

池田 幸

宇都宮大学大学院工学研究科・教授

ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合による
革新的な水処理微生物制御技術の開発

§1. 研究実施体制

(1)「池田」グループ

- ① 研究代表者:池田 幸 (宇都宮大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・活性汚泥試料中の微生物コミュニケーションの探索と同定
 - ・微生物コミュニケーション阻害物質の探索と同定
 - ・モデル評価系を用いた微生物コミュニケーション制御技術の効果の検証

(2)「加藤」グループ

- ① 主たる共同研究者:加藤 紀弘 (宇都宮大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・水処理微生物制御のためのナノ素材の開発
 - ・シグナル物質捕獲法の開発
 - ・シグナル物質構造類似体・シグナル物質分解法の開発
 - ・モデル評価系を用いた制御技術の効果の検証

(3)「内山」グループ

- ① 主たる共同研究者:内山 裕夫 (筑波大学大学院生命環境科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・水処理微生物制御ナノ素材の評価系の構築と応用
 - ・活性汚泥の脱窒能、硝化能への効果の測定
 - ・バイオフィルム、バイオフィアウリングへの効果の測定

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. 池田グループ

活性汚泥中の微生物コミュニケーションを探索するため、栃木県県央浄化センターより採取した活性汚泥からランダムに細菌を単離し、グラム陰性細菌における微生物コミュニケーションのシグナル物質である *N*-アシルホモセリンラクトン(AHL)の合成細菌及び分解細菌のスクリーニングを行なった。AHL 合成及び分解の検出には AHL に応答して紫色色素生産を示すレポーター株である *Chromobacterium violaceum* CV026 株及び VIR07 株を用いた。その結果、県央浄化センター単離菌 96 株から AHL 合成細菌を 16 株、AHL 分解細菌を 12 株単離することに成功した。16S rRNA 塩基配列を基にした菌種の同定及び系統解析により、AHL 合成細菌は主に *Aeromonas* 属細菌、AHL 分解細菌は *Acinetobacter* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌等で構成されていることが明らかとなった。次年度は、栃木県下の他の 6 ヶ所(北那須浄化センター、鬼怒川上流浄化センター、巴波川浄化センター、秋山川浄化センター、思川浄化センター、大岩藤浄化センター)の浄化センターから採取した活性汚泥についても AHL 合成及び分解細菌のスクリーニングを行ない、地域の違いによる活性汚泥中の微生物コミュニケーションの相違について詳細な解析を行なう予定である。

また、微生物コミュニケーション阻害物質として、疎水性空孔内に AHL を包接可能な環状オリゴ糖シクロデキストリン(CD)の誘導体の合成を行なった。CD に炭素数7以上の直鎖アルキルアミンを修飾した誘導体は微生物コミュニケーション阻害効果を示すが、今回新たに、枝分かれ構造を持つアルキルアミン修飾体、直鎖アミド修飾体、直鎖アルキルアミン二置換体の 3 タイプの CD を合成し、モデル病原菌である *Serratia marcescens* AS-1 株に対する微生物コミュニケーション阻害効果を調べた。その結果、①「微生物コミュニケーション阻害効果の強弱は CD の空孔サイズ(α , β , γ)にほとんど依存せず、修飾置換基の影響が大きい」、②「直鎖アルキルアミド修飾体は微生物コミュニケーション阻害効果を示さない(=アミノ基を持つことが必須)」、③「二置換体は優れた微生物コミュニケーション阻害効果を示すが、枝分かれアルキル修飾体は微生物コミュニケーション阻害効果を示さない」の 3 点が CD 誘導体の設計に重要であることが明らかとなった。今後は、様々な置換基を持つ新規 CD の合成を進めつつ、2 次元 NMR や質量分析、X 線結晶構造解析等を用いることで、微生物コミュニケーション阻害機構の化学的解明を進める予定である。

2. 加藤グループ

AHL を捕獲し、シグナル濃度を人為的に制御するナノ素材の開発を推進した。AHL のアシル鎖が CD の疎水性空孔に水溶液中で包接する複合体形成を原理として、微生物コミュニケーションを抑制可能なことを示した。高分子ヒドロゲルシート、エレクトロスピンニング(電界紡糸)法で合成した高分子ファイバー不織布に、空孔サイズの異なる CD を固定化した各種高分子材料を設計・合成し、物理化学的な解析に加え、池田グループが開発した *S. marcescens* AS-1 株を用いたモ

デル評価系により微生物コミュニケーション抑制効果を評価し、より高性能な素材をスクリーニングした。

CD と AHL の相互作用は、水晶振動子マイクロバランス法(QCM 法)により定量評価し、平衡論的解析および速度論的解析を実施した。その結果、 α -CD および β -CD と *N*-hexanoyl homoserine lactone の複合体形成は安定度定数 $K \approx 5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 程度であり、CD と AHL は 1 対 1 で複合体を形成していることを物理化学的手法により明らかにした。

微生物コミュニケーションを抑制する異なるアプローチとして、AHL シグナルの酵素分解法の基礎検討を推進した。*Bacillus cereus* ATCC14579 由来の AHL ラクトナーゼ AiiA の大量発現・精製系を遺伝子工学的的手法により構築した。AiiA は metallo- β -lactamase スーパーファミリーに属し、AHL ラクトン環の加水分解反応により微生物コミュニケーションを不活性化可能である。今年度は速度論的解析により AHL シグナルの加水分解速度と微生物コミュニケーションの不活性化の相関を検討した。次年度は、このシグナル物質分解法に加えシグナル物質構造類似体を用いる拮抗阻害法の基礎検討を推進する予定である。

3. 内山グループ

制御技術やナノ素材の実活性汚泥系、複合系に対する効果の検証を行なうために、脱窒菌に対する効果を脱窒活性として、また、硝化細菌に対する効果を硝化活性として、遺伝子レベルまで解析可能な技術開発を進めた。具体的には、主に AHL 類およびキノロン類の細菌シグナルを中心に、それらが脱窒また硝化に及ぼす効果を検証した。その結果、細菌の脱窒活性また硝化活性にそれらのシグナルの効果が認められた。さらに、それらの効果のメカニズムを調べたところ、シグナルにより細菌の呼吸(脱窒)が遺伝子レベルまた酵素活性レベルで制御されていることを明らかに出来た(3)。また、疎水性シグナル(長鎖 AHL 類およびキノロン類)の効果には細菌が自ら生産する細胞外粒子(膜タンパク質ベシクル)が関与することと、さらにそのベシクルについて運搬役(キャリアー)としての物理的性質をはじめとする諸性質を調べた結果、細菌由来にもかかわらずその細菌よりも安定性が高いことが示された(2, 4)。活性汚泥においても多くの膜タンパク質ベシクルが存在する事も確認出来た。

一方、活性汚泥においてもシグナルの効果が確認出来た。具体的には、サイトが異なる様々な硝化活性汚泥において、シグナルの添加が硝化能を上昇させることが示され、シグナルに着目した新しい制御の可能性が示された。また、活性汚泥におけるアンモニア除去能を簡易的に測定解析出来る技術開発にも成功した(1)。

以上の新規な知見およびオリジナルな技術を用いて、今後は、シグナル等制御剤による硝化・脱窒の活性変化さらにバイオマス(活性汚泥等)の構造変化についての解析系の構築を進める。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Toda, K., Yawata, Y., Setoyama, E., Fukuda, J., Nomura, N. and Suzuki, H. (2011) Continuous monitoring of ammonia removal activity and observation of morphology of microbial complexes in a microdevice, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**(12), 4253-4255. (DOI: 10.1128/AEM.01246-10)
2. Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., Ichikawa, S., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2011) Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosci., Biotech., Biochem.*, **75**(3), 605-607. (DOI: 10.1271/bbb.100754)
3. Toyofuku, M., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2012) Social Behaviors under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*, *International Journal of Microbiology*, in press. (DOI :10.1155/2012/405191)
4. Tashiro, Y., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2012) Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*, *Environ. Microbiol.*, in press. (DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02632.x)