

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780333

研究課題名（和文） 庄内沿岸極浅海域において嫌氣的メタン代謝を担う未知微生物群に関する研究

研究課題名（英文） Depth-related diversity, distribution, and activities of methane-metabolizing archaea in sediments of a shallow river estuary

研究代表者

服部 聡 (HATTORI SATOSHI)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：40373352

研究成果の概要（和文）：

本研究では山形県酒田市沿岸河口域堆積物に生息するメタン代謝古細菌および関連古細菌の生理生態解析を行った。分子系統解析の結果、当該環境からメタン生成古細菌や嫌氣的メタン酸化古細菌（ANME 古細菌）に近縁なクローンが検出された。これらのクローンの分布は堆積物深度により異なる傾向があったことから、クローンに対応する古細菌細胞は堆積物深度に依存して棲み分けを行っている可能性が推察された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, analyses of vertical distribution, diversity, and activities of estuarine methane-metabolizing archaea have been conducted. rRNA and *mcrA* gene analyses indicated that some of clones affiliated with anaerobic methanotroph.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：汽水域堆積物、メタン生成古細菌、嫌氣的メタン酸化古細菌、16S rRNA 遺伝子、*mcrA* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

温室効果ガスであるメタンは陸域だけで海洋からも生成されているが、その生成量は地球上の全メタン生成量の 1～10%程度と少ない。これは、海洋で発生したメタンの 9割以上が海底堆積物を通過する過程で嫌氣的に分解されたためと考えられている。嫌氣的堆積物環境においては、メタンの分解は嫌氣的メタン酸化古細菌（ANaerobic MEthanotroph, ANME）によって行われていると推察されている。当該古細菌の多くは水深数百メートルから数千メートルという深海域で頻繁に検出されている。また、水深の浅い海域においても嫌氣的メタン酸化反

応が起きている事が報告されている。しかし後者については、どのような ANME 古細菌群が、どの堆積物深度に於いて生息しているのか等の詳細な微生物生態学的研究は殆ど行われていない状況にあった。

2. 研究の目的

本研究では、日本海沿岸汽水域の極浅深度領域の堆積物中に生息する古細菌および ANME 古細菌を研究対象として、これらの微生物の多様性を明らかにするとともに、堆積物深度による古細菌群の分布の差異（垂直分布）を明らかにすることを目的とした。また、絶対嫌気培養法によるメタン代謝古細菌の

取得および、当該古細菌の生息環境である堆積物の物理化学的特性を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 庄内沿岸極浅深度堆積物の採取および物理化学的性質の解析

山形県酒田市酒田北港豊川河口において、堆積物試料を採取した。採取には垂直式試料採取器を使用することで、堆積物試料の圧縮を回避し試料の深度情報を維持することを可能とした。採取後の堆積物は現場にて滅菌済みのスパーテルにより深度ごとに分画し、脱酸素剤入りの滅菌ポリカーボネートボックスに密封、実験室へ持ち帰った。堆積物試料は 20,000 xg, 10 分間遠心分離を行い、上清画分を間隙水とした。得られた間隙水を用いて、堆積物深度ごとに pH, 電気伝導度 (EC)、陰イオン・陽イオンの測定を行った。測定には微量 pH 計 (B-212, Horiba)、微量 EC 計 (B173, Horiba)、イオンクロマトグラフ (DX-100, Dionex) を用いた。酸化還元電位 (ORP) の測定は、脱酸素処理済みアルゴンガス気流下で堆積物に ORP 電極を挿入することにより測定した。溶存メタン濃度は、バイアル瓶内で飽和 NaCl 溶液と混合した堆積物試料の気相部をガスクロマトグラフ (GC-2014AF, Shimadzu) で分析する事により測定した。なお、上記堆積物の遠心分離後の沈殿画分はただちに -80°C で超低温保存した。

(2) 16S rRNA 遺伝子による古細菌の菌叢解析

遠心分離後の堆積物沈殿画分を試料として、ビーズ法 (PowerMax Soil DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories) を用いて DNA 抽出を行った。抽出後の DNA はエタノール沈殿により 100 倍に濃縮後、深度ごとの DNA 量のバラツキを抑えるため、濃度調整を行った。得られた DNA を鋳型として、サーマルサイクラーにより古細菌 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。増幅には A25F

(5'-CYGTTGATCCTGCCRG-3') および 1492R (5'-GGHTACCTTGTTACGACTT-3') プライマーを用い、ホットスタート法、18 サイクルの条件で反応を行った。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動およびゲノム精製キット (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen) により精製後、ベクター (pCR4-TOPO, Invitrogen) に導入した。これをコンピテントセル (ECOS *E. coli* DH5 α , Nippon Gene) に組み入れ、大腸菌の形質転換を行った。形質転換後の大腸菌を LB/Ampicillin/X-Gal プレートに塗抹し、Blue/White selection により古細菌 16S rRNA 遺伝子を含むコロニーをランダムに選択し、クローンライブラリーを作成した。次いで、コロニーを釣菌し、コロ

ニーPCRを行った。増幅にはベクタープライマー (M13M4 および M13RV) を用い、25 サイクルの条件で反応を行った。増幅後の PCR 産物は精製キット (Exo-SAP IT) により精製し、これを鋳型としてサイクルシーケンス反応を行った。反応条件として、反応試薬に BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を、シーケンスプライマーに M520R (5'-TACCGCGGCGGCTGGC-3') を用いた。サイクルシーケンス反応産物は精製キット (CleanSEQ, Beckman coulter) により精製し、DNA シーケンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) により配列決定を行った。得られた DNA 配列は塩基配列解析ソフト (ATGC-MAC ver. 4 および GENETYX MAC ver. 13) にて配列の波形チェックとトリミングを行った後、国立遺伝学研究所 DNA データベース (DDBJ) に登録されている古細菌の 16S rRNA 配列と相同性の比較をすることにより、近縁種の推定を行った。その後、分子系統解析ソフト (MEGA, ver. 4) により分子系統樹を作成した。作成には近隣結合法を、分子進化モデルには p-distance を用いた。分子系統樹のトポロジー検定のためのブートストラップ検定は 500 回行った。

(3) *mcrA* 遺伝子による古細菌の菌叢解析

堆積物中に生息するメタン代謝古細菌の菌叢を明らかにするために、研究方法 (2) の 16S rRNA 遺伝子と併用して、*mcrA* (methyl coenzyme M reductase α subunit) 遺伝子を用いた。解析に用いた堆積物は (2) と同じものを用いた。PCR 増幅には *mcrA* 遺伝子増幅用プライマーである MCR-f

(5'-TAYGAYCARATHTGGYT-3') および MCR-r (5'-ACRTTCATNGCRTARTT-3') を用いた。増幅反応は 35 サイクルで行った。増幅産物の精製、ベクターへの導入、大腸菌クローニング、コロニーPCR は研究方法 (2) と同様にして行った。サイクルシーケンス反応には、T7 プライマー (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') を用いた。DNA シーケンサーにより得られた塩基配列はアミノ酸配列に変換後、DDBJ により相同性検索を行った。その後、16S rRNA 遺伝子と同様にして、分子系統樹を作成した。

(4) 安定同位体標識メタンガスによる嫌氣的メタン酸化活性の評価

アルゴンガス置換および還元剤処理済みの反応溶液を含むバイアル瓶に、高深度堆積物を添加密封したものを基礎試料とした。この基礎試料に硫酸ナトリウム (20 mM)、2-Bromoethanesulfonate (BES, 20 mM)、モリブデン酸ナトリウム (20 mM)、¹³C 標識メタン (200 kPa) の 4 種の化合物を適宜組み合わせとした反応系を作成した。化合物の組み合わせとして、無添加 [反応系 1]、¹³C 標識メタン

のみ[反応系 2]、¹³C 標識メタン+硫酸ナトリウム[反応系 3]、¹³C 標識メタン+硫酸ナトリウム+BES[反応系 4]、¹³C 標識メタン+硫酸ナトリウム+モリブデン酸[反応系 5]の5つを作成した。各々の反応系は対象区として試料添加後オートクレーブ滅菌したものも作成した。これらの反応系試料は 20°C でインキュベートを行い、その気相生成物 (¹³CO₂, m/z=45) をガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP5000, Shimadzu) を用いて分析した。

(5) メタン代謝古細菌の集積培養

クリーンベンチにて堆積物試料をバイアル瓶に添加し、スラリーを作成した。これを絶対嫌気培地に適宜接種し、集積培養を行った。培養にはメタン生成古細菌が利用する基質として知られる各種の基質 (H₂/CO₂, 酢酸、メタノール、トリメチルアミン等) を用いた。増殖が認められた培養系の植継を繰り返す事により、集積および純化操作を行った。菌体の形態評価は蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) を用いて行った。蛍光フィルターには U-MWBV2 を用いた。

4. 研究成果

(1) 庄内沿岸極浅深度堆積物の採取および物理化学的性質の解析

堆積物間隙水の pH を測定した結果、pH7.6 ~ 8.3 の弱アルカリ性であった。また、陽イオン濃度はナトリウムが最も多く、次いでマグネシウム、カルシウムの順で多かった (図 1)。陰イオン濃度は塩化物イオンが最大で、次いで硫酸イオンの順となった (図 2)。陽イオン・陰イオンとも、堆積物の深度が深くなるにつれ減少した。硫酸イオン濃度は堆積物表層部で約 34 mM あったが、44 cm 以深では 3.2 mM まで減少した。EC 値も同様に深度依存の減少を示した。一方、堆積物間隙水中の溶存メタン濃度は深度が深くなるにつれ増加した (図 3)。この結果から、当該堆積物環境では上層部で硫酸還元が、下層部でメタン生成が行われる環境にある事が示唆された。なお、ORP は堆積物表層 10 cm におい

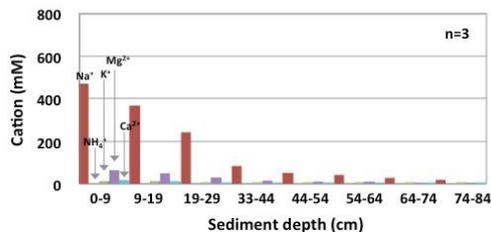


図1. 庄内沿岸堆積物間隙水の陽イオン濃度

て -200 mV (標準水素電極換算) を示した事か

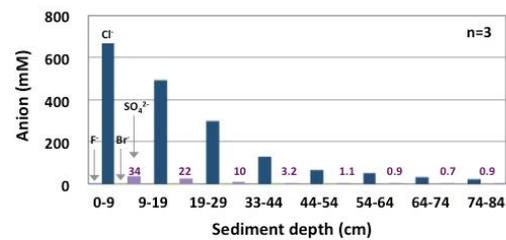


図2. 庄内沿岸堆積物間隙水の陰イオン濃度

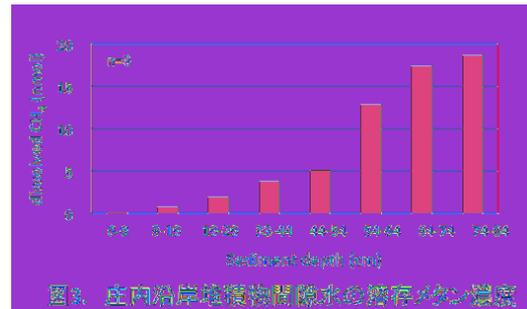


図3. 庄内沿岸堆積物間隙水の溶存メタン濃度

ら、当該環境は絶対嫌気環境にあることが示唆された。

(2) 16S rRNA 遺伝子による古細菌の菌叢解析
分子系統解析の結果、メタン生成古細菌、ANME 古細菌、*Thermoplasmatales* 目古細菌や、*Thaumarchaeota* 門古細菌に近縁な遺伝子クローンが検出された。メタン生成古細菌においては、*Methanomicrobiales* 目古細菌や *Methanosaetaceae* 科古細菌が比較的多く検出された。ANME 古細菌においては、ANME-3 古細菌が低深度堆積物において、ANME-2 古細菌が中深度から高深度堆積物において多く検出された。

(3) *mcrA* 遺伝子による古細菌の菌叢解析
分子系統解析の結果、*Methanomicrobiales* 目古細菌が検出された (図 4)。一方で、*Methanosaetaceae* 科古細菌は検出されなかった。*Methanomicrobiales* 目古細菌クローンは、特に高深度堆積物において多く検出された。当該古細菌は水素資化能を有する事が知られている事から、本研究環境では高深度領域において水素依存性のメタン生成が行われている可能性が示唆された。一方、ANME 古細菌においては、16S rRNA による古細菌の菌叢解析結果と同様に、ANME-3 が低深度堆積物において、ANME-2 古細菌が中心度から高深度において検出された。これらの結果から、当該堆積物環境においては、ANME 古細菌が生息し、かつ、堆積物深度に依存した異なる生息域を有している可能性が示唆された。

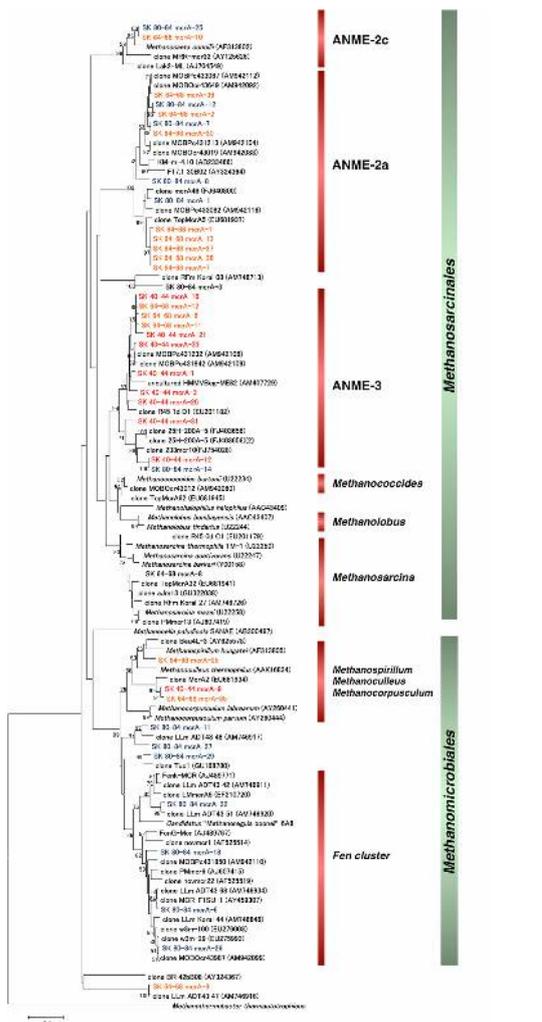


図4. *mcrA*遺伝子による古細菌の分子系統樹(庄内沿岸堆積物3深度)

(4) 安定同位体標識メタンガスによる嫌気的メタン酸化活性の評価

分析の結果、 ^{13}C 標識メタン+硫酸ナトリウム添加系である反応系 3 において、有意な $^{13}\text{CO}_2$ 生成が認められた (図5)。メタン生成阻害剤 (BES)、硫酸還元細菌阻害剤 (モリブデン酸) 存在下では $^{13}\text{CO}_2$ の生成は著しく抑制された。また、滅菌対象区においても有意な $^{13}\text{CO}_2$ 生成は認められなかった。これらの結果から、当該堆積物においては、硫酸還元反応と共役した嫌気的メタン酸化反応を潜在的に行い得る能力を有する微生物系、すなわち ANME 古細菌と硫酸還元細菌が生息している可能性が推察された。

(5) メタン代謝古細菌の集積培養

集積の結果、 H_2/CO_2 、メタノール、トリメチルアミンを基質とした系において、不定形

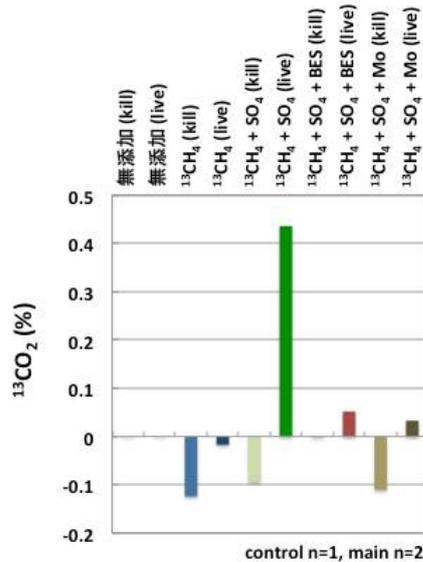


図5. 庄内沿岸堆積物における嫌気的メタン酸化活性(各種阻害剤存在下)

の球状菌の増殖が認められた (図6、メタノール集積培養系)。気相部の分析を行ったところ、メタン生成が認められた事、また、メタン生成古細菌が有する補酵素 F420 の自家蛍光を捉える蛍光フィルターにより蛍光が検出された事から、これらの菌はメタン生成古細菌である事が示唆された。現在、これらの菌の純粋分離を行っているところである。



図6. 庄内沿岸堆積物から得られた古細菌集積培養系(基質メタノール)

以上、本研究により、これまで未明瞭であった極浅深度堆積物環境に生息するメタン代謝古細菌について、その多様性、分布、活性を明らかにした。今後、より詳細な嫌気的メタン酸化活性評価や純粋分離が行われることにより、当該古細菌の研究進展に寄与する事が期待される。

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)

[学会発表] (計1件)

① Satoshi Hattori

Depth-related diversity, distribution, and activities of methanogens in sediment of shallow river estuary.

日本微生物生態学会第28回大会、2012年9月20日～21日、豊橋技術科学大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 聡 (HATTORI SATOSHI)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：40373352