

屋久島の土壌微生物群集構造の解析

野村暢彦

筑波大学応用生物化学系

1. はじめに

屋久島は、九州最南端の佐多岬から南へ約 70 km 離れた場所に位置する、周囲約 132km、面積約 503 km² のほぼ円形の島である。島の中央には九州最高峰の宮之浦岳 (1935 m) をはじめ 1800 m を超える峰々がそびえ、「洋上のアルプス」とも呼ばれている。山頂部と海岸部で気温差が 12°C もあるため、海岸付近の亜熱帯性植生から冷温帯植生に至る多様な植生の垂直分布が見られる (図 1)。

屋久島の自然環境の特徴の 1 つは、生物多様性である。屋久島には 1900 種以上もの動植物が生息しており、そのうち約 100 種は屋久島固有の動植物であるといわれている。植物は赤道に近いほど、また島の面積が大きいほど種数が多くなるのが普通である。屋久島よりさらに南に位置し、面積も大きい奄美大島では帰化植物を含めても 1,300 種あまりであることを考えると、屋久島の植物相の豊かさがわかる。また南限種や北限種も多数確認されている (1)。屋久島の自然環境のもう 1 つの特徴は、美しい景観が残されていることである。非常に多雨な気候のため、森林地帯では樹木や地表がコケに覆われており、独特の景観を構成している。屋久島は、森林景観の美しさが特に知られているが、海岸にもすぐれた景観が残されている。

このように屋久島には優れた生物多様性と景観が残されていることから、次の 2 つの条件を満たしているとして、1993 年 12 月に屋久島全体の約 2 割がユネスコの世界自然遺産リストに登録された (2)。

- ・ 陸上・淡水域・沿岸・海洋生態系、動植物群集の進化や発展において、重要な進行しつつある生態学的・生物学的過程を代表する顕著な例であること

- ・ ひときわすぐれた自然美および美的要素をもった自然現象、あるいは地域を含むこと

このように、非常に他に類を見ないほど豊かな生態系を持つ屋久島だが、現在、樹木の白骨樹化や河川の酸性化などの環境危機が懸念されている。その上、世界遺産指定に伴う観光客の大幅増加により各種施設が建設され、それに伴い自然環境の破壊が急速に進んでいる。

「土は微生物の宝庫」といわれるほど、土壌には非常に多くの原生動物、菌類、および細菌類が生息しており、地球上の物質循環に大きな役割を果たしている。たとえば藻類、植物のような光合成生物によって合成された有機物は、人間を含めた動物に利用された後、微生物によって最終的には二酸化炭素や窒素ガスにまで無機化される。硫黄の循環にも土壌微生物が大きく関わっている。さらに、土壌中の微生物の物質分解能は驚くほど高く、石油系炭化水素、フェノール、クレゾール、アセトン等を炭素源やエネルギー源として利用できる微生物も存在している。このように土壌中の微生物は地球循環の定常性に役立っている。

しかし、その種類と単位重量あたりの数については、ごくおおまかな測定がなされた程度でしかない。土壌中の微生物で群を抜いて数が多いのは細菌であるが、その数については乾燥させた土 1 g あたり、顕微鏡法で 10¹⁰ を中心にその数倍から 10 分の 1 の範囲、平板培養法では 10⁷ を中心に数十倍から 10 分の 1 の範囲にあるといわれている。地表から深部に向けて、どの微生物の数も減少する傾向があるが、細菌の減少は菌類や原生動物に比べてゆるやかである。地下数メートル

以下から数百メートルまでかなり多くの細菌が存在しており、さらに深いところにも細菌類は存在する可能性があるといわれている(3)。

一般に土壌は、物理的、生物的な働きを介して、生態系の炭素、窒素、ミネラル、水の循環に影響を与えるだけではなく、植生の維持、更新にも関わっている。屋久島の土壌は花崗岩が風化して作られた薄い土壌である。薄い土壌は攪乱に対して脆弱であり、とりわけ降水量の多い屋久島では浸食が起こって自然破壊がさらに進む可能性がある。土壌は屋久島の森林生態系や自然環境を考える上で重要なファクターであるが、その研究はまだ不十分な状況である。こうした状況にある屋久島の環境と生態系を存続させるためには、自然環境の特質とその現状、さらにその中でも微生物群集や炭素動態機能の面から、屋久島の土壌とはどんなものであるのかを明らかにする必要がある。

従来、土壌を含め環境中の微生物群集の解析には、培養による検出や顕微鏡観察が行われてきた。しかし、微生物、特に原核生物は形態学的な特長に乏しいため、それらの分類は非常に困難を伴う。また、生きてはいるが培養してもコロニーを形成しないVBNC(Viable But Not Culturable)菌の存在も報告されたことから培養による検出は限界があるという認識がされるようになった(4,5)。

微生物群集の構造は、一般に環境中に生息する微生物の種類とそれらの相対的割合に関する情報として表される。この微生物の群集構造や多様性について知ることは、多くの有用な情報をもたらす。土壌の微生物が物質の循環や土壌の形成において重要な働きを持ち、生態系の示す機能の上で重要な役割を担っていることから、農業開発、汚染物質増加、地球環境変化といった環境ストレスや攪乱が、生態系に及ぼす影響を評価するための情報を

提供する。また、土壌の微生物の多くが培養困難であるため、微生物の機能や遺伝的能力にはいまだ未知の部分があり、それらを新規な産物や技術を提供する資源として活用するための情報を教えてくれる。

このような重要性にもかかわらず、これまで微生物群集の構成種の特定は、培養した微生物についてのみ、その形態学的、生理生化学的、遺伝学的特性を指標として行われてきた。このため限定された情報しか得られず、ほとんどの生態系における、本当の微生物群集の構造や多様性についての知識や理解はきわめて不十分である(6)。

そこで、これらの問題点を克服する一つの方法として分子生物学的手法を利用した微生物生態系の解析が近年広まっている。そのなかでも、16S rRNA やそれをコードしている遺伝子(16S rDNA)を分子マーカーとして利用する方法が1990年代に入り広く普及した。16S rDNAは、原核生物のリボソームに普遍的に存在する30S小サブユニットを構成する16SリボソームRNAの遺伝子であり、その中に保存性の高い領域(Conserved region)と種による違いの大きい領域(Variable region)を持つため、系統分子マーカーとして利用できる。また、塩基配列により種の同定が行えるデータベースが整っていることからよく利用されている。そして、DNAを酵素的に増幅する方法(PCR)とポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法(特にDGGEやTGGE)を組み合わせるDNAフィンガープリンティングに利用する方法がMuyzerらによって微生物生態系の研究に導入され(7,8)、以後細菌群集構造変化の解析に頻繁に用いられるようになった(9-11)。

DGGEの原理を図1に示す。2本鎖DNAは、完全な二重らせん構造の場合に比べ、1本鎖に解離するとポリアクリルアミドゲル中での移動度が非常に遅くなる。二重らせんが部分的に解離する条件(温度、変性剤濃度)はDNA

の塩基配列に依存する。したがって、大きさが同じでも、塩基配列の異なる DNA 断片を変性剤（尿素およびホルムアミド）の濃度勾配を持つゲル中で泳動すると、部分解離の条件が異なることから、ゲル中での移動度が異なり、分離することが可能となる。PCR-DGGE 法では一つのプライマーの 5' 末端に 40 塩基の G（グアニン）および C（シトシン）からなる GC クランプと呼ばれる配列を付加しておく。GC クランプは PCR 産物中もっとも解離しにくい領域となるので、このような断片の部分解離の条件はプライマー間の配列に依存することから、より高感度の分離が可能となる。DGGE では一塩基の違いも検出することが可能である(12)。

微生物の群集構造の研究における PCR-DGGE 法の利点として以下のことがあげられる。1) 定性および半定量的に群集の構成を即座に表示することができる。2) 時間と労力が少なくすむ。3) 特定バンドの菌種を決定するために、DNA 断片を DGGE ゲルから切り出して再び PCR 増幅した後クローニングすることなく、直接シーケンスすることができる。このような利点の一方で、次のような微生物群集解析における定性・定量性の問題点も指摘されている(13)。また、DGGE に供する DNA 断片は約 240 bp 程度と短いため、種レベルまでの同定は困難である。従って、細菌種を詳しく知りたい場合には、より長い 16S rDNA 領域の塩基配列を決定するクローンライブラリー法を組み合わせることが必要であると思われる。

以上をふまえ、本研究では環境の破壊が急速に進んでいる屋久島の生態系の中で、土壌と微生物とのかかわりに注目し、土壌中の細菌群集構造の解析を行うことで、屋久島土壌の細菌と環境とのかかわりを明らかにすることを目的とし、屋久島土壌における細菌群集構造の変化を、PCR-DGGE 法およびクローン

ライブラリー法(16S rRNA 遺伝子ライブラリー構築)を用いて解析した。

2. 屋久島の細菌群集構造の定量的解析

本研究では、屋久島土壌(図1)における細菌群集構造の変化を、PCR-DGGE 法およびクローンライブラリー法(16S rRNA 遺伝子ライブラリー構築)を用いて解析した。まず、PCR-DGGE 法を用いて、屋久島土壌における細菌群集構造の植生帯による変化および季節による変化について解析を行った。得られた DGGE バンドパターンは、地表から 30 cm の深さから採取された Y1(針葉樹林)、Y2(照葉樹林)、Y3(亜熱帯性海岸林)においては調査時期ごとに類似しており、植生ごとの違いは少ない結果となった(図3)。一方、地表から採取された 1301~1701 においてはそれぞれ異なるバンドパターンが得られた。また、DGGE バンドパターンをもとに主成分分析(PCA)を行った結果、DGGE バンドパターンに現れた特徴のように、Y1、Y2、Y3 では調査時期ごとにまとまる結果となった(図4)。また、2001年8月と2002年8月のサンプルが近い位置となった。1301~1701 にはまとまった特徴は見られず、散在した結果となった。屋久島の土壌組成は島全体でほぼ変わらないため、地表から 30 cm の深さでは表面の植生の影響や、植物の根による根圏効果よりも土壌の構成成分により強く影響を受けている可能性が示唆された。また、酸性雨降雨地帯である Y4 についても、その DGGE バンドパターンに同時期の Y1~Y3 と比べて大きな変化はなかった。これは、土壌表面で見られている酸性雨の影響が、雨水が土壌に浸透していく過程でなくなっていることを示しており、酸性雨に対する土壌の浄化効果が存在していることが示唆された。

3. 屋久島の細菌群集構造の定性的解析

次に、2001年8月、2002年1月の試料

について、サンプリングポイントに生息する細菌種レベルでの解析を行うために、16S rDNA クローンライブラリーを作成し、その塩基配列の解読を行い、その情報に基づき細菌群集構造の解析を行った。また、得られた形質転換体を DGGE および制限酵素処理をそれぞれ単独で用いてクラスター分類するという方法を取った。相同性検索の結果、Y1、Y2、Y3 のすべての採取地点から *Proteobacteria* が確認された。また、Y3 では *Proteobacteria* に加え、*Actinobacteria* といった division が見られた。データベースと 98% 以上の高い相同性を示すクローンはほとんど存在せず、90% から 98% の相同性を示したクローンの中うちの大半は、いまだ同定されていなく環境中から得られたことをしめす、environmental samples であった。また、これらの environmental samples 内の多くはデータベース上で培養法では検出できない菌、という分類がされていた。このことから、屋久島の細菌群集構造の特異性と未知の菌が存在する可能性が示唆された。

さらに、始原菌に注目して、同様にクローンライブラリーを作成し、解析を行った。またクラスター分類については、得られた形質転換体を制限酵素処理によって 1 次クラスターに分類し、DGGE でさらに細かくクラスター分類を行うという方法を取った。相同性検索の結果、針葉樹林、照葉樹林、亜熱帯性海岸林のいずれの地点からも硫黄代謝好熱菌などが属する Crenarchaeota が同定された。結果、硫黄代謝に関わる始原菌は温泉が湧出している沿岸地域だけではなく、屋久島原生林に広く分布することが示された。また、本章で用いたクラスター分類方法は、DGGE のみによる分類と比べて有効な手段であることが示された。

以上の結果から、屋久島は標高ごとに異なった植生を持っているが、土壌の細菌群集は植生から大きな影響を受けているのではなく、

その他の要因に影響を受け、島全体である程度安定した構造を形成していることが示された。

引用文献

- (1)湯本貴和著. 1995. 屋久島 巨木の森と水の島の生態学. 講談社. 13.
- (2)栗山浩一, 北島能房, 大島康行編著. 2000. 世界遺産の経済学 屋久島の環境価値とその評価. 勁草書房. 40-43.
- (3)服部勉著. 1998. 微生物を探る. 新潮選書
- (4)Xu,H-S., N.Roberts, F.L.Singleton, R.W.Attwell, D.J.Grimes, and R.R.Colwell. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb.Ecol.* 8: 313-323.
- (5)Colwell,R.R. 木暮一啓訳. 1999. 生きているが培養できない病原細菌に挑む. 科学. 69: 508-516
- (6)土壤微生物研究会編. 1998. 新・土の微生物(3) 遺伝子と土壌微生物. 博友社. 39-40.
- (7)Muyzer,G., S.Hottentrager, A.Teske, and C.Wawer. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.4.4.: 1-23.
- (8)Muyzer,G., and K.Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 127-141.
- (9)Gelsomino,A., A.C.Keijzer-Wolters, G.Cacco, and J.D.van Elsas. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by

- Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*. 38: 1-15.
- (10) Henckel, T., U. Jackel, S. Schnell, and R. Conrad. 2000. Molecular Analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1801-1808.
- (11) Miethling R., G. Wieland, H. Backhaus, and C. C. Tebbe. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbiol. Ecol.* 41: 43-56.
- (12) 谷佳津治, 山口進康, 那須正夫. 1997. 微生物生態学の手法にみる 90 年代の進展. *Microbes and Environments*. 12(2): 41-56.
- (13) 土壤微生物研究会編. 1998. 新・土の微生物(3) 遺伝子と土壤微生物. 博友社. 43-47.



図 1 サンプルングポイント

Y 1 : 針葉樹林帯	標高 1300 m	1301 : 標高 295 m
Y 2 : 照葉樹林帯	標高 400 m	1501 : 標高 1555 m
Y 3 : 亜熱帯性海岸林	標高 50 m	1601 : 標高 1886 m
Y 4 : 酸性雨地帯	標高 400 m	1602 : 標高 1780 m
		1603 : 標高 1680 m
		1604 : 標高 1640 m
		1701 : 標高 1380 m

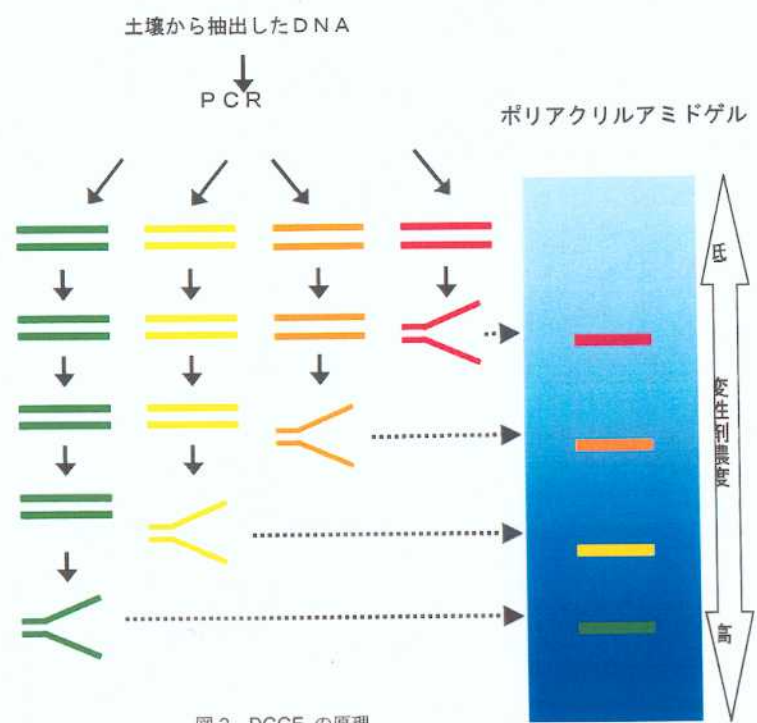


図 2 DGGE の原理

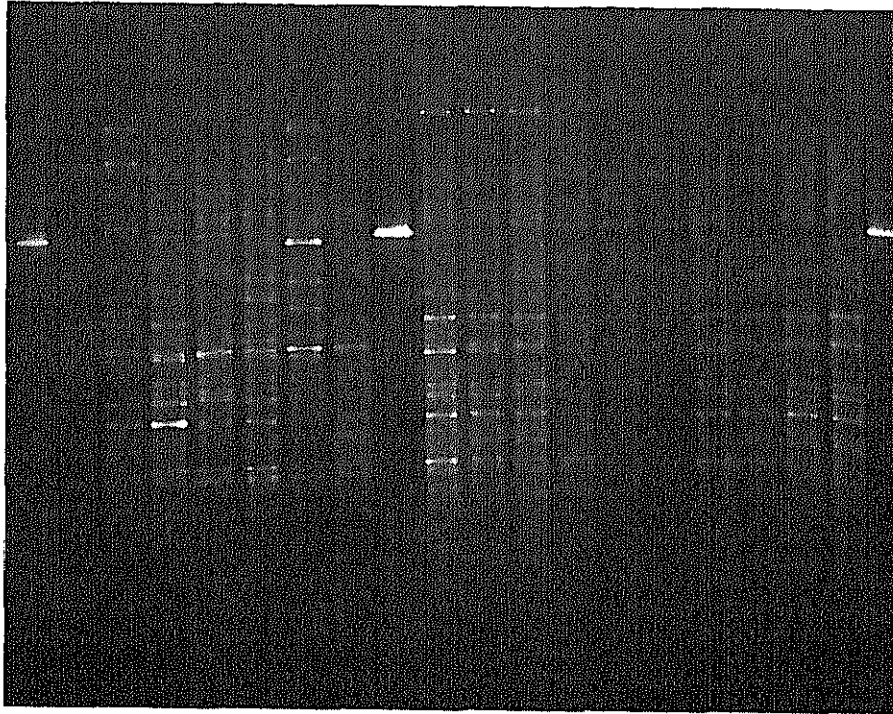


図 3 DGGE 泳動結果

レーン 2~8 : 2002 年 7 月, 1301~1701

レーン 10~12 : 2001 年 8 月, Y1,Y2,Y3

レーン 13~15 : 2002 年 1 月, Y1,Y2,Y3

レーン 16~19 : 2002 年 8 月, Y1,Y2,Y3,Y4

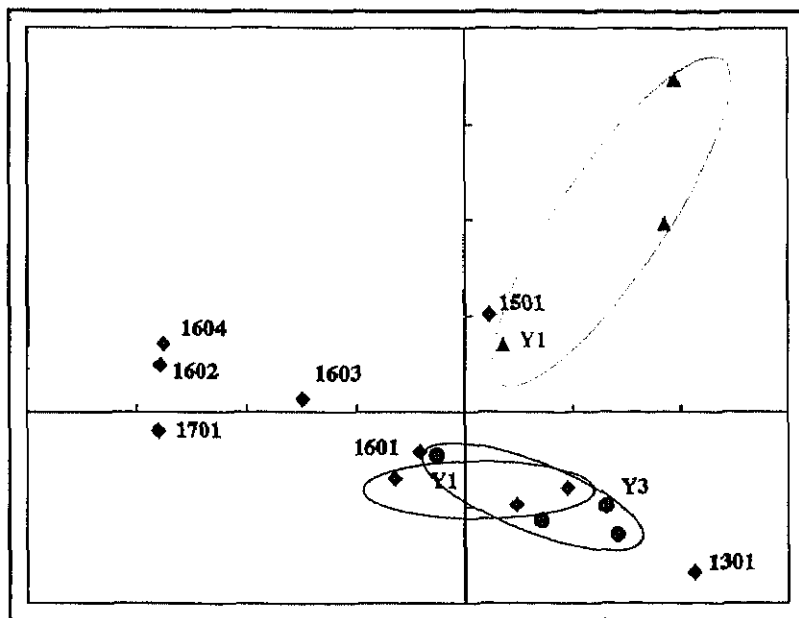


図 4 PCA による解析結果

DGGE バンドパターンを PCA (Principal Component Analysis) を用いて解析した結果を示した。

Y1、Y2、Y3 および Y4 は、それぞれ土壌試料採取場所である、Y1: 針葉樹林、Y2: 照葉樹林、Y3: 亜熱帯性海岸林、Y4: 酸性雨地帯を表し、図中の記号は以下に示したように採取時期を表す。

