

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32641

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19857

研究課題名（和文）選択培地と集積培養に依存しない硝化菌の純粹分離

研究課題名（英文）Isolation of nitrifiers not via highly-enriched culture using a selective medium

研究代表者

諏訪 裕一（Suwa, Yuichi）

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：90154632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：従来の、選択培地を使った集積培地でなく、NH₄⁺以外の、たとえばureaを添加した培地でアンモニア酸化と亜硝酸酸化が起こる場合、oligotrophicな硝化菌が培養されることが考えられる。この考え方で森林土壌から亜硝酸酸化細菌を単離した。予備的検討ながら、この株がoligotrophicであると推定された。また、硝化菌の培養には異例な、有機態窒素に富む土壌抽出液をベースとした培地を用い、NOBが共存する培養からは、新規なAOAが多数見出された。これらの結果は、生態学的に意義のある硝化菌の単離のために、従来の考え方にとらわれない戦略が有効であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌の協働はよく知られているが、ひとつの培養から両者を単離した例はない。硝化菌は有機物に富む環境にも分布するが、有機物を含む培地を用いた実験例はほとんどない。従来の硝化菌研究の歴史への批判に基づき、硝化菌の生態を実験室培養に反映させる新たな培養系の設計と、そこでの硝化活性の検出法を案出した。それらを組み合わせて生態学的に意義のある硝化菌を単離し、その性格を解明することが本研究の意義である。廃水処理で汎用されている硝化菌の培養の不安定さは良く知られているが、そのメカニズムは明確ではない。本研究は、こうした課題への波及によって、今後、社会的な意義も顕在する。

研究成果の概要（英文）：When both ammonia- and nitrite-oxidation occur in a culture applied with urea at a low concentration as a sole source of electron for the nitrifying population, it is supposed that oligotrophic nitrifiers would be predominated. According to this view point, experiments were conducted. A nitrite-oxidizer was isolated, and preliminary studies suggest that this nitrite-oxidizers would be oligotrophic. Unfortunately, ammonia-oxidizers have not been isolated so far, but experiments on this subject are on-going. In co-cultures established on a medium comprising urea on diluted soil extract, several novel ammonia-oxidizing Archaea species have been found. In a culture, its abundance reached up to 2%, among much more abundant heterotrophs supported by organic substances derived from soil extract. These results suggest that designing totally unconventional media and procedures would be the key for isolating nitrifiers in elucidating relevant ecological subjects.

研究分野：微生物生態学

キーワード：硝化菌 純粹培養 亜硝酸酸化細菌 アンモニア酸化細菌 アンモニア酸化アーキア 限界希釈法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硝化はアンモニア酸化微生物* (AOM) による NH_4^+ の NO_2^- への酸化と、亜硝酸酸化細菌 (NOB) による NO_2^- への酸化が逐次的に進行する過程と考えられ、永らくこれ以外の代謝は知られていなかった。2015 年、 NH_4^+ を NO_3^- にまで酸化する完全硝化菌 (comammox) が報告された (1,2) (Fig. 1)。発見者である Daims らは comammox が環境にひろく分布していること、環境によっては、AOB や AOA を上回って優占していることを明らかにした (3)。この発見は硝化の概念を大きく変えた。

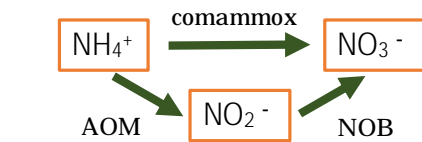


Fig1. Comammoxと新たな硝化のパラダイム

*、好気性のアンモニア酸化細菌 (AOB) とアンモニア酸化アーキア (AOA) の総称。

2. 研究の目的

では、なぜ comammox は見過ごされてきたのだろうか。微生物の純粋培養を得る場合、微生物学の原則に従うと (古典的な方法)、純粋培養を得る手順は、次のとおりである。まず、単離をめざす微生物を選択的に増殖させることができ、かつそれ以外の微生物を排除することができる培地 (選択培地) を設計し、それが最も有効にはたらく培養条件のもと、特定の微生物を集積する。得られた集積培養を単離源として、純粋培養を得る。硝化菌の場合、寒天平板上にコロニーを作らせることが容易でないため、液体培地を用いて限界希釈法を繰り返して純粋培養を得るのが一般的である。表 1 に示すように、AOM の単離を狙う場合も NOB を狙う場合も、古典的な方法では comammox は排除されていた可能性が高い。両者が共存した場合、たとえば、AOB を単離したいときに、NOB をとり除くことが容易でない場合が考えられるため、これまででは、どちらか一方が集積された培養を単離源とするのが一般的であった。

表 1. 古典的な硝化菌の単離法と本研究での方法との比較。

単離の方法	単離をめざす微生物	電子供与体の供給と生産物		単離源とする培養の選抜 [§]	予想される単離株の生理学的特徴
		培養に (初期濃度)*	微生物が暴露される電子供与体と生産物の濃度の推移予想		
古典的な方法	AOM	2 mM NH_4^+	NH_4^+ は減少。約 2 mM NO_2^- に暴露される。	NO_2^- 蓄積	2 mM NO_2^- に耐性。
	NOB	2 mM NO_2^-	NO_2^- は減少。約 2 mM NO_3^- に暴露される。	NO_3^- 蓄積	2 mM NO_2^- に耐性。
本研究	AOM + NOB	1 mM urea* or 有機窒素化合物** (有機 N)	<ul style="list-style-type: none"> urea と有機 N は経時的に減少。分解によって NH_4^+ が定期的に (より長期間) 供給され、さらに NO_2^- に酸化される。そのため、低濃度の NH_4^+ にしか暴露されない。 生成した NO_2^- は NO_3^- に酸化される。低濃度の NO_2^- にしか暴露されない。 約 2 mM の NO_3^- に暴露される。 	AOM, NOB いずれも NO_3^- 蓄積 [§]	<ul style="list-style-type: none"> AOM も NOB も、2 mM NO_2^- に耐性がない可能性がある。 NO_2^- に対する K_m が低い NOB が卓越。 NH_4^+ に対する K_m が低い AOM が卓越。

*、2 mM はあくまで一例である。Urease によって分解された urea からは 2 mM の NH_4^+ が生じる。

**、土壌抽出液中の窒素化合物も含む。

§、単離の操作でも培養が維持されることを、継代培養を繰り返すことで確かめる必要がある。

§、完全硝化菌 (comammox) は排除されない。

多様な硝化菌を単離しようとするためには、古典的な方法、つまり選択培地による集積培養の「逆」の発想をしてみるものが一案であろう。たとえば、AOM, NOB, comammox のいずれをも排除しないように、選択性の低い培地を使用する。特定の微生物を高度に集積せず、多様な硝化菌が共存する培養を単離源に選ぶことが考えられる。本研究では、実際にこの考え方に従って硝化菌の培養実験を設計し、AOM と NOB を共存させた培養を両者の単離源とした場合、生理学的あるいは系統分類学的に新規性のある硝化菌を実験室で培養することができるか、さらに単離できるかを検討する。また、新たな硝化菌単離の戦略を考察する。

3. 研究の方法

本研究での硝化菌の単離の戦略のポイントと、予想される結果は次のとおりである (表 1)。

- 1) 硝化菌 (AOM, NOB および comammox) の電子供与体として urea を用いる。Urea を利用する AOM も知られているが、urea が分解されると NH_4^+ が生じ、培養中ではすぐに利用されると考えられる。そのため、培養中の微生物は低い濃度の NH_4^+ にしか暴露されることがないと予想される。そうであれば、これまでに単離された硝化菌よりも電子供与体 (NH_4^+ や urea) に親和性が高い (K_m 値が小さい) AOM (あるいは comammox) が優占する可能性がある。
- 2) NO_3^- が蓄積された、つまり、AOM と NOB が共存する培養を単離源に用いる。AOM が生産した NO_2^- は NOB によってすぐに利用されるため、培養中の微生物は低濃度の NO_2^- にしか暴露されないと考えられる。そうであれば、これまでに単離された硝化菌よりも、電子供与体 (NO_2^-) に親和性が高い (K_m 値が小さい) NOB が培養中に優占する可能性がある。

- 3) これまで使用されてきた硝化菌の培地は、無機塩だけから成り、シンプルな組成がほとんどであった。土壌中の硝化菌を培養するのに、土壌抽出液を基礎培地として用いたとき、新規性の高い硝化菌が培養されるかどうかを検討する。

4. 研究成果

- 1) 唯一のエネルギー源として urea を含む培地を用いた森林土壌からの oligotrophic な亜硝酸酸化細菌の単離と特徴づけ

「研究の方法」の 1) にしたがって、まず、0.75 mM urea を含む pH7.6 の培地を使って、東京大学千葉演習林のスギ・ヒノキ林の表層 (0-10 cm) 鈹質土層から採取した土壌の硝化菌を MPN 計数した。硝化が起こった培養管のすべてで NO_3^- が検出された。NOB の多くは高い濃度の NH_4^+ あるいは NH_3 に感受性を示すことが知られている。高い濃度の NH_4^+ を培地に与えないことで、AOM だけでなく NOB を共存させることができたと考えられる。MPN 計数に使った培養のうち、2 本の培養を繰り返し植え継ぎ、安定して継代できた培養のひとつから、限界希釈法で AOM と NOB の純粋培養を取得することを試みた。

現在までのところ、AOM を単離することはできなかったものの、NOB の単離には成功した。この NOB 単離株については、純化操作がさらに必要ではあるが、純粋培養の可能性が高いと考えられた段階で、この株を含む培養を仮の単離株として、i) それが純粋培養の可能性が高いかどうか、ii) 系統分類学的な位置づけ、また、iii) この NOB 株の電子供与体 (NO_2^-) に対する親和性は高い (K_m 値が小さい) かどうか、を検討した。結果の概略を以下に記す。

- i) 「仮単離株」の培養を対象に、16S rRNA 遺伝子の universal primer を使って PCR し、アンプリコンを、クローン・ライブラリを作成せずに直接シーケンスした。その結果、非常にきれいなバックグラウンドと、明瞭な波形が得られ、複数の細菌の培養である証拠は得られなかった。
- ii) 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (1340 bp) を BLAST 検索した結果、土壌で優占することが多いと言われる *Nitrospira* 属ではないが、別属の NOB であると推定された。
- iii) 予備的な実験として、 K_m 値を求めたところ、土壌の *Nitrospira* 属で求められた K_m 値、6–9 μM (4, 5) に近い値が得られている。純粋培養株を使って、この K_m 値を再現する必要はあるものの、土壌環境において、この NOB 種が *Nitrospira* 属 NOB と十分競合できる性格を持つ可能性が示唆された。また、このように低い K_m 値をもつ NOB が培養されたことは、実験の想定通りである (表 1)。

この「仮単離株」を限界希釈法で純化を繰り返した。純化された培養を対象に、16S rRNA 遺伝子の universal primer を使って PCR し、アンプリコンのクローン・ライブラリを作成した。109 クローンについて塩基配列 (580 bp) を比較した結果、すべて同一であった。培養中の細胞形態も均一であり、純粋培養が得られたものと判断された。今後、純粋培養株を用いての K_m 値再測定を含む生理試験を実施するとともに、ゲノム解析を行う。

同じ培養からの AOM の単離は成功しなかったとして、NOB と共存した AOM が NO_2^- に高い感受性があったことが考えられる。このような生理学的性質を前提に、今後、AOM の単離実験を設計する必要がある。

- 2) 土壌抽出液を含む培地による多様で新規なアンモニア酸化アーキアの実験室培養
20 年以上、堆肥のみを施用している畑土壌の硝化と硝化菌を検討した。

実験 1 土壌抽出液培地での硝化反応の検証

土壌に純水を加え 121 ℃、20 分間オートクレーブすることで熱抽出したものを土壌抽出液とした。土壌抽出液を主体とした培地、および AOB の培養に汎用してきた無機塩培地を基礎培地とし、それぞれ、pH を 6.5 または 7.6 に調整した。4 種類の基礎培地に、硝化の電子供与体として 1.5 mM $^{15}\text{NH}_4^+$ または 0.75 mM ^{15}N -urea を添加した。このように調整した、合計 8 種類の培地に、滅菌水で $10^2 \sim 10^6$ 倍に希釈した土壌懸濁液を各 5 連、培地の容積に対して 10% の量を接種した。硝化微生物の代謝物である NO_2^- 、 NO_3^- を土壌抽出液由来のそれらと区別するため、培地には ^{15}N で標識された基質を使用した。代謝物は脱窒菌法で N_2O に変換し、 ^{15}N 標識化合物と非標識化合物を GCMS で分別定量した。ほとんどの場合、土壌抽出液培地による AOM の MPN 計数値は合成無機培地による MPN 計数値を 42–520 倍上回った。

実験 2 無機塩培地および土壌抽出液培地で培養した硝化微生物の単離の可能性の検討

実験 1 と同様に、1 試料について 8 種類の培地を用いて硝化菌を MPN 計数した。10-12 週間の培養後、それぞれの *amoA* に特異的なプライマー・セットを用いた PCR で AOB および AOA を検出し (6, 7)、アンプリコンの塩基配列から系統を解析した。安定的に継代培養できた培養について、16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析で微生物群集構造を調べた。

硝化能のある培養の大半でアンモニア酸化細菌 (AOB) かアーキア (AOA) のどちらか一方が優占し、両者が共存したのは、28 培養中 1 培養だった。AOB が優占する 9 培養、AOA が優占する 18 培養、両者が共存する 1 培養を継代できた。AOB が優占する培養について、*amoA* 遺伝子

(461 bp) のアンプリコンを対象に、クローン・ライブラリを作成せず、そのまま塩基配列の決定を試みたが、決定できたのは 10 培養中 2 培養のみであった。そのいずれもが *Nitrosospira* sp. Nsp12 と 99.8-100% 相同であり、この検討のかぎりでは、系統分類学的に新規な AOB を見出すことはできなかった。

AOA が優占する 19 培養についても同様の検討を行った。19 培養中 16 培養でアンプリコンの塩基配列が決定できた。それらの *amoA* (461 bp) の塩基配列を相同性 98% でまとめると、5 つの OTU に分類された。OTU1 に属する 1 培養は既存株との相同性が 100% だったが、それ以外の 4 つの OTU に属する AOA は、いずれも最も近縁な既存株との相同性が 94.7 ~ 85.1% であり、系統分類学的に新規性の高い AOA であることが示唆された。この研究で得られた AOA の 5 つの OTU の代表的な配列と、既存株との系統関係を Fig. 2 に示す。

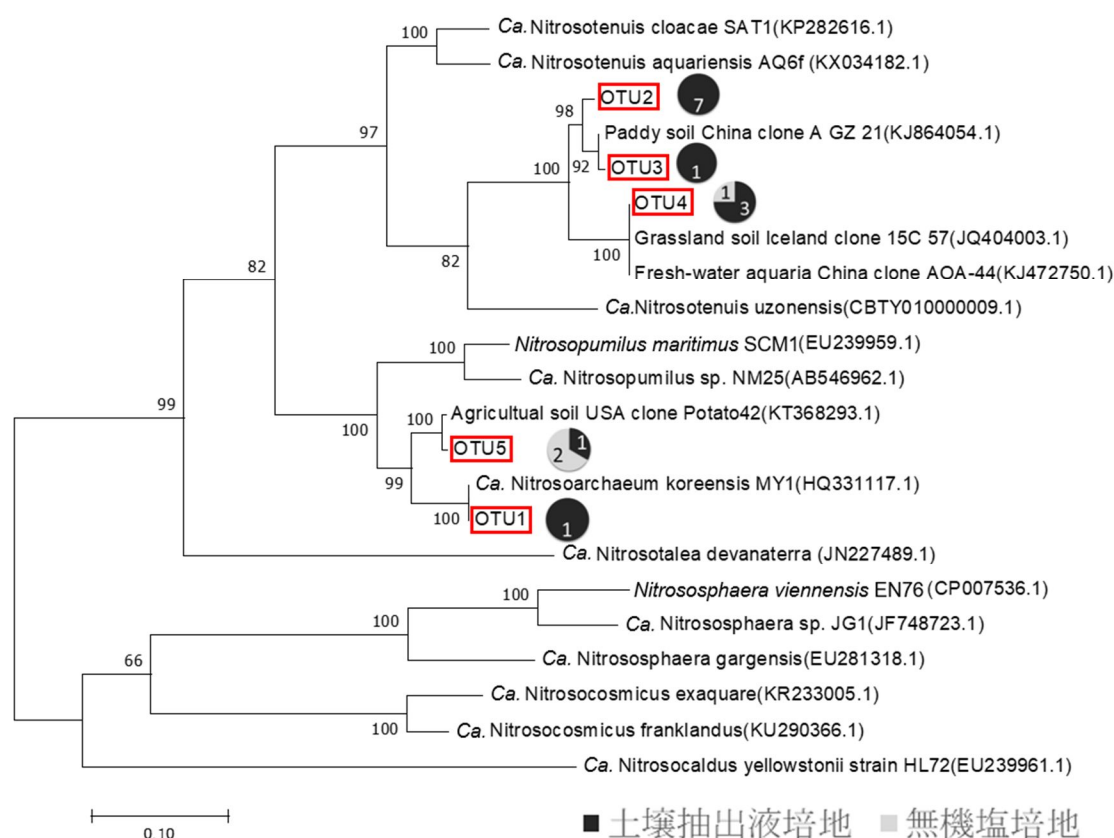


Fig. 2. AOA-*amoA* 遺伝子に基づき最尤法によって作成した (8) AOA の系統樹 (T92 model G+I parameter)。枠で囲った OTU1 ~ 5 が本研究で培養された AOA を示す。それぞれの OTU には 1 ~ 7 の培養が含まれ、その培養が得られた基礎培地、つまり土壌抽出液培地から得られたのか、無機塩培地から得られたのかを、円グラフで示す。

OTU4 と OTU5 に属する AOA は、土壌抽出液培地および無機塩培地の両方から得られた。一方、OTU1 ~ 3 に属する AOA は土壌抽出液培地だけから得られた。この結果は、無機塩培地で培養できた AOA は土壌抽出液培地でも培養できる可能性があり、土壌抽出液培地では、無機塩培地では培養されなかった新規性の高い AOA も培養できたことを示すものであり、AOA の培養に土壌抽出液培地が有効であることを示唆する。

AOA を含む 5 培養の群集構造を 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンをもとに解析した (Fig. 3)。その結果、Fig. 3 に示す OTU5 に属する AOA-*amoA* を含む培養 (5s-9) では、*Nitrosopumilus* 属の AOA が微生物群集全体の 2% の abundance になると推定された。土壌抽出培地は大量の有機物を含む。そのため heterotroph が圧倒的に優占すると考えられるが、AOA が可視化されるほど優占することは、限界希釈法が適用できる可能性があることを示唆する。今後、抗生物質の使用などによる AOA の集積、あるいは、ろ過による AOA の選別の可能性も考えられ、この培養からの AOA の単離は期待できる。一方、その他の 4 培養では AOA を可視化できなかった (Fig. 3)。これらについては、メタン菌などの嫌気性菌が優占しており、培養が嫌気的だったことが示された。好気的な環境を維持することが、AOA 培養の維持に必要なことが示された。

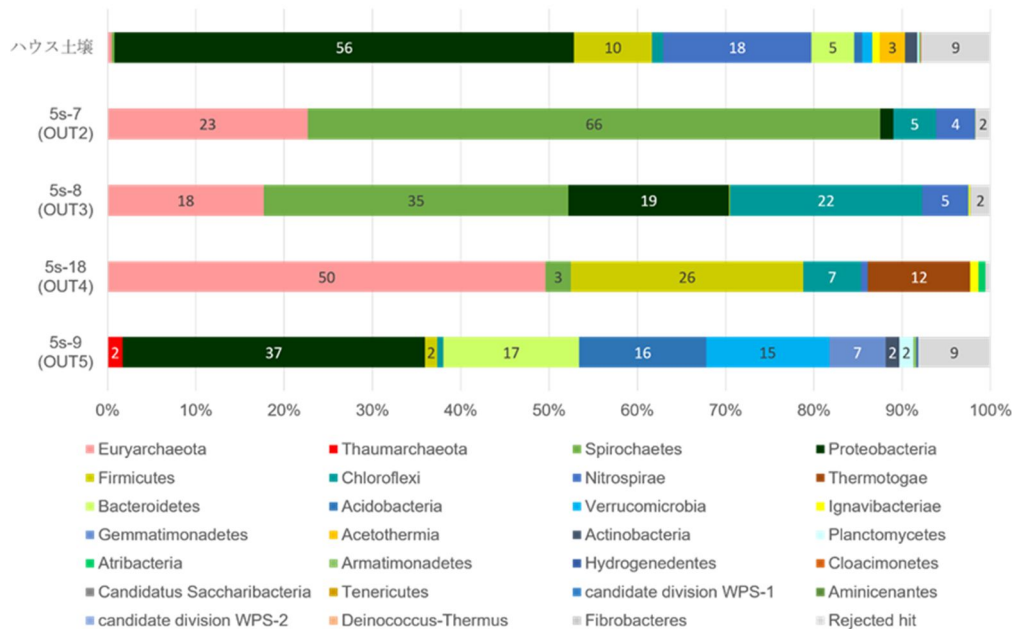


Fig. 3. 16S rRNA 遺伝子に基づく門レベルでのアンプリコン解析の結果。目的とする *Thaumarchaeota* (赤色) に属す AOA は OTU5 のみで検出された。OTU2, 3, 4 ではアーキアが高い優占率を示していたが、すべて *Thaumarchaeota* 門ではなく *Euryarchaeota* 門 (桃色) に属すアーキアであった。薄いグレーの Rejected hit はデータベースに登録されているの配列との相同性が 97% 未満で同定できなかったアンプリコンを示す。

3) まとめ

アンモニア酸化と亜硝酸酸化が認められる培養から NOB を単離した。実験の想定どおり、NO₂ に高い親和性を持つ NOB が単離されたとみらる。同じ培養からの AOM の単離には成功しなかったが、その AOM には新たな生理学的な特徴が推定された。NH₄⁺ 直接ではなく、urea や有機態窒素に富む土壌抽出液を基礎培地とし、NOB を共存させた培養からは、新規な AOA が多数見出された。Fig. 1 に示した硝化菌を単離するための新たな戦略に基づいた実験から得られたこれらの結果は、生態学的に意義のある硝化菌の単離のために、この戦略が有効であることを示す。

引用：

- 1) Daims, H. et al., Nature (2015) 528, 504-509.
- 2) van Kessel, M. et al., Nature (2015) 528, 555-559.
- 3) Pjevac, P. et al., Front. Microbiol(2017) 8, 1508
- 4) Nowka, B. et al., Appl. Environ. Microbiol (2015) 81, 745-753.
- 5) Ushiki, N. et al., J. Biosci. Bioeng (2017) 123, 581-589.
- 6) Francis, C.A. et al., PNAS (2005) 102, 14683- 14688
- 7) Rotthauwe, J.H. et al., Appl. Environ Microbiol(1997) 63
- 8) Kumar, S. et al., Mol. Biol. Evol (2016) 33, 1870- 1874

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅澤千陽, 黒岩恵, 橋本知義, 磯部一夫, 諏訪裕一
2. 発表標題 土壌抽出液培地を用いたMPN計数を經由した多様な新規アンモニア酸化アーキアの実験室培養
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umezawa, C., Kuroiwa, M., Hashimoto T., Isobe., K., and Suwa, Y.
2. 発表標題 Enriching soil ammonia-oxidizing Archaea using newly designed medium supplemented with soil extract
3. 学会等名 6th International Conference on Nitrification and Related Processes (ICoN6) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nissato E., Toyofuku, M., Kuroiwa M., Nomura N. and Suwa Y.
2. 発表標題 Observation of membrane vesicle-like particle of ammonia-oxidizing bacteria by transmission electron microscope.
3. 学会等名 6th International Conference on Nitrification and Related Processes (ICoN6) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅澤千陽, 黒岩恵, 橋本知義, 磯部一夫, 諏訪裕一
2. 発表標題 土壌抽出液培地による新規な硝化菌培養の可能性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018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	藤谷 拓嗣 (Hirotsugu Fujitani) (50708617)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員 (82626)	
研究 分担者	黒岩 恵 (Megumi Kuroiwa) (00761024)	中央大学・理工学部・助教 (32641)	