

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340016

研究課題名(和文)メタン・アンモニア酸化関連微生物検出手法の開発と応用

研究課題名(英文)Development and application of detection methods for genes like the ones for ammonia- or methane- oxidation

研究代表者

布施 博之 (Fuse, Hiroyuki)

芝浦工業大学・システム工学部・教授

研究者番号：30357925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年その存在が明らかになってきた非メタン短鎖炭化水素資化性菌の膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ(pMMO)類似の遺伝子について、新たな分離菌中にその存在を見出すとともに、分離株中の遺伝子の解析を行った。その解析結果を基にそれら遺伝子の検出手法を開発し、環境試料中よりそれら遺伝子の検出と解析を行った。それにより従来のpMMO遺伝子やエタン・エチレンのpMMO類似遺伝子の他に、新たな系統の遺伝子群も検出された。

研究成果の概要(英文)：New nonmethane hydrocarbon assimilating marine bacteria were isolated and pmo-like genes were found in the isolates. Those pmo-like genes of marine strains were analyzed. Primers for pmo-like genes of non-methanotrophic bacteria were created. Those pmo-like genes in the environmental samples were amplified using the primers by PCR and a new group of genes in addition to the genes in the group of ethane- or ethylene- assimilating bacteria were detected.

研究分野：海洋微生物

キーワード：メタンモノオキシゲナーゼ遺伝子 短鎖炭化水素資化性菌 メタン酸化細菌

1. 研究開始当初の背景

メタンは強力な温暖化ガスであるとともに炭素循環の上からも地球環境において重要な役割を果たしている。他のガス状炭化水素(NMHC)については、その存在量は少ないものの、対流圏の光化学反応等において重要な役割を担っている。これらの短鎖炭化水素の分解微生物は、それら物質の地球規模の循環の上からも重要であると同時に、それら微生物の有する初発酸化酵素の基質特異性が広いことから、バイオレメディエーションへの応用や、光学活性エポキシ化合物の生産など工業への利用の面からも研究が進められてきている。メタンを含んだ短鎖炭化水素の分解を担う初発酸化酵素系は非ヘム型の2原子鉄を持つ可溶型メタンモノオキシゲナーゼ(sMMO)型のものと同様に、銅結合型メタンモノオキシゲナーゼ(pMMO)型の酵素系に大きく分類される。メタン資化性菌については、pMMOは*Methylocella*属を除く全てのメタン酸化細菌が有していると考えられているのに対し、sMMOは系統的には分散した一部のメタン酸化細菌が持っているにすぎない。これに対して、NMHC資化性菌においては、従来、塩基配列が決められたものは、全てsMMO型であった。

しかし、近年、申請者が海洋から分離したエタン資化性菌とエチレン資化性菌に関しては、sMMO型の遺伝子は検出されず、pMMO型の遺伝子(*pmo*)を持っていることが明らかとなり、従来pMMO型の遺伝子としてはメタン資化性菌とアンモニア酸化細菌のものしか知られていなかった系統樹の中で、新たなクラスターを形成していることを明らかにしてきた。

2010年にメキシコ湾で大規模な原油流出事故が発生したが、その際に最も多く流出した炭化水素はメタンであり、最終的にはメタンによる酸素消費が最も高かったことが推定されているが、初期においてはプロパンやエタンによる酸素消費がほとんどを占めていて、その消費は海洋性のNMHC資化性菌によっていると考えられている。我々が分離したエタン資化性菌に類縁の細菌は、他の炭化水素シープでも検出されており、海洋中に広く分布している海洋における短鎖炭化水素の分解に重要な働きをしている事が示唆されていた。また、*pmo*型の遺伝子として森の土壌等から検出されているいくつかの配列についても、これらのエチレン・エタンの配列に類似のものがあり、陸域においても、今までそれと認識されなかったものの、広く存在していると考えられていた。

2. 研究の目的

*pmo*型の遺伝子については、メタン・アンモニア酸化細菌以外でも、NMHCの資化性菌等においてその存在が明らかになりつつあるものの、その報告は少なく、それがどの程度の範囲に渡っているのか明らかでない。さら

に、我々の分離したエタン資化性菌に見られるように、複数のクラスターを持つ菌もあり、その実際の働きについても十分に明らかになっていない。そこで、本研究においては、それらをより明らかにするとともに、環境中における*pmo*型の遺伝子を検出する手法を開発し、その分布と動態を明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

使用微生物としては、既分離の株を用いて*pmo*型の遺伝子とその発現について解析するとともに、さらに環境中からスクリーニングを行うことにより、新たな微生物・遺伝子の発見を行い、分離株については、その性状の解析も行った。

研究室保存の既分離のエタン資化性菌については、既に*pmo*型遺伝子クラスターが明らかなることから、その発現を基質とその濃度等を変えてRT-PCRを用いた発現解析を行うとともに、pMMOがその活性に銅を必要とすることから、銅と活性の関連において、その働きを確認した。

これら*pmo*型遺伝子のデータを基に、その検出が可能なプライマーを設計し、環境中からの検出を行った。増幅が確認されればクローニングにより塩基配列の決定を行った。

一方、バイオレメディエーションへの適用の観点からも、トリクロロエチレンなどの環境汚染物質についても、休止菌体を用いて、その分解活性の検討を行った。

4. 研究成果

エタン資化性菌ET-HIRO株、ET-SHO株においては2つの*pmo*型遺伝子群(cluster ,)を有するが、エタン、ピルビン酸、グルタミン酸、イソブタンを生育基質としたET-HIRO株において、clusterの発現は認められず、clusterのみが構成的に発現していることが示された。銅欠乏状態の菌体を用いたエタン酸化の実験により、銅の欠乏状態においては、エタンの酸化活性が低下することから、両株は、銅を活性中心とする*pmo*型がエタンの酸化に関与していることが推定された。

新たにエタン、エチレン、プロピレン資化性菌の各1株の分離菌について、*pmo*型遺伝子の有無を確認するとともに、その性状を明らかにした。

今回検討を行った海洋性エタン資化性菌の分離株(iBTB08W)は、その16SrRNA遺伝子の解析より*Rhodococcus* sp.と推定された。本菌株はエタン・プロパン・ブタン・イソブタン・メタノールで生育が可能であったが、メタン・エチレンには生育しなかった。短鎖アルカン・アルケンを炭素源とする菌に多く見出されてきたsMMOの遺伝子は確認されず、*pmo*型の遺伝子を3セット持つことが分かった(図1)。そのシーケンス結果から、本株はグラム陽性細菌であるにもかかわらず、

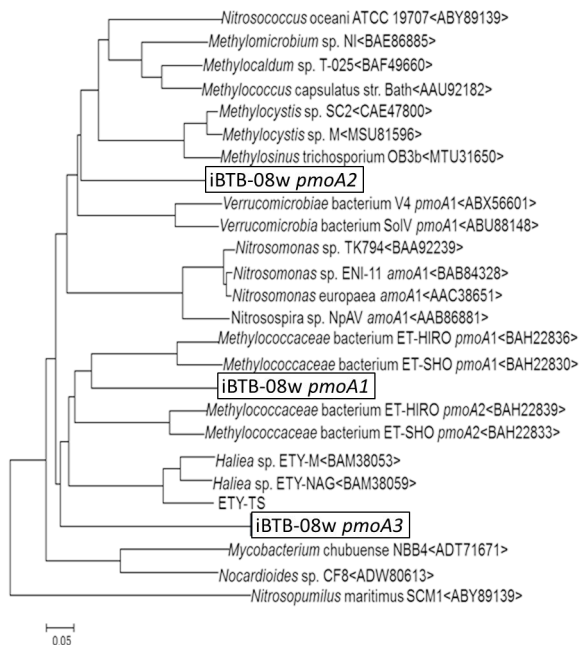


図1 エタン資化性菌 iBTB08W 株の *pmoA* のアミノ酸配列に基づく系統樹

グラム陰性細菌の *pmo* 型遺伝子のアミノ酸配列との相同性が高い事が示された。イソブタンを基質として培養したサンプルは *pmo* 型クラスター、の発現が確認でき、ピルビン酸 Na を基質として培養したサンプルでは *pmo* 型クラスターのみ発現した。*pmo* 型クラスターに関しては共に発現しなかった。この結果から、iBTB-08W 株のイソブタン代謝に関与しているのは、*pmo* 型クラスターであることがわかった。*pmo* 型クラスターに関しては共に発現が確認できたため、イソブタン代謝に関与しているとは言い切れない。図1から iBTB-08W 株の *pmo* 型クラスターは、エタン資化性菌と相同性が高く、また、*pmo* 型クラスターはメタン資化性菌と相同性が高く、同じアルカンであるイソブタンを代謝する際に発現したのではないかと考えられる。*pmo* 型クラスターに関しては、メタン・エタン資化性菌共に相同性が低く、イソブタン代謝に関与しないのではないかと考えられる。

遠州灘沖の海泥試料から新規のエチレン資化性細菌 ETY-TS 株を単離した。本株は、大きさが 0.5-0.55 × 3.0-4.5 μm、生育 pH 域は 5.5-8.0、生育温度範囲は 10-25、生育塩濃度は 1.3-2.6%、エチレン以外のガス状炭化水素のメタン、エタン、プロパン、n-ブタン、プロピレンには生育せず、エタノールには生育したが、1-プロパノール、2-プロパノールには生育しなかった。その 16SrRNA 遺伝子の解析より *Maricurvus nonylphenolicus* に最も近縁であった。TS 株は *pmo* 型遺伝子を有していることが確認され、エチレンによって誘導的に発現していることから、エチレン分解に関与していることが示唆された。

プロピレン資化性菌の東京湾からの分離

株については、運動性のない短桿菌で、生育基質としては、プロピレン、1-ブテン、n-ブタン、1-プロパノール、1-ブタノールを用いることができるが、メタン、エタン、プロパン、イソブタン、ペンタン、エチレン、2-ブテン、エタノール、2-プロパノール、アセトンを用いることはできない。エチレンは資化できないものの、16S rRNA 遺伝子配列を基にした相同性検索および系統樹解によると、*Halioglobus* 属で 96%、海洋性エチレン資化性菌である *Haliea* sp. ETY-M、*Haliea* sp. ETY-NAG とは 94%、95%の相同性を示したことから、ETY-M 株の *pmoA* 遺伝子を指標として Southern hybridization を行った。しかしながら、total DNA 上に相同性を示す領域は検出されなかった。

pmo 型遺伝子の検出されたエタン・エチレン資化性菌について、14 種類の VOC に対して VOC 分解能試験の結果、エタン資化性菌では 5~7 種類、ETY-TS 株は 12 種類の分解を確認できた。この結果からエチレン資化性菌の保有する pMMO の方がエタン資化性菌の保有する pMMO をよりも基質特異性が低く、VOC の分解に適していることが示唆された。

実海域のメタン酸化細菌の検出のため、メタンの湧出の報告がある日本海の海水における *pmo* の分布とその系統に関して検討を行った。メタンハイドレートからのメタンの漏出が想定される 2 地点については深度別、沿岸近くの 5 地点については表層のみの海水試料から DNA を抽出し、海水系 *pmo* のクローニング解析を行い、q-PCR を用いてその定量を行った。メタン濃度に関しては、ヘッドスペース法を用い、GC-FID によって定量を行った。メタン濃度と *pmo* のコピー数の相関は必ずしもよくなかった。クローニング解析の結果では、表層試料と深層試料の *pmo* は系統が異なっており、それらは東海沖の非メタン湧出域の海底直上水の *pmo* の系統とも異なっていた。

また、*pmo* 型遺伝子の *pmoA* の情報を基に、非メタン系 *pmoA* 検出用プライマーを設計し、数種類のプライマーについて、実際に PCR を行うことで最も増幅の良いものを選択した。これについては、同時に -プロテオバクテリアに属するアンモニア酸化細菌の遺伝子も増幅し、-プロテオバクテリアのメタン酸化細菌の *pmoA* についてもわずかに薄いバンドが確認されたが、従来のプライマーに比べメタン酸化細菌の *pmoA* の増幅はごくわずかであった。しかし、実際の東京湾の海水・海泥や日本海の海水の試料についての PCR の結果、やはり増幅は確認されなかった。そこで、さらに Nested-PCR についても検討を行った。エタン資化性菌・エチレン資化性菌の *pmoA* 前後の配列から設計したプライマーを最初に用いた PCR を、上記の環境試料に対して用いた後に上記の PCR を行うことにより、エチレン資化性細菌、エタン資化性細菌の *pmoA* 遺伝子に近縁のクローンが多く検出された。同時に未知の *pmoA* グループや -プロ

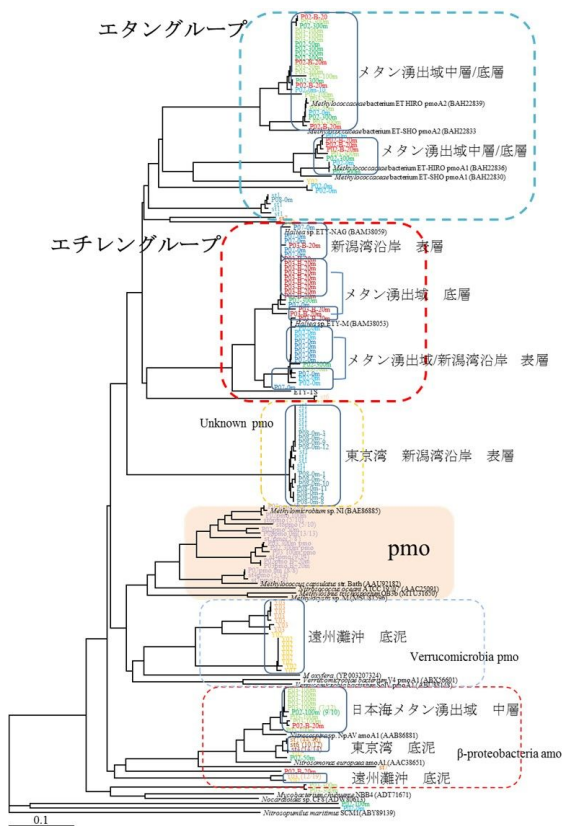


図2 環境試料から検出された pmo 類似遺伝子

テオバクテリアの *amoA* 遺伝子に近縁なグループも検出され、こうした非メタン系 *pmo* 型遺伝子が広く存在することが明らかとなった(図2)。

DGGEを用いた海水中の *pmo* 型遺伝子の検出についても検討を行った。海水試料からの直接の遺伝子の増幅は難しかったが、やはり、Nested-PCRを用いることや、PCR手法の改良により、海水試料中の *pmo* 型遺伝子の増幅を確認することが出来た。これにより、更に詳しい解析が可能となった

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)

[学会発表](計8件)

劉園, 逸見彰大, 阿久津祥吾, 四方麻妃, 塩谷達也, 江晨, 布施博之, 寺原猛, 今田千秋, 帆秋利洋, 沖田紀子, 吉田光毅, 海野圭祐, 上越沖メタン湧出域を含む日本近海の海水中のメタン酸化細菌の分布、第6回メタンハイドレート総合シンポジウム、2014年12月03日、東京

塩谷達也, 寺原猛, 今田千秋, 羽部浩, 布施博之、Cu-MMOを有する新規海洋性エチレン資化性細菌、環境微生物系合同大会 2014、2014年10月21日、浜松

朝重翔, 鈴木敏弘, 羽部浩, 布施博之、海洋性エタン資化性菌の諸性質とその初発酸化酵素遺伝子に関する研究、環境微生物系合同大会 2014、2014年10月21日、浜松

Fuse H., Henmi A., Akutsu S., Shikata M., Shioya T., Jiang C. Liu Y., Terahara T., Imada C., Yoshida K., Okita N., Habe H、Methanotrophic Bacteria in Seawater around Japan.、Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (Gordon Research Conferences)、2014年08月10日、MA(USA)

逸見彰大, 阿久津祥吾, 四方麻妃, 塩谷達也, 江晨, 布施博之, 寺原猛, 今田千秋, 吉田光毅, 平田敦洋, 沖田紀子, 荒田直, 新潟沖メタン湧出域におけるメタン酸化細菌、第5回メタンハイドレート総合シンポジウム、2013年12月04日、東京

飯島智祐, 鈴木敏弘, 丸山明彦, 布施博之、海洋性短鎖炭化水素資化菌の諸性質とその初発酸化酵素遺伝子、第29回日本微生物生態学会、2013年11月23日、鹿児島

6. 研究組織

(1)研究代表者

布施 博之 (FUSE Hiroyuki)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30357925