

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17380046

研究課題名（和文） 耕地土壌における脱窒のエコ・ゲノミクスー根粒菌共生系の
N₂O パラドックスの解明と土壌微生物集団ゲノム科学の基盤構築ー研究課題名（英文） Eco-genomics of microbial denitrification in agricultural fields: N₂O
paradox in rhizobial symbiosis with legumes and soil community genomics

研究代表者

南 澤 究 (MINAMISAWA KIWAMU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70167667

研究成果の概要：土壌のない実験室系では根粒は N₂O を吸収か非発生であるが、圃場ダイズ根粒は N₂O の発生源であった。圃場を模した土壌栽培系とダイズ根粒菌変異株の実験より、*nosZ* を欠損株は硝酸から N₂O 発生を起こし、その硝酸は硝化細菌により供給されていた。ゲノム比較等により農耕地土壌の BJ2 クラスターに属するダイズ根粒菌は、*nosZ* を欠損し、最終産物として N₂O を生成した。以上の結果は、少なくともダイズ根粒菌の *nosZ* 遺伝子型と硝化細菌の共同作用により圃場ダイズ根粒から N₂O 発生が生ずることを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,800,000	0	3,800,000
2006年度	3,600,000	0	3,600,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	14,400,000	2,100,000	16,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学（分科）・植物栄養学・土壌学（細目）

キーワード：根粒菌、脱窒、亜酸化窒素、硝酸、土壌、ダイズ、*nosZ*

1. 研究開始当初の背景

近年地球レベルの窒素循環が変動をきたし、生活排水・畜産廃棄物などによる窒素汚染が進み、微生物による脱窒（硝酸が還元されて気体状の窒素分子 N₂ が生成されること）の重要性が高まっている。しかし、脱窒過程では、温室効果ガスである亜酸化窒素(N₂O)が副産物として生じる。本研究は、耕地生態系における脱窒に関わる微生物の働きや構成員を現代的な微生物生態学の視点から評価を行い、その持続的な利用を目指すものである。

2. 研究の目的

根粒菌共生系の N₂O パラドックス（実験室では根粒は N₂O 浄化をするが、圃場では N₂O の発生源になっている矛盾）の原因を解明することを第1の目的とした。第2の目的として、耕地土壌で起きている脱窒機能を担っている微生物群集に着目し、それらの微生物群集のゲノム解析という新領域の基盤をつくることである。

3. 研究の方法

(1) 実験室におけるダイズ根粒の N₂O 代謝
ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株の *nosZ* 遺伝子破壊株を作成し、親株とともに無菌的にダイズに接種を行い、

形成された根粒を密閉容器に入れ、N₂O 濃度変化の測定を行った。

(2) 圃場におけるダイズ根粒の N₂O 代謝

東北大学の鹿島台圃場で栽培した、播種後約 100 日目のダイズ根系を密閉容器に入れ、N₂O 濃度変化の測定を行った。

(3) ダイズ根粒菌の脱窒系の多様性

日本各地から収集したダイズ根粒菌の脱窒遺伝子(硝酸還元酵素遺伝子 *napA*、亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK*、一酸化窒素還元酵素遺伝子 *norCB*、亜酸化窒素還元酵素遺伝子 *nosZ*) の保有状況をゲノム比較とサザンハイブリダイゼーションにより検討した。また、培養菌体の嫌気条件下で硝酸を添加し、脱窒の最終産物を硝酸、亜硝酸の比色定量および亜酸化窒素および窒素のガスクロマトグラフ分析計による定量を行った。16S rRNA 遺伝子配列を決定し、分子系樹を作成し、脱窒遺伝子の保有状況と脱窒活性との関係を調べた。

(4) 圃場におけるダイズ根粒根圏の生物群集構造解析

リボソーム RNA 遺伝子の Small subunit と Large subunit の間の ITS (Internal transcribed sequence)領域をターゲットとし、蛍光標識プライマーを用いて PCR 増幅した。その PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後に、蛍光スキャナーを用いて多型解析を行った。目標とする特異的なバンドを切り出して、クローニングを行い ITS 領域の DNA シーケンスを決定した。DNA データベースに対して相同性検索を行い、生物種の同定を行った。

(5) 圃場におけるダイズ根粒根圏の N₂O 発生メカニズムの解明

レオナルドジャー栽培接種系により、ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 と硝酸還元酵素遺伝子変異株を接種したダイズを栽培した。播種後 30 日目に、土壌添加・老化処理(地上部切断)を行い、15 日目まで根粒から放出される N₂O をガスクロマトグラフ分析計で測定した。

4. 研究成果

(1) 実験室におけるダイズ根粒の N₂O 代謝

ダイズ根粒菌は、共生窒素固定細菌で空気中の窒素ガス N₂ をアンモニア NH₃ に宿主植物の光合成のエネルギーを使って固定をする。いわば太陽エネルギーを利用して自前で窒素肥料を作っている環境に優しい側面を持っている。しかし、ダイズ根粒菌は以下の図 1 のような 4 ステップの脱窒遺伝子があり、硝酸 NO₃⁻ を N₂ (または N₂O) まで還元

し大気中へ戻している。

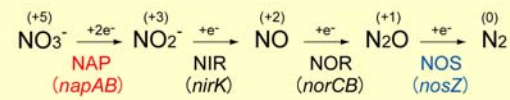


図 1 ダイズ根粒菌 USDA110 株の脱窒遺伝子と脱窒過程

そこで、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株の *nosZ* 遺伝子破壊株を作成し、親株とともに無菌的にダイズに接種を行い、形成された根粒周辺の気相の N₂O 濃度の測定を行った(図 2 左)。

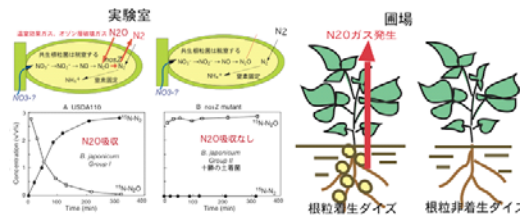


図 2 実験室ダイズ根粒の亜酸化窒素(N₂O)吸収と圃場における N₂O 発生

実験室でダイズ根粒菌野生株 USDA110 を接種したダイズ根粒は、N₂O を活発に還元吸収し、*nosZ* 遺伝子破壊株ではそのような吸収は認められなかった。したがって、USDA110 株の *nosZ* 遺伝子が N₂O 取込み活性を担っていることが明らかとなり、ダイズ根粒は根部周辺の N₂O ガス濃度を低下させることが分かった。さらにこのダイズ根粒の N₂O ガス取込み活性は、大気濃度の 0.3 ppm の N₂O でも観察され、温室効果ガスの除去系としても有効であると考えられた。

(2) 圃場におけるダイズ根粒の N₂O 代謝

そこで、圃場におけるダイズ根粒の N₂O 代謝の測定を行った。播種後約 100 日目のダイズ根系の N₂O 濃度を測定したところ、驚いたことに、根粒から N₂O が発生していることが明らかとなった。特に、老化が進んだ根粒から顕著な N₂O 発生が観察された(図 3、図 4)。

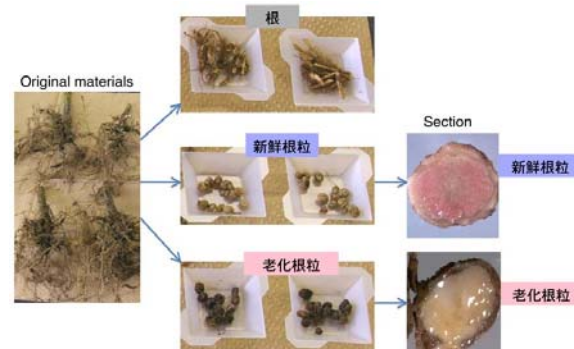


図 3 圃場ダイズ根系の分割

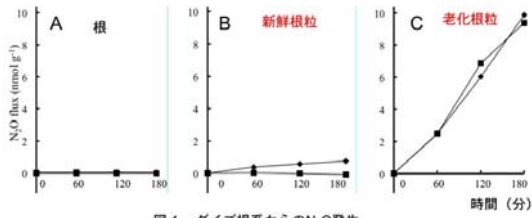


図4 ダイズ根系からのN₂O発生

(3) ダイズ根粒菌の脱窒系の多様性

日本各地から収集したダイズ根粒菌株の脱窒遺伝子(硝酸還元酵素遺伝子 *napA*、亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK*、一酸化窒素還元酵素遺伝子 *norCB*、亜酸化窒素還元酵素遺伝子 *nosZ*)の保有状況と脱窒活性(図1)について検討した。*Bradyrhizobium japonicum* cluster BJ1の大部分は *napA/nirK/norCB/nosZ* のフルセットの脱窒遺伝子を保有し、*B. japonicum* cluster BJ2は基本的に *nosZ* 遺伝子を欠損した *napA/nirK/norCB* タイプで、脱窒の最終産物は N₂O であった(図5)。したがって、*B. japonicum* cluster BJ2 のダイズ根粒菌が優占している土壌ではダイズ根粒菌の脱窒の最終産物は N₂O となり、圃場で観察された N₂O 発生の一因となることが示唆された。

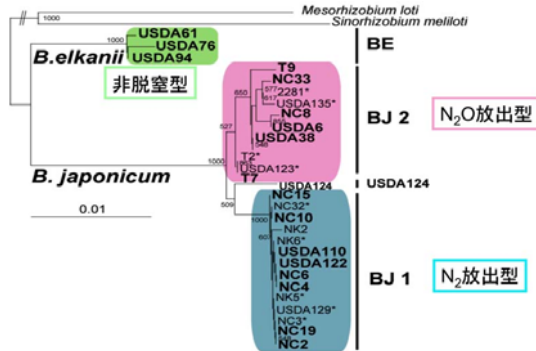


図5 ダイズ根粒菌の16S rDNA遺伝子の塩基配列による系統解析

(4) 圃場におけるダイズ根粒根圏の生物群集構造解析

リボソーム RNA 遺伝子の Small subunit と Large subunit の間の ITS (Internal transcribed sequence) 領域を PCR 増幅し、N₂O の発生している老化根粒に特異的に生息している土壌生物の検出を試みた(図6)。

老化根粒に特異的なバンドを切り出して、ITS 領域の DNA シーケンスを調べたところ、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* や根圏細菌やエンドファイトとして報告のある *Acidovorax*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* などの細菌、*Fusarium* などのカビ類、線虫や原生動物までもが検出された。老化根粒内外では、これらの生物が急速に増殖し、その一部が N₂O 発生過程に関与しているものと考えられた。

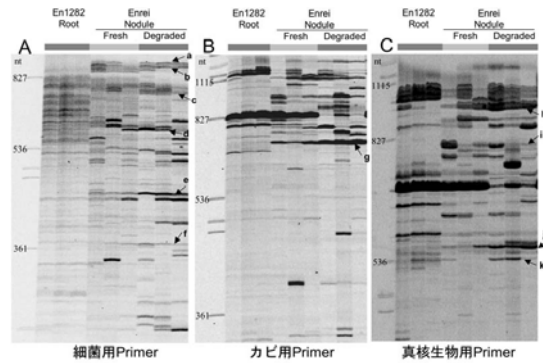


図6 根粒根圏のRISA法による微生物群集構造解析

(5) 圃場におけるダイズ根粒根圏の N₂O 発生メカニズムの解明

N₂O 発生の生態メカニズムを明らかにするために、レオナルドジャー栽培接種系による根粒着生ダイズ根系からの N₂O 発生に関する生物と窒素変換過程を検討した。*nosZ* 遺伝子を保有する野生型のダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 を対照として、*nosZ* 遺伝子破壊株の、ダイズへの接種実験による比較実験を行った。具体的には、30日間栽培した接種ダイズを、無処理、老化処理、土壌添加処理、同時処理を行い、処理後の根圏から放出される N₂O の測定を行った。その結果、接種したダイズ根粒菌の N₂O 還元酵素遺伝子 *nosZ* が存在しないと、老化根粒からの N₂O 発生が顕著に増えることが明らかとなった。

さらに、ダイズ根粒菌の硝酸還元酵素 *napA* と *nosZ* の2重変異株を作成し同様の検討を行ったところ、当該2重変異株では N₂O 発生が減少する傾向が観察された。また、硝酸および亜硝酸添加により老化根粒からの N₂O 発生が促進され、硝化抑制剤で顕著に N₂O 発生が抑制された。したがって、老化根粒からの N₂O 発生は、土壌中の硝化細菌の硝化過程を経て、根粒中のダイズ根粒菌が最終的な脱窒過程を担って発生していると結論された。

以上の結果等から、根粒老化過程で、根粒内のタンパク質がアンモニアに変化し、硝化過程で硝酸と亜硝酸に硝化細菌が変換し、ダイズ根粒菌が N₂O に変換するという生態メカニズムであると推定された。

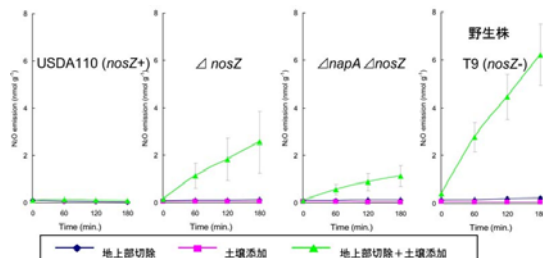


図7 硝酸還元能の異なる菌株を接種したダイズから回収した根粒のN₂O発生

本研究の第1の目的である、「根粒菌共生系の N₂O パラドックスの原因解明」は、モデ

ル実験などにより予定通り進行したと判断された。大部分の結果についてはすでに国際学術誌に公表されている。

一方、第2の目的である「機能微生物群集のゲノム解析という新領域の開拓」では、本報告書ではダイズ根粒菌の分子系統解析と根粒根圏の微生物群集構造解析の説明を行ったのみであるが、安定同位体を使用した Stable Isotope Probing 法、機能遺伝子のクローンライブラリー解析、根圏等からの細菌細胞濃縮法などの検討も同時に行い、今後の機能微生物群集のゲノム解析についての基盤技術を確立したと言える。今後、根圏微生物やダイズ根粒菌の比較ゲノム解析やメタゲノム解析による植物共生細菌や土壌細菌のゲノム進化則の解明や農業利用へ展開させていく予定である。

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 12 件) (全て査読あり)

- ① Itakura, M., K. Saeki, H. Omori, T. Yokoyama, T. Kaneko, S. Tabata, T. Ohwada, S. Tajima, T. Uchiumi, K. Honnma, K. Fujita, H. Iwata, Y. Saeki, Y. Hara, S. Ikeda, S. Eda, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2009. Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other Bradyrhizobiaceae members. ISME J. 3: 326-339.
- ② Inaba, S., K. Tanabe, S. Eda, S. Ikeda, A. Higashitani, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2009. Nitrous oxide emission and microbial community in the rhizosphere of nodulated soybeans during the late growth period. Microbes Environ. 24: 64-67.
- ③ Ikeda, S., L. E. E. Rallos, S. Inaba, S. Eda, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2008. Microbial community analysis of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes. Appl. Environ. Microbiol. 74: 5704-5709.
- ④ Itakura, M., K. Tabata, S. Eda, H. Mitsui, K. Murakami, J. Yasuda, and K. Minamisawa. 2008. Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N₂O reductase activity by selection after introduction of a mutated *dnaQ* gene. Appl. Environ. Microbiol. 74: 7258-7264.
- ⑤ 南澤 究, 増田幸子, 板倉学, 池田成志 (2008) ゲノム情報に基づいた植物共生細菌の環境応答と物質循環機能の解明. 土と微生物 62: 89-92.
- ⑥ Saito, A., S. Ikeda, H. Ezura, and K. Minamisawa. 2007. Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. Microbes

Environ. 22 (2):93-105.

- ⑦ 齋藤 朝美, 池田 成志, 則武 ちあき, 坂 真理子, 藤城 圭輔, 安藤 勝彦, 南澤 究 (2007) RISA法による微生物多様性評価, 日本微生物生態学会誌 22 (2) : 59-71.
 - ⑧ Sameshima-Saito, R., K. Chiba, and K. Minamisawa. 2006. Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean bradyrhizobia. Microbes Environ. 21 (3): 174-184.
 - ⑨ Sameshima-Saito, R., K. Chiba, J. Hirayama, M. Itakura, H. Mitsui, S. Eda, and K. Minamisawa. (2006) Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. Appl. Environ. Microbiol. 72:2526-2532
 - ⑩ 南澤 究, 犬伏和之 (2006) 農耕地からの地球温暖化ガスN₂O発生とその抑制 水環境学会誌 Vol.29, No.2. 67-71.
 - ⑪ 南澤 究 (2005) 微生物と植物の共生相互作用の科学 特集: 微生物バイオテクノロジー 学術月報 Vol. 58, No.10: 19-24.
 - ⑫ 福井 学, 南澤 究, 笠原康裕, 町田雅之, 早津雅仁, 妹尾啓史 (2005) 土壌微生物学におけるポストゲノム研究の現状と将来 日本土壌肥料学雑誌 Vol.76, No.4: 523-529.
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 板倉学, 田畑和文, 江田志磨, 三井久幸, 村上紀里子, 安田淳一, 南澤究: 変異型*dnaQ*プラスミドを用いた*Bradyrhizobium japonicum*高N₂O還元酵素活性変異株の取得. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27日-29日、福岡)
 - ② 南澤 究, 池田成志, 大久保卓, 金子貴一, Lynn Ester E. Rallos, 江田志磨, 三井久幸, 佐藤修正, 中村保一, 田畑哲之: 植物生息微生物の群集構造に対する根粒共生系の影響、第3回ゲノム微生物学会 (2009年3月5-7日、東京)
 - ③ 池田成志, Lynn Rallos, 大久保卓, 江田志磨, 稲葉尚子, 三井久幸, 南澤究: 異なる根粒形成表現型ダイズにおける微生物多様性解析. 日本微生物生態学会第24回大会 (2008年11月25日-28日、札幌)
 - ④ 板倉学, 田畑和文, 江田志磨, 三井久幸, 村上紀里子, 安田淳一, 南澤究: ダイズ根粒菌変異型*dnaQ*プラスミドを用いた高N₂O還元酵素活性変異株の取得. 日本微生物生態学会第24回大会 (2008年11月25日-28日、札幌)
 - ⑤ 稲葉尚子, 田邊謙二, 菊池真和, 江田志磨, 南澤究: 老化ダイズ根粒からのN₂O発生における根粒菌の寄与. 日本微生物生態学会第24回大会 (2008年11月25日-28日、札幌)
 - ⑥ 稲葉尚子, 田邊謙二, 菊池真和, 江田志

- 磨、南澤 究：ダイズ根粒根圏からの N_2O 発生における根粒菌の寄与。日本土壌肥料学会東北支部会宮城大会（2008年7月2日、仙台）
- ⑦ 南澤 究：ゲノム情報に基づいた植物共生細菌の環境応答と物質循環機能の解明。日本土壌微生物学会2008年度大会シンポジウム（2008年6月13日-14日、静岡）
- ⑧ 南澤 究：微生物生態学における環境ゲノミクス。第23回日本微生物生態学会シンポジウム（2007年9月15日-18日、松山）
- ⑨ 菊池真和、田邊謙二、池田成志、江田志磨、三井久幸、南澤 究：ダイズ根粒根圏の N_2O 発生に関わる微生物の解明。第23回微生物生態学会（2007年9月15日-18日、松山）
- ⑩ 植竹佑輔、千葉芳里、平山潤太、江田志磨、三井久幸、南澤 究：ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* における N_2O 還元酵素高発現株の作成。第23回微生物生態学会（2007年9月15日-18日、松山）
- ⑪ 南澤 究：農業におけるゲノム情報の利用、豊橋技術科学大学・農業環境技術研究所共催公開シンポジウム「未来型農業都市社会と食農産業クラスターの構築に向けて」（Invited speaker, 2007年3月12日、豊橋）
- ⑫ 田邊謙二、池田成志、江田志磨、南澤 究：ダイズ根粒根圏の N_2O 発生と生物群集構造解析、日本土壌肥料学会2006年度大会（2006年9月5日-7日、秋田）
- ⑬ 南澤 究、千葉芳里、平山潤太、鮫島玲子：ダイズ根粒菌の N_2O パラドックス。日本土壌微生物学会 2005 年度大会（2005 年 6 月 11 日-13 日、名古屋）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/chicken/publication/new.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南澤 究 (KIWAMU MINAMISAWA)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：70167667

(2) 研究分担者

妹尾 啓史 (KEISHI SENOO)
東京大学・大学院農学生命研究科・教授
研究者番号：40206652