

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実施状況報告書(平成24年度)

本様式の内容は一般に公表されます

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 <sub>2</sub> 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

### 1. 当該年度の研究目的

平成24年度は、野菜畑等のN<sub>2</sub>O発生ポテンシャルの高い圃場を選定し、23年度までに確立した手法を応用して、フィールドスケールでのN<sub>2</sub>Oの安定同位体比およびサイトプレファランス(SP)のモニタリング方法およびメタゲノム解析方法を確立することを目的とした。これにより、最終年度(平成25年度)に予定しているN<sub>2</sub>O削減に有効な施肥法や資材による多段階的削減方法を実施し、N<sub>2</sub>O生成微生物の生態への影響と削減効果を検証するという目標を達成する。

### 2. 研究の実施状況

- ①圃場におけるN<sub>2</sub>Oフラックス連続モニタリング、安定同位体自然存在比およびSPの測定  
作物残さは重要なN<sub>2</sub>O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い。また近年、作物の種類により、残さからの発生量が大きく異なる可能性が報告されている。一方、残さからのN<sub>2</sub>O発生メカニズムについては研究例がない。このため、24年度はキャベツ圃場において、N<sub>2</sub>O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およびSPの測定を実施した。その結果、キャベツ収穫残さが重要なN<sub>2</sub>O発生源であることが明らかになった。また、N<sub>2</sub>O安定同位体比およびSPの解析結果より、細菌による脱窒およびカビ脱窒がN<sub>2</sub>Oの発生経路と推定された。
- ②大雨後のN<sub>2</sub>Oバーストピークとそのメカニズムの解明(土壌インキュベーション実験)  
農環研の灰色低地土転換畑圃場において、大雨後に非常に大きなN<sub>2</sub>O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、土壌インキュベーション実験を行った。その結果、大雨前の土壌水分がバーストピークの発生の有無を左右し、大雨前に土壌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。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。また従来は脱窒関連遺伝子のうち、N<sub>2</sub>O還元酵素をコードするnosZ遺伝子の発現が他の脱窒関連遺伝子の発現よりも遅れるため大雨後のN<sub>2</sub>O発生が起こるといわれていたが、本実験において脱窒に関連するDNA・mRNAを解析した結果、nosZ遺伝子の発現の遅れはみられないことが明らかになった。
- ③脱窒カビの培養と安定同位体自然存在比およびSPの測定  
茨城大学不耕起圃場において採取したN<sub>2</sub>Oサンプルおよび同圃場から単離した脱窒カビの培養実験によるN<sub>2</sub>Oサンプルの安定同位体自然存在比およびSPの分析を行った結果、圃場におけるN<sub>2</sub>Oの主な発生源はカビ脱窒ではなく、細菌による脱窒が主であると考えられた。
- ④N<sub>2</sub>O発生に関与する微生物と機能遺伝子群の解析  
N<sub>2</sub>Oフラックスデータに基づきN<sub>2</sub>O発生ピークにおいて採取した土壌から調製したDNAまたはmRNA、rRNAを解析し、N<sub>2</sub>O発生に関与する微生物と機能遺伝子群を解析した。まず高純度土壌RNA調製を最適化し、解析に必要な純度と量のRNAを調製する方法を確立した。次

様式19 別紙1

に DNA レベルで N<sub>2</sub>O 発生関連遺伝子 (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。以上の結果に基づき上記②の土壌化学と微生物学の融合的実験を実施し成果を得た。

以上、同位体解析と微生物遺伝子解析を統合的に展開し、最終年度(平成25年度)の N<sub>2</sub>O 削減に有効な技術を N<sub>2</sub>O 生成微生物の生態的解析から検証へとつなげる。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 6 件            1. Itakura M, Uchida Y, <u>Akiyama H</u>, Hoshino TY, Shimomura Y, Morimoto S, Tago K, Wang Y, Hayakawa C, Uetake Y, Sanchez C, Eda S, Hayatsu M, Minamisawa K (2013) Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by <i>Bradyrhizobium japonicum</i> inoculation, <i>Nature Climate Change</i>, 3, 208-212            2. <u>Akiyama H</u>, Morimoto S, Hayatsu M, Hayakawa A, Sudo S, Yagi K (2013) Nitrification, ammonia-oxidizing communities, and N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fluxes in an imperfectly drained agricultural field fertilized with coated urea with and without dicyandiamide, <i>Biology and Fertility of Soils</i>, 49(2), 213-223            3. Yamamoto A, <u>Akiyama H</u>, Naokawa T, Yagi K (2012) Effect of lime-nitrogen application on N<sub>2</sub>O emission from an Andosol vegetable field, <i>Soil Science and Plant Nutrition</i>, 58(2), 245-254            4. Uchida Y, Nishimura S, <u>Akiyama H</u> (2012) The relationship of water-soluble carbon and hot-water-soluble carbon with soil respiration in agricultural fields, <i>Agriculture Ecosystems &amp; Environment</i>, 156, 116-122            5. Nishina K, <u>Akiyama H</u>, Nishimura S, Sudo S, Yagi K (2012) Evaluation of uncertainties in N<sub>2</sub>O and NO fluxes from agricultural soil using a hierarchical Bayesian model, <i>Journal of Geophysical Research</i>, 117(G4), doi:1.1029/2012JG002157            6. Uchida Y, Von Rein I, <u>Akiyama H</u>, Yagi K (2012) Contribution of nitrification and denitrification to nitrous oxide emissions in Andosol and from Fluvisol after coated urea application, <i>Soil Science and Plant Nutrition</i>, 59(1), 46-55            (掲載済み一査読無し) 計 1 件            1. 秋山博子, 早津雅仁 (2013) ダイズ根粒菌を活用した温室効果ガスの抑制, ニューカンントリー, 北海道協同組合通信社, 707            (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件            1. 秋山博子, 内田義崇, 星野(高田)裕子, 下村有美, 森本品, 多胡香奈子, 王勇, 早川(荒木)千嘉, 板倉学, 早津雅仁, 南澤究 (2012) N<sub>2</sub>O 還元酵素活性を強化した根粒菌接種によるダイズ畑から発生する N<sub>2</sub>O の削減 1 -異なる土壌における nosZ 強化株接種の効果, 日本土壌肥料学会 講演要旨集, 58, 181, 2012 年 9 月 4 日~6 日            2. Uchida Y, Von Rein I, <u>Akiyama H</u> (2012) Changes in nitrification and denitrification potentials after coated urea application affect soil N<sub>2</sub>O emissions from different soils - a <sup>15</sup>N tracer study, 4th International Congress EUROSOL 2012, 1499, 2012 年 7 月 2-6 日            3. 内田義崇, 秋山博子, 星野(高田)裕子, 下村有美, 森本品, 多胡香奈子, 王勇, 板倉学, 早津雅仁, 南澤究 (2012) N<sub>2</sub>O 還元酵素活性を強化した根粒菌接種によるダイズ畑から発生する N<sub>2</sub>O の削減 2 -黒ボク土畑における nosZ+および nosZ 強化株接種の効果, 日本土壌肥料学会 講演要旨集, 58, 181, 2012 年 9 月 4 日~6 日            4. 山本昭範, 秋山博子, 直川拓司, 八木一行 (2012) 灰色低地土における N<sub>2</sub>O 放出に与える石灰窒素の影響, 日本土壌肥料学会 講演要旨集, 58, 189, 2012 年 9 月 4 日~6 日            5. 松浦江里, 須藤重人, 秋山博子, 大浦典子, 岸本文紅, 田野中武志 (2012) ガスフラックス測定のための可搬型サンプリング草地(AGSS)の応用事例と課題 Applications and tasks in an automated gas sampling system for long-term monitoring of gas fluxes from soils (AGSS), 日本土壌肥料学会 講演要旨集, 58, 186, 2012 年 9 月 4 日~6 日            6. Wang Y, Nagaoka K, Hayatsu M, Sakai Y, Tago K, Asakawa S, <u>Akiyama H</u>, Fujii T (2012) A novel method for RNA extraction from soil revealed amoA genes expressed in Andosols in response to ammonium sulfate treatment, JASME2012 The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology, JK-ISME2012 The 4th Japan-Korea International Symposium on Microbial Ecology Program &amp; Abstracts, PB-12, 2012 年 9 月 19 日~22 日            7. Shimomura Y, Tokuda S, Tago K, Wang Y, Hoshino TY, Uchida Y, <u>Akiyama H</u>, Hayatsu M (2012) Analysis of community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in agricultural soils under long-term application</p>

様式19 別紙1

	<p>of chemical fertilizer and cow manure, JASME2012 The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology, JK-ISME2012 The 4th Japan-Korea International Symposium on Microbial Ecology Program &amp; Abstracts, 143 2012年9月19日~22日</p> <p>8. 星野裕子, 板倉学, 多胡香奈子, <u>秋山博子</u>, 下村有美, 内田義崇, 森本晶, 早川(荒木)千嘉, 早津雅仁, 南澤究 (2012) N<sub>2</sub>O還元酵素活性を強化したダイズ根粒菌の利用に向けた培養・接種・検出方法の確立, 日本土壌肥料学会 講演要旨集, 58, 180, 2012年9月4日~6日</p> <p>9. 山本昭範, <u>秋山博子</u>, 直川拓司, 八木一行 (2013) 石灰窒素が灰色低地土からのN<sub>2</sub>O放出に与える影響, 第60回日本生態学会大会, P2-456, 2013年3月5~9日</p> <p>10. 内田義崇, <u>秋山博子</u> (2013) 畑地土壌からのN<sub>2</sub>Oガス排出削減-新しい技術の必要性と可能性, 第60回日本生態学会大会, H2-25, 2013年3月5~9日</p> <p>一般向け 計0件</p>
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	<p>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</p> <p><a href="http://www.niaes.affrc.go.jp/magazine/155/mgzn15501.html">http://www.niaes.affrc.go.jp/magazine/155/mgzn15501.html</a></p>
国民との科学・技術対話 の実施状況	<p>1) 24年4月20日、農業環境技術研究所一般公開においてミニ講演会「農地から出る温室効果ガスを削減する」を午前、午後の2回行い、中学生～一般の方を対象に、30名×2回の一般向け公演を行った。</p> <p>2) 25年1月22日、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-において、「農耕地土壌からの一酸化二窒素発生とその削減」のタイトルで茶農家や一般の方を対象に講演を行った。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	<p>25年1月24日、中日新聞17面、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-における一般向け講演の内容が掲載された。</p>
その他	

4. その他特記事項

なし

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	110,000,000	29,920,000	40,040,000	40,040,000	0
間接経費	33,000,000	8,976,000	12,012,000	12,012,000	0
合計	143,000,000	38,896,000	52,052,000	52,052,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	3,682,738	40,040,000	0	43,722,738	42,258,065	1,464,673	0
間接経費	1,104,821	12,012,000	0	13,116,821	12,677,419	439,402	0
合計	4,787,559	52,052,000	0	56,839,559	54,935,484	1,904,075	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	21,249,587	ゲル撮影装置、小型冷凍機、理化学消耗品等
旅費	912,470	国内外学会発表、国内打合せ
謝金・人件費等	15,903,509	ポスドク人件費、研究補助者賃金
その他	4,192,499	研究機器修理費、学会参加費
直接経費計	42,258,065	
間接経費計	12,677,419	
合計	54,935,484	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
核酸電気泳動装置	Bio-rad 170- 9078J1	1	992,250	992,250	2013/1/24	農業環境技術研 究所
ゲル撮影装置	Gel Doc XR Plus Labシステム	1	1,691,550	1,691,550	2013/1/24	農業環境技術研 究所
小型冷凍器	クリメコ小型冷凍 器 CC2006	1	1,890,000	1,890,000	2013/2/26	農業環境技術研 究所
PCR用サーマルサイ クラー	Veriti 96well	1	956,970	956,970	2013/2/26	農業環境技術研 究所
微生物用ファーメン タ	EYELA 249000 型式:M-1000A	1	508,725	508,725	2013/2/26	農業環境技術研 究所