

■受領No.1332

低分子化合物を用いた亜硝酸型硝化処理法の開発

代表研究者

松岡 真生

東京大学大学院農学生命科学研究科 農学共同研究員



1. 研究目的

湖沼や内湾等の閉鎖性水域における水質汚濁を改善するために平成13年12月に策定された第5次水質総量規制により、廃水処理場における脱窒素処理の重要性が増してきている。現在、廃水処理場での脱窒素処理において広く運用されている生物学的硝化脱窒法は、廃水処理槽内に繁殖しているフロック状の微生物集合体である活性汚泥中の微生物の窒素代謝能を利用した技術である。処理槽内では、廃水に含まれているアンモニアが、硝化工程（通気条件）において活性汚泥中の硝化細菌群の働きにより亜硝酸、さらに硝酸へと酸化される。この硝化細菌群のなかで、アンモニアから亜硝酸へと酸化する働きを有する微生物はアンモニア酸化細菌、亜硝酸から硝酸へと酸化する働きを有する微生物は亜硝酸酸化細菌と呼ばれる。そして、廃水中の硝酸や亜硝酸は脱窒工程（嫌気条件）において活性汚泥中の脱窒細菌群の働きにより N_2O や N_2 へと還元され、大気中に放出される。この硝化脱窒を交互に繰り返すことによって脱窒素処理を行なう。この処理法の課題として、硝化工程に必要な曝気動力や余剰汚泥の処理が指摘されている。

一方で、生物学的硝化脱窒法の一つである亜硝酸型硝化脱窒法が、廃水中のアンモニアからの硝化を亜硝酸の状態までにとどめ、亜硝酸から脱窒により窒素除去を行なう効率的な方法で、広く普及されている硝酸型硝化脱窒法の抱える問題を解

決できる経済的で低環境負荷の処理技術として近年注目が集まっている。この亜硝酸型硝化脱窒法の確立には硝化工程における亜硝酸酸化細菌の選択的排除の方法が重要であり、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の培養至適条件（pH、温度、溶存酸素、遊離アンモニア濃度等）の差異に着目した亜硝酸型硝化処理の開発が今までに多くなされてきた。しかしながら、その開発の実現に向けては、安定した亜硝酸型硝化処理の継続が難しいことが大きな障壁となっている。

そこで、本研究では、硝化細菌群のなかで亜硝酸酸化細菌を選択的に阻害する化合物のスクリーニングを行ない、低分子化合物を用いた新規亜硝酸型硝化処理法の開発への足がかりを築くことを目的とした。化合物を用いた処理法は、長期に渡る安定した継続運転を可能にし、エネルギー・コスト削減や環境負荷低減に大きく貢献すると予想される。

2. 研究概要

硝化細菌群のなかで亜硝酸酸化細菌を選択的に阻害する化合物の網羅的スクリーニングを行なうために、まず、膨大な種類の化合物からヒット化合物を迅速に選別するための、マイクロプレートを用いた細胞ベースでのアッセイ系を構築し、図1に示している流れでスクリーニングを行なうことにした。

1次スクリーニングでは、亜硝酸酸化細菌である *Nitro bacter winogradskyi* NBRC 14297株を用い

て、細胞レベルにおいて亜硝酸酸化反応を阻害する化合物を選別した。その際に、亜硝酸の検出に利用される Griess法を用いて、基質である亜硝酸の消費量を測定することにより、亜硝酸酸化反応に対する化合物の阻害評価を行なった。続いて1次スクリーニングにより得られたヒット化合物から、アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* NBRC 14298株を用いて、細胞レベルにおいてアンモニア酸化反応を阻害しない化合物をスクリーニングした。阻害判定は、Griess法を用いてアンモニア酸化反応の産物である亜硝酸の産生量を測定することにより行なった。3次スクリーニングでは、NBRC 14297株とNBRC 14298株の共培養による完全硝化反応の過程で、ヒット化合物の添加により完全硝化が阻害され培養液中に亜硝酸の蓄積が生じることを確認した。

化合物の網羅的スクリーニングには、理化学研究所の所有する化合物バンクNPDepoの天然化合物ライブラリーと分子量300程度の分子群から成るFBDD (Fragment-Based Drug Discovery) ライブラリーを利用した。1次スクリーニングでは、NPDepoライブラリー (化合物20393種) からは化合物60種が (図2)、FBDDライブラリー (化合物16268種) からは化合物228種が (図3)、ヒット化合物として選抜された。続いて、これらのヒット

化合物を2次スクリーニングに供したところ、NPDepoライブラリーから45種、FBDDライブラリーから175種が、アンモニア酸化反応を阻害しない化合物として選定された。これらのヒット化合物の亜硝酸酸化活性に対するIC₅₀値を算出したところ、NPDepoライブラリーから29種、FBDDライブラリーから51種が、IC₅₀値が20 μM以下という低い値を示し、中にはIC₅₀値が1 μM以下の化合物も存在しており、亜硝酸酸化反応に対して強力な阻害効果を示すがアンモニア酸化反応に対しては阻害しないという目的の化合物を多く獲得できた。現在3次スクリーニングにおいて硝化細菌の共培養による完全硝化反応に対する効果を検証しているが、低分子化合物を用いた新規亜硝酸型硝化処理法の実現に大きな期待のもてる結果となった。

今後は、ヒット化合物が様々な亜硝酸酸化細菌に対して普遍的に有効性を示すことを確認し、そのなかで新規亜硝酸型硝化処理システムへの利用に最も適した化合物を定めて有用化合物の亜硝酸型硝化処理に対する促進効果の実証試験を目指すと同時に、有用化合物の細胞内標的分子の同定と化合物の細胞内作用機序の解析といった基礎研究を進めていき、基礎研究で得られた知見を更なる強力な亜硝酸酸化細菌特異的阻害剤の開発に生かしていく予定である。

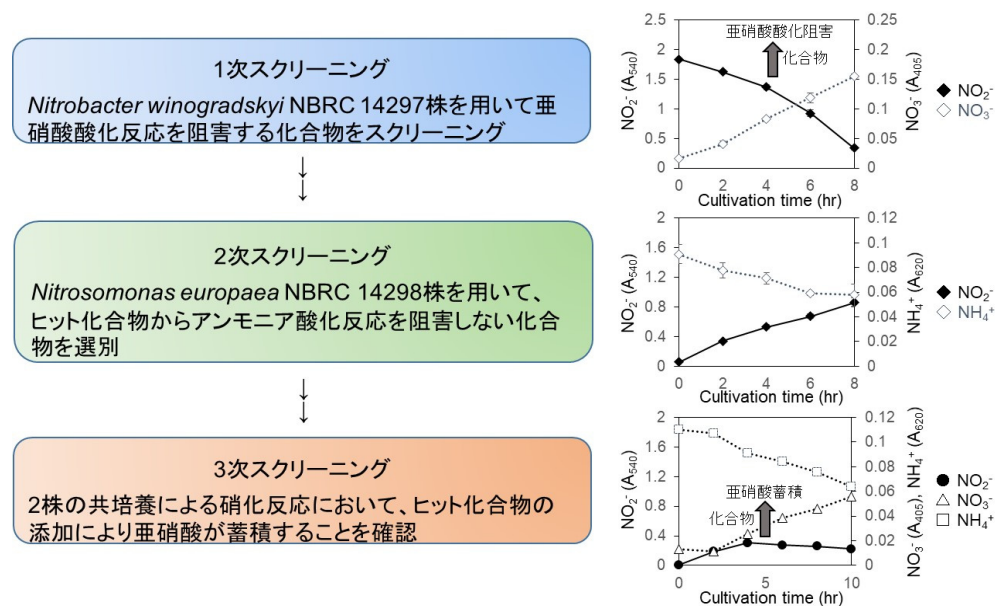
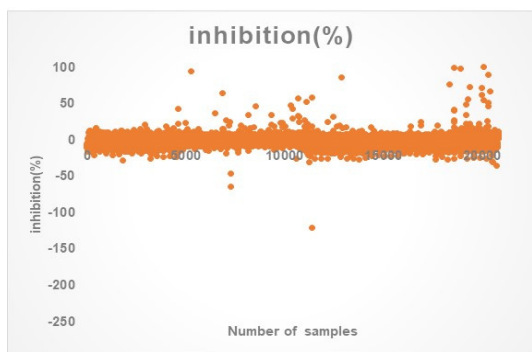


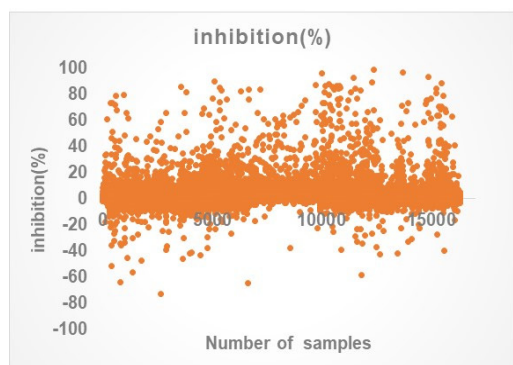
図 1. 亜硝酸酸化細菌の活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニングの流れ



InH(%)	# of compounds			
≥ 50	25	25	25	25
40-50	7	7	7	
30-40	8	8		
20-30	20			
	≥ 20%	≥ 30%	≥ 40%	≥ 50%
Hit compounds	60	40	32	25
Hit ratio (%)	0.3	0.2	0.2	0.1

ヒット化合物

図 2. NPDepo ライブラリーを用いた 1 次スクリーニングの結果



InH(%)	# of compounds					
≥ 90	11	11	11	11	11	11
80-90	25	25	25	25	25	
70-80	30	30	30	30		
60-70	43	43	43			
50-60	44	44				
40-50	75					
	≥ 40%	≥ 50%	≥ 60%	≥ 70%	≥ 80%	≥ 90%
Hit compounds	228	153	109	66	36	11
Hit ratio (%)	1.4	0.9	0.7	0.4	0.2	0.1

ヒット化合物

図 3. FBDD ライブラリーを用いた 1 次スクリーニングの結果

3. 発表 (研究成果の発表)

- (1) 松岡真生、Ashutosh Kumar、Muhanmmad Muddassar、松山晃久、Kam Y. J. Zhang、吉田稔

農耕地で発生する環境破壊ガス N_2O の主要源であるカビ脱窒の化学的制御

第18回東京大学生命科学シンポジウム (ポスター発表、東京、2018年6月)

- (2) 松岡真生、松山晃久、吉田稔

亜硝酸型硝化脱窒法に用いるための、亜硝酸酸化細菌の活性を選択的に阻害する化合物の探索

第9回スクリーニング学研究会 (ポスター発表、東京、2018年11月)

- (3) Masaki Matsuoka, Ashutosh Kumar, Muhanmmad Muddassar, Akihisa Matsuyama, Kam Y. J. Zhang, Minoru Yoshida

Screening for compounds inhibiting fungal

denitrification toward prevention of greenhouse gas N_2O emissions

The 5th CSRS-ITbM Joint Workshop (ポスター発表、名古屋、2019年1月)