

博士論文概要

論文題目

独自の培養戦略で分離した
“*Candidatus Nitrotoga* sp.” AM1P の
生理活性およびゲノム情報の解析

Physiological and genomic characterization of
“*Candidatus Nitrotoga* sp.” AM1P
isolated by a unique cultivation strategy

申請者

石井	拳人
Kento	ISHII

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2020年12月

窒素は酸化数を変えながら、無機窒素化合物あるいは有機窒素化合物として地球を循環している。窒素循環において、アンモニアが亜硝酸を経て硝酸へ好氣的に酸化される硝化反応は、硝化菌によって担われている。排水処理場では、硝化菌は生物学的窒素除去プロセスに関与しており、水質汚染や富栄養化を防いでいる。一方農耕地においては、硝酸は土壤コロイドに反発して流亡するため、硝化は窒素肥料の損失を招いている。これら窒素をめぐる環境問題に対処するための戦略を練る上で、窒素循環を駆動させている微生物の生理生態を理解することは不可欠である。

硝化反応のうち、硝酸産生のほとんどは亜硝酸酸化細菌 (Nitrite-oxidizing bacteria: NOB) によってのみ触媒されている。培養が主流であった時代では、*Proteobacteria* 門 *Nitrobacter* 属が主要な NOB であると考えられていた。しかし、このパラダイムは技術の発達や新規な NOB の発見により、塗り替えられてきた。遺伝子情報に基づいて、培養に依存せずに NOB の系統ごとの分布や存在量が調べられるようになると、自然環境や水処理施設に豊富に棲息しているのは *Nitrospirae* 門 *Nitrospira* 属であると考えられた。*Nitrospira* が最初に分離培養されてから、約 30 年後の 2007 年に *Proteobacteria* 門 “*Ca. Nitrotoga*” 属が発見された。“*Ca. Nitrotoga*” は目レベルで他の NOB と系統が離れている。*Nitrotoga* は分類・命名をする上で十分な記載がされていないため、暫定的な地位 (*Candidatus*) に止まっている。系統マーカーである 16S rRNA 遺伝子に基づく環境分布の調査では、*Nitrospira* と同様に “*Ca. Nitrotoga*” は幅広い棲息域を有していることが明らかになった。また、“*Ca. Nitrotoga*” が *Nitrospira* よりも多く検出されている環境が報告され、“*Ca. Nitrotoga*” は亜硝酸酸化の重要な担い手であると認識されるようになった。“*Ca. Nitrotoga*” の全ゲノム解析により、“*Ca. Nitrotoga*” は亜硝酸酸化以外にも多様なエネルギー獲得経路を持つことが示された。環境分布から推察される生態学的役割や、ゲノムに基づいた仮説を確かめるためには、遺伝子情報を蓄積させることに加え、“*Ca. Nitrotoga*” 分離株を用いた培養依存的な研究も必要である。しかし、“*Ca. Nitrotoga*” を実験室環境で培養することは難しく、“*Ca. Nitrotoga*” 分離株は 1 株しか獲得されていない。発見から 10 年以上経過しているにも関わらず分離株が不足していることは、亜硝酸と微量元素を含む無機培地を用いた平板培養法や限界希釈法といった従来の培養法が “*Ca. Nitrotoga*” に適していないことを示唆している。そこで本研究では、“*Ca. Nitrotoga*” 分離株を獲得するための独自の分離培養戦略を考案する。また、生理生態を理解する上で重要な、“*Ca. Nitrotoga*” 分離株の生理学的性質およびゲノム情報を解析することを目的とする。

第 1 章では、窒素循環、硝化反応、NOB の重要性、NOB の培養方法と分離技術、NOB のゲノム情報といった研究背景を概説した。また、先行研究で集積され

た“*Ca. Nitrotoga*”について述べた。さらに、本研究の目的を記載した。

第2章では、先行研究で得られた“*Ca. Nitrotoga*”集積培養系から“*Ca. Nitrotoga*”を分離培養した。分離培養するためには、「“*Ca. Nitrotoga*”以外の微生物の除去」と「“*Ca. Nitrotoga*”の増殖促進」を達成する必要があった。“*Ca. Nitrotoga*”集積サンプルを顕微鏡観察すると、主に“*Ca. Nitrotoga*”の細胞で構成された微生物凝集体（“*Ca. Nitrotoga*”凝集体）が観察された。“*Ca. Nitrotoga*”凝集体を選択的に分取・培養することで、“*Ca. Nitrotoga*”を濃縮できると考えた。そこで、培地を分注した96ウェルプレートの各ウェルに、セルソーターを用いて“*Ca. Nitrotoga*”凝集体を一つずつ播種した。セルソーティングによって、“*Ca. Nitrotoga*”集積培養系に存在していた細菌は数種類まで絞られた。

混在する“*Ca. Nitrotoga*”以外の細菌を除去するため、抗生物質処理を施した。

“*Ca. Nitrotoga*”は亜硝酸を栄養源として増殖する独立栄養細菌である。一方、混在しているのは“*Ca. Nitrotoga*”が産生する代謝物（有機物）を栄養源とする従属栄養細菌である。抗生物質は代謝活性が高い細菌を標的とするため、栄養源の違いを利用して混在細菌の代謝だけを活性化すれば、混在細菌のみが抗生物質によって死滅させられると考えた。セルソーティング後集積培養系に含まれる全細菌の代謝活性を落とすため、いかなる栄養源も含まない培地で2週間培養した。前培養した集積培養系にストレプトマイシンとゲンタマイシンを添加し、4時間培養した。このとき、従属栄養細菌の代謝のみを活性化させるために、有機栄養源に富む培地も添加した。上清を入れ替え、抗生物質を含まない無機培地で培養を続けた。抗生物質処理後では、セルソーティング後に優占していた混在細菌は検出されなかった。

混在細菌よりも“*Ca. Nitrotoga*”の増殖速度が上回れば、継代培養を繰り返すことで“*Ca. Nitrotoga*”は純化される。“*Ca. Nitrotoga*”の増殖を促進する物質として、アンモニウムとピルビン酸に着目した。先行研究では、アンモニウムは“*Ca. Nitrotoga*”の亜硝酸酸化活性を促進させた。また *Nitrospira* においては、無機培地にピルビン酸を添加するとその増殖活性が上昇したと報告されている。亜硝酸、アンモニア、ピルビン酸を含む培地を用いて、“*Ca. Nitrotoga*”が純化されるまで、抗菌薬処理後集積培養系の継代培養を続けた。分離培養された株を、“*Ca. Nitrotoga* sp.” AM1P と命名した。

第3章では、AM1Pの生理学的性質およびゲノム情報を解析した。分離培養過程においてアンモニウムとピルビン酸を利用したため、窒素同化とピルビン酸代謝に焦点を当て、表現型とゲノム情報を結びつけることを目指した。亜硝酸含有無機培地にアンモニウムを添加したところ、AM1Pの亜硝酸酸化活性が上昇した。AM1Pゲノムからアンモニウムトランスポーターが同定されたため、AM1Pは培地中のアンモニウムを細胞内へ輸送したと予想される。窒素源として亜硝酸

ではなくアンモニウムを利用することで、亜硝酸同化に必要な還元力を節約し、余剰の還元力は他の生合成反応に使われたために、亜硝酸酸化活性が上昇したと考えられる。ピルビン酸添加は、AM1Pの亜硝酸酸化および増殖活性を促進した。その理由として、ピルビン酸がH₂O₂ストレスを化学的に除去したこと、エネルギー源・炭素源としてAM1Pに代謝されたことが挙げられる。ピルビン酸を輸送するためのトランスポーターはAM1Pゲノムから見つからなかったが、ピルビン酸を同化・異化するために必要な遺伝子群は保存されている。H₂O₂分解酵素であるカタラーゼとピルビン酸をそれぞれ添加したところ、ピルビン酸の方がAM1Pの亜硝酸酸化活性の促進効果が高かった。したがって、ピルビン酸は未同定のトランスポーターを介して細胞内に輸送され、エネルギー源・炭素源としても利用された可能性が高い。既知の“*Ca. Nitrotoga*”とAM1P間の比較ゲノム解析は、AM1Pが乳酸脱水素酵素Ldhを保持することを明らかにした。LdhはL-乳酸をピルビン酸へ変換し、同時にNAD⁺をNADHに還元する酵素である。AM1Pを亜硝酸とL-乳酸を含む培地で培養した結果、L-乳酸はピルビン酸よりもAM1Pの増殖速度を早めた。L-乳酸が増殖活性を促進したことは、AM1Pが保持するLdhは機能的であり、L-乳酸からピルビン酸の変換によって産生されたNADHが電子伝達系で消費されて、ATP産生に必要なプロトン駆動力を形成した可能性を示唆している。

第4章では、研究の総括と今後の展望を記載した。本研究では、新規な分離株“*Ca. Nitrotoga* sp.” AM1Pを獲得し、AM1Pの生理活性およびゲノム情報を解析した。セルソーターおよび抗生物質処理による標的微生物以外の除去法は、他の微生物種の純化にも応用できる。微生物は環境中で単一種として存在することは稀有であり、凝集体のような複雑な集団の一員として存在している。凝集体を分取すれば、一度の操作で標的微生物の存在率を上昇させられる。また、標的微生物が独立栄養細菌である場合、前培養したうえで抗生物質処理を短時間施せば、混在する従属栄養細菌を減らせる。分離培養過程で“*Ca. Nitrotoga*”の増殖を促す化合物として利用したアンモニウムとピルビン酸の効果は、AM1P分離株を用いた培養実験によって確かめられた。AM1Pの活性が上昇した機構は、AM1Pのゲノム情報を用いて説明できた。AM1Pの活性は、H₂O₂の除去やL-乳酸の添加によっても促進した。本研究の知見を踏まえると、亜硝酸と微量元素だけを含む無機培地を利用し続けてきたことが、“*Ca. Nitrotoga*”の分離培養を妨げていたと考えられる。窒素源、エネルギー源、炭素源を巧みに使い分け、酸化ストレス除去を異種微生物に依存することが、“*Ca. Nitrotoga*”の生存戦略の1つであると予想される。本研究では、AM1Pの表現型とゲノム情報をリンクさせ、分子生物学的なアプローチや集積培養系を用いた実験だけでは解明できなかった、“*Ca. Nitrotoga*”の微生物学を理解できたといえる。未培養なNOBの生理生態に関する知見を紡いでいくことは、窒素循環の理解および制御につながる。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 石井 拳人 印

(2021年 1月 現在)

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="288 443 1465 539">1. <u>Kento Ishii</u>, Hirotugu Fujitani, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Physiological and genomic characterization of a new '<i>Candidatus Nitrotoga</i>' isolate. <i>Environmental Microbiology</i>. April 2020. 22(6): 2365-2382.<li data-bbox="288 577 1465 674">2. Hiroto Ide, <u>Kento Ishii</u>, Hirotugu Fujitani, Satoshi Tsuneda. Draft genome sequence of <i>Acidovorax</i> sp. strain NB1, isolated from a nitrite-oxidizing enrichment culture. <i>Microbiology Resource Announcements</i>. August 2019. 8(33): 8:e00547-19.<li data-bbox="288 712 1465 846">3. <u>Kento Ishii</u>, Hirotugu Fujitani, Kentaro Soh, Tatsunori Nakagawa, Reiji Takahashi, Satoshi Tsuneda. Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite-oxidizing <i>Nitrotoga</i> sp. from an eelgrass sediment. <i>Applied and Environmental Microbiology</i>. May 2017. 83(14): e00549-17.

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

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】 国際会議 口頭	1. <u>Kento Ishii</u> , Hirotsugu Fujitani, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Physiological and Genomic Characteristics of a New “ <i>Candidatus Nitrotoga</i> ” Isolate. 6th International Conference on Nitrification and Related Processes, Xiamen (China), October 2019.
国際会議 ポスター	1. <u>Kento Ishii</u> , Hirotsugu Fujitani, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Metabolic Lifestyles of Nitrite Oxidizer <i>Nitrotoga</i> under Mixotrophic and Heterotrophic Conditions. 2019 Nordic Meeting in Molecular Microbial Ecology, 22, Uppsala (Sweden), September 2019. 2. <u>Kento Ishii</u> , Hirotsugu Fujitani, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Mixotrophic Lifestyle of Nitrite Oxidizer <i>Nitrotoga</i> in the Presence of Pyruvate. FEMS2019, PW129, Glasgow, (Scotland), July 2019. 3. <u>Kento Ishii</u> , Hirotsugu Fujitani, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Culture-dependent analyses of isolated <i>Nitrotoga</i> sp. provide deeper insight into the physiology. 17th International Symposium on Microbial Ecology, 193B, Leipzig (Germany), August 2018. 4. <u>Kento Ishii</u> , Hirotsugu Fujitani, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Genome-informed isolation of nitrite oxidizer <i>Nitrotoga</i> sp. 5th International Conference on Nitrification and Related Processes, P51, Vienna (Austria), July 2017. 5. <u>Kento Ishii</u> , Hirotsugu Fujitani, Tatsunori Nakagawa, Reiji Takahashi, Satoshi Tsuneda. Physiological characterization of <i>Nitrotoga</i> -like bacteria enriched from coastal sand. 16th International Symposium on Microbial Ecology. 275B, Montreal (Canada), August 2016.
国内会議 口頭	1. <u>Kento Ishii</u> , Hirotsugu Fujitani, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Isolation Process and Genomic Analysis of Nitrite Oxidizer <i>Nitrotoga</i> sp. Provide Insights on Physiological Characteristics and Clues to Promote the Growth. 日本微生物生態学会 第 32 回大会, O2-2, 沖縄, 2018 年 7 月.
国内会議 ポスター	1. 井出 寛人, <u>石井 拳人</u> , 藤谷 拓嗣, 常田 聡. 従属栄養細菌との相互作用を介した硝化菌の増殖促進機構, 日本微生物生態学会第 32 回大会, P1-21, 山梨, 2019 年 9 月. 2. <u>石井 拳人</u> , 藤谷 拓嗣, 関内 勇地, 常田 聡. ピルビン酸存在下での亜硝酸酸化細菌 <i>Nitrotoga</i> の混合栄養的な増殖様式, 第 13 回 日本ゲノム微生物学会年会, P-058, 東京, 2019 年 3 月. 3. <u>石井 拳人</u> , 藤谷 拓嗣, 常田 聡. ゲノムから推定する遅増殖性 <i>Nitrotoga</i> の活性促進因子, 環境微生物系学会合同大会 2017, P-150, 仙台, 2017 年 8 月. 4. <u>石井 拳人</u> , 藤谷 拓嗣, 常田 聡. セルソーターによって分取された凝集体内の微生物間相互作用の解明, 第 11 回 日本ゲノム微生物学会年会, 1P-37, 神奈川, 2017 年 3 月.

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

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】 国内会議 ポスター	5. <u>石井 拳人</u> , 藤谷 拓嗣, 中川 達功, 高橋 令二, 常田 聡. 微生物凝集体ソーティングによる未培養な亜硝酸酸化細菌 <i>Nitrotoga</i> の獲得と生存戦略, 日本微生物生態学会第31回大会, P-151, 神奈川, 2016年10月.
その他 【論文】	1. Sike Wang, <u>Kento Ishii</u> , Heng Yu, Xuchuan Shi, Barth F. Smets, Alejandro Palomo, Jiane Zuo. Stable nitrogen removal by anammox process after rapid temperature drops: insights from metagenomics and metaproteomics. <i>Bioresource Technology</i> . October 2020. 124231. 2. Hirotugu Fujitani [†] , Kengo Momiuchi [†] , <u>Kento Ishii</u> [†] , Manami Nomachi, Shuta Kikuchi, Norisuke Ushiki, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda. Genomic and physiological characteristics of a novel nitrite-oxidizing <i>Nitrospira</i> strain isolated from a drinking water treatment plant. <i>Frontiers in Microbiology</i> . September 2020. 11:545190. [†] 共同第一著者
【紀要】	1. <u>石井 拳人</u> . 世界初の亜硝酸酸化細菌 <i>Nitrotoga</i> の分離培養とゲノム解析, 日本微生物生態学会誌, 2018年33巻1号, p.4.
国内会議 口頭	1. 一色 理乃, <u>石井 拳人</u> . 培養することで導き出す硝化細菌の難培養性のヒミツ, 日本微生物生態学会第32回大会, 自由集会, 沖縄, 2018年7月.