

## 水田圃場に生息する新規なメタン酸化細菌の特性解明

### 水田からのメタン発生低減への活用を目指して

名古屋大学大学院生命農学研究科 浅川 晋

#### はじめに

メタン酸化細菌はメタンを唯一の炭素源及びエネルギー源として生育する好気性微生物であり、地球上のメタンの循環に大きな役割を果たしているとともに、様々な環境汚染物質の分解者としても注目されている。メタンは温室効果ガスの一つであり、水田はその主な発生源の一つである。メタンの放出量は生成量と酸化量の差であるため、メタン発生の低減に果たすメタン酸化細菌の役割は大きいものと期待されている。

水田圃場に生息するメタン酸化細菌はこれまで、培養法および分子生物学的手法により研究が行われてきた。しかし、培養により純粋分離され、特性が明らかにされている菌株は少なく、そのいずれもが *Methylosinus* あるいは *Methylocystis* に属するタイプ II のメタン酸化細菌に限られていた。そこで、水田圃場に生息するメタン酸化細菌の分布や構成種などの微生物生態的な情報を明らかにするため、Dianou(2004)は水田生態系を構成している様々な部位(田面水、表層土、作土、根圏土壌、水稻根、水稻の茎、水稻の刈株)よりメタン酸化細菌を分離することを試みた。Dianou(2004)は、得られた純粋分離株のうち、10 菌株について 16S rDNA の部分塩基配列を解析し、系統分類群の推定を行った。3 菌株はこれまでに水田土壌から分離例のある  $\gamma$ -Proteobacteria に属するタイプ II のメタン酸化細菌であったが、2 菌株は、水田環境ではこれまで分子生物学的手法によってのみその存在が検出され培養では菌株が分離されていない、 $\gamma$ -Proteobacteria に属するタイプ I のメタン酸化細菌であった。さらに、残りの 5 菌株は、これまでに報告のない  $\gamma$ -Proteobacteria および Bacteroidetes に属する全く未知のメタン酸化細菌であると考えられた。

近年分子生態学的手法が急速に発達し、培養に依らない微生物の解析が可能となり、菌の分離がますます行われなくなりつつあるが、菌の生理・生態的特性などは分離株が得られなければ明らかにならないことがほとんどである。そこで本研究では、Dianou(2004)が水田より分離した新規メタン酸化細菌の菌学的特性を明らかにし、水田圃場におけるメタン酸化に果たす役割の解明や利活用のための基礎的知見を得るとともに、メタン酸化細菌についての理解を深め、水田からのメタン発生低減への活用を目指すことを目的とした。

## 材料と方法

愛知県安城農業技術センターの水田圃場から採取した試料（田面水・作土・表層土・水稲根・根圏土壌・茎・刈り株）より，硝酸塩無機塩培地を用い，気相にメタンを加えて Dianou(2004)が培養・分離した，メタン酸化能を有する 17 菌株を対象とした。それぞれの菌株について，細胞形態，寒天培地上におけるコロニー形態と色素産生，メタン酸化能，メタノール利用性，37 および 45 における生育，耐熱性（外生孢子形成）を調査した。さらに，菌体よりゲノム DNA を抽出し，16S rRNA 遺伝子及びメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子（*pmoA*）の断片を PCR により増幅し，塩基配列を決定した。

## 結果と考察

### 1) 形態及び生理的性質

分離菌株の位相差顕微鏡写真を図 1 に，形態及び生理的性質を表 1 に示した。細胞形態は球状短桿，短桿，桿，長桿，湾曲した桿と多様であり，運動性を有していた。また，生育経過や培養条件により形態が変化し，一部の菌株では多形性を示した。外生孢子様の構造は 3 菌株で認められた。寒天培地上でのコロニーは不透明で一部にゼラチン状，夾膜状，繊維状の性状を示し，白色あるいは赤，黄，黄～橙，桃～紫の色素を産生した。これらの性質はこれまでのメタン酸化細菌分離株で一般的に報告されている性状と一致するものであった。

分離株は硝酸塩無機塩液体及び寒天培地で 30 ，7 日間あるいは 10 日間培養することにより，気相（メタン濃度 18%）の約 50～80%のメタンを酸化する活性を有していた。45 で生育可能な菌株はなく，3 菌株は 37 においても生育が認められなかった。表層土から分離された SS10D-Y-Pr 株を除いて，0.1%メタノールで生育が認められた。一般的にメタン酸化細菌はメタン及びメタノールをエネルギー源かつ炭素源として利用して生育可能である。しかし，菌株によっては高濃度のメタノールが生育に阻害的に作用し，より低濃度のメタノールを用いて馴養化を行う必要があることが知られており，SS10D-Y-Pr 株はこのような前培養が必要であると考えられる。

### 2) 16S rRNA 遺伝子及びメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子（*pmoA*）の解析

ほぼ全長の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分離株の系統樹を図 2 に示した。4 株がタイプ I メタン酸化細菌の *Methylomonas* 属あるいは *Methylocaldum* 属（ - Proteobacteria），10 株がタイプ II メタン酸化細菌の *Methylocystis* 属（ - Proteobacteria），2 株が *Flexibacter* 属（Bacteroidetes），1 株が *Acidovorax* 属（ - Proteobacteria）に近縁であることが示された。タイプ I のメタン酸化細菌は，これまで水田生態系では分子生物学的手法によってのみその存在が報告されていたが，培養による

初めての分離例であり、大きな意味を持つと考えられる。さらに、田面水及び根圏土壌から分離されたFW12E-Y株とRS11D-Pr株は、それぞれ最近縁の既存種 *Methylomonas methanica* 及び *Methylocaldum szediense* の基準株との間で 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 93% 及び 92% と低く、*Methylomonas* 属及び *Methylocaldum* 属の新種であると考えられた。しかし、*Methylocaldum* 属のメタン酸化細菌は 40 以上に最適生育温度を持つ中程度の高温性であるが、RS11D-Pr 株は 45 °C では生育せず（表 1）、表現型に相違が見られた。*Methylocaldum* 属は *Methylococcus* 属との間で系統的な類縁性が高いため、両属に近縁な新規種である可能性も考えられた。

メタンモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*pmoA*) の部分断片のアミノ酸配列に基づく系統樹を図 3 に示した。*pmoA* 配列に基づく系統関係は、図 2 に示した 16S rRNA 遺伝子による系統的位置を良く反映しており、分離株のタイプ A 及びタイプ B のメタン酸化細菌への帰属が再度確認された。

一方、作土と水稻根から分離された S1A-W 株と Rt4B-Y-0 株は 16S rRNA 遺伝子の解析により *Flexibacter sancti* に最も近縁であり、*pmoA* はそれぞれタイプ A 及びタイプ B のメタン酸化細菌の配列に近縁であった。FW5B-W 株は田面水から分離された菌株であり、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析では *Acidovorax* 属に最も近縁であり、その *pmoA* は *Methylocystis parvus* の基準株 OBBP 株の *pmoA* 配列と高い相同性を示した。これらの菌株は *pmoA* を有する *Flexibacter* 属あるいは *Acidovorax* 属の新規のメタン酸化細菌である可能性が考えられた。また、いずれの菌株も顕微鏡観察とコロニー形態観察から純粋であると判断され、シーケンス解析の結果からゲノム DNA より増幅した 16S rRNA 遺伝子断片には塩基配列の異なる複数の断片は含まれていないと判断されたものの、それでもなお、タイプ A あるいはタイプ B のメタン酸化細菌が *Flexibacter* 属や *Acidovorax* 属の菌に共存して共生的にメタンを酸化している可能性もあるのではないかと考えられた。そこで、分離株と最近縁であった *Flexibacter sancti* と *Acidovorax delafieldii* の両種の菌株を菌株保存機関より取り寄せ、メタン酸化能と *pmoA* の存在を確認した。いずれの菌株においても、メタンを唯一のエネルギー源・炭素源とした硝酸塩無機塩培地では有意な生育、メタン酸化とともに確認できなかった。しかし、菌培養液より抽出したゲノム DNA を対象に、*pmoA* の部分断片増幅用のプライマーを用いて PCR を行ったところ、非特異的な増幅断片が多かったものの、既知のメタン酸化細菌の *pmoA* と同一の長さを有する断片の増幅が確認され、*pmoA* 類似の遺伝子断片の存在を示唆する結果であった。一方で、S1A-W 株、Rt4B-Y-0 株、FW5B-W 株は、*Flexibacter sancti* や *Acidovorax delafieldii* の培養に用いる有機物培地に継代培養したところ良好な生育を示したが、硝酸塩無機塩培地へ再度継代培養しても生育・メタン酸化とともに確認できなかった。さらに、有機物培地で生育した菌体から抽

出したゲノム DNA を対象に *pmoA* の PCR 増幅を行ったところ、非特異的な増幅断片が硝酸塩無機塩培地で生育した場合よりも増加した。これはメタン酸化細菌が共存しており、有機物培地では生育しなかったことを示唆していた。このため、上記の2つの可能性のどちらであるかを確かめるには至らず、さらに詳細な検討が必要であると考えられた。しかし、いずれの場合でもこれまでに類似の報告例はなく、新規のメタン酸化細菌が関与していると考えられた。

以上より、水田生態系にはタイプ I 及びタイプ II のメタン酸化細菌ともに水田各部位に遍在しており、さらに、既存種とは系統的に類縁性の低い菌群が生息していることが明らかになった。

### 今後の予定と展望

水田生態系より分離したタイプ I 及びタイプ II のメタン酸化細菌株について、至適メタン濃度等のメタン酸化に関わる諸特性を中心に解析し、メタン発生抑制に有用な情報を収集する。水田生態系から初めて培養・分離されたタイプ I のメタン酸化細菌については、さらに、分類学的諸特性を明らかにして種レベルの同定、あるいは新種と考えられた2菌株については新分類群名の提案を行う予定である。また、*Flexibacter* 属と *Acidovorax* 属に近縁な菌株については、純粋であるか共生体であるのかの検討を慎重に行い、メタン酸化の微生物学に新たな知見を加えたいと考えている。

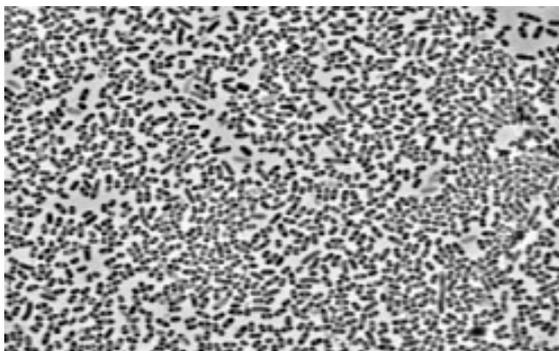
最後になりましたが、以上のように、意義深い研究が発展する基礎となる1年間に対しエスベック地球環境研究技術基金より研究助成を頂きましたこと、深く感謝申し上げます。

### 学会発表

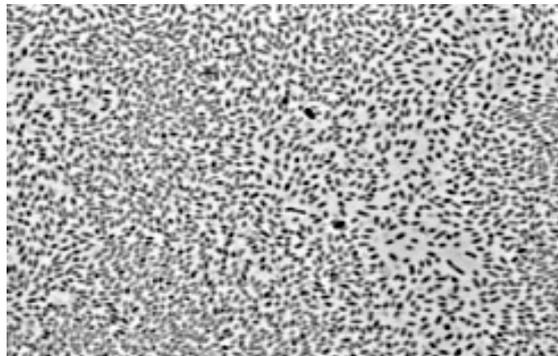
「Diversity of Culturable Methane-Oxidizing Bacteria in a Japanese Rice Field Ecosystem」第18回世界土壌科学会議，フィラデルフィア，アメリカ，2006年7月

「水田各部位から分離されたメタン酸化細菌の特性」2006年度日本土壌肥料学会大会，秋田，2006年9月

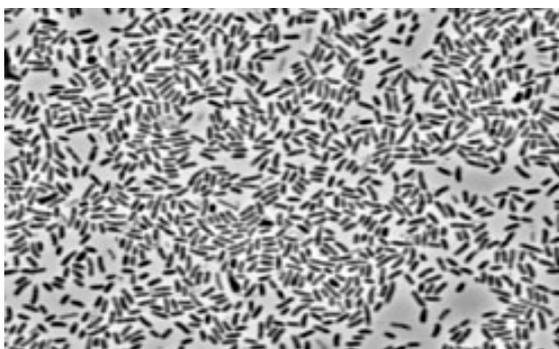
FW5B-W



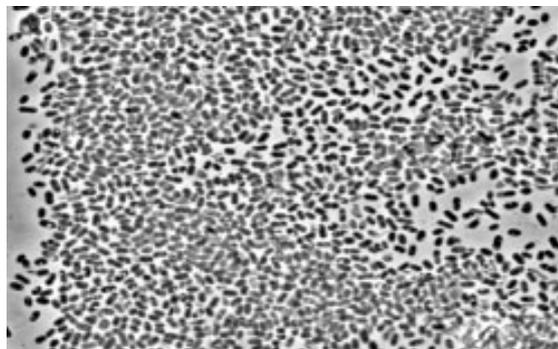
FW12E-Y



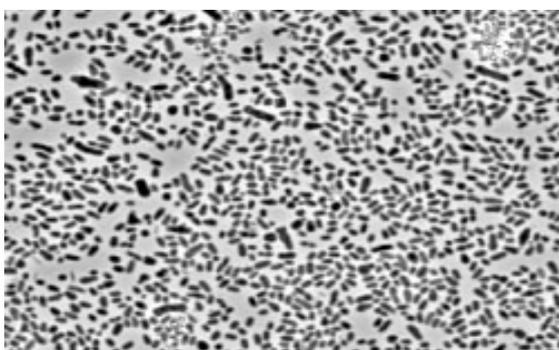
FW1B-WF



SS10D-Y-Pr



SS37A-Re



S1A-W

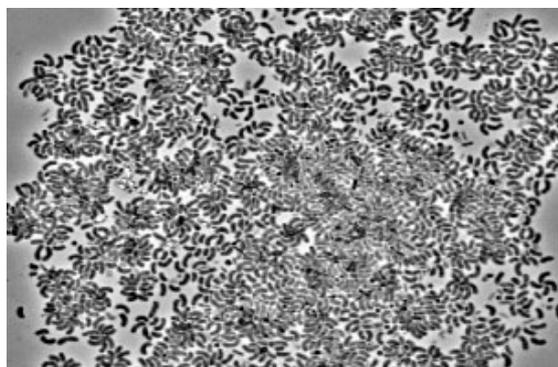
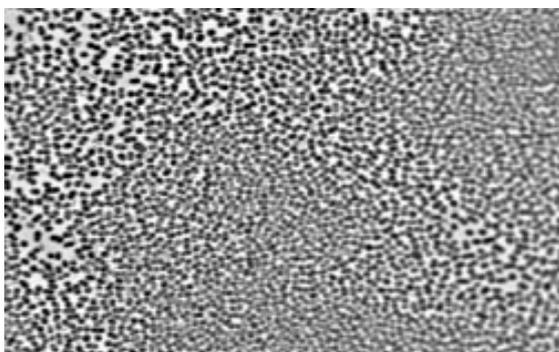
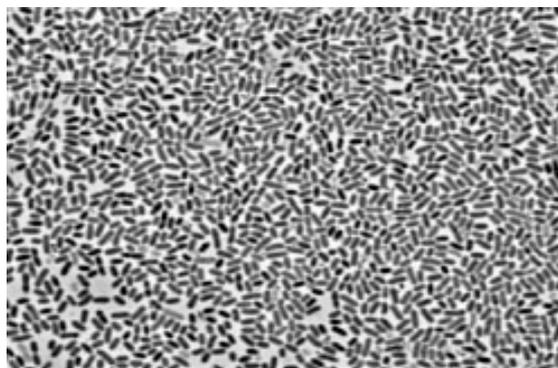


図1 . 分離株の位相差顕微鏡写真

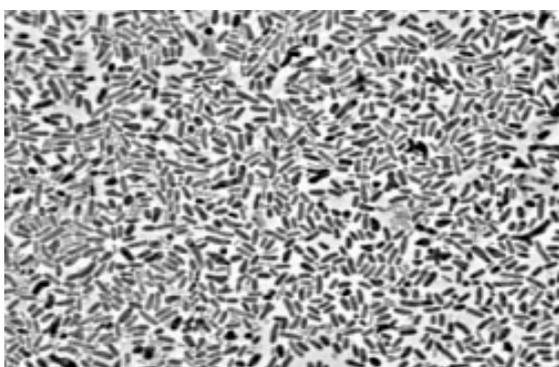
S5B-W



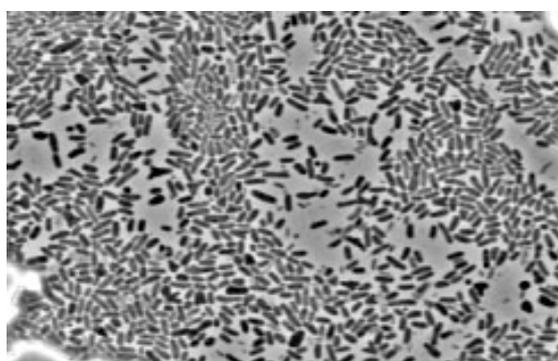
S18C-Re



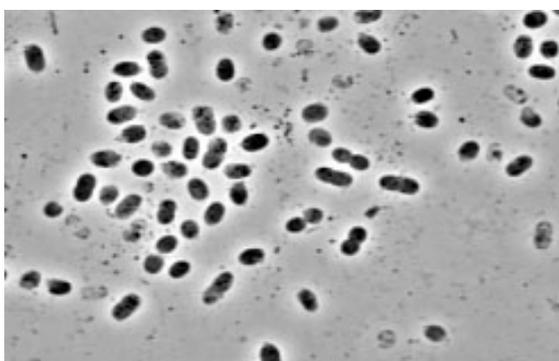
RS5A-Re



RS6A-Re



RS11D-Pr



Rt4B-Y-O

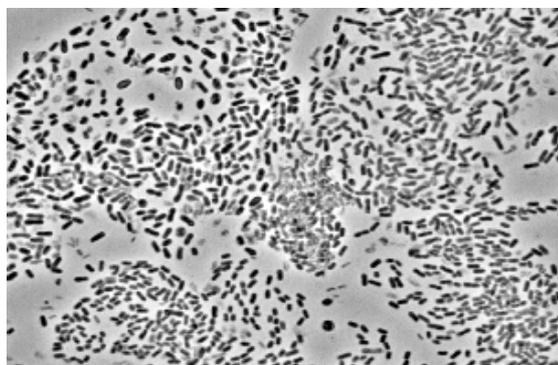
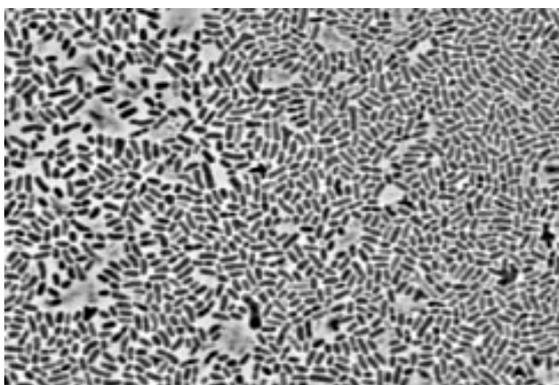
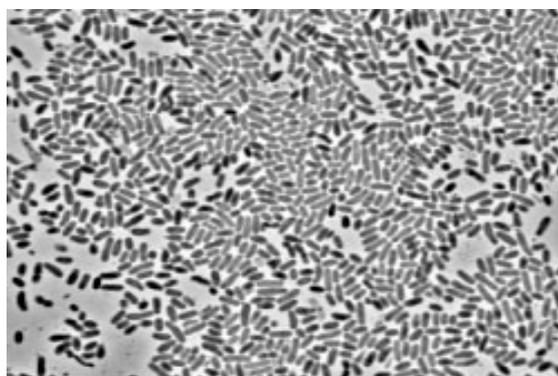


図1 . 分離株の位相差顕微鏡写真 ( 続き )

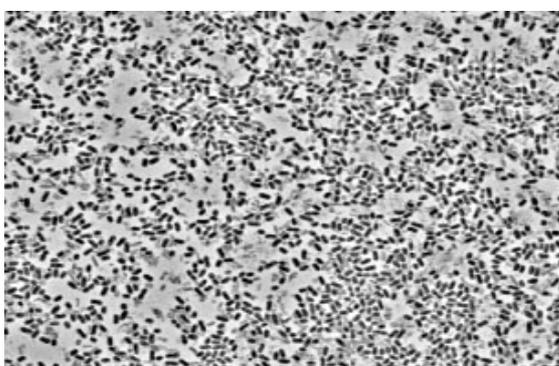
Ste2C-Re



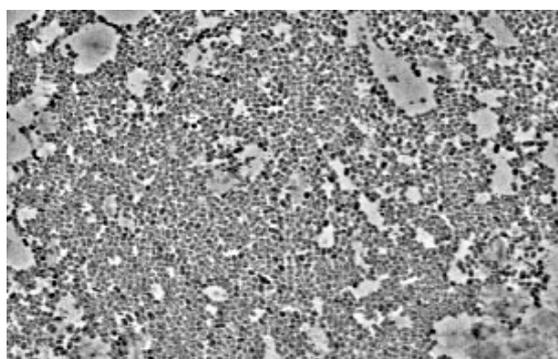
Ste3C-Re



Stu1B-Pr



Stu5B-P-Pr



Stu20C-Re

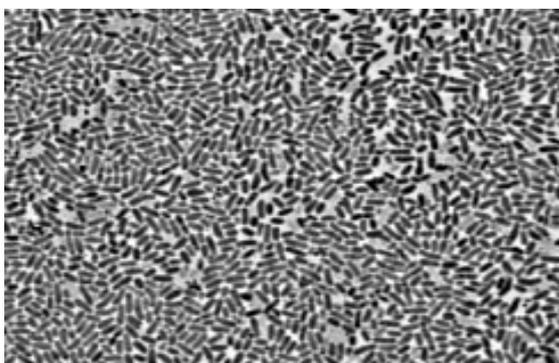


図1 . 分離株の位相差顕微鏡写真 ( 続き )

表 1 . 分離株の形態及び生理的性質

| 菌株 <sup>1</sup> | 形態 <sup>2</sup> | 運動性 | 外生胞子形成 | 寒天培地上のコロニー形態 <sup>3</sup> | 0.1%メタノールでの生育 | 37 での生育 | 45 での生育 |
|-----------------|-----------------|-----|--------|---------------------------|---------------|---------|---------|
| FW5B-W          | SR              | +   | -      | W, O                      | +             | +       | -       |
| FW12E-Y         | SR              | +   | -      | Y-O, O, c                 | +             | +       | -       |
| FW1B-WF         | LRC             | +   | -      | W, O, F                   | +             | +       | -       |
| SS10D-Y-Pr      | SR              | +   | -      | Y, O, G                   | -             | +       | -       |
| SS37A-Re        | LR              | +   | -      | Re, O                     | +             | +       | -       |
| S1A-W           | SRC             | +   | -      | W, O                      | +             | -       | -       |
| S5B-W           | SR              | +   | -      | W, O                      | +             | +       | -       |
| S18C-Re         | R               | +   | -      | Re, O                     | +             | +       | -       |
| RS5A-Re         | R               | +   | -      | Re, O                     | +             | +       | -       |
| RS6A-Re         | R               | +   | -      | Re, O                     | +             | +       | -       |
| RS11D-Pr        | RC              | +   | -      | Pr-P, O                   | +             | +       | -       |
| Rt4B-Y-O        | R               | +   | -      | Y-O, O, c                 | +             | +       | -       |
| Ste2C-Re        | R               | +   | +      | Re, O                     | +             | +       | -       |
| Ste3C-Re        | R               | +   | +      | Re, O                     | +             | +       | -       |
| Stu1B-Pr        | LR              | +   | -      | P-Pr, O, G                | +             | -       | -       |
| Stu5B-P-Pr      | R               | +   | -      | P-Pr, O, G                | +             | -       | -       |
| Stu20C-Re       | R               | +   | +      | Re, O                     | +             | -       | -       |

<sup>1</sup> FW, 田面水 ; SS, 表層土 ; S, 作土 ; RS, 根圏土壌 ; Rt, 水稻根 ; Ste, 茎 ; Stu, 刈り株 .

<sup>2</sup> SR, short rod; SRC, short rod curved; R, rod; RC, rod curved; LR, long rod; LRC, long rod curved.

<sup>3</sup> W, white; Y-O, yellow to orange; Re, red; Pr-P, purple to pink; P-Pr, pink to purple; Y, yellow; F, filamentous; G, gelatinous; O, opaque; c, capsule.

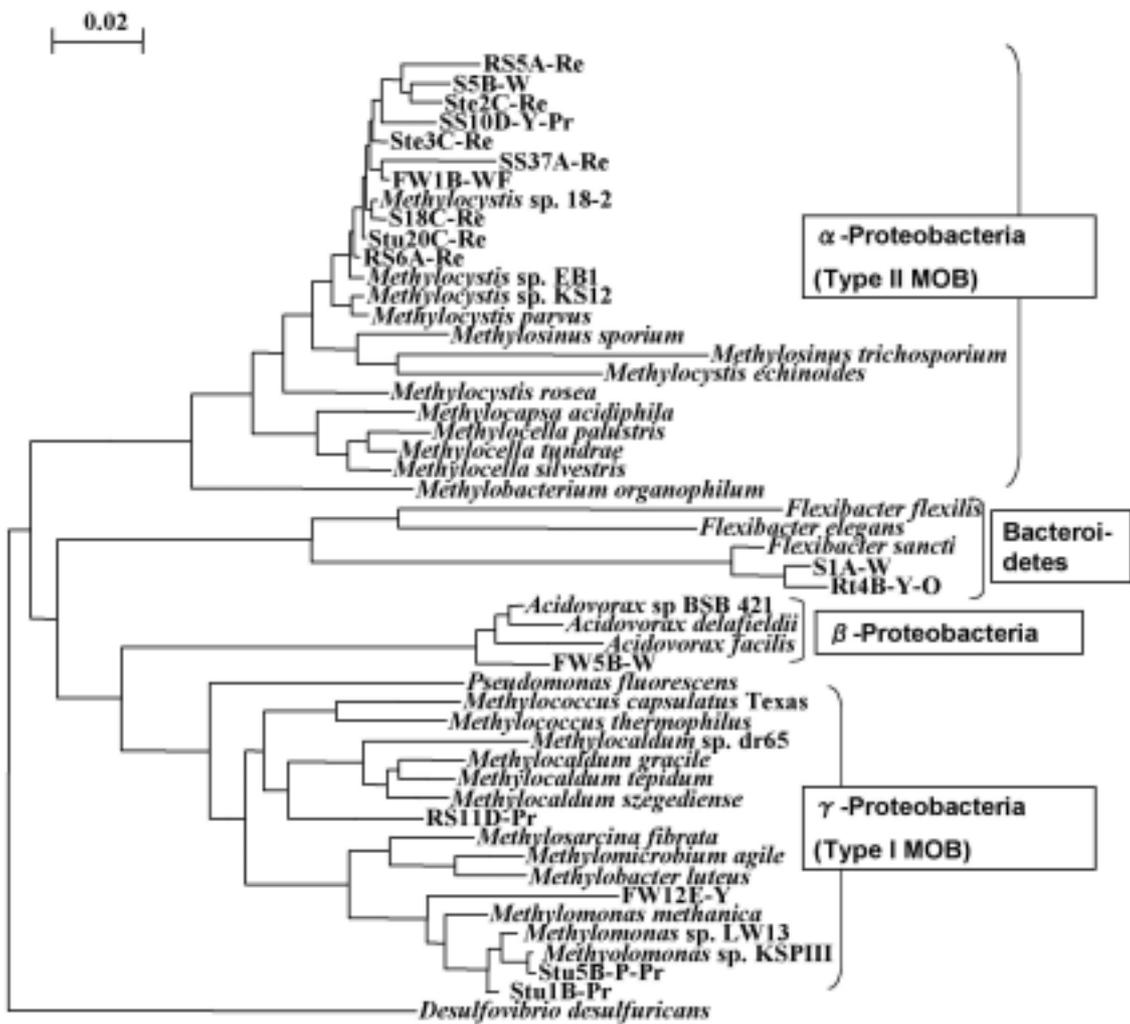


図2 . 分離株の 16S rDNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹

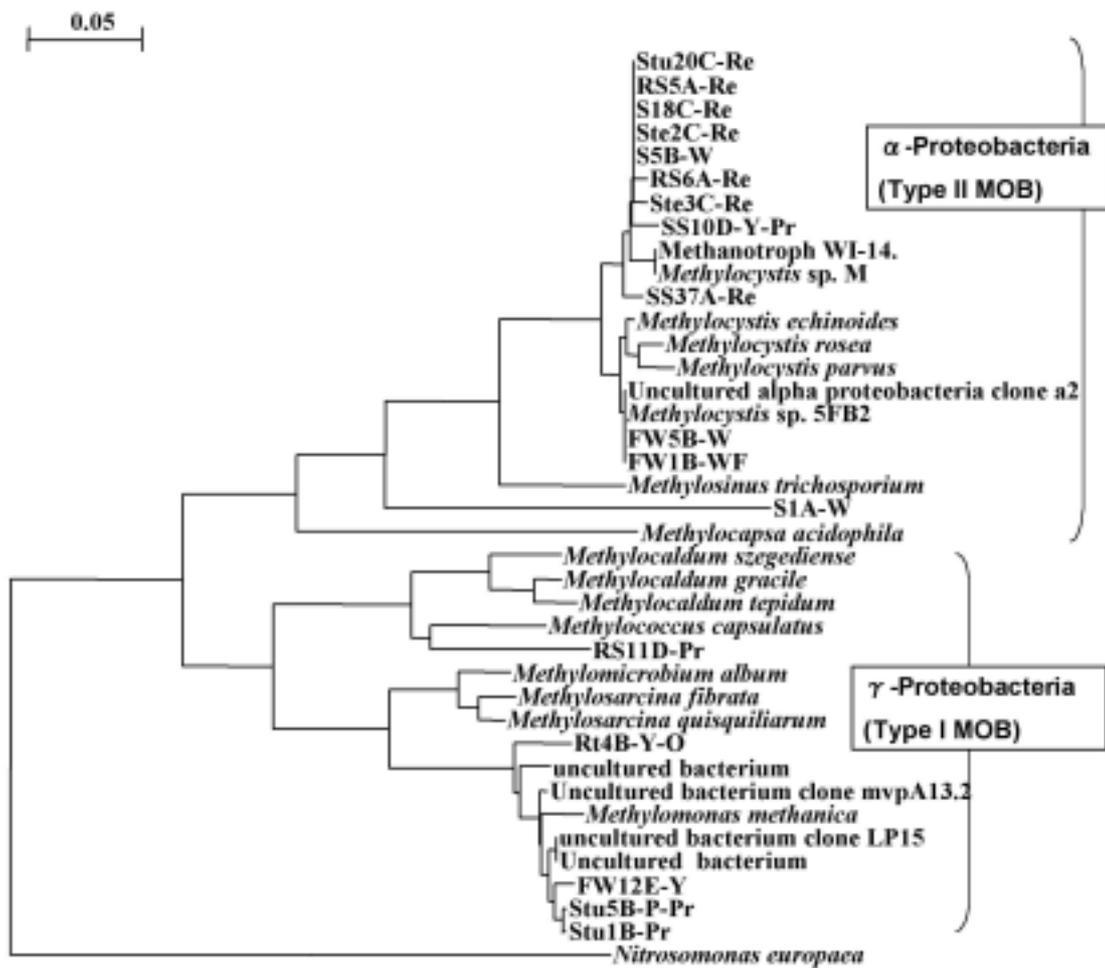


図3 . 分離株の *pmoA* のアミノ酸配列に基づく系統樹