

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 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780290

研究課題名（和文）

節水管理水田土壌中のメタン生成古細菌の群集構造解析によるメタン放出抑制機構の解明

研究課題名（英文）Evaluation of mitigation mechanism of methane emission by community analysis of methanogenic archaea in water-saving rice paddy field soil

研究代表者

渡邊 健史 (Takeshi Watanabe)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：60547016

研究成果の概要（和文）：

乾湿繰返し(AWD)節水灌漑管理が、水田土壌中のメタン生成古細菌群集に及ぼす影響を、分子生態学的手法により調査した。メタン生成古細菌の群集構造および代謝活性の変化は、水管理の違いによって異なる傾向を示し、異なる菌が水処理の違いを特徴付けていることが明らかになった。しかし菌数に違いは見られなかった。したがって、AWD 節水管理水田土壌中のメタン生成に至る有機物分解過程は、慣行の水管理水田とは異なっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Effect of an alternate wetting and drying (AWD) water-saving practice on the methanogenic archaeal community in a paddy field soil was investigated by molecular ecological analyses. Dynamics of the community structure and metabolic activity of methanogenic archaea tended to be different depending on water management, and distinct members characterized the each treatment. However, population of methanogenic archaea was not different between the treatments. This study indicated that process of methane production via decomposition of organic materials in the AWD paddy field soil was different from the traditional paddy field soil.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：土壌微生物学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：水田、メタン生成古細菌、節水水稲栽培、群集構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化に伴う気候変動や急激な人口増加により、世界の広い地域で深刻な水不足が問題となっている。一方で、安定した食糧生産を確保するために持続可能な農耕地管理技術の開発は急務である。これらの問題に対応するため、国際稲研究所(フィリピン)では AWD (Alternate Wetting and Drying) と呼ばれる一種の間断灌漑管理によ

る節水水稲栽培技術の開発が進められてきた。AWD の基本管理は、土壌水分がある基準まで低下したときのみ灌水を行うことにある(図1)。これまでの圃場試験の結果より、慣行的な常時湛水管理から AWD 節水管理に変更することで(i)灌漑水使用量を15～30%削減すること、(ii)メタン放出量を年間35～44%削減可能なこと、(iii)水使用量当たりの水稲生産性が維持されること、が報告されて

いる。しかし、節水管理が土壌中のメタン生成および微生物群集にどのような影響を及ぼし、メタン放出が抑制されるのか、そのメカニズムはよくわかっていなかった。

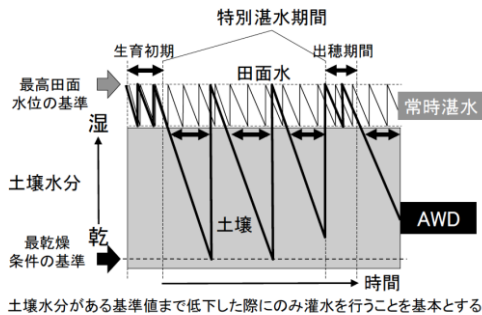


図 1. AWD 節水稲栽培の基本的な水管理

2. 研究の目的

メタン生成古細菌は、水田のような嫌気的な環境中の有機物分解過程において、分解の最終過程を担う。従って、メタン生成古細菌群集の変化を明らかにすることは、節水管理水田のメタン発生抑制機構の解明につながると考えられた。

そこで本研究では、メタン生成古細菌群集の分子生態学的解析を通じて、AWD 節水管理がメタン生成古細菌群集に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験圃場

国際稲研究所(フィリピン)で試験されている圃場(北緯 14° 16' N、東経 121° 26' E)を対象とした。AWD 節水管理試験は 2005 年より開始されており、2006 年より乾期作(1 月または 2 月から 5 月)および雨期作(7 月から 10 月)の二期作で管理されている。土性は重埴土(粘土 55%、シルト 34%、砂 11%)であり、Vertic Tropaquept (USDA Soil taxonomy)に分類される。土壌中の有機炭素および全窒素含量は 1 kg 当たり 15.0 g、1.7 g であり、土壌 pH は 7.0 であった。

(2) 土壌試料の採取

本研究では、深さ 15 cm の土壌水分張力が -20 kPa まで低下した際にのみ灌水することを基本とする -20 kPa AWD 区(以下 AWD 区)と、慣行の管理方法である常時湛水区をそれぞれ 3 連で対象とした。2008 年雨期作、2009 年乾期作、2009 年雨期作(試験開始後 6、7、8 作目)に、約 1 ヶ月ごとに深さ 3~13 cm の土壌を採取し、各実験に供試した。

(3) メタン生成古細菌群集の解析

採取した土壌試料より DNA および RNA を抽出した後、メタン生成古細菌の 16S rDNA および 16S rRNA を対象とした PCR-DGGE、real-time PCR を行った。PCR には

1106F-GC/1378R プライマーを用い、DGGE は、Bio-Lad D-code Universal Mutation Detection System を用いて、変性剤濃度勾配 32~62%、1×TAE バッファー、100V、60°C の条件で 14 時間行った。PCR-DGGE により観察されたバンドパターンは、クラスター分析および主成分分析により解析し、試料を特徴付けた。また、観察されたバンドの塩基配列を解読し、BLAST 検索および系統解析により、土壌中に存在するメタン生成古細菌の系統を推定した。Real-time PCR は、TaKaRa Thermal Cycler Dice Real time system を用いてインターカーレーター(SYBR green I)法により行った。

以上より AWD 節水管理がメタン生成古細菌の群集構造、菌数に及ぼす影響を明らかにし、節水管理水田のメタン発生抑制機構を推定した。

4. 研究成果

(1) DGGE 法による群集構造解析

2008 年雨期の稲作期間中のメタン生成古細菌群集の DGGE バンドパターンを図 1 に示す。全部で 26 本のバンドが観察され、主要なバンドの多くは処理区にかかわらず作付け期間を通じて観察されたが、主成分分析の結果、常時湛水と AWD 区で試料が分かれる傾向を示した(図 2)。

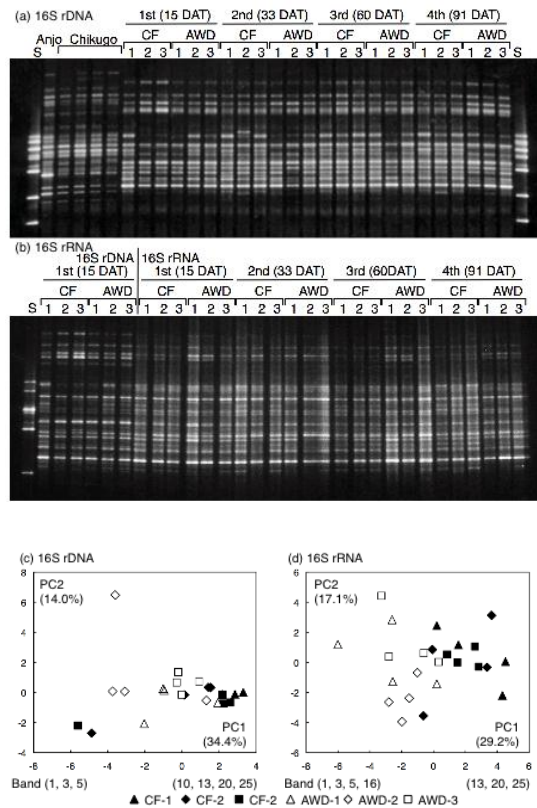


図 2. 2008 年雨期作のメタン生成古細菌群集の DGGE パターン(a および b)および主成分分析

析(c および d). (a および c) 16S rDNA. (b および d) 16S rRNA. AWD; 節水管理区. CF; 常時湛水区.

2009 年乾期作、2009 年雨期作の稲作期間中の DGGE 解析の結果、2008 雨期作と類似した結果を示した。すなわち、主要なバンドの多くは処理区にかかわらず作付け期間を通じて観察されたが、クラスター分析の結果、常時湛水と AWD 区で試料が分かれる傾向を示した。

2008 年雨期作から 2009 年雨期作までの三作付け期間を同時に解析した結果、常時湛水区と AWD 区の群集構造は徐々に違いが大きくなる様子が観察された。主成分分析の結果、常時湛水区でははっきりと群集構造が変化していったが、AWD 区では、処理区のバラツキが大きく、はっきりとした傾向は観察されなかった(図 3)。

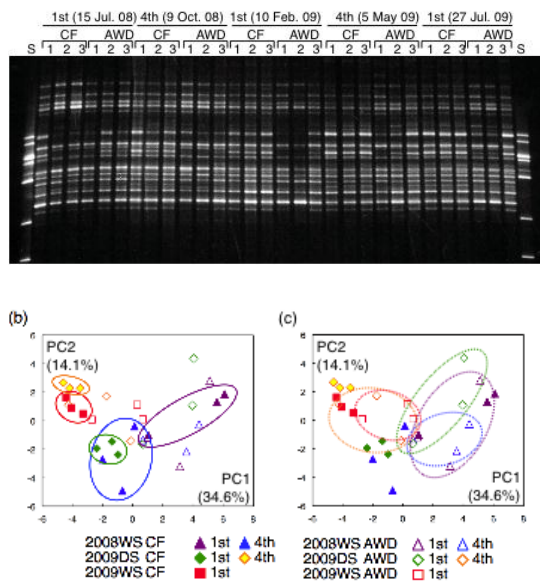


図 3. 三作付け期間(2008 年雨期作~2009 年雨期作)におけるメタン生成古細菌の群集構造の変化. (a) DGGE パターン. (b) 常時湛水区の主成分分析. (c) AWD 区の主成分分析. CF; 常時湛水区. AWD; 節水管理区.

メタン生成古細菌 16S rRNA を対象とした DGGE 解析の結果、DNA での解析と同様に、常時湛水区と AWD 区でパターンが異なる傾向が示された(図 2)。また、2008 年雨期作に採取した最初の土壌試料においても、処理区により群集構造が異なる傾向を示したことから、2006 年より始まった節水水稻栽培の影響がすでに現れていたことが推察された。

(2) メタン生成古細菌の系統解析

2008 年雨期の試料より観察された DGGE バンドの塩基配列を解説した結果、

Methanobacteriaceae, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* に近縁な配列が得られた。

2008 年雨期作、2009 年乾期作、2009 年雨期作より得られた DGGE バンドパターンを主成分分析により比較した結果、それぞれ *Methanosarcinales*, *Methanocellales* に近縁なバンドが常時湛水区および AWD 区を特徴付けることが示された。

Methanosarcinales に属するメタン生成古細菌は、酢酸、メタノールなどのメチル化合物、水素/二酸化炭素をメタン生成の基質として利用する菌である。

一方で、*Methanocellales* に属する菌は、水素/二酸化炭素をメタン生成の基質として利用する菌である。

過去の研究により、水田土壌を一時的に好氣的、酸化的環境にすると、水素/二酸化炭素に由来するメタン生成が優占することが報告されている。また、同様に、稲わらなどの有機物を施肥された土壌では、酢酸に由来するメタン生成が優占することが知られている。本研究で得られた結果は、これらの過去の結果を支持すると考えられた。従って、AWD による節水管理は水田土壌中のメタン生成古細菌の群集構造に影響を及ぼしていることが明らかになり、土壌中の嫌氣的な有機物分解において炭素フローが変化していることが推察された。

(3) メタン生成古細菌数の変動

Real-time PCR による菌数の定量の結果、乾土 1g 当たりのメタン生成古細菌 16S rDNA 数は、2008 年雨期作の常時湛水区で $4.7 \times 10^7 \sim 4.0 \times 10^8$ 、AWD 区で $2.3 \times 10^7 \sim 4.1 \times 10^8$ 、2009 乾期作の常時湛水区では $5.1 \times 10^7 \sim 2.2 \times 10^8$ 、AWD 区では $6.2 \times 10^7 \sim 4.1 \times 10^8$ 、2009 雨期作の常時湛水区では $1.1 \times 10^8 \sim 2.1 \times 10^8$ 、AWD 区では 6.0×10^7 to 2.1×10^8 であった(図 4)。

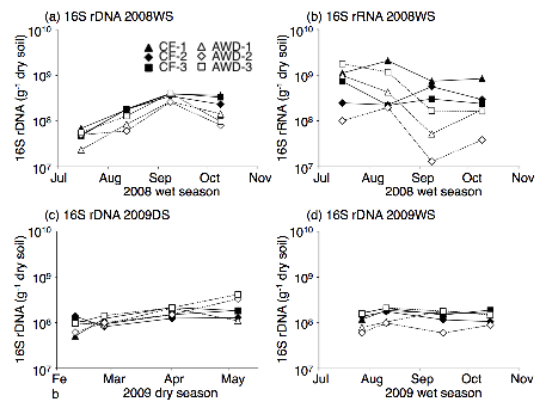


図 4. メタン生成古細菌 16S rDNA 数および 16S rRNA 数の変動. (a) 2008 年雨期作 16S

rDNA (b) 2008 年雨期作 16S rRNA (c) 2009 年乾期作 16S rDNA (d) 2009 年雨期作 16S rDNA. CF; 常時湛水区. AWD; 節水管理区.

乾土 1g 当たりのメタン生成古細菌 *mcrA* 遺伝子数は 2008 年雨期作の常時湛水区で $1.4 \times 10^7 \sim 9.6 \times 10^7$ 、AWD 区で $5.4 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^8$ 、2009 年乾期作の常時湛水区では $2.7 \times 10^7 \sim 1.3 \times 10^8$ 、AWD 区では $3.3 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^8$ 、2009 年雨期作の常時湛水区では $2.8 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ 、AWD 区では $2.3 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^8$ であった。

2008 年雨期作では、どちらの処理区も作付け期間中に増減したが、常時湛水と AWD 区間で有意な差が観察された ($P < 0.05$)。一方、2009 年乾期作、2009 年雨期作では時期による変動はあるものの、処理区間で違いはなかった。

(4) まとめ

本研究により、AWD 節水管理が水田土壌中のメタン生成古細菌群集に及ぼす影響が明らかになった。DGGE 解析の結果より、メタン生成古細菌の群集構造は、節水管理により群集構造を変化させることが明らかになった。Real-time PCR 解析の結果より、メタン生成古細菌数は、処理区間に有意な違いは見られなかったが、メタン生成古細菌の代謝活性は、節水管理により減少することが示唆された。以上より、継続的な AWD 節水管理は、土壌中のメタン生成古細菌数の減少には繋がらないが、菌の構成には影響を及ぼし、徐々に AWD 節水管理下の土壌条件に適応した群集構造に変化させることが推察された。すなわち、AWD 節水管理水田土壌中のメタン生成に至る有機物分解過程は、慣行の水管理水田とは異なっていることが示唆された。

本研究は、土壌中の炭素の動態と微生物群集の挙動との関係に関する知見を提供した。また、実験室内での培養実験ではなく、国際研究機関で管理されているフィリピンの試験圃場を直接対象とした解析を行った。このような研究はこれまでに行われておらず、国際的にインパクトのある成果を挙げた。今後、メタンフラックス、土壌中の物質循環の変化との関係を明らかにすることで、より詳細なメタン放出抑制機構が明らかになり、節水水稲栽培技術の基盤をより確固たるものにするための重要な知見として利用されることが期待される。

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 12 件)

① Watanabe T, Wang G, Lee CG, Murase J,

Asakawa S, Kimura M. Assimilation of glucose-derived carbon into methanogenic archaea in soil under unflooded condition. *Appl. Soil Ecol.*, 査読有, 48 巻, 2011, 201-209

② Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. Diversity of methanogenic archaeal communities in Japanese paddy field ecosystem, estimated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Biol. Fertil. Soils*, 査読有, 46 巻, 2010, 343-353

③ Watanabe T, Wang G, Taki K, Ohashi Y, Kimura M, Asakawa S. Vertical changes in bacterial and archaeal communities with soil depth in Japanese paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 査読有, 56 巻, 2010, 705-715

④ 渡邊健史. 水田土壌に生息するメタン生成アーキア. 生物工学会誌, 査読有, 88 巻, 2010, 676

[学会発表] (計 11 件)

① 李哲揆. 好気環境土壌におけるメタン生成菌の生育. 日本土壌肥料学会 2011 年度つくば大会, 2011 年 8 月, つくば

② 渡邊健史. AWD 節水水田土壌中のメタン生成古細菌の分子生態学的解析 - 継続的な節水管理が群集構造に及ぼす影響の評価. 日本土壌肥料学会 2010 年度北海道大会, 2010 年 9 月, 札幌

③ Watanabe T. Changes in community structure and transcriptional activity of methanogenic archaea in a paddy field soil brought about by a water-saving practice - estimation by PCR-DGGE and qPCR of 16S rDNA and 16S rRNA. 19th World Congress of Soil Science, 2010 年 8 月, ブリスベン (オーストラリア連邦)

④ 渡邊健史. AWD 節水水稲栽培が土壌中のメタン生成古細菌群に及ぼす影響の評価 - 16S rRNA を対象とした PCR-DGGE、qPCR 解析. 日本土壌微生物学会 201 年度大会, 2010 年 6 月, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 健史 (Watanabe Takeshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 60547016

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし