

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07498

研究課題名(和文) 深海熱水域の未知メタン酸化細菌群：集積培養系から探る生理生態と系統

研究課題名(英文) The unexplored methanotrophs in the deep-sea hydrothermal field: phylogeny and ecophysiology inferred from enrichment cultures

研究代表者

平山 仙子 (HIRAYAMA, Hisako)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・主任研究員

研究者番号：90359167

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)：中部沖縄トラフ伊平屋北深海熱水活動域に生息する好気性メタン酸化細菌はこれまで培養されることがなかったが、本研究ではフロースルー型連続培養システムを採用し初めて培養に成功した。高度に集積したMethyloprofundus属細菌についてゲノムおよび代謝解析を行い、自然環境での生存競争に有利なシステムを備えていることを明らかにした。また集積培養系よりMethylomarinovum属およびMethylomarinum属の新種をそれぞれ単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタン酸化細菌は生態学的に重要な役割を持つが、物質生産など産業利用の可能性も秘めている。しかし特に海洋性メタン酸化細菌は培養例が少なく、利用可能な単離株は10株に満たない。本研究では深海のメタン酸化細菌が培養可能なことを示し、単離株も得た。また海洋でも特に深海に遍在していると考えられるMethyloprofundus属細菌の諸性質を明らかにした。本研究結果は、いまだ漠然としている海洋性メタン酸化細菌の生態学的機能を理解するための有用な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：Aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs) inhabiting the Iheya North deep-sea hydrothermal field in the mid-Okinawa Trough have never been cultivated before. In this study, we employed a continuous flow-through cultivation system and successfully enriched various methanotrophs from the samples in the hydrothermal field for the first time. The highly enriched Methyloprofundus sp. has been subjected to genomic and transcriptomic analysis and has been shown that it has several systems useful for its survival in a competitive environment. In addition, new species of the genera Methylomarinovum and Methylomarinum have been isolated from the enriched cultures.

研究分野：環境微生物学

キーワード：深海熱水 メタン酸化 メタン資化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタンは温室効果が高く環境中での動態が注目されているが、メタンを利用できる生物として知られているのは限られた系統の微生物(アーキアとバクテリア)だけである。それらの微生物は自然界でメタンが大気圏へと拡散するのを抑制するとともに、メタンを他の生物が利用可能な炭素化合物へと変換する役目を担っている(Reeburgh, 2007)。したがって、その存在と活動は環境や生態系の維持に不可欠である。好気性メタン酸化細菌(以下、メタン酸化細菌)は、メタンを唯一のエネルギー源および炭素源として利用するユニークな細菌群であり、その多くは有機物を利用できない。海洋では、浅海から深海まで様々な環境から好気性メタン酸化細菌の遺伝子が検出されており、広く生息していることが伺える。一方で培養例は非常に少なく未培養系統が圧倒的に多いため、どのような特性を持つメタン酸化細菌が生息しているのか、その実態は掴めていない。

2. 研究の目的

深海熱水活動域は熱水由来のメタンや無機物が高濃度で噴出する特異な環境である。そのため、メタン酸化細菌等を組織に共生させ独自の進化を遂げた無脊椎動物が生息するなど、陸域や他の海域では見られない固有の生態系が形成されている(Petersen & Dubilier, 2009)。しかし深海へのアクセスや培養の難しさから、深海熱水活動域のメタン酸化細菌を対象とした研究は限られている。そこで本研究は、深海調査航海の機会を生かすとともに、より現場環境に近い条件を設定できる連続培養法を採用することにより多様なメタン酸化細菌を集積培養し、それらの代謝特性を明らかにすること、またバイオリソースとして今後広く活用できる単離株を取得することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 中部沖縄トラフ伊平屋北熱水活動域の化学合成生物コロニー(水深約 1,000 m)に微生物を捕集するための現場培養器を設置した。現場培養器として、ステンレス製カゴに市販の水槽ろ過用セラミック担体(0.9 cm × 0.9 cm × 1.0 cm)を捕集体として入れたものを用意し、設置から2ヶ月後に回収した。回収した現場培養器と、同熱水活動域に生息するシンカイヒバリガイ鰓組織を接種源とし、メタン酸化細菌の培養を行った。培養にはフロースルー型の連続培養装置を使用した。培地は人工海水レイシーマリンII(イワキ)に硝酸アンモニウム(360 μM)、リン酸塩(50 μM)、硫酸銅(0.1 μM)、トレースミネラル溶液(DSMZ 141、1.6 ml/L)、重炭酸ナトリウム(0.1 g/L)を添加しpH 7.2-7.5に調整した。メタンと酸素を溶解した培地(5L、ろ過滅菌)は、MasterFlexポンプを用い、流速15~20 ml/hで接種源を入れたガラスカラムへ送液し、10℃、室温、45℃の3つの温度条件下で連続培養した。温度調整のため10℃培養は培養装置全体をクロマトチャンバーに入れた。室温培養は装置の温度調整はせず、エアコンによる室温調節のみとし、18~25℃の範囲(概ね20~23℃)を維持した。45℃培養ではガラスカラム部分のみ45℃インキュベータに収納し、その他の部分は室温とした。カラム内の微生物の増殖は定期的に顕微鏡観察により確認するとともに、好気性メタン酸化細菌の遺伝子マーカーである膜結合型メタン酸化酵素遺伝子(*pmoA*)のPCRによる検出により確認した。

(2) メタン酸化細菌が高度に集積された培養系については、MiSeqシステムやPacBioシステムによりメタゲノム解析を行うとともに、RNA抽出を行いメタトランスクリプトーム解析を行った。また、集積培養系より随時メタン酸化細菌の単離を試み、ゲノムおよび分類学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 現場培養器を接種源とした培養に先行して、シンカイヒバリガイ(*Bathymodiolus japonicus*)鰓組織を接種源とした10℃での培養を始めた。この集積培養系において、海洋性メ

タン酸化細菌として知られる *Gammaproteobacteria* 綱の *Methyloprofundus* 属細菌が高度に集積されていることが分かった。そこでこの集積培養系を PacBio システムでメタゲノム解析した。その結果、生育する *Methyloprofundus* 属細菌の完全ゲノム配列情報を取得し *Methyloprofundus* sp. INp10 とした。INp10 の染色体ゲノムサイズは 4.39 Mb であり、0.04 Mb のプラスミドを 1 つ保有し、G+C 含量は 39.9 % であった。シンカイヒバリガイの鰓には *Methyloprofundus* 属細菌が共生しているが、当該共生菌と INp10 の 16S rRNA 遺伝子配列は一致しなかったことから、INp10 は鰓組織表面に付着していたものと考えられる。INp10 が分類学上の新種に相当するか確認するため、ゲノム配列が解読されている他の *Methyloprofundus* 属細菌 3 種 (*M. sedimenti* WF1 株、シンカイヒバリガイ共生菌、ヘイトウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus platifrons*) 共生菌) とのゲノム配列の類似度 (Average Nucleotide Identity: ANI) とアミノ酸配列の類似度 (Average Amino acid Identity: AAI) を算出した。結果を図 1 に示す。INp10 と比較した 3 種の ANI は互いに種の定義の基準値 95 % よりも十分低く、それぞれが独立した種であること、すなわち INp10 は *Methyloprofundus* 属の新種に相当することが明らかとなった。

	INp10	M.sedim	B.ja_Sm	B.pl_Sm	
INp10		75	76	77	AAI
M.sedim	74		83	82	
B.ja_Sm	74	79		85	
B.pl_Sm	75	79	83		
	ANI				

ANI : Average Nucleotide Identity
 AAI : Average Amino acid Identity
 M.sedim : *Methyloprofundus sedimenti* WF1
 B.ja_Sm : Methanotrophic symbiont of *Bathymodiolus japonicus*
 B.pl_Sm : Methanotrophic symbiont of *Bathymodiolus platifrons*

図 1. *Methyloprofundus* 属細菌のゲノム比較

(2) メタトランスクリプトーム解析から INp10 の代謝を推定した。最も高発現していたタンパクは膜結合型メタン酸化酵素の 3 つのサブユニット遺伝子 (*pmoCAB*) であった。メタンの酸化によって生じるメタノールは、メタノール脱水素酵素によってホルムアルデヒドへと酸化される。このメタノール脱水素酵素には 2 つのタイプ (*MxaFI*, *XoxF*) があり、ほとんどの *Gammaproteobacteria* 綱のメタン酸化細菌は両タイプの遺伝子を持つことが知られている。しかし INp10 は *XoxF* 酵素の遺伝子 *xoxF* しか持たず、発現解析からも *xoxF* が高発現していることが確認された。*XoxF* メタノール脱水素酵素は活性部位に軽希土類元素 (Light rare earth elements: La, Ce, Pr, Nd 等) を有することが知られている (Keltjens et al. 2014)。本研究では軽希土類元素を添加していないため、INp10 の *XoxF* 酵素がどの元素を利用しているか不明であるが、INp10 の成育には、必ずしも軽希土類元素の添加を必要としないということは明らかである。

また炭素固定は Ribulose monophosphate pathway で行い、ピルビン酸の生成は主に Entner-Doudoroff pathway で行われているようであった。また TCA 回路に必要な遺伝子はすべて揃っていた。INp10 はべん毛、pilus system、type II および type VI secretion system、chemotaxis、aerotaxis、異化的硝酸還元酵素 (硝酸から亜酸化窒素)、hemerythrin 等の遺伝子を持ち、集積培養系においてそれらの多くを高発現させていた。また他のメタン酸化細菌には一般的にあまり見られない特徴として、セルロース合成遺伝子クラスターや Enediyne 合成遺伝子クラスターを有していた。バクテリアの生成するセルロースについては植物や動物の共生菌や病原菌でその機能が研究されており、セルロースは、ターゲットに付着する際に重要な役割を担って

いたり、バイオフィルムの成熟に寄与していることが示唆されている (Augimeri et al. 2015)。INp10 は培養カラム内でバイオフィルムを形成していることから、これにセルロースが関与している可能性が考えられる。以上の結果から、INp10 は低酸素や貧栄養といった厳しい環境で生き抜く能力を備えていることが推察される。

(3) 現場培養器を接種源とした培養においても、多様なメタン酸化細菌を含む集積培養系が得られた。その中からメタン酸化細菌の単離を試み、2 株の単離株を得た。1 株は 45 での集積培養系から単離し IN45 株とした。もう 1 株は室温での集積培養系から単離し IN20 株とした。両株は PacBio システムでゲノム解析を行い、近縁種とのゲノム比較から IN45 株は *Methylomarinovum* 属の新種に、IN20 株は *Methylomarinum* 属の新種にそれぞれ相当することが明らかとなった。

< 引用文献 >

Reeburgh, W. S. (2007) Chem. Rev., 107, 486-513.

Petersen, J. M. & Dubilier, N. (2009) Environ. Microbiol. Rep., 1, 319-335.

Keltjens et al. (2014) Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 6163-6183.

Augimeri et al. (2015) Front. Microbiol., 6, 1282.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Rush, D., Osborne, K.A., Birgel D., Kappler A., Hirayama, H., Peckmann, J., Poulton, S.W., Nickel, J.C., Mangelsdorf, K., Kalyuzhnaya, M., Sidgwick, F.R., and Talbot, H.M.	4. 巻 11
2. 論文標題 The bacterioplanopolyol inventory of novel aerobic methane oxidising bacteria reveals new biomarker signatures of aerobic methanotrophy in marine systems	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0165635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植松勝之、Chong Chen、平山仙子
2. 発表標題 メタン酸化細菌の立体構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第62回シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山仙子、高木善弘、阿部真理子
2. 発表標題 深海に生息する好気性メタン酸化細菌Methyloprofundus sp. INp10のゲノムおよびトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 2018年度極限環境生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植松勝之、Chong Chen、平山仙子
2. 発表標題 FIB/SEMによるメタン酸化細菌の立体構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木 善弘、平山 仙子、阿部 真理子、津田 美和子
2. 発表標題 メタン酸化バイオフィルムにおける遺伝子発現解析
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木 善弘、平山 仙子、阿部 真理子、津田 美和子
2. 発表標題 リアクター培養法による深海性メタン酸化細菌の分離培養の試み
3. 学会等名 第18回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高木 善弘、平山 仙子、阿部 真理子、津田 美和子、高井 研
2. 発表標題 深海性メタン酸化細菌のバイオフィルムにおける遺伝子発現
3. 学会等名 日本微生物生態学会第31回大会
4. 発表年 2016年

〔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
研究 分担者	高木 善弘 (TAKAKI Yoshihiro) (10399561)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・主任技術研究員 (82706)	