

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02270

研究課題名(和文) 活性汚泥内に存在する微生物細胞間シグナル物質の多様性、動態、作用機構の解明

研究課題名(英文) Diversity, dynamics and function of microbial cell-cell signaling molecules present in activated sludge

研究代表者

飛野 智宏 (Tobino, Tomohiro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師

研究者番号：90624916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：下廃水の生物学的処理プロセスである活性汚泥法を対象とし、その中の微生物細胞間情報伝達機構(クオラムセンシング)を解明するための研究を進めた。具体的には、クオラムセンシングで用いられるシグナル物質を、未知のものを含めて幅広く探索するための手法を確立し、実処理場内に存在するシグナル物質の多様性と動態を明らかにした。また、活性汚泥内に存在するシグナル物質合成酵素遺伝子の多様性を明らかにするため、遺伝子キャプチャー法を用いた解析を行い、未報告の多様な遺伝子配列を得るとともに、それがシグナル物質に反応して発現していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、活性汚泥内の微生物細胞間相互作用であるクオラムセンシングに着目し、クオラムセンシングで用いられるシグナル物質の検出・探索手法の確立と遺伝子解析を行い、これまで知られていなかったシグナル物質の多様性と動態を明らかにした。活性汚泥法は近代下水処理技術のスタンダードとして世界中で広く普及しているが、その運転制御はもっぱら経験的なノウハウに基づいて行われており、真のポテンシャルを発揮しているとは言い難い。本研究の成果は、活性汚泥内のクオラムセンシング機構の理解とその活用に向けた基礎的知見を提供するものであり、将来の生物学的水処理プロセスの高度化に資するものである。

研究成果の概要(英文)：We conducted research to elucidate the mechanism of signaling system between microbial cells (quorum sensing) in activated sludge processes. Specifically, we established a method to search for a wide range of signaling compounds used in quorum sensing, including unknown ones, and clarified the diversity and dynamics of signaling compounds existing in actual wastewater treatment plants. In addition, to clarify the diversity of signaling compound synthase genes present in activated sludge, we applied a gene capture method to obtain diverse gene sequences that have not yet been reported, and confirmed that they are actually expressed in response to signaling compounds.

研究分野：環境工学

キーワード：クオラムセンシング 活性汚泥 アシルホモセリンラクトン 高分解能質量分析 複合微生物系

1. 研究開始当初の背景

近代下水道において、下水の処理にはもっぱら生物学的処理プロセスである活性汚泥法が用いられている。活性汚泥法では、溶存酸素濃度や固形物の滞留時間等の制御を通して、目的とする微生物反応をコントロールし、求められる処理水質を達成する。しかし、これらの制御はもっぱら経験的なノウハウに基づいて行われており、また制御可能なプロセス変数も限られていることから、活性汚泥法の有するポテンシャルを最大限に発揮できているとは言い難い。

環境中に存在する一部の細菌は、クオラムセンシング (quorum sensing, QS) と呼ばれる細胞間情報伝達機構を有することが知られている。微生物間コミュニケーションと称されることもあり、細菌細胞が特定のシグナル物質を生産し、細胞間で授受を行うことで、遺伝子発現を制御し、生理機能 (バイオフィーム形成や病原性発現、等) を調節する機構である。近年、QS が活性汚泥内で機能し、処理性能に影響を及ぼすことが報告されてきている。特に、膜分離活性汚泥法 (Membrane bioreactor, MBR) における膜目詰まりと QS の関連を示した報告^[1]以降、QS に基づく MBR 膜ファウリング制御の報告が多くなされてきている。これらは、微生物生態学における機構を工学的プロセスに応用した点で革新的であり、生物学的な水処理全般における制御技術へと応用できる発展性を秘めている。また、QS で用いられる細胞間シグナル物質が一定の種特異性を有することから、従来の運転管理では困難であった複合微生物系内の特定の微生物グループを標的としたプロセス制御の手段を提供できる可能性を有している。

一方で、活性汚泥内に存在する QS のシグナル物質の多様性や動態についてはほとんど明らかとなっていない。活性汚泥内には数百種以上の細菌が存在しており、未知のものを含めた多種多様なシグナル物質を介した相互作用が存在しているはずであるが、既往の報告 (例えば^[2]) は標準物質を入手可能な一部のシグナル物質しか分析対象としていない。また、上述の MBR 膜ファウリング制御への応用研究では、その効果ばかりが着目され、なぜシグナル物質濃度を操作することで膜目詰まりが抑制されるのか、その原理的理解が置き去りにされている感が否めない。これらのギャップを埋めるためには、活性汚泥内にどのようなシグナル物質が存在し、それらがどのように系内の微生物機能に影響しているのか、活性汚泥内シグナル物質の多様性、動態および作用機構を基礎的なレベルで明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、活性汚泥内の QS シグナル物質の多様性、動態および作用機構を明らかとすることを目的とし、QS シグナル物質の探索手法の確立および QS シグナル物質生産遺伝子の多様性解析の 2 つを中心として研究を進めた。具体的には、高分解能質量分析による活性汚泥中に存在する潜在的 QS シグナル物質のノンターゲット分析手法の確立と遺伝子キャプチャー法を用いた *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) 合成酵素遺伝子の多様性解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 高分解能質量分析による潜在的 QS シグナル物質のノンターゲット分析手法の確立

活性汚泥中で優占しているグラム陰性細菌で広く用いられていることが知られているシグナル物質である AHLs を QS シグナル物質の代表物質として、未知の構造体を含めた AHLs の網羅的探索手法の最適化を進めた。AHLs はその分子内にホモセリンラクトン環を有するため、質量分析での MS2 スペクトルでホモセリンラクトン環に由来する共通するプロダクトイオン (signature fragments, SFs) が検出される。このことを利用し、高分解能質量分析計 (Q-Exactive Focus, Thermo Fischer Scientific) を用いて、MS1 スペクトルと MS2 スペクトルを交互に取得し、MS2 データから SFs の抽出イオンクロマトグラムを描き、それらのピーク形状と高い相関を有する MS1 抽出クロマトグラム中のピークを選別する (以下、ピーク形状マッチングと呼ぶ) ことで、AHL 様物質のスクリーニングを行った。MS2 スペクトルを取得する際に導入する前駆イオンの m/z の幅を変えて (15, 30, 50 m/z)、検出特異性や感度を比較した。分析条件の最適化には、AHL の標準物質または AHL 標準物質を添加した汚泥抽出試料を用いた。汚泥試料からの抽出は、上澄みは直接、また汚泥バイオマスからは超音波抽出を行った後、固相抽出 (Oasis HLB cartridge, Waters) とジクロロメタンを用いた液-液抽出によるクリーンアップを行い、1000-2000 倍の濃縮を行った。また、最適化された条件で実下水処理場より採取した下水および活性汚泥試料を分析し、存在する AHL 様物質の多様性を評価した。

(2) 遺伝子キャプチャー法を用いた AHL 合成酵素遺伝子の多様性解析

AHLs を合成する酵素 (AHL synthase) をコードする遺伝子は *luxI* ファミリーとして知られている。既知の *luxI* ファミリー遺伝子配列をプローブとした遺伝子キャプチャー法^[3] により、活性汚泥中に存在する AHL 合成酵素遺伝子を幅広く捕集し、その配列多様性を解析した。まず、キャプチャー反応条件の最適化を目的とし、*Pseudomonas aeruginosa* の *rhlI* 遺伝子配列をターゲットとする 100 nt のピオチン標識プローブを合成し、*rhlI* と配列相同性が段階的 (100, 90, 80, 70, 60, 50%) に異なる合成オリゴヌクレオチドと非標的遺伝子として *rhlR* 遺伝子をターゲットとしてキャプチャー反応を行い、ターゲット遺伝子の回収率および特異性を評価した。ハイブリダイゼーション温度は 6 段階 (46, 51, 56, 61, 66, 71) に設定した。次に実際の活性汚泥試料に用いるためのキャプチャープローブとして、既報のデータベース登録配列をもとに *luxI* ファミリー遺伝子配列の中で保存性の高い領域を抽出し、23 種類の既知配列からなるピオチン標識混合プローブを合成した。これを用いて実験室 MBR の汚泥および膜面上に形成されたバイオフィームから抽出した DNA に対してキャプチャー反応を行い、補足された配列情報をメタゲノム解析により取得した。キャプチャー法による効果を評価するため、キャプチャー回数を 0, 1, 2 回で変えて比較した。キャプチャー法により回収された *luxI* ファミリー相同遺伝子の中から複数を選び、活性汚泥に AHL (11 種類混合物) を外部添加 (0.2~1.7 μM) した際のそれらの遺伝子の発現応答を評価した。

4. 研究成果

(1) 高分解能質量分析による潜在的 QS シグナル物質のノンターゲット分析

AHL 標準物質を用いた検討において、ホモセリンラクトン環に由来する SFs の MS2 ピーク強度が collision energy によって大きく変化した。4 種類の SFs をバランスよく検出できる CE は 20V であった。

ピーク形状マッチングでは、ピーク形状の一致度の指標として両ピーク中のデータポイント間での相関係数を用いるが、その際の一致 / 不一致を判別する閾値 ($R_{\text{threshold}}$) によって、AHL 様物質のスクリーニングの感度と特異性が変わる。実験室 MBR から採取した活性汚泥上澄み試料の固相抽出サンプルを用いたノンターゲット分析結果に対して、 $R_{\text{threshold}}$ を変えて最適化を行った。 $R_{\text{threshold}}$ が 0.4 以下の領域では擬陽性率が大きく上昇し、 $R_{\text{threshold}}$ が 0.5 を超えると真陽性率が大きく低下することが分かった。これらの結果から、 $R_{\text{threshold}} = 0.4$ が真陽性率を高く維持しつつ (92%) 擬陽性率を低く抑えられる (4%) 最適な閾値であることが分かった。

MS2 スペクトル取得時の前駆イオンの導入幅 (15, 30, 50 m/z) がピーク形状マッチングによるスクリーニングの感度と特異性に及ぼす影響について、実験室 MBR から採取した活性汚泥上澄み試料の固相抽出サンプルを用いて評価した。50 m/z の条件では、ピーク形状マッチングにより最も多い AHL 様物質候補が得られたが、そのうちターゲット分析により AHL 様物質であると確認できたものの割合、すなわち真陽性率は、10% と低い結果となった。一方、30 m/z および 15 m/z の条件では、真陽性率がそれぞれ 42%、39% と 50 m/z の条件よりも大きく向上した。また 30 m/z よりも 15 m/z のほうが、AHL 様物質候補数およびターゲット分析で確認できた AHL 様物質数が多かった。これらの結果から、前駆イオンの導入幅を小さくすることで特異性、感度ともに向上する傾向が確認された。さらに 15 m/z よりも小さい幅とすればより高い特異性と感度が得られると期待されるが、その分 injection 回数が増えることとなる。ターゲット分析 ($[M+H]^+ \pm 1.5 m/z$) と比較した場合、親水性の高い一部の AHL では 15 m/z の条件で検出される SFs 数の減少が見られたものの、それ以外の AHL では 15 m/z の幅においても同数の SFs を検出された。また、30 m/z から 15 m/z へと幅を小さくした際の感度と特異性の向上は限定的であった。これらに加え、導入幅を小さくした場合の必要試料量と分析時間の増大に伴うコストも考慮すると、15 m/z の導入幅が感度と特性の面で妥当であると結論づけられた。

以上で最適化した条件で、国内 6 か所の下水処理場にて採取した活性汚泥試料 (上澄みおよび汚泥固形分の 2 画分) を分析した。ピーク形状マッチングにより 181 個の AHL 様物質候補が得られ、そのうちターゲット分析により 42 個 (23.2%) が AHL 様物質として確認された。精密質量から推定される分子式に基づく、検出されたものはアシル鎖の炭素数が 7~20 個と推定された。また、そのうち 28 個は正準型の AHL とは構造が異なると推定され、特にそのうち 7 個はアシル鎖内に芳香環を有していることが推測された。このような芳香環を有する AHL 様物質の報告例は非常に限られており^[4]、本研究で類似の物質を複数の活性汚泥試料から検出できたことは特筆に値する。他に、流入下水中にも AHL 様物質が存在しており、その多くが活性汚泥内で分解されていることが明らかとなった。汚泥固相中で検出された全ての AHL 様物質が汚泥上澄み中でも検出されたことから、活性汚泥内の AHL 様物質は汚泥フロック内の微生物により生産され、上澄み中にその一部が放出されていると考えられた。つまり、上澄み試料を分析することでその汚泥のフロック微生物叢内で生産されている AHL 様物質類を評価可能であることが示唆

された。

以上、本研究では、これまで知られていなかった活性汚泥中の AHL 様物質の多様性を明らかにするための新たなアプローチを確立し、それをを用いて実処理場内の AHL 様物質の多様性と動態を一部明らかにすることができた。検出された物質はあくまでも分子構造に基づくものであるため、今後、その機能を検証するための研究へと展開する。

(2) 遺伝子キャプチャー法を用いた AHL 合成酵素遺伝子の多様性解析

rhlI 遺伝子配列をプローブとし、プローブとの配列相同性が段階的に異なる合成配列をターゲットとして、ハイブリダイゼーション温度を 6 段階で変えてキャプチャー反応を行った。プローブとターゲットの相同性が 80% 以上の場合は、ハイブリダイゼーション温度に関わらず、35% 以上の回収率が得られた。相同性が 70% の場合は 56 を超えると回収率の低下が見られ、61 以上では回収率が 1% 以下となった。相同性が 60% 以下の場合は、いずれの温度でも回収率は 1% 以下であった。キャプチャー反応の特異性の指標として、標的遺伝子と非標的遺伝子 (*rhlR*) の回収率の比を enrichment factor (EF) と定義した。相同性が 70% 以上の配列は、56 まではハイブリダイゼーション温度の上昇と主に EF が増加し、56 において約 8000 もしくはそれ以上の EF が得られた。本研究における遺伝子キャプチャーではなるべく多様な *luxI* ファミリー相同遺伝子配列を得ることにあるため、以後の反応におけるハイブリダイゼーション温度は、配列相同性が 70% 以上であれば高い回収率と EF が見込める 56 に設定した。

実験室 MBR から採取した活性汚泥および膜面上バイオフィームから抽出した DNA に対して、23 種類の混合プローブを用いてキャプチャー反応を行った。キャプチャーなしでは、汚泥試料から 19 種類、バイオフィーム試料から 12 種類の AHL synthase 遺伝子に相同な配列が得られたのに対し、キャプチャー反応を 2 回行うことでそれぞれ 58 種類、51 種類へと増加し、キャプチャー反応を経ることでより多様な配列を得ることができた。一方で、キャプチャー反応 2 回による EF は 9.34~9.51 と非常に低かった。これは、今回プローブとして用いた 23 種類の配列と相同性の高い配列が試料中にほとんど存在しなかったためと考えられる。キャプチャー反応 2 回後に得られた合計 68 種類の AHL synthase 遺伝子相同配列のうち、41 種類が汚泥とバイオフィームに共通であり、残りは各試料に固有であった。また、データベースとの相同性検索 (blastp) によって、既知の AHL synthase との相同性が認められたものが 53 種類あり、そのうち identity が 90% 以下のものが 36 種類あるなど、データベースに未登録の配列を数多く得ることができた。

上記で見つかった新規 AHL synthase 遺伝子相同配列のうち、4 種類の配列に対して PCR プライマーを設計し、11 種類の混合 AHL を添加した後の汚泥中での発現応答を評価した。AHL 添加なしと比較して、AHL を添加した汚泥では 4 種類の配列全てで 15 分後の発現量が非添加系の 3~140 倍に増加した。また、添加する AHL 種を変えると発現量も変化したことから、AHL 種に応じて特異的に応答していることが確認された。

以上より、遺伝子キャプチャー法を用いることで、未報告の配列を含めて従来法より幅広い AHL synthase 相同遺伝子を検出することができ、かつそれらは実際に汚泥中で AHL 濃度に応答して発現していることが確認された。今回使用した 23 種類のプローブ配列ではまだ実際の多様性のごく一部のみを捉えたものと考えられるため、今後は既知の配列情報から効率よく幅広い相同配列を捉えるためのプローブ設計手法の構築を進めていく。

[1] Yeon et al. 2009, Environmental Science & Technology; [2] Tan et al. 2014, ISME J; [3] Denonfoux et al. 2013 DNA Research; [4] Schaefer et al. 2008 Nature

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Guo Yu., T. Tobino, F. Nakajima
2. 発表標題 Development and optimization of untargeted detection method for AHLs in activated sludge
3. 学会等名 The 4th International Forum on Asian Water Environment Technology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Guo Yu., T. Tobino, F. Nakajima
2. 発表標題 Effect of different dosage of exogenous AHLs on indigenous AHL degradation activity and bacterial composition
3. 学会等名 Water and Environmental Technology Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 箱島卓, 黒木颯, 飛野智宏, 中島典之
2. 発表標題 定量的画像解析による運転条件の異なる活性汚泥フロックの形状評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口奈々, 飛野智宏, 中島典之
2. 発表標題 遺伝子キャプチャー法を用いたMBR 活性汚泥中アシルホモセリンラクトン合成酵素遺伝子の探索
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会 (紙面発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato, S., T. Tobino, F. Nakajima
2. 発表標題 Degradation Characteristics of Acylated Homoserine Lactones in Activated Sludge
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 典之 (Nakajima Fumiyuki) (30292890)	東京大学・環境安全研究センター・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------