

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏名 吉田 愛美
指導教員名 妹尾 啓史

論文題名

機能遺伝子配列情報を用いた水田土壌の脱窒菌群集構造解析

1. 研究の背景

脱窒は、嫌氣的条件下で硝酸や亜硝酸が還元され、最終生成物として一酸化窒素(NO)、一酸化二窒素(N₂O)、窒素(N₂)ガスが生成される微生物反応である。脱窒は環境中の様々な場所で起こっており、窒素肥料が添加される農耕地もその一つである。農耕地における脱窒は、施肥窒素の損失につながることや、温室効果ガスである N₂O の生成・消去にも関わることから、古くより注目されてきた。

水田は畑地に比べてN₂Oの発生が少なく、また、地下水の汚染につながる硝酸の溶脱も少ないことが知られている。これは、水田では湛水期間中に土壌が還元状態となり、脱窒反応が活発に起こることに由来すると考えられる。水田で脱窒に関与する微生物を特定することは、学術的に重要であるだけでなく、畑地からのN₂O発生を抑制する技術や、硝酸汚染された地下水の浄化技術への応用が期待できる。しかし、水田で活発に脱窒を行っている微生物についてこれまでに得られている知見は少ない。

土壌微生物の大半は培養が困難とされていることから、水田土壌の脱窒菌群集構造を明らかにする上で、まず、土壌 DNA に基づく培養非依存的な解析が有効であると思われた。さらに近年では、土壌から純度の高いRNAを抽出する手法が確立され、土壌RNAに基づく解析も可能となってきた。加えて、脱窒機能遺伝子である亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirS*, *nirK*)や一酸化二窒素還元酵素遺伝子(*nosZ*)を標的とし幅広くカバーするPCRプライマーが開発され、既知の微生物や環境中から得られた脱窒機能遺伝子を含むデータベースも充実してきている。すなわち、現在、土壌DNAやRNAを用いた土壌脱窒機能遺伝子を標的とした培養非依存的な手法を用いることにより、水

田土壌に存在し、機能する脱窒菌群集を調べる事が可能な状況となっている。

以上の背景の下、本研究は、水田土壌中で脱窒を担っている微生物の群集構造を培養非依存的な手法によって詳細に解明することを目的とした。この目的を達成するために、脱窒活性を高めた実験室内のモデル水田土壌ならびに水田圃場の土壌より DNA と RNA を抽出し、それらを材料として脱窒機能遺伝子を標的とした PCR ベースの解析を行った。

2. 実験室内モデル水田土壌における脱窒菌群集構造

再現性が高く繰り返し実験が容易となるよう、水田の実験室内モデル水田による解析をまず行った。東大農学部附属生態調和農学機構の水田から採取され、保存されていた風乾細土(黒ボク土)を湛水状態で前培養し、硝酸とコハク酸を添加してさらに嫌氣的に培養し、土壌の脱窒活性を高めた。培養前後の土壌それぞれから DNA を抽出し、脱窒の亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirS*, *nirK*)を標的とした定量的 PCR ならびに PCR-クローンライブラリ解析を行った。土壌中の *nirS* のコピー数や多様性指数は培養によって変化しなかったが *nirS* の組成は変化し、その変化から *Acidovorax* 属, *Azoarcus* 属, *Kocuria* 属, および *Cupriavidus* 属の *nirS* に近縁な *nirS* を保有する微生物が本実験条件の土壌で脱窒に関わっている可能性が示唆された。また、既知の *nirS* とは近縁でない *nirS* を保有する微生物が多く存在し、その一部も脱窒に関与していることが示唆された。一方、*nirK* のコピー数や多様性指数は土壌の培養によって増加した。また、*nirK* の組成も土壌の培養によって変化し、*Bradyrhizobium* 属, *Rhodopseudomonas* 属, *Nitrosospira* 属などの *nirK* に近縁な *nirK* を保有する微生物の他、既知の脱窒菌のものと近縁でない *nirK* を保有する微生物がこの土壌で脱窒に関わっていることが示唆された。本実験から脱窒機能遺伝子を標的とした定量的 PCR ならびに PCR-クローンライブラリ解析によって水田土壌の脱窒菌の量と群集構造の変動を解析することができた。次に、この手法を水田圃場を対象とした解析に適用することにした。

3. 水田圃場の脱窒菌群集構造解析

上述の生態調和農学機構の水田圃場から、湛水直前、湛水二週間後、一か月後、二か月後に表層 10 cm の土壌を採取した。土壌 DNA を抽出して上述と同様に *nirS* と *nirK* を標的とした定量的 PCR と PCR-クローンライブラリ解析を行い、土壌の湛水後の時間経過に伴う *nirS*, *nirK* の量と群集構造の変動を調べた。

定量的 PCR の結果、水田土壌に含まれる *nirS* のコピー数は、調査期間内に大きな変化を示さなかった。*nirK* は *nirS* の 10 倍程度のコピー数が存在し、湛水後に若干増加したが後に減少した。クローンライブラリ解析から、どの時期の土壌においても *nirK* は多様であり、既知の *nirK* とは異なる *nirK* を保有する微生物が存在していることが示された。採取時期ごとに *nirS* ならびに *nirK* の組成を比較した結果、脱窒が活発に行われていると考えられる湛水後の時期に出現する、あるいは存在量が増加する *nirS*, *nirK* 保有微生物群が見出された。それらは、*Aromateium* 属, *Azoarcus* 属, *Acidovorax* 属, *Dechloromonas* 属, *Azosprillum* 属の *nirS* に近縁な *nirS* 保有微生物、あるいは既知のものと近縁でない *nirS* または *nirK* を保有する微生物であり、これらが水田土壌において脱窒

に強く関わっている可能性が示された。

4. 実験室内モデル水田土壌における脱窒機能遺伝子の発現解析

土壌で実際に活動している脱窒菌をより直接的に明らかにするために、土壌 RNA を解析対象とし、脱窒機能遺伝子を発現している微生物の特定を試みた。安定した土壌 RNA 抽出が可能だった新潟県農業総合研究所の水田土壌(灰色低地土)を材料とした。湿潤土壌を用いて上述と同様の実験室内モデル水田を構築し、培養 0, 6, 12, 16, 20, 24 時間後の土壌から DNA と RNA を抽出し、RNA は逆転写して cDNA とした。それらを鋳型とし、16S rRNA 遺伝子, *nirS*, *nirK*, *nosZ*, およびその cDNA を標的とした定量的 PCR を行い、遺伝子コピー数ならびに遺伝子の発現量の定量と PCR-クローンライブラリ解析を行った。

定量的 PCR の結果、16S rRNA 遺伝子と各脱窒機能遺伝子のコピー数は土壌の培養時間の経過に伴って増加した。これらの遺伝子の発現量も徐々に増加したが、脱窒活性が最大となる培養 20 時間後に最大となった後、減少する傾向を示した。

培養 0 時間後ならびに各遺伝子の発現量が最大となった培養 20 時間後の土壌から得た DNA ならびに cDNA からそれぞれクローンライブラリを作成し、得られた塩基配列およびアミノ酸配列から多様性解析を行った。16S rRNA 遺伝子を標的とした解析の結果、脱窒が活発な培養 20 時間後の土壌中では *Betaproteobacteria* 綱と *Acidobacteria* 門、特に *Betaproteobacteria* 綱の *Neisseriales* 目に属する微生物の活性が高まっていることが示された。脱窒機能遺伝子を標的とした解析の結果、脱窒機能遺伝子を発現している微生物は土壌に存在している脱窒機能遺伝子保有微生物のごく一部であることが示された。また、脱窒活性が高い土壌で *nirS* を発現しているのは、*Betaproteobacteria* 綱に属する *Cupriavidus* 属, *Pseudogulbenkiania* 属, *Burkholderia* 属, *Thiobacillus* 属, *Azoarcus* 属の *nirS* に近縁な *nirS* 保有微生物と、未知の *nirS* を保有する微生物であることが示された。一方、発現されている *nirK* の多様性指数は極めて小さく、*Alphaproteobacteria* 綱に属する *Bradyrhizobium* 属および *Rhodopseudomonas* 属の *nirK* に近縁な *nirK* のみが発現されていることが明らかになった。また *nosZ* を標的とした解析から *Betaproteobacteria* 綱に属する *Thiobacillus* 属, *Aromateleum* 属, *Burkholderia* 属, *Pseudogulbenkiania* 属の *nosZ* に近縁な *nosZ* と既知のものと異なる *nosZ* が発現されていることが示された。

5. 水田圃場における脱窒機能遺伝子の発現解析

上述の新潟県農業総合研究所の水田圃場から経時的に採取した土壌に由来する DNA および cDNA の試料から、湛水 2 週間後、すなわち Eh が低下する途中にあり、土壌の脱窒活性ポテンシャルが高まっている時期、および 5 週間後、すなわち Eh が下がりきり、メタン生成が始まっているが依然として土壌の脱窒活性ポテンシャルが高い時期の、2つの時期の DNA 試料と、湛水前、すなわち土壌 Eh が高く脱窒活性ポテンシャルが低い時期を加えた3つの時期の cDNA 試料を選び、*nirS*, *nirK* を標的としたクローンライブラリ解析を行った。

湛水後の土壌の cDNA から得られた *nirS*, *nirK* クローンの多様性指数は DNA から得られた両クローンの多様性指数よりも小さかった。土壌中に存在している *nirS*, *nirK* 保有微生物のうち、実際にそれらの遺伝子を発現している微生物は一部であることが示された。湛水後の土壌中で発現している *nirS* の大部分は既知の脱窒菌の *nirS* とは近縁でないものであり、既知の脱窒菌の *nirS* に近縁なものとしては、*Thiobacillus* 属の *nirS* に近縁な *nirS* の発現が湛水 5 週間後の土壌でわずかに検出されたのみであった。湛水後の土壌中で発現していた、すなわち cDNA 由来の *nirK* クローンの大部分は *Bradyrhizobium* 属および *Rhodopseudomonas* 属の *nirK* に近縁だった。しかし、この *nirK* クローンが土壌 DNA 由来のクローンに占める割合は低かった。逆に、土壌 DNA 由来のクローン中では *Mesorhizobium* 属の *nirK* に近縁な *nirK* クローンが優占していたが、この *nirK* の土壌での発現は検出されなかった。

水田圃場の土壌と実験室内のモデル水田土壌から得られた結果から、以下の考察が導かれた。まず新潟水田土壌においては、湛水後の水田土壌、および脱窒活性が高まったモデル水田土壌のいずれにおいても、*Bradyrhizobium* 属および *Rhodopseudomonas* 属の *nirK* に近縁な *nirK* の発現が見出されたことから、これらの *nirK* を保有する微生物が脱窒を担っている主要な微生物の一部であることが示唆された。また、湛水後の水田土壌で発現していた *nirS* は、脱窒活性が高まったモデル水田土壌で発現していた *nirS* の一部と近縁であった。この *nirS* を保有する微生物も新潟水田土壌で脱窒を担っている主要な微生物の一部であることが示唆された。

6. まとめ

本研究では、まず脱窒機能遺伝子を標的とした培養非依存的な解析を行い、東大生態調和農学機構および新潟県農業総合研究所の水田土壌に存在する *nirS* および *nirK* が既知のどの微生物と近縁であるか明らかとなり、また既知のものと異なる新規な *nirS* および *nirK* の存在も示された。

さらに、本研究が行われた土壌圏科学研究室に蓄積している様々な脱窒菌分離株の 16S rRNA 遺伝子や脱窒機能遺伝子の情報との比較解析を行い、本研究で検出された *nirS*, *nirK*, *nosZ* を保有する脱窒菌を推定することを試みた。その結果、生態調和農学機構や新潟の土壌から得られた新規な *nirS* を保有している脱窒菌は *Bradyrhizobium* 属や *Pseudogulbenkiania* 属であり、新潟土壌で発現している *nirK* を保有している脱窒菌は *Bradyrhizobium* 属であり、また新潟土壌で発現している *nosZ* を保有している脱窒菌は *Zoogloea* 属であると推定された。

1. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 41, pp. 2044-2051 (2009)
2. *nirK*-Harboring denitrifiers are More responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harboring bacteria. *Microbes and Environments*, Vol. 25, pp. 45-48 (2010)