

*Gemmatimonas aurantiaca*による亜酸化窒素 (N₂O) 還元のと適温度・pH域および N₂Oに対する親和性の測定

長岡工業高等専門学校 外山 結加 押木 守 荒木 信夫
長岡技術科学大学 幡本 将史 山口 隆司
東京農工大学 末永 俊和 寺田 昭彦

1. 背景

亜酸化窒素(N₂O)ガスは気候変動を及ぼす可能性のある強力な温室効果ガスであり、成層圏のオゾン層破壊に強く寄与することが明らかとなっている¹⁾。現在大気中に亜酸化窒素(N₂O)ガスは約330 ppb (=1.47 μM)の濃度で存在しており、さらに増加傾向にある。N₂Oガスが地球温暖化に与える効果は二酸化炭素ガスの約300倍であり、さらに長寿命な温室効果ガスとされている。二酸化炭素よりはるかに温室効果が高く大気寿命の長いN₂Oを削減することは長期にわたる地球温暖化の抑制に繋がる。また、いくつかの微生物は亜酸化窒素還元酵素をコードする遺伝子(*nosZ*)を保有しており、N₂OをN₂に還元させ無害化する能力を持っている。こうした背景からN₂Oを消費する微生物に注目が集まっている。

*Gemmatimonas aurantiaca*は2003年に下水処理場活性汚泥から発見された細菌であり、rRNA遺伝子配列による系統解析から既存の細菌との配列相同性は極めて低いとされ、新しく*Gemmatimonadetes*門の代表株として認定された細菌である。これまでに実施された環境試料に対する16S rRNA遺伝子解析の結果から、本細菌は様々な種類の土壌試料から数%程度の存在割合で検出されており、土壌性細菌であると考えられている³⁾。

*G. aurantiaca*の全ゲノム情報は2009年に解読され、1本の環状体DNA上に3,998個の遺伝子が存在することが報告されている⁴⁾。我々が本ゲノムについて代謝機能予測を行った結果、興味深いことに、*G. aurantiaca*がN₂O還元酵素(*NosZ*)を保有していることが明らかとなった。これは*G. aurantiaca*がN₂O還元細菌であることを示唆しているが、*G. aurantiaca*によるN₂Oの還元条件の知見は集積されていない。

本研究では活性のある*G. aurantiaca*が実環境中に存在しているか調査を行い、*G. aurantiaca*が自然環境でN₂Oの消費に関与しているか明らかにするため実験を行った。活性のある*G. aurantiaca*を調査するため長岡市内の土壌からRNA抽出を行い16S rRNA遺伝子の定量を行った。*G. aurantiaca*のN₂O消費活性を測定する実験では、*G. aurantiaca*を異なる温度・pH条件で培養し、N₂O消費活性を測定した。また、N₂OマイクロセンサーによるN₂O測定試験を行い、測定結果から*K_s*値(ミカエリス・メンテン定数)を算出し、N₂Oに対する基質親和性を調査した。

2. 実験方法

2.1 RNA抽出

長岡市内の土壌を採取し、Total RNA Isolation Kit, RNA PowerSoil を用いてRNA抽出を行った。

2.2 逆転写反応

逆転写反応には Prime Script™ RT Reagent Kit(TaKaRa)を使用し、5×Prime Script Buffer 2 μl, Prime Script RT Enzyme Mix 1 0.5 μl, Random 6 mers (100 μM) 0.5 μl, total RNA 1.0 μl, RNase Free dH₂O 6.0 μl を混合し、37°C15分、85°C5秒で逆転写反応を行った。

2.3 遺伝子定量

土壌中の全菌の16S rRNA遺伝子と*G. aurantiaca*の16S rRNA遺伝子の遺伝子定量を行うため、SsoFast™ EvaGreen® Supermix 10 μl, Forward primer 1 μl, Reverse primer 1 μl, RNase/DNase-free water 7.5 μl, DNA template 0.5 μl を混合しRT-PCRを行った。全菌の16S rRNA遺伝子の定量では、プライマーは 515F : GTGYCAGCMGCCGCGGTAA, 806r :

GGACTACNVGGGTWTCTAAT を使用した。 *G. aurantiaca* の 16S rRNA 遺伝子の定量では、G1G3-673F : GAATGCGTAGAGATCC, 907r : CCGTCAATTCMTTTRAGTTT を使用した。

2.4 *G. aurantiaca* の培養

G. aurantiaca (NBRC100505T) の培養には NBRC822 培地(per 1 liter; glucose 0.5g, peptone 0.5g, yeast extract 0.5g, sodium glutamate 0.5g, KH₂PO₄ 0.44g, (NH₄)₂SO₄ 0.1g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, pH7.0)を使用し, 30°Cで震盪培養した。

2.5 比活性試験

硝子バイアル(5 ml 容積)へ NBRC822 培地を 3ml 分注し, ブチルゴム栓およびアルミシールで密栓した。溶存酸素を除去するために Ar ガスパージを行い, ヘッドスペースを He ガスに置換した。

G. aurantiaca の菌体を 100 µl (終濃度 0.43 mg-BSA protein/ml)分注した後, N₂O ガスを終濃度 1000 ppm となるように添加し, 培養を開始した。温度依存性試験では 4~80°Cの異なる温度条件で実施し, pH 依存性試験では pH5.0~pH10.0 の異なる pH 条件で実施した。各系 3 繰り返しでバイアルを培養した。

2.6 化学分析

N₂O ガスの定量はガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)で行った。バイアルのヘッドスペースガス 10 µl をガスタイトシリンジで採取し, ガスクロマトグラフ GCMS-QP2010SE(島津製作所, カラム CP-PoraBOND Q)へ注入し, N₂O に相当する $m/z=44$ を測定した。

G. aurantiaca の菌体濃度はタンパク質濃度として評価した。*G. aurantiaca* の菌体懸濁液を遠心分離(14,000 rpm, 5 min)し, 菌体ペレットを 10% (w/v) SDS 溶液に懸濁させた。10 分間の煮沸処理後, 遠心分離(15,000 rpm, 10 min)し, 上澄みを総タンパク質として回収した。タンパク質量は DC-protein assay kit (Bio-Rad)を用いた Lowry 法で行い, ウシ血清アルブミン(BSA)を用いて検量線を作成した。

2.7 N₂O マイクロセンサーによる N₂O 測定試験

チャンバーに *G. aurantiaca* (終濃度 68.2mg-BSA

protein/ml)を分注した後, 純 N₂O ガスで曝気した NBRC822 培地を終濃度 50 µM となるように添加した。培養温度は 30°Cに設定し, N₂O マイクロセンサーにより測定を開始した。測定結果からミカエリス・メンテン式を用い, K_s 値を算出した。

3. 実験結果

3.1 土壤試料における *G. aurantiaca* 16S rRNA の定量

長岡市内の土壤中の全菌の 16S rRNA と *G. aurantiaca* の 16S rRNA の遺伝子定量を行った結果を図 1 に示す。RNA は微生物活性の指標になることから⁵⁾, 図 1 は土壤中に活性のある *G. aurantiaca* が存在したことを示している。全菌の 16S rRNA 量と *G. aurantiaca* の 16S rRNA 量を比較すると, *G. aurantiaca* の 16S rRNA 量は 6~16%を占めた。土壤には 100 万種以上の細菌が存在しており⁶⁾, 膨大な種類の細菌が存在している土壤において 16S rRNA が 6~16%を占める *G. aurantiaca* は, 土壤中で優占している細菌種であると言える。

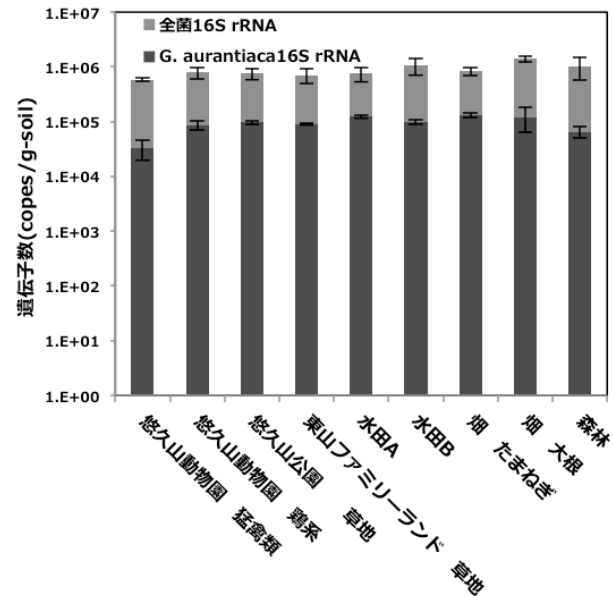


図 1 *Gemmatimonas aurantiaca* の遺伝子数。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)

3.2. 温度依存性試験

G. aurantiaca を 4~80°Cの異なる温度条件で 25 時間培養し, N₂O の消費をモニタリングした。N₂O 消

費活性を図 2 に示す。4~50°Cの培養温度において、*G. aurantiaca* による N₂O の消費が確認された。30°Cで最も高い消費活性が見られ、0.813nmol (mg-BSA protein · h)⁻¹の速度であった。

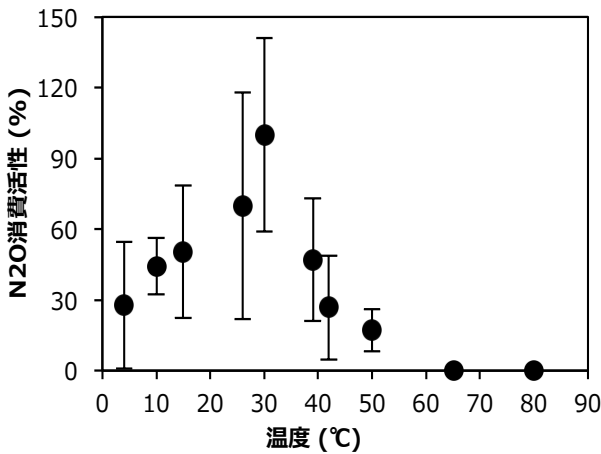


図 2 *Gemmatimonas aurantiaca* の N₂O 消費活性. 30°C培養時の N₂O 消費活性(0.813 μmol mg-BSA protein⁻¹ h⁻¹)を 100%とし、各温度域における消費活性を相対的に示した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)

3.3. pH 依存性試験

G. aurantiaca を pH5~pH10 の条件で培養し、N₂O の消費をモニタリングした。24 時間培養時までの N₂O 消費活性を図 3 に示す。pH5.0~pH8.5 の pH 条件において、*G. aurantiaca* による N₂O の消費が確認された。pH7.0 で最も高い消費活性が見られ、1.55 nmol (mg-BSA protein · h)⁻¹の速度であった。

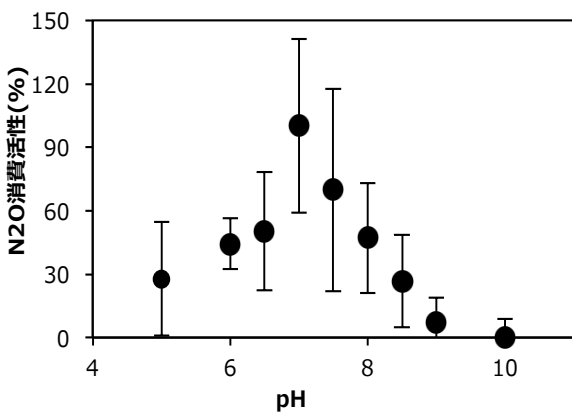


図 3 *Gemmatimonas aurantiaca* の N₂O 消費活性. 30°C 培養時の N₂O 消費活性(1.55 nmol mg-BSA protein⁻¹ h⁻¹)を 100%とし、各温度域における消費活性を相対的に示した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)

3.4. K_s 値の測定

N₂O に対する基質親和性を明らかにするために、N₂O マイクロセンサーを用いて *G. aurantiaca* による N₂O の消費活性を測定し、N₂O が完全に消費されるまでモニタリングした。N₂O 消費速度と N₂O 濃度の関係を図 4 に示す。ミカエリス・メンテン式を用い、*G. aurantiaca* の K_s 値を算出した結果、V_{max}=7.3(pmol/mg-BSA/h), K_s=4.4 (μM)を算出した。

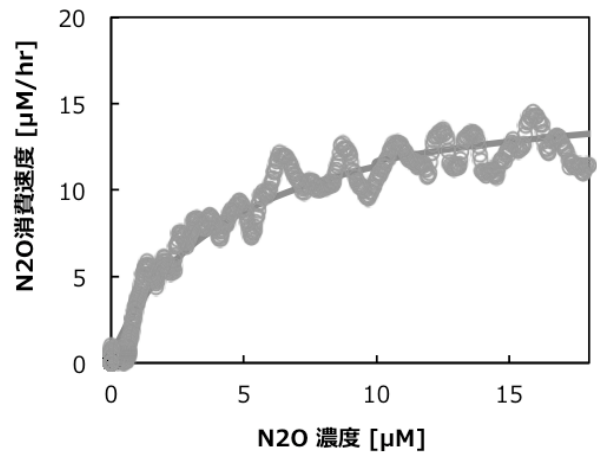


図 4 基質濃度と N₂O 消費速度の関係

4. 考察

G. aurantiaca は 4~50°Cの培養温度において N₂O 消費活性を示した。この温度域は国内の年平均土壌温度の範囲内(3.6~25.8°C)である⁷⁾。また各国の土壌温度を見ると幅広い地域で 4~50°Cの温度が観測されている⁸⁾。このことから *G. aurantiaca* が世界の土壌において N₂O の消費に関与することを期待できる。また pH5.0~pH8.5 の範囲で N₂O 消費活性を示した。本研究で得られた pH の範囲は世界の土壌でもよく見られる値である⁹⁾。特に土壌 pH が pH5.0~7.0 の地域が多く、本研究で最も高い消費活性であった pH7.0 も多くの地域で観測されている。これより pH の観点からも、*G. aurantiaca* が土壌における N₂O の消費に関与することを期待できる。

K_s 値は基質に対する親和性を示しており、K_s 値が小さいほど酵素と基質の親和性は高い。大気中の N₂O 濃度は 1.47 μM であり、本研究で得られた K_s 値は大気中の N₂O 濃度より約 3 μM 高い結果となっ

た。これより大気中の N₂O との親和性は低いことが明らかとなった。また、土壌に生息する菌で N₂O 還元能を保有していると報告のある *Flavobacterium sp.* の *K_s* 値は 0.5 μM¹⁰⁾、*A. dehalogenans strain 2CP-C* の *K_s* 値は 1.34 μM であり¹¹⁾、これと比べても *G. aurantiaca* の *K_s* 値は高かった。これより大気中の N₂O との親和性は低く、N₂O 消費への寄与は小さいと推測される。しかし、*G. aurantiaca* が自然環境下で N₂O の消費に関与することを明らかとするため、土壌における *nosZ* 遺伝子の発現を今後調査する必要がある。

5. 参考文献

- 1) Ravishankara, A.R., Daniel, J.S. and Portmann, R.W. 2009. Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-Depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123-125.
- 2) Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y. and Nakamura, K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1155-1163.
- 3) DeBruyn, J.M., Nixon, L.T., Fawaz, M.N., Johnson, A.M. and Radosevich, M. 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 6295-6300.
- 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構 HP: <http://www.nite.go.jp/nbrc/genome/project/annotation/analyzed/ga1.html>
- 5) Andreas S., Odilo M., Susanne S., Ruediger S., Michael L., Marcus G., Samar L., Wolfram M., Martin G., Thomas R., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology.* 10.1186/1471-2199-7-3
- 6) Gans J., Wolinsky M., Dunbar J., Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *26:309(5739):1387-1390.*
- 7) Takata, Y., Kuwagata, T., Kohyama, K. and Obara, H. 2011. Delineation of Japanese soil temperature regime map. *Soil Sci. Plant Nutr.* **57**: 294-302.
- 8) World Forecast Directory
HP:<http://www.eldoradocountyweather.com/climate/world-maps/world-land-temps.html>
- 9) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
HP:<http://www.fao.org/soils-portal/levantamiento-de-suelos/propiedades-del-suelo/propiedades-quimicas/es/>
- 10) Betlach M.R., Tiedje J.M., Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial. *Appl Environ Microbiol.* 42(6):1074-1084.
- 11) Sukhwan Yoon, Silke Nissen, Doyoung Park, Robert A. Sanford, Frank E. Löffler, 2016. Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I versus clade II *NosZ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**:13 3697.