

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07818

研究課題名(和文) 温室効果ガス亜酸化窒素発生現場における糸状菌の機能発現解明

研究課題名(英文) Diversity and activity of fungal community during nitrous oxide emission in an agricultural field

研究代表者

星野 裕子(高田裕子)(Hoshino, Yuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・上級研究員

研究者番号：40354104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：農耕地から微生物活動により発生する亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)は、強力な温室効果、オゾン層破壊の性質を有し、発生機構の解明が大きな課題である。N<sub>2</sub>Oはこれまで主に細菌により発生すると考えられてきたが、圃場より発生するN<sub>2</sub>Oの安定同位体比解析より糸状菌脱窒の寄与が高い可能性を見出した。脱窒糸状菌の分離及びメタゲノム手法による糸状菌動態解析より、圃場のN<sub>2</sub>O発生現場における脱窒糸状菌の増大を確認した。

研究成果の概要(英文)：Agricultural soil is the single largest source of global anthropogenic nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission, accounting for approximately 59% of anthropogenic emissions. N<sub>2</sub>O is a greenhouse gas that is also detrimental to the ozone layer. While microbial activities are the major pathways of N<sub>2</sub>O production, these pathways are not well studied at field scale. The analysis of N<sub>2</sub>O isotopomer ratios suggested the contribution of fungal denitrification to N<sub>2</sub>O emission in our study field. We isolated and monitored denitrifying fungi in the same fields. The ratio and the abundance of denitrifying fungi increased in the field samples when the high N<sub>2</sub>O emission was observed.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：カビ脱窒 農耕地

## 1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) は強力な温室効果ガスであるとともにオゾン層破壊物質でもある。農業は人間活動に由来する  $N_2O$  の最大の排出源であり、その主要な発生源である農耕地からの  $N_2O$  の発生メカニズムの解明と発生削減技術の開発は急務である。

$N_2O$  発生経路は、細菌による硝化・脱窒過程が主であるとされてきた。農耕地における  $N_2O$  発生のメカニズム解析において、関与する細菌の研究が進む一方で、糸状菌も発生に重要な役割を果たすことが指摘されている。

糸状菌脱窒の生化学的・分子生物学的研究は、1990年代から日本で祥雲らにより菌株コレクションを用いて精力的に行われてきた。糸状菌脱窒は、その発生条件もメカニズムも細菌のそれとは異なり、環境中での機能も注目されている (Hayatsu et al., *Soil Sci. Plant Nutr.*, 2008)。しかし、関与する糸状菌、また、その環境中の動態や機能については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

申請者らは、これまでに圃場における作物の栽培期間を通じた  $N_2O$  連続モニタリングにより、地表に作物残渣がある比較的好気的な状態で  $N_2O$  が発生し、糸状菌脱窒の可能性があることを見出した。

そこで、本研究では、農耕地からの  $N_2O$  発生に糸状菌脱窒の寄与があるかどうかについて、発生  $N_2O$  ガスの安定同位体比分析による解析と合わせて、 $N_2O$  発生現場での脱窒糸状菌の動態を培養による手法とメタゲノム手法により解析することで、明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 圃場からの発生 $N_2O$ のモニタリング

茨城県つくば市の農業環境技術研究所ライシメーター圃場 (黒ボク土) において、春と秋の二作ジャガイモを栽培した。慣行に従い、収穫前に地上部を切除し2週間程度放置した後、収穫した。栽培期間中圃場からの  $N_2O$  発生量及び発生  $N_2O$  の安定同位体比を連続モニタリングした。

### (2) 圃場採取サンプルの $N_2O$ 発生ポテンシャル測定

地上部切除前と切除1週間後に、土壌および地上部あるいは地上部残渣を採取した。採取サンプルの部位別 (土壌、葉、茎) の  $N_2O$  発生ポテンシャルを、採取後各サンプルについて直ちにインキュベーション試験することで測定した。

### (3) 糸状菌の分離と特性解明

(2) で採取した土壌および地上部あるいは

地上部残渣サンプルから平板培地を用いて糸状菌を分離培養した。これらの分離糸状菌について、ITS領域の塩基配列解析により、分類群を推定した。また、亜硝酸を基質とした液体培養系で培養中の発生  $N_2O$  を測定することで、 $N_2O$  発生活性を測定した。

### (4) 圃場採取サンプルのメタゲノム解析

培養法による微生物の検出は、手法によりバイアスがかかり、実際の環境中の存在割合や量が必ずしも反映されとは限らない。そのため圃場サンプルから直接 DNA を抽出する培養を経ない、いわゆるメタゲノム手法により、糸状菌群集構造を解析した。

(2) で採取した土壌および地上部あるいは地上部残渣サンプルから DNA を抽出し、糸状菌 ITS 領域を対象とした PCR-DGGE 解析及び糸状菌 ITS 領域を対象とした次世代シーケンサー Miseq によるアンプリコン解析を行い、糸状菌群集構造の変化を解析した。

さらに、圃場から分離した糸状菌の内、特に  $N_2O$  発生活性の高い *Fusarium* sp. 等について、サンプルから抽出した DNA における菌密度を、ITS 領域を対象とした定量 PCR により測定した。

### (5) 糸状菌の脱窒系遺伝子解析

(3) で分離された糸状菌について、これまで報告のある糸状菌脱窒系遺伝子 (*NirK* 及び *P450nor*) プライマーを用い、これらの遺伝子が増幅されるか検討した。

さらに、(4) で土壌および地上部あるいは地上部残渣サンプルから抽出した DNA において、糸状菌脱窒系遺伝子の存在密度を定量 PCR で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 圃場からの $N_2O$ 発生量と発生経路推定

春作において地上部切除から1週間後に、圃場から  $N_2O$  の発生ピークが見られた。秋作でも同時期に  $N_2O$  発生が見られたが、発生量は春先に比べ少なかった。

非常に発生量の多かった春作の地上部切除後の  $N_2O$  発生ピークにおいて、発生  $N_2O$  の安定同位体比の解析が可能だった。  $N_2O$  発生ピークの特に後半において、糸状菌脱窒から発生する  $N_2O$  安定同位体比と同じ値を示すデータが得られ、糸状菌脱窒により  $N_2O$  が発生している可能性が示唆された。

### (2) 圃場からの $N_2O$ 発生時期と部位の特定

採取サンプルのインキュベーション試験の結果、土壌ではなく地上部に放置されているジャガイモ葉あるいは茎の地上部残渣から  $N_2O$  発生が見られた。春作の残渣において、特に高い  $N_2O$  発生ポテンシャルが見られた。

圃場において、春作の地表に作物残渣が放置された時期に  $N_2O$  が発生し、発生源は作物残渣自体であるが明らかになった。

### (3) 分離糸状菌の特性解明

幅広い分類群に属する菌が分離された。土壌とジャガイモ地上部残渣から同じ分類群の菌も多数分離されたが、土壌からのみ検出された分類群あるいは地上部残渣からのみ検出された分類群もあり、菌の種により存在する部位が異なることが示唆された。

また地上部残渣から分離された糸状菌の分類群は、採取時期により違いが見られ、春作の切除前の地上部サンプルより採取した分離菌は、*Aureobasidium* 属に近縁と推定されたものが多かった。N<sub>2</sub>O 発生活性である春作の切除後の地上部残渣サンプルより採取した分離菌は、*Alterinaria* 属、*Fusarium* 属、*Penicillium* 属、*Cladosporium* 属等に近縁の菌が見られた。秋作の切除後の地上部残渣サンプルより採取した分離菌は、*Cladosporium* 属、*Phoma* 属に近縁の菌が多かった。

本実験で用いた液体培養条件での各菌の N<sub>2</sub>O 発生活性は、菌種により大きな違いがあった。*Fusarium* 属等、特に N<sub>2</sub>O 発生活性の高い菌が数種検出される一方、様々な分類群に N<sub>2</sub>O 発生糸状菌が見られた。N<sub>2</sub>O 発生活性と系統分類群との間には関連が見られた。

春作と秋作の地上部残渣の放置時期において、各圃場サンプル(土壌あるいは残渣)から分離された糸状菌がどの程度の N<sub>2</sub>O 発生活性を示したかを調べると、春作の残渣放置一週間後のサンプルで N<sub>2</sub>O 発生活性の高い糸状菌が、高い頻度で分離されていた。

### (4)メタゲノム解析による糸状菌の動態解明

圃場採取サンプルについて、メタゲノム手法により糸状菌群集構造の解析を行った。

PCR-DGGE 法で菌群構造を見ると、ジャガイモ地上部残渣と土壌の糸状菌群集構造は大きく異なっており、特に、地上部残渣において、採取時期で菌群構造が変化することが分かった。

次世代シーケンスによる解析の結果より、糸状菌群集の多様性は、ジャガイモ地上部残渣に比べて、土壌において高かった。N<sub>2</sub>O 発生時期である春作の地上部切除 1 週間後の残渣サンプルで、春作の地上部切除前の植物体および秋作の地上部切除後の残渣に比べ、糸状菌群集の多様性が低かった。

地上部残渣において、N<sub>2</sub>O 発生のみられる春作の地上部切除後に、*Sordariomycetes* の存在割合が増加した。OTU レベルで見ると、採取時期を通じて植物体あるいは残渣には担子菌 *Cryptococcus* と子囊菌 *Cladosporium* にそれぞれ近縁な配列が優占しており、春作地上部切除後に特に増大する配列は Blast 検索の結果、*Alternaria alternata* や unidentified *Sordariomycetes* sp. に近縁であった。

(3) の結果で、N<sub>2</sub>O 発生活性の高かった菌種について、分離菌と同じ配列である

OTU が、上記の次世代シーケンス解析結果において、どのような割合で存在するかを調べた。土壌においては採取時期によって大きな変化は見られなかったが、*Fusarium* sp. 等いくつかの菌種において、地上部及び地上部残渣における存在割合は採取時期によって劇的に変化し、特に春作の地上部切除 1 週間後に高くなるものがあった。これらの菌種の定量 PCR による菌密度の測定においても、同様の結果が得られた。

### (5) 機能遺伝子の解析

(3) で分離した糸状菌について脱窒関連遺伝子の PCR 増幅を試みた。N<sub>2</sub>O 発生活性が非常に高い糸状菌種についてはバンドが検出される一方、N<sub>2</sub>O 発生活性がないあるいはほとんど見られない糸状菌については検出できず、N<sub>2</sub>O 発生活性の高い糸状菌遺伝子を特異的に増幅できることが明らかになった。

圃場サンプル由来のメタゲノムにおいて乾物重あたりの糸状菌脱窒遺伝子の存在量を定量 PCR で測定したところ、N<sub>2</sub>O 発生時の腐敗残渣で高くなっており、圃場の N<sub>2</sub>O 発生現場で糸状菌脱窒遺伝子が増大していることが明らかになった。

### (6) まとめ

今回対象とした農耕地の作物残渣由来の N<sub>2</sub>O 発生は、施肥由来のものとともに重要で、圃場からの年間 N<sub>2</sub>O 発生のうち 80% を占めるような場合も見られ、高い割合を占める。この N<sub>2</sub>O 発生に糸状菌脱窒が関与していることを示唆する証拠が得られたが、今回の解析は DNA レベルにとどまっており、遺伝子発現レベルでより詳細に糸状菌脱窒関与を明らかにするとともに詳細なメカニズムを解明する必要がある。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

星野(高田)裕子・秋山博子・中島泰弘・山本昭徳(2017)作物残渣からの N<sub>2</sub>O 発生への糸状菌脱窒の寄与の検討 - 脱窒糸状菌の動態と抗菌剤処理の影響 - , 環境微生物学会合同大会 2017, 東北大学(仙台市), 8月29 - 31日

星野(高田)裕子・上西博英・秋山博子・中島泰弘・山本昭徳(2016)ジャガイモ栽培圃場における土壌及び放置残渣の糸状菌相メタゲノム解析, 日本土壤微生物学会 2016 年度大会 岐阜大学(岐阜市), 6月11 - 12日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野裕子（高田裕子）(HOSHINO, Yuko)  
国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・物質循環研究領域・上級研究員  
研究者番号：40354104

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

秋山 博子 (AKIYAMA, Hiroko)  
国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・気候変動対応研究領域・ユニット長  
研究者番号：00354001

中島 泰弘 (NAKAJIMA, Yasuhiro)  
国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・物質循環研究領域・上級研究員  
研究者番号：10354086

(4) 研究協力者

なし ( )