

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
 - ・バイオフィー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)「野村」グループ

- ① 主たる共同研究者:野村 暢彦 (筑波大学生命環境系、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
 - ・バイオフィーム、バイオフィアウリングに関する解析

§ 2. 研究実施の概要

池田グループでは、昨年度までに、グラム陰性細菌における微生物コミュニケーションである Quorum Sensing (QS) のシグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) の合成細菌と分解細菌を、栃木県下の 7 ヶ所 (県央浄化センター、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) の浄化センターの活性汚泥から多種採取しており、今年度は、これらの解析を進めた。主な AHL 合成細菌種であった *Aeromonas* 属細菌のほとんどは *N*-butyryl homoserinelactone (C4-HSL) と *N*-hexanoyl homoserinelactone (C6-HSL) を生産することを明らかとした。AHL 分解細菌として最も単離数が多い菌種が *Acinetobacter* 属細菌であり、その中でも AHL 分解活性の高い菌株について、その AHL 分解機構を解析したところ、AHL のアミド結合を切断して分解する AHL アシラーゼ活性を有する可能性が示唆された。

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た。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を合成し、微生物コミュニケーションを制御するその作用機構を物理化学的手法により解析し、新素材の機能性を評価した。異なる三つの手法 (AHL 捕獲法、AHL 分解法、AHL 類似体による拮抗阻害法) について評価した。AHL 捕獲法は、水溶液中で AHL のアシル鎖と包接複合体を形成するシクロデキストリン (CD) の利用技術である。水晶発振子マイクロバランス法 (QCM 法) の CD 修飾金電極を作製し、AHL との複合体形成を平衡論解析し、包接複合体形成反応の安定度定数を決定した。AHL 分解法は AHL 加水分解酵素の利用技術である。AHL ラクトナーゼ AiiA の固定化高分子担体を作製し、加水分解過程の速度論的定数を評価した。拮抗阻害法は、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の利用技術である。AHL の 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を有機合成し、コミュニケーション阻害効果とアシル鎖長の関連を調査した。QCM 法を用いることで AHL に対する拮抗阻害効果を評価した。開発した三つの手法はどれも AHL をシグナル物質とする微生物コミュニケーションを効果的に抑制可能である。

野村グループでは、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、微生物コミュニケーションの活性変化やバイオマス (活性汚泥、バイオフィルム等) の構造変化を解析する技術を構築した。具体的には、AHL 類の細菌シグナルを検出する系を構築し、排水処理条件下 (脱窒条件下) でのシグナル物質を測定した。その結果、脱窒のモデル細菌において、好気と脱窒条件下でシグナル物質生産量が異なることが明らかとなった。さらに、今後の応用に向けて、シグナル物質の輸送体として働く可能性のあるナノ小胞体 (メンブランベシクル) の解析手法を構築した。また、当グループが開発した、共焦点反射顕微鏡法の連続的最適化技術 (COCRM 法) などを用いて、複合系バイオフィルムの観察やモデル細菌のバイオフィルム構造に環境が与える影響を解析した。さらにバイオフィルムについては、その形成に関わるシグナル物質やタンパクの役割を明らかにし、バイオフィルム制御のためのターゲット候補を同定した。複合系の活性やナノ素材の効果を簡易的に測定するための解析技術の構築も行った。以上、チーム内の加藤グループが AHL 捕獲法や AHL 分解法および拮抗阻害法として CD や AHL 分解酵素およびアシル化シクロペンチルアミドを利用し開発したナノ素材の効果の評価・解析を行う基盤が整った。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

- 1 Yuanbai, P., Nomura, N., Nakajima, T., and Uchiyama, H. (2013) Comprehensive analysis of benzene-degrading microorganisms and functional genes under mesophilic aerobic conditions using modified and conventional stable-isotope probing methods. *J. Environ. Biotech.* 13, 2, 151–159. (DOI: なし)

論文詳細情報(国際)

- 1 Ochiai, S., Morohoshi, T., Kurabeishi, A., Shinozaki, M., Fujita, H., Sawada, I., and Ikeda, T. (2013) Production and degradation of *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules in bacteria isolated from activated sludge, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 77, 2436-2440. (DOI: 10.1271/bbb.130553)
- 2 Inaba, T., Tokumoto, Y., Miyazaki, Y., Inoue, N., Maseda, H., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., Nomura, N. (2013) Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 7082-7090. (DOI: 10.1128/AEM.01664-13)
- 3 Fang, H., Toyofuku, M., Kiyokawa, T., Ichihashi, A., Tateda, K., Nomura, N. (2013) The impact of anaerobiosis on strain-dependent phenotypic variations in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 1747-1752. (DOI: 10.1271/bbb.130309)
- 4 Inaba, T., Ichihara, T., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., Nomura, N. (2013) Three-dimensional visualization of mixed species biofilm formation together with its substratum, *Microbiol. Immunol.*, 57, 589-593. (doi: 10.1111/1348-0421.12064.)
- 5 Zhang, W., Huhe, Pan, Y., Toyofuku, M., Nomura, N., Nakajima, T., Uchiyama, H. (2013) Dechlorination of chloral hydrate is influenced by the biofilm adhesin protein LapA in *Pseudomonas putida* LF54, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 4166-4169. (DOI: 10.1128/AEM.00804-13)
- 6 Obana, N., Nomura, N., Nakamura, K. (2013) Structural requirement in *Clostridium perfringens* collagenase mRNA 5' leader sequence for translational induction through small RNA-mRNA base pairing, *J. Bacteriol.*, 195, 2937-2946, (DOI: 10.1128/JB.00148-13)
- 7 Zheng, Y. T., Toyofuku, M., Nomura, N., and Shigeto, S. (2013) Carotenoid accumulation correlates with aggregation and biofilm development in *Rhodococcus* sp. SD-74, *Analytical Chemistry*, 85, 7295-7301. (DOI: 10.1021/ac401188f. Epub 2013 Jul 10)

- 8 Obana, N., Nakamura, K., Nomura, N. (2014) A sporulation factor is involved in the morphological change of *Clostridium perfringens* biofilms in response to temperature, *J. Bacteriol.*, 196, 1540-50. (DOI: 10.1128/JB.01444-13)
- 9 Yamamoto, T., Obana, N., Yee, L. M., Asai, K., Nomura, N., Nakamura, K. (2014) SP10 infectivity is aborted after bacteriophage SP10 infection induces nonA transcription on the prophage SP8 region of the *Bacillus subtilis* genome, *J. Bacteriol.*, 196, 693-706. (DOI: 10.1128/JB.01240-13)
- 10 Toyofuku, M., Zhou, S., Sawada, I., Takaya, N., Uchiyama, H., Nomura, N. (2013) Membrane vesicle formation is associated with pyocin production under denitrifying conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Environ. Microbiol.*, in press
- 11 Ono, K., Oka, R., Toyofuku, M., Sakaguchi, A., Hamada, M., Yoshida, S., and Nomura, N. (2014) cAMP signaling affect the irreversible attachment in biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Microbes & Environments.*, in press
- 12 Tashiro, Y., Inagaki, A., Ono, K., Inaba, T., Yawata, Y., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2014) Low concentrations of ethanol stimulate biofilm and pellicle formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press

(3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数 (国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 0 件)