

## 微生物細胞間シグナル物質が活性汚泥の硝化活性に与える効果

### Effect of Bacterial Signal Molecule on Nitrification in Activated Sludge

小林 祐子<sup>1</sup>, 豊福 雅典<sup>1</sup>, 稲葉 英樹<sup>2</sup>, 橋本 庸平<sup>2</sup>,  
内山 裕夫<sup>1</sup>, 中島 敏明<sup>1</sup>, 野村 暢彦<sup>1\*</sup>

YUKO KOBAYASHI, MASANORI TOYOFUKU, HIDEKI INABA, YOHEI HASHIMOTO,  
HIROO UCHIYAMA, TOSHIKI NAKAJIMA and NOBUHIKO NOMURA

<sup>1</sup> 筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

<sup>2</sup> 住友重機械工業(株)技術開発センター 〒237-8555 横須賀市夏島 19 番地

\* TEL/FAX: 029-853-6627

\* E-mail: nomunobu@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

<sup>1</sup> Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1,  
Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

<sup>2</sup> Research and Development Center, Sumitomo Heavy Industries, Ltd., Natsusima 19, Yokosuka, Kanagawa 237-8555, Japan

キーワード: 細胞間情報伝達, 微生物複合系, 硝化

Key words: cell-to-cell communication, mixed species community, nitrification

(原稿受付 2009年10月19日/原稿受理 2009年12月2日)

#### 1. はじめに

バイオレメディエーションなどの普及とともに、実環境中で有用な細菌群を制御したいニーズは高まってきている。しかしながら、実環境中において微生物は様々な種が混在する複合系で生育しているため、その中からいかにして目的の細菌群を制御していくかが課題となっている。一方で、細菌は細胞外に産生する低分子化合物を介して遺伝子発現の制御を行っていることが近年明らかとなった。このシグナル物質は特異的な受容体を介して遺伝子発現調節を行うため、その特異性を利用すれば複合系中の目的の細菌群を制御できる可能性がある。そこで、本研究では複合微生物系である硝化活性汚泥を用いてシグナル物質による硝化活性の制御を試みた。

#### 2. 微生物細胞間シグナル物質

微生物細胞間シグナル物質とは、微生物間でやりとりされる低分子化合物で、その特異的な受容体を介して遺伝子発現調節を行う。現在までにグラム陰性菌、陽性菌問わず様々なシグナル物質が報告されており、その構造も多岐にわたっている<sup>8)</sup>。グラム陰性菌においてはアシル化ホモセリンラクトン (AHL) が代表的なシグナル物質であり、炭素数 4 ~ 14 のアシル鎖と 3 位の置換によってその特異性が決まる。図 1 に AHL の基本構造を示す。グラム陽性菌においてはペプチド系シグナルが用いられており<sup>9)</sup>、一部のグラム陰・陽性菌両者に共通して見られるシグナルとしてはホウ素化合物が知られてい

る。このホウ素化合物はメチル基代謝の副産物であるため、種による違いがないことが分かっている<sup>12)</sup>。さらに、このようなシグナル伝達網は、同種間から異種間、さらには動植物との間にまで広がっており、微生物と動植物との感染や共生にも関連することが明らかになっている。

一般的にシグナル物質の作用機構は受容体を介しており、微生物が環境中に産生したシグナル物質は、蓄積して濃度が増すと他細胞の受容体タンパクに結合し、活性化した受容体タンパクが標的遺伝子群の転写を調節する(図 2)。例えば、シグナル伝達機構の研究の先駆けとなった *Vibrio* 属細菌を用いた発光の研究では、*Vibrio* 属細菌の一種である *Vibrio fischeri* において発光関連遺伝子の発現が制御されていることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。また、細胞間シグナル物質の研究において汎用されている微生物である *Pseudomonas aeruginosa* ではシグナル物質によって、数百以上の遺伝子が制御されていることが示唆されており<sup>13)</sup>、粘性物質に覆われた細菌の

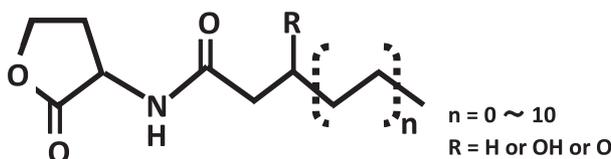


図 1. AHL の基本構造

ラクトン環に炭素数 4 ~ 14 のアシル鎖がついている。3 位には H や OH, O が置換される。これら炭素数や置換基の違いにより AHL の特異性が決定する。

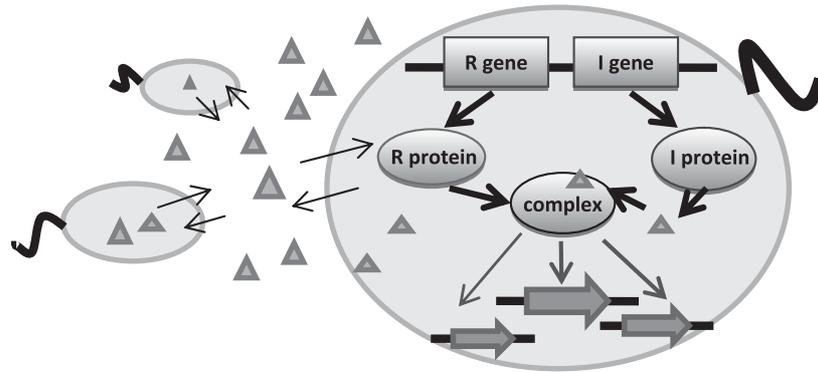


図2. 受容体を介したシグナル伝達機構

微生物が環境中に産生したシグナル物質は、蓄積して濃度が増すと他細胞の受容体タンパクに結合し、活性化した受容体タンパクが標的遺伝子群の転写を調節する。

高次構造体であるバイオフィルムの形成や毒素生産などが制御されていることが分かっている<sup>3,7)</sup>。さらに、いくつかの細菌においては細胞間シグナル物質が生育に影響を与えることが観察されており、*Serratia* 属細菌の一部や *Gluconacetobacter* 属細菌の一部では醗酵が制御されていることが報告されている<sup>4,5)</sup>。*P. aeruginosa* においては、脱窒が AHL の一種である C4-HSL, 3-oxo-C12HSL, 及び PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) によって影響を受けることが本研究室において明らかとなっている<sup>9,10)</sup>。

### 3. 微生物複合系と細胞間シグナル物質

シグナル物質とその作用について実際に詳しく検証されているのは、前述したような *P. aeruginosa* や *V. fischeri* などのすでに単離され純粋培養できるバクテリアのみである。しかし、微生物は実環境中において、単独で生育しているのではなく、様々な微生物種が混在する複合系で生育している。その微生物複合系の一例として廃水処理に用いられる活性汚泥が挙げられ、これらは細菌類、真菌類、原生動物や後生動物などの微生物により構成されている。このような活性汚泥やグラニューールのように大部分が単離培養不可能なバクテリアが占める複合系におけるシグナル物質の働きは詳細に分かっていない。しかしながら、複合系においてもシグナル物質によるコミュニケーションは存在していると予想される。例えば、活性汚泥から単離された細菌において AHL と類似した構造を持つ物質の生産が観察されており、化学合成されたシグナル物質を添加すると微生物相が変化し、フェノール分解が安定的に維持されたとの報告がある<sup>11)</sup>。

### 4. 細胞間シグナル物質を用いた廃水処理の効率化へ向けて

活性汚泥を用いた廃水の処理は、微生物の代謝を利用し廃水中に含まれる有機性汚濁物質・窒素・リンを減少させる日本において最も主流な処理法の一つである。有機性汚濁物質のなかでも窒素は廃水中に非常に多く含まれており、生物学的窒素除去プロセスは廃水処理工程において重要な位置付けにある。一般に、廃水からの窒素

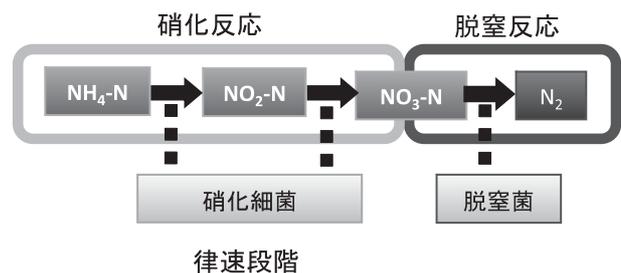


図3. 硝化・脱窒反応

硝化反応は硝化細菌群によるアンモニアから亜硝酸、硝酸への酸化反応である。脱窒反応は脱窒細菌群による硝酸から窒素ガスへの還元反応である。

除去は、アンモニアから硝酸への酸化反応と硝酸から窒素ガスへの還元反応によって図3のように進行し、それぞれの反応を硝化細菌群、脱窒細菌群が司っている。これらの細菌群のうち、硝化細菌群は極めて増殖速度が遅く、一連の反応の律速因子となっている。従って、複合系の中で硝化細菌をいかに制御するかが、効率よく水質浄化を行う上で非常に重要となる。これまでこのプロセスは主に温度や pH, 補助栄養素の添加などの手段により人工的に制御されてきた。しかし、これらの手法は古くから実施されており、さらなる活性の向上には新規な制御方法が必要である。そこで当研究室では、新たな複合系の制御法として菌種特異的な効果が期待できる細胞間シグナル物質に着目した。従来の制御法においては、分解に関与する菌だけでなくその他の菌を含む複合系全体が同時に制御されていたが、この細胞間シグナル物質を用いることで、複合系中の分解に関与する特定の菌群の代謝を制御できると考えられる。これまでに硝化細菌群におけるシグナル物質に関する知見は非常に少ないものの、硝化細菌の代表的な菌である *Nitrosomonas europaea* においては少なくとも C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL を生産することが報告されている<sup>2)</sup>。さらに、3-oxo-C6-HSL が飢餓状態からの早期回復に関与するという報告があり<sup>1)</sup>、活性汚泥中の硝化細菌群もシグナル物質により何らかの影響を受ける可能性が考えられる。そこで、本研究では活性汚泥において細胞間シグナル物質が硝化活性に与える影響を検討し、複合系中の硝化細菌群の特異的活性化を目指すこととした。本研究はシグ

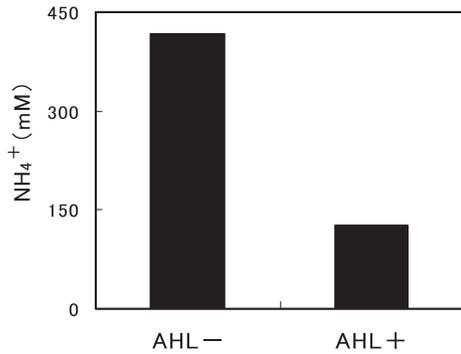


図4. AHLがアンモニアの消費に与える影響  
培養開始4日後のアンモニア濃度。培養開始時に活性汚泥1 ml に対し、基質であるアンモニアを6.8 mg, AHLは10 μM 添加した。

ナル物質による目的菌種の特異的活性化という複合系の制御法の新たな方向性を示すものとなるのに加え、複合系における細胞間シグナル物質の働きを理解するうえで重要な考察要素となり得ると考えられる。

### 5. 好気硝化活性汚泥におけるシグナル物質の硝化活性への効果

シグナル物質が硝化活性に与える影響を調べるために、まず初めにシグナル物質の検討を行った。AHLを中心に様々なシグナル物質を活性汚泥に添加し硝化活性を検討したところ、図4に示した通り、コントロールとAHLの一種を添加した系において培養開始4日後のアンモニア濃度に差が見られた。さらに、アンモニア酸化の産物である亜硝酸が、シグナル物質を添加するとコントロールに比べて高濃度で蓄積するという結果も得られている (data not shown)。つまり、硝化細菌群に対し直接または間接的にシグナル物質が影響を及ぼし、アンモニア酸化反応を促進させたことが示唆された。

### 6. 終わりに

本研究では微生物複合系である活性汚泥において、AHLの一種が硝化活性を促進させることが明らかとなった。しかしながら、本研究においてAHLが硝化細菌群に直接作用しているのか、その他の細菌に作用し間接的に硝化細菌群に作用しているのかは明らかでなく、今後詳細な解析が必要である。また、活性汚泥に含まれる微生物種は汚泥ごとに異なり、活性汚泥に対するシグナル物質の効果は一様ではないと考えられる。実際に当研究室において、由来の異なる数種類の活性汚泥を用いたところ、活性汚泥ごとに硝化活性の促進がみられるシグナル物質に差異があるという結果を得ている。

廃水処理現場での実用化へ向けては多くの課題が残さ

れているが、本研究により複合系の制御法の新たな方向性として細胞間シグナル物質の利用が示された。また、本研究は詳細に解析されていない複合系における細胞間シグナル物質の働きの新たな知見であり、今後さらなる解析が期待される。

### 文 献

- 1) Batchelor, S.E., M. Cooper, S.R. Chhabra, L.A. Glover, G.S.A.B. Stewart, P. Williams, and J.I. Prosser. 1997. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammoniaoxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2281–2286.
- 2) Burton, E.O., H.W. Read, M.C. Pellitteri, and W.J. Hickey. 2005. Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4906–4909.
- 3) Davies, D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280: 295–298.
- 4) Van Houdt, R., P. Moons, M. Hueso Buj, and C.W. Michiels. 2006. N-acyl-L-homoserine lactone quorum sensing controls butanediol fermentation in *Serratia plymuthica* RVH1 and *Serratia marcescens* MG1. *J. Bacteriol.* 188: 4570–4572.
- 5) Iida, A., Y. Ohnishi, and S. Horinouchi. 2008. Control of Acetic Acid Fermentation by Quorum Sensing via N-Acylhomoserine Lactones in *Gluconacetobacter intermedius*. *J. Bacteriol.* 190: 2546–2555.
- 6) Lupp, C., and E. G. Ruby. 2004. *Vibrio fischeri* LuxS and AinS: Comparative study of two signal synthases. *J. Bacteriol.* 186: 3873–3881.
- 7) Passador, L., J.M. Cook, M.J. Gambello, L. Rust, and B.H. Iglewski. 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*. 260: 1127–1130.
- 8) Ryan, R.P., and J.M. Dow. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*. 154: 1845–1858.
- 9) Toyofuku, M., N. Nomura, E. Kuno, Y. Tashiro, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2008. Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190: 7947–7956.
- 10) Toyofuku, M., N. Nomura, T. Fujii, N. Takaya, H. Maseda, I. Sawada, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2007. Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 189: 4969–4972.
- 11) Valle, A., M.J. Bailey, A.S. Whiteley, and M. Manefield. 2004. N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environ. Microbiol.* 6: 424–433.
- 12) Vendeville, A., K. Winzer, K. Heurlier, C. M. Tang, and K. R. Hardie. 2005. Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 383–396.
- 13) Wagner, V.E., D. Bushnell, L. Passador, A.I. Brooks, and B.H. Iglewski. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185: 2080–2095.