

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16218

研究課題名（和文）培養技術とゲノム解析で紐解く硝化界のダークマター「完全アンモニア酸化細菌」

研究課題名（英文）Dark matter in nitrification illuminated by cultivation technique and genome analysis: Complete ammonia-oxidizing bacteria

研究代表者

藤谷 拓嗣 (Fujitani, Hirotsugu)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：50708617

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、1菌体で硝化を行う完全アンモニア酸化（comammox）細菌の培養と性状解析を目指した。酸性土壌の細菌集団で相対量1%を占めるNitrospiraを長期培養し、最大92%まで集積した。集積したNitrospiraはpH 4以下の酸性で生存可能な酸耐性菌であり、硝化に必要な全遺伝子を備えるcomammox Nitrospiraであった。さらに既往研究で報告されている4種と別種相当の新規性を持ち、生理学・ゲノム科学の両面で新規な細菌であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養の播種源に用いた茶園土壌は、多量の窒素肥料が投入され、活発に硝化が起こる酸性土壌である。硝化を人為的に制御することは、窒素負荷を低減し、温室効果ガスである亜酸化窒素の削減にも貢献する。しかしながら、こうした環境への負荷を及ぼす要因となる、微生物の学術的知見は乏しい。本研究で得られた comammox 細菌の知見は、窒素循環に関連する環境負荷を削減するための方策や人為的に硝化を制御するための技術開発の一助となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to cultivate complete ammonia oxidation (comammox) Nitrospira, which oxidize ammonia to nitrate in a single cell and characterize their physiological and genomic features. The genus Nitrospira, which occupied 1% in an acidic soil, was enriched up to 92% during incubation. The enriched Nitrospira was able to survive an acidic condition of pH 4 and its genome encoded all the genes for comammox. Furthermore, the genome content was distinct from the previously reported four comammox species. Thus, we successfully cultivated a novel comammox Nitrospira in a viewpoint of physiology and genomics.

研究分野：微生物生態学，環境微生物学

キーワード：硝化 comammox 土壌 培養 ゲノム 酸性 アンモニア 亜硝酸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

硝化菌は環境中の硝化反応を担っており、アンモニア酸化菌(細菌・古細菌)、亜硝酸酸化細菌で構成されている。無機炭素(CO<sub>2</sub>)を炭素源とし、酸化反応によりエネルギーを獲得する化学合成独立栄養菌である。1892年にSergei Winogradskyによって硝化菌が発見されて以来、120年以上の間アンモニア酸化と亜硝酸酸化はそれぞれ独立した微生物が担っていると考えられてきた。しかし、近年亜硝酸酸化細菌として知られていた *Nitrospira* 属の一部の細菌が、アンモニアから亜硝酸、硝酸へと変換する完全アンモニア酸化 (complete ammonia oxidation: comammox) を担っているという報告がなされた(文献1, 2)。さらに、環境サンプルを対象とするメタゲノム解析から comammox 細菌特有の *amo* 遺伝子(アンモニア酸化能を有する遺伝子)が地球規模で幅広く検出された。comammox 細菌が発見される以前は、微生物生態・環境微生物学における硝化研究はアンモニア酸化菌と亜硝酸酸化細菌を対象にしてきた。培養に基づいた研究によって個々の純粋培養株が特徴づけられ、遺伝子解析によって環境中の存在量、分布などが明らかにされてきた。しかし、完全アンモニア酸化能を保持する comammox 細菌の発見は、既存のプレイヤーだけで硝化を論じてきた、これまでの研究者に対して新たな課題を叩きつけた。

### 2. 研究の目的

#### 「問い1」

comammox 細菌と既存の硝化菌では、どのような生理学的な性質の違いがあるのか? その違いが硝化菌の生態学的なニッチ(競合・共存する硝化菌間の棲み分け)にどのような影響を及ぼしているのか?

#### 「問い2」

comammox 細菌のゲノム情報には生化学・進化学的にどのような意味が込められているのか? *amo* 遺伝子と *nrx* 遺伝子を両方持つ微生物と片方のみを持つ微生物の進化系統はどのように異なるのか?

これらの「問い」を解明するためには、環境サンプルから comammox 細菌の純粋培養株を得ること、もしくは高度に集積することが必要である。そこで本研究では、comammox 細菌を培養し、生理学・ゲノム科学的な特徴づけを行い、環境への適応機構と進化系譜を考察する。

### 3. 研究の方法

#### 1) comammox 細菌の集積

##### 1-1) アンモニア含有無機培地を連続供給させたバイオリアクターの運転

サンプルソースとして多量の窒素肥料が投入され、活発に硝化が起こる茶園の酸性土壌を選択した。多量のアンモニアが存在する酸性土壌の環境を再現した。常に高濃度のアンモニアを含む新鮮な培地を供給しつつ、微生物の流出を防ぐためにバイオマス担体に固定した。さらに pH コントローラを用いた自動制御により、酸性環境を維持した。培養 0~206 日目までは、流入アンモニア濃度を 0~50 mM の範囲で上昇させ、培養 206 日目以降は 50 mM に維持した。pH については、培養 0~373 日目までは 6.0 で制御し、培養 374 日目以降は 5.5 に制御した。培養期間中のアンモニア態窒素、および亜硝酸・硝酸態窒素は、それぞれインドフェノール法、イオンクロマトグラフィで測定した。

##### 1-2) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法による観察

バイオリアクターで培養された硝化菌の増殖過程を観測するために、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を行った。*Nitrospira* lineage I, *Nitrospira* lineage II (文献3), Betaproteobacteria 綱のアンモニア酸化細菌, *Nitrobacter* を検出するプローブを用いた。また、全菌数の測定用として核酸染色剤である SYTOX Green を併用した。

##### 1-3) 16S rRNA 遺伝子、および comammox *amoA* 遺伝子に基づいた群集構造解析

バイオリアクター内の微生物群集構造を明らかにするために、16S rRNA 遺伝子の V7-V8 領域を対象にしたアンプリコン解析を行った。初期サンプル、および培養 1, 16, 38, 51, 84, 99, 122, 136, 150, 164, 206, 220, 309, 406, 526, 701, 749, 795 日目のサンプルから抽出した DNA を PCR で増幅した。アンプリコンは Ion Torrent シークエンサーで解析し、シークエンスデータは CLC Genomics Workbench に取り込んだ。バーコードシークエンス、クオリティの低いシークエンスを取り除いた後、QIIME で解析した。98%以上の相同性を持つシークエンスを Operational Taxonomic Unit (OTU) とし、データベース上で微生物種を同定した。comammox *amoA* 遺伝子を標的とするプライマー(文献4)を用いて、同様の手順で *amoA* 遺伝子の配列を取得し、97%以上の相同性を持つシークエンスを OTU とした。

## 2) メタゲノム解析

バイオリアクターで集積された comammox 細菌を含む培養サンプルからゲノム DNA を抽出した。DNA の全塩基配列を、ショートリードシーケンサー Illumina HiSeq とロングリードシーケンサー Nanopore MinION を用いて取得した。両者のリードデータを OPERA-MS によってアセンブルし、MetaBAT2 を用いてビンニングした。取得された metagenomic bin の completeness と contamination を checkM で評価し、completeness  $\geq 90\%$ 、contamination  $\leq 10\%$  の *Nitrospira* ゲノムを選出した。選出された高品質な metagenomic bin の塩基配列から、DFAST によって機能遺伝子を推定した。既存のゲノムとの相同性を評価するため、pyani を用いて average nucleotide identity (ANI) を算出した。

## 4. 研究成果

### 1) comammox 細菌の集積

培養期間中、流入アンモニア濃度の上昇に伴い流出する硝酸濃度は上昇し、亜硝酸の蓄積は見られなかった。pH を 6.0 から 5.5 へ下げたことによって硝化が停止することもなかった。したがって、培養期間全体を通じて良好な硝化が起こっていると判断した。培養 84 日目で FISH 観察を行ったところ、*Nitrospira* lineage II、*Nitrospira* lineage I、および AOB が検出された。しかし、全微生物数に占める、各硝化菌の割合は小さかった。また、*Nitrobacter* は観察されなかった。培養 228、319、791 日目では、*Nitrospira* lineage II と AOB が豊富に検出された。特に *Nitrospira* lineage II が優占する様子が観察された (図 1)。*Nitrobacter* もわずかに検出され、*Nitrospira* lineage I は検出されなかった。16S rRNA 遺伝子に基づいた群集構造解析では、培養 150 日目以降、Nitrospiraceae 科の占める割合が急激に上昇し、培養 526 日目で最大 92% まで *Nitrospira* が集積された。したがって、pH 5.5~6.0 の範囲で *Nitrospira* を培養する条件は適切であると判断した。また、この集積サンプルを対象に行なった生理学的試験では、pH 4 以下の酸性条件においても、わずかに硝化活性が確認された。すなわち、本研究で集積された comammox 細菌が酸性環境に適応している可能性が示唆された。

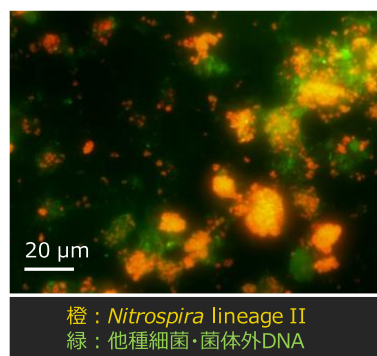


図1 集積された comammox 細菌

### 2) メタゲノム解析

バイオリアクターで集積された *Nitrospira* 属細菌を対象にメタゲノム解析を実施した。その結果、アンモニア酸化および亜硝酸酸化の酵素遺伝子を併せ持つ comammox 細菌 *Nitrospira* sp. AFB01 の全ゲノムが構築された。既往研究で報告されている 4 種の comammox 細菌 (*N. inopinata*, *Ca. N. nitrosa*, *Ca. N. nitrificans*, *Ca. N. kreftii*) との ANI は種の基準である 95% 未満であり、AFB01 はこれらと別種相当の新規性をもつことが明らかになった (文献 1, 2, 5)。さらに AFB01 は、上記 4 種が持たないシアン酸分解酵素や尿素輸送体を保有した。これまで comammox 細菌の培養例は少なく、純粋培養株や集積を介して構築されたハイクオリティなゲノムは未だ 2 種に限られている。正確かつ詳細な comammox 細菌のゲノム情報を取得し、生理学的な現象と結びつけることが本研究の目的の一つであった。その観点から、本研究で得られた成果は当該分野において重要かつインパクトの高いものであると言える。

### <引用文献>

- 1) Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., et al. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 504-509.
- 2) van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J., Kartal, B., et al. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 528, 555-559.
- 3) Maixner, F., Noguera, D. R., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl, G., Wagner, M., et al. (2006). Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environ. Microbiol.* 8, 1487-1495.
- 4) Fowler, S. J., Palomo, A., Dechesne, A., Mines, P. D., and Smets, B. F. (2018). Comammox *Nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities. *Environ. Microbiol.* 20, 1002-1015.
- 5) Sakoula, D., Koch, H., Frank, J., Jetten, M. S. van Kessel, M. A. H., Lueker, S. (2020). Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification. *ISME J.* 15, 1010-1024.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 藤谷拓嗣	4. 巻 21
2. 論文標題 未培養硝化菌の分離戦略と特徴づけ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.50963/jenvbio.21.1_1_53	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 Takahashi Yu, Fujitani Hirotsugu, Hirono Yuhei, Tago Kanako, Wang Yong, Hayatsu Masahito, Tsuneda Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Enrichment of Comammox and Nitrite-Oxidizing Nitrospira From Acidic Soils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01737	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 Fujitani Hirotsugu, Momiuchi Kengo, Ishii Kento, Nomachi Manami, Kikuchi Shuta, Ushiki Norisuke, Sekiguchi Yuji, Tsuneda Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomic and Physiological Characteristics of a Novel Nitrite-Oxidizing Nitrospira Strain Isolated From a Drinking Water Treatment Plant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 545190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.545190	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤谷拓嗣
2. 発表標題 地球の窒素循環を駆動する未培養微生物の実態に迫る
3. 学会等名 第15回細菌学若手コロッセウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 悠, 藤谷 拓嗣, 谷口 愛樹, 林 哲也, 多胡 香奈子, 早津 雅仁, 常田 聡
2. 発表標題 弱酸性硝化リアクターで集積培養された新規なcomammox Nitrospiraのコンプリートゲノムの構築
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 悠, 藤谷 拓嗣, 廣野 祐平, 多胡 香奈子, 早津 雅仁, 常田 聡
2. 発表標題 茶園の酸性土壌に生息する硝化菌Nitrospiraの集積培養
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤谷拓嗣
2. 発表標題 培養技術とゲノム解析で紐解く硝化菌の生理生態
3. 学会等名 日本水環境学会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤谷拓嗣, 常田 聡
2. 発表標題 未培養硝化菌を対象とした新規分離培養技術の開発
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Takahashi, Hirotsugu Fujitani, Yuhei Hirono, Kanako Tago, Yong Wang, Masahito Hayatsu, Satoshi Tsuneda
2. 発表標題 Enrichment of comammox and canonical Nitrospira from acidic soil: Insights into niche differentiation and adaptation to low pH
3. 学会等名 6th International Conference on Nitrification and Related Processes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Takahashi, Hirotsugu Fujitani, Kanako Tago, Yong Wang, Yuhei Hirono, Masahito Hayatsu, Satoshi Tsuneda
2. 発表標題 Enrichment of Complete Ammonia Oxidizer and Nitrite Oxidizer of genus Nitrospira from Acidic Soil
3. 学会等名 Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2019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

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			
デンマーク	デンマーク工科大学			