

池田 宰

宇都宮大学大学院工学研究科物質環境化学専攻・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 宰 (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
- ・バイオフィルム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

(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

- ・微生物コミュニケーションシグナル物質捕獲法の開発
- ・微生物コミュニケーション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微生物コミュニケーション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

- ・微生物コミュニケーションシグナル物質添加がおよぼす活性汚泥の脱窒能、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に関する解析

§ 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) 池田グループの実施内容

池田グループでは、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、昨年度行った栃木県県央浄化センターより採取した活性汚泥に加えて、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アシル化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。1ヶ所の浄化センターから96株単離し、7ヶ所で合計672株からAHL合成細菌を107株、AHL分解細菌を48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を行った結果、昨年度県央浄化センター単独で行った結果と同じく、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。活性汚泥中にAHL分解活性を有する *Acinetobacter* 属細菌が存在し、高い存在割合を示すという結果は本研究が初めてであり、次年度は、*Acinetobacter* 属細菌によるAHL分解活性を詳細に解析するとともに、AHL分解遺伝子のクローニングを試みる予定である。

次に、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った¹⁾。昨年度の研究により、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、モデル病原菌である *Serratia marcescens* AS-1株に対して優れた微生物コミュニケーション阻害効果を示す事を明らかにした。本年度は、アルキルアミン修飾CDのAHL包接機構に関して詳細な解析を行った。まず、アルキルアミン修飾CDの構造についてNMR(核磁気共鳴分光法:Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)解析を行ったところ、修飾したアルキルアミンがCDの環内部に入り込み、自己包接体を形成していることが明らかとなった。また、アルキルアミン修飾CDとAHLとの結合定数を算出したところ、アルキルアミンの鎖長が長くなるに従ってAHLとの結合定数も増加し、それに伴ってAS-1株に対する阻害効果も増加することが明らかとなった。以上より、アルキルアミンの自己包接が、AHLとの結合能の強化につながっている可能性が示唆された。さらに、アルキルアミン修飾CDは *S. marcescens* だけでなく、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* や *Chromobacterium violaceum* といった他のグラム陰性細菌に対しても優れたコミュニケーション阻害効果を示したことから、アルキルアミン修飾CDが幅広い細菌のコミュニケーション阻害に対して有効であることが実証された。

(2) 加藤グループの実施内容

加藤グループでは、水処理微生物制御のためのナノ素材の開発を推進し、グラム陰性細菌の微

生物コミュニケーションシグナル物質 AHL と相互作用する各種新素材の設計、合成と機能性評価を実施した。AHL の人工レセプターとして CD を選択し、AHL との包接複合体形成に関する安定度定数を物理化学的手法により明らかにした。アミノ基を導入した CD 誘導体を有機合成し、これを水晶発振子マイクロバランス法(QCM 法)の金電極上に共有結合で固定した修飾センサーを構築し、AHL との複合体形成過程を速度論的に解析し β -CD と AHL が 1 対 1 で複合体形成することを示した²⁾。CD を固定化した高分子ヒドロゲルシート、電解紡糸法で調製した高分子ファイバー不織布など各種 CD 固定化素材を設計し、合成した素材の微生物コミュニケーション抑制効果を *S. marcescens* を利用するモデル評価系で試験したところ、CD 固定化高分子ファイバー不織布が優れたコミュニケーション阻害効果を示すことを実証した³⁾。AHL 構造類似体として設計したアシル化シクロペンチルアミドは、光学活性な L-ホモセリンラクトン環をシクロペンタン環に置換した構造を有する拮抗阻害剤であり、優れたコミュニケーション阻害効果を有し、その効果はアシル鎖長に依存することをモデル評価系により明らかとした。AHL 加水分解酵素を用いるシグナル物質分解法として、*Bacillus cereus* ATCC14579 由来の AHL ラクトナーゼ AiiA を各種高分子担体に固定化し、固定化酵素によるコミュニケーション阻害系を確立した。

(3) 内山グループの実施内容

内山グループでは、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うために、複合系の解析技術の構築を行った。具体的には、主に AHL 類の細菌シグナルを中心に、実活性汚泥に与える効果を検証した。その結果、実活性汚泥の脱窒活性または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るために、複合系での微生物の活性測定技術、および遺伝子レベルでの解析技術を構築した^{4, 5)}。また、微生物制御剤の効果を簡易的に測定解析できる技術を開発した⁷⁾。バイオフィウリングについては、実際にバイオフィウリングを起こした RO 膜及び物理的にバイオフィウムを剥がした膜の可視化に成功し、バイオフィウリングの抑制効果を検証するための技術構築を行った。さらに、RO 膜よりバイオフィウリングを引き起こす細菌を同定した。これらの細菌をバイオフィウリングのモデル菌とし、RO 膜にバイオフィウムを形成させ、解析することに成功した(図 1)。また、バイオフィウムの付着に関与する因子の探索を行った⁶⁾。

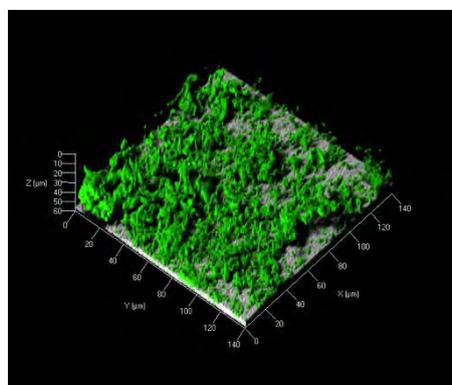


図1. モデル菌を使って、RO 膜にバイオフィウムを再形成させた。緑:菌体, 白;RO 膜

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Morohoshi, T., Tokita, K., Ito, S., Saito, Y., Maeda, S., Kato, N. and Ikeda, T. (2013) Inhibition of quorum sensing in Gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (in press; DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.022)
2. Okano, C., Arai, M., Nasuno, E., Iimura, K., Morohoshi, T., Ikeda, T. and Kato, N. (2012) β -Cyclodextrin interaction with *N*-hexanoyl homoserine lactone as quorum sensing signal produced in gram-negative bacteria, *Transactions of the Material Research Society of Japan*, **37**, 315-318.
3. Nasuno, E., Umemura, T., Ogi, T., Okano, C., Kawanago, T., Iimura, K., Morohoshi, T., Ikeda, T. and Kato, N. (2012) Inhibitory effects of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by electrospun polyvinyl alcohol fibers immobilized with cyclodextrin, *Transactions of the Material Research Society of Japan*, **37**, 593-596.
4. Wang, S., Nomura, N., Nakajima, T. and Uchiyama, H. (2012) Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **113**(5):624-630. (doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.01.005)
5. Yamasaki, S., Nomura, N., Nakajima, T. and Uchiyama, H. (2012) Cultivation-independent identification of candidate dehalorespiring bacteria in tetrachloroethylene degradation, *Environ. Sci. Technol.*, **17**;46(14):7709-7716. (doi: 10.1021/es301288y)
6. Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K. and Eberl, L. (2012) Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix, *J. Proteome Res.*, **5**;11(10):4906-4915. (doi: 10.1021/pr300395)
7. Takagi, R., Fukuda, J., Nagata, K., Yawata, Y., Nomura, N. and Suzuki, H. (2013) A microfluidic microbial culture device for rapid determination of the minimum inhibitory concentration of antibiotics, *Analyst*, **138**(4):1000-1003. (doi: 10.1039/c2an36323b)