

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：25101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550051

研究課題名(和文) バイオイメージング技術を応用した微生物代謝活性のライブ評価

研究課題名(英文) Development of Real-time observation devices for process in microbial consortia with bio-imaging techniques

研究代表者

吉永 郁生 (Yoshinaga, Ikuo)

公立鳥取環境大学・環境学部・教授

研究者番号：40230776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究テーマでは、自然環境におけるメタンや亜酸化窒素などの微生物集団の代謝産物であるガス生産において重要と考えているバイオフィルムや凝集塊などの微生物集団の高次構造を光学機器で観察した状況で解析する実験系を構築することを最終の目標としている。そのためのモデル生物として、実験畑地の土壌からメタン生成・資化細菌コンソーシアの分離を試み、凝集塊存在下でのみガス生産が認められる培養系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Because the spacial distribution and/or location of each microbial cells in microbial consortia, such as biofilm and aggregates, is essential for gas production via microbial process. Greenhouse gases, as methane, N₂O, and CO₂, are emitted increasingly from pond, lake, paddy field and farmland, and then we attempt to the development of research device for real-time analysis of metabolite from microbial consortia with some equipment. For the goal, we at first tried to establish the model system for methanogenesis/methanotroph consortia from soil samples of a farmland. After all we establish the microbial consortia that emit the methane gas at the case of microbial aggregates are constructed.

研究分野：微生物生態学

キーワード：メタン 微生物コンソーシア

1. 研究開始当初の背景

メタンや亜酸化窒素は、二酸化炭素と同様かそれ以上の温暖化効果を持つガスとして知られている。大気中のこれらのガス濃度は最近の 100 年間に増加しつつあり、二酸化炭素の排出削減とともにこれらのガス生産を抑制することが、これ以上の地球環境の温暖化を抑制するために必要である。さて、これらのガスの多くは細菌や古細菌などの微生物のみが関わる微生物過程（微生物代謝）の産物であり、地球上のこれらのガス生産/消費過程を解析するうえでさまざまな自然環境中の微生物過程を正確に解析し評価することが今後重要であると考えられる。

メタンや亜酸化窒素の生産/消費過程は炭素や窒素の循環と密接に関係するうえに、その化合物の転換過程に関与する一群の微生物の置かれた環境に支配される。例えばメタンの生成は、嫌気環境下において、単純な有機物や水素を基質として一群の古細菌、一般的にメタン生成菌と呼ばれる、によって行なわれる（図 1）。

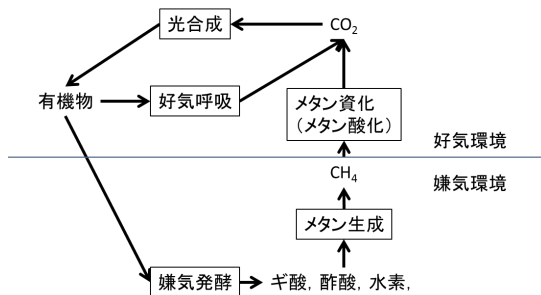


図 1 炭素サイクルと生物過程

この過程において重要なのは、メタン生成が有機物の生成と嫌気発酵過程やその他の有機物分解過程に深くリンクしていることである。つまり、メタンの基質となる乳酸や酢酸、水素などは、光合成などで生成された有機物がおもに嫌気環境で分解・利用される過程で生産される副産物（あるいは最終産物）のみを基質としている点である。さらには、これらの物質は、この特殊な古細菌によって地球全体の大きな炭素循環の中に組み込まれていることに留意しなければならない。

さらに生成されたメタンは、おもに好気環境下において資化（酸化）されて二酸化炭素へと転換するが、この過程に関わる微生物群（細菌と古細菌）も、通常の微生物とは分類学的に異なる一群の特殊な細菌群（メチロトロフと呼ばれる）である。

近年、このメタン生成過程は、有機物の生成/堆積が恒常的に見込まれ、比較的嫌気環境になりやすいいくつかの環境、つまり草食動物のルーメン、土壌、懸濁粒子、海底や湖底の堆積物など、で行われていることが知られている。さらにルーメンを除く多くの自然

環境において、この好気環境と嫌気環境が時間的・空間的にきわめて近接している環境を想定することが重要であるとの認識が一般化している。それは、浸透性の高い酸素分子の挙動を考えると、常時嫌気環境である自然環境では、水やその他の生物活動に必須の物質の動きも鈍く、必然的にメタン生成を含む生物活動全般が不活性であると考えられるため、むしろ有機物が多く、微生物による好気分解が活発であるゆえに速やかに酸素が消費されて嫌気化する環境の方が微生物による嫌気反応過程が活発であるだろうとの理由からである。そのような環境を想定する場合、恒常的に嫌気環境が続く安定的な嫌気土壌や貧酸素化の激しい水域環境よりも、大きな枠組みでは場が流動しており、光が供給される土壌や水塊の表層に近く光合成による有機物生産が旺盛な環境の方がむしろ、メタンの生成に適しているかもしれないという考えに達する。このような考え方は亜酸化窒素（ N_2O ）にも適用できる。なぜならば、亜酸化窒素も窒素循環のおおきな循環の中から、有機物分解にともなうアンモニアの生成に引き続く硝化過程（硝化微生物という一群の特殊な細菌・古細菌による好気反応過程）と、硝酸イオンを利用した有機物の分解過程である脱窒（脱窒微生物という一群の細菌や古細菌による嫌気過程のいずれかで生産されるため、好気・嫌気環境の境界が両環境が激しく入れ替わる環境を想定するのが妥当であろう。

このような考えの下では、微生物の自然環境での生存形態を想定しなければならない。それは数ミクロンから数ミリ程度の範囲の微環境である。自然界では好気・嫌気環境が時間的・空間的に著しく近接したこのような微環境が想定される場がいたるところに存在する。それが固体表面に形成される微生物被膜（バイオフィーム）や微生物と有機物が凝集した凝集塊（デトリタスや団粒、あるいはアグリゲイト）である。

今後はこのような微環境における微生物の代謝とその生産物であるメタンや亜酸化窒素などのガス生産を詳細に研究することが、温暖化を含む地球環境の変動を正確に推測するためには必須であるだろう。また、人間社会活動の増大による大気中の二酸化炭素の急速な蓄積だけではないメタンや亜酸化窒素の大気中での蓄積の多くは、産業革命以降の人口爆発とそれを可能にした農業生産の飛躍的な増大に因を辿る必要があるだろう。なぜならば、土壌や水域への有機物負荷や水域の富栄養化は結果として微環境への有機物負荷を招き、そのことは上記の仮説によれば、メタンや亜酸化窒素の生成量の増加を招くからである。それゆえ、微生物生態学の見地からは早急にこの自然界で想定できる微環境の構造とそこでの微生物代謝をリアルタイムで解析する手法を開発する必要に迫られていると言える。

2. 研究の目的

近年のバイオイメージング技術の急速な進展により、種々の生体細胞を形態だけでなくその機能を観察可能にした。これには細胞内に選択的に集積する蛍光色素プローブと高感度テレビカメラといったハード面の発展とともに、レシオ法によるカルシウムイメージングなどソフト面での開発が進展したことが非常に大きい。

一方、海洋や土壌の微生物を生きのまま直接、顕微鏡観察する技術開発も模索されているものの、環境微生物群集の多様で培養困難な性質と、試料に含まれる鉱物や塩類、有機物の自家蛍光による干渉などにより、研究の進展が遅れているのが現状である。また、環境微生物は微小かつローカルな個々の生息環境にその活性を支配・制御されていると考えられるうえに、予測不可能な時間的な環境要因の変動がその解析を難しくしている。しかしこの微生物活性は地域のみならず地球レベルでの物質循環や気候変動にも大きな影響を及ぼしていることは自明であり、ゆえに人間とその生産活動が自然に与える影響を評価するには避けては通れない知見である。

本研究における最終目標は、小型密閉チャンバーを組み込んだ共焦点レーザー顕微鏡を用いて、森林、農地、および湖沼・海洋に由来する環境微生物群集による代謝過程を、オンサイトで直接観察する実験系を構築することである。これにより、任意の条件で温室効果ガスを含むいくつかの物質の生成機能を持つ微生物の活性をビジュアル化することが期待できる。特に環境微生物が生成・排出する様々なガスを逐次回収して直接 GC に導入することにより、その生成条件と関与する微生物群集の動態をリアルタイムで解析することを目指す。そのためのソフト面、ハード面の技術開発の端緒として、まずは微環境の違いによる微生物代謝ガス、特にメタンの生成/資化活性が変化するモデル微生物コンソーシアを、自然環境から選抜し、安定的な維持できる技術を開発することとした。

3. 研究の方法

本研究ではまず、現在共同研究者である角野によって、竹粉による土壌改良実験を実施中である鳥取県八頭郡若桜町広留野小谷農園のダイコン圃場にて土壌の採取を行った。圃場内の条件の異なる数か所から土壌表層を採取した。その際、できるだけ本来の団粒構造が壊れないように留意した。土壌を採取した数か所の条件は水分含量の多寡、日照の多寡などの点で異なっており、一部、冠雪により土壌表面であっても嫌気条件であった地点からも試料を採取した。このことが微生物集団にとっての微環境形成の違いを反映していると考えた。

採取した土壌試料は、段階希釈後、メタン生成菌培養用の選択培地（ギ酸以外の有機物を含まない液体合成培地）に植菌した。段階希釈に際しては、希釈液として合成培地を用いた。嫌気培養の場合、通常 N₂/CO₂（80/20[vol/vol]）などで気相置換を行うが今回はこれを行わず、密閉したバイアル瓶内の従属栄養性細菌の酸素消費による嫌気化を想定した。なぜならば、実際の環境においても有機物の好気分解による酸素消費がメタン生成環境の創出に寄与していると考えたからである。そのための有機物源としては、もともとの接種源である土壌試料に含まれる有機物のほか、別途、グルコースを添加した実験系も用意した。培養中の攪拌は基本的に行わず、培養系が気相と接しており酸素が供給される上層と酸素が消費しつくされて嫌気条件になる下層に分かれるように設定した。24 時間ごとに 1 回観察を行い、その際バイアル瓶を振り混ぜ、気相も含めた培養系全体が嫌気条件になっているかを確認した。培養は 25 °C で行った。

ガスが生産されたバイアルに関しては、数次の植菌による微生物コンソーシアの維持・安定化を試みた。安定的に培養が維持された培養系に関しては、ガスクロマトグラフィーによるメタンガスの検出と、16SrRNA によるメタン生成菌およびメタン資化細菌の確認を行った。

4. 研究成果

ダイコン圃場から採取した土壌から安定的にガスの生産が見られる培養系を確立した。この摂取源としては、想定通り、冠雪等によって土壌表層から嫌気化していた土壌試料よりも、比較的土壌表層は好気的な試料であった。これは、今回の培養系で用いた「環境中の好気的従属栄養細菌の酸素消費により培養系を嫌気化する」際に、酸素消費が速かったこと可能性があると同時に、もともとこのような環境においてメタン生成微生物コンソーシアが成立しやすかった可能性が考えられる。

安定的にガス生産が維持された培養系において、攪拌子による攪拌を行う培養系と行わない培養系を並行して行ったところ、前者においては微生物の凝集塊が発達せず、ガスの生産量も低い傾向が見られた。ただし、この結果は安定的なものではないため、再度の検討を要する。しかしこの結果が事実であるとすれば、メタン生成コンソーシアのメタン生成条件には、微環境である微生物アグリゲイトの成立が必須であるという本研究の仮説を裏付ける結果と言える。

16SrRNA 遺伝子によるメタン生成菌の検出を試みた。PCR 増幅のプライマーとしては、全古細菌の rRNA を増幅するプライマーとともに、既知のメタン生成菌に特異的な PCR プライマーを用いた。遺伝子の解析の結果、古細菌遺伝子群内から既知のメタン生成菌に

近縁の遺伝子は検出されなかった。これは、このメタン生成微生物コンソーシア内でメタン生成菌の存在割合が少ないことを意味するものである。しかし、全古細菌に適應する PCR プライマーの増幅バイアスが影響した可能性もある。実際、既知のメタン生成菌の 16SrRNA 遺伝子配列から作出したメタン生成菌特異的プライマーによって十分量の増幅産物が得られており、今後は微生物凝集塊からの DNA の抽出・精製法を含む実験手法の再検討を行う必要がある。しかし、本研究の最終目的である、オンタイムでの顕微鏡観察技法によって、この問題は解決できる可能性もある。

今回の 2 年間の研究により、メタンガスを生成する微環境内の微生物過程をオンサイトで観察するためのモデル微生物コンソーシアを選択できたと考えている。今後はこのモデルコンソーシアを用いて、実際にさまざまな培養条件下でメタンガスの生成をより詳細に検討し、代謝産物の網羅的な解析や mRNA の解析からの実際の代謝系の再構築などを行うとともに、中間代謝産物をマーカーとした、「バイオイメージング技術を応用したメタンガス代謝のライブ評価」を目指す予定である。

本研究において、小型チャンバーを備えたレーザー顕微鏡の開発等、ハード面の開発におはまったく手を付けることができなかった。これは、モデル微生物系の選抜に予想以上に時間がかかったことに加えて、本研究チーム周辺の実験機器環境が十分に備わっていなかったことが原因である。しかし、本研究チーム周辺の実験機器環境も本年度内にはかなり充実する予定であり、今後も最終のゴールを目指して研究を継続していく予定にしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Yuji Watanabe, Karen Tait, Simon Gregory, Masatoshi Hayashi, Akifumi Shimamoto, Peter Taylor, Henrik Stahl, Kay Green, Ikuo Yoshinaga, Yuichi Suwa, Jun Kita, Response of the ammonia oxidation activity of microorganisms in surface sediment to a controlled sub-seabed release of CO₂. International Journal of Greenhouse Gas Control, 38: 162-170, 2015
2. 吉永郁生, 環境微生物の視点から見た貝殻敷設の有用性. 月刊海洋 47(2):80-85, 2015
3. 河野恵理子, 弓木麻紀子, 島田克也, 横山勝英, 吉永郁生, 東日本震災後の気仙沼底質における n-ヘキサン抽出物重量法による流出油の影響評価の検討. 水産海洋研究 80(2): 1-10, 2016
4. 北尾文人, 角野貴信, 藤沼康実, 佐藤伸, ナシ剪定枝堆肥化における木材腐朽菌処理効果について. 公立鳥取環境大学紀要

14:71-77, 2016

5. 斯日古楞, 伊ヶ崎健大, 角野貴信, 曹楽, 康峪梅, 楊俊, 都瓦拉, 梅栄, 小崎隆, 中国内モンゴル自治区の牧畜業において土地利用様式の違いが植生及び土壌に与える影響. ペドロジスト, 59(2): 41-51, 2015
6. 曹楽, 伊ヶ崎健大, 角野貴信, 斯日古楞, 杉原創, 小崎隆, 中国内モンゴル自治区フルンボイル草原において観光行動が草原退化に及ぼす影響. ペドロジスト, 59(2):52-62, 2015
7. Soh Sugihara, Shinya Funakawa, Atsunobu Kadono, Yusuke Takata, Kozue Sawada, Kazumichi Fujii, Takashi Kosaki, In situ short-term dynamics of CO₂ flux and microbial biomass after simulated rainfall in dry croplands in four tropical and continental ecosystems. Soil Science and Plant Nutrition, 61: 392-403, 2015

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 夏池真史, 西谷豪, 山田雄一郎, 横山勝英, 吉永郁生, 東日本大震災による津波被害の状況と海水・海底への影響 - 宮城県気仙沼湾での調査事例 - 平成 27 年度水産環境保全委員会シンポジウム「東北・北海道沿岸における東日本大震災以後の貝毒の問題」, 2015
2. 夏池真史, 西谷豪, 横山勝英, 吉永郁生, 宮城県気仙沼湾における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* および *A. tamarense* シストの発芽フラックス定量の試み 2015 年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会, 2015
3. Shin Sato, Application of Microbial Processes for Utilization of Waste Woody Biomass and Synthetic Wastes. International symposium, Ecological Challenges of Natural Management and Environmental Protection in the Asia-Pacific Region, Vladivostock, Russia, 2015
4. Atsunobu Kadono, Modeling of greenhouse gas emission from soils under different ecosystem. International Symposium "Ecological Challenges of Nature Management and Environmental Protection in the Asia-Pacific Region, Vladivostock, Russia, 2015
5. 角野貴信, 舟川晋也, LAL, R., 小崎隆, 土壌有機物動態モデルを用いた温室効果ガス放出速度の推定. 日本土壌肥料学会, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 郁生 (YOSHINAGA, IKUO)
公立鳥取環境大学・環境学部・教授

研究者番号：40230776

(2)研究分担者

佐藤 伸 (SATO SHIN)

公立鳥取環境大学・環境学部・准教授

研究者番号：60467438

角野 貴信 (KADONO ATSUNOBU)

公立鳥取環境大学・環境学部・准教授

研究者番号：50511234