

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25252013

研究課題名(和文)水田メタゲノミクス：持続的生産を支える土壌-根圏微生物とその機能の全貌解明

研究課題名(英文)Metagenomic and metatranscriptomic analysis of rice paddy soil

研究代表者

妹尾 啓史 (Senoo, Keishi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：40206652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年新たに登場したDNA・RNA塩基配列大規模解読技術を用いて、水田土壌の物質返還反応を駆動している微生物群を網羅的に明らかにすることを試みた。まず、メタン生成・酸化を駆動する微生物群集の局と変遷を明らかにした。また、還元的窒素循環反応(脱窒、DNRA、窒素固定)を駆動する微生物としてデルタプロテオバクテリア綱に属する鉄還元菌の重要性を明らかにし、水田の窒素循環微生物に関する知見を大きく刷新した。特に、鉄還元菌が水田土壌の硝酸溶脱の低減や窒素肥沃度の維持に大きく寄与している可能性を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Waterlogged paddy soil is characterized by surface oxidized and lower reduced layers, where various kind of oxidation/reduction reactions proceed. Shotgun DNA/RNA sequencing analysis (metagenomics and metatranscriptomics) of both layers soil samples revealed whole picture of microbial communities involved in methane generation and oxidation. Our analysis also revealed that most reductive nitrogen transformation (nitrogen fixation, DNRA and denitrification) gene transcripts were derived from Deltaproteobacteria, particularly the genera Anaeromyxobacter and Geobacter, previously known as iron reducers. This finding suggests the important role of these bacteria for nitrogen fertility of paddy soil.

研究分野：農学、農芸化学、土壌学

キーワード：水田土壌 メタゲノム解析 メタトランスクリプトーム解析 メタン生成・消去 窒素固定 DNRA 脱窒

### 1. 研究開始当初の背景

水田には膨大な数の多種多様な微生物が生息して水田微生物叢(マイクロバイオーム)を形成しており、土壌の炭素・窒素代謝や逐次還元反応を駆動するとともに植物への様々な作用を行って、持続的水稻生産を支えている。水田マイクロバイオームについて、これまで分離・培養法や分子生態学的手法による解析がなされてきたが、その全体像は十分に解明されておらず、大部分がブラックボックスのまま残されていた。水田マイクロバイオームがこれまでの解析手法で解明するには複雑すぎるからである。

このブラックボックスをこじ開けることを可能にしたのが、近年開発された「メタゲノミクス」の手法である。これは、次世代シーケンシング技術を用いて環境微生物叢のゲノム情報(メタゲノム)や発現している遺伝子情報(メタトランスクリプトーム)を丸ごと解析するものである。この新しいゲノム科学の手法により、従来とは桁違いに大量の塩基配列情報が得られ、従来法をはるかに凌駕する定性的・定量的解像度で環境中の微生物群集構造や機能遺伝子群の全体像を描き出し、微生物の新たな生態系機能の発掘が可能となった。

応募者らはこれまでに水田作土層全体のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析に世界で初めて取り組み、解析の基盤を整えるとともに次の成果を得た。(1)土壌微生物群集と機能遺伝子群の詳細な構造を初めて明らかにした。(2)土壌の窒素変換や逐次還元反応に、これまでに注目されていなかったグループの細菌が関わっている可能性を見出した。(3)土壌 DNA を用いたメタゲノム解析で調べた、土壌に存在する微生物群集構造は湛水・非湛水期で差異が少なく、活性の高い微生物群や発現している機能遺伝子群の変動解析には土壌 RNA を用いたメタトランスクリプトーム解析が有効である。(4)注目すべき微生物群や微生物機能に的を絞ったさらに高精度な解析を行うには、系統分類遺伝子(16S rDNA など)や機能遺伝子を対象とした PCR 産物の次世代シーケンサーによる大量解析(メタアンプリコン解析)も有効である。この場合、メタゲノム情報から新規プライマーを設計することで従来捉えられなかった新たな情報が得られる。本申請研究は、以上の研究成果をさらに発展させるものである。

### 2. 研究の目的

水田生態系は特徴の異なる複数のサブシステム(田面水、酸化層、還元層、下層土、根圏)と水稻から構成されている。本研究ではこのうち特に微生物活性の高い酸化層、還元層、根圏を解析対象とし、微生物群集・機能遺伝子組成とその変動、各サブシステムに特有な物質代謝とそれを駆動する微生物群、各サブシステムの新規な微生物生態系機能を、メ

タゲノム・メタトランスクリプトーム・メタアンプリコン解析(以下、適宜「メタ解析」と略す)を駆使して網羅的に明らかにする。これにより水田の環境保全型持続的生産を支えている微生物システムの高度な理解と、その機能向上につながる新規知見の取得が期待され、さらなる研究展開の先導的役割を果たすことを目指す。各サブシステムの解析内容は次の通りである。

#### (1) 酸化層の物質変換とそれを駆動する微生物群のメタ解析

湛水後の水田土壌表面に形成される酸化層(田面水・還元層との両境界面を含む)は、窒素固定、硝化、脱窒、硝酸からアンモニアへの異化的還元(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonia, DNRA)、メタン酸化など活発な窒素・炭素代謝が起こっている部位である。この部位のメタ解析を実施して微生物群集構造、これら窒素・炭素代謝を活発に駆動している微生物群、その他の物質変換を網羅的に明らかにする。応募者らはこれまでの作土層メタゲノム解析から、脱窒の各反応ならびに DNRA 反応に、これまで注目されていなかった Deltaproteobacteria が大きく寄与している可能性を見出しており、重点的に追及する。

#### (2) 還元層の逐次還元反応、還元土壌の再酸化を担う微生物群のメタ解析

湛水後の作土のうち酸化層を除いた部位においては主に微生物活動に由来して脱窒、マンガ還元、鉄還元、硫酸還元、メタン生成の逐次還元反応が進行して還元層を形成する。また、水田が落水されると還元された物質の酸化反応が進行する。応募者らのこれまでの解析から各還元反応を担う未分離の微生物群の候補、メタン生成期や落水期にそれぞれ活性が上昇する新たな細菌グループや機能遺伝子群を特定した。本サブ課題では逐次還元・再酸化の各反応が活発な土壌毎にメタ解析を適用し、それぞれの還元・酸化反応を担う微生物群の全貌を明らかにする。

### 3. 研究の方法

新潟県農業総合研究所内の水田において、湛水直後から収穫後にかけての 5 つの時期(湛水直後・2 週間後・中干し前・間断灌漑期・落水期)に土壌コアを採取した。還元層が最も発達する中干し前の土壌の酸化層・還元層の位置を土色に基づいて決定し、他の時期の土壌についても同位置を分取した。土壌の還元の進行の指標となる二価鉄濃度は、湛水期の還元層において最も高く、分取が適切であったことが示された。酸化層・還元層それぞれの土壌から高純度 DNA・RNA を抽出、ライブラリ作製を行い、次世代シーケンサー(Illumina MiSeq)を用いてメタゲノム・メタトランスクリプトームデータを取得した。得られたシーケンスは MG-RAST 等を利用してインフォマティクス解析を行い、各層における微生物群集・機能遺伝子組成とそれらの

経時的変動を明らかにした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 微生物群集構造

rRNA 配列情報に基づく酸化層・還元層の細菌群集構造解析の結果、全ての時期において *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占していた。同綱の中では、中干し前の最も還元層が発達する時期の還元層では嫌気性の鉄還元菌として知られている *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌、好気的環境となる落水期においては好気性のセルロース分解菌として知られている *Chondromyces* 属・*Sorangium* 属細菌の優占が見られた。このように、湛水・落水に伴う環境変化とともに、水田土壌において最も優占している *Deltaproteobacteria* 綱細菌の群集組成は変化することが示された。

##### (2) メタン生成・メタン酸化遺伝子

メタン生成に関わる鍵遺伝子として *mcr*、メタン酸化に関わる鍵遺伝子として *pmo* を解析した。本研究では、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析から得られた機能遺伝子とその転写産物の配列情報に基づき、酸化層・還元層それぞれにおけるメタン生成遺伝子転写産物の相対存在量と由来の微生物の組成を解析した。その結果、最も土壌が還元的になる中干前の還元層において、メタン生成遺伝子とその転写産物が最も多く検出された。また、同時期の酸化層においてメタン酸化遺伝子とその転写産物が最も多く検出された。本結果は、水田土壌において最も多くのメタンフラックスが検出される時期と一致していた。メタン生成遺伝子転写産物は、酢酸利用型メタン生成菌である *Methanosaeta*、水素利用型である *Methanocella*、*Methanoregula* 属古細菌由来のものが優占していた(図 1 a)。一方、メタン酸化遺伝子転写産物は、*Methylocystis*、*Methylogaea* 属細菌由来のものが優占していた(図 1b)。これまで、水田土壌におけるメタン生成菌として *Methanoregula* 属古細菌は検出例が報告されていない。また、メタン酸化についても *Methylogaea* 属細菌はこれまでに高頻度に検出された例はない。しかしながら、本研究ではこれらの属の古細菌・細菌が高頻度に検出されている。この原因として、これらの古細菌・細菌は近年になって単離され、これまでの研究で利用されていたデータベースに登録されていなかったことが考えられた。

このように本研究から、新潟水田土壌では最も還元環境が発達する中干前の還元層において、*Methanosaeta*、*Methanocella*、*Methanoregula* 属古細菌によりメタンが生成され、その上層に位置する酸化層において *Methylocystis*、*Methylogaea* 属細菌によりメタンが酸化されることが示された。

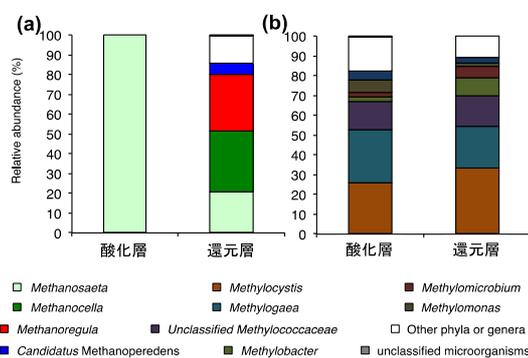


図 1. 中干前の土壌におけるメタン生成 (a) メタン酸化 (b) 機能遺伝子転写産物の微生物群集組成

##### (3) 脱窒・DNRA・窒素固定遺伝子

脱窒に関わる鍵遺伝子として *nar*、*nir*、*nor*、*nos* を、DNRA に関わる鍵遺伝子として *nrf* を、窒素固定に関わる鍵遺伝子として *nif* を解析した(図 2)。本研究では、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析から得られた機能遺伝子とその転写産物の配列情報に基づき、湛水期(S1, S2)・落水期(S3, S4)における酸化層(S1, S3)・還元層(S2, S4)それぞれにおける各遺伝子転写産物の微生物群集組成を解析した(図 3A, B)。その結果、脱窒反応では、*nir* は従来の脱窒菌(*Alpha*-、*Beta*-、*Gamma**proteobacteria* 綱細菌)由来のものが検出された一方、*nor* や *nos* はこれまでにほとんど検出例がない *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter*、*Geobacter* 属細菌由来のものが高頻度に検出された。

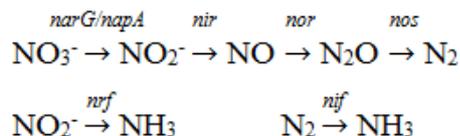


図 2. 脱窒・DNRA・窒素固定関連遺伝子

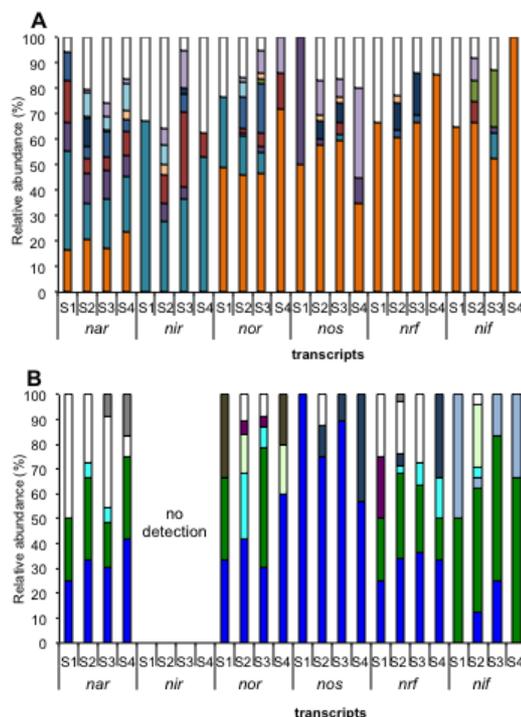


図 3. 各窒素循環関連遺伝子転写産物を発現していた微生物の群集構造  
(A: 細菌の門・*Proteobacteria* の綱レベル,  
B: *Deltaproteobacteria* の属レベル)

このことから、水田土壌における脱窒反応は、*Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌が部分的に関与し「協奏的に」進行することがはじめて示唆された。DNRA の鍵酵素遺伝子とその転写産物についても、*Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌由来のものが高頻度に検出された。さらに驚くべきことに、古くから水田の主要な窒素固定細菌として考えられてきた光合成細菌の窒素固定遺伝子よりも、これまでほとんど検出例のない *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌の窒素固定遺伝子の方がはるかに高頻度に転写されていることが明らかとなった。

得られた新たな知見の普遍性を確認するため、新潟以外の水田を含む様々な環境の土壌を解析対象として定量 PCR による *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属の鉄還元菌の分布調査とメタゲノム解析を行った。土壌サンプルとして、日本全国の 4 カ所の水田土壌、4 カ所の畑・雑草地・森林土壌、4 カ所の底泥を用いた。定量 PCR の結果から、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌は畑・雑草地・森林土壌よりも水田土壌や底泥において優占度が高いことが明らかになった。メタゲノム解析の結果から、脱窒、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の検出頻度は、水田が最も高く、続いて底泥、畑・雑草地・森林土壌であった。また、一酸化窒素還元、一酸化二窒素還元、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の群集構造については、畑・雑草地・森林土壌と比較して水田土壌や底泥において *Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌の優占度が高かった。これらのことから、還元的窒素循環反応は水田土壌においてポテンシャルが高く、新潟水田以外の水田土壌や底泥においても、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌がこれらの反応のキープレイヤーである可能性が示された。

本研究から、「鉄還元菌が主導する還元的窒素変換反応」の可能性が初めて示されたが、鉄還元菌由来の機能遺伝子転写産物はこれまでの研究ではほとんど検出されていない。この理由として、鉄還元菌の機能遺伝子は他の細菌由来の遺伝子に比べて GC 含量が高く、PCR 増幅されにくいことが理由であることが考えられた。また、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌はほとんどの還元的窒素循環反応において活性を保有することが報告されており、実際に土壌中の還元的窒素循環反応を駆動している可能性が高い。

以上の結果から、水田土壌におけるメタン生成・酸化は *Methanocella*, *Methanosaeta*, *Methanoregula* 属古細菌・*Methylocystis*, *Methylogaea* 属細菌が行っている可能性が示された。また、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌が DNRA や窒素固定によってアンモニアを生成している可能性が高く、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌が水田土壌の窒素肥沃性の維持に寄与していることがはじめて示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Masuda Y, Itoh H, Shiratori Y, Isobe K, Otsuka S, Senoo K, Predominant but previously-unseen prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, unveiled by metatranscriptomics, *Microbes & Environments*, 査読有、2017、in press DOI: 10.1264/j sme2.ME16179

[学会発表](計 14 件)

増田曜子、伊藤英臣、白鳥豊、磯部一夫、大塚重人、妹尾啓史、水田土壌オミクス解析から見た陸域生態系における鉄還元菌の新たな機能 - 還元的窒素変換 (Predominant but previously-unseen prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, unveiled by metatranscriptomics)、JpGU-AGU Joint Meeting 2017、2017 年 5 月 24 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

妹尾啓史、水田土壌の窒素変換微生物：特定・分離と N<sub>2</sub>O 削減への利用、第 34 回土・水研究会、2017 年 2 月 27 日、つくば農林ホール(茨城県つくば市)

Masuda Y., Itoh H., Shiratori Y., Isobe K., Otsuka S., Senoo K., Overlooked but pivotal prokaryotic drivers involved in reductive nitrogen transformations in paddy soils, captured by metatranscriptomics, 3rd Thünen Symposium on Soil Metagenomics, 2016 年 12 月 14 日~16 日、Braunschweig (Germany)

Keishi Senoo, Greenhouse gas and soil microorganisms: N<sub>2</sub>O generating and eliminating microbial communities in agricultural soils, China-Japan Environmental Microbiology Forum, 2016 年 11 月 13 日、Chongqing (China)

増田曜子、伊藤英臣、白鳥豊、磯部一夫、大塚重人、妹尾啓史、水田土壤に優占する微生物の新機能：鉄還元菌こそが窒素循環に重要である、日本微生物生態学会第31回大会、2016年10月23日～25日、横須賀市文化会館（神奈川県横須賀市）

Keishi Senoo、Denitrifying Microbial Community in Agricultural Soils: Key Players Involved in N<sub>2</sub>O Generation and Elimination、105th International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society for Applied Biological Chemistry、2016年6月16日、Jeju Island (Korea)

田伏曜子・伊藤英臣・白鳥豊・磯部一夫・大塚重人・妹尾啓史、水田土壤に優占する Deltaproteobacteria の窒素固定・脱窒・DNRA への寄与 - オミクス解析による水田窒素循環微生物コミュニティの刷新 -、日本土壤微生物学会 2016 年度大会、2016 年 6 月 11 日～12 日、岐阜大学（岐阜県岐阜市）

田伏曜子・角田洋子・伊藤英臣・白鳥豊・磯部一夫・大塚重人・妹尾啓史、水田土壤の窒素循環に寄与する新規微生物群の発見、日本微生物生態学会第30回大会 7th JTK Symposium、2015年10月17日～20日、土浦亀城プラザ（茨城県土浦市）

角田洋子・伊藤英臣・磯部一夫・白鳥豊・大塚重人・妹尾啓史、メタゲノム解析からみた水田土壤における窒素代謝関連遺伝子の詳細、日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会、2015 年 9 月 9 日～11 日、京都大学吉田キャンパス（京都府京都市）

田伏曜子・伊藤英臣・磯部一夫・白鳥豊・大塚重人・妹尾啓史、水田土壤のメタトランスクリプトーム解析 - 微生物群集構造と炭素・窒素循環機能遺伝子の解析 -、日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会、2015 年 9 月 9 日～11 日、京都大学吉田キャンパス（京都府京都市）

田伏曜子・伊藤英臣・白鳥豊・磯部一夫・大塚重人・妹尾啓史、メタトランスクリプトーム解析から見た水田土壤の炭素・窒素循環とそれを駆動する微生物、日本地球惑星連合 2015 年大会、2015 年 5 月 19 日～24 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）

妹尾啓史、21 世紀の土壤微生物研究の目指すもの、環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 22 日～24 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

角田洋子・白鳥豊・伊藤英臣・掘知行・西澤智康・磯部一夫・大塚重人・妹尾啓史、水田におけるパルクおよび根圏土壤細菌群集の構造とその周年変動、環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 22 日～24 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

角田洋子・白鳥豊・伊藤英臣・掘知行・西澤智康・磯部一夫・大塚重人・妹尾啓史、水稲根圏の微生物の群集組成とその栽培期間における変動 - 16S メタアンプリコンシーケンスによる解析 -、日本土壤肥料学会 2014 年度東京大会、2014 年 9 月 9 日～11 日、東京農工大学小金井キャンパス（東京都小金井市）

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

妹尾 啓史 (SEN00, Keishi)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：40206652

### (2) 研究分担者

大塚 重人 (OTSUKA, Shigeto)  
東京大学・農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：10313074

磯部 一夫 (ISOBE, Kazuo)  
東京大学・農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：30621833

### (3) 連携研究者

服部 正平 (HATTORI Masahira)  
早稲田大学・先進理工学研究科・教授  
研究者番号：70175537

黒川 顕 (KUROKAWA Ken)  
国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・教授  
研究者番号：20343246

高見 英人 (TAKAMI Hideto)  
(独) 海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物領域・チームリーダー  
研究者番号：70359165