

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：22540499

研究課題名（和文）同位体地球化学と微生物学の結合による熱水系の窒素動態解析

研究課題名（英文）Nitrogen dynamics in geo- and hydro-thermal environments elucidated from isotope geochemistry and microbiology

研究代表者

西澤 学（NISHIZAWA MANABU）

独立行政法人海洋研究開発機構・システム地球ラボ・研究員

研究者番号：60447539

研究成果の概要（和文）：本研究では、アンモニアに富む熱水帯とアンモニアに乏しい熱水帯での窒素動態に関する新知見を得た。アンモニアに富む熱水帯では好熱古細菌のアンモニア酸化代謝を起点とした一連の窒素異化代謝が、熱水生態系のエネルギー獲得機構として重要であることを初めて定量的に示した。アンモニアに乏しい海底下熱水帯では超好熱メタン菌による窒素固定が生物生産を規定する鍵反応である可能性が高いことを初めて示した。

研究成果の概要（英文）：This study first showed that ammonia oxidation by thermophilic archaea mainly provided chemical energy for the development of microbial community in an ammonia-rich hot spring. In contrast, culture experiments first suggest that nitrogen fixation by hyperthermophilic methanogen is a key process to regulate primary production of subsurface microbial communities in ammonia-poor hydrothermal environments.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：生物地球化学、熱水域、窒素動態、微生物、同位体、環境遺伝子

1. 研究開始当初の背景

熱水系における窒素動態の理解は、極限環境下での微生物地球相互作用や初期生命進化の理解においてきわめて重要である。近年、動態解析の基盤となる（超）好熱菌の窒素代謝能を推定するための遺伝子情報が蓄積しつつある。しかし、熱水環境条件下で実際に好熱菌が行う窒素代謝の種類や速度はあまりわかっていなかった。また地球化学の研究と微生物生態学の研究はこれまで別個に行われてきたため、実際の熱水環境におけ

る窒素動態は未知であった。したがって、これらの問題を克服するためには熱水環境に卓越する主要な好熱菌の窒素代謝に関する実験的研究や熱水に溶存する窒素化合物の同位体地球化学解析と環境 DNA 解析を直接結合させた観測研究が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では環境 DNA 観測、溶存窒素化合物の同位体地球化学観測ならびに培養実験

による好熱菌の窒素代謝活性測定から熱水環境における窒素代謝-反応速度-微生物種との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

熱水環境の微生物群集組成を明らかにするため、環境 DNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った。熱水環境の窒素代謝機能遺伝子の種類と存在量を測定するため、環境 DNA に含まれるアンモニア酸化酵素遺伝子、亜硝酸還元酵素遺伝子のクローン解析と定量 PCR を行った。熱水や堆積物間隙水に溶存する各種窒素化合物の定量ならびに同位体分析を行った。アンモニアは比色法にて定量し、亜硝酸と硝酸は陰イオンクロマトグラフィー (UV-HPLC 法) にて定量した。一方で、各窒素化合物は一酸化二窒素 (N_2O) に変換し、質量分析計にて窒素同位体比を測定した (GC-IRMS 法)。超好熱メタン菌の窒素同化の種類・生理学・カイネティクス・同位体効果を解明するため、実際の海底下環境を模した様々な化学条件 (水素濃度、鉄濃度、モリブデン濃度) で培養実験を行った。

4. 研究成果

熱水帯の窒素動態は、アンモニアに富む熱水帯とアンモニアに乏しい熱水帯で大きく異なると予想される。そこで、本研究ではアンモニアに富む熱水帯・温泉帯の窒素動態ならびにアンモニアに乏しい熱水帯を対象として以下の成果を得た。

(1) アンモニアに富む地下温泉帯の生物地球化学調査を行い、温泉水に溶存する窒素化合物の濃度・同位体組成ならびに温泉に発達した微生物マットの菌相と窒素代謝機能遺伝子の網羅的解析を行った。また微生物マットを使った活性測定を行い、硝化や脱窒のポテンシャル速度を計測した。その結果、この温泉地帯では好熱古細菌 (*Ca. Nitrosocaldus* sp.) が行うアンモニア酸化を起点とした一連の窒素エネルギー代謝 (硝化、脱窒) が、収量とフラックスの点からマット生態系の一次生産を支える重要な代謝であることが判明した (図 1、2)。本研究は、アンモニアに富む温泉帯での窒素動態を定量的に記述するとともに、現場窒素動態と微生物群集の分布・存在量・機能との関係を明らかにした初めての例となった (論文成果①)。また、上述の好熱古細菌に近縁の遺伝子は世界各地の地熱帯から普遍的に検出されることが知られているが、生息環境での生理は未知であった (Zhang et al., 2008 AEM)。今回得られた研究成果から、地熱帯においては普遍的に好熱古細菌がアンモニア酸化を行い、生態系を支える化学エネルギーを供給しているとともに窒素循環を駆動していると考えら

れる。

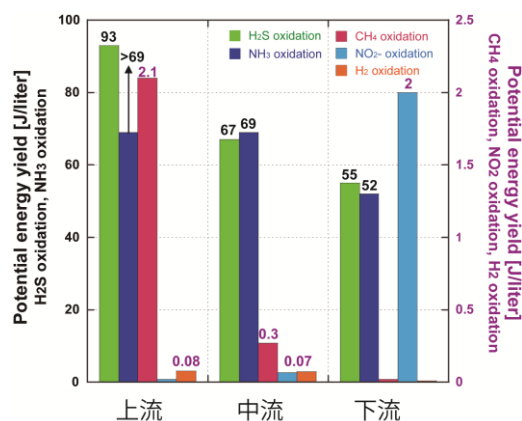


図 1、地下温泉のエネルギー収量

(2) アンモニアに富む海底熱水帯として沖縄トラフ伊平屋北熱水活動域を調査対象とした。研究船「ちきゅう」による沖縄トラフ熱水活動域の掘削航海 (IODP exp. 331) に参加し、活動域の周縁部から中心部にわたって堆積物コア試料と間隙水試料を採取した。船上ならびに陸上の実験室で間隙水溶存窒素化合物ならびに堆積物全窒素の定量と同位体解析をおこない、海底下をも含めた熱水帯の窒素動態を推察するための基盤的知見を初めて得た。掘削コアの性状と間隙水の多成分化学組成分析の結果から、伊平屋北熱水域では海底下を水平方向に流れる複数の熱水が存在することが本航海により明らかにされた (論文成果③、⑤)。本研究から、間隙水の硝酸が海底下の熱水の流れを検知する化学トレーサーになること、海底下での熱水と低温海水の混合領域ではアンモニア濃度は硫酸濃度と逆相関を示すことが分かった (論文準備中)。後者は、混合領域で微生物によるアンモニア酸化硫酸還元という新規の代謝が起きている可能性を示唆し、培養実験による直接的な検証が今後重要となる。

(3) 中央海嶺海底熱水域に代表されるアンモニアに乏しい熱水帯での海底下生態系の生物生産を規定するメカニズムを明らかにするため、鍵反応と考えられる超好熱菌の窒素同化 (窒素固定、アンモニア同化、硝酸同化) に注目した。特に、地球史を通じて水素に富む熱水域で主要な一次生産者と考えられている超好熱メタン菌を対象として培養実験を行った。実験の結果、超好熱メタン菌は窒素分子とアンモニアを同化するが、現在の海水に豊富に存在する硝酸は同化できないこと、窒素固定に不可欠なモリブデンに乏しい条件下でも活発に窒素固定を行うこと、細胞あたりの窒素固定速度は海洋で主要な光合成細菌の窒素固定速度より一ケタ高い

ことが明らかとなった。これらの事実はアンモニアに乏しい海底下熱水帯では超好熱メタン菌による窒素固定が生物生産を規定する鍵反応である可能性が高いことを実験から初めて体系的に示した点で重要である（論文投稿中）。一方で、アンモニアに乏しいマリアナ熱水域やインド洋中央海嶺熱水域について実地調査を行い、熱水やチムニー試料の採取を行った。今後は、これらの試料を用いた微生物・地球化学解析により実際の環境で窒素固定が行われているのか、どれくらいの速度で行われているのかを観測することが重要となる。

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 11 件）

- ① Nishizawa, M., Koba, K., Makabe, A., Yoshida, N., Kaneko, M., Hirao, S., Ishibashi, J., Yamanaka, T., Shibuya, T., Kikuchi, T., Hirai, M., Miyazaki, J., Nunoura, T., Takai, K. (2013) Nitrification-driven forms of nitrogen metabolism in microbial mat communities thriving along an ammonium-enriched subsurface geothermal stream. *Geochim. Cosmochim. Acta* 113, 152-173. 査読有。
 - ② Nunoura, T., Nishizawa, M., Kikuchi, T., Tsubouchi, T., Hirai, M., Koide, O., Miyazaki, J., Hirayama, H., Koba, K., Takai, K. (2013) Molecular biological and isotopic biogeochemical prognoses of the nitrification-driven dynamic microbial nitrogen cycle in hadopelagic sediments. *Environmental Microbiology*, doi: 10.1111/1462-2920.12152. 査読有。
 - ③ Takai, K., Mottl, M. J., Nielsen, S.H.H., the IODP Expedition 331 Scientists (2012) IODP Expedition 331: Strong and Expansive Subseafloor Hydrothermal Activities in the Okinawa Trough, *Scientific Drilling*, 13, 19-27, doi:10.2204/iodp.sd.13.03.2011. 査読無。
 - ④ Morono, Y., Terada, T., Nishizawa, M., Ito, M., Hillion, F., Takahata, N., Sano, Y., Inagaki, F. (2011) Carbon and nitrogen assimilation in deep subseafloor microbial cells. *Proc. National Aca. Sci. USA* 108, 18295-18300. 査読有。
 - ⑤ Expedition 331 Scientists, Integrated Ocean Drilling Program Expedition 331 Preliminary Report (Deep Hot Biosphere, 1 September-3 October 2010), doi:10.2204/iodp.pr.331.2010. 査読有。
- 〔学会発表〕（計 10 件）
- ① Nishizawa, M., Takai, K. Compositional and isotopic properties of nitrogen in subseafloor hydrothermal environments at the Iheya North field in the mid-Okinawa Trough. AGU Fall meeting 2012, San Francisco, USA, December 3, 2012.
 - ② Nishizawa, M., Aoyama, S., Ueno, Y., Takai, K. Chemical and isotopic compositions of sulfur and nitrogen in subseafloor hydrothermal environments at the Iheya North field in the mid-Okinawa Trough. IODP331 2nd Post-cruise meeting, Hawaii, USA, November 12, 2012
 - ③ 西澤学、布浦拓郎、平井美穂、真壁明子、柳川勝紀、野牧秀隆、北橋倫、木庭啓介、高井研「海溝堆積物における窒素動態と微生物生態」、第 4 回日韓微生物生態シンポジウム、豊橋技術科学大学、2012 年 9 月 20 日
 - ④ 西澤学、宮崎淳一、木庭啓介、高井研「超好熱メタン生成菌の窒素固定：金属要求性と窒素同位体システムティクス」2011 年度日本地球化学会年会、北海道大学札幌キャンパス、2011 年 9 月 14 日
 - ⑤ Nishizawa, M., Koba, K., Makabe, A., Yoshida, N., Hirai, M., Miyazaki, J., Nunoura, T., Takai, K. Linking nitrogen isotope systematics and microbiology in a subsurface geothermal water stream, Hishikari Gold mine, Japan. Goldschmidt2011, Prague, Czech, August 15, 2011.
 - ⑥ Nishizawa, M., Miyazaki, J., Takai, K., Isotopic effects and kinetics of nitrogen fixation by hyperthermophilic methanogen: Insight into nitrogen biogeochemistry in the contemporary and ancient hydrothermal ecosystem. Astrobiology Science Conference 2010 (AbSciCon 2010), League City, Texas, USA, 26th April, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 学 (Nishizawa Manabu)
独立行政法人海洋研究開発機構・システム
地球ラボ・研究員
研究者番号：60447539

(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

(3) 連携研究者

なし