

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26310315

研究課題名(和文) 農耕地における窒素循環の駆動力 微小環境でリンクする硝化と脱窒

研究課題名(英文) Driving force of nitrogen transformation in agricultural soil - Linking nitrification and denitrification in a microenvironment

研究代表者

早津 雅仁 (Hayatsu, Masahito)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・主席研究員

研究者番号：70283348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：微生物の相互作用により硝化と脱窒が共役的あるいは共同的に進行する反応系の形成やそこに関与する硝化菌や脱窒菌の多様性や菌数、活性を明らかにすることを目的として以下の結果を得た。土壌の微粒子の解析には、粒子間の微生物の混入防止する技術の開発が不可欠である。農耕地の硝化や脱窒の活性が活発な部位は、土壌のごく表層や有機物層などに限られその部位には多様あるいは多数の硝化菌や脱窒菌が存在する。茶園土壌から新規な硝化菌を分離し新属新種であることを明らかにした。分離菌のゲノム解析結果から、硝化菌は細胞外高分子物質を生産し、微生物集団を形成して機能していると推定した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the mechanism of formation of a microbial reaction system in soil microenvironment in which nitrification and denitrification proceed cooperatively, and analyze the community structure of nitrifying and denitrifying bacteria in the system. The following results were obtained. 1) To analyze a microbial community in soil microparticles (soil microenvironment), it is essential to develop a technology to prevent microbial contamination between particles. 2) The hot spot of nitrification and denitrification at which various and many nitrifying and denitrifying bacteria were found are limited to surface and organic matter layers of the soil used. 3) We successfully isolated an ammonia oxidizing bacterium which was identified as a new genus new species. 4) The results of genomic analysis of the isolate indicated that the nitrifying bacteria formed a microbial community in the soil microenvironment by producing extracellular macromolecular substances.

研究分野：微生物生態学

キーワード：硝化 脱窒 亜酸化窒素 メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

肥料の施用や家畜排泄物の廃棄により、硝酸性窒素による水系汚染や温室効果ガス N<sub>2</sub>O の増加が問題となっている。これらの原因は、窒素の人為的な投入より、土壌中の窒素動態に関与する微生物の多様性、菌数、活性が影響を受けるためである。これらの微生物のうち特にアンモニアを硝酸に酸化する硝化菌と亜硝酸や硝酸を窒素ガスや N<sub>2</sub>O に還元する脱窒の活動が重要とされている。

申請者らは農耕地における窒素汚染の実態把握と制御を目的に高精度な窒素動態のモニタリングと微生物性の解析を行い、窒素汚染の原因である好氣的反応硝化と嫌氣的反応脱窒が、変動する気象、供給される有機物、肥料の種類に適應し、硝化菌や脱窒菌が土壌の微小環境に微生物集団を形成し高い活性や独自の機能を獲得することにより硝酸性窒素や亜酸化窒素が大量に生成すると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本課題では、有機物が供給される土壌表層や有機物の微小な環境に生じる好気・嫌気環境とその混在領域で多様な微生物の相互作用により好氣的反応硝化と嫌氣的反応脱窒が共役的あるいは共同的に進行する独自の反応システムの形成やそこに關与する硝化菌や脱窒菌の多様性や菌数、活性を明らかにすることを目的とする。

具体的には、これまでに我々が明らかにしてきた硝化脱窒活性の高い農耕地（野菜畑や茶園）を対象とし、従来の数百グラムの土壌を採取・混合する土壌採取法では、硝化と脱窒がリンクしている微小環境が破壊され見落とされてきた事実を踏まえ、硝化菌や脱窒菌の存在する微小部位がどのようにして形成されるかを前提に、硝化脱窒のホットスポットを特定する。次いでメタゲノム解析によりそこに存在する微生物の多様性を明らかにする。その結果に基づいて硝化菌あるいは脱窒菌を分離し硝化脱窒共役系形成機構を提案する。ここで得られる知見を施肥法や土壌管理法の開発に活用する。

## 3. 研究の方法

### (1) 硝化菌（アンモニア酸化細菌）の多様性解析

土壌からビーズビーティング法により DNA を抽出し精製後、濃度と純度を測定した。この DNA を鋳型にして、アンモニア酸化細菌（AOB）およびアンモニア酸化古細菌（AOA）のアンモニアモノオキシゲナーゼサブユニット A (amoA) に特異的なプライマーで PCR 増幅した。この増幅した amoA の DNA 断片を次世代シーケンサー（454Jr）により解析した。系統解析は Muthour および Mega を用い

た。また amoA の計数は定量 PCR により行った。土壌中の amoA の mRNA は、土壌から全 RNA を抽出し、amoA に特異的なプライマーを用いて逆転写定量 PCR により定量した。

### (2) 農耕地における脱窒菌多様性の解析

土壌 DNA の調製は硝化菌の項と同様に実施した。脱窒菌では、亜硝酸酸化酵素 (NirK, NirC) および亜酸化窒素還元酵素 (NosZ) をターゲットとして、これらに特異的なプライマーを用いて PCR 反応を実施した。PCR 産物は次世代シーケンサー（454Jr）により解析した。系統解析は Muthour および Mega を用いた。脱窒遺伝子の計数は定量 PCR により行った。土壌中の nirK と nirS の mRNA は、土壌から全 RNA を抽出し、それぞれに特異的なプライマーを用いて逆転写定量 PCR により定量した。

### (3) 硝化脱窒ホットスポットの特定

茶園土壌のリター層およびその下層をコアサンプラーで採取し、その後数センチ単位で切断した。これらについて硝化活性や amoA 解析を実施した。

ゲリラ豪雨後に大量の N<sub>2</sub>O を発生した転換畑圃場からコアサンプラーで土壌を採取し、これを用いて培養実験を行った。

### (4) カギとなる硝化菌の分離とゲノム解析

集積培養法によりアンモニア酸化細菌を分離した。分離菌から DNA を抽出し、Miseq および PacBio で解析しアセンブルした。不確定な領域はダイデオキシ法で塩基配列を解析した。トランスクリプトーム解析は、培養菌体から RNA を抽出し、rRNA を除去した後に mRNA 鋳型に逆転写酵素により DNA を合成し、次世代シーケンサー（454Jr）により解析した。

### (5) 各種測定法

硝化活性は亜硝酸酸化を塩素酸で阻害してアンモニア酸化で生成する亜硝酸を比色法測定する土壌懸濁液培養法により測定した。亜酸化窒素はガスクロマトグラフィー（検出器 ECD）で定量した。土壌分析は常法で行った。

## 4. 研究成果

### (1) 土壌ミクロ団粒からの DNA 調製

土壌 40mg から DNA を抽出することができた。粒径の異なる団粒 (0.4g) から DNA を調製し PCR-DGGE でアンモニア酸化細菌の amoA (アンモニアオキシゲナーゼサブユニット A) を解析したところ粒径の異なる団粒集団で amoA の多様性に差はなかった。このことは土壌の土壌粒子の調製時に、マクロ団粒が崩壊した微粒子をミクロ団粒としてとらえたため、ミクロ団粒を集めて DNA を抽出するとマクロ団粒を再構成したことになり、結果として多様性に大きな違いが認められなかったと推察された。当初の計画では、微小環境の分離とそれを用いた硝化脱窒系の解析を行う予定だったが、各粒子画分調製時の粒

子間の微生物のコンタミネーションの問題の解決が困難であると考えられた。そこで土壌粒子の調製方法の検討とともに、鍵となる硝化菌を特定し、その性質から硝化菌群集さらに硝化脱窒菌群集の形成と機能にアプローチすることとした。

#### (2) 硝化ホットスポットの特定

鍵となる硝化菌を特定し分離するため、硝化活性が高く N<sub>2</sub>O 発生能も高い茶園を対象として検討した。

N<sub>2</sub>O 発生能が高い茶園土壌において表層有機物さらにその下部の土壌を深さ別にコアサンプラーで採取し、硝化能と AOA と AOB の菌数をアンモニアモノオキシゲナーゼサブユニット A の存在量を指標に定量した。茶園土壌は、農研機構(金谷)の茶園圃場から採取した。その結果、有機物画分に極めて多数の AOB が検出され、その部位の硝化も著しく高かった。しかし AOA は全体的に AOB の 1/100 以下であった。また筆者らが発見した gamma-AOB (後述)は有機物層と表層土壌に多く存在することがわかった。このことから本課題で対象とする脱窒と硝化がリンクする場所は、茶園においては有機物層であると推定された。この知見は新規性が高く本課題の目的である脱窒と硝化のリンクを明らかにする上で重要であると同時に茶園の有機物層の微小環境研究のモデルとしての有効性を示している。特に有機物層は好氣的であり、新鮮有機物が豊富で部分的に嫌氣的になることから、脱窒と硝化双方にとって好適であると判断し、茶園有機物層を中心に研究を進めることとした。

#### (3) 硝化菌の分離

アンモニア酸化細菌(AOB)の純粋培養における pH の下限は 6.0~6.5 で酸性環境では生育できない。一方茶園は酸性化しており土壌 pH は 4 以下がほとんどである。このため茶園の硝化を駆動する微生物の正体は不明であった。しかし、好酸性型のアンモニア酸化古細菌(AOA) *Nitrosotalea devanattera* が 2011 年に分離され、酸性環境での硝化の担い手が明らかになったかにみえた。しかし茶園土壌では AOA 菌数が少ないが高い硝化能が認められ、その硝化の実態には不明な点が残った。

茶園土壌(pH4 以下)を調査した結果、土壌の高い硝化活性に対して既知の AOA および AOB の菌数は極めて少なかった。そこで、茶園土壌には未知の好酸性あるいは耐酸性アンモニア酸化菌が存在すると仮定し分離を試みた。その結果、新規なアンモニア酸化細菌 TAO 株の分離に成功した。TAO 株は、純粋培養では pH2~6 の強~弱酸性条件に対して耐性を示した。これまでに土壌からはプロテオバクテリアの 2 属 *Nitrosomonas* と *Nitrosospora* が分離されているが、TAO 株はプロテオバクテリアに属していた。

AOB は *Nitrosococcus* 属のみが知られており、好塩性で海洋や塩湖に特有とされていた。

TAO 株は生理的性質とゲノムの特徴が既知菌株とは大きく異なることから新属新種として *Candidatus Nitrosoglobus terrae* と命名した。一方、この TAO 株が実際に土壌で機能しているか明らかにするため、TAO 株を分離した茶園土壌の amoA の DNA と mRNA を定量したところ、TAO 株の amoA は、DNA と mRNA とともに他のアンモニア酸化菌より多いことから、TAO 株が供試土壌中で機能していることが示された。ゲノム解析の結果から TAO 株は細胞外高分子物質を生産する遺伝子群を数多く有すること、また実際に培養条件下で細胞集団を形成しストレス環境下でも生育することが示された。これまでに排水処理における活性汚泥中で、硝化菌と脱窒菌がリンクして硝化脱窒反応を駆動することが知られており、その細胞集団の形成に細胞外高分子物質が重要であることが示されている。本課題の結果から、茶園土壌でも TAO 株は細胞外高分子物質を生産し土壌粒子に固着してさらに他の微生物群とコミュニティを形成し硝化・脱窒系を駆動すると推定された。

#### (4) 脱窒に関する検討

これまでに畑地土壌は大雨の後に冠水することがあり、冠水後水が引くときに N<sub>2</sub>O の排出量が急激かつ爆発的に増加し、この時脱窒酵素遺伝子が大量に発現することを明らかにした。しかしどのような脱窒菌群集が関与するかは不明だった。脱窒菌の多様性解析では、脱窒に関与する酵素遺伝子(*nirK*, *nirS*, *nosZ*)を対象として PCR 産物の分析が行われる。しかしこれらの酵素の多様性が広いため全体像を把握するのが困難であった。ここでは、最近開発された複数のクラスターごとに PCR 増幅可能なプライマーセットの中から *nirK*, *nirS*, *nosZ* の高いカバレッジを示す PCR プライマーを用いて次世代シーケンサーによるパイロシーケンシング解析を行い、土壌中の脱窒菌群集に対する短期間の冠水および排水時の反応を調べた。まずフィールドにおける N<sub>2</sub>O モニタリングで冠水による N<sub>2</sub>O 大量発生を観察した圃場の土壌コア(深さ 0-5 cm)を採取し、実験室レベルで検討した。土壌コア上部注水し冠水させ直ちに排水させた。この間 N<sub>2</sub>O を測定した。一定期間ごとにコアを解体し 0-1, 1-3, 3-5cm に切り分け脱窒遺伝子のメタゲノム解析を行った。その結果、短期間の冠水と排水は、*nirK*, *nirS*, および *nosZ* 遺伝子を含む微生物群集の存在量(菌数に相当)やアルファ多様性にほとんど影響を与えなかったが、特に 0~1cm の土壌の各遺伝子の組成に有意な影響を与えた。これらの結果は、土壌中の脱窒菌数よりむしろ脱窒菌群の組成が、農業土壌生態系の短期間の冠水に反応することを示した。

この結果を受けてここで特定された脱窒菌の分離し、先に分離した硝化菌とモデル培養系を構築することにより、硝化と脱窒がリンクした反応系の解明をアプローチできると考えられる。しかしながら本課題の研究期

間中にはこれらのモデル培養を実施することができなかった。

#### (5) まとめ

本研究課題では以下の成果を得た。

土壌の微粒子の解析には、粒子間の微生物の混入防止する技術の開発が不可欠である。

農耕地の硝化や脱窒の活性が活発な部位は、土壌のごく表層や有機物層などに限られその部位には多様あるいは多数の硝化菌や脱窒菌が存在する。

茶園土壌から新規な硝化菌を分離し新属新種であることを明らかにした。

分離菌のゲノム解析結果から、硝化菌は細胞外高分子物質を生産し、微生物集団を形成して、機能していると推定した。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 3件)

Yong Wang, Yoshitaka Uchida, Yumi Shimomura, Hiroko Akiyama, Masahito Hayatsu. 2017. Responses of denitrifying bacterial communities to short-term waterlogging of soils waterlogging. Scientific Reports,

DOI:10.1038/s41598-017-00953-8. (査読有)

Masahito Hayatsu, Kanako Tago, Yong Wang, Yumi Shimomura, Taku Okubo, Atsushi Toyota, Ikuo Uchiyama, Futoshi Kurisu, Yuhei Hirono, Kunihiro Nonaka, Hiroko Akiyama, Hideto Takami. 2017.

Acidotolerant gammaproteobacterial ammonia oxidizing bacteria from soil. ISME J. doi. 10.1038/ismej.2016.191. (査読有)

Kanako Tago, Takashi Okubo, Yumi Shimomura, Yoshitomo Kikuchi, Tomoyuki Hori, Atsushi Nagayama, Masahito Hayatsu. 2015. Environmental factors shaping the community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in sugarcane field soil. Microbes and Environments. 30:21-28. (査読有)

##### 〔学会発表〕(計 2件)

早津雅仁. 土壌微生物が示す黒ボク土の特殊性と物質循環への影響, 日本土壌肥料学会 講演要旨集 62, 194. 2016.9.22 佐賀大学 (佐賀県・佐賀市)

多胡香奈子、大久保卓、下村有美、菊池義智、堀知行、永山敦士、早津雅仁. アンモニア酸化菌に及ぼす土壌の性質, 日本土壌肥料学会 講演要旨集 61, 32. 2015.9.11 京都大学 (京都府・京都市)

〔図書〕(計 0件)

無し

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

無し

取得状況 (計 0件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

早津 雅仁 (HAYATSU Masahito)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・農業環境変動研究センター

物質循環研究領域 主席研究員

研究者番号: 70283348

##### (2) 研究分担者

多胡 香奈子 (TAGO Kanako)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・農業環境変動研究センター

物質循環研究領域 主任研究員

研究者番号: 20432198

##### (3) 連携研究者

諏訪 裕一 (SUWA Yuchi)

中央大学 理工学部 教授

研究者番号: 90154632

勝山 千恵 (KATSUYAMA Chie)

中央大学 理工学部 助教

研究者番号: 10580061

高見 英人 (TAKAMI Hideto)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋

極限環境生物領域 上席研究員

研究者番号: 70359165

栗栖 太 (KURISU Hutoroshi)

東京大学大学院 工学研究科 准教授

研究者番号: 30312979