

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K15423
研究課題名(和文)鉄還元窒素固定菌から見た水田土壌の炭素・窒素動態：稲が土を肥やし土が稲を育てる

研究課題名(英文)Carbon and nitrogen dynamics in paddy soils from the perspective of iron-reducing nitrogen-fixing bacteria

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)・助教

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)： ^{13}C 標識した稲わらを添加した水田土壌を用いて稲わら由来の炭素を利用する細菌をSIP法により特定した。また、GCMSを用いて稲わら由来の有機酸および糖類を同定および定量した。その結果、鉄還元菌は培養初期から稲わら由来の ^{13}C を取り込むこと、稲わら由来の低分子炭素化合物は微生物に取り込まれ土壌にほとんど残存しないことが示唆された。 $^{15}\text{N}_2$ を封入した水田土壌マイクロコズムを作製し、鉄還元窒素固定菌が実際に ^{15}N を取り込むことを実証した。また、IRMSを用いて土壌中に固定された窒素量の算出も行った。このように、鉄還元菌がイネ由来の炭素を利用すること、土壌の窒素肥沃度を高めることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
代表者が発見した「鉄還元菌窒素固定」は、窒素固定の従来の常識を覆す新知見であった。本研究は水田土壌の自律的な窒素肥沃度維持の微生物メカニズムとして、稲が鉄還元菌窒素固定を駆動して土壌の窒素肥沃度(地力)を高め、それを利用して稲が生育するとの新概念、「稲が土を肥やし土が稲を育てる」を提唱し検証したものであり、実際に水田土壌で起きている事象の完全解明という学術的な意義だけでなく、将来的に低窒素施肥農業技術を支える基盤となる社会的意義も持つ。

研究成果の概要(英文)：Bacteria utilising rice straw-derived carbon were identified by SIP using paddy soil microcosms supplemented with ^{13}C -labelled rice straw. As a result, iron-reducing bacteria incorporated ^{13}C derived from rice straw from the early stages of culture. Rice straw-derived organic acids and sugars were also identified and quantified using GCMS. The results indicated that rice straw-derived carbon compounds were quickly consumed and little remained in the soil. Paddy soil microcosms containing $^{15}\text{N}_2$ in the gas phase were prepared to verify that the iron-reducing diazotrophs actually fix nitrogen. The amount of nitrogen fixed in the soil was also calculated using IRMS. This study revealed that iron-reducing diazotrophs utilise rice straw-derived carbon and increase the nitrogen fertility of paddy soils.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：水田土壌 鉄還元窒素固定菌 稲わら 安定同位体 SIP

1. 研究開始当初の背景

「麦は肥料で、稲は地力でとる」と古くから言われてきた。実際、施肥に大きく依存する畑作物とは対照的に、水田では土壤の窒素肥沃度が水稻の生育を支えており、窒素施肥量を減らしても比較的高い収量が得られる。すなわち、水田土壤には自律的に窒素肥沃度を維持する高い能力が存在するのである。しかし、これまでそのメカニズムは不明であった。人為的な施肥以外の農地への窒素供給経路として、土壤微生物による窒素固定がある。応募者らは水田土壤の窒素肥沃度維持メカニズムを解明するため、メタトランスクリプトーム解析を行い、水田土壤における窒素固定微生物を調べた。その結果、水田土壤で発現する窒素固定遺伝子の70%以上が、水田土壤の優占種でありながらこれまで窒素固定への関与が見落とされてきた「鉄還元菌」(Anaeromyxobacter, Geobacter 属細菌)に由来することを突き止めた(図 1A, Masuda et al., 2017)。さらに、これまで水

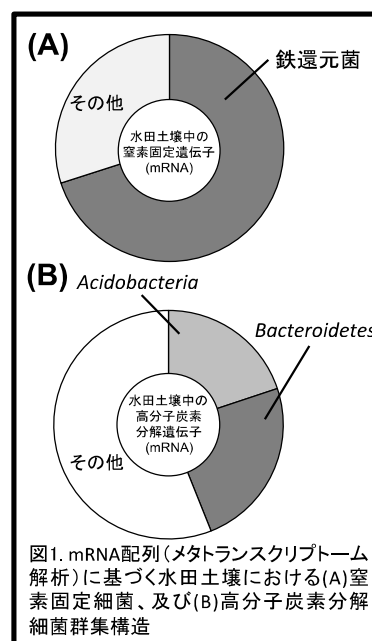


図1. mRNA配列(メタトランスクリプトーム解析)に基づく水田土壤における(A)窒素固定細菌、及び(B)高分子炭素分解細菌群集構造

田土壤からの単離例がなかった鉄還元菌を単離培養し(Xu et al., 2019)、それらが鉄還元(鉄呼吸)を行うと同時に窒素を固定することを実証した(Masuda et al., 2020)。我々の研究により、豊富に存在する鉄還元菌こそが水田土壤における窒素固定を担う主要な微生物であることが判明したのである。水田土壤中の鉄は湛水と落水に連動して還元 - 酸化を永続的に繰り返す。鉄還元菌が鉄を還元し窒素固定を行うことは、水田土壤の窒素肥沃度が維持されるメカニズムとして極めて理に適っており、鉄還元菌窒素固定こそが水田土壤の窒素肥沃度維持の根幹であると考えられる。

一方、鉄還元窒素固定菌が生育し窒素固定を行うためには炭素源・エネルギー源となる炭素化合物が必須である。水田土壤において鉄還元窒素固定菌はどのような炭素化合物を利用しており、その炭素化合物の供給源や経路はどのようなものだろうか？また、水田土壤において炭素化合物を利用して行われる鉄還元菌窒素固定の量はどの位だろうか？この問いの答えを明らか

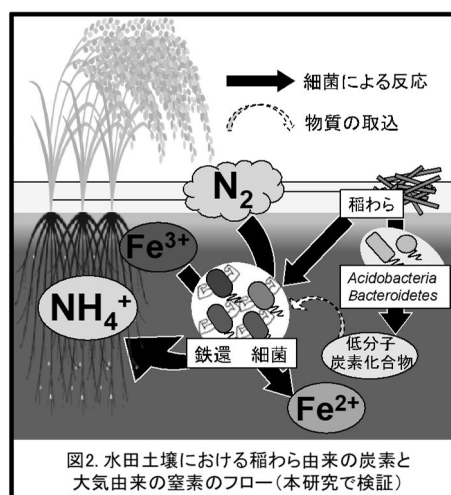


図2. 水田土壤における稲わら由来の炭素と大気由来の窒素のフロー(本研究で検証)

かにすることは鉄還元菌窒素固定の学術的基盤として重要であるだけでなく、水稻生産性向上のための基礎知見としても重要である。

これまでに応募者は、水田土壤マイクロコズム試験において、土壤への稲わら添加により窒素固定活性が高まり、この時鉄還元窒素固定菌の窒素固定遺伝子転写量が上昇することを明らかにした。また、分離菌株の培養実験から、鉄還元窒素固定菌は酢酸等の低分子炭素化合物を利用して窒素固定を行うこと、不溶性セルロース等の高分子炭素化合物も利用できることを明らかにした(未発表)。さらに、水田土壤メタトランスクリプトーム解析から、稲わら由来の高分子炭素化合物であるセルロースやキシランの分解(低分子化)を、主に Acidobacteria および Bacteroidetes 門細菌が担っている可能性を見出した(図 1B, 未発表)。以上のことから、次の仮説が考えられた(図 2)。

稲わら由来の高分子炭素化合物は主に *Acidobacteria* および *Bacteroidetes* 門細菌により低分子炭素化合物へと分解される。

鉄還元窒素固定菌は、稲わら由来のセルロースだけでなく、で生成した稲わら由来の低分子炭素化合物も資化し窒素固定を行う。

こうして稲わら由来の炭素化合物が鉄還元菌窒素固定を駆動して土壌の窒素肥沃度を維持向上させ、その窒素肥沃度に支えられて水稻が生育すると考えられる。すなわち、「稲が土を肥やし土が稲を育てる」である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前述した仮説を実証することであった。すなわち、稲わら由来の高分子炭素化合物を低分子化する微生物群ならびに生成する低分子化合物の解明、稲わら由来の炭素化合物を鉄還元菌窒素固定菌が同化することの証明、それらを利用して鉄還元菌窒素固定菌が固定する窒素量の解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、以下の項目を実施し、(1)水田土壌における水稻由来の炭素が鉄還元菌窒素固定菌に達するまでのフロー、および(2)鉄還元菌窒素固定菌による窒素固定の量を明らかにした。また、(2)窒素固定に関与する細菌群ならびに固定された窒素量の可視化・定量化を行った。

(1)水田土壌において鉄還元菌窒素固定を駆動する水稻由来炭素化合物の動態 (図3)

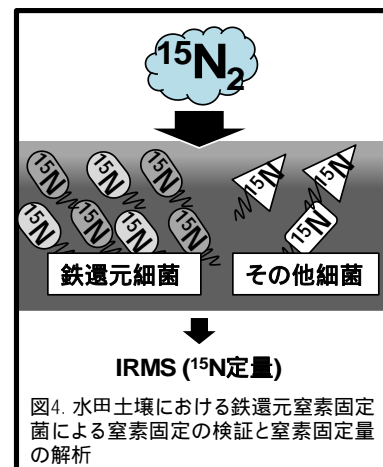
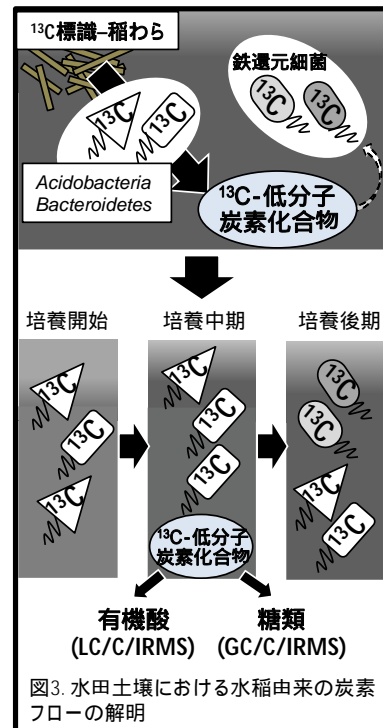
水稻は、光合成によって固定した炭素を、残渣(主に稲わら)を介して土壌中に供給すると考えられる。では、 ^{13}C 同位体標識した稲わらを水田土壌マイクロコズムに添加し、稲わらを分解して ^{13}C を取り込んだ細菌群の変遷を解明して鉄還元菌窒素固定菌に取り込まれることを証明した。では、分解されて生じた低分子炭素化合物の形態の特定を行った。

稲わら分解微生物の解明

新潟水田土壌に ^{13}C で標識した稲わらを添加したマイクロコズムを作製し、培養した。培養した土壌は数日ごとに採取し、DNA/RNA を抽出した。抽出し精製した DNA/RNA は、密度勾配遠心分離に供した。得られた ^{13}C -DNA/RNA 画分内に含まれる 16S rRNA 配列を定量した。ピークシフトが見られた密度の画分についてアンプリコン解析を行い、どの細菌群が ^{13}C を取り込んだか特定した。また、RNA をメタトランスクリプトーム解析に供し、機能遺伝子配列から高分子炭素化合物の分解を担う微生物群を明らかにした。

稲わら分解で生成する炭素化合物の特定

において作製した土壌マイクロコズムにおいて、稲わら分解によって生成する炭素化合物の種類と量を時系列で明らかにした。マイクロコズムから採取した土壌から有機酸および糖類を抽出した。抽出した有機酸および糖類は、GCMS に供し、土壌中に存在する ^{13}C 標識された有機酸



および糖類の種類の間定と定量を行った。

(2)鉄還元窒素固定菌による窒素固定量の解明(図4)

$^{15}\text{N}_2$ を気相に封入した水田土壌マイクロコズムを作製し、鉄還元窒素固定菌が実際に ^{15}N 窒素を取り込んでいることを ^{15}N -DNA-SIPにより確認した。また、土壌中に取り込まれた ^{15}N をIRMS分析により定量し窒素固定量を算出した。

4. 研究成果

(1) 水田土壌において鉄還元菌窒素固定を駆動する水稻由来炭素化合物の動態

稲わら分解により生成する炭素化合物の特定安定同位体標識した稲わらを添加した水田土壌マイクロコズムを作製し、湛水および落水を行い60日間培養した。培養した土壌を採取し、土壌を凍結保存した。保存した土壌からDNAおよびRNAを抽出し、密度勾配遠心を行った(^{13}C -DNA/RNA-SIP)。それぞれの画分における16S rRNA遺伝子量を測定したところ、日数の経過とともに密度の高い画分におけるDNA/RNAの存在量が増加していることが示された。重い画分および軽い画分に含まれる微生物種をアンプリコンシーケンシングにより同定した。また、保存していた土壌から有機酸および糖類を抽出して同定および定量を行い、培養期間中のそれらの遷移を解析した。その結果、鉄還元菌の中でも特に*Geobacteraceae*科細菌に培養初期から高分子炭素化合物由来の ^{13}C が取り込まれていることがわかった。さらに、糖類および有機酸はほとんど検出されず、高分子化合物は微生物により低分子化されすぐに取り込まれるか直接利用されていることが示唆された。

SIP解析では特に*Geobacteraceae*科細菌に培養初期から稲わら由来の ^{13}C が取り込まれていたため、実際に稲わら由来の高分子炭素化合物を鉄還元菌が利用できるのか調べた。その結果、稲わらの構成成分であるキシランを*Geobacteraceae*科細菌は利用できること、*Anaeromyxobacter*属細菌は利用できないことが示された。

(2)鉄還元窒素固定菌による窒素固定量の解明(図4)

新潟県農業総合研究所内の水田圃場において農業用鉄資材を散布した区画および無処理区画からそれぞれ土壌を採取した。それぞれの土壌について $^{15}\text{N}_2$ を気相に封入した水田土壌マイクロコズムを作製し、鉄還元窒素固定菌が実際に ^{15}N を取り込んでいること、取り込まれる窒素量が鉄資材散布区において増加することを確認した。

培養48, 72時間双方のサンプルにおいて鉄還元菌由来の窒素固定遺伝子は ^{14}N で培養を行った時と比較して ^{15}N で培養を行った時に密度が高い画分にピークがシフトすることを確認した。最も16S rRNA遺伝子の相対存在量が多かったピーク画分について16S rRNAアンプリコン解析を行ったところ、鉄還元菌の相対存在量は特に重い画分(^{15}N が取り込まれている画分)において高いことが示された。さらに、鉄添加により窒素固定活性が高まる新たな細菌を見出し、分離、性状解析およびゲノム解析を行った。また、IRMSを用いて土壌中に固定された窒素量を測定し、無処理区においても窒素は固定されていること、鉄資材添加区において無処理区よりも固定窒素量が増加することを示した。本結果は論文として出版した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Itoh Hideomi, Xu Zhenxing, Mise Kazumori, Masuda Yoko, Ushijima Natsumi, Hayakawa Chie, Shiratori Yutaka, Senoo Keishi	4. 巻 72
2. 論文標題 Anaeromyxobacter oryzae sp. nov., Anaeromyxobacter diazotrophicus sp. nov. and Anaeromyxobacter paludicola sp. nov., isolated from paddy soils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005546	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 Shen Weishou, Long Yaou, Qiu Zijian, Gao Nan, Masuda Yoko, Itoh Hideomi, Ohba Hiroto, Shiratori Yutaka, Rajasekar Adharsh, Senoo Keishi	4. 巻 19
2. 論文標題 Investigation of Rice Yields and Critical N Losses from Paddy Soil under Different N Fertilization Rates with Iron Application	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 8707 ~ 8707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph19148707	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 Zhang Zhengcheng, Xu Zhenxing, Masuda Yoko, Wang Xueding, Ushijima Natsumi, Shiratori Yutaka, Senoo Keishi, Itoh Hideomi	4. 巻 44
2. 論文標題 Geomesophilobacter sediminis gen. nov., sp. nov., Geomonas propionica sp. nov. and Geomonas anaerohicana sp. nov., three novel members in the family Geobacteraceae isolated from river sediment and paddy soil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Systematic and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 126233 ~ 126233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.syapm.2021.126233	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 Xu Zhenxing, Masuda Yoko, Wang Xueding, Ushijima Natsumi, Shiratori Yutaka, Senoo Keishi, Itoh Hideomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Genome-Based Taxonomic Rearrangement of the Order Geobacterales Including the Description of Geomonas azotofigans sp. nov. and Geomonas diazotrophica sp. nov.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.737531	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 妹尾啓史、増田曜子、伊藤英臣、白鳥豊、大峽広智、Xu Zhenxing、山中遥加、石田敬典、高野諒、佐藤咲良、Shen Weishou	4. 巻 75
2. 論文標題 水田土壌における鉄還元菌窒素固定の学術的基盤解明と 低窒素農業への応用：低炭素社会の実現を目指して	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 土と微生物	6. 最初と最後の頁 60～65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18946/jssm.75.2_60	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 Mise Kazumori, Masuda Yoko, Senoo Keishi, Itoh Hideomi	4. 巻 6
2. 論文標題 Undervalued Pseudo- <i>nifH</i> Sequences in Public Databases Distort Metagenomic Insights into Biological Nitrogen Fixers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/msphere.00785-21	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 Masuda Yoko, Shiratori Yutaka, Ohba Hiroto, Ishida Takanori, Takano Ryo, Satoh Sakura, Shen Weishou, Gao Nan, Itoh Hideomi, Senoo Keishi	4. 巻 1
2. 論文標題 Enhancement of the nitrogen-fixing activity of paddy soils owing to iron application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 1～5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2021.1888629	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 Zhang Zhengcheng, Masuda Yoko, Xu Zhenxing, Shiratori Yutaka, Ohba Hiroto, Senoo Keishi	4. 巻 13
2. 論文標題 Active Nitrogen Fixation by Iron-Reducing Bacteria in Rice Paddy Soil and Its Further Enhancement by Iron Application	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 8156～8156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app13148156	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 Masuda Yoko, Satoh Sakura, Miyamoto Ryota, Takano Ryo, Ishii Katsuhiro, Ohba Hiroto, Shiratori Yutaka, Senoo Keishi	4. 巻 205
2. 論文標題 Biological nitrogen fixation in the long-term nitrogen-fertilized and unfertilized paddy fields, with special reference to diazotrophic iron-reducing bacteria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-023-03631-8	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 鉄で土を肥やす! 鉄還元に伴う窒素固定の発見
3. 学会等名 新潟県土壌肥料懇話会 第2回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 鉄で土を肥やし環境を守る: 水田の持続的水稲生産を支える鉄還元菌窒素固定の発見と応用
3. 学会等名 農学と工学の超越創発 イノベーションフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原拓己、増田曜子、妹尾啓史
2. 発表標題 水田土壌において鉄還元窒素固定菌への炭素源供給を担う微生物群集の解明
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 稲が土を肥やし土が稲を育てる - 鉄還元菌と水田土壌の炭素・窒素循環 -
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千原 光貴, 増田 曜子, Xu Zhenxing, 妹尾 啓史
2. 発表標題 鉄還元窒素固定菌による水稻由来炭素化合物の利用
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原拓己、増田曜子、妹尾啓史
2. 発表標題 水田土壌において鉄還元窒素固定菌への炭素源供給を担う微生物群集の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠原拓己、増田曜子、妹尾啓史
2. 発表標題 水田土壌において鉄還元窒素固定菌への炭素源供給を担う微生物群の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 許 振興、増田曜子、伊藤英臣、服部祥平、豊田 栄、妹尾啓史
2. 発表標題 DNRA-derived N ₂ O production and its isotopomer signatures in Geomonas and Oryzomonas, iron reducing bacteria isolated from paddy soils
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 木(=bacteria)を見て森(=microbiome)も見るために。
3. 学会等名 Plant Microbiota Research Network (PMPR) 第1回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 鉄で土を肥やし環境を守る：水田の持続的水稻生産を支える鉄還元菌窒素固定の発見と応用
3. 学会等名 農学と工学の超越創発イノベーションフォーラム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 鉄で土を肥やす！鉄還元に伴う窒素固定の発見
3. 学会等名 新潟県土壌肥料懇話会 令和3年度第2回研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田曜子
2. 発表標題 窒素長期無施用水田土壌における窒素肥沃度維持の微生物メカニズム
3. 学会等名 2021年度 日本土壌肥料学会 関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zhang Zhengcheng, Yoko Masuda, Keishi Senoo
2. 発表標題 Identification of activated diazotrophs by iron application in paddy soil using $^{15}\text{N}_2$ -DNA Stable-Isotope Probing coupled with amplicon sequencing
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田曜子、石田敬典、山中遥加、Xu Zhenxing、伊藤英臣、白鳥豊、大峽広智、妹尾啓史
2. 発表標題 水田土壌における鉄還元菌窒素固定の発見・検証と鉄・稲わら添加による増強
3. 学会等名 土壌肥料学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田曜子、石田敬典、伊藤英臣、早川智恵、白鳥豊、妹尾啓史
2. 発表標題 水田土壌の鉄還元菌窒素固定の増強 - 稲わらと鉄添加の効果
3. 学会等名 土壌微生物学会
4. 発表年 2020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
---------	---------