

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19194

研究課題名(和文) ニッチを共有した異種微生物複合系による好気的一酸化二窒素発生機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of nitrogen oxide production by a microbial consortium under aerobic environment.

研究代表者

多胡 香奈子 (Tago, Kanako)

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・上級研究員

研究者番号：20432198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、強酸性土壌では好気的環境で酸性適応型アンモニア酸化細菌 脱窒系状菌共生系がニッチを共有し一体化しており、この共生系の反応により大量の一酸化二窒素が発生することを仮説とし、これを証明することを目的とした。その結果、強酸性化した茶園土壌では有機物(主に茶の葉と枝)堆積層とその直下の土壌が高い硝化能とN₂O発生ポテンシャルを有することを示した。また土壌中では糸状菌とアンモニア酸化菌が棲み分けを行っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温室効果ガスの1つである一酸化二窒素(N₂O)はその発生の1/4が農業由来とされていることから、農地におけるN₂Oの発生に関する詳細な状況を把握し、それらのデータに基づいてN₂O発生削減技術を開発することが求められる。本研究では特にN₂O発生量が多いとされる茶園土壌において、これまで着目されてこなかった有機物残さが土壌と同様かそれ以上にN₂Oを発生していることを明らかにし、その原因微生物の具体的な分布を明らかにした。以上から学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that ammonia-oxidizing bacteria collaborated with denitrifying fungi to produce nitrogen oxide from ammonium in a tea field soil where is highly acidic due to the application of large amounts of nitrogen fertilizers. As a result, litters and soils just below the litters showed a high nitrification activity and a N₂O production potential. The ammonia oxidizers and denitrifying fungi localized at different place in the litter and soil. Therefore, the two microorganisms present in different place to produce nitrogen oxide cooperatively.

研究分野：環境微生物学

キーワード：硝化脱窒

1. 研究開始当初の背景

急激に増加している温室効果ガス一酸化二窒素 (N_2O) の最大の発生源は農耕地である。申請者らはこれまでに、農耕地のなかでも茶園土壌の N_2O 発生量が最も高く、水田や畑地よりも数十倍も高いことを明らかにした。さらに茶園土壌は好気条件で大量の N_2O を発生し、糸状菌用抗生物質を添加すると 70% も発生が抑制されることを示し、 N_2O 生産の主体は脱窒能を有する糸状菌であることを指摘した。このことは、従来の N_2O 発生、即ち好気的環境では硝化細菌が嫌気的環境では脱窒細菌が N_2O 発生を担うという見解を覆すものであった。一方、脱窒糸状菌は亜硝酸から N_2O を生成することが示されている。茶園土壌は強酸性化していることから、脱窒糸状菌に大量かつ効率的に亜硝酸を供給する酸性環境に適応した硝化菌 (アンモニアを亜硝酸に酸化するアンモニア酸化細菌) の存在が推定された。

一方で、茶園土壌のような酸性環境に適応したアンモニア酸化細菌は長年不明だった。しかし我々は世界で初めて酸性環境に適応したアンモニア酸化細菌を強酸性茶園土壌から分離し、メタゲノム解析により酸性土壌で機能していること証明した (Hayatsu, Tago, et al., ISME J, 2017)。このアンモニア酸化細菌を分離した土壌こそが、糸状菌による N_2O の発生量が最も高い茶園土壌であった。以上から我々は茶園土壌において、酸性適応型のアンモニア酸化細菌が生産した亜硝酸を糸状菌が取り込み好気的亜硝酸還元反応により N_2O が大量に発生しているという仮説を立てた。この仮説を証明するには解明すべき大きな問題がある。それは、亜硝酸イオン (NO_2^-) は強酸性条件ではその大部分が反応性に富む HNO_2 となって揮散し、土壌から消失するということである。したがって耐酸性アンモニア酸化細菌と脱窒糸状菌による N_2O 生成システムが機能するためには、土壌の微小環境中においてアンモニア酸化細菌と脱窒糸状菌は亜硝酸の授受が可能な空間的分布、即ちニッチを共有しており、さらに両者の間に安定的な亜硝酸輸送機構が存在する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究を進めるにあたり、以下 3 つの目的を立てることとした。

(1) 強酸性土壌では、好気的環境で酸性適応型アンモニア酸化細菌 脱窒糸状菌共生系がニッチを共有し一体化しており、この共生系の反応により大量の亜酸化窒素が発生することを証明する。

(2) アンモニア酸化細菌が糸状菌に、酸性条件下における亜硝酸分解を回避して亜硝酸を供給する機構が存在することを明らかにする。

(3) 酸性適応型アンモニア酸化細菌 脱窒糸状菌共生系が土壌で実際に機能していることを証明する。

この結果得られる知見は、窒素循環において好気的条件下ではアンモニアは亜硝酸を経て硝酸に酸化されるという定説を覆すと同時に、従来、窒素循環は細菌や古細菌といった原核生物の逐次反応で駆動されるという見方に対し、細菌と糸状菌の共生という原核生物と真核生物の組み合わせにより駆動する窒素循環系を提案する。このために本課題では目的微生物の存在場所の特定とそれらの微生物の土壌中における分布を把握することを目的とした。また土壌で一体化していると考えられるアンモニア酸化菌と脱窒糸状菌をコンソーシアのまま分離するための手法を検討した。

3. 研究の方法

本課題の目的は、好気的環境で酸性適応型アンモニア酸化細菌 - 脱窒糸状菌共生系が存在し、この共生系より大量の一酸化二窒素が発生することを明らかにすることである。そのためにまず、好気条件下で極めて高い一酸化二窒素発生ポテンシャルを有する土壌部位を特定することとした。施肥が開始される 2 月ころから定期的に茶園土壌をサンプリングし、有機物堆積層とその下の土壌を回収した。土壌は上層 (0-2.5cm) と下層 (2.5-5.0cm) に分けてから有機物堆積層と各土壌についてそれぞれ pH、水分含量、無機態窒素の量、硝化能および N_2O 発生ポテンシャルを測定した。

次に、アンモニア酸化菌と脱窒糸状菌の土壌中における分布を明らかにすることとした。土壌は易分解性有機物を含む物質から鉱物を多く含む物質までが混在し複雑な構造をなしている。これらの物質は比重で分画できることから、この手法を応用し、土壌を微生物の栄養源を含むと

考えられる易分解性有機物を含む画分とそれ以外に分け、それぞれの画分にアンモニア酸化菌と脱窒系状菌が存在するか PCR により調べた。

一方で特定した土壤部位から目的の微生物を分離するための手法を検討した。特に今回はアンモニア酸化菌と脱窒系状菌のコンソーシアを分離のターゲットにしていることから、従来の単一の微生物を分離する手法とは異なる方法をとることにした。具体的には、難培養微生物を分離するための 1 つの手法として用いられている原位置培養系を参考にし、独自に考案した土壤に埋設して 1~2 か月インキュベート後にそれを回収し分離を行うこととした。

4. 研究成果

一酸化二窒素発生ポテンシャルを有する土壤部位を特定するため、茶園土壤を 1 年間定期的にサンプリングし、理化学性と微生物活性（硝化能と N_2O 発生ポテンシャル）を調べた。その結果、pH は有機物堆積層 > 土壤上層 > 土壤下層となり、有機層は時期によって中性付近を示すこともあった。このことから、一般的には酸性土壤とされている茶園土壤には、実は局所的あるいは時期的にヘテロな環境が生み出されており、微生物の活動に大きく影響を与える pH も酸性から中性まで様々な環境が生じることが明らかとなった。このことから酸性適応型アンモニア酸化細菌 - 脱窒系状菌共生系に加えて中性アンモニア酸化細菌と脱窒系状菌共生系の 2 つの共生系が茶園土壤中には存在すると推察された。 N_2O 発生ポテンシャルについては、有機物堆積層とその直下の土壤において高い一酸化二窒素発生ポテンシャルが観察された。特に春から夏にかけては土壤上層の、秋には有機物堆積層での N_2O 発生ポテンシャルが高かったことから、季節によって機能する共生系の分布が異なることが考えられた（図 1）。



図 1. 春（5 月、左）と秋（10 月、右）のうね間の様子。春は土壤上層で N_2O 発生ポテンシャルが高く、秋は有機物堆積層で N_2O 発生ポテンシャルが高かった。秋は春に比べて有機物堆積層の量が多く、これが N_2O 発生ポテンシャルの違いに現れたと考えられた。

次にアンモニア酸化菌と脱窒系状菌の土壤中における分布を明らかにするため、比重分画法により土壤を易分解性有機物を含む画分とそれ以外に分け、アンモニア酸化菌と脱窒系状菌がどの画分に存在するかを PCR により調べた。すると、細菌の一部は糸状菌と同じ画分に存在したことから、さらにこの糸状菌の存在する画分に存在する細菌にアンモニア酸化菌が含まれるか調べた。その結果、糸状菌の存在する画分にアンモニア酸化菌が検出され、土壤を構成する物質に基づく分布という観点からは、アンモニア酸化菌と糸状菌が同じニッチに存在していると考えられた。

ところで、微生物は環境中では一般にコミュニティを形成して存在していると考えられているが、従来の微生物分離方法は環境中に多様に存在する微生物群集の中から単一の微生物を取り出すことを目的とした手法が主流である。そこでコンソーシアとしての微生物集団（あるいは群集）を分離するため、従来の分離方法とは異なる新たな手法を確立することにした。これまで難培養微生物を分離するために考案されたいくつかの手法を参考に培養装置を組み立て茶園土壤中に設置した。この培養装置は、高さ約 0.6cm × 幅約 1 cm の筒の中にゲルを充填しその両側にメンブレンフィルターを張り付けたものである。メンブレンフィルターのポアサイズを調整することで、土壤の栄養素のみがフィルターを通り培養装置の中へ移動することが出来たり、糸状菌と、糸状菌とコンソーシアを形成するアンモニア酸化菌が土壤からメンブレンフィルターを通過してアガロース内に侵入することが出来る。ここではアガロース部分に肥料の粒子を 1 粒入れることで肥料を利用する微生物が土壤から培養装置内に取り込まれることを想定した。しかし、培養装置を土壤に埋設して 1, 2 か月後に取り出し N_2O 発生ポテンシャルを調べたところ、培養装置からの N_2O の発生量は非常に少なく、また微生物がアガロース上で増殖している様子は認められなかった。メンブレンフィルターを実態顕微鏡で観察したところ、糸状菌の菌糸が張り巡らされていたことから、糸状菌の菌糸はアガロースより菌糸を固定できる何らかの固体表面が必要であることが分かった。以上のことからこの培養装置を用いた分離手法についてはさらなる検討が必要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 多胡 香奈子、廣野 祐平、早津雅仁
2. 発表標題 Unique characteristics of tea field soils which allows coexistence of various ammonia-oxidizers.
3. 学会等名 Sixth International Conference on Nitrification and Related Processes (ICoN6) (国際学会)
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
研究分担者	早津 雅仁 (Hayatsu Masahito) (70283348)	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・再雇用職員 (82111)	

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
---------	---------