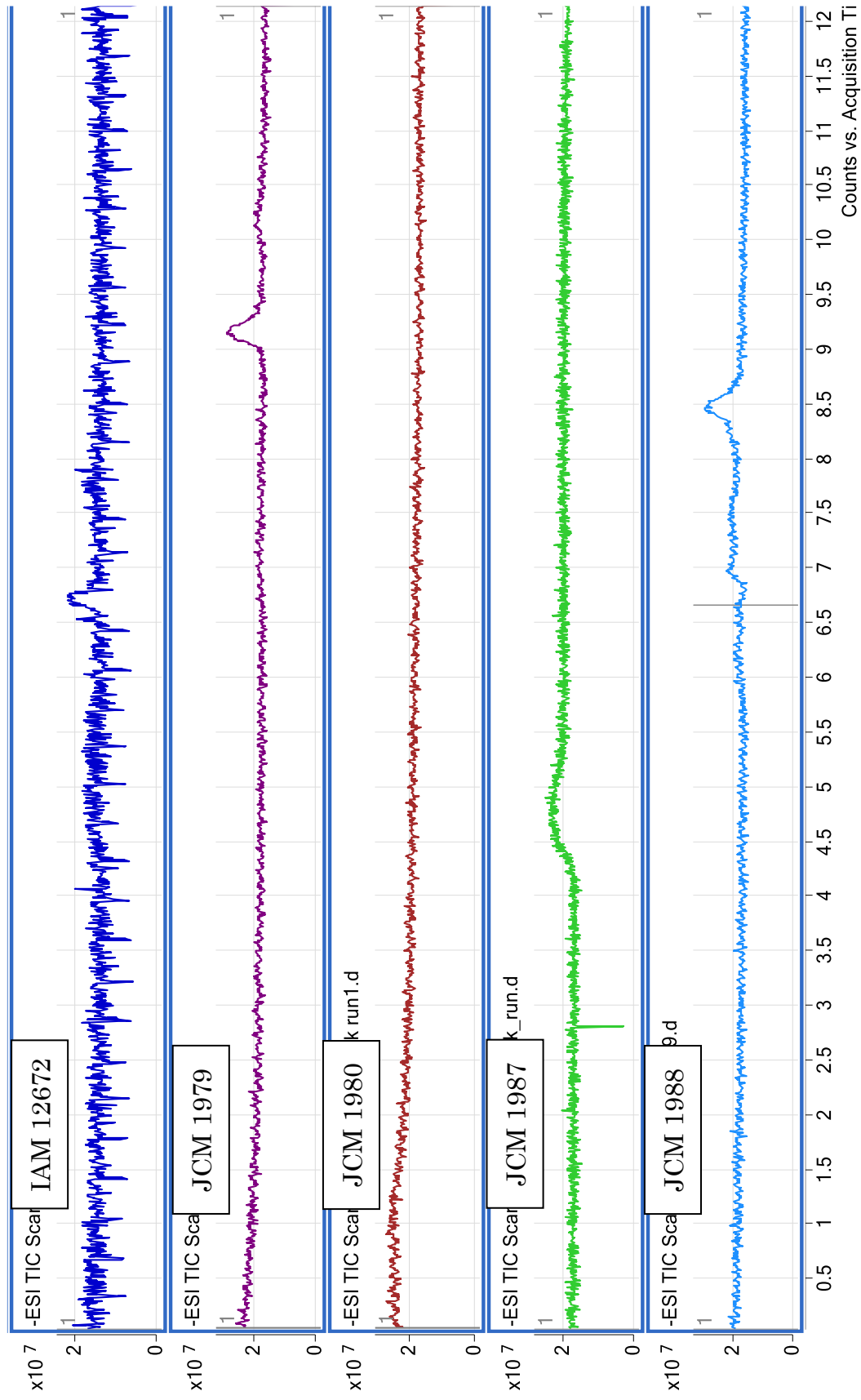


Figure 3-1-5 Biovar II 群の產生するシデロフォアの LC/MS 解析

第2節 シデロフォアの二次精製と LC/MS による検出

一次精製のみではシデロフォアの精製が不十分であると考えられたため、本節ではさらに精製を行い、LC/MS 解析によりその精製度を確認した。

【実験方法】

供試菌株の内、カテコール型シデロフォア産生の知見がある *S. maltophilia* K279a 株を用いた。第1節にて一次精製した *S. maltophilia* K279a 株のシデロフォア試料 400 μ l を、Asahipak Shodex ODP-90 20F (20.0 mm \times 300 mm) HPLC カラムに注入し、10%アセトニトリル、90% Milli-Q water, 0.05% Tri Fluoroacetic Acid (TFA) を含む溶液を用いて溶出した。HPLC は島津社の CBM-20A system controller, SPD-M10AVP diode array detector, FRC-10A fraction collector, LC-10AD liquid feeding unit, DGU-12A degassing unit, SIL-10A injector と CTO-10A column oven を用いた。流速 2 mL/min, カラム温度 40°C の条件で 250 min 間測定した。得られた各ピークを分取し、それぞれの画分に対し CAS assay と Arnow assay を行った。

【結果】

確認した全てのピークを分取し、CAS assay や Arnow assay をした結果、117 ~145 min の画分においてカテコール型シデロフォアを確認した (Figure 3-2-1, 3-2-2)。この画分をシデロフォア試料として次の実験に使用した。

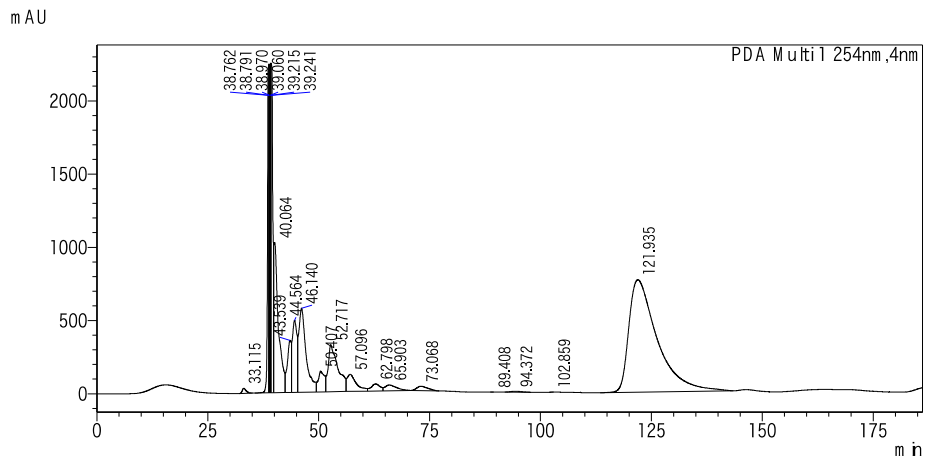


Figure 3-2-1 HPLCによるシデロフォア分取

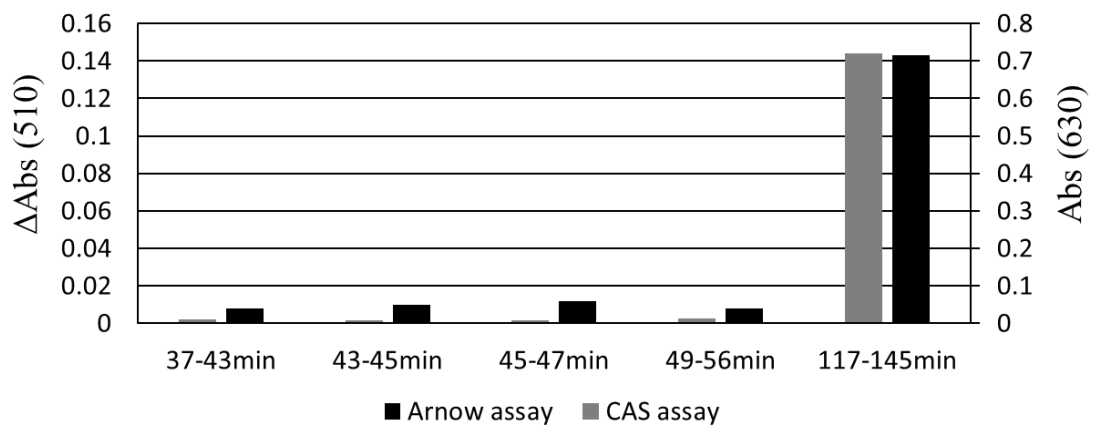


Figure 3-2-2 HPLCによる分取画分のCAS assayとArrow assay

【実験方法】

第 1 節と同様の方法を用いて得られたシデロフォアの精製度を LC/MS を用いて確認した。

【結果と考察】

第 1 節により得られたクロマトグラムに比べ、多くのピークが消失していることが確認できた (Figure 3-2-3)。また、クロマトグラムの 27 min~28 min に DHBS と推定される $m/z = 240$ のピークを確認した (Figure 3-2-4)。以上のことから一次精製と二次精製を組み合わせることで単一であるシデロフォアが得られることが考えられた。これを精製シデロフォア試料とした。

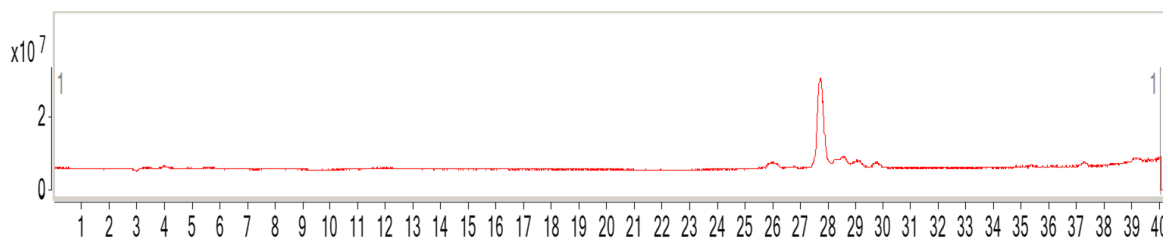


Figure 3-2-3 LC/MS によるシデロフォア精製度の確認

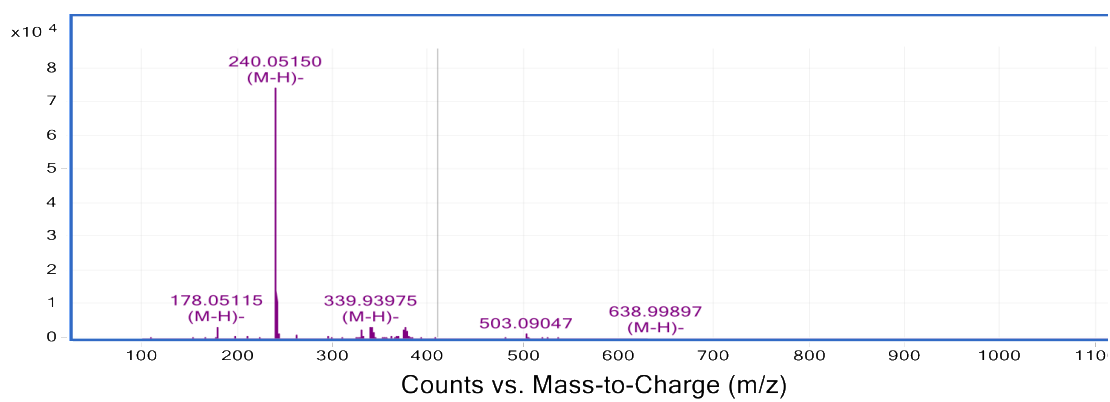


Figure 3-2-4 の產生するシデロフォア質量 (RT 27.9 min)

第3節 NMRによるシデロフォアの構造決定

二次精製によって純度の高いシデロフォアが得られたため、シデロフォアの構造を決定するためにNMRを用いた構造解析をした。

【実験方法】

第2節にて二次精製したシデロフォア試料を凍結乾燥し、1 mLのDMSO-d₆ (Fujifilm 044-34292)に溶解した。この試料を窒素で満たしたNMRチューブに添加し¹H-NMRおよび¹³C-NMR分析を行った。NMRはJEOL RESONANCE JNM-ECXII (日本電子社)を用いた。

【結果】

¹H-NMRおよび¹³C-NMRから得られた化学シフトの値を過去の報告⁽²⁴⁾と比較したところ、DHBSとして報告されている値と非常に近い結果を示した (Figure 3-3-1)。¹H-NMR解析の結果、C β -Hのシグナル3.82 ppm (dd, 11.5, 5.1 Hz)と3.76 ppm (dd, 11.5, 3.6 Hz)、C α -Hのシグナル4.46 ppm (dd, 7.6, 5.1, 3.6 Hz)、アミドNHのシグナル8.81 ppm (dd, 7.6 Hz)から、化合物にセリンが含まれていることが明らかになった。また、2,3-dihydroxybenzoyl基部分の芳香族は、7.32 ppm (dd, 8.8, 1.4 Hz), 6.93 ppm (dd, 7.7, 1.4 Hz), 6.72 ppm (dd, 8.8, 7.7 Hz)であり、それぞれH-6, H-4, H-5に割り当てられた。¹³C-NMRの解析結果は、これまでの報告の値と一致した⁽²²⁾。(Figure 3-3-2)。セリン部分は55.5 (C α), 61.4 (C β), 172.3 (CO₂H) ppmのシグナルに、2,3-dihydroxybenzoyl基部分は116.7 (C-1), 148.2 (C-2), 146.3 (C-3), 119.4 (C-4), 119.19, 119.22 (C-5, C-6) ppmのシグナル (Figure 3-3-3)、および

168.7 (CONH) ppm のシグナルで確認された。また、DHBS の分子量は 241 であり LC/MS 解析により得られた m/z 値とも合致する。以上のことから、NMR 解析により、*S. maltophilia* K279a が生産するシデロフォアは、カテコール型である 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) と一致することがわかった (Figure 3-3-4)。

LC/MS 解析により得られた Biovar I 群の m/z 値も同様であったことから、Biovar I 群の産生するシデロフォアは DHBS であることが明らかとなった。

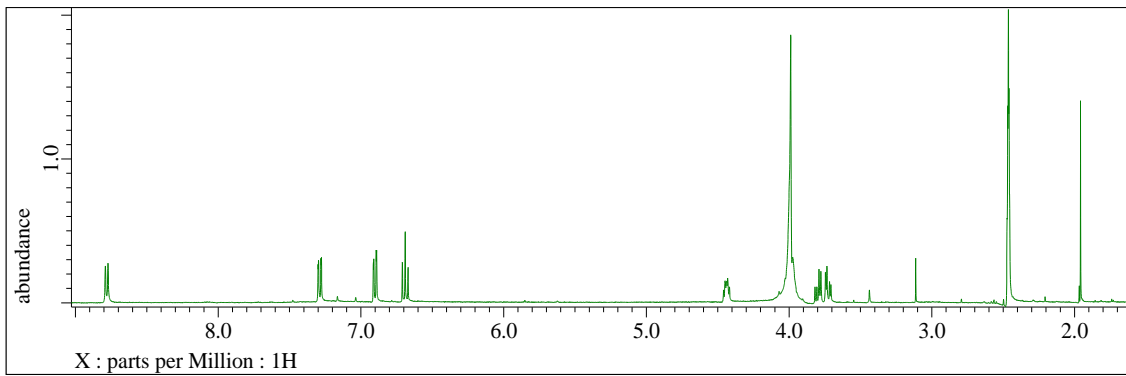


Figure 3-3-1 ¹H-NMR 解析結果

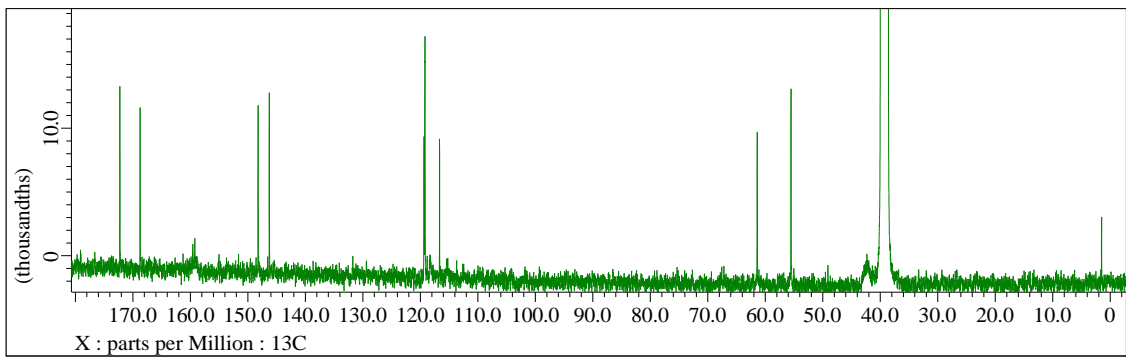


Figure 3-3-2 ¹³C-NMR 解析結果

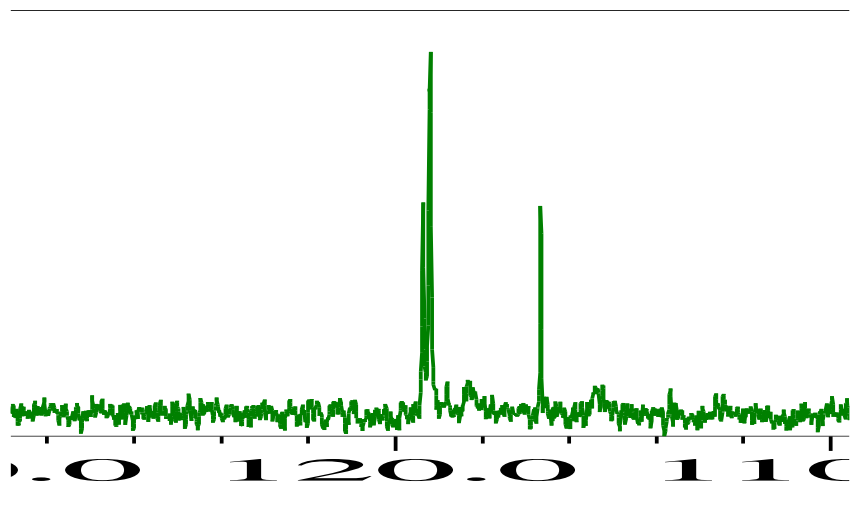


Figure 3-3-3 ¹³C-NMR 119ppm 付近化学シフト値の詳細

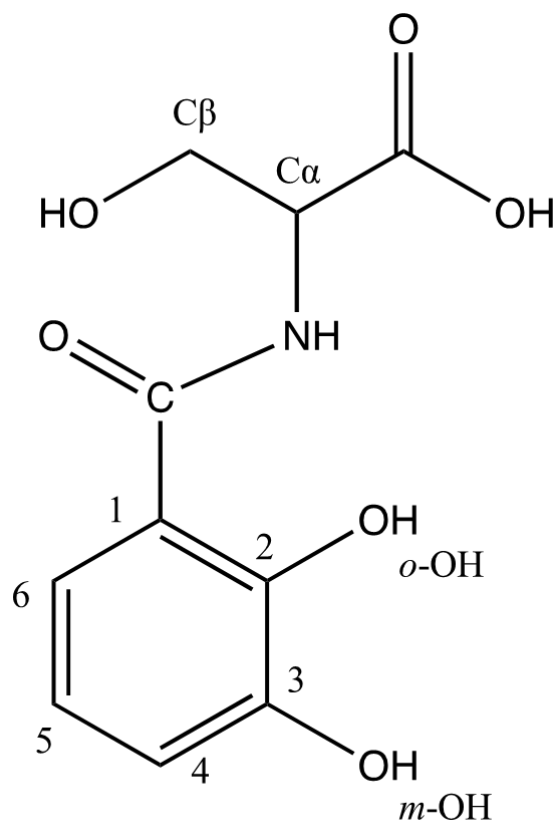


Figure 3-3-4 構造解析結果

小括

本研究により *S. maltophilia* K279a 株の産生するカテコール型シデロフォアを得る大量培養法を確立した。本手法は大量の鉄無添加培地を使用することで細菌のシデロフォア産生を誘導する方法であり、*S. maltophilia* 以外の細菌のシデロフォア産生の誘導にも応用可能であると考えた。また、カテコール型シデロフォアである DHBS の精製法を本研究により確立した。DHBS の精製は XAD4 カラムによるイオン交換クロマトグラフィー法のみでは不十分であり、逆相カラムを用いた HPLC での精製を組み合わせることで、単離が可能であることが明らかとなった。本手法はカテコール型シデロフォアなどの酸性化合物を精製する手法であり、CAS assay や Arnow assay などの検出法を組み合わせることで、DHBS 以外のカテコール型シデロフォアの精製も可能であることが考えられた。また、NMR 解析の結果、そのスペクトルは DHBS のスペクトルと一致した。*S. maltophilia* K279a 株やその他 Biovar I 群の産生するシデロフォア構造は明らかではなかったが、本研究により初めてその構造を明らかにした。*S. maltophilia* は日和見感染菌として知られているため、DHBS をターゲットとした薬剤開発が *S. maltophilia* の感染の制御につながることを考えられた。

第4章 *S. maltophilia* K279a の DHBS 合成遺伝子と合成経路の推定

序文

S. maltophilia K279a 株は大腸菌などが産生する DHBS の三量体であるエンテロバクチンを合成するための遺伝子群の一部を保有しているが⁽¹³⁾、前章においてその産生は確認できなかった。さらに、エンテロバクチンを利用した鉄の取り込みができないことが知られている⁽¹⁴⁾。また、既知のエンテロバクチンの合成経路の中間体に DHBS はないことから、エンテロバクチン合成経路周辺に新規な DHBS 合成経路があると考えられる。DHBS 合成経路を解明することで DHBS を産生する微生物の推定や、病原菌の DHBS 合成を阻害する薬剤開発への応用に期待ができる。そこで、本項目ではゲノム情報から *S. maltophilia* 株の DHBS 合成経路を推定した。

第1節 エンテロバクチン生合成経路関連遺伝子の探索

S. maltophilia の DHBS 合成経路を推測するために *S. maltophilia* K279a 株がエンテロバクチン合成関連遺伝子を保有しているかゲノム情報から探索した。

【解析方法】

Blast (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて供試菌株の塩基配列からエンテロバクチン合成遺伝子を探索した。遺伝子の比較対象株としてエンテロバクチン産生の報告がある *Escherichia coli* K-12 株を使用した。遺伝子

の同定基準は相同性 70%以上かつ Evalue が e^{-30} 以下とした。

【結果と考察】

Table 4-1-1 に示すように *S. maltophilia* K279a 株のエンテロバクチン合成系のゲノムを解析した結果、コリスミ酸からエンテロバクチンを合成する代謝に関する遺伝子のうち *entABCEF* 遺伝子は存在したものの、*entD* 遺伝子のみが欠失していた。さらに、エンテロバクチンへと環化されなかった DHB を再環化するために機能する *entH* 遺伝子も欠失していた。また、供試菌株の Biovar I 群においても同様に *entD*, *entH* 遺伝子が欠失していた。一方、Biovar II 群はエンテロバクチン合成遺伝子である *ent* 系統の遺伝子を保有していなかった。*S. maltophilia* K279a 株や Biovar I 群がエンテロバクチンを産生しない要因としてこれら遺伝子が欠失していることが影響すると考えられた。

EntD は EntB や EntF を活性化する機能を持つ⁽²⁵⁾。活性化された EntB や EntF は反応の足場となり 3 分子の 2,3-dihydroxybenzoate (DHB) を修飾し環化させてエンテロバクチンを合成するために必須である。したがって、*entD* の欠失はエンテロバクチンの合成を阻害する可能性が考えられた。過去の報告から *entF* が機能しないことでホスホパントテン酸補因子が反応の足場となり DHBS が合成されることが知られている⁽²⁶⁾。よって、*S. maltophilia* K279a 株においても *entD* が欠失することで *entF* が機能せず、ホスホパントテン酸補因子が反応の足場となることで DHBS を合成することが考えられた。

Table 4-1-1 *S. maltophilia* K279a 株のシデロフォア合成遺伝子

エンテロバクチン関連遺伝子	遺伝子	相同性 (%)	Evalue
生合成系 遺伝子	<i>entA</i>	98%	e^{-50}
	<i>entB</i>	83%	$2e^{-64}$
	<i>entC</i>	81%	e^{-57}
	<i>entD</i>	-	-
	<i>entE</i>	98%	e^{-150}
	<i>entF</i>	95%	0
	<i>entH</i>	-	-

第2節 エンテロバクチントランスポーター生合成経路関連遺伝子の探索

S. maltophilia のエンテロバクチン排出や取り込みのための遺伝子について報告がないため、本節ではそれら遺伝子の有無を確認した。

【解析方法】

Blast (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて供試菌株のエンテロバクチン排出や取り込み遺伝子を探索した。遺伝子の比較対象株としてエンテロバクチン産生の報告がある *Escherichia coli* K-12 株を使用した。遺伝子の同定基準は相同性 70%以上かつ Evalue が e^{-30} 以下とした。

【結果と考察】

Table 4-2-1 に示すように *S. maltophilia* K279a 株は鉄-エンテロバクチン複合体を取り込むために必要な *fepA* 遺伝子や、複合体を加水分解し鉄を獲得するために必要な *fes* 遺伝子を欠失していた。また、エンテロバクチンの排出のために必要な *mfs* 遺伝子も存在しなかった。これは Biovar I 群にも共通しており、*S. maltophilia* K279a 株を含む Biovar I 群はエンテロバクチンを排出することや取り込む能力がないことが考えられた。一方、Biovar II 群には *cirA* や *fiu* 遺伝子のみ存在を確認した。これらの結果から Biovar II 群の株はエンテロバクチンなどのカテコール型シデロフォアの排出や取り込みをしないことが考えられた。

Table 4-2-1 *S. maltophilia* K279a 株のシデロフォア排出・取り込み遺伝子

エンテロバクチン関連遺伝子	遺伝子	相同性 (%)	Evalue
排出系 遺伝子	<i>mfs</i>	-	-
	<i>tolC</i>	87%	6e ⁻⁵⁹
取り込み系 遺伝子	<i>fepB</i>	-	-
	<i>cirA</i>	95%	0
	<i>fiu</i>	91%	3e ⁻¹⁰⁷
加水分解系 遺伝子	<i>fes</i>	-	-

小括

S. maltophilia 株は大腸菌などが産生する DHBS の三量体であるエンテロバクチンを合成するための遺伝子群の一部を保有しているが、その産生や利用した鉄の取り込みができない。そこで、本章では *S. maltophilia* 株の DHBS 合成経路を推定した。Table 4-3-1 に示すように Biovar I 群は、*entABCEF* 遺伝子を保有していたが、*entD* 遺伝子が欠失していた。EntD の欠失がエンテロバクチンの合成を阻害していることが考えられた。また、*entD* が欠失することで *entF* が機能せず DHBS へと合成される要因になることが考えられた。一方、Biovar II 群はエンテロバクチン合成のための遺伝子を保有しなかった。このことが、エンテロバクチンや DHBS を産生しない要因であることが考えられた。また、全ての供試菌株は *entH* 遺伝子や *fes* 遺伝子、*fepA* 遺伝子が欠失しており、これが *S. maltophilia* がエンテロバクチンの産生や取り込みをしない要因であることが考えられた。

Table 4-3-1 *S. maltophilia* のエンテロバクテリン関連遺伝子まとめ

グループ	株番号	生合成系遺伝子		加水分解系遺伝子	排出系遺伝子		取り込み系遺伝子			
		<i>entABCEF</i> 遺伝子	<i>entD</i> 遺伝子	<i>fes</i> 遺伝子	<i>mfs</i> 遺伝子	<i>tolC</i> 遺伝子	<i>fepB</i> 遺伝子	<i>cirA</i> 遺伝子	<i>fiu</i> 遺伝子	
Biovar I	IAM 12423 ^T									
	GN 12873									
	KMM 349									
	KMM 365									
	KMM 3045	○				○				
	NCB 0306-284									
	IAM 1566		×	×	×		×	○	○	
	JCM 1976									
	K279a									
Biovar II	IAM 12672									
	JCM 1979							×		
	JCM 1980									
	JCM 1987	×								
	JCM 1988									
比較対象株	<i>E. coli</i> K-12	○	○	○	○	○	○	○	○	○

第5章 *S. maltophilia* K279a 株の DHBS 取り込み

序章

S. maltophilia K279a 株を含む Biovar I 群の株が DHBS を産生することが明らかとなったが、鉄と DHBS の複合体を取り込む報告はない。そこで、本章では *S. maltophilia* が DHBS をシデロフォアとして利用するか試験をした。

第1節 生育測定を用いた DHBS 取り込み能試験

S. maltophilia K279a 株が DHBS を利用するか判断するために、生育試験を用いた DHBS 利用能を評価した。

【実験方法】

MM9 培地に 500 nM の FeCl_3 を加えた鉄(III)培地と第3章にて得られた 500 nM の DHBS を加えた DHBS 培地、500 nM の FeCl_3 と DHBS を加えた鉄(III)-DHBS 培地を調製した。*S. maltophilia* K279a 株を NB 培地にて培養後、EDTA⁽²⁷⁾ を含むマレイン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、細胞表面の FeCl_3 などの培地成分を除去した。洗浄した細胞を MM9, DHBS, 鉄(III), 鉄(III)-DHBS 培地に接種し、定常期まで培養し生育を測定した。

【結果と考察】

生育測定をした結果、Figure 5-1-1 に示すように *S. maltophilia* K279a 株は 10 時間から 17 時間の培養期間で、鉄(III)-DHBS 培地にて、鉄(III)培地よりも良好に増殖し、その後はどちらの培地でも同じような増殖を示した。また、MM9 培

地と DHBS 培地において *S. maltophilia* K279a 株は、鉄を含む培地条件ほどの増殖はしなかった。この結果から、鉄(Ⅲ)-DHBS 複合体は *S. maltophilia* K279a 株の増殖の促進に関与することが明らかとなった。よって、*S. maltophilia* K279a 株は鉄(Ⅲ)-DHBS 複合体を利用した生育をすることが考えられた。

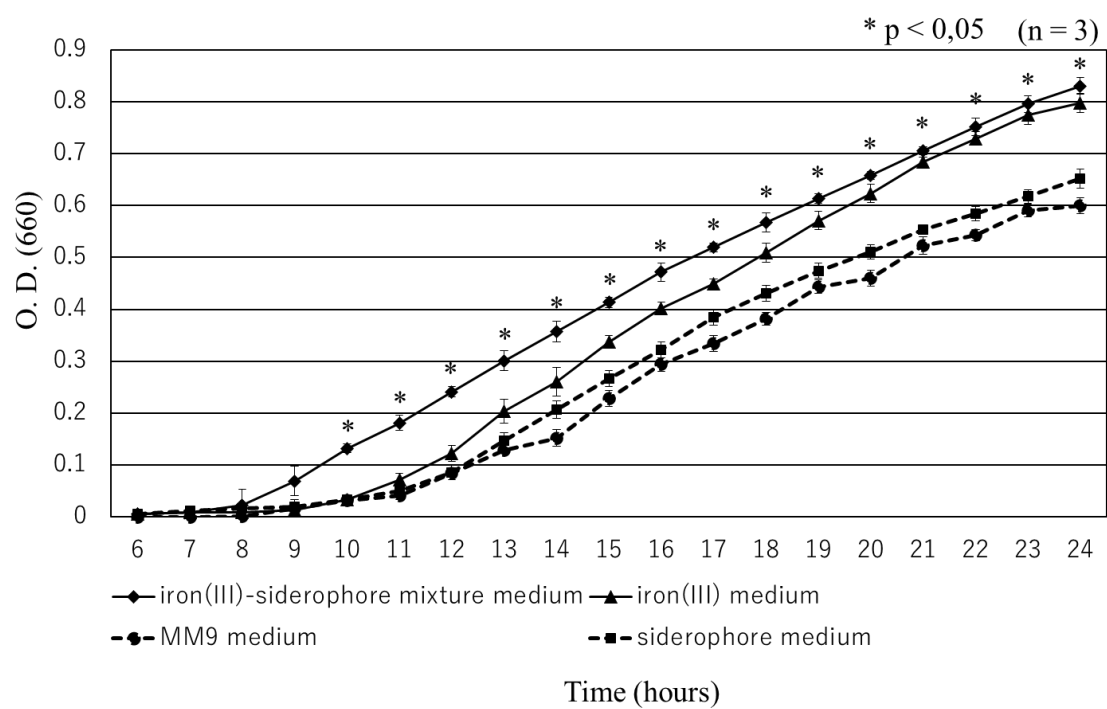


Figure 5-1-1 生育測定による DHBS 利用能の評価

第2節 細胞内 DHBS 量測定による DHBS 取り込み能試験

S. maltophilia K279a 株が DHBS を細胞内に蓄積するか判断するために、LC/MS 解析を用いた DHBS 蓄積能を評価した。

【実験方法】

MM9 培地に 500 nM の FeCl_3 を加えた鉄 (III) 培地と第3章にて得られた 500 nM の DHBS を加えた DHBS 培地、500 nM の FeCl_3 と DHBS を加えた鉄 (III)-DHBS 培地を調整した。*S. maltophilia* K279a 株を NB 培地にて培養後、EDTA⁽²⁷⁾ を含むマレイン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、細胞表面の FeCl_3 などの培地成分を除去した。洗浄した細胞を MM9, DHBS, 鉄(III), 鉄(III)-DHBS 培地に接種し、定常期まで培養した。培養後、EDTA を含むマレイン酸緩衝液 (pH7.0) で菌体洗浄し、 -20°C で凍結した。室温で解凍した後、超音波破砕機を用いて 1 分間細胞を破砕した。溶解した細胞から、 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルター (ADVANTEC CO. LTD.) を用いて夾雑物を取り除いた。LC/MS を用いて細胞破砕液中の DHBS 量を測定した。

【結果と考察】

Figure 5-2-1 に示すように *S. maltophilia* K279a 株の細胞内 DHBS 量は鉄添加条件に比べ鉄無添加条件において多く検出された。これは鉄飢餓状態では菌体内で DHBS を生合成するためだと考えられた。さらに、鉄(III) と鉄(III)-DHBS 培地の間で細胞内 DHBS 量を比較すると、鉄(III)-DHBS 培地にて培養した菌体内からより多くの DHBS が検出された。よって、細胞外 DHBS は、*S. maltophilia* K279a 株の鉄(III)や細胞内 DHBS 量に影響を与えていることがわかった。

この結果から、鉄(Ⅲ)-DHBS 複合体は *S. maltophilia* K279a 株の細胞内 DHBS の蓄積に関与することが明らかとなった。*S. maltophilia* K279a の細胞内 DHBS は、鉄(Ⅲ)を含まない培地で培養した場合に生合成や蓄積されたものとは異なり、鉄(Ⅲ)の取り込みによるものと考えられる。したがって、DHBS は *S. maltophilia* K279a の鉄(Ⅲ)の取り込みに関与している可能性が考えられた。

第4章にて *S. maltophilia* K279a が保有することを確認した CirA と Fiu は、DHBS などの受容体であることが知られている^(28,29)。また、TonB, ExbB, ExbD は、外膜の受容体にエネルギーを供給することが知られており、これらをコードする遺伝子も存在している⁽¹⁴⁾。これらの結果から、*S. maltophilia* は、鉄(Ⅲ)-DHBS 複合体を取り込むことができると考えられた。

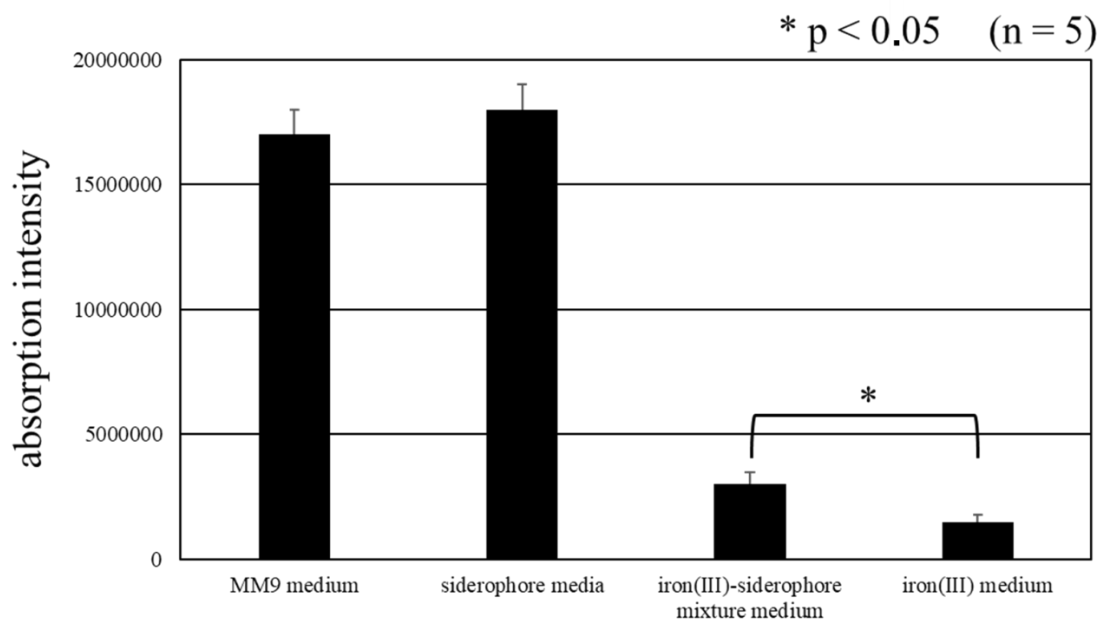


Figure 5-2-1 DHBS の細胞内蓄積量の評価

小括

S. maltophilia K279a 株は鉄(Ⅲ)-DHBS 複合体添加時に生育が促進したことから DHBS を利用した生育をすることが明らかとなった。また、細胞内の DHBS 量を比較することで DHBS を利用した鉄の取り込みをすることが明らかとなった。さらに、ゲノムの情報からも DHBS などの受容体である CirA と Fiu や、外膜の受容体にエネルギーを供給する TonB, ExbB, ExbD が *S. maltophilia* K279a 株に存在していることから鉄(Ⅲ)-DHBS 複合体を取り込むことができると考えられた。生育や細胞内シデロフォアを測定することによる、シデロフォア利用能の評価法は未だ報告が無い。本手法を用いることで様々な細菌のシデロフォア利用能が評価できると考えた。

第6章 環境微生物のバイオフィルム形成へのシデロフォアが及ぼす影響

序文

シデロフォアは微生物のバイオフィルム形成を促進する。中でもエンテロバクチンは大腸菌のバイオフィルム形成を促進することが知られている⁽³⁰⁾。微生物が鉄-エンテロバクチン複合体を利用する際に DHBS へと加水分解され環境中に放出されることが考えられるが⁽²⁴⁾、DHBS がバイオフィルム形成に与える影響は知られていない。DHBS は γ -Proteobacteria が主に利用するシデロフォアであり、この系統群には環境微生物も多く属する^(28,31)。そこで、本項目では DHBS を環境試料に添加し、シデロフォアがバイオフィルム形成に与える影響を評価した。

第1節 環境サンプルのバイオフィルム形成能

シデロフォアが環境微生物のバイオフィルム形成に及ぼす影響を調査するために、環境試料に DHBS を添加し形成されたバイオフィルム量を評価した。

【実験準備】

試料には東京農業大学敷地内のビオトープ (E35°38' 24.96", N139°37' 54.65") の水と土壌を用いた。試料水 200 ml を 125 mm 分析用濾紙 (ADVANTEC Dublin, CA, USA) を用いてろ過したものおよび 10 g の土壌を 0.85%の生理食塩水 200 ml に懸濁した後、同様にろ過したものをサンプルとした。シデロフォアは *Pseudomonas* 属や腸内細菌科等の γ -Proteobacteria が利用すると報告されてい

る DHBS を使用した^(28,31)。本研究では *S. maltophilia* K279a 株が産生した DHBS を第 3 章にて用いた手法により精製し使用した。

【実験方法】

土壌サンプルおよび水サンプルの DHBS 添加によるバイオフィーム形成誘導試験のため、サンプルを 96 穴ウェルプレートに 200 μ l ずつ添加した。必要に応じて 0.015 mM DHBS, 0.015 mM EDTA または negative control として滅菌水を各々 12 ウェルに 3 μ l 添加し、シーリングシートにて密閉し 25°C, 4 週間静置で集積培養した。1 週間毎に集積培養した各々の 3 ウェルの培養上清液をマイクロピペットにより除き、その後 0.85% 生理食塩水を 200 μ l 添加、緩やかにピペッティングし、再度同様に洗浄した。洗浄したウェルのバイオフィーム量を Infinite 200PRO (TECAN Männedorf Switzerland) を用いてクリスタルバイオレット法⁽³²⁾により波長 595 nm にて吸光値を測定した。バイオフィーム量は既報の方法に従い⁽³³⁾、OD 値と Negative control の吸光値 (ODN) を用いて、 $OD \leq ODN$ (バイオフィーム産生なし)、 $ODN < OD \leq 2 ODN$ (少量のバイオフィーム産生あり)、 $2 ODN < OD \leq 4 ODN$ (中程度のバイオフィーム産生あり)、 $4 ODN < OD$ (多量のバイオフィーム産生あり) の 4 段階で評価した。統計解析 Tukey-Kramer 法による検定を行った。

【結果と考察】

Figure 6-1-1, 6-1-2 に示すように、集積培養の 4 週目には土壌サンプルと水サンプルともに EDTA 添加条件と DHBS 無添加条件では OD 値が ODN と同程度であり、バイオフィーム産生は認められなかった。一方で、DHBS 添加条件下において水サンプルでは OD 値が ODN の 25 倍程度、土壌サンプルでは OD 値が ODN の 15

倍程度であり、両条件共に多量のバイオフィルム産生を示した。したがって、サンプルへの DHBS 添加はバイオフィルム形成を誘導した。以降、DHBS 添加条件で得た試料をバイオフィルム、無添加条件で得た試料を培養上清とする。

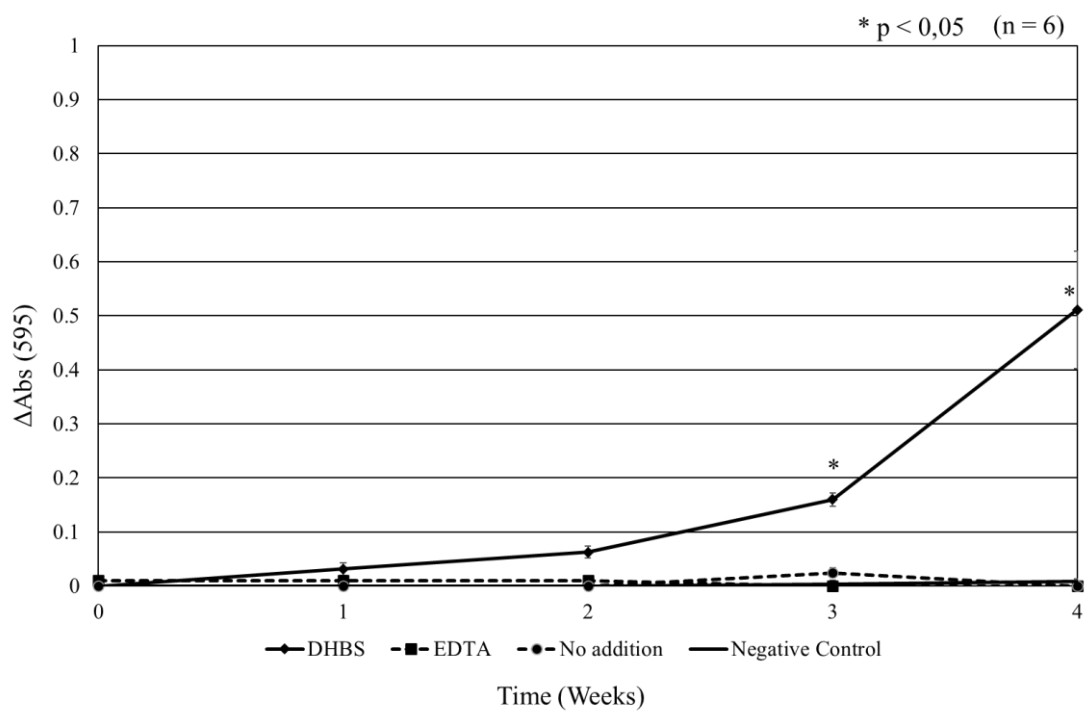


Figure 6-1-1 水試料のバイオフィルム形成量

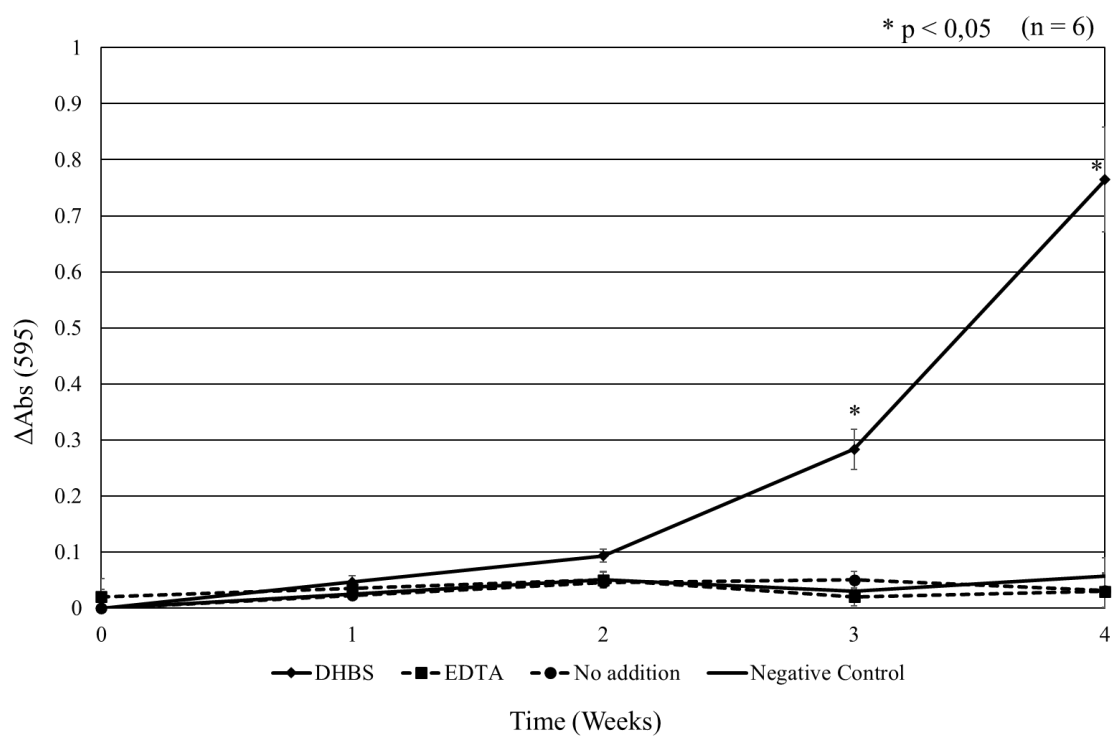


Figure 6-1-2 土壌試料のバイオフィルム形成量

第2節 環境サンプル由来微生物の生菌数

DHBS の添加が環境微生物のバイオフィルムの形成の他に生育に影響を及ぼすか調査するためにバイオフィルムや培養上清の生菌数を評価した。

【実験方法】

4週間培養したバイオフィルムサンプルに 200 μ l 0.85%生理食塩水を添加し懸濁した。懸濁したバイオフィルムサンプルを 10 倍間隔で 10^{-5} まで生理食塩水にて希釈後、各希釈液を NB 培地に 1.5%の寒天を添加した NB 培地に 100 μ l 接種し平板塗抹法により 25°C, 24 h の条件で培養した。培養後、既報の方法に従ってコロニー数をカウントしバイオフィルム内の細胞数の計測をした⁽³⁴⁾。

【結果と考察】

バイオフィルムの生菌数は集積培養 4 週目で $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml 程度であった。特に EDTA 添加条件では生菌は確認されなかった。EDTA は鉄キレート材の一種であり微生物が利用しないことから、鉄イオンを始めとする無機塩類が十分に利用できない環境であったと考えられる⁽³⁵⁾。同様にバイオフィルムが形成されなかった DHBS 無添加条件では集積培 4 週間後の上清の生菌数が $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml 程度であった。したがって、DHBS の添加は土壌や水に棲息する微生物の生育とバイオフィルム形成に影響すると考えられた。

第3節 環境サンプル由来微生物の分離同定

バイオフィルム構成菌種を特定するために培養上清やバイオフィルムから微生物の分離と同定をした。

【実験方法】

バイオフィルムと培養上清の生菌数試験で得たコロニーをサイズや形状、色により選抜し分離・純化した。また、単一のコロニーをNB培地に接種し25°C、24 h、160 rpmの条件で培養後、培養後画線塗抹法によりNA培地にて25°C、24 hの条件で培養した。以上の操作を繰り返し、細菌の単離をした。

DNA抽出やPCR、精製濃縮法は第1章、第1節と同様の方法を用いることで単離した各細菌の16S rDNAの部分配列を決定した。決定した塩基配列はThermo Fisher Connect Cloud Dashboard (<https://www.thermofisher.com/account-center/cloud.html>) によって処理し、EZ Bio Cloud 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net/>) によって細菌種の同定をした。

【結果と考察】

Table 6-3-1 に示すように、バイオフィルムからの分離株は γ -Proteobacteriaが大半を占め、水サンプルでは分離株の内*Pseudomonas*属が77.8%、*Escherichia coli/Shigella* groupが11.1%、土壌サンプルでも*Pseudomonas*属が80%、腸内細菌科の*Enterobacter*属と*Kluyvera*属がそれぞれ6.70%であった。培養上清では、水サンプルの分離株はバイオフィルムとは異なり*Pseudomonas*は分離されず γ -Proteobacteriaは*Escherichia coli/Shigella* groupのみであった。土壌サンプルの培養上清の分離株は全て*Pseudomonas*属で

あった。

Table 6-3-1 16S rDNA による環境試料からの細菌種同定結果

Isolation source	DHBS	Isolated from	Closest species	Homology	Number of strain	Content rate	Strain No. used for tests
Biotope water	-	Supernatant	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	100%	1	5.90%	W1
			<i>Paraburkholderia fungorum</i>	100%	6	35.3%	W2
			<i>Rhizobium rhizogenes</i>	100%	5	29.4%	W3
			<i>Escherichia coli/Shigella group</i>	100%	5	29.4%	W4
Biotope water	+	Biofilm	<i>Paraburkholderia fungorum</i>	100%	2	11.1%	WD1
			<i>Pseudomonas asplenii</i>	100%	2	11.1%	WD2
			<i>Pseudomonas cedrina</i>	100%	9	50.0%	WD3
			<i>Pseudomonas synxantha</i>	100%	3	16.7%	WD4
			<i>Escherichia coli/Shigella group</i>	100%	2	11.1%	WD5
Biotope soil	-	Supernatant	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	100%	2	25.0%	S1
			<i>Pseudomonas migulae</i>	100%	4	50.0%	S2
			<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	100%	2	25.0%	S3
Biotope soil	+	Biofilm	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	100%	1	6.70%	SD1
			<i>Herbaspirillum huttiense</i>	100%	1	6.70%	SD2
			<i>Enterobacter soli</i>	99.29%	1	6.70%	SD3
			<i>Pseudomonas monteilii</i>	100%	1	6.70%	SD4
			<i>Pseudomonas asplenii</i>	99~100%	9	60.0%	SD5
			<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	100%	2	13.2%	SD6

第4節 分離株の系統解析

無添加条件由来の *Pseudomonas* 属と DHBS 添加条件由来の *Pseudomonas* 属の系統を判断するために系統解析をした。

【実験方法】

MEGAX software⁽³⁶⁾を用いてバイオフィルムと培養上清の *Pseudomonas* 属の分離株を 16S rDNA 配列によって系統解析をした。

【結果と考察】

系統解析の結果、Figure 6-4-1 に示すように供試菌株は大きく分けて3つのクラスターを形成し、それぞれ group a は *Pseudomonas fluorescens* group, group b は *Pseudomonas aeruginosa* group, group c は *Pseudomonas putida* group であった。また、group a には4つの subgroup が含まれた。それぞれ、subgroup 1 は *P. fluorescens* subgroup, subgroup 2 は *P. chlororaphis* subgroup, subgroup 3 は *P. mandelii* subgroup, subgroup 4 は *P. jessenii* subgroup であった。さらに、group c に含まれる subgroup 5 は *P. asplenii* subgroup であった。ほとんどの分離株が *Pseudomonas fluorescens* group の4つの subgroup のいずれかに属したが、バイオフィルムと培養上清からの分離株は subgroup が異なった。加えて、バイオフィルムからの分離株には *Pseudomonas putida* group や *Pseudomonas aeruginosa* group に属するものもあった。したがって、バイオフィルム由来の *Pseudomonas* 属の分離株は明らかに DHBS が要因となって集積培養で選択圧がかかったことにより分離されたと考えられる。

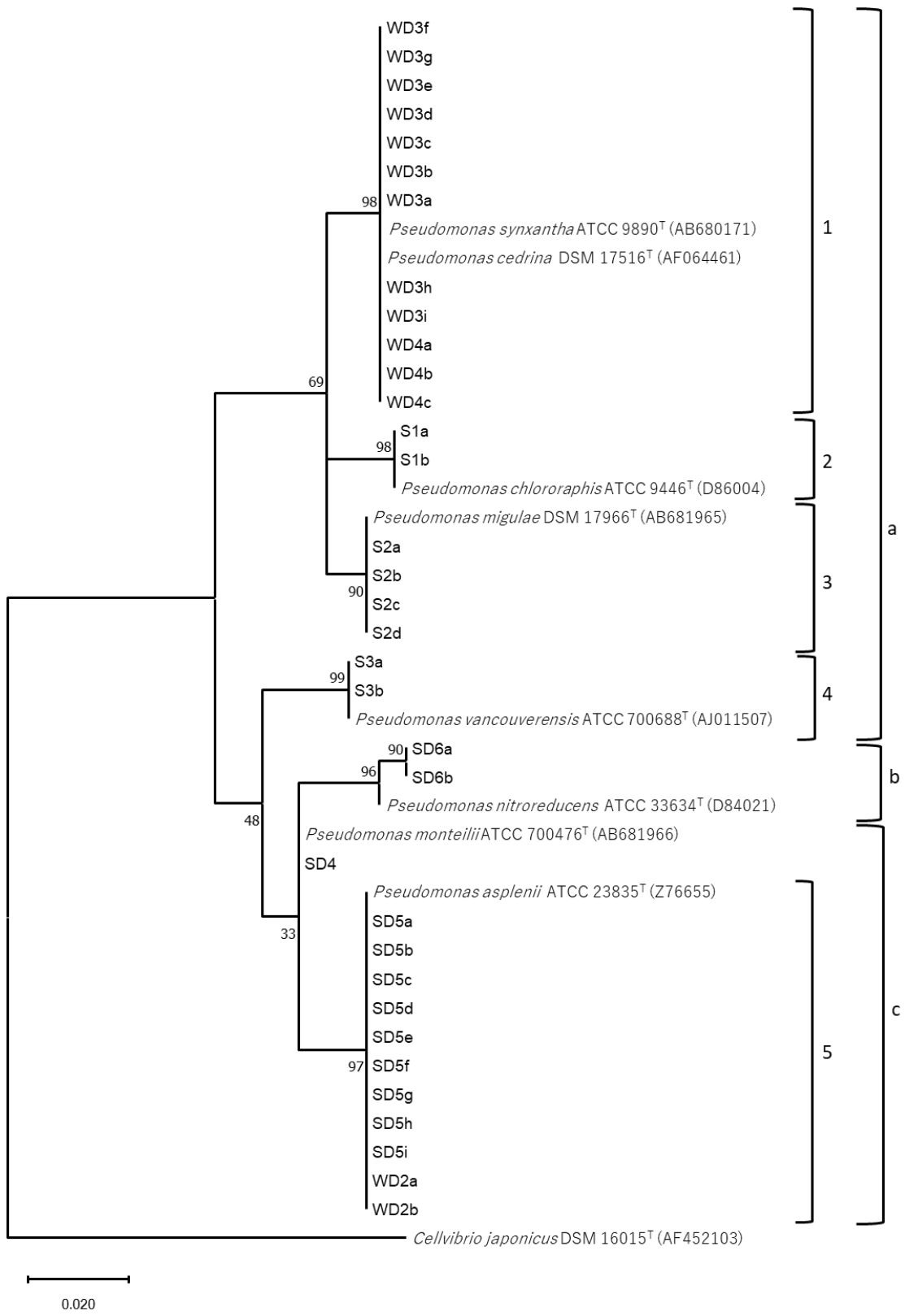


Figure 6-4-1 系統解析結果

第5節 分離株のDHBSによるバイオフィルム形成能

DHBS が細菌のバイオフィルム形成に影響するかを調べるために環境試料からの分離株のバイオフィルム形成能を評価した。

【実験方法】

バイオフィルム産生試験では栄養を制限するためにMM9培地を1000倍希釈した1/1000 MM9培地基本培地とし、これに500 nM FeCl₃を添加した1/1000 Fe培地、500 nM DHBSを添加した1/1000 DHBS培地、500 nM FeCl₃と500 nM DHBSを添加した1/1000 DHBS-Fe培地を使用した。これら培地を使用することでDHBSを利用したバイオフィルム形成を確認した。前培養はNB培地で25°C, 24 h, 160 rpmで振盪培養し、生理食塩水にて2回菌体洗浄、培地1%当量を試験培地に接種した。本試験では200 μlの各培地を96穴ウェルプレートに添加し、洗浄菌体を接種後25°C, 5日間培養した。その後、クリスタルバイオレット法⁽³¹⁾によりバイオフィルム量を測定した。バイオフィルム量は前述の方法により評価した⁽³³⁾。

【結果と考察】

Figure 6-5-1, 6-5-2に示すように培地にFeCl₃を含まない基本培地や1/1000 DHBS培地では土壌サンプル由来9株中6株と水サンプル由来9株中5株のOD値はバイオフィルムの産生なし、もしくは少量の産生であることを示した。残りの供試菌株はいずれかの培地において中程度のバイオフィルム産生を示した。しかし、FeCl₃を含む1/1000 Fe培地と1/1000 DHBS-Fe培地では全供試菌株においてそのOD値はODNの約3倍から8倍であり、中程度から多量のバイオフィル

ム産生が認められた。FeCl₃などの鉄化合物は多くの細菌のバイオフィルム産生を促進することから⁽⁷⁾、1/1000 Fe 培地において供試菌株は基本培地や 1/1000 DHBS 培地よりも多量のバイオフィルムを産生したことが考えられた。本条件のバイオフィルム由来と培養上清由来の各供試菌株の産生の程度を OD の平均値で比較すると、土壌サンプルではいずれも 0.26±0.01、水サンプルにおいてはバイオフィルム由来は 0.28±0.02、培養上清由来は 0.26±0.03 であった。両サンプルとも等分散を仮定した 2 標本による t 検定をした結果、由来による差は認められなかった。しかし、一部の供試菌株においては 1/1000 Fe 培地の OD 値に比べ 1/1000 DHBS-Fe 培地でさらに 1.5 倍から 2 倍の OD 値を示した。これらの供試菌株はバイオフィルムから分離した *Pseudomonas asplenii* WD2 および SD5, *Pseudomonas cedrina* WD3, *Pseudomonas nitroreducens* SD6, *Pseudomonas synxantha* WD4 であった。全てのバイオフィルムからの分離株のうち、これらの菌種の株の割合は土壌サンプルと水サンプルでそれぞれ 73.3%, 77.8%であった (Table 6-3-1)。一方で、1/1000 Fe 培地と 1/1000 DHBS-Fe 培地での OD 値に大きな差を示さなかった供試菌株もあった。その中で、バイオフィルムから分離した供試菌株である土壌サンプル由来の *Kluyvera cryocrescens* SD1 と *Herbaspirillum huttiense* SD2, *Enterobacter soli* SD3, *Pseudomonas monteillii* SD4 および水サンプル由来 *Paraburkholderia fungorum* WD1 と *Escherichia coli/Shigella* group WD5 はいずれもバイオフィルムからの分離株の中で低い割合の菌種であった (Table 6-3-1)。さらに、*Paraburkholderia fungorum* と *Escherichia coli/Shigella* group については DHBS を添加していない集積培養上清からも分離された菌種であった。したがって、バイオフィルムを構成する主要な菌種は FeCl₃に加えて DHBS が共存することでバイオフィルム形成がより促進される性質を有している *Pseudomonas* 属細菌であることが明らかとなった。

バイオフィルムから分離された *P. asplenii* についてはバイオフィルム形成の報告があり⁽³⁷⁾、培養上清から分離した *Pseudomonas choroloraphis*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas nitroreducens* でもバイオフィルム形成の報告がある^(38, 39, 40)。したがって、*Pseudomonas* 属細菌であっても DHBS によるバイオフィルム産生への影響は種のみならず株によっても異なることが考えられる。

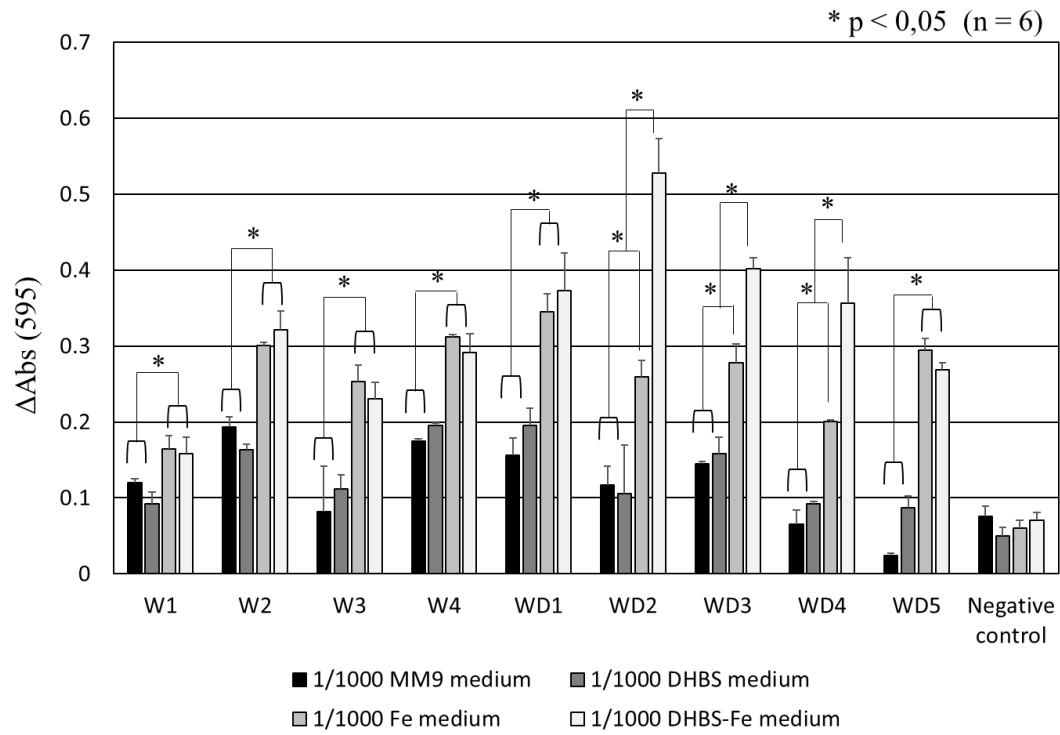


Figure 6-5-1 水試料のバイオフィルム形成量

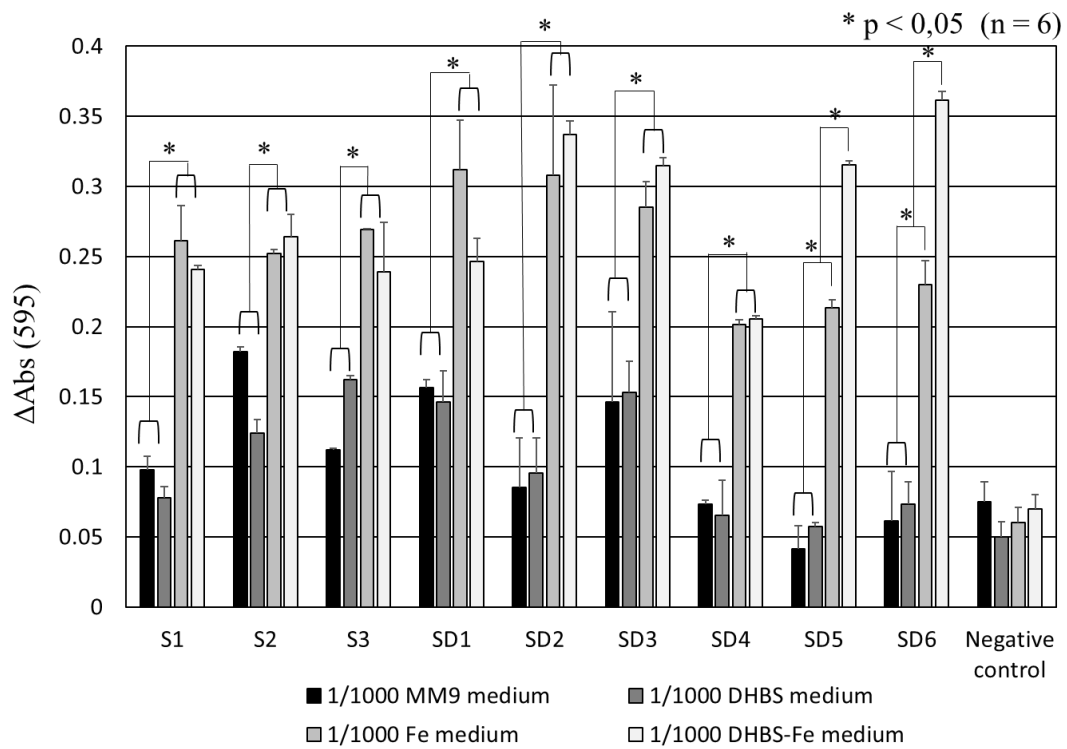


Figure 6-5-2 土壌試料のバイオフィルム形成量

第6節 分離株のDHBSの利用能

一部の分離株がDHBSと鉄の複合体を添加することでバイオフィーム形成が促進したが、DHBSを利用しているかは定かではない。そこで、本節ではビオトープ由来の分離株がDHBSを利用するか評価をした。

【実験方法】

Table 6-3-1 に示す分離株のDHBS利用能について既報の経時的生育測定による方法で検討した。栄養を制限するために基本培地はMM9培地を20倍希釈した1/20 MM9培地とし、バイオフィーム誘導試験の時と同様の濃度で基本培地にDHBSやFeCl₃を添加した3種の培地、1/20 DHBS培地、1/20 Fe培地および1/20 DHBS-Fe培地を使用した。供試菌株の洗浄菌体を2 mlの各培地に接種し、25°C、160 rpmの条件で培養し、3時間毎に定常期まで生育を測定した。生育の測定は可視/紫外可視分光光度計 GENESYS 40/50 (Thermo Fisher SCIENTIFIC Massachusetts, USA) を使用した。

【結果と考察】

全ての供試菌株においてFeCl₃を含まない1/20 MM9と1/20 DHBS培地で生育し、FeCl₃を含む1/20 Fe培地と1/20 DHBS-Fe培地では生育が向上した。そして、FeCl₃を含む培地では供試菌株において2種の生育パターンが観察された。

Figure 6-6-1は*Microbacterium liquefaciens* W1, *Rhizobium rhizogenes* W3, *K. cryocresens* SD1を除く供試菌株で確認された。このパターンを示す菌株はDHBS-Fe培地では細胞外のDHBSを鉄イオンの取り込みに用いることができ

るため対数期の増殖が 1/20 Fe 培地より促進されていると共に、その後 1/20 Fe 培地でも吸光値が 1/20 DHBS-Fe 培地と同程度になることから、Figure 6-6-1 の生育を示す株は別の鉄イオン取り込み機構を有するか、もしくは DHBS や他のシデロフォア、例えば *Escherichia coli/Shigella* group ではエンテロバクチン⁽⁴¹⁾、*Pseudomonas* 属ではシデロフォアであるピオベルジンやピペラジン⁽⁴²⁾を産生した後に鉄イオンを取り込むと考えられる。

Figure 6-6-2 は *M. liquefaciens* W1, *R. rhizogenes* W3, *K. cryocresens* SD1 が示した鉄イオンの取り込みに DHBS を利用しない生育パターンである。以上のように、バイオフィームから分離した *P. asplenii* WD2 および SD5, *P. cedrina* WD3, *P. nitroreducens* SD6, *P. synxantha* WD4 が DHBS のみでは生育に影響はなく、DHBS を鉄イオンの取り込みに利用し、生育を促進させることが明らかとなった。これらの分離株は他の分離株とは異なり、同条件でのバイオフィーム形成も促進されたことから、DHBS を利用した鉄イオンの取り込みが生育のみならずバイオフィーム産生の促進に関与すると考えられた。鉄イオンの取り込みのバイオフィーム産生への影響については、*P. aeruginosa* でバイオフィーム産生関連遺伝子に作用することが報告されている⁽⁶⁾。本試験では培地の FeCl₃ を 500 nM としたが、土壌や水環境では溶存態の鉄は多くても 100 nM 程度である。このような環境では鉄イオンにより生育が向上しバイオフィーム産生が向上する細菌よりも、DHBS を添加した場合に DHBS と鉄の錯体の取り込みによるバイオフィーム産生が向上する細菌がバイオフィームを形成すると考えられる。

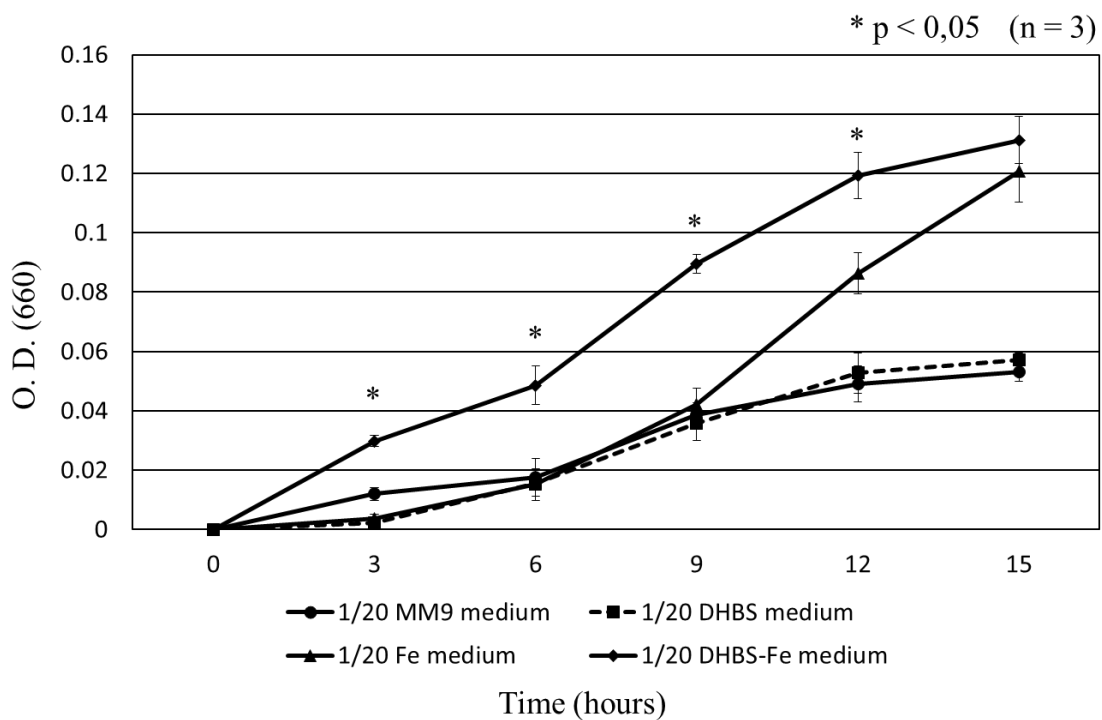


Figure 6-6-1 DHBS を鉄の取り込みに利用する生育

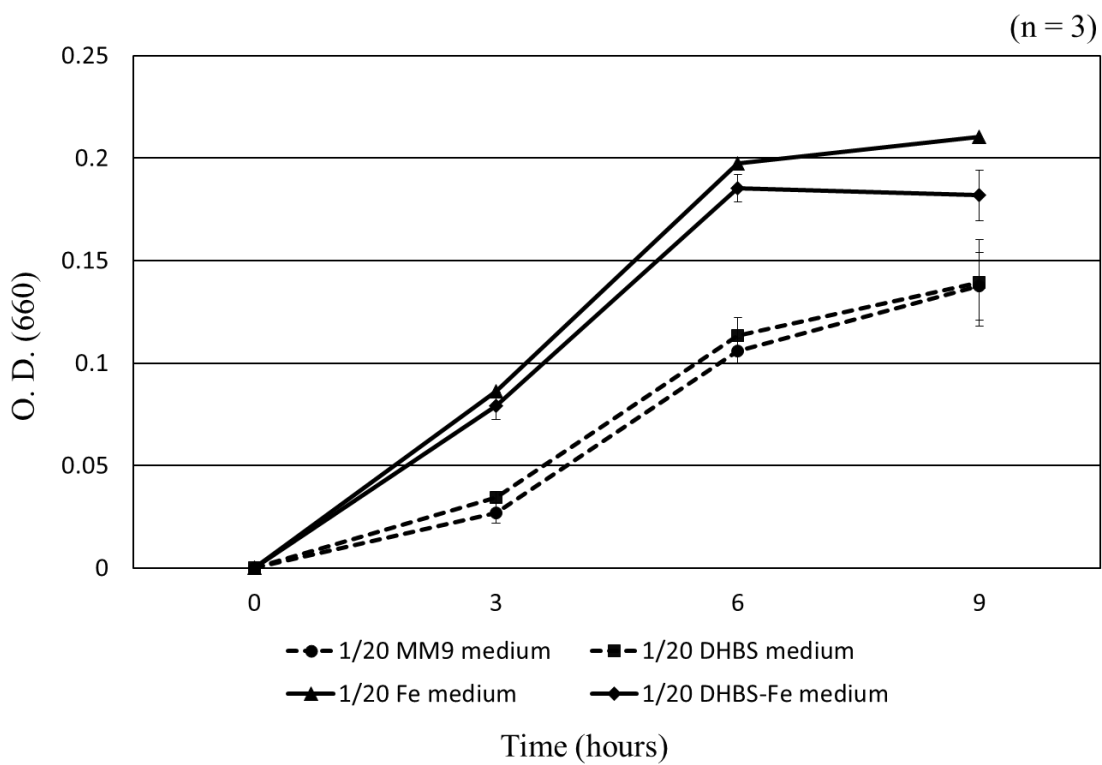


Figure 6-6-2 DHBS を鉄の取り込みに利用しない生育

第7節 分離株のDHBS 産生能

一部のビオトープからの分離株がDHBS を利用した生育をしたため、分離株のDHBS 産生能を評価した。

【実験方法】

バイオフィーム形成はシデロフォア産生と連動するとの報告もあるため、供試菌株のDHBS 産生能を検討した。供試菌株を2 ml のMM9 培地で25°C, 24 h, 160 rpm の振盪培養後、第5章第2節にて用いた方法によりLC/MS (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) を用いて行った。Positive control には *S. maltophilia* K279a 株を用いた。

【結果と考察】

全ての供試菌株がDHBS 非産生であった。 γ -Proteobacteria ではDHBS を産生せずDHBS を利用するのみの菌株が多く報告されている^(24, 27)ため、今回の分離株も同様と考えられた。

小括

本章ではビオトープ由来の水や土壌サンプルに DHBS を添加することでバイオフィームが形成され、形成したバイオフィームから分離した供試菌株の多くが DHBS と鉄の錯体の取り込みによりバイオフィーム形成が誘導・促進される特性を有することが明らかとなった。供試菌株の中には、 FeCl_3 のみの存在で多量のバイオフィーム産生を示すにも関わらず、集積培養で形成されたバイオフィームの主要構成菌種ではない菌株もあった。その要因は溶存態の鉄が多くても 100 nM 程度の土壌や水に比べ、バイオフィーム産生試験培地の FeCl_3 が 500 nM であり、集積培養の時と異なり試験培地においては比較的豊富な鉄イオンによるバイオフィーム形成が多くの供試菌株で強く誘導されてしまったためと考えられる。また、環境試料ではシデロフォアの添加によって形成されたバイオフィームから、そのシデロフォアを利用する菌株が高い割合で分離されたため、シデロフォアを添加した集積培養は利用株の選択的な分離に応用することも考えられる。しかし、ターゲットとした菌種や系統群が利用するシデロフォアの種類の情報が必要である。そこで、ショットガンメタゲノム解析等により環境中の棲息する菌種推定やシデロフォア合成遺伝子、シデロフォアトランスポーターの遺伝子およびバイオフィーム合成関連遺伝子の同定と発現ネットワークを推定するとともにコミュニティをなす複合的なバイオフィーム形成にシデロフォアや細胞間のシグナル等の他の因子がどのように関与しているか明らかにすることが今後の課題であると考えられる。

第7章 総括

本研究では、*S. maltophilia* 株の産生するシデロフォアの特性を明らかにし、その応用への知見を得ることを目的とした。そのために材料となる *S. maltophilia* 株を広く収集し、それらを系統分類学的に再分類し、シデロフォア生産の評価のベースとした。

1. *S. maltophilia* の分類

本研究により、海洋や土壌、臨床環境などから分離した *S. maltophilia* 14 株を表現性状やゲノムの情報から分類した。16S rDNA を用いた簡易的同定をした結果、Biovar I 群や K279a 株は *S. maltophilia* や近縁種とも相同性が高い結果となった。Biovar II 群に関しては *S. maltophilia* と同定される株は確認できなかった。また、API 20 NE による表現性状試験を行った結果、Biovar I 群の多くの株は基準株と同一の性状を示した。一方、Biovar II 群の株は基準株や近縁種と表現性状が一致することはなく、新種が含まれる可能性が考えられた。次に、全ゲノムを用いて ANI 解析による塩基の一致度を算出した結果、Biovar I 群の GN 12873 株のみ *S. maltophilia* と同定された。また、JCM 1976 株や IAM 1566 株は *S. lactitubi* と同定される結果となった。KMM 349 株と KMM 365 株、K279a 株は互いに同定の指標である 95%以上の相同性を示したが、*S. maltophilia* や既知種には属することはなく、新種である可能性が考えられた。一方、Biovar II 群の各菌株は基準株との相同性 95%を大きく下回り、別種であることが考えられた。また、JCM 1979 株と JCM 1980 株、JCM 1987 株は互いに 95%以上の相同性を示したが、既知種に属することはなく新種であることが考えられた。一方、JCM 1988 株は *S. terrae* と 95%以上の相同性を示したが、API による試験では同一

の性状を示さないことから別種である可能性も考えられた。さらに、供試菌株の系統樹を作成した結果、本研究に用いた供試菌株は 8 つのクラスターを形成していた。基準株とクラスターを形成した株は GN 12873 株のみでありその他菌株は異なるクラスターを形成した。NCB 0306-284 株は *S. pavanii* と、JCM 1976 株、IAM 1566 株は *S. lactitubi* と、JCM 1988 株は *S. terrae* とクラスターを形成した。上記以外の供試菌株はどの近縁種の基準株ともクラスターを形成せず、新種や亜種に分類される可能性が考えられた。また、Biovar I 群と Biovar II 群の各クラスターは群間において大きく差があり、この 2 群は明らかに異なる菌種であることが分かった。Biovar I 群に属する菌株の内 *S. maltophilia* 以外の種に分類される菌株として IAM 1566 株と JCM 1976 株は *S. lactitubi* と同定した。また、NCB 0306-284 株のみ Biovar I 群と表現性状が異なり、*S. pavanii* と非常に近縁であったため、本菌株は新種である可能性を示した。その他の Biovar I に属する菌株や K279a 株は *S. maltophilia* と近縁であり同一の表現性状を示すことから、本研究では暫定的に *S. maltophilia* として扱った。また、Biovar II 群に属する全ての菌株は *S. maltophilia* やその近縁種として分類できないことから、本群に属する菌株は *Stenotrophomonas* 属に分類される新種である可能性が考えられた。以上から本章により *S. maltophilia* として知られる多くの株が新種や他種と同定されることを明らかにした。

2. *S. maltophilia* の産生するシデロフォアタイプ

S. maltophilia を含む多くの細菌は鉄飢餓状態でシデロフォアを産生するため、鉄無添加培地にて *S. maltophilia* のシデロフォア産生能とそのタイプを調べた。本研究では 14 株の *S. maltophilia* を用いたが全ての株がシデロフ

ォア産生をした。また、過去の報告と同様に⁽¹²⁾、*S. maltophilia* K279a 株のカテコール型シデロフォアを産生することを確認した。同時に Biovar I 群は全ての株がカテコール型シデロフォアを主に産生した。また、Biovar II 群の一部の株はフェノール型シデロフォアを主に産生した。また、ヒドロキサム酸型シデロフォアやカルボン酸型シデロフォアの産生の有無については知見がなく、本研究により産生されないことが明らかとなった。また、本研究では鉄無添加培地にて継代培養を続けることでそのシデロフォアタイプに変化が生じるか調査をした。鉄無添加培養を 5 日間続けた結果、KMM 365 株、IAM 1566 株、IAM 12423 株のカテコール型シデロフォアの活性が低下し、フェノール型シデロフォアの活性が増加した。*S. maltophilia* がフェノール型シデロフォアを産生する報告はなく、本章により初めて明らかにした。鉄飢餓状態が続くことで生合成されるカテコール型シデロフォアの構造がフェノール型シデロフォアに変化することや、カテコール型シデロフォアの生合成が止まり、新たにフェノール型シデロフォアを生合成することなどが考えられた。鉄飢餓状態を続けることで産生されるシデロフォアタイプやその構造が変化する報告はなく、フェノール型シデロフォアの構造解析をすることがシデロフォアタイプが変化するメカニズムの解明につながると考えた。しかし、本手法により得られるフェノール型シデロフォアの濃度は非常に低く、構造解析に至らなかった。今後、鉄飢餓を続けた際に産生されるフェノール型シデロフォアを大量に得る手法を開発することで、産生シデロフォアの構造変化についての知見が深まると考えた。

3. *S. maltophilia* の産生するカテコール型シデロフォア

S. maltophilia はカテコール型シデロフォアの産生が報告されており、本研究においてもその活性を確認したため、大量培養法を用いてシデロフォアを獲得し精製後、構造解析をした。大量培養法を用いても *S. maltophilia* のシデロフォアタイプは変化がなかった。その後、回収したシデロフォアに対しイオン交換クロマトグラフィーによる精製をした。LC/MS 解析によってその精製度を確認した結果、多くの夾雑物のピークを確認したことから、精製が不十分であることが考えられた。また、Biovar I 群からはカテコール型シデロフォアと推定されるピークも確認することができ、その質量や構造は $m/z = 240$ である 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) であることが推定された。一方、Biovar II 群からは既知のシデロフォアの分子量や構造と一致する化合物は検出されなかった。その後の詳細研究の供試菌株はシデロフォア産生について報告の多い *S. maltophilia* K279a 株を使用した。逆相 HPLC カラムを用いてカテコール型シデロフォアを分取した。様々なピークをそれぞれ分取したが、その中の一つのピークにのみカテコール型シデロフォア活性を確認した。その分取したシデロフォア画分の精製度を LC/MS 解析によって確認した結果、DHBS ($m/z = 240$) と推定されるピークのみが確認され、構造解析に十分な精製度であることが考えられた。以上の操作はカテコール型シデロフォアのような酸性化合物を精製する手法であり、CAS assay や Arnow assay を組み合わせることで *S. maltophilia* 以外の細菌が産生するカテコール型シデロフォアの精製にも活用が可能であると考えた。また、精製したシデロフォアは NMR を用いて構造解析した。精製したシデロフォアは報告されている DHBS のスペクトルと類似したピークを示したが、そのスペクトルはエンテロバクチンとも類似していた。そ

ここで、LC/MS 解析により得られた質量情報と組み合わせることで *S. maltophilia* Biovar I 群の産生するシデロフォアは DHBS であることを明らかにした。

S. maltophilia K279a 株の産生するシデロフォア構造は知られておらず本章により初めてその構造を明らかにした。本研究の応用として、DHBS に薬剤を結合するなどの工夫をすることで DHBS を利用する病原菌をターゲットとした薬剤開発につながることを考えられた。

4. *S. maltophilia* K279a 株の DHBS 合成経路のゲノム解析

DHBS の合成経路に関しては知見がなく、本章によりその合成経路を推定した。DHBS はエンテロバクチンの単量体であり、その合成経路は類似すると考えられたため、*S. maltophilia* K279a 株を用いてエンテロバクチン合成経路を探索した。結果、*S. maltophilia* K279a 株は *entD* 遺伝子を保有していなかった。さらに、エンテロバクチンの取り込みに必要な *fepA* 遺伝子や排出のための *mfs* 遺伝子、加水分解に必要な *fes* 遺伝子も保有していなかった。*entD* 遺伝子が欠失していることがエンテロバクチンを合成しない要因であると考えられ、さらに DHBS を合成する要因である可能性も示唆した。今後は *entD* の機能を詳細に研究することで DHBS 産生のメカニズム解明につながることを考えられた。

5. *S. maltophilia* K279a の DHBS 取り込み

生育試験や細胞内 DHBS 量を評価した結果、*S. maltophilia* が DHBS を利用し

た鉄の取り込みをすることが明らかとなった。生育や細胞内シデロフォアを測定することによる、シデロフォア利用能の評価法は未だ報告が無く、本手法を用いることで様々な細菌のシデロフォア利用能が評価できると考えた。さらに、細菌種の外膜受容体に関わる遺伝子を知ることで、利用するシデロフォアをおおよそ推測することが可能であると考えられた。

これらの成果の応用として DHBS に薬剤を結合し *S. maltophilia* などの DHBS を利用する病原菌に取り込ませることが薬剤開発につながることを考えられた。

6. DHBS によるバイオフィーム形成の促進とその応用

環境中の土壌や水といった鉄イオンが限られる環境でのシデロフォアの存在は生態やバイオフィーム形成に影響すると考えられる。本研究では土壌や水にシデロフォアを添加した時のバイオフィーム形成とその構成菌種について検討した。さらに、バイオフィームは高密度に微生物を固定化するため、シデロフォアを利用した選択的な集積培養への応用について検討した。

S. maltophilia の産生する DHBS は *Pseudomonas* 属や腸内細菌科等の γ -Proteobacteria が利用する報告があり、幅広い菌種が利用する。そこで、土壌や水といった環境試料に DHBS を添加したところ、無添加条件よりも大幅にバイオフィーム形成が促進した。DHBS を添加した際に形成されたバイオフィームの生菌数は無添加条件の 1000 倍ほどであり、DHBS の影響によりバイオフィーム形成の促進や生菌数が増加することが考えられた。また、水、土壌どちらの試料においても形成したバイオフィームからの分離株は無添加条件からとは異なる菌

種が分離された。よって、これら菌種は DHBS が要因となって集積培養で選択圧がかかったことにより分離されたと考えられた。また、バイオフィルムから分離された菌株の多くは DHBS を利用することでバイオフィルム形成や生育が促進することが明らかとなった。

環境試料へのシデロフォアの添加により選択的な集積培養と類似した挙動を示したことから、ターゲットとした種や系統群が利用するシデロフォアの種類を知ることで選択的分離に応用できる可能性が考えられる。さらに、本研究で行ったようにウェルプレートを使用することで容易に多くのサンプルから分離することもできる。ただし、DHBS によるバイオフィルム形成が強く促進されない菌株もバイオフィルムから少数ながら分離された。このような菌株はバイオフィルムに付着した菌株と考えられ、エタノールを用いたバイオフィルム表面の付着細菌を処理すること等により、バイオフィルム内の主要構成菌株をより効率的に分離することができると考えられる。

今後、シデロフォアとバイオフィルムを利用した分離を行う場合は、ショットガンメタゲノム解析等により環境中の棲息する菌種推定やシデロフォア合成遺伝子、シデロフォアトランスポーターの遺伝子およびバイオフィルム合成関連遺伝子の同定と発現ネットワークを推定することでより選択的分離の方法として活用できると考えられる。

Summary

1 Identification of *S. maltophilia* strains

In this study, *S. maltophilia* strains collected were reidentified on the basis of phenotypic and phylogenetic analysis. A phylogenetic tree of the strains tested in this study based on 16 S rDNA sequences showed that they formed eight clusters. NCB 0306-284 clustered with *S. pavanii*, JCM 1976, IAM 1566 with *S. lactitubi* and JCM 1988 with *S. terrae*. The other test strains did not form clusters with any of the related species and may be classified as new species or subspecies. Among the Biovar I strains, NCB 0306-284, IAM 1566 and JCM 1976 were the only strains classified as species other than *S. maltophilia*. IAM 1566 and JCM 1976 were identified as *S. lactitubi*. Only strain NCB 0306-284 differed phenotypically from the Biovar I group and was very closely related to *S. pavanii*, indicating that this strain may be a new species. The other strains belonging to Biovar I and K279a are closely related to *S. maltophilia* and show the same phenotypic characteristics, so they are tentatively treated as *S. maltophilia* in this study. Since any of the strains of Biovar II were not identified as *S. maltophilia* or known species, the Biovar II strains may be classified as new species in the genus *Stenotrophomonas*.

2 Siderophore types produced by *S. maltophilia*

Since many bacteria, including *S. maltophilia*, produce siderophores under iron starvation conditions, we examined the ability of *S. maltophilia* strains to produce siderophores and their types in iron-free medium. All of *S. maltophilia* strains tested produced siderophores. At the same time, all strains in the Biovar I group produced catechol-type siderophores. Some strains in the Biovar II group produced phenolic siderophores under 2-day incubation conditions. In the present study, it was found that some strains of Biovar II produced phenolic siderophores under 2-day incubation conditions, but not hydroxamic acid or carboxylic acid siderophores. We also investigated whether iron starvation would alter the amount and type of siderophores produced. After 7 days of iron-free incubation, the siderophore production activity of all strains was reduced compared to the 2-day incubation condition. In addition, the activity of catechol type siderophores of KMM 365, IAM 1566 and IAM 12423 strains decreased and the activity of phenol type siderophores increased. These results suggest that iron starvation changes the structure of catechol-type siderophores to phenolic-type siderophores, or that the biosynthesis of catechol-type siderophores stops and phenolic-type siderophores are newly synthesized. There are no reports on changes in siderophore type or structure after iron starvation, and we thought that structural analysis of phenolic siderophores would help to clarify the mechanism of siderophore type change.

3 Catechol-type siderophores produced by *S. maltophilia*

Siderophores of *S. maltophilia* were obtained from mass culture, purified, and structurally analyzed. After the mass culture, the collected siderophores were purified by ion-exchange chromatography, and the degree of purification was confirmed by LC/MS analysis, which showed many peaks of foreign substances, suggesting that the purification was insufficient. In Biovar I group, a peak of catechol type siderophore was observed, and based on its mass spectrometry, the structure was estimated to be 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) with $m/z = 240$. On the other hand, no siderophore compounds were detected from the cells of the strains in the Biovar II group. *S. maltophilia* K279a, which has been reported to produce siderophores, was used as the test strain. The catechol-type siderophores were fractionated using a reversed-phase HPLC column. A variety of peaks were collected, but only one of them showed catechol-type siderophore activity. The purified siderophore fraction was checked by LC/MS analysis and only one peak, presumed to be DHBS ($m/z = 240$), was identified, which was considered to be sufficiently purified for structural analysis. The purified siderophore was subjected to structural analysis by NMR. Furthermore, by combining the mass information obtained by LC/MS analysis, it was confirmed that the siderophore produced by *S. maltophilia* was DHBS.

4 Pathway of DHBS synthesis in *S. maltophilia* strain K279a

As the synthetic pathway of DHBS have not been known, it was estimated in this chapter. Since DHBS is a part of enteribactin and its synthetic pathway is thought to be similar, we explored the pathway of enterobactin synthesis using *S. maltophilia* K279a strain. The results showed that *S. maltophilia* K279a strain did not possess the *entD* gene which is known as a gene of enterobactin synthesis gene cluster. *S. maltophilia* K279a strain did not possess the *entD* gene, nor did they possess the *fepA* gene for enterobactin uptake or the *fes* gene for hydrolysis. The lack of the *entD* gene may be a factor in the absence of enterobactin synthesis, and may also be a factor in the synthesis of DHBS.

5 DHBS uptake by *S. maltophilia* K279a

Growth studies and assessment of intracellular DHBS levels revealed that *S. maltophilia* utilises DHBS for iron uptake. There is no reported method to evaluate siderophore utilization by measuring growth and intracellular siderophores, and this method could be used to evaluate siderophore utilization in various bacterial species. Furthermore, it is possible to estimate the siderophore utilization by revealing the genes involved in the outer membrane receptors of bacterial species.

6 Promotion of biofilm formation by DHBS and its application

The presence of siderophores in environments with limited iron ions, such as soil and water, may affect the ecology and biofilm formation. In this study, we investigated biofilm formation and its constituent bacterial species when siderophores were added to soil and water. Furthermore, since biofilms immobilize microorganisms at high density, we investigated the application of siderophores for selective accumulation culture.

When DHBS was added to environmental samples such as soil and water, biofilm formation was significantly enhanced comparing with the non-addition condition, and the number of viable bacteria in the biofilm formed when DHBS was added was about 1000 times higher than the non-addition condition. This suggests that DHBS may promote biofilm formation and increase the number of viable bacteria. In both water and soil samples, the isolates from the biofilms were different from those from the untreated condition. Therefore, it is likely that these strains were isolated due to the selective pressure exerted by DHBS in the accumulation culture. Most of the strains isolated from the biofilms showed that DHBS promoted biofilm formation and growth. The addition of siderophores to environmental samples showed similar behaviour to that of selective accumulation cultures, suggesting that knowing the type of siderophore used by a target species or phylogenetic group could be applied to selective isolation.

Furthermore, the use of well plates, as was done in this study, allows

for easy separation from a large number of samples. However, a small number of strains were isolated from biofilms where biofilm formation was not strongly promoted by DHBS. Such strains were considered to be attached to the biofilm, and treatment of the attached bacteria on the biofilm surface with ethanol, for example, would allow more efficient isolation of the main constituent strains in the biofilm. When using siderophores and biofilms for isolation, it will be useful to estimate the species of bacteria living in the environment by shotgun metagenomic analysis, and to identify siderophore synthesis genes, siderophore transporter genes, and biofilm synthesis-related genes, and to estimate their expression networks. We believe that this method can be used for selective isolation of the target samples.

謝辞

本研究の遂行にあたり，終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました東京農業大学大学院農学研究科環境共生学専攻 田中 尚人 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり，御校閲と御助言を賜りました東京農業大学生命科学部分子微生物学科 志波 優 准教授，東京農業大学大学院農学研究科環境共生学専攻 武田 晃治 教授，東京農業大学大学院農学研究科環境共生学専攻 古庄 律 教授，理化学研究所分子構造解析ユニット 越野 広雪 先生，東京農業大学生命科学部分子微生物学科 藤田 信之 教授，東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 鈴木 健一郎 教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり，御助言を賜りました同大学大学院 環境共生学専攻の各先生方に御礼申し上げます。

多大な協力を頂いた，同大学大学院生命科学部分子微生物学科 小川 泰地さん，栢森 綺音さん同大学生命科学部分子微生物学科 中野 愛さん，同大学大学院生命科学部分子微生物学科の大学院生ならびに学部生の皆様に深く感謝致します。

参考文献

1. Berg, G., Roskot. N. & Smalla. K. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Clin Microbiol 37: 3594-3600
2. Senol, E. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. J Hosp Infect. 57: 1-7
3. Kalidasan, V., Joseph, N., Kumar, S., Awang, H.R. & Neela, V.K. 2018. Iron and virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*: all we know so far. Front. Front Cell Infect Microbiol 8: 401-408
4. Ratledge, C. & Dover, L.G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 54: 881-941
5. Miethke, M. & Marahiel, M.A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol Mol Biol Rev 71: 413-451
6. Banin, E., Vasil, M.L. & Greenberg, E.P. 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 11076-11081.
7. Miethke, M. & Marahiel, M.A. 2007. Siderophore-Based iron acquisition and pathogen control. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 71: 413-451
8. Bereschenko, L.A., Stams, A.J.M., Euverink, G. J. W. & van Loosdrecht, M. C. M. 2010. Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas* spp. Applied and Environmental Microbiology. 76: 2623-2632
9. Ratledge, C., and Dover, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic

- bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 881-941.
10. Chen, T., Liu, N., Ren, P., Xi, X., Yang, L., Sun, W., Yu, B., Ying, H., Ouyang, P., Liu, D. & Chen, Y. 2019. Efficient biofilm-based fermentation strategies for L-threonine production by *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology.* 10: 1773-1784
 11. Ali, SS., Vidhale, NN., 2013. Bacterial siderophore and their application: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2: 303-312
 12. Garcia, C.A., Passerini, D.R.B., Alcaraz, E., Vay, C., Franco, M., 2012. Siderophores of *Stenotrophomonas maltophilia*: detection and determination of their chemical nature. *Rev Argent Microbiol* 44: 150-154
 13. Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7: 514-525.
 14. Nas, M.Y., Cianciotto, N.P., 2017. *Stenotrophomonas maltophilia* produces an EntC-dependent catecholate siderophore that is distinct from enterobactin. *Microbiology (Reading)* 163: 1590-1603
 15. Palleroni, N.J., & Bradbury, J.F., 1983. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. *Int J Syst Bacteriol.* 3: 606-609
 16. Ikemoto, S., Suzuki, K., Kaneko, T., and Komagata, K., 1980. Characterization of Strains of *Pseudomonas maltophilia* Which Do Not Require Methionine. *Microbiology.* 30: 437-447
 17. Alavi, P., Starcher M.R., Thallinger G.G., Zachow, G., Müller. H.,

- & Berg, G., 2014. *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. BMC Genomics. 15: 482-496
- 18 Chirag, J., Luis, M.R., Adam, M.P., K, T.K & Srinivas, A. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat. Commun. 9: 5114-5121
19. Schwyn, B., and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 47-56.
20. Arnow, L.E., 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. Anal. Chim. Acta. 118: 531-537.
21. Csaky, T.Z., 1948. On the estimation of bound Hydroxylmine in Biological Materials. 2:250-454
22. HJEFFERY, G.J. BASSSETT, J. MENDHAM, R.C. CENNEY Vogel
Chemical test Set in 10111pt Lasercomp Times New Roman
23. Sayyed, R.Z., Chincholkar, S.B., 2005. Purification of siderophores of *Alcaligenes faecalis* on Amberlite XAD, Bioresour. Technol. 97: 1026-1029.
24. Bergstrom, C.P., Lu, M.C. and Bell, C.L., 1991. NMR studies of dimeric 2,3-dihydroxy-N-benzoyl serine. J. Nat. Prod. 54: 1003-1008
25. Peter, E.C & Charles, F.E., 1989. The *entD* Gene of the *Escherichia coli* K12 Enterobactin Gene Cluster. J. Microbiol. 135: 3043-3055
26. Gehring, A.M., Mori, I., W, C.T., 1998. Reconstitution and

- Characterization of the *Escherichia coli* Enterobactin Synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochem.* 37:2648-2659
27. McEldowney, S., 2000. The impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiol Ecol.* 33: 121-128.
28. Hantke, K., 1990. Dihydroxybenzoylserine-a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 55:5-8.
29. Nikaido, H. and Rosenberg, E.Y., 1990. Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with β -lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J. Bacteriol.* 172: 1361-1367.
- 30 Thithiwat, M., Satoshi, O. 2011. Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*. *Environ Microbiol.* 13: 3149-3162
31. Screen, J., Moya, E., Blagbrough, I.S. & Smith, A.W. 1995. Iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by N-(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-serine and 2,3-dihydroxybenzoic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 127: 145-149
32. Shukla, S.K. & Rao, T.S. 2017. An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtitre plate. *BioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/100214>
33. Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L. & Deng, Y. 2016. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Curr. Microbiol.* 73: 474-482

34. Goldman, E. & Green, L.H. 2008. Quantitation of Microorganisms, Lee, P.S., Goldman, E. & Green, L.H. (eds.), Practical handbook of microbiology, Second Edition, p. 11-22 CRC Press, Boca Raton.
35. Chang, Y., Gu, W. & McLandsborough, L. 2012. Low concentration of ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by inhibiting its initial adherence. Food Microbiol. 29: 10-17
36. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 35: 1547-1549
37. Ude, S., Arnold, D.L., Moon, C.D., Wilson, T.T. & Spiers, A.J. 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. Environ. Microbiol. 8: 1997-2011
38. Kaur, J. & Yogalakshmi, K.N. 2018. Control of sludge microbial biofilm by novel quorum quenching bacteria *Pseudomonas nitroreducens* JYQ3 and *Pseudomonas* JYQ4 encapsulated sodium alginate - Magnetic iron nanocomposites. Int. Biodeterior. Biodegradation 134: 68-75
39. Maddula, V.S.R.K., Pierson, E.A. & Pierson, L.S. 2020. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84: Effects on Biofilm Formation and Pathogen Inhibition. J. Bacteriol. 190: 2759-2766
40. Zhao, Y., Qu, D., Zhou, R., Yang, S. & Ren, H. 2016. Efficacy of forming biofilms by *Pseudomonas migulae* AN-1 toward in situ bioremediation of aniline-contaminated aquifer by groundwater

circulation wells. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23: 11568-11573

41. O' Brien, I.G. & Gibson, F. 1970. The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoyne conjugates from *Escherichia Coli*.

Biochim. Biophys. Acta 215: 393-402

42. Poole, K. & McKay, A.G. 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. Front. Biosci. 8:

661-686

研究業績等

掲載論文

○Atsushi Hisatomi, Yuh Shiwa, Nobuyuki Fujita, Hiroyuki Koshino, Naoto Tanaka. Identification and structural characterisation of a catecholate-type siderophore produced by *Stenotrophomonas maltophilia* K279a. *Microbiology*. Vol. 167. doi.org/10.1099/mic.0.001071. (2021).

○久富 敦, 志波 優, 藤田 信之, 田中 尚人. 環境試料へのシデロフォア添加によるバイオフィルム形成および構成菌種の特性. *日本微生物資源学会誌*. 2022年掲載予定.

口頭発表

○2018年 農芸化学会 2018年度大会

「*Stenotrophomonas maltophilia* のシデロフォアについて」

○2018年 日本微生物資源学会第25回大会

「*Stenotrophomonas maltophilia* 種内のシデロフォアタイプについて」

○2019年 農芸化学会 2019年度大会

「*Stenotrophomonas maltophilia* の産生するカテコール型シデロフォアについて」

○2019年 日本微生物資源学会第26回大会

「マングローブ由来カビの生産するリグニン分解酵素の特性解析」

受賞歴

○2018年 日本微生物資源学会第25回大会

「*Stenotrophomonas maltophilia* 種内のシデロフォアタイプについて」
最優秀ポスター賞 受賞

○2019年 日本微生物資源学会第26回大会

「マングローブ由来カビの生産するリグニン分解酵素の特性解析」
優秀ポスター賞 受賞