

ダイズ根粒根圏からの温室効果ガス発生： 根圏土壌生物のランチャタイム

南澤 究（東北大学大学院生命科学研究科）

仙台市青葉区片平 2-1-1, E-mail: kiwamu@ige.tohoku.ac.jp

圃場における根粒根圏は N_2O 発生のホットスポットである。 N_2O は強力な温室効果ガスであり、また、オゾン層破壊ガスでもある。そこで、演者らの実施してきたダイズ根粒菌の N_2O 還元酵素遺伝子 *nosZ*、根圏微生物コミュニティの N_2O 代謝の分子微生物生態学的な研究を通して、ダイズ圃場における N_2O 発生メカニズムの解明と、その低減化技術シーズについて紹介したい。

1. ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) の脱窒遺伝子

ダイズ根粒菌は共生窒素固定だけでなく、その逆過程の脱窒能力も示す。*B. japonicum* USDA110 株は、硝酸イオンから窒素ガス(N_2)までの還元 ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$) を行い、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。しかし、ダイズ根粒菌では、最終産物が N_2 の完全脱窒型、 N_2O までの脱窒型、脱窒を示さない菌株が存在している。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、 N_2O 還元酵素(N_2OR)遺伝子 *nosZ* を保有している BJ1 系統と非保有の BJ2 系統が存在していることが分かった(1-3)。

2. ダイズ根粒における N_2O 吸収

N_2O 還元酵素(N_2OR)が *nos* 遺伝子群に担われているか調べた。USDA110 株の *nosZ* 遺伝子破壊株は N_2OR 活性を失い、その *nos* 相補は N_2OR 活性を回復した(4)。さらに、USDA110 株により形成された根粒は ^{15}N - N_2O を定量的に ^{15}N - N_2 に変換した。驚いたことに、大気中に微量に含まれている N_2O ガス(340 ppb)をも吸収還元した(4)。

3. ダイズ根粒の N_2O 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 N_2O の強力なシンクであることを示している。一方、農耕地の環境科学分野では、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報告されている。演者らは、東北大学の鹿島台圃場のダイズ根系をからの N_2O を測定したところ、老化根粒がその原因であることが分かった(5)。

4. 老化根粒に特有な生物群集

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、ITS 領域をターゲットとした RISA 群集構造解析を行った。その結果、種々の脱窒細菌、脱窒カビが検出された(図1)(5)。また、原生動物や線虫のシグナルも検出された。これらの結果より、特有な土壌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。硝化阻害剤、硝酸の添加実験により、 N_2O が発生している老化根粒では、硝化と脱窒が起こっている状況証拠が得られた。

5. 根粒菌硝酸還元の N_2O 発生への寄与

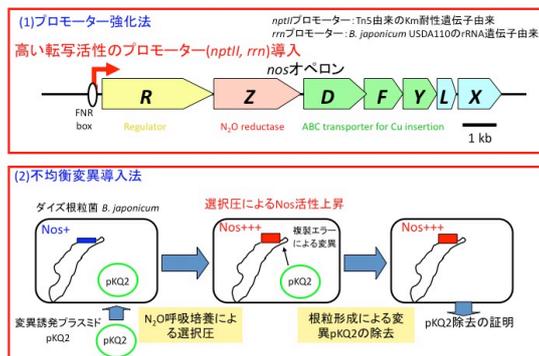
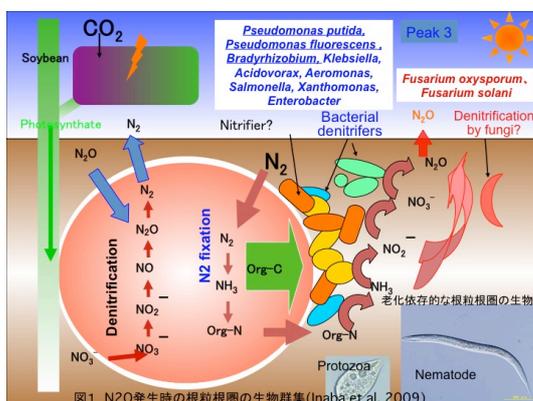
N_2O 還元酵素遺伝子を保有するダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 と硝酸還元酵素系変異株 $\Delta nosZ$ 、 $\Delta napA \Delta nosZ$ 、 $\Delta nirK \Delta nosZ$ を接種してダイズを無菌的に栽培し、30 日後に (i) 土壌添加処理、(ii) 地上部切除と土壌添加の同時処理を行った。その結果、土壌添加と地上部切除の同時処理を行ったダイズの根粒のみ、顕著な N_2O 発生が見られた。

また、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、 N_2O を N_2 に還元する酵素をコードする遺伝子 *nosZ* 遺伝子破壊株 USDA110 Δ *nosZ*、 Δ *napA* Δ *nosZ*、 Δ *nirK* Δ *nosZ* を接種源とした根粒からは N_2O 発生が見られた。この結果から、根粒菌は N_2O 発生原因微生物でなく、添加した土壤微生物が関与していることが明らかになった。USDA110 株接種の根粒から N_2O が発生しなかった理由は、根粒内あるいは根粒表面に存在する他の微生物により発生した N_2O が根粒菌の N_2OR (N_2O 還元酵素)により N_2 に還元されたためと考えられる。

6. N_2O 還元酵素(N_2OR)活性の高いダイズ根粒菌の作出と N_2O 発生の低減化

ダイズ根粒根圏から放出される N_2O 発生を削減するために、 N_2OR 活性の高いダイズ根粒菌の作出をプロモーター強化及び不均衡変異導入 (6) の2つのアプローチで作製した(図2)。その結果、野生型と比較し、いずれの株でも N_2OR 活性の顕著な上昇が認められた。*nosZ* を保有していない根粒菌(*nos*-株)が優占している土壤に、 N_2OR 活性の上昇した株を接種したところ、根粒老化過程における N_2O 発生の低減化が観察された。

根粒根圏から放出される N_2O は、おそらく根粒タンパク質を物質的な起点として、土壤生物によるアンモニア化、硝化、脱窒と、根粒菌による N_2O 還元のバランスにより生成すると考えられる。今後、各過程を担っているプレーヤーと窒素形態変化の解明を目指したい。また、農耕地から生成する N_2O の有効な生物学的防止策として、 N_2O 還元酵素(N_2OR)活性の高いダイズ根粒菌の接種効果等について検討する予定である。



参考文献

- 1) Sameshma-Saito, R., Chiba, K., and Minamisawa, K. 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.
- 2) Sameshma-Saito, R., Chiba, K., and Minamisawa, K. 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.
- 3) Itakura, M. et al. 2009. Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other Bradyrhizobiaceae members. *ISME. J.* 3:326-339.
- 4) Sameshma-Saito, R. et al. 2006. Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N_2O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2532-2006.
- 5) Inaba, S. et al. 2009. Nitrous oxide emission and microbial community in the rhizosphere of nodulated soybeans during the late growth period. *Microbes Environ.* 24: 64-67.
- 6) Itakura et al. 2008. Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N_2O reductase activity by selection after introduction of a mutated *dnaQ* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2532-2006.