

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05059

研究課題名（和文）温室効果ガス発生の新犯人 植物体で機能する微生物の脱窒代謝系の解明

研究課題名（英文）The hidden source of N<sub>2</sub>O production-the denitrifying bacteria functioning in plants

研究代表者

多胡 香奈子（Kanakano, Tago）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・主任研究員

研究者番号：20432198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、これまでに温室効果ガスの1つである一酸化窒素（N<sub>2</sub>O）が、施肥や降雨後の土壌からではなく収穫前後に圃場に残された作物体自体（作物残さ）から直接発生していることを突き止めたことを受け、このN<sub>2</sub>O発生は脱窒によるものと仮説を立てて、作物体を起点とした窒素代謝経路の全貌を明らかにすることを目的とした。

その結果、作物残さが老化していく過程で作物体から直接N<sub>2</sub>Oが発生していることを示した。またN<sub>2</sub>Oが発生している部位から脱窒菌を複数分離し特徴を調べた結果、植物常在菌の一部が脱窒菌として一時的に機能し、作物体に含まれる成分を利用して脱窒を行いN<sub>2</sub>Oを発生していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前から作物残さのN<sub>2</sub>O発生への関与は認められていたが、ほとんどが土壌微生物によるものと考えられていた。本研究課題で明らかにした作物体から直接発生する一酸化二窒素（N<sub>2</sub>O）の発生メカニズムに関する研究成果は、これまで詳細が不明であった作物（植物）という新たなN<sub>2</sub>O発生源とそこに存在する植物に常在する微生物の窒素循環への関与という新たな知見を提案する。

研究成果の概要（英文）：We had found that nitrous oxide is emitted from not only soil but also unharvested crop residues on a cabbage field, and hypothesized that denitrification occurs in the crop residue. As a result, some plant indigenous bacteria were isolated as denitrifiers from the crop residue, and the isolates showed denitrification activity under an aerobic (static) condition. Genomic features were not identical among the isolates: some of the isolates encoded nitrous oxide reductase gene on their genomes while the others didn't. A high amount of nitrate was detected in the residue. Culturing experiments with the residue showed cell growth of the isolate was observed with a reduction of nitrate concomitant with a release of nitrous oxide. Moreover, some sugars and organic acids contained in the residue were shown to be electron donors for the denitrifiers. These results suggest that some plant indigenous bacteria can utilize components of the crop residue to denitrify and produce nitrous oxide.

研究分野：環境微生物学

キーワード：好氣的脱窒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多量の窒素肥料が農地に投入され、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 (Kaiser et al., 1998)。 $N_2O$  生成経路の 1 つに、脱窒という、嫌気～微好気環境で硝酸が  $N_2O$  を経て窒素に還元される微生物代謝経路がある。 $N_2O$  は微好気環境で発生するが、特に農地では施肥や降雨時に発生し、これは一般に土壌に棲む脱窒菌が原因とされている。その一方、植物 (作物) 体からの  $N_2O$  発生を検証した研究はほんの数例しかなく、それらも植物は土壌で生成した  $N_2O$  が大気へ放出する通路としての役割を示すという結論が大半である。従って作物体に存在する微生物の窒素循環や  $N_2O$  発生への関与は不明である。

キャベツなどの葉菜類では、その収穫前後に畑から施肥時よりも多量の  $N_2O$  が発生することがあるが、あまり知られていない。我々はこれまでに、 $N_2O$  のモニタリング結果から収穫前後に土壌ではなくキャベツ外葉から直接  $N_2O$  が盛んに発生していることを発見した。しかも  $N_2O$  は葉表面の特に老衰の進んだ直径数 cm の範囲からスポット的に大量に発生していることを突き止めた。キャベツ外葉の成分は硝酸や有機酸や糖類に富む。つまり、脱窒に適した基質を多く含んでいると考えられる。そこで作物体での  $N_2O$  発生は脱窒によると推定し、実際に葉の  $N_2O$  発生スポットから主要な脱窒菌を分離することに成功した。これらの脱窒菌は、嫌気条件よりも微好気条件で高い脱窒能を示し、主に機能する脱窒代謝系は硝酸から  $N_2O$  までと推定された。キャベツ外葉は高濃度の硝酸を含むが、外葉の抽出液を脱窒菌に与えると 30 時間程度で外葉中の硝酸を完全に消費し  $N_2O$  を放出した。従って、作物体が老衰することでそこに棲む微生物が作物体成分を基質に脱窒を行い、 $N_2O$  を生成することがモデル実験で示された。さらに系統遺伝子解析の結果から、分離した脱窒菌群は植物と共生あるいは寄生する分類群に属していた。このことから、分離した脱窒菌群は健全な植物を生育の場とするが、宿主が老衰すると脱窒菌としての機能を発現すると推定された。これは、今まで注目されてこなかった「 $N_2O$  発生源としての作物体」と「植物共生微生物が  $N_2O$  発生を担う」という 2 つの重要な新知見を示す証拠である。以上から、植物体という特殊な環境に適応した植物依存型脱窒菌の生態とそこに構築される窒素代謝系を解析することで  $N_2O$  が発生する仕組みを明らかにできると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究を進めるにあたり、以下 4 つの目的を立てることとした。

(1) 脱窒と  $N_2O$  発生に利用される電子供与体を特定する。

環境中には極めて多くの電子供与体候補物質が存在するため、脱窒菌が利用する電子供与体は未だ推定の範囲にとどまる。これまで測定したキャベツ外葉での  $N_2O$  発生量から推測すると、外葉には大量の電子供与体が蓄積していることになる。そこで  $N_2O$  の大量放出をもたらす作物体中の電子供与体をメタボローム解析などにより特定する。

(2) 酸素と  $N_2O$  発生の関係を詳細に明らかにする。

酸素濃度は脱窒と  $N_2O$  発生に強く影響する。葉が老衰・腐敗していく過程でそこから発生する  $N_2O$  とその場の酸素濃度を、マイクロセンサーを用いて同時測定し、葉での酸素濃度の分布状況と  $N_2O$  発生との関係を明らかにする。

(3)  $N_2O$  発生型脱窒代謝系とその発現制御機構を明らかにする。

脱窒菌分離株のドラフトゲノム解析は既に完了している。そこでこの脱窒菌ゲノム情報を利用してトランスクリプトーム解析を行い、実際に作物体からの成分供給を受けて機能する脱窒代謝経路のパターンと、その際に  $N_2O$  発生の制御に関わる遺伝子群の発現を明らかにする。

(4) 植物依存型脱窒菌の起源と分布を明らかにする。

作物体の成長に伴い成分が変化する茎葉や老衰していく葉の内部あるいは表面における脱窒菌の菌数と分布をアンプリコンシーケンス解析と定量 PCR を組み合わせて評価し、植物依存型脱窒菌の起源と分布を明らかにする。

以上から脱窒菌の代謝と生態を、遺伝子レベル (ゲノム解析) から個体レベル (生化学) さらに生態学的なレベル (アンプリコンシーケンス解析および定量 PCR) まで明らかにすることにより、作物体で起こる  $N_2O$  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

本研究では以下 (1) ~ (3) については、キャベツ外葉から分離した脱窒菌に外葉の抽出液を与えて培養し、この培養液を用いた。(4) については圃場からキャベツ外葉を回収してマイクロコズムを作成し、老衰して  $N_2O$  が盛んに発生している部位を回収して実験に使用した。

(1)  $N_2O$  発生に利用される電子供与体の特定

培養液を濾過したのち、低分子から高分子まで幅広い化合物を解析できる NMR (核磁気共鳴) 解析と、高精度な解析が可能な LC-MS (液体クロマトグラフィー質量分析法) を用いたメタボローム解析を行った。

## (2) 酸素と N<sub>2</sub>O 発生の関係性の解明

培養液に N<sub>2</sub>O あるいは O<sub>2</sub> 測定用マイクロセンサーを設置し、細胞の増殖と酸素濃度の変化をモニターした。

## (3) N<sub>2</sub>O 発生型脱窒代謝系とその発現制御機構の解明

既に分離株のドラフトゲノム解析を終了した。このゲノムデータを用いて細胞の対数増殖初期・中期・後期の培養液から細胞を回収し、トランスクリプトーム解析に供した。これにより脱窒代謝系とそれに付随して発現する遺伝子群を解析した。

## (4) 植物依存型脱窒菌の起源と分布の解明

老衰し N<sub>2</sub>O が発生している葉のアンプリコンシーケンス解析と定量 PCR を行い、分離株の分布と数を調べた。

## 4. 研究成果

脱窒菌を外葉抽出液を与えて培養したところ、キャベツに含まれる硝酸が消費され、それに伴い N<sub>2</sub>O が発生と細胞の増殖が認められた (図1)。そこでこの増殖過程の培養液を各種解析に用いた。

(1) N<sub>2</sub>O 発生に利用される電子供与体の特定  
メタボローム解析の結果、複数の有機酸と糖が培養液中で消費されていることが分かった。従って脱窒菌は作物体に含まれる有機酸と糖を1種類ではなく同時に複数利用して N<sub>2</sub>O を発生していることが分かった。次いでこれらの有機酸と糖を電子供与体の候補化合物として、硝酸を含む無機塩培地に加え脱窒菌を培養した。その結果、計 10 種類の糖と有機酸が消費され、N<sub>2</sub>O の発生と細胞の増殖が認められた。以上からこれらの糖や有機酸が脱窒の電子供与体であることを明らかにした。

## (2) 酸素と N<sub>2</sub>O 発生の関係性の解明

一般に脱窒菌は嫌気条件下での代謝とされているが、本研究では圃場でのキャベツの状態を考慮し、培養は嫌気環境にせず、好気条件下で静置培養することとした。マイクロセンサーで酸素濃度を測定したところ、培養液中の酸素濃度は数時間で急激に減少した。しかしゼロにはならなかった。試しに嫌気条件下で培養を行ったところ菌体の増殖は非常に遅くなり活性も弱まった。以上から、分離した脱窒菌は増殖し初めには酸素がある程度必要であり、それを推進力として微酸素濃度下で脱窒を行うことが示された。

## (3) N<sub>2</sub>O 発生型脱窒代謝系とその発現制御機構の解明

トランスクリプトーム解析の結果、増殖と N<sub>2</sub>O 発生が生じている際に有意な発現が見られたのは、脱窒、短鎖脂肪酸の代謝、分枝鎖アミノ酸の代謝、等に関わる遺伝子群であった。一方ミトコンドリアの機能に関わる遺伝子群は発現が抑制されていた。従ってこれらの代謝経路が脱窒の駆動に関与していることが示唆された。

## (4) 植物依存型脱窒菌の起源と分布の解明

外葉の pH や無機態窒素の濃度はその老衰に伴い変化した。またこれらの老衰した葉に存在する全細菌数は新鮮な葉の千倍~1万倍に増加していた。一方これらの葉に含まれる細菌の多様性解析では、新鮮葉に比べて老衰葉で分離株の存在割合(全細菌種に含まれる分離株の割合)が増えており、分離した脱窒菌は細菌全体の中でも特にその集団を大きくしたといえる。

以上の結果から、分離株はキャベツの老衰に伴い放出された硝酸と電子供与体を利用して脱窒を行い N<sub>2</sub>O を発生したと結論を得た。

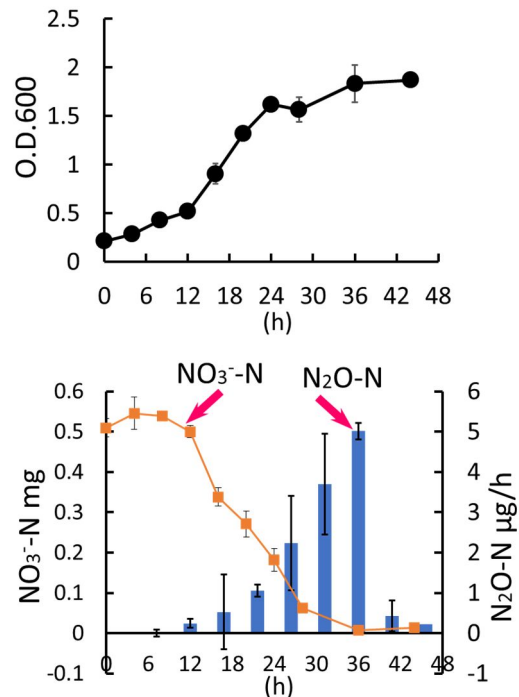


図1 上: 菌体の増殖 (好気・静置培養) .  
下: NO<sub>3</sub>濃度の減少及び N<sub>2</sub>O の生成 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多胡 香奈子、徳田 進一、郭永、黒岩恵、中村知喬、西澤智康、諏訪裕一、早津 雅仁
2. 発表標題 もう1 つの温室効果ガス発生源 作物残さに由来する一酸化二窒素の発生とその原因微生物の解析
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2019 年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多胡 香奈子、徳田 進一、早津 雅仁
2. 発表標題 キャベツ作物体のN2O 発生への関与とそこに棲む脱窒菌の特徴
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019 年度静岡大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考