

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32657

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18214

研究課題名(和文) 抗菌薬存在下で機能を発揮できるアンモニア酸化細菌に関する知見のライブラリ構築

研究課題名(英文) Comprehensive Surveillance of Ammonia Oxidizing Bacteria Able to Oxidize Ammonia in the Presence of Antibacterial Agents

研究代表者

筒井 裕文 (TSUTSUI, HIROFUMI)

東京電機大学・理工学部・助教

研究者番号：70620649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：畜産排水の処理で問題となる抗菌薬による窒素処理の問題を解決することを目的として、抗菌薬存在下で活性を示すアンモニア酸化細菌の知見の集積とモニタリング手法の構築を試みた。最適な酵素の選択でモニタリング手法を改善しつつ、テトラサイクリンが排水処理へおよびず影響を調べ、*Nitrosomonas oligotropha/ureae*が重要であることを示した。さらに、レボフロキサシン耐性株の特徴づけを行い、系統的に既知の株との違いを示すとともに、その耐性機構がDNAジャイレースの変異によることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

畜産排水の窒素除去は流域の水質管理の面から重要な問題であり、家畜に抗菌薬を投与することで抗菌薬が流入した場合の影響を明らかにしつつ、安定な運転に寄与する細菌の情報と比較的簡易なモニタリング手法の開発は有効であると言える。本研究で、広く用いられているテトラサイクリンについて調査を行い、テトラサイクリン存在下で活性を示すAOBについて明らかにすることができ、効率的な畜産排水処理に寄与することが期待される。また、世界的に報告例のないAOBの薬剤耐性機構について、LVFX耐性株について明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of biological nitrogen removal due to inflow of antibacterial agents is an important problem in livestock wastewater treatment. Comprehensive surveillance of ammonia oxidizing bacteria (AOB) able to oxidize ammonia in the presence of antibacterial agents was conducted by using improved microbial community analysis(T-RFLP). Inhibition of ammonia oxidization by the tetracycline was observed at 5 µg/ml or more. AOB strains assumed to be *Nitrosomonas oligotropha/ureae* might be important on ammonia oxidizing in the presence of tetracycline. Characteristics of Levofloxacin-resistant AOB strain isolated from activated sludge were investigated. Phylogenetic analysis based on the sequence of 16S rRNA gene and amoA gene showed this strain is closely related to *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosomonas eutropha*. Furthermore, levofloxacin resistance of this strain would be due to the mutation of DNA gyrase.

研究分野：環境工学，衛生工学

キーワード：抗菌薬 アンモニア酸化細菌 排水処理

1. 研究開始当初の背景

排水処理においては、有機物の処理のみならず、富栄養化防止の観点から窒素の処理が重要となる。畜産分野では、近年排水中の全窒素濃度に関する暫定基準が見直され、2004年度までの1,500 mg/Lから、2016年度には600 mg/Lに引き下げられ、将来の100 mg/Lの達成に向けた効率的な窒素除去が求められていた。一方、畜産分野では病気の予防や治療を目的に抗菌薬が大量に使用されており、使用量は2015年度に原末換算で抗生物質が634 t、合成抗菌薬が150 tであった。体内で代謝されなかった抗菌薬はし尿とともに排水処理プロセスに流入する。このような抗菌薬による排水処理の阻害は、特にアンモニア酸化反応で報告されており、その対策を求められているが、未だその解決に至っていない。

排水処理においてアンモニア酸化反応は、主に化学的独立栄養細菌群であるアンモニア酸化細菌(AOB)が担っており、排水処理における窒素除去の初段の反応であることから重要である。さらに近年、AOBはアンモニアの酸化だけでなく、幅広い難分解性微量化学物質の分解への寄与も期待されており、AOBの活性を高く維持することへの期待が高まっていた。しかし、AOBは環境分野では重要な細菌であるにも関わらず、通常の寒天培地で培養が出来ず単離が困難であることからその生理学的特徴について理解が十分に進んでいないのが現状であった。分子生物学的手法の発展により、メタゲノム解析をはじめとした環境中のAOBに関する調査が活発に行われ、遺伝子配列データは急速に蓄積されつつあったものの、実際の機能や活性と結びつけた検討は未だ限られており、特に抗菌薬に対する感受性の知見は不足しており、急速に蓄積されている科学的知見を現場での運転に活かすためにも、抗菌薬が幅広いAOBのそれぞれにおよぼす影響を明らかにし、まとめることが重要であった。

2. 研究の目的

抗菌薬が流入する畜産排水で高いアンモニア酸化活性を維持するためには、流入する抗菌薬に対するそれぞれのAOBごとの感受性や、抗菌薬存在下で安定してアンモニア酸化活性を示すAOBの活性を維持するための運転方法について知見が必要となる。また、維持管理の実務でその知見を活かすためには、メタゲノム解析に比べて簡便な遺伝子解析手法が必要といえる。そこで、本研究では、比較的簡便かつ安価で解析が可能であるT-RFLP法を用い、抗菌薬存在下でもアンモニア酸化活性を發揮できるAOBに関する知見のライブラリを構築することを目的として検討をすすめた。

3. 研究の方法

(1) 抗菌薬の曝露がアンモニア酸化細菌群集へおよぼす影響の調査

T-RFLP法によるAOB群集構造解析手法の最適化

一般的に負荷の高い活性汚泥中で優占していると考えられるプロテオバクテリアに属するAOBを標的とし、実際に環境試料として2ヶ所の下水処理場から採取した活性汚泥と市販の硝化菌製剤について既往研究で使用されていた制限酵素(MspI, RsaI, TaqI)を用いてアンモニアモノオキシゲナーゼ(*amoA*)遺伝子を標的としたプライマー[*amoA*-1F, *amoA*-2R]を用い、T-RFLP解析を実施した。その後、Type strainを含む過去に単離されたAOBの*amoA*配列を集め、制限酵素で消化した際に得られる末端断片の断片長を計算することで最適な制限酵素の種類や組合せの候補を選出し、*amoA*遺伝子を標的とした適切なT-RFLP解析法を提案した。

各種抗菌薬の曝露に対するAOBの応答性の評価

畜産分野で比較的使用される抗菌薬のうち、ラクタム系抗菌薬としてアンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン系抗菌薬としてテトラサイクリン(TC)を選出し、異なる濃度で曝露させた際の活性汚泥中のAOBへの影響を調査した。都市下水処理場から採取した活性汚泥を合成下水で順養したのち、ABPCの場合は0, 10, 50, 100 µg/mlとなるように、TCの場合は0, 5, 10, 25, 50 mg/Lとなるように合成下水に添加し、バッチ式で運転を行った。抗菌薬添加直後に*amoA*のRNA量をMPN-PCRで測定することで短期的な影響を、運転期間中のアンモニア酸化量と*amoA*遺伝子を標的とした群集構造解析(*AluI*+*MboI*)を用いたT-RFLP法をもとに中長期的な影響をそれぞれ評価した。

(2) 抗菌薬存在下で機能を發揮できるAOBの単離、特徴付け

単離されたレボフロキサシン(LVFX)耐性AOB株について分子生物学的特徴を明らかにするため、抽出したDNAを全ゲノム解析に供した。得られた配列データはQCに供したのち、velvetによるアセンブリに供した。得られたContigをMiGAPによるアノテーションに供することで遺伝子情報を獲得した。得られた遺伝子配列の相同性はDDBJのBLASTnにより、クラスター解析はClustalWを利用した。さらにアンモニア酸化に関する動力学的な特徴を明らかにするために、純菌状態および単離時に共生していた従属栄養細菌(*Ideonella* sp.)との共生状態でアンモニア濃度に対する酸化速度を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) 抗菌薬の曝露がアンモニア酸化細菌群集へおよぼす影響の調査

T-RFLP 法による AOB 群集構造解析手法の最適化

既往研究において *amoA* 遺伝子を標的とした T-RFLP 法で使用されていた *MspI*, *RsaI*, *TaqI* を使用して解析したところ, 最も広く用いられている *TaqI* で断片数が少なく, 多様性が少なかった. また, *MspI*, *RsaI* を用いた場合でも断片数が 8~16 と限られていたため, より適切な制限酵素の検討を実施した.

データベースに登録されている Type strain を含む過去に単離された 57 株の AOB の *amoA* 遺伝子配列をもとに, まず AOB の *amoA* 遺伝子配列の多様性を調査するためにクラスター解析を実施した. その結果, 大きく *Nitrosomonas europaea/eutropha* クラスター, *Nitrosomonas nitrosa* クラスター, *Nitrosomonas halophila/mobilis* クラスター, *Nitrosomonas aestuari/marina* クラスター, *Nitrosomonas oligotropha/ureae* クラスター, および *Nitrospira/Nitrosovibrio* クラスターに分類され, 好塩性やウレアーゼ産生能, アンモニア性窒素への親和性など AOB の生理学特性に対応した違いが認められた. *Nitrosomonas europaea/eutropha* クラスターのうち, *Nitrosomonas europaea* 内では極めて高度に配列が保存され, *Nitrosomonas eutropha* 内でも比較的高度に配列が保存されていることが明らかとなり, これらは種レベルより詳細な解析は困難であると判明した. 続いて, 計 32 種類の制限酵素(4~6 塩基認識)について, 57 株の *amoA* 遺伝子の切断位置を特定し, T-RFLP 解析で検出される断片長を算出した. その結果, 既往研究で使用されている *MspI*, *RsaI*, *TaqI* は断片数が 5~9 と少なく, 特定の断片長に複数のクラスターの AOB が対応することが判明した. 一方で, *AluI* と *MboII* の組合せおよび *AcII* と *FokI* の組合せによるダブルダイジェスションを行った場合, 13~14 の断片が得られたほか, 遺伝子配列の保存性の高い *Nitrosomonas europaea* および *Nitrosomonas eutropha* の間でも異なる断片長が得られたことから, 特に塩分濃度が比較的高く, 窒素不可の高い畜産排水に適し, より詳細な解析が可能となる制限酵素の組合せを提案することができた.

各種抗菌薬の曝露に対する AOB の応答性の評価

2 週間ほど実験室内で順養した活性汚泥に ABPC を 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加したところ, 添加後 5 分後では *amoA* 転写量に大きな変化は認められなかったものの, 1 日後には 50 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した系で 1/3 以下まで有意に減少し, 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した系では明確な差は認められなかった. 菌種は異なるものの, 腸内細菌科細菌のアンピシリンの感受性の判定基準は 8 $\mu\text{g/ml}$ であり, 活性汚泥による吸着効果もあわさることで 10 $\mu\text{g/ml}$ で阻害効果が認められなかったと考えられた. その後, 運転を継続したところ, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加系ではアンモニア性窒素酸化量が対照系との間に有意な差は認められず, 50 $\mu\text{g/ml}$ 添加系では添加 3 日後から 50%程度減少し, 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加系ではほぼ完全な阻害が生じた. 運転終了時(20 日目)にかけてアンモニア性窒素酸化量は回復せず, アンピシリン耐性 AOB 株は単離できなかった.

同様の試験を, TC を 0, 5, 10, 25, 50 mg/L となるように合成下水に添加して実施した. 添加後 5 分後では *amoA* 転写量に大きな変化は認められなかったものの, 1 日後には 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上となるように添加した系で半以下まで有意に減少し, 比較的阻害効果が速やかに生じることが示された. その後, 運転を継続したところ, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加系では 2 日後から 18 日目にかけてアンモニア性窒素酸化量が対照系と比較して 20%程度減少したものの, その後対照系と同程度まで回復した. 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加系では添加 1 日後から 50%程度減少し, 実験終了時まで回復は認められなかった. 以上の結果から, TC を 10 $\mu\text{g/ml}$ で添加した系では TC 耐性 AOB 株が存在する可能性が考えられたため, 単離を試みるとともに T-RFLP 解析に供した. 平板培地での TC 耐性 AOB の単離は出来なかったものの, T-RFLP 解析の結果, *Nitrosomonas oligotropha/ureae* クラスターに属すると思われる 141 bp の断片長の割合が 5%程度から 25%程度まで増加しており, この断片長に現れる AOB が大きな役割を示していると考えられた. 抗菌薬によって同じ濃度でも回復の有無が認められた原因として, 耐性菌の存在の有無, 抗生物質の作用機序の違い(ABPC は殺菌的な抗菌薬であり, TC は静菌的な抗菌薬である)の影響が考えられた. 今後は同様の作用機序を持つ抗菌薬について検討を進める必要があると考えられた.

(2) 抗菌薬存在下で機能を発揮できる AOB の単離, 特徴付け

(1)で示した通り, ABPC および TC 添加条件で耐性株が得られなかったことから, 過去に研究室で単離された世界で報告例のない LVFX 耐性 AOB 株について詳細な調査を実施した.

全ゲノム解析の結果より, 16S rRNA 遺伝子配列と *amoA* 遺伝子, およびフルオロキノロン耐性に深く関係するといわれている *gyrA* 遺伝子配列が得られた. 16S rRNA 遺伝子配列を相同性解析に供したところ, 最も相同性の高い株は *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 で相同性は 97%であった. また, プロテオバクテリアに属する AOB の Type strain の遺伝子配列とともにクラスター解析に供したところ, *Nitrosomonas europaea* や *Nitrosomonas eutropha* の近傍で独立したクラスターを構成した. 続いて *amoA* 遺伝子についても同様の解析に供したところ, 最も相同性の高い株は *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 で相同性は 88%であった. また, クラスター解析に供したところ, 16S rRNA 遺伝子と同様に *Nitrosomonas europaea* や *Nitrosomonas eutropha* の近傍で独立したクラスターを構成した. 以上の結果から, 高負荷な排水処理で広く検出される *Nitrosomonas europaea* や *Nitrosomonas eutropha* と相同性が高いものの, これまで報告されている AOB とは種レベルで異なる可能性が示された.

フルオロキノロン耐性に関係するといわれている *gyrA* 遺伝子配列をもとに得られたアミノ酸配列を他の *Nitrosomonas* 属のアミノ酸配列と比較したところ、フルオロキノロン耐性との関係が指摘されている N 末端より 83 番目のアミノ酸に特異的な変異が認められたほか、計 16 か所の特異的なアミノ酸配列の違いが確認された。このことから、単離された AOB 株のフルオロキノロン耐性は、フルオロキノロンが作用する DNA ジャイレースの GyrA タンパクの変異によるものである可能性が高いと考えられた。

単離された LVFX 耐性 AOB のアンモニア酸化に関する動力学的な解析を実施したところ、ヘインズウルフ式での近似から純菌状態での $V_{max}=1.4 \times 10^{-7}$ mg-N/L/h/cell で $K_m = 19.3$ mg-N/L となり、従属栄養細菌である *Ideonella* sp.との共生状態で $V_{max}= 2.7 \times 10^{-7}$ mg-N/L/h/cell で $K_m=17.5$ mg-N/L となった。以上の結果から、この株は共生状態において比アンモニア性窒素酸化速度が上昇し、かつミカエリス定数が小さくなり、アンモニア酸化活性が向上することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirofumi TSUTSUI and Taro URASE
2. 発表標題 Ammonia oxidizing kinetics of fluoroquinolone-resistant ammonia oxidizing bacterial consortium
3. 学会等名 The 2019 International Conference on the "Challenges in Environmental Science and Engineering" (CESE-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 筒井 裕文, 浦瀬 太郎
2. 発表標題 アンモニア酸化細菌の群集構造解析を目的としたT-RFLP 法に適した制限酵素の検討
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

CESE-2019 BEST YOUNG SCIENTIST ORAL PRESENTATION AWARD (The 2019 International Conference on the "Challenges in Environmental Science and Engineering" (CESE-2019)) 筒井裕文(2019) 抗菌薬含有排水の生物学的処理の改良に向けた取組み. Precision Medicine, 8. (ISBN17791-08)

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------