

平成22年 5月25日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380041
 研究課題名（和文） 水田土壌の脱窒微生物群の系統・機能遺伝子解析とコミュニティゲノミクスの基盤形成
 研究課題名（英文） Phylogenetic and functional analysis of key denitrifiers in rice paddy soil: towards community genomics of soil microorganisms
 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・教授
 研究者番号：40206652

研究成果の概要（和文）：水田は温室効果ガス N_2O の発生や地下水を汚染する硝酸の溶脱の少ない環境保全型農地である。これは水田土壌の高い脱窒活性に由来するが、脱窒を担っている土壌微生物は良く分かっていなかった。本研究では、いくつかの異なる手法を用いて水田土壌で機能している脱窒細菌群を詳細に明らかにした。また、得られた遺伝子情報を利用して土壌の脱窒菌や脱窒活性の遺伝子診断を行う手法について、その基盤を整えた。

研究成果の概要（英文）：Rice paddy soil has been shown to have strong denitrifying activity. However, the microbial populations responsible for denitrification have not been well characterized. We used multiple approaches, including stable isotope probing, large-scale 16S rRNA gene sequence analysis, nitrite reductase gene analysis, and a novel single-cell isolation procedure, to identify the key players in denitrification in rice paddy soil. Based on the culture-independent analyses, bacteria in the orders Burkholderiales and Rhodocyclales were identified as the key players in denitrification in rice paddy soil under both laboratory and field conditions. Based on 16S rRNA gene, *nirS* and *nirK* sequence, oligonucleotide probes for phylogenetic and functional microarray were successfully designed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：水田土壌、脱窒細菌、土壌核酸、SIP解析、FSC分離法、クローンライブラリ解析、脱窒機能遺伝子、16S rRNA 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

水田土壌には肥料や土壌有機物に由来す

るアンモニアが存在し、一部はイネの窒素養分として吸収されるが、残りの部分は硝化反

応により硝酸イオンに、さらに脱窒反応により窒素ガスに変換され大気へ放出される。水田土壌はこの硝化-脱窒反応により土壌の窒素を大気へ戻す能力が高く、窒素肥料の損失となる一方、周辺の農耕地を含む地域環境に負荷される余剰窒素を大気へ戻す窒素浄化の場としても期待されている。現在、家畜排泄物の増大や循環型農業としての有機質肥料の利用促進などにより水田土壌にはこれまでにない窒素負荷がかけられようとしている。このような水田土壌への窒素負荷に由来する二つの窒素汚染が懸念される。一つは大量の硝酸イオンが生成・流入し、その一部が脱窒されないまま下層への浸透や灌漑排水により流出して地下水や水系の硝酸汚染を引き起こすことである。もう一つは硝化あるいは脱窒の途中で生成する温暖化ガス亜酸化窒素 (N_2O) の大量発生である。

硝化-脱窒反応はいずれも土壌微生物によるものである。水田土壌における脱窒は「好氣的な酸化層において硝化により生成された硝酸イオン (NO_3^-) が、嫌氣的な還元層において嫌気性細菌により亜酸化窒素 (N_2O) を経て窒素ガス (N_2) に還元される反応」であることが長年常識とされてきた。実際、実験室内の嫌気条件下で脱窒能を示す細菌は多種知られている。ところが意外なことに土壌で実際に機能している脱窒微生物は未だ特定されていない。また、水田土壌の酸化-還元境界層 (水田微視的環境) では、硝化-脱窒が一連のプロセスとして活発に進行しており、硝化菌と脱窒微生物がコミュニティを形成して相互作用のもとに窒素変換機能を発揮していると予想されるがその実体は明らかでない。

さらに、近年、生化学や廃水処理の分野から新規な窒素代謝の発見が次々と報告されている。すなわち①糸状菌や放線菌の微好氣的条件下での脱窒 (亜酸化窒素 N_2O を生成) ②糸状菌や放線菌の共脱窒反応 (亜硝酸イオン (NO_2^-) とアミノ酸から N_2O または N_2 を生成) ③嫌気環境下での NH_4^+ と NO_2^- とからの N_2 生成 (嫌気性アンモニア酸化、Anammox) ④メタン酸化と共役した脱窒⑤原生動物の脱窒などである。このようなタイプの脱窒が水田土壌で起こっている可能性も十分にある。事実、水田土壌では、土壌の還元の進行初期や、低温条件、ある種のアミノ酸の添加により N_2O が生成し、糸状菌による脱窒が示唆されているが詳細な解析は行われていない。

すなわち、水田土壌の脱窒機能はイネの生育と環境保全に重要な意味を有しているにもかかわらず、脱窒を担う微生物群、それらの系統および機能遺伝子群に関する情報は欠落しているのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究は次の事柄を目的として実施する。

- (1) 水田土壌における脱窒経路ならびに活発に機能している脱窒微生物群を明らかにする。
- (2) 脱窒微生物群の系統分類遺伝子と脱窒機能遺伝子を網羅的に収集・整備する。
- (3) 水田土壌で機能している脱窒微生物群と脱窒機能遺伝子を迅速に診断して土壌の脱窒特性を評価するためのマイクロアレイの構築を図る。
- (4) 以上を土壌微生物コミュニティゲノミクスの基盤とし、今後の展開の起点とする。

3. 研究の方法

水田土壌で活発に機能している脱窒微生物群を特定し系統・機能遺伝子情報を取得するために、本研究では複数の手法を用いた。すなわち、Stable Isotope Probing (SIP) 法、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nir*) クローンライブラリ解析、16S rRNA 遺伝子大量シーケンス、ならびに Functional Single Cell (FSC) 分離法である。各々の方法は次の通り。

- (1) Stable Isotope Probing (SIP) 法による解析

SIP 法を脱窒菌コミュニティの解析に適用するにあたり、再現性の高い室内モデル実験系を確立した。すなわち、湛水状態で前培養した土壌をバイアル瓶に入れ、脱窒菌の基質としての 50 mg C-コハク酸ならびに脱窒の電子受容体としての 10 mg N-硝酸を添加し、気相を $Ar-C_2H_2$ 混合ガスで置換してインキュベートする Microcosm 系である。この条件下では、脱窒活性が 18~24 時間で高まる。SIP 法を実施するために ^{13}C でラベルしたコハク酸を用いた。24 時間のインキュベート後の土壌から土壌 DNA を抽出し、塩化セシウム密度勾配超遠心により、 ^{12}C -DNA を中心とする軽い DNA 画分 (L 画分) と ^{13}C -DNA を中心とする重たい DNA 画分 (H 画分)、またその中間の画分 (M 画分) を分離した。PCR-DGGE 法により、それぞれの画分の群集構造を比較した。H 画分については、16S rRNA 遺伝子および亜硝酸還元酵素 (*nirS*, *nirK*) を対象としたクローンライブラリ解析も行った。

- (2) *nirS*, *nirK* 解析に基づく水田土壌の脱窒細菌の多様性解析

本研究では、脱窒機能遺伝子である亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* および *nirK* をターゲットとしたクローンライブラリ解析および定量的 PCR を行うことによって、フィールド水田における脱窒菌の多様性と量の経時変動を調べた。また、同じ手法を室内モデル系にも適用し、フィールド水田とモデル実験系で検出される脱窒菌の傾向を比べた。東大多摩農場の水田土壌から湛水直前、湛水 2 週間後、

湛水1ヶ月後、湛水2ヶ月後の土壌をサンプリングした。室内モデル系実験は上記(1)と同様に行った。それぞれの土壌サンプルからDNAを抽出し、*nirS*および*nirK*を対象とした定量的PCRを行った。また、*nirS*および*nirK*を対象としたPCRを行い、クローニングを経て塩基配列を解読し、亜硝酸還元酵素の部分アミノ酸配列を推定した。

また、実際に水田土壌中で機能している脱窒機能遺伝子の特定を特定するため、RNA抽出が容易な新潟県農業総合研究所の水田土壌を用い、上記(1)と同様に室内モデル実験系のインキュベーションを行った。インキュベーション0~24時間後の土壌からDNAとRNAを抽出し、RNAは逆転写をしてcDNAとした。16S rRNA、*nirS*、*nirK*、*nosZ*を対象とした定量的PCRを行い、室内モデル実験系での各遺伝子の発現量の増減を調べた。また、各遺伝子をPCR増幅後クローニングを経て塩基配列を解読し、解析を行った。

(3) 16S rDNA 大量シーケンス

脱窒が活発に起こる土壌と活発でない土壌の微生物群集構造を比較解析することによって脱窒条件で増えてくる細菌群を特定することを目的とした。実験には、上記(1)で確立した室内モデル実験系を用いた。具体的には、湛水状態で前培養した水田土壌をバイアル瓶に入れ、硝酸およびコハク酸を添加し嫌気条件下、30℃にて24h培養し脱窒活性を高めた。対照として、硝酸のみ添加、コハク酸のみ添加、両者無添加でそれぞれ培養した土壌、さらに培養前の土壌を用意した。これら5つの土壌サンプルからDNAをbead beatingを用いた直接法で抽出した。16S rRNA遺伝子のV3領域を対象としたPCR-DGGE法により、5種類のサンプル間で群集構造に差があるか判断した。さらに、16S rRNA遺伝子のほぼ全長を対象にPCRを行い、クローニングを経て塩基配列を解読した。それぞれのサンプルにつき1000クローンを目標にサンガー法でシーケンスを行い、比較解析した。

(4) FSC 分離法による水田土壌の脱窒菌群の解析と分離

我々が開発したFunctional Single-Cell (FSC)分離法は、土壌から特定の機能を持つ細菌を1細胞ずつ分離するユニークな手法である。狙いの機能を持つ細菌が増殖する土壌条件を設定し、土壌に細胞分裂阻害剤を添加して増殖しようとする細胞を伸張させ、蛍光染色剤で染色し、蛍光顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを用いて1細胞ずつ分離するものである。目的とする土壌細菌コミュニティを、通常の培養法では避けられないバイアスをかけることなく、「そっくりそのまま」分離できるのが本手法の特徴である。FSC分離法を水田土壌からの脱窒細菌の分離に適用するための最適条件をまず設定した。

(1)で用いた水田土壌の室内モデル実験系を基本とし、土壌に添加する細胞分裂阻害剤の最適濃度と処理時間を検討した。また、設定した最適条件下での伸長細胞数を従来のMPN法による脱窒菌計数値と比較した。一方、菌株保存機関から入手した多様な分類群に属する脱窒菌株を用い、本実験で用いた細胞分裂阻害剤と蛍光染色剤の効果を確認した。

最適化したFSC分離法を用い、水田土壌で脱窒を行って活発に増殖した脱窒菌コミュニティを分離・解析するとともに、土壌DNA解析で示された鍵脱窒菌を単離することを目的とした。なお、本研究は分離した細菌細胞の培養に用いた培地の違いによって二つにわけられる。はじめはLB培地を用いていたが、増殖しないサンプルが多数みられたことより、後半で硝酸およびコハク酸を添加した1/100NB培地に変更した。脱窒菌の単離後はガスクロマトグラフィーを用いて脱窒能を検定した。また16S rDNAの塩基配列を解読し、系統分類を推定するとともに、亜硝酸還元酵素遺伝子*nirS*、*nirK*のPCR増幅、シーケンス解析を行った。さらに、rep-PCR DNAフィンガープリント法を用いて、さらに詳細な系統解析を行った。

(5) アレイプローブおよびPCRプライマーの設計

(1)のSIP解析から得た16S rDNA、*nirS*、*nirK*配列に基づき、九州大学の久原教授の協力を得てプローブの設計を行った。さらに、このプローブ配列を利用して、グループ特異的PCRプライマーを設計した。PCRプライマーは定量的PCRにも利用できるような増幅長を調整した。また、設計したプライマーが実際に使えるかどうか実験的に確認した。

4. 研究成果

(1) Stable Isotope Probing (SIP) 法による解析

16S rDNAを鋳型としたPCR-DGGE法により、L画分、H画分、ならびにM画分では異なった細菌群集構造が見られた。H画分に特徴的なDGGEバンドはBurkholderiales、Rhodocyclales、ならびにRhodospirillalesに近縁であることがわかった。PCR-DGGE法よりさらに厳密な結果が得られる16S rDNAを対象としたクローンライブラリ法によっても同様の結果が得られた。さらに、Rhodocyclalesに近縁な新規のグループが優占していることが明らかになった。脱窒の亜硝酸還元酵素遺伝子を利用したクローンライブラリ法では、Burkholderiales およびRhodocyclales由来の*nirS* および、Rhizobiales由来の*nirK*に近縁な遺伝子が同定された。以上の知見から、硝酸およびコハク酸を添加した水田土壌ではBurkholderiales、Rhodocyclales、

Rhodospirillales に属する細菌群、ならびに Rhodocyclales に近縁な新規のグループが脱窒に機能している主要な脱窒菌群であることが明らかとなった。なお、SIP で特定された主要な脱窒菌は FSC 分離法で単離された。

(2) *nirS*, *nirK* 解析に基づく水田土壌の脱窒細菌の多様性解析

土壌から得られたクローンは、NirS, NirK アミノ酸配列に基づくいずれの系統樹においても広い分布を示した。Burkholderiales, Rhodocyclales, Rhizobiales に属する既知の脱窒細菌由来の Nir に近縁なクローンが多く見られた一方、既知の脱窒細菌の Nir とは近縁でないクローンの存在も示され、このようなクローンは脱窒が活発な土壌から多く検出された。定量的 PCR の結果、フィールド土壌中の *nirK* の遺伝子量は *nirS* に比べ多いことが明らかになった。また、湛水後の脱窒活性が高まっていると考えられるサンプルで *nirK* のコピー数は最大になった。同様に、室内モデル実験系では土壌の培養後に顕著な *nirK* コピー数の増加がみられた。これらの結果から、水田土壌には新規なグループを含む極めて多様な脱窒菌が存在していること、それら多様な脱窒菌の分布には時期的変動があること、*nirK* 保有脱窒菌が *nirS* 保有脱窒細菌に比べて優占していることが示唆された。なお、本研究で確認された新規な *nirS*, *nirK* の持ち主が、FSC 分離法によって発見された。

新潟土壌を用いた定量的 PCR の結果、DNA の存在量はインキュベーションが進むに従って増加してゆくのに対し、RNA の発現量は脱窒活性に伴って増減し、室内モデル実験系で脱窒活性が高まるインキュベーション 20 時間後の土壌で発現量が最大となった。インキュベーション 20 時間の土壌から抽出した DNA と cDNA を対象としたクローンライブラリ解析の結果、Betaproteobacteria に近縁な 16S rRNA, *nirS* や *nosZ*, Alphaproteobacteria に近縁な *nirK* 配列が多く見られた。また、これらの中には既知の配列と近縁でない脱窒機能遺伝子を有しているものも存在していた。

(3) 16S rDNA 大量シーケンス

5 種類の土壌サンプルについて、それぞれ 1000 クローン以上をシーケンスし、合計 5312 クローンの塩基配列を解読した。多様な門に属する細菌分類群が見出され、そのなかでも Firmicutes が 5 つのサンプルで共通して優占していることが明らかになった。主成分分析により、無添加土壌、硝酸のみ、あるいはコハク酸のみ添加の土壌と比較して、硝酸およびコハク酸を添加した土壌はユニークな細菌群集構造を有している事が分かった。パターンマッチ解析により硝酸とコハク酸を添加して培養した土壌に特異的に出現したク

ローンが特定でき、相同性解析から、Burkholderiales、特に *Herbaspirillum* が特異的に増加していることが明らかになった。これらの細菌は脱窒が活発に行われる条件下で特異的に増殖するものと推定された。この結果は(1)の Stable Isotope Probing により得られた結果と一致する。

(4) FSC 分離法による水田土壌の脱窒菌群の解析と分離

(1) で用いた水田土壌の室内モデル実験系に FSC 分離法を適用した。この実験系に細胞分裂阻害剤 (ナリジクス酸、ピロミド酸、ピペミド酸) を添加してインキュベートした土壌を蛍光染色剤 (CFDA-AM) で処理し、顕微鏡観察した所、多数の伸長細胞が見られることを確かめた。細胞分裂阻害剤の濃度と処理時間を複数段階設定して検討し、最大の伸長細胞数が得られる最適条件を決定した。得られた最大伸長細胞数 (1.55×10^5 cells/g dry soil) は MPN 法による計数值 (1.74×10^5 MPN/g dry soil) と同等であり、設定条件の妥当性が確認された。一方、今回用いた細胞分裂阻害剤と蛍光染色剤は 8 目 10 属に属する 11 種の脱窒菌保存菌株を伸長・蛍光染色し、幅広い脱窒菌に有効である事も確認された。

FSC 分離法によって水田土壌 (田無農場) から 131 の伸長細胞を分離し LB 培地に植え継いだところ、82 サンプルで増殖が見られた。単離や脱窒能の検定を経て、最終的に 36 株が脱窒菌と判定された。そのうちの多くが *Azospirillum* 属と *Ochrobactrum* 属に分類された。PCR によって 14 株からは亜硝酸還元酵素 *nirK* が確認されたが、ほかの株からは検出されなかった。新たな PCR プライマーの設計が必要であると思われる。Rep-PCR DNA フィンガープリント法による解析によって、*Ochrobactrum* 属の株は系統的に均質だが、*Azospirillum* 属の株は系統的に多様であることが明らかになった。

新たに FSC 分離法で 68 サンプルを分離し硝酸およびコハク酸添加をした 1/100NB 培地に植え継いだところ、すべてのサンプルで増殖が見られた。単離や脱窒能の検定を経て、最終的に 62 株が脱窒菌として判定された。LB 培地を用いたときと異なり、*Azospirillum* 属と *Herbaspirillum* 属が主要な脱窒菌と判定された。また、38 株が脱窒機能遺伝子を保有していた。特筆すべき点は、(1) で検出された Rhodocyclales に近縁な新規の脱窒菌を単離したこと、(3) で検出した *Herbaspirillum* に近縁な鍵脱窒菌を単離したこと、および(2) で検出した新規 *nirS*, *nirK* の持ち主を解明したことである。FSC 分離法の有効性が示された。

(5) アレイプローブおよび PCR プライマーの設計

(1) の SIP 解析で得られたほとんどのクロ

ーンについて 23 塩基長の特異的プローブを設計することができた。このプローブは 2 塩基以上のミスマッチを許容しているが、このレベルのミスマッチではマイクロアレイ実験において問題がないことが久原研究室で実験的に確認されている。今後さらに配列情報が追加されることが予想されたため、最終的なプローブ設計はまた後にすることにしたが、本研究によって、16S rDNA, *nirS*, *nirK* 配列に基づいてマイクロアレイに利用可能なプローブが設計できることが確認された。

マイクロアレイ実験に先立って、定量的 PCR に使えるプライマーを作成することにした。16S rDNA に基づくプローブ配列を利用して以下の 3 つのグループ特異的 PCR プライマーが設計できた。(1) で検出された Rhodocyclales に近縁な新規のグループ、①-②で検出された *Herbaspirillum* に近縁な鍵脱窒菌、および *Azospirillum* 属のグループ、である。実際の PCR によって、ターゲットのグループを増幅できることが確認された。

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)

- ① Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S. and Senoo, K., Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.*, 査読有, 41, 2009, 2044-2051
- ② Ashida, N., Ishii, S., Hayano, S., Tago, K., Tsuji, T., Yoshimura, Y., Otsuka, S. and Senoo, K., Isolation of Functional Single Cells from Environments Using a Micromanipulator: Application to Study Denitrifying Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 査読有, 85, 2010, 1211-1217
- ③ Ishii, S., M. Yamamoto, M. Kikuchi, K. Oshima, M. Hattori, S. Otsuka, and K. Senoo, Microbial populations responding to denitrification-inductive conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S rRNA gene analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, 75, 2009, 7070-7078
- ④ Megumi Yoshida, Satoshi Ishii, Shigeto Otsuka and Keishi Senoo, The *nirK*-Harboring Denitrifiers Are More Responsive to the Denitrification Inducing Condition in a Rice Paddy Soil Than *nirS*-Harboring Bacteria. *Microbes and Environments*, 査読有, 25, 2010, 45-48

[学会発表] (計 16 件)

- ① 吉田愛美, 石井聡, 斉藤貴之, 大塚重人, 妹尾啓史, 脱窒機能遺伝子 *nirS*, *nirK* 解析に基づく水田土壌の脱窒細菌群集構造、第 24 回日本微生物生態学会札幌大会、2008 年 11 月 26 日、札幌
- ② 妹尾啓史, 石井聡, 水田土壌の窒素浄化機能に貢献する脱窒細菌群集構造の解析、農業環境技術研究所公開セミナー「農業分野におけるメタゲノム解析技術の応用の可能性」2008 年 12 月 17 日、つくば
- ③ 多胡香奈子, 石井聡, 上井祐介, 大塚重人, 妹尾啓史, Functional Single-Cell 分離法による水田土壌からの脱窒菌の分離と脱窒能の特徴、日本土壌微生物学会 2009 年度大会、2009 年 6 月 12 日、福岡
- ④ 妹尾啓史, 石井聡, 多胡香奈子, 吉田愛美, 大塚重人, 水田土壌で機能する脱窒細菌群集の特定と Single-Cell Isolation、第 25 回日本微生物生態学会広島大会、2009 年 11 月 23 日、広島
- ⑤ 多胡香奈子, 石井聡, 上井祐介, 大塚重人, 妹尾啓史, 各地の水田土壌より分離した脱窒細菌の系統と機能の多様性、第 25 回日本微生物生態学会広島大会、2009 年 11 月 23 日、広島
- ⑥ 吉田愛美, 石井聡, 多胡香奈子, 藤井大地, 大塚重人, 妹尾啓史, 水田土壌における脱窒機能遺伝子の発現解析：室内モデル系による解析、第 25 回日本微生物生態学会広島大会、2009 年 11 月 22 日、広島
- ⑦ Megumi Yoshida, Takayuki Saito, Satoshi Ishii, Shigeto Otsuka, and Keishi Senoo, Seasonal Change in Diversity of Nitrate Reducing Genes in Rice Field Soil, 12th International Symposium on Microbial Ecology, 2008 年 8 月 17-22 日、ケアンズ
- ⑧ Naoaki Ashida, Sadakazu Hayano, Satoshi Ishii, Takashi Tsuji, Yoshitaka Yoshimura, Shigeto Otsuka, and Keishi Senoo, Functional Single-Cell Isolation Method: Application to Study Denitrifying Community in Rice Paddy Soil, 12th International Symposium on Microbial Ecology, 2008 年 8 月 17-22 日、ケアンズ
- ⑨ K. Tago, S. Ishii, T. Saito, M. Yoshida, M. Yamamoto, S. Hayano, N. Ashida, T. Tsuji, Y. Yoshimura, S. Otsuka, and K. Senoo, Denitrifying Community Structure in Rice Paddy Soil Investigated by Multiple Approaches, 7th International Symposium of Subsurface Microbiology, 2008 年 11 月 16-21 日、静岡
- ⑩ Kanako Tago, Satoshi Ishii, Yusuke Uei, Shigeto Otsuka, and Keishi Senoo, Phylogenetic and Functional Diversity of

Denitrifying Bacteria Isolated from Rice Paddy Soil, MARCO SYMPOSIUM 2009 2009年10月6日, つくば

⑪ Megumi Yoshida, Satoshi Ishii, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo, Temporal shifts in diversity and quantity of nitrite reductase genes, nirS and nirK, in a rice paddy field soil, MARCO SYMPOSIUM 2009, 2009年10月6日, つくば

⑫ Keishi Senoo, Satoshi Ishii, Kanako Tago, Megumi Yoshida and Shigeto Otsuka, Multiple Approaches to Identify Key Players in Denitrification in Rice Paddy Soil, MARCO SYMPOSIUM 2009, 2009年10月6日, つくば

⑬ 石井聡、芦田直明、大塚重人、妹尾啓史、Functional single cell 分離法による水田土壌からの新規脱窒細菌株の取得、第4回日本ゲノム微生物学会年会、2010年3月7日、福岡

⑭ S. Ishii, M. Yamamoto, M. Kikuchi, K. Oshima, M. Hattori, S. Otsuka, K. Senoo, Comparative 16S rRNA Gene Clone Library Analyses Can Identify Soil Microbial Population Responding to the Denitrification-Inductive Condition, 109th General Meeting of the American Society for Microbiology, May 17 - 21, 2009, Philadelphia, U. S. A.

⑮ 石井聡、山本倫大、菊池真美、大島健志朗、服部正平、大塚重人、妹尾啓史、第3回日本ゲノム微生物学会年会、2009年3月6日、東京

16S rRNA 遺伝子の大量シーケンスによる水田土壌における脱窒細菌コミュニティの解析

⑯ Satoshi Ishii, Michihiro Yamamoto, Mami Kikuchi, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Shigeto Otsuka, and Keishi Senoo, Comparative Analysis of the 16S rRNA Gene Clone Libraries Identified Microbial Populations Responding to Environmental Changes in a Rice Paddy Soil. 10th International Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, June 15 - 19, 2009, Uppsala, Sweden

〔図書〕(計1件)

妹尾啓史・石井聡、シーエムシー出版、水田土壌で機能する脱窒細菌群集の土壌DNAに基づく特定と Single-Cell Isolation In 難培養微生物研究の最新技術II～ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望～、2010、184-196

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

日本土壌微生物学会 2010 年度大会 (東京) において公開シンポジウム「土の微生物ー地球を支える小さな生き物たち」を開催し、土壌微生物の種類や働き、利用について一般市民に分かりやすく解説した。

6. 研究組織

(1) 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・教授

研究者番号：40206652

(2) 研究分担者

大塚 重人 (OTSUKA SHIGETO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10313074