

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760512

研究課題名(和文) 合掌造り家屋床下の焰硝生産遺構に生息する新規微生物が有する未知硝化経路の解明

研究課題名(英文) The Microbial Community Structure of Relict Niter-beds Previously Used for Saltpeter Production

研究代表者

成廣 隆(Narihiro, Takashi)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：20421844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白川郷合掌造り家屋の床下で営まれていた「焰硝生産」の土壌遺構に生息する未知硝化微生物を分子生態解析による解明を目指した。16S rRNA及びアンモニア酸化酵素遺伝子を標的とし、最新の高速シーケンサーを利用した分子生態解析を実施した結果、Nitrosospira属やNitrososphaera属に近縁のアンモニア酸化微生物が検出された。得られた群集構造データと、土壌試料の物理化学的パラメータとの関連性を調べた結果、土壌のpHや有機炭素濃度がアンモニア酸化微生物の多様性に影響を及ぼすことが示された。これらの結果から、床下土壌遺構に生息する硝化微生物の多様性を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：The saltpeter had been produced by using niter-bed process formed under the floor of gassho-style house in a Historic Village of Shirakawa-go and Gokayama. The diversity of the nitrifying microbes in such relict niter-bed soil remains unclear. Here, the microbial assemblages of relict niter-bed soils were performed by pyrosequencing analysis targeting 16S rRNA gene and ammonia monooxygenase gene (amoA). The 16S rRNA gene analyses revealed that members of the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, and Bacteroidetes were major microbial constituents, and principal coordinate analysis showed that soil ion contents were critical factors for the communities. The amoA pyrotag analysis revealed that Nitrosospira and "Ca. Nitrososphaera" predominated, and soil pH and organic carbon content were important factors for the ecological niche of nitrifying microbes. These results suggest that these organisms may play roles in ammonia-oxidation in relict niter-bed soil ecosystems.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：環境微生物学 微生物生態学 硝化反応 土壌環境

1. 研究開始当初の背景

白川郷・五箇山の合掌造り集落は、その景観的な美しさに加え、そこに居住する人々が独特な生活様式を築いていたことから、ユネスコ世界遺産に登録されている。合掌造り家屋を中心とした伝統的な生活様式は、平野部が極端に少ないこと、冬期に豪雪地帯となることといった、この地域特有の地理・気象条件により培われてきた。これまでに実施された考古学的・民俗学的研究から、合掌造り集落に居住していた人々は、わずかな平野部を利用してヒエなどの穀類を生産していたことが判明しているが、それだけでは日常生活における食料の確保が困難であった。このような中、人間生活に不利な条件を克服し収入を得るために、合掌造り家屋の天井裏で養蚕を営み、得られた絹を貨幣や食料と交換していたことが記録されている。養蚕による絹の生産は、全国各地の山岳集落で貴重な収入源となっていたが、白川郷・五箇山の合掌造り集落は、他にも驚くべき収入源を確保していた。それが「焰硝生産」である。この地域に遺る歴史的な文書や伝承を調査した研究によると、中世から近世にかけて、合掌造り家屋の床下土壌において、養蚕により排出される蚕糞、ヒエや山草などの非食用部分、そして人尿を混合し、生物学的酸化反応によりアンモニアから硝酸を生成し、抽出・精製過程を経て軍用途の黒色火焰の原料となる「焰硝（硝石、 KNO_3 ）」を生産していたことが明らかとなった（Maji, 2007）。アンモニアから硝酸を生成する反応系は、硝化微生物と呼ばれる原核生物の一群が担うことが知られているが、床下土壌遺構に生息する微生物群（硝化微生物含む）の多様性や生態は未解明のままであった。

2. 研究の目的

本提案課題では、床下土壌遺構に生息する微生物群集全体、および硝化反応を担うと考えられる硝化微生物群の多様性を、高速シーケンサーを用いた最新の分子生態学的解析技術を利用して解き明かすことを最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 土壌試料：硝石生産床下遺構の土壌試料は、白川村教育委員会および馬路泰藏教授（修文大学）の協力のもと提供された。土壌資料は岐阜県大野郡白川村に現存する3種類の合掌造り家屋(OVA, OVB, OVC)の床下から採取した合計9種類の土壌試料(OVA1~OVA5, OVB2~OVB3, OVC1~OVC2)を解析に使用した。

(2) DNA抽出：土壌試料からのDNA抽出は、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用い、添付の説明書の手順に従った。

(3) PCRおよび高速シーケンシング：調製したゲノムDNAを鋳型として、表1に示すプ

ライマーを用いたPCR法により16S rRNA遺伝子およびアンモニア酸化酵素サブユニットA遺伝子(*amoA*)を増幅した。*amoA*遺伝子は、異なるドメインに分布するアンモニア酸化微生物を標的とするため、バクテリア、アーキアで異なるプライマーセットを用いた (Table 1)。

PCRには、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa Bio)を用い、98 (10秒)、55 (15秒)、72 (60秒)のサイクルを、16S rRNA遺伝子では25サイクル、バクテリア由来*amoA*遺伝子では40サイクル、アーキア由来*amoA*遺伝子では35サイクル実施した。得られたPCR増幅試料をWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製し、高速シーケンサー GS-FLX Titanium platform (Roche/454 Life Sciences)によりシーケンシングを実施した。

Table 1. プライマーセット

Target	Name	Sequence (5'-3')
16S rRNA gene	Univ519F	CAGCMGCCGCGGTAATWC
	Univ926R	CCGTCAATTCMTTTRAGTT
Bacterial <i>amoA</i> gene	<i>amoA</i> -1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT
	<i>amoA</i> -2R*	CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC
Archaeal <i>amoA</i> gene	Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG
	Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATG

Mao et al., PLoS One (2011)を参照

(4) データ処理：得られた塩基配列の生リードをDDBJ/EMBL/GenBank遺伝子データベースに登録し (accession no. DRA001202)、QIIMEソフトウェアを用いてノイズ除去およびトリミング処理して基準データセットを作成した。97%以上の16S rRNA遺伝子塩基配列相同性を有するリードをひとつのグループとしてまとめ、各グループをoperational taxonomic unit (OTU)として定義した。バクテリアおよびアーキアの*amoA*遺伝子リードでは、85%以上の相同性を有するグループをひとつのOTUとして定義した。各OTUの存在比や塩基配列情報に基づき、多様性指数 (Chao1)、カバレッジ (Good's coverage)、主座標分析 (Principle coordinate analysis, PCoA)などの統計学的解析を実施した。塩基配列の相同性は、BLAST+プログラムを用いて実施した。*amoA*遺伝子の進化系統樹は、MEGAソフトウェアを用いて作成した。

4. 研究成果

(1) 16S rRNA遺伝子を標的とした分子生態解析：9種類の遺構土壌試料を対象とした高速シーケンサー解析の生リードを処理した結果、合計173,016個の16S rRNA遺伝子リード、3,146個のOTUが得られた (Table 2-1)。各試料のカバレッジは96.7%-98.6%となり、得られた16S rRNA遺伝子リードが土壌全体の微生物群集の多様性をほぼカバーしていることが示された。Chao1値に基づく推定では、各土壌試料には、1.38-1.63倍のOTUが存在することが示唆された。

Table 2. 高速シーケンズ解析結果の概要

(1) 16S rRNA遺伝子

試料名	リード数 (個)	OTU (個)	Chao 1 多様性指数	Good's カバレッジ (%)
OVA1	7,770	514	757.8	97.52
OVA2	17,480	641	1,042.8	98.59
OVA3	16,615	990	1,485.7	97.80
OVA4	19,266	1,496	2,248.9	96.99
OVA5	18,029	1,360	2,124.7	97.06
OVB2	19,304	1,020	1,411.7	98.23
OVB3	22,764	1,028	1,538.0	98.42
OVC1	23,172	1,144	1,816.1	98.09
OVC2	28,616	1,238	1,824.5	98.42

(2) バクテリア由来 *amoA* 遺伝子

試料名	リード数 (個)	OTU (個)	Chao 1 多様性指数	Good's カバレッジ (%)
OVA1	N.D.			
OVA2	N.D.			
OVA3	7,826	6	6.00	99.99
OVA4	10,197	5	5.00	99.99
OVA5	14,558	6	6.00	99.99
OVB2	4,606	6	6.00	99.98
OVB3	6,896	9	10.50	99.96
OVC1	8,016	3	3.00	100.00
OVC2	7,305	5	5.00	100.00

(3) アーキア由来 *amoA* 遺伝子

試料名	リード数 (個)	OTU (個)	Chao 1 多様性指数	Good's カバレッジ (%)
OVA1	4,240	6	7.00	99.95
OVA2	3,455	9	10.00	99.91
OVA3	3,872	6	7.00	99.95
OVA4	2,705	9	10.50	99.89
OVA5	3,670	8	8.33	99.95
OVB2	2,957	4	4.00	100.00
OVB3	3,695	8	8.33	99.95
OVC1	3,550	10	10.00	99.97
OVC2	4,943	12	18.00	99.92

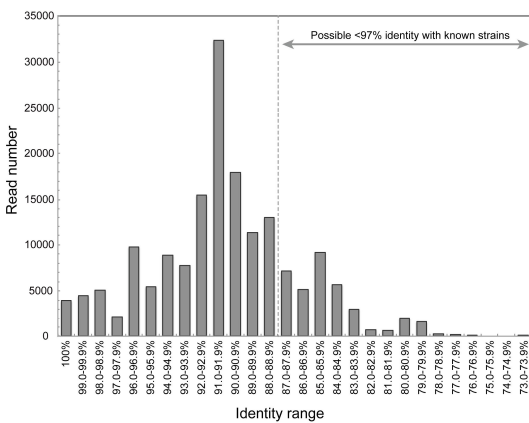


Fig.1. 16S rRNA 遺伝子リードの同源性分布

BLAST+により各 OTU の塩基配列と既知の微生物の塩基配列を比較したところ、*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* および *Planctomycetes* の各門に属する微生物が優占していることが明らかとなった。また、これらの OTU の約 20% は、既知の微生物に対する同源性が 88% 以下であることから、系統学的に新規な微生物が多数存在していることが示唆された (Fig.1)。

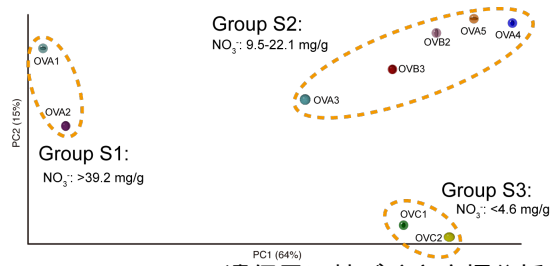


Fig.2. 16S rRNA 遺伝子に基づく主座標分析

16S rRNA 遺伝子データセットに基づく主座標分析の結果、遺構土壌の微生物群集は 3 つのグループに (S1, S2, S3) 分かれることが示され、そのグルーピングには土壌に含まれる硝酸濃度が影響していることが示唆された (Fig.2)。硝石を抽出する前後で土壌に含まれる硝酸濃度が変化することが知られており (Maji, 2007)、硝石生産プロセスの名残が現在の微生物群集の違いに残されていることが示唆された。

硝石生産において重要な役割を果たす硝化微生物の存在量に着目してみると、微生物群集全体の 1.5% 以下と非常に少ないことが明らかとなった。このことから、16S rRNA 遺伝子を標的とする分子生態解析では土壌遺構に生息する硝化微生物の多様性のすべてを解明することができないことが示唆された。そこで、硝化微生物の多様性をより詳細に解明するため、*amoA* 遺伝子を標的とした分子生態解析を実施することにした。

(2) バクテリア由来 *amoA* 遺伝子を標的とした分子生態解析：高速シーケンサーを利用したバクテリア由来 *amoA* 遺伝子解析の結果、

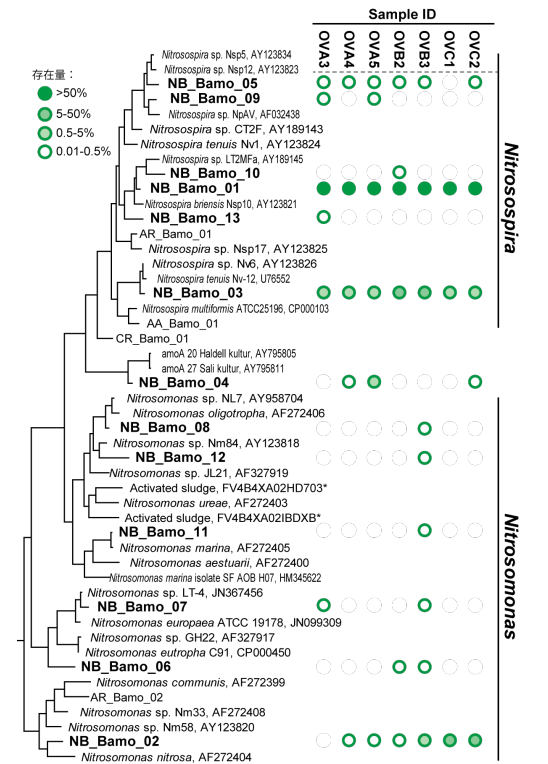


Fig.3. バクテリア由来 *amoA* 遺伝子に基づく進化系統樹

合計 59,494 個のリードから 13 個の OTU が得られた (Table 2-2)。各試料のカバレッジは約 100% となり、アンモニア酸化バクテリアの多様性をほぼカバーしていることが示された。各 OTU の塩基配列と既知の硝化微生物由来の *amoA* 遺伝子塩基配列を比較したところ、*Nitrosospira* 属や *Nitrosomonas* 属に近縁のアンモニア酸化バクテリアの割合が高いことが示された (Fig. 3)。また、バクテリア由来遺伝子データセットに基づく主座標分析の結果、遺構土壌のアンモニア酸化バクテリアの群集構造は土壌 pH に影響されることが示唆された。

(3) アーキア由来 *amoA* 遺伝子を標的とした分子生態解析：高速シーケンサーを利用したバクテリア由来 *amoA* 遺伝子解析の結果、合計 33,087 個のリードから 16 個の OTU が得られた (Table 2-3)。各試料のカバレッジはアンモニア酸化バクテリア同様、約 100% となり、アンモニア酸化アーキアの多様性をほぼカバーしていることが示された。各 OTU の塩基配列と既知の硝化微生物由来の *amoA* 遺伝子塩基配列を比較したところ、'*Ca. Nitrososphaera*' 属と '*Ca. Nitrosopumilus*' 属に近縁のアンモニア酸化アーキアの割合が高いことが示された (Fig. 4)。

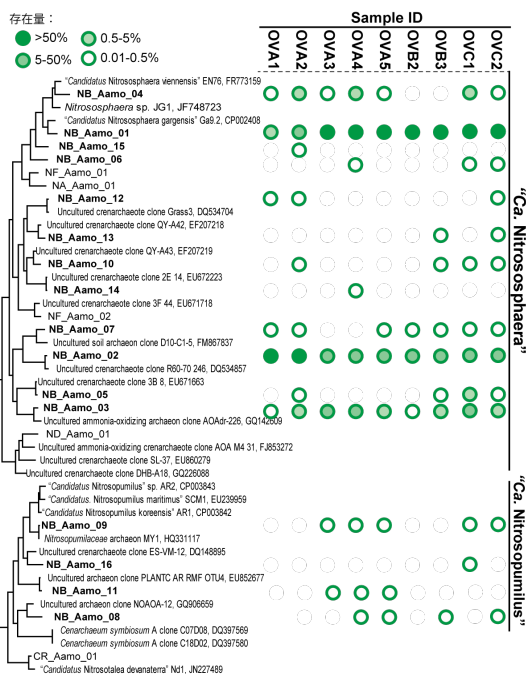


Fig. 4. アーキア由来 *amoA* 遺伝子に基づく進化系統樹

また、アーキア由来遺伝子データセットに基づく主座標分析の結果、遺構土壌のアンモニア酸化アーキアの群集構造は、2つのグループに (A1, A2) に分かれ、そのグルーピングには遺構土壌に含まれる各種イオン濃度 (硝酸、塩素、カリウム、ナトリウム) に影響されることが示唆された (Fig. 5)。また、16S rRNA 遺伝子データセットに基づく微生物群

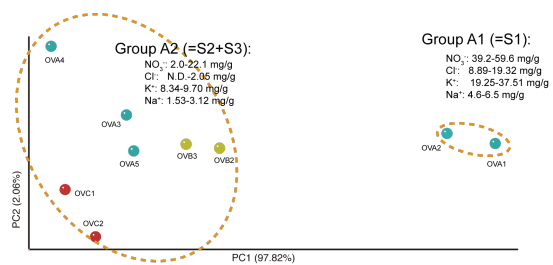


Fig. 5. アーキア由来 *amoA* 遺伝子に基づく主座標分析

集全体の主座標分析と比較すると、S1 にグルーピングされた試料が A1、S2 および S3 にグルーピングされた試料が A2 に相当することがわかった。また、硝酸濃度の高い土壌では '*Ca. Nitrososphaera*' 属のサブグループ 4.1 に近縁のアンモニア酸化アーキアが優占していたのに対し、硝酸濃度の高い土壌では '*Ca. Nitrososphaera gargensis*' が属するサブグループ 1.1 が優占していた。このことは、同じ '*Ca. Nitrososphaera*' 属であっても、種レベルでアンモニアに対する親和性が異なることを示唆している。これらの未培養アンモニア酸化アーキアの生態学的機能を明らかにするためには、今後、メタゲノムやメタトランスクリプトーム等を利用した研究が必要となる。

また、これまでに本研究で適用した方法と同様のアプローチで解析され、公共の遺伝子データベースで公開されている、ナミビア、オーストリア、コスタリカ、グリーンランドで採取された土壌試料のアーキア由来 *amoA* 遺伝子データセット (Pester et al, 2012) を、本研究で構築した遺構土壌のデータセットとマージして PCoA 解析を実施した。その結果、土壌環境に生息するアンモニア酸化アーキアの群集構造は、土壌 pH および土壌有機炭素濃度に影響されていることが示唆された (Fig. 6)。つまり、硝石生産遺構土壌試料はオーストリアで採取された土壌のうち 1 サンプルとクラスタリングし、土壌 pH は 7.1-8.4 の弱アルカリ性、有機炭素濃度は 3.7-23.3% と比較的高かった。また、ナミビアで採取された土壌は、オーストリアで採取された土壌のうち 1 サンプルとクラスタリングし、土壌 pH は弱酸性 (5.7-6.8)、有機炭素濃度は 0.3-1.6% と低かった。また、pH が酸性の土壌はこれらのどちらにもクラスタリングせず、中でも有機炭素濃度の濃淡でさらにクラスタリングされていた。この結果から、アンモニア酸化アーキアの生息環境は、土壌 pH と有機炭素濃度が重要な環境因子となっていることが示された。

以上の結果から、合掌造り家屋床下土壌遺構に生息する微生物群集、特にアンモニア酸化微生物の多様性と、それらの生息に影響を及ぼす環境因子を解明することができた。

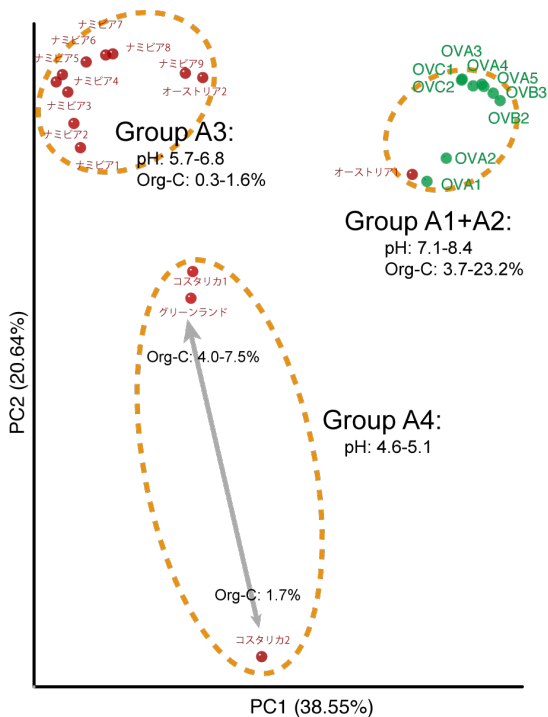


Fig.6. 既存のアーキア由来 *amoA* 遺伝子データセットに基づく主座標分析

(4)参考文献

Maji T, Maji A (2007) The Unknown History of Shirakawago: The Circulation of Nitrogen in Relation with Urine, Saltpeter and Rice, and The Daily Life in the Edo Era. Nagoya, Japan: Fubaisha Press.

Mao YJ, Yannarell AC, Mackie RI (2011) Changes in N-transforming archaea and bacteria in soil during the establishment of bioenergy crops. PLoS One 6: e24750.

Pester M, et al. (2012) *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. Environ Microbiol 14: 525-539.

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 0 件)

〔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〕

アウトリーチ活動情報:

本研究の遂行に当たり、アメリカ合衆国イリノイ州立大学 (University of Illinois at Urbana-Champaign) Civil and Environmental Engineering 学科の Wen-Tso Liu 教授の研究室に滞在し、高速シーケンサーによる遺伝子解析技術、および微生物群集構造の統計学的解析手法を習得した。また、同研究室にて本研究の成果を発表し、情報発信に勤めた。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

成廣 隆 (Takashi Narihiro)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 20421844