

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
研究期間： 2006～2009
課題番号： 18380050
研究課題名（和文） 糸状菌生態研究の基盤構築と糸状菌の硝化・脱窒能の解明による窒素循環系の新提案
研究課題名（英文） Construction of basic fungal ecology and new proposal of nitrogen cycle system through clarification of ability of nitrification and denitrification of fungi.
研究代表者
 鮫島 玲子 (SAMESHIMA REIKO)
 静岡大学・農学部・助教
 研究者番号： 377722

研究成果の概要（和文）：

畑土壌中の脱窒糸状菌の多様性や分布・機能の特徴を明らかにするために、糸状菌群集構造、および分離した脱窒糸状菌の系統と機能の関係を調査した。また、特異的阻害剤を用いて糸状菌と細菌の土壌の脱窒活性への寄与率を比較した。また、畑土壌から分離された糸状菌の生理的特徴と脱窒遺伝子発現について調査した。

研究成果の概要（英文）：

The community structure and the relationship between the phylogeny and the denitrifying ability of the isolated fungi were investigated to clarify the feature of diversity, distribution and the function of the denitrifying fungi in the field soil. Moreover, the contribution rate of fungus denitrification to the denitrifying activity of the soil was compared to bacterial denitrification by using the selected inhibitor. Moreover, the physiological traits and the denitrification gene expression of the fungi isolated from the field soil were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：糸状菌、脱窒、亜酸化窒素、茶園土壌、群集構造解析

1. 研究開始当初の背景

長年にわたり窒素循環における硝化と脱窒は細菌により担われているとされてきた。一方、糸状菌に硝化能や脱窒能があることは古くから知られており、最近、糸状菌の脱窒機構が生化学的に明らかにされた。しかし、窒素循環における糸状菌の役割や硝酸 (NO_3^-)、亜酸化窒素 (N_2O) などの窒素汚染とのかかわりは不明である。この原因として糸状菌生態学の遅れがあげられる。

2. 研究の目的

本研究課題は糸状菌の土壌における生態と窒素循環への関与を分子生態的に解析する手法を確立すること、また確立した手法を用いて硝化能や脱窒能を有する糸状菌を分離し、その多様性・分布・機能の特徴を明らかにすることを目的とする。これらを総合し新たな窒素循環系を提案する。

3. 研究の方法

(1) 農耕地から分離した脱窒糸状菌の生理的特徴

土壌中の糸状菌の酸素要求性と脱窒の関係は多様と考えられるが、実態は不明である。これまでに、①糸状菌による N_2O 発生が確認されているチャ園土壌、および、② N_2O の発生と *Fusarium* 属糸状菌の存在がダイズ根粒着生系統に特異的なダイズ根粒根圏土壌の、2 種類の農地土壌から脱窒糸状菌が分離されていた。そこで、これらの脱窒糸状菌を供試菌株とし、以下の実験を行った。

まず、18SrDNA 部分塩基配列解析による同定を行なった。次に、チャ園土壌分離株の PDA-0-7 株とダイズ根粒根圏土壌分離株の Root-5 株について、密閉培養系(初期好気条件、初期 O_2 濃度約 21%)での N_2O 発生量と O_2 濃度を測定した。また、PDA-0-7 株については初期 O_2 濃度約 12%、約 5%、約 0%の培養系においても、測定した。

(2) 農耕地から分離した脱窒糸状菌の *CYP55* 遺伝子発現モニタリング法の確立

土壌における糸状菌脱窒活性と *CYP55* 遺伝子発現をモニタリングする方法を確立するため、まずは土壌から分離した脱窒糸状菌を用いて、培養系での脱窒活性と *CYP55* 遺伝子発現のモニタリングをおこなうことを目的とした。まず、PDA-0-7 株と Root-5 株が糸状菌に特有な NO 還元酵素遺伝子 (P450nor の遺伝子 *CYP55*) を保持しているかどうか調査するため、ゲノム DNA からの *CYP55* の PCR 増幅を試みた。次に脱窒活性が高発現となる培地を用いて ECD-GC で脱窒活性を経時的に測定し、それに伴う *CYP55* 発現の real-time PCR を用いた定量解析を試みた。

(3) 農耕地土壌における糸状菌群集構造解析と脱窒糸状菌の分離

土壌中での糸状菌の動態解析および、脱窒糸状菌の生態的な位置づけを行うことを目的とし、糸状菌の群集構造解析を、18SrRNA 遺伝子と 28SrRNA 遺伝子までの領域 (IGS 領域) を標的とした Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) を用いて解析した。また、群集構造を行った圃場の脱窒糸状菌を多様な分離条件で分離し、脱窒糸状菌のコレクションを作成した。

供試土壌には窒素を年 40kg/10a 施肥した対照区と、その3倍の窒素肥料(年 120kg/10a)を施肥した 3N 区の茶園土壌(野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点)を用いた。まず圃場における N_2O 発生を測定した。また、微生物の脱窒に影響を及ぼす土壌環境要因を調査するために土壌の理化学性試験を行い、次に希釈平板法により各土壌の糸状菌を計数した。培地にはクロラムフェニコールと 5mM の NaNO_3 を添加したローズベンガル培地の

pH4.5 と pH6.8 の 2 種類を用い、好気培養とアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を用いて嫌気培養を行った。計数を行った平板より各分離方法につき 10 株、計 80 株の糸状菌を単離した。

(4) 脱窒糸状菌の系統と脱窒能の解析

(3) で分離した計 80 株の糸状菌の N_2O 発生能を調査した。また、好気培養単離株のうち 28 菌株については ITS 領域を標的とした PCR を行い、その DNA 塩基配列を決定した。その後 DDBJ の BLAST プログラムを用いて決定した塩基配列の相同性検索を行った。

(5) 基質誘導呼吸阻害法 (S I R I N法) による茶園土壌における糸状菌脱窒の寄与の推定

茶園土壌からの亜酸化窒素発生が細菌と真菌のどちらの代謝に由来するのかを基質誘導呼吸阻害法を用いて調査した。調査に先立ち、使用する抗生物質に対する耐性菌の計数・分離・同定・脱窒活性調査をおこない、また硝酸濃度・炭素源濃度・抗生物質の溶媒の種類・測定時間などの最適条件を検討した。

4. 研究成果

(1) 農耕地から分離した脱窒糸状菌の生理的特徴

18SrDNA 部分塩基配列解析による分離菌株の同定を行なった結果、チャ園土壌からは *Aspergillus* 属、*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属の脱窒性糸状菌が、ダイズ根粒根圏土壌からは *Fusarium* 属の脱窒性糸状菌が同定された。これらの属の糸状菌は一般的な土壌菌とされる。

次に、チャ園土壌分離株の PDA-0-7 株 (*Aspergillus*) とダイズ根粒根圏土壌分離株の Root-5 株 (*Fusarium*) について、密閉培養系(初期好気条件、初期 O_2 濃度約 21%)で

の N_2O 発生量と O_2 濃度を測定した。また、PDA-0-7 株については初期 O_2 濃度約 12%、約 5%、約 0%の培養系においても、測定した。その結果、PDA-0-7 株は、初期 O_2 濃度約 0%の培養系以外の培養系において、 O_2 濃度の減少に伴い N_2O が検出され、嫌気になった後も N_2O を発生し続けた。Root-5 株では嫌気での N_2O 発生が検出された。

(2) 農耕地から分離した脱窒糸状菌の *CYP55* 遺伝子発現モニタリング法の確立

PDA-0-7 株と Root-5 株が、糸状菌に特有な NO 還元酵素遺伝子 (P450nor の遺伝子 *CYP55*) を保持しているかどうか調査するため、ゲノム DNA からの *CYP55* の PCR 増幅を試みた。その結果、PDA-0-7 株のゲノムからは *CYP55* 遺伝子配列は検出されなかった。一方、Root-5 株のゲノムには *CYP55* 遺伝子配列が検出された。ダイズ根粒根圏土壌では、Root-5 株が N_2O を発生しており、NO から N_2O への還元反応は *CYP55* 遺伝子が生産する P450nor が担っていることが示唆された。そこで、Root-5 株の脱窒活性が高発現となる培地を検討したところ、炭素源としてグリセロール、窒素源として硝酸を用い、さらに NH_4Cl を添加した培地で最も N_2O 生成量が増大した。そこで、脱窒活性が高発現となる培地を用いて ECD-GC で脱窒活性を経時的に測定し、それに伴う *CYP55* 発現の real-time PCR を用いた定量解析を試みたところ、脱窒活性が増加しても *CYP55* 発現量は一定であり、*CYP55* 発現量は N_2O 生成量と相関関係が無いことが示唆された。

(3) 農耕地土壌における糸状菌群集構造解析と脱窒糸状菌の分離

まず圃場における N_2O 発生を測定したところ、対照区では $0.04 \text{ mg N/m}^2/\text{h}$ 、3N 区では

8.27 mg N/m²/h 発生していた。次に希釈平板法により各土壌の糸状菌を計数した。好気培養・嫌気培養いずれにおいても対照区のほうが3N区よりも3.4~23倍高い糸状菌数を示した。培地pHは6.8よりも4.5で計数値が下がる傾向にあった。また、嫌気培養より好気培養の計数値が4.8~168倍高い値を示した。

また、糸状菌の群集構造解析を、18SrRNA遺伝子と28SrRNA遺伝子までの領域(IGS領域)を標的としたRibosomal intergenic spacer analysis (RISA)を用いて解析したところ、標準区と比較して3N区では存在するRISAの断片パターンが全く異なっており、また多様性も低くなっていた。また3N区土壌には脱窒糸状菌として報告のある*Fusarium*属や*Hypocrea*属の糸状菌が存在することが分かった。

(4) 系統と脱窒能の解析

(3)で計数を行った平板より各分離方法につき10株、計80株の糸状菌を単離しN₂O発生能を調査したところ、3N区の嫌気培養単離株はすべてN₂O発生能を示さなかったが、好気培養分離株は半分以上の株が高いN₂O発生能を示した。

3N区から分離された20菌株中8株が*Penicillium*属に近縁で、いずれも硝酸からN₂Oを発生していた。また対照区から分離された8菌株中5株が*Penicillium*属に近縁であったが、これらの株は硝酸および亜硝酸からのN₂O発生を示さなかった。このことより、供試した茶園土壌では*Penicillium*属の糸状菌が優占しており、3N区では脱窒活性を有する系統が集積している可能性が示された。

また3N区から分離された20菌株中7株が、*Hypocrea*属に近縁の株で、*H. rufa*に近縁な1株は硝酸からN₂Oを発生したが、*H. koningii*

に近縁な6株では硝酸からN₂Oを発生した株と硝酸・亜硝酸いずれからもN₂Oを発生しなかった株があった。このことから、*Hypocrea*属は系統の近い菌株間で脱窒能や脱窒様式に多様性があることが示された。

対照区から分離され、硝酸からの脱窒能を示した菌株は1株のみだったが、3N区から分離された糸状菌の脱窒活性と比較すると著しく低かった。また硝酸からの脱窒を示さない株は亜硝酸からのN₂O発生も示さなかった。

今後、糸状菌脱窒能の多様性を生む遺伝的背景の解明が望まれる。

(5) 基質誘導呼吸阻害法(SIRIN法)による茶園土壌における糸状菌脱窒の寄与の推定

まず、使用する抗生物質に対する耐性菌の計数・分離・同定・脱窒活性調査をおこない、基質誘導呼吸阻害法に影響する耐性菌が存在しないことを確認した。また硝酸濃度・炭素源濃度・抗生物質の溶媒の種類・測定時間などの最適条件を検討した。

本調査の結果、供試した茶園土壌において亜酸化窒素の発生は土壌の炭素源の種類によって細菌と脱窒の寄与率が変化することが判明した。供試土壌の全炭素含有率は高いが、易分解性の有機物炭素が低いいため、炭素源無添加の場合、亜酸化窒素の発生そのものは低いものの真菌による発生が全体の約66%を占めた。一方、易分解性の炭素源であるグルコースを添加し微生物を活性化した場合、亜酸化窒素の発生も高まり、細菌による脱窒が約60%を占めた。また、アセチレン阻害の有無で亜酸化窒素発生を比較したところ、細菌による亜酸化窒素還元活性(Nos活性)は非常に低く、本茶園土壌の脱窒細菌は窒素までの完全脱窒をほとんど行っていないことが示唆された。一方、糸状菌脱窒に

においてはアセチレン阻害により有意な亜酸化窒素発生の増加がみられたことから、糸状菌がNos活性を持っている可能性が考えられた。これまで、糸状菌の脱窒はP450_{nor}による亜酸化窒素の発生ままでであり、アセチレンにより活性阻害を受ける細菌型のNosは持たないとされてきた。もし、糸状菌が細菌型のNos活性を持っているとすれば、これまでに報告のない新しい知見となる。

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2件)

- ① Sameshima-Saito, R., Chiba, K., Hirayama, J., Itakura, M., Mitsui, H., Eda, S. and K. Minamisawa, Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding soybean root system via nitrous oxide reductase, *Appl. Environ. Microbiol.* 査読あり, 2006, 72(4), 2526-2532
- ② Reiko Sameshima-Saito, Kaori Chiba and Kiwamu Minamisawa Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean bradyrhizobia. *Microbes and Environments*, 査読あり, 21(3), 2006, 174-184

[学会発表] (計10件)

- ① 上田里美、徳元美佳、田崎大貴、鮫島玲子：茶園土壌中の亜硝酸還元酵素遺伝子のPCR-DGGE解析と脱窒細菌の分離、日本土壌微生物学会2009年度大会、要旨集P37、2009年6月12日、九州大学
- ② 山本祥子・平野智之・日比野友彰・鮫島玲子、畑土壌における糸状菌の群集構造と脱窒活性日本土壌肥料学会2008年度愛知大会、2008年9月10日、名古屋市立大学
- ③ Reiko Sameshima-Saito and Makoto Kameda Characterization and distribution of *Nitrobacter winogradskyi* MK1 isolated from the field soil simultaneously amended with cattle manure and chemical fertilizer, 12th International Symposium on Microbial Ecology2008年8月19日 Cains Convention Centre, Cains, Australia

- ④ 上田里美・廣野祐平・森田明雄・鮫島玲子、脂肪酸施用が茶園土壌の微生物と脱窒活性に及ぼす影響日本土壌微生物学会2008年度大会2008年6月13日、静岡大学
- ⑤ 亀田信、早津雅仁、小川直人、鮫島玲子、有機物連用土壌より分離した亜硝酸酸化菌に関する研究、第23回日本微生物生態学会2007年9月16日愛媛大学
- ⑥ 鮫島玲子、千葉芳里、南澤究：ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* および *B. elkanii* の多様な系統株における脱窒遺伝子と脱窒能。日本土壌微生物学会2006年6月10日、東北大学
- ⑦ 下條隼大、石橋朋剛、徳田進一、早津雅仁、鮫島玲子：農地土壌から分離した脱窒性糸状菌の解析。第22回日本微生物生態学会2006年10月28日 東京大学
- ⑧ 板倉学、伊沢剛、鮫島玲子、三井久幸、南澤究：ダイズ根粒菌超反復配列(HRS)株と通常(non-HRS)株のゲノム構造比較：第22回日本微生物生態学会2006年10月28日 東京大学
- ⑨ 亀崎沙耶花、鮫島玲子、早津雅仁：牛糞堆肥の連用が硝化菌に及ぼす影響。第22回日本微生物生態学会2006年10月28日 東京大学
- ⑩ 板倉学、佐伯和彦、大森博文、横山正、金子貴一、田畑哲之、大和田琢二、田島茂行、内海俊樹、藤田耕之助、本間佳奈、鮫島玲子、三井久幸、南澤究：ダイズ根粒菌のゲノムの構造比較と共生窒素固定能。日本土壌肥料学会2006年9月5日 秋田県立大学

[その他]

- ① 鮫島玲子：部門別進歩総説特集 第3部門 土壌生物 その2 群集構造、畑地、窒素代謝、日本土壌肥料学雑誌 第79巻 第6号、2008年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮫島 玲子 (SAMESHIMA REIKO)
静岡大学・農学部・助教
研究者番号：377722

(2) 研究分担者

徳田 進一 (TOKUDA SHINICHI)
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・野菜茶業研究所・主任研究官
研究者番号：50425576
(H19-H20：連携研究者)

加藤 憲二 (KATO KENJI)
静岡大学・理学部・教授
研究者番号：70169499