



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 深 野 透

審査委員	主査	教 授	森 川 正 章
	副査	教 授	福 井 学
	副査	准教授	笠 原 康 裕
	副査	准教授	三 輪 京 子

学 位 論 文 題 名

トイレ便器内の初期バイオフィー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)

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ーム形成能など諸特性を調べることで、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、背景と本研究の意義について論じた後に、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ームサンプル中に含まれる細菌叢の経時変化の解析ならびに、細菌の単離の成果を報告した。具体的には、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ーム形成能顕著に高い、R8株を取得した。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%の相同性を有していたが、顕著なバイオフィーム形成活性を有するR8株に対して、H152^T株はバイオフィー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。さらに、特筆すべきことは、R8株は根粒形成能力を失っていることであり、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株のバイオフィー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ー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、バイオフィー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ーム形成能が上昇した。この結果からEPSがバイオフィー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。以上の R8株のユニークな特徴を元に新種‘*Rhizobium latrinae*’を提唱した。

さらに、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、便器表面への初期付着能力が高い新規*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、

およびその因子の同定を行った。11種の細菌群を組み合わせる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ろつぽ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ものである。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。