

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780318

研究課題名(和文) ヒドロゲナーゼ遺伝子の解析による水田土壌中の水素生成菌群集の生態解明

研究課題名(英文) Analysis of hydrogenase genes for the ecological elucidation of hydrogen-producing bacterial community in paddy field soil

研究代表者

渡邊 健史 (Watanabe, Takeshi)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：60547016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水田土壌の水素生成菌群集の多様性と動態を明らかにすることを目的とし、水素生成に関わる酵素 [FeFe]-ヒドロゲナーゼのhydA遺伝子を対象にした分子生物学的な手法による解析を行った。本研究より、水田土壌には [FeFe]-ヒドロゲナーゼを有する多様な微生物が生息し、それらの菌は安定した群集構造を形成していることが明らかになった。一方で、土壌中での嫌気的な有機物分解に伴い、hydAを転写した菌群の構成は大きく変化することを示し、水田土壌の有機物分解過程において、水素生成を担う菌群とその水素生成活性は土壌条件によって変化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, molecular biological analysis of hydA gene, encoding [FeFe]-hydrogenase related to hydrogen production, was carried out to reveal diversity and dynamics of the hydrogen-producing bacterial community in paddy field soil. This study showed inhabitant of diverse bacteria possessing [FeFe]-hydrogenase and their stable community structures in the paddy field soil. However, hydA-transcribing bacterial groups changed significantly during the anaerobic decomposition of organic materials in the soil, indicating that the hydrogen-producing bacterial groups and their hydrogen-producing activity varied depending on the soil conditions.

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：水素生成 ヒドロゲナーゼ 水田 群集構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

湛水された水田土壌では、好気性微生物による酸素の消費後に、硝酸、鉄、マンガン、硫酸が嫌氣的呼吸の最終電子受容体として利用され、逐次的還元過程が進行する。それと並行して、有機物は、多様な微生物による様々な代謝過程を経て、最終的にメタンと二酸化炭素にまで分解される。

水素は、嫌氣的有機物分解過程において、一次発酵、二次発酵反応の代謝産物として生成される。さらに、生成された水素はより下流の分解過程において電子供与体として利用される。二次発酵反応は、環境中の水素分圧が上昇すると、エネルギー的に不利になるため、水素消費菌との共生関係においてのみ反応が進行する(種間水素転移)。また、一次発酵反応においても、水素分圧が低く保たれることにより、発酵微生物がよりエネルギーを獲得しやすくなることが知られている。このように、水素は嫌氣的な有機物分解過程を制御する極めて重要な中間代謝産物である。

水素生成菌は酵素ヒドロゲナーゼを有する。ヒドロゲナーゼは、 $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$  の可逆反応を触媒し、水素の生成、消費反応に関与する。真核生物、真正細菌、古細菌の幅広い生物に存在し、酵素の活性部位に含まれる金属の違いにより、大きく [NiFe]-、[FeFe]-、[Fe]-ヒドロゲナーゼの3種類に分類される。その内、[FeFe]-ヒドロゲナーゼは、主に嫌気性菌および一部の真核生物に存在し、嫌氣的な環境中での水素生成反応を担うと考えられている。近年、バイオリクター中の多様な微生物の[FeFe]-ヒドロゲナーゼの *hydA* 遺伝子を対象にした群集構造解析が初めて行われ、その後、微生物マットや酸性湿地においても解析が行われた (Xing et al., 2008; Boyd et al., 2009; Schmidt et al., 2010)。しかし、水田土壌中の水素生成菌群集に関する知見は皆無であり、その生態は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、水田土壌微生物の[FeFe]-ヒドロゲナーゼ *hydA* 遺伝子を対象とした分子生態学的手法を用いた解析方法を確立し、水田土壌中における水素生成菌群集の多様性と動態を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

これまでに報告されている[FeFe]-ヒドロゲナーゼ *hydA* 遺伝子を対象にしたプライマーセット3種類を用いてPCR-DGGE、クローンライブラリー解析を行い、水田土壌試料の解析に最適なプライマーセットを検討した。

また、土壌培養実験を行い、嫌氣的な有機物分解に伴う水素生成菌群集の変化をRNAレベルで解析した。

合わせて、水田土壌より水素生成菌を集積、分離し、その菌学的特徴の解明を試みた。

(1) 水田土壌の[FeFe]-ヒドロゲナーゼ *hydA* 遺伝子を対象とした群集構造解析方法の検討

バイオリクター(Xing et al., 2008)、微生物マット(Boyd et al., 2009)、酸性湿地(Schmidt et al., 2010)を対象に設計されたプライマーセット(それぞれ *hydF1/hydR1*、*FeFe-272F/FeFe427R*、*HydH1f/HydH3r*)をPCR条件の検討に用いた。

水田土壌試料は、愛知県農業総合試験場安城農業技術センターより採取し、DNA抽出キットにより抽出したDNAをPCR条件の検討に用いた。

各プライマーセットのPCR条件を検討し、得られた増幅産物を対象にクローンライブラリー解析を行った。各ライブラリーの検出範囲、多様性指数を比較し、水田土壌試料の解析に最適なプライマーセットとPCR条件を決定した。また *hydA* 遺伝子を対象としたPCR-DGGE条件を検討し、水素生成菌の群集構造解析方法を確立した。

(2) 稲わら分解過程における水素生成菌群集の変動の解析

落水時に採取した水田土壌に稲わらを添加し、室内で4週間湛水培養実験を行った。培養1日目および14日目にRNAを抽出し、*hydA* 転写産物のクローンライブラリー解析を行った。土壌中の二価鉄濃度、硫酸塩濃度、土壌からのメタン生成量を合わせて測定し、嫌氣的な有機物分解に伴う土壌の酸化還元状態の変化と、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子の転写活性の変化について解析した。

(3) 水素生成菌の集積培養

水田土壌を接種源とした嫌気微生物培養を行い、水素生成菌を集積し、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子の解析を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 水田土壌の[FeFe]-ヒドロゲナーゼ *hydA* 遺伝子を対象とした群集構造解析方法の検討

これまでに報告されている[FeFe]-ヒドロゲナーゼ *hydA* 遺伝子を対象にしたプライマーセット3種類を用いてPCR条件、クローンライブラリー解析を行い、水田土壌試料の解析に最適なプライマーセットを検討した。すなわち、プライマー-*hydF1/hydR1*、*FeFe-272F/FeFe-427R*、*HydH1f/HydH3r* を用いてPCR条件を検討した後、これらのPCR産物を用いてクローンライブラリー解析を行った。各プライマーセットの間で検出される微生物群とその割合を比較した結果(図1) 主要な微生物群が共通しており検出範囲にも大きな差はないと考えられた。そこで、最も幅広い菌を検出されるように設計された *HydH1f/HydH3r* を以下の解析で使用することとした。落水および湛水期に採取した水田土壌を対象に解析を進めた結果、多様な分類群に属する細菌

と相同性の高い[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子を検出した。特に、Dehalococcoides、Clostridiales、Desulfovibrionales に属する細菌の持つ[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子と高い相同性を持つクローンが、落水および湛水土壌のいずれについても多数得られた。したがって、これらの系統に属する菌群が、水田土壌において水素生成反応を担うポテンシャルを持つことが示唆された。また、水田における[FeFe]-ヒドロゲナーゼの多様性は、これまでに解析した他の嫌気環境とは異なっており、水田には水田特有の水素生成菌群集が生息することが示唆された。

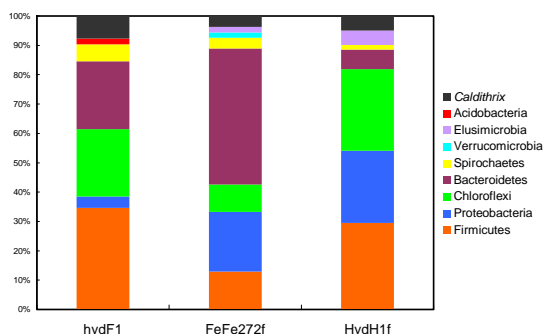


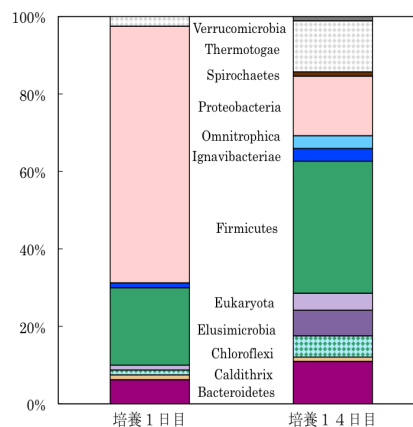
図 1. 異なるプライマーセットを用いて作成した *hydA* クローンライブラリー中の各細菌分類群の割合

続いて、*hydA* を対象とした PCR-DGGE 法による群集構造解析手法を確立し、日本の 2 地点の水田より継時的に採取・抽出した土壌 DNA を対象として水素生成微生物群集構造を解析した。PCR-DGGE 法の検討では、GC クランプを付加したプライマーを使用して目的断片長の PCR 産物を得るため、長さと同様の異なる GC クランプを HydH1f に付加し、増幅の程度を比較した。その結果、33 塩基対の GC クランプを HydH1f に付加した場合に目的断片長の増幅産物が得られることが明らかとなったため、HydH1f-33GC を使用して PCR を行うこととした。さらに PCR 産物の精製方法や DGGE に供試する DNA 量がバンドパターンに与える影響についても解析した。一種類の塩基配列を有する *hydA* であっても明瞭なバンドが観察されない場合があったが、DGGE バンドパターンが土壌 DNA 由来の *hydA* について得られ、PCR-DGGE 法による解析が可能であると考えられた。日本の 2 地点の水田より継時的に採取・抽出した土壌 DNA 中の *hydA* を対象として、確立した PCR-DGGE 法を適用したところ、一部時期で異なるバンドや地点ごとに異なるバンドが検出されたものの、DGGE バンドパターンは年間を通じて大きな変化は示さず、水素生成微生物群集構造が年間を通じて安定していることが示唆された。

(2) 稲わら分解過程における水素生成菌群集の変動の解析

水田土壌に有機物源として稲わらを添加

して嫌氣的に湛水培養し、土壌中の二価鉄濃度、硫酸塩濃度、土壌からのメタン生成量を測定した。培養直後から二価鉄の生成と硫酸還元が進行し、その後培養中期からメタンの生成が開始した。また、培養 3 日目までは水素生成が認められたが、その後は、見かけ上、水素生成は認められなかった。還元状態の異なる 2 つの時期にあると考えられた培養 1 日目と培養 14 日目に採取・保存した土壌から RNA を抽出し、mRNA を対象として *hydA* の RT-PCR およびクローンライブラリー解析を行った。



■ Verrucomicrobia	1	
□ Thermotogae	2	12
■ Spirochaetes		1
□ Proteobacteria	53	14
□ Omnithrophica		3
■ Ignavibacteriae	1	3
■ Firmicutes	16	31
□ Eukaryota	1	4
■ Elusimicrobia		6
■ Chloroflexi	1	5
■ Caldithrix	1	1
■ Bacteroidetes	5	10

図 2. 培養 1 日目および培養 14 日目の *hydA* クローンライブラリー中の各分類群の割合およびクローン数。下の表の空欄は、それぞれの分類群と相同性が高い配列が得られなかったことを示す。

それぞれ 80、91 の *hydA* を得た (図 2)。いずれの時期も多様な *hydA* が得られたことに加えて、Deltaproteobacteria および Firmicutes の *hydA* と相同性の高い配列が多く得られたが、DNA を対象とした解析で多数検出された Chloroflexi の *hydA* と相同性の高い配列は得られなかった。培養時期によって検出される割合は異なっており、培養 1 日目では Deltaproteobacteria の *hydA* が、培養 14 日目では Firmicutes の *hydA* が多く転写されていると考えられた。また、培養 14 日目では Elusimicrobia や Omnithrophica など、より多様な分類群に属する微生物も *hydA* を転写していると考えられた。したがって、水田土壌中で水素生成を担う菌群は、土壌中での有機物分解過程、還元状態により、大きく変化することが示唆された。

### (3)水素生成菌の集積培養

水田土壌で有機物分解を担う水素生成微生物の生理的性質を明らかにするため、水田土壌から水素生成微生物の分離を試みた。非加熱・加熱した水田土壌、あるいは湛水状態の水田より採取した水田土壌を、二重皿法あるいはロールチューブ法により従属栄養微生物の分離に適した VL 寒天培地で嫌氣的に培養し、それぞれで形成したコロニーを VL 液体培地に嫌氣的に接種した。球菌や桿菌など様々な形態の微生物が観察されたほか、運動性や孢子形成能を有する微生物も存在した。植え継いだ液体培地の約半数で水素生成が確認された。その中には、*hydA* が検出されない系列も存在したが、約半数で *hydA* が検出された。水素性性能と [FeFe]-ヒドロゲナーゼの関係性については今後さらに解析を進める必要がある。

### (4)まとめ

本研究では、水田土壌の水素生成菌群集の多様性と動態の解明を目的として、まず、水素生成に関わる酵素 [FeFe]-ヒドロゲナーゼの *hydA* 遺伝子を対象とした解析方法を確立した。確立した方法を用いて解析を進め、水田土壌には [FeFe]-ヒドロゲナーゼを有する多様な微生物が生息し、それらの菌は安定した群集構造を形成していることを示した。一方で、mRNA を対象とした解析より、[FeFe]-ヒドロゲナーゼを有する微生物の *hydA* 転写活性は、嫌氣的な土壌中でダイナミックに変化することを示し、有機物分解過程、土壌の還元状態により、水素生成を担う菌群は大きく変化することが示唆された。今後、分離菌を含めた解析、異なる土壌条件下における解析をさらに進めることで、嫌氣的な水田土壌中の水素生成微生物群集の生態や役割について詳細に解明され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 8 件)

Baba, R., Kimura, M., Asakawa, S., Watanabe, T. (2014) Analysis of [FeFe]-hydrogenase genes for the elucidation of a hydrogen-producing bacterial community in paddy field soil. *FEMS Microbiol Lett* **350**: 249-256. 査読有り.  
DOI: 10.1111/1574-6968.12335

渡邊健史 (2013) 分子生態学的手法による水田土壌のメタン生成古細菌の動態と多様性に関する研究. *土肥誌* **84**: 355-356. 査読無し.  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009766887>

浅川晋・渡邊健史 (2013) 水田からのメタ

ン発生とメタン生成古細菌. *遺伝* **67**: 579-585, 査読無し.

[http://www.nts-book.co.jp/item/detail/summary/bio/20051225\\_42bk13.html](http://www.nts-book.co.jp/item/detail/summary/bio/20051225_42bk13.html)

〔学会発表〕(計 9 件)

馬場竜子・木村真人・浅川晋・渡邊健史. 水田土壌の水素生成微生物群集構造解析. 日本土壤肥料学会 2013 年度名古屋大会, 名古屋 (2013 年 9 月 11~13 日).

渡邊健史. 分子生態学的手法による水田土壌のメタン生成古細菌の動態と多様性に関する研究. 日本土壤肥料学会 2013 年度名古屋大会, 名古屋 (2013 年 9 月 11~13 日).

水野かすみ・浅川晋・渡邊健史. 異化的亜硫酸還元酵素遺伝子およびホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素遺伝子を対象とした水田土壌の硫酸還元菌および CO<sub>2</sub> 還元酢酸生成菌の群集構造解析. 日本土壤肥料学会 2013 年度名古屋大会, 名古屋 (2013 年 9 月 11~13 日).

Ryuko Baba · Makoto Kimura · Susumu Asakawa · Takeshi Watanabe. Hydrogen-producing bacterial community in paddy field soils estimated by [FeFe] hydrogenase gene. 第 28 回日本微生物生態学会大会, 豊橋 (2012 年 9 月 21~22 日)

〔図書〕(計 2 件)

渡邊健史・浅川晋 (2013) 22-1. メタン生成菌, 土壤微生物実験法第 3 版, 日本土壤微生物学会編, pp. 262-268, 養賢堂, 東京.

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

渡邊 健史 (Watanabe Takeshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号: 60547016