

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H00793

研究課題名(和文) オミックスでanammox反応の窒素循環システムを解く

研究課題名(英文) Omics reveals nitrogen cycling system with anammox

研究代表者

高見 英人 (Takami, Hideto)

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：70359165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：anammox細菌群集メタゲノムから2例目となるanammox細菌*Brocadia pituitae*ゲノムを完全解読した。本菌と先に解読されたanammox細菌及び高完成度の6細菌ゲノムとの比較解析が、これらのコアゲノム構造が1,152のオーソログからなることを示した。しかし、anammox反応の鍵遺伝子であるnirS, nirKはコアには含まれず、その他の候補酵素遺伝子(hao2, hao3)が含まれていた。メタゲノムには多くのnirS, nirKが存在するため、*B. pituitae*は、協働菌が供給するNOだけでなく、候補酵素の作用によるNOも利用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌氣的アンモニア酸化(anammox)と脱窒活性が長期的に維持されている集積バイオリクターの窒素循環システムに關与すると考えられる未培養の4優先種のゲノム情報と遺伝子発現プロファイル、および反応産物として生成されるガス成分解析結果から、リアクター内の窒素循環モデルを構築した。これにより、anammox細菌と協働する不完全型脱窒菌や亜硝酸酸化菌との機能的關係性の一端を明らかにできたことは学術的に意義深い。また、本成果は、anammox反応を用いた窒素除去リアクターシステムの人為的構築や効率的な運転条件を考える上での指針となり得る点で社会的にも意義深い。

研究成果の概要(英文)：We present the second complete genome of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacterium, *Brocadia pituitae*, along with those of a nitrite oxidizer and two incomplete denitrifiers from the anammox bacterial community (ABC) metagenome. *B. pituitae* lacks nitrite reductase genes (nirK and nirS) responsible for this reaction. Comparative genomics of *B. pituitae* with *Kuenenia stuttgartiensis* and six other anammox bacteria with nearly complete genomes revealed that their core genome structure contains 1,152 syntenic orthologues. But nitrite reductase genes were absent from the core and these genes were horizontally acquired from multiple lineages. In contrast, at least five hydroxylamine oxidoreductase genes containing another nitrite reductase one were observed in the core. Because many nirS and nirK genes have been detected in the ABC metagenome, *B. pituitae* presumably utilizes not only NO supplied by the ABC members but also NO and/or NH<sub>2</sub>OH by self-production for anammox metabolism.

研究分野：ゲノム微生物、環境微生物

キーワード：anammoxバクテリア メタゲノム解析 メタトランスクリプトーム解析 比較ゲノム解析 *Ca. Brocadia pituitae* 亜硝酸酸化菌 不完全型脱窒菌 生理代謝ポテンシャル

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

嫌氣的アンモニア酸化(anammox)反応は、アンモニアを利用する脱窒反応と見なすことができる。生息場所は、脱窒と重なり両者は  $\text{NO}_2^-$  を競合する。anammox の電子受容体は  $\text{NO}_2^-$  で、 $\text{NO}_3^-$  は利用できないとされている(図 1)。anammox 細菌は純粋分離された例はまだないが、なぜ純粋培養が得られないのか? anammox 細菌は実環境中の  $\text{NO}_3^-$  プール( $\text{NO}_2^-$  は殆ど無い)をどのように利用するのか? 他の細菌との「共生関係」はあるのか? など不明な点が多く、「謎」となっている。従って、この謎を解き明かすには anammox 細菌のみではなく、共存微生物を含む網羅的な解析が鍵となる。2006 年に anammox 細菌の 1 種である *Ca. Kuenezia stuttgartiensis* が 70% を占める集積培養系から、メタゲノム(細菌叢の網羅的ゲノム)解析によって本菌のゲノムが概ね解読された[1]。これにより、本細菌は単独で anammox 反応を行うと推定され、異化反応の機構が提案された。その後、その他 anammox 細菌のゲノム情報も報告されたが、いずれも未完成であったため[2-4]、現状ゲノム解読が完了した anammox 細菌はまだない。一方、研究代表者と研究分担者は、新学術領域ゲノム支援の協力を得て、anammox 集積培養系微生物群集(ABC)のメタゲノム解析から anammox 細菌(*Ca. Brocadia* 属の新種)ゲノムを再構築した。詳細なゲノム解析は今後の課題だが、現状  $\text{NO}_2^-$  還元に必要な酵素遺伝子(*nirK/nirS*)がゲノム中に見出されていないため、本 anammox 細菌は  $\text{NO}_2^-$  ではなく、 $\text{NO}$  を利用する可能性が示唆されている。anammox 細菌の研究では、純粋培養を目指し、高度な集積培養系が用いられてきたが、こうした集積培養では anammox 細菌と協働する微生物群が結果的に排除される。そこで、我々は anammox 細菌の極端な集積を行わない ABC のメタゲノム解析を行い、独自に開発した生理・代謝機能評価(Genomable™)システムを用いて、集積培養系を構成する細菌叢の組成と窒素循環に関与する機能のアバダンスを調べた。その結果、細菌叢の約 40% を anammox 細菌、3 分類門に渡る細菌がそれぞれ 10% 程度を占めていること、脱窒反応の各ステップを担う酵素遺伝子のアバダンスに極端な偏りがあることがわかった。そこで、ABC を構成する主要生物種のゲノム情報を活用し、継続運転中の集積培養リアクターの細菌叢から抽出した網羅的 RNA 情報に基づく遺伝子発現プロファイル、さらには細菌叢やリアクター内の代謝産物や窒素ガス成分などの分析結果と合わせて解析することで、anammox 反応に関与する窒素循環システムの全貌解明が可能と考えた。

[1] Strous *et al.* (2006) *Nature* 440, 790-94. [2] Hu *et al.* (2012) *Front. Microbiol.* 366. [3] Speth *et al.* (2015) *Genome Ann.* 3, e01415-14. [4] Oshiki *et al.* (2015) *Genome Ann.* 3, e0267-15.

### 2. 研究の目的

本研究は、環境中での窒素循環反応のうち、その実態が未解明の anammox 反応に着目する。anammox と脱窒活性が長期的に維持されている集積培養リアクターの窒素循環システム的全貌を最新のオミックス(生物が持つ網羅的 DNA, RNA 情報や生命活動に伴う網羅的代謝産物などを対象とした研究)と同位体化学的手法を駆使して解明することを目的とした。具体的には、網羅的ゲノム解析研究(メタゲノミクス)によって再構築に成功した anammox リアクター優占種細菌(anammox 菌、脱窒菌、亜硝酸酸化菌)のゲノム配列情報を最大限に活用し、それらの窒素循環に関与する遺伝子発現パターンや反応産物として生成されるガス成分、代謝産物の解析から窒素循環モデルを構築することで、窒素循環プロセスに対する新たなモデルを提唱する。

### 3. 研究の方法

(1) ゲノムアノテーション anammox 細菌叢を構成する主要 4 生物種のうち 3 生物種(2.81 M, 3.15 M, 4.05 M 塩基対)のゲノム解読が完成し、残りの 1 生物種は、3.2 M 塩基対までゲノム配列が再構築されている。そこで本研究に不可欠な細菌叢のゲノム基盤情報を得るため、それぞれのゲノム配列のアノテーションを行った。アノテーションはまず web で利用できる自動アノテーションツール DFAST(<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>)を用いて遺伝子領域予測、機能予測、RNA の同定を行なった。しかし、DFAST のゲノムデータベースは極めて限られており、多くの遺伝子機能予測が困難であったため、NCBI database に対して再検索し、マニュアルアノテーションを行なった。

(2) 生理代謝機能評価 アノテーションが終了したゲノム配列を Genomable™ に供試し、各生物種が持つ生理・代謝機能ポテンシャルを評価した。これにより、窒素循環を担う脱窒、硝化モジュ

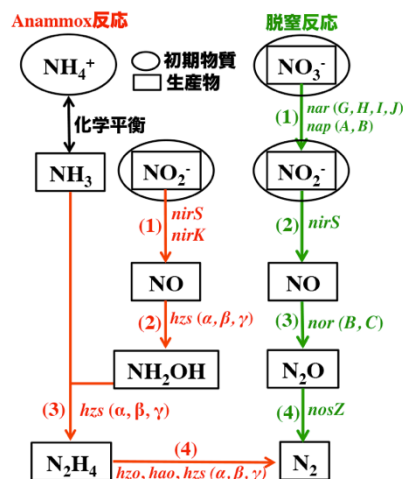


図1. Anammox (嫌氣的アンモニア酸化)と脱窒反応 イタリック: 遺伝子, ( ) 反応ステップ

ールやその他の生理代謝機能モジュールの充足率 (%) を数値化し、各生物種の機能ポテンシャルの違いを比較した。また、完成度の高い anammox 細菌のゲノム配列も Genomaple に供試し、anammox 微生物間の生理代謝ポテンシャル比較も行なった。

(3) **anammox 細菌ゲノムのメタゲノム DNA からの濃縮** ゲノムアノテーションの結果、完成したと思われる anammox 細菌のゲノム配列に矛盾点が生じたため、anammox リアクター細菌群集から DNA を抽出し、再度配列決定を行った。配列決定には anammox 細菌のゲノムが濃縮された DNA が必要となるので、細菌群集の破碎条件を検討した。anammox 細菌のゲノム DNA 組成を 16S rDNA の増幅量から推定し、最も anammox 細菌のゲノム DNA 組成が高い条件で抽出した DNA を用いて配列決定を行い、それらの配列情報を用いて再度ゲノム再構築を行った。

(4) **anammox 細菌の比較ゲノム解析** 既知の anammox 細菌は全て *Ca. Brocadiaceae* 科に含まれるが、4 属に渡っているため、これら 4 属に分類される anammox 細菌が持つ遺伝子の共通性と多様性解析を web 上から利用可能な MBGD (Microbial Genome Database, <http://mbgd.genome.ad.jp/>) を用いて行った。また、RECOG (<http://mbgd.genome.ad.jp/RECOG/>) を用いてこれら細菌種のコアゲノム構造を決定した。

(5) **anammox 細菌群集の遺伝子発現解析** anammox 集積培養リアクターから不織布 2 枚を抜き取り、不織布から菌体を掻き取った。RNA 抽出は、細菌からの RNA 抽出に定評があり他の細菌でも行った経験がある Qiagen RNeasy と QIAzol を使い、マニュアルに従って行った。RNA (~1µg 程度) を抽出したら、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (細菌用) を用いて、RNA サンプルからの rRNA 除去を行なった。RNA 標品を Illumina 社のマニュアルに従って鋳型調整を行い、MiSeq を用いて配列決定を行なった。方法は、Illumina 社が推奨する遺伝子発現プロファイリング法に従い、2x75 塩基対のランフォーマットで行った。決定された配列をアノテーションが終了した個別ゲノム配列にマッピングし、遺伝子発現量を RPKM (read per kilobase million mapped reads) として算出した。遺伝子発現のポジティブコントロールとなるリボソームタンパク質群の平均 RPKM 値と各遺伝子の RPKM 値との比を求めることで、本リアクター内で有意に発現する遺伝子群を特定した。

#### 4. 研究成果

(1) **優占種ゲノム配列の精査と菌種の同定** ゲノムの再構築に成功した未培養の *Ca. Brocadia* 属、Armatimonadetes 門、及びクラス  $\beta$ -Proteobacteria の 3 種の全ゲノム配列を精査した。その結果、*Ca. Brocadia* 属のゲノム配列に矛盾点が生じたため、anammox リアクターのバイオマスから *Ca. Brocadia* 属のゲノムを濃縮し、再度配列決定後矛盾点を解消した。その他の優占種ゲノムには特に問題がなかったため、優占種 3 ゲノムの配列決定が終了した。これに加え、Anaerolinea 科の優占種を 4 コンティグまでアセンブルした。これら 4 種は既知のどの生物種とも優位な相同性を示さないため、新種、または新属・新種と判断した。Anammox 細菌は、*Ca. Brocadia pituitae* (*pituitae* はラテン語で「汚泥」の意) と命名し。以下の 3 種については、ゲノムの特徴とゲノムから推定される生理・代謝学ポテンシャルに基づいて、*Ca. Nitrosymbiomonas proteolyticus* (Armatimonadetes 門細菌)、*Ca. Desulfobacillus denitrificans* ( $\beta$ -Proteobacteria 細菌)、及び *Ca. Denitrolinea symbiosum* (Anaerolinea 科細菌) と命名した。

(2) **優占種ゲノムの特徴** *Ca. B. pituitae* のゲノムサイズは 4,075,302 bp (GC 含有量:43.4%) で、3,593 のタンパク質コード配列、tRNA47 遺伝子、及び rRNA3 遺伝子が同定された。このゲノムの 3,593 遺伝子のうち、1,138 遺伝子が anammox 細菌のコアゲノム構造に含まれていた。他の 2 つの優占種、*Ca. N. proteolyticus* と *Ca. D. denitrificans* のゲノムも、それぞれ 2,809,316 bp (GC 含量:

表1. anammoxリアクターの4優占種の一般的ゲノムの特徴

General features	<i>Ca. B. pituitae</i>	<i>Ca. N. proteolyticus</i>	<i>Ca. D. denitrificans</i>	<i>Ca. D. symbiosum</i>
Size (bp)	4,075,302	2,809,316	3,145,360	3,705,798
contig	1	1	1	4
G + C (%)	43.4	61.1	66.7	59.5
protein coding genes	3,593	2,561	3,104	3,442
function assigned	2,015	1,626	2,378	1,811
conserved hypothetical	1,418	869	684	1,520
hypothetical	160	66	42	111
rRNA	3	3	4	3
tRNA	47	47	51	49
ribosomal protein (KO-assigned)	51	54	53	50

61.1%) と 3,145,360 bp (GC 含量:66.7%) からなっていた。*Ca. D. symbiosum* のゲノムはまだ 4 つのコンティグに分割されているが、コンティグの全長は 3,705,798bp で、GC 含量 (59.5%) は他の 2 優占種ゲノムと同程度に高かった(表 1)。このゲノムには、バクテリアに通常 51~52 存在する ribosome タンパク質が 50 検出されたため、全ゲノムの 90%以上カバーされていると判断した。ゲノム解析の結果、*Ca. B. pituitae* は *nirS* や *nirK* などの亜硝酸還元酵素遺伝子を有さず、これらの遺伝子は anammox 細菌ゲノムのコア構造に含まれていなかった。しかし、anammox バイオリアクター



では、これらの遺伝子は、バイオリクター内の他の ABC メンバー（つまり、亜硝酸塩からの NO 生産者）の遺伝子によって補完されていた。ABC バイオリクターで検出されたすべての亜硝酸還元酵素のうち、*Ca. D. denitrificans* と *Ca. D. symbiosum* に由来する *nirS* 遺伝子はそれぞれ 25% と 7% を占めていた(図 2)。これらの 2 つの ABC メンバーは、硝酸還元遺伝子(*narGHI* 及び/または *napAB*)を有していたが、NO 還元酵素遺伝子(*norBC*)は欠損していた。これは、*norBC* 遺伝子を他の ABC メンバーが有することから考えると、これらは不完全型脱窒菌であることが分かった。実際、バイオマス顆粒のごく一部を反応性基質としてアンモニウムと亜硝酸塩とともに嫌氣的に保持した場合、全窒素放出の 84% は anammox 反応由来であり、残りの 16% は脱窒由来であった。従って、NO を生成する ABC メンバーが NO を *Ca. B. pituitae* に供給していると考えられる。また、NO を基質とした場合、全窒素排出量の 69% が anammox 反応に由来していた。*nirS* 遺伝子の発現はメタトランスクリプトミクス解析によって確認され、*Ca. D. denitrificans* 及び *Ca. D. symbiosum* の遺伝子発現レベルはリボソームタンパク質の平均レベルよりも 5~10 倍

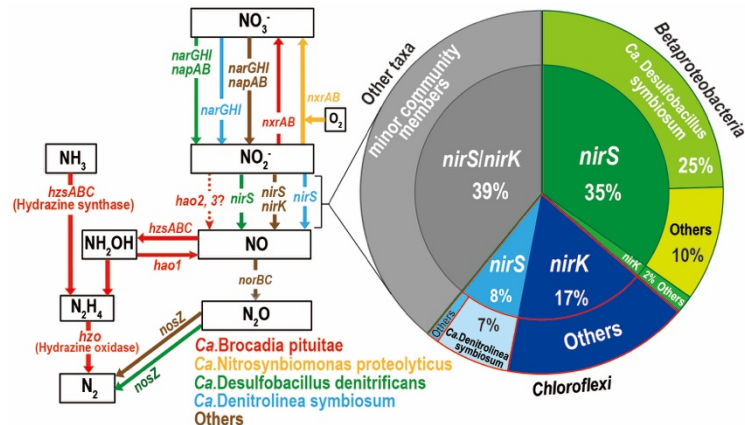


図 2. anammox リアクター内の窒素循環反応とその担い手

(RPKM ratio: 0.1~0.2)低いことが示された。従って、これら不完全型脱窒菌を含む ABC メンバーは、NO を生成して *Ca. B. pituitae* に供給する能力を持つが、*Ca. B. pituitae* は必ずしも NO を ABC メンバーのみに依存しているとは考えにくい。一方、*Ca. K. stuttgartiensis* は *nirS* 遺伝子を持っているが、この遺伝子は他の主要な異化反応をコードする遺伝子と比較して、転写及びタンパク質レベルでほとんど発現していない。一方、*Ca. Jettenia caeni* KSU1、*Ca. B. fulgida* 及び *Ca. B. caroliniensis* は、*nirS* の代わりに *nirK* を有しているが、他の Brocadia 種はそのような亜硝酸還元酵素を有していない。*Ca. B. pituitae* はこれらの遺伝子を有していないが、この種は亜硝酸塩、NO、及び  $\text{NH}_2\text{OH}$  を anammox 代謝の基質として利用することが実験的に証明された。

*Ca. N. proteolyticus* は亜硝酸酸化細菌 (NOB) の 1 つだが、他の NOB とは異なり炭素固定能はない。*Ca. N. proteolyticus* は、複数の分泌ペプチダーゼと溶解性トランスグリコシダーゼと II 型分泌システムを持っているため、自己溶解した古い細胞からのバイオマスのタンパク質分解が可能である。従って、これらの酵素に感受性のある ABC メンバーの溶解による栄養素が、*Ca. N. proteolyticus* 自体、更に *Ca. D. denitrificans* や *Ca. D. symbiosum* などの従属栄養優占種に供給されることで、ABC メンバーが維持されているのではないかと考えられる。

(3) *nirK*, *nirS* 遺伝子のゲノム上の位置と分子系統先に述べたように、anammox 細菌は必ずしも *nirK* 及び *nirS* タイプの亜硝酸還元酵素遺伝子を有しておらず、コアゲノム構造には含まれていない。

*Ca. Brocadia* sp. UTAMX2 及び *Ca. Jettenia caeni* KSU1 は、*Ca. B. pituitae* とは異なり *nirK* 遺伝子を、*Ca. K. stuttgartiensis* は *nirS* 遺伝子を、*Ca. Scalindua rubra* BSI-1 はその両方を有している。*nirK* 付近のゲノム構造と *nirK* を欠く他の anammox 細菌のゲノム構造を比較すると、KSU1 ゲノムの *nirK* は、IS630 ファミリーに属する挿入配列 (IS) を伴ってコア遺伝子の間に挿入されていた(図 3)。UTAMX2 では、近傍に IS は確認されていない

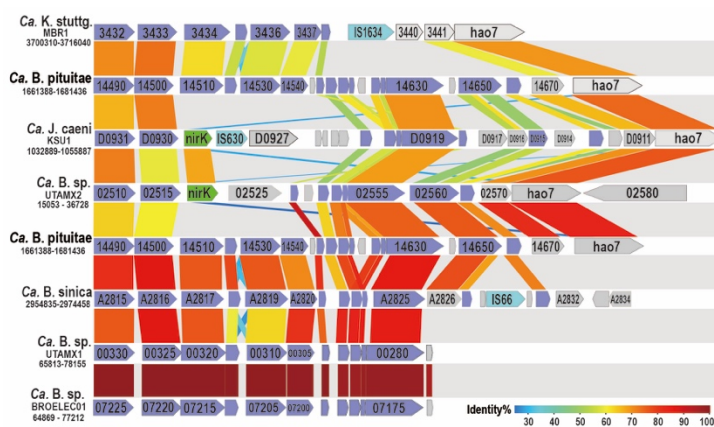


図 3. anammox バクテリアに挿入された *nirK* (亜硝酸還元酵素遺伝子) 近傍の遺伝子構成

が、*nirK* 遺伝子が KSU1 ゲノム上と同位置に挿入されていた。従って、*nirK* 遺伝子は、明らかに可動性遺伝子を介した水平伝播によって獲得されたと考えられる。*nirK* 遺伝子を欠く *Ca. K. stuttgartiensis* と *Ca. B. sinica* のこの領域には、さまざまなタイプの IS が発見されている。実際、ゲノム配列決定が完了した *Ca. K. stuttgartiensis* 及び *Ca. B. pituitae* のゲノムには、広く細菌ゲノムに

分布する IS630, IS4, 及び ISL3 のトランスポゼース遺伝子がそれぞれ 74 及び 68 検出されている。これらの *nirK* 遺伝子はお互い 67% の相同性を示すが、系統解析の結果、*nirK* 遺伝子は単系統群に由来せず、複数の系統に由来していた。この結果は *nirS* 遺伝子についても同様であった。

(4) **anammox 細菌の生理代謝能** *Ca. B. pituitae* の生理代謝能を他の anammox 細菌と比較し、anammox 細菌間の機能的共通性と多様性の特徴付けを行うため、完成 2 ゲノム (*Ca. B. pituitae* と *Ca. K. stuttgartiensis*) に加え、5 コンティグ未満まで再構築された *Ca. J. caeni* 及び *Ca. B. sinica* ゲノムを Genomagle™ に供試した。KEGG module に対する充足率 (MCR) と充足率の確からしさを示す指標である *Q* 値を anammox 細菌間で比較した。その結果、すべての KEGG module を通じて 4 種間に一部を除き代謝経路モジュールには目立った違いはなく、主要な 4 anammox 細菌の基本的な同化作用ポテンシャルは基本的に類似していることが分かった。

(5) **hao (hydroxylamine oxidoreductase) 遺伝子群のオーソログ解析** Hao は、アンモニア酸化細菌 (AOB) の硝化プロセスで  $\text{NH}_2\text{OH}$  の  $\text{NO}_2$  または  $\text{NO}$  への酸化を触媒する。一方、Hao 様タンパク質は、*Ca. K. stuttgartiensis* 及び *Ca. Scalindua profunda* では  $\text{NO}_2$  から  $\text{NO}$  への還元、*Ca. B. sinica* では、 $\text{NH}_2\text{OH}$  への還元を触媒する最も可能性の高い候補酵素であると予測されている。Hao (hydroxylamine oxidoreductase) は、アンモニア酸化細菌 (AOB) の硝化プロセスで  $\text{NH}_2\text{OH}$  の  $\text{NO}_2$  または  $\text{NO}$  への酸化を触媒する。一方、Hao 様タンパク質は、*Ca. K. stuttgartiensis* 及び *Ca. Scalindua profunda* では  $\text{NO}_2$  から  $\text{NO}$  への還元、*Ca. B. sinica* では、 $\text{NH}_2\text{OH}$  への還元を触媒する最も可能性の高い候補酵素と予測されている。また、*Ca. B. pituitae* は、Hao 様タンパク質をコードする 9 つのパラログ遺伝子を有しているため、典型的な AOB と anammox 細菌ゲノムで同定された Hao 様タンパク質遺伝子をクラスタリング解析によって分類し、それらを *hao1-hao10* とした。大きな独立クラスターである *hao5* を *hao5A* と *hao5B* の 2 グループに分かれ、*hao8* クラスターは AOB *hao* クラスターと大きなクラスターを形成した (図 4)。これらのうち、少なくとも 5 つ (*hao1-hao4* 及び *hao5B*) がコアゲノムに含まれていたが、*Ca. B. sinica* は *hao5B* を欠損していた。主な anammox 反応に関与する hydrazine synthase サブユニット A, B, C (*hzsABC*) と hydrazine oxidoreductase (*hzo*) をコードする遺伝子、亜硝酸 酸化酵素 (*nxrAB*) もコアゲノムに含まれていた。*Ca. B. sp. UTMX2* と *Ca. J. caeni* KSU1 は *Ca. B. pituitae* と同じ *hao* 様遺伝子レパートリーであったが、*Ca. K. stuttgartiensis* は *hao8* と *hao9* を欠損していた。*hao1* に対応する KSMBR1\_2670 の発現とその遺伝子産物は、*Ca. K. stuttgartiensis* の hydroxylamine oxidase として実験的に証明されている。また、*hao2* 及び *hao3* に対応する KSMBR1\_2163, KSMBR1\_3792 の発現も、遺伝子産物と伴に確認されている。タンパク質配列分析から、*Ca. K. stuttgartiensis* の KSMBR1\_2163 (*hao2*) 及び KSMBR1\_3792 (*hao3*) は、 $\text{NO}_2$  を  $\text{NO}$  に還元する第二の亜硝酸還元酵素をコードすると考えられている。一方、*Ca. B. sinica* では、 $^{15}\text{N}$  tracer 実験によって  $\text{NO}_2$  から  $\text{NO}$  ではなく  $\text{NH}_2\text{OH}$  への還元が確認され、*hao3* がその酵素遺伝子と推測されているが、まだ特定はされていない。また、*Ca. B. sinica* は  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4$  を利用するが、 $\text{NO}_2$  還元下流の  $\text{N}_2\text{H}_4$  合成には  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_4$  を利用しないことも確認され、*Ca. B. sinica* の anammox 代謝が  $\text{NH}_2\text{OH}$  に依存することが示されている。一方、*Ca. B. pituitae* は、*Ca. B. sinica* と同様に anammox 代謝に  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4$  が利用できることを確認した。実際、*Ca. B. pituitae* ゲノムのすべての *hao* 様遺伝子は、anammox リアクターの通常の運転条件下においてさまざまなレベルで発現しており、*hao1*, *hao2*, 及び *hao5B* は 10 を超える高い RPKM ratio であった。また、*hao3* も 3.09 の RPKM 比で有意に発現していた。*Ca. K. stuttgartiensis* と *Ca. B. sinica* で予測されているように、*hao2* と *hao3* がそれぞれ  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  を生成する亜硝酸還元酵素をコードすると仮定すると、*Ca. B. pituitae* は、これらの酵素を用いて  $\text{NO}_2$  を  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  に還元し、 $\text{N}_2\text{H}_4$  生合成に利用すると考えられる。詳細はまだ不明だが、これら 2 つの遺伝子の発現は、anammox バイオリアクターの環境に応じて制御されると考えられるため、*Ca. B. pituitae* は、ABC メンバーから供給された  $\text{NO}$  だけでなく、anammox 代謝のための自己生産による  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  も利用する可能性が示唆された。

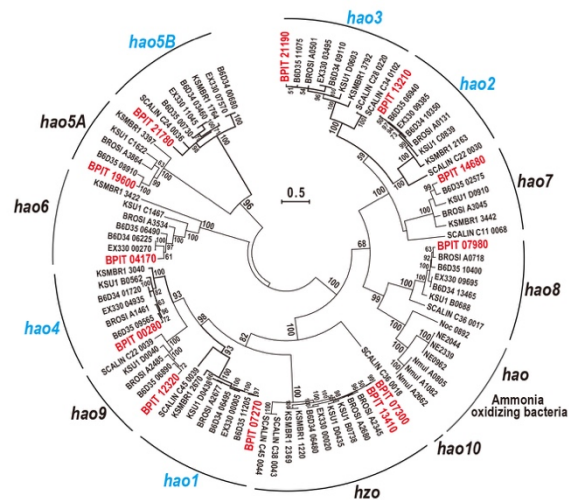


図 4. hao (hydroxylamine oxidoreductase) 様パラログ遺伝子のクラスタリング  
赤文字は、*Ca. B. pituitae*、青文字はコアに含まれるクラスター

図 4. *hao* (hydroxylamine oxidoreductase) 様パラログ遺伝子のクラスタリング解析によって分類し、それらを *hao1-hao10* とした。大きな独立クラスターである *hao5* を *hao5A* と *hao5B* の 2 グループに分かれ、*hao8* クラスターは AOB *hao* クラスターと大きなクラスターを形成した (図 4)。これらのうち、少なくとも 5 つ (*hao1-hao4* 及び *hao5B*) がコアゲノムに含まれていたが、*Ca. B. sinica* は *hao5B* を欠損していた。主な anammox 反応に関与する hydrazine synthase サブユニット A, B, C (*hzsABC*) と hydrazine oxidoreductase (*hzo*) をコードする遺伝子、亜硝酸 酸化酵素 (*nxrAB*) もコアゲノムに含まれていた。*Ca. B. sp. UTMX2* と *Ca. J. caeni* KSU1 は *Ca. B. pituitae* と同じ *hao* 様遺伝子レパートリーであったが、*Ca. K. stuttgartiensis* は *hao8* と *hao9* を欠損していた。*hao1* に対応する KSMBR1\_2670 の発現とその遺伝子産物は、*Ca. K. stuttgartiensis* の hydroxylamine oxidase として実験的に証明されている。また、*hao2* 及び *hao3* に対応する KSMBR1\_2163, KSMBR1\_3792 の発現も、遺伝子産物と伴に確認されている。タンパク質配列分析から、*Ca. K. stuttgartiensis* の KSMBR1\_2163 (*hao2*) 及び KSMBR1\_3792 (*hao3*) は、 $\text{NO}_2$  を  $\text{NO}$  に還元する第二の亜硝酸還元酵素をコードすると考えられている。一方、*Ca. B. sinica* では、 $^{15}\text{N}$  tracer 実験によって  $\text{NO}_2$  から  $\text{NO}$  ではなく  $\text{NH}_2\text{OH}$  への還元が確認され、*hao3* がその酵素遺伝子と推測されているが、まだ特定はされていない。また、*Ca. B. sinica* は  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4$  を利用するが、 $\text{NO}_2$  還元下流の  $\text{N}_2\text{H}_4$  合成には  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_4$  を利用しないことも確認され、*Ca. B. sinica* の anammox 代謝が  $\text{NH}_2\text{OH}$  に依存することが示されている。一方、*Ca. B. pituitae* は、*Ca. B. sinica* と同様に anammox 代謝に  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4$  が利用できることを確認した。実際、*Ca. B. pituitae* ゲノムのすべての *hao* 様遺伝子は、anammox リアクターの通常の運転条件下においてさまざまなレベルで発現しており、*hao1*, *hao2*, 及び *hao5B* は 10 を超える高い RPKM ratio であった。また、*hao3* も 3.09 の RPKM 比で有意に発現していた。*Ca. K. stuttgartiensis* と *Ca. B. sinica* で予測されているように、*hao2* と *hao3* がそれぞれ  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  を生成する亜硝酸還元酵素をコードすると仮定すると、*Ca. B. pituitae* は、これらの酵素を用いて  $\text{NO}_2$  を  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  に還元し、 $\text{N}_2\text{H}_4$  生合成に利用すると考えられる。詳細はまだ不明だが、これら 2 つの遺伝子の発現は、anammox バイオリアクターの環境に応じて制御されると考えられるため、*Ca. B. pituitae* は、ABC メンバーから供給された  $\text{NO}$  だけでなく、anammox 代謝のための自己生産による  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  も利用する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wataru Arai, Takeaki Taniguchi, Susumu Goto, Yuki Moriya, Hideya Uehara, Kazuhiro Takemoto, Hiroyuki Ogata and Hideto Takami	4. 巻 82
2. 論文標題 MAPLE 2.3.0: an improved system for evaluating the functionomes of genomes and metagenomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1515-1517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1476122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayatsu Masahito, Tago Kanako, Uchiyama Ikuo, Toyoda Atsushi, Wang Yong, Shimomura Yumi, Okubo Takashi, Kurisu Futoshi, Hirono Yuhei, Nonaka Kunihiro, Akiyama Hiroko, Itoh Takehiko, Takami Hideto	4. 巻 11
2. 論文標題 An acid-tolerant ammonia-oxidizing -proteobacterium from soil	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ismej.2016.191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zapata-Perez Ruben, Martinez-Monino Ana-Belen, Garcia-Saura Antonio-Gines, Cabanes Juana, Takami Hideto, Sanchez-Ferrer Alvaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Biochemical characterization of a new nicotinamidase from an unclassified bacterium thriving in a geothermal water stream microbial mat community	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0181561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0181561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Maeda Allyn H., Nishi Shinro, Ishii Shun'ichi, Shimane Yasuhiro, Kobayashi Hideki, Ichikawa Junko, Kurosawa Kanako, Arai Wataru, Takami Hideto, Ohta Yukari	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Altererythrobacter sp. Strain B11, an Aromatic Monomer-Degrading Bacterium, Isolated from Deep-Sea Sediment under the Seabed off Kashima, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00200 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00200-18	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okubo Takashi, Toyoda Atsushi, Fukuhara Kohei, Uchiyama Ikuo, Harigaya Yuhki, Kuroiwa Megumi, Suzuki Takuma, Murakami Yuka, Suwa Yuichi, Takami Hideto	4. 巻 28
2. 論文標題 The physiological potential of anammox bacteria as revealed by their core genome structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsaa028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsaa028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大久保 卓、豊田 敦、福原 康平、内山 郁夫、黒岩 恵、針ヶ谷 優生、鈴木 拓磨、村上 由夏、諏訪 裕一、高見英人
2. 発表標題 anammox 反応の原型はN <sub>2</sub> を電子受容体として利用していた
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会 第14回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒岩恵、鈴木拓磨、高見英人、大久保卓、諏訪裕一
2. 発表標題 アナモクスリアクターにおける窒素代謝の速度論的解析
3. 学会等名 日本生態学会 第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高見英人、中川剛史、荒井渉、吉村健二
2. 発表標題 高速且つ利便性が向上した最新版生理代謝機能評価システム-MAPLE 2.3.1-
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見英人、中川剛史、荒井渉、木田洋祐、青野圭祐、吉村健二
2. 発表標題 生理・代謝機能評価のための最新版統合型高速解析システム-MAPLE 2.3.1-
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保卓、豊田敦、福原康平、黒岩恵、荒井渉、鈴木拓磨、針ヶ谷優生、諏訪裕一、高見英人
2. 発表標題 窒素代謝コンソーシアムによる新規嫌気性アンモニア酸化
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideto Takami, Kazuhiro Takemoto, Wataru Arai, Yoshitoshi, Ogura, Tetsuya Hayashi, and Koji Hamasaki
2. 発表標題 Functional metagenomics of low latitude areas of the Pacific Ocean
3. 学会等名 FEMS 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高見英人
2. 発表標題 機能からマオクロバイオームを見る
3. 学会等名 日本感染症学会 西日本中日本支部 合同集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 高見英人、多田雄哉、荒井涉、鈴木翔太郎、瀨崎恒二
2. 発表標題 メタゲノム解析で見る太平洋低緯度海域の表層微生物叢代謝
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒井 涉、谷口 丈晃、五斗 進、守屋 勇樹、上原 英也、竹本 和広、緒方 博之、高見英人
2. 発表標題 利便性が向上した生理・代謝機能ポテンシャル評価システム -MAPLE2.3.0-
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Hideto Takami	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 271
3. 書名 MAPLE enables functional assessment of microbiota in various environments	

1. 著者名 Hideto Takami	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 699
3. 書名 Functional microbial diversity: Functional genomics and metagenomics using MAPLE	

1. 著者名 Hideto Takami	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 699
3. 書名 Molecular tools in microbial diversity: Functional assessment tool for genomes and metagenomes, MAPLE system	

〔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	黒岩 恵 (Kuroiwa Megumi)  (00761024)	中央大学・理工学部・助教  (32641)	2020年4月より、東京農工大 工学部 助教
研究分担者	諏訪 裕一 (Suwa Yuichi)  (90154632)	中央大学・理工学部・教授  (32641)	

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