

## 活性汚泥中の硝化菌に対する微生物細胞間シグナルの影響

### Effects of Bacterial Signaling Molecules on Nitrifying Bacteria in Activated Sludge

河嶋伊都子<sup>1</sup>, 小林 祐子<sup>1</sup>, 豊福 雅典<sup>1</sup>, 橋本 庸平<sup>2</sup>,  
稲葉 英樹<sup>2</sup>, 内山 裕夫<sup>1</sup>, 野村 暢彦<sup>1\*</sup>  
ITSUKO KAWASHIMA<sup>1</sup>, YUKO KOBAYASHI<sup>1</sup>, MASANORI TOYOFUKU<sup>1</sup>, YOHEI HASHIMOTO<sup>2</sup>,  
HIDEKI INABA<sup>2</sup>, HIROO UCHIYAMA<sup>1</sup> and NOBUHIKO NOMURA<sup>1\*</sup>

<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> 住友重機械工業株式会社技術研究所 〒237-8555 横須賀市夏島町 19 番地

\* TEL/FAX: 029-853-6627

\* E-mail: nomura.nobuhiko.ge@u.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> Technology Research Center, Sumitomo Heavy Industries, Ltd., Natsusima 19, Yokosuka, Kanagawa 237-8555, Japan

キーワード: 活性汚泥, AHL, 硝化

Key words: activated sludge, AHL, nitrification

(原稿受付 2013 年 11 月 15 日 / 原稿受理 2013 年 11 月 22 日)

#### 1. はじめに

実環境中には多種多様な微生物が存在しているが、それらは単独で生育しているのではなく、様々な菌種が混在する「複合微生物系」と呼ばれる状態で生育している。このような複合微生物系は我々の生活、社会、環境にも深く関わっており、土壌・地下水のバイオレメディエーションや生物学的排水処理プロセスはその代表的な利用例である。しかしながら様々な菌種が混沌と存在している中から、我々人間にとって有用な特定の細菌群のみの制御を行うことは非常に困難である。そのため、このような複合微生物系の中から有用な能力を持つ微生物の代謝を活性化させて上手く利用していくことは、より効率的な環境浄化の実現のために必要不可欠な課題といえる。

また一方で着目すべきは、近年の研究によって明らかになってきた「微生物細胞間シグナル物質」である。これは微生物間のコミュニケーションに用いられる低分子化合物であり、微生物はこのシグナル物質を受け取ることにより自身の遺伝子発現を変化させ、個々の生育や代謝、さらには集団としての挙動を変えることが報告されている<sup>7,15,16,22,23</sup>。さらに、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、その特異性を利用して目的の細菌群を制御できる可能性が、複合微生物系である硝化活性汚泥を用いた実験で明らかとなっている<sup>9</sup>。

そこで本稿では、この活性汚泥における硝化活性の制御とそのメカニズムの解明を目的とした実験結果を報告

し、微生物細胞間シグナル物質を用いた複合微生物系への新規制御法確立について記していく。

#### 2. 複合微生物系における 生物細胞間コミュニケーション

従来、微生物の挙動は pH, 温度, 栄養などの物理化学的な条件によって決定されると考えられてきたが、近年は微生物細胞間シグナル物質と呼ばれる低分子化合物を介した細胞間コミュニケーションによる制御が明らかとなり研究が進められている。前述したように微生物細胞間シグナル物質を介した細胞間コミュニケーションとは、細胞外に排出された低分子化合物が、その特異的な受容体を介して転写レベルでの遺伝子発現調節を行うことであり、これまでに様々な構造を持つシグナル物質が報告されている<sup>7,15,16,22,23</sup>。グラム陰性菌においては *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL) が代表的なシグナル物質であり、図 1 に AHL の基本構造を示す。そして一般的にシグナル物質の作用機構は受容体を介してお

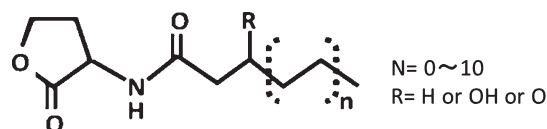


図 1. AHL の基本構造

ラク톤環に炭素数 4 ~ 14 のアシル鎖がつき、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 の特異性が決定している。

り、微生物が環境中に分泌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ことが知られている<sup>5,10,21,24</sup>。この遺伝子調節機構は細胞の形態変化や毒素などの物質生産に影響するだけでなく、挙動やいくつかの細菌においては細胞間シグナル物質がエネルギー獲得機構、つまりはその代謝と生育にまで影響を与えることが観察されている<sup>6,8</sup>。当研究室の先行研究においても、*P. aeruginosa* においては、自身が生産する AHL の一種である C4-HSL および 3-oxo-C12HSL が、窒素酸化物を電子受容体とした嫌気呼吸である脱窒を抑制し、さらに、*P. aeruginosa* が生産するもう一種のシグナル物質である PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) は AHL とは別の機構で脱窒を抑制することが明らかとなっている<sup>18,19</sup>。

こうした微生物細胞間シグナルとそれを用いた細胞間コミュニケーションの研究において、現在までに詳しく検証されているのは *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。しかしながら実環境中において微生物は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として生育している。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も挙げられる。そしてこのような複合微生物系においてもシグナル物質を介した細胞間コミュニケーションが行われていることが予想される。これは活性汚泥から単離された細菌において AHL の生産が観察されており<sup>12</sup>、活性汚泥の細胞外成分を対象としたメタボローム解析から多数の既知微生物細胞間シグナル物質様物質が検出されたこと等が理由である。加えて、活性汚泥中に広く存在するアンモニア酸化細菌の代表的な菌 *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おり<sup>9</sup>、さらには 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も存在している<sup>3</sup>。

細胞間コミュニケーションの研究の発展として、純粋培養が可能な微生物種では微生物細胞間シグナルを用いた微生物の新規の制御方法へ応用がなされてきている<sup>5,24</sup>。しかしながら、同じように細胞間コミュニケーションの存在が示唆される複合系に関しては、その制御方法にこの細胞間シグナルが応用されている例はほとんど存在していない。そのため、この機構を利用することで実環境中に存在している微生物複合系を制御していく新たな方法が確立できるかもしれない。

### 3. 活性汚泥の生物学的窒素除去プロセスとその課題

現在、日本の排水処理現場では主に標準活性汚泥法による生物処理プロセスが用いられている。活性汚泥は前述したとおり、様々な種の菌が凝集体を形成している微生物複合系の代表例である。この活性汚泥に含まれる微生物の代謝機能を利用し、排水中に含まれる有機性汚濁物質を分解処理しているのである<sup>13</sup>。

排水に含まれる有機性汚濁物質のなかでも、生活排水や工業排水に由来する窒素は排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排水処理工程において重要な位置付けにある。しかしながら、この窒素除

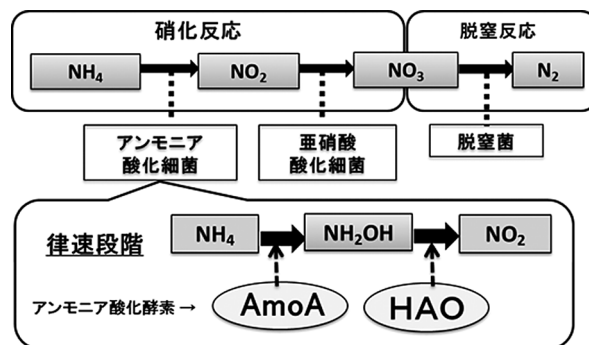


図2. 硝化・脱窒反応におけるアンモニア酸化

活性汚泥における生物学的窒素除去プロセス。アンモニアから亜硝酸、硝酸への酸化反応である硝化反応と硝酸から窒素ガスへの還元反応である脱窒反応によって構成されている。またアンモニア酸化の1段階目の酸化反応を担う酸化酵素 AmoA と、2段階目の酸化反応を担う酸化酵素 HAO を示す。

去プロセスは不安定である場合が多く、しばしば処理能力が低下するなど、排水処理現場における問題点となっている。一般に、排水からの窒素除去は図2のように進行し、アンモニアがアンモニア酸化細菌及び、亜硝酸酸化細菌により硝酸へ酸化され、続いて脱窒菌により硝酸は窒素ガスへ還元される。これらの硝化・脱窒反応を担う細菌群の中で、アンモニア酸化細菌群は他の従属栄養微生物に比べ、環境変化に対する感受性が高く、温度や pH 変化等の物理的因子や排水中に存在する低濃度の化学物質によって影響を受けるため、その活性維持および向上が難しい。そのため「アンモニアの酸化」が一連の処理反応の律速段階となっており、活性の向上が求められる。

従来は汚泥活性化のため、温度や溶存酸素濃度、pH の条件検討といった物理化学的な手法が用いられてきたが、これらの物理化学的な手法では特定の菌のみへのアプローチができなため、複合微生物系の一部として存在する有用微生物の活性化には限界があると指摘されていた。そこで前述した細胞間コミュニケーションの知見を利用し、この活性汚泥に対して微生物細胞間シグナル物質を投与することで、汚泥中の有用微生物つまり硝化活性を担うアンモニア酸化細菌を特異的に活性化させる新規の制御方法の開発を試みた。

### 4. 微生物細胞間シグナル物質を用いた硝化汚泥活性化

まず、本研究では微生物細胞間シグナル物質が活性汚泥の硝化活性に影響するかどうかを調べるために、シグナル物質添加・非添加の系における硝化課程で生じる反応産物量を比較した。本実験ではシグナル物質として短鎖のアシル基をもつ AHL の一種である C4-HSL を用いた。

この C4-HSL は硝化反応と密接な反応である脱窒反応が制御されることが先行研究において明らかとなっている<sup>18</sup>。硝化培地に反応基質であるアンモニアを 50 mM 加え、活性汚泥と混合して培養を行った。なお、培養はバッチ系で 30°C・振とう条件で行った。この培養系は C4-HSL の添加・非添加の系を作成して、培養後

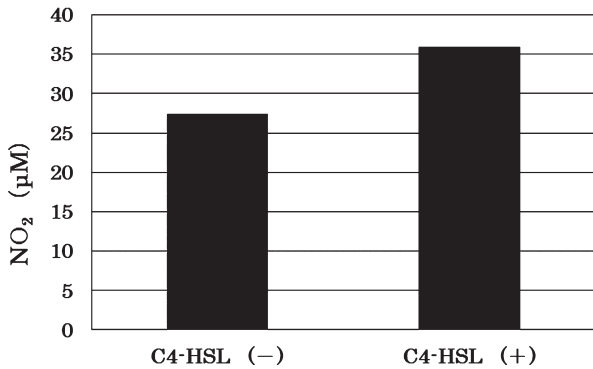


図3. 微生物シグナル物質添加・非添加における亜硝酸濃度の比較

50 mM のアンモニアを基質として加えた硝化培地で活性汚泥を 24 h 培養後、C4-HSL (10 mM) 添加と非添加の系で亜硝酸濃度比較をした。

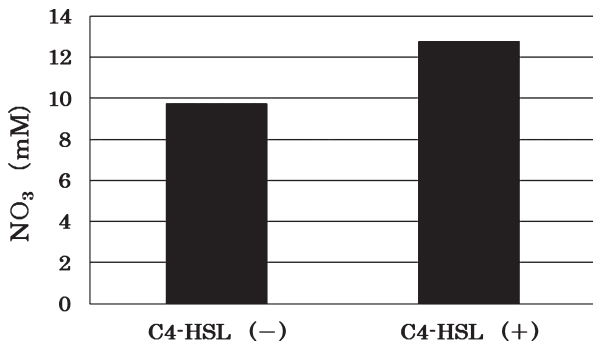


図4. 微生物シグナル物質添加・非添加における硝酸濃度の比較  
50 mM のアンモニアを基質として加えた硝化培地で活性汚泥を 7 日間培養後、C4-HSL (10 mM) 添加と非添加の系で硝酸濃度比較をした。

にそれぞれの系からアンモニアの酸化産物である亜硝酸と硝酸を測定した。

この結果、硝酸・亜硝酸濃度共にシグナル物質 C4-HSL を添加した系の方が高い値を示した (図3・図4)。さらに、この活性汚泥の培養を 7 日間続けて継続的にサンプリングを行った。その結果、亜硝酸に関しては C4-HSL を添加した系の方が短時間でピーク値に到達し、そのピーク濃度も高い値であった。このピークを過ぎると亜硝酸の検出濃度は急激に減少するが、減少もまたシグナル物質添加の系のほうが早いことが確認された。一方硝酸に関しては検出濃度が上昇し続け、培養 5 日目あたりからシグナル添加・非添加の差が生じ始めて次第にその差が大きくなる様子が確認された (図省略)。以上の結果より、本実験で用いた活性汚泥に関しては、シグナル物質を添加することで硝化活性が向上することが示唆された。

### 5. 複合微生物系からの RNA・DNA 抽出

硝化反応産物測定により、シグナル物質の添加によって活性汚泥の硝化活性が向上することが明らかとなった。しかしながら、添加したシグナル物質が実際に活性汚泥中で硝化反応のアンモニア酸化に影響を与えている

かは分からない。つまり、このシグナル物質が硝化活性向上へどのように作用しているかは不明なままである。そこで本研究では、図3の結果より亜硝酸の生産に差異が生じていたため、硝化反応の第一段階目である亜硝酸生産反応、つまりアンモニア酸化を担っている酵素 Amo とそれをコードしている *amoA* 遺伝子に着目した (図2)。この AmoA はアンモニアを酸化する細菌には必要不可欠な酵素であるため、その遺伝子の DNA 量の定量値は活性汚泥中のアンモニア酸化細菌数を表す指標として用いられる。また、この *amoA* 遺伝子の RNA を定量することで、この *amoA* 遺伝子がどれだけ転写されているか、アンモニア酸化が転写レベルでどのような影響を受けているかが明らかとなる。すなわち、これらアンモニア酸化細菌数やアンモニア酸化酵素遺伝子の転写に対するシグナル物質添加の影響がわかれば、前述した活性汚泥の硝化活性向上のメカニズムに迫ることができる。

そこで、我々はシグナル物質を介した硝化活性化のメカニズムを解明するために、活性汚泥からの DNA と RNA の抽出を試みた。活性汚泥からの DNA の抽出は報告例も多数存在しており、土壌用から DNA 抽出、精製が可能である FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いることで、本汚泥からも DNA を抽出することができた。しかしながら、活性汚泥のような複合微生物系からの RNA の抽出は容易ではなかった。それは様々な微生物の代謝産物が混在しているため、分解されやすい RNA は抽出しにくいと考えられる。活性汚泥から RNA を抽出している報告はいくつか存在するが<sup>12,11)</sup>、複合系の活性汚泥はその由来が異なれば生息する微生物種やその性質も大きく異なるため、各汚泥に合った抽出方法の確立が好ましいようである。そこで、他の報告で用いられていた抽出方法を組み合わせ条件検討を行った。その結果、ガラスビーズとフェノールを用いて菌体を物理化学的に破碎した後、エタノール沈殿により高分子を落とすリチウム沈殿を併用することで、本実験で用いた活性汚泥から RNA を効率的に抽出することに成功した (図5)。

### 6. 微生物細胞間シグナル物質によるアンモニア酸化細菌への影響

微生物細胞間シグナル物質を介した硝化活性向上のメカニズムを明らかにするために硝化活性を測定した活性汚泥のシグナル物質添加・非添加の系それぞれから DNA と RNA を前述の方法で抽出した。その後リアルタイム PCR を用いて *amoA* DNA と RNA の測定をして値を比較した。なお、RNA は cDNA 化した後にリアルタイム PCR に供し、DNA・cDNA の増幅には同様の *amoA* プライマーを用いた<sup>14)</sup>。

まず、活性汚泥中にシグナル物質である C4-HSL を添加すると *amoA* DNA の量が増加していることが確認された。これは、アンモニア酸化酵素の遺伝子をもつアンモニア酸化菌の割合が活性汚泥中で増加したことを示唆する。つまり、シグナル物質を活性汚泥に添加するとアンモニア酸化細菌の細菌数に影響を与えていると考えられる。さらに、*amoA* RNA の量に関しても、シグナ



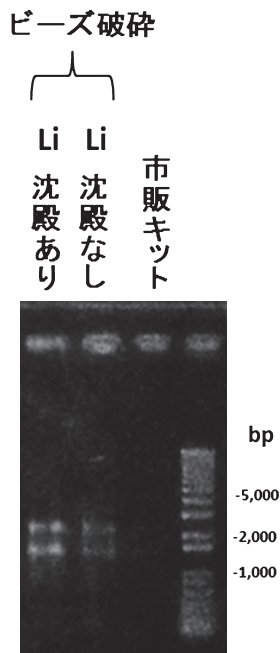


図5. 活性汚泥から抽出した RNA の泳動写真  
活性汚泥から抽出した RNA を 1.2% アガロースゲルで泳動した。抽出方法は左のレーンから、ガラスビーズ破碎＋リチウム沈殿、ガラスビーズ破碎、市販キット。

ル物質非添加の系に比べてシグナル物質を添加した系では、著しくその値が上昇していた。このことから、シグナル物質の添加によってアンモニア酸化酵素をコードする *amoA* 遺伝子の転写にも影響を与えていることが示唆される。

この *AmoA* 酵素は、アンモニア酸化細菌にとっては呼吸代謝に必要な酵素である。以上のことから硝化活性向上のメカニズムを考察すると、活性汚泥にシグナル物質を添加することでアンモニア酸化酵素 *amoA* の発現が活性化されて、その割合が上昇し、結果として活性汚泥全体の硝化活性が向上したのではないかと考えられる。

## 7. おわりに

本実験によって、シグナル物質を活性汚泥に添加すると硝化活性と *amoA* の DNA と RNA 量が上昇することが示唆された。これらの結果は、前述したようにシグナル物質がアンモニア酸化細菌に作用して *amoA* の転写活性をあげることで代謝を活性化させて菌体の割合を増加させること。そしてその結果として汚泥全体としての硝化活性が向上するというシグナル物質の作用メカニズムの可能性も示す。しかしながら実際の酵素 *AmoA* の活性や、ターゲットとなる菌種は未だに不明なままである。そのため今後は、酵素タンパクの活性測定や DGGE によるシグナル物質添加・非添加区の菌叢比較を行う予定である。この研究がより発展していけば、シグナル物質のより詳細な作用メカニズムが明らかとなり、シグナル物質添加を介した硝化活性の更なる向上につながると期待している。

さらに本研究は硝化汚泥のみならず、微生物複合系の

新規制御法確立のためにも重要な知見となるだろう。近年では、シグナル物質を添加すると複合微生物系において微生物相が変化し、フェノール分解能が安定的に維持されたとの報告もされている<sup>20)</sup>。また、シグナル物質が異種細菌の生育を抑制するということが明らかとなってきている<sup>17)</sup>。そのため実環境中に広く存在し、我々の生活に深く関係をしている複合微生物系を、特異的に制御できる新たな制御法への応用としても、微生物細胞間シグナル物質と細胞間コミュニケーションの分野はさらなる発展をしていくことだろう。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省からの科学研究費補助、科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (CREST) および先端的低炭素化技術開発 (ALCA) の補助を受けて行われました。この場を借りて感謝いたします。

## 文 献

- 1) Aoi, Y., Y. Masaki, S. Tsuneda, and A. Hirata. 2004. Quantitative analysis of *amoA* mRNA expression as a new biomarker of ammonia oxidation activities in a complex microbial community. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 39(6): 477–482.
- 2) Aoi, Y., Y. Shiramasa, Y. Masaki, S. Tsuneda, A. Hirata, A. Kitayama, and T. Nagamune. 2004. Expression of *amoA* mRNA in wastewater treatment processes examined by competitive RT-PCR. *J. Biotechnol.* 2004 Jul 15; 111(2): 111–120.
- 3) Batchelor, S., M. Cooper, S. Chhabra, L. Glover, G. Stewart, P. Williams, and J. Prosser. 1997. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2281–2286.
- 4) Burton, E., H. Read, M. Pellitteri, and W. Hickey. 2005. Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4906–4909.
- 5) Davies, D., M. Parsek, J. Pearson, B. Iglewski, J. Costerton, and E. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295–298.
- 6) Eberl, L., M.K. Winson, C. Sternberg, G.S. Stewart, G. Christiansen, S.R. Chhabra, B. Bycroft, P. Williams, S. Molin, and M. Givskov. 1996. Involvement of *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* 20: 127–136.
- 7) Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269–275.
- 8) 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.
- 9) 小林祐子, 豊福雅典, 稲葉英樹, 橋本庸平, 内山裕夫, 野村暢彦. 2009. 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. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 9: 109–111.
- 10) Lupp, C. and E. Ruby. 2004. *Vibrio fischeri* LuxS and AinS: comparative study of two signal synthases. *J. Bacteriol.* 186: 3873–3881.
- 11) McIlroy, S.J., K. Porter, R.J. Seviour, and D. Tillett. 2009. Extracting nucleic acids from activate d sludge which reflect community population diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 96(4): 593–605. doi: 10.1007/s10482-009-9374-z.

- 12) Morgan-Sagastume, F., N. Boon, S. Dobbelaere, T. Defoirdt, and W. Verstraete. 2005. Production of acylated homoserine lactones by *Aeromonas* and *Pseudomonas* strains isolated from municipal activated sludge. *Can. J. Microbiol.* 51: 924–933.
- 13) 村田恒雄. 1992. 下水の高度処理技術. 理工図書株式会社.
- 14) Rotthauwe, J.H., K.P. Witzel, and W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4704–4712.
- 15) Ryan, R. and J. Dow. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* 154: 1845–1858.
- 16) Taga, M.E. and B.L. Bassler. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 Suppl 2: 14549–14554.
- 17) Toyofuku, M., T. Nakajima, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. The effect of a cell-to-cell communication molecule, *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), produced by *P. aeruginosa* on other bacterial species. *Microbes. Environ.* 25, 1: 1–7.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Valle, A., M. Bailey, A. 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.
- 21) Wagner, V., D. Bushnell, L. Passador, A. Brooks, and B. Iglewski. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185: 2080–2095.
- 22) Williams, P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153: 3923–3938.
- 23) Williams, P., K. Winzer, W.C. Chan, and M. Cámara. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362: 1119–1134.
- 24) Winson, M.K., M. Camara, A. Latifi, M. Foglino, S.R. Chhabra, M. Daykin, M. Bally, V. Chapon, G.P. Salmond, and B.W. Bycroft. 1995. Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 9427–9431.