

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22296

研究課題名（和文）低水素供給培養法を利用した低エネルギー環境からの未知メタン生成菌の分離

研究課題名（英文）Isolation of methanogens from low-energy environments using a low-concentration H₂-supplying system

研究代表者

加藤 創一郎（Kato, Souichiro）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30597787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：鉄腐食反応に伴う水素発生反応を利用した低濃度水素供給システムを構築した。このシステムは添加する鉄の粒径や量を変えることで異なる水素供給速度条件で数か月間の培養が可能であった。様々な環境サンプルを微生物源とし、低濃度水素供給システムにより水素資化性のメタン生成菌、酢酸生成菌の集積培養を行った結果、一般的な高濃度水素培養で集積される微生物とは異なる水素資化性菌の集積が可能であった。集積培養物から複数種のメタン生成菌、酢酸生成菌の分離培養に成功した。そのうち、泥炭土壌から分離された2種の新規酢酸生成菌は、また高濃度水素条件では増殖しない、低水素環境に特化した微生物であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では低水素分圧下でメタン生成菌や酢酸生成菌を長期間培養可能なシステムを構築し、実際に2種の新規微生物の分離培養に成功した。これまで自然環境に類似した低水素環境で簡便に培養できる系はなく、本システムによりこれまで培養できなかった未知の水素利用メタン生成菌、酢酸生成菌の分離が可能になり、自然界におけるこれら嫌気微生物の生理生態の理解がさらに深まると期待される。

研究成果の概要（英文）：A low-concentration H₂-supplying system was constructed by using H₂ production via corrosion of iron. This system enabled long-term cultures under various low H₂ conditions by changing the amounts and the sizes of supplied iron. We conducted enrichment cultures of hydrogenotrophic methanogens and acetogens using the H₂-supplying system. Different types of methanogens and acetogens were enriched by the new system comparing to the canonical high-H₂ culture system. Some methanogens and acetogens were successfully isolated from the enrichment cultures. Among them, two novel strains isolated from peat soil were acetogens adapting low H₂ conditions: they could grow in the low H₂ culture system but not in high H₂ conditions.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物 嫌気 水素 メタン生成菌 酢酸生成菌 培養技術

1. 研究開始当初の背景

酸素が存在しない嫌気環境において、水素は非常に重要な代謝中間体・エネルギーキャリアである。特にメタン生成菌による水素と二酸化炭素からのメタン生成は、温室効果ガスであるメタンの大気放出、ひいては地球規模での炭素循環に大きく寄与する重要な反応である。しかし近年発展が著しい環境DNAの次世代シーケンス解析により、特に利用可能なエネルギー源(有機物)に乏しい地下圏・海洋底泥・湿原(泥炭)環境には未だ分離培養されていない未知のメタン生成菌が多く存在することが示されている。申請者はこれら未知メタン生成菌が分離培養できていない大きな理由が、培養時の水素濃度にあると推測している。自然環境においてメタン生成菌が利用する水素は発酵性の有機物分解菌によって供給される(図1左)が、現場の水素濃度は1-100 Pa程度と非常に低い。しかし実験室環境では、メタン生成菌の分離・培養に際しおよそ1気圧(100,000 Pa)もの水素を供給するのが一般的である(図1右)。そのような超高濃度の水素条件では、低エネルギー環境、すなわち低濃度水素環境に特化したメタン生成菌の分離培養は不可能であり、革新的な培養技術の開発が求められている。

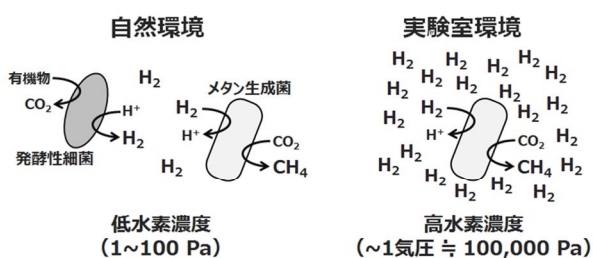


図1.メタン生成菌が利用可能な水素濃度は、自然環境と実験室環境で1,000~100,000倍も異なる。

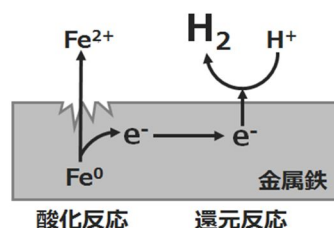


図2. 嫌気条件での鉄腐食反応。鉄腐食は金属鉄の二価鉄への酸化反応と還元反応(好気条件では酸素還元、嫌気条件では水素発生)の共役により進行する。

2. 研究の目的

本研究では、金属鉄(Fe⁰)が無酸素溶液中での自然酸化反応(腐食反応)に伴い緩やかに水素を発生するという知見(図2)に着目し、低濃度水素を継続的かつ簡便に供給可能な微生物培養システムを構築する。さらにその培養システムを使用し、低水素環境を好む/要求する嫌気性微生物(メタン生成菌や酢酸生成菌)を集積・分離培養することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 鉄腐食反応を利用した低濃度水素供給システムの構築

水素発生剤となる金属鉄を微生物培養液にそのまま添加すると、プロトン消費による培養液pHの上昇や、高濃度の2価鉄イオンによる微生物の生育障害が起きてしまう。そこで鉄腐食による水素発生と微生物の培養をそれぞれ異なるバイアル中でおこない、その気相部分をステンレスパイプ(内径約1.5mm)で接続するシステムを構築した(図3)。この培養システムを使用し、長期間にわたる水素ガス発生の確認、既存のメタン生成菌の培養が可能であるかの確認を行った。水素、メタンの定量にはFID/TCD検出器を搭載したガスクロマトグラフィーを使用した。

(2) 低濃度水素供給システムによる水素資化嫌気性菌菌の集積培養

様々な嫌気環境サンプルを微生物源とし、項目(1)で構築した低濃度水素供給システム、およびコントロールとして従来の高濃度水素培養系、ならびに水素発生減となる鉄と微生物培養を同じ1つのバイアルで行う鉄腐食培養法を使用し、水素資化性のメタン生成菌、酢酸生成菌を集積培養した。メタン生成菌の培養にはバクテリアの阻害剤であるリファンピシンを、酢酸生成菌の集積培養にはメタン生成菌の阻害剤である2-bromoethanesulfonateを添加した。酢酸の定量にはUV検出器を搭載したHPLCを使用した。数回の継代培養ののち培養物からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を標的としたPCR産物を次世代シーケンサー解析に供することで、微生物群集構造解析をおこない各培養系で優占した微生物種を特定した。

(3) 集積されたメタン生成菌、酢酸生成菌の分離培養と特性評価

集積培養物を微生物源とし、6-well plateとアネロパックを用いた嫌気培養法により水素資化性菌の分離培養を試みた。水素減としてはアネロパックに直接水素ガスを添加する方法に加え、1つのウェルに培養液と鉄粒子の懸濁液を添加し系内で水素を発生させる方法の両方を試験した。分離された微生物について16S rRNA遺伝子配列にもとづく系統分類解析をおこない、そ

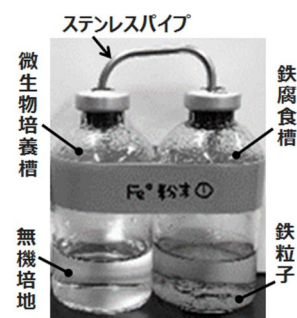


図3. 低濃度水素供給システムの外観。

の分類学的位置を同定した。低濃度水素供給システム、およびコントロールとして従来の高濃度水素培養系を用いて培養し、低濃度水素への親和性を評価した。

4. 研究成果

(1) 鉄腐食反応を利用した低濃度水素供給システムの構築

図3に示す低濃度水素供給システムについて、添加する鉄の粒径（粒状：1-2 mm、もしくは粉末：<45 μm ）および添加量を変化させ、水素供給速度をモニターした（図4）。鉄粒子を系に添加した場合（図4A）水素供給速度はその添加量（0.03~3 g）に応じて比例的に増加し、その範囲は0.12~4.4 $\mu\text{mol}/\text{vial}/\text{day}$ であった（図4C）。一方、鉄粉末を系に添加した場合（図4B）添加量が多い条件で水素発生が頭打ちとなる現象が確認された。この時の水素分圧は約1.5 atmにまで達しており、熱力学的な要因により水素生成が止まってしまったものと推察された。そのため微生物による水素利用により系内の水素濃度が低く保たれれば、水素発生は継続するものと予想された。鉄粉末を使用した場合の水素供給速度は2.0~93 $\mu\text{mol}/\text{vial}/\text{day}$ の範囲であった。以上のことから、本研究で構築したシステムは数か月という機関にわたり安定に水素を供給可能であること、また添加する鉄の粒径や量（すなわち全表面積）を変えることで約3オーダーの範囲で水素供給速度を変化せられることが示された。

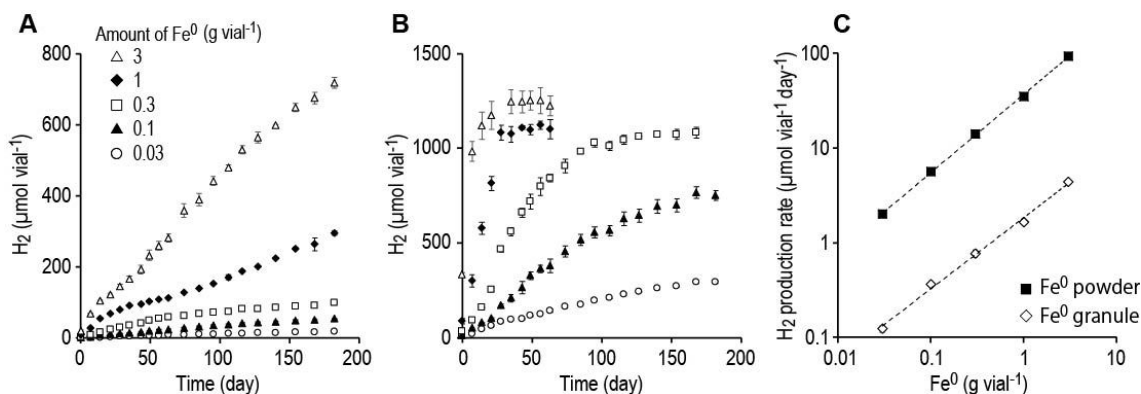


図4. 鉄粒子（A）もしくは鉄粉末（B）を水素源として使用した際の系内の水素濃度上昇。（C）AとBのデータから算出した水素供給速度と添加鉄重量との相関。

低濃度水素供給システムを利用し水素資化性メタン生成菌の既知分離株 *Methanobacterium formicicum* を培養した（図5）。水素発生バイアルに1gの鉄粉末を添加し、もう一方のバイアルに *M. formicicum* を植菌し培養を行った。培養に伴いほぼ一定速度でのメタン生成が確認され、そのメタン量は図4Cに示した水素発生速度から算出される理論値とほぼ同等であった。また培養初期には一時的に水素の蓄積（約200 Pa）が観察されたが、その後の期間は約数十 Pa という非常に低い水素分圧であった。以上のことから、このシステムは低い水素濃度を保ちながら水素資化性嫌気性菌を長期間培養可能であることが実証された。

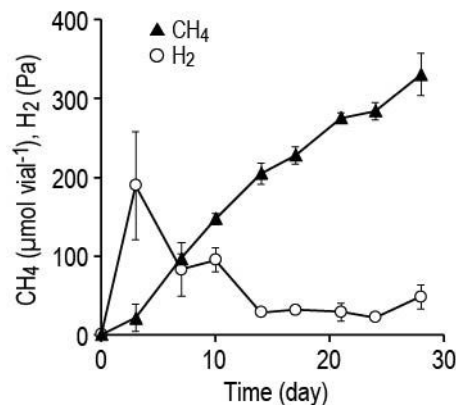


図5. 低濃度水素供給システムでの *Methanobacterium formicicum* の培養過程におけるメタンと水素ガスの推移。

(2) 低濃度水素供給システムによる水素資化嫌気性菌菌の集積培養

水田土壌、池底泥、湿原土壌、地下水サンプル等、様々な環境サンプルを微生物源とし、低濃度水素供給システムを用い水素資化性のメタン生成菌、酢酸生成菌の集積培養を実施した。

ここでは典型的なものとして水田土壌の結果を報告する。一般的な高濃度水素培養、鉄粉末と微生物の同一バイアルでの培養、低濃度水素供給システムでの培養での水素、メタン、酢酸濃度の推移を図6に示す。高濃度水素培養では、数日間のうちに水素が消費され、その濃度に応じたメタンもしくは酢酸の生成が確認され（High H_2 、図6A, D）、メタン生成菌もしくは酢酸生成菌の集積が起きていることが示された。鉄粉末と微生物の同一バイアルでの培養においても、培養の経過に伴いメタンもしくは酢酸の生成が観察された（ Fe^0 、図6B, E）。その生成量は培養途中までは鉄腐食に伴う水素生成から算出される理論値（点線）とほぼ同程度であったが、培養後半に頭打ちとなる現象が観察された。これは鉄腐食に伴う pH 上昇や 2 価鉄の蓄積が微生物の生育に悪影響を及ぼしているためと考えられた。一方、低濃度水素供給システムでの培養では、約1か月間にわたり安定的なメタンもしくは酢酸の生成がみられ、またその生成量は鉄腐食に伴う水素生成から算出される理論値（点線）とほぼ同程度であった（iCH、図6C, F）。また培養期間に検出される水素は極めて低濃度であった（<10 Pa）。このことから低濃度水素供給システムにより低濃度水素を利用するメタン生成菌、酢酸生成菌が集積されていることが示唆された。

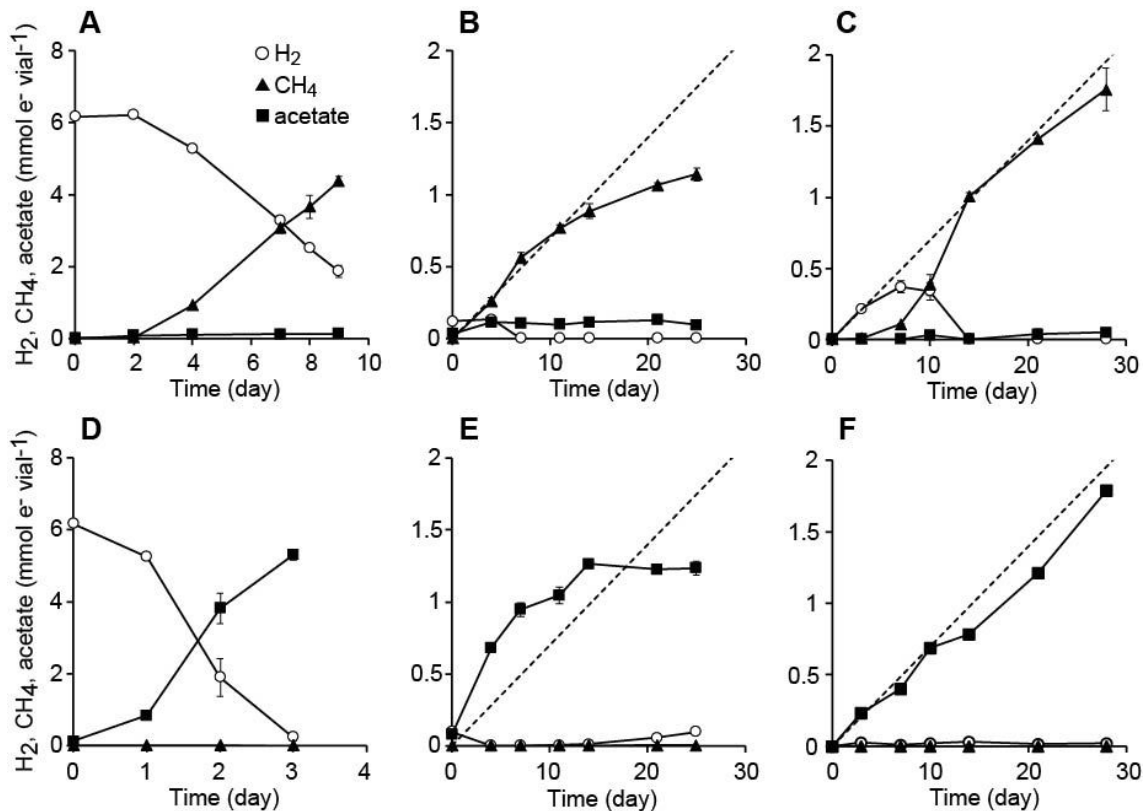


図6. 集積培養過程における水素、メタン、酢酸濃度の推移。(A~C)メタン生成菌の集積培養、(D~E)酢酸生成菌の集積培養。(A, D)高濃度水素培養、(B, E)鉄粉末と微生物の同一バイアルでの培養、(C, F)低濃度水素供給システムでの培養。

集積物について微生物群集構造解析を行った結果、メタン生成菌(図7A)酢酸生成菌(図7B)のいずれにおいても、高濃度水素培養、鉄との共存培養、低濃度水素培養では優占する微生物種が大きく異なることが示された。特に低濃度水素培養で優占した微生物種は、低濃度水素環境に特化した微生物であると予想された。

(3) 集積されたメタン生成菌、酢酸生成菌の分離培養と特性評価

集積物から分離培養を試み、複数種のメタン生成菌、酢酸生成菌の分離に成功した。そのうち、泥炭土由来集積物から分離された2種の酢酸生成菌は、既知の酢酸生成菌と同一のグループ(*Clostridium*, *Sporomusa*)に属してはいたが、記載されている微生物種との16S rRNA 遺伝子相同性が極めて低く、科~属レベルで新規な微生物であることが予想された。これらの微生物を低濃度水素供給系で純粋培養したところ、良好な水素消費・酢酸生成が確認されたが、一方で通常の高濃度水素培養では全く水素消費や生育が観察されなかった。この結果は、今回分離培養に成功した2種の新規酢酸生成菌は、低濃度水素環境にかなり特化した性質を有していることを示唆している。

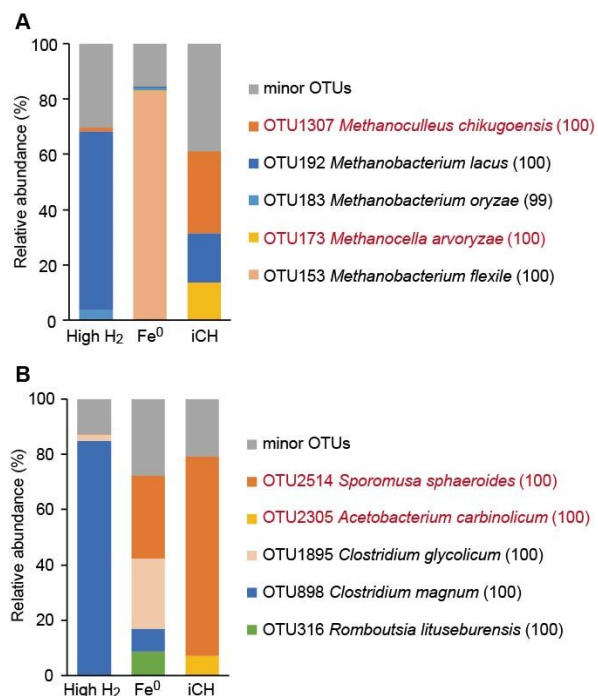


図7. 集積培養の菌叢解析結果。(A)メタン生成菌集積培養、(B)酢酸生成菌集積培養。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Souichiro, Takashino Motoko, Igarashi Kensuke, Mochimaru Hanako, Mayumi Daisuke, Tamaki Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 An iron corrosion-assisted H ₂ -supplying system: a culture method for methanogens and acetogens under low H ₂ pressures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76267-z	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------