

平成21年 6月30日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2006～ 2008
 課題番号：18687006
 研究課題名 (和文) 地球上で最も未知な生物群「古細菌」-純粋分離で開拓する多様な新生物機能-
 研究課題名 (英文) Explore new metabolic functions of most unknown organism group "Archaea" by obtaining of pure cultures
 研究代表者
 井町 寛之 (IMACHI HIROYUKI)
 独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター・研究員
 研究者番号：20361933

研究成果の概要：

古細菌に属する微生物群の多くは人為的に培養がなされていないため、その生物学的な機能は不明な点が多い。そこで本研究課題では新規な微生物培養法を用いて学術および産業上重要であると推定されている古細菌群の培養を試みた。その結果、従来法では培養できなかった古細菌群を培養することに成功した。それら分離株の中には、水田からのメタン生成に最も関与していると推定されていた古細菌や深海底のメタンの生成と抑制に関与するメタン菌が含まれている。これらの分離株は温室効果ガスであるメタンの生成メカニズムの解明や抑制技術の開発のための重要な基礎情報になると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
総計	21,000,000	6,300,000	27,300,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：古細菌、分離培養、生物資源保全、16S rRNA 遺伝子、メタン、嫌氣的メタン酸化

1. 研究開始当初の背景

「古細菌」(*Archaea*) は地球上で最も未知のベールに包まれた生物群である。それは、近年の 16S rRNA 遺伝子に基づいた分子遺伝学的微生物同定・検出技術がはっきりと示している。古細菌を門や綱といった分類学上の高い階層でグルーピングして鳥瞰すると、それらの大半は人為的に純粋分離がなされたことがなく機能が不明なグループであることがわかる。単純に我々人間を含む真核生物と比較して論じることはできないが、これは「(昆虫等の) 節足動物門」や「(ほ乳類等の)

脊椎動物門」が発見されていないことと同等の意味を有している。このように機能が不明なグループが多い古細菌ではあるが、今まで純粋分離されて機能がわかっている古細菌は地球上の物質循環に大きく関与あるいは産業上極めて有用であることが明らかとなっている。具体的には (1) メタン生成古細菌はメタン生成するという特徴から、地球温暖化ならびに天然ガス・メタンハイドレート形成といった環境とエネルギー問題に直結している微生物群である、(2) 超高温、高圧、強酸・強アルカリ等の特殊な環境下にする極

限環境微生物の多くは古細菌であり、これらの持つ有用な遺伝子や酵素はバイオテクノロジー産業への応用が大きく期待されている、(3) 海洋に広く生息している *Marine Group I* と呼ばれる古細菌群は地球上で最大のバイオマス量を持つグループであり、地球の炭素・窒素循環に大きく関与していることが明らかとなっている。これらいくつかの分離された古細菌を眺めてみただけでも、古細菌がいかに地球上において重要な機能を果たしている生物群であるかは明白である。

2. 研究の目的

未知な古細菌を純粋分離することで、最近流行りの培養を介さない分子遺伝学的手法による解析だけでは絶対に明らかにできない、古細菌の持つ多様で新しい生物機能を明らかにすることを目的とする。現実的な目標設定として、本研究課題の期間ですべての未培養系統分類群に属する古細菌グループを純粋分離することは困難であるので、既往の研究から産業上有用ならびに地球上の物質循環に重要であると推定されている (1) メタン生成古細菌、(2) 嫌気性メタン酸化古細菌 (3) 深海堆積物に生息する古細菌 (メタンの生成ならびに *DSAG* 等の未培養系統分類群に属する古細菌群) に焦点を絞って純粋分離株の取得を目指す。

3. 研究の方法

(1) メタン生成古細菌の培養方法

嫌気共生細菌と呼ばれる発酵性細菌とメタン生成古細菌の水素を介した微生物異種間の共生関係を利用した培養法である「嫌気共生培養法」を用いた。培地は *Widdel* と *Pfennig* の方法に従って作成した。嫌気共生培養法によるメタン生成古細菌の培養には、嫌気共生細菌とメタン菌の共生系によって分解される基質である、エタノール (10 mM)、酪酸 (20 mM) およびプロピオン酸 (20 mM) を唯一のエネルギー源として用いた。集積培養系からのメタン生成菌の分離は、液体培地を用いた希釈培養法、寒天培地を用いたロールチューブ法およびディープアガー法を用い、それらの操作を繰り返すことで行った。

(2) 塩基配列の決定

DNA 抽出はビーズビーダー法を用いて行った。抽出した DNA を鋳型にして古細菌の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。その増幅には古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的な *Ar109f/1490R* のプライマーセットを用いた。PCR 増幅産物は *MinElute Purification Kit* (*Qiagen*) を用いて精製後、*TOPO TA cloning kit* (*Invitrogen*) を用いてクローン化し、クローンライブラリを作成した。得られた塩基配列は、*Ribosomal Database Project (RDP)* の *Chimera Check* プログラムを用いてキメラ配

列の判定を行い、*BLAST search* によって同姓検索を行った。その後、分子系統解析ソフト *ARB* によりアライメントを行い、近隣結合法を用いて系統樹の作成を行った。

4. 研究成果

(1) メタン生成古細菌の培養および純粋分離株の獲得

先の萌芽研究で開発したメタン生成古細菌を培養するための新規培養法である嫌気共生培養法を用いて人為的に分離されていない分類学的に新規なメタン生成古細菌の培養を試みた。その結果、水田土壌や嫌気性汚泥に優占的に存在し、かつ未培養古細菌群に属するメタン生成古細菌を分離・培養することに成功した。これらの分離株は詳細な菌学的特徴の決定を行った後に、それぞれ、新目 *Methanocellales*, 新科 '*Methanoregulacea*', および新属 *Methanolinea* を代表する新規なメタン生成古細菌として記載・命名を行った。これらメタン生成古細菌の中でも、*Methanocellales* を代表する新規なメタン生成古細菌は従来の手法では全く培養ができなかった *Rice Cluster I* という未培養古細菌グループ初の分離株である。*Rice Cluster I* は水田からのメタン生成の大部分を担っていることが *Science* 誌でも指摘された未培養古細菌であり、本研究課題で分離した菌株は水田からのメタン生成機構を明らかにする上での重要な糸口の1つとなり得る。

これら3株の新規なメタン生成古細菌を培養できたことで嫌気共生培養法の有効性が十分に証明できたと考え、さらに9種類の環境サンプルに嫌気共生培養法を適用することで新規なメタン生成古細菌の培養を試みた。その結果、*Methanocellales* 目や *Methanomicrobiales* 目に属する新属あるいは新種を代表するメタン生成古細菌の培養に成功した。加えてこの研究の過程において、メタン菌の系統分類群ごとに水素に対する基質親和性が異なることを見いだした。

(2) 嫌気性メタン酸化古細菌の培養の試み

難培養性古細菌の代表である嫌気性メタン酸化古細菌の培養を行うために、本研究課題で開発した新規嫌気性培養器を用いて培養を行った。和歌山県沖の南海トラフから採取してきた深海堆積物および下北半島東方沖で採取された深海底堆積物コアサンプルを植種源として培養を始めた。培養を開始してから9ヶ月経過した後に培養系内に嫌気的メタン酸化古細菌が生育しているかを確かめるために 16S rRNA 遺伝子に基づいた解析を行った。その結果、嫌気的メタン酸化古細菌を培養することができているというデータを得ることができた。現在まで、嫌気的メタン酸化古細菌を培養できた例はほとんど

なく、非常にインパクトのある成果である。さらに嫌氣的メタン酸化古細菌の検出・定量をするための 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて、環境中の嫌氣的メタン酸化古細菌の多様性の調査を行った。その結果、いくつかの水田土壌や天然ガス田において嫌氣的メタン酸化古細菌が存在していることを明らかにした。水田は主要なメタンガス放出源であり、嫌氣性メタン酸化古細菌が水田に存在しているという発見も非常にインパクトがある。

(3) 深海底堆積物に生息する未培養古細菌の培養の試み

上記の嫌氣的メタン酸化古細菌の培養にも用いた新規嫌氣微生物培養器を用いて深海底堆積物に生息する未培養古細菌の培養を試みた。その結果、培養開始から 289 日後にメタンの生成が確認された。水質・ガス分析および分子遺伝学的微生物同定・検出技術を用いて解析を行った結果、水素資化性のメタン菌が本嫌氣性培養器で優占的に生育しているものと推察された。加えて、DSAG や Rice Cluster III と呼ばれる未培養古細菌群も培養がされていることが判明した。続いて、本嫌氣性培養器から希釈培養法やロールチューブ法を用いて古細菌の培養を網羅的に試みた結果、*Metanobacterium* 属、*Methanosarcina* 属、*Methanococoides* 属に属する 3 種のメタン生成古細菌を培養することに成功した。以上の結果は、ほとんど知見が無かった深海底環境からのメタン生成機構を解明するための重要な基礎データとなり得る。一方で、DSAG 等の未培養古細菌群の純粋分離株の取得には今のところ成功していないので、さらなる培養技術の開発が必要であると考えられる。

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 17 件)

- ① Imachi, H., S. Sakai, H. Nagai, T. Yamaguchi and K. Takai. 2009. *Methanofollis ethanolicus* sp. nov., an ethanol-utilizing methanogen isolated from a lotus field. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 800-805. 査読有
- ② Mochimaru, H., H. Tamaki, S. Hanada, H. Imachi, K. Nakamura, S. Sakata and Y. Kamagata. 2009. *Methanobolus profundus* sp. nov., a new methylotrophic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 714-718. 査読有
- ③ Hatamoto, M., H. Imachi, Y. Yashiro, A. Ohashi, and H. Harada. 2008. Detection of

active butyrate-degrading microorganisms in methanogenic sludges by RNA-based stable isotope probing. Appl. Environ. Microbiol. 74: 3610-3614. 査読有

- ④ Sekiguchi, Y., M. Muramatsu, H. Imachi, T. Narihiro, A. Ohashi, H. Harada, S. Hanada and Y. Kamagata, 2008. *Thermodesulfovibrio aggregans* and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., two anaerobic, thermophilic, sulfite-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2541-2548. 査読有
- ⑤ Nunoura, T., H. Oida, J. Miyazaki, A. Miyashita, H. Imachi and K. Takai, 2008. Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and anaerobic methanotrophic microbial communities. FEMS Microbiol. Ecol. 64: 240-247. 査読有
- ⑥ Imachi, H., S. Sakai, H. Hirayama, S. Nakagawa, T. Nunoura, K. Takai and K. Horikoshi, 2008. *Exilispira thermophila* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic spirochete isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2258-2265. 査読有
- ⑦ Sakai, S., H. Imachi, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada and Y. Kamagata, 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane producing archaeon that is the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 929-936. 査読有
- ⑧ Kubota, K., H. Imachi, S. Kawakami, K. Nakamura, H. Harada and A. Ohashi, 2008. Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. J. Microbiol. Methods. 72: 54-59. 査読有
- ⑨ Imachi, H., S. Sakai, Y. Sekiguchi, A. Ohashi, H. Harada, S. Hanada and Y. Kamagata. 2008. *Methanolinea tarda* gen. nov. sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 294-301. 査読有
- ⑩ 酒井早苗、井町寛之 2007. 水田土壌からのメタン生成キープレイヤー—Rice Cluster I メタン生成古細菌を”嫌氣共生培養法”で純粋分離に成功—、化学と生物、第 45 卷 12 号、pp. 814-816. 査読無
- ⑪ Hatamoto, M., H. Imachi, S. Fukayo, A. Ohashi, and H. Harada. 2007. *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., a novel anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-oxidizing bacterium isolated from a methanogenic sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:

2137-2142. 査読有

- ⑫ Sakai, S., H. Imachi, Y. Sekiguchi, A. Ohashi, H. Harada and Y. Kamagata. 2007. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy field: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the Rice Cluster I. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4326-4331. 査読有
- ⑬ Mochimaru, H., H. Yoshioka, H. Tamaki, K. Nakamura, H. Imachi, Y. Sekiguchi, T. Hoaki, H. Uchiyama, and Y. Kamagata. 2007. Microbial diversity in deep subsurface gas-associated water at the Minami-Kanto gas field in Japan. *Geomicrobiol. J.* 24: 93-100. 査読有
- ⑭ Imachi, H., S. Sakai, A. Ohashi, H. Harada, S. Hanada, Y. Kamagata and Y. Sekiguchi. 2007. *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1487-1492. 査読有
- ⑮ 井町寛之、酒井早苗 2006. 難培養性メタン生成古細菌 Rice Cluster I の分離と特性、土と微生物、vol. 60, pp. 85-89. 査読無
- ⑯ Hatamoto, M., H. Imachi, A. Ohashi, and H. Harada. 2007. Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1332-1340. 査読有
- ⑰ 酒井早苗、井町寛之、関口勇地、大橋晶良、原田秀樹、鎌形洋一 2006. 嫌気共生培養系を利用した未培養系統分類群に属するメタン生成古細菌の分離・培養、水環境学会誌 Vol.29, No.7, pp. 389-397. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

- ① 青井健、廃水処理リアクターを利用した深海底メタン生成菌の培養の試み、第 43 回日本水環境学会年会、2009 年 3 月 16 日、山口大学吉田キャンパス・山口
- ② 井町寛之、廃水処理リアクターを利用した難培養性微生物の培養、第 43 回日本水環境学会年会、2009 年 3 月 16 日、山口大学吉田キャンパス・山口
- ③ 井町寛之、微生物学的廃水処理リアクターを利用した深海底微生物の培養、第 24 回日本微生物生態学会、2008 年 11 月 26 日、北海道大学学術交流会館・札幌
- ④ Imachi, H., Cultivation of marine subsurface microbes using continuous-flow bioreactor, 7th International Symposium for Subsurface Microbiology ISSM 2008, 2008 年 11 月 18 日, Granship, Shizuoka, Japan
- ⑤ 矢代悠人、フローサイトメータを利用した新規なメタン生成古細菌の分離・培養の試み、2008 年 9 月 10 日、第 63 回土木学会年次講演会、東北大学川内北キャンパ

ス・仙台

- ⑥ Yashiro, Y., Cultivation of uncultivated methanogenic Archaea by using co-culture method, 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME-12, 2008 年 8 月 21 日, Cairns Conventional Center, Cairns, Australia
- ⑦ Imachi, H., 16S rRNA phylogenetic investigation of anaerobic methane-oxidizing Archaea in terrestrial habitats, 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME-12, 2008 年 8 月 19 日, Cairns Conventional Center, Cairns, Australia
- ⑧ Sakai, S., Isolation and characterization of Rice Cluster I methanogens, 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME-12, 2008 年 8 月 18 日, Cairns Conventional Center, Cairns, Australia
- ⑨ 宮下藍、嫌気的メタン酸化古細菌の検出と培養の試み、第 20 回日本 Archaea 研究会、2008 年 7 月 5 日、沖縄県男女共同参画センター「ているる」・那覇
- ⑩ 井町寛之、微生物学的廃水処理技術を利用した深海底微生物の培養の試み、第 20 回日本 Archaea 研究会、2008 年 7 月 5 日、沖縄県男女共同参画センター「ているる」・那覇
- ⑪ 井町寛之、深海底堆積物環境の微生物資源—資源量・多様性・培養の試み—、日本微生物資源学会第 15 回大会シンポジウム、2008 年 7 月 2 日、千葉大学けやき会館・千葉
- ⑫ 矢代悠人、嫌気共生培養法を利用した新規なメタン生成古細菌の分離・培養、第 42 回日本水環境学会、2008 年 3 月 21 日、名古屋大学・名古屋
- ⑬ 宮下藍、嫌気的メタン酸化反応を担う微生物の分離の試み、第 42 回日本水環境学会 2008 年 3 月 20 日、名古屋大学・名古屋
- ⑭ Imachi, H., Archaea responsible for global methane emission and oxidation, The 8th International Symposium Global Renaissance by Green Energy Revolution, 2008 年 1 月 27 日, Nagaoka, Japan.
- ⑮ Miyashita, A., 16S rRNA gene-based molecular survey of anaerobic methane-oxidizing Archaea in terrestrial habitats, The 8th International Symposium Global Renaissance by Green Energy Revolution, 2008 年 1 月 26 日, Nagaoka, Japan.
- ⑯ Sakai, S., Isolation of Rice Cluster I methanogens playing a key role of global methane emission, The 8th International Symposium Global Renaissance by Green Energy Revolution, 2008 年 1 月 26 日, Nagaoka, Japan.

- ⑰ Hatamoto, M., Identification of active butyrate degrading microorganisms in methanogenic sludges revealed by RNA-based stable isotope probing, 11th World Congress on Anaerobic Digestion (AD11), 2007年9月20日, Brisbane, Australia
- ⑱ 宮下藍、16S rRNA phylogenetic investigation of anaerobic methane-oxidizing Archaea.第23回日本微生物生態学会、2007年9月16日、愛媛大学城北キャンパス・松山
- ⑲ 酒井早苗、Isolation of a thermophilic Rice Cluster I methanogen.第23回日本微生物生態学会、2007年9月16日、愛媛大学城北キャンパス・松山
- ⑳ 幡本将史、嫌気性汚泥における脂肪酸分解細菌の多様性解析—パルミチン酸および酪酸を用いたRNA-SIP法による比較—、第41回日本水環境学会年会、2007年3月17日、大阪産業大学・大阪
- 21 宮下藍、様々な環境における嫌氣的メタン酸化反応を担う微生物の検出と定量、第41回日本水環境学会年会、2007年3月17日、大阪産業大学・大阪
- 22 Imachi, H., A novel cultivation method for capturing uncultivated methanogenic Archaea, 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11), 2006年8月20日, Vienna, Austria
- 23 井町寛之、難培養性メタン生成古細菌 Rice Cluster I の分離と特性、日本土壤微生物学会 2006年度大会シンポジウム、2006年6月10日、東北大学・仙台

[図書] (計1件)

- ① 井町寛之、幡本将史、原田秀樹、シーエムシー出版、メタン発酵汚泥からの難培養性微生物の分離・培養 (第1章第2節)、バイオガスの最新技術、2008年、pp. 15-23.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井町 寛之 (IMACHI HIROYUKI)
 独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター・研究員
 研究者番号：20361933

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし