

令和元年6月17日現在

機関番号：53101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15305

研究課題名（和文）窒素循環に新たな1ページを加える第三の窒素ガス生成経路を担う微生物群の同定

研究課題名（英文）Investigation of hydroxylamine disproportionation, a novel nitrogen gas-formation reaction

研究代表者

押木 守 (oshiki, mamoru)

長岡工業高等専門学校・環境都市工学科・准教授

研究者番号：90540865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：微生物が窒素ガスを生成する新たな経路としてhydroxylamine disproportionation (HD)反応に注目した。嫌気性アンモニウム酸化細菌を用いてHD反応が起こりえる条件を調査したところ、pH、温度、基質濃度が影響し、特に基質濃度の影響が強いことを明らかにした。触媒酵素が非常に不安定であることが明らかになったため、HD反応をin-vivoで観察すべく、ヒドロキシルアミンに特異的に結合する蛍光プローブを合成し、蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒素ガスを生成する微生物代謝経路としてこれまで脱窒および嫌気性アンモニウム酸化反応のみが知られてきたが、第三の経路としてHD反応を同定することは、地球圏での窒素代謝を理解するために必要不可欠である。本研究ではHD反応について基礎的な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Hydroxylamine disproportionation (HD) is a novel microbial reaction, in which microorganisms produce nitrogen gas using hydroxylamine. We found that pH, temperature, and especially hydroxylamine concentration affects activities of HD. An enzyme responsible for HD reaction was very labile to cell disruption, and thus in-vivo studies need to be carried out.

研究分野：環境微生物学、水環境工学

キーワード：窒素循環 ヒドラジン 窒素ガス 嫌気性アンモニウム酸化 ヒドロキシルアミン

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

1. 研究開始当初の背景

地球上の窒素循環では、年間 100~2,000 メガトンもの窒素が様々な形態に形を変えながら循環している。この内、窒素ガス生成は窒素化合物を大気中に N_2 の形で放出し、 N_2 は地球上を広く拡散することから、窒素循環において極めて重要なプロセスとなる。この N_2 生成反応は主に微生物が担っており、これまでに 1) 脱窒反応($NO_x^- \rightarrow N_2$)および 2) 嫌気性アンモニウム酸化反応($NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2$)が窒素ガス生成経路として報告されている。一方、著者は第三の窒素ガス生成経路になりえる hydroxylamine disproportionation(HD)反応を 2016 年に見いだしており(*Environ. Microbiol.* 18, 3133-3143.)、この HD 反応が第三の窒素ガス生成経路として窒素循環に寄与しているのではないかという着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、窒素循環における HD 反応の寄与を解明することを目指し、基礎的知見として以下を得ることを目指した。

- ・HD 反応の至適条件のスクリーニング
- ・HD 反応触媒酵素の同定
- ・HD 反応の *in-vivo* 観察

以上の実験を行うため、本研究では嫌気性アンモニウム酸化細菌(*Candidatus "Brocadia sinica"*)を HD 反応のモデル微生物として用いた。

3. 研究の方法

3-1) HD 反応至適条件のスクリーニング

B. sinica にヒドロキシルアミンを添加し、嫌気培養を行った。この際、培養条件を以下のように変化させることで、HD 活性への影響を調査した: pH 6.0 - 10.5、4 - 65°C、ヒドロキシルアミン濃度 1 - 100 mM。なお、HD 反応では N_2 ガスの他にヒドラジンが生成することを我々は明らかにしていたため、HD 活性をヒドラジン合成活性として評価した。

3-2) HD 反応触媒酵素の同定

B. sinica の菌体をフレンチプレス/ビーズビーディングで破碎し、細胞破碎液を超遠心分離へ供し、可溶性画分と膜画分を得た。粗抽出液、可溶性画分、膜画分へヒドロキシルアミンを添加し、培養を行い、HD 活性を測定した。

3-3) HD 反応の *in-vivo* 観察

ヒドロキシルアミン/ヒドラジンに特異的に結合し、蛍光を呈する蛍光プローブ(Rhodol levulinate プローブ)を合成し、合成品についてヒドロキシルアミン/ヒドラジンとの反応性を調査した。

4. 研究成果

4-1) HD 反応至適条件のスクリーニング

pH、培養温度、基質(ヒドロキシルアミン)濃度が *B. sinica* の HD 活性に及ぼす影響を調査したところ、pH は pH9、温度は 37°C で最も反応が進行することを明らかにした。特に基質濃度が本反応に及ぼす影響は大きく、基質濃度 1 mM 以上では反応活性が著しく低下することを明らかにした(図 1a-c)。基質濃度が活性に大きく影響することが明らかとなったため、培養液中のヒドロキシルアミン濃度を低濃度で維持しながら培養することを可能にする連続培養装置を新たに構築した。上述の条件に基づき至適条件で *B. sinica* を培養したところ、培養液中のヒドラジン濃度が上昇し、最大で 0.6 mM 以上を達成した(図 1a-d)。これはこれまでに報告されているヒドラジン濃度を上回る、世界最高値(表 1)であり、本研究において、*B. sinica* にヒドラジンを合成させ、続けて窒素ガスを生成させる反応の至適培養条件を明らかにすることができた。

4-2 HD 反応触媒酵素の同定および *in-vivo* 観察

B. sinica の菌体を破碎し、粗抽出、可溶性画分、膜画分を調整し、HD 活性の有無を調査した。いずれの画分からも HD 活性を検出することができず、触媒酵素が酸素感受性を持つ酵素であるか、酵素活性に必要な複合体形成が細胞破碎の過程で破壊されてしまったことが原因と考えられた。酸素感受性については還元剤を添加した後に菌体を破碎し、追試を実施したが活性を確認することができず、おそらく後者の複合体の破壊が原因であると推察された。

HD 反応を *in-vitro* で観察することが困難であることが明らかとなったため、ヒドロキシルアミンの代謝を *in-vivo* でイメージングすることを試みた。文献調査の結果、ヒドラジンと特異的に結合する蛍光プローブ(rhodol levulinate プローブ)が近年開発されており(*Spectrochim. Acta A* 195, 136-141.)、この蛍光プローブがヒドロキシルアミンとも反応しうることを見いだした。そこで、ナノテクノロジープラットフォーム事業(受け入れ:千歳科学技術大学)に依頼し、蛍光プローブを合成し、反応性を検証した。予測通り、本蛍光プローブがヒドロキシルアミンとも反応することを見いだした。現在、*B. sinica* 細胞内でのヒドロキシルアミン代謝を蛍光顕微鏡観で *in-vivo* 観察することを試みている。

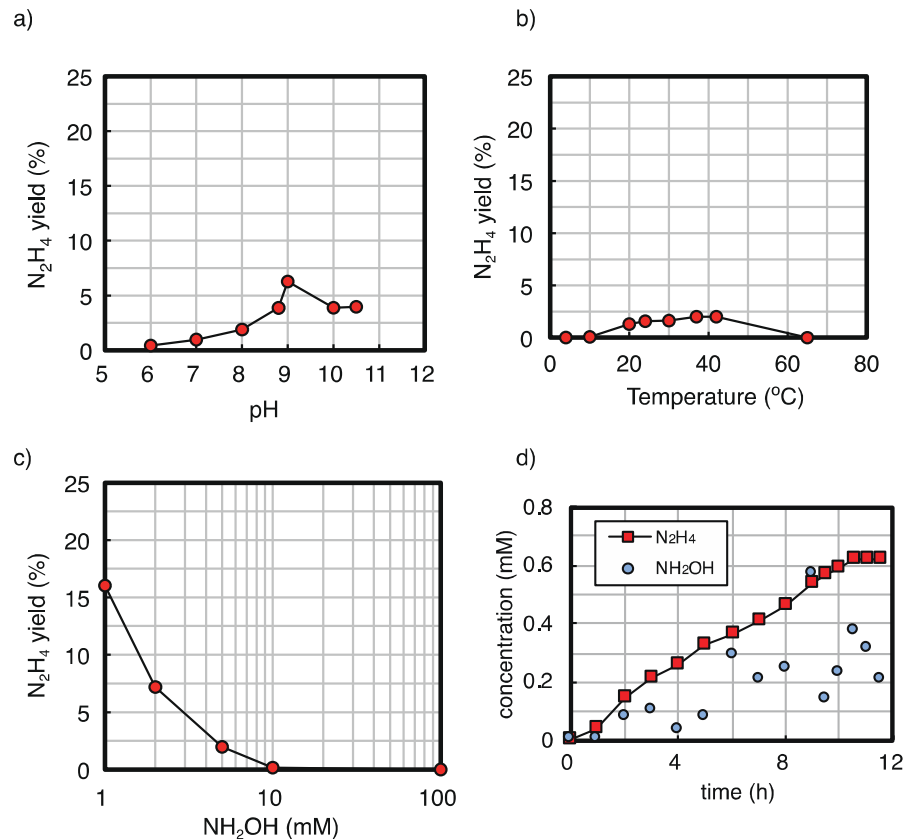


図1. 培養条件がHD活性へ及ぼす影響; a) pH、b)温度、c)基質(ヒドロキシルアミン)濃度の影響。d) 連続培養試験におけるHD活性。

表1 異なる培養条件下における嫌気性アンモニウム酸化細菌によるヒドラジン合成

pH	Temp. (°C)	NH ₂ OH (mM)	N ₂ H ₄ (mM)	Yield (%)	N ₂ H ₄ production rate (μM h ⁻¹)	Reference
9	38	<0.6	0.62	<i>n.a.</i>	83	This study
9	38	<0.3	0.56	<i>n.a.</i>	74	This study
7.5 – 8.0	37	6.6	0.15	2.3%	68	van der Star et al., 2008
7.6	37	1.5	0.26	18%	88	Oshiki et al., 2016
7.0 – 7.3	33	4	0.19	4.8%	54	Kartal et al., 2008
7.8	37	3	0.12	4.0%	40	Ali et al., 2015
7.0 – 7.3	33	5	0.3	6.0%	600	Kartal et al., 2007
7.5	30	3	0.5	16.7%	42	van de Graaf et al., 1997

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kobayashi, S., Hira, D., Yoshida, K., Toyofuku, M., Shida, Y., Ogasawara, W., Yamaguchi, T., Araki, N. and Oshiki, M., 2018. Nitric oxide production from nitrite reduction and hydroxylamine oxidation by copper-containing dissimilatory nitrite reductase (NirK) from the aerobic ammonia-oxidizing archaeon, *Nitrososphaera viennensis*. *Microbes Environ.* 33, 428-434.
2. Oshiki, M., Masuda, Y., Yamaguchi, T. and Araki, N., 2018. Synergistic inhibition of anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity by phenol and thiocyanate. *Chemosphere* 213, 498-506.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 永井孔明、押木守、荒木信夫、増間智郎、山口隆司、岡部 聡 (2019) 海洋窒素循環を駆動

- させる触媒分子の機能を解き明かす, 日本農芸化学会 2019 年度大会.
2. 中林豊博、押木守、荒木信夫、岡部聡、山口隆司 (2019) Anammox 細菌 "*Candidatus Kuenenia*" が保有する亜硝酸還元酵素の精製および生化学的性状, 日本農芸化学会 2019 年度大会.
 3. 押木守、小林駿、平大輔、吉田圭太郎、豊福雅典、志田洋介、小笠原渉、山口隆司、荒木信夫 (2019) アンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaera viennensis* が保有する銅含有型亜硝酸還元酵素(NirK)の触媒特性, 日本農芸化学会 2019 年度大会.
 4. 中林豊博、押木守、荒木信夫、岡部聡、山口隆司 (2019) Anammox 細菌"*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*"が保有する亜硝酸還元酵素の精製及び同定, 第 53 回日本水環境学会年次大会.
 5. 根津拓福、荒木信夫、押木守、相塚睦 (2019) 新規なリアクターを用いた低温海水水槽に適用する硝化技術の開発, 第 53 回日本水環境学会年次大会.
 6. 中林豊博、押木守、荒木信夫、山口隆司 (2018) Anammox 細菌による亜硝酸還元反応, 第 36 回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会
 7. 相塚睦、荒木信夫、押木守、山口隆司、大森聖史、長野晃弘 (2018) DHS リアクターを用いた低温海水魚水槽での硝化技術の開発, 第 36 回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会.
 8. 永井孔明、押木守、荒木信夫、山口隆司 (2018) 生理機能解析を目指した海洋性 anammox 細菌の大量培養, 第 36 回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

※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。