

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26252058

研究課題名(和文) 脱窒土壌細菌でのN₂O生成鍵遺伝子水平伝播の検証と化学物質によるN₂O発生制御研究課題名(英文) Investigation of horizontal transmission among N₂O emission-associated genes and N₂O emission suppressing chemical agents

研究代表者

橋床 泰之 (Hashidoko, Yasuyuki)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：40281795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：N₂O放出能の高い熱帯泥炭開墾土壌、北海道黒ボク畑地土壌、ならびに亜北極湿地ミズゴケから亜酸化窒素(N₂O)生成細菌を探索・分離し、それらのN₂O生成機構の共通性と違いを比較した。熱帯泥炭地のN₂O放出細菌Burkholderia属はnosZを欠く一方、黒ボク土壌のPseudomonas属細菌では機能低下nosZ保有株が見出された。亜北極のパルサ泥炭崩壊地では、Rhizobium属細菌とSerratia属細菌の混合体にKN₂Oから効率的にN₂Oを発生する能力があった。パラコートやアリルイソチオシアネートに強いN₂O放出抑制活性を見出し、新たな活性物質候補として細菌分化誘導因子を見出した。

研究成果の概要(英文)：Active N₂O emitting microorganisms were searched for, at the soils from reclaimed tropical peatland in Malaysia, Andisol corn farmland in Hokkaido, and palsa mire-degrading boreal peat in Finland Lapland, all of which are known as active N₂O emission hotspots. Resulting active N₂O emitting bacteria were compared their physiological and biological traits. Burkholderia spp. isolated as a hyper-active N₂O emitter from tropical peat soils were missing nosZ genes, while 4 strains out of 10 active N₂O emitting Pseudomonas spp. rather harbored weakly functional nosZ gene. In boreal peatland, particularly degrading palsa bogs, Rhizobium sp. and Serratia sp. mixed colonies had abilities to release N₂O from NO₂-.

In investigation of N₂O production-repressing chemicals, Paraquat and allyl isothiocyanate showed relatively strong N₂O-emission inhibitory effect. For further screening, several differentiation-inducing factors toward bacteria were isolated and identified.

研究分野：微生物生態化学

キーワード：N₂O放出ホットスポット N₂O放出細菌 不完全脱窒細菌 脱窒関連遺伝子 遺伝子水平伝播 N₂O放出抑制因子 微生物機能性分化因子 無機窒素代謝

1. 研究開始当初の背景

植物の根圏で活動する微生物群集は、土壌生態系においては本質的に植物生育に関わる要因、つまり土壌への窒素供給、硝化・脱窒、それらに伴う CN バランスの調整、不溶性ミネラル分の可溶化、生体異物やポリフェノールなど難分解性化合物の分解除去などに大きく寄与していることが明らかになってきた。それらエコシステムを支える分解者である微生物と生産者である植物は密接な関係性を有するが、より迅速に環境応答を行い、遺伝子を改変できる微生物は、そのようなエコシステム修復能力獲得のために、ダイナミックな環境応答機構が存在するのではないかと考えたのが、本研究着想の背景にある。植物の根に含まれる植物種属に特有の二次代謝産物は、これらの根圏微生物の活動と代謝を制御し、健全な根圏環境の維持と持続的物質循環を担保する要因となっているとの仮説に立ち、 N_2O 生成ホットスポットにおいても N_2O 放出細菌が同様の振る舞いをし、一部の化学物質がその応答を仕切ることができるのではないかと仮定し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

亜酸化窒素 (N_2O) 放出能の高い熱帯泥炭開墾土壌、北海道黒ボク畑地土壌、ならびに亜北極湿地ミズゴケから N_2O 生成細菌をそれぞれ探索・分離し、それらの N_2O 生成機構の共通性と違いを比較することを本研究の目的とし、その違いをそれぞれの N_2O 放出ホットスポット出現抑制に活かせないかを検討しようとした。

3. 研究の方法

N_2O 放出ホットスポットとして知られる、上記3地点から N_2O 放出真正細菌の分離を試み、それらの脱窒関連遺伝子ドナーの再現性をみるととも、その遺伝子水平伝播プロセスを追跡する。パラコートやアリルイソチオシアネート等、適量処理すると N_2O 放出が抑制される化学物質の添加によって土壌菌相にどのような変動が起こるかを調べる。化学物質の面では、*Bacillus* 属細菌が diacetonamine 誘導体による芽胞形成時にコンピテント・セルへの分化を起こすこと、さらには AI-2 生成能を欠く 5DH (*LuxS*) 株が *Burkholderia* 属細菌を受け入れ、完全な混合バイオフィルムを形成することなど、興味ある挙動を示すことが分かっているため、この状況下で遺伝子水平伝播が起こり得るか否かを検証する。

一方、遺伝子水平伝播によって脱窒能を獲得した細菌が植物とどのように関わりを持つかについても調べ、特に特有の色素をもつ陸生ミズゴケの赤色色素や茶色色素、さらには中心子目植物のベタニン色素と N_2O 放出との関係を検証し、これらが膜機能の改変等を介して無機窒素代謝の変動に関わるか否

かを精査する。

4. 研究成果

熱帯泥炭地から得られる強力な N_2O 放出 *Burkholderia* 属細菌は *Gammaproteobacteria* 亜門に由来する脱窒関連遺伝子を持っていたが、*narG* 配列が完全に一致する *Xanthomonas* 属近縁の脱窒細菌は現地土壌から見いだせなかった。一方、黒ボク土壌の主たる N_2O 生成細菌は *Pseudomonas* 属細菌であったが、*narG* は自前の配列を有し、また、機能が低下してはいるが *nosZ* が残存した株が 10 株中 4 株見いだされた。亜北極のバルサ泥炭崩壊地では、突出して N_2O 放出活性の高い *Rhizobium* 属細菌と *Serratia* 属細菌の混合体コロニーを見出した。再分離した細菌株は、ともに高 N_2O 放出株であり、両者とも $(NH_4)_2SO_4$ には反応せず、 NO_3^- と同程度に NO_2^- を効率的に N_2O へ代謝する能力があった。また、pH 7.5-8.5 の塩基性側で強い N_2O 放出能を認めた。*Serratia* 属は *narG*, *nirK* を有していたが、*Rhizobium* 属はこれら脱窒関連遺伝子を欠き、*Serratia* 属と *Rhizobium* 属分離株それぞれの無機窒素代謝機能欠損の補完が強く示唆された。これら緯度が異なる N_2O 放出ホットスポットでは、その基質に加え、 N_2O 放出の至適 pH 領域も、さらには脱窒遺伝子の保持パターンもそれぞれに特徴的であった。

N_2O 放出抑制化学物質の探索では、土壌に散布できる除草剤や作物根由来の二次代謝産物中にこれらを探し求めた結果、パラコートに極微量 ($2 \mu M$ 以下) で N_2O 生成抑制効果を認めた。*Pseudomonas* 属脱窒細菌を接種した滅菌黒ボク土壌塊でも、パラコートを終濃度 50 マイクロモル濃度で添加すると N_2O 放出がほぼ完全に停止した。天然物ではアリルイソチオシアネートに比較的強い N_2O 放出抑制活性 ($30 \mu M$) を見出した。一方、不完全脱窒細菌の N_2O 放出に対する影響を調べるため、多様な細菌に対する分化誘導因子を検索し、*Bacillus* 属細菌の芽胞形成誘導物質として diacetonamine を、*Nostoc* sp. のホルモゴニア誘導因子として anacardic acid C15- Δ^8 decyl ester、同じくソテツのホルモゴニア誘導因子として (3"-8)-diapigenin、ならびに *Burkholderia plantarii* の tropolone 産生亢進物質として 3'-hydroxyoctyl-N-acyl-L-homoserinelactone を同定した。これらが N_2O 放出抑制剤として働くかを検討する必要がある。

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 14 件)

1. H. Nishizuka, Y. Hashidoko. Comparison

- of Nostoccean hormogonium induction and its motility on solid plates between agar and gellan gum at varying gel matrix concentrations. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82, 525-531 (2018).
2. Y. Hashidoko. Studies on metabolic regulation of denitrifying bacteria and phytopathogenic microorganisms using chemical agents found in chemical ecology-based phenomena. *Journal of Pesticide Science*, 43, 47-54 (2018).
 3. Y. Nie, M. Wang, W. Zhang, Z. Nia, Y. Hashidoko, W. Shen. Ammonium nitrogen content is a dominant predictor of bacterial community composition in an acidic forest soil with exogenous nitrogen enrichment. *Science of The Total Environment*, 624, 407-415 (2018).
 4. R. Isoda, S. Hara, T. Tahvanainen, Yasuyuki Hashidoko. Comparison of archaeal communities in mineral soils at a boreal forest in Finland and a cold-temperate forest in Japan. *Microbes and Environments*, 32, 360-363 ME17100 (2017).
 5. R. Della, H.C. Wijaya, Y. Hashidoko, et al. (8 名中 3 番目). Concentration of some trace elements in two wild edible ferns, *Stenochlaena palustris* and *Diplazium esculentum*, and an aluminum accumulator *Melastoma malabathricum*, all grown on different soil profiles in tropical peatlands in Central Kalimantan. *Eurasian Journal of Forest Research*, 20, 11-20 (2017).
 6. A. Ikeda, D. Kim, Y. Hashidoko. Identification of diacetoneamine from soybean curd residue as a sporulation-inducing factor toward *Bacillus* spp. *AMB Express*, 7, 101 (2017).
 7. T. Nishiyama, D. Haba, Y. Hashidoko. Effect of some cover crops and their secondary metabolites on nitrous oxide (N₂O) emission by *Pseudomonas* denitrifiers isolated from chemically fertilized corn farm soils. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 2, 71-77 (2016).
 8. M. Wang, S. Tachibana, Y. Murai, L. Li, S.Y.L. Lau, M. Cao, G. Zhu, M. Hashimoto, Y. Hashidoko. Indole-3-acetic acid produced by *Burkholderia heleaia* inhibits tropolone biosynthesis in *Burkholderia plantarii*. *Scientific Reports*, 6, 22596 (2016).
 9. Y. Nie, L. Li, R. Isoda, M. Wang, R. Hatano, Y. Hashidoko. Physiological and genotypic characteristics of nitrous oxide (N₂O)-emitting *Pseudomonas* species isolated from dent corn Andisol farmland in Hokkaido, Japan. *Microbes and Environments*, 31, 93-103 (2016).
 10. Y. Nie, L. Li, M. Wang, T. Tahvanainen, Y. Hashidoko. Nitrous oxide emission potentials of *Burkholderia* species isolated from the leaves of a boreal peat moss *Sphagnum fuscum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79, 2086-2095 (2015).
 11. T. Anan, S. Shimma, Y. Toma, Y. Hashidoko, R. Hatano, M. Toyoda. Real time monitoring of gases emitted from soils using the Multi-turn Time-of-Flight Mass Spectrometer "MULTUM-S II". *Environmental Science, Progress & Impacts*, 16, 2752-2757 (2014).
 12. S.Y.L. Lau, Y. Hashidoko, N. Takahashi, R. Hatano, Lulie Melling. Correlation between mineral nitrogen contents and vertical distribution of N₂O emission potentials in tropical peat soils are inverted in 2-year- and 10-year-cultivated oil palm plantations in Sarawak, Malaysia. *Journal of Agricultural Science & Technology B*, 4, 691-700 (2014).
 13. L. Li, M. Wang, R. Hatano, Y. Hashidoko. Effects of methyl viologen dichloride and other chemicals on nitrous oxide (N₂O) emission and repression by pseudomonad denitrifiers isolated from corn farmland soil in Hokkaido, Japan. *Journal of Pesticide Science*, 39, 115-120 (2014).
 14. S. Hara, R.V. Desyatkin, Y. Hashidoko. Investigation of the mechanisms underlying the high acetylene reducing activity exhibited by the soil bacterial community from BC2 horizon in the permafrost zone of the East Siberian larch forest bed. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 865-876 (2014).
- [学会発表](計 35 件)
1. Yanxia Nie, Yasuyuki Hashidoko. Isolating active N₂O emitters from boreal sphagnum moss peat and searching for natural substances suppressing N₂O emission. 20th World Congress of Soil Science, 2014 年 6 月 9 日. ポスター番号 AF0634 (Jeju ICC, Korea)
 2. Reika Isoda, Shintaro Hara, Teemu Tahvanainen, Yasuyuki Hashidoko. The role of characteristic archaeal community in nitrogen circulation of the boreal forest bed soil. 20th World Congress of Soil Science, 2014 年 6 月 12 日. ポスター番号 AF1038 (Jeju ICC,

- Korea).
3. 村井勇太, 橋本誠. 光アフィニティーラベル法による生体分子解明を目指した光反応性芳香族 - アミノ酸の合成. 日本ケミカルバイオロジー第9回年会 (大阪大学豊中キャンパス)
 4. 吉田卓真, 村井勇太, Wang Lei, 橋床泰之, 橋本 誠. Friedel-Crafts 反応による光反応性 phenylalanine 誘導体の立体保持合成. 第44回複素環討論会, 札幌市民ホール, 2014年9月10日(ポスター, 1P-25)
 5. Yanxia Nie, Teemu Tahvanainen, Mengcen Wang, Yasuyuki Hashidoko. Comparison of N₂O-emitting bacteria and bacterial community between *Sphagnum fuscum* and *Sphagnum capillifolium* in the boreal peat. 日本農芸化学会2015年大会(岡山, 岡山大), 平成27年3月28日(口頭発表)
 6. 羽馬大輔, 大井辰哉, 橋床泰之. アカバセンニチコウ葉肉細胞でのベタレイン退色現象の観察とそのメカニズム解明の試み. 日本農芸化学会2015年大会(岡山, 岡山大), 平成27年3月28日(口頭発表)
 7. Yasuyuki Hashidoko. Bridge between food chemistry and microbiological ecology - regulation of bacterial metabolisms by chemical components from tea, soy pulp, and red beet. 82th 2015 International Symposium and Annual Meeting of KoSFoST (Busan, Korea), Invited plenary lecture.
 8. 磯田玲華, 原新太郎, 小林 真, Reiner Giesler, 橋床泰之. 亜北極生態系における土壤微生物群集、土壤含水量および窒素固定の関連. 日本土壤肥料学会年次大会, 9月11日(於京都大学), 「ポスター発表」
 9. 西山隆晃, 橋床泰之. アブラナ科植物根二次代謝産物による土壤脱窒細菌のN₂O生成亢進/抑制効果の検証
 9. 日本土壤肥料学会年次大会, 9月11日(於京都大学), 「ポスター発表」
 10. 西塚紘明, Olle Zackrisson, Thomas Deluca, 橋床泰之. 窒素固定性シアノバクテリア *Nostoc* sp. 共生宿主フェザーモス *Pleurozium schreberi* が産生するホルモゴニア分化誘導因子の探索. 日本植物化学調節学会, 10月24日(於東京大学), 「口頭発表」
 11. 立花誠治, 王 蒙岑, 前川雅彦, 橋床泰之. フェニル酢酸構造類似体を用いたイネ苗立枯細菌病の抑制. 日本農薬学会大会, 3月8日(於島根大学, 松江), 「口頭発表」
 12. 西塚紘明, Thomas DeLuca, 橋床泰之. 窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. を共生させる蘚類 *Pleurozium schreberi* が産生するホルモゴニア分化誘導因子の探索. 日本農芸化学会2016年札幌大会, 3月29日(於札幌コンベンションセンター)「ポスター発表」.
 13. 池田 陽, Dongyeop Kim, 橋床泰之. オカラ抽出物に含まれる *Bacillus* 芽胞形成誘導物質の探索. 単離精製・構造決定. 日本農芸化学会2016年札幌大会, 3月29日(於札幌コンベンションセンター)「ポスター発表」
 14. Y. Hashidoko. N₂O emitters from different habitats, boreal peats and tropical peats, and comparison of their physiological traits. International Peat Congress 2016 (Kuching, Malaysia), August 19, oral presentation.
 15. Y. Hashidoko, Daisuke Haba, Junichi Asano. In situ functionality of betanin in photo-damaged leaf tissues of betalain-producing *Caryophyllales* plants with dynamic intra- and inter-cellular effusion of the pigment from vacuoles. 28th International Conference on Polyphenol 2016 (Vienna, Austria), July 11-15 (Poster).
 16. 立花誠治・Bak Gyeryeong・前川雅彦・橋床泰之. 永年無施肥水田栽培ハイブリッドイネ LIA-1 根から *Burkholderia kururiensis* の分離およびその性質と機能性. 日本土壤肥料学会大会(佐賀大学), 平成28年9月21日(ポスター, P3-1-15)
 17. 西塚紘明, 橋床泰之. イチョウ偽果に含まれるアナカルド酸類とそれらのエステル誘導体を示す対 *Nostoc* 属シアノバクテリア・ホルモゴニア分化誘導活性. 植物化学調節学会51回大会(高知大学, ポスター), 平成28年10月30日, No. 80(優秀発表賞).
 18. 池田 陽, 橋床泰之. ジアセトナミンおよびその関連化合物の *Bacillus* 属細菌芽胞形成誘導活性の検証. 日本農芸化学会北海道支部第二回支部会(北大, ポスター), 平成28年11月3日, No. 33,
 19. 立花誠治, 王 蒙岑, 橋床泰之. イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* におけるファイトトキシン・トロポロン生合成経路の研究: 阻害剤を用いた生合成中間体探索. 第42回日本農薬学会大会(愛媛大学), 平成29年3月7日(口頭発表)
 20. 能崎 薫, Anastatia Setiawa, 橋床泰之. *Burkholderia* 属細菌間の増殖や機能性制御に関わるシグナル因子の探索. 第42回日本農薬学会大会(愛媛大学), 平成29年3月7日(口頭発表)
 22. 西塚紘明, 橋床泰之. 窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. を共生させるソテツ・リターに含まれるホルモゴニア分化誘導因子の探索. 日本農芸化学会2017年大会(京都女子大), 平成29年3月19日(口頭発表)
 23. 浅野純一, 橋床泰之. 酵母型真菌の代謝産物中における Betanin 分解抑制物質の

- 探索. 日本農芸化学会 2017 年大会 (京都女子大), 平成 29 年 3 月 20 日 (口頭発表)
24. 高津祐太, 橋床泰之. 北海道の黒ボク土からなる高 N_2O 放出圃場より難培養性 N_2O 放出細菌および N_2O 消去細菌の探索. 日本農芸化学会 2017 年大会 (京都女子大), 平成 29 年 3 月 18 日 (口頭発表)
25. 阿知和菜子, Nie Yanxia, Teemu Tahvanainen, 橋床泰之. フィンランド・ラップランドの陸生ミズゴケに着生する高 N_2O 放出 *Alphaproteobacteria* 網細菌の脱窒遺伝子解析. 日本土壌肥料学会 仙台大会, 2017 年 9 月 5 日 (火)~7 日 (木) 東北大学青葉山新 キャンパス
26. Hiroaki Nishizuka and Yasuyuki Hashidoko. Biflavones of *Cycas revoluta* induce differentiation of filamentous *Nostoc cyanobacteria* into motile hormogonia
27. 33 回国際化学生態学/第 9 回アジア太平洋化学生態学合同会議, August 23-27 (2017), 京都市, 龍谷大学
28. Yasuyuki Hashidoko, Hiroaki Nishizuka, Manato Tanaka, and Kanako Murata. Diacylglycerols isolated from *Cycas revoluta* coralloid root and analogous anacardic acid derivatives induce morpho-differentiation of filamentous *Nostoc cyanobacteria* into motile hormogonia. 33 回国際化学生態学/第 9 回アジア太平洋化学生態学合同会議, August 23-27 (2017), 京都市, 龍谷大学
29. 浅里仁美, 池田 陽, Dongyeop Kim, 橋床泰之. *Bacillus amyloliquefaciens* の芽胞化を誘導するジアセトナミン部分構造の推定. 日本農芸化学会北海道支部会 2017 年第 1 回講演会, 2017 年 7 月 22 日 (とかちプラザ) ポスター
30. 橋床泰之. 化学生態学的現象に基づいた化学的微生物代謝制御法の開発に関する研究. 日本農芸化学会北海道支部会 2017 年第 2 回講演会, 特別講演 (日本農薬学会業績賞 (研究) 受賞) 2017 年 12 月 2 日 (北海道大学 農学部)
31. 浅里 仁美, 池田 陽, キム ドンギョブ, 橋床 泰之. ジアセトナミン塩酸塩添加による *Bacillus thuringiensis* 栄養増殖菌体での Cry-toxin 産生亢進の検証. 2018 年 3 月 17 日 (名古屋, 名城大) 3A09a12
32. 阿知和菜子, Nie Yanxia, Teemu Tahvanainen, 橋床 泰之. フィンランド・ラップランドのバルサ崩壊地の泥炭から高 N_2O 放出細菌株の分離, それらの挙動および脱窒遺伝子の解析. 2018 年 3 月 17 日 (名古屋, 名城大) 3A11a06
33. 能崎 薫, 橋床 泰之. *Sphingobium yanoikuyae* EC-S001 株が産生する *Burkholderia plantarii* トロポロン生合成亢進因子の探索研究. 2018 年 3 月 17 日

(名古屋, 名城大) 3A18p03

34. 橋床 泰之, 西塚 紘明. ソテツリターからシアノバクテリアのホルモゴニア分化を誘導するピフラボン類の単離構造決定. 2018 年 3 月 17 日 (名古屋, 名城大) 3A19p06
35. Jie Duan, Junichi Asano, Yasuyuki Hashidoko. Easy isolation of pure betanin from red beetroots as substrate for an effective imine-exchange reaction to obtain several betalamic acid-aldimine derivatives. 2018 年 3 月 17 日 (名古屋, 名城大) 3A15a08

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: ベタニンまたはその類似化合物を含む皮膚組織修復剤
 発明者: 橋床泰之, 浅野純一, 羽根匡毅
 権利者: 北海道大学
 種類: 通常
 番号: 出願番号 2018-093061
 出願年月日: 2018 年 5 月 14 日
 国内外の別: 国内

名称: トロポロン類製造方法
 発明者: 橋床泰之, 能崎 薫, 立花誠治, 三宅 裕
 権利者: クミアイ化学 (株), 北海道大学
 種類: 通常
 番号: 整理番号 7639
 出願年月日: 2018 年 5 月 18 日
 国内外の別: 国内

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
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/hashidokoh/p1.pdf>

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 橋床 泰之 (北海道大学・大学院農学
 研究院・教授)

研究者番号: 40281795

(2)研究分担者

村井 勇太 (北海道大学・先端生命科学
学研究科・助教)

研究者番号： 20707038

(3)連携研究者

内田 義崇 (北海道大学・大学院農学研
究院・助教)

研究者番号： 70705251