

## 主論文の要約

### 1. 背景と目的

水田では湛水により土壌の大部分が嫌気・還元的になり、嫌気呼吸や発酵による有機物分解が進行する。発酵過程で水素を生成する水素生成微生物は、有機物を酪酸やプロピオン酸などの低級脂肪酸、酢酸や C<sub>1</sub>化合物へ分解する主要な微生物群のひとつであり、水田土壌における有機物の分解への寄与は大きい。さらに、水素生成微生物は、酸化還元電位の低下した水田土壌中で有機物分解の最終過程を担うメタン生成古細菌をはじめとした水素消費微生物に電子供与体である水素を供給する微生物群として重要な役割を担う。

一方で、系統的・生理的に多様な水素生成微生物の解析は困難であり、これまで水田土壌中の水素生成微生物を群集として網羅的に解析した例はなかった。そのため、水田土壌の水素生成微生物の種類や構成、圃場での年間を通じた動態、さらには有機物分解過程における動態や水素生成活性などは不明だった。しかし近年、水素生成反応を触媒するとされる酵素[FeFe]-ヒドロゲナーゼの活性サブユニットをコードする遺伝子 *hydA* をマーカーとした分子生物学的方法による解析により、環境中の水素生成微生物群集の多様性を明らかにすることが試みられている。

そこで、本研究では水田土壌中の水素生成微生物群集の多様性と動態を解明することを目的として、水田土壌、あるいは水素生成微生物から抽出した DNA および RNA 中に含まれる *hydA* および *hydA* 転写産物を対象とした分子生物学的方法による解析を行った。

### 2. 水田土壌における水素生成微生物群集の解析手法の確立と多様性および動態の解明

これまで不明だった水田土壌に存在する水素生成微生物群集の多様性と、圃場における年間動態を明らかにすることを目的として、水田土壌から抽出した土壌 DNA に含まれる *hydA* を対象とした PCR-クローンライブラリー法および PCR-DGGE による解析手法を確立した。さらに、確立した解析手法により落水条件および湛水条件土壌に含まれる *hydA* の多様性と、日本の 2 地点の水田土壌から主に水稲作付期間に経時的にサンプリングした土壌中の微生物の *hydA* のパターンを解析した。

まず、*hydA* の部分配列を増幅する 3 種のプライマーセット (*hydF1/hydR1*, *FeFe-272F/FeFe-427R*, *HydH1f/HydH3r*; それぞれ Xing et al. 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1232-1239; Boyd et al. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4620-4623; Schmidt et al. 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2027-2031.)を使用して水田土壌 DNA を鋳型とした PCR-クローンライブラリー法による解析手法を確立した。その結果、いずれ

のプライマーセットを使用した場合でも Firmicutes, Chloroflexi, Proteobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes, *Caldithrix* の有する *hydA* と高い相同性を示す *hydA* が得られた。

そこで、最もプライマーのミスマッチが少なく、特異性が高いと考えられた HydH1f/HydH3r を使用した *hydA* の多様性の解析を行うこととした。落水条件および湛水条件の水田土壌から抽出した DNA を鋳型として HydH1f/HydH3r を使用した PCR-クローンライブラリー法による *hydA* の多様性の解析を行った。その結果、落水条件および湛水条件の土壌ともに Firmicutes、Chloroflexi、Proteobacteria の有する *hydA* と高い相同性を示す *hydA* が高い割合で得られた。このことから、水田土壌には Firmicutes、Chloroflexi、Proteobacteria を中心に多様な水素生成微生物群集が存在することが示唆された。

また、PCR-DGGE では主に水稲作付期間に経時的に採取した水田土壌から抽出した DNA の *hydA* のパターンを解析した。その結果、*hydA* の DGGE バンドパターンはスメアであり、より詳細な解析が必要であるものの、そのバンドパターンは年間を通じて大きく変化しないことが示唆された。これにより、水田土壌に存在する水素生成微生物群集構造が水稲作付期間を含めた年間を通じて安定していることが示唆された。

以上より、水田土壌に Firmicutes、Chloroflexi、Proteobacteria を中心とした水素生成微生物群集が安定して存在することが示唆された。

### 3. 稲わら分解過程において活性を有する水素生成微生物群集の動態の解明

DNA を対象とした解析により多様な水素生成微生物群集が水田土壌に安定して存在することが示唆されたが、水田は土壌の状態が大きく変化するため、嫌気性微生物である水素生成微生物群集の活性はこの土壌の状態に依存して変化すると考えられた。特に、発酵に伴って起こる水素生成は有機物分解過程で起こる反応であるため、有機物分解の段階に依存して活性を有する水素生成微生物群集が変化することが考えられた。

そこで、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解析を行った。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、経時的に採取した土壌から抽出した DNA および RNA を用いて *hydA* および *hydA* 転写産物を対象とした (RT-)PCR-クローンライブラリー法および (RT-)PCR-DGGE による解析を実施した。土壌 DNA を用いた PCR-DGGE による解析では *hydA* のバンドパターンが稲わら添加区および無添加区ともに培養期間を通じて大きく変化しなかったことから、土壌中に存在する水素生成微生物群集構造は湛水後の酸化

還元状態の変化や有機物の有無に依らず安定していると考えられた。また、土壌 DNA の PCR-クローンライブラリー法による解析では、Firmicutes, Chloroflexi, Proteobacteria, Bacteroidetes などの有する *hydA* と高い相同性を示す *hydA* 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。土壌 RNA の RT-PCR-DGGE による解析では、無添加区では十分な RT-PCR 産物が得られなかったが、稲わら添加区では培養期間を通じて *hydA* 転写産物のバンドパターンが変化し、活性を有する水素生成微生物群集が培養時期によって変化していることが示唆された。

そこで、土壌の逐次還元初期過程かつ稲わら分解の初期過程が進行していた稲わら添加区培養 1 日目、メタン生成過程かつ稲わら分解の中期～後期過程が進行していた稲わら添加区培養 14 日目、穏やかな逐次還元過程が進行していた無添加区培養 14 日目の土壌 RNA に含まれる *hydA* の転写産物を対象とした RT-PCR-クローンライブラリー法による解析を行った。その結果、それぞれのクローンライブラリーで *hydA* の多様性が異なっており、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。まず、稲わら添加区の培養 1 日目ではごく限られたグループの Proteobacteria と Firmicutes の有する *hydA* と高い相同性を示す *hydA* が高い割合で転写されており、特定の微生物群が水素生成活性を上昇させることが示唆された。また、稲わら添加区の培養 14 日目では転写される *hydA* の多様性が増大し、Firmicutes を中心により多くの種類の微生物群が水素生成活性を上昇させることが示唆された。さらに、無添加区の培養 14 日目では、一部稲わら添加区の培養 14 日目と似た *hydA* 転写産物の多様性が見られたが、多様性は低く、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有無あるいは分解過程により変化し、特に稲わら分解の中期～後期過程すなわちメタン生成過程で多様性が増大することが示唆された。

#### 4. 水田土壌からの水素生成微生物の分離と *hydA* の転写活性の解析

土壌中の水素生成微生物群集を対象とした *hydA* の解析より稲わら分解過程において転写される *hydA* の多様性は変化すること、特に稲わら分解の中期～後期過程あるいはメタン生成過程でより多様な *hydA* が転写され、多くの水素生成微生物が活性を有することが示唆された。しかし、*hydA* の転写と水素生成活性の関係については限られた水素生成微生物株を除いて示されておらず、実際に水田土壌の水素生成微生物が水素生成時に *hydA* を転写しているかは不明だった。また、主要な水素生成微生物群集であるとされた Firmicutes および

Deltaproteobacteria に属する水素生成微生物はゲノムに複数の *hydA* パラログを有することが知られており、水素生成時にもこれらのパラログを周囲の環境に応じて使い分けている可能性があると考えられた。

そこで、水田土壌で有機物分解を担う水素生成微生物の水素生成活性と *hydA* 転写の関係を明らかにすることを目的として、水田土壌から分離された水素生成活性を有する分離株を用いて、水素生成活性を測定するとともに *hydA* パラログの転写活性の培養期間における変化を RT-qPCR 法により解析した。

本研究では、供試菌株として *Clostridium* sp. H2 株 (以下 H2 株) および *Desulfovibrio* sp. A1 株 (以下 A1 株) および *Methanobacterium* sp. AH1 株 (以下 AH1 株) を使用した。H2 株はグルコースを基質とした培地に 80°C・10 分間の熱処理を行った水田土壌を加えた培養物から分離した水素生成微生物である。また、A1 株および AH1 株は水田土壌の酢酸を基質とした集積培養から分離された硫酸還元菌と水素利用性メタン生成古細菌であり、硫酸塩を含まない乳酸塩を基質とした無機塩培地で共生することが明らかになっている。

近縁株のゲノム情報をもとにした PCR および PCR 産物のシーケンス解析により、H2 株と A1 株は系統的に異なる *hydA* パラログをそれぞれ 5 種類 (*H2hydA1*~*H2hydA5*) および 2 種類 (*A1hydA1*, *A1hydA2*) 有することが明らかになった。

H2 株を、グルコースを基質とした培地で生育させたところ、対数増殖期に高い水素生成活性がみられた。また、特に対数増殖期において *H2hydA3* の転写活性が上昇し、他の *hydA* パラログと比較して水素生成へ寄与していたことが示唆された。また、A1 株では乳酸塩と硫酸塩を基質とした培地で生育させる硫酸還元条件と、乳酸塩を基質とした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発酵条件で培養を行った。このとき 2 種の *hydA* の転写活性はそれぞれ異なっており、特に共培養発酵条件では *A1hydA2* の転写活性が上昇し、*A1hydA2* がメタン生成古細菌との共生時に重要な役割を有することが示唆された。

以上より、水田土壌の水素生成活性を有する微生物が水素生成時に *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ていることが示唆された。

## 5. 本研究で得られた成果

本研究より、水田土壌の水素生成微生物群集の多様性と動態の一部が明らかになった。まず、水田土壌に Firmicutes, Proteobacteria, Chloroflexi などに属する多様な水素生成微生物が安定して存在していることが明らかになった。一方、活性を有する水素生成微生物

群集は土壌の酸化還元状態および稲わらの分解過程で変化した。稲わら分解の初期には特定の *Proteobacteria* に属する水素生成微生物が活性を有することが示唆された。また、メタン生成を伴う稲わら分解中期以降には、*Firmicutes* を中心により多様な水素生成微生物が活性を有することが示唆された。さらに、水田土壌から分離された *Clostridium* sp. H2 株が水素生成時に特定の *hydA* の転写活性を上昇させることや、水田土壌から分離された *Desulfovibrio* sp. A1 株の特定の *hydA* の転写活性が硫酸還元条件と水素利用性メタン生成古細菌との共培養発酵条件で変化することが明らかになった。

以上より、水田土壌に存在する水素生成微生物群集の特徴として高い多様性と安定性ととも、有機物の分解過程や周囲の環境の変化に応答して水素代謝活性を少なくとも *hydA* の転写レベルで変化させるという環境応答性があることが示唆された。