

学 位 論 文 題 名

Community structure and activity of aerobic methane oxidizing bacteria in forest soils and freshwater lakes

(森林土壌および淡水湖沼における好気性メタン酸化細菌の群集構造と活性)

学位論文内容の要旨

好気性メタン酸化細菌 (MOB) は、メタンを酸素で酸化し、炭素源およびエネルギー源として利用できる細菌であり、メタンと酸素の両方を利用できる様々な環境に生息している。その性質により、MOB は地球の炭素循環において重要な役割を果たしていると考えられている。その役割の一つは、重要な温室効果ガスであるメタンの消費である。大気中のメタン濃度は、大気への放出と消費のバランスにより決まる。メタンは、湿地や湖沼の底泥などの嫌気的な環境においてメタン生成菌により生成される。この生成されたメタンの大半は、大気へ放出される前に好気的な環境において MOB により消費される。大気へ放出されたメタンは、成層圏において化学反応により分解されるが、森林や草原のような十分に好気的な土壌に生息する MOB によっても消費される。また、MOB を起点とした食物網も存在する。例えば湿原や湖沼においては、メタンを構成する炭素から MOB によって合成された有機物が、従属栄養生物の炭素源として重要な位置を占めるという例が報告されている。これらのことから、MOB の活性とその決定要因を知ることは、メタン動態、ひいては地球上の炭素循環の包括的な理解のために重要である。MOB の存在量はその場のメタン酸化活性に反映され、その生理学的特性は系統により異なる。したがって、環境中における MOB の存在量と群集構成 (MOB 群集構造) やその決定要因を知ることは、メタン酸化活性の決定要因を知るために重要である。また、MOB 群集を構成する系統から、その環境に対する応答についての知見も得ることができると期待される。これまで、様々な環境における MOB 群集構造が調べられてきたが、これらの多くは、綱レベルか属レベルでの解析が主であった。しかし、細菌の多くは、種以下のレベルでもその生理学的特性は異なる。したがって、本論文では、環境中の MOB 群集構造を種レベル以下の解像度で解析することにより、各種環境要因への応答について調査した。調査地は、そこに生息する MOB がメタン動態や地球上の炭素循環へ大きな影響を与えている、森林土壌および淡水湖沼である。MOB 群集構造は、16S rRNA 遺伝子や、主要なメタン酸化酵素である粒子性メタン酸化酵素の α サブユニットをコードする *pmoA* 遺伝子を対象とした手法により解析した。

第 2 章では、大気メタンの吸収源である森林土壌において調査を行った。森林生態系は、林床に植生が繁茂しており、その分布や密度は空間的に非常に不均一である。本章では、北海道の森林林床で幅広く繁茂しているササに注目した。林床にクマイザサが繁茂した針広混交林およびミズナラ林、チシマザサが繁茂したダケカンバ林およびチシマザサを除去したダケカンバ林の 4 つの調査地を選択した。これらの調査地において、土壌の大気メタン吸収速度および土壌中の MOB 群集構成を解析した。メタン吸収速度はクローズドチャンバー法により、MOB 群集構成は *pmoA* 遺伝子を対象にした PCR-DGGE 法 (PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) により解析した。その結果、ササ除去区において、ササが繁茂している調査地より 2 倍程度高い大気メタン吸収活性が見られた。また、MOB 群集構成は、林床植生が共通している混交林とミズナラ林では同様であったが、他の調査地間では異なっていた。ここで検出された *pmoA* 遺伝子はいずれも、陸上土壌における大気メタン消費を主に担っていると考えられている属レベルの系統 (USC α) に属していた。メタン吸収

活性および MOB 群集構成の調査地間の違いと、土壌の温度、含水率、pH および灼熱減量の間で関連性は見られなかった。以上の結果から、ササにより土壌中の MOB 活性が抑制されている可能性が示唆された。また、MOB 群集構成は、林冠植生ではなくササの種類の影響を強く受けて決定づけられていることが示唆された。

第 3 章では、部分循環湖である淡水ダム湖において調査を行った。一般に部分循環湖の深層は年間を通じて嫌氣的であり、全層が淡水の場合には深層の湖水中にはメタンが蓄積されている。この深層部のメタンの大部分は、大気へ放出される前に好氣的な湖水中の MOB により消費される。本章では、様々な季節において、各水深における MOB の優占度および群集構成を解析した。MOB の優占度は、定量 PCR 法により決定した *pmoA* 遺伝子と全バクテリアの 16S rRNA 遺伝子のコピー数の比率として求めた。MOB の 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 法により MOB 群集構成の鉛直プロファイル調べ、代表的な深度において *pmoA* 遺伝子対象のクローニング法を用いてその構成をより詳細に解析した。その結果、MOB は、酸素とメタンが同時に多く供給されている好気 - 嫌気境界層付近で最も優占していた。この水深付近では、メタンの炭素安定同位体比およびメタン濃度から、活発なメタン酸化が起きていると推測された。また、好気層におけるメタン極大層においても MOB 優占度のピークが見られた。DGGE 法およびクローニング法により得られた配列の大半は *Methylobacter* 属であったが、その構成は深度により異なっていた。DGGE バンドパターンは、温度や酸素濃度の変動に伴って垂直的に変化していた。以上の結果から、湖水中の MOB の活性および存在量は、酸素とメタンの両方により決定づけられていることが示唆された。また、MOB 群集構成は、温度や酸素濃度によって決定づけられていることが示された。

第 4 章では、水面から底泥表面まで好氣的な淡水湖沼の底泥において調査を行った。この湖の水深の異なる 2 地点において、底泥の好氣的な表層から嫌氣的な深層にかけて、潜在的な好氣的メタン酸化活性、*pmoA* 遺伝子のコピー数および MOB 群集構成を解析した。メタン酸化活性は、十分に好氣的な条件下でのメタン消費速度とした。*pmoA* 遺伝子コピー数は、定量 PCR 法により決定した。群集構成は、MOB の 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 法により解析した。その結果、いずれの地点においても潜在的なメタン酸化活性は深くなるにつれて減少していた。一方で、*pmoA* 遺伝子コピー数は、好氣的な表層よりも嫌氣的な深層の方が多かった。MOB 群集は *Methylobacter* 属により構成されており、地点間および深度間で優占する系統に違いは見られなかったが、一部の系統の相対量に違いが見られた。これらの結果から、嫌氣的な底泥深層に存在する MOB の遺伝子は、その場でメタンを酸化している MOB 群集ではなく、過去に好氣的な表層において増殖し嫌氣的な深層に埋没した MOB 群集に由来すると考えられた。一つの属により構成された MOB 群集構成の違いは、地点間や過去の環境要因の違いによってもたらされていることが推測された。

本論文で、環境中の MOB 群集の活性や構造は、様々な環境要因により決定づけられていることが示された。そして、MOB の自然環境中における生理生態学的特性は、種以下のレベルで異なることが示唆された。本論文は、MOB 群集構造を調べる際に綱や属よりも低いレベルで解析することの重要性を示している。本論文で示された MOB 群集と環境要因との関連性は、他の調査地での MOB 群集を調査する上で有用な情報となるだろう。今後、森林土壌や淡水湖沼だけではなく様々な生態系の MOB 群集構造をよりで細かな系統で調べることで、MOB 群集の環境への応答についての新たな知見を得ることができよう。このことは、地球上の炭素循環についての理解を深めることに繋がると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 井 学

副 査 教 授 森 川 正 章

副 査 准教授 笠 原 康 裕

副 査 助 教 小 島 久 弥

学 位 論 文 題 名

Community structure and activity of aerobic methane oxidizing bacteria in forest soils and freshwater lakes

(森林土壌および淡水湖沼における好気性メタン酸化細菌の群集構造と活性)

好気性メタン酸化細菌 (MOB) は、メタンを酸素で酸化し、炭素源およびエネルギー源として利用できる細菌であり、メタンと酸素の両方を利用できる様々な環境に生息している。その性質により、MOBは地球の炭素循環において重要な役割を果たしていると考えられている。その役割の一つは、重要な温室効果ガスであるメタンの消費である。大気中のメタン濃度は、大気への放出と消費のバランスにより決まる。メタンは、湿地や湖沼の底泥などの嫌気的な環境においてメタン生成菌により生成される。この生成されたメタンのお大半は、大気へ放出される前に好気的な環境においてMOBにより消費される。これらのことから、MOBの活性とその決定要因を知ることは、メタン動態、ひいては地球上の炭素循環の包括的な理解のために重要である。MOBの存在量はその場のメタン酸化活性に反映され、その生理学的特性は系統により異なる。したがって、環境中におけるMOBの存在量と群集構成 (MOB群集構造) やその決定要因を知ることは、メタン酸化活性の決定要因を知るために重要である。また、MOB群集を構成する系統から、その環境に対する応答についての知見も得ることができると期待される。これまで、様々な環境におけるMOB群集構造が調べられてきたが、これらの多くは、綱レベルか属レベルでの解析が主であった。しかし、細菌の多くは、種以下のレベルでもその生理学的特性は異なる。したがって、本論文では、環境中のMOB群集構造を種レベル以下の解像度で解析することにより、各種環境要因への応答について調査した。調査地は、そこに生息するMOBがメタン動態や地球上の炭素循環へ大きな影響を与えている、森林土壌および淡水湖沼である。MOB群集構造は、16S rRNA遺伝子や、主要なメタン酸化酵素である粒子性メタン一酸化酵素の α サブユニットをコードする*pmoA* 遺伝子を対象とした手法により解析した。

第2章では、大気メタンの吸収源である森林土壌において調査を行った。本章では、北海道の森林林床で幅広く繁茂しているササに注目した。ササ除去区において、ササが繁茂している調査地より2倍程度高い大気メタン吸収活性が見られた。また、MOB群集構成は、林床植

生が共通している混交林とミズナラ林では同様であったが、他の調査地間では異なっていた。以上の結果から、ササにより土壤中のMOB活性が抑制されている可能性が示唆された。また、MOB群集構成は、林冠植生ではなくササの種類の影響を強く受けて決定づけられていることが示唆された。

第3章では、部分循環湖である淡水ダム湖において調査を行った。一般に部分循環湖の深層は年間を通じて嫌氣的であり、全層が淡水の場合には深層の湖水中にはメタンが蓄積されている。本章では、様々な季節において、各水深におけるMOBの優占度および群集構成を解析した。その結果、MOBは、酸素とメタンが同時に多く供給されている好気-嫌気境界層付近で最も優占していた。この水深付近では、メタンの炭素安定同位体比およびメタン濃度から、活発なメタン酸化が起きていると推測された。DGGE法およびクローニング法により得られた配列の大半は*Methylobacter*属であったが、構成パターンは、温度や酸素濃度の変動に伴って垂直的に変化していた。以上の結果から、湖水中のMOBの活性および存在量は、酸素とメタンの両方により決定づけられていることが示唆された。また、MOB群集構成は、温度や酸素濃度によって決定づけられていることが示された。

第4章では、水面から底泥表面まで好氣的な淡水湖沼の底泥において調査を行ったところ、嫌氣的な底泥深層に存在するMOBの遺伝子は、その場でメタンを酸化しているMOB群集ではなく、過去に好氣的な表層において増殖し嫌氣的な深層に埋没したMOB群集に由来すると考えられた。一つの属により構成されたMOB群集構成の違いは、地点間や過去の環境要因の違いによってもたらされていることが推測された。

本論文で、環境中のMOB群集の活性や構造は、様々な環境要因により決定づけられていることが示された。そして、MOBの自然環境中における生理生態学的特性は、種以下のレベルで異なることが示唆された。本論文は、MOB群集構造を調べる際に綱や属よりも低いレベルで解析することの重要性を示している。本論文で示されたMOB群集と環境要因との関連性は、他の調査地でのMOB群集を調査する上で有用な情報となるだろう。今後、森林土壌や淡水湖沼だけではなく様々な生態系のMOB群集構造をよりで細かな系統で調べることで、MOB群集の環境への応答についての新たな知見を得ることができよう。このことは、地球上の炭素循環についての理解を深めることに繋がると期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。