

令和元年6月9日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20061

研究課題名（和文）亜酸化窒素固定能を有する淡水産シアノバクテリアの獲得とその生理生態の解明

研究課題名（英文）Exploration of freshwater cyanobacteria capable of fixing nitrous oxide and elucidation of their ecophysiology

研究代表者

細見 正明（Hosomi, Masaaki）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90132860

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：N₂O固定が可能な淡水産シアノバクテリアの獲得と生理生態の解明を目指した。河川サンプルを明・暗期を繰返す嫌気条件で集積培養した。その後、クロロフィルの自家蛍光強度と細胞形態の違いによる細胞分取を実施した。その結果、Nostoc属のシアノバクテリアの獲得に成功した。ゲノム解析を実施した結果、窒素固定の遺伝子を保有する一方、N₂O還元を担う遺伝子を保有しないことを示した。15Nトレーサーを用いた回分試験により、この細菌のN₂O取り込みを明らかにした。一方、N₂がN₂O取り込みの阻害になることを確認した。さらに、窒素濃度が高い環境から新奇シアノバクテリアの獲得を目指したが分離培養までは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、淡水産シアノバクテリアであるNostoc属の一種が、温室効果ガスとして知られる亜酸化窒素（N₂O）を細胞内に取り込むことを示した研究である。また、ゲノム解析を実施することにより、様々な遺伝子ポテンシャルを明らかにすると共に、N₂O消費機構が異化反応によるものでないことを示唆した。このような研究成果は、淡水産シアノバクテリアによるN₂O固定という新しいN₂O変換経路の重要性を示した。この基礎的知見は、窒素循環で副生成物として生成するN₂Oの削減技術につながる可能性を有している。さらに、有用物質の生産能を明らかにする研究につながっていく可能性もあり、社会的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the acquirement of freshwater cyanobacteria able to take up N₂O and the elucidation of the physiology and phylogeny. A river water biomass was inoculated for the incubation under an anoxic condition in the dark. Subsequently, a single cell of the enriched biomass was separated by the differences in the auto-fluorescent intensity and cell morphology. The attained cyanobacterium was phylogenetically identified, affiliated with the genus Nostoc. The genome analysis of the cyanobacterium confirmed the presence of a functional gene for nitrogen fixation but the absence of N₂O reduction. The application of 15N tracer revealed that the cyanobacterium can take N₂O and that nitrogen is a competitor with N₂O as a fixed nitrogen source. The enrichment and isolation from the various natural freshwater environment were conducted, but the isolation was not successful.

研究分野：環境工学

キーワード：淡水産シアノバクテリア 亜酸化窒素 ゲノム解析 15Nトレーサー 集積培養 フローサイトメーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長年に亘り、亜酸化窒素 (N_2O) は二酸化炭素の約 265 倍の温暖化効果を有すると共に深刻なオゾン層破壊物質として知られている。 N_2O の主な排出源は農耕地、バイオマス燃焼、排水処理などである。21 世紀の人口増加に伴い、大気中の N_2O 濃度が増加の傾向を示していることから、 N_2O 排出量削減に向けた検討が行われている。多くの研究が N_2O 生成のメカニズム解明をもとにして排出抑制を目指すことに注力されている一方、 N_2O シンクとして N_2O 消費を行う微生物群に焦点を当てた研究は限られている。近年の研究では、 N_2O 還元酵素をコードする機能遺伝子である *nosZ* を保有する微生物群の生理生態が明らかにされてきている。一方、これらの微生物群は N_2O を異化反応の電子受容体として用いるものの、全ての環境条件に適用できるわけではなく、万能な解決策とはなりえない。

近年に入り、一部の海洋産シアノバクテリアは、 N_2O を同化的に取り込むことが報告されている (Farias *et al.*, 2013 PLoS One 8: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063956>)。具体的には、*Trichodesmium sp.* や *Crocospaera watsonii* は培養条件により N_2O を固定されることが示されている。一方、 N_2O の固定が可能な淡水産シアノバクテリアの生理生態に関する報告はない。淡水中の N_2O 排出量は、産業活動の増大に伴い増えていることや、淡水環境からの N_2O フラックスは海洋に比べると 2 桁高いことを考えると、 N_2O を固定可能な淡水産シアノバクテリアがいても驚くべきことではない。

2. 研究の目的

以上の背景を鑑み、本研究では、河川に棲息する N_2O の取り込みが可能な淡水産シアノバクテリア、および N_2O 供給型バイオリアクターの出口に棲息する N_2O の取り込みが可能なシアノバクテリアの集積培養を行い、 N_2O 固定が可能なシアノバクテリアの獲得を目指した。この目的達成のため、フローサイトメーターを用い、サイズおよびクロロフィルの色素の自家蛍光の強さから細胞を分取する方法の確立に取り組んだ。さらに、集積培養を行うことにより、 N_2O 固定シアノバクテリアの分離培養を行った。単離を行えた種類に関しては、16S rRNA 遺伝子による系統解析、ゲノム解析、 ^{15}N トレーサーを用いた N_2O 取り込み回分試験をそれぞれ実施することにより、単離したシアノバクテリアの生理生態の解明に迫った。

3. 研究の方法

(1) サンプリングと回分培養

茨城県の銚田川の水サンプルを植種源として、100 mL バイアル内にて長期培養を行った。バイアル内にはヘッドスペースを確保し、 N_2 と CO_2 ガスを 95% と 5% の割合で混合したガスでヘッドスペースを満たし、培養液を嫌気条件に保った。バイアルは照度 10,000 lx、明期・暗期をそれぞれ 12 時間で繰返す条件を設定し、培養槽内で振とう培養を行った。集積されたバイオマスは、DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコンシーケンスを実施することにより、バイオマス内の微生物叢、優占種の同定を行った。

(2) フローサイトメーターを用いた細胞分取

シアノバクテリアは、他の真正細菌と細胞形状が異なり、色素として様々なクロロフィルを有している。このクロロフィルは特有の吸収波長を有し、その波長を適用することにより自家蛍光を発生させる。この特徴を利用して、フローサイトメーターを用いた細胞分取の条件設定と、シアノバクテリアの分取獲得を目指した。3.1. の条件で長期培養を行ったバイオマスを採

取し、ホモジナイザーを用いてバイオマスの分散を行った。その後、35 μm のポアサイズを有するろ過膜を通してサイズの大きな夾雑物を排除した後、フローサイトメーターに適用した。フローサイトメーターでは、前方散乱光を細胞全長として観測し、側方散乱光を藻類が有するペリジニン-クロロフィルタンパク質 a 複合体を観測した。この複合体の検出のために 480 nm の波長を適用した。このような条件により、シアノバクテリアのサイズと自家蛍光の強さを基にして細胞分取を目指した。前方・側方散乱光の適用により、得られた二次元ドットプロットを元に 96 ウェルプレートに細菌 1 細胞が入るように分取作業を行った。

(3) 16S rRNA 遺伝子による系統解析

分取が行われた 96 ウェル中の培養液に存在する細菌細胞の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR を実施し、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。シーケンサーで得られる塩基配列のクロマトグラムでコンタミネーションを確認し、単一生物由来のクロマトグラムが得られたものに関しては、培養を行った。

(4) ゲノム解析

3.(3) で示した分離培養が行えたシアノバクテリア (*Nostoc* sp. MS1) の全ゲノム配列を解析した。長鎖の DNA 配列が読むことが可能なポータブル型 DNA シークエンサー MinION を導入し、本ゲノム解析を通じて解析環境の構築と手法の確立を行った。できるだけ断片化していない DNA を抽出するため、フェノール-クロロホルム法とエタノール沈殿を併用した DNA 抽出法を採用し、前培養した *Nostoc* sp. MS1 を抽出、電気泳動にて断片化がないことを確認した。ゲノム DNA をライブラリ調整に使用し、MinION にロードした。

(5) ^{15}N トレーサー試験による N_2O 取り込みの確認

100 mL バイアルに、BG11₀ 改良培地を 30 mL 加えてヘリウムガスでパージした後に密封し、脱気を行ってバイアル内を真空状態にした。それぞれのバイアル内のヘッドスペースを Table 1 に示すように調整し、10% $^{15}\text{N}^{15}\text{NO}$ を 0.1 mL 加えて約 100 ppm とした。その後オートクレーブ滅菌にかけた。

Table 1 ^{15}N トレーサー試験のヘッドスペース条件

	Blank	He 系	He+O ₂ 系	N ₂ +O ₂ 系
He [mL]	95	95	75	-
O ₂ [mL]	-	-	20	20
N ₂ [mL]	-	-	-	75
CO ₂ [mL]	5	5	5	5
$^{15}\text{N}^{15}\text{NO}$ [ppm]	100	100	100	100

三角フラスコで培養していた *Nostoc* sp. MS1 の培養液をクリーンベンチ内で 50 mL 遠沈管に入れ、遠心分離した後、数回洗浄した。*Nostoc* sp. MS1 の細胞懸濁液を Table 1 の Blank 系以外の各バイアルへ 1 mL 添加した。添加した液にシアノバクテリア以外の従属栄養細菌のコンタミネーションがないかを確認するため、残った液に対してコンタミネーションのチェックを行った。このチェックでは、BG11₀ 培地に有機物を加えて従属栄養細菌を生育しやすくした培地に、培養液を滴下して培養した。1 週間培養し、白く懸濁しなければコンタミ無しと判断した。実験系のバイアルは 25°C、明期・暗期を 12 時間周期で培養した。光強度は 5.5 W/m²、80 rpm

で培養を行った。ヘッドスペースの N_2O と O_2 濃度を GC-ECD で、 $^{15}N^{15}N$ の濃度を GC-MS で測定した。培養終了後に培養液をガラス繊維フィルターでろ過し、菌体を回収した。濾過後のフィルターは 50 mL の遠沈管に入れて $-20^{\circ}C$ で凍結させて保管した。ドライチャンバーを用いて凍結乾燥させた後、重量を測定し、IR-MS により ^{15}N の割合(^{15}N Atom%)と全窒素量(Total N)を測定した。

(6) N_2O 供給バイリアクターからのシアノバクテリアの獲得

N_2O 固定化性能の高い新奇シアノバクテリア採取を目指した。 N_2O 供給フラックスが高い環境条件であれば、より高速に N_2O を取り込むことが可能なシアノバクテリアが獲得できるのではないかと考え、 N_2O を連続供給しているバイリアクターの出口に形成されたバイオフィームからシアノバクテリアの獲得を目指した。バイリアクター出口に形成された緑色のバイオマスを採取し、DNA 抽出を行い、16S rRNA 遺伝子に基づいた微生物叢解析を行った。さらに、この集積バイオマスを 3.2 に示すフローサイトメーターに適用し、さらなる淡水産シアノバクテリアの分取・分離培養を目指した。

4. 研究成果

(1) サンプルングと回分培養

明期・暗期を導入し、嫌気条件によるバイアルの回分培養を繰返すことにより、Cyanobacteria 門が優占されることが明らかになった。Proteobacteria 門、Gemmatimonadetes 門が次に優占されている門であった。

(2) フローサイトメーターを用いた細胞分取

4.(1) で集積されたバイオマスを分散・ろ過後にフローサイトメーターに適用した結果、自家蛍光強度が高く、サイズが大きい領域に集中的にドットが存在していることを確認した。この領域にある細胞を分取して培養したが、複数種の細菌が共存していることが確認され、完全な分離培養に至らなかった。したがって、この集積された複合種の細菌で構成されるバイオマスを再度フローサイトメーターに適用したところ、球状の細菌が糸状に連なった形態を有する単一種の分離培養に成功した。

(3) 16S rRNA 遺伝子による系統解析

4.(2) で得られた単一種の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、Cyanobacteria 門・Nostocaceae 科の *Nostoc* sp. に近縁な種類であることが明らかになった。分離培養に成功した *Nostoc* sp. を MS1 株とした。

(4) ゲノム解析

シーケンスを行い、*Nostoc* sp. MS1 の 4,26Gb の塩基を解読した。平均リード長は 18.6 kbp、最長で 218-170 kbp のリードが得られた。一方で、用いたシーケンス技術の改善点として、読み取り精度が低いことが指摘されている。得られた解読結果の精度向上に向け、読み取り精度が高い一方、塩基断片が短鎖である Illumina 社の機器を用いたシーケンス解析を実施し、MinION のデータと併用したハイブリッドアッセンブルを実施した。結果全てのコンセンサス配列が環状になり Nearly complete genome を獲得した。

Nostoc sp. MS1 のゲノムは全長 7.90Mb であり、1 つの chromosome (7.14Mb) と、5 つの plasmid から構成されていることを明らかにした。近縁種でゲノム解列が公開されている *Nostoc* sp. NIES-2111 (6.52Mb) との全ゲノムでの類似性を Genome-to-Genome Calculator にて推定したところ、同種である確率は 4.76% となり獲得した株は新種であることが示唆された。

Nostoc sp. MS1 の窒素代謝経路を解析したところ、窒素固定経路を完全に保存していたのに対して、亜硝酸、一酸化窒素、亜酸化窒素を還元する脱窒経路はすべて欠損していた。また、異化的亜硝酸還元経路（亜硝酸→アンモニア）を有することが明らかになった。

(5) ^{15}N トレーサー試験による N_2O 取り込みの確認

He 系で最も N_2O の消費量が多く、 N_2+O_2 系では N_2O の消費はごくわずかであった。酸素と窒素による N_2O 固定への阻害の影響が示唆された。*Nostoc* sp. MS1 は、 N_2O の取り込みが行えることが明らかになったものの、実環境では *Nostoc* sp. MS1 は N_2O の固定をほとんど行っていない可能性が考えられた。菌体量あたりの N_2O 消費速度を評価したところ、 N_2O 消費速度は He 系と比べて、He+ O_2 系では約 50%、 N_2+O_2 系では 5% となった。IR-MS による ^{15}N Atom% と Total N を評価したところ、 ^{15}N Atom% は He 系で最も高く、次いで He+ O_2 系、 N_2+O_2 系となり、 $^{15}\text{N}^{15}\text{NO}$ の減少量と同じ傾向にあった。Total N は N_2+O_2 系が最も多く、これは窒素固定由来のものであると考えられる。

(6) N_2O 供給型バイオリアクター出口からのシアノバクテリアの獲得

N_2O 供給型バイオリアクター出口に形成された緑色のバイオマスを対象に、16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコンシーケンスを実施した。この微生物叢解析により、未培養シアノバクテリアの優占化を確認した。これらの優占化された種類と見られる、クロロフィル由来の自家蛍光を有する球状や糸状性の微生物群を分取細胞のターゲットとした。フローサイトメーターの適用により、単一と考えられる球状および糸状性の細胞が分取できたものの、その後の継代培養が困難であった。新奇シアノバクテリアの分離培養のためには、環境条件、培地組成などの詳細な検討が今後の課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Kazumi Suda, Souichiro Matsuzaki, Toshikazu Suenaga, Shohei Riya, Akihiko Terada, Masaaki Hosomi: Exploration of N_2O -fixing cyanobacteria and clarification of N_2O fixation conditions, 7th International Congress and Expo on Bioscience and Biotechnology (Paris, France) 2019 年 9 月(発表決定済み)

(2) 須田和美、松崎壮一郎、末永俊和、利谷翔平、藤谷拓嗣、常田聡、細見正明、寺田昭彦: N_2O を固定するシアノバクテリアの探索と N_2O 固定ポテンシャルの解明 第 52 回日本水環境学会年会(札幌) 2018 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。