

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450077

研究課題名(和文) 水田土壌のメタン生成過程における硫酸還元菌群集の動態の解明

研究課題名(英文) Community analysis of sulfate-reducing bacteria during methanogenic process in paddy field soil

研究代表者

渡邊 健史 (WATANABE, TAKESHI)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：60547016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水田土壌中で硫酸還元反応と発酵による水素生成反応の2つの役割を担う硫酸還元菌群集を対象に解析を行った。本研究により、水田土壌にはこれまで考えられていた以上に多様な硫酸還元菌が生息しており、その群集構成や動態は水田圃場により異なることが示唆された。また水素生成に関わる酵素[FeFe]-ヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とその転写産物の解析から、硫酸還元菌が複数のヒドロゲナーゼを保有し、条件に応じて使い分けるとともに、水田土壌の嫌氣的な有機物分解過程において水素生成者として重要な役割を担うことを示唆する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal community structure of sulfate-reducing bacteria and their roles in paddy field soil. Community analysis showed that diverse sulfate-reducing bacteria including uncultured and unknown members inhabited paddy field soils and the composition and dynamics were different depending on the fields. Analysis of *hydA* gene, which encode [FeFe]-hydrogenase known as an H₂-producing enzyme, and the transcripts of a sulfate-reducing bacterium isolated from a paddy field soil revealed that the bacterium differently regulated transcription of two *hydA* paralogs between under sulfate-reducing and H₂-producing conditions. In addition, *hydA* genes related to sulfate-reducing bacteria were transcribed in an anoxic paddy soil. These findings indicated that sulfate-reducing bacteria are involved in the anaerobic decomposition of organic material in paddy field soil as one of the key H₂-producers.

研究分野：土壤微生物学

キーワード：水田土壌 硫酸還元菌 水素生成

1. 研究開始当初の背景

水田は温室効果ガスであるメタンの主要な人為的発生源である。水田が湛水されると、有機物は多種多様な嫌気性微生物が関わって段階的に分解されるとともに硝酸、マンガ、鉄、硫酸が逐次的に還元され、最終的にメタンが生成される。その中で硫酸還元菌は、土壌中に硫酸塩が存在する条件下ではメタン生成を担うメタン生成古細菌に優先して基質を利用し、硫酸還元を行う一方で、メタン生成段階では有機酸を発酵して水素をメタン生成古細菌に供給し、条件に応じて戦略を変えることができる。したがって、硫酸還元菌は水田土壌中の硫黄循環だけでなくメタン生成過程においても重要な役割を担う。しかし、その生態については限られた知見しか蓄積しておらず、これまでに水田土壌中の硫酸還元菌の動態や多様性、水素生成への寄与については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、水田土壌中の硫酸還元菌群集の動態を分子生態学的手法を用いて解明するとともに、土壌および水田分離菌株の水素生成に関わる酵素[FeFe]-ヒドロゲナーゼの活性中心をコードする *hydA* 遺伝子と転写産物の解析を通じて、水田土壌中の嫌氣的有機物分解における硫酸還元菌の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 硫酸還元菌の群集構造解析

東北農業研究センター(以下、大曲; 灰色低地土)、九州沖縄農業研究センター(以下、筑後; 灰色低地土)、青森県産業技術センター(旧青森県農林総合研究センター; 以下、黒石; 黒ボク土)の有機物長期連用試験水田(化学肥料連用区と稲わら堆肥連用区)および愛知県農業総合試験場安城農業技術センター(以下、安城)の二毛作水田を対象圃場とした。各圃場より経時的に採取した土壌より抽出した DNA を対象に、硫酸還元反応を触媒する異化的亜硫酸還元酵素 dissimilatory (bi)sulfite reductase (DSR) のサブユニットをコードする *dsrB* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR-DGGE、qPCR、クローンライブラリー解析を行った。

(2) 稲わら分解に関与する水素生成微生物群集の解析

水田土壌中の稲わら分解に関わる活性を有する水素生成微生物群集の多様性と土壌の状態変化に対応した動態を明らかにすることを目的として、水田土壌をそのまま、あるいは基質として稲わらを添加して嫌氣的に培養し、土壌からのメタン、二酸化炭素および水素の発生量を経時的に測定するとともに、土壌より DNA および RNA を抽出し、*hydA* を対象とした(RT-)PCR-DGGE による解析を行った。また、逐次還元初期過程かつ稲わら分

解の初期過程(稲わら添加区培養 1 日目)、メタン生成過程かつ稲わら分解の中期~後期過程(稲わら添加区培養 14 日目)、穏やかな逐次還元過程(無添加区培養 14 日目)にある土壌より抽出した土壌 DNA および RNA を用いてクローンライブラリー法による解析を行った。

(3) 水田より分離した *Desulfovibrio* sp. A1 株の *hydA* 転写活性と水素生成活性の解析
水田土壌より分離した硫酸還元菌である *Desulfovibrio* sp. A1 株を対象に、硫酸還元条件下およびメタン生成古細菌 *Methanobacterium* sp. AH1 株との共培養による発酵条件下で生育させ、見かけ上の水素生成量を測定するとともに A1 株が保有する *hydA* パラログの転写活性の変化を RT-qPCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 硫酸還元菌の群集構造

dsrB 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 解析より、硫酸還元菌の群集構成は地域間で大きく異なっていたものの、同一圃場内の群集構成に経時変化はほとんど見られないことが明らかになった(図 1)。一方で、qPCR 解析により、乾土 1g あたりには約 $10^7 \sim 10^9$ コピーの *dsrB* 遺伝子が検出されたが、経時変化はほとんど見られない(大曲)、湛水期間中に減少(筑後)、あるいは中干し期間および中干し後に減少傾向(黒石、安城)など地域により異なる傾向が示された(図 2)。安城水田を除いて *dsrB* 遺伝子コピー数は土壌抽出 DNA 量と正の相関関係が見られたことから、それらの圃場では硫酸還元菌数の増減は土壌微生物バイオマスに規定されている可能性が推定された。一方で、圃場によって抽出 DNA 量の変動幅と *dsrB* 遺伝子数の変動幅の関係には違いがあり、圃場によって硫酸還元菌の動態が異なることが示唆された。

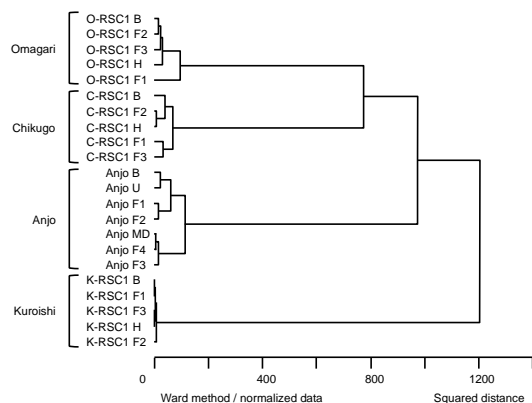


図 1. 大曲(O)、黒石(K)、筑後(C)、安城(Anjo)水田土壌より得られた硫酸還元菌 *dsrB* 遺伝子断片 DGGE バンドパターンのクラスター分析による比較

大曲、黒石、筑後は稲わら堆肥連用区(RSC)

1 のサンプルを用いた。B、F1~F4、MD、H、U は湛水前、湛水中、中干し、収穫後および小麦播種後採取試料を表す。

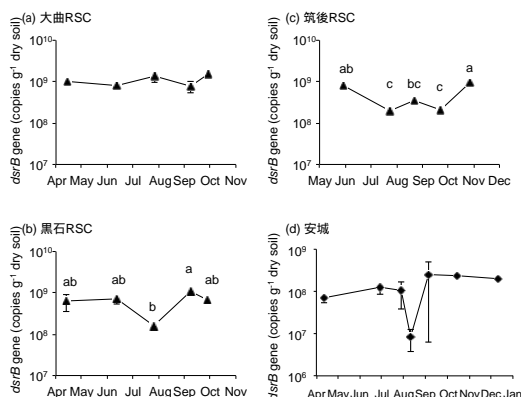


図 2. 大曲(a)、黒石(b)、筑後(c)、安城(d) 水田土壌中の硫酸還元菌 *dsrB* 遺伝子コピー数

クローンライブラリー解析の結果、既知硫酸還元菌として *Desulfobacca*、*Desulforhabdus*、*Syntrophobacter*、*Desulfovira*、*Desulfocapsa*、*Desulfohopalus*、*Desulfofustis*、*Desulfobulbus*、*Desulfatibacillum*、*Desulfomonile*、*Desulfovibrio* 属の硫酸還元菌の DSR に近縁な配列が検出された。また、既知菌株と系統的に大きく異なるグループに属する配列も多数得られた。したがって、これまでの水田からの分離菌の多様性を超える幅広い分類群の硫酸還元菌が水田土壌に存在することが明らかになった。加えて、異なる圃場間で *Desulfobacca acetoxidans* lineage や *Syntrophobacteraceae* 科のグループの割合が異なっていたことから、地域により異なる硫酸還元菌が水田土壌中の硫黄循環および有機物分解に関与していることが推察された。

(2) 稲わら分解に関与する水素生成微生物群集

水田土壌に稲わらを添加して嫌氣的に培養し、経時的に採取、抽出した土壌 DNA を対象に行った PCR-DGGE 解析の結果、*hydA* のバンドパターンが培養期間を通じて大きく変化しなかったことから、存在する水素生成微生物群集構造は安定していると考えられた。一方で、稲わら添加土壌より抽出した RNA を対象に行った RT-PCR-DGGE 解析では、バンドパターンは、培養中に変化しており、水素生成に関わる微生物群集が変化することが示唆された。

クローンライブラリー解析(図 3)により、DNA レベルでは Firmicutes, Chloroflexi, Proteobacteria, Bacteroidetes などの有す

る *hydA* と系統的に近い *hydA* 部分配列が得られ、これらの微生物群が水田土壌に水素生成微生物群集として存在すると考えられた。一方で *hydA* 転写産物の解析より、土壌の条件により異なる微生物群集が水素生成活性を有すると考えられた。すなわち、稲わら添加区の培養 1 日目では限られたグループの Proteobacteria と Firmicutes の有する *hydA* が主に転写されていた。ここで検出された Proteobacteria の *hydA* は、硫酸還元菌あるいは鉄還元菌由来の *hydA* と近縁であった。培養 3 日目までに土壌から急激に水素が発生していたことから、これらの微生物群が湛水直後の水素生成に寄与している可能性が示唆された。一方で、稲わら添加区の培養 14 日目では、培養 1 日目では検出されなかったグループを含む、より多様な微生物由来の *hydA* が検出され、さまざまな微生物が水素生成に関与することが示唆された。また、無添加区の培養 14 日目では、一部稲わら添加区の培養 14 日目と共通した *hydA* 転写パターンがみられるものの、より種類の少ない微生物群が水素生成活性を有していたと考えられた。

以上より、水田土壌で活性を有する水素生成微生物群集構造は土壌の還元状態や有機物の存在状態によりダイナミックに変化することが示唆された。

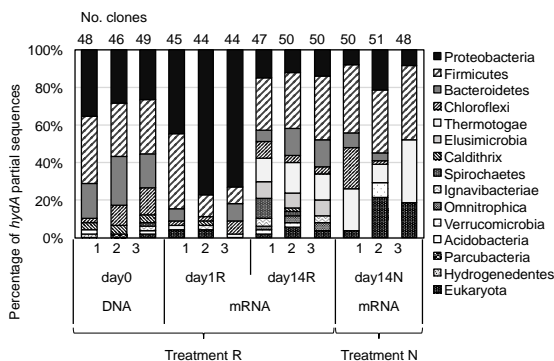


図 3. 水田土壌中で転写された *hydA* のクローンライブラリー解析

Treatment R および N は、稲わら添加土壌および無添加土壌を示す。培養 0 日目の *hydA* 遺伝子および培養 1 日目、14 日目の稲わら添加土壌、培養 1 日目の稲わら無添加土壌で転写された *hydA* の構成を示す。

(3) 水田より分離した *Desulfovibrio* sp. A1 株の *hydA* 転写活性と水素生成活性

安城の水田土壌より分離した *Desulfovibrio* sp. A1 株が保有する *hydA* を PCR ベースの解析で調べた結果、A1 株は、系統的に異なる *hydA* パラログを少なくとも 2 種類 (*A1hydA1*、*A1hydA2*) 有することが明らかになった(図 4)。

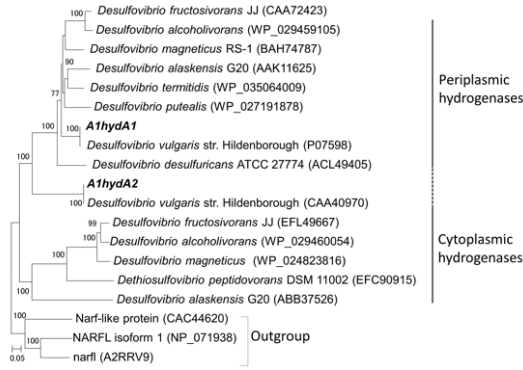


図 4. *Desulfovibrio* sp. A1 株が保有する *hydA* の系統関係

続いて、A1 株を乳酸塩と硫酸塩を基質とした培地で生育させる条件(硫酸還元条件)と、乳酸塩を基質として培地でメタン生成古細菌である AH1 株と生育させる共培養条件(種間水素転移によるメタン生成条件)での培養を行い、2 種の *hydA* の転写活性を解析した結果、*hydA* パラログの転写活性はそれぞれ異なっていることが明らかになった(図 5)。すなわち、*A1hydA1* は、硫酸還元、共培養条件を問わず、培養開始直後は高い転写活性を示したものの、その後大きく減少した。一方で *A1hydA2* の転写活性は、特に共培養条件で培養中に上昇した。この上昇は、水素生成、そして水素消費菌であるメタン生成古細菌のメタン生成活性の上昇と対応していたことから、*A1hydA2* がメタン生成古細菌との共生時に水素生成酵素として重要な役割を担うことが示唆された。

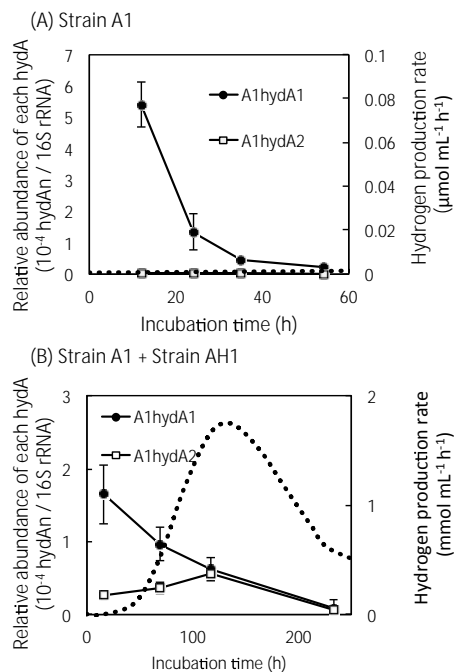


図 5. 硫酸還元条件 (A) メタン生成共生条

件 (B) で転写された *hydA* パラログと水素生成活性

A1 株が保有する 2 つの *hydA* 遺伝子と、土壌中の稲わら分解過程で転写された *hydA* を併せて比較すると、共培養条件下で水素生成に関わると考えられた *A1hydA2* に近縁な配列が、DNA レベルで検出され、さらにメタン生成段階にある土壌中でも転写されていることが明らかになった。

以上より、硫酸還元菌は、水素生成時に *hydA* を転写するとともに、複数の *hydA* パラログを条件に応じて使い分けしていることが示唆され、実際に、メタン生成段階に至った水田土壌中での水素生成に寄与していることが示唆された。

(4) まとめ

本研究により、水田土壌にはこれまで考えられていた以上に多様な硫酸還元菌が生息しており、その群集構成や動態は、それぞれの水田圃場により異なることが示唆された。また、土壌より抽出した RNA や分離菌株を用いた解析により、硫酸還元菌が水素生成者として水田土壌中の物質動態に関わっていることが示唆され、水田土壌の嫌氣的な有機物分解過程において重要な役割を担うと考えられた。

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 2 件)

Baba, R., Morita, M. Asakawa, S., Watanabe, T. (2017) Transcription of [FeFe]-hydrogenase genes during H₂ production in *Clostridium* and *Desulfovibrio* spp. isolated from a paddy field soil. *Microbes Environ*: in press. DOI: 10.1264/j sme2.ME16171 (査読有)

Baba, R., Asakawa, S., Watanabe, T. (2016) H₂-producing bacterial community during rice straw decomposition in paddy field soil: estimation by an analysis of [FeFe]-hydrogenase gene transcripts. *Microbes Environ* 31(3): 226-233. DOI: 10.1264/j sme2.ME16036 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

馬場竜子・森田麻友美・浅川晋・渡邊健史 (2016) 水田土壌より分離した水素生成細菌株の *hydA* 転写活性はパラログ間で異なる. 第 31 回日本微生物生態学会大会, 横須賀市文化会館(横須賀市). 10月 23-25 日

Baba, R., Morita, M., Asakawa, S., Watanabe, T. (2016) The relationship

between transcriptional activity of [FeFe]-hydrogenase genes and H₂ production in bacterial strains isolated from a paddy field soil. *16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME 16)*, 253B, Montreal, Canada. 21-26 August 2016

水野かすみ・平松雅代・内田利治・齋藤雅人・西田瑞彦・関矢博幸・加藤直人・土屋一成・浅川晋・渡邊健史 (2016) 水田土壌の硫酸還元菌の群集構造解析. 日本土壌微生物学会 2016 年度大会, 岐阜大学(岐阜市). 6月11-12日

馬場竜子・浅川晋・渡邊健史 (2014) 水田土壌中で活性を有する水素生成微生物群集の解析. 環境微生物系学会合同大会 2014, 浜松アクトシティコンgresセンター(浜松市). 10月22-24日

馬場竜子・浅川晋・渡邊健史 (2014) 嫌気水田土壌の還元化に伴う活性を有する水素生成微生物群集の変化-[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子の mRNA を対象としたクローンライブラリー解析-. 日本土壌肥料学会 2014 年度東京大会, 東京農工大(小金井市). 9月9-11日

〔図書〕(計1件)

渡邊健史 (2014) 嫌気環境の微生物の共同作業. 環境と微生物の事典(日本微生物生態学会編), pp. 91-92, 朝倉書店.

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 健史 (WATANABE, Takeshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師
研究者番号: 60547016

(2)連携研究者

浅川 晋 (ASAKAWA, Susumu)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 50335014