

平成30年6月7日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25450119

研究課題名(和文) 土壌動物に関連する微生物生態系の解析と新規バイオリソースの開発

研究課題名(英文) Investigation of microbial community structure in soil animals and development of novel microbial bioresources

研究代表者

飯田 敏也 (Toshiya, Iida)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任研究員

研究者番号：30321722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、土壌に生息する多様な微小土壌動物と土壌細菌との関連性を探ると共に、土壌動物に由来する新規な細菌バイオリソースを開発するものである。本研究では、土壌動物として5種のササラダニ類をモデルとし、メタ16S解析による細菌群集解析及び細菌の分離培養解析を行った。その結果、ササラダニ種により細菌の多様性に大きな差異が見られることなどを明らかにした。また、モンツキダニ粉碎液から新規性の高い細菌株が比較的多く分離され、これらの中には特定の細菌株との共培養条件下でのみ培養可能な新規性の高い細菌株が含まれていた。これらは新規バイオリソースとしてJCMに寄託するとともに、新規細菌分類群の提唱を目指す。

研究成果の概要(英文)：This study aims to explore the relationships between soil microbes and small animals living in the soil, with hopes of developing novel microbial bioresources derived from soil animals. In this study, five species of oribatid mites (Acari: Oribatida) were used as model soil animals. Bacteria were isolated from these animals, and bacterial community structure was analyzed. Based on the results from meta-16S rRNA gene sequence analysis, I revealed large differences in bacterial diversity among oribatid mite species. In addition, a relatively large number of novel bacterial strains were isolated from Trhypochthonius species samples. Some of the isolates were novel bacterial strains that can only be cultured under a co-culture condition with specific bacterial strains. These novel bacterial strains were deposited into the JCM culture collection and will be used as novel bacterial bioresources.

研究分野：微生物学

キーワード：ササラダニ 細菌群集解析 新規細菌バイオリソース

## 1. 研究開始当初の背景

陸上生態系において「分解者」となる土壌には、細菌をはじめとする多様な微生物が著量生息し、元素循環に重要な腐食連鎖を支えている。しかし、細菌等の土壌微生物の多くは実験室環境で分離培養できない、いわゆる難培養の性状を示すものが多く、土壌生態系における機能や存在意義には不明な点が多い。土壌にはまた多種多様な土壌動物が生息し、土壌の「分解」機能に寄与している。これら多様な土壌動物は食性やサイズも様々で、土壌生態系において難分解性植物遺体の粉碎、土壌と有機物の混合を伴う土壌構造の改変、微生物の補食による種構成の制御やそれらの移動・拡散の補助といった影響を与えており、結果として土壌生態系における難分解性植物遺体等の有機物分解と元素循環の効率化に貢献していると考えられる。しかしながら、分解機能の主要な要素となる細菌等土壌微生物と土壌動物との関連性については未解明な部分が多い。その一因として、土壌微生物生態系の解析において、土壌サンプル中の小型～中型土壌動物の存在を考慮した試料の調製が困難であることが考えられる。そこで本研究では、土壌に生息する微小な土壌動物を単離し、土壌動物個体ごとに微生物群集解析を行うことで、土壌微生物叢において土壌動物との関連性を有する微生物群の一端の解明を試みた。また、土壌動物を分離源として微生物を分離培養し、土壌動物に由来する特徴的なバイオリソースの解析と整備を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、土壌表層において普遍的に観察される土壌動物であるササラダニ類に着目した。これらの細菌群集構造を明らかにするとともに、土壌動物を分離源とした細菌の分離培養を行い、土壌動物と土壌細菌の未知の相互作用(共生)の発見を目指すとともに、土壌動物に由来する特徴的な新規バイオリソースとして整備することを目的とした。

## 3. 研究の方法

理化学研究所筑波事業所構内においてサンプリングした落葉を含む土壌表層部を採取源とし、ツルグレン装置を用いてササラダニ類を単離した。ツルグレン装置下には空のピーカー等の容器を置き、30分程度の短時間の白熱灯照射により生存した状態で土壌動物を抽出し、実体顕微鏡観察下目視にて目的の土壌動物を採取して実験に用いた。細菌の分離培養を目的としたササラダニ類の粉碎には、乾熱滅菌した適量の1mm径ジルコニアビーズ(ニッカトー YTZ-1)を2mLスクリュウキャップチューブに入れ、滅菌水400μLを加えたものを用いた。粉碎装置にはFastPrep-24(MP-Biomedicals)を用い、穏やかな条件(速度4で10秒間)で粉碎した溶液を適宜希釈し、R2A寒天培地等に塗布して

培養した。分離されたコロニーを任意に選択し、27F及び1492RプライマーによるPCRにて16S rRNA遺伝子配列を解析した。

細菌やダニの遺伝子解析用の破碎には、粉碎媒体として乾熱滅菌した適量の0.2mm径ジルコニアビーズ(YTZ-0.2)及び1粒の5mm径ジルコニアビーズ(YTZ-5)を2mLスクリュウキャップチューブに入れ、TE緩衝液400μLを加えたものを用い、比較的激しい破碎条件(速度6で40秒間)で粉碎した。粉碎液の遠心上清をMonoFas DNA精製キットI(GLサイエンス)にてDNAを精製、濃縮し、PCRの鋳型とした。アンプリコンシーケンス解析には、GS Junior(ロシユ)またはMiSeq(イルミナ)を用い、それぞれ16S rRNA遺伝子のV4領域またはV1V2領域のPCR産物のデータを得た。アンプリコンシーケンスデータの解析にはMacQIIME version 1.9.1を用いた。

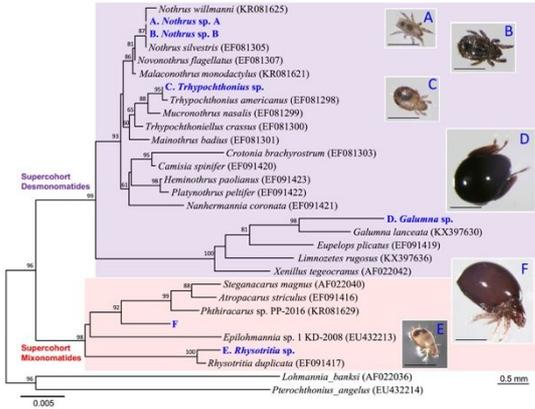
## 4. 研究成果

### (1) ササラダニの採取と解析

土壌生態系の腐食連鎖に関わる土壌動物として、土壌表層部に多数生息するササラダニ類に着目した。理化学研究所筑波事業所構内の各地点より土壌サンプルを採取し、ササラダニの採取条件等を検討した。ツルグレン装置下の容器内に抽出された土壌動物を生きた状態で採取し、実体顕微鏡にて観察した。種々の検討により、ヒノキ科の立木が植栽されている一画において、落葉と共に土壌表層部を採取しツルグレン装置にかける手順にて、時期を問わず特定のダニを繰り返し採取できることを確認した。

実体顕微鏡観察下ササラダニと推定された6種のダニについて、18S rRNA遺伝子配列解析によってササラダニ種の推定を行った。採取されたダニ1個体をジルコニアビーズ破碎処理し、その上清を鋳型としてPCRを行った。増幅産物の塩基配列の解析の結果、検討した6種のダニがササラダニの一種(Acari: Oribatida)であることを確認した。18S rRNA遺伝子配列に基づく分子系統解析の結果を図-1に示す。アミメオニダニ団アミメオニダニ科(図-1中の写真A及びB, *Nothrus* sp.と推定)及びモンツキダニ科(写真C, *Trhypochthonius* sp.と推定)の一種と推定されたものは、サンプリングサイトから時期を問わず高頻度で抽出された。また、ハナレササラダニ団フリソデダニ上科の一種(写真D, *Galumna* sp.と推定)並びにセツゴウササラダニ上団ヘソイレコダニ上科(写真E, *Rhysotritia* sp.と推定)及びイレコダニ上科(写真F)のササラダニも、サンプリングサイトからは比較的頻度良く観察された。なお、ササラダニ種の詳細な同定は未検討であるが、本研究では18S rRNA遺伝子配列から推定された属名にて各ササラダニを取り扱うこととした。

図-1 ササラダニ検体の 18S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統樹 (NJ 法)



(2) ササラダニの細菌群集解析

ササラダニの破砕液を鋳型として細菌群集解析を行った。細菌の 16S rRNA 遺伝子配列の PCR 増幅には、V1V2 領域を増幅する 27Fmod 及び 338R を用いた。ササラダニ 1 個体に由来する細胞破砕液を鋳型とした PCR を試みたが、増幅が弱く解析が困難であったため、実体顕微鏡観察下同種と推定された複数個体のササラダニ (2-10 個体) を採取、破砕し、スピカラムにて DNA を精製・濃縮した溶液を PCR の鋳型とした。16S rRNA 遺伝子と同時に 18S rRNA 遺伝子配列も PCR 解析し、採取した複数のササラダニ個体が 18S rRNA 遺伝子配列レベルで同一であることを確認した。サンプリングの都合により F のササラダニは解析対象から外し、A-E の 5 種のササラダニを解析対象として、MiSeq によるアンプリコンシーケンス解析を 2 回実施した。なお、1 回目の実験 (1st) においては 0.2 mm 径ジルコニアビーズ破砕液の精製・濃縮液を鋳型として用いたが、2 回目の実験 (2nd) においては、採取したササラダニを 1 mm 径ジルコニアビーズにて穏やかに粉砕処理して一部を細菌の分離培養実験に用い、その残液を 0.2 mm 径ジルコニアビーズで更に破砕・精製・濃縮したものをアンプリコン解析の鋳型とした。5 種の検体から計約 42 万リードが得られた。99%類似度で最小 OTU サイズを 10 とした条件における Chao1 等の多様性指標の値を表-1 に示す。

表-1 ササラダニ類の細菌群集 (多様性)

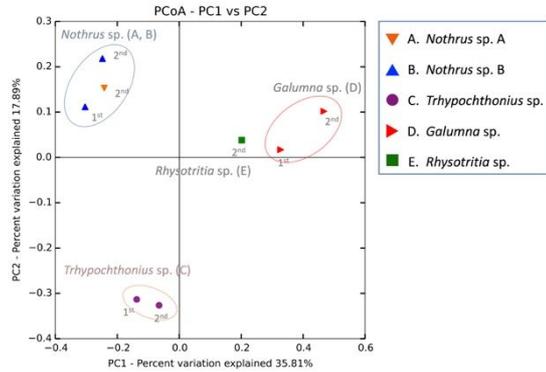
Sample (No. of individuals)	Read	Observed OTUs	Chao1
1st-B : <i>Nothrus</i> sp. B (4)	130,310	1882	2264
1st-C : <i>Trhypochthonius</i> sp. (3)	90,851	1253	1418
1st-D : <i>Galumna</i> sp. (2)	41,215	375	426
2nd-A : <i>Nothrus</i> sp. A (4)	29,526	1324	1518
2nd-B : <i>Nothrus</i> sp. B (2)	38,902	1497	1865
2nd-C : <i>Trhypochthonius</i> sp. (2)	30,155	856	942
2nd-D : <i>Galumna</i> sp. (3)	17,689	234	252
2nd-E : <i>Rhyssotritia</i> sp. (10)	43,011	415	458

多様性指標の値はササラダニ種により大きく異なり、Chao1 ではササラダニ種間で 6 倍程度の開きが見られ、アミメオニダニ科の

二種 (*Nothrus* sp.) が高く、次いでモンツキダニ科 (*Trhypochthonius* sp.)、ヘソイレコダニ上科 (*Rhyssotritia* sp.)、フリソデダニ上科 (*Galumna* sp.) と低下した。

次に、ササラダニ細菌群集構造の比較を Unweighted unifrac 解析にて行った (図-2)。その結果、*Nothrus* sp. の 2 種と *Trhypochthonius* sp. 及び *Galumna* sp. についてはそれぞれがグルーピングされた。サンプリング時期の異なる 1st と 2nd の検体において、種毎に細菌群集の類似性が示されたことから、これらから検出された OTU は各ササラダニ種に特有の細菌群集であることが示唆された。

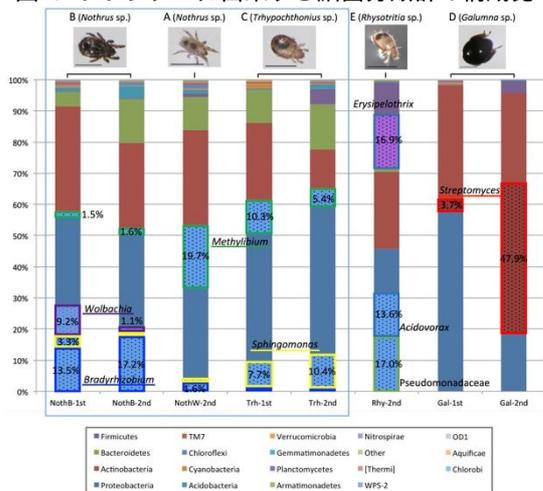
図-2 ササラダニ種毎の細菌群集の比較 (Unweighted unifrac による主座標分析)



検出された OTU の代表配列から推定される分類群 (門) の配列比を図-3 に示す。アミメオニダニ団の 2 種の *Nothrus* sp. 及び *Trhypochthonius* sp. の主要な細菌門は Proteobacteria 及び Actinobacteria で、これらが全体の 77-91% を占めていた。二種の *Nothrus* 属検体のうち、B 種の個体において Alphaproteobacteria の *Bradyrhizobium* 属の配列が 13-17% の割合で検出された一方で、A 種の個体では Betaproteobacteria の *Methylibium* 属の配列が 20% を占めるなど、菌叢における優占種の特徴が両者でやや異なっていた。*Trhypochthonius* sp. の検体からは、優占種として *Methylibium* 属の配列 (5-10%) や *Sphingomonas* 属の配列 (7-10%) が検出された。細菌の多様性が低かった *Galumna* sp. と *Rhyssotritia* sp. の細菌叢はアミメオニダニ団のものとは大きく異なり、*Galumna* sp. の 2 つの検体においては *Streptomyces* 属の特定の配列が 4% または 48% の比率で検出されるなど、検体間の存在比に大きなばらつきが見られたことから、多様性の低いサンプルを鋳型とする PCR を介した人為的な結果である可能性が示唆された。*Rhyssotritia* sp. においては、Pseudomonadaceae (Gammaproteobacteria) 及び *Acidovorax* 属 (Betaproteobacteria) の配列並びに Firmicutes の *Erysipelothrix* 属の配列が大きな比率を占めていた。一部のササラダニで感染例が報告されている *Wolbachia* 属 (Alphaproteobacteria; Rickettsiales) の

配列は、*Nothrus* 属の B 種の検体から見出され、特に 1st 検体からは 9.2%と比較的高い存在比率で検出された。他のササラダニ検体からは、*Wolbachia* 属の配列は検出されなかった。

図-3 ササラダニに由来する細菌分類群の構成比



### (3) ササラダニからの細菌の分離培養

ササラダニ粉砕液から細菌の分離培養を行った。穏やかな条件で処理したササラダニ粉砕液の希釈液を R2A 寒天培地に塗布し、好気条件下で培養した結果、ササラダニ種毎に出現したコロニー数に大きな差異が観察された。個体あたりの出現コロニー数の比較で、*Nothrus* 属の A 個体は *Galumna* 属の 104 倍であった。任意に 206 コロニーを採取して 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列を解析したところ、99.5%以上を一致とみなす条件で、解析コロニーの 84% (172/206) の配列がアンプリコン解析データ上にも検出された。分離株は Proteobacteria と Actinobacteria が 94%と大きな比率を占めていた。既知の基準株 16S rRNA 遺伝子配列データベース (Silva LTPs128) と比較したところ、96%未満の相同性を示したものが 21 株取得され、それらの多くが *Trhypochthonius* sp. に由来していた。*Rhysotritia* sp. や *Galumna* sp. からは、その条件に該当する菌株は取得されなかった。これらのうち、*Rhizobiales* に分類される 5 株 (Trh-6, Trh-YS2, Trh-8, Trh-DRS9, Trh-DRL45) は全て *Trhypochthonius* sp. の検体に由来し、*Rhizobiales* における新規な一群 (科・属) を構成するものであることが示唆された。また、Chitinophagaceae の一種である Trh-7La1 株、Dermacoccaceae の一種である Trh-DRL9 株、*Nothrus* sp. の B 種個体サンプル由来の Alcaligenaceae に分類される NothB-19 株などは、それぞれ属レベルで新規な細菌株であることが期待された。他に、*Sphingomonas* 属、*Spirosoma* 属、*Nakamurella* 属等の新種の可能性が期待される菌株が *Trhypochthonius* sp. の検体から分離された。また、この種のササラダニ検体からは、特定の細菌

との共存下でのみ増殖可能な新規性の高い細菌株も分離された。これらの一部についてはドラフトゲノム解析を実施し、また JCM に寄託した。

### (4) 今後の展望

本研究により、ササラダニ類との高い関連性が示唆される細菌群集を明らかにするとともに、ササラダニ種により関連細菌群集の多様性に大きな差異があることを見出した。また、ササラダニ種毎に特徴的な細菌種を見出すとともに、それらに該当する分離株も一部得られていることから、培養株を用いたゲノム解析を含む各種解析によりササラダニ種との関連性についての解明が期待される。本研究ではまた、*Trhypochthonius* sp. の検体から分類学的に興味深い細菌株を多数分離し、ササラダニ類が新規細菌バイオリソースの探索源として有用であることを示した。本研究で分離された菌株については分類学的解析やゲノム解析を進めて、新規細菌分類群の提唱を目指すとともに、ササラダニ類との関連性 (相互作用・共生) についても探っていきたい。

### 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 3 件)

飯田敏也、工藤卓二、大熊盛也「ササラダニ類からの新規細菌の分離」日本微生物資源学会第 25 回大会、2018 年 6 月 14 日 (国立環境研究所)

飯田敏也、工藤卓二、大熊盛也「新規細菌の分離源としてのササラダニ類の解析」日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 16 日 (名城大学天白キャンパス)

飯田敏也、國則成史、工藤卓二、大熊盛也「*Armadillidium vulgare* (オカダンゴムシ) 排泄物を分離源とした細菌の分離と解析」日本微生物資源学会第 21 回大会、2014 年 9 月 3 日 (東京農業大学世田谷キャンパス)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
飯田 敏也 (IIDA TOSHIYA)  
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソ  
ースセンター・専任研究員  
研究者番号：30321722

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )