

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651266

研究課題名(和文)「天狗の麦飯」の多様性と消滅因子の解明

研究課題名(英文) Studies on the diversity of "Tenguno-mugimeshi" microbial community

研究代表者

宮下 英明 (Miyashita, Hideaki)

京都大学・地球環境学堂・教授

研究者番号：50323746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：「天狗の麦飯」と総称される土壌様微生物塊について、既報産地の再調査・解析をおこない、異なる山系のものが類似の微生物群集構造をもつ一方で、全く異なる微生物群集構造をもつものがあること、「天狗の麦飯」の弾力のある粒状微生物塊の形成には、細胞外粘質物質をもつ *-proteobacteria* 及び *Acidobacteria* が寄与していること、既報産地の「天狗の麦飯」の消滅に、植物による被覆や土壌化、人為的攪乱が深く関わっている可能性があること、が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study re-investigated the current status of reported habitats of "Tengu-no-mugimeshi", soil-like massive microbial particles, and compared the microbial community structures of the particles from those habitats. Microbial community structure of the particles from one habitat was completely different, while those from the other habitats even in different mountain area were similar one another. Gamma-proteobacteria and Acidobacteria with extracellular mucilage contributed to the formation of the granular and elastic particles. Disappearance of "Tengu-no-mugimeshi" from the reported habitats might be caused by covering by plants, accumulation of soil and man-made disturbance.

研究分野：藻類学、微生物生態学

キーワード：天狗の麦飯 微生物群集構造 生態変化 微生物保全 土壌微生物 消滅因子

## 1. 研究開始当初の背景

「天狗の麦飯」は、長野県や群馬県内の火山帯や周辺高地のみに分布する微生物塊で、日本固有であると考えられている。褐色がかった寒天粒子状で、江戸末期から明治時代には「飯砂」や「粟飯」とも呼ばれ「食べられる土」として知られていた。一部の産地は天然記念物に指定されているものの、気候変動、土地利用形態の変化等により産地が激減している。その一方で、それらの微生物群集組成、各微生物の代謝、群集の生成・消滅因子など生物学的知見は乏しい。「天狗の麦飯」の実体については、大正期および昭和初期に、それぞれ細菌塊説(川村 1916)と藍藻(シアノバクテリア)塊説(Molish 1926)が提案され、現在では藍藻塊説が広く流布している。我々はこれまでに、川村の報告した産地の「天狗の麦飯」を許可を得て採取し、主に16S rDNA 遺伝子をターゲットとした PCR-DGGE 法を用いてその微生物群集構造を解析し、この微生物塊が、藍藻群集ではなく7~10 種程度の細菌を主とする難培養細菌の複合群集であることを明らかにしてきた。また、過去に報告された「天狗の麦飯」産地のうち、現存地4箇所と消滅地3箇所を見出している。現存が確認された産地のうち採取許可の得られた3箇所から「天狗の麦飯」を採取したところ、同一呼称で呼ばれている「天狗の麦飯」はその性状が必ずしも一致しておらず、それらの微生物組成も一致していない可能性に気付いた。これは、産地ごとに生成・維持機構が異なり、特定の産地のみを知見を基に立案された保護・保全策が、汎用的に応用できるわけではないことを示唆する。このため、各産地の微生物群集構造を解析し、各産地の「天狗の麦飯」微生物群集構造を把握し、その特徴を明らかにしたうえで、成因や代謝の推定や、個々産地の保護・保全策を立案する必要がある。さらに、3箇所の消滅産地の現状を整理し、消滅の要因を推定することは、保護・保全のあり方について重要な情報を提供できるものと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、「天狗の麦飯」多様性、群集構造の解析、さらに消滅因子の解明を目指し以下のことを行うことを目的とした。

- (1) 先行研究によって報告されている産地を再調査し現存状況を明らかにする。同時に、消滅産地の特定をはかる。
- (2) 現存産地の「天狗の麦飯」の微生物群集構造を解析し、産地相互に比較することによって、その多様性を明らかにする。
- (3) 「天狗の麦飯」において体積を占める細菌の分類群を特定する。「天狗の麦飯」の特徴の一つである弾力のある寒天粒子状の微生物群集を形成することは、細胞外多糖(EPS)を生産する複数の細菌によるものである。しかし、PCR-DGGE など rRNA 遺伝子のコピー数や配列に基づく群集構造解析方法

では、光学顕微鏡観察によって観察することのできる細菌が、PCR-DGGE によって検出されたとの細菌に相当するか相互関係を明らかにすることができない。また、PCR-DGGE では、それら EPS を大量に生産する細菌が相対的に過少評価される可能性が高い。そこで、実際に光学顕微鏡によって観察できる細菌がどの分類群に属する微生物であるかについて蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)を用いて明らかにすることを目的とした。

(4) 消滅産地の特徴を整理し消滅因子の推定を行うこと。

## 3. 研究の方法

(1) 先行研究によって報告されている産地の現存状況の再調査

高橋基生(1935)によって報告された群馬県角間山周辺の産地 ~ , 川村多実二博士(1934)によって報告された長野県上水内郡信濃町古海の産地について、文献や地権者ならびに地元の有識者へのヒアリング、現地での探索調査によって産地の再発見を試みた。

(2) 微生物群集構造の比較

細菌、真核生物、古細菌の小サブユニット rDNA 遺伝子をターゲットとして、PCR-DGGE を行い、ゲルからバンドを切り出した後、塩基配列を決定した。BLAST による相同性検索によって当該配列をもつ生物の分類学的位置を推定した。また、DGGE におけるバンドの濃さから当該微生物存在量の多少を推定した。

(3) 体積を占める細菌の同定

体積を占める細菌の同定には、CARD-FISH 法を用いた。また、解析には長野県北信地方から採取した「天狗の麦飯」を用いた。

-proteobacteria, Acidobacteria に対するプローブには既報のものを用いた。

-proteobacteria の既報のプローブの配列が DGGE で検出された配列の一致しなかったため、また、Chloroflexi に対するプローブは存在しなかったため、それぞれ DGGE バンドの解析によって得られた配列を既報の配列とともに BioEdit を用いてアラインメントし、それぞれの生物群に特異的なプローブを作成した。また、ハイブリダイゼーションの際の細胞透過処理には、マイクロウェーブとリゾチーム処理を組み合わせた新たな手法を用いた。

(4) 消滅産地の特徴と消滅因子の推定

これまでに消滅の確認されている産地ならびに本研究における既報産地の現地調査によって明らかにされた消滅産地の特徴を整理した。

(4) 消滅産地の特徴と消滅因子の推定

これまでに消滅の確認されている産地ならびに本研究における既報産地の現地調査によって明らかにされた消滅産地の特徴を整理した。

## 4. 研究成果

(1) 先行研究によって報告されている産地の現存状況の再調査

高橋基生(1935)によって報告された群馬県角間山周辺の産地 ~ , 川村多実二博士

(1934)によって報告された長野県上水内郡信濃町古海の産地の特定と現存状況について調査した。産地 および産地 については現存が確認できた。



図1 角間山周辺の産地

産地 (図1)は、尾根上に縦約8m、幅4mにわたってササや灌木等による被覆がない場所に「天狗の麦飯」が露出していた。中心部では、深さ約6cmまで微生物塊が存在し、それ以下には粘土層があり約19cmで石に当たり観察不可能となった。周縁部では、繁茂するササの根元の深さ23cm程度まで「天狗の麦飯」様の塊が確認できた。残念ながらこの産地には、幅50cm程度のスコップによる盗掘跡が3箇所みられた(図2)。盗掘時期は全く不明であるが、調査時においては復元していなかった。地権者のヒアリングから、この産地がかつてメディアに出たことがわかっており、これが影響して盗掘に至っていることが考えられた。保護・保全方法がわからない現状では、無闇な産地情報公開が破壊や消滅をもたらす可能性があることを如実に示していた。



図2 角間山周辺の産地 の盗掘跡の一例

産地 はササに被われており目視による産地の特定はできなかったものの、コア採取により表層から10cm程度までの間にササの根が絡みついた「天狗の麦飯」様の塊が観察できた。産地は急峻なササ原で、分布の範囲や深度等の詳細については調査できていない。産地ならびに古海の産地については、おおよその場所を特定することはできたものの、微生物

塊の発見には至らなかった。産地 は斜面の崩落が見られたことから消滅したものと考えられる。古海の産地については、ササ等の被覆によって発見できなくなってしまった可能性と消滅してしまっただけの可能性が考えられるため、さらに詳細な調査が必要である。

## (2) 微生物群集構造の比較

これまでに長野県北信地方(図3左図)と群馬県吾妻郡の2産地の「天狗の麦飯」粒子状微生物塊の微生物群集構造結果から、「天狗の麦飯」を構成する微生物群集が相互によく似ており、いずれも Acidobacteria, Ktedonobacteria, -Proteobacteria, -Proteobacteria, を主とする7~10種程度の細菌によって構成されているものであることがわかっている。そこで、本研究の過程で新たに再発見した2産地(角間山周辺産地、髭山)の微生物群集構造をPCR-DGGEで解析し、他産地と比較した。



図2 天狗の麦飯

左：長野県北信地方産地，中央：角間山周辺産地，右：長野県髭山産地

角間山周辺産地 の「天狗の麦飯」(図3中央)は、白色~茶褐色を呈し、長径が0.7mm程度の弾力のある寒天状の粒子によって構成されていた。光学顕微鏡観察では、異なる形態の細菌・藻類・菌類が約20種類観察された。体積の大部分は、他の産地にも観察された厚い細胞外マトリクスをもつ細菌によって占められていた。群集構造解析の結果、-Proteobacteria, Acidobacteria, Ktedonobacteriaを中心とする、主に10種類程度の細菌によって構成されていることがわかった。山系、標高も異なる環境において類似の微生物群集が観察され、また、それらの群集が類似の微生物塊を形成していたことは、一定の環境条件がそろえば「天狗の麦飯」が、どこにでも形成される可能性を示唆している。

文献に記載されている産地を探索する過程で再発見した髭山の「天狗の麦飯」(図3右図)は、湿潤な柔らかいペースト状であった。これは、これまでの「天狗の麦飯」が、湿潤な弾力のある寒天粒状であったことと大きく異なっていた。さらにこれまでの「天狗の麦飯」が、微臭あるいは無臭であったのに対して、髭山のものに臭気がある点においても違いが見られた。光学顕微鏡観察では、異なる形態をもつ約8種類の細菌が観察された(図4)。

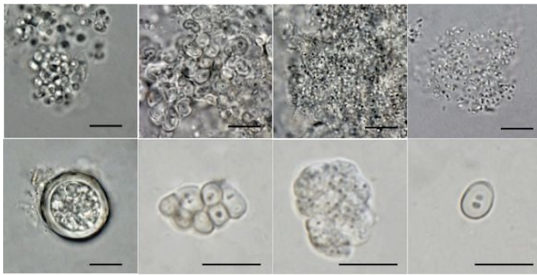


図4 鬢山産地の「天狗の麦飯」に見られる細菌形態の多様性 (スケールバー: 10 μm)

PCR-DGGEにより17本のバンドが確認され、配列解析により、Acidobacteria 7種類、Firmicutes 4種類、Proteobacteria 1種類、Bacteroidetes 1種類、Actinobacteria 1種類、ゴースバンドあるいは微量で解析できなかったバンドが4本である。このうち主要なバンドは3本であり、Acidobacteria門subdivision 1に帰属される1種類、Firmicutes門Clostridia綱に帰属される2種類であった。真核生物1種 (Mucoromycotina亜門)が検出されたものの、顕微鏡観察においては菌類が観察されていないことから主たる構成者ではないと考えた。Clostridia綱の細菌は偏性嫌気性の従属栄養細菌であることから、鬢山の「天狗の麦飯」が嫌気環境において形成された細菌塊であることが推定された。また主たる細菌として検出されたAcidobacteria (M14)も、他の産地から検出されているAcidobacteriaと一致しなかった (図4)。他の産地の群集構造と全く異なっていたことから、「天狗の麦飯」と総称される土壌様微生物塊が必ずしも類似の微生物で構成されているわけではないことが明らかになった。

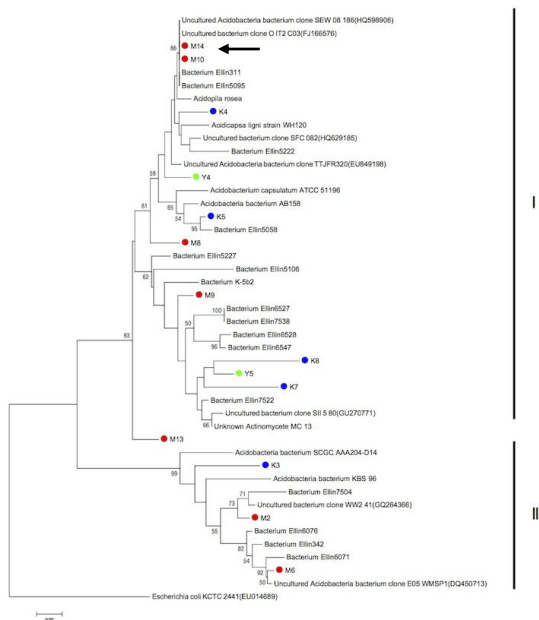


図4 天狗の麦飯に検出されるAcidobacteriaの分子系統関係

青: 長野県北信地方産地, 緑: 群馬県吾妻郡産地, 赤: 鬢山産地

### (3) CARD-FISH法を用いた体積を占める細菌の同定

「天狗の麦飯」にCARD-FISHを適用する方法を構築し、「天狗の麦飯」の体積を占めるバクテリアがDGGEで検出された4つの門・綱のいずれにあたるのかを同定した。その結果、-proteobacteria門及びAcidobacteria門のバクテリアが、体積を占めるバクテリアであることがわかった。特に、過去の多くの研究で「天狗の麦飯」の本体であると指摘されてきた直径約10 μmのカプセル状EPSをもつバクテリアがAcidobacteriaであるということが明らかになった (図5)。

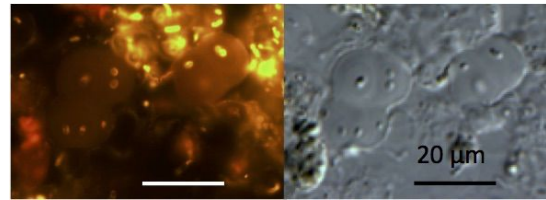


図5 「天狗の麦飯」のFISH解析  
左: 蛍光顕微鏡像, 右: 光学顕微鏡像  
プローブ: Acidobacteria プローブ

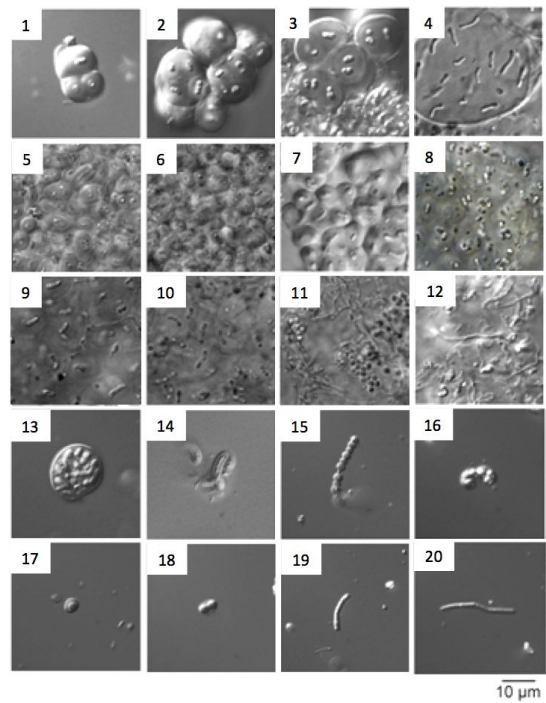


図6 長野県北信地方産地から採取した「天狗の麦飯」に観察される細胞形態の多様性

図6には最も研究報告例の多い長野県北信地方産地から採取した「天狗の麦飯」に観察される細胞を示した。FISH解析の結果、図6の1~4がAcidobacteriaであることが明らかになった。これらは、先行研究において「天狗の麦飯」を構成する主たる細菌として報告されてきたものである。図6の5~7は-proteobacteriaであった。図6の8~10はAcidobacteriaあるいは-proteobacteriaであり、現状においては判断が難しく今後の詳細な検討が必要である。図6の11および

12 は、Chloroflexi であった。これらの結果から、弾力のある粒状の細菌塊の形成には、EPS を産生する Acidobacteria および -proteobacteria が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

#### (4) 消滅産地の特徴と消滅因子の推定

これまでに古文書や先行研究に報告されている「天狗の麦飯」産地の現地調査から、産地は、明らかに消滅している産地、ササの被服によって不明な産地、縮小している産地に大別できる。明らかに消滅している産地には、群馬県高峰山、浅間山、信濃町古海である。高峰山産地は、スキー場の造成による人為的攪乱によって消失したものと考えられる。浅間山産地は、地元の方の案内もあり明確にポイントを探すことができものの、産地は植物に覆われ「天狗の麦飯」は全く観察されなかった。この産地には腐植が蓄積しており、コアによる掘削調査においても「天狗の麦飯」様微生物塊を見いだすことはできなかった。このことは、「天狗の麦飯」の消失には、腐植の堆積による土壌化が深く関わっているものと考えられた。また、古海の産地も植林や植物による被覆によって消失したものと考えら得る。ササの被服によって不明な産地には、飯縄山がある。産地の場所についてはほぼ特定できたものの、特別保護地区であることもありコア採取等の調査には至っていない。本研究において新たに見いだした角間山周辺産地 もササに覆われていたが、コア調査によってかろうじて「天狗の麦飯」を見いだすことができた。角間山周辺産地 はササが周囲を囲み、地権者によるとササの侵入による産地面積が小さくなっているとのことであった。実際に、周囲のササの下に「天狗の麦飯」を見いだすことができる。また、これまでに報告の無い我々が地権者に教えていただいた産地も、ササの侵入により年々縮小しているとのことであり、その様子は航空写真の比較によっても見て取れた。また、ササの侵入により縮小した場所では、腐植の蓄積による土壌化が進み、多様な植物の生育が確認できた。

これらの観察結果から、人為的攪乱を除き、「天狗の麦飯」は、植物等の侵入による腐植の蓄積さらに土壌化によって失われているものと考えられる。おそらく、「天狗の麦飯」は、貧栄養条件下のある特定の環境において形成される微生物群集であり、有機物の蓄積による土壌化は、これらの細菌の生育を阻害する、あるいは、他の微生物の成育によって、これらの細菌が優勢できない環境になるのではなかろうか。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

武藤清明、金井真知子、幡野恭子、神川龍馬、宮下英明、新たに再発見した産地から採取した「天狗の麦飯」の微生物群集構造解析、環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 21 日-2014 年 10 月 24 日、アクトシティー浜松コンgresセンター(浜松市)

金井真知子、幡野恭子、福井学、久保響子、神川龍馬、宮下英明、CARD-FISH を用いた「天狗の麦飯」の主要細菌の同定、日本微生物生態学会第 29 回大会、2013 年 11 月 23 日-2013 年 11 月 25 日、鹿児島大学(鹿児島市)

金井真知子、坂本皆子、幡野恭子、大久保智司、宮下英明「天狗の麦飯」の主要構成微生物の門レベルでの識別、日本微生物生態学会第 28 回大会、2012 年 9 月 20 日-2012 年 9 月 21 日、豊橋技術科学大学(豊橋市)

坂本皆子、高取惇哉、大久保智司、宮下英明「天狗の麦飯」微生物群集構造の産地間比較、日本微生物生態学会第 28 回大会、2012 年 9 月 20 日-2012 年 9 月 21 日、豊橋技術科学大学(豊橋市)

〔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〕

無し

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮下 英明 (MIYASHITA, Hideaki)  
京都大学・大学院地球環境学堂・教授  
研究者番号：5 0 3 2 3 7 4 6

##### (2) 研究分担者

神川 龍馬 (KAMIKAWA, Ryoma)  
京都大学・大学院地球環境学堂・助教  
研究者番号：4 0 6 2 7 6 3 4