

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12385

研究課題名(和文)一酸化窒素の生成と分解に寄与する機能遺伝子に着目した亜酸化窒素生成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of nitrous oxide production mechanisms focusing on the mRNA expression related to nitric oxide production and decomposition

研究代表者

齋藤 利晃 (SAITO, Toshiaki)

日本大学・理工学部・教授

研究者番号：50277381

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)：アンモニア酸化細菌の亜酸化窒素生成に寄与する一酸化窒素(NO)の影響を明らかにするため、亜硝酸還元酵素およびNO還元酵素の誘導がNOの必要性と存在量に応じて変化し、結果として亜酸化窒素の生成の大小を決定するとの仮説を立て、その検証を試みた。NOの直接的曝露および無酸素工程を付与することによるアンモニア酸化細菌自身により生成されたNOの影響を調べた結果、NO過剰時の亜酸化窒素生成の増大に関する結果だけではあるが、amoA発現量とは無関係にnorB発現量が増大する結果が得られ、仮説の一部ではあるが検証することができた。この成果は、亜酸化窒素生成抑制技術の開発に極めて重要な知見であると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱炭素社会の構築に向けて、エネルギー消費由来でない温室効果ガスの直接的な排出を抑制する技術の開発は喫緊の課題である。本研究は、排水処理において排出される亜酸化窒素の生成抑制技術の開発に貢献するため、生成メカニズムを詳細に検討したものである。アンモニア酸化細菌の状態変化に伴う亜酸化窒素の生成に関連する機能遺伝子同士の転写量の関係が明らかにされ、一酸化窒素の生成・分解とアンモニア酸化細菌の想い(mRNA転写量)に関する仮説を概ね示せたことから、生成抑制技術の開発に極めて重要かつ必須な知見が得られたものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to elucidate the nitrous oxide production mechanism by ammonia-oxidizing bacteria, especially focusing on the mRNA expression related to nitric oxide production and decomposition. From the previous research, it has been hypothesized that the demand and availability of nitric oxide determines the nitrous oxide production. To verify the hypothesis, the effect of nitric oxide or nitrogen gas bubbling on ammonia oxidation, nitrous oxide production and mRNA expression were investigated. From the results, one part of the hypothesis that the excessive nitric oxide increases the expression of norB mRNA is almost verified. Although further research is required, it is concluded that the demand and availability of nitric oxide could be the critical factor on nitric oxide production. From this research, the basic and essential findings for nitrous oxide production control have been obtained.

研究分野：土木環境システム

キーワード：亜酸化窒素 一酸化窒素 アンモニア酸化細菌 mRNA 転換率モデル

1. 研究開始当初の背景

閉鎖性水域の富栄養化対策として行われてきた生物学的窒素除去において、二酸化炭素のおよそ 300 倍という極めて強い温室効果を有する亜酸化窒素が生成することが知られている。脱炭素社会を形成するためには、電力の脱炭素化のみならず、亜酸化窒素に代表される温室効果ガスの直接排出分を削減する技術の開発が喫緊の課題である。亜酸化窒素の排出削減手法については、これまで曝気槽において寄与が大きいとされるアンモニア酸化細菌について、溶存酸素濃度や亜硝酸濃度など経験的に得られた影響因子に着目して数多くの研究がなされてきたが、具体的な排出抑制手法の開発には至っていない。

現状を打破する新たな視点として、アンモニア酸化細菌が何故亜硝酸や一酸化窒素を還元して亜酸化窒素を生成するのかという根源的な問いに着目したのが本研究である。即ち、従属栄養細菌が行う脱窒と異なり、酸素存在下で生じる脱窒であることから、エネルギー獲得のための反応とは考え難い。その生態学的な理由に着目することで有効な制御手法の開発につながると考えた。実際、*Nitrosomonas* 属のアンモニア酸化細菌が、アンモニアをヒドロキシルアミンに酸化する過程で一酸化窒素を原料とする NO_x サイクル反応を行なっているという報告がなされており、そのことから、亜硝酸を還元する必要性はアンモニア酸化に必要な一酸化窒素を生成するためではないかという仮説が立てられている。その仮説に基づけば、意図して生成した一酸化窒素を還元して亜酸化窒素を生成する理由として、一酸化窒素の毒性からの自己防衛策ではないかとの仮説を立てることができる。

本研究は、この仮説の検証を試みるものであるが、その前に、一酸化窒素を意図的に曝露させた実験系を構築し、亜酸化窒素の生成挙動を調べたところ、図 1 に示されるように、一酸化窒素を曝露させる際の溶存酸素の有無によって、亜酸化窒素の生成に差異が生じる結果が得られた。即ち、溶存酸素の存在下一酸化窒素に曝露させたところ (図中 O_xNO) 亜酸化窒素転換率は、水質条件から予測されるよりも低い値が観察され、亜酸化窒素の生成が抑制されていると考えられた。一方、無酸素条件下で一酸化窒素を曝露させた後に曝気を加えたところ (M_xNO-20、M_xNO-50、M_xNO-90) 逆に亜酸化窒素の生成が増加する結果が得られた。

これらの結果は、一酸化窒素の濃度と必要性に応じて、亜硝酸の還元による一酸化窒素の生成と一酸化窒素の分解が行っている可能性を示唆すると解釈された。そこで、本研究により、亜酸化窒素の生成に関連する機能遺伝子である *amoA*、*hao*、*nirK* および *norB* の発現量を調べ、このようなメカニズムが現実に作用しているか否かを検証することを試みた。

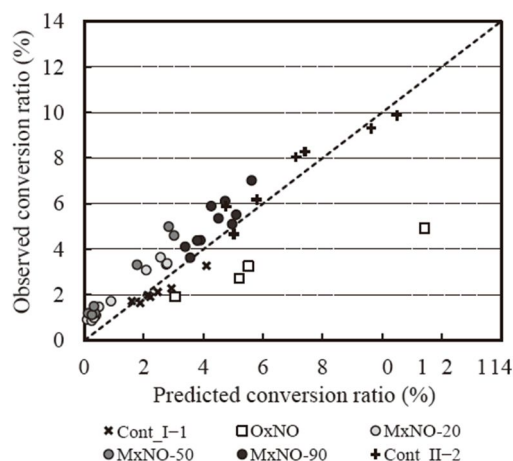


図 1 N₂O 転換率の予測値と実測値¹⁾

2. 研究の目的

上記視点に基づき、アンモニア酸化細菌の細胞内部において、亜硝酸の還元による一酸化窒素の生成と一酸化窒素の還元による分解の制御が如何なる条件で生じているのかを明らかにし、その結果を評価することで、観察される亜酸化窒素生成の大小に及ぼす環境条件の影響を、アンモニア酸化細菌の応答から説明したいと考えている。特に、一酸化窒素の存在がその生成と分解に寄与する機能遺伝子の発現量の制御に如何に反映されているのかを明らかにし、亜酸化窒素生成機構をアンモニア酸化細菌の立場から解明しようとするものである。

3. 研究の方法

アンモニア酸化細菌が優占した汚泥を獲得するため、無機栄養塩を基質として有効容積 4 L の回分式生物反応槽を pH7 前後、水温 20 °C 前後で運転した。定期的にフロックの破碎と正確な SRT 制御を行うことで、想定通り、アンモニア酸化細菌を優占させることができ、硝酸の生成量を極く微量に制御することができた。その後、初年度は、通常運転時におけるアンモニア酸化の進行と亜酸化窒素の生成状況、および関連 mRNA (*amoA*、*hao*、*nirK* および *norB*) の発現量の把握を行なった。2 年目は、通常運転を行なっている汚泥に対し、無酸素工程を一時的に付与し、一酸化窒素または窒素を 30 分ほど強制散気した場合にアンモニア酸化、亜酸化窒素の生成および関連機能遺伝子の mRNA 発現量を調べた。更に、3 年目の最終年度は、サイクルの間に無酸素条件を 90 分、180 分および 360 分の 3 段階に分けて付与することにより、アンモニア酸化細菌が自ら生産する一酸化窒素による影響を調べた。また、得られた結果に転換率モデルを当てはめ、一酸化窒素の直接的な影響を評価し、mRNA 発現量との関係性を評価した。

亜酸化窒素の収支は、排ガス中の濃度および溶存態の濃度を ECD 検出器付きのガスクロマトグラフィで測定した上で、散気量および気相部液相部の蓄積量変化を算出して求めた。溶存態濃度は、シリンジを用いた平衡法により行なった。また、mRNA の測定は、RNA を抽出・精製後、cDNA を合成後に -20°C で保存した試料について、予め定めた条件にて定量 PCR を用いて測定した。検量線は、相対比較が可能のように、各機能遺伝子について増幅したサンプルから希釈をしたものを検量線とした。各機能遺伝子の mRNA の測定は同一の操作で行なった同一 cDNA 試料から用いたものとし、相対比較が容易かつ正確に行えるように工夫した。

4. 研究成果

(1) 初年度

各機能遺伝子の mRNA 発現量と酵素活性との関係を明らかにすることを目的とし、アンモニア酸化細菌の回分式培養槽を用いて、安定期間の亜酸化窒素生成挙動および関連遺伝子の発現量を調べた。安定運転期においては、アンモニア酸化や亜酸化窒素の生成、加えて amoA 発現量あたりの nirK 及び norB の発現量には大きな変化は見られなかったが、曝気を通常より継続するとアンモニア酸化及び亜酸化窒素生成が増加する一方、amoA 発現量あたりの nirK 及び norB の発現量は低下する傾向があることを見出した。この成果をベースに変化を与えた系の発現量変化と亜酸化窒素生成との関係を追っていくこととした。

(2) 2 年目

2 年目は、窒素または一酸化窒素を 30 分間強制散気することによる影響を調べた。アンモニア酸化は、窒素散気後の曝気工程において減少し、逆に一酸化窒素散気後は若干増加する結果が得られた。亜酸化窒素の生成については、窒素散気後に低下したが、転換率そのものには変化は見られなかった。一方、一酸化窒素散気後は、転換率自体も低下する結果が得られた。これらの結果は、当初想定していた仮説としての一酸化窒素の必要量と存在量とのバランスの影響であることを示唆したが、機能遺伝子発現量の測定結果から裏付けるまでには至らなかった。

(3) 最終年度

3 年目は、機能遺伝子発現量に着目し、アンモニア酸化細菌自身による一酸化窒素生成の影響を調べる実験を行った。通常の回分サイクルの間に、90 分、180 分および 360 分の無酸素工程を設定して引き続く曝気工程におけるアンモニア酸化や亜酸化窒素生成への影響を調べる実験を行った。その結果、無酸素時間中に亜酸化窒素の生成が生じるとともに、引き続く工程においても、亜酸化窒素の生成が増加する傾向が観察された。また、無酸素工程曝露後にはアンモニア酸化そのものは減少する傾向であった。

一方、無酸素工程への曝露により引き続く好気工程の溶存酸素濃度は低く維持される傾向があり、亜酸化窒素の生成に及ぼす影響を直接評価することは困難であった。そこで、溶存酸素濃度および亜硝酸濃度の影響を排除して評価するために、転換率モデルを用いた評価を試みた。その結果、曝気工程の継続とともに直接的な効果としては転換率の減少が観察された(データ省略)。

無酸素条件曝露によって、亜酸化窒素生成に相違が生じたことから、その相違と機能遺伝子発現量の変化との関係を調べた。図 2 に示されるように、amoA 発現量と hao 発現量については、極めて綺麗な相関関係が観察された。即ち、Case-I、Case-II および Case-III のいずれの場合においても、通常のサイクル(0x1)における amoA の相対発現量(白抜き)は、無酸素条件(灰色)及びその後の曝気条件(黒塗り)において減少する傾向を示したが、hao の相対発現量も同程度に低下しており、両者は強い相関関係を示している。このことから、アンモニア酸化に必要なアンモニア酸化酵素(AMO)を生成しようとする際には、併せてヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)の誘導も生じることが示唆された。この傾向は、亜硝酸還元酵素(NIR)に関与する nirK 発現量についても、無酸素工程曝露後の好気工程(黒塗り)で若干高い発現量が示されたが、概ね hao と同様に amoA と強い相関が観察された(データ省略)。一方、一酸化窒素還元酵素(NOR)に関与する norB については、図 3 に示されるように、二つのグループに分けられた。即ち、無酸素工程への曝露によって、amoA の相対発現量が低下する傾向を示す一方、無酸素条件曝露時(灰色)やその後の曝気工程(黒塗り)において norB の相対発現量は、必ずしも低下する傾向を示さず、逆に多くの場合、増大する傾向を示した。このことは、無酸素状態へ曝露させることで、アンモニア酸化の必要性(amoA の発現量)とは無関係に、norB 発現量が増えたと考えられ、一酸化窒素による阻害の防御機能であることが推察された。

また、上述の通り、本実験系では無酸素条件を付与した後にその直接的な影響として亜酸化窒素生成が低下したことから、norB 発現量の相対的な増加と同時に、nirK の相対的な応答抑制が生じ、結果として、直接的な影響としての亜酸化窒素生成の減少が生じたのではないかと推察される。

以上の結果から、アンモニア酸化に必要な量以上に一酸化窒素が存在する場合には、アン

モニア酸化を促進させる *amoA* の発現は抑制された状態で *norB* の発現が促進されていることが示唆された。即ち、図4に示されるように、無酸素条件に曝露させたことでアンモニア酸化活性が低下していることから、その後の曝気工程における一酸化窒素の必要性が低下した状態であったと考えられる。そのため、*nirK* の発現量も *amoA* に比して変化がなかったと考えられる。一方、無酸素条件下で生成された外部の一酸化窒素が必要量に対して生成が過剰になるため、阻害緩和をするために一酸化窒素を分解する必要性が生じ、*norB* 発現量が *amoA* 発現量に比して増大した可能性を示唆している。

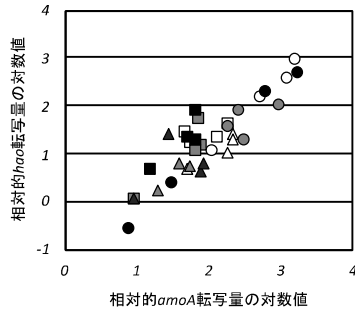


図2 無酸素工程360分曝露後の *amoA* と *hao* の転写量比較

○ Case-I Ox1 △ Case-II Ox1 □ Case-III Ox1
● Case-I Ax ▲ Case-II Ax ■ Case-III Ax
● Case-I Ox2 ▲ Case-II Ox2 ■ Case-III Ox2

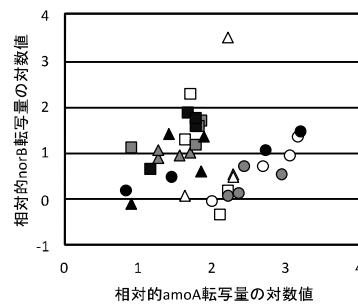


図3 無酸素工程360分曝露後の *amoA* と *norB* の転写量比較

○ Case-I Ox1 △ Case-II Ox1 □ Case-III Ox1
● Case-I Ax ▲ Case-II Ax ■ Case-III Ax
● Case-I Ox2 ▲ Case-II Ox2 ■ Case-III Ox2

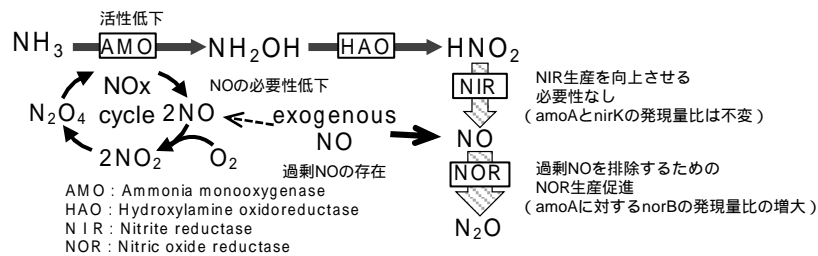


図4 本研究結果から想定された一酸化窒素過剰時の亜酸化窒素生成増大メカニズム

上記の通り、アンモニア酸化に必要な一酸化窒素よりも多くの一酸化窒素が存在する場合については、当初想定したメカニズム通りの結果が得られたと考えられる。但し、水中に存在する一酸化窒素量がアンモニア酸化に必要な一酸化窒素量よりも少ない場合や、アンモニア酸化に必要な量と同程度の一酸化窒素が存在する場合についての検証までには至らなかった。特に、図5に示されるように、一酸化窒素の必要量に対して滴量存在する場合の *nirK* 及び *norB* 発現量の挙動を調べることは、亜酸化窒素生成抑制の制御法につながる重要な検証事項である。本研究により、手法の有効性が確認できたことから、本研究成果を基に、今後、早期に検証を行いたいと考えている。

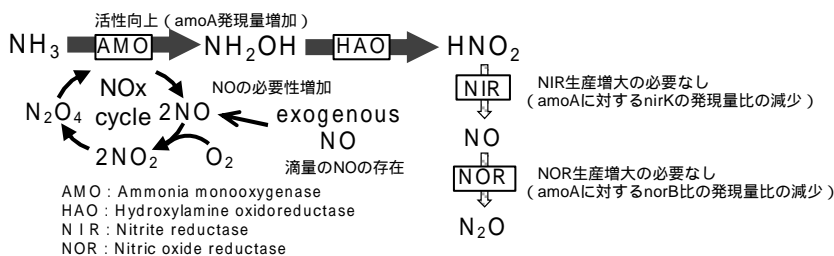


図5 今後検証すべき一酸化窒素滴量存在時の亜酸化窒素生成抑制メカニズム

参考文献

- 1) 齋藤利晃, 赤城大史, 藤井大地, 小沼晋, 吉田征史. アンモニア酸化細菌の亜酸化窒素生成に及ぼす一酸化窒素散気の直接的影響の評価. 水環境学会誌, 45 巻 3 号, 107-114. DOI <https://doi.org/10.2965/jsw.45.107>

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 0件）

1. 発表者名 池ヶ谷祥吾, 齋藤利晃, 吉田征史
2. 発表標題 無酸素状態履歴がアンモニア酸化細菌の亜酸化窒素生成および関連遺伝子のmRNA転写量挙動に及ぼす影響
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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