

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0024

研究課題名(和文) 畑土壌の一酸化二窒素ガス発生・非発生の微生物メカニズム解明と削減技術の基盤構築

研究課題名(英文) Identification and characterization of microbial drivers involved in nitrous oxide gas emission from upland field

研究代表者

妹尾 啓史 (Senoo, Keishi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：40206652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：畑土壌への窒素肥料の施用に由来して、温室効果ガスの一つである一酸化二窒素(N₂O)ガスが発生している。N₂O発生を削減するためには、N₂O生成と消去のそれぞれを駆動している微生物群とその性質を明らかにすることが必要である。本研究ではN₂Oが発生している畑土壌のDNA/RNA解析情報と、分離菌株情報の両面から、土壌のN₂O生成・消去微生物を特定した。また、銅の添加により幅広い種類の微生物のN₂O消去能力を強化できることを見出した。さらに、N₂O消去・植物生育促進微生物のゲノム解読から植物生育促進のメカニズムを推定し、微生物資材としての応用利用の基礎情報を提供した。

研究成果の概要(英文)：Large emission of nitrous oxide (N₂O) gas is observed in upland field soil due to application of nitrogen fertilizer. To mitigate the N₂O emission, identification and characterization of the microbial drivers of N₂O generation and elimination in soils are essential. In this study, we successfully identify N₂O generating/eliminating microorganisms in soil based on the analysis of soil DNA/RNA and bacterial isolates. N₂O eliminating activity of large variety of bacterial isolates was enhanced by addition of Cu to culture medium. Based on the genome information, mechanism of plant growth promoting activity of two strains of N₂O eliminating bacteria was clarified. These results will be useful to develop novel bio-fertilizer with both N₂O mitigation and plant growth promoting ability.

研究分野：土壌学

キーワード：一酸化二窒素ガス 畑土壌 土壌微生物 環境調和型農業 土壌学

1. 研究開始当初の背景

畑土壌への窒素施肥に由来して温室効果ガス N_2O (一酸化二窒素) が発生する。 N_2O 発生は土壌中で N_2O を生成あるいは消去する各脱窒微生物群の活動の総和として観測される。このため、 N_2O 発生プロセスを解明し、 N_2O 発生を削減するためには、 N_2O 生成・消去のそれぞれを駆動している微生物群とその活性を解析し、環境条件による変動を明らかにすることがまず必要である。これまでに畑土壌からの N_2O 発生量やそれに関わる環境要因について多くの環境科学研究がなされ知見が蓄積されてきたが、土壌における N_2O 生成・消去微生物群に関する土壌微生物学的な知見は極めて乏しく、いわば「ブラックボックス」のままとなっていた。

これまでの我々の土壌メタゲノム解析から、典型的脱窒細菌だけでなく、定義上の非脱窒細菌も含む多様な微生物が N_2O 生成・消去に関わっている可能性を導いた。また、これらをもれなく検出するための PCR プライマーを整え、土壌から効率的に分離するシングルセル分離法も開発した。水田土壌分離株のゲノム解析から、脱窒細菌は脱窒以外の多彩な土壌生態系機能を有することも見出してきた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究はこれまでの研究成果をさらに発展させ、日本各地の農耕地土壌の N_2O 生成・消去微生物を詳細に描き出し、土壌環境条件による N_2O 発生・非発生の变化のメカニズムを明らかにする。さらに、 N_2O 生成・消去微生物の生態や機能を明らかにして N_2O 発生削減につながる土壌管理技術を提案する。具体的には次の事柄を明らかにする。

(1) N_2O 発生量測定データが得られている各地の地域試験研究機関の畑圃場土壌について、メタゲノム解析により脱窒機能遺伝子群の多様性と、推定される持ち主微生物群を明らかにする。

(2) 各土壌について、異なる土壌環境条件(肥料、土壌水分、土壌温度)における N_2O 発生量を室内系土壌試験により調査する。

(3) 各土壌環境条件において存在し、機能している N_2O 生成ならびに消去微生物群を土壌 DNA・RNA 解析から明らかにする。

(4) 各土壌環境条件で中心的に機能する N_2O 生成ならびに消去微生物群を土壌から分離して性質を調べ、土壌 DNA・RNA 情報から明らかにした微生物群を確定する。

(5) 土壌環境条件の変化 - N_2O 生成・消去微生物群の変動 - N_2O 発生量の変化の関係性を明らかにし、それぞれの土壌において N_2O 生成・消去に大きく寄与している鍵微生物を特定する。

(6) N_2O 生成・消去鍵微生物のゲノム解析から土壌での生態や機能を明らかにし、それらを制御して N_2O 発生削減につながる土壌管

理技術を提案して各地域試験研究機関にフィードバックする。

3. 研究の方法

(1) N_2O 発生量測定データが得られている各地の地域試験研究機関の圃場の土壌を採取し、メタゲノム解析により脱窒機能遺伝子群の多様性と、推定される持ち主微生物群を明らかにする。

(2) 各土壌を用い、異なる土壌環境条件(添加する肥料、土壌水分、土壌温度)における N_2O 発生量を室内系土壌マイクロゾム試験により調べる。化学肥料添加の場合は ^{15}N ラベル肥料を添加し、GC-MS により $^{15}N_2O$ と $^{15}N_2$ の発生量と割合を明らかにする。

(3) N_2O の生成・消去が起こっている各条件の土壌に存在し、機能している N_2O 生成ならびに消去微生物群を土壌 DNA, RNA 解析から明らかにする。土壌から DNA, RNA を抽出し、新規 PCR プライマーを用いて各脱窒機能遺伝子をターゲットとした PCR を行う。増幅産物をシーケンスし、データベース情報から各脱窒機能遺伝子配列の持ち主微生物の分類群を推定する。

(4) シングルセル分離法により土壌から分離した脱窒菌株の機能遺伝子配列情報と(3)で得られた情報とを照らし合わせて、各土壌環境条件で中心的に機能する N_2O 生成ならびに消去微生物群を確定する。

(5) N_2O 生成・消去鍵微生物のゲノム解析から土壌での生態や機能を明らかにし、それらの制御により N_2O 発生を削減できる土壌管理技術を提案して各地域試験研究機関にフィードバックする。

4. 研究成果

(1) 土壌中の N_2O 生成・消去微生物の特定

新潟県農業総合研究所内の灰色低地土壌圃場において、尿素肥料または粒状有機質肥料を施用してその後の N_2O フラックスを測定する圃場試験をこれまでに行ってきた。 N_2O は脱窒反応の中間産物として生成し、一方、脱窒反応の最終ステップ ($N_2O \rightarrow N_2$) で消去される。継時的に採取して保存していた圃場の土壌から土壌 DNA・RNA を抽出し、 N_2O 生成に関わる脱窒反応の *nirK*, *nirS* 遺伝子ならびに N_2O 消去に関わる脱窒反応の *nosZ* 遺伝子を対象として PCR-クローンライブラリ解析を行った。

一方、同圃場の土壌からこれまでに多様な分類群に属する多数の脱窒細菌株をシングルセル分離法等により分離してきた。これらについて、16S rRNA 遺伝子 *nirK*, *nirS*, *nosZ* 遺伝子を解析して系統分類ならびに脱窒遺伝子の系統関係を明らかにした。

圃場において N_2O 発生がピークを示している時期の土壌 RNA に含まれる脱窒機能遺伝子の配列と、分離脱窒菌株の系統分類ならびに脱窒機能遺伝子の配列を照らし合わせることで、 N_2O の生成ならびに消去に寄

与している脱窒細菌を特定した。圃場での N₂O 発生のピーク時に *nosZ* を発現していると考えられる脱窒細菌の分類群が複数見出され、これらの脱窒細菌が N₂O 還元に関与している可能性が示された。

(2) 銅による脱窒細菌の N₂O 還元能の強化

脱窒細菌の N₂O 還元酵素活性 (Nos) が培地への銅 (Cu²⁺) 添加により高まるとの報告に基づき、有機質肥料に銅を添加することで脱窒細菌由来の N₂O 発生を削減できる可能性を考えた。この可否を培養菌株実験ならびに土壌マイクロゾム実験で調べた。

我々がすでに各地の農耕地土壌からシングルセル分離法等により分離して保有している多様な分類群に属する脱窒細菌を、¹⁵N-硝酸とコハク酸を含む培地で嫌氣的に培養した。培地への銅 (13 μM の硫酸銅) の添加・無添加条件において、それぞれ脱窒反応の最終産物として生成した N₂ と N₂O ガスに含まれる N₂ ガスの割合を算出した。その結果、ほぼ全ての菌株について N₂ ガスの割合が増加、すなわち、N₂O ガス発生割合が減少した。幅広い脱窒細菌について、銅添加により N₂O 還元酵素活性が高められ、脱窒に由来する N₂O 発生が低減できることが示唆された。

次に、これを利用して、土壌に施用した有機質肥料から脱窒反応に由来して発生する N₂O ガスを低減化できるかどうか、室内系土壌マイクロゾム実験により調べた。成型有機質肥料に 13 μM から 130 mM の各段階の濃度の銅 (硫酸銅溶液) を添加し、土壌に混合した。土壌水分を最大容水量の 80% に調整して保温静置し、N₂O フラックスを測定した。その結果、130 mM の銅添加によって N₂O 発生がほぼ完全に抑制された。しか 13 mM 以下の濃度では N₂O 発生は銅無添加コントロールと同等であった。有機質肥料や土壌への銅の吸着のため、純粋培養系よりもはるかに高濃度の銅添加が N₂O 発生低減に必要であったと考えられた。

(3) N₂O 除去・植物生育促進脱窒細菌のゲノム解析

これまでに水田土壌から多数の脱窒細菌を分離し、N₂O 還元能力の高い菌株を選抜してきた。さらに、植物生育促進能を示す菌株を選抜した (N₂O 除去・植物生育促進脱窒菌)。選抜した菌株について、有機質肥料に添加することにより、土壌に施用した際の N₂O 発生を削減できることを圃場試験で確認し、また、牧草 (チモシー、赤クローバー) の生育と土壌からの N₂O 発生を削減できることをポット試験で確認した。

N₂O 除去・植物生育促進脱窒菌のうちの 2 菌株 (*Azospirillum* sp. TSA2S および *Azospirillum* sp. TSH100) についてゲノム解読を行い、植物生育促進に関連する機能の遺伝的基盤を明らかにした。両菌株ともに硝酸のアンモニアへの異化的還元 (DNRA)、窒素固定、ならびにリン溶解に関わる機能遺

伝子群を保有していた。両菌株ともに、Phosphonate cluster (*phn*) 遺伝子、2, 4-Dacetylphloroglucinol synthesis, Hydrogen cyanide synthesis, Acetoin/2, 3-butanediol synthesis に関わる機能遺伝子群は保有していなかった。また、TSA2S 株は Auxin synthesis ならびに ACC diamination に関わる機能遺伝子を保有していたが、TSH100 株はそれらを保有していなかった。

これらのことから、TSA2S 株は窒素固定、リン溶解、植物ホルモン生成、ACC 除去などの総合的な作用により、TSH100 株は窒素固定、リン溶解などの総合的な作用により植物生育促進効果を示すものと考えられた。

一方、これらの菌株を用いて N₂O 削減・植物生育促進効果を有する微生物資材を開発することを念頭に、土壌中における両菌株の菌数を定量するためのプライマーを、ゲノム情報を利用して設計した。

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 4 件)

Nan Gao, Weishou Shen, Estefania Camargo, Yutaka Shiratori, Tomoyasu Nishizawa, Kazuo Isobe, Xinhua He, Keishi Senoo, Nitrous oxide (N₂O)-reducing denitrifier-inoculated organic fertilizer mitigates N₂O emission from agricultural soils. *Biol Fertil. Soils*, 査読有, 53, 885-898 (2017), doi:10.1007/s00374-017-1231-z

Nan Gao, Weishou Shen, Hiroko Kakuta, Nobuhiro Tanaka, Toru Fujiwara, Tomoyasu Nishizawa, Noriko Takaya, Tadashi Nagamine, Kazuo Isobe, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo, Inoculation with nitrous oxide (N₂O)-reducing denitrifier strains simultaneously mitigates N₂O emission from pasture soil and promotes growth of pasture plants. *Soil Biol. Biochem.*, 査読有, 97, 83-91 (2016), <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.03.004>

磯部一夫、妹尾啓史 環境中の脱窒微生物に関する研究の進展 バイオサイエンスとインダストリー、査読有、73(5) 374-377 (2015)

Wei Wei, Kazuo Isobe, Tomoyasu Nishizawa, Lin Zhu, Yutaka Shiratori, Nobuhito Ohte, Keisuke Koba, Shigeto Otsuka and Keishi Senoo, Higher

diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. ISME J., 査読有, 9, 1954-1965 (2015), doi: 10.1038/ismej.2015.9

[学会発表](計 16 件)

Keishi Senoo, Microbial Ecology of Nitrogen Dynamics in Agricultural Soils: Key Drivers of Reductive N Transformation in Paddy Field and N₂O Generation in Upland Field, 2018 International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, June 18-20, 2018, ICC JEJU (Jeju, Korea)

西澤智康・迫田翠・花岡彩乃・鈴木義人・山下竜司・兼井啓介・原田健一・妹尾啓史、*Azoarcus* sp. KH32C 株が保有するポリケチド合成酵素遺伝子の分子遺伝学的解析、日本ゲノム微生物学会年会、2018年3月5~7日、京都大学(京都市)

Keishi Senoo, Microbial Drivers of Nitrogen Transformation in Rice Paddy Soil: Identification, Isolation and Application to N₂O Mitigation, 南京農業大学セミナー、2018年1月15日、南京農業大学(中国南京市)

Keishi Senoo, Microbial Drivers of Nitrogen Transformation in Rice Paddy Soil: Identification, Isolation and Application to N₂O Mitigation, 南京信息工程大学セミナー、2018年1月15日、南京信息工程大学(中国南京市)

畔上洋一、藤村玲子、磯部一夫、魏魏、角田洋子、白鳥豊、西澤智康、木庭啓介、大手信人、大塚重人、妹尾啓史、陸域環境における脱窒微生物群集組成の比較、日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5~7 日(宮城県仙台市)

Keishi Senoo, Microbial Drivers of Nitrogen Transformation in Rice Paddy Soil: Identification, Isolation and Application to N₂O Mitigation, 中国浙江大学セミナー、2017 年 7 月 11 日、浙江大学(中国浙江省)

Keishi Senoo, Microbial drivers of nitrogen transformation in rice paddy soil: Identification, isolation, and application to N₂O mitigation, 中国江蘇大学セミナー、2017 年 3 月 27 日、江

蘇大学(中国鎮江市)

妹尾啓史、水田土壌の窒素変換微生物：特定・分離と N₂O 削減への利用、第 34 回 土・水研究会 物質循環とそれを駆動する微生物、2017 年 2 月 27 日、つくば農林ホール(茨城県つくば市)

Keishi Senoo, Greenhouse gas and soil microorganisms: N₂O generating and eliminating microbial communities in agricultural soils, China-Japan Environmental Microbiology Forum, Nov. 13, 2016, 西南大学(Chongqing, China)

Tomoyasu Nishizawa, Maika Mizusawa, Fumitaka Shiotsu, Shohei Sakuda, Toru Fujiwara, Hiroyuki Ohta, Keishi Senoo, Plant growth promoting ability of the denitrifying and N₂O-reducing bacterium *Azoarcus* sp. strain KH32C in low nitrogen condition, The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology, Sept. 30 – Oct. 2, 2016, 国立台湾大学(Taipei, Taiwan)

西澤智康、水澤舞花、塩津文隆、作田庄平、藤原徹、太田寛行、妹尾啓史、脱窒細菌 *Azoarcus* KH32C 株接種による窒素無施用水田土壌でのイネ生育促進、日本土壤肥料学会 2016 年度佐賀大会、2016 年 9 月 20-22 日、佐賀大学(佐賀県佐賀市)

Keishi Senoo, Denitrifying Microbial Community in Agricultural Soils: Key Players Involved in N₂O Generation and Elimination, 105th International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, June 16, 2016, ICC JEJU, (Jeju Island, Korea)

Keishi Senoo, Greenhouse Gas and Soil Microorganisms: Key Denitrifiers Responsible for N₂O Generation and Elimination, 120th Anniversary of Shanghai Jiao Tong University, 2016. 4.27, Shanghai Jiao Tong University, School of Agriculture and Biology (Shanghai, China)

Keishi Senoo, Which microbes generate and eliminate N₂O in agricultural soils?, BioTechnology Institute Seminar, 2016.3.21, Minnesota University (St. Paul, Minnesota, USA)

畔上洋一, 磯部一夫, 魏魏, 角田洋子, 白鳥, 西澤智康, 木庭啓介, 大手信人, 大塚重人, 妹尾啓史, 陸域環境における亜硝酸還元酵素遺伝子の分布と組成、日本微生物生態学会第30回大会、7th JTK Symposium、2015年10月17日~20日、亀城プラザ(茨城県土浦市)

Isobe Kazuo, Wei Wei, Shiratori Yutaka, Nishizawa Tomoyasu, Otsuka Shigeto, Senoo Keishi, Who produces N₂O in cropland fields?, 日本微生物生態学会第30回大会、7th JTK Symposium、2015年10月17日~20日、亀城プラザ(茨城県土浦市)

〔図書〕
なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計1件)

名称: 農耕地用一酸化二窒素低減材
発明者: 白鳥豊、土田沙由里、妹尾啓史、平柳貴弘、永峰賢、深野透
番号: 特願 2017-175439
出願年月日: 2017年9月13日
国内外の別: 国内

〔その他〕

妹尾啓史、農耕地からの N₂O ガス発生を削減し作物生産性を向上する微生物資材の開発、日本エコサイクル土壌協会講演会、2018年2月16日、AP 東京(東京都中央区)

Keishi Senoo, Identification and isolation of active N₂O reducers in rice paddy soil, and application to N₂O mitigation, China-Japan Symposium on Rhizosphere Cross-talk (NFSC-JST Cooperative Research Projects), 2018年1月13日, Nanjing Shanshui Grand Hotel (Nanjing, China)

妹尾啓史、N₂O 生成・消去微生物の特定・分離と削減技術への応用、平成28年度農業教育実技講習会・高大連携教育懇話会、2016年9月16日、拓殖大学北海道短期大学(北海道深川市)

Nan Gao, Weishou Shen, Hiroko Kakuta, Tomoyasu Nishizawa, Kazuo Isobe, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo, Inoculation of nitrous oxide (N₂O)-reducing denitrifiers mitigates N₂O emission from soil and promotes growth of pasture plants, 生態調和機構研究交流会、2016年3月31日、東京大学農学部附属生体調和農学機構(東京

都西東京市)

日経産業新聞「畑の温暖化ガス 微生物で減らす」2016年12月20日(新聞報道)

妹尾啓史、農耕地からの一酸化二窒素ガス発生を削減し作物生産性を向上する微生物資材の開発に向けて、JATAFF ジャーナル vol.4, No.5, 67 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

妹尾 啓史 (SENOO, Keishi)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 40206652

(2) 研究分担者

磯部 一夫 (ISOBE, Kazuo)
東京大学・農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 30621833

(3) 連携研究者

大塚 重人 (OTSUKA, Shigeto)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 10313074

(4) 研究協力者

白鳥 豊 (SHIRATORI, Yutaka)
新潟県農業総合研究所・基盤研究部・専門
研究員

角田 洋子 (KAKUTA, Hiroko)
東京大学・農学生命科学研究科・博士課程
大学院生

増田 曜子 (MASUDA, Yoko)
東京大学・農学生命科学研究科・博士課程
大学院生

正木 勝也 (MASAKI, Katsuya)
東京大学・農学生命科学研究科・修士課程
大学院生