

Functional Single Cell 分離が明かす水田土壌脱窒菌の機能と生態

石井 聡*・妹尾啓史

東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生1丁目1-1

Phylogenetic and functional diversity of denitrifiers in rice paddy soils, as revealed by functional single cell isolation

Satoshi Ishii* and Keishi Senoo

The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Key words : denitrification, single-cell isolation, stable isotope probing, nitrite reductase gene

1. はじめに

脱窒は、硝酸や亜硝酸が微生物の呼吸の電子受容体として用いられ、一酸化窒素ガス (NO), 亜酸化窒素ガス (N_2O), 窒素ガス (N_2) に還元される反応であり、環境中の窒素循環の重要な部分を担っている¹⁾。脱窒反応の中間産物である N_2O は CO_2 の約 296 倍の温室効果を持っているため、 N_2O の発生・除去に関与する脱窒菌の機能と生態を調べることは温室効果ガスの低減に向けて重要である。水田土壌の高い脱窒活性はいまから 100 年以上も前から知られている現象であるが、水田土壌からの N_2O 発生は畑土壌からのそれと比べて極端に少ない²⁾。これは、水田土壌の脱窒菌によって N_2O が N_2 まで完全に還元されているためと考えられている。しかしながら、水田土壌でどのような脱窒菌が活動しているのかについてはあまりよくわかっていなかった。

これまでの脱窒菌の研究では、集積培養やプレート培地を用いて脱窒菌を単離するか、培養に依存しない手法を用いることが多かった。培養非依存的手法では、16S rRNA 遺伝子ではなく、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*) や亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) を対象とすることが多かった。これは、脱窒菌が系統的に多様な種に分布し、また同じ属であっても脱窒するものとならないものが含まれている場合があるためである。しかしながら、亜硝酸還元酵素遺伝子や亜酸化窒素還元酵素遺伝子に基づく解析では、その持ち主を特定することはできないという問題があった。

脱窒菌の機能と生態を解明するために、我々のグループは次のような戦略で望んだ (図1)。まず、Stable Isotope Probing (SIP) 法および 16S rRNA 遺伝子の大量シーケンス解析を用いて、脱窒活性を高めた条件下で増殖する微生物を特定した^{3,4)}。またその条件下で増える *nirK* および *nirS* 遺

伝子について解析を行った⁵⁾。次に、脱窒条件下で増殖する微生物をマイクロマニピュレータを用いて一細胞ずつ分離・培養した (Functional single cell [FSC] 分離法)⁶⁾。また、培養後に純化した株について系統、機能遺伝子配列、脱窒活性、その他の生理生態を調べた⁷⁾。このように、DNA に基づく解析と FSC 分離法による単離株情報を組み合わせることによって、水田土壌脱窒菌の機能と生態を明らかにすることができた。

2. SIP 法

まず実験を始めるにあたって、再現性の高いモデル実験系を構築した。東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構 (旧多摩農場) の水田圃場からサンプリングした土壌をバイアルびんに入れ、脱窒の電子受容体として硝酸 (0.1 mg N/g 乾土), 電子供与体としてコハク酸 (0.5 mg C/g 乾土) を添加し、気相を $\text{Ar}-\text{C}_2\text{H}_2$ 混合ガスで置換 (アセチレンブロック法) して 24 時間培養した。土壌中のコハク酸と硝酸の濃度を液体クロマトグラフィーで、 N_2O の生成量をガスクロマトグラフィーで測定し、コハク酸と硝酸の減少に対応した脱窒活性の上昇を確認した。基質としてコハク酸を選択したのは、①この条件においてコハク酸は脱窒を促進し、異化的アンモニア生成や発酵は促進しない⁸⁾、②コハク酸は多様な脱窒菌に基質として利用される⁹⁾、また③コハク酸は湛水土壌に存在する有機酸の一つである¹⁰⁾ ためである。なお、本研究では脱窒菌を主なターゲットとしているが、硝酸から亜硝酸までの還元、すなわち硝酸呼吸を行う細菌も本条件で増殖する可能性がある。

SIP 法 (安定同位体標識法) は、 ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O などの安定同位体で標識した基質を土壌などの試料に添加して培養を行い、安定同位体を取り込んだ DNA や RNA を分離回収して解析することにより、添加した基質を資化した微生物群集を明らかにしようとする手法である。本研究では、 ^{13}C でラベルしたコハク酸を用いた。上述のモデル実験系で培養した土壌から DNA を抽出し、塩化セシウム密度勾配超遠

2010 年 6 月 25 日受付・2010 年 7 月 12 日受理

* Corresponding author.

E-mail: anaerobe@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

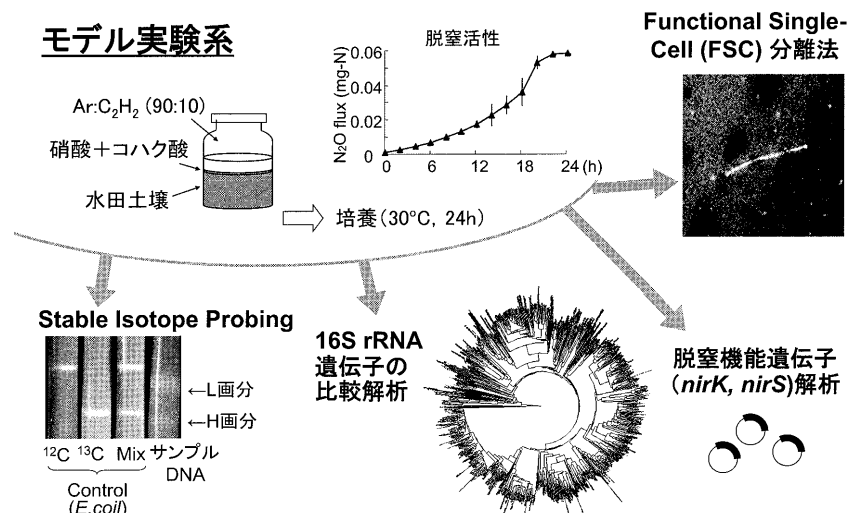


図1 モデル実験系を用いた多角的アプローチ

心により ^{12}C -DNA を中心とする軽い DNA 画分 (L 画分), ^{13}C -DNA を中心とする重い DNA 画分 (H 画分), またその中間の画分 (M 画分) を分離した。16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-密度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法によってそれぞれに対応する細菌群集構造を解析したところ, それぞれの画分では異なったバンドプロファイルが見られた。さらに詳細な系統解析を行うため, H 画分について 16S rDNA を対象としたクローンライブラリ解析を行ったところ, *Burkholderiales*, *Rhodocyclales*, *Rhodospirillales*, ならびに *Rhodocyclales* に近縁な新規のグループが主要なメンバーであることがわかった³⁾。なお, H 画分を鋳型として古細菌の 16S rDNA および真菌類の 18S rDNA に特異的なプライマーを用いた PCR を行ったが増幅は見られなかった。

3. 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリの比較解析

SIP 法は特定の環境下で基質を取り込んだ微生物を特定するのに有効であるが, 基質を取り込まなかった微生物は解析できない。そこで, 脱窒活性が活発な土壌と活発でない土壌の微生物群集を比較解析することによって, 脱窒条件下で増殖する細菌群を特定できるのではないかと考え, 次の実験を行った。実験には上述の室内モデル実験系を用いた。硝酸およびコハク酸を添加して脱窒活性を高めた土壌の他に, 対照として硝酸のみ添加, コハク酸のみ添加, 両者無添加でそれぞれ培養した土壌, さらに培養前の土壌を用意した。これら 5 つの土壌サンプルから DNA を bead beating を用いた直接法で抽出した。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を対象に PCR を行い, クローニングを経て各サンプル 1,000 クローン以上の塩基配列を解読した。多様な門に属する細菌分類群が見出され, そのなかでも *Firmicutes* が 5 つのサンプルで共通して優占していることが明らかになった。主成分分析により, 無添加土壌, 硝酸のみ, あるいはコハク酸のみ添加の土壌と比較して, 硝酸およびコハク酸を添加した土壌はユニークな細菌群集構造を有している事が分かった。また, テンプレートマッチ解析¹¹⁾により硝酸とコハク酸を添加して培養した土壌に特異的に出現した

クローンが特定でき, 同源性解析から *Burkholderiales*, 特に *Herbaspirillum* が特異的に増加していることが明らかになった⁴⁾。これらの細菌は脱窒が活発に行われる条件で特異的に増殖するものと推定された。今回はモデル実験系を用いたが, この手法はフィールドにも適用できるものと思われる。すなわち, 野外の水田において脱窒が活発に起こっているときと活発に起こっていないときの群集を比較解析することで, フィールド条件下で脱窒に関与する微生物を推定できると思われる。現在この考えに基づきフィールドでの実験を進めている。

4. 脱窒機能遺伝子の解析

続いて, 亜硝酸還元酵素 (NirK および NirS) をコードする遺伝子 (*nirK*, *nirS*) に基づく解析を行った。NirK および NirS はともに亜硝酸を一酸化窒素に還元する反応を触媒するが, NirK は銅型, NirS はシトクロム型である¹⁾。脱窒菌は NirK または NirS のいずれかを保有し, 脱窒菌以外のはこれらの酵素を持っていない。

上述のモデル実験系において, 培養前後の土壌から DNA を抽出し, *nirK* および *nirS* のコピー数を定量的 PCR で, 遺伝子多様性の変化をクローンライブラリ解析で調べた。培養によって *nirK* コピー数が有意に増加したのに対し, *nirS* コピー数はあまり大きく変化しなかった。また, *Burkholderiales*, *Rhodocyclales*, *Rhizobiales* に属する既知の脱窒細菌由来の *nirS* および *nirK* に近縁なクローンが多く見られた一方で, 既知の脱窒細菌の *nir* とは近縁でないクローンの存在も示され, このようなクローンは培養後の土壌から多く検出された⁵⁾。

5. Functional single cell 分離法

これまで述べてきたように, 16S rRNA 遺伝子に基づく解析によって, 脱窒条件下で増殖する微生物を推定することができた。また, 脱窒機能遺伝子の解析によって, 脱窒菌が持つ機能遺伝子の多様性を明らかにすることができた。しかしながら, 16S rDNA に基づく解析だけでは脱窒能の

有無を確定することはできない。脱窒条件下で増えたからといって必ずしも脱窒をしているとは限らないからである。また、脱窒機能遺伝子の解析からだけではその持ち主を特定できない。それは脱窒機能遺伝子が水平伝播をして広がった可能性が指摘されているからである¹²⁾。そこで、我々はある条件下で増殖する微生物を一細胞ずつ取得する方法としてFSC分離法を開発し、脱窒菌の単離に応用した。

FSC分離法はDirect Viable Count (DVC) 法、生菌染色、およびマイクロマニピュレーション法を組み合わせたものである。DVC法は、土壌や海水などの環境試料に酵母エキス等の基質と細胞分裂阻害剤を添加することにより、増殖・分裂しようとする細菌細胞を伸長させる方法であり、試料中の生菌数を計測に使われてきた¹³⁾。目的とする機能を有する細菌細胞のみが増殖する土壌条件を設定してDVCを行うことも可能である¹⁴⁾。FSC分離法では、そのように伸張した細胞を生菌染色剤で染めて、マイクロマニピュレーターで一細胞ずつ取得する(図2)。

我々は、モデル実験系の脱窒条件下で増殖しようとする微生物をFSC分離法で取得し、53株の脱窒菌を得た。分離株の系統解析を行ったところ、多様な分類群に属する幅広い脱窒菌を培養菌株として取得することができた。特筆すべき点は、上述の土壌DNAに基づく手法によって特定してきたユニークな脱窒菌群も分離され、培養菌株として取得できたことである。具体的にはSIP法で検出された

Rhodocyclales に近縁な新規の脱窒菌、16S rDNA 大量シーケンスで検出した*Herbaspirillum* に近縁な脱窒菌、SIP法や*nir* クローンライブラリ法で検出した新規*nirS*の持ち主などである。特に、新規の*nirS*を保有する*Bradyrhizobium* 脱窒菌を得たことは予想外の結果であった。なぜなら、*Bradyrhizobium* は通常亜硝酸還元酵素遺伝子として*nirK*を持つからである。この*Bradyrhizobium* は根粒を形成しなかったが、窒素固定(アセチレン還元)を独立状態で行った。また外部からN₂Oを取り込んでN₂に還元した。以上より、新規の脱窒型*Bradyrhizobium* であると考えられる⁷⁾。

さらに、FSC分離法によって複数種の単離菌株を得たことで、16S rDNAに基づく解析結果と機能遺伝子解析の結果をリンクさせることができた(図3)。今回の解析によって、*nirK* および*nirS*の所有関係はいままで知られていた以上に複雑であることが明らかになった。例えば、SIP法で検出された*nirS*クローンNS18の持ち主候補は*Azospirillum*, *Bacillus*, *Herbaspirillum* と3目3種にまたがることになった。FSC分離法を用いたことによって、土壌DNA情報と分離菌株情報との間に新しい関係を見出すことができたと言えよう。

6. フィールドにおける脱窒菌の時期的変動

モデル実験系の結果より、コハク酸存在下で脱窒を行う微生物を特定することができた。また、それらが持つ亜硝酸還元酵素遺伝子の配列を取得できた。これらの脱窒菌は、野外の水田でも実際に脱窒を行っているのだろうか?それを調べるため、東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構の水田圃場から5~7月にかけて経時的に土壌を採取し、亜硝酸還元酵素遺伝子の時期的変動を追った¹⁵⁾。その結果、*Bradyrhizobium* 脱窒菌の新規*nirS*は時期を通じて多く見られた(図4)。また、脱窒活性が高まっていると予想される時期に*Herbaspirillum* の*nirS*に近縁なクローンの割合が増加しており、これらの脱窒菌が現場の水

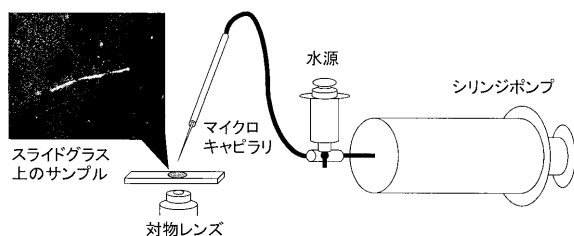


図2 Functional single-cell 分離法の概要

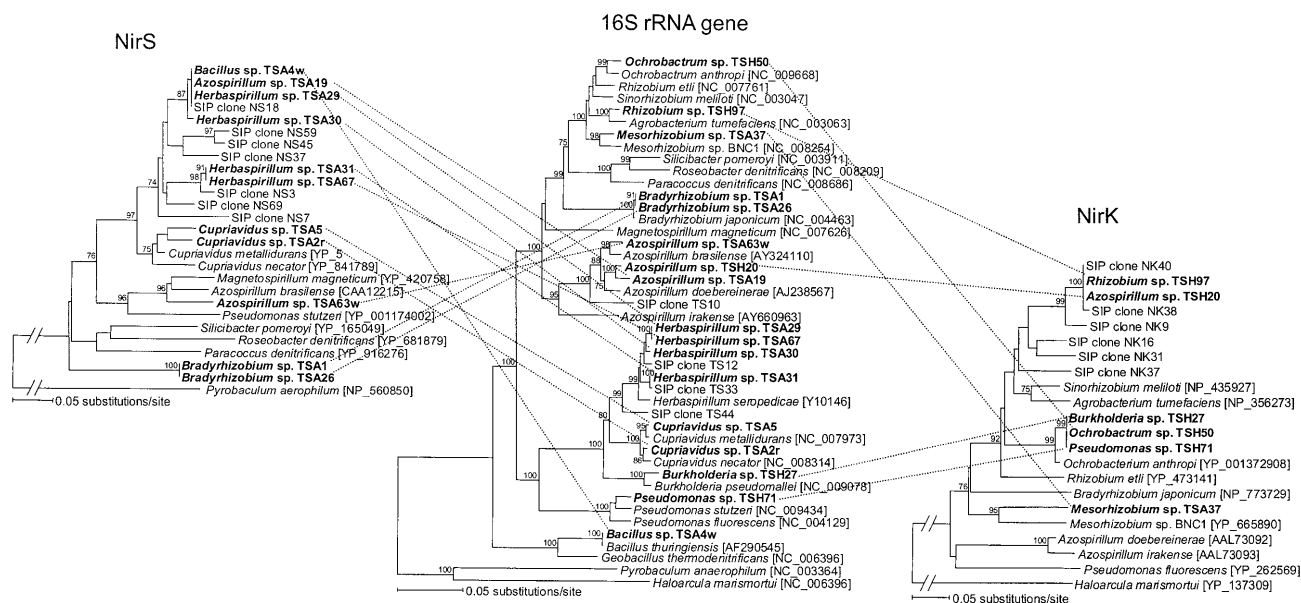


図3 水田土壌脱窒菌の16S rRNA 遺伝子、*nirK*, および*nirS*の保有関係

田でも脱窒を行っている可能性が示された。

7. 単離株取得のススメ

これまでみてきたように、培養に依存しない手法で得られた遺伝子情報を Single-cell 分離した個別菌株の情報によってつなぐことができた。今回は水田土壌の脱窒菌を対象を絞って解析を行ったが、脱窒以外の機能にもこのアプローチは有効だと考えられる。

近年は、解析手法の発展に伴い、土壌などの環境サンプルから直接抽出した DNA や RNA に基づく解析が盛んに行われるようになった。また、メタゲノムやメタトランスクリプトームのような網羅的解析も行われるようになっていく。しかし、機能遺伝子の配列情報が蓄積していく一方で、その遺伝子を保有する菌株の情報は少ない。菌株を単離すると、機能遺伝子と持ち主の関係が明らかになるだけでなく、さまざまな生理活性試験を行うことができる。また、個別菌株のゲノムデータは、メタゲノム解析のリファレンスとして使うことができる。メタゲノム解析からは有用な情報が多く得られるが、土壌を対象にしたメタゲノムの場合、多くの配列は機能未知として分類され、配列の持ち主も不明の場合が多い。その原因として、①土壌に多様な微生物が存在していること、②土壌微生物として解読されたゲノムの数が少ないこと、が挙げられる。土壌微生物を単

離して、リファレンスゲノムを充実させていく必要があるだろう。分離した Single cell から培養を経ずにゲノム解析することも技術的には可能になってきているので、土壌の難培養微生物についてもゲノム解析ができるようになる日も近いことだろう。

土壌 DNA・RNA 情報、個別菌情報とあわせて、環境データを充実させることも重要である。我々土壌微生物を扱う者にとって興味のあることは、どの微生物がどういう役割を担っていて、それがどのような結果をもたらすのか、ということだと思う。機能とその担い手については、土壌 DNA・RNA 情報および個別菌情報から推測できるが、それがもたらす結果は環境データ (e.g., N_2O 発生量, メタンフラックス, 病害発生率) として現れる。環境データ, 土壌 DNA・RNA 情報, および個別菌情報を融合して解析することによって、「メタ」解析時代の土壌生態学として新たな展望が開けるものと期待している (図5)。

謝 辞

水田土壌試料は東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構から分譲して頂いた。FSC 分離法の確立に際して辻亮博士 (玉川大学学術研究所), 吉村義隆博士 (玉川大学農学部) の協力を得た。16S rRNA 遺伝子の大量解析には、服部正平博士, 大島健志朗博士, 菊池真美博士 (と

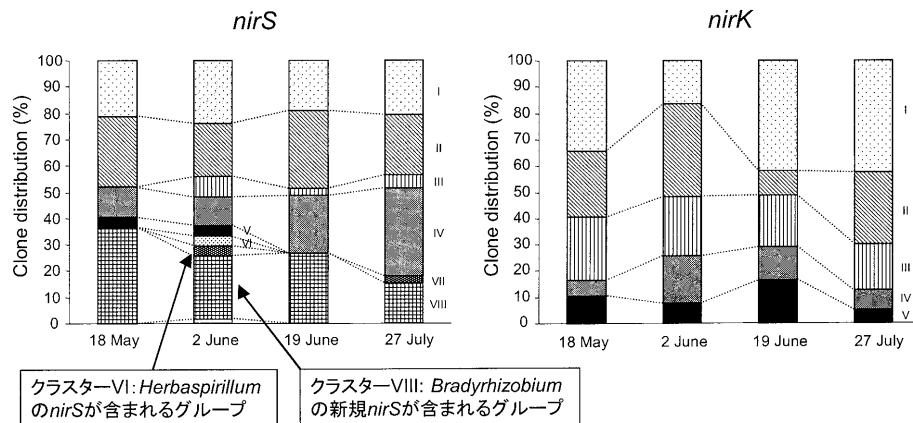


図4 *nirK* および *nirS* クローンの割合の季節変動 (Yoshida *et al.*¹⁵⁾ より改変)

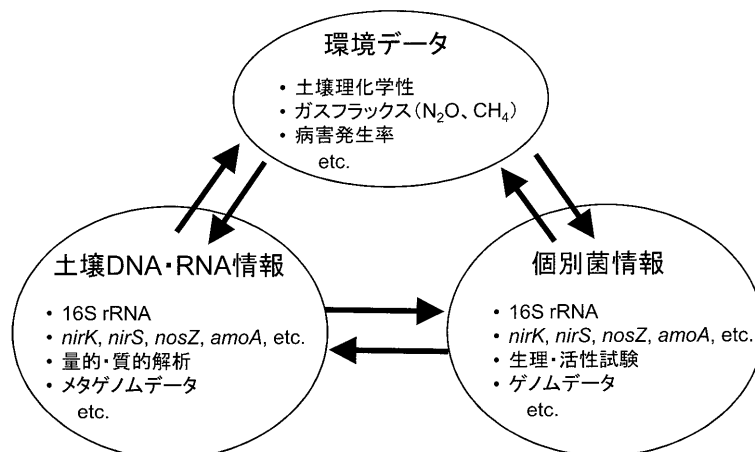


図5 環境データ, 土壌 DNA・RNA 情報, および個別菌株情報の融合

もに東京大学大学院新領域創生科学科)の協力を得た。齊藤貴之, 吉田愛美, 早野禎一, 山本倫大, 芦田直明の各氏には技術協力を頂いた。また, 大塚重人博士, 多胡加奈子博士(東京大学大学院農学生命科学研究科)には研究全般を通じて貴重な助言を頂いた。ここに記して謝意を表する。本研究は生研センター基礎研究推進事業, 農水省 eDNA プロジェクト, ならびに学術振興会科学研究費補助金の支援を受けた。

要 旨

水田土壌は脱窒活性が高いことが知られているが, 水田で脱窒を担う微生物についてはよくわかっていなかった。脱窒菌の機能と生態を解明するために, 我々のグループは次のような戦略で望んだ。まず, Stable Isotope Probing 法および 16S rRNA 遺伝子の大量シーケンス解析を用いて, 脱窒活性を高めた条件で増殖する微生物を特定した。またその条件下で増える脱窒機能遺伝子 (*nirK* および *nirS*) について解析を行った。次に, 脱窒条件下で増殖する微生物をマイクロマニピュレータを用いて一細胞ずつ分離・培養した (Functional single cell 分離法)。培養後に純化した株について系統, 機能遺伝子配列, 脱窒活性, その他の生理生態を調べた。その結果, SIP 法などで存在は予想されていたが, 分離例のなかった新規の脱窒菌単離株を FSC 分離法によって取得することができた。DNA に基づく解析だけではわからなかった水田土壌脱窒菌の機能と生態を, FSC 分離法による単離株情報から明らかにすることができた。これらの結果を踏まえて, 環境データ, 土壌 DNA・RNA 情報, および個別菌情報を融合して解析することの重要性を議論した。

引用文献

- 1) Zumft W (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533-616
- 2) Akiyama H, Yan X and Yagi K (2006) Estimations of emission factors for fertilizer-induced direct N₂O emissions from agricultural soils in Japan: summary of available data. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **52**, 774-787
- 3) Saito T, Ishii S, Otsuka S, Nishiyama M and Senoo K (2008) Identification of novel *Betaproteobacteria* in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing. *Microbes Environ.*, **23**, 192-200
- 4) Ishii S, Yamamoto M, Kikuchi M, Oshima K, Hattori M, Otsuka S and Senoo K (2009) Microbial populations responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as

- revealed by comparative 16S rRNA gene analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7070-7078
- 5) Yoshida M, Ishii S, Otsuka S and Senoo K (2010) *nirK*-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harboring bacteria. *Microbes Environ.*, **25**, 45-48
 - 6) Ashida N, Ishii S, Hayano S, Tago K, Tsuji T, Yoshimura Y, Otsuka S and Senoo K (2010) Isolation of functional single cells from environments using a micromanipulator: application to study denitrifying bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 1211-1217
 - 7) Ishii S, Ashida N, Otsuka S and Senoo K (2010) Identification of the host of previously uncharacterized nitrite reductase genes by functional single-cell isolation method. The 110th American Society for Microbiology General Meeting, San Diego, CA, May 23-27, 2010. Q-1457
 - 8) 佐藤立夫・関根靖彦・和田秀徳 (1989) 添加有機物の種類と量が湛水土壌の硝酸代謝に及ぼす影響, 土肥誌, **60**, 134-139
 - 9) Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, Verstraete W, Boon N and De Vos P (2006) Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2637-2643
 - 10) 木村真人・和田秀徳・高井康雄 (1977) 水稻根圏に関する研究 (第4報) 根圏土壌の理化学的性質 (その2), 土肥誌, **48**, 540-545
 - 11) Ishii S, Kadota K and Senoo K (2009) Application of a clustering-based peak alignment algorithm to analyze various DNA fingerprinting data. *J. Microbiol. Methods*, **78**, 344-350
 - 12) Heylen K, Gevers D, Vanparys B, Wittebolle L, Geets J, Boon N and De Vos P (2006) The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.*, **8**, 2012-2021
 - 13) Kogure K, Simidu U and Taga N (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420
 - 14) Bakermans C and Madsen EL (2000) Use of substrate responsive - direct viable counts to visualize naphthalene degrading bacteria in a coal tar-contaminated groundwater microbial community. *J. Microbiol. Methods*, **43**, 81-90
 - 15) Yoshida M, Ishii S, Otsuka S and Senoo K (2009) Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.*, **41**, 2044-2051