

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710012

研究課題名(和文) 新規な二重標識トレーサー法による硝化細菌が持つ2つのN₂O生成経路の分別定量研究課題名(英文) Quantification of the contribution of each pathway in N₂O production from nitrifying bacteria by using a dual-labeled tracer technique

研究代表者

勝山 千恵 (KATSUYAMA, Chie)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：10580061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：好気性アンモニア酸化細菌が温室効果ガス亜酸化窒素(N₂O)を生成する2つの経路(アンモニア酸化過程および硝化菌脱窒過程)を、¹⁵Nおよび¹⁸O安定同位体トレーサーを用いて分別定量するために、(1)調製した各種標識N₂Oガスを用いて、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)におけるN₂Oのフラグメント効率やスクランブル比を求めた。(2) Nitrosomonas属細菌の純粋培養株の細胞懸濁液を用いてN₂O生成速度を定量したところ、N₂O生成の第3の経路(ハイブリッドN₂Oの生成)が新たに示された。N₂O生成に対する3つの経路のそれぞれの寄与率は菌株によって異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ammonia-oxidizing bacteria (AOB) have been shown to produce nitrous oxide (N₂O) from hydroxylamine (NH₂OH) during ammonia oxidization and/or from nitrite (NO₂⁻) during nitrifier denitrification under aerobic condition. The aim of this study is to determine which mechanisms are responsible for producing N₂O by AOB species using a ¹⁵N and ¹⁸O tracer technique. (1) The fragmentation and the scrambling ratio of N₂O were determined by GC/MS. (2) Cell suspension of Nitrosomonas strains formed hybrid N₂O from NH₂OH and NO₂⁻. The dominant pathway in N₂O production differed among Nitrosomonas strains under a condition, where they were allowed to grow optimally.

研究分野：微生物生態学

キーワード：安定同位体トレーサー アンモニア酸化細菌 亜酸化窒素 硝化 脱窒 窒素循環 温室効果ガス ガスクロマトグラフィー質量分析計

1. 研究開始当初の背景

好気性アンモニア酸化細菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) は温室効果ガスおよびオゾン層破壊の原因となる亜酸化窒素 (N_2O) を生成し、性格の異なる2つの生成経路を持つ; アンモニア酸化過程におけるヒドロキシルアミン (NH_2OH) 由来 (図1) および硝化菌脱室過程における亜硝酸塩 (NO_2^-) 由来 (図1)。しかし、これらの経路を明確に分別して定量できる方法がなく、それぞれの寄与は不明であり、 N_2O 発生を抑制するための操作因子を割り出すことは難しい。例えば、大量の窒素成分が集約されるシステム廃水処理系から発生する N_2O は量的にも多く、また技術的な対応も可能なことから、その低減技術の開発が課題となっているが、ここでの N_2O 発生において、どちらの経路が優占するのかは明らかになっていない。 N_2O 低減に向けた廃水処理システムの制御には、 N_2O 発生における両者の寄与率を特定する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が改良したガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) と2種類の安定同位体 ^{15}N , ^{18}O を用いて、アンモニア酸化からの N_2O と硝化菌脱室からの N_2O を正確に分別定量する簡便な新しい方法 (二重標識トレーサー法) を確立し、純粋培養アンモニア酸化細菌を用いて2つの経路の寄与を明らかにすることを目的とした。具体的には、*Nitrosomonas* 属細菌においてそれぞれの N_2O 生成経路の寄与を分別し、優占する N_2O 生成経路が菌株により異なるのかどうか比較することを目的とした。

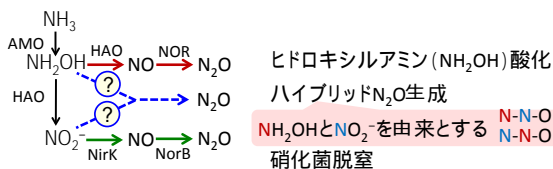


図1 *Nitrosomonas europaea* による既知の N_2O 生成経路 (実線) と未知の N_2O 生成経路 (破線)

3. 研究の方法

(1) N_2O のフラグメント解析

本研究では、申請者が改良した GC/MS システムを使用することで、高感度、短時間で微生物の代謝ガスを測定することが可能である (Isobe et al., JBB 2011, 84: 46-51)。このシステムですでに確立した ^{15}N トレーサー測定法 (Isobe et al., M&E 2011, 26: 46-53) を基に、 N_2O の発生源特定に必須な N 標識位置の分析技術 (N_2O のフラグメント解析) を確立した。化学的に亜硝酸イオン (NO_2^-) から N_2O に変換するアザイド法 (McIlvin & Altabet,

Anal. Chem. 2005, 77: 5589-5595) や脱窒菌により各種標識 N_2O を調製した。Garber & Hollocher (JBC 1982, 257: 4705-4708) に倣い、調製した N_2O ガスを用いて当研究室の GC/MS における N_2O のフラグメント効率や標識位置のスクランプリング比を求めた。

(2) AOB の N_2O 生成経路の分別定量

中央大学理工学部諏訪教授 (当研究室) が純粋分離、保持し、国際共同研究により全ゲノム配列が明らかになっている貧栄養性の *Nitrosomonas* sp. AL212 株 (Suwa et al., J. Bacteriol. 2011, 193: 5047-5048) および JL21 株、type strain である富栄養性の *N. europaea* ATCC 25978 株および全ゲノム解析済みでもっともよく研究されてきた *N. europaea* ATCC 19718 株を用いた。細胞懸濁液に NH_4^+ , NH_2OH , NO_2^- , H_2O の ^{15}N , ^{18}O 標識試薬を組み合わせ加え、好氣的に 27 で培養した。生成される N_2O の ^{15}N , ^{18}O 標識率と標識位置を GC/MS により分析した。 N_2O の組成から、 N_2O 生成へのアンモニア酸化と硝化菌脱室の寄与率を算出した。

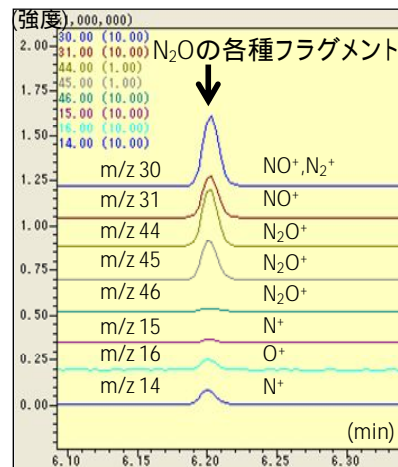


図2 GC/MS イオン源で生じる N_2O フラグメントイオン

4. 研究成果

(1) N_2O のフラグメント解析

まず、GC/MS イオン源で生じる各種 N_2O フラグメントイオンを検出した (図2)。化学的に亜硝酸塩 (NO_2^-) から N_2O に変換するアザイド法により片側 ^{15}N 標識ガス ^{14}N - ^{15}N -O の再現性の良い調製条件を設定した。調製した N_2O ガスを用いて、 ^{15}N 標識位置の計算に必要な N_2O のフラグメント効率やスクランプリング比を求めた。

(2) AOB の N_2O 生成経路の分別定量

すべての菌株について、 N_2O 発生量は電子供与体として NH_4^+ を入れたときよりも NH_2OH を入れた時の方が高かった。 NH_2OH

と $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加したときに、 NH_2OH 由来の N_2O ($^{14}\text{N}_2\text{O}$, m/z 44)、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 由来の N_2O ($^{15}\text{N}_2\text{O}$, m/z 45) に加え、 NH_2OH と $^{15}\text{NO}_2^-$ から一原子ずつ N を由来とする N_2O ($^{14,15}\text{N}_2\text{O}$, m/z 46) が生成された (図3)。全 N_2O 生成速度に対する $^{14,15}\text{N}_2\text{O}$ の生成速度は、AL212 株で約 8-9 割、JL21 株で約 7 割、ATCC 25978 株で約 3 割、というように *Nitrosomonas* 属細菌の菌株によって N_2O 生成の優占メカニズムが異なることが示された。また、 N_2O 生成と同時に培養液中の NO_2^- 濃度および NO_2^- の ^{15}N 標識率を同時モニタリングした (図4)。ヒドロキシルアミン酸化による NO_2^- 生成に伴う NO_2^- プール内の ^{15}N 標識率の減少 (図4B) を加味しても、この $^{14,15}\text{N}_2\text{O}$ 生成はヒドロキシルアミン酸化と硝化菌脱窒の2つの経路のみでは説明できない割合の比率で生成され、またオートクレーブ滅菌した細胞懸濁液よりも有意に多く生成されたことが示された。このことから、AOB による N_2O 生成の第3の経路 (ハイブリッド N_2O の生成) が示唆された (図1)。ハイブリッド N_2O の生成は脱窒菌では報告されているが、AOB では報告がなく、新規な経路と考えられる。 N_2O のフラグメント解析から、このハイブリッド N_2O では、N-N-O の中央と端の N に NH_2OH と $^{15}\text{NO}_2^-$ から一原子ずつ均等に N が入っていることがわかった。 NH_2OH と $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加したときに ATCC 19718 株の細胞懸濁液から生成される N_2O に対する各経路の寄与率を、 N_2O および NO_2^- の ^{15}N 標識率から試算したところ、ハイブリッド N_2O が 80% を占めることが示された。 ^{18}O を用いた培養実験では、 $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ からの N_2O 生成経路において ^{18}O をトレースできることが示された。 $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ からの N_2O 生成過程では、O 原子が水もしくは分子状酸素から入り込むことが示唆された。

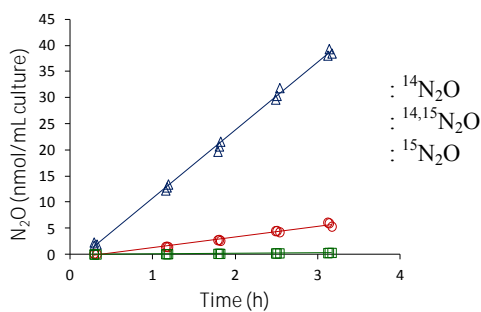


図3 1 mM NH_2OH および 1 mM $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加して培養した時の AL212 株による N_2O 生成

以上より、AOB による新規な N_2O 生成経路としてハイブリッド N_2O の生成が示唆された。想定した2つの経路だけでなく第3の経路の存在が示され、生成経路の分別は当初予定より複雑であることがわかった。そのため、 ^{18}O トレーサーを用いて3つの N_2O 生成

経路を精確に分別定量するためには、第3の経路のメカニズム解明が必須である。現在、ハイブリッド N_2O 生成メカニズムの解明に着手している。

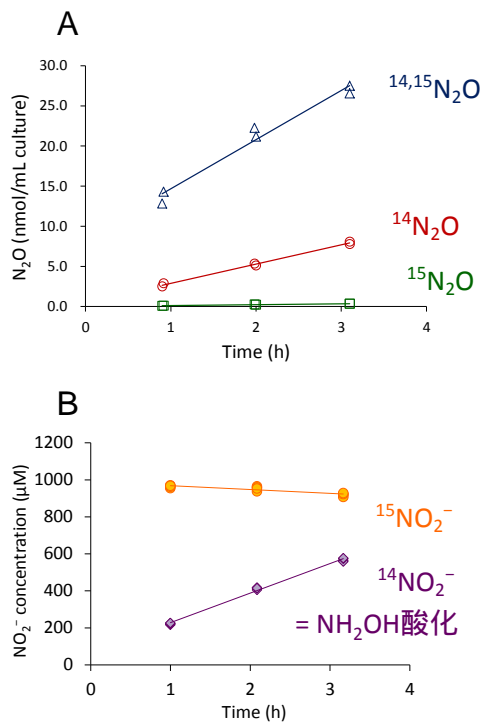


図4 AL212 株細胞懸濁液における (A) N_2O および (B) NO_2^- の同時モニタリング

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)

[学会発表] (計4件)

Chie Katsuyama, Keisuke Koba, Yuichi Suwa. Evidence of hybrid N_2O production from NH_2OH and NO_2^- in cell suspension of oligotrophic ammonia-oxidizing bacterial strain *Nitrosomonas* sp. AL212 using a ^{15}N and ^{18}O tracer technique. 14th International Symposium on Microbial Ecology (19-24 Aug. 2012, Copenhagen, Denmark)

勝山千恵, 大手信人, 加藤憲二, 諏訪裕一. 森林生態系の地下水帯における亜酸化窒素の発生と消費メカニズムの解明に向けた安定同位体の利用. 第28回日本微生物生態学会大会, シンポジウム JS-S06a: 窒素循環と微生物群集・機能: 最先端研究の現場より (2012年9月20-22日, 豊橋技術科学大学, 愛知).

Chie Katsuyama, Keisuke Koba and Yuichi Suwa. Dominant pathway in nitrous oxide production may differ among *Nitrosomonas* strains. 3rd International Conference on

Nitrification (ICoN3), (2-5 Sep. 2013, Tokyo, Japan)

勝山千恵, 木庭啓介, 諏訪裕一. アンモニア酸化細菌の菌株により異なる亜酸化窒素の発生特性. 第 29 回日本微生物生態学会大会 (2013 年 11 月 23-25 日, 鹿児島大学, 鹿児島).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝山 千恵 (KATSUYAMA, Chie)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号: 10580061