

活性汚泥から獲得された亜硝酸酸化細菌
Nitrospira の生理学的性質および
ゲノム情報の比較解析

Comparative analyses based on physiological characteristics and
genomic information between two *Nitrospira* strains isolated from
activated sludge

2017年2月

牛木 章友
Norisuke USHIKI

活性汚泥から獲得された亜硝酸酸化細菌
Nitrospira の生理学的性質および
ゲノム情報の比較解析

Comparative analyses based on physiological characteristics and
genomic information between two *Nitrospira* strains isolated from
activated sludge

2017年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 環境生命科学研究

牛木 章友
Norisuke USHIKI

目次

第 1 章 序論	5
1.1. 研究背景	5
1.1.1. 硝化微生物.....	5
1.1.2. 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite-Oxidizing Bacteria : NOB)	5
1.1.3. 排水処理場に生息する NOB	9
1.2. 研究目的	12
1.3. 本論文の構成.....	12
第 2 章 2 系統の Nitrospira の生理学的性質の解明	14
2.1. 序論	14
2.2. 実験方法	16
2.2.1. 分離株	16
2.2.2. 培養条件.....	16
2.2.3. 動態パラメーター	16
2.2.4. 亜硝酸半飽和定数.....	17
2.2.5. 酸素半飽和定数.....	17
2.2.6. 定量 PCR による細菌数変化のモニタリング	18
2.2.7. 亜硝酸態窒素濃度の測定.....	19
2.2.8. アンモニアに対する感受性.....	19
2.3. 結果	20
2.3.1. 亜硝酸に対する親和性.....	20
2.3.2. 酸素に対する親和性.....	20
2.3.3. 倍加時間.....	20
2.3.4. アンモニアに対する感受性.....	21
2.4. 考察	22
2.4.1. 亜硝酸に対する親和性.....	22
2.4.2. 酸素に対する親和性.....	22
2.4.3. 倍加時間.....	24
2.4.4. アンモニアに対する感受性.....	24
2.5. 結言	26
2.5.1. 2 系統の分離株による比較.....	26
2.5.2. NOB における 2 つの Nitrospira 分離株の位置づけ	26
2.5.3. 活性汚泥における NOB の適応および共存	27
第 3 章 2 系統の Nitrospira の比較ゲノム解析	40
3.1. 序論	40

3.2.	実験方法	42
3.2.1.	ゲノム解析に用いた単離株の系統学的特徴.....	42
3.2.2.	ゲノム配列の再構築.....	42
3.2.3.	遺伝子同定.....	42
3.2.4.	系統学的解析.....	43
3.2.5.	Nitrospira のゲノム配列の比較.....	43
3.2.6.	窒素同化に関する遺伝子発現.....	43
3.2.7.	尿素分解活性.....	44
3.3.	結果、考察	45
3.3.1.	ゲノムの再構築.....	45
3.3.2.	Nitrospira のゲノムの系統学的位置づけ.....	45
3.3.3.	Nitrospira の保有遺伝子の比較.....	46
3.3.4.	窒素代謝.....	46
3.3.5.	運動性	50
3.3.6.	クオラムセンシング機構.....	52
3.3.7.	CRISPR-Cas 機構	53
3.3.8.	窒素同化の遺伝子の系統.....	54
3.4.	結言	57
3.4.1.	2 系統の分離株による比較ゲノム.....	57
3.4.2.	Nitrospira 間における比較ゲノム.....	57
3.4.3.	活性汚泥における 2 つの分離株.....	58
第 4 章	Nitrospira japonica の Quorum sensing 機構	72
4.1.	序論	72
4.2.	実験方法	74
4.2.1.	系統学的解析.....	74
4.2.2.	AHL の濃縮	74
4.2.3.	AHL レポーター株によるバイオアッセイ.....	74
4.2.4.	AHL 合成遺伝子の増幅	75
4.2.5.	プラスミド抽出.....	75
4.2.6.	形質転換.....	75
4.2.7.	生理活性試験.....	76
4.2.8.	NXR をコードする遺伝子の発現制御調査	76
4.2.9.	QS 機構関連遺伝子の発現.....	77
4.2.10.	定量 PCR.....	77
4.3.	結果	79
4.3.1.	系統学的解析.....	79

4.3.2.	AHL レポーター株によるバイオアッセイ.....	79
4.3.3.	AHL 添加による NJ1 株の亜硝酸酸化活性および増殖活性への影響.....	80
4.3.4.	NxrA 遺伝子の発現制御.....	80
4.3.5.	細菌数に依存した QS 機構関連遺伝子の発現.....	81
4.4.	考察.....	82
4.4.1.	系統学的解析.....	82
4.4.2.	AHL の検出.....	82
4.4.3.	AHL の同定.....	83
4.4.4.	AHL 添加による NJ1 株の亜硝酸酸化活性および増殖活性への影響.....	84
4.4.5.	NxrA 遺伝子の発現制御.....	84
4.4.6.	細菌数に依存した QS 機構関連遺伝子の発現.....	85
4.5.	結言.....	86
第 5 章	結言	98
5.1.	本研究で得られた知見.....	98
5.1.1.	2 系統の <i>Nitrospira</i> の生理学的性質の比較.....	98
5.1.2.	2 系統の <i>Nitrospira</i> の比較ゲノム解析.....	98
5.1.3.	<i>Nitrospira japonica</i> の Quorum sensing 機構.....	98
5.2.	活性汚泥における亜硝酸酸化の制御.....	98
5.3.	本研究の波及効果.....	99
5.4.	展望.....	99
5.4.1.	トランススクリプトーム解析による QS 機構関連遺伝子の網羅的探索.....	99
5.4.2.	AHL を介した硝化細菌の共生関係の解明.....	99
5.4.3.	AHL 合成酵素の探索.....	100
5.4.4.	<i>Nitrospira</i> の有機物代謝.....	100
5.4.5.	<i>Nitrospira</i> と <i>Nitrobacter</i> の基質親和性.....	100
Appendix	101
謝辞	125
参考文献	126
研究業績	136

第1章 序論

1.1. 研究背景

1.1.1. 硝化微生物

硝化反応は好気条件下でアンモニアを硝酸に酸化する反応であり、窒素循環における重要な反応である。硝化反応はアンモニアを亜硝酸に酸化するアンモニア酸化細菌 (Ammonia-Oxidizing Bacteria : AOB)、アンモニア酸化古細菌 (Ammonia-Oxidizing Archaea : AOA)、亜硝酸を硝酸に酸化する亜硝酸酸化細菌 (Nitrite-Oxidizing Bacteria : NOB)、そして近年発見された完全アンモニア酸化 (Complete Ammonia Oxidation : COMAMMOX) を行う COMAMMOX 細菌によって担われている。これら硝化細菌は自然環境のみならず、排水処理場の活性汚泥における生物学的窒素除去プロセスにも貢献し、環境富栄養化を防いでいる¹⁾。特に NOB が担う亜硝酸酸化は有毒な亜硝酸の除去²⁾、微生物、植物の窒素源となる硝酸を生産するため、生態系において重要な役割を担っている。

1.1.2. 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite-Oxidizing Bacteria : NOB)

NOB は 16S rRNA 遺伝子に基づく系統分類では、*Proteobacteria* 門、*Chloroflexi* 門、*Nitrospirae* 門の 3 つに分類される³⁾。*Proteobacteria* 門の NOB として、*Alphaproteobacteria* 綱の *Nitrobacter* 属、*Gammaproteobacteria* 綱の *Nitrococcus* 属、*Deltaproteobacteria* 綱の *Nitrospina* 属、*Betaproteobacteria* 綱の *Nitrotoga* 属の 4 つの属が知られており、*Chloroflexi* 門の NOB として *Nitrolancetus* 属が近年発見された⁴⁾。また、*Nitrospirae* 門の NOB としては *Nitrospira* 属のみが知られている。

1.1.2.1. *Nitrobacter* 属

約 1 世紀以上も前に発見、分離培養された NOB が *Nitrobacter* 属である。*Nitrobacter*

は他の NOB よりも培養しやすく、生理学、生化学的研究に必要なバイオマスまで十分に増殖させることが可能であり、NOB の生理学的研究モデル微生物として用いられた。現在、*Nitrobacter* 属の分離株は土壌から単離された *Nitrobacter winogradskyi*、*Nitrobacter hamburgensis*⁵⁾、高塩基性の湖の堆積物、土壌から単離された *Nitrobacter alkalicus*⁶⁾、淡水、土壌、排水処理場などから単離され、多様な生息域を持つと考えられる *Nitrobacter vulgaris*⁷⁾が知られている。近年、*Nitrospira winogradskyi* Nb-255、*Nitrospira hamburgensis* X14、*Nitrobacter* sp. Nb-311A の 3 株の比較ゲノム解析が行われた⁸⁾。ゲノム解析の結果から、16S rRNA 遺伝子は相同性が非常に高いにも関わらず、ゲノムは大きく異なっており、共通の遺伝子が全体の半数であること、染色体がシトクロム b や様々な代謝経路に関する遺伝子を持つことが判明した⁸⁾。また、Na⁺/Ca²⁺アンチポターや Cl⁻チャネルなどの耐塩性に関わる遺伝子の保持数が生息環境に関わることが判明した。また、*N. hamburgensis* X14 はゲノム上に亜硝酸酸化還元酵素 NXR、炭素固定酵素 RuBisCO など生育に重要な酵素を重複して保持しており、異なる環境に応じてこれらの遺伝子の発現を変化させ、酵素活性に幅を持たせていることが推測された。

1.1.2.2. *Nitrospina* 属

Nitrospina 属の NOB として、北大西洋から単離された *Nitrospina gracilis*⁹⁾と黒海から単離された *Nitrospina watsoni*¹⁰⁾が知られている。分子生物学的解析に基づく、ほとんどの NOB は海洋以外の環境からも発見されているが、*Nitrospina* 属は海洋のみでしか発見されていない。また、16S rRNA に基づく定量 PCR とメタゲノム解析を用いた研究により、*Nitrospina* 様細菌が海洋生態系の硝化に重要であり、海洋のみに広く分布していることが示唆されている¹¹⁾。さらに近年、*Nitrospina gracilis* strain 2/311 のゲノム解析が行われた¹²⁾。ゲノム解析の結果、好気性微生物であるにもかかわらず活性酸素に対する防衛機構が欠損していることや二酸化炭素固定に逆 TCA 回路を使用していることが明らかにな

り、*Nitrospina* は微好気性微生物から進化したことが示唆された。また保持している遺伝子から、固定した炭素をグリコーゲンとして保存することが示唆されるが、外部の有機物を利用するための遺伝子を保持していないため、有機物は基本的に利用できないと予測される。実際に *N. gracilis* の生理学的性質を解析した結果からは従属栄養性は確認されていない⁹⁾。また、*N. gracilis* のゲノムを他の微生物と比較解析した結果、16S rRNA 遺伝子レベルでは大きく異なっている *Nitrospirae* 門とのホモログが最も多く、同じ亜硝酸酸化還元酵素 NXR を祖先にしていることも踏まえ、*Nitrospina* 属が進化的に *Nitrospirae* 門と非常に近縁であることが示唆された。また、従来は *Deltaproteobacteria* 綱 *Nitrospina* 属としていたが、新たに *Nitrospinae* 門が提唱されている。

1.1.2.3. *Nitrococcus* 属

Nitrococcus 属の NOB は南太平洋から単離された *Nitrococcus mobilis* が唯一の分離株である⁹⁾。土壌中に含まれる *nxA* 遺伝子を解析したところ、*Nitrobacter* 型の *nxA* の遺伝子がいくつか回収されたのに対し、*Nitrococcus* に関連のある *nxA* の遺伝子は回収されないという知見が得られ、*Nitrococcus* 属の NOB は海洋に分布していることが示唆されている^{13, 14)}。また近年、投稿論文としては発表されていないが、*Nitrococcus mobilis* のゲノム解析が進められている。

1.1.2.4. *Nitrotoga* 属

Nitrotoga 属の NOB として、*Candidatus Nitrotoga arctica* がシベリアの永久凍土の土壌から集積培養されている¹⁵⁾。*Ca. Nitrotoga arctica* は一般的な NOB が増殖できない 10°C という低温環境が最適増殖温度であるという非常に興味深い生理活性を持っている。他の NOB の最適温度が 28~39°C であるのに対し、*Ca. Nitrotoga arctica* は 25°C では亜硝酸酸化は観察できず、4°C で亜硝酸酸化が確認された。*Ca. Nitrotoga arctica* の 16S rRNA 遺伝

子に基づいて系統解析を行った結果、下水、汚染河川のバイオフィーム、氷河下環境、湖堆積物からも検出されており、永久凍土に限らず環境中に広く分布していることが報告されている^{16, 17)}。

1.1.2.5. *Nitrolancetus* 属

Nitrolancetus hollandicus は *Chloroflexi* 門から発見された初めての NOB である⁴⁾。*N. hollandicus* はオランダの排水処理場の活性汚泥から単離された。*N. hollandicus* は高濃度亜硝酸、高濃度アンモニアを好み、畜産排水の様な高濃度窒素環境に多く生息していると考えられる。加えて、単離した *N. hollandicus* はゲノム解析が進められ、アンモニアトランスポーター、ギ酸分解酵素の存在など他の NOB とは異なる特徴があることがわかった。一方、炭素固定にカルビンベンソン回路を用いる点、*N. hollandicus* の亜硝酸酸化還元酵素 NXR と *Nitrobacter* の NXR のアミノ酸配列相同性が高い点といったように、*Nitrobacter* に類似する特徴を持つこともわかった。

1.1.2.6. *Nitrospirae* 門

Nitrospira は *Nitrospirae* 門 *Nitrospira* 属に属する細菌であり、*Nitrospirae* 門には *Nitrospira* 属以外に好酸性鉄酸化細菌の *Leptospirillum* 属、好熱性硫酸還元細菌の *Thermodesulfobivrio* 属、磁性細菌の *Ca. Magnetoovum* 属などが属している。*Nitrospira* 属に属する NOB は海洋、淡水、土壌、活性汚泥、砂漠、地熱温泉といった様々な環境中に普遍的に生息していることが知られている^{18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25)}。*Nitrospira* 属は多様な系統を持つため、lineage I-VI の 6 つに分立している。この lineage は正式に決められたものではなく、相同性が 94.9%以上を同じ lineage とし、それ以下を異なる lineage と便宜的に定義されたものである^{26, 27)}。このように多様な系統、生息域を持つ *Nitrospira* 属であるが、一般的な分離培養技術では分離株が獲得できない難培養性微生物として知られており、

これまでに獲得されている分離株は非常に限られていた。しかし近年、光ピンセットとアガロース平板法を利用した分離培養手法により、排水処理場の活性汚泥から *Nitrospira defluvii*、*Nitrospira lenta* の分離培養が報告され、一部の生理学的性質が報告されている^{28, 29)}。さらに、当研究室でもセルソーティングシステムを利用した分離培養手法により *Nitrospira sp.* ND1 株、*Nitrospira japonica* NJ1 株の分離培養に成功している^{30,31)}。

1.1.3. 排水処理場に生息する NOB

排水処理場ではアンモニア酸化微生物と亜硝酸酸化微生物を利用した硝化反応、および脱窒細菌を利用した脱窒反応を組み合わせることによって、生物学的窒素除去を行っている。排水処理場の活性汚泥には *Nitrobacter* 属と *Nitrospira* 属に属する NOB が生息している以前から知られていた^{32, 33, 34, 35)}。そして近年、2 属の NOB が基質である亜硝酸に対する K-/r-仮説に基づく共存関係にあることが報告された³⁶⁾。報告された K-/r-仮説では *Nitrospira* は亜硝酸に対する基質親和性が高く、増殖速度が遅い K-戦略者であり、*Nitrobacter* は亜硝酸に対する基質親和性が低く、増殖速度が速い r-戦略者であると考えられている (図 1)。この K-/r-仮説に基づき、*Nitrobacter* と *Nitrospira* は活性汚泥中の亜硝酸を使い分けしているため、同じ環境中での 2 属の NOB の共存が成立すると考えられていた。この K-/r-仮説に基づき、当研究室の Fujitani はバイオリアクターを用いた低濃度亜硝酸を連続供給することで *Nitrospira* の集積化に成功している³⁷⁾。

排水処理場の活性汚泥に生息する *Nitrospira* 群は系統学的に lineage I と lineage II に分類することができ、これら 2 系統の *Nitrospira* が優占種として普遍的に検出されている²⁶⁾。この事実を踏まえ、活性汚泥中の 2 系統の *Nitrospira* の競合についても研究が進められている³⁸⁾。活性汚泥由来の *Nitrospira* 集積サンプル中の亜硝酸を高濃度にした場合では、lineage I の占有率が上昇し、lineage II は減少するのに対し、亜硝酸を低濃度にした場合では lineage I、II の存在比が 1:1 程度になることが報告された。この結果から、活性

汚泥に生息する 2 系統の *Nitrospira* の競合において亜硝酸濃度が重要な因子であることが明らかとなった。また近年、亜硝酸濃度以外にもギ酸利用、AOB との共生関係も、活性汚泥中の 2 系統の *Nitrospira* の競合における重要な因子であることが報告されている^{25, 39)}。

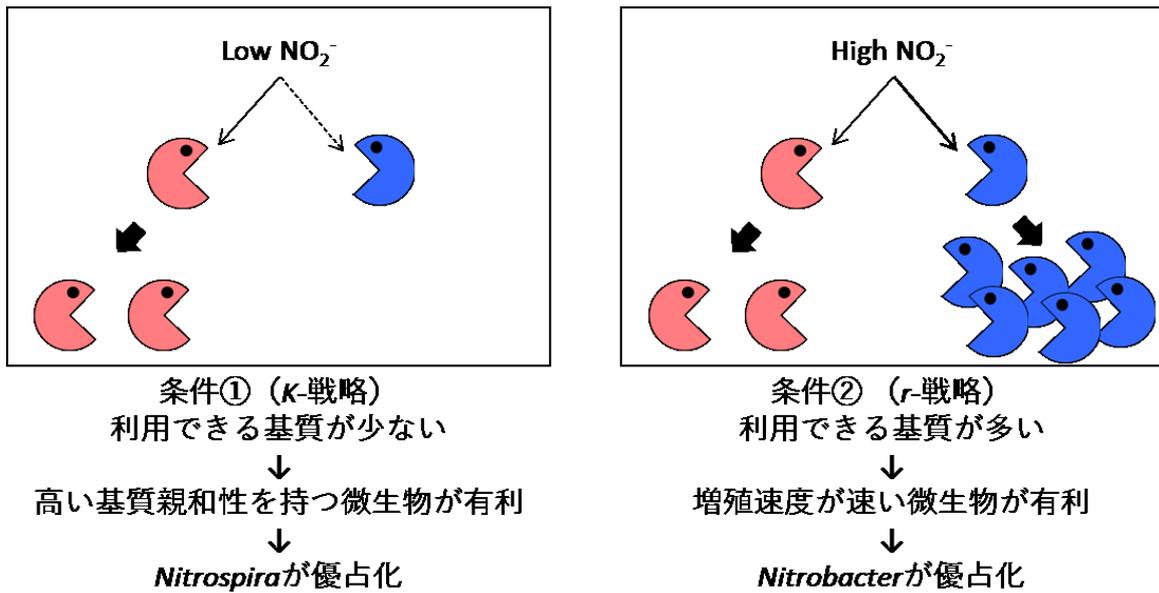
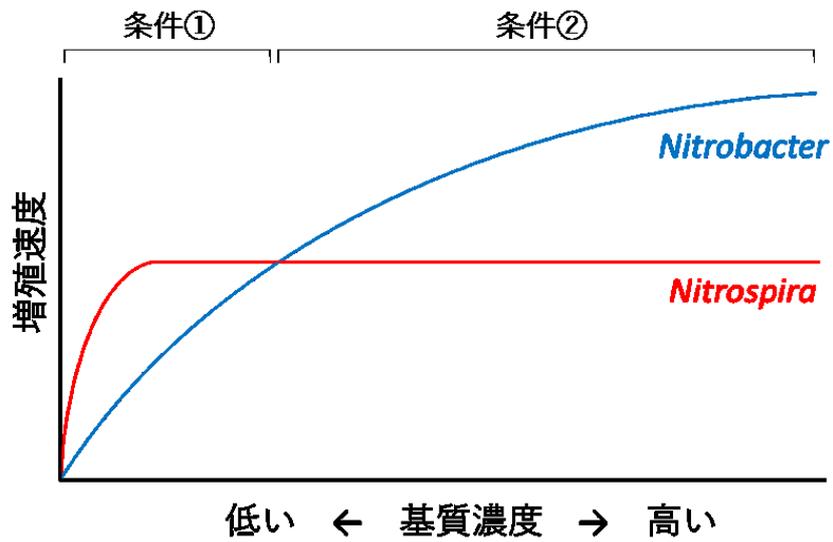


図1 NOBにおけるK-r仮説

1.2. 研究目的

前述したように、排水処理場の活性汚泥には *Nitrospira* が優占的に生息しているが、その知見は非常に限られている。また、活性汚泥中には異なる性質および機能を持つ 2 系統の *Nitrospira* が共存しており、活性汚泥における亜硝酸酸化反応を安定化させる上で両者の詳細な知見が必要である。前述した背景を踏まえ、当研究室では排水処理場の活性汚泥から 2 系統の *Nitrospira* 分離株の獲得を目指してきた。先行研究において、セルソーティング技術を利用した新規な分離培養技術により、排水処理場の活性汚泥から分離株として *Nitrospira sp.* ND1 株および *Nitrospira japonica* NJ1 株の獲得に成功している^{30, 31)}。本研究では獲得された 2 系統の分離株の性質や機能の違いを比較解析することで、活性汚泥中における 2 系統の *Nitrospira* がどのように棲み分け、共存しているのかを明らかにすることを目的とする。まず、2 系統の分離株の亜硝酸酸化活性、倍加時間、アンモニアに対する感受性といった詳細な生理学的性質を調査する。得られた生理学的性質を 2 つの分離株同士、および既往研究で報告されている NOB の性質と比較し、2 系統の *Nitrospira* 分離株間の棲み分け、活性汚泥中への適応を考察する。次に、2 系統の *Nitrospira* 分離株のゲノム配列を解読し、ゲノム配列上に保持されている遺伝子群を比較することで、2 系統の *Nitrospira* 分離株の性質や機能の違いをゲノム配列情報から推測する。さらに、ゲノム情報を解読することによって既往研究では報告されてこなかった代謝機能、および微生物制御機構を明らかにする。最終的には、得られた知見から 2 系統の *Nitrospira* の共存、および活性汚泥中への適応機構を考察し、排水処理プロセスにおける亜硝酸酸化活性の安定化を実現するための改善策を提案する。

1.3. 本論文の構成

本論文は下記の内容から構成されている。第 1 章では研究背景、研究目的、および構成について述べる。第 2 章では *Nitrospira sp.* ND1 株と *Nitrospira japonica* NJ1 株の亜

硝酸消費速度や倍加時間といった詳細な生理学的性質の解明について述べる。第 3 章では 2 系統の分離株のゲノム配列解読について述べる。第 4 章ではゲノム配列解読から新たに発見された *Nitrospira* の Quorum-sensing (QS) 機構について述べる。最後に、第 5 章では本研究全体をまとめた上で、今後の展望を述べる。

第2章 2 系統の *Nitrospira* の生理学的性質の解明

2.1. 序論

環境中には多種多様な微生物が生息し、複合生態系を形成している。環境微生物学や微生物生態学における微生物の環境適応機構や存在分布の理解、あるいは生物工学におけるバイオプロセス中の微生物の動態予測を行うために、微生物の個々の動態パラメーターを求める必要がある。微生物は細胞外から基質を取り込み、それらを異化することでエネルギーを生産し、細胞増殖する（図 2.1）。また、取り込んだ一部の基質を同化し、細胞構成成分の一部として利用する。生物工学において微生物は図 2.1 のようにふるまうと考えられ、基質消費速度 V 、比増殖速度 μ 、収率 Y といったパラメーターによって、微生物の動態を予測することができる。

しかし、近年の分子生物学的手法の発展に伴い、環境中のほとんどの微生物が未培養性または難培養性であることが明らかとなってきた。そのため、これまでに報告されている微生物の性質や動態パラメーターは分離培養が容易な微生物に基づいており、環境中の微生物の動態を反映しているとは言い難い。中でも、NOB は独立栄養性であるため増殖が非常に遅く、培養が難しいため、NOB の生理学的性質や動態パラメーターに関する知見は限られている。NOB の中でも最初に発見された *Nitrobacter* は分離株を獲得することが比較的容易なため、その動態パラメーターが数多く報告されている²⁸⁾。しかしながら、*Nitrospira* は従来の分離培養技術では分離株を獲得するのが非常に困難であり、わずかな生理学的性質しか報告されていない⁴⁰⁾。近年、Nowka らのドイツの研究チームによって、*Nitrospira* を始めとした NOB の分離株の亜硝酸酸化速度、倍加時間、収率といった亜硝酸酸化における詳細な動態パラメーターが報告された²⁸⁾。しかしながら、NOB の生理学的性質の知見は未だ少なく、更なる生理学的知見、動態パラメーターが求められている。

第2章では、当研究室で分離培養に成功した *Nitrospira sp.* ND1 株および *Nitrospira japonica* NJ1 株を対象に、NOB の重要な動態パラメーターである亜硝酸酸化活性における亜硝酸および酸素の見かけの親和性、倍加時間、および生理学的性質としてアンモニアに対する感受性を評価した。

2.2. 実験方法

2.2.1. 分離株

本章では以前に当研究室で獲得された *Nitrospira* sp. ND1 株と *Nitrospira japonica* NJ1 を調査対象とした^{30,31)}。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析では、ND1 株は lineage I に属しており、NJ1 株は lineage II に属している。また、2 株の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的相同性は 92.7%であり、系統学的に非常に離れている。

2.2.2. 培養条件

活性試験に用いた無機培地の組成は KH_2PO_4 (38.2 mg l⁻¹)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (61.1 mg l⁻¹)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10.0 mg l⁻¹)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5.00 mg l⁻¹)、 NaHCO_3 (200 mg l⁻¹)、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (54.2 μg l⁻¹)、 H_3BO_3 (49.4 μg l⁻¹)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (43.1 μg l⁻¹)、 $\text{Na}_2\text{Mo}_4\text{O}_4$ (27.6 μg l⁻¹)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (25.0 μg l⁻¹)とした。また、その他の培養条件は温度 29°C、pH7.8~8.0、暗室、振とう 100 rpm とした。

2.2.3. 動態パラメーター

2.1 の序論で記述したように、微生物の動態パラメーターとして基質消費速度 V 、比増殖速度 μ 、収率 Y が知られている (図 2.1)。しかし、図 2.1 に示したような動態パラメーターは大腸菌のように増殖速度が非常に速い微生物をモデルにしているため、*Nitrospira* の動態モデルとして適切ではない点が多い。大腸菌のような従属栄養細菌は基質濃度の増加に伴い、比増殖速度が増加する Monod 式に当てはめることができるが、*Nitrospira* は高濃度基質から阻害を受けるため Monod 式に当てはめることが困難である。また、倍加時間も数日であるため、消費速度 V は収率 Y 、比増殖速度 μ から求めるのではなく、消費速度を測定すべきである。既往研究²⁸⁾を参考にし、本研究では *Nitrospira* の菌体を一つの酵素と考え、*Nitrospira* の動態モデルを新たに仮定した (図 2.2)。大腸菌とは異なり、*Nitrospira* の動

態モデルでは亜硝酸および酸素の消費速度にミカエリスメンテン式を適用している(図 2.2)。本モデルで仮定した動態モデルの亜硝酸および酸素に対する親和性(半飽和定数)は、細菌から亜硝酸酸化還元酵素を精製していないため、見かけの半飽和定数 K'_m とした。

2.2.4. 亜硝酸半飽和定数

分離株の見かけの亜硝酸に対する親和性を調べるためには分離株の亜硝酸酸化活性を高める必要があり、ND1 株および NJ1 株を亜硝酸濃度 20 mg-N l⁻¹、全量 100 ml に調製した無機培地で培養し、定期的に亜硝酸濃度をモニタリングした。亜硝酸が完全に枯渇後 12-48 時間以内(early-stationary phase)の分離株を使用することで、分離株の亜硝酸酸化活性を考慮した実験を行った。*Nitrospira* は菌体密度が非常に低いため、50 ml の early-stationary phase の分離株を 0.2 μm のフィルターでトラップし、5 ml の培地で回収することで濃縮した。濃縮した分離株中の亜硝酸濃度を約 5 mg-N l⁻¹ に調製し、経時的にサンプリングを行った。サンプリング間隔は当初 10 分間隔で行ったが、残留亜硝酸濃度が 2 mg-N l⁻¹ を下回った段階で、5 分、2.5 分と細かい間隔でサンプリングを行った。残留亜硝酸濃度は Griess 試薬を利用して判断した。また、試験サンプルの全容量が 5 ml と少ないことから、サンプルのロスを避けるためフィルター処理による滅菌ではなく、95°C で 20 分間処理することで、分離株の亜硝酸酸化活性を停止させた。亜硝酸濃度が枯渇するまで実験を行い、Griess 試薬を利用した比色分析により亜硝酸濃度変化を測定した⁴¹⁾。その後、下記のミカエリスメンテン式に基づいて、最小二乗法により最も近似な見かけの半飽和定数 K'_m を算出した。

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K'_m + [S]}$$

2.2.5. 酸素半飽和定数

分離株の酸素に対する見かけの親和性を調べるために東京農工大学にある酸素測

定用の微小電極システム(Unisense AS 社)を使用した。微小電極システムは酸素センサーのアンブ(OXY-Meter)、クラーク型の酸素微小電極(OX-MR)、攪拌システム用のガラスコートされた磁石、2 ml のガラスチャンバーと栓、ラック、データ入手ソフトウェア Mic Ox 3.0 から構成されており、この実験では、室温制御された部屋で恒温槽を用いて 200 rpm で攪拌させながら行った。また、2.2.4 の亜硝酸半飽和定数の実験と同じように活性の高い分離株を濃縮して試験に用いた。濃縮した菌体懸濁液を 2 ml のガラスチャンバーに移し、蓋をして即座に恒温槽に入れた。その後、酸素センサーをチャンバーの微小孔に挿入し、センサーからのシグナルが安定するように 30 分間待機した。つづいて、チャンバーの 2 つ目の微小孔からシリンジを挿入し、亜硝酸濃度が 20 mg-N l^{-1} となるように 1 g-N l^{-1} 亜硝酸を $40 \text{ }\mu\text{l}$ 添加した。得られた酸素濃度曲線からデータ入手ソフトウェアである Sigma plot13.0 (Systat Software GmbH 社) を用いて酸素濃度に対する酸素取込み率をプロットし、2.2.4 の亜硝酸半飽和定数の実験と同様にミカエリスメンテン式に基づいて、最小二乗法により最も近似な見かけの半飽和定数を算出した。

2.2.6. 定量 PCR による細菌数変化のモニタリング

ND1 株と NJ1 株はどちらも非常に強固なマイクロコロニーを形成しており、超音波処理でもマイクロコロニーを崩すことができない。また、*Nitrospira* は非常に密に凝集しているため観察による細菌数測定も困難である。そこで、試験サンプルから抽出した DNA 中の *Nitrospira* の *nxB* 遺伝子のコピー数を定量 PCR により測定することで、細菌数変化をモニタリングした。*NxB* 遺伝子は ND1 株のゲノム上に 1 コピー、NJ1 株のゲノム上に 3 コピー存在することを考慮して細菌数を算出した。また、*nxB* 遺伝子は生育に必要な不可欠な遺伝子であるため突然変異で欠落する可能性は非常に低い。定量 PCR には KOD SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社)、Applied Biosystems® StepOne™ (Thermo Fisher Scientific 社)、表 2.1 のプライマーセットを使用した。また、分離株から *nxB* 遺伝子を

PCR で増幅し、PCR 産物を用いて検量線を作成した。

2.2.7. 亜硝酸態窒素濃度の測定

亜硝酸態窒素濃度は Griess 試薬を利用した比色分析により測定した⁴¹⁾。また、測定する前に容量が 1 ml 確保できるサンプルに関しては、孔径サイズが 0.2 μm のメンブレンフィルター (Advantec 社) で滅菌した。

2.2.8. アンモニアに対する感受性

ND1 株と NJ1 株のアンモニアに対する感受性を調べるために、各アンモニア濃度における亜硝酸酸化活性を調べた。50 ml 試験管に、分離株 8 ml、調整用無機培地を 2 ml 加え、全量を 10 ml に保ちながら亜硝酸濃度を 20 mg-N l^{-1} 、アンモニア濃度を 0、10、25、50、100 mg-N l^{-1} に調製した。29°C に設定したインキュベーターで 3 日間振とう培養 (150 rpm) を行い、初日と 3 日後に 1 ml サンプルングを行った。3 日間の亜硝酸濃度の変化を測定し、各アンモニア濃度における亜硝酸酸化活性を比較した。

2.3. 結果

2.3.1. 亜硝酸に対する親和性

ND1 株、NJ1 株の亜硝酸に対する見かけの半飽和定数をミカエリスメンテン式に従い、亜硝酸濃度と亜硝酸消費速度から計算した（図 2.3）。3 回行った測定試験を平均すると、ND1 株の亜硝酸に対する見かけの半飽和定数 $6.91\mu\text{M}$ であり、NJ1 株の亜硝酸に対する見かけの半飽和定数は $7.81\mu\text{M}$ であった（表 2.2）。

2.3.2. 酸素に対する親和性

ND1 株および NJ1 株の酸素に対する見かけの半飽和定数をミカエリスメンテン式に従い、酸素濃度と酸素消費速度から計算した（図 2.4）。ND1 株の酸素に対する見かけの半飽和定数は $4.31\mu\text{M}$ であり、NJ1 株の酸素に対する見かけの半飽和定数は $4.28\mu\text{M}$ であった。

2.3.3. 倍加時間

活性試験を行った結果、ND1 株および NJ1 株は 9 日間で約 1 mM の亜硝酸を消費した（図 2.6）。0 日目と 9 日目の細菌数を比較すると、サンプル 1 ml 中から検出される *nxB* 遺伝子のコピー数が増加しており、両株とも亜硝酸を消費し、増殖したことがわかる。興味深いことに、ND1 株と NJ1 株の増殖には違いがみられた。ND1 株は培養初期ではほとんど増殖しない誘導期が存在し、培養後期で急激に増殖するのに対し、NJ1 株は一定間隔で増殖した（図 2.7）。NJ1 株は一定間隔で増殖したため、指数関数で近似することができ、近似式から倍加時間を算出した結果、NJ1 株の倍加時間は 39 時間であった（表 2.3）。一方、ND1 株の倍加時間を急激に細菌数が増加した 8-9 日で算出した結果、14 時間であった（表 2.3）。また、0 日目と 9 日目の細菌数変化から全体の倍加時間を算出すると 74 時間であった（表 2.3）。

2.3.4. アンモニアに対する感受性

両株のアンモニアに対する感受性を調べた結果、ND1 株はアンモニア 10 mg-N l⁻¹ 以上含有している場合、コントロール（アンモニア 0 mg-N l⁻¹）に対して亜硝酸酸化活性が大幅に減少した（図 2.7）。それに対し、NJ1 株はアンモニア 10, 25 mg-N l⁻¹ 含有している場合でも亜硝酸酸化活性は減少せず、アンモニア 50 mg-N l⁻¹ 以上含有している場合において亜硝酸酸化活性が減少した。この結果から、NJ1 株は ND1 株よりもアンモニアに対して耐性があることが示唆される。

2.4. 考察

2.4.1. 亜硝酸に対する親和性

2.3.1において、ND1株とNJ1株の亜硝酸酸化における見かけの半飽和定数（亜硝酸に対する親和性）を算出した結果、 $6.91\mu\text{M}$ と $7.81\mu\text{M}$ であり、排水処理場から獲得されている*Nitrospira defluvii*の見かけの半飽和定数の値と非常に近いことから、今回算出した値は妥当だと思われる（表2.2）。また、今回算出したND1株とNJ1株の亜硝酸の見かけの半飽和定数は、既往研究で報告されている既知のNOBの見かけの半飽和定数よりも低い値であった。排水処理場の活性汚泥では亜硝酸濃度は検出できないほど非常に低いため、ND1株とNJ1株を代表とする*Nitrospira* lineage Iとlineage IIが活性汚泥で優占的なNOBとして生息することが可能であったのは、亜硝酸に対し非常に高い親和性を持つためだと思われる。

興味深いことに、亜硝酸に対する見かけの半飽和定数ではND1株とNJ1株では顕著な違いは確認できなかった（図2.3）。既往研究において、代表的なNOBである*Nitrobacter*と*Nitrospira*の競合関係はK-/r-仮説に基づいていると考えられており、K-戦略者である*Nitrospira*はr-戦略者である*Nitrobacter*よりも亜硝酸に対する見かけの半飽和定数が一桁以上高いことが明らかになっている²⁸⁾（表2.2）。既往研究において、*Nitrospira* lineage Iとlineage IIの間にも亜硝酸に対する親和性に基づく生態学的ニッチが形成されていることが示唆されていたが³⁸⁾、本研究で対象にしているND1株とNJ1株の生態学ニッチには亜硝酸に対する親和性は関与していないと思われる。

2.4.2. 酸素に対する親和性

2.3.2において、ND1株とNJ1株の亜硝酸酸化における酸素の見かけの半飽和定数（酸素に対する親和性）を算出した結果、 $4.31\mu\text{M}$ と $4.28\mu\text{M}$ であった（図2.4）。既往研究において、*Nitrospira*の酸素に対する親和性についての報告がないため、*Nitrobacter*の

酸素に対する見かけの半飽和定数と比較した。*Nitrobacter* の酸素に対する見かけの半飽和定数は 25-135.3 μ M と報告されているため⁴²⁾、ND1 株と NJ1 株の酸素に対する親和性は非常に低いことがわかる。そのため、*Nitrospira* は酸素に対する親和性においても、*Nitrobacter* と K-r-仮説に基づく競合関係にあると考えられる。一方で、ND1 株と NJ1 株の酸素に対する見かけの半飽和定数に顕著な違いは確認できなかった。既往研究において、溶存酸素濃度がバイオリアクター中の *Nitrospira* lineage I と lineage II の生態学的ニッチを形成させていることが報告されているが³⁹⁾、本研究で対象にしている ND1 株と NJ1 株の生態学ニッチには酸素に対する親和性は関与していないと考えられる。

興味深いことに亜硝酸酸化における両株の酸素に対する見かけの半飽和定数は、亜硝酸に対する見かけの半飽和定数と近い値を示していた。既往研究において、*Nitrobacter hamburgensis* の酸素に対する見かけの半飽和定数は、亜硝酸に対する見かけの半飽和定数よりも一桁以上高い値を示すことが報告されている⁴²⁾。*Nitrobacter* の亜硝酸および酸素に対する親和性が顕著に異なるのに対し、*Nitrospira* では両者の親和性が近い値を示すのは、亜硝酸酸化反応を触媒する亜硝酸酸化還元酵素 (Nitrite-oxidoreductase : NXR) の活性部位の細胞膜上における配置が関係していると考えられる。既往研究において、NXR は α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットから構成されており、 α サブユニットが活性部位であり、 γ サブユニットがアンカータンパク質として NXR を細胞膜に固定していると報告されている⁴³⁾。*Nitrobacter* に関しては α 、 β サブユニットが細胞質内に存在し、 γ サブユニットによって固定されているのに対し、*Nitrospira* に関しては α 、 β サブユニットはペリプラズム空間に存在し、サブユニットによって固定されている (図 2.5)。*Nitrobacter* は NXR の活性部位が細胞質側にあるため、亜硝酸トランスポーターなどによって亜硝酸を細胞内に取り込む必要がある。一方、*Nitrospira* は NXR の活性部位がペリプラズム空間側にあるため、亜硝酸を細胞内に取り込む必要がない。そのため、*Nitrospira* の亜硝酸に対する親和性は *Nitrobacter* よりも高いと考えられている⁴³⁾。しかし、酸素は

細胞膜を通過するため、トランスポーターを必要としない。そのため、*Nitrobacter* の酸素に対する見かけの半飽和定数は、亜硝酸に対する見かけの半飽和定数よりも一桁以上低い値を示すのだと考えられる。以上を踏まえると、ND1 株と NJ1 株の酸素の見かけの半飽和定数が亜硝酸の見かけの半飽和定数と近い値であることは、*Nitrospira* の NXR の活性部位がペリプラズム空間側に存在するという既往研究の仮説を支持するものである。

2.4.3. 倍加時間

2.3.3 において、ND1 株と NJ1 株の倍加時間を算出した結果、14 時間と 39 時間であった。NJ1 株は既往研究で報告されている *Nitrospira* の倍加時間と近いため、今回算出した値は妥当だと思われる（表 2.3）。一方、ND1 株は培養初期に誘導期が存在することがわかった。既往研究においても、排水処理場から分離培養された *Nitrospira lenta* は高濃度亜硝酸から強い阻害を受けるため、培養を開始した初期段階で増殖が遅くなる誘導期が存在することが報告されている²⁹⁾。倍加時間を比較すると、ND1 株は NJ1 株よりも早い倍加時間を持つため、ND1 株の方が有利であると考えられる。しかし、誘導期の存在を踏まえると、一概に ND1 株の方が有利であるとは言えない。また、全体の細菌数変化を比較すると ND1 株と NJ1 株に顕著な違いは見られない。したがって、倍加時間で ND1 株と NJ1 株の生態学的ニッチを説明することは困難である。

2.4.4. アンモニアに対する感受性

2.3.4 において、ND1 株と NJ1 株のアンモニアに対する感受性を測定した結果、両株のアンモニアに対する感受性が顕著に異なることが明らかになった（図 2.7）。既往研究¹⁷⁾において、活性汚泥における 2 系統の *Nitrospira* の細菌叢、流入アンモニア濃度、流出アンモニア濃度の解析結果が報告されている（表 2.4）。各活性汚泥における *Nitrospira* の細菌叢は①lineage I のみが検出、②lineage II のみが検出、③lineage I と lineage II が検出

といった3つの条件が存在した(表2.4)。しかしながら、lineage IIのみが検出される活性汚泥のデータが1つしかなく、流入アンモニア濃度が測定されていないため、②の条件は考察から除外した。①と③の条件における各活性汚泥の流入アンモニア濃度を比較すると、①の条件の流入アンモニア濃度は6.5-28 mg-N l⁻¹であるのに対し、③の条件の流入アンモニア濃度は42.5-754.4 mg-N l⁻¹であった。つまり、lineage Iのみが検出される活性汚泥の流入アンモニア濃度は、lineage Iとlineage IIの両方が検出される活性汚泥の流入アンモニア濃度よりも低い傾向にあることが示唆される。この知見は、本研究で明らかになった「NJ1株(lineage II)の方がND1株よりも(lineage I)アンモニアに対する耐性が高い」という結果とも一致している。したがって、本研究で明らかになった2系統の*Nitrospira*のアンモニアに対する感受性の違いは、活性汚泥における2系統の*Nitrospira*の生態学的ニッチに反映されていると考えられる。

また、既往研究において*Nitrobacter winogradskyi*は250 mg-N l⁻¹以上のアンモニアが培地中に含有していても亜硝酸酸化活性、増殖活性が阻害されなかったことが報告されている⁴⁴⁾。そのため、環境中にアンモニアが豊富に存在する場合、*Nitrospira*よりも*Nitrobacter*が優占的に生息すると考えられる。しかし、活性汚泥中においてはアンモニア濃度が変動するが、亜硝酸濃度が非常に低いと考えられるため、亜硝酸に対する親和性が高い*Nitrospira*が優占的なNOBとして検出されていると考えられる。

2.5. 結言

2.5.1. 2系統の分離株による比較

第2章において、ND1株とNJ1株の亜硝酸酸化における見かけの半飽和定数および倍加時間といった動態パラメーターを算出し、アンモニアに対する感受性を評価した。まず、動態パラメーターを2つの分離株で比較すると顕著な違いは見られず、両株は亜硝酸酸化および増殖に関して同様な動態を示すと考えられる。既往研究において、NOBが基質として利用する亜硝酸や酸素に対する親和性および感受性が*Nitrospira*の棲み分けに関与していることは報告されていたが^{25, 28, 38, 39}、本研究室で分離された2系統の*Nitrospira*の間の棲み分けには関与していないと考えられる。しかしながら、2系統の分離株間でアンモニアに対する感受性が顕著に異なっていることが明らかとなった。そのため、この2系統の*Nitrospira*の間では、アンモニアに対する感受性によって生態学的ニッチが形成されていると考えられる。活性汚泥中には多様な*Nitrospira*が生息しているため、2系統の*Nitrospira*群が一様にアンモニアに対する感受性によって生態学的ニッチを形成するわけではない。しかし、アンモニアに対する感受性が*Nitrospira*の生態学的ニッチ形成要因の一つである点を明らかにしたことは微生物生態学的に重要な知見であると言える。

2.5.2. NOBにおける2つの*Nitrospira*分離株の位置づけ

本章で算出した2つの*Nitrospira*の亜硝酸に対する見かけの半飽和定数は*Nitrobacter*属や*Nitrotoga*属といった異なる系統のNOBよりも非常に低く、酸素に対する見かけの半飽和定数の値も*Nitrobacter*属よりも非常に低かった。一方、倍加時間は*Nitrotoga*属よりも非常に遅いことがわかった。そのため、獲得した分離株も既往研究と同じように*Nitrobacter*とはK-/r-仮説に基づく共存関係にあると考えられる(1.1.3.参照)³⁶。また、今回明らかにした動態パラメーターは既往研究で報告されている*Nitrospira*の

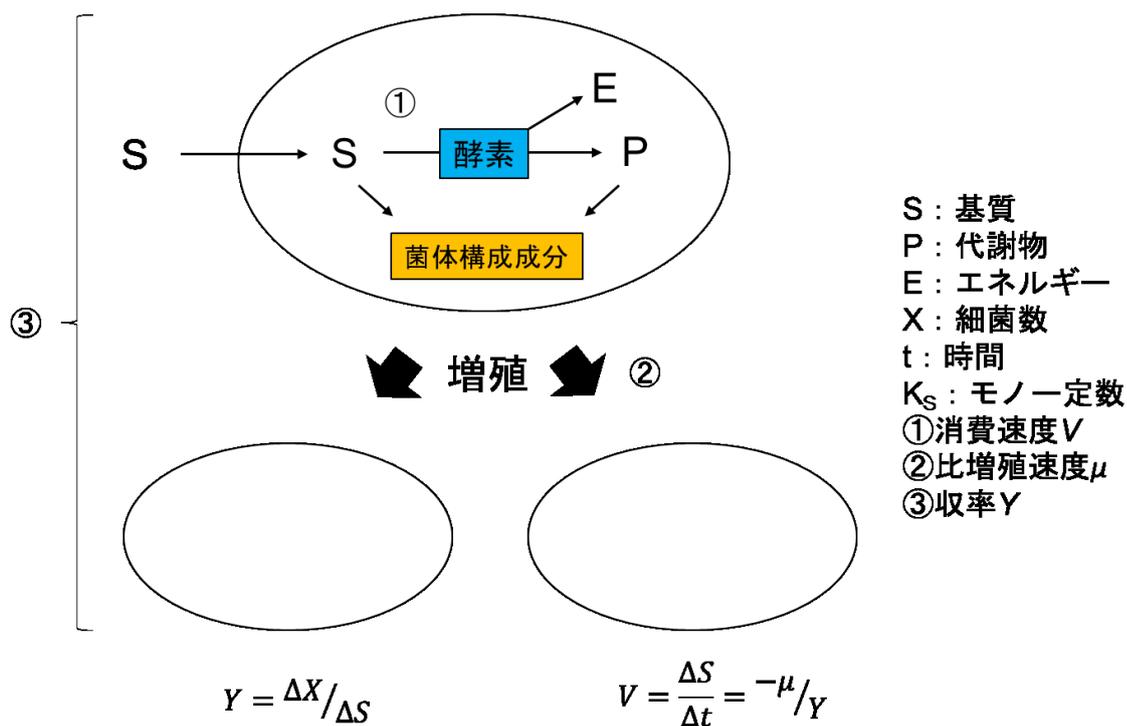
動態パラメーターと近い値であるため、基質に対する見かけの親和性や増殖速度といった NOB の主要な動態パラメーターは *Nitrospira* の分離株間で顕著な違いは存在しないことが示唆された²⁸⁾。そのため、本研究室で獲得した ND1 株と NJ1 株は、NOB 研究における代表株として使用されることが今後期待される。

2.5.3. 活性汚泥における NOB の適応および共存

ND1 株と NJ1 株は排水処理場の活性汚泥から獲得されていることを踏まえ、それらの生理学的性質と活性汚泥中における生態との関係を考察する。まず、亜硝酸に対する親和性は両株とも非常に高く、亜硝酸濃度が非常に低い活性汚泥に適応していると考えられる。また、*Nitrospira* は酸素濃度が非常に低い、活性汚泥中のバイオフィーム中からも検出されており、酸素に対する親和性が高い両株は活性汚泥に適応していると考えられる。さらに、活性汚泥中では流入排水中のアンモニア濃度やアンモニア酸化細菌の活性によって、アンモニア濃度が変動している。そのため、アンモニアに対する感受性の違いによって、ND1 株と NJ1 株の活性汚泥中における存在率が変動する可能性を示している。既往研究において、亜硝酸酸化によってエネルギーを獲得する NOB にとって、アンモニアは基質ではないため重要視されていなかった。しかし近年報告された、尿素やシアン酸分解による AOB と NOB による相利共生^{45, 46)}やアンモニア酸化を行う NOB (COMAMMOX 細菌)の発見^{47, 48)}を踏まえると、環境中のアンモニア濃度は AOB、NOB、COMAMMOX 細菌といった硝化細菌間の共生や競合において重要な制限因子になっていることが推測される。

表 2.1 定量 PCR に使用したプライマー

プライマー	塩基配列	参考文献
169f	TACATGTGGTGGAACA	Pester et al., 2014 ²⁴⁾
638r	CGGTTCTGGTCRATCA	



$$\mu = \frac{\text{Ln}\Delta X}{\Delta t} = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

図 2.1 微生物の動態モデル

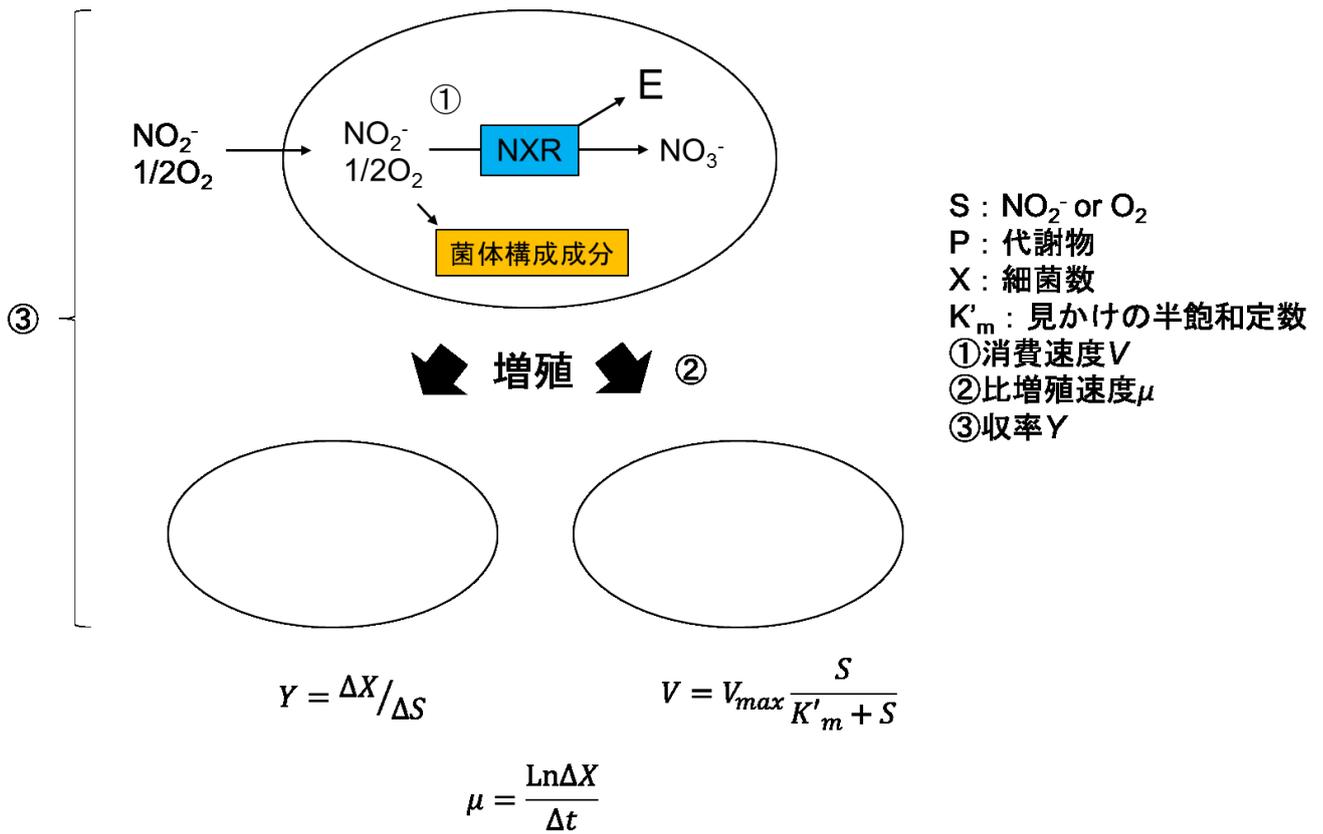


図 2.2 NOB の動態モデル

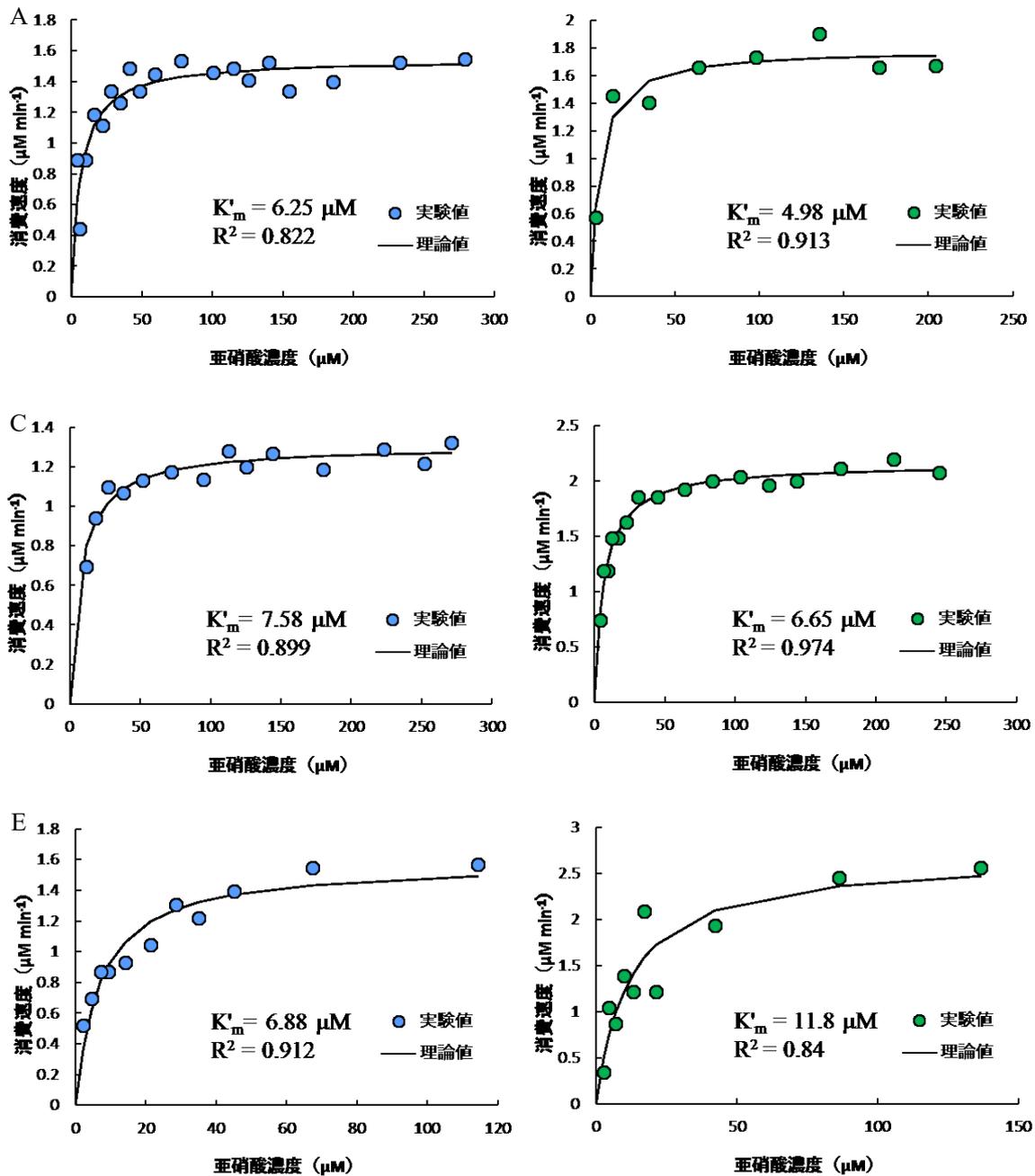


図 2.3 *Nitrospira* 分離株の亜硝酸に対する半飽和定数の測定結果

A、C、E : ND1 株

B、D、F : NJ1 株

表 2.2 既往研究と本研究で算出した半飽和定数

(参考文献 49 の表より転載)

菌株 (最適温度 [°C])	見かけの 半飽和定数 (μM)	参考文献 ^{28, 49)}
<i>Nitrobacter vulgaris</i> ^a (28)	49 ± 11	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> ^a (28)	544 ± 55	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ^a (28)	309 ± 92	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrospira defluvii</i> ^a (28)	9 ± 3	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrospira</i> sp. ND1 株 ^a (29)	6.91 ± 0.66	In this study
<i>Nitrospira japonica</i> NJ1 株 ^a (29)	7.81 ± 3.55	In this study
<i>Nitrospira moscoviensis</i> ^a (37)	9 ± 3	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrospira lenta</i> ^a (28)	27 ± 11	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrotoga arctica</i> ^b (17)	58 ± 28	Nowka <i>et al.</i> , (2015)

^a 分離株

^b 集積株

±は biological triplicate を示す。

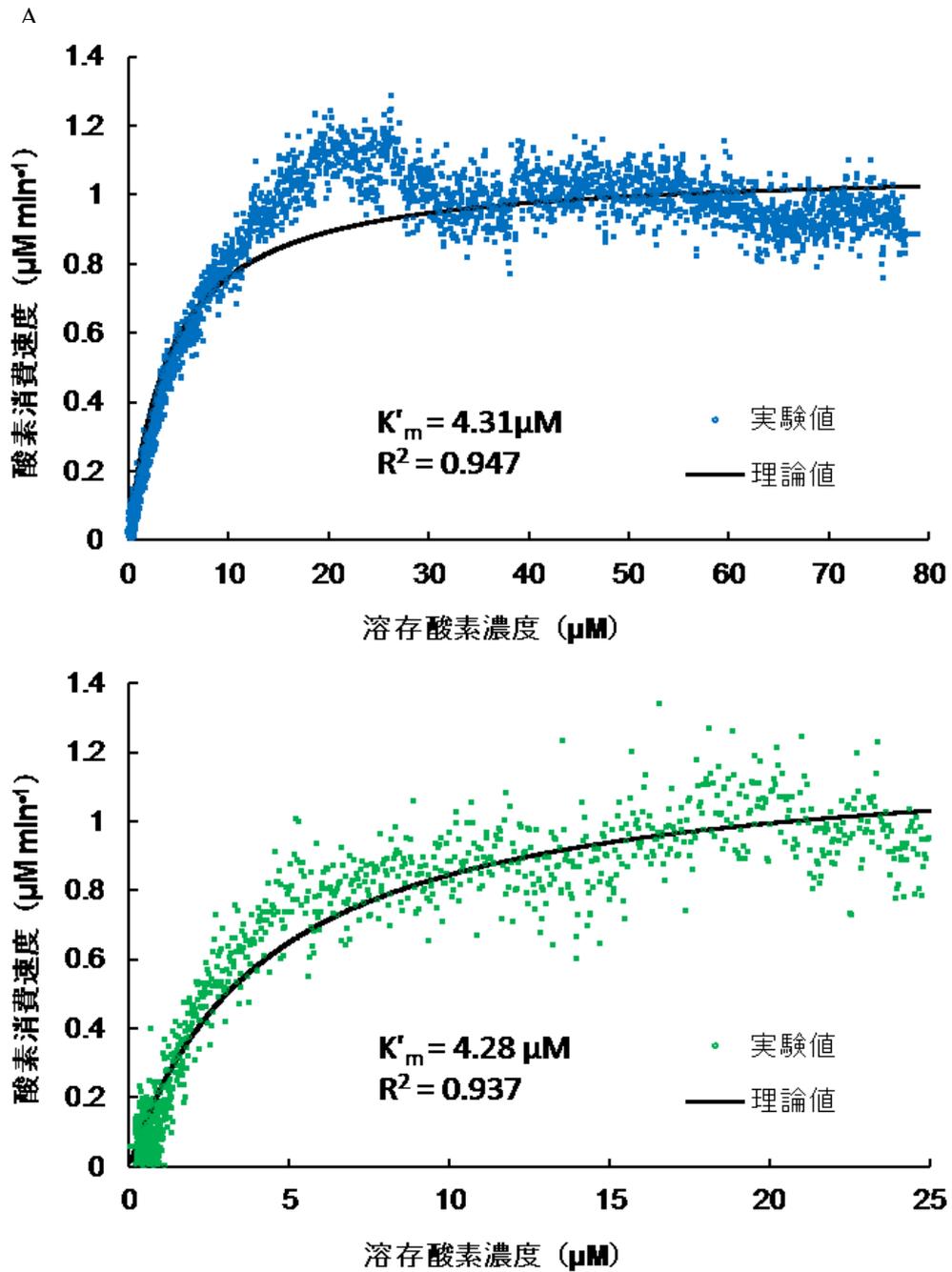
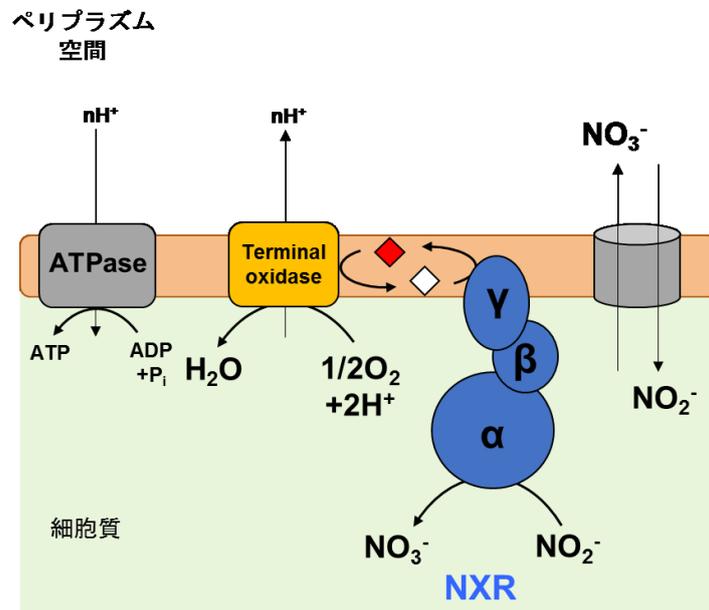


図 2.4 *Nitrospira* 分離株の酸素に対する半飽和定数の測定結果

(参考文献 49 の図より転載)

A : ND1 株 B : NJ1 株

Nitrobacter



Nitrospira

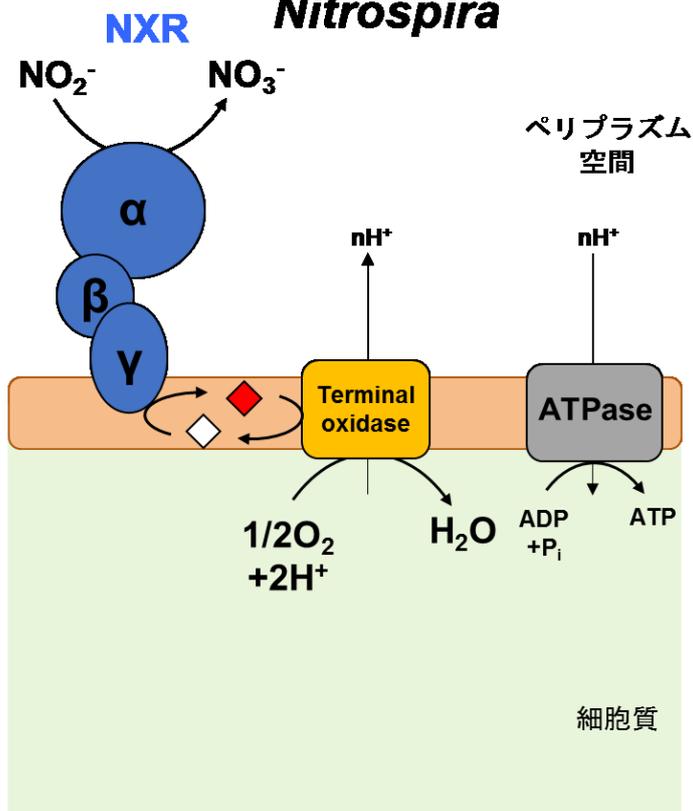


図 2.5 *Nitrobacter* と *Nitrospira* における NXR の活性部位の向き (参考文献 43)

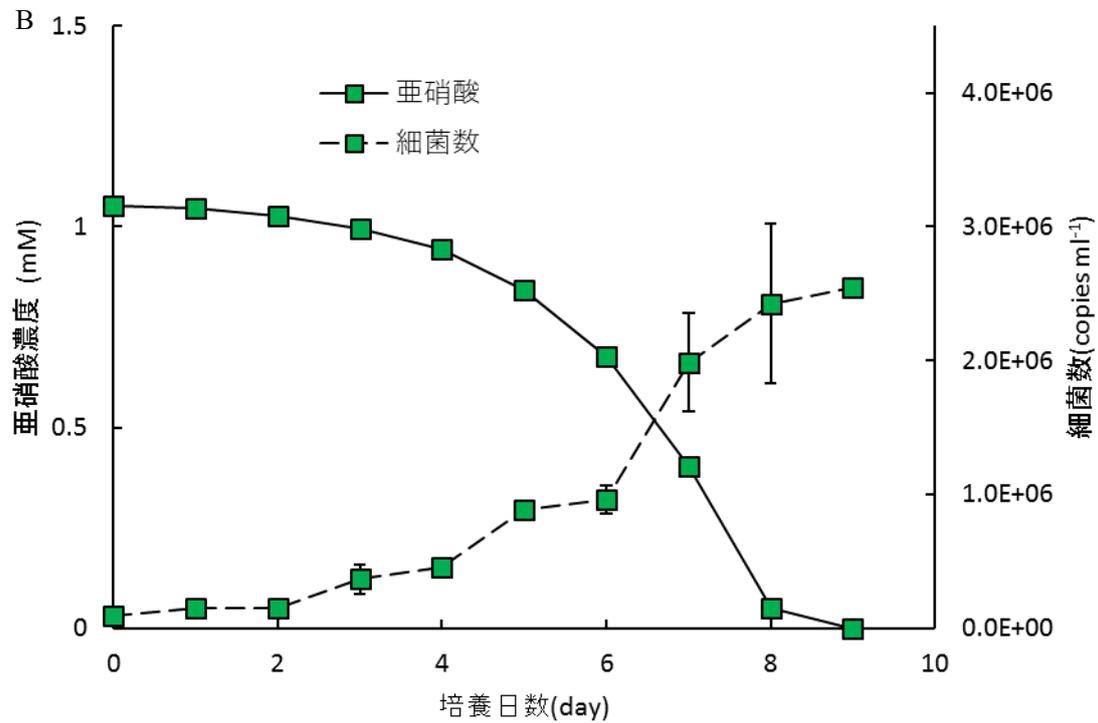
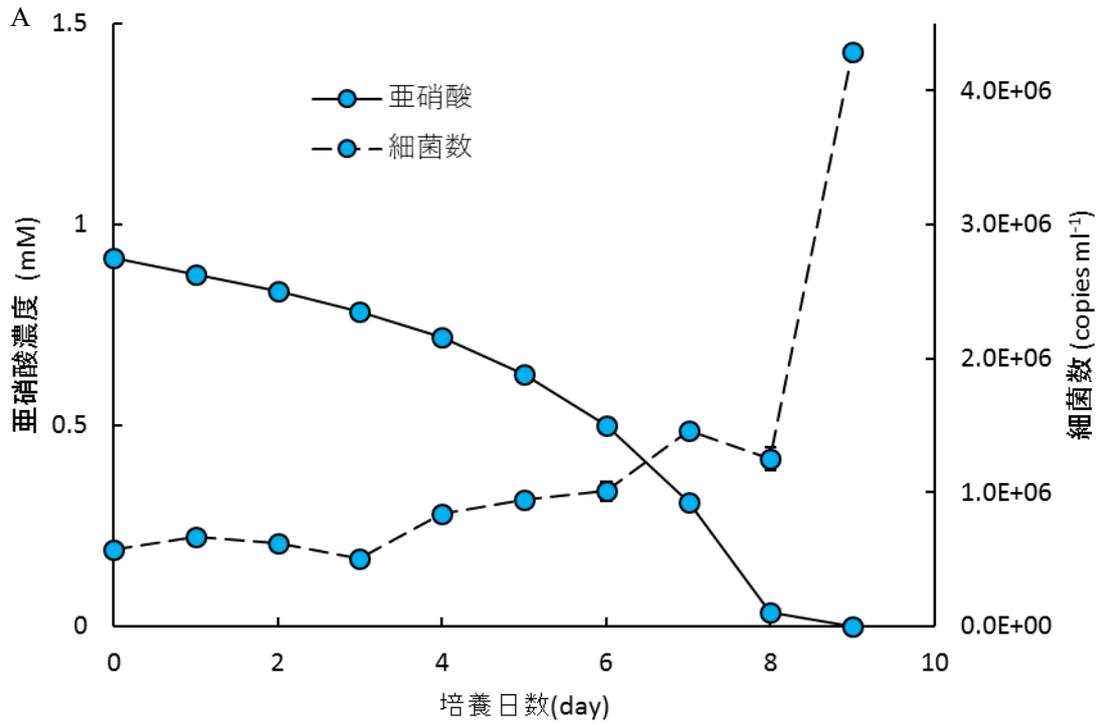


図 2.6 活性試験における亜硝酸濃度、細菌数変化 (参考文献 49 の図より転載)

A : ND1 株 B : NJ1 株

Error bar は technical triplicate を示す。

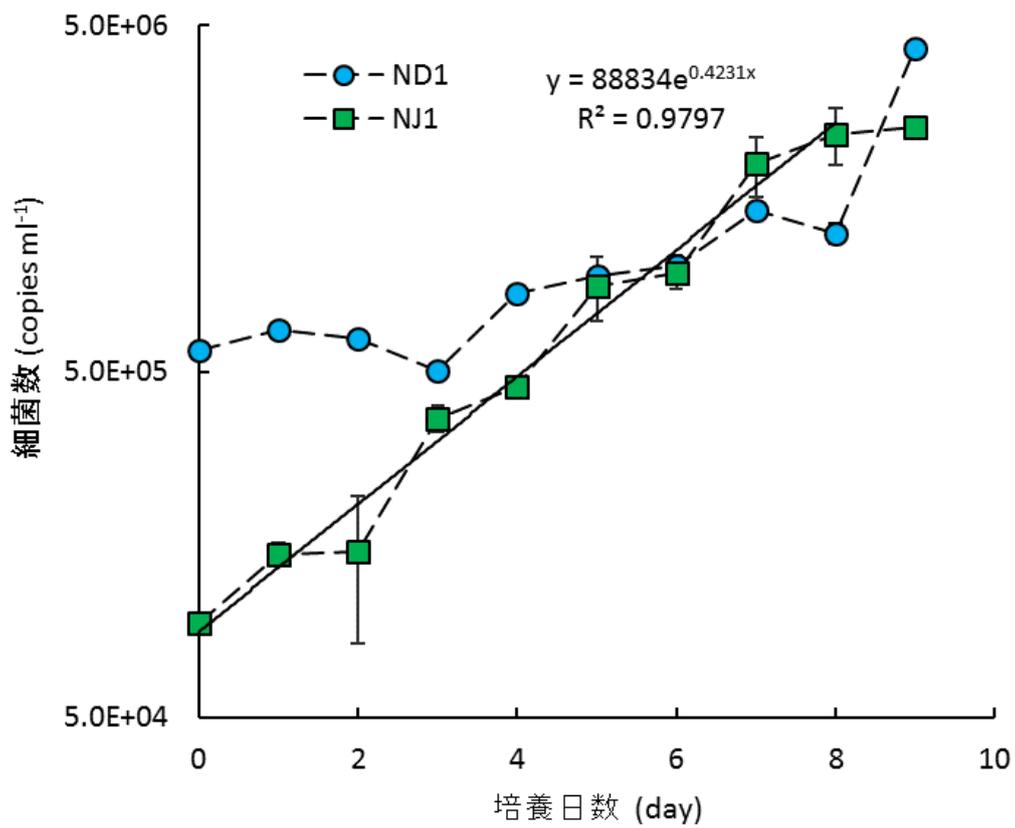


図 2.7 活性試験における細菌数変化 (参考文献 49 の図より転載)

Error bar は technical triplicate を示す。

表 2.3 既往研究と本研究で算出した半飽和定数

(参考文献 49 の表より転載)

菌株 (最適温度 [°C])	倍加時間 (h)	参考文献 ^{28, 49)}
<i>Nitrobacter vulgaris</i> ^a (28)	13	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> ^a (28)	43	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ^a (28)	26	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrospira defluvii</i> ^a (28)	37	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrospira</i> sp. ND1 株 ^a (29)	14(74)	In this study
<i>Nitrospira japonica</i> NJ1 株 ^a (29)	39	In this study
<i>Nitrospira moscoviensis</i> ^a (37)	32	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrospira lenta</i> ^a (28)	37	Nowka <i>et al.</i> , (2015)
<i>Nitrotoga arctica</i> ^b (17)	44	Nowka <i>et al.</i> , (2015)

^a分離株

^b集積株

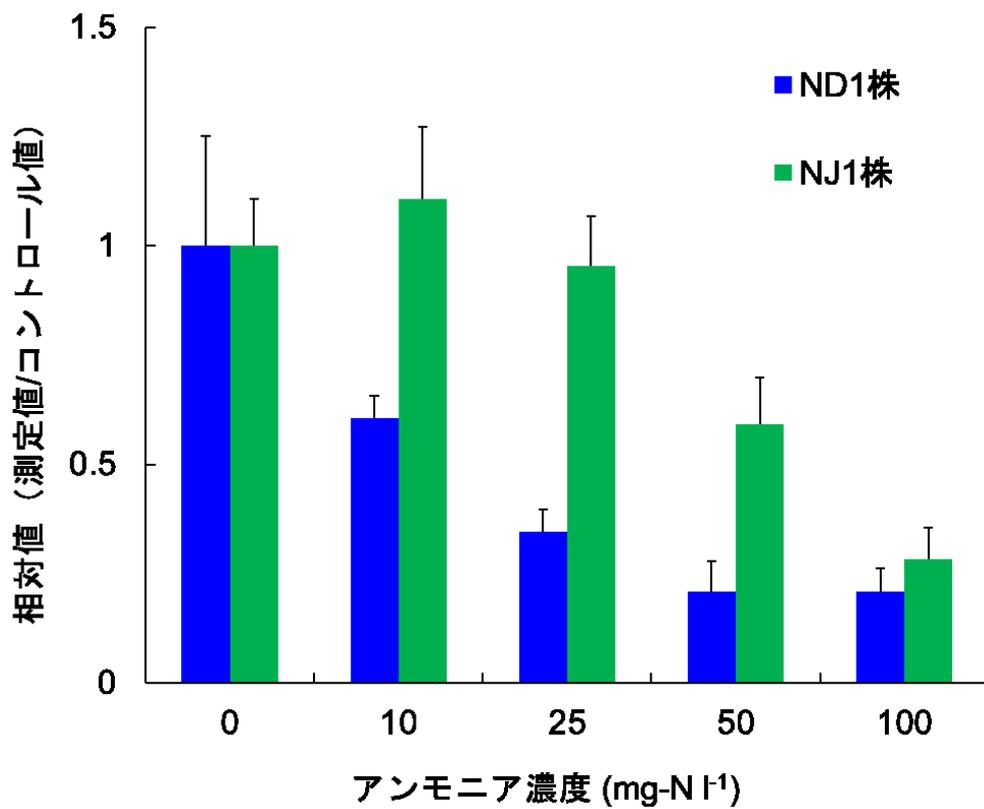


図 2.8 ND1 株と NJ1 株のアンモニアに対する感受性 (参考文献 49 の図より転載)

Error bar は technical triplicate を示す。

表 2.4 活性汚泥におけるアンモニア濃度と *Nitrospira* の細菌叢 (参考文献 17)

<i>Nitrospira</i> の存在	流入アンモニア濃度 (mg-N l ⁻¹)	流出アンモニア濃度 (mg-N l ⁻¹)
lineage I, lineage II	42.5	7.1
lineage II	未測定	0.1
lineage I	28.0	0.4
lineage I, lineage II	未測定	0.3
lineage I, lineage II	43.6	9.6
lineage I, lineage II	52.9	0.1
lineage I, lineage II	665.8	0.2
lineage I, lineage II	309.2	27.5
lineage I	15.6	0.8
lineage I, lineage II	544.4	0.8 以下
lineage I, lineage II	350.0	0.8 以下
lineage I, lineage II	583.3	0.8
lineage I	未測定	0.0
lineage I, lineage II	754.4	未測定
lineage I	6.5	1.2
lineage I	18.7	0.2 以下
lineage I	14.4	0.1 以下
lineage I, lineage II	未測定	0.0

第3章 2 系統の *Nitrospira* の比較ゲノム解析

3.1. 序論

近年、次世代シーケンサーの普及に伴い *Nitrospira* 属に属する微生物のゲノム解析が報告され、これまでの硝化細菌の常識を覆されつつある。最初に報告されたのが lineage I に属している *Candidatus Nitrospira defluvii* のゲノム解析である⁴³⁾。Lücker らはメタゲノムデータから *Ca. Nitrospira defluvii* のゲノム配列を再構築し、各遺伝子を同定した結果、*Nitrospira* が保持する亜硝酸酸化の鍵酵素である亜硝酸酸化還元酵素 (Nitrite-oxidoreductase : NXR) を特定した。驚くべきことに、*Nitrobacter*、*Nitrococcus* といった他の NOB が保持する NXR と *Ca. Nitrospira defluvii* の保持する NXR の系統が非常に異なっていることが判明した。さらに、嫌気性細菌が利用する cytochrome *bd* oxidase を保持すること、炭素固定にカルビンベンソン回路ではなく還元的 TCA 回路を用いること、好気条件下で亜硝酸酸化をするにも関わらず活性酸素に対する防御機構を欠如しているといった従来の NOB とは異なる特徴が明らかになった。以上を踏まえ、Lücker らは光合成細菌から進化したと予測される *Nitrobacter*、*Nitrococcus* とは異なり、*Nitrospira* は嫌気性細菌または微好気性細菌から進化したという新たな NOB の進化史を提唱した。

つづいて、lineage II に属している *Nitrospira moscoviensis* のゲノム解析が Lücker、Daims らオーストリアのグループによって解読され、報告された⁴⁵⁾。驚くべきことに、ゲノム解析の結果から *N. moscoviensis* は亜硝酸酸化に頼らず、水素酸化、ギ酸酸化によっても増殖することが可能であることが示唆され、それらの機能が生理活性試験によって確認された^{45, 50)}。さらに、*N. moscoviensis* のゲノム配列からこれまでに NOB が保持しているとは考えられていなかった尿素分解酵素 Urease が発見され、*Nitrospira* 由来と予測される尿素分解酵素 Urease が環境中に幅広く分布していることが明らかになった⁴⁵⁾。加えて、シアン酸分解酵素も NOB に幅広く保存されていることも報告され⁴⁶⁾、NOB が尿素、

シアン酸からアンモニアを生成し、アンモニア酸化微生物群に基質であるアンモニアを供給しつつ、AOM から亜硝酸を受け取るという一種の相利共生の関係を持つことが明らかになった。

そして、最も驚くべき報告は 2015 年に発表された完全アンモニア酸化 (Complete ammonia oxidation : COMAMMOX) 細菌の存在である^{47, 48)}。これまで亜硝酸のみを酸化すると考えられていた *Nitrospira* の一部がアンモニアを酸化することができる COMAMMOX 細菌であることが明らかになった。また、集積培養された *Candidatus Nitrospira inopinata*、*Candidatus Nitrospira nitrosa*、*Candidatus Nitrospira nitrificans* の 3 株はゲノム中にアンモニア酸化に必要なアンモニアモノオキシゲナーゼ (Ammonia-monooxygenase : AMO) と NXR のコードする両方の遺伝子を保持していることがメタゲノム解析によって明らかになった。この COMAMMOX 細菌の発見により、AOM から供給される亜硝酸をエネルギー源にしていると考えられていた *Nitrospira* の一部は、AOM とアンモニアを奪い合う競合関係にあることが示唆された。

上記のように、これまでは独立栄養性亜硝酸酸化細菌であると考えられていた *Nitrospira* が亜硝酸酸化以外にも幅広い代謝能を保持していることが示唆され、その機能や生態学的役割は亜硝酸酸化細菌に留まらないものになりつつある。また、ゲノム解析は未知なる微生物の進化系譜、性質および代謝を予測する上で非常に強力なツールであるとも言える。本章では、当研究室で活性汚泥からの分離培養に成功した *Nitrospira* sp. ND1 株³¹⁾と *Nitrospira japonica* NJ1 株³⁰⁾のゲノム配列を読み解き、両株の独特の機能および特徴を探索する。

3.2. 実験方法

3.2.1. ゲノム解析に用いた単離株の系統学的特徴

本章でゲノム配列を解読した ND1 株と NJ1 株の系統は、16S rRNA 遺伝子に基づく分類では *Nitrospirae* 門 *Nitrospira* 属に系統分類される^{31, 30)}。*Nitrospira* 属は 6 つの lineage に分類されており^{26, 27)}、その中で ND1 株は lineage I に、NJ1 株は lineage II にそれぞれ属している。ND1 株は活性汚泥から集積、分離培養された lineage I に属する *N. defluvii* と非常に近縁である (DQ059545 ; 99.8%)^{29, 51)}。一方、NJ1 株は lineage II に属する金属バイオフィルムから単離された *N. moscoviensis* (CP011801; 96.1%)²⁰⁾、活性汚泥から分離培養された *Nitrospira lenta* (KF724505; 96.1%)²⁹⁾ と近縁であった。加えて、ND1 株と NJ1 株の 16S rRNA 遺伝子の相同性は 92.7% と非常に低く、系統学的に非常に離れている。

3.2.2. ゲノム配列の再構築

DNA 抽出キットである NucleoSpin® Tissue (TaKaRa 社) を使用して ND1 株と NJ1 株から DNA を抽出した。DNA シーケンス、ゲノム配列の再構築は独立行政法人産業技術総合研究所の関口勇地博士に委託した。

3.2.3. 遺伝子同定

関口博士が再構築した ND1 株と NJ1 株のゲノム配列を Microscope annotation platform⁵²⁾ に統合し、ゲノム中の遺伝子同定および予測を進めた。Microscope annotation platform により CDS を同定後、窒素代謝や炭素代謝といった重要な代謝経路、呼吸鎖、トランスポーターシステム、分泌機構および鞭毛合成などに関わる CDS を機能ごとに表 A.1 に整理した (Appendix 参照)。また、MaGe により unknown function と示された CDS に関しては NCBI の protein blast で相同なアミノ酸配列を検索し、近縁なタンパク質から機能を推測した。

3.2.4. 系統学的解析

各遺伝子がコードするタンパク質の系統学的類似性を調べるために、NCBI の protein blast を使用し、データベース上の近縁なタンパク質のアミノ酸配列を獲得した。獲得したアミノ酸配列と両株中のゲノムに含まれる各遺伝子のアミノ酸配列を、MEGA ver. 6 を用いてアライメントした⁵³⁾。つづいて、遺伝的距離の計算に p-distance モデルを使用し、塩基配列に基づいた系統樹作成に近隣結合法 (Neighbor-Joining : NJ) を用いた。

3.2.5. *Nitrospira* のゲノム配列の比較

既往研究で報告されている *N. defluvii*、*N. moscoviensis*、*Ca. Nitrospira inopinata*、*Ca. Nitrospira nitrification*、*Ca. Nitrospira nitrosa* のゲノム配列、ゲノム配列にコードされているアミノ酸配列、および遺伝子のアノテーション結果を NCBI から獲得した。残念ながら、*Nitrospira lenta* のゲノム配列は公開されていないため獲得することはできなかった。獲得したゲノム配列と ND1 株、NJ1 株のゲノム配列に基づき各 *Nitrospira* 間の Average Nucleotide Identity (ANI) と、アミノ酸配列に基づき各 *Nitrospira* 間の Average amino acid identity (AAI) を計算した。ANI と AAI の計算には Kostas lab のオンラインツールを利用した (<http://enve-omics.ce.gatech.edu>)。ANI のパラメーター設定は、アライメント部分が 70%を含んでおり、相同性が 30%以上、切断する幅は 1000 bp、step size は 200bp とした。AAI のパラメーターは相同性を 30%以上とした。また、各ゲノムに保存されている遺伝子を比較し、*Nitrospira* 間の共通の特徴をまとめた。

3.2.6. 窒素同化に関する遺伝子発現

窒素同化に関わる遺伝子の発現量を調べるために、RNA 抽出キットである QIAGEN®を用いて、ND1 株と NJ1 株の培養サンプルから全 RNA 抽出を行った。窒素源

として亜硝酸のみを含む培養系と、窒素源として亜硝酸とアンモニアを含む培養系では、窒素同化に利用している亜硝酸還元酵素の発現量が変化すると予測したので、両株を亜硝酸のみを含む無機培地、および窒素源としてアンモニアを加えた無機培地を用いて好気条件で培養した。RNA を抽出後、gDNA Eraser を用いてゲノム DNA を除去し、逆転写酵素である Prime Script RT Enzyme を用いて、RNA を cDNA に逆転写した。逆転写した cDNA を Promega 社の Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System キットを用いて精製した。精製した cDNA を Qubit High sensitivity キットを用いて、DNA 濃度を測定した。精製した cDNA を濃度が同じになるように希釈し、表 3.1 のプライマーセットを用いた PCR により遺伝子を増幅した。PCR の反応条件は、95°C 3min、{95°C 30sec、50°C 30sec、72°C 30sec} ×40cycle、72°C 4min、4°C ∞とした。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動で確認した。

3.2.7. 尿素分解活性

ND1 株と NJ1 株の尿素分解活性を調べるために、尿素含有培地におけるアンモニア発生量を調べた。500 ml フラスコに、分離株 50ml、無機培地を 450 ml 加え、尿素を終濃度 1 mM、亜硝酸を終濃度 20 mg-N l⁻¹ になるように添加した。29°C に設定したインキュベーターで数日間振とう培養 (100 rpm) を行い、2 日おきに 1 ml サンプルングした。アンモニア濃度をインドフェノール法⁵⁴⁾により測定し、両株の尿素分解活性を調べた。

3.3. 結果、考察

3.3.1. ゲノムの再構築

獲得されたリードをアセンブリした結果、いくつか Gap 配列は存在するが、ND1 株は 6 つの scaffold に、NJ1 株は 1 つの scaffold に再構築された。また、それぞれのゲノムの全長は 4,456,043 bp と 4,084,817 bp になった。再構築したゲノムの基本的な情報を表 3.2 に示す。つづいて、Microscope annotation platform⁵²⁾を用いて候補遺伝子 (CDS) の同定および予測を行った結果、それぞれの *Nitrospira* のゲノムは 4,602 および 4,151 の CDS を保持していた。Microscope annotation platform によって同定した CDS に基づいた微生物構造および代謝経路の予想図を図 3.1 に示す。

3.3.2. *Nitrospira* のゲノムの系統学的位置づけ

今回ゲノム解析した 2 株と既往研究で報告されている *Nitrospira* のゲノムについて、ANI、AAI、および保有遺伝子の特徴を比較した。*Nitrospira* 属のゲノム情報として、これまでに *N. defluvii*、*N. moscoviensis* の完全ゲノム、*Ca. Nitrospira inopinata*、*Ca. Nitrospira nitrosa*、*Ca. Nitrospira nitrificans* のドラフトゲノム、*N. lenta* のゲノム配列の一部が公開されている。16S rRNA 遺伝子に基づく系統分類では、ND1 株と *N. defluvii* は lineage I に属しており、他の *Nitrospira* はすべて lineage II に属している。ND1 株と *N. defluvii* は 16S rRNA 遺伝子の相同性は 99.8%であったが、両株の ANI は 91.37%であった (表 3.3)。既往研究における“異種”の定義が ANI 相同性 94%以下であるため⁵⁵⁾、ND1 株は *N. defluvii* とは異種であると言える。lineage II に属する 5 株の ANI は 76.04%-78.95%の範囲であり (表 3.3)、*Nitrospira* lineage II の多様性の高さがうかがえる。また、ND1 株と NJ1 株の ANI は 65.2%でありゲノム情報は非常に異なっていることがわかる。したがって、ND1 株のゲノム配列は既往研究で報告されている *N. defluvii* のゲノム配列と非常に近縁であるが、NJ1 株のゲノム配列は既往研究で報告されている *Nitrospira* のゲノム配列とは大きく異なり、

独特かつ新規な機能が期待される。

3.3.3. *Nitrospira* の保有遺伝子の比較

Nitrospira lineage I である ND1 株と *N. defluvii* の AAI は 93.07% であり (表 3.3)、両株のゲノム中ではほとんどの遺伝子が共通していることがわかる。しかしながら、*N. defluvii* とは違い、ND1 株は亜硝酸還元酵素 NrfA と尿素分解酵素である Urease オペロンを保有していることがわかった (図 3.2)。つづいて、*Nitrospira* lineage II 間の AAI を比較すると、*Nitrospira* lineage II 間での AAI は 66.56%-77.61% と非常に低く、lineage II の *Nitrospira* 群が多様な遺伝子をそれぞれ保持していることがわかる (表 3.3)。さらに、NJ1 株と他の *Nitrospira* lineage II の AAI は 66.56%-69.14% と 70% を下回っているが、他の *Nitrospira* lineage II 間での AAI は 70.32%-77.61% と NJ1 株との AAI よりも高い値を示しており (表 3.2)、NJ1 株は lineage II の中でも新規性の高いゲノム配列を持っていると言える。実際にゲノム中に保有されている遺伝子を比較しても、異なる系統の Urease の保持、鞭毛合成と CRISPR-Cas 機構の関連遺伝子の欠損、Quorum-sensing 機構の保持といったように他の *Nitrospira* lineage II には見られない独特の特徴を持っていた (図 3.2)。そこで、*Nitrospira* のゲノム特徴において顕著に違いがみられた点として亜硝酸還元などの窒素代謝、運動性、CRISPR、QS 機構に焦点を当てることにした。

3.3.4. 窒素代謝

3.3.4.1. 亜硝酸還元

NJ1 株と ND1 株は亜硝酸含有無機培地で培養しているため、亜硝酸を窒素源とし、亜硝酸をアンモニアに還元する亜硝酸還元酵素が必要である。NJ1 株は octahaeme cytochrome c 型の亜硝酸還元酵素 (Octahaeme cytochrome c Nitrite Reductase : ONR) をコードする CDS (NSJP_v1_2416) を保持していた (図 3.1、表 A.1)。近年報告された *N.*

moscoviensis のゲノム解析においても、*N. moscoviensis* は ONR によって亜硝酸還元を行っていると予測されている⁴⁵⁾。また、*N. moscoviensis* と同様にこの CDS のすぐ下流にはシトクロム b をコードする遺伝子 (NSJP_v1_2414、NSJP_v1_2415) が存在しており、亜硝酸をアンモニアに還元する際の還元力は電子伝達系のキノールプールから得ていると思われる。

一方、興味深いことに ND1 株は亜硝酸還元酵素遺伝子として、NirA をコードする *nirA* 遺伝子 (NSDF_v1_60559) と NrfAH をコードする *nrfAH* 遺伝子 (NSDF_v1_60626、NSDF_v1_60627) の 2 種類の亜硝酸還元酵素をコードする遺伝子をゲノム中に保持していた (図 3.1 および表 3.3)。NirA は細胞内に存在するフェレドキシンを介する亜硝酸還元酵素であり、植物や微生物の窒素同化に利用されている亜硝酸還元酵素である^{56, 57, 58)}。NrfAH はシトクロム c を介する亜硝酸還元酵素であり、NrfA がペリプラズム空間に存在し、NrfH が細胞膜中に存在する膜結合型酵素である。NrfAH は嫌気呼吸に関わっている亜硝酸還元酵素 (Respiratory nitrite reductase) であり⁵⁹⁾、嫌気呼吸の際にキノールプールからの電子を、電子受容体としての亜硝酸へと伝達し、亜硝酸をアンモニアに還元する。既往研究において、*Ca. Nitrospira defluvii*、*Nitrospira lenta* のゲノム解析では NirA が Nitrogen assimilation に関わっていると報告されており^{45, 43)}、近年発見された Comammox 細菌である *Ca. Nitrospira inopinata* のメタゲノム解析では NrfAH を窒素同化に利用していると予測されている⁴⁷⁾。

3.3.4.2. 窒素代謝関連遺伝子

両株のゲノム配列にコードされている窒素代謝関連遺伝子を比較した結果、NJ1 株の ONR 遺伝子 (NSJP_v1_2416) と ND1 株の *nirA* 遺伝子 (NSDF_v1_60559) の近傍には、GS/GOGAT 回路に関わるグルタミン合成酵素 (NSJP_v1_2406 および NSDF_v1_60563)、アンモニア透過酵素 (NSJP_v1_2403、NSJP_v1_2411、NSJP_v1_2413、および

NSDF_v1_60562)、窒素同化を制御する P-II タンパク質 (NSJP_v1_2404 および NSDF_v1_60565) といった窒素同化に関わる遺伝子群が存在していることがわかった (図 3.3)。そのため、ND1 株と NJ1 株は NirA と ONR はそれぞれ窒素同化に利用される亜硝酸還元酵素である可能性が高い。また、Urease 遺伝子群 (NSJP_v1_2394-NSJP_v1_2400 および NSDF_v1_60570-NSDF_v1_60575)、尿素透過酵素遺伝子群 (NSJP_v1_2387-NSJP_v1_2391、NSJP_v1_2401、および NSDF_v1_60577-NSDF_v1_60581)、シアネート分解酵素 (NSJP_v1_2410 および NSDF_v1_60561) といったアンモニア生成遺伝子群も亜硝酸還元酵素の近傍に存在しており (図 3.3)、尿素やシアニ酸からもアンモニアを生成し、窒素同化すると思われる。

一方で、ND1 株のゲノム中の *nrfAH* 遺伝子 (NSDF_v1_62626, NSDF_v1_62627) のすぐ下流にシトクロム bd キノールオキシターゼをコードする *cydAB* 遺伝子 (NSDF_v1_62628 および NSDF_v1_62629) が保持されていた (表 A.1)。このシトクロム bd キノールオキシターゼは *Bacteroides fragilis* といった嫌気性微生物が nM レベルの酸素を利用するのに必要とされている^{60,61)}。既往研究において、*Nitrospira* が嫌気性もしくは微好気性微生物から進化したことが考察されていることを踏まえると⁴³⁾、ND1 株は *nrfAH* 遺伝子と *cydAB* 遺伝子を利用して嫌気呼吸をされると考えられる。

3.3.4.3. 遺伝子発現解析

両株の窒素同化経路を特定するために、両株の窒素同化に関わる各遺伝子の発現量変化を実験的に確認した (図 3.4)。窒素同化は細胞の増殖期に強く発現すると考えたため、菌体数が増加し、亜硝酸消費量が急激に大きくなる 6 日目で RNA を抽出した (図 3.4A)。まず、NJ1 株の各遺伝子の発現量を逆転写 PCR で確認したところ、無機培地中のアンモニアの有無に関わらずエネルギー生産に必要な *nxB* 遺伝子と窒素同化に関わるグルタミン合成酵素をコードする *glnA* 遺伝子は増幅されていた (図 3.4B、C)。そのため、NJ1 株

において *nxB* 遺伝子と *glnA* 遺伝子は培地中の窒素源の違いに関わらず発現していることを確認した。一方、ONR をコードする遺伝子 NSJP_v1_2416 は窒素源として亜硝酸のみを含む培地で培養した際は増幅されるのに対し、窒素源としてアンモニアも含む培地で培養した際は増幅されなかった (図 3.4B、C)。この結果は窒素源としてアンモニアが存在する場合、NJ1 株がアンモニアを直接窒素源とするため、亜硝酸還元酵素の発現量が低下したことを示している。したがって、NJ1 株は ONR を窒素同化に利用していることが強く示唆される。一方、ND1 株が保持している NirA と NrfAH をそれぞれコードする *nirA* 遺伝子、*nrfAH* 遺伝子はどちらの培養系でも発現が確認できなかったため、ND1 株が窒素同化にどちらの遺伝子を利用しているかは定かではない (data not shown)。

3.3.4.4. 尿素分解活性

近年、*Nitrospira moscoviensis* のゲノム解析により、*N. moscoviensis* が尿素分解酵素を保持していることが初めて発見され、また環境中には *Nitrospira*、*Nitrospina* が保持する *ureC* 遺伝子が存在していることが報告されている⁴⁵⁾。今回解析した ND1 株と NJ1 株のゲノム中にも、尿分解酵素である Urease とその Urease アクセサリータンパク質をコードする遺伝子が保持されていた (図 3.3)。Urease は 3 つのサブユニットから構成され、*ureCBA* 遺伝子にコードされ、4 つの Urease アクセサリータンパク質は *ureDEFG* 遺伝子によってコードされている。Urease は α サブユニットである *ureC* が触媒活性を保持しており、補酵素として Ni を補因子とする metallo-dependent hydrolases ファミリーの酵素である⁶²⁾。Urease アクセサリータンパク質はニッケルドナーとして Urease の成熟化に関わっており、これらの一部が欠損していると Urease の活性が半分程度下がる、また消失することが報告されている^{63, 64)}。

ND1 株と NJ1 株のゲノム中には 3 つの Urease 遺伝子 (*ureCBA*) が保持されていたが、アクセサリー遺伝子 (*ureDEFG*) に関しては、NJ1 株は 4 つのアクセサリー遺伝子を

全てコードしていたが、ND1 株は *ureE* 遺伝子を欠損していた (図 3.3 および表 A.1)。*ureE* 遺伝子は Urease の成熟化に必要なニッケルドナーとしての役割を担っているため、この遺伝子を欠損している ND1 株の Urease 酵素の活性は低いと予測されたが⁶⁵⁾、両株とも尿素を分解し、アンモニアを発生することがわかった (図 3.5)。ND1 株と同様に *N. moscoviensis* および *N. lenta* のゲノムも、Urease を保持しているにも関わらず *ureE* 遺伝子を欠損していた。*N. moscoviensis* のゲノム解析の報告では、*N. moscoviensis* は *ureE* 遺伝子の代わりにシャペロンタンパク質が Urease の成熟化を担っていると考察しているが⁴⁵⁾、ND1 株は同様のシャペロンタンパク質を保持していなかった。そこで、ND1 株と NJ1 株が保有する遺伝子を比較した結果、ND1 株のみが親和性の高いニッケル/コバルトトランスポーターを保持していることがわかった。また、*ureE* 遺伝子を欠損している *Nitrospira moscoviensis* もニッケルトランスポーターを保持していることがわかった。ND1 株ではニッケルドナーとして役割を持つ UreE タンパク質を欠落しているため、細胞内のニッケル濃度を高くすることで Urease を活性化していると思われる。

3.3.5. 運動性

ND1 株のゲノム中には鞭毛合成や化学走化性に関わるほとんどの遺伝子が保存されているにも関わらず、NJ1 株のゲノム中にはそのほとんど保持がされていなかった (図 3.1)。そのため、NJ1 株は他の硝化細菌とは異なり、鞭毛による運動性を持たないことが示唆される。既往研究における *N. defluvii*、*N. moscoviensis* のゲノム解析では鞭毛に関わるほとんどの遺伝子がゲノム中に保存されていることが明らかになっている^{45, 43)}。また、最近発見された Comammox 細菌である *Ca. Nitrospira inopinata* の論文では、電子顕微鏡観察によって *Ca. Nitrospira inopinata* の鞭毛が観察された⁴⁷⁾。加えて、既往研究で報告されている NOB である *Nitrobacter* 属および *Nitrococcus* 属、AOB である *Nitrosomonas* 属および *Nitrosospira* 属のゲノム中にも鞭毛はコードされている^{8, 12, 66, 67, 68)}。したがって、鞭毛

を保持していない NJ1 株は非常に稀有な硝化微生物であると言える。

今回解析した ND1 株のゲノム中には鞭毛に関わる遺伝子 (*flg* 遺伝子、*flh* 遺伝子、*fli* 遺伝子、および *motAB* 遺伝子) と化学走化性に関わる遺伝子 (*che* 遺伝子および *MCP* 遺伝子) のほとんどを保持していることがわかった (表 A.1)。しかしながら、ND1 株のゲノム中には鞭毛合成のマスターレギュレーターである *flhDC* 遺伝子 (鞭毛合成の開始を制御する)⁶⁹⁾ が保持されていなかった。既往研究における *Nitrobacter* のゲノム解析においても、*flhDC* 遺伝子が存在しておらず、他の遺伝子によって調節されていると考察されていた⁶⁸⁾。興味深いことに、ND1 株のゲノム中において、鞭毛に関わる遺伝子群の近傍に転写調節因子である *fleQ* 遺伝子が保持されていた (表 A.1)。近年、*FleQ* 遺伝子は *Pseudomonas aeruginosa* の鞭毛合成のマスターレギュレーターであることが報告されており^{70, 71, 72)}、ND1 株も *fleQ* 遺伝子によって鞭毛合成を制御されていると考えられる。さらに、*fleQ* 遺伝子の近傍には two-component sensor である *fleSR* 遺伝子が存在しており、これらの遺伝子は生育環境に応じた ND1 株の鞭毛合成制御に関わっていると推測される。実際に、*Nitrospira defluvii* および *Nitrospira lenta* は培養中において、硝酸といった代謝物の蓄積によって、マイクロコロニーおよびシングルセル状態といったように、形態変化することが報告されており^{29, 51)}、この形態変化には鞭毛が関わっている可能性がある。

本研究の比較ゲノム解析により、*Nitrospira* には運動性を有する ND1 株のような motile *Nitrospira*、運動性を有しない NJ1 株のような non-motile *Nitrospira* という 2 つの表現型が存在することが明らかになった。運動性を保持する motile *Nitrospira* は chemotaxis と鞭毛を用いて、基質濃度や阻害物質濃度に応じ、生存に適した環境へと移動することが可能であると予測される。一方、non-motile *Nitrospira* は鞭毛を持たないため前述とは異なる生態学的ニッチを形成していると予測される。既往研究において、比較ゲノム解析、増殖活性試験、および環境測定を用いて、南極の Deep Lake の water column に生息する 4 系統の haloarchaea 群の棲み分けが報告されている⁷³⁾。haloarchaea DL31 株は運動性

を欠損しているが、微粒子に付着し、タンパク質のトランスポーターを複数種類保持し、タンパク質を取り込みやすくし、基質を堆積物中のタンパク質を標的にすることで他の haloarchaea とは異なる生態学的ニッチを形成させていることが報告されている⁷³⁾。おそらく、non-motile *Nitrospira* である NJ1 株も haloarchaea と同様に motile *Nitrospira* とは異なる生態学的ニッチを形成していると思われる。特に、NJ1 株は ND1 株とは異なり、複数のアンモニアトランスポーター、尿素、硫酸トランスポーターを保持している (図 3.1)。また、前章の生理学的性質の解析において、ND1 株が阻害を受ける 10 mg-N l⁻¹ のアンモニアにさらされても、NJ1 株は阻害を受けないことがわかっている。したがって、NJ1 株は運動性を欠損しているが、物質の取り込みや有毒物質に対する耐性を保持することで ND1 株とは異なる生態学的ニッチを形成しているのかもしれない。

3.3.6. クオラムセンシング機構

非常に興味深いことに、鞭毛を欠損している NJ1 株はクオラムセンシング (QS) 機構に関わるオートインデューサー合成遺伝子と受容体遺伝子 (NSJP_v1_1610 および NSJP_v1_1611) をゲノム中に保持していた (図 3.1 および表 A.1)。既往研究で報告されている *Ca. Nitrospira defluvii*、*N. moscoviensis* のゲノム解析では Autoinducer 合成遺伝子は発見されておらず、NJ1 株のみで初めて検出された。既往研究において、メタゲノム解析によってフォスミドライブラリー中に *Nitrospira* 由来と考えられるオートインデューサー合成遺伝子と受容体遺伝子が発見され、合成されるオートインデューサーが *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone (12-HSL) であることが報告された⁷⁴⁾。さらに既往研究において、アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea*、*Nitrosospira multiformis* と NOB である *Nitrobacter winogradskyi* のゲノム中から *N*-アシルホモセリンラク톤の合成遺伝子および受容体遺伝子が発見され、分泌される autoinducer が同定されている^{75, 76, 77)}。NJ1 が保持する QS システムがどのような役割を持つかは定かではないが、同種間または

異種間での微生物間コミュニケーションに利用している可能性がある。また既往研究において、*N. winogradskyi* が分泌するオートインデューサーが硝化活性に関わる遺伝子の発現量を誘導しているという報告もあり、NJ1 が保持する QS システムも *Nitrospira* の代謝活性を制御する上で重要な役割を持つ可能性がある⁷⁸⁾。NJ1 株の QS 機構については第 4 章で詳細に記載する。

3.3.7. CRISPR-Cas 機構

Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) -Cas (CRISPR-associated genes) 機構は細菌や古細菌の間で広く保存されている外来遺伝子に対する免疫機構である。NJ1 株のゲノム中には CRISPR-Cas 機構が保存されていた。既往研究の *N. defluvii* と *N. moscoviensis* のゲノム解析でも同様に CRISPR-Cas 機構は保存されていた^{45, 43)} (図 3.1 および表 A.1)。既往研究で報告されている CRISPRfinder⁷⁹⁾を用いて ND1 株の CRISPR 配列を調査した結果、ND1 株は 2 つの CRISPR 配列を保持しており、繰り返し配列の間にそれぞれ 7 と 24 のスペース配列 (crRNA) が存在することがわかった (表 3.3)。ND1 株の crRNAs が標的にする配列を DDBJ の blast データベースで検索したが、データベースには標的配列は存在しなかった。しかし、おそらく crRNAs はバクテリオファージやプラスミドといった外来遺伝子を標的にしていると予測され、ND1 株は他の *Nitrospira* のゲノム解析で示唆されているのと同様に CRISPR-Cas 機構を免疫機構として利用していると思われる。

一方、予想外にも NJ1 株は CRISPR-Cas 機構を保持していなかった (図 3.1 および表 A.1)。CRISPR-Cas 機構は外来遺伝子に対する防御機構として知られているが、一般的に CRISPR-Cas 機構は水平伝搬による新規な遺伝子の獲得を防いでいると考えられる⁸⁰⁾。既往研究において、*Enterococcus faecalis* の抗生物質耐性の獲得と CRISPR-Cas 機構の関係は負の相関を示しており⁸¹⁾、CRISPR-Cas 機構の存在は微生物の新機能獲得を阻害してい

ると予測される。しかし、その一方で水平伝搬の頻度と CRISPR のアレイの長さの関係性に負の相関は証明できないことが報告されており、CRISPR-Cas 機構は水平伝搬を阻害しないことも示唆されている⁸²⁾。したがって、NJ1 株が CRISPR-Cas 機構を欠損していることはバクテリオファージやプラスミドといった外来遺伝子に対する防御機構を持たない点では不利であるが、新規な遺伝子を獲得することが期待できるといった点では有利である。

3.3.8. 窒素同化の遺伝子の系統

今回ゲノム解析した両株はアンモニア生成する酵素として、亜硝酸還元酵素である NirA、NrfAH、ONR、尿素分解酵素である Urease、およびシアネート分解酵素である Cyanase をゲノム中に保持していることが明らかになった（図 3.3）。これらの酵素をコードする遺伝子の系統を調べるために、各遺伝子の系統を調査した（図 3.6）。非常に興味深いことに、Cyanase をコードする *cynS* は *Nitrospira* 間で独自のクラスターを形成しており、16S rRNA 遺伝子の系統と位置関係が相似していた（図 3.6A）。この *cynS* のアミノ酸配列の保存性は Cyanase が *Nitrospira* において重要な酵素であることを意味しており、*Nitrospira* にとって Cyanase による Cyanate 分解は AOM に基質であるアンモニアを供給すること、Cyanate の毒性からの防御機構、または窒素源としてのアンモニアを確保する上で重要であると考えられる。

一方で、予想外にも Urease の活性部位にあたる Urease alpha subunit をコードする *ureC* 遺伝子は *Nitrospira* 間で系統が二つに分類されることがわかった。*UreC* 遺伝子の系統解析をした結果、lineage II に属している *N. moscoviensis*、*N. lenta*、*Ca. Nitrospira nitrosa*、*Ca. Nitrospira nitrificans* および *Ca. Nitrospira inopinata* が保持する *ureC* 遺伝子は独自に *Nitrospira* クラスターを形成し、lineage I に属する ND1 株の *ureC* 遺伝子も同じ *Nitrospira* クラスターに含まれた（図 3.6B）。興味深いことに、ND1 株と非常に近縁な *N. defluvii* は

Urease を保持していなかった。さらに、他の *Nitrospira* lineage II と同様に、ND1 株の Urease オペロンには Urease accessory タンパク質である UreE をコードする *ureE* 遺伝子が欠損している (図 3.3 および表 A.1) ⁴⁵⁾。したがって、ND1 株は lineage II に属する *Nitrospira* から Urease オペロンを水平伝搬により獲得したと思われる。一方、NJ1 株は Urease アクセサリータンパク質をコードする遺伝子 (*ureDEFG*) を全てコードしていた (図 3.3 および表 A.1)。また、NJ1 株の *ureC* 遺伝子は *Nitrospira* クラスタに属さず、他の *Nitrospira* の *ureC* 遺伝子群とは近縁ではなかった。この *ureE* 遺伝子の欠損と系統解析の結果は NJ1 株が保持する Urease は他の *Nitrospira* とは異なる起源を持つ Urease であることを示唆している。

今回解析した NJ1 株および ND1 株とゲノム情報が公開されている他の *Nitrospira* のゲノム中の亜硝酸還元酵素を比較すると、フェレドキシン型還元酵素グループ (*NirA*) とシトクロム c 型還元酵素グループ (*NrfA* および *ONR*) の 2 つのグループに分かれることが明らかになった (図 3.2)。それぞれの遺伝子 (*nirA*、*nrfA*、*ONR* をコードする遺伝子) について系統的解析を行った結果、それぞれの遺伝子は独自に *Nitrospira* クラスタを形成していた (図 3.6C-E)。既往研究において、最初に解析された *N. defluvii* と *Nitrospira lenta* が *nirA* 遺伝子を保持していることから、*nirA* 遺伝子が *Nitrospira* において標準の亜硝酸還元酵素であると考えられていた。しかしながら、NJ1 株も *N. moscoviensis* と同様に *NirA* を欠損しており、*ONR* により亜硝酸還元していることが今回明らかになった。さらに、非常に興味深いことに ND1 株は *nirA* 遺伝子の他にも、新たに COMAMMOX 細菌として発見された *Ca. Nitrospira inopinata* が亜硝酸還元を利用している *nrfA* 遺伝子の両方を持っていた (図 3.3 および表 A.1)。既往研究において *ONR* は *NrfA* から進化したと報告されており ⁸³⁾、それを踏まえるとシトクロム c 型還元酵素グループの亜硝酸還元酵素の方が多くの *Nitrospira* で保存されている。既往研究において *Nitrospira* が嫌気性細菌または微好気性細菌から進化したと予測されること ⁴³⁾、*NrfA* が嫌気環境下で亜硝酸呼吸に使

用されることを踏まえると、NrfAHが*Nitrospira*の標準の亜硝酸還元酵素だと予測される。おそらく、シトクロムc型還元酵素グループ（NrfA、ONR）を持たない*Nitrospira*は、進化の過程で NirA や Urease といった新たなアンモニア生成酵素を獲得したことにより、シトクロムc型還元酵素グループ（NrfA、ONR）を欠損したと考えられる。

3.4. 結言

3.4.1. 2系統の分離株による比較ゲノム

本研究室で獲得した2つの *Nitrospira* 分離株のゲノム配列を解読し、比較解析した結果、窒素同化、運動性、CRISPR-Cas 機構、QS 機構に関わる遺伝子群において大きな違いが確認された。窒素同化に関しては、亜硝酸還元酵素とトランスポーターの違いから、ND1 株は亜硝酸を取り込みやすいの対し、NJ1 株はアンモニウムを取り込みやすいことがわかった。また、ND1 株は運動性、CRISPR-Cas 機構に関わる遺伝子群を保持しているのに対し、NJ1 株はそれらを欠損していることがわかった。一方、NJ1 株は QS 機構に関わる遺伝子を保持していたが、ND1 株は QS 機構を保持していないことがわかった。既往研究において、活性汚泥中の2系統の *Nitrospira* の共存には亜硝酸酸化、ギ酸の利用が着目されていたが²⁵⁾、本研究では *Nitrospira* の共存、棲み分けの要因として、新たに窒素同化、運動性、ファージに対する免疫機構、QS 機構が関与している可能性を明らかにした。

3.4.2. *Nitrospira* 間における比較ゲノム

本研究で解読した2つの *Nitrospira* 分離株のゲノム配列を既往研究で報告されている *Nitrospira* のゲノム配列と比較した。上記の2つの分離株での比較では4つの顕著な違いが確認されていたが、他の *Nitrospira* の運動性、CRISPR-Cas 機構、QS 機構は ND1 株と同様であった。そのため、*Nitrospira* ゲノムの中でも NJ1 株のゲノム配列は独特であることがわかる。また、ND1 株とその近縁種である *N. defluvii* のゲノム配列を比較すると、亜硝酸還元酵素、Urease の有無が異なっており、近縁種であっても一部の機能が異なることがわかる。さらに、窒素同化経路を比較すると、ND1 株や *N. defluvii* といった *Nitrospira* lineage I は亜硝酸を取り込みやすいのに対し、NJ1 株を始めとする *Nitrospira* lineage II はアンモニウムを取り込みやすいことがわかる。そのため、本研究室で獲得された2つの

分離株のみならず、アンモニアに対する感受性は lineage I と lineage II の系統間における違いであると言える。したがって、ND1 株と NJ1 株のゲノム配列を解読したことによって、*Nitrospira* ゲノム配列の系統間における共通性を見出すことができた。

3.4.3. 活性汚泥における 2 つの分離株

活性汚泥槽には排水が連続的に流入するため、アンモニア濃度が変動している。また、活性汚泥中の亜硝酸はアンモニア酸化細菌によって供給されるために、非常に低い濃度である。*Nitrospira* は亜硝酸を酸化することでエネルギーを生産するため亜硝酸を基質として利用しているが、その一方で亜硝酸を窒素源として同化するためにはアンモニアに還元する必要もある。そのため、活性汚泥中では亜硝酸を窒素源として取り込む *Nitrospira* よりも、アンモニウムを窒素源として取り込む *Nitrospira* の方が有利であると考えられる。前述したように ND1 株は亜硝酸を取り込みやすいの対し、NJ1 株はアンモニウムを取り込みやすいことを踏まえると、NJ1 株の方が ND1 株よりも活性汚泥に適応していると言える。

表 3.1 逆転写 PCR に使用したプライマー

プライマー	塩基配列	標的	増幅長	文献
169f	TACATGTGGTGAACA	<i>nxrB</i>	470 bp	Pester <i>et al.</i> , 2014 ²⁴⁾
638r	CGGTTCTGGTCRATCA			
ONR_765f	AAACAAGGAAAAAATGAAGC	ONR (NSJP_v1_2416)	270 bp	In this study
ONR_1034r	TGATCCATCGAAATAAAGAA			
<i>glnA</i> _23f	AGTTTGCCAAAAAAAACAAG	<i>glnA</i>	392 bp	
<i>glnA</i> _414r	GATCGAAGATGAAGAACTC			

表 3.2 分離株のゲノム配列の基本情報

	ND1 株	NJ1 株
全長 (bp)	4456043	4084817
Scaffolds 数	6	1
GC 含有率 (%)	58.87	58.96
翻訳率(%)	89.55	90.37
CDS	4602	4151
rRNA	3	3
tRNA	46	45
misc_RNA	7	7

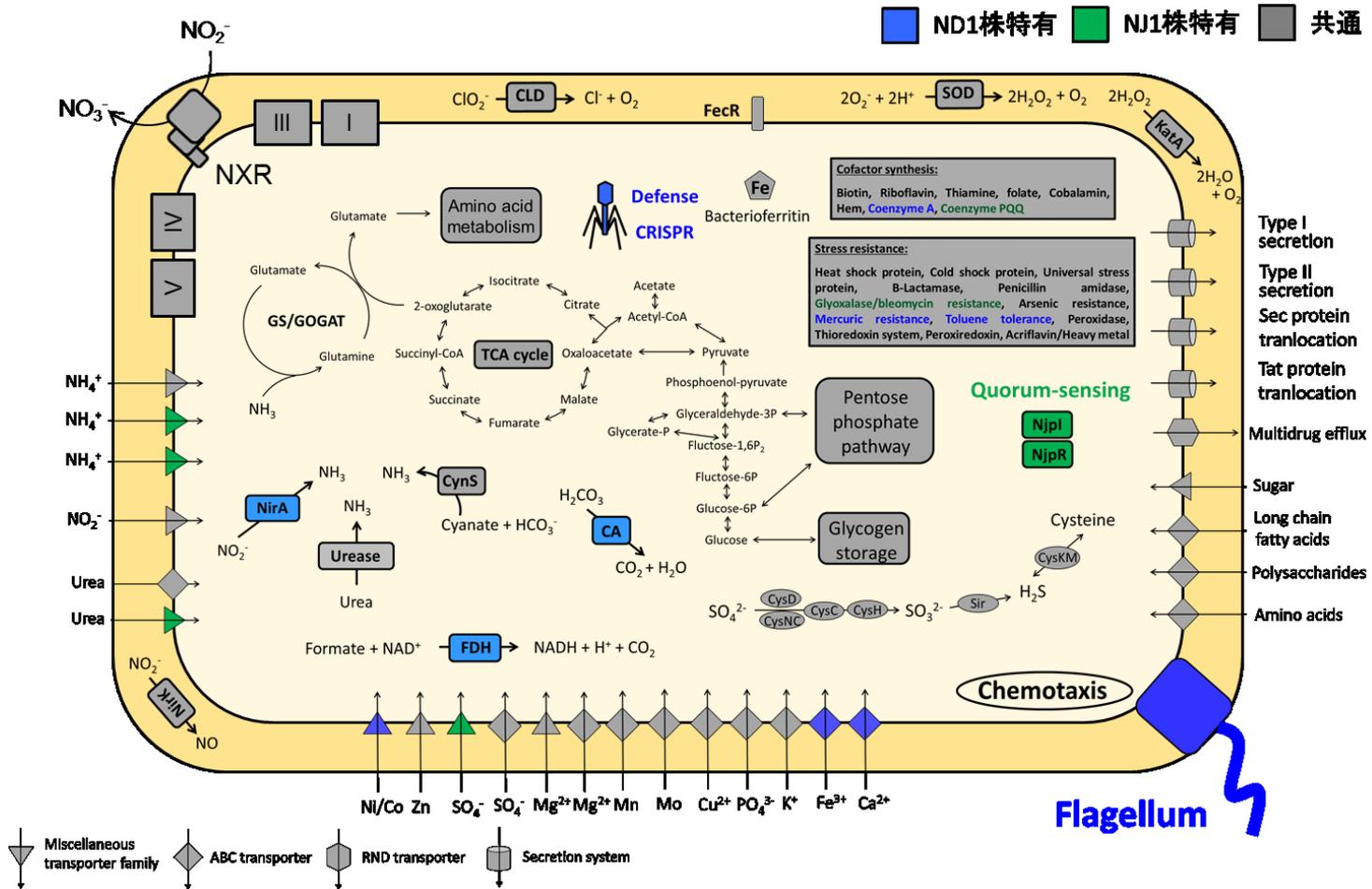


図 3.1 ND1 株、NJ1 株の微生物構造、代謝経路の概略図

表 3.3 *Nitrospira* 間の ANI、AAI

		ANI (%)						
		ND1 株	<i>N. defluvii</i>	NJ1 株	<i>N. moscoviensis</i>	<i>Ca. N. inopinata</i>	<i>Ca. N. nitrificans</i>	<i>Ca. N. nitrosa</i>
	ND1 株		91.37	76.38	77.36	75.57	76.22	76.66
	<i>N. defluvii</i>	93.07		76.79	76.77	75.5	76.51	76.85
AAI	NJ1 株	65.02	65.38		78.11	76.04	77.5	77.14
(%)	<i>N. moscoviensis</i>	66.49	66.59	69.14		77.04	76.75	76.81
	<i>Ca. N. inopinata</i>	64.82	64.42	66.83	70.86		77.87	78.93
	<i>Ca. N. nitrificans</i>	64.6	64.87	66.56	70.99	71.19		78.95
	<i>Ca. N. nitrosa</i>	64.64	64.65	66.71	70.32	70.5	77.61	

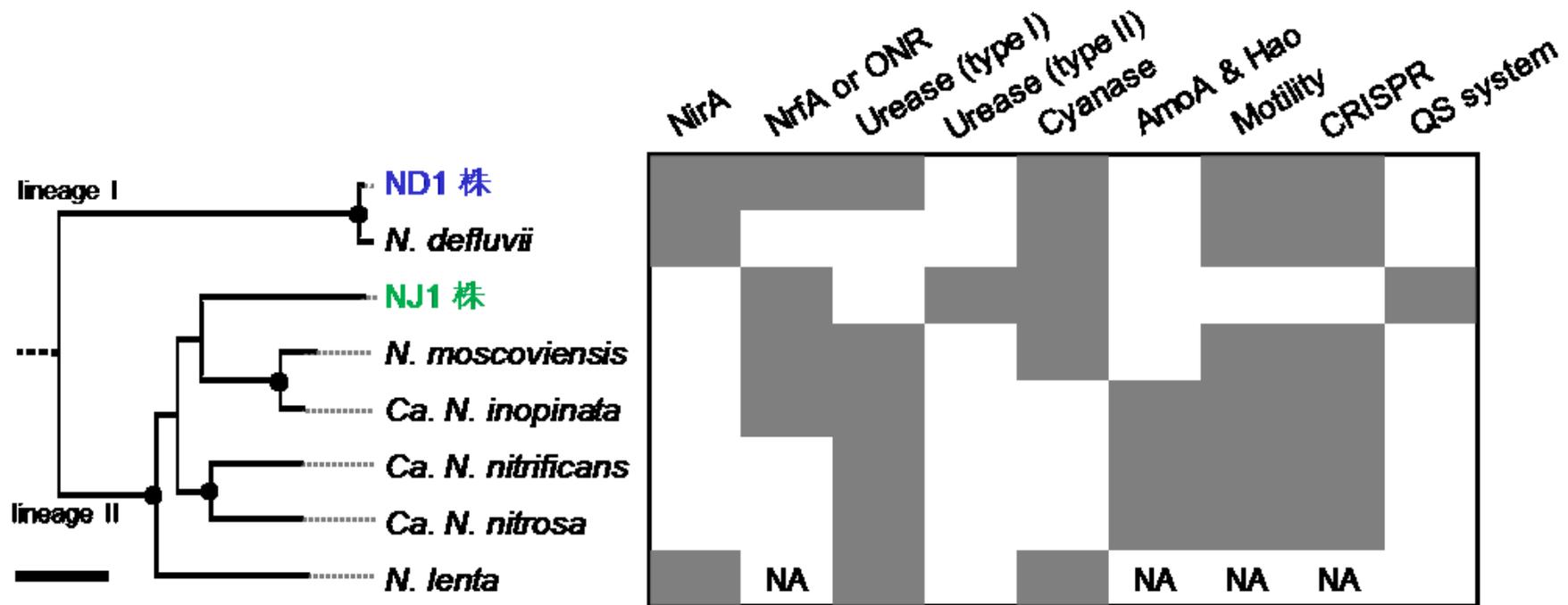


図 3.2 *Nitrospira* ゲノムにおける機能遺伝子の比較

灰色：保持 白色：欠損 NA：不明

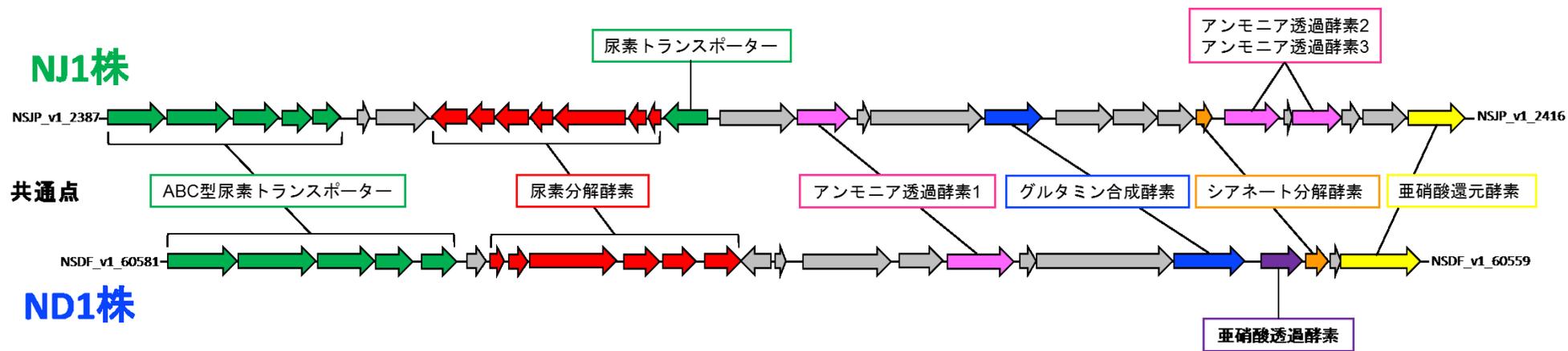
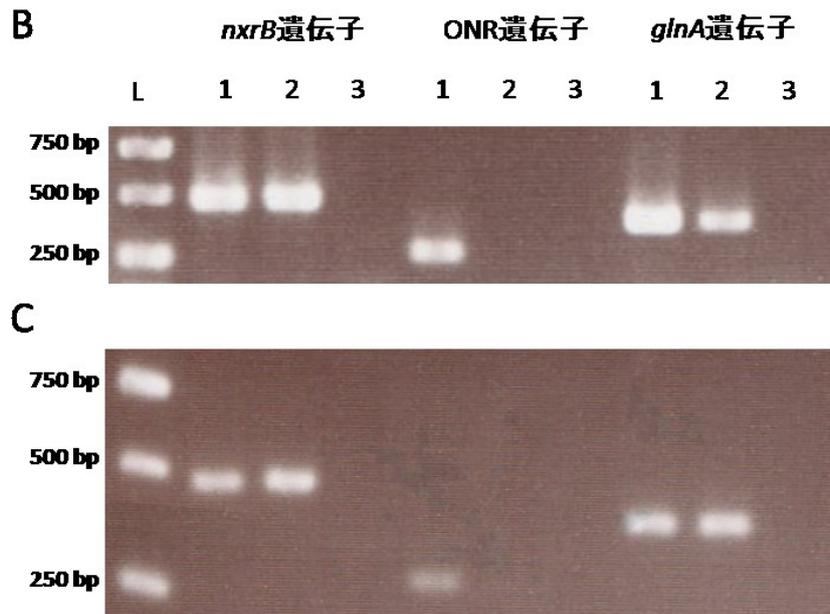
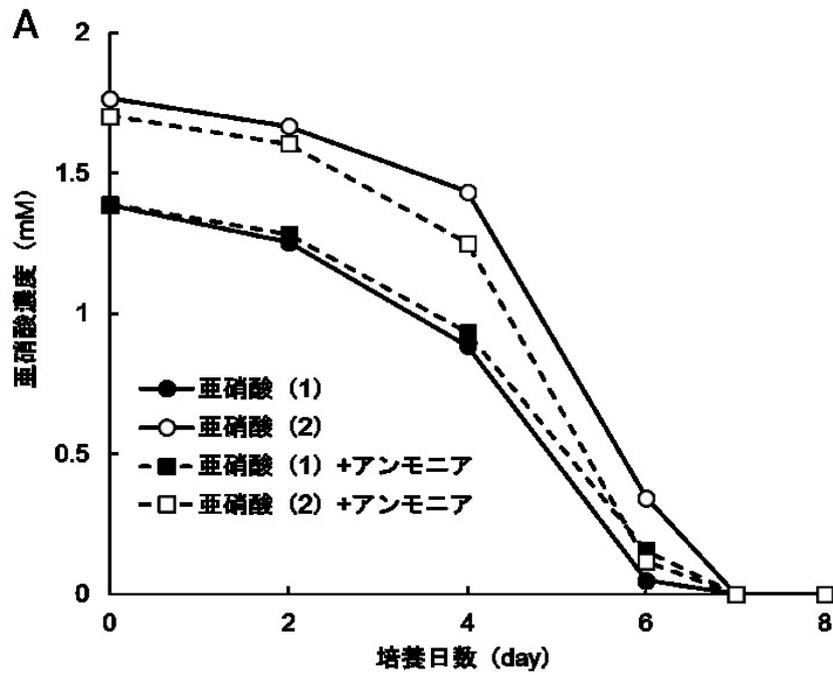


図 3.3 ND1 株と NJ1 株の窒素代謝に関する遺伝子群の流れ



L : DNAラダー
 1 : NO_2^-
 2 : $\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$
 3 : ネガティブコントロール

図 3.4 NJ1 株の窒素同化に関する遺伝子発現

A : 亜硝酸濃度変化 B : 遺伝子発現 (1 回目) C : 遺伝子発現 (2 回目)

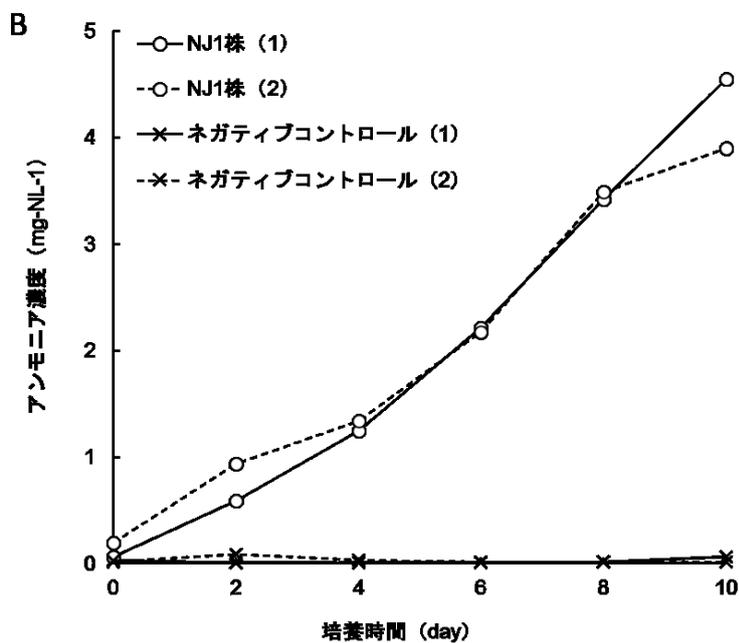
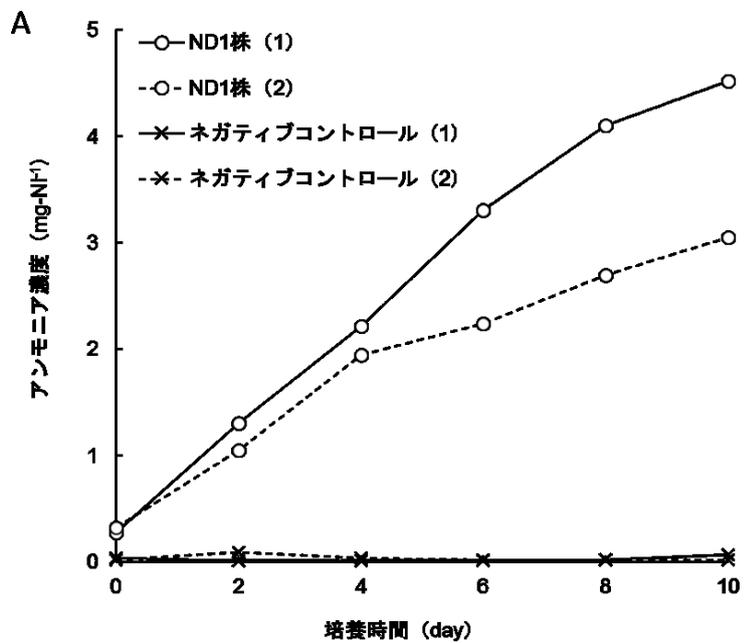


図 3.5 ND1 株と NJ1 株の尿素分解活性

A : ND1 株 B : NJ1 株

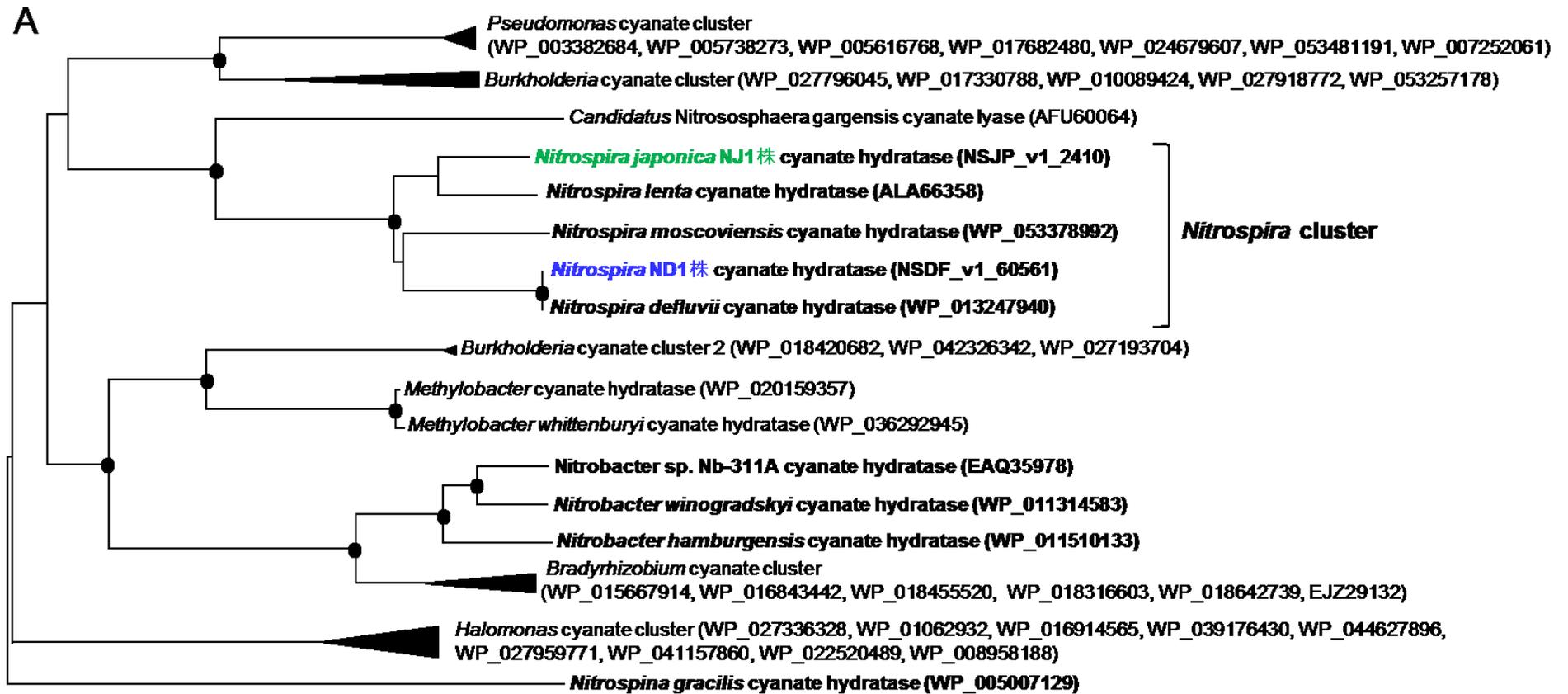


図 3.6 窒素代謝に関わる遺伝子に基づく系統樹 (スケールバー : 5%)

A : *cynS* 遺伝子



図 3.6 窒素代謝に関わる遺伝子に基づく系統樹 (スケールバー : 5%)

B : *UreC* 遺伝子

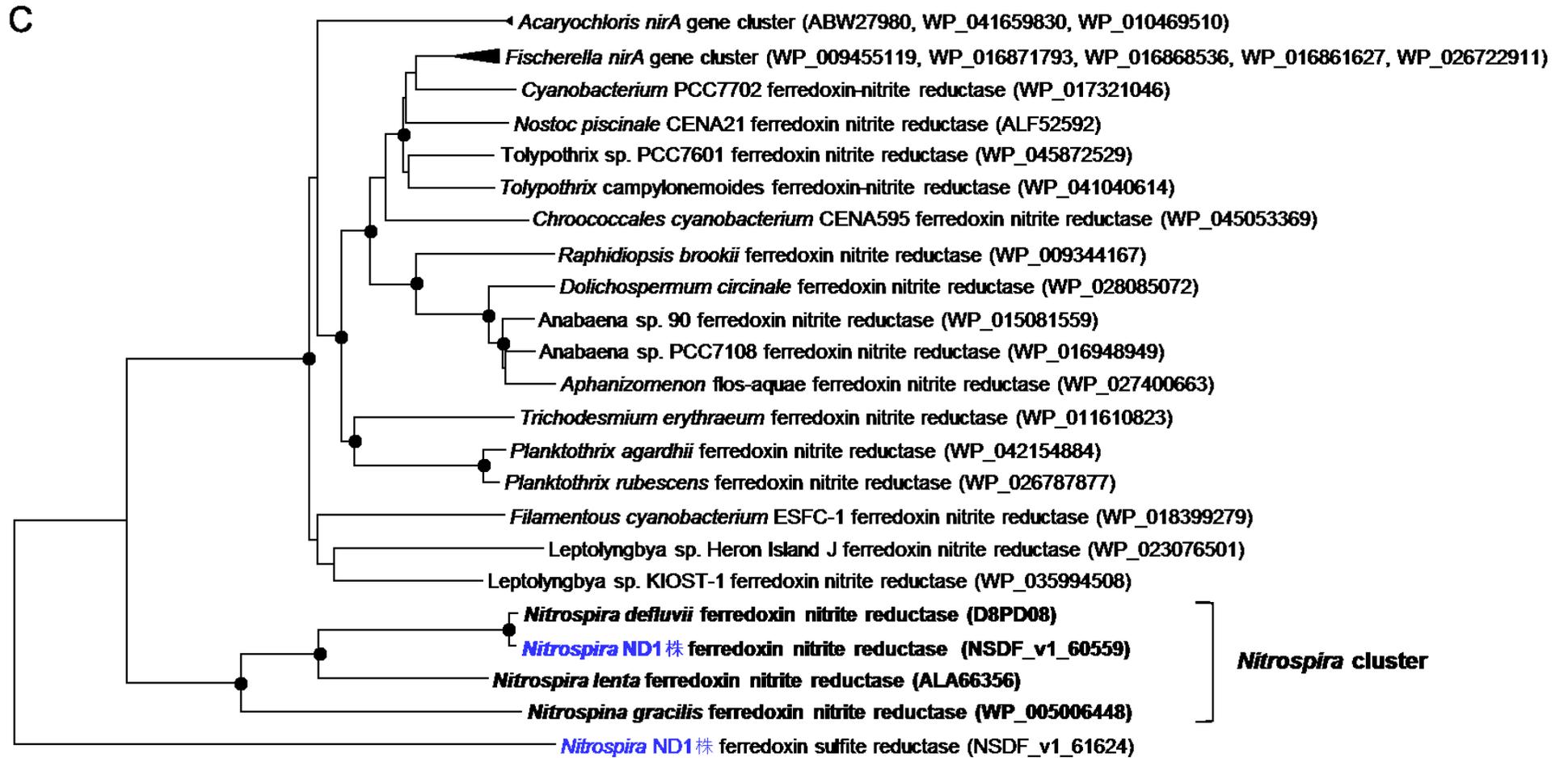


図 3.6 窒素代謝に関わる遺伝子に基づく系統樹 (スケールバー : 5%)

C : NirA 遺伝子

D

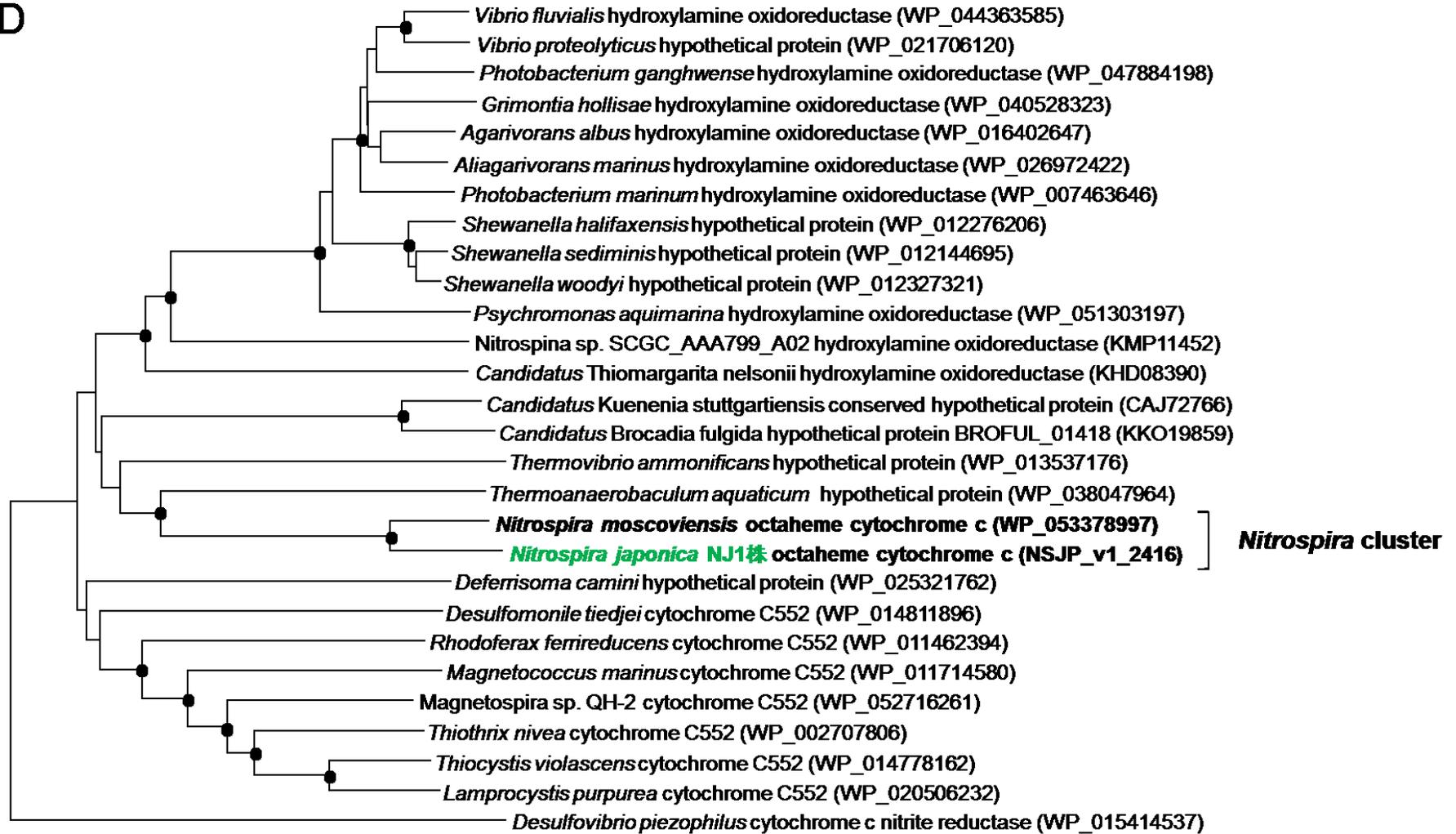


図 3.6 窒素代謝に関わる遺伝子に基づく系統樹 (スケールバー : 5%)

D : ONR をコードする遺伝子

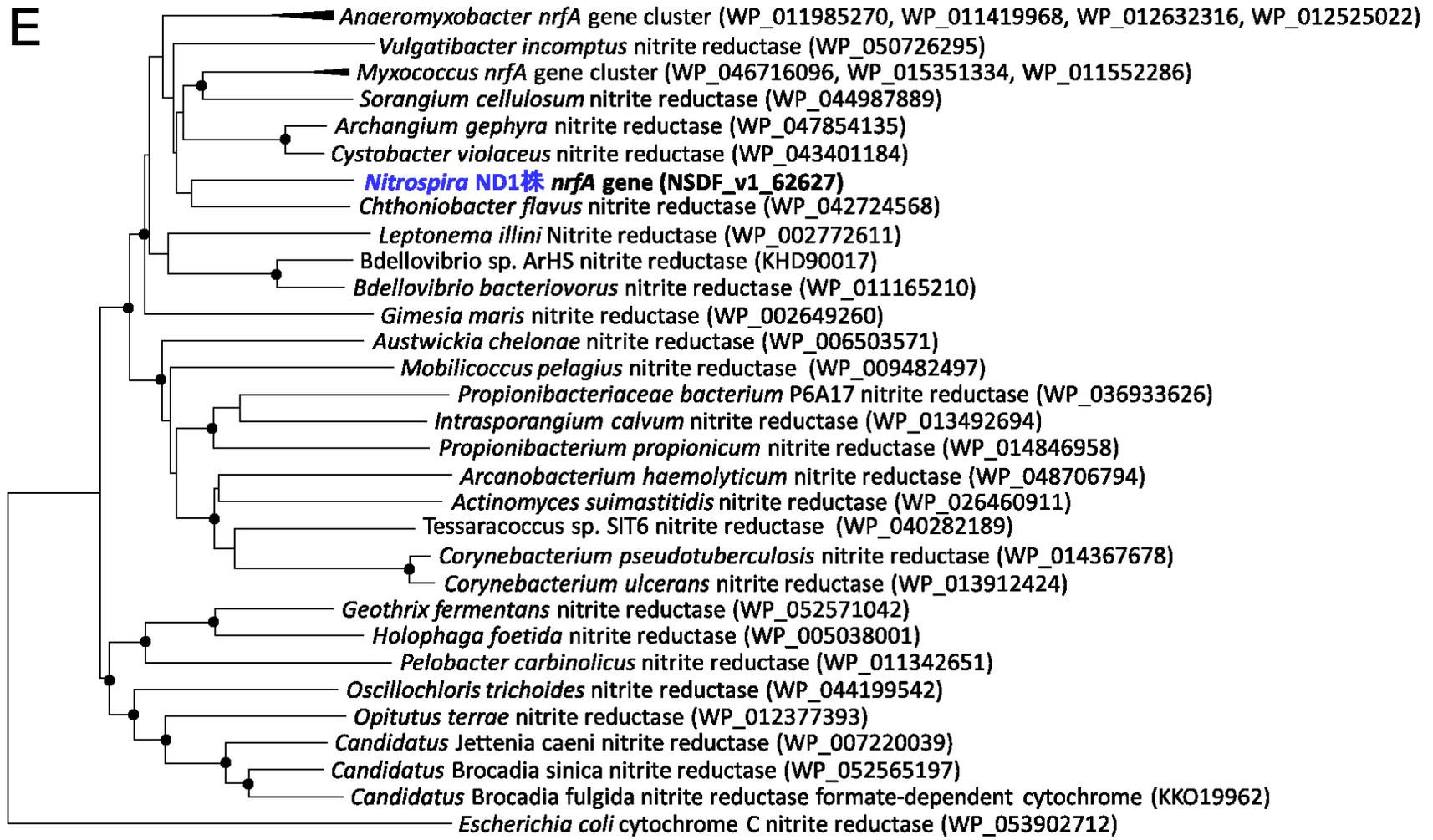


図 3.6 窒素代謝に関わる遺伝子に基づく系統樹 (スケールバー : 5%)

E : *NrfA* 遺伝子

第4章 *Nitrospira japonica* の Quorum sensing 機構

4.1. 序論

一定以上の細菌密度により活性が高くなる微生物が存在する。この微生物の細菌密度に依存した活性制御は Quorum sensing (QS) 機構と呼ばれ、微生物の生存戦略の一つである^{84, 85)}。QS 機構ではシグナル物質を分泌し、シグナル物質の濃度に応じて遺伝子発現を制御することで、細菌密度に依存して微生物のふるまいを制御している。この QS 機構によって運動性、生物発光、細胞外多糖の分泌、バイオフィーム形成、および静止期への移行など様々な微生物のふるまいが制御下にあることが報告されている^{84, 85)}。QS 機構にはシグナルペプチドやアシル化ホモセリンラクトンなども利用されているが、研究が最も盛んに進められているのがアシル化ホモセリンラクトン (AHL) である。

AHL は合成酵素 LuxI によって生産され、受容体 LuxR によって認識される。この LuxI ホモログと LuxR ホモログは、硝化細菌といった窒素循環に関わる細菌でも保有していることが明らかになっている^{75, 76, 77)}。AOB である *Nitrosomonas europaea* および *Nitrospira multiformis*、NOB である *Nitrobacter winogradskyi*、*Nitrobacter hamburgensis*、および *Nitrobacter* NA311 のゲノム中にも LuxI ホモログと LuxR ホモログが存在しており、AHL の同定も報告されている^{75, 76, 77)}。また、硝化細菌ではないが、嫌気性アンモニア酸化細菌 (Anaerobic ammonia oxidizing bacteria : ANAMMOX 細菌) も AHL の添加により活性が上昇することが報告されている^{86, 87)}。さらに、*Nitrospira* の QS 機構については土壌由来のフォスミドメタゲノムライブラリーから、*Nitrospira* 由来の LuxI ホモログと LuxR ホモログが発見され、LuxI ホモログが合成する AHL が同定された⁷⁴⁾。しかしながら、既往研究で報告されている *Candidatus Nitrospira defluvii* のメタゲノム解析、*Nitrospira moscoviensis* のゲノム解析では LuxI ホモログと LuxR ホモログは発見されておらず^{45, 43)}、一部の *Nitrospira* のみしか保有していないと考えられる。

既往研究におけるメタゲノム解析では *Nitrospira* 由来の LuxI ホモログと LuxR ホモ

ログが発見することができたが⁷⁴⁾、QS 機構を保持する *Nitrospira* 分離株が存在しないため、QS 機構による遺伝子制御メカニズムを明らかにすることはできなかった。非常に興味深いことに、前章のゲノム解析において *Nitrospira japonica* NJ1 株が LuxI ホモログと LuxR ホモログを保持することが明らかになった。そこで本章では *N. japonica* NJ1 株における QS 機構による制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。

4.2. 実験方法

4.2.1. 系統学的解析

AHL 合成酵素の系統学的類似性を調べるために NCBI の protein blast を使用し、データベース上の近縁なタンパク質のアミノ酸配列を獲得した。獲得したアミノ酸配列と NJ1 株の AHL 合成酵素のアミノ酸配列を MEGA ver6 を用いてアライメントした⁵³⁾。つぎに、遺伝的距離の計算に p-distance モデルを使用し、塩基配列に基づいた系統樹作成に近隣結合法 (Neighbor-Joining : NJ) を用いた。

4.2.2. AHL の濃縮

NJ1 株の培養上清中に含まれる AHL を回収するために、酢酸エチルを用いた濃縮を行った。まず、NJ1 株の培養サンプル 21 をメンブレンフィルターユニットでろ過滅菌した。濾過滅菌した培養上清の一部 (約 100 ml) を分液ロートに移し、等量の酢酸エチルを添加し、混合した。分液ロートを静置させることでエチル層と水層に分離し、上部のエチル層を回収した。つづいて、400 ml ナスフラスコに回収したエチル層を移し、エバポレーターにより酢酸エチルを蒸発させた (50°C)。エチル層の蒸発後、1ml のジメチルスルホキシドを添加し、残留物をジメチルスルホキシド中に溶解させ、回収した。以上の工程を繰り返した結果、最終的に 21 の上清サンプルに含まれる AHL を 1 ml のジメチルスルホキシドに濃縮した。

4.2.3. AHL レポーター株によるバイオアッセイ

宇都宮大学生物工学研究室の諸星知広博士が開発した AHL レポーター株である、*Chromobacterium violaceum* CV026 株と *C. violaceum* VIR07 株によるバイオアッセイを行った。まず、CV026 株と VIR07 株を諸星博士から分譲していただき、LB 液体培地 5 ml に播種し、30°C、100 rpm で一晩培養した。培養後、オートクレーブした 1.5%寒天含有の

LB 培地 20 ml と混釈し、AHL レポーター株含有の寒天混釈培地を作製した。寒天に滅菌した 7 mm のペーパーディスク (Advantec 社) を乗せ、試料 10 μ l をペーパーディスクに添加し、30°C で一晩静置培養した。ポジティブコントロールには側鎖 C-6 の AHL (10 μ M) と側鎖 C-10 の AHL (1 μ M) を使用した。培養サンプルの一部を 40%グリセロールと混釈し、グリセロールストックとして -80°C 冷凍庫に保存し、バイオアッセイを行う際はグリセロールストックから使用した。

4.2.4. AHL 合成遺伝子の増幅

NJ1 株の gDNA から AHL 合成遺伝子 (NSJP_v1_1610) を PCR により増幅した。PCR には ExTaq (TaKaRa 社) と表 4.1 のプライマーを使用した。使用したプライマーセットには制限酵素 NotI、StiI の認識配列が含まれている (下線)。また、PCR の反応条件は 95°C 3min、{95°C 30sec、55°C 30sec、72°C 30sec} \times 30cycle、72°C 4min、4°C ∞ とした。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動で確認した。増幅を確認後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティック社) を用いて PCR 産物を精製した。

4.2.5. プラスミド抽出

プラスミド pCA24N を保持する大腸菌から、FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティック社) を用いてプラスミドを抽出した。プラスミド pCA24N には下流の遺伝子を過剰発現させるためのプロモーター (T5-lac promotor) とクロラムフェニコール耐性遺伝子が保持されている。また、プロモーターの下流領域に制限酵素 Not I、Sti I の認識配列が含まれている。

4.2.6. 形質転換

4.2.4 で増幅した PCR 産物と 4.2.5 で抽出したプラスミドを制限酵素 NotI、StiI で処

理した (37°C 4 h、60°C 20 min、4°C ∞)。制限酵素処理後、プラスミドサンプルに関しては、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、目的の長さ (約 5 kbp) のバンドを切り出した。制限酵素処理した PCR 産物と切り出したプラスミドサンプルを FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティック社) を用いて精製した。精製後、T4 DNA ligase (TaKaRa 社) によりライゲーションを行った (16°C、一晩)。ライゲーションサンプルを E. coli JM109 株 (コンピテントセル) に添加し、形質転換を試みた。形質転換した大腸菌をクロラムフェニコール (30 µg/ml) 含有 LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養することでスクリーニングを行った。スクリーニング後、表 4.1 のプライマーを用いた PCR により、目的の AHL 合成遺伝子 (NSJP_v1_1610) のインサートチェックを行った。インサートチェック後、形質転換に成功した大腸菌をクロラムフェニコール含有 LB 培地に添加し、37°C で一晩振とう培養した。培養後、その上清を孔径サイズ 0.2 µm のフィルター (Advantec 社) で滅菌した。

4.2.7. 生理活性試験

AHL 添加による NJ1 株の活性変化を調べるために、表 4.2 のような培養条件で振とう培養した。全ての培養条件において亜硝酸含有無機培地を使用しており、29°C、100 rpm とした。定期的に 1 ml サンプルングを行い、Griess 試薬を用いた比色分析法により、亜硝酸濃度を測定した。また、定期的に DNA 抽出を行い、*glnA* 遺伝子を対象にした定量 PCR (4.2.9) により、両株の細菌数を測定した。

4.2.8. NXR をコードする遺伝子の発現制御調査

NJ1 株 20 ml を 180 ml の無機培地で 13 日間振とう培養した (29°C、100 rpm)。その後、培養サンプルを 50 ml×4 に分注し、表 4.3 の培養条件で一晩培養した。培養後、RNeasy Mini kit (QIAGEN 社) を用いて、total RNA 抽出を行った。RNA を抽出後、gDNA Eraser

(TaKaRa 社) を用いてゲノム DNA を除去し、逆転写酵素である Prime Script RT Enzyme (TaKaRa 社) を用いて、RNA を cDNA に逆転写した。逆転写した cDNA を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティック社) を用いて精製した。精製した cDNA を Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて濃度を測定し、cDNA 濃度を 1 ng/μl に調整した。つづいて、定量 PCR (4.2.9) により NXR をコードする遺伝子の発現量を測定した。

4.2.9. QS 機構関連遺伝子の発現

NJ1 株の QS 機構関連遺伝子の発現量変化を調べるために、NJ1 株 1ml を 999 ml の 1.5 mM 亜硝酸を含む無機培地で 12 日間振とう培養した (29°C、100 rpm)。定期的に 20 ml サンプルングを行い、亜硝酸濃度測定、細菌数測定、RNA 抽出を行った。亜硝酸濃度測定には Griess 試薬を用いた比色分析法を使用した。細菌数測定では SYTOX Green (Thermo Fisher Scientific 社) による核酸染色をすることで *Nitrospira* を蛍光標識し、蛍光顕微鏡下 (Axioskop 2 plus、カールツァイス社) で細菌数をカウントした。RNA 抽出には RNeasy Mini kit (QIAGEN 社) を使用し、上記の 4.2.8 と同様の手順で cDNA に逆転写した。精製した cDNA (1 ng/μl) を使用して、定量 PCR により AHL 合成遺伝子と AHL 受容体遺伝子の発現量を測定した。

4.2.10. 定量 PCR

定量 PCR には KOD SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社)、Applied Biosystems® StepOne™ (Thermo Fisher Scientific 社)、表 4.4 のプライマーセットを使用した。4.2.6 における菌体数測定では、*glnA* 遺伝子の PCR 増幅産物をスタンダードサンプルとして検量線を作成した。1 ml から抽出した DNA 中のコピー数を定量することで、培養サンプルの菌体数を算出した。一方、4.2.8 の NXR をコードする遺伝子の発現量解析では各 *nxrA*

遺伝子の PCR 増幅産物を、4.2.9 の QS 機構関連遺伝子の発現解析では AHL 合成遺伝子と AHL 受容体遺伝子の PCR 増幅産物をスタンダードサンプルとして検量線を作成し、各遺伝子の発現量を測定した。

4.3. 結果

4.3.1. 系統学的解析

NJ1 株が保持する AHL 合成遺伝子を NCBI のデータベース上で近縁な遺伝子は、Nasuno らが活性汚泥中からメタゲノム解析によって検出した uncultured bacteria が保持する AHL 合成遺伝子であった (47.86%、BAM45368)⁷⁴⁾。系統解析を行った結果、NOB である *Nitrobacter* 属および *Nitrococcus* 属、アンモニア酸化細菌である *Nitrosospira* 属の合成遺伝子と NJ1 株が持つ合成遺伝子の配列は大きく異なっていた (図 4.1)。また、非常に興味深いことに合成遺伝子と近縁な遺伝子が NJ1 株と同じ lineage II に属している *N. moscoviensis* のゲノム中にも存在していることがわかった (47.29%、WP_053378364)。

4.3.2. AHL レポーター株によるバイオアッセイ

AHL レポーター株である CV026 株および VIR07 株を用いて、NJ1 株の培養上清 21 の濃縮サンプルをバイオアッセイした結果、濃縮サンプルから AHL は検出することはできなかった (data not shown)。おそらく、*N. japonica* NJ1 株の培養上清中に含まれる AHL の濃度が、AHL レポーター株の検出限界よりも低いためだと考えられる。一方、AHL レポーター株である CV026 株および VIR07 株を用いて、AHL 合成遺伝子を形質転換させた大腸菌の培養上清サンプルをバイオアッセイした結果、VIR07 株では陽性反応が確認された (図 4.2)。バイオアッセイにより、解析に十分量の AHL を確認したので、LC-MS/MS による AHL 同定を宇都宮大学生物工学研究室の諸星博士に委託した。LC-MS/MS による解析の結果、AHL 合成遺伝子組み換え大腸菌の培養上清中から C10-HSL、3-oxo-C10-HSL、3-OH-C10-HSL、および 3-OH-C12-HSL の 4 種類の AHL が同定された (図 4.3)。LC-MS/MS のピーク強度から分泌されている 4 種類の AHL の相対的な濃度を比較した。その結果、3-OH-C12-HSL が最も多く分泌されており、残りの 3 種類の C10HSL のいずれも 3-OH-C12-HSL の 1/5 程度分泌されていることがわかった。

4.3.3. AHL 添加による NJ1 株の亜硝酸酸化活性および増殖活性への影響

表 4.2 の培養条件における NJ1 株の亜硝酸消費量と菌体数変化を図 4.4 に示した。条件①では 10 日間で 1.5 mM の亜硝酸を消費し、亜硝酸の消費に伴い菌体数が増加することが確認された (図 4.4A)。また、同様に条件②でも亜硝酸の消費と菌体数の増加が確認された (図 4.4B)。しかし一方で、条件③では亜硝酸消費と菌体数の増加が完全に阻害されることがわかった (図 4.4C)。条件③の結果において、亜硝酸消費と菌体数の増加が阻害された原因は定かではないが、おそらく大腸菌の代謝物または LB 培地中の有機物が NJ1 株の活性を阻害すると考えられる。さらに、非常に興味深い点は条件②の培養条件においても、条件③の培養条件と同様に NJ1 株の活性を阻害する物質が含まれているにも関わらず、NJ1 株が通常の活性を示すことである (図 4.4B および C)。つまり、この結果は NJ1 株の阻害されている亜硝酸酸化活性が AHL 添加により増強されたことを意味している。この結果を受け、NJ1 株が分泌する AHL が亜硝酸酸化活性を担う NXR をコードする遺伝子を制御しているのではないかと考え、下記の 4.3.4 で NXR をコードする遺伝子の発現量を調査した。

4.3.4. *NxrA* 遺伝子の発現制御

各培養条件における各 *nxrA* 遺伝子の発現量を比較すると、*nxrA1* 遺伝子に関しては亜硝酸を添加した条件①でのみ発現量が増加していることがわかった (図 4.5)。また、*nxrA3* 遺伝子に関しては AHL を添加した条件③でのみ発現量が増加していることが明らかになった (図 4.5)。さらに、*nxrA2* 遺伝子の発現量に関してはどの培養条件でも発現量は非常に低かった (図 4.5)。

4.3.5. 細菌数に依存した QS 機構関連遺伝子の発現

活性試験における NJ1 株の亜硝酸消費と菌体数変化を図 4.6A に、AHL 合成遺伝子と AHL 受容体遺伝子の発現量変化を図 4.6B に示した。12 日間の振とう培養の結果、1.5 mM の亜硝酸の減少に伴い、細菌数が増加することが確認された（図 4.6A）。さらに、培養初期段階（0-1 日）では AHL 合成遺伝子と AHL 受容体遺伝子の発現量はほとんど確認されないが、2-7 日にかけて徐々に上昇していき、8 日以降で発現量が顕著に上昇することが確認された。

4.4. 考察

4.4.1. 系統学的解析

系統解析を行った結果、既存の硝化細菌の合成遺伝子と NJ1 株が持つ合成遺伝子は非常に異なっており、NJ1 株の AHL 合成酵素は非常に新規であることがわかる(図 4.1)。また、NJ1 株が属している *Nitrospira* lineage II グループの代表株である *N. moscoviensis* のゲノム中にも、NJ1 株の AHL 合成遺伝子と近縁な未知機能遺伝子が存在していることから、lineage II に属する他の *Nitrospira* も QS 機構を保有していることが考えられる。

4.4.2. AHL の検出

NJ1 株の培養上清 21 の濃縮サンプルから AHL が検出できなかった原因として 2 つの点が考えられる。一つは AHL の分解能である。既往研究において、AHL 合成酵素をゲノム上に有する *N. multiformis* の培養上清からも本研究と同様に AHL は検出することはできなかった⁷⁶⁾。この結果に対して Gao らは *N. multiformis* が AHL 分解能を持ち、AHL が蓄積しにくいために培養上清から AHL が検出できないのではないかと考えた。実際に、AHL が過剰に含まれる組み換え大腸菌の培養上清を *N. multiformis* に添加して培養した結果、数時間でレセプター株の検出限界以下まで AHL が分解されることが明らかになった。そこで、NJ1 株にも AHL 分解能が保有されているのかもしれない。もう一つの原因として考えられるのは NJ1 株が分泌する AHL 濃度が非常に低いことである。NJ1 株は非常に密に凝集したマイクロコロニーを形成する。もし、NJ1 株が AHL を同種間での細胞間コミュニケーションに使用しているのであれば、非常に近い距離に同種がいるので微量な AHL のみを分泌すると考えられる。しかしながら、21 以上の分離株を濃縮するのは困難であるため、分離株の培養上清から AHL を検出することは断念した。

4.4.3. AHL の同定

LC-MS/MS によって、NJ1 株の合成遺伝子を組み換えた大腸菌は 4 種類の AHL を分泌していることが明らかになった(図 4.3)。1 種類の AHL 合成酵素から複数種類の AHL を分泌することは既往研究でも報告されており⁷⁸⁾、複数種類の AHL を分泌することで環境の状態を把握しているのではないかと推測されている⁸⁸⁾。既往研究で報告されている LuxI ファミリーに属している AHL 合成酵素は、S-アデノシルメチオニン(SAM)にアシル基が付属した acyl-carrier protein (ACP)を結合させることで AHL を合成することが知られている(図 4.7)⁸⁹⁾。SAM はメチオニンから Methionine adenosyltransferase 1(NSJP_v1_1822)によって合成され、アシル ACP は脂肪酸合成経路の一部である。*Nitrospira japonica* NJ1 株のゲノム解析の結果、NJ1 株は SAM 合成経路、脂肪酸合成経路を保持しているため、NJ1 株は SAM、アシル ACP を基に AHL を合成していると考えられる。同定された AHL が C10-HSL、3-oxo-C10-HSL、3-OH-C10-HSL、および 3-OH-C12-HSL であることを踏まえると、基となったアシル ACP はデカノイル ACP (C10-ACP) とドデカノイル ACP (C12-ACP) であると予想される。脂肪酸合成の段階において、デカノイル ACP、3-oxo-デカノイル ACP、3-OH-デカノイル ACP、3-OH-ドデカノイル ACP を合成することは可能であるため、一つの合成酵素遺伝子を大腸菌に組み換えたとしても上記の 4 種類の AHL を合成される可能性は非常に高い。また、既往研究における AHL 合成酵素の構造解析、遺伝子変異解析により、AHL 合成酵素は特定の長さのアシル基 (C6~C8) を持つアシル ACP を選択し、複数の AHL を合成することが報告されている^{90,91,92)}。したがって、同定された AHL が 4 種類であったのは大腸菌により合成された AHL が修飾を受けているのではなく、*Nitrospira japonica* NJ1 の合成酵素遺伝子によって 4 種類の AHL が合成されているためである。

既往研究で報告されている硝化細菌から同定された AHL を表 4.5 にまとめた。表 4.5 から硝化細菌によって様々な種類の AHL が分泌されていることがわかる。また、

NOB である *Nitrospira* と *Nitrobacter* 間で C10HSL が共通しており、C12HSL に関しては *Nitrospira* のみで共通していた (表 4.5)。しかしながら、硝化細菌の AHL については未だ報告が少なく、属レベルで共通した AHL を利用しているかは定かではなく、さらなる知見の集積を待つ必要がある。

4.4.4. AHL 添加による NJ1 株の亜硝酸酸化活性および増殖活性への影響

4.3.3 において、条件③では NJ1 株の亜硝酸酸化活性、増殖活性が阻害された (図 4.4)。条件③では大腸菌の代謝物または LB 培地中の有機物を含有しており、それらが NJ1 株の活性を阻害したと考えられる。既往研究において、金属パイプのバイオフィームから分離培養された *N. moscoviensis* を培養する際に、 0.75g l^{-1} 以上の有機物 (酵母エキス、肉エキス、ペプトン) を添加すると増殖に阻害がかかることが報告されており⁴⁰⁾、NJ1 株も *N. moscoviensis* と同様に阻害を受けると考えられる。

4.4.5. *NxrA* 遺伝子の発現制御

4.3.4 において、3 つの *nxrA* 遺伝子の発現量を測定した結果、3 つの *nxrA* 遺伝子は異なる遺伝子発現制御を受けていることがわかった (図 4.5)。非常に興味深いことに AHL で誘導される *nxrA3* 遺伝子の上流には σ -54 dependent transcriptional regulator という転写制御タンパク質が保持されている (図 4.8)。既往研究において、クオラムセンシング機構における遺伝子制御の一つに σ -54 因子による転写制御が報告されている。そのため、 σ -54 dependent transcriptional regulator の下流にある *nxrA2* 遺伝子も *nxrA3* 遺伝子と同様に AHL によって発現制御を受けていると考えられる。

4.3.4 の結果において *nxrA1* 遺伝子は亜硝酸添加によって誘導され、*nxrA3* 遺伝子は AHL 添加によって誘導されることが明らかになった。*NxrA1* 遺伝子の結果は、NJ1 株が生育環境の亜硝酸濃度に依存して NXR をコードする遺伝子の制御していることを示して

おり、亜硝酸が存在している環境でのみ *nxrA1* 遺伝子を発現させるのは非常に理に適っていると言える。一方で、*nxrA3* 遺伝子の結果は NJ1 株が細菌数に依存して NXR をコードする遺伝子の制御していることを示している。おそらく、細菌数が上昇する増殖期などエネルギーを必要とする際に、NJ1 株は AHL を介して *nxrA3* 遺伝子の発現を制御させ、NXR により多くのエネルギーを獲得するのではないかと考えられる。

4.4.6. 細菌数に依存した QS 機構関連遺伝子の発現

4.3.5 において、細菌数と QS 機構関連遺伝子を比較すると、細菌数の増加に伴い AHL 合成遺伝子と AHL 受容体遺伝子の発現量が上昇する傾向にあることが確認できる (図 4.6)。また、培養 8 日において AHL 合成遺伝子が顕著な上昇することから、ある一定量の AHL の蓄積、または細菌数 (約 2.0×10^6 cells ml⁻¹) が QS 機構制御の閾値と考えられる。既往研究において、*Nitrobacter winogradskyi* は QS 機構によりある一定の細菌数に達すると増殖速度が遅くなることが報告されている⁷⁷⁾。図 4.6 の結果から NJ1 株の増殖速度に変化はないため、亜硝酸酸化といった増殖以外の微生物機能を QS 機構によって制御していると考えられる。

4.5. 結言

N. japonica NJ1 株のゲノム配列から発見された QS 機構について調査した結果、NJ1 株が保持する AHL 合成酵素が 4 種類の AHL を合成することが明らかとなった。また、合成酵素遺伝子を組み換えた大腸菌が分泌した AHL を添加することより、NJ1 株の亜硝酸酸化活性が増加することが明らかとなった。さらに、AHL を添加することで亜硝酸酸化を担う NXR をコードする *nxrA3* 遺伝子の発現が誘導されることも明らかとなった。以上の 3 つの結果を踏まえると、NJ1 株は AHL を分泌することで亜硝酸酸化活性を制御していると思われる。本章の *Nitrospira japonica* NJ1 株が QS 機構により亜硝酸酸化活性を制御しているという発見は、*Nitrospira* と異種間との共生関係の解明、バイオプロセスにおける AHL 添加による亜硝酸酸化活性制御の可能性といった点で重要な知見になると考えられる。

表 4.1 AHL 合成遺伝子組み換え用プライマー

(制限酵素処理される部位を下線で示した)

プライマー	塩基配列
NSJP1610_f	<u>GGGGCCCTGAGGGCC</u> ATGAGCGACTCGATGGTGGT
NSJP1610_r	<u>CCGCGGCCGCTCAGGCGGCTTCGT</u> ATTGG

表 4.2 生理活性試験の培養条件

培養条件	条件①	条件②	条件③
NO ₂ ⁻	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
AHL	—	+	—
大腸菌代謝物	—	+	+

表 4.3 NXR をコードする遺伝子の発現制御調査の培養条件

培養条件	条件①	条件②	条件③	条件④
NO ₂ ⁻	0 mM	1.5 mM	0 mM	0 mM
AHL	—	—	+	—
大腸菌代謝物	—	—	+	+

表 4.4 定量 PCR に使用したプライマー

プライマー	塩基配列	標的
glnA_23f	AGTTTGCCAAAAAAAACAAG	glnA
glnA_414r	GATCGAAGATGAAGAACTC	
nxrA1_722f	TTTTAATAACAGCGTTCTG	<i>nxrA1</i>
nxrA1_1144r	TGAACTGCTTCAGAAAATC	
nxrA2_721f	ATGAACACCCGCTTCA	<i>nxrA2</i>
nxrA2_1104r	TTTGGAACCACCCAGG	
nxrA3_732f	AGGCATCAACGCTTTG	<i>nxrA3</i>
nxrA2_721f	ATGAACACCCGCTTCA	
1610_f	ATGAGCGACTCGATGGTGGT	<i>aubI</i>
1610_r	TCAGGCGGCTTCGTATTGG	
1610_f	ATGGCAGAAGCCTCAAATATCC	<i>aubR</i>
1611_r	TTAGACCGCGCTGGGAAGG	

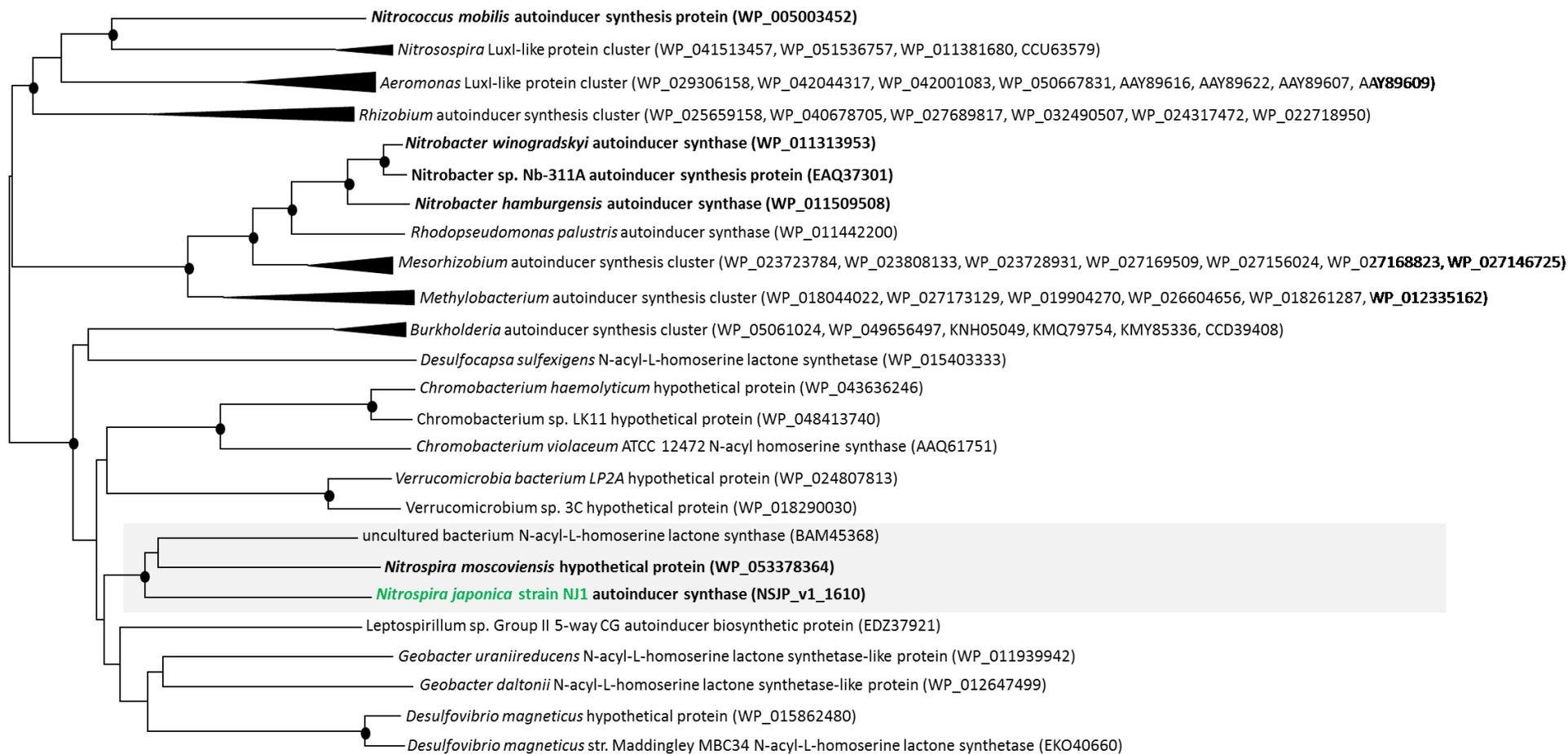
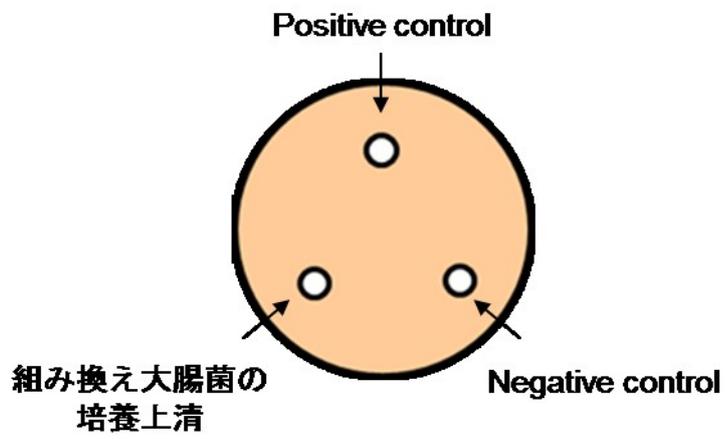


図 4.1 AHL 合成遺伝子の系統樹 (スケールバー : 5%)



VIR07株
長い側鎖 (C10-C18) のAHL

図 4.2 AHL レポーター株によるバイオアッセイ

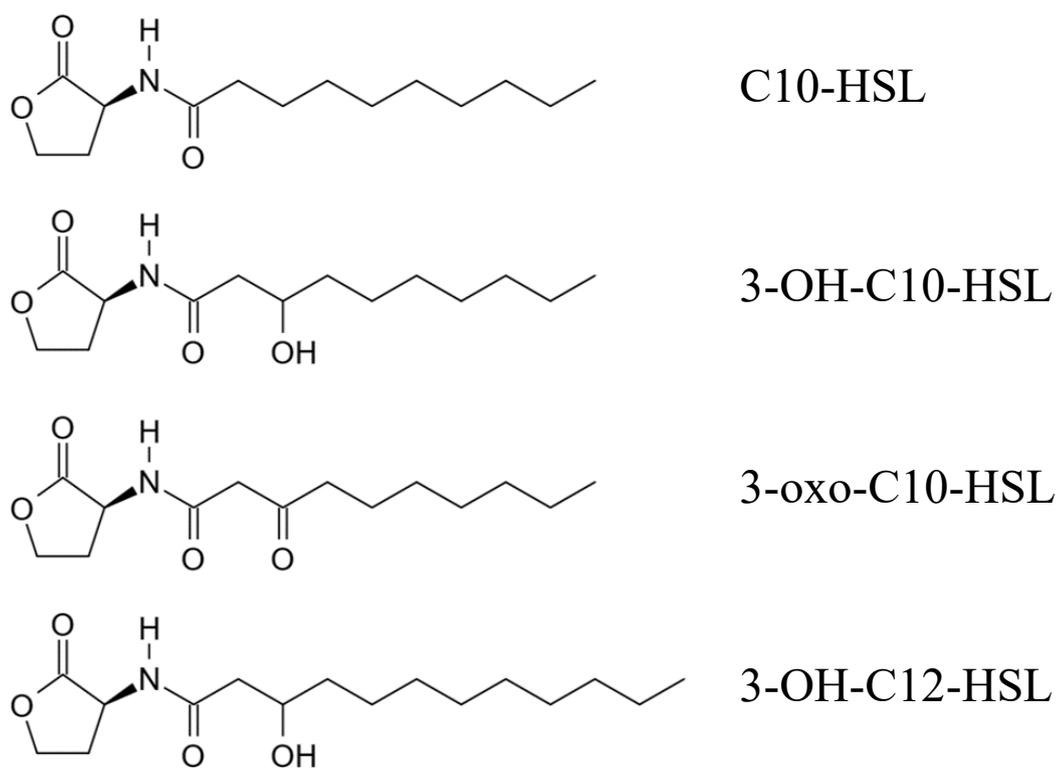
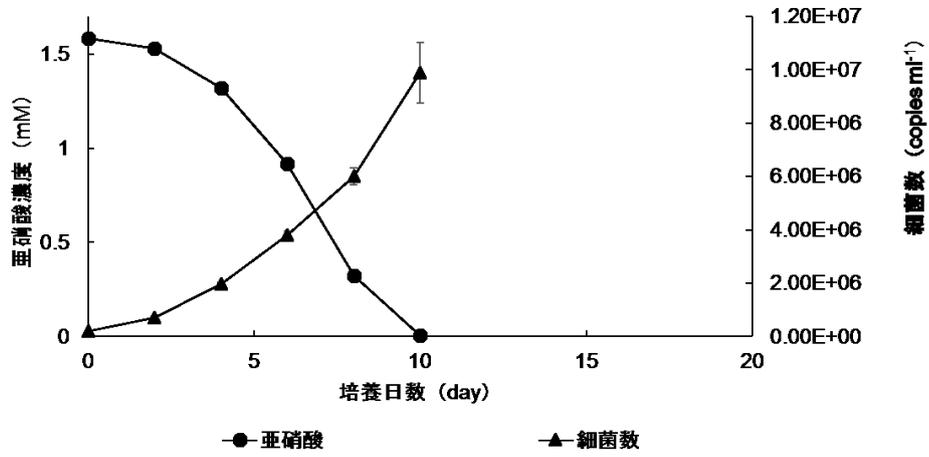


図 4.3 LC-MS/MS により同定した AHL



B

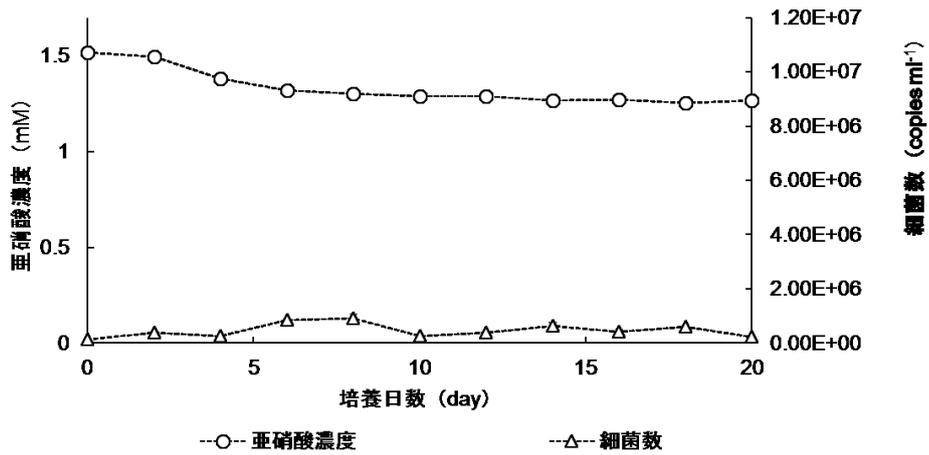
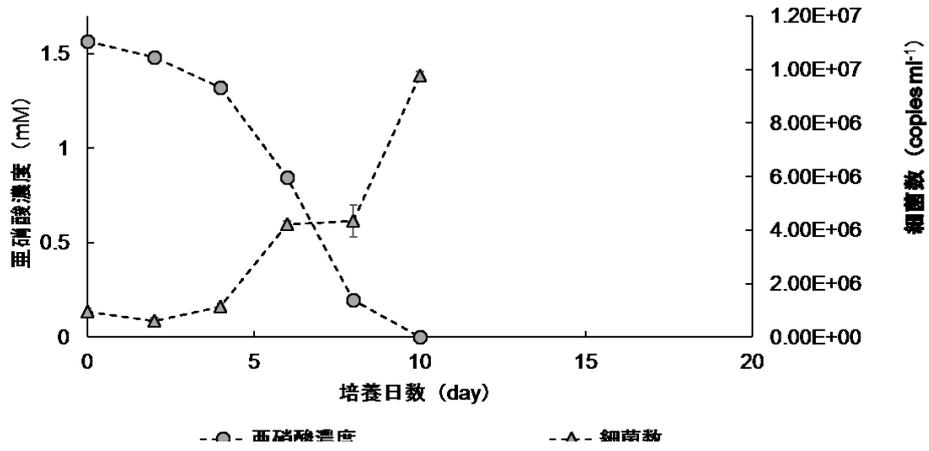


図 4.4 AHL 添加による NJ1 株の亜硝酸酸化活性および増殖活性への影響

A : 条件① B : 条件② C : 条件③

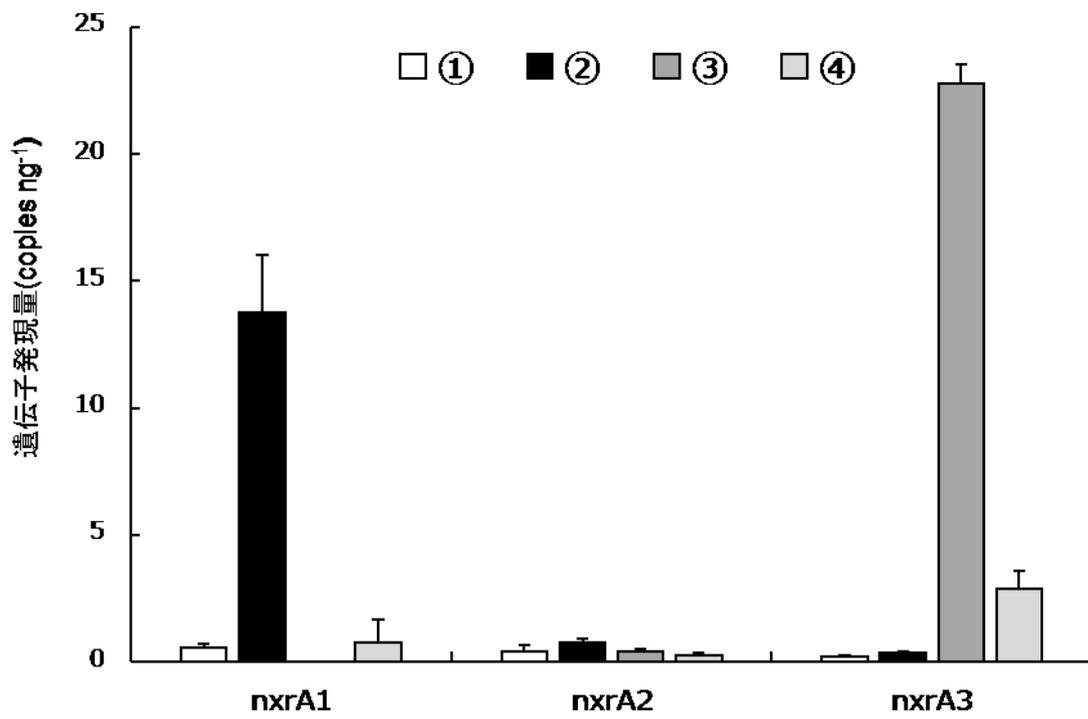


図 4.5 *NxrA* 遺伝子発現量の測定結果

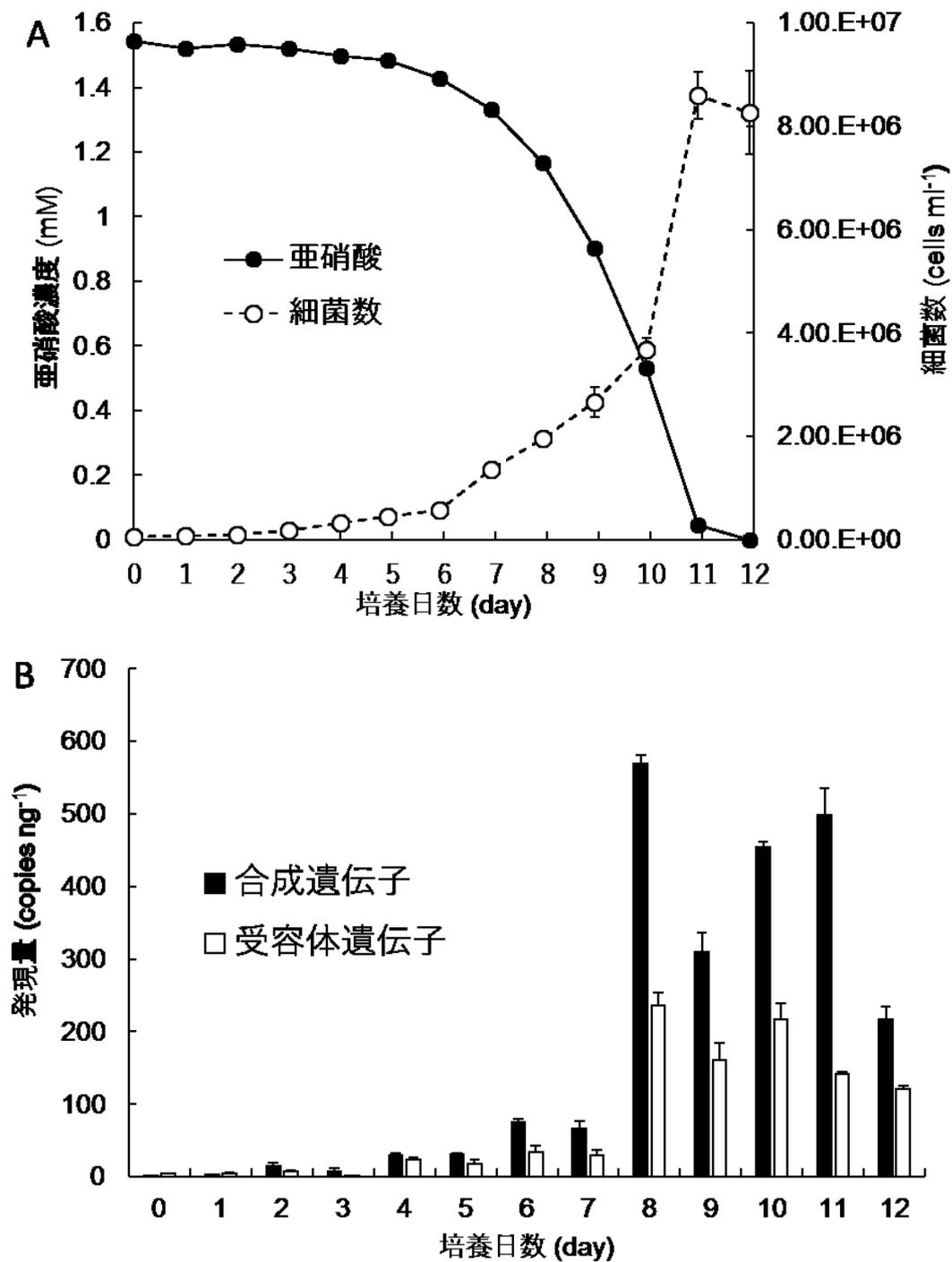


図 4.6 細菌数に依存した QS 機構関連遺伝子の発現

A : 亜硝酸濃度変化、細菌変化

B : QS 機構関連遺伝子の発現

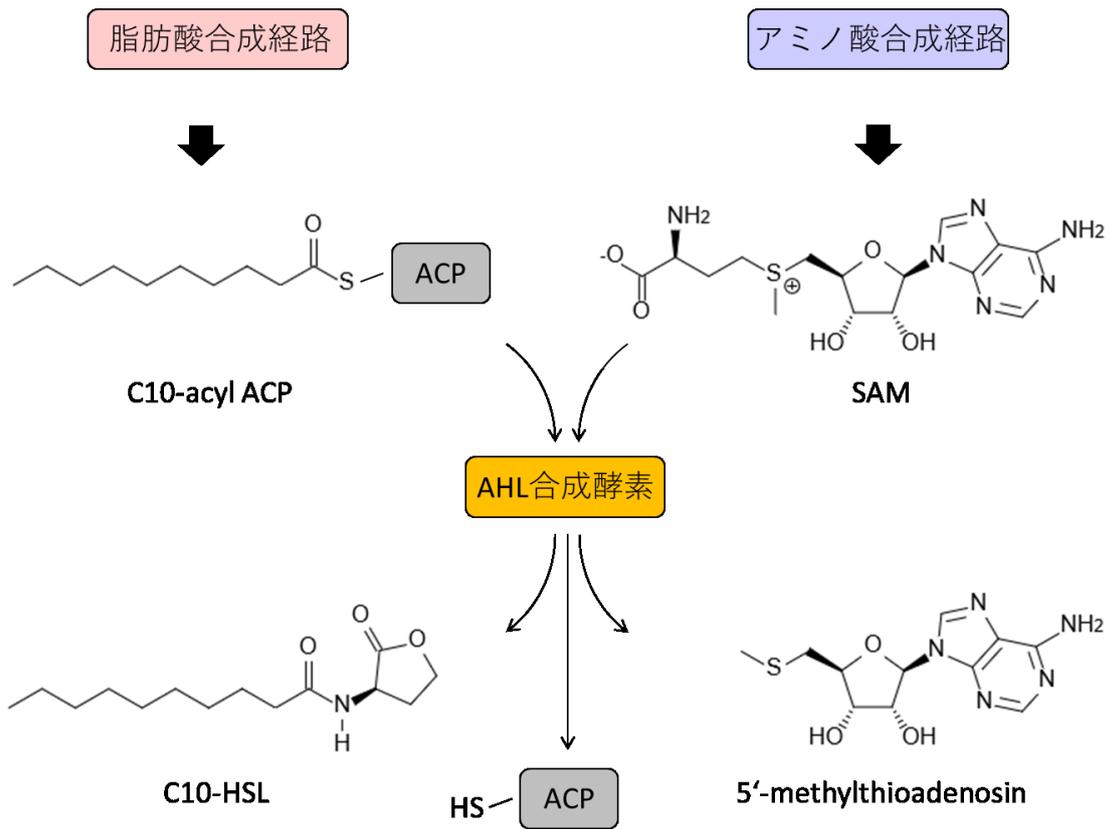


図 4.7 AHL 合成経路の概略図

表 4.5 硝化細菌の AHL

細菌種	C6	C7	C8	C9	C10			C12		C14		
					-	3-oxo	3-OH	7,8-trans	-	3-OH	-	3-oxo
NOB	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ⁷⁸⁾	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Nitrospira japonica</i> strain NJ1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
	Uncultured clone (from <i>Nitrospirae</i>) ⁷⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AOB	<i>Nitrosomonas europaea</i> ⁷⁵⁾	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Nitrosospira multiformis</i> ⁷⁶⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

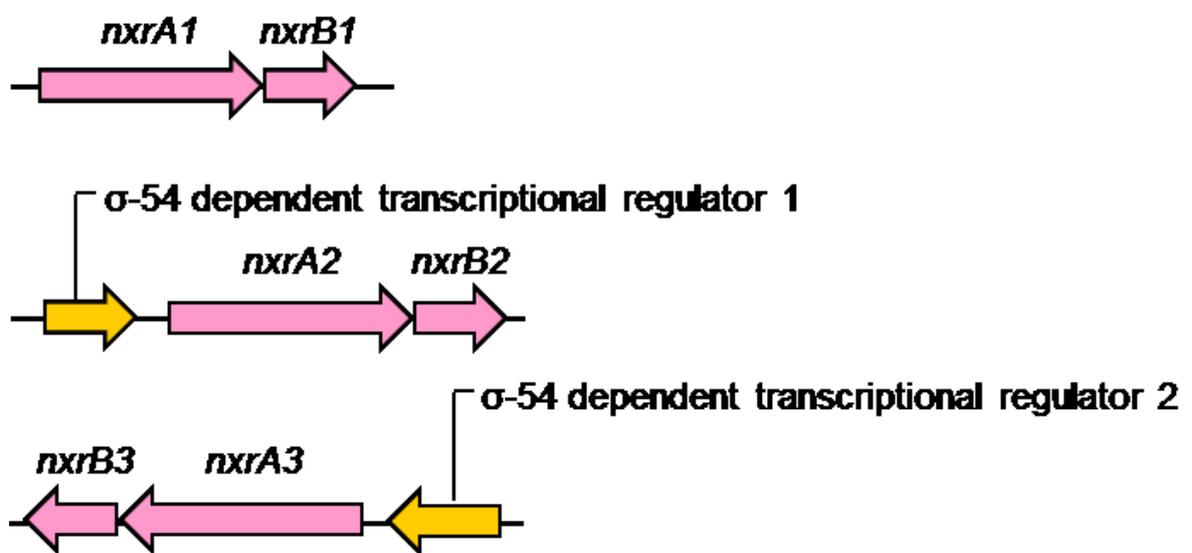


図 4.8 σ-54 dependent transcriptional regulator と NXR オペロンの概略図

第5章 結言

5.1. 本研究で得られた知見

5.1.1. 2系統の *Nitrospira* の生理学的性質の比較

2系統の *Nitrospira* 分離株の詳細な生理学的性質を比較した結果、亜硝酸半飽和定数、酸素半飽和定数、および倍加時間は顕著な違いが確認されなかったが、アンモニアに対する感受性に関しては顕著な違いが確認された。分離株の生理学的性質の違いから、ND1 株と NJ1 株は排水処理場の活性汚泥において生態学的ニッチを形成していると思われる。

5.1.2. 2系統の *Nitrospira* の比較ゲノム解析

2系統の *Nitrospira* 分離株のゲノム配列を比較した結果、鞭毛合成、CRISPR-Cas 機構、QS 機構、および窒素代謝経路が顕著に異なっていた。前述した遺伝子群の違いは生理活性試験では判断することが困難な性質であり、比較ゲノム解析を駆使したことにより初めて見いだされた発見である。また、前述した違いは既往研究の *Nitrospira* のゲノム解析では着目されていない性質であり、非常に目新しい発見でもある。

5.1.3. *Nitrospira japonica* の Quorum sensing 機構

ゲノム配列解読によって NJ1 株はこれまでに *Nitrospira* の研究では報告のない微生物活性制御メカニズムである QS 機構を保持していることがわかった。NJ1 株の QS 機構を詳細に調査した結果、NJ1 株はシグナル物質として4種類の AHL を分泌し、亜硝酸酸化反応を担う亜硝酸酸化還元酵素の遺伝子発現を制御することで、NJ1 株の亜硝酸酸化活性が制御されていることが明らかとなった。

5.2. 活性汚泥における亜硝酸酸化の制御

本研究で得られた知見に基づいて、活性汚泥における亜硝酸酸制御について考察する。活性汚泥による窒素除去プロセスの硝化工程では、アンモニアを亜硝酸まで酸化させる部分硝化と、アンモニアを硝酸まで酸化させる完全硝化が採用されている。従来の排水処理手法ではアンモニアを完全硝化するために NOB による亜硝酸酸化を促進させるが、ANAMMOX 細菌を利用した排水処理手法ではアンモニアを部分硝化するために NOB による亜硝酸酸化を阻害する必要がある。本研究の知見を踏まえると、完全硝化の場合は流入アンモニア濃度を低くし、AHL を添加することで NOB の亜硝酸酸化活性を上昇させ、部分硝化の場合は流入アンモニア濃度を高くし、AHL 阻害剤などで NOB の亜硝

硝酸化活性を低下させるといった制御方法が提案できる。

5.3. 本研究の波及効果

本研究で算出した 2 系統の *Nitrospira* の動態パラメーターは排水処理プロセスにおける亜硝酸酸化反応を予測、理解、制御する上で必要不可欠なパラメーターである。また、動態パラメーターを含む生理学的性質は活性汚泥中における、NOB との競合、アンモニア酸化細菌との共生関係を解明する上でも必要な知見である。そのため、水処理プロセスの安定、向上化や *Nitrospira* の動態パラメーターを用いた数理シミュレーション、*Nitrospira* の自然生態系への適応、共生関係の解明に応用されることが期待される。

さらに、本研究のゲノム解析により NJ1 株が微生物制御機構である QS 機構を保持しており、QS 機構によって亜硝酸酸化活性を制御していることが明らかになった。おそらく、環境中に生息する一部の *Nitrospira* は NJ1 株のように QS 機構を保持すると考えられる。そのため、活性汚泥、農地における亜硝酸酸化活性を制御させる際に、本研究で同定した AHL の利用が期待される。

以上のように、本研究で明らかにした 2 系統の *Nitrospira* の詳細な生理学的性質やゲノム配列情報、QS 機構による亜硝酸酸化活性制御の知見は、排水処理工学、微生物生態学において重要な知見になることが期待される。

5.4. 展望

5.4.1. トランスクリプトーム解析による QS 機構関連遺伝子の網羅的探索

本研究の第 4 章で AHL を添加することで NJ1 株の活性が大きく変化すること、亜硝酸酸化還元酵素をコードする遺伝子の発現が AHL に制御されていることを明らかにしたが、AHL を介した QS 機構の制御下にある遺伝子をほとんど特定できていない。そこで今後の展望として、トランスクリプトーム解析による NJ1 株の QS 機構の制御下にある遺伝子の網羅的探索により、NJ1 株の QS 機構の全貌を解明し、NJ1 株を始めとする *Nitrospira* の活性制御が期待される。

5.4.2. AHL を介した硝化細菌の共生関係の解明

QS 機構は微生物の活性制御機構と知られている一方で、微生物間相互作用として異種間における共生関係にも寄与していることが知られている。アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* は、アンモニアから硝酸への一連の硝化反応を担う微生物群であるため、古くから共生関係が示唆されてきた。しかし、これまで考えられてきた共生

関係はアンモニアや亜硝酸などの基質のやり取りのみであり、AHL などのシグナル物質による共生関係の有無は不明であった。そこで今後の展望として、当研究室が活性汚泥から獲得したアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas yedoensis* と NJ1 株の AHL を介した共生関係を解明することが期待される。

5.4.3. AHL 合成酵素の探索

本研究で初めて *Nitrospira* 属の微生物が QS 機構を保持することが明らかになったが、本研究で同定した AHL は一部の微生物にのみ作用すると考えられる。そこで今後の展望として、環境中の *Nitrospira*-like な AHL 合成酵素を探索し、*Nitrospira* を始めとした硝化細菌の活性制御に関わると考えられる AHL を同定することが期待される。NJ1 株以外の *Nitrospira* の AHL 合成遺伝子を明らかにすることで、*Nitrospira* 属で共通する AHL や亜硝酸酸化活性を向上させる AHL、亜硝酸酸化活性を阻害させる AHL の発見が期待される。

5.4.4. *Nitrospira* の有機物代謝

第 4 章の NJ1 株の QS 機構の解明において、NJ1 株が大腸菌の代謝物または LB 培地中に含まれる有機物によって、活性が阻害されることが示唆された。既往研究においても、*Nitrospira moscoviensis* が有機物（酵母エキス、肉エキス、ペプトン）によって増殖が阻害されることが報告されており⁴⁰⁾、一部の *Nitrospira* は有機物によってその活性が変化すると考えられる。そこで今後の展望として、遺伝子発現解析によって ND1 株と NJ1 株の代謝経路に対する有機物の影響を明らかにすることで、両株の生態学的ニッチを決定する要因に迫ることが期待される。

5.4.5. *Nitrospira* と *Nitrobacter* の基質親和性

第 2 章の *Nitrospira* の生理学的性質の解明において、*Nitrospira* 属と *Nitrobacter* 属の亜硝酸、酸素に対する親和性の違いを微生物構造から考察した。この仮説を確認するためには 2 つの NOB から亜硝酸酸化還元酵素を精製し、亜硝酸に対する半飽和定数を測定する必要がある。精製した酵素から得られた半飽和定数と今回得られた結果を比較した際に、*Nitrobacter* においてのみ顕著な差が確認できれば上記の仮説を証明することができる。それにより、従来は推測の域でとどまっていた *Nitrospira* 属と *Nitrobacter* 属の基質親和性の違いの要因を明白にすることができる。

Appendix

ND1 株、NJ1 株の保有遺伝子一覧

表 A.1 ND1 株と NJ1 株が保持する遺伝子一覧

遺伝子	機能	CDS 番号	近縁種 (SwissProt database)	近縁種 (TrEMBL database)
ND1 株				
窒素代謝				
nxrA1	putative Nitrate oxidoreductase, alpha subunit	NSDF_v1_63189	Dechloromonas aromatica (Q47CW6; 927/1147, 24.4%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI59; 1147/1147, 99.48%)
nxrA2	putative Nitrate oxidoreductase, alpha subunit	NSDF_v1_63207	Dechloromonas aromatica (Q47CW6; 927/1146, 23.41%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI41; 1146/1146, 98.69%)
nxrB1	putative Nitrate oxidoreductase, beta subunit	NSDF_v1_63188	Rhodovulum sulfidophilum (Q8GPG3; 325/429, 35.31%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI40; 429/429, 99.53%)
nxrC1	putative Nitrate oxidoreductase, gamma subunit	NSDF_v1_61084	Ideonella dechloratans (P60000; 239/275, 27.76%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBQ9; 275/275, 94.55%)
nxrC2	putative Nitrate reductase, gamma subunit	NSDF_v1_63165	Ideonella dechloratans (P60000; 239/317, 31.21%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI81; 317/317, 99.68%)
nxrC3	putative Nitrate oxidoreductase, gamma subunit	NSDF_v1_63172	Thauera selenatis (Q9S1G7; 239/277, 26.67%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI74; 280/277, 98.92%)
nirC	Nitrite transporter NirC	NSDF_v1_60562	Salmonella typhimurium (P25926; 269/276, 41.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD05; 276/276, 97.83%)
nirC2	putative Nitrite transporter NirC	NSDF_v1_63202	Bacillus subtilis (O05399; 266/293, 32.84%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI46; 293/293, 97.95%)
nasA	Nitrate transporter	NSDF_v1_60544	Bacillus subtilis (P42432 ; 401/413, 40.15%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD23; 413/413, 95.16%)
nirK1	putative Copper-containing nitrite reductase (NO-forming)	NSDF_v1_50537	Neisseria meningitidis (Q9JTB8; 386/323, 38.1%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PG56; 323/323, 91.95%)
nirK2	Copper-containing nitrite reductase	NSDF_v1_62149	Neisseria gonorrhoeae (Q02219; 392/321, 38.19%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8T5; 321/321, 97.82%)
nirA	Ferredoxin--nitrite reductase	NSDF_v1_60559	Synechococcus elongatus (P39661; 512/531, 44.47%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD08; 531/531, 99.06%)
nrfA	Nitrite reductase (Cytochrome ammonia-forming)	NSDF_v1_62627	Bacteroides fragilis (Q5LI95; 493/457, 38.84%)	Chthoniobacter flavus (B4CX41; 471/457, 70.63%)
nrfH	Cytochrome c-type protein	NSDF_v1_62626	Wolinella succinogenes (Q9S1E6; 177/152, 36%)	Austwickia chelonae (K6VTZ3; 163/152, 56.86%)
napG	Ferredoxin-type protein NapG	NSDF_v1_63163	Escherichia coli (P0AAL4; 231/201, 35%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI83; 201/201, 97.01%)
amtB1	ammonium transporter	NSDF_v1_60566	Bacillus subtilis (Q07429; 404/442, 53.23%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD01; 442/442, 97.96%)
glnA	glutamine synthetase	NSDF_v1_60563	Nostoc sp. (P00964; 474/469, 62.34%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD04; 469/469, 100%)
nadE	putative glutamine-dependent NAD(+) synthetase	NSDF_v1_60568	Thermotoga maritima (Q9X0Y0; 576/589, 48.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCZ9; 589/589, 95.76%)
gltD	Glutamate synthase [NADPH] small chain	NSDF_v1_63055	Mycobacterium tuberculosis (P96219; 488/477, 60.88%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PII2; 477/477, 97.48%)
gltB	glutamate synthase, large subunit	NSDF_v1_63054	Synechocystis sp. (P55037; 1550/1506, 60.62%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PII3; 1506/1506, 99.07%)
gdhA	Glutamate dehydrogenase	NSDF_v1_61588	Thermotoga maritima (P96110; 416/418, 56.93%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAF8; 419/418, 98.09%)

nifA	Nif-specific regulatory protein	NSDF_v1_60451	Escherichia coli (P19323; 692/517, 39.61%)	Candidatus Nitrospira defluvii (B3U4Q6; 517/517, 97.29%)
nifA2	Nif-specific regulatory protein NifA	NSDF_v1_63206	Escherichia coli (P19323; 692/506, 40.24%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI42; 506/506, 97.23%)
Fnr	putative Fumarate and nitrate reduction regulatory protein	NSDF_v1_62451	Escherichia coli (P0A9E5; 250/236, 29.2%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7X1; 236/236, 97.46%)
glnB	Nitrogen regulatory protein P-II	NSDF_v1_60174	Thermotoga maritima (P46213; 919/107, 32%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PE43; 107/107, 99.07%)
glnB2	Nitrogen regulatory protein P-II	NSDF_v1_62016	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P967; 113/113, 96.46%)
glnK	regulatory protein, P-II 2, for nitrogen assimilation by glutamine synthetase, regulates GlnL (NRII) and GlnE (ATase)	NSDF_v1_60565	Aquifex aeolicus (O66513; 112/112, 68.75%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD02; 112/112, 100%)
glnD	Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme	NSDF_v1_60564	Azospirillum brasilense (Q8RQD1; 933/894, 33.37%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD03; 894/894, 97.32%)
ntrX	Nitrogen assimilation regulatory protein NtrX	NSDF_v1_60754	Azorhizobium caulinodans (Q04849; 454/466, 44.71%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCM0; 466/466, 98.49%)
cynS	Cyanate hydratase	NSDF_v1_60561	Thiobacillus denitrificans (Q3SHJ2; 147/146, 39.86%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD06; 146/146, 100%)
尿素分解				
ureA	urease gamma subunit	NSDF_v1_60575	Kocuria rhizophila (B2GI08; 100/100, 73%)	Coraliomargarita akajimensis (D5EM12; 100/100, 77%)
ureB	urease beta subunit (modular protein)	NSDF_v1_60574	Natronomonas pharaonis (Q3IRZ6; 132/153, 55.56%)	Ruminococcus sp. (W0U6Z8; 226/153, 61.54%)
ureC	urease alpha subunit	NSDF_v1_60573	Nostoc punctiforme (B2IT66; 571/575, 74.56%)	Pseudanabaena biceps (L8N5U8; 570/575, 74.91%)
ureD	putative Urease accessory protein UreD	NSDF_v1_60570	Delftia acidovorans (A9BUC8; 305/289, 33.81%)	Desulfotomaculum carboxydivorans (F6B8Y3; 290/289, 30.9%)
ureF	putative Urease accessory protein UreF	NSDF_v1_60572	Actinobacillus pleuropneumoniae (O54423; 227/228, 30.32%)	Actinobacillus minor (C8L042; 231/228, 32.13%)
ureG	urease accessory protein	NSDF_v1_60571	Alkalilimnicola ehrlichii (Q0AC95; 211/223, 78.72%)	Thiocapsa marina (F9UCI8; 204/223, 74.6%)
urtA	putative branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	NSDF_v1_60581	Pseudomonas aeruginosa (P27017; 385/454, 28.28%)	Cytophaga hutchinsonii (Q11VN9; 445/454, 70.05%)
urtB	conserved membrane protein of unknown function	NSDF_v1_60580	Pseudomonas aeruginosa (P21627; 307/513, 30.07%)	Candidatus Entotheonella (W4LWH4; 507/513, 48.46%)
urtC	conserved membrane protein of unknown function	NSDF_v1_60579	Salmonella typhimurium (P30296; 425/381, 26.79%)	Candidatus Entotheonella sp.(W4LVW4; 394/381, 60.78%)
urtD	Urea ABC transporter, ATP-binding protein UrtD	NSDF_v1_60578	Shigella flexneri (P0A9S9; 255/255, 32.94%)	Desulfotomaculum carboxydivorans (F6B8X5; 252/255, 58.78%)
urtE	Urea ABC transporter ATP-binding protein	NSDF_v1_60577	Pseudomonas aeruginosa (P21630; 233/236, 37.33%)	Stanieria cyanosphaera (K9XR50; 248/236, 52.97%)
	putative High-affinity nickel/cobalt transport protein	NSDF_v1_61679	Schizosaccharomyces pombe (O74869; 408/266, 30.8%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PF17; 267/266, 62.78%)
炭素代謝				
クエン酸回路 (TCA 回路)				
aclA	ATP citrate lyase, alpha subunit	NSDF_v1_61166	Arabidopsis thaliana (Q9C522; 608/606, 41.77%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ2; 606/606, 99.17%)

acIB	ATP-citrate lyase, beta subunit	NSDF_v1_61167	Arabidopsis thaliana (Q9SGY2; 423/399, 36.15%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ1 ; 399/399, 98.25%)
gltA	Citrate synthase	NSDF_v1_50451	Synechocystis sp. (Q59977; 397/377, 59.52%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFX4; 377/377, 98.67%)
porA	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	NSDF_v1_61025	Methanothermobacter marburgensis (P80900; 383/403, 32.9%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX4; 403/403, 99.26%)
porB	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase beta subunit	NSDF_v1_61026	Methanothermobacter marburgensis (P80901; 288/300, 34.65%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX3; 300/300, 100%)
porC	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	NSDF_v1_61027	Thermococcus kodakaraensis (Q5JIK2; 185/235, 34.76%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX2; 235/235, 100%)
porD	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase delta subunit	NSDF_v1_61024	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX5; 211/211, 100%)
porE	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase epsilon subunit	NSDF_v1_61028	Aquifex aeolicus (O67232; 78/92, 45.83%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX1; 92/92, 100%)
porA2	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	NSDF_v1_60466	Methanothermobacter marburgensis (P80900; 383/401, 33.42%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX4; 403/401, 87%)
porB2	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase beta subunit	NSDF_v1_60465	Methanothermobacter marburgensis (P80901; 288/298, 33.7%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX3; 300/298, 95.95%)
porA3	Pyruvate synthase subunit PorA	NSDF_v1_62503	Methanothermobacter thermautotrophicus (P56810; 383/412, 42.78%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJH3; 412/412, 96.36%)
porB3	Pyruvate synthase subunit PorB	NSDF_v1_62504	Methanocaldococcus jannaschii (Q57714; 298/312, 43.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJH2; 312/312, 95.83%)
pycA	putative Pyruvate carboxylase, subunit A	NSDF_v1_60774	Hydrogenobacter thermophilus (D3DJ42; 472/472, 55.08%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCK3; 472/472, 99.58%)
pycB	putative Pyruvate carboxylase large subunit	NSDF_v1_60775	Hydrogenobacter thermophilus (D3DJ41; 652/662, 45.3%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCK2; 643/662, 98.91%)
mdh	Malate dehydrogenase	NSDF_v1_62853	Chloroherpeton thalassium (B3QSH8; 310/314, 61.04%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ09; 313/314, 97.76%)
fumC	fumarate hydratase (fumarase C), aerobic Class II	NSDF_v1_50454	Halobacterium salinarum (Q9HQ29; 470/484, 55.94%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFX7; 484/484, 98.97%)
sdhA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	NSDF_v1_61796	Rickettsia bellii (Q1RHB9; 596/565, 49.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA31; 551/565, 96.19%)
sdhB	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, Fe-S protein subunit	NSDF_v1_50520	Haemophilus influenzae (P44893; 256/324, 38.96%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PG40; 324/324, 99.38%)
sdhE	Succinate dehydrogenase, subunit C	NSDF_v1_50530	Methanothermobacter thermautotrophicus (O27907; 302/300, 34.46%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PG50; 300/300, 98.33%)
sdhA or nadB	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit or L-aspartate oxidase	NSDF_v1_61162	Methanocaldococcus jannaschii (Q60356; 539/533, 42.12%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ6; 533/533, 98.12%)
sucD	succinyl-CoA synthetase, NAD(P)-binding, alpha subunit	NSDF_v1_61159	Coxiella burnetii (P53591; 294/290, 67.24%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ8; 290/290, 99.31%)
sucC	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	NSDF_v1_61160	Parvibaculum lavamentivorans (A7HT39; 389/392, 59.95%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ7; 392/392, 98.72%)
forA	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	NSDF_v1_61174	Methanocaldococcus jannaschii (Q57715; 389/448, 29.37%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI4; 448/448, 99.11%)
forB	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase beta subunit	NSDF_v1_61178	Methanocaldococcus jannaschii (Q57714; 298/299, 30.77%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI0; 299/299, 100%)
forC	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase	NSDF_v1_61177	Pyrococcus abyssi (Q9UY99; 185/237, 33.53%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI1; 237/237, 93.67%)

	gamma subunit			
forD	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase delta subunit	NSDF_v1_61175	Haemophilus influenzae (P45354; 928/252, 35.19%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI3; 254/252, 96.41%)
forE	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase epsilon subunit	NSDF_v1_61176	Aquifex aeolicus (O67251; 79/107, 38.37%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI2; 107/107, 89.72%)
icd	Isocitrate dehydrogenase	NSDF_v1_60167	Thermus thermophilus (P33197; 496/119, 33.33%)	Leptospirillum ferrooxidans (I0IMI6; 115/119, 65.52%)
icd2	Isocitrate dehydrogenase (NAD(+))	NSDF_v1_60168	Arabidopsis thaliana (Q945K7; 374/337, 50.91%)	Leptospirillum ferro Diazotrophum (C6HUA9; 336/337, 84.08%)
icd3	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	NSDF_v1_61164	Azotobacter vinelandii (P16100 ; 741/743, 71.64%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ4; 743/743, 98.79%)
acnA	Aconitate hydratase	NSDF_v1_61165	Gracilaria gracilis (P49609; 779/748, 57.37%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ3; 748/748, 96.29%)
解糖系および糖新生				
glk	Glucokinase	NSDF_v1_61750	Synechocystis sp. (Q55855; 355/361, 43.28%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA74; 361/361, 95.57%)
pgm	phosphoglucomutase	NSDF_v1_50151	Gluconacetobacter xylinus (P38569; 555/550, 64.72%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PEZ4; 550/550, 95.09%)
algC	Phosphomannomutase/phosphoglucomutase	NSDF_v1_63461	Pseudomonas putida (Q88C93; 463/466, 45.39%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHE2; 466/466, 96.13%)
pgi	Glucose-6-phosphate isomerase	NSDF_v1_61748	Leptospira borgpetersenii (Q04YI9; 445/567, 27.89%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA76; 567/567, 95.77%)
pfkA	6-phosphofructokinase	NSDF_v1_63256	Streptomyces coelicolor (O08333; 342/421, 32.95%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHY9; 421/421, 97.39%)
pfkA2	putative 6-phosphofructokinase (Modular protein)	NSDF_v1_62120	Haemophilus ducreyi (Q8GNC1; 329/774, 32.12%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8W7; 779/779, 97.82%)
fbp	fructose-1,6-bisphosphatase I	NSDF_v1_63463	Gloeobacter violaceus (Q7NGN9; 348/332, 55.18%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHE0; 332/332, 97.89%)
fbaB	Fructose-bisphosphate aldolase class I	NSDF_v1_63464	Escherichia coli (P0A992; 350/307, 33.9%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHD9; 307/307, 99.35%)
tpiA	Triosephosphate isomerase	NSDF_v1_60881	Carboxydotherrmus hydrogenoformans (Q3AFD0; 251/259, 51.98%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCA5; 259/259, 91.89%)
gapA	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	NSDF_v1_60879	Geobacillus stearothermophilus (P00362; 335/335, 64.97%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCA7; 335/335, 99.1%)
pgk	phosphoglycerate kinase	NSDF_v1_60880	Geobacter uraniireducens (A5G382; 399/399, 63.85%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCA6; 399/399, 99.5%)
gpmA	phosphoglyceromutase 1	NSDF_v1_61547	Nitrobacter hamburgensis (Q1QRT7; 207/201, 63.27%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAJ4; 201/201, 99.5%)
apgM	putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	NSDF_v1_62269	Geobacter sulfurreducens (Q74C57; 399/416, 40.29%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8E9; 416/416, 96.88%)
eno	enolase	NSDF_v1_63550	Geobacter sulfurreducens (Q74AR6; 428/428, 69.6%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PH76; 428/428, 99.53%)
pyk	Pyruvate kinase	NSDF_v1_62121	Geobacillus stearothermophilus (Q02499; 587/483, 45.27%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8W6; 483/483, 97.31%)
pykF	Pyruvate kinase	NSDF_v1_50910	Arabidopsis thaliana (Q9FLW9; 579/479, 42.37%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGX5; 478/479, 98.33%)
pdhA	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	NSDF_v1_62527	Porphyra purpurea (P51267; 344/354, 42.64%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJF1; 324/354, 87.23%)
pdhB	Pyruvate dehydrogenase E1 component, beta subunit (Transketolase)	NSDF_v1_62526	Oryza sativa (Q6Z1G7; 374/324, 46.13%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJF2; 324/324, 94.14%)

pdhC	putative Pyruvate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) component	NSDF_v1_62525	Rhizobium meliloti (Q9R9N3; 447/390, 30.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJF3; 390/390, 92.31%)
pdhA2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	NSDF_v1_62434	Rhizobium meliloti (Q9R9N5; 348/325, 48.61%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7Z1; 325/325, 94.46%)
pdhB2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	NSDF_v1_62435	Rickettsia felis (Q4UKQ7; 326/325, 57.76%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7Z0; 325/325, 97.23%)
pdhC2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	NSDF_v1_62436	Rhizobium meliloti (Q9R9N3; 447/400, 40.98%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7Y9; 400/400, 93.25%)
Lpd	putative Dihydrolipoyl dehydrogenase, E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes	NSDF_v1_62062	Staphylococcus aureus (P0A0E5; 547/469, 33.41%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P919; 453/469, 93.38%)

ペントースリン酸経路およびカルビンベンソン回路

zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	NSDF_v1_50070	Synechocystis sp. (P73411; 509/514, 48.29%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFB0; 507/514, 98.82%)
zwf2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	NSDF_v1_61558	Synechocystis sp. (P73411; 509/503, 47.99%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAI4; 509/503, 97.42%)
pgl	6-phosphogluconolactonase	NSDF_v1_61749	Nostoc sp. (P46016; 240/253, 41.56%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA75; 253/253, 88.54%)
gnd	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase	NSDF_v1_50069	Bacillus subtilis (P54448; 297/297, 40.74%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFB1; 297/297, 96.97%)
rpiA	Ribose-5-phosphate isomerase A	NSDF_v1_61751	Nitrobacter hamburgensis (Q1QN95; 232/238, 52.86%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA73; 238/238, 92.44%)
rpe	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	NSDF_v1_61634	Bacillus subtilis (O34557; 217/234, 60.09%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAB5; 234/234, 97.86%)
xfp	putative phosphoketolase	NSDF_v1_62910	Gloeobacter violaceus (Q7NLX2; 793/791, 75.8%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PIW3; 791/791, 97.47%)
prsA	phosphoribosylpyrophosphate synthase	NSDF_v1_61226	Desulfotalea psychrophila (Q6AJL7; 313/313, 60.52%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBD9; 313/313, 67.44%)
tktA	Transketolase	NSDF_v1_50539	Mus musculus (Q9D4D4; 627/628, 53.98%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PG58; 628/628, 98.41%)
tal	putative transaldolase	NSDF_v1_61533	Geobacter lovleyi (B3E1K9; 214/215, 60.75%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAK9; 215/215, 99.53%)
gmhB	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase (fragment)	NSDF_v1_60152	Escherichia coli (P63229; 191/90, 40%)	Gloeocapsa sp. (K9XL68; 203/90, 41.33%)
rlp	Ribulose bisphosphate carboxylase-like protein (RuBisCO type IV-like protein)	NSDF_v1_50259	Rhodospseudomonas palustris (Q6N7T7; 368/389, 36.65%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PEE9; 370/389, 89.46%)

ギ酸代謝

focA	putative formate transporter 1	NSDF_v1_50211	Escherichia coli (P0AC23; 285/280, 43.26%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PEK0; 280/280, 96.07%)
fdsA	Formate dehydrogenase, alpha subunit	NSDF_v1_50212	Methanocaldococcus jannaschii (P61159; 673/907, 41.97%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PEJ9; 908/907, 94.82%)
fdsB	Formate dehydrogenase, beta subunit	NSDF_v1_50213	Desulfovibrio fructosivorans (Q46507; 490/498, 46.59%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PEJ8; 498/498, 97.79%)
fdsC	Formate dehydrogenase, gamma subunit	NSDF_v1_50214	Desulfovibrio fructosivorans (Q46505; 171/149, 28.38%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PEJ7; 149/149, 95.97%)
fh1A	Formate hydrogenlyase transcriptional activator	NSDF_v1_61988	Escherichia coli (P19323; 692/708, 42%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9A8; 693/708, 83.36%)

hyfR	Hydrogenase-4 transcriptional activator	NSDF_v1_63118	Escherichia coli (P71229; 670/680, 40.39%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PIC0; 980/980, 96.47%)
hyfB	Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSDF_v1_62131	Escherichia coli (P23482; 672/674, 38.2%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U6; 375/374, 89.78%)
hyfC	putative Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSDF_v1_62132	Escherichia coli (P77858; 315/318, 34.63%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U5; 318/318, 98.74%)
hyfE	putative Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSDF_v1_62133	Escherichia coli (P0AEW2; 216/221, 24.2%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U4; 221/221, 99.55%)
hyfF	Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSDF_v1_62134	Escherichia coli (P77437; 526/510, 35.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U3; 510/510, 97.65%)
hyfG	putative Formate hydrogenlyase, large subunit	NSDF_v1_62135	Escherichia coli (P16431; 569/530, 34.19%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U2; 530/530, 96.23%)
hyfI	putative Formate hydrogenlyase, small subunit	NSDF_v1_62136	Methanocaldococcus jannaschii (Q57936; 148/173, 47.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U1; 173/173, 91.23%)
グリコーゲン代謝				
glgA	Glycogen synthase	NSDF_v1_63558	Koribacter versatilis (Q11LA0; 484/510, 45.6%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PH69; 496/510, 94.35%)
glgB	1,4-alpha-glucan branching enzyme	NSDF_v1_62970	Aquifex aeolicus (O66936; 630/688, 64.11%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PIR3; 637/688, 98.58%)
glgC	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	NSDF_v1_60077	Rhodopirellula baltica (Q7UXF5; 446/412, 54.7%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PE66; 412/412, 93.45%)
glgC2	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	NSDF_v1_60149	Acidovorax citrulli (A1TRG1; 435/419, 50.63%)	Thiobacillus denitrificans (Q3SJM6; 408/419, 53.19%)
glgP	Glycogen phosphorylase	NSDF_v1_60653	Aquifex aeolicus (O66932; 692/719, 42.24%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCT3; 719/719, 97.91%)
glgP2	Similar to glycogen phosphorylase	NSDF_v1_50602	Mycobacterium tuberculosis (Q10639; 863/617, 38.88%)	Candidatus Methyloirabilis oxyfera (D5MMT0; 618/617, 70.8%)
	Glycogen debranching enzyme	NSDF_v1_60099	Equus caballus (A8QB4; 1533/679, 27.08%)	Gemmatimonadetes bacterium (W0RJT4; 707/679, 53.23%)
glgX	Glycogen operon protein GlgX homolog	NSDF_v1_60131	Mycobacterium tuberculosis (P0A4Y4; 721/712, 59.17%)	planctomycete KSU-1 (I3IH15; 739/712, 68.31%)
	putative Glycogen debranching enzyme (Archaeal type)	NSDF_v1_60853	Saccharomyces cerevisiae (Q06625; 1536/661, 27.21%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCD2; 661/661, 93.95%)
電子伝達系				
複合体 I				
nuoA	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	NSDF_v1_61409	Nitrosomonas europaea (Q82TU3; 122/123, 53.91%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX8; 123/123, 99.19%)
nuoB	NADH-quinone oxidoreductase subunit B 1	NSDF_v1_61410	Solibacter usitatus (Q020B6; 188/159, 66.46%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX7; 159/159, 96.86%)
nuoCD	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D 2	NSDF_v1_61411	Aquifex aeolicus (O67335; 586/583, 44.36%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX6; 583/583, 99.14%)
nuoE	NADH-quinone oxidoreductase subunit E 2	NSDF_v1_61412	Rattus norvegicus (P19234; 248/179, 52.38%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX5; 178/179, 94.83%)
nuoF	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain F	NSDF_v1_61413	Rhizobium meliloti (P56913; 421/435, 56.39%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX4; 435/435, 98.85%)
nuoG	NADH-quinone oxidoreductase, subunit G	NSDF_v1_61415	Rhizobium meliloti (P56914; 853/889, 35.22%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX3; 889/889, 94.71%)
nuoH	NADH-quinone oxidoreductase subunit H 1	NSDF_v1_61416	Geobacter sulfurreducens (Q74GA1; 348/355, 56.32%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX2; 355/355, 98.03%)
nuoI	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	NSDF_v1_61417	Verminephrobacter eiseniae (A1WLN6; 169/191, 41.5%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX1; 191/191, 98.95%)

nuoJ	NADH-quinone oxidoreductase chain 10	NSDF_v1_61418	Marchantia polymorpha (P26850; 199/170, 38.46%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX0; 206/170, 94.12%)
nuoK	NADH-quinone oxidoreductase subunit K	NSDF_v1_61419	Chloroherpeton thalassium (B3QXL8; 101/101, 59%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAW9; 101/101, 97.03%)
nuoL	NADH-quinone oxidoreductase subunit L	NSDF_v1_61420	Neisseria meningitidis (Q9JX92; 672/634, 45.66%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAW8; 632/632, 98.58%)
nuoM	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit M	NSDF_v1_61421	Rhodobacter capsulatus (P50974; 512/522, 50.81%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAW7; 522/522, 95.59%)
nuoN	NADH-quinone oxidoreductase subunit N 2	NSDF_v1_61422	Rhizobium meliloti (P56911; 479/491, 46.28%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAW6; 491/491, 97.56%)
nuoA2	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	NSDF_v1_61872	Nitrosomonas europaea (Q82TU3; 122/127, 52.46%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V9; 127/127, 98.43%)
nuoB2	NADH-quinone oxidoreductase subunit B 1	NSDF_v1_61873	Herpetosiphon aurantiacus (A9B4Z5; 179/175, 59.62%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V8; 175/175, 100%)
nuoC2	fragment of NADH dehydrogenase I chain C,D (part 1)	NSDF_v1_61874	Geobacter sulfurreducens (Q74GA6; 162/165, 46.21%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V7; 165/165, 98.19%)
nuoD2	fragment of NADH dehydrogenase I chain C,D (part 2)	NSDF_v1_61875	Geobacter metallireducens (Q39QB0; 390/415, 54.52%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V6; 415/415, 99.28%)
nuoG2	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit G	NSDF_v1_61876	Bacillus subtilis (Q795Y4; 980/902, 27.32%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V5; 902/902, 96.12%)
nuoI2	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	NSDF_v1_61877	Polaromonas sp. (Q127Y0; 165/195, 39.47%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V4; 202/195, 100%)
nuoJ2	NADH-quinone oxidoreductase, membrane subunit J	NSDF_v1_61878	Rhodobacter capsulatus (P50975; 202/174, 35.09%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V3; 174/174, 95.98%)
nuoK2	NADH-quinone oxidoreductase subunit K	NSDF_v1_61879	Chloroherpeton thalassium (B3QXL8; 101/100, 55.1%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V2; 100/100, 100%)
nuoL2	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit L	NSDF_v1_61880	Paracoccus denitrificans (P29924; 703/667, 40.25%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V1; 667/667, 99.4%)
nuoM2	NADH-quinone oxidoreductase subunit M	NSDF_v1_61881	Rickettsia conorii (Q92G96; 493/519, 37.68%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V0; 519/519, 99.42%)
nuoM3	NADH-quinone oxidoreductase, membrane subunit M	NSDF_v1_61882	Paracoccus denitrificans (P29925; 513/551, 30%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9U9; 551/551, 99.64%)
nuoN2	NADH-quinone oxidoreductase subunit N	NSDF_v1_61883	Heliobacterium modesticaldum (B0TH87; 472/498, 44.26%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9U8; 498/498, 98.39%)
nuoL3	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit L	NSDF_v1_60176	Chlorokybus atmophyticus (Q19V60; 655/555, 34.36%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PE41; 555/555, 95.32%)
nuoL4	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit L	NSDF_v1_62019	Neisseria meningitidis (Q9JX92; 674/602, 34.25%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P964; 564/602, 97.87%)
nuoM4	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit M	NSDF_v1_62018	Methanosarcina mazei (F1SVH9; 495/435, 27.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P965; 435/435, 92.64%)
nuoF	NADH-quinone oxidoreductase subunit F 2	NSDF_v1_62855	Rhizobium meliloti (P56913; 421/433, 47.52%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ07; 425/433, 98.35%)
	putative NAD(P)H dehydrogenase (Quinone)	NSDF_v1_62581	Haemophilus influenzae (P45245; 202/195, 26.23%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJA0; 195/195, 95.9%)

複合体 III

qcrA	putative Quinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit, modulated with PRC-barrel (Modular protein)	NSDF_v1_61090	Geobacillus thermodenitrificans (Q45657; 169/312, 26.51%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBQ3; 312/312, 95.51%)
------	--	---------------	---	--

qcrB	putative Quinol-cytochrome c reductase, cytochrome b subunit	NSDF_v1_61089	Chlorobaculum thiosulfatiphilum (Q59297; 428/371, 39.37%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBQ4; 371/371, 99.46%)
qcrA2	putative Quinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske iron-sulfur protein)	NSDF_v1_62485	Chlorobaculum thiosulfatiphilum (Q46136; 181/183, 28.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ18; 183/183, 81.42%)
qcrB2	Quinol-cytochrome c reductase, fused cytochrome b/c subunit	NSDF_v1_62486	Geobacillus thermodenitrificans (Q45658; 224/441, 48.43%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ17; 441/441, 96.81%)
	putative Quinol-cytochrome c reductase, cytochrome c subunit	NSDF_v1_62491	Pavlova lutheri (P00107; 83/319, 33.33%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ14; 219/319, 94.16%)
複合体 IV				
cydA	Cytochrome bd quinol oxidase, subunit I	NSDF_v1_50731	Bacillus subtilis (P94364; 468/447, 34.47%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGC9; 447/447, 95.75%)
cydB	Cytochrome bd quinol oxidase, subunit II	NSDF_v1_50730	Escherichia coli (P0ABK2; 379/349, 31.18%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGC8; 340/349, 86.47%)
cydA2	Cytochrome bd quinol oxidase subunit I	NSDF_v1_62628	Bacillus subtilis (C0SP90; 443/448, 37.19%)	Anaeromyxobacter dehalogenans (B8JEM2; 448/448, 56.38%)
cydB2	Cytochrome bd quinol oxidase, subunit II	NSDF_v1_62629	Bacillus subtilis (O34505; 346/338, 21.32%)	Singulisphaera acidiphila (L0DHE5; 351/338, 48.32%)
複合体 V				
atpA	F1 sector of membrane-bound ATP synthase, alpha subunit	NSDF_v1_61733	Geobacter uraniireducens (A5G9D6; 505/502, 70.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA90; 505/505, 99.8%)
atpB	ATP synthase subunit a	NSDF_v1_62659	Rhodospirillum rubrum (P15012; 241/249, 46.86%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R6; 249/249, 97.99%)
atpC	ATP synthase epsilon chain	NSDF_v1_61730	Desulfovibrio salexigens (C6BSP5; 142/140, 49.28%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA93; 140/140, 98.57%)
atpD	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, beta-subunit	NSDF_v1_61731	Anaeromyxobacter sp. (A7HIX7; 481/480, 76.16%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA92; 480/480, 100%)
atpE	ATP synthase subunit c	NSDF_v1_62660	Rhodospirillum rubrum (Q2RPA5; 75/76, 51.39%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R5; 76/76, 100%)
atpF	ATP synthase subunit b	NSDF_v1_62661	Rubrobacter xylanophilus (Q1AVH5; 174/170, 33.99%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R4; 170/170, 98.82%)
atpG	ATP synthase gamma chain	NSDF_v1_61732	Carboxydotherrmus hydrogenoformans (Q3A945; 282/295, 47.8%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA91; 295/295, 98.31%)
atpH	ATP synthase subunit delta	NSDF_v1_61734	Ochrobactrum anthropi (A6WXW8; 186/179, 32.18%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA89; 179/179, 98.88%)
atpI	putative ATP synthase F0, subunit I	NSDF_v1_62658	Rhodospirillum rubrum (P15011; 123/94, 46.43%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R7; 94/94, 95.74%)
ppk	Polyphosphate kinase	NSDF_v1_63023	Pseudomonas aeruginosa (Q9S646; 690/712, 58.64%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PIK7; 712/712, 99.02%)
ppk2	putative Polyphosphate kinase 2	NSDF_v1_61949	Leptolyngbya boryana (Q04605; 136/277, 51.79%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9M2; 277/277, 94.95%)
ppnK	putative inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	NSDF_v1_50456	Geobacter bemidjiensis (B5EFY8; 288/286, 48.61%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFX9; 286/286, 97.55%)
運動性				
鞭毛合成				
flaG	Flagellar protein FlaG	NSDF_v1_50342	Vibrio parahaemolyticus (Q56704; 144/123, 25.23%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFL6; 119/123, 91.87%)
flgA	putative Flagella basal body P-ring formation	NSDF_v1_50315	Agrobacterium tumefaciens (Q44339; 162/265, 28.1%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI9; 265/265, 95.47%)

protein FlgA					
flgB	Flagellar basal body rod protein FlgB	NSDF_v1_50288	Salmonella typhimurium (P16437; 138/135, 30.37%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG1; 135/135, 97.78%)	
flgC	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	NSDF_v1_50289	Borrelia burgdorferi (Q57466; 152/149, 43.14%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG2; 149/149, 98.66%)	
flgF	Flagellar basal-body rod protein FlgF	NSDF_v1_50313	Buchnera aphidicola (Q8K9K4; 260/255, 32.43%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI7; 255/255, 98.43%)	
flgG	flagellar component of cell-distal portion of basal-body rod	NSDF_v1_50314	Salmonella typhi (P0A1J4; 260/263, 52.73%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI8; 263/263, 100%)	
flgH	Flagellar L-ring protein	NSDF_v1_50316	Geobacter lovleyi (B3EAV2; 224/230, 43.81%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ0; 238/230, 97.31%)	
flgI_f1	fragment of flagellar basal body P-ring protein (part 1)	NSDF_v1_50317	Nitrosomonas europaea (Q82XG5; 370/283, 57.86%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ1; 436/283, 98.12%)	
flgI_f2	fragment of flagellar basal body P-ring protein (part 2)	NSDF_v1_50318	Geobacter uraniireducens (A5G8X8; 368/124, 55.65%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ1; 436/124, 100%)	
flgJ	putative Peptidoglycan hydrolase FlgJ	NSDF_v1_50319	Salmonella typhimurium (P15931; 316/109, 33.33%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ2; 109/109, 90.83%)	
flgK	First flagellar hook-filament junction protein FlgK	NSDF_v1_50322	Bacillus subtilis (P39810; 507/464, 28.6%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ5; 464/464, 97.63%)	
flgL	putative Second flagellar hook-filament junction protein FlgL	NSDF_v1_50323	Bacillus subtilis (P96501; 298/296, 28.57%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ6; 296/296, 99.32%)	
flgM	Anti-sigma 28 factor FlgM	NSDF_v1_50320	Bacillus subtilis (P39809; 88/101, 36.36%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ3; 101/101, 98.02%)	
flgN	putative Flagellar chaperone FlgN	NSDF_v1_50321	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ4; 128/150, 87.02%)	
flgW	Flagellar assembly factor FliW	NSDF_v1_50325	Natranaerobius thermophilus (B2A827; 151/158, 41.84%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFJ8; 158/158, 94.9%)	
fliA	RNA polymerase sigma factor FliA	NSDF_v1_50311	Pseudomonas aeruginosa (P29248; 247/253, 44.35%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI5; 247/253, 97.98%)	
fliC or hag	Flagellin	NSDF_v1_50341	Bacillus halodurans (Q05203; 272/275, 44.85%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFL5; 275/275, 97.09%)	
fliD	putative Flagellar capping protein FliD	NSDF_v1_50343	Escherichia coli (P24216; 468/463, 28.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFL7; 463/463, 92.86%)	
fliE	Flagellar hook-basal body complex protein FliE	NSDF_v1_50290	Geobacter lovleyi (B3EBH2; 99/103, 44.59%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG3; 103/103, 97.09%)	
fliF	Flagellar M-ring protein	NSDF_v1_50291	Salmonella typhimurium (P15928; 560/518, 34.95%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG4; 518/518, 98.26%)	
fliG	Flagellar motor switch protein FliG	NSDF_v1_50292	Thermotoga maritima (Q9WY63; 335/331, 39.58%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG5; 331/331, 100%)	
fliH	putative Flagellar biosynthesis protein FliH with response regulator receiver domain (Modular protein)	NSDF_v1_50293	Rhizobium meliloti (P13632; 460/349, 34.09%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG6; 349/349, 97.42%)	
fliI	flagellum-specific ATP synthase	NSDF_v1_50294	Bacillus subtilis (P23445; 438/435, 52.86%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG7; 435/435, 98.39%)	
fliJ	putative Flagellar biosynthesis protein FliJ	NSDF_v1_50295	Mus musculus (Q8BL66; 1411/146, 25.89%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG8; 146/146, 95.21%)	
fliK	Putative Flagellar hook-length control protein FliK (modular protein)	NSDF_v1_50297	Rattus norvegicus (P16884; 1072/524, 23.3%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH1; 414/524, 83.33%)	
flgD	Flagellar hook capping protein FlgD	NSDF_v1_50298	Bacillus subtilis (P23455; 140/96, 43.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH2; 101/96, 100%)	

flgE	Flagellar hook protein FlgE	NSDF_v1_50299	Salmonella typhimurium (P0A1J1; 403/407, 38.44%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH3; 407/407, 99.02%)
fliL	Flagellar basal body-associated protein FliL	NSDF_v1_50300	Aquifex aeolicus (O67712; 161/178, 28.74%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH4; 178/178, 97.19%)
fliM	Flagellar motor switch protein FliM	NSDF_v1_50301	Pseudomonas aeruginosa (Q51465; 323/323, 42.22%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH5; 323/323, 98.76%)
fliN	Flagellar motor switch protein FliN	NSDF_v1_50302	Pseudomonas aeruginosa (Q51466; 157/124, 51.22%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH6; 124/124, 99.19%)
fliO	putative Flagellar biosynthetic protein FliO, export component	NSDF_v1_50303	Pseudomonas aeruginosa (Q51467; 150/122, 30.91%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH7; 122/122, 94.17%)
fliP	flagellar biosynthesis protein	NSDF_v1_50304	Bacillus subtilis (P35528; 221/266, 55.94%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH8; 266/266, 91.73%)
fliQ	flagellar biosynthesis protein	NSDF_v1_50305	Escherichia coli (P0AC07; 89/89, 40.91%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFH9; 89/89, 100%)
fliR	Flagellar biosynthetic protein fliR	NSDF_v1_50306	Bacillus subtilis (P35537; 259/262, 31.5%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI0; 263/262, 98.47%)
fliS	Flagellin-specific chaperone FliS	NSDF_v1_50344	Pseudomonas aeruginosa (Q9I4N6; 126/130, 34.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFL8; 130/130, 96.92%)
fliT	conserved protein of unknown function	NSDF_v1_50345	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFL9; 114/123, 87.72%)
fleQ	fused response regulator of ato operon, in two-component system with AtoS: response regulator ; sigma54 interaction protein	NSDF_v1_50284	Escherichia coli (Q06065; 461/471, 43.6%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFF7; 471/471, 98.51%)
fleS	putative Sensor histidine kinase FleS	NSDF_v1_50286	Escherichia coli (Q06067; 608/429, 29.95%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFF9; 429/429, 91.48%)
fleR	fused response regulator of ato operon, in two-component system with AtoS: response regulator ; sigma54 interaction protein	NSDF_v1_50287	Escherichia coli (Q06065; 461/472, 45.23%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFG0; 472/472, 97.67%)
flhA	putative flagellar export pore protein	NSDF_v1_50308	Escherichia coli (P76298; 692/702, 50.08%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI2; 702/702, 97.58%)
flhB	Flagellar biosynthetic protein FlhB	NSDF_v1_50307	Bacillus subtilis (P35538; 360/360, 42.05%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI1; 360/360, 96.94%)
flhF	putative Flagellar biosynthetic protein FlhF, GTP binding	NSDF_v1_50309	Bacillus subtilis (Q01960; 366/427, 28.12%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI3; 427/427, 95.78%)
flhG or fleN	Site-determining protein	NSDF_v1_50310	Bacillus subtilis (P40742; 298/288, 33.06%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFI4; 288/288, 98.96%)
motA	Flagellar motor protein MotA	NSDF_v1_50359	Helicobacter pylori (P65410; 257/256, 37.3%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFN2; 256/256, 99.22%)
motB	Flagellar motor protein MotB	NSDF_v1_50360	Bacillus subtilis (P28612; 261/259, 35.29%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFN3; 259/259, 95.74%)

化学走化性

cheA	Chemotaxis protein histidine kinase CheA	NSDF_v1_50353	Bacillus subtilis (P29072; 672/630, 35.98%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFM6; 630/630, 95.23%)
cheA2	fused chemotactic sensory histidine kinase in two-component regulatory system with CheB and CheY: sensory histidine kinase ; signal sensing protein	NSDF_v1_50364	Enterobacter aerogenes (P21813; 652/705, 43.14%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFN7; 715/705, 93.64%)
cheA3	putative Chemotaxis protein CheA modulated with response regulator receiver region (Modular protein)	NSDF_v1_50770	Thermotoga maritima (Q56310; 671/1129, 31.85%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGH3; 1129/1129, 94.15%)

cheB	fused chemotaxis regulator ; protein-glutamate methyltransferase in two-component regulatory system with CheA	NSDF_v1_50355	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (P62637; 367/371, 45.5%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFM8; 365/371, 88.22%)
cheB2	fused chemotaxis regulator ; protein-glutamate methyltransferase in two-component regulatory system with CheA	NSDF_v1_50370	<i>Erwinia carotovora</i> (Q6D6I7; 350/349, 59.48%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFP3; 349/349, 95.99%)
cheB3	putative chemotaxis protein-glutamate methyltransferase	NSDF_v1_60118	<i>Leptospira interrogans</i> (Q8F5D8; 193/201, 47.46%)	<i>Singulisphaera acidiphila</i> (L0D7C6; 193/201, 62.29%)
cheD	putative chemoreceptor glutamine deamidase CheD	NSDF_v1_50369	<i>Halorhodospira halophila</i> (A1WZ13; 216/205, 49.23%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFP2; 205/205, 90.24%)
cheM	Globin-coupled methyl-accepting chemotaxis protein (Modular protein)	NSDF_v1_50366	<i>Enterobacter aerogenes</i> (P21822; 556/816, 53.05%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFN9; 772/816, 67.64%)
cheR	Chemotaxis protein methyltransferase CheR	NSDF_v1_50350	<i>Vibrio cholerae</i> (Q9KS61; 288/287, 35.43%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFM3; 287/287, 95.47%)
cheR2	Chemotaxis protein methyltransferase 2	NSDF_v1_50368	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Q9I6V7; 280/272, 42.01%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFP1; 272/272, 97.42%)
cheV	Chemotaxis signal transducer CheV	NSDF_v1_50354	<i>Bacillus subtilis</i> (P37599; 303/327, 31.72%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFM7; 327/327, 88.69%)
cheW	Chemotaxis signal transducer CheW	NSDF_v1_50357	<i>Enterobacter aerogenes</i> (P21821; 166/172, 39.29%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFN0; 172/172, 94.77%)
cheW2	purine-binding chemotaxis protein	NSDF_v1_50365	<i>Shigella flexneri</i> (P0A967; 167/169, 43.9%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFN8; 169/169, 93.49%)
cheW3	putative CheW-like signal transduction protein	NSDF_v1_50768	<i>Rhizobium etli</i> (Q2KCI0; 155/158, 24.14%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PGH1; 158/158, 93.04%)
cheW4	putative Chemotaxis protein CheW	NSDF_v1_50772	<i>Caulobacter crescentus</i> (O87715; 155/145, 27.94%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PGH5; 145/145, 96.55%)
cheY	putative Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_10001	<i>Escherichia coli</i> (P0AFU5; 444/136, 30.17%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PI33; 146/136, 96.21%)
cheY2	chemotaxis regulator transmitting signal to flagellar motor component	NSDF_v1_50351	<i>Escherichia coli</i> (P0AE67; 129/126, 66.13%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFM4; 120/126, 99.17%)
cheY3	Chemotaxis protein CheY homolog	NSDF_v1_50363	<i>Helicobacter pylori</i> (P71403; 124/123, 41.53%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PFN6; 123/123, 100%)
cheY4	putative Chemotaxis regulator CheY	NSDF_v1_50773	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P43501; 121/120, 38.66%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PGH6; 120/120, 99.17%)
cheY5	Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_50922	<i>Treponema pallidum</i> (O83112; 513/397, 27.65%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PGY4; 394/397, 94.16%)
cheY6	putative Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_60023	<i>Xanthomonas campestris</i> (Q4UU85; 378/211, 33.77%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PEC7; 211/211, 97.16%)
cheR3	putative methyltransferase Cher3	NSDF_v1_60117	<i>Pseudomonas putida</i> (Q88GG4; 273/279, 53.51%)	<i>Caulobacter segnis</i> (D5VMC8; 273/279, 71.16%)
cheY7	Response regulator, CheY like	NSDF_v1_60181	<i>Bacillus thuringiensis</i> (P52942; 122/121, 35.34%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PE36; 121/121, 100%)
cheY8	putative Response regulator, CheY like (Modular protein)	NSDF_v1_60213	<i>Porphyridium aeruginum</i> (P28835; 240/388, 26.72%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PE08; 388/388, 91.24%)
cheY9	DNA-binding response regulator, CheY like	NSDF_v1_60258	<i>Synechocystis</i> sp. (Q55169; 147/142, 37.59%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PDW3; 142/142, 95.07%)
cheY10	Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_61446	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (A1TEL7; 231/127, 37.19%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8PAU5; 127/127, 88.98%)
cheY11	putative CheY-like response regulator modulated diguanylate cyclase	NSDF_v1_62180	<i>Salmonella typhi</i> (Q8Z5R0; 567/324, 33.93%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8P8N2; 324/324, 95.36%)
cheY12	putative Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_62296	<i>Escherichia coli</i> (Q06065; 461/262, 35.59%)	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (D8P8C3; 276/262, 92.75%)

cheY13	putative Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_62443	Bacillus subtilis (P06628; 124/143, 33.33%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7X8; 149/143, 95.1%)
cheY14	putative Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_62830	Klebsiella oxytoca (Q9APD9; 443/144, 31.2%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ31; 144/144, 100%)
cheY15	putative Response regulator, CheY-like	NSDF_v1_62897	Proteus hauseri (P28787; 473/146, 35.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PIY4; 146/146, 99.32%)
cheY16	putative Transcriptional regulator, CheY-like	NSDF_v1_63353	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHP8; 129/129, 96.12%)
cheY17	CheY-like response regulator	NSDF_v1_63389	Synechocystis sp. (Q55169; 147/146, 36.23%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHL0; 146/146, 98.63%)
cheZ	putative Chemotaxis regulator CheZ	NSDF_v1_50352	Escherichia coli (P0A9H9; 214/216, 24.62%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFM5; 216/216, 97.22%)
	putative Methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)	NSDF_v1_50356	Pseudomonas aeruginosa (G3XD24; 629/561, 35.03%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFM9; 561/561, 89.3%)
	putative Methyl-accepting chemotaxis protein	NSDF_v1_50362	Bacillus subtilis (P39209; 573/371, 29.8%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFN5; 371/371, 92.45%)
	putative Methyl-accepting chemotaxis protein	NSDF_v1_50771	Pseudomonas aeruginosa (P42257; 682/624, 31.81%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGH4; 624/624, 98.72%)

CRISPR-Cas 機構

cas1	CRISPR-associated endonuclease Cas1 1	NSDF_v1_60383	Moorella thermoacetica (Q2RL66; 343/343, 61.81%)	Geobacter metallireducens (Q39WR2; 344/343, 61.81%)
cas2	CRISPR-associated endoribonuclease Cas2 1	NSDF_v1_60382	Moorella thermoacetica (Q2RL67; 96/96, 64.58%)	Truepera radiovictrix (D7CYF2; 96/96, 59.38%)
cas3	Metal dependent phosphohydrolase	NSDF_v1_60388	Methanothermobacter thermautotrophicus (O27158; 830/770, 23.62%)	mine drainage metagenome (E6PG15; 768/770, 58.91%)
cas4	CRISPR-associated protein Cas4	NSDF_v1_60384	Geobacter sulfurreducens (Q74H36; 559/212, 33.99%)	Geobacter metallireducens (H1L8J9; 204/212, 58.59%)
cas5	conserved protein of unknown function	NSDF_v1_60387	Mannheimia succiniciproducens (Q65TW5; 225/256, 36.4%)	mine drainage metagenome (T1AWC9; 276/256, 71.6%)
csd1	conserved protein of unknown function	NSDF_v1_60386	No hits	mine drainage metagenome (T1AZJ3; 600/576, 64.35%)
csd2	CRISPR-associated protein Csd2	NSDF_v1_60385	No hits	mine drainage metagenome (T1C8N3; 329/331, 74.39%)
crRNA_0_1	AACGCTCCAAGTCGGGCGCTGTGGTGT CTTGTT	-	-	-
crRNA_0_2	CAGCGAGTGTACGAAACACATCGAAG TTCCCGG	-	-	-
crRNA_0_3	GGCGGGAGTAGCTTCTGTGCGCGTAG CTCTTTT	-	-	-
crRNA_0_4	ATTGCAAGGCTCGGCGTGGTGTCCAGG TCGGTG	-	-	-
crRNA_0_5	GGTTTACCCATGGTTTCCTCTCTCGGAT TTCTAA	-	-	-
crRNA_0_6	GCAGGCCCATCGTGAAGCCGTGGCCCA CTTCATA	-	-	-
crRNA_0_7	GGGATTCCAGCGACGGCCTCATCGTCT GGCTCAT	-	-	-
crRNA_0_8	ATCAACAATGATCCGATCAGCCGAGGA ATCTAA	-	-	-

crRNA_0	CTGTGGAGTCGCGGGCACCAGTGGGTT	-	-	-
9	TCCGCCTT	-	-	-
crRNA_1	TTGAGCGACATAAGAGCCAGCGCAGCG	-	-	-
0	CGAGCCC	-	-	-
crRNA_1	GGGCGCACGCTTGTCAGGGGCAAACG	-	-	-
1	CTTGTCG	-	-	-
crRNA_1	GGCAGGGAGTAACAAC TAATGAGCCTC	-	-	-
2	TCAGCCA	-	-	-
crRNA_1	GATAGTTGGTGTAGAACTTAATGGCTT	-	-	-
3	CCGACTT	-	-	-
crRNA_1	GGCAGAACCACCGGGCAAAGGGCTTAT	-	-	-
4	TGTCATC	-	-	-
crRNA_1	CGTTTCGCCACAGCGGTGGGGCGTCCT	-	-	-
5	GCCCCGTG	-	-	-
crRNA_1	GCCCCGATGAGTTGGCAGAATTTCTTTC	-	-	-
6	GCTGTACTG	-	-	-
crRNA_1	TGCGAGGCGTTGATGCATTACTGCCGG	-	-	-
7	TTCTCCGT	-	-	-
crRNA_1	GGCCGCAGGGGCCACAATCAACCGTGT	-	-	-
8	CACGCTG	-	-	-
crRNA_1	TGCACGTCGCCATTCTTGATCATGGGCT	-	-	-
9	TGATCCA	-	-	-
crRNA_2	GGCCTCGGCGGACG TAGTACATCATA	-	-	-
0	TAGAAATA	-	-	-
crRNA_2	TACAAGCTGCACGGTGAGTTGCCACGC	-	-	-
1	TATGAC	-	-	-
crRNA_2	GCTCAAAGCGGATGTGATGCGAGTGGG	-	-	-
2	CGGACAG	-	-	-
crRNA_2	GCCGTCACCACCGCCAGGGTGCGCGG	-	-	-
3	TTTCCTC	-	-	-
crRNA_2	CTCATGCGCTTGGAGCGCCGCATCGGC	-	-	-
4	GCGATGCC	-	-	-
crRNA_2	GGGAGGGTTTAGGTTGGGAAGGTGAG	-	-	-
5	AATCTGGG	-	-	-
crRNA_2	GATGAGCGGC GTA ACTTGTCCTGATCG	-	-	-
6	ATAAACG	-	-	-
crRNA_2	TGGAAGCCGCATCCGCCGAGCCGAT	-	-	-
7	TATGAAGA	-	-	-
crRNA_2	TGAAGACTGAGGGGGATCTTCTCGCGC	-	-	-
8	TGTGTAA	-	-	-
crRNA_2	TTAGAACGAAGGAGAAAACGAAAATGT	-	-	-
9	ATAAGCCA	-	-	-
crRNA_3	GCGTCTACGATGGTCACGAATTGCCAA	-	-	-
0	CTATTATT	-	-	-
crRNA_3	GGTGAGTTGCTGCACCAATCGAGTCAA	-	-	-
1	CTTATCAACG	-	-	-

LuxR ファミリー				
luxR	putative Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_50423	Staphylococcus aureus (Q7A4R9; 209/237, 23.04%)	Candidatus Nitrospira defluvii (B3U4R4; 249/237, 43.64%)
luxR2	putative Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_50821	Bacillus subtilis (P13800; 229/235, 26.24%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGN5; 235/235, 67.66%)
luxR3	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_60137	Staphylococcus aureus (Q6GE42; 217/218, 31.929%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI51; 214/218, 47.83%)
luxR4	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_60138	Staphylococcus aureus (Q6GE42; 217/227, 38.28%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCG2; 214/227, 51.18%)
luxR5	putative Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_60443	Bacillus subtilis (O32197; 211/249, 28.64%)	Candidatus Nitrospira defluvii (B3U4R4; 249/249, 89.16%)
luxR6	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_60815	Staphylococcus carnosus (Q7WZY4; 217/214, 36.15%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCG2; 214/214, 99.53%)
luxR7	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_60876	Brevibacillus brevis (P54662; 236/214, 34.84%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCB0; 214/214, 93.93%)
luxR8	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_60944	Escherichia coli (Q46791; 210/106, 55%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PC52; 106/106, 92.45%)
luxR9	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_60954	Escherichia coli (P0AED5; 218/234, 31.43%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PC42; 234/234, 93.59%)
luxR10	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_61062	Staphylococcus carnosus (Q7WZY4; 217/216, 39.07%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBT9; 216/216, 99.54%)
luxR11	putative Transcriptional regulator, LuxR family	NSDF_v1_61438	Rhizobium sp. (P55629; 326/265, 37.07%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAV3; 265/265, 87.92%)
luxR12	Transcriptional regulator, LuxR family	NSDF_v1_61447	Mycobacterium tuberculosis (P95193; 217/226, 36.99%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAU4; 226/226, 96.02%)
luxR13	Transcriptional regulator, LuxR family	NSDF_v1_61449	Escherichia coli (P0AED5; 218/212, 36.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAU3; 212/212, 95.28%)
luxR14	Transcriptional regulator, LuxR family	NSDF_v1_62278	Staphylococcus carnosus (Q7WZY4; 217/94, 47.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8E0; 94/94, 98.94%)
luxR15	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_62408	Staphylococcus carnosus (Q7WZY4; 217/214, 35.71%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P820; 214/214, 91.12%)
luxR16	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_62563	Bacillus subtilis (P55184; 218/222, 30.84%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI51; 214/222, 56.67%)
luxR17	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_63198	Escherichia coli (P0AED5; 218/214, 33.33%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI51; 214/214, 99.07%)
luxR18	Response regulator, LuxR family	NSDF_v1_63551	Escherichia coli (P0AED5; 218/220, 34.29%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHQ0; 215/220, 98.14%)

NJ1 株

窒素代謝

nrxA1	putative Nitrate oxidoreductase, alpha subunit	NSJP_v1_0818	Dechloromonas aromatica (Q47CW6; 927/1145, 23.76%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI41; 1146/1145, 88.47%)
nrxA2	putative Nitrate oxidoreductase, alpha subunit	NSJP_v1_0950	Dechloromonas aromatica (Q47CW6; 927/1148, 24.04%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI59; 1147/1148, 91.45%)
nrxA3	putative Nitrate oxidoreductase, alpha subunit	NSJP_v1_2217	Dechloromonas aromatica (Q47CW6; 927/1145, 24.4%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI59; 1147/1145, 86.35%)
nrxB1	putative Nitrate oxidoreductase, beta subunit	NSJP_v1_0817	Rhodovulum sulfidophilum (Q8GPG3; 325/429, 35.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI40; 429/429, 97.9%)
nrxB2	putative Nitrate oxidoreductase, beta subunit	NSJP_v1_0951	Rhodovulum sulfidophilum (Q8GPG3; 325/429, 35.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI40; 429/429, 97.9%)

nrxB3	putative Nitrate oxidoreductase, beta subunit	NSJP_v1_2216	Rhodovulum sulfidophilum (Q8GPG3; 325/429, 35.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI40; 429/429, 97.9%)
nrxC1	putative Nitrate oxidoreductase, gamma subunit	NSJP_v1_0104	Thauera selenatis (Q9S1G7; 239/275, 26.81%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI74;280/275, 80.07%)
nrxC2	putative Nitrate oxidoreductase, gamma subunit	NSJP_v1_0110	Ideonella dechloratans (P60000; 239/317, 29.3%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI81; 317/317 89.59%)
nrxC3	putative Nitrate oxidoreductase, gamma subunit	NSJP_v1_1860	Thauera selenatis (Q9S1G7; 239/277, 28.33%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBQ9; 275/277, 65.17%)
nirC	putative Nitrite transporter	NSJP_v1_3882	Methanobacterium formicicum (P35839; 280/290, 35.27%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI46; 293/290, 70.31%)
nrtAC	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, periplasmic component	NSJP_v1_2407	Synechocystis sp. (P73450; 670/452, 33.33%)	Desulfomonile tiedjei (I4C053; 464/452, 62.92%)
nrtB	Nitrate ABC transporter permease	NSJP_v1_2408	Synechocystis sp. (P73451; 275/350, 34.82%)	Opitutaceae bacterium (W0IY10; 285/350, 63.51%)
nrtD	Nitrate transport ATP-binding subunits C and D	NSJP_v1_2409	Synechococcus elongatus (P38046; 274/288, 49.61%)	Desulfomonile tiedjei (I4C051; 276/288, 64.96%)
nasA	Nitrate transporter	NSJP_v1_2443	Bacillus subtilis (P42432; 401/400, 46.28%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD23; 413/400, 52.76%)
nirK1	Multicopper oxidase	NSJP_v1_0812	Neisseria gonorrhoeae (Q02219; 392/324, 38.1%)	Nitrobacter winogradskyi (Q3SP90;323/324, 43.85%)
nirK2	Nitrite reductase	NSJP_v1_2517	Neisseria gonorrhoeae (Q02219; 392/492, 55.32%)	Herbaspirillum frisingense (R0GAR4; 498/492, 62.01%)
nirK3	putative Copper-containing nitrite reductase	NSJP_v1_3878	Neisseria meningitidis (Q9JTB8; 386/328, 38.03%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PG56; 323/328, 84.27%)
ONR	Putative octahaeme cytochrome c Nitrite Reductase	NSJP_v1_2416	Nitrosomonas europaea (Q50925; 570/474, 27.12%)	Desulfomonile tiedjei (I4CB31; 453/474, 50.59%)
petC	putative Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	NSJP_v1_2414	Chlorobaculum thiosulfatiphilum (Q46136; 181/148, 32.37%)	Geobacter bemidjensis (B5EH06; 138/148, 33.81%)
petB	putative Cytochrome b/b6 domain-containing protein	NSJP_v1_2415	Psilotum nudum (Q8WHZ3; 215/342, 40.21%)	Caldithrix abyssi (H1XYE4; 348/342, 38.14%)
napG	nitrate reductase	NSJP_v1_0113	Paracoccus denitrificans (Q51659; 224/198, 35.15%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI83; 201/198, 67.69%)
amtB1	Ammonium transporter NrgA	NSJP_v1_2403	Bacillus subtilis (Q07429; 404/425, 45.93%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD01; 442/425, 61.48%)
amtB2	ammonium transporter	NSJP_v1_2411	Bacillus subtilis (Q07429; 404/443, 50.62%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD01; 442/443, 67.04%)
amtB3	Ammonium transporter NrgA	NSJP_v1_2413	Bacillus subtilis (Q07429; 404/388, 40.94%)	Pelotomaculum thermopropionicum (A5D4I5; 472/388, 49.63%)
glnA	glutamine synthetase	NSJP_v1_2406	Nostoc sp. (P00964; 474/469, 62.77%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD04; 469/469, 90.83%)
nadE	putative glutamine-dependent NAD(+) synthetase	NSJP_v1_2402	Thermotoga maritima (Q9X0Y0; 576/591, 47.47%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCZ9; 589/591, 69.04%)
gltD	Glutamate synthase, small chain	NSJP_v1_0208	Mycobacterium tuberculosis (P96219; 488/477, 61.51%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PII2; 477/477, 90.57%)
gltB	glutamate synthase, large subunit	NSJP_v1_0209	Synechocystis sp.(P55037, 1550/1506, 60.19%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PII3; 1506/1506, 84.24%)
gdhA	Glutamate dehydrogenase	NSJP_v1_1494	Thermotoga maritima (P96110; 416/418, 56.2%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAF8; 419/418, 80.86%)
nifA	Nif-specific regulatory protein	NSJP_v1_0709	Escherichia coli (P19323; 692/523, 40.79%)	Candidatus Nitrospira defluvii (B3U4Q6; 517/523, 68.28%)

nifA2	Nif-specific regulatory protein	NSJP_v1_0814	Escherichia coli (P19323; 692/508, 40.08%)	Candidatus Nitrospira defluvii (B3U4Q6; 517/508, 64.4%)
glnB	Nitrogen regulatory protein P-II	NSJP_v1_0998	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P967; 113/113, 84.55%)
glnK	regulatory protein, P-II 2, for nitrogen assimilation by glutamine synthetase, regulates GlnL (NRII) and GlnE (ATase)	NSJP_v1_2404	Aquifex aeolicus (O66513; 112/112, 66.07%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD02; 12/112, 88.39%)
glnD	Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme	NSJP_v1_2405	Bradyrhizobium diazoefficiens (Q89VX9; 929/829, 32.34%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD03; 894/892, 66.13%)
ntrX	Nitrogen assimilation regulatory protein NtrX	NSJP_v1_2203	Azorhizobium caulinodans (Q04849; 454/469, 45.59%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCM0; 466/469, 80.81%)
cynS	Cyanate hydratase	NSJP_v1_2410	Pseudomonas syringae (Q48GB5; 155/146, 41.38%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PD06; 146/146, 77.4%)
尿素分解				
ureA	Urease subunit gamma	NSJP_v1_2400	Laribacter hongkongensis (C1D5Z6; 100/100, 79%)	Rhodococcus sp. (U0EFH2; 100/100, 79%)
ureB	Urease subunit beta	NSJP_v1_2399	Brucella suis (Q8FZW3; 159/143, 72.87%)	Brucella canis (G8STN6; 159/143, 72.87%)
ureC	Urease subunit alpha	NSJP_v1_2398	Laribacter hongkongensis (C1D5Z8; 572/572, 76.92%)	Yersinia rohdei (C4USP3; 572/572, 75.66%)
ureD	Urease accessory protein UreD	NSJP_v1_2394	Brucella suis (Q8FZV8; 302/304, 58.98%)	Brucella pinnipedialis (C9TX01; 302/304, 58.98%)
ureE	Urease accessory protein UreE	NSJP_v1_2397	Yersinia aldovae (Q6UR83; 230/206, 48.26%)	Brucella suis (N8ID88; 201/206, 58.33%)
ureF	Urease accessory protein UreF	NSJP_v1_2396	Laribacter hongkongensis (C1D602; 231/273, 57.02%)	Singulisphaera acidiphila (L0D8L6; 229/273, 60.35%)
ureG	Urease accessory protein UreG	NSJP_v1_2395	Laribacter hongkongensis (C1D603; 211/212, 86.34%)	Singulisphaera acidiphila (L0DA99; 212/212, 82.46%)
	urea transporter	NSJP_v1_2401	Oryctolagus cuniculus (Q28614; 397/349, 30.9%)	Rhizobium mesoamericanum (K0Q5I0; 363/349, 59.35%)
urtA	putative branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	NSJP_v1_2387	Pseudomonas aeruginosa (P27017; 358/453, 29.64%)	Cytophaga hutchinsonii (Q11VN9; 445/453, 70.02%)
urtB	Urea ABC transporter permease	NSJP_v1_2388	Pseudomonas aeruginosa (P21627; 307/518, 26.62%)	Candidatus Entotheonella (W4LWH4; 507/518, 46.85%)
urtC	conserved membrane protein of unknown function	NSJP_v1_2389	Salmonella typhimurium (P30296; 425/379, 26.25%)	Candidatus Entotheonella (W4LVW4; 394/379, 60.52%)
urtD	Urea ABC transporter ATP-binding protein	NSJP_v1_2390	Escherichia coli (P0A9S8; 255/254, 32.8%)	Candidatus Entotheonella (W4LWH9; 249/254, 60.64%)
urtE	Urea ABC transporter ATP-binding protein	NSJP_v1_2391	Salmonella typhimurium (P0A191; 237/236, 41.38%)	Moorea producens 3L (F4XZM9; 233/236, 55.51%)
炭素代謝				
クエン酸回路 (TCA 回路)				
aclA	ATP citrate lyase, alpha subunit	NSJP_v1_1802	Arabidopsis thaliana (Q9FGX1; 608/606, 41.94%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ2; 606/606, 95.54%)
aclB	ATP-citrate lyase, beta subunit	NSJP_v1_1801	Arabidopsis thaliana (Q9SGY2; 423/398, 35.99%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ1; 399/398, 88.64%)
gltA	Citrate synthase	NSJP_v1_3437	Synechocystis sp. (Q59977; 397/378, 58.98%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFX4; 377/378, 81.7%)

porA	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	NSJP_v1_1996	Methanothermobacter marburgensis (P80900; 383/403, 32.61%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX4; 403/403, 92.56%)
porB	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase beta subunit	NSJP_v1_1995	Methanothermobacter marburgensis (P80901; 288/300, 34.43%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX3; 300/300, 96.67%)
porC	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	NSJP_v1_1994	Thermococcus kodakaraensis (Q5JIK2; 185/235, 36.36%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX2; 235/235, 93.19%)
porD	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase delta subunit	NSJP_v1_1997	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX5; 211/210, 89.05%)
porE	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase epsilon subunit	NSJP_v1_1993	Aquifex aeolicus (O67232; 78/92, 46.55%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBX1; 92/92, 93.48%)
pycA	Pyruvate carboxylase, subunit A	NSJP_v1_2186	Hydrogenobacter thermophilus (D3DJ42; 472/474, 54.24%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCK3; 472/474, 84.11%)
pycB	2-oxoglutarate carboxylase large subunit	NSJP_v1_2185	Hydrogenobacter thermophilus (D3DJ41; 652/651, 45.59%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCK2; 643/651, 80%)
mdh	Malate dehydrogenase	NSJP_v1_0412	Chloroherpeton thalassium (B3QSH8; 310/340, 61.04%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ09; 313/340, 81.03%)
fumC	fumarate hydratase (fumarase C), aerobic Class II	NSJP_v1_3434	Halobacterium salinarum (Q9HQ29; 470/485, 58.08%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFX7; 484/485, 86.8%)
sdhB	Succinate dehydrogenase and fumarate reductase iron-sulfur protein	NSJP_v1_0942	Bacillus subtilis (P08066; 253/263, 30.91%)	Leptospira meyeri (K5BPC1; 246/263, 67.08%)
sdhA	Succinate dehydrogenase or fumarate reductase, flavoprotein subunit	NSJP_v1_0943	Bacillus subtilis (P08065; 586/637, 34.93%)	Roseiflexus castenholzii (A7NNJ3; 656/637, 70.91%)
sdhC	Succinate dehydrogenase cytochrome B subunit, b558 family	NSJP_v1_0944	No hits	Leptospira noguchii (T0FHI9; 226/225, 49.3%)
sdhA2	putative Oxidoreductase with FAD/NAD(P)-binding domain	NSJP_v1_0946	Bacillus subtilis (Q795R8; 420/419, 31.58%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ57; 436/419, 59.86%)
sdhA or nadB	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit or L-aspartate oxidase	NSJP_v1_1807	Methanocaldococcus jannaschii (Q60356; 539/527, 42.12%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ6; 533/527, 91.05%)
sucD	succinyl-CoA synthetase alpha chain	NSJP_v1_1810	Coxiella burnetii (P53591; 294/290, 66.9%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ8; 290/290, 93.79%)
sucC	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	NSJP_v1_1808	Parvibaculum lavamentivorans (A7HT39; 389/392, 59.18%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ7; 392/392, 91.84%)
forA	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	NSJP_v1_1793	Methanocaldococcus jannaschii (Q57715; 389/447, 30.16%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI4; 448/447, 90.85%)
forB	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase beta subunit	NSJP_v1_1789	Methanocaldococcus jannaschii (Q57714; 298/300, 30.77%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI0; 299/300, 95.96%)
forC	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	NSJP_v1_1790	Pyrococcus horikoshii (O58411; 185/238, 35.09%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI1; 237/238, 91.74%)
forD	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase delta subunit	NSJP_v1_1792	No hits	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI3; 254/254, 89.37%)
forE	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase epsilon subunit	NSJP_v1_1791	Aquifex aeolicus (O67251; 79/107, 43.42%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBI2; 107/107, 96.26%)
icd	Isocitrate dehydrogenase	NSJP_v1_1804	Azotobacter vinelandii (P16100; 741/743, 70.83%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ4; 743/743, 85.73%)
acnA	Aconitate hydratase	NSJP_v1_1803	Gracilaria gracilis (P49609; 779/748, 57.92%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBJ3; 748/748, 92.38%)

解糖系および糖新生				
glk	Glucokinase	NSJP_v1_1397	Nostoc punctiforme (B2J224; 341/354, 40.71%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA74; 361/354, 71.47%)
pgm	phosphoglucomutase	NSJP_v1_2855	Gluconacetobacter xylinus (P38569; 555/548, 61.36%)	Rhodovulum sp. (J6UCP2; 554/548, 69.89%)
algC	Phosphomannomutase/phosphoglucomutase	NSJP_v1_4120	Pseudomonas aeruginosa (P26276; 463/466, 45.02%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHE2; 466/466, 75%)
pgi	glucosephosphate isomerase	NSJP_v1_2856	Syntrophus aciditrophicus (Q2LRD0; 546/546, 74.34%)	delta proteobacterium NaphS2 (D8F6N5; 544/546, 75%)
pfkA	6-phosphofructokinase	NSJP_v1_2867	Mycobacterium bovis (P65691; 343/420, 34.23%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHY9; 421/420, 60.64%)
pfkA2	putative 6-phosphofructokinase (Modular protein)	NSJP_v1_0906	Haemophilus ducreyi (Q8GNC1; 324/772, 30.79%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8W7; 779/772, 74.97%)
fbp	fructose-1,6-bisphosphatase I	NSJP_v1_4118	Chloroherpeton thalassium (B3QWF5; 349/333, 52%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHE0; 332/333, 62.92%)
fbaB	Fructose-bisphosphate aldolase class I	NSJP_v1_4117	Escherichia coli (P0A991; 350/307, 33.33%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PHD9; 307/307, 85.57%)
tpiA	Triosephosphate isomerase	NSJP_v1_2116	Symbiobacterium thermophilum (Q67SW4; 256/257, 53.39%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCA5; 259/257, 57.77%)
gapA	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	NSJP_v1_2118	Geobacillus stearothermophilus (P00362; 335/337, 63.36%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCA7; 335/337, 85.59%)
pgk	phosphoglycerate kinase	NSJP_v1_2117	Geobacter sp. (C6E770; 399/399, 62.15%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCA6; 399/399, 86.65%)
gpmA	phosphoglyceromutase 1	NSJP_v1_1523	Parvibaculum lavamentivorans (A7HZ35; 210/201, 63.27%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAJ4; 201/201, 84.58%)
apgM	putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	NSJP_v1_0751	Geobacter sulfurreducens (Q74C57; 399/413, 40.73%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8E9; 416/413, 58.21%)
eno	enolase	NSJP_v1_4083	Geobacter metallireducens (Q39T27; 429/428, 66.35%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PH76; 428/428, 87.59%)
pyk	Pyruvate kinase 2	NSJP_v1_0905	Synechocystis sp.(P73534; 591/484, 44.54%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8W6; 483/484, 69.98%)
pdhAB	pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component E1, thiamin-binding	NSJP_v1_3238	Pseudomonas aeruginosa (Q59637; 885/899, 57.47%)	Melioribacter roseus (I6Z4N1; 892/899, 63.76%)
pdhC	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	NSJP_v1_3237	Pseudomonas aeruginosa (Q59638; 547/489, 34.24%)	Candidatus Entotheonella sp. (W4LEG5; 453/489, 42.86%)
lpd	lipoamide dehydrogenase, E3 component is part of three enzyme complexes	NSJP_v1_3236	Haemophilus influenzae (P43784; 478/469, 48.92%)	Planctomyces maris (A6C4P3; 475/469, 58.64%)
ペントースリン酸経路およびカルビンベンソン回路				
zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1	NSJP_v1_2572	Mycobacterium tuberculosis (P0A586; 466/465, 41.14%)	Granulicella mallensis (G8P0W0; 470/465, 66.81%)
zwf2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	NSJP_v1_2784	Synechococcus elongatus (P29686; 511/489, 45.77%)	Gemmatimonadetes bacterium (W0RDA7; 511/489, 53.89%)
zwf3	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	NSJP_v1_3737	Synechococcus elongatus (P29686; 511/514, 51.11%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFB0; 507/514, 77.51%)
pgl	6-phosphogluconolactonase	NSJP_v1_1398	Nostoc sp. (P46016; 240/255, 42.86%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA75; 253/255, 54.62%)
gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	NSJP_v1_2573	Bacillus subtilis (P54448; 297/338, 37.95%)	Granulicella mallensis (G8NPU9; 340/338, 75.44%)

gnd2	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase YqeC	NSJP_v1_3736	Bacillus subtilis (P54448; 297/297, 42.76%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PFB1; 297/297, 75.76%)
rpiA	Ribose-5-phosphate isomerase A	NSJP_v1_1396	Gluconobacter oxydans (Q5FQ98; 231/232, 49.34%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA73; 238/232, 58.11%)
rpe	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	NSJP_v1_1450	Bacillus subtilis (O34557; 217/226, 57.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAB5; 234/226, 75.11%)
xfp	putative phosphoketolase 1	NSJP_v1_2868	Rhizobium meliloti (Q92T74; 789/803, 76.78%)	Nitrobacter sp. Nb-311A (A3WV18; 788/803, 81.27%)
prsA	phosphoribosylpyrophosphate synthase	NSJP_v1_1754	Desulfotalea psychrophila (Q6AJL7; 313/313, 62.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBD9; 313/313, 82.37%)
tktA	Transketolase	NSJP_v1_3876	Rattus norvegicus (P50137; 623/621, 52.85%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PG58; 628/621, 80.48%)
tal	putative transaldolase	NSJP_v1_1536	Caldicellulosiruptor bescii (B9MJS9; 217/216, 64.35%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAK9; 215/216, 82.33%)
gmhB	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase	NSJP_v1_1154	Salmonella typhimurium (Q8ZRM8; 188/200, 35.33%)	Gloeobacter kilauensis (U5QE02; 192/200, 53.48%)
rlp	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	NSJP_v1_2759	Rhodospseudomonas palustris (Q6N7T7; 368/386, 37.26%)	Thiocystis violascens (I3YDD4; 378/386, 45.33%)

ギ酸代謝

hyfI	putative Formate hydrogenlyase, small subunit	NSJP_v1_3396	Methanocaldococcus jannaschii (Q57936; 148/169, 47.24%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U1; 173/169, 78.92%)
hyfG	putative Formate hydrogenlyase, large subunit	NSJP_v1_3397	Escherichia coli (P16431; 569/528, 32.86%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U2; 530/528, 71.43%)
hyfF	Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSJP_v1_3398	Escherichia coli (P77437; 526/504, 37.13%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U3; 510/504, 62.33%)
hyfE	putative Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSJP_v1_3399	Escherichia coli (P0AEW2; 216/222, 21.3%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U4; 221/222, 79.07%)
hyfC	putative Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSJP_v1_3400	Escherichia coli (P77858; 315/320, 33.99%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U5; 318/320, 77.24%)
hyfB	Formate hydrogenlyase, membrane subunit	NSJP_v1_3401	Escherichia coli (P23482; 672/675, 37.59%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8U6; 675/675, 67.66%)

グリコーゲン代謝

glgA	Glycogen synthase	NSJP_v1_4076	Pelobacter carbinolicus (Q3A0B8; 484/494, 44.79%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PH69; 496/494, 52.53%)
glgB	1,4-alpha-glucan branching enzyme	NSJP_v1_3008	Rubrobacter xylanophilus (Q1AZ86; 722/735, 57.79%)	Isosphaera pallida (E8R3Y6; 781/735, 59.13%)
glgC	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	NSJP_v1_1204	Acidovorax citrulli (A1TRG1; 435/413, 49.75%)	Thiocystis violascens (I3YGL9; 419/413, 50.37%)
glgC 2	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	NSJP_v1_3090	Rhodopirellula baltica (Q7UXF5; 446/412, 56.14%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PE66; 412/412, 79.37%)
glgP	Glycogen phosphorylase	NSJP_v1_2323	Aquifex aeolicus (O66932; 692/718, 43.42%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PCT3; 719/718, 76.12%)
glgP2	glycogen phosphorylase	NSJP_v1_2870	Homo sapiens (P11216; 843/833, 50.49%)	Azospirillum brasilense (G8AGT3; 841/833, 70.08%)
glgX	Glycogen operon protein GlgX homolog	NSJP_v1_1129	Mycobacterium bovis (P0A4Y5; 721/723, 57.02%)	planctomycete KSU-1 (I3IH15; 739/723, 67.14%)
glgX2	Glycosyl hydrolase (Glycogen debranching enzyme)	NSJP_v1_2869	Mycobacterium bovis (P0A4Y5; 721/722, 50.09%)	Azospirillum brasilense (G8AGT4; 719/722, 68.8%)

電子伝達系

複合体 I

nuoA	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	NSJP_v1_1634	Nitrosomonas europaea (Q82TU3; 122/123, 56.52%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX8; 123/123, 77.24%)
nuoB	NADH-quinone oxidoreductase subunit B 1	NSJP_v1_1633	Solibacter usitatus (Q020B6; 188/159, 70.89%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX7; 159/159, 93.71%)
nuoCD	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D 2	NSJP_v1_1632	Aquifex aeolicus (O67335; 586/584, 44.94%)	uncultured bacterium (K0J3N5; 583/584, 81.16%)
nuoE	NADH-quinone oxidoreductase subunit E	NSJP_v1_1631	Rattus norvegicus (P19234; 248/176, 49.38%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX5; 178/176, 80.11%)
nuoF	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain F	NSJP_v1_1630	Rhizobium meliloti (P56913; 421/435, 57.11%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX4; 435/435, 86.64%)
nuoG	NADH-quinone oxidoreductase subunit G	NSJP_v1_1629	Rhizobium meliloti (P56914; 853/895, 35.83%)	uncultured bacterium (K0IYC1; 887/895, 73.06%)
nuoH	NADH-quinone oxidoreductase subunit H 2	NSJP_v1_1628	Koribacter versatilis (Q11S40; 354/356, 51.39%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX2; 355/356, 85.23%)
nuoI	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	NSJP_v1_1627	Symbiobacterium thermophilum (Q67P14; 162/192, 44.12%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PAX1; 191/192, 86.63%)
nuoJ	NADH-quinone oxidoreductase subunit J	NSJP_v1_1626	Rhodobacter capsulatus (P50975; 202/172, 41.82%)	uncultured bacterium (K0IT96; 172/172, 75%)
nuoK	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit K	NSJP_v1_1625	Chloroherpeton thalassium (B3QXL8; 101/101, 61%)	uncultured bacterium (K0ISW0; 101/101, 86.14%)
nuoL	NADH-quinone oxidoreductase subunit L	NSJP_v1_1624	Neisseria meningitidis (Q9JX92; 647/631, 45.25%)	uncultured bacterium (K0IYC6; 632/631, 78.57%)
nuoM	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit M	NSJP_v1_1623	Rhodobacter capsulatus (P50974; 512/518, 50.1%)	uncultured bacterium (K0IWA7; 519/518, 80.64%)
nuoN	NADH-quinone oxidoreductase subunit N 2	NSJP_v1_1622	Rhizobium meliloti (P56911; 479/495, 47.3%)	uncultured bacterium (K0J3Q0; 495/495, 76.36%)
nuoA2	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	NSJP_v1_1309	Nitrosomonas europaea (Q82TU3; 122/127, 53.28%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V9; 127/127, 84.25%)
nuoB2	NADH-quinone oxidoreductase subunit B 1	NSJP_v1_1308	Herpetosiphon aurantiacus (A9B4Z5; 179/175, 60.9%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V8; 175/175, 92.53%)
nuoCD2_f	fragment of NADH dehydrogenase I chain D	NSJP_v1_1305	Geobacter metallireducens (Q39QB0; 390/414, 53.75%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V6; 415/414, 94.66%)
nuoCD2_f	fragment of NADH dehydrogenase I chain C	NSJP_v1_1307	Geobacter sulfurreducens (Q74GA6; 162/167, 46.21%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V7; 165/167, 76.97%)
nuoF2	NADH-quinone oxidoreductase subunit F 2	NSJP_v1_0409	Rhizobium meliloti (P56913; 421/433, 46.06%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ07; 425/433, 82.73%)
nuoG2	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit G	NSJP_v1_1304	Rhizobium meliloti (P56914; 853/895, 32.72%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V5; 902/853, 75%)
nuoI2	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	NSJP_v1_1303	Polaromonas sp. (Q127Y0; 165/195, 38.96%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V4; 202/195, 89.74%)
nuoJ2	NADH-quinone oxidoreductase, membrane subunit J	NSJP_v1_1302	Leptolyngbya boryana (Q00243; 199/173, 34.16%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V3; 174/173, 72.83%)
nuoK2	NADH-quinone oxidoreductase subunit K	NSJP_v1_1301	Chloroherpeton thalassium (B3QXL8; 101/100, 57.14%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V2; 100/100, 88%)
nuoL2	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit L	NSJP_v1_0994	Neisseria meningitidis (Q9JX92; 674/647, 33.16%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P964; 564/647, 64.5%)

nuoL3	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit L	NSJP_v1_0995	Neisseria meningitidis (Q9JX92; 674/566, 32.84%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P964; 564/566, 68.33%)
nuoL4	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit L	NSJP_v1_1300	Pseudomonas aeruginosa (Q9I0J1; 615/654, 44.62%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V1; 667/654, 78.43%)
nuoM2	NADH-quinone oxidoreductase, membrane subunit M	NSJP_v1_1299	Rickettsia conorii (Q92G96; 493/519, 38.88%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9V0; 519/519, 79.37%)
nuoM3	NADH-quinone oxidoreductase, membrane subunit M	NSJP_v1_1298	Paracoccus denitrificans (P29925; 513/562, 30.77%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9U9; 551/562, 84.64%)
nuoM4	putative NADH-quinone oxidoreductase, subunit M	NSJP_v1_0996	Escherichia coli (P0AFE8; 509/436, 24.62%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P965; 435/436, 42.69%)
nuoN2	NADH-quinone oxidoreductase subunit N	NSJP_v1_1297	Heliobacterium modesticaldum (B0TH87; 472/500, 43.76%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9U8; 498/500, 81.2%)
複合体 III				
qcrA	putative Quinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit, modulated with PRC-barrel (Modular protein)	NSJP_v1_1854	Geobacillus thermodenitrificans (Q45657; 169/310, 27.53%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBQ3; 312/310, 77.88%)
qcrB	putative Quinol-cytochrome c reductase, cytochrome b subunit	NSJP_v1_1855	Chlorobaculum thiosulfatiphilum (Q59297; 428/370, 39.05%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PBQ4; 371/370, 92.56%)
qcrA2	putative Quinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske iron-sulfur protein)	NSJP_v1_2516	Bacillus subtilis (P46911; 167/182, 31.13%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ18; 183/182, 64.12%)
qcrB2	Quinol-cytochrome c reductase, fused cytochrome b/c subunit	NSJP_v1_2519	Chlorobium tepidum (Q9F721; 428/442, 37.42%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ17; 441/442, 73.64%)
複合体 IV				
cydA	Cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I	NSJP_v1_1152	Bacillus subtilis (C0SP90; 443/432, 35.83%)	Gemmatimonadetes bacterium (W0RCQ5; 462/432, 57.94%)
cydB	putative terminal oxidase subunit II	NSJP_v1_1153	Bacillus subtilis (O34505; 346/335, 22.12%)	Sorangium cellulosum (A9G2B1; 342/335, 47.43%)
複合体 V				
atpA	F1 sector of membrane-bound ATP synthase, alpha subunit	NSJP_v1_1416	Carboxydotherrnus hydrogenoformans (Q3A944; 501/505, 70.48%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA90; 505/505, 94.46%)
atpB	ATP synthase subunit a	NSJP_v1_0492	Magnetococcus sp. (A0LDW6; 259/250, 50.81%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R6; 249/250, 77.6%)
atpC	ATP synthase epsilon chain	NSJP_v1_1419	Syntrophobacter fumaroxidans (A0LLF7; 134/141, 54.89%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA93; 140/141, 80.45%)
atpD	membrane-bound ATP synthase , F1 sector, beta-subunit	NSJP_v1_1418	Carboxydotherrnus hydrogenoformans (Q3A946; 473/480, 75%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA92; 480/480, 96.04%)
atpE	ATP synthase subunit c	NSJP_v1_0491	Rhodospirillum rubrum (Q2RPA5, 75/76, 50%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R5; 76/76, 97.37%)
atpF	ATP synthase subunit b	NSJP_v1_0490	Magnetococcus sp. (A0LDW8; 189/168, 37.74%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R4; 170/168, 81.12%)
atpG	ATP synthase gamma chain	NSJP_v1_1417	Anaeromyxobacter sp. (A7HIX8; 290/292, 48.82%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA91; 295/292, 86.78%)
atpG2	ATP synthase gamma chain	NSJP_v1_2865	Geobacter bemidjiensis (B5EF18; 287/298, 46.64%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA91; 295/298, 64.77%)

atpH	ATP synthase subunit delta	NSJP_v1_1415	Phenylobacterium zucineum (B4RD44; 184/179, 35.06%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PA89; 179/179, 64.25%)
atpI	Putative ATP synthase F0, subunit I	NSJP_v1_0494	Rhodospirillum rubrum (P15011; 123/73, 46.43%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7R7; 94/73, 80%)
Ppk	Polyphosphate:nucleotide phosphotransferase, PPK2 family	NSJP_v1_1053	Leptolyngbya boryana (Q04605; 136/272, 50.89%)	Nitrosomonas sp. AL212 (F9ZJY7; 272/272, 69.37%)
ppk2	Polyphosphate kinase 2	NSJP_v1_2212	Chlorobium tepidum (O68984; 714/725, 51.45%)	Aminomonas paucivorans (E3D0G3; 714/725, 59.91%)
hppA	K(+)-insensitive pyrophosphate-energized proton pump	NSJP_v1_0096	Xanthomonas campestris (Q8P5M6; 675/685, 62.59%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI69; 684/685, 90.36%)
ppa	Inorganic pyrophosphatase	NSJP_v1_2779	Chlamydia pneumoniae (Q9Z6Y8; 215/227, 51.26%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7H5; 227/22777.63%)
運動性				
鞭毛合成				
	putative Outer membrane protein, OmpA/MotB family	NSJP_v1_1336	Escherichia coli (P37665; 219/393, 29.87%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P9Y8; 400/393, 42.21%)
化学走化性				
cheA	putative Chemotaxis protein CheA modulated with response regulator receiver region (Modular protein)	NSJP_v1_3528	Myxococcus xanthus (P18769; 777/1136, 29.3%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGH3; 1129/1136, 59.6%)
cheB	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase (fragment)	NSJP_v1_1942	Pyrococcus horikoshii (O58192; 368/200, 40.11%)	planctomycete KSU-1 (I3IN72; 344/200, 47.64%)
cheB2	Two-component system, chemotaxis family, response regulator CheB (fragment)	NSJP_v1_1963	Thermococcus kodakaraensis (Q5JF95; 355/215, 33.82%)	Fibrella aestuarina (I0KAQ1; 350/215, 45.08%)
cheR	CheB methylesterase:MCP methyltransferase, CheR-type	NSJP_v1_1962	Rhodobacter capsulatus (Q02998; 952/948, 35.13%)	Chlorobium ferrooxidans (Q0YQ86; 997/948, 48.98%)
cheW	putative CheW-like signal transduction protein	NSJP_v1_3526	Bacillus subtilis (P39802; 156/148, 23.77%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGH1; 158/148, 44.96%)
cheW2	Putative Chemotaxis protein CheW (modular protein)	NSJP_v1_3530	Enterobacter aerogenes (P21821; 166/173, 29.19%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGH5; 145/173, 55.97%)
CheY	putative Response regulator, CheY-like	NSJP_v1_0436	Klebsiella oxytoca (Q9APD9; 443/145, 31.45%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PJ31; 144/145, 85.21%)
cheY2	putative Response regulator, CheY-like	NSJP_v1_0723	Anaeromyxobacter sp. (A7HD44; 238/261, 28.416%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8C3; 276/261, 56.65%)
cheY3	Putative Response regulator, CheY-like (fragment)	NSJP_v1_1115	Bacillus subtilis (P06628; 124/132, 31.03%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P7X8; 149/132, 61.86%)
cheY4	Putative Response regulator, CheY-like (modular protein)	NSJP_v1_1144	Mycobacterium leprae (Q9CD68; 228/148, 39.64%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI33; 146/148, 40.68%)
cheY5	putative Response regulator, CheY-like	NSJP_v1_1216	Bacillus subtilis (P37478; 235/137, 30.33%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI33; 146/137, 46.67%)
cheY6	putative Chemotaxis protein CheY	NSJP_v1_2060	Porphyridium aeruginum (P28835; 240/143, 33.33%)	Clostridium sp. (R6P250; 243/143, 34.71%)
cheY7	putative Response regulator, CheY-like	NSJP_v1_2437	Mycobacterium smegmatis (A0QTK2; 228/215, 34.88%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PEC7; 211/215, 53.47%)
cheY8	putative Response regulator, CheY like (Modular protein)	NSJP_v1_2977	Porphyridium aeruginum (P28835; 240/379, 29.91%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PE08; 388/379, 40.46%)
cheY9	Response regulator, CheY like	NSJP_v1_3004	Bacillus subtilis (P06628; 124/120, 39.13%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PE36; 121/120, 69.17%)

cheY10	DNA-binding response regulator, CheY like	NSJP_v1_3511	Synechocystis sp. (Q55169; 147/168, 29.5%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PDW3; 142/168, 40.44%)
	putative Methyl-accepting chemotaxis protein	NSJP_v1_3529	Alcanivorax borkumensis (Q0VTI9; 675/624, 37.43%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGH4; 624/624, 69.63%)

Quorum-sensing 機構および LuxR ファミリー

NjpI	N-acyl-L-homoserine lactone synthase	NSJP_v1_1610	Aeromonas salmonicida (P70774; 207/245, 31.51%)	uncultured bacterium (K0ITA7; 237/245, 47.86%)
NjpR	Transcriptional regulator	NSJP_v1_1611	Rhizobium sp. (P55629; 326/271, 28.72%)	uncultured bacterium (K0J3R4; 267/271, 64.86%)
LuxR	Transcriptional regulator, LuxR family	NSJP_v1_0381	Brevibacillus brevis (P54662; 236/149, 38.46%)	Thermaerobacter marianensis (E6SMC6; 280/149, 48%)
LuxR2	Transcriptional regulator, LuxR family	NSJP_v1_0742	Escherichia coli (Q46791; 210/91, 47.14%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P8E0; 94/91, 73.33%)
LuxR3	Transcriptional regulator, LuxR family	NSJP_v1_1081	Escherichia coli (P0AED5; 218/212, 39.52%)	Pedosphaera parvula (B9XGC4; 198/212, 52.76%)
LuxR4	Response regulator, LuxR family	NSJP_v1_1125	Staphylococcus carnosus (Q7WZY4; 217/221, 38.5%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI51; 214/221, 52.97%)
LuxR5	Response regulator, LuxR family	NSJP_v1_1126	Bacillus subtilis (O32197; 211/241, 35.47%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PI51; 214/241, 47.6%)
LuxR6	Response regulator, LuxR family	NSJP_v1_2063	Staphylococcus carnosus (Q7WZY4; 217/214, 34.58%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8P820; 214/214, 60.28%)
LuxR7	Two component transcriptional regulator, LuxR family	NSJP_v1_2850	Bacillus subtilis (P13800; 229/148, 35.16%)	Desulfobulbus propionicus (E8RC70; 212/148, 43.2%)
LuxR8	Two component transcriptional regulator, LuxR family	NSJP_v1_2851	Staphylococcus epidermidis (Q8CN75; 218/216, 31.63%)	Koribacter versatilis (Q1IJ83; 233/216, 52.86%)
LuxR9	putative Response regulator, LuxR family	NSJP_v1_3830	Bacillus subtilis (O32197; 211/234, 32.57%)	Candidatus Nitrospira defluvii (D8PGN5; 235/234, 42.01%)

謝辞

生命医科学科を卒業し、常田研究室で 5 年間研究に着手させていただきました。この 5 年間、挫けることなく研究を続けることができたのは、ひとえに常田研究室の皆様のおかげです。常田研究室の皆様には心から感謝しております。

研究に対する姿勢，研究の進め方，進路など，研究の域を超えて様々なご指導をしていただいた早稲田大学先進理工学部生命医科学科常田聡教授に対し，心から感謝の意を表し，深く御礼申し上げます。また、研究を進める上での方向性や具体的な実験方法のみならず，進路や生活に関しても親身に助言・指導していただいた藤谷拓嗣博士には心から感謝を申し上げます。さらに、ゲノム配列の再構築にご協力してくださった関口勇地博士、AHL レポーター株の分譲、AHL の同定にご協力してくださった諸星知広博士にも心から感謝を申し上げます。

参考文献

1. Okabe S, Aoi Y, Satoh H, Suwa Y (2011). Nitrification in wastewater treatment. In: Ward BB, Arp DJ, Klotz MG (eds). *Nitrification*. ASM Press: Washington DC, pp 405-433.
2. Philips S, Laanbroek HJ, Verstraete W. (2002). Origin, causes, and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev Environ Sci Biotechnol* 1:115-141.
3. Daims H, Lücker S, Wagner M (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends Microbiol.* 24:699-712.
4. Sorokin D, Lücker S, Vejmekova D, Kostrikina N, Kleerebezem R, Rijpstra W, et al. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum *Chloroflexi*. *ISME J* 6:2245-2256.
5. Bock E, Sundermeyerklinger H, Stackebrandt E (1983). New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol* 136:281-284.
6. Sorokin D, Müyzer G, Brinkhoff T, Kuenen J, Jetten M (1998). Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N-alkalicus* sp. nov. *Arch Microbiol* 170:345-352.
7. Bock E, Koops H, Moller U, Rudert M (1990). A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter-vulgaris* sp-nov. *Arch Microbiol* 153:105-110.
8. Starkenburg SR, Larimer FW, Stein LY, Klotz MG, Chain PS, Sayavedra-Soto LA, et al. (2008). Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. *Appl Environ Microbiol* 74:2852-2863.
9. Watson SW, Waterbury JB (1971). Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina-gracilis* nov-gen-nov-sp and *Nitrococcus-mobilis* nov-gen-nov-sp. *Archiv Mikrobiol* 77:203-230.
10. Spieck E, Keuter S, Wenzel T, Bock E, Ludwig W (2014). Characterization of a new marine nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospina watsonii* sp. nov., a member of the newly proposed phylum "*Nitrospinae*". *Syst Appl Microbiol* 37:170-176.

11. Mincer T, Church M, Taylor L, Preston C, Kar D, DeLong E (2007). Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol* 9:1162-1175.
12. Lückner S, Nowka B, Rattei T, Spieck E, Daims H (2013). The Genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Front Microbiol* 4:27.
13. Poly F, Wertz S, Brothier E, Degrange V (2008). First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. *FEMS Microbiol Ecol* 63:132-140.
14. Wertz S, Poly F, Le Roux X, Degrange E (2008). Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxrA* sequences in soil. *FEMS Microbiol Ecol* 63:261-271.
15. Alawi M, Lipski A, Sanders T, Eva-Maria-Pfeiffer, Spieck E (2007). Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME J* 1: 256-264.
16. Alawi M, Off S, Kaya M, Spieck E (2009). Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge. *Environ Microbiol Reports* 1:184-190.
17. Lückner S, Schwarz J, Gruber-Dorninger C, Spieck E, Wagner M, Daims H (2015). *Nitrotoga*-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants. *ISME J* 9:708-720.
18. Altmann D, Stief P, Amann R, De Beer D, Schramm A (2003). In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. *Environ Microbiol* 5:798-803.
19. Anitori RP, Trott C, Saul DJ, Bergquist PL, Walter MR (2002). A culture-independent survey of the bacterial community in a radon hot spring. *Astrobiology* 2:255-270.
20. Freitag TE, Chang L, Clegg CD, Prosser JI (2005). Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Appl Environ*

Microbiol 71:8323-8334.

21. Lebedeva EV, Alawi M, Fiencke C, Namsaraev B, Bock E, Spieck E (2005). Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiol Ecol* 54:297-306.
22. Hongxiang X, Min W, Xiaogu W, Junyi Y, Chunsheng W (2008). Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica* 28:479-485.
23. Neilson JW, Quade J, Ortiz M, Nelson WM, Legatzki A, Tian F, et al. (2012). Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Extremophiles* 16:553-566.
24. Pester M, Maixner F, Berry D, Rattei T, Koch H, Lückner S, et al. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*. *Environ Microbiol* 16:3055-3071.
25. Gruber-Dorninger C, Pester M, Kitzinger K, Savio DF, Loy A, Rattei T, et al. (2015). Functionally relevant diversity of closely related *Nitrospira* in activated sludge. *ISME J* 9:643-655.
26. Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, Schleifer KH, Wagner M (2001). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 67:5273-5284.
27. Lebedeva EV, Off S, Zumbargel S, Kruse M, Shagzhina A, Lückner S, et al. (2011). Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. *FEMS Microbiol Ecol* 75:195-204.
28. Nowka B, Daims H, Spieck E (2015). Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: nitrite availability as a key factor in niche differentiation. *Appl Environ Microbiol* 81:745-753.
29. Nowka B, Off S, Daims H, Spieck E (2015). Improved isolation strategies allowed the phenotypic differentiation of two *Nitrospira* strains from widespread phylogenetic lineages. *FEMS Microbiol Ecol* 91:3.

30. Ushiki N, Fujitani H, Aoi Y, Tsuneda S (2013). Isolation of *Nitrospira* belonging to sublineage II from a wastewater treatment plant. *Microbes Environ* 28:346-353.
31. Fujitani H, Ushiki N, Tsuneda S, Aoi Y (2014). Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy. *Environ Microbiol* 16:3030-3040.
32. Wagner M, Rath G, Koops HP, Flood J, Amann R, (1996). *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci Technol* 34:237-244.
33. Burrell P, Keller J, Blackall LL (1998). Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Appl Environ Microbiol* 64: 1878-1883.
34. Hovanec TA, Taylor LT, Blakis A, Delong EF (1998). *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Appl Environ Microbiol* 64: 258-264.
35. Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommerening-Röser A, Koops HP, et al. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3042-3051.
36. Schramm A, de Beer D, van den Heuvel JC, Ottengraf S, Amann R (1999). Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Appl Environ Microbiol* 65:3690–3696.
37. Fujitani H, Aoi Y, Tsuneda S (2013). Selective enrichment of two different types *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria from a wastewater treatment plant. *Microbes Environ* 28: 236-243.
38. Maixner F, Noguera DR, 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.
39. Park HD, Noguera DR (2008). *Nitrospira* community composition in nitrifying reactors operated with two different dissolved oxygen levels. *J Microbiol Biotechnol* 18:1470-1474.

40. Ehrlich S, Behrens D, Lebedeva E, Ludwig W, Bock E (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch Microbiol* 164:16-23.
41. Griess-Romijn van Eck E. (1966). Physiological and chemical tests for drinking water. NEN 1056 IV-2 Nederlands Normalisatie Instituut: Rijswijk, The Netherlands.
42. Laanbroek H, Bodelier P, Gerards S (1994). Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations. *Arch Microbiol* 161: 156-162.
43. Lüscher S, Wagner M, Maixner F, Pelletier E, Koch H, Vacherie B, et al. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13479-13484.
44. Sayavedra-Soto L, Ferrell R, Dobie M, Mellbye B, Chaplen F, Buchanan A, et al. (2015). *Nitrobacter winogradskyi* transcriptomic response to low and high ammonium concentrations. *FEMS Microbiol Lett* 362:1-7.
45. Koch H, Lüscher S, Albertsen M, Kitzinger K, Herbold C, Spieck E, et al. (2015). Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11371-11376.
46. Palatinszky M, Herbold C, Jehmlich N, Pogoda M, Han P, von Bergen M, et al. (2015). Cyanate as an energy source for nitrifiers. *Nature* 524:105-108.
47. Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, et al. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528:504-509.
48. van Kessel MA, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJ, Kartal B, et al. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 528:555-559.
49. Ushiki N, Jinno M, Fujitani H, Suenaga T, Terada A, Tsuneda S. Nitrite oxidation kinetics of two *Nitrospira* strains: The quest for competition and ecological niche differentiation. *J Biosci Bioeng* (in press) DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.12.016.

50. Koch H, Galushko A, Albertsen M, Schintlmeister A, Gruber-Dorninger C, Lücker S, et al. (2014). Growth of nitrite-oxidizing bacteria by aerobic hydrogen oxidation. *Science* 345:1052-1054.
51. Spieck E, Hartwig C, McCormack I, Maixner F, Wagner W, Lipski A, et al. (2006). Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira* -like bacterium from activated sludge. *Environ Microbiol* 8:405–415.
52. Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, et al. (2013). MicroScope--an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* 41:D636-47.
53. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
54. Kandeler E, Gerber H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol Fertil Soils* 6:68–72.
55. Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2567-2572.
56. Luque I, Flores E, Herrero A (1993). Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Mol Biol* 21:1201-1205.
57. Suzuki I, Sugiyama T, Omata T. (1993). Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* 34:1311–1320.
58. Moreno-Vivian C, Cabello P, Martinez-Luque M, Blasco R, Castillo F (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* 181:6573-6584.
59. Simon J (2002). Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev* 26:285-309.

60. Baughn AD, Malamy MH (2004). The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature* 427:441-444.
61. Das A, Silaghi-Dumitrescu R, Ljungdahl LG, Kurtz DM, Jr (2005). Cytochrome bd oxidase, oxidative stress, and dioxygen tolerance of the strictly anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *J Bacteriol* 187:2020-2029.
62. Mobley HL, Island MD, Hausinger RP (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59:451-480.
63. Lee MH, Mulrooney SB, Renner MJ, Markowicz Y, Hausinger RP (1992). *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of *ureD* and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, and *ureG*) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. *J Bacteriol* 174:4324-4330.
64. Park IS, Carr MB, Hausinger RP (1994). In vitro activation of urease apoprotein and role of UreD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3233-3237.
65. Lee MH, Pankratz HS, Wang S, Scott RA, Finnegan MG, Johnson MK, et al. (1993). Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly. *Protein Sci* 2:1042-1052.
66. Chain P, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Lao V, Land M, et al. (2003). Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 185:2759-2773.
67. Norton JM, Klotz MG, Stein LY, Arp DJ, Bottomley PJ, Chain PS, et al. (2008). Complete genome sequence of *Nitrosospora multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl Environ Microbiol* 74:3559-3572.
68. Starkenburg SR, Chain PS, Sayavedra-Soto LA, Hauser L, Land ML, Larimer FW, et al. (2006). Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Appl Environ Microbiol* 72:2050-2063.
69. Kutsukake K (1997). Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in

Salmonella typhimurium. *Mol Gen Genet* 254:440-448.

70. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R (1997). A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* 179:5574-5581.
71. Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R (1995). Cloning and phenotypic characterization of fleS and fleR, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun* 63:4868-4876.
72. Dasgupta N, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S, et al. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 50:809-824.
73. Williams TJ, Allen MA, DeMaere MZ, Kyrpides NC, Tringe SG, Woyke T, et al. (2014). Microbial ecology of an Antarctic hypersaline lake: genomic assessment of ecophysiology among dominant haloarchaea. *ISME J* 8:1645-1658.
74. Nasuno E, Kimura N, Fujita MJ, Nakatsu CH, Kamagata Y, Hanada S (2012). Phylogenetically novel LuxI/LuxR-type quorum sensing systems isolated using a metagenomic approach. *Appl Environ Microbiol* 78:8067-8074.
75. Burton EO, Read HW, Pellitteri MC, Hickey WJ. (2005). Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt. *Appl Environ Microbiol* 71:4906-4909.
76. Gao J, Ma A, Zhuang X, Zhuang G (2014). An N-acyl homoserine lactone synthase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis*. *Appl Environ Microbiol* 80:951-958.
77. Mellbye BL, Bottomley PJ, Sayavedra-Soto LA (2015). Nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* produces N-acyl-homoserine lactone autoinducers. *Appl Environ Microbiol* 81:5917-5926.
78. Shen Q, Gao J, Liu J, Liu S, Liu Z, Wang Y, et al. (2016). A new acyl-homoserine lactone molecule generated by *Nitrobacter winogradskyi*. *Sci Rep* 6:22903.

79. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35:W52-7.
80. Hatoum-Aslan A, Marraffini LA (2014). Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 17:82-90.
81. Palmer KL, Gilmore MS (2010). Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio* 1:10.1128/mBio.00227-10.
82. Gophna U, Kristensen DM, Wolf YI, Popa O, Drevet C, Koonin EV (2015). No evidence of inhibition of horizontal gene transfer by CRISPR-Cas on evolutionary timescales. *ISME J* 9:2021-2027.
83. Klotz MG, Schmid MC, Strous M, op den Camp HJ, Jetten MS, Hooper AB (2008). Evolution of an octahaem cytochrome c protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria. *Environ Microbiol* 10:3150-3163.
84. Waters CM, Bassler BL (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319-346.
85. Hense BA, Schuster M (2015). Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:153-169.
86. De Clippeleir H, Defoirdt T, Vanhaecke L, Vlaeminck SE, Carballa M, Verstraete W, et al. (2011). Long-chain acylhomoserine lactones increase the anoxic ammonium oxidation rate in an OLAND biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1511-1519.
87. Tang X, Liu S, Zhang Z, Zhuang G (2015). Identification of the release and effects of AHLs in anammox culture for bacteria communication. *Chem Eng J* 273:184-191.
88. Cornforth DM, Popat R, McNally L, Gurney J, Scott-Phillips TC, Ivens A, et al. (2014). Combinatorial quorum sensing allows bacteria to resolve their social and physical environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4280-4284.
89. More MI, Finger LD, Stryker JL, Fuqua C, Eberhard A, Winans SC (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*

272:1655-1658.

90. Gould TA, Schweizer HP, Churchill ME (2004). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Mol Microbiol* 53:1135-1146.
91. Watson WT, Minogue TD, Val DL, von Bodman SB, Churchill ME (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* 9:685-694.
92. Ortori CA, Atkinson S, Chhabra SR, Camara M, Williams P, Barrett DA (2007). Comprehensive profiling of N-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 387:497-511.

研究業績

種 類 別	題名、発表・発行掲載誌名、発表・発行年月、連名者（申請者含む）
論文 ○	<ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="373 456 1343 586">1. <u>Ushiki N</u>, Jinno M, Fujitani H, Suenaga T, Terada A, Tsuneda S. Nitrite oxidation kinetics of two <i>Nitrospira</i> strains: The quest for competition and ecological niche differentiation. <i>J Biosci Bioeng</i> (in press) DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.12.016. <li data-bbox="373 689 1343 757">2. Fujitani H, <u>Ushiki N</u>, Tsuneda S, Aoi Y (2014). Isolation of sublineage I <i>Nitrospira</i> by a novel cultivation strategy. <i>Environ Microbiol</i> 16:3030-3040. <li data-bbox="373 860 1343 958">3. <u>Ushiki N</u>, Fujitani H, Aoi Y, Tsuneda S (2013). Isolation of <i>Nitrospira</i> belonging to sublineage II from a wastewater treatment plant. <i>Microbes Environ</i> 28:346-353.

種 類 別	題名、発表・発行掲載誌名、発表・発行年月、連名者（申請者含む）
講演	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Ushiki N</u>, Fujitani H, Sekiguchi Y, Tsuneda S, “Comparative genomic analysis of phylogenetically distinct two <i>Nitrospira</i> strains isolated from a wastewater treatment plant”, 16th International Symposium on Microbial Ecology, Montreal, Aug 2016 2. 牛木章友, 藤谷拓嗣, 関口勇地, 常田聡, “比較ゲノム解析が明らかにする亜硝酸酸化細菌 <i>Nitrospira</i> の生態学的ニッチ”, 日本微生物生態学会第30回大会、土浦、2015年10月 3. <u>Ushiki N</u>, Fujitani H, Sekiguchi Y, Tsuneda S, “Comparative genomic analysis of phylogenetically distant two <i>Nitrospira</i> strains isolated from a wastewater treatment plant”, 4th International Conference on Nitrification (and Related Processes), Edmonton, Jul 2015 4. 牛木章友、藤谷拓嗣、常田聡, “排水処理槽内から単離された2種類の <i>Nitrospira</i> の比較解析”第48回日本水環境学会年会、仙台、2014年3月 5. <u>Ushiki N</u>, Fujitani H, Aoi Y, Tsuneda S, “Comparative physiological analysis of <i>Nitrospira</i> strains isolated from a wastewater treatment plant”, 3rd International Conference on Nitrification, Tokyo, Sep 2013 6. <u>Ushiki N</u>, Fujitani H, Tsuneda S, Aoi Y, “Comparative physiological analysis of previously uncultured <i>Nitrospira</i> strains isolated from wastewater treatment plants”, 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, Aug 2012

