

令和元年6月25日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18609

研究課題名(和文)革新的分離培養技術で解明する硝化細菌の生理生態と多様性

研究課題名(英文) Novel isolation technology illuminates ecophysiology and diversity of nitrifiers

研究代表者

藤谷 拓嗣 (Fujitani, Hirotsugu)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・次席研究員(研究院講師)

研究者番号：50708617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：硝化は、アンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌によって反応する、窒素循環の一部である。硝化細菌は、実験室で分離培養することが難しく、その生理生態は不明な点が多い。そこで本研究では、硝化細菌を対象とした分離培養技術を開発し、新規な硝化細菌を獲得することを目的とした。さらに、獲得した硝化細菌を特徴付けし、生理学的性質・ゲノム特性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された分離培養技術は、工学的な培養技術と分光技術をベースとした独創的な手法である。本手法は、硝化細菌をはじめとする環境微生物全般に広く一般化できるポテンシャルを持っている。また、本研究によって、系統的に新規な硝化細菌を特徴付けることができた。硝化細菌の生理生態を明らかにすることで、過剰な窒素化合物の流出や温室効果ガスの抑制など環境問題の解決に向け、微生物学的知見を拡充することができた。

研究成果の概要(英文)：Nitrification is a key reaction of biogeochemical nitrogen cycle and catalyzed by ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. Generally, nitrifiers are difficult to cultivate and isolate under laboratory conditions resulting that their eco-physiological characteristics are still unknown. In this study, we aimed to develop novel cultivation and isolation methods for uncultured nitrifiers and obtain novel nitrifiers. Isolates were characterized physiologically and genomically.

研究分野：環境微生物学，微生物生態学，微生物工学

キーワード：アンモニア酸化 亜硝酸酸化 分離培養 ゲノム 代謝物 セルソーター バイオリクター

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

環境中には細菌や古細菌などの多種多様な微生物が雑多に存在し、複合微生物系を形成している。新規で有用な微生物の獲得や個々の微生物の詳細な生理・生態機能を解明するためには、環境中から微生物を純粋培養することが必須である。しかし、分離培養技術は今もなお、大きな技術革新には至っておらず、地球上に生息する99%以上の微生物は未だ培養できていない。したがって、菌株保存機関等で保存されている純菌株コレクションは、環境中の微生物の多様性を反映していない。

培養が困難な微生物として、硝化細菌が挙げられる。硝化細菌は環境中の硝化反応（アンモニア酸化と亜硝酸酸化； $\text{NH}_3 \Rightarrow \text{NO}_2^- \Rightarrow \text{NO}_3^-$ ）を担う唯一の生物であるにも関わらず、実験室で分離培養することが難しい。硝化細菌の分離培養は、平板プレート（固体培地）や限界希釈法（液体培地）などの古典的な培養手法を用いて盛んに試みられてきた。しかし、易培養性の偏った系統グループばかり獲得されてきた。近年、硝化反応を触媒する機能遺伝子（*amoA* 遺伝子、*nxrB* 遺伝子）やメタゲノム等の遺伝子解析により、環境中には系統学的に新規な硝化細菌が豊富に存在している可能性が示唆されている。新規な硝化細菌が遺伝子ベースで次々と検出されているにも関わらず、古典的な培養手法への依存が純菌株の獲得を制限している。

2. 研究の目的

本研究では、環境を模擬することが可能な連続流入式バイオリアクターと高効率に純菌株を獲得することが可能なマイクロコロニー（数細胞～数10細胞から構成される凝集体）分取法を用いた新規な分離培養技術を導入した。新規な培養技術によって、個体（細胞）ベースで環境中の硝化細菌の生理生態、ゲノム特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 連続流入式バイオリアクターのセットアップ

硝化反応が活発に起こっている茶畑の土壌（静岡県島田市）、アマモ群落の砂泥（静岡県下田市）をサンプルソースとし、基質を連続的に供給した。微生物固定化担体として不織布を用いた。培養期間に応じて、段階的に流入基質濃度と流速を上げ集積化を図った。培養中、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、定期的に細菌数を測定する。集積サンプルからDNAを抽出し、16S rRNA および機能遺伝子（*amoA*、*nxrB* など）に基づいたクローン解析、アンプリコン解析を行った。

(2) 集積サンプルからの硝化細菌マイクロコロニーの分取

集積サンプルに含まれる不純物を除去するための調製方法を検討した。調製したサンプルをセルソーターに適用し、硝化細菌のマイクロコロニーが存在するフラクションをドットプロット上で探索した。前方散乱光（大きさ）と側方散乱光（複雑さ）を指標とした。分取後の純粋培養の操作性を踏まえ、マイクロコロニー分取効率は30-50%程度を目標値とした。

(3) 純粋培養と純菌株の同定

分取したマイクロコロニーから純粋培養を行った。顕微鏡観察と基質濃度の変化から増殖の有無を判断した。獲得した純菌株は、16S rRNA 遺伝子および機能遺伝子に基づき系統・多様性解析を行い、新規性を評価した。

(4) 純菌株の性状解析

新規性の高い純菌株から優先的に生理・生化学的性質（基質親和性、増殖速度、ゲノム等）を明らかにした。得られたデータとサンプル元の環境データを照合し、実際の環境中における硝化細菌の生態を考察した。

4. 研究成果

(1) 亜硝酸酸化細菌 *Nitrotoga* の分離培養と特徴付け

海洋沿岸域に生息するアマモ群落の砂泥サンプルについては、バイオリアクターによる連続培養とフラスコを用いた回分培養を繰り返したことで、*Nitrotoga* 属に分類される新規な亜硝酸酸化細菌 *Nitrotoga* sp. AM1 集積株を獲得することに成功した。AM1 集積株を特徴付けしたところ、16°Cで最も高い亜硝酸酸化活性を示し、従来知られている亜硝酸酸化細菌の中でも比較的低温域で機能していることが明らかになった。AM1 集積株の倍加時間はおよそ54時間であった。また、アンモニア濃度による感受性を調べたところ、30 mM以下のアンモニアでは、亜硝酸酸化活性が向上したことから、AM1 集積株は窒素源としてアンモニアを取り込む可能性が示唆された。塩化ナトリウムが0.5%以上の濃度で含まれる培地ではAM1 集積株は増殖阻害を受けた。アマモ群落をサンプルソースとしているにも関わらず浸透圧によって活性を失ったことは、環境中においてAM1は他の海洋微生物と相互作用することで塩耐性を獲得していた可能性がある。

続いて、AM1 集積株に共存する従属栄養細菌を除去するための方法論を構築し、純菌株を獲得した。具体的には、セルソーターを用いて *Nitrotoga* の細胞を含む凝集体を分取し、複数種の抗生物質を用いて従属栄養細菌の増殖を抑制させた。また、*Nitrotoga* の増殖を促すために、アン

モニアとピルビン酸を培地に添加したところ、亜硝酸酸化活性の上昇を確認し、純化することに成功した (図 1)。

さらに、DNA を抽出し、シーケンス解析により得られたリード情報に基づいて、ゲノムを再構築した。ドラフトゲノム中のタンパク質コード領域の同定とアノテーション作業を経て、保有している遺伝子情報に基づいて、代謝経路を予測した。AM1 純菌株の代謝経路から、細胞の増殖活性を促す可能性を持つ有機物を推定し、その有機物が細胞に与える影響を評価した。AM1 株の増殖活性を促す物質として、ピルビン酸が有力な候補として挙げられた。ピルビン酸は、亜硝酸酸化の過程で発生する過酸化水素を分解するポテンシャルを持ち、一方で炭素源・エネルギー源として利用できる可能性も合わせ持っていることから、AM1 株の増殖活性を促していることが示唆された。

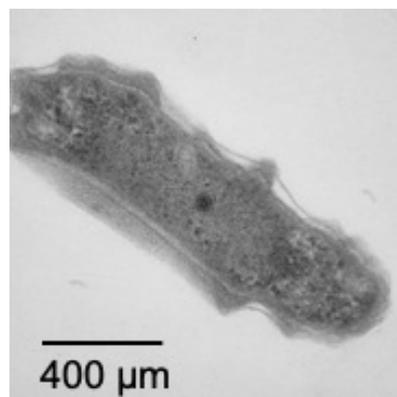


図 1 純化した *Nitrotoga* sp. AM1

(2) 亜硝酸酸化細菌 *Nitrobacter* の分離培養と特徴付け

茶畑の土壌サンプルについては、バイオリアクターを用いて複数種の亜硝酸酸化細菌を集積培養することに成功した。pH の変化に伴い、優占する亜硝酸酸化細菌の種類も変動することを見出した。続いて、集積サンプルを対象にセルソーターで亜硝酸酸化細菌の形成するマイクロコロニーを分取した。一定の培養期間を経て、増殖が確認されたウェルについてシーケンスを同定したところ、*Nitrobacter vulgaris* に近縁な株 (NbAS 株) を獲得することに成功した。

続いて、獲得した NbAS 株を対象にゲノム解析を実施した。データベースに公開されている *Nitrobacter* のゲノム情報と比較したところ、NbAS 株は脱窒反応関連遺伝子を複数保持しており、特に亜酸化窒素還元酵素をコードする遺伝子 *nosZ* を保持していたのは、NbAS 株のみであった (図 2)。*nosZ* 遺伝子に基づいた系統解析により、*Bradyrhizobium* 属、*Rhodopseudomonas* 属などの *Alphaproteobacteria* 綱の細菌と近縁であることがわかった。したがって、NbAS 株は硝化細菌として、温室効果ガスの亜酸化窒素を除去する唯一の株であることが期待される。

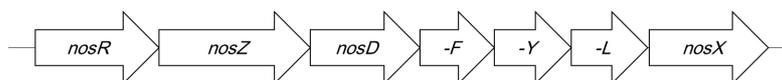


図 2 NbAS 株の持つ亜酸化窒素還元関連遺伝子

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件) 全て査読有り

1. Norisuke Ushiki, **Hirotsugu Fujitani**, Yu Shimada, Tomohiro Morohoshi, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda, “Genomic analysis of two phylogenetically distinct *Nitrospira* species reveals their genomic plasticity and functional diversity”, *Front. Microbiol.* 2018. 8(2637)., doi: 10.3389/fmicb.2017.02637
2. Kento Ishii, **Hirotsugu Fujitani**, Tatsunori Nakagawa, Reiji Takahashi, Satoshi Tsuneda, “Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite oxidizer *Nitrotoga* sp. from an eelgrass sediment”, *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. 83(14) e00549-17. doi: 10.1128/AEM.00549-17
3. Norisuke Ushiki, Masaru Jinno, **Hirotsugu Fujitani**, Toshikazu Suenaga, Akihiko Terada, Satoshi Tsuneda, “Nitrite oxidation kinetics of two *Nitrospira* strains: the quest for competition and ecological niche differentiation”, *J. Biosci. Bioeng.* 2017. 123(5): 581-589. doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.016

[学会発表] (計 13 件)

1. **藤谷拓嗣**, 菊池脩太, 石井拳人, 関口勇地, 常田聡, 「見過ごされたアンモニア酸化細菌: *Nitrosomonas* 属の新規な生理学, ゲノミクス, 環境分布」, 第 13 回日本ゲノム微生物学会年会, 2019 年 3 月 6-8 日, 八王子
2. 石井拳人, **藤谷拓嗣**, 関口勇地, 常田聡, 「ピルビン酸存在下での亜硝酸酸化細菌 *Nitrotoga* の混合栄養的な増殖様式」, 第 13 回日本ゲノム微生物学会年会, 2019 年 3 月 6-8 日, 八王子
3. **Hirotsugu Fujitani**, Kengo Momiuchi, Kento Ishii, Masaru Jinno, Norisuke Ushiki, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda “Genomic and physiological characteristics of novel nitrite-oxidizing *Nitrospira* isolated from a drinking water treatment plant”, 17th International society for microbial ecology, 12 - 17 August, 2018, Leipzig, Germany.
4. Kento Ishii, **Hirotsugu Fujitani**, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda, “Culture-dependent analysis of isolated *Nitrotoga* sp. provide deeper insight into the physiology”, 17th International society for microbial ecology, 12 - 17 August, 2018, Leipzig, Germany.
5. Kento Ishii, **Hirotsugu Fujitani**, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda, “Isolation process and genomic

- analysis of nitrite oxidizer *Nitrotoga* sp. provide insights on physiological characteristics and clues to promote the growth”, 32th Japanese Society Microbial Ecology Annual Meeting and 10th Asian Symposium on Microbial Ecology, 12 - 13 July, 2018, Okinawa, Japan.
6. Yu Takahashi, **Hirotsugu Fujitani**, Yuhei Hirono, Masahito Hayatsu, Satoshi Tsuneda, “Cultivation of novel nitrite oxidizer *Nitrospira* from acidic soil”, 32th Japanese Society Microbial Ecology Annual Meeting and 10th Asian Symposium on Microbial Ecology, 12 - 13 July, 2018, Okinawa, Japan.
 7. 石井 拳人, **藤谷 拓嗣**, 常田 聡, 「ゲノムから推定する遅増殖性 *Nitrotoga* の活性促進因子」, 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017 年 8 月 29-31 日, 仙台
 8. Norisuke Ushiki, **Hirotsugu Fujitani**, Yu Shimada, Tomohiro Morohoshi, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda, “Comparative genomics of phylogenetically distinct two *Nitrospira* strains isolated from activated sludge”, 5th International Conference on Nitrification, 23 - 27 July, 2017, Vienna, Austria.
 9. Kento Ishii, **Hirotsugu Fujitani**, Tatsunori Nakagawa, Reiji Takahashi, Satoshi Tsuneda, “Genome-informed isolation of nitrite oxidizer *Nitrotoga* sp.”, 5th International Conference on Nitrification, 23 - 27 July, 2017, Vienna, Austria.
 10. 牛木章友, **藤谷拓嗣**, 諸星知広, 常田 聡, 「*Nitrospira* の亜硝酸酸化活性を制御する Quorum-sensing 機構の発見」, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017 年 3 月 2-4 日, 藤沢
 11. 石井拳人, **藤谷拓嗣**, 常田 聡, 「セルソーターによって分取された凝集体内の微生物間相互作用の解明」, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017 年 3 月 2-4 日, 藤沢
 12. 石井拳人, **藤谷拓嗣**, 中川達功, 高橋令二, 常田 聡, 「微生物凝集体ソーティングによる未培養な亜硝酸酸化細菌 *Nitrotoga* の獲得と生存戦略」, 第 31 回日本微生物生態学会, 2016 年 10 月 22-25 日, 横須賀
 13. **藤谷拓嗣**, 牛木章友, 神野 大, 安部拓磨, 常田 聡, 「新規な分離培養技術によって獲得された硝化細菌の生理・ゲノム特性」, 環境バイオテクノロジー学会, 2016 年 6 月 13-14 日, 広島

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。