

¹⁵N 安定同位体トレーサー法による好気性アンモニア酸化細菌

Nitrosomonas europaea の新規な N₂O 生成経路の証明

Elucidation of novel N₂O production pathway from ammonia-oxidizing bacteria

Nitrosomonas europaea using a ¹⁵N tracer technique

生命科学専攻 山田真由子

Department of Biological Sciences

自然環境において、窒素 (N) は様々な形態で存在し、その循環には微生物による反応過程が大きく関与している。陸域では、過剰な窒素肥料の投入や排気ガスに含まれる NO_x の増加により窒素が過多となっており、その問題の一つに、強力な温室効果ガスである亜酸化窒素 (N₂O) の系外への放出がある。好気性アンモニア酸化細菌 (AOB) は、アンモニアの酸化の過程での中間代謝産物であるヒドロキシルアミン (NH₂OH) から、もしくはいわゆる硝化菌脱窒とよばれる異化的亜硝酸還元過程において、亜硝酸イオン (NO₂⁻) から亜酸化窒素 (N₂O) を生成することが報告されてきた (Stein, 2011)。ところで、脱窒細菌およびカビは NH₂OH および NO₂⁻ から N を一つずつ組み込んだ hybrid N₂O を生成することが報告されており、共脱窒とよばれている。AOB についても、hybrid N₂O の生成の可能性は考えられているが (Terada et al. submitted)、その生成については、純粋培養を用いた生理学的な研究としての実証例は報告されていない。

本研究では、好気性 AOB の典型種であり、もっともよく研究されてきた *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 株を用い、安定同位体である ¹⁵N で標識した NO₂⁻ をトレーサーとして用いる培養実験を行い、NH₂OH あるいは NO₂⁻ から生成する N₂O を分別定量した。この実験では、ATCC 19718 株による hybrid N₂O 生成が可能性として生じたため、hybrid N₂O を生成するのかどうかを証明することを目的とした。また、ATCC 19718 株の NO₂⁻ 還元および NO 還元を担う酵素遺伝子 (それぞれ *nirK*, *norB*) の変異株 3 株 (*nirK*::Kan, *norB*::Gen, *nirK*::Kan *norB*::Gen) を用いて、N₂O 生成経路への各酵素の関与の有無を示すことを目的とした。

まず、ATCC 19718 株および各変異株を大量培養し、アンモニア酸化による NO₂⁻ 生成量から増殖曲線を引き、N₂O 生成試験に用いる対数増殖期後期の菌体を得た。次に、各菌株を集菌、濃縮した細胞懸濁液をバイアル瓶に密封し、1 mM のアンモニウム (NH₄⁺)、NH₂OH、もしくは ¹⁵N 標識した NO₂⁻ を組み合わせて加え、好氣的に 27°C で培養した。ヘッドスペースガス中への N₂O 生成量および各アイソトポマー (¹⁴N¹⁴NO, ¹⁴N¹⁵NO もしくは ¹⁵N¹⁴NO, ¹⁵N¹⁵NO ; *m/z* 44, *m/z* 45, *m/z* 46) の N₂O はガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を用いてモニタリングした。さらに、hybrid N₂O 生成活性の有無をより確かにするために、アザイド法により培養液中の NO₂⁻ を N₂O に化学的に変換し、N₂O の量と ¹⁵N 存在比を求めることによって培養液中の NO₂⁻ 濃度および NO₂⁻ プール内の ¹⁵N 存在比を求めた。

ATCC 19718 株および各変異株の培養液で生成された NO₂⁻ 量から増殖曲線を引いたところ、いずれの菌株も培養開始 6~7 日に対数増殖期後期に達することが明らかとなった。対数増殖期後期の菌体を用いた N₂O 生成試験では、すべての菌株において、N₂O 生成量と速度は電子供与体として NH₄⁺ を入れたときよりも NH₂OH を入れた時の方が高かった (Fig. 1A,C)。さらに、NH₄⁺ もしくは NH₂OH と ¹⁵NO₂⁻ を組み合わせて添加した ¹⁵N トレーサー実験において、¹⁴N と ¹⁵N を一つずつ含む hybrid N₂O と考えられる N₂O (*m/z* 45) が生成された (Fig. 1B,D)。¹⁵N トレーサーを用いた N₂O 生成試験と同時にアザイド法によって NO₂⁻ プール内の ¹⁵N 存在比を求め、確かに hybrid N₂O が生成されたことを示した。*nirK* および *norB* の各変異株 3 株を用いて N₂O 生成活性を比較したが、NirK および NorB が hybrid

N_2O 生成経路に関与しているとは言えなかった。以上より、ATCC 19718 株が好氣的に N_2O を生成することを示し、 NH_2OH および NO_2^- から N を一つずつ組み込んだ hybrid N_2O を生成する新規な経路が存在することを明らかにした。

【参考文献】

Stein, L.Y. 2011. Heterotrophic Nitrification and Nitrifier Denitrification. *In* Nitrification, eds. B. B. Ward, D. J. Arp, and M. G. Klotz. ASM Press, 95–114.

Terada, A., S. Sugawara, K. Hojo, Y. Takeuchi, S. Riya, W. F. Harper Jr., T. Yamamoto, M. Kuroiwa, K. Isobe, C. Katsuyama, Y. Suwa, K. Koba, and M. Hosomi. Hybrid Nitrous Oxide Production from Partial Nitrifying Bioreactor: Hydroxylamine Interactions with Nitrite. submitted.

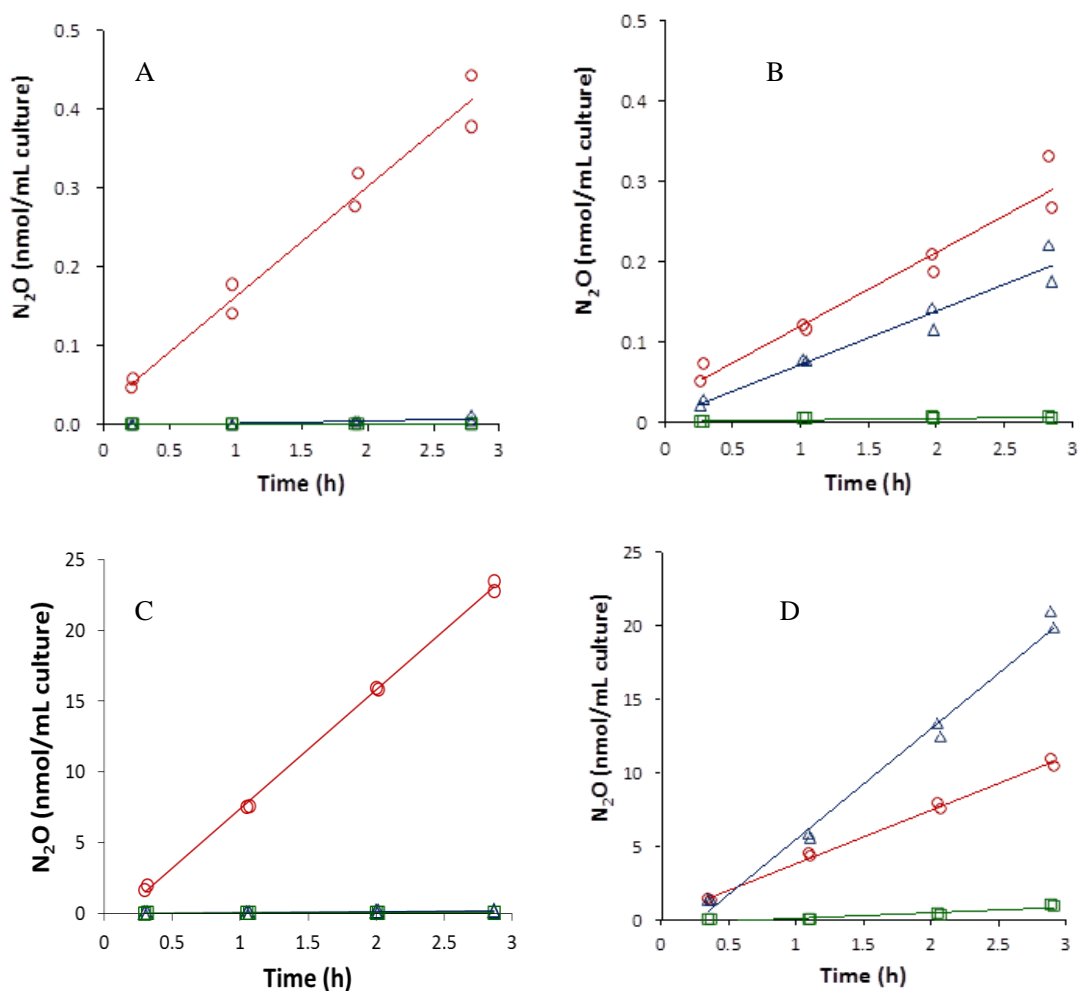


Fig. 1. *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 株野生株の細胞懸濁液における N_2O 生成. NH_4Cl (A), $NH_4Cl+Na^{15}NO_2$ (B), NH_2OH (C) もしくは $NH_2OH+Na^{15}NO_2$ (D) を細胞懸濁液に添加し、培養した. ○: $^{14}N^{14}NO$ (m/z 44), △: $^{14}N^{15}NO$ もしくは $^{15}N^{14}NO$ (m/z 45), □: $^{15}N^{15}NO$ (m/z 46) .