

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成26年度博士課程進学  
氏名 増田 曜子  
指導教員名 妹尾 啓史

論文題目 水田土壌の窒素循環を担う微生物群集の  
オミクス法を用いた網羅的解析

### 第1章 序論

湛水下の水田土壌においては、田面水によって大気中の酸素が供給されにくくなり、鉛直方向に酸素濃度の勾配が生じる。田面水に接する表層土壌は比較的高い酸素濃度が保たれ酸化的な環境（酸化層）が維持される一方、表層土よりも下層では酸素濃度が著しく低い嫌氣的な環境（還元層）が発達する。嫌氣的環境下では、土壌中の窒素循環に関わる各還元反応、すなわち、硝酸や亜硝酸が一酸化二窒素や窒素ガスに還元される脱窒、硝酸がアンモニアに還元されるアンモニア生成型硝酸還元(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium, DNRA)、窒素ガスがアンモニアに変換される窒素固定が活発に進行する。この水田土壌で特徴的に見られる活発な還元的窒素循環反応が、畑土壌では見られない「硝酸の低溶脱」「窒素肥沃度の維持」といった水田土壌の環境保全性ならびに持続的生産性の基柱と考えられている。したがって、これらの反応を駆動する微生物群を明らかにすることは、学術的に重要であるのみならず、環境負荷が少なく持続的な農業生産につながる知見が得られると期待される。

水田土壌の還元的窒素循環に関わる微生物群を明らかにするために、土壌 DNA を用い各反応の機能遺伝子を PCR 増幅して微生物の多様性を推定する手法がこれまでに多く用いられてきた。しかしながら、近年急速に拡充されつつある微生物ゲノム解読により、還元的窒素循環関連遺伝子はこれまでよりもはるかに広範な分類群の微生物に保存されていることが明らかとなっている。このことから、従来の PCR ベースの解析手法では、プライマーのミスマッチにより多様性を著しく過少評価してしまう可能性が指摘されている。こうした問題を回避し網羅的な解析を行うため、PCR を介さないメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析法（オミクス法）が用いられるようになってきた。水田土壌においてもオミクス解析が導入されるようになってきたものの、データ量が小

規模である上、還元的窒素循環反応にフォーカスしその詳細を議論した研究例は無く、これらの反応を担う微生物に関する包括的な理解は未だ達成されていない。

そこで本研究では、水稻栽培期間の水田土壌の酸化層や還元層について大規模なオミクス解析を行い、水田土壌において特徴的な還元的窒素循環反応（脱窒、DNRA、窒素固定）に焦点をあて、それら機能遺伝子量・転写量ならびに多様性・局在を解析し、水田土壌の活発な還元的窒素循環反応の駆動力となる微生物群の全貌解明を試みた。

## 第2章 新潟水田土壌における還元的窒素循環反応に関わる微生物群集の概観

新潟県農業総合研究所内の水田において、2012年の湛水直後から収穫後にかけての5つの時期（湛水直後・2週間後・中干し前・間断灌漑期・落水期）に土壌コアを採取した。還元層が最も発達する中干し前の土壌の酸化層・酸化層直下・還元層（X層・Y層・Z層）の位置を土色に基づいて決定し、他の時期の土壌についても同位置を分取した。土壌の還元進行の指標となる $Fe^{2+}$ 濃度は湛水期のZ層において最も高く、分取が適切であったことが示された。分取した全ての土壌からRNAを抽出し、次世代シーケンサーに供して塩基配列を取得し、各データベースに対して相同性検索を行った。

rRNA配列情報に基づく土壌の細菌群集構造解析の結果、全ての時期において *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占していた。中でも、最も還元状態が発達する湛水期のZ層土壌においては嫌気性細菌の *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌、好気的環境となる落水期においては好気性細菌の *Chondromyces* 属、*Sorangium* 属細菌が優占していることが明らかになった。

一方、本解析で得られた mRNA の配列数が少数であったことから、窒素循環反応に関わる微生物群集構造の解析は全てのサンプルから得られた配列をまとめて行った。硝酸還元は *Alpha-*, *Beta-*, *Deltaproteobacteria* 綱細菌、亜硝酸還元は *Thaumarchaeota* 門古細菌・*Betaproteobacteria* 綱細菌、一酸化窒素還元と一酸化二窒素還元は *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の mRNA が高頻度に検出された。また、DNRA 遺伝子の mRNA については、古くから DNRA 細菌として見出されてきた *Firmicutes* 門や *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来のものではなく、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものが高頻度に検出された。さらに、窒素固定遺伝子の mRNA については、従来法でもよく検出されてきた光合成細菌や根圏細菌由来ものだけでなく、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものも高頻度に検出された。これらの結果から、水田土壌では *Deltaproteobacteria* 綱細菌が脱窒、DNRA、窒素固定に関与している可能性が示された。

### 第3章 新潟水田土壌のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析

第2章において見出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌の還元的窒素循環反応への関与をより詳細に解析・検証するために、湛水期ならびに落水期の X 層、Z 層土壌を解析対象とし、メタゲノム解析とともに土壌サンプルあたりのシーケンス量を増やしたメタトランスクリプトーム解析を行った。

脱窒反応（亜硝酸→一酸化窒素→一酸化二窒素→窒素ガス）の各ステップを触媒する亜硝酸還元酵素、一酸化窒素還元酵素、一酸化二窒素還元酵素の各遺伝子 (*nir*, *nor*, *nos*) とその転写産物を調べたところ、*nir* は脱窒菌としてよく知られた *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来のものが検出された一方、*nor* や *nos* はこれまでの研究ではほとんど検出例がない *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌由来のものが脱窒菌由来のものよりも極めて高頻度に検出された。これらのことから水田土壌における脱窒反応は、亜硝酸還元を行う細菌群（従来の脱窒菌）だけで完結するのではなく、一酸化窒素還元、一酸化二窒素還元を行う *Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌が部分的に関与することによって「協奏的に」進行していることがはじめて示唆された。

DNRA の鍵酵素遺伝子とその転写産物についても、*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌由来のものが高頻度に検出された。さらに驚くべきことに、古くから水田の主要な窒素固定細菌として考えられてきた光合成細菌の窒素固定遺伝子よりも、これまでほとんど検出例のない *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌の窒素固定遺伝子の方がはるかに高頻度に転写されていることが明らかとなった。これらのことから *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌が DNRA や窒素固定によってアンモニアを生成している可能性が高く、*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌が水田土壌の窒素肥沃性の維持に寄与していることがはじめて示唆された。

### 第4章 全国の水田土壌、畑・雑草地・森林土壌、底泥のメタゲノム解析

第2章・第3章では、新潟水田土壌において *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌が還元的窒素循環反応を主導している可能性を示した。第4章では、水田を含む様々な環境の土壌を解析対象とし、新潟水田において示された知見の一般性を確認した。

土壌サンプルとして、日本全国の4カ所の水田土壌、4カ所の畑・雑草地・森林土壌、4カ所の底泥を用いた。これら土壌中の *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌の 16 rRNA 遺伝子量を定量 PCR 法により調べた。また各土壌から DNA を抽出しメタゲノム解析を行った。

定量 PCR の結果から、*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌は畑・雑草地・森林土壌

よりも水田土壌や底泥において優占度が高いことが明らかになった。メタゲノム解析の結果から、脱窒、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の検出頻度は、水田が最も高く、続いて底泥、畑・雑草地・森林土壌であった。また、一酸化窒素還元、一酸化二窒素還元、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の群集構造については、畑・雑草地・森林土壌と比較して水田土壌や底泥において *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌の優占度が高かった。これらのことから、還元的窒素循環反応は水田土壌においてポテンシャルが高く、新潟水田以外の水田土壌や底泥においても、*Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌がこれらの反応のキープレイヤーである可能性が示された。

## 第5章 総合考察

本研究により、*Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌が水田土壌の脱窒、DNRA、窒素固定反応を主導している可能性が示された。*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌はこれまで水田土壌に普遍的に優占する鉄還元菌であることが知られているが、従来の PCR ベースの解析において、環境中からこれら鉄還元菌の還元的窒素循環関連遺伝子が検出された例はほとんどない。これら鉄還元菌の還元的窒素循環関連遺伝子について、従来 PCR ベースの解析で用いられてきたプライマーのミスマッチを調べたところ、顕著なミスマッチがないものも見つかった。そこで GC 含量を調べたところ、これら鉄還元菌の窒素固定遺伝子は他の細菌由来の遺伝子に比べて GC 含量が高く、PCR 増幅されにくいことが考えられた。ミスマッチのないプライマーを用いても *Anaeromyxobacter* 属細菌の一酸化二窒素還元酵素遺伝子は増幅されないことも報告されている。このことから、水田土壌中に優占しているにも関わらず *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌の還元的窒素循環関連遺伝子が検出されてこなかった理由として、プライマーのミスマッチだけでなく、GC 含量の高さが考えられた。なお、これまでに *Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌はほとんどの還元的窒素循環反応において活性を保有することが報告されている。したがって、*Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌が実際に土壌中の還元的窒素循環反応において活性を発揮している可能性は高い。

本研究は、水田土壌の窒素循環を駆動する微生物群集構造に関する知見を大きく刷新し、生態系における *Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌の新たな機能を提唱するものである。これまで水田土壌の優占種でありながら還元的窒素循環反応への関与がほとんど議論されてこなかった鉄還元菌こそが、脱窒反応の一部を担って亜硝酸や窒素ガスを生成し、DNRA や窒素固定によってアンモニアを生成している可能性が高く、それらが水田土壌の硝酸溶脱の低減や窒素肥沃度の維持に大きく寄与していることが示唆された。