

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	温室効果ガスの高精度モニタリングと環境メタゲノミクスの融合によるN ₂ O削減
研究機関・部局・職名	独立行政法人農業環境技術研究所・物質循環研究領域・主任研究員
氏名	秋山 博子

【研究目的】

一酸化二窒素（亜酸化窒素；N₂O）は二酸化炭素の約 300 倍の温室効果があり、オゾン層破壊物質でもある。N₂O の最大の人為的発生源は農業活動であり、その主要な発生源は農耕地への窒素肥料の施用である。今後も急激な人口増加による農業生産の増大に伴い、N₂O 発生量は増加し続けると推定されている。しかし農耕地からの N₂O 発生は微生物による複数の窒素代謝経路の副産物として生成され、正確な発生量の測定と予測、ならびに効果的な低減技術の開発は十分でない。このため、発生メカニズムの解明とそれに基づく効果的な排出低減技術の開発は急務である。

N₂O は土壌中の微生物による脱窒および硝化の過程から主に発生する。純粹分離された微生物の N₂O 発生メカニズムが酵素・遺伝子のレベルまで明らかにされているにも関わらず、多くの微生物は培養不可能であるため環境中で実際に機能する N₂O 生成微生物とその具体的な代謝経路、代謝系の環境応答機構等は不明である。

一方最近、環境中の DNA を丸ごと解析するメタゲノム解析が次世代シーケンサーの登場で可能になり、世界的に注目されているが、N₂O 生成微生物を対象とした研究は行われていない。このため、本研究では様々な農耕地において N₂O 発生量のモニタリングと同時に土壌微生物等の解析を行う。

本研究においては、いままでは別々に行われてきた温室効果ガスフラックス測定とメタゲノミクスという異なる専門分野の研究を融合し、現象とメカニズムの総合的な理解を目指す（図 1）。本研究は発生メカニズムの解明に基づく N₂O 発生削減技術の

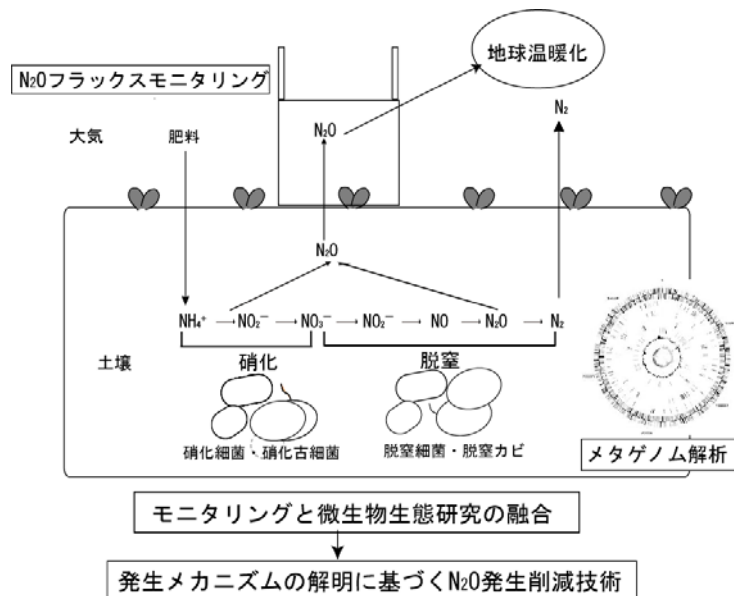


図 1 異分野融合による N₂O 発生メカニズムの解明

開発のための基礎的知見を得るものであり、農耕地で実際にどのような土壤微生物が N₂O 発生に関与しているかを明らかにし、N₂O 発生削減技術の開発につなげる。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題においては、課題担当者が精力的に研究を展開し、初期の目的を達成する成果をあげるとともに、積極的に公表していると評価できる。

圃場レベルで温暖化ガス発生メカニズムを、アイソトポマー分析と微生物機能解析から明らかにし、正確に評価するための技術開発を進め、N₂O 生成が農業サイドから生起していること、N₂O 生成が土壤微生物の働きであること、降雨後の N₂O バースト発生のメカニズムを詳細に明らかにしている。また、土壌の特性、窒素肥料施肥形態と N₂O 発生との関係についても解析を進め、土壌により N₂O の発生経路が異なること、これにより被覆肥料の削減効果が異なることなどを明らかにし、N₂O 生成がいろいろな工夫によって削減できることを示唆している。

また、作物残渣のすき込みが N₂O のホットスポットを生み出すことを明らかにした点は栽培技術を考える上で重要な点と思われる。さらに、硝抑剤の N₂O 発生に及ぼす影響をメタゲノム解析から検討し、肥料の種類との関連を明らかにした点も、今後の N₂O 削減のための施肥体系を構築する上で重要と考えられ、社会的な課題の解決への貢献が期待できる。最終的に農業サイドからの具体的な N₂O 削減の提言ができるよう、さらに研究を発展させていただきたい。

今回確立されたフィールドでの実験手法を、今後、N₂O のみならず、CH₄、CO₂削減技術の研究にも大きな影響を与え、貢献するものと期待される。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

圃場実験と圃場の現象を再現するためのインキュベーション実験を組み合わせ、同位体解析と微生物遺伝子解析を統合的に展開し、N₂O 発生削減のための発生メカニズム解明を行い、研究成果の欄に概要を記述するように、下記5項目の全てにおいて所期の目的を達成した。

(1)N₂O 安定同位体自然存在比の連続測定法の開発

(2)N₂O ホットスポットからの DNA・RNA 抽出・生成方法ならびにメタゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析手法の開発

(3)N₂O フラックス、N₂O 安定同位体比のモニタリングと土壌メタゲノム解析手法を

用いた N₂O 発生経路と微生物の解析

(4) N₂O 発生に関与する微生物と生成経路を短時間に特定する解析法の開発

(5) N₂O フラックス連続モニタリング、安定同位体自然存在比、土壤微生物解析を組み合わせた N₂O 発生メカニズムの解明および削減技術の評価

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

1) N₂O 安定同位体自然存在比の連続測定法の開発

日本で初めて導入した亜酸化窒素同位体計（レーザー分光 N₂O 同位体計）を用いた N₂O 連続測定を実施し、大気濃度における測定手法を開発した。

(2) N₂O ホットスポットからの DNA・RNA 抽出・生成方法ならびにメタゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析手法の開発

N₂O モニタリングデータに基づき N₂O 発生のホットスポットを特定し、DNA および mRNA、rRNA を抽出した。高純度土壤 RNA 調製法を最適化し、解析に必要な純度と量の RNA を調製する方法を確立し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析を行い機能している遺伝子群を定性・定量する一連の手法を確立した。

(3) N₂O フラックス、N₂O 安定同位体比のモニタリングと土壤メタゲノム解析手法を用いた N₂O 発生経路と微生物の解析

①¹⁵N トレーサー法を用いた土壤インキュベーション実験

被覆肥料の N₂O の削減効果が土壤により大きく異なる (Akiyama et al. 2011) 理由を明らかにすることを目的として実験を行った。黒ボク土および灰色低地土 (WFPS55%) に尿素または被覆尿素を添加し、N₂O 発生量、土壤中無機態窒素濃度、安定同位体比の測定を行った結果、灰色低地土では、硝化および脱窒からの N₂O 発生量は同程度であり、被覆尿素を添加した場合に硝化の寄与が増加した。一方、黒ボク土ではいずれの肥料においても硝化が主な N₂O 発生経路であった。これらの結果より、土壤により N₂O の発生経路が異なることが、被覆肥料の削減効果が異なる理由であると考えられた。

②大雨後の N₂O バーストピークとそのメカニズムの解明 (土壤インキュベーション実験)

灰色低地土転換畑圃場において、大雨後に非常に大きな N₂O の発生 (バーストピーク) を観測した。この発生メカニズムの解明のため、土壤インキュベーション実験を行った結果、大雨前に土壤が乾燥している場合にのみバーストピークが見られることが明らかになった (図 2)。自然安定同位体比の解析の結果、脱窒が主な発生源であることが明らかになった。

さらに、脱窒に関連する N_2O 発生関連遺伝子について DNA レベルで (*nirK*, *nirS*, *nosZ*) の存在量を調べた。その結果、灰色低地土では、*nirS* が主要な亜硝酸酸化酵素遺伝子であることを明らかにした。さらにこれらのデータに基づき、各遺伝子の mRNA を調べ *nirK* に比べて *nirS* の発現量が多いことを示した。また湛水と同時に脱窒関連遺伝子の DNA および mRNA が増加している (図 3) のに対し、 N_2O 発生は湛水後に見られること (図 2) から、遺伝子の発現と N_2O 発生にはタイムラグがあることが明らかになった。この原因は N_2O 還元酵素 (*NosZ*) の合成の遅れ、酸素による失活および湛水によるガス拡散速度の低下によるものと考えられた。

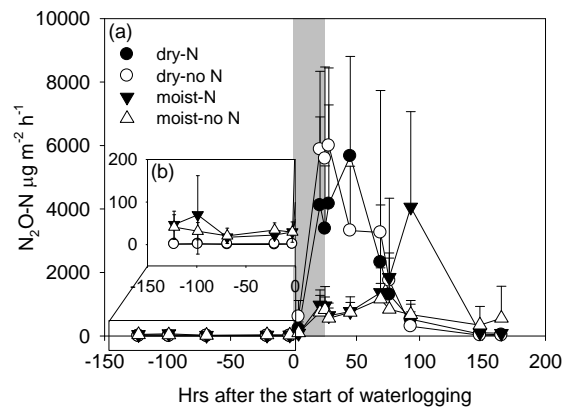


図 2 土壤湛水前後の N_2O 発生 (バーストピーク)

湛水前の土壤が乾燥している場合のみ N_2O バーストピーク現象が起こることを解明

(4) N_2O 発生に関与する微生物と生成経路を短時間に特定する解析法の開発

最近の次世代シーケンス技術の著しい進歩により、マイクロアレイに代えて次世代シーケンサーによるメタトランスクリプトーム解析と RT-定量 PCR を用いた定性的・定量的な解析が有効と考えられた。そこで (2) で確立した手法と RT-定量 PCR 法を用いて、 N_2O 生成に重要な mRNA-*amoA* を解析し、施肥によりアンモニア酸化古細菌 (AOA) と細菌 (AOB) の反応性の違いを明らかにした。さらに強酸性茶園土壤には新規なアンモニア酸化細菌が存在することを示した。このように土壤からの DNA、mRNA の抽出技術、次世代シーケンス技術 (メタゲノミクス、トランスクリプトミクス) を組み合わせることにより、効率的に N_2O 発生微生物の生態を評価できた。

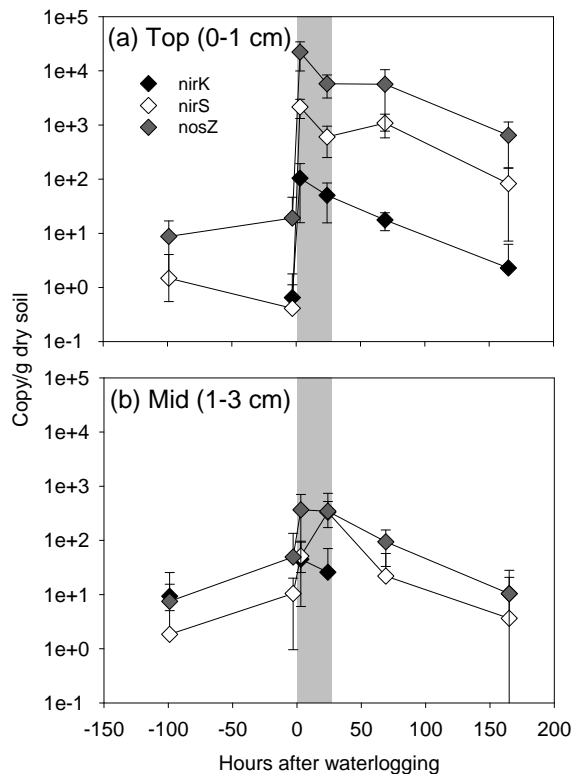


図 3 土壤湛水前後の mRNA 量の変化

土壤湛水と同時に脱窒関連 mRNA の増加
→ mRNA の増加と N_2O 発生にはタイムラグ: 原因は N_2O 還元酵素合成の遅れ、湛水によるガス拡散低下

(5) N_2O フラックス連続モニタリング、安定同位体自然存在比、土壤微生物解析を組み合わせた N_2O 発生メカニズムの解明および削減技術の評価

① 脱窒カビ培養実験および不耕起圃場における糸状菌脱窒の寄与の推定

近年、脱窒細菌だけでなく糸状菌も脱窒を行うことが明らかになった。しかし、環境中における糸状菌脱窒の重要性については不明であるため、この寄与を明らかにすることを目的として実験を行った。各種の

糸状菌を培養した結果、糸状菌の種類により N_2O 発生量は大きく異なった。糸状菌脱窒経路からの N_2O 安定同位体比および SP の報告例はこれまでに 1 報のみであるが、圃場から分離した糸状菌を用いた本実験においても同程度の値が得られた。さらに、茨城大学不耕起圃場において採取した N_2O サンプルおよび同圃場から分離した脱窒カビの培養実験による N_2O の安定同位体自然存在比の比較を行った結果、圃場における N_2O の主な発生源は細菌脱窒であるが、カビ脱窒および硝化の寄与も一部あると推定された。

② 作物残さから発生する N_2O 発生量および発生メカニズムの解明

作物残さは N_2O 発生源である可能性が指摘されているが、研究例は非常に少なく、その N_2O 発生メカニズムについては研究例がない。このため、野菜栽培圃場において、 N_2O フラックスの連続モニタリングおよび安定同位体自然存在比測定を行った。その結果、キャベツやジャガイモ等の収穫残さが重要な N_2O 発生源であることを明らかにした。また、 N_2O 安定同位体比の解析結果より、細菌脱窒およびカビ脱窒が N_2O の主な発生経路と推定された。ジャガイモ残渣からの糸状菌の分離を行い、残渣からの N_2O 発生において糸状菌脱窒が重要であることを明らかにした。

③ 硝化抑制剤のターゲットとなるアンモニア酸化菌の生態解明

圃場実験により、硝化抑制剤により AOB および AOA 菌数の増加が抑制され N_2O 発生が削減されることを示した。さらに硝化抑制剤の評価のターゲットとなる AOA および AOB について、施肥条件の異なる野菜畑土壌および茶園土壌を用い検討した。野菜畑のアンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*) のメタゲノム解析から、AOB と AOA は化学肥料と有機肥料 (牛糞堆肥) の施用で増加したが、それらの多様性は肥料の種類により異なり、肥料への反応も堆肥連用土壌と化学肥料連用土壌で異なることを明らかにした。また茶園土壌では pH によって存在する AOA と AOB の多様性、菌数が異なり、AOA と AOB の mRNA-*amoA* の発現量も異なることを示した。さらに pH3 程度の強酸性土壌に酸性環境に適応した AOB が存在することを見出した。この結果は硝化抑制剤を評価するための指標として利用できると考えられる。

以上、圃場実験と圃場の現象を再現するためのインキュベーション実験を組み合わせ、同位体解析と微生物遺伝子解析を統合的に展開し、 N_2O 発生削減のための発生メカニズム解明を行った。

先進性、優位性、特記事項

本課題担当者の研究グループが開発した可搬型温室効果ガス連続モニタリング装置、所属機関が所有する温室効果ガス 3 成分自動同時分析計などを活用できる優位性を最大限に活かして、実験室規模からフィールド規模における幅広い研究を展開することができた。さらに本課題により、国内で初めて亜酸化窒素同位体計 (レーザー分光 N_2O 同位体計) を導入し、 N_2O 同位体自然存在比の連続測定システムを開発した。本システムを用いて、世界でまだ報告例のない N_2O 同位体の野外連続測定に成功した。また N_2O 発生ホットスポットからの DNA・RNA 抽出に成功し、次世代シーケンサーを用いて N_2O 発生に関与する微生物についての解析を行った。得られた一連の技術と成果には、先進性、優位性が認められる。

ブレイクスルーと呼べる成果

圃場レベルでの N_2O 発生経路の推定を連続的に可能とした技術は土壌のヘテロさを考えた場合に非常に重要で、この分野における今後の研究展開のブレイクスルーとなることが期待できる技術である。

得られた成果は、当初の目的の範囲内であると判断する。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

本課題では実験室規模からフィールド規模において N_2O フラックス、安定同位体自然存在比解析、微生物遺伝子解析を組み合わせた N_2O 発生メカニズムの解明を行った。また、この研究展開に必要な技術についても、国内で初めてレーザー分光 N_2O 同位体計を導入し、 N_2O 同位体自然存在比の連続測定手法を開発した。複雑な系で構成される土壌中の微生物による N_2O 発生についても、 N_2O 発生ホットスポットからのDNA・RNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて解析をすすめる手法の有効性を示した。このようにモニタリング、同位体分析、メタゲノミクスという異分野の研究を融合させ、 N_2O 生成現象の全体像を明らかにする研究手法は、他の温室効果ガスやその他の物質循環研究にも応用が可能であることから、地球環境研究全般に波及効果が期待される。

また、作物残渣のすき込みが N_2O のホットスポットを生み出すことを明らかにした点は栽培技術を考える上で重要な点と思われる。農業分野は比較的低コストで温室効果ガスの発生量を削減できると考えられ、農耕地における発生削減技術の開発は重要な課題である。本課題の成果は、 N_2O 発生メカニズムの解明に基づく発生削減技術の開発につながるものであり、将来的に地球温暖化防止施策に貢献することが期待される。

今回確立されたフィールドでの実験手法は、今後の N_2O のみならず、 CH_4 、 CO_2 削減技術の研究にとって大きな進歩である。食糧増産に伴う肥料の投入に基づく温暖化ガス発生抑制は喫緊の課題であることから、耕種体系からその抑制技術を提言することの意義は大きい。社会的な課題の解決への貢献が見込まれる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

所期の目標を達成しており、研究計画、実施体制は適切であったといえる。また、指摘事項への対応も適切になされた。研究展開のマネジメントは適切であった。

助成金も有効に活用されている。

成果の公表については、下記に示すように適切に行われている。国民との科学・技術の対話についても適切に行われたと評価できる。

雑誌論文：合計 19 件 （査読有・掲載済み 15 件、査読無・掲載済み 4 件）

会議発表：合計 31 件 （専門家向け 30 件、一般向け 1 件）

図書：合計 3 件

新聞・一般雑誌等掲載：合計 2 件

知的財産権の申請・登録：0 件

国民との科学・技術対話：合計：5 件

ウェブサイト：

研究者 URL

http://www.niaes.affrc.go.jp/researcher/akiyama_h.html

農業環境技術公開セミナー in 静岡-生産性と環境保全を両立する茶園のエコ管理-の報告および写真は下記のサイトに掲載

<http://www.niaes.affrc.go.jp/magazine/155/mgzn15501.html>

サイエンスカフェ

http://www.niaes.affrc.go.jp/project/niaes_model/event.html にレポートおよび動画を掲載