



Title	Visualization of quorum sensing metabolites in bacteria biofilms using mass spectrometry imaging
Author(s)	Rattanaburi, Pitchapa
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92904
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (RATTANABURI PITCHAPA)

Title

Visualization of quorum sensing metabolites in bacteria biofilms using mass spectrometry imaging (質量分析イメージングを用いた細菌バイオフィーム中のクオラムセンシング代謝物の可視化)

Abstract of Thesis

Quorum sensing (QS) is a form of cell-to-cell communication controlled by chemical signals in the form of molecules, including *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs), which regulate biofilm. Biofilm formation depends on the surface it is on and requires research into its chemical composition, temporal regulation, and spatial distribution. Understanding the role of QS in biofilm formation is important for addressing microbial biofilm growth issues. *Pseudomonas putida* is a well-studied biofilm-forming bacterium which was involved in bacterial rhizosphere competence to promote plant growth and used as the biosurfactant in the bioremediation. However, the process of *P. putida* biofilm formation is still poorly understood due to the lack of knowledge of the QS system, which requires advances in analytical techniques. This study aims to develop a sample preparation and cultivation method for widespread mass spectrometry-based chemical imaging of agar-based biofilms. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI) has been utilized to explore the distribution of metabolites within the biofilms and examine the interplay between co-cultures. The conventional method employed for MSI analysis in biofilm studies, drip flow reactor, is subject to limitations in its visualization of QS metabolites. Reports indicate a dramatic decrease in the intensity of these QS compounds after 48 hours, whereas the drip flow reactor method requires at least 72 hours for cultivation. Thus, this experiment endeavors to develop a novel workflow for the cultivation and characterization of agar-based biofilms for MALDI-MSI analysis. The workflow commences with the cultivation of *P. putida* 6157 directly on an ITO-coated glass slide embedded in a thin layer of agar medium, followed by incubation for various time periods. After incubation, the biofilm and surrounding agar attached to the glass slide undergo specific biofilm processing, to preserve biofilm morphology during the sublimation of the 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix prior to MALDI-MSI analysis. The utilization of agar-based biofilms in MALDI-MSI enables the first visualization of AHL-QS metabolites and their distributions within *P. putida* biofilm. A time-course analysis of MALDI-MSI was conducted on biofilm samples incubated for 6, 12, 24, and 48 hours post-inoculation. This examination shed light on the correlation between the spatial distribution of QS metabolites produced by *P. putida* 6157 and the progression of biofilm formation. The findings revealed that the QS metabolites detected in *P. putida* biofilms varied over the course of cultivation. Two prominent ion groups were recognized as QS metabolites. The first group, *N*-butanoyl-L-homoserine lactone and *N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone, was present in early-stage biofilms and concentrated around the point of inoculation. The second group, comprised of quinolone metabolites, 2-heptyl-4-quinolone, 2-heptyl-3-hydroxy-quinolone, and 2-nonyl-4-quinolone, was observable only in mature biofilms and uniformly distributed across the surface of *P. putida* 6157 biofilms which suggests swarming motility, resulting in a massive movement of cells and, thus, mature biofilm formation. Pyochelin was present only in mature biofilms and primarily located at the forefront. These results highlight a distinct association between the temporal production and spatial distribution of QS metabolites and the advancement of biofilm development in *P. putida* 6157. Finally, a comprehensive genome sequencing was performed on genomic DNA obtained from *P. putida* 6157 to confirm the existence of AHL-QS. This study marked the first time that the presence of AHL-QS in the genome of *P. putida* 6157 was reported, resulting in the detection of AHL-QS metabolites through MALDI-MSI visualization.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (RATTANABURI PITCHAPA)			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査 副 査 副 査	教 授 教 授 教 授	福崎 英一郎 村中 俊哉 本田 孝介 (生物工学国際交流センター)
バイオフィルムは微生物種から発生する多細胞の微生物群衆である。このバイオフィルムの構造は包まれた微生物を環境や生物学的危険から守るバリアとして機能する。単一微生物種からなるバイオフィルであっても構造体の異なる場所に存在する集団は異なる発現パターンを示し、異なる代謝物を分泌し、クオラムセンシング (QS) という細胞間のコミュニケーション機構を示す。N-アシルホモセリンラクトン (AHL) は、様々なQS分子の中でも特に研究が進んでいる分子である。AHLは、病原性、共生、バイオフィルム形成、金属キレートなど、多くの形質の発現を制御することが知られている。バイオフィルム構造におけるQSの役割を理解することは、微生物のバイオフィルム形成に起因する問題の治療や予防に必要である。そこで、本研究では、寒天培地バイオフィルムの質量分析イメージング (MSI) を行うための培養法および試料調製法の開発に焦点を当てた。培養後、スライドガラスに付着したバイオフィルムと周囲の寒天を、液体窒素での瞬間凍結や凍結乾燥などの前処理の後、MALDI-MSIを行い、<i>P. putida</i> バイオフィルム中のAHLs-QS代謝物およびその分布を初めて可視化した。本手法のさらなる検証のため、接種後6、12、24、48時間、26℃で培養したバイオフィルム試料のMSI解析を実施した。鉄のキレートに関与するシデロフォアであるピオクレンは、<i>P. putida</i> 6157バイオフィルムの成熟期にのみ、主にバイオフィルムの最前線で観察された。その結果、<i>P. putida</i> バイオフィルム上で検出されたQS代謝物は、培養時間の違いによって同じものではないことがわかった。<i>P. putida</i> 6157が産生するQS代謝物の空間分布とバイオフィルム形成段階との関係を明らかにするためタイムコース解析を実施し、<i>P. putida</i> 6157におけるQS代謝物の時間的生産と空間分布とバイオフィルムの発達との間に明確な関係があることが示された。6時間および12時間培養したバイオフィルムはバイオフィルムの初期段階を表し、24時間および48時間培養したバイオフィルムは成熟バイオフィルムの特徴を示した。この第2群の分布は、群泳運動との親和性が高く、細胞の大量移動をもたらし、その結果、成熟したバイオフィルムが形成されることが判明した。研究に使用した<i>P. putida</i> 6157株とバイオフィルムを形成することが知られている<i>P. aeruginosa</i>とのゲノム比較を行った結果、<i>P. putida</i> 6157株にクオラムセンシング化合物産生に関わる一連の遺伝子群の存在を確認した。以上の知見により、クオラムセンシングに関する知識とAHL-QSを用いたバイオフィルム形成のメカニズムに関する知見が広がった。本研究で使用したワークフローはシンプルであり、様々な微生物のバイオフィルムに容易に適応することが可能である。本研究はバイオフィルム研究を進めるうえで極めて重要な基盤技術であるバイオフィルムの質量分析イメージングを実施した初めての報告である。よって本論文は博士論文として価値があるものと認める。			