

研究種目：若手研究 (スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20810046

研究課題名 (和文)

微生物の共生関係を利用した新規培養法によるメタン生成古細菌の網羅的分離・培養

研究課題名 (英文)

Cultivation of methanogens using the coculture method.

研究代表者

酒井 早苗 (SAKAI SANAE)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・ポストドクトラル研究員

研究者番号：70512911

研究成果の概要 (和文)：

嫌気環境下での微生物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てメタン生成古細菌の培養を試みた。様々な嫌気環境サンプルを植種源とし、嫌気環境下で微生物の共生関係によって分解される基質であるエタノール、酪酸もしくはプロピオン酸を基質に用いて培養を行った。その結果、プロピオン酸を基質として水田土壌の培養を行った集積培養系内から *Methanomicrobiales* 目や *Methanocellales* 目の新種を代表すると考えられるメタン生成古細菌を純粋培養することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

We previously reported the isolation of novel methanogens by using a new cultivation method, referred to as the coculture method. Here, we extended our coculture method to various anaerobic environmental samples. As a result, we successfully cultivated some uncharacterized methanogens in coculture enrichments and eventually isolated new methanogens, within the order *Methanomicrobiales* and *Methanocellales*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,360,000	408,000	1,768,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,560,000	768,000	3,328,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：分離・培養、嫌気性微生物、メタン生成古細菌、共生

1. 研究開始当初の背景

メタンは地球温室効果ガスの1つであるが、大気中に放出されるメタンの約 70-90 % は生物由来と考えられており、その生成にメタン

生成古細菌が大きく関与していることが知られている。また、メタン生成古細菌は、次世代エネルギーとして注目されているメタンハイドレートの形成にも関与していると

言われており、今後、環境・エネルギー問題を考える上で環境中のメタン生成古細菌の生態や役割を調査していくことは極めて重要な課題の1つである。

現在までに約100種のメタン生成古細菌が純粋培養され記載・命名が行われているが、近年の16S rRNA 遺伝子の情報の蓄積とその分子系統解析の結果から、自然環境中には未だ人為的に分離培養されていないメタン生成古細菌(と思われる古細菌)が多数存在していることが明らかとされている。しかしながら、世界的に見ても、メタン生成古細菌の分離・培養を行っている研究者の数は圧倒的に少なく、また、これら未培養なメタン生成古細菌の培養が極めて難しいと考えられ、新規なメタン生成古細菌の分離報告は細菌や他の古細菌と比較して極めて少ないのが現状である。

2. 研究の目的

研究代表者は環境中のメタン生成古細菌の生態や役割を調べるには、より多くの未培養なメタン生成古細菌を純粋培養し生理学的特徴など基礎的知見を収集する事が重要だと考えている。そして、これまでの研究において、新規なメタン生成古細菌の培養法である「嫌気共生培養法」を考案した。

嫌気共生培養法とは、微生物の共生関係に着目し実環境に近い条件下で培養を行う培養法である。具体的に説明すると、嫌気(メタン生成)環境下における、嫌気共生細菌と呼ばれる発酵性細菌と水素を利用してメタンを生成する水素利用性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に着目し、低分圧の水素をゆっくりと連続的に供給しながら培養を行う培養方法である。嫌気共生細菌とは、嫌気環境下における脂肪酸およびアルコール類等の分解に関与する微生物

群の総称であり、嫌気環境下でのこれら脂肪酸等の分解は水素分圧が極めて低く保たれていないと進行しないことが知られている。そのため、環境中において嫌気共生細菌は、水素の受け渡しを速やかに行うために、水素利用性メタン生成古細菌と強固な共生関係を構築していることが知られている。加えて、一般的な嫌気共生細菌は増殖速度が遅いことが知られており、このことは嫌気共生細菌から放出される低分圧の水素がゆっくりと連続的にメタン生成古細菌に供給されていることを意味している。従って、嫌気共生細菌とメタン生成古細菌の共生関係によって分解される基質を用いて嫌氣的に培養を行えば、実環境を模擬した低分圧の水素をゆっくりと連続的に供給する事が可能であり、低水素分圧下で優占的に生育してくる水素資化性メタン生成古細菌 (=おそらく今まで人為的に培養されたことのない未培養なメタン生成古細菌) を選択的に培養できる可能性が考えられた。そこで実際に、プロピオン酸を基質に用いた嫌気共生培養法にて水田土壌の培養を行った所、これまで分離が難しいとされてきた未培養なメタン生成古細菌を世界で初めて純粋培養することに成功した。この研究によって嫌気共生培養法が新規なメタン生成古細菌の培養に有効であることが示された。本研究では、嫌気共生培養法をさらに発展させることで未だ人為的に分離されていないメタン生成古細菌を網羅的に分離・培養し、メタン生成古細菌の基礎的知見の収集・人類共通の知的財産の提供を行い、メタン生成機構の解明および抑制技術の開発に繋げて行くことを目的とした。

3. 研究の方法

先行研究の結果から、嫌気共生培養法が新規なメタン生成古細菌の培養に非常に有効

な手法であることが示された。そこで本研究では、培養に用いる基質の種類を増やし、様々な環境サンプルに適用することによって未培養なメタン生成古細菌の網羅的分離・培養を試みた。

(1)環境サンプルおよび培養条件

一般的にメタン生成古細菌の生息環境とされている湖沼の底泥、水田土壌や海洋堆積物等の嫌気環境サンプルを準備した。そして、これら環境サンプルを人工培地に植種し、培養を行った。分離培養に用いた人工培地は Widdel と Pfennig の方法に従って作成した。海洋堆積物サンプルからの微生物の分離培養には上述の培地に塩化ナトリウムを最終濃度で $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 加えた。嫌気共生培養法を用いた培養には、嫌気環境下で微生物の共生関係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) を唯一の炭素源として用いた。加えて、対照系として、従来のメタン生成古細菌の培養方法と同様、高分圧の水素 (ca. 150 kPa) および高濃度のギ酸 (40 mM) を基質とした培養も行った。また、プロピオン酸 (20 mM) を唯一の炭素源とした培地に中温性のプロピオン酸酸化共生細菌である *Syntrophobacter fumaroxidans* strain MPOB (DSM 10017) を添加した培養系 (植種量 5%) の作成も行った。ただし、*S. fumaroxidans* は耐塩性を持たない細菌であるため、海洋サンプルからの培養系には添加しなかった。培養は既知の多くのメタン生成古細菌の至適生育温度である $37 \text{ }^\circ\text{C}$ で行った。培養開始後、ガスクロマトグラフを用いてメタンガス生成量を測定し、メタンガスの発生量から基質の消費量を算定、基質消費量が約 60 % 以上となった時点で継代培養を行った。

集積培養系からのメタン生成古細菌の分離は、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)クローニングおよび分子系統解析

集積培養液中の菌体からの DNA 抽出はビーズビータ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 遺伝子に特異的な Ar109f および細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的な 1490R のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。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の作成を行った。各クローンライブラリから 10 クローンをランダムに選択し、塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列は、BLAST search によって相同性検索を行った。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) 従来法 (水素およびギ酸) を用いたメタン生成古細菌の培養

水素およびギ酸の全ての集積培養系は、培養日数 3-5 日程度で微生物の増殖が確認され、基質の減少に伴ってメタンが生成されていた。集積培養系内を顕微鏡で観察すると、形態的におよそ 1-2 種類の微生物が優占して存在しており、これらの微生物はメタン生成古細菌に特有の F_{420} の自家蛍光を持っていた。このことから、集積培養系内にメタン生成古細菌が優占的に培養されていることが示唆された。

次に、集積培養系内に生育しているメタン生成古細菌を同定するため、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。少なくとも継代培養を 3 回行った集積培

養系内から DNA を抽出し、クローンライブラリの作成を行った。その結果、水素およびギ酸の集積培養系内から得られた全ての phylotype は既知のメタン生成古細菌が属する *Euryarchaeota* 門に属し、その大部分は *Methanobacterium* 属に属した。この他にも *Methanospirillum* 属や *Methanogenium* 属に属する phylotype が数 phylotype 得られた。

これら phylotype の多くは、既知のメタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子と 97% 以上の高い相同性を持ち、16S rRNA 遺伝子間の相同性が 97% 以上であると同一種である可能性が高いことから、既知のメタン生成古細菌と近縁な株が培養されていると考えられた。一方で、中には既知のメタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子と 97% 未満の相同性を示す phylotype も得られた。これらの phylotype は、既知のメタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子との相同性が 95% 程度とおそらく新規レベルの新規性があったが、*Methanobacterium* 属など分離株の報告数も多く良く研究されているメタン生成古細菌と近縁な菌株であった。従って、従来法を用いた培養では、現在までに分離されていかつ限定されたメタン生成古細菌しか培養されなかった。

(2) 嫌気共生培養法を用いた低水素分圧条件下でのメタン生成古細菌の培養

エタノール、酪酸およびプロピオン酸を基質とした嫌気共生系を用いた培養は、エタノール集積培養系では 1 週間程度で微生物の増殖が確認できたが、酪酸およびプロピオン酸を基質とした集積培養系では 1-3 ヶ月以上とその増殖は極めて遅かった。特にプロピオン酸集積培養系内の微生物の増殖は遅く、中には培養開始から半年後によくメタン生成を確認できた培養系も存在した。これら全ての集積培養系内では基質の分解に伴

ってメタンが生成されており、この時の集積培養系内の水素分圧はエタノール培養系では約 20-100 Pa、酪酸およびプロピオン酸の集積培養系では約 20 Pa 程度と低く保たれていた。顕微鏡によりこれら集積培養系内を観察したところ、すべての集積培養系内において数種の形態の異なる微生物が存在しており、その中にはメタン生成古細菌に特有の F₄₂₀ の自家蛍光を持つ微生物も確認された。このことから、すべての集積培養系において嫌気共生細菌とメタン生成古細菌が水素を介した共生関係を構築していることが示唆された。しかしながら、中には基質の分解が進行しない集積培養系が 2 培養系存在し、半年以上培養を行ってもメタン生成を確認することができなかった。そのため、以後の解析はこれら集積培養系を除いて行った。

続いて、嫌気共生培養系内に生息するメタン生成古細菌を同定するために、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いたクローン解析を行った。その結果得られた全ての phylotypes は *Euryarchaeota* 門に属した。得られた phylotype の 4 割は高分圧の水素および高濃度のギ酸を基質とした集積培養系と同様に *Methanobacterium* 属や *Methanospirillum* 属に属する phylotype であった。しかし一方で、*Methanomicrobiales* 目や *Methanocellales* 目、*Methanosarcinales* 目に属する phylotype も得られた。*Methanomicrobiales* 目に属する配列は、*Methanoculleus* 属、*Methanofollis* 属、*Methanocalculus* 属、*Methanoplanus* 属、*Methanolinea* 属、‘*Candidatus Methanoregula boonei*’に近縁であった。また、*Methanocellales* 目は *Methanocella* 属に、*Methanosarcinales* 目は *Methanosaeta* 属に近縁な配列であった。これら phylotype の中には既に分離されているメタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子と 97%

以上の高い相同性を持っているものも含まれていたが、96%以下の相同性を示し分類学上新種以上で提案可能と思われるメタン生成古細菌由来の *phylotype* も検出された。そして、中には *Methanolinea* 属、 '*Candidatus Methanoregula boonei*' や *Methanocella* 属など近年分離が報告されたばかりの比較的新しいメタン生成古細菌の系統であり、分離株の報告が少ないメタン生成古細菌と近縁な *phylotype* も含まれていた。従って、嫌気共生培養法を用いることによって、より多様で、また、分離報告の少ないメタン生成古細菌を培養することが出来た。

(3) 新規なメタン生成古細菌の分離

嫌気共生培養法を用いて環境サンプルの培養を行った結果、新種もしくは新属として提案可能と思われる未培養なメタン生成古細菌を優占的に集積培養することが出来た。続いて、これら新規なメタン生成古細菌の純粋培養を試みた。

新規なメタン生成古細菌が培養されたエタノール集積培養系やプロピオン酸集積培養系を植種源に用いて、一般的にメタン生成古細菌が単独で利用可能な基質である水素 (ca. 150 kPa)、ギ酸 (40 mM) を基質として希釈培養、ロールチューブおよびディープアガー法による分離を試みた。その際、メタン生成古細菌以外の微生物の増殖を抑制するためにバンコマイシン (50 µg/ml) あるいはペニシリン (50 µg/ml) を添加した。

その結果、水田土壌を植種源としたプロピオン酸培養系から、*Methanomicrobiales* 目や *Methanocellales* 目の新種を代表すると考えられるメタン生成古細菌を純粋培養することに成功した。その他の培養系からもメタン生成古細菌の分離を試みたが、高い水素分圧条件下や高濃度のギ酸を基質として培養を行うと、クローン解析では検出されなかった

Methanobacterium 属や *Methanoculleus* 属等の既知のメタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子と 97% 以上の相同性をもつ古細菌が優占化し、新規なメタン生成古細菌を分離することができなかった。

嫌気共生培養法を用いて環境サンプルの培養を行うことによって、新規なメタン生成古細菌を培養することに成功し、最終的に純粋培養することが出来た。しかし、嫌気共生培養法を用いた培養法にはまだ問題点があり、本手法を用いて新規なメタン生成古細菌を培養することが出来ても、最終的に分離株を得るためには従来からの培養方法(高濃度の水素もしくはギ酸を基質に用いる培養法)に頼らざるを得ない部分があり、そのため新規なメタン生成古細菌を培養出来ても最終的に純粋培養に至らないケースが存在した。嫌気共生培養法は新規なメタン生成古細菌を培養する上で有効な手法ではあるが、この問題を克服する必要がある、そのためには新しい手法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 2 件)

① Sanae Sakai, Ralf Conrad, Werner Liesack, and Hiroyuki Imachi, *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from Italian rice field soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 査読有, *in press*, 2010

② Sanae Sakai, Hiroyuki Imachi, Yuji Sekiguchi, I-Cheng Tseng, Akiyoshi Ohashi, Hideki Harada, Yoichi Kamagata, Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Applied and Environmental Microbiology*. 査読有, 75, 2009, 4892-4896

[学会発表] (計 1 件)

① Sanae Sakai, Ralf Conrad, Hiroyuki Imachi, Isolation and characterization of Rice Cluster I methanogens. 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME 12, 2009, Aug. 18

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 早苗 (SAKAI SANAE)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極
限環境生物圏領域・ポストドクトラル研
究員

研究者番号：70512911

(2)研究分担者

(3)連携研究者