

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06336

研究課題名(和文) 基質・生成物の可逆代謝能を利用した酢酸酸化細菌の網羅的分離培養および多様性解析

研究課題名(英文) Cultivation and diversity of syntrophic acetate-oxidizing bacteria

研究代表者

服部 聡 (Hattori, Satoshi)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：40373352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では無酸素環境下で酢酸を酸化分解する酢酸酸化細菌を研究対象として、山形県泥炭堆積物からこれらの微生物を取得することを目的とした。その結果、酢酸酸化細菌の分離には至らなかったものの、同細菌と逆方向の代謝反応を行う炭酸固定細菌(還元的酢酸生成細菌)の分離培養に成功した。分離した当該細菌グループのうちの1株は既存の還元的酢酸生成細菌の16S rRNA遺伝子との相同性が96%であり、新種レベルに相当する新規の菌であることが示唆された。また、酢酸酸化細菌を分離する過程で既存の細菌との16S rRNA遺伝子相同性が88%という新科レベルの細菌の取得にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酢酸はメタン生成環境下において複数の微生物群による分解過程で生成する化合物であり、これらの蓄積は嫌氣的有機物分解プロセスの破綻を招くことから、その分解あるいは生成を担う微生物は非常に重要である。本研究では酢酸の生成に関与する細菌として、新規の還元的酢酸生成細菌の取得に成功した。これらの成果は泥炭環境下におけるメタン生成プロセスにおいて知見の乏しかった当該細菌の多様性や機能解明に貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, microbial diversity in peat pond was studied by using a culture-independent 16S rRNA gene amplicon analysis. The results showed that several bacterial families (Clostridiaceae, Ruminococcaceae, Veillonellaceae, Holophagaceae, and Spirochaetaceae) to which previously reported homoacetogens belonged were detected. In addition, cultivation of the syntrophic acetate-oxidizing bacteria was attempted. Although the attempt was not successful, several homoacetogens and other bacteria have been successfully cultivated and isolated. The 16S rRNA gene analysis showed that one strain related to the homoacetogens was likely to be phylogenetically novel at the species-level. Also, the other strain was considered as belonging to a novel family of the order Bacteroidales. The findings in this study will contribute to the studies of microbial diversity and function in the peat ecosystems.

研究分野：微生物学

キーワード：酢酸酸化細菌 還元的酢酸生成細菌 メタン生成古細菌 微生物菌叢解析 分離培養

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタンは温室効果ガスあるいはバイオマスエネルギーとして功罪両面を有する重要な化合物である。メタンガスは湖沼堆積物や湛水水田など嫌気環境において、複数の嫌気微生物群(加水分解微生物群、酸生成微生物群、メタン生成微生物群)の連携により生成される。このうち、メタン生成微生物群は有機物分解の最終段階を担う重要なグループであると考えられている。メタン生成においては水素と酢酸が重要な化合物として知られ、これらの化合物を代謝する細菌のうち、酢酸分解・水素生成方向を担う微生物として酢酸酸化細菌が、水素消費・酢酸生成方向を担う微生物として還元的酢酸生成細菌の存在が知られているこれらの微生物の分離例は限られており、その実態は未だ明らかになっていない状況にある。

2. 研究の目的

本研究では泥炭堆積物における嫌気微生物群の多様性を遺伝子工学的手法により明らかにするとともに、絶対嫌気培養法により新規の酢酸酸化細菌および還元的酢酸生成細菌を取得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ハス泥炭試料の採取

手漕ぎ船により淡水池(山形県鶴岡市大山上池)の中程まで行き、船上から泥炭採取器を用いてハス泥炭を垂直方向に25 cm 採取した。これを直ちに研究室に持ち帰り、泥炭深度ごとに3画分(深度0-10 cm, 10-20 cm, 20-25 cm)に分画した。

(2) ハス泥炭堆積物中における微生物菌叢解析

3画分に分画したハス泥炭のうち各々0.25 gをDNA抽出用の試料とした。ビーズ破砕機により細胞破砕処理を行った後、土壤用DNA抽出キット(DNeasy PowerSoil Pro Kit)を用いて各々の堆積物試料からゲノムDNAを抽出精製した。次いで、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を対象として次世代シーケンサーにより paired end シーケンスを行なった。得られた塩基配列からキメラ配列を除去した後、菌叢解析パイプライン QIIME2 により泥炭深度ごとに微生物菌叢解析を行った。

(3) 還元的酢酸生成細菌およびメタン生成古細菌の集積培養および菌叢解析

泥炭試料のうち、0-10 cm 画分を植菌源として、バイアル瓶内に調製した絶対嫌気液体培地に植菌し25°Cで集積培養を行った。なお、還元剤には硫化ナトリウム・システイン系を、培養基質には水素、メタノール、酢酸などを各々用いた。気層部はN₂/CO₂ (80:20, v/v)またはH₂/CO₂ (80:20, v/v)でガス置換を行った。なお、細菌の集積時にはメタン生成古細菌の特異的阻害剤としてBES (2-bromoethanesulfonate)を、メタン生成古細菌の集積時には同菌の補酵素 CoM (2-mercaptoethanesulfonate)を添加して培養を行った。集積培養により得られた優先微生物種を同定するため、上記(2)と同様の手法により菌叢解析を行った。

(4) 還元的酢酸生成細菌および関連微生物の純粋分離

集積培養により得られた微生物培養液を植菌源として、各基質を含有した絶対嫌気固体

培地に嫌氣的に植菌し、コロニー形成による純粹分離を行った。植菌は脱酸素済みの N₂/CO₂ ガスを吹き込み、酸素の混入による培地の酸化を回避しながら行った。植菌後、H₂/CO₂ (100 kPa) または N₂/CO₂ (常圧) で気層部をガス置換し、25°C で静置培養を行った。得られた分離株について、PCR により 16S rRNA 遺伝子の増幅を行い、サンガー法により当該遺伝子配列を決定、相同性解析および分子系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) ハス泥炭堆積物中における微生物菌叢解析

網羅的菌叢解析の結果、ハス泥炭 3 画分共に類似した微生物種の構成割合を示した。また、Pseudomonadota 門、Chloroflexota 門、Acidobacteriota 門などの真正細菌や、Euryarchaeota 門古細菌が主要な微生物群として泥炭微生物生態系を構成していることが明らかとなった。また、還元的酢酸生成細菌が属する系統群の一部 (Clostridiaceae 科、Ruminococcaceae 科、Veillonellaceae 科、Holophagaceae 科、Spirochaetaceae 科) や、水素資化性メタン生成古細菌が属する系統群の一部 (Methanoregulaceae 科、Methanobacteriaceae 科、Methanospirillaceae 科、Methanomassiliicoccaceae 科) も検出された。これらから、泥炭環境には多様な還元的酢酸生成細菌、メタン生成古細菌が生息していることが示唆された。

(2) 還元的酢酸生成細菌およびメタン生成古細菌の集積培養および菌叢解析

各種基質存在下で絶対嫌気培養を行うことにより、各々の基質から集積培養系を得た。16S rRNA 遺伝子を用いて微生物種の特定を行ったところ、H₂/CO₂ 集積培養系において還元的酢酸生成細菌である *Sporomusa* 属や *Acetobacterium* 属細菌の増殖が認められた。また、メタン生成古細菌については継代培養が困難であったものの、酢酸集積培養系においては Methanosaetaceae 科メタン生成古細菌が、メタノール集積培養系においては Methanosarcinaceae 科メタン生成古細菌の増殖が認められた。

(3) 還元的酢酸生成細菌および関連微生物の純粹分離

上記の集積培養系から絶対嫌気固体培地を用いて嫌氣的にコロニーを形成させることにより、各種基質から分離株を取得した。メタノール培養系からは *Lacrimispora sphenoides* (Lacnospiraceae 科) に近縁な細菌 (KM-2 株) を取得した。また、H₂/CO₂ 培養系からは還元的酢酸生成細菌である *Acetobacterium* 属に属する分離株 (KM-16 株) や、*Romboutsia* 属に属する細菌 (KM-20 株) を取得することに成功した。16S rRNA 遺伝子全長解析の結果、KM-16 株は *Acetobacterium maricum* と 96.4% の相同性を示したことから、同分離株は *Acetobacterium* 属の新種相当の株であることが示唆された。また、H₂/CO₂ 培養系において、Bacteroidales 目に属する細菌 (KM-10 株) を取得した。16S rRNA 遺伝子全長解析の結果、当該細菌の最近縁種は *Bacteroides caecigallinarum* であったが、その相同性は 88.5% と低かった。これらから、KM-10 株は新科相当の株であることが示唆された。

以上、本研究においては酢酸酸化細菌の同定には至らなかったものの、酢酸酸化細菌と逆方向の代謝を行う還元的酢酸生成細菌について、新種相当の分離株の取得に成功した。また、新科相当の細菌など、新規細菌の取得にも成功した。泥炭は温暖化ガスの発生源として負の

側面もあるが、泥炭中には多種多様な微生物が生息しており、新規微生物を取得する上で魅力的な分離源であることが本研究において改めて示されたものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------