

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14366

研究課題名（和文）陸域環境の窒素固定を担う微生物基盤の刷新

研究課題名（英文）New insights into the diazotrophs in terrestrial environments

研究代表者

増田 曜子（Masuda, Yoko）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：80813237

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究成果1:鉄還元菌窒素固定は地球規模で普遍的かつ重要な事象であることの提唱。国内および海外127地点の土壌メタゲノム解析を行ったところ、うち79地点で鉄還元菌の窒素固定遺伝子が検出された。検出頻度は水田土壌だけでなく森林土壌、砂漠、極地土壌においても高かった。このことから、鉄還元菌による窒素固定は土壌環境において普遍的な事象である可能性が示された。

研究成果2:鉄還元菌が窒素固定活性を發揮することの証明。水田土壌から単離したAnaeromyxobacter属細菌が実際の土壌においても窒素固定活性を示すことを初めて実証した。また、その他新属の鉄還元菌も多数分離に成功し窒素固定活性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒素固定は大気中の窒素ガスを生物が利用できる形態の窒素に変換して土壌に供給する重要な反応である。19世紀末にはじめて窒素固定が発見されて以降、「土壌の窒素固定は植物共生細菌や光合成細菌が担う」というのが一般常識であった。しかし本研究により、窒素固定できる鉄還元菌が地球規模で普遍的に分布していること、そして既知の窒素固定細菌群よりも存在量が多い傾向も見出された。このことは窒素固定に関する定説を刷新して自然生態系の支持基盤の本質に迫るものであり、土壌学分野だけでなく、微生物学、地球科学、生態学といった自然科学分野全般において意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：In our metagenomic analysis of the terrestrial soils around the world, nif genes derived from iron-reducing bacteria were detected in 79 among 127 sites. The nif genes derived from iron-reducing bacteria was frequently detected not only in paddy soils but also in the forest, desert, and polar soils. These results suggested that nitrogen fixation by iron-reducing bacteria is a universal phenomenon in the soil environment. We verified, for the first time, the nitrogen-fixing activity of Anaeromyxobacter isolated from paddy soil, both in culture medium and soil microcosm. In addition, we successfully isolated several strains of iron-reducing belonging to new genera, Geomonas and Oryzomonas, and confirmed their nitrogen-fixing activity.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：鉄還元菌 窒素固定 水田土壌 メタゲノム Geomonas Oryzomonas Anaeromyxobacter

1. 研究開始当初の背景

微生物による窒素固定は「不活性な窒素ガス」を「生物が利用できる形態(アンモニア)」へ変換する唯一の生物反応であり、窒素源の供給という自然生態系を根底から支える重役を担っている【図1A】。窒素固定微生物に関する幾多の研究が行われ、窒素固定は *Cyanobacteria* 門の光合成細菌や *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria* 綱, *Actinobacteria* 門細菌に代表される根圏・根粒菌によって駆動されることが、ここ100年間不変の公知である。

しかしながら近年申請者らは、この窒素固定微生物の固定概念を覆す発見に至った。申請者らは、従来法である PCR 法や分離培養法と比べ解析バイアスが極めて少ない、環境中の DNA や RNA を網羅的に塩基配列解読するメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析によって、水田土壌中の窒素変換を担う微生物群集を解析した【Masuda *et al.*, 2017, doi: 10.1264/jsm.2017.01.011】。その結果、光合成細菌や植物共生細菌の窒素固定遺伝子 (*nif*) よりも、従来法ではほとんど検出されてこなかった *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter*・*Geobacter* 属細菌由来の *nif* やその転写産物は、はるかに高頻度に検出された【図1B】。これらの細菌は、水田土壌に優占することが知られていたが、その機能は鉄などをはじめとする金属還元であると考えられてきた。申請者らの発見から、従来注目されてきた光合成細菌や植物共生細菌ではなく、鉄還元菌こそが窒素固定のキープレイヤーである可能性が初めて示唆されたのである。さらに驚くべきことに、これら鉄還元菌は水田土壌だけでなく河川の底泥にも優占する他、畑・森林・雑草地の土壌にも分布しており、「鉄還元菌による窒素固定」が陸域生態系、特に還元的な環境において普遍性を持った事実である可能性も強く示唆された【図2】。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この窒素固定の新たな微生物基盤に関する仮説を検証することである。日本及び世界各地の陸域メタゲノムデータの包括的解析、分離培養、菌株ゲノム解析、安定同位体測定法を用いて、特に還元環境における「鉄還元菌による窒素固定」を生態レベルから活性レベルまで多角的に実証した。

3. 研究の方法

(1) 陸域生態系における窒素固定遺伝子のグローバル調査

水田や河川の底泥と同様に嫌気的な環境下にあると考えられる湿地や湿潤性森林土壌など多地点の土壌試料についてメタゲノム解析を行った。また、公共データベース MG-RAST に登録されている世界各地の陸域土壌(極地、砂漠、熱帯雨林、農耕地等)のメタゲノムデータの収集を行い、これらについて、上記と同様にメタゲノムデータに含まれる *nif* の微生物由来を調査し、光合成細菌や根圏・根粒菌などの既存の窒素固定細菌由来の *nif* と鉄還元菌由来の *nif* の分布と優占度を比較解析した。

(2) 鉄還元菌の窒素固定能の検証

(2-1) 鉄還元菌の単離培養、窒素固定活性の測定、窒素固定遺伝子の同定

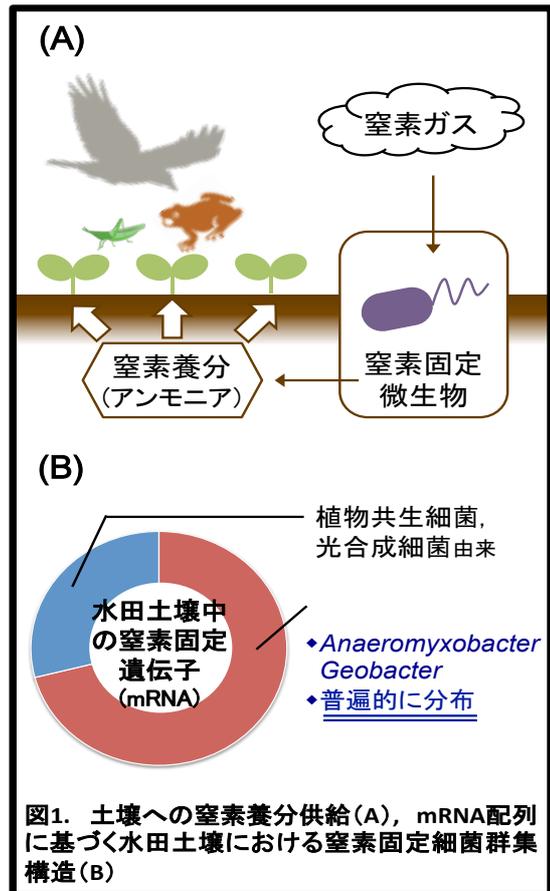


図1. 土壌への窒素養分供給(A), mRNA配列に基づく水田土壌における窒素固定細菌群集構造(B)

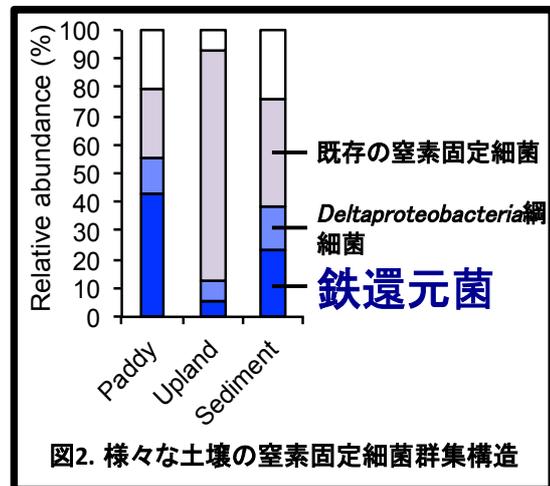


図2. 様々な土壌の窒素固定細菌群集構造

これまで水田土壌からほとんど単離されたことのなかった鉄還元菌を集積培養法によりスクリーニングし、コレクションした。単離株は生理性状試験および 16S rRNA 遺伝子配列解析により分類同定した。また、定法のアセチレン還元活性測定法により単離した鉄還元菌の窒素固定活性とそれに伴う菌の成育を調べた。窒素固定活性が確認された菌株について、ドラフトゲノム解読を行なって *nif* の配列とそのクラスタ構造を明らかにした。

(2-2) 土壌中における鉄還元菌の窒素固定能の解析

2-1 で窒素固定能が確かめられた鉄還元菌について、滅菌した土壌に接種して土壌の窒素固定活性を経時的に測定した。同時に、その土壌から RNA を抽出し、定量 PCR 法により接種した菌株の *nif* 転写量が上昇しているか確認した。

(2-3) 鉄還元菌の窒素固定能の直接検証

安定同位体でラベルした $^{15}\text{N}_2$ を封入して土壌を培養し、培養後土壌 DNA を抽出して超遠心に供した。分取した ^{15}N -DNA 画分に含まれる鉄還元菌の窒素固定遺伝子の割合の変化を追い、鉄還元窒素固定菌の窒素固定への寄与を検証した。

4. 研究成果

(1) 陸域生態系における窒素固定遺伝子のグローバル調査

国内 29 地点の土壌環境の DNA データを解析したところ、うち 28 地点で *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌の窒素固定遺伝子が検出された。また、水田土壌や河川の底泥では森林や畑土壌より高頻度に窒素固定遺伝子が検出された (図 3)。また、海外 98 地点の土壌環境の DNA データを解析したところ、うち 51 地点で *Geobacter* と *Anaeromyxobacter* の窒素固定遺伝子が検出された。また、これらの検出頻度は水田土壌だけでなく熱帯雨林等の森林土壌、砂漠、極地土壌においても高かった (図 4)。これらのことから、鉄還元菌による窒素固定は水田土壌だけでなく他の環境においても活発に行われている可能性が示された。以上のことから、鉄還元細菌による窒素固定は土壌環境において普遍的な事象であり、鉄還元細菌が土壌環境における窒素固定のキープレイヤーである可能性が示唆された

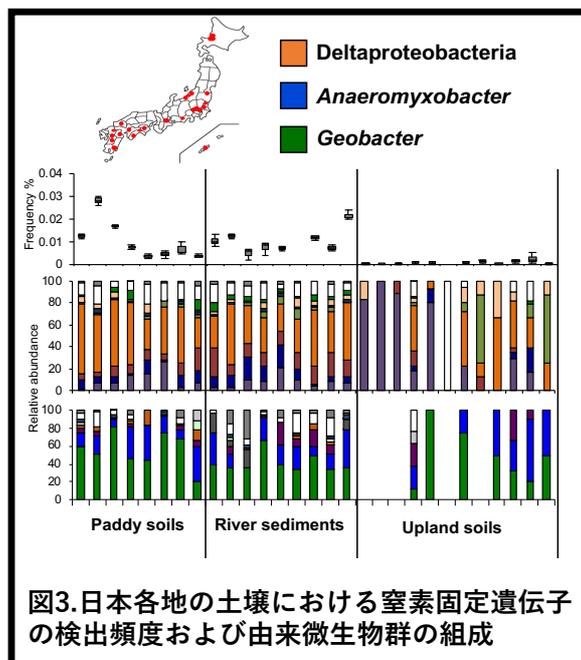


図3. 日本各地の土壌における窒素固定遺伝子の検出頻度および由来微生物群の組成

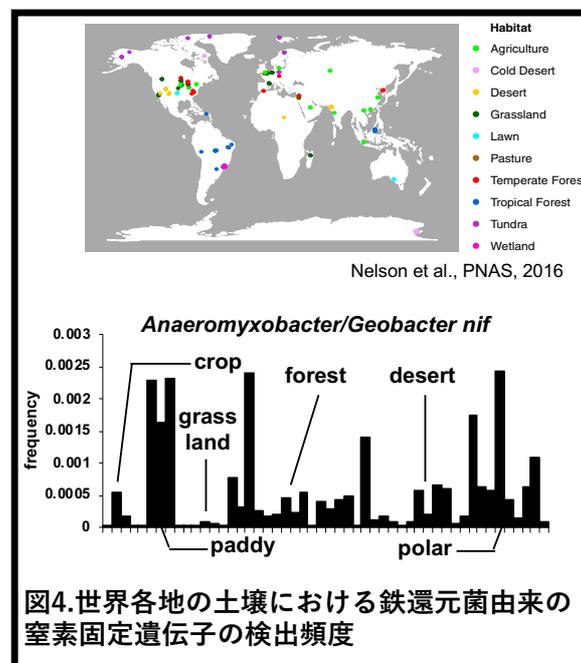


図4. 世界各地の土壌における鉄還元菌由来の窒素固定遺伝子の検出頻度

(2) 鉄還元菌の窒素固定能の検証

(2-1) 鉄還元菌の単離培養、窒素固定活性の測定、窒素固定遺伝子の同定

スクリーニングの結果、*Anaeromyxobacter* 属細菌 7 株と *Geobacter* 属細菌 700 株以上の単離培養に成功した (図 5A, B)。これらは既知記載種との DNA の相同性が一様に低く、全ての株が新規な系統群であることが示唆された。さらに、ゲノム解読や生理性状試験の結果、従来の *Geobacter* 属細菌とは異なることが判明し、2つの新属 *Geomonas* および *Oryzomonas* を提案した (図 5B) (Xu et al., 2019, 2020; Itoh et al., 2021)。また、*Anaeromyxobacter*, *Geomonas*, *Oryzomonas* 属細菌の窒素固定能を実証した (図 5C) (Masuda et al., 2020; 一部 Data not shown)。

(2-2) 土壌中における鉄還元菌の窒素固定能の解析

滅菌した土壌にこの *Anaeromyxobacter* 属細菌を接種したところ、土壌の窒素固定活性が上昇するとともに、土壌中での *Anaeromyxobacter* 属細菌の増殖も確認された (Masuda et al., 2020)。これらのことから、*Anaeromyxobacter* 属細菌は窒素固定活性を有すること、そして土壌中で窒素固定能を発揮できることが明らかとなった。*Anaeromyxobacter* 属細菌の窒素固定能を活性レベルで

証明した例は世界ではじめてである。

(2-3)鉄還元菌の窒素固定能の直接検証

安定同位体でラベルした $^{15}\text{N}_2$ を封入して培養した水田土壌マイクロコズムから抽出した土壌 DNA を用いて $^{15}\text{N}_2$ を取り込んだ細菌群の ^{15}N -SIP 法による特定を行った。その結果、 ^{15}N を取り込んだ画分に置いて鉄還元菌由来の 16S rRNA 塩基配列が他の窒素固定菌と比較して極めて高頻度に検出された (Data not shown)。このことから、鉄還元菌が実際の土壌において窒素固定を行っているキープレーヤーであることが示唆された。

このように、本研究によって窒素固定鉄還元菌は世界各地の陸域土壌に置いて普遍的に分布および優占していること、実際に窒素固定能を保有しており、土壌において窒素固定を行えることが明らかとなった。さらに、水田土壌における窒素固定のキープレーヤーは鉄還元菌であるということが、 ^{15}N -SIP 法により裏付けられた。

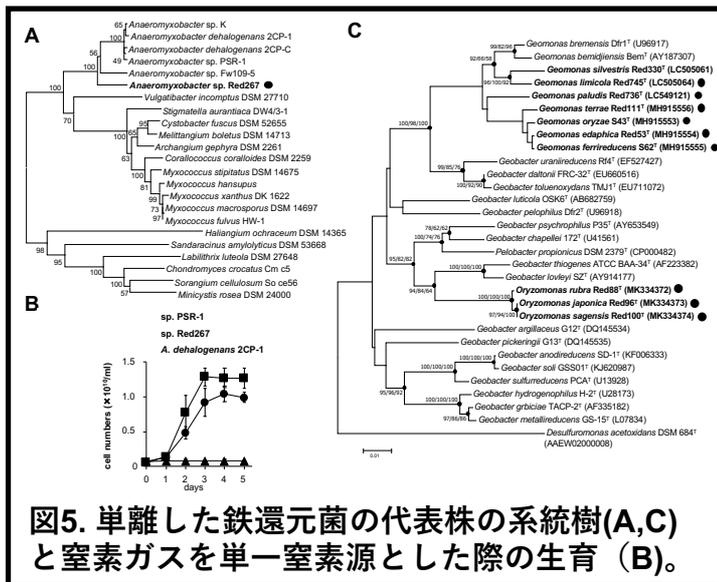


図5. 単離した鉄還元菌の代表株の系統樹(A,C)と窒素ガスを単一窒素源とした際の生育 (B)。

表1. *Anaeromyxobacter* 属細菌を接種した水田土壌マイクロコズムにおける窒素固定活性

	No. of 16S rRNA (copies/g-soil)	C_2H_4 (nmol/g-soil/h)
before incubation	nd	nd
Control (water added)	nd	nd
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. PSR-1	$(2.38 \pm 2.14) \times 10^5$	0.24 ± 0.33
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Red267	$(1.39 \pm 0.56) \times 10^5$	0.58 ± 0.38

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xu Zhenxing, Masuda Yoko, Itoh Hideomi, Ushijima Natsumi, Shiratori Yutaka, Senoo Keishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Geomonas oryzae gen. nov., sp. nov., Geomonas edaphica sp. nov., Geomonas ferrireducens sp. nov., Geomonas terrae sp. nov., Four Ferric-Reducing Bacteria Isolated From Paddy Soil, and Reclassification of Three Species of the Genus Geobacter as Members of the Genus Geomonas gen. nov.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 10.3389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.02201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Xu Zhenxing, Masuda Yoko, Hayakawa Chie, Ushijima Natsumi, Kawano Keisuke, Shiratori Yutaka, Senoo Keishi, Itoh Hideomi	4. 巻 8
2. 論文標題 Description of Three Novel Members in the Family Geobacteraceae, Oryzomonas japonicum gen. nov., sp. nov., Oryzomonas sagensis sp. nov., and Oryzomonas ruber sp. nov.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 634 ~ 634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8050634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 増田曜子	4. 巻 58
2. 論文標題 水田土壌における鉄還元菌窒素固定の発見と応用 オミクス解析から低窒素農業へ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 143-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuda Yoko, Yamanaka Haruka, Xu Zhen-Xing, Shiratori Yutaka, Aono Toshihiro, Amachi Seigo, Senoo Keishi, Itoh Hideomi	4. 巻 86
2. 論文標題 Diazotrophic Anaeromyxobacter Isolates from Soils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 956-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00956-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Hideomi, Xu Zhenxing, Masuda Yoko, Ushijima Natsumi, Hayakawa Chie, Shiratori Yutaka, Senoo Keishi	4. 巻 71
2. 論文標題 Geomonas silvestris sp. nov., Geomonas paludis sp. nov. and Geomonas limicola sp. nov., isolated from terrestrial environments, and emended description of the genus Geomonas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 4607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004607	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 水田土壌における鉄還元菌窒素固定の発見と応用 - マイクロバイオーム解析から低窒素農業へ -
3. 学会等名 土壌微生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masuda Yoko
2. 発表標題 Nitrogen fixation by iron reducing bacteria - previously overlooked diazotrophs essential for sustainable soil-plant ecosystems -
3. 学会等名 ASME (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masuda Yoko
2. 発表標題 Nitrogen fixation of iron reducing bacteria in rice paddy soils: potent agents for sustainable crop production with low nitrogen input
3. 学会等名 BAGECO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Masuda
2. 発表標題 Semi-ubiquitous presence of iron reducing bacterial nif genes in terrestrial soils
3. 学会等名 ASME (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中遥加
2. 発表標題 鉄還元細菌の窒素固定能の検証
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度大会 (神奈川大会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 水田土壌の優占種、鉄還元菌の新機能-窒素肥沃度を支えるキープレイヤー-
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Masuda
2. 発表標題 Nitrogen fixing activity of iron reducing bacteria in paddy soils: potent agents for low nitrogen rice production in East Asia
3. 学会等名 NARO-MARCO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Masuda
2. 発表標題 Iron-reducing bacteria is a ubiquitous but previously-overlooked driver of reductive nitrogen transformation in terrestrial ecosystems
3. 学会等名 ASME (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 見落とされてきた微生物の生態 - メタトランスクリプトーム解析の応用 -
3. 学会等名 土壌微生物 × 物質循環ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関