

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340087

研究課題名(和文) 難培養性微生物を標的としたハイスループット分離・培養・代謝機能解析システムの開発

研究課題名(英文) Development of a high-throughput system for separation, cultivation and metabolism analysis on uncultured microorganisms

研究代表者

重松 亨 (Shigematsu, Toru)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：10315286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：難培養性微生物のハイスループット分離培養技術確立のために、マイクロプレートを用いた液体分離培養法をメタン発酵プロセスに生息する嫌気性微生物群集に応用した。酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta* 属、*Methanosarcina* 属、そして、水素資化性メタン生成古細菌である *Methanolinea* 属をそれぞれ分離して培養することに成功した。一方、水素資化性メタン生成古細菌と共生する酢酸酸化細菌の分離・同定には至らなかった。本研究の成果は、メタン発酵プロセスにおいて重要な役割を果たす難培養性の微生物共生系の分類学的な多様性と生理機能を解明するための有効な研究手法につながるものである。

研究成果の概要(英文)：To develop a high-throughput microbial separation and cultivation method for unculturable microorganisms, a liquid cultivation method using 96-well microplates was applied for anaerobic microorganisms in a methane fermentation process. Aceticlastic methanogens affiliated with the genera *Methanosaeta* and *Methanosarcina*, as well as hydrogenotrophic methanogen affiliated with the genus *Methanolinea*, were separately cultivated on a medium with acetate as the sole carbon source. Acetate-oxidizing bacteria, which could form syntrophic associations with hydrogenotrophic methanogens, could not be identified. This study would provide a novel culture-dependent method for analysis on the taxonomic diversity and physiological functions of anaerobic acetate-oxidizing syntrophs with hydrogenotrophic methanogens, which play important roles for acetate conversion to methane in methane fermentation processes.

研究分野：応用微生物学、食品工学

キーワード：メタン発酵 嫌気性微生物 微生物共生系 酢酸酸化細菌 メタン生成古細菌 難培養性微生物 ハイスループット 分離培養

1. 研究開始当初の背景

現在、食品や環境中の微生物を検出・解析するために最も一般的に用いられている方法は、寒天などの固体培地上で微生物を増殖させてコロニーを形成させるものである。1匹の微生物は固体培地上で細胞分裂を繰り返し肉眼でも見える大きさのコロニーにまで増殖する。微生物を純粋培養できるこの方法は、コッホにより確立されて以来、微生物学の基本的な方法とされてきた。

しかし近年、この方法で培養できるのは、自然環境中に生息する微生物のせいぜい1% (海水試料にいたっては0.0001~0.1%)であり、残りの大部分は取り残されているということが分かってきた。こうした、通常では培養できない難培養性微生物にはどんな種類のものがいて、それらがどういう機能を持つのかを解明し、微生物世界の全貌を明らかにすることが、微生物学の大きな課題の一つとして浮かび上がってきた。

難培養性を示すメカニズムについては未解明の部分が多いが、次のパターンが考えられている。

- 1) 使用している培地の組成や濃度が、対象とする微生物には適さない。
- 2) 増殖に同種または異種微生物の相互作用が必要であり、微生物を単独にすると相互作用が維持できなくなる。
- 3) 増殖速度がきわめて遅いため、コロニーとして目視できず見過ごされている。
- 4) 固体培地表面という特殊な環境により増殖が阻害される。

などである。

これまで申請者らは、上記4)の難培養性メカニズムに対応することによる培養可能域の拡大を企図し、マイクロプレートを用いた液体分離培養系を構築した。これにより、難培養性微生物を含めた好気性細菌のハイスループット分離培養技術を完成した。続いて、この技術を嫌気性微生物に応用し、上記2)の難培養性メカニズムに対応することによる培養可能域の拡大を企図した。

2. 研究の目的

メタン発酵は、様々な嫌気性微生物群の共同作用によって廃水等の有機物をメタンと二酸化炭素に変換するプロセスである。酢酸メタン発酵プロセスにおける最も主要な中間代謝物であり、生成されるメタンの約70~80%が酢酸由来である。

酢酸からのメタン生成反応には、酢酸酸化性メタン生成古細菌による反応、および酢酸酸化細菌と水素酸化性メタン生成古細菌による熱力学的共生反応の2種類の経路が考えられている。この反応を行うことのできる酢酸酸化性メタン生成古細菌として、*Methanosaeta* 属および *Methanosarcina* 属の2属が報告されている。この反応に従事する酢酸酸化細菌としては、AOR 株、*Thermacetogenium phaeum*、そして *Clostridium*

ultunense などが報告されている。また、特に低い希釈率(長い滞留時間)で連続運転するメタン発酵プロセスにおいては、細胞濃度としては上記の微生物が優占していても、代謝機能としては、上記の微生物共生系によるメタン生成反応が高い割合を占めることが報告されている。しかし、この微生物共生系の分離培養は困難であるため、メタン発酵プロセスにおける生理機能、そして、酢酸酸化細菌の分類学的な多様性などは未解明のままである。

我々は、マイクロプレート液体分離培養法を開発し、好気性細菌のハイスループット分離培養技術を開発した。続いて、この技術を嫌気微生物群に応用する検討を進め、酢酸酸化性メタン生成古細菌のマイクロプレート培養に成功した。本研究では、この技術を軸とし、分子生物学的手法を駆使して、難培養性の酢酸酸化細菌と水素酸化性メタン生成古細菌からなる微生物共生系の効率的な単離を目指した。

3. 研究の方法

マイクロプレート液体分離培養のための微生物群として、酢酸を唯一の炭素源とする中温メタン発酵プロセスを構築し、酢酸利用嫌気性微生物群の集積を行った。下水処理場の嫌気性消化槽汚泥を微生物源とし、実容積2Lの完全混合型リアクター(CSTR)を用いたケモスタット式の連続培養を構築した。酢酸を唯一の炭素源とし、全有機態炭素濃度8g/Lに調整した合成廃水を希釈率0.025 d⁻¹で供給し、槽内温度は37℃に維持した。

槽内液を採取し、酢酸を唯一の炭素源とする培地(DSMZ334)でバイアルビンを用いて嫌氣的に段階希釈した。各希釈倍数の細胞懸濁液を、嫌気性グローブボックス内で96-wellマイクロプレートに各well150μlずつ分注した。シリコン製キャップマットで蓋をして、アネロパック嫌気ジャー内にて37℃で47日間静置培養した。

4. 研究成果

(1)マイクロプレート分離培養液中の古細菌(*Archaea*)の解析

CSTR槽内液を10¹から10⁶倍希釈しマイクロプレート分離培養を行った培養液を採取して95℃で5min加熱した。遠心分離した上清を鋳型として、*Archaea*の16S rRNA遺伝子を標的としたPCRを行った。プライマーセットには *Archaea* 全般を標的とする AR28F×1490Rを用い、アニーリング温度50℃でPCRを行った。その結果、10³希釈液を用いたマイクロプレート培養液からは、96ウェル中92ウェルで増幅が見られた。同様に、10⁴希釈液では39ウェル、10⁵希釈液では5ウェルで、それぞれ増幅が見られた。

PCR増幅の感度を上げるために、Nested-PCR法を検討した。その結果、10⁵希釈液を用いたマイクロプレート培養液から

は、96 ウェル中 47 ウェルで、 10^6 希釈液では 13 ウェルで、それぞれ増幅が見られた。このことから、Nested-PCR で増幅が見られたウェルにおいて古細菌が分配され増殖したものと判断した。

Nested-PCR 法で増幅した断片を大腸菌にクローン化して塩基配列を決定した。 10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液からは、26 ウェルについて塩基配列が決定でき、25 ウェルに *Methanosaeta* 属、1 ウェルに *Methanosarcina* 属がそれぞれ検出された。一方、 10^6 希釈液からは、8 ウェルについて塩基配列が決定でき、7 ウェルに *Methanosaeta* 属、1 ウェルに *Methanosarcina* 属がそれぞれ検出された。いずれも酢酸酸化性メタン生成古細菌として知られており、水素酸化性メタン生成古細菌は検出されなかった。

(2) マイクロプレート分離培養液中の水素酸化性メタン生成古細菌の PCR 検出

本研究の目的は、酢酸酸化細菌と水素酸化性メタン生成古細菌の分離培養にある。そのため、マイクロプレート分離培養液からの水素酸化性メタン生成古細菌の PCR 検出を検討した。

CSTR 槽内液の顕微鏡観察を行った結果、水素酸化性メタン生成古細菌に特徴的な補酵素 F_{420} の自家蛍光を示す不完全球菌型の微生物が検出され、細胞形状から *Methanomicrobiales* 目の *Methanoculleus* 属メタン生成古細菌であることが示唆された。また、以前の報告により、同条件で運転するメタン発酵プロセス中に *Methanoculleus* 属の水素酸化性メタン生成古細菌の検出が報告されている。そこで、*Methanoculleus* 属に近縁古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーをデザインして、CSTR 槽内液から抽出した DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、1 段階目の PCR にはプライマーセット AR28F × 1490R を用いアニーリング温度 50 で行い、2 段階目にプライマーセット MG1023F × MG1200R を用いてアニーリング温度 60 で PCR を行うことで、*Methanomicrobiales* 目の *Methanolinea mesophila* に近縁なメタン生成古細菌が検出された。この種のメタン生成古細菌が CSTR 内に生息していることが判明した。

このプライマーセットを用いて、マイクロプレート分離培養液からの水素酸化性メタン生成古細菌の検出を行った。 10^4 希釈液を用いたマイクロプレート培養液からは、14 ウェルにおいて PCR 増幅が確認でき、 10^5 希釈液からは、2 ないし 7 ウェルにおいて PCR 増幅が確認できた。以上の結果から、 10^4 希釈液、 10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液中に *Methanolinea* 属の水素酸化性メタン生成古細菌が存在することが確認できた。

Methanolinea 属の水素酸化性メタン生成古細菌の存在が示されたウェルに対して、酢酸酸化性メタン生成古細菌の存在の有無を確

認する実験を行った。CSTR およびマイクロプレート分離培養液の解析の結果から最も優占していた *Methanosaeta* 属に特異的なプライマーセットを用いて、*Methanolinea* 属が存在したウェルの培養液に対する PCR を行った。プライマーセット MS1bF × SAW835R および SAE761F × SAE835R を用いて PCR を行ったところ、 10^4 希釈液を用いたマイクロプレート培養液の解析した 3 ウェルにおいては、いずれも PCR 増幅が認められ、*Methanosaeta* 属の共存が示された。一方、 10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液の解析した 7 ウェルにおいては、全く増幅が認められなかった。このことから、 10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液の 7 ウェル(E1, F1, H1, A9, B9, D9, H9)には、古細菌としては水素酸化性メタン生成古細菌である *Methanolinea* 属のみが存在することが示された。

(3) マイクロプレート分離培養液中の細菌 (*Bacteria*) の解析

次に、マイクロプレート分離培養液中の *Bacteria* の解析を行った。*Bacteria* 全般の 16S rRNA 遺伝子を標的とするプライマーセット EU27F × 1490R を用い、アニーリング温度 50 で PCR を行った。その結果、 10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液からは 10 ウェル(B2, C4, G4, F5, E8, F8, G8, A9, E9, D10)、 10^6 希釈液からは 4 ウェルにおいて、増幅が認められた。 10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液から得られた増幅断片を大腸菌にクローン化して塩基配列を決定した。9 ウェルについて塩基配列が決定でき、7 ウェルについては、*Proteobacteria* 門、*Betaproteobacteria* 綱、*Rhodocyclales* 目に属する細菌に分類された。一方、2 ウェルについては、*Bacteroidetes* 門 *Bacteroidia* 綱、*Bacteroidales* 目、*Porphyromonadaceae* 科、*Proteiniphilum* 属の細菌に分類された。また、この 2 ウェルについては、*Proteobacteria* 門、*Gammaproteobacteria* 綱、*Pseudomonadales* 目、*Moraxellaceae* 科、*Enhydrobacter* 属に分類される細菌、および未同定細菌がそれぞれ混在している可能性が示された。検出された *Bacteria* には、酢酸酸化細菌として報告されているものはおらず、これらが酢酸酸化細菌として水素酸化性メタン生成古細菌と共生している可能性の可否は判断できなかった。また、*Methanolinea* 属のみが存在し、*Bacteria* が存在しないウェルが認められたことから、PCR の検出感度が低い可能性が示唆された。

そこで、Nested-PCR 法を適用することにした。1 段階目の PCR にはプライマーセット EU27F × 1490R を用いアニーリング温度 50 で行い、2 段階目にプライマーセット EU338-mixF × Univ 907R を用いてアニーリング温度 50 で PCR を行った。その結果、 10^6 希釈液を用いたマイクロプレート培養液から全てのウェルにおいて PCR 増幅が確認された。この結果から、CSTR の槽内液中には、

高い濃度の *Bacteria* が存在し、 10^6 希釈液を用いたマイクロプレート培養液においても、全てのウェルに *Bacteria* が分配され、PCR で検出されたものと考えられた。したがって、本研究において検出された *Bacteria* が酢酸酸化細菌として水素資化性メタン生成古細菌と共生している可能性は低いと判断した。

(4) マイクロプレート分離培養液のバイアル瓶を用いた回分培養

10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液中に *Archaea* としては *Methanolinea* 属の水素資化性メタン生成古細菌のみが存在する培養液が得られた。マイクロプレート分離培養には酢酸を唯一の炭素源とした培地を用いているので、これらのウェルにおいて酢酸酸化細菌が共存して、酢酸から水素と二酸化炭素を生成し、*Methanolinea* 属に受け渡していると考えなければ、*Methanolinea* 属の存在の説明がつかない。しかし、CSTR 中の *Bacteria* の濃度が高すぎ、 10^6 希釈液を用いたマイクロプレート培養液においても全てのウェルに *Bacteria* が分配され PCR で検出されたため、酢酸酸化細菌の特定には至らなかった。そこで、マイクロプレート分離培養液を用いて、ガラスバイアル瓶にて、酢酸を唯一の炭素源とした培地での嫌気性回分培養を検討した。

100 ml 容ガラスバイアル瓶に、酢酸を唯一の炭素源とする合成培地(DSM334)を 50 ml 分注し、ガス置換ゴブチルゴム栓で蓋をし、オートクレーブ、還元剤添加を行い嫌気環境とした。CSTR 槽内液の 10^5 希釈液を用いたマイクロプレート培養液の 7 ウェル(E1, F1, H1, A9, B9, D9, H9)および 10^4 希釈液を用いたマイクロプレート培養液の 3 ウェル(H3, A4, G4)の合計 10 ウェルの培養液をシリンジで採取し、ガラスバイアル瓶の培地に植菌した後、37 で静置培養を行った。培養開始後培養開始して 1 年間経過した時点で 10 本ともバイオガスは発生していないが、わずかに増殖の兆候が見られた。培養を継続することで、*Bacteria* 中の酢酸酸化細菌が、水素資化性メタン生成古細菌と共生関係を構築し優占して増殖することで、微生物の共生系の単離につながると期待している。

(5) まとめ

本研究では、メタン発酵プロセスの槽内に生息する嫌気性微生物群のマイクロプレートを用いた分離培養法の構築に成功した。これによって、*Archaea* としては、酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta* 属、*Methanosarcina* 属、そして、水素資化性メタン生成古細菌である *Methanolinea* 属をそれぞれ独立ウェルに分離して培養することを可能とした。一方で、槽内に生息する *Bacteria* の細胞濃度が高く、マイクロプレート分離培養のみでは、水素資化性メタン生成古細菌と共生する酢酸酸化細菌の分離・同定には至ら

なかった。今後、マイクロプレート分離培養を 50 日毎に繰り返す等、酢酸酸化能を持つ *Bacteria* が優占して増殖できる方法を検討することで、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をハイスループットに分離培養することが可能となる。

本研究の分離培養法とメタボロミクス等の網羅的代謝解析を組み合わせることで、未知の部分が多いが、メタン発酵プロセスや自然の嫌気環境において重要な役割を果たしている微生物共生系の分類学的多様性と生理機能が明らかになると考えている。

< 引用文献 >

- 重松亨. 現代化学, No.453, 64-65 (2008)
Shigematsu, T. et al. FEMS Microbiol. Lett., 293, 240-247 (2009)
Shigematsu, T. et al. Appl. Environ. Microbiol., 70, 4048-4052 (2004).
中島美沙子他. 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集 p. 259 (2011)
重松亨他. 第 63 回日本生物工学会大会講演要旨集 p. 34 (2011)

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)

- Yue-Qin Tang, Toru Shigematsu, Shigeru Morimura and Kenji Kida “Dynamics of the microbial community during continuous methane fermentation in continuously stirred tank reactors.” J. Biosci. Bioeng., 査読有, 119(4), 375-383 (2015)

[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]

特になし。

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・教授
研究者番号：10315286

(2) 研究分担者

井口 晃徳 (IGUCHI, Akinori)
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
研究者番号：60599786