

## 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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380175

研究課題名（和文）高度好熱菌性油田細菌の原始的なアルカン代謝および生態に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the primitive alkane metabolisms and ecology of extremely thermophilic petroleum bacteria

## 研究代表者

森川 正章（MORIKAWA MASAOKI）

北海道大学・大学院地球環境科学研究所・教授

研究者番号：20230104

研究成果の概要（和文）：深部高温地下油田から単離した *Geobacillus thermoleovorans* B23 の全ゲノム配列を解読し、高度好熱菌固有の3組の新規アルカン代謝遺伝子群を発見した。またその遺伝子産物が、高温油田環境で独自に進化した非金属型酵素であることを示唆した。一方、深部高温地下油田から初めて単離に成功した *Coprothermobacter proteolyticus* PM9-2 がメタン生成菌と栄養共生関係にあることを実証した。さらに、両者がユニークな多糖類で包まれた凝集体を形成して相互の物質交換の効率化を図っていることを示唆した。以上の成果から、地表から隔絶した深部油田微生物群の生態を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We determined whole genome sequence of *Geobacillus thermoleovorans* B23 and successfully discovered three sets of gene operons responsible for alkane degradation. We also indicated that the gene products are non-metal enzymes that should have been uniquely evolved under high temperature petroleum conditions. On the other hand, we have experimentally demonstrated that *Coprothermobacter proteolyticus* PM9-2, the first isolated bacterium from a deep subterranean high temperature oil reservoir, constituted syntrophy with a methanogenic archaeum. Moreover, it was found that they grew in coagulates that were covered by unique polysaccharides in order to exchange materials effectively. These results contribute to clarify microbial ecology in deep subterranean high temperature petroleum reservoir that is far isolated from surfaces.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：深部地下油田, *Geobacillus*, *Coprothermobacter*, *Methanothermobacter*, 高度好熱菌, アルカン水酸化酵素, ゲノム, 栄養共生

## 1. 研究開始当初の背景

1895年にわが国の植物学者 三好 学博士が、ブドウ果表皮のパラフィンのカビが分解することを観察したのが、微生物による炭化水素分解の最初の報告であるとされている。以来、1980年頃を頂点とする「石油発酵」分野は日本が世界をリードしてきた。やがて、炭化水素分解微生物の探索源は地表土壌や表層水から深部高温環境へと広がり、生物の起源や地下生物圏解明への糸口という新たな局面を迎えている。私たちが2000年に帝国石油の協力を得て、深度2,150メートルの新潟県南阿賀油田から単離した高度好熱菌 *Geobacillus thermoleovorans* B23 は、炭素鎖長30程度の難分解性固形長鎖アルカンを70°Cで完全分解できる特徴を有する (Kato et al. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 100 [2001])。その後、本菌のアルカン代謝機構を丹念に調べる中で、常温細菌には存在しない真核生物型のアシル CoA オキシダーゼ活性を検出すると共に、その反応副産物である有害過酸化物を細胞内で除去する酵素群がアルカン分解に伴って顕著に誘導されることを報告した (Kato et al. *BMC Microbiol.* 9, 60 [2009])。これらは真核生物細胞に見られるオルガネラ：ペルオキシソーム (ミクロボディ) と共通する特徴であることから、私たちは B23 の祖先がペルオキシソームの起源ではないかと考えている (Morikawa. *Appl. Microbiol. Biotech.* 87, 1596 [2010])。これに対して、長鎖アルデヒド脱水素酵素は常温細菌由来のものと同じタイプであることから本菌のアルカン代謝機構は細菌型と真核生物型のキメラであることを示唆した (Kato et al. *Extremophiles* 14, 33 [2010])。関連する国内外の研究動向としては、1995年に東フランスの油田深度1,670 mから超好熱菌 *Thermotoga subterranea* が単離されたのを契機にいくつかの超好熱菌群が報告されているが、いずれも炭化水素分解活性は有していない。1996年にはドイツのグループが65°Cで芳香族炭化水素分解を分解する *G. thermoleovorans* A2 を報告し、その後関連酵素の遺伝子クローニングと諸特性解析を進めているが特に際立った特徴は報告されていない。一方、2006年になって中国のグループが B23 と同様に長鎖アルカンを分解する *G. denitrificans* NG80-2 を内陸深部油田から発見した (Wang et al. *Extremophiles* 10, 347 [2006])。さらに翌年には全ゲノム解読を終了し、アルカンの初発水酸化反応が、従

来報告されているタイプとは全く異なる新規酵素 LadA によって触媒されることを報告した (Feng et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5602 [2007])。今年の9月、中国の別のグループが中鎖アルカンを分解する *Geobacillus* sp. MH-1 をやはり深部油田から単離し、そのアルカン初発水酸化酵素は常温細菌のものと同じ A1kB タイプであることを報告している (Liu et al. *Res. Microbiol.* 160, 560 [2009])。以上のように、高度好熱菌の炭化水素分解経路は常温細菌群と共通か、あるいは異なる系統のものか不明な点が多い状況であった。一方、私たちは本研究課題を開始するまでに南シナ海の深部海底油田から絶対嫌気性高度好熱菌性油田細菌 *Coprothermobacter proteolyticus* PM9-2 を発見していた。これは同属細菌として油田から単離に成功した最初の例である。PM9-2 は炭化水素分解活性を有さず、タンパク質などの有機物を発酵により分解することは判っていたが、海水環境から隔離した地下油田環境においてどのような役割を担っているのか全く不明であった。

## 2. 研究の目的

以上背景で述べた通り、私たちはこれまでにさまざまな油田環境から新属あるいは新種細菌を単離し、それらが有する固有の代謝機構や酵素の諸特性を分子レベルで明らかにしてきた。そこで本研究課題では、これまでの研究実績を基盤として、以下の二点を目的とした研究を計画した。(1) 深部地下油田から単離した好気性高度好熱性細菌 *G. thermoleovorans* B23 の生化学的解析と全ゲノム解読を行い、そのユニークな原始的アルカン代謝機構および関連遺伝子構造の全容を解明することによって「生命の高温環境起源説を傍証」する。(2) 南シナ海深部海底油田より単離した絶対嫌気性高度好熱性細菌 *C. proteolyticus* PM9-2 とメタン生成菌を中心とした「光エネルギーに依存しない深部油田微生物圏の栄養共生関係」を探る。

## 3. 研究の方法

*G. thermoleovorans* B23 については全ゲノム配列を決定する。得られた配列情報を xBASE (www.xbase.ac.uk) などの公開ゲノム解析ツールにより遺伝子推定を行なう。推定された遺伝子群のなかからアルカン水酸化酵素の候補遺伝子を選抜し、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) を用いて既知の遺伝子配列データベースと比

較する。さらに、ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) により分子系統樹を作成し、遺伝子進化について考察する。一方、遺伝子が機能を有することについては当該遺伝子領域を欠損した *Pseudomonas* 属細菌内で遺伝子発現を行い欠損機能が回復することによって検証する。もし、3種類の遺伝子産物に活性の違いが見られた場合はその構造と活性との相関に関する実験も行なう。

*C. proteolyticus* PM9-2 については、まず代謝産物を詳細に調べ同菌株の生理学的特性を明らかにする。続いて、高度好熱メタン生成菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* ΔH と共培養を行い生育や代謝産物の変化を観察する。栄養共生関係が確認できた場合はさらに、走査型電子顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡観察などを駆使して細胞間相互作用についてより詳細に調べる。この際に、メタン発酵槽より単離されている *C. proteolyticus* DSM5265 を比較対照として用いる。南シナ海深部海底油田から再度サンプルを入手できた場合は、細菌群集構造解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサー ロシユ社 GS FLX 1/4region Paired-End 解析法により *G. thermoleovorans* B23 全ゲノム配列の委託解析を行なった。その結果、209 のコンテイングが得られ全ゲノム長の 97% に相当する 3.353 Mb を解読できた。同属近縁種で既にゲノム配列が公開されている *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (マリアナ海溝底泥より単離された高度好熱菌) を参照配列として整理後、xBASE による遺伝子推定を行った。その結果、主要代謝遺伝子はほぼ全て共通していた。しかし、HTA426 を含め多くの同属細菌で欠失している約 5 kb の配列内 (Contig93) に AlkB とは異なるアルカン水酸化酵素遺伝子群が 3 つタンデムに存在することを発見した (LadA $\alpha\beta\gamma$ , Fig. 1)。

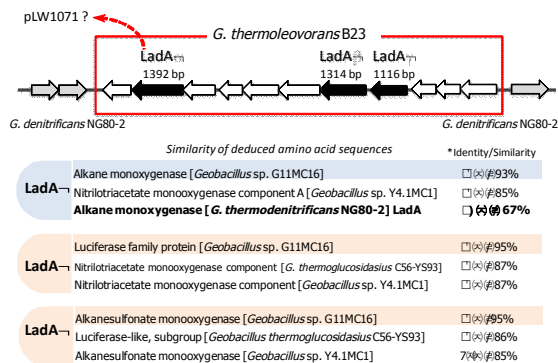


Fig. 1. Tandem repeat structure of three LadA genes in *G. thermoleovorans* B23 genome

これらは中国のグループによって *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (中国北部深部油田) でプラスミド遺伝子として報告された FMN-dependent Alkane hydroxylase (LadA) と同じ遺伝子グループであることから、LadA 遺伝子はプラスミドの水平移動によって高度好熱菌の間に伝播して行ったと推定される (Fig. 2)。

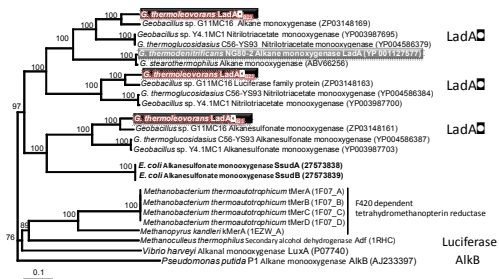


Fig. 2. Phylogenetic tree of LadA, Luciferase, and AlkB gene clusters

次に LadA  $\alpha\beta\gamma$  遺伝子が機能を有するかについて、異種発現により検証した。すなわち、アルカン水酸化酵素 (AlkB) 遺伝子を欠損した *Pseudomonas* 属細菌内で LadA  $\alpha\beta\gamma$  遺伝子を別々に発現させた。その結果、いずれの組換え体もアルカン酸化能を部分的に回復し、さらにその回復率は 30°C に比べて 35°C においてより高かったことから、LadA  $\alpha\beta\gamma$  遺伝子の機能発現に由来すると考えられた (Fig. 3)。

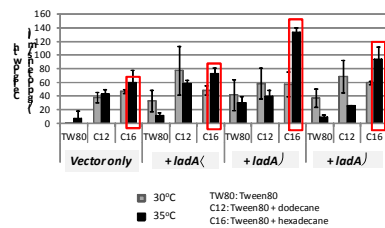


Fig. 3. Growth of recombinant cells on alkane (C12, C16)

さらに興味深いことに、LadA (NG80-2) とアミノ酸配列類似度が低く分子系統的に遠い LadA  $\beta$  の機能 (活性) が最も高いことが判った。以上、高温深部地下など隔離した環境に棲息する好気性高度好熱菌 *G. thermoleovorans* B23 のアルカン水酸化酵素 LadA は常温細菌に見られる非ヘム鉄酵素 AlkB とは全く異なる起源をもち高度好熱菌群のなかでのみ独自の進化経路を辿ったことが強く示唆された。一方、AlkB は常温菌とニッチを共有する可能性のあった同属の高度好熱菌に分布し、それぞれの環境で別々の遺伝子進化を遂げたことが予想される。

(2) *C. proteolyticus* PM9-2 は 16S rRNA 配列に基づく分子系統樹解析により高度好熱菌のなかでも最も超好熱菌群に近い (Fig. 4)。

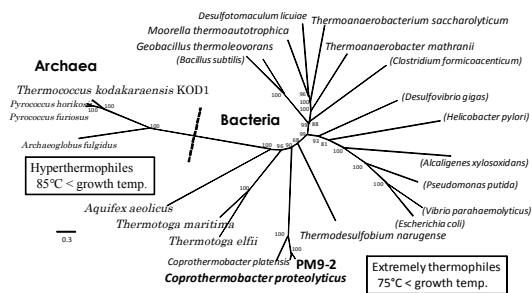


Fig. 4. Phylogenetic tree of extremely thermophiles and hyperthermophiles based on 16S rRNA gene sequence

その代謝産物を調べた結果、生育に伴って酢酸やコハク酸などの有機酸と共に著量の水素を生産した。また、水素によってその生育が阻害されることが判った。ここで、PM9-2 を単離した油田では原油と共にメタンを含む天然ガスも産出していたことから PM9-2 は深部海底油田環境においてメタン生成菌と栄養共生しているという仮説を立てた。残念ながら油田サンプルを再度入手することができなかつたため、高度好熱メタン生成菌標準株である *M. thermotrophicus* ΔH を用いて共培養実験を行なった。その結果、単独培養時に比べて PM9-2 の生育は約 2 倍に上昇した (Fig. 5)。

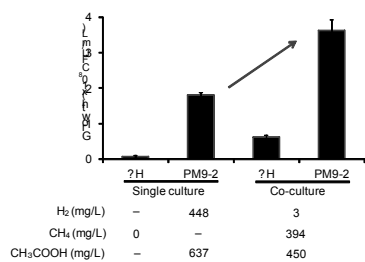


Fig. 5. Recovery of cell growth of PM9-2 and ?H upon co-culture

さらに、その際に培地中に水素はほとんど検出されず、代わりに顕著なメタン生成が確認できた。これは PM9-2 が生産する水素を使ってメタン生成菌 ΔH がメタンを生成し、その水素消費によって PM9-2 の生育阻害が解除されたことを示唆する。また、共培養では酢酸の生成量は低下した。次に、各種顕微鏡観察を行なったところ、共培養に伴って凝集体が形成された (Fig. 6)。

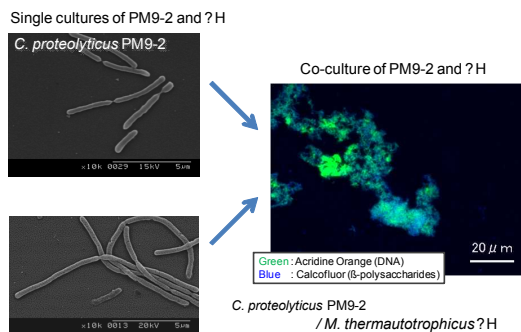


Fig. 6. Coagulation and polysaccharide production upon co-culture of PM9-2 and ?H

この凝集体について化学分析を行なったところその主成分は α および β 結合を含むグルコマンナンであることが判った。このことは蛍光顕微鏡観察によっても確認した。一方、PM9-2 と同種の *C. proteolyticus* DSM5265 (メタン発酵槽由来) ではグルコマンナンの生成は見られず、細胞外にナノチューブ様の構造体が観察できた。以上、深部海底油田からはじめて単離に成功した *C. proteolyticus* PM9-2 はメタン生成菌と強い親和性を有し、効率的に水素を介した栄養共生関係を構築していることが強く示唆された。本研究課題を推進することで、これまで未解明であった深部地下高温油田における微生物生態の一部が明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Shimada K, Itoh Y, Washio K, Morikawa M, Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms, *Chemosphere*, 査読有, 87 巻, 2012, 226-233  
DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.12.078
- ② Tojo F, Itoh Y, Okabe S, Morikawa M, Analyses of three dominant membrane proteins from anammox planctomycete *Candidatus 'Brocadia sinica.'*, *J Environ Biotechnol*, 査読有, 11 巻, 2011, 77-81
- ③ Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants, *Int J Mol Sci* [Review], 査読有, 12 巻, 2011, 141-172  
DOI:10.3390/ijms12010141.
- ④ Yamaga F, Washio K, Morikawa M, Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*, *Environ Sci Technol*, 査読有, 44 巻, 2010, 6470-6474  
DOI: 10.1021/es1007017.
- ⑤ 坂口直史、Taha, A. I. B. H. M.、牧秀明、濱田誠一、森川正章、奥山英登志、サハリン油田開発に伴う原油汚染事故を想定したバイオレメディエーション技術の可能性、*生物工学会誌*, 査読有, 88 巻, 2010, 150-157

〔学会発表〕(計 21 件)

- ① M. Morikawa, High Temperature Petroleum Reservoir Microbiology, 42<sup>nd</sup> Philippine Society for Microbiology Conference (招待講演), 2013年4月18日-19日, Summit Ridge Hotel (Philippine)
- ② 森川正章、細菌のバイオフィーム形成と生存戦略、第47回緑膿菌感染症研究会教育講演(招待講演)2013年2月23日、札幌医科大学(札幌市)
- ③ M. Morikawa, How do bacteria treat with interfaces and surfaces, Seminar at L'Oréal Aulnay Research Center (招待講演), 2012年9月14日, L'Oréal Aulnay Research Center (France)
- ④ W. Urushibata, T. Funayama, M. Morikawa, Characterization of an extremely thermophilic bacterium, *Coprothermobacter* sp. PM9-2, isolated from an undersea petroleum reservoir, 9th International Congress on Extremophiles 2012, 2012年9月10日-13日, Hotel NH Central Convenciones (Spain)
- ⑤ 東條ふゆみ、伊東義兼、岡部聡、森川正章、Anammox 細菌 *Candidatus 'Brocadia sinica'* の膜画分に高発現するタンパク質に関する研究、環境バイオテクノロジー学会(学会奨励賞受賞講演)、2012年6月25日-6月26日、京都大学(京都市)
- ⑥ M. Morikawa, Beneficial biofilm formation by environmental bacteria, Seminar at Harvard Medical School (招待講演), 2012年6月20日, Harvard Medical School (USA)
- ⑦ C. Boonmak, Y. Takahashi, M. Honma, M. Morikawa, Analysis of LadA-related long-chain alkane monooxygenase in an extremely thermophilic *Geobacillus thermoleovorans* B23, 112th ASM General Meeting, 2012年6月16日-18日, Moscone convention center (USA)
- ⑧ 森川正章、バイオフィームの形成〜微生物の優れた生存戦略、バイオミメティクス研究会シンポジウム(招待講演)、2011年12月7日、北海道大学(札幌市)
- ⑨ 漆畑亘、船山哲、森川正章、海底油田から単離した高度好熱菌 *Coprothermobacter* sp. PM9-2 株の諸特性解析、第12回極限環境生物学会、2011年11月27日-11月28日、長崎大学(長崎市)
- ⑩ M. Morikawa, Enhancement of water purification activity by reconstructing rhizobacterial community, JST-NSFC "China-Japan Workshop on Novel Remediation Technologies for Wastewater Environment Conservation (招待講演), 2011年10月28日, 同済大学(中国)
- ⑪ C. Boonmak, Y. Takahashi, M. Morikawa, Analysis of LadA-related long-chain alkane monooxygenase in an extremely thermophilic *Geobacillus thermoleovorans* B23, 第63回日本生物工学会大会、2011年9月26日-9月28日、東京農工大学(小金井市)
- ⑫ C. Boonmak, Y. Takahashi, M. Morikawa, Analysis of multiple *alkB* genes from *Geobacillus thermoleovorans* B23, IUMS2011, 2011年9月6日-9月10日, 札幌コンベンションセンター(北海道)
- ⑬ W. Urushibata, T. Funayama, M. Morikawa, An extremely thermophilic bacterium, *Coprothermobacter* sp. PM9-2, isolated from an offshore petroleum reservoir in the South China Sea, 国際長期生態学研究ネットワーク(ILTER)年次会議2011, 2011年9月5日-9月9日, 北海道大学(札幌市)
- ⑭ 森川正章、生物界面活性剤と微生物膜、室蘭工業大学セミナー(招待講演)、2011年7月14日、室蘭工業大学(室蘭市)
- ⑮ 森川正章、高橋康徳、原油汚染土壌修復技術へのバイオフィームの適用、環境バイオテクノロジー学会2011年度大会、2011年6月20日-6月21日、東京大学(文京区)
- ⑯ Y. Itoh, M. Matsumoto, M. Morikawa, Isolation of a Novel Thermotolerant Ammonia-Oxidizing Bacterium, *Nitrosomonas thermotolerans* JPCCT2, from Activated Sludge in a Thermal Power Station in Japan, 111th ASM General Meeting, 2011年5月21日-5月24日, Morial convention center (USA)
- ⑰ F. Tojo, Y. Itoh, S. Okabe, M. Morikawa, Analysis of the granule formation by Anammox bacteria, 第一回国際アナモックスシンポジウム, 2011年5月19日-5月20日, 熊本大学(熊本市)
- ⑱ 高橋康徳、Chanita Boonmak、森川正章、好熱性アルカン分解細菌 *Geobacillus thermoleovorans* B23由来 *alkB* 遺伝子の多様性解析、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月25日-3月28日、京都女子大学(京都市)
- ⑲ 漆畑亘、阿形朋子、金井保、跡見晴幸、今中忠行、森川正章、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来細胞表層タンパク質 S1p を発現する細菌の凝集性およびバイオフィーム形成能の評価、第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド(神戸市)
- ⑳ M. Morikawa, Biofilm formation on the duckweed roots expands substrate

specificity of alkane degrading  
rhizobacteria, China-Japan Workshop on  
Novel Remediation Technologies for  
Wastewater Environment Conservation,  
2010年10月14日, 北京大学(中国)

- ② M. Morikawa, Origin of Peroxisomal  
Beta-oxidation Pathway Suggested by  
Extremely Thermophilic Alkane  
Degrading Bacteria, BIT' s 1<sup>st</sup> Annual  
World Congress of Petromicrobiology,  
2010年7月26日, Dailan Municipal Party  
Committee Hotel (中国)

[図書] (計1件)

- ① 森川正章、シーエムシー出版、池 道彦、  
平田収正監修「植物機能のポテンシャル  
を活かした環境保全・浄化技術」2011年、  
pp169-176

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)  
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/morikawalab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森川 正章 (MORIKAWA MASA AKI)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究所・  
教授  
研究者番号: 20230104

### (2) 研究分担者

鷺尾 健司 (WASHIO KENJI)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究所・  
助教  
研究者番号: 50241302

### (3) 連携研究者

なし