

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H04138

研究課題名（和文）多重同位体標識窒素化合物（MILNC）による超高精度窒素循環解析

研究課題名（英文）Precise examination of N₂O production and consumption processes with MILNC

研究代表者

木庭 啓介（Koba, Keisuke）

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：90311745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,400,000円

研究成果の概要（和文）：大変複雑な一酸化二窒素の生成消費プロセスを解明するためには、¹⁵Nだけでなく¹⁸O、そして¹⁷Oによる多重同位体標識窒素化合物（MILNC）による超高精度窒素循環解析法が必要である。本研究では、これら3種の安定同位体でラベルしたN₂Oを生成し、それらの濃度をGC/MSにて測定、さらにこのN₂Oを使って微生物がN₂Oをどれだけ生成し同時にどれだけ消費するかを明らかにすることができる仕組み作りを実現した。さらにN₂Oの挙動を詳細に解析するための窒素循環プロセスモデルを開発し、これを用いることで特に複雑なN₂O生成プロセスが定量的に議論できるようになると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温室効果ガスの削減は喫緊の課題である。今回対象としているN₂Oガスは温室効果が強いだけでなくオゾン層を破壊するガスでもあるため、その削減が求められているが、その生成消費過程が大変複雑なため、未だにN₂Oの挙動については良くわかっていない。今回開発したMILNC測定法によりこのN₂O挙動がより詳細に理解できるようになると期待される。たとえば今後、このMILNC測定法を様々な土壌や堆積物に利用することで、人間活動により変化する窒素供給に対してN₂Oがどのように反応して放出されてしまうかを明らかにすることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed the analytical setting of multi-isotope labelling of nitrogen compounds (MILNC) for N₂O to elucidate the complex features of N₂O productions and consumptions. We proposed the platform to measure ¹⁵N, ¹⁷O and ¹⁸O-labelled N₂O by GC/MS, which allowed us to measure the production and consumption of N₂O simultaneously. In addition, the process model we develop can facilitate the interpretation of the MILNC data to discuss the relative strength of production and consumption processes.

研究分野：生態系生態学

キーワード：窒素循環 一酸化二窒素 安定同位体トレーサー 脱窒 硝化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生態系における窒素循環は大変複雑で、特に土壌を含む陸上生態系では土壌の持つ物理化学性と様々な生物との関係を明らかにしなければならず、このことが、たとえば温室効果ガスの放出削減に大きな問題となっている。

(2) 本研究では温室効果ガスの一つである一酸化二窒素ガス(N₂O)の生成と消費について着目するが、このN₂Oは様々な微生物が様々な基質を用いて、様々な環境要因に応じた生成と消費を行うため、その発生・消費予測が大変困難なものとして知られている。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究ではN₂Oの生成消費を定量的に追跡するために、通常の15Nトレーサー利用をさらに展開し、180、そして170という複数の安定同位体トレーサーを用いて、N₂Oの生成消費速度を解析するためのツール開発を試みた。

(2) 具体的にはまずN₂Oを15Nだけでなく、180さらに170でラベルする方法の確立、そしてその濃度測定法の確立、さらには、その解析に利用すべきプロセスモデルの開発である。

3. 研究の方法

(1) まずとして、N₂Oを15Nと180でラベルする手法について検討した。いくつかの方法が考えられ、発生反応の容易さ(時間、ハンドリング)、発生後の扱いやすさ(N₂Oガスとして培養実験などに利用しやすい状態で確保できるか)などについての検討を行った。特に180ラベル水が高価であるため、水の量を最小限に保つ方法、水の180ラベルを希釈しない方法を探索した。また、実際の測定においては、窒素ガス、二酸化炭素ガス、水蒸気などのガスがN₂Oと共存するため、それらを考慮した発生反応を模索した。

(2) 次にとしてその生成されたN₂OのGC/MS(EI)による測定法の確立に取り組んだ。これまで我々のグループではGC/MS(EI)を用いた15N₂Oの定量については実績があるものの、180そして170がラベルされた際にどれだけ定量性が確保できるかについては未知の領域であった。また、これまでも14N-15N-160等については数例測定例があるものの、170そして180が含まれ、しかも、測定例で利用されているIRMSではなく、より一般的かつ感度が低いGC/MSではどのようになるかは問題であった。測定すべきN₂Oは14N-14N-160、14N-14N-170、14N-14N-180、14N-15N-160、14N-15N-170、14N-15N-180、15N-15N-180であり、これらを検出するために、m/z 14、15、16、17、18、30、31、32、33、44、45、46、47、48をスキャンすることとした。さらに容器への大気混入などのチェックのためにm/z 40(Ar)もデータを取得した。

また実際にこれらの測定を用いた例として、脱窒菌によるN₂O生成と消費のモニタリング実験を実施するため、嫌気培養実験を実施した。

(3) について、これまでも15Nトレーサーを用いた窒素循環解析用のモデルは存在しているが、非公開であったり、パラメーターが圧倒的に足りなかったりという問題があった。そこで本研究では手軽に様々な研究者が利用できることを目指して、Rでのプロセスモデルの構築を試みた。RでMCMCでパラメーター推定となると、計算速度の問題があるが、今後拡張してゆくことも考え、Rでの開発とした。

4. 研究成果

(1) について、N₂Oを15N、170そして180でラベルするためにはいくつかの方法が考えられたがもっとも容易かつ効果的なものは亜硝酸イオンとアジ化水素を用いながら水を180でラベルし、その180をN₂Oに取り込ませる方法であった。ただし、180ラベル水は大変高価であるため、反応試薬の量を調整することで、水の180レベルを極力下げないようにすること、また反応容器からの取り出しのために容器内圧を加圧に保つなどの工夫が必

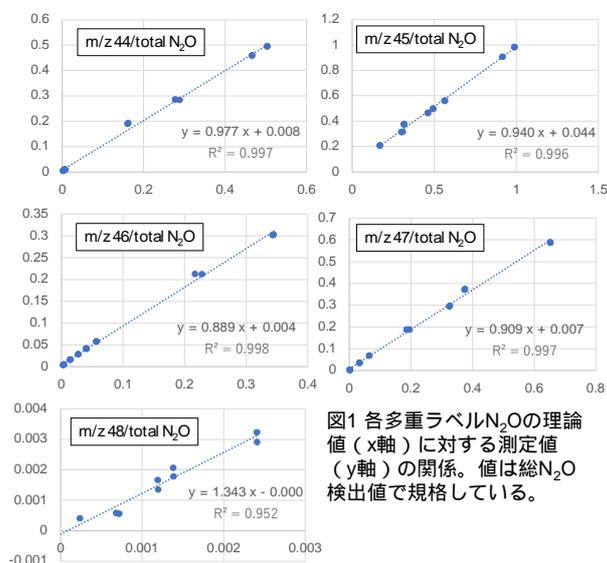


図1 各多重ラベルN₂Oの理論値(x軸)に対する測定値(y軸)の関係。値は総N₂O検出値で規格している。

要であった。さらに、180 だけでなく 170 のラベルも試みた。これは水の 180 と 170 ラベルを同時に実現すれば良いものであるが、問題は水の 180 と 170 ラベルの定量であった。水の 180 と 170 のラベル強度を測定する方法はいくつかあり、当初考えていた GC/MS によるイオンフラグメントからの測定が余り芳しくなかった。そこで最終的には 170 および 180 濃度が報告されているラベル水を利用することとした。そのラベル水を用いて、180 ラベル水で検討した N₂O 生成方法を用いることで、14N-15N-170 および 14N-15N-180 という N₂O の生成が可能となった。一方で、どうしても水の 180 および 170 レベルを下げてしまう事が避けられないこと、N₂O 生成を停止しその後の測定を行うために、溶液の pH を制御する必要があるので、ラベル水を再利用することが単純には実現しないこと等の問題点も明らかとなった。今後は微量水の 180、170、160 の測定技術の開発を進めることでこの問題は解決できると期待する。

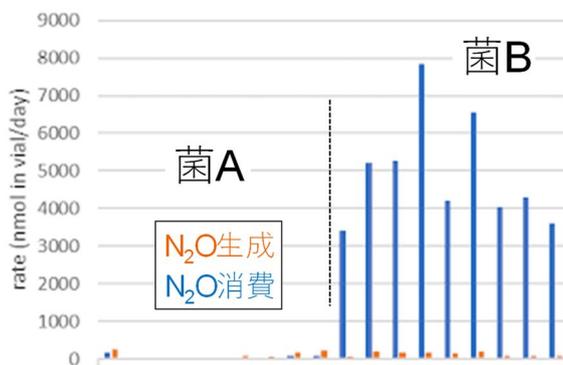


図2 バクテリア2種を用いたN₂O生成および消費特性解析。菌AはN₂Oを消費も生成もしないが、同環境で菌Bは活発に消費していることが分かる。

(2) について、図1に示すように、14N-14N-160 (m/z 44)、14N-14N-170 (m/z 45)、14N-14N-180 (m/z 46)、14N-15N-160 (m/z 45)、14N-15N-170 (m/z 46)、14N-15N-180 (m/z 47)、15N-15N-180 (m/z 48) について検量線を得ることができた。IRMSを用いた先行研究 (Laughlin et al. 1997, SSSAJ) と同様に、異なるラベル N₂O 種は、小さいながらも異なる検出感度を示すことがこれらの検量線の傾きの違いから明らかになった。この傾きの違いは IRMS を用いた別の先行研究 (Westley et al. 2007, RCM) でも問題になっていたとおり、最終的な N₂O の 15N、170 および 180 の計算に影響を及ぼすため、測定時には毎回これらの傾きを出す必要があることが示唆された。しかし、これらの傾きが求まることで、Laughlin et al. (1997) と同様に、N₂O の濃度測定が可能となることが明らかとなった。

これらの検量線情報を用いて、実際に N₂O を生成消費する脱窒菌の活性を調べてみた。実験には異なる 2 種の脱窒菌を用いたが、図にあるように、一方の脱窒菌は N₂O 生成・消費を余り行わず、もう一種は N₂O 消費を活発に行うことが認められた。また、この N₂O 生成と消費は共存する他の窒素化合物 (硝酸イオン、亜硝酸イオン) に影響を受けることも明らかとなった。この多重ラベル N₂O を用いた N₂O 生成消費速度算出は、N₂O 消費能の高い微生物や土壌をスクリーニングする際、さらにその温度感受性や窒素レベル感受性を見る際に、有効な手法となり得ると期待される。

(3) については、すでに報告されている 15N 添加実験データ (Rütting and Müller 2008 EJSS) を用いて、論文と同様のパラメータ推定が我々のプロセスモデルでも実現できることを確認した後、実際の森林土壌を用いた 15N 添加実験を実施し、そのデータ解析を実施した。とある森林土壌でのモデルフィッティングを図2に示す。それなりの CPU パワーとメモリーを積んだ PC を用いているとはいえ、ごく普通に手に入るデスクトップ PC による 1 日の計算で、このようなモデルフィッティングが可能となった。この実験では森林土壌に硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンを添加するが、その際に 1 つだけ 15N でラベルすることで、同じような窒素添加状態でそれぞれの窒素化合物がどのように利用されてゆくかを調べることができる培養法を用いている。左図にあるように濃度レベルではどの実験区でもほぼ均一な反応が見られているが、15N レベルでみると、添加した化合物が異なると、硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンの 15N レベルは大きく変化していた (図3)。また我々のプロセスモデルは濃度および 15N レベルをよく再

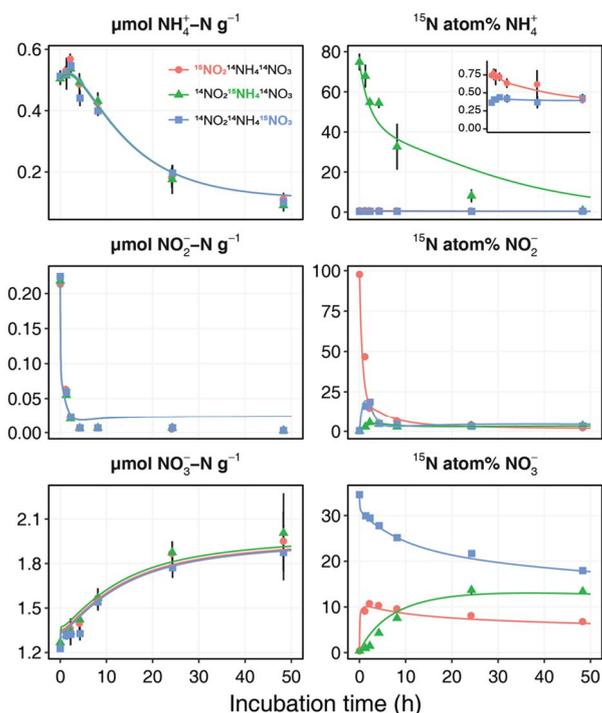


図3 森林土壌を用いた¹⁵N添加培養実験。点は各処理区での測定値、線は開発したモデルによるパラメータ推定を元に描いたものである。

現できており、これらから硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンの総生成・消費速度を求めることができる。特にアンモニウムイオンから亜硝酸イオン、そして硝酸イオンと連続的に反応が進む硝化反応において、この研究で前半と後半でどちらが硝化を律速しているか、またこれまでの研究でも余り求められていない亜硝酸イオンの滞留時間などを計算することができるようになった。またここでは示していないが同時に $^{15}\text{N}_2\text{O}$ と $^{14}\text{N}_2\text{O}$ の濃度変化も追跡できているため、3つの基質のどれからより N_2O が放出していたかを計算することも可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Kanae, Fukushima Keitaro, Onishi Yuji, Nishina Kazuya, Makabe Akiko, Yano Midori, Wankel Scott D., Koba Keisuke, Okabe Satoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Influence of 180 of water on measurements of 180 of nitrite and nitrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 e8979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rcm.8979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kazuki Shinoda, Midori Yano, Muneoki Yoh, Makoto Yoshida, Akiko Makabe, Yohei Yamagata, Benjamin Z. Houlton, Keisuke Koba	4. 巻 34
2. 論文標題 Control of the Nitrogen Isotope Composition of the Fungal Biomass: Evidence of Microbial Nitrogen Use Efficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 5-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME18082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Wei Wei, Kazuo Isobe, Yutaka Shiratori, Midori Yano, Sakae Toyoda, Keisuke Koba, Naohiro Yoshida, Haoyang Shen, Keishi Senoo	4. 巻 287
2. 論文標題 Revisiting the involvement of ammonia oxidizers and denitrifiers in nitrous oxide emission from cropland soils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 117494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envpol.2021.117494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 X. Ding, W. Lan, Y. Li, A. Yan, Y. Katayama, K. Koba, A. Makabe, K. Fukushima, M. Yano, Y. Onishi, Q. Ge, and J-D. Gu.	4. 巻 165
2. 論文標題 An internal recycling mechanism between ammonia/ammonium and nitrate driven by ammoniaoxidizing archaea and bacteria (AOA, AOB, and Comammox) and DNRA on Angkor sandstone monuments.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Biodeterioration & Biodegradation	6. 最初と最後の頁 105328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibiod.2021.105328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒岩恵・勝山千恵・木庭啓介
2. 発表標題 窒素循環解析に向けた重窒素・酸素標識一酸化二窒素定量手法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黒岩 恵 (Kuroiwa Megumi) (00761024)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教 (12605)	
研究分担者	勝山 千恵 (Katsuyama Chie) (10580061)	広島大学・統合生命科学研究科(総)・助教 (15401)	
研究分担者	寺田 昭彦 (Terada Akihiko) (30434327)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	渡邊 哲弘 (Watanabe Tetsuhiro) (60456902)	京都大学・地球環境学堂・准教授 (14301)	
研究分担者	仁科 一哉 (Nishina Kazuya) (60637776)	国立研究開発法人国立環境研究所・地球システム領域・主任 研究員 (82101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	内田 義崇 (Uchida Yoshitaka) (70705251)	北海道大学・農学研究院・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関