

ダイズ根圏の N₂O 発生機構と根粒菌による削減

Mitigation of N₂O Emission from Soybean Rhizosphere by *Bradyrhizobium japonicum* Inoculation

板倉 学, Sánchez Cristina, 森内 真人, 南澤 究

MANABU ITAKURA, CRISTINA SÁNCHEZ, MAKOTO MORIUCHI and KIWAMU MINAMISAWA

東北大学大学院生命科学研究所 〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-Ku, Sendai 980-8577, Japan

キーワード: 亜酸化窒素, 脱窒, ダイズ根粒菌, 根圏

Key words: Nitrous oxide, Denitrification, Bradyrhizobium, Rhizosphere

(原稿受付 2013年11月27日/原稿受理 2013年12月4日)

1. はじめに

一酸化二窒素 (N₂O, 亜酸化窒素) は強力な温室効果ガスであるとともに、オゾン層破壊の主要な原因物質である。大気中の N₂O 濃度は、産業革命以前の 270 ppbv から、近年にいたるまでほぼ直線的にその濃度が増加し続けており、地球環境問題の対策として大気中への N₂O 放出量の削減は必要不可欠となっている。

N₂O は農業活動からの発生量が約 4 割と多く、マメ科植物の根粒根圏は N₂O 発生のホットスポットであり^{1,11,15,17}、マメ科植物の圃場や牧草地からの N₂O 発生低減化技術の研究は、近年世界的にも注目を集めている。そこで、本稿では我々の実施してきたダイズ根粒菌の N₂O 還元酵素遺伝子 *nosZ*、根圏微生物コミュニティの N₂O 代謝の分子微生物生態学的な N₂O 発生メカニズムおよびダイズ根粒菌の N₂O 還元能を利用した N₂O 削減の研究について紹介したい。

2. ダイズ根粒菌における脱窒遺伝子と N₂O 還元能

ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) は共生窒素固定だけでなく、その逆過程の脱窒も行い、硝酸イオンから窒素ガス (N₂) までの還元 (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂) を行う (図 1)。2002 年に全ゲノム塩基配列が決定された USDA110 株では各ステップの反応を担う還元酵素遺伝子 (*napAB*, *nirK*, *norCB*, *nosZ*) を保有していた⁸。しかし、ダイズ根粒菌には、USDA6 株⁹ のように *nosZ* 遺伝子を欠いているために N₂O までの脱窒しか示さない株も存在している。日本の土着ダイズ根粒菌株の脱窒遺伝子を調べたところ、N₂O 還元酵素遺伝子 *nosZ* を保有系統と非保有系統が存在していた^{6,12,13}。これは、ダイズ根粒菌 *B. japonicum* は硝酸から N₂O までの還元過程は共通して保有しているが、最終反応の N₂O 還元酵素およびその構造遺伝子 *nosZ* は一部のダイズ根粒菌にしか存在しないことを意味する。

N₂O 還元酵素は N₂O から N₂ への反応を触媒する酵素であり、N₂O の削減において非常に重要な因子である。そこで、ダイズ根粒菌の N₂O 還元活性が *nosZ* 遺伝子に担われているか調べた。その結果、USDA110 株の *nosZ* 遺伝子破壊株は N₂O 還元酵素活性を失い、その *nosZ* の遺伝的相補により N₂O 還元酵素活性が回復した¹⁴。

さらに、USDA110 株により形成された根粒は¹⁵N-N₂O を定量的に¹⁵N-N₂ に変換したことから、N₂O 還元能を持つダイズ根粒菌は根粒状態においても N₂O を N₂ に吸収還元する能力を有していることが明らかとなった。また驚いたことに、大気中に微量に含まれている N₂O ガス (約 340 ppb) をも吸収還元した (図 1)¹⁴。土壌中の N₂O 濃度は一般に大気中より高いので、*nosZ* 遺伝子を持ったダイズ根粒菌が形成した根粒は土壌中の N₂O をクリーンアップできると考えられた。

3. N₂O パラドックス

上記の実験結果は、ダイズ根粒が少なくとも N₂O の強力なシンクであることを示している。一方、農耕地の

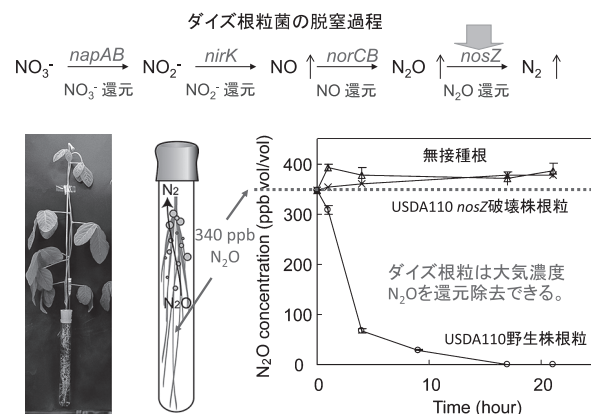


図 1. ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* による脱窒。

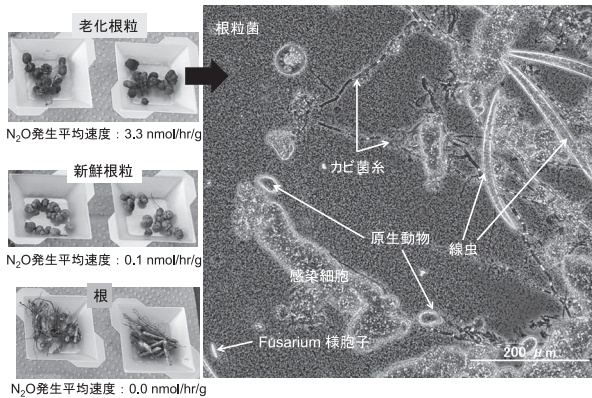


図2. 老化根粒からの N_2O 発生と老化根粒の顕微鏡観察。

環境科学分野では、ダイズも含めたマメ科作物圃場から N_2O が放出されていることが多数報告されている。この N_2O パラドックスの原因を解明するために、東北大学の鹿島台圃場のダイズ根系の N_2O フラックス測定をダイズ栽培期間中、根粒や根に分けて行ってみた。その結果、老化根粒から N_2O フラックスが高いことが一つの原因であることが明らかとなった (図2)³⁾。

N_2O が発生している老化根粒、発生していない新鮮根粒、根から DNA を抽出し、培養に依存しない DNA に基づく生物群集構造解析と顕微鏡観察を行った。その結果、種々の脱窒細菌、脱窒糸状菌が検出された (図2)³⁾。また、原生動物や線虫も検出された (図2)。

根粒の老化過程を注意深く観察すると、新鮮根粒の窒素固定機能が失われると、根粒内がピンクから茶褐色になり、土壤の細菌捕食性線虫が根粒内に侵入する。その後、原生動物やカビが侵入し、1ヶ月室温で放置しておくとも根粒の内部はきれいに無機化され、根粒の表皮のみが残るといった状況になった。これらの観察結果より、特有な土壤生物相が老化根粒内外で一過的に形成されているものと考えられた。

4. 根粒菌硝酸還元による N_2O 発生への寄与

圃場栽培ダイズではどの微生物が N_2O 発生に関わっているのか詳細な反復解析が難しいので、実験室で根粒老化を再現するモデル実験系を作成した⁴⁾。 N_2O 還元酵素遺伝子 *nosZ* を保有するダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 株と硝酸還元酵素系変異株 $\Delta nosZ$, $\Delta nirK$, $\Delta nirK\Delta nosZ$ を接種してダイズを無菌的に栽培し、30日後に根粒老化を促進するため (i) 地上部切除、(ii) 地上部切除と土壌添加等の同時処理を行った。その結果、土壌添加と地上部切除の同時処理を行ったダイズの根粒からのみ、 $\Delta nosZ$, $\Delta nirK\Delta nosZ$ 株接種において顕著な N_2O 発生が見られ、 N_2O の発生はダイズ根粒菌の *nosZ* の機能に依存していることが明らかとなった⁴⁾。また、ダイズに $^{15}N_2$ ガスを暴露し根粒内の固定窒素を ^{15}N で標識し、根粒老化によって発生する ^{15}N 濃度を測定した結果、 ^{15}N 標識した根粒が老化した際に放出される N_2O ガスの ^{15}N 濃度は根粒の ^{15}N 濃度と等しかったので、根粒根圏から発生する N_2O の起源は根粒窒素であることが明らかとなった⁴⁾。

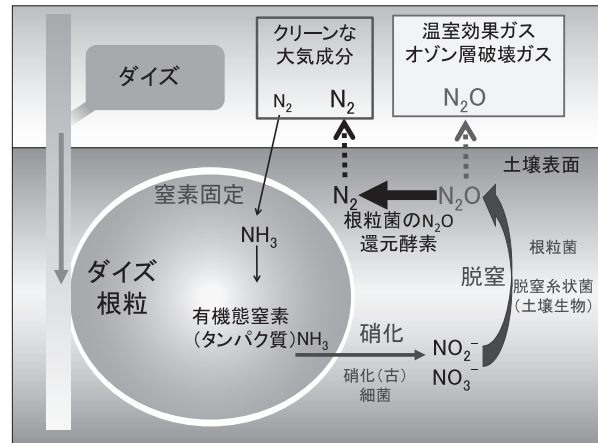


図3. 根粒根圏の N_2O 発生メカニズム。

最終脱窒産物が N_2 である USDA110 株を接種源とした根粒からは N_2O は発生しなかったが、 $\Delta nirK\Delta nosZ$ 株を接種源とした根粒からは $\Delta nosZ$ 株接種根粒の約半分の N_2O 発生が観察された。 $\Delta nirK\Delta nosZ$ 株では脱窒反応が亜硝酸で止まり、ダイズ根粒菌由来の N_2O は発生しない。そのため $\Delta nirK\Delta nosZ$ 株接種根粒からの N_2O 発生には、接種したダイズ根粒菌以外の土壌微生物が関与していることが強く示唆される。

以上の結果より、ダイズ根粒根圏からの N_2O 発生には、 N_2O 発生源 (ソース) としてダイズ根粒菌と土壌微生物の両方が関与していること、*nosZ* 遺伝子を保有しているダイズ根粒菌が N_2O 吸収源 (シンク) として働くことが明らかとなった (図3)⁴⁾。

5. ダイズ根粒根圏における糸状菌脱窒

上記のモデル実験系に脱窒カビをはじめとする真核生物の生育を阻害するシクロヘキシミドを添加したところ、 N_2O 発生が顕著に減少した。このことからダイズ根粒根圏からの N_2O 発生には脱窒性糸状菌の関与が示唆された。脱窒性糸状菌の中でもフザリウム (*Fusarium* 属糸状菌) が高い脱窒能を保有しているということが分かっており¹⁶⁾、顕微鏡や DNA 解析からも老化根粒においてフザリウムの存在が検出されていた。そこで、根粒根圏からの N_2O 発生への脱窒糸状菌の関与を明らかにするため、 N_2O 発生が活発に起こっている根粒根圏から三日月型をしたフザリウム様の胞子の単胞子分離を行った。得られた12株の糸状菌の系統マーカー遺伝子配列を決めたところ、11株が *Fusarium solani* であった。

フザリウムは植物病原菌として知られているが、ダイズには特に病兆を示さないので、本分離株は非病原性のフザリウムと考えられる。得られたフザリウム分離株の脱窒活性試験を行ったところ、硝酸ではなく亜硝酸のみを脱窒基質として利用し、ほぼ化学量論的に N_2O へと変換されることが分かった。さらに、 ^{15}N 標識トレーサー実験によって発生した N_2O の発生源を調べたところ、発生した N_2O はすべて亜硝酸由来であった。したがって、ダイズ根粒根圏からの N_2O 発生を起こしている鍵土壌微生物として、フザリウムによる亜硝酸からの

N₂O 発生が強く疑われる (図 3)。

6. 根粒根圏からの N₂O 発生の低減化

モデル実験系によるダイズ根粒根圏からの N₂O 発生機構の検討の結果、ダイズ根粒菌及び脱窒糸状菌が N₂O ソースとして働き、ダイズ根粒菌の保有する *nosZ* が N₂O のシンクとして機能していることが明らかとなった。そこで、筆者らはダイズ根粒菌の *nosZ* の活性を高める、すなわち N₂O シンクの機能を増強することが出来れば、N₂O 削減に利用できると考えた。そこで N₂O 還元活性の高いダイズ根粒菌 (*nosZ*++) の作出を、*B. japonicum* USDA110 株を用いてプロモーター強化及び不均衡変異導入^{5,7)} の2つのアプローチで試みた (図 4)。その結果、プロモーター強化株、不均衡変異導入株のいずれも野生株と比較し N₂O 還元活性の顕著な上昇が認められた^{5,7)}。

前述のモデル実験系を用いて、*nosZ*++ 株接種根粒からの N₂O 発生を測定した結果、根粒老化過程における N₂O 発生の有意な低減化が観察された⁷⁾。特に、土壌中の濃度を想定した 10 ppm N₂O 雰囲気中では、*nosZ*++ 株根粒のみで N₂O の取込みが見られた。以上の結果より、*nosZ*++ 株により形成された根粒は N₂O 除去ポテンシャルが通常の *nosZ*+ 株よりも高いことが明らかとなった⁷⁾。さらに、ポット栽培系を用い、*nosZ* を保有していない根粒菌 (*nosZ*- 株) が優占している土壌に、*nosZ*++ 株及び *nosZ*+ 株を接種しダイズを栽培

したところ、土着 *nosZ*- 株区と比較し、*nosZ*++ 株及び *nosZ*+ 株接種区において、根粒老化過程における N₂O 発生が有意に減少していた。また老化根粒を回収し、老化根粒由来の N₂O 発生を詳細に測定した結果、*nosZ*++ 株接種によって *nosZ*+ 株接種に比べ N₂O 発生量が有意に減少していた⁷⁾。*nosZ*++ 株の接種効果を圃場レベルで検証するため、*nosZ*- ダイズ根粒菌が優占している実験圃場で *nosZ*++ 株の接種試験を行った。その結果、根粒老化が起きる収穫期以降にダイズ根圏から発生する N₂O をフィールドレベルでも半減させることが判明した⁷⁾。

7. 根粒菌 N₂O 還元酵素遺伝子の新規制御系

不均衡変異導入法により作出された *nosZ*++ 株の N₂O 還元活性上昇の原因を明らかにするため、同手法により作出された 6 株の *nosZ*++ 株のゲノム解析を行い、染色体上の変異を同定した。その結果、解析した全ての *nosZ*++ 株において、硝酸同化系遺伝子の二成分制御因子 NasST¹⁰⁾ のセンサータンパク質をコードする *nasS* 遺伝子に変異が生じていた。そこで、*B. japonicum* USDA110 株の *nasS* 変異株を作成したところ、*nosZ*++ 株と同様に N₂O 還元活性の上昇が観察され、*nasS* の変異が N₂O 還元活性上昇の原因であり、*nosZ* の発現制御に関与していることが示された (図 5)。NasS は NasT とともに、硝酸・亜硝酸の同化系遺伝子 *nasABCDEF*、*nirA* などの 2 成分制御系として機能していることが他

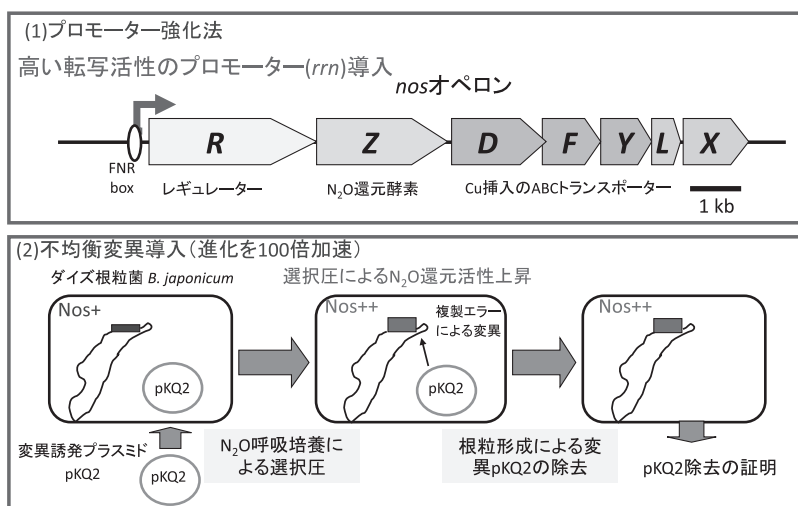


図 4. N₂O 還元酵素活性強化根粒菌の二つの作出方法。

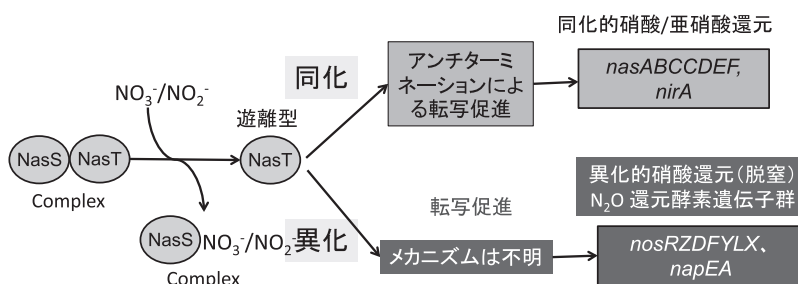


図 5. NasST による硝酸還元系遺伝子の転写制御。

の脱窒細菌で知られている (図5)。実際、*nasT* 変異により *nasS* 変異による *nosZ* の発現や N_2O 活性上昇はキャンセルされた。これらの結果より、*nasS* による脱窒過程の *nos* 遺伝子制御も同様なメカニズムなのか、その同化・異化および還元・酸化を超えた *NasST* による制御の可能性という面で興味深い。さらに、上記のダイズ根粒菌の *nasS* 変異に着目すれば、*nosZ++* 株を取得できることを科学的に証明したことも、実用化という観点でも重要である。

8. おわりに

根圏微生物研究の創始者である Hiltner は 1904 年にマメ科植物根の周辺土壌では細菌数が増加することを明らかにし、それは根粒から放出される窒素化合物の影響であると考察した²⁾。ある意味では、本研究は Hiltner の根圏研究の現代版であるとも言える¹⁸⁾。

根粒根圏から放出される N_2O は、根粒タンパク質を物質的な起点として、土壌生物によるアンモニア化、硝化、脱窒と、根粒菌による N_2O 還元バランスにより生成すると考えられる。目に見えない微生物群がどのように物質循環過程を担っているかは微生物生態学の課題であるが、実は純粋分離された個別の微生物の性質に基づいて推定されている場合が多い。今後、アンモニア化、硝化、脱窒の各過程を担っているプレーヤーと窒素形態変化のダイナミズムの解明を、同位体化学とゲノム解析を駆使して解析することは、挑戦的で魅力的な課題である。

ダイズ根粒菌 *nosZ++* 株の作出と N_2O 削減効果の実証は、世界で初めての微生物を利用した N_2O 削減技術の成功事例である⁷⁾。今後、地球温暖化の防止という観点から本技術を広く世の中に広めていくためには、圃場野生株のナチュラルバリエーションからの N_2O 還元酵素活性の高い根粒菌の選抜作出法の開発とそれらの利用が大変重要となる。さらに、ダイズ根粒菌において二成分制御系 *NasST* が N_2O 還元活性の上昇に関与していることが明らかとなった。この *NasST* は硝酸同化系遺伝子の二成分制御系として環境細菌に広く分布していることが知られており¹⁰⁾、*nosZ++* 株による N_2O 削減戦略の *NasST* 及び *nosZ* 遺伝子を保有する環境細菌への応用も期待される。

謝 辞

本研究は生物系特定産業技術研究支援センター「基礎研究推進事業」及び「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の助成により行われました。

文 献

- Duxbury, J.M., D.R. Bouldin, R.E. Terry, and R.L. Tate III. 1982. Emissions of nitrous oxide from soils. *Nature*. 298: 462-464.
- Hartmann, A., M. Rothballer, and M. Schmid. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil*. 312: 7-14.
- Inaba, S., K. Tanabe, S. Eda, S. Ikeda, A. Higashitani, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2009. Nitrous oxide emission and microbial community in the rhizosphere of nodulated soybeans during the late growth period. *Microbes Environ*. 24: 64-67.
- Inaba, S., F. Ikenishi, M. Itakura, M. Kikuchi, S. Eda, N. Chiba, C. Katsumata, Y. Suwa, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2012. N_2O emission from degraded soybean nodules depends on denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* and other microbes in the rhizosphere. *Microbes Environ*. 27: 470-476.
- Itakura, M., K. Tabata, S. Eda, H. Mitsui, K. Murakami, J. Yasuda, and K. Minamisawa. 2008. Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N_2O reductase activity by selection after introduction of a mutated *dnaQ* gene. *Appl. Environ. Microbiol*. 74: 7258-7264.
- Itakura, M., K. Saeki, H. Omori, T. Yokoyama, T. Kaneko, S. Tabata, T. Ohwada, S. Tajima, T. Uchiumi, K. Honnma, K. Fujita, H. Iwata, Y. Saeki, Y. Hara, S. Ikeda, S. Eda, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2009. Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other Bradyrhizobiaceae members. *ISME J*. 3: 326-339.
- Itakura, M., Y. Uchida, H. Akiyama, Y. Takada-Hoshino, Y. Shimomura, S. Morimoto, K. Tago, Y. Wang, C. Hayakawa, Y. Uetake, C. Sanchez, S. Eda, M. Hayatsu, and K. Minamisawa. 2013. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Nature Climate Change*. 3: 208-212.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpō, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res*. 7: 331-338.
- Kaneko, T., S. Maita, H. Hirakawa, N. Uchiie, K. Minamisawa, A. Watanabe, and S. Sato. 2011. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6T. *Genes*. 2: 763-787.
- Luque-Almagro, V.M., A.J. Gates, C. Moreno-Vivian, S.J. Ferguson, D.J. Richardson, and M.D. Roldan. 2011. Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochem. Soc. Trans*. 39: 1838-1843.
- Mori, A., M. Hojito, H. Kondo, H. Matsunami, and D. Scholefield. 2005. Effects of plant species on CH_4 and N_2O fluxes from volcanic grassland soil in Nasu, Japan. *Soil Sci. Plant Nutr*. 51: 19-27.
- Sameshma-Saito, R., K. Chiba, and K. Minamisawa. 2004. New method of denitrification analysis of *Bradyrhizobium* field isolates by gas chromatographic determination of ^{15}N -labeled N_2 . *Appl. Environ. Microbiol*. 70: 2886-2891.
- Sameshma-Saito, R., K. Chiba, and K. Minamisawa. 2006. Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean bradyrhizobia. *Microbes Environ*. 21: 174-184.
- Sameshma-Saito, R., K. Chiba, J. Hirayama, M. Itakura, H. Mitsui, S. Eda, and K. Minamisawa. 2006. Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N_2O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. *Appl. Environ. Microbiol*. 72: 2526-2532.
- Scaglia, J., R. Lensi, and A. Chalamet. 1985. Relationship between photosynthesis and denitrification in oiled soil. *Plant Soil*. 84: 37-43.
- Shoun, H., D.H. Kim, H. Uchiyama, and J. Sugiyama. 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 94: 277-282.
- Yang, L. and Z. Cai. 2005. The effect of growing soybean (*Glycine max*. L.) on N_2O emission from soil. *Soil Biol. Biochem*. 37: 1205-1209.
- 板倉 学, 稲葉尚子, 池西史生, 南澤 究. 2011. ダイズ根粒根圏からの重酸化窒素発生機構とその低減化. *化学と生物*. 49: 560-565.