

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 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21770028

研究課題名（和文） 自然生態系におけるアンモニア酸化アーキアの二酸化炭素固定に関する分子生態学的研究

研究課題名（英文） Molecular ecological study on fixing carbon dioxides by an ammonia-oxidizing archaea in natural ecosystems

研究代表者

中川 達功（NAKAGAWA TATSUNORI）

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：40434104

研究成果の概要（和文）：

自然生態系における二酸化炭素固定能を有するアンモニア酸化アーキアが存在量を調べるため、次の実験を試みた。(1)アンモニア酸化アーキア培養系の確立、(2)安定同位体 DNA プローブ法によるアンモニア酸化アーキアの炭酸固定、(3)低アンモニウムに対するアンモニア酸化アーキアの二酸化炭素固定能関連遺伝子の発現解析。これらの解析により、自然生態系におけるアンモニア酸化アーキアの二酸化炭素固定が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the abundance of ammonia-oxidizing archaea to be able to fix carbon dioxide in nature, the following experiments were conducted. (1) establishment of ammonia-oxidizing archaea culture, (2) bicarbonate fixation of ammonia-oxidizing archaea by using stable isotope probing method, (3) transcription involved in fixation carbon dioxide toward low ammonium. These analyses suggested the fixation carbon dioxide by ammonia-oxidizing archaea in nature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：分子生態

1. 研究開始当初の背景

化学独立栄養性のアンモニア酸化微生物は二酸化炭素を固定し、土壌や海洋に広く分布する微生物であることから、地球環境の炭素循環の一部を担っていると考えられている。2005 年のアンモニア酸化アーキアの発見

以降、アンモニア酸化性アーキアは、海洋と土壌において量的にも多様性においても既存のアンモニア酸化バクテリアと同等あるいはそれを上回るといったデータが続々と世界中で報告されてきた。それまでアーキアは高温や低 pH などの極限環境といった限られた環境での生息が知られていた。しかし、

アンモニア酸化アーキアが地球上の大部分を占める海洋や土壌から発見された。このアンモニアを酸化するアーキアの発見は、20世紀までの地球規模の窒素や炭素の物質循環に関わる微生物の役割の常識を新しく塗り替える可能性を持つことから、世界的に衝撃的なニュースであった。その後、日本の海洋（沿岸海域から深海まで）や土壌環境（森林、畑、水田）、さらにはタイ王国の酸性硫酸塩土壌において、アンモニア酸化アーキアの量や多様性に関するデータが報告されてきた。しかしながら、培養法が確立されていない現状では、自然生態系における物質循環へのアンモニア酸化性アーキアの貢献度は未知であった。そこで、本研究では自然生態系におけるアンモニア酸化アーキアの二酸化炭素固定について調べた。

2. 研究の目的

海砂や土壌を試料として安定同位体 DNA プローブ法、および分子生態学的手法を用い、海洋や土壌中にどのくらい二酸化炭素固定能を有する難培養性アンモニア酸化アーキアが存在するのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の研究の目的を達成するため、次の実験を実施した。

- (1) 既存のアンモニア酸化細菌や集積培養されたアンモニア酸化アーキアをコントロールとして使用し、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を用いた安定同位体 DNA プローブ法を確立。
- (2) 既存のアンモニア酸化細菌や集積培養されたアンモニア酸化アーキアを使用して、アンモニア酸化細菌の活性のみを阻害する物質を探索。
- (3) 海底砂や土壌に $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 添加のインキュベーション実験を行い、安定同位体 DNA プローブ法コントロールとの比較実験。
- (4) アンモニア酸化アーキアの二酸化炭素固定能関連遺伝子を検出するための分子マーカー (PCR プライマー) の探索とその遺伝子の定量化技術の確立。
- (5) 海洋環境を模擬した低アンモニウム培養でのアンモニア酸化アーキアの二酸化炭素固定能関連遺伝子の発現解析。

4. 研究成果

(1) 新規アンモニア酸化アーキア集積培養系の確立

静岡県下田市のアマモ場の砂から、アンモニア酸化アーキア '*Nitrosopumilus sp.*' NM25 集積培養系を確立することに成功した。集積培養されたアンモニア酸化アーキアは '*Nitrosopumilus maritimus*' SCM1 株のアンモニアモノオキシゲナーゼ (*amoA*) 遺伝子と 93%、16S rRNA 遺伝子では 98%の相同性を示した。

(2) 安定同位体 DNA プローブ法によるアンモニア酸化アーキアの炭酸固定

アンモニア酸化アーキアの炭酸固定機能について調べるため、次の実験を実施した。(1) 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸回路内の HCO_3^- 固定を担う Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) をコードする遺伝子 (*accA*)、および同回路のみで確認される 4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase (HCD) をコードする遺伝子 (*hcd*) を標的とする PCR プライマーの有効性の判定、(2) 安定同位体プローブ法を用いた '*Nitrosopumilus sp.*' NM25 の炭酸 (HCO_3^-) 固定機能の有無の調査。

集積培養系から抽出された DNA からは、*accA* 遺伝子と *hcd* 遺伝子が検出された。一方、環境試料に対しては、*hcd* 遺伝子用 PCR プライマーが有効であることが確認された。安定同位体プローブ法により、'*Nitrosopumilus sp.*' NM25 の炭酸固定機能が確認された。これらの結果より、'*Nitrosopumilus sp.*' NM25 は 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸回路を利用して炭酸固定を行う独立栄養性アーキアであることが示唆された。

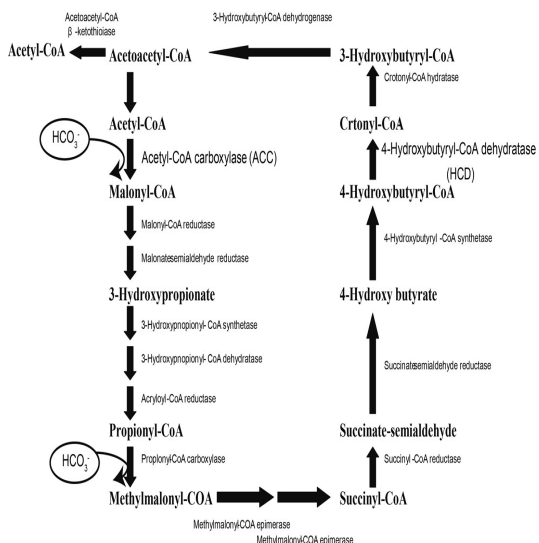


図 1. アンモニア酸化アーキアによる独立栄養性炭素固定のための 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸回路

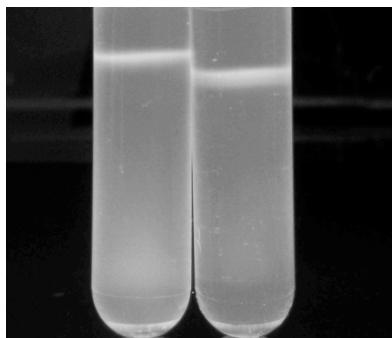


図 2. 密度勾配沈降平衡法による ^{12}C ラベルされた DNA (左) と ^{13}C ラベルされた DNA (右) の分画

(3) 低アンモニウムに対するアンモニア酸化アーキアの二酸化炭素固定能関連遺伝子の発現解析

環境中の炭酸固定遺伝子発現量の定量化と発現量と環境因子（特にアンモニウムイオン濃度）の関係を調べるため、アンモニア酸化アーキア '*Nitrosopumilus maritimus*' SCM1 株を用いた新規インキュベーション実験に基づく炭酸固定遺伝子発現量の定量解析を実施した。

新規インキュベーション実験では実際の海洋環境と同レベル（約 $10 \mu\text{M NH}_4^+$ ）のアンモニウムイオン濃度を安定的にアンモニア酸化アーキア純粋株に供給することができた。この結果により、研究室において海洋環境を模擬したアンモニウムイオン濃度条件下でのアンモニア酸化アーキア純粋株の遺伝子発現量のモニタリングが可能になった。

炭酸固定関連遺伝子 *hcd* と *amoA* の mRNA 量の変化をモニタリングするため、定量的逆転写-PCR に用いる RNA スタンダードの作成、定量的逆転写-PCR の反応条件の検討を実施した。その結果、海洋環境を模擬した低アンモニウムイオン濃度での *hcd* 遺伝子の mRNA 量の変化のモニタリングに成功し、菌数の増殖も確認された。

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 1 件）

- ① Matsutani, N., T. Nakagawa, K. Nakamura, R. Takahashi, K. Yoshihara and T. Tokuyama. Enrichment of a novel marine ammonia-oxidizing archaeon obtained from sand of an eelgrass zone. *Microbes and Environments*, 26, 23-29, 2011
DOI: 10.1264/jsme2.ME10156

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① Nakagawa T, Y Ando, R Ihii, R Takahashi. Influence of ammonium concentration on *amoA* mRNA levels of ammonia-oxidizing archaea within sand of an eelgrass zone (Shimoda, Japan). 14th International Symposium on Microbial Ecology, August 19-24 (2012)、デンマーク、コペンハーゲン
- ② Nakagawa T, Y Ando, R Takahashi. Influence of ammonium concentration on *amoA* mRNA levels of ammonia-oxidizing archaea within sand of an eelgrass zone. asm2012 112th General Meeting, June 16-19 (2012)、アメリカ、サンフランシスコ
- ③ 中村恭子、高橋令二、中川達功. 海洋性アンモニア酸化アーキア '*Nitrosopumilus sp.*' NM25 の炭酸固定とアンモニア酸化. 第 27 回日本微生物生態学会大会. 京都大学. 2011 年 10 月 8 日.
- ④ 中川達功、安藤善史、石井涼、吉原喜好、高橋令二、徳山龍明. 静岡県下田市田ノ浦湾のアマモ群落底砂におけるアンモニア酸化性微生物のアンモニア酸化活性に対するアンモニア濃度の影響. 第 26 回日本微生物生態学会大会. 筑波大学. 2010 年 11 月 25 日.
- ⑤ 中村恭子、中川達功、高橋令二、徳山龍明. 安定同位体プローブ法を用いた海洋性アンモニア酸化アーキア '*Nitrosopumilus sp.*' NM25 の炭酸固定の解析. 第 62 回日本生物工学会大会. 宮崎シーガイア. 2010 年 10 月 28 日.
- ⑥ 中川達功、松谷直樹、中村恭子、高橋令二、吉原喜好、徳山龍明. 海洋性アンモニア酸化アーキア集積培養系の確立とその群集構造解析. 第 62 回日本生物工学会大会. 宮崎シーガイア. 2010 年 10 月 28 日.
- ⑦ Nakagawa T., N Matsutani, K Nakamura,

R Takahashi, K Yoshihara, T Tokuyama.
A novel marine ammonia-oxidizing
crenarchaeote '*Candidatus Nitro-*
sopumilus sp. NM25' enriched under
high ammonium concentration. The 13th
International Symposium on Microbial
Ecology. アメリカ・シアトル. 2010年
8月26日.

- ⑧ 松谷直樹、安藤善史、中川達功、高橋令
二、吉原喜好、徳山龍明. 海水性アンモ
ニア酸化アーキアの集積培養系の確立
とその群集構造解析. 第25回日本微生物
生態学会大会. 広島大学. 2009年11
月21日.
- ⑨ 松谷直樹、安藤善史、中川達功、高橋令
二、吉原喜好、徳山龍明. アマモ群落底
砂由来のアンモニア酸化アーキアの培
養系と現場底砂の群集構造比較. 第61
回日本生物工学会大会. 名古屋大学.
2009年9月24日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~biken/index/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 達功 (NAKAGAWA TATSUNORI)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号: 40434104

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: