

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19195

研究課題名(和文) 悠久の時間を生き抜く謎を解く-地下微生物が作る新規物質の同定と測定法の開発-

研究課題名(英文) Development of a method to measure new substances produced by underground microorganisms

研究代表者

持丸 華子 (Mochimaru, Hanako)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

研究者番号：90462861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：陸源有機物に含まれている化合物を基質として培養した場合に微生物により生産される物質が、高温貧栄養という深部地下環境における生き残り戦略に関係していると想定し、この物質の同定および測定法の開発を行うことを目的とした。本研究では、嫌気リアクターを用いた微生物株の大量培養を行い、細胞外多糖および糖脂質の分析を行った。さらにフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)、核磁気共鳴分光法(NMR)を用いて測定を行った。さらに他の手法を用いて分析を進めた結果、粘性成分を構成する各種成分の同定に成功した。この微生物株が細胞外にこれらの成分を分泌していることは初めての発見であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分離した微生物株は、粘性物質を生産する培養条件において、長期間高温飢餓条件において溶菌せずに生存した。この研究により油田ガス田などの地下深部における微生物の生存戦略および微生物の生態の一端を明らかにすることができる。深部油田における残存原油分解メタン生成ならびにガス田におけるメタンの増産に応用できる可能性がある。さらに、この粘性物質が細胞膜を守る機能を持っているのであれば、その機能解明により、人間の細胞を若々しく守ることに応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A microbial strain isolated from deep underground produced extracellular viscous substances depending on the substrate. When grown on the substrates that led to viscous extracellular substances, the strain survived for a long time. The purpose of this study was to identify the substances produced by this microbial strain and develop a method to measure them. An anaerobic reactor was used to grow the cells that produced extracellular substances. Extracellular polysaccharides and glycolipids were analyzed. Furthermore, measurements were performed using a Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) and Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Ultimately, the constituents of the extracellular substance were successfully identified. This experiment provided the first evidence that the strain isolated produced the components we identified from extracellular viscous substances extracellularly.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物 油田 ガス田 菌体外物質 深部地下

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の地下深部油ガス田貯留層の多くは、百万年以上もの間、光合成により生産される酸素やフレッシュな有機物の供給が途絶えた地表とは全く異なる環境でとされている。堆積有機物は時間経過により重合縮合を繰り返し、分析不可能な不溶性の巨大分子へと変化していると考えられており(Jour. Sedimentological Soc. Japan 1987. 1-24)、現在も 10^5 cell/ml も生存する地下微生物が、何を食べて生きているのか謎であった(Extremophiles 2007. 11:453-461)。近年我々は、陸源有機物である石炭にメトキシ化合物が含まれ、1種のみであるが、メタン生成古細菌でさえ、それを直接利用可能であることを明らかにした(Science 2016. 354: 222-225)。我々は、このような地下深部環境から数多くの微生物を分離培養してきた。この中の一つの微生物株は、低分子の既知の基質を用いて培養すると対数増殖期を過ぎると速やかに溶菌し死滅した。しかし、比較的高分子の陸源由来有機物を用いて培養を行うとバイオフィルムを形成し、粘性物質が生産され、基質が利用され尽くした後も溶菌がほとんど起こらず長期間の培養後も良好な生存が確認された。この微生物株の基質利用性は極めて限られており、この粘性物質を基質にしている可能性は低いと推察された。このことから、この粘性物質は 55 という高温環境において、細胞膜を保護する役割を担っている可能性があるが、その構成成分および機能については明らかではない。この粘性物質はこれまでの諸検討により新規有機物である可能性が示唆されていたが、正確な分析には多量の粘性物質の回収が必要であり、その回収方法および分析方法については詳細な検討が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、地下の生命活動を支えている可能性の高い陸源有機物由来成分を利用するときに限り生産される粘性物質が、地下深部に生息する微生物の生き残り戦略に関係する物質であるという可能性に着目し、この物質の回収、同定および測定法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 嫌気連続培養器(リアクター)を用いた粘性物質の回収

この微生物株は酸素に触れると死滅する絶対嫌気性の微生物であった。そこで、この微生物株を大量に培養し、粘性物質を物質同定のために回収するため、丸菱バイオエンジの 10 L 嫌気連続リアクターを導入し、微生物株の大量培養を行った。これにより、粘性物質の付着した菌体を大量に回収した。

(2) 粘性物質の抽出・同定・定量方法の確立

微生物菌体から細胞外に分泌された粘性物質を回収するための方法について、1L スケールでさらに詳細に検討を行った。そして、回収した粘性物質を精製し、各種成分分析を行った。バイオフィルムを形成する微生物の多くは細胞外多糖を分泌することが知られているため、初めにこの粘性物質に含まれている多糖を分析した。続いて、糖脂質について分析を行った。さらに、フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)を用いて官能基の推定、核磁気共鳴(NMR)装置を用いた分子構造の解析を行った。その後、粘性物質を一度分解し、その構成分子について同定を行った。さらに、この粘性物質の元素分析を行った。

(3) 培養液の表面張力の測定

粘性物質が生産された場合に培地を激しく振り混ぜると数日間消えないような泡が立った。このため、表面張力について測定を行った。陸源有機物由来成分を用いた場合と他の基質を用いた場合において、培養の遅滞期、対数増殖期、定常期の複数点で培養液の濁度および表面張力をそれぞれ測定した。表面張力は、微生物の通らない $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過した液で測定を行った。

4. 研究成果

(1) 嫌気連続リアクターを用いた粘性物質の回収

深部地下環境から分離した微生物株が、陸源有機物由来成分を利用するときに限り生産する粘性物質を大量に回収するため、嫌気連続リアクターを用いた。嫌気連続リアクターを用いることで菌体を大量に集めることができたが、微生物細胞と菌体外の粘性物質を分離することが困難であった。菌体に粘性物質が付着したままでも解析が可能な場合のために、回収菌体は冷凍保存した。

(2) 粘性物質の抽出・同定・定量方法の確立

菌体外物質がどのような物質であるか予測が立つまで、1L スケールで無攪拌の培養を行い、菌体外物質を丁寧に回収した。菌体外物質はバイオフィルム形成がなされた時に最も回収量が多いため、バイオフィルムが形成されたタイミングで攪拌と遠心分離により、菌体と細胞外物質とに分けて回収を行った。まずは、この菌体外物質を用いて多糖の分析を行った。多糖は多くの微生物でバイオフィルム形成時に菌体外に生産される。そこで、遊離糖と多糖の構成成分の定性分析を行った。その結果、菌体外物質に糖は含まれていなかった。また、バイオサーファクタントとして機能する可能性のある糖脂質についても分析を行ったが、検出されなかった。この物質を、フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)を用いて官能基の推定、核磁気共鳴(NMR)装置を用いた分子構造の解析を試みた。しかし、目視では溶解しているように見えた粘性物質が、実際は水に溶けていなかった可能性が高く、これらの測定では有力な情報は得られなかった。その後、菌

体外物質の溶解性を検討した際に、その物性から化合物の推定を行うことができた。この推定に基づき、構成成分に分解した後、その分解後の成分の分析を行った。その結果、これらの構成成分について詳細を明らかにすることに成功した。さらに粘性物質の元素分析を行ったところ、先の構成成分に含まれる元素が検出され、調和的な結果が得られた。

(3) 培養液の表面張力の測定

この粘性物質が生産された場合に培地を振り混ぜると数日間消えないような泡が立った。そこで、培養液の表面張力の測定を行った。陸源有機物由来成分を用いた場合および他の基質を用いた場合において共通して、培養液の濁度の増加と共に表面張力の減少が確認された。他の二つの基質を用いた時には、表面張力は 55 mN/m であったが、陸源有機物由来成分を用いた場合は 50 mN/m であった。なお、基質を培地に添加したものでは表面張力の低下は見られなかった。陸源有機物由来成分を用いた方が少し表面張力の低下が確認されたが、全く泡の立たない他の基質でも表面張力の低下が見られたことから、粘性物質と表面張力には相関がないと推測された。

以上のように、本研究では、地下の生命活動を支えている可能性の高い陸源有機物由来成分を利用するときに限り生産される粘性物質について、その抽出方法、測定方法を明らかにした。さらに粘性物質の構成成分を詳細に解明した。用いた微生物株がこのような物質を細胞外に生産しているということは、初めての発見であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 持丸華子、眞弓大介、坂田将、吉岡秀佳、玉木秀幸、鎌形洋一
2. 発表標題 深部地下高温油層環境における原油分解とメタン生成
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤創一郎、高篠素子、五十嵐健輔、持丸華子、眞弓大介、玉木秀幸
2. 発表標題 鉄腐食反応を利用した低水素濃度環境を好むメタン生成菌・酢酸生成菌の新規培養法
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞弓大介、持丸華子、玉木秀幸、山本京祐、吉岡秀佳、鈴木祐一郎、鎌形洋一、坂田将
2. 発表標題 石炭を直接利用するメタン菌の新たなメタン生成経路
3. 学会等名 日本地球化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 持丸華子
2. 発表標題 メタン生成菌との共生培養を用いたリグニン関連物質分解微生物の分離培養
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----