

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510022

研究課題名（和文）新たな温暖化促進微生物：メタン酸化菌による亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) 生成の検証

研究課題名（英文）Evaluation of nitrous oxide emission by aerobic methanotrophs as possible microbial members contributing to global warming.

研究代表者

平山 仙子 (HIRAYAMA HISAKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：90359167

研究成果の概要（和文）：海洋性の好気的メタン酸化菌を中心に亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) 生成能を検証し、深海底泥から単離した *Methylobacter* sp. 株が他の株の数十～数百倍の N<sub>2</sub>O 生成能を持つこと、亜硝酸塩の存在が N<sub>2</sub>O 生成に大きく寄与することを明らかにした。また複数のメタン酸化株について、メタン酸化菌が N<sub>2</sub>O を生成する上で重要と考えられているヒドロキシルアミン酸化酵素 (HAO) の遺伝子を探索し、塩基配列を決定した。

研究成果の概要（英文）：The ability of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) production by aerobic methanotrophic bacteria was examined by using pure cultures obtained mainly from marine environments. *Methylobacter* sp. strain, which was isolated in our laboratory from the deep-sea sediment, was revealed to produce significantly more N<sub>2</sub>O than other strains tested. The addition of nitrite to the growth medium promoted production of N<sub>2</sub>O. The presence of genes encoding hydroxylamine oxidoreductase was examined by DNA extracted from the strains, and the partial nucleotide sequences of the genes were determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境動態解析

キーワード：メタン酸化菌・地球温暖化・亜酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) は二酸化炭素の約 300 倍の高い温室効果を示す上、最大のオゾン層破壊物質であると考えられており、現在注目されている問題物質である。自然界で発生する N<sub>2</sub>O は主に微生物の代謝活動によるものであり、その代謝特性は、N<sub>2</sub>O の起源を知り

抑制対策を講じる上で重要な情報となる。

N<sub>2</sub>O 生成に寄与する代謝は、これまで主に異化的な硝化と硝酸還元であると考えられてきた。一方、好気的メタン酸化菌（メタン酸化菌）がエネルギー生産を伴わない硝化を行う可能性があること、そして、それが N<sub>2</sub>O 生成に寄与し得ることはあまり知られてお

らず、研究例は非常に限られている。特に海洋性のメタン酸化菌は分離株が非常に限られている上、公的菌株保存機関から入手できる株が無かったため、分離株を用いた研究を行うには自ら分離する以外に研究手段がないという状況であった。したがって、これまでに海洋性メタン酸化菌の  $N_2O$  生成に関する研究報告例は無い。

## 2. 研究の目的

我々の研究室では様々な海洋環境から分離したメタン酸化菌株を数株保有しており、それらの窒素化合物利用特性を見極めた上で、(1)  $N_2O$  生成能を検証する、(2) 硝化により  $N_2O$  を生成する場合に必須と考えられるヒドロキシルアミン酸化酵素 (HAO) の遺伝子を探査し配列決定する、以上2点を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究には、本研究室で海洋環境から分離したメタン酸化菌3株 (*Methylobacter* sp. MR1 株、*Methylomarinum vadi* IT-4 株、および *Methylohalobius* sp. IT-9 株) と、公的菌株保存機関より入手した塩湖由来の *Methylohalobius crimeensis* 10KiT 株 (DSM 16011) を用いた。この他に、随時比較対象として陸域由来の *Methylococcus capsulatus* ATCC 19069 株と *Methylosinus sporium* DSM 17706 株を用いた。

培養は 15 mL 容の試験管に 3 mL の無機培地を用意し、ブチルゴム栓で密閉して行った。気層はメタン 30~80 %、酸素は各菌株の至適濃度に応じて 5~7 % に調整した。各菌株は表 2 に示した温度条件下で振とう培養した。

(2) 各菌株が  $NH_4Cl$ 、 $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$  を単独の窒素源として利用できるかどうか調べるため、それぞれを単独で添加した培地で培養し、生育の有無を確認した。

(3)  $N_2O$  生成を検証するにあたり、表 1 に示した 9 通りの窒素化合物の組み合わせ (基質 1-9) で菌株を培養した。それぞれの条件下で各菌株を定常期まで培養した後、気層ガス 0.5 mL を GS-CarbonPLOT カラム (30 m x 0.32 mm, 3  $\mu$ m, Agilent J&W) および Finnigan TRACE DSQ GC-MS システム (Thermo Fisher Scientific) で分析し、 $N_2O$  を定量した。

(4) HAO をコードする *hao* 遺伝子を探査するため、オリゴ DNA プライマーを設計した。塩基配列データベースに登録されている既知のアンモニア酸化菌およびメタン酸化菌の *haoA* 塩基配列をマルチプルアライメント解析し、共通プライマー候補を複数作製した。各菌株から抽出した染色体 DNA を鋳型として共通プライマーで PCR を行い、該当するサ

イズの増幅産物の塩基配列決定を行った。

## 4. 研究成果

(1) 各菌株は生育における窒素源として共通して  $NH_4Cl$  を利用できた。一方、 $NaNO_2$  と  $NaNO_3$  については、*Methylobacter* MR1 株と *Methylomarinum* IT-4 株は利用できたが、*Methylohalobius* 属の 2 株は利用できなかった。 $NaNO_2$  を利用できる MR1 株と IT-4 株でも、通常濃度 (0.05 %) の  $NaNO_2$  存在下では多少の生育阻害が起きるため、 $N_2O$  生成の検証にあたり  $NaNO_2$  添加量を 0.017 % に減らした。一方、*Methylohalobius* 属の 2 株は  $NH_4Cl$  を窒素源とした上で追加的に  $NaNO_2$  を添加した場合、0.01% 濃度では大きな生育阻害は起きなかったため、 $N_2O$  生成の検証にあたり  $NaNO_2$  添加量を 0.01 % とした。

表 1. 培地中の窒素化合物 (基質) の組み合わせ

	$NH_4Cl$ (%)	$NaNO_2$ (%)	$NaNO_3$ (%)
基質 1	0.05	-	-
基質 2	0.25	-	-
基質 3	0.05	0.01-0.017	-
基質 4	0.25	0.01-0.017	-
基質 5	0.05	-	0.05
基質 6	0.25	-	0.05
基質 7	-	-	0.05
基質 8	-	0.01-0.017	0.05
基質 9	-	0.01-0.017	-

(2) 培養後の試験管の気層中  $N_2O$  濃度を表 2 にまとめた。分析は独立した培養をそれぞれ 2 回ずつ行い、平均値を示した。また、培養後に培養液の細胞密度を顕微鏡下で計測した。

### ① *Methylobacter* sp. MR1

MR1 株は下北半島沖海底下約 1000 m の深海底堆積物より分離した。テストした 4 株の中で最も多くの  $N_2O$  を生成したのは MR1 株であり、特に  $NaNO_2$  存在下での  $N_2O$  生成が顕著であった。 $N_2O$  が最も多く検出されたのはこれまでの報告通り、過剰量の  $NH_4Cl$  と  $NaNO_2$  が共存する条件下 (基質 4) であった。培養後の菌体密度は、基質 2 が最も高く  $1.7 \times 10^8$  cells/mL、次いで基質 1 の  $7.5 \times 10^7$  cells/mL であった。一方、基質 3 と 4 の菌密度はそれぞれ  $3.0 \times 10^7$  cells/mL と  $3.1 \times 10^7$  cells/mL であった。つまり、基質 2 ( $NH_4Cl$  のみ) と基質 3 および 4 ( $NH_4Cl+N_2O$ ) を比べると、後者は細胞数が 1/5 以下であるが、

N<sub>2</sub>O 生成量は約 180-810 倍になる。

PCR 法による *hao* 遺伝子探索の結果、MR1 株から *hao* 遺伝子が見つかった。従って、メタン酸化酵素により NH<sub>4</sub>Cl からヒドロキシルアミンが生成し、さらに HAO を経由し N<sub>2</sub>O か、あるいは NO<sub>2</sub> に変換されると考えられる。一方、NaNO<sub>2</sub> 添加条件下ではすべて高い N<sub>2</sub>O 生成を示していることから、たとえ NH<sub>4</sub>Cl から NO<sub>2</sub> が生成しても、それらは還元されて N<sub>2</sub>O になると考えられる。NH<sub>4</sub>Cl 単独の添加では N<sub>2</sub>O 生成量が低い理由として、メタン酸化酵素によるアンモニア酸化能が低くヒドロキシルアミン生成速度が遅いことが考えられる。しかし、NH<sub>4</sub>Cl 濃度は低い (0.05%) よりも高い (0.25%) 方が N<sub>2</sub>O 生成が増加する傾向が認められたことから、MR1 株においては NH<sub>4</sub>Cl の増加は硝化を促進すると結論づけられる。

基質 8 および 9 (NaNO<sub>2</sub>+NaNO<sub>3</sub> および NaNO<sub>2</sub> のみ) においても基質 3 に近い量の N<sub>2</sub>O が生成したことは、MR1 株の N<sub>2</sub>O 生成を左右する最大の因子は NO<sub>2</sub> であることを強く示唆している。しかし、MR1 株が NO<sub>2</sub> → NO → N<sub>2</sub>O のいわゆる亜硝酸還元経路 (nitrifier denitrification) を持つかどうかは不明である。*Methylococcus capsulatus* では全ゲノム解析で亜硝酸還元酵素遺伝子が見つからなかったことから、HAO の逆反応で NO<sub>2</sub> からヒドロキシルアミンが生成し、さらに N<sub>2</sub>O へ変換される可能性が指摘されている。したがって、今後の課題は NO<sub>2</sub> で発現が促進されるタンパクの同定であると考えられる。

NaNO<sub>3</sub> 単独でも少量の N<sub>2</sub>O 生成が認められたことも特筆に値する。弱いながらも硝酸還元能を有することが考えられる。しかし、MR1 株において硝酸呼吸能は認められていない。

## ② *Methylomarinum vadi* IT-4

IT-4 株は沖縄の竹富島沖浅海底温泉 (水深 23 m) より分離した。IT-4 株は NaNO<sub>2</sub> 存在下でのみ少量の N<sub>2</sub>O を生成した。NH<sub>4</sub>Cl の添加や増加が N<sub>2</sub>O 生成を促進するといった効果は認められなかった。IT-4 株においては *hao* 遺伝子が検出されなかったことから、NaNO<sub>2</sub> からの N<sub>2</sub>O 生成は HAO 以外の酵素群によるものと推察される。

表 2. 実験に用いたメタン酸化菌と N<sub>2</sub>O 生成特性

	<i>Methylobacter</i> MR1	<i>Methylomarinum</i> IT-4	<i>Methylohalobius</i> IT-9	<i>Methylohalobius</i> 10KiT
分離起源	深海底泥	浅海熱水域	浅海熱水域	塩湖
培養温度	25°C	37°C	45°C	30°C
<i>hao</i> 遺伝子	+	-	+	+
最終菌密度 (cells per mL)	3.0 × 10 <sup>7</sup> - 1.7 × 10 <sup>8</sup>	1.3 × 10 <sup>7</sup> - 2.0 × 10 <sup>8</sup>	1.4 × 10 <sup>7</sup> - 2.3 × 10 <sup>7</sup>	3.3 × 10 <sup>7</sup> - 6.0 × 10 <sup>7</sup>
N <sub>2</sub> O 濃度 (nM)				
基質 1	± <sup>(a)</sup>	BDL <sup>(b)</sup>	BDL	BDL
基質 2	10.8	BDL	±	BDL
基質 3	1980	15.7	14.2	58.7
基質 4	8760	12.3	16.2	104
基質 5	13.2	BDL	BDL	BDL
基質 6	25.2	BDL	±	BDL
基質 7	8.87	BDL	NA <sup>(c)</sup>	NA
基質 8	1210	7.81	NA	NA
基質 9	1240	13.3	NA	NA

(a) ±, 測定限界近辺のため未確定

(b) BDL, 測定限界以下 (約 6 nM, 絶対量として 3 pmol 以下)

(c) NA, 当該基質では生育不可のため未分析

## ③ *Methylohalobius crimeensis* 10KiT および *Methylohalobius* sp. IT-9

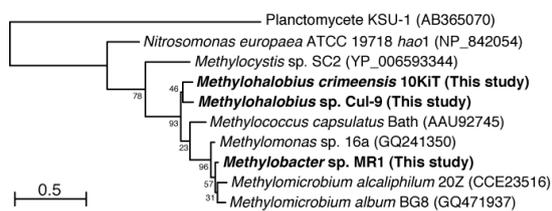
10KiT 株はウクライナ、クリミア半島の塩湖で分離され菌株保存機関に寄託された株で、本研究では菌株保存機関より購入した。IT-9 株は *Methylomarinum vadi* IT-4 株と同じ竹富島沖浅海温泉より分離した。これら 2 株は窒素源として NaNO<sub>2</sub> と NaNO<sub>3</sub> を利用できないため、基質 7~9 を除き、基質 1~6 の条件下で解析を行った。その結果、NaNO<sub>2</sub> を添加した場合に明らかな N<sub>2</sub>O 生成が認められた。一方、高濃度の NH<sub>4</sub>Cl が N<sub>2</sub>O 生成を促進している兆しも認められることから、今後、データ数を増やして考察する必要がある。なお、*Methylohalobius* 属の 2 株からは *hao* 遺伝子が検出された。

本実験ですべての株に認められたのは、NH<sub>4</sub>Cl を単独で添加しただけではアンモニア酸化はあまり促進されないということである。一方、すべての株で共通して、NaNO<sub>2</sub> の添加が N<sub>2</sub>O 生成を促進する、あるいは促進の兆候があることが分かった。NO<sub>2</sub> から N<sub>2</sub>O への変換に HAO が関与しているかどうかについて、これまでの研究では関与が推察されているものの、証明されるまでには至っていない。今後は、ヒドロキシルアミンを基質とした場合の N<sub>2</sub>O 生成を調べるとともに、ヒドロキシルアミンや NaNO<sub>2</sub> により発現が促進されるタンパクを同定することが課題である。

(3) 独自に作製した共通プライマーを用いた PCR 法により、*hao* 遺伝子を探索した。その結果、*Methylobacter* sp. MR1 株、

*Methylohalobius crimeensis* 10KiT 株、*Methylohalobius* sp. IT-9 株の3株から *hao* 様遺伝子が検出され、それぞれ約 860-bp の塩基配列を決定した。それらの翻訳アミノ酸配列の相同性解析では、アンモニア酸化菌 *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 (NP\_842054) の HAO との similarity は 56-59 %、メタン酸化菌 *Methylococcus capsulatus* Bath の HAO (MCA0956) との similarity は 79-83 % であった。データベースに登録されている他のメタン酸化菌の HAO との系統関係を調べるため、アミノ酸配列 (286 aa) を用いて最尤法により系統樹を作製した (図 1)。HAO の系統関係は 16S rRNA 遺伝子の系統関係とよく一致した。

図 1. HAO アミノ酸配列の系統樹



(4) メタン酸化菌の  $N_2O$  生成に関する報告はこれまでにいくつかあるものの、実験方法・条件が様々である。したがって本研究でも明らかのように、生育条件によって  $N_2O$  生成量が大きく変化することを考えると、単純に過去の文献データと  $N_2O$  生成能を比較することはできない。本研究では GC-MS を用いることで従来よりも相当高感度で  $N_2O$  を定量できることが分かった。今後、報告のある菌株を同じ方法で測定し直すことにより、メタン酸化菌群における  $N_2O$  生成の全体像がより鮮明になってくると考える。

また、メタン酸化菌が  $NO_2$  からどのような経路で  $N_2O$  を生成するのかは未だ大きな疑問として残されている。これを明らかにすることが  $N_2O$  生成を人為的に制御する上でも不可欠である。アンモニア酸化菌と異なり、メタン酸化菌による  $N_2O$  生成経路はエネルギー生成に関与していないと考えられ、これは遺伝子破壊株の作製というアプローチを可能にする点で、アンモニア酸化菌を対象とした研究に比べ有利であり、今後検討したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Hirayama, H., Fuse, H., Abe, M., Miyazaki, M., Nakamura, T., Nunoura, T., Furushima,

Y., Yamamoto, H., and Takai, K. 2013, *Methylomarinum vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments. 査読有、Int J Syst Evol Microbiol, Vol.63, No.3, pp.1073-1082, DOI:10.1099/ij.s.0.040568-0

② Hirayama, H., Suzuki, Y., Abe, M., Miyazaki, M., Makita, H., Inagaki, F., Uematsu, K., and Takai, K. 2011, *Methylothermus subterraneus* sp. nov., a moderately thermophilic methanotrophic bacterium from a terrestrial subsurface hot aquifer in Japan. 査読有、Int J Syst Evol Microbiol, Vol.61, No.11, pp.2646-2653, DOI:10.1099/ij.s.0.028092-0

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平山 仙子 (HIRAYAMA HISAKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：90359167

### (2) 研究分担者

高井 研 (TAKAI KEN)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・

プログラムディレクター

研究者番号：80359166