

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380046

研究課題名（和文）

水田土壌中におけるバクテリオファージの役割とその遺伝子多様性・新奇性

研究課題名（英文）

Role of bacteriophage communities in paddy soils and their gene diversity and uniqueness

研究代表者

木村 真人 (MAKOTO KIMURA)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20092190

研究成果の概要（和文）：本研究においては、水田土壌中でのバクテリオファージ（ファージ）の役割を生元素循環における役割として取らえ、溶菌ファージの細菌細胞への感染の程度の評価と ^{13}C 標識植物遺体の分解に伴うファージ DNA の ^{13}C による標識の確認を行った。なお、新鮮および乾燥した ^{13}C 標識水稻カルスをそれぞれ根冠細胞および植物遺体のモデル物質として使用した。また、ファージ群集における遺伝子多様性・新奇性は、各種の土壌中のファージ遺伝子 *g23*, *g20*, *psbA* の塩基配列を海洋や湖沼から得られた塩基配列と比較し評価した。溶菌ファージの細菌細胞への感染率は、海洋や湖沼でこれまでに報告されている感染率に比べてはるかに高かった。また、 ^{13}C で標識された *g23*, *g20* クローンが得られたことからファージ群集は水田土壌中での生元素循環において微生物循環の重要な担い手と判断した。また、土壌中から得られた *g23* クローンの多様性は海洋や湖沼中に比べてはるかに高く、多くの塩基配列は海洋や湖沼の *g23* 塩基配列とは異なる土壌に特異的な塩基配列であった。さらに、水田表面水中の *g20*, *psbA* 塩基配列は陸水中のものに類似し、土壌中の *g20* 塩基配列は、表面水、海洋や湖沼とは異なるものであった。

研究成果の概要（英文）：The role of bacteriophage (phage) communities in paddy soils was studied from the phage contribution to bio-element cycling in this study, and the frequency of phage infection to their hosts and the carbon flow of plant residue to phage DNA were evaluated. Fresh and dried ^{13}C -labelled callus cells were used as the model materials of root cap cells and plant residue, respectively. The gene diversity and uniqueness of phage communities in soils were examined from the phage *g23*, *g20* and *psbA* sequences in comparison with those in marine and freshwater environments. The frequency of virulent phage infection to bacteria in soils was markedly higher than those reported from marine and freshwater environments. The recovery of ^{13}C -labelled *g23* and *g20* clones indicated that the phage communities are important in bio-element cycling as the drivers of the microbial loop. The diversity of *g23* clones was significantly higher than those in marine and freshwater environments, and their sequences were mostly soil-specific and different from those of marine and freshwater origins. In addition, it was known that *g20* and *psbA* gene sequences in the floodwater of paddy fields were more similar to the sequences in the freshwater environment than to those in the marine environments and that *g20* sequences in paddy field soils were different from those not only of marine and freshwater origins but also in the floodwaters overlying.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：水田土壌学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード： *g23* 遺伝子・*g20* 遺伝子・*psbA* 遺伝子・T4 型ファージ・DNA-SIP・多様性・微生物循環・水田土壌

1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋や陸水環境において、ウイルスが生物地球化学的物質循環、遺伝子の貯蔵庫として重要であることが明らかとなり、水環境におけるウイルス生態学は新たな世紀を迎えた。しかし、土壌中のウイルスに関する研究は、これまで農学的・疫学的関心に終始し、ウイルスの土壌中における生態と役割、多様性に関する研究は、研究代表者らの研究を除き国内・国外とも皆無に近い状況であった。(2) 研究代表者は、科学研究費補助金(基盤研究(B))「水田表面水中のウイルスの生態」(平成 18~20 年度)において、水田表面水中における、1) ウイルス数の季節変動および細菌数とウイルス数の関係、2) 各種細菌に感染するバクテリオファージ(以下、ファージ)数の季節変動、3) ウイルスのサイズ分布からウイルスの主体はファージ、4) ウイルスの感染状況などを明らかにするとともに、5) 分離した *Sphingomonas* 属菌に感染するファージの電子顕微鏡による形態観察からいずれも Shiphoviridae 科のファージで、他方 T4 型ファージに特有のカプシド遺伝子 *g23* の解析からは水田表面水中に新奇の T4 型ファージが存在することが推察された。T4 型ファージは本来 Myoviridae 科に属すファージであり、形態(Shiphoviridae 科)と遺伝情報(Myoviridae 科)の間の不一致は、極めて新奇なファージの存在を示唆した。さらに、6) 青森、秋田、愛知、福岡の水田土壌中の *g23* 遺伝子を調べ、いずれの土壌中の *g23* 遺伝子も水田に特有の塩基配列をもつとともに 9 つのグループに区分されることを見出した。

2. 研究の目的

(1) 水田を対象とした先の研究中、研究 1) ~ 3) は土壌中のウイルスの生態に関するもっとも基礎的情報に関するものであり、研究 4) はファージの物質循環における役割、5) と 6) はファージの多様性に関する研究であった。本研究では、同じく水田を主な対象として、ファージの物質循環における役割およびファージの多様性と新奇性をさらに追及することを目的とした。

(2) 具体的には、1) ファージの物質循環における役割に関し、水田土壌中の細菌へのファージの感染率を調べ、ファージによる細菌の死滅が細菌の細胞死の中で有する重要性を評価するとともに、¹³C で標識した植物遺体

を土壌に添加した後、経時的に土壌から DNA を抽出し、Stable Isotope Probing (SIP)法により ¹³C で富化したファージを検出することにより、ファージの土壌中での物質循環への寄与を証明することを目的とした。また、2) ファージの遺伝子多様性と新奇性に関しては、これまでの研究から、土壌固有の T4 型ファージに特徴的な *g23* 遺伝子が存在し、9 つのグループに区分されることが明らかとなった。そこで、世界各地の水田土壌や畑土壌を調査し、T4 型ファージの土壌固有性と多様性、地域間差を評価することを目的とした。さらに、ファージ群集の多様性を評価するため、*psbA* 遺伝子(Cyanophages)、*g20* 遺伝子(Myoviridae 科)を対象に、各種ファージ群集の遺伝子多様性、新奇性を海洋環境と比較することとした。

3. 研究の方法

(1) 水田土壌中の細菌へのファージの感染率の推定：HF を用いて細菌の土壌からの脱着を試みるとともに、細菌表面に沈着した Fe や Al を除去した後、低回転速度の遠心により、砂画分、シルト画分を分離・除去した。次いで、上澄液中の細菌を染色し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、ファージの感染率を求めた。

(2) 土壌中でのファージによる細菌の死滅の確認：供試土壌に ¹³C 標識カルスを添加し、経時的(1~56 日)に土壌から DNA を抽出した。*g23* 遺伝子、*g20* 遺伝子に特異的なプライマーにより、¹³C 標識ファージの存在を確認し、土壌中での有機物循環(代謝)にファージが関与していることを証明した。本研究では、¹³C 標識カルスを作製し、乾燥後の試料は植物遺体の、また新鮮なままのカルスは根冠細胞のモデル物質として使用した。

(3) 世界各地の土壌中のファージの多様性、共通性の解明：中国、インドネシア、バングラデシュ、ブルキナファソから採取した土壌中の *g23* 遺伝子と *g20* 遺伝子を解析した。

(4) 水田土壌中におけるファージ遺伝子 *psbA*、*g20* の解析：両遺伝子に特異的なプライマーを用いて塩基配列を決定し、海洋環境の *psbA*、*g20* 遺伝子配列と比較し、土壌中のこれら遺

伝子の多様性、新奇性を評価した。

4. 研究成果

A. 土壌中の細菌へのファージの感染率

(1) 溶菌性ファージの細菌への感染は細菌の死滅を引き起こす結果、ファージは環境中での生元素循環において重要な役割を演じている。そこで、溶菌性ファージの細菌への感染状況を TEM を用いて高倍率で細菌細胞を観察することにより評価した。溶菌ファージが感染した細菌細胞には菌体内に 100~200 nm の黒色粒子が観察され、多数の細菌細胞を TEM 観察することにより細菌への溶菌性ファージの感染率が推定可能である。予備実験において、分離したファージを細菌宿主に感染させ、宿主細胞内に黒色の粒子が形成されることを確認した後実験を進めた。

(2) まず、土壌試料としてニュージーランドの開放系大気 CO₂ 増加(FACE)実験が行われている放牧草地の土壌を供試し、大気 CO₂ の増加がファージの細菌宿主への感染に及ぼす影響を評価した。その結果、大気 CO₂ を増加させた区では 18%の細菌に、通常濃度の対照区では 28%の細菌細胞で黒色粒子の存在が観察された。本研究は、土壌中の細菌へのファージの感染を観察した世界初の研究であった。

(3) わが国水田の 3 層位から採取した土壌中におけるファージの細菌細胞への感染率を TEM を用いて観察し、細菌死滅へのファージの寄与率を推定した。感染率は 9~12%であった。また、感染率は長桿菌より短桿菌で高い傾向を示し、細菌細胞内のファージ様粒子数の中央値は 12~16 であった。

(4) 以上の 2 つの研究から、土壌中の細菌への溶菌性ファージの感染率はこれまでに報告された海洋や湖沼中の細菌へのファージの感染率に比べて極めて高いことが推察された。しかし、TEM 観察によるファージの感染率推定には研究者の個人差が反映する。そこで、湛水期の水田から表面水とその直下の土壌を採取し、細菌への感染率を比較した。その結果、土壌中の細菌へのファージの感染率は、表面水中の細菌への感染率に比べて有意に高いことが判明し、土壌中の細菌には高頻度でファージが感染していることが明らかとなった。

(5) 細菌宿主に感染したファージは、細胞内でファージゲノムを増幅させた後ファージ体を形成し、細菌細胞外へと放出される。ファージ体が細菌細胞内に形成されて初めて、黒色粒子として TEM で観察される。感染初

期のファージゲノムの増幅中は、TEM 観察ではファージの感染が確認できず、この期間を暗黒期という。従って、TEM 観察から細菌細胞への正味の感染率を推定するためには、ファージの感染から細胞体外への放出までの期間に占める暗黒期の期間を考慮して感染率を求める必要がある。これまでに海洋細菌を用いて推定された暗黒期間を用いて正味の感染率を試算した結果、土壌細菌の死滅の大部分がファージの感染によるものと結論された。

B. 土壌中でのファージによる細菌死滅の確認

(1) 「食う-食われる」の関係で、低次の微生物群集から高次の生物群集に物質が流れる現象を食物連鎖という。しかし、一部微生物は食われることなく死滅し、自己溶解等によって細胞内容物が環境に還元され、微生物群集の基質として再度利用される。物質が微生物群集間を循環することから、微生物循環 Microbial loop と呼ばれる現象である。近年、通常食物連鎖に比べて、微生物循環が物質の流れとして重要な過程で、ウイルスが微生物循環の重要な駆動力になっていることが海洋において明らかとなった。しかし、これまで土壌中においてウイルスが微生物循環を促進している証拠は得られていない。

(2) 本研究では、植物遺体の分解過程でファージを介した微生物循環が進行していることを DNA-SIP 法を用いて証明することとした。DNA-SIP 法とは、基質を ¹³C で標識して土壌中で分解させ、分解に関わる生物群集のゲノム DNA を ¹³C で標識した後、土壌から DNA を抽出して密度勾配超遠心操作で ¹³C-DNA と ¹²C-DNA を分画し、¹³C-DNA の塩基配列解析から基質の分解に関与した微生物群集を推定する方法である。

(3) SIP 法を利用するためには、基質(植物遺体)を高度に ¹³C で標識することが求められる。そこで、本研究では植物遺体のモデル物質として ¹³C で標識した水稻カルスを作製した。カルスの ¹³C 標識濃度は 78~84%であった。

(4) 乾燥カルスを土壌中で分解させた後、土壌から DNA を抽出し、密度勾配超遠心により ¹³C-DNA と ¹²C-DNA を分画し、¹³C-DNA 画分からファージの頸部遺伝子 g20 を検出した。

(5) カルスはまたその属性から、根冠細胞のモデル物質としても有用である。そこで、¹³C で標識した新鮮なカルスを土壌に添加し、同様に培養後、DNA-SIP 法により ¹³C-DNA 画

分を得、カプシド遺伝子 *g23* クローンを多数取得した。

(6) 以上 *g20*、*g23* 遺伝子の検出結果から、土壌中でもファージを駆動力とする微生物循環が進行していることを明らかにした。

C. 世界各地の土壌中のファージの多様性、共通性の解明

(1) 世界各地の土壌から DNA を抽出し、*g23* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅した後、得られた PCR 産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)で分画し、主要な DGGE バンドの塩基配列を解読した。用いた土壌は、ブルキナファソ・バングラデシュの水田土壌、中国東北部に分布する黒色土畑土壌と水田土壌、わが国水田から採取した層位別土壌等であった。

(2) 得られた *g23* クローンの塩基配列は、大部分が土壌に特異的な配列を示し、海洋等の水圏からこれまでに得られた塩基配列とは異なるとともに、土壌中の *g23* 遺伝子から推察される T4 型ファージ群集はより多様であることが判明した。

(3) 統計解析の結果、世界各地から得られた *g23* クローンの塩基配列は一般に高い類似性を示すとともに、一部は各地・各土壌に特徴的な配列であった。

(4) 本研究ではさらに、堆肥化過程にある稲ワラから DNA を抽出し、*g23* クローンの塩基配列も調査した。結果は、土壌中で検出された塩基配列に類似するものであった。

D. 水田土壌中におけるファージ遺伝子 *psbA*、*g20* の解析

(1) *psbA* 遺伝子、*g20* 遺伝子を対象に土壌中のファージ群集の特異性をさらに調査した。*psbA* 遺伝子は、ラン藻の光合成系 II の中心部に機能する遺伝子で、ラン藻に感染するファージも *psbA* 遺伝子を有し、感染細胞中でファージの *psbA* 遺伝子が機能していることが知られている。

(2) *psbA* 遺伝子の研究においては、水田表面水を供試した。得られた *psbA* クローンは 2 つのグループに大別され、これまでに海洋から得られた塩基配列とは異なり、陸水から得られた塩基配列に類似するもので、*psbA* 遺伝子は陸域の水環境と海洋で異なることが推察された。

(3) 水田表面水および水田土壌中の *g20* 遺伝子を調査した。表面水中の *g20* クローンの塩基配列は *psbA* クローン同様、陸水から得ら

れた塩基配列に類似し、*g20* 遺伝子は陸域の水環境と海洋で異なることが推察された。他方、水田土壌中の *g20* クローンの塩基配列は、水田表面水、湖沼や海洋中の *g20* 塩基配列のいずれとも異なり土壌に特有であることが判明した。

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 10 件)

- ① Chol Gyu Lee, Takeshi Watanabe, Yuichi Fujita, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Heterotrophic growth of cyanobacteria and phage-mediated microbial loop in soil: Examination by stable isotope probing (SIP) method. *Soil Science and Plant Nutrition*, Doi:10.1080/00380768.2012.658739 (2011) [査読有り]
- ② Guanghua Wang, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Spatial and temporal changes of cyanophage communities in paddy field soils as revealed by capsid assembly protein gene *g20*. *FEMS Microbiology Ecology*, **76**(2), 352-359 (2011) [査読有り]
- ③ Ryu Takahashi, Saman Bowatte, Katsutoshi Taki, Yoshinori Ohashi, Nanako Yoshikawa, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: High frequency of phage-infected bacterial cells in a rice field soil in Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*, **57**(1), 35-39 (2011) [査読有り]
- ④ Guanghua Wang, Zhenhua Yu, Junjie Liu, Jian Jin, Xiaobing Liu, and Makoto Kimura: Molecular analysis of the major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in an upland black soil in Northeast China. *Biology and Fertility of Soils*, **47**(3), 273-282 (2011) [査読有り]
- ⑤ Shun Fujihara, Jun Murase, Cho Cho Tun, Tomoya Matsuyama, Makoto Ikenaga, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Low diversity of T4-type bacteriophages in applied rice straw, plant residues and rice roots in Japanese rice soils: Estimation from major capsid gene (*g23*) composition. *Soil Science and Plant Nutrition*, **56**(6), 800-812 (2010) [査読有り]
- ⑥ Saman Bowatte, Paul C.D. Newton, Ryu Takahashi, and Makoto Kimura: High frequency of virus-infected bacterial cells in a sheep grazed pasture soil in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**(5), 708-712 (2010) [査読有り]
- ⑦ Guanghua Wang, Jun Murase, Susumu

Asakawa, and Makoto Kimura: Unique viral capsid assembly protein gene (*g20*) of cyanophages in the floodwater of a Japanese rice field. *Biology and Fertility of Soils*, **46**(2), 93-102 (2010) [査読有り]

- ⑧ Guanghua Wang, Jun Murase, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Novel cyanophage photosynthetic gene *psbA* in the floodwater of a Japanese rice field. *FEMS Microbiology Ecology*, **70**(1), 79-86 (2009) [査読有り]
- ⑨ Vita Ratri Cahyani, Jun Murase, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Change in T4-type bacteriophage communities during the composting process of rice straw: Estimation from the major capsid gene (*g23*) sequences. *Soil Science and Plant Nutrition*, **55**(4), 468-477 (2009) [査読有り]
- ⑩ Guanghua Wang, Jun Murase, Katsutoshi Taki, Yoshinori Ohashi, Nanako Yoshikawa, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Changes in major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages with soil depth in two Japanese rice fields. *Biology and Fertility of Soils*, **45**(5), 521-529 (2009) [査読有り]

[学会発表] (計4件)

- ① Yong Li, Chol Gyu Lee, Takeshi Watanabe, Jun Murase, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Bacterial communities incorporating carbon of root cap cells under upland soil conditions (DNA-SIP approach). 日本土壤肥料学会 2011年度つくば大会、つくば、2011年8月8-10日
- ② 高橋龍、浅川晋、木村真人：ファージ感染が土壤細菌の計数に及ぼす影響、日本土壤肥料学会 2011年度つくば大会、つくば、2011年8月8-10日
- ③ Makoto Kimura, Guanghua Wang, Natsuko Nakayama, and Susumu Asakawa: Ecology of viruses in rice fields, 19th World Congress of Soil Science, Brisbane, 2010年8月1-6日
- ④ 藤原俊、松山倫也、Tun Cho Cho, 浅川晋、木村真人：水田土壤中の植物遺体に存在する T4 型バクテリオファージ群集のカプシド遺伝子 *g23* による解析、日本土壤微生物学会 2009 年度大会、福岡、2009年6月1日

[図書] (計2件)

- ① Makoto Kimura, Guanghua Wang, Natsuko Nakayama, and Susumu Asakawa: Ubiquitous bacteriophage hosts in rice paddy soil. In Guenther Witzany (ed.) *Biocommunication of Soil Microorganisms*.

pp.189-213. Springer Science+Business Media. New York (2010)

- ② Vita Ratri Cahyani, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura: Succession and phylogenetic composition of microbial communities responsible for the composting process of rice straw. In Joseph C. Pereira, and John L. Bolin (eds.), *Composting: Processes, Materials and Approaches*. pp.69-112. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA (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

木村 真人 (KIMURA MAKOTO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：20092190

(2) 研究分担者

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：30285241

(3) 連携研究者