

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580096

研究課題名(和文) 各種環境に棲息する亜硝酸酸化菌の純粋分離および新規分類指標の開発

研究課題名(英文) Pure isolation of nitrite-oxidizing bacteria from several environments and development of new phylogenetic marker for them.

研究代表者

高橋 令二 (TAKAHASHI REIJI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70197193

研究成果の概要(和文)：亜硝酸酸化菌(NOB)は広汎な自然環境に棲息し、硝化の後段に関与する有用な菌種でありながら、単一菌として分離されている菌株はわずかである。本研究は有用遺伝子資源の探索とその応用はかるため、各種環境からNOBの新規分離菌株を多数獲得し、菌学的性質の検討のための対象菌株の充実を実現した。また、NOBの新規分類指標の探索、開発を行ない、新規指標による分子系統分類を確立し非培養系解析への応用を試みた。

研究成果の概要(英文)：Nitrite oxidizing bacteria (NOB) that inhabit the whole environment extensively are bacterial species that are in charge of the latter part of nitrification. But little strains of them are isolated as pure culture. This study were carried out for exploration and its application of useful of genetic resources and showed following knowledge. First, as many NOB strains were newly isolated from a variety of environments, we got sufficient strains for studying microbial properties of them. Second, we explored new markers for phylogenetic classification for NOB. Third, we established a new phylogenetic classification with new markers, and we have applied it to “non-culture” analysis of NOB in natural environments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：環境微生物学、亜硝酸酸化菌、分子系統分類、亜硝酸酸化還元酵素遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、地球環境汚染や食糧増産についての

関心が高まるとともに、元素循環を担う微生物への注目度も高まっている。窒素循環に着

目すると、独立栄養性硝化細菌（アンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌）は植物への窒素化合物供給の重要な担い手である。同時に、環境面へ目を向ければ有機・無機窒素化合物の蓄積、あるいは窒素化合物等の有害物質に対する分解者として、また、地球温暖化の一要因である炭酸ガスの消費（固定）者、あるいは無機物の有機資源化の担い手として期待される機能が多い。また、硝化のプロセスのなかで連続的な酸化過程を担う両菌種は、物質循環の視点からとらえた複雑系微生物集団のシンプルなモデルとして適用できる可能性を持っている。しかしながらこれらの菌種は種々のメカニズムの応用という面で大きな潜在能力を秘めているにもかかわらず、一般的には純粋な単一菌としての分離およびその培養維持が困難であるため、応用的研究はもちろんのこと、生理生態学・生化学的側面でも未だ解明されていない部分が多い。研究代表者らは、既に独立栄養性硝化細菌の効率的な純粋分離法、および大量培養法を改良・確立しており、特にゲランガム（微生物由来の多糖類）を用いた純粋分離法を開発し、多様な環境にわたる分離源から新規分離単一菌を多数得て硝化細菌研究に総合的に大きく寄与してきた。近年、未分離・非培養株について遺伝子レベルでのみ論議されるケースが多いが、申請者のグループは単一菌株として多数の独立栄養性硝化細菌を取り扱ってきた実績と経験が蓄積していることは特筆すべきことであり、DNA レベルのみにとどまらず、単一菌体についての知見を得られることは難培養性である当菌種にとって非常に重要であり、それが可能な本研究グループでのみ、本研究のような解析が遂行され得るといっても過言ではない。

一方、難分離、難培養性の微生物にとって、非培養系の解析が有効であるのは近年の研究動向を見るまでもないことであり、硝化細菌研究についても例外ではない。しかしながらこの方法論において重要なポイントは、より高解像度で解析が可能な分子系統分類マーカーを得ることである。申請者らのグループは、アンモニア酸化菌においてはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP) およびホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) の遺伝子である *gap*、*pgk* 等について検討し、16SrRNA 遺伝子では識別し得ない *Nitrosospora*、*Nitrosolobus*、*Nitrosovibrio* の分類を可能にした。これにより形態の相違と矛盾しない分子系統分類が可能になったことは、非培養系においてもより詳細な分類の可能性を示し意義深い。

これらを踏まえて本研究では、広汎な自然環境に棲息し、硝化の後段に関与する亜硝酸酸化菌 (NOB) に着目し、有用遺伝子資源の探索とその応用を視野に入れ、自然界での分布を解析するために、以下の各点について解明しようとするものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、広汎な自然環境に棲息し、硝化の後段に関与する亜硝酸酸化菌 (NOB) に着目し、有用遺伝子資源の探索とその応用を視野に入れ、自然界での分布を解析するために、以下の各点について解明しようとするものである。

現在 NOB は *Nitrobacter* ( $\alpha$ -proteobacteria)、*Nitrospina* ( $\delta$ -proteobacteria)、*Nitrococcus* ( $\gamma$ -proteobacteria)、*Nitrospira* (class Nitrospira) の 4 属に分類されており、*Nitrobacter hamburgensis* X14、*Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 の 2 株についてはすでに全ゲノムが解読されている。しかしながら、単一菌として分離されている菌株はごくわずかであり、菌株保存機関での保有数も非常に少なく、特に *Nitrobacter* 属以外は分離例がほとんど無い。NOB はアンモニア酸化菌 (AOB) がアンモニアを酸化して生成した亜硝酸を酸化して硝酸を生成する。国内では茶園土壌へ過剰なアンモニア肥料が施肥され、硝化の結果生じた硝酸による土壌の酸性化、水系の汚染が従来より重篤な問題となっており、AOB、NOB ともその環境中での挙動の解明が急務である。

第一に、各種環境から NOB の新規分離菌株を多数獲得することにより、非常に少ない単一菌株のコレクションを累加し、菌学的性質の検討のための対象菌株の充実をはかる。特に、*Nitrobacter* 属以外の 3 属の分離を試みる。また、現在まで分離例の無い、酸性環境からの分離を試みる。また、申請者らのグループは植物根面より本菌種を分離するにあたり、植物根面土壌もしくは由来物の効率的かつ確実な独自の調製法を考案している。植物との相互作用を考える場合、より密接な関係が予想される分離源を得ることが可能となった。

第二に、NOB の新規分類指標の探索、開発を行なう。現在 16S rRNA 遺伝子を指標とした分子系統分類が一般的におこなわれているが、現在、分離菌株、非培養系データとも最も多い *Nitrobacter* 属については Freitag

らにより、3つのサブグループへの分類が提唱されている。しかしながら本方法では、近縁種との分別が困難であり、特に自然界で最も広汎に棲息することが予測される *Nitrobacter* 属の詳細な分類には不適であると考えられる。また、現在のところ、NOBには AOB における *amoA* のような高解像度の分子系統分類マーカーは見出されていない。そこで、NOB に特異的な遺伝子による分子系統分類を検討し、属内および NOB 内におけるより詳細な分類を試みる。

第三に、前項で述べた新規分類指標による分子系統分類を確立し、非培養系解析への応用を図る。現在では、16S rRNA を指標とした分類では、その配列の相同性の高さから近縁種の分別は不可能であり非培養系での属の確定には困難を伴う。したがって、NOB 特異的な分類指標を開発することにより、単一菌によるアプローチと併せて、確実な分布解析等の情報を得ることが可能になると考えられる。

これらの研究成果を得ることにより、地球上の広汎な環境に棲息し、硝化に関与している重要な環境微生物である亜硝酸酸化菌の詳細な分布解析や、バイオフィーム等の複雑系、複合微生物系に生息している亜硝酸酸化菌を精密に捕捉することが可能となると考える。また、本研究グループは、国内外の硝化細菌研究において中核たり得ており、現在硝化細菌の分離法は、当グループによって開発されたゲランガム法が多数引用されている。本研究についても、DNA レベルと単一菌体の両面で研究が進められることにより、未分離・非培養で得られた情報のみが増大する硝化細菌研究において、非常に有意義な知見が累加されるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規分離株の分離同定およびその育種、機能解析

本研究グループが改良・確立した、平板培地のゲル化剤にゲランガムを用いた分離法を用いて行う。分離源としては、酸性硫酸塩土壌、海水、深海堆積物、植物による污水浄化装置内の排水、脱臭装置、また、同じく申請者らが考案・確立した植物根面環境由来物の調製法により得られた各種植物分離源より、独立栄養性の亜硝酸酸化菌の純粋分離を行う。特に植物についてはイネ、ブルーベリー（好アンモニア態窒素性）、オオムギ、ナス（好硝酸態窒素性）等を対象として分離株

の獲得をはかる。

単一菌として分離株が得られれば、培養特性の検討、電子顕微鏡による形態観察、16S rRNA 遺伝子による系統分類等を実施し、分離株の同定を行う。また、応用的付加価値の高い生物資源としてプラスミド保有、低栄養性、高度増殖等の機能を有する菌株の獲得もはかる。順次分離源を広げていくと同時に、当グループで保有する既存の分離株を比較対照として解析を進める。

#### (2) 新規分離株の遺伝子解析および亜硝酸酸化菌スクリーニングのための DGGE プライマー・特異的プローブの検討

新規分離の NOB について、各種遺伝子についてその遺伝子クローニングと塩基配列解析を行う。

①現在 NOB の分子系統分類には、通常 16S rRNA 遺伝子より設計されたプライマーが使用されている。本研究では NOB に特有なエネルギー獲得系主幹酵素である亜硝酸酸化還元酵素 (NXR) について、NOB 内の識別を可能にするプライマーの獲得を試みる。申請者らにより既に得られている、多数の新規分離 NOB および本研究から得られる新規分離菌から、NXR の構成サブユニットのうちの一つをコードする *nxB* のクローン化および塩基配列決定を行いプライマー設計の基本情報として累積するとともに分子系統分類を行なう。

②前項で得られた情報により、NOB 内の識別を可能にするプライマーおよびプローブ設計の検討を行う。NOB に適応する有効なプライマーを探索し、より効率の良い解析を確立することを目指す。

両項目とも初期条件決定等には、既に当グループ申請者らが保有する分離株および基準株を使用する。

③得られた *nxB* 配列情報より、DGGE 解析用のプライマー開発を行なう。各種環境より採取、抽出した環境 DNA に対して、最適な解析条件と、プライマー配列の検討を行なう。プライマーの解像度は、亜硝酸酸化菌と近縁菌種を分別可能なものと、前述のとおり *Nitrobacter* 属内をサブグループ化するものと両者を対象とする。

#### (3) 環境中の亜硝酸酸化菌の分布解析

DGGE 解析用プライマーの開発が成功に至れば、それを用いて環境中の NOB の分布解析を行い、環境ごとの優占種の確定等を行なう。対象は分離源と同様に、酸性硫酸塩土壌、海水、深海堆積物、植物による污水浄化装置内の排水、脱臭装置、植物根面環境由来物（特に植物についてはイネ、ブルーベリー、オオ

ムギ、ナス等を対象とする)。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規分離株の分離同定

当研究グループが改良・確立した、平板培地のゲル化剤にゲランガムを用いた分離法を用い、酸性硫酸塩土壌、海水、深海堆積物、植物による汚水浄化装置内の排水、脱臭装置、また、同じく我々が考案・確立した植物根面環境由来物の調製法により得られた根面液等を分離源として、独立栄養性の亜硝酸酸化菌の純粋分離を行った。単一菌として酸性硫酸塩土壌環境由来の分離源から新規分離株2株 (MRB54株、MLRB6株) が得られた。また、花壇土壌から1株 (SS10株)、排水浄化装置内のヨシ根面より1株 (YN1株) の計4株が分離された。16S rRNA遺伝子による系統分類によりいずれも*Nitrobacter*属と同定された。電子顕微鏡による形態観察、培養特性については解析中である。引き続き他の分離源についても分離を進行中である。

##### (2) 新規分離株の遺伝子解析および亜硝酸酸化菌スクリーニングのための DGGE プライマー・特異的プローブの検討

①新規分離 NOB および当研究グループにより既に得られている多数の分離菌から、亜硝酸還元酵素 (NXR) の構成サブユニットのうちの一つをコードする *nxB* のクローン化および塩基配列決定を行いプライマー設計の基本情報として累積するとともに分子系統分類を行なった。得られた情報よりプライマー設計 (*nxB* 1F、NORB 756R) を行い、環境サンプルの非培養系解析への応用をはかり、環境中での当該遺伝子解析基礎的条件を確立した。

②各種環境より分離された *Nitrobacter* 属菌 24 菌株について、NOB に特徴的な NXR の  $\beta$  サブユニットをコードする *nxB* 遺伝子を分類指標とし、詳細な分類を試みた。16S rRNA 遺伝子を分類指標としたものは、5 つのクラスターを形成し Vanparys らと類似した結果を得た。*nxB* 遺伝子を分類指標としたものでは、酸性硫酸塩土壌、ライミング処理した酸性硫酸塩土壌、水田土壌からそれぞれ分離された 3 つのグループに分けられ、16S rRNA 遺伝子による分類とは異なる傾向を示した。このことから、*nxB* 遺伝子による *Nitrobacter* 属の分類は属内での詳細な分類が可能となった。

##### (3) 環境中の亜硝酸酸化菌の分布解析

タイ王国バンナ試験場圃場土を環境サン

プルとし、*nxB* 遺伝子を指標とした NOB の群集構造解析により、*nxB* 遺伝子の非培養系への応用の検討を行った。*nxB* 遺伝子断片 (約 600bp) を目的領域としたプライマー *nxB* 1F、NORB 756R を用いた PCR により、4 種類の土壌サンプル (ギンネム、キイロギンネム、トウモロコシ、タチナタマメの各植物栽培土壌) について目的遺伝子領域の増幅が確認された。その後系統樹を作成した結果、*Nitrobacter* 属と近縁なクローンが得られ、*nxB* 遺伝子による群集構造解析の可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Fujii, C., T. Nakagawa, Y. Onodera, N. Matsutani, K. Sasada, R. Takahashi, T. Tokuyama. (2010) Succession and community composition of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in bulk soil of a Japanese paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr.* (In Press). 査読有

②Onodera, Y., T. Nakagawa, R. Takahashi, T. Tokuyama. (2010) Seasonal change in vertical distribution of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their nitrification in temperate forest soil. *Microbes Environ.* 25, 28-35. 査読有

③Nakaya, A., Y. Onodera, T. Nakagawa, K. Satoh, R. Takahashi, S. Sasaki, T. Tokuyama. (2009) Analysis of ammonia monooxygenase and archaeal 16S rRNA gene fragments in nitrifying acid-sulfate soil microcosms. *Microbes Environ.* 24, 168-174. 査読有

④Ando, Y., T. Nakagawa, R. Takahashi, K. Yoshihara, T. Tokuyama. (2009) Seasonal changes in abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria and their nitrification in sand of an eelgrass zone. *Microbes Environ.* 1, 21-27. 査読有

⑤Sato, K., Itoh, C., Kang, D.-J., Sumida, H., Takahashi, R., Isobe, K., Sasaki, S. and Tokuyama T. (2007) Characteristics of newly isolated ammonia-oxidizing bacteria from acid sulfate soil and the rhizosphere of leucaena grown in that soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 53, 23-31. 査読有

他 1 件

[学会発表] (計 34 件)

①羽飼亮太, 中川達功, 植田育男, 高橋令二, 徳山龍明. PCR-DGGE分析による水族館ろ過槽ろ材における亜硝酸酸化菌*Nitrospira*属のモニタリング. 第 25 回日本微生物生態学会大会. 広島大学. 2009 年 11 月 22 日.

②石森英樹, 高橋令二, 中村渉, 山田静恵, 中川達功, 徳山龍明. 各種環境から分離された*Nitrobacter* 属菌の特性と*nxrB*遺伝子による分類の検討. 日本土壤肥料学会 2009 年度京都大会. 京都大学. 2009 年 9 月 15 日.

③日比野倫士, 高橋令二, 中川達功, 佐藤一朗, 徳山龍明. 酸性硫酸塩土壌から分離されたアンモニア酸化菌のウレアーゼの発現解析. 第 61 回日本生物工学会大会. 名古屋大学. 2009 年 9 月 24 日.

④羽飼亮太, 山根さつき, 藤井千尋, 安藤善史, 中川達功, 植田育男, 笹田勝寛, 高橋令二, 吉原喜好, 徳山龍明. 亜硝酸酸化菌*Nitrospira*属の 16S rRNA遺伝子に特異的な PCRプライマーの開発. 第 61 回日本生物工学会大会. 名古屋大学. 2009 年 9 月 24 日.

⑤石森英樹, 高橋令二, 佐藤有佑, 石山祥子, 中川達功, 徳山龍明. 各種環境から分離された*Nitrobacter* 属菌の特性とその分類. 2008 年度日本土壤肥料学会関東支部大会. 新潟大学. 2008 年 11 月 29 日.

⑥日比野倫士, 高橋令二, 中川達功, 佐藤一朗, 徳山龍明. タイ王国酸性硫酸塩土壌から分離されたアンモニア酸化菌のウレアーゼの発現解析. 2008 年度日本土壤肥料学会関東支部大会. 新潟大学. 2008 年 11 月 29 日.

⑦高橋令二, 中川達功, 徳山龍明. 各種環境より分離した亜硝酸酸化菌の特性と新規分類指標の検討. 日本土壤肥料学会 2007 年度東京大会. 東京農業大学. 2007 年 8 月 24 日.

他 27 件

[図書] (計 2 件)

①Tokuyama, T.; Shoukadoh (Kyoto, Japan). Overview of microorganisms isolated from acid sulfate soils. (2008). In: Sasaki S (ed). Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry. p. 51-52.

②Takahashi, R., K. Sato, T. Tokuyama. Shoukadoh (Kyoto, Japan). Analysis of microbial diversity, isolation of ammonia-oxidizing and sulfur-oxidizing bacteria in acid sulfate soil. (2008). In: Sasaki S (ed). Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry. p. 53-56.

[その他]

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~biken/index/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 令二 (TAKAHASHI REIJI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70197193

### (2) 研究分担者

徳山 龍明 (TOKUYAMA TATSUAKI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90059684

中川 達功 (NAKAGAWA TATSUNORI)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：40434104

### (3) 連携研究者

なし