

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710004

研究課題名（和文） 亜酸化窒素発生における土壌糸状菌の生態学的役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the ecological significance for nitrous oxide emission by soil fungi

研究代表者

佐藤 嘉則（SATO YOSHINORI）

独立行政法人国立文化財機構 東京文化財研究所・保存修復科学センター・研究員

研究者番号：50466645

研究成果の概要（和文）：

本研究は、温室効果ガスである亜酸化窒素（ N_2O ）を生成する土壌糸状菌のデータベース構築を行うものであり、従来、細菌グループが専ら担っていると考えられてきた窒素循環（硝化、脱窒）に果たす糸状菌の生態学的役割を再検証することを目的とした。主な成果として土壌糸状菌の広範な系統群に N_2O 生成活性が認められること、 N_2O 生成活性強度は系統群によって分けられること、を明らかにした。これらの成果は農耕地からの亜酸化窒素発生を制御する持続型の土壌管理技術開発に向けた基盤的知見の提供になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

This research aimed to construct the databases of nitrous oxide (N_2O)-producing fungi, and to reevaluate the ecological role of soil fungi for the nitrogen cycle (nitrification and denitrification). The activity of N_2O production was observed in the extensive phylogenetic groups of soil fungi, and the intensity of N_2O producing activity was divided by phylogenetic groups. These results offer the foundational knowledge towards the sustainable agricultural practices for controlling the N_2O emission from field soil.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：物質循環

1. 研究開始当初の背景

(1) 農耕地から発生する温室効果ガスの重要性： 温室効果ガスである亜酸化窒素（ N_2O ）は1分子あたりの温室効果ポテンシャルが二酸化炭素の約300倍であり、いったん放出すると対流圏で140年ほどの平均滞留時間を持つ安定なガスである。また、成層圏ではオ

ゾン層の破壊に関与していることが知られている。 N_2O の大気中の濃度は産業革命以降に急速に上昇しており、1992年の時点で年間増加率は3～4.5 Tg N と推定されている（Watson ら、Climate Change 1992）。その人為的発生源としては、バイオマス燃焼（10%）や化石燃料の燃焼（14%）のほか、窒素肥料を

施用する農耕地からの放出(10%)などが見積もられている(Bouman, 1988)。近年の人口爆発に伴う食料問題やバイオ燃料生産の拡大といった世界の動向から、施肥土壌の拡大とそれに伴う N_2O の長期的な濃度上昇が懸念されており、 N_2O 発生を制御する持続型の土壌管理技術開発は喫緊の課題である。

(2) 亜酸化窒素の生成への糸状菌の寄与：これまでの知見によれば、 N_2O は、主に細菌グループによって脱窒反応の中間産物または硝化反応の副産物として生成するとされてきた。しかし、Laughlin と Stevens (2002) は、土壌における N_2O 生成の担い手を再考する必要性を示した。彼らは、草地土壌に細菌および糸状菌の増殖阻害剤を添加し、 N_2O 生成量に占める両者の寄与率を調査した。その結果、 N_2O 生成量は無処理土壌に比べ糸状菌阻害剤で 89%、細菌阻害剤で 22%減少し、糸状菌が N_2O 生成において優占することが示された。また、研究代表者らのグループが行った研究では、茨城大学内の畑地土壌を異なる耕起条件と異なる冬季カバークロップの条件で管理して糸状菌密度を変化させた場合、土壌糸状菌バイオマスと現場土壌での N_2O 発生量は正の相関関係を示す結果を得ている (Zhaorigetu ら 2008)。

(3) 糸状菌による亜酸化窒素の生成：糸状菌による N_2O 生成に関して、祥雲らは糸状菌 *Fusarium oxysporum* について詳細な研究を行っており、硝酸イオンや亜硝酸イオンから N_2O に還元する活性(脱窒経路)を持つことを見出した(Shoun と Tanimoto 1991; Shoun ら 1992 など)。さらに、脱窒反応のシステムがミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア中の硝酸還元酵素と亜硝酸塩還元酵素の活性が呼吸鎖と連動して嫌気呼吸のように機能することを示した(Kobayashi ら 1996; Takaya ら 1999)。研究代表者らのグループは、茨城大学内の畑地土壌から分離した糸状菌株(54株)について N_2O 生成活性を測定した結果、13種41株から N_2O 生成活性が検出された(鶴田ら、日本土壌肥料学会 2007、2008 年度大会)。しかし、糸状菌(酵母も含む)の脱窒活性は一部の系統でしか検討されていないため、糸状菌の系統と N_2O 生成活性とを関係付けた体系的なデータベースの構築は必要な課題である。

(4) 糸状菌の新規 N_2O 生成経路：Laughlin と Stevens (2002) は、草地土壌での硝化反応においても糸状菌の従属栄養的な硝化量が細菌の硝化量を上回るという結果を報告している。糸状菌による硝化反応は、Stutzer と Hartleb(1896)や Schmidt ら(1954)などの報告があるが、糸状菌硝化と N_2O 生成を関連

付けた研究は行われていない。研究代表者らは予備実験において、糸状菌 *Metarhizium* 属分離株がペプトンのような有機体窒素やアンモニウムイオンから N_2O を生成することを見出した。

(5) N_2O 生成糸状菌に内生する細菌：亜酸化窒素生成糸状菌分離株のうち、*Moritierella elongate* と同定された菌株(FMR23-1株)を顕微鏡観察した結果、菌糸内に細菌様の構造体が確認された(Y. Sato ら 2008: International Symposium on Microbial Ecology)。この FMR23-1 株の菌糸体から DNA を抽出して、原核生物に固有な 16S リボソーム RNA 遺伝子を系統解析した結果、*Betaproteobacteria* 綱の *Burkholderiaceae* 科に属する新属新種の細菌の存在が示唆された。糸状菌内生細菌が、 N_2O 生成に関与するかどうかを明らかにすることは N_2O 生成抑制の技術開発への展開が期待されるだけでなく、学術的な意義も大きい。なお、細菌が内在する糸状菌については、*Rhizopus microsporus* (内生細菌は *Burkholderia* 属) (Partida-Martinez と Hertweck 2005) と AM 菌根菌 (内生細菌は *Burkholderiaceae* 科の新属) (Bianciotto ら 2003) の例がある。

2. 研究の目的

先述の背景を踏まえて、本研究では、以下の3項目の解明を目的とした。

(1) N_2O 生成活性を有する土壌糸状菌の網羅的な解析：畑地土壌からの糸状菌分離株コレクションを体系的に作製し、 N_2O 生成活性と関係づけたデータベースを構築する。また、代表的な菌株について、培養環境条件が N_2O 生成活性に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 新規 N_2O 生成経路の解明：土壌糸状菌分離株コレクションから、有機体窒素およびアンモニウムイオンから N_2O 生成活性を有する菌株をスクリーニングする。さらに、代表的な菌株を用いて N_2O 生成経路を明らかにする。

(3) N_2O 生成糸状菌に内生する細菌と N_2O 生成との関係の解明：細菌内生糸状菌について、内生する細菌が N_2O 生成に関わるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

亜酸化窒素生成活性を有する糸状菌の網羅的解析は、茨城大学フィールドサイエンス教育研究センター陸稲連作体系無施肥区土壌および九州沖縄農業研究センターの家畜スラリー連用土壌供試した。そこから網羅的に糸状菌の分離と同定を行い、 N_2O 生成能を有する菌株を Shoun ら(1992)の方法を用いてスクリーニングした。同時に、新規 N_2O 生

成経路を有する糸状菌のスクリーニングも
行い N₂O 生成土壌糸状菌のデータベースの構
築を行った。新規 N₂O 生成経路の解明および
内生細菌保有糸状菌の N₂O 生成機構の解明で
は、下記に記す 3 つを経路を想定し実証を試
みた。供試菌株は、*Metarhizium* 属菌を代表
株とし、さらにスクリーニングで得た株を追
加した。後者では、N₂O 生成能を有する糸状
菌について内生細菌の存在の有無を検討し
た。内生細菌を保有している糸状菌について
は、宿主からの内生細菌の分離もしくは除去
を行い、N₂O 生成に内生細菌が関与するか否
かを明らかにした。

4. 研究成果

N₂O 生成活性を有する糸状菌の分離と同定
についての解析を行った結果では、茨城大学
フィールドサイエンス教育研究センター陸
稲連作体系無施肥区土壌(以下、FSC と省略)
および九州沖縄農業研究センターの家畜ス
ラリー連用土壌(以下、NARC と省略)を供試
して、FSC 試料では、糸状菌株を 54 株分離し
て同定を行ったところ、*Mortierella*
elongata に近縁な種が 40%と多く検出され、
N₂O 生成活性を測定した結果、分離株の 77%
が硝酸からの N₂O 生成活性を示した。一方、
NARC 試料では糸状菌を 46 株分離し、同定を
行ったところ、*Cheilymenia stercorea* に近
縁な種が 63%と多く検出され、N₂O 生成活性で
は、分離株の 44%が硝酸からの N₂O 生成を
示した。亜硝酸からはほぼ全ての分離株が N₂O
生成活性を有していた。また、種の違いによ
って活性強度が大きく異なることが明らか
となった。具体的には、*Hypocreales* 目に属
する *Metarhizium*, *Myrothecium*,
Clonostachys, *Trichoderma*, *Fusarium* 属菌
に近縁な分離株から高い N₂O 生成活性が認め
られた。この結果を受けて、N₂O 生成糸状菌
の代表菌株を選抜し、新規 N₂O 生成経路の解
明および内生細菌保有糸状菌の N₂O 生成機構
の解明を行った。新規 N₂O 生成経路について
は、各種阻害剤を用いて次の 3 つを経路の推
定を試みた。なお、供試菌株は *Metarhizium*
属分離株を代表株とした。①硝化反応によっ
て、有機体窒素が硝酸イオンに酸化され、続
いて脱窒反応により硝酸イオンから N₂O を生
成する経路。②硝化過程から副産物として N₂O
を生成する経路。③アルギニンから一酸化窒
素を生成し、さらに一酸化窒素から N₂O を生
成する経路。現在までに、一酸化窒素生成酵
素の阻害剤(L-NAME)の実験から、阻害剤を
加えた場合でも N₂O 生成が認められたため③
の経路である可能性は低い。今後①および②
に関してさらに解析を進める必要がある。一
方、内生細菌保有糸状菌の N₂O 生成機構の解
明では、N₂O 生成糸状菌で内生細菌を保有す
る菌株 *Mortierella elongata* について詳細

に検討した。単孢子分離法から内生細菌を保
有していない株の選抜に成功した。保有株、
非保有株について N₂O 生成活性を検討したが、
どちらの株からも同程度の N₂O 生成が認めら
れた。また、保有株の DNA を抽出し、脱窒関連
遺伝子(*nirS*, *nirK* 遺伝子)の検出を試みたが
陰性だったため、糸状菌の N₂O 生成における
内生細菌の関与の可能性は低いと考えられ
た。しかしながら、亜硝酸添加培地で嫌気培
養を行うと、内生細菌を保有している株のみ
が死滅するという現象が見出された。これは
N₂O 生成の前に発生する一酸化窒素(NO)に
よる毒性効果とも考えられ、細胞内での NO
検出や脱窒関連遺伝子の再検討などの課題
が挙げられた。また、*Mortierella* 属以外の N₂O
生成糸状菌についても内生細菌の検出およ
び内生細菌保有糸状菌の N₂O 生成機構の解
明についてさらに解析を進める必要があると
考えられる。

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 佐藤嘉則、成澤才彦、西澤智康、小松崎
将一、太田寛行、糸状菌細胞に内生する
細菌の存在とその検出法、土と微生物、
Vol. 65, No.1, 49-54, 2011, 査読有、
<http://ci.nii.ac.jp/naid/4001879560>
9
- ② Sato, Y., K. Narisawa, K. Tsuruta, M.
Umezumi, T. Nishizawa, K. Tanaka, K.
Yamaguchi, M. Komatsuzaki, and H. Ohta,
Detection of betaproteobacteria
inside the mycelium of the fungus
Mortierella elongata soil isolates,
Microbes and Environments, Vol. 25,
321-324, 2010, 査読有、
<http://www.soc.nii.ac.jp/jsme2/>
DOI:10.1264/jsme2.ME10134

[学会発表] (計 9 件)

- ① 奈良岡雅大、佐藤嘉則、赤池恵、太田寛
行、土壌モデルを利用した畑地土壌にお
ける糸状菌の亜酸化窒素生成の解析、日
本土壌微生物学会 2011 年度大会、2011
年 11 月 26 日、宮城県大崎市
- ② 赤池恵、鶴田和人、佐藤嘉則、西村歩、
小松崎将一、太田寛行、不耕起畑地土壌
より分離した糸状菌の亜酸化窒素生
成活性、日本土壌微生物学会 2011 年度
大会、2011 年 11 月 26 日、宮城県大崎
市
- ③ Masahiro Naraoka, Yoshinori Sato,
Megumi Akaike, and Hiroyuki Ohta,

Continuous in vitro measurement of soil N₂O production in a headspace gas-circulating jar system connected to an infrared gas analyzer, International Society for Environmental Biogeochemistry, 27-30 September, 2011, Istanbul, Turkey

- ④ 奈良岡雅大、佐藤嘉則、赤池恵、太田寛行、基質誘導呼吸阻害法を用いた土壌モデル系での細菌と糸状菌の亜酸化窒素生成活性の解析、日本微生物生態学会第27回大会、2010年10月8日、京都大学
- ⑤ 高島勇介、佐藤嘉則、東條元昭、成澤才彦、*Pythium aphanidermatum*及び*P. nunn*に内生する細菌様構造物の検出、日本微生物生態学会第27回大会、2010年10月8日、京都大学
- ⑥ Y. Sato, T. Nishizawa, M. Umezu, K. Tsuruta, K. Narisawa, M. Komatsuzaki, and H. Ohta, Predominance of nitrous oxide-producing fungus, *Mortierella elongata*, in no-tilled, low-nitrogen input upland soils, 13th International Symposium on Microbial Ecology, 22-27, August, 2010, Seattle, Washington, USA
- ⑦ Y. Sato, K. Narisawa, K. Tsuruta, M. Umezu, T. Nishizawa, M. Komatsuzaki and H. Ohta, Identification of intracellular bacteria related to the genus *Burkholderia* in the mycelia of the nitrous oxide-producing fungus, *Mortierella elongate*, 19th International Symposium on Environmental Biogeochemistry, 14-18th, Sep, 2009, Humburg, Germany
- ⑧ Y. Sato, K. Narisawa, K. Tsuruta, M. Umezu, T. Nishizawa, M. Komatsuzaki and H. Ohta, The *Burkholderia*-related bacteria presented in the mycelia of nitrous oxide-producing fungus, *Mortierella elongate*, The 1st Korea-Japan Symposium on Microbial Ecology, 28-30th, May, 2009, Jeju, Korea
- ⑨ 佐藤嘉則、鶴田和人、梅津昌史、成澤才彦、太田寛行、糸状菌細胞内生細菌の存在と亜酸化窒素生成活性の関係、日本土壌微生物学会2009年度大会、2009年6月12-13日、九州大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 嘉則 (SATO YOSHINORI)
独立行政法人国立文化財機構東京文化財

研究所・保存修復科学センター・研究員
研究者番号：50466645

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし