

平成30年6月25日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14874

研究課題名(和文) 土壌微生物の細胞形態変化による低濃度基質利用機構の解明

研究課題名(英文) Microbial cell aggregates are advantageous for survival under low substrate concentration

研究代表者

早津 雅仁 (Hayatsu, Masahito)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・主席研究員

研究者番号：70283348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、硝化菌細胞凝集体は生育に不利な環境で生存能力が優れていることを示すことを目的とし、次の結果を得た。安定的に増殖するNitrosoglobus属のアンモニア酸化細菌凝集体には10%程度の従属栄養細菌が共存していた。Nitrosoglobus属新種の存在を明らかにし、それらが亜硝酸酸化菌・従属栄養細菌と細胞凝集体を形成し共存することを示した。酸性環境に適応したCOMAMMOX菌の存在を明らかにし、この菌は複数種の従属栄養細菌と凝集体を形成していることを示した。これらの結果から硝化菌とある種の従属栄養細菌は凝集体中で共存し劣悪な環境に適応していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to shed light on the advantage of microbial cell aggregates for survival in an unfavorable soil environment such as low substrate concentration and acidic condition. Enrichment culture of acid-tolerant nitrifying bacteria isolated from tea soils was used to achieve this objective, and the following results were obtained: 1) Stable culture of acid-tolerant Nitrosoglobus cell aggregates contained 10% heterotrophic bacteria 2) Isolation of stable acid-tolerant nitrifying microbial aggregates revealed a new species of Nitrosoglobus, which was found to coexist with nitrite-oxidizer and several heterotrophic bacteria 3) Comammox, which has adapted to acidic environment, was found to be present. This bacterium coexisted with heterotrophic bacteria. These results suggested that nitrifying bacteria and certain heterotrophic bacteria coexist in aggregates and are adapted to an unfavorable soil environment such as low substrate concentration and acidic condition.

研究分野：微生物生態学

キーワード：硝化 耐酸性 アンモニア酸化 低基質濃度

1. 研究開始当初の背景

培養微生物の活性に比べ土壤中の微生物活性のエネルギー源や炭素源に対する基質親和性が高く、生存能力が優れていることは古くから知られている。しかしこのギャップの原因は未だに不明である。特に硝化反応では、硝化菌に比べて土壤の硝化活性のアンモニアに対する親和性は高く、より低濃度のアンモニアを酸化する。硝化は硝酸性窒素汚染や温室効果ガス N_2O の発生に関与することから、硝化菌(アンモニア酸化細菌 = AOB)はアンモニアを酸化してエネルギーを得る。アンモニアを酸化するアンモニアモノオキシゲナーゼ(AMO)の基質は NH_3 であるため、培養液が酸性化すると NH_3 、 NH_4^+ の平衡から NH_3 の濃度が低下しアンモニアの酸化速度は低下する。このため酸性土壌では AOB は活動しないとされてきた。しかし AOB は細胞凝集体を形成し、培地が酸性化してもアンモニアを酸化し続けることが知られている。細胞凝集体は微生物の土壌における低濃度基質に適応した存在形態で、独自の基質取り込み機構を持つと推定された。

2. 研究の目的

これまで多くの硝化菌(アンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌)の分離過程で、培養中に細胞が塊となるフロックやアグリゲートと呼ばれる細胞凝集体を形成することが経験されてきた。しかし一部の硝化菌でアグリゲートが pH 耐性に寄与するという報告があるだけである。そこで硝化菌の細胞凝集体の形成機構と機能を解析することにより、新たな硝化能の特性を明らかにする。また硝化は硝酸性窒素の水系汚染や窒素肥料の損失の原因となるので、古くから硝化抑制剤が開発されてきた。しかし硝化抑制効果のバラツキが大きくまた効果が低いことが多かった。細胞凝集体は環境耐性を有することから、単細胞遊離状態に比べて硝化抑制剤への耐性が大きいと推察される。本課題では、純粋培養硝化菌に比べ細胞凝集体は、不利な環境条件でもエネルギー源や炭素源に対する基質親和性が高く、生存能力が優れていることを示す。

3. 研究の方法

(1) 耐酸性アンモニア酸化細菌の分離

アンモニウムイオン濃度が高まりアンモニア(NH_3)が低下する条件下で AOB の生育と細胞凝集体の関係を調べるために、耐酸性アンモニア酸化細菌を分離し、その性質を検討した。このため我々がこれまでに静岡県から分離した新属 AOB を他の地域から分離し細胞凝集体の形成を調べた。具体的には、滋賀県、京都府、鹿児島県の茶園土壌から集積培養法に耐酸性 AOB を分離し、これらの性質を検討した。

(2) 細胞凝集体のメタゲノム解析

細胞凝集体を構成する微生物群集を明らかにするために、16SrDNA を原核生物用プライマーで増幅し、PCR 産物を次世代シーケンサー(Miseq)で解析した。系統解析は Quime および Mega を用いた。

(3) 細胞凝集体のゲノム解析

細胞凝集体を構成する微生物のゲノムを解析した。凝集体から Beads Beating 法によりゲノムを調製し、Miseq により分析後、アセンブルしてアノテーションを行った。これらのゲノムの情報からメタゲノム代謝系解析アプリケーション Maple を用いて、細胞凝集体内の微生物集団の代謝系を調べた。

(4) 各種測定法

硝酸、アンモニア、亜硝酸は、カタルド法、インドフェノール法、グリース法でそれぞれ測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞凝集体の取得

静岡県の茶園土壌から分離した耐酸性アンモニア酸化細菌 TA0100 は、これまで海洋や塩湖からしか分離されていないプロトバクテリアに属していた。海洋や塩湖から分離された *Nitrosococcus* 属の AOB はすべて好塩性の中性型の AOB だが、TA0100 は耐塩性は示さず耐酸性型であった。またゲノムサイズや GC 含量も *Nitrosococcus* 属の AOB とは大きく異なることから新属新種の AOB と判断し *Nitrosoglobus terrae* と命名した。

TA0100 は単細胞遊離状態では pH4 以下で生育は著しく低下する。しかし細胞凝集体を形成すると pH1.9 程度まで活発にアンモニアを酸化した。このことは細胞凝集体が耐酸性と酸性下でのアンモニア利用性の向上に寄与していると考えられた。そこで同一サイズの細胞凝集体をセルソーターで分取し、それらを培養して均質な細胞凝集体培養を行おうと試みた。TA0 株をアンモニア濃度と培地 pH を変えて培養して、様々な大きさの細胞凝集体を調製する方法について検討した。その結果、培養時間を長期するほど凝集体が成長し大きくなった。しかし培養のタイミングによっては凝集体を形成しないなど不安定な場合もあった。

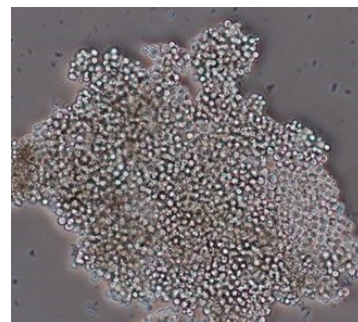


図 1 TA0100 の巨大細胞凝集体

これらのことから、TAO 株の情報だけでは、土壌からの硝化菌凝集体の分離に必要な情報が限定されると考え、TAO 株と類似の酸性耐性型のアンモニア酸化細菌を TAO 株を分離した地域（静岡県）とは地理的に異なる地域からの分離を試みた。

強酸性土壌でかつ施肥窒素量が多く硝化活性の高い茶園土壌（滋賀県、京都府、鹿児島県）を採取し、高濃度のアンモニア（硫酸として添加）と低 pH（MES 緩衝液、pH5.5 - 6.0）の AOB 用培養液に土壌を接種して、巡回培養を行った。経時的にアンモニア濃度や硝酸濃度、pH を測定した。AOB の存在が確実に認められた培養液は、少量を希釈頻度法 の要領で継代培養した。

その結果、安定的に細胞凝集体を形成する培養菌体を京都と滋賀の茶園土壌から得た。この培養液から調製した DNA に 16SrDNA を増幅するプライマー（515f-806r）を使用して PCR 増幅し、Miseq でアンプリコン解析を行った。キメラ除去した後に、各サンプル 3 万 ~ 4 万 リード断片の塩基配列情報を得た。また TA クローニングにより 16SrDNA 全長を含むクローンを得て、その配列を決定した。その結果 図 2 青色の主要な細菌は静岡の茶園土壌から分離した *Nitrosogobus terrae* と同種であった。これらの培養液は 90% 前後が *Nitrosogobus terrae* であった。また共存菌は *Mycobacterium*、*Geobacillus*、*Thermus* 属の細菌であった。これらの菌集団は安定的に凝集体を形成することから、細胞凝集体の形成と安定化には、AOB 以外の菌種が必要と推察された。

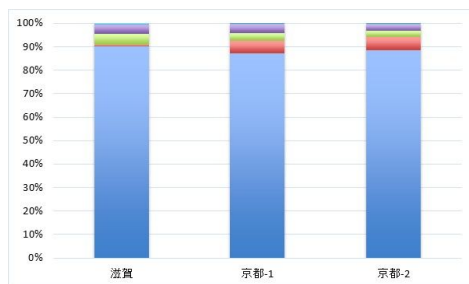


図 2 アンプリコンシーケンス
青：Nitrosogobus の AOB

(2) 完全硝化凝集体の特徴

鹿児島県の茶園土壌からは、2 つの硝化菌を中心とした微生物集団を分離することができた。これらはいずれも細胞凝集体を形成し安定的に増殖した。2 つの微生物集団の構成メンバーを培養液から調製した DNA に 16SrDNA を増幅するプライマー（515f-806r）を使用して PCR 増幅し、Miseq でアンプリコン解析を行った。その結果は京都、滋賀から得られた微生物集団とは大きく異なっていた。一つには AOB と亜硝酸酸化細菌 (NOB) が共存しアンモニアを亜硝酸を経て硝酸に酸化した (AOB-NOB)。もう一方は完全硝化菌が存在していた (COMAMMOX)。

AOB-NOB 集団のアンプリコン解析の結果を 図 3 に示した。この集団は pH3 - 6 の範囲で継代培養において安定的に維持された。光学顕微鏡観察では複数の形態の細菌が確認された。アンプリコン解析により プロテオバクテリアに属するアンモニア酸化細菌 (-AOB) と推察された。また亜硝酸酸化細菌も主要な構成メンバーと推察された。そこでこの微生物集団から DNA を調製し Miseq によるゲノム配列を解析した。その結果、16SrDNA と *amoA* 配列から -AOB は *Nitrosoglobus terrae* に近縁だか別種であり、*Nitrosococcus* 属と *Nitrosoglobus* 属の中間的な存在であることがわかった。一方、*Burkholderia* 属および *Rhodanobacter* 属の細菌も主要なメンバーであった。使用している培地には有機物は添加していないことから、-AOB がアンモニアを酸化してエネルギーを得て炭酸固定し増殖する。ここで生成した亜硝酸を NOB が硝酸に酸化してエネルギーを得て炭酸固定により増殖する。この 2 つのプロセスで培養液中に供給された有機物を *Burkholderia* 属および *Rhodanobacter* 属が利用していると考えられた。細胞凝集体はこのようなメカニズムで形成され安定的に維持されているのであろう。

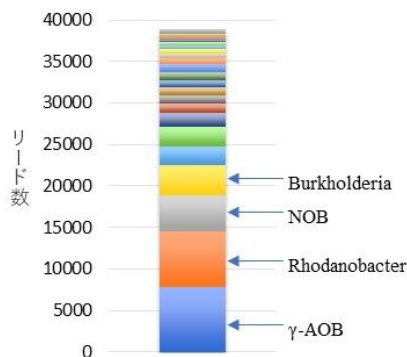


図 3 AOB-NOB 集団

一方、完全硝化菌集団においては(図 4) アンモニアを硝酸にまで酸化する能力を持つ完全硝化菌 *Nitrospira* の存在がアンプリコン解析から示唆された。そこで、この微生物集団から DNA を調製し Miseq によるゲノム配列を解析した。その結果、16SrDNA と *amoA* 配列、*Nxr* (亜硝酸酸化酵素) 配列から完全硝化菌 *Nitrospira* の存在が証明された。このことから完全硝化菌 *Nitrospira* がアンモニアを酸化しエネルギーを得て炭酸固定し増殖する過程で生産される有機物を従属栄養細菌が利用して細胞凝集体を構成すると考えられた。この微生物集団は極めて安定で、同一の三角フラスコ内で培養し、適宜アンモニアを加え pH を調整するだけで 1 年以上も培養可能であった。

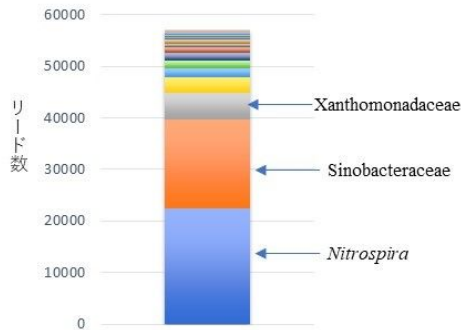


図4 完全硝化菌集団

当初、AOB が単独で細胞凝集体を形成し、低 pH 下で低濃度のアンモニアを利用するという仮説に基づき実験を進めた。しかし安定な細胞凝集体は硝化菌 (AOB、NOB あるいは COMAMMOX) という化学合成独立栄養細菌を中心とした従属栄養菌からなり、それらが何らかの相互作用のもとに共存しているという結論を得た。今後、この集団の基本メンバーを絞り込み、これらの微生物間の相互作用を明らかにする必要がある。これにより土壤中で硝化菌が安定的に維持・増殖するメカニズムが明らかになると考えられる。

(5) まとめ

本研究課題では以下の成果を得た。
細胞凝集体は条件によって不安定であり、その調製に工夫を必要とする。
安定的に維持・増殖する *Nitrosoglobus* 属 AOB には 10% 程度の従属栄養菌と推定される細菌が存在している。
Nitrosoglobus 属新種の存在を明らかにし、それらが NOB と共存することを示した。この硝化菌集団には複数種の従属栄養菌が共存していた。
酸性環境に適応した COMAMMOX 菌の存在を明らかにした。また本菌は複数種の従属栄養菌と強固な微生物集団を形成し、一年以上も培養できることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

早津雅仁・多胡香奈子. 酸性土壌の硝化に関する新知見 耐酸性新属アンモニア酸化細菌の分離・特徴・機能 . 土と微生物 (2018), 72, 14-21.

Wenjie Yang, Yong Wang, Kanako Tago, Shinichi Tokuda, Masahito Hayatsu. Comparison of the effects of phenylhydrazine hydrochloride and dicyandiamide on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Andosols. Frontiers in microbiology. (2017), 8, 2226. doi: 10.3389/fmicb.2017.02226. (査読有)

Masahito Hayatsu, Kanako Tago, Yong Wang, Yumi Shimomura, Taku Okubo, Atsushi Toyota, Ikuo Uchiyama, Futoshi Kurisu, Yuhei Hirono, Kunihiro Nonaka, Hiroko Akiyama, Hideto Takami. Acidotolerant gammaproteobacterial ammonia oxidizing bacteria from soil. ISME J (2017), 11, 1130-1141. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

早津雅仁. 酸性土壌の窒素循環のミッシングリンクを解く: 耐酸性新属アンモニア酸化細菌の分離・特徴・機能, 環境微生物学会合同大会 講演要旨集 S-016, 2017.8.29 佐賀大学 (宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

無し

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

無し

取得状況 (計 0 件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早津 雅仁 (HAYATSU Masahito)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター
物質循環研究領域 主席研究員
研究者番号: 7 0 2 8 3 3 4 8

(2) 研究分担者

多胡 香奈子 (TAGO Kanako)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター
物質循環研究領域 主任研究員
研究者番号: 2 0 4 3 2 1 9 8

(3) 連携研究者

藤谷 博嗣 (FUJITANI Hirotugu)
早稲田大学 理工学術院 助教
研究者番号: 5 0 7 0 8 6 1 7