HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	トイレ便器内の初期バイオフィルム形成とその制御に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	深野, 透
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第11792号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59357
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Toru_Fukano_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士(環境科学)　　氏 名　深野 透

学 位 論 文 題 名

トイレ便器内の初期バイオフィルム形成とその制御に関する研究
(Studies on the early biofilm formation in toilet bowls and its control)

室内の環境は第一に清潔であることが求められるが、カビや細菌は家屋中に存在し、特に浴室やトイレなどの水回りで良く繁殖することが経験的に知られている。これまでの研究により、便器の不潔を象徴する黒ずみの原因であるカビの付着に先だって、初期付着した細菌がバイオフィルムを形成してカビが付着しやすい便器表面環境を形成することが示唆されている。バイオフィルムとは、固体表面に付着した微生物が細胞外高分子物質(EPS)を生産することにより形成する高次構造体である。

これまでにトイレ洗浄剤が数多く開発されてきたが、いずれも殺菌剤や界面活性剤によるものであり、これらの大量使用は下水処理場において重要な働きを担う活性汚泥微生物への負荷となる可能性がある。

本研究では、便器表面に初期に付着する細菌群について、経時的な菌叢解析および主要な初期付着細菌を単離・同定し、それらのバイオフィルム形成能など諸特性を調べること、さらにはそれを阻害(制御)するための手がかりを得ることを目的とした。

まず、第一章では背景と本研究の意義について論じた。第2章では、実際の家庭で使用されている便器表面から採取した初期バイオフィルムサンプル中に含まれる細菌叢の経時的変化の解析ならびに、細菌の単離を試みた。洗浄後3日目の便器表面より単離した細菌11菌株 (R1～R11)のうちプラスチック表面およびガラス表面へのバイオフィルム形成能が最も高かったR8株に注目して、その分類系統解析及びバイオフィルム形成に関わるタンパク質及びEPSの分析を行った。

16S rRNA遺伝子配列解析と生理学的特性試験の結果より、R8株は *Rhizobium giardinii* H152^{T}株と最も近縁の Rhizobium属細菌であることが判った。16S rRNA遺伝子配列では98.9%の相同性であり糖の資化性においてはズルシトールの利用性が異なっていた。一方、顕著なバイオフィルム形成活性を有するR8株に対して、H152^{T}株はバイオフィルムをほとんど形成せず、また極めて高いウレアーゼ

活性がR8株に見られたことから、R8株は便器表面環境によりよく適応した新規細菌であることが示された。

次に、R8株のバイオフィルム形成に関わる生体分子を明らかにする目的で、浮遊細胞とバイオフィルム細胞のタンパク質発現パターンをSDS-PAGEにより比較した。その結果、バイオフィルム細胞にのみ特異的に発現していると考えられる約60kDaの膜タンパク質(MP60)を見いだした。さらにMP60のN末端アミノ酸配列(10残基)を決定したところ、類似の配列を有するタンパク質はNCBIデータベースにはなく新規膜タンパク質であることが示唆された。

続いて、マンニトールを含むYM寒天培地でR8株のコロニーを形成したところ、その粘性が顕著に上昇したことからEPS生産性の上昇が示唆された。またR2A培地にマンニトールを添加した結果バイオフィルム形成能が上昇した。この結果からEPSがバイオフィルム形成に関与していることが予想されたので、粗精製及び分析を行った。R8株のコロニーからEPSをエタノール沈殿法により回収し、加水分解の後ピリジルアミノ化誘導体を作成しHPLCにより構成糖を分析した。その結果、主要構成糖としてガラクトース、グルコース、マンノースがモル比で8:1:1の割合で含まれていることが分かった。

第三章では、自然界での微生物間相互作用を利用した環境負荷の低い防除技術基盤の構築を目指すことを目的として、前章で解析した新規*Rhizobium* 属細菌であるR8株のバイオフィルム形成を阻害する細菌の探索、およびその阻害因子の同定を行った。11種の細菌群を組み合わせてバイオフィルム形成試験を行った結果、*Chryseobacterium* sp. R1, *Microbacterium* sp. R2株が R8株の便器表面付着を抑制することを見いだした。さらに、興味深いことに大腸菌 *Escherichia coli K-12* にも同様の抑制効果が見いだされたため、当該遺伝子を特定するために、*E. coli* MG1655株の遺伝子破壊ライブラリ 3,884株について試験した。その結果、大腸菌外膜主要タンパク質である OmpA および TolA がR8株の便器付着およびバイオフィルム形成を抑制する原因遺伝子産物である可能性が示唆された。

これまでに、大腸菌自身のバイオフィルム形成に OmpA が重要であることは報告されているが、他の細菌の付着やバイオフィルム形成を阻害するという報告はなく、これは全く新しい発見である。またこの阻害現象は便器表面と近い素材と考えられる磁器製のるつぼを用いたバイオフィルム形成試験においても確認できた。以上、本研究はトイレの環境科学ならびに環境負荷の少ない便器表面防汚技術開発の為に有益な基礎的知見を提供する。