ミニレビュー

Stable Isotope Probing (SIP) 法を用いた 土壌で機能する微生物の特定[†]

妹尾啓史, 石井 聡

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Key Words : stable isotope probing, arable soil,
soil microorganism

1. Stable Isotope Probing (SIP) 法の土 壌微生物研究への導入

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生体成分 (DNA, RNA, リン脂質脂肪酸など) 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^{1), 2)}。

農耕地土壌ではさまざまな物質循環が土壌微生物によって駆動されており, 作物生産や地域・地球環境に大きく関わっている。物質循環を実際に担っている土壌微生物を解明することは学術的にも応用面でも重要な課題であるが, 土壌微生物の大部分が培養困難であることなどから研究の進展が遅れていた。SIP 法は培養に依存しない解析方法として強力なツールであり, 近年多くの研究が報告されている。筆者らが行った研究を含めていくつかを紹介する。

2. 水田土壌の物質代謝に機能する微生物群 集の特定

湛水された水田土壌では主として微生物の活

動に由来して, 酸素の消失, 脱窒 (硝酸の消失), マンガン還元, 鉄還元, 硫酸還元, メタン生成といった還元反応が逐次進行する。

水田土壌の脱窒反応は窒素養分の損失に関わる一方, 地下水の汚染につながる硝酸の溶脱や温室効果ガスの一つである亜酸化窒素ガスの発生を低減化している要因でもある。水田土壌の脱窒反応が見出されてから 100 年が経過するが, 脱窒を担っている微生物はブラックボックスのままであった。筆者らは水田土壌で活発に機能する脱窒細菌群集を解析する手法の一つとして SIP 法を適用した³⁾。

東京大学農学部附属生態調和農学機構 (旧・多摩農場) の水田圃場から採取した土壌をバイアルびんに入れ, 脱窒菌の基質としての ^{13}C -コハク酸並びに脱窒の電子受容体としての硝酸を添加し, 気相を $\text{Ar-C}_2\text{H}_2$ 混合ガスで置換 (アセチレンブロック法) してインキュベートした。その結果, 土壌中の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。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含めている。

インキュベート後の土壌から DNA を抽出し, 塩化セシウム密度勾配超遠心により ^{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 (16S rDNA) を対象とした PCR 及び濃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。それぞれの画分では異なったバンドプロフィールが見られた。H 画分について 16S rDNA を対象としたクローンライブラリの解析を行ったところ, *Burkholderiales*, *Rhodocyclales* (β -プロテオバクテリア), 並びに *Rhodospirillales* (α -プロテオバクテリア) に近縁な微生物や, *Rhodocyclales* に近縁な新規のグループが優占していることも明らかになった。H 画分について, 脱窒の亜硝酸還元酵素遺伝子

[†]Stable Isotope Probing as a Tool to Identify Active Microbial Populations in Soil.

Keishi SENOO and Satoshi ISHII: Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

nirS 及び *nirK* を対象としたクローンライブラリも作成して解析した。得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、*Burkholderiales* 及び *Rhodocyclales* に属する脱窒菌の既知の *NirS* 及び、*Rhizobiales* に属する脱窒菌の既知の *NirK* に近縁だった。以上の結果により、本実験で用いた条件下における水田土壌では *Burkholderiales*, *Rhodocyclales*, *Rhodospirillales* に属する細菌群、並びに *Rhodocyclales* に近縁な新規のグループに属する細菌が脱窒に関わっている主要な細菌群であることが明らかとなった。

湛水土壌では脱窒反応に引き続いて鉄還元反応が進行する。Hori ら⁴⁾は酢酸を代謝し鉄を最終電子受容体として還元する鉄還元菌を RNA-SIP により特定した。水田土壌を嫌氣的にインキュベートして元々存在する鉄の還元が終了した後に、¹³C-酢酸並びに鉄酸化物であるフェリハイドライト又はゲータイトを添加して更にインキュベートした。土壌 RNA を抽出して密度勾配超遠心により¹³C-RNA 画分を得た。細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象としたクローンライブラリを作成して解析したところ、フェリハイドライト添加の場合には *Geobacter* が、ゲータイト添加の場合には *Geobacter*, *Anaeromyxobacter*, 並びに新規な β -プロテオバクテリアが優占していることが明らかになった。よって、これらが水田土壌において酢酸を酸化して鉄還元を行っている細菌であると考えられる。

水田土壌における還元反応の最終段階としてメタン生成反応がある。水稻根から分泌される化合物や根の脱落組織はメタン生成の炭素源の大きな供給源である。Lu ら⁵⁾は¹³C-CO₂を与えて水稻を栽培し、根圏土壌の Rice Cluster I と呼ばれる古細菌グループの rRNA に¹³C が取り込まれていることを見出し、これがメタン生成に重要な役割を果たしていることを示した。

一方、水田土壌で生成したメタンは土壌表層などの酸化的な部位においてメタン酸化菌によって資化される。Murase ら⁶⁾は、メタン酸化菌に取り込まれたメタン由来の炭素が更に他の

生物に利用される食物網が存在していると推測し、RNA-SIP により検証した。水田土壌マイクロゾムに¹³C-CH₄を添加してインキュベートし、土壌 RNA を抽出して rRNA を対象とした T-RFLP 解析、クローンライブラリ解析、DGGE 解析により細菌並びに原核生物群集を調べた。その結果、¹³C はメタン酸化菌だけでなく、*Myxobacteria* に近縁な細菌、更に、アメーバ、繊毛虫類、鞭毛虫類などの原生生物に取り込まれていた。おそらくはメタン酸化菌がこれらの生物に捕食されたものであり、メタンにより駆動される食物網が確かに存在していることを示した。

3. その他の適用例

土壌に投与された除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を資化して分解する微生物が、¹³C で一部をラベルした 2,4-D を用いた DNA-SIP により調べられた (Cupples ら⁷⁾)。¹⁵N-N₂ を用いた DNA-SIP により土壌中の単生窒素固定菌の多様性が調べられた (Buckley ら⁸⁾)。ジャガイモを¹³C-CO₂を与えて栽培し、植物体内に生息する内生細菌 (エンドファイト) が同定された (Rasche ら⁹⁾)。農耕地土壌ではアンモニア酸化細菌の方がアンモニア酸化古細菌よりも活発にアンモニア酸化を行っていることが¹³C-CO₂を用いた DNA-SIP などにより示された (Jia ら¹⁰⁾)。

土壌だけでなく他の環境中で機能する微生物の特定にも SIP 法は広く使われており、今後様々な研究が展開されるであろう。

文 献

- 1) Radajewski, S. et al., *Nature*, **403**, 646-649 (2000)
- 2) 村瀬 潤, 日本土壌肥科学雑誌, **77**, 231-234 (2006)
- 3) Saito, T. et al., *Microbes Environ.*, **23**, 192-200 (2008)
- 4) Hori, T. et al., *ISME J.*, **4**, 267-278 (2010)
- 5) Lu, Y. H. and Conrad, R., *Science*, **309**, 1088-1090

- (2005) 3196-3204 (2007)
- 6) Murase, J. et al., *Environ. Microbiol.*, **9**, 3025-3034 (2007)
- 7) Cupples, A. M. and Sims, G. K., *Soil Biol. Biochem.*, **39**, 232-238 (2007)
- 8) Buckley, D. H. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3196-3204 (2007)
- 9) Rasche, F. T. et al., *New Phytol.*, **181**, 802-807 (2009)
- 10) Jia, Z. J. and Conrad, R., *Environ. Microbiol.*, **11**, 1658-1671 (2009)
-