

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18310009

研究課題名（和文） 土壌細菌 DNA の総観的分子分類解析による環境診断法の展開

研究課題名（英文） Environmental Assessment Based on Synoptic Molecular Taxonomy of Soil Bacterial DNA

研究代表者

伊藤 公紀 (ITO KIMINORI)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号 40114376

研究成果の概要：環境中で重要な機能を担うにも関わらず、その詳細が不明な土壌細菌群集に関して、実験的・理論的な解析を行った。実験的には、DNA を高い分離能の検出できる二次元電気泳動法と、異なる DNA の集合を全体的に見るための総観的分子分類学に基づいて、新しい評価法を開発した。二次元電気泳動では、それぞれの細菌種を、1つ1つのスポットとして得ることができるため、全体の見通しが良い。理論的には、多様性が出現する機構を、「食う・食われる」の関係を表す食物網から検討すると共に、生態系中の非線形な相互作用による動態の解析を行い、典型的な湖汚染であるアオコ(シアノバクテリアの集団)の季節変動や日内変動などの挙動を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：環境計測

1. 研究開始当初の背景

(1)土壌細菌システム-最後のフロンティア
土壌細菌システムは土壌中で極めて重要な機能を担う。そのキャラクターゼーションは、環境汚染や環境回復に関わる動態解析のため、また基礎的な生態系解析として必要性が高い。しかし土壌細菌システムには未知の部分が多く、「宇宙の探究にも似た最後のフロンティア」とも称される(Curtis & Sloan, Science, 2005年)。

(2)分子分類学に基づく手法の展開 近年発達した16SリボソームRNA(16S rRNA)の分子分類学は、細菌集団の解析に新しい地平を開いた。特に、土壌細菌からのDNA採取法の改良(例えば Zhou ら, Appl. Environ. Microbiol., 1996年)により、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)が効果的に適用できるようになり、T-RFLP(制限酵素断片鎖長多形法)などの手法が開発されている(例えば Clement ら, J. Microbiol. Methods,

1998年)。しかし、土壌細菌システムの膨大な全容に迫るには不足である。

(3)生態系の多様性解析 申請者らは、持続可能な生態系の性質を調べる目的で、食物網の形成(Rossberg, Itohら、2005)や生態系のレジリエンス(弾力性、回復幅)(Amemiya, Itohら、2005)についての理論的検討を行った。これらの検討においては、特に複雑系の観点に立ち、環境ストレスに対する系のヒステリシス的な挙動を生ずる原因等を探っている。このような生態系の一般的特性は土壌細菌についても成り立つだろう。従って、土壌細菌の全貌を伺う手法の開発と共に、複雑系の観点から土壌細菌生態系を扱うというアプローチが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

(1)総観的分子分類解析 このような状況に鑑み、本研究の大目的は、土壌細菌システムに対して有効となる総観的な半定量・半定性手法を開発・確立し、土壌環境評価に資することである。特に、種の多様性を問題にすることから、種レベルまで同定できる16S rRNAの遺伝学的特性に注目した。

(2)生態系解析 生態系の解析自身が不十分であることに鑑み、食物網の理論的検討も進めるとともに、非線形相互作用が生態系の動態に及ぼす影響を評価した。

3. 研究の方法

(1)総観的分子分類解析 細菌進化の過程において、まず塩基の置換が起こるので、近い種では16S rRNAの鎖長は等しく、成分が異なる(GC含量変化)。属同士では鎖長も異なる。例えば16S rRNAの多形を調べると、変化幅は十分に大きい。従って、16S rRNAの鎖長とGC含量のマッピングを行うことにより、一つのスポットが一つの細菌種に相当するような、細菌集団の分子分類学的なパターンが得られる。実際、適当な変異領域とPCRプライマーを仮定したシミュレーションによれば、進化的に類縁の細菌は、鎖長-GC含量マップにおいて近くに位置する。実験的には、鎖長解析と成分解析の組み合わせによる二次元電気泳動が適当と思われた。

(2)高分離能二次元電気泳動法 PCRにより、16S rDNA 適当な変化領域を増幅し、鎖長多形と成分多形を組み合わせ二次元電気泳動によって分離能の高い測定手法を開発した。一次元目の16S rRNAの鎖長解析および二次元目のゲルとのマッチングが技術的なネックであるので、高分離能ゲルの調査とゲルの組み合わせの最適化を図った。

(3)生態系動態の理論的解析 食物網の解析のため、種々の生態系モデルを提案し、食物網中の相互作用の結果生ずる定常状態における群集解析を行った。また、生態系中の非線形相互作用の例として、湖の細菌群集を取り上げ、挙動の数理解析を行った。

4. 研究成果

(1)高分離能二次元電気泳動法の開発

従来の電気泳動法では、16S rRNA の変化領域 I(鎖長 150 程度)を 1 塩基対で分離することはできなかった。そこで、様々なゲルを比較検討した。分離能の点では高架橋度のアガロースゲル(商品名スプレデックス)が適していたが、二次元目の DGGE(成分多形解析)に用いるポリアクリルアミドゲルとのマッチングが不适当で、DNA の移行が困難であった。検討の結果、特殊なゲル化剤を添加した高分離能ゲルが最適であることを見出した。その結果得られた二次元電気泳動図の例を示す。横軸は一次元目の鎖長解析、縦軸は二次元目の成分解析(DGGE)である。鎖長は、ほぼ 1 塩基対の分離能を実現している。

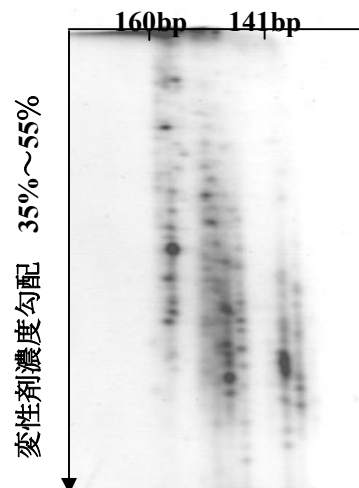


図 1.DNA 二次元電気泳動の例 (GC クランプ付き DNA 断片)

各スポットから DNA を抽出し、シーケンシングを行うことができた。その結果、基本的には、各スポットが一種類ずつの細菌の DNA 断片であり、通常の DGGE では得られない分離能が得られていることが分かった。

異なる環境からサンプリングした細菌群集試料について、二次元電気泳動による評価を行った。例えば、河川底泥を上流・中流・下流からサンプリングし、DNA 二次元マップを作成した。その結果、上流の試料が示す DNA マップよりも、下流の二次元マップが単純であることが判明し、DNA 二次元マップ法が環

境中の細菌多様性評価を用い得ることが分かった。

(2) ランクアバンドランスプロットによる多様性解析 図1のような二次元電気泳動によるDNA二次元マップの結果から多様性等の評価をすることができる。例えば、各スポットの強度を測定し、ランクアバンドランスプロットを作成することができる。その例を以下に示す。

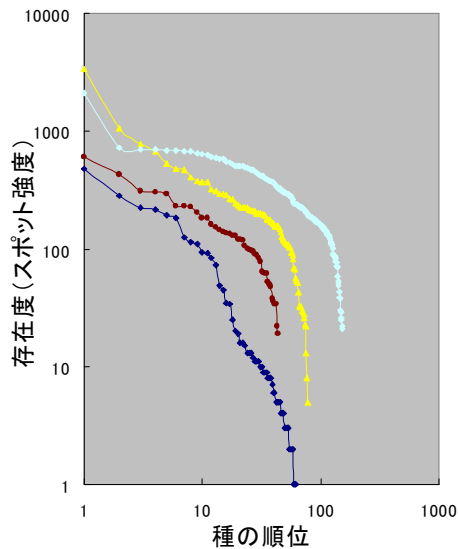


図 2. 分布曲線(種数存在度プロット)の例

各曲線は、異なる環境から得た細菌 DNA の PCR 断片に対するランクアバンドランスプロットである。中間の水平部分が長いほど、多様性が高いと判断できる。

(3) 生態系動態の理論的解析 図2のようなランクアバンドランスプロットの形が、何によって決まるのか、ということを探るために、生態系における食物網の理論的検討を行った。その結果、被食者と捕食者でランクアバンドランスプロットの形が異なること、土壌細菌のランクアバンドランスプロットは被食者が示す形と一致することが分かった。

ランクアバンドランスプロットの情報は、累積頻度に基づいた Gini 係数の算出に使うことができ、土壌細菌や活性汚泥細菌の多様性に定量的指標を与えることが可能である。

湖の細菌集団の挙動を調べるために、シアノバクテリアを被食者、動物プランクトンを捕食者とする生態系モデルを組み、その数値的解析を行った。その結果、自然界で観測される空間分布や時間変動が再現できることが分かった。

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 13 件)

① Qing Chang, Takashi Amemiya, Jianbo Liu, Xianjing Xu, and Kiminori Itoh, Identification and Validation of suitable Reference Genes for Quantitative Expression of xylA and xylE Genes in *Pseudomonas putida* mt-2, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (2009) 印刷中 査読有

② H. Serizawa, T. Amemiya, K. Itoh, Noise-triggered regime shifts in a simple aquatic model, *Ecological Complexity*, (2009) 印刷中 査読有

③ Hiroshi Serizawa; Takashi Amemiya; Kiminori Itoh, Patchiness and bistability in the comprehensive cyanobacterial model (CCM), *Ecological Modelling*, **220**, 764-773 (2009) 査読有

④ A. G. Rossberg, R. Ishii, T. Amemiya, and K. Itoh, The top-down mechanism for body mass - abundance scaling, *Ecology*, **89**(2), 567-580 (2008) 査読有

⑤ Guohua Liu, Takashi Amemiya, and Kiminori Itoh, Two-Dimensional DNA Gel Electrophoresis Mapping: a Novel Approach to Diversity Analysis of Bacterial Communities in Environmental Soil, *J. Bioscience and Bioengineering*, **105**, 127-133 (2008). 査読有

⑥ H. Serizawa, T. Amemiya, T. Enomoto, A. G. Rossberg, and K. Itoh, Mathematical modeling of colony formation in algal blooms: phenotypic plasticity in cyanobacteria, *Ecological Research*, **23**, 841-850 (2008) 査読有

⑦ Hiroshi Serizawa, Takashi Amemiya, Axel G. Rossberg, and Kiminori Itoh, Computer simulations of seasonal outbreak and diurnal vertical migration of cyanobacteria, *Limnology*, **9**, 185-194 (2008) 査読有

⑧ Hiroshi Serizawa, Takashi Amemiya, and Kiminori Itoh, Spatial distribution of phytoplankton in a mathematical model, *Journal of Biosciences*, **33**, 391-403 (2008) 査読有

⑨ T. Amemiya, T. Enomoto, A. G. Rossberg, T. Yamamoto, Y. Inamori, and K. Itoh, Stability and dynamical behavior in a lake-model and implications for regime shifts in real lakes

ecological modeling, *Ecological Modelling*, **206** (2007) 54-62. 査読有

⑩ A.G. Rossberg, H. Matsuda, T. Amemiya, K. Itoh, Some properties of the speciation model for food-web structure— Mechanisms for degree distributions and intervality, *Journal of Theoretical Biology*, **238**, 401-415 (2006). 査読有

⑪ Axel G. Rossberg; Hiroyuki Matsuda; Takashi Amemiya; Kiminori Itoh, Food Webs: Experts Consuming Families of Experts, Food webs: Experts consuming families of experts, *J. Theoretical Biology*, **241**(3), 552–563 (2006). 査読有

⑫ Axel G. Rossberg, K Yanagi, Takashi Amemiya, Kiminori Itoh, Estimating trophic link density from quantitative but incomplete diet data, *Journal of Theoretical Biology*, **243**, 261-272 (2006). 査読有

⑬ Takumi Isshi, Rajendran Narasimmalu, Takashi Amemiya and Kiminori Itoh, Development of a two-dimensional electrophoresis method to study soil bacterial diversity, *Soil Science and Plant Nutrition*, **52**, 601-609 (2006) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① G-H. Liu, T. Amemiya, K. Itoh (June 28-July 2, 2009): A Rapid Analysis for Environmental Bacterial Community Structure based on Selective Primer Pairs-Two dimensional DNA Gel Electrophoresis Mapping, FEMS 2009 – 3rd Congress of European Microbiologists, Gothenborg (Sweden) 発表予定

② 柴田賢一, 雨宮隆, 伊藤公紀 (2009年3月29日): キッチン培地による殺藻細菌の単離—スキムミルク培地との比較—, **H21年度日本水産学会春季大会**, 東京海洋大学 (東京).

③ Amemiya T (February 5, 2009): Understanding nonlinearity in ecosystems for benefitting sustainable ecosystem services, *International Conference on Sustainability Science 2009 (ICSS2009)*, The University of Tokyo (Tokyo).

④ 雨宮隆, 芹沢浩, 伊藤公紀 (2009年1月10日): 湖沼の富栄養化によるアオコ (藍藻類) のパターン形成, **第18回非線形反応と協同現象研究会**, 同志社大学 (京都).

⑤ Shibata K, Amemiya T, Itoh K (June 11,

2008): Activities of algicidal bacteria and their influences on microbial communities, *JST Presto Symposium on Mathematical Sciences towards Environmental Problems*, Hokkaido University (Sapporo).

⑥ 劉国華, 原田智幸, 雨宮隆, 伊藤公紀 (2008年11月26日): 細菌 DNA の二次元電気泳動法の開発とその生態リスク評価への応用, **日本微生物生態学会第24回大会**, 北海道大学 (札幌).

⑦ 安海日, 柴田賢一, 雨宮隆, 伊藤公紀 (2008年11月26日): 顕微 FT-IR によるアオコ (*Microcystis* 属) の生体内分子組成の解析, **日本微生物生態学会第24回大会**, 北海道大学 (札幌).

⑧ 砂田尚孝, 雨宮隆, 伊藤公紀 (2008年11月26日): 実下水処理場におけるリン除去への影響因子: 微生物群集変化の長期モニタリングに着目して, **日本微生物生態学会第24回大会**, 北海道大学 (札幌).

⑨ 坪井隼, Narasimmalu Rajendran, 雨宮隆, 伊藤公紀 (2008年11月26日): *Desulfitobacterium* sp. PCE1 株によるテトラクロロエチレン分解の分子生物学的研究, **日本微生物生態学会第24回大会**, 北海道大学 (札幌).

⑩ 濱島隆浩, 雨宮隆, 伊藤公紀 (2008年11月26日): 大腸菌を用いたバイオアブソープションによる重金属除去, **日本微生物生態学会第24回大会**, 北海道大学 (札幌).

⑪ Qing Chang, Takashi Amemiya, Jianbo Liu and Kiminori Itoh (October 20-23, 2008): Relative Quantification of Gene Expression During Biodegradation to Select Reliable Reference Genes, 24th Annual International Conference on Soils, Sediments and Water, University of Massachusetts in Amherst, (USA)

⑫ S. Tsuboi, Y. Urushigawa, K. Seto, Takashi Amemiya, Kiminori Itoh, N. Rajendran (August 17-22, 2008): Influence of Organic Matter Sources on Bacterial Biomass in The Surface Sediments of Coastal Lagoon Environments – Stable Isotope and Quantitative PCR Analyses , The 12th International Symposium on Microbial Ecology, Cairns (Australia)

⑬ 大木智行・原田知幸・雨宮隆・伊藤公紀、(2007年3月25～28日) 二次元電気泳動法による環境細菌の多様性解析、日本化学会第87春季年会、関西大学(大阪)

⑭ 渡辺悠介・榎本隆寿・雨宮隆・伊藤公紀、(2007年3月25～28日) 藍藻類 *Microcystis* sp. の細胞内分子組成と生理生態の関連性、日本化学会第87春季年会、関西大学(大阪)

⑮ 劉建波, Narasimalu Rajendran, 伊藤公紀, 雨宮隆(2007年3月25～28日)リアルタイムRT-PCR 法を用いたToluene 誘導下におけるtodC1遺伝子発現の相対定量、日本化学会第87春季年会、関西大学(大阪)

⑯ G.H. Liu, T. Amemiya, K. Itoh (2007年3月25～28日) Two-Dimensional DNA Electrophoresis Mapping: Comparison of Dominant Bacteria in Trichloroethylene(TCE)- Contaminated Sites、日本化学会第87春季年会、関西大学(大阪)

[図書] (計 3件)

① Amemiya T, Serizawa H, Ssakajo T, Itoh K: Mathematical models for dynamics and management of algal blooms in aquatic ecosystems. in *Aquatic Ecosystem Research Trends*. Nova Scientific Publishers, Inc. in press. (2009)

②. 雨宮隆 他, よみがえれ！研究者魂—研究はアイデア、寄り道、セレンディピティだ—, 丸全株式会社, 印刷中. (2009)

③ 浦野紘平・松田裕之共編、伊藤公紀ら(17名)著、生態環境リスクマネジメントの基礎、オーム社、2007年3月(雨宮担当・第12章 p.157-172、伊藤担当・第14章 p.185-194)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

名称: DNA 検出センサおよびDNA 検出方法

発明者: 伊藤公紀、菊池晋平

権利者: 国立大学法人横浜国立大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-212151

出願年月日: 平成 19 年 8 月 16 日

名称: 光導波路型 DNA センサおよび DNA 検出方法

発明者: 伊藤公紀、片岡淳司

権利者: 国立大学法人横浜国立大学

種類: 特許

番号: 特開 2008-70214

出願年月日: 平成 18 年 9 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤公紀 (ITOH KIMINORI)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号 40114376

(2) 研究分担者

雨宮 隆 (AMEMIYA TAKASHI)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号 60344149

(3) 連携研究者