

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850225

研究課題名(和文)作物体に共生する脱窒菌からの好氣的N₂O発生メカニズムの解明研究課題名(英文)Mechanisms of N₂O production by denitrifiers using crop residues

研究代表者

多胡 香奈子(Tago, Kanako)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20432198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：温室効果ガス一酸化二窒素(N₂O)は葉菜類の作物体やその残さからも発生するが、そのメカニズムは不明である。そこで作物体に存在する脱窒菌群集からのN₂O発生メカニズムを解明することを目的とした。圃場からN₂Oが多量に発生している試料を回収し、そこから脱窒菌を分離して解析した。その結果、分離した脱窒菌は植物と関わりのある分類群に属していること、微好気条件で脱窒を行いN₂Oを最終生産物とすることなどが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Denitrification is a microbial respiratory process converting nitrate or nitrite to dinitrogen gases (N₂O and N₂). Nitrous oxide (N₂O) is a greenhouse gas that is estimated to be 296 times more potent than carbon dioxide, notorious for causing global warming. The mechanisms of N₂O emission from crop residues are largely unknown. The objective of this research was to isolate N₂O producing microorganisms, especially denitrifiers, from cabbage residues and understand how the denitrifiers produce N₂O using the residues.

I isolated ca. 60 denitrifiers from the residues where high N₂O emission was observed. The denitrifiers were identified to genera which are known to associate with plants. Whole genome analysis and GC-MS analyses using ¹⁵N stable isotope revealed that a representative strain of the isolates produces N₂O as the end-product of denitrification. The representative strain produce N₂O under low oxygen concentration.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境汚染

1. 研究開始当初の背景

食料の安定生産のため、農耕地には多量の窒素肥料が投入されている。その結果、農耕地の微生物群集による窒素代謝作用が影響を受け、温室効果ガス一酸化二窒素 (N_2O) の発生量が増加し続けている。国内で発生する N_2O の約 25% は農耕地で、その原因は土壌微生物の窒素代謝によるといわれている。しかしそれだけでは農耕地からの総 N_2O 発生量を十分には説明できない。しかし土壌以外の N_2O 発生源に関する情報は乏しく、 N_2O がどこでどのような窒素代謝に起因して発生しているのか全く不明である。

N_2O 生成経路の 1 つである脱窒は、嫌気～微好気環境で起こり微好気で N_2O が発生するとされる。脱窒菌の生態は、脱窒代謝遺伝子を標的とした解析に依るところが大きい。しかし脱窒遺伝子の存在量は N_2O 発生の指標にならないことが多い。一方で脱窒活性は、電子供与体、電子受容体および酸素濃度などの環境要因に左右される。また種によってその影響の程度は異なる。このため環境の脱窒能は多様な脱窒菌の個々の活性の総体といえる。従って N_2O 発生の実態を把握するためには、環境で機能する脱窒菌の代謝様式を明らかにして、それらの活性と環境要因 (酸素や基質など) との関連性を把握する必要がある。

2. 研究の目的

N_2O は施肥や降雨時に土壌から発生するだけでなく葉菜類の作物体やその残さからも発生することがあるが、あまり知られていない。これまでに申請者らは、 N_2O が土壌ではなく作物体自体から盛んに発生していることを突き止めた。作物体成分に関する知見から、葉菜類の外葉は脱窒菌に好適な環境であり、 N_2O 発生には脱窒が関与していると予想した。そこで外葉から微生物画分を回収し、独自に考案した培地に接種し好氣的環境と嫌氣的環境で培養した。すると、好氣的培養系は嫌氣的培養系より脱窒活性が高かった。従って作物体という酸素濃度の高い場所での N_2O 発生は、これまで予期していなかった好気環境での N_2O 発生源であると考えられた。以上からこれまで農作物の N_2O 発生源としての重要性は未知であった作物体からの N_2O 発生メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 葉から脱窒菌の分離

複数種類の培地を用いて、好氣的培養系から希釈平板法により脱窒菌のスクリーニングを行った。脱窒活性の測定にはアセチレン

ブロック法を用いた。

(2) 葉で機能する脱窒菌の多様性解析

分離した脱窒菌から DNA を抽出し、それを 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析に供して簡易的に分類した。

(3) 脱窒菌の脱窒代謝経路の最終生産物の特定

脱窒代謝経路の最終生産物は N_2O と N_2 であるが、それらの割合は微生物個体によって異なる。そこで分離した脱窒菌が N_2O 発生型なのか N_2 発生 (つまり N_2O 消費) 型なのか明らかにするため、安定同位体を用いた分析を行った。 ^{15}N ラベルした硝酸を分離株に与えて培養し、発生したガスを採取して GC-MS に供した。

(4) 脱窒菌の増殖と基質濃度の変化

脱窒菌を独自に考案した培地で培養し、定期的に培養液を回収し、増殖と単位時間当たりの N_2O 発生量、および硝酸の濃度を測定した。

(5) 脱窒環境中における酸素濃度の測定

酸素濃度は脱窒に大きな影響を与える因子である。そこで脱窒条件で培養しマイクロセンサーを用いて N_2O が発生しているときの培養液の酸素濃度を測定した。硝酸の測定にはカタルド法を用いた。

(6) 分離した脱窒菌のゲノム情報の取得

分離株のなかから代表菌株を決定し、そこから DNA を抽出して全ゲノム解析に供した。

4. 研究成果

(1) 葉から脱窒菌の分離

既存の合成培地と独自に考案した培地の計 3 種類の培地を用いて、それぞれの培地で生育するコロニーを全部で 900 株ピックアップし、それらを個別に培養して脱窒活性を測定した。分離株の脱窒活性に再現性があるか確かめるため、活性のあった菌株を再び培養して活性を測定した。この操作を 3 回繰り返し、脱窒菌を純化して、最終的に約 60 株の脱窒菌株を分離した。なお、スクリーニングの途中で活性が消失した菌株については、「個体の活性が不安定であった」「個体を自然生態系の状態から隔離してしまったことにより脱窒系酵素遺伝子が欠落した」「複数種類の個体が協調的に脱窒を行っていたが、パートナーと隔離されたことで協調関係が崩壊した」ことなどが考えられた。

(2) 葉で機能する脱窒菌の多様性解析

分離した脱窒菌の多様性を明らかにするため、16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った。その結果分離株は 5 属に分かれ、かつ

分離株の多くが植物と関わりの深い微生物群に属していたことが分かった。

(3) 脱窒菌の脱窒代謝経路の最終生産物の推定

分離株の中から8株を用いて脱窒の特徴を調べた。まず分離株の脱窒能と最終生産物(N₂OまたはN₂)を調べるため、アセチレンブロック法を用いて脱窒活性を測定した。脱窒菌を好気環境で(気相を窒素などの無機ガスに置換せずに)静置培養したところ、用いた8株は数倍程度の範囲で異なる脱窒活性を示した。また、いずれの菌株も最終生産物としてN₂Oを発生した。

ただ、従来法のアセチレンブロック法では脱窒菌がN₂Oのみ発生しているのかN₂とN₂Oを発生しているのかははっきりと判断できなかった。というのも、実験を進めていく中で、アセチレンが菌体の脱窒能だけでなく菌体の増殖能力など細胞の活動全体を抑制している可能性がでてきたのである。そこでアセチレンブロック法はやめて、安定同位体を用いた分析を行うことにした。15Nラベルした硝酸を培養液に加えて脱窒条件下で培養し、発生したガスを採取してGC-MSに供した。するとN₂Oは検出されたがN₂は検出されなかった。以上から分離した脱窒菌はN₂Oを脱窒の最終生産物としていることが明らかになった。

(4) 脱窒菌の増殖と基質濃度の変化

脱窒菌は独自に考案した培地で最も高い活性を示した。そこでこの培地を用いて、脱窒菌の増殖とそれに伴う基質(硝酸)濃度とN₂O発生量の変化を調べた。すると硝酸の濃度減少が始まると同時に細胞が増殖しはじめ、かつN₂O発生が起こった。その後硝酸が枯渇すると細胞の増殖も止まりN₂Oも発生しなくなった。

現時点での脱窒菌の定義は「与えた基質(本研究では硝酸)の20%以上が消費されること」及び「基質の減少に伴い細胞の増殖が認められること」である(Tiedje JM, 1994)。従って、分離株は脱窒菌であると証明された。

余談として、培養液に緩衝液としてリン酸バッファーを添加したことがある。その際も同じように細胞の増殖が認められた。ただその場合は、細胞が増殖し終わってもN₂Oの発生が継続した。従って緩衝液として加えたリンが、実は細胞の脱窒活性やN₂O発生能力に影響する重要な因子である可能性が示唆された。

(5) 脱窒環境中における酸素濃度の測定

脱窒には酸素が強く影響することは以前より知られている。そこで脱窒やN₂O発生に対する酸素の影響を調べるため、培養液をいくつかの異なる速度で攪拌・通気しながらN₂O発生量を測定した。その結果、激しく攪拌・通気するとN₂O発生量が減少した。次に、

これらのN₂O発生量の異なる培養液中の酸素濃度を明らかにすることにした。まずマイクロセンサーを用いた酸素測定法を確立した。次いで確立した測定法を用いて培養液中の酸素濃度を深度別に測定した。すると、静置培養した場合には深度数mmで酸素濃度が急激に下がりほぼゼロとなった。その一方、攪拌・通気しN₂O発生が低下した培養液の酸素濃度は大気より低いもののある程度の濃度を保った。以上から酸素濃度はN₂O発生に大きく影響することが分かった。またスクリーニングを行っていた当初は分離株は好氣的に脱窒を行うと考えていたが、実際には超低酸素濃度下で脱窒を行っていることが明らかとなった。

(6) 分離した脱窒菌のゲノム情報の取得

分離した脱窒菌の持つ遺伝子情報からそれが持つ脱窒代謝経路や関連する機能や特徴を推定するため、分離株の中から代表株を選抜し、全ゲノム解析を行った。分離株に最も近縁なものは、植物と関わりの深い細菌であった。この近縁な既知菌株は既に全ゲノムが解読されていた。そこでこの既知菌株との脱窒経路を比較したところ、両者は類似しておりN₂O還元酵素を持っていなかった。この結果は(3)での安定同位体を用いた分析結果を裏付けとなった。即ち遺伝子情報からも、分離した脱窒菌はN₂Oを脱窒の最終生産物とすることが明らかとなった。

(7) まとめ

以上から、分離した脱窒菌の基本的な生化学的性質を明らかにすることが出来た。現在は、メタボローム解析とトランスクリプトーム解析を進めている。それらの解析結果とゲノム解析により得た遺伝子情報を統合することで作物体における脱窒とN₂O発生のメカニズムが明らかになると考えている。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

無し

6．研究組織

(1)研究代表者

多胡 香奈子 (TAGO Kanako)

国立研究開発法人・農業環境技術研究所・生

物生態機能研究領域・任期付研究員

研究者番号：20432198

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：