

課題I 土壌構造 (土壌団粒)

土壌団粒は土の微細粒子によって作られた凝集体

2000 μm 200 μm 20 μm 2 μm 0.2 μm

マクロ団粒 ミクロ団粒 細菌 糸状菌 微生物残体 粘土鉱物

土壌団粒はN₂O発生と消去のホットスポット

土壌構造と微生物生存の解明

物理構造 化学量 微生物量

天然の土壌団粒の解析

物理的分法 X線CT法 構成要素 (一次・二次鉱物) (有機物・金属等) 接着物質

人工土壌団粒の作出

人工土壌団粒の作出

N₂O除去資材に必要な要素が明らかに N₂O除去能を持つ人工団粒のプロトタイプ作成に成功

ロングリード DNAシーケンス バイオインフォマティクス シングルセル シーケンス ネットワーク解析

土壌中の微生物多様性を完全解明するための革新的技術開発を実施

超音波 シングルセルゲノム解析 脂肪酸分析

シングルセルゲノムで土壌団粒内部のN₂O除去微生物を特定

課題II・V N₂O循環と評価 (詳細: A-8-2, 4)

課題II-1全体で目指すもの

高N₂O還元活性根粒菌 (nosZ++)の探索 (II-1-a) 5-20%程度 優占化してN₂O削減強化? 課題III

一般的な接種資材 (nosZ-株) N₂O無害化活性強化 土着菌 → nosZ++接種菌

宿主作物の最適化による nosZ++接種菌優占化 (II-1-b)

種子コートなどで、接種根粒菌数が減らせる画期的な技術に!

今まで根粒菌のゲノム編集でしかN₂O還元活性を上昇させることは不可能。しかしN₂O還元活性の高い新規の根粒菌野生株を取得、N₂O削減強化を確認

新規 (nosZ++)株によるパンチスケールN₂O削減

宿主作物の最適化による nosZ++接種菌優占化 (II-1-b) → ポスターA-8-2

ダイスコアコレクション

施肥 収穫

根粒菌接種 (10月) のN₂O発生量: 無接種 (nosZ-優占) > 新菌株 (nosZ++)

圃場実証

新菌株 (nosZ++)

新規 (nosZ++)株による圃場スケールのN₂O削減 (黒ボコ土、NosZ-優占)

II-2, 3 畑地および水田由来のN₂Oの無害化・資源化

II-2 作物の植物根圏微生物によるN₂O無害化

a) カバー・クロップ・不耕起土壌における窒素駆動型微生物の解明と利用 (茨城大)

ライムキ・カバー・クロップ

好気条件 嫌気条件

資材化

b) N₂O無害化能力の高い微生物の探索と利用 (静岡大)

・レッドクローバー根粒菌 (nosZ+) ・根粒菌以外の細菌 (nosZ-) 分離に成功

高活性株の探索 安倍川河川敷 鳴瀬川河川敷 その他地帯

特性解析 N₂O還元活性 窒素固定活性 根粒形成総合

II-3 N₂O固定菌・N₂O資源化微生物コンソーシアムによるN₂O資源化 (東大・産総研) → ポスターA-8-4

N₂O資源化作物栽培システムの確立

水田土壌由来の細菌のN₂O固定能および固定量

水田土壌におけるN₂O固定能と関与する細菌群

南澤MSの大課題 (実施体制)

Theme 01 土壌構造 Theme 02 N₂O循環 Theme 03 資材設計 Theme 04 CH₄循環 Theme 05 評価とモデル

課題IV. CH₄循環 (詳細: A-8-3)

課題IV: 水田CH₄削減の戦略

イネ低メタン化技術 (品種) IV-1

微生物資材 IV-2

イネ共生CH₄酸化窒素固定菌の機能最大化40%削減

既存技術

環境制御 水管理 有機物管理 40%削減

中干し (既存技術)

80%削減

微生物制御 + 環境制御 (水田中干し等) → 水田メタン80%削減

課題IV-2: CH₄酸化窒素固定菌の機能最大化

デジタルPCR-CH₄排出量と関係するCH₄酸化菌グループの解明

① 根圏土壌 (根の表面) y = -72.516x + 75.922 R² = 0.4613 p < 0.01

② イネ体内 y = -90.093x + 92.321 R² = 0.475

微生物資材化を見据えた高活性菌の単離

12株の分離・純化が完了 タイプIa-2株、タイプII-10株

11株でN固定活性を確認

MuR21-B4c タイプIa

NpR20-75 タイプII

農業のN₂O・CH₄削減のビジネスモデル案

N₂Oビジネス CH₄ビジネス

オーダーメイド資材を提案

- 微生物資材
- 作物品種
- 窒素制御剤
- 人工団粒

評価

資材のN₂O削減効果最適化 資材A 資材B 資材C

GC 赤外

低メタン米

日本 → 世界 日本 → アジア

課題III-3 資材設計 (詳細: A-8-3)

目標 窒素循環の最適化によるN₂O削減

研究の概要: 農地由来N₂O排出を80%削減可能な資材(分子標的型制御剤と微生物資材)の開発

III-1: 自然界のN₂O無害化酵素NosZを上回る高活性酵素をもつ微生物資材

III-2: HAO標的硝化抑制剤とNirK標的脱窒抑制剤

III-3: 資材化技術開発

薬剤結合ポケット

Heme P60

土壌メタゲノム解析 × 構造ベース創薬

培養困難な土壌菌にも効く分子標的型制御剤を開発

III-3: 資材化技術開発: 土壌微生物構造を模した担体を作成して微生物定着性を評価することで、N₂O還元微生物が種子及び土壌中で安定的に生存し機能を発現する資材化技術を開発する

材料選抜

- 優れた微生物の選抜・保護効果を示す微生物安定化材料の候補取得に成功
- 微生物安定化材料のスクリーニング
- 粘着性ポリマーのスクリーニング

開発資材① 開発資材②

- 種子コーティング資材
- 土壌に散らす資材

優れた微生物の選抜・保護効果を示す微生物安定化材料の候補取得に成功

新規な種子コーティング法の開発に前進

微生物安定化材料 非接種菌

土壌微生物の増殖に優れる新規な種子コーティング法の開発に前進

土壌吸収ポテンシャルの評価に着手

微生物安定化材料 非接種菌

新たに発見した土壌・根圏の定着剤と遺伝子から定着剤候補(欠損株)を取得

粘着性ポリマーのスクリーニング

土壌メタゲノム解析 × 構造ベース創薬

Tn-seqによる微生物定着剤の候補遺伝子

N₂O・CH₄削減のためのイメージング技術開発

実体顕微鏡 共焦点顕微鏡

土壌中イネ根圏の細菌との相互作用可視化 (根圏で)

細菌との相互作用に関わるイネ遺伝子(発現の可視化 (蛍光レポーター-緑蛍光タンパク質))

ポロPAL向上型顕微鏡の可視化 (根圏内での相互作用)

遺伝子発現を連続的に観察

多色蛍光顕微鏡による細菌の可視化 (根圏内での相互作用)

イネ根圏におけるCH₄酸化細菌の局在やイネ細胞との相互作用様式解明

根圏菌などの微生物接種の環境影響評価 (遺伝子発現解析)

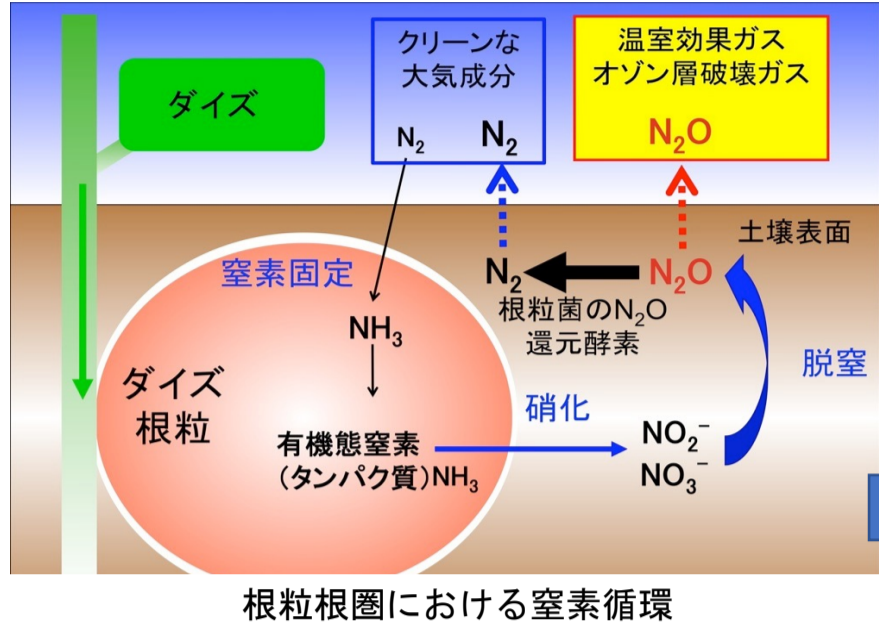
イネ根とCH₄酸化細菌との相互作用様式解明 with CH₄グループ (東大・龍谷大・G/永野G)

N₂O削減根粒菌とCH₄酸化細菌によるGHG除去効率化・資材化

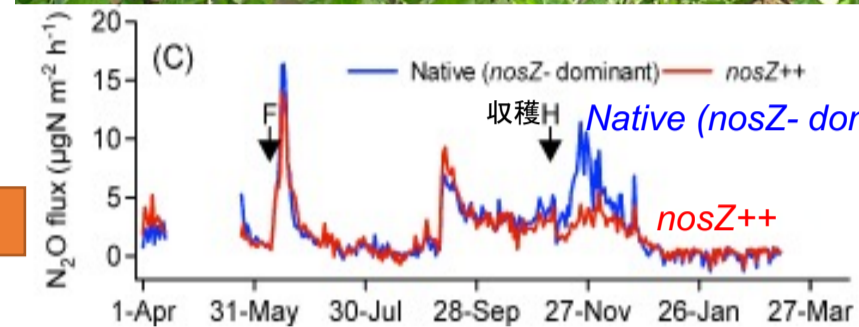
II-4. 土壌環境の最適化によるN₂O無害化・資源化評価栽培システムの構築 (龍谷大・別役G/永野G)

背景・目的

老化根粒ではN₂Oが発生するが、根粒菌によりN₂Oは還元される



人為的に育種した nosZ++ 根粒菌の圃場接種による N2O 排出削減



Itakura et al. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by Bradyrhizobium japonicum inoculation. Nature Climate Change, 2013

根粒菌による一酸化二窒素 (N₂O) 発生削減 → 50~80%削減

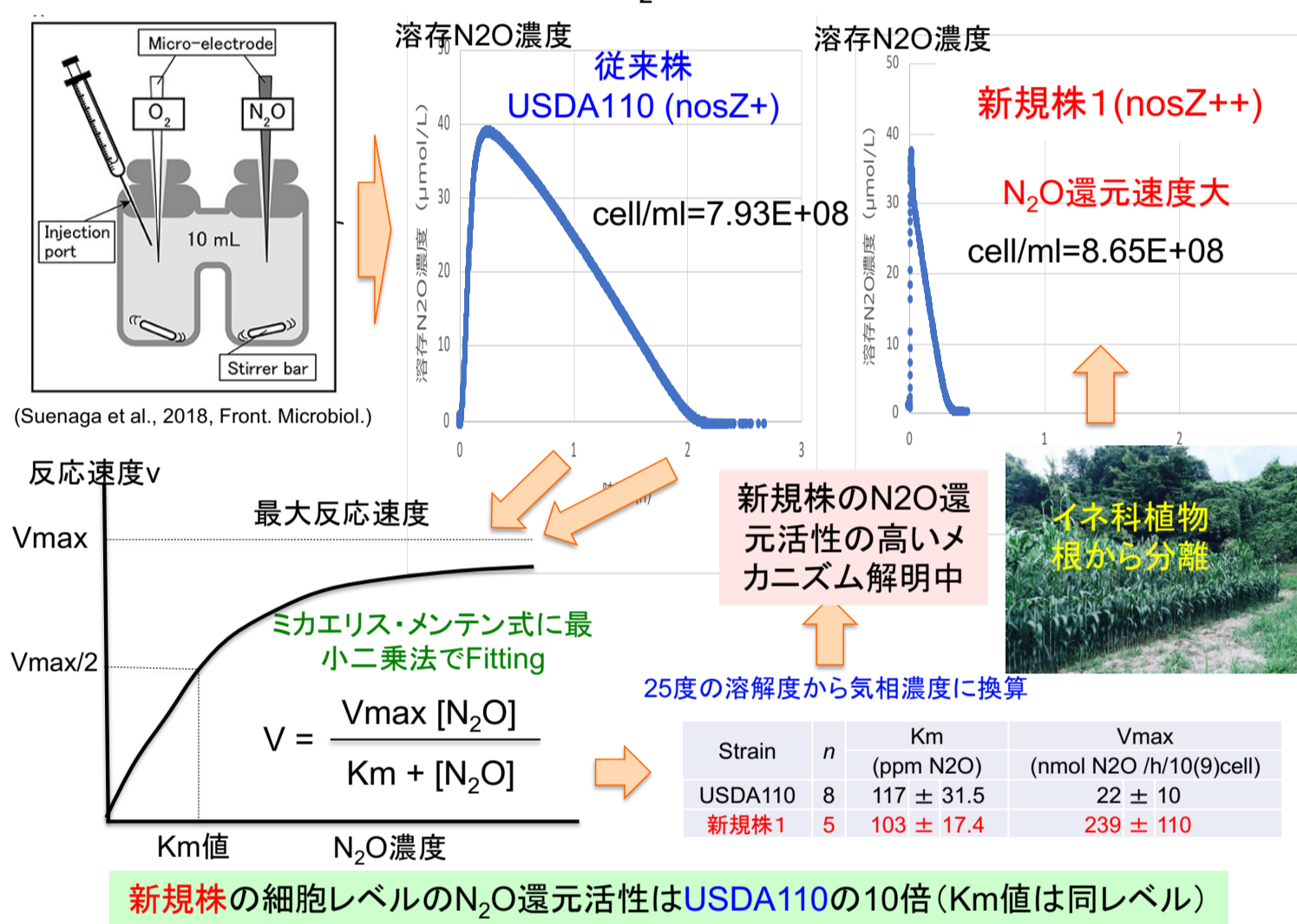


Information about nosZ++ strains, their benefits, and application in soybean cultivation.

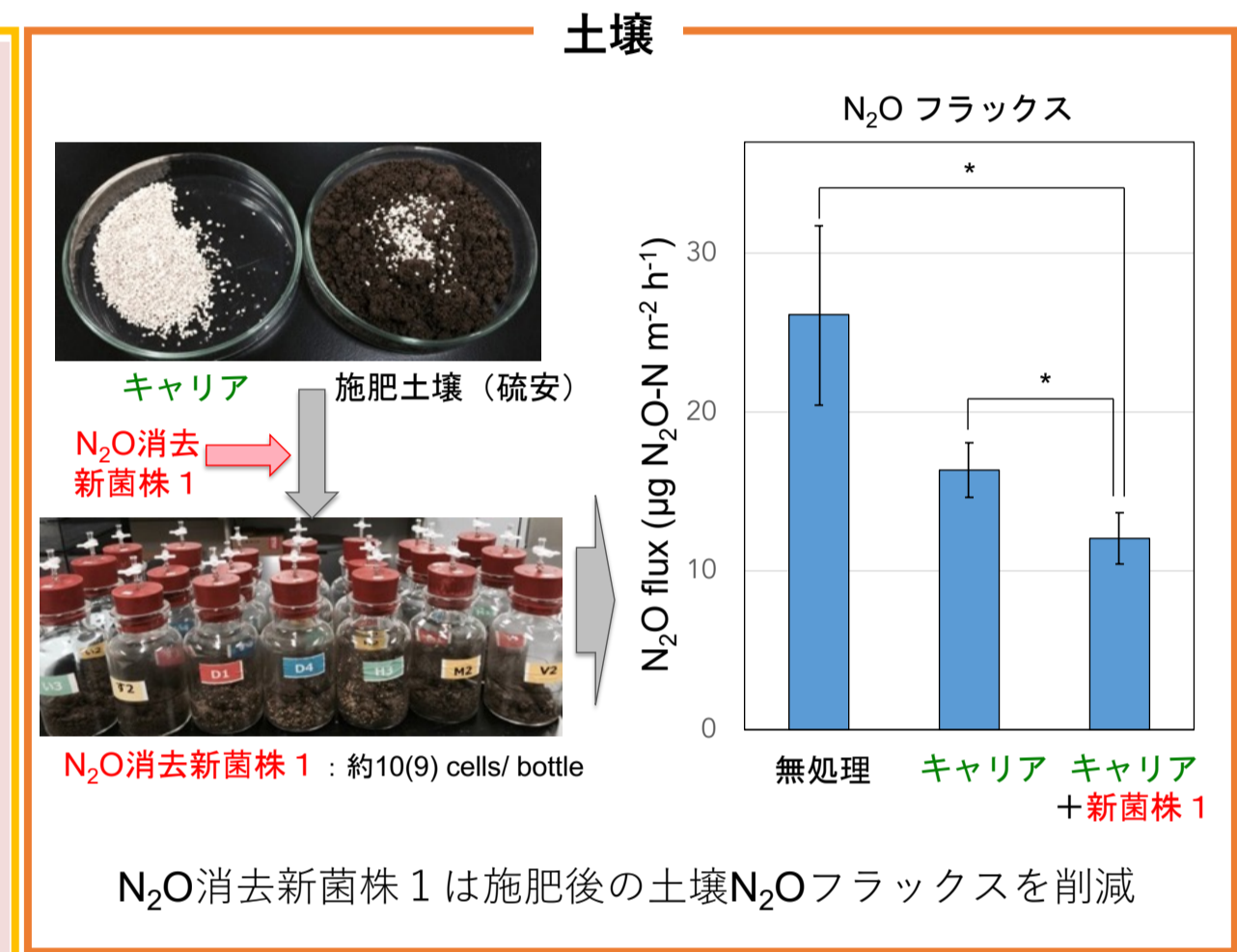
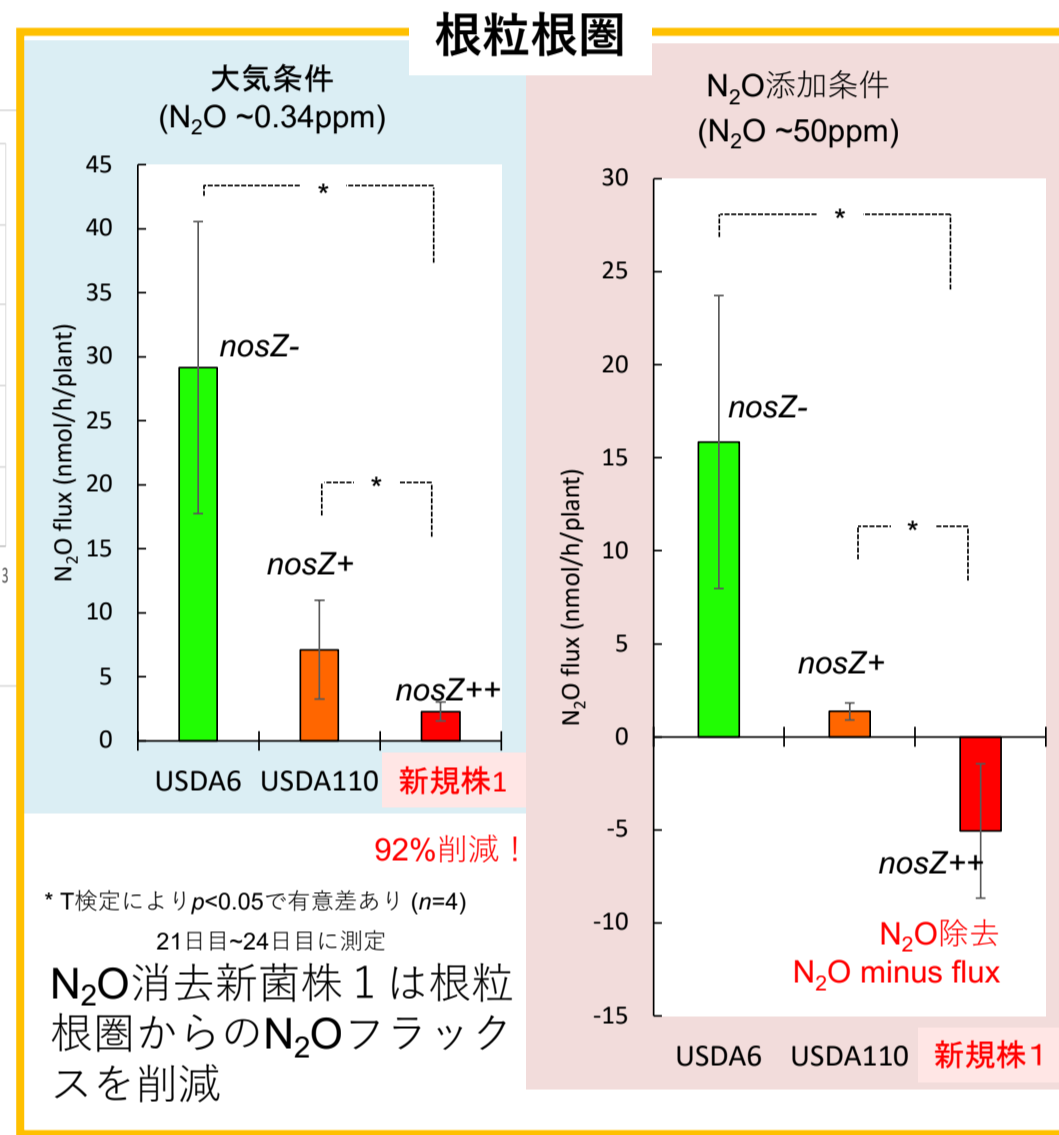
農業現場での普及のため野生型で高N₂O還元活性を示す根粒菌を探索・分離し利用技術を確認する。

新規nosZ++根粒菌によるN₂O削減効果

新規nosZ++株の単生状態でのN₂O還元活性

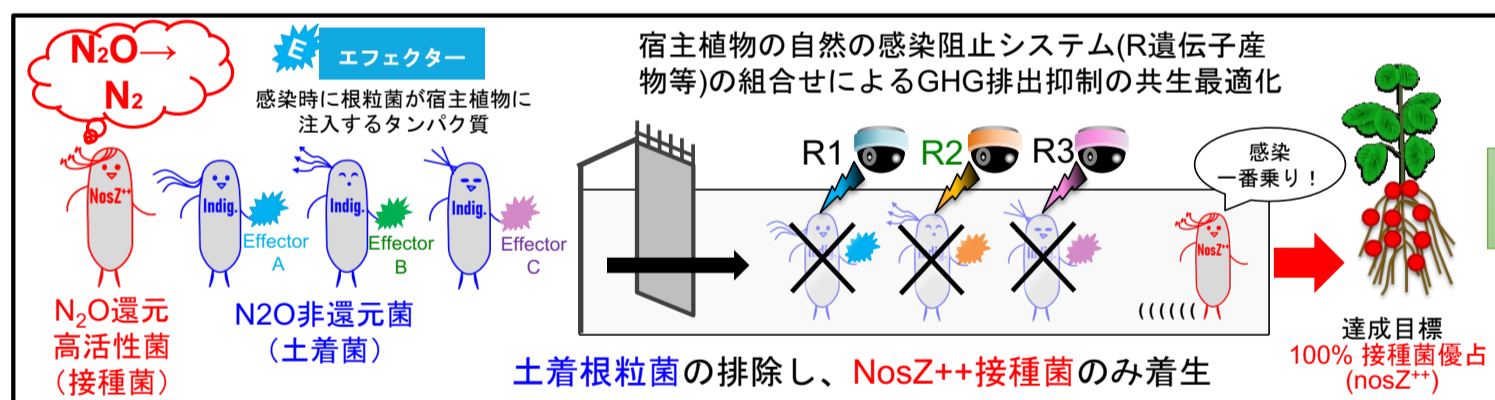


ベンチスケールでの新規株(nosZ++) N₂O削減能

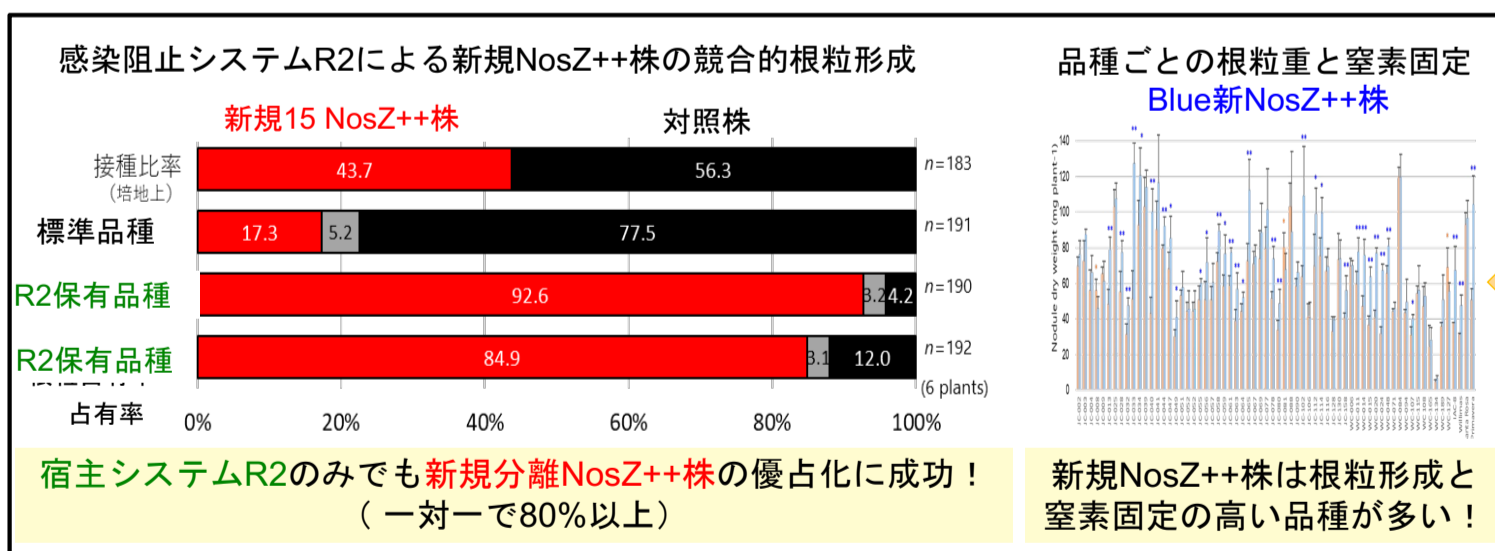


高N₂O還元活性根粒菌の共生最適化

根粒菌エフェクターによる共生最適化戦略



新規nosZ++株の競合能・窒素固定能評価



ダイズ根粒菌nosZ++野生株の探索

N₂O還元活性の高い新規18株を獲得 (2022年11月 78株)

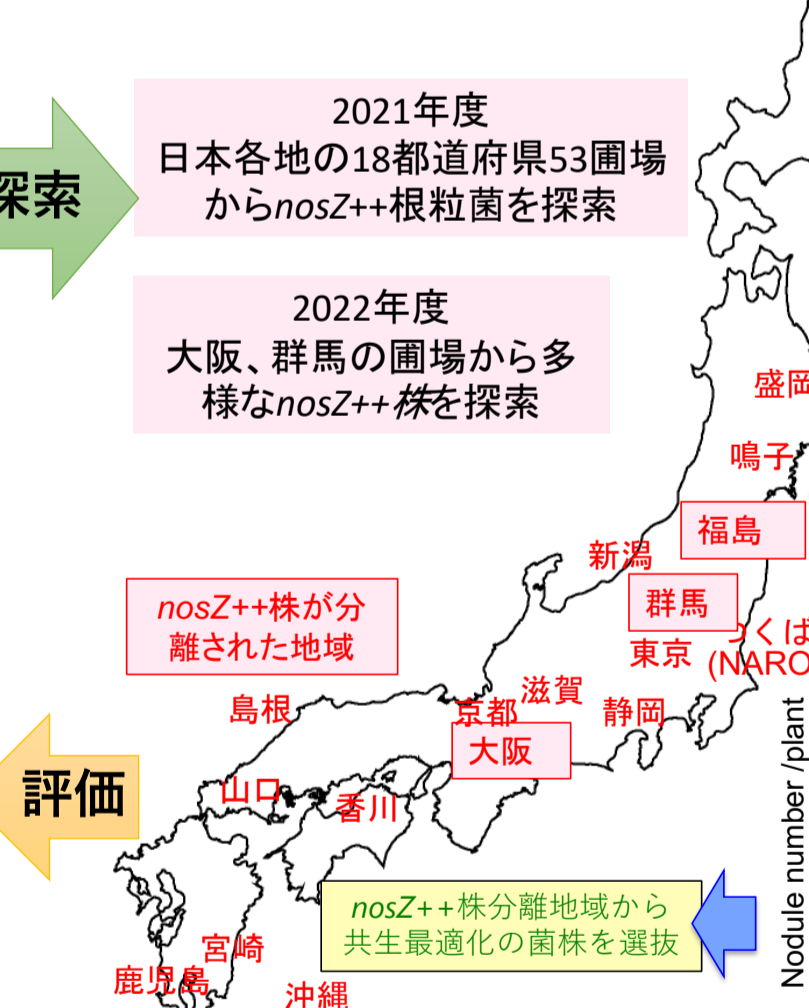
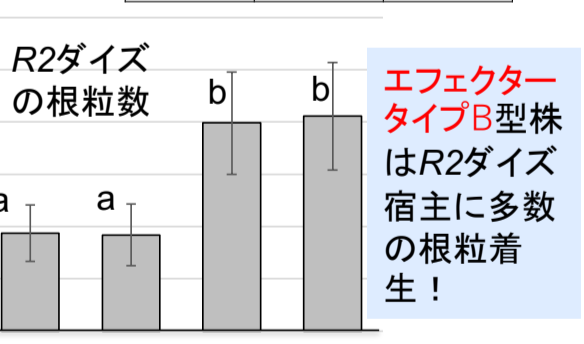
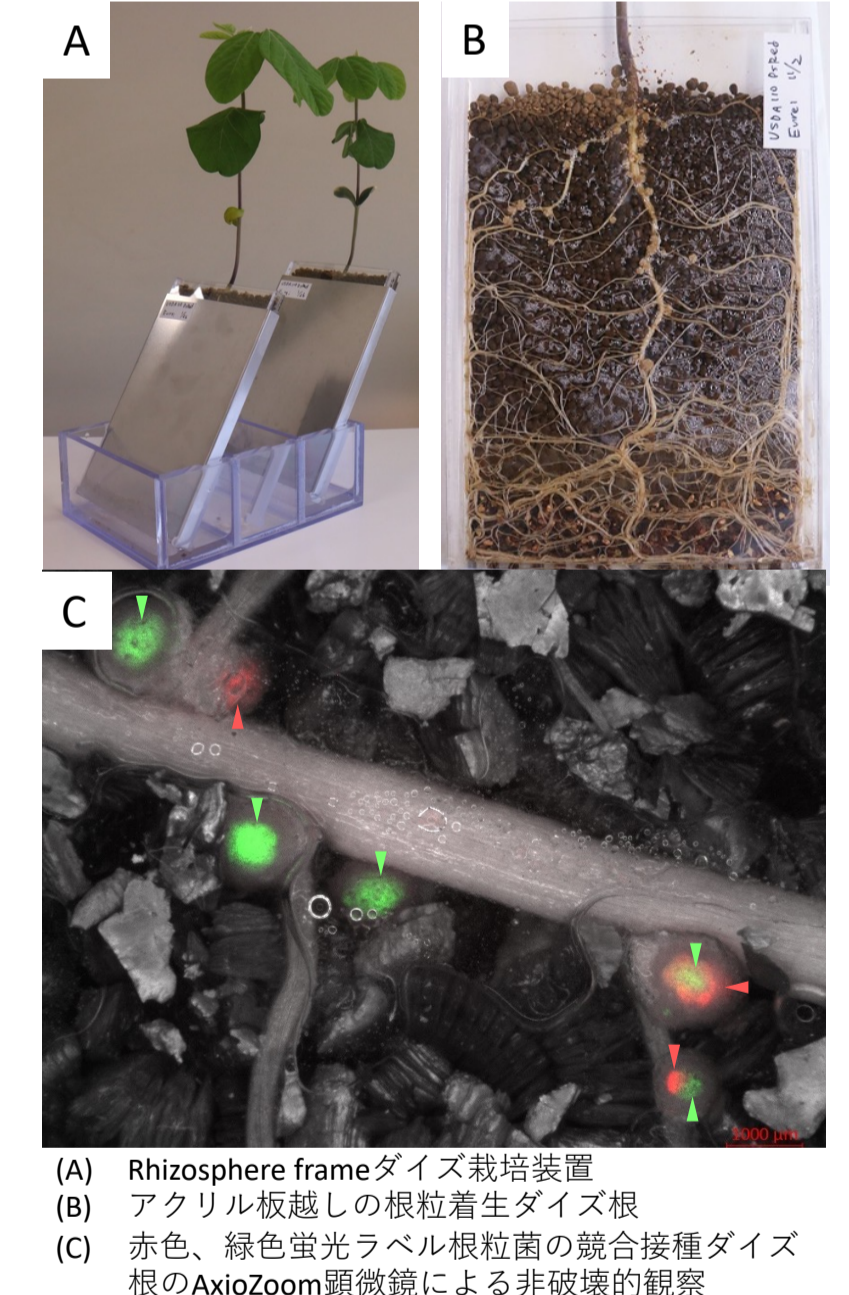


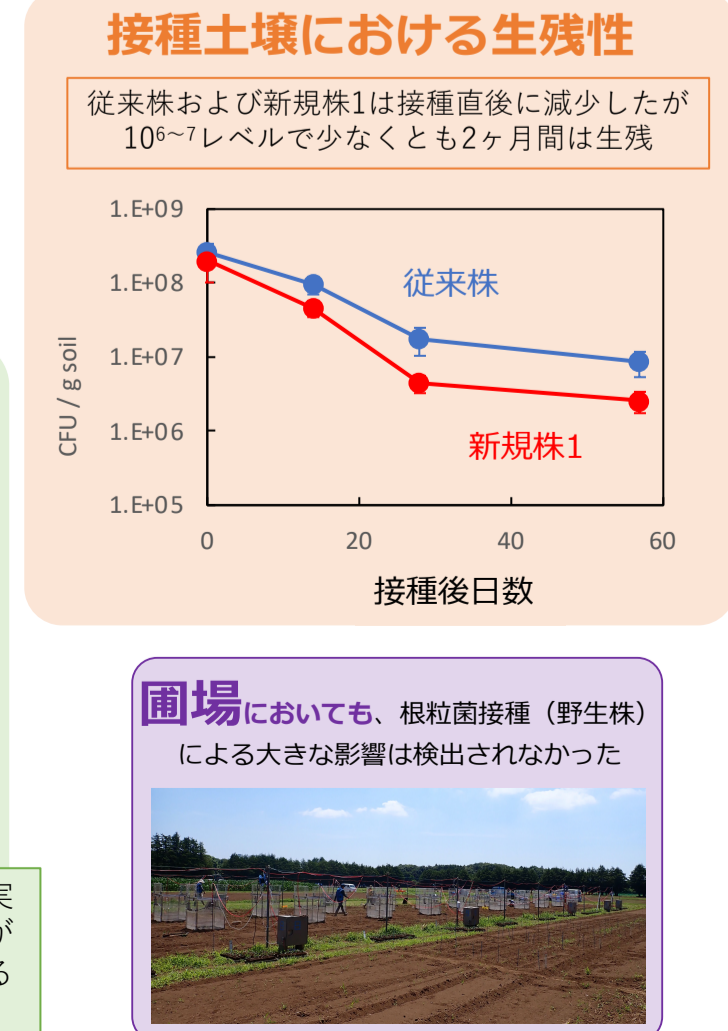
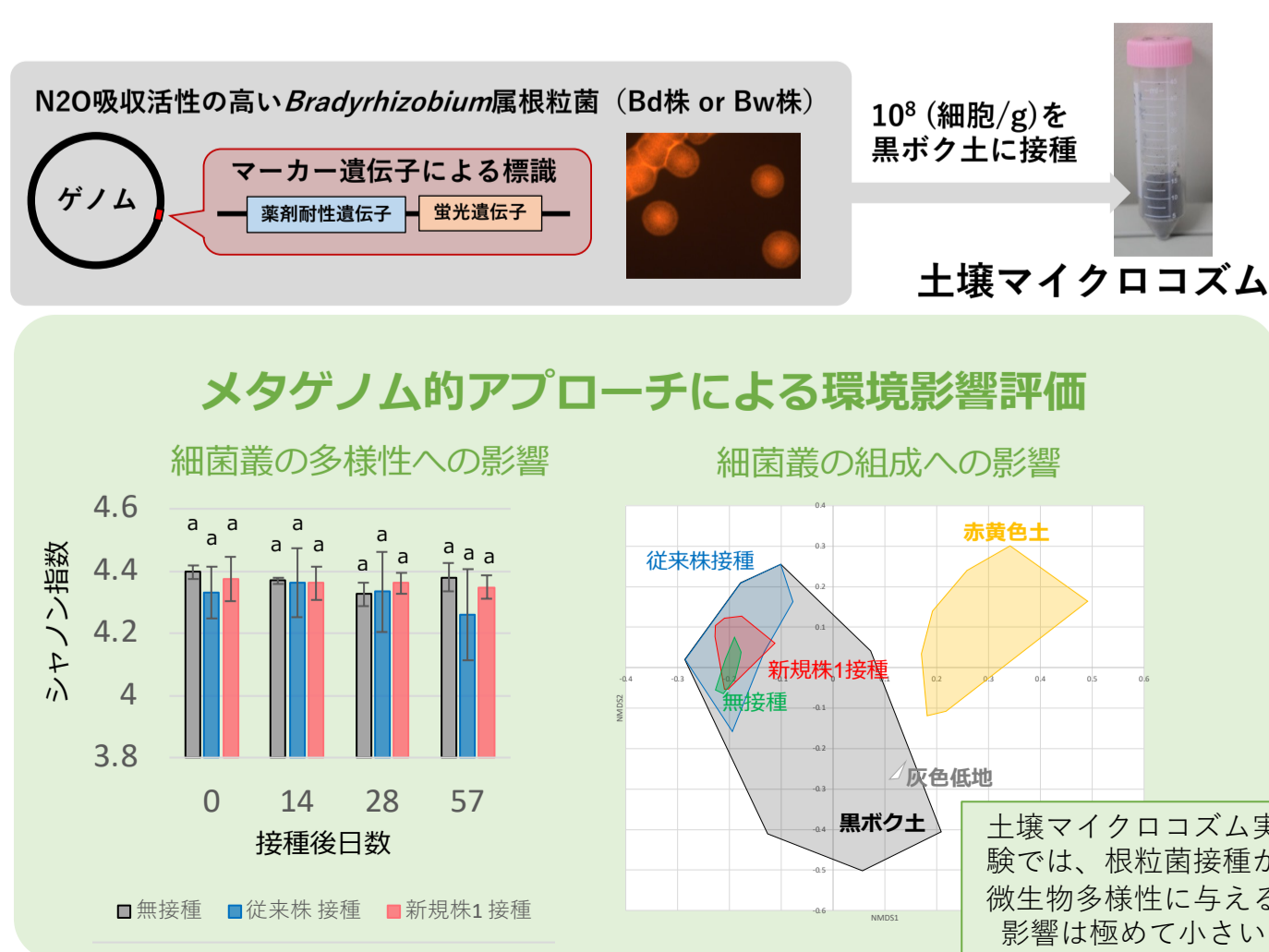
Table listing 18 newly discovered nosZ++ strains with their characteristics.



非破壊的根粒菌感染観察システム



根粒菌接種による環境影響の評価

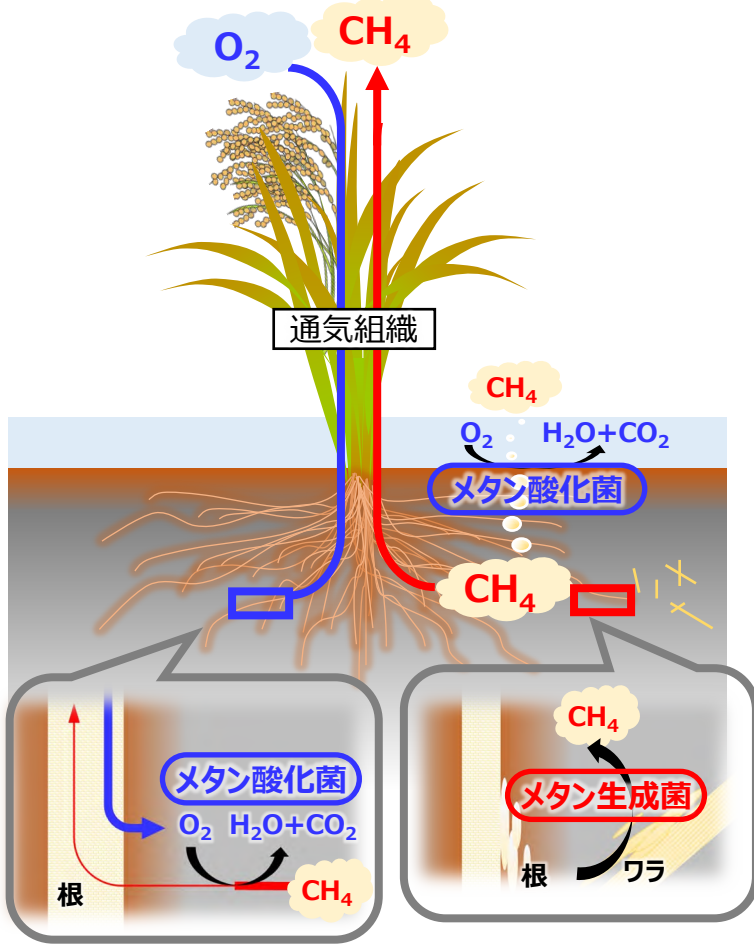


市民科学「地球冷却微生物を探せ！」

Information about the citizen science project 'Find Earth-Cooling Microbes!', including methodology and results.

低メタンイネ品種開発による水田由来メタン(CH₄)の発生削減→既存技術と合わせ80%削減へ

背景



世界の水田からのCH₄発生量: 人為的CH₄発生量の約1割

- CH₄生成 (図右)
 - 嫌気的条件下でメタン生成古細菌による稲わらなどの有機物の分解によりCH₄生成
- CH₄酸化 (図左)
 - イネ根圏と土壌表層でメタン酸化菌によりCH₄が酸化されCO₂と水に分解
- 既存CH₄削減技術
 - 水田中干し延長によるCH₄酸化促進、秋耕(春すき込みから秋すき込みへの変更)によるCH₄生成抑制 (NARO成果: 農水省環境保全型農業直接支払交付金で普及中)

研究開発の概要

現在の主力水稻品種を低CH₄化

- ✓ イネ品種の低CH₄化技術
 - イネの遺伝的改変による低CH₄化
 - イネ根圏のCH₄メタン酸化促進
 - ✓ CH₄酸化窒素固定菌の機能最大化 (東北大・名古屋大)
 - 微生物資材による低CH₄化
 - イネ体内に生息する微生物によるCH₄酸化促進
- ハイスループット CH₄排出量評価法 農研機構が持つ多様なイネ遺伝資源
- 低メタンイネ品種・システムのスクリーニング
- 有用イネ形質と遺伝子座の同定
- 現在の主力品種 (例: コシヒカリ) へ導入、低CH₄化

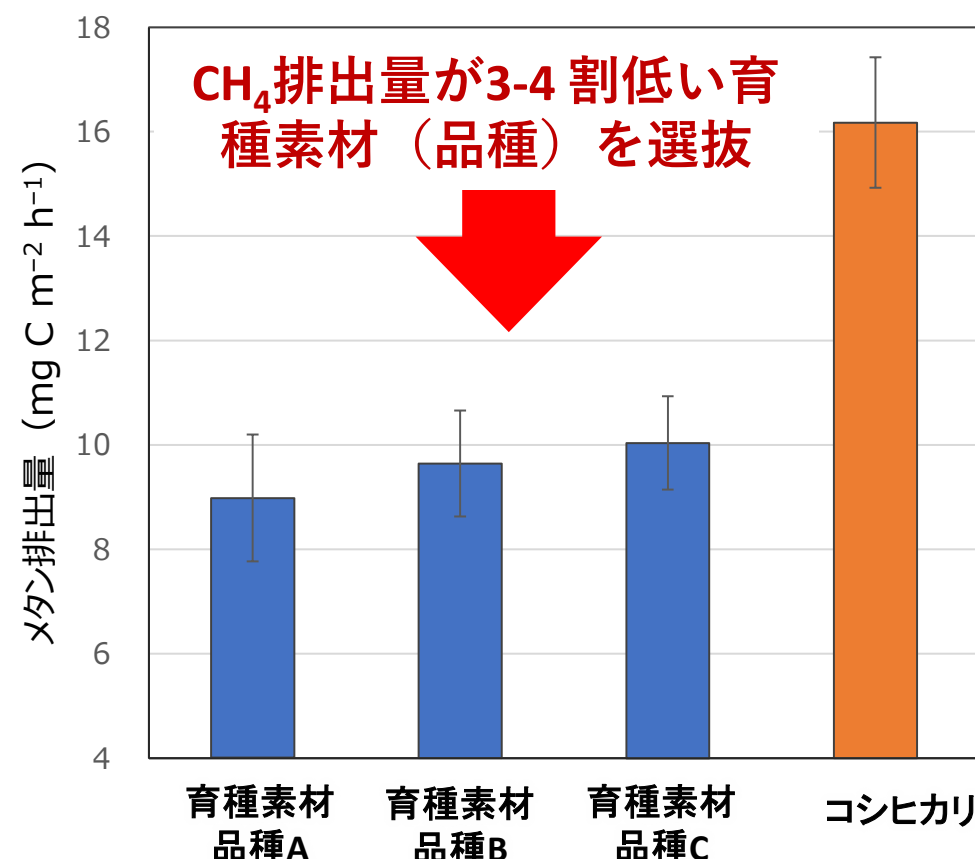
主な成果

迅速評価手法確立



携帯型CH₄計を使った迅速測定

Tokida 2021, Kajjura & Tokida, 2021, 2022



CH₄排出量が3-4割低い育種素材(品種)を選抜

- メタン排出量迅速評価手法を確立
 - 多システムのスクリーニング・評価に不可欠な技術
 - スループット3倍 (既存手法: 45分、新手法: 15分以内)
- 低メタンイネのスクリーニング
 - コシヒカリと比べて3割メタン排出量が低い育種素材(品種)を選抜
- ✓ 染色体断片置換系統(CSSL)を利用した低メタンシステムをスクリーニング中

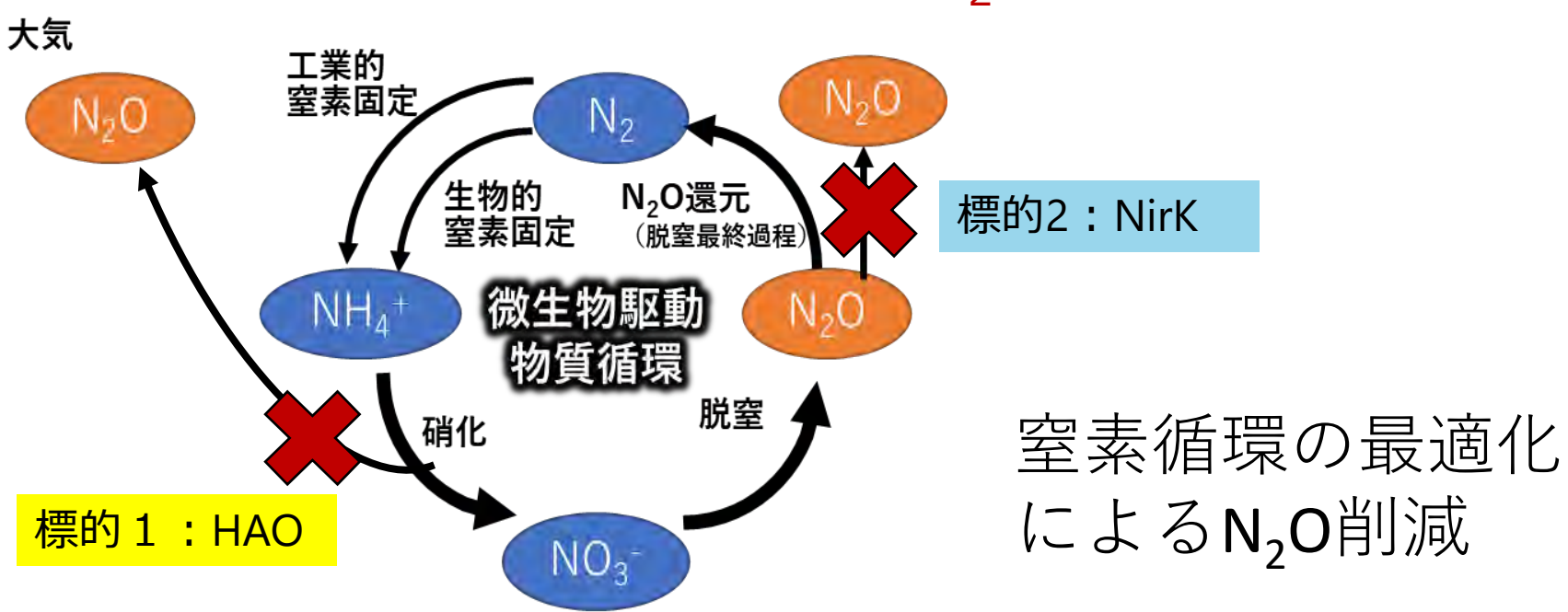
CH₄排出量が3~4割低い育種素材(品種)を選抜

→低メタンに関わる遺伝子をコシヒカリ等に導入し、低メタンイネ品種を作出

分子標的型制御剤による一酸化二窒素(N₂O)の発生削減→微生物資材と合わせ80%削減へ

背景

- ✓ 世界の農業由来N₂O発生量は人為的N₂O発生量の約6割
- ✓ 微生物による硝化・脱窒過程よりN₂Oが発生
- ✓ 硝化(標的1: HAO)、脱窒(標的2: NirK)をターゲットとした分子標的型制御剤によりN₂Oを削減



窒素循環の最適化によるN₂O削減

研究開発の概要

- ✓ 土壌メタゲノム情報とin silico薬剤スクリーニングによる分子標的型制御剤の開発

標的1: HAO標的型阻害剤の開発

1. HT薬剤スクリーニング
 - 1次スクリーニング(酵素阻害活性)
 - 2次スクリーニング(擬陽性ヒット排除)
 - 3次スクリーニング(生菌阻害活性)
- 土壌評価と構造最適化
- 基本骨格化合物の創出

標的2: NirK標的型阻害剤の開発

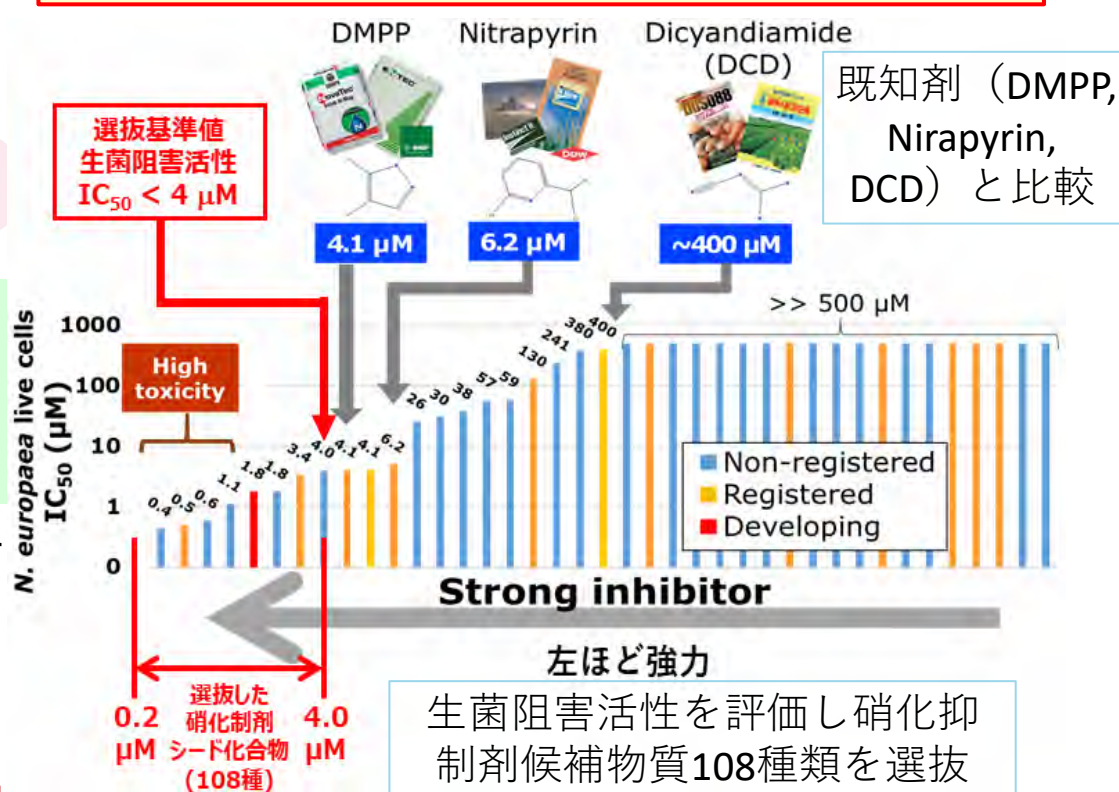
2. In silico薬剤スクリーニング
 - 市販化合物カタログ(~800万)
 - 薬剤として不適切なものを排除
 - In silico薬剤スクリーニング
 - 類似化合物分類と目視による絞り込み
- 活性測定

主な成果

標的1: HAO

- 市販剤の標的酵素
 - 立体構造解析不可
 - MSの標的酵素
 - 立体構造解析可能
 - ゲノム創薬可能
 - 高活性薬剤開発可能
- ✓ 既知硝化抑制剤の生菌阻害活性を評価し選抜基準をIC₅₀(50%阻害濃度) < 4μMに設定 (最強市販薬DMPP IC₅₀ = 4.1 μM)。
- ✓ 選抜基準をクリアする硝化抑制剤候補化合物108種類を取得

生菌阻害活性: 開発剤と既知剤との比較

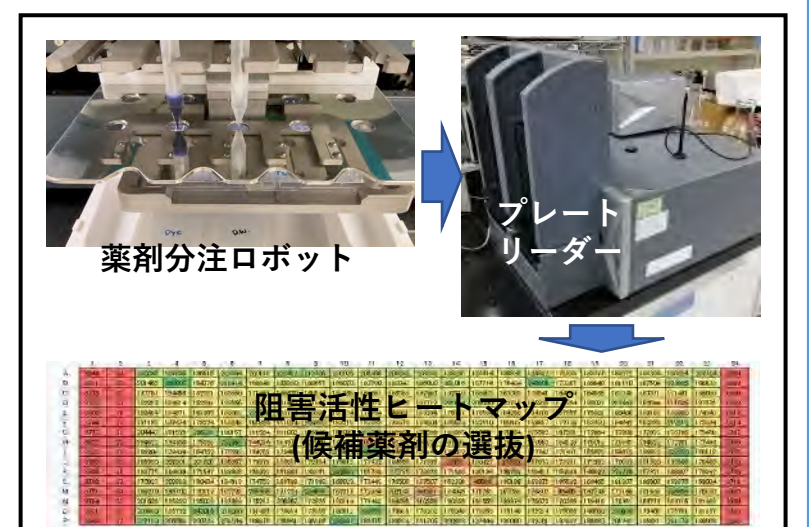


標的2: NirK

これまで脱窒制御剤が製品化された事例はない



- ✓ ハイスループット(HT)化したNirK活性測定法を用いた約1万化合物の薬剤スクリーニングによりNirK阻害剤候補化合物(>50%阻害@10μM)を100種類取得

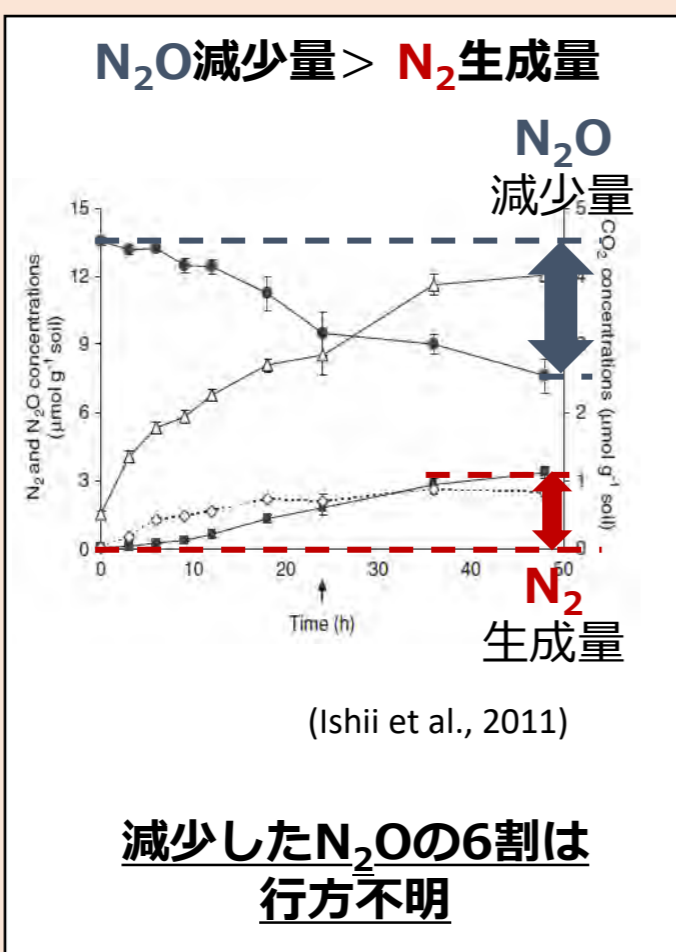
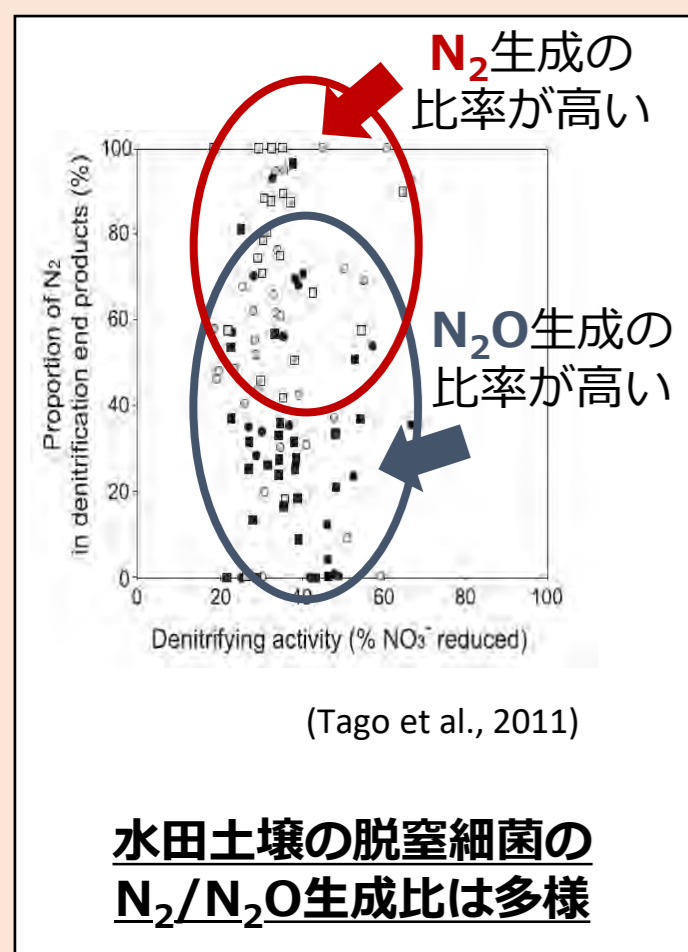


阻害活性ヒートマップ(候補薬剤の選抜)

ハイスループット (HT) 薬剤スクリーニング

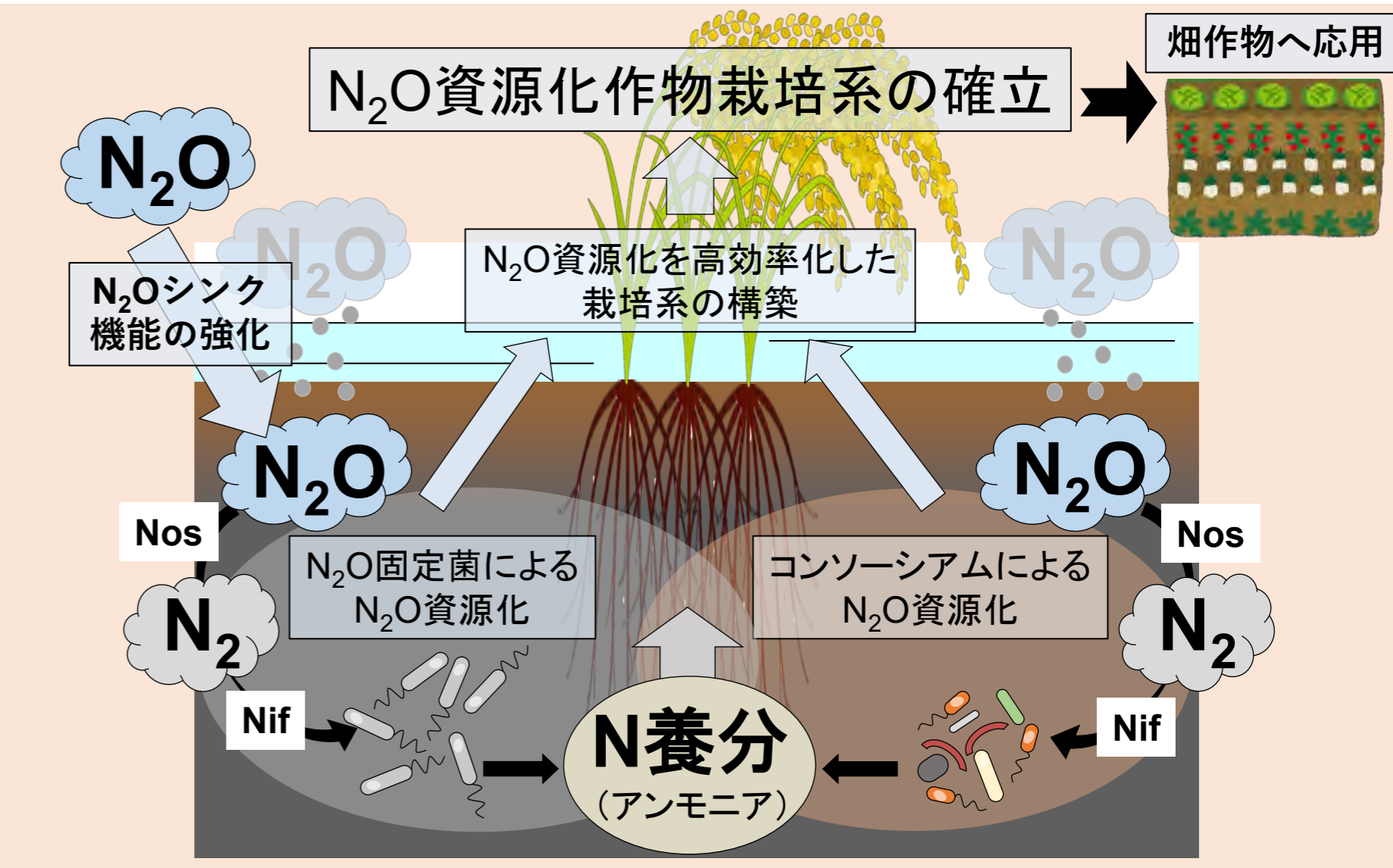
硝化(HAO)抑制剤候補化合物108種類取得、脱窒(NirK)阻害剤候補化合物100種類取得

Introduction



identification	strain No.	motility	Culturability	nifH	窒素固定能
<i>Acetivibrio</i> sp.	TSH81w	○	Copiotrophic	○	—
	TSH81y	○	Copiotrophic	—	—
	TSH91	○	Copiotrophic	—	—
	TSH96	○	Copiotrophic	—	—
	TSH98	○	Copiotrophic	—	—
	TSH100	○	Copiotrophic	—	—
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	TSA1	○	—	○	○
	TSA15y	○	—	○	○
	TSA26	○	—	○	○
	TSA27s	○	—	○	○
	TSA27b	○	—	○	○
	TSA43	○	—	○	○
	TSA44	○	—	○	○

窒素固定能を有する脱窒細菌が存在



背景: 水田では生成されたN₂Oが細菌によって固定されているのではないかと? 目的: N₂Oをアンモニアに変換して作物の窒素養分にする

I. 水田土壌細菌のN₂O固定能の解析と制御、およびN₂O資源化への応用

N₂O固定ポテンシャルをもつ細菌

① N₂O還元酵素遺伝子 (*nos*) を持つ鉄還元窒素固定菌

Anaeromyxobacter sp.

- 水田土壌に優占する鉄還元菌
- 水田土壌メタトランスクリプトーム解析で*nos*および*nif*の転写産物が多数検出された

② 窒素固定遺伝子 (*nif*) を持つ脱窒菌

Bradyrhizobium sp.

- N₂O還元活性が高い脱窒菌として単離
- nif* (窒素固定遺伝子) も保有

③ N₂Oを単一窒素源として生育する微生物コンソーシアムの取得

① Anaeromyxobacter属細菌のN₂O固定能の検証

- N₂Oを唯一の窒素源および電子受容体とした培地では、生存するが増殖しない
- N₂Oと少量のN₂が存在する条件において増殖が安定し、N₂Oの減少が見られた
- この時、*nosZ*および*nifD*の転写も確認された

- 水田土壌マイクロコズム (滅菌土) に *Anaeromyxobacter* 属細菌を接種
- 5日間培養後に増殖を確認 (16S rRNA コピー数の増加、*nosZ*および*nifD*の転写を確認) → 土壌に定着し増殖していることを確認中

② Bradyrhizobium属細菌のN₂O固定能の検証

- Anaeromyxobacter* 属細菌と同様、N₂Oと少量のN₂が存在する条件において増殖した
- Anaeromyxobacter* 属細菌と同様、5日間の培養後に増殖確認を行ったところ、16S rRNA コピー数の増加、*nosZ*および*nifD*の転写が確認されたため、現在培養前後の土壌をIRMSに供し、¹⁵N量を解析している

微量のN₂存在下でAnaeromyxobacter属およびBradyrhizobium属細菌はN₂O固定を行う (固定量は解析中)

③ N₂Oを単一窒素源として生育する微生物コンソーシアムの取得

- N₂Oを唯一の窒素源として増殖する微生物コンソーシアムを取得し、N₂Oが減少することを確認した
- 現在、*Bradyrhizobium* 属細菌と同様に¹⁵N固定量をIRMSで解析中

今後の予定
・ N₂O固定量の解析を続行
・ 細菌およびコンソーシアムにおいてN₂O固定活性を増強する要因の解析

II. 水田土壌におけるN₂O資源化コンソーシアムの解明

温室効果ガス N₂O → **有機態窒素 (植物の窒素養分) NH₄⁺**

脱窒硝化 DNRA → Nos → N₂ → Nif

N₂O還元微生物群 窒素固定微生物群

▶ 土壌メタゲノミクスの解析戦略の構築
▶ N₂O還元する微生物集団と窒素固定する微生物集団を明らかにする

▶ 既存の解析方法の問題点と改良

■ 窒素固定酵素の構成遺伝子

■ 解析結果への影響

nifH = nifD, nifKのはず...

■ ゲノムデータベース上では

nifH > nifD, nifK !?
▶ 偽物のnifHが多数登録されている

デタラメな結果になる
nifHを除いた精度の高い解析手法を考案した
Mise et al., mSphere, 2021

▶ N₂Oを単一窒素源として生育する微生物コンソーシアム

N₂O還元と窒素固定は同じ微生物が行う? 別々の微生物が行う?

水田土壌マイクロコズム
→ 10% N₂Oが1週間で完全に消失
→ 1週間後の土壌をメタトランスクリプトーム解析

N₂O資源化は異なるグループの微生物が共存することで行われる?

今後の予定
・ ¹⁵N₂Oを用いた土壌マイクロコズムによる解析
・ 各地の水田土壌を用いた解析による普遍性の検証