

第3章 水田土壌において嫌氣的プロピオン酸酸化に関わる栄養共生細菌の計数

第1節 要約

水田土壌に生息する栄養共生プロピオン酸酸化細菌の経時的計数および優占種の推定を試みた。水田土壌は平成20年4月、6月、7月、8月、11月の5回、落水期と湛水期を含む時期に採取した。計数には水素消費パートナーとして基質利用性の異なる3種類のメタン生成古細菌 (*Methanobacterium kanagiense* 169 菌株、*Methanobacterium formicicum* FR-3 菌株、*Methanospirillum hungatei* SR-20 菌株) を使用した。経時的な計数の結果、使用した菌株の違いによる計数値の著しい差異は観察されなかった。4月から7月にかけて計数値は増加し、最大で約 10^8 cells/g 乾土に達した後、8月以降は減少する傾向が観察された。PCR-DGGE 解析により優占する細菌種の特異性を試みた結果、*Pelotomaculum*、*Syntrophobacter*、*Smithella* の細菌が多く検出された。*Pelotomaculum* に近縁な配列は相対性が97%を超える配列が多くを占め、既知の細菌に近縁な細菌が検出される傾向が観察された。 δ -*Proteobacteria* に属する配列は新規性の高い配列が多くを占め、未分離の多様な細菌が栄養共生プロピオン酸酸化に関与している可能性を示唆した。

PCR-DGGE 解析において、水素消費パートナーがバンドパターンに与える影響を検討したが明確な傾向は観察されなかった。

第2節 序論

水田土壌においてメタン生成菌との水素/蟻酸の種間転移によって栄養共生的なプロピオン酸酸化を行うプロピオン酸酸化細菌の生態は殆ど明らかにされていない。栄養共生的に増殖する *Pelotomaculum* 属の細菌を含む *Desulfotomaculum* lineage I に属する細菌の RT-PCR 解析では、水田土壌には乾燥土壌 1g あたり約 10^7 個の細胞が検出されている (Stubner, 2002)。水田土壌における MPN 法を用いた計数はポット栽培の土壌を用いた一例のみであり (N. Krylova, R. Conrad et al., 1997)、実際の圃場における計数や経時的な計数は行われていない。栄養共生プロピオン酸酸化細菌の培養法を用いた計数には MPN 法が使用されているが、段階希釈により水素/蟻酸消費パートナーも希釈されるため、特に高次希釈において栄養共生プロピオン酸酸化細菌の生育が抑制されると推察される。そこであらかじめメタン生成古細菌などの水素/蟻酸消費パートナーを添加して計数が行われる。栄養共生プロピオン酸酸化では特に蟻酸転移が有利であると考えられている (D. R. Boone, Y. Liu et al., 1989) が、実際に水田土壌中で蟻酸転移が働いているかは明らかではなく、計数に用いる水素消費パートナーの蟻酸利用性の影響について詳細な検討は行われていない。

本研究では、水田土壌に生息する栄養共生プロピオン酸酸化細菌の生態に関する知見を

得るため、MPN 法による経時的な計数を行った。計数には水田土壌由来のメタン生成古細菌を水素消費パートナーとして使用し、水素／蟻酸資化性が計数に及ぼす影響も調べた。また PCR-DGGE 法を用いて、培養可能な栄養共生プロピオン酸酸化細菌の優占種の推定を試みた。

第 3 節 材料と方法

1. 培養方法と試料採取

1-1. 使用培地および使用菌株

MPN 計数の培養には、上述した方法に従ってミネラル培地を使用し培養した。計数には *Methanobacterium kanagiense* 169 菌株、*Methanobacterium formicicum* FR-3 菌株、*Methanospirillum* sp. SR-20 菌株を水素消費パートナーとして使用した。

1-2. 土壌の採取、前処理と保存、土壌管理と採取日

水田土壌は弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育研究センターの水田から平成 20 年 4 月、6 月、7 月、8 月、11 月の 5 回、落水期と湛水期を含む時期に採取した (図 3-1)。水田土壌は約 10cm の深さまで表層の土壌を除き、出来る限り水稻根や植物遺体を含まないようにして 3 箇所から採取した。採取した土壌はチャック付きポリ袋に詰め、出来る限り空気が入らないようにして密閉し持ち帰った。3 箇所から採取した土壌をそれぞれ等量ずつよく混合し、2mm 幅の目の篩を通して粗大な有機物を除き、計数用の試料とした。土壌試料はチャック付きポリ袋に詰め、出来る限り空気が入らないようにして密閉し使用まで 4℃以下で保存した。

2. 土壌の分析 (水分や全炭素、全窒素分析)

2-1. 土壌の水分含量の測定

土壌サンプルは粗大な有機物を除くため 2mm 幅の目の篩にかけたものを使用した。秤量ビンに 1g 程度土壌を加えて正確に重量を測定した後、ふたを開けたまま、105℃で、12 時間以上乾燥させた。デシケーターにて 30 分間放熱した後、秤量ビンのふたを閉めて、重量を正確に測定した。再度 2 時間乾燥させ、完全に乾燥し重量に変化がないことを確認した後、測定結果から水分含量を算出した。

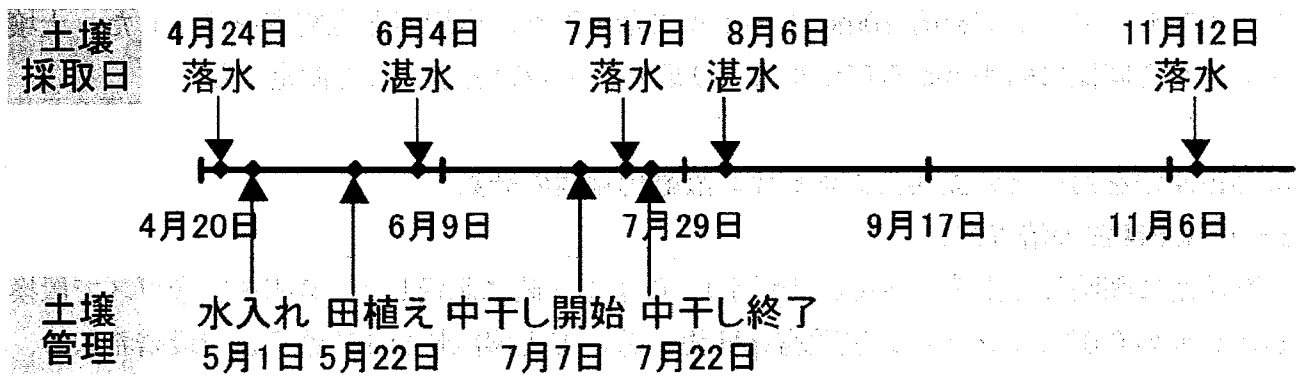


図 3-1.平成 20 年土壌採取日および水管理と土壌管理

2-2. 土壌 pH の測定

土壌 10g を 50ml 容ビーカーにとり、1N KCl を 25ml 加え、ガラス棒にて攪拌し、室温に 30 分以上放置した後、pH メーター (pH METER M-11, HORIBA) を用いて pH を測定した。同様の操作で、溶媒を H₂O にした場合も測定した。

2-3. 土壌中の全窒素および全炭素の測定

土壌は風乾し、2mm のふるいにかけて後に、メノウ乳鉢で細かく粉砕し水分含量を測定した。N・C アナライザー (AUTOMATIC HIGH SENSITIVE N・C-ANALYZER SUMIGRAPH NC-90A, SUMIKA CHEMICAL ANALYSIS SERVICE, LTD) で、スタンダードとしてアセトアニリドを約 10mg 石英セルに量り取り、全炭素と全窒素を測定した。土壌サンプルを同様に約 15mg 石英セルに量り取り、全炭素と全窒素を測定した。

3. MPN 法を用いた栄養共生プロピオン酸酸化細菌の計数

3-1. MPN 法の培養方法

計数用に調整した土壌試料を約 1g 測り、重量を正確に記録した。気相を窒素ガスで置換した 9ml の 0.03% システイン塩酸塩 (pH 約 7.0) にて土壌試料を 10⁷ 希釈まで段階希釈し、土壌試料希釈液とした。栄養共生プロピオン酸酸化細菌の生育を支持するため、水田土壌から分離した 3 種類のメタン生成古細菌を水素+二酸化炭素を基質として前培養し、水素消費パートナーとして使用した。ただし 4 月採取土壌試料では水素消費パートナーとして 169 菌株のみを使用した。土壌試料希釈液は、基質として 20mM プロピオン酸ナトリウムを含む水素消費パートナーの培養液 10ml に対して 1ml ずつ接種し 30℃、暗所で静置培養を開始した。培養はそれぞれ 3 連で行った。

3-2. メタン生成古細菌の種類と前培養

MPN 法を用いた計数には 169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株を水素消費パートナーとして使用した。各菌株の前培養は、培地にあらかじめ基質 (20mM プロピオン酸ナトリウム) を添加した点を除いては第 2 章に記載した方法に従って行った。

3-3. TCD ガスクロマトグラフおよび HPLC 測定による陽性の判定と計数値の算出

MPN の培養液は、Krylova ら (N. Krylova, R. Conrad et al., 1997) の報告に従い 0.05% 以上のメタンの生成、および酢酸の生成を確認することで陽性と判定した。気相のメタンは TCD ガスクロマトグラフを用いて測定し、液相の酢酸は HPLC を用いて測定した (表 3-1)。TCD ガスクロマトグラフを用いた気相の分析は上述した方法に従って行った。

表 3-1. HPLC 測定条件

高速液体クロマトグラフ : LC-6A LIQUID CHROMATOGRAPH 1, 2

(島津製作所株式会社)

脱気ユニット : DGU-12 DEGASSER (島津製作所株式会社)

検出器 : CDD-10AVP CONDUCTIVITY DETECTOR (島津製作所株式会社)

カラムオーブン : CTO-10A COLUMN OVEN (島津製作所株式会社)

インテグレーター : C-R6A CHOMATOPAC (島津製作所株式会社)

カラム : Shim-pack SCR-101H (300 mm×7.9 mm.i.d)

ガードカラム : Shim-pack SCR(H)(50 mm×7.8 mm.i.d)

分離温度 : 40 °C

流速 : 0.8 ml / min

移動相 : 4 mM p-トルエンスルホン酸

< 検出条件 >

反応液 : 4 mM p-トルエンスルホン酸及び 100 μ M EDTA を含む 16 mM Bis-tris 水溶液

流速 : 0.8 ml / min

検出 : polarity : +, response : SLOW, temperature : 43

scale : 1×24 μ S / cm (標準状態)

4. 陽性試験管の PCR-DGGE 解析

MPN 陽性試験管の高次希釈培養液には、培養可能な栄養共生プロピオン酸酸化細菌のうち優占種が増殖していると考えられるため、PCR-DGGE 解析を行い優占種の推定を行った。ただし最高次希釈液はメタン生成、酢酸生成ともに非常に僅かであり、栄養共生細菌の細胞数も少ないと予想されたことから、最高次希釈培養液の一段階低次の培養液からサンプリングを行い、PCR-DGGE 解析に供した。

4-1. DGGE および DGGE バンドの塩基配列の決定

DGGE 解析は上述した方法に従って行った。ただし栄養共生細菌を特異的に検出するため、使用するプライマーセットの検討を行った。

4-2. DGGE 用プライマーセットの検討

既知の栄養共生プロピオン酸酸化細菌である *Syntrophobacter* 属や *Smithella* 属を含む δ -*Proteobacteria* に特異的なプライマー DSBAC355f(Scheid & Stubner, 2001)、*Pelotomaculum* 属を含む *Desulfotomaculum* lineage I サブクラスター lh に特異的なプライマー DEM116f/DEM1164r(Stubner & Meuser, 2000)(表 3-2)を使用した。 δ -*Proteobacteria* に特異的なプライマー DSBAC355f には GC クランプを付加し、DSBAC355f-GC として 534r とのプライマーペアで PCR 増幅を行った。*Desulfotomaculum* lineage I サブクラスター lh の細菌 16S rRNA 遺伝子配列を増幅する場合には、まず DEM116f/DEM1164r プライマーペアで PCR 増幅を行い、MagExtractorTM-PCR & Gel Clean up-キット(東洋紡ライフサイエンス)を用いて増幅産物を精製し、続いて精製 DNA 約 1ng を鋳型としてユニバーサルプライマー 341f-GC/534r で nested PCR を行った。

表 3-2. DGGE 解析に使用したプライマーセット

プライマー名	配列(5'-3')	標的	参考文献
341f-GC	GC clump cc tac ggg agg cag cag	全細菌	1
534r	att acc gcg gct gct gg		
DSBAC355f-GC	GC clump cag tga gga att ttg cgc	<i>Syntrophobacter</i> , <i>Smithella</i> を含む δ - <i>Proteobacteria</i>	2 を改変
DEM116f	gta acg cgt gga taa cct	<i>Pelotomaculum</i> を含む	3
DEM1164r	cct tcc tcc gtt ttg tca	<i>Desulfotomaculum</i> lineage 1	

GC clump: cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg g

1: Muyzer et al., 1993 , 2: D. Sheid, S. stubner, 2001 , 3: S. Stubner, K. Meuser, 2000

第4節 結果

1. 土壌分析

全窒素、全炭素、土壌 pH の測定結果を表 3-3 に示した。土壌の全窒素含量は 10.275% ~11.997% の間で変動した。落水期の 4 月、7 月に低下する傾向が観察されたが、年間を通して大きな変化は見られなかった。全炭素含量 4.27%~4.46% の間で変動し、6 月、7 月にやや増加する傾向を示したが、年間を通して大きな変化は観察されなかった。C/N 比は 0.356~0.431 の間で変動し、7 月に最大値を示した。pH(KCl)、pH(H₂O) はそれぞれ 4.11 ~4.3、4.5~5.36 の範囲で変動したが、いずれも 4 月から 6 月にかけて上昇し、その後低下する傾向が観察された。

2. 異なる水素消費パートナーを用いた MPN 計数

計数には水素消費パートナーとして基質利用性の異なる 3 種類のメタン生成古細菌 (*Methanobacterium kanagiense* 169 菌株、*Methanobacterium formicicum* FR-3 菌株、*Methanospirillum hungatei* SR-20 菌株) を使用したが、経時的な計数の結果、7 月 SR-20 菌株の計数値を除いて使用した菌株の違いによる計数値に著しい差異は観察されなかった。4 月から 7 月にかけて計数値は増加し、最大で約 10⁸ cells/g 乾土に達した後、8 月以降は減少する傾向が観察された (図 3-2)。

3. MPN 高次希釈培養液の PCR-DGGE 解析

3-1. 採取時期および水素消費パートナーごとの DGGE 解析

4、6、7、8 月 MPN の陽性試験管のうち最高次希釈では第一段階目の PCR では増幅が確認できず、nested PCR を行うことで初めて PCR 増幅が確認されたが、DGGE 解析の結果プロピオン酸酸化細菌に近縁な配列は検出されなかった。そこで nested PCR の第一段階目で増幅の確認された試験管について PCR-DGGE 解析を行った。4 月 DGGE では 169 菌株のみを水素消費パートナーとして使用したが、3 連の試験管の間で類似性は観察されなかった。*Desulfotomaculum lineage I* を標的としたプライマーセット DEM116f/1164r および δ -*Proteobacteria* の *Desulfobacteriaceae* を標的としたプライマー DSBAC355f を用いた場合、全細菌用プライマーによるバンドパターンと比較してより少ないバンドに限定されるか、全細菌プライマーで検出されなかったバンドが検出される傾向が観察された。6、7、8 月 MPN においても同様の傾向が観察された。

4 月、6 月 MPN では比較的多様なバンドパターンを示す傾向が観察された (図 3-3~3-6) のに対し、7 月、8 月 MPN ではより単純なバンドパターンが検出された (図 3-7~3-10)。特に 7 月 MPN の DEM116f/1164r によるバンドは水素消費パートナーの種類が異なっても非常に類似したバンドが検出され、8 月も同様の傾向が観察された。DSBAC355f を用いた場合では DEM116f/1164r によるバンドパターンと比較してより数が多く、複雑化

する傾向を示した。

2010年		2011年		2012年	
件数	割合	件数	割合	件数	割合
10	10.0%	10	10.0%	10	10.0%
20	20.0%	20	20.0%	20	20.0%
30	30.0%	30	30.0%	30	30.0%
40	40.0%	40	40.0%	40	40.0%
50	50.0%	50	50.0%	50	50.0%

表 3-3. 土壌 pH、全窒素、全炭素の測定結果

採取時期	全窒素(%)	全炭素(%)	C/N 比	pH(KCl)	pH(H ₂ O)
4 月	10.745	4.291	0.399	4.15	5.08
6 月	11.572	4.455	0.385	4.30	5.36
7 月	10.275	4.428	0.431	4.28	5.05
8 月	11.606	4.297	0.370	4.15	4.75
11 月	11.997	4.270	0.356	4.11	4.50

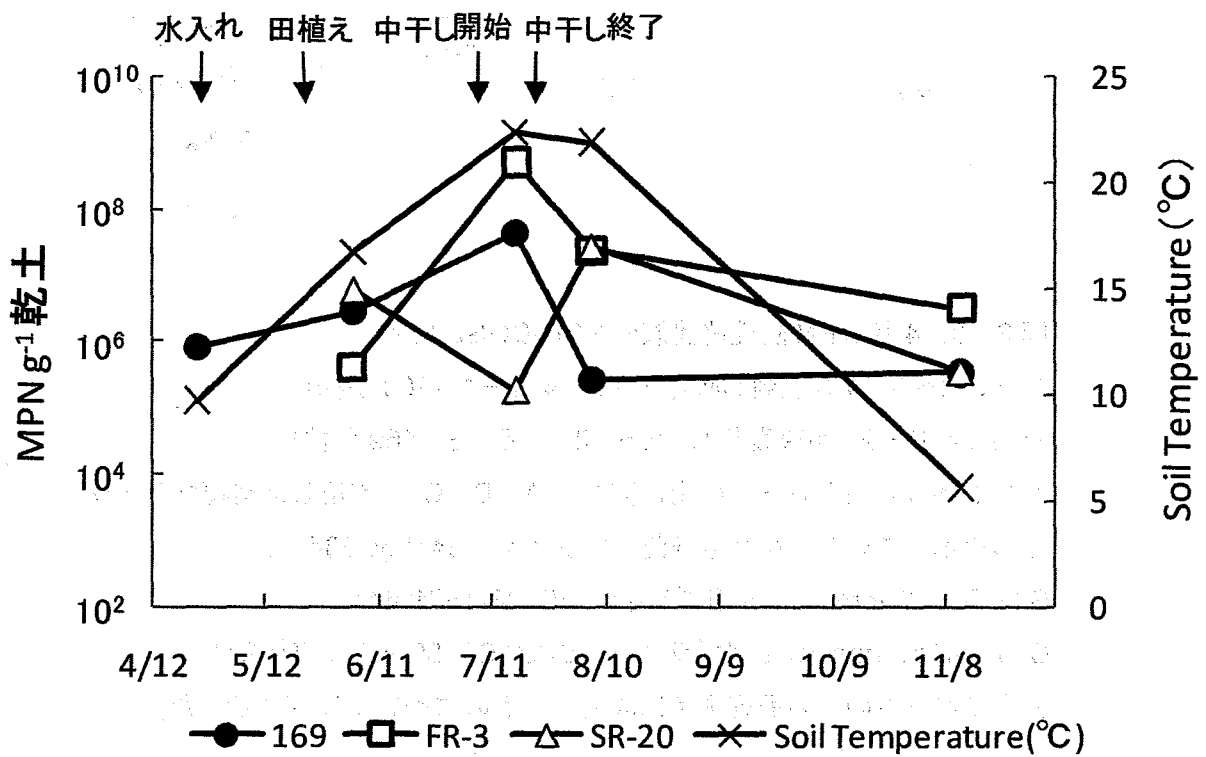


図 3-2. 異なる水素消費パートナーを用いた栄養共生プロピオン酸酸化細菌の経時的計数

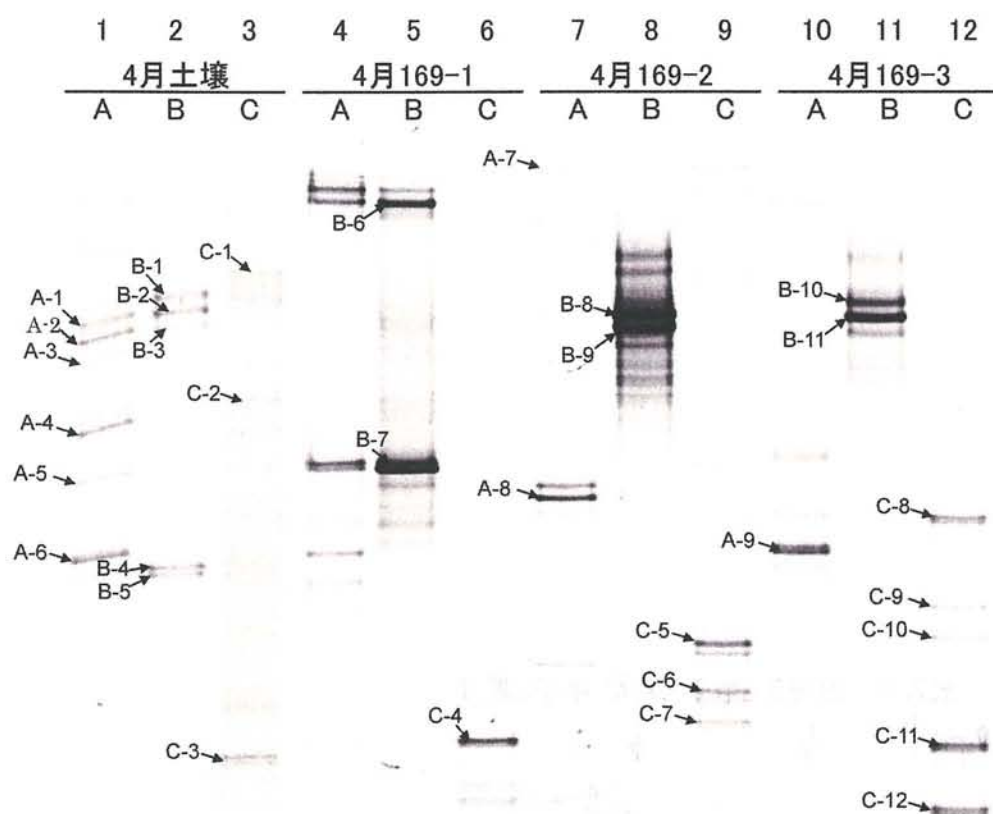


図3-3. 4月 MPN 陽性培養液の PCR-DGGE 解析

レーン 1~3 : 4 月土壌 DNA、4~6 : 4 月-1 (169 菌株)

7~9 : 4 月-2 (169 菌株)、10~12 : 4 月-3 (169 菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記した A、B、C は使用した増幅プライマーの種類を示している。A は全細菌用プライマー-341f-gc/534r、

B は *Desulfotomaculum* 用プライマー-DEM116f/1164r、

C は δ -*Proteobacteria* 用プライマー-DSBAC355f をそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
A-8	4-169-0312-2	C-4	4-169-DSB-1
A-9	4-169-0312-3	C-7	4-169-DSB-2
B-7	4-169-DEM-1	C-8	4-169-DSB-3
B-8	4-169-DEM-3	C-11	4-169-DSB-4
B-9	4-169-DEM-4	C-12	4-169-DSB-5
B-11	4-169-DEM-5		

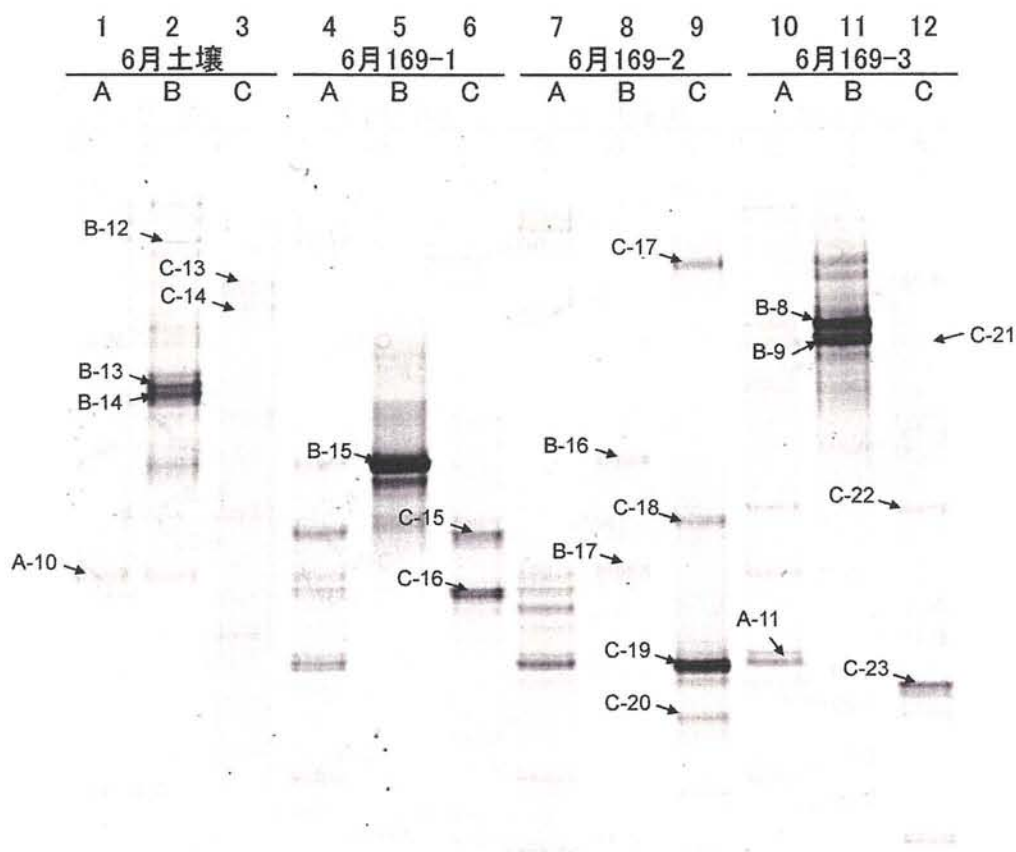


図3-4. 6月MPN陽性培養液のPCR-DGGE解析

レーン1~3: 6月土壌DNA、4~6: 6月-1 (169菌株)、

7~9: 6月-2 (169菌株)、10~12: 6月-3 (169菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記したA、B、Cは使用した増幅プライマーの種類を示している。Aは全細菌用プライマー341f-gc/534r、

Bは*Desulfotomaculum*用プライマーDEM116f/1164r、

Cは δ -*Proteobacteria*用プライマーDSBAC355fをそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
B-8	4-169-DEM-3	B-15	6-169-DEM-5
B-9	4-169-DEM-4	C-15	6-169-DSB-6
B-13	6-169-DEM-47	C-19	6-169-DSB-G24
B-14	6-169-DEM-42	C-23	6-169-DSB-18

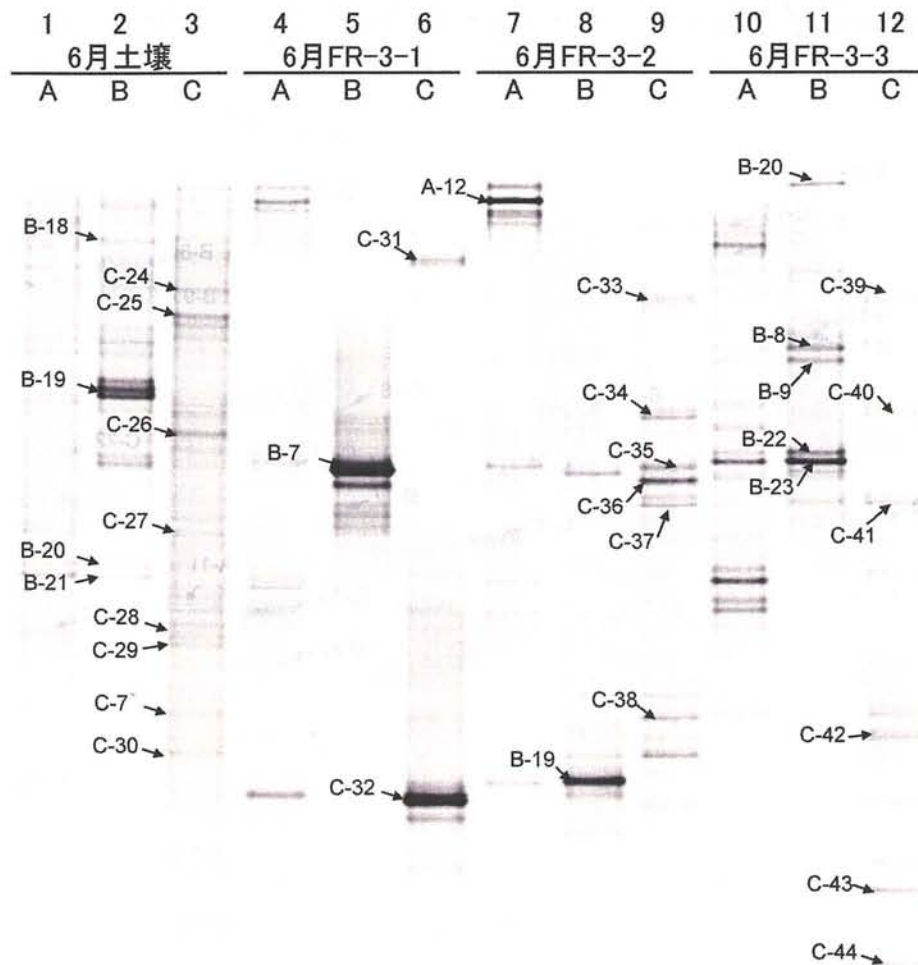


図 3-5. 6 月 MPN 陽性培養液の PCR-DGGE 解析

レーン 1~3 : 6 月土壌 DNA、4~6 : 6 月-1 (FR-3 菌株)、

7~9 : 6 月-2 (FR-3 菌株)、10~12 : 6 月-3 (FR-3 菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記した A、B、C は使用した増幅プライマーの種類を示している。A は全細菌用プライマー 341f-gc/534r、B は *Desulfotomaculum* 用プライマー DEM116f/1164r、C は δ -*Proteobacteria* 用プライマー DSBAC355f をそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
B-7	4-169-DEM-1	C-32	6-FR3-DSB-23
B-15	6-169-DEM-5	C-36	6-FR3-DSB-G16
C-7	4-169-DSB-2	C-38	6-FR3-DSB-29
C-30	6-FR3-DSB-30		

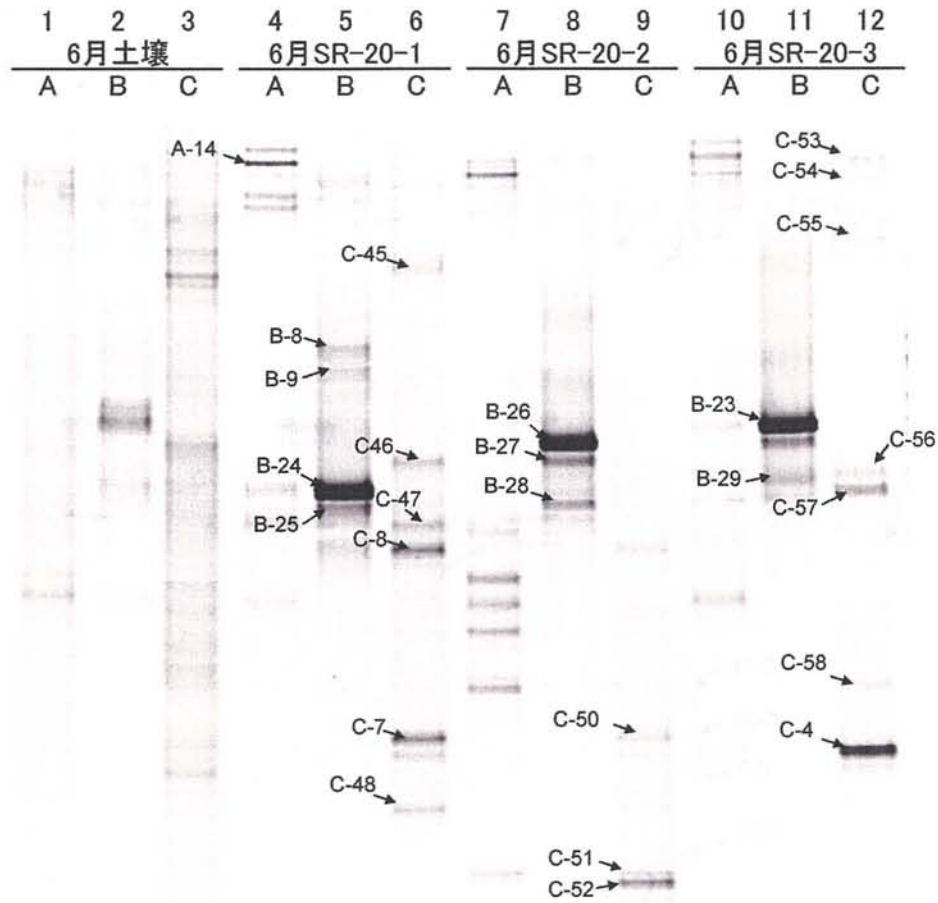


図 3-6. 6 月 MPN 陽性培養液の PCR-DGGE 解析

レーン 1~3 : 6 月土壤 DNA、4~6 : 6 月-1 (SR-20 菌株)、

7~9 : 6 月-2 (SR-20 菌株)、10~12 : 6 月-3 (SR-20 菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記した A、B、C は使用した増幅プライマーの種類を示している。A は全細菌用プライマー-341f-gc/534r、

B は *Desulfotomaculum* 用プライマー-DEM116f/1164r、

C は δ -*Proteobacteria* 用プライマー-DSBAC355f をそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
B-8	4-169-DEM-3	C-4	4-169-DSB-1
B-9	4-169-DEM-4	C-7	4-169-DSB-2
B-23	6-SR20-DEM-47	C-52	6-SR20-DSB-G49
B-24	6-SR20-DEM-38	C-56	6-SR20-DSB-49
B-26	6-SR20-DEM-42		

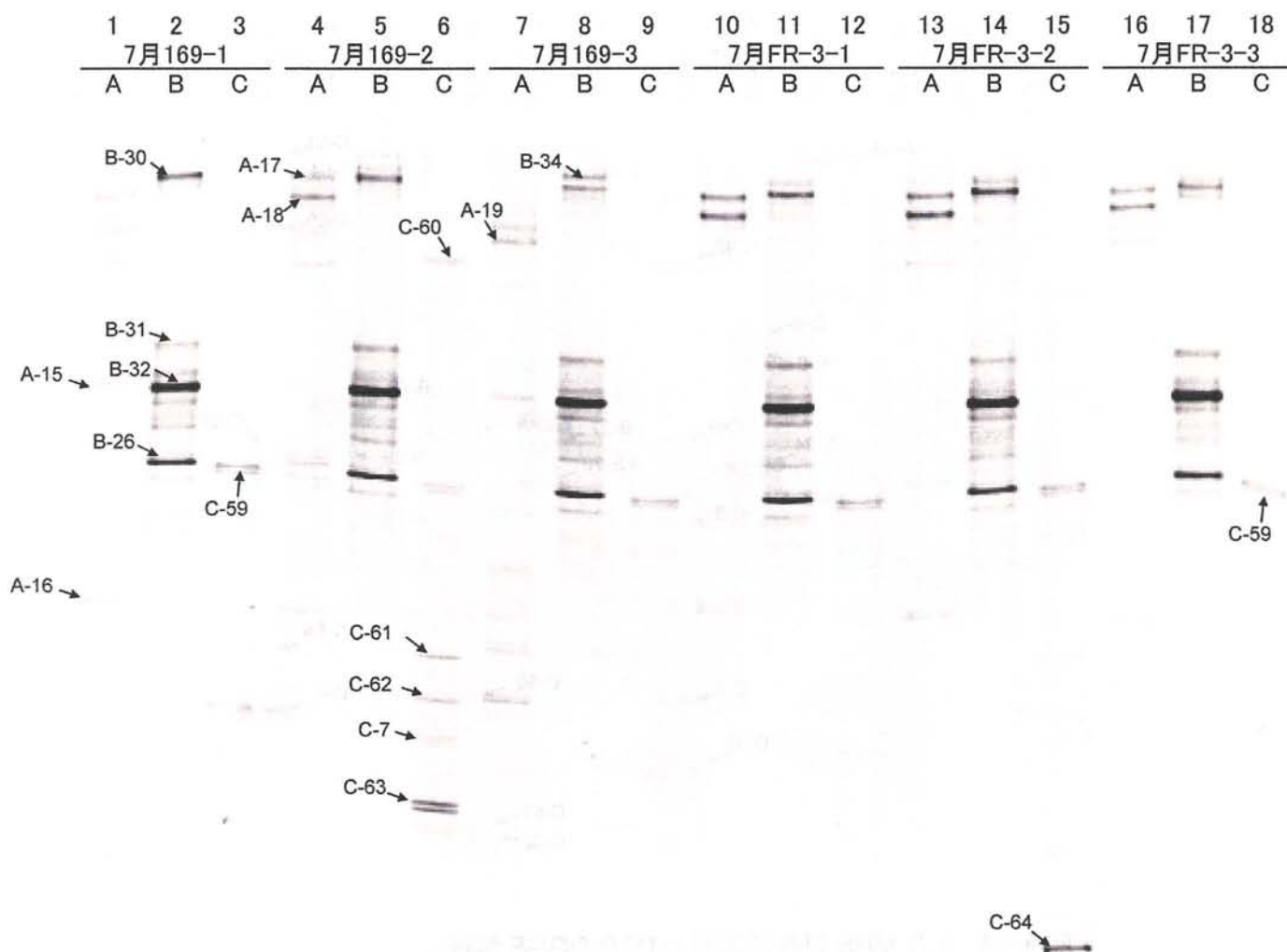


図 3-7. 7月 MPN 陽性培養液の PCR-DGGE 解析

レーン 1~3 : 7月-1 (169 菌株)、4~6 : 7月-2 (169 菌株)、

7~9 : 7月-3 (169 菌株)、10~12 : 7月-1 (FR-3 菌株)、

13~15 : 7月-2 (FR-3 菌株)、16~18 : 7月-3 (FR-3 菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記した A、B、C は使用した増幅プライマーの種類を示している。

A は全細菌用プライマー 341f-gc/534r、B は *Desulfotomaculum* 用プライマー DEM116f/1164r、

C は δ -*Proteobacteria* 用プライマー DSBAC355f をそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
B-26	6-SR20-DEM-42	C-59	7-169-DSB-8
B-32	7-169-DEM-3	C-63	7-169-DSB-12
C-7	4-169-DSB-2		

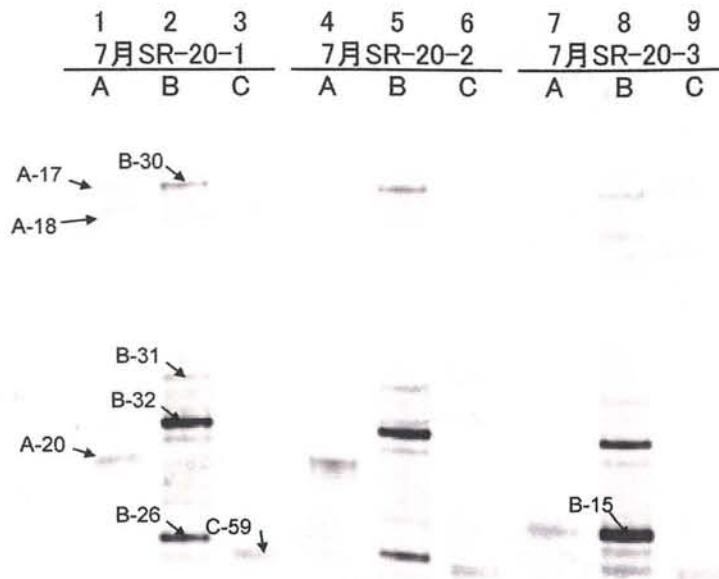


図 3-8. 7 月 MPN 陽性培養液の PCR-DGGE 解析

レーン 1~3 : 7 月-1 (SR-20 菌株)、

4~6 : 7 月-2 (SR-20 菌株)、

7~9 : 7 月-3 (SR-20 菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記した A、B、C は使用した増幅プライマーの種類を示している。A は全細菌用プライマー 341f-gc/534r、

B は *Desulfotomaculum* 用プライマー DEM116f/1164r、

C は *δ-Proteobacteria* 用プライマー DSBAC355f をそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
B-15	6-169-DEM-5	B-32	7-169-DEM-3
B-26	6-SR20-DEM-42	C-59	7-169-DSB-8

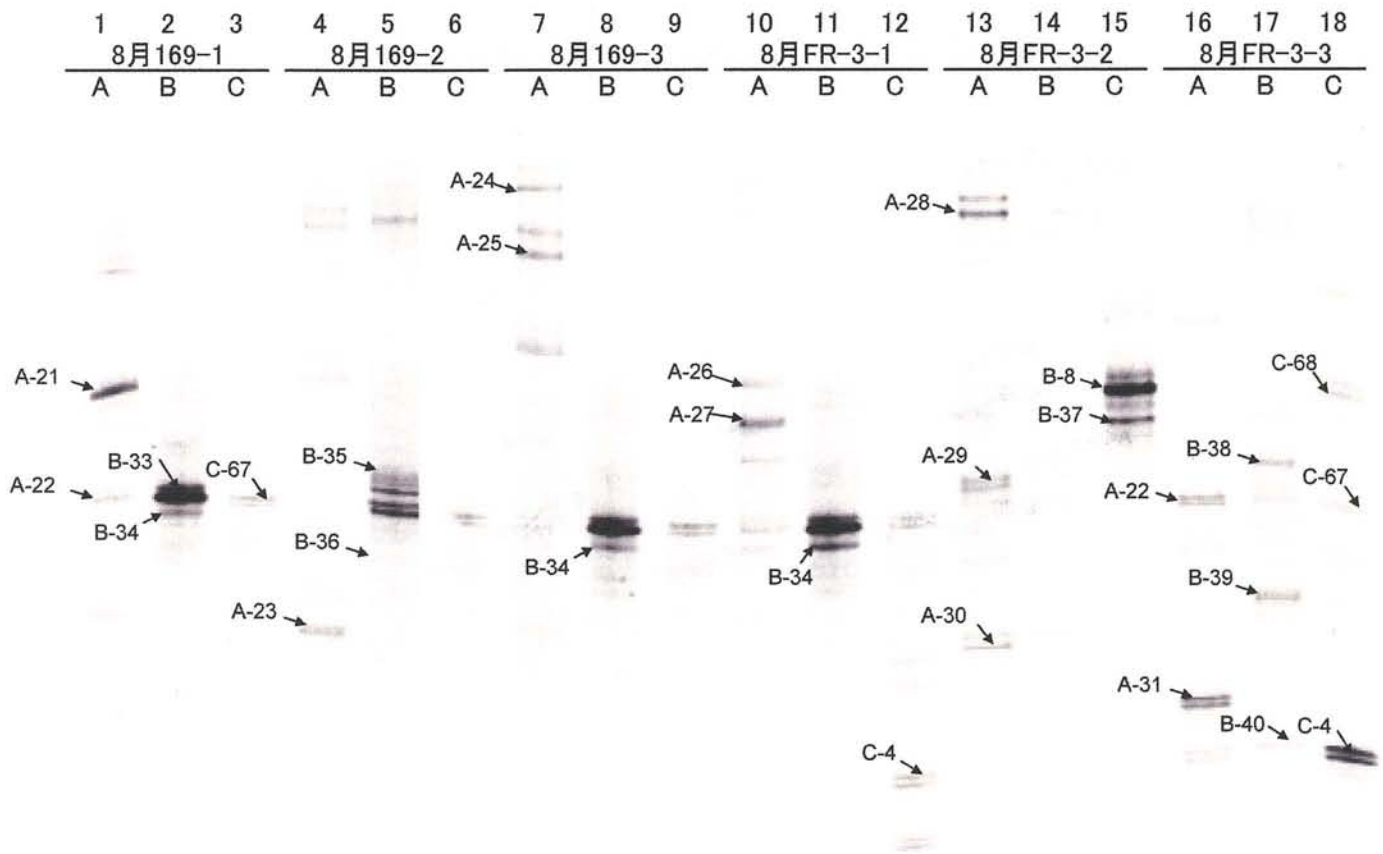


図 3-9. 8 月 MPN 陽性培養液の PCR-DGGE 解析

レーン 1~3 : 8 月-1 (169 菌株)、4~6 : 8 月-2 (169 菌株)、

7~9 : 8 月-3 (169 菌株)、10~12 : 8 月-1 (FR-3 菌株)、

13~15 : 8 月-2 (FR-3 菌株)、16~18 : 8 月-3 (FR-3 菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記した A、B、C は使用した増幅プライマーの種類を示している。

A は全細菌用プライマー-341f-gc/534r、B は *Desulfotomaculum* 用プライマー-DEM116f/1164r、

C は *δ-Proteobacteria* 用プライマー-DSBAC355f をそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
A-21	4-169-DEM-4	B-33	8-169-DEM-2
B-8	4-169-DEM-3	C-4	4-169-DSB-1

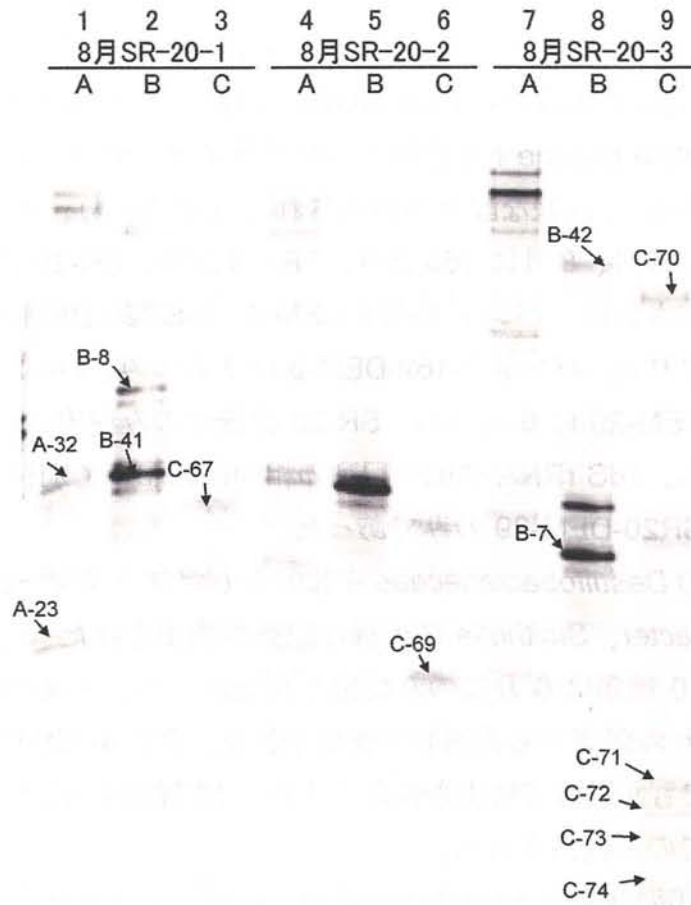


図 3-10. 8月 MPN 陽性培養液の PCR-DGGE 解析

レーン 1~3 : 8月-1 (SR-20 菌株)、

4~6 : 8月-2 (SR-20 菌株)、

7~9 : 8月-3 (SR-20 菌株)

バンド番号の前とレーンの上に記した A、B、C は使用した増幅プライマー

の種類を示している。A は全細菌用プライマー 341f-gc/534r、

B は *Desulfotomaculum* 用プライマー DEM116f/1164r、

C は *δ-Proteobacteria* 用プライマー DSBAC355f をそれぞれ表す。

図中のバンドのうち配列決定に成功したものについて以下に示した。

バンド番号	決定した配列名	バンド番号	決定した配列名
B-7	4-169-DEM-1	B-41	8-SR20-DEM-29

3-2. MPN-PCR-DGGE で検出された細菌 16S rRNA 遺伝子配列の解析

4月～8月のMPN高次希釈液からPCR-DGGEを行い、得られたバンドの配列解析を行った。*Desulfotomaculum* lineage Iを標的としたプライマーセットDEM116f/1164rを用いた場合、*Pelotomaculum*に近縁な配列が検出された(表3-4)。バンド4-169-DEM-1、4-169-DEM-3は4月、6月、8月に169菌株、FR-3菌株、SR-20菌株のいずれの菌株においても共通して検出された。バンド6-169-DEM-5、6-SR20-DEM-42は6月、7月にいずれの菌株でも検出された。バンド7-169-DEM-3は7月のみ、いずれの菌株でも検出された。バンド8-SR20-DEM-29は8月のみ、SR-20菌株でのみ検出された。*Pelotomaculum*属に近縁な配列のうち、16S rRNA 遺伝子配列の相同性において別種とする基準の97%未満を下回ったのは8-SR20-DEM-29のみであった。

δ -*Proteobacteria*の*Desulfobacteriaceae*を標的としたプライマーDSBAC355fを用いた場合には*Syntrophobacter*、*Smithella*に近縁な配列が検出された(表3-5)。検出された配列16種類のうち10種類は6月にのみ検出されたが、バンド4-169-DSB-2の配列は4月、6月、7月にいずれの菌株でも共通して検出された。また4-169-DSB-1も4月、6月、8月にいずれの菌株でも共通して検出された。また、16種類中12種類の配列は1種類の水素消費パートナーでのみ検出された。

図3-11にDEM116f/1164rで検出された配列に基づく系統樹を示した。4-169-DEM-1、4-169-DEM-3、6-169-DEM-5、8-SR20-DEM-29は*Pelotomaculum*に近縁であることが示され、イタリアの水田土壌から本研究と同じプライマーセットを使用して得られているクローン*Desulfotomaculum* sp. DEM-KMe98-4(Stubner & Meuser, 2000)に対しても近縁であることが示唆された。MPN-PCR-DGGEにおいてはクローンC165-1-1と同一の配列は検出されなかった。6-SR20-DEM-42、7-169-DEM-3の配列は*Pelotomaculum*とは系統的に離れた位置に関係付けられた。

図3-12にDSBAC355fで検出された配列に基づく系統樹を示した。DSBAC355fでは栄養共生プロピオン酸酸化細菌が含まれる*Syntrophobacter*、*Smithella*に近縁な配列が複数種類観察され、クラスターを形成していた。また上記二属の他に*Geothrix*に近縁な配列や、6-FR3-DSB-29のような系統的に離れた配列が観察された。

表 3-4. DEM116f/1164r を用いた MPN-PCR-DGGE で検出された配列

バンド 番号	配列名	月	パートナー	近縁生物名	相同性 (%)
B-7	4-169-DEM-1	4,6,8	MK, MF, MS	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	97.7
B-8	4-169-DEM-3	4,6,8	MK, MF, MS	<i>Pelotomaculum schinkii</i>	99.3
B-15	6-169-DEM-5	6,7	MK, MF, MS	<i>Pelotomaculum schinkii</i>	97.2
B-26	6-SR20-DEM-42	6,7	MK, MF, MS	<i>Clostridium viride</i>	96.5
B-32	7-169-DEM-3	7	MK, MF, MS	<i>Desulfotomaculum halophilum</i>	92.7
B-41	8-SR20-DEM-29	8	MS	<i>Pelotomaculum propionicum</i>	96.6

MK=*M. kanagiense* 169, MF=*M. formicum* FR-3, MS=*Methanospirillum* sp. SR-20

*シーケンスにより配列決定したバンドと同じ移動度のバンドは同じ配列とし、検出された月および水素消費パートナー、最近縁種とその相同性を示した。

表3-5. DSBAC355f を用いた MPN-PCR-DGGE で検出された配列

バンド 番号	配列名	月	パートナー	近縁生物名	相同性 (%)
C-8	4-169-DSB-3	4,6	MK, MS	<i>Smithella propionica</i>	96
C-7	4-169-DSB-2	4,6,7	MK, MF, MS	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	93.3
C-4	4-169-DSB-1	4,6,8	MK, MF, MS	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>	94.1
C-12	4-169-DSB-5	4	MK	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>	94.2
C-15	6-169-DSB-6	6	MK	<i>Gracilibacter thermotolerans</i>	94.5
C-19	6-169-DSB-G24	6	MK	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	99.2
C-23	6-169-DSB-18	6	MK, MS	<i>Holophaga foetida</i>	90.8
C-21	6-169-DSB-9	6	MK,	<i>Smithella propionica</i>	94.7
C-36	6-FR3-DSB-G16	6	MF	<i>Gracilibacter thermotolerans</i>	98.4
C-38	6-FR3-DSB-29	6	MF	<i>Micropruina glycogenica</i>	95.1
C-30	6-FR3-DSB-30	6	MF	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	96
C-32	6-FR3-DSB-23	6	MF	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	92.2
C-55	6-SR20-DSB-49	6	MS	<i>Smithella propionica</i>	95.3
C-55	6-SR20-DSB-G55	6	MS	<i>Algorimarina butyrica</i>	93.4
C-51	6-SR20-DSB-G49	6	MS	<i>Holophaga foetida</i>	89.9
C-63	7-169-DSB-12	7	MK	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	95.7
C-59	7-169-DSB-8	7	MK	<i>Geothrix fermentans</i>	98

MK=*M. kanagiense* 169, MF=*M. formicicum* FR-3, MS=*Methanospirillum* sp. SR-20

*シーケンスにより配列決定したバンドと同じ移動度のバンドは同じ配列とし、
検出された月および水素消費パートナー、最近縁種とその相同性を示した。

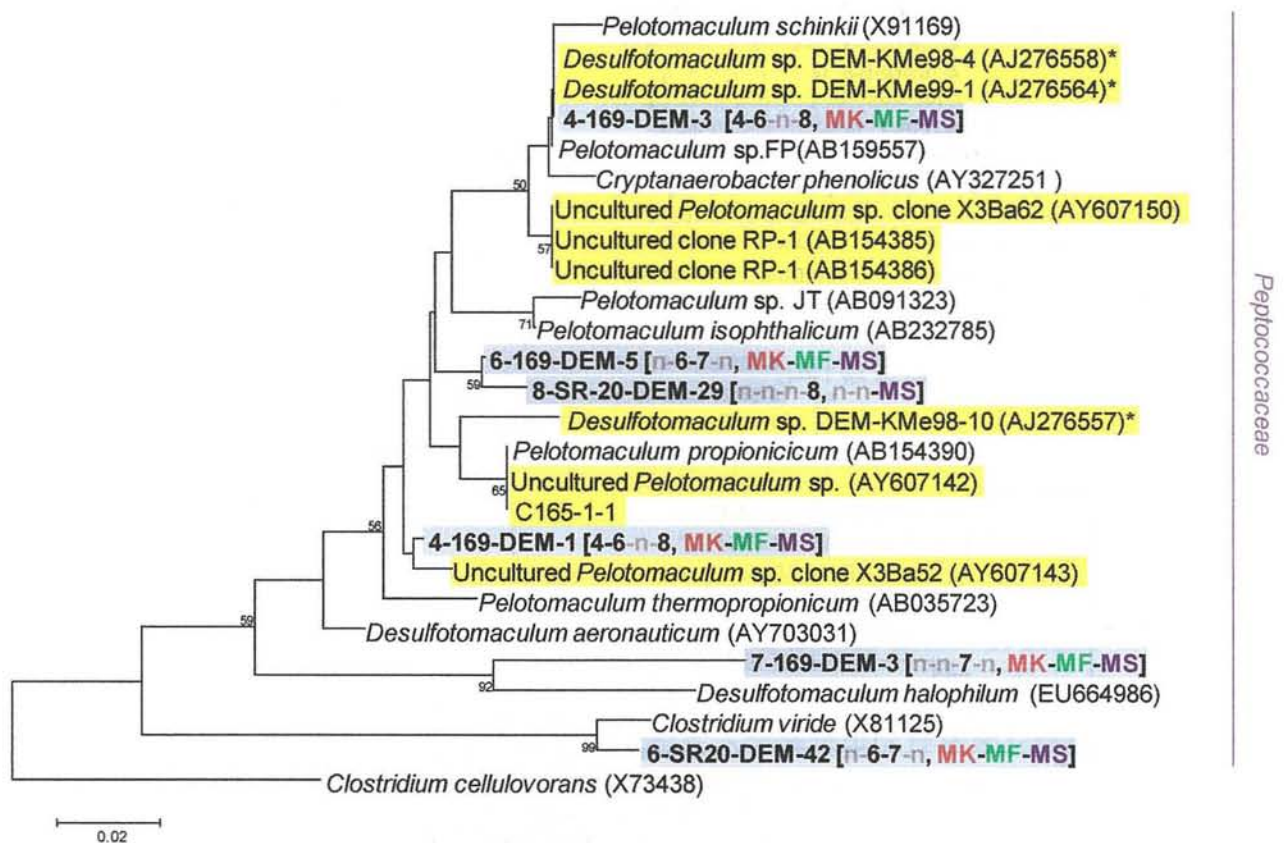


図 3-11. DEM116f/1164r を用いた MPN-PCR-DGGE 解析で得られた配列の 16S rDNA 配列に基づいた系統樹。()内には配列のアクセッション番号を示した。[]内には配列が検出された月、水素消費パートナーを示した (n:検出されなかった、MK:*Methanobacterium kanagiense* 169 菌株、MF:*Methanobacterium formicicum* FR-3 菌株、MS:*Methanospirillum* SR-20 菌株)。例: [4-6-n-8, MK-n-n]の場合、4月、6月、8月に *Methanobacterium kanagiense* 169 菌株でのみ検出されたことを示す。各ノード値はブートストラップ値(>50)を示し、スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。*Clostridium cellulovorans* (X73438)をアウトグループとした。背景が黄色の配列は水田由来の配列を示し、背景が青色の配列は本研究で検出された配列を示す。過去にプライマーペア DEM116f/DEM1164r により検出された配列は*で示した(Stubner & Meuser, 2000)。

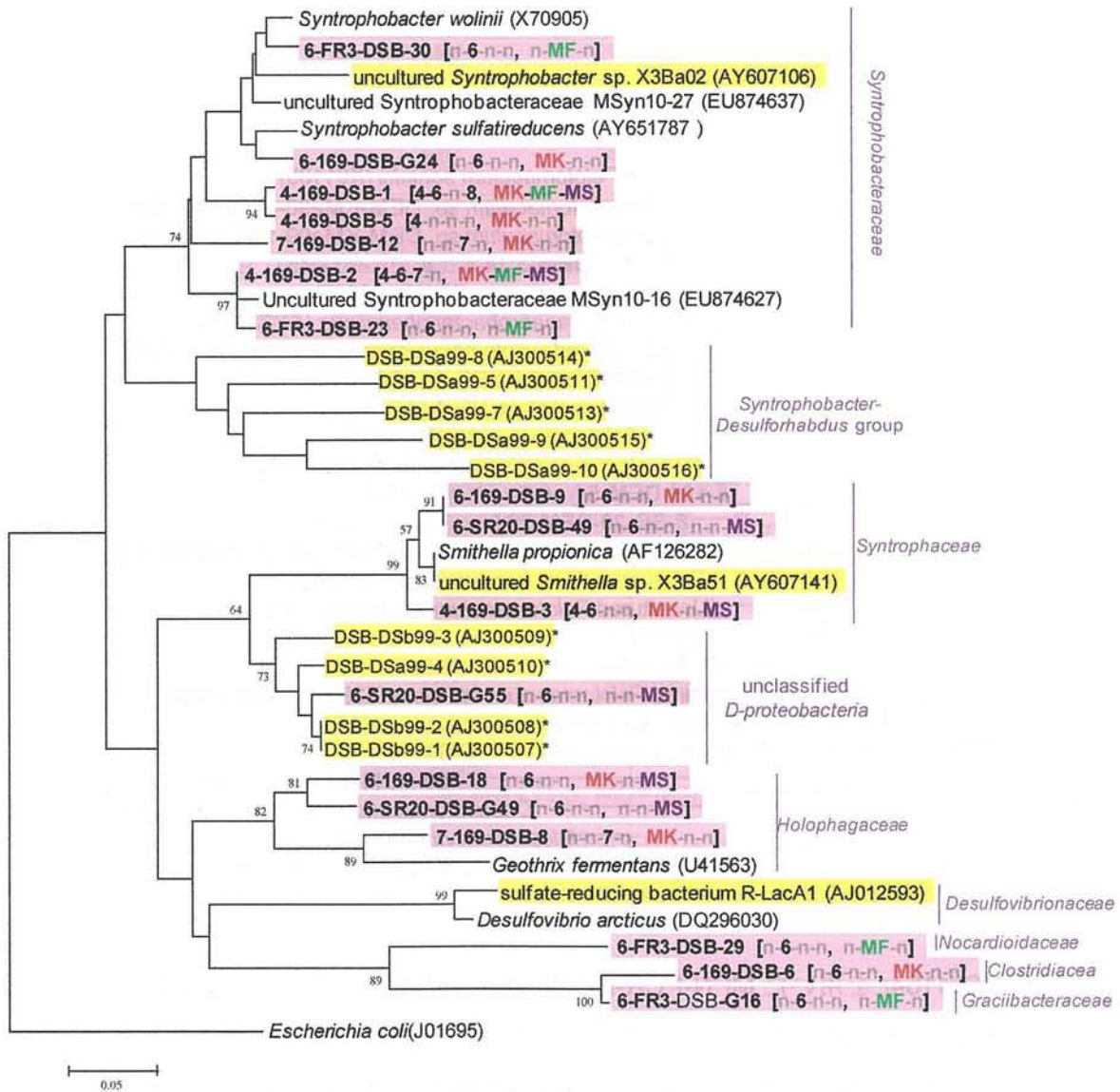


図 3-12. DSBAC355f を用いた MPN-PCR-DGGE 解析で得られた配列の 16S rDNA 配列に基づく系統樹。()内には配列のアクセッション番号を示した。[]内には配列が検出された月、水素消費パートナーを示した(図 4-10 を参照)。各ノード値はブートストラップ値(>50)を示し、スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。*E. coli* (J01695)をアウトグループとした。背景が黄色の配列は水田由来の配列を示し、背景が赤色の配列は本研究で検出された配列を示す。過去に DSBAC355f により検出された配列は*で示した(Scheid & Stubner, 2001)。

第5節 考察

MPN 計数において、計数値は4月から7月にかけて上昇し、その後下降する傾向が観察された(図3-1)。水田土壌において水素消費パートナーとなりうる水素/蟻酸資化性メタン生成古細菌の生菌数は土壌ごとに異なるが、培養法においては $10^2 \sim 10^7$ cells/g dry soil の範囲で検出されている(Asakawa & Hayano, 1995; Asakawa et al., 1998; Grosskopf et al., 1998; Joulain et al., 1998)。また年間を通して生菌数は概ね一定であり、大きく変動しないことが報告されている(Asakawa & Hayano, 1995; Sch tz et al., 1989)。しかし、近年 Watanabe ら(Watanabe et al., 2009)が MPN-PCR により土壌中の *mcrA* 遺伝子の数および転写産物の数を計数したところ遺伝子数は年間を通して変動しないが、*mcrA* 遺伝子数あたりの転写産物数の比および潜在的メタン生成活性は7月から9月にかけて上昇し、その後下降することを明らかにしている。メタン生成活性の変動はプロピオン酸酸化細菌の生育にも影響すると考えられるため、プロピオン酸酸化細菌の計数とメタン生成古細菌の活性を関連付けて調べることが、水田においてプロピオン酸酸化に関わる細菌及び古細菌の生態を明らかにするために必要である。

169 菌株および FR-3 菌株の計数値は7月17日の落水期の土壌において最も高い値が得られた。今回計数したプロピオン酸酸化細菌は嫌気性細菌を対象としており、田面水が無くなる落水期の土壌が酸化的事になることを考慮すると、計数値は低下すると予想されたが実際には増加していた。この原因としては、採取場所が透水性の不良な湿田であるため落水開始(7月7日)から土壌採取の時点までに十分に乾燥せず、土壌の嫌気状態が保たれていた可能性が考えられる。

7月の SR-20 菌株による計数値を除いては、偏性水素資化性の 169 菌株の計数値と比較して水素/蟻酸資化性の FR-3 菌株および水素資化性の SR-20 菌株の計数値が $10^1 \sim 10^2$ のオーダーで高くなる傾向が観察された(図3-2)。この結果は水素消費パートナーの蟻酸利用性が計数値に影響する可能性を示唆しており、栄養共生プロピオン酸酸化に蟻酸転移が重要である(de Bok et al., 2002)という報告に沿っていた。

δ -Proteobacteria および *Desulfotomaculum* lineage I に特異的な PCR プライマーを用いた PCR-DGGE 解析によって、高次希釈の MPN 陽性培養液にはすべて、共生的プロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum* および *Syntrophobacter* に系統的に近縁な細菌が増殖していることが示され、弘前大学附属生物共生教育研究センター金木農場水田土壌には培養可能なプロピオン酸化細菌として *Pelotomaculum* 属および *Syntrophobacter* 属が優占していることが明らかになった(表3-4、5)。*Pelotomaculum* 属に近縁な配列は 8-SR20-DEM-29 を除きいずれの水素消費パートナーを用いた MPN においても検出され、*Pelotomaculum* 属細菌が水素消費パートナーの蟻酸利用性に関わらず増殖することが示唆された(表3-4)。また、4-169-DEM-3、6-169-DEM-5、8-SR20-DEM-29 はそれぞれ絶対共生菌と報告されている *Pelotomaculum schinkii* (16S rRNA 遺伝子配列相同性 99.3%、97.2%) (de Bok et al.,

2005)、または *Pelotomaculum propionicicum* (96.6%) (Imachi et al., 2007) に近縁であることが示された。6-SR20-DEM-42 は *Clostridium viride* (96.5%) (Buckel et al., 1994) に近縁であったが、*Clostridium viride* は 5-アミノ吉草酸などを利用して増殖し、発酵産物としてアンモニア、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸を生成すると報告されており、プロピオン酸酸化に関与している可能性は低いと考えられた。一方 7-169-DEM-3 は *Desulfotomaculum halophilum* (92.7%) (Tardy-Jacquenod et al., 1998) に近縁であったが、*D. halophilum* は硫酸塩の存在下で、ピルビン酸やリンゴ酸を硫酸還元基質および発酵基質として利用するが、プロピオン酸はいずれの基質としても利用しない。従って、プロピオン酸の嫌氣的酸化経路であるメチルマロニル CoA 経路 (図 1) で中間代謝物として生成されるリンゴ酸、ピルビン酸を利用して増殖した結果 7-169-DEM-3 が検出された可能性が考えられた。また、最も近縁である *D. halophilum* に対しても 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 92.7% と、同属と判断する基準の 95% をも下回っていたことから、未知の代謝能を有している可能性も否定出来ない。いずれにせよ、MPN 高次希釈液で検出されたことから水田土壌に相当数生息していることが推察されるため、水田土壌の生態系に関する基礎的な知見を深める意味でも、*Pelotomaculum* 属細菌のみならず 7-169-DEM-3 のような新規性の高い細菌の分離および生理・生化学的性質の解析は重要であると考えられる。

本研究で DSBAC355f をプライマーとして用いた場合、MPN 陽性の高次希釈培養液からは *Syntrophobacter*、*Smithella* が主に検出され、栄養共生プロピオン酸酸化細菌の検出に成功したことが示唆された。Scheid and Stubner (2001) は土壌および水稻根から抽出した DNA を鋳型として DSBAC355f を用いて PCR、クローニング、T-RFLP 解析を行い、*Desulfobacteriaceae* に属する配列を検出しているが、6-SR20-DSB-G55 を除いては本研究で検出した配列との系統的な類縁関係は低いことが示唆された (図 3-12)。この理由としては、直接土壌 DNA を採取する方法に対して集積培養を経たことで目的とするプロピオン酸酸化栄養共生細菌を効率よく検出することに成功したと考えられる。

ただし、この実験においては MPN を経ることで培養条件に適した細菌のみが増殖し、検出されていると考えられるため、実際に環境中に生息する菌数あるいは微生物種の数に対して少なく見積もられていることを考慮に入れて結果を解釈する必要がある。

Syntrophobacter に近縁な配列は、4、6、7 月に検出された 4-169-DSB-2 と、4、6、8 月に検出された 4-169-DSB-1 を除いては 169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株のうち 1 種類の水素消費パートナーでしか検出されず、また 4 月、6 月、7 月それぞれの月にのみ検出された配列も存在した (表 3-5)。4-169-DSB-1 および 4-169-DSB-2 は 4 月から計数値が上昇する 7、8 月にかけて継続して、かつ 3 種類の水素消費パートナー全てにおいて検出されたことから、水田土壌において安定に存在し、プロピオン酸の代謝に関与していることが示唆された。対照的に 4 月のみ、6 月のみ、7 月のみ、169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株のうち 1 種類の水素消費パートナーでのみ検出された配列は採取時期の影響や水素消

費パートナーの種類の影響を受けたことが示唆された。採取時期の違いによる影響要因としては、地温、水管理（落水、湛水）、pH、栽培中の水稻による影響などが考えられる。落水期の4月に検出された配列は4種類（4-169-DSB-1, 2, 3, 5）と少なく、湛水していた6月には13種類と増加した。その後中干しで落水された7月には3種類、8月には1種類と劇的に減少した。ただし7月、8月 DGGE では DSBAC355f によるバンドが全体的に薄く、ダイレクトシーケンスによる配列決定が困難なバンドがあり、実際には配列決定した他にもより多くのバンドが存在した。そのため、より正確なデータを得るためには上記のバンドをクローン解析などにより配列決定する必要がある。しかし、現時点では湛水期の6月に *Syntrophobacter* に近縁な細菌が増加し、7月の落水期以後は微生物種の構成が単純化したか、DSBAC355f で検出可能な生菌数が減少した可能性が示唆された。

MPN-PCR-DGGE に対する水素消費パートナーの影響要因としては基質利用性、特に蟻酸の利用性や、運動性の有無などが考えられる。今回検出された配列のうち、*Pelotomaculum* に近縁な配列の多くが3種類の水素消費パートナーいずれにおいても検出されたのに対し、*Syntrophobacter* に近縁な配列は7種類のうち3種類（4-169-DSB-5, 6-169-DSB-G24, 7-169-DSB-8）が169菌株のみ、2種類（6-FR3-DSB-23, 30）がFR-3菌株のみで検出された。また、*Smithella* に近縁な配列はFR-3菌株では検出されず、水素消費パートナーが異なることで増殖・集積される細菌が異なる可能性が示唆された。この差異が計数値に与える影響は明らかではないが、見かけ上は計数値が類似していたとしてもその内訳が異なることも起こり得ることが示唆された。従って単一種の水素消費パートナーのみを用いて計数した結果には偏りまたは不足が生じている可能性がある。

16S rRNA 遺伝子を標的とした分子的手法により圃場のメタン生成古細菌群の群集構造が安定しており、通年で変動しないことが示されているが(Krüger *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2006)、Watanabe ら(Watanabe *et al.*, 2009)により水田の湛水期と落水期で活性のあるメタン生成古細菌群集が変化することが明らかにされたことから、水素消費パートナーの種類の変化という点からも水管理が栄養共生プロピオン酸化細菌に影響を与える可能性が考えられた。また、*Syntrophobacter* および *Smithella* に近縁な配列は新規性の高い配列が多く(表3-5)、水田土壌において未培養の栄養共生プロピオン酸化細菌が多数生息し、働いていると推察された。

水田における栄養共生プロピオン酸化を理解する上で、プロピオン酸代謝に関わる細菌の分離および生理・生化学的性質の解析は言うまでもなく重要である。MPN-PCR-DGGE において、*Pelotomaculum* 属細菌、*Syntrophobacter* 属細菌、*Smithella* 属細菌が優占的に検出されたことは以前イタリアの水田土壌を用いて行われた RNA-SIP に基づく研究の結果と符合しており(Lueders *et al.*, 2004)、上記3属の細菌が水田土壌における嫌氣的プロピオン酸代謝において重要な役割を担っていることを示唆した。また、異なる地域の水田土壌において嫌氣的プロピオン酸化に関与する微生物が共通して検出されたことも非常に

興味深い。これら 3 属に近縁な配列の中には新規性の高い配列も多く存在しており、複数種類の水素消費パートナーを用いた MPN 法が新規性の高い栄養共生細菌の分離においても有効に働く可能性が示された。今後検出された配列に相当する細菌の分離、特徴付けを行うことで、水田において実際にプロピオン酸酸化に関わる微生物群の生態や機能についてより詳細に推測することが可能になると考えられる。

第5章 総合考察

水田においてメタン生成の直接の基質は主として酢酸、水素であり、水素は約 95-97% が嫌氣的プロピオン酸酸化に伴う種間水素転移によりメタン生成古細菌に供給されるが (Conrad *et al.*, 1989)、現在までに分離された栄養共生プロピオン酸酸化細菌は 5 属 9 種と少ない (Boone & Bryant, 1980a; Chen *et al.*, 2005; de Bok *et al.*, 2005; Harmsen *et al.*, 1998a; Imachi *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999; Plugge *et al.*, 2002; Wallrabenstein *et al.*, 1995)。

Pelotomaculum 属細菌を含む *Desulfotomaculum* lineage サブクラスター 1h に属する細菌の 16S rRNA 遺伝子配列は、水田を含むメタン生成的環境において広く検出されており、(Imachi *et al.*, 2006) 水田土壌の RT-PCR 解析では乾燥土壌 1g あたり約 10^7 個の細胞が検出されている (Stubner, 2002)。また、イタリアの水田土壌において *Syntrophobacter* 属、*Smithella* 属、*Pelotomaculum* 属の細菌が栄養共生共生的にプロピオン酸を酸化していることが示唆されているが、純粋分離までは行われていない (Lueders *et al.*, 2004)。しかし、上記 3 属の細菌が水田土壌に普遍的に存在し、栄養共生プロピオン酸酸化を行っているのか、地域により更に異なる栄養共生細菌が関与するのかは明らかにされていない。そのため、湛水された水田土壌において、嫌氣的有機物分解の重要な一過程である栄養共生プロピオン酸酸化の詳細については明らかにされていない。プロピオン酸酸化細菌の生態を解明するためには、純粋な培養物を得て生理生化学的な解析を進めることが重要である。

さらに水田土壌における栄養共生プロピオン酸酸化細菌の生菌数についてもポット栽培された土壌における計数 (MPN 法) しか報告されておらず (Krylova *et al.*, 1997)、実際の圃場で、また経時的に計数を行った例はなく、優占種の推定もなされていない。本研究では、平成 15 年に本研究室の佐々木が弘前大学生物共生教育研究センター附属金木農場の水田土壌を接種源として開始した集積培養液を材料として、栄養共生プロピオン酸酸化に関わる細菌および古細菌の純粋培養と併せてプロピオン酸酸化系の解析を行った。栄養共生プロピオン酸酸化に関わる細菌および古細菌を純粋分離し、その生理・生化学的性質を詳細に特徴付けすることで、実際の水田土壌におけるそれら細菌の機能および働きを推察し、嫌氣的プロピオン酸酸化からのメタン生成に関する微生物の生態について考察した。また、水田土壌に生息する栄養共生プロピオン酸酸化細菌の生態に関する知見を得るため、MPN-PCR-DGGE 法による経時的な計数および優占種の推定を行った。メタン生成古細菌の分離は水田土壌に生息するメタン生成古細菌の生態を知る手がかりになるだけでなく、水田土壌に生息するプロピオン酸酸化細菌の共生パートナーとして利用できると考えられるため、水田土壌における栄養共生関係を研究するうえで重要である。

第 2 章では、弘前大学附属金木農場の水田土壌を接種源とし、プロピオン酸を基質として安定なプロピオン酸酸化系を確立し、解析を行った。PCR-DGGE 解析により、集積培養液にはプロピオン酸酸化細菌と推定される *Pelotomaculum* 属細菌と、その他の *Desulfomicrobium* 属細菌、*Sphingobacteriaceae* 科に属する細菌の 3 種類の細菌が優占し

ていることが示唆された。古細菌の DGGE 解析では、*Methanospirillum* および *Methanosaeta* が優占していた。集積培養液から 169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株の 3 種類のメタン生成古細菌を分離したが、このうち 169 菌株は系統学的に新規な水素資化性メタン生成古細菌であると考えられたため 169 菌株の詳細な特徴付けと新種としての記載および FR-3 菌株、SR-20 菌株の部分的な特徴付けを行った。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、169 菌株は *Methanobacterium subterraneum* DSM 11074^T に 96.8% と最も高い相同性を示した。FR-3 菌株、SR-20 菌株はそれぞれ *Methanobacterium formicicum* strain MF^T に対して 100%、*Methanospirillum hungatei* JF-1^T に 98.4% の相同性を示した。169 菌株は形態的特徴、基質利用性、抗生物質に対する応答、G+C 含量において *Methanobacterium subterraneum* DSM 11074^T と異なるため、*Methanobacterium* 属に属する新種と考えられた。169 菌株を新種 *Methanobacterium kanagiense* として提案し、記載した。

また、プロピオン酸集積培養液から栄養共生プロピオン酸酸化細菌の分離を試みた。段階希釈、加熱処理、アガーシェイク法、増殖因子の添加やモリブデン酸ナトリウムの添加など複数の方法を検討したが、汚染細胞は脱落しなかった。PCR-DGGE 解析では加熱処理や添加物により新たなバンドが複数検出され、集積培養液 C166-1 に存在する *Pelotomaculum* 属細菌を純粋化することはできなかったが、集積培養液 C166-1 に共存する細菌 *Bacteroidetes* bacterium 4F6B 菌株、*Synergistaceae* bacterium 4F6E 菌株、*Bacteroidetes* bacterium 6E 菌株、*Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株を純粋分離し、4F6E 菌株について詳細な特徴付けを行った。16S rRNA 遺伝子配列解析に基づき、4F6B 菌株は *Mucilaginibacter daejeonensis* (86%)、4F6E 菌株は *Aminobacterium colombiense* DSM 12261^T (89.5%)、6E 菌株は *Meniscus glaucopsis* strain ATCC 29398 (89.1%)、7A 菌株は *Desulfomicrobium norvegicum* strain DSM 1741 (98.9%) にそれぞれ最も近縁であった。4F6E 菌株は *Synergistaceae* 科の新規細菌株であることが示され、新属を形成する可能性も示唆された。4F6E 株と *Aminobacterium* 属とを明瞭に関係付けるためには *M. formicicum* との共培養でのアミノ酸利用性試験を行う必要があると考えられた。

第 3 章では、水田土壌に生息する栄養共生プロピオン酸酸化細菌の経時的計数および優占種の推定を試みた。水素消費パートナーの差異が与える影響を検討するため、計数には基質利用性の異なる 3 種類のメタン生成古細菌 (*Methanobacterium kanagiense* 169 菌株、*Methanobacterium formicicum* FR-3 菌株、*Methanospirillum hungatei* SR-20 菌株) を使用した。経時的な計数の結果、使用した菌株の違いによる計数値の著しい差異は観察されなかった。4 月から 7 月にかけて計数値は増加し、最大で約 10^8 cells/g 乾土に達した後、8 月以降は減少する傾向が観察された。PCR-DGGE 解析により優占する細菌種の特特定を試みた結果、*Pelotomaculum* 属、*Syntrophobacter* 属、*Smithella* 属に属する細菌が多く検出された。*Pelotomaculum* 属に近縁な配列は相同性が 97% を超える配列が多くを占め、既知の細菌に近縁な細菌が検出される傾向が観察された。*δ-Proteobacteria* に属する配列は新規

性の高い配列が多くを占め、未分離の多様な細菌が栄養共生プロピオン酸酸化に関与している可能性を示唆した。PCR-DGGE 解析において、水素消費パートナーがバンドパターンに与える影響を検討したが明確な傾向は観察されなかった。

集積培養液 C165-1 では形態的に *Methanobacterium* 属に類似したメタン生成古細菌が優占しており、実際に 169 菌株や FR-3 菌株のような *Methanobacterium* 属に属する株が分離された。最初に分離された 169 菌株は集積培養液において優占していたと考えられたが、蟻酸利用性を欠く偏性水素資化性の菌株であった。また、集積培養液 C166-1 において移植を繰り返すごとに SR-20 菌株が優占してきたが、SR-20 菌株も蟻酸を利用しなかった。栄養共生プロピオン酸酸化において種間水素転移に加えて種間蟻酸転移が重要であるという証拠が複数報告されている(Boone et al., 1989; de Bok et al., 2002; de Bok et al., 2004b) にも関わらず、実際に水田由来の集積培養液からは蟻酸利用性を持たないメタン生成古細菌が分離され、水素消費パートナーとして働くことが示された。既知の栄養共生プロピオン酸酸化細菌において、中温性の *Pelotomaculum* 属、*Syntrophobacter* 属、*Smithella* 属の細菌はいずれも *Methanospirillum* 属のメタン生成菌を水素消費パートナーとして利用し、分離に成功している。SR-20 菌株は *Methanospirillum hungatei* と異なり蟻酸を利用しないことが示されたが、*Methanobacterium* 属に無い運動性を有している。本研究において集積培養液の移植を繰り返すことにより *Methanospirillum* sp. SR-20 菌株が優占する傾向が観察されたことは、プロピオン酸酸化細菌の栄養共生的培養において *Methanospirillum* 属メタン生成菌の運動性が優位に働く可能性を示唆している。また、MPN-PCR-DGGE において水素消費パートナーとして *Methanospirillum* sp. SR-20 菌株を使用した場合、*Syntrophobacter* 属だけではなく *Smithella* 属に近縁な新規性の高い (16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 94.7~96%) 配列も多く検出されたことから、未培養の栄養共生プロピオン酸酸化細菌の分離に有効である可能性も示唆された。

集積培養液 C166-1からは4F6E 菌株、4F6B 菌株、6E 菌株、7A 菌株の4種類の細菌が分離された。これらの菌株はいずれも0.1%酵母エキス+リンゴ酸を基質として分離され、4F6E 菌株については詳細な特徴付けを行った。4F6E 菌株は *Synergistaceae* 科に属し、*Aminobacterium* 属細菌に近縁であった。集積培養液の DGGE 解析において主要なバンドではなかったが、基質利用性としてプロピオン酸酸化経路の中間代謝物であるピルビン酸、リンゴ酸を利用可能であることが示された。また、7A 菌株は集積培養液において主要なバンドの一つである *Desulfomicrobium* 属細菌に相当する細菌であることが確認された。7A 菌株は発酵性基質としてピルビン酸、電子供与体としてピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸を利用した。4F6B 菌株は基質としてピルビン酸を、6E 菌株はリンゴ酸、フマル酸、コハク酸、ピルビン酸を利用することが示された。これらの集積培養液に共存している細菌はいずれも嫌氣的プロピオン酸酸化経路であるメチルマロニル CoA 経路の中間代謝物の利用性を有することが示された。プロピオン酸酸化の中間代謝物を消費または除去すること

が栄養共生細菌のエネルギー産生に対して有益であるかは明らかではないが、今回分離された4種類の細菌が栄養共生プロピオン酸酸化の中間代謝物、もしくは2次的な代謝産物を利用して集積培養液中に共存している可能性は否定出来ない。また、*Syntrophobacter sulfatireducens* に対して *Proteiniphilum acetatigenes* が栄養共生プロピオン酸酸化を促進したように(Chen & Dong, 2005)、4F6E 菌株、4F6B 菌株、6E 菌株、7A 菌株がビタミンなどの未知の物質を分泌し、栄養共生細菌の代謝・増殖に対して有益に働いている可能性も考えられる。この場合、栄養共生プロピオン酸酸化細菌と共存している細菌はゆるい共生関係にあるとも言えよう。この仮定が正しいならば、栄養共生プロピオン酸酸化細菌の分離を試みた際に、コロニー形成が難しいことや増殖が遅くなる現象は、ゆるい共生関係にある細菌が脱落することにより栄養共生細菌の増殖が抑制されることが影響している可能性も考えられる。共存する細菌の分泌物がプロピオン酸酸化細菌の分離に必要なならば、集積培養液または共存する細菌の純粋培養液を採取し、オートクレーブやフィルター濾過により滅菌した上清を培地に添加し、分離操作を行うことでコロニー形成が促進される可能性が考えられる。

また、プロピオン酸酸化細菌のコロニーが形成されない理由の一つとして考えられるのは水素消費パートナーとして使用しているメタン生成古細菌と接触する確率が低いことが考えられる。プロピオン酸酸化細菌は水素消費パートナーと距離が近いほど種間水素転移に有利に働くことが知られているが、そのために両者が近接することが必要になる(Ishii et al., 2005)。分離操作に用いるメタン生成古細菌の密度が低い場合、プロピオン酸酸化細菌との平均的な距離が大きくなり種間水素転移が起こりにくくなることは容易に想像される。*Pelotomaculum thermopropionicum* は運動性を持たないが鞭毛を有しており、鞭毛を介して水素消費パートナーと連結、接近することが報告されている(Ishii et al., 2005)。また、近年 *P. thermopropionicum* の全ゲノム配列が解読され、鞭毛先端に存在する FliD タンパク質が水素消費パートナーである *Methanothermobacter thermautotrophicus* のメタン生成に関わる酵素の転写活性を発現上昇させることが示されている(Shimoyama et al., 2009)。プロピオン酸集積培養液に存在する C165-1-1 も *Pelotomaculum* 属菌株に近縁であることが示されたことから、*P. thermopropionicum* の鞭毛と類似した構造を有している可能性が考えられる。鞭毛の有無は電子顕微鏡などにより確認する必要があるが、もし C165-1-1 も鞭毛を有しているならば、*P. thermopropionicum* と同様にメタン生成菌との相互作用が働く可能性があると考えられる。液体培養において *P. thermopropionicum* の鞭毛は比較的自由に動くことができると考えられるが、アガーシェイクのような高層寒天培地に混合された場合は固化材によりある程度固定され、鞭毛が *M. thermautotrophicus* と接触する機会が著しく減少することが容易に想像される。同様に、C165-1-1 も水素消費パートナーと接触する機会が減少し、液体培養と比較して増殖が抑制されるのではないだろうか。

本研究で明らかにしたことを総合すると、水田土壌において優占する培養可能な栄養共

生プロピオン酸化細菌は *Pelotomaculum*、*Syntrophobacter*、*Smithella* で、それらは水素消費パートナーとして添加したメタン生成古細菌の種類によりある程度選択されている可能性が示唆された。実際に、蟻酸利用生を欠く *Methanobrevibacter arboriphilus* DSM1125 との共培養では *Syntrophobacter fumaroxidans* は増殖しなかったと報告されている (Dong et al., 1994)。また、その場合も蟻酸利用性を持つ細菌を添加することでプロピオン酸酸化が起こった (Dong et al., 1994) ことから、水素消費パートナーの基質利用性がプロピオン酸酸化細菌との相性に大きく影響していると考えられる。

Pelotomaculum は既知の細菌と同種レベルの配列が多く、それに対して *Syntrophobacter* は新規性の高い配列が多かった。*Pelotomaculum* はいずれの時期も検出されたが *Syntrophobacter* は4月および6月に多く、多様な配列が検出された。これらのことから、*Desulfotomaculum* cluster lh に属する *Pelotomaculum* に近縁な細菌が水田土壌に常に一定数存在しているが、*Syntrophobacter*、*Smithella* は時期により菌数や種類が変動している可能性が考えられる。*Syntrophobacter*、*Smithella* の変動には稲の成長による有機物の供給や地温の変化、さらには土壌の酸化還元電位を劇的に変動させる中干しなどが影響しているかもしれない。*Pelotomaculum* 属細菌は孢子形成することが知られており (de Bok et al., 2005; Imachi et al., 2002b; Imachi et al., 2007)、酸素や乾燥への耐性が強いと考えられるため中干しを経ても生菌数を維持していた可能性が考えられた。

水田土壌において、水稻根の周囲は根の分解や滲出物として有機物が供給され、さらに根からの酸素の流出により硫黄の酸化が起こり、硫酸塩が供給される (Chen et al., 2007; Liesack et al., 2000; Wind & Conrad, 1995)。硫酸還元能を持つプロピオン酸酸化細菌はこの硫酸塩を利用して増殖することができると考えられ、実際に水田土壌における栄養共生プロピオン酸酸化細菌と硫酸還元プロピオン酸酸化細菌の MPN 法を用いた計数では同じオーダーで (10^7 cells/g 乾土) 検出されている (Krylova et al., 1997)。一方 *Pelotomaculum* を含む *Desulfotomaculum* cluster lh に属する細菌も RT-PCR 解析法により 10^7 cells/g 乾土のオーダーで検出されており (Stubner, 2002)、水田土壌には硫酸還元能をもつプロピオン酸酸化細菌と栄養共生プロピオン酸酸化細菌が同程度存在しており、土壌の酸化還元電位や基質の供給、水素消費パートナーの活性や硫酸塩の濃度など、水田土壌中の環境条件に合わせて優占する細菌が変動すると推察された。

第2章の集積培養液だけでなく、第3章の MPN-PCR-DGGE においても、プロピオン酸酸化に直接関与していないと考えられる細菌が多数検出されており、*Pelotomaculum* のみならず *Syntrophobacter* や *Smithella* といった栄養共生プロピオン酸酸化細菌が共存する細菌と中間代謝物をやり取りしている可能性が示唆された。本研究の示した結果から、水田土壌において栄養共生プロピオン酸酸化系に関わる微生物が、従来想定されていたようなプロピオン酸酸化細菌と水素消費パートナーとの単純な相互関係に留まらない、より複雑な系によりプロピオン酸を分解していることが推察された。

参考文献

- Achenbach, L. & Woese, C. (1995). 16S and 23S rRNA-like primers. *Archaea: a Laboratory Manual*, 201-203.
- Alm, E. W., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A. & Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3557.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- An, D. S., Yin, C. R., Lee, S. T. & Cho, C. H. (2009). *Mucilaginibacter daejeonensis* sp. nov., isolated from dried rice straw. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1122.
- Asakawa, S. & Hayano, K. (1995). Populations of methanogenic bacteria in paddy field soil under double cropping conditions (rice-wheat). *Biol Fertility Soils* **20**, 113-117.
- Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y. & Hayano, K. (1998). Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter. *Soil Biol Biochem* **30**, 299-303.
- Asakawa, S., Morii, H., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y. & Hayano, K. (1993). Characterization of *Methanobrevibacter arboriphilicus* SA isolated from a paddy field soil and DNA-DNA hybridization among *M. arboriphilicus* strains. *Int J Syst Evol Microbiol* **43**, 683.
- Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Morii, H., Koga, Y. & Hayano, K. (1995). Characterization of *Methanosarcina mazei* TMA isolated from a paddy field soil. *Curr Microbiol* **31**, 34-38.
- Baena, S., Fardeau, M. L., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J. L. & Patel, B. (2000). *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 259.
- Baena, S., Fardeau, M. L., Labat, M., Ollivier, B., Thomas, P., Garcia, J. L. & Patel, B. (1998). *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an Amino Acid-degrading Anaerobe Isolated from Anaerobic Sludge. *Anaerobe* **4**, 241-250.
- Bartholomew, J. W. & Mittwer, T. (1952). The gram stain. *Microbiol Mol Biol Rev* **16**, 1.
- Boone, D. & Bryant, M. (1980). Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **40**, 626.
- Boone, D. R., Johnson, R. L. & Liu, Y. (1989). Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1735.
- Bryant, M. P. & Boone, D. R. (1988). Isolation and characterization of *Methanobacterium formicicum* MF. *Int J Syst Evol Microbiol* **38**, 453.
- Buckel, W., Janssen, P. H., Schuhmann, A., Eikmanns, U., Messner, P., Sleytr, U. & Liesack, W. (1994). *Clostridium viride* sp. nov, a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to *Clostridium aminovalericum*. *Arch Microbiol* **162**, 387-394.

- Chen, S., Liu, X. & Dong, X. (2005). *Syntrophobacter sulfatireducens* sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1319-1324.
- Chen, S. Y. & Dong, X. Z. (2005). *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2257-2261.
- Chen, Z., Jin, X., Wang, Q., Lin, Y., Gan, L. & Tang, C. (2007). Confirmation and determination of carboxylic acids in root exudates using LC-ESI-MS. *J Sep Science* **30**, 2440-2446.
- Cicerone, R. J. & Oremland, R. S. (1988). Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* **2**, 299-327.
- Conrad, R., Mayer, H. P. & Wüst, M. (1989). Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol Lett* **62**, 265-273.
- Date, Y., Nakanishi, Y., Fukuda, S., Kato, T., Tsuneda, S., Ohno, H. & Kikuchi, J. (2010). New monitoring approach for metabolic dynamics in microbial ecosystems using stable-isotope-labeling technologies. *J Biosci Bioeng* **110**, 87-93.
- De Bok, F., Plugge, C. & Stams, A. (2004a). Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research* **38**, 1368-1375.
- de Bok, F. A., Luijten, M. L. & Stams, A. J. (2002). Biochemical evidence for formate transfer in syntrophic propionate-oxidizing cocultures of *Syntrophobacter fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4247-4252.
- de Bok, F. A., Plugge, C. M. & Stams, A. J. (2004b). Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Res* **38**, 1368-1375.
- de Bok, F. A., Harmsen, H. J., Plugge, C. M., de Vries, M. C., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. & Stams, A. J. (2005). The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1697-1703.
- de Bok, F. A. M., Stams, A. J. M., Dijkema, C. & Boone, D. R. (2001). Pathway of propionate oxidation by a syntrophic culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1800.
- Dianou, D., Miyaki, T., Asakawa, S., Morii, H., Nagaoka, K., Oyaizu, H. & Matsumoto, S. (2001). *Methanoculleus chikugoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1663.
- Dong, X., Plugge, C. M. & Stams, A. J. M. (1994). Anaerobic degradation of propionate by a mesophilic acetogenic bacterium in coculture and triculture with different methanogens. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2834.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127.
- Glissmann, K. & Conrad, R. (2002). Saccharolytic activity and its role as a limiting step in methane

- formation during the anaerobic degradation of rice straw in rice paddy soil. *Biol Fertility Soils* **35**, 62-67.
- Griggs, D. J. & Noguera, M. (2002).** Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Weather* **57**, 267-269.
- Grosskopf, R., Janssen, P. H. & Liesack, W. (1998).** Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol* **64**, 960-969.
- Hansen, K. H., Ahring, B. K. & Raskin, L. (1999).** Quantification of syntrophic fatty acid-beta-oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4767.
- Harmsen, H., Van Kuijk, B., Plugge, C., Akkermans, A., DE, V., WILLEM, M. & STAMS, A. (1998).** *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **48**, 1383.
- Holzappel-Pschorn, A., Conrad, R. & Seiler, W. (1986).** Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant Soil* **92**, 223-233.
- Hungate, R. & Macy, J. (1973).** The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bulletins of the Ecological Research Committee*, 123-126.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A. & Harada, H. (2000).** Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Applied and environmental microbiology* **66**, 3608.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A. & Harada, H. (2002).** *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1729-1735.
- Imachi, H., Sakai, S., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y. & Sekiguchi, Y. (2007).** *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1487-1492.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Loy, A., Qiu, Y. L., Hugenholtz, P., Kimura, N., Wagner, M., Ohashi, A. & Harada, H. (2006).** Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with *Desulfotomaculum* cluster I are widely distributed in methanogenic environments. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2080-2091.
- IRGENS, R. L. (1977).** *Meniscus*, a new genus of aerotolerant, gas-vacuolated bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **27**, 38.
- Ishii, S., Kosaka, T., Hori, K., Hotta, Y. & Watanabe, K. (2005).** Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7838-7845.
- Joulian, C., Ollivier, B., Patel, B. & Roger, P. A. (1998).** Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiol Ecol* **25**,

- Joulian, C., Patel, B. K. C., Ollivier, B., Garcia, J. L. & Roger, P. A. (2000). *Methanobacterium oryzae* sp. nov., a novel methanogenic rod isolated from a Philippines ricefield. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 525.
- Kane, M., Poulsen, L. K. & Stahl, D. (1993). Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **59**, 682.
- Kellenberger, E., Ryter, A. & S chaud, J. (1958). Electron microscope study of DNA-containing plasms. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **4**, 671.
- Keller, M., Matson, P. & Prinn, R. (1994). Global Atmospheric-Biospheric Chemistry.
- Kotelnikova, S., Macario, A. J. L. & Pedersen, K. (1998). *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, mesothermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol* **48**, 357.
- Krüger, M., Frenzel, P., Kemnitz, D. & Conrad, R. (2005). Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flooded Italian rice field. *FEMS Microbiol Ecol* **51**, 323-331.
- Krumböck, M. & Conrad, R. (1991). Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol Lett* **85**, 247-256.
- Krylova, N. I. & Conrad, R. (1998). Thermodynamics of propionate degradation in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol* **26**, 281-288.
- Krylova, N. I., Janssen, P. H. & Conrad, R. (1997). Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol* **23**, 107-117.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*.
- Langenberg, K., Bryant, M. & Wolfe, R. (1968). Hydrogen-oxidizing Methane Bacteria. II. Electron Microscopy. *J Bacteriol* **95**, 1124.
- Liesack, W., Schnell, S. & Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 625-645.
- Litchfield, C. D., Sikaroodi, M. & Gillevet, P. M. (2006). 21 Characterization of Natural Communities of Halophilic Microorganisms. In *Methods in Microbiology*, vol. Volume 35, pp. 513-533. Edited by D. O. B. S. L. S. U. B. R. L. A. U. S. A. Editors: Fred A Rainey & I. Aharon Oren Institute of Life Sciences The Hebrew University of Jerusalem Jerusalem: Academic Press.
- Liu, Y., Balkwill, D., Aldrich, H., Drake, G. & Boone, D. (1999). Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *Int J Syst Evol Microbiol* **49**, 545.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**, 554-568.
- Lueders, T., Pommerenke, B. & Friedrich, M. W. (2004). Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl Environ*

Microbiol **70**, 5778.

- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J. & Riley, P. W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**, 3521.
- McSweeney, C. S., Allison, M. J. & Mackie, R. I. (1993). Amino acid utilization by the ruminal bacterium *Synergistes jonesii* strain 78-1. *Arch Microbiol* **159**, 131-135.
- Mori, H., Sato, Y., Taketomo, N., Kamiyama, T., Yoshiyama, Y., Meguro, S., Sato, H. & Kaneko, T. (1997). Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *J Dairy Sci* **80**, 1959-1964.
- Nakamura, K., Terada, T., Sekiguchi, Y., Shinzato, N., Meng, X. Y., Enoki, M. & Kamagata, Y. (2006). Application of pseudomurein endoisopeptidase to fluorescence in situ hybridization of methanogens within the family *Methanobacteriaceae*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6907.
- Nakanishi, Y., Fukuda, S., Chikayama, E., Kimura, Y., Ohno, H. & Kikuchi, J. A dynamic omics approach identifies nutrition-mediated microbial interactions. *Journal of Proteome Research*.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F. L. & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3367.
- Oyaizu, H. S., & Hiraishi, A., (editor) (1999). *Molecular phylogenetic evolution. In Microbiology Experiment Methods*. Koudansha Scientific.
- Plugge, C., Balk, M. & Stams, A. (2002). *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionate-oxidizing, spore-forming bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 391.
- Sakai, S., Conrad, R., Liesack, W. & Imachi, H. (2010). *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from Italian rice field soil. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. (2008). *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 929.
- Schütz, H., Seiler, W. & Conrad, R. (1989). Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* **7**, 33-53.
- Schütz, H., Holzappel-Pschorn, A., Conrad, R., Rennenberg, H. & Seiler, W. (1989). A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. *Journal of Geophysical Research* **94**, 16405.
- Scheid, D. & Stubner, S. (2001). Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 175-183.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 262.
- Schink, B. & Stams, A. (1992). Syntrophism among prokaryotes. *The prokaryotes* **1**, 276-299.
- Schmidt, J. E. & Ahring, B. K. (1995). Interspecies electron transfer during propionate and butyrate degradation in mesophilic, granular sludge. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2765.

- Scholten, J. & Conrad, R. (2000). Energetics of syntrophic propionate oxidation in defined batch and chemostat cocultures. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2934.
- Sharak Genthner, B. R., Friedman, S. D. & Devereux, R. (1997). Reclassification of *Desulfovibrio desulfuricans* Norway 4 as *Desulfomicrobium norvegicum* comb. nov. and confirmation of *Desulfomicrobium escambiense* (corrig., formerly "escambium") as a new species in the genus *Desulfomicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**, 889.
- Shimoyama, T., Kato, S., Ishii, S. & Watanabe, K. (2009). Flagellum mediates symbiosis. *Science* **323**, 1574.
- Sioud, M., Possot, O., Elie, C., Sibold, L. & Forterre, P. (1988). Coumarin and quinolone action in archaeobacteria: evidence for the presence of a DNA gyrase-like enzyme. *J Bacteriol* **170**, 946.
- Stubner, S. (2002). Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen (TM) detection. *J Microbiol Methods* **50**, 155-164.
- Stubner, S. & Meuser, K. (2000). Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. *FEMS Microbiology Ecology* **34**, 73-80.
- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F. & Horikoshi, K. (1997). Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 279-285.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596.
- Tardy-Jacquenod, C., Magot, M., Patel, B. K. C., Matheron, R. & Caumette, P. (1998). *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 333-338.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673.
- Tsutsuki, K. & Ponnampereuma, F. N. (1987). Behavior of anaerobic decomposition products in submerged soils: Effects of organic material amendment, soil properties, and temperature. *Soil Sci Plant Nutr* **33**, 13-33.
- Wahlen, M., Tanaka, N., Henry, R., Deck, B., Zeglen, J., Vogel, J. S., Southon, J., Shemesh, A., Fairbanks, R. & Broecker, W. (1989). Carbon-14 in methane sources and in atmospheric methane: the contribution from fossil carbon. *Science* **245**, 286-290.
- Wallrabenstein, C., Hauschild, E. & Schink, B. (1995). *Syntrophobacter pfennigii* sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. *Arch Microbiol* **164**, 346-352.
- Watanabe, T., Kimura, M. & Asakawa, S. (2006). Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biol Biochem* **38**, 1264-1274.
- Watanabe, T., Kimura, M. & Asakawa, S. (2009). Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biology & Biochemistry* **41**, 276-285.
- Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K. & Kimura, M. (2004). DGGE method for

- analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol Lett* **232**, 153-163.
- Widdel, F. & Pfennig, N. (1982).** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol* **131**, 360-365.
- Wind, T. & Conrad, R. (1995).** Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thiosulfate, and cell numbers of sulfate reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol* **18**, 257-266.
- 上木勝司、永井史郎 (1993). 嫌気微生物学, vol. 2. 養賢堂.
- 福井作蔵・秦野琢之 (2008). 微生物増殖学の現在・未来 *Propagation of Micro-organisms*. 東京都: 地球科学館.

謝辞

本研究の遂行に当たり、指導教員として終始御指導御鞭撻を賜りました弘前大学遺伝子実験施設 赤田辰治准教授と弘前大学農学生命科学部 殿内暁夫准教授に謹んで御礼申し上げます。また、本論文のご校閲と適切な御教示を賜りました、山形大学農学部 上木厚子教授、山形大学農学部 上木勝司名誉教授、帯広畜産大学 大和田琢二 准教授に心より御礼申し上げます。電子顕微鏡試料の作製から電子顕微鏡操作まで懇切丁寧にご指導いただきました弘前大学農学生命科学部 植物病理学教室の藤田隆助教に厚く御礼申し上げます。また、実験施設や様々な実験器具等を使用させて下さった遺伝子実験施設の方々にも厚く御礼申し上げます。そして本研究を行うにあたり、本田拓也君をはじめとして日々支えてくださった研究室の皆様に感謝申し上げます。