

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710091

研究課題名(和文) 指標微生物のITS-DNAを用いたマイクロアレイによる土壌環境評価技術の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation technique for soil quality using ITS-DNA microarray of indicator microorganisms.

研究代表者

岡村 恵子 (OKAMURA, KEIKO)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・研究員

研究者番号：10570533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、農耕地土壌における適切な肥料および農薬施用のための土壌管理システムの構築を目標とし、土壌微生物を指標生物とした土壌環境モニタリング法開発の基盤研究を行った。指標生物として、農耕地土壌などを含めた自然環境中に普遍的に存在する、アンモニア酸化微生物に着目した。

定量PCRの結果、強酸性茶園土壌ではAOBと比較してAOAが圧倒的に優占していることから、アンモニア酸化は、ほぼAOAによると示唆された。T-RFLP解析およびクローンライブラリー解析の結果、強酸性茶園土壌では一般土壌と比較して特異的な群集構造が形成されており、酸性環境に適応したAOAが特異的に生息していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Ammonia oxidation is the important step of nitrification and is performed by both ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB). In tea orchard soil, we must employ available means to inhibit incomplete nitrification by ammonia oxidizing microorganisms and to prevent denitrification by ammonia oxidizing bacteria. The aim of this study is to reveal activity and diversity of AOA and AOB in acidic tea orchard soil to develop agricultural management technologies.

Archaeal amoA genes are more abundant than bacterial amoA genes in soil samples, and qPCR suggested that ammonia oxidization is driven by AOA in acidic tea orchard soil. The result of the phylogenetic analyses showed that all clones in clone libraries for tea orchard soils can be distinguished from those for unplanted soil. These results suggest the specific AOA populations dominate as ammonia oxidizers in acidic soils, particularly acidic tea orchard soils, as a result of the adaptation to specific ecological niches.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：強酸性茶園土壌 AOA AOB amoA遺伝子 PNR 定量PCR T-RFLP解析 クローンライブラリー解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 農耕地土壌での効率的な農作物生産には、化学肥料や農薬の施用が必要不可欠であるが、それらの適切な管理システムは開発されておらず、過剰施用による周辺土壌・地下水・河川への環境汚染が問題となっている。近年、環境保全型農業が推進され、農耕地土壌や周辺環境の環境負荷の軽減が重要視されるようになり、実用的な土壌環境モニタリング法が求められている。一般に土壌環境要因の数値分析は、高価な分析機器や専門技術が必要であるため、容易に実施できない。一方、特定の環境要因に顕著な挙動を示す指標微生物を選択し、これをモニタリングすることで、間接的に土壌環境のモニタリングが可能となる。

(2) 近年、腸内細菌などの複合微生物群のモニタリングには、使用の簡便さからマイクロアレイが用いられている。これには DNA プローブとして一般的に 16S rRNA 遺伝子が多用されるが、近縁微生物の識別解像度が低いという問題がある。申請者はプロテオバクテリアを用い、ITS 領域は 16S rRNA 遺伝子より 20 倍も系統学的識別解像度が高いことを示した。さらに ITS を DNA プローブに用いた場合の識別解像度は、最高解像度のゲノム DNA-DNA ハイブリダイゼーション法に匹敵することを示した。この様にマイクロアレイに ITS-DNA をプローブに用いることで、識別解像度の高い微生物モニタリングの実現が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、モデル茶園土壌中の指標微生物による ITS-DNA マイクロアレイを作製し、指標微生物のモニタリングによる、簡易・迅速かつ安価な土壌環境モニタリング法の開発を行う。また、これにより農耕地土壌での化学肥料・農薬の適切な施用管理システムの実現が期待できる。

(2) 農耕地土壌を含む土壌環境全般では、プロテオバクテリアとアシドバクテリアの DNA が普遍的に検出される。特に酸性土壌での優占は、これらが茶園土壌を特徴づける指標微生物として不可欠であることを示している。プロテオバクテリアの多くは純粋分離が可能であるが、アシドバクテリアの分離は極めて難しい。申請者は High through-put culturing (HTC) 法により、従来は困難であった土壌微生物群 (アシドバクテリア) の純粋分離を試みる。当然のことながら、これらはマイクロアレイの DNA プローブとして重要な要素となる。

(3) HTC 法により分離効率が飛躍的に上昇し、系統的に極めて密接した微生物群の獲得が予測できる。ITS は多様性が大きく、近縁種識別の系統指標として有用であるため、本研究における土壌微生物分離株の識別には最適である。一方で、ITS は同一ゲノム内での多型性が著しい場合があるため注意が必要である。しかし申

請者らは微生物ゲノム内の複数 ITS を同時にハイブリダイゼーションに用いることを考案し、この問題を克服している。分類学では近縁の 2 種の類似度評価には全ゲノム情報を用いるが、ゲノム内のほんの一部の配列 (ITS) を用いる発想は世界的にも類がない。

(4) マイクロアレイ解析による土壌指標微生物のモニタリングから、間接的な土壌環境モニタリングが可能となれば、農耕地土壌での化学肥料・農薬の適切な施用管理システムが実現でき、過剰施用による農耕地周辺域の環境汚染が回避できる。このように本研究計画によって土壌環境モニタリング技術の基礎から応用までの一貫した研究の構築が実現できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 当初の予定では、過剰施肥・無施肥の茶園土壌の構築と、土壌の物理化学的環境要因の定量分析。16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーによる各土壌の複合微生物群集構造解析。High through-put culturing (HTC) 法による微生物の純粋分離。分離微生物株の生理学的解析。指標微生物から ITS-DNA プローブを調整、これを用いて DNA マイクロアレイを作成。土壌試料を用いてマイクロアレイの有効性を確認。のように、からまでの実験を行う予定であった。しかし、の結果から、ターゲットとする微生物群があまりにも分子系統学的に多岐にわたり、続くにおいて分離を試みても、純粋分離が可能な微生物が実際の環境中に存在する微生物の 0.1%にも満たないことが予測された。そこで、以下では指標微生物群を、茶園などの強酸性環境下にも普遍的に存在する、アンモニア酸化微生物 (アンモニア酸化アーキア (AOA) とアンモニア酸化バクテリア (AOB)) に絞ることにした。

(2) 愛知県田原市、豊橋市の 4 箇所の茶園において土壌試料を採取した。対照系として、一般農地土壌および一般土壌の採取は、田原市および豊橋市の 2 地点から行った。土壌試料の採取は畦間から行い、表土 (0~15 cm) を採取した。採取した土壌試料を研究室に持ち帰り、一部は直ちに -20 で冷凍保存した。その他の土壌試料は 2 mm のふるいを通して以降の分析に用いた。土壌化学特性の分析として、土壌 pH、含水率・有機物量、微量元素 (銅、亜鉛、マンガ、ホウ素)、アンモニア酸化活性 (PNR: potential nitrification rate) は塩素酸塩阻害法を用いた亜硝酸塩の比色定量法を用いた。

(3) 土壌試料からの DNA 抽出は、MobiO Powersoil kit を用いた。茶園土壌は炭酸カルシウムを用いて中和した後、DNA 抽出を行った。抽出した DNA を用いて、16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を標的として、定量 PCR を行った。16S rRNA 遺伝子のスタンダードとして、*E. coli* IAM 12119^T および *Methanothermobacter thermoautotrophicus* delta H 株を用いた。また、AOB および AOA のスタンダードとして、1 つの

茶園土壌試料より得た AOA-*amoA* 遺伝子を用いた。AOB のスタンダードとして、*Nitrosomonas europaea* ATCC 19716 株を用いた。さらに、AOA および AOB の *amoA* 遺伝子を標的とした、T-RFLP 解析、また両遺伝子を用いたクローンライブラリー解析を行った。

4. 研究成果

(1) 茶園土壌の物理化学的性状として、pH は 3.9-5.1 と一般土壌に比べて低く、酸性傾向にあった。熱抽出性窒素の値は、一般土壌と比較し、茶園土壌のほうが 10 倍以上と極めて高い値を示した。また含水率、リン酸、カリウム、マグネシウムも一般土壌と比較し、高い値を示した。このことから、対象とした茶園土壌には養分が非常に豊富に含まれていることが明らかになった。

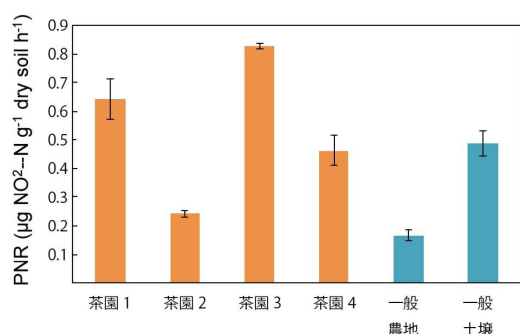


図 1 各土壌におけるアンモニア酸化活性

茶園酸性土壌 4 種、一般土壌 2 種について塩素酸塩阻害法を用いてアンモニア酸化活性を定量した (図 1)。一般土壌ではアンモニア酸化活性はそれぞれ 0.17g NO₂⁻-N dry soil g⁻¹ h⁻¹、0.49g NO₂⁻-N dry soil g⁻¹ h⁻¹ となり、アンモニア酸化活性が認められた。一方、茶園酸性土壌におけるアンモニア酸化活性は 0.24-0.83g NO₂⁻-N dry soil g⁻¹ h⁻¹ となり、今回調査した全ての酸性茶園土壌試料においてアンモニア酸化活性が認められた。このことから、酸性環境である茶園土壌においてもアンモニア酸化が起きていることが示された。

(2) リアルタイム定量 PCR による遺伝子定量の結果を図 2 に示す。茶園 1-4 の土壌試料および一般土壌について、定量 PCR による 16S rRNA および *amoA* 遺伝子の定量を行った。

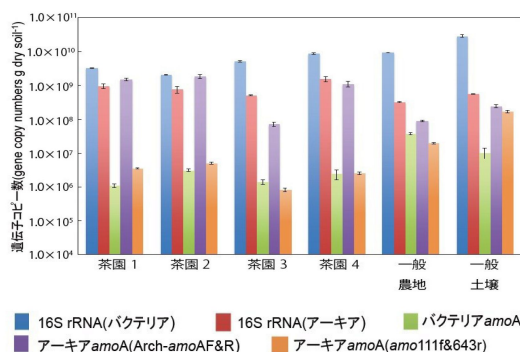


図 2 定量 PCR による各土壌の遺伝子量

16S rRNA 遺伝子の分布量から、茶園酸性土壌、一般土壌ともにアーキアよりも細菌の存在量が多いことがわかった。一方、*amoA* 遺伝子の分布量からは、AOB よりも AOA の存在量が多い結果となった。特に茶園酸性土壌試料においてはその傾向は顕著であった。全 *amoA* 遺伝子量のうち、細菌由来の *amoA* 遺伝子の占める割合は 0.07-1.9% であり、アンモニア酸化微生物として AOA が圧倒的に優占することがわかった。

(3) T-RFLP の結果を用いて多次元尺度解析を行い、茶園土壌と一般土壌の比較評価を行った。その結果を図 3 に示す。図はプロットされた点が近ければ近い程、類似した群集構造をとっていることを示している。左上から制限酵素 *Hae*III、*Bst*UI、*Hha*I を用いた結果を示す。AOA の *amoA* 遺伝子を標的として行なった解析結果では、一般土壌と比較して茶園土壌試料の AOA はいずれの制限酵素を用いた結果においても近い位置にプロットされた。このことから、茶園酸性土壌における AOA の群集は類似的な構造をとっていることが示された。また AOB の結果についても、制限酵素 2 種において比較的類似した群集構造を示した。一般土壌においては、AOA の *amoA* 遺伝子を標的とした解析ではいずれも近い位置にプロットされた。その一方で、AOB の *amoA* 遺伝子を標的とした解析ではばらつきがあり、*Hae*III と *Bst*UI の結果ではかなり離れた位置にプロットされた。

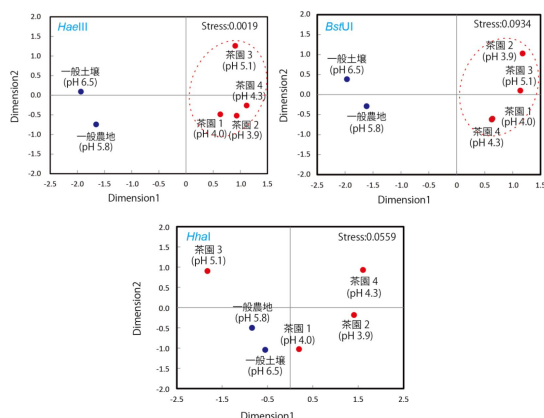


図 3 各土壌の T-RFLP 法による多次元尺度解析 (AOA)

(4) 茶園土壌、一般土壌の AOA の *amoA* 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析を行った後、それぞれのクローン配列を基に系統解析を行った。本研究において、茶園酸性土壌から得られたクローンは好酸性 AOA グループに属し、一般土壌から得られたクローンは土壌・土壌堆積物からなるクラスターに属することが明らかになった。茶園土壌環境から得られた全ての AOA クローンは、互いに系統学的に近縁種であり、中国の茶園や森林土壌から得られたクローンと近い種であった。これらの結果は、対象とした茶園酸性環境では、好酸性 AOA がアンモニア酸化を担っていることを示唆した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Nakabachi, A., Ueoka, R., Oshima, K., Teta, R., Mangoni, A., Gurgui, M., Oldham, N.J., van Echten-Deckert, G., Okamura, K., Yamamoto, K., Inoue, H., Ohkuma, M., Hongoh, Y., Miyagishima, S.Y., Hattori, M., Piel, J., Fukatsu, T. Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Curr. Biol.*, 23, 2013, 1478-1484. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.027.

Yamada, T., Araki, S., Ikeda-Ohtsubo, W., Okamura, K., Hiraishi, A., Ueda, H., Ueda, Y., Miyauchi, K., Endo, G. (2013) Community structure and population dynamics of ammonia oxidizers in composting processes of ammonia-rich livestock waste. *Syst Appl Microbiol.* 36(5):359-67. doi: 10.1016/j.syapm.2013.02.001.

Okamura, K., Hisada, T., Takata, K., and Hiraishi, A. Relationships between 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer DNA and genomic DNA similarities in the taxonomy of phototrophic bacteria. *Journal of Physics: Conference Series*, 査読有, 433, 2013, 012037, doi:10.1088/1742-6596.

Takaichi, S., Sasikala, C., Ramana, C.V., Okamura, K., and Hiraishi A. Carotenoids in *Rhodoplanes* species: variation of compositions and substrate specificity of predicted carotenogenesis enzymes. *Curr. Microbiol.*, 査読有, 65(2), 2012, 150-155, doi: 10.1007/s00284-012-0139-y.

Okamura, K., Takanashi, A., Yamada, T., and Hiraishi, A. Ammonia-oxidizing activity and microbial community structure in acid tea (*Camellia sinensis*) orchard soil. *Journal of Physics: Conference Series*, 査読有, 352, 2012, 012052, doi:10.1088/1742-6596.

[学会発表](計6件)

K. Okamura *et al.*, Comparison of hybridization analyses of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer DNA and of genomic DNA in phototrophic genera, The Irago Conference 2012(15-16, Nov, 2012) Irago Sea-Park & Spa.

A. Takanashi *et al.*, Diversity analysis of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in acidic tea orchard soil, The Irago Conference 2012(15-16, Nov, 2012) Irago Sea-Park & Spa.

A. Takanashi *et al.*, Analysis of ammonia-oxidizing microorganisms in acid tea orchard soil in terms of quantity, quality, and

activity, 第28回日本微生物生態学会大会 (2012年9月19-22日)豊橋技術科学大学

高梨藍生、酸性茶園土壌におけるアンモニア酸化微生物の活性と多様性、環境バイオテクノロジー学会、2012年度大会(2012年6月25-26日)京都大学宇治キャンパス宇治おうばくプラザ

高梨藍生、強酸性茶園土壌におけるアンモニア酸化活性とアンモニア酸化微生物の群集構造解析日本農芸化学会 2012年度大会(2012年3月22-26日)京都女子大学

K. Okamura *et al.*, Ammonia-oxidizing activity and community structure in hyperacidic tea (*Camellia sinensis*) orchard soil, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (17-18, Nov, 2011) Toyohashi Univ. Technol.

[図書](計0件)

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡村 恵子(OKAMURA, Keiko)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・研究員

研究者番号 : 10570533