

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14675

研究課題名（和文）水田土壌における脱窒反応への「非脱窒細菌」の寄与を探る

研究課題名（英文）Contribution of "atypical denitrifiers" to denitrification in rice paddy soil

研究代表者

妹尾 啓史（Senoo, Keishi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：40206652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：環境中で微生物が転写しているRNA配列を網羅的に解読する手法であるメタトランスクリプトーム解析法を用いて、水田土壌において典型的脱窒細菌（主としてAlpha-, Beta-, Gammaproteobacteria綱に属する脱窒細菌）以外の非典型的脱窒細菌（ここでは非脱窒細菌）が脱窒反応を駆動しているのかを明らかにすることを試みた。その結果、湛水期・落水期、酸化層・還元層全てのサンプルにおいて亜硝酸還元以外の脱窒反応は非脱窒細菌が主に駆動している可能性が強く示された。本研究は、水田土壌の脱窒反応を担うプレイヤーと分業体制に関する新たな学術的知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：We elucidated the drivers of denitrification in rice paddy soil by metatranscriptomic analysis. It was suggested that typical denitrifiers (denitrifying bacteria belonging to Alpha-, Beta-, or Gammaproteobacteria) largely contributed to nitrite reduction to nitric oxide, whereas atypical denitrifiers largely contributed to other denitrification reactions (i.e., nitrate reduction, nitric oxide reduction and nitrous oxide reduction). Denitrification in rice paddy soil could be "orchestrated" reactions by combination of typical and atypical denitrifiers.

研究分野：農学、農芸化学、土壌学

キーワード：水田土壌 脱窒 典型的脱窒細菌 非典型的脱窒細菌 メタトランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

大工原・今関により水田土壌の脱窒現象が、塩入らにより水田土壌の酸化層・還元層の分化と硝化・脱窒現象がそれぞれ発見されて以来長きにわたり、水田土壌の脱窒反応を担う微生物についてはブラックボックスのままとなっていた。応募者らは Stable Isotope Probing 法や独自に開発したシングルセル分離法など複数の最先端手法によりその解明に挑戦し、(1) *Burkholderiales* 目, *Rhodocyclales* 目, *Rhodospirillales* 目, *Rhizobiales* 目に属する細菌が水田土壌で脱窒に機能する重要な細菌群であること、(2) その中で *Azospirillum* 属, *Herbaspirillum* 属の脱窒細菌が脱窒の最終段階の $N_2O \rightarrow N_2$ 還元を担っていることなどを明らかにしてきた。これらの脱窒細菌はいずれも *Alpha-, Beta-, Gamma-proteobacteria* 綱に属し「典型的脱窒細菌」と呼ばれている。

一方、我々は新潟水田土壌のメタゲノム解析において、土壌メタゲノムに含まれる脱窒機能遺伝子 (*nirK, nirS, norB, nosZ*) を洗い出し(図1) その持ち主となる微生物をデータベースから推定した結果、次の可能性を導いた。

- (1) *Alpha-, Beta-, Gamma-proteobacteria* に属する典型的脱窒細菌が NO_2^- を N_2O または N_2 にまで還元する2段階または3段階の反応を担っている。それに加えて、
- (2) *Verrucomicrobia* 門に属する細菌が NO_2^- を NO に還元する1段階の反応を担っている。
- (3) *Acidobacteria* 門に属する細菌が NO を N_2O に還元する1段階の反応を担っている。
- (4) *Bacteroidetes* 門に属する細菌が N_2O を N_2 に還元する1段階の反応を担っている。
- (5) *Delta-proteobacteria* 綱に属する細菌が NO を N_2O さらに N_2 に還元する2段階反応を担っている。

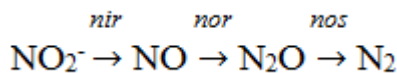


図1. 脱窒反応の酵素遺伝子

これらのことは、水田土壌の脱窒反応が典型的脱窒細菌によるだけでなく、(2)~(5)の各微生物群(脱窒の定義からは脱窒細菌ではなく「非脱窒型 NO_2^- 還元細菌」などとなる。ここでは「非脱窒細菌」と総称する。)の分業体制によっても進行していることを示唆する新規な発見である。

2. 研究の目的

上記の状況を踏まえ、本研究は水田土壌における脱窒反応への「非脱窒細菌」の寄与を探ることを目的とする。具体的には次の事柄を明らかにする。(i) 上記の(2)~(5)が新潟水田土壌において実際に起こっているのか。(ii) 日本各地の他の水田土壌でも普遍的に起こっているのか。(iii) 年間の水田管理のどの時期に、土壌のどの部位で、どの程度起こ

ているのか。

3. 研究の方法

新潟県農業総合研究所内の水田において、湛水直後から収穫後にかけての5つの時期(湛水直後・2週間後・中干し前・間断灌漑期・落水期)に土壌コアを採取した。還元層が最も発達する中干前の土壌の酸化層・還元層の位置を土色に基づいて決定し、他の時期の土壌についても同位置を分取した。土壌の還元の進行の指標となる二価鉄濃度は、湛水期の還元層において最も高く、分取が適切であったことが示された。酸化層・還元層それぞれの土壌から高純度 DNA・RNA を抽出、ライブラリ作製を行い、次世代シーケンサー(Illumina MiSeq)を用いてメタゲノム・メタトランスクリプトームデータを取得した。得られたシーケンスは MG-RAST 等を利用してインフォマティクス解析を行い、各層における微生物群集・機能遺伝子組成とそれらの経時的変動を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 新潟水田土壌のメタトランスクリプトーム解析

脱窒反応の各ステップの鍵遺伝子である *nir, nor, nos* (図1)の転写産物の配列情報に基づき、湛水期(S1, S2)・落水期(S3, S4)における酸化層(S1, S3)・還元層(S2, S4)における各遺伝子転写産物の微生物群集組成を解析した(図2)。その結果、典型的脱窒細菌である *Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌による優占が見られたのは *nir* 転写産物のみであり、*nor, nos* 転写産物の微生物群集組成では、非脱窒細菌である *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものが最も優占していた。*Deltaproteobacteria* 綱細菌以外にも *Bacteroidetes* 門、*Verrucomicrobia* 門細菌等、非脱窒細菌由来の脱窒関連遺伝子転写産物が多く検出された。これらの結果は、時期・層を問わず全てのサンプルにおいて同様であった。

このことから、新潟水田土壌において非脱窒細菌が亜硝酸還元以外の脱窒反応に大きく寄与している可能性が強く示された。

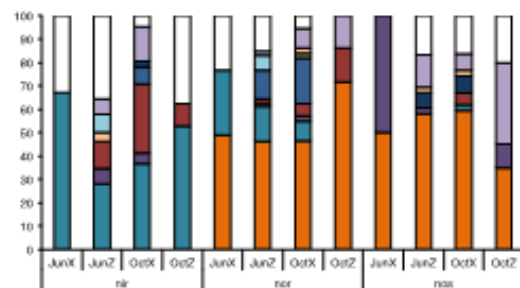


図2. 新潟水田土壌のメタトランスクリプトーム解析に基づく脱窒関連遺伝子転写産物の微生物群集組成

(2) 普遍性の検証

上記(1)によって可能性が深まった「非脱窒細菌による脱窒反応」は、日本各地の水田土壌や他の環境においても起きているのかを確認するため、様々な土壌サンプルを用いたメタゲノム解析を行った(図3)。土壌サンプルは、日本全国の4カ所の水田土壌、4カ所の畑・雑草地・森林土壌、4カ所の底泥を用いた。その結果、新潟水田土壌と同様にどの環境サンプルにおいても、典型的脱窒細菌である *Alpha*-、*Beta*-、*Gammaproteobacteria* 綱細菌による優占が見られたのは *nir* 転写産物の微生物群集組成みであり、*nor*、*nos* 転写産物では非脱窒細菌の優占が見られた。

上記(1),(2)の結果から、新潟水田土壌において非脱窒細菌が脱窒反応に大きく寄与しており、新潟以外の水田土壌や他の環境においても同様である可能性が強く示唆された。また、脱窒反応は典型的脱窒細菌によって単独で行われるのではなく、典型的脱窒細菌や非脱窒細菌によって協奏的に行われている可能性が示された。

本研究は、水田土壌の脱窒反応を担うプレーヤーと分業体制に関する新たな学術的知見を提供した。

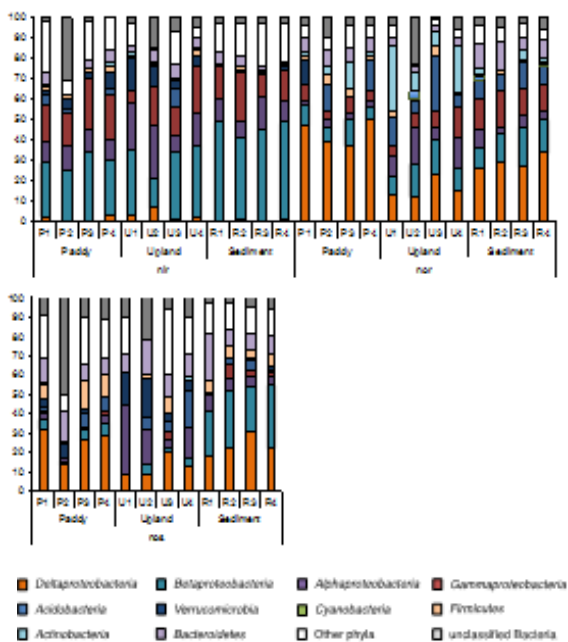


図3. 様々な土壌のメタゲノム解析に基づく脱窒関連遺伝子の微生物群集構造

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1件)

Masuda Y, Itoh H, Shiratori Y, Isobe K, Otsuka S, Senoo K, Predominant but previously-unseen prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in

paddy soils, unveiled by metatranscriptomics, *Microbes & Environments*, 査読有, 2017, in press DOI: 10.1264/jsme2.ME16179

[学会発表](計10件)

Keishi Senoo, Yoko Masuda, Hideomi Itoh and Yutaka Shiratori, Predominant but previously-overlooked prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, revealed by metatranscriptomics, 2nd Global Soil Biodiversity Conference, 2017年10月15日~19日, Nanjing (China)

増田曜子、伊藤英臣、白鳥豊、石井勝博、磯部一夫、藤村玲子、早川智恵、大塚重人、妹尾啓史、水田土壌の優占種、鉄還元菌の窒素肥沃度維持への寄与の可能性 - オミクス解析から見た鉄還元菌が駆動する窒素固定、DNRA、脱窒 -、日本土壌肥料学会 2017年度仙台大会、2017年9月5日~7日、東北大学青葉山新キャンパス(宮城県仙台市)

増田曜子、伊藤英臣、白鳥豊、妹尾啓史、水田土壌の鉄還元菌のもう一つの顔: 窒素肥沃度を支えるキープレーヤー、環境微生物系学会合同大会 2017、2017年8月28日~31日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

増田曜子、伊藤英臣、白鳥豊、磯部一夫、大塚重人、妹尾啓史、水田土壌オミクス解析から見た陸域生態系における鉄還元菌の新たな機能 - 還元的窒素変換 (Predominant but previously-unseen prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, unveiled by metatranscriptomics)、JpGU-AGU Joint Meeting 2017、2017年5月24日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

妹尾啓史、水田土壌の窒素変換微生物: 特定・分離とN₂O削減への利用、第34回土・水研究会、2017年2月27日、つくば農林ホール(茨城県つくば市)

Masuda Y., Itoh H., Shiratori Y., Isobe K., Otsuka S., Senoo K., Overlooked but pivotal prokaryotic drivers involved in reductive nitrogen transformations in paddy soils, captured by metatranscriptomics, 3rd Thunen Symposium on Soil Metagenomics, 2016年12月14日~16日, Braunschweig (Germany)

Keishi Senoo, Greenhouse gas and soil microorganisms: N₂O generating and

eliminating microbial communities in agricultural soils、China-Japan Environmental Microbiology Forum、2016年11月13日、Chongqing (China)

研究者番号：30621833

増田曜子、伊藤英臣、白鳥豊、磯部一夫、大塚重人、妹尾啓史、水田土壤に優占する微生物の新機能：鉄還元菌こそが窒素循環に重要である、日本微生物生態学会第31回大会、2016年10月23日～25日、横須賀市文化会館（神奈川県横須賀市）

Keishi Senoo、Denitrifying Microbial Community in Agricultural Soils: Key Players Involved in N₂O Generation and Elimination、105th International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society for Applied Biological Chemistry、2016年6月16日、Jeju Island (Korea)

田伏曜子・伊藤英臣・白鳥豊・磯部一夫・大塚重人・妹尾啓史、水田土壤に優占する Deltaproteobacteria の窒素固定・脱窒・DNRA への寄与 - オミクス解析による水田窒素循環微生物コミュニティの刷新 -、日本土壤微生物学会 2016 年度大会、2016 年 6 月 11 日～12 日、岐阜大学（岐阜県岐阜市）

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

Keishi Senoo、Microbial drivers of nitrogen transformation in rice paddy soil: Identification, isolation, and application to N₂O mitigation、Seminar at Jiangsu University、2017年3月27日、Zhenjiang (China)

Keishi Senoo、Greenhouse Gas and Soil Microorganisms: Key Denitrifiers Responsible for N₂O Generation and Elimination、Seminar at Shanghai Jiao Tong University、2016年4月27日、Shanghai (China)

6. 研究組織

(1)研究代表者

妹尾 啓史 (SENOO, Keishi)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：40206652

(2)研究分担者

磯部 一夫 (ISOBE, Kazuo)
東京大学・農学生命科学研究科・助教