

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25450265

研究課題名(和文) ゲノム解析と培養試験による海洋のメタン酸化微生物群の共生機構の解明

研究課題名(英文) Studies on syntrophic relationship among marine methane oxidizing microorganisms

研究代表者

竹内 美緒 (Takeuchi, Mio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20357403

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)：地球温暖化によるメタンハイドレート分解、それに伴うメタンの大気への放出が懸念されている。大気への放出を抑制するのは海水中のメタン酸化細菌であるが、分離培養が困難であることから分離例が少なく、研究が進んでいない。本研究では海底堆積物からメタン酸化細菌ならびにそれと共生する微生物を分離し、ゲノム解析を行うことを目的とした。培地等の工夫により、新種である *Methylocaldum marinum* S8, ならびに S8 株と共生する新属新種のメチロトロフ、*Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4 の分離培養に成功した。また、それぞれ完全ゲノムの解読に成功した。

研究成果の概要(英文)：The intimate relationship between methane-oxidizing bacteria (methanotrophs) and methanol-oxidizing bacteria (methylotrophs) has been known for a long time. The co-existence with methylotrophs has been always explained in terms of cross-feeding. However, the real nature of the relationship remains unknown. In this study, we have isolated novel marine methanotroph, *Methylocaldum marinum* S8, and novel methylotroph, *Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4, that syntrophically grow with *M. marinum* S8. We also determined complete genomes of the two strains in order to infer their interrelationship.

研究分野：微生物生態学

キーワード：メタン 共生 ゲノム 海洋細菌 メタノトロフ メチロトロフ

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化が進む中、懸念される課題の1つがメタンハイドレートの分解に伴うメタンガスの大気への放出である。メタンハイドレートに由来するメタンの放出は、メタンハイドレートの開発に伴っても生じる可能性が指摘されている。海洋のメタン酸化細菌は、海水中において大気へのメタンの放出抑制を担う唯一の存在であるが、メタンの動態予測には、メタン酸化細菌の理解が不可欠であった。しかし、海洋のメタン酸化細菌は分離培養が困難であり、これまで数件の分離例しかなかった上、それらは浅海の海水に由来に限られているなど、ほとんど理解が進んでおらず、海底堆積物表層における挙動を解析するための適切な供試菌はなかった。そのような背景の下、我々は鹿児島湾の水深約200m地点の海底堆積物から3種類の微生物から成るメタン酸化混合培養系を得ることに成功していた。さらに、文部科学省によるゲノム支援を受け、メタン酸化混合培養系の3種類の微生物についてのドラフトゲノム情報が得られたところであった。

2. 研究の目的

本申請課題では、まずこの3者培養系を用いて1)既に得られているドラフトゲノム情報をベースに、完全ゲノムの構築を目指し、各微生物の代謝系を解明する。続いて、相補的に2)網羅的培養試験を実施し、含まれる微生物群の生理学的性質を解明する。最終的には、これらの結果をリンクさせ、混合培養系に存在する共生機構の解明を目的とした。

ゲノム情報と培養試験との併用は、これまでも微生物間共生関係の解明や難分離培養微生物の培養に有効に用いられてきた。例えば、*Symbiobacterium thermophilum* と *Bacillus* sp. の共生関係は、前者が炭酸脱水酵素を欠いており、後者によって供給される二酸化炭素が必要であることがゲノム情報と培養試験とから証明された (Ueda et al. 2004, *Nucleic Acids Res.* 32: 4937-4944.)。また、ゲノム情報をもとにして、特殊環境(窒素固定条件)で培養することにより、目的とする難分離培養性微生物を分離培養した例も知られている (Tyson et al. 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6319-6324.)。本申請課題でも、ゲノム情報と培養試験による生理学的情報とを相互にリンクさせることにより、海洋のメタン酸化微生物群による共生機構を解明することを目標とした。

3. 研究の方法

微生物間の共生関係を解明するにあたっては、ある特定の代謝系の存在だけでなく、欠損をも証明する必要がある。完全ゲノムが望ましい。まず混合株の3種類の微生物について完全ゲノムを構築することを目標とする。プライマーウォーキングによる Gap Filling などの解析は外注分析で実施する。

最終的なゲノムフィニッシングおよび解析は、連携研究者である東京大学大気海洋研究所地球表層圏変動研究センターの岩崎渉博士により解析ツールの提供を受け、実施する。

培養法によるアプローチからも共生関係の解明を目指す。他の微生物から生育因子が供給されている場合、純粋培養株あるいは混合株の培養上清をうまく用いることで、メタン酸化細菌が分離できる可能性がある。2種類の純粋株と混合株の培養上清を添加し、液体培地を用いた限界希釈培養ならびに固体培地を用いた培養によりメタン酸化細菌の単独の増殖を評価する。増殖がみられた場合には、上清の化学分析(分子量分画や、申請者のグループで保有しているGC-MS等を利用する)により、生育因子の絞り込みを行う。

また、既に分離培養できている従属栄養細菌とメタノール酸化細菌 (Gela4 株と MA1 株)については、網羅的な生理学的試験を実施する。基質資化性や、ビタミンやアミノ酸などの栄養要求性、窒素源利用性、酵素カインेटィクス等は共生関係の解明に重要であることから、詳細な試験を実施する。

4. 研究成果

1)3種類の微生物の分離培養ならびに新種・新属記載

研究当初、Gela4 株と MA1 株が既に分離されていた。これらについて、詳細な生理学試験や化学分析等を行った結果、共にプロテオバクテリアに属する新属新種と言えることが明らかとなり、これらを *Methyloceanibacter caenitepidi*, *Tepidicaulis marinus*、として新属新種記載論文を発表した (Takeuchi et al., 2014a, 2015) (Figure 1)。

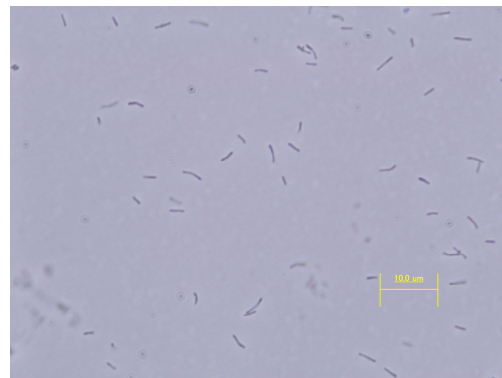


Figure 1. *Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4

Methyloceanibacter caenitepidi は、メタノールの他に酢酸、ギ酸、グルコースなど様々な有機物を利用する通性メチロトロフであった。*Tepidicaulis marinus* は、微好気環境下で N_2O を生成する従属栄養細菌であること

が明らかになった。さらに、培地成分を工夫することにより、メタン酸化細菌である S8 株の分離培養にも成功した。解析の結果本菌株は *Methylocaldum* 属に属する新種であることが明らかになったことから、*Methylocaldum marinum* として新種記載の論文を公表した (Takeuchi et al., 2014b) (Figure 1)。

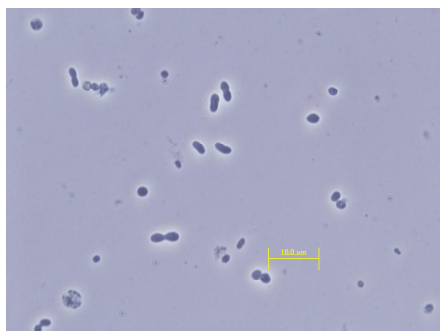


Figure 1. *Methylocaldum marinum* S8

2) Gela4 株, S8 株の完全ゲノムの完成

Gela4 株, S8 株については完全ゲノムを得ることができた。Gela4 株ゲノムは 3.4Mbp であり、メタノール酸化酵素遺伝子群や TCA 回路、解糖系などの遺伝子が確認された。S8 株ゲノムは 6.1 Mbp であり、メタン酸化酵素、メタノール酸化酵素遺伝子群、RuMP pathway 遺伝子群が確認された。また、S8 株ゲノムは重複ゲノムが多く、ゲノムサイズが大きい要因の1つとして重複ゲノムが多いことが明らかとなった。また、近年知られるようになったきたレアアースに依存すると考えられているメタノール酸化に関わる *xoxF* 遺伝子が、Gela4 株、S8 株ともに複数確認された。

3) メチロトロフのトランスクリプトーム解析

連携研究者の協力により、予定より少ない費用で完全ゲノムが得られたことから、研究を当初計画以上に発展させ、メチロトロフである Gela4 株について、トランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を実施した。Gela4 株がメタノトロフとの共生時にどのような代謝経路で増殖しているのかを明らかにすることを目的とした。メタノールを基質として単独で培養した際、メタノトロフである S8 株との共生により、炭素源をメタンのみにして培養した際について、発現遺伝子の比較を行った。その結果、どちらの条件においてもメタノール酸化に関わる *mxoA* オペロンが多く発現しており、共生時にはメタノールが主要な Gela4 株の基質になっていることが明らかになった。また、単独培養時と比較し、共生培養時には、約半数の遺伝子が発現を増加あるいは減少させていることが明らかになった。

発現が増減した遺伝子をもとにどのような代謝経路の発現が変動したかを解析した。

また、代謝経路の確認のため、S8 株なら

びに共生系の培養液を用いて、GC-MS, HPLC を用いた化学分析を行った。これらの成果については、現在国際誌に論文を投稿準備中である。

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 3 件)

Takeuchi, M., Katayama, T., Yamagishi, T., Hanada, S., Tamaki, H., Kamagata, Y., Oshima, K., Hattori, M., Marumo, K., Nedachi, M., Maeda, H., Suwa, Y., and Sakata, S. 2014. *Methyloceanibacter caenitepidi* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively methylotrophic bacterium isolated from marine sediments near the hydrothermal vent area. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 462-468.

Takeuchi, M., Kamagata, Y., Oshima, K., Hanada, S., Tamaki, H., Marumo, K., Maeda, H., Nedachi, M., Hattori, M., Iwasaki, W. and Sakata, S. 2014. *Methylocaldum marinum* sp. nov., a thermotolerant, methane-oxidizing bacterium isolated from marine sediments, and emended description of the genus *Methylocaldum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 3240-3246.

Takeuchi, M., Yamagishi, T., Kamagata, Y., Oshima, K., Hattori, Katayama, T., Hanada, S., Tamaki, H., Marumo, K., Maeda, H., Nedachi, Iwasaki, W., Suwa, Y., Sakata, S. 2015. *Tepidicaulis marinus* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that reduces nitrate to nitrous oxide under strictly microaerobic conditions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**: 1749-1745.

[学会発表](計 4 件)

竹内美緒・丸茂克美・前田広人・根建宗具・大島健志朗・片山泰樹・山岸昂夫・岩崎渉・鎌形洋一・花田智・玉木秀幸・服部正平・諏訪裕一・坂田将. 鹿児島湾海底堆積物中に生息するメタンを基盤とする新規中温性微生物群の生理学的・遺伝学的特徴の解明. 第29回日本微生物生態学会、2013、鹿児島。

竹内美緒, 山岸昂夫, 鎌形洋一, 大島健志朗, 服部正平, 片山泰樹, 花田智, 玉木秀幸, 丸茂克美, 前田広人, 根建心具, 岩崎渉, 諏訪裕一, 坂田将. 微好気条件下のみ硝酸還元・亜酸化窒素生成(N_2O)を行う新規海洋細菌. 環境微生物系学会合同大会 2014、浜松。

竹内美緒, 尾崎 遼, 平岡聡史, 大島健志朗, 服部正平, 鎌形洋一, 岩崎渉. ゲノム解

析・RNAseqによるメタン酸化細菌とメタノール資化性菌の共生機構の解明.環境微生物系学会合同大会 2017、仙台.

Mio Takeuchi, Haruka Ozaki, Satoshi Hiraoka, Yoichi Kamagata, Susumu Sakata, Wataru Iwasaki. Cross-feeding pathways from a methanotroph to a marine methylotroph, *Methyloceanibacter caenitep idi* Gela4, under co-culture condition. the 23rd International Symposium on Environmental Biogeochemistry (ISEB23), 2017, Austraria.

〔図書〕(計 1 件)

Methylotardum. Mio Takeuchi, In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley, 2016.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01180.pub2>

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 美緒 (TAKEUCHI, Mio)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：20357403

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岩崎渉 (IWASAKI, Wataru)
東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：50545019

(4) 研究協力者

()