

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880035

研究課題名(和文)モデル微生物共生系を用いた酢酸分解メタン生成機構の解明

研究課題名(英文)Analyses on the mechanisms of methanogenic acetate degradation with model microbial consortia

研究代表者

加藤 創一郎(Kato, Souichiro)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：30597787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：酢酸からの微生物によるメタン生成には単独型、共生型の2種類が存在する。本研究ではモデル微生物共生系を用いて、高アンモニア濃度、高圧力という2種類のストレス条件下で、2種類のメタン生成経路がそれぞれどのような影響を受けるのかを調べた。アンモニアストレスはメタン生成酵素の直接阻害、細胞内pH恒常性の崩壊、細胞内酸化ストレスの上昇を引き起こし、共生型よりも単独型を強く阻害することを明らかにした。高圧ストレスは逆に共生型に強く阻害的に働き、高圧下でのメタン生成には変性タンパクの再構成、細胞膜・細胞壁構造の変化が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Methanogenic acetate degradation proceeds via two different pathways, aceticlastic and syntrophic pathways. Here we studied the effects of ammonia and high-pressure stresses on the two methanogenic pathways using model microbial consortia. Ammonia stress induced direct inhibition of methanogenic enzymes, disruption of intracellular pH homeostasis, and oxidative stresses to the microbes tested, and inhibited aceticlastic methanogenesis more strongly. On the other hand, high pressure stress suppressed syntrophic pathway more strongly. We found reconstruction of denatured proteins and reconstruction of cell membrane/wall are required to generate methane under high-pressure conditions.

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：研究活動スタート支援

キーワード：微生物 酢酸分解 メタン生成 モデル共生系 アンモニア阻害 高圧

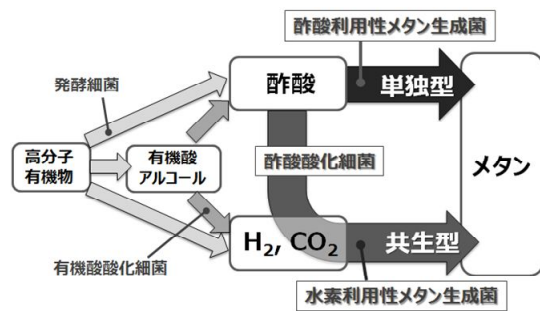
1. 研究開始当初の背景

メタンは「クリーンエネルギー源」、「温室効果ガス」という二つの異なる側面から現在注目を集めている。地球上におけるメタン生成のほとんどは微生物により触媒される。高分子有機物からの微生物によるメタン生成は複数微生物種の共同作用により進行する(図1)。この一連の反応において酢酸は非常に重要な中間代謝産物であり、生成されるメタンの炭素原子の70%以上が酢酸を経由する。そのため酢酸分解メタン生成活性の多寡は、メタン生成反応全体に多大な影響を及ぼす。

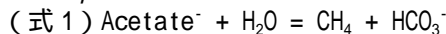
微生物による酢酸分解メタン生成には以下の2種類の経路が存在する(図1)

酢酸利用性メタン生成古細菌単独による経路(単独型)

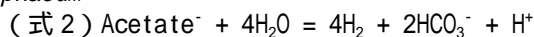
酢酸酸化細菌と水素利用性メタン生成古細菌との共生による経路(共生型)



単独型: 酢酸利用メタン生成菌 *Methanosaeta thermophila*



共生型 : 酢酸酸化細菌 *Thermacetogenium phaeum*



共生型 : 水素利用メタン生成菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus*

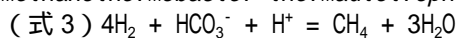


図1. 有機物からの微生物によるメタン生成のフローと2種類の酢酸分解経路(単独型・共生型)の反応式

様々な環境要因が酢酸分解メタン生成活性に影響を及ぼすことが知られているが、いくつかの環境要因は単独型・共生型それぞれの活性に異なる影響を及ぼす。例えば低温~中温域では共生型の反応はほとんど機能せず単独型が優占化するが、高温・高有機物環境(高温メタン発酵槽など)や高温・高圧環境(地下圏など)では共生型が優位に機能することが示唆されている。現在までの酢酸分解メタン生成の研究は、もっぱら実際の環境、

もしくは微生物群集の集積培養系が対象とされてきた。このような実験系では、多種多様な微生物が存在し、またメタン生成に影響を及ぼす環境要因を実験的に制御・制限することが困難である。そのため、各種環境要因がそれぞれのメタン生成経路に及ぼす影響を定量的に調べることは不可能であり、またその分子機構の解明も困難であった。

申請者が所属する研究グループでは、過去長年の研究により酢酸分解メタン生成に関与する高温性微生物(酢酸利用性メタン生成菌 *Methanosaeta thermophila*、酢酸酸化細菌 *Thermacetogenium phaeum*、水素利用性メタン生成菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus*)を同一の環境(高温メタン発酵槽)から純粋分離することに成功している。これらの微生物の純粋培養系、およびその共培養によるモデル共生系を実験に用いることで、各種環境要因がそれぞれのメタン生成経路に及ぼす影響を独立して、また詳細に解析することが可能になる。本研究ではアンモニア濃度・高圧の2種類の環境要因をターゲットとして実験をおこない、その影響の定量的評価・機構解明を目指す。

2. 研究の目的

地球上の炭素循環の理解、ならびにクリーンエネルギーとしてのメタンの利用にあたって、酢酸分解メタン生成は最も重要な反応の一つであり、どのような環境要因がどの程度その活性に影響を与えるのかを知ることには非常に重要であると考えられる。本研究では酢酸分解メタン生成に関わる3種の微生物の純粋・共培養系を用いて、2種の環境要因についてのメタン生成に及ぼす影響の定量的評価、機構解明を目的とする。

a) アンモニア濃度

嫌気廃水処理メタン発酵において、高濃度アンモニアがメタン生成、特に酢酸利用性メタン生成菌(単独型)に阻害的に働くことが頻繁に報告されている。高濃度アンモニアによる一般的な微生物阻害機構としては、非イオン態アンモニア(NH₃)の細胞膜透過とそれに伴う細胞内のアルカリ化が知られている。またメタン生成菌に関しては、アンモニアによるメタン生成酵素の直接的阻害の影響もあるといわれている。しかしながら嫌気廃水処理メタン発酵におけるアンモニア阻害の詳細な機構はよくわかっていない。本研究では高濃度アンモニアによるメタン生成阻害について、以下の点を明らかにする。

どの程度の濃度でそれぞれの酢酸分解経路が阻害をうけるか

その阻害はいかなる機構で生じるのか

b) 高圧

近年の地球生物化学的研究により、天然ガスやメタンハイドレート中のメタンの多くは微生物により生成された(されている)こ

とが示唆されている。いずれの場合も、そのメタン生成が起こっているのは高温(50-70℃)・高圧(10 MPa [100気圧相当]~)の地下環境であろうと予想されている。高圧環境下では、メタン生成の基質や産物である気体分子(水素、二酸化炭素、メタン)の溶解度が大きく上昇するなどの影響により、常圧下と比較してメタン生成活性に大きな変化が生じることは容易に想像できる。しかしこれまで、高い圧力がメタン生成活性に及ぼす影響を実験的に調べた例はほとんどない。本研究では、地下微生物圏環境を模擬可能な高圧培養システムを用いたメタン生成モデル微生物群の培養実験により、以下の点を明らかにする。

高圧はそれぞれの酢酸分解経路にどのような、またどれほどの影響を与えるのか
その機構はいかなるものか

3. 研究の方法

2種の環境要因(アンモニア濃度・高圧)が酢酸分解メタン生成反応に与える影響をモデル微生物の純粋培養、共培養を用いて定量的に評価する。モデル微生物としては以下の3種の高温性微生物を使用する。これらはいずれも高温メタン発酵槽から我々のグループが分離した微生物である。また近縁の微生物が様々な高温メタン発酵槽、および地下微生物圏環境から頻りに検出されており、これらの微生物群は酢酸分解メタン生成において中核的な役割を担っていると考えられている。各微生物の培養は N_2/CO_2 ガス通気により無酸素状態を保ったバイアル中で、無機培地を使用し、55℃の温度条件でおこなった。酢酸酸化細菌は共生状態でしか酢酸酸化反応をおこなえないため、純粋培養の際にはエタノールをエネルギー源として使用した。2種のメタン生成菌はそれぞれ酢酸、水素をエネルギー源として純粋培養をおこなった。

a) アンモニア濃度の影響評価

培地に10~500 mMの NH_4Cl を添加し、各微生物の生育や代謝産物(酢酸、メタン等)を測定した。そのデータをもとに各微生物の増殖速度を算出し、アンモニアの影響を定量的に評価した。また3種の微生物を混合したモデル共生系を構築し、共生状態における影響も評価した。さらに各微生物の16S rRNA遺伝子に対する特異的プライマーを設計し、定量PCRにより各微生物の存在量推移を評価した。またアンモニアストレス条件下における遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析により網羅的に解析し、アンモニアが各微生物の生理状況にどのような影響を与えるのかを評価した。

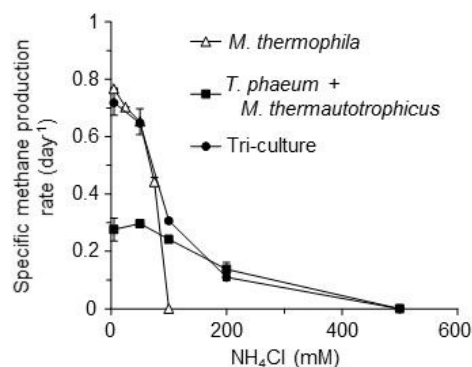
b) 高圧の影響評価

高圧培養には内容積150 mLのステンレス製耐圧容器を使用した。本耐圧容器の両端には0.2 μm の焼結フィルターを装着し、微生物の流出・外部からの汚染を防止した。耐圧容器に微生物培養用培地、基質(酢酸等)を添加、 N_2/CO_2 ガス通気をおこなった後オートクレーブ滅菌した。シリンジで微生物の前培養液を添加した後、シリンジポンプを利用し容器内の圧力(静水圧)を5-20 MPa(200気圧相当)の範囲で制御し、55℃の湯浴内で培養した。各条件下での、微生物の生育、メタン生成を適宜測定し、圧力による影響を定量的に評価した。また高圧条件下における遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析により網羅的に解析し、圧力が各微生物の生理状況にどのような影響を与えるのかを評価した。

4. 研究成果

a) アンモニア濃度の影響(発表論文1)

単独型(*M. thermophila*)、共生型(*T. phaeum*+*M. thermautotrophicus*)、その3者培養(Tri-culture)をそれぞれ異なるアンモニア濃度化で培養し、メタン生成速度の変化を比較した(図2)。その結果、単独型は低濃度アンモニア条件では共生型よりも高いメタン生成活性を示したが、100 mMのアンモニアによりその活性は完全に阻害された。一方で共生型は200 mMアンモニア存在下でも良好なメタン生成活性を示した。3者培養のメタン生成速度は50-100 mMを境に単独型、共生型のメタン生成速度に近い傾向がみられた。また各微生物に特異的PCRプライマーを用いた定量PCR解析の結果、3者培養において~50 mMアンモニア濃度化では単独型



の微生物が優占的に増殖し、一方で100~ mMアンモニア濃度化では共生型の微生物が優占的に増殖していることが確認された。図2. 単独型(*M. thermophila*)、共生型(*T. phaeum*+*M. thermautotrophicus*)、その3者培養(Tri-culture)のメタン生成速度に及ぼすアンモニアの効果

アンモニアストレスに弱いことが明らかとなった単独型の酢酸利用メタン生成菌について、アンモニアストレス条件下での遺伝子発現変動をマイクロアレイにより解析した。図3にコントロール条件(5 mM NH₄Cl)と比較してアンモニアストレス条件下(100 mM NH₄Cl)で発現が有意に増加・低下した遺伝子を機能別に分類したものを示す。その結果、細部内 pH ホメオスタシスの崩壊、メタン生成酵素群の直接的阻害、細胞内酸化ストレスの上昇といった様々な要因がアンモニアストレスにより引き起こされていることが示唆された。

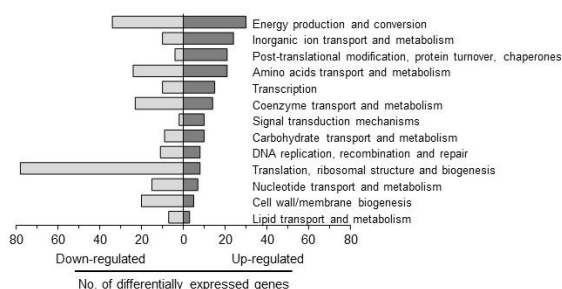


図3. アンモニアストレス条件下で発現が有意に増加・低下した遺伝子の機能別分類

b) 高圧の影響

新規に作製した微生物高圧培養システムを用いて、酢酸利用メタン生成菌、水素利用メタン生成菌、および酢酸酸化細菌と水素利用メタン生成菌の共培養系を培養し、いずれも 15 MPa 程度の高圧条件下でメタン生成が可能であることを明らかにした。異なる圧力下での各微生物の培養試験の結果、いずれの微生物も高圧条件下では生育、メタン生成の低下が観察されたが、その影響は酢酸酸化細菌と水素利用メタン生成菌の共培養系で特に顕著であった。

高圧条件が微生物生理に与える影響を評価するため、酢酸利用メタン生成菌 *M. thermophila* を対象としてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析をおこなった。コントロール(大気圧下)と比較して、高圧条件下(5, 15 MPa)では特に変性したタンパクの再構成をおこなうシャペロンタンパク質、および細胞膜、細胞壁の合成に関与するタンパクの遺伝子発現の増加が顕著であった。この結果は、高圧により変性したタンパクの構造回復、ならびに細胞膜や細胞壁の構造変化が高圧条件下での生育、メタン生成に重要であることを強く示唆する。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Souichiro Kato, Konomi Sasaki, Kazuya Watanabe, Isao Yumoto, Yoichi Kamagata, Physiological and transcriptomic analyses of a thermophilic, acetoclastic methanogen *Methanosaeta thermophila* responding to ammonia stress., 査読有, Microbes and Environments, 2014, in press

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 創一郎 (KATO, Souichiro)
産業技術総合研究所 研究員
研究者番号: 30597787

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし