

土を肥やす新たな微生物基盤の解明

研究代表者

妹尾啓史 東京大学大学院農学生命科学研究科
東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構

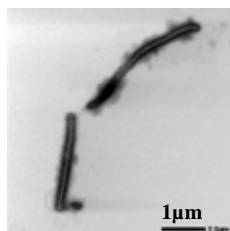
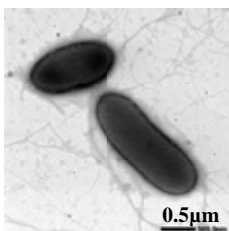


共同研究者

白鳥 豊 新潟県農業総合研究所
大峽広智 新潟県農業総合研究所
伊藤英臣 産業技術総合研究所 北海道センター



右上：東大グループ 右：妹尾、左：増田（特任研究員）
左上：新潟農総研グループ 左：白鳥、右：大峽
下：産総研北海道センター 伊藤



水田土壌から分離した鉄還元細菌
Geomonas 属(左)と *Anaeromyxobacter* 属(右)



新潟県長岡水田圃場(左)と十日町水田圃場(右)

1. 研究の背景と達成目標

窒素肥料にまつわる環境・エネルギー・経済格差問題といった「食の南北問題」の解決のために、環境への影響やエネルギー消費を最小限に抑えつつ最大の作物生産を得る「低窒素農業」の確立が重要である。このためには、土壌が本来備えている生物的窒素固定の真相解明と農業への活用が必要である。土壌の窒素固定が光合成細菌や植物共生細菌によって駆動されることは古くから研究されており、いわば自然科学における常識ともなっている。しかしながら近年我々は、そのような従来着目されてきた細菌群ではなく、これまで着目されてこなかった「鉄還元細菌」こそが窒素固定のメインプレイヤーである可能性を見出した。鉄還元細菌は土壌に広く分布するグループであり、「鉄還元細菌による窒素固定」が地球規模で普遍的な事象である可能性が高いものの、従来研究の盲点であり実態は全く不明である。そこで本研究では、「鉄還元細菌による窒素固定」を生態レベルから活性レベルまで多面的に検証し、農業への活用を目指して「土を肥やす」新たな微生物基盤を提供する。研究項目と目標は次の通りである。

土壌環境における窒素固定遺伝子のグローバル調査

世界各地98箇所ならびに国内各地20箇所の土壌環境における窒素固定遺伝子の微生物プロファイルを明らかにし、「鉄還元細菌による窒素固定」のグローバルな普遍性を提唱する。

鉄還元細菌の分離培養、窒素固定活性の測定、窒素固定遺伝子の同定

鉄還元細菌3属30株を単離し、窒素固定活性ならびに窒素固定能の遺伝的基盤を明らかにし、鉄還元細菌の窒素固定能を菌株レベルで証明する。

土壌中における鉄還元細菌の窒素固定能と制御要因の解析

水田、畑、森林土壌について窒素固定活性が高まる土壌環境要因と鉄還元細菌の寄与を明らかにする。鉄還元細菌による窒素固定を制御する土壌環境条件と圃場管理法を明らかにする。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・研究成果1: 鉄還元細菌窒素固定は地球規模で普遍的かつ重要な事象であることを提唱
- ・研究成果2: 鉄還元細菌が窒素固定活性を發揮することを証明
- ・研究成果3: 鉄施用が水田土壌の鉄還元細菌の窒素固定活性を高め、コメの増収に繋がることを発見

社会や学術へのインパクト

窒素固定は大気中の窒素ガスを生物が利用できる形態の窒素に変換して土壌に供給する、いわば自然生態系を根底から支える重要な反応である。19世紀末にはじめて窒素固定が発見されて以降、数多くの研究が行われてきたが、「土壌の窒素固定は植物共生細菌や光合成細菌が担う」というのが高校教材にも記載されるような一般常識として定着していた。本研究により、窒素固定できる鉄還元細菌が地球規模で普遍的に分布していること、そして植物共生細菌や光合成細菌といった従来の窒素固定微生物よりも存在量が多い傾向も見出された。このことは窒素固定に関する定説を刷新して自然生態系の支持基盤の本質に迫るものであり、その波及効果は土壌学分野に留まることなく、微生物学、地球科学、生態学まで広く自然科学分野全般に及ぶ。

また、土壌を肥やす根幹を担う鉄還元細菌の窒素固定活性を特異的に高め、農作物の増収につなげる技術シーズも創出した。鉄還元細菌が好む鉄の施用が土壌の窒素固定力の向上とコメの増収に持続的な効果をもたらすこと、さらには窒素施肥量を減らしても鉄を施用すれば収量が保てることを見出した。「持続可能な開発目標(SDGs)」にも掲げられるように、環境負荷低減の観点から窒素施肥量の削減が求められる。窒素施肥の代替技術となり得る鉄施用は、環境保全性と安定した作物生産を両立できる革新的な農業技術体系(低窒素農業)になると考えられる。

3. 研究成果

土壌環境における窒素固定遺伝子のグローバル調査

これまで我々の行った新潟水田土壌のメタトランスクリプトーム解析では、Deltaproteobacteria 綱の鉄還元菌である *Anaeromyxobacter* および *Geobacter* 属細菌の窒素固定遺伝子転写産物が高頻度に検出され、これらが水田土壌における窒素固定のキープレーヤーである可能性が示された。しかしこれは新潟水田土壌のみの解析結果であり、新潟以外の水田においても窒素固定を行うキープレーヤーは鉄還元菌であるのか、その他の陸域土壌においても同様であるのかについては不明である。そこで我々は、土壌環境における鉄還元細菌による窒素固定の普遍性を検証するために、国内・海外の様々な土壌環境の DNA データを収集し、鉄還元細菌の窒素固定遺伝子の検出頻度を調べた。国内の水田土壌（10 地点）、畑土壌（8 地点）、森林土壌（4 地点）、河川の底泥（7 地点）については、土壌試料を採取してメタゲノム解析を行い、DNA データを取得した。また、海外の 114 地点の土壌環境の DNA データは、公共のデータベース(MG-RAST; <https://www.mg-rast.org/>)から取得した。これらの DNA データから相同性検索によって窒素固定遺伝子を抽出し、その微生物由来を調べた。

国内 29 地点の土壌環境の DNA データを解析したところ、うち 28 地点で *Anaeromyxobacter*, *Geobacter*, そして本研究成果 で新属提唱した *Geomonas*, *Oryzomonas* 属細菌の窒素固定遺伝子が検出された。また、水田土壌や河川の底泥では森林や畑土壌より高頻度に窒素固定遺伝子が検出された (Fig.1)。これらのことから、鉄還元菌による窒素固定は日本各地の土壌において普遍的に行われており、特に水田土壌や河川の底泥においてそのポテンシャルが高いことが示された。

また、海外 98 地点の土壌環境の DNA データを解析したところ、うち 51 地点で *Geobacter* と *Anaeromyxobacter* の窒素固定遺伝子が検出された。また、これらの検出頻度は水田土壌だけでなく熱帯雨林等の森林土壌、砂漠、極地土壌においても高かった (Fig.2)。これらのことから、鉄還元菌による窒素固定は水田土壌だけでなく他の環境においても活発に行われている可能性が示された。

以上のことから、鉄還元細菌による窒素固定は土壌環境において普遍的な事象であり、鉄還元細菌が土壌環境における窒素固定のキープレーヤーである可能性が示唆された。

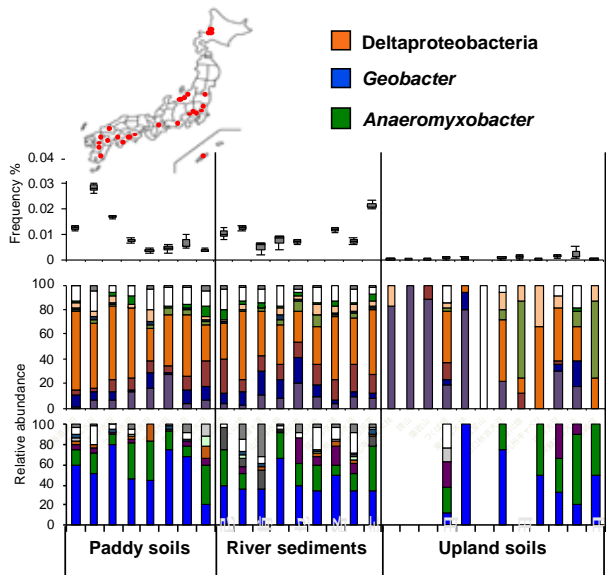


Fig.1 日本各地の土壌における窒素固定遺伝子の検出頻度および由来微生物群の組成

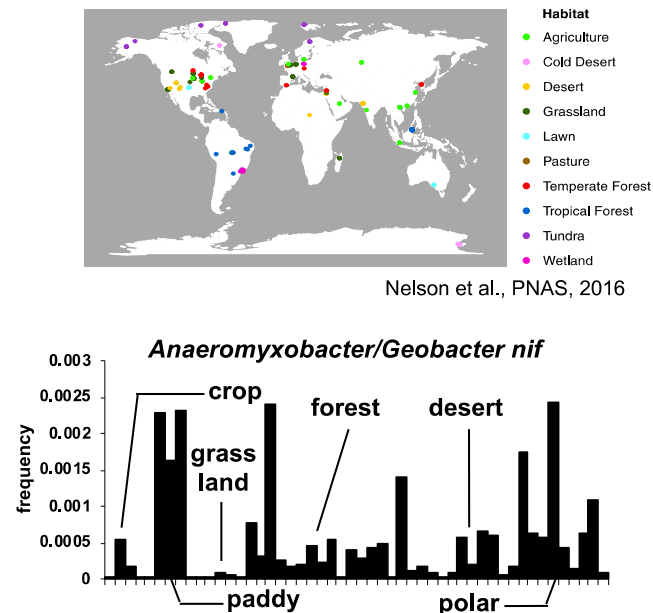


Fig.2 世界各地の土壌における鉄還元菌由来の窒素固定遺伝子の検出頻度

鉄還元細菌の分離培養、窒素固定活性の測定、窒素固定遺伝子の同定

の土壌中の DNA に基づく解析が示すように、鉄還元細菌が土壌環境に普遍的かつ重要な窒素固定微生物であると推察された。しかしながら、実際に土壌から分離培養された例は限られており、培養試験に基づく解析で窒素固定活性を証明した例はほとんどなかった。そこで、土壌から鉄還元細菌を単離し、単離株の窒素固定遺伝子の同定および窒素固定能の検証を試みた。

土壌そのものを集積培地として用いるユニークな手法を用いて、日本各地の土壌、畑土壌、森林土壌、河川の底泥からの単離を試みたところ、*Anaeromyxobacter* や *Geobacter* 属細菌に近縁な株を複数単離することができた。

Anaeromyxobacter 属細菌は 7 株得られ、全て水田土壌から単離された (Fig. 3A)。このうち 3 株のゲノムを解読したところ、全て株において窒素固定遺伝子がコードされていた。また、窒素ガスを唯一の窒素源として生育できること (Fig. 3B, 原著論文 3)、その際に窒素固定遺伝子の転写量が上昇することがわかった (原著論文 3)。さらに、滅菌した土壌にこの *Anaeromyxobacter* 属細菌を接種したところ、土壌の窒素固定活性が上昇するとともに、土壌中での *Anaeromyxobacter* 属細菌の増殖も確認された (原著論文 3)。これらのことから、*Anaeromyxobacter* 属細菌は窒素固定活性を有すること、そして土壌中で窒素固定能を発揮できることが明らかとなった。*Anaeromyxobacter* 属細菌の窒素固定能を活性レベルで証明した例は世界ではじめてである。

Geobacter 属細菌に近縁なものも 700 株以上単離できたが、驚くべきことに既知記載種との DNA の相対性が一様に低く、全ての株が新規な系統群であることが示唆された。さらにゲノム解読や生理性状試験の結果、従来の *Geobacter* 属とは異なる特徴を示すこと、また分子進化系統樹上でも *Geobacter* 属から独立した系統群を形成することが判明し、2 つの新属 *Geomonas* と *Oryzomonas* を提案した (Fig. 3C, 原著論文 1, 2, 4)。これらの *Geomonas* 属細菌および *Oryzomonas* 属細菌も窒素固定遺伝子を保有し、窒素固定能を有することを明らかにした (Data not shown)。

以上のように、土壌から窒素固定遺伝子が高頻度に検出される鉄還元細菌が実際に窒素固定活性を有することを証明し、「鉄還元細菌による窒素固定」の重要なエビデンスを得ることができた。

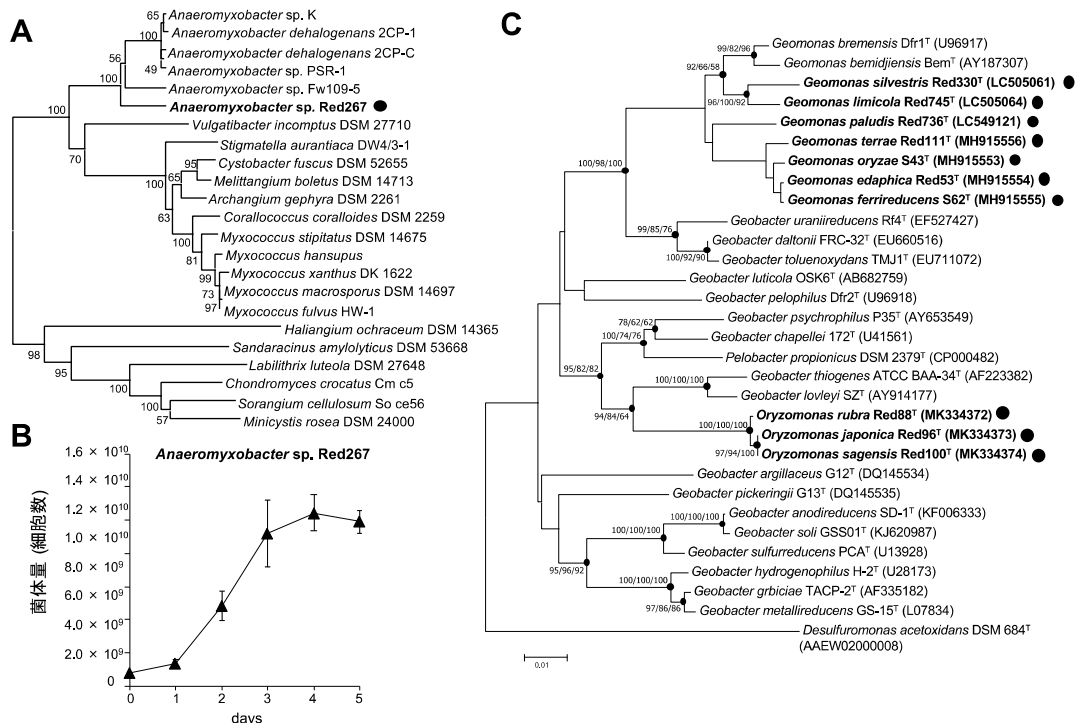


Fig. 3 単離した鉄還元細菌の代表株の分類系統(A, C)と窒素固定による生育 (B)。系統樹上の太文字は本研究で単離した *Anaeromyxobacter* (A), *Geomonas* と *Oryzomonas* (C) の株を示す。 *Anaeromyxobacter* は窒素ガスを窒素源として生育した (=窒素固定能あり) (B)。 出典 : Masuda et al., Appl. Environ. Microbiol., 86:00956-20, 2020; Itoh et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 71:004607, 2021

土壌における鉄還元細菌の窒素固定能と制御要因の解析

単離した鉄還元細菌は $\text{Fe}(\text{II})$ を電子受容体として生育した。そこで、鉄還元細菌が利用する鉄を土壌に添加することで、土壌中の鉄還元細菌の窒素固定活性を高めることができるのではないかと考えた。

まず、室内実験系において、鉄の酸化物のフェリハイドライトや Fe_2O_3 を土壌に添加したところ、無添加土壌と比較して有意に窒素固定活性が高まり、鉄還元細菌の窒素固定遺伝子の転写量が上昇した (Fig. 4, 原著論文 5)。このとき、光合成細菌や植物共生細菌といった従来よく知られてきた窒素固定微生物の窒素固定遺伝子の転写産物は全く検出されなかった (原著論文 5)。これらのことから、鉄酸化物を土壌に供給することが、土壌中の「鉄還元細菌による窒素固定」を特異的に活性化させ、ひいては土壌の窒素肥沃度の向上につながる可能性を見出した。

次に、この可能性を検証するためにほ場試験を実施した。新潟県長岡市および十日町市内の水田ほ場において、農業用純鉄粉を施用した区画を設けて、土壌の窒素固定活性とコメの収量に与える影響を調べた。その結果、両ほ場とも鉄施用区の土壌の方が有意に高い窒素固定活性を示した (Fig. 5) (原著論文 5)。また、鉄施用区の方がコメの収量が多くなる傾向が見られ、さらにこの鉄施用による増収傾向は施用した初年目のみならず、次年目、次々年目も観察された。以上のことから、鉄施用により土壌の窒素固定力を高めてコメの収穫量を増やせること、また一度施用すれば少なくとも 3 年間はその効果が持続することが明らかとなった。すなわち、鉄で土を肥やせることを発見したのである。

最後に、鉄施用が窒素施肥の代わりになり得るか調べた。慣行施肥区と比べると、無施肥区では当然コメの収量が下がったが、無施肥区に鉄を施用した区では慣行施肥区と同レベルの収量が得られる傾向がみられた。このように窒素施肥量を減らしても鉄を施用すれば収量が保てたことから、鉄施用が窒素施肥の代替技術となり得る可能性を見出した。

4. 今後の展開

水田の鉄還元細菌窒素固定に焦点を絞り、窒素肥料の施用量を減らしても高い水稻収量を得る「低窒素農業技術」を構築する。水田土壌における鉄還元窒素固定菌の生態、土壌への窒素固定量の解析、鉄還元細菌窒素固定を制御する土壌ならびにイネ側の要因を詳細に明らかにする。得られた知見を取り入れ、鉄施用を軸として水田土壌の鉄還元菌窒素固定を高める技術を洗練化し、国内外の圃場において実証する。鉄還元細菌窒素固定が支える水田土壌の窒素供給力維持機構の全貌を解明する学術的意義を有するとともに、窒素肥料の使用にともなう環境への影響やエネルギー消費を最小限に抑えた水稻生産が可能になり、地球・地域環境の保全と低炭素社会の実現に貢献する。

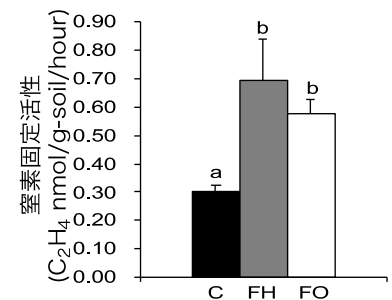


Fig.4 鉄酸化物添加による土壌の窒素固定活性への影響(n=3)。

C, 無添加土壌
FH, フェリハイドライト添加
FO, Fe_2O_3 添加

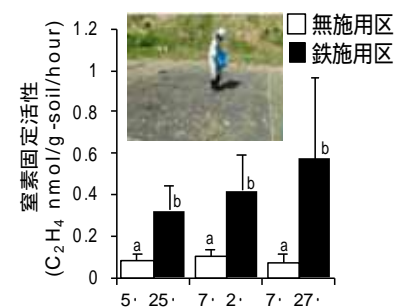


Fig.5 水田圃場における鉄施用による土壌の窒素固定活性への影響。写真とデータ(平均値±標準偏差(n=3))は新潟県十日町市の圃場のもの。

5. 発表実績

【原著論文】

1. Z. Xu, Y. Masuda, H. Itoh, N. Ushijima, Y. Shiratori, K. Senoo. *Geomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., *Geomonas edaphica* sp. nov., *Geomonas ferrireducens* sp. nov., *Geomonas terrae* sp. nov., four ferric-reducing bacteria isolated from paddy soil, and reclassification of three species of the genus *Geobacter* as members of the genus *Geomonas* gen. nov.. *Front. Microbiol.*, 10: 2201 (2019)
2. Z. Xu, Y. Masuda, C. Hayakawa, N. Ushijima, K. Kawano, Y. Shiratori, K. Senoo, H. Itoh. Description of three novel members in the family *Geobacteraceae*, *Oryzomonas japonicum* gen. nov., sp. nov., *Oryzomonas sagensis* sp. nov., and *Oryzomonas ruber* sp. nov.. *Microorganisms*, 8(5): 634 (2020)
3. Y. Masuda, H. Yamanaka, Z. Xu, Y. Shiratori, T. Aono, S. Amachi, K. Senoo, H. Itoh. Diazotrophic *Anaeromyxobacter* isolates from soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 86: e00956-20 (2020)
4. H. Itoh, Z. Xu, Y. Masuda, N. Ushijima, C. Hayakawa, Y. Shiratori, K. Senoo. *Geomonas silvestris* sp. nov., *Geomonas paludis* sp. nov. and *Geomonas limicola* sp. nov., isolated from terrestrial environments, and emended description of the genus *Geomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 71(1): 004607 (2021)
5. Y. Masuda, Y. Shiratori, H. Ohba, T. Ishida, R. Takano, S. Satoh, W. Shen, N. Gao, H. Itoh, K. Senoo. Enhancement of the nitrogen-fixing activity of paddy soils owing to iron application. *Soil Sci. Plant Nutr.*, doi: 10.1080/00380768.2021.1888629 (2021)

【解説・記事】

1. 増田曜子, 伊藤英臣, 白鳥豊, 妹尾啓史. 水田土壌における鉄還元菌窒素固定の発見と応用 オミクス解析から低窒素農業へ. *化学と生物*, 58(3), 143-150 (2020)
2. 増田曜子, 伊藤英臣, 白鳥豊, 妹尾啓史. 水田土壌における鉄還元菌窒素固定の発見と応用 - マイクロバイオーム解析から低窒素農業へ - . *土と微生物*, 74(1), 2-7 (2020)
3. 妹尾啓史. チッソ固定の新たな役者 鉄還元細菌が田んぼを肥やす. *現代農業* 10月号, 88-91 (2020.10)

【招待講演】

1. 妹尾啓史, 増田曜子, 伊藤英臣, 白鳥豊. 理想の農業を追求する - サステイナブルで革新的な食糧生産を支える基礎研究と現場技術 水田土壌における鉄還元菌窒素固定の発見と低窒素農業への応用の試み - オミクス解析からサステイナブル農業へ - . 2019年9月3-5日, 日本土壌肥料学会 2019年度静岡大会 (静岡大学, 静岡市)
2. Yoko Masuda, Haruka Yamanaka, Hideomi Itoh, Zhenxing Xu, Yutaka Shiratori, Seigo Amachi, Toshihiro Aono, Keishi Senoo. Nitrogen fixation by iron reducing bacteria - previously overlooked diazotrophs essential for sustainable soil-plant ecosystems. 11th Asian Symposium of Microbial Ecology, May 10-13, 2019, Tunghai University, Taichung, Taiwan