

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：26660047
研究課題名(和文) ダイズ根圏フザリウムの脱窒様式とN₂O発生への寄与

研究課題名(英文) N₂O emission from rhizosphere by fungi

研究代表者
南澤 究 (Minamisawa, Kiwamu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70167667
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：N₂Oは温室効果ガスであり、マメ科作物根圏はN₂Oの主要な発生源である。本研究では、根粒根圏の糸状菌N₂O生成について、下記の成果を得た。亜硝酸を利用するカビ脱窒が当該根粒根圏で生じていた。根粒根圏から12株のフザリウム分離株を得た。N₂O発生圃場のダイズ根粒根圏における糸状菌群集構造解析の結果、分離フザリウム株が圃場およびポットでも優勢であった。大部分のフザリウム単離株が亜硝酸からN₂Oの顕著なカビ脱窒反応を触媒し、主に二分子の亜硝酸から一分子のN₂Oが生成していた。以上の結果より、ダイズ根粒根圏では亜硝酸利用型のカビ脱窒によりN₂O発生が実質的に起きていると結論された。

研究成果の概要(英文)：Nitrous oxide (N₂O) is a key atmospheric greenhouse gas that affects global warming and the destruction of stratospheric ozone. Legume field is one of major sources of N₂O emission from degraded root nodules. However, soil microorganisms emitting N₂O other than bradyrhizobial endosymbionts in the rhizosphere remain unknown. N₂O isotopomer analysis is useful tool to discriminate fungal and bacterial N₂O emissions. Generally, the site preference values of N₂O (N₂O-SP) produced by fungal denitrification are higher than those of bacterial denitrification. The addition of nitrite instead of nitrate to soybean nodulated roots significantly increased N₂O-SP. Moreover, the mutation of nirK gene (encoding dissimilatory nitrite reductase) in symbiotic bradyrhizobia significantly increased N₂O-SP in the presence of nitrite. These results indicate that nitrite-utilizing N₂O emission via fungal denitrification occurred in the rhizosphere.

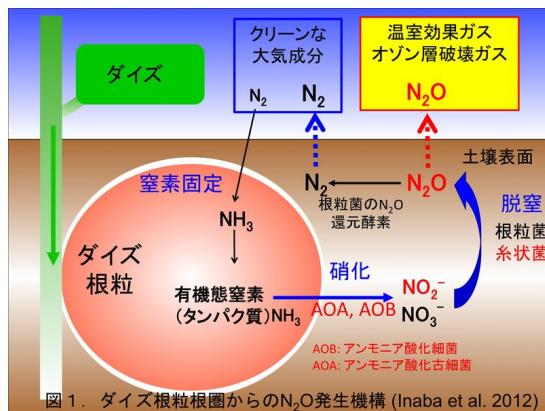
研究分野：土壌微生物学、植物微生物学

キーワード：土壌生物 根圏窒素循環 脱窒 N₂O フザリウム

1. 研究開始当初の背景

収穫期のダイズ根粒根圏から発生する温室効果ガス N_2O が、土壤生物による根粒有機態窒素の無機化・硝化・脱窒により発生することを解明し、根粒菌で根圏の N_2O 発生を圃場レベルで削減できることを申請者は明らかにしてきた(図1)。この成果は、Nature Climate ChangeとNature Contentsに掲載され (Itakura *et al.* 2013)、地球温暖化防止に土壤微生物である根粒菌が使えることで国内外の反響を呼んでいる。

一方、本研究はダイズ老化根粒の N_2O 発生過程の重要なプレーヤーであると想定される土壤糸状菌フザリウムに焦点を当てたものである。ダイズ根圏の N_2O 発生過程には、根粒菌と土壤生物の両方が関与している (Inaba *et al.* 2012)。しかし、どの土壤生物が N_2O 発生を起こしているか不明であった。研究代表者は、種々の証拠から、フザリウムのカビ脱窒が土壤生物としての N_2O 発生源になっている可能性があると考えた。



2. 研究の目的

研究代表者は、ダイズ根粒根圏からの N_2O 発生に土壤糸状菌フザリウムによるカビ脱窒が関与している可能性を見いだした。本研究では、ダイズ根圏 N_2O 発生へのカビ脱窒の寄与・様式・削減策を明らかにするために、(1) ^{15}N 同位体の N_2O 分子中偏在性解析によるカビ由来 N_2O 発生の寄与度評価、(2)根圏分離フザリウムの共脱窒のポテンシャル、(3)硝化細菌とフザリウムの共生体の形成と機能、(4)非脱窒型フザリウムによる N_2O 発生削減可能性を明らかにすることを目的とする。本研究計画は、今まで土壤細菌や菌根菌中心であった根圏微生物研究に新しい知見と潮流を提示できる。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、以下の項目の研究を行う。

(1) 根圏 N_2O 発生へのカビ脱窒の寄与

研究代表者が確立した根粒根圏からの N_2O 発生をモニターできるレオナルドジャーシステム (Inaba *et al.* 2012, Itakura *et al.* 2013) を用いて、ポット栽培したダイズ根圏から発生する N_2O のSite Preference (SP, ^{15}N 同位体の N_2O 分子中偏在性の指標(per mil))を質量分析計で測定した。根粒窒素由来の自然処理以外に、測定前に硝酸・亜硝酸を人為的に添加すると N_2O 発生速度は上昇したので、その際のSP値も測定した。以上の根圏の N_2O 分子のSP値と分離フザリウムとダイズ根粒菌の純粋培養時のSP値を比較し、フザリウムがダイズ根圏の N_2O 発生にどの程度寄与しているか明らかにする。また、圃場栽培ダイズとレオナルドジャーの実験室系で、 N_2O を発生している根粒根圏の糸状菌の多型プロファイルを取り、分離フザリウムと比較した。

(2) フザリウムの共脱窒のポテンシャル

^{15}N 標識亜硝酸を添加した根圏分離フザリウム培養液に根粒抽出液やその他の窒素供与体を添加して、生成したハイブリッド N_2O ($^{15}N^{14}NO$)の質量分析を行い、共脱窒が起きる条件を明らかにした。具体的には、 ^{15}N 標識亜硝酸を添加した根圏分離フザリウム培養液に根粒抽出液やその他の窒素供与体を添加して、生成した N_2O の質量分析を行い、共脱窒が起きる条件を調査した。0.1- 50 mMの亜硝酸添加培地を基本として、 N_2O 発生が起きている根粒根圏抽出液や根圏に存在している可能性のある ^{15}N 標識されていない有機・無機化合物を使用する。本条件では、共脱産物として $^{15}N^{14}NO$ (MW=45)が、通常の脱窒産物として $^{15}N^{15}NO$ (MW=46)が生成されるはずである。

(3) 硝化細菌とフザリウムの共生

アンモニアを10-50 mM添加した培地(適宜炭素源を低下または除く)に、 N_2O の生成能のある根圏分離フザリウムを閉鎖系で培養し、少量の根圏土壤をアンモニア酸化(古)細菌(AOB)として共接種した。培地中のアンモニア濃度と N_2O 、気相中の N_2O 濃度をモニターし、どのような条件で「アンモニア N_2O 」という反応が起こるか検討

を行った。また、根圏土壌を共接種源として用いる場合は、古細菌集積用の抗生物質群 (Vancomycin, Kanamycin, Penicillin G (それぞれ100 ug/ml)) を添加し、アンモニア酸化古細菌(AOA)とフザリウムの共同体の形成を期待して選択的な集積培養を行った。最終的にアンモニアをエネルギー源と窒素源、CO₂を炭素源とした安定した集積培養系を目指す。

(4) 非脱窒型フザリウムによるN₂O抑制

非脱窒型のフザリウム接種によりダイズ根圏からのN₂O発生が低減化できるか否か検討を行った。具体的には、ダイズ根粒根圏から分離されたフザリウム株の内、FK1株は、亜硝酸および硝酸からのN₂O発生を示さなかった。しかも、FK1株のITS配列は、亜硝酸からのN₂O発生を起こすFK2株と同じであり、*Fusarium solani*に属する。したがって、FK1株は非脱窒型の土壌フザリウムと考えられた。そこで、FK1株の接種により根圏N₂O発生が抑制されるか否か、レオナルドジャーシステム (Inaba *et al.* 2012, Itakura *et al.* 2013) を用いて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 根圏N₂O発生へのカビ脱窒の寄与

N₂Oの分子内¹⁵N自然存在比に基づくアイソトポマー解析はカビと細菌のN₂O発生の起源を区別できる有用な手法である(Maeda *et al.* 2015)。一般に、カビ起源のN₂OのSite preference (SP)値は、細菌起源のN₂OのSP値より高い値を示す(Maeda *et al.* 2015)。N₂O還元酵素遺伝子*nosZ*を欠損したダイズ根粒菌により形成された根粒の根圏からは、硝酸投与より亜硝酸投与によって、発生するN₂OのSP値が-3.5‰から4.2‰に有意に上昇した。さらに、ダイズ根粒菌の*nosZ*遺伝子欠損を遺伝的背景とし、異化的亜硝酸還元酵素遺伝子*nirK*遺伝子を欠損により、亜硝酸存在下の根粒根圏から発生するN₂OのSP値が4.2‰ to 13.9‰に有意に上昇した。以上の結果は、亜硝酸を利用するカビ脱窒が当該根粒根圏で起こっていることを示唆していた。さらに、圃場栽培ダイズとレオナルドジャーの実験室系で、N₂Oを発生している根粒根圏の糸状菌の主要なRISA多型プロファイルは、分離フザリウムのRISA多型プロファイルと一致していたので、分離フザリウムは圃場のダイズ根粒根圏で機能し

ているフザリウムであることが強く示唆された。

(2) フザリウムの共脱窒のポテンシャル

¹⁵N標識亜硝酸 (¹⁵N; 99 atom%)を添加した分離フザリウム培養液における主要な生成物は、¹⁵N¹⁵NO (MW=46)であり、共脱窒生成物である¹⁵N¹⁴NO (MW=45)は1%程度であった。根粒抽出液などの他の¹⁴N由来の有機窒素源を入れてもこの結果は変化しなかった。したがって、根圏分離フザリウムは微弱な共脱窒ポテンシャルを持つものの、主要な反応は、「2分子の亜硝酸から1分子のN₂O」であることが明らかとなった。

(3) 硝化細菌とフザリウムの共生

アンモニアを添加した培地に、N₂Oの生成能のある分離フザリウムと少量の根圏土壌を添加して培養したところ、アンモニアからN₂Oを生成する現象が一過的に観察されたものの、アンモニアをエネルギー源と窒素源、CO₂を炭素源とした安定した集積培養系は得られなかった。また、古細菌集積用の抗生物質群の添加でも同様であった。

(4) 非脱窒型フザリウムによるN₂O抑制

ダイズ根粒根圏から分離されたフザリウム株の内、FK1株は、亜硝酸および硝酸からのN₂O発生を示さない。そこで、FK1株の接種により根圏N₂O発生が抑制されるか否か、レオナルドジャーシステムを用いて検討を行ったところ、ポットから生成するN₂Oが有意に半減した。

(5) まとめ

本研究では、根粒根圏の糸状菌フザリウムによるN₂O生成に関して、幾つかのチャレンジングな研究を行い、以下の点について前進が得られた。

ダイズ根粒菌の種々の脱窒遺伝子変異体を駆使したポット実験により、亜硝酸を利用するカビ脱窒が当該根粒根圏で起こっているが明らかとなった。N₂O発生ダイズ根粒根圏からの単孢子分離を顕微鏡の下で行い、ITS(Internal Transcribed Sequence)解析の結果、12株のフザリウム分離株を得た。N₂O発生が起こっている圃場のおよびポットのダイズ根粒根圏における糸状菌群集構造解析の結果、単孢子分離で得られたフザリウム株が、圃場およびポットで優勢であった。フザリウム単離株12株中10株で亜硝酸からN₂Oの顕著なカビ脱窒反応が検出され

た。¹⁵N 標識亜硝酸を用いたトレーサー実験より、主に一分子の N₂O が二分子の亜硝酸から生成していることが明らかとなった。以上の結果より、ダイズ根粒根圏では亜硝酸利用型のカビ脱窒により N₂O 発生が実質的に起きていると結論された(図2)。以上の学術的な成果とともに、N₂O 生成能を示さないフザリウム接種により、根圏の N₂O 発生を削減できることが明らかとなった。以上の成果は、根圏糸状菌研究の新しい方向性を提示でき、現在論文公表の準備をしている。

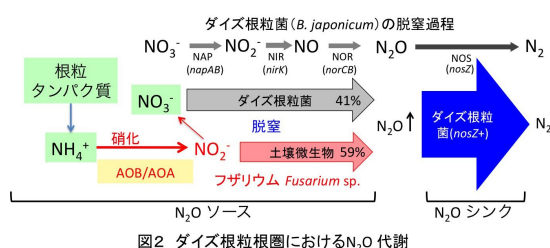


図2 ダイズ根粒根圏におけるN₂O代謝

引用文献

Maeda *et al.* 2015. N₂O production, a widespread trait in fungi. *Scientific Rep.* **5**, 9697.

Itakura *et al.* 2013. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Nature Climate Change* **3**, 208-212.

Inaba *et al.* 2012. N₂O emission from degraded soybean nodules depends on denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* and other microbes in the rhizosphere. *Microbes Environ.* **27**, 470-476.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

①南澤究. 食料生産・環境分野における微生物ゲノミクスの可能性と課題、生命医薬情報学連合大会 2015 年大会. 2015 年 10 月 30 日、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ(京都府宇治市)

②Kiwamu Minamisawa, Makoto Moriuchi, Keiichi Kusunuki, Fumio Ikenishi, Reiko Sameshima, Akira Nakagiri, Sakae Toyoda, Chie Katsuyama, Naohiro Yoshida, Yuichi Suwa. N₂O emission from soybean rhizosphere mediated by fungal denitrification, 20th European Nitrogen Cycle Meeting, 28 September 2015, Aberdeen (UK)

③Kiwamu Minamisawa, Cristina Sánchez, Makoto Moriuchi, Shoko Inaba, Manabu Itakura, N₂O emission from soybean rhizosphere and its mitigation based on N-cycle biology, 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 29 October 2014, Chengdu (China)

④森内真人、葛貫桂一、池西史生、板倉学、包智華、豊田栄、吉田尚弘、鮫島玲子、三井久幸、南澤究. アイソトポマー分析を利用した *Fusarium* 属糸状菌による根圏 N₂O 発生の特定、環境微生物系学会合同大会 2014. 2014 年 10 月 23 日、浜松アクトシティコンgresセンター(静岡県浜松市)

⑤南澤究. 微生物ゲノム情報を圃場で活かす—作物根圏からの温室効果ガス発生を制御するために—、平成 26 年度日本農学会シンポジウム. 2014 年 10 月 4 日、東京大学弥生講堂(東京都文京区)

⑥Makoto Moriuchi, Shoko Inaba, Fumio Ikenishi, Manabu Itakura, Masakazu Kikuchi, Shima Eda, Naohiko Chiba, Chie Katsuyama, Yuichi Suwa, Reiko Sameshima, Hisayuki Mitsui, Kiwamu Minamisawa. N₂O emission from soybean rhizosphere mediated partially by fungal denitrification by *Fusarium* species, 15th International Symposium on Microbial Ecology. 25 August 2014, Seoul (Korea)

〔図書〕(計 2 件)

① 按田瑞恵、南澤究、シーエムシー出版、難培養微生物研究の最新技術 III - 微生物の生き様に迫り課題解決へ、2015 年、261 (218-226)

② 南澤究、養賢堂、シリーズ 21 世紀の農学 ここまで進んだ! 飛躍する農学、2015 年、171 (85-102)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

南澤 究 (MINAMISAWA, Kiwamu)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 70167667