

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25241020

研究課題名(和文) 微生物シグナルを利用した微生物集団制御技術の科学的基盤確立に関する研究

研究課題名(英文) Basic study of biofilm control by using bacterial signals

研究代表者

野村 暢彦 (NOMURA, Nobuhiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60292520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,900,000円

研究成果の概要(和文)：持続可能な水利用の技術開発の取り組みは必須である。そこで、これまでブラックボックスであった活性汚泥中の微生物間相互作用の理解への扉を開くことを目的として研究を進めた。具体的には、複合微生物の挙動・局在を経時的に解析できる新規イメージング技術を用いて、実活性汚泥における細菌シグナルのレスポンスなどの時空間解析の構築に成功し、実活性汚泥において微生物コミュニケーションが存在する事を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Promotion of issues regarding technology development for a sustainable supply of water is important. One pressing issue is the control of microorganisms in activated sludge which is required in waste water treatment. Microorganisms exist as multi-species biofilms, however, biofilm control is often based on engineering approaches, such as nutrients, pH, and oxygen supply, but these approaches are rapidly reaching their limit. Therefore, control technology and the theory of innovative multi-species biofilms is of vital importance. In light of this, we investigated cell-cell communications in activated sludge, and indicated that interactions between bacteria exist in activated sludge by using a new imaging technology.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バイオフィルム 微生物間相互作用 細菌シグナル クォーラムセンシング 活性汚泥

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 水の浄化技術は、持続可能な水利用において重要である。下水、排水(廃水)などの微生物を用いた生物処理方法として活性汚泥法による水処理技術は、日本中で利用されている。そして、その活性汚泥法を用いた水処理技術は、プロセス設計や運転条件の最適化など、完成の域に到達していると考えられている。しかしながら、活性汚泥法においては、処理スピードや過大な設備、大量の汚泥の発生など、省エネルギーなどの観点からは、未だ問題点も多い。これらの原因の一つには、現在の活性汚泥法の制御は、あくまでも環境因子のみの制御であり、自然の活性の域を超えていない点にある。そこで、これ以上の改善のためには、これまでの溶存酸素や pH さらにはエタノール(電子受容体)添加などによる微生物集団の全体的な制御とは異なり、集団中の目的微生物群のみを制御する新しいアプローチが必須である。

(2) 近年、微生物集団内において微生物細胞間コミュニケーションが行われていることが明らかになってきた。微生物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(細菌シグナル)が他細胞で受け取られ、様々な遺伝子発現そして酵素活性に影響を与える現象である。グラム陰性菌で、側鎖のアシル基が異なるアシル化ホモセリンラクトン(AHL)が発見され、AHLと特異的に結合する受容体も同定され、それは Quorum-sensing と呼ばれている。現在、グラム陰性菌、陽性菌を問わず様々な細菌で細菌シグナルが発見されている。しかし、これら微生物コミュニケーションの研究は感染症を中心とした医学の分野で注目されているが、水処理などの環境分野では、科学的検証が少なく認知されていない。しかし、研究代表者は、水処理の窒素除去において最も重要な脱窒(呼吸)が細菌シグナルにより制御されることを世界で初めて明らかにした。具体的には、環境常在菌として世界中で用いられているモデル細菌緑膿菌において、そのシグナルである C4-HSL(ホモセリンラクトン)および PQS(Pseudomonas quinolone signal)が生育に必要な呼吸(脱窒(嫌気呼吸))を制御することを世界で初めて明らかにした。

2. 研究の目的

そこで、実活性汚泥において微生物コミュニケーションが存在する事を科学的に証明し、革新的活性汚泥制御法の基盤構築を図る。

具体的には、複合微生物の挙動・局在を経時的に解析できる新規イメージング COCRM 法などのオリジナル技術を用いて、実活性汚泥における細菌シグナルのレスポンスなどの時空間解析の構築を行う事で、

これまでブラックボックスであった活性汚泥中の微生物間相互作用の理解への扉を開くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細菌シグナルのセンサー細菌の作製
細菌コミュニケーションにおける細菌シグナルに反応する細胞(細菌)を作製する。具体的には、細菌シグナルとして、AHL(アシル化ラクトホモセリン)を標的にしたセンサー細菌を作製する。レポーターとして蛍光タンパクである GFP 等を用いる。また、それらを組込む細菌は活性汚泥に定着が必須となる。よって、これまで活性汚泥に存在が確認されている属・種を考慮に入れて選抜した。

(2) 活性汚泥におけるシグナル応答の 3D 解析

様々な微生物が集まっている複合微生物系のバイオフィルム(BF)3次元構造解析は染色や固定を伴うため、生きたままの BF 構造の観察は蛍光タンパク質に因っており、よって活性汚泥など複合微生物の解析は進んでいないのが現状であった。しかし、回折散乱光をシグナルとして対象(BF中の各細菌1細胞)を立体的に可視化し、取得した3次元画像からバイオフィルム立体構造およびその体積も算出出来る共焦点レーザー反射顕微鏡解析による新規イメージング技術 COCRM 法(Continuous Optimizing Confocal Reflection Microscopy)を開発し、活性汚泥など細菌集団 BF の三次元構造をありのままに観察・解析することに成功した。本法は、従来の蛍光タンパク質観察技術(あるいは蛍光染色)を組み合わせて使用することにより、BFの構造及びその内部の1細胞の3次元局在遷移を継時的に簡単に解析することが可能になる。そこで、(1)で作製したシグナルセンサー細菌を実活性汚泥サンプルに投入し、その定着の局在、さらに、シグナルのレスポンスについて 3D 解析を行った。

(3) 使用培地

LB 液体培地(各セレクション時には適した抗生物質を混合)、LB 固体培地(1.5%寒天培地、各セレクション時には適した抗生物質を混合)、VBMM 液体培地、VBMM 固体培地(1.5%寒天培地、各セレクション時には適した抗生物質を混合)

4. 研究成果

(1) 細菌シグナルのセンサー細菌の作製
活性汚泥に存在が確認されている微生物属・種を考慮に入れ、*Pseudomonas* 属細菌(*Pseudomonas putida*)を宿主細胞に選定し、細菌シグナル(N-dodecanoylhomoserine lactone, C12-AHL)に反応した時に、緑色蛍光を発する、シグナル応答センサー細菌

の構築に成功した。また、本細菌の活性汚泥への定着性もあわせて評価するために、同細菌にさらに赤色蛍光を発する蛍光タンパクの導入を行い同様に成功した。

(2) 活性汚泥におけるシグナル応答の3D解析

構築したシグナルセンサー細菌を実活性汚泥 A に添加してまずその付着性を調べた。

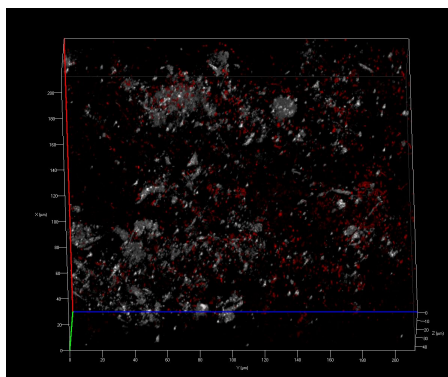


図1 実活性汚泥 A (灰色) のシグナルセンサー細菌 (赤) の定着 3D 解析

活性汚泥中の様々なフロック(複合微生物)に局在(赤色蛍光)が確認出来た(図1)。

続いて、それらが細菌シグナルにレスポンスしているかを同様に確認した。その結果、シグナルにレスポンスしたと思われる緑色蛍光を発する細胞の局在が確認出来た。このことは、活性汚泥の各フロックに含にシグナルを産生する細菌が存在することも示される。

続いて、局在とシグナルレスポンスの同時観察を行った。

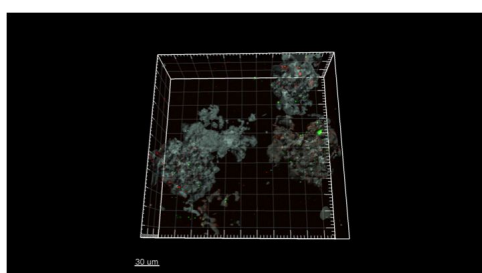


図2 実活性汚泥 A (灰色) のシグナルセンサー細菌の定着 (赤) とそのシグナルレスポンス (緑) の3D解析。

その結果、非常に興味深いことに、シグナルにレスポンスする細胞(緑色+赤色=黄色)と、していない細胞(赤色)の局在が確認出来た(図2)。このことは、活性汚泥において、局在的に細菌シグナルによる相互作用が行われていることを示しており、細菌シグナルの輸送の効率化などが可能に

なれば、さらなる微生物活性の向上が見込めることを示唆している。

そこで、さらに細菌シグナルの効率的輸送を担うメンブランベシクル(MV)の解析をその生成メカニズムもあわせて進め成果が得られた。さらに、活性汚泥に広く存在が確認されている脱窒細菌の呼吸鎖や QS および MV さらに付着などの種々基盤研究も進め優れた研究成果が得られた。また、応用展開としても、それらの細菌の制御としてバイオフィーム形成や運動性などについての制御についても成果が得られた。これらの制御についてさらなる展開研究を可能にするデバイス開発にも成功した。

以上、本成果は、これまでの活性汚泥研究に新たな知見をもたらすと共に、応用展開への基盤構築となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Yang J, Toyofuku M, Sakai R, Nomura N. Influence of the alginate production on cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 *Environ Microbiol Rep.*, 9:239-249. (2017) (査読有り) [doi: 10.1111/1758-2229.12521](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12521)

Yoshida K, Toyofuku M, Obana N, Nomura N. Biofilm formation by *Paracoccus denitrificans* requires a type I secretion system dependent adhesin BapA. *FEMS Microbiol Lett.*, 364(4). (2017) (査読有り) [doi: 10.1093/femsle/fnx029](https://doi.org/10.1093/femsle/fnx029).

Toyofuku M, K Morinaga, Y Hashimoto, J Uhl, H Shimamura, H Inaba, P Schmitt-Kopplin, L Eberl, N Nomura. Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *The ISME Journal*, 11:1504-1509 (2017) (査読有り) [doi:10.1038/ismej.2017.13](https://doi.org/10.1038/ismej.2017.13)

Kiyokawa T, Usuba R, Obana N, Yokokawa M, Toyofuku M, Suzuki H, Nomura N. A Versatile and Rapidly Deployable Device to Enable Spatiotemporal Observations of the Sessile Microbes and Environmental Surfaces. *Microbes Environ.*, 32(1):88-91. (2017) (査読有り) [doi: 10.1264/j sme2.ME16161](https://doi.org/10.1264/j sme2.ME16161).

Turnbull, L., M. Toyofuku, AL. Hynen, M. Kurosawa, G. Pessi, NK. Petty, SR. Osvath, G. Cárcamo-Oyarce, ES. Gloag, R. Shimoni, U. Omasits, S. Ito, X.

Yap, LG. Monahan, R. Cavaliere, CH. Ahrens, IG. Charles, N. Nomura, L. Eber and CB. Whitchurch. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat. Commun.*, 7:11220. (2016) (査読有り) [doi:10.1038/ncomms11220](https://doi.org/10.1038/ncomms11220)

Inaba, T., H. Oura, K. Morinaga, M. Toyofuku, N. Nomura. The Pseudomonas quinolone signal inhibits biofilm development of *Streptococcus mutans*. *Microbes Environ.*, 30(2):189-191. (2015) (査読有り) doi: 10.1264/jisme2.ME14140.

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, Nomura N. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming Motility by 1-Naphthol and Other Bicyclic Compounds Bearing Hydroxyl Groups, Applied and Environmental Microbiology, 81:2808-18. (2015) (査読有り) doi: [10.1128/AEM.04220-14](https://doi.org/10.1128/AEM.04220-14).

Hamada M, M. Toyofuku, T. Miyano, N. Nomura. Aerobic Respiratory Enzymes, Cbb3-type Cytochrome Oxidases, Impact the Anaerobic Life of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Journal of Bacteriology, 196:3881-9. (2014) (査読有り) DOI: [10.1128/JB.01978-14](https://doi.org/10.1128/JB.01978-14)

〔学会発表〕(計11件)

野村暢彦、複合微生物系における細胞間シグナル伝達、JBA 発酵と代謝研究会 平成29年度第2回勉強会(招待講演)、JBA 本部(東京都)、2018年

野村暢彦、微生物制御3.0 ~集団微生物学のすすめ~、農芸化学100年シンポジウム(招待講演)、徳島大学(徳島市)、2017年

野村暢彦、集団微生物間ネットワークとバイオフィーム、第66回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第64回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会(招待講演)、京王プラザ(東京都新宿区)、2017年

野村暢彦、微生物バイオフィーム制御の新展開、日本セラミックス協会秋季

シンポジウム(招待講演)、神戸大学(神戸市)、2017年

野村暢彦、微生物制御3.0、第31回日本バイオフィーム学会学術集会(招待講演)、筑波大学(つくば市)、2017年

野村暢彦、細菌の細胞死とバイオフィーム ~One for All, All for One? ~、アドバンスド・セミナー(大阪大学微生物病研究所)(招待講演)、大阪大学(吹田市)、2017年

野村暢彦、ミクロな微生物社会を掴む新技術、第90回日本細菌学会総会(招待講演)、2017年

野村暢彦、微生物バイオフィームの三次元構造解析と新規制御法の展開、腐食防食学会シンポジウム(招待講演)、中央大学駿河台記念館(東京都千代田区)、2016年

野村暢彦、細菌の細胞死とバイオフィーム ~ One for all ~、日本農芸化学会関東支部例会(招待講演)、東京農業大学(東京都小金井市)、2016年

豊福雅典、稲葉知大、尾花望、野村暢彦、微生物細胞間シグナルの利用による革新的水処理技術への挑戦(依頼講演)、環境微生物系学会合同大会2014、アクトシティ浜松、2014年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.envr.tsukuba.ac.jp/~microbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 暢彦 (NOMURA, Nobuhiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60292520