

資源循環の最適化による農地由来の温室効果 ガスの排出削減

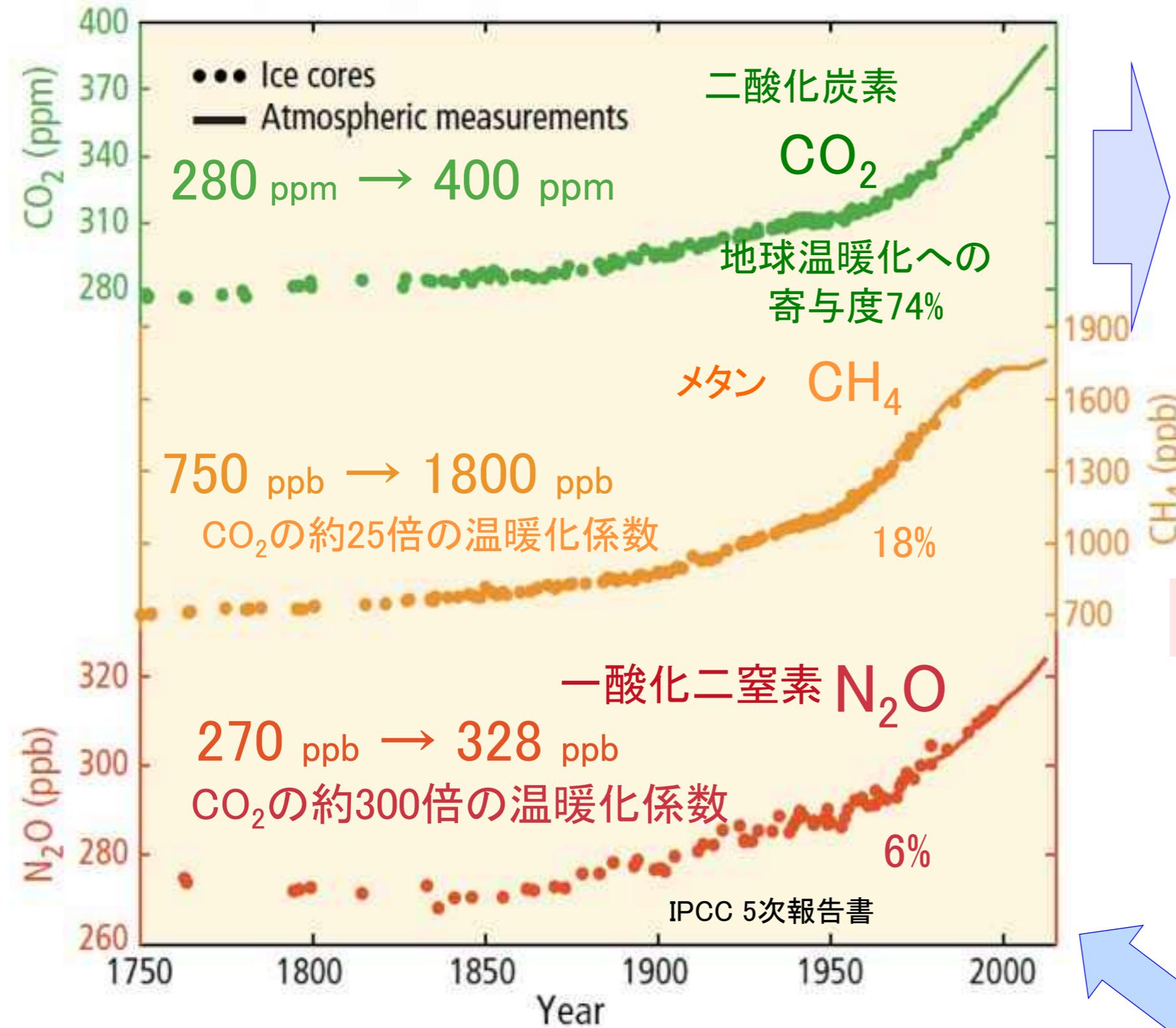


PM：南澤 究
国立大学法人東北大学大学院 生命科学研究科 特任教授

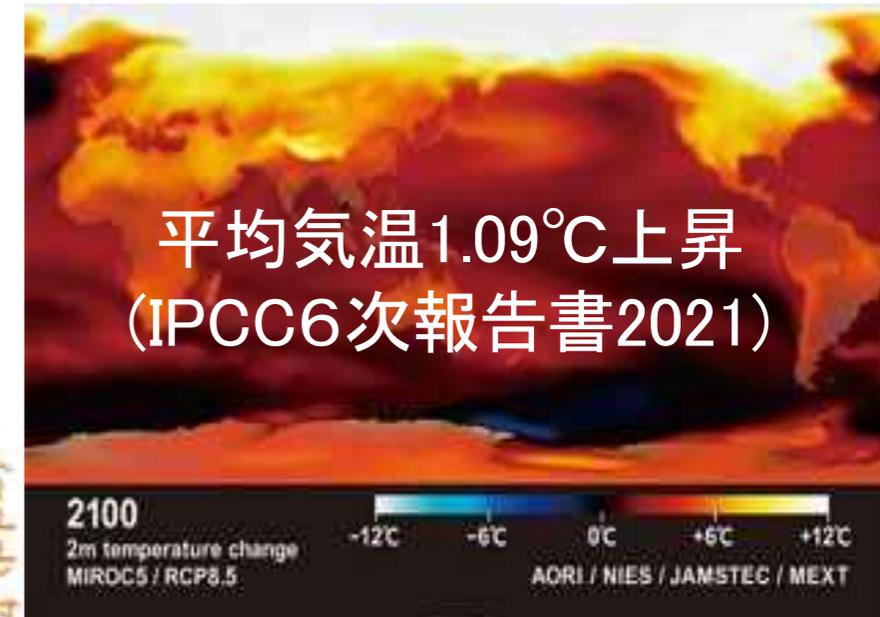
PJ参画機関：国立大学法人東北大学、国立大学法人東京大学
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

再委託機関：東京農工大学、岩手大学、帯広畜産大学、静岡大学、
産業技術総合研究所、茨城大学、愛媛大学、京都大学、
森林研究・整備機構、国立環境研究所、龍谷大学
東京工業大学、名古屋大学、理化学研究所、
bitBiome株式会社

大気中の温室効果ガス(GHG)濃度の上昇



人為的なGHG排出による地球温暖化



気候変動リスクの増大

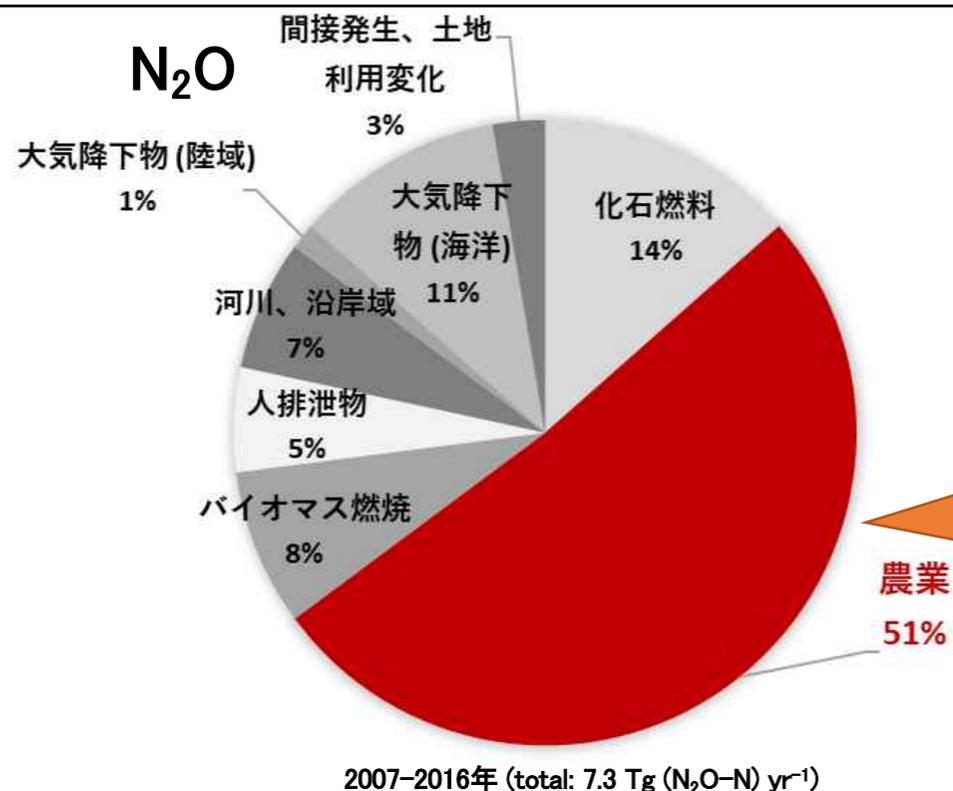
甚大な災害
生活基盤
の破壊



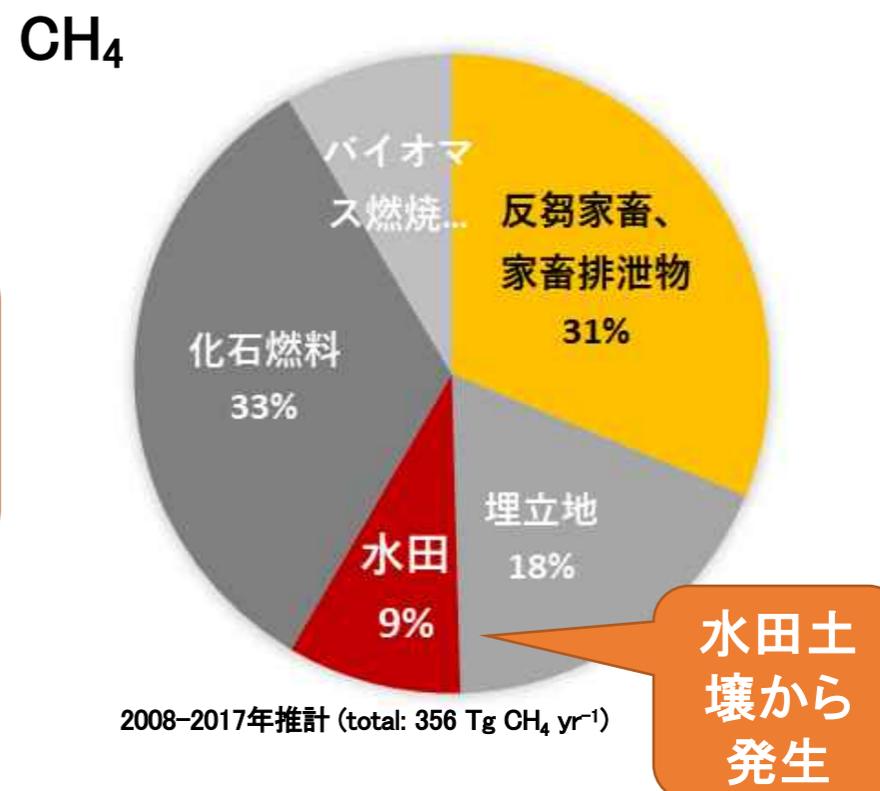
いかに CO_2 , CH_4 , N_2O の人為的な排出を削減するか？₂

気温上昇を産業革命時から1.5°C以内に抑える(パリ協定、COP26)ためには CO_2 以外の温室効果ガス削減も必須

農業はN₂OとCH₄の主要な人為的発生源



農地土壌や家畜排せつ物の管理から発生

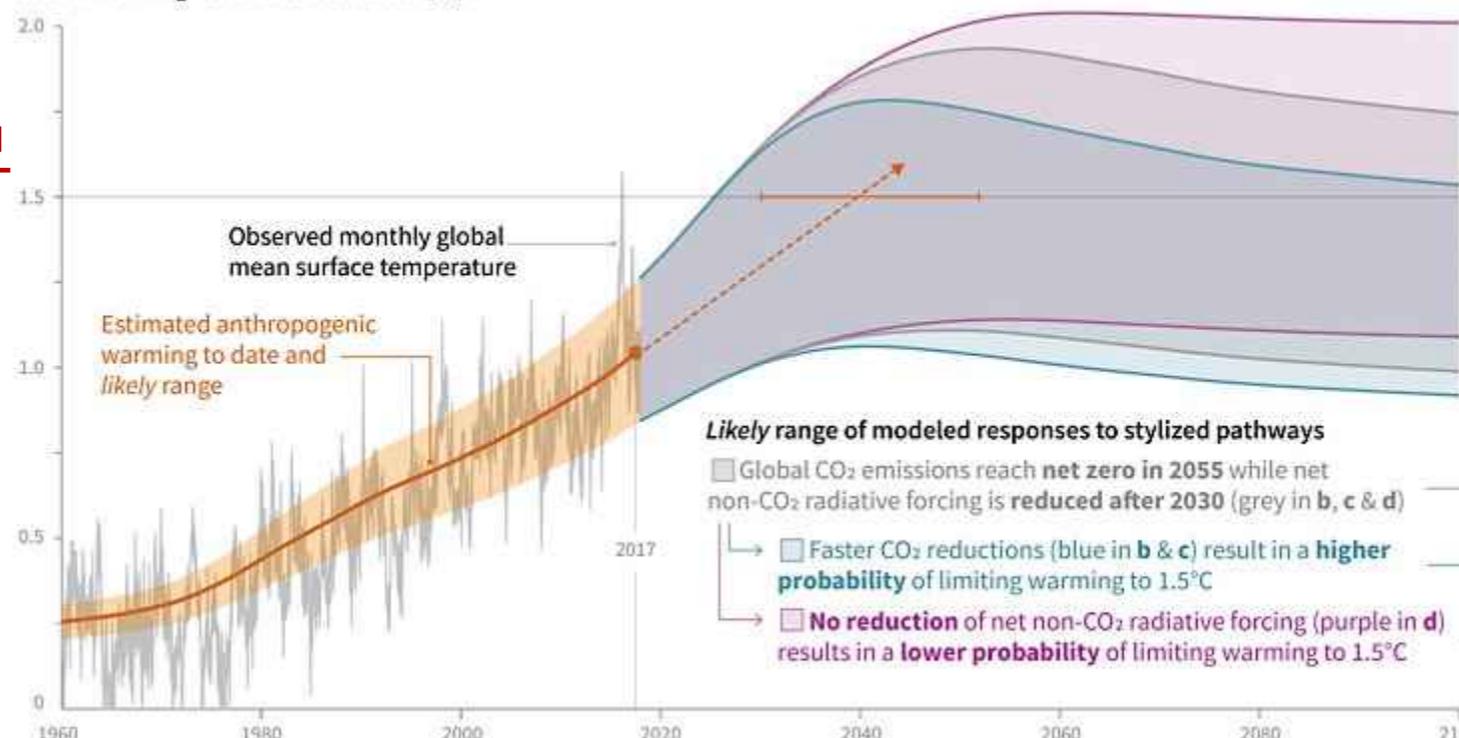


水田土壌から発生

世界のN₂OおよびCH₄の人為的発生源の内訳 (IPCC-AR6 WG1, 2021)

人為起源の排出に対する気温変化のモデル予測 (IPCC SR1.5°C, 2018)

Global warming relative to 1850-1900 (°C)



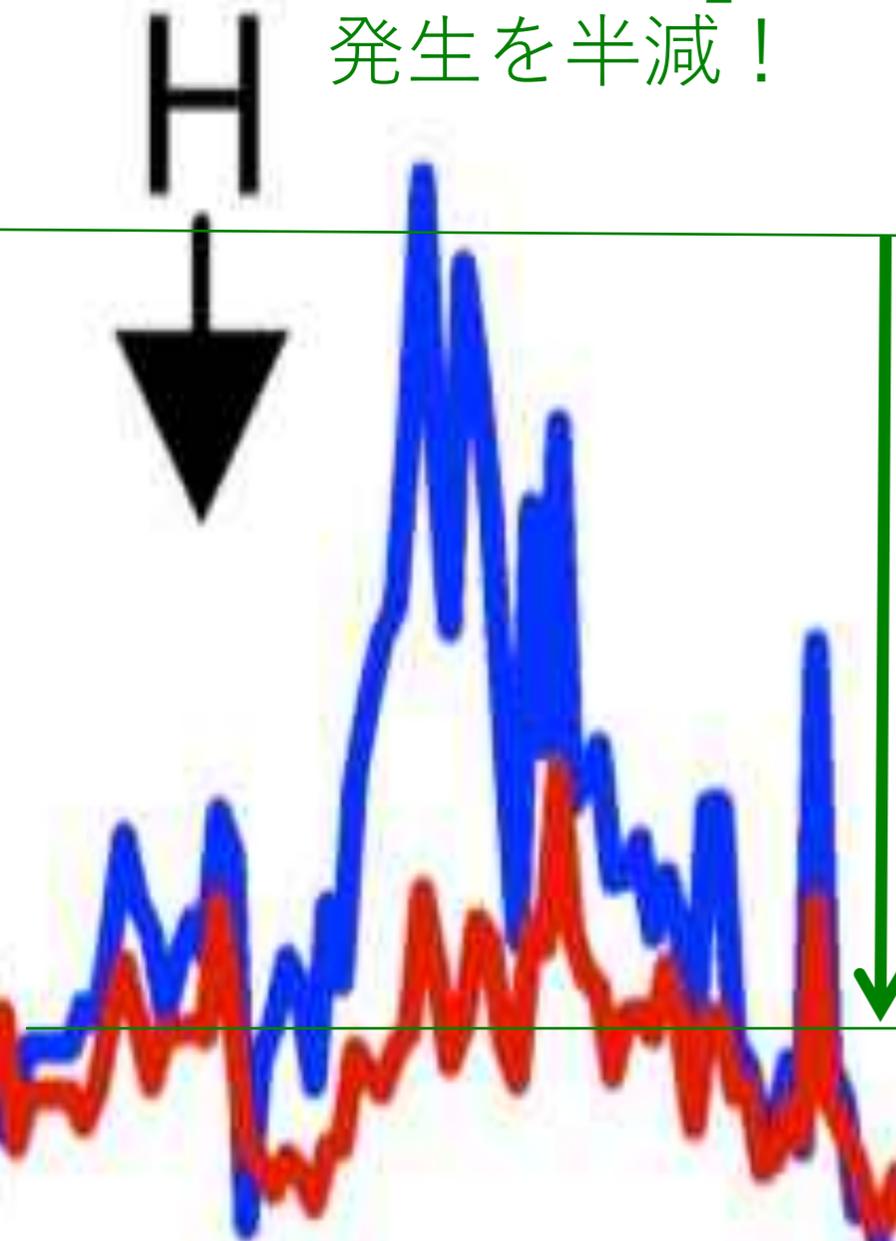
CO₂のみ削減では1.5°C以下の確率低

CO₂とCO₂以外のGHG削減で1.5°C未満確率上昇

CO₂急激な削減+CO₂以外GHG削減で1.5°C以下の確率高

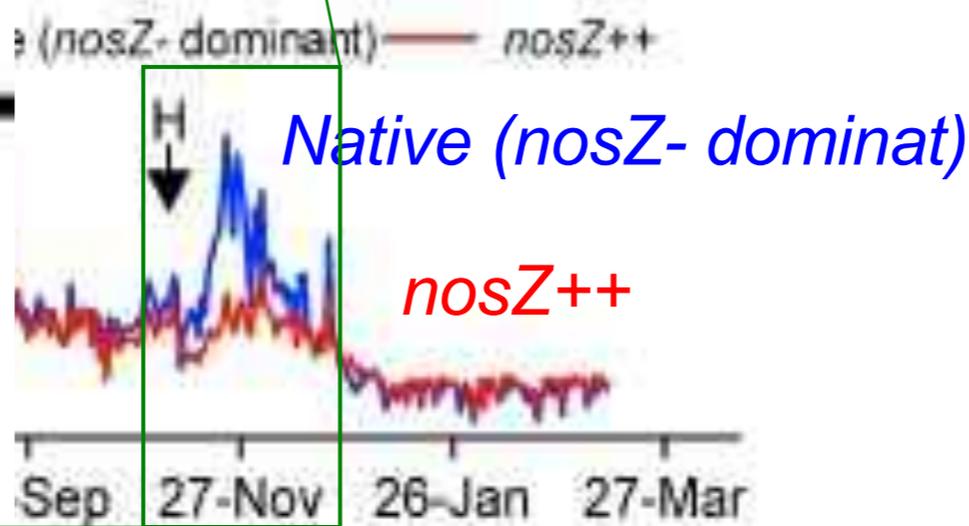
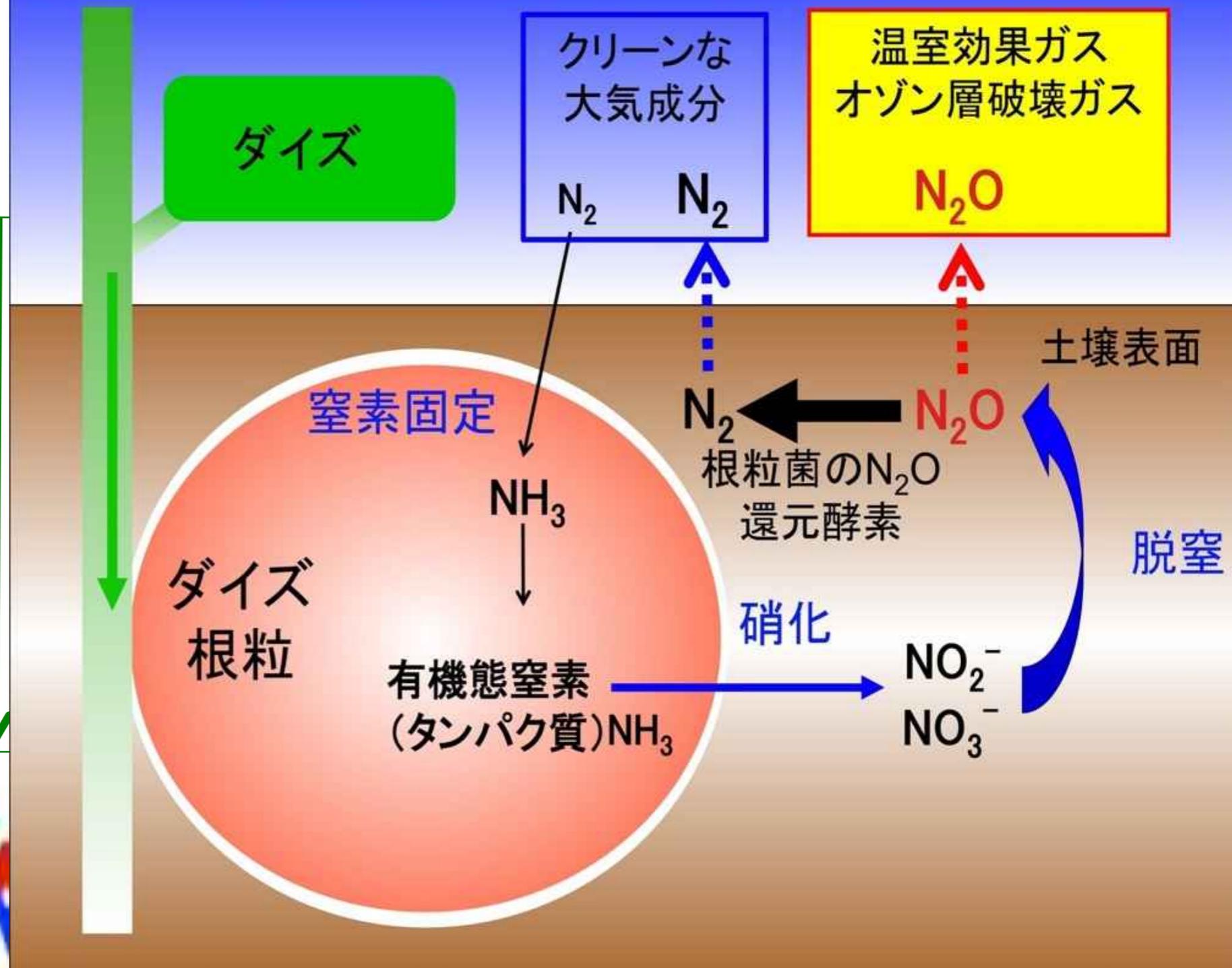
世界平均気温上昇を1.5°C以下に抑えるためにはCO₂削減に加え、N₂O・CH₄削減も重要

収穫期のN₂O発生を半減!



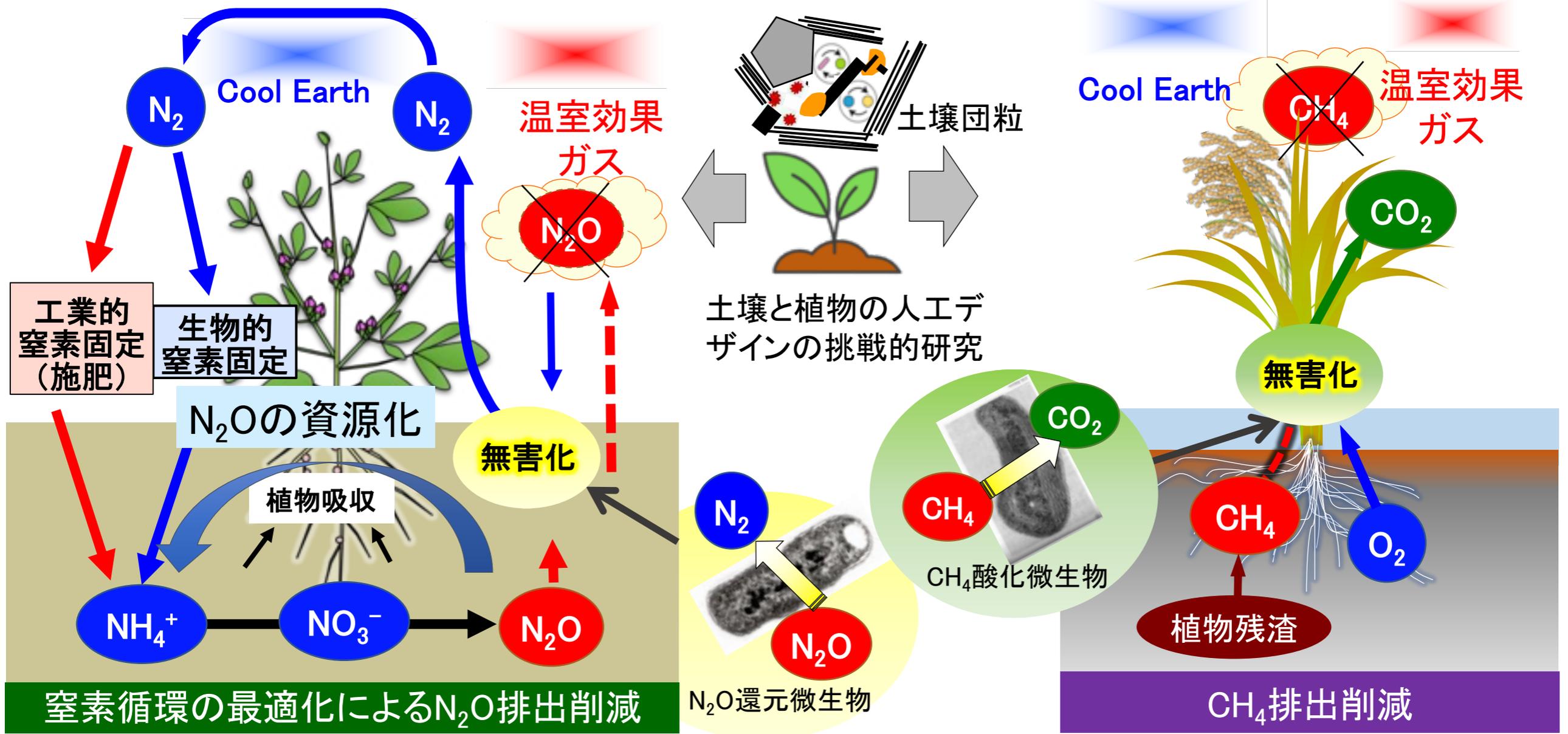
生物を利用した新規のN₂O発生削減

27-Nov



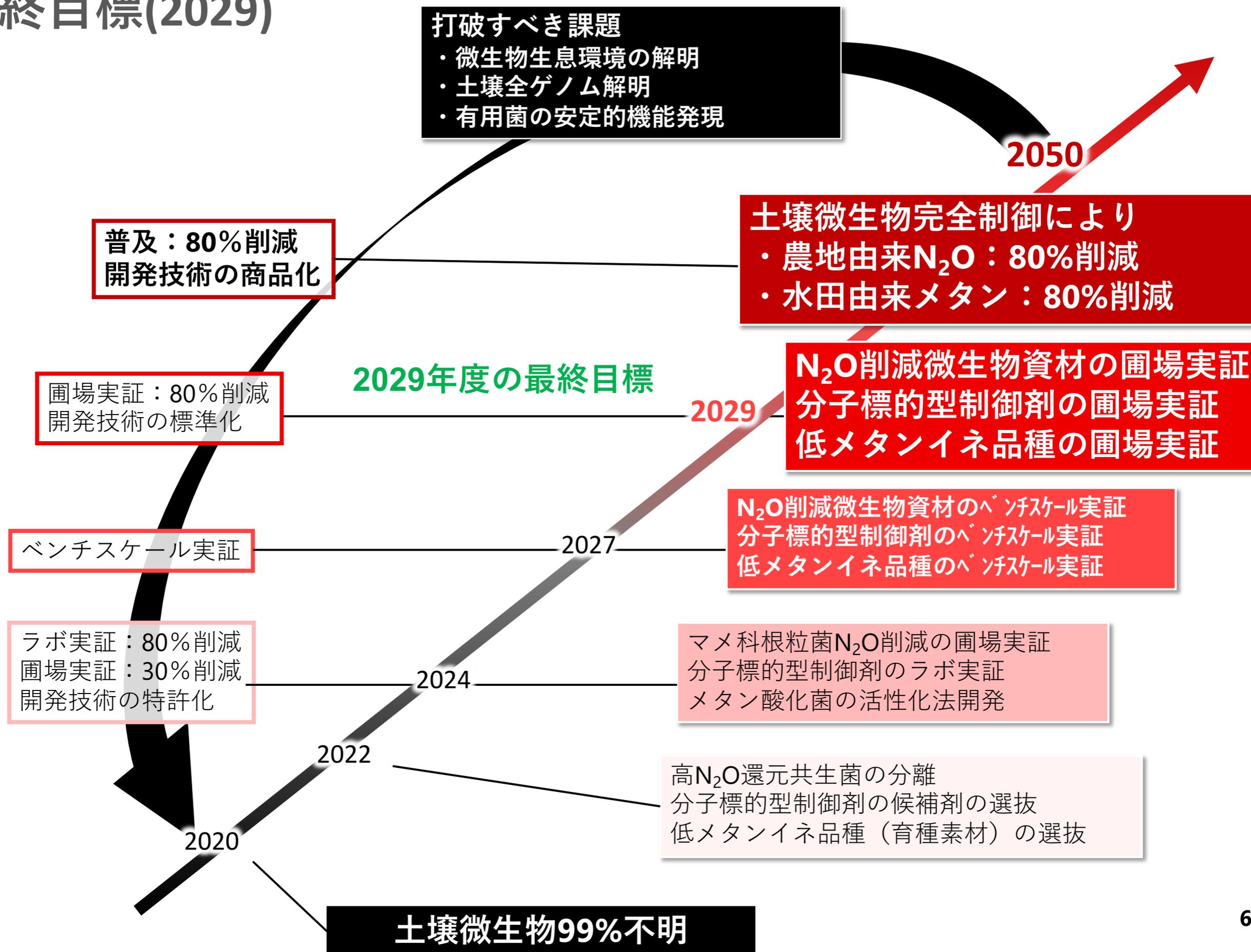
Itakura *et al.* Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. **Nature Climate Change, 2013**

2050年までに農地由来温室効果ガス N_2O と CH_4 の80%削減！
 N_2O ・ CH_4 を無害化する微生物を土壌団粒や植物のデザインにより利用



自然界の微生物多様性やあらゆる知見・技術を総動員して、人為的GHG発生の削減や持続的な窒素・炭素サイクルの実現を目指しています。

実施期間/開発スケジュール と最終目標(2029)



本プロジェクトの社会実装の全体イメージ(1)

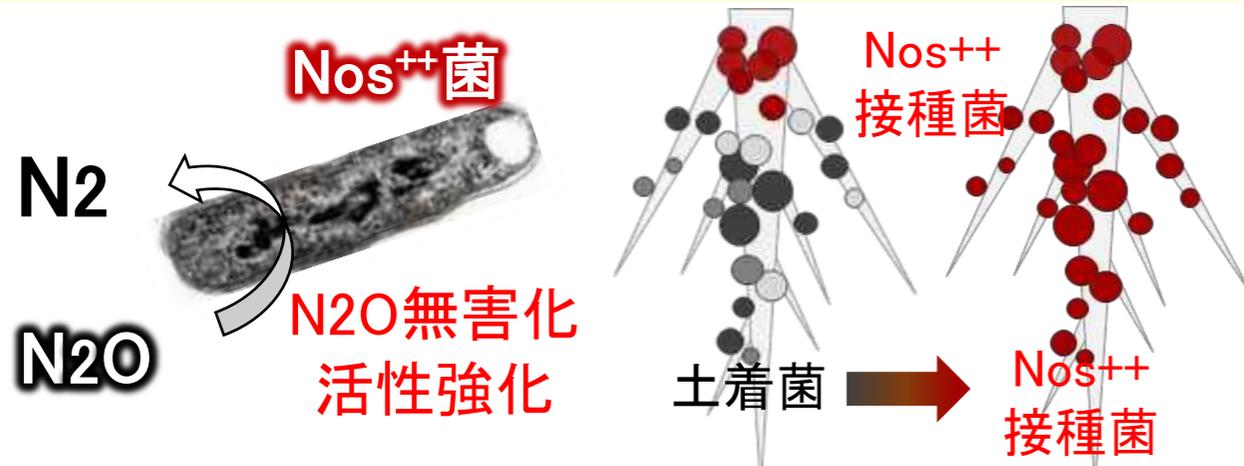


本プロジェクトの社会実装のイメージ(2)ダイズとイネ

2020 → 2024 → 2029

N₂O無害化根粒菌と微生物

・N₂O還元活性強化株(Nos⁺⁺)の探索・作出



・宿主作物の最適化によるNos⁺⁺菌優占化

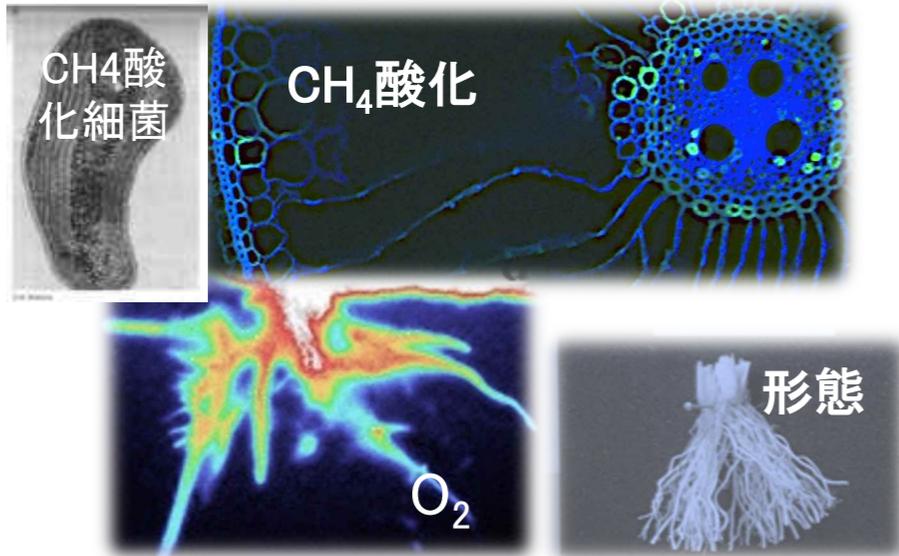
微生物 + 種子 + キャリア

Cool Erathのための微生物接種等の社会受容



CH₄無害化イネ栽培

イネの低メタン化技術の開発



低メタン化イネ
メタン酸化細菌

主要品種の低メタン化 + (メタン酸化菌)



南澤MSの大課題(実施体制)



土壌構造



N₂O循環



資材設計

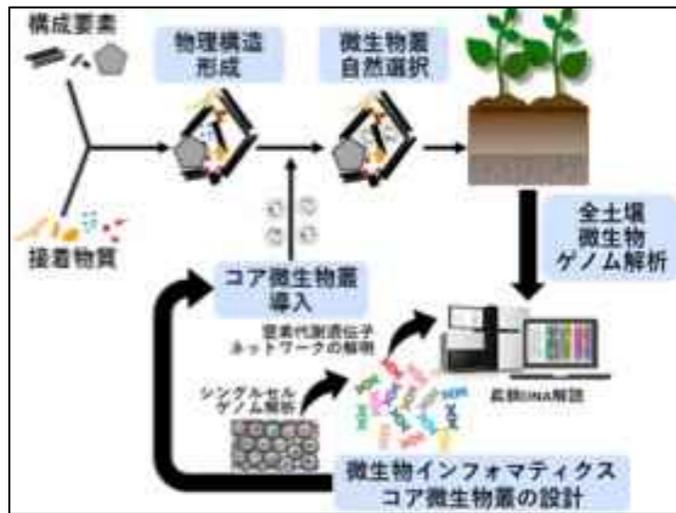


CH₄循環

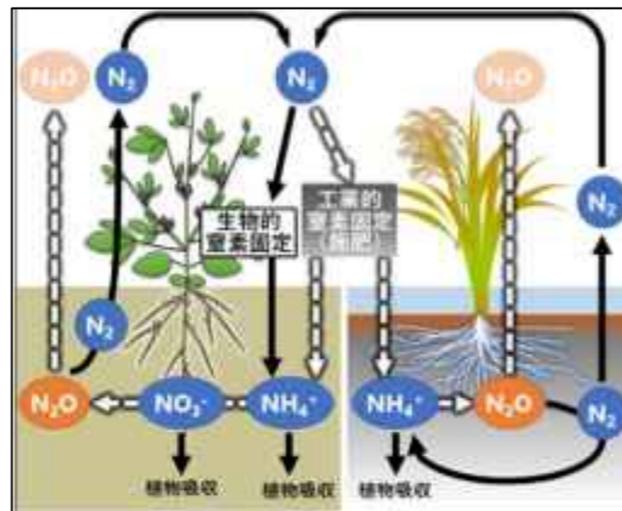


評価とモデル

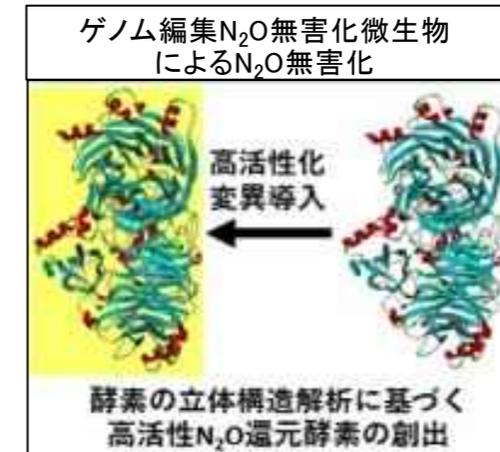
I. 土壌生態系デザイン(土壌構造)(7)



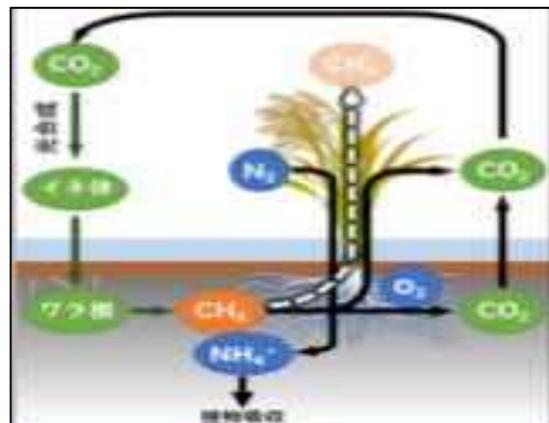
II. N₂O無害化・資源化微生物(N₂O循環)(12)



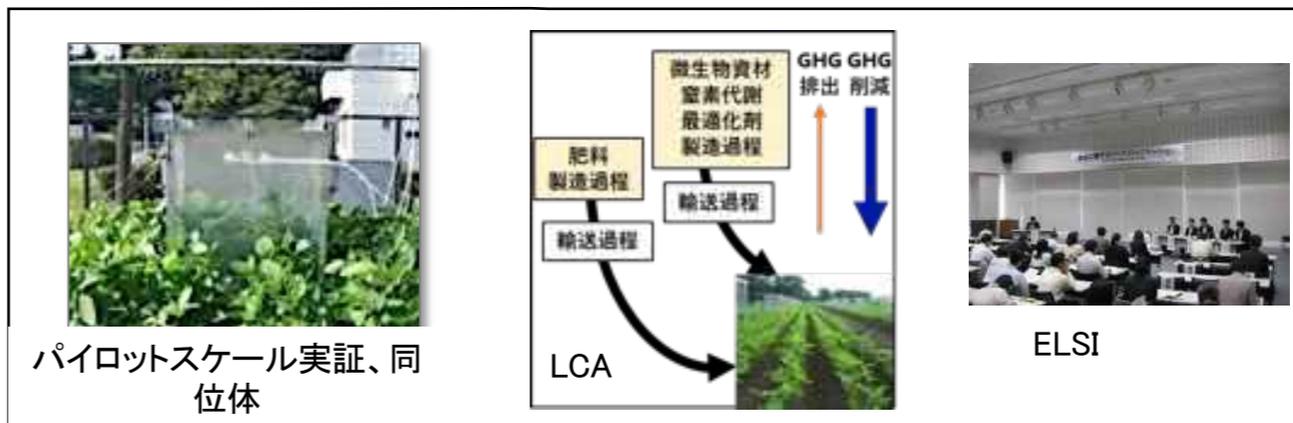
III. 微生物最適利用技術・窒素制御剤(資材設計)(3)



IV. 水田由来CH₄削減(CH₄循環)(3)



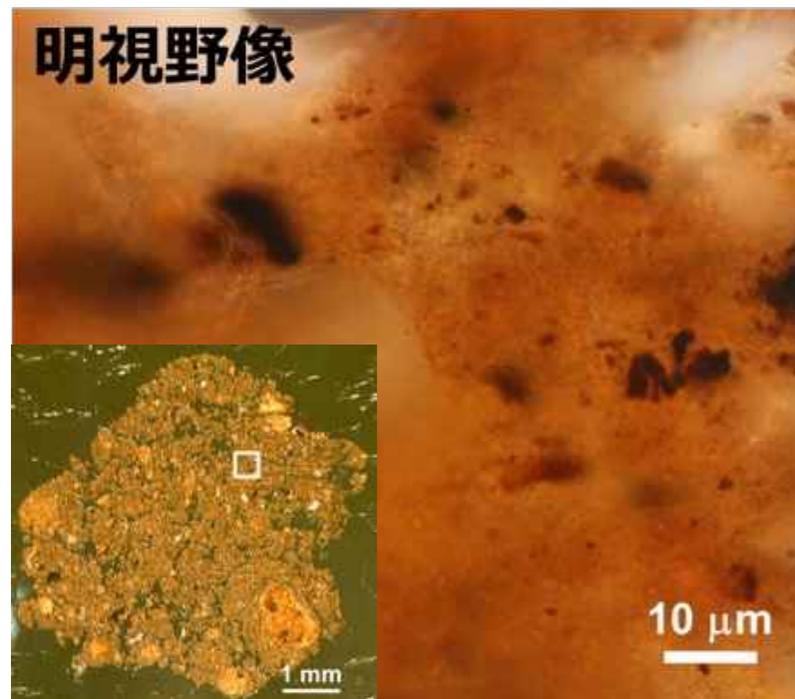
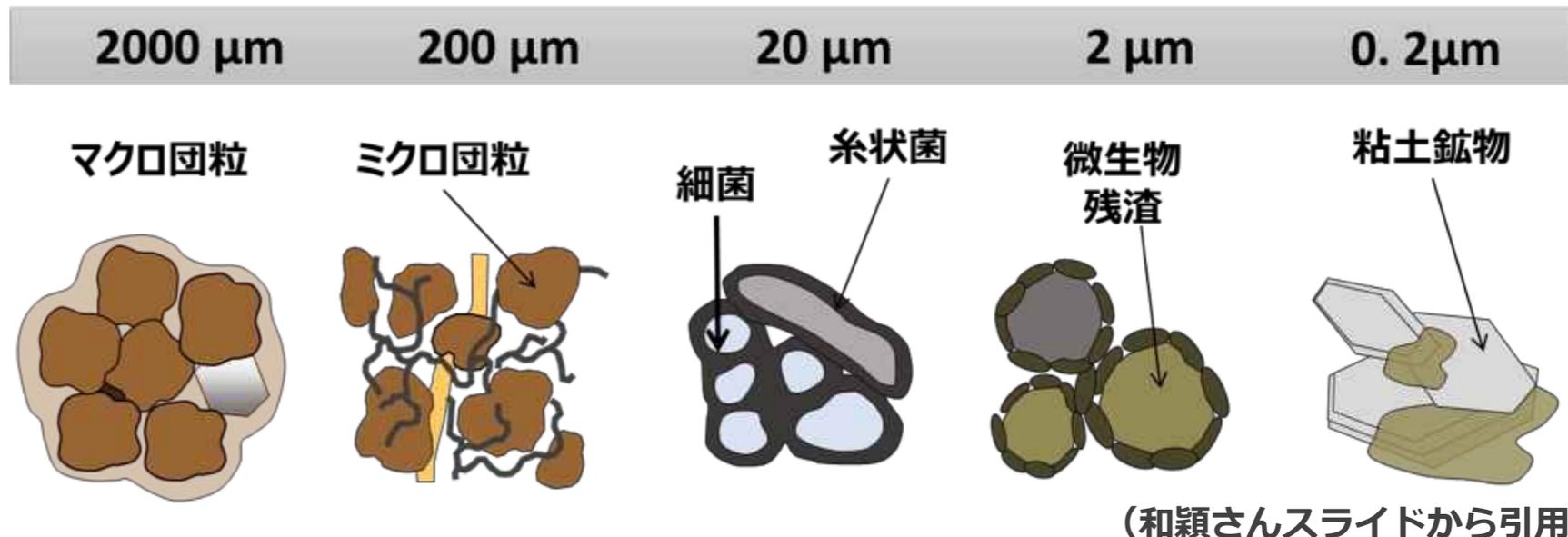
V. パイロットスケール実証・評価(評価とモデル)(6)



土壌団粒



土の微細粒子によって作られた凝集体



物理構造

化学量

微生物量

土壌団粒は土壌中の N_2O 発生(や消去)のホットスポット

自然の制御要因を調べれば、 N_2O 除去資材に必要な要素がわかる

課題I-1. 土壌構造と微生物生存の解明

研究開発目標（目標スペック）

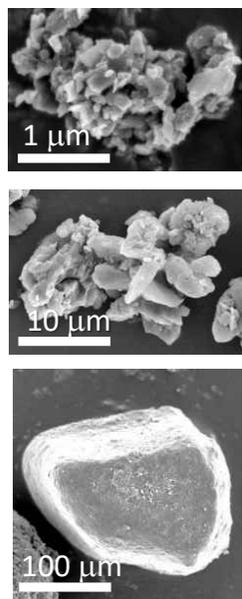
- ✓ R4年度までに、団粒形成過程における微生物代謝物と鉱物粒子の接着および複合体形成プロセスを解明
- ✓ R6年度までに、自然土壌を模した人工マイクロ団粒を作成
- ✓ 上記成果を踏まえ、R11年度までに、 N_2O 無害化機能を高めた人工団粒を作成しパイロットスケール実証

天然の土壌団粒の解析



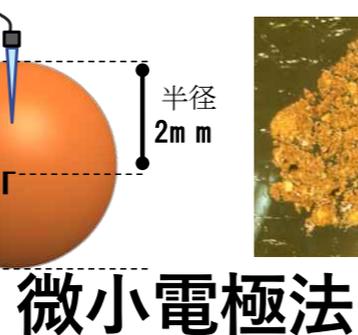
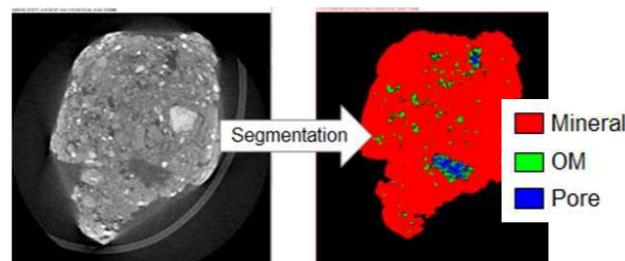
人工土壌団粒の作出

物理分画法

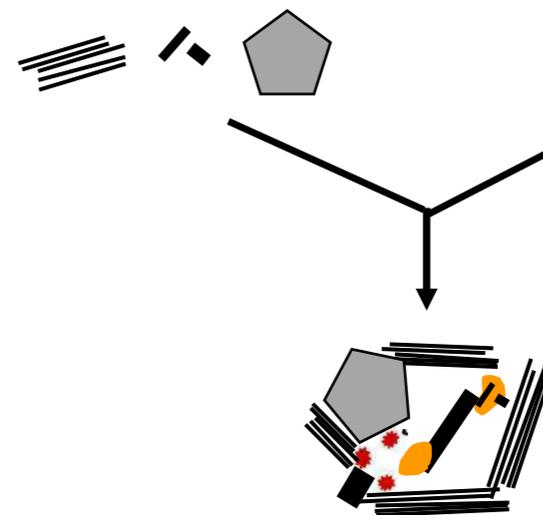


自然土壌団粒
(数十μm～数mm)

X線CT法



構成要素
(一次・二次鉱物)



接着物質
(有機物・金属等)

団粒形成メカニズム・接着物質の特定

人工団粒の作成
(自然土壌形成の加速化)

N₂O消去土壌団粒・資材に求められる要素が明らかに

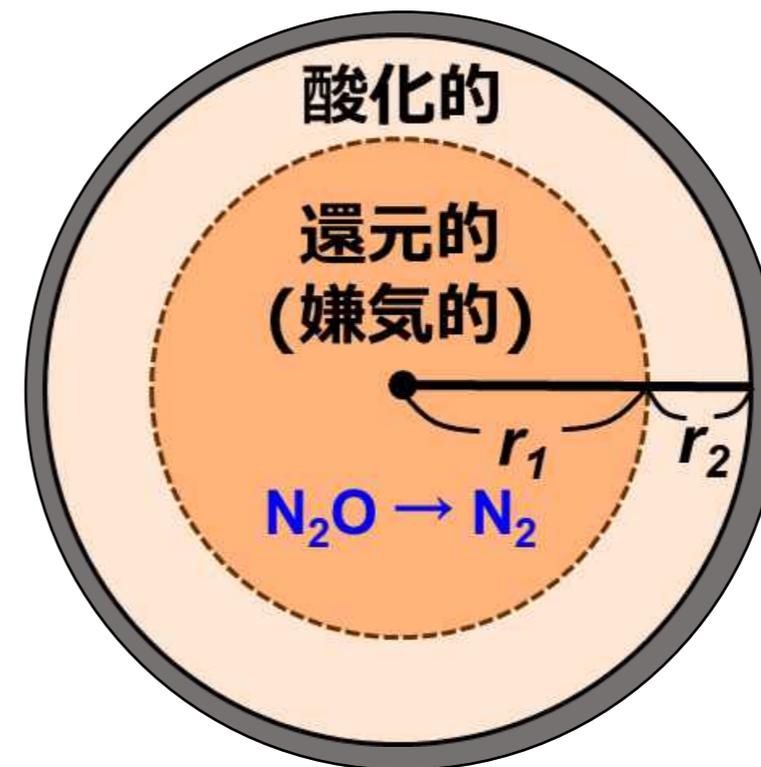
N₂O還元菌が高活性化する環境を提供する団粒資材

広い嫌気環境が長期間保持される団粒 ($r_1 > r_2$)

資材に必要な基本物性・要素

1. 耐水性
2. 粒径
3. 孔隙率
4. 形状
5. N₂O還元菌の種類
6. 孔隙サイズ
7. 粘土鉱物含有量

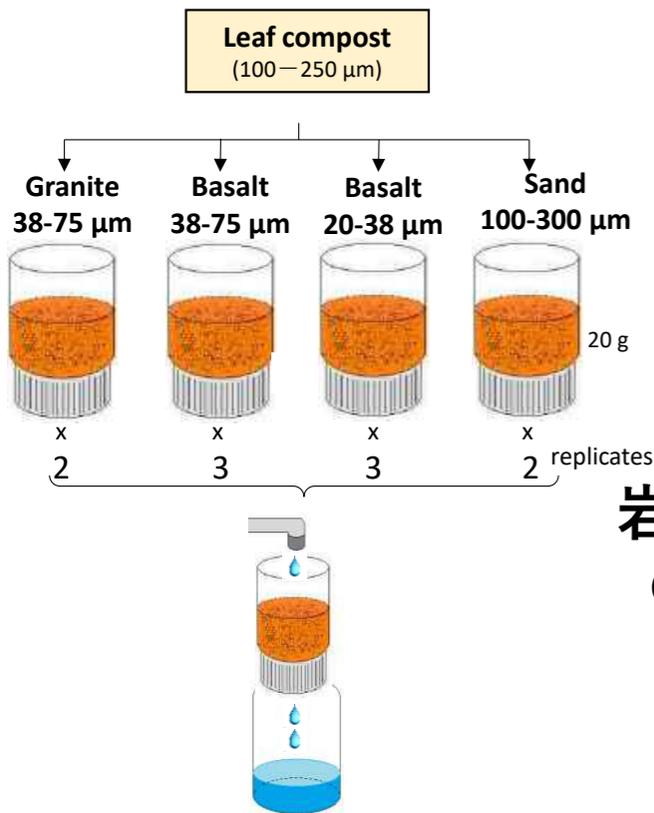
天然の土壌団粒の解析



他課題との連携により、高度化したハイブリッド資材も検討中

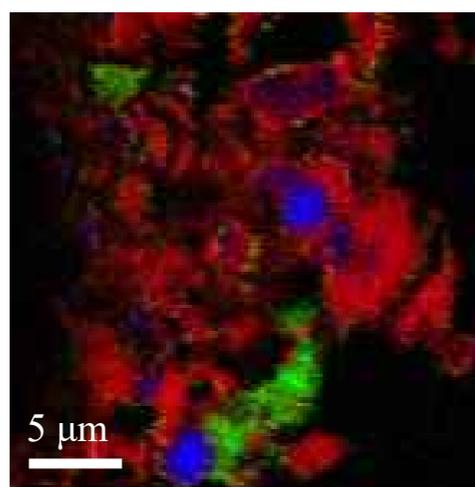
人工土壌団粒の作出

鉱物＋有機物素材からの人工団粒作成



岩石＋落葉堆肥（接着物質）の培養後に比重分画により団粒分離

団粒を構成する細粒画分（＝接着物質）の評価



ナノスケールでの存在形態情報

- Carbon
- Iron
- Aluminum

短期間で団粒形成が可能

8種類の母材の長期埋設試験



異なる化学組成の岩石粉末から異なる団粒構造・微生物群集組成の形成

N_2O 消去細菌

N_2O 除去能を保有する人工団粒のプロトタイプ作成に成功！

課題I-2全体で目指すもの

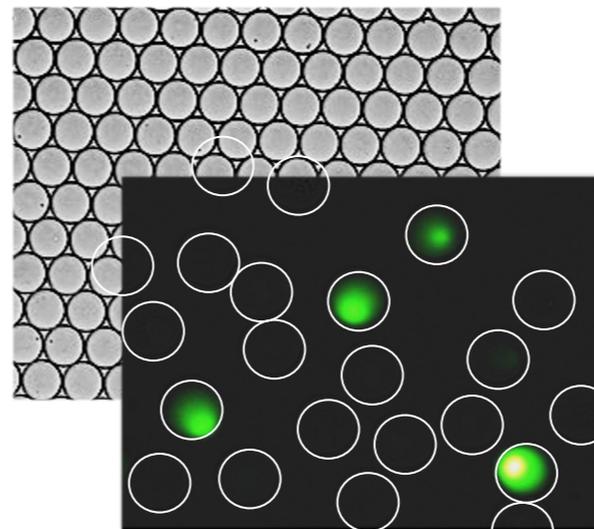
ロングリード
DNAシーケンス



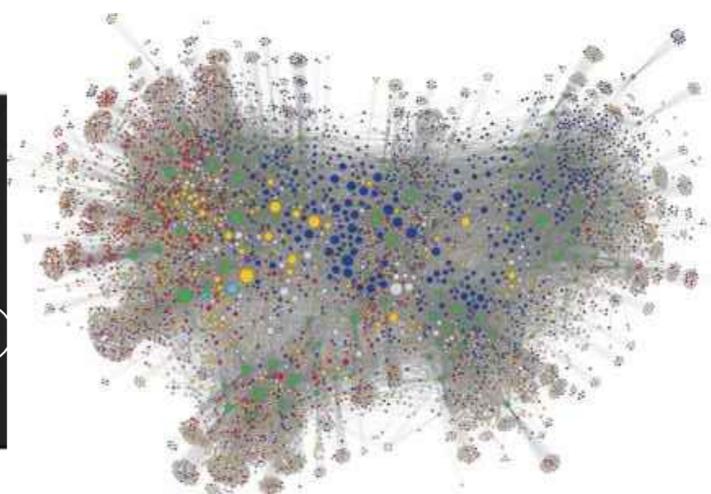
バイオインフォ
マティクス



シングルセル
シーケンス



ネットワーク
解析



土壤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

培養株100株を超えるGHG削減関連微生物の完全長ゲノムを決定、メタゲノムデータも多数取得に成功！

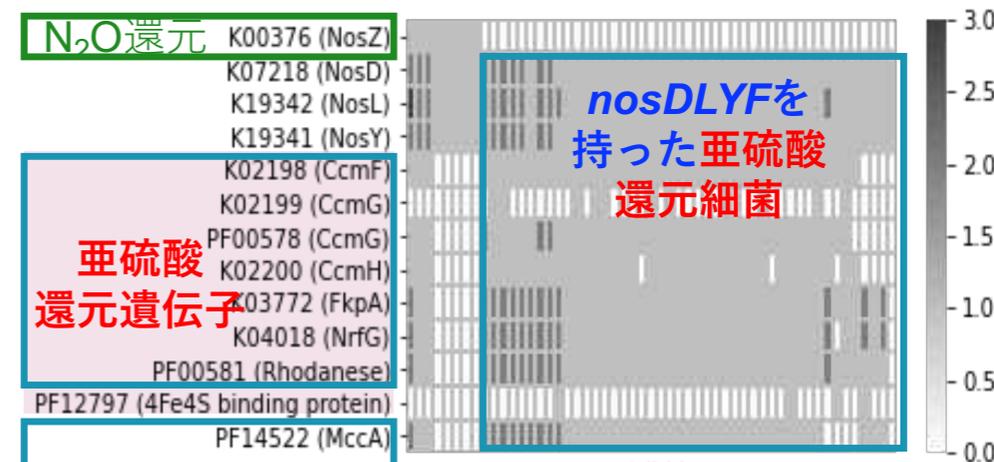
共起・近隣遺伝子に着目した新規窒素循環遺伝子探索法を確立！

学名	種類	GHG削減能	菌株数
<i>B. diazoefficensis</i>	ダイズ根粒菌	NosZ+	65
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ダイズ根粒菌	NosZ++	9
<i>B. lianoningense</i>	ダイズ根粒菌	NosZ+	1
<i>B. japonicum</i>	ダイズ根粒菌	NosZ-	3
<i>B. elkanii</i>	ダイズ根粒菌	NosZ-	3
<i>R. leguminosarum</i>	クローバ根粒菌	NosZ+/-	2
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 46	N ₂ O資源化土壌細菌	NosZ+	1
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	イネエンドファイト	NosZ+/-	19
<i>Methylocystis echinoides</i>	メタン酸化細菌(Type II)	CH ₄ 酸化	5
合計			108

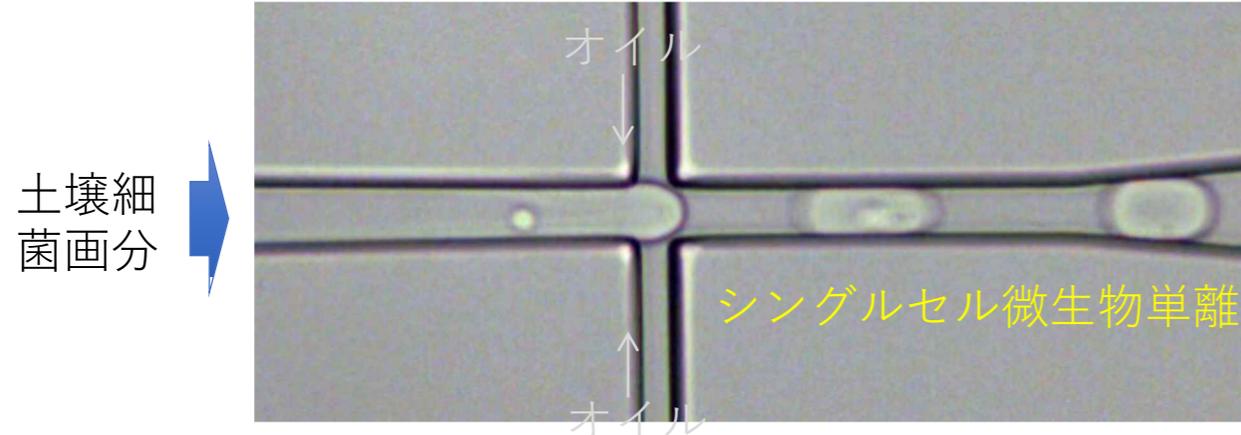
ゲノム構造比較によるGHG削減関係、競合遺伝子、作物生育促進などの機能遺伝子を解析中

(課題II, IV, Vと連携)

Ex. *Shewanellaceae* 53株



微小液滴・シングルセル技術により、既存技術より30倍以上の効率で遺伝子データ取得可能に！



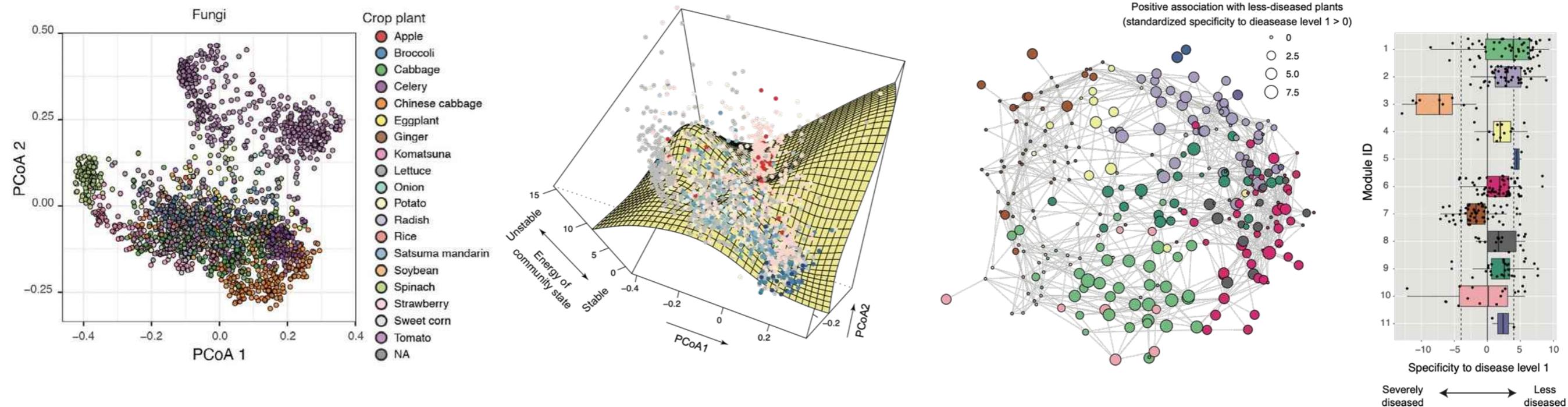
phylum_gtdb	class_gtdb	培養性や新規性	n
Proteobacteria	Gammaproteobacteria		2
Bacteroidota	Bacteroidia	新規性あり	1
Bacteroidota	Kapabacteria	新規性あり	1
Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	培養困難	1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria		1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria		1
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	培養困難	1

独自技術：微小液滴シングルセルシーケンス

培養困難なN₂O還元細菌ゲノムにアクセス、一団粒解析も成功！

2500個超の土壌微生物のシングルセルゲノム解析データから*nosZ*遺伝子を持つ微生物ゲノムを探索し、N₂O還元能を持つと思われる土壌微生物を新たに20種以上特定！

日本全国の農地土壌微生物叢をプロファイル化！ 安定で生産的な土壌微生物の組み合わせを解明



課題II-1

課題II-1全体で目指すもの

高N₂O還元活性 (*nosZ*++)の探索・作出 (II-1-a)

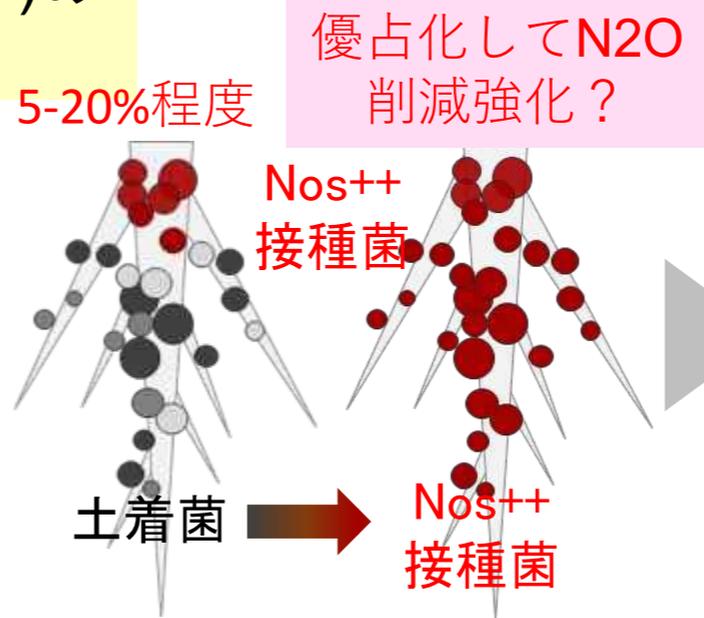


十勝農協連

一般的な接種資材(*nosZ*-株)



南米液体資材

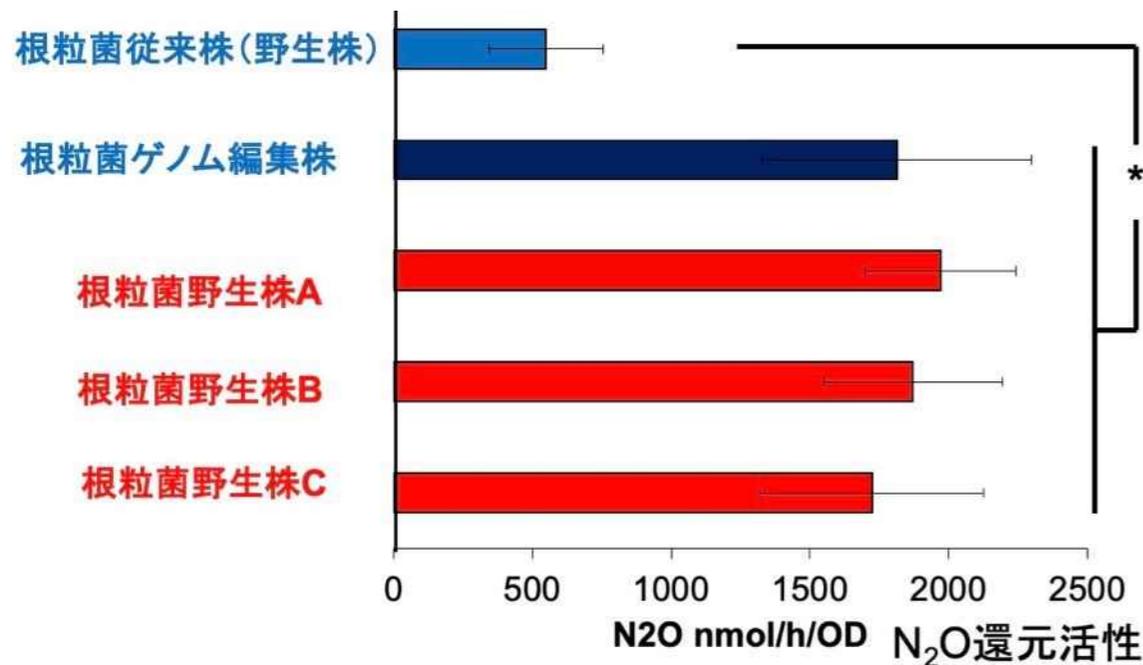


宿主作物の最適化による *nosZ*++接種菌優占化(II-1-b)

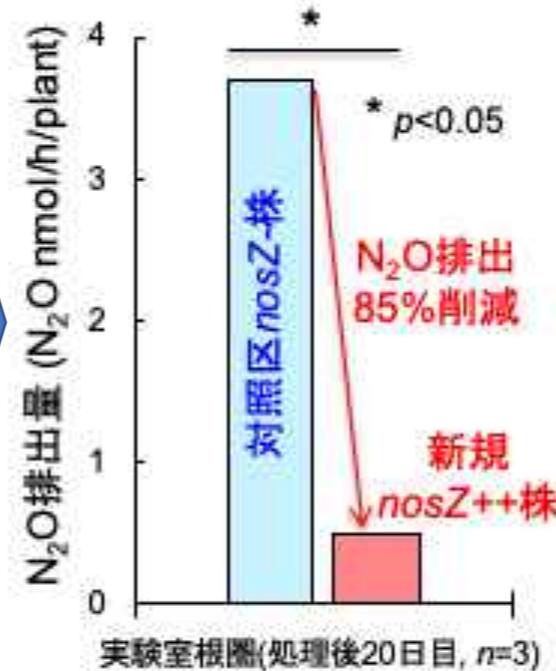
課題III

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*++)株によるベンチスケールN₂O削減



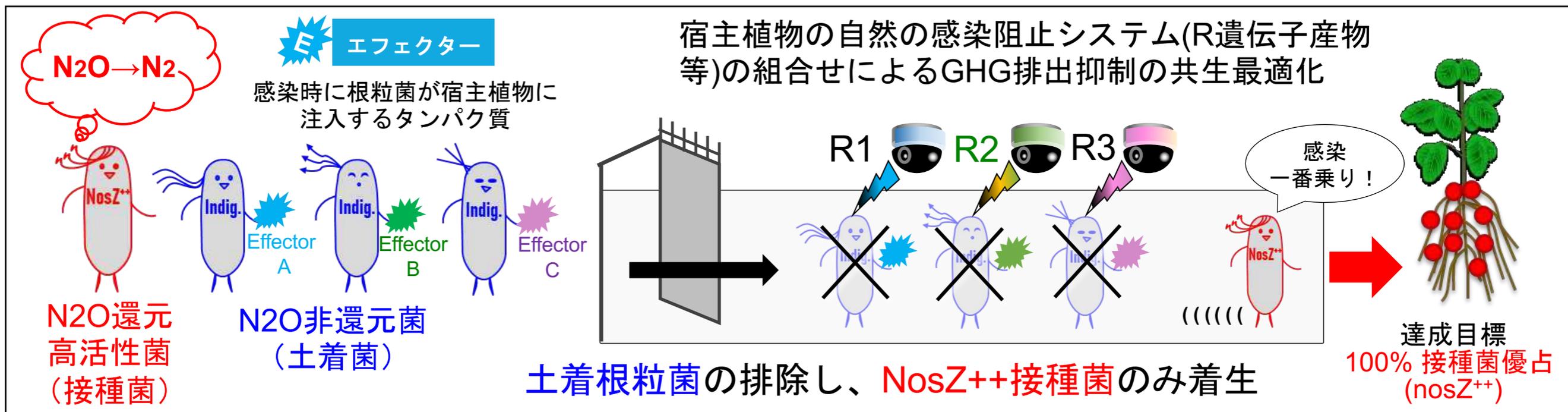
ダイズ品種多様性を利用したダイズ共生系の創出



ダイスコアコレクション

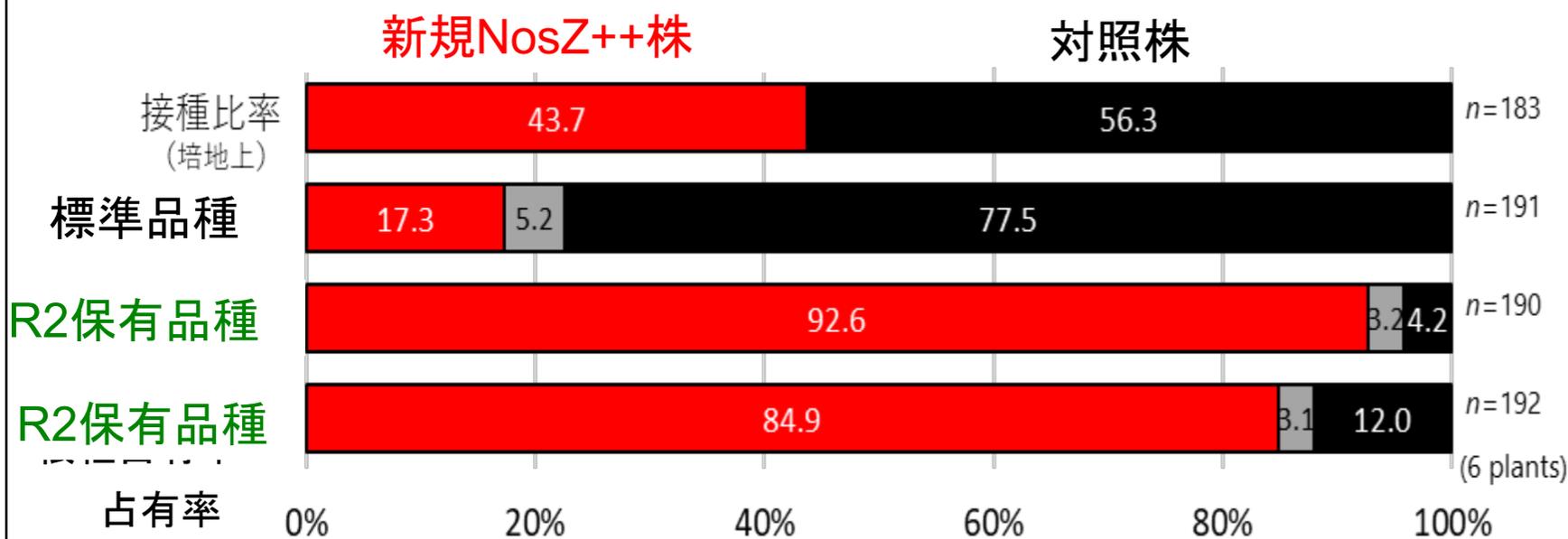
Ⅱ-1-b 不和合性システムに基づくN₂O還元高活性菌の共生最適化

研究開発の概要



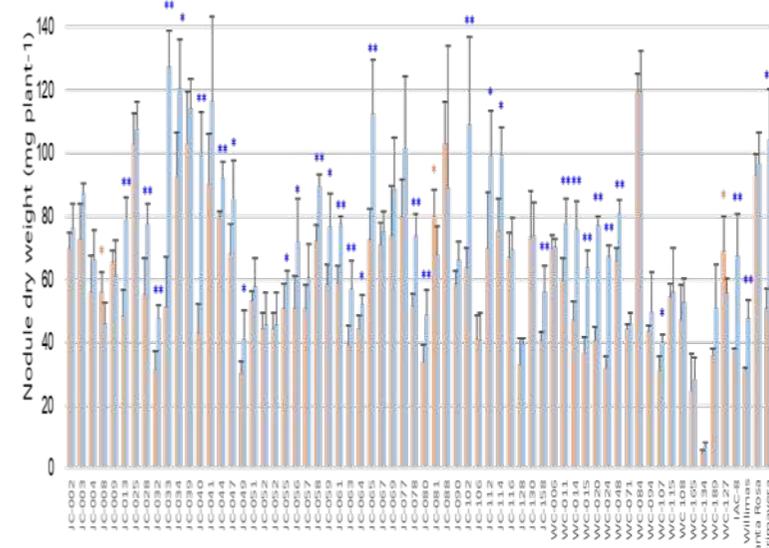
主な成果

感染阻止システムR2による新規NosZ++株の競合的根粒形成



宿主システムR2のみでも新規分離NosZ++株の優占化に成功!
 (一対一で80%以上)

品種ごとの根粒重と窒素固定
 Blue新NosZ++株



新規NosZ++株は根粒形成と窒素固定の高い品種が多い!

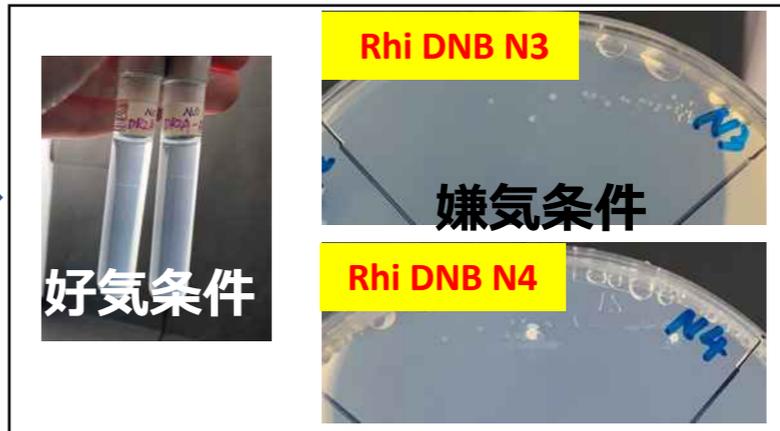
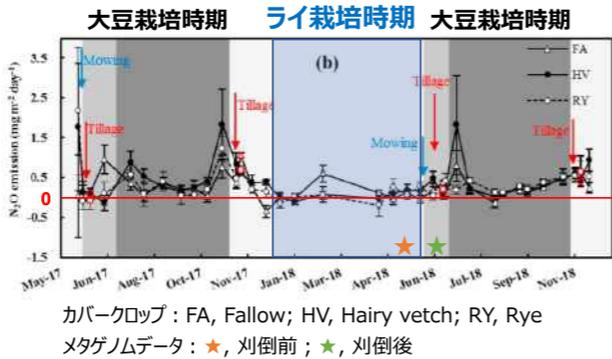
II-2, 3 畑地および水田由来のN₂Oの無害化・資源化

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）



2017年5月～2018年12月のN₂O Flux (Gong et al., 2021)



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）

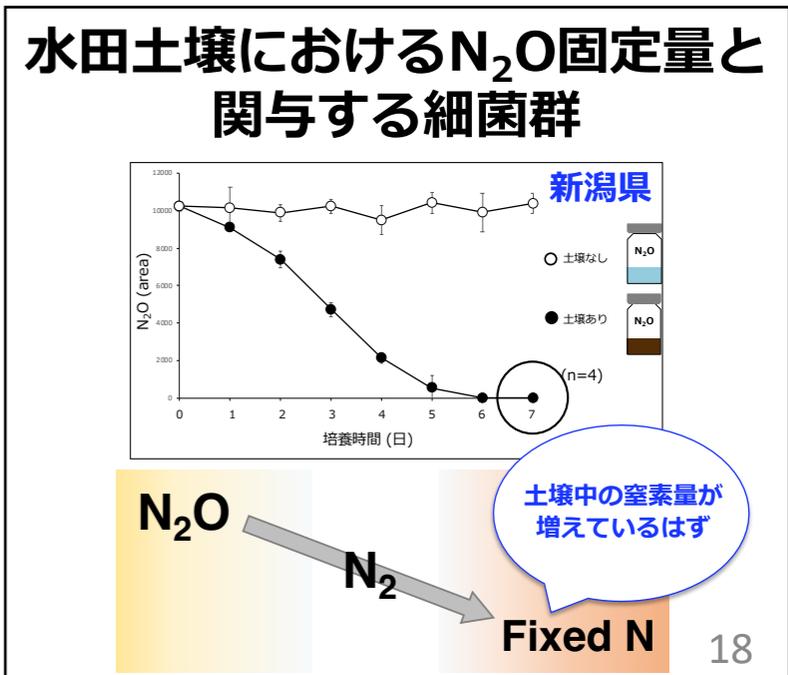
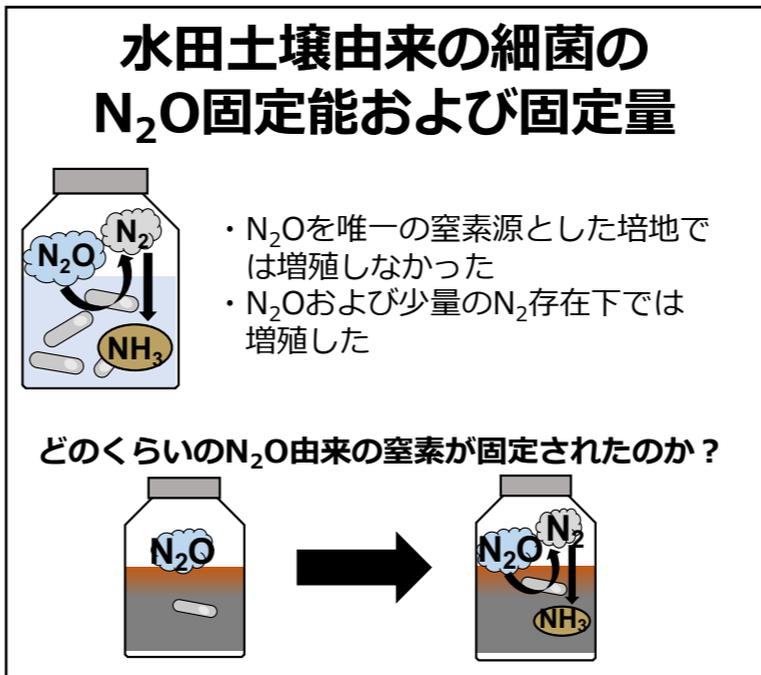
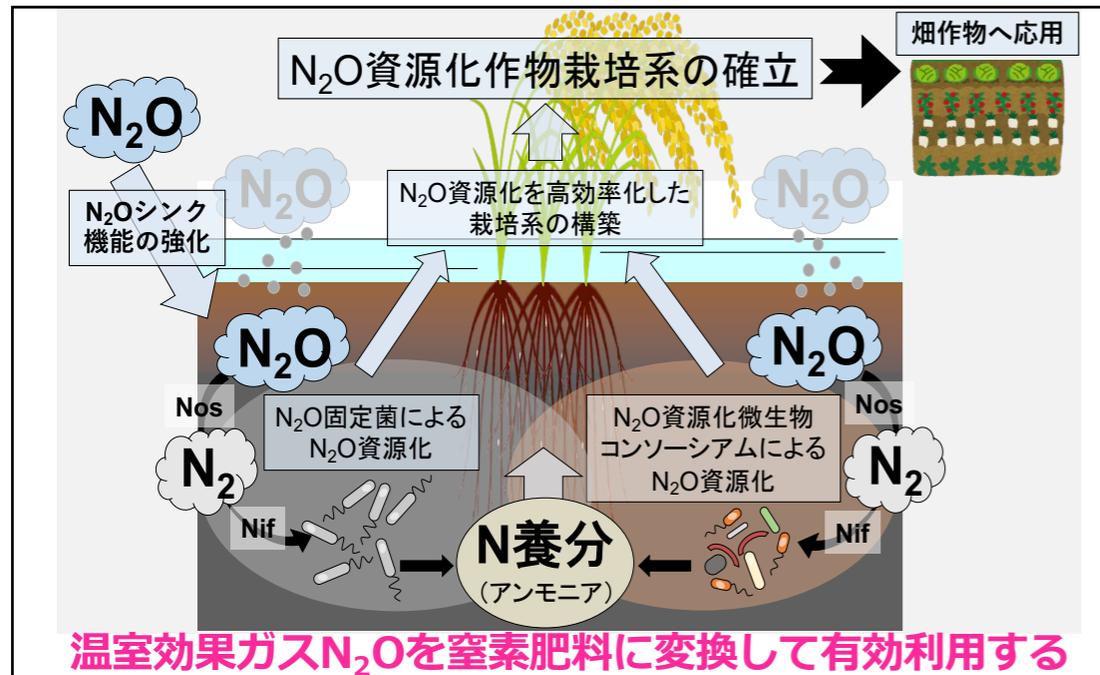


- ・レッドクローバー根粒菌(*nosZ+*)
 - ・根粒菌以外の細菌(*nosZ+*)
- 分離に成功

- 高活性株の探索
- 安倍川河川敷
 - 鳴瀬川河川敷
 - その他畑地等

- 特性解析
- N₂O還元活性
 - 窒素固定活性
 - 根粒形成競合能

II-3 N₂O固定菌・N₂O資源化微生物コンソーシアによるN₂O資源化（東大・産総研）



II-4. 土壤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)

2022年度の到達目標: 制御環境下での顕微鏡観察が可能な*根箱システムを作る(+他グループのイメージング/NGS解析支援)

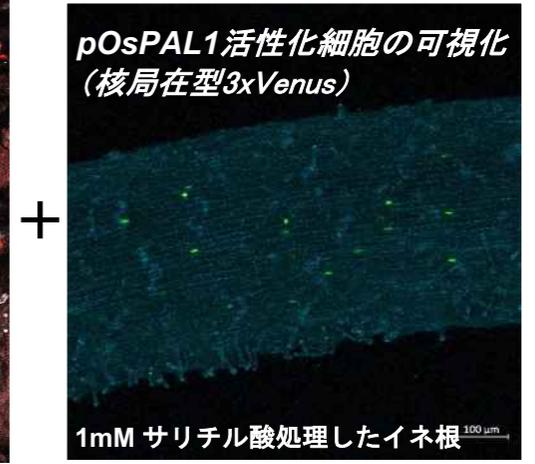
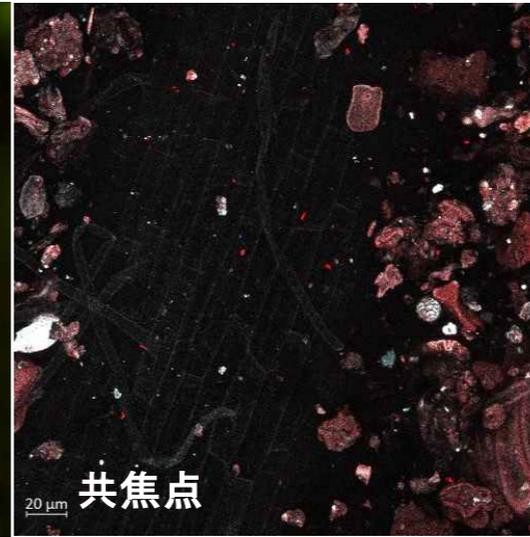
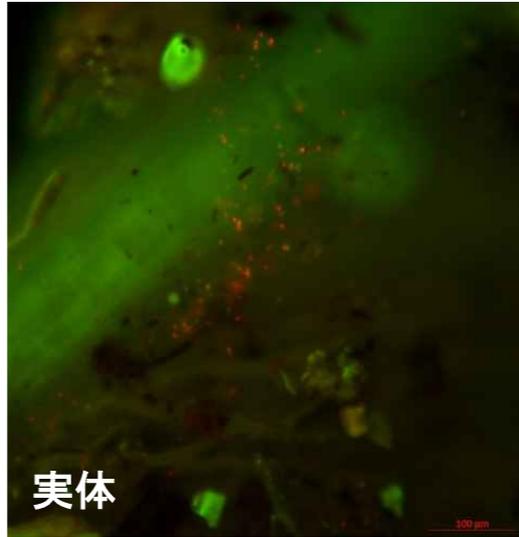
*イネ-CH₄酸化細菌相互作用解明に注力

別役G (イメージング)

土壤中イネ根圏での細菌との相互作用可視化(根箱で)

細菌との相互作用に関わるイネ遺伝子(6種)発現の可視化(蛍光レポーター組換えイネ)

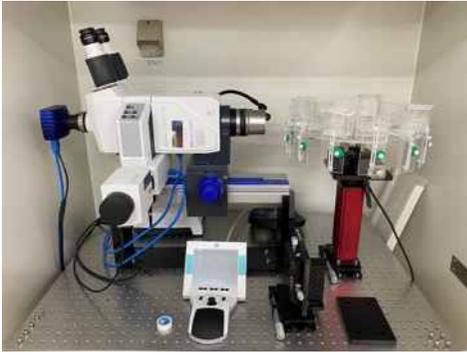
pOsPAL1活性化細胞の可視化(核局在型3xVenus)



→ 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

実体蛍光顕微鏡
+多検体並列観察装置

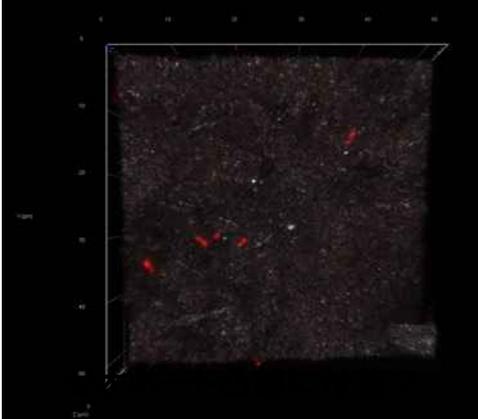
共焦点スペクトル顕微鏡



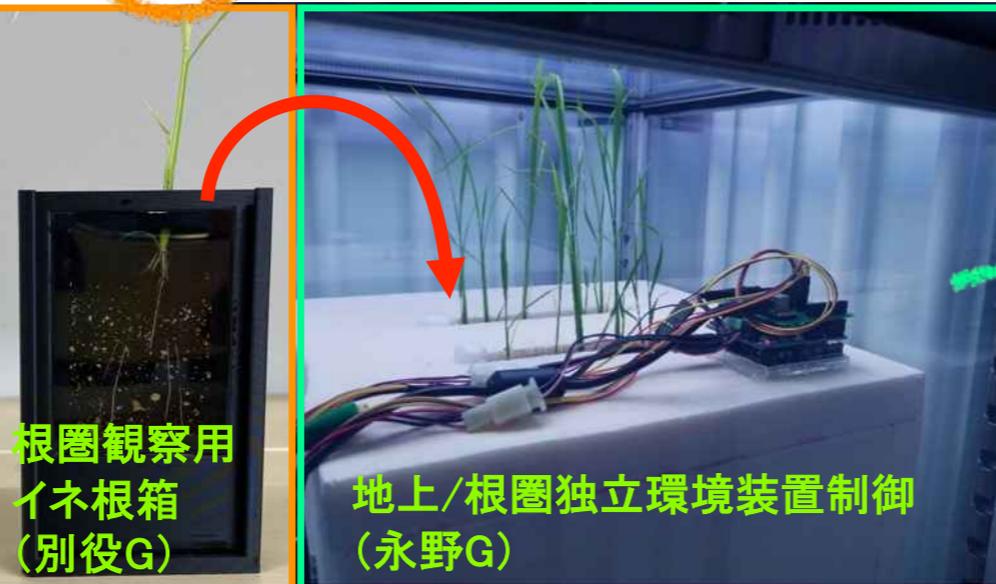
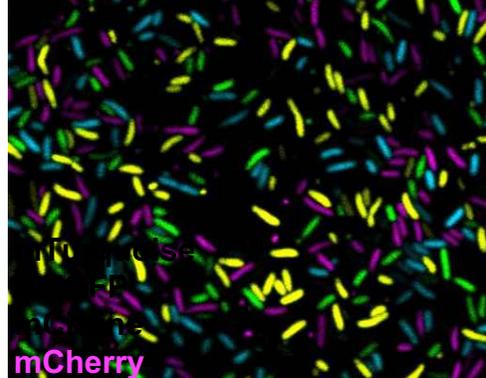
他グループとのコラボ

根粒可視化Gへの可視化情報提供、他GサンプルNGS解析や可視化(下記)

資材上での根粒菌局在可視化



多色蛍光発現細菌株の区別(土壤中での遺伝子水平移行調査)

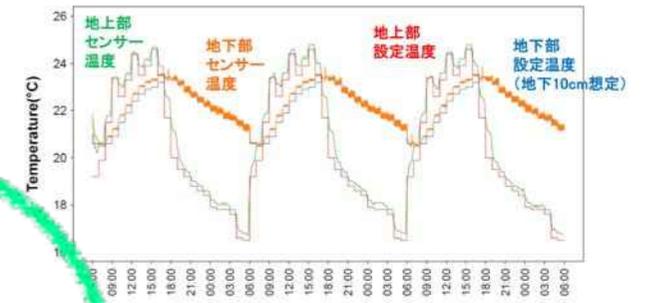


イネ根とCH₄酸化細菌との相互作用様式解明 with CH₄グループ(未開拓のブルーオーシャン!!)

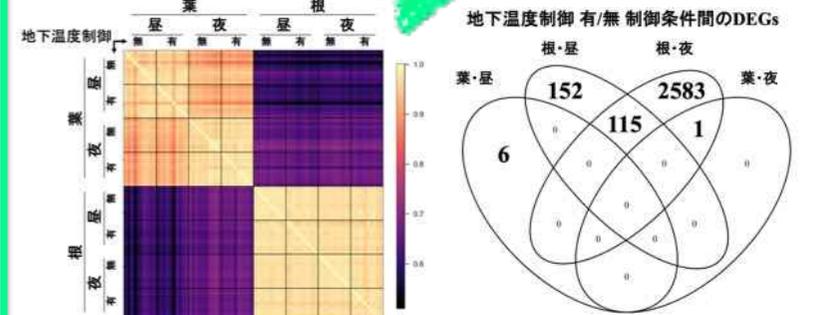
CH₄酸化細菌によるCH₄除去高効率化・資材化

永野G (環境制御/RNAseq)

気温/地温の野外実測値の再現に成功



独立制御の影響調査(RNAseq) 根部遺伝子発現に大きく影響



→ 野外環境再現・環境要因の影響解明 19

Ⅲ-1 高活性N₂O無害化酵素を持つ微生物の作出

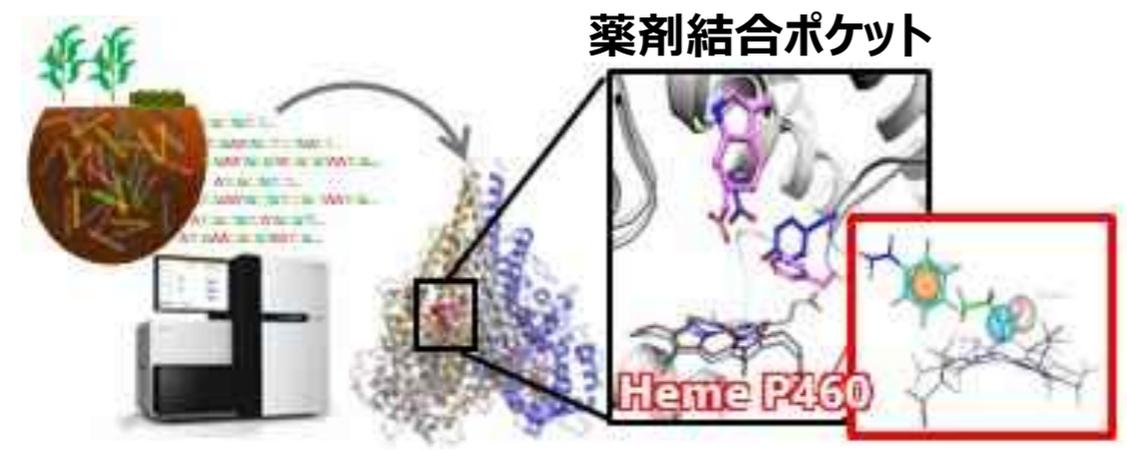
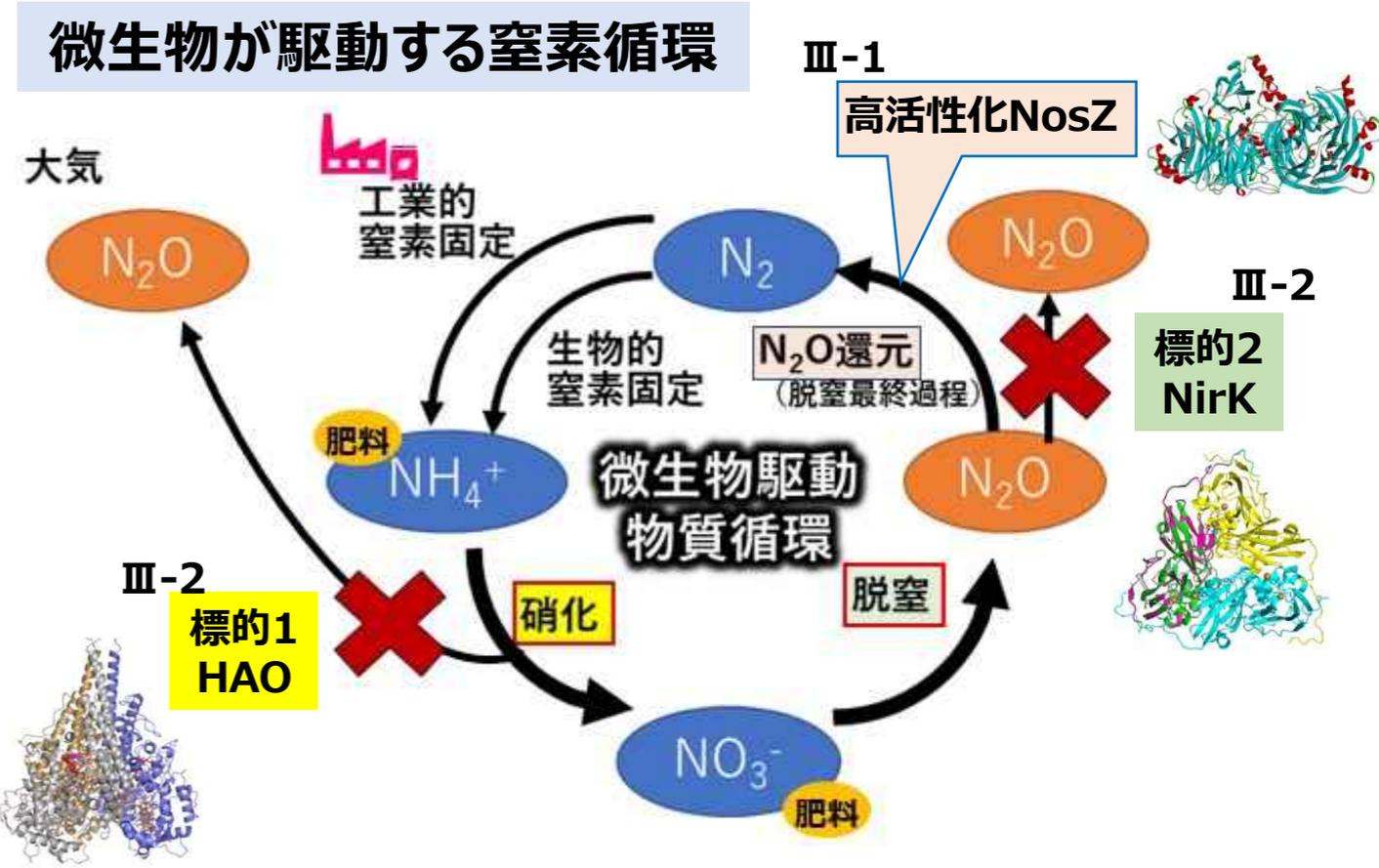
Ⅲ-2 窒素代謝最適化剤創薬

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標的脱窒制御剤



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-2 窒素代謝最適化剤創薬の主な成果

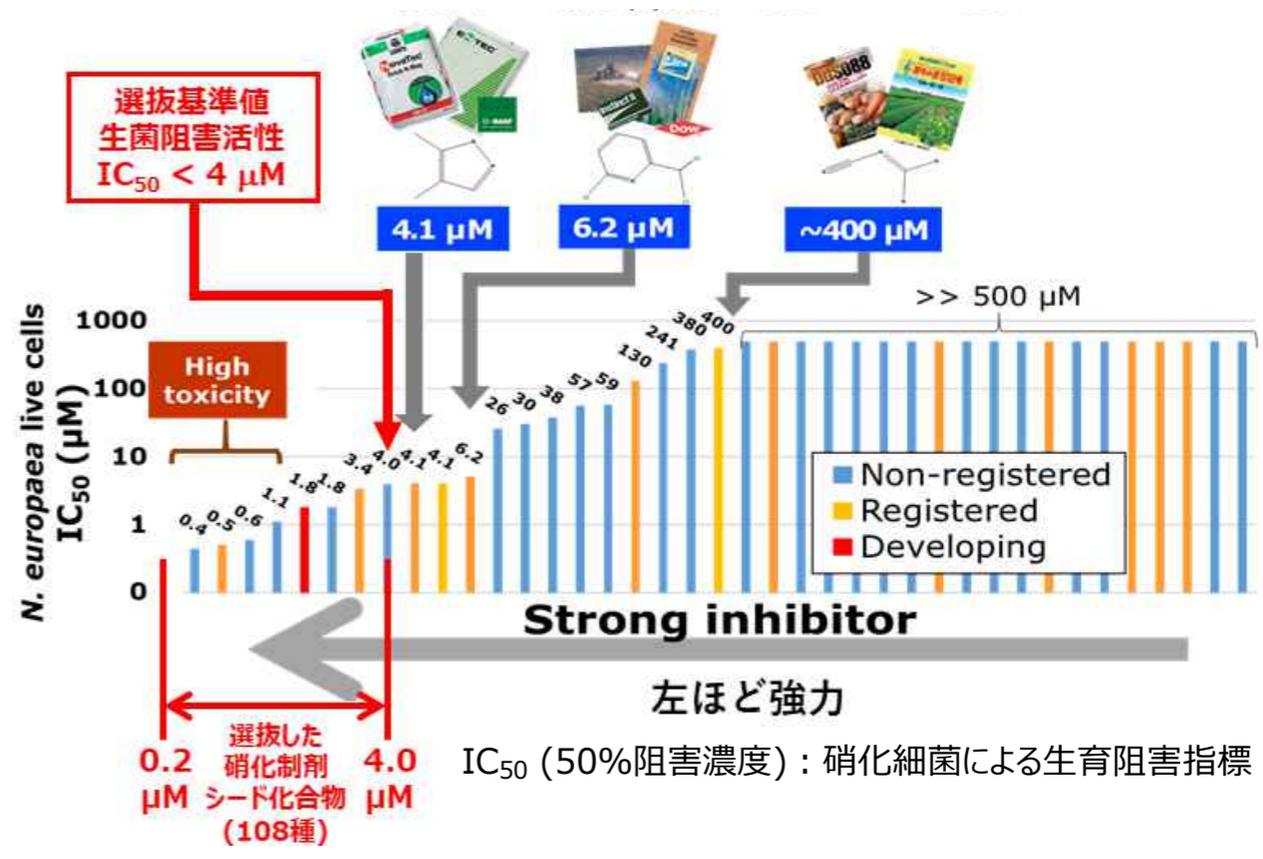
硝化抑制剤候補化合物108種類とNirK阻害剤100種類を取得

標的1: HAO



- ✓ メタゲノム解析により**土壤中のHAO(99%以上)はβ-AOB型HAOの活性中心と完全一致**することを解明。
- ✓ 既知硝化抑制剤の生菌(β-AOB)阻害活性を評価し**選抜基準を $\text{IC}_{50} < 4\mu\text{M}$ に設定** (最強上市薬DMPP $\text{IC}_{50} = 4.1\mu\text{M}$)。
- ✓ **選抜基準をクリアする硝化抑制剤候補108化合物を取得。**
- ✓ X線結晶構造解析により、**候補化合物は作用機作の違いにより3つのクラス(競合的阻害剤、自殺型阻害剤、電子伝達阻害剤)に大別される**ことを解明。作用機作の異なる硝化抑制剤は併用による相乗効果が期待できる。

生菌(β-AOB)阻害活性：開発剤と既知剤との比較

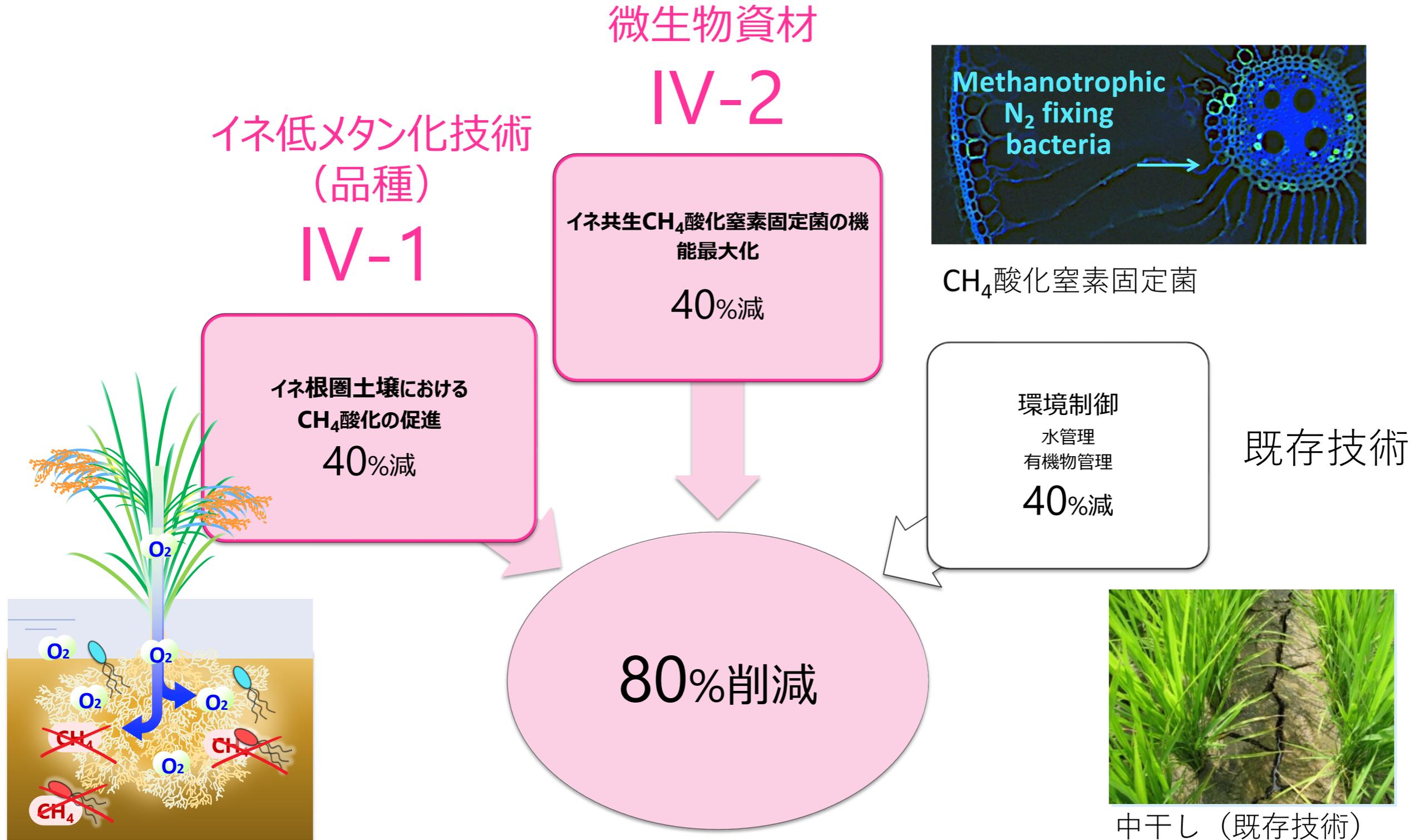


標的2: NirK



- ✓ 偽NirKを除去する正確なメタゲノム解析法を確立。公共DBの土壤メタゲノムデータを解析し、世界各地の農耕地土壤中**で優占するNirKはいずれもClade2であることを解明。**
- ✓ ハイスループット(HT)化したNirK活性測定法を確立。約1万化合物の薬剤スクリーニングにより**NirK阻害剤 (>50%阻害@10 μM)を100種類取得。**
- ✓ 3種類の微生物のNirKのX結晶構造解析に成功。

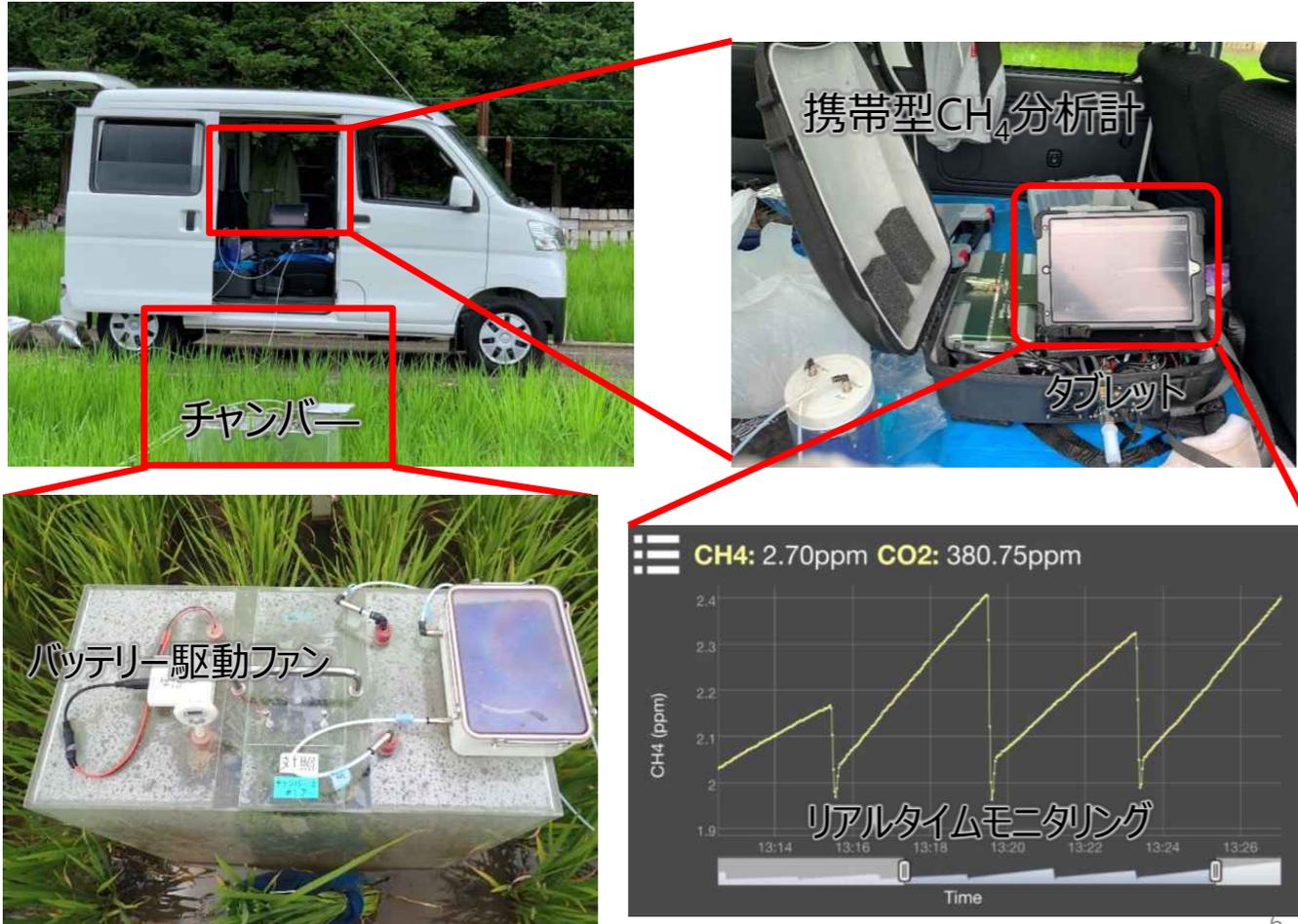
課題IV: 水田CH₄削減の戦略



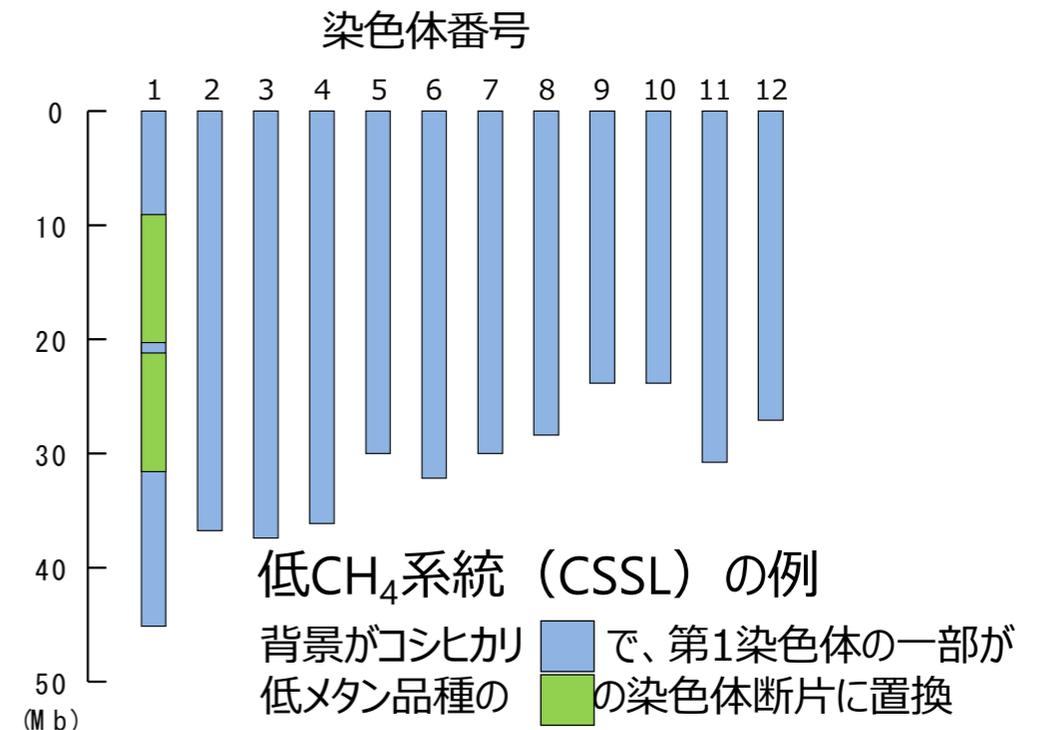
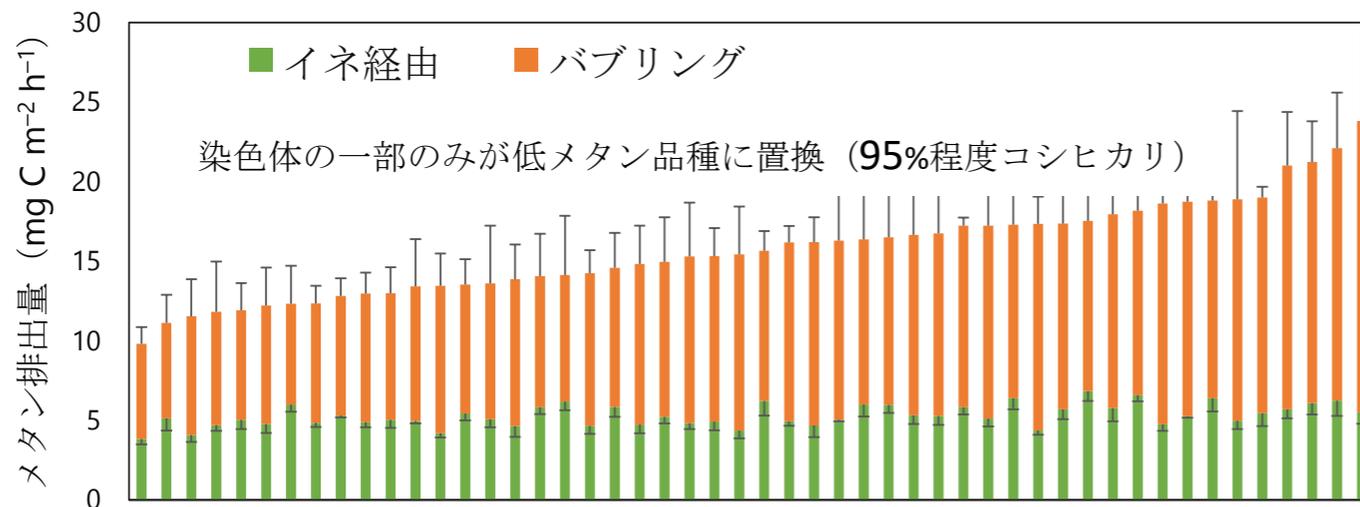
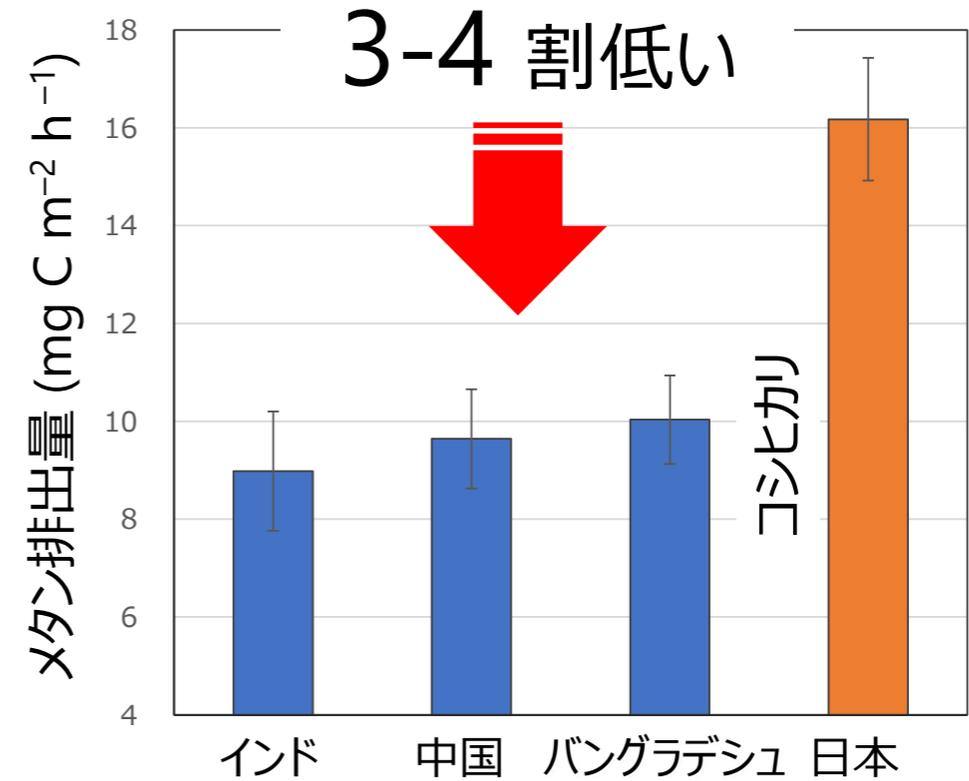
微生物制御 + 環境制御 (水田中干し等) → 水田メタン80%削減

課題IV-1 イネの低メタン化技術

CH₄排出量の迅速評価手法



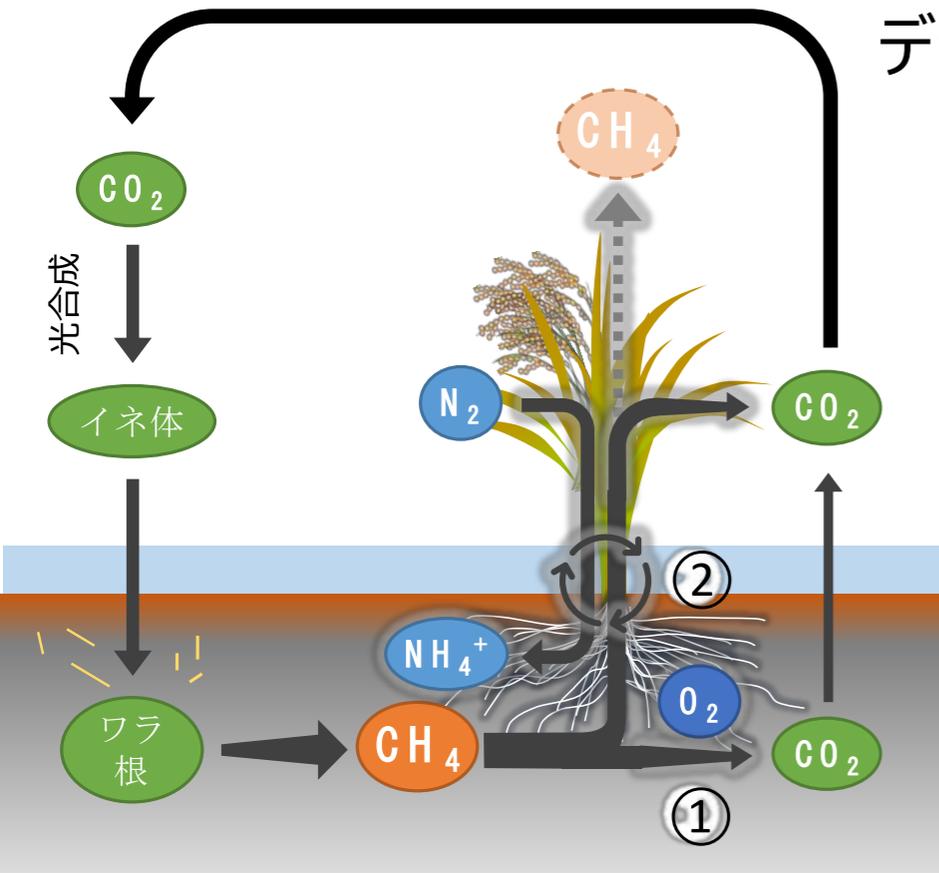
低CH₄品種の探索・特定



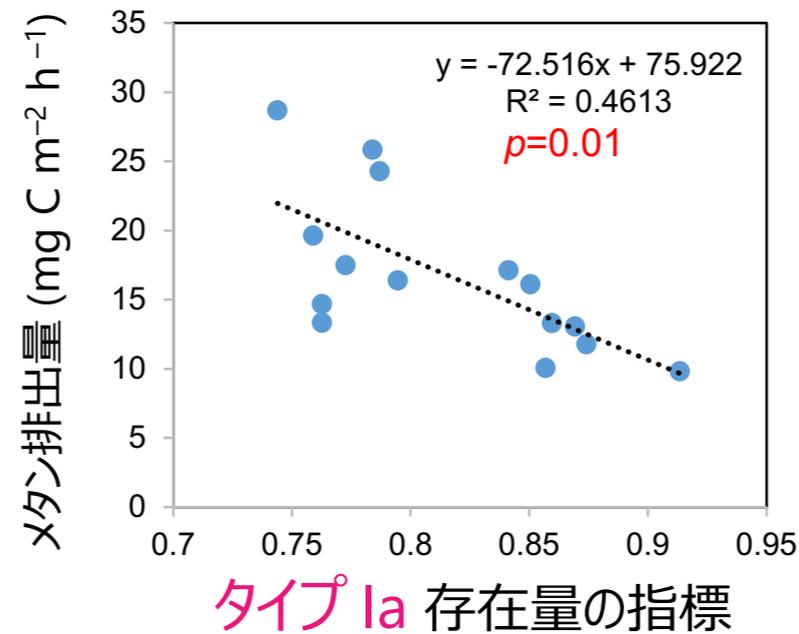
染色体断片置換系統 (CSSL) を活用したコシヒカリの低CH₄化

課題IV-2 CH₄酸化窒素固定菌の機能最大化

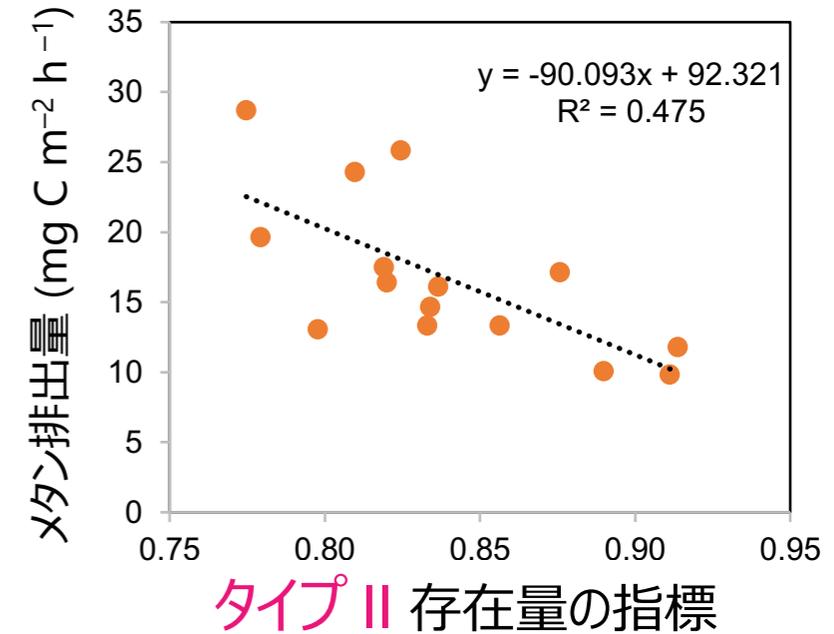
デジタルPCR-CH₄排出量と関係するCH₄酸化菌グループの解明



① 根圏土壌 (根の表面)



② イネ体内部

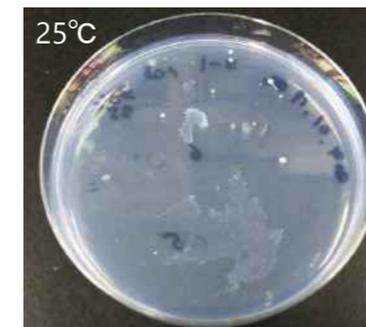


微生物資材化を見据えた高活性菌の単離

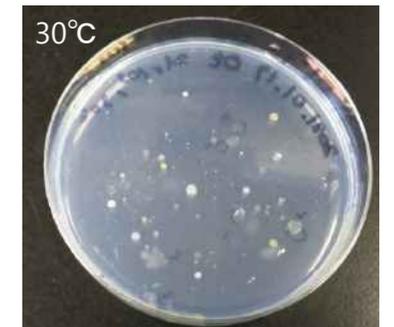
- 12 株の分離・純化が完了
- タイプ Ia-2株、タイプ II-10株
- 11 株でN固定活性を確認



寒天平板培養

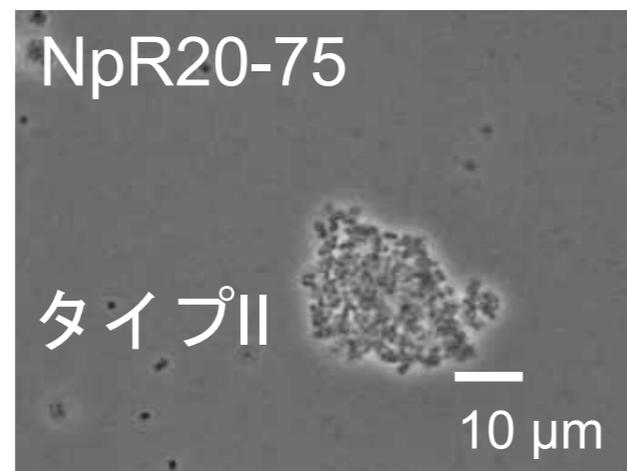
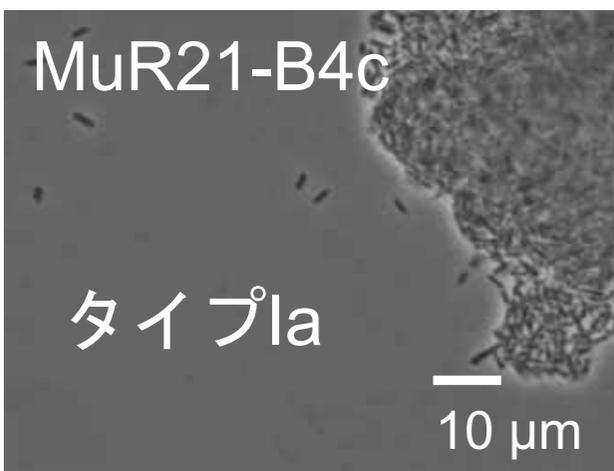


25°C



30°C

NMS寒天平板培地上に形成されたコロニー



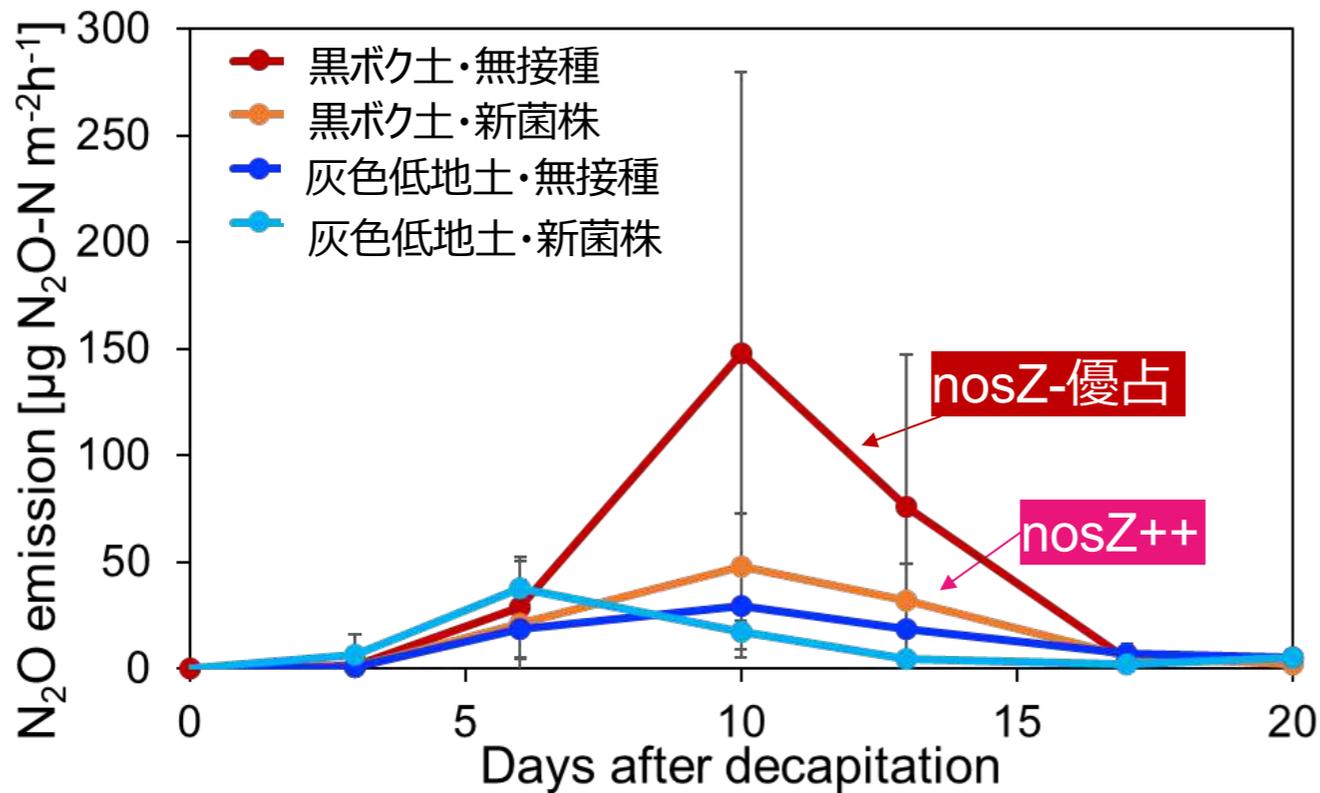
液体集積培養



上：メタン酸化細菌
下：ネガティブコントロール

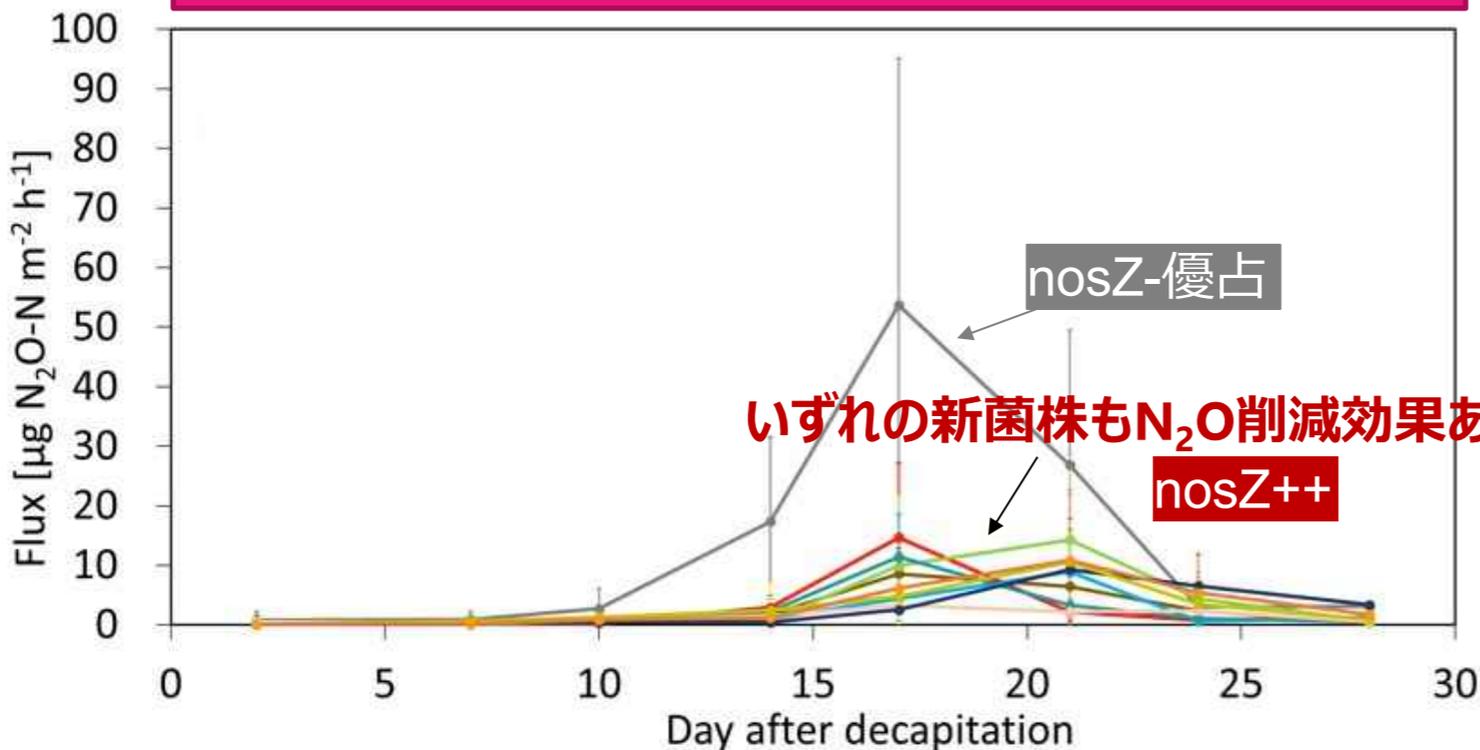
V1. 新規根粒菌株によるN₂O削減効果の実証（ポット実験）

新規nosZ++根粒菌によりN₂O発生削減



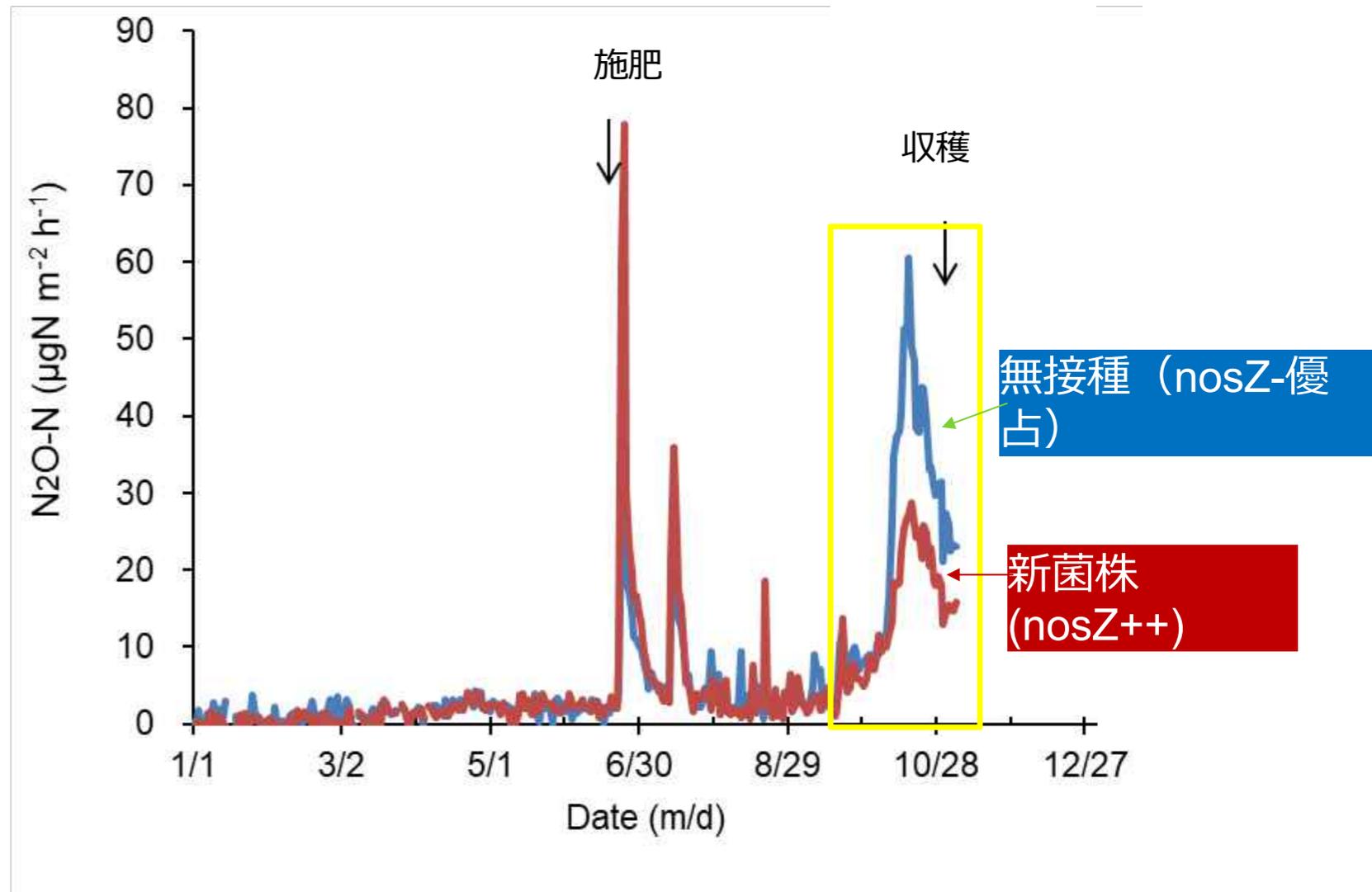
- ✓ 黒ボク土 (*nosZ*-優占) において、新規根粒菌株 (*nosZ*++)接種によりN₂O削減
- ✓ 灰色低地土 (*nosZ*+優占) において、新規根粒菌株(*nosZ*++)接種との差なし

複数の新規nosZ++根粒菌によりN₂O発生削減



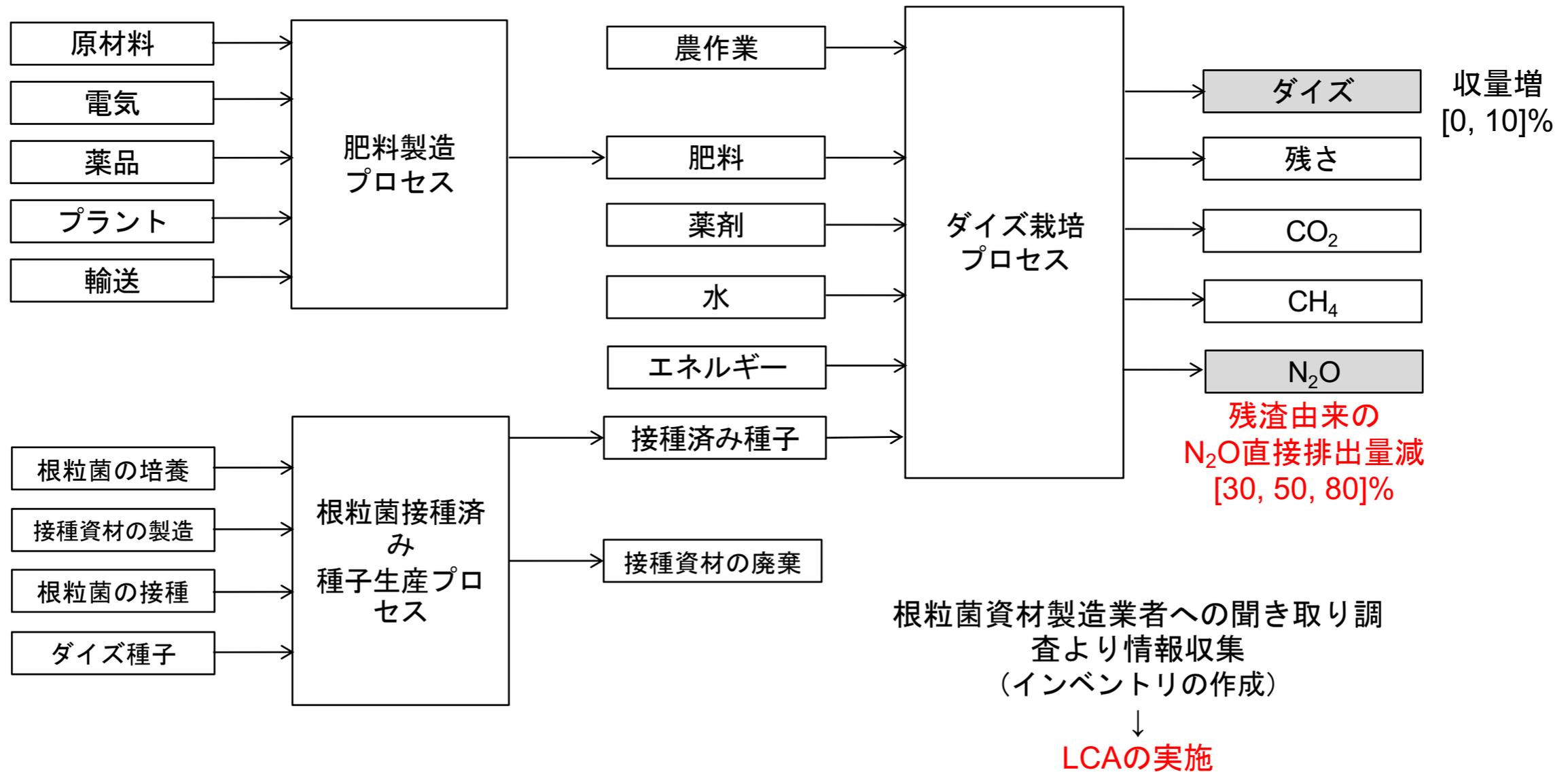
- ✓ 東北大で分離した複数の新菌株 (*nosZ*++) のポットスケールでのN₂O削減効果を実証（黒ボク土）

圃場実証：新規根粒菌株によるN₂O削減 (黒ボク土、NosZ-優占)



- 根粒崩壊期（10月）のN₂O発生量:
無接種(nosZ-優占) > 新菌株(nosZ++)

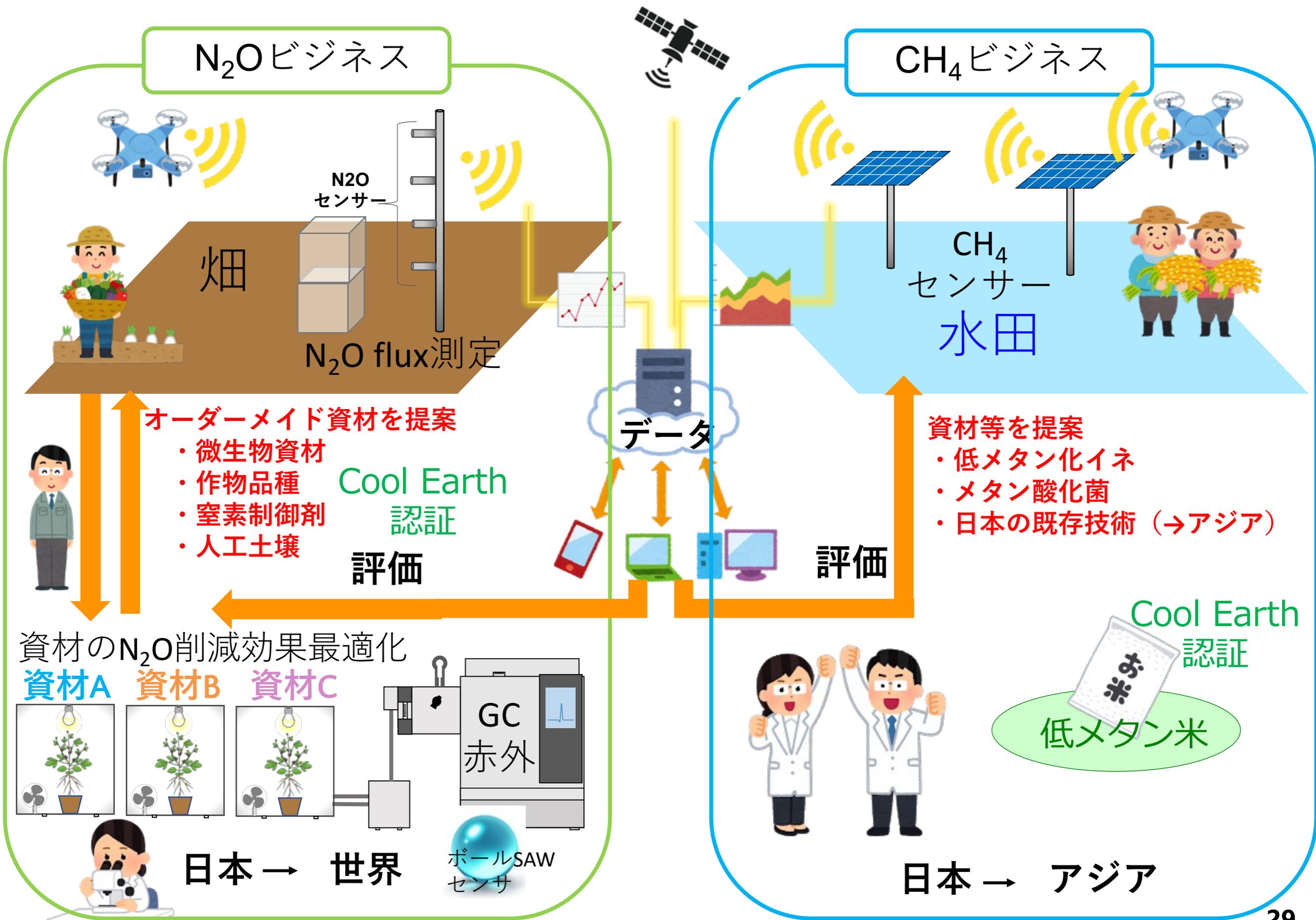
根粒菌接種資材LCA： ダイズ生産プロセス全体のGHG



接種資材製造によるGHG発生量はダイズ生産プロセス全体の
0.004%程度

ダイズのライフサイクルにおいて無視できるレベル

農業のN₂O・CH₄削減のビジネスモデル案



市民参加型プロジェクト (市民科学_ ELSI)

市民科学(Citizen Science)は第6期科学技術政策やEU Soil が重要課題と記載

Soil in a Bottle 市民科学プロジェクト: 地球冷却微生物を探せ

概要 活動内容 参加登録 運営組織 お問い合わせ

皆様も参加しませんか？
いま、
空気と土を
真剣に考えよう
~未来の環境をまもるために~

<https://dsoil.jp/soil-in-a-bottle/>

市民科学プロジェクトの意義

市民科学(Citizen Science)は第6期科学技術政策やEU Soil が重要課題と記載



□ 地球冷却微生物を見つける

高いN₂O消去活性をもつ微生物を探索し、その微生物がすむ環境の特性を明らかにし、N₂O削減微生物資材としての利用を目指す。

□ 市民との対話、知識の共有、ユーザー開拓

実験を通じて、市民に地球環境・土壌・身のまわりの微生物へ興味をもってもらい、科学を楽しむ文化を醸成する。双方向コミュニケーションによりGHG削減微生物等の社会実装に必須の課題を探る。

□ 土壌と微生物のデータを蓄積する

日本中から膨大な数の土壌と空気を収集し、その大規模なデータ（微生物叢、メタデータ）で土壌微生物研究を変革できる。

