

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580061

研究課題名(和文)

メタン酸化をめぐる微生物食物連鎖の機能解析

研究課題名(英文)

Structure and functions of a methanotrophic microbial food chain

研究代表者：

村瀬 潤 (MURASE Jun)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：30285241

研究成果の概要(和文)：

湛水土壌の酸化還元境界層はメタン酸化が活発な環境であり、メタンの大気放出を制御する重要なフィルターとして働いている。安定同位体プロービング法による解析により、メタン酸化にともない増殖したメタン酸化細菌は速やかに原生動物に捕食されること、また本研究で新たに発見された新属・新種のアメーバをはじめとする原生動物の捕食作用が、メタン酸化細菌群集の構造を決定する重要な生物因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

In a wetland rice field, methane oxidation is active at the oxic-anoxic boundary layer, which plays a crucial role controlling methane emission to the atmosphere. The present study using stable isotope probing approach demonstrated that methanotrophic biomass is immediately grazed by soil protozoa. Soil protozoa including novel amoeba isolated from a rice field soil grazed on methanotrophic bacteria with preferential selection on a certain group. Our results suggested that protozoa is one of the most important biological factors controlling methanotrophic biomass.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：土壤微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壤学

キーワード：水田土壌、メタン酸化細菌、原生動物、微生物食物連鎖、Stable Isotope Probing

## 1. 研究開始当初の背景

水田や湿原などの湿地土壌は、地球温暖化ガスであるメタンの主要な発生源である。嫌氣的な還元層で生成したメタンは、植物体や土壌表面を経由して大気へ放出されるが、好

氣的な表層土壌や根圏を通過する際に大部分が酸化される。このことは、メタンが湿地土壌の酸化還元境界層に生息する微生物群集にとって重要な炭素源となり得ることを意味している。メタンの酸化に直接関与するのは限られた細菌群(メタン酸化細菌)であるが、申請者の最近の研究により、メタン酸

化細菌バイオマスが原生動物に捕食されることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

原生動物は、その捕食作用を通じて細菌群集やその活性に影響を与えていると考えられるが、特定の土壌機能に及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。本課題では、メタン酸化をめぐる微生物食物連鎖がメタン酸化細菌群集の構造および機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究では、以下の3課題に取り組んだ。

- 1) PLFA-SIP法を用いた水田土壌の原生動物によるメタン酸化細菌の捕食解析
- 2) 水田土壌から分離された新規 Heterolobosea アメーバの形態学的・分子系統学的解析
- 3) 原生動物の捕食作用が水田土壌のメタン酸化細菌群集に及ぼす影響

## 3. 研究の方法

### 1) PLFA-SIP法を用いた水田土壌の原生動物によるメタン酸化細菌の捕食解析

水田土壌をメタン雰囲気下で前培養した後に、 $^{13}\text{C}$ でラベルしたメタンを基質として増殖した5株のメタン酸化菌を1gあたり $5 \times 10^7$ 細胞となるように接種し、加圧培養試験管内で好氣的に培養した。経時的にヘッドスペースの炭酸ガス採取し濃度および炭素安定同位体比を測定した。培養24時間後および48時間後の土壌からPLFAを抽出し、原生動物の分子マーカーとなる脂肪酸(C18:3 $\omega$ 6およびC20:4 $\omega$ 6)の定量を行うとともにその炭素安定同位体比を測定し、各脂肪酸への $^{13}\text{C}$ の取り込み量を推定した。

### 2) 水田土壌から分離された新規 Heterolobosea アメーバの形態学的・分子系統学的解析

イタリア Vercelli 稲作試験場で採取した水田土壌から培養法によって土壌アメーバ 6\_5F 株を分離した。分離したアメーバは migration 法によってさらに純化を進めた。位相差顕微鏡下でアメーバ期およびシスト期の細胞の形態観察を行うとともに、シストについては透過電子顕微鏡による内部の観察もあわせて行った。また、アメーバ細胞からDNAを抽出し、18S rRNA 遺伝子および ITS-5, 8S-ITS2 領域の塩基配列を決定し、近縁種との系統関係を明らかにした。

### 3) 原生動物の捕食作用が水田土壌のメタン酸化細菌群集に及ぼす影響

メタン雰囲気下で培養した水田土壌からブレンダーによる分散とろ過( $< 2 \mu\text{m}$ )により微生物を分離した。分離した微生物群集のメタン酸化能を確認するとともに、

*pmoA* 遺伝子を対象とした PCR-RFLP 解析により抽出されたメタン酸化菌群が抽出元の土壌の群集を反映していることを確かめた。得られたメタン酸化細菌の接種源を単独で、あるいは同じ土壌から分離した原生動物(絨毛虫1種類[*Colpoda* 属]、鞭毛虫3種類[*Cercomonas* 属, *Spumella* 属および未同定種]、アメーバ4種類[*Acanthamoeba* 属, *Platyamoeba* 属, *Paravahlkampfia* 属および上記2で同定した新規 heterolobosea アメーバ])とともに殺菌土壌に加え、湛水土壌の酸化還元層を模したマイクロゾム<sup>1)</sup>で培養し、メタン酸化活性を測定するとともに培養後の土壌の微生物群集の解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) PLFA-SIP法を用いた水田土壌の原生動物によるメタン酸化細菌の捕食解析

ヘッドスペース中の炭酸ガス濃度はほぼ直線的に増加し、メタン酸化菌の種類や接種の有無による差は認められなかった。一方、メタン酸化細菌を接種した土壌から放出された炭酸ガスの炭素安定同位体比は、初めて測定した培養16時間後で既に顕著に上昇しており、メタン生成菌バイオマス由来の炭素の無機化が起こっていることが示された(図1-1)。PLFAの炭素安定同位体比も培養24時間で既に顕著に上昇しており、接種したメタ

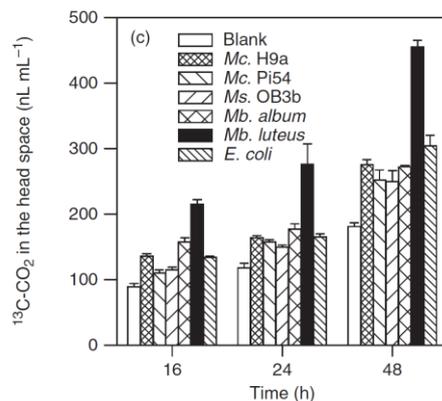


図 1-1 土壌に接種した  $^{13}\text{C}$  標識細菌からの炭酸ガスの発生

ン酸化菌が速やかに原生動物に捕食されたと考えられた。特に、分離した原生動物に対する被捕食性の高かった Type I に属する *Methylobacter luteus* を接種した場合に無機化速度や原生動物への取り込みが顕著であった(図1-2)。また、 $^{13}\text{C}$ でラベルされた2つのPLFAの量比は全量比と大きく異なっており、土壌に存在する原生動物群集のうち一部のグループがメタン酸化菌を捕食したことが示唆された。

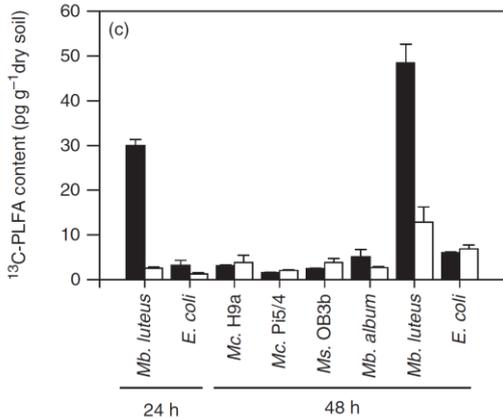


図 1-2 土壤に接種した  $^{13}\text{C}$  標識細菌バイオマスの原生動物由来 PLFA への取り込み

## 2) 水田土壤から分離された新規 Heterolobosea アメーバの形態学的・分子系統学的解析

形態観察および 18S rRNA 遺伝子の塩基配列情報より、6\_5F 株は *Stachyamoeba* 属に近縁な Heterolobosea アメーバと推定された。しかしながら、*Stachyamoeba lipophora* の記載論文との比較および保存機関から入手した *Stachyamoeba* ATCC50324 株との比較からシストの形態に差異が認められた (図 2-1)。

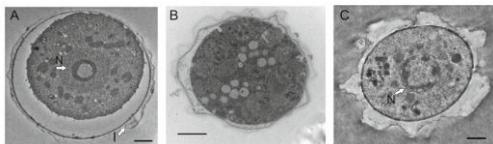


図 2-1 アメーバ 6\_5F 株 (A, B) および *Stachyamoeba* ATCC50324 株 (C) のシストの TEM 画像。スケールバー：1  $\mu\text{m}$

また、ATCC50324 株で栄養成長期と鞭毛期の細胞が観察された (図 2-2B, C) のに対し、6\_5F 株では鞭毛期の細胞は観察されなかった (図 2-2A)。さらに、18S および 5.8S rRNA 遺伝子の塩基配列からみた 6\_5F 株と ATCC50324 株の近縁関係は、別の属に分類される他の Heterolobosea アメーバ間の近縁関係よりも遠いことが示唆された (図 2-3)。以上の結果から、6\_5F 株は新奇のアメーバであると考えられ、*Vrihiamoeba italica* n. gen. n. sp. として提案した。

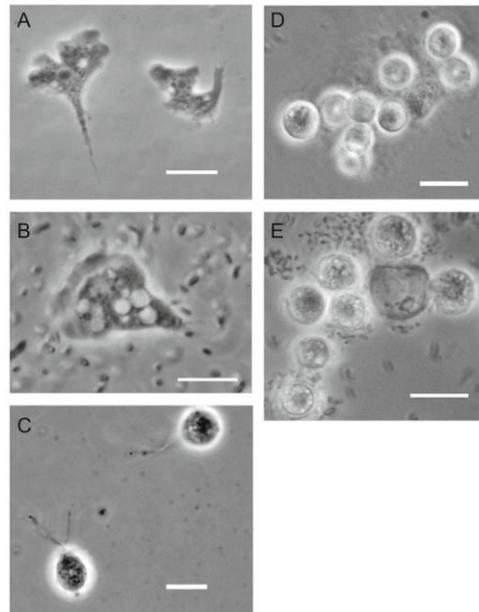


図 2-2 アメーバ 6\_5F 株 (A, D) および *Stachyamoeba* ATCC50324 株 (B, C, E) の位相差顕微鏡画像。スケールバー：10  $\mu\text{m}$

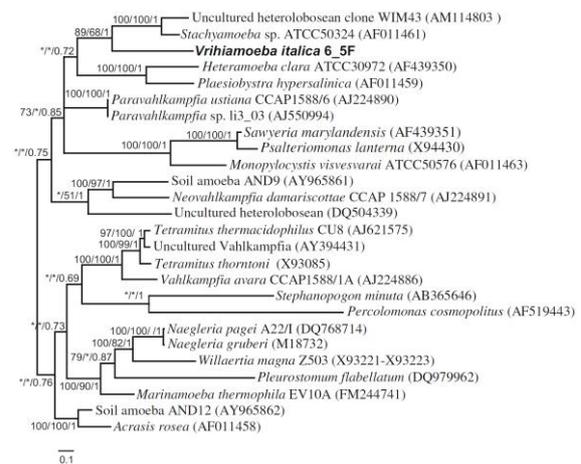


図 2-3 18S rRNA の塩基配列に基づくアメーバ 6\_5F 株の系統関係

## 3) 原生動物の捕食作用が水田土壤のメタン酸化細菌群集に及ぼす影響

土壤のメタン酸化活性に原生動物の有無による顕著な差は認められなかった (図 3-1)。一方で、接種した原生動物の一部はメタン由来の  $^{13}\text{C}$  を取り込んでいることが明らかとなり、メタン酸化を基点とする微生物食物連鎖が確認された。 $^{13}\text{C}$  取り込みの程度は、同一の原生動物由来でも様々であり、原生動物が個体レベルでメタン酸化細菌に対して異なる捕食選択性を示す可能性が示唆された (図 3-2)。

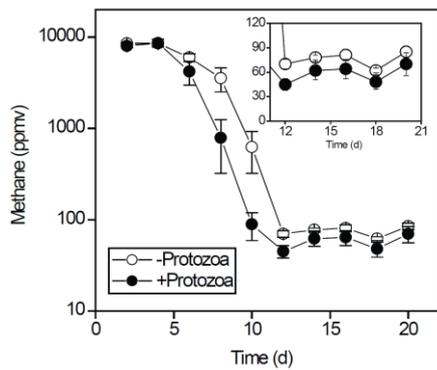


図 3-1 ミクロゾムヘッドスペースのメタン濃度の経時変化と原生動物接種の影響

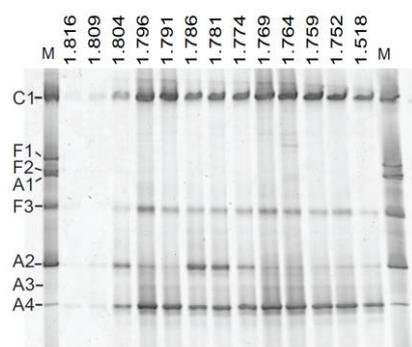


図 3-2 密度勾配遠心分離後の 18S rRNA の DGGE 解析。上の数字は浮遊密度 (g/mL) M; PCR products of 18S rRNA gene from protozoan isolates. C1; *Colpoda* sp., F1; *Cercomonas* sp., F2; *Spumella* sp., F3; unidentified flagellate, A1; *Acanthamoeba* sp., A2; *Platyamoeba* sp., A3; *Vrihiamoeba italica*, A4; *Paravahlkampfia* sp.

メタン酸化酵素 *pmoA* の遺伝子を対象としたマイクロアレイ解析の結果、原生動物を接種した土壌では Type II のメタン酸化細菌群 (*Methylocystis*, *Methylosinus*) が独占的に検出されたが、原生動物を接種しない土壌では、*Methylobacter* に属する Type I のメタン酸化細菌の優占度が Type II と同程度まで高まること示された。一方、16S rRNA を対象とした T-RFLP および大量シーケンスの結果から、 $^{13}\text{C}$  の取り込みの有無に関わらず RNA を発現する活性の高い細菌群集は原生動物の影響を強く受けることが明らかになった。 $^{13}\text{C}$  を取り込んだメタン酸化細菌群集は、*pmoA* 遺伝子の解析とは対照的に、Type II よりも Type I が優占しており、原生動物の接種によって特異的に優占度が高くなる Type I の存在が明らかとなった。以上のことから、原生動物の捕食圧は、メタン酸化細菌群集とその活性を大きく変化させることが示された。

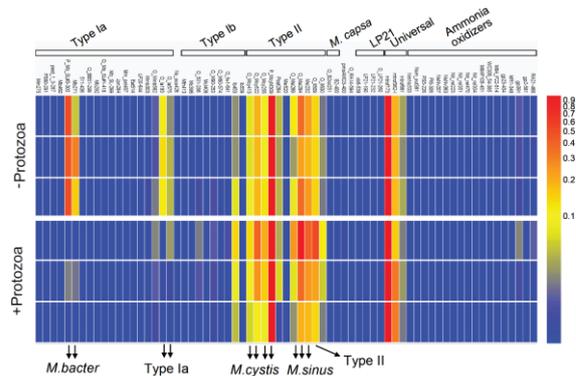


図 3-3 メタン酸化細菌群集におよぼす原生動物の影響

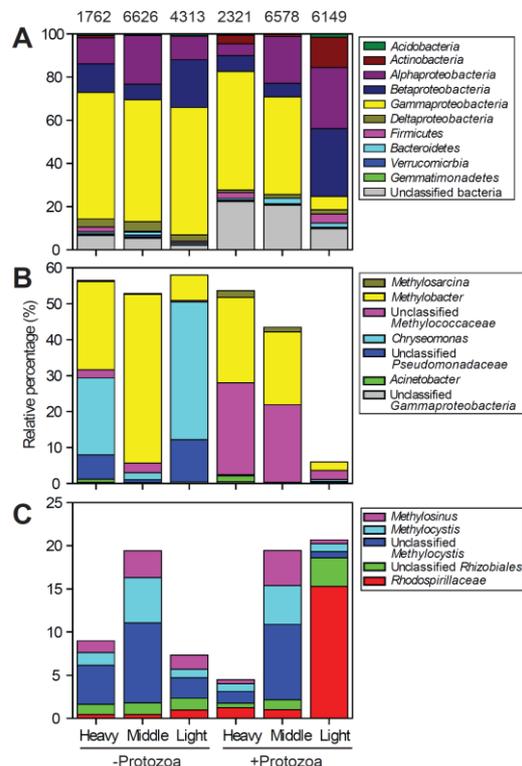


図 3-4 原生動物が 16S rRNA を発現する細菌群集に及ぼす影響。A; Domain bacteria, B; *Gammaproteobacteria*, C; *Alpha-proteobacteria*.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Murase J., Hordijk C., Tayasu I., Bodelier P.L.E.: Strain-specific incorporation of methanotrophic biomass into eukaryotic grazers in a rice field soil revealed by PLFA-SIP. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 284-290 (2011) 査読有
2. Murase J., Kawasaki M., De Jonckheere J.F.: Isolation of a new heterolobosean amoeba from a rice field soil: *Vrihiamoeba italica* gen. nov., sp.

nov. Eur. J. Protistol. 46, 164-170 (2010) 査読有  
3. Hatamoto, M., Tanahashi, T, Murase J.,  
Matsuya, K., Hayashi, M., Kimura, M., Asakawa,  
S.: Eukaryotic communities associated with the  
decomposition of rice straw compost in a  
Japanese rice paddy field estimated by DGGE  
analysis. Biol. Fert. Soils 44, 527-532 (2008)  
査読有

4. Murase, J., Frenzel, P.: Selective grazing of  
methanotrophs by protozoa in a rice field soil.  
FEMS Microbiol. Ecol. 65, 408-414 (2008) 査読  
有

[学会発表] (計 13 件)

1. 村瀬 潤: 微生物食物連鎖の分子生物学  
的解析: メタン酸化を例として 第 57 回日  
本生態学会 2010. 3. 15-20. (招待)

2. Murase, J., Frenzel, P.: Impact of  
protozoan grazing on the community of  
methanotrophic bacteria in a wetland rice  
field soil. The 10th International  
symposium on bacterial genetics and  
ecology (BAGECO-10) (Uppsala, Sweden)  
2009. 6. 15-19

3. 村瀬 潤: 水田土壌生態系の機能におけ  
る細菌-原生生物系の役割 日本土壌肥料学  
会 2008 年度愛知大会シンポジウム (名古  
屋) 2008. 9. 13. (招待)

[図書] (計 5 件)

1. 村瀬 潤: 12. 窒素サイクル, メタンサ  
イクルに果たす微生物の役割、シリーズ  
現代の生態学 11 巻、共立出版、2011

2. 村瀬 潤: 7. 集水域の中の水田、日本陸  
水学会東海支部会編、身近な水の環境科学-  
源流から干潟まで-, p. 92-102、朝倉書店  
(2010)

3. 村瀬 潤・浅川 晋: 7. 水田の土壌環  
境と微生物相、根本正之編著、身近な自然の  
保全生態学、p. 149-173、培風館(2010)

4. 村瀬 潤: 1 - I 3. 4. アメーバ、鞭  
毛虫、土壌の原生生物・線虫群集-その土壌  
生態系での役割-, 日本土壌肥料学会編、  
p. 23-30、博友社(2009)

5. 村瀬 潤: 2 - III. 水田土壌生態系の機能  
における細菌-原生生物系の役割、土壌の原  
生生物・線虫群集-その土壌生態系での役割  
-, 日本土壌肥料学会編、p. 94-114、博友社  
(2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村瀬 潤 (MURASE JUN)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師

研究者番号: 3 0 2 8 5 2 4 1

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし