

平成 20 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380050

研究課題名 (和文) 糸状菌生態研究の基盤構築と糸状菌の硝化・脱窒能の解明による窒素循環系の新提案

研究課題名 (英文) Construction of basic fungal ecology and new proposal of nitrogen cycle system through clarification of ability of nitrification and denitrification of fungi.

研究代表者

鮫島 玲子 (SAMESHIMA REIKO)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：00377722

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：糸状菌、脱窒、亜酸化窒素、茶園土壌、群集構造解析

## 1. 研究計画の概要

本研究課題は糸状菌の土壌における生態と窒素循環への関与を分子生態的に解析する手法を確立すること、また確立した手法を用いて硝化能や脱窒能を有する糸状菌を分離し、その多様性・分布・機能の特徴を明らかにすることを目的とする。これらを総合し新たな窒素循環系を提案する。

## 2. 研究の進捗状況

平成 18 年度は農地土壌から分離した脱窒性糸状菌の同定を行ない、分離された脱窒糸状菌は一般的な土壌菌とされるものであることがわかった。次に、チャ園土壌分離株の PDA-0-7 株 (*Aspergillus*) とダイズ根粒根圏土壌分離株の Root-5 株 (*Fusarium*) について、脱窒が起こる酸素条件を調査した。さらに、Root-5 株のゲノムからは PCR 増幅によって糸状菌の脱窒遺伝子である *CYP55* 遺伝子配列を検出することが可能となった。そこで、土壌系における糸状菌脱窒活性と *CYP55* 遺伝子発現の関係を PCR 増幅でモニタリ

ングするため、平成 19 年度はまずは培養系でのモニタリングを試みた。Root-5 株の培養菌体から total RNA を抽出し、逆転写-PCR により *CYP55* の転写を確認した。その結果、脱窒活性が増加しても *CYP55* 発現量は一定であり、*CYP55* 発現量は  $N_2O$  生成量とは相関関係が無いことが示唆された。しかし、PDA-0-7 株では *CYP55* の PCR 増幅が成功していないため、多様な系統の糸状菌が存在する土壌系には現時点での応用は難しいと判断した。

また、平成 19, 20 年度には窒素を年 40kg/10a 施肥した対照区と、その 3 倍の窒素肥料 (年 120kg/10a) を施肥した 3N 区の茶園土壌 (野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点) から計 80 株の糸状菌を単離し  $N_2O$  発生能を調査した。3N 区の嫌気培養単離株はすべて  $N_2O$  発生能を示さなかったが、好気培養分離株は半分以上の株が高い  $N_2O$  発生能を示した。また供試菌株は *Penicillium* 属、*Hypocrea* 属、*Trichoderma* 属、*Ophiostoma* 属、*Sporothrix* 属に近縁であることがわかった。しかし、供試菌株の脱窒能と糸状菌の系統の間に規則

性がみられなかった。また、群集構造解析を従来の 18SrRNA 遺伝子だけでなく 28SrRNA 遺伝子までの領域 (IGS 領域) を標的とした Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) を用いて解析し、3N 区では脱窒糸状菌として報告のある *Fusarium* 属や *Hypocrea* 属の糸状菌が存在することが分かった。分離菌株が土壤中でどのような生態的位置を占めるかは今のところ照合できていない。

### 3. 現在までの達成度

#### ②おおむね順調に進展している

糸状菌の脱窒に関しては、いくつかの土壌を用いて脱窒能をもつ糸状菌の分離、RISA 解析による糸状菌の分子生態的解析、脱窒遺伝子の検出及び発現解析を行っているが、各土壌についてすべての解析が終わっているわけではなく、雑誌への投稿が遅れている。

### 4. 今後の研究の推進方策

現在、脱窒遺伝子の検出が特定の株でしかできていないため、PCRプライマーの再検討などが必要である。脱窒遺伝子の検出が可能となれば、土壌系での脱窒遺伝子のモニタリングを行う。また、群集構造解析の結果と単離菌株の照合を行い、単離菌株の生態的位置づけを行う予定である。

### 5. 代表的な研究成果

(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)

①Reiko Sameshima-Saito, Kaori Chiba and Kiwamu Minamisawa. Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean bradyrhizobia. *Microbes and Environments*. 査読

有, 21(3), 2006 174-184

[学会発表] (計 4 件)

①山本祥子・平野智之・日比野友彰・鮫島玲子. 畑土壌における糸状菌の群集構造と脱窒活性. 日本土壌肥料学会 2008 年度愛知大会. 2008 年 9 月 10 日. 名古屋市立大学

②Reiko Sameshima-Saito and Makoto Kameda. Characterization and distribution of *Nitrobacter winogradskyi* MK1 isolated from the field soil simultaneously amended with cattle manure and chemical fertilizer. 12<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. 2008 年 8 月 19 日. Cains Convention Centre, Cains, Australia

③上田里美・廣野祐平・森田明雄・鮫島玲子. 脂肪酸施用が茶園土壌の微生物と脱窒活性に及ぼす影響. 日本土壌微生物学会 2008 年 度大会. 2008 年 6 月 13 日. 静岡大学

④亀田信・早津雅仁・小川直人・鮫島玲子. 有機物連用土壌より分離した亜硝酸酸化菌に関する研究. 第 23 回日本微生物生態学会. 2007 年 9 月 16 日. 愛媛大学

[その他]

①鮫島玲子. 部門別進歩総説特集 土壌生物 その 2 群集構造, 畑地, 窒素代謝. 日本土壌肥料学雑誌. 79(6), 2008, 560-563