

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04241

研究課題名(和文) Anammox細菌の機能分化を探索:実は多様なAnammox

研究課題名(英文) Exploring functional differentiation of anammox bacteria: actually diverse anammox

研究代表者

黒岩 恵 (Kuroiwa, Megumi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00761024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：無機合成培地を供給する上向流式anammoxリアクターに集積したanammox微生物群を対象に、窒素安定同位体で標識されたanammox反応の基質・中間生成物を添加・培養し、GCMSでガス代謝をモニタリングすることで基質利用特性を明らかにした。メタゲノム解析から細菌組成および機能ポテンシャルの変動を調査し、anammoxと脱窒細菌群の相互作用を推定した。これらとanammox細菌の比較ゲノム解析とを総合し、anammoxに共通する特性がNOとNH<sub>4</sub><sup>+</sup>からN<sub>2</sub>を生成する機能であることを提唱した。また、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の利用性もしくは用いる酵素と、hao遺伝子群の保有パターンに多様性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、環境への窒素負荷は産業革命以前の2倍以上に拡大し、我々の健康や生活に対して多面的な損失を引き起こしている。anammox反応は無機態窒素を無害な窒素ガスに還元する生物反応であり、環境中における機能解明に加え、排水処理での利用が期待されている。一方、anammox細菌の、培養の困難さ・ゲノム情報の不十分さ・生理生態機能の情報不足、が障壁となっている。本研究は、独自に開発した解析手法を活用し、anammox細菌の基質利用能・共存細菌との相互作用・ゲノム情報に基づく機能ポテンシャルの知見を拡充し理解を深めるとともに、今後の関連研究におけるホットトピックを提起した。

研究成果の概要(英文)：Substrate utilization characteristics were determined by nitrogen stable isotope(15N) tracing methods for anammox community enriched in up-flow anammox reactors fed with inorganic synthetic media. We added 15N-labeled substrate or intermediate and monitored gas metabolisms by GCMS. Metagenomic analysis was used to investigate changes in bacterial composition and functional potential and to infer interactions between anammox and denitrifying bacterial community. Synthesizing these results with comparative genomic analysis of anammox bacteria, we proposed that a common characteristic of anammox is its ability to produce N<sub>2</sub><sup>-</sup> from NO and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. We also showed that there is diversity in the NO<sub>2</sub><sup>-</sup> availability or in the enzymes used and in the patterns of possession of the hao-like genes.

研究分野：物質動態解析

キーワード：窒素安定同位体 トレーサー anammox メタゲノム 機能ポテンシャル解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年、環境への窒素負荷は産業革命以前の2倍以上に拡大し<sup>(1)</sup>、我々の健康や生活に対して多面的な損失を引き起こしていることが指摘されている<sup>(2)</sup>。そのため、生物が直接利用可能な形態の無機態窒素を反応性の低い $N_2$ に還元する過程は、窒素汚染の除去や生態系の生産性制御という点で非常に注目されている。しかし、脱窒とともにこの過程を駆動する、嫌気性アンモニア酸化(anaerobic ammonia oxidation; anammox)に対する理解はいまだにきわめて乏しい。

anammox 反応は $NH_4^+$ を電子供与体とする脱窒反応( $NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$ )であり、特に海洋において主要な $N_2$ 発生源として知られる<sup>(3)</sup>。さらに汽水、陸水、水田土壌などの広汎な環境で活性が確認されており、全球的な窒素循環に大きく関与していると考えられている。また工学的には、低コスト・低環境負荷の排水処理技術としての活用が期待されている。このような重要性に反して、anammox 反応がどのような経路で生じるかという基本的な情報すら、十分に得られていないのが現状だ。なぜなら、anammox 細菌には純粋培養株が無く、完全ゲノムですら現在に到るまで研究開始時点で1例(*Kuenenia stuttgartiensis*)しか得られていなかった<sup>(4)</sup>。加えて、anammox 反応の基質や中間生成物( $NO_2^-$ ,  $NO$ ,  $NH_2OH$ ,  $N_2H_4$ )は、いずれも化学反応性・毒性が高いために早い速度で代謝され、一般に低濃度でしか蓄積されないため、ほとんどの研究では物質動態を追うことができていない。実際、もっともよく研究されている anammox 細菌; *Kuenenia stuttgartiensis* についてですら、2015年に anammox 代謝経路が改められ<sup>(5)</sup>、また、2016年にはこれまで考えられてきたのとは異なる経路で anammox 反応を行う anammox 細菌; *Brocadia sinica* が報告された<sup>(6)</sup>。これらの報告からは、これまで提唱されてきた anammox 反応の概念は流動的なものであり、未知な多様性が存在することが想起された。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)anammox を集積培養したリアクターに優占する新種 anammox 細菌の窒素変換過程の速度を安定同位体トレーサー法を用いて定量し、メタゲノム・トランスクリプトーム情報等と照らし合わせ、anammox 経路の特定と各反応を担う酵素遺伝子の対応づけを行うこと、および、(2)1により得られた情報と、複数の anammox 細菌の比較ゲノム・生理代謝機能予測を組み合わせて、機能的多様性の推定と機能的進化の考察を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Anammox 集積培養リアクターの運転

不織布を担体とする、2基の上向流式 anammox リアクターを研究期間にわたって運転・維持した。基質として $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ を含む無機合成培地を供給し、リアクター内の溶存酸素濃度(DO)とpHおよび、流入水・流出水の無機態窒素( $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ 、 $NO_3^-$ )濃度をモニタリングすることで、anammox 反応の進行と、リアクターの窒素除去性能をモニタリングした。研究提案当初、これらのリアクターには *Ca. Brocadia* 属に類別される新種 anammox 細菌が集積していたが、その後複数回のメタゲノム解析によって、一定の運転条件を維持したとしても anammox 細菌の組成が大きく変動する可能性が示された。そのため、anammox 細菌相および共存する微生物群集相の変遷をモニタリングするために、経時的なメタゲノム解析を行った(下記方法(2),(3))。また、代表研究者の所属変更に伴い、2020年3月にリアクターを運搬・移設したため、移設前後での影響も検討した。

### (2) DNA 抽出とメタゲノム解析

リアクター内の不織布担体から、担体の位置による微生物相の不均質性を考慮してバイオマスを採取・混合した。試験篩に通し、バイオマスの物理構造を均一化したのち、ISOIL for beads beating(ニッポンジーン)付属のプロトコルをベースとして、酵素処理およびビーズ破碎の手法を付加・改変した手法により、DNAを抽出した。NovaSeq, 250 bp paired end でショットガンシーケンスを行い、各試料につき約300万リードのアミノ酸配列を微生物群集の代謝ポテンシャル解析ツールである Genomagle<sup>TM(7)</sup>での解析に供した。

### (3) 細菌群集の組成と機能ポテンシャルの解析

細菌群集組成について、Genomagle で細菌のリボソームタンパク質にアノテーションされた配列の組成から評価した。また、このうち anammox 細菌が類別される Planctomycetes 門由来と判別された配列について、アミノ酸の nr データベースを対象に BLASTp による相同性検索を行い、anammox 群集の組成をより詳細に評価した。また、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域をターゲットとしたアンプリコン解析による菌叢組成の解析も行った。

### (4) Anammox 細菌群集の比較ゲノム解析

Anammox 細菌ドラフトゲノムと、既報の完全ゲノム1例および本研究のリアクターから新たに復元した完全ゲノム1例について MBGD (<https://mbgd.nibb.ac.jp/>) による比較ゲノム解析と RECOG (<https://mbgd.nibb.ac.jp/RECOG/>) によるコアゲノム解析を行った。

(5)安定同位体トレーサーを用いた活性試験

Anammox リアクターから採取したバイオマスを目開き 53 $\mu$ m の試験篩に通し均質化し、洗浄後に、基質を含まない培地に懸濁した。この懸濁液をガラスバイアルに封入し、嫌気条件に調製した。窒素安定同位体 (<sup>15</sup>N) でラベルされた、anammox 反応の基質または中間生成物をバイアル内に添加し、培養時系列でのガス代謝を GCMS でモニタリングすることで、anammox 反応の速度や経路の解析を行った。また、スターラー攪拌による分散処理前後での基質利用率の変化を検討した。バイオマスの形状変化は FISH 法による蛍光染色と共焦点顕微鏡観察で確認した。

4. 研究成果

(1) Anammox 集積培養リアクターの微生物相

Anammox 集積培養リアクター 2 基は安定的に維持され、ほとんどの期間において、流入窒素の 8 割以上が除去される性能を維持した。当初、リアクターに集積していた新種 anammox 細菌をターゲットとした解析を行うことを予定していたが、ほぼ同一の条件で連続運転を行った場合であってもリアクター内の細菌群集および anammox 細菌組成がダイナミックに変化する可能性が見いだされたため、細菌群集および anammox 細菌組成の変遷を解析した。また、細菌群集組成の評価は(A)16S アンプリコン解析および(B)リボソームタンパク配列の双方で評価した。(A)法による評価は広く一般に用いられるが、細菌種によって保持する 16S rRNA 遺伝子数が大きく異なり、かつ、16S の特定領域の増幅されやすさも異なるため、細菌組成の推定にバイアスをもたらすことが指摘されている。一方で、リボソームタンパク遺伝子は通常 1 コピーずつ保有されており、バイアスを回避した細菌群集組成の評価が可能だと提唱されている<sup>(7)</sup>。anammox 細菌の存在比率の推定値は(A)法と(B)法で大きく異なり、それぞれ 15-27%, 1.5-12%で変動した。また、存在比率の時系列での変動傾向も(A)・(B)法によって異なった(図1)。(B)法の定量値の妥当性を明確にするためにはさらなる検討を行う必要があると考えるが、典型的な(A)法による菌叢推定には 16S コピー数および PCR バイアスに伴う大きな誤差があることが示唆された。

また、リボソームタンパク配列組成から anammox 細菌の組成を解析した結果、リアクター運転期間を通じて、anammox 細菌組成が変化したことが示された(図2)。当初集積していると想定された *Ca. B. pituitae* と拮抗して同属の *Ca. B. caroliniensis* が集積され、両者の存在比率は運転条件に明確な変化が無いにもかかわらず、リアクターの移設前後や時期によって変動を示した。集積された anammox 細菌のうち、*Ca. B. caroliniensis* と *Ca. B. WS118* は既知の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>還元酵素(*nir*)を保有するが、*Ca. B. sinica* と *Ca. B. pituitae* は *nir* を保有しない。したがって、anammox 細菌群による NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の利用性や、共存する脱窒細菌との相互作用が、時系列で変動したことが示唆された。コロナ禍における研究機関への立ち入り制限等の事情も鑑み、特定の anammox 細菌種のみを集積する操作は困難であると判断し、anammox 細菌群集単位での基質利用率とメタゲノム解析から、anammox 細菌の代謝経路を明らかにすることを試みた。

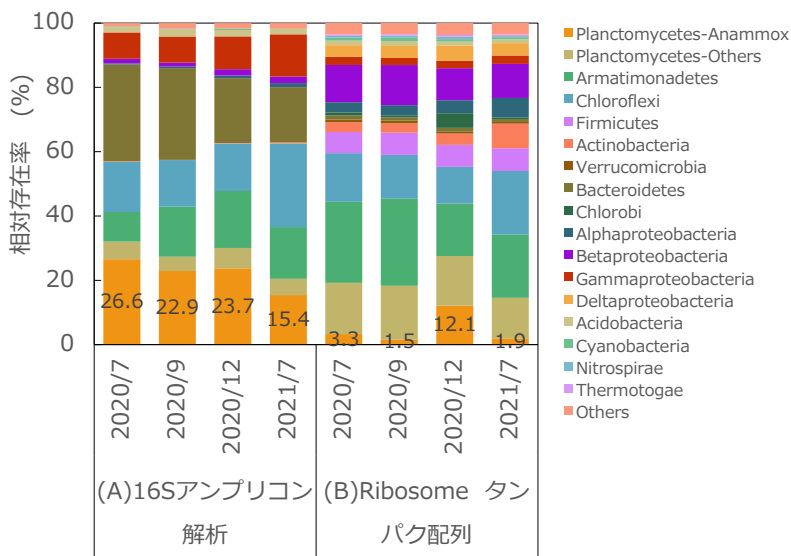


図1 リアクター細菌組成の時系列変化  
分類群は門レベルで示した。解は (A) 16S  
アンプリコン解析【従来法】および、(B) リ  
ボソームタンパク組成の 2 手法で評価した。

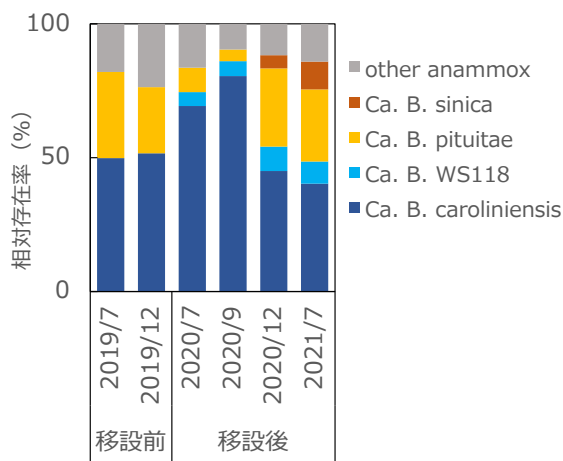


図2 anammox 細菌組成の時系列変化

## (2) Anammox 細菌の基質利用能・代謝経路

集積培養リアクターから採取したバイオマスを用いて、 $^{15}\text{N}$  で標識された  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{NO}$  のいずれかと非標識の  $\text{NH}_4^+$  を基質として活性試験を行った。その結果、いずれの物質を基質とした場合も標識 N と非標識 N に由来する活発な  $\text{N}_2$  生成が確認され、集積した anammox 微生物群は  $\text{NO}_2^-$  以外に外来の  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{NO}$  を取込み anammox 反応を行うことが確認された (図 3)。anammox 細菌群集は *nir* を保有するものとし、ないものが共存したため、 $\text{NO}_2^-$  を直接的に還元するのか、あるいは他の細菌群によって変換された中間産物も利用するのかを、分散処理を行ったバイオマスを対象に検討した。バイオマス粒径を小さくした場合に、アナモックスコンソーシアにおける  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4^+$  由来の  $\text{N}_2$  生成は増加する一方で、 $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NH}_4^+$  由来の  $\text{N}_2$  生成は顕著に低下した (図 4)。さらに、この阻害効果はバイオマス密度を増加させた場合、それに伴い緩和されたことから、 $\text{NO}_2^-$  利用にはバイオマスの物理構造や細菌の空間配置が重要であり、共存細菌との協働によって  $\text{NO}_2^-$  を利用することが示唆された。リアクターの細菌組成から、 $\text{NH}_2\text{OH}$  を供給しうる硝化細菌はわずかにしか存在しない一方で、脱窒細菌は豊富に存在し、脱窒細菌が生成する  $\text{NO}$  を anammox 細菌群集が利用し、 $\text{N}_2$  生成を行う可能性が考えられた。この仮説は、実際に  $\text{NH}_4^+$  と  $^{15}\text{NO}$  を添加した場合、菌体外の添加  $\text{NO}$  を取込んだ  $\text{N}_2$  生成が生じた (図 3) ことに加え、Genomape で評価した脱窒細菌群集の  $\text{NO}$  還元能が  $\text{NO}$  生成能に対して恒常的に低い (生成の 7-27%) ことからサポートされた。 $\text{NO}_2^-$  から  $\text{NO}$  を生成する酵素をコードする *nir* を保有する群集は anammox 以外に *Chloroflexi* 門の脱窒細菌が約 3-6 割を占め、 $\text{NO}$  供給者として重要である可能性が考えられた。

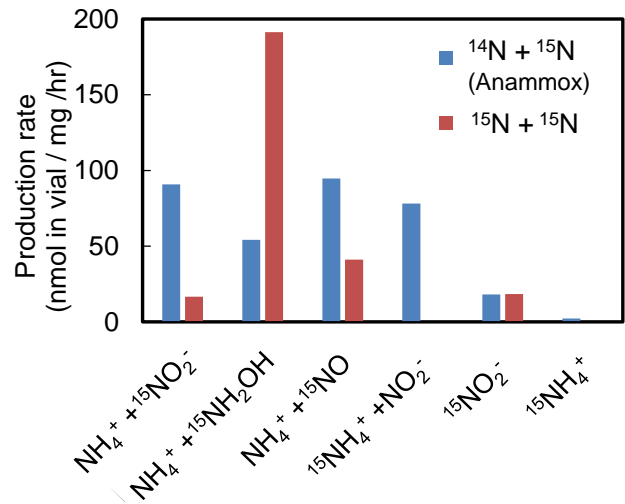


図 3 anammox 細菌群の基質利用能  
青棒は anammox 活性を示す。赤棒はラベル物質 2 分子に由来する  $\text{N}_2$  生成活性を示し、ラベル物質が  $\text{NO}$  や  $\text{NO}_2^-$  である場合、脱窒活性を示す。図には平均値 ( $n=2$ ) を示した。値は天然の  $^{15}\text{N}$  ( $^{14}\text{N}$ ) 存在量および大気  $\text{N}_2$  の混入を考慮した補正を行った。

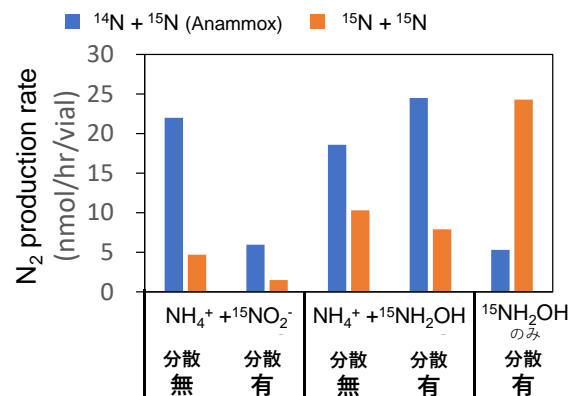
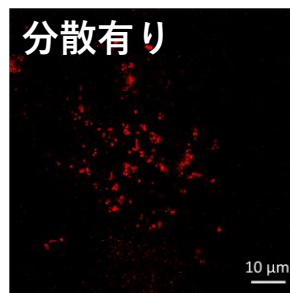
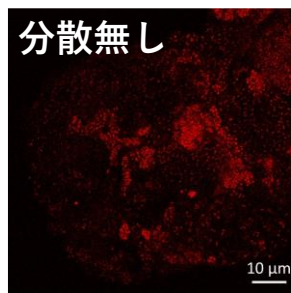


図 4 分散処理に伴う anammox の  $\text{NO}_2^-$  利用能低下

FISH 画像は anammox 細菌に特異的なプローブ (赤色) で蛍光標識したバイオマスの共焦点顕微鏡観察により取得した。活性測定結果の青棒は anammox 活性を、オレンジ棒はラベル物質 2 分子に由来する  $\text{N}_2$  生成活性を示し、ラベル物質が  $\text{NO}_2^-$  である場合、脱窒活性を示す。図には平均値 ( $n=2$ ) を示した。値は天然の  $^{15}\text{N}$  ( $^{14}\text{N}$ ) 存在量および大気  $\text{N}_2$  の混入を考慮した補正を行った。

## (3) 比較ゲノムによる anammox の多様性と機能的進化の考察

本研究開始以前にリアクターに集積していた新種 anammox 細菌 (*Ca. Brocadia pituitae* と命名) について、世界 2 例目となる完全ゲノム復元が完了したため、この細菌と複数の anammox 細菌のゲノム情報から、比較ゲノム解析を行った。anammox 反応の基質は一般に  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NH}_4^+$  であると理解されているが、既知の  $\text{NO}_2^-$  還元酵素 (*nir*) は anammox 細菌が一貫して保有するわけではなく、*Ca. Brocadia* 属細菌のうち *nir* を保有しないグループが存在した (図 5)。また、*nir* の系統解析から、anammox 細菌間で進化的に *nir* が保存されていないことが示唆され、*nir* を用いた  $\text{NO}_2^-$  還元は anammox 細菌に共通の特性ではないことが明らかになった。これらの結果から、始原的 anammox 反応は  $\text{NO}_2^-$  ではなく  $\text{NO}$  に依存的な anammox を行う可能性が提起された。また、anammox 細菌は多数のヒドロキシアミンデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*hao*) のパラログを持つ



が、この保有パターンは anammox 細菌間で多様なことが示唆された。一部の *hao* グループは anammox 細菌に共通するコアゲノムに含まれ(図5)、これらが anammox 反応に中心的な役割を果たす可能性がある。*nir* を保有しないグループに特異的な *hao* の保有パターンは見いだされなかったが、Hao 様タンパクが NO<sub>2</sub><sup>-</sup>還元を直接的に担う可能性も指摘されている(8)。また、anammox 細菌が NH<sub>2</sub>OH を NH<sub>4</sub><sup>+</sup>に変換することが報告されているが、この反応を担う酵素は不明であり、Hao 様タンパクが担う可能性がある。本研究では NH<sub>2</sub>OH 添加条件でこの反応が活発に生じ、生成 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が N<sub>2</sub>に変換されることが強く示唆された(図3,4)。今後、特にコアゲノムとして保有される *hao* グループの機能に着目した研究を行うことで、anammox 代謝の未知の全容に迫ることが期待される。

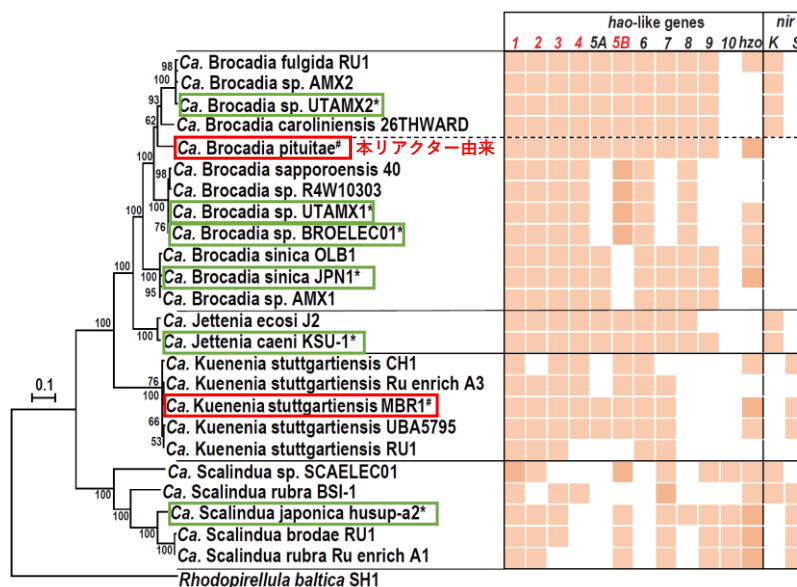


図5 anammox 細菌の *nir*、*hao* 様遺伝子の保有パターン。リボソームタンパク配列から系統樹を作成。赤枠は完全ゲノム、緑枠は完成度の高いドラフトゲノムを示す。オレンジの四角は各遺伝子を保持することを示し、色の濃いものは該当の遺伝子を2コピー持つことを示す。*nir* がコアゲノム(赤字表記の遺伝子)でない一方、*hao* パラログの一部は共通して保持されていた。

【引用文献】(1) Galloway *et al.* (2003) *Bioscience* 53(4):341-356, (2) Rockström *et al.* (2009) *Nature* 461:472-475, (3) Kuypers *et al.* (2005) *PNAS* 102(18):6478-6483, (4) Frank *et al.* (2018) *Scientific Reports* 8:4580, (5) Dietl *et al.* (2015) *Nature* 527:394-397, (6) Oshiki *et al.* (2016) *Environ. Microbiol.* 18(9), 3133-43, (7) Takami *et al.* (2016) *DNA Res.* 23(5), 467-475, (8) Kartal and Keltjens (2016) *Trends Biochem. Sci.* 41(12):998-1011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 -
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 -

1. 著者名 Kuroiwa Megumi, Fukushima Keitaro, Hashimoto Kazuma, Senga Yukiko, Sato Tsubasa, Katsuyama Chie, Suwa Yuichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Measurement of the Potential Rates of Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium Based on $^{14}\text{NH}_4^+$ / $^{15}\text{NH}_4^+$ Analyses via Sequential Conversion to $\text{N}_2\text{O}$	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59562	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 -

〔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 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NO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 鈴木拓磨, 黒岩 恵, 川面佑登, 諏訪裕一
2. 発表標題 分散操作によるアナモクス活性の阻害とヒドロキシルアミン添加による回復
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
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 黒岩 恵、村井 沙妃、川面 佑登、寺田 昭彦、利谷 翔平、安田 昌平、諏訪 裕一、高見 英人
2. 発表標題 アナモックスと共生細菌の関係に着目したアナモックスアバンダンス制御 因子の探索
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2022
4. 発表年 2022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	高見 英人  (Takami Hideto)  (70359165)	東京大学・大気海洋研究所・特任研究員   (12601)	
研究 分担者	大久保 卓  (Okubo Takashi)  (70749275)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・ポストドクトラル研究員   (82706)	

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