

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20570

研究課題名（和文）メタン排出削減とイネ生育促進を目指した微生物コンソーシアムの機能解明

研究課題名（英文）Analysis of the microbial consortia of methane-oxidizing bacteria in rice with the aim of reducing methane emissions and promoting rice growth

研究代表者

新庄 莉奈 (Shinjo, Rina)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：10908841

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、メタン酸化細菌と共存する従属栄養細菌に着目し、これらの細菌がメタン酸化やイネ生育に与える影響を明らかにすることを目指す。

イネからメタン酸化細菌と共存する従属栄養細菌を分離し、メタン酸化細菌と*in vitro*で共培養したところ、5株の分離株でメタン酸化を促進する効果が認められた。一方、メタン酸化細菌と従属栄養細菌分離株（*Ancylobacter*属）をイネに共接種したところ、イネの生育を促進する傾向は認められたが、根におけるメタン酸化活性やメタン酸化細菌数には影響を与えなかった。イネに対する効果の検証については、異なる菌株の組み合わせを含め、さらなる検証が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水田からのメタン排出の削減に向けてメタン酸化細菌の活用が期待される一方で、その単離は数例に留まっており、農業現場での応用利用は進んでいない。その要因のひとつとしてメタン酸化細菌の純粋培養の難しさがある。メタン酸化細菌と従属細菌の分離は非常に困難であり、その純化には集積培養や限界希釈法を繰り返し数ヶ月かかることもある。本研究はそのメタン酸化細菌と従属細菌の強固な結びつきを逆手にとり、菌間相互作用の解明、さらにはイネにおけるメタン生成量の削減と生育促進の実現を目指すものである。本研究で得られる成果はメタン酸化細菌の農業分野での安定した実用化に繋がり、農業生産の持続的な発展につながるものとする。

研究成果の概要（英文）：Aerobic methane-oxidizing bacteria (MOB) are important in mitigating methane emissions from paddy fields. This study aims to clarify the microbial structure of heterotrophic bacteria that coexist with MOB in rice-derived enrichment cultures and to investigate the effects of these heterotrophic bacteria on methane oxidation. Twelve strains of heterotrophic bacteria, classified into seven genera (*Acidovorax*, *Ancylobacter*, *Caulobacter*, *Methylobacillus*, *Phenylobacterium*, *Roseomonas*, *Segnochromobacterium*), were isolated from enrichment culture. *In vitro* cocultures with the heterotrophs *Acidovorax* sp., *Ancylobacter* sp., *Caulobacter* sp., *Roseomonas* sp., and *Segnochromobacterium* sp., showed that the methane oxidation of *Methylomonas* sp. was significantly promoted. However, co-inoculation of MOB (*Methylomonas* sp.) and *Ancylobacter* sp. to rice tended to promote rice growth but did not affect methane oxidation activity. Further analysis is needed to verify the effect of co-inoculation on rice.

研究分野：農学

キーワード：メタン酸化細菌 イネ コンソーシアム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水田は世界の主要作物であるイネの主要な生産現場である一方、強力な温室効果ガスであるメタン ( $\text{CH}_4$ ) の主要な発生源の一つである。メタン酸化細菌 (Methane-oxidizing bacteria, MOB) はメタンを唯一のエネルギー源・炭素源として生育する好気性微生物であり、水田からのメタン発生低減への活用が期待される。MOBは系統的に *Gammaproteobacteria* (Type I)、*Alphaproteobacteria* (Type II)、*Verrucomicrobia* (Type III) に大別され、水田には主に Type I と Type II が生息することが知られる。一方、農業現場において MOB の利用には未だ至っておらず、土着菌との競合の観点から圃場における MOB 単独の接種効果は不安定であることが予想される。

本研究では、持続可能なイネ栽培のため、MOB やそれと協同的にはたらく従属栄養微生物の機能に着目した。環境中の微生物は、他の微生物と相互作用しながら生活しており、特定の微生物との共同体 (コンソーシアム) の形成は環境中における微生物の生存戦略の一つである。これまでに、MOB を *Rhizobium* 属などの従属栄養細菌と混合培養するとメタン酸化が促進された例が報告されている (Iguchi *et al.*, 2011)。また、MOB と栄養共生関係にある *Methylobacterium* sp. などのメタノール酸化細菌の中には窒素固定能や植物ホルモン生合成能を有する種が存在し (Lidstrom and Chistoserdova, 2002)、植物生育を向上させるポテンシャルを持つと予想される。これらの先行研究から、MOB と共存するメタノール資化性細菌などの従属栄養微生物は、環境中においてメタン酸化の向上や植物の生育促進に関与している可能性が考えられるが、イネ根圏からメタン酸化に関わる微生物群をコンソーシアムとして分離した例はなく、また、メタン酸化やイネの生育に対するコンソーシアムの効果は未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、イネの根圏で MOB と協調的にはたらくメタノール資化性細菌などの従属栄養微生物に着目し、その機能について群集構造解析や分離培養を通じて明らかにするとともに、MOB と共同体 (コンソーシアム) としてイネに共接種することでメタン酸化とイネ生育に対するコンソーシアム接種効果を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) メタン酸化コンソーシアムの群集構造解析と分離

東北大学鹿島台水田圃場 (2021 年、2022 年) 及び農研機構谷和原圃場 (2022 年) で栽培したイネ (品種: 日本晴、Muha、Tupa121-3、Qiu Zhao Zong) の根と茎を採取し、硝酸無機塩 (NMS) 液体培地に添加後、メタン雰囲気下 (約 14% [v/v]) で MOB の集積培養を行った (図 1)。集積培養液から抽出した DNA を鋳型に、16S rRNA 遺伝子 (V3-V4 領域) のアンプリコン解析を行った。また、希釈した集積培養液を NB 培地、YPMG 培地、メタノール添加培地に塗抹し、コロニー分離を繰り返して従属栄養細菌を純化・分離した。分離した MOB 及び従属栄養細菌株について、集菌した菌体からゲノム DNA を抽出し、PacBio Revio (PacBio) によるロングリードシーケンシングによりゲノム配列を決定した。

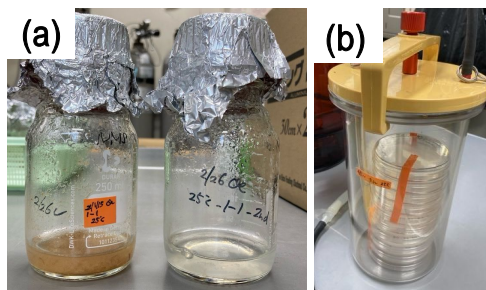


図 1. (a)メタン雰囲気下での集積培養。(b)NMS 平板培地( $\text{CH}_4$  雰囲気下)を用いたメタン酸化コンソーシアムの分離の様子。

## (2) 従属栄養細菌によるメタン酸化促進効果の検証

分離した Type I MOB (*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株)と従属栄養細菌 6 株(*Acidovorax* sp. C13-NB1 株、*Ancylobacter* sp. Y5 株、*Caulobacter* sp. Y7 株、*Phenylobacterium* Y6 株、*Roseomonas* sp. Y12 株、*Segnochroacterium* sp. B49-NB1 株)について、*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株と各従属栄養細菌株の懸濁液を混合してメタン雰囲気下(約 20% [v/v])で 9 日間培養した。経時的に水素炎イオン化検出器 (Flame Ionization Detector; FID) 付きガスクロマトグラフ (GC-14B, Shimadzu) で気相のメタン濃度を測定することによりメタン酸化活性を算出し、*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株を単独で培養した場合のメタン酸化活性との比較から、メタン酸化にもたらす従属栄養細菌の影響を検証した。

## (3) メタン酸化とイネ生育に対するコンソーシアム接種効果の検証

イネの根に由来する集積培養液から分離した Type I MOB (*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株)及び従属栄養細菌 (*Ancylobacter* sp. Y5 株)を共にイネ苗に接種し、従属栄養細菌がイネの生育やメタン酸化に及ぼす影響を調査した。*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株、及び *Ancylobacter* sp. Y5 株の菌懸濁液をそれぞれ単独または混合してイネ苗に接種後、名古屋大学東山圃場に移植した。出穂期にイネを採取し、分けつ数と地上部乾物重を測定した。さらに、採取した根の一部をバイアル瓶に入れ、メタンを気相の 20% になるように封入し、経時的に FID 付ガスクロマトグラフで気相のメタン濃度を測定することで根 1g あたりのメタン酸化活性を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) メタン酸化コンソーシアムの群集構造解析と分離

集積培養液の菌叢解析の結果、MOB の占める割合は 18–45% であり、メタンが唯一の炭素源であるにもかかわらず、従属栄養細菌が高い割合を占めることが明らかとなった。また、群間比較解析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) により、*Methylocystis* 属や *Methylosinus* 属 (Type II MOB) が優占する培養液では *Xanthomonadaceae* 科や *Chitinophagaceae* 科が (図 2 a)

*Methylomonas* 属 (Type I MOB) が優占する集積培養液では *Flavobacteriaceae* 科や *Caulobacteraceae* 科が多く存在することが明らかとなり (図 2 b)、優占する MOB の種類によって共存する従属栄養細菌の菌叢も異なることが示唆された。

次に、集積培養液から MOB と共存する従属栄養細菌を分離したところ、7 属 (*Acidovorax* 属、*Ancylobacter* 属、*Caulobacter* 属、*Methylobacillus* 属、*Phenylobacterium* 属、*Roseomonas* 属、*Segnochroacterium* 属)に分類される 12 株の従属栄養細菌を得た。分離した従属栄養細菌の多くでメタノール利用性が認められたほか、コバラミンなど

MOB が利用するビタミンの生合成に関わる遺伝子を持つことがゲノム解析から明らかとなった。

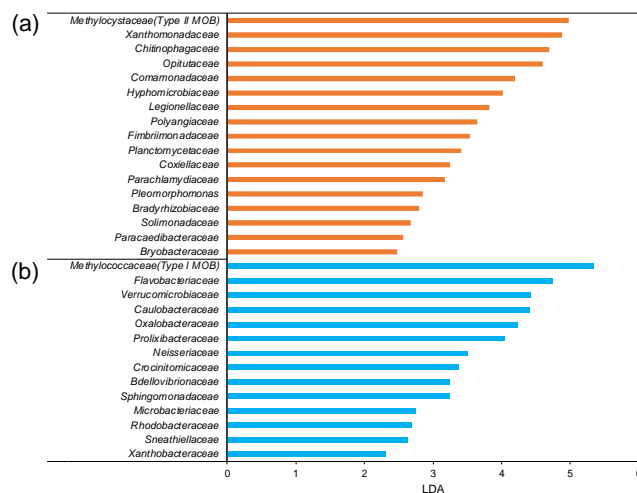


図 2. 東北大学圃場から採取したイネ (品種: Qiu Zhao Zong) の根に由来する集積培養液の LEfSe (群間比較) 解析結果. (a) Type II MOB, (b) Type I MOB が優占する集積培養液における解析結果.

## (2) 従属栄養細菌によるメタン酸化促進効果の検証

分離した従属栄養細菌株のうち、系統的に異なる6株(*Acidovorax* sp. C13-NB1 株、*Ancylobacter* sp. Y5 株、*Caulobacter* sp. Y7 株、*Phenylobacterium* Y6 株、*Roseomonas* sp. Y12 株、*Segnochromobacterium* sp. B49-NB1 株)について、Type I MOB (*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株) と共培養試験を行った。その結果、*Acidovorax* sp. C13-NB1 株、*Ancylobacter* sp. Y5 株、*Caulobacter* sp. Y7 株、*Roseomonas* sp. Y12 株、*Segnochromobacterium* sp. B49-NB1 株と共培養した場合に *Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株のメタン酸化が促進されることが明らかとなり、その促進の程度は *Segnochromobacterium* sp. B49-NB1 株で最大であった。また、B49-NB1 株のゲノム解析の結果、既知の *Segnochromobacterium* 属菌とのゲノム相同性 (Average nucleotide identity, ANI) が最も高いもので 91.5 であったことから、この菌株は *Segnochromobacterium* 属の新種である可能性が示された。以上から、集積培養液に優占する MOB の分類グループによって共存する従属栄養細菌群集が異なること、また、その一部の菌株はメタン酸化を促進する作用を持つことが示された。これらの従属栄養細菌株がメタン酸化を促進するメカニズムについては、メタン酸化促進物質の供与やメタン酸化抑制物質の除去が考えられ、今後、網羅的発現解析やメタボロームなどによるさらなる検証が必要である。

## (3) メタン酸化とイネ生育に対するコンソーシアム接種効果の検証

イネの根に由来する集積培養液から分離した Type I MOB (*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株) 及び従属栄養細菌 (*Ancylobacter* sp. Y5 株) を共にイネに接種した結果、イネの分けつ数及び地上部乾物重は *Ancylobacter* sp. Y5 株を接種した区において増加傾向にあり (図 3)、*Ancylobacter* sp. Y5 株はイネの生育を促進する効果を有する可能性が示された。一方、根 1g あたりの MOB のメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*pmoA*) コピー数とメタン酸化活性を調査したところ、処理区間に差はなく、*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株や *Ancylobacter* sp. Y5 株の接種によるメタン酸化

の促進効果は認められなかった。この原因として、接種した MOB がイネの根に定着しなかった可能性や、イネ根のメタン酸化活性の測定手法が適切でなかった可能性などが考えられる。今後は MOB の接種方法や定着性の評価について、異なる MOB と従属栄養細菌分離株の組み合わせを含め、複数のイネの生育ステージでの定着性の比較などにより詳細に検討する必要がある。また、MOB を接種したイネ根におけるメタン酸化活性の評価方法は、<sup>13</sup>C 標識メタンや発現解析などを用いた手法も含めて再検討する必要があると考えられた。

### < 引用文献 >

Iguchi H, Yurimoto H, Sakai Y. (2011). Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(24), 8509–8515.

Lidstrom ME, Chistoserdova L. (2002). Plants in the pink: cytokinin production by *Methylobacterium*. *J. Bacteriol.*, 184(7):1818.

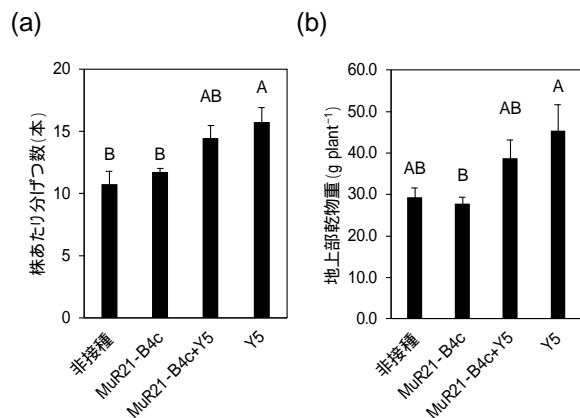


図3.メタン酸化細菌 (*Methylomonas* sp. MuR21-B4c 株) と従属栄養細菌 (*Ancylobacter* sp. Y5 株) を単独または共に接種した場合の(a) イネの分けつ数、及び(b) 地上部乾物重。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinjo Rina, Oe Fumika, Nakagawa Koki, Murase Jun, Asakawa Susumu, Watanabe Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Type-specific quantification of particulate methane monooxygenase gene of methane-oxidizing bacteria at the oxic-anoxic interface of a surface paddy soil by digital PCR	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	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） 10.1111/1758-2229.13155	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 Kondo Motohiko, Shinjo Rina, Okamoto Takanori	4. 巻 -
2. 論文標題 N-Fixation by Free-Living and Endophytic Bacteria and Their Impact on Field Crops with Emphasis on Rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainable Growth of Non-legumes	6. 最初と最後の頁 347 ~ 376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-19-4906-7_16	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新庄 莉奈, 大江 史花, Ma Xuping, 福嶋 大智, 梶浦 雅子, 常田 岳志, 橋本 駿, 三井 久幸, 佐藤 修正, 渡邊 健史, 浅川 晋
2. 発表標題 低メタン排出イネ品種における高活性メタン酸化細菌群の探索
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新庄 莉奈, 大江 史花, 中川 晃希, 村瀬 潤, 浅川 晋, 渡邊 健史
2. 発表標題 デジタルPCRによるメタン酸化細菌の定量法の開発と水田土壌表層における菌群の分別定量解析
3. 学会等名 日本土壌肥科学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022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
---------	---------