

### 3) 熊本市周辺畑地土壌における脱窒遺伝子の検出と解析について

前田 敏孝 永田 武史\* 上本 清次\*\*

#### 要 旨

合志市竹迫及び熊本市東区戸島の畑地のボーリング調査で得られた土壌試料を用いて脱窒遺伝子 (*nirS*, *nirK*) に関する調査を行った。両地点とも表層で各遺伝子を検出し、その分布には硝酸イオンなどの土壌中の成分が関係していると考えられた。また、得られた *nirS* 遺伝子の配列をもとに系統樹解析を行ったところ、特定の微生物に近縁という傾向は見られず、畑地土壌には様々な脱窒菌が存在していることが示唆された。

キーワード: 硝酸性窒素, 畑地土壌, 脱窒菌, 亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*)

#### はじめに

地下水の硝酸性窒素は、過剰な施肥、家畜排せつ物の不適正な処理及び生活排水の地下浸透等によって濃度が上昇する<sup>1)</sup>。一方、微生物による脱窒や地下水流動における混合希釈等により硝酸性窒素濃度は減少するため<sup>2)</sup>、各地点の汚染状況を測定するだけでなく、その地点での浄化能力を把握することも必要である。

汚染浄化機構のひとつである脱窒は、酸素に乏しい還元状態下において、有機物や硫化物などの電子供与体が存在する場合に微生物の働きで硝酸や亜硝酸が還元される反応のことで、この反応に関わる微生物は脱窒菌とよばれる<sup>2)</sup>。近年、分子生物学的手法により脱窒菌が有する亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*) や亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) を対象に、水田や地下水などの自然環境中の脱窒菌を解析する研究が進みつつある<sup>3),4)</sup>。

筆者らは、硝酸性窒素削減対策に資する基礎資料を得ることを目的に、熊本市東区戸島及び合志市竹迫の畑地土壌におけるボーリングコア試料の解析を行い、前報<sup>5)</sup>では土壌溶出試験結果について報告した。今回、土壌における脱窒遺伝子に関する解析を行ったので報告する。

#### 調査地点

図1に調査地点及び名称を示す。今回の調査は合志

市竹迫地区及び熊本市東区戸島地区の畑地(各1地点。以下それぞれ「竹迫」及び「戸島」と記す。)で実施された。調査地点はどちらも収穫後のトウモロコシ畑で、肥料として家畜ふん尿が使用されている。詳細については前報<sup>5)</sup>のとおりである。



図1 調査地点

#### 調査試料

平成26年11月、熊本県環境保全課及び国立大学法人熊本大学大学院自然科学研究科水文学・嶋田研究室が竹迫及び戸島で不攪乱土壌ボーリングを実施し、竹迫は深さ15m、戸島は深さ14mまでのコア試料が採取された。これを分取したものを調査試料とした。

\* 現熊本県環境生活部環境局循環社会推進課 \*\* 現熊本県北広域本部玉名地域振興局保健福祉環境部

既往の研究<sup>6),7)</sup>で、深さ 2~3m の浅い土壌や地下水で硝酸イオン濃度の減少が見られた事例について脱窒菌の関与が推察されるとの報告があったため、深さ 0~4.0m までのコア試料は密な深度間隔で解析を行えるよう 0.4m ごとに 1 つの試料として区切り、深さ 4.0m 以降のコア試料は 2m ごとに区切って混合し、試料を調製した。

## 調査方法

### 1 土壌試料からの DNA 抽出

DNA の抽出は、ISOIL for Beads Beating (Nippon gene) を用いた。加藤ら<sup>8)</sup>によると、スキムミルクの添加が DNA 抽出効率を向上させるとのことであったため、DNA 抽出キット付属のマニュアルに記載されている土壌 0.5g にスキムミルク 20mg を添加する改変プロトコルで実施した。得られた溶液は 260nm の吸光度を測定し、DNA 量を算出した。

### 2 PCR 法による脱窒遺伝子の検出

今回、Throback ら<sup>9)</sup>の文献を参照して、*nirK* 遺伝子及び *nirS* 遺伝子のタンパク質コード領域の一部を増幅するプライマー、反応液組成及び条件を決定した。採用したプライマー等の詳細は表 1 から表 3 に示した。

なお、反応溶液はアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロミドで染色し、目的遺伝子の増幅の有無を調べた。

### 3 脱窒遺伝子の塩基配列解析

2 で増幅した *nirS* 遺伝子の PCR 産物は、DynaExpress TA PCR Cloning Kit (BioDynamics Laboratory Inc) を用いてライゲーション及び大腸菌の形質転換を行い、アンピシリン添加 LB 培地で培養した。コロニーダイレクト PCR で目的遺伝子の挿入が確認されたクローンは、1 サンプルにつき 2 クローンを対象にシークエンス解析で塩基配列を決定した。

得られた塩基配列はアミノ酸配列に変換し、BLAST 検索により近縁種を推定した。また、MEGA6 を用いて近隣結合法による系統樹解析を行った。

表 1 プライマーの塩基配列

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列
<i>nirS</i>	cd3aF	5'-G TSAACG TSAAGGARACSGG-3'
	R3cd	5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3'
<i>nirK</i>	F1aCu	5'-ATCATGGTCTGCGCG-3'
	R3Cu	5'-GCCTCGATCAGRTTGTGGTT-3'

※ S = C or G, R = A or G

表 2 反応液組成

試薬	添加量 (μL)
5×PCR Buffer	5
2mM dNTP mixture	2.5
0.1mM Fw primer	0.1
0.1mM Rev primer	0.1
20mg/mL BSA	0.5
GoTaq DNA polymerase	0.2
Template DNA	20ng となる量
DW	-
total	25

表 3 反応条件

温度	時間	
94°C	2min	
94°C	30sec	} 35cycles
51°C	1min	
72°C	1min	
72°C	10min	
4°C	Hold	

## 結果及び考察

### 1 土壌中の微生物 DNA 量

採取した土壌の深さに対する DNA 量を表 4 に示す。

竹迫では、0~0.4m の試料でおよそ 9000ng の DNA 量が最大となったが、それ以降の試料では 82ng~830ng の範囲で推移した。戸島では、深さ 1.6m までの 4 つの試料で 1000ng を超す DNA 量となり、それ以降の試料では 110ng~400ng の範囲で推移した。

260nm の吸光度から算出する DNA 量は、その波長に吸収をもつ土壌由来の夾雑物の影響などで、濃度が実際より高く見積もられてしまう場合があるものの、竹迫は深さ 0.4m まで、戸島は深さ 1.6m までの土壌表層に多くの微生物が存在することが考えられた。

### 2 脱窒遺伝子の検出とイオン成分の関係

表 4 土壌試料における DNA 抽出量

竹迫

試料	深さ(m)	DNA 量 (ng)
(1)	0-0.4	9300
(2)	0.4-0.8	410
(3)	0.8-1.2	830
(4)	1.2-1.6	460
(5)	1.6-2.0	500
(6)	2.0-2.4	140
(7)	2.4-2.8	82
(8)	2.8-3.2	210
(9)	3.2-3.6	95
(10)	3.6-4	230
(11)	4-6	160
(12)	6-8	100
(13)	8-10	150
(14)	10-11*	290
(15)	11-13	100
(16)	13-15	220

戸島

試料	深さ(m)	DNA 量 (ng)
(1)	0-0.4	3400
(2)	0.4-0.8	1100
(3)	0.8-1.2	2100
(4)	1.2-1.6	1100
(5)	1.6-2.0	220
(6)	2.0-2.4	400
(7)	2.4-2.8	190
(8)	2.8-3.2	130
(9)	3.2-3.6	110
(10)	3.6-4	230
(11)	4-6	130
(12)	6-8	130
(13)	8-10	130
(14)	10-12	150
(15)	12-14	320

※ 試料（14）においては、区切る深さを誤ったため、2m 単位ではなく 1m 分の試料となっている。

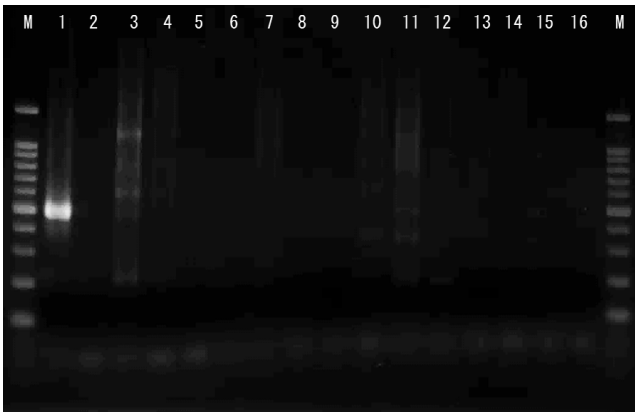


図 2 *nirK* 遺伝子泳動結果（竹迫）

1~16：竹迫の試料（1）～（16）

M：100bp ラダーマーカー



図 3 *nirK* 遺伝子泳動結果（戸島）

1~15：戸島の試料（1）～（15）

M：100bp ラダーマーカー

PCR法で *nirK* 遺伝子の塩基配列の一部 (472bp) を増幅後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を確認した結果を図 2 及び図 3 に示す。竹迫では (1) 0~0.4m の試料で、戸島では (1) 0~0.4m 及び (3) 0.8~1.2m の2つの試料で *nirK* 遺伝子の増幅が見られた。

一方、*nirS* 遺伝子の塩基配列の一部 (425bp) を増幅後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を確認した結果を図 4 及び図 5 に示す。竹迫では (1) 0~0.4m の試料で、戸島では (1) 0~0.4m, (3) 0.8~1.2m, (4) 1.2~1.6m の3つの試料で *nirS* 遺伝子の増幅が見られた。なお、竹迫の (4) 1.2~1.6m 以降及び戸島の (8) 2.8~3.2m 以降では非特異的な増幅と考えられる複数のバンドが確認された。

ここで、前報<sup>5)</sup>で本調査地点における土壌溶出試験を実施していることから、脱窒遺伝子が検出された深さと土壌に含まれるイオン成分との関連について考察した。

表 5 に前報<sup>5)</sup>の表 1 を一部改変したものを再掲した。脱窒菌の活動には硝酸が不可欠であることから、まず硝酸イオン溶出量に注目した。竹迫では表層の 1 試料 (0~0.4m) で脱窒遺伝子を検出したのに対し、硝酸イオン溶出量は表層の 1 試料 (0~1m) でのみ 100  $\mu$ g/g を超える値を示した。戸島では深さ 1.6m までの試料で脱窒遺伝子を検出したのに対し、硝酸イオン溶出量は深さ 2m までの試料で 100  $\mu$ g/g を超える値を示した。土壌溶出試験では深さ 1m 単位で試料を調製し、分析を実施しているため、深さの完全な一致が見られたわけではないものの、土壌に含まれる硝酸イオン濃度の大きさと脱窒遺伝子の検出にはある程度の相関があると考えられた。

さらに、戸島の各イオン成分の溶出量に注目すると、カリウムイオンと塩化物イオンにおいて、硝酸イオンと同様に 2m を境に溶出量が急減する傾向が見られた。この2つのイオンは家畜ふん堆肥に含まれる主要な成分である<sup>10)</sup> ことから、2m までの深さには家畜ふん尿由来の成分がよく浸透していると考えられた。これらのことから、戸島では家畜ふん尿の土壌への浸透により、脱窒菌が必要とする硝酸イオン、電子供与体 (有機物など) が供給されたため、竹迫より深い土壌においても脱窒遺伝子を検出した可能性が考えられた。

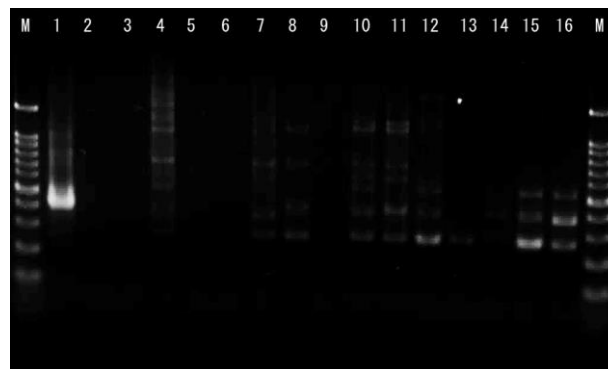


図 4 *nirS* 遺伝子泳動結果 (竹迫)

1~16: 竹迫の試料 (1) ~ (16)  
M: 100bp ラダーマーカー

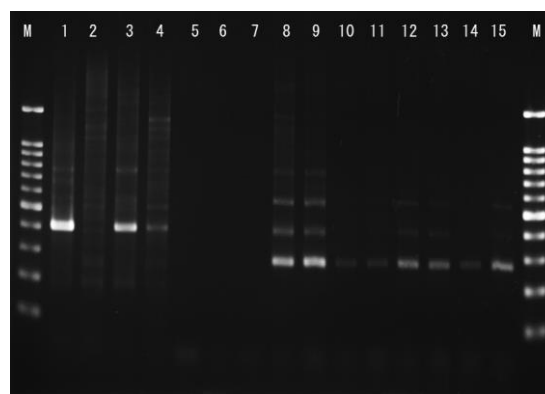


図 5 *nirS* 遺伝子泳動結果 (戸島)

1~15: 戸島の試料 (1) ~ (15)  
M: 100bp ラダーマーカー

### 3 *nirS* 遺伝子の塩基配列解析

Ishii ら<sup>11)</sup>によると、熊本の水田及び水田から転換したダイズ畑土壌を脱窒活性が高まる条件下で培養すると、*Pseudogulbenkiania* 属、*Dechloromonas* 属、*Azoarcus* 属などのベータプロテオバクテリア綱に属する脱窒菌が優占することが明らかとなっている。そこで、今回の土壌でこういった脱窒遺伝子をもつ菌が存在するかを調べるため、得られた PCR 産物の塩基配列情報を用いて遺伝子解析を行った。

表 6 に *nirS* 遺伝子の塩基配列をアミノ酸配列に変換し BLAST 検索を行った結果を示す。すべてのクローンにおいて、種々の uncultured bacterium の配列との相同性が最大となり、その配列をもつ菌についての十分な情報が得られなかった。一方で、データベースに登録されていた配列の環境的、地理的な由来等を示す Isolation source によると、海洋や河川、廃水等ではなく、主に農耕地の土壌由来の微生物の配列であったこ

とから、今回の実験で得られた *nirS* 遺伝子配列は妥当な結果であると考えられた。

次に、系統樹解析の結果を図 6 に示す。各クローンは、脱窒活性が高い条件で優占すると報告があったベータプロテオバクテリア綱だけでなく、アルファプロテオバクテリア綱に属するものも見られた。このことから、土壌には多様な菌が存在していることが考えられた。

なお、今回は硝酸イオン中の各種安定同位体比の測定やアセチレンブロック法による脱窒活性の測定などの脱窒の有無や程度を検証する実験を行っておらず、実際の土壌で脱窒が起きていたかは明らかでない。したがって、脱窒遺伝子の検出や解析した脱窒菌の情報のみで脱窒の有無を判断することは難しい。しかしながら、脱窒菌の活動に必要な要素がいくつか揃っていることから、土壌の還元状態の進行や酸素濃度の低下などの環境が整うことで脱窒が起きるものと考えられる。

#### ま と め

合志市竹迫及び熊本市東区戸島で得られたボーリング土壌の脱窒遺伝子 (*nirK*, *nirS*) に関する分析を行った。

両地点とも *nirK* 遺伝子、*nirS* 遺伝子を検出し、その分布は高濃度の硝酸イオンが含まれる土壌の深さと概ね一致していた。また、戸島において竹迫より深い土壌で脱窒遺伝子を検出したことについては、脱窒菌に必要な成分が家畜ふん尿の土壌への浸透により供給された可能性が示唆された。

実験で得られた *nirS* 遺伝子の塩基配列情報を用いた解析からは、竹迫及び戸島の土壌中の脱窒菌は特定の菌に近縁という傾向はなく、多様な種が存在すると考えられた。なお、遺伝子解析の結果は脱窒菌の存在を示すものであり、土壌中で脱窒が起きていることを証明するものではないため、今回の結果をもとに土壌表層で脱窒が起きていると結論づけることには注意が必要である。

今後、脱窒菌解析の対象を硝酸性窒素汚染が問題となっている地下水にも広げることで、新たな知見が得られることが期待される。

#### 謝辞

本調査の実施については、国立大学法人熊本大学大学院先導機構の細野准教授及び熊本県環境保全課の榮田智志氏に多大なご協力をいただきました。

また、分析にあたり技術指導及び機器等の使用を快諾していただいた古川真斗氏 (現 薬務衛生課) 始め微生物科学部の方々に深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 環境省：硝酸性窒素による地下水汚染対策手法技術集，(2009).
- 2) 齋藤光代，小野寺真一：日本水文学会誌，41 (3)，91-101 (2011).
- 3) 石井聡，多胡香奈子，妹尾啓史：化学と生物，49 (7)，479-484 (2011).
- 4) 安元純，廣瀬 (安元) 美奈，久手堅剛，宮城雄次，大城要平，聖川健斗，細野高啓，嶋田純，中野拓治：地下水学会誌，57 (2)，153-169 (2015).
- 5) 永田武史，前田敏孝，藤本貴大，上本清次：熊本県保健環境科学研究所報，44，67-74 (2014).
- 6) 糟谷真宏，恒川歩，前田美恵子：愛知県農業総合試験場研究報告，39，89-94 (2007).
- 7) 八槇敦，楠田隆，香川淳，古野邦雄：千葉県農林総合研究センター研究報告，5，41-46 (2013).
- 8) 加藤芳章，内田真理子，青木智子，野村暢彦，中島敏明，内山裕夫：環境バイオテクノロジー学会誌，10 (2)，109-114 (2010).
- 9) Throback IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S. : *FEMS Microbiol Ecol*, 49, 401-417 (2004).
- 10) 小柳渉：畜産環境技術情報，41，13-15 (2008).
- 11) Ishii S, Yamamoto M, Tago K, Otsuka S, and Senoo K. : *Soil Sci. Plant Nutr*, 56, 220-224 (2010).

表 5 竹迫及び戸島の土壤溶出液における各イオン成分の溶出量

竹迫

深さ(m)	溶出量(μg/g)											
	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
0-1	9.19	0.22	116.3	5.2	37.9	3.3	9.1	0.25	0.05	121.6	136.8	0.15
1-2	17.9	0.01	26.2	18.1	133.1	1.3	23.1	0.03	0.01	18.2	425.4	< 0.01
2-3	38.8	< 0.01	3.0	11.4	59.8	0.8	5.6	0.02	0.01	7.1	277.3	< 0.01
3-4	32.6	< 0.01	3.2	4.7	12.8	0.6	1.6	0.01	< 0.01	0.6	128.2	< 0.01
4-5	36.6	< 0.01	5.7	3.8	9.0	0.7	2.1	0.02	< 0.01	0.6	124.2	< 0.01
5-6	37.7	< 0.01	8.8	3.0	6.6	0.6	3.2	0.01	< 0.01	2.0	114.3	0.03
6-7	32.0	< 0.01	11.0	3.5	6.6	0.7	6.2	0.03	< 0.01	5.3	95.5	0.22
7-8	27.9	< 0.01	7.6	3.9	4.9	0.8	11.2	0.02	< 0.01	12.6	53.5	0.41
8-9	25.7	< 0.01	6.6	4.0	5.6	0.8	10.3	< 0.01	0.01	14.4	39.3	0.33
9-10	20.8	< 0.01	6.7	3.1	5.2	0.7	6.2	< 0.01	0.01	11.8	20.2	0.28
10-11	15.7	0.01	10.1	2.3	4.9	0.5	4.5	< 0.01	0.01	10.3	17.8	0.29
11-12	13.5	0.01	10.9	2.1	5.4	0.3	3.3	< 0.01	0.01	9.9	18.2	0.21
12-13	13.0	< 0.01	11.5	2.2	5.3	0.3	2.8	< 0.01	< 0.01	10.4	16.9	0.13
13-14	12.6	< 0.01	11.1	1.8	4.3	0.2	2.7	< 0.01	0.01	10.6	15.6	0.13
14-15	11.9	0.01	10.9	1.8	4.1	0.2	3.0	< 0.01	0.01	9.9	18.5	0.22

戸島

深さ(m)	溶出量(μg/g)											
	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
0-1	23.0	1.83	243.4	16.7	53.5	2.0	28.1	0.24	0.07	176.2	346.5	0.04
1-2	26.7	0.24	173.1	24.4	96.7	1.1	24.5	0.08	0.06	183.0	448.9	< 0.01
2-3	50.3	0.02	11.4	17.5	79.3	0.9	9.9	0.02	0.02	75.1	332.1	< 0.01
3-4	41.2	< 0.01	2.2	4.5	16.9	0.4	6.8	0.01	0.01	37.0	124.4	< 0.01
4-5	47.1	< 0.01	3.6	2.9	7.7	0.4	7.4	< 0.01	0.01	48.2	95.3	0.05
5-6	45.1	< 0.01	4.4	1.8	3.7	0.4	6.8	0.01	0.02	54.4	66.0	0.07
6-7	28.1	0.01	3.7	1.2	1.8	0.6	7.5	0.01	0.01	41.8	9.5	0.32
7-8	27.0	0.01	5.6	1.8	3.4	0.6	6.2	0.01	0.01	30.2	0.3	0.23
8-9	24.7	< 0.01	7.1	1.5	3.0	0.7	6.9	< 0.01	0.01	36.4	0.3	0.39
9-10	17.5	0.03	12.8	1.6	3.3	0.4	6.1	0.01	0.01	38.1	0.3	0.16
10-11	16.5	0.02	15.5	2.3	5.5	0.3	7.8	0.02	0.02	50.0	0.5	0.22
11-12	17.4	0.02	16.8	2.8	7.3	0.3	7.4	0.09	0.02	52.4	0.9	0.21
12-13	15.8	0.02	16.5	2.6	6.5	0.2	8.5	0.03	0.02	55.9	0.5	0.16
13-14	29.6	0.02	19.0	2.0	6	0.9	7.5	0.05	0.02	62.5	1.5	0.65

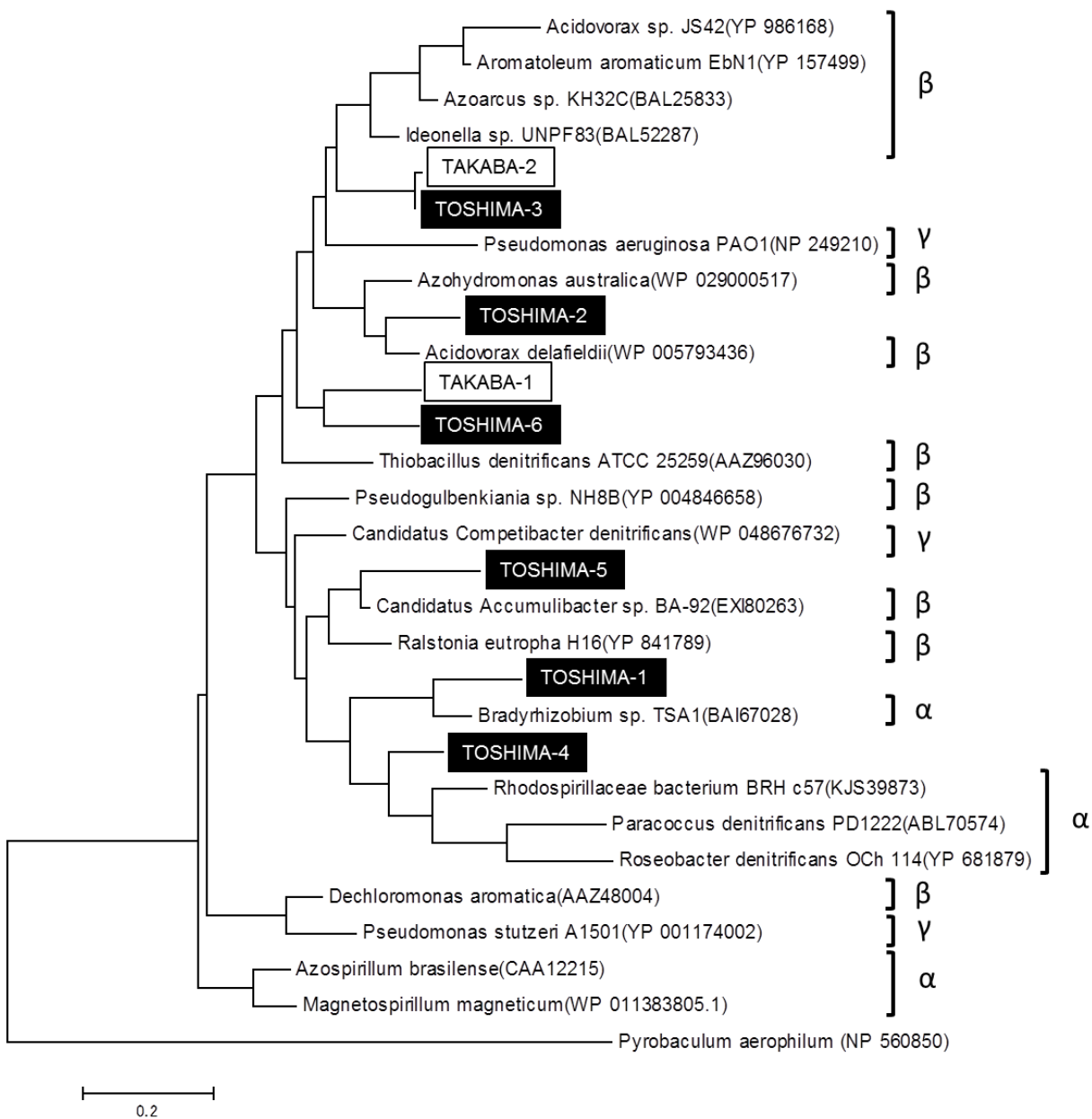


図6 *nirS* 遺伝子のアミノ酸配列に基づく系統樹解析結果

(図中の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  はそれぞれアルファプロテオバクテリア綱, ベータプロテオバクテリア綱, ガンマプロテオバクテリア綱を示す)

表 6 *nirS* 遺伝子のアミノ酸配列に基づく BLAST 検索結果

Origin	Sample name	Depth (m)	Genebank accession No.	Identities	Closest relative	Isolation source
戸島土壌	TOSHIMA-1	0 - 0.4	AGI99822	90% (101 bp/112 bp)	uncultured bacterium	wetland soil (China: Qinghai-Tibet Plateau)
	TOSHIMA-2		ALE65832	97% (110 bp/113 bp)	uncultured bacterium	agricultural soil (-)
	TOSHIMA-3	0.8 - 1.2	BAN58619	100% (110 bp/110 bp)	uncultured bacterium	an Andosol upland field soil (Japan: Kumamoto)
	TOSHIMA-4		BAR90742	93% (100 bp/108 bp)	uncultured bacterium	grassland soil (China: Inner Mongolia)
	TOSHIMA-5	1.2 - 1.6	AHY29485	98% (109 bp/111 bp)	uncultured bacterium	arable soil (-)
	TOSHIMA-6		ADB24976	96% (107 bp/112 bp)	uncultured bacterium	potato field (Canada)
竹迫土壌	TAKABA-1	0 - 0.4	ACF98445	96% (107 bp/111 bp)	uncultured bacterium	agricultural soil under corn (Canada: Ontario)
	TAKABA-2		BAN58619	99% (109 bp/110 bp)	uncultured bacterium	an Andosol upland field soil (Japan: Kumamoto)

※ Isolation source のカッコ内はその遺伝子配列が得られた場所の国や地域を示す。(-)は国や地域に関する記述がなかったもの。