

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450478

研究課題名(和文) 庄内沿岸極浅海域に生息する嫌氣的メタン酸化古細菌の多様性・活性評価および培養化

研究課題名(英文) Diversity, activity, and cultivation of anaerobic methane-oxidizing archaea in sediments of a shallow river estuary

研究代表者

服部 聡 (HATTORI, Satoshi)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：40373352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では山形県庄内沿岸河口域堆積物に生息する嫌氣的メタン酸化古細菌(ANME古細菌)の垂直多様性分布を明らかにするとともに、嫌氣的メタン酸化活性(AOM活性)の垂直活性分布を明らかにすることを試みた。mcrA遺伝子を用いた分子系統解析の結果、堆積物深度に応じて異なるANME古細菌が棲み分けている可能性が推察された。また、AOM活性は逆メタン生成かつ硫酸還元依存性である可能性を示すとともに、堆積物下層部ほど高活性であることを明らかにした。これらの結果から、当該堆積物においては逆メタン生成能を有するANME古細菌と硫酸還元細菌の共生微生物系により嫌氣的メタン酸化反応が起こり得ることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Anaerobic methanotrophic archaea (ANME) and sulfate-reducing bacteria (SRB) are considered to be important microbes in marine sediments, since they would consume most of greenhouse gas (CH<sub>4</sub>) through anaerobic oxidation of methane (AOM) coupled with sulfate reduction. To date, relatively few studies regarding ecophysiology of the ANME in estuary sediments. In this study, I investigated vertical distribution, diversity, activity, and cultivation of ANME in sediments of shallow water estuary. Stable isotope labeling experiments indicated that the highest AOM activity was observed in the deepest sediment. The activity was suppressed in the presence of methanogen- or sulfate reducing bacteria specific inhibitors. The clone analysis of mcrA gene indicated the possibility that the different ANME community would be developed depending on the sediment depth.

研究分野：微生物学、微生物生態学

キーワード：嫌氣的メタン酸化古細菌 mcrA遺伝子 dsrAB遺伝子 垂直分布 多様性 汽水域堆積物 難培養微生物

### 1. 研究開始当初の背景

メタンはエネルギー資源として有用な反面、温室効果ガスとして負の側面も有している。メタンガスは泥炭や水田、反芻動物など陸域が主要な発生源であり、海洋からの発生は地球上の1~10%程度と少ない。これは、海洋から発生するメタンガスの9割以上が海底の堆積物を通過する過程で嫌氣的メタン酸化反応 (Anaerobic oxidation of methane, AOM) により分解されているためと考えられている。海洋における AOM 反応は、嫌氣的メタン酸化古細菌 (Anaerobic Methanotrophs, 以下 ANME 古細菌) が担っていると考えられており、その反応の進行には硫酸還元細菌 (Sulfate-reducing bacteria) の関与が推察されている。上述のように温室効果ガス抑制の観点から、ANME 古細菌は重要な微生物であると考えられるが、当該古細菌は強度の難培養微生物でもあるため、未だ分離培養の成功例がない状況にある。そのため、ANME 古細菌研究は脂質同位体解析や環境 DNA/RNA 解析など、培養に依存しない手法が主に用いられている。また、主な調査場所は水深数百メートルから数千メートルという深海域においておこなわれている。水深の浅い海域においても当該古細菌研究は行われているものの、その生息域分布や AOM 反応の垂直活性分布など、微生物生態生理学的な研究はあまり進んでいない状況にあった。

### 2. 研究の目的

本研究では、庄内沿岸河口域の極浅深度汽水領域の堆積物を研究試料として、(1)堆積物深度ごとに AOM 活性を測定することにより、垂直分布活性を明らかにすること、(2)遺伝子マーカーによる ANME 古細菌および硫酸還元細菌の垂直分布多様性を明らかにすること、(3)当該古細菌および硫酸還元細菌の培養化を目的とした。

### 3. 研究の方法

山形県酒田市酒田北港豊川河口において、堆積物試料約 1 m を採取した。採取は半円錐型試料採取器を用いて堆積物の垂直情報を保持したまま、2回に分けて採取した。採取後の堆積物を滅菌ナイフで深度ごと 10 cm 間隔で切り出し、脱酸素剤入りのポリカーボネートボックスに密封し、減圧処理を行った。その後、直ちに試料を研究室に持ち帰った。はじめに堆積物の化学分析を行った。分析には堆積物深度 (1)10-20 cm、(2)20-29 cm、(3)65-75 cm、(4)75-85 cm、(5)85-95 cm、(6)95-105 cm、(7)105-115 cm の 7 深度の堆積物を用いた。各々の堆積物中の化学的性質を明らかにするため、イオン濃度、pH、電気伝導度 (EC)、酸化還元電位 (ORP)、溶存メタン濃度、水分含量の測定を行った。イオン濃度、pH、EC の測定には堆積物中の間隙水を用いた。間隙水は各々の堆積物試料を遠心ボ

トルに詰め、遠心分離機で 20,000  $xg$ , 20 分遠心分離を行うことにより取得した。イオン濃度はイオンクロマトグラフ (DX-100, Dionex) を用いて測定した。pH および EC は微量 pH 計 (B-212, 堀場製作所) および微量 EC 計 (B-174, 堀場製作所) を用いて測定した。ORP の測定は、堆積物を測定容器に移し、脱酸素処理済みアルゴンガス気流下で ORP 電極 (9300-10D, 堀場製作所) を挿入することにより行った。なお、ORP は変換式 ( $ORP_{S.H.E} = E + 206 - 0.7(t-25)$ ,  $E$ =実測値、 $t$ =温度) を用いることにより、標準水素電極値 ( $ORP_{S.H.E}$ ) に換算した。溶存メタン濃度はバイアル瓶内に飽和食塩水 3 mL と堆積物 0.5 g を混合密封し、攪拌後の気相部をガスクロマトグラフ (GC-2014AF, 島津製作所) で分析することにより測定した。水分含量は各々の深度の堆積物を小シャーレに添加し、乾燥前重量と乾燥処理 (105°C, 3 日間) 後の重量から算出した。

次に、堆積物深度ごとに AOM 活性の測定を行った。測定には安定同位体標識メタン ( $^{13}CH_4$ ) を用い、堆積物深度 (1)10-20 cm、(2)20-29 cm、(3)75-85 cm、(4)85-95 cm、(5)105-115 cm の 5 深度の堆積物を用いた。AOM 活性試験は実際の堆積物のイオン組成に近い状態で行えるように、上記間隙水のイオン分析データを基に深度ごとにイオン濃度を調整し、反応溶液とした (ただし、硫酸イオン  $SO_4^{2-}$  は堆積物深度によらず同一濃度を用いた)。反応溶液は嫌氣的にバイアル瓶に調製後、各々の深度に対応した堆積物を 1 g 添加密封し、系内を脱気・窒素ガス置換した。なお、活性測定においては、A) 無添加、B)  $^{13}CH_4$  のみ [ $SO_4^{2-}$  非添加]、C)  $^{13}CH_4 + SO_4^{2-}$ 、D)  $^{13}CH_4 + SO_4^{2-}$  + メタン代謝阻害剤 [プロモエタン硫酸塩、BES]、E)  $^{13}CH_4 + SO_4^{2-}$  + 硫酸還元阻害剤 [モリブデン酸ナトリウム、Mo] の 5 つの反応系を作製・使用した。また、各々の反応系は 3 反復、オートクレーブ滅菌した対照区は 2 反復作製した。これらを 25°C でインキュベートし、気相部試料を経日的にガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP5000, 島津製作所) に注入、 $^{13}CO_2$  ( $m/z=45$ ) の測定を行った。これにより、堆積物深度ごとに、また、異なる反応系ごとに AOM 活性の評価を行った。

次に、ANME 古細菌およびメタン生成古細菌の垂直分布多様性解析を行った。解析試料としては、堆積物深度 (1)10-20 cm、(2)75-85 cm、(3)105-115 cm の 3 深度の堆積物を用いた。各々の堆積物は遠心分離により間隙水を除去後、ビーズ法 (PowerMax Soil DNA Isolation Kit, MO Bio Laboratories) により DNA の抽出・精製を行った。エタノール沈殿により DNA を濃縮後、これを鋳型として、サーマルサイクラーによりメタン生成古細菌および ANME 古細菌の機能遺伝子である methyl-CoM reductase  $\alpha$  subunit gene (*mcrA* 遺伝子) の PCR 増幅を行った。増幅には MLF (5'-GGTGGTGTGGATTACACARTAYGCWACAGC-3'

)、MLr (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3')のプライマーセットを用いた。増幅産物を MinElute PCR purification kit (Qiagen)で精製後、プラスミドベクター (pCR4-TOPO, Invitrogen) に導入した。これをコンピテントセル (ECOS Competent *E. coli* DH-5 $\alpha$ , ニッポンジーン) に組み入れ、大腸菌の形質転換を行った。形質転換後の大腸菌を LB/Ampicillin/X-Gal プレートに塗抹し、Blue/White selection により *mcrA* 遺伝子を含むコロニーをランダムで選択し、堆積物深度ごとに *mcrA* 遺伝子クローンライブラリーを作成した。次いで、コロニーを釣菌し、コロニーPCRを行った。増幅には M13M4 および M13RV プライマーセットを用い、25 サイクルで反応を行った。*mcrA* 遺伝子を含む増幅産物を ExoSAP-IT (Affymetrix/ThermoFischer Scientific) で精製後、これを鋳型としてサイクルシーケンス反応を行った。反応試薬には BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/ThermoFischer Scientific) を、シーケンスプライマーとして T7 プライマーを用いた。サイクルシーケンス反応産物は、精製キット (CleanSEQ, Agencourt/Beckman Coulter) を用いて精製し、DNA シーケンサー (ABI PRISM3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems/ThermoFischer Scientific) により塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列は遺伝子情報処理ソフト (GENETYX、ゼネティックス) によりアミノ酸配列に変換し、国立遺伝学研究所 DNA データバンク (DDBJ) または米国国立生物工学情報センター (NCBI) の Protein BLAST により、相同性検索を行った。得られた近縁のアミノ酸配列およびクローン配列を用いて系統解析ソフト (MEGA4) による多重アライメントを行い、推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹を作成した。これらの情報から、堆積物深度ごとの ANME 古細菌およびメタン生成古細菌の菌叢を明らかにするとともに、菌叢間の比較を行った。

次に、硫酸還元細菌の垂直分布多様性解析を行った。解析試料としては、*mcrA* 遺伝子と同様に、堆積物深度 (1) 10-20 cm、(2) 75-85 cm、(3) 105-115 cm の 3 深度の堆積物を用いた。また、解析方法も *mcrA* 遺伝子と同様にクローンライブラリー法により行った。機能遺伝子としては dissimilatory sulfite reductase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit gene (*dsrAB* 遺伝子) を用いた。PCR 増幅後、クローニングにより堆積物深度ごとに *dsrAB* 遺伝子クローンライブラリーを作成し、塩基配列決定を行った。次いで、*mcrA* 遺伝子と同様にアミノ酸配列に変換し、推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹を作成、堆積物深度ごとの硫酸還元細菌の菌叢を明らかにするとともに、菌叢間の比較を行った。

ANME 古細菌および硫酸還元細菌の培養化には、嫌気嫌気固体培地によるコロニー培養法を用いた。堆積物を嫌気グローブボックス

(ANX-5、ヒラサワ) 内に導入し、堆積物 1 g をジチオスレイトール還元嫌気緩衝液 (pH8.5) 9 ml 入りのバイアル瓶に添加混合し、密栓した。これをディスポーザブルシリンジおよびニードルを用いて嫌気緩衝液に随時希釈することで、試料微生物の嫌気希釈液を作成した。次いで、嫌気環境下でこれらの嫌気希釈液を 100  $\mu$ l 採取し、絶対嫌気固体培地に塗抹した。その後、固体培地をステンレス製小型培養器に入れ、密封して 25 $^{\circ}$ C で静置培養を行った。なお、培養基質としては、メタン生成基質として H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80%:20%)、ギ酸ナトリウム (ギ酸)、酢酸ナトリウム (酢酸)、メタノールを用いた。硫酸還元細菌の培養に関しても同様の方法で行った。ただし、当該細菌の培養においては、硫酸ナトリウムを固体培地に追加した上、基質はメタノールの代わりに乳酸ナトリウムを用いた。得られたコロニーを嫌気グローブボックス内で釣菌し、継代培養により分離株の取得を試みた。

#### 4. 研究成果

化学分析の結果、堆積物深度が深くなるにつれて全体的にイオン濃度が低下する傾向にあることが判った。特に硫酸還元細菌の生育環境に影響を与える硫酸イオン濃度は高深度において減少していた。EC 値はばらつきがあったが、傾向としてはイオン濃度と同様に、堆積物深度が深くなるにつれて低くなっていた。最大 EC 値は堆積物上層部 (深度 10-20 cm) の 7 mS/cm、最小 EC 値は堆積物下層部 (深度 105-115 cm) の 0.5 mS/cm であった。また、間隙水の pH、ORP、および堆積物水分含量を測定した結果、いずれの堆積物深度においても pH8 の弱アルカリ性で、ORP は -200 mV 前後と絶対嫌気環境であること、水分含量は概ね 70%前後であることが判った。溶存メタン濃度については、堆積物中層部から下層部において濃度が上昇する傾向にあった。これらの結果から、硫酸イオンが少ない堆積物下層部において、メタン生成古細菌が優勢している可能性が考えられた。

次に、<sup>13</sup>C 標識メタンを用いて各々の深度の堆積物における AOM 活性を測定した結果、堆積物深度が深まるほど高い活性が得られた (図 1)。一方、堆積物上層部 (深度 10-20 cm) では当該活性は低く、最下層部 (深度 105-115 cm) の 8%程度であった。なお、滅菌対照区においては有意な AOM 活性は検出されなかった。このことから、当該活性は生物学的な活性に由来するものであり、かつ、堆積物下層部に ANME 古細菌が優勢している可能性が考えられた。また、各種の反応系において AOM 活性を測定した結果、メタン代謝阻害剤存在下で活性が著しく抑制された。この結果から、当該堆積物における AOM 反応を担う微生物 (ANME 古細菌) は、メタン代謝の障害を受ける微生物であるメタン生成古細菌の代謝系を有している可能性が考えられた。これは、ANME 古細菌がメタン生成古細菌として生息

し、AOM 反応を行う際にメタン生成の代謝系を逆方向に動かしている可能性（逆メタン生成、Reverse Methanogenesis）を示唆するものと考えられる。他方、AOM 活性は硫酸イオン非存在下、または硫酸還元阻害剤存在下においても著しく阻害された。これらから、当該堆積物における AOM 反応は ANME 古細菌に加え、硫酸還元細菌も関与している可能性が示唆された。以上の結果から、当該堆積物中においては、(1) 逆メタン生成能を有する ANME 古細菌と、硫酸還元細菌の微生物共生系により成立している可能性、(2) それらの共生微生物系が堆積物下層部において優勢している可能性が考えられた。

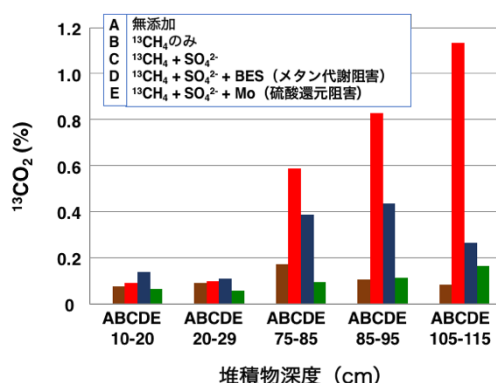


図1 堆積物深度におけるAOM活性

次に、*mcrA* 遺伝子による ANME 古細菌の垂直分布多様性解析を行った (図2)。その結果、AOM 活性の最も高かった堆積物下層部 (深度 105-115 cm) において、ANME-2a グループおよびその近縁未分類グループ (ANME-2a related group) が約 9 割検出された。残りの 1 割は水素資化性メタン生成古細菌である *Methanomicrobiales* 目に近縁なクローンから構成されていた。一方、堆積物中層部 (深度 75-85 cm) においては、ANME-2a グループは検出されず、ANME-3 グループに近縁なクローンが約 2 割検出された。また、主要な *mcrA* クローンは *Methanomicrobiales* 目で約 5 割強検出された。その他、酢酸等メチル基の利用性を有する *Methanosarcinaceae* 科および *Methanosaetaceae* 科が検出された。堆積物上層部 (深度 10-20 cm) においては、ANME-2a および ANME-3 グループは検出されなかった (ANME-2a に近縁な未分類グループは 3.8%と僅かに検出された)。主要なクローンは *Methanomicrobiales* 目で約 6 割弱占め、その他に水素資化能を有する *Methanocellales* 目、*Methanobacteriales* 目メタン生成古細菌や、*Methanosarcinaceae* 科が約 2 割占めていた。以上の結果から、当該堆積物中においては、(1) ANME 古細菌を含むメタン代謝関連古細菌が堆積物深度により棲み分けを行っている可能性、(2) 堆積物下層部では ANME-2a 古細菌またはその近縁未分類グループが AOM 活性を担っている可能性、(3) 堆積物中層部では

ANME-3 古細菌グループが AOM 活性を担っている可能性が考えられた。

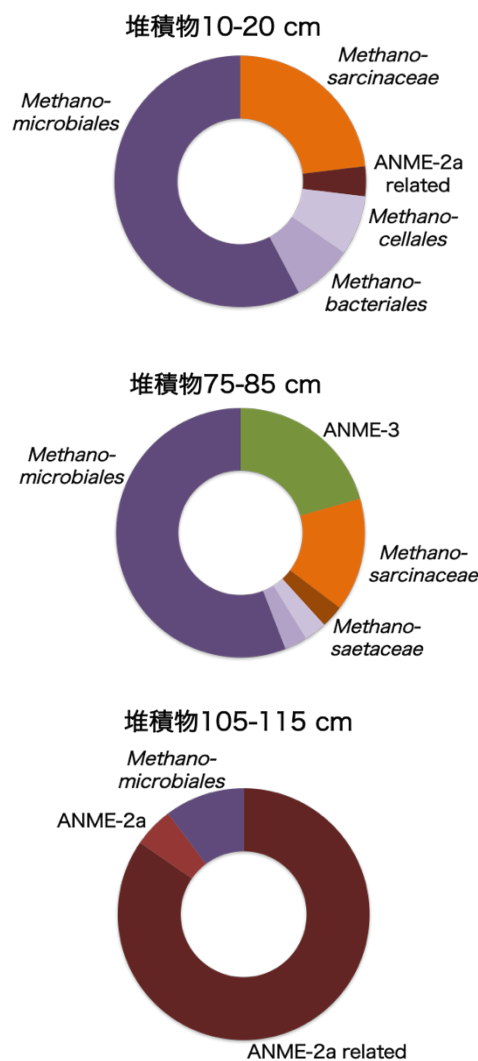


図2 ANME古細菌およびメタン生成古細菌クローンの菌叢 (*mcrA*遺伝子)

次に、*dsrAB* 遺伝子による硫酸還元細菌の垂直分布多様性解析を行った (図3)。その結果、堆積物の下層部・中層部・上層部のいずれにおいても *Desulfobacteraceae* 科、*Desulfobulbaceae* 科、Laterally Acquired *dsrAB* Firmicutes group (LAFirm group)、Environmental Firmicutes group (EnvFirm group) に近縁なクローンが検出された。一方、これらのクローンが占める割合は堆積物深度において異なっていた。なお、AOM 活性の最も高かった堆積物下層部では上記のグループは比較的均等に分布していた。また、他の堆積物深度では検出されなかった *Syntrophobacteraceae* 科に近縁なクローンが約 1 割強検出された。一方、堆積物中層部では EnvFirm group が最も多く、6 割強を占めていた。また、堆積物上層部では *Desulfobacteraceae* 科が最も多く、6 割強を占めていた。以上の結果から、当該堆積物中

においては、(1)ANME 古細菌と同様に、硫酸還元細菌も堆積物深度により棲み分けを行っている可能性、(2)ANME 古細菌と共生系を構築し得る硫酸還元細菌はこれらのグループのうちのいずれかに属する可能性が考えられた。

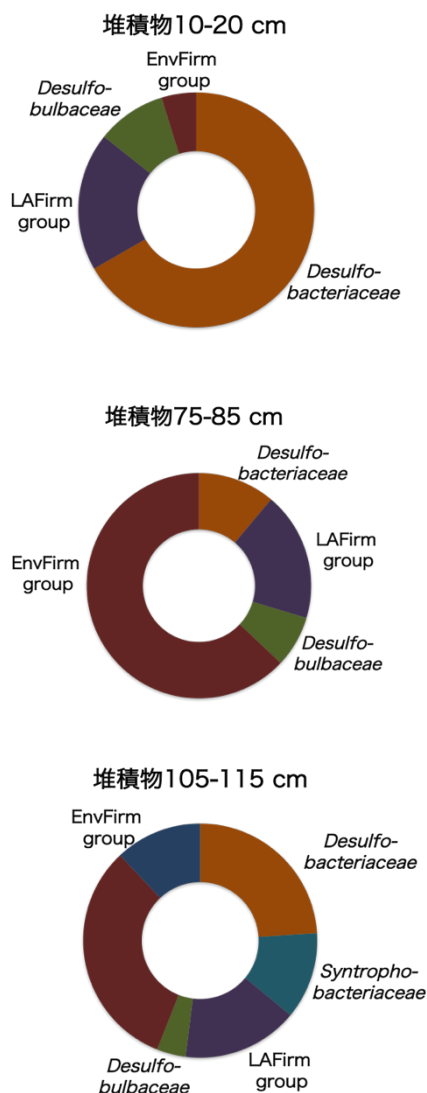


図3 硫酸還元細菌クローンの菌叢 (*dsrAB*遺伝子)

次に、ANME 古細菌および硫酸還元細菌を対象とした培養化を試みた。ANME 古細菌は逆メタン生成能を有するメタン生成古細菌として培養を試みた。その結果、 $H_2/CO_2$ 、ギ酸、酢酸、メタノールともに絶対嫌気固体培地でのコロニー形成が認められた。また、硫酸還元細菌においても  $H_2/CO_2$ 、ギ酸、酢酸、乳酸ともにコロニー形成が認められた。一方、その後の植え継ぎプロセスでは培養が不安定となり、純粋分離株の取得には至らなかった。これは、菌の増殖因子などが枯渇した等の理由が原因であるものと思われた。今後、培地組成の改良や培養法の改良を行うことにより、これらの継続的な培養を試みる予定である。

## 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)

[学会発表] (計1件)

①佐々木捺実、曾田直紀、塩澤圭介、服部聡：山形県庄内沿岸汽水域堆積物に生息する嫌氣的メタン酸化微生物の活性および多様性評価、日本微生物生態学会第31回大会、2016年10月23日～24日、横須賀市民会館(神奈川県・横須賀市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 聡 (HATTORI Satoshi)  
山形大学・農学部・准教授  
研究者番号：40373352