

博士論文

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

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻

平成 20 年度 博士課程 進学

吉田愛美

指導教員 妹尾啓史

第一章 背景と目的	p. 1
1-1 窒素循環	p.1
1-2 脱窒	p.1
1-3 環境における脱窒	p.3
1-4 水田における脱窒	p.3
1-5 環境中の脱窒菌の解析手法	p.5
1-6 本研究の目的	p.6
第二章 実験室内モデル水田土壌における脱窒菌群集構造解析	p.11
2-1 緒言	p.11
2-2 実験方法	p.12
2-2-1 供試土壌	p.12
2-2-2 実験室内モデル水田土壌のインキュベーション	p.12
2-2-3 DNA 抽出	p.12
2-2-4 PCR 反応	p.13
2-2-5 クローンライブラリ作製とシーケンス	p.13
2-2-6 系統解析	p.14
2-2-7 定量的 PCR	p.15
2-2-8 アクセッション番号	p.15
2-3 結果と考察	p.15
2-3-1 NirS の系統解析	p.15
2-3-2 NirK の系統解析	p.18
2-3-3 まとめ	p.20
第三章 水田圃場の脱窒菌群集構造解析	p.27
3-1 緒言	p.27
3-2 実験方法	p.27
3-2-1 供試土壌とサンプリング	p.27
3-2-2 DNA 抽出	p.28
3-2-3 PCR、クローンライブラリ作製とシーケンス、 系統解析、定量的 PCR	p.28
3-2-4 アクセッション番号	p.28
3-3 結果と考察	p.28
3-3-1 nirS, nirK の定量的 PCR	p.28
3-3-2 NirS の系統解析	p.29
3-3-3 NirK の系統解析	p.31

3-3-4	実験室内のモデル水田土壌との比較-NirS	p.33
3-3-5	実験室内のモデル水田土壌との比較-NirK	p.35
3-3-6	まとめ	p.35
第四章	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	p.46
4-1	緒言	p.46
4-2	実験方法	p.47
4-2-1	供試土壌とサンプリング	p.47
4-2-2	実験室内モデル水田土壌のインキュベーション	p.47
4-2-3	DNA 抽出	p.47
4-2-4	RNA 抽出・逆転写	p.48
4-2-5	定量的 PCR	p.48
4-2-6	PCR	p.49
4-2-7	クローンライブラリ作製とシーケンス	p.49
4-2-8	系統解析	p.50
4-2-9	アクセッション番号	p.50
4-3	結果と考察	p.50
4-3-1	定量的 PCR	p.50
4-3-2	16S rRNA の系統解析	p.52
4-3-3	NirS の系統解析	p.54
4-3-4	NirK の系統解析	p.57
4-3-5	NosZ の系統解析	p.58
4-3-6	まとめ	p.60
第五章	水田圃場における脱窒機能遺伝子の発現解析	p.71
5-1	緒言	p.71
5-2	実験方法	p.71
5-2-1	供試土壌	p.71
5-2-2	核酸抽出	p.72
5-2-3	PCR、クローンライブラリ作製とシーケンス、 系統解析、定量的 PCR	p.72
5-2-4	アクセッション番号	p.72
5-3	結果と考察	p.73
5-3-1	定量的 PCR	p.73
5-3-2	NirS の系統解析	p.73
5-3-3	NirK の系統解析	p.75

5-3-4	実験室内のモデル水田土壌との比較-NirS	p.78
5-3-5	実験室内のモデル水田土壌との比較-NirK	p.80
5-3-6	まとめ	p.82
第六章	総合考察	p.93
6-1	研究目的と戦略の概要	p.93
6-2	解析方法と結果	p.94
6-2-1	NirS の系統解析とクラスター分類結果	p.94
6-2-2	NirK の系統解析とクラスター分類結果	p.96
6-2-3	NosZ の系統解析とクラスター分類結果	p.97
6-3	考察	
6-3-1	生態調和機構水田土壌ならびに新潟農総研水田土壌の NirS, NirK 配列の群集組成の比較	p.98
	• NirS	p.98
	• NirK	p.100
6-3-2	本研究で見出された脱窒機能遺伝子を保有する脱窒菌の推定	p.101
	• 生態調和機構の水田土壌から見出された nirS を保有する脱窒菌	p.101
	• 生態調和機構の水田土壌に存在する nirK を保有する脱窒菌	p.103
	• 新潟農総研の水田土壌で発現している nirS を保有する脱窒菌	p.103
	• 新潟農総研の水田土壌で発現する nirK を保有する脱窒菌	p.105
	• 新潟農総研の水田土壌に存在する nosZ を保有する脱窒菌	p.106
	• 新潟農総研の水田土壌で発現する nosZ を保有する脱窒菌	p.107
6-4	まとめ	p.107
	参考文献	p.122
	謝辞	p.129

第一章 背景と目的

1-1 窒素循環

窒素は、物理的・生物的な作用を受けてその形態を変えて環境中を循環している(図 1-1)。窒素(N_2)は安定な分子で、大気中に約 80%存在しているが、大気中での放電による反応、ハーバーボッシュ法による化学合成の他、窒素固定細菌による反応によってアンモニアに変換される(窒素固定)。固定されたアンモニアは、アンモニア酸化細菌・古細菌によって亜硝酸に変換された後、硝化菌の作用により亜硝酸や硝酸へと変換される(硝化)。

アンモニアと硝酸は植物や微生物に吸収された後、アミノ酸などの有機態窒素へと合成され、食物連鎖によって動物へと移行する。動植物の糞や遺体が分解されると、有機態窒素はアンモニアへと分解される(アンモニア化成)。分解されたアンモニアの一部はそのまま、もしくは硝化されて硝酸として再び植物や微生物に同化される。しかし、硝酸の一部は脱窒微生物により還元され、ガス状窒素(NO 、 N_2O 、 N_2)として大気中に戻る(脱窒)。また、近年、亜硝酸からアンモニアへ変換される Dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA)、カビによる共脱窒、アンモニアと亜硝酸から窒素を生成する嫌氣的アンモニア酸化(anammox)の反応が発見され、窒素循環に関わっていることが明らかになった。

1-2 脱窒

1-1 で述べたとおり 脱窒は、窒素循環の最終段階として、嫌氣的条件下で環境中の硝酸や亜硝酸を還元し、最終生成物としてガス状の一酸化窒素(NO)や一酸化二窒素(N_2O)、窒素(N_2)として大気に放出する反応である。この反応は、硝酸、亜硝酸、一酸化窒素、一酸化二窒素、窒素の順に段階的に還元されていく(図 1-2)。それぞれの還元反応は段階毎に異なる酵素によって触媒されている。

脱窒の第一段階の反応である硝酸から亜硝酸への還元は、narG によってコードされる膜結合型

の硝酸還元酵素(NarG)、napA によってコードされるペリプラズム酵素である硝酸還元酵素(NapA)によって触媒される。細菌によっては narG, napA の両方を持つものも存在している(Richardson et al., 2007)。

亜硝酸から一酸化窒素へは、亜硝酸還元酵素(Nir)によって還元される。亜硝酸還元酵素は nirS によってコードされ、活性中心にヘム c とヘム d1 を含む NirS と nirK によってコードされ活性中心に銅を含有する NirK の、構造が異なるが機能は同じ二種類の酵素が存在する。この二種類の酵素を同時に持つ微生物は存在しないとされている(Rinaldo et al., 2007)。

一酸化窒素から一酸化二窒素への還元は、一酸化窒素還元酵素 Nor によって触媒される。Nir と同様に、Nor にも構造が異なるが機能が同じ酵素が存在する。シトクロム bc 複合体の dNor、キノンを電子供与体とする qNor、dNor と qNor の両方の特徴を持つ qCuANOR が存在する(Vries et al., 2007)。

脱窒の最終段階である一酸化二窒素から窒素への還元は nosZ によってコードされる一酸化二窒素還元酵素(NosZ)によって触媒される。NosZ は活性中心に銅を必要とし、酸素によって活性が阻害される(Zumft et al., 2007)。nosZ を保有する微生物の割合が、脱窒によって発生する N₂O の割合に関与していることが示唆されている(Philippot et al., 2009)。

脱窒を行う微生物は、土壌や水系に存在する微生物のうちの約 10-15%を占めているといわれている(Casella et al., 1996)。Gamble et al. (1977)により、脱窒を行う微生物として、様々な土壌から Pseudomonas 属、Cupriavidus 属、Flavobacterium 属などが分離された他、Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱の多くの微生物が脱窒機能を持つことが明らかとなった (Zumft, 1997)。また、土壌 DNA に含まれる脱窒機能遺伝子の解析から、Achromobacter 属、Agrobacterium 属、Alcaligenes 属、Azospirillum 属、Bacillus 属、Flavobacterium 属、Paracoccus 属、Pseudomonas 属、Bradyrhizobium 属 (Bothe et al., 2000)などの多様な脱窒菌が土壌に生息している事が示されている。近年は細菌だけでなく、古細菌(Zumft, 1997; Cabello et al., 2004)、カビや酵母(Kobayashi et al., 1996; Shoun et al., 1992 ; Tanimoto et al., 1992; Tsuruta et al., 1998)にも脱窒を行うものが

明らかになり 脱窒機能を持つ微生物は多岐に渡っている。

1-3 環境における脱窒

脱窒は、海洋、湖沼、河川、森林、草地など、様々な環境で起こっている。脱窒は、陸水域からの硝酸の除去に重要である一方、農地においては添加した肥料が大気中に放出され、作物が利用できる窒素が減少するという問題がある。さらに、脱窒経路の生成物の一つである N_2O は、大気中で安定であり CO_2 の 296 倍の温室効果(Global Warming Potential, GWP)がある上、 N_2O の分解産物である NO と NO_2 はオゾン層を破壊する事が知られている(IPCC, 2007)。大気中の N_2O 濃度は近年急激に増加し地球環境問題となっている。 N_2O の発生源として、農地土壌、家畜排泄物の処理過程、化石燃料の燃焼、廃棄物の燃焼、ナイロンの製造過程などが知られているが、脱窒が N_2O 発生に占める割合が非常に大きい(Conrad, 1996)。農地では、脱窒に必要な炭素源、及び窒素が植物や肥料によって土壌に供給されるため、降雨後などに土壌が嫌気的条件になると脱窒が活発に起こる。窒素肥料の使用量は 1950 年頃から急激に増加し、2000 年にはその使用量は 10 倍以上に増えている(文部科学省、平成 12 年版科学技術白書。http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/html/hpaa200001/index.html)。土壌に添加された大量の肥料によって N_2O 発生が増加していると考えられている。2009 年に日本で発生した N_2O の 26%が農耕地由来(環境省、<http://www.env.go.jp/earth/ondanka/ghg/2009yoin-3.pdf>)、2009 年にアメリカで発生した N_2O の 69.2%が農耕地由来(EPA, 2011)であり 農地からの N_2O の放出が問題となっている(IPCC, 2001; IPCC, 2007)。

1-4 水田における脱窒

イネは、日本の耕地面積の 54% (政府統計、<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001074725>)、世界でも 155711 kha もの面積で栽培されている(http://beta.irri.org/solutions/index.php?option=com_content&task=view&id=250)。このうち、日本では 100%、世界で

もおよそ 60%が灌漑された水田で栽培されており、水田は広大な面積を誇る農地である。

水田は非耕作期間は落水されており、畑地と同じく主として好気的な環境にあるが、耕作期間中の大部分は土壌は田面水で覆われる。田面水の存在により、湛水開始と共に土壌への酸素供給はほとんど無くなり、田面水と土壌の境に形成される厚さ数 mm の酸化層で酸素は消費され、その下層は還元状態となる。水田は、嫌気的条件下の湛水期と、酸化的条件下の落水期を繰り返す極めて特殊な環境であるといえる。

水田での脱窒は、水田に硝酸態窒素肥料を施肥した場合、アンモニア態窒素肥料より生育が悪いという現象から初めて明らかとなった(大工原 今関, 1907)。その後、塩入 青峰(1937、1938)は水田土壌を用いた室内実験において、アンモニア態窒素は湛水後に土壌表層で減少し硝酸態窒素は増加するが、土壌深部においては土壌表層とは逆に湛水後に硝酸態窒素が減少する事を明らかにした。この結果から、塩入(1942)は水田における硝化・脱窒について、湛水開始と共に土壌への酸素供給はほとんど無くなり、酸素は消費しつくされると同時に、土壌 Eh が下がってゆき、田面水と土壌の境に形成される厚さ数 mm の酸化層において硝化細菌によってアンモニア態窒素が硝酸又は亜硝酸に変換され、酸化層の直下の還元層で脱窒菌による脱窒が起こる事を示した(図 1-3)。

塩入の仮説を支持する研究として、石沢・豊田(1964)は、水田土壌は畑土壌に比べて放線菌のような好気性細菌が少ない一方、脱窒菌が多く、特に下層で多いことを明らかにした。また、高井・上原(1973、1976、1983)は脱窒菌が易分解性有機物が多い湛水初期に急激に増加し、特に酸化層と還元層の境界近くで増加すること、さらに酸化層が現れる湛水中期にアンモニアの減少と共に硝化菌が増殖しても硝酸の蓄積がないことから、脱窒は酸化層直下において硝化と共役して活発に行われていることを明らかにした。また、Reddy (1980)は酸化層へのアンモニアの移動と、アンモニア酸化速度が水田での窒素ロスの律速段階であるとし、Arth et al. (1998)は硝化阻害剤を加えると脱窒活性が下がる事を示して、酸化層と還元層での硝化と脱窒の共役を裏付けた。

水田での脱窒の機構が明らかにされる一方で、様々な地域での水田における N_2O 発生のモニ

タリングが行われている。しかし、湛水期間中においては窒素肥料の施肥があっても畑地などの他の耕作地に比べて N_2O 発生は少ないことが知られている(Akiyama et al., 2005, 2006; Bouwman et al., 2002)。ただし、落水後に土壌が酸化状態に戻ると N_2O の発生が起こる(Akiyama et al., 2005; Byrnes et al., 1993; Zheng et al., 2000)。湛水期間中に N_2O 発生が少ないのは、水田土壌が湛水により十分に還元状態になり、脱窒反応が N_2 生成まで進行すること、また、脱窒反応の過程で一旦 N_2O が発生しても N_2O が水に溶けやすいため、 N_2O が水中に留まり、大気に放出されず、その間に他の微生物によって N_2 まで還元されることによると考えられる。

水田での活発な脱窒は、窒素肥料の損失にもつながるが、畑地で溶脱した硝酸態窒素が含まれる地下水が、水田での脱窒により浄化されることが示されており(小川, 1984; 戸田, 1997; 新良, 2005)、水田は過剰な窒素を大気に放出する場としても期待できる。従って、水田で起こっている活発な脱窒に関与する微生物を明らかにすることは、水田土壌学の一課題として学術的に重要であるだけでなく、硝酸汚染土壌の浄化や、畑土壌で見られるような N_2O 発生型の脱窒の抑制技術への応用といった環境問題解決への貢献が期待できる。しかし、水田において活発に脱窒を行う脱窒菌及び脱窒菌群集構造についてはこれまでに未解明のままとなっていた。

1-5 環境中の脱窒菌の解析手法

環境中の脱窒菌を明らかにする上で、これまでに脱窒菌を分離・培養・計測する手法での解析が行われている(e.g. Gamble, 1977)。また、近年、筆者の所属する土壌圏科学研究室において脱窒活性が高い脱窒微生物を土壌から単離する手法として、Functional Single Cell 分離法(FSC 分離法)を開発し、この手法による解析も行われている(Ashida et al., 2010; Ishii et al., 2011a, b; Tago et al., 2011)。培養依存的な手法は微生物単体の脱窒機能の解明には適しているが、環境中の微生物の大半が培養できないことから、土壌中の脱窒菌群集構造を明らかにし、脱窒を担う微生物を特定するには不十分である可能性がある。培養に依存しない手法として、環境から抽出した DNA や RNA を用いた解析は、土壌中の微生物群集を難培養のものも見逃すことなく調べるう

えで有効であると考えられる。DNA や RNA を用いて土壤中の微生物群集を調べる際には、16S rRNA などの系統分類に用いられる遺伝子を標的とすることが一般的である。しかし、1-2 に述べたとおり、脱窒を行う微生物は広い分類群に属している(Philippot, 2007)ため、16S rRNA などを標的とした解析を行って脱窒菌を解析することは難しい。

近年、脱窒機能遺伝子に対するプライマーが開発され(Scala et al., 1998; Braker et al., 1998; Hallin et al., 1999)、機能遺伝子を遺伝子マーカーとして環境中の DNA や RNA を基に脱窒菌群集構造、脱窒機能遺伝子保有微生物の存在量や発現量を解析する手法が確立されてきている。脱窒機能遺伝子を標的にする研究では、主に亜硝酸還元酵素遺伝子である *nirS*, *nirK* と 亜酸化窒素還元酵素である *nosZ* が良く使われており、様々な環境由来の機能遺伝子の配列情報が充実している。この解析手法は畑土壌(Bru et al., 2011; Dandie et al., 2008, 2011; Lopez-Gutierrez, 2004; Wertz et al., 2009)、森林土壌(Barta et al., 2010; Katsuyama et al., 2008; Mergel et al., 2001)、海洋水(Oakley et al., 2007)、水圏堆積物(Braker et al., 2000; Braker et al., 2001; Bulow et al., 2008; Smith et al., 2007)、活性汚泥(Geets et al., 2007)などの様々な環境の脱窒菌群集構造解析に用いられている。また水田においてもこの手法を用いた研究が報告され始めている(Bannert et al., 2011; Chen et al., 2010, 2011, 2012; Saito et al., 2008)。

1-6 本研究の目的

以上の事柄を背景に、本研究では脱窒機能遺伝子を標的とした水田土壌における脱窒菌群集構造解析を行い、水田土壌中で活発に脱窒を行う微生物群集を明らかにすることを目的とした。

水田では一度のイネの栽培に長い期間を要するため、繰り返し実験は難しい。そのため、まず繰り返し実験が容易であり、短期間で行える系として、人工的に脱窒活性を高める実験室内モデル水田を用いて培養した土壌から抽出した DNA を基に、水田土壌中の亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS*, *nirK* を標的とした脱窒菌群集構造解析を行った(第二章)。次に、水田圃場から季節毎にサンプリングを行い、第二章と同様の脱窒菌群集構造解析を行うことで、実際の水田で脱窒を担う微生物

物を明らかにすることを試みた(第三章)。また、実験室内モデル水田と水田で得られた脱窒機能遺伝子配列の比較をすることにより、水田土壌で脱窒を担う微生物の推測を行った。

第二章、第三章で行った DNA に基づく解析では、土壌中に存在する脱窒菌の群集構造は明らかになるが、実際に脱窒を行っている脱窒菌の特定は難しい。そのため、第四章、第五章では、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。まず、繰り返し実験が容易であり、脱窒活性の変化が予測しやすい実験室内モデル水田を用い、脱窒機能遺伝子の発現解析を行った(第四章)。次に、水田土壌について、第四章と同様に脱窒機能遺伝子の発現解析を行い、水田土壌中で脱窒機能遺伝子を発現している微生物群集を明らかにすることを試みた(第五章)。また、第四章、第五章で得られた脱窒機能遺伝子配列を用いた比較を行い、水田土壌で実際に脱窒を行う微生物の特定を目指した。

最後に、本研究で得られた脱窒機能遺伝子配列と、水田や環境中から得られたクローンや、水田から単離された分離菌株の脱窒機能遺伝子配列を比較し、水田で脱窒を担う脱窒菌の探索を行った(第六章)。

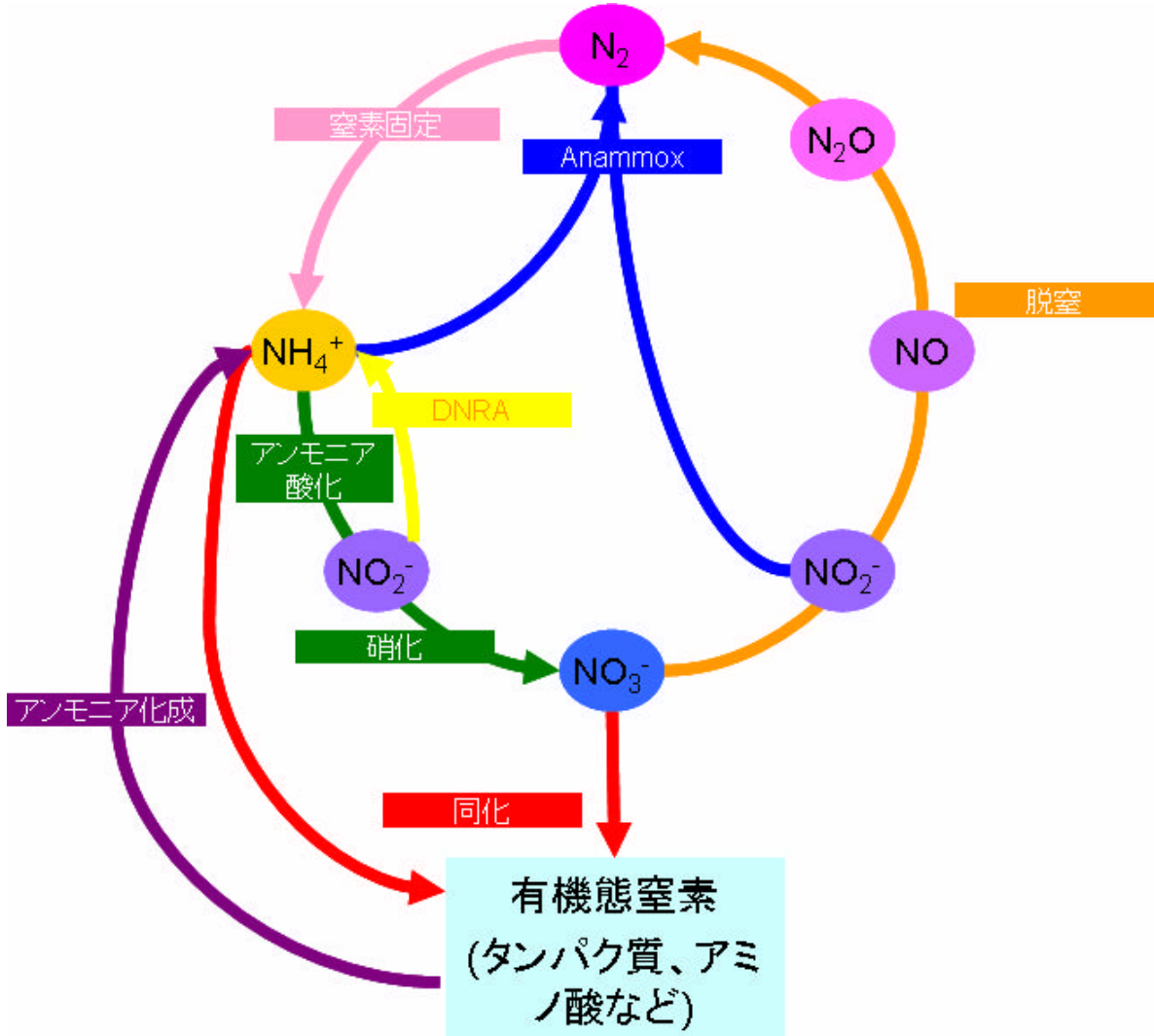


図 1-1 環境における窒素循環

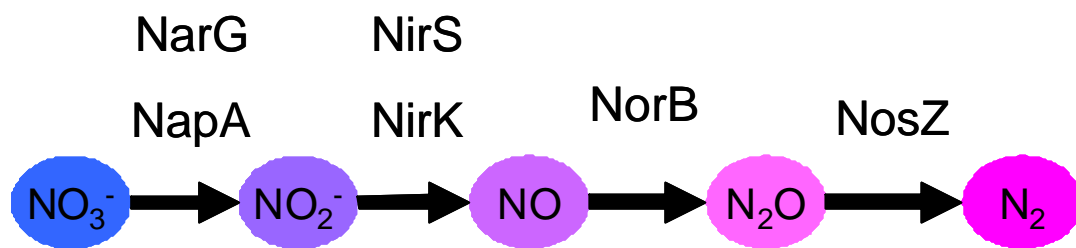


図 1-2 脱窒反応の各ステップとそれを触媒する酵素

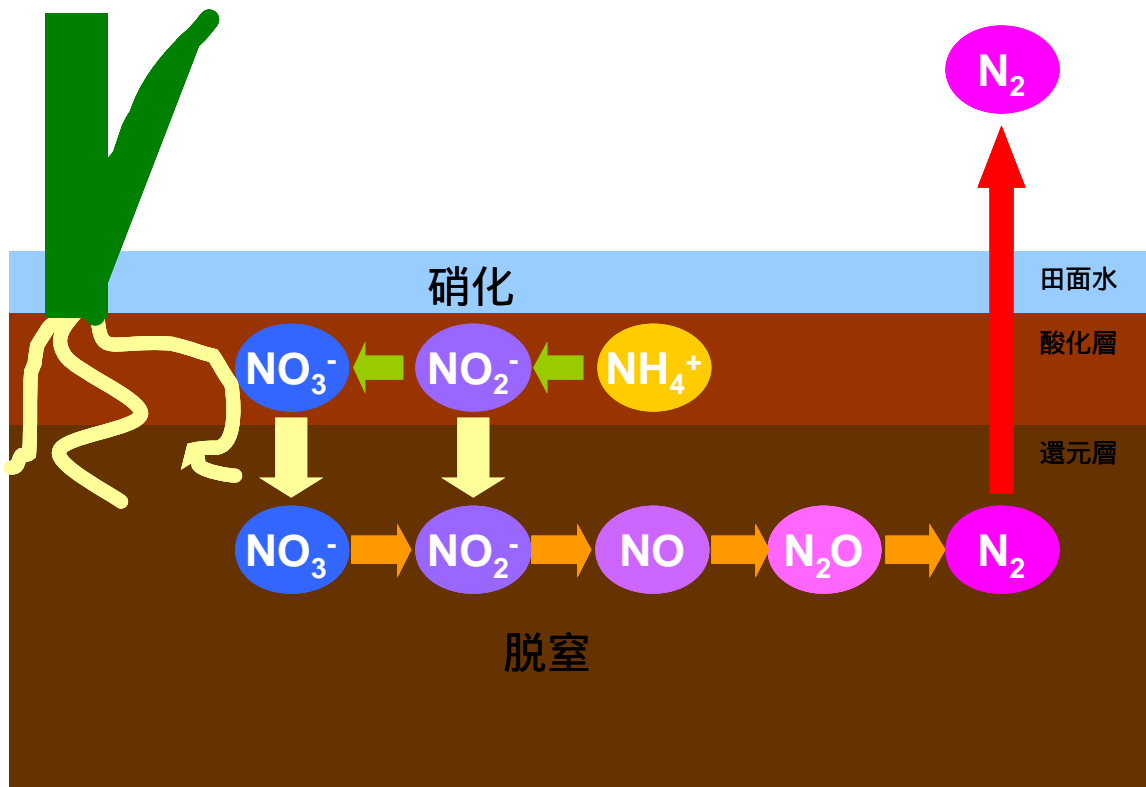


図 1-3 水田における酸化層、還元層の分化と硝化 脱窒

第二章 実験室内モデル水田土壌における脱窒菌群集構造解析

2-1 緒言

水田ではイネの栽培は年に一回しかできず、繰り返し実験が難しい事を考慮して、水田土壌の脱窒菌群集構造を解析する第一のステップとして、再現性が高く、繰り返し実験が容易な実験室内モデル水田土壌を用いた解析を行うことを考えた。

実験室内モデル水田として、容易に土壌中の脱窒活性を高めることができ、かつ脱窒活性の確認が容易であり、さらにインキュベーションに要する時間が短いことから、「水田土壌のガス置換インキュベーション」(佐藤ら, 1989)を採用した。これは、水田土壌をバイアル瓶に入れ、脱窒菌の基質としてコハク酸を、電子受容体として硝酸を添加し、気相をアルゴン-アセチレンガスで置換して嫌気状態とし、密閉した状態でインキュベーションするものである。これにより脱窒活性を高めると同時に、アセチレンの存在により N_2O を N_2 に変換する一酸化二窒素還元酵素 NosZ の活性を阻害することで気相に N_2O が蓄積し、これをガスクロマトグラフにより測定することで脱窒活性を確認できる(Yoshinari et al., 1976)。

この実験室内モデル水田によるインキュベーション前後、すなわち脱窒活性を高める前後のそれぞれの土壌からDNAを抽出し、脱窒の第二段階の酵素遺伝子であるnirS, nirK遺伝子を標的としたPCR-クローンライブラリを構築し、クローンの塩基配列を解読し、塩基配列情報を利用して、それぞれの土壌の脱窒菌群集構造を明らかにすることを試みた。また、インキュベーション前後の土壌から得られた結果を比較することにより、脱窒活性が高まるに応じて増殖し優占してくる脱窒菌群をとらえることを試みた。一方、nirS, nirKを標的とした定量的PCRを行い、各遺伝子を保有する微生物の定量を行った。

以上の成果を第二章で記述する。

2-2 実験方法

2-2-1 供試土壌

本研究では、2004年10月8日に東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構(35°44'N, 139°32'E)の水田圃場から採取され、風乾細土として保存されていた土壌を用いた。この土壌は黒ボク土であり土性は埴壤土 (clay loam)、 $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})=6.5$ 、 $\text{pH}(\text{KCl})=5.7$ 、アンモニア態窒素が $14.6 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ soil}$ 、硝酸態窒素が $52.3 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ soil}$ である(Saito et al., 2008)。

2-2-2 実験室内モデル水田土壌のインキュベーション

土壌のインキュベーションは佐藤ら(1988, 1989)及び Saito et al.(2008)の手法によって行った。また、土壌の培養は3連で行った。

バイアル瓶(20 ml 容量)に風乾細土 1 g を入れ、1.5 ml(最大容水量の150%相当)の滅菌蒸留水を加え、アルミホイルで蓋をして常温、暗所で一週間ブレインキュベーションを行った。ブレインキュベーション終了後、上清を捨て、土壌 1 g あたり 0.1 mg N と 0.5 mg C になるよう 6.08% (w v⁻¹) NaNO_3 溶液と 2.81% (w v⁻¹) コハク酸ナトリウム溶液をそれぞれ 100 μl ずつ添加した。バイアル瓶をシリコン栓とスクリューキャップで密閉し、真空ポンプと無酸素ガス注入加圧装置 IP-8 (三紳工業株式会社、神奈川)を用いて、脱気とアルゴン・アセチレン混合ガス(90:10)の注入を3回繰り返して気相置換した。気相置換を行ったバイアル瓶を30、暗所で24時間インキュベーションした。また、培養終了後、佐藤ら(1988)に準じ、気相のガスをマイクロシリンジでサンプリングし、佐藤らの条件に準じて TCD-ガスクロマトグラフ GC-14B(島津製作所、京都)に注入して、土壌から発生した N_2O ガスを測定することにより土壌の脱窒活性を確認した。

2-2-3 DNA 抽出

インキュベーション前、後のそれぞれの土壌 1 g を土壌 DNA 抽出に供し、ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン、東京)を用い、キットに添付のマニュアルに従って DNA 抽出を行った。

PCR 阻害物質の影響を減らすため、得られた DNA 溶液は、Power Soil DNA Purification Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)を用い、キットに添付のマニュアルに従って精製を行った。抽出した DNA は 1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、スメアな土壌抽出 DNA の存在を確認した。

なお、DNA 抽出・精製はバイアル瓶一つにつき一連で行った。

2-2-4 PCR 反応

土壌抽出 DNA を鋳型とし、脱窒反応の第二段階に関わる亜硝酸還元酵素遺伝子 nirS、nirK を標的とするプライマーである Cd3aF/R3Cd (nirS)、F1aCu/R3Cu (nirK)を用いて PCR 反応を行った。使用したプライマーの詳細は表 2-1 に示した。

PCR の反応条件は Throback et al. (2004) によるものを用いた。PCR の反応溶液の組成(終濃度)は Tris-HCl (pH 8.3) が 10 mM、KCl が 50 mM、MgCl₂ が 1.5 mM、gelatin が 0.001% (w v⁻¹)、dNTPs が 0.2 mM、F-プライマーとR-プライマーがそれぞれ 1 μM、BSA が 10 μg、AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) が 2 U となるよう調製し、50 倍希釈した土壌抽出 DNA 溶液を 1 μl 加えた。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用い、最初の熱変性は 94 °C で 2 分、続いて熱変性を 94 °C で 30 秒、アニーリングを 57 °C で 1 分、伸長反応を 72 °C で 1 分を 35 サイクル行い、最終伸長反応を 72 °C で 10 分を行った。PCR 産物は、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動によって正しいサイズのバンドが出ている事を確認した。

2-2-5 クローンライブラリ作製とシーケンス

2-2-4 で増幅した PCR 産物は MicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA)を用いて、付属のプロトコル通りにプライマー除去を行った。16S rRNA を標的とした PCR-DGGE を行った結果、サンプル間で群集構造に差が見られなかったことから、精製

した PCR 産物は三連を等量混合し、一つのサンプルとした。混合したサンプルから、pGEM-T Easy System (Promega, Madison, WI, USA)を用い、マニュアルに従ってクローニングを行った。得られたクローンは 100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、98、10 分加熱して DNA を粗抽出した後、M13 vector primers M3、RV-P(表 2-1)を用いて PCR 増幅を行った後、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動によってインサートのサイズ確認を行った。

PCR 増幅したクローンのインサー配列は、DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequence (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) と Genetic Analysis System CEQ 8000 (Beckman)を用いてシーケンスを行った。また、シーケンス解析の一部はタカラバイオ(株)ドラゴンジェノミクスセンターに委託した。得られた波形データは phred (Gordon et al., 1998)によってベースコールを行い、Finch TV ver.1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA, USA)によって波形を確認した。その際、ベクターとプライマーの配列は除去した。

2-2-6 系統解析

得られた塩基配列を TranSeq (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq>)を用いてアミノ酸配列に変換し、NCBI BLASTx program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)によって GenBank に登録された配列との相同性検索を行った。また、アミノ酸配列に変換した配列を用いて ClustalX ver. 1.83 (Thompson et al., 1997)を用いてアラインメントを作成した後、SeaView ver.2.2 (Galtier et al., 1996)を用いてアラインメントの確認を行った。また、PHYLP package ver. 3.67 (Felsenstein, 2008)中の ProtDist プログラムを用いて距離並行を算出した後、DOTUR program ver. 1.53 (Schloss and Handelsman, 2005)を用いて 95% 以上一致する配列を同一 operational taxonomic unit (OTU)とし、Chao 1 指数、Shannon-Weiner 指数(H')、Simpson 指数($1/D$)を計算した。計算した OTU から代表クローンを選定し、代表配列と既知微生物のアミノ酸配列を元に、ClustalX を用いて多重置換とギャップを除いた近隣結合系統樹を作成した。作成した系統樹は NJplot (Perriere and Gouy, 1996)と FigTree ver. 1.1.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>)を用いて描写し

た。

2-2-7 定量的 PCR

nirS, nirK を標的とした定量的 PCR の為のプライマーには、modified-cd3aF/-R3cd (nirS)、nirK876F/nirK1040R (nirK)を用いた(表 2- 1)。反応溶液(最終量 20 μ l)の組成は 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l、F-プライマーとR-プライマーがそれぞれ 0.2 mM、BSA が8 μ g となるよう調製し、10 倍に希釈したDNA 溶液を1 μ l加えた。反応条件は Henry et al. (2004)に従い、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用い、SYBR-Green 法によって測定した。測定は、土壌の培養前後からそれぞれ3 サンプルを、各2 連ずつ行った。測定した値から遺伝子コピー数を計算し、R program ver. 2.8.1 (<http://www.r-project.org>) を用いて nirS, nirK のサンプル間の遺伝子コピー数について分散分析(ANOVA)を行った。

2-2-8 アクセッション番号

第二章で得た塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank に登録した。そのアクセッション番号は以下の通りである。

nirS: AB377710?AB377810, AB453398?AB453406

nirK: AB377969?AB378007, AB453441?AB453539

2-3 結果と考察

2-3-1 NirS の系統解析

本研究で用いた実験室内モデル水田では、土壌の培養によって、脱窒によってコハク酸と硝酸が消費され、 N_2O が発生する。土壌の培養開始から時間が経過するに従って N_2O が発生し、24 時間後に頭打ちとなる事が分かっている(Saito et al., 2008)。よって、土壌の培養開始から24 時間の間に脱窒が起こり、その間に脱窒を行った微生物がコハク酸を資化して増殖していると考えられる。

そのため、培養前の土壌と培養後の土壌の脱窒菌群集構造を比較することで、脱窒が活性化された土壌で脱窒を行う微生物を明らかにできると考えられる。

nirS を標的としたクローンライブラリを作成した結果、培養前の土壌から50 クローン、培養後の土壌から55 のクローンを得た。得られたクローンのアミノ酸塩基配列に基づくDOTUR プログラムによる多様性解析の結果を表 2-2 に示した。土壌の培養前と培養後で、Chao 1 指数はそれぞれ 36 と 33、Shannon 指数(H')は 2.88 と2.94、Simpson 指数(1/D)は 19.14 と20.92 であり NirS の多様性指数は土壌の培養前後であまり変化が見られず、nirS を保有する微生物の多様性は土壌の培養によって変化しないことが示唆された。

得られたNirS クローンのアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹を図 2-1 に示す。クローンは 8 つのクラスター (Cluster I-VIII) に分類された(図 2-1)。そのうち、既知の微生物として、Cluster I は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Acidovorax 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属の NirS を含み、Cluster IV は Alphaproteobacteria 綱の Rhodospirillales 目に属する Azospirillum 属 と Magnetospirillum 属、Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Bordetella 属、Rhodocyclales に属する Dechloromonas 属、Gammaproteobacteria 綱に属する Pseudomonas 属、Cluster V は Actinobacteria 門に属する Kocuria 属と Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Burkholderia 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属、Cluster VI は Alphaproteobacteria 綱の Rhodobacterales 目に属する Roseobacter 属と Ruegeria 属、Paracoccus 属、Dinoroseobacter 属の NirS 配列を含んでいた。一方、Cluster II, III, VII, VIII には既知の微生物の NirS は含まれていなかった。このうち、Cluster II に含まれるクローンの NirS 配列は Thiobacillus 属の NirS 配列と60% 以上一致していたが、系統樹上では異なるクラスターに分類された。

図 2-1 の NirS 配列に基づく系統樹から、各クラスターに分類されるクローン数の割合を求め、定量的 PCR の結果得られた遺伝子コピー数から、各クラスターに分類される nirS のコピー数に換算した結果を図 2-3 A に示す。定量的 PCR の結果、遺伝子コピー数の合計は土壌の培養前後共に

1.5 × 10⁶ copy g soil⁻¹ であり(図 2-3A)、nirS を保有する微生物の存在量は培養前後で有意な差が無いことが示唆された。

実験室内モデル水田土壌の培養前後で nirS コピー数に有意な差がなく、多様性指数にも変化が見られなかったことから、nirS を保有する脱窒菌の数や多様性に変化は見られなかったが、構成する微生物は培養前後で大きく変化していた(図 2-3A)。例えば、土壌の培養前後を比較して、Acidovorax 属, Azoarcus 属, Aromatoleum 属に分類される微生物の NirS を含む Cluster I と Kocuria 属, Cupriavidus 属, Burkholderia 属, Pseudogulbenkiania 属の NirS を含む Cluster V の遺伝子コピー数はそれぞれ増加した。また、既知の微生物の NirS を含まない Cluster II には、土壌の培養前のクローンは含まれなかったが、土壌の培養後にはクローンの多くが分類された。上述したとおり本研究で用いた実験室内モデル水田では、培養後 12-24 時間で脱窒活性が高まる事が知られている(Saito et al., 2008)ため、24 時間の培養を行った土壌に多く存在する微生物はコハク酸を資化して脱窒を活発に行った微生物であると考えられる。そのため、Cluster I, II, V に属する微生物は、本研究で用いた実験室内モデル水田土壌において活発に脱窒を行って増殖している脱窒菌であることが示唆された。

土壌の培養によって活発に増殖する脱窒菌の存在が示唆された一方、既知の微生物の NirS を含まない Cluster VIII には多くのクローンが含まれていた。このことから未知の nirS を保有する微生物が水田土壌中に多く存在していることが考えられるが、土壌の培養後にこのクラスターに含まれる nirS コピー数は減少していた。同様に、培養前の土壌由来のクローンが既知の微生物の NirS を含まない Cluster III に分類されたが、培養後の土壌由来のクローンはこのクラスターには分類されなかった。これらのことから、本研究で用いた実験系においては、Cluster III, VIII に分類される nirS を保有する脱窒菌はあまり脱窒に関わっていない可能性がある。

本研究で用いた風乾細土と、実験室内モデル水田土壌を用いて、別の手法により脱窒菌を解析する次の二つの研究が、筆者の属する土壌圏科学研究室で行われた。本研究で用いた通常のコハク酸の代わりに安定同位体の¹³C を含むコハク酸を加え、培養を行った土壌から採取した DNA

から超遠心により 重画分の DNA を採取し、脱窒機能遺伝子配列の PCR-クローンライブラリ解析を行った研究(Stable Isotope Probing (SIP)法)(Saito et al., 2008)ならびに、土壌の培養の際にコハク酸と硝酸に加えて細胞分裂阻害剤を加えて培養し、土壌の培養後に伸長した細胞、つまり脱窒を行って増殖しようとした細菌を分離する Functional Single Cell (FSC)分離法(Ashida et al., 2010 ; Ishii et al., 2011a)である。SIP 法による解析によって、コハク酸を同化し、活発に脱窒を行った微生物由来のものと考えられる重画分に含まれる DNA から、Burkholderiales 目や Rhodocyclales 目に分類される微生物の NirS が得られており、また、FSC 法でも Burkholderiales 目に属する Burkholderia 属、Herbaspirillum 属に分類される微生物が得られている(Ashida et al., 2010 ; Ishii et al., 2011a)。Rhodobacterales 目や、Rhodocyclales 目に分類される微生物の NirS は、中国の水田土壌からも確認されている(Chen et al., 2010)。

nirS に基づく系統樹と 16S rRNA に基づく系統樹の比較により、nirS の塩基配列情報は科レベルではある程度系統的に一致するという報告もある(Heylen et al., 2006)が、系統的に一致しないという報告もあり(Jones et al., 2008; Song et al., 2003)、また、二つの起源の異なる nirS を持つ微生物の存在から、遺伝子の水平伝播が起こっている可能性も示されている(Etchebehere et al., 2005)。そのため、NirS のアミノ酸配列のみで nirS を保有する微生物を特定することはできないが、本研究で用いた実験室内モデル水田土壌では Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に分類される微生物が活発に脱窒を行っている可能性が高い。

2-3-2 NirK の系統解析

nirK を標的としたクローンライブラリを作成した結果、培養前の土壌から 80 クローン、培養後の土壌から 57 のクローンを得た。得られたクローンのアミノ酸塩基配列に基づく DOTUR プログラムによる多様性解析の結果を表 2-2 に示した。DOTUR プログラムによる多様性解析の結果、培養によって Chao 1 指数は 45 から 65 に、Shannon 指数は 3.03 から 3.24 に、Simpson 指数は 18.70 から 33.25 にそれぞれ増加し、本研究で用いた室内実験モデル水田では土壌の培養によって nirK は

多様性が増すことが示された(表 2-1)。

得られた NirK クローンのアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹を図 2-2 に示す。NirK のクローンは 10 のクラスター (Cluster I-X) に分類された(図 2-2)。このうち、Cluster I は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含み、Cluster V は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Mesorhizobium 属、Cluster VI は Alphaproteobacteria 綱に属する Rhodobacter 属、Cluster VII は Betaproteobacteria 綱に属する Achromobacter 属と、Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Brucella 属、Ochrobactrum 属、Agrobacterium 属、Sinorhizobium 属、Rhizobium 属、Cluster X は Betaproteobacteria 綱の Nitrosomonadales 目に属する Nitrosospira 属の NirK を含んでいた。Cluster II, III, IV, VIII, IX は既知の微生物の NirK を含まなかった。

図 2-2 の NirK 配列に基づく系統樹から、各クラスターに分類されるクローン数の割合を求め、定量的 PCR の結果得られた遺伝子コピー数から、各クラスターに分類される nirK のコピー数に換算した結果を図 2-3 B に示す。遺伝子コピー数は培養前で 1.6×10^7 copy g soil⁻¹、培養後は 2.5×10^7 copy g soil⁻¹ となり(図 2-3B)、nirK コピー数は土壤の培養によって増加する傾向($p < 0.01$)が見られ、nirK を保有する脱窒菌は土壤の培養によって、コハク酸を資化して増殖したと考えられた。また、nirK のコピー数は nirS のコピー数に対しておよそ 10 倍であり、本研究で用いた水田土壤において、nirK を保有する脱窒菌は nirS を保有する脱窒菌より数が多いことが示唆された。nirS 保有脱窒菌が nirK を保有する脱窒菌より多い環境(Henry et al., 2006 ; Kandeler et al., 2006; Geets et al., 2007 ; Wallenstein and Vilgalys, 2005)もあれば、その逆に nirK を保有する脱窒菌が nirS を保有する脱窒菌より多い環境(Barta et al., 2010; Su et al., 2008 ; Towe et al., 2010)も存在するが、水田については nirK を保有する脱窒菌が多いという報告(Bannert et al., 2011; Chen et al., 2010, 2012)があり、水田土壤は nirK を保有する脱窒菌が多く存在する環境であると考えられる。

土壤の培養によって nirK の多様性が増し、遺伝子コピー数が増加しただけでなく、土壤の培養によって群集構造にも変化が見られた(図 2-3B)。Rhodobacter 属の NirK を含む Cluster VI、

Achromobacter 属とBrucella 属, Ochrobactrum 属, Agrobacterium 属, Sinorhizobium 属, Rhizobium 属の NirK を含む Cluster VII は、土壌の培養の前後で nirK のコピー数が減少した。一方、Bradyrhizobium 属とRhodopseudomonas 属の NirK を含む Cluster I と、Nitrosospira 属の NirK を含む Cluster X、既知の微生物の NirK を含まない Cluster II、IV、VIII、IX の遺伝子コピー数は土壌の培養後に増加した(図 2-3B)。この結果から、Cluster I、X に属する Bradyrhizobium 属、Rhodopseudomonas 属、Nitrosospira 属の nirK に近縁な nirK を保有する微生物や、Cluster II、IV、VIII、IX に属する既知の微生物とは近縁でない nirK を保有する微生物が脱窒を行って増殖したと考えられる。

本研究で用いた実験室内モデル水田を用いた Saito et al. (2008) による SIP 法を用いたクローンライブラリ解析でも、実験室内モデル水田の培養後の土壌から得られた重画分由来の DNA から Rhizobiales 目に属する NirK が多数を占めていた。同様に実験室内モデル水田を用いた Ishii et al. (2011a) による FSC 分離法による脱窒菌の分離培養でも Rhizobiales 目に属する Mesorhizobium に近縁な微生物がいくつか単離されている。そのため、本研究で用いた室内モデル実験系では、Rhizobiales に分類される微生物が脱窒を行っている主要な微生物の一つであると考えられる。

また、これまでに環境中から既知の微生物の NirK とは近縁でない NirK 配列が多く見つかった (Bremer et al., 2007; Katsuyama et al., 2008; Throback et al., 2004; Wolsing et al., 2004)。そのため、水田土壌中でも未知の微生物も脱窒に関わっている可能性がある。

ただし、nirS と同様に、nirK が既知微生物の機能遺伝子に近縁であっても、nirK を保有する微生物が系統的に近縁であるとは限らない (Heylen et al., 2006; Jones et al., 2008) ため、NirK のアミノ酸配列のみで nirK を保有する微生物を特定することはできない。

2-3-5 まとめ

実験室内モデル水田を用いて、人工的に脱窒活性を高めた水田土壌における脱窒菌群集構成を調べた。水田土壌中の nirS を保有する脱窒菌は、存在量や多様性は土壌の培養によって変

化しなかったが、群集構造は変化し、*Acidovorax* 属, *Azoarcus* 属, *Aromatoleum* 属 *Kocuria* 属, *Cupriavidus* 属, *Pseudogulbenkiania* 属, *Burkholderia* 属に近縁な *nirS* を保有する脱窒菌が脱窒に関わっている可能性が示唆された。また、既知の微生物の *nirS* とは近縁でない *nirS* を持つ微生物が多く存在し、その一部は土壌の脱窒によって存在量が増えていたことから脱窒に関与していることと示唆された。*nirS* とは対照的に、*nirK* を保有する脱窒菌は土壌の培養によって存在量や多様性が増した。また、*nirK* を保有する脱窒菌の群集構造も土壌の培養によって変化し、*Bradyrhizobium* 属, *Rhodopseudomonas* 属, *Nitrosospira* 属に近縁な *nirK* を保有する脱窒菌の他、既知の微生物とは近縁でない微生物が脱窒を活発に行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。そのため、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。

表 2-1 第二章の実験で使用したプライマー

primer	gene	Sequence	Reference
cd3aF	nirS	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	Throback (2004)
R3cd	nirS	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	Throback (2004)
F1aCu	nirK	ATC ATG GTS CTG CCG CG	Throback (2004)
R3Cu	nirK	GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT	Throback (2004)
m-Cd3aF	nirS	AAC GYS AAG GAR ACS GG	Kandeler (2006)
m-R3cd	nirS	GAS TTC GGR TGS GTC TTS AYG AA	Kandeler (2006)
nirK876F	nirK	ATY GGC GGV CAY GGC GA	Henry (2004)
nirK1040R	nirK	GCC TCG ATC AGR TTR TGG TT	Henry (2004)
M13 vector primers M3	vector	GTA AAA CGA CGG CCA GT	
RV-P	vector	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	

表 2-2 クローンライブラリから得られた nirS, nirK クローンの多様性解析

Gene	Name of soil sample	No. of clones	No. of OTUs (5% cut)	Chao 1	Shannon-Wiener Index (H')	Simpson index (1/D)
NirS	Before incubation	50	23	36	2.88	19.14
	After incubation	55	24	33	2.94	20.92
NirK	Before incubation	80	30	45	3.03	18.70
	After incubation	57	31	65	3.24	33.25

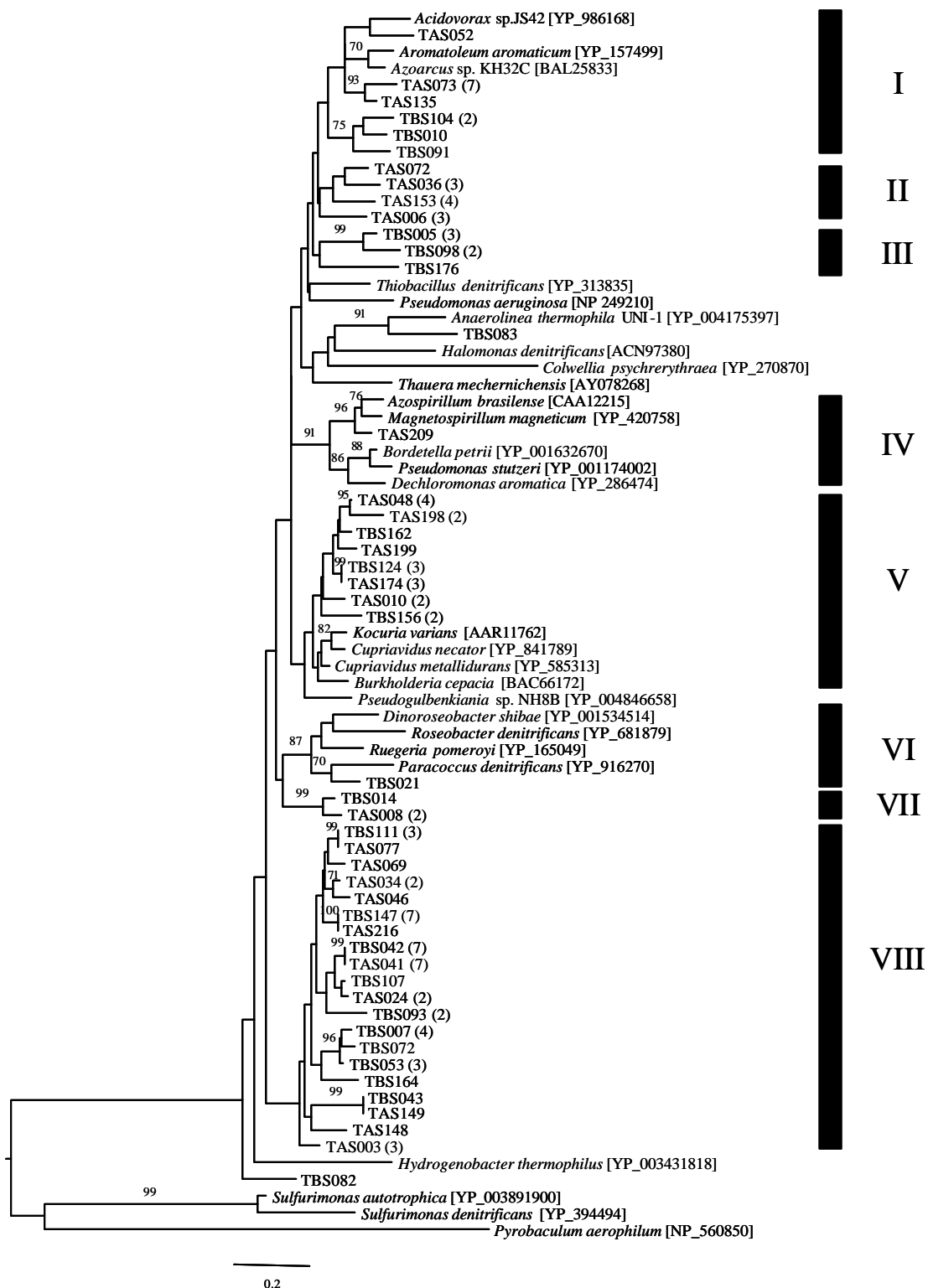


図 2-1 NirS のアミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹。ブートストラップ値は 70% 以上のみ表記。OTU 代表株名の後の括弧は OTU に含まれるクローンの数を表している。TBS :インキュベーション前の土壌から得られた NirS クローン, TAS :インキュベーション後の土壌から得られた NirS クローン。

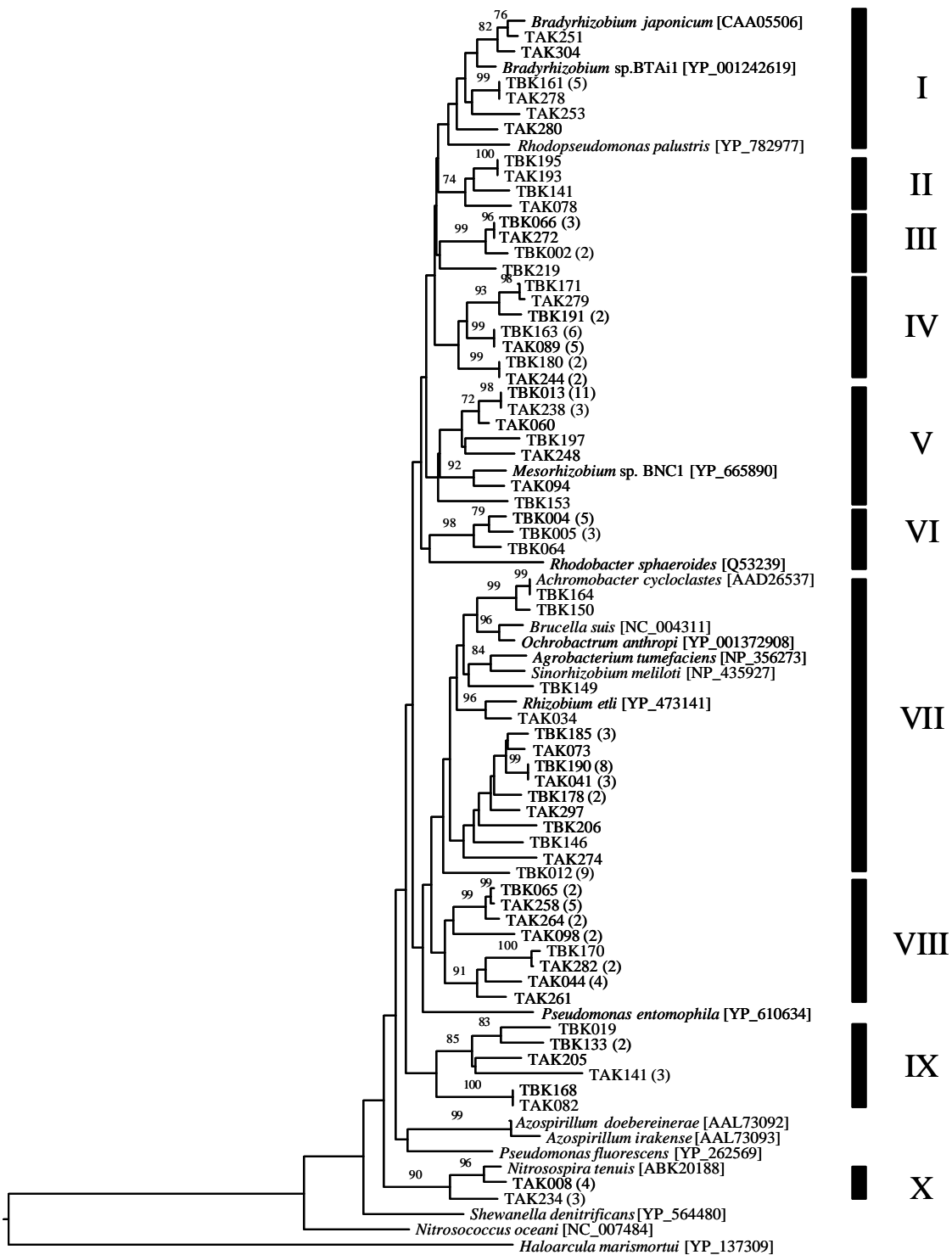


図 2-2 NirK のアミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹。ブートストラップ値は 70% 以上のみ表記。OTU 代表株名の後の括弧は OTU に含まれるクローンの数を表している。TBK : インキュベーション前の土壌から得られた NirK クローン, TAK : インキュベーション後の土壌から得られた NirK クローン。

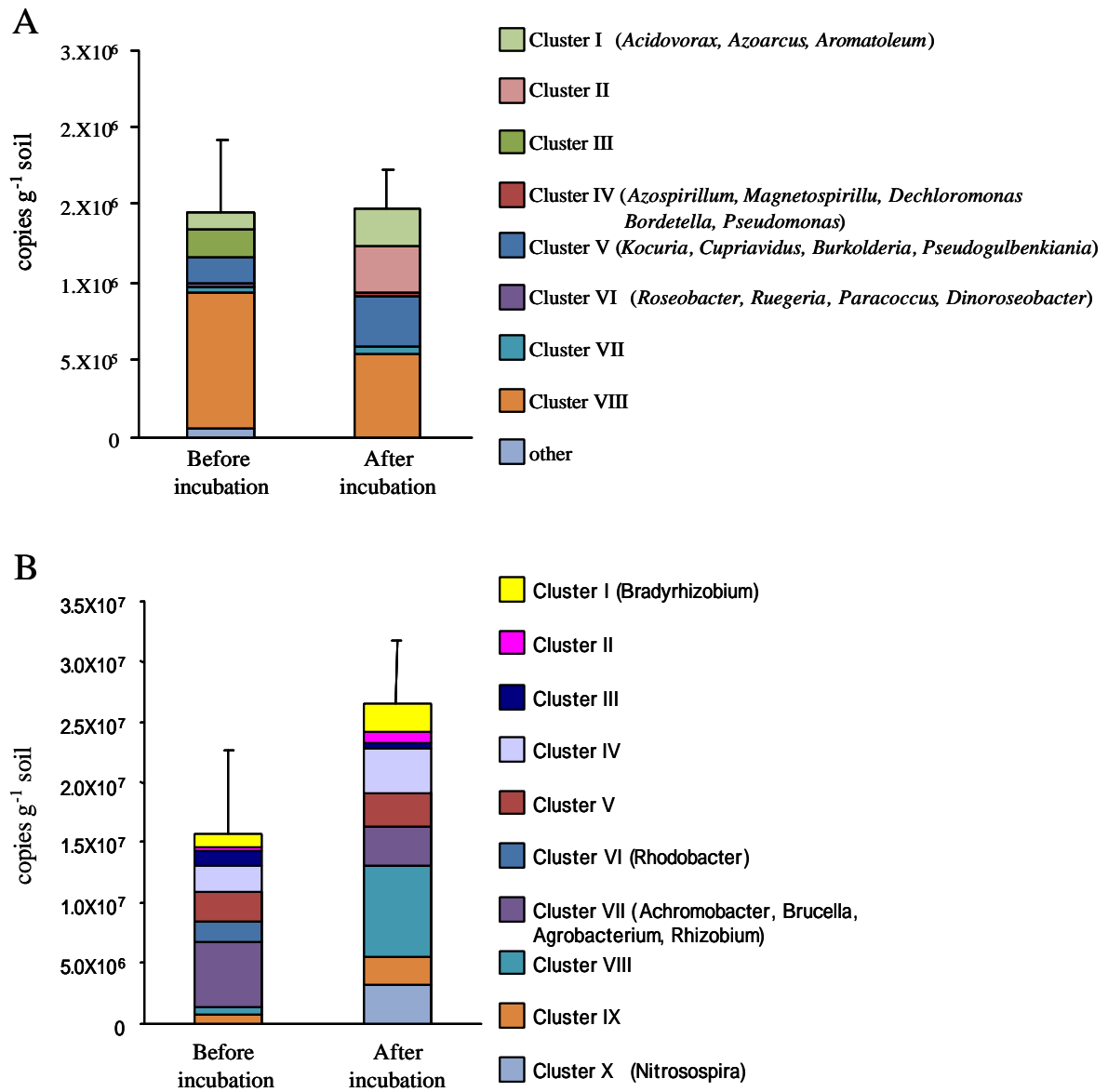


図 2-3 培養に前後の nirS (A)と nirK (B)の遺伝子コピー数と構成するクラスター。図 2-1(A)、図 2-2(B)の系統樹上の各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合に応じて表示した。

第三章 水田圃場の脱窒菌群集構造解析

3-1 緒言

前章では繰り返し実験が容易であること、土壌の脱窒活性を人為的に高めることが可能であることなどを考慮して、実験室内モデル水田を用いた脱窒菌群集構造の解析を行った。しかし実験室内モデル水田は、基質の添加やガス置換により人為的に土壌の脱窒活性を高めて解析したものであり、現場の水田の状況を正しく再現しているとは限らない。

本章では東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構の水田圃場から土壌のサンプリングを行い、前章と同様の手法を用いて脱窒菌群集構造を解析した。また、水田からのサンプリングは湛水直前 1 回と湛水後 3 回の計 4 回行うことにより、土壌の還元の進行に伴う脱窒菌群集構造の変動を調べた。

また、本章と同じ生態調和農学機構の水田土壌を用いた第二章で得られた機能遺伝子配列と、本章で得られた機能遺伝子配列を合わせた解析を行うことで、この土壌で脱窒を行っていると考えられる脱窒菌を総合的に明らかにすることを試みた。

以上の成果を第三章で記述する。

3-2 実験方法

3-2-1 供試土壌とサンプリング

供試土壌は第二章と同じく、東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構の水田土壌を用いた。土壌は、第二章で用いた土壌を採取した水田圃場(2号圃)から採取した。サンプリングは2006年のイネ栽培期間中、湛水前である5/18、湛水二週間後の6/2、湛水一ヶ月後の6/19、湛水二ヶ月後の7/27に行った。

土壌のサンプリングは圃場内の5地点から採取した。5/18にはシャベルで表層から約10 cmまでの土壌を採取した。その後の土壌が湛水されてからのサンプリングにおいては、直径5 cm、長

さ10 cm のコアを用いて土壌表面から深さ10 cm までの土壌を採取した。採取したコアは直ちに研究室に持ち帰り、上部 2-3mm を酸化層として除き、酸化層を除いたコアの上部 5cm を酸化層下の還元層として、トレー上で 5 地点分を一つにまとめてよく混合したものを供試土壌とした。

サンプリングを行った水田土壌では、湛水前の 5/16 に「くみあい苦土マンガンほう素塩安入り複合燐加安 A906 号(窒素 12% 含有。JA 東日本くみあい飼料 (株))」が N=6kg/10a となるように施肥された。また、田植えは 5/26 に行われた。

3-2-2 DNA 抽出

土壌の採取から 2 時間以内に DNA 抽出を開始した。DNA 抽出は第二章 2-1-3 と同様に行い、サンプリング 1 回につき 3 連抽出した。

3-2-3 PCR、クローンライブラリ作製とシーケンス、系統解析、定量的 PCR

PCR 反応、クローンライブラリ解析、系統解析、定量的 PCR は全て第二章 2-2 の同項目と同様に行った。

3-2-4 アクセッション番号

第三章で得た塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank に登録した。そのアクセッション番号は以下の通りである。

nirS: AB377811?AB377968, AB453407?AB453440

nirK: AB378008?AB378056, AB453540?AB453683

3-3 結果と考察

3-3-1 nirS, nirK の定量的 PCR

定量的 PCR の結果から計算した土壌における nirS, nirK 各遺伝子のコピー数を表 3-2 に示し

た。nirS のコピー数は $0.6-1.2 \times 10^6$ copy g soil⁻¹ であり サンプルング時期によって有意な差は見られなかった。一方、nirK のコピー数は $5.7-12.6 \times 10^6$ copy g soil⁻¹ で、湛水前の 5/18 と湛水二週間後の 6/2 はコピー数に有意な差はなかったが、6/2 から湛水 1 ヶ月後の 6/19 にコピー数が有意に減少し ($p=0.040$)、nirK を保有する微生物数はサンプルング時期によって変化した事が示唆された。nirS コピー数に変化が無く、nirK コピー数に変化が見られるという傾向は、第二章の室内モデル実験系と同様であった。nirS に比べ、nirK を保有する微生物は施肥や pH などの環境の変化を受けやすいといわれている(Barta et al., 2010; Chen et al., 2010)。nirS を保有する微生物は水田土壌中ではあまり存在量が変化せず、一方、nirK を保有する微生物は水田での環境変化に影響を受け、数が変動していることが示唆された。

また、nirK のコピー数は nirS のコピー数より 6.0-11.4 倍と、常に nirS より多かった。第二章でもこの水田土壌では nirK を保有する微生物が nirS を保有する微生物より多い事が示された。他の水田でも nirS を保有する微生物より nirK を保有する微生物が多いという報告(Bannert et al., 2011; Chen et al., 2010, 2012)がなされている。水田土壌中で一般に nirK を保有する微生物が nirS を保有する微生物より多く存在しているのか興味深い。

3-3-2 NirS の系統解析

水田は、湛水前は畑地と同様に主として好氣的な状態である。しかし、湛水されると田面水により土壌への酸素はほとんど供給されなくなり、わずかな酸素も田面水と土壌の境に形成される酸化層で消費され、土壌は還元状態になる。そのため、土壌 Eh は急激に減少し、湛水からおよそ 2 週間から 1 ヶ月後に Eh が最も低くなることが知られている(高井ら、1973 ;長谷部、1986)。また、この時期は脱窒活性が最も高くなることが考えられる時期である(高井ら、1973)。従って、湛水前の土壌と比較して、湛水 2 週間後から 1 ヶ月後に増加している脱窒菌は、水田で脱窒を担って増殖した脱窒菌である可能性が高い。

nirS を標的としたクローンライブラリを作成した結果、5/18、6/2、6/19、7/27 に採取した土壌から

それぞれ 52 クローン、54 クローン、37 クローン、39 クローン、合計 182 の nirS のクローンを得た。得られたクローンの NirS のアミノ酸塩基配列を基に DOTUR による多様性解析を行った結果を表 3-1 に示す。6/2 に採取した土壌を除く土壌では、Chao 1 指数は 38-45、Shannon 指数は 2.88-3.25、Simpson 指数は 22.45-27.75 と、多様性指数はサンプリング時期であまり変化が見られなかったが、6/2 の土壌では Chao 1 指数は 55、Shannon 指数は 3.25、Simpson 指数は 34.07 と他の土壌に比べて多様であった(表 3-1)。このことから、nirS を保有する微生物は湛水 2 週間後に多様性が増すと考えられる。

図 3-1 はアミノ酸配列に基づく NirS の近隣結合系統樹である。得られたクローンは 11 つのクラスター(Cluster I-XI)に分類された。11 のクラスターのうち、Cluster III は Betaproteobacteria 綱の Hydrogenophilales 目に属する Thiobacillus 属の NirS 配列を含み、Cluster VIII は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Acidovorax 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属、Cluster X は Alphaproteobacteria 綱の Rhodobacterales 目に属する Roseobacter 属と Ruegeria 属、Paracoccus 属、Dinoroseobacter 属、Cluster XI は Alphaproteobacteria 綱の Rhodospirillales 目に属する Azospirillum 属と Magnetospirillum 属、Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Bordetella 属、Rhodocyclales に属する Dechloromonas 属、Gammaproteobacteria 綱に属する Pseudomonas 属の NirS 配列を含んでいた。一方、Cluster I, II, IV, V, VI, VII, IX は既知の微生物の NirS を含まなかった。

図 3-1 の NirS 配列に基づく系統樹から、各クラスターに分類されるクローン数の割合を求め、定量的 PCR の結果得られた遺伝子コピー数から、各クラスターに分類される nirS のコピー数に換算した結果を図 3-3 A に示す。

クローンの多くは既知の微生物の NirS が含まれない Cluster I, II, IV, V, VIII に分類された(図 3-3 A)。このことから、水田土壌中では未だ培養されていないが脱窒能を持つ微生物が多く存在していることが示唆された。このような既知の微生物の NirS と同一性が低い NirS 配列は、様々な環境 (Braker et al., 2000; Chen et al., 2010 ; Katsuyama et al., 2008 ; Prieme et al., 2002; Throback et

al., 2004)からも見つかっている。これらのクラスターの中で、Cluster I に属する nirS コピー数は湛水 2 ヶ月後の 7/27 に増加が見られたが、湛水前から湛水 1 ヶ月後まで変化が見られなかった。また、Cluster II, IV, VII の nirS コピー数もサンプリング時期による変化がほとんどなかった。しかし、Cluster V, IX に含まれる nirS コピー数は湛水後に減少する傾向が見られた。

既知の微生物の NirS を含まない Cluster VI の存在量は湛水前の 5/18 と比較して、湛水二週間後の 6/2 に増加し、6/19、7/27 で減少した。また、同様の傾向を示すクラスターとして、Acidovorax 属、Aromatoleum 属、Aoarcus 属の NirS を含む Cluster VIII、Roseobacter 属と Ruegeria 属、Paracoccus 属、Dinoroseobacter 属の NirS を含む Cluster X、Azospirillum 属、Magnetospirillum 属、Bordetella 属、Dechloromonas 属、Pseudomonas 属の NirS を含む Cluster XI は、湛水前のクローンは含まなかったが、湛水後の 6/2 のクローンは含んでいた。これらのクラスターに含まれる NirS をコードする nirS を保有する微生物の存在量は 6/2 が最も多く、6/19、7/27 では減少するか消滅した。湛水 2 週間後である 6/2 は水田において脱窒が最も活発になると考えられる時期である(高井ら、1973)。そのため、6/2 で存在量が最大となった Cluster VI, VIII, X, XI に属する nirS を保有する微生物は、脱窒を行って増殖した水田での脱窒を担う重要な微生物である可能性が高い。

3-3-3 NirK の系統解析

nirK を標的としたクローンライブラリを作成した結果、5/18、6/2、6/19、7/27 に採取した土壌からそれぞれ 67 クローン、54 クローン、31 クローン、40 クローン、合計で 192 の nirK のクローンを得た。得られたクローンの NirK のアミノ酸塩基配列を基に DOTUR による多様性解析を行った結果を表 3-1 に示した。5/18 では Chao 1 指数が 46、Shannon 指数が 3.16、Simpson 指数が 24.3 であったが、湛水後の 6/2、6/19、7/27 では Chao 1 指数が 22-30、Shannon 指数が 2.60-2.72、Simpson 指数が 14.31-19.02 であり、湛水前と比較して、湛水後は NirK の多様性指数が減少していた(表 3-1)。この結果から、湛水前の好気的条件下では多様な nirK を保有する微生物が存在しているが、湛水によって土壌が還元状態になることで、環境に適応した一部の nirK を保有する微生物が優占

し、多様性が下がるものと考えられる。ただし、Shannon 指数の値を他の土壌と比較すると森林 (Katsuyama et al., 2008)、農地 (Smith et al., 2008) より高く、水田土壌の nirK を保有する微生物の多様性は大きいと考えられる。

得られた NirK クローンのアミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹を図 3-2 に示す。クローンは 10 のクラスター (Cluster I-X) に分類された (図 3-2)。このうち、Cluster II は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含み、Cluster IV は Alphaproteobacteria 綱に属する Rhodobacter 属、Cluster VI は Betaproteobacteria 綱に属する Achromobacter 属と Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Brucella 属、Ochrobactrum 属、Agrobacterium 属、Sinorhizobium 属、Rhizobium 属、Cluster VIII は Nitrosomonadales 目に属する Nitrosospira 属の NirK を含んでいた。一方、Cluster I, III, V, VII, IX, X には既知の微生物の NirK を含まなかった。

図 3-2 の NirK 配列に基づく系統樹から、各クラスターに分類されるクローン数の割合を求め、定量的 PCR の結果得られた遺伝子コピー数から、各クラスターに分類される nirK のコピー数に換算した結果を図 3-3 B に示す。

Rhodobacter 属の NirK を含む Cluster IV、既知の微生物の NirK を含まない Cluster X に属する NirK をコードする nirK を保有する微生物の数は湛水 2 週間後の 6/2 で最大となった。3-4-1 で述べたように、6/2 では脱窒が活発に行われていると考えられることから、これらの配列を持つ微生物が水田での脱窒に関与していると考えられる。

既知の微生物の NirK を含まない Cluster I, III, V に属する NirK をコードする nirK を保有する微生物は、6/19、7/27 に存在量は減少するものの、サンプリング時期にかかわらず高い割合で存在していた (図 3-3B)。そのため、このクラスターに分類される nirK を保有する微生物は水田土壌中に安定して存在していると思われる。

3-3-4 実験室内のモデル水田土壌との比較-NirS

生態調和農学機構の水田土壌について、第二章では脱窒活性を高めた実験室内モデル水田土壌を用いて、第三章では水田圃場から土壌をサンプリングして、それぞれの土壌で脱窒に関わっていると考えられる微生物の解析を行った。実験室内モデルでは土壌の脱窒活性の変動に伴う nirS, nirK の量と組成の変化を調べられるという利点を持つものの、人工的に脱窒活性を高めていることや、再現性を優先して風乾土壌を用いたという欠点がある。一方、水田圃場では実際の水田土壌環境の nirS, nirK の量と組成の変化を調べることができたが、現場での脱窒活性を測定することは困難である。そこで、実験室内モデル水田と水田圃場から得られた脱窒機能遺伝子配列を併せて解析することで、この土壌で脱窒を行っていると考えられる脱窒菌を総合的に明らかにすることを試みた。

実験室内モデル水田土壌から得られた NirS クローンと、水田圃場から採取した土壌から得られた NirS クローンのアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹を図 3-4 に示した。クローンは系統樹上の 11 つのクラスターに分類された。このうち、Cluster I, II, VII, IX については室内モデル実験系と、フィールド系双方で共通する特徴が見られた。Cluster III は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Acidovorax 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属の NirS を含み、Cluster VIII は Actinobacteria 門に属する Kocuria 属と Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Burkholderia 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属、Cluster IX は Alphaproteobacteria 綱の Rhodospirillales 目に属する Azospirillum 属と Magnetospirillum 属、Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Bordetella 属、Rhodocyclales に属する Dechloromonas 属、Gammaproteobacteria 綱に属する Pseudomonas 属、Cluster X は Alphaproteobacteria 綱の Rhodobacterales 目に属する Roseobacter 属と Ruegeria 属、Paracoccus 属、Dinoroseobacter 属の NirS 配列を含んでいた。Cluster I, II, IV, V, VI, VII, XI には既知の微生物の NirS を含まなかった。

実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirS クローンは図 3-4 の系

統樹に示された各クラスターに分布する数の割合を表 3-3 に示した。11 のクラスターのうち、Cluster III、IX、XI については実験室内モデル水田と水田の双方で共通する特徴が見られた。

Acidovorax 属、Aromatoleum 属、Azoarcus 属の NirS を含む Cluster III は、水田から 5/18 に採取した土壌以外の全ての土壌由来のクローンが含まれていた。また、このクラスターでは実験室内モデルの培養後の土壌由来のクローンの割合が増加し、水田でも脱窒活性が高い 6/2 でクローンが占める割合が最大となったことから、Cluster III に分類される NirS をコードする nirS を保有する微生物は脱窒が活発な土壌で脱窒を担っている可能性が高い。

また、Azospirillum 属、Magnetospirillum 属、Bordetella 属、Dechloromonas 属、Pseudomonas 属の NirS を含む Cluster IX には、実験室内モデル水田の培養後の土壌と 6/2 に採取した土壌由来のクローンのみが含まれており Cluster IX に分類される NirS をコードする nirS を保有する微生物が水田土壌で脱窒を行っていることが示唆された。

既知の微生物の NirS を含まない Cluster XI には、実験室内モデル、水田両方の由来のクローンの多くが含まれていた。ただし Cluster XI に含まれるクローンの割合は、実験室内モデルの培養後、及び水田の湛水後の両方で減少したため、このクラスターに分類される NirS をコードする nirS を保有する微生物は土壌に存在しているが、脱窒に大きくは関与していない可能性がある。

実験室内モデルと水田で共通して存在するクローンが見られた一方、どちらかにのみ存在するクローンも見られた。例えば、既知の微生物の NirS を含まない Cluster II、VII には、水田由来のクローンのみ含まれていた。Cluster II、VII とは対照的に、Kocuria 属、Cupriavidus 属、Pseudogulbenkiania 属の NirS を含む Cluster VIII には実験室内モデル由来のクローンのみが含まれ、このクラスターに属する微生物の割合は培養によって増加していた。これらの違いは、実験室内モデルに用いた土壌が風乾土壌であり、風乾の過程で乾燥に弱い微生物が減少し、逆に乾燥に強い微生物の割合が増加したからかもしれない。また、実験室内モデルでは脱窒活性を高めるため、基質として硝酸とコハク酸を添加しており、実際の環境とは栄養条件が異なること、また、実験室内モデルの培養時間が 24 時間と短いため、生育が速く、脱窒に適した環境に素早く応答でき

る脱窒菌への影響しか見られないことがこの違いを生んだものと思われる。

3-3-5 実験室内のモデル水田土壌との比較-NirK

実験室内モデル水田土壌から得られた NirK クローンと、水田圃場から採取した土壌から得られた NirK クローンのアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹を図 3-5 に示した。クローンは系統樹上に広く分布し、12 のクラスター(Cluster I-XII)に分類された。Cluster I は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含み、Cluster VI は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Mesorhizobium 属、Cluster VII は Alphaproteobacteria 綱に属する Rhodobacter 属、Betaproteobacteria 綱に属する Achromobacter 属と、Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Brucella 属、Ochrobactrum 属、Agrobacterium 属、Sinorhizobium 属、Rhizobium 属、Cluster IX は Nitrosomonadales 目に属する Nitrosospora 属の NirK を含んでいた。

実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirK クローンが図 3-5 の系統樹に示された各クラスターに分布する数の割合を表 3-4 に示した。Cluster I, II, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XI には、実験室内モデルと水田に共通してクローンが存在しており、クローンが全体に占める割合にも大きな変化が見られないクラスターが多数を占めていた。このことから、実験室内モデルは水田の nirK を保有する微生物の群集構造をある程度反映していると考えられた。

一方、Cluster III には実験室内モデル由来のクローンのみが含まれ、水田のクローンは含まれていなかった。Cluster III とは反対に、Cluster X, XII には実験室内モデル由来のクローンは含まれず、水田のクローンのみが含まれていた。この違いは、NirS での違いと同様に、使用した実験系の違いによる影響が考えられる。

3-3-6 まとめ

水田土壌のクローンライブラリ解析によって、Aromatoleum 属、Acidovorax 属、Azoarcus 属、

Dechloromona 属、Azospirillum 属、Rhodobacter 属、Rhodobacter 属の Nir に近縁な Nir をコードする nir を保有する微生物、及び未知の nir を保有する微生物が脱窒が活発な時期に脱窒に関わっている可能性が示された。また、定量的 PCR の結果、水田土壌では nirS を保有する微生物の存在量はあまり変化がないが、nirK を保有する微生物は湛水によって存在量が大きく変化し、さらに nirS を保有する微生物よりも多く存在することが示された。

実験室内モデル水田と、水田圃場のクローンライブラリ解析の結果を総合的に解析した結果、nirS を保有する微生物の群集構造の変化は実験室内モデルと水田である程度似た傾向が見られ、水田土壌では Azospirillum 属、Aromatoleum 属、Dechloromonas 属、Azospirillum 属、Magnetospirillum 属などに近縁な nirS を保有する微生物が脱窒に深く関わっている事が示唆された。nirK を保有する微生物の群集構造は実験室内モデルと水田多くの共通した結果が得られた。この結果から、実験室内モデル水田は、水田で得られた解析結果の確認や、より詳細な解析に有効であると考えられた。ただし、実験室内モデル水田と実際の水田とで異なる結果が得られた部分もあるため、注意が必要であり、実験室内モデル水田と水田の両方を併用して解析するのが望ましいと考えられた。

表 3-1 土壌から得られた NirS, NirK クローンの多様性解析

Gene	Name of soil sample	No. of clones	No. of OTUs (5% cut)	Chao 1	Shannon-Wiener Index (H')	Simpson index (1/D)
NirS	18 May	52	25	38	3.01	24.56
	2 June	54	31	55	3.25	34.07
	19 June	37	22	45	2.93	27.75
	27 July	39	22	40	2.88	22.45
	Total	182	74	-	-	-
NirK	18 May	67	31	46	3.16	24.30
	2 June	54	21	30	2.72	14.31
	19 June	31	16	28	2.60	17.88
	27 July	40	18	22	2.72	19.02
	Total	192	47	-	-	-

表 3-2 水田土壌の nirS と nirK の定量的 PCR による遺伝子コピー数の定量

	18 May	2 June	19 June	27 July	Probability
<i>nirS</i>	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1	NS
<i>nirK</i>	11.4 ± 2.1	12.6 ± 1.2	7.1 ± 2.7	5.3 ± 1.7	<0.01
Probability	<0.01	<0.001	<0.05	<0.05	

単位は 10^6 copy · g soil⁻¹

表 3-3 実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirS クローンが図 3-4 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合

クラスターに含まれる nirS 保有脱窒菌	実験室内モデル		水田			
	Before incubation	After incubation	5/18	6/2	6/19	7/27
Cluster I Thiobacillus	-	5.5%	16.7%	13.2%	19.4%	5.7%
Cluster II	-	-	4.2%	7.5%	-	5.7%
Cluster III Acidovorax, Aromatoleum, Azoarcus	8.0%	16.4%	-	7.5%	2.8%	5.7%
Cluster IV	-	-	6.3%	3.8%	-	5.7%
Cluster V	-	14.5%	-	-	8.3%	-
Cluster VI	12.0%	-	22.9%	24.5%	19.4%	20.0%
Cluster VII	-	-	12.5%	11.3%	22.2%	37.1%
Cluster VIII Kocuria, Cupriavidus, Pseudogulbenkiania	12.0%	21.8%	-	-	-	-
Cluster IX Azospirillum, Bordetella, Magnetospirillum, Pseudomonas, Dechloromonas	-	1.8%	-	1.9%	-	-
Cluster X Dinoroseobacte, Roseobacter, Paracoccus, Ruegeria	4.0%	3.6%	-	3.8%	-	2.9%
Cluster XI	60.0%	36.4%	35.4%	24.5%	27.8%	14.3%
other	4.0%	-	2.1%	1.9%	-	2.9%
Total	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

表 3-4 実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirK クローンが図 3-5 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合

	クラスターに含まれる nirK 保有脱窒菌	室内モデル実験系		水田			
		Before incubation	After incubation	5/18	6/2	6/19	7/27
Cluster I	Bradyrhizobium, Rhodopseudomonas	6.3%	8.8%	3.0%	-	3.2%	12.5%
Cluster II		7.5%	1.8%	3.0%	1.9%	6.5%	2.5%
Cluster III		2.5%	3.5%	-	-	-	-
Cluster IV		13.8%	14.0%	25.4%	14.8%	32.3%	17.5%
Cluster V		15.0%	8.8%	22.4%	25.9%	9.7%	20.0%
Cluster VI	Mesorhizobium	11.3%	1.8%	3.0%	9.3%	-	7.5%
Cluster VII	Achromobacter, Brucella, Ochrobactrum, Agrobacterium, Sinorhizobium, Rhizobium	33.8%	12.3%	3.0%	3.7%	-	7.5%
Cluster VIII		3.8%	28.1%	20.9%	18.5%	19.4%	10.0%
Cluster IX	Nitrosospira	-	12.3%	7.5%	5.6%	16.1%	2.5%
Cluster X		-	-	3.0%	1.9%	-	2.5%
Cluster XI		3.8%	7.0%	1.5%	1.9%	-	7.5%
Cluster XII		-	-	3.0%	16.7%	12.9%	-
other		2.5%	1.8%	4.5%	-	-	10.0%
Total		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

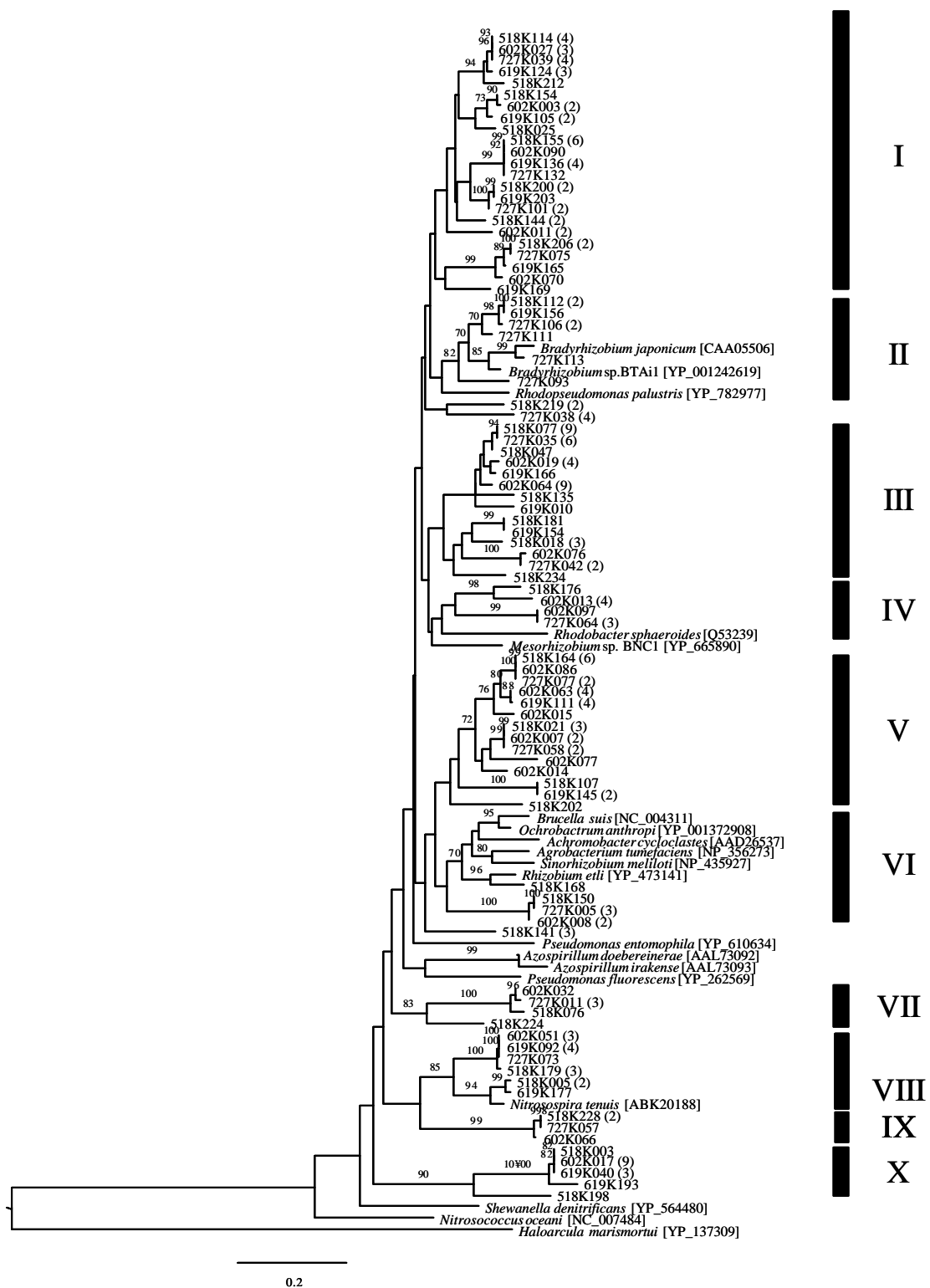


図 3-2 NirK アミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹。ブートストラップ値は 70% 以上のみ表記。518K 5/18 に採取した土壌由来の NirK クローン、602K 6/2 に採取した土壌由来の NirK クローン、619K:6/19 に採取した土壌由来の NirK クローン、727K:7/27 に採取した土壌由来の NirK クローン。

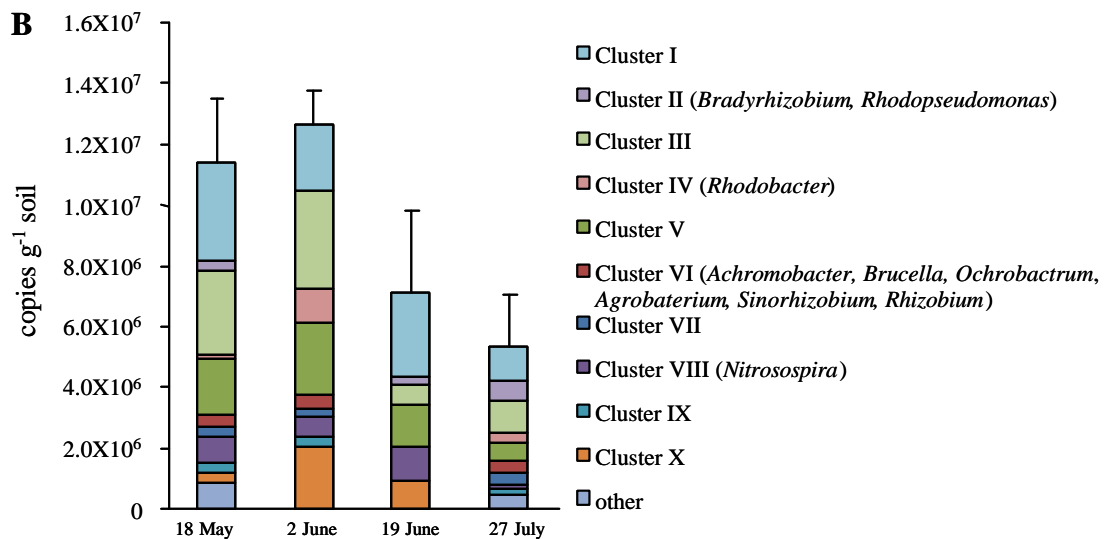
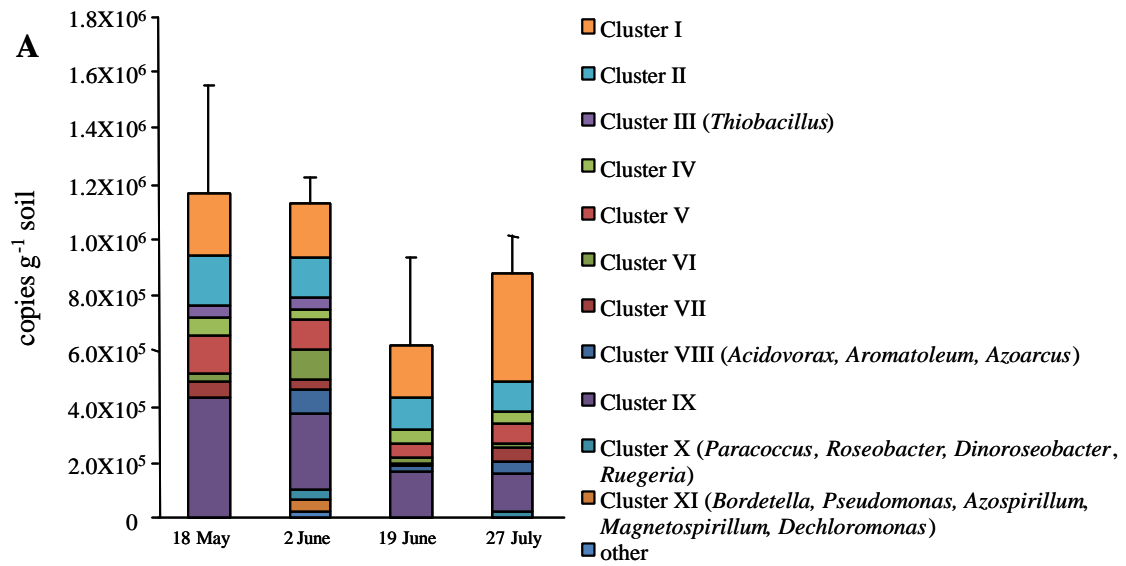


図 3-3 nirS (A) と nirK (B) の遺伝子コピー数と構成するクラスター。図 2-1(A)、図 2-2(B) の系統樹上の各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合に応じて表示した。

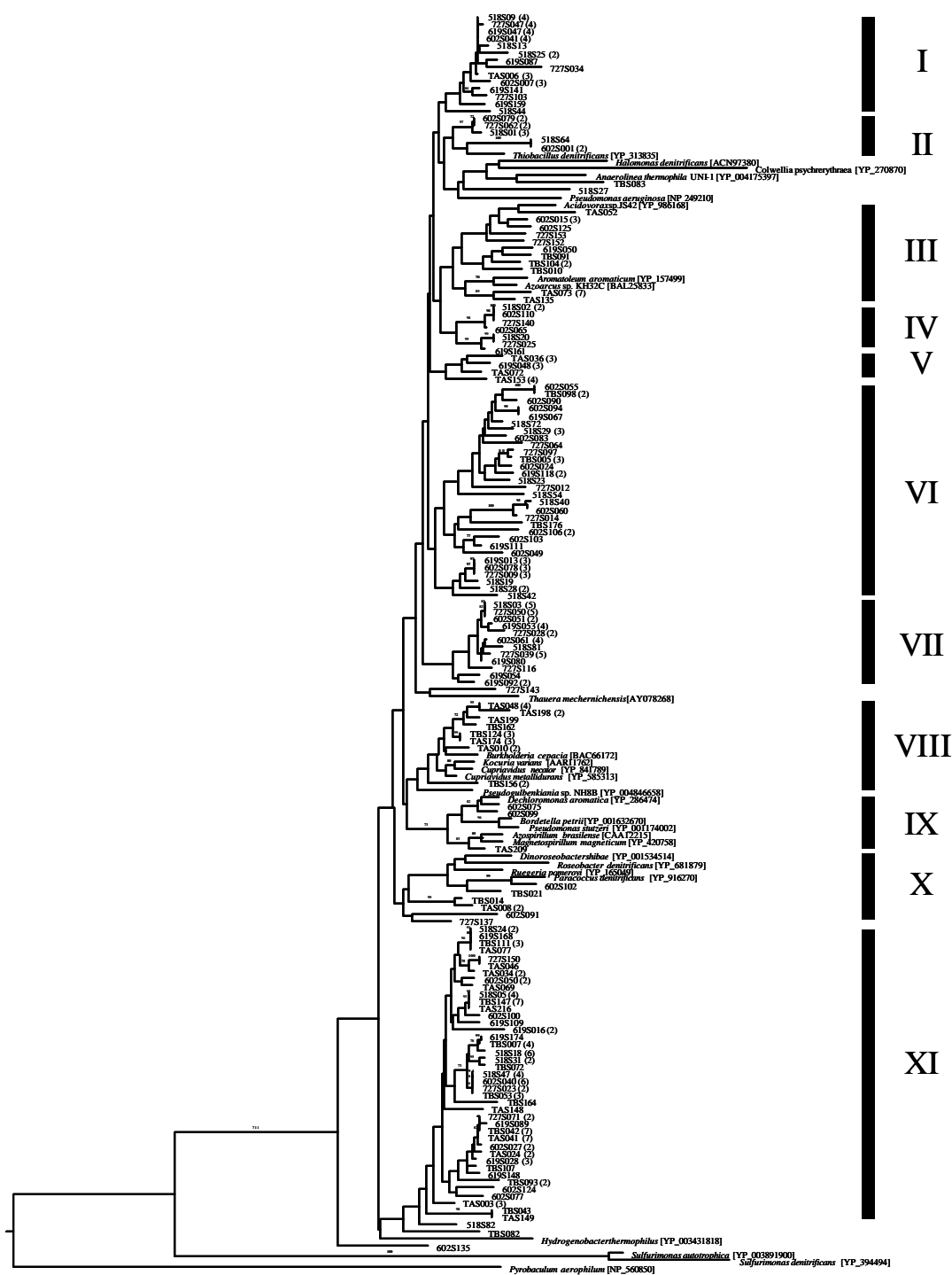


図 3-4 NirS アミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹。ブートストラップ値は 70% 以上のみ表記。TBS 実験室内モデル水田の土壌の培養前の土壌由来の NirS クローン、TAS 実験室内モデル水田の土壌の培養後の土壌由来の NirS クローン、518S 5/18 に採取した土壌由来の NirS クローン、602S 6/2 に採取した土壌由来の NirS クローン、619S:6/19 に採取した土壌由来の NirS クローン、727S:7/27 に採取した土壌由来の NirS クローン。

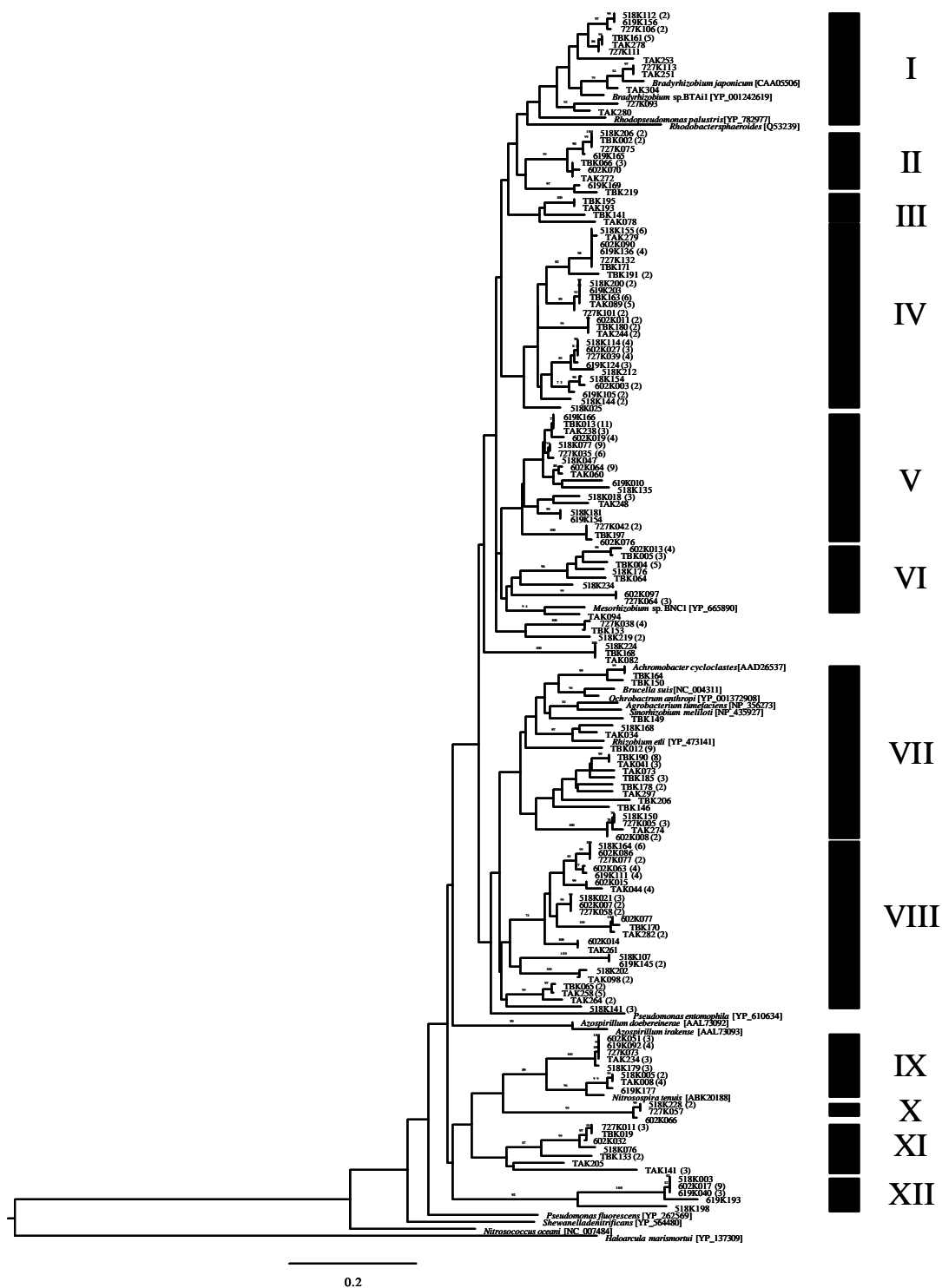


図3-5 NirKアミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹。ブートストラップ値は70%以上のみ表記。TBK 実験室内モデル水田の土壌の培養前の土壌由来の NirK クローン、TAK 実験室内モデル水田の土壌の培養後の土壌由来の NirK クローン、518K 5/18 に採取した土壌由来の NirK クローン、602K 6/2 に採取した土壌由来の NirK クローン、619K:6/19 に採取した土壌由来の NirK クローン、727K:7/27 に採取した土壌由来の NirK クローン。

第四章 実験室内モデルを用いた水田土壌の脱窒機能遺伝子の発現解析

4-1 緒言

第二章、第三章では水田土壌の脱窒微生物の群集構造を DNA に基づき脱窒機能遺伝子を標的として解析した。DNA に基づいた解析は、土壌中に存在する脱窒微生物の群集構造を調べるのには適しているが、実際に土壌中で脱窒を行っている微生物を特定することは一般的には難しい。そのため、第二章、第三章では脱窒活性の異なる土壌における脱窒微生物の群集構造を比較することによって、脱窒を担っている微生物を特定することを行ってきた。一方、より直接的に脱窒に機能している微生物を明らかにするためには、土壌から抽出した RNA を用い、実際に発現されている遺伝子配列を解析をするのが望ましい。RNA は DNA に比べて分解されやすく、土壌から RNA を抽出するのは困難であったが、近年、Burgmann (2003) や Wang (2008) によって、土壌 RNA 抽出技術が発達してきた。

以上を背景に、本章では土壌で実際に活動している脱窒菌を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。本実験の供試土壌としては、土壌 RNA 抽出が可能な土壌として予備実験で見出した新潟県農業総合研究所の水田土壌 (灰色低地土) を用いた。まず再現可能な実験系であり、土壌培養時の経時的な脱窒活性の変化が明らかな実験室内モデルを用いた。培養した土壌から RNA と DNA を抽出し、RNA は逆転写して cDNA とした後、16S rRNA と脱窒機能遺伝子を標的とした定量的 PCR を行い、培養による脱窒機能遺伝子の存在量と発現量の変化を測定した。また、培養前の土壌と脱窒活性が高い時期の土壌 DNA, cDNA を用いて脱窒機能遺伝子を標的とした PCR-クローンライブラリ解析を行い、水田土壌で実際に脱窒を担う微生物の群集構造の特定を試みた。

以上の成果を第四章で記述する。

4-2 実験方法

4-2-1 供試土壌とサンプリング

第二章、第三章で用いた生態調和農学機構の水田土壌(黒ボク土)からは RNA 抽出が困難であったため、本実験では RNA の抽出が可能な土壌として予備実験で見出していた新潟県農業総合研究所の水田土壌を用いた。

2009 年 4 月 23 日に新潟県農業総合研究所(新潟県長岡市)の水田土壌から採取した土壌を使用した。土壌は水田の離れた地点から表層約 10 cm を採取し、冷蔵して持ち帰り 2 mm の篩を通して礫や植物残渣などを除いた後、4℃ で保存されていたものである。

土壌は灰色低地土であり、土性は埴壤土 (clay loam)、 $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})=5.6$ である(Ishii et al., 2010a)。

4-2-2 実験室内モデル水田土壌のインキュベーション

第二章で用いたのと同様の実験室内モデル実験系を用いた。ただし、第二章とは異なり、土壌の乾燥の影響を防ぐため、供試土壌は風乾土ではなく湿潤土を用いた。また、アセチレンによる NosZ の阻害を防ぐため、バイアル瓶の気相は 100%アルゴンで置換した。

5 g(乾燥重量 3g 相当)の生土をバイアル瓶に入れ、5.4 ml(最大容水量の三倍)の滅菌蒸留水を加えて 30℃ で一週間ブレインキュベーションを行った。ブレインキュベーション終了後、余分な水を捨て、0.3 mg-N NO_3^- 、1.5 mg-C コハク酸を添加してボルテックスミキサーで懸濁した。バイアル瓶にゴム栓とスクリュウキャップで蓋をした後、気相を 100%アルゴンガスで置換し、0、6、12、16、20、24 時間培養を行った。培養時間それぞれについて、バイアル瓶は各 3 本ずつ用いた。

本章で使用した土壌のインキュベーションでは、脱窒活性は培養時間の経過と共に高まり、培養 16 時間でピークに達する事が調べられている(藤井、未発表。図 4-1)。

4-2-3 DNA 抽出

DNA は土壌 0.5 g から UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA,

USA)を用いて抽出、精製した。抽出した DNA は 1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、土壌抽出 DNA のバンドの存在を確認した。腐植などの PCR 阻害物質の影響を減らすため、抽出した DNA 溶液を PCR 用には 50 倍、定量的 PCR 用には 10 倍に希釈した。また、PCR 用の DNA 溶液は 3 サンプルの DNA が等量になるように混合した。

4-2-4 RNA 抽出 逆転写

RNA はバイアル瓶一つにつき1連で、土壌3.2 g(乾燥重量2.0 g 相当)からRNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (MoBio Laboratories)を用いて抽出し、腐植の除去のため MicroSpin Columns S?400 HR (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を用いて精製した。さらに、Turbo DNA-free kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて残存するDNA の分解を行い、RNA Clean & Concentrator-5 kit (Zymo Research, Orange, CA, USA)を用いて DNase の除去とRNA の濃縮を行った。抽出した RNA の収量は NanoDrop 1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA)を用いて測定した。また、抽出した RNA 溶液中に DNA が残存しているかどうかは、逆転写する前の RNA 抽出液を用いて、表 4-1 に示す 16S rRNA を標的としたプライマーを用いた PCR と電気泳動を行い、バンドが出ない事を確認した。精製した RNA は、PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa Bio, Otsu, Shiga, Japan)に、RNase 阻害剤として SUPERase-In RNase Inhibitor (Applied Biosystems)を加えて、ランダム6-mer のプライマーを用いて PrimeScript Reverse Transcriptase のプロトコルに従って逆転写を行い、cDNA として-20 で保存した。逆転写した cDNA は 16S rRNA の定量的 PCR 用に 1000 倍に希釈し、脱窒機能遺伝子(nirS, nirK, nosZ)の定量的 PCR 用には 10 倍に希釈した。また、PCR 用に、3 サンプルの cDNA が等量になるように混合し 10 倍に希釈した。

4-2-5 定量的 PCR

DNA、cDNA それぞれを元に、16S rRNA, nirS, nirK, nosZ を標的とした定量的 PCR を行った。それぞれの遺伝子に対し、16S rRNA は 357F/520R (Lane, 1991; Moyer et al., 1993)、nirS は

modified-Cd3aF/-R3Cd (Kandeler et al., 2006)、nirK は F1aCu/R3Cu (Throback et al., 2004)、nosZ は nosZ-F/nosZ-R (Geets et al., 2007)のプライマーを用いた。プライマーの詳細は表 4-1 に示す。各反応の反応溶液は 2-2-7 で示した通りである。16S rRNA の反応条件は 95 10 分のプレヒートの後、95 15 秒、60 30 秒を 40 サイクル行い、95 15 秒、60 30 秒の後に Melting Curve を作成した。nirS, nirK の反応条件については、2-2-7 と同様に行った。nosZ の反応は Geets (2007)による手法に従った。反応は StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用い、SYBR-Green 法によって測定した。

4-2-6 PCR

DNA, cDNA それぞれを元に、16S rRNA, nirS, nirK, nosZ を標的とした PCR を行った。それぞれの遺伝子に対し、16S rRNA は modified-27F/-1492R (Tyson et al., 2004)、nirS は Cd3aF/R3cd (Throback et al., 2004)、nirK は F1aCu/R3Cu (Throback et al., 2004)、nosZ は nosZ-F-1181/-R-1880 (Rich et al., 2003)のプライマーを用いた。プライマーの詳細は表 4-1 に示す。PCR 反応溶液(20 μ l)は BSA が 10 μ g、Tris⁺HCl (pH 7.5)が 10 mM、NaCl が 10 mM、EDTA が 0.01 mM、dithiothreitol が 0.2 mM、glycerol が 5% (w v⁻¹)、MgCl₂ が 1.5 mM、dNTP が各 0.2 mM、F-プライマーとR-プライマーがそれぞれ 1 μ M、BIOTaq HS DNA polymerase (Bioline, London, UK)が 2 units となるように調製し、1 μ lのテンプレートを追加した。PCR 反応は GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用い、95 10 分のプレヒートの後、各プライマーの参考論文に従った反応で行った。また、cDNA は濃度が低かったため、nirK, nosZ の PCR 反応は一回目の反応生成物を 10 倍に希釈して再度同じ条件で PCR 反応を行った。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルによる電気泳動を行い、目的のサイズのバンドが現れているか確認を行った。

4-2-7 クローンライブラリ作製とシーケンス

第二章の 2-2-5 で述べた手法と同様にクローニングを行い、得られたクローンについてシーケ

ンスを行った。プライマーは、nirS, nirK, nosZ は M13 vector primers M3/ RV-P を用い、16S rRNA は M13 vector primers M3/ RV-P、357F/519R (Lane, 1991)、803F/U907R (Baker et al., 2003) を用いてシーケンスを行った。プライマーの詳細は表 4-1 に示した。

4-2-8 系統解析

16S rRNA は DOTUR program ver. 1.53 (Schloss and Handelsman, 2005) を用いて 99% 以上一致するクローン同士を同一 OTU とし、多様性解析を行った。また、Ribosomal Database Project classifier program (Wang et al., 2007) を用いてクローンの系統を推定した。nirS, nirK, nosZ は第二章の 2-2-6 と同様に OTU を作成し、多様性解析を行った。また、系統樹も第二章 2-2-6 と同様に作成した。

4-2-9 アクセッション番号

本章で得た塩基配列のうち、OTU の代表株の塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank に登録した。登録番号は、AB672106?AB672500 である。

4-3 結果と考察

4-3-1 定量的 PCR

DNA を対象とした定量的 PCR によって明らかになった、土壌の培養にともなう遺伝子コピー数の変化を図 4-2 A, B, C に示した。16S rRNA の遺伝子コピー数は土壌の培養前は 1.4×10^9 copy g soil⁻¹ であったが、土壌の培養 16 時間後から増加し、土壌の培養 24 時間後には 3.2×10^9 copy g soil⁻¹ となりコピー数は最大となった (図 4-2 A)。脱窒機能遺伝子についても 16S rRNA と同様に、nirS のコピー数は土壌の培養前は 8.2×10^5 copy g soil⁻¹ であったが、土壌の培養後には 1.5×10^6 copy g soil⁻¹ に増加する傾向が見られ (図 4-2 B)、nirK のコピー数は土壌の培養前は 5.4×10^5 copy g soil⁻¹ だったが、土壌の培養 20 時間後から 24 時間後にかけて急激に増加し、 3.1×10^6

copy g soil⁻¹ に増加した(図 4-2 C)。これらの結果から、実験室内モデル水田の培養によって、土壌中の細菌数は増加し、また、nirS 保有微生物ならびに nirK 保有微生物も増加している事が明らかになった。

本研究で用いた土壌では、nirS コピー数と nirK コピー数は同程度であり、nirS を保有する微生物と nirK を保有する微生物の数が同程度である事が示唆された。これは、第二章、第三章で用いた土壌とは異なる結果となった。水田土壌では nirK 保有脱窒菌が優占するという報告(Bannert et al., 2011; Chen et al., 2010)があるが、nirS 保有脱窒菌の方が nirK 保有脱窒菌より多く存在する土壌もあり(Henry et al., 2008; Kandeler et al., 2006)、土壌の何らかの性質や環境が影響すると考えられる。

cDNA に基づく定量的 PCR によって明らかになった、土壌の培養にともなう遺伝子の発現量の変化を図 4-2 D, E に示した。16S rRNA の発現量は、土壌の培養前では 1.3×10^9 copy g soil⁻¹ であったが、土壌の培養開始と共に徐々に増加し、土壌の培養 12 時間後から急激に増加し、培養 20 時間後には 1.2×10^{11} copy g soil⁻¹ となり発現量が最大となった(図 4-2 D)。

nirS の発現量も 16S rRNA と同様の傾向が見られ、土壌の培養前は 3.8×10^4 copy g soil⁻¹ であったが、土壌の培養 20 時間後に 5.2×10^5 copy g soil⁻¹ となり発現量が最大となった(図 4-2 E)。図 4-1 で示した実験室内モデル水田における脱窒活性は土壌の培養から 16 時間後に最大となっており nirS の発現量は、脱窒活性を反映していると考えられる。一方で nirK の発現量は土壌の培養前後にかかわらず検出限界(2.5×10^3 copy g soil⁻¹)以下であった。

DNA 及び cDNA に基づく定量的 PCR の結果を比較すると、16S rRNA の発現量は、土壌の培養前は遺伝子コピー数と同程度であったが、土壌の培養によって遺伝子コピー数を上回った(図 4-2 A, D)。このことから、培養前の土壌では細菌の活性は低い、土壌の培養によって活性が高まったと考えられる。一方、脱窒機能遺伝子 nirS の発現量は、遺伝子コピー数に比べて一桁程度小さく、nirK の発現は検出されなかった(図 4-2 B-E)。このことから、水田土壌に存在する nirS または nirK を保有する微生物のうち、実際にそれらを発現しているのは一部であることが示唆され

た。ただし、*Pseudomonas* 属の *nirS* の mRNA の半減期は細胞中で 12.6 分である(Hartig et al., 1999)など、mRNA は短命であること、環境中には RNA 分解酵素である RNase が豊富に存在するため、抽出や逆転写操作中に mRNA が分解されてしまった可能性も考えられる。

DNA、cDNA を用いて *nosZ* を標的とした定量的 PCR も行ったが、増幅産物のクローニングを行い、塩基配列を解読したところ、非特異的な増幅とみられる配列が多く、信頼性の低いデータと考えられた。

定量的 PCR の結果、培養開始から 20 時間経過した土壌で 16S rRNA と *nirS* の発現量が最大になった(図 4-2 D, E)。このことから、本研究で用いた実験室内モデル水田では土壌の培養を開始してから 20 時間後に最も微生物の活性が高まり、活発に脱窒機能遺伝子を発現していると考えられた。そのため、培養 20 時間後の土壌に発現している脱窒機能遺伝子を明らかにすることで、水田で実際に脱窒を担う微生物を特定できると期待された。そこで、培養 20 時間後と比較として培養前の土壌から抽出した DNA ならびに RNA サンプルをテンプレートとして以降の PCR-クローンライブラリ解析を行った。

4-3-2 16S rRNA の系統解析

16S rRNA を標的とした PCR-クローンライブラリを作製した結果、培養前(培養 0 時間)の土壌の DNA からは 93 クローン、cDNA からは 35 クローン、培養後(培養 20 時間)の土壌の DNA からは 63 クローン、cDNA からは 148 クローンを得た(表 4-2)。得られたクローンの遺伝子配列を元に DOTUR による多様性解析の結果を表 4-2 に示した。その結果、土壌の培養前の DNA の Chao 1 指数は 637、Shannon 指数は 4.34、Simpson 指数は 267.34 であったが、土壌の培養後の DNA の Chao 1 指数は 348、Shannon 指数は 3.90、Simpson 指数は 130.00 であり、土壌の培養によって多様性指数は減少し、土壌中に存在する細菌の多様性は小さくなったといえる。このことから、土壌中に多様に存在していた細菌のうち、培養条件に適した一部の微生物が増殖し、群集構造に変化が起きたものと考えられる。

cDNA に基づく多様性解析を行った結果、培養前の土壌では Chao 1 指数が 26.5、Shannon 指数が 2.781、Simpson 指数が 22.037 であったが、培養後の土壌では Chao 1 指数は 149.0、Shannon 指数は 3.455、Simpson 指数は 16.383 であった(表 4-2)。Simpson 指数は培養前の土壌の方が大きかったが、Chao 1 指数、Shannon 指数は培養後の土壌で大きくなった。このことから、培養前の土壌では活性の高い細菌は少ないが、土壌の培養によって多様な細菌の活性が高くなったと思われる。

DNA と cDNA 由来の 16S rRNA クローンの DNA 塩基配列に基づき作成した近隣結合系統樹を図 4-3 に示した。系統樹上の分布と RDP classifier による分類はほぼ一致していた。RDP classifier によって各分類群に分類されたクローン数の割合を図 4-7 A に示した。

DNA に基づく解析では、土壌の培養前と培養後で Firmicutes 門、Betaproteobacteria 綱に分類されたクローンの割合が増加した。一方、Actinobacteria 門、Planctomycetes 門、Bacteroidetes 門、Alphaproteobacteria 綱、Deltaproteobacteria 綱に分類されるクローンの割合は土壌の培養後にそれぞれ減少した(図 4-7 A)。

cDNA に基づく解析では、土壌の培養によって、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Deltaproteobacteria 綱に分類されるクローンの割合が減少した(図 4-7 A)。一方、Betaproteobacteria 綱、Acidobacteria 門に分類されたクローンの割合は培養後に大きく増加した。

Betaproteobacteria 綱に分類されたクローンの内訳を調べたところ、DNA、cDNA の培養前では Burkholderiales 目に分類されるクローンが Betaproteobacteria 綱に分類されるクローンの各々 72.7%、75.0%を占めていたのに対し、培養後は DNA、cDNA 共に 13.3%に減少した。一方、Neisseriales 目に分類されたクローンは、培養前には存在していなかったが、培養後には DNA で 60.0%、cDNA で 50.0%と急激に増加した。また、Rhodocyclales 目に分類されるクローンは DNA では培養前から培養後に、27.3%から 20.0%に減少したのに対し、cDNA では 25.0%から 34.7%に増加した。また、Rhodocyclales 目に分類された cDNA 由来のクローンの多くは Zoogloea 属細菌の 16S rRNA と同姓が高かった。

本研究で用いた新潟県農業総合研究所の水田土壌の脱窒活性を同様に高めた土壌で機能している脱窒菌として、Pseudogulbenkiania 属などの Neisseriales 目に近縁な微生物が多数分離されている(Tago et al., 2011)。さらに、本研究で得られたクローンについてBLASTによる相同性検索を行った結果、脱窒が活発な時期である土壌の培養 20 時間後の cDNA 由来のクローンである R20h16S001 (アクセッション番号は AB672261)を含む 49 クローンの 16S rRNA 配列と最も相同性が高かった配列は、Tago et al. (2011)によって分離された Pseudogulbenkiania sp. NH8B の 16S rRNA の配列(アクセッション番号は AB551594)であった。この結果から、Pseudogulbenkiania 属に分類される微生物は室内実験モデル水田の土壌中で活性が高い可能性がある。また、Betaproteobacteria 綱の Rhodocyclales 目に属する Zoogloea 属細菌には脱窒能を持つものがあることが知られており(Mohn et al., 1999)、Acidobacteria 門に属する細菌にも、亜硝酸還元能を持つものがあることが知られている(Ward et al., 2009)。Betaproteobacteria 綱と Acidobacteria 門が活発に脱窒を行い、増殖した結果、割合が増加していると考えられる。一方、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Deltaproteobacteria 綱に分類されるクローンの割合は、DNA と cDNA の両方で土壌の培養後に減少していたが、16S rRNA のコピー数や発現量が土壌の培養後に増加したことも併せて、これらの微生物は水田土壌中ではあまり活性が高くなく、増殖もしていないため、活性が高く増殖した微生物と比較して相対的に割合が減少したと考えられる。

4-3-3 NirS の系統解析

nirS を標的とした PCR-クローンライブラリを作製した結果、培養前の土壌の DNA からは 84 クローン、cDNA からは 89 クローン、培養後の土壌の DNA からは 129 クローン、cDNA からは 99 クローンを得た(表 4-2)。NirS アミノ酸配列を基に DOTUR による多様性解析の結果を表 4-2 に示した。その結果、培養前の DNA の Chao 1 指数は 64.2、Shannon 指数は 3.499、Simpson 指数は 34.515 であったが、培養後の DNA の Chao 1 指数は 76.3、Shannon 指数は 3.676、Simpson 指数は 42.557 であり、土壌の培養によって多様性指数は増加し、土壌中に存在する細菌の多様性が増したこと

が示唆された。このことから、土壌の培養によって nirS を保有する多様な微生物が増殖し、多様な nirS が存在するようになったものと考えられる。

cDNA に基づく解析では、培養前の土壌では Chao 1 指数が 12.3、Shannon 指数が 0.811、Simpson 指数が 1.514 であったが、培養後の土壌の Chao 1 指数は 26.3、Shannon 指数は 2.527、Simpson 指数は 8.601 となり(表 4-2)、土壌の培養後に多様性指数が大きく増した。nirS の発現量は土壌の培養前には非常に少なかったとの定量的 PCR の結果と併せて、土壌中では、脱窒に適さない環境ではごく一部の nirS を保有する微生物が nirS を発現し、本研究で用いたような脱窒に適した環境におかれることで、様々な nirS を保有する脱窒菌が nirS を発現するようになったと思われる。

NirS のアミノ酸塩基配列に基づき近隣結合系統樹を図 4-4 に示した。得られた NirS のクローンは 10 のクラスター(Cluster I-X)に分類された(図 4-4)。このうち、Cluster III は Betaproteobacteria 綱の Hydrogenophilales 目に属する Thiobacillus 属の NirS 配列を含み、Cluster V は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Acidovorax 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属、Cluster VII は Alphaproteobacteria 綱の Rhodospirillales 目に属する Azospirillum 属 と Magnetospirillum 属、Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Bordetella 属、Rhodocyclales 目に属する Dechloromonas 属、Gammaproteobacteria 綱に属する Pseudomonas 属、Cluster VIII Actinobacteria 門に属する Kocuria 属と Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Burkholderia 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属、Cluster IX は Chloroflexi 門に属する Anaerolinea 属の NirS 配列を含んでいた。一方、Cluster I, II, IV, VI, X は既知の微生物の NirS を含まなかった。

NirS クローンが図 4-4 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を図 4-7B に示した。DNA に基づくクローンライブラリで得られた NirS クローンのうち、既知の微生物の NirS を含まない Cluster II, V, X に分類された NirS クローンの割合は土壌の培養後に増加し、一方、Cluster III, VII に分類される NirS クローンの割合は減少した(図 4-7 B)。

DNA に基づくクローンライブラリで得られた NirS クローンのうち、土壌の培養前に得られたクローンのほとんどが既知の微生物の NirS を含まない Cluster I に分類され、他のクラスターに分類される NirS クローンは存在しなかった。しかし、土壌の培養後に Cluster I に分類される NirS クローンの割合が減少した一方で、Cluster II, III, V, VII, VIII, X に分類される NirS クローンの割合は、それぞれ増加した (図 4-7 B)。この結果は、土壌の培養前はほとんどの nirS を保有する微生物が nirS を発現せず、土壌を培養することによって、様々な nirS を保有する微生物が nirS を発現するようになったことを示唆しており、培養前の土壌では nirS の発現量が少ないが培養後の土壌で nirS の発現が増加したとの定量的 PCR の結果ならびに、多様性解析の結果土壌の培養後に多様性指数が大きく増したと整合する。

DNA と cDNA それぞれの解析結果を比較すると、既知の微生物の NirS を含まない Cluster II, V, X に含まれるクローンの割合は DNA、cDNA の両方で培養後に増加しており、本研究で用いた実験室内モデル水田では、既知の微生物の NirS とは近縁でない NirS をコードする nirS を保有する微生物が増殖し、nirS を発現している事が示唆された。また、Cluster III, VII に含まれる NirS クローンの割合は DNA では土壌の培養後に割合が減少しているが、cDNA では土壌の培養後にこのクラスターに分類されるクローンが出現した。そのため、Cluster III, VII に分類される NirS をコードする nirS を保有する微生物は、顕著な増殖はしていないが、nirS の発現は行っていると考えられる。既知の微生物の NirS を含まない Cluster I は、培養前の土壌と比較して土壌の培養後には DNA、cDNA 両方の割合が減少した。しかし、培養前の土壌と比べて培養後の土壌では nirS の遺伝子コピー数が増加し (図 4-2 B)、nirS の発現量も増加した (図 4-2 D) ことから、Cluster I に分類された NirS をコードする nirS を保有する微生物は、顕著な増殖はしないが、土壌の培養前後の両方で nirS を発現していると考えられる。

既知の微生物の NirS を含まない Cluster IV, VI には DNA 由来のクローンが分類されたが、cDNA 由来のクローンは含まれず、nirS を保有していながら本実験の条件下では脱窒を行わない微生物の存在が示唆された。

4-3-4 NirK の系統解析

nirK を標的としたクローンライブラリを作製した結果、培養前の土壌の DNA から 31 クローン、培養後の土壌の DNA から 45 クローン、培養前の土壌の cDNA から 67 クローン、培養後の土壌の cDNA から 47 クローンを得た。しかし、培養前の土壌の cDNA 由来の 67 クローンと、培養後の土壌の cDNA 由来の 24 クローンは DNA 塩基配列からアミノ酸塩基配列に変換すると配列の途中で終止コドンが出現し、Pseudo gene であると考えられたため、その後の解析から除いた。そのため、cDNA のクローンは培養後の土壌の 23 クローンのみ解析に用いた。

得られた配列を用いて NirK のアミノ酸塩基配列を基に DOTUR による多様性解析を行った結果を表 4-2 に示した。培養前の土壌の DNA では、Chao 1 指数は 8.0、Shannon 指数は 1.410、Simpson 指数は 3.370 であり、培養後の土壌の DNA は培養後の Chao 1 指数は 8.0、Shannon 指数は 1.648、Simpson 指数は 4.853 であった(表 4-2)。培養前と培養後の土壌の DNA での多様性指数を比較すると、土壌の培養によって多様性指数は増加し、土壌中に存在する細菌の多様性が増したことが示唆された。このことから、土壌の培養によって nirK を保有する脱窒菌が増殖し、多様な nirK 保有微生物が存在するに至ったものと考えられる。

培養後の土壌の cDNA の解析では、Chao 1 指数は 2.0、Shannon 指数は 0.669、Simpson 指数は 1.992 であった(表 4-2)。DNA の多様性指数と cDNA の多様性指数を比較すると、cDNA の多様性指数は DNA の多様性指数より小さかった。本実験で用いた土壌中では、実際に nirK を発現する nirK を保有する微生物は一部であることが考えられた。

また、16S rRNA、NirS、NosZ の多様性指数と比較して、NirK の多様性指数は DNA、cDNA で共に低い傾向にあった。このことから、本研究で用いた水田土壌中に存在する nirK を保有する微生物、nirK を発現する微生物の多様性は小さいことが示唆された。

得られた NirK クローンのアミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹を図 4-5 に示した。得られたクローンは、配列が 60% 以上一致するかどうかによって 6 つのクラスターに分類された(図 4-5)。このうち、Cluster 1 は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Mesorhizobium 属の NirK を含

み、Cluster II は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属、Cluster IV は Alphaproteobacteria 綱に属する Rhodobacter 属、Cluster VI は Nitrosomonadales 目に属する Nitrosospira 属の NirK を含んでいた。一方、Cluster III, V は既知の微生物の NirK を含まなかった。

NirK クローンが図 4-5 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を図 4-7 C に示した。

DNA に基づく解析で得られたクローンは、Cluster II を除く全てのクラスターに分類された(図 4-7 C)。その中で、Cluster III, IV, V に分類された NirK クローンの割合は、土壌の培養後にそれぞれ増加した。これらのクラスターに分類される NirK をコードする nirK を保有する微生物は、土壌の培養によって増殖したものと考えられた。一方、Cluster I, VI に分類された NirK クローンの割合は、培養後に減少した。しかし、nirK の遺伝子コピー数は土壌の培養によって増加しているため、これらのクラスターに属する NirK をコードする nirK を保有する微生物は顕著な増殖をしていないだけであると考えられる。

cDNA に基づく解析で得られたクローンは、DNA での解析で得られたクローンとはいずれも近縁でなく、Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含む Cluster II にのみ分類された。定量的 PCR を行っても nirK の発現量は検出限界以下であり、多様性解析を行っても発現している nirK の多様性は非常に小さかった(表 4-2)。これらの結果から、本研究で用いた土壌中では、nirK を保有する微生物の中ではわずかな存在量を占める Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属に近縁な NirK をコードする nirK を保有する微生物が nirK を強く発現し、他の nirK を保有する微生物の nirK の発現量を大きくしていることが示唆された。

4-3-5 NosZ の系統解析

培養前の土壌の cDNA からは nosZ を標的とした PCR 増幅が見られなかった。そのため、培養前と培養後の土壌の DNA、培養後の土壌の cDNA からのみクローンライブラリを作製した。クロー

ンライブラリを作製した結果、DNA に基づく解析では培養前の土壌から 26 クローン、培養後の土壌から 84 クローン、cDNA に基づく解析では培養後の土壌から 88 クローンを得た(表 4-2)。NosZ のアミノ酸塩基配列を基にした DOTUR による多様性解析の結果を表 4-2 に示した。その結果、培養前の土壌の DNA では、Chao 1 指数は 19.5、Shannon 指数は 2.302、Simpson 指数は 12.50 であり、培養後の土壌の DNA は培養後の Chao 1 指数は 24.0、Shannon 指数は 2.199、Simpson 指数は 5.796 であった。また、cDNA の解析では、Chao 1 指数は 8.5、Shannon 指数は 1.496、Simpson 指数は 3.455 であり、DNA に基づく多様性指数よりも小さかった(表 4-2)。この結果から本実験で用いた土壌中では、実際に nosZ を発現する微生物は nosZ 保有微生物の一部であることが考えられた。

得られたクローンの NosZ のアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹を図 4-6 に示した。得られたクローンは、配列が 60%以上一致するかどうかによって 6 つのクラスター (Cluster I-VI) に分けられた (図 4-6)。Cluster I は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属、Oligotropha 属、Rhodopseudomonas 属、Brucella 属、Ochrobactrum 属、Sinorhizobium 属の NosZ を含み、Cluster III は Alphaproteobacteria 綱の Rhodobacterales 目に属する Paracoccus 属と Rhodobacter 属、Cluster IV は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Burkholderia 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属、Cluster VI は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Acidovorax 属、Rubrivivax 属の NosZ を含んでいた。一方、Cluster II, V には既知の微生物の NosZ を含まなかった。

NosZ クローンが図 4-6 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を図 4-7 D に示した。

DNA に基づく解析では、Cluster IV に分類されるクローンの割合が土壌の培養後に増加した。一方、Cluster I, II, III, V に分類されるクローンの割合は土壌の培養後に減少した。これらの結果から、Cluster IV に分類される NosZ をコードする nosZ を保有する微生物が土壌の培養によって増

殖することが示唆された。

cDNA に基づく解析で得られたクローンは、Cluster I, II, III には分類されず、Burkholderia 属、Aromatoleum 属、Azoarcus 属 Pseudogulbenkiania 属の NosZ を含む Cluster IV、既知の微生物の NosZ を含まない Cluster V、Cupriavidus 属、Acidovorax 属、Rubrivivax 属の NosZ を含む Cluster VI に分類された。NosZ は NirS や NirK に比べて、系統的な保存性が高いといわれている(Zumft et al., 2006; Ishii et al., 2011c)ため、これらの微生物が nosZ を発現し、N₂O の還元に寄与している可能性が高い。

4-3-6 まとめ

脱窒活性を高める実験室内モデル水田を用いて、土壌 DNA と RNA を逆転写した cDNA に基づく解析を行った。16S rRNA と nirS, nirK の定量的 PCR を行った結果、遺伝子コピー数は土壌の培養によって段階的に増加するが、16S rRNA と nirS の発現量は脱窒活性に従って増減した。

クローンライブラリ解析を行った結果、DNA に基づく解析と比較して、cDNA に基づく解析では cDNA での多様性が小さい傾向があり、土壌中に存在している微生物のうち、実際に活動している微生物が一部であることが示唆された。

16S rRNA を標的としたクローンライブラリ解析の結果、DNA では土壌の培養前後で群集構造に顕著な変化が見られなかったが、cDNA では土壌の培養前後に構成が大きく変化し、脱窒活性が高い培養後の土壌では Betaproteobacteria 綱と Acidobacteria 門、特に Neisseriales 目に属する微生物が目立って活性が高まっていた。nirS を標的とした解析でも、Betaproteobacteria 綱に属する Cupriavidus 属、Burkholderia 属、Thiobacillus 属、Pseudogulbenkiania 属、Acidovorax 属、Aromatoleum 属、Azoarcus 属などに近縁な NirS をコードする nirS を保有する微生物と、未知の nirS を保有する微生物が脱窒に関わっていることが示唆された。さらに、nosZ を標的とした解析でも Betaproteobacteria 綱に属する Thiobacillus 属、Aromatoleum 属、Azoarcus 属、Pseudogulbenkiania 属、Burkholderia 属に近縁な NosZ をコードする nosZ を保有する微生物が

N₂Oの還元を行っていることが示唆された。また、既知の微生物のNirSやNosZとは近縁でない未知のnirS, nosZを保有する微生物によるnirS, nosZの発現も見られた。そのため、本研究で用いた室内モデル実験系においては、Betaproteobacteria綱に属する微生物や、未知の微生物が脱窒を担っている主要な微生物であると考えられる。

一方、nirKを保有する微生物は、nirS, nosZと比較して多様性が低かった。また、DNAとcDNAに基づくクローンライブラリ解析では、cDNA由来のクローンはDNA由来のクローンとは近縁でないAlphaproteobacteria綱に属するBradyrhizobium属、Rhodopseudomonas属に近縁なNirKをコードするnirKを保有する微生物のみがnirKを発現していることが明らかになり、土壌中にごくわずかに存在するこれらの微生物がnirKを強く発現していることが示唆された。

表 4-1 第四章の実験で使用したプライマー

primer	gene	Sequence	Reference
m-27F	16S rRNA	AGR GTT TGA TYM TGG CTC AG	Tyson (2004)
m-1492R	16S rRNA	GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	Tyson (2004)
cd3aF	nirS	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	Throback (2004)
R3cd	nirS	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	Throback (2004)
F1aCu	nirK	ATC ATG GTS CTG CCG CG	Throback (2004)
R3Cu	nirK	GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT	Throback (2004)
nosZ-F1181	nosZ	CGC TGT TCI TCG ACA GYC AG	Rich (2003)
nosZ-R1880	nosZ	ATG TGC AKI GCR TGG CAG AA	Rich (2003)
357F	16S rRNA	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Lane (1991)
520R	16S rRNA	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G	Muyer (1993)
m-Cd3aF	nirS	AAC GYS AAG GAR ACS GG	Kandeler (2006)
m-R3cd	nirS	GAS TTC GGR TGS GTC TTS AYG AA	Kandeler (2006)
nirK876F	nirK	ATY GGC GGV CAY GGC GA	Henry (2004)
nirK1040R	nirK	GCC TCG ATC AGR TTR TGG TT	Henry (2004)
nosZ-F	nosZ	CGY TGT TCM TCG ACA GCC AG	Geets (2007)
nosZ1622R	nosZ	CGC RAS GGC AAS AAG GTS CG	Geets (2007)
M13 vector primers M3	vector	GTA AAA CGA CGG CCA GT	
RV-P	vector	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	
519R	16S rRNA	GWA TTA CCG CGG CKG CTG	Lane (1991)
U907R	16S rRNA	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	Baker (2003)
803F	16S rRNA	GAT TAG ATA CCC TGG TAG	Baker (2003)

表 4-2 得られた各クローンの多様性解析結果

Name of soil		clones	OTUs	ChaoI	Shannon (H')	Simpson (1/D)
D0	16S rRNA	93	82	637.0	4.342	267.375
	NirS	84	43	64.2	3.499	34.515
	NirK	31	7	8.0	1.410	3.370
	NosZ	26	12	19.5	2.302	12.500
D20	16S rRNA	63	54	348.0	3.901	130.200
	NirS	129	51	76.3	3.676	42.557
	NirK	45	7	8.0	1.648	4.853
	NosZ	82	17	24.0	2.199	5.796
R0	16S rRNA	35	19	26.5	2.781	22.037
	NirS	89	9	12.3	0.811	1.514
R20	16S rRNA	148	63	149.0	3.455	16.383
	NirS	99	21	26.3	2.527	8.601
	NirK	23	2	2.0	0.669	1.992
	NosZ	88	8	8.5	1.496	3.455

D0 培養前の土壌の DNA、D20 培養 20 時間後の土壌の DNA、R0 培養前の土壌の cDNA、R20 培養 20 時間後の土壌の cDNA

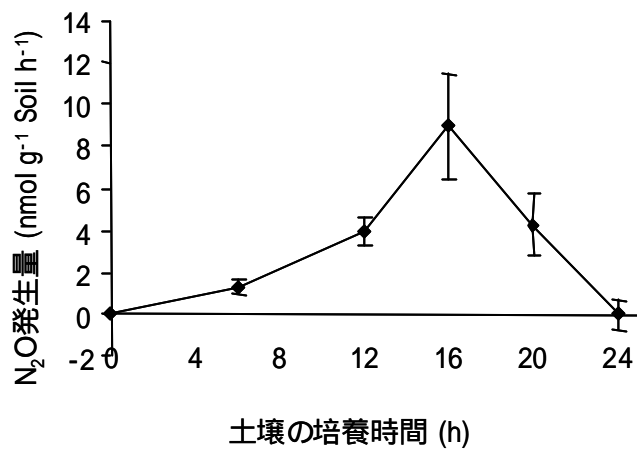


図 4-1 実験室内モデル水田土壌の脱窒活性の経時的変化(藤井、未発表)

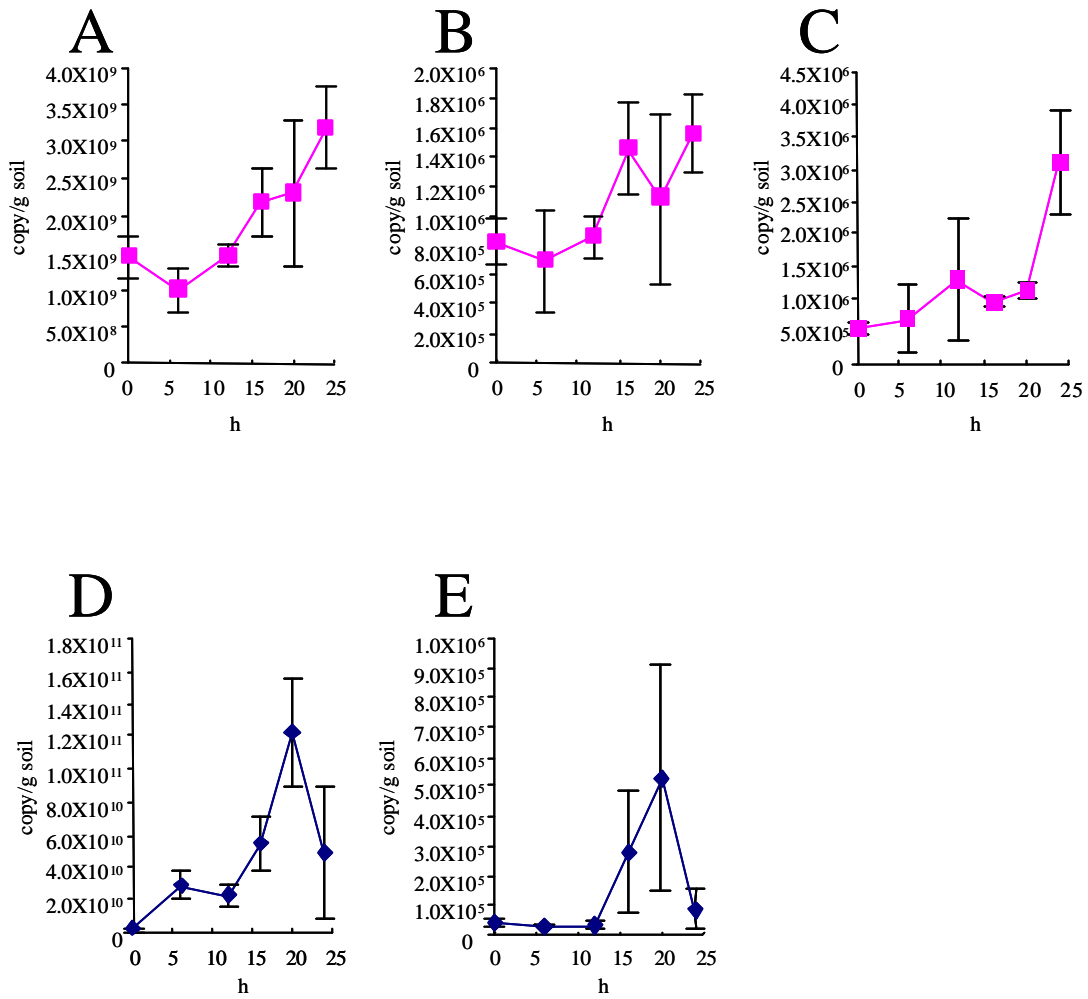


図 4-2 各遺伝子の定量的 PCR による遺伝子コピー数及び発現量の定量。A) DNA, 16S rRNA; B) DNA, nirS; C) DNA, nirK; D) cDNA, 16S rRNA; E) cDNA, nirS



図 4-3 16S rRNA の塩基配列に基づく近隣結合系統樹。bootstrap 値は 70%以上のものを記載。D0h16S 培養 0 時間の DNA 由来の 16S rRNA クローン、D20h16S 培養 20 時間の DNA 由来の 16S rRNA クローン、R0h16S 培養 0 時間の cDNA の 16S rRNA 由来クローン、R20h16S 培養 20 時間の cDNA 由来の 16S rRNA クローン。

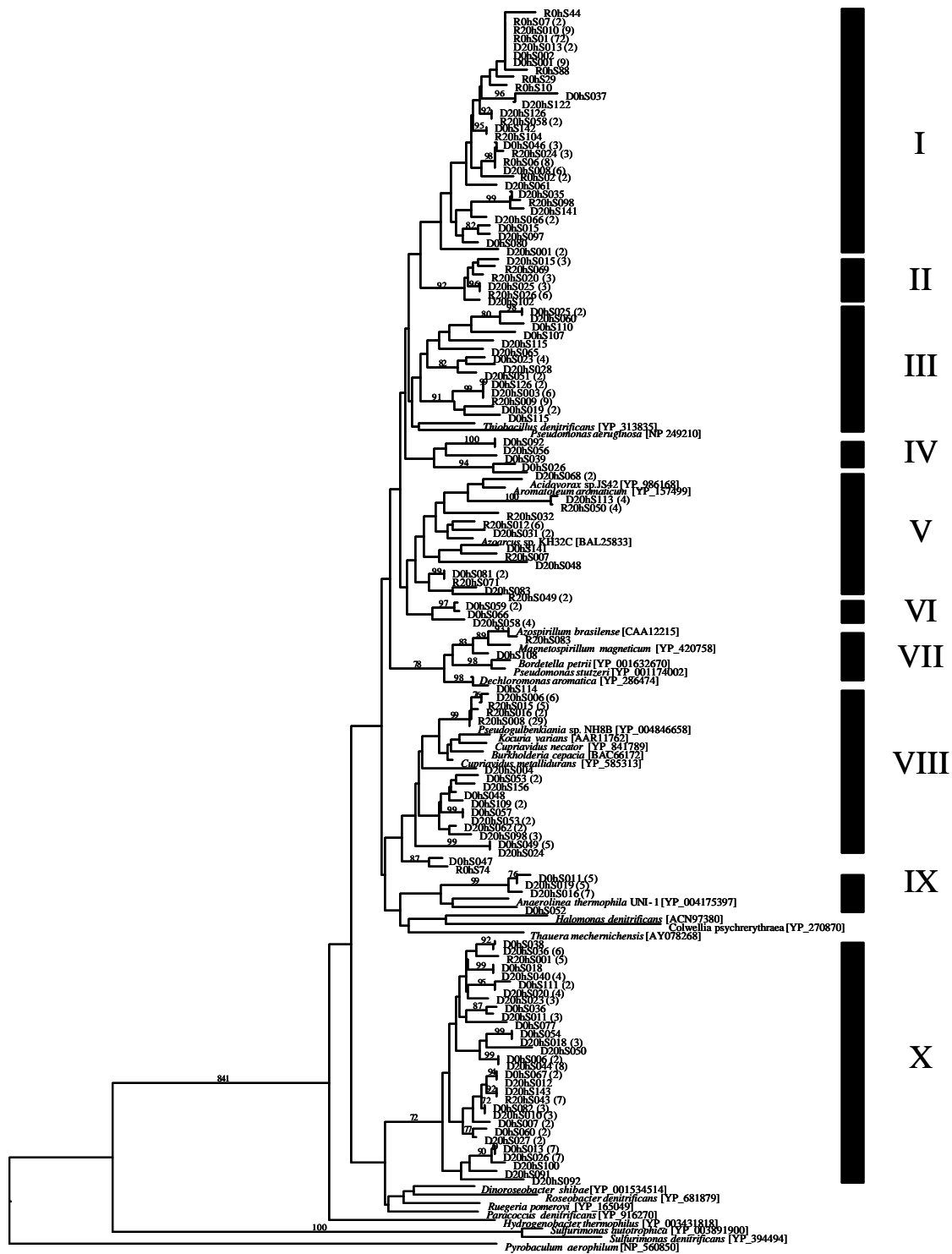


図 4-4 NirS のアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹。bootstrap 値は 700%以上のものを記載。D0hS 培養 0 時間の DNA 由来の NirS クローン、D20hS 培養 20 時間の DNA 由来の NirS クローン、R0hS 培養 0 時間の cDNA の NirS 由来クローン、R20hS 培養 20 時間の cDNA 由来の NirS クローン。

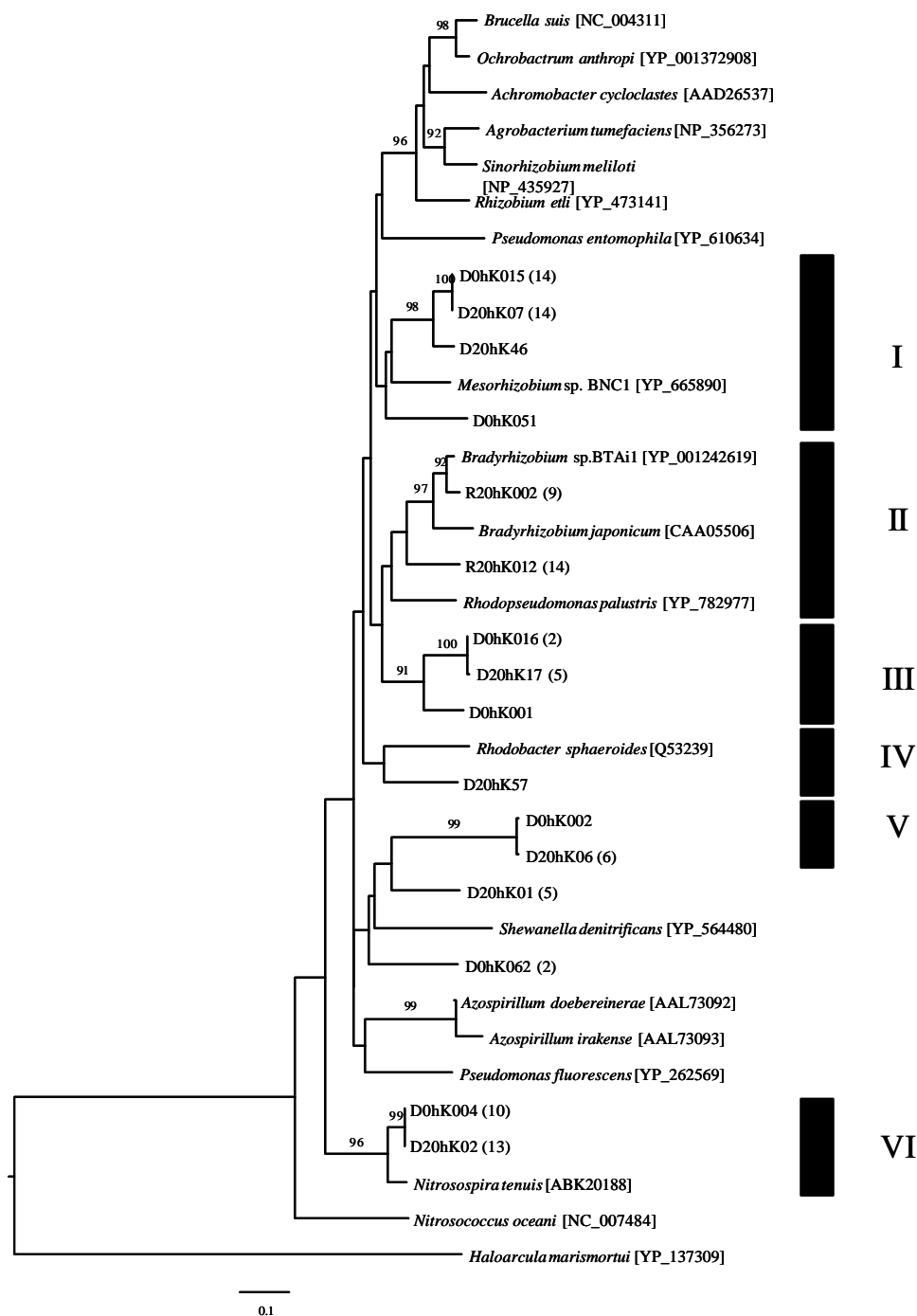


図 4-5 NirK のアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹。bootstrap 値は 70%以上のものを記載。D0hK 培養 0 時間の DNA 由来の NirK クローン、D20hK 培養 20 時間の DNA 由来の NirK クローン、R0hK 培養 0 時間の cDNA 由来の NirK クローン、R20hK 培養 20 時間の cDNA 由来の NirK クローン。

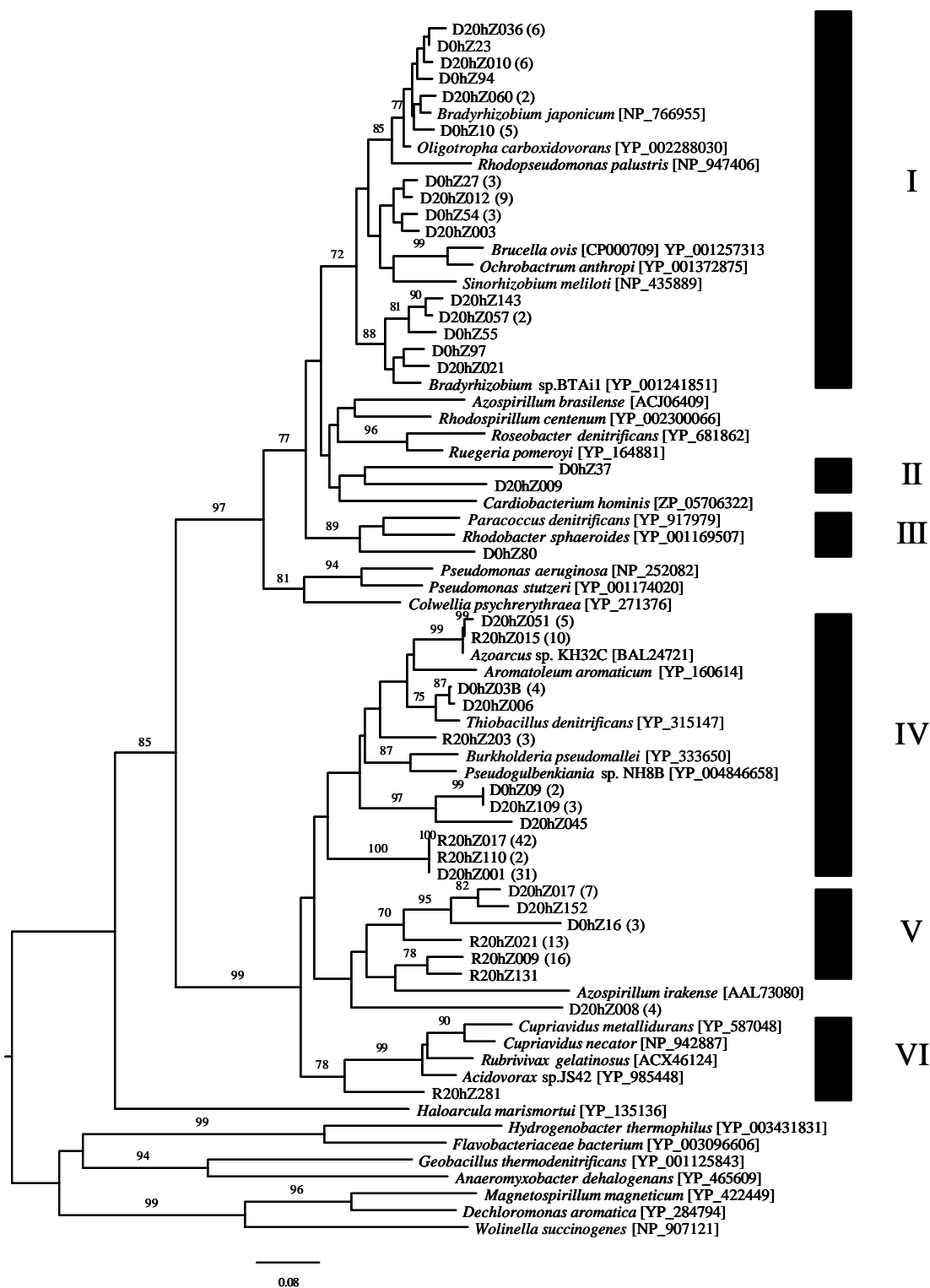


図 4-6 NosZ のアミノ酸塩基配列に基づく近隣結合系統樹。bootstrap 値は 70%以上のものを記載。D0hZ 培養 0 時間の DNA 由来の NosZ クローン、D20hZ 培養 20 時間の DNA 由来の NosZ クローン、R0hZ 培養 0 時間の cDNA の NosZ 由来クローン、R20hZ 培養 20 時間の cDNA 由来の NosZ クローン。

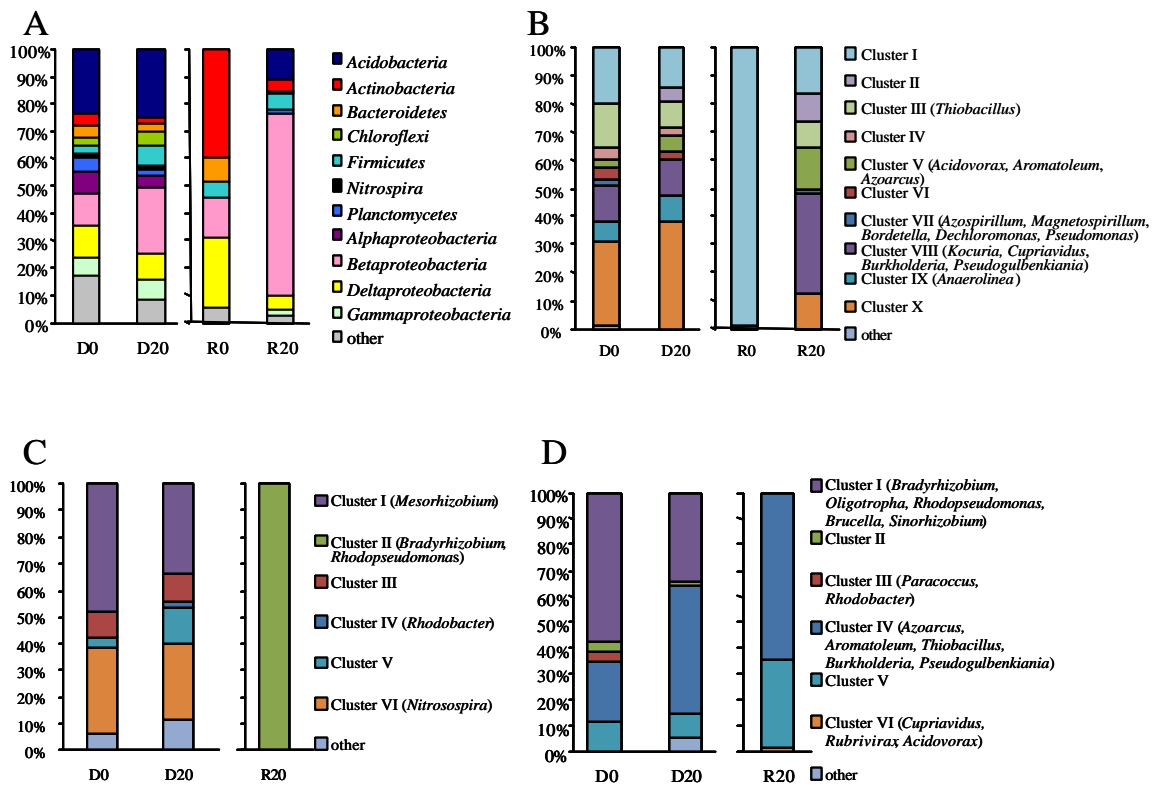


図 4-7 系統実験室内モデルの各土壌サンプルから得られた A) 16S rRNA クローンが RDP classifier によって各分類群に分類されたクローンの割合、B) NirS、C) NirK、D) NosZ クローンが系統樹上の各クラスターに占める割合。D0 培養 0 時間の DNA 由来のクローン、D20 培養 20 時間の DNA 由来、R0 培養 0 時間の cDNA 由来、R20 培養 20 時間の cDNA 由来のクローン。

第五章 水田圃場における脱窒機能遺伝子の発現解析

5-1 緒言

第四章では実験室内モデル水田を用いた脱窒機能遺伝子の発現解析を行った。実験室内モデル水田は、確実に脱窒活性を高めることのできる再現性の高い系であり、また実験室で土壌の培養を行うため土壌の培養後速やかに RNA を抽出できるという利点があるが、脱窒活性を高めるために人工的に基質を添加するため、実際の水田における脱窒を必ずしも再現していない可能性もある。そこで本章では、第四章の供試土壌を採取した新潟県農業総合研究所の水田圃場を研究対象とした。圃場から経時的に採取した土壌から調製された DNA と cDNA のうち、湛水してから 2 週間、5 週間がそれぞれ経過し、土壌の脱窒活性ポテンシャルが高まっている時期の DNA サンプル 2 つと、湛水前も加えた 3 つの cDNA サンプルを選び、脱窒機能遺伝子(nirS, nirK)に基づく群集構造解析を行った。

また、第四章で得られた結果と、本章で得られた結果とを総合して、新潟水田土壌で脱窒を担っている微生物の特定を目指した。

以上の成果を第五章で記述する。

5-2 実験方法

5-2-1 供試土壌

第四章で用いた新潟県農業総合研究所の水田から伊藤ら(2010)によって採取された土壌を用いた。土壌サンプリングは 2009 年のイネ栽培期間中 1~ 2週間毎に行われ、このうち湛水一週間

前の4月23日、湛水2週間後の5月14日、湛水5週間後の6月4日の土壌を用いた。このうち、5月14日は湛水後、土壌 Eh が低下する途中にあり、湛水してから最初に脱窒活性ポテンシャルが高まった時期である。また、6月4日は土壌 Eh が下がりにメタン生成も始まっているが、湛水期間中最も脱窒活性ポテンシャルが高まった時期である。

5-2-2 核酸抽出

伊藤ら(2010)によって抽出された土壌 DNA と、土壌 RNA を逆転写し cDNA としたものをを用いた。各土壌から DNA と RNA は 3 連ずつ抽出され、PCR のため、土壌 DNA は 100 倍に、cDNA は 10 倍に希釈し、核酸濃度が等量となるよう 3 サンプルを混合した。

5-2-3 PCR、クローンライブラリ作製とシーケンス、系統解析、定量的 PCR

DNA、cDNA それぞれを元に、nirS、nirK を標的とした PCR を行った。使用したプライマーと反応溶液は 4-2-6 と同じである。PCR 反応は 4-2-6 で述べた反応温度・反応時間で行ったが、PCR のサイクル数は DNA をテンプレートとした場合は 35 サイクル、cDNA をテンプレートとした場合は 45 サイクルで行った。

クローンライブラリ解析と系統解析は 4-2-7、4-2-8 で述べた手法と同様に行った。

また、nirS、nirK を標的とした定量的 PCR は、4-2-5 で述べた手法により行った。

5-2-4 アクセッション番号

第五章で得た塩基配列のうち、OTU の代表株の塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank に登録し

た。登録番号は、nirS :AB684454-AB684561、nirK :AB684562-AB684618 である。

5-3 結果と考察

5-3-1 定量的 PCR

DNA に基づく定量的 PCR によって明らかになった、土壌の遺伝子コピー数の経時的な変化を図 5-1 A, B に示した。nirS の遺伝子コピー数は $2.5-3.8 \times 10^7$ copy g soil⁻¹ で、サンプリング時期による有意な変化はなかった(図 5-1 A)。また、nirK の遺伝子コピー数は $6.0-7.5 \times 10^5$ copy g soil⁻¹ で、nirS と同じくサンプリング時期による有意な変化はなかった。nirS と nirK の遺伝子コピー数を比較すると、nirS の遺伝子コピー数の方が多く存在していた。このことから、この水田土壌には nirS を保有する微生物が nirK を保有する微生物より多く存在していると考えられた。

cDNA に基づく定量的 PCR も行ったが、nirS、nirK で共に検出限界(nirS: 3.6×10^4 copy g soil⁻¹、nirK 2.5×10^3 copy g soil⁻¹)以下であった。今回しらべた土壌サンプルでの nirS、nirK の発現は著しいものではない可能性が示された。

5-3-2 NirS の系統解析

クローンライブラリ解析によって、4/23 に採取された土壌由来の cDNA から 74 クローン、5/14 に採取された土壌由来の DNA から 126 クローン、cDNA から 118 クローン、6/4 に採取された土壌由来の DNA から 132 クローン、cDNA から 133 クローン、合計 583 クローンを得た。NirS アミノ酸塩基配列を基に行った DOTUR による多様性解析の結果を表 5-1 に示した。5/14 に採取された土壌由来の DNA に基づく解析では、Chao I 指数は 53.7、Shannon 指数は 3.672、Simpson 指数は 43.750

であり 6/4 に採取された土壌由来の DNA に基づく解析では、Chao 1 指数は 79.7、Shannon 指数は 3.509、Simpson 指数は 28.255 であった(表 5-1)。5/14 と 6/4 の土壌中の nirS の多様性は、Chao 1 指数を見た場合には 6/4 の方が OTU の数が多いという結果であったが、Shannon 指数と Simpson 指数では 5/14 の方が多様な nirS 保有脱窒菌が存在していることを示した。

cDNA の多様性解析では、4/23 の cDNA では OTU が 1 つだけであり Chao 1 指数は 1.0、Shannon 指数は 0.000、Simpson 指数は 1.000 であった。一方、5/14 の cDNA の多様性解析では、Chao 1 指数は 5.0、Shannon 指数は 1.113、Simpson 指数は 2.438 であり 6/4 では Chao 1 指数は 5.0、Shannon 指数は 1.242、Simpson 指数は 3.251 となり 多様性指数は湛水後に増加した。このことから、湛水前に nirS を発現している nirS を保有する微生物は極めて限られており 湛水によってより多様な微生物が nirS を発現することが示唆された。ただし、DNA に基づく解析と比較して、cDNA での解析における多様性指数は小さかったことから、土壌中に存在する nirS を保有する微生物の一部のみが実際に nirS を発現していると考えられる。

NirS のアミノ酸塩基配列に基づき近隣結合系統樹を図 5-2 に示した。クローンは 8 つのクラスター(Cluster I-VIII)に分類された。これらのクラスターのうち、Cluster IV は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Acidovorax 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属、Cluster V は Betaproteobacteria 綱の Hydrogenophilales 目に属する Thiobacillus 属、Cluster VII は Actinobacteria 門に属する Kocuria 属と Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Burkholderia 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属、Cluster IX は Chloroflexi 門に属する Anaerolinea 属の NirS 配列を含んでいた。一方、Cluster I, II, III, VI は既知の微生物の NirS 配列を含まなかった。

NirS クローンが図 5-2 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を図 5-4 A に示した。

DNA を用いたクローンライブラリ解析を行った結果、湛水 2 週間後の 5/14 と湛水 5 週間後の 6/4 の土壤の群集構造は似ていた(図 5-4 A)。その中で既知の微生物の NirS を含まない Cluster VI に分類されるクローンが多数を占めていた。そのため、脱窒が活発に行われていると考えられる土壤では、既知の微生物の NirS とは近縁でない NirS をコードする nirS を保有する微生物が多く存在していることが示唆された。

cDNA を用いたクローンライブラリ解析を行った結果、湛水前の 4/23 の土壤では既知の微生物の NirS を含まない Cluster VI に分類されるクローンのみが得られた(図 5-4 A)。一方、脱窒活性ポテンシャルが高い湛水 2 週間後の 5/14 の土壤と湛水 5 週間後の 6/4 の土壤で、既知の微生物の NirS を含まない Cluster I に分類されるクローン現れた。また、土壤の還元が最も進んだ 6/4 の土壤でのみ Thiobacillus 属の NirS を含む Cluster V に分類されるクローンが現れたが、その割合は少なかった。これらの結果から、水田の脱窒活性が高いと思われる時期には、Cluster I, VI に分類される既知の微生物の NirS とは近縁でない NirS をコードする nirS を保有する微生物が主に働いている可能性が示された。

5-3-3 NirK の系統解析

クローンライブラリ解析によって、4/23 に採取された土壤由来の cDNA から 89 クローン、5/14 に採取された土壤由来の DNA から 113 クローン、cDNA から 93 クローン、6/4 に採取された土壤由来の DNA から 133 クローン、cDNA から 101 クローン、合計 516 クローンを得た。NirK のアミノ酸塩

基配列を基に DOTUR による多様性解析を行った結果を表 5-1 に示した。5/14 の DNA に基づく解析では、Chao 1 指数は 40.2、Shannon 指数は 2.568、Simpson 指数は 6.946 であった。6/4 の DNA に基づく解析では、Chao 1 指数は 27.5、Shannon 指数は 2.287、Simpson 指数は 4.958 であった(表 5-1)。5/14 と 6/4 の土壌中の nirK の多様性を比較すると、還元状態がより進行した 6/4 の DNA でより多様性が小さくなった。

cDNA に基づく解析では、4/23 では Chao 1 指数は 2.0、Shannon 指数は 0.690、Simpson 指数は 2.010 であった。一方、5/14 の cDNA 由来のクローンによる多様性解析では、Chao 1 指数は 1.0、Shannon 指数は 0.000、Simpson 指数は 1.000 であり 6/4 では Chao 1 指数は 3.0、Shannon 指数は 0.438、Simpson 指数は 1.322 となり(表 5-1)、湛水前の 4/23 が最も多様性が高く、湛水 2 週間後の 5/14 に多様性が小さくなり 湛水 5 週間後の 6/4 に再び多様性が増した。この結果から、湛水 2 週間後の土壌では、湛水前、湛水 5 週間後の土壌と比べて限られた微生物が強く nirK を発現していると考えられる。また、nirS と同様に、DNA に基づく解析と比較して、cDNA での解析における多様性指数は小さかったことから、土壌中に存在する nirK 保有脱窒菌も一部のみが実際に nirK を発現していることが示唆された。

得られた NirK クローンのアミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹を図 5-3 に示した。クローンは 9 つのクラスター(Cluster I-IX)に分類された(図 5-2)。これらのクラスターのうち、Cluster I は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含み、Cluster III は、Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Mesorhizobium 属、Cluster IV は Betaproteobacteria 綱に属する Achromobacter 属と、Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Brucella 属、Ochrobactrum 属、Agrobacterium 属、Sinorhizobium 属、

Rhizobium 属、Cluster VII には Rhodobacterales に属する Rhodobacter、Cluster IX は Nitrosomonadales 目に属する Nitrosospira 属の NirK を含んでいた。一方、Cluster II, V, VI, VIII には既知の微生物の NirK は含まれていなかった。

NirK クローンが図 5-3 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を図 5-4 B に示した。

DNA を用いたクローンライブラリ解析を行った結果、5/14、6/4 に採取した土壌の両方で Mesorhizobium 属の NirK を含む Cluster III、既知の微生物の NirK を含まない Cluster VI に分類されるクローンが多数を占めていた。また、Nitrosospira 属の NirK を含む Cluster IX には 6/4 に採取した土壌由来のクローンが多く含まれていた。

cDNA を用いたクローンライブラリ解析の結果、湛水前の 4/23 の土壌由来のクローンは Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含む Cluster I、Achromobacter 属、Brucella 属、Ochrobactrum 属、Agrobacterium 属、Sinorhizobium 属、Rhizobium 属の NirK を含む Cluster IV に分類された(図 5-3 B)。一方、湛水 2 週間後の 5/14 の土壌では、Cluster IV に分類されるクローンは見られなくなり 5/14 の cDNA 由来のクローンは全て Cluster I に分類された。最も還元状態が進行した 6/4 の土壌では、クローンの多くは Cluster I に分類され、既知の微生物の NirK を含まない Cluster II に分類されるクローンも現れた。これらの結果から、湛水して脱窒が活発であると思われる時期には、主として Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK が含まれる Cluster I に分類される NirK をコードする nirK を保有する微生物が nirK を発現していると考えられる。

Cluster I に属する nirK 保有脱窒菌が湛水状態の水田土壌中で主に脱窒を行っている可能性が示された一方、DNA によるクローンライブラリ解析の結果からこれらの微生物は土壌中の nirK 保

有微生物の中での優占度は高くないことが示された(図 5-4 B)。また、Mesorhizobium の NirK を含む Cluster III には DNA 由来のクローンが多く含まれていたが、cDNA 由来のクローンは含まれなかった。また、Cluster IV, V, IX には 5/14 の DNA と 6/4 の DNA の両方の由来のクローンが含まれていたが、cDNA 由来のクローンは含まれていなかった。これらの事から、土壤中に存在している nirK を保有する微生物のうち、nirK を発現しているのは一部であることが示唆された。

5-3-4 実験室内モデル水田土壌との比較-NirS

水田土壌において脱窒機能遺伝子を発現し、脱窒を行っている微生物群集を明らかにするため、新潟県農業総合研究所の水田土壌を対象とし、第四章では実験室内モデル水田を用いて、脱窒活性が高まっている土壌での脱窒機能遺伝子の発現解析を行ったが、人工的に脱窒活性を高めたため圃場での現象を正しく再現しているとは限らない。本章では圃場の土壌 Eh や脱窒活性ポテンシャルから推測して脱窒が活発に起こっていると考えられる時期の土壌について脱窒機能遺伝子の発現解析を行ったが、圃場の現場での脱窒活性を直接図ることは困難であり、解析を行った時期に実際に脱窒活性が高まっていたかは確実ではない。そこで、両者の欠点を補うために、第四章と本章で得られた脱窒機能遺伝子配列を合わせた解析を行うことで、水田土壌で脱窒を担っている微生物の総合的な解明を試みた。

第四章、第五章で得られたクローンの NirS のアミノ酸塩基配列に基づいて作成した近隣結合系統樹を図 5-5 に示した。クローンは系統樹上の 12 のクラスター(Cluster I-XII)に分類された。Cluster IV は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Acidovorax 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属の NirS を含み、Cluster V は Alphaproteobacteria 綱の

Rhodospirillales 目に属する Azospirillum 属 と Magnetospirillum 属、Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Bordetella 属、Rhodocyclales 目に属する Dechloromonas 属、Gammaproteobacteria 綱に属する Pseudomonas 属、Cluster XI は Actinobacteria 門に属する Kocuria 属と Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Burkholderia 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属の NirS がそれぞれ含まれていた。一方、Cluster I, II, III, VI, VII, VIII, IX, X, XII には既知の微生物の NirS は含まれなかった。

実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirS クローンが図 5-5 の系統樹に示された各クラスターに分布する数の割合を表 5-2 に示した。

Cluster II, IV, V には実験室内モデル水田のクローンのみが含まれた。一方、水田のクローンのみが含まれるクラスターは存在しなかった。

既知の微生物の NirS を含まない Cluster I, VIII, X は、実験室内モデル水田と水田の両方の DNA 由来のクローンが含まれ、また、脱窒活性が高い実験室内モデル水田の培養後の土壌や、湛水後の水田土壌の cDNA 由来のクローンが含まれていた(表 5-2)。この結果から、これらのクラスターに分類される NirS をコードする nirS を保有する微生物は水田土壌中に存在し、脱窒活性が高い時期に nirS を発現して脱窒に関与している可能性が高い。

既知の微生物の NirS を含まない Cluster VI, VII, IX, XII には実験室内モデルと水田の土壌から抽出した DNA を用いたクローンライブラリ解析で得られたクローンは含まれていたが、実験室内モデル、水田のいずれでも cDNA の解析由来のクローンは含まれなかった。このことから、これらのクラスターに属する nirS 保有脱窒菌は、土壌中に存在はしているが、nirS の発現はしていないと考えられる。

このように、実験室内モデル水田と水田で共通した点が見られた一方、異なる点も見られた。

既知の微生物の NirS を含まない Cluster II、Acidovorax 属、Aromatoleum 属、Azoarcus 属の NirS を含む Cluster IV には、実験室内モデル水田の培養後の土壌の DNA、cDNA 由来のクローンのみが含まれていた(表 5-2)。また、既知の微生物の NirS を含まない Cluster III と Cupriavidus 属、Burkholderia 属、Kocuria 属、Pseudogulbenkiania 属の NirS を含む Cluster XI には、実験室内モデル水田と水田の両方の DNA 由来のクローンが含まれていたが、DNA 由来のクローンは実験室内モデルの培養後の土壌から得られたもののみ含まれていた。

これらの違いは、実験室内モデル水田は人工的に脱窒活性を高めるため、人工的に基質を加えるなど、実際の水田と土壌がおかれる条件が違うことが原因として考えられる。一方で、水田はサンプリングの回数や時期が限られ、現場での脱窒活性を調べることは困難であることから、実際に脱窒活性が高い時期を特定して土壌を採取するのは難しい。そのため、本章で解析を行った時期とは異なる時期に、実験室内モデル水田でのみ発現が見られたような nirS を保有する微生物が nirS を発現している可能性がある。

5-3-5 実験室内のモデル水田土壌との比較-NirK

NirS と同様に、第四章で得られた実験室内モデル水田の脱窒機能遺伝子配列と、本章で得られた水田の脱窒機能遺伝子配列を合わせて解析を行った。

第四章、第五章で得られた NirK クローンのアミノ酸塩基配列に基づいて作成した近隣結合系統樹を図 5-6 に示した。クローンは 9 のクラスター(Cluster I-IX)に分類された(図 5-6)。Cluster I は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK

を含み、Cluster III は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Mesorhizobium 属、Cluster IV は Betaproteobacteria 綱に属する Achromobacter 属と Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Brucella 属、Ochrobactrum 属、Agrobacterium 属、Sinorhizobium 属、Rhizobium 属 Cluster VI は Alphaproteobacteria 綱に属する Rhodobacter 属、Cluster IX は Nitrosomonadales 目に属する Nitrosospira 属の NirK を含んでいた。一方、Cluster II, V, VII, VIII には既知の微生物の NirK は含まれなかった。

実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirS クローンが図 5-6 の系統樹に示された各クラスターに分布する数の割合を表 5-3 に示した。

Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含む Cluster I は、実験室内モデル水田の土壌から抽出した DNA からはクローンが得られず、また、水田の土壌から抽出した DNA から得られたクローンの 4.2-8.8% が分類された程度で、このクラスターに分類される NirK をコードする nirK を保有する微生物は土壌中の nirK 保有微生物の中での存在割合は低いことが示唆された。しかし、cDNA を用いた解析では、室内モデル実験系の培養後、水田の 4/23、5/14、6/4 に採取した土壌から得られたクローンの多くがこのクラスターに分類された。この結果から、Cluster I に属する NirK をコードする nirK を保有する脱窒菌は nirK 保有脱窒菌の中での存在割合は低い、活発に nirK を発現していることが示唆された。

Cluster I のように、実験室内モデル水田と共通した点が見られた一方、水田でのみ見られた特徴も存在した。

既知の微生物の NirK を含まない Cluster II には、実験室内モデル水田の土壌の培養前後と水田から採取した土壌から抽出した DNA 由来のクローンが含まれていた。また、最も還元状態が進

行した6/4に採取した土壌のcDNAから得られたクローンの13.9%がこのクラスターに分類された。

そのため、このクラスターに属する NirK をコードする nirK を保有する脱窒菌も脱窒活性が高い時期に nirK を発現していると考えられた。

この違いは、5-3-4 でも述べたように、実験室内モデル水田の土壌の培養条件が水田の環境とは異なることと、水田のサンプリング条件に起因すると考えられた。

5-3-6 まとめ

本章では、水田の湛水前と、脱窒活性ポテンシャルが高まった湛水 2 週間後、湛水 5 週間後に採取した土壌から抽出した DNA ならびに RNA を逆転写した cDNA を用いて、nirS、nirK を標的としたクローンライブラリ解析を行った。その結果、土壌中に存在している nirS、nirK を保有する脱窒菌の多様性と比較して、実際に nirS、nirK を発現している微生物は一部であることが示唆された。また、本研究によって、還元状態が進行し、脱窒活性ポテンシャルが高い水田土壌で Thiobacillus 属、Bradyrhizobium 属、Rhodopseudomonas 属の Nir に近縁な Nir をコードする nir を保有する脱窒菌や、既知の微生物の Nir とは近縁でない Nir をコードする nir を保有する脱窒菌が脱窒を行っている可能性が初めて明らかになった。また、土壌中に多く存在し、脱窒活性が高い時期に存在割合が大きい nirS、nirK 保有微生物と、脱窒活性が高い時期に実際に nirS、nirK を発現している nirS、nirK 保有微生物は異なり、土壌中に存在している nirK を保有する微生物のうち、nirK を発現しているのは一部であることが示唆された。

また、実験室内モデル水田と水田で得られた脱窒機能遺伝子配列を合わせて解析したところ、脱窒活性が高まった実験室内モデル水田土壌、湛水後の水田土壌の両方で Bradyrhizobium 属、

Rhodopseudomonas 属の NirK に近縁な NirK をコードする nirK を保有する微生物、既知の微生物の NirS とは近縁でない NirS をコードする nirS を保有する微生物が nirS を発現していることが見出された。そのため、これらの微生物が水田で脱窒を行っている可能性が高い。一方、Kocuria 属、Cupriavidus 属、Pseudogulbenkiania 属、Acidovorax 属、Aromatoleum 属、Azoarcus 属の NirS に近縁な NirS や、既知の微生物の NirS とは近縁でない NirS をコードする nirS を保有する微生物の一部は、今回調べたのとは異なる時期や、異なる土壌の部位において nirS を発現するのかもしれない。

表 5-1 得られた各クローンの多様性解析結果

NirS	Number of clones	OTUs	ChaoI	Shannon (H')	Simpson (1/D)
D0514S	126	48	53.7	3.672	43.750
D0604S	132	49	79.7	3.509	28.255
R0423S	74	1	1.0	0.000	1.000
R0514S	118	5	5.0	1.113	2.438
R0604S	133	5	5.0	1.242	3.251
583					
NirK	Number of clones	OTUs	ChaoI	Shannon (H')	Simpson (1/D)
D0514K	113	27	40.2	2.568	6.946
D0604K	120	24	27.5	2.287	4.958
R0423K	89	2	2.0	0.690	2.010
R0514K	93	1	1.0	0.000	1.000
R0604K	101	3	3.0	0.438	1.322

D0514 5/14 採取土壌の DNA 由来、D0604 6/4 採取土壌の DNA 由来、R0423 4/23 採取土壌の RNA 由来、R0514 5/14 採取土壌の RNA 由来、R604 6/4 採取土壌の RNA 由来。

表 5-2 実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirS クローンが図 5-4 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合

クラスターに含まれる nirS 保有脱窒菌	実験室内モデル水田				水田				
	DNA		cDNA		DNA		cDNA		
	培養前	培養後	培養前	培養後	5/14	6/4	4/23	5/14	6/4
Cluster I	20.2%	14.0%	98.9%	16.2%	15.1%	14.4%	-	86.4%	39.1%
Cluster II	-	5.4%	-	10.1%	-	-	-	-	-
Cluster III	3.6%	1.6%	-	4.0%	4.0%	8.3%	-	-	-
Cluster IV	Acidovorax, Aromatoleum, Azoarcus	-	4.7%	-	11.1%	-	-	-	-
Cluster V	Azospirillum, Bordetella, Magnetospirillum, Pseudomonas, Dechloromonas	2.4%	-	-	1.0%	-	-	-	-
Cluster VI		3.6%	3.1%	-	-	3.2%	6.8%	-	-
Cluster VII		3.6%	2.3%	-	-	7.1%	10.6%	-	-
Cluster VIII		6.0%	4.7%	-	9.1%	4.0%	10.6%	-	3.8%
Cluster IX		9.5%	4.7%	-	-	0.8%	0.8%	-	-
Cluster X		29.8%	38.0%	-	12.1%	42.9%	29.5%	100.0%	13.6%
Cluster XI	Kocuria, Cupriavidus, Pseudogulbenkiania	13.1%	12.4%	-	36.4%	11.9%	9.8%	-	-
Cluster XII		6.0%	9.3%	-	-	9.5%	7.6%	-	-
other		2.4%	-	1.1%	-	1.6%	1.5%	-	-
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

表 5-3 実験室内モデルと水田の各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirK クローンが図

5-5 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合

	クラスターに含まれる nirK 保有脱窒菌	実験室内モデル水田			水田				
		DNA		cDNA	DNA		cDNA		
		培養前	培養後	培養後	5/14	6/4	4/23	5/14	6/4
Cluster I	Bradyrhizobium, Rhodopseudomonas	-	-	100.0%	8.8%	4.2%	46.1%	100.0%	86.1%
Cluster II		9.7%	11.1%	-	12.4%	8.3%	-	-	13.9%
Cluster III	Mesorhizobium	45.2%	33.3%	-	45.1%	45.0%	-	-	-
Cluster IV	Achromobacter, Brucella, Ochrobactrum, Agrobacterium, Sinorhizobium, Rhizobium	-	-	-	0.9%	1.7%	53.9%	-	-
Cluster V		3.2%	-	-	-	5.0%	-	-	-
Cluster VI	Rhodobacter	-	2.2%	-	7.1%	6.7%	-	-	-
Cluster VII		6.5%	11.1%	-	23.9%	14.2%	-	-	-
Cluster VIII		3.2%	13.3%	-	0.9%	0.8%	-	-	-
Cluster IX	Nitrospira	32.3%	28.9%	-	0.9%	10.8%	-	-	-
other		-	^	-	-	3.3%	-	-	-
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

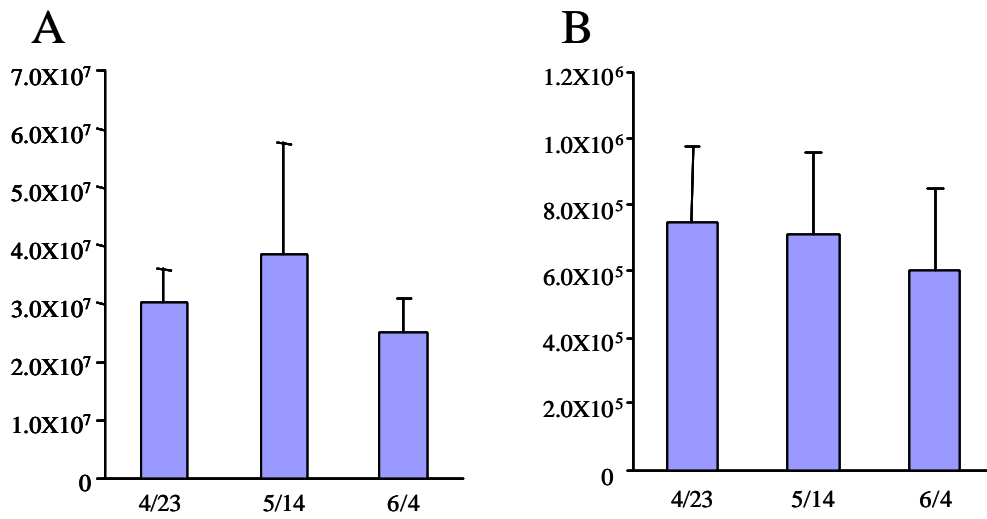


図 5-1 定量的 PCR による各遺伝子のコピー数の定量。A) nirS、B) nirK

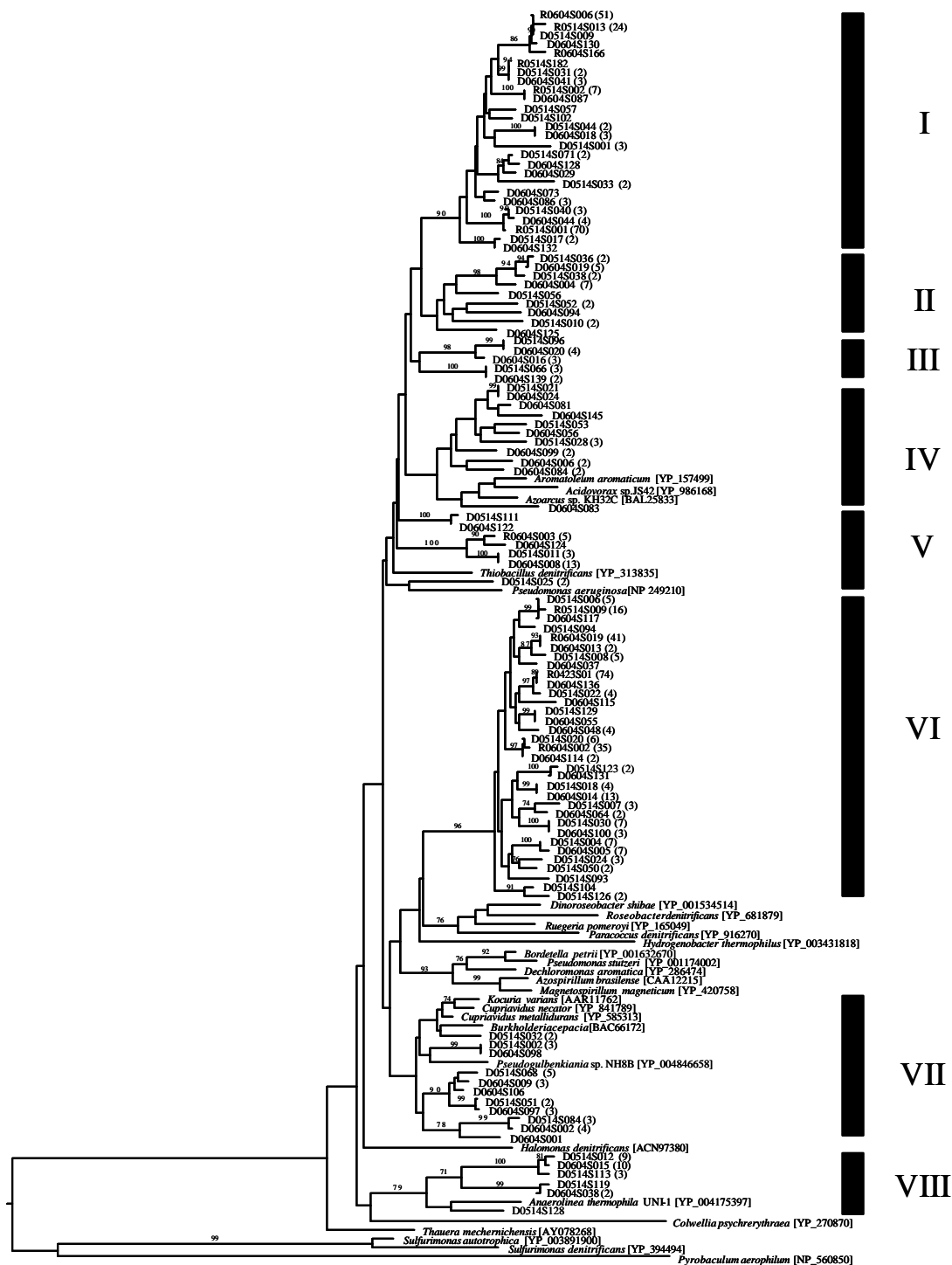


図 5-2 NirS アミノ酸配列情報に基づく近隣結合系統樹。bootstrap 値は 70%以上のものを記載。D0514S 5/14 採取土壌の DNA 由来クローン、D0604S 6/4 採取土壌の DNA 由来クローン、R0423S 4/23 採取土壌の RNA 由来クローン、R0514S 5/14 採取土壌の RNA 由来クローン、R604S 6/4 採取土壌の RNA 由来クローン。

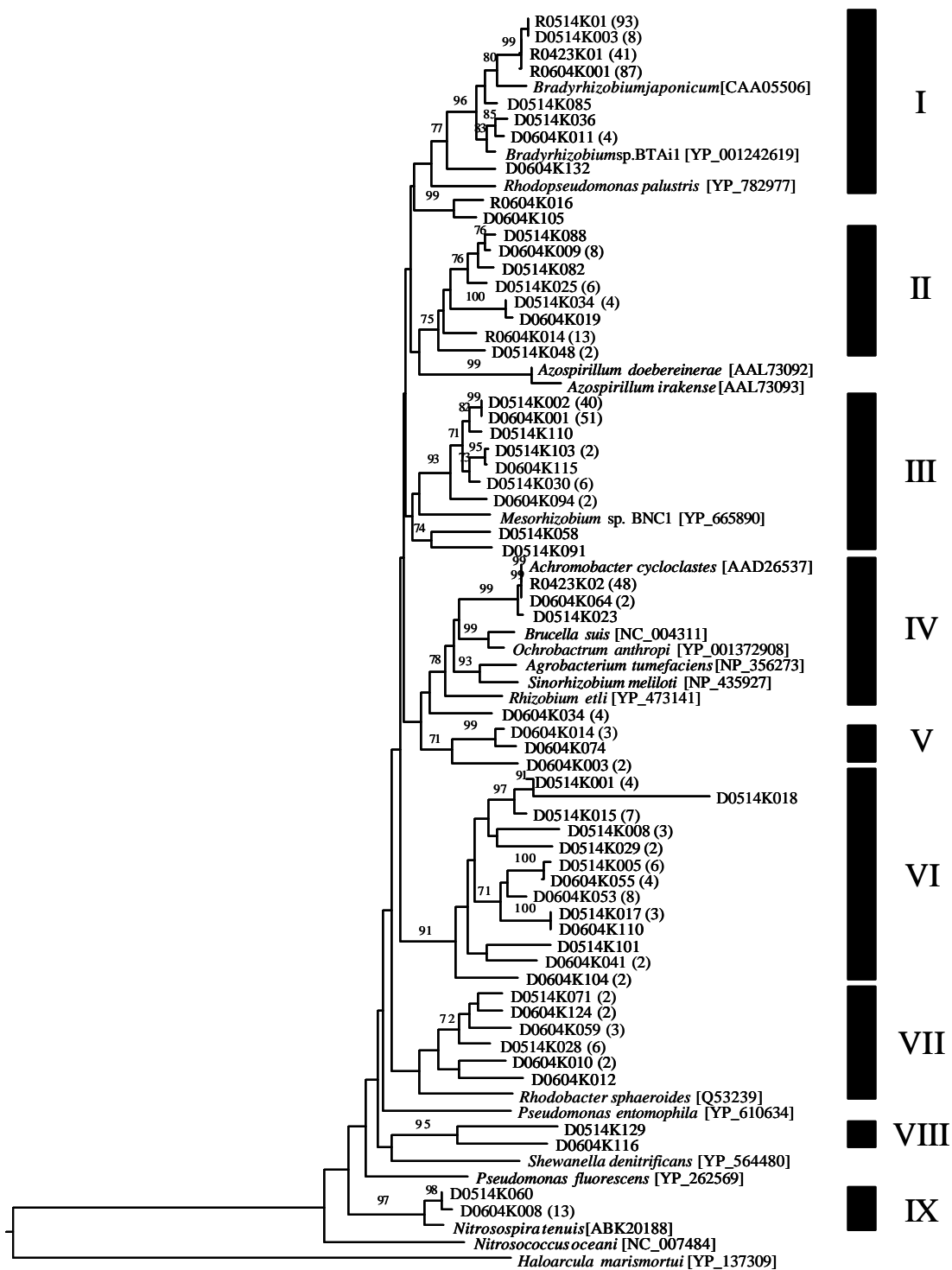


図 5-3 NirK アミノ酸配列情報に基づく近隣結合系統樹 bootstrap 値は 70%以上のものを記載。D0514K 5/14 採取土壌の DNA 由来クローン、D0604K 6/4 採取土壌の DNA 由来クローン、R0423K 4/23 採取土壌の RNA 由来クローン、R0514K 5/14 採取土壌の RNA 由来クローン、R604K 6/4 採取土壌の RNA 由来クローン。

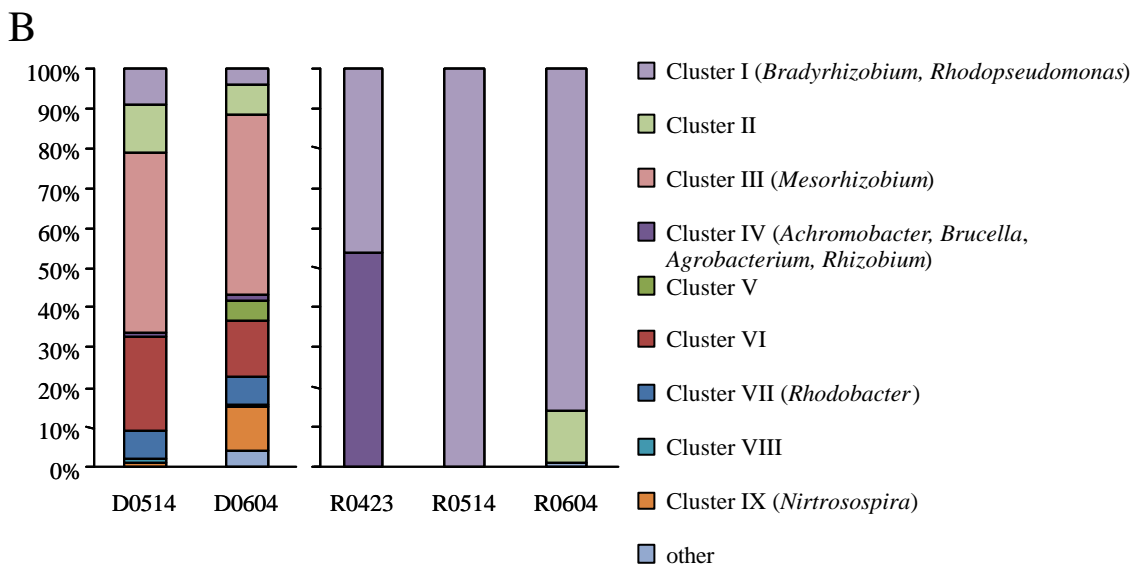
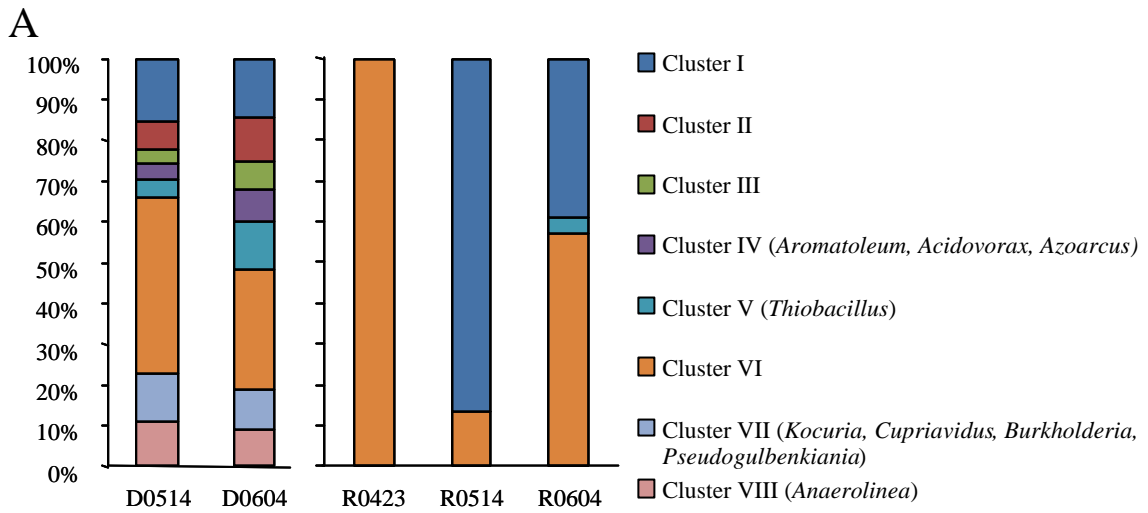


図 5-4 クローンが系統樹上の各クラスターに占める割合。A)NirS、B)NirK。D0514 5/14 採取土壌の DNA 由来、D0604 6/4 採取土壌の DNA 由来、R0423 4/23 採取土壌の RNA 由来、R0514 5/14 採取土壌の RNA 由来、R604 6/4 採取土壌の RNA 由来。

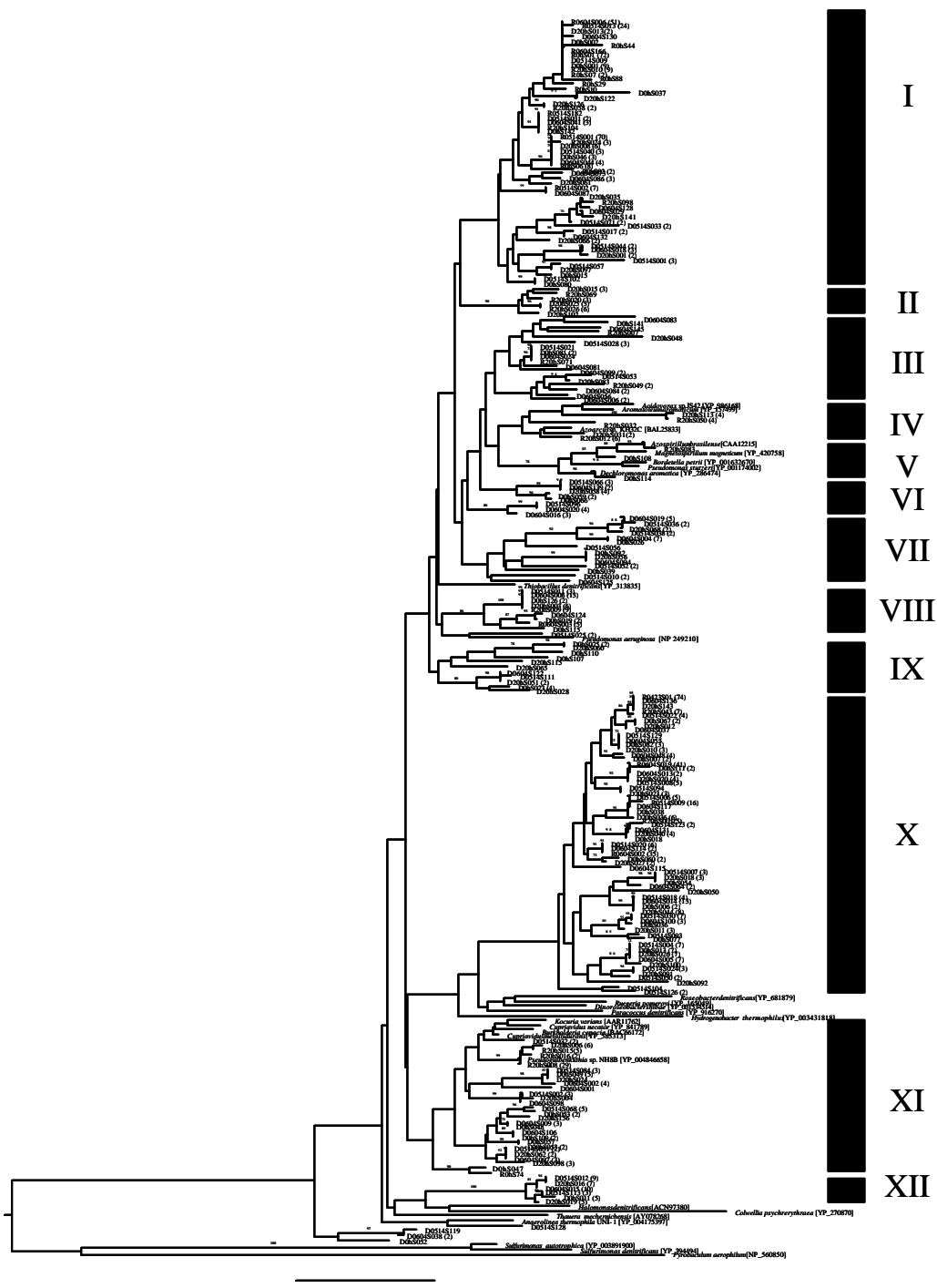


図 5-5 NirS アミノ酸配列情報に基づく近隣結合系統樹。bootstrap 値は 70%以上のものを記載。D0hS 培養 0 時間の DNA 由来クローン、D20hS 培養 20 時間の DNA 由来クローン、R0hS : 培養 0 時間の cDNA 由来クローン、R20hS 培養 20 時間の cDNA 由来クローン、D0514S 5/14 採取土壌の DNA 由来クローン、D0604S 6/4 採取土壌の DNA 由来クローン、R0423S 4/23 採取土壌の RNA 由来クローン、R0514S 5/14 採取土壌の RNA 由来クローン、R604S 6/4 採取土壌の RNA 由来クローン。

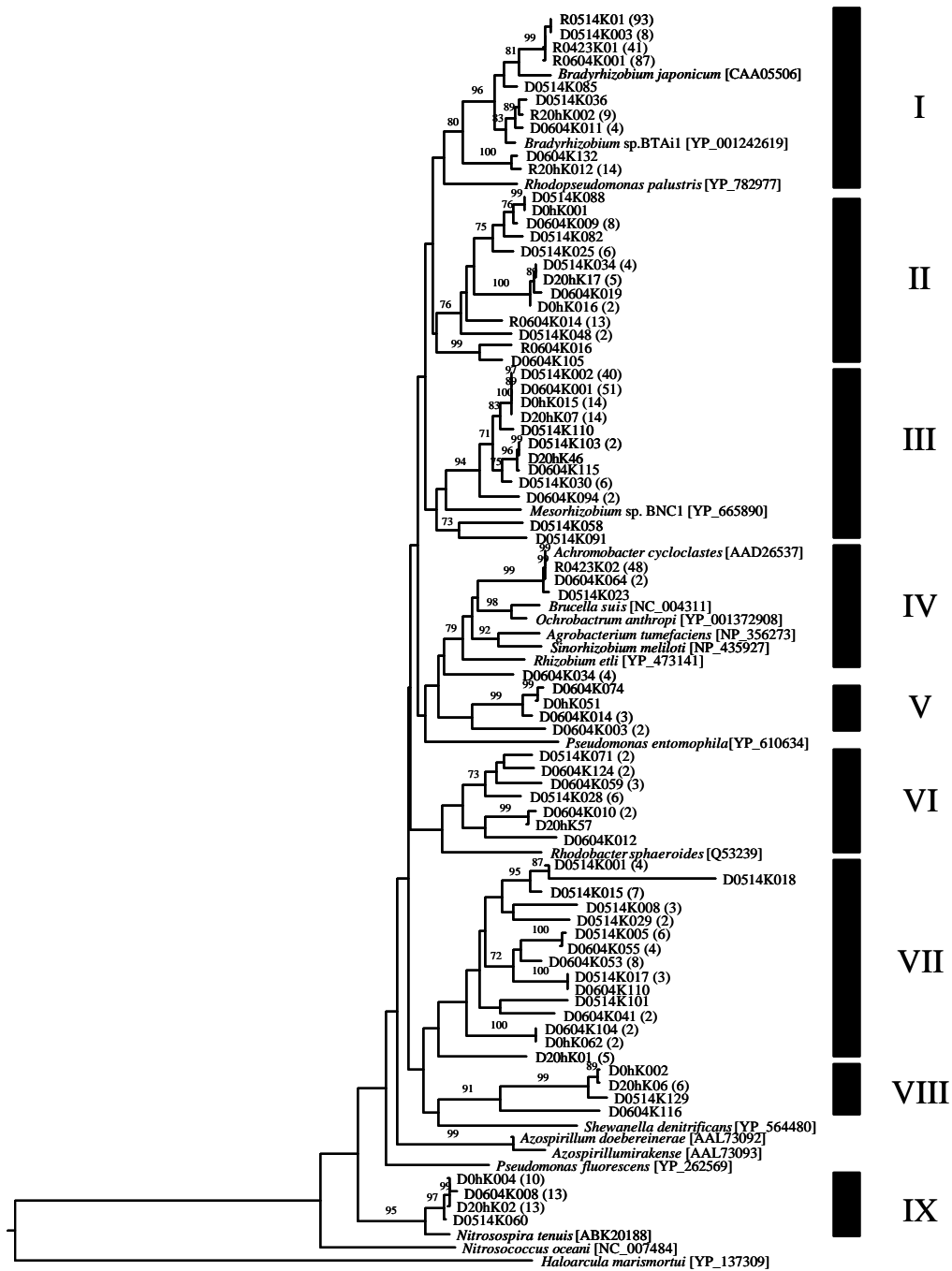


図 5-6 NirK アミノ酸配列情報に基づく近隣結合系統樹。bootstrap 値は 70%以上のものを記載。D0hK :培養 0 時間の DNA 由来クローン、D20hK :培養 20 時間の DNA 由来クローン、R0hK :培養 0 時間の cDNA 由来クローン、R20hK :培養 20 時間の cDNA 由来クローン、D0514K 5/14 採取土壌の DNA 由来クローン、D0604K 6/4 採取土壌の DNA 由来クローン、R0423K 4/23 採取土壌の RNA 由来クローン、R0514K 5/14 採取土壌の RNA 由来クローン、R604K 6/4 採取土壌の RNA 由来クローン。

第六章 総合考察

6-1 研究目的と戦略の概要

第二章では、脱窒機能遺伝子をマーカーとした解析の有用性を確かめる目的も含め、東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構の水田から採取した土壌の風乾細土を用いて実験室内モデル水田を設定し、脱窒活性を高める前と高めた後の土壌から抽出された DNA を用いて nirS, nirK を標的とした PCR-クローンライブラリ解析を行った。第三章では、水田で脱窒を担う微生物を明らかにするため、第二章で用いた土壌を採取した水田からイネの作付け期間中に定期的に土壌を採取し、第二章と同様に PCR-クローンライブラリ解析を行った。

第四章では脱窒が活発に起こっている水田土壌で活性化し、脱窒機能遺伝子を発現している微生物を明らかにするため、まず、新潟県農業総合研究所(新潟農総研)の水田から採取した湿润土壌を用いて実験室内モデル水田を構築した。次に、その土壌の脱窒活性を第二章と同様にして高めてから、土壌 DNA および RNA を抽出し、RNA については逆転写 PCR により cDNA を調製した。そして、それらの DNA および cDNA を試料として、16S rRNA 遺伝子、nirS, nirK, nosZ を標的としたクローンライブラリ解析を行った。第五章では第四章で用いた土壌を採取した水田から、湛水前と湛水 2 週間後、5 週間後に採取された土壌から調製された DNA と cDNA を用いて、nirS, nirK を標的とした同様の解析を行った。

第二章から第五章までの解析を行った結果、生態調和農学機構ならびに新潟農総研の水田土壌中に存在する、もしくはそこで発現している脱窒機能遺伝子の塩基配列を多数得ることができた。両者の水田土壌から得られた脱窒機能遺伝子の組成を比較することや、脱窒機能遺伝子の 持ち

主」の脱窒菌の正体を明らかにすることが目的である。

一方、筆者が所属する土壌圏科学研究室では、本研究で用いた生態調和機構や新潟農総研の水田から採取された土壌から Functional Single Cell (FSC)分離法により多数の脱窒菌の分離菌株が得られ、その所属分類群や脱窒機能遺伝子の塩基配列が解析されている (Ishii et al., 2011a, 2011b; Tago et al., 2011; 上井、未発表 近藤、未発表)。

本章では、まず本研究で得られた NirS, NirK の推定アミノ酸配列を基に、他の研究により生態調和機構と新潟農総研の水田からこれまでに得られている脱窒機能遺伝子の塩基配列に基づく推定アミノ酸配列を合わせて解析し、二つの水田の微生物群集の共通点や相違点を明らかにすることを試みた。次に、本研究で得られた NirS, NirK, NosZ の推定アミノ酸配列と水田土壌から FSC 分離法によって分離された菌株の脱窒機能遺伝子塩基配列に基づく推定アミノ酸配列の同一性を解析することで、本研究で見出された脱窒機能遺伝子の「特主」脱窒菌の推定を以下のように行った。

6-2 解析方法と結果

6-2-1 NirS の系統解析とクラスター分類結果

NirS の解析には、生態調和農学機構の水田土壌 (風乾細土を用いた実験室内モデル水田および屋外の水田圃場それぞれから採取した土壌) から調製された DNA に由来する NirS クローンと新潟農総研の水田土壌 (湿潤土壌を用いた実験室内モデル水田および屋外の水田圃場それぞれから採取された土壌) から調製された DNA 及び cDNA に由来する NirS クローンから得られた NirS アミノ酸配列のうち、各章でグループ分けされた OTU の代表クローンのアミノ酸配列を用いた。

また、生態調和農学機構の風乾細土を用いた実験室内モデル水田土壌から Ishii et al. (2011a, 2011b)によって FSC 分離法を用いて分離された分離菌株と、上井(未発表)および近藤(未発表)によって新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法を用いて分離された分離菌株の、NirS アミノ酸配列を用いた。

これらのアミノ酸配列と既知微生物の NirS アミノ酸配列を用い、本章では新たに ClustalX ver. 1.83 (Thompson et al., 1997)を用いてアラインメントを作成した後、SeaView ver.2.2 (Galtier et al., 1996)を用いてアラインメントが適切であることを確認した。また、PHYLP package ver. 3.67 (Felsenstein, 2008)中の ProtDist プログラムを用いて距離並行を算出した後、DOTUR program ver. 1.53 (Schloss and Handelsman, 2005)を用いてそれぞれの配列間の相同性を計算した。また、ClustalX を用いて多重置換とギャップを除いた近隣結合系統樹を作成した。作成した系統樹は NJplot (Perriere and Gouy, 1996)とFigTree ver. 1.1.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>)を用いて描写した。

NirS アミノ酸配列に基づき作成した近隣結合系統樹を図 6-1 ABCD に示した。クローンは 18 のクラスター (Cluster I-XVIII) に分類された。これらのクラスターのうち、Cluster VI は Betaproteobacteria 綱の Hydrogenophilales 目に属する Thiobacillus 属の NirS を含み、Cluster VII は Chloroflexi 門に属する Anaerolinea 属、Cluster VIII は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Acidovorax 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属、Cluster XIV は Alphaproteobacteria 綱の Rhodospirillales 目に属する Azospirillum 属 と Magnetospirillum 属、Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Bordetella 属、Rhodocyclales 目に属する Dechloromonas 属、Gammaproteobacteria 綱に属する Pseudomonas 属、Cluster XV は

Actinobacteria 門に属する Kocuria 属と Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Burkholderia 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属、Cluster XVIII は Alphaproteobacteria 綱の Rhodobacterales 目に属する Roseobacter 属と Ruegeria 属、Paracoccus 属、Dinoroseobacter 属の NirS を含んでいた。一方、Cluster I, II, III, IV, V, IX, X, XI, XII, XIII, XVI, XVII には既知の微生物の NirS を含まなかった。

各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirS クローンが、図 6-1 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を、表 6-1 に示した。

6-2-2 NirK の系統解析とクラスター分類結果

NirK の解析には、本研究で得られたアミノ酸塩基配列から 6-2-1 と同様に選択したものをを用いた。また、6-2-1 と同様に Ishii et al. (2011a)、上井(未発表)、および近藤(未発表)によって得られた分離菌株の NirK アミノ酸配列を用いた。これらのアミノ酸配列と既知微生物の NirK アミノ酸配列を用いて、6-2-1 と同様の手法を用いて各配列間の相同性を検索し、系統樹の作製を行った。

NirK アミノ酸配列に基づき作成した近隣結合系統樹を図 6-2 AB に示した。クローンは 14 のクラスター(Cluster I-XIV)に分類された。このうち、Cluster I は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizobium 属と Rhodopseudomonas 属の NirK を含み、Cluster VI は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Mesorhizobium 属、Cluster VII は Betaproteobacteria 綱に属する Achromobacter 属と Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Brucella 属、Ochrobactrum 属、Agrobacterium 属、Sinorhizobium 属、Rhizobium 属、Cluster IX は Alphaproteobacteria 綱の Rhodobacterales 目に属する Rhodobacter 属、Cluster XIII は

Nitrosomonadales 目に属する Nitrosospira 属の NirK を含んでいた。一方、Cluster II, III, IV, V, VIII, X, XI, XII, XIV は既知の微生物の NirK を含まなかった。

各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirK クローンが、図 6-2 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を、表 6-2 に示した。

6-2-3 NosZ の解析手法と結果

NosZ の解析には、第四章の新潟農総研の水田土壌を用いた実験室内モデル水田から調製された DNA 及び cDNA に由来する NosZ クローンアミノ酸配列のうち、第四章でグループ分けされた OTU の代表クローンのアミノ酸配列を用いた。また、上井(未発表)、近藤(未発表)によって新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法を用いて得られた分離菌株の NosZ アミノ酸配列を用いた。これらのアミノ酸配列と既知微生物の NosZ アミノ酸配列を用い、6-2-1 と同様の手法を用いて各配列間の相同性を検索し、系統樹の作製を行った。

NosZ アミノ酸配列に基づき作成した近隣結合系統樹を図 6-3 に示した。クローンは 8 つのクラスター(Cluster I-VIII)に分類された。Cluster I は Alphaproteobacteria 綱の Rhizobiales 目に属する Bradyrhizium 属、Oligotropha 属、Rhodopseudomonas 属、Brucella 属、Ochrobactrum 属、Sinorhizobium 属の NosZ を含み、Cluster II は Alphaproteobacteria 綱の Rhodobacterales 目に属する Roseobacter 属と Paracoccus 属、Cluster IV は Betaproteobacteria 綱の Hydrogenophilales 目に属する Thiobacillus 属、Burkholderiales 目に属する Burkholderia 属、Rhodocyclales 目に属する Aromatoleum 属と Azoarcus 属、Neisseriales 目に属する Pseudogulbenkiania 属、Cluster VIII は Betaproteobacteria 綱の Burkholderiales 目に属する Cupriavidus 属と Acidovorax 属、Rubrivivax

属の NosZ アミノ酸配列をそれぞれ含んだ。一方、Cluster III, V, VI, VII は既知の微生物の NosZ を含まなかった。

各土壌サンプルから得られたそれぞれの NosZ クローンが図 6-3 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合を表 6-3 に示した。

6-3 考察

6-3-1 生態調和機構水田土壌ならびに新潟農総研水田土壌の NirS, NirK 配列の群集組成の比較

NirS

本研究の各土壌から得られたクローンが図 6-1 の系統樹上の各クラスターに属する割合を表 6-1 に示した。表には、生態調和農学機構の水田土壌、新潟農総試の水田土壌、前者の風乾細土を用いて構築された実験室内モデル水田の土壌、および後者の湿潤土を用いて構築された実験室内モデル水田の土壌の 4 タイプの土壌サンプルから得られたすべてのクローンを示したが、ここでは両水田土壌 (モデル水田ではなく屋外の水田圃場の土壌) から得られた DNA 由来のクローンについて主に考察する。

生態調和農学機構と新潟農総試の両方の水田土壌 DNA に由来するクローンが共通して含まれるクラスターとして Cluster I, II, III, IV, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XVII が見出された。それらのうち、Cluster X, XVII には生態調和農学機構と新潟農総試の DNA 由来のクローンが多く含まれ、また、新潟農総試水田圃場と実験室内モデルの cDNA 由来のクローンも見いだされた。そのため、Cluster X, XVII に含まれるこれらの NirS をコードする nirS の持ち主は、生態調和農学機構と新潟

農総試の水田土壌におけるnirS 保有微生物の中での存在割合が高く、また nirS を発現している脱窒を主に担う微生物であると推測される。

また、Cluster IV に含まれるクローンに占める生態調和農学機構由来のクローンの割合は大きく、新潟農総試水田圃場由来のクローンの割合は小さかった。そのため、このクラスターに含まれる NirS をコードするnirS の持ち主は、二カ所の水田に共通して存在するが、生態調和農学機構水田圃場により高い割合で存在すると考えられる。

Cluster I, II, III, VIII, IX, XI, XII, XIII には、二カ所の水田に由来するクローンが同程度の割合で含まれていた。そのため、これらのクラスターに含まれるNirS をコードするnirS の持ち主は、二カ所の水田に同程度の割合で存在することが考えられた。

Cluster VI には生態調和農学機構の水田圃場に由来するクローンが高い割合で含まれていたが、新潟農総試水田圃場に由来するクローンは含まれていなかった。そのため、このクラスターに含まれる NirS をコードするnirS の持ち主は、生態調和農学機構の水田圃場に特徴的に生息していると考えられる。ただし、新潟農総試の土壌を用いて構築された実験室内モデル水田に由来するクローンは含まれていたため、新潟農総試の土壌にも低い割合で存在していると考えられる。

同様に考えて、Cluster VII に含まれるNirS をコードするnirS の持ち主は、新潟農総試の水田圃場に特徴的に生息すると考えられる。ただし、このクラスターには生態調和農学機構の土壌を用いて構築された実験室内モデル水田の、脱窒活性を高める前の土壌から少ない割合であるが見いだされた。このことは、生態調和農学機構の土壌中にも存在することを示している。

Cluster VII と同様に、Cluster XV にも新潟農総試の水田圃場に由来するクローンのみが含まれていた。このクラスターには、新潟農総試土壌を用いて構築された実験室内モデル水田の cDNA

由来のクローンが多く含まれていたため、このクラスターに含まれるNirSをコードするnirSの持ち主は、土壌の条件によってはnirSを発現する微生物である可能性が考えられる。また、このクラスターには生態調和農学機構の土壌を用いた実験室内モデル水田に由来するクローンが含まれていた。生態調和農学機構の実験室内モデル水田では風乾土壌を用いたため、水田圃場とは異なる微生物群集が形成されていた可能性が考えられる。

また、Cluster V, XIII, XIV, XVIII には新潟農総試と新潟農総試のいずれかの水田圃場に由来するクローンのみが分類されていた。ただし、これらのクラスターに分類されるクローンの全体に対する割合は小さく、これらのクラスターに分類されるNirSをコードするnirSの持ち主は、水田圃場のnirS 保有微生物としては優占度が小さいと考えられる。

NirK

本研究の各土壌から得られたクローンが図 6-2 の系統樹上の各クラスターに属する割合を表 6-2 に示した。表には、生態調和農学機構の水田土壌、新潟農総試の水田土壌、前者の風乾細土を用いて構築された実験室内モデル水田の土壌、および後者の湿潤土を用いて構築された実験室内モデル水田の土壌の 4 タイプの土壌サンプルから得られたすべてのクローンを示したが、ここでは両水田土壌 (モデル水田ではなく屋外の水田圃場の土壌) から得られた DNA 由来のクローンについて主に考察する。

生態調和農学機構と新潟農総試の両方の水田圃場に由来するクローンが含まれるクラスターとして、Cluster I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII が見出された。これらのクラスターのうち Cluster I および III は、生態調和農学機構と新潟農総試の両方に由来するクローンにより構成され

ている。それぞれの土壌由来のクローンがこれら二つのクラスターに占める割合はあまり高くなかったが、これらのクラスターには新潟新潟農総試の水田圃場から調製されたcDNA由来のクローンが多く含まれている。そのため、これらのクラスターに含まれるNirKをコードするnirKの持ち主は、両水田圃場に共通して存在し、nirKを発現していると推測される。

Cluster II, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIIIには生態調和農学機構と新潟農総試の両水田圃場に由来するクローンが分類された。また、それぞれの土壌由来のクローンがこれらのクラスターに占める割合には顕著な差異がなかった。そのため、これらのクラスターに含まれるNirKをコードするnirKの持ち主は、両水田圃場において、nirK保有微生物全体の中で同程度の割合で存在すると考えられる。

Cluster VI, XIVには生態調和農学機構の水田圃場に由来するクローンのみが見出され、新潟新潟農総試の水田圃場に由来するクローンは含まれなかった。しかし、これらのクラスターに分類されるクローンの割合は小さかった。これらのNirKをコードするnirKの持ち主は、生態調和農学機構の水田圃場に特徴的に生育するが、nirK保有微生物の中で優占度の小さい微生物であると推測される。

6-3-2 本研究で見出された脱窒機能遺伝子を保有する脱窒菌の推定

生態調和機構の水田土壌から見出されたnirSを保有する脱窒菌

図 6-1 D の中に示した Cluster XVII には、既知の微生物の NirS は含まれなかったが、生態調和機構の実験室内モデル水田、水田圃場の両方に由来するクローンの多くが含まれていた(表 6-1)。このクラスターに属する NirS をコードする nirS の持ち主は、水田土壌中の nirS 保有微生物

の中での存在割合が比較的大きい(表 6-1)。このクラスターに含まれるクローンのうち、7/27 に水田から採取した土壌由来のクローンである 727S150、および脱窒活性を高めた実験室内モデル水田由来のクローンである TAS046 の NirS アミノ酸配列(塩基配列のアクセッション番号はそれぞれ AB453437、AB377772)は、生態調和機構の水田土壌から FSC 分離法によって分離された Bradyrhizobium 属の脱窒菌 TSA1 株の NirS アミノ酸配列(塩基配列のアクセッション番号は AB542304)と 95%以上の相同性を示した。これらのアミノ酸配列と高い相同性を示す既知微生物の NirS はデータベースに登録されていないことから、未知の微生物が偶然にこのアミノ酸配列と相同性の高い NirS を有する可能性を除外すれば、これらの NirS の持ち主は、Bradyrhizobium 属の脱窒菌である可能性が高い。

図 6-1 C の中に示した Cupriavidus 属、Pseudogulbenkiania 属の NirS を含む Cluster XV には、生態調和機構の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の土壌由来の多くのクローンが含まれた(表 6-1)。このクラスターに含まれるクローンのうち、脱窒活性を高める前の土壌由来のクローン TBS124、高めたのちの土壌由来のクローン TAS174 の NirS アミノ酸配列(塩基配列のアクセッション番号はそれぞれ AB377739、AB377798)は、生態調和機構の水田から FSC 分離法によって分離された Herbaspirillum 属や Burkholderia 属、Arthrobacter 属、Azospirillum 属、Bacillus 属の脱窒菌の NirS アミノ酸配列(e.g. Herbaspirillum sp. TSO46-2、アクセッション番号は AB545713)と 95%以上の相同性を示した。これらの脱窒菌が土壌から得られた NirS の「持ち主」である可能性が高い。

生態調和機構の水田土壌に存在するnirK を保有する脱窒菌

図 6-2 A の中に示した Cluster V は、既知の微生物の NirK を含まなかったが、生態調和機構の土壌を用いた実験室内モデル水田、水田圃場から得られたクローンが含まれた(表 6-2)。このクラスターに含まれていた、生態調和機構の水田から 5/18 に採取した土壌由来のクローンである 518K181、6/19 から採取したクローンである 619K154 の NirK 配列(塩基配列のアクセッション番号はそれぞれ AB453559、AB453632)は、生態調和機構の水田土壌から FSC 分離法によって分離された脱窒菌 *Mesorhizobium* sp. TSA38 の NirK アミノ酸配列(塩基配列のアクセッション番号は AB542298)と 95%以上の相同性があった。このクラスターには、同じく生態調和機構の水田から FSC 分離法によって分離された *Mesorhizobium* 属に分類される他の脱窒菌の NirK も含まれていた。このクラスターに分類される既知の微生物の NirK とは相同性の低い NirK をコードする nirK の持ち主は、*Mesorhizobium* 属の脱窒菌である可能性が高い。

新潟農総研の水田土壌で発現しているnirS を保有する脱窒菌

図 6-1 A の Cluster VIII には、新潟農総研の土壌を用いて脱窒活性を高めた実験室内モデル水田の cDNA 由来の NirS クローンが多く含まれていた(表 6-1)。よって、このクラスターは水田で nirS を発現している微生物から構成されるクラスターであると考えられる。このクラスターに含まれている、脱窒活性を高めた実験室内モデル水田の DNA 由来のクローンである D20 hS113、および cDNA 由来のクローンである R20hS050 の NirS アミノ酸配列(アクセッション番号はそれぞれ AB672411、AB672441)は、新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法によって分離された *Zoogloea* 属に分類される脱窒菌の NirS アミノ酸配列(e.g. *Zoogloea* sp. 3L-59aA、未発表)と相同性が高かった。そのた

め、実験室内モデル水田土壌に存在し、この nirS を発現している微生物は Zoogloea 属の脱窒菌である可能性が高い。実験室内で脱窒活性を高めた新潟農総研の土壌において Zoogloea 属細菌の活性が高まっていることが 16S rRNA の解析から見出されている(第四章)ことは、上記の推論を支持するものである。

図 6-1 C の Cluster XV には、新潟農総研の土壌を用いて脱窒活性を高めた実験室内モデル水田から調製された DNA および cDNA に由来するクローンの多くが含まれた(表 6-1)。このうち、脱窒活性を高めた実験室内モデル水田の cDNA 由来のクローンである R20hS008 の NirS アミノ酸配列(アクセッション番号は AB672429)は新潟農総研の土壌から FSC 分離法によって分離された Pseudogulbenkiania sp. NH8B 株 の NirS アミノ酸配列(アクセッション番号 YP_004846658)をはじめとする Pseudogulbenkiania 属に分類される脱窒菌の NirS アミノ酸配列と99%以上の相同性を示した。また、同様に実験室内モデル水田の DNA 由来のクローンである D20hS006、cDNA 由来のクローンである R20hS016 の NirS アミノ酸配列(アクセッション番号はそれぞれ AB672370、AB672434)もこれらの菌株の NirS アミノ酸配列と95%以上の相同性を示した。このことから、実験室内モデル水田で脱窒活性が高い時期に増殖し、nirS を発現している nirS 保有微生物は Pseudogulbenkiania 属の脱窒菌である可能性が高い。脱窒活性を高めたこの土壌において Pseudogulbenkiania 属の活性が高まっていたこと(第四章)は、この推論を支持するものである。

図 6-1 D の Cluster XVII には、既知の微生物の NirS を含まなかったが、新潟農総研の土壌を用いた実験室内モデル水田、水田由来の DNA、cDNA クローンが多く含まれた(表 6-1)。そのため、このクラスターに分類される NirS をコードする nirS 保有微生物は水田土壌に多く存在し、また、脱窒活性の高い水田で nirS を発現していると考えられる。このクラスターに分類されるクローンのうち、

新潟農総研の水田から4/23に採取された土壌のcDNA由来のクローンであるR0423S01、5/14に採取された土壌のDNA由来のクローンであるD0514S022、脱窒活性を高めた実験室内モデル水田のDNA由来のクローンであるD20hS143、cDNA由来のクローンであるR20hS043等のNirSアミノ酸配列(アクセッション番号はそれぞれAB684562、AB684479、AB672416、AB672439)は、新潟農総研の水田からFSC分離法によってPseudogulbenkiania属、Bradyrhizobium属に分類される脱窒菌のNirSアミノ酸配列(e.g. Pseudogulbenkiania sp. UNPF67b、未発表)と95%以上の相同性を示した。そのため、この新規なNirSをコードするnirSを保有する微生物の一部は、Pseudogulbenkiania属やBradyrhizobium属の脱窒菌である可能性がある。

新潟農総研の水田土壌で発現するnirKを保有する脱窒菌

図6-2AのCluster Iには、新潟農総研の土壌を用いた実験室内モデル水田、水田の脱窒活性が高い時期のcDNA由来のクローンの大半が含まれている(表6-2)。そのため、このクラスターに含まれるNirKをコードするnirKの持ち主は、水田で活発にnirKを発現している可能性が高い。このクラスターに分類されたクローンのうち、脱窒活性を高めた実験室内モデル水田のcDNA由来のクローンであるR20hK002のNirKアミノ酸配列(アクセッション番号はAB672462)は新潟農総研の水田土壌からFSC分離法によって分離されたBradyrhizobium属に分類される脱窒菌のNirKのアミノ酸配列(e.g. Bradyrhizobium sp. UNPF42、未発表)と95%以上の相同性を示した。このクラスターに分類された他のクローンは分離菌株のNirKとの相同性はあまり高くなかったが、Cluster IにはBradyrhizobium属に分類される分離菌株のNirKが多く含まれていた。これらの結果から、新潟農総研でnirKを発現しているnirK保有微生物は、Bradyrhizobium属の脱窒菌である可能性が高

い。

図 6-2B の Cluster VII には、湛水前の水田から採取された土壌の cDNA 由来のクローンの多くが含まれていた(表 6-2)。R0423K02 の NirK のアミノ酸配列(アクセッション番号は AB684563)は、新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法によって分離された Zoogloea 属、Ralstonia 属、Azospirillum 属、Enterobacter 属の脱窒菌の NirK のアミノ酸配列(e.g. Enterobacter sp. 3H-6aB-1、未発表)と95%-99%以上の相同性を示した。これらの脱窒菌がこの NirK 配列をコードする nirK の保有微生物可能性がある。

新潟農総研の水田土壌に存在する nosZ を保有する脱窒菌

図 6-3 の Cluster I には新潟農総研の土壌を用いた実験室内モデル水田の cDNA 由来のクローンは含まれなかったが、DNA 由来のクローンが多く分類された(表 6-3)。このクラスターに分類されるクローンのうち、脱窒活性を高める前の土壌の DNA 由来のクローンである D0hZ94、D0hZ10、脱窒活性を高めた土壌の DNA 由来のクローンである D20hZ060 の NosZ アミノ酸配列(アクセッション番号は AB672489)は、新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法によって分離された Agromonas 属、Bradyrhizobium 属、Zoogloea 属の脱窒菌の NirK アミノ酸配列(e.g. Agromonas sp. 2H-3-83、未発表)と95%以上の相同性を示した。NosZ は NirS や NirK に比べて、系統的な保存性が高いといわれている(Zumft et al., 2006; Ishii et al., 2011c)。このクラスターに含まれる NosZ をコードする nosZ を保有する微生物はこれらの脱窒菌である可能性が高い。

新潟農総研の水田土壌で発現するnosZ を保有する脱窒菌

図 6-3 の Cluster IV には、新潟農総研の土壌を用いた実験室内モデル水田の DNA 及び cDNA 由来のクローンが多数含まれていた(表 6-3)。この結果から、Cluster IV に含まれる NosZ をコードする nosZ の持ち主は、土壌中の nosZ 保有微生物の中での割合が高く、nosZ を発現していると考えられる。このクラスターに含まれるクローンのうち、脱窒活性を高めた実験室内モデル水田の cDNA 由来のクローンである R20hZ110、R20hZ017 の NosZ アミノ酸配列(アクセッション番号はそれぞれ AB672497、AB672495)は新潟農総研の土壌を用いて FSC 分離法によって分離された Betaproteobacteria 綱に属する Zoogloea 属、Duganella 属、Oxalobacteraceae 科に含まれる脱窒菌の NosZ アミノ酸配列(e.g. Rhodoferrax sp. 3L-68a、未発表)と99%以上の相同性を示した。また、これらのクローンの NosZ と相同性の高い NosZ をコードする nosZ を保有する分離菌株の一部(e.g. Zoogloea sp. 3L-63aA、未発表)は nirS も保有し、その NirS アミノ酸配列は、図 6-1 A の Cluster VIII に含まれる、新潟農総研の cDNA 由来のクローンの NirS アミノ酸配列との相同性も高かった。この結果から、この nosZ を発現している nosZ 保有微生物は Betaproteobacteria 綱の Zoogloea 属、Duganella 属、Oxalobacteraceae 科の脱窒菌である可能性が高く、また、その一部は nirS の発現も行っている可能性が示唆された。実験室内で脱窒活性を高めたこの土壌の DNA、cDNA に由来する 16S rRNA クローンの多くが Betaproteobacteria 綱に分類され、その中でも Zoogloea 属の活性が高かった(第四章)ことは、上記の推論を支持するものである。

6-4 まとめ

以上、本章では生態調和農学機構ならびに新潟農総研の水田圃場の脱窒機能遺伝子の組成

の比較を行い、両土壤で共通して存在する機能遺伝子とどちらかの土壤に高い選択性をもって存在する機能遺伝子とがあることが明らかになった。

また、本研究で培養非依存的な方法により両土壤から得られた脱窒に関わる酵素のアミノ酸配列と、それぞれの土壤から分離された脱窒菌培養株の脱窒関連酵素アミノ酸配列との比較を行った結果、土壤から得られたアミノ酸配列の「持ち主」が推定された。新潟農総研の水田土壤において、既知の微生物のNirSとは近縁でないNirSをコードして発現しているnirS保有微生物の一部はBradyrhizobium 属や Pseudogulbenkiania 属、Zoogloea 属の脱窒菌、新潟農総研土壤で発現しているnirKを保有している微生物はBradyrhizobium 属の脱窒菌、また新潟農総研土壤で発現しているnosZを保有している微生物はZoogloea 属やDuganella 属の脱窒菌であると推定された。

表 6-1 各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirS クローンが図 6-1 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合

クラスターに含まれる 既知のnirS保有脱窒菌	生態調和農学機構の水田土壌							新潟県農業総合研究所の水田土壌								
	実験室内モデル水田			水田				実験室内モデル水田				水田				
	培養前	培養後	DNA					培養前	培養後	cDNA		5/14	6/4	4/23	cDNA	
			5/18	6/2	6/19	7/27	培養前			培養後	5/14				6/4	
Cluster I	-	-	1.9%	-	-	-	6.0%	4.7%	-	9.1%	2.4%	10.6%	-	-	3.8%	
Cluster II	-	-	1.9%	3.7%	-	-	-	-	-	-	1.6%	-	-	-	-	
Cluster III	-	-	5.8%	3.7%	2.7%	5.1%	-	-	-	-	1.5%	-	-	-	-	
Cluster IV	-	5.5%	13.5%	13.0%	18.9%	12.8%	4.8%	2.3%	-	-	0.8%	0.8%	-	-	-	
Cluster V	-	-	-	-	-	-	2.4%	-	-	1.0%	0.8%	1.5%	-	-	-	
Cluster VI	Thiobacillus	-	-	17.3%	16.7%	21.6%	41.0%	4.8%	1.6%	-	-	-	-	-	-	
Cluster VII	Anaerolinea	2.0%	-	-	-	-	-	7.1%	9.3%	-	-	11.1%	9.1%	-	-	
Cluster VIII	Azoarcus, Acidovorax, Aromatoleum	8.0%	16.4%	1.9%	7.4%	2.7%	5.1%	1.2%	6.2%	-	14.1%	3.2%	5.3%	-	-	
Cluster IX		2.0%	-	3.8%	7.4%	2.7%	-	3.6%	2.3%	-	-	4.0%	10.6%	-	-	
Cluster X		10.0%	-	9.6%	9.3%	8.1%	7.7%	20.2%	14.0%	-	16.2%	15.1%	14.4%	-	86.4% 39.1%	
Cluster XI		-	5.5%	-	-	8.1%	-	-	5.4%	98.9%	10.1%	-	-	-	-	
Cluster XII		-	9.1%	5.8%	5.6%	-	7.7%	3.6%	3.1%	-	-	6.3%	6.8%	-	-	
Cluster XIII		-	-	1.9%	-	2.7%	2.6%	1.2%	-	1.1%	-	-	-	-	-	
Cluster XIV	Dechloromonas, Bordetella, Pseudomonas, Azospirillum, Magnetospirillum	-	1.8%	-	3.7%	-	-	2.4%	-	-	1.0%	-	-	-	-	
Cluster XV	Pseudogulbenkiana, Kocuria, Cupriavidus, Burkholderia	12.0%	21.8%	-	-	-	-	13.1%	12.4%	-	36.4%	11.9%	9.8%	-	-	
Cluster XVI		2.0%	3.6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cluster XVII		62.0%	36.4%	36.5%	24.1%	27.0%	15.4%	29.8%	38.0%	-	12.1%	42.9%	29.5%	100.0%	13.6% 57.1%	
Cluster XVIII	Paracoccus, Roseobacter, Ruegeria, Dinoroseobacter	2.0%	-	-	1.9%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
other		-	-	-	3.7%	5.4%	2.6%	-	0.8%	-	-	-	-	-	-	
Total		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

表 6-2 各土壌サンプルから得られたそれぞれの NirK クロオンが図 6-2 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクロオン数の全体に占める割合

クラスターに含まれる 既知のnirK保有脱窒	クラスターに含まれる	生態調和農学機構の水田土壌						新潟県農業総合研究所の水田土壌							
		実験室内モデ		水田				実験室内モデル水田		水田					
		培養前	培養後	DNA				培養前	培養後	培養後	DNA		cDNA		
				5/18	6/2	6/19	7/27				5/14	6/4	4/23	5/14	6/4
Cluster I	Bradyrhizobium, Rhodopseudomonas	6.3%	8.8%	3.0%	-	3.2%	12.5%	-	-	60.9%	8.8%	4.2%	46.1%	100.0%	86.1%
Cluster II		10.0%	5.3%	3.0%	1.9%	6.5%	2.5%	-	-	39.1%	-	0.8%	-	-	1.0%
Cluster III		13.8%	14.0%	25.4%	14.8%	32.3%	17.5%	9.7%	11.1%	-	12.4%	7.5%	-	-	12.9%
Cluster IV		1.3%	-	3.0%	-	-	25.0%	-	-	-	1.8%	-	-	-	-
Cluster V		15.0%	8.8%	22.4%	25.9%	9.7%	5.0%	45.2%	33.3%	-	43.4%	45.0%	-	-	-
Cluster VI	Mesorhizobium	-	1.8%	1.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cluster VII	Achromobacter, Brucella, Ochrobactrum, Agrobacterium, Sinorhizobium, Rhizobium	33.8%	12.3%	3.0%	3.7%	-	7.5%	-	-	-	0.9%	1.7%	53.9%	-	-
Cluster VIII		3.8%	28.1%	20.9%	18.5%	19.4%	10.0%	3.2%	-	-	-	8.3%	-	-	-
Cluster IX	Rhodobacter	11.3%	-	-	9.3%	-	7.5%	-	2.2%	-	7.1%	6.7%	-	-	-
Cluster X		3.8%	7.0%	1.5%	1.9%	-	7.5%	6.5%	-	-	23.0%	14.2%	-	-	-
Cluster XI		1.3%	1.8%	3.0%	-	9.7%	-	-	11.1%	-	0.9%	-	-	-	-
Cluster XII		-	-	3.0%	16.7%	3.2%	-	3.2%	13.3%	-	0.9%	-	-	-	-
Cluster XIII	Nitrosospira	-	12.3%	7.5%	5.6%	16.1%	2.5%	32.3%	28.9%	-	0.9%	10.8%	-	-	-
Cluster XIV		-	-	3.0%	1.9%	-	2.5%	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	99.2%	100.0%	100.0%	100.0%

表 6-3 各土壌サンプルから得られたそれぞれのNosZ クローンが図 6-3 の系統樹に示された各クラスターに含まれるクローン数の全体に占める割合

	クラスターに含まれる 既知のnosZ 保有脱窒菌	DNA		cDNA
		培養前	培養後	培養後
Cluster I	Bradyrhizobium, Brucella, Sinorhizobium, Rhodopseudomonas, Oligotropha, Ochrobactrum	57.7%	34.1%	-
Cluster II	Rhodobacter,	3.8%	-	-
Cluster III		3.8%	1.2%	-
Cluster IV	Aromatoleum, Azoarcus, Burkholderia, Thiobacillus, Pseudogulbenkiania	23.1%	50.0%	64.8%
Cluster V		-	4.9%	-
Cluster VI		11.5%	9.8%	19.3%
Cluster VII		-	-	14.8%
Cluster VIII	Cupriavidus, Rubrivivax, Acidovorax	-	-	1.1%
Total		100.0%	100.0%	100.0%

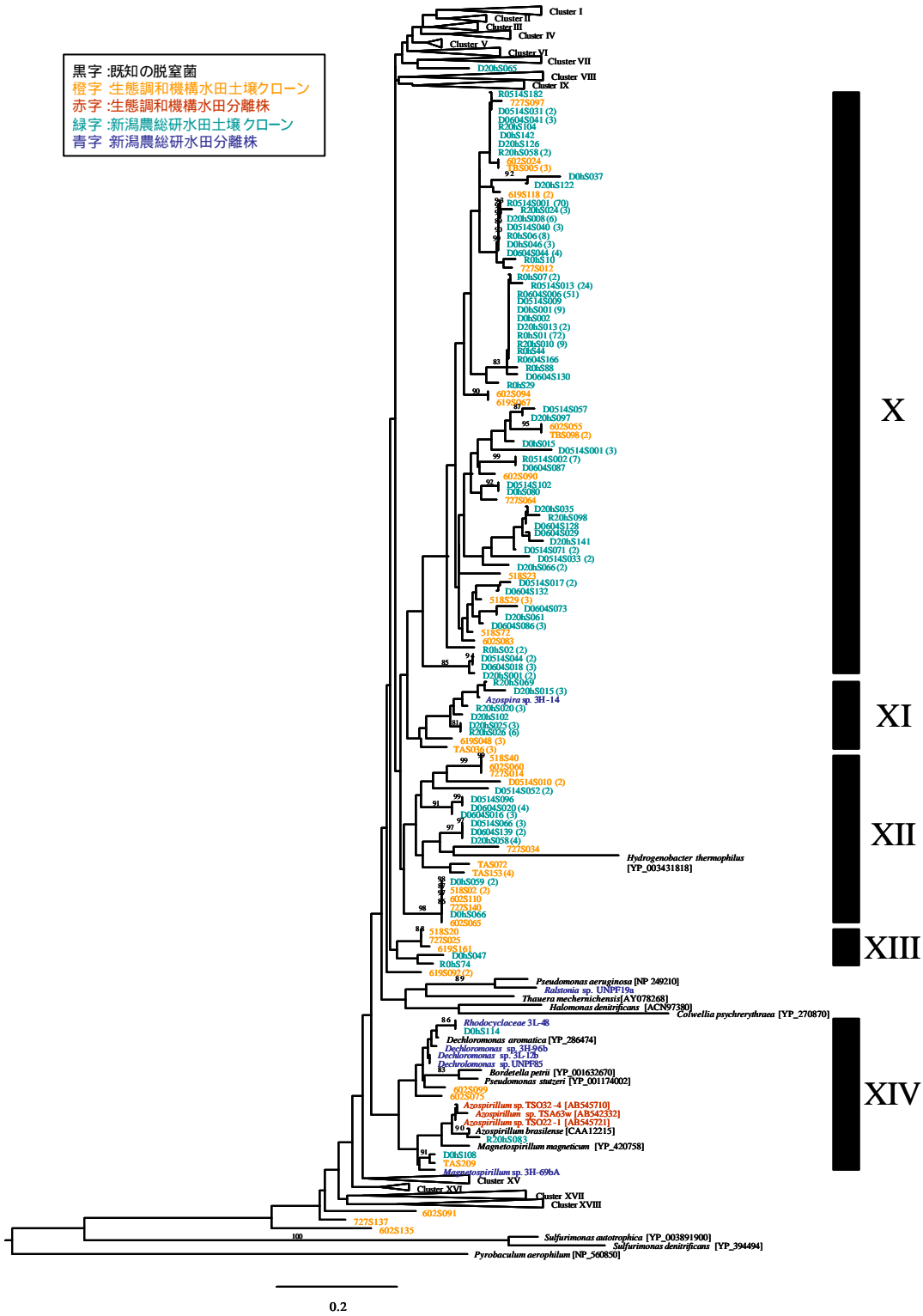
(図 6-1 説明続き)

比較対象に加えた配列について、公表済みのデータについてはアクセッション番号を記載し、未発表のデータについては記載していない。

系統樹上のクローン名及び分離菌株名について、由来毎に色分けをした。

- 黒字 :既知の脱窒菌
- 橙字 :本研究で得られた生態調和機構の実験室内モデル及び水田圃場由来のクローン
(TBS :生態調和機構の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の土壌の培養前の土壌由来の NirS クローン、TAS :生態調和機構の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の土壌の培養後の土壌由来の NirS クローン、518S :5/18 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirS クローン、602S :6/2 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirS クローン、619S:6/19 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirS クローン、727S:7/27 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirS クローン)
- 赤字 :生態調和機構の水田土壌から FSC 分離法によって分離された分離菌株
- 緑字 :本研究で得られた新潟農総研の実験室内モデル及び水田圃場由来のクローン
(D0hS :新潟農総研の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の培養 0 時間の土壌の DNA 由来の NirS クローン、D20hS :新潟農総研の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の培養 20 時間の土壌の DNA 由来の NirS クローン、R0hS :新潟農総研の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の培養 0 時間の土壌の cDNA 由来の NirS クローン、R20hS :新潟農総研の水田土壌を用いた培養 20 時間の cDNA 由来の NirS クローン、D0514S :5/14 に採取された新潟農総研の水田土壌の DNA 由来の NirS クローン、D0604S :6/4 に採取された新潟農総研の水田土壌の DNA 由来の NirS クローン、R0423S :4/23 に採取された新潟農総研の水田土壌の RNA 由来の NirS クローン、R0514S :5/14 に採取された新潟農総研の水田土壌の RNA 由来の NirS クローン、R604S :6/4 に採取された新潟農総研の水田土壌の RNA 由来の NirS クローン)
- 青字 :新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法によって分離された分離菌株

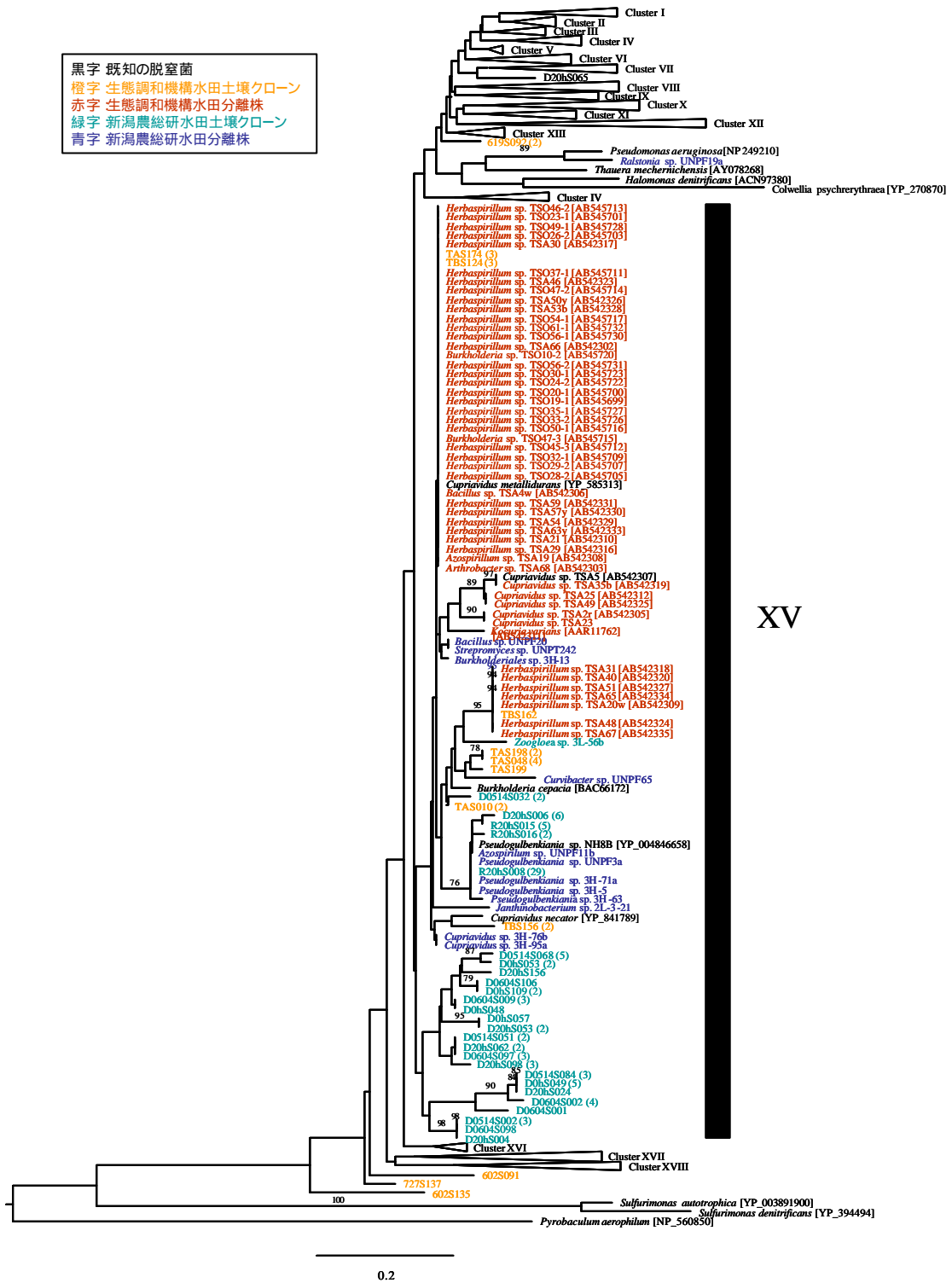
B



(図 6-1 続き)

C

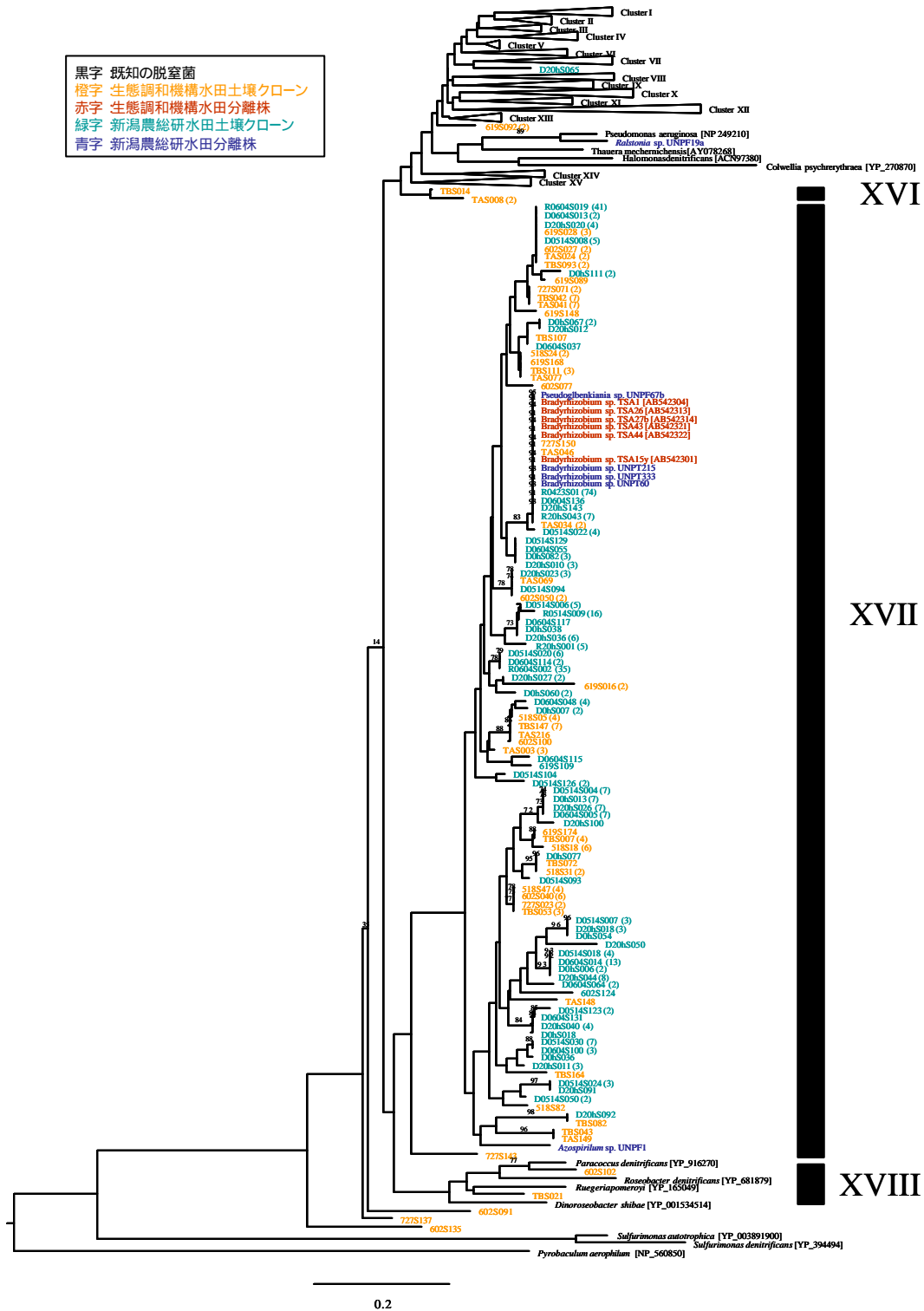
黒字 既知の脱窒菌
 橙字 生態調和機構水田土壌クローン
 赤字 生態調和機構水田分離株
 緑字 新潟農総研水田土壌クローン
 青字 新潟農総研水田分離株



(図 6-1 続き)

D

黒字 既知の脱窒菌
 赤字 生態調和機構水田土壌クローン
 赤字 生態調和機構水田分離株
 緑字 新潟農総研水田土壌クローン
 青字 新潟農総研水田分離株



(図 6-1 続き)

A

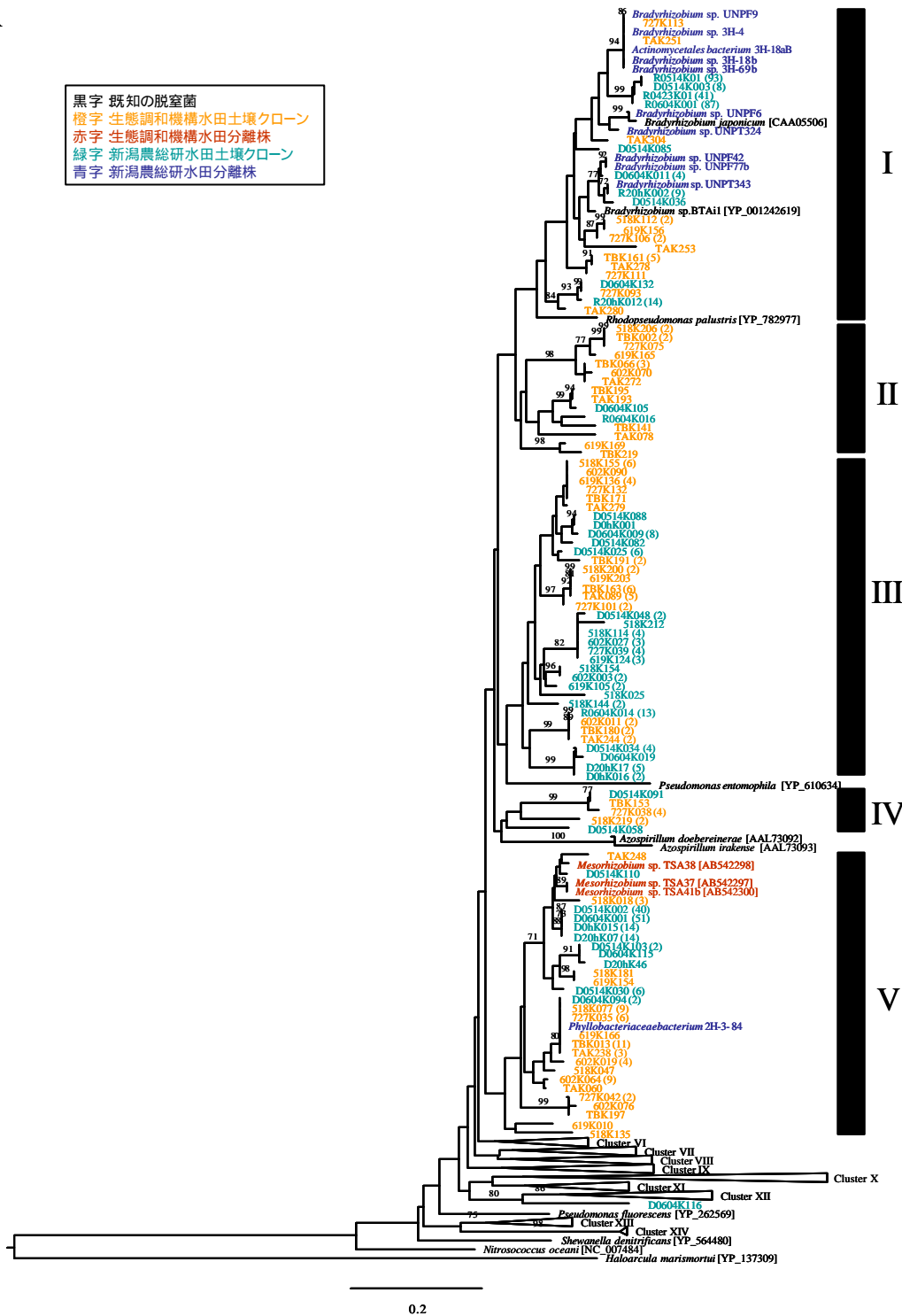


図 6-2 NirK アミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹。A)Cluster IV、B)Cluster VI-XIV。Bootstrap 値は 70%以上のものを記載した。OTU 代表株名の後の括弧は OTU に含まれるクローンの数を表している。

(続)

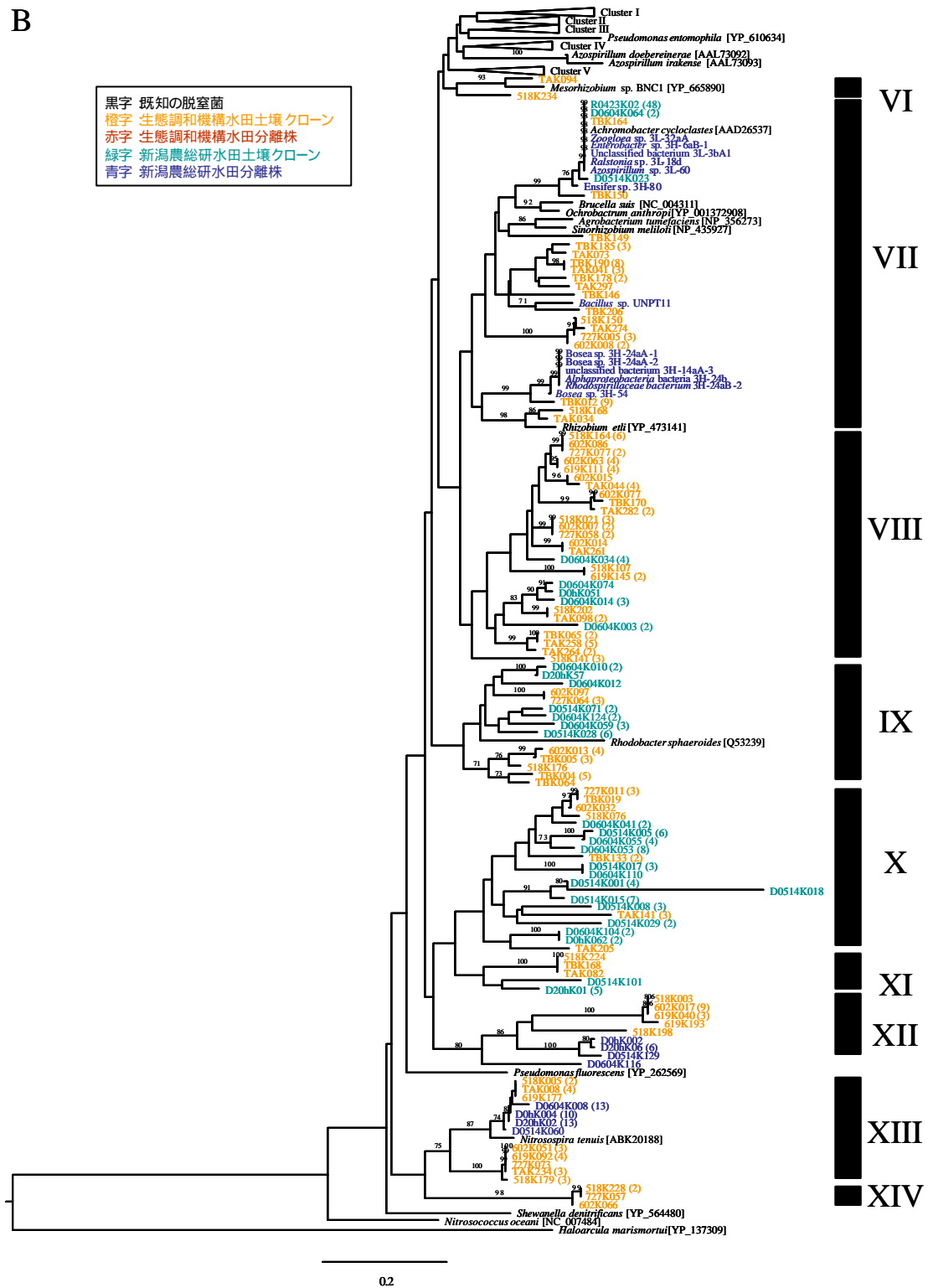
(図 6-2 説明続き)

比較対象に加えた配列について、公表済みのデータについてはアクセッション番号を記載し、未発表のデータについては記載していない。

系統樹上のクローン名及び分離菌株名について、由来毎に色分けをした。

- 黒字 :既知の脱窒菌
- 橙字 :本研究で得られた生態調和機構の実験室内モデル及び水田圃場由来のクローン (TBK :生態調和機構の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の土壌の培養前の土壌由来の NirK クローン、TAK :生態調和機構の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の土壌の培養後の土壌由来の NirK クローン、518K :5/18 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirK クローン、602K :6/2 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirK クローン、619K :6/19 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirK クローン、727K :7/27 に採取した生態調和機構の水田土壌由来の NirK クローン)
- 赤字 :生態調和機構の水田土壌から FSC 分離法によって分離された分離菌株
- 緑字 :本研究で得られた新潟農総研の実験室内モデル及び水田圃場由来のクローン (D0hK :新潟農総研の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の培養0時間の土壌の DNA 由来の NirK クローン、D20hK :新潟農総研の水田土壌を用いた実験室内モデル水田の培養 20 時間の土壌の DNA 由来の NirK クローン、R20hK :新潟農総研の水田土壌を用いた培養 20 時間の cDNA 由来の NirK クローン、D0514K :5/14 に採取された新潟農総研の水田土壌の DNA 由来の NirK クローン、D0604K :6/4 に採取された新潟農総研の水田土壌の DNA 由来の NirK クローン、R0423K :4/23 に採取された新潟農総研の水田土壌の RNA 由来の NirK クローン、R0514K :5/14 に採取された新潟農総研の水田土壌の RNA 由来の NirK クローン、R604K :6/4 に採取された新潟農総研の水田土壌の RNA 由来の NirK クローン)
- 青字 :新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法によって分離された分離菌株

B



(図 6-2 続き)

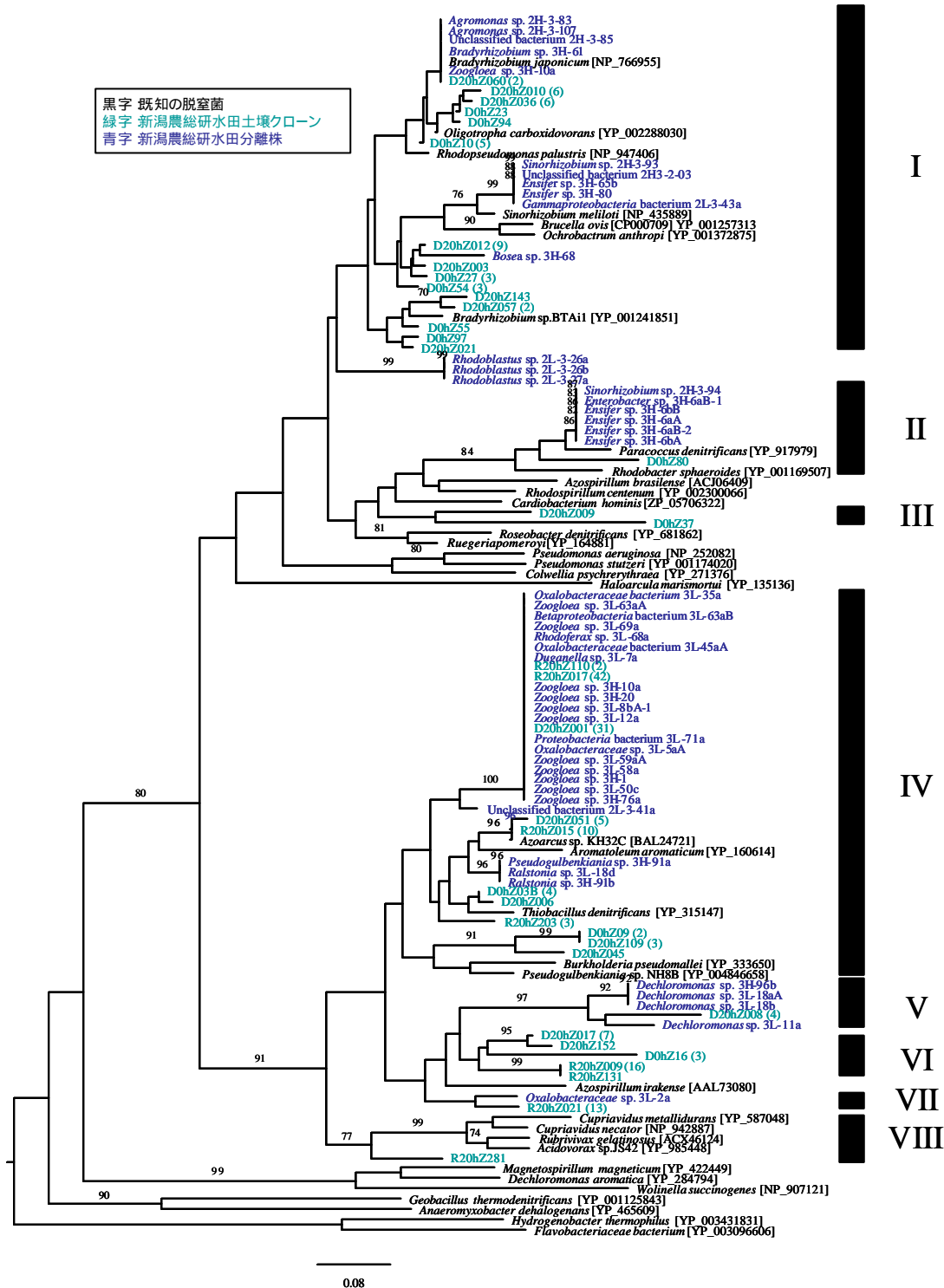


図 6-3 NosZ アミノ酸配列に基づく近隣結合系統樹。Bootstrap 値は 70%以上のものを記載した。
 (解説続々)

(図 6-3 解説続き)

比較対象に加えた配列について、公表済みのデータについてはアクセッション番号を記載し、未発表のデータについては記載していない。OTU 代表株名の後の括弧は OTU に含まれるクローンの数を表している。

系統樹上のクローン名及び分離菌株名について、由来毎に色分けをした。

- 黒字 :既知の微生物。
- 緑字 :本研究で得られた新潟農総研の実験室内モデル及び水田圃場由来のクローン (D0hZ 培養 0 時間の DNA 由来の NosZ クローン、D20hZ 培養 20 時間の DNA 由来の NosZ クローン、R20hZ 培養 20 時間の cDNA 由来の NosZ クローン。)
- 青字 :新潟農総研の水田土壌から FSC 分離法によって分離された分離菌株

参考文献

1. Akiyama H, Yagi K. (2005) Direct N₂O emissions from rice paddy fields: Summary of available data. *Global Biogeochem CY* 19:GB1005
2. Arth I, Frenzel P, Conrad R. (1998) Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice. *Soil Biol Biochem* 30:509-515
3. Ashida N, Ishii S, Hayano S, Tago K, Tsuji T, Yoshimura Y, Otsuka S, Senoo K. (2010) Isolation of functional single cells from environments using a micromanipulator: application to study denitrifying bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1211-1217
4. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Meth* 55:541-555
5. Bannert A, Kleineidam K, Wissing L, Mueller-Niggemann C, Vogelsang V, Welzl G, Cao Z, Schloter M. (2011) Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in a tidal wetland versus paddy soils cultivated for different time periods. *Appl Environ Microbiol* 77:6109-16
6. Barta J, elichova T, Van?k D, Picek T, ?antr??kova H. (2010) Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of nirK and nirS denitrifiers in spruce forest soil. *Biogeochemistry* 101:123-132
7. Bothe H, Jost G, Schloter M, Ward BB, Witzel K-P. (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev* 24:673-690
8. Bouwman AF, Boumans LJM, Batjes NH. (2002a) Emissions of N₂O and NO from fertilized fields. Summary of available measurement data. *Global Biogeochem Cy* 16:1058
9. Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64:3769-3775
10. Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM. (2000) Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest Marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* 66:2096-2104
11. Braker G, Ayala-Del-R?o HL, Devol AH, Fesefeldt A, Tiedje JM. (2001) Community structure of denitrifiers, Bacteria, and Archaea along redox gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (nirS) and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 67:1893-1901
12. Bremer C, Braker G, Matthies D, Reuter A, Engels C, Conrad R. (2007) Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-type denitrifier communities in soil. *Appl Environ Microbiol* :6876-6884

13. Bru D, Ramette A, Saby NPA, Dequiedt S, Ranjard L, Jolivet C, Arrouays D, Philippot L. (2011) Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J* 5:532-542
14. Burgmann H, Widmer F, Sigler WV, Zeyer J. (2003) mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Appl Environ Microbiol* 69:1928-1935
15. Bulow SE, Francis CA, Jackson GA, Ward BB. (2008) Sediment denitrifier community composition and *nirS* gene expression investigated with functional gene microarrays. *Environ Microbiol* 10:3057-3066
16. Bynes BH, Holt S, Austin ER. (1993) The emission of nitrous oxide upon wetting a rice soil following a dry season fallow. *J Geophys Res* 98:22925-22929
17. Cabello P, Roldan MD, Moreno-Vivian C. (2004) Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* 150:3527-3546
18. Casella S, Payne WJ. (1996) Potential of denitrifiers for soil environment protection. *FEMS microbiol Lett* 140:1-8
19. Chen Z, Luo X, Hu R, Wu M, Wu J, Wei W. (2010) Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil. *Microb Ecol* 60:850-861
20. Chen Z, Hou H, Zheng Y, Qin H, Zhu Y, Wu J, Wei W. (2011a) Influence of fertilisation regimes on a *nosZ*-containing denitrifying community in a rice paddy soil. *J Sci Food Agric* :
21. Chen Z, Liu J, Wu M, Xie X, Wu J, Wei W. (2012) Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil. *Microb Ecol* 63:446-459
22. Conrad R. (1996) Soil Microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO , CH_4 , OCS , N_2O , and NO). *Microbiol Rev* 60:609-640
23. Dandie CE, Burton DL, Zebarth BJ, Henderson SL, Trevors JT, Goyer C. (2008) Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity. *Appl Environ Microbiol* 74:5997-6005
24. EPA (2011) Inventory of U.S. greenhouse gas emissions and sinks: 1990-2009.
25. Etchebehere C, Tiedje J. (2005) Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. *Appl Environ Microbiol* 71:5642-5645
26. Felsenstein J. (2008) Comparative methods with sampling error and within-species variation: contrasts revisited and revised. *Am Nat* 171:713-25
27. Galtier N, Gouy M, Gautier C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543-8.
28. Gamble TN, Betlach MR, Tiedje JM. (1977) Numerically dominant denitrifying bacteria from

- world soils. *Appl Environ Microbiol* 33:926-939
29. Geets J, Cooman M, Wittebolle L, Heylen K, Vanparys B, Vos PD, Verstraete W, Boon N. (2007) Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:211-221
 30. Gordon D, Abajian C, Green P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8:195-202
 31. Hallin S, Lindgren PE. (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:1652-1657
 32. Henry S. (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl Environ Microbiol* 72:5181-5189
 33. Henry S, Texier S, Hallet S, Dambreville DBC, Cheneby D, Bizouard F, Germon JC, Philippot L. (2008) Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environ Microbiol* 10:3082-3092
 34. Heylen K, Gevers D, Vanparys B, Wittebolle L, Geets J, Boon N, Vos PD. (2006) The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ Microbiol* 8:2012-2021
 35. Hussain Q, Liu Y, Jin Z, Zhang A, Pan G, Li L, Crowley D, Zhang X, Song X, Cui L. (2011) Temporal dynamics of ammonia oxidizer (*amoA*) and denitrifier (*nirK*) communities in the rhizosphere of a rice ecosystem from Tai Lake region, China. *Appl Soil Ecol* 48:210-218
 36. IPCC (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases.
 37. IPCC (2007) Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing.
 38. Ishii S, Ashida N, Otsuka S, Senoo K. (2011a) Isolation of oligotrophic denitrifiers carrying previously uncharacterized functional gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 77:338-342
 39. Ishii S, Ohno H, Tsuboi M, Otsuka S, Senoo K. (2011) Identification and isolation of active N₂O reducers in rice paddy soil. *ISME J* 5:1936-1945
 40. Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, Senoo K. (2011) Nitrogen cycling in rice paddy environments: fast achievements and future challenges. *Microbes Environ* 26:282-292
 41. Jones CM, Stres B, Rosenquist M, Hallin S. (2008) Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol Biol Evol* 25:1955-1966
 42. Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D, Bru D, Philippot L. (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a Glacier Foreland. *Appl Environ Microbiol* 72:5957-5962
 43. Katuyama C, Kondo N, Suwa Y, Yamagishi T, Itoh M, Ohte N, Kimura H, Nagaosa K, Kato K. (2008) Denitrification activity and relevant bacteria revealed by nitrite reductase gene

- fragments in soil of temperate mixed forest. *Microbes Environ* 23:337-345
44. Kobayashi M, Matsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F, Shoun H. (1996) Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J Biol Chem* 271:16263-16267
 45. Lane DJ. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt E & Goodfellow M, eds), pp. 115-147. Wiley, New York.
 46. Lopez-Gutierrez JC. (2004) Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *J Microbiol Meth* 57:399-407
 47. Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, Bothe H. (2001) Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* 36:33-42
 48. Mohn WW, Wilson AE, Bicho P, Moore ER. (1999) Physiological and Phylogenetic Diversity of Bacteria Growing on Resin Acids. *Syst Appl Microbiol* 22: 68-78
 49. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700
 50. Oakley BB, Francis CA, Roberts KJ, Fuchsman CA, Srinivasan S, Staley JT. (2007) Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. *Environ Microbiol* 9:118-130
 51. Perriere G, Gouy M. (1996) WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78:364-369
 52. Philippot L, Hallin S, Schloter M. (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Adv Agron* 96:249-305
 53. Philippot L, Cuhel J, Saby NPA, Chèneby D, Chronáková A, Bru D, Arrouays D, Martin-Laurent F, Šimek M (2009) Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community.. *Environ Microbiol* 11:1518-1526
 54. Prieme A, Braker G, Tiedje JM. (2002) Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl Environ Microbiol* 68:1893-1900
 55. Reddy KR, Patrick WH, Phillips RE. (1980) Evaluation of selected processes controlling nitrogen loss in a flooded soil. *Soil Sci Soc Am J* 44:1204-1246
 56. Rich JJ, Heichen RS, Bottomley PJ, Cromack K Jr, Myrold DD. (2003) Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Appl Environ Microbiol* 69:5974-5982
 57. Richardson JD, van Spanning RJM, Ferguson SJ. (2007) The prokaryotic nitrate reductases. *Biology of the Nitrogen Cycles* (Bothe H, Ferguson SJ, Newton NE eds), pp. 21-35. Elsevier, Amsterdam.
 58. Rinaldo S, Cutruzzola F. (2007) Nitrite reductases in denitrification. *Biology of the Nitrogen Cycles* (Bothe H, Ferguson SJ, Newton NE eds), pp. 37-55. Elsevier, Amsterdam.

59. Saito T, Ishii S, Otsuka S, Nishiyama M, Senoo K. (2008) Identification of novel Betaproteobacteria in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing. *Microbes Environ* 23:192-200
60. Scala DJ, Kerkhof LJ. (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *FEMS Microbiol Lett* 162:61-68
61. Schloss PD, Handelsman J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71:1501-1506
62. Shoun H, Kim D-H, Uchiyama H, Sugiyama J. (1992) Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett* 94:277-282
63. Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, Osborn AM. (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (narG and napA), nitrite reductase genes (nirS and nrfA), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* 73:3612-3622
64. Smith JM, Ogram A. (2008) Genetic and functional variation in denitrifier populations along a short-term restoration chronosequence. *Appl Environ Microbiol* 74:5615-5620
65. Song B, Ward BB. (2003) Nitrite reductase genes in halobenzoate degrading denitrifying bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 43:349-357
66. Su M, Kleineidam K, Schloter M. (2010) Influence of different litter quality on the abundance of genes involved in nitrification and denitrification after freezing and thawing of an arable soil. *Biol Fert Soils* 46:537-541
67. Tago K, Ishii S, Nishizawa T, Otsuka S, Senoo K. (2011) Phylogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice-soybean rotation fields. *Microbes Environ* 26:30-35
68. Tanimoto T, Hatano K, Kim D, Uchiyama H, Shoun H. (1992) Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett* 93:177-180
69. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882
70. Throback IN, Enwall K, Jarvis A., Hallin S. (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* 49:401-417
71. Towe S, Albert A, Kleineidam K, Brankatschk R, Dumig A, Welzl G, Munch JC, Zeyer J, Schloter M. (2010) Abundance of microbes involved in nitrogen transformation in the rhizosphere of *Leucanthemopsis alpina* (L.) Heywood grown in soils from different sites of the Damma glacier forefield. *Microb Ecol* 60:762-770

72. Tsuruta S, Takaya N, Zhang L, Shoun H, Kimura K, Hamamoto M, Nakase T. (1998) Denitrification by yeasts and occurrence of cytochrome P450_{nor} in *Trichosporon cutaneum*. *FEMS microbiol Lett* 168:105-110
73. Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37-43
74. Simon de Vries S, Pouvreau LAM. (2007) Nitric oxide reductase: structural variations and catalytic mechanism. *Biology of the Nitrogen Cycles* (Bothe H, Ferguson SJ, Newton NE eds), pp. 57-66. Elsevier, Amsterdam.
75. Wallenstein, MD, Vitgalys RJ. (2005) Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. *Pedobiologia* 49:665-672
76. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261-5267
77. Wang Y, Shimodaira J, Miyasaka T, Morimoto S, Oomori T, Ogawa N, Fukuda M, Fujii T. (2008) Detection of bphAa gene expression of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 in soil using a new method of RNA preparation from soil. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:694-701
78. Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, Henrissat B, Coutinho PM, Wu M, Xie G, Haft DH, Sait M, Badger J, Barabote RD, Bradley B, Brettin TS, Brinkac LM, Bruce D, Creasy T, Daugherty SC, Davidsen TM, DeBoy RT, Detter JC, Dodson RJ, Durkin AS, Ganapathy A, Gwinn-Giglio M, Han CS, Khouri H, Kiss H, Kothari SP, Madupu R, Nelson KE, Nelson WC, Paulsen I, Penn K, Ren Q, Rosovitz MJ, Selengut JD, Shrivastava S, Sullivan SA, Tapia R, Thompson LS, Watkins KL, Yang Q, Yu C, Zafar N, Zhou L, Kuske CR. (2009) Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol* 75:2046-2056
79. Wertz S, Dandie CE, Goyer C, Trevors JT, Patten CL. (2009) Diversity of nirK denitrifying genes and transcripts in an agricultural soil. *Appl Environ Microbiol* 75:7365-7377
80. Wolsing M, Prieme A. (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. *FEMS Microbiol Ecol* 48:261-271
81. Yoshinari T, Knowles R. (1976) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem Biophys Res Comm* 69:705-710
82. Zheng X, Wang M, Wang Y, Shen R, Gou J, Li J, Jin J, Li L. (2000) Impact of soil moisture on nitrous oxide emission from croplands: A case study on the rice-based agro-ecosystem in southeast China. *Chemosphere Global Change Sci* 2:207-224
83. Zumft WG. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol R*

61:533-616

84. Zumft WG, Kroneck PM. (2007) Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Adv Microb Physiol* 52:107-227
85. Zumft WG, Korner H. (2007) Nitrous oxide reductases. *Biology of the Nitrogen Cycles* (Bothe H, Ferguson SJ, Newton NE eds), pp. 67-81. Elsevier, Amsterdam.
86. 石沢修一、豊田広三. (1964) 本邦土壌の微生物フロラに関する研究. *農技研* 14:203-284
87. 伊藤英臣、石井聡、妹尾啓史. (2010) 水田土壌のメタゲノム解析. *メタゲノム解析技術の最前線* (服部正平 監修), pp. 215-221. シーエムシー出版、東京。
88. 上原 洋一、高井 康雄. (1976) 水田土壌作土表層部における硝化脱窒過程に関する研究 (第 2 報) : 理化学性の異なる 3 種類の土壌における窒素の形態変化および硝化菌 脱窒菌の変動. *土肥誌* 47:542-548
89. 上原 洋一、高井 康雄. (1983) 湛水土壌最表層部における硝化脱窒過程の微視的手法による検討 : 水田土壌作土表層部における硝化脱窒過程に関する研究(第 3 報). *土肥誌* 54:241-246
90. 小川 吉雄、酒井 一. (1984) 畑地から水田内へ流入した硝酸態窒素の動向. *土肥誌* 55:533-538
91. 佐藤 立夫、関根 靖彦、和田 秀徳. (1988) アセチレンブロック法による脱窒量測定法の検討. *土肥誌* 59:557-562
92. 佐藤 立夫、関根 靖彦、和田 秀徳. (1989) 添加有機物の種類と量が湛水土壌の硝酸代謝に及ぼす影響. *土肥誌* 60:134-139
93. 塩入松三郎・青峰重範. (1937) 水田状態の土壌中におけるアンモニア態窒素の消長について. 11:389-392
94. 塩入松三郎・青峰重範. (1938) 湛水状態の土壌中における窒素の形態変化. 12:406-410
95. 塩入松三郎. (1942) 水田の脱窒現象に就て. *土肥誌* 16:104-116
96. 大工原銀太郎、今關常次郎. (1907) 智利硝石の水田肥料として不適当なる所以を論ず. *Bull Imp Central Agric Exp Stn* 34:5-43
97. 高井 康雄、上原 洋一. (1973) 水田土壌作土表層部における硝化脱窒過程に関する研究 (第 1 報) : 湛水状態下長野土壌各層別の酸化還元状態の変動, 窒素の形態変化および硝化菌 脱窒菌の消長. *土肥誌* 44:463-470
98. 戸田 任重、望月 康秀、川西 琢也、川島 博之. (1997) 静岡県牧ノ原における茶園-水田連鎖系による窒素流出負荷低減効果の推定. *土肥誌* 68:369-375
99. 新良 力也、渥美 和彦、宮地 直道. (2005) 静岡県牧ノ原台地の茶園地帯における硝酸性窒素の流出量と水田による除去可能性. *土肥誌* 76:901-904
100. 長谷部 亮、関矢 信一郎、飯村 康二. (1986) 水管理条件が酸化層・還元層の分化発達に及ぼす影響. *土肥誌* 57:544-550

謝辞

本論文は筆者が東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻博士課程における研究成果をまとめたものである。同専攻教授 妹尾啓史先生には、本研究を進めるにあたり 指導教員として終始に渡り多大なるご指導、ご助言をいただいた。ここに深謝の意を表す。同専攻准教授 大塚重人先生、同専攻特任助教 石井聡先生(現 北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 助教)には、本研究を進めるにあたり 多くの的確なご助言をいただき、本論文の細部にわたりご指導をいただいた。ここに深謝の意を表す。本研究の第二章の実験にあたり東京大学附属生態調和農学機構准教授山岸淳子先生、第四章 第五章の実験にあたり新潟県農業総合研究所基礎研究部専門研究員白鳥豊氏から供試土壌を提供していただいた。第四章で用いた実験室内モデル水田の脱窒活性の測定をしていただいた藤井大地氏、第五章の実験にあたり本専攻土壌圏科学研究室の伊藤英臣氏に土壌 DNA, cDNA を提供していただいた。ここに感謝の意を表す。最後に、東京大学農学部土壌圏科学研究室の各位には研究に多くの助言・協力をいただいた。ここに感謝の意を表す。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費(特別研究員(DC1)、20 4259)の助成を受けた。