

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770010

研究課題名(和文) 低酸素条件下におけるメタン酸化細菌群集の機能と環境応答

研究課題名(英文) Function and environmental response of methane-oxidizing bacteria community under low-oxygen conditions

研究代表者

小島 久弥 (KOJIMA, Hisaya)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：70400009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：強力な温室効果ガスであるメタンの大気中への放出量に影響を持つ、環境中に生息するメタン酸化細菌の低酸素条件下での生態に関する研究を行った。これまで知見が無かった亜熱帯における調査では、ダム湖の水中から無酸素条件下でメタンを酸化する能力を持った細菌と近縁な微生物が数多く検出された。積雪中のメタン酸化細菌に関する研究では、メタン酸化細菌と鉄還元菌の相互作用の可能性が両者の微視的な空間分布から示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ecological study of methane-oxidizing bacteria in low-oxygen environments was performed. In water of a subtropical reservoir, one of the dominant microbes was close relative of a methane-oxidizing bacterium which has ability to oxidize methane under anoxic conditions. Possible interaction between methane-oxidizing and iron-reducing bacteria was suggested by microscopic observation of snow sample which contained both of those organisms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生態・環境

キーワード：メタン酸化細菌 湖沼

1. 研究開始当初の背景

メタンは強力な温室効果を持ち、その大気中での濃度は全地球規模での気候変動に大きく関わっている。湖沼は大気への主要なメタン供給源であり、その寄与は全体の6-16%と見積もられている。湖沼で生成されるメタンは大気へ放出される量の数十倍以上に及び、その大半は湖沼内でメタン酸化細菌によって消費されている。そのため、メタン酸化細菌の活性は大気へのメタンの付加量に大きな影響を及ぼす。メタン酸化細菌群集が環境の変化に対してどのような反応をするかによって、大気メタンの濃度とそれがもたらす温室効果は大きく異なったものとなる。従来の研究により、湖沼のメタン酸化細菌は酸素がごく微量しか存在しない、あるいは全く存在しない領域に多く生息していることが示されている。さらに、湖沼でのメタン消費のほとんどは上記のような場で起きていることも示されている。これらのことは、メタン動態を把握する上で本質的な重要性を持つのは、低酸素環境におけるメタン酸化細菌の生態であることを示す。一方、野外において無酸素環境下で認められるメタン酸化活性については、検出限界以下の酸素を利用してと推測されてきた。これは、バクテリアによるメタン酸化には酸素が必須であると考えられていたためである。しかし近年、無酸素条件下でメタンを酸化する細菌が発見された。このメタン酸化細菌は‘*Methylomirabilis oxyfera*’と呼ばれ、湖沼から一般的に検出されるメタン酸化細菌とは系統的に大きく隔たっている。‘*Methylomirabilis oxyfera*’は無酸素条件下において亜硝酸から分子状酸素を生成し、これをメタン酸化に用いる。‘*Methylomirabilis oxyfera*’と同様な機能を持つメタン酸化細菌は無酸素条件下でのメタン酸化に大きく機能していると考えられるが、これらの微生物の自然環境中での分布と多様性はほとんど明らかとなっていない。‘*Methylomirabilis oxyfera*’を含む既知のメタン酸化細菌は、系統的に大きく4つのグループに分かれている。そのうち、湖沼でのメタン酸化に大きく貢献しているものは、type I および type II と呼ばれる2つのグループであると考えられている。特に、type I は亜寒帯や温帯の湖沼で実施された多くの研究において水中でのメタン酸化で中心的な役割を果たすものであると推定されている。この傾向については、淡水湖沼にも塩湖にも共通している。一方、熱帯のダム湖では type II がより重要であるとの報告がなされているが、熱帯での研究例はごく少数しかない。さらに、温帯との中間にあたる亜熱帯での研究例は知られていない。

2. 研究の目的

近年新たに得られた知見を考慮に入れたうえで、自然環境中に生息するメタン酸化細菌の無酸素・低酸素条件下での生態に関する

基礎的な情報を得る。これまでメタン酸化細菌の生息環境としての調査が行われていなかったタイプの調査地を対象とすることで、従来の知見を補完する結果を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 亜寒帯に位置する汽水部分循環湖の浮遊性メタン酸化細菌群集構造を明らかにするため、水深別に採取した湖水から DNA を抽出した。これをもとに、16S rRNA 遺伝子をマーカーとして全バクテリア群集の解析を行った。同じ DNA 試料を対象に、メタン酸化細菌に特異的な遺伝子 (*pmoA* 遺伝子) を対象としたクローニング解析を行うことでメタン酸化に関わる微生物の多様性を解析した。さらに、特定の系統群を特異的に染色する手法 (CARD-FISH) によって主要なメタン酸化細菌の計数を行った。

(2) 亜熱帯に位置するダム湖の浮遊性メタン酸化細菌群集構造を明らかにするため、上記の亜寒帯湖沼と同様の方法による解析を行った。調査は、合計4回行った。

(3) 過去の研究によって積雪内部から主要な微生物として検出されていたメタン酸化細菌の生態を探るため、CARD-FISH によって微視的な空間分布を観察した。同じ試料中に多数存在していることが示されている鉄還元菌についても同様の解析を実施し、両者の位置関係と分布パターンの差異について検討した。

4. 研究成果

(1) 汽水部分循環湖の調査では、16S rRNA 遺伝子の PCR 産物配列を次世代シーケンサーによって大量に取得した。その結果、既知のメタン酸化細菌の4つのグループのうち3グループを検出した。水深ごとに大きく環境が異なるにも関わらず、type I と type II の双方が全水深に渡って検出され、その検出頻度は type I の方が高かった。詳細な系統解析の結果、検出された type I の多くは他の湖沼で多く検出されてきた属とは異なるメタン酸化細菌であった。第3のグループとして、‘*Methylomirabilis oxyfera*’に近縁な細菌も検出されたが、その頻度は低かった。

メタン酸化細菌特異的な *pmoA* 遺伝子のクローニング解析でも type I と type II の双方が検出された。図1に示す通り、5水深についてクローンライブラリーを作成し、それぞれ60クローン程度の配列を決定した。検出頻度は青で示した type I の方が高かったが、赤で示した type II の割合が嫌気的な底層水で高くなる傾向がみられた。

CARD-FISH による解析の結果は、水深や季節による変化パターンにおいて DNA による解析の結果と概ね一致したが、一部において食い違う結果が得られた。全体として、DNA の結果よりも type II が相対的に多く検出される傾向にあった。

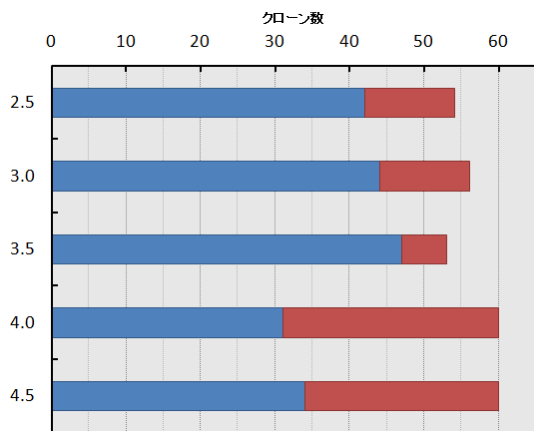


図1 汽水部分循環湖での *pmoA* 遺伝子クローニング解析の結果。系統関係から type I (青)と type II (赤)に大別して水深ごとに示したものの。

(2) 亜熱帯のダム湖調査では、全バクテリアの群集構造は 16S rRNA 遺伝子のクローニング解析によって実施した。酸素を含む表層水(水深 10m)と、酸素をほとんど含まない底層水(水深 90m)を解析の対象とした。全ての試料からメタン酸化細菌が検出されたが、その検出頻度は底層水でより高い傾向にあった(図2)。

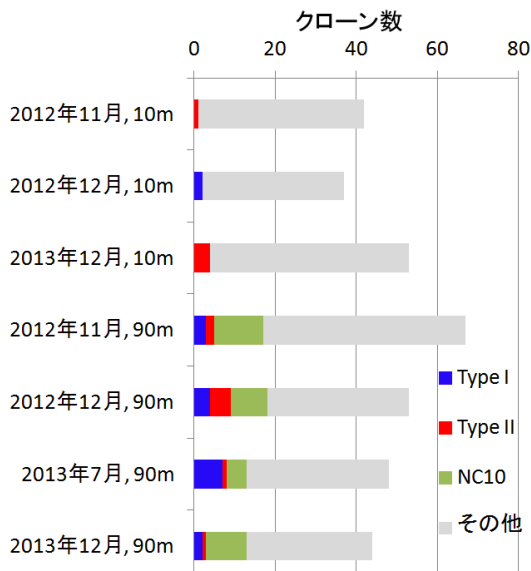


図2 亜熱帯ダム湖での 16S rRNA 遺伝子クローニング解析の結果。'Methylomirabilis oxyfera' に近縁な配列は "NC10" として表示。"その他" はメタン酸化細菌以外のバクテリア。

底層水からは、type I と type II に加えて、'Methylomirabilis oxyfera' に近縁なメタン酸化細菌も検出された。検出されたメタン酸化細菌を種に相当するレベルで区分すると、type I の中には8種程度が含まれるのに対し、type II のメタン酸化細菌は1種のみであることが示唆された(図3)。8種の type I の中では、特定の1種のみが特に高頻度で検出されていた(図3)。'Methylomirabilis oxyfera' 様のメタン酸化細菌も単一の種であり、過去に琵琶湖の

堆積物から検出されたものと非常に近縁であることから同一種であると考えられた。

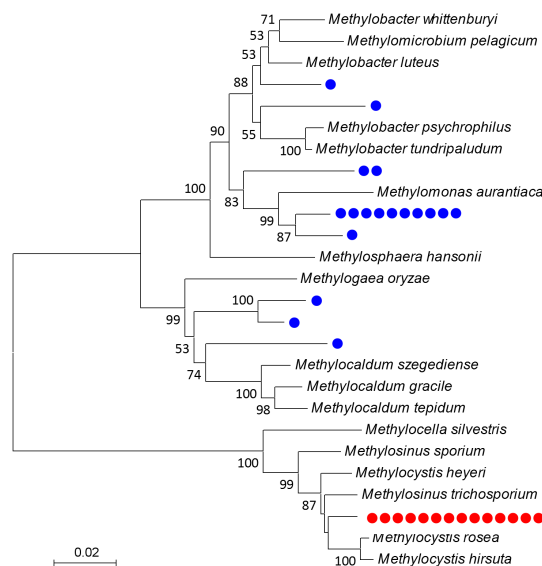


図3 亜熱帯ダム湖の 16S rRNA 遺伝子クローニングライブラリーから検出された 8 種の type I (青)と 1 種の type II (赤)の系統関係。 の数は、クローン数を表す。

pmoA 遺伝子の解析は、2012年に採取された底層水のみを対象に行い、11月と12月の試料ではほぼ同一の結果が得られた。type I と type II の *pmoA* 遺伝子を一括して検出する解析においては、type I がより高頻度で検出され、type II は全体の15%程度であった。16S rRNA 遺伝子解析の結果から、相対的に type I の多様性が高いことが示唆されていたが、*pmoA* 遺伝子の解析によってもこれが支持された。検出された type II の *pmoA* 遺伝子は全て同一の種に由来するものと推定され、その系統上の位置も 16S rRNA 遺伝子として検出された type II と一致した。'Methylomirabilis oxyfera' 様細菌が持つ *pmoA* 遺伝子については個別に解析を行った。ダム湖の深層水に生息しているものが琵琶湖のものと同様である可能性が、この解析によっても支持された。

CARD-FISH による計数は、2013年12月に採取された底層水を対象に行った。これまで湖沼の主要なメタン酸化細菌とはみなされていなかった'Methylomirabilis oxyfera' 様の細菌を計数したところ、その細胞数は同様の方法で計数された全バクテリアの21%にも及んだ。この値は、過去に知られている水界環境での報告に比べて非常に高いものである。

亜熱帯ダム湖での調査結果は、環境中のメタン酸化細菌群集に関連する従来のあらゆる研究と明確に異なっている。湖沼のみに関わらず、メタン酸化細菌については多様な生態系について数多くの研究例がある。そのいずれにおいても'Methylomirabilis oxyfera' に近縁な生物が主要なメタン酸化細菌となっている例はない。'Methylomirabilis oxyfera' はそ

の機能において他のあらゆる細菌と異なった特性を持つことから、これに近縁な微生物を環境中から特異的に検出しようという試みは活発に行われつつある。しかしながら、そのほとんどの場合において対象とする生物は特異性の高い方法でのみ検出され、微生物群集の中での割合は低いものであることが示唆されている。これらの微生物が、特定の環境下において微生物群集の主要な構成要素となりうることを培養に依存することなく示した点で、本研究での発見は非常に大きな意義を持つ。また、従来知見の欠けていた亜熱帯湖沼におけるメタンの動態を把握するうえでも、本研究の結果は重要な位置を占めるものと期待される。

(3) 積雪内部でのメタン酸化細菌の微視的分布については、過去に DNA の解析によってその存在が繰り返し確認されている、鉄の蓄積が起きている試料を用いて行った。この試料においては、表面を酸化鉄に覆われた一定の形状の粒子が多数存在していることが分かっていた。この粒子の実態を探るために表面の酸化鉄を酸で処理したところ、内部に細菌のものと思われる細胞があることが確認できた(図2)。さらに、酸処理と CARD-FISH を組み合わせた解析により、粒子の中心となる細胞の少なくとも一部はメタン酸化細菌であることが確認できた。メタン酸化細菌は、粒子の中心に存在している場合と、粒子の外側に付着している場合の双方が観察された。一方で、同じく DNA 解析で検出されていた鉄還元菌については、粒子の外側に付着していることが確認されたものの、粒子の中心となっている例は確認できなかった。

生育に酸素を要求するメタン酸化細菌と、酸素を嫌う鉄還元菌は、生息環境が異なるものとみなされ、両者の間の相互作用は考慮されてこなかった。しかし、貧酸素条件下におかれたメタン酸化細菌が有機酸や水素を細胞外に放出することが近年になって発見された。これらの物質は鉄還元菌にとって栄養源となり得る。本研究の結果は、実際に両者が共存する環境下での観察から相互作用の可能性を示唆する例として大きな意義を持つ。また、今回観察したような粒子を含む積雪は、水田や湿原、湖沼など湿潤な環境で見られる。これらはいずれもメタン放出源であり、これを覆う積雪中に生息するメタン酸化細菌は大気へのメタン放出を抑える役割を果たしている可能性がある。積雪が重要なメタン酸化の場であるならば、気候変化による積雪量の変化は温室効果ガスであるメタンの放出量の増減を介したフィードバックもたらす可能性がある。この点から積雪中のメタン酸化細菌の生態を理解することは重要な課題であり、そのための新たな視点をもたらすものとして本研究の成果は意義深いものである。

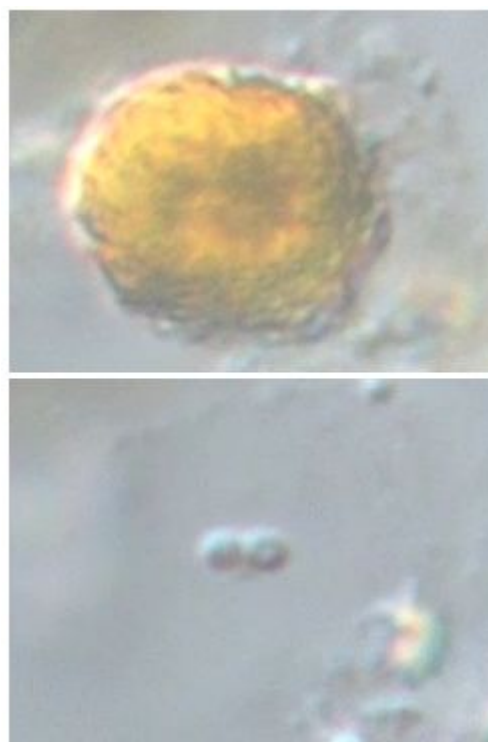


図4 メタン酸化細菌を含む積雪中に観察された鉄に富む粒子。上段はもとの状態、下段は同じ粒子を酸処理することで露出した細胞の顕微鏡写真。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 久弥 (KOJIMA, Hisaya)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：70400009