

機関番号： 11501
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2009~2010
 課題番号： 21780295
 研究課題名 (和文) 月山湿原泥炭に優占的に生息する新規古細菌群に関する研究

研究課題名 (英文) Diversity and distribution of novel archaea in a peat bog at Mt. Gassan.

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 (和文)：

本研究は山形県月山弥陀ヶ原湿原の池塘泥炭に生息する未知の古細菌群の整理生態を明らかにすることを試みた。分子系統解析により、当該環境には *Methanomicrobiales* 目や *Methanocellales* 目メタン生成古細菌、*Thermoplasmatales* 目の未知古細菌群、あるいは *Crenarchaeota* 門といった多様な未知古細菌群が優占していることを明らかにするとともに、泥炭深度における古細菌群の垂直分布を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, phylogenetic analysis of archaea in the peat bog at Mt. Gassan has been conducted. rRNA gene analysis revealed that the clones mainly affiliated with four euryarchaeotic (Orders *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, and *Thermoplasmatales*) and two crenarchaeotic (soil group 1.1 and 1.2) groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： 遺伝子資源、微生物生態、古細菌

1. 研究開始当初の背景

湿原泥炭は温室効果ガスであるメタンガスの主要な発生源の1つとして考えられており、中でも高緯度低温地域（ユーラシア大陸等）に位置する酸性泥炭からの当該ガスの排出が主因と考えられている。泥炭からのメタン排出は複数の原核微生物種による有機物分解を経て最終的にメタン生成古細菌により行われる。泥炭の有機物分解に関与する古細菌はメタン生成古細菌以外にも多種多様なものが存在していると考えられるが、それらの古細菌に関する知見は極めて乏しい状況にある。日本においては、高緯度低温地域に属する酸性泥炭の1つとして、山形県月山・湯殿山湿原群に属する弥陀ヶ原湿原があ

げられる。当該湿原泥炭は月山の八合目付近（標高約 1400 m）と高地環境に位置するとともに、日本有数の豪雪地帯として年間の半分以上が積雪に覆われる等、低温を維持した環境にある。また、当該湿原には池塘と呼ばれる泥炭池が点在しており、酸性水が泥炭を常に覆っている環境を形成している。このような環境下においては、泥炭は空気中の酸素の浸透を受けにくくなり、メタン生成を末端とする絶対嫌気微生物生態系が形成されていることが推察される。また、弥陀ヶ原湿原泥炭においては、本報告者らにより特定の真正細菌を対象とした研究が行われているが、古細菌を対象とした研究はこれまで全く行われていなかった。このため、当該湿原泥炭

において古細菌群の研究を行うことにより、未知古細菌群の生態解明など、新規の学術的知見が得られることが想定される状況にあった。

2. 研究の目的

本研究では、月山湿原群の弥陀ヶ原湿原池塘泥炭(図1)に生息する古細菌群を研究対象として、これらの多様性を明らかにするとともに、泥炭深度による古細菌群の分布の差異(垂直分布)を明らかにすることを目的とした。また、当該古細菌群の培養による取得も目的とした。更に、当該古細菌群の培養条件を決定するため、池塘泥炭の物理化学的性質を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 月山弥陀ヶ原池塘泥炭の採取および物理化学的性質の解析

泥炭試料は平成21年11月に採取した。採取には垂直式試料採取器(ピートサンプラー)を使用した。これにより、泥炭の圧縮を回避し、垂直分布情報を維持することを可能とした。採取後の泥炭(図2、深度約24cm)は現場にて滅菌済みのスパーテルにより4cm間隔に分画し、脱酸素剤入りのポリカーボネートボックスに密封、氷冷状態で実験室に持ち帰った。分画泥炭試料を40,000xg、20分遠心分離を行い、上清画分を採取し間隙水とした。間隙水を用いて、pH、溶存イオン(硫化水素、鉄、ナトリウム、カルシウム、アンモニウム、塩化物、硫酸、硝酸イオン等)の測定を行った。測定には微量pH計(Twin pH, Hotiba)、イオンクロマトグラフ(DX-100, Dionex)、および各種比色定量法(フェナントロリン法、クライン法等)を用いた。なお、遠心分離後の沈殿画分の泥炭はただちに-80°Cで超低温保存した。



図1 月山弥陀ヶ原湿原池塘



図2 泥炭試料の採取風景

(2) 古細菌の菌叢解析

遠心分離により脱水された泥炭を試料として、ビーズ法(PowerMax Soil DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories)によりDNA抽出を行った。抽出後のDNAはエタノール沈殿により100倍に濃縮し、分光光度計(Gene Quant Pro, GEヘルスケア)およびアガロースゲル電気泳動によりDNA濃度と純度の評価を行った。得られたDNAを鋳型として、サーマルサイクラー(PCR Express II, Thermo Fischer Scientific)により古細菌16S rRNA遺伝子約1.5 kbpのPCR増幅を行った。なお、PCR条件として、A25F(5'-CYGGTTGATCCTGCCRG-3')および1492R(5'-GGHTACCTTGTTACGACTT-3')プライマーセット、20サイクル、ホットスタート法で行った。PCR増幅産物はアガロースゲル電気泳動および精製キット(Min Elute Gel Extraction Kit, Qiagen)により精製後、プラスミドベクター(pCR4-TOPO, Invitrogen)に導入した。これをコンピテントセル(ECOS Competent E. coli DH5 α , Nippon gene)に入れ、大腸菌の形質転換を行った。形質転換後の大腸菌をLB/Ampicillin/X-Galプレートに塗抹し、Blue/White selectionにより古細菌16S rRNA遺伝子を含むコロニーをランダムに選択し、クローンライブラリーを作成した。続いてコロニーを釣菌し、コロニーPCRを行った。PCR条件として、プラスミドベクター由来のプライマーセットであるT3(5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3')およびT7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')、30サイクルで行った。増幅後のコロニーPCR産物は、①PCR-RFLP法によるDNA多型解析、②塩基配列解析の2つの実験に用いた。① PCR-RFLP多型解析: PCR増幅産物を制限酵素(*Hha* I, Takara Bio)で37°C、2時間インキュベートすることで断片化し、アガロース電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色後、泳動後パターンの多型評価を行った。解析は泥炭深度あたり60クローンずつ行った。② 塩基配列の決定: 上記PCR-RFLP多型解析で同一のバンドパターンを示したクローングループを同一のクローンとし、塩基配列の決定を行った。配列決定のため、クローンライブラリーより大腸菌コロニーを釣菌し、上述のようにコロニーPCRを行った。コロニーPCR産物を精製キット(Exo-SAP-IT, GEヘルスケア)により精製し、これを鋳型としてサイクルシーケンス反応を行った。サイクルシーケンス反応条件として、反応試薬にBigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を、シーケンスプライマーに1390R(5'-ACGGCGGTGTGTACAA-3')を用いた。

サイクルシーケンス反応後の産物は精製キット (CleanSEQ, Beckman coulter) により精製し、DNA シークエンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) により配列決定を行った。得られた DNA 配列は塩基配列解析ソフト (ATGC-MAC ver.4, Genetyx) および遺伝子情報処理ソフト (GENETYX MAC ver.13, Genetyx) により配列のトリミングとチェックを行った。その後、配列情報を国立遺伝学研究所 DNA データベース (DDBJ, DNA Data Bank of Japan) に登録されている既知古細菌種および未知古細菌の 16S rRNA 遺伝子配列と比較することで、近縁種の推定を行った。更に、本研究および上記の相同性解析により得られた塩基配列を用い、分子系統解析を行った。解析は塩基配列を整列後、分子系統解析ソフト (MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver.4.1) により系統樹を作成することにより行った。なお、系統樹は近隣結合法を、分子進化モデルには Kimura's 2 parameter を、ギャップ処理には Pairwise deletion を用いた。また、系統樹が描くトポロジーの正確さを評価するため、ブートストラップ検定を 500 回行った。

(3) 古細菌の分離培養

クリーンベンチ内にて泥炭試料を滅菌済みのスパーテルで均一化し、アルゴンガスにより脱酸素処理・滅菌処理済みの血清バイアル瓶に添加密封した。次いで、アルゴンガス脱酸素処理・滅菌処理・チタン還元処理済みの低温弱酸性液体培地 (GM 液体培地) を無菌的かつ嫌氣的に採取し、上記の泥炭入りの血清バイアル瓶に添加し、懸濁した。これにより、泥炭懸濁液を作成した。泥炭懸濁液は、希釈用の GM 液体培地に適宜接種することで限界希釈を行った。

液体培養：泥炭懸濁希釈液に各種の基質 (H_2/CO_2 、酢酸、メタノール等) を封入あるいは添加し、 $20^\circ C$ にて静置液体培養を行った。固体培養：上記の泥炭懸濁希釈液を GM 固体培地に混合することで固体培養を行った。なお、接種前には $100^\circ C$ で液状化させた GM 固体培地をクリーンベンチ内で風冷させ、十分低温にしてから接種を行った。混合後、ただちにバイアル瓶を横に寝かせることでスラント化させ、 $20^\circ C$ で静置培養を行った。

4. 研究成果

(1) 月山弥陀ヶ原池塘泥炭の採取および物理化学的性質の解析

間隙水および池塘水の pH を測定した結果、いずれの泥炭深度においても pH 4.6-5.0 であった。この結果から、当該環境は弱酸性から酸性の環境にあることが明らかになった。

これは、当該環境の水源が雨水または雪解け水のみ依存していることに起因し、フミン酸などの腐植酸が蓄積することによるものと考えられた。また、溶存イオンの分析の結果、鉄イオン濃度は概ね $100\sim 300\ \mu M$ の範囲にあり、泥炭深度が深くなるほど上昇する傾向が見られた。また、いずれの深度においてもほぼ三価鉄が占めていた。水底に近い上層部泥炭部 (0-4 cm) においても三価鉄が 50%以上を占めていたことから、当該池塘泥炭は水底下でただちに酸素が消費され、嫌気環境にあることが示唆された。溶存硫化水素イオン濃度は深度によらず概ね $5\sim 10\ \mu M$ の範囲にあった。この結果から、当該環境においては、微量の硫酸イオンを硫酸還元微生物が還元しているものと推察された。その他の溶存イオン濃度については、概ね $150\ \mu M$ の範囲にあった。このうち、アンモニウムイオン濃度は深度が浅くなるほど低下した。この結果から、泥炭上層部でアンモニア酸化微生物による酸化反応が起きている可能性も推察された。これらと微生物種の相関性に関しては、より詳細な解析が必要であると思われる。

(2) 古細菌の菌叢解析

いずれの深度の泥炭からも、ゲノム DNA の取得・PCR 増幅に成功した。また、クローニング後の DNA 多型解析において、特徴的なバンドパターンを示したクローンとして、0-4 cm 区画で 25 クローン、4-8 cm 区画、8-12 cm 区画、12-16 cm 区画、および 20-24 cm 区画で 24 クローン、16-20 cm 区画で 31 クローンが得られた (図 3)。これらのクローンの塩基配列を決定し、分子系統解析を行った結果、いずれ泥炭深度においても、*Euryarchaea* 門 *Thermoplasmatales* 目の他 *Methanomicrobiales* 目 *Methanosarcinales* 目、*Methanocellales* 目のメタン生成古細菌のグループが共通に検出された。*Thermoplasmatales* 目においては、海底で多く見いだされる未培養クローン群である Marine Benthic Group D (MBGD) や、淡水環境で頻出する未培養クローンである Water-Soil Group1&2 に近縁なものが多く検出された (図 4)。特に MBGD においては、弥陀ヶ原湿原に特異的なクローングループが得られ、これらを Midagahara Cluster と名付けた。同クラスターを形成する古細菌群の機能については不明であるが、いずれの深度の泥炭においても頻出したことから、泥炭分解において重要な役割を果たしていることが推察された。*Methanomicrobiales* 目においては、本菌叢解析で最も主要な古細菌群を形成していた (図 5)。本グループはニューヨークやシベリア泥炭など、高緯度低温地域の泥炭において頻繁に見いだされており、

泥炭からのメタン生成に関わる重要なメタン生成古細菌群として認識されている。このため、弥陀ヶ原湿原泥炭においてもメタン生成の主因となるグループであることが強く示唆された。*Methanosarcinales* 目においては、メチルアミンなど酢酸以外の基質を資化可能なグループである *Methanosarcinaceae* 科は検出されず、酢酸のみ資化可能な *Methanosaetaceae* 科メタン生成古細菌のグループに近縁なクローンが見いだされた(図5)。これらから、当該泥炭においては *Methanosaetaceae* 科に属するメタン生成古細菌が泥炭分解に伴い生成した酢酸をメタンに変換する役割を担っているものと推察された。*Methanocellales* 目においては、メタン生成古細菌の中でも *Methanomicrobiales* 目の古細菌群に次いで多くのクローンが検出された(図5)。これらのグループは他の高緯度低温泥炭では古細菌菌叢の数%程度しか見いだされないことから、弥陀ヶ原湿原泥炭ではこれらのグループの古細菌群が優占するような何らかの環境が整っていることが推察された。同グループのメタン生成古細菌は近年水田より純粋分離がなされ、低水素環境で生育可能であることが明らかとなっている。そのため、本研究環境においても泥炭から生成した低濃度の水素を資化することでメタン生成に関与している可能性が推察された。

古細菌の菌叢解析の結果、上記の *Euryarchaeota* 門以外に *Crenarchaeota* 門の古細菌群に属するクローンも検出された(図6)。これらは各々の泥炭深度における古細菌菌叢の3割から5割を占めており、当該環境で何らかの役割を担っていることが推察された。その機能に関しては、これらと近縁なものが未培養クローン群(Group 1.1 および 1.2)であることから、現時点で推定は困難な状況にある。これらのグループの機能推定には、メタゲノムによる機能遺伝子情報の網羅的取得や、培養化が有効であると思われる。

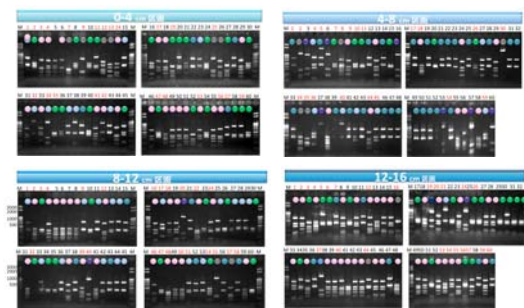


図3 PCR-RFLPによる古細菌クローンの多型解析

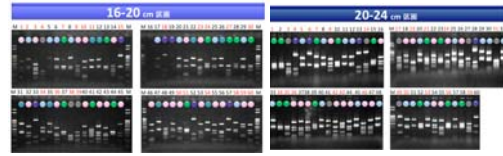


図3 続き

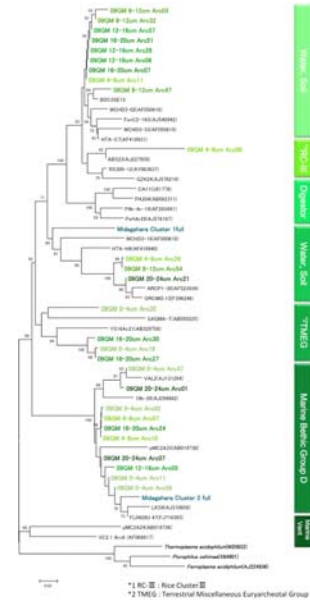


図4 月山弥陀ヶ原湿原池塘泥炭に生息する古細菌の分子系統樹 (*Thermoplasmatales* 目古細菌)

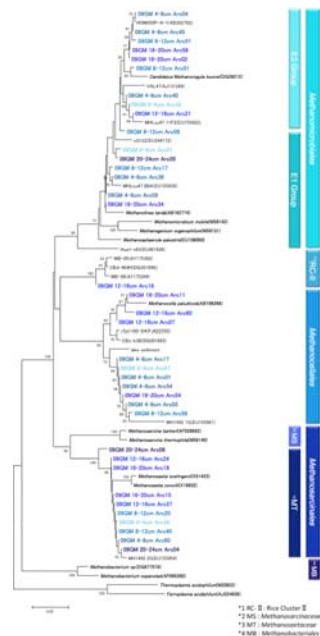


図5 月山弥陀ヶ原湿原池塘泥炭に生息する古細菌の分子系統樹 (メタン生成古細菌)

日本微生物生態学会、2010年11月25日、筑波大学

②服部聡、月山弥陀ヶ原湿原池塘における古細菌 16S rRNA 遺伝子の多様性と分布、第25回日本微生物生態学会、2009年11月21日、広島大学



図6 月山弥陀ヶ原湿原池塘泥炭に生息する古細菌の分子系統樹 (Crenarchaeota 門古細菌)

(3) 古細菌の分離培養

液体培養および固体培養のいずれにおいても H_2/CO_2 、メタノール、酢酸を基質とした培養系で菌の増殖が見られた。これらの微生物については単離には至っておらず、現在分離培養を続けているところである。今後、Midagahara Cluster 古細菌をはじめとする未知古細菌群が単離されることにより、弥陀ヶ原湿原泥炭における未知古細菌群の役割解明に繋がることが期待される。

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 2 件)

①服部聡、月山弥陀ヶ原湿原泥炭におけるメタン生成アーキアの多様性と分布、第26回

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