

平成22年5月13日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780052

研究課題名（和文） 新奇メタン生成共生系の『第二の種間伝達物質』の可能性

研究課題名（英文） Possibility in the second substance of inter-species transfer within a novel methanogenic syntrophic community

研究代表者

中村 浩平 (NAKAMURA KOHEI)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：40456538

研究成果の概要（和文）：

天然ガス田地層水から新規のメタン生成アーキア RMAST 株を取得した。本菌の環境試料からの取得には共生菌との共生培養が必須であった。RMAST 株は H₂-CO₂ を唯一のエネルギー源と炭素源とした。また、生育にアミノ酸源を要供したことから、共生系内で共生菌からアミノ酸様の物質を供給されていたと考えられた。RMAST 株の微生物学的解析の結果、*Methanobacteriales* 目の異なる 3 属の特徴をモザイク状に有しており、極めて特殊な性状を示した。本菌株を *Methanobacteriaceae* 科の新属新種として提唱する。

研究成果の概要（英文）：

A novel thermophilic methanogen strain RMAST^T was isolated from a formation water of a natural gas field. The methanogen was eventually obtained by applying co-cultivation technique with a syntrophic acetate-oxidizing bacterium. Strain RMAST^T grows solely on H₂-CO₂ and requires sources of amino acids which were probably supplied by the syntroph within the syntrophic culture for growth. Microbiological characteristics (Figure 2) of strain RMAST^T indicates its mosaic character that comprises features of three different genera within the order *Methanobacteriales*. We propose this strain as a type strain of novel methanogen belonging to the family *Methanobacteriaceae*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,300,000	690,000	2,990,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 農学

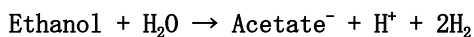
科研費の分科・細目： 農芸化学・応用微生物学

キーワード： メタン生成アーキア、共生菌、微生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

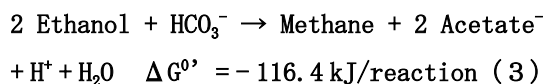
メタン生成共生系とは地球上の生物学的炭素循環の末端を担う微生物共生系である。多糖などの生体高分子は嫌気環境下で酸化され最終的にメタンとなる。生体高分子は発酵菌によってそれぞれのモノマーにまで分解される。モノマーはさらに発酵菌やホモ酢酸菌によって酢酸、水素、アルコール・揮発性脂肪酸などの発酵産物にまで分解される。ホモ酢酸菌はモノマーの分解によって生じる還元力や水素を用いて二酸化炭素を還元し酢酸を生成する。メタン生成アーキアは発酵によって生じる水素を使い二酸化炭素を還元してメタンとし、または酢酸を直接メタンとする。アルコールや揮発性脂肪酸は共生菌とメタン生成アーキアの働きによりメタンと酢酸になる。この共生菌とメタン生成アーキアの間には強い共生関係が存在し、メタン生成共生系と呼ばれる。メタン生成共生系には熱力学法則に基づく水素を介した微生物間相互作用が存在する。

エタノールの嫌氣的酸化の場合、式1のように標準状態で吸エルゴン反応となり進行不可能である。



$$\Delta G^{0'} = + 9.6 \text{ kJ/reaction (1)}$$

この反応の進行を阻害するのは発酵で生じる水素である。自然界では水素利用性のメタン生成アーキアがこの水素を速やかに消費する。すなわち、水素からのメタン生成反応(式2)とエタノール酸化が共役して式3のように発エルゴン反応となり進行可能となる。 $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Methane} + 3\text{H}_2\text{O}$ $\Delta G^{0'} = - 135.6 \text{ kJ/reaction (2)}$



このようにメタン生成アーキアと共生菌の間には、水素を種間伝達物質とした熱力学法則に基づく微生物間相互作用が存在する。熱水湧出孔や有機物のほとんど存在しない深部地下などの特殊な環境を除いて、自然界ではメタン生成アーキアは共生菌から水素を受け取って生育する。さて、このメタン生成共生系には熱力学法則に基づいた微生物間相互作用しか成立しないのであろうか？

メタン生成共生系に関して、水素またはギ酸を介した種間伝達は多く研究されているものの、これらの熱力学法則に基づく物質以外の種間伝達物質に関する知見はほとんどない。メタン生成アーキアと共生菌は、地球の炭素循環の末端を担う生物として共に進化したと考えられる。両者の間には単純に熱力学的作用のもとに進化したのか、それともエネルギー授受に加えて未知の種間伝達物質、つまり『第二の種間伝達物質』を要求するような進化を遂げたのであろうか？残念ながらこれまでの知見からは後者のような現象は明らかにされていない。しかし、本応募者らは『第二の種間伝達物質』の存在の可能性をもつメタン生成共生系を取得した。

本メタン生成共生系は天然ガス田地層水から得た。この地層水中には水素利用性と考えられる未培養のメタン生成アーキア(RMAS)が優占種として存在することが遺伝子レベルでわかっている (Mochimaru et al. Extremophiles, 2007)。天然ガス田で現在もメタン生成を行っている可能性のある RMAS

の生理性状を理解するため一般的な水素利用性メタン生成アーキアの分離法を試みたが分離は不可能であった。そこで、Sakai ら (Appl. Environ. Microbiol., 2007) によって提唱された共生菌を用いた培養法を基に、既知の酢酸酸化共生菌である *Thermacetogenium phaeum* PB 株を用いて集積培養を行ない、さらに応募者らが開発した嫌気性微生物の平板培養技術を用いて酢酸をエネルギー源としたときに RMAS と PB 株の“共生コロニー”としてのみ分離が可能であった。様々な培養方法を試みたが RMAS の純粋培養株は得られず、常に PB 株との共生系でのみ RMAS の維持が可能である。このような経緯から応募者は、本共生系の RMAS は『第二の種間伝達物質』を要求する“共生メタン生成アーキア”ではないかと仮説を立てた。本仮説に至った主たる実験事実は以下の5点である。

1. RMAS は酢酸を基質として PB 株との“共生コロニー”を平板培地に形成する。
2. RMAS は 16S rDNA 配列に基づく分子系統解析より水素利用性メタン生成アーキアに属する。
3. 水素に加え既知の水素利用性メタン生成アーキアの生育促進・要求物質(酢酸、ギ酸、酵母エキス)を添加した平板培地で肉眼で検出できる目視可能なコロニー(直径 0.5mm 以上)を形成しない。
4. 水素のみを基質とした液体培地で RMAS は PB 株とともに生育する(PB 株はホモ酢酸菌でもあり水素と二酸化炭素から酢酸を生成して生育する(図 1 参照))。
5. 水素のみを基質とし PB 株が高密度に存在する平板培地で RMAS は微小なコロニー(直径 0.1mm 未満)を PB 株の微小なコロニー近辺に形成する。

これらの事実は、RMAS が水素をエネルギー源

として、生育に必須な『第二の種間伝達物質』を PB 株からうけとり生育する可能性を示唆している。

本メタン生成共生系により、未知の物質授受を含んだメタン生成共生系における全く新しい微生物間相互作用に関する知見が得られることが強く期待される。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが取得した新奇のメタン生成共生系から未解明の研究領域であるメタン生成共生系の全く新しい微生物間相互作用の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 『第二の種間伝達物質』の存在の検証

既報にてコロニーを形成しにくいメタン生成アーキアが報告されている。RMAS も PB 株との共生コロニーを形成するが単独では目視可能なコロニーを形成しないことも考えられる。その場合『第二の種間伝達物質』は存在しない可能性が生じる。第一にこの可能性を検証する。

抗生物質、溶菌酵素を用いた PB 株の選択的溶菌、温度・pH・塩分濃度などの生育条件、Percoll 密度勾配超遠心などを単独または組み合わせ用いて RMAS と PB 株を分離する。水素のみの液体培地で RMAS が生育するか FISH や定量 PCR で確認する。また、ホモ酢酸菌でない共生菌 (*Pelotomaculum thermopropionicum*, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum*, *D. nigrificans* 等) を用いて共生コロニーを形成させて共培養系を取得し、水素のみで生育可能か確認する。生育可能であれば『第二の種間伝達物質』は存在しないと考えられる。一方、RMAS が生育しない、または生育するときは必ず PB 株も生育する場合、『第二の種間伝達物質』は存

在すると考えられる。

(2) RMAS を純粋培養可能とする培養条件の検討

i) 平板培養法 (1) と並行して『第二の種間伝達物質』は存在すると仮定し水素存在下の平板培養法で RMAS のコロニー形成を検証する。平板培地にメタン生成アーキアの生育を促進・要求する既知物質を添加する。また、共生系培養液の上清や PB 株の水素基質下純粋培養液上清を未知物質として添加する。これらの培養上清は培養後に未知物質の濃度が低下する可能性を考慮して固相抽出カラム等により濃縮を行い、更に有酸素下で失活する可能性を考慮して嫌気チャンバーで平板培地に添加する。さらに PB 株の水素基質下の純粋培養液にも同様に未知物質が含まれる可能性を考慮する。RMAS のコロニー形成の確認は、出現したコロニーの 16S rDNA 配列情報をもとに行う。コロニー形成が確認できれば RMAS の詳細な生理性状解析及び物質の同定を行う。

確認できない場合、RMAS は単独では目視可能なコロニーを形成しない (Case 1)、既知物質が該当しない・培養上清濃度が不相当である (Case 2) 可能性の二通りを想定する。Case 1 に関しては次いで限外希釈培養法を試みる。Case 2 については文献、研究協力者との意見交換を参考にメタン生成アーキア以外の微生物に関して既知の生育要求物質を用いて実験を行う。未知物質に関しては、培地量に対して 100 倍量程度迄をめどに上清を添加して実験を行う。それでもコロニーの形成が確認されない場合、Case 1 と判断し限外希釈培養法を試みる。

(3) RMAS の生理生化学性状の検討

RMAS は、*Methanobacteriaceae* 科の新規のメタン生成アーキアであることがこれまでの研究から示唆されており、本菌株を新種記

載するために下記の菌学的諸性質の検討を行う。

各種生育至適条件 (温度、pH、塩濃度等)、生育基質、生育必須・補助因子、形態学的特徴 (TEM、SEM)、GC 含量の検討、メチル補酵素 M 還元酵素遺伝子の系統学的解析等を行う。

(4) PB 株の産出する種間伝達物質の推定及び異種共生菌との共生系の構築

これまでの研究から PB 株が RMAS にアミノ酸様の物質を供給している可能性が示唆された。本物質の推定および他の共生菌からも同様の物質が RMAS に供給されるかを検討する。共生菌として *Syntrophothermus lipocalidus*、*Tepidanaerobacter syntrophicus* を用いる。これらの共生菌との共培養系の構築を試みる共生菌とメタン生成アーキア間での種間伝達物質伝達の遍在性を検討する。

4. 研究成果

(1) 『第二の種間伝達物質』の存在の検証

抗生物質、温度条件を検討し PB 株の選択的排除を試みた。その結果、RMAS が生育するときは必ず PB 株が同時に培養された。また、ホモ酢酸菌でない共生菌 *Desulfotomaculum nigrificans* を用いて限外希釈培養、共生コロニーの形成を試みた。その結果、共生系は構築できたものの PB 株も混在した培養系であった。これらの結果から RMAS が生育するには、PB 株も生育も必須である可能性が示唆され、『第二の種間伝達物質』は存在すると考えられた。

(2) RMAS を純粋培養可能とする培養条件の検討




平板培養法で RMAS のコロニー形成を試みた。平板培地にメタン生成アーキアの生育を促進・要求する既知物質を添加した。生じたコロニーを検証した結果、PB 株単独または

RMASとPB株の共コロニーであった。種々の条件検討から、RMAS-PBの混合液体培養系において水素を基質にトリプトン、酵母エキス、ビタミン、酢酸を添加したとき、増殖速度の増加が確認された。これらの結果から、RMAS単独のコロニー形成には増殖に上記の物質にくわえ、高度な嫌気条件が必要と考え、水素基質に上記の物質を添加したDeep チューブ法によるコロニー形成を試みた。その結果、RMASの純粋コロニーの取得に成功した。RMASは生育にアミノ酸源を要求し、PBは共生培養条件下でそれらをRMASに供与する可能性が示唆された。

(3) RMASの生理生化学性状の検討

RMAS株は、生育至適温度（範囲）65°C（45~80°C）、生育至適pH（範囲）6.9~7.7（6.9~7.7）、生育至適塩濃度（範囲）0.25%（0.001~2%）であり、低塩濃度の中性付近に生育至適を持つ好熱性のメタン生成アーキアであった。栄養源はH₂-CO₂であり、その他のメタン生成基質（ギ酸、酢酸、メタノール等）を利用しなかった。更に増殖因子として、酵母エキス、トリプトン、またはビタミン類を必要とした。共生菌（PB株）からアミノ酸またはビタミンが供給されていることを強く支持した。その細胞は、超薄切片電子顕微鏡像からおよそ30nmの厚い細胞壁をもち、近縁の *Methanothermus* 属のものに類似していた（表1）。

表1 RMAS株とその近縁株における細胞壁の厚さ

	RMAS株	<i>M. thermotrophicus</i>	<i>M. fervidus</i> ⁺
16S rDNA相同性	-	96%	91%
TEM切片図 (Bar: 100 nm)			
厚さ (nm)	25	1	26
S-layer	-	-	+

細胞壁のアミノ酸組成からシュードムレインを有していると考えられたが、シュードム

レイン分解酵素に耐性であった。また、分子系統的解析から *Methanothermobacter* 属 (16S rDNA) (図1)、*Methanobacterium* 属 (McrA) (図2) に近縁であり、遺伝子またはアミノ酸配列によって近縁種が異なることが明らかとなった。

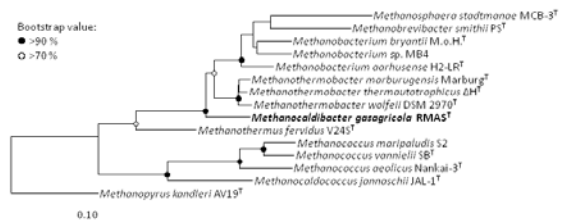


図1 16S rRNA遺伝子配列に基づくRMAS株と近縁種の分子系統樹

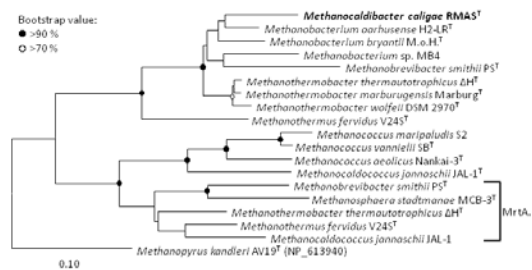


図2 McrAアミノ酸配列に基づくRMAS株と近縁種の分子系統樹

これらの結果から RMAS株は *Methanobacteriaceae* 科の異なる3属のメタン生成アーキア (*Methanothermobacter*, *Methanobacterium*, *Methanothermus*) の性状をモザイク状に有しており、これを新属新種のメタン生成アーキア *Methanocaldibacter caligae* として提唱する。

(4) PB株の産出する種間伝達物質の推定及び異種共生菌との共生系の構築

PB株の産出する種間伝達物質は、アミノ酸（ペプチド様物質）であると考えられた。しかし、これらの物質の特定には至らなかった。また、RMAS株とPB株をH₂-CO₂で培養した時には、PB株の産出する酢酸もRMAS株の生育に影響することが考えられた。

PB株以外にRMAS株と共生関係を持つ共生菌が存在するか、乳酸分解水素発生型共生菌 *Tepidanaerobacter syntrophicus*、及び酪酸

分解水素発生型共生菌 *Syntrophothermus lipocalidus* を用いて共生系の構築を試みた。その結果、アミノ酸源を供給しない時、その共生系の構築は困難であった。これは、共生菌でも RMAS 株と共生関係を構築できるものは限られている可能性を示していた。

(5) 総括

このように、PB 株との共生培養を経て RMAS 株の分離培養に成功した。RMAS 株は全く新規のメタン生成アーキアであり新属新種として提唱する準備を行っている。『第二の種間伝達物質』はアミノ酸（またはペプチド様物質）であると考えられた。そして、共生菌と呼ばれる水素を供給するバクテリアのなかにも、これらを RMAS 株に供給することができるものとそうでないもの存在することが考えられた。

一見、完全な独立栄養性でない RMAS 株は環境中において生存競争の中で不利のように考えられる。しかしながら、データベース上には RMAS 株タイプのメタン生成アーキアがさまざまな嫌気環境（油田、メタン発酵槽、埋立地、温泉など）からも検出されている。中には、PB 株様のバクテリアも同時に検出されている環境（油田、メタン発酵槽）も存在し、さまざまな環境で『第二の種間伝達物質』がメタン生成アーキアと共生菌の間でやり取りされていることが示唆された。さらにその多くの環境で RMAS 株タイプのメタン生成アーキアが優占種として検出されている。どのようにしてこれらは優占種として存在しうるのであろうか？アミノ酸合成能を失っても、それを補完し優占種として存在させる能力とは一体何であらうか？そして、それは PB 株のような共生菌との間に何らかのより親密な共生関係を築かせるものなのであろうか？

我々はこれらの謎を解く鍵は、水素親和性

にあると考えている。今後はこれらを明らかにするために、近縁のメタン生成アーキアを含めた網羅的な比較ゲノム、生化学的研究を行っていく必要があると考え、現在進行中である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

①森 幾啓、中村 浩平、高見澤 一裕 水溶性天然ガス田より分離された新規メタン生成アーキアの細胞壁に関する報告 日本農芸化学会 2010/3/29 東京

②外山 知英、中村 浩平、鎌形 洋一、高見澤 一裕 共生培養により取得した新規メタン生成アーキアの水素親和性に関する反応速度論的解析 日本農芸化学会 2010/3/29 東京

③高橋 亜瑞美、中村 浩平、玉木 秀幸、持丸 華子、高見澤 一裕、中村 和憲、鎌形 洋一 水溶性天然ガス田地層水より分離された新規メタン生成アーキアに関する研究 日本農芸化学会 2009/3/28 博多

④高橋 亜瑞美、中村 浩平、玉木 秀幸、持丸 華子、高見澤 一裕、中村 和憲、鎌形 洋一 水溶性天然ガス田地層水より分離された新規メタン生成アーキアに関する研究 微生物生態学会 2008/11/26, 27 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 浩平 (NAKAMURA KOHEI)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：40456538