

# 新規嫌氣的アンモニア酸化微生物の発見とその反応機構の解明

## Identification and mechanistic elucidation of novel microbial anaerobic ammonia oxidation

(日本農芸化学会推薦)

代表研究者 東京都立大学 春田伸 Tokyo Metropolitan University Shin HARUTA  
協同研究者 産業技術総合研究所 花田智 AIST Satoshi HANADA  
北京大学 磯部一夫 Peking University Kazuo ISOBE  
ネブラスカ大学 Hyun Seob SONG University of Nebraska Hyun Seob SONG

Anaerobic ammonium oxidation is an important pathway in the global nitrogen cycle. Ammonium is a thermodynamically valuable electron source, and anoxygenic photosynthetic ammonium oxidation has long been expected. However, photosynthetic bacteria that oxidize ammonium for growth have yet to be identified. This study explored ammonium-oxidizing photosynthetic bacteria.

Sediments collected from Onikobe Hot Springs (Miyagi) were anaerobically cultivated in an autotrophic medium containing  $\text{NH}_4^+$  at 55°C in the light to establish enrichment cultures. The enrichment cultures contained filamentous anoxygenic photosynthetic bacteria in the genus *Chloroflexus*. *Chloroflexus* isolates were examined for  $\text{NH}_4^+$ -dependent growth capability. A stable growth on  $\text{NH}_4^+$  as a sole electron source was observed in an isolate.  $\text{NH}_4^+$  consumption during the growth of the *Chloroflexus* isolate was confirmed, and the consumed amount was larger than the expected amount of  $\text{NH}_4^+$ , which was required as a nitrogen source. Productions of nitrite, nitrate, and gaseous compounds were not detected. A nitric oxide (NO)-scavenging reagent did not affect the initial growth on  $\text{NH}_4^+$  but increased the final growth yield. These results suggested that NO was an oxidized product of  $\text{NH}_4^+$  by the *Chloroflexus* isolate.

### 研究目的

アンモニアは生態系における窒素循環の鍵化合物である。アンモニアは生体成分合成のための窒素源として多くの生物にとって重要であるばかりでなく、エネルギー源としても有効であり、これまでに、アンモニアを電子源とする多様な好氣的アンモニア酸化微生物が見つかった。しかし嫌氣的に、完全に酸素の関与なく、アンモニアを酸化してエネルギーを得る微生物は未だ同定されていない (Oren, 2015)。1990年代にアンモニアを亜硝酸で酸化し窒素ガスを生成する微生物 (anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX) が見つかったが、亜硝酸の供給にはアンモニアの酸素による酸化が必要である (Mulder et al., 1995)。

酸素非発生型光合成細菌は環境中に広く分布して

おり、代謝多様性が高く、有機物をはじめとして、水素ガス、硫黄化合物、鉄、亜硝酸など多様な化合物を嫌氣的に酸化する。アンモニアを嫌氣的に酸化する光合成細菌の存在を理論的に予測した論文が1970年に *Science* 誌に発表されていた (Olson, 1970)。ところが、アンモニア酸化反応が光阻害を受ける報告もあり (French et al., 2012)、光照射条件でのアンモニア酸化微生物の探索は検討されてこなかった。そこで本研究では、嫌氣条件でアンモニアを酸化し二酸化炭素を炭素源として生育する微生物を自然環境から探索し、その代謝反応を同定することを目的とした。

## 研究経過

### 1. 集積培養系の特性

#### 1-1. 集積培養系の確立

鬼首温泉郷（宮城県）において高温土壌および温泉流水中に発達する微生物マットを採取した。アンモニア（15 mM）を含む以下の無機培地に接種し、55°C、光照射条件（ハロゲンランプ、>700 nm ロングパスフィルター）で嫌氣的に培養した（気相 N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>=4:1）。

培地組成 (L<sup>-1</sup>): 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.78 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.2 g sodium bicarbonate, 5 mL basal salt solution\*, 1 mL vitamin mixture\*\*.

\*basal salt solution (L<sup>-1</sup>): 1.1 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 24.3 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.111 g MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 23.0 g NaCl, 2.94 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.029 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.025 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.031 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.024 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.029 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.02 g NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4.53 g trisodium EDTA.

\*\* vitamin mixture (100 mL<sup>-1</sup>): 0.005 g biotin, 0.05g folic acid, 0.05 pyridoxine HCl, 0.1 g thiamine HCl, 0.1 g nicotinic acid, 0.05 g calcium pantothenate, 0.001 g vitamin B<sub>12</sub>, 0.05 g *p*-aminobenzoic acid.

いくつかの試料から生育が確認でき、10 回以上の継代培養後も安定に生育が見られる集積培養系が得られた (Fig. 1)。

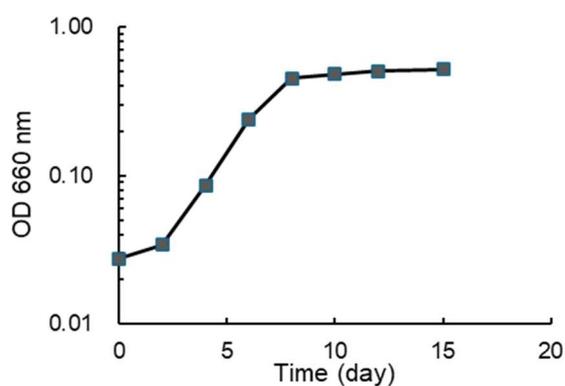


Fig. 1. Growth curve of an enrichment culture obtained from geothermal springs in the ammonium medium in the light. The optical density (OD) of the culture was measured at 660 nm.

この集積培養系は暗所では生育が見られず、また培養液の吸収スペクトル解析からバクテリオクロロフィルを有する酸素非発生型光合成細菌を含むと考えられた。

#### 1-2. 微生物群集構造解析

得られた集積培養系から全 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を対象に GridION (Oxford Nanopore Technologies) を用いて PCR アンプリコン解析を行った。

いずれの集積培養系も糸状性酸素非発生型光合成細菌である *Chloroflexus* 由来のリード数が 50%以上を占めていた。またその配列は既報の *Chloroflexus* 属細菌の配列と 99%と高い相同性を示した。加えて、*Thermodesulfovibrio* 属や *Desulfomicrobium* 属などの硫酸還元細菌および *Armatimonadota* や *Bacteroidota* に分類される未培養細菌が共存していることが分かった。

### 2. *Chloroflexus* 属光合成細菌の代謝活性

#### 2-1. 生育特性の解析

陸上温泉から分離された好熱性光合成細菌 *Chloroflexus* 属細菌株を用いて、生育特性を解析した。有機物を含む培地で嫌気光従属栄養的に前培養し、細胞を集菌・洗浄後、アンモニア（15 mM）を含む無機培地に接種した。光照射・嫌気条件、55°Cで継代培養後も安定な生育が見られた株のうち、最も生育の良かった株について以降の解析を行った。

培養液の濁度を指標とした生育曲線を Fig. 2 に示す。培養開始とともにアンモニアの減少と濁度の上昇が見られ、約 4 週間の培養で生育は定常状態に達した。倍加時間は約 120 時間であった。

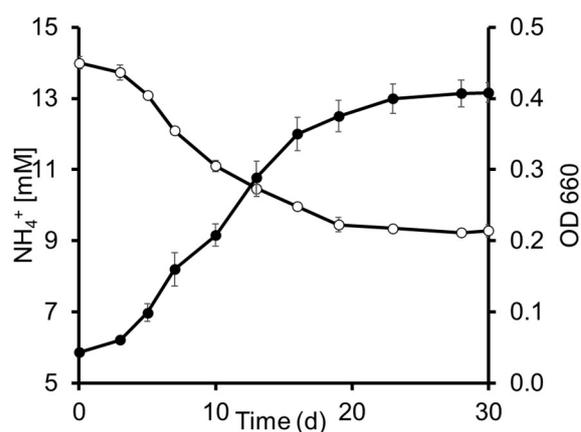


Fig. 2. Growth curve of *Chloroflexus* sp. in the ammonium medium in the light.

培地のアンモニア濃度を 1.5 mM から 30 mM と変え、それぞれの培地条件での増殖速度を測定し、増殖に対するアンモニアの *K<sub>m</sub>* 値を算出したところ、約 1 mM と推定された。

生育に伴うアンモニアの消費量について、水素ガスを電子源とした培養と比較した。水素ガス添加条件に比べ、アンモニア消費量は顕著に多く、アンモニアが窒素源以外に利用されていると考えられた。生育に伴い、培養液のアンモニア以外の可溶性全窒素量が増加していることが確認できた。そこで、予想されるアンモニア酸化物である硝酸、亜硝酸を測定したがいずれも検出限界以下であった。また、アンモニア生育に伴うガス生成は検出されなかった。

<sup>15</sup>N 標識したアンモニアを用いて培養し、気相に含まれる窒素化合物を GCMS 分析したが、亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) および窒素ガスの生成は検出されなかった。

アンモニア酸化物として一酸化窒素 (NO) 生成の可能性を考えた。ただし、一酸化窒素は反応性が高く検出が困難であり、またその蓄積は生育を抑制することが知られる。そこで、一酸化窒素除去剤である 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl (PTIO) (Kartal et al., 2011) が生育に与える影響を評価した。その結果、PTIO 添加培養では、増殖後期に顕著な生育促進が見られた。

*Chloroflexus* 属細菌について、好気無機独立栄養生育能も知られている (Kawai et al., 2019)。そこで、好氣的アンモニア酸化能を検証するため、アンモニア培地の気相に 5% O<sub>2</sub> を添加し、暗条件で生育試験を行った。気相に水素ガスを含む条件では生育が見られたが、水素ガス無しの条件では約 1 ヶ月の培養でも培養液の濁度上昇は見られなかった。

## 2-2. ゲノム情報の解析

上記 *Chloroflexus* 属細菌から DNA を抽出・精製し、PacBio Sequel II プラットホームを用いてゲノム配列を解析した。得られたゲノム配列から得られた遺伝子は Prokka ver 1.14.5 を用いてアノテーションした。総塩基数 4,525,649 bp で、3,757 の遺伝子が検出された。ゲノム全体に対して、アンモニアや一酸化窒素をはじめとする窒素化合物関連代謝の遺伝子を探索した (Table 1)。

好氣的アンモニア酸化細菌・アーキアに知られているアンモニア酸化酵素遺伝子に相同な遺伝子は見つからなかった。既報の ANAMMOX 細菌に見ついているヒドラジン合成酵素はアンモニアから一酸化窒素とヒドラジンを生成する酵素として知られるが、*Chloroflexus* 属細菌に相同な遺伝子は見られなかった。

脱窒過程では亜硝酸から一酸化窒素が生成されるが、その反応を担う亜硝酸還元酵素および一酸化窒素をさらに還元する酵素をコードすると考えられる遺伝子も見つからなかった。窒素固定関連遺伝子である *nifH*、*vnfH*、*anfH* などのニトロゲナーゼ還元酵素をコードする遺伝子に相同な配列が見られたが、これらはアンモニア代謝には関わっていないと考えられる。

Table 1. Exploration of genes related to inorganic nitrogen metabolisms in *Chloroflexus* sp.

| gene                               | Amino acid seq. identify | Query*                         |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Aerobic ammonium oxidation related |                          |                                |
| <i>amoABC</i>                      | n.d.                     | <i>Nitrosomonas</i> sp.        |
| ANAMMOX related                    |                          |                                |
| <i>hao</i>                         | n.d.                     | <i>Ca. Kuenenia</i> sp.        |
| <i>hzsA</i>                        | n.d.                     | <i>Ca. Kuenenia</i> sp.        |
| <i>hzsB</i>                        | n.d.                     | <i>Ca. Kuenenia</i> sp.        |
| <i>hzsC</i>                        | 24.6%                    | <i>Ca. Kuenenia</i> sp.        |
| <i>hdh</i>                         | n.d.                     | <i>Ca. Kuenenia</i> sp.        |
| Denitrification related            |                          |                                |
| <i>nirK</i>                        | n.d.                     | <i>Nitrosomonas</i> sp.        |
| <i>nirS</i>                        | n.d.                     | <i>Ca. Kuenenia</i> sp.        |
| <i>norC</i>                        | n.d.                     | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |
| <i>nosZ</i>                        | n.d.                     | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |
| Dinitrogen fixation related        |                          |                                |
| <i>nifDK</i>                       | n.d.                     | <i>Thermodesulfovibrio</i> sp. |
| <i>nifH</i>                        | 37.6%                    | <i>Thermodesulfovibrio</i> sp. |
| <i>vnfG</i>                        | n.d.                     | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |
| <i>vnfDK</i>                       | n.d.                     | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |
| <i>vnfH</i>                        | 36.4%                    | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |
| <i>anfG</i>                        | n.d.                     | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |
| <i>anfD</i>                        | n.d.                     | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |
| <i>anfK</i>                        | 22.5%                    | <i>Azotobacter</i> sp.         |
| <i>anfH</i>                        | 38.3%                    | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.    |

n.d., no homologous gene was detected.

\*used as the query for BLAST search.

## 考察

本研究では、始原的な好熱性光合成細菌である *Chloroflexus* 属細菌がアンモニアを含む無機合成培地で嫌気・光合成生育することを見出した。その倍加時間はこれまでに報告されている嫌氣的アンモニア酸化反応である ANAMMOX よりも十分に速いと考えられた。ただし、本研究では残念ながらアンモニアの酸化産物の同定に至らなかった。一酸化窒素除去剤を用いた試験から一酸化窒素またはその関連化合物が生成していると予想される。また *Chloroflexus* 属細菌のゲノムに、これまでに知られているアンモニア酸化や一酸化窒素生成に関わる遺伝子と相同な遺伝子は見られず、全く新規な反応系を有している可能性が示唆された。

本研究で得た集積培養系は、*Chloroflexus* 属細菌分離株よりも顕著に速い生育速度および高い増殖量を示していた。集積培養系には *Chloroflexus* 属細菌を優占種として複数種の細菌が共存していると考えられ、それらの協働作用が生育に寄与している可能性がある。今後、*Chloroflexus* 属細菌単独での代謝機構とともに他種との混合効果についても検討していきたいと考えている。

## 参考文献

- French, E., Kozlowski, J. A., Mukherjee, M., Bullerjahn, G., and Bollmann, A. Ecophysiological characterization of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:5773–5780 (2011)
- Kartal, B., Maalcke, W. J., de Almeida, N. M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op den Camp, H. J. M., Harhangi, H. R., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H. G., Keltjens, J. T., Jetten, M. S. M., and Strous, M. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* 479:127–130 (2011).
- Kawai, S., A. Nishihara, K. Matsuura, S. Haruta. Hydrogen-dependent autotrophic growth in phototrophic and chemolithotrophic cultures of thermophilic bacteria, *Chloroflexus aggregans* and *Chloroflexus aurantiacus*, isolated from Nakabusa hot springs. *FEMS Microbiology Letters* 366:fnz122 (2019)
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16:177–183 (1995)
- Olson, J.M. The evolution of photosynthesis. *Science* 168:438-446 (1970)
- Oren A. Anammox revisited: thermodynamic considerations in early studies of the microbial nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters* 362:fnv114 (2015)

## 研究の発表

ポスター発表

1. Alam, Md. Gahangir, S. Haruta. Isolation of ammonium-oxidizing sulfate-reducing bacteria from terrestrial hot springs. 日本微生物生態学会第 35 回大会（札幌）2022

誌上発表

1. Alam, Md. Gahangir and S. Haruta. Whole-genome sequence of *Thermodesulfomicrobium* sp. strain WS, isolated from Onikobe geothermal field in Japan. *Microbiology Genome Announcements*, 16;12:e0132122 (2023)

著書

1. 春田伸「未発見微生物の探索」 青柳秀紀監修 「未培養微生物研究の最新動向」 シーエムシー 出版 2022