

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26701003

研究課題名(和文)アンモニア酸化細菌による新規ハイブリッド亜酸化窒素生成のメカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of hybrid N₂O production mechanisms by ammonia-oxidizing bacteria

研究代表者

勝山 千恵 (Katsuyama, Chie)

広島大学・総合科学研究科・助教

研究者番号：10580061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：好気性アンモニア酸化細菌によるヒドロキシルアミンおよび亜硝酸塩のNを一つずつ由来とするハイブリッド亜酸化窒素(N₂O)生成のメカニズムを¹⁵Nトレーサー法により推測した。好気的なハイブリッドN₂O生成はアンモニアからのヒドロキシルアミン供給に依存することが明らかになった。基質の組み合わせに応答するN₂O生成速度とそれに占めるハイブリッドN₂O生成の割合は菌株によって異なった。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of hybrid nitrous oxide (N₂O) production by aerobic ammonia-oxidizing bacteria, a combination of one nitrogen from hydroxylamine and the other from nitrite, were analyzed by using ¹⁵N tracer. In the presence of nitrite, hybrid N₂O was aerobically produced with hydroxylamine from ammonia, but not with ammonia directly. Processing ammonia and N-oxides and ratio of hybrid N₂O in total N₂O production were different between Nitrosomonas strains.

研究分野：微生物生態学

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

1. 研究開始当初の背景

温室効果ガスおよびオゾン層破壊ガスである亜酸化窒素 (N_2O) の主な生成源は、陸域生態系における微生物の窒素循環過程である。好気性アンモニア酸化細菌 (AOB) は、 N_2O を生成し、その経路としてアンモニア酸化と硝化菌脱窒の2つが知られている (図1)。様々な純粋培養株がアンモニア酸化だけでなく硝化菌脱窒を行うことが明らかにされ (Shaw et al., 2006)、環境における N_2O 生成に対する AOB の寄与の重要性が指摘されている (Kool et al., 2011)。申請者は安定同位体トレーサーを用いた実験方法を開発し、アンモニア酸化の中間産物ヒドロキシルアミン (NH_2OH) および亜硝酸塩 (NO_2^-) の N を一つずつ由来とするハイブリッド N_2O の生成の存在を示した (図1)。

環境で生成される N_2O の起源がどの経路にあるのかという各経路の寄与率の分別定量は、特に大量の窒素成分が集約される廃水処理系では、 N_2O 低減に向けた制御において重要な課題である。これまで、アンモニア酸化細菌からはアンモニア酸化および硝化菌脱窒の2つの経路による N_2O 生成を想定していたが、ハイブリッド N_2O 生成も考慮した3つの経路の分別定量が課題解決のために必須となった。そのためには、ハイブリッド N_2O 生成のメカニズムを明らかにし、3つの経路の寄与率を精確に測定できる方法を確立する必要がある。

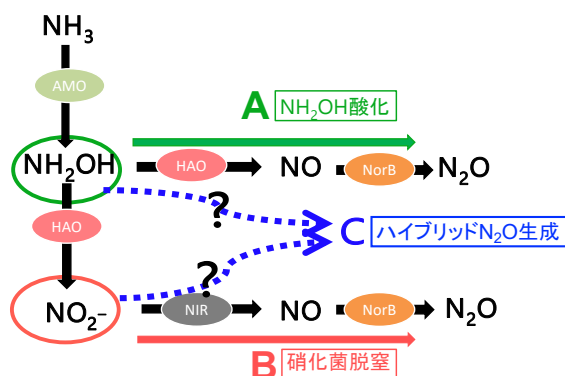


図1 *Nitrosomonas europaea* による既知の N_2O 生成経路 (実線) と未知の N_2O 生成経路 (破線)

2. 研究の目的

本研究では、AOB 純粋培養株を用いて、(1) 安定同位体トレーサー法による培養系を確立し、(2) その方法を使って AOB のハイブリッド N_2O 生成経路の寄与率を求める。さらに (3) 関連酵素遺伝子の変異株および阻害剤等を用いてハイブリッド N_2O 生成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌株と培養

AOB 純粋培養株は、廃水処理系の活性汚泥から純粋分離され申請者らが保持する *Nitrosomonas* sp. AL212 株 (Suwa et al., 1994, 2011)、*Nitrosomonas* 属で最もよく研究されてきた *N. europaea* ATCC 19718 株の野生株およびその NO 還元酵素遺伝子 *norB* 変異株 (Kozłowski et al., 2014) を用いた。AL212 株および ATCC 19718 株は、AOB の 16S rRNA 遺伝子による系統樹において異なるクラスターに位置し (それぞれ cluster 6A, cluster 7)、AL212 株は ATCC 19718 株と比べて高濃度のアンモニウムイオン (NH_4^+) に対して感受性がある。2 菌株とも全ゲノム配列が解析されている。

(2) 培養系の確立

N_2O 生成速度測定用に集菌するための培養方法を検討した。回収できる細胞数が限られているため、また微量の N_2O を検出できるようにするため N_2O 生成速度測定時に細胞懸濁液を入れた密閉ガラスバイアルの実験系を小スケール化した。さらに、 N_2O 生成速度および経路に大きく影響を及ぼすと考えられる O_2 濃度を測定中に確認するために、非接触型酸素スポットセンサー (FireStingO2, Pyro Science) により細胞懸濁液の溶存酸素 (DO) 濃度をモニタリングできるようにした。図2に分析の流れを示す。

(3) N_2O 生成速度測定

細胞懸濁液に NH_4^+ , NH_2OH , NO_2^- の ^{15}N 標識試薬を組み合わせ加え、好氣的 (21% O_2 , He ベース) もしくは嫌氣的 (<1% O_2 , He ベース) に 28°C で培養した。ヘッドスペースガス中に生成される N_2O のアイソトポマー (m/z 44, 45, 46) を四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS; GCMS-QP2010 Ultra, 島津製作所) により分析した (図2)。 N_2O の組成および基質の ^{15}N 標識率から、 N_2O 生成への NH_2OH 酸化、ハイブリッド N_2O 生成および硝化菌脱窒の各寄与率を算出した。この安定同位体トレーサー法により、AL212 株および ATCC 19718 株のハイブリッド N_2O 生成速度、優占 N_2O 生成経路を比較した。

(4) 阻害剤等による N_2O 生成経路の推定

NH_4^+ を含む培地にアンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) 阻害剤であるアシルチオ尿素 (ATU) を添加し、ハイブリッド N_2O 生成が AMO および NH_2OH の供給に依存するかどうかを調べた。また、一酸化窒素 (NO) 除去剤である Carboxy-PTIO (同仁化学) を加え、ハイブリッド N_2O は NO を経由して生成されるかどうか (図1) を調べた。

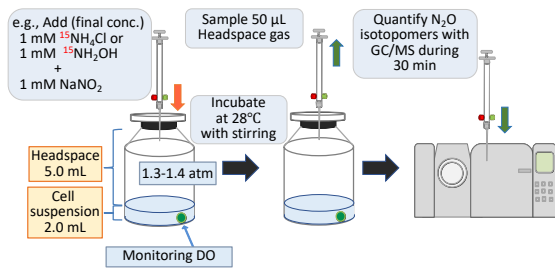


図2 ^{15}N トレーサー法による N_2O 分析の流れ

4. 研究成果

(1) 培養系、 N_2O 分析系の確立

N_2O 生成分析に用いる AOB の対数増殖期後期の培養液を集菌するために、 NH_4^+ を含む AOB 用培地における NO_2^- 生成の経時変化から、AL212 株は 2.75 L の培養液で 5 日間、ATCC 19718 株は 2.15 L の培養液で 4 日間培養した。AOB の増殖速度は従属栄養細菌と比べると遅く、増殖には O_2 消費とアンモニア酸化による NO_2^- 生成を伴う。 N_2O 生成に影響を及ぼすと考えられる DO と NO_2^- が大きく変わらない培養初期の N_2O 生成初速度を求めるために集菌した高密度の細胞懸濁液を使用した。培養液の DO モニタリングにより好気条件が維持されることを確認しながら、2 mL の細胞懸濁液に 5 mL のヘッドスペースガスという小さな密閉培養系で 30 分以内での N_2O 生成が定量可能であることを示した。以後この系で実験を行った (図 2)。

(2) N_2O 生成速度測定

AL212 株および ATCC 19718 株の細胞懸濁液に ^{15}N 標識した NH_4^+ および非標識の NO_2^- を加えて好氣的に培養した結果、AL212 株の方が ATCC 19718 株よりの N_2O 生成速度が高く、両菌株ともハイブリッド N_2O ($^{14,15}\text{N}_2\text{O}$, m/z 45) を生成した (図 3, 図 4)。 $^{15}\text{NH}_4^+$ および NO_2^- もしくは $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ および NO_2^- を添加したときに、 $^{15}\text{NH}_4^+$ および NO_2^- では AL212 株と ATCC 19718 株では優占する N_2O 生成経路が異なり AL212 株では硝化菌脱窒によると考えられる N_2O ($^{14}\text{N}_2\text{O}$, m/z 44) が優占した。よって、*Nitrosomonas* 属による好氣的なハイブリッド N_2O 生成は普遍的であることが示唆されたが、 N_2O 生成速度および基質による N_2O 生成過程が菌株によって異なると考えられた。また、ATCC 19718 株は嫌気条件 (<1% O_2) においてもハイブリッド N_2O 生成活性があることが示された。ただし、 $^{15}\text{NH}_4^+$ および NO_2^- の添加では硝化菌脱窒、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ および NO_2^- の添加ではハイブリッド N_2O 生成が優占した。

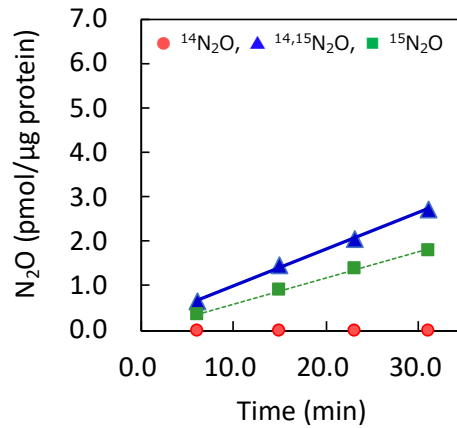


図3 1 mM $^{15}\text{NH}_4^+$ および 1 mM NO_2^- を添加して培養したときの *N. europaea* ATCC 19718 株による N_2O 生成の例

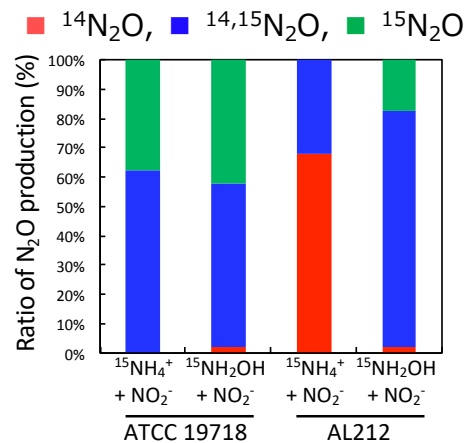


図4 ATCC 19718 株および AL212 株の各基質添加における生成 N_2O 組成の比較

(3) 阻害剤等による N_2O 生成経路の推定

好気条件において $^{15}\text{NH}_4^+$ および NO_2^- を基質とした ATCC 19718 株の細胞懸濁液に AMO 阻害剤 ATU を添加し、 NH_2OH の生成を阻害したところ、ハイブリッド N_2O は生成されなかった (図 5)。一方、 NO_2^- 存在下、 NH_2OH の添加で生成された。これらの結果は、ハイブリッド N_2O 生成が NH_2OH の供給に依存することを示す。ハイブリッド N_2O 生成速度は、 NO_2^- 初期濃度に対して比例的に増加した。これは、 NO_2^- の供給に依存することを示唆する。

ATCC 19718 株の野生株と *norB* 変異株では好気条件での N_2O 生成においてハイブリッド N_2O 生成と NH_2OH 酸化の寄与率がそれぞれ約 65% と約 35% で変わらないことから、野生株では好気条件では *NorB* が機能していないことが予想され、このとき検出されたハイブリッド N_2O 生成に *norB* は関与していない可能性がある。また、*norB* 変異株においても野生株と同様に NH_2OH 酸化由来の N_2O が検

出されたことから、 NH_2OH 酸化由来の NO 還元経路には別の NOR が存在することが示唆され、このことは Kozlowski et al. (2014) の見解と一致している。

NO が蓄積しやすいと考えられる *norB* 変異株に NO 除去剤である Carboxy-PTIO を加えるとわずかに $^{14,15}\text{N}_2\text{O}$ 生成速度が減少したが、 NO が除去された条件においてもハイブリッド N_2O が生成されたと考えられた。しかし、好気条件での *N. europaea* の培養において Carboxy-PTIO がその効果を示さない可能性があり (私信)、ハイブリッド N_2O 生成において NO を介するのかどうかについてはさらに検討が必要である。

AOB が集積された部分硝化リアクターからはハイブリッド N_2O の産生が検出されており (Terada et al., 2017, 雑誌論文①)、これら廃水処理系における N_2O 産生にこれまで知られてきたヒドロキシルアミン酸化および硝化菌脱窒に加え、純粋培養株を用いて本研究においても示された AOB によるハイブリッド N_2O 生成が関与していると考えられる。

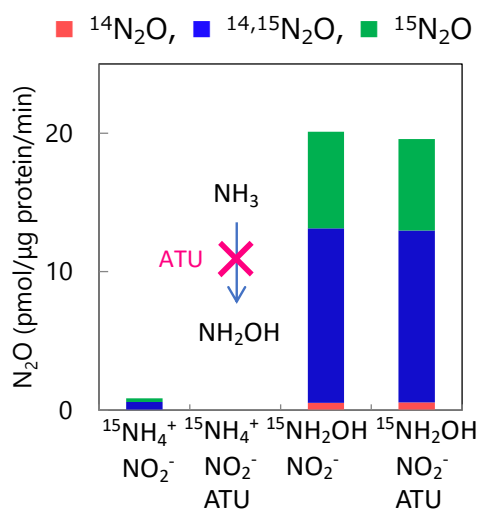


図5 ATCC 19718 株における AMO 阻害剤 ATU を添加したときの各 N_2O 生成速度

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 Akihiko Terada, Sho Sugawara, Keisuke Hojo, Yuki Takeuchi, Shohei Riya, Willie F. Harper Jr., Tomoko Yamamoto, Megumi Kuroiwa, Kazuo Isobe, Chie Katsuyama, Yuichi Suwa, Keisuke Koba, and Masaaki Hosomi (2017) Hybrid nitrous oxide production from a partial nitrifying bioreactor: hydroxylamine interactions with nitrite. *Environ. Sci. Technol.*, 51: 2748–2756. DOI: 10.1021/acs.est.6b05521, 査読有り.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 菅野麻子, 岩本茉莉, 久我ゆかり, 諏訪裕一, 勝山千恵. 好気性アンモニア酸化細菌による好気条件での hybrid N_2O 生成経路の検討. 第 11 回日本ゲノム微生物学会大会, 2017.
- ② Chie Katsuyama, Mako Kanno, Akihiko Terada, Keisuke Koba, Yukari Kuga, Lisa Y. Stein, Martin G. Klotz, Yuichi Suwa. Effects of ammonium and hydroxylamine on N_2O -producing pathways in *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 and *Nitrosomonas* sp. AL212 revealed by a ^{15}N tracer technique. Fifth International Conference on Nitrification and Related Processes (ICoN5), 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝山 千恵 (KATSUYAMA, Chie)
 広島大学・総合科学研究科・助教
 研究者番号：10580061