

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 13 年度博士課程進学

氏 名 劉 啓徳

指導教官名 小柳津 広志

## 論文題目

Molecular analyses of microbial production and oxidation of methane in paddy soils and forest soils

(水田および森林土壌におけるメタン生成・酸化の分子生態学的研究)

メタンは対流圏および成層圏で起こる光化学反応において重要な役割を果たしており、その濃度変動はオゾンや OH ラジカルなどの大気微量成分の動態に大きな影響を及ぼしている。また二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)、亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)、クロロフルオロカーボン(CFC)などとともに温室効果ガスとしても知られており、メタン一分子当たりの温室効果が二酸化炭素の約 20 倍にも及ぶという事実に加え、大気メタン濃度が急激な割合で増加を続けていることが確認され、近年大きな注目を集めている。

メタンの主要発生源は水田、自然湿地など嫌気的環境であり、好気的な土壌では大気からのメタン吸収が認められている。しかし IPCC(気象変動に関する政府間パネル)で各種メタン発生源からの年間メタン発生量の推定の根拠となったのは科学的推定に基づくが、いまだ多くの不確定要因が存在すると指摘されている。メタン発生量をより正確に把握するためには各発生源で土壌・大気間および土壌内部でのメタンの発生・吸収機構を解明することは重要である。

### 第一部 水田土壌中及び海洋底質中の古細菌の分子生態学的研究

現在の微生物生態学において特定遺伝子を用いた分子系統学的手法は、自然環境における微生物の群集構造や培養困難種の生態についての研究にとってきわめて重要な解析手段として受け入れられてきている。また、化石の残りにくい細菌には分子進化学的アプローチがとりわけ有効であった。分子系統学的解析方法は、従来の分離、培養可能な極めて限られた微生物を対象とした手法に比べ、環境中の DNA や RNA を直接調べることにより現場における微生物の群集構造及びその活力を、培養条件や技術に影響されることなく、定量的かつ客観的な解析を可能とすると考えられている、また極めてバイオマスの低いサンプルや地理的及び物理的に採集が困難な環境サンプルにも応用できる。本研究では分子系統学的手法を用いて、水田や海洋底質の微生物生態を

探索し、多様な未知の微生物の存在することを明らかにした。

#### 1. 環境試料からの DNA 抽出法の検討

環境試料中の核酸は、粘土などの土壌成分に吸着することや、抽出した核酸液中に腐植酸などの PCR 阻害物質が混入してくるため、解析に用いる DNA を抽出することは容易ではない。これらの問題を解決するために、DNA 抽出法を検討した。その結果、環境試料（水田土壌と海洋底質）を 4% paraformaldehyde/PBS で予め固定し、低速遠心分離により細胞濃縮を行い、ビーズビーターにより細胞を破壊し、DNA 精製キット (FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil) で精製する方法が最適であると考えられた。得られた DNA はサイズも大きく (9 ~ 23 kb)、純度も高いため、PCR の Template として、直接に用いることができた。

#### 2. 16S rDNA 配列による古細菌生態解析

水田土壌に生息している古細菌と海洋底質で見いだされた古細菌とどんな関連性を示すかを比較するため、16S rDNA による系統解析を行った。その結果、水田土壌及び海洋底質ではよく似た古細菌系統が確認されて、また、これらのほとんどはこれまで培養されていない系統であった。

#### 3. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) による環境中の古細菌の測定

自然界の微生物の大部分は、生きていても培養できない状態にあるため、生菌数測定法では菌数が正しく評価できないことが多い。この研究では、水田土壌試料と海洋底質試料を固定し、スラリー状態で DAPI、rhodamine-EUB338 probe 及び FITC-ARC915 probe で三重染色を行って、古細菌のポピュレーションを調べた。結果、水田土壌における微生物のうちの 3.3% ~ 8.8%、海洋底質では 7.8% ~ 10.1% が古細菌で占められことを確認した。

#### 4. 環境中の培養困難な微生物の分離技術の開発

環境中で分離培養困難な VBNC (viable but non-culturable) 細菌や数少ない菌種の分離技術の開発を試みた。環境試料(水田土壌試料と海洋底質試料)を固定して、ビオチン化 oligonucleotide プローブと磁性高分子ポリマービーズを用いて、標的細胞を吸着後、磁石によりビーズを集めることによって、試料から標的細胞を取り出すという手法を用いた。この方法で環境試料中の古細菌の回収に成功した。今後、この方法が環境中の数少ない培養困難な菌群についても適用されると期待される。

### 第二部 水田および森林土壌におけるメタン生成・酸化の分子生態学的研究

本研究では水田（埼玉農林研究センター）、温帯林（丹沢大山）、熱帯林（インドネシアの Gunung walat と Haubentes の二カ所）、畑（インドネシア Institute Pertanian Bogor におけ

る実験圃場)などでガスをサンプリングし、各地のメタン発生量(フラックス)を算出した。また、各々の土壌を採取し、培養実験により各土壌の潜在的メタン生成能と酸化能を明らかにした。なお、嫌気培養実験でメタンの濃度が激しく変化する現象が観察されたことから、海洋以外の場所でも嫌気性メタン酸化が起こっていることが示唆された。

### 1. メタンフラックスおよびメタン生成・酸化活性の測定

一般的に水田土壌はメタンの発生源で、森林土壌はメタンのシンクと認識されている。

インドネシアの森林で測定したメタンフラックスの値はマイナスとなり、メタンが吸収されていることを示したが、丹沢大山で測定したメタンフラックスの値はプラスとなり、メタンが放出されていることを示している。このことから森林は必ずしもメタンを吸収するとは限らないことが示唆された。

次に、土壌による潜在的メタン酸化能、メタン生成能の比較をそれぞれ好気培養実験法、嫌気培養実験法により行った。その結果、水田土壌を用いた場合に、ほかの土壌サンプルよりも早く高濃度のメタンを酸化することが確認され、潜在的メタン生成能を測定する実験では、30日間の培養期間で、水田土壌の平均メタン生成能が一番高いことが示された。

### 2. 気相濃度異がなったメタン添加によるメタン生成能の測定

潜在的メタン酸化能の実験で、好気培養で約 10% ( $4.0 \times 10^3 \text{ mmol m}^{-3}$ ) のメタンを添加したが、嫌気環境で同じく高濃度のメタンを添加した場合に、メタン生成活性にどのような影響を与えるかを確かめるため、異なった濃度(約 0.1-10%)のメタンをバイアル瓶に添加し、60日間嫌気培養を行って、潜在的メタン生成活性を測定した。水田土壌および Haubentes 森林土壌を試料として用いた。その結果、水田土壌のメタン生成率の平均値は 0.1%-10% のメタンを添加しても大きな差が見られなかった。一方、Haubentes 森林土壌ではメタンを加えていない場合に比べ、メタン生成率の平均値が低くなることが観察された。これはおそらく湛水状態の水田の中では高濃度のメタンが常に生成されているため、メタンに対するキャパシティーが大きいのだろうと考えられた。一方、好気状態では Haubentes 森林土壌の潜在的メタン生成能が高いが、これは嫌気状態では気相に高濃度のメタンが存在しているため、ルシャトリエの法則によりメタンの生成が抑えられると考えられた。

### 3. 嫌気性メタン酸化の検証

嫌気培養期間中、気相濃度 10%添加実験の経時変化図を見ると、激しい濃度変動が見られる。その濃度の最大下落変化率を計算すると、メタン濃度の増加とともに最大減少率の値も大きくなっていった。このことから、メタンが嫌気状態でも酸化されている可能性が示唆された。今まで嫌気性メタン酸化は深海のメタン湧水帯の堆積物や地下からメタンを含んだ湧水する場所などのところでしか発見されていない。また嫌気性メタン酸化が起こるところでは盛んに硫酸還元反応も行

われている。このような場所のサンプルについて、16S rRNA 系統解析を行うと、メタンの嫌気性酸化は ANME-1 および ANME-2 と呼ばれる 2 つの古細菌グループ (*Methanosarcinales* 属に近縁) によって行われることが示された。さらに ANME グループに対する特異的なプローブを用いて蛍光顕微鏡観察を行うと古細菌はしばしば硫酸還元細菌 (SRB) とコンソーシアとして観察される。以上の事実から、ANME グループに属する古細菌と硫酸還元細菌は共生関係にあると考えられる。このことから、どちらの菌の生育にも適した条件を作ることで、嫌気性メタン酸化能を高めることができるか検証することを目的に、土壌試料に硫酸塩、酢酸、メタノールなどの基質を添加し、60 日間嫌気培養を行った。その結果、基質を添加しない場合にはメタン濃度の変化が少ないサンプルでも、嫌気培養開始 1 ヶ月後から著しい濃度変化が観察された。

嫌気状態で *Methanosarcina* グループなどのメタン生成菌が硫酸還元菌とともにメタンを酸化しているとするならば、メタン生成の生育を抑えた場合、嫌気性メタン酸化に影響する可能性がある。そこで、土壌試料にメタン生成反応の特異的阻害剤である BES (プロモエタンスルホンナトリウム) を添加し、40 日間嫌気培養を行った。その結果、BES が存在しない条件で観察される激しいメタン濃度変化がみられなくなった。このことは、BES がメタン生成を押さえると同時にメタン酸化を抑制したと考えられた。この結果は、メタン生成菌がメタン生成をすると同時にメタンを酸化する反応を行う、即ち気相中のメタン濃度によって逆反応を行うという仮説 (Hoehler ら, 1994) を支持するものである。

#### 4. 嫌気性メタン酸化菌 (ANME グループ) の系統解析

環境試料 (水田、森林、畑) から DNA を抽出し、嫌気性メタン酸化菌である ANME グループに対する特異性を持つプライマーで PCR を行い、16S rDNA 遺伝子の一部約 800 塩基を増幅した。クローン化した後、塩基配列を決定した。決定した配列とデータベース上の古細菌の配列のアライメントを行い、遺伝子解析用プログラムを利用し、系統樹を作成した。得られたクローンのうち、ANME1-b および ANME2 に近い系統が見出されたので、海以外の環境で嫌気性メタン酸化古細菌が存在する可能性が示された。

#### 5. リアルタイム PCR (Real time PCR) 法により環境試料中における嫌気性メタン酸化菌の定量

土壌試料中における嫌気性メタン酸化菌の数を計るために、既知濃度のプラスミド DNA をスタンダードとして、希釈系列を作り、それぞれについて嫌気性メタン酸化細菌に特異性をもつ 16S rDNA プライマーを用いて PCR を行った。ここでは、増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold cycle  $C_t$  値) と核酸量をプロットし、検量線を作成した。土壌試料について同じ条件で PCR を行い、 $C_t$  値を求めることにより、検量線から試料中の目的嫌気性メタン酸化菌の数を測定した。その結果、嫌気状態でメタン酸化率が大きいほど試料の中から嫌気性メタン酸化菌の数も多く検出された。