

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：33903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12229

研究課題名（和文）硝化・脱窒菌のバイオフィーム形成制御と応用

研究課題名（英文）Regulation of biofilm formation in nitrifying and denitrifying bacteria and its application

研究代表者

西村 聡子（NISHIMURA, AKIKO）

愛知工業大学・工学部・准教授

研究者番号：90609322

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）：本研究は、生活・工業廃水中の窒素化合物除去に利用されるアンモニア酸化細菌および脱窒菌のバイオフィーム形成を制御することで、窒素化合物除去効率の向上をはかることを目的とした。環状ジグアニル酸は、様々な細菌でバイオフィーム形成の調節に関わっている。ここではアンモニア酸化細菌および脱窒菌において、環状ジグアニル酸を合成・分解する酵素が存在すること、これらの酵素によって実際に環状ジグアニル酸が合成されていること、またこれらの細菌におけるバイオフィーム形成について明らかにした。この結果から、環状ジグアニル酸を介してバイオフィーム形成を制御することで、窒素化合物除去効率の向上につながる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

廃水中に含まれる窒素化合物は様々な環境問題を引き起こすため、生物学的窒素処理法の高効率化が望まれている。そのために、この過程に関わる細菌の増殖や反応効率を高めることが重要である。この第一段階に関わるアンモニア酸化細菌は極めて増殖速度が遅く、処理全体の律速となっている。本研究では、これまで不明であったアンモニア酸化細菌のバイオフィーム形成とその制御に関わると考えられる環状ジグアニル酸の存在を明らかにした点で重要な意義がある。またアンモニア酸化細菌と脱窒菌のゲノム解析より、これらの細菌における環状ジグアニル酸の制御機構を明らかにした。これらの知見は、生物学的窒素処理の効率向上に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Biological nitrification and denitrification using microorganisms is widely used as a method to remove nitrogen compounds in domestic and industrial wastewater which cause environmental problems. In this study, we aimed to improve the nitrogen removal efficiency by regulating the biofilm formation in ammonia oxidizing bacteria and denitrifying bacteria. One of the cyclic dinucleotide, c-di-GMP, is known to be involved in the regulation of biofilm formation in various bacteria. Here, we identified c-di-GMP synthesis and degradation enzymes in ammonia oxidizing bacteria and denitrifying bacteria, and showed the involvement of these enzymes in c-di-GMP regulation and biofilm formation in these bacteria. These results suggest the regulation of biofilm formation via c-di-GMP may contribute in the improvement of the efficiency of nitrogen removal.

研究分野：微生物学

キーワード：生物学的窒素処理 アンモニア酸化細菌 脱窒菌 バイオフィーム 環状ジヌクレオチド

### 【1. 研究開始当初の背景】

生活・工業廃水中に含まれる種々の窒素化合物は河川や湖沼、内海の富栄養化の原因物質であり、大きな環境問題となっている。これらの窒素化合物を処理する方法として、微生物を用いた生物学的硝化・脱窒法が広く利用されており、その高効率化が求められている(1)。生物学的硝化・脱窒法の反応過程は、 $\text{NH}_3$ 、 $\text{NO}_2^-$ と $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ の二段階からなる硝化過程、および脱窒過程( $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{N}_2$ )に分けられる(図1)。本研究では、硝化の第一階に関わるアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea*、および脱窒過程に関わる *Paracoccus denitrificans* のバイオフィーム形成制御に焦点をあてた。

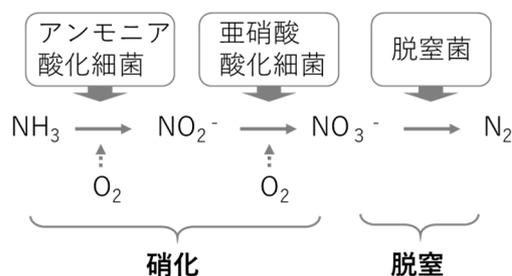


図1. 生物学的硝化・脱窒法

バイオフィームとは、固体表面に付着した細菌および細菌が産生する細胞外多糖などからなる三次元構造体である(2)。一般に細菌はバイオフィームを形成することにより、環境変化に対してより耐性となる。そのため、廃水処理において生物学的硝化・脱窒に関わる細菌のバイオフィーム形成制御は重要な意味をもつ。

環状ジグアニル酸 c-di-GMP は、種々の細菌に存在する天然核酸化合物であり、細菌の運動性やバイオフィーム形成の制御に重要な役割を果たしていることが知られている(3)。また細菌内の c-di-GMP 濃度は c-di-GMP 合成酵素および分解酵素により厳密に制御されていることが明らかになっている(図2)。しかし、生物学的硝化・脱窒に関わる種々の細菌における c-di-GMP の生理活性およびバイオフィーム制御機構については不明な点が多い。そのため、これらの細菌において、c-di-GMP のバイオフィーム形成に対する効果や c-di-GMP 合成・分解酵素の機能を解析し、そのバイオフィーム形成制御機構を明らかにすることが重要であると考えられた。

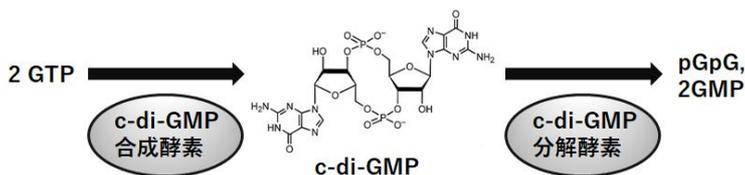


図2. 細菌におけるc-di-GMPの合成と分解

### 【2. 研究の目的】

生物学的硝化・脱窒に関わる細菌は、廃水プラント内でバイオフィームを形成して存在すると考えられる。本研究は、アンモニア酸化細菌 *N. europaea*、および脱窒菌 *P. denitrificans* のバイオフィーム形成制御機構を明らかにすることで、廃水中の窒素化合物除去の高効率化を実現することを目的とする。

考えられるバイオフィーム制御機構の一つに、環状ジグアニル酸 c-di-GMP があげられる。c-di-GMP は、種々の細菌においてバイオフィームの生合成調節に関わることが明らかとなっている。ゲノム検索により *N. europaea* および *P. denitrificans* において c-di-GMP 合成系が存在することが示唆されており、これらの細菌において c-di-GMP がバイオフィーム形成の制御に関わっている可能性が考えられる。また近年 *P. denitrificans* のバイオフィーム形成において c-di-GMP シグナルが関与することが示唆されている(4)。ここでは *N. europaea* および *P. denitrificans* において、c-di-GMP のバイオフィーム形成に対する効果を検討すると共に、c-di-GMP 合成や分解に関わる遺伝子の機能について検討を行う。この解析により、これらの細菌におけるバイオフィーム形成制御機構を明らかにし、その知見を元に廃水処理における生物学的硝化・脱窒の高効率化をはかることが本研究の目的である。

### 【3. 研究の方法】

#### ・細菌の培養およびバイオフィーム形成の解析

*N. europaea* NBRC14298 株および *P. denitrificans* IFO12442 株を用いた。嫌気性での培養は、密閉容器中でアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を用いて培養を行った。これらの細菌をマルチウェルプレート中で培養し、クリスタルバイオレット色素でバイオフィームを染色した後、ジ

メチルスルホキシドによりバイオフィルムを溶解し、プレートリーダーで OD<sub>570</sub> を測定してバイオフィルム形成量を求めた。またマルチウェルプレート内にカバーガラスを入れて細菌を培養し、カバーガラス上に形成されたバイオフィルムを 5% グルタルアルデヒドで固定し、生細胞・死細胞を染色する SYTO9 および死細胞を染色するヨウ化プロピジウム (PI) で染色して、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (OLYMPUS FV3000) による観察を行った。

#### ・ c-di-GMP 代謝関連遺伝子の同定

NCBI のデータベースを用い、*N. europaea* および *P. denitrificans* のゲノム DNA において c-di-GMP 合成酵素に特徴的な **GGDEF** モチーフ、および c-di-GMP 分解酵素に特徴的な **EAL** モチーフと相溶性の高い遺伝子を検索し、得られた候補遺伝子について **SMART (Simple modular architecture research tool)** によりドメイン解析を行った。

#### ・ 定量 PCR による遺伝子発現の解析

一定期間培養した細菌培養液から RNA を抽出し、定量 PCR により各遺伝子の発現量を解析した。内在性コントロールとして、*N. europaea* では 16S rRNA および *amoA* 遺伝子、*P. denitrificans* では 16S rRNA および GAPDH 遺伝子を用いて標準化を行った。

#### ・ c-di-GMP 代謝関連遺伝子のクローニング、タンパク質発現および酵素活性の測定

データベース解析より同定された c-di-GMP 代謝関連遺伝子の機能解析のため、pET-Blue2 プラスミドに目的遺伝子を導入し、得られた組換えプラスミドを BL21(DE3) 大腸菌に形質転換した。得られた組換え大腸菌を IPTG 存在下で培養し、目的タンパク質を His タグ精製カラムにより精製し、SDS-PAGE およびイムノブロットングによりタンパク質の発現を確認した。得られたタンパク質の酵素活性の確認のため、c-di-GMP 合成酵素については **GTP** を基質として c-di-GMP を合成する反応を行い、また c-di-GMP 分解酵素については c-di-GMP 分解反応を行い、**Cyclic di-GMP ELISA Kit (Cayman Chemical)** を用いて反応液中の c-di-GMP 濃度を定量した。

### 【 4 . 研究成果】

#### ( 1 ) *N. europaea* におけるバイオフィルム形成制御機構の解析

##### 培養法の検討およびバイオフィルム形成の解析

難培養性であるアンモニア酸化細菌 *N. europaea* の培養方法を確立した。また、クリスタルバイオレット染色によるバイオフィルム定量法を用いて、*N. europaea* におけるバイオフィルム形成について検討を行った。*N. europaea* は極めて増殖速度が遅く、1 週間の培養ではほとんどバイオフィルムが形成されていないが、3 週間後にバイオフィルムの形成が確認された ( 図 3 )。また共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察においても、*N. europaea* におけるバイオフィルム形成が確認された ( 図 4 )。

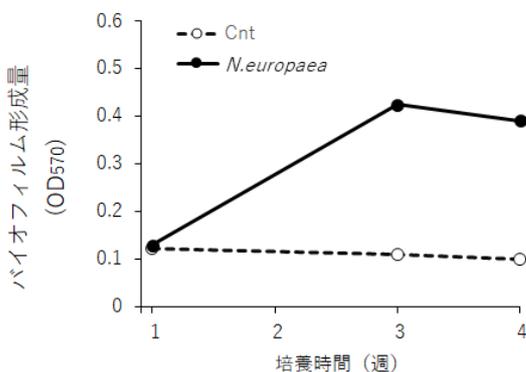


図3. *N. europaea* におけるバイオフィルム形成量 (CV法による解析)

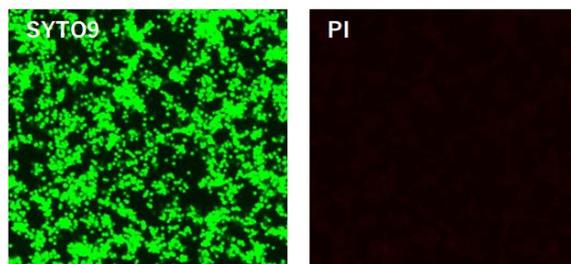


図4. *N. europaea* におけるバイオフィルム形成 (共焦点レーザー顕微鏡による解析)  
緑色：生細胞、赤色：死細胞を示す。

### 細胞内 c-di-GMP 濃度の定量

*N. europaea* 内の c-di-GMP 濃度を測定した。細菌培養液から c-di-GMP を抽出し、ELISA 法による定量を行った結果、*N. europaea* は乳酸菌の一種である *Bacillus coagulans* や大腸菌と比較し、高レベルの **c-di-GMP** 濃度を示した(図5)。この結果から、*N. europaea* において c-di-GMP 合成系が存在することが示され、c-di-GMP シグナルを介したバイオフィーム形成制御が行われている可能性が考えられた。

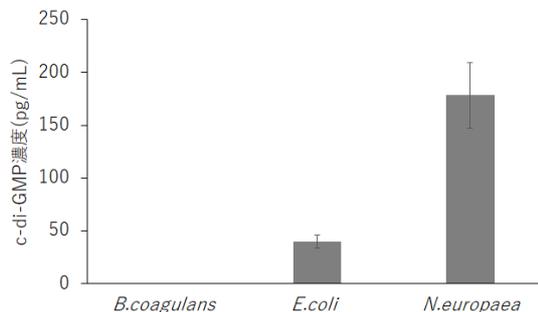


図5. 細菌内のc-di-GMP濃度 (OD=1の細菌培養液 1mLあたり)

### c-di-GMP 代謝関連遺伝子の同定

*N. europaea* NBRC14298 株のゲノム解析から、c-di-GMP 合成酵素に特徴的な **GGDEF** モチーフを含むタンパク質 **3種** (**GGDEF1~3**) c-di-GMP 分解酵素に特徴的な **EAL** モチーフを含むタンパク質 **7種** (**EAL1~7**) および両方のモチーフを含むタンパク質 **5種** (**GGDEF+EAL1~5**) をコードする遺伝子を同定した(図6)。このように一つの菌に多数の c-di-GMP 合成酵素や分解酵素が存在する例は大腸菌や緑膿菌をはじめとする多くの菌で報告されており、c-di-GMP シグナルの重要性を示していると考えられる。またこれらの遺伝子発現を定量PCRにより解析した結果、いずれも mRNA レベルでの発現が示された。

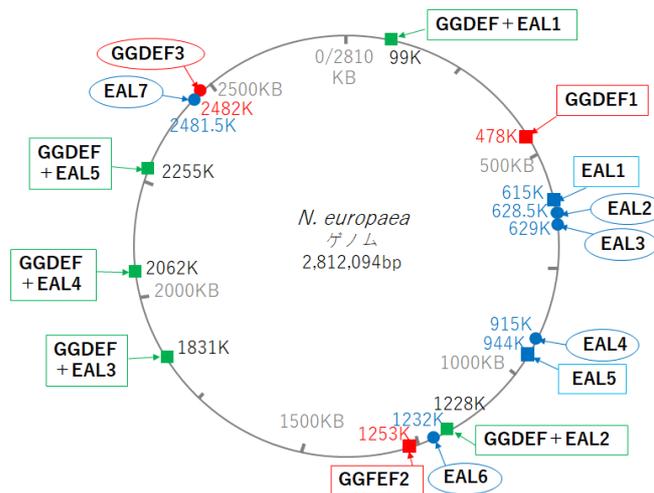


図6. *N. europaea* ゲノムにおけるc-di-GMP代謝酵素関連遺伝子の位置 (□はセンサードメインを含むもの、○はセンサードメインを含まないものを示す)

### c-di-GMP 代謝関連酵素活性の測定

これまでに **GGDEF1~4, EAL1~4** 遺伝子のクローニングを完了し、これらのうち **GGDEF1,3** および **EAL1~4** タンパク質の発現が確認された。このうち **GGDEF3** の酵素活性について検討した結果を示す(図7)。精製した His タグ **GGDEF3** タンパク質に基質として **GTP** を加え、30°Cで反応させたところ、時間と共に c-di-GMP 量の増加が見られた。このことから、**GGDEF3** が c-di-GMP 合成酵素として機能することが確認された。

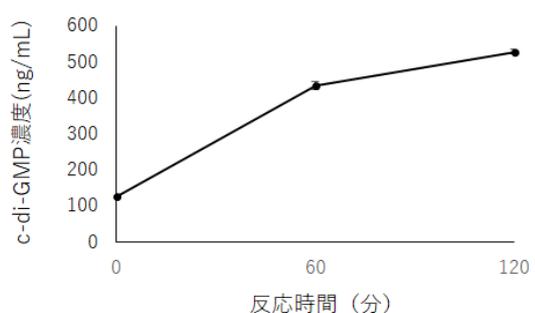


図7. GGDEF3によるc-di-GMP合成反応

### 遺伝子導入方法の検討

*N. europaea* は難培養性であり、遺伝子導入の例は少ない。*N. europaea* への遺伝子導入のためQには固体上でのコロニー形成法が必要となる。本研究では、固体寒天培地上でのコロニーの形成の方法を確立した。

## (2) *P. denitrificans* におけるバイオフィーム形成制御機構の解析

### c-di-GMP 代謝関連遺伝子の同定

*N. europaea* と同様に *P. denitrificans* のゲノム解析を行った結果、2つの合成酵素および2つの分解酵素遺伝子を持つことが明らかとなった。またこれらの遺伝子発現を定量PCRにより解析した結果、いずれも mRNA レベルで発現していることが示された。

### バイオフィーム形成の解析

好気性および嫌気性条件下での細菌培養およびバイオフィーム形成条件について検討し、それぞれの条件下でのバイオフィーム形成を確認した。好気性条件下では EDTA 添加の有無に関わらずバイオフィームが形成された一方、嫌気性培養では EDTA の添加によりバイオフィーム形成が阻害されたことから、異なるバイオフィーム形成制御機構が働いていることが考えられる(図8)。また嫌気性条件において c-di-GMP を添加すると、バイオフィーム形成量の増加が見られた(図9)。

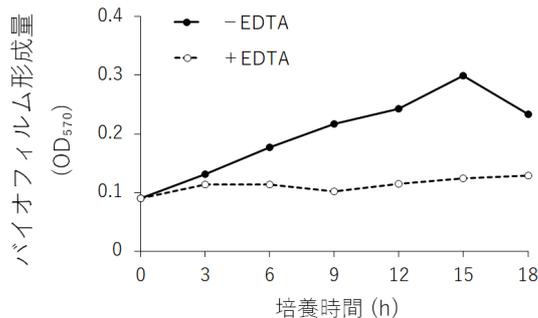


図8. 嫌気性条件における *P. denitrificans* のバイオフィーム形成

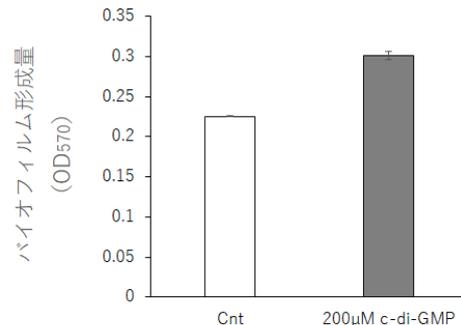


図9. *P. denitrificans* のバイオフィーム形成に対する c-di-GMP の効果

### 脱窒関連遺伝子の発現解析

*P. denitrificans* は嫌気性条件下で脱窒反応を行うことが知られている。種々の培養条件が脱窒反応に与える影響を検討するため、脱窒反応やその調節に関わる遺伝子 (*nirS*, *norC*, *fnr*) の発現を定量 PCR により検討した。*nirS* は亜硝酸還元酵素シトクロム *cd<sub>1</sub>*、*norC* は NO 還元酵素のシトクロム *c* サブユニット、*fnr* は好気性呼吸と嫌気性呼吸間の切り替えの制御因子をコードしている(5)。*nirS*、*norC* は予想される通り嫌気性条件でより発現量が多かったが、好気条件においてもわずかながら発現していることが確認された。また *fnr* は好気性・嫌気性いずれの条件下でも発現量に大きな違いはなかった。

### (3) まとめと今後の展望

本研究では、*N. europaea* および *P. denitrificans* の c-di-GMP 代謝関連遺伝子を同定し、その遺伝子発現を確認した。また、これらの遺伝子のクローニングを進め、いくつかの酵素活性を確認した。また、これまで不明であった *N. europaea* における c-di-GMP の存在とバイオフィーム形成を明らかにした。また *P. denitrificans* において、好気性条件と嫌気性条件で異なるバイオフィーム制御機構が働く可能性を示した。これらの知見は、*N. europaea* および *P. denitrificans* におけるバイオフィーム形成機構の解明に貢献するものと考えられる。

今後、これらの細菌において同定された c-di-GMP 代謝関連遺伝子の発現が、細菌の増殖過程や培養条件によってどのように変化するかを解析する。またさらにこれらの遺伝子のクローニングおよびタンパク質の発現・精製を進め、その酵素活性を検討する。遺伝子導入法についても引き続き検討を行い、*N. europaea* および *P. denitrificans* の c-di-GMP 代謝関連遺伝子の過剰発現および破壊株を作成し、バイオフィーム形成への影響を検討する。これらの解析から、*N. europaea* および *P. denitrificans* に複数存在する c-di-GMP 代謝関連遺伝子が相互にどのように機能し、どのように細菌内 c-di-GMP 濃度の制御およびバイオフィーム形成制御に関与しているかを明らかにしたい。これらの知見を元に、生物学的窒素処理の高効率化に向けた検討を進める。

#### <参考文献>

- 1) Rajta, A., Bhatia, R., Setia, H., and Pathania, P. (2020) Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *J. Appl. Microbiol.*, 128(5), 1261-1278
- 2) Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S.D., Schwartz, S.A., Bruggemann, L., and Aalinkel, R. (2023) Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*. 11(6), 1614.
- 3) Romling, U., Galperin, M.Y., and Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (1), 1-52.
- 4) Kumar, S. and Spiro, S. (2017) Environmental and Genetic Determinants of Biofilm Formation in *Paracoccus denitrificans*. *mSphere*. 2(5), e00350-17
- 5) 山本勇 (2000) 脱窒を担う細菌と遺伝子群 環境浄化への利用に向けて *化学と生物* 38(5), 301-308

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村 聡子,水崎 圭,水津 暁生,高橋 佑,金岡 英徳,飯島 信司
2. 発表標題 アンモニア酸化細菌における環状ジグアニル酸合成・分解酵素の解析
3. 学会等名 第75回 日本生物工学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村 聡子、水崎 圭、清水 博史、三宅 克英、飯島 信司
2. 発表標題 アンモニア酸化細菌における環状ジグアニル酸合成・分解酵素の解析
3. 学会等名 第74回 日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水崎圭、清水博史、西村聡子、三宅克英、飯島信司
2. 発表標題 アンモニア酸化細菌における環状ジグアニル酸の機能
3. 学会等名 第86回 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水博史，飯島信司，國枝尚弘，三宅克英，西村聡子
2. 発表標題 アンモニア酸化細菌 <i>N. europaea</i> の環状ジグアニル酸の合成および分解酵素の解析および効果の検討
3. 学会等名 第85回 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021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	飯島 信司  (IIJIMA SHINJI)  (00168056)	愛知工業大学・工学部・教授    (33903)	

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