

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450393

研究課題名(和文)ルーメン内新奇メタン生成菌の分離とゲノム解析

研究課題名(英文) Isolation and genome analysis of novel methanogens from the rumen.

## 研究代表者

松井 宏樹 (MATSUI, Hiroki)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：30346001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウシなどの反すう家畜からは、地球上の全排出量の15%にもおよぶメタンが排出されている。メタンはルーメンと呼ばれる消化管に生息するメタン生成菌が生成する。従ってルーメンのメタン生成菌の特性を知る必要がある。本課題では共生関係にある微生物との共培養によるメタン生成菌の新規分離方法の開発とその方法により分離した菌株の特徴づけを行った。また、分離した菌株の中から1つを選びゲノム解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Livestock cattle is considered to contribute 15% of total methane emission. Methanogens produce methane in the rumen of cattle. Therefore, characterization of methanogens is required. In this project, a new isolation method which uses symbiotic microorganisms was developed and isolates were collected and characterized. Furthermore, genome sequence of one isolates from the collection was analyze.

研究分野：消化管微生物学

キーワード：メタン生成菌 ルーメン メタン生成抑制 ゲノム解析 インビトロ培養

## 1. 研究開始当初の背景

メタン生成菌 (methanogen, methanogenic archaea) は様々な嫌気環境に生息している。消化管もメタン生成菌の生息場所であり、昆虫 (シロアリ、ゴキブリ)、ほ乳類や鳥類の消化管内に生息していることが知られている。反すう動物のルーメンも生息環境の一つである。反すう動物のルーメン内に生息しているメタン生成菌は発酵によって生じた水素ガスと二酸化炭素からメタンを生成する。生成したメタンはあい気としてルーメンから排出され、反すう家畜から排出されるメタンは地球上で生成する全メタンガスの 15% を占めると推定されている (Mitsumori and Sun, 2008)。地球温暖化ガスの排出削減が求められる中、反すう家畜からのメタン排出量の削減は急務である。

メタン生成菌は、それぞれ異なった特性を持つため、効果的にメタンを抑制するためには個々のメタン生成菌の特性を知る必要がある。これまで、ルーメンからメタン生成菌の分離や特徴付け (characterization) が行われてきた (Jarvis et al., 2000; Miller et al., 1986; Smith and Hungate, 1958)。しかしながら、これまでルーメンから分離されてきたメタン生成菌の分離菌株は数菌株程度と少ないため、効果的なメタン排出抑制法の手がかりを得ることを目的とするには十分とは言いがたい。メタン生成菌は偏性嫌気性菌 (絶対嫌気性菌) であり、その培養は高度な嫌気度 (酸化還元電位 Eh 値 = -300mV 以下) を要求するため困難である (三森と湊, 2004)。また、増殖速度も遅く、肉眼でコロニーが確認できるまで 2 週間以上必要になり、培養に時間がかかる。このようにメタン生成菌の培養は非常に難しく、そのことがメタン生成菌の分離培養の障害となっている。ルーメン内に生息するメタン生成菌は培養法で明らかになっている以上に多様であり、未培養のものが多数存在することが分子生物学的解析により明らかになっている (King et al., 2011; Lwin et al., 2014; Ozutsumi et al., in press; Tajima et al., 2001; Tatsuoka et al., 2001; Wright et al., 2004, 2006, 2008)。ルーメン内に生息するメタン生成菌の理解を深め、反すう家畜からのメタン排出量の削減技術の開発のためには、これまで未培養であったメタン生成菌を分離し、より多くの菌株を収集することが重要である。また、分離した菌株については生理・生化学的な特徴付けやさらにはゲノム解析を行うことが不可欠である。

これまで未培養であったルーメン内のメタン生成菌を水素生成微生物である嫌気性真菌を利用して、下記に説明する共培養法により分離することを試みる。分離した菌株の中でも新奇性の高いものについては生理・生化学性状などの特徴付けを行い、さらにゲノム解析も行う。

水素を利用するメタン生成菌の分離は、高水素ガス分圧下 (100kPa 程度) で行われる

のが一般的である。しかしながら、メタン生成菌の生息環境における水素ガス分圧はそれよりもはるかに低く、10~100Pa 程度である。一般的なメタン生成菌分離方法では、高水素ガス分圧環境を好み、その環境で速く増殖する菌株を選択的に分離していることになる。この方法では、そのような条件では生育しない、あるいはそのような条件では増殖速度が低いような菌株を無視していることになる。この問題を解決するために、Sakai et al. (2007) は水素生成細菌との共培養 (Co-culture) による水素利用メタン生成菌の新たな分離方法 (共培養法; co-culture method) を開発し、それまで未培養であったメタン生成菌を水田土壌中から分離を報告した。彼らの分離方法の特徴は、自然環境下で見られるメタン生成菌と水素生成微生物との共生関係を利用するところにある。水素を利用するメタン生成菌のなかには水素生成微生物から水素を受け取り、基質として利用し増殖する種が存在する (種間水素転移; inter-species hydrogen transfer)。メタン生成菌は水素生成微生物から基質を提供してもらえらるため、栄養的な利益を享受している。一方、水素生成微生物は代謝産物である水素がメタン生成菌によって除去されるので、代謝産物が蓄積することによる増殖の阻害が起こらないため、やはり栄養的に利益を享受する。このように、メタン生成菌と水素生成微生物の間には栄養的な共生関係が成立し、双方が栄養的に利益を享受している関係を栄養共生 (syntroph) と呼ぶ。Sakai et al. (2007) は、メタン生成菌が直接基質として利用できないプロピオン酸を加えた培地に水素の供給者として Syntrophobacter fumaroxidans を接種し、そこへ接種物を添加し集積培養を行うことにより新奇メタン生成菌を分離した。S. fumaroxidans はプロピオン酸を基質として利用し、水素を生成する。メタン生成菌はプロピオン酸を利用できないので、S. fumaroxidans がプロピオン酸を資化して生成した水素を利用して増殖することになる。このとき、水素ガスの分圧は低く保たれており、分離されて新奇メタン生成菌はそのような条件下で増殖したのである。

本課題の特色・独創性は、水素生成微生物として嫌気性真菌を用いることで効率的にルーメン由来のメタン生成菌を分離するところにある。ルーメン内ではメタン生成菌が水素生成微生物であるプロトゾアや嫌気性真菌に付着している様子が観察されている。これらの水素生成微生物とメタン生成菌は栄養共生の関係にあり、種間水素転移が行われていると考えられている。ルーメン内に生息する水素生成微生物を水素供給者として用いれば、未培養であったルーメンメタン生成菌を分離できる可能性が高い。ルーメンプロトゾアは未だに培養法が確立されておらず、共培養法によりメタン生成菌を分離する

ためにはプロトゾアを用いることは困難である。ルーメン内の真正細菌(ルーメン細菌)の中には水素を生成するものが存在するが、現在のところメタン生成菌との栄養共生が明らかになっていたり、示唆されているルーメン細菌は知られていないため、共培養法によるメタン生成菌の分離にルーメン細菌は適していない。嫌気性真菌は真核生物であるため各種の抗生物質を使用することができ、ルーメン細菌のコンタミネーションを極力排除し、メタン生成菌の集積をより効率よく行うことが可能である。これらの点を考慮すると、ルーメンのメタン生成菌を共培養法による分離のためには嫌気性真菌が最も適していると考えられる。

本課題で用いる方法により新奇メタン生成菌菌株を分離することができれば、ルーメンメタン生成菌のカルチャーコレクションを充実することができる。得られた菌株については、国内外を問わず研究者からの要請があれば分譲を行い、必要があればカルチャーコレクションへ寄託する。このことにより、多くの研究者が材料として用いることができることで、メタン生成菌の研究を加速することができる。分離できた新奇性の高い菌株については生理・生化学性状について調査を行い、さらにゲノム解析を行うことで、メタン生成菌の特性を明らかにできる。これらの成果は反すう家畜からのメタン排出抑制技術の開発につながるだろう。最終的には畜産業のみならず、地球環境問題解決へのインパクトも大きいと考えられる。

## 2. 研究の目的

本課題では、Sakai et al. (2007)の方法をもとに、ルーメンに由来する嫌気性真菌を水素生成微生物として用い、新奇メタン生成菌を嫌気性真菌との共培養を行うことにより分離を試みる。

## 3. 研究の方法

本課題では、Sakai et al. (2007)の方法をもとに、ルーメンに由来する嫌気性真菌を水素生成微生物として用い、新奇メタン生成菌を嫌気性真菌との共培養系からメタン生成菌のみを分離した。また得られた分離株について特徴づけを行った。また1菌株についてゲノム解析を行った。

## 4. 研究成果

嫌気性真菌との共培養系によりメタン生成菌の分離をする試みは本研究が世界で初めてである。合計 26 菌株のメタン生成菌を上記の方法で分離した。これらの菌株は *Methanobrevibacter ruminantium*、*Methanobrevibacter millerae*、*Methanobrevibacter thaueri* および *Methanomicrobium mobile* の 4 菌種に分類された。我々は米ぬかがメタン生成を抑制することを突き止めている。そこでこれらの菌種

の増殖に対する米ぬかのエタノール可溶性分画の影響について調べた。米ぬか抽出物は *M. mobile* の増殖を抑制したが、*M. thaueri* の増殖には影響しなかった。得られた菌株の中から 1 菌株を選び、ゲノム解析を行った。これらの成果は、今後、ルーメンからのメタン生成抑制に貢献すると考えられる。

## 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)

(雑誌論文)(計 8 件)

1. Arfan Abrar, M. Kondo, T. Kitamura, T. Ban-Tokuda, and H. Matsui. The effect of dietary calcium salt medium-chain fatty acid on rumen fermentation in vitro, methanogenesis, and rumen microbial density. *Pakistan Journal of Nutrition*. 査読有, 印刷中.
2. Arfan Abrar, H. Watanabe, T. Kitamura, M. Kondo, T. Ban-Tokuda, and H. Matsui. Diversity and fluctuation in ciliate protozoan population in the rumen of cattle. *Animal Science Journal*. 査読有, 印刷中.
3. Arfan Abrar, M. Kondo, T. Kitamura, T. Ban-Tokuda, and H. Matsui. Effect of supplementation of rice bran and fumarate alone or in combination on in vitro rumen fermentation, methanogenesis, and methanogens. *Animal Science Journal*. 査読有, 87: 398-404. (2016)
4. Uyeno, Y., C. Wang, A. Jayanegara, M. Kondo, T. Ban-Tokuda, and H. Matsui. Increase in rumen fibrolytic bacteria and the improvement of fiber degradability of ensiling total mixed ration assessed by in vitro rumen culture. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 査読有, 4: 183-186. (2016)
5. Wang, C., Y. Uyeno, A. Jayanegara, M. Kondo, T. Ban-Tokuda, and H. Matsui. Changes in in vitro rumen fermentation characteristics of different compositions of total mixed rations TMR and the ensiled TMRs. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 査読有, 4: 178-182. (2016)
6. Arfan Abrar, T. Tsukahara, M. Kondo, T. Ban-Tokuda, C. Wang, and H. Matsui. Effect of monensin withdrawal on rumen fermentation, methanogenesis and microbial populations in cattle. *Animal Science Journal*. 査読有, 86: 849-854. (2015)
7. Lwin, K. O., and H. Matsui.

Comparative analysis of the methanogen diversity in horse and pony by using *mcrA* gene and archaeal 16S rRNA gene clone libraries. *Archaea*. 査読有, vol. 2014, Article ID 483574 (2014)

8. Mitsumori, M., H. Matsui, K. Tajima, T. Shinkai, A. Takenaka, S. Denman, and C. McSweeney. Effect of bromochloromethane and fumarate on phylogenetic diversity of the formyltetrahydrofolate synthetase gene in the bovine rumen. *Animal Science Journal*. 査読有, 85 : 25-31. (2014)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Arfan Abrar, 伴(徳田)智美, 近藤誠, 松井宏樹. Supplementation of fumarate and rice bran on in vitro fermentation and methanogenesis. 第 118 回日本畜産学会. 2014 年 3 月 28 日. エポカルつくば(茨城県つくば市).
2. Abrar A, Kondo M, Ban-Tokuda T, Matsui H. Effect of fumarate and rice bran supplementation on in vitro rumen fermentation and methanogenesis. In Proceedings of the 16th AAAP Animal Science Congress Vol. II, 10-14 November 2014, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. pp. 235-238.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

松井 宏樹(MATSUI, Hiroki)  
三重大学・生物資源学研究科・教授  
研究者番号：30346001

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：