

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11636

研究課題名(和文) アンモニア酸化古細菌の基質選択性に関する研究

研究課題名(英文) Selectivity of substrate by ammonia oxidizing archaea

研究代表者

眞壁 明子 (Makabe, Akiko)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・准研究員

研究者番号：90752618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海洋での存在度が高く、窒素・炭素循環において重要な役割を担っているアンモニア酸化古細菌の基質選択性を調べるために、アンモニウムや尿素を基質としたアンモニア酸化活性を求めるときの培養実験を実施した。北太平洋、インド洋における活性実験においては、アンモニウムを基質としたアンモニア酸化活性がある場所では、ほぼすべての場所で尿素を基質としたアンモニア酸化活性もあったが、採取した環境によってアンモニウムと尿素の利用比は異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋におけるアンモニア酸化は、表層における一次生産をコントロールする要因の一つであるだけでなく、深海においては一次生産そのものとしても機能している。本研究の成果について、環境中の栄養塩・有機物濃度や微生物情報と合わせてさらに解析することにより、窒素利用と炭素利用の相互作用を含めた新たな窒素・炭素循環モデルを構築することができると考えられる。また、海洋酸性化やプラスチック汚染の影響を考慮する上で、基盤となる情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ammonia oxidizing archaea is one of the dominant microorganisms in the ocean. It plays an important role in nitrogen and carbon cycles in the ocean. In this study, we conducted the incubation experiments using seawater to estimate ammonia oxidation by using ammonium or urea as the substrate. We found that the ammonia oxidation using urea was detected at almost all depths where the ammonia oxidation using ammonium was detected, and the ratio of ammonia oxidizing fluxes using ammonium and urea was different in the sampling sites.

研究分野：生物地球化学

キーワード：アンモニア酸化 安定同位体 海洋

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2005年にKönnekeらによって単離された *Nitrosopumilus maritimus* がアンモニア酸化及びCO<sub>2</sub>固定能を持つことが明らかとなつて以降、アンモニア酸化古細菌 (Ammonia oxidizing archaea: 以下 AOA) は、窒素・炭素循環における最も重要なキープレイヤーとして着目されてきた。AOAは、現在では様々な生態系に広く存在していることが知られているが、特に海洋性微生物としては最も存在量が多く、(1)植物プランクトンの栄養源であるNO<sub>3</sub><sup>-</sup>生成を担い表層の一次生産を支えている、(2)CO<sub>2</sub>固定を行い光の届かない深層における一次生産者として働く、(3)代謝過程で温暖化ガスであるN<sub>2</sub>Oを生成する、という点において特に重要である。しかし、未だにAOAの単離・集積培養は非常に困難であり、限られた研究機関でしか研究が進んでこなかった。

AOAは、アンモニア酸化によりエネルギーを得て、CO<sub>2</sub>を炭素栄養源としていると考えられてきたが、近年になって、ほとんどのAOAがureaseを保持しており、尿素もエネルギー源/炭素源として利用できることが明らかとなつてきた (Qin et al. 2014)。様々な生理的機能が明らかになる一方で、実際に自然環境中でAOAがどの代謝経路を利用して活動しているかについては不明であり、単にアンモニア酸化速度やCO<sub>2</sub>固定速度を求めるのでは活性を過小評価している可能性がでてきた。

### 2. 研究の目的

AOAの多様な代謝能に対して、複数のエネルギー源及び炭素源が存在するときに、基質選択性が何に依存しているのかを明らかにし、新たな物質循環モデルを提唱することを目的とした。

### 3. 研究の方法

AOAの培養実験による基質選択性に関わる速度論的パラメーターの決定と、天然試料の培養実験及び自然安定同位体比の解析によるモデルの検証から構成される。

AOAの純粋培養実験については、陸上鉱山から採取されたAOAの集積培地を用いるとともに、北太平洋深海から採取された海水からの単離培養も試みた。

天然試料の培養実験については、北太平洋及びインド洋において実施されたCTD調査航海において海水を採取した。ニスキン採水器から100mLのバイアル瓶にヘッドスペースができないように採水し、<sup>15</sup>Nで標識された基質を添加し、現場水温と同程度の温度、暗所で培養した。培養終了時に0.45µmのフィルターでろ過し、分析まで冷凍で保存した。NO<sub>x</sub><sup>-</sup>については、脱窒菌法により処理し、生成した<sup>15</sup>NO<sub>x</sub><sup>-</sup>、<sup>15</sup>N<sub>2</sub>Oの生成量をGC-IRMSにて分析した。また、モデルを検証するために、同海域のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、N<sub>2</sub>Oの自然安定同位体比についてもGC-IRMSにて分析した。

### 4. 研究成果

天然試料の培養実験については、北太平洋及びインド洋にて、陸からの距離や緯度に応じて現場の栄養塩や有機物濃度が異なる複数の海域・深度において海水の採水を行い、複数基質の安定同位体標識を用いた、海水のアンモニア酸化培養実験を実施した。また、アンモニア酸化に付随して生成する温暖化ガスである一酸化二窒素の生成速度を調べるための条件でも培養実験を実施した。アンモニウムを基質としたアンモニア酸化活性がある場所では、ほぼすべての場所で尿素を基質としたアンモニア酸化活性もあることが明らかとなった (図1)。また、ほとんどの場所でアンモニウムを基質とした活性の方が尿素を基質とした活性よりも高かったが、一部で尿素を基質とした活性の方が高い場所があった。試料を採取した場所によって、アンモニア酸化におけるアンモニウムと尿素の利用比が異なることが明らかとなったが、その要因については、今後、栄養塩・有機物濃度や微生物情報と合わせてさらに解析する予定である。その結果として、窒素利用と炭素利用の相互作用を含めた新たな窒素・炭素循環モデルを構築することができると考えられる。

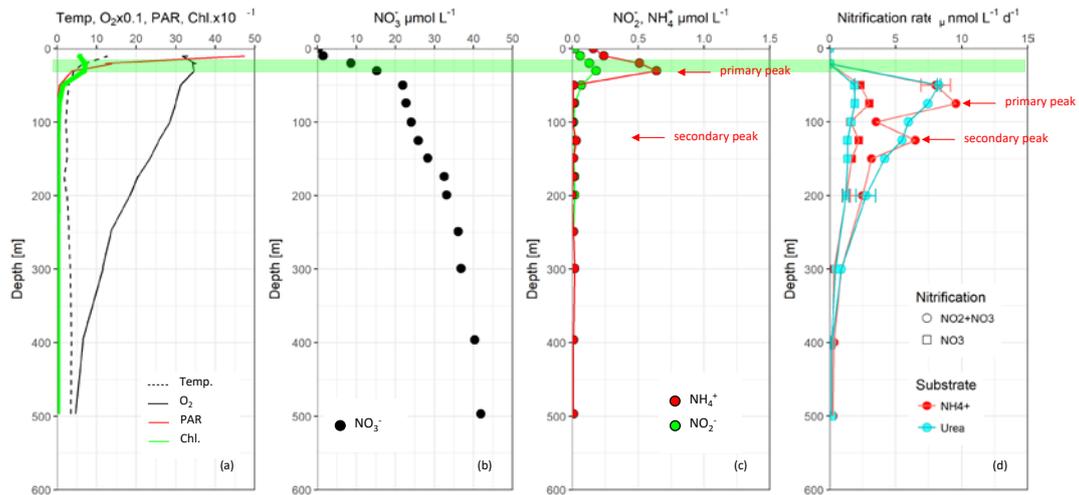


図1 北太平洋におけるアンモニア酸化活性の鉛直分布の一例  
 ((a)水温、溶存酸素、クロロフィル(b)NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度(c)NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度(d)アンモニア酸化活性)

<引用文献>

- Könneke M, et al. (2005), Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon, Nature, 437 (7058), 543-546.  
 Qin W, et al. (2014), Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation, PNAS, 111(34), 12504-12509

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akiko Makabe, Takuro Nunoura, Chisato Yoshikawa, Keisuke Koba
2. 発表標題 Nitrification rates in the Subarctic and Subtropical North Pacific
3. 学会等名 Goldschmidt2019（国際学会）
4. 発表年 2019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	横川 太一  (Yokokawa Taichi)  (00402751)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・研究員    (82706)	

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
---------	---------