

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26630250

研究課題名(和文) シントロフィーを促進するサポーター微生物の存在とその新規微生物間相互作用の解明

研究課題名(英文) Deciphering the supporter microbes that facilitate syntrophic degradation in methanogenic ecosystem

研究代表者

成廣 隆 (Narihiro, Takashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：20421844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、嫌気性共生細菌(シントロフ)とメタン生成菌の2者による微生物間相互作用である「シントロフィー」による有機物分解を促進する代謝機能を特定することを目的とし、その担い手であるシントロフとメタン生成菌や、それらが生息している環境の微生物群の代謝機能をゲノム情報から解き明かすことを試みた。長期間にわたり経代培養した集積シントロフィー培養系の微生物群集構造解析やシントロフの比較ゲノム解析から、有機酸の分解等に関与する代謝経路と、その反応を支えるエネルギー保存に関与する酵素遺伝子を特定し、これらの代謝機能がシントロフィーによる有機物分解の安定化に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the metabolic function that promotes decomposition of organic substrates (e.g., propionate and butyrate) by "syntrophy" which is known as a microbial interaction between syntrophic substrate metabolizers (syntrophs) and methanogenic archaea (methanogens), we aimed to elucidate the metabolic function of syntrophs and methanogens from their genomic information. As a result, we successfully identify the dominant microbial constituents that inhabit the syntrophy-associated methanogenic microbiota. The genomes of three butyrate-oxidizing syntrophs encode genes involved in degradation pathway of butyrate and biological energy conservation systems that require for the degradation. In conclusion, these metabolic functions contribute to the stabilization and promotion of biodegradation in anaerobic ecosystem.

研究分野：環境微生物学

キーワード：微生物ゲノム 嫌気共生細菌 メタン生成菌 シントロフィー 環境動態

1. 研究開始当初の背景

酸素の存在しない嫌気的な環境では、鉄や硫酸塩などの電子受容体がエネルギー獲得に用いられるが、それすらも欠乏した環境では、嫌気性共生細菌(シントロフ)とメタン生成アーキアの2者による微生物間相互作用である「シントロフィー」により有機物分解が進行することが知られている。シントロフィーにより分解可能な有機物は、炭水化物、タンパク質、脂質等の発酵的分解によって生じる酪酸やプロピオン酸等の揮発性脂肪酸、安息香酸等の芳香族化合物、一部のアミノ酸等であり、単一種の微生物が有する代謝機能だけでは熱力学的に分解が不可能なものばかりである。我々の研究グループでは、都市下水処理場の嫌気性汚泥消化プロセスから採取した汚泥、および豚糞試料を接種源とし、プロピオン酸、酪酸、または安息香酸を唯一の基質として10世代以上継代培養した集積培養系を構築し、それらの基質がシントロフとメタン生成アーキアの2者培養物に比べ、極めて速い速度で分解されることを見出した。例えば、プロピオン酸を唯一の基質とする集積培養物のプロピオン酸分解速度は、プロピオン酸分解シントロフとして知られている *Syntrophobacter wolinii* と、水素利用性メタン生成アーキア *Methanospirillum hungatei* の2種の共培養系に比べて10倍以上も早かった。この「複数種の微生物が混在

する系のほうが、2種のシントロフィーよりもプロピオン酸分解速度が早い」という単純な事実は、「シントロフィーを促進する微生物」と、それらが有する「未解明の微生物代謝機能」が存在することを示唆している(図1)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、シントロフィーによる有機物分解を促進する微生物を「サポーター微生物」として定義し、我々が構築した集積培養系等の嫌気環境から分離培養を試み、それらが有する新規な微生物間相互作用機構を各種オミクス技術により明らかにすることを当初の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 嫌気集積培養物の微生物群集構造解析
シントロフィーによる有機物分解を支えるサポーター微生物の存在を解明するため、嫌気汚泥消化プロセスから採取した汚泥および豚糞を、6種類の基質(プロピオン酸、酪酸、安息香酸、酢酸、ギ酸、水素)で3年以上に渡り継代培養してきた集積培養物の微生物群集構造解析を実施した。培養物から回収した菌体から市販のDNA抽出キットを用いて全ゲノムを抽出し、16S rRNA 遺伝子のV3-V4 領域を標的としてPCRによる増幅を行った。得られたPCR産物を精製し、GS-FLX Titanium プラットフォームを用いてシーケンシングを実施した。シーケンサーからの出力データをQIIMEソフトウェアにより処理し、集積培養物に存在する微生物の存在量と系統学的所属を解析した。

(2) シントロフとメタン生成菌のゲノム解析

シントロフィーを形成する微生物群の代謝機能を詳細に解析することを目的として、酪酸やその他の脂肪酸を分解することが知られている *Syntrophomonadaceae* 科のシントロフである *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica*、および、*Methanomicrobiaceae* 科に属するメタン生成アーキアである *Methanoculleus horonobensis*、*Methanoculleus thermophilus*、*Methanofollis ethanolicus* のゲノム塩基配列をシーケンシングした。各菌株から抽出したゲノムDNAのショットガンシーケンシングを、イルミナ社MiSeqシーケンサーを用いて実施した。出力された遺伝子リードをSPAdesソフトウェアによりアセンブルし、Prokkaソフトウェアを用いてアノテーションを実施した。NCBI-BLASTプラットフォーム等を活用して代謝機能の推定を実施した。

(3) 嫌気環境試料のメタゲノム解析

メタン生成環境の代表例として、嫌気性廃水処理プロセスを対象とし、シントロフィー

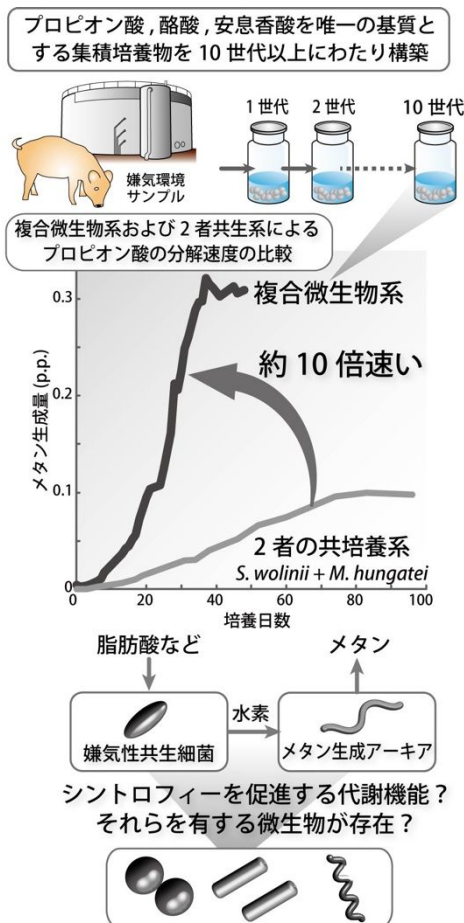


図1. 本研究の背景

による有機物分解を担うシントロフとメタン生成アーキア、およびシントロフィーを促進していることが推定される嫌気性微生物群の代謝機能をメタゲノム解析により明らかにすることを試みた。汚泥試料から市販のDNA抽出キットを用いて全ゲノムを抽出し、前項のゲノム解析と同様にシーケンシング、アセンブル、アノテーションを実施した。さらに、MaxBinソフトウェアを用いて、個別の微生物群由来と考えられるコンティグを抽出するピニングを実施した。

4. 研究成果

(1) 嫌気集積培養物の微生物群集構造解析

図2に示すように、プロピオン酸、酪酸、安息香酸、酢酸、ギ酸、水素を唯一の基質として添加した集積培養物の微生物群集構造を解析した結果、メタン生成アーキアが利用可能な基質（酢酸、ギ酸、水素）の集積培養物ではシントロフの優占が確認されなかった。一方、プロピオン酸、酪酸、安息香酸を基質とした集積培養物では、それぞれの基質を分解する可能性のあるシントロフ（*Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophus*）が優占していた。これらの3種類の集積培養物では、*Methanoculleus* 属が水素利用メタン生成アーキアとして優占していたのに対し、ギ酸や水素を添加した集積培養物では *Methanobacterium* 属等が高頻度で検出された。この結果から、「シントロフィー」という微生物間相互作用において有利に増殖する特徴的なメタン生成アーキアが存在することが示唆された。また、これらの集積培養物では、シントロフ、メタン生成アーキア以外の微生物群、例えば *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes* 門に属する未知微生物群が存在しており、これらの微生物群が11世代にも渡り高度に集積された培養物の中に生存しているという事実は、プロピオン酸、酪酸、安息香酸を分解するシントロフィーにおいて何らかの重要な役割を果たしていることを示唆している。

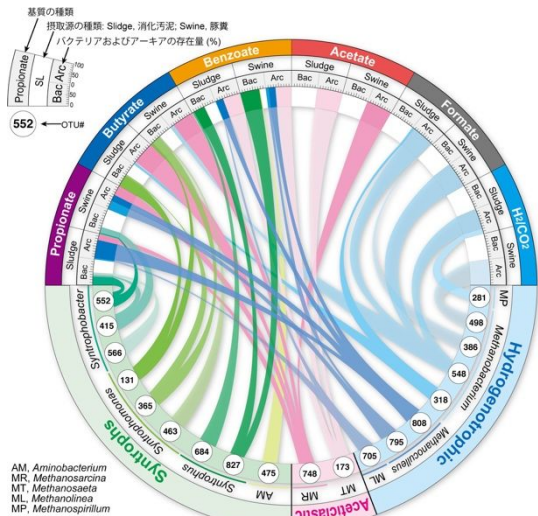


図2. 集積培養物内のシントロフ・メタン生成菌の存在量とペアリング

(2) シントロフとメタン生成菌のゲノム解析

酪酸やその他の脂肪酸を分解することが知られている *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica* のゲノムシーケンスを実施し、すでにゲノム情報が報告されている近縁のシントロフである *Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei*、*Syntrophothermus lipocalidus* の3株の比較ゲノム解析を実施した。その結果、メタン生成環境においてはシントロフィーでしか分解することができない酪酸、イソ酪酸、2-メチル酪酸の分解に関与する代謝経路と、その代謝経路における分解反応の進行を可能にするエネルギー保存システムや水素・ギ酸生成に関与する酵素遺伝子群を特定した（図3）。メタン生成アーキアの比較ゲノム解析では、メタン生成反応の各段階を触媒する酵素遺伝子のシンターを比較し、*Methanomicrobiaceae* 科に属する *Methanoculleus* や *Methanofollis* などの水素利用メタン生成アーキアが、メタン生成に必要な一連の酵素遺伝子をゲノム上に連続して配していることが明らかとなり、シントロフ-メタン生成菌のペアリング形成にとって有利に働いていることが示唆された。

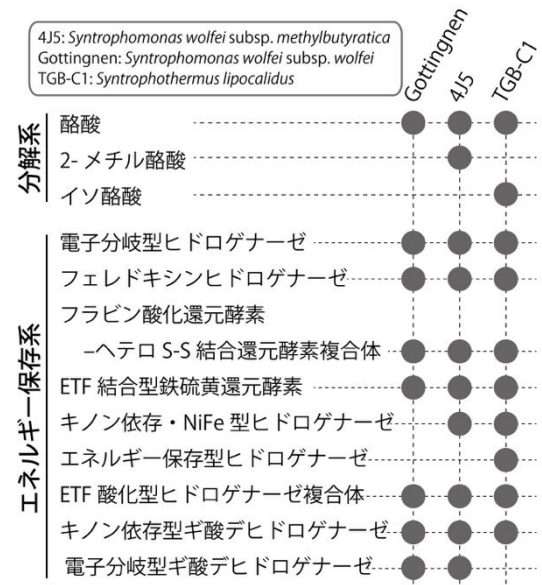


図3. シントロフの比較ゲノム解析概要

(3) 嫌気環境試料のメタゲノム解析

実際の嫌気環境においてシントロフィーによる有機物分解を担う微生物群の代謝機能をメタゲノム解析により明らかにすることを試みた。項目(2)で実施した比較ゲノム解析によって得られた情報を基盤とし、シントロフィーによる有機物分解を支える各種ヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、および電子伝達フラボプロテイン酸化型ヒドロゲナーゼ複合体、フェレドキシン:NAD酸化還元酵素複合体、フラビン酸化還元酵素-へ

テロ S-S 結合還元酵素複合体等のエネルギー保存系をコードする遺伝子群を、*Syntrophomonas*、*Pelotomaculum*、*Syntrophorhabdus* 等に近縁のシントロフのメタゲノム情報から見出した。その結果、これらの代謝機能がシントロフィーの促進と維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、サポーター微生物としての機能を有している可能性のある *Bacteroidetes*、*Chloroflexi*、*Spirochaetes* 門に由来するメタゲノム情報からは、最終生成物として脂肪酸や水素を生じる有機物の発酵代謝経路や、シントロフではあまり検出されないことのないフェレドキシン:NAD⁺酸化還元酵素複合体 (Rnf)が見出され、これらの機能遺伝子がシントロフィーによる有機物分解の安定化に寄与していることが示唆された。今後は、本研究で得られたシントロフ、メタン生成菌、サポーター微生物のゲノム・メタゲノム情報を基盤として、分離培養株を用いた共培養実験を実施して遺伝子発現を解析し、シントロフィーを促進する微生物機能を特定することを試みる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Narihiro T, Kamagata Y. Genomics and metagenomics in microbial ecology: recent advances and challenges. *Microbes and Environments*, 査読無 2017 年 32(1):1-4.
doi: 10.1264/jsm2.ME3201rh

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Sekiguchi Y, Liu WT. Comparative genomics of syntrophic branched-chain fatty acid degrading bacteria. *Microbes and Environments*, 査読有 2016 年 31(3):288-292.
doi: 10.1264/jsm2.ME16057.

Narihiro T, Kusada H., Yoneda Y, Tamaki H. Draft genome sequences of *Methanoculleus horonobensis* strain JCM 15517, *Methanoculleus thermophilus* strain DSM 2373, and *Methanofollis ethanolicus* strain JCM 15103, hydrogenotrophic methanogens belonging to the family *Methanomicrobiaceae*. *Genome Announcements*, 査読有 2016 年 4(2): e00199-16.
doi: 10.1128/genomeA.00199-16.

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Liu WT. Draft genome sequence of *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica* strain 4J5^T (JCM 14075), a mesophilic butyrate- and 2-methylbutyrate-degrading syntroph.

Genome Announcements, 査読有 2016 年 4(2): e00047-16.
doi: 10.1128/genomeA.00047-16.

Narihiro T, Nobu MK, Kim NK, Kamagata Y, Liu WT. The nexus of syntrophy-associated microbiota in anaerobic digestion revealed by long-term enrichment and community survey. *Environmental Microbiology*, 査読有 2015 年 17(5):1707-1720.
doi: 10.1111/1462-2920.12616.

[学会発表](計 4 件)

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Sekiguchi Y, Liu WT. Comparative genomics of branched-chain fatty acid degrading syntrophs reveals multiple genes involved in β -oxidation and energy conservation system. 16th International Symposium on Microbial Ecology, モントリオール (カナダ), 2016 年 8 月 21 日~2016 年 8 月 26 日

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Liu WT. Genome analysis of branched chain fatty acid degrading syntrophs: "*Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica*" strain JCM 14075^T and *Syntrophothermus lipocalidus* strain TGB-C1^T. 日本微生物生態学会年会, 亀城プラザ(茨城県土浦市) 2015 年 10 月 17 日~2015 年 10 月 20 日

成廣 隆, Nobu MK, 鎌形洋一, Liu WT. エコゲノミクスによる嫌気性廃水処理プロセスに生息する未培養微生物群の機能解明. 第 14 回 LS-BT 合同研究発表会, 産業技術総合研究所 (茨城県つくば市), 2015 年 2 月 3 日~2015 年 2 月 4 日

Narihiro T, Nobu MK, Kim NK, Kamagata Y, Liu WT. Analysis of microbial communities in syntrophy-associated enrichments and anaerobic wastewater treatment processes. 15th International Symposium on Microbial Ecology, ソウル(韓国), 2014 年 08 月 24 日~2014 年 08 月 29 日

[図書](計 1 件)

Narihiro T, Kamagata Y. Anaerobic cultivation, *In* Manual of Environmental Microbiology 4th Edition, ASM press. pp. 2.1.2-1~ 2.1.2-12,
doi: 10.1128/9781555818821.ch2.1.2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成廣 隆 (NARIHIRO, Takashi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：20421844

(2) 連携研究者

玉木秀幸 (TAMAKI, Hideyuki)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：00421842

鎌形洋一 (KAMAGATA, Yoichi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門・研究部門付
研究者番号：70356814

(3) 研究協力者

LIU, Wen-Tso
イリノイ大学・教授