

水田土壌の窒素固定やメタン生成・消去を担う微生物の同定と応用

増田曜子（東京大学大学院農学生命科学研究科）
yokomasuda@g.ecc.u-tokyo.ac.jp, ygigico@gmail.com

はじめに

水田土壌の微生物は脱窒、アンモニア生成型異化的硝酸還元（DNRA）、窒素固定等の還元的窒素変換反応やメタン生成をはじめとした炭素代謝を駆動し、窒素肥沃度の維持や温室効果ガス（一酸化二窒素およびメタン）の生成・消去において重要な役割を担っている（図1）。

水田土壌において還元的窒素変換反応やメタン代謝を駆動している微生物群は、これまで微生物を土壌から分離・培養し生理性状解析を行う手法や、特定の反応に関わる酵素遺伝子をPCRにより増幅し配列解読するPCRベースの手法により解明が試みられてきた。しかしこれらの手法は、土壌微生物の大部分を占める分離・培養困難な微生物や、プライマー等のPCR条件に合わない微生物を見落とす可能性が高く、微生物の機能や多様性を低く評価する危険性をはらんでいた。そこで本研究では、環境中のRNA配列を網羅的に解読するメタトランスクリプトーム解析を導入し、水田土壌における還元的窒素変換反応やメタン代謝を駆動する微生物群の真の姿の解明を試みた。

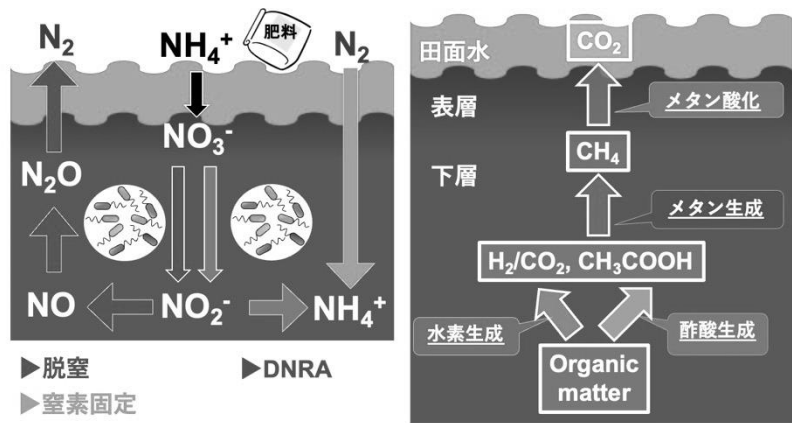


図1 水田土壌における還元的窒素変換反応とメタン代謝反応

水田土壌のメタトランスクリプトーム解析

水田土壌で活発に進行している還元的窒素変換反応は、脱窒、DNRA、および窒素固定である。脱窒反応はNO₃⁻ → NO₂⁻、NO₂⁻ → NO、NO → N₂O、N₂O → N₂の4ステップからなり、それぞれNar（硝酸還元酵素）、Nir（亜硝酸還元酵素）、Nor（一酸化窒素還元酵素）、Nos（一酸化二窒素還元酵素）により触媒される。水田土壌メタトランスクリプトーム解析の結果、nar, nor, および nos 転写産物において、これまでに多く用いられてきた分離・培養法やPCR法で見落とされてきたDeltaproteobacteria綱細菌由来のものが最も優占していることがわかった。一方でnir転写産物については、Beta-, Alpha-, Gammaproteobacteria綱のよく知られている脱窒菌由来のものがほとんどであった。脱窒反応は、これまでnirを保有し亜硝酸還元を行う微生物が単独で完結させていると考えられてきた。しかし本結果により、亜硝酸還元と一酸化窒素還元以降のステップは全く異なる細菌群により協奏的に行われている可能性が示された¹⁾。この協奏的脱窒反応については、同位体標識した亜硝酸を連続的に供給する室内系水田土壌マイクロゾムを構築し、脱窒反応が実際に起きている土壌においてどの細菌群がそれぞれの反応を駆動しているのかを明らかにすることで実証した²⁾。

DNRAは、脱窒の最初の反応と共通するNarおよびNrf（アンモニア生成型亜硝酸還元酵素）が触

媒する反応である。本解析では、*mrf* 転写産物についても Deltaproteobacteria 綱細菌由来のものが優占していることが明らかとなった。さらに驚くべきことに、*nif* (窒素固定酵素遺伝子) 転写産物の由来細菌叢においても、古くから水田土壌における主な窒素固定微生物として知られてきた光合成細菌である Cyaobacteria 門細菌や根圏に多く分布する Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria 綱細菌等ではなく、Deltaproteobacteria 綱細菌由来ものが優占していた¹⁾。

脱窒、DNRA、および窒素固定遺伝子転写産物の由来細菌として最も高頻度に検出された Deltaproteobacteria 綱細菌の大部分は、*Anaeromyxobacter* および *Geobacter* 属細菌であった。これらは土壌圏に普遍的に存在し水田土壌で優占している細菌であるが、主な機能は鉄還元であると考えられており、還元的窒素循環反応への関与はこれまで完全に見落とされてきた。メタトランスクリプトーム解析から初めて、これら鉄還元菌が亜硝酸還元以外の脱窒反応を駆動し、DNRA や窒素固定によりアンモニアを生成し、水田土壌からの硝酸溶脱・N₂O 排出の低減や窒素肥沃度の維持に寄与している可能性が見出された¹⁾。

メタン生成の基質となる酢酸や水素の生成は、acetyl-CoA decarbonylase/synthase (ACD/ACSS)、acetate kinase (AckA)、および [FeFe]/[NiFe] hydrogenase (Hyd/Hya) により触媒される。土壌からのメタン排出が活発な時期に、メタトランスクリプトーム解析によりこれらの酵素遺伝子転写産物の由来微生物叢を調べたところ、ACD/ACSS 遺伝子や *ackA* の転写産物は、Alpha-, Beta-, Deltaproteobacteria 綱および Acidobacteria 門細菌由来、*hyd/hya* 転写産物は Planctomycetes、Acidobacteria 門、および Deltaproteobacteria 綱細菌由来のものが高頻度に検出された³⁾。また、メタン生成を触媒する酵素である Methyl coenzyme M reductase (MCR) 遺伝子転写産物においては、酢酸利用型メタン生成アーキアでは *Methanosaeta* 属、水素利用型では *Methanocella* 属や *Methanoregula* 属アーキア由来のものが優占していた。さらに、メタン消去 (酸化) に関与する酵素である particulate methane monooxygenase (PMO) 遺伝子転写産物では、*Methylogaea* 属および *Methylocystis* 属細菌由来のものが表層土壌において高頻度に検出された。このように本研究は、メタン生成および消去に関与する微生物を初めて同時評価した³⁾ (図 2)。

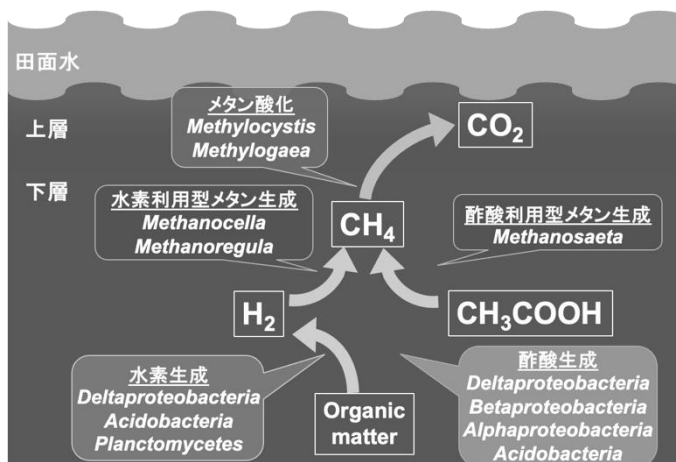


図 2. 水田土壌におけるメタン生成・消去に

鉄還元菌の窒素固定能の実証

水田土壌の窒素固定は主に鉄還元菌が駆動しているという新事実がメタトランスクリプトーム解析から示唆されたが、水田土壌の鉄還元菌が実際に窒素固定能を有しているのか、土壌環境中で窒素固定能を発揮できるのかは不明であった。これまで鉄還元菌は水田土壌の優占種であるにもかかわらず水田土壌からの単離例がなく、窒素固定能についてもほとんど着目されてこなかった。そこで、水田土壌からの鉄還元菌の単離および窒素固定能の検証を行った。

鉄還元菌の単離は、滅菌した水田土壌に生土試料を添加した培養系を用いた集積培養法により行った。その結果、*Anaeromyxobacter* 属および *Geobacter* 属細菌を複数株単離することに成功した^{4,5,6,7,8,9)}。単離した *Anaeromyxobacter* 属細菌をゲノム解読したところ、全てが窒素固定遺伝子クラスタを保有し

ていた。また、それらは窒素ガスのみを窒素源とした培地でも増殖し、窒素固定活性を示した。さらに、滅菌した水田土壌にそれらを接種したところ、土壌中でも窒素固定活性を示すとともに増殖することが確認できた。これらのことから、水田土壌の *Anaeromyxobacter* 属細菌が窒素固定能を有すること、水田土壌中で窒素固定能を発揮できることが明らかとなった。これは、*Anaeromyxobacter* 属細菌の窒素固定能を活性レベルで証明した初めての報告となった¹⁰⁾。

Anaeromyxobacter 属細菌と同時に *Geobacter* 属細菌も多数単離されたが、全ての単離菌株について記載種との相同性が低く、新種であることがわかった。さらに、ゲノム相同性や生理性状試験から、それらがこれまでの *Geobacter* 属とは異なること、系統樹上でも独立した系統群を形成することが明らかとなり、*Geomonas* 属、*Oryzomonas* 属および *Geomesophilobacter* 属を提唱した^{4,5,6,7,8)}。それらは全て窒素固定遺伝子を保有しており、培地中および水田土壌マイクロコズム中で窒素固定活性を示すことを確認した⁹⁾。

さらに、35年間にわたり窒素肥料無施用で慣行施肥の7割もの水稲収量を挙げ続けている長期試験水田において、土壌の窒素肥沃度維持に重要な窒素固定の主要な担い手として鉄還元窒素固定菌が機能していることも明らかにした¹¹⁾。

このように、水田土壌の鉄還元菌の窒素固定能を実証するとともに、鉄還元菌が窒素肥沃度維持の重要な担い手として水稲収量に影響を与えていることが明らかになった。

鉄還元菌窒素固定の増強

鉄還元菌の窒素固定活性を強化することにより、水田土壌の窒素肥沃度を向上させ、窒素肥料を減らした水稲生産技術につながると期待される。そこで、鉄還元菌が呼吸の電子受容体として利用する Fe^{3+} に着目し、水田土壌に Fe^{3+} を添加することで鉄還元菌の窒素固定活性を増強することを試みた。

本試験は、水田土壌を模した室内系マイクロコズムを用いて行った。マイクロコズムは、植物残渣を取り除いた水田土壌に、電子供与体を供給する稲わらと電子受容体である Fe^{3+} 化合物 (Fe_2O_3 または Ferrihydrite) を添加して作製した。それぞれの添加区における窒素固定活性や、鉄還元菌およびその他細菌群の窒素固定遺伝子の転写産物を測定した。その結果、「稲わら+ Fe_2O_3 」および「稲わら+Ferrihydrite」を添加した区では、 Fe^{3+} 化合物を添加しない区よりも窒素固定活性が有意に高まった¹²⁾。また窒素固定活性が高くなった区においては、鉄還元菌由来の窒素固定遺伝子の転写産物が検出された。一方で、これまで主に着目されてきた窒素固定菌由来のものは検出限界以下であった。このことから、水田土壌に稲わらと Fe^{3+} 化合物を添加することにより、鉄還元菌の窒素固定活性が上昇することが示唆された。また、水田圃場に農業用純鉄粉を施用し、酸化後に水稲栽培を行って水田土壌の窒素固定活性の増強効果を調べた。その結果、鉄粉施用区で無施用区と比較して窒素固定活性が有意に高くなることわかった (図3)。また、

一般的な窒素固定菌の窒素固定遺伝子コピー数に対する鉄還元菌の窒素固定遺伝子コピー数の比についても、鉄粉施用区において無施用区より大きかった。本結果は、一般的な窒素固定菌の菌数に対する鉄還元窒素固定

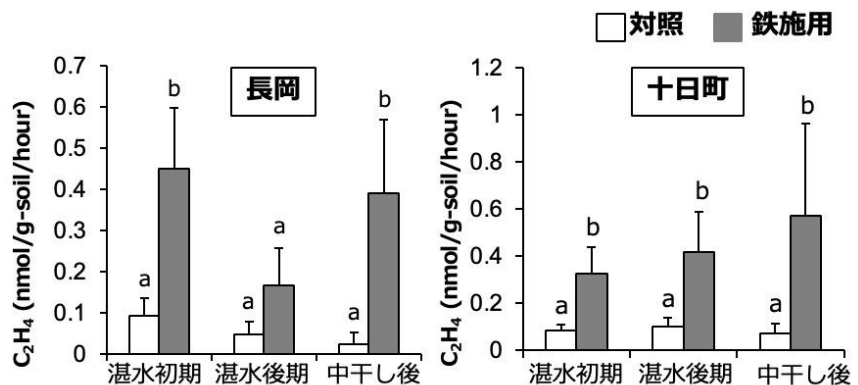


図3 鉄粉施用区と無施用区の水田土壌の窒素固定活性

菌の菌数が鉄の施用により上昇したことを意味する。これらのことから、圃場においても鉄酸化物の施用により水田土壌の窒素固定活性が増強され、鉄還元菌がその増強に寄与していることが示唆された¹²⁾。

さらに、圃場において鉄施用により鉄還元菌の窒素固定が上昇したことを直接的に証明するため、圃場から採取した土壌をバイアルびんに入れ、その気相部に安定同位体標識した¹⁵N₂および非標識の¹⁴N₂を封入して水田土壌マイクロゾムを作製した。この土壌マイクロゾムを6日間培養し、培養2, 4, 6日目に固定窒素量の定量ならびに¹⁵Nを取り込んだ細菌群の解析を行った¹³⁾。窒素固定菌は¹⁵Nを取り込むため、窒素固定菌由来のDNAは非窒素固定菌由来のものよりも比重が大きくなることを利用し、鉄粉施用区において窒素固定を行っている細菌群を特定した。その結果、鉄粉施用区において無施用区よりも土壌への固定窒素量が有意に多いこと、鉄施用区において*Anaeromyxobacter* 属、*Geomonas* 属、*Bacteroides* 属、*Geobacter* 属の鉄還元菌が窒素固定を行っていることが実証された¹³⁾。

このように、メタトランスクリプトーム解析による鉄還元窒素固定菌の発見に始まり、それを活用した低環境負荷型の水稲栽培技術の開発を試みた。今後も、実験室レベルの基礎研究だけでなく圃場での応用研究も行い、現場に普及できる農業生産技術の開発に貢献していきたい。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたり推薦を賜りました一般社団法人日本土壌肥料学会の藤原徹会長、信濃卓郎副会長ならびに関係者の皆様に深く御礼申し上げます。本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科および新潟県農業総合研究所で行われたものであり、実施にあたり多くの方々にご指導およびご協力を賜りました。特に東京大学大学院の妹尾啓史教授、産業技術総合研究所の伊藤英臣博士、新潟県農業総合研究所の白鳥豊博士ならびに大峽広智博士に心より謝意を表します。また、本研究を遂行する上でご支援およびご協力いただきました研究室関係者および共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Masuda Y., Itoh H., Shiratori Y., Isobe K., Otsuka S., and Senoo K.: *Microbes Environ* 32:180-183 (2017).
- 2) Masuda Y., Matsumoto T., Isobe K., and Senoo K. *Soil Sci Plant Nutr* 65:342-345 (2019).
- 3) Masuda Y., Itoh H., Shiratori Y., and Senoo K.: *Soil Sci Plant Nutr* 64:455-464 (2018).
- 4) Xu Z., Masuda Y., Itoh H., Shiratori Y., and Senoo K.: *Front Microbiol* 10:2201 (2019).
- 5) Xu Z., Masuda Y., Hayakawa C., Ushijima N., Shiratori Y., Senoo K., and Itoh H.: *Microorganisms* 8:634 (2020).
- 6) Itoh H., Xu Z., Masuda Y. et al.: *Int J Syst Evol Microbiol* 71: 004607 (2020).
- 7) Zhang Z., Xu Z., Masuda Y. et al.: *Syst Appl Microbiol* 44:126233 (2021).
- 8) Xu Z., Masuda Y., Wang X. et al.: *Front Microbiol*. 12:737531 (2021).
- 9) Itoh H., Xu Z., Mise K. et al.: *Int J Syst Evol Microbiol* 72: 005546 (2022).
- 10) Masuda Y., Yamanaka H., Xu Z. et al.: *Appl Environ Microbiol* 86: e00956-20 (2020).
- 11) Masuda Y., Satoh S., Miyamoto R., et al.: *Arc Microbiol* 205:291 (2023).
- 12) Masuda Y., Shiratori Y., Ohba H., et al.: *Soil Sci Plant Nutr* 67:243-247 (2021).
- 13) Zhang Z., Masuda Y., Xu Z., Shiratori Y., Ohba H., and Senoo K.: *Appl Science* 13:8156 (2023).