

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21780084

研究課題名（和文） 植物遺体食性土壌動物とその排泄物顆粒の微生物生態系と腐植化に関連する細菌の研究

研究課題名（英文）Microbial community structure in feces of litter-feeding soil animals.

研究代表者

飯田 敏也 (IIDA TOSHIYA)

独立行政法人理化学研究所・微生物材料開発室・専任研究員

研究者番号：30321722

研究成果の概要（和文）：植物遺体食性土壌動物排泄物の細菌群集を解析し、腐食連鎖における土壌動物と土壌細菌の新規な関連性の発見を試みた。陸生甲殻類の一種である *Armadillidium vulgare*（オカダンゴムシ）をモデル土壌動物とし、サクラ落葉を飼料とした飼育系から採取した排泄物の細菌群集を、高速シーケンサーで解析した。その結果、排泄物に特徴的に存在する細菌群や、排泄物の土壌埋設処理によって存在比が増大または減少する細菌群を見出し、未消化植物遺体を含む排泄物中の有機物分解が、存在比を増大させた細菌群によって担われていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed bacterial communities in the feces of soil animals feeding on plant litter and attempted to find a novel association between soil bacteria and soil animals in the detritus food chain. The *Armadillidium vulgare*, a terrestrial isopod, was used as the model soil animal. The feces of *A. vulgare* were collected from farming systems that use fallen cherry leaves as feed. The analysis results using a high-performance sequencer showed bacterial groups that are characteristically present in feces and those groups whose abundance ratio increased or decreased based on the manner in which the feces was disposed in the soil. This suggested that the bacterial groups with high abundance ratio led the decomposition of organic matter in feces containing undigested plant litter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：細菌群集解析、土壌動物、土壌細菌

## 1. 研究開始当初の背景

土壌には陸上生態系において分解者として機能する多様な微生物が生息し、動植物遺体の分解と元素循環に寄与している。土壌生態系にはまた様々な土壌動物が見られるが、これらは植物遺体等の粉碎、土壌耕耘、微生物の捕食による群集制御といった機能を担い、土壌圏の有機物分解系を支えている。

栄養成分に乏しい枯死植物を主な食糧源とする土壌動物において、難分解性有機物の消化に微生物が関わっているものが多い。例えばシロアリは、後腸内にセルラーゼを発現する原生動物等の微生物を共生させることで、枯死植物の効率的な利用を実現している。また、一部のミミズ、双翅目や甲虫の幼虫、シロアリ等において、土壌や有機物と共に非特異的に土壌微生物を腸管内に取り込み、腸管内で活性化させた微生物により分解された有機物を利用する形態が知られている。また、自らの排泄物を摂食する糞食の行動が観察される枯死植物食者が見られるが、これは排泄物中に残る未利用の有機物を土壌微生物に分解させ、糞食によってそれら微生物が作り出した分解酵素や分解産物を利用しているものと考えられている。

このように、土壌動物と土壌微生物はゆるやかな共生関係を築いていると考えられており、それらの関連性を見出すことは、土壌中に生息する多様な微生物の土壌生態系における新たな機能の発見につながるものと思われる。しかし、これまで土壌動物の排泄物に着目した微生物群集に関する知見として、分離培養を基本とした解析例がいくつか見られるものの、使用された培地の種類や培養条件は限定的であり、培養困難な種を含めた微生物群集の全体像は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物遺体の摂食と排泄という動物の行動によって引き起こされる細菌群集の変遷や、土壌環境に置かれた排泄物における細菌群集の遷移の詳細を明らかにすることで、排泄物を介した土壌動物と土壌細菌の新規な関連性の発見を目指した。また、土壌動物排泄物を分離源とした細菌の分離培養を試み、土壌動物排泄物における培養可能株について、土壌細菌の機能の考察を試みた。

## 3. 研究の方法

陸生甲殻類の一種で植物遺体食性である *Armadillidium vulgare* (オカダンゴムシ) をモデル土壌動物として選択した。埼玉県和光市の理化学研究所構内で採取した *A. vulgare* を飼育容器に投入した。飼料として、ある程度

腐朽したソメイヨシノ落葉を研究所構内で採取し、表面に付着した土壌などを純水である程度濯ぎ落としたものを用いた。*A. vulgare* 排泄物を効率よく採集する飼育条件を検討し、最終的に以下の方法で行った。飼育容器内にコンクリート製ブロックを設置し、落葉をブロック周辺に置いて暗所で飼育した。定期的にブロック上に排泄された排泄物を採取し、目視で夾雑物を除去したものを実験に用いた。排泄物及び飼育環境サンプルからの DNA 単離には、ニッポンジーン社 ISOIL for Beads Beating を使い、必要に応じて追加の精製を行った。

各検体由来の DNA を鋳型として、細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なユニバーサルプライマーにより PCR 増幅し、各種解析に用いた。T-RFLP 解析には、27F (5'末端 FAM ラベル)/910R プライマーと制限酵素 *AluI*、*HhaI* を使い、GeneScan 1200LIZ をサイズマーカーとして ABI3130xl にてフラグメント解析を行った。T-RFLP データの統計解析には、T-REX を用いた。高速シーケンサー GS Junior (Roche 社) による網羅的なシーケンス解析には、BSF343/BSR926 プライマー (各プライマーの 5'末端側に解析に必要なアダプター配列、キー配列、MID 配列を付加) を使い、BSR926 側からの配列データが得られるように設計した。データ解析には Mothur、Blast+、Fast UniFrac 等の各種プログラム及び web 上の各種解析サービスを用いた。

細菌の分離培養には、*A. vulgare* 排泄物を滅菌水中に投入し、ホモジナイザーで排泄物顆粒を押しつぶした懸濁液を分離源とした。分離用の培地として R2A、Yeast-Starch (YS)、Nutrient Broth (NB)、Luria-Bertani (LB) 等をそのまま、または希釈し、寒天培地として用いた。排泄物懸濁液を適宜希釈後寒天培地に塗布し、30 度好気条件下で培養した。得られたコロニーを純化し、16S rRNA 遺伝子の配列解析により分離株の種を簡易的に同定した。必要に応じて各種分解能、資化能を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) *A. vulgare* 排泄物の細菌群集解析 (T-RFLP 解析)

35 日間の実験室飼育期間中に 10 回のサンプリングを行い、T-RFLP 解析を行った。同時に PCR 増幅産物のクローンライブラリーを作成し、塩基配列解析とフラグメント解析により、塩基配列から予想される制限酵素切断断片長と移動度を求めた。

*AluI* 解析データにおいて、移動度 147.4 及び 192.7 のフラグメントが全 10 検体から、移動度 67.3 及び 234.5 のフラグメントが 8 検体

から検出された。*HhaI* 解析データにおいて移動度 860.6 のフラグメントが全 10 検体から、移動度 366.8, 368.5 及び 459.5 のフラグメントが 9 検体から検出された。これらの移動度を元に、クローンライブラリーから断片長が類似するものを検索し、フラグメント解析によって *AluI* 及び *HhaI* 消化断片の移動度を求め、各フラグメントの由来生物種の同定を試みた。その結果、最も大きな存在比を示したもの (*AluI* 147.4, *HhaI* 860.6) は、陸生甲殻類の中腸腺への共生が示唆されている *Candidatus Hepatoplasma* の近縁種と推定された。また、同器官への共生が示唆されている *Candidatus Hepatincola* の近縁種の存在も推定された (*AluI* 121.5)。その他フラグメントの由来生物種として、*Enterobacter* 属類縁種 (*AluI* 67.3, *HhaI* 366.8) や *Streptomyces* 属類縁種 (*AluI* 192.7, *HhaI* 459.5) 等の存在が推定された。この結果から、*A. vulgare* 排泄物に中腸腺の共生細菌が排出されていること、*Gammaproteobacteria* や放線菌群が優勢化していることが示された。

## (2) *A. vulgare* 排泄物の細菌群集解析 (高速シーケンサーを用いた解析)

より詳細な細菌群集構造の解明を目指し、高速シーケンサーを用いた網羅的なシーケンス解析による群集解析を行った。

飼育 11 日目及び 25 日目に採取した *A. vulgare* 排泄物及び飼育容器内の土壌と落葉を解析検体とした。得られた計 86230 配列を解析プログラム Mothur にて処理し、69977 配列をその後の解析に用いた。Rarefaction 解析の結果から、落葉及び土壌については、細菌群集の全容を網羅するには追加のシーケンス解析が必要と思われるが、細菌群集の概要を把握するには十分な量であると判断した。3%の差異に基づく OTU において、estimated richness 及び diversity index の解析値から、落葉及び土壌と比較して排泄物の細菌群集は多様性が低いことが示された。構成される細菌群の分類群情報を解析した (図 1)。落葉では、*Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* 及び *Sphingobacteriia* が優勢化していた。土壌では *Acidobacteria* が最優勢で、次いで *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* であった。*A. vulgare* 排泄物の 2 検体では、*Gammaproteobacteria*, *Mollicutes* 及び *Actinobacteria* が優勢であった。飼料落葉と比べて排泄物で存在比が増大した細菌群は、*Gammaproteobacteria* (*Kluyvera* 属など), *Actinobacteria* (*Streptomyces* 属など), *Mollicutes* (*Ca. Hepatoplasma* など) 及び *Alphaproteobacteria* (*Ca. Hepatincola* など) であり、逆に存在比を減少させた菌群は *Sphingobacteriia*, *Acidobacteria*, *Betaproteobacteria* 及び *Deltaproteobacteria* であった。

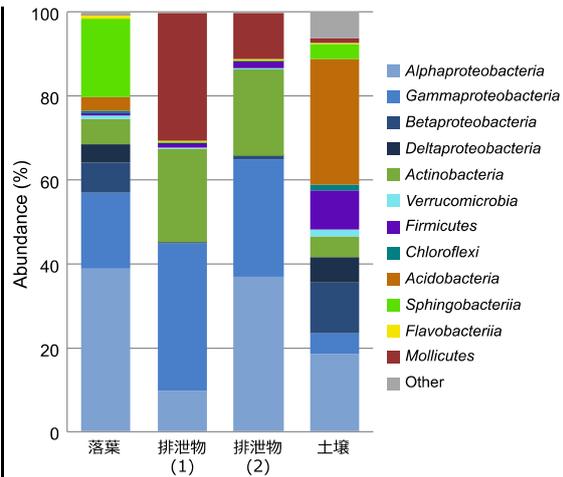


図 1 *A. vulgare* 飼育環境に由来する排泄物、落葉及び土壌検体に検出された各種細菌群の配列の存在比 (Phylum または Class)

次に、*A. vulgare* 排泄物細菌群集の経時的な変化を解析した。排泄物が土壌環境中に排出された状況を想定し、以下に示す方法で排泄物を処理した。飼育系より採取した *A. vulgare* 排泄物を 0.16 mm メッシュのナイロンシートで包み、そのままシャーレ内に静置または土壌に埋設した。1 週間後または 3 週間後に DNA を調製して、細菌群集解析に供した。土壌埋設前の排泄物、飼料落葉及び埋設に用いた土壌も同様に解析した。得られた配列データを Mothur にて処理し、51245 配列を解析に供した。

3%の差異に基づく OTU 数は、落葉が 762、土壌が 1009 であったのに対して、採取直後の排泄物は 138 であり、先に示した結果と同様に、*A. vulgare* による落葉摂食と排泄の過程で細菌の多様性の低下が示された。排泄直後の排泄物とシャーレ内静置排泄物の細菌群集構造に有意な変化は見られなかったが、土壌に埋設した排泄物においては、3%の差異に基づく OTU 数が 3 週間後に 2.7 倍 (374) に増大し、estimated richness 及び diversity index の解析値から細菌の多様性の増大も示された。構成される細菌の分類群情報を解析した (図 2)。その結果、土壌埋設処理により、採取直後の排泄物で最優勢であった *Gammaproteobacteria* の存在比は大幅に低下し、*Sphingobacteriia*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Verrucomicrobia* の存在比の増大が見られた。また、採取直後の排泄物で大きな割合を占めた *A. vulgare* の中腸腺共生細菌と推定される *Mollicutes* の 2 菌種 (*Ca. Hepatoplasma* 及び *Ca. Hepatincola*) の配列存在比は、土壌埋設またはプレート内静置処理により大幅に減少した。しかし、3 週間後の排泄物検体からも配列が検出されたことから、これら共生細菌の固体間の伝播に糞食行

動の介在が示唆された。

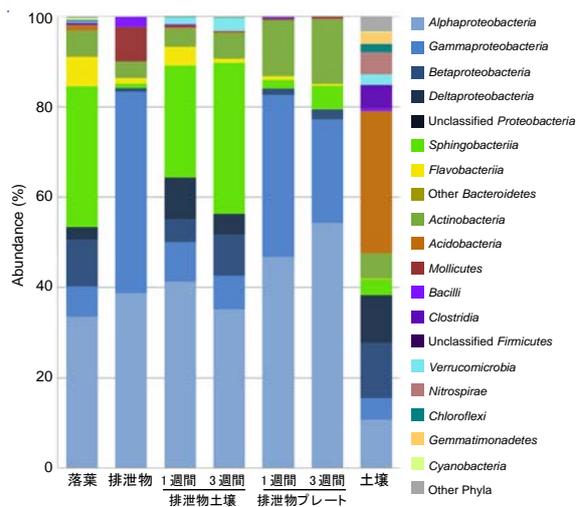


図 2 *A. vulgare* 排泄物及び飼育環境から検出された各種細菌群の配列の存在比 (Phylum または Class)

### (3) *A. vulgare* 排泄物からの細菌の分離培養

各種培地より分離された細菌のうち、*A. vulgare* 排泄物において大きな存在比を占めた *Enterobacteriaceae* (*Gammaproteobacteria*) の細菌を NB 及び LB 培地上のコロニーから選抜したところ、*Kluyvera* 属、*Citrobacter* 属、*Raoultella* 属、*Enterobacter* 属等の細菌が多数分離された。また、R2A や YS 培地において *Actinobacteria* や *Bacilli* に分類される細菌群が多数分離され、分類学上の新規性が期待される菌株もいくつか得られた。本研究では、マンガン酸化活性を指標としたラッカーゼ活性保有株の探索も行ったが、本研究で検討した条件下では活性保有株の分離には至らなかった。

### (4) 今後の展望

本研究により、植物遺体食性土壤動物で陸生甲殻類の一種である *A. vulgare* の排泄物の細菌群集構造の詳細を明らかにすると共に、土壤生態系において落葉変換者として機能する土壤動物の活動過程で生ずる細菌群集の変化を具体的に解明した。土壤動物により粉碎され、動物腸管内を通過し、体外に排泄された排泄物は、落葉や土壤動物由来の有機物に富んでいると考えられ、その環境で増殖できる菌群がどのような代謝活動を繰り広げているのか、またどのような環境要因が特定菌群の活性化に有効なのか、興味深い。今後 *A. vulgare* 排泄物から対象菌群の分離培養を試み、排泄物における代謝機能との関連性を分析することで、排泄物を介した土壤動物と土壤細菌の新規な関連性の発見につなが

るものと期待される。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

① 飯田敏也、國則成史、宇佐美論、大熊盛也「オカダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*) 排泄物の細菌群集構造解析」土壤動物学会第 35 回大会、平成 24 年 5 月 27 日 (昭和大学富士吉田校舎)

② 國則成史、飯田敏也、宇佐美論、大熊盛也「植物遺体食性土壤動物 *Armadillidium vulgare* (オカダンゴムシ) 排泄物の細菌群集解析」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日 (京都女子大学)

③ 國則成史、飯田敏也、大熊盛也、宇佐美論「枯死植物食性土壤動物 *Armadillidium vulgare* (オカダンゴムシ) 排泄物の細菌群集構造解析」極限環境生物学会 第 12 回大会、2011 年 11 月 27 日 (長崎大学良順会館)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 敏也 (IIDA TOSHIYA)

独立行政法人理化学研究所・微生物材料開発室・専任研究員

研究者番号：3 0 3 2 1 7 2 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし