

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K08165  
研究課題名（和文）庄内沿岸極浅海堆積物において棲み分けを行う嫌気的メタン酸化古細菌に関する研究

研究課題名（英文）Study on anaerobic methane-oxidizing archaea in the coastal sediments of Shonai region

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）：本研究では無酸素環境下でメタンガスを分解する強度の難培養微生物である嫌気的メタン酸化古細菌（ANME古細菌）および関連微生物を研究対象として、山形県庄内沿岸汽水域の堆積物におけるこれらの微生物の垂直分布多様性評価およびANME古細菌の分離培養を試みた。その結果、ANME古細菌のうち、ANME2a-2bグループに属する古細菌が高深度堆積物において優占していることを明らかにした。また、高深度堆積物からメタン生成古細菌の分離培養に成功した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は海洋由来のメタンガスを嫌気的に分解する微生物（嫌気的メタン酸化古細菌，ANME古細菌）を対象として、庄内沿岸極浅海堆積物におけるこれらの微生物の多様性と垂直分布を明らかにしたものである。本研究によりANME2a-2bグループの古細菌が高深度の堆積物に生息していることが明らかになった。本研究で沿岸域におけるANME古細菌の生態の一端を明らかにしたことは、温室効果ガスであるメタンガス抑制の観点から学術的・社会的に意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, we have investigated vertical distribution of anaerobic methane-oxidizing (ANME) archaea, cultivated methanogens derived from the coastal sediments of Shonai region. The 16S rRNA gene amplicon analysis revealed that the genes related to ANME archaea were detected in the deep and middle sediment layer, whereas no ANME related sequences were detected in the surface one. The analysis also showed that the ANME2a-2b group archaea were apparently dominant in the deep sediment layer. Although it was difficult to cultivate the target archaea, we have successfully isolated several hydrogenotrophic methanogens from the deep sediment layer.

研究分野：微生物生態学

キーワード：古細菌 嫌気的メタン酸化 メタン生成 難培養微生物 微生物菌叢

研究開始当初の背景：

メタンガスはエネルギー資源として有用である一方、地球温暖化の原因物質として負の側面も有している。メタンガスの主要な発生源は陸域にあり、海洋からのメタンの発生量は地球上のメタンガス生成の1~10%程度と、陸域に比べて少ない。これは、海洋から発生したメタンガスの9割以上が海底堆積物中に生息する嫌気性微生物により分解されているためと推察されている。当該堆積物におけるメタンの嫌気分解は、嫌氣的メタン酸化古細菌 (Anaerobic methane-oxidizing archaea, ANME 古細菌) と硫酸還元細菌 (Sulfate-reducing bacteria, SRB) の2種からなる共生微生物系により行われていることが示唆されている。嫌氣的メタン生成反応は熱力学的には極めて不利な反応であり、硫酸イオンを電子受容体とした電子の消費反応 (硫酸還元反応) が伴わないと全体の反応が進行せず、かつ、得られるエネルギーが極めて少ないものと考えられている。そのため、ANME 古細菌の増殖は極めて遅く、強度の難培養微生物として現在まで純粋分離はなされていない状況にある。このような培養の困難さから、ANME 古細菌の研究は脂質同位体分析やメタゲノム解析など、培養に依存しない手法が主に用いられている。このうち、メタゲノム解析においては環境試料から直接回収したDNAからANME古細菌の遺伝子解析が行われ、当該古細菌はメタンガスを生成する微生物であるメタン生成古細菌 (Methanogens) が保有する遺伝子を数多く有していることから、逆メタン生成 (reverse methanogenesis) 経路を有している可能性も指摘されている。上述のように、嫌氣的メタン生成環境下においてはANME古細菌の培養は極めて困難であることが予想されるが、ANME古細菌の中にメタン生成古細菌として生育できるものが存在すれば、これらをメタン生成古細菌として分離培養できる可能性も考えられる。なお、ANME-SRB共生微生物系の研究は主に深海堆積物において行われており、これらと比較すると沿岸など浅深度環境における研究例は少ない状況にある。温暖化防止におけるANME古細菌の重要性を鑑みると、沿岸域における当該古細菌の生態学的意義や生理・生化学的性質を把握することの重要性は近年増加している状況にあった。

研究の目的：

本研究では、日本海沿岸極浅海域に分布する堆積物中に生息するANME古細菌や硫酸還元細菌を主な対象として、培養に依存しない手法によりこれらの微生物の多様性を網羅的に明らかにするとともに、堆積物深度ごとの微生物群の垂直分布を明らかにすることを目的とした。また、嫌氣的メタン酸化活性およびメタン生成活性の最も高い高深度堆積物を試料として、ANME古細菌をメタン生成古細菌として分離培養することを目的とした。

研究の方法：

#### (1) 堆積物中の原核微生物菌叢解析

山形県酒田市の最上川支流の豊川河口の堆積物約1mを試料とした。堆積物の採取には半円錐型泥炭採取器を用い、深度情報を維持した状態で試料を採取した。採取後の堆積物を深度ごとに10cm間隔で切り出し、直ちに研究室に試料を持ち帰った。各々の堆積物試料のうち、深度10-20cmの低深度堆積物、75-85cmの中深度堆積物、105-115cmの高深度堆積物の3つの画分を分析試料とした。各々の画分堆積物を遠心ボトルに詰め、20,000xg、20分間遠心分離を行い、上清と沈殿画分に分離した。得られた沈殿画分からビーズ破砕法 (PowerSoil DNA Isolation Kit) によりゲノムDNAの抽出精製を行ったのち、エタノール沈殿によりDNAの濃縮を行なった。濃縮DNAを試料として、16S rRNA遺伝子V4領域を対象としたPCRおよび識別用インデックスを含む2nd PCRを行い、次世代シーケンサー (MiSeq) によるpaired endシーケンス (約250bp x2) を行なった。得られた塩基配列からキメラ配列を除去後、菌叢解析用パイプラインQIIMEにより堆積物深度ごとに原核微生物の菌叢解析を行った。

#### (2) 古細菌分離培養

上記の採取場所で採取した堆積物試料のうち、高深度堆積物を嫌気グローブボックス ( $N_2/H_2/CO_2$ , 75:5:20, v/v%) に入れ、嫌気緩衝液 (硫化ナトリウム・システイン還元済み  $Na_2CO_3/CO_2$  緩衝液) で堆積物を嫌氣的に懸濁した。この懸濁液を遠心ボトルに添加し、200xg、3分間低速遠心分離を行うことで堆積物粒子と菌体懸濁液に粗分離した。得られた菌体懸濁液を遠心ボトルに添加し、8,000xg、5分間高速遠心分離を行うことで、菌体沈殿物を得た。この沈殿物を密度勾配試薬であるPercoll PLUS溶液 (脱酸素処理、還元剤添加、浸透圧調製、緩衝液調製済み) 5mLに懸濁し、超遠心用チューブに添加した。密封後、30,000xg、30分間、超遠心分離を行った。分離後の試料を嫌気グローブボックスに入れ、無酸素環境下、チューブの上部か

ら滅菌済みシリンジとニードルで約 1 mL ずつ採取し、5 つの密度画分（フラクション F1～F5）を得た。取得した各々の試料は古細菌培養用の絶対嫌気培地に植菌し、25°C で静置培養を行った。基質には H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v%)、メタノールを用いた。培養により得られた菌体は、16,000 xg, 5 分間遠心を行い、菌体を得た。緩衝液で菌体を洗浄後、Kaneka Easy DNA Extraction Kit により DNA を抽出した。次いで、古細菌 16S rRNA 遺伝子用プライマー (A25F&A1385R) を用いて PCR 増幅を行った。増幅 DNA 産物を精製後、古細菌 16S rRNA 遺伝子用プライマー (1100Ar および M520R) を用いてサイクルシーケンス反応・精製を行なったのち、DNA シーケンサーにより 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列を決定した。その後、相同性解析および分子系統解析を行い、分離株の同定を行なった。

研究成果：

(1) 堆積物中の原核生物菌叢解析

ANME 古細菌に関しては、各々の深度の堆積物のうち、高深度堆積物（約 155,000 リード）において ANME 古細菌 (ANME2a-2b グループ) が多く検出された (図 1)。当該深度における ANME2a-2b 古細菌の割合は細菌、古細菌を含めた原核生物全体のうちの約 4.5% を占めていた。また、ANME-2D グループもわずかに (約 0.6%) 検出された。中深度堆積物（約 14,5000 リード）においても ANME-2a-2b 古細菌は検出されたが、その割合は少なく、全体の約 0.5% 程度であった。低深度堆積物（約 108,000 リード）においては、ANME 古細菌は検出されなかった。なお、本報告者による以前の研究において、同じ場所の堆積物を用いて 13C 標識メタンガスおよび硫酸イオン存在下、嫌氣的メタン酸化活性 (AOM 活性) を測定したところ、高深度堆積物で高い AOM 活性を有し、堆積物深度が浅くなるにつれ AOM 活性が低下するという結果が得られている。これらの AOM 活性の堆積物深度ごとの差異は、本研究の網羅的原核微生物菌叢解析において検出された ANME 古細菌の存在割合と相関性があると考えられる。すなわち、本研究の高深度堆積物において検出された ANME-2a-2b 古細菌が実際に AOM 活性を保有している可能性が考えられた。なお、本研究で堆積物から検出されたメタン生成古細菌として、高深度堆積物では *Methanomassiliicoccaceae* 科 (3.3%)、中深度では *Methanoregulaceae* 科 (2.3%) と *Methanomassiliicoccaceae* 科 (1.9%) が検出された。低深度堆積物では検出されたのは *Methanoregulaceae* 科 (0.3%) と僅かであった。本報告者による以前の研究において測定されたメタン生成活性においても、高深度堆積物で最も活性が高い結果が得られていることから、*Methanomassiliicoccaceae* 科あるいは *Methanoregulaceae* 科のメタン生成古細菌が当該堆積物中でメタン生成を担う微生物である可能性が考えられた。なお、高深度堆積物において検出された ANME-2a-2b 古細菌がメタン生成能を有しているか否かを明らかにするには、安定同位体プロービング法など代謝活性情報 (同位体標識化合物) と分子系統情報 (DNA) をリンクさせるアプローチが必要であると思われた。

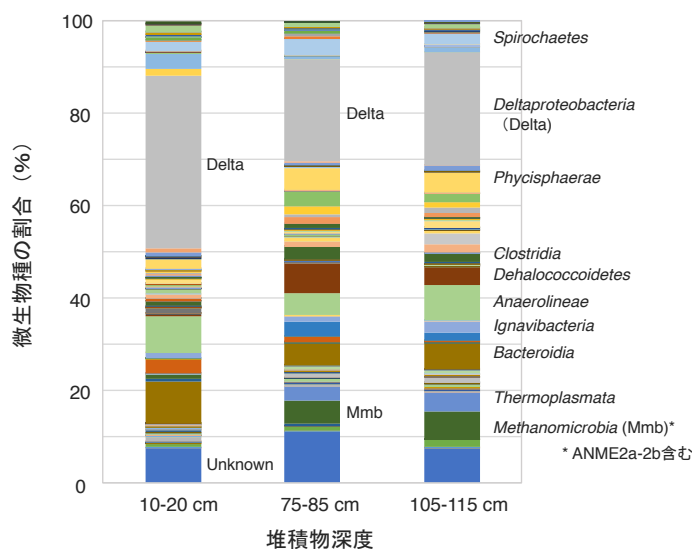


図 1. 庄内沿岸極浅海域堆積物中の原核微生物菌叢 (メタ 16S アンプリコン解析、綱レベル)

硫酸還元細菌関連では、高深度堆積物で *Desulfobulbaceae* 科(4.7%)、*Syntrophaceae* 科(4.2%)、*Desulfobacteraceae* 科(3.9%) 等が、中深度堆積物で *Syntrophaceae* 科(7.6%)、*Desulfarcuaceae* 科(2.9%) 等が、低深度堆積物で *Desulfobacteraceae* 科(13%)、*Desulfobulbaceae* 科(9.4%)、*Desulfuromonadaceae* 科(6.2%) 等が主に検出された。検出された硫酸還元細菌の多くは水素を電子供与体として硫酸還元を行う能力を有すること、本報告者による以前の研究において、硫酸還元細菌の阻害剤(モリブデン酸)存在下で AOM 活性が阻害されたことから、高深度堆積物においては上記の硫酸還元細菌種が ANME 古細菌と水素を介した共生微生物系を構築している可能性が考えられた。以上から、網羅的菌叢解析により、堆積物深度ごとの微生物プロファイルを明らかにするとともに、嫌氣的メタン生成活性を担う微生物種を推定することに成功した。

## (2) 古細菌分離培養

培養時において増殖の速い菌が系内に優占してしまうリスクを回避するため、堆積物試料中の微生物を培養前に密度勾配試薬により物理的に分画することを試みた。分画の結果、F1 を除く各フラクションから微生物を物理的に分離することに成功した。得られた各々のフラクションを植菌源として各種基質を用いて培養を行なった結果、フラクション F2、F3、F4、F5 から植菌した培養系のうち、 $H_2/CO_2$  を基質とした培養系において増殖が認められた。これらの菌体を蛍光顕微鏡により観察したところ、メタン生成古細菌が有する補酵素  $F_{420}$  の自家蛍光が認められた(図2)。分離株の DNA を取得し、相同性解析および分子系統解析を行ったところ、*Methanobacterium formicicum* や *Methanobacterium subterraneum* 等、水素資化性メタン生成古細菌と近縁であることが明らかとなった。なお、F5 画分においては桿菌様以外に球菌様のメタン生成古細菌も観察された(図2)。以上の結果から、異なるメタン生成古細菌を細胞密度の違いによりある程度選別し得ることが明らかとなった。今後、本研究で適用した絶対嫌気環境下における密度勾配遠心分画法を最適化し、引き続き ANME 古細菌の分離培養化を試みる予定である。

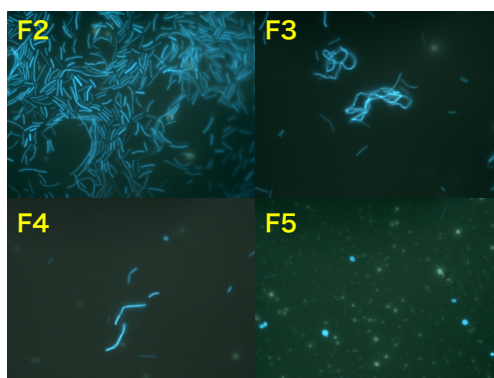


図2. 庄内沿岸極浅海域高深度堆積物から分離したメタン生成古細菌の蛍光顕微鏡写真  
F, Fraction (密度勾配遠心分画) 由来

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----