

「持続可能な水利用を実現する革新的な技術とシステム」
平成 22 年度採択研究代表者

H26 年度
実績報告書

池田 幸

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 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抑制物質の探索と同定

(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抑制技術の効果の検証

(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
- ・バイオフィルム、バイオフィアリングに関する解析

§ 2. 研究実施の概要

(1) 池田グループ

池田グループでは、昨年度までに、栃木県内 7 箇所の浄化センターにおける微生物コミュニケーション(Quorum Sensing)に関連する細菌の単離と同定を行い、Quorum Sensing のシグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン(AHL)合成及び分解細菌の単離、同定に成功した。本年度は、これらの細菌の機能についてより詳細な解析を行った。AHL 分解細菌については、活性汚泥内部で主要な AHL 分解細菌種である *Acinetobacter* 属細菌から、新規 AHL 分解遺伝子である *amiE* をクローニングすることに成功し、AmiE は AHL のアミド結合を切断して分解する AHL アシラーゼとして機能することが明らかとなった²⁾。さらに、モデル細菌である緑膿菌に *amiE* を導入することで Quorum Sensing によって制御される遺伝子発現を抑制可能であることが示された²⁾。次に、企業の工場内に併設された活性汚泥システム及びその生物処理水から AHL 生産菌のスクリーニングを行った。その結果、主要な AHL 生産菌として *Aeromonas* 属細菌を単離することに成功し、*Aeromonas* 属細菌は膜ファウリングの原因となるバイオフィーム形成を Quorum Sensing により抑制していることが明らかとなった。また、生物処理水を RO 膜処理する実験処理システムを構築し、数週間運転を行った結果、RO 膜内部に大量の膜ファウリング物質が付着していることが明らかとなった。この膜ファウリング物質中の AHL を酢酸エチルで抽出し、AHL レポーター株により検出したところ、微量ではあるがアシル鎖長の長い AHL の存在が明らかとなった。膜ファウリング中に AHL が存在することを示した報告は、本研究が初めてである。

(2) 加藤グループ

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 Quorum Sensing を抑制するために、シグナル物質 AHL をトラップする AHL 捕獲法、あるいは AHL を不活化する AHL 分解法に利用可能な素材を設計し、その機能性を評価した。AHL 捕獲法には、水溶液中で AHL のアシル鎖と複合体を形成するシクロデキストリン(CD)及び合成高分子を利用した。AHL 分解法には、池田グループが栃木県内浄化センターの活性汚泥処理施設において曝気槽から単離した AHL 分解細菌の利用を検討した⁴⁾。CD を固定化した高分子微粒子、AHL 分解細菌を包括固定した高分子微粒子を効率良く合成し、AHL 濃度依存性 Quorum Sensing が効果的に抑制されることを実証した⁴⁾。更に、AHL 分解細菌が生産する AHL 加水分解酵素を遺伝子工学的手法により取得し、これを利用する Quorum Sensing 抑制技術を開発した。バイオフィーム形成過程に Quorum Sensing が関与する緑膿菌をモデル細菌として、これら開発した素材のバイオフィーム形成阻害効果を、緑色蛍光タンパク質で標識した緑膿菌の蛍光顕微鏡観察により検討した。開発した素材は AHL 捕獲法、分解法共に、バイオフィーム形成抑制素材として有効であるとの知見を得た。

(3) 野村グループ

野村グループでは、昨年度に開発した活性汚泥中の硝化活性を細菌種ごとに測定する技術である SIP-D 法を用いて、Quorum Sensing が活性汚泥の細菌叢に与える影響を種レベルで解析

し、シグナル物質やナノ素材がどの細菌に効果的に作用するのか予測できるようになった。さらに、モデル細菌において脱窒能の調節に関わる新たなタンパク、及びそのメカニズムを同定した¹⁰⁾。本成果により、更なる素材の開発に向けてターゲットとなりうる因子の幅を広げられた。また、シグナル物質のキャリアーとして有効なナノ小胞について、その付着性を脱窒細菌に対して検証した結果、優れた付着性のあることを明らかにした。また、バイオフィーム形成に関わる新たなシグナル物質や剤(薬剤)を同定し、今後のバイオフィーム、バイオフィアウリング制御剤としての利用に繋がる成果が得られた^{5, 13)}。また、活性汚泥で優占化する細菌において、外から剤を加える事によってバイオフィーム形成を抑制出来ることが明らかとなった。実ファウリング RO 膜においてもこれらの剤の有効性が確認されている。

以上の全グループの知見のもと、各グループが、それぞれ、企業、CREST 都留チームなどとの連携研究を開始し、実用化、実装化への取り組みを開始した。

【今年度の代表的な原著論文】

- 1) Ochiai, S., Yasumoto, S., Morohoshi, T. and Ikeda, T. (2014) AmiE, a novel *N*-acylhomoserine lactone acylase belonging to the amidase family, from the activated sludge isolate *Acinetobacter* sp. Ooi24. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 6919-6925. (DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02190-14>)
- 2) Takahashi, N., Nasuno, E., Matsunaga, Y. T. and Kato, N. (2014) Enzymatic quorum quenching using complex microbial system in polymer microcapsules fabricated by microfluidic device, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 39, 401-405. (DOI: <http://dx.doi.org/10.14723/tmrsj.39.401>)
- 3) Oura, H., Tashiro, Y., Toyofuku, M., Ueda, K., Kiyokawa, T., Ito, S., Takahashi, Y., Lee, S., Nojiri, H., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., Futamata, H., and Nomura, N. (2015) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility by 1-naphthol and other bicyclic compounds bearing hydroxyl groups, *Appl Environ Microbiol*, 81(8), 2808-18. (DOI: [10.1128/AEM.04220-14](http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04220-14))