

農耕地における農薬・窒素動態に関わる土壌微生物の新機能解明

多胡 香奈子（農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター）

tago@affrc.go.jp

はじめに

微生物は地球上の物質代謝に主要な役割を担っている。特に農耕地生態系では、投入される肥料や農薬は微生物により代謝され、その過程で、温室効果ガスの発生や農薬汚染／無効化など様々な問題が引き起こされている。本研究では農薬の動態と温室効果ガス一酸化二窒素（ N_2O ）の発生に関与する土壌微生物を取り上げ、これらの生態を明らかにするために、独自に考案した分離・培養法と、分子生態学的手法やメタゲノム解析手法などの非培養法を駆使して研究に取り組んできた。

農薬の分解に関わる土壌微生物の生態

農薬は病害虫の防除に不可欠である。しかしその連用により、ある種の土壌微生物が散布された農薬を分解する能力を獲得して増加する。そこで微生物の農薬分解能を環境修復技術へ応用するための基礎研究として、国内外で広く使用されている有機リン系農薬（殺虫剤）フェニトロチオンを分解する土壌微生物の生態に関する研究を行った。また近年、深刻化する害虫の農薬抵抗性化にこれらの土壌微生物が関与していることが明らかになったのでそれについても検討した。

1) フェニトロチオン分解菌の土壌における適応プロセス

フェニトロチオンを連用すると土壌の分解能が高まる。著者らは、この原因は主に *Burkholderia* 属細菌の一部がフェニトロチオン分解能を獲得し増殖したためであることを明らかにした¹⁾。また酵素および遺伝子の解析から、分解菌はプラスミドにコードされた加水分解酵素と2種類の芳香環酸素添加酵素を組み合わせることでフェニトロチオンを資化していたことを明らかにした^{2,3,4)}。次に、フェニトロチオンの散布によって土壌中で分解菌の菌数と多様性が変化し適応するプロセスを調べた。土壌マイクロゾムを作成しそこへフェニトロチオンを数回散布したところ、分解菌が複数種出現した。さらに散布を繰り返すと分解菌数は増加したが、それに伴い分解菌の優占種の多様性は減少し、最終的には1種に収束した。そこで分解菌を分離しそれらの代謝特性を調べて上記で得られた土壌でのデータとともに数理生態モデルに供した。その結果、土壌における「分解菌の増加とそれに伴う多様性の減少」プロセスは、競争排除則に従うことを見出した⁵⁾。

2) 害虫の殺虫剤抵抗性化に関わるフェニトロチオン分解菌の野外における生態

環境中に存在する *Burkholderia* 属の一部の種は害虫カメムシ（ダイズ栽培に甚大な被害をもたらすホソヘリカメムシとその近縁種）の消化管に共生することが知られている。著者らが土壌から分離したフェニトロチオン分解菌の一部はカメムシ共生菌に近縁であったことから、カメムシ共生菌に近縁な分解菌をカメムシに与えた。すると分解菌はカメムシ消化管に共生し、この宿主はフェニトロチオンに抵抗性を示すようになった。また実際に野外で分解菌を共生させたカメムシ（カンシャコバナネナガカメムシ）が見つかった。こうして、分解菌の共生による新たな害虫の殺虫剤抵抗性獲得機構が見出された⁶⁾。この仕組みを明らかにするために次の仮説を立てた。それは「フェニトロチオンの散布によって *Burkholderia* 属の分解菌が土壌で出現して増加し、その

一部がカメムシに共生して宿主がフェニトロチオン抵抗性を獲得する」というものである。著者らは宿主外での分解菌の生態に着目し、①土壌で分解菌が出現増加するプロセスと、②生態系におけるカメムシへの感染源と経路を明らかにすることを目的として研究を進めた。

まず①分解菌の出現増加プロセスを、土壌マイクロゾムを用いて検討した。土壌へフェニトロチオンを数回散布すると、カメムシ共生タイプの分解菌が土壌に出現した。さらに散布を繰り返すと分解菌数が増加し、これに伴い分解菌の優占種は非共生タイプに入れ替わった。以上から、カメムシに共生できる分解菌のフェニトロチオンに対する反応は素早く、数回の散布で土壌に出現することが明らかとなった⁵⁾。

次に②生態系における分解菌のカメムシへの感染源を明らかにするため、フェニトロチオンが連用されており、実際にフェニトロチオン抵抗性を有するカンシャコバナナガカメムシ（サトウキビ害虫）が見つかったサトウキビ畑⁶⁾で現地調査を行った。その結果、土壌から分解菌が分離され、そのほとんどがカメムシ共生タイプの *Burkholderia* 属であった。またフェニトロチオンの散布頻度が分解菌数に影響していた。また分解菌は土壌だけでなくサトウキビ植物体（地上部）にも分布していることが分かった。それに加え、根圏土壌、植物体、カメムシ消化管という異なる環境から、同一種の分解菌を分離することに成功した。このことは、フェニトロチオンの散布でカメムシに共生できる分解菌が増殖し、土壌や植物体を經由してカメムシに感染していること強く示唆している⁷⁾。

一方、土壌には分解能を持たない共生菌も存在しており、それが分解菌のカメムシへの感染に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、上記で使用したサトウキビ畑の土壌に存在する *Burkholderia* 属細菌の全体像を明らかにするため、*Burkholderia* 属に特異的なプライマーを設計し、これを用いて次世代シーケンサーによる解析を行った。すると、これらの土壌にはカメムシ共生タイプの種が多様に存在し、その割合は全 *Burkholderia* 属細菌の半分以上を占めていた⁸⁾。またフェニトロチオンの散布頻度や分解菌数によらず、土壌の *Burkholderia* 属細菌数は同程度であった。以上から、土壌中にはカメムシ共生タイプの非分解菌も相当数存在しているといえる。非分解菌を共生させたカメムシはフェニトロチオンによって死滅することなども考慮すると、共生タイプの分解菌 vs 非分解菌の生態についてはさらなる検討が必要である。

以上から、殺虫剤フェニトロチオンに対する分解菌の出現・増加プロセスを明らかにし、さらにこの現象から分解菌集団内での競争排除則を見出した。また害虫—微生物相互作用による害虫の新たな殺虫剤抵抗性獲得機構を証明し、分解菌が農耕地生態系で出現してカメムシへの感染に至る経路を明らかにした。

一酸化二窒素 N_2O の生成に関与する硝化菌・脱窒菌の生態

N_2O は主要な温室効果ガスの1つであり、その発生源として大きな割合を占めるのが農耕地である。 N_2O は主に硝化と脱窒という2つの微生物反応過程で生成される。また脱窒菌は N_2O を窒素に還元除去する。従って、農耕地で実際に機能する硝化菌や脱窒菌を特定しその多様性と生態および代謝系の特徴を明らかにすることは、農耕地土壌からの N_2O 発生機構の解明や、脱窒菌の N_2O 還元能力を高めて N_2O 発生を制御する技術など応用面に貢献するための基礎的知見となる。

1) 農耕地で機能する脱窒菌の N_2O 生成・還元ポテンシャル

水田—ダイズ転換畑では、 N_2O は水田からはほとんど発生しないが、水田をダイズ畑に転換す

ると多量に発生する。この原因は、土壤に存在する脱窒菌の多様性や機能が変化したためであるという仮説を立て、水田と転換ダイズ畑の土壤に存在する脱窒菌を分離し、それらの多様性と N_2O 生成・還元能力を調べた。まず、土壤中で実際に機能している脱窒菌を独自の手法を用いて単細胞分離した。この手法は、土壤に基質と細胞分裂阻害剤を添加して脱窒条件下におくことで、基質を取り込み分裂・増殖しようとする脱窒菌は細胞分裂阻害剤により細胞が肥大化することを利用して、活性があり肥大化した脱窒菌をマイクロマニピュレーターを使って顕微鏡下で単細胞分離するというものである⁹⁾。この手法を用いて、水田と転換ダイズ畑の土壤から機能する脱窒菌を数百株分離した。これら分離株の脱窒代謝様式は、最終生産物が N_2O と窒素ガスまたは両方である3タイプに類型化された。また系統発生的には極めて近縁であっても、 N_2O 還元能は菌株によって異なった。以上のことから、一般的には脱窒で発生する N_2O は硝酸が窒素に還元される過程の中間生産物だとされているが、実際には土壤で機能する脱窒菌が環境に応じて変化させる多様な脱窒反応の収支によって N_2O 発生量が決まるという結論を得た¹⁰⁾。

2) 農耕地における硝化菌の多様性

硝化菌の種類は系統発生的に限られていることから、DNAやRNAに基づく環境中での追跡が容易で、土壤では硝化菌の多様性は土壤型やpHなど環境に影響を受けることが試験研究機関の管理された圃場を用いた研究で示されている。著者らはさらに一般の農地土壤の硝化活性とそこに生息する硝化菌の菌数と多様性を解析し、環境要因との関連性を調べた。その結果、アンモニア酸化古細菌(AOA)、アンモニア酸化細菌(AOB)ともに菌数は活性と相関があり、両者とも土壤中で機能していること、また次世代シーケンサーを用いた*amoA*の解析から、AOAとAOBの多様性は土壤pHの影響を強く受けることを明らかにした。また、pHに応じて機能するAOBとAOAのサブグループは異なることを示した¹¹⁾。一般的に土壤pHは施肥の影響を強く受ける。そこで多肥により酸性化した茶園土壤から新属新種のAOBを発見し、実際に酸性土壤で機能していることを示した¹²⁾。

以上から土壤における硝化菌と脱窒菌を分離してその機能を明らかにし、脱窒菌がコミュニティとして栽培環境の変化に対応しながら機能している可能性と、硝化菌の菌数と多様性は土壤pHに大きく影響を受けていることを示した。

おわりに

本研究では農薬や肥料の投与を人工的な選択圧とみなし、それに対する農薬分解または窒素循環に関与する土壤微生物の適応を個体レベルや集団レベルで解明することを目的として研究を遂行してきた。これにより、微生物の個体としての機能と集団あるいは群集としての多様性や相互作用(競合や共生)を明らかにすることができた。またこの過程で、”土壤“微生物は土壤に限って存在するのではなく、生態系の中では植物や昆虫にまでその住処を変えて生きているという考察を新たに得た。すなわち土壤微生物は生態系を支える大きな力である。彼らに敬意を表しつつ研究を推進していきたいと考える。

謝辞

本賞にご推薦頂きました一般社団法人日本土壤肥料学会 犬伏知之会長、波多野隆介副会長はじめ関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究は、静岡大学大学院農学研究科、岐阜大学大学

院連合農学研究科、東京大学大学院農学生命科学研究科、及び国立研究開発法人農研機構農業環境変動研究センターにおいて実施しました。本研究の推進にあたり、長年にわたりご指導賜りました早津雅仁博士（農業環境変動研究センター）に深甚なる感謝を申し上げます。妹尾啓史教授（東京大学）および南澤究教授（東北大学）には、多大なるご助言、ご協力、ご支援を賜り、心より感謝申し上げます。また共同研究者の菊池義智博士（産業総合技術研究所）、勝山千恵助教（広島大学）や日頃よりお力添えいただいている農業環境変動研究センターの皆様、その他本研究と一緒に携わってきた全ての皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Tago K., Kiho A., Katsuyama C., Hoshito Y., Yamada N., Hirano K., Sawada H., and Hayatsu M.: *Microbes and Environments* 21: 58–64 (2006).
2. Tago K., Yonezawa S., Ohkouchi T., Ninomiya T., Hashimoto M., and Hayatsu M.: *Microbes and Environments* 21: 53–57 (2006).
3. Tago K., Yonezawa S., Ohkouchi T., Hashimoto M., and Hayatsu M.: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 80–82 (2006).
4. Tago K., Sato J., Takesa H., Kawagishi H., and Hayatsu M.: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 517–523 (2005).
5. Tago K., Kikuchi Y., Nakaoka S., Katsuyama C., and Hayatsu M.: *Molecular Ecology* 24: 3766–3778 (2015).
6. Kikuchi Y., Hayatsu M., Hosokawa T., Nagayama A., Tago K., and Fukatsu T.: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 8618–8622 (2012).
7. Tago K., Okubo T., Itoh H., Kikuchi Y., Hori T., Sato Y., Nagayama A., Hayashi K., Ikeda S., and Hayatsu M.: *Microbes and Environments* 30: 29–36 (2015).
8. Tago K., Itoh H., Kikuchi Y., Hori T., Sato Y., Nagayama A., Okubo T., Navarro R., Aoyagi T., Hayashi K., and Hayatsu M.: *Microbes and Environments* 29: 434–437 (2014).
9. †Nishizawa T., †Tago K., Uei Y., Ishii S., Isobe K., Otsuka S., and Senoo K.: *AMB Express* 2: 50, doi:10.1186/2191-0855-2-50 (2012) (†co-first authors).
10. Tago K., Ishii S., Nishizawa T., Otsuka S., and Senoo K.: *Microbes and Environments* 26: 30–35 (2011).
11. Tago K., Okubo T., Shimomura Y., Kikuchi Y., Hori T., Nagayama A., and Hayatsu M.: *Microbes and Environments* 30: 21–28 (2015).
12. Hayatsu M., Tago K., Uchiyama I., Toyoda A., Wang Y., Shimomura Y., Okubo T., Kurisu F., Hirono Y., Nonaka K., Akiyama H., Itoh T., and Takami H.: *The ISME Journal* 11: 1130–1141 (2017).