

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25241021

研究課題名(和文) 環境メタゲノミクスで富栄養淡水湖沼での新しい窒素循環像を探る

研究課題名(英文) elucidating relationship among functions responsible for nitrogen cycle in a eutrophic lake using metagenomics

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) 32,800,000円

研究成果の概要(和文)：顕著な嫌気性アンモニア酸化(anammox)が観測される茨城県北浦の地点(KU3)および、より活性の低い2地点(KU4, KU6)の堆積物の微生物群集のメタゲノム解析を行い、窒素循環を検討した。Anammox細菌の優占度は活性と比例関係にあり、anammox細菌の存在量が活性に影響を与えていると考えられた。一方、脱窒を担う微生物種はいずれの地点でも共通したが、KU3で特異的で少なく、anammox微生物と負の相関が見られた。KU3では、特にNO還元ポテンシャルが低く、脱窒を律速すると推定された。この特異的な代謝とanammoxとの関連を議論した。

研究成果の概要(英文)：Metagenomics analyses on a eutrophic lake sediment sampled from 3 stations, of which anammox activity was varied, were conducted to elucidate relationship between anammox and other functions responsible for N cycle. Abundance of anammox population linearly correlated with its activity, suggesting the population size may affect its in situ activity. On the other hand, negative correlation was found between abundance of denitrifiers and their activities. Abundance of denitrifiers in KU3, where anammox activity was highest, was significantly lower than other stations. Notably, NO reduction potential in KU3 seemed especially lower and could limit the denitrification. Relevance of this unique metabolism was discussed with respect to anammox.

研究分野：微生物生態学

キーワード：メタゲノム解析 窒素循環 アナモクス 脱窒 硝化 微生物群集

1. 研究開始当初の背景

(1) 窒素循環像を改訂する必要がある

窒素循環は生物の一次生産を担い、それを構成する素過程は逐次反応となっている。しかも、ある素過程どうしには基質の競合があり、複雑である。嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) は 1990 年代に発見された比較的新しい素過程であり (Mulder *et al.*, 1995), NH_3 を NO_2^- を用いて N_2 まで酸化する反応である (Strous *et al.*, 2006)。水圏環境の窒素負荷を軽減する反応として重要視されており、海洋で活性が検出されたが (Amano *et al.*, 2007; Kuiper *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2007; Trimmer *et al.*, 2003), 研究代表者らは陸水圏において anammox 活性を有する環境を見だし、その検討を重ねてきた (Yoshinaga *et al.*, 2011)。世界各国の陸水圏からも anammox 活性が検出され (Sato *et al.*, 2012; Lansdown *et al.*, 2016; Wenk *et al.*, 2013), anammox 細菌が環境に広く分布しているという認識が定着した。しかしながら anammox が検出される環境では硝化、脱窒といった窒素循環に関わる他の反応が共存し、anammox を含めた新たな窒素循環像を描く必要がある。

(2) どのような解析をすべきか

反応どうしの関係性を考察する方法として古典的には活性測定がある。一般的にこれはポテンシャル値として測定される。ところで、近年のゲノムシーケンシング技術の飛躍的向上によって、環境中の全ゲノムを抽出し解析する「メタゲノム解析」が実現可能となった。メタゲノムデータから (ポテンシャルではなく) 環境の実態を描く方法も開発されつつある。そのひとつが分担者 (高見) の開発した MAPLE システムである (Takami *et al.*, 2012; Takami *et al.*, 2016)。このシステムによってある代謝に対してメタゲノムデータ中の機能遺伝子に対応させ、ヒット数を定量的に求めることができる。このように、MAPLE は各代謝の関係性を可視化する最先端の解析ツールである。

2. 研究の目的

Anammox 活性が検出された淡水湖沼 (茨城県北浦) を対象に、高い anammox 活性が特異的に検出される地点 (KU3)、下流方向で anammox 活性が失われる地点 (KU6)、およびそれらの中間地点 (KU4) の堆積物から DNA を抽出し、anammox 細菌に基質を受け渡す可能性のある硝化、anammox 細菌と基質を巡って競合する可能性のある脱窒の関係性を MAPLE システムで推定した。

3. 研究の方法

(1) サンプルング

2013 年 7 月 17 日に茨城県北浦の、KU3、KU4、KU6 地点より堆積物コアサンプル (0-4 cm) を採取した。

(2) 活性測定試験

Anammox および脱窒活性は堆積物を無機塩培地で 25 w/w % に懸濁し、GC/MS を用いて測定した (Amano *et al.*, 2007)。硝化活性は堆積物を 0.2 μm 孔径フィルターで濾過した KU6 地点の湖水で 25 w/w % に懸濁し ($\text{pH}: 7.6 \pm 0.1$)、2 連、 20°C 暗所、200 rpm で攪拌培養した。 NO_2^- 、 NO_3^- の増加はイオンクロマトグラフ IC-2010 (TOSOH) で測定した。

(3) 機能アバンダンスの推定

DNA は ISOIL (Nippongene) で抽出し、Miseq (Illumina) を用いて 250bp ペアエンドシーケンスを行った。解読した塩基配列を対象に MetaGene (<http://metagene.nig.ac.jp/metagene/metagene.html>) を用いて遺伝子領域を検索し、遺伝子と判定された 300 万リードをアミノ酸配列に翻訳した。このようにして得たメタゲノムデータを MAPLE ver. 2.1.0 (<http://www.genome.jp/tools/maple21/>) に供試し、KEGG 機能モジュールを構成する機能遺伝子のヒット数を基に反応段階ごとの機能遺伝子存在量を計算した。機能モジュールを構成する反応を担う酵素に対してのヒット数が最少となる反応段階が、その代謝を律速する反応と推定し、そのヒット数を“機能アバンダンス”とした。

ところで MAPLE は KEGG に登録されている生物種データベースと機能モジュールを利用して機能アバンダンスを計算するが、anammox 細菌は完全ゲノムが報告されていないため、KEGG のデータベースに登録されていない。したがって、代謝経路も登録されていない。そこでメタゲノムデータ中の anammox 機能遺伝子 (NirK, NirS, Hzs, Hzo, Hao) 配列を対象に、nr データベースに基づく同源性検索した。既知の代謝経路を参考に仮想モジュールを構築し、これについて上述と同様に、機能アバンダンスを計算した。

(4) リボソームタンパク質に基づく微生物群集構造解析

微生物群集構造は全リボソームタンパク質に対する各微生物種のリボソームタンパク質の組成から求めた。リボソームタンパク質は微生物種でコピーセットのみ保存されていることがほとんどである。この特徴を利用して微生物種組成を推定できる。これを行うため、MAPLE でリボソームタンパク質にヒットした配列を抽出し、nr データベースに基づく同源性検索を行って、微生物種を phylum あるいは class レベルで同定し、それぞれの優占度を求めた。

4. 研究成果

(1) 活性測定

Anammox、脱窒、硝化活性測定結果を Fig. 1 に示す。Anammox 活性は KU3 地点が最も高く下流に向かうにつれ活性が低下した。一方、脱窒活性は KU3 地点が最も小さく、下流に向かうにつれ活性が大きくなり、anammox 活性と負の相関を示した。硝化活

性は3地点で差はなく、KU3ではanammox活性とも差はなかった。

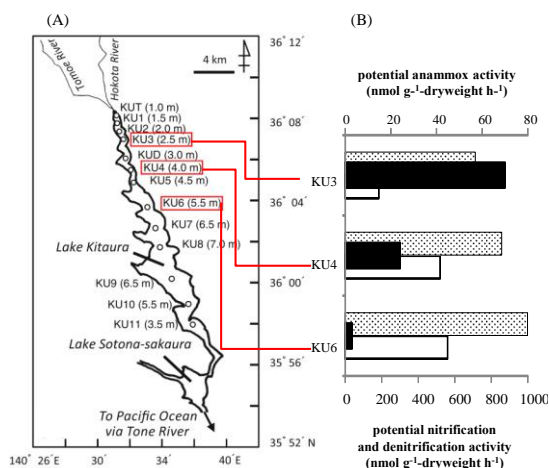


Fig. 1 (A) 北浦でのサンプリングサイト (Yoshinaga et al., 2011), (B) 硝化 (▨, lower x-axis), 脱窒 (□, lower x-axis), および anammox (■, upper x-axis) のポテンシャル活性測定結果。

(2) Anammox 細菌の優占度と活性との関係

群集構造解析より導かれた全菌数に対する anammox 細菌の割合を Fig. 2 に示す。Anammox 細菌は KU3 地点から下流の KU6 に向かって全菌数に対する割合が減少した。

(1) で示した anammox 活性についての傾向と同様の傾向が認められ、anammox 活性の差は anammox 細菌の存在量に対応すると考えられた。一方、anammox に寄与する機能遺伝子 (NirK, NirS, Hzs, Hzo, Hao) のほとんどが検出できなかつたため、その機能アバンダンスは計算できなかった。

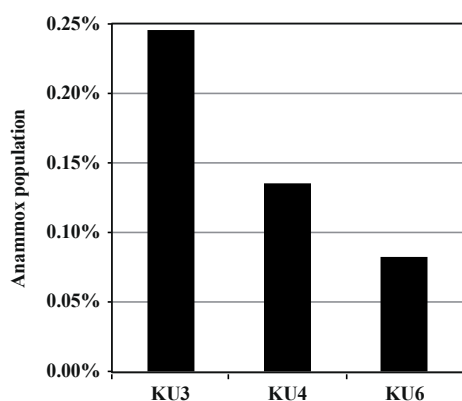


Fig. 2 全菌数に対する anammox 細菌の割合

(3) 脱窒機能アバンダンス解析

脱窒機能モジュール (M00529) を充足した生物種は *Beta* -, *Gamma* -, *Delta* - *proteobacteria* だった。そこでこれら生物種ごとの機能アバンダンス (個別生物種機能アバンダンス) を求めた (Fig. 3)。Anammox 活性が高い KU3 地点において脱窒菌の機能アバンダンスは特異的に低く、活性測定の結

果と同じ傾向を示した。また、anammox 活性が高い KU3 地点では完全な脱窒を行える生物種数が極端に少なく、その原因として、*Betaproteobacteria* の優占度が小さいことによる可能性が示唆された。活性測定においても脱窒活性は N_2O と N_2 の蓄積によって求めているため、例えば N_2O の生成能が欠損した脱窒菌は活性測定の結果に反映されず、かつ class レベルでの微生物種ごとの優占度の結果にも反映されない。したがって、そのような脱窒菌 (NO 生成菌) が優占している場合、それが見逃された可能性がある。

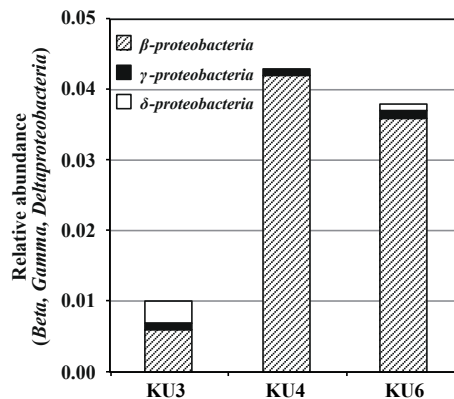


Fig. 3 個別生物種アバンダンス解析結果. 個別生物種ごとのアバンダンスの結果を地点ごとに合算した。

そこで *Betaproteobacteria* の脱窒について反応段階ごとの機能遺伝子存在量を計算し、律速となっている反応を機能アバンダンスとして調べた (Fig. 4)。地点間で比較した場合、 NO_3^- 還元、 NO_2^- 還元、 N_2O 還元は機能遺伝子存在量に差がない。その一方で、NO還元は KU3 のみ極端に少なかった。また、すべての地点において NO 還元の機能遺伝子存在量が最も少なく、anammox 細菌が多く生息している KU3 は NO 還元能が極端に低い可能性が示唆された。すなわち、 N_2O を生成する反応が反応全体の律速になっているため、KU3 地点での活性と個別機能アバンダンスが特異的に低い結果が得られたと考えられる。

Module ID : M00529		Function	Dinitrification functional abundance (Only <i>Betaproteobacteria</i>)		
			KU3	KU4	KU6
<i>narG</i>	<i>napA</i>	NO_3^- reduction	0.077	0.094	0.100
<i>narH</i>					
<i>narI</i>					
<i>narJ</i>					
<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	NO_2^- reduction	0.132	0.136	0.129
<i>norB</i>					
<i>norC</i>	<i>cyp55</i>	NO reduction	0.006	0.042	0.036
<i>nosZ</i>					
		N_2O reduction	0.023	0.061	0.048

Fig. 4 脱窒のモジュールと *Betaproteobacteria* の脱窒機能アバンダンスについて反応段階ごとに解析した結果。

(4) 硝化機能アバンダンス解析

アンモニア酸化機能モジュール (M00528) を充足した生物種は *Beta* -, *Gamma* - *proteobacteria* だった。

ところでアンモニア酸化細菌 (AOB) は *Beta*, *Gammaproteobacteria* 両方で知られているが, *Gammaproteobacteria* AOB は海水もしくは酸性土壌のみで見出されており (Watson, 1965; Koops *et al.*, 1990;

Alzerreca *et al.*, 1999; Ward and O'Mullan, 2002; Hayatsu *et al.*, 2017), 淡水湖沼での発見例はない。アンモニア酸化は2段階の反応で構成されているが, 最初の反応を触媒する ammonia monooxygenase (Amo) はメタン酸化細菌 (MOB) が保有する methane monooxygenase (Pmo) とオーソログスな関係にあり, 区別できない (Norton *et al.*, 2002)。また, アンモニア酸化の2番目の反応を触媒する hydroxylamine oxidoreductase (Hao) は

Gammaproteobacteria MOB でも保有例が知られている (Campbell *et al.*, 2011)。以上より, アンモニア酸化モジュールを充足した *Gammaproteobacteria* は AOB ではなく, MOB である可能性が大きい。これを AOB と考えた場合, 過大評価の恐れがあり, ここでは結果から除いた。

アンモニア酸化について

Betaproteobacteria の個別生物種機能アバンダンスの結果を Fig. 5 に示す。

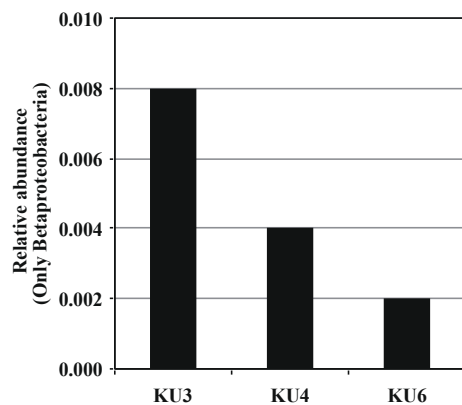


Fig. 5 *Betaproteobacteria* に由来するアンモニア酸化アバンダンス解析結果。

KU3 地点から KU6 にかけて個別生物種機能アバンダンスが減少しており, anammox 細菌優占度の結果と同様の傾向を示した。

なお, アンモニア酸化微生物についてアンモニア酸化古細菌 (AOA) は反応経路の一部が未解明なため, MAPLE の機能アバンダンス計算結果に反映されていない。AOA は全て *Thaumarchaeota* に属しているため, 群集構造解析で全菌数に対する

Thaumarchaeota の割合を計算したところ, 全地点において 0.05% 未満と, anammox 細菌よりさらに少なかった。したがって *Thaumarchaeota* が窒素循環に寄与している可能性は低く, 以上よりアンモニア酸化の

北浦の窒素循環への寄与は AOB が主体であると考えられる。

(5) 本研究のまとめ

以上の結果より, 北浦における窒素循環について anammox を中心に考察する。

Anammox 細菌は活性と全菌数に対する割合が同じ傾向を示したため, anammox 細菌の存在量が活性に影響を与えていると考えられた。

アンモニア酸化は anammox 細菌存在量の増加に伴って機能アバンダンスが増加したため, アンモニア酸化による NO₂ の生成が anammox の存在量に影響していると考えられた。一方, アンモニア酸化活性は機能アバンダンスと同じ傾向を示さなかった。これは, 本研究では活性測定を土壌と湖水に元々含まれていた NH₃ のみを基質に行ったため, 環境中に存在すると考えられている低基質濃度に適応した AOB のみが活性を有し, 高い基質濃度に適応した AOB の活性が検出されなかった可能性がある。Oligotrophic な AOB は北浦堆積物から分離に成功しており, 現在, 菌株記載に向けて生理試験を行っている (学会発表 3)。

脱窒活性は anammox 活性と負の相関を示したが, 個別生物種機能アバンダンスを求めたところ, 完全な脱窒能を有する細菌が anammox 活性の高い KU3 地点では少ないことが示された。脱窒についてみると, いずれの地点においても, *Betaproteobacteria* に属する脱窒菌が優占しており, KU3 においては, 特に NO 還元能が著しく低いことが示唆された。このことは本研究室で得た anammox 集積培養を対象としたメタゲノム解析においても示唆された (学会発表 7)。

これまでの知見では anammox 細菌の生存には, 基質である NO₂ を供給する AOM が必要不可欠であり, 脱窒菌とは NO₂ を巡り競合していると考えられてきた。しかし, 本研究では NO 生成菌の存在が示唆されたことから, anammox 細菌が存在するには AOM 以外にも NO 生成菌が関わっている可能性が新たに考えられた。Anammox において NO は中間産物の一つとして考えられており, NO を添加して anammox 活性を検出した例もある (Oshiki *et al.*, 2016)。これは環境中で anammox 細菌が微生物由来の NO を利用している可能性を示唆する結果であり, 本研究での結果と矛盾しない。この関係性は集積培養の解析でも示唆された (学会発表 7)。

<引用文献>

1. Alzerreca, J. J., *et al.* 1999. The amo operon in marine, ammonia-oxidizing γ -proteobacteria. *FEMS Microbiol.* **180**, 21-29.
2. Amano, T., I. *et al.* 2007. Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in

- Japan. Microbes Environ. **22**, 232-242.
3. Campbell, M. A., *et al.* 2011. Model of the molecular basis for hydroxylamine oxidation and nitrous oxide production in methanotrophic bacteria. FEMS Microbiol. **322**, 82-89.
 4. Hayatsu, M., *et al.* 2017. An acid-tolerant ammonia-oxidizing γ -proteobacterium from soil. ISME J. doi: 10.1038/ismej.2016191.
 5. Koops, H. P., *et al.* 1990. Description of a new species of *Nitrosococcus*. Arch Microbiol. **154**, 244-248.
 6. Kuypers, M. M. M., *et al.* 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. PNAS. **102**, 6478-6483.
 7. Lam, P., *et al.* 2007. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. PNAS. **104**, 7104-7109.
 8. Lansdown, K., *et al.* 2016. Importance and controls of anaerobic ammonium oxidation influenced by riverbed geology. Nat. Geosci. **9**, 357-360
 9. Mulder, A., *et al.* 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. FEMS Microbiol. Ecol. **16**, 177-184.
 10. Norton, J. M., *et al.* 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Arch Microbiol. **177**, 139-149.
 11. Oshiki, M., *et al.* 2016. Hydroxylamine-dependent anaerobic ammonium oxidation (anammox) by "Candidatus Brocadia sinica". Environ. Microbiol. **18**, 3133-3143.
 12. Sato, Y., *et al.* 2012. Detection of anammox activity and 16S rRNA genes in ravine paddy field soil. Microbes. Environ. **27**, 316-319.
 13. Strous, M., *et al.* 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. Nature. **440**, 790-794.
 14. Takami, H., *et al.* 2012. Evolution method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. BMC Genomics. **12**, 699.
 15. Takami, H., *et al.* 2016. An automated system for evaluation of the potential functionome: MAPLE version 2.1.0. DNA Res. **23**, 467-475.
 16. Trimmer, M., *et al.* 2003. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. **69**, 6447-6454.
 17. Ward, B. B., *et al.* 2002. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceanus*, a Marine ammonia-oxidizing γ -proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 4153-4157.
 18. Watson, S. W. 1965. Characteristics of a marine nitrifying bacterium, *Nitrosocystis oceanus* sp. nov. Limnol. Oceanogr. **10**, R247-R289.
 19. Wenk, C. B., *et al.* 2013. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria and sulfide-dependent denitrifiers coexist in the water column of a meromictic south alpine lake. Limnol. Oceanogr. **58**, 1-12.
 20. Yoshinaga, I., *et al.* 2011. Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, lake Kitaura, Japan. Microbes. Environ. **26**, 189-197
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 0 件)
- [学会発表] (計 8 件)
1. 池田拓哉, 近藤竜二, 森裕美, 勝山千恵, 山岸昂夫, 上田眞吾, 吉永郁生, 諏訪裕二, 2013, 富栄養化淡水湖沼・北浦における anammox 活性垂直分布と微生物群集構造, 第 29 回日本微生物生態学会年次大会
 2. 諏訪裕二, 村上由夏, 荒井渉, 池田拓哉, 勝山千恵, 小椋義俊, 林哲也, 吉永郁生, 福原康平, 黒岩恵, 高見英人, 2015, 安定的嫌気性アンモニア酸化活性を示す北浦のメタゲノム解析. -微生物群集とその代謝ポテンシャルの特徴-, 2015 年度ゲノム支援拡大班会議
 3. 石川裕士, 磯部一夫, 浅野智之, 福原康平, 黒岩恵, 諏訪裕二, 2015, 湖堆積物および森林土壌からの oligotrophic な *Nitrosospira* sp. の純粋分離, 日本微生物生態学会第 30 回大会
 4. 諏訪裕二, 村上由夏, 荒井渉, 池田拓哉, 勝山千恵, 小椋義俊, 林哲也, 吉永郁生, 福原康平, 黒岩恵, 高見英人, 2015, メタゲノム解析による生理・代謝機能ポテンシャルから見た富栄養湖沼(北浦)の窒素循環像, 第 30 回日本微生物生態学会
 5. 福原康平, 村上由夏, 荒井渉, 小椋義俊, 林哲也, 黒川顕, 諏訪裕二, 高見英人, 2016, メタゲノム解析で見た富栄養湖の窒素循環像, 水圏微生物フォーラム 2016
 6. 福原康平, 村上由夏, 荒井渉, 小椋義俊,

- 林哲也, 黒川頭, 諏訪裕一, 高見英人, 2016, メタゲノム解析から見える富栄養湖の窒素循環に関与する anammox の実態, 日本微生物生態学会第 31 会大会
7. 福原康平, 村上由夏, 荒井渉, 豊田敦, 小椋義俊, 林哲也, 黒川頭, 諏訪裕一, 高見英人, 2017, Anammox 活性を有する微生物叢のメタゲノム解析, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会
8. 針ヶ谷優生, 豊田敦, 荒井渉, 諏訪裕一, 高見英人, 2017, Anammox 集積培養のメタゲノムから再構築した *Armatimonadetes* 細菌のゲノム解析, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

高見 英人 (TAKAMI, HIDETO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋資源研究開発センター・上席研究員

研究者番号: 70359165

(3) 研究分担者

吉永 郁生 (YOSHINAGA, IKUO)

鳥取環境大学・環境学部・教授

研究者番号: 40230776

(4) 連携研究者

勝山 千恵 (KATSUYAMA, CHIE)

広島大学・総合科学研究科・助教

研究者番号: 10580061

黒岩 恵 (KUROIWA, MEGUMI)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号: 00761024