

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510092

研究課題名（和文）液体分離培養法による嫌気性酢酸代謝微生物共生系の多様性および機能の解明

研究課題名（英文）Analyses on Diversity and Functions of Anaerobic Acetate Metabolizing Syntrophic Microorganisms by Using a Liquid Separation and Cultivation Technique.

研究代表者

重松 亨 (SHIGEMATSU TORU)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：10315286

研究成果の概要（和文）：マイクロプレートを用いた液体分離培養技術を構築し、酢酸代謝微生物（酢酸資化性メタン生成古細菌あるいは、酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の微生物共生系）のハイスループット分離培養を検討した。マイクロプレート分離培養液の古細菌の増殖をPCR法により解析した結果、古細菌のマイクロプレートへの分配はポアソン分布の予測と概ね一致した。酢酸代謝嫌気性微生物をハイスループットに分離培養する実験系を構築することに成功した。

研究成果の概要（英文）：A high-throughput separation and cultivation technique of anaerobic acetate-metabolizing microorganisms, which contain aceticlastic methanogens and microbial syntroph of acetate-oxidizing bacteria and hydrogenotrophic methanogens, was developed by liquid cultivation using microplates. By PCR detection of Archaea in the wells of microplates after cultivation, distribution of archaeal cells was proven to be agreed with Poisson's distribution. The separation and cultivation of anaerobic acetate-metabolizing microorganisms could be successfully carried out using this new technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：環境負荷低減技術

1. 研究開始当初の背景

土壌、水田などの地層圏、河川、湖沼、海底などの水圏下層部、そしてメタン発酵槽などの嫌気的な自然あるいは人工環境において、有機物は様々な代謝様式を持つ嫌気性細

菌群の作用で酸化分解され、最終的にメタン生成古細菌群によりメタンと二酸化炭素に変換される。酢酸はこの有機物の嫌気分解反応における主要な中間代謝物であり、様々な嫌気環境で生成されるメタンの70～80%が酢

酸由来とされている。

酢酸からメタンを生成する反応経路には酢酸資化性メタン生成古細菌による経路と酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の共生による経路の2種類が知られている。これまで、多くの酢酸資化性メタン生成古細菌が様々な嫌気環境から単離され詳細に解析されている。しかし、もう一つの共生経路については、酢酸酸化細菌の単離例が少ないため知見が乏しい状況にある。

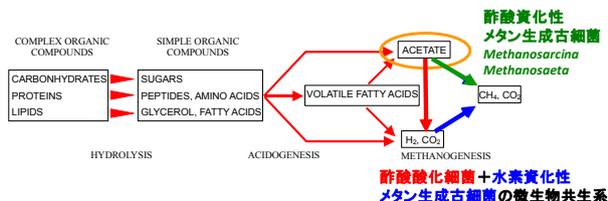


図1 メタン発酵における有機物の分解経路

2. 研究の目的

本研究では、上記の微生物共生系を含む、酢酸代謝微生物をハイスループットに分離培養する技術を確認し、この微生物共生系の分類学的多様性、ポピュレーション構造、代謝機能、そして、メタン発酵環境における炭素フローに対する寄与率などについての知見を獲得することを目的とした。過去の研究により、低負荷で運転するメタン発酵槽や淡水湖底泥においてこの共生系による経路が酢酸からのメタン生成の主要経路であることを示す報告がある。したがって、この共生系についての知見は、メタン発酵プロセスの安定運転および嫌気微生物生態系の理解につながると考えた。

3. 研究の方法

我々は、マイクロプレートを用い、環境試料中の好気性細菌をハイスループットに分離・液体培養するマイクロプレート希釈法を開発し群集構造を細胞数に基づき解析する手法を確認した。本研究ではこの手法を嫌気性微生物群集に応用することで、微生物共生系を含む酢酸代謝微生物群集をハイスループットに分離培養する技術の確認を行った。分離培養した微生物に対して分子生物学的手法を適用し、分類情報を獲得し、ポピュレーション構造を解析した。

4. 研究成果

(1) 連続培養系による嫌気性酢酸代謝微生物群集の集積

下水処理場の嫌気性消化槽汚泥を微生物源として、酢酸を唯一の炭素源とする合成廃水を連続供給する嫌気性ケモスタット培養系を構築した。37℃において希釈率 0.025 d⁻¹で、バイオガス発生速度約 10 ml/h、槽内 pH

7.4 で安定した連続培養系の構築が行えた。定常状態における培養系内の酢酸資化性微生物の濃度を最確数(MPN)法により計測したところ、 $3.09 \times 10^4 \pm 1.25 \times 10^4$ [MPN/ml]であった。

連続培養液中の微生物を位相差顕微鏡ならびに蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法により観察した。その結果、糸状および凝集塊を形成する古細菌が優占することを確認し、細胞形状からそれぞれ *Methanosaeta* 属および *Methanosarcina* 属の酢酸資化性メタン生成古細菌と推定した。

また、少数であるが、水素資化性メタン生成古細菌の特徴である補酵素 F₄₂₀ の強い自家蛍光を発する短桿菌状の微生物が認められた。このことから、本連続培養系に目的の微生物共生系が存在することが示唆された。

古細菌および細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅し、系統解析のための実験手順を構築した。

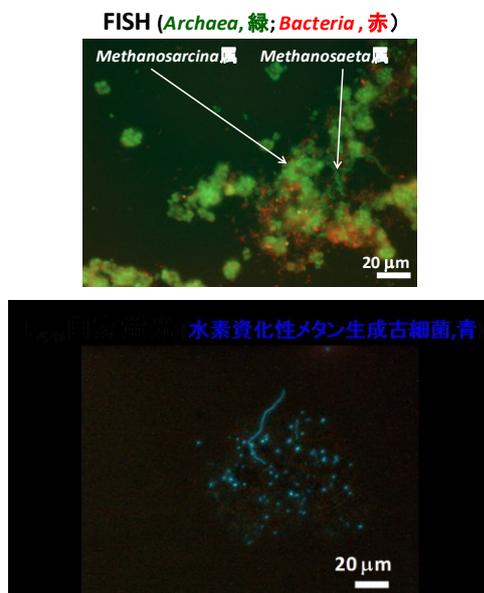


図2 連続培養液中の顕微鏡観察。FISH 法による古細菌 (Archaea) と細菌 (Bacteria) の識別(上)と、補酵素 F₄₂₀ 自家蛍光による水素資化性メタン生成古細菌の検出(下)。

(2) マイクロプレートを用いた嫌気性微生物分離培養技術の確立

96ウェルマイクロプレートを用いた分離培養技術の構築を行った。まず、海水中の好気性細菌をZoBell液体培地を用いて希釈後、マイクロプレート10枚に分注し、分離培養を行った。合計960ウェル中98ウェルが増殖した希釈条件では、増殖ウェル中の微生物はほぼ単一であることが16S rRNA遺伝子解析により示された。この結果から、細胞のマイクロプレートウェルへの分配はポアソン分布に従うこ

とが分かり、総ウェル数の10%以上のウェルにおいて増殖が認められる希釈条件ならば、2個以上の細胞が同一ウェルに分配される期待値が高いことが示された。

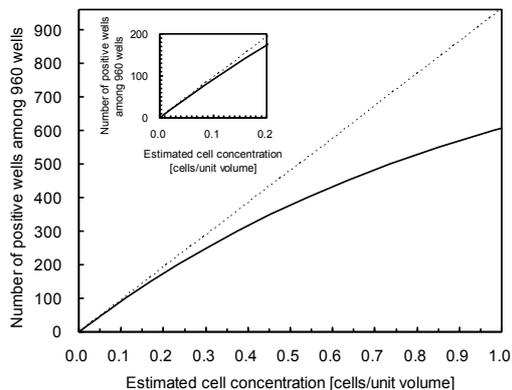


図3 各ウェルあたりの平均分配細胞数と960ウェルのうち増殖が生じるウェル数の推定

このマイクロプレート希釈培養技術を嫌気性微生物に応用するために、Hungate法による脱酸素操作を行った培地を嫌気性グローブボックス中でマイクロプレートに分注し、シリコンゴム栓でふたをした後、脱酸素剤入りの嫌気ジャーに移す培養法を構築した。①培地中の還元剤(システイン塩酸塩および硫化ナトリウム)濃度、②マイクロプレートの材質、③マイクロプレートのシール材をそれぞれ検討することで、嫌気性指示薬であるレサズリンの赤色化を少なくとも2週間以上防止する嫌気環境を達成することができた。

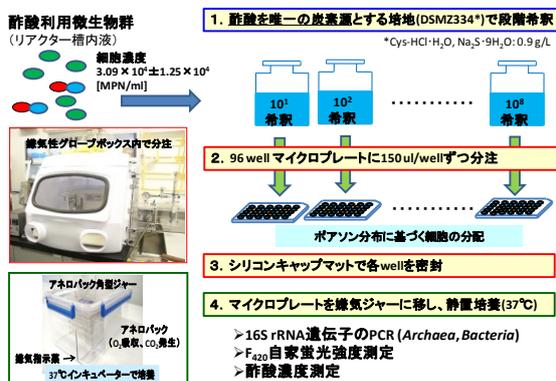


図4 嫌気性マイクロプレート分離培養実験の概念図

最適化した嫌気培養法を用いて、連続培養系の培養液を、酢酸を炭素源とする合成培地(DSMZ334)で適宜希釈し、マイクロプレートにて分離培養を行った。微生物の増殖をメタン生成古細菌に特有の補酵素 F_{420} の自家蛍光を指標として行った。約2週間の培養の結果、1wellあたり約3個の細胞

の分配が予想されるマイクロプレートで高い自家蛍光を示すwellがいくつか検出された。しかし、低い検出感度と高いバックグラウンドの問題が生じ増殖の判定を行うことは困難と判断した。

(3) マイクロプレート分離培養液からの16S rRNA 遺伝子の増幅と解析

マイクロプレート分離培養液を鋳型として *Archaea* の16S rRNA 遺伝子のPCR増幅を行い、増幅の有無を指標に増殖を判定することにした。その結果、増殖が認められたマイクロプレートのwell数は、MPN法に基づく細胞濃度からポアソン分布により予測した数と概ね一致した。このことから、発酵槽内液の段階希釈により、酢酸資化性メタン生成古細菌あるいは微生物共生系がほぼ純粋に分離できる可能性が示された。マイクロプレート分離培養をもう一度実施したところ、再現性が認められた。

表1 分離培養液中の *Archaea* の検出の予測と実測値

希釈倍数	1.0×10^2	1.0×10^3	1.0×10^4	1.0×10^5	1.0×10^7
1wellに1個以上の細胞が分配されるwell数(ポアソン分布による予測値)	96	95	35	4	0
Archaeal-16SrRNA 遺伝子が検出されたwell数(実測値)	NT	92	39	5	NT

NT, not tested

PCR増幅の感度をNested-PCR法により増加させ、増幅した *Archaea* の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。解析ができた24wellの培養液からのPCR産物の塩基配列の内、23wellは *Methanosaela* 属、1wellが *Methanosarcina* 属の16S rRNA 遺伝子に相同性を示した。以上の結果から、酢酸資化性の嫌気性微生物をハイスループットに分離培養する実験系を構築することに成功した。解析するwell数を増加することで、培養法に基づく、これらの酢酸資化性メタン生成古細菌のポピュレーション解析を可能とする。

現時点では共生系を構成する水素資化性メタン生成古細菌が分離培養されたwellは確認されていないが、今後解析well数を増やすことで、ポピュレーションの低い共生系が確率的に分配される可能性はあると考えている。今後、本研究を進めることで、酢酸分解共生系の多様性および機能を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① 重松 亨、湯岳琴、木田建次「メタン発酵プロセスに関与する微生物群集」生物工学会誌、査読無 87(12), 570-596 (2009)

年 12 月)

研究者番号：10315286

[学会発表] (計 6 件)

- ① 重松 亨「メタン発酵槽に生息する微生物群集の構造と機能」バイオマス&エネルギー expo in 新潟、朱鷺メッセ(2012年3月1日)
- ② 重松 亨「メタン発酵プロセスにおいて酢酸を分解する微生物群集の構造および機能」第3回メタン高度利用技術シンポジウム、長岡商工会議所(2011年12月5日)
- ③ 井口晃徳、重松 亨、大久保努、大矢明子、高橋優信、久保田健吾、関口勇地、荒木信夫、山口隆司、原田秀樹「無加温実下水処理 UASB リアクターの微生物群集構造と高頻度に検出される未培養微生物群の検出」第3回メタン高度利用技術シンポジウム、長岡商工会議所(2011年12月5日)
- ④ 重松 亨、中島美沙子、林真由美、上野茂昭、藤井智幸、正木春彦、井口晃徳、平山匡男「マイクロプレートを用いた嫌気性酢酸利用メタン生成微生物群の分離培養系の構築」第63回日本生物工学会大会講演要旨集 p. 34 東京農工大学(2011年9月26日)
- ⑤ 中島美沙子、林真由美、上野茂昭、藤井智幸、正木春彦、重松 亨、平山匡男「マイクロプレートを用いた嫌気性酢酸代謝微生物共生系の分離培養」日本農芸化学会2011年度大会講演要旨集 p. 259 京都女子大学(2010年3月25~28日)
- ⑥ Toru Shigematsu, Mayumi Hayashi, Isamu Kikuchi, Shigeaki Ueno, Haruhiko Masaki and Tomoyuki Fujii "A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment" Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC' 09) J. Biosci. Bioeng., 108 (S1), S78, Kobe International Conference Center (2009/11/25)

[図書] (計 1 件)

- ① 重松 亨「第22章 食品・環境と難培養性微生物」大熊盛也，工藤俊章監修「難培養微生物研究の最新技術 II」ISBN978-4-7813-0183-9 pp. 2412-247. シーエムシー出版，東京(2010年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重松 亨 (SHIGEMATSU TORU)

新潟薬科大学 応用生命科学部 准教授