

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06243

研究課題名(和文) 酸素非発生型光合成細菌を用いた革新的な硝化・脱窒プロセスの開発

研究課題名(英文) The development of innovative nitrification and denitrification process using anoxygenic phototrophic bacteria

研究代表者

花田 智 (Hanada, Satoshi)

首都大学東京・理学研究科・教授

研究者番号：10357791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,900,000円

研究成果の概要(和文)：今までアンモニアから亜硝酸・硝酸への酸化は硝化細菌によって酸素存在下で進行するプロセスと考えられてきた。しかし、酸素非発生型光合成細菌は亜硝酸だけではなくアンモニアも光合成電子伝達の電子供与体に成り得ると考えられるが、アンモニアを嫌氣的に酸化できる酸素非発生型光合成細菌は未だ発見されていない。

本研究において海洋や温泉といった環境から無酸素条件下でのアンモニア酸化能を有する海洋性または好熱性の酸素非発生型光合成細菌の培養に成功した。これら細菌のアンモニア酸化に伴う中間産物が何であるかは明らかとはならないが、世界で初めての培養例であると言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

廃水処理プロセスの効率化で問題となっている硝化プロセスを、酸素非発生型光合成細菌を使って、革新することが本研究の目的である。従来の硝化(アンモニアから亜硝酸・硝酸への酸化)は硝化細菌によって酸素存在下で進行すると考えられてきた。しかし、酸素非発生型光合成細菌による亜硝酸の嫌氣的酸化が発見され、硝化プロセスを効率化する新たなアプローチとして注目され始めた。未だ発見されていないアンモニア酸化できる酸素非発生型光合成細菌を環境中から見出し、光によってコントロール可能な酸素非存在下での硝化・脱窒プロセスを提案することができる。

研究成果の概要(英文)： Until now, the oxidation of ammonia to nitrous acid and nitric acid has been considered to be a process that progresses in the presence of oxygen by nitrifying bacteria. However, it is possibility that anoxygenic photosynthetic bacteria can use ammonia as an electron donor for their photosynthetic electron transfer in addition to nitrite, but no photosynthetic bacteria capable of anaerobically oxidizing ammonia have been discovered.

In this study, we succeeded in culturing a marine or thermophilic anoxygenic photosynthetic bacterium capable of oxidizing ammonia under anaerobic conditions from natural environments such as the ocean and hot springs. It has not been clarified what the intermediate products associated with the ammonia oxidation in these bacteria are, but it can be said that these are the first culture examples in the world.

研究分野：環境微生物学

キーワード：嫌氣的アンモニア酸化 酸素非発生型光合成細菌 バクテリオクロロフィル 硝化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

廃水処理において課題となっているもののひとつにアンモニアがある。廃水中のアンモニアは硝化・脱窒プロセスにより窒素ガスとなり、大気に放出される。なお、この変換を担っているのは微生物(アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌、脱窒細菌)である。この従来のプロセスは比較的安定的に維持できる反面、硝化プロセスの速度が遅く、高速化しづらいという難点がある。このプロセスを効率化する新たな戦略として、アナモックス反応という嫌気(無酸素)条件下でアンモニアと亜硝酸から窒素ガスが発生する生物反応が注目を集めているが、結局のところ亜硝酸の供給のために従来法を部分的に用いるしかなく、従来法での問題点を完全に解決したものとは言えない。申請者は嫌気廃水処理システムに光照射を行うことで光合成細菌を増殖させて処理を効率化する研究を行っていた経験があり、酸素非発生型光合成細菌がこの硝化・脱窒の問題を解決する鍵となるのではと考えていた。そんな中、2007年にサイエンス誌に掲載された嫌気条件下で亜硫酸を酸化し得る光合成細菌の発見の記事を目にし、光合成細菌が硝化・脱窒プロセスの効率化に役立つ可能性に思い当たった。酸素発生型光合成細菌と異なり、酸素非発生型光合成細菌は様々な物質を電子供与体として用いることができ、亜硫酸ばかりでなく、アンモニアをも電子供与体として使って光合成を行うことが理論上は可能である。しかし、そのようなアンモニア酸化光合成細菌は未だ発見されたとの報告はない。

2. 研究の目的

廃水処理プロセスの効率化で問題となっている硝化・脱窒プロセスを、酸素非発生型光合成細菌を使って、革新することが本研究の目的である。従来の硝化(アンモニアから亜硝酸・硝酸への酸化)は硝化細菌(アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌)によって好氣的(酸素存在下)で進行するプロセスと考えられてきた。しかし、酸素非発生型光合成細菌による亜硝酸の嫌氣的酸化が発見され、硝化プロセスを効率化する新たなアプローチとして注目され始めた。亜硝酸だけではなくアンモニアも光合成電子伝達の電子供与体に成り得るが、アンモニアを嫌氣的に酸化できる酸素非発生型光合成細菌は未だ発見されていない。これはアンモニア酸化活性が光によって阻害されるという事実によって阻まれて、研究が行われてこなかったことに因る。確かにアンモニア酸化作用は光照射に紫外-青色光照射によって著しく低下するが、酸素非発生型光合成細菌の光合成に用いられる近赤外光では阻害は全く見られない。特定波長(700nm)以下を遮断するフィルターによってアンモニア酸化反応を阻害することなく、酸素非発生型光合成細菌を培養し得る培養システムを設計することができる。また、このシステムは(670nmに長波長側の吸収帯をもつ)クロロフィルを光合成色素として有する藻類やシアノバクテリアなどの酸素発生型の光独立栄養生物の生育も阻害することもでき、アンモニア酸化酸素非発生型光合成細菌のみを効率的に得ることができものであると言える。この培養システムを用いて海洋や陸水、または温泉などの様々な環境中から採取した分離源を用いて、アンモニア酸化酸素非発生型光合成細菌の世界に先駆けての発見を目指す。更には分離培養に成功した酸素非発生型光合成細菌を用いて、光によってコントロール可能な硝化・脱窒プロセスを提案することが最終目標である。

3. 研究の方法

本実験計画は未分離の(1)嫌氣的アンモニア酸化酸素非発生型光合成細菌の純粋培養に世界に先駆けて成功すること、そして、(2)その嫌氣的アンモニア酸化反応の詳細を知ることである。

(1)に関しては、前述の通り照射光の波長を考慮することにより、純粋分離を確立することが出来る。光照射条件はカットフィルタ(700nm以下をカットする)の使用、またはLEDによる特定波長照射である。(2)は液体培養系を用いた実験であり、微生物複合系や純粋分離系でのアンモニアの酸化産物の特定や、複合系であれば、アンモニア酸化に関係する微生物の特定を16S rRNA解析等の手法を用いて明らかにする。

4. 研究成果

(1)海洋性嫌氣的アンモニア酸化酸素非発生型光合成細菌の分離と安定的複合系培養物の取得

赤外光フィルター(>700nm)を付けた投光装置を装着した光合成培養装置を構築し様々な海洋サンプル(宮城県松島の海岸海水)を分離源とした培養実験を開始した。その中で松島(仙台)の海岸で採取されたサンプルを用いての培養で、光合成細菌の増殖が認められた。用いた培養液は無機培地にアンモニアを硫酸塩(硫安)として添加したものであり、アンモニア以外の電子供与体となり得るものは一切含まれていないことから、アンモニア酸化光合成により光合成細菌が増殖したものと考えた。ただし、この培養は未だ複合系であり、当該酸素非発生型光合成細菌だけではなく様々な海洋性の非光合成細菌を依然として含んでいる。色素分析の結果から当該酸素非発生型光合成細菌はバクテリオクロロフィルaとカロテノイドを含んでいることが明らかとなり、またin-vivoスペクトルの解析からプロテオバクテリア門に属する紅色細菌であると推定された。紅色細菌に存在する光合成光化学反応中心タンパク質の遺伝子配列(*pufLM*)のPCR増幅を行い行ったところ、単一のPCR産物を得ることができた。その配列情報に基づく解析を

おこなったところ、当該酸素非発生源光合成細菌は海洋性紅色硫黄細菌である *Marichlomatium* 属細菌に近縁なものであることが明らかとなった。現在、この光合成細菌を単離すべく GTG アガロース平板培養を用いた分離培養を繰り返し行った。この平板培養において酸素非発生源光合成細菌のコロニー形成は見られたものの、海洋性の非光合成細菌の増殖も同時に見られ、且つ GTG アガロースの溶解が起きていることが確かめられた。これは共存する海洋性非光合成細菌が寒天を溶解し、GTG アガロース溶解物である糖が当該酸素非発生源光合成細菌の光合成を支える基質となっている可能性を示唆されたため、ゲル化剤をゲランガムに変更し平板培養を開始した。

しかし、ゲランガム平板培養においても当該光合成細菌の純粋分離は困難を極めた。この平板培養においても、当該酸素非発生源光合成細菌のコロニーの出現が確認でき、且つゲル化剤の溶解は見られなかったが、光合成色素を持たない細菌のコロニーが常に近傍に形成され、それは何度画線を繰り返しても解消されることはなかった。そこで、海洋性紅色硫黄細菌培養用の硫化水素を含む Pfenig 培地を用いての平板培養に切り替えたところ、当該光合成細菌の単一コロニーの獲得に成功することができた。しかし、このコロニーをアンモニア酸化条件で見られる無機培地に植菌したところ、依然として非光合成細菌が共存するコンソーシアムであることが 16S rRNA アンプリコン解析から明らかとなった（当該酸素非発生源光合成細菌 *Marichromatium* sp.に加え、*Shewanella algae*、*Vibrio fluvialis*、*Pseudomonas* sp.が多数存在していることが明らかとなった）。本コンソーシアムにおいて明らかなアンモニア消費は見られているが、亜硝酸や硝酸の増加が見られないことから、光合成細菌が酸化したアンモニアが共存する非光合成細菌によって再還元されているという「閉じた窒素循環」があると予想した。亜硝酸を過剰に添加した培養において、光依存的なアンモニア酸化と硝酸の増加が明確に見られたことから、非光合成細菌の硝酸還元活性は亜硝酸によって阻害され、その結果、硝酸の蓄積が認められたものと結論した。

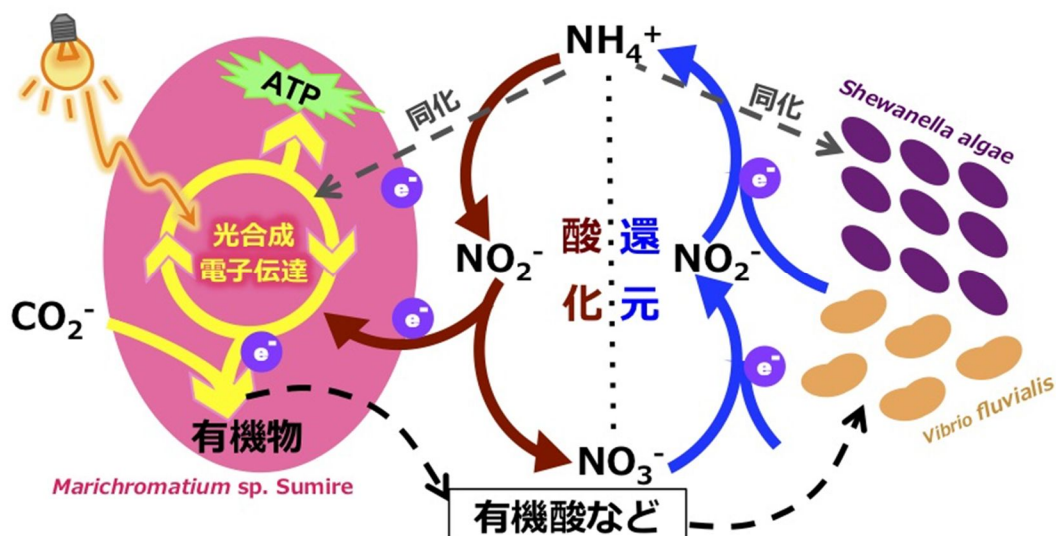


図 1 海洋性複合系における閉じた窒素循環モデル

(2) 好熱性嫌氣的アンモニア酸化酸素非発生源光合成細菌の分離培養と案のみ亜酸化代謝プロセスの検討

長野県の中房温泉を分離源とした培養実験を行った。嫌気条件下でアンモニアを唯一の電子供与体とする無機培地を用い、アンモニア酸化を阻害する青色光含む可視光をカットした 700nm 以上の光照射条件下、サンプリング温度に近い 55 で培養を行った。酸素の混入を避け液体培養に関しては窒素・二酸化炭素 (80:20) の気相内で培養した。この条件で生育する細菌は嫌気条件下で光を利用してアンモニア酸化しエネルギーを得ていると考えられる。培養物の植え継ぎを行うとともに、平板培地を用いて嫌気条件下での培養を進め、世界で初めて単離に成功した。顕微鏡を用いた観察から、単離された菌株は好熱性光合成細菌である *Chloroflexus aggregans* に形態が類似していることが明らかとなり、16S rRNA 遺伝子解析を用いた系統解析から *C. aggregans* NBF 株との高い相同性 (99%) が示された。また、単離株は光のない環境で生育できないこと、生育の前後でアンモニア量が明確に減っていることが示された。また、生育のためにはある程度のアンモニア量 (約 15 mM) が必要なことも明らかになった。嫌氣的に酸化されたアンモニアがどのような酸化化合物になっているのかを解析を行ったところ、硝化の中間生成物である亜硝酸や最終生成物である硝酸が培養液中 (または菌体内) に蓄積していないことが明らかとなった。これら物質が脱窒反応によって再還元されている可能性も考え、同位体ラベルした

アンモニアを用いた解析を行ったが、二酸化窒素や窒素には変換されていないことも明らかとなった。アンモニアの酸化化合物はまだ不明であるが、全ゲノム遺伝子の解析から、NXR (Nitrite oxidoreductase 亜硝酸酸化還元酵素) 様酵素が見つかった。この酵素は亜硝酸から硝酸への酸化反応と、亜硝酸からアンモニアへの還元反応を行う酵素であり、アンモニアから亜硝酸への逆反応 (アンモニア酸化) を触媒する可能性をも考えられ得るだろう。

本研究で発見された嫌氣的アンモニア酸化光合成細菌は、先行研究で見出された海洋性のものとはその生育環境のみならず系統的にも明らかに異なる細菌であった。遠く離れた系統の双方に嫌氣的アンモニア酸化能が存在しているということは、このような特殊な嫌気酸化能力が酸素非発生源光合成細菌に広く分布している可能性を示唆し、この研究をさらに推進することは意義があるものと考えられる。このような好熱性光合成細菌がシアノバクテリア出現以前の酸素がほとんど存在していなかった古地球環境中での窒素循環に、アンモニアを酸化できる生物として、大きく寄与していたのであろう。

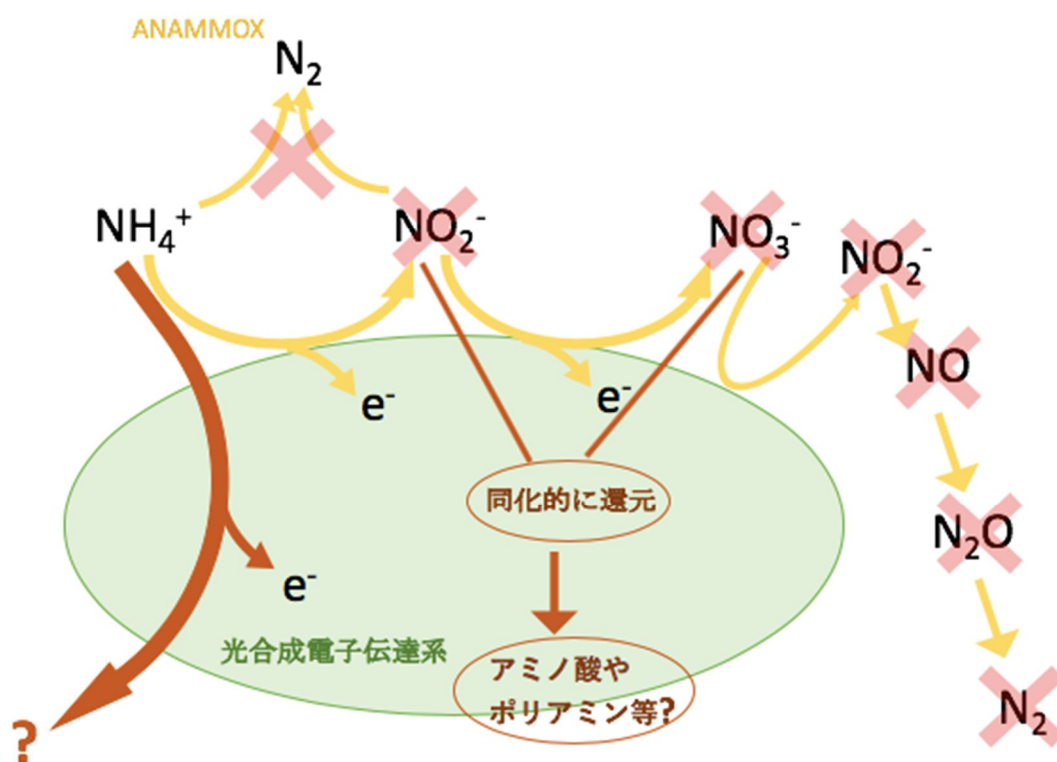


図2 好熱性光合成細菌によるアンモニア酸化のモデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中陽菜、中小路董、花田智
2. 発表標題 淡水性嫌氣的アンモニア酸化光合成細菌の分離
3. 学会等名 第32回日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中小路董、成廣隆、延優、嶋田敬三、春田伸、花田智
2. 発表標題 アンモニア酸化をする酸素非発生型光合成細菌の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中小路董、花田智
2. 発表標題 嫌気条件下でアンモニアを酸化する酸素非発生型光合成細菌の探索
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 花田智
2. 発表標題 分離培養の進展を阻害しているのは、「分離出来ない」って思い込み以外の何ものでもない
3. 学会等名 環境微生物系学会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----