

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03096

研究課題名（和文）低メタン性をもたらすイネ - 土壌-微生物系の包括的キャラクタリゼーション

研究課題名（英文）Characterization of rice-soil-microbe system leading to low CH₄ emission

研究代表者

常田 岳志 (Tokida, Takeshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・上級研究員

研究者番号：20585856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000 円

研究成果の概要（和文）：携帯型メタン分析計を用いたハイスループットのフラックス測定法の開発を進め、従来法と比較し3倍以上のスループットをもつ改良型チャンバ法を開発した。世界の様々なイネ品種には3倍以上に上るメタン排出量の差異があることが明らかとなった。

イネ品種の違いがメタン排出量の多寡に影響する機序の一つとして、一部の低メタン品種の根圏では、土壌中の粗大有機物の低分子化活性が低い可能性が示された。

土壌細菌Betaproteobacteria綱Azoarcus sp. KH32C株をイネ種子に接種することで水田由来のメタン排出が低減する可能性が示され、メタン生成・消費微生物群集の変動がそれに寄与したと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これ以上の地球温暖化を緩和するためには、強力な温室効果ガスであるメタンの排出をできる限り早期にかつ大幅に削減する必要があり、水田からのメタン排出を削減する新たな技術が必要とされている。本研究によって、新たにハイスループットのメタン排出量の調査方法が開発され、その手法を用いることで3倍以上に及ぶメタン排出量の品種間差が確認された。また品種間差のメカニズムの一端も解明され、土壌細菌を種籾へ接種することによるメタン低減効果も一部確認された。これらの結果は、品種選択や育種、土壌細菌の利用等によって大幅なメタン削減が可能であることを示唆するものであり、学術および実社会に対しても大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：A modified closed-chamber method suitable for high-throughput measurements of CH₄ emission from rice paddies was developed using a portable spectroscopic gas analyzer. With this method, < 3-fold differences were observed among different rice genotypes.

Some low-CH₄ emission varieties had lower cellulase activity, implying that the lower hydrolytic activity in the rhizosphere was one of the mechanisms behind the low-CH₄ emission.

Inoculation of a Betaproteobacteria, Azoarcus sp. KH32C onto rice seed reduced CH₄ emissions from a paddy field cultivated with the inoculated rice plant compared to non-inoculated control.

研究分野：農業環境工学

キーワード：メタン 水田 イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水田はコメを生産する人類最大の食糧基地である一方、土壌中の微生物の働きにより強力な温室効果ガスである「メタン」が多量に生成され、大気へ排出されている。水田はメタンの主要な排出源のため、その排出量削減が喫緊の課題となっている。これまで多くの研究が、中干し・AWD等の水管理などによって土壌をより好氣的にすることでメタン生成を抑制する技術の開発を進めてきた。

一方で、水田からのメタン排出量が栽培するイネの品種によって異なるという報告もみられる。しかし多品種・多系統のイネを対象とした、包括的・網羅的な調査は行われていない。メタン排出量測定に広く用いられるクロードチャンバ法は手動ガスサンプリングを伴い、1測定あたり30分程度の時間を要する。このため測定手法のハイスループット化によって多くの品種・系統を対象とした測定を可能にする必要がある。またイネがどのように水田のメタン動態に影響を与えるかはよく分かっておらず、メタン排出量に品種間差が生じるメカニズムも不明である。

水田土壌中で生成されるメタンの一部は、メタン酸化細菌によって好氣的に消費されるなど、土壌や根圏の微生物動態による影響も受けることが知られている。しかし微生物資材等を使って積極的にイネ根圏の微生物群集を改変することでメタン排出量を削減しようとした試みはほとんど見られない。

2. 研究の目的

本研究は以下3点を目的とした：

(1) イネ遺伝子型(品種・系統)によるメタン排出量の差異を効率的に調査するため、携帯型メタン計を用いた、多品種・多系統を対象としたハイスループットフラックス測定法の開発を進める。その際、メタンはイネの通気組織を介して大気へ排出される以外に、気泡の上昇(バブリング)によっても突発的に排出されることが知られているため、イネ経由とバブリングを分別定量できる手法を開発する。

(2) イネの品種がメタン排出量に差異をもたらすメカニズムの可能性の一つとして、水田土壌では前年のイネ残渣や栽培時の脱落根といった粗大有機物が低分子化して、メタンの基質の一部となるため、低メタン品種根圏ではこの低分子化活性が低い可能性が考えられた。本研究では根圏土壌のセルラーゼ活性に着目し、品種間差を調査した。

(3) これまでに土壌細菌 *Betaproteobacteria* 綱 *Azoarcus* sp. KH32C 株をイネ種子に接種して栽培すると、イネ根域土壌の微生物群集構造が変動することが示された。そこで KH32C 株を接種したイネの栽培が水田からのメタン排出および土壌中のメタン生成・消費に関わる微生物群集に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高精度・高時間分解能の携帯型メタン計を活用し、チャンバ内メタン濃度の変化を秒単位で捉えることで、迅速かつ経路別にメタン排出量を定量する手法を開発した。

クロードチャンバ法にバッテリーで駆動する携帯型メタン濃度計を接続し、チャンバ内のメタン濃度変化を秒スケールで観測した(図1)。チャンバ内濃度はタブレットやスマートフォンによってリアルタイムに確認した。イネ経由の排出は時間に対して直線的な濃度上昇として、バブリングは階段状の急上昇として観測された(図2-a)。得られた濃度データをフラックス(単位時間・面積あたりの排出量)の時系列データに変換・平滑化し(図2-b、赤線)その確率密度分布を計算することで、イネ経由のフラックスが求まった(図2-c、極大値の中で最小のフラックス。図2-bでは緑線に相当)。バブリングによる排出は、全排出量とイネ経由との差分として計算された。

(2) イネ種子(日本晴)を浸種・催芽後、KH32C株を接種したイネ種子(KH)と無接種のイネ種子(CT)を約3週間育苗し、農研機構農業環境研究部門(つくば市)内の窒素施肥(8N)区と窒素無施肥(0N)区の水田圃場にそれぞれ移植して栽培した。中干しは行わなかった。湛水期間中のメタン排出量はクロードチャンバ法により調査した。また、土壌溶液中の溶存メタン濃度、溶存有機炭素濃度、二価鉄濃度を測定した。湛水期間中の0、27、54、77、89 days after transplantation (DAT)に土壌を採取してRNAを抽出し、メタン生成古細菌が保有するメチル補酵素M還元酵素 α サブユニット遺伝子(*mcrA*)およびメタン酸化細菌が保有する膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ β サブユニット遺伝子(*pmoA*)の定量的逆転写PCRアッセイおよび*mcrA*と*pmoA*のアンプリコンシーケンス解析を行った。得られた配列は操作的分類単位(OTU)に分類し、アミノ酸配列に基づく系統解析から、優占するOTUを属レベルで同定した。収穫期にはイネを刈り取り、玄米収量を調査した。

(3) 日本晴とコシヒカリを基準品種とし、低メタン性の4品種と高メタン性の1品種の計7品種を農環研水田圃場(茨城県 つくば市)で栽培した。穂ばらみ期(少量メタン排出期)と出穂期(メタン排出最大期)に根圏土壌をコア採取し、4mmメッシュで粗大な根を除去した。セルラーゼ活性のポテンシャル測定として、パイラルびんに新鮮土壌、緩衝液(pH5.5)およびカルボキシルメチルセルロース(CMC、水溶性セルロース)を入れて30℃で24時間培養した後、遠心上清に含まれる還元糖(基)をソモギー・ネルソン法で検出した。さらにより現場環境に近いセルラーゼ活性の測定として、土壌、蒸留水、およびセルロースパウダー(不溶性セルロース)を混合し30℃で5日間培養後、遠心上清の還元糖(基)を同様に定量した。

4. 研究成果

(1) 多品種・多系統のイネを対象にメタン排出量を測定するため、携帯型メタン分析計を用いたフラックス測定法の開発・評価を進め、ガス採取・GCによる分析に依存した従来法と比較し、3倍以上のスループットをもつ改良型チャンバ法を開発した。また十分な精度で測定するために必要なチャンバ設置時間は、泡が少ない場合は4分程度であり、泡が多発する場合(2.5回/分)は15分程度であることがわかった。2カ年-3,255点の測定では、99%以上のケースで10分以内に測定を完了できた。この現場計測手法とデータ解析法を用いることによって、イネ経由とバブリングによる排出を分離定量することが可能となった。その結果、これまで考えられていたよりも、バブリングによる排出の寄与が大きいこと、低メタン品種ではバブリングによる排出が少ないことがわかった。さらにイネコアコレクション等を対象にメタン排出量を測定したところ、世界の様々なイネの間には3倍以上に上る品種間差が存在することが明らかとなった。

(2) 低メタン品種タカナリ根圏のセルラーゼ活性は、基準品種(日本晴、コシヒカリ)根圏と変わらないかむしろ高い傾向があり、“低メタン品種根圏では粗大有機物の低分子化活性が低い”という仮説は棄却された。その一方、例えば低メタン品種 Keiboba は不溶性セルロース分解活性の低い傾向があり、品種によっては本仮説の当てはまる可能性が示された。

(3) 湛水期間中のメタンフラックス、土壌溶液中の溶存メタン濃度、溶存有機炭素濃度、二価鉄濃度は、イネ栽培の経過とともに増加する傾向にあった。0N-KH区および8N-KH区は、それぞれ0N-CT区および8N-CT区よりメタンフラックスが低い傾向にあり(図a)、0N-KH区および8N-KH区の湛水期間中の総メタン排出量(落水直前の100DATの積算メタン排出量)は、0N-CT区および8N-CT区よりそれぞれ23.5%、17.2%減少した($p < 0.05$, 混合線形モデル; 図b)。

土壌cDNA中の*mcrA*のコピー数はイネの生育段階により変動し、77DATで最も多く、次いで89DATで多かった。一方で、*pmoA*のコピー数は顕著な変動がなかった。アンプリコンシーケンス解析で得られた主要なOTUのうち、*mcrA*のOTU01m(*Methanoregula* 属古細菌)、OTU02m(*Methanothrix* 属古細菌)および*pmoA*のOTU004p、OTU005p(TypeIメタン酸化*Methylococcaceae*科細菌)の相対存在量はメタンフラックスと正の相関を示し、CT区よりKH区で減少する傾向にあったことから、KH区における低メタン生成・高メタン消費の微生物群集への変動が推察された。

玄米収量は0N区より8N区で増加したが、それぞれのCT区とKH区で有意な差はなかった。

以上の結果から、KH32C株を接種したイネの栽培は水田由来メタン排出の低減に有用であることが示され、土壌中のメタン生成・消費微生物群集の変動がメタン排出低減効果に寄与したと推察された。



図1 携帯型メタン計を用いた水田からのメタン排出量の観測方法

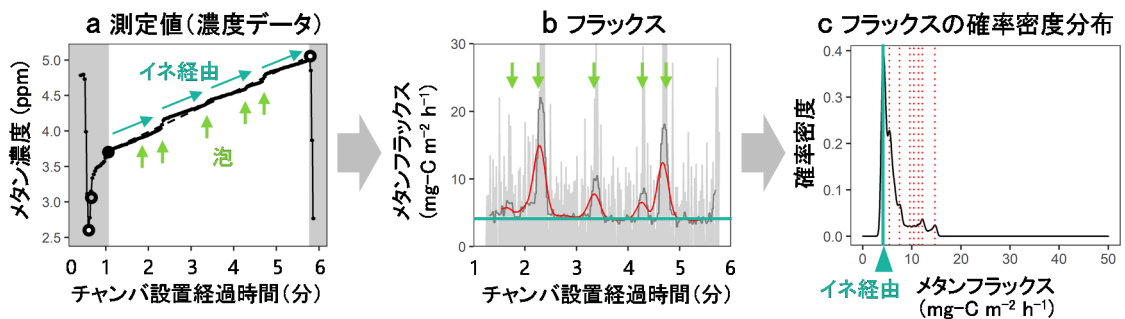


図2 経路別メタン排出量(フラックス)の解析方法

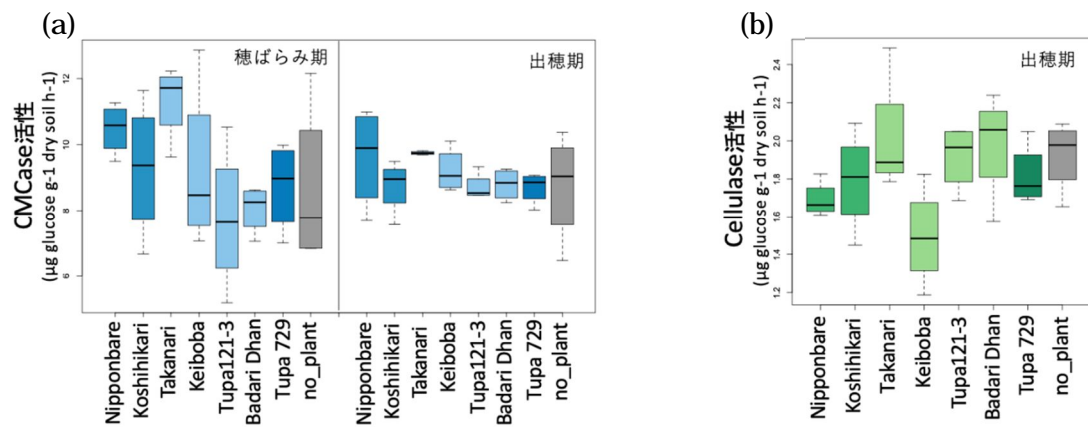


図3 根圏土壌の水溶性セルロース分解活性(a)および不溶性セルロース分解活性(b)の品種間差

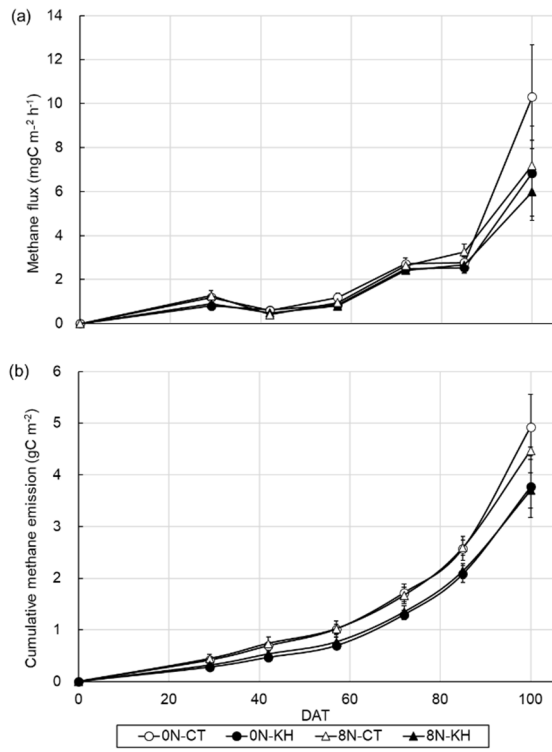


図4 湛水期間中のメタンフラックス (a) および積算メタン排出量 (b). DAT, days after transplantation.

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 4件）

1. 著者名 TOKIDA Takeshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Increasing measurement throughput of methane emission from rice paddies with a modified closed-chamber method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural Meteorology	6. 最初と最後の頁 160 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2480/agrmet.D-20-00029	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 Sakoda Midori, Tokida Takeshi, Sakai Yoriko, Senoo Keishi, Nishizawa Tomoyasu	4. 巻 37
2. 論文標題 Mitigation of Paddy Field Soil Methane Emissions by Betaproteobacterium & Azoarcus Inoculation of Rice Seeds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME22052	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 KAJIURA Masako, TOKIDA Takeshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Appropriate chamber deployment time for separate quantification of CH4 emissions via plant and ebullition from rice paddies using a modified closed-chamber method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural Meteorology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2480/agrmet.D-21-00033	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 KAJIURA Masako, TOKIDA Takeshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Quantifying bubbling emission (ebullition) of methane from a rice paddy using high-time-resolution concentration data obtained during a closed-chamber measurement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural Meteorology	6. 最初と最後の頁 245 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2480/agrmet.D-21-00022	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 常田岳志	4. 巻 1693
2. 論文標題 水田から排出される温室効果ガス - メタンを削減するための育種的、栽培的アプローチ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 農業	6. 最初と最後の頁 37-43
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 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24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 酒井順子、大久保卓、常田岳志、荒井見和、林健太郎、中村浩史、酒井英光、長谷川利拡
2. 発表標題 メタン排出量の異なるイネ品種根圏のメタン生成菌とメタン酸化菌の分子生物学的解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 迫田翠、常田岳志、酒井順子、妹尾啓史、西澤智康
2. 発表標題 微生物を接種した水稻栽培によるメタン排出低減と玄米の外観品質の向上
3. 学会等名 2020年度 日本土壤肥料学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 迫田翠、常田岳志、酒井順子、妹尾啓史、西澤智康
2. 発表標題 イネ種子への微生物接種によりメタン排出が低減した水田土壌の微生物性解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masako Kajiura, Takeshi Tokida
2. 発表標題 Quantifying bubbling emission of methane from a rice paddy using high time-resolution concentration data during a closed chamber measurement
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural Meteorology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masako Kajiura, Takeshi Tokida
2. 発表標題 A new chamber deployment strategy with a high time-resolution measurement: toward a separate quantification of CH ₄ emissions via plant and ebullition from rice paddies
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural Meteorology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 彪流、西脇 淳子、常田 岳志
2. 発表標題 水田土壤中の溶存CH ₄ とFe(II) 濃度 - 水稲による影響とCH ₄ 排出との関係 -
3. 学会等名 第71回農業農村工学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常田岳志
2. 発表標題 携帯型メタン計を用いた水田からのメタンフラックス測定の迅速化
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Tokida
2. 発表標題 Increasing measurement throughput of methane emission from rice paddies with a mobile gas analyzer
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural Meteorology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常田 岳志、須田 碧海、森地 翠
2. 発表標題 メタン排出量の水稲品種間差と水田土壌溶液中のガス・鉄イオン濃度との関係
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 常田 岳志
2. 発表標題 水田からのメタン排出とその気候変動影響
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2019年大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 迫田翠、佐々木拓朗、増富祐司、坂上伸生、妹尾啓史、西澤智康
2. 発表標題 イネ (日本晴) 初期生育を促進するAzoarcus属細菌の接種効果: イネの質的向上と根域土壌微生物群集への影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 迫田 翠, 西脇淳子, 常田岳志, 妹尾啓史, 西澤智康
2. 発表標題 イネ種子への微生物接種は水田からのメタン排出に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakoda, M., T. Tokida, Y. Sakai, K. Senoo, T. Nishizawa
2. 発表標題 Inoculation of Azoarcus sp. strain KH32C onto rice seeds mitigates methane emission from a paddy field
3. 学会等名 World Microbe Forum (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakoda, M., T. Tokida, Y. Sakai, K. Senoo, T. Nishizawa
2. 発表標題 The molecular genetic analysis on methanogens and methanotrophs of methane-mitigating paddy soil: The effect of bacterium inoculation onto rice seeds
3. 学会等名 The 12th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xuping Ma, Takeshi Tokida, Daichi Fukushima
2. 発表標題 An improved pin-board method in combination with a machine-learning image analysis for evaluating root system architecture of rice plant grown in field condition
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野圭介、常田岳志
2. 発表標題 群落内濃度に基づく水稻メタン発生強度の推定
3. 学会等名 日本農業気象学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井順子、迫田翠、西澤智康、常田岳志
2. 発表標題 メタン排出量の異なるイネ品種の根圏土壌セルラーゼ活性の比較
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶浦雅子、常田岳志
2. 発表標題 水田からの経路別メタンフラックスの推定に向けた新チャンバ設置法
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常田岳志、梶浦雅子、齊藤彪流
2. 発表標題 排出経路の違いから見たメタンフラックスの水稻品種間差
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤彪流、梶浦雅子、西脇淳子、常田岳志
2. 発表標題 水田からの経路別メタンフラックスと土壌溶液中メタン濃度・二価鉄濃度との関係、及びその水稲品種間差
3. 学会等名 農業農村工学会2021年度全国大会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常田岳志
2. 発表標題 温暖化防止のためのイノベーション：メタン低放出性イネとムーンショット型研究開発事業におけるdS01Lプロジェクト
3. 学会等名 つくば会議2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masako Kajiuura, Takeshi Tokida
2. 発表標題 Diurnal variation in CH ₄ emissions from a rice paddy due to ebullition sensitive to temperature
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural Meteorology 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Tokida, Masako Kajiuura, Takeru Saito, Junko Nishiwaki
2. 発表標題 Varietal differences in methane emissions through rice plants and via ebullition
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural Meteorology 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井順子、大久保卓、常田岳志、荒井見和、林健太郎、中村浩史、酒井英光、長谷川利拓
2. 発表標題 メタン排出量の異なるイネ品種の根および根圏土壌のメタン酸化遺伝子群の構成比較
3. 学会等名 日本微生物生態学会2021年度新潟大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 常田岳志、柳井洋介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 -
3. 書名 土壌物理学 (西村拓 編) -第4章 温室効果ガス	

〔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	西澤 智康 (Nishizawa Tomoyasu) (40722111)	茨城大学・農学部・准教授 (12101)	
研究分担者	酒井 順子 (Sakai Yoriko) (10354052)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・上級研究員 (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
---------	---------