

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01156

研究課題名（和文）陸域窒素循環のミッシングリンクを解く 酸性土壌の硝化の正体

研究課題名（英文）Elucidate the missing link of terrestrial nitrogen cycle &amp;#8211; Who is the key nitrifier in acidic soil?

研究代表者

多胡 香奈子（Tago, Kanako）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・上級研究員

研究者番号：20432198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,600,000円

研究成果の概要（和文）：酸性土壌における硝化のメカニズムを明らかにするため、耐酸性硝化微生物コミュニティの窒素代謝系の特徴と主要な硝化菌の分離を検討した。その結果、新規な耐酸性型アンモニア酸化細菌の分離に成功した。また耐酸性硝化コミュニティにおいて機能する中性型の亜硝酸酸化菌を純粋分離して、中性菌でも酸性環境で機能することを示した。さらに分離した硝化コミュニティのメタゲノム解析から主要な菌株のゲノム情報を推定した。以上から硝化の過程で菌体外に生産した多量の多糖など起点とした硝化微生物コミュニティによる窒素代謝系が形成され、硝化と脱窒が同時に進行し酸性条件下でも硝化が安定的に進行するという結論を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで知られている酸性土壌環境に適応したアンモニア酸化細菌は1種のみであったが、本研究において新属と推定される新規なアンモニア酸化細菌の分離と特徴づけに成功した。さらに酸性環境でも中性型の亜硝酸酸化細菌が微生物コミュニティ中で機能することを明らかにした。これらの知見は酸性土壌における窒素循環や一酸化二窒素の生成機構の理解に貢献する。さらに酸性土壌の硝化制御技術（例えば硝化抑制剤の設計や窒素肥料施用法の改善技術）の開発に役立てることができる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of nitrification in acidic soils, we investigated characteristics of nitrogen metabolism of acid-tolerant nitrifying microbial community and key nitrifying bacteria. Isolation of a novel acid-tolerant ammonia-oxidizing bacteria was successfully achieved. Neutral-type nitrite-oxidizing bacteria that functions in the acid-tolerant nitrifying community was cultured in pure, and it was shown that even neutral nitrite-oxidizing bacteria can function in an acidic environment. Genetic information involved in nitrogen metabolism such as denitrification of heterotrophic bacteria was examined by metagenomic analysis. It is assumed that a heterotrophic bacterial community is formed by utilizing polysaccharides produced by the nitrifying bacteria, and that a complex nitrogen metabolic pathway is formed in the community. Based on these results, it was deduced that nitrification and denitrification proceed simultaneously and stably even under acidic conditions.

研究分野：土壤微生物

キーワード：窒素循環 硝化菌 アンモニア酸化菌 亜硝酸酸化菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

陸域に占める酸性土壌(pH5.5以下)の割合は30%にも及び世界中に広範囲に分布しており、このうち50%が農地に利用されているが農地への利用が可能とされ、人口増加への食糧供給の場として期待されている。また化学肥料の投入によって酸性化した土壌も広く分布する。これらの酸性土壌でも硝化活性は中性土壌と同等以上であり、さらに温室効果ガスN<sub>2</sub>Oの発生比率が高いことから、酸性土壌の硝化の解明は重要な課題とされている。しかし酸性土壌には窒素サイクルのミッシングリンクが存在している。その最大の謎は、酸性環境に適応した硝化菌アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌が不明なことであった。ところが2011年に好酸性型のアンモニア酸化古細菌が欧州の研究グループにより分離された。そして2017年には申請者らが独自の分離方法を確立し、酸性環境に適応した新規な耐酸性アンモニア酸化細菌の分離に成功した。比較ゲノム解析からこの耐酸性アンモニア酸化細菌は、海洋・塩湖固有種とされている好塩性アンモニア酸化細菌が陸域生態系に進出し酸性土壌に適応したことを示した。さらに調査対象の土壌のメタトランスクリプトーム解析(アンモニア酸化酵素のmRNA発現量)とメタゲノム解析により、この分離株が実際に強酸性土壌で硝化を担う主要な微生物であることを証明した。しかしこれらの知見だけでは、依然として酸性環境の硝化を説明することはできず、このため酸性条件下で起こる硝化と亜硝酸などの無機窒素の化学反応あるいは脱窒がどのような関係にあるのか、そして酸性土壌の高い硝化活性やN<sub>2</sub>O生成機構も謎のままであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、酸性土壌から分離した硝化菌を含む複数種の微生物からなる耐酸性硝化微生物コミュニティの窒素代謝系の特徴および硝化菌とその生育を支える複数種の細菌とが共生してコミュニティを形成し酸性環境で安定的に機能するメカニズムを解析するとともに、土壌模擬実験系を用いて硝化微生物コミュニティが酸性条件下で高い硝化能を維持し、これらのコミュニティから排出される中間代謝物亜硝酸の化学反応や脱窒菌によるN<sub>2</sub>Oの生成と消費を、ゲノム情報など多角的に解析し、硝化や他の微生物の代謝系や化学反応が関与する窒素動態を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 鍵となる硝化菌を分離あるいは集積する方法を確立し、その特徴を明らかにするために生理試験、ゲノム解析を実施した。

(2) 複数種の細菌により安定的に維持されている凝集体から全ゲノムを抽出し、コミュニティとしてゲノム解析を行い、個別の細菌のゲノムを再構築する。この結果に基づきコミュニティ全体の代謝ネットワークマップを解析した。

(3) 土壌における硝化微生物コミュニティの硝化活性や共生状態を明らかにするために、疑似土壌モデル実験系として球状の多孔質ポリビニルアルコール樹脂(PVA多孔質体)に凝集体を形成させ、安定的に生存・増殖させる方法を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 新規に分離した20種以上の細菌からなる耐酸性硝化コミュニティの中心となっているアンモニア酸化細菌を特定した。この菌株はgamma-Proteobacteriaに属するアンモニア酸化細菌(GA0100)であった。GA0100は、系統マーカー遺伝子と比較ゲノム解析から、我々がこれまで分離した耐酸性アンモニア酸化細菌*Nitrosoglobus terrae* TA0100とは、分類的には離れており新規な種あるいは属であることを示した。またTA0100の生育のpHの低限が1.9であるのに対し、GA0100ではpH3.4であった。ゲノムサイズは海洋・塩湖由来の*Nitrosococcus*属とTA0100の中間的なサイズであった。GA0100は単独では安定的に増殖できず耐酸性硝化コミュニティが形成する細胞凝集体中で安定的に増殖した。このためGA0100の細胞を遠心分別法で回収する方法を確立し実験に用いた。一方、この耐酸性硝化コミュニティには亜硝酸酸化細菌(GN0100)が存在することがコミュニティのアンプリコン解析により示された(以下(3)で詳述)。この耐酸性硝化コミュニティ中では、硝化はGA0100とGN0100が共生的にアンモニア亜硝酸硝化という完全硝化反応を進めていることが示された。

(2) GA0100のゲノム配列を決定しコードされる遺伝情報を解析した。TA0100および既知の塩湖や海洋に生息する好塩性アンモニア酸化細菌(*Nitrosococcus*属)とGA0100の比較ゲノム解析を行い、機能の推定や進化的な類縁性を解析した。その結果、GA0100は*Nitrosococcus*が保持している浸透圧耐性関係の遺伝子を維持していた。しかしTA0100はこれらの遺伝子を失っていることから、GA0100は*Nitrosococcus*が陸域に進出してTA0100が分岐する前の種であると推察された。またGA0100はTA0100が失っている脱窒系の遺伝子を一部保持していた。さらに系統遺伝子やゲノム情報の比較からGA0100は、*Nitrosoglobus terrae*と好塩性アンモニア酸化細菌(*Nitrosococcus*)の中間に位置付けられた(図1)。

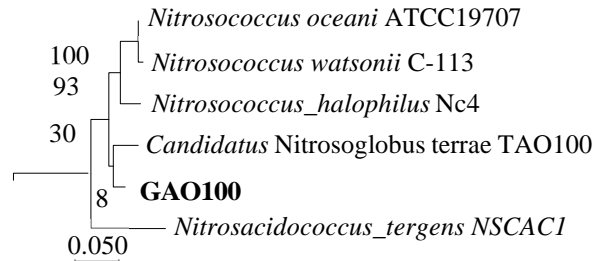


図1 16SrDNA 配列に基づく GAO100 株の系統的位置づけ

アウトメンバー : *Nitrosomonas europaea* ATCC19718

(3) 耐酸性硝化コミュニティにおいて亜硝酸酸化を担う GNO100 の純粋分離に成功した。この分離株のゲノム配列を決定して遺伝情報を詳細に解析した。16SrDNA 配列の比較から GNO100 は *Nitrobacter hamburgensis* と同種と考えられた。しかしゲノムタイピング「ANI (Average Nucleotide Identity)」の結果からは別種あるいは別属と推定された。また *N. hamburgensis* のゲノムサイズは 4.4Mb であり、GNO100 は 3.4Mb とかなり小さく、CDS 数も少なかった。本菌株は硝酸還元酵素から一酸化窒素還元酵素までの脱窒系遺伝子を保有していたが、一酸化二窒素還元酵素は有していなかった。また耐酸性に必要な遺伝子も確認されなかった。そこで培養実験で調べたところ、pH6 以下では生育しなかった。しかし硝化微生物コミュニティは pH3.5 程度まで亜硝酸酸化能を示すことから、このコミュニティは GNO100 を酸性から保護する機能を有するかあるいは GNO100 が酸性環境に耐える未知の機能を有していると推定された。

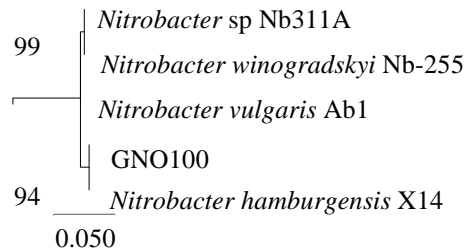


図2 16SrDNA 配列に基づく GNO100 株の系統的位置づけ

アウトメンバー : *Nitrosomonas europaea* ATCC19718

(4) 完全長 16SrDNA のアンプリコン解析の結果から、コミュニティを構成する細菌は約 20 種類程度で、このうち GNO100 の割合は約 30%、GAO100 は約 15%であった。また細胞凝集体を構成する多くの細菌種は未培養菌で新種、新属と推定された。ショットガンメタゲノム解析からは既知の一酸化窒素還元酵素遺伝子と相同性の高い 3 つの遺伝子を含む各種 脱窒系遺伝子群が確認された。以上から本コミュニティは硝化・脱窒サイクルを駆動する細菌群から構成されていることが示された。

(5) GAO100 と GNO100 を含む 20 種以上の微生物コミュニティのロングリードおよびショートリードメタゲノム解析を行い、構成する個々の微生物のゲノムをアセンブルした。その結果、11 種の細菌について Finished Level MAG (完全性の高いゲノム) が、11 種の細菌については High-quality draft MAG (前記に次ぐ完全性) を構築することができた。Finished Level MAG が得られた細菌のうち、11 種が脱窒遺伝子 *NirK* を有しているが、このうち *Nor* を有するものは 4 種、*NosZ* を有するものは 1 種のみであった。このほかの代謝遺伝情報、さらには GAO100 と GNO100 のゲノム情報から微生物コミュニティ中の微生物間の代謝系の関係性を示す代謝ネットワークマップの作製が可能となった。一方、これらの菌株は培養液中で強固な凝集体を形成し、凝集体を成長させながら分散しさらに凝集体として増殖した。GAO100 と GNO100 を除く構成種はメタゲノム解析から従属栄養細菌と考えられ、脱窒代謝系を有する種も多数確認された。このことからこれらの従属栄養細菌は、硝化反応を担う GAO100 がアンモニアを GNO100 が亜硝酸をエネルギー源として炭酸固定し増殖して、この過程で菌体外に生産した多量の多糖や GAO100・GNO100 の死菌体を栄養源として利用し増殖していると推定された。このように硝化菌による炭酸固定を起点とした微生物コミュニティによる窒素代謝系が形成され、凝集体中の酸素濃度や pH の不均一性などの環境要因の影響下で硝化と脱窒が同時に進行し酸性条件下でも硝化が安定的に進行すると推定された。

(6) 当初計画で予定した PVA (ポリビニルアルコール polyvinyl alcohol) 多孔質体を用いた微生物コミュニティの形成を検討したが、GAO100 は GNO100 を含む複数種の細菌と安定的な凝集体を形成しており、PVA 多孔質体に微生物コミュニティを形成させることは困難であった。GAO100 が生産する細胞外多糖と推定される物質がコミュニティの安定化と凝集体の形成に寄与しているためと推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohbayashi Tsubasa, Wang Yong, Aoyagi Luciano Nobuhiro, Hara Shintaro, Tago Kanako, Hayatsu Masahito	4. 巻 38
2. 論文標題 Diversity of the Hydroxylamine Oxidoreductase (HAO) Gene and Its Enzyme Active Site in Agricultural Field Soils	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME23068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.ME23068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大林翼・王勇・原新太郎・廣野祐平・多胡香奈子・早津雅仁
2. 発表標題 農耕地土壌におけるヒドロキシルアミン酸化還元酵素（HAO）およびその活性中心の多様性解析
3. 学会等名 日本土壌微生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 早津雅仁・王勇・Luciano Nobuhiro Aoyagi・大林翼・原新太郎・青野俊裕・廣野祐平・高見英人・多胡香奈子
2. 発表標題 Gammaproteobacteria に属するアンモニア酸化細菌の茶園土壌における分布と特徴
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Luciano Nobuhiro Aoyagi・Tsubasa Ohbayashi・Shintaro Hara・Toshihiro Aono・Yong Wang・Yuhei Hirono・Kanakano Tago・Masahito Hayatsu
2. 発表標題 Genome analysis of ammonia-oxidizing bacteria (AOB), Nitrosomonas sp. and Nitrosospora spp. isolates from tea field soils
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大林翼・王勇・原新太郎・廣野祐平・多胡香奈子・早津雅仁
2. 発表標題 hao と amoA に着目した農耕地土壌における硝化菌の多様性解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Luciano Nobuhiro Aoyagi, Yong Wang, Tsubasa Ohbayashi, Shintaro Hara, Toshihiro Aono, Yohei Hirono, Hideto Takami, Kanako Tago, Masahito Hayatsu
2. 発表標題 Isolation and characterization of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) belonging to $\gamma$ -proteobacteria and a nitrite-oxidizing bacteria (NOB) from tea field soils
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大林 翼、王 勇、Aoyagi Nobuhiro Luciano、原 新太郎、多胡 香奈子、早津 雅仁
2. 発表標題 農耕地における硝化菌の多様性解析と新規硝化抑制剤の開発
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友 優里, 黒岩 恵, 藤谷 拓嗣, 徳田 進一, 早津 雅仁, 多胡 香奈子, 諏訪 裕一
2. 発表標題 培養時間が農耕地土壌のグロス硝化速度に与える影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水 千尋, 大友 優里, 黒岩 恵, 藤谷 拓嗣, 早津 雅仁, 多胡 香奈子, 諏訪 裕一
2. 発表標題 15N標識N20を使用した土壌からのN20のgross 生成速度の測定の試み
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多胡香奈子, 王勇, 高橋悠, 藤谷博嗣, 廣野祐平, 常田聡, 早津雅仁
2. 発表標題 強酸性茶園土壌由来の完全硝化菌を含む集積培養微生物群集のメタゲノム解析
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王勇, 徳田進一, 多胡香奈子, 早津雅仁
2. 発表標題 施肥条件が異なるキャベツ畑土壌の完全硝化菌群集とアンモニア酸化菌群集の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早津雅仁, 王勇, 大久保卓, 廣野祐平, 宇田川真由美, 多胡香奈子
2. 発表標題 土壌に存在する -プロテオバクテリア属のアンモニア酸化細菌の分布と多様性
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回山梨大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanaako Tago, Yuhei Hirono, Masahito Hayatsu
2. 発表標題 Unique characteristics of tea field soils which allows coexistence of various ammonia-oxidizers
3. 学会等名 第6回国際硝化菌学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	早津 雅仁 (Hayatsu Masahito) (70283348)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・再雇用職員  (82111)	
研究分担者	諏訪 裕一 (Suwa Yuichi) (90154632)	中央大学・理工学部・教授  (32641)	
研究分担者	藤谷 拓嗣 (Fujitani Hirotsugu) (50708617)	中央大学・理工学部・助教  (32641)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------