

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26304042

研究課題名(和文)緯度の異なるN2O放出ホットスポットでの窒素循環要因の探査と環境修復生物資源調査

研究課題名(英文) Searching for nitrogen cycling factors at N2O emitting hotspots in different latitude zones and biological agents for rehabilitation of N2O emitting hotspots

研究代表者

橋床 泰之 (Hashidoko, Yasuyuki)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：40281795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：Sphagnum ripariumから高活性N2O放出細菌の検索を行い、 $\gamma$ -Proteobacteria綱のRhizobium属細菌を分離した。この分離株は  $\gamma$ -Proteobacteria綱のSerratia属細菌株と混在コロニーを形成し、後者にもN2O放出能を与えていた。一方、亜北極のバルサ崩壊北方泥炭地と静内コーン圃場の黒ボク土壌から、強力なN2O消去微生物としてそれぞれRhodococcus属およびChitinophaga属様細菌を分離した。これらは共にnosZおよびatypical nosZを持たず、この強いN2O消去が単なるN2OのN2ガスへの還元ではないことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hyper-N2O emitting microorganisms were screened from Sphagnum riparium, which is tolerant to conditions polluted with minerals and ammonia. According to our N2O emission assay, Rhizobium sp. of class Alphaproteobacteria was isolated as a hyper-active N2O emitting eubacteria. This bacterium formed almost equivalent mixture with a Serratia sp. of class Gammaproteobacteria and administered an ability to produce N2O to the Serratia. In addition, we have isolated non-denitrifying N2O quenchers from both Andisol in Hokkaido and degrading palsa mire in Finland, and the potent N2O quenchers were identified as Rhodococcus sp. and Chitinophaga sp. respectively. Both of the N2O quenchers were missing both nosZ gene for denitrifiers and atypical nosZ genes for dissimilatory nitrite reduction to ammonia (DNRA) bacteria. Hence their N2O quenching mechanisms were not simple reduction of N2O to N2 gas, but more drastic and active catabolic reaction of N2O as their nitrogen source was predicted.

研究分野：Environmental Microbiology

キーワード：N2O emitter N2O quencher degrading boreal peat Andisol corn farmland Sphagnum riparium nitrogen cycle

## 1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) 生成ハイパー・ホットスポットとされる緯度の異なる世界の3地点(亜北極帯、温・冷帯、熱帯)では、それぞれが酸性土壌という共通点を有し、活発に  $N_2O$  を放出している。これらの主たる  $N_2O$  放出微生物の多くは不完全脱窒細菌であると予想されるが、それぞれの環境下で脱窒や  $N_2O$  放出が完全脱窒よりも優先的に進行する理由はよく分かっていなかった。そこで、北海道の黒ボク土壌コーン圃場を含め、それらの  $N_2O$  放出微生物の比較から、高  $N_2O$  放出微生物が出現する理由を探れるのではないかと考えた。また、このような最終ステップがスキップされた脱窒は酸性条件や低温では通常の脱窒に比べて早く進行するため、エコシステムの窒素源を低レベルに留める原因となる。そのため、正常な生産系では脱窒にブレーキをかける生物的硝化抑制機構が働いていると予想された。従って、 $N_2O$  放出ホットスポットにおいても、 $N_2O$  放出を抑制する土壌生物(微生物・植物・微小動物)が存在する可能性があり、それを探索する意義は大きいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、温暖化によって氷核コアが融解し、沈降が始まっている攪乱北方泥炭地を主な  $N_2O$  放出微生物探索源とし、それらの分離と微生物生理学的な特徴を明らかにすること、さらにはその特徴を温帯域や熱帯泥炭の高  $N_2O$  放出細菌と比較することを主たる研究目的とした。また、 $N_2O$  放出抑制を含めた脱窒抑制に応用可能な生物資材の発掘も本研究の副次的な目的とした。

## 3. 研究の方法

現地調査では特に、 $N_2O$  生成・抑制を含めた土壌無機窒素代謝能に連動した環境要因の特定と、 $N_2O$  生成能・抑制能発動微生物群集の調査をそれぞれの地点について行う。探索には、ガスクロマトグラフィー用バイアルに閉じ込めたミズゴケや泥炭そのものに  $KNO_3$  や  $KNO_2$  あるいは  $(NH_4)_2SO_4$  を窒素源として添加した培養物に加え、上記無機窒素塩を窒素源にした低栄養ゼランガムソフトゲル培地に、植物や土壌洗浄液を接種後培養したものを対象として、高  $N_2O$  放出微生物の探索を試みた。高い  $N_2O$  放出を示した培養試料については、そこからの単コロニー分離を試み、培養可能な脱窒微生物を得た場合には、それらが持つ機能性遺伝子の解析を行った。中緯度あるいは高緯度緯度帯に存在する  $N_2O$  生成ハイパー・ホットスポットでの窒素循環と  $N_2O$  生成抑制土壌生物のスクリーニングも合わせて行い、このような  $N_2O$  消去微生物の微生物生理学的な特徴と鍵酵素の活性比較等から、生物学的  $N_2O$  放出抑制技術の開発戦略を見出す。

## 4. 研究成果

北極圏の  $N_2O$  放出ホットスポットとして、フィンランド・キルピサルビの赤色色素を蓄積する

陸生ミズゴケ, *Sphagnum capillifolium* からハイパー・ $N_2O$  放出細菌の検索を行い、強力な  $N_2O$  放出細菌として初めて *Alphaproteobacteria* 綱の *Rhizobium* 属細菌を分離した。この分離株は、硝酸還元酵素ラーゼラブユニット遺伝子 *narG* をもつが、その相同性検索によって得られた部分配列は *Gammaproteobacteria* 綱に属する *Serratia* 属細菌に由来することを確認した。

また、北方泥炭地から  $N_2O$  を消去する細菌株を分離した。この性状はマレーシア熱帯泥炭圃場の土壌培養物から分離した *Chitinophaga* 属に極めて類似する挙動を示した。

我々の研究室では、サラワク・マレーシアの熱帯土壌から強力な  $N_2O$  消去細菌として *Chitinophaga* 属細菌を得ており、高緯度亜北極ツンドラ帯と赤道直下の熱帯泥炭で  $N_2O$  消去細菌が存在し、それらが挙動の類似した非脱窒性真正細菌である点で注目に値する。

日本の黒ボク土壌と北方泥炭というそれぞれ全く別の  $N_2O$  生成ホットスポットから、非脱窒性  $N_2O$  消去細菌が分離された意味は大きいと考えられる。これらの細菌株が  $N_2O$  消去能を最大限に発揮する条件を確立しており、各緯度にある  $N_2O$  放出ホットスポットでの  $N_2O$  放出抑制への実用化が着実に進展している。

## 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10件)

1. Y. Hashidoko, Studies on metabolic regulation of denitrifying bacteria and phytopathogenic microorganisms using chemical agents found in chemical ecology-based phenomena. *Journal of Pesticide Science*, 43, 47-54 (2018). (査読なし)
2. Reika Isoda, Shintaro Hara, Teemu Tahvanainen, and Yasuyuki Hashidoko. Comparison of archaeal communities in mineral soils at a boreal forest in Finland and a cold-temperate forest in Japan. *Microbes and Environments*, 32 (4), 360-363 (2017). (査読あり)
3. Della Rahmawati, C. Hanny Wijaya, Yasuyuki Hashidoko, Gunawan Djajakirana, Akira Haraguchi, Toshihiro Watanabe, Kanta Kuramochi, and Yanetri Asi Nion. Concentration of some trace elements in two wild edible ferns, *Stenochlaena palustris* and *Diplazium esculentum*, and an aluminum accumulator *Melastoma malabathricum*, all grown on different soil profiles in tropical peatlands in Central Kalimantan. *Eurasian Journal of Forest Research*, 20, 11-20 (2017). (査読有り)
4. Yanxia Nie, Li Li, Reika Isoda, Mengcen Wang, Ryusuke Hatano, Yasuyuki

- Hashidoko. Physiological and genotypic characteristics of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O)-emitting *Pseudomonas* species isolated from dent corn Andisol farmland in Hokkaido, Japan. *Microbes and Environments*, 31, 93-103 (2016). (査読有り)
5. Mengcen Wang, Seiji Tachibana, Yuta Murai, Li Li, Sharon Yu Ling Lau, Mengchao Cao, Guonian Zhu, Makoto Hashimoto, and Yasuyuki Hashidoko. Indole-3-acetic acid produced by *Burkholderia heleaia* inhibits tropolone biosynthesis in *Burkholderia plantarii*. *Scientific Reports*, 6, 22596 (2016). (査読有り)
  6. Nadanong Seeoob, Weeranuch Lang, Yasuyuki Hashidoko, Atsuo Kimura, and Jintanart Wongchawalit. Discovery of novel enormous extracellular polysaccharide (MCC EPS) from waxy corn rhizobacterium. *Advances in Environmental Biology*, 9 (26), 38-46 (2016). (査読有り)
  7. T. Nishiyama, D. Haba, and Y. Hashidoko. Effect of some cover crops and their secondary metabolites on nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission by *Pseudomonas* denitrifiers isolated from chemically fertilized corn farm soils. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 2, 71-77 (2016). (査読有り)
  8. Y. Nie, L. Li, R. Isoda, M. Wang, R. Hatano, Y. Hashidoko. Physiological and genotypic characteristics of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O)-emitting *Pseudomonas* species isolated from dent corn Andisol farmland in Hokkaido, Japan. *Microbes and Environments*, 31, 93-103 (2016). (査読有り)
  9. Y. Nie, L. Li, M. Wang, T. Tahavanainen, Y. Hashidoko. Nitrous oxide emission potentials of *Burkholderia* species isolated from the leaves of a boreal peat moss *Sphagnum fuscum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79, 2086-2095 (2015). (査読有り)
  10. S.Y.L. Lau, Y. Hashidoko, N. Takahashi, R. Hatano, Lulie Melling. Correlation between mineral nitrogen contents and vertical distribution of N<sub>2</sub>O emission potentials in tropical peat soils are inverted in 2-year- and 10-year-cultivated oil palm plantations in Sarawak, Malaysia. *Journal of Agricultural Science & Technology B*, 4, 691-700 (2014). (査読有り)

[学会発表](計 29 件)

1. 阿知和菜子, Nie Yanxia, Teemu

- Tahvanainen, 橋床泰之. フィンランド・ラップランドのパルサ崩壊地の泥炭から高 N<sub>2</sub>O 放出細菌株の分離, それらの挙動および脱窒遺伝子の解析. 2018 年 3 月 17 日 (名古屋, 名城大). 3A11a06
2. Jie Duan, Junichi Asano, Yasuyuki Hashidoko. Easy isolation of pure betanin from red beetroots as substrate for an effective imine-exchange reaction to obtain several betalamic acid-alimine derivatives. 2018 年 3 月 17 日 (名古屋, 名城大). 3A15a08
  3. Yasuyuki Hashidoko, Masataka Hane, Ryosuke Tamura, Yanetri A. Nyon, Hanny C. Wijaya. Seed germination of *Xyris complanata*, a monocot pioneer plant in burnt tropical peatlands, can be stimulated by a soil *Penicillium* sp. The 26th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. September 19-22, 2017 (Kyoto).
  4. Masataka Hane, Ryosuke Tamura, Yanetri A. Nyon, Hanny C. Wijaya, Yasuyuki Hashidoko. Does *Penicillium rolfsii*, a fungus that stimulated germination of *Xyris complanata* seeds, stimulate germination of dormant seeds in a soil seed bank? The 26th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. September 19-22, 2017 (Kyoto).
  5. 高津祐太, 清水俊宏, 阿知和菜子, 橋床泰之. 北海道静内黒ボク畑地土壌から亜酸化窒素消去細菌の探索およびその活性評価. 日本土壌肥料学会仙台大会, 2017 年 9 月 5 日(火)~7 日(木) 東北大学青葉山新 キャンパス
  6. Jie Duan, Junichi Asano, Yasuyuki Hashidoko. Isolation of pure betanin from red beetroots as substrate for effective imine- exchange reaction to obtain several betalamic acid-amine conjugates. 日本農芸化学会北海道支部会 2017 年第 1 回講演会, 2017 年 7 月 22 日(とちぎプラザ). ポスター
  7. 三又一泰, 横田 基, 橋床泰之. *Trichoderma virens* によるセスキテルペン高度合成系の構築のためのプロトプラスト調製. 日本農芸化学会北海道支部会 2017 年第 1 回講演会 2017 年 7 月 22 日(とちぎプラザ). ポスター
  8. 河上智也, 磯田玲華, 橋床泰之, 小林真. 高カルシウム条件に対するミミズの局所適応: その検証と窒素循環における重要性. 日本生態学会 2017 年 3 月 17 日(仙台), ポスター発表
  9. 西塚紘明, 橋床泰之. 窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. を共生させるソテツ・リターに含まれるホルモゴニア分化誘導因子の探索. 日本農芸化学会 2017 年大会, 2017 年 3 月 19 日(京都女子

- 大) . 口頭発表
10. 高津祐太, 橋床泰之. 北海道の黒ボク土からなる高  $N_2O$  放出圃場より難培養性  $N_2O$  放出細菌および  $N_2O$  消去細菌の探索. 日本農芸化学会 2017 年大会, 2017 年 3 月 18 日 (京都女子大), 口頭発表
  11. 西塚紘明, 橋床泰之. イチョウ偽果に含まれるアナカルド酸類とそれらのエステル誘導体が示す対 *Nostoc* 属シアノバクテリア・ホルモゴニア分化誘導活性. 植物化学調節学会 51 回大会 (高知大学, ポスター), 2016 年 10 月 30 日, No. 80 (優秀発表賞)
  12. 橋床泰之, 西山隆晃, 高津祐太, 阿知和菜子, 磯田玲華. ハツカダイコン芽生え地上部に見出された強力な対脱窒細菌  $N_2O$  放出亢進効果とその水溶性活性化因子の追跡. 日本土壌肥料学会大会, 2016 年 9 月 21 日 (佐賀大学), ポスター
  13. 磯田玲華, 宮本敏澄, 阿部 碧, 原新太郎, Olle Zackrisson, 橋床泰之. オオサビハリタケ菌系マット直下の土壌微生物群集は北方圏針葉樹林林床でのポドゾル形成に参与しているか? 日本土壌肥料学会大会, 2016 年 9 月 21 日 (佐賀大学), ポスター
  14. 立花誠治, Bak Gyeryeong, 前川雅彦, 橋床泰之. 永年無施肥水田栽培ハイブリッドイネ LIA-1 根から *Burkholderia kururiensis* の分離およびその性質と機能性. 日本土壌肥料学会大会, 2016 年 9 月 21 日 (佐賀大学) ポスター
  15. Reika Isoda, Reiner Giesler, Yasuyuki Hashidoko. Relationship between vegetation and soil microbial community structure in Arctic tundra in northern Sweden soil microbial ecology. 16th International Symposium on Microbial Ecology (McGill University, Montreal, Canada). August 23 (Poster 328B), August 23, 2016 (Montreal, Canada), poster
  16. Y. Hashidoko.  $N_2O$  emitters from different habitats, boreal peats and tropical peats, and comparison of their physiological traits. International Peat Congress 2016 (Kuching, Malaysia), August 19, 2016, oral presentation.
  17. 磯田玲華, Reiner Giesler, 橋床泰之. Relationship of vegetation to microbial community in U-shaped glacial valley Kärkevagge, Sweden. 日本農芸化学会 2016 年札幌大会, 2016 年 3 月 29 日 (於札幌コンベンションセンター)「ポスター発表」
  18. 西塚紘明, Thomas DeLuca, 橋床泰之. 窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. を共生させる蘚類 *Pleurozium schreberi* が産生するホルモゴニア分化誘導因子の探索. 日本農芸化学会 2016 年札幌大会, 2016 年 3 月 29 日 (於札幌コンベンションセンター)「ポスター発表」
  19. 浅野純一, 橋床泰之. ベタミン摂取ワラジムシに特徴的な腸内微生物叢の解析. 日本農芸化学会 2016 年札幌大会, 2016 年 3 月 29 日 (於札幌コンベンションセンター)「ポスター発表」
  20. 西塚紘明, Olle Zackrisson, Thomas DeLuca, 橋床泰之. 窒素固定性シアノバクテリア *Nostoc* sp. 共生宿主フェザーモス *Pleurozium schreberi* が産生するホルモゴニア分化誘導因子の探索. 日本植物化学調節学会, 2015 年 10 月 24 日 (於東京大学), 「口頭発表」
  21. 磯田玲華, 原新太郎, 小林 真, Reiner Giesler, 橋床泰之. 亜北極生態系における土壌微生物群集・土壌含水量および窒素固定の関連. 日本土壌肥料学会年次大会, 2015 年 9 月 11 日 (於京都大学), 「ポスター発表」
  22. 西山隆晃, 橋床泰之. アブラナ科植物根二次代謝産物による土壌脱窒細菌の  $N_2O$  生成亢進/抑制効果の検証. 日本土壌肥料学会年次大会, 2015 年 9 月 11 日 (於京都大学), 「ポスター発表」
  23. 橋床泰之, 羽馬大輔, 大井辰哉, 橋本 誠. 赤ビートから精製したベタミンを用いたベタラミン酸イミン誘導体の調製. 日本農薬学会大会第 40 回記念大会 (玉川学園大), 平成 27 年 3 月 17 日 (口頭発表)
  24. 磯田玲華, 宮本敏澄, 原新太郎, Zackrisson Olle, 橋床泰之. 外生菌根性オオサビハリタケ (*Hydnellum ferrugineum*) 菌系マットが直下の北方針葉樹林土壌微生物群集構造に与える影響. 日本農芸化学会 2015 年大会 (岡山, 岡山大), 2015 年 3 月 27 日 (口頭発表)
  25. Yanxia Nie, Teemu Tahvanainen, Mengcen Wang, Yasuyuki Hashidoko. Comparison of  $N_2O$ -emitting bacteria and bacterial community between *Sphagnum fuscum* and *Sphagnum capillifolium* in the boreal peat. 日本農芸化学会 2015 年大会 (岡山, 岡山大), 2015 年 3 月 27 日 (口頭発表)
  26. 西塚紘明, 橋床泰之. 窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. に対する銀杏抽出物のホルモゴニア分化誘導因子の探索. 日本農芸化学会 2015 年大会 (岡山, 岡山大), 2015 年 3 月 28 日 (口頭発表)
  27. 西山隆晃, Li Li, 橋床泰之. 植物二次代謝産物が脱窒菌に与える影響についての比較・検証. 日本土壌肥料学会 2014 年度大会 (東京, 東京農工大) 2014 年 9 月 10, 11 日, ポスター発表 P8-1-19
  28. 磯田玲華, 原新太郎, 小林 真, Reiner Giesler, 橋床泰之. 森林限界線近傍土壌のアセチレン還元と土壌微生物群集構造に対する土壌含水量の関与. 日本土壌肥料学会 2014 年度大会 (東京, 東京農工大) 2014 年 9 月 10, 11 日, ポスター発表 P3-1-105.

29. S.Y.L. Lau, L. Melling, Y. Hashidoko. Isolation and characterization of a potent N<sub>2</sub>O-quenchers, *Chitinophaga* sp. from an oil palm plantation on peat in Sarawak, Malaysia. International Union of Microbiological Societies Congresses (at Palais des Congres de Montreal, Montreal, Canada), Jul 27-Aug 1, 2014.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

橋床 泰之 (北海道大学・大学院農学  
研究院・教授)

研究者番号：40281795

##### (2) 研究分担者

宮本 敏澄 (Miyamoto Toshizumi)  
北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：00343012

小林 真 (Kobayashi Makoto)  
北海道大学・北方生物圏フィールド科学セン  
ター・助教

研究者番号：60719798