

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780237
 研究課題名（和文） 湿原泥炭層に生息する還元的酢酸生成細菌の特異的検出
 研究課題名（英文） Phylogenetic diversity of acetogenic bacteria in northern peat bogs.

研究代表者
 服部 聡（HATTORI SATOSHI）
 山形大学・農学部・助教
 研究者番号：40373352

研究成果の概要：

泥炭中に生息する還元的酢酸生成細菌を検出するため、formyltetrahydrofolate synthetase 遺伝子 (*fhs* 遺伝子) と 16S rRNA 遺伝子を用いたクローニング・多様性解析を行った。研究の結果、当該泥炭から既知の還元的酢酸生成細菌とは系統的に異なるクローンが多く検出された。これらの結果は、湿原泥炭中に未培養かつ新規の還元的酢酸生成細菌が生息している可能性を示すものであった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：還元的酢酸生成細菌、formyltetrahydrofolate synthetase、湿原泥炭

1. 研究開始当初の背景

還元的酢酸生成細菌とは無酸素環境下（嫌気環境下）で水素等の還元力を消費して二酸化炭素を固定することにより還元的に酢酸を合成する嫌気性真正細菌である。嫌気環境下、特にメタンが生成するような環境下においては、有機物は複数の異なる物質分解能を有する微生物によって段階的に分解される。水素や酢酸はこれら複数の嫌気性微生物による一連の有機物分解の最終段階を担う化合物である。そのため、これらの物質の両方の代謝に関与する重要な細菌として、還元的酢酸生成細菌の動向が着目されている。還元的酢酸生成細菌はルーメン動物や昆虫の消化管内、あるいはメタン発酵リアクターなど各種の環境からこれまでに 22 属 100 種以上純粋分離されている。しかし、これらの細菌の分離源である各々の環境において、還元的

酢酸生成細菌がどのくらいの多様性を持って生息しているのかについては、知見が極めて少ない状況にある。現在までに還元的酢酸生成細菌を対象とした多様性解析が行われた例は、シロアリやダチョウの腸管内やヒトや馬の糞便、あるいは塩性植物の根部など数例のみとなっている。これらの解析は分離培養に依存しない手法である分子生物学的手法によって行われており、対象とする遺伝子として、formyltetrahydrofolate synthetase 遺伝子 (*fhs* 遺伝子) が用いられている。*fhs* 遺伝子はホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素をコードする遺伝子であり、その酵素は還元的酢酸生成細菌が炭酸固定時に用いる代謝経路である CODH/Acetyl-CoA synthase 経路 (Wood/Ljungdahl 経路) の鍵酵素の 1 つとして知られている。*fhs* 遺伝子を用いた多様性解析の特徴として、例えばシロアリの腸内に系統

学的に特有の *fts* 遺伝子クローンが検出されるなど、各々の環境に特有の還元的酢酸生成細菌が生息している可能性が示唆されている。

還元的酢酸生成細菌の多様性について明らかになっていない環境の1つとして、湿原泥炭があげられる。泥炭は植物遺体を主体とする泥状物であり、通気性、透水性が悪く内部は低酸素環境にある。このため、泥炭内部では多様な嫌気性微生物が生息し、セルロースを分解発酵物質とした嫌氣的有機物分解が行われていると推察されている。なお、これらの分解の際に水素資化性あるいは酢酸資化性メタン生成古細菌の働きによりメタンガスが生成されるため、泥炭は温室効果ガスの主要な発生源の1つとしても考えられている。一方、還元的酢酸生成細菌は水素資化性メタン生成古細菌などと基質を巡り競合関係にあるため、当該細菌の泥炭内での動態や多様性を把握することは、温室効果ガス発生メカニズムの理解という観点からも重要であると思われる。

メタン生成古細菌と還元的酢酸生成細菌の競合においては、通常は水素への親和性の違いや、取得可能なエネルギー量の差によって、メタン生成古細菌の方が多くの環境で優占する。他方で、低温かつ低 pH といった環境においては、還元的酢酸生成細菌がメタン生成古細菌よりも優占しやすいと考えられている。このような条件を満たす環境として、高緯度寒冷地域の高層湿原泥炭があげられる。日本においては、山形県月山・湯殿山湿原群に属する弥陀ヶ原湿原に点在する泥炭池（池塘）がこれらの条件を満たす環境の1つとしてあげられる。当該湿原泥炭は月山の八合目付近（標高約 1400 m）と高地にある上、日本有数の豪雪地帯として、半年以上積雪に覆われる等、低温環境にある。さらに、池塘の水源は雨水や雪解け水に依存していることから極めて貧栄養の環境にある。また、池塘水の pH は約 4.8 と弱酸性にある上、水底の泥炭部は透水性が極めて悪く嫌気環境にある。上述のように、このような環境は還元的酢酸生成細菌の生育環境として適しており、多様な当該細菌が生息している可能性が推察される。一方、弥陀ヶ原湿原泥炭においては還元的酢酸生成細菌のみならず、その他の真正細菌も含め、多様性解析を始めとする微生物学的な研究は全く行われていない状況にあった。

2. 研究の目的

本研究では、山形県月山弥陀ヶ原湿原泥炭内に生息する還元的酢酸生成細菌を研究対象として、分子生物学的アプローチにより、当該細菌が保有する遺伝子を泥炭内から検出、これらの遺伝子の系統関係を明らかにす

ることにより、当該湿原泥炭内に生息する還元的酢酸生成細菌の多様性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

山形県月山弥陀ヶ原湿原に点在する池塘（北緯 38 度 35 分、東経 140 度 01 分）を試料採取地とした（図 1）。採取器具として、容器底部を繰り抜いた滅菌済み 50 ml 容プラスチック遠心管を用いた（図 2）。



図 1 試料採取地



図 2 採取器具と泥炭試料

上記の加工済み遠沈管を池塘水底の泥炭表層に当て、捻りながら垂直に掘り下げることにより、容器内に流入する池塘水による泥炭試料の圧縮を回避しつつ試料を採取した。なお、泥炭試料は泥炭と池塘水の境界面を 0 cm とし、その深部約 10 cm までを採取した。採取した試料は移動式小型冷凍庫にて直ちに -15°C に冷却して持ち帰った。試料は DNA 抽出時まで -80°C の超低温条件下で保存した。

泥炭試料は氷上にて解凍後、泥炭の深度 8-10 cm の部分を滅菌済みのスパーテルを用いて採取した。これらの泥炭を湿重量 10 g 量りとり、DNA の抽出に供した。DNA 抽出にはビーズ破碎法を用いた。破碎には土壤 DNA 抽出キットである PowerSoil DNA Isolation kit (MO Bio Laboratories 社)を用いた。抽出処理後、得られた DNA は分光光度計にてスペクトルを取り、純度のチェックと定量を行った。得られた DNA のうち、100 ng を鋳型として用い、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による遺伝子増幅を行った。増幅には *fts* 遺伝子断片約 1.1 kbp を増幅するプライマーとして、FTHFS-f(5'-TTYACWGGHGAYTTCCATGC-3') と FTHFS-r (5'-GTATTGDGTYTTRGCCAT-3')

を用いた。DNA 変性条件 (94°C 30 秒) に引き続きアニーリング条件として、[63°C→55°C 30 秒, 1°C 減/1 サイクル] x 9 サイクル、以後[55°C 30 秒] x 25 サイクルを適用することで、非特異的な遺伝子の増幅を避けた。DNA 伸長条件は 72°C 90 秒とした。PCR 反応により得られた増幅産物は、ベクター (pCR4-TOPO, Invitrogen 社) と大腸菌 (ECOS Competent *E.coli* DH5 α , ニッポンジーン社) を用いてクローニングした。Blue/White コロニーセクションにより *fhs* 遺伝子断片を含む大腸菌コロニーをランダムに選択し、ベクター由来のプライマー

M13M4 (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') と M13RV (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') により *fhs* 遺伝子断片領域を含む PCR 増幅を行った。引き続き、ベクター由来のプライマー T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') または T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') を用い、ダイナーミネーター法によるサイクルシーケンス反応 (BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit, Applied Biosystems 社) を行った後、DNA シーケンサーにより *fhs* 遺伝子断片の DNA 配列を決定した。得られた DNA 配列は塩基配列解析ソフト (ATGC-MAC version 4) により、*fhs* 遺伝子約 1.1 kbp のコンティグ (63 クローン) を得た。次いで、塩基配列解析ソフト (Genetyx-Mac version 12) により、各々のクローンの DNA 配列をアミノ酸配列に変換した。これらのアミノ酸配列を web 上で 相同性検索 (Blast search) にかけて、近縁な微生物種の推定を行った。引き続き、本研究で得られたクローンを、近縁種あるいは近縁環境クローンの *fhs* 遺伝子配列とともに整列化を行った後、分子系統解析ソフト (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA version 4) によりアミノ酸配列に基づいた分子系統解析を行った。解析には近隣結合法を使用した。なお、*fhs* 遺伝子断片による多様性解析結果と比較をするため、真正細菌リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子断片のクローニングも行った。DNA の抽出は *fhs* 遺伝子と同様の条件で行った。

また、PCR プライマーとして、27F(5'-AGRGTGTTGATYMTGGCTCAG-3') と 1492R(5'-GGHTACCTTGTTACGACTT-3') を使用した。PCR 反応 (95°C 1 分→[95°C 20 秒, 50°C 1 分, 72°C 2 分] x 25 サイクル→72°C 7 分) 後、*fhs* 遺伝子と同様の方法によりクローニングを行った。クローニングにより得られた 32 クローンの塩基配列は、DNA に基づいた相同性検索を行った後、他の参照配列と整列化し、分子系統解析を行った。系統解析には近隣結合法を用いた。

4. 研究成果

fhs 遺伝子のアミノ酸配列を基にグループ

分けを行った結果、当該湿原から得られたクローンは 2 つの主要なグループ (GM*fhs*OTU1, GM*fhs*OTU2) と少数のグループ (GM*fhs*OTU3 ~19) から構成されることが明らかとなった。このうち、GM*fhs*OTU1 は全体の約 2 割を占めており、アミノ酸配列による相同性解析の結果、*Clostridium cellulolyticum* (CP001348)、*Clostridium acidurici* (M21502) といった *Firmicutes* 門の非還元的酢酸生成細菌と近縁であることが明らかとなった。一方、GM*fhs*OTU2 も全クローンの 2 割弱を占めており、相同性解析の結果、これらのグループは *Firmicutes* 門に属する還元的酢酸生成細菌である *Moorella thermoacetica* (J02911) と近縁であることがわかった。また、その他のグループである GM*fhs*OTU3、GM*fhs*OTU4 に於いても、*Firmicutes* 門の硫酸還元細菌である *Desulfotomaculum reducens* (CP000612) やメタン発酵リアクターから得られた環境クローンである clone G41 (AB353092) や clone G51 (AB353093) と近縁であることが明らかとなった。また、その他のグループにおいては、脱塩素細菌である *Desulfobacterium hafniense* (CP001336) や一酸化炭素酸化細菌として知られる *Carboxydothemus hydrogenoformans* (CP000141) 等と近縁なクローンも得られた。これらの結果から、*fhs* 遺伝子による多様性解析においては、*Firmicutes* 門の真正細菌が弥陀ヶ原湿原泥炭に生息している可能性が示唆された。また、当該湿原泥炭には *fhs* 遺伝子を保有する多種多様な細菌が生息しており、それらは還元的酢酸生成細菌による酢酸生成能のみならず、硫酸還元能や脱塩素能など、幅広い代謝能を有している可能性も推察された。

次に、*fhs* 遺伝子による多様性解析の結果と比較するため、16S rRNA 遺伝子を用いて弥陀ヶ原湿原泥炭に生息する真正細菌の多様性解析を行った。当該遺伝子 32 クローンの相同性解析を行った結果、弥陀ヶ原湿原泥炭中には *Proteobacteria* 門、*Planctomycetes* 門、*Verrucomicrobia* 門、*Acidobacteria* 門、*Spirochaetes* 門に属するクローンが多く含まれていることが明らかとなった。これらの系統門に属するクローンは海外の高緯度寒冷地域の泥炭に於いても検出されることから、弥陀ヶ原湿原泥炭においても主要な細菌種を形成していることが示唆された。一方、16S rRNA 遺伝子と *fhs* 遺伝子による解析結果を比較すると、*fhs* 遺伝子解析で多く検出された *Firmicutes* 門に属するクローンは 16S rRNA 遺伝子解析においては検出されないなど、差異が見られた。これは、真正細菌において *fhs* 遺伝子を保有している細菌に限られていることに起因しているものと考えられる。

これまでに還元的酢酸生成細菌は様々な環境から純粋分離されているが、それらの多くは系統的には *Firmicutes* 門に属することが知られている。これらの分類学的知見と本研究における *fhs* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子解析の結果から、少なくとも弥陀ヶ原湿原においては既存の還元的酢酸生成細菌は主要な細菌種では無い可能性も考えられた。他方、本研究において *fhs* 遺伝子を用いることにより、泥炭中に未知の種を含む還元的酢酸生成細菌が存在している可能性を示すことが出来た。これまでに、*fhs* 遺伝子を適用して泥炭中の微生物の多様性解析を行った報告例は無く、本研究が初めての報告となった。また、本研究で得られた成果は、湿原泥炭環境が還元的酢酸生成細菌の新たな分離源となり得ることを示唆するものであり、極めて有用な知見であると思われる。今後、本研究で得られた成果を活用し湿原泥炭から新規の還元的酢酸生成細菌の分離を行うことにより、世界的にも未だベールに包まれた還元的酢酸生成細菌の包括的な理解が進むことが期待される。

(4) 研究協力者
なし

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

松田潤、森田孝平、服部聡、月山弥陀ヶ原湿原池塘における細菌の菌叢解析、第 24 回日本微生物生態学会、2008 年 11 月 26 日、北海道大学

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 聡 (HATTORI SATOSHI)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：40373352

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし