

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月30日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21687006

研究課題名（和文）アーキアハンティング・純粋分離で解明する未知アーキア（古細菌）の新生物機能

研究課題名（英文）Archaeal hunting: explore new metabolic functions of uncultured Archaea by using new culturing techniques

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・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：20361933

研究成果の概要（和文）：アーキア（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アーキア群の培養を試みた。その結果、従来法では培養できなかったアーキアを培養することに成功した。それら分離株の中には、水田や湖沼からのメタン生成に関与していると推定されていたアーキアや深海底のメタンの生成と抑制に関与するアーキアが含まれている。これらの分離株はメタンの放出抑制に関わるアーキアの地球規模での炭素循環における役割等の解明、ひいては環境問題およびエネルギー問題を解決していくための基礎情報となる。

研究成果の概要（英文）：Cultured enrichments and isolates are important in developing our understanding of microbial physiology, genetics, and ecology. However, many microorganisms, particularly members of the domain *Archaea*, remain uncultured. In this study, I attempted to cultivate and isolate uncultured *Archaea* from various environmental samples using new cultivation techniques I developed. As a result, I successfully cultivated and isolated methanogenic and methanotrophic *Archaea*. These results strongly suggest that the culturing methods I developed are effective ways to cultivate fastidious but ecologically important archaeal species that would otherwise escape conventional isolation strategies. Also, these isolates obtained in this study would promote to understand carbon cycle on earth and to develop new environmental technologies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：環境微生物学

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：アーキア、分離培養、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

アーキア (*Archaea*, 古細菌) 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・検出技術を用いた研究結果がはっきりと示している。アーキアを

門や綱といった分類学上の高い階層でグループ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ができないが、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アーキアではあるが、今まで純粋分離あるいは分子遺伝学的手法等を使って機能が推定されているアーキアは地球規模での物質循環に大きく関与あるいは産業上極めて重要であることが明らかとなっている。具体的には (1) メタン生成アーキアはメタンを生成することから、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生息する極限環境微生物の多くはアーキアであり、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) 海底生命圏における優占種はアーキアであることが極性脂質や DNA を用いた解析から推定され、炭素ベースで考えた場合、地球上における最大のバイオマスはアーキアであると見積もられている。これらいくつかの情報を眺めただけでも、アーキア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

未知なアーキア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依存した解析（例えば環境ゲノム解析）だけでは絶対に明らかにできない、アーキア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アーキアグループを純粋分離することは困難であるので、代表者の研究を含めた既往の研究から地球上の物質循環に重要あるいは産業上有用と推定されている (1) メタン生成アーキア、(2) 嫌気性メタン酸化アーキア (3) 土壌や廃水処理プロセス等の普通の環境から頻繁に検出される *Crenarchaeota* の C2 グループや *Euryarchaeota* の Sediment Archaea-1 グループ等の未知アーキア、そして (4) 深海底環境（熱水活動域、メタンハイドレート胚胎層や冷湧水帯）に生息する DSAG や FCG2 グループ等の未知アーキア、の主に大きく 4 つのグループ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) メタン生成アーキアの培養方法

嫌気共生細菌と呼ばれる発酵性細菌とメタン生成アーキア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」および下降流懸垂型スポンジ (down-flow hanging sponge: DHS) リアクターを用いた。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ブアガー法を用い、それらの操作を繰り返すことで行った。

(2) 嫌気性メタン酸化アーキアの培養方法

嫌気的メタン酸化反応を行うと推定されている ANME アーキア培養には、DHS リアクターを用いた。DHS リアクターには塔長 1,200 mm、内径 68 mm の円筒形をした密閉型アクリル製容器を用いた。リアクター内部に 1 辺が 3 cm の立方体スポンジ担体をナイロン製の糸で数珠なりに連結してリアクター上部から吊り下げた。水理学的滞留時間は 20 時間とし、10°C の恒温器内で連続運転を行った。嫌気的メタン酸化反応の電子受容体である硫酸を含む人工海水は窒素曝気後、pH7.5 に調整してリアクター上部から供給した。メタンガスはリアクター下部から供給した。

(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 を鋳型にしてアーキアの 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。その増幅にはアーキアの 16S rRNA 遺伝子に特異的な Arch21F/Ar912r あるいは 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) メタン生成アーキアの培養および純粋分離株の獲得

先の萌芽研究で開発し、先の若手研究 A で適用・実証した微生物相互間作用を利用した嫌気共生培養法を用いて、様々な環境サンプルからメタン生成アーキアの培養を試みた。その結果、*Methanocellales* 属、*Methanoregula* 属、あるいは *Methanolinea* 属に属する新種を代表するメタン生成アーキアの培養に成功した。これらを分離し、詳細な菌学的特徴の決定を行うことで、新規なメタン生成アーキアとして記載・命名を行った。これら 3 つのメタン生成アーキアの分離株が持つ 16S

rRNA 遺伝子が世界各地で見つかっていることから、これら分離株を含めたメタン生成アーキアが地球環境において重要な働きを担っていることが強く示唆された。

先の若手研究 A の後半に開発した新規微生物培養器である下降流懸垂型スポンジ (down-flow hanging sponge: DHS) リアクターを用いて、深海堆積物に生息するメタン生成に関与するアーキアの培養および分離を試みた。その結果、培養開始から 289 日後に有意なメタン生成を初めて観察するとともにメタンに含まれる炭素同位体比の値からそれがメタン生成アーキアによるものであることを確認した。続いて、本培養器内部に培養されてきた微生物の種類を調べるために 16S rRNA 遺伝子に基づいた分子生物学的な解析を行った。その結果、メタン生成菌のグループとして知られている *Methanobacterium* 属や *Methanosarcina* 属等に近縁なメタン生成菌の他、これまで培養が全くなされたことがない未知のバクテリアやアーキアのグループに属する微生物も多種類培養されていることを明らかとなった。続いて本リアクター内で培養に成功した微生物種の純粋分離を行ったところ、メタン生成アーキアを 4 種と嫌気性バクテリアを 6 種類の合計 10 種の海底微生物を純粋分離することに成功した。これらの分離した微生物株の中には、遺伝子解析でしか存在が確認できていなかった未知の微生物や系統分類学的に新規性の高い微生物が含まれていた。これらの結果は、本研究で開発された新しい微生物培養法が従来までに培養が極めて困難とされてきた新規海底微生物を獲得することが可能な方法であり、海底の未知生態系の実態や生物学的な炭素循環システムなどを解明する上で極めて有効な手法ということを示していた。また、将来は本研究で得られたメタン生成アーキアの詳細な研究を行い、海洋エネルギー資源として期待されているメタンハイドレート等の天然ガス資源の生産メカニズムの解明のほか、産業的酸化炭素を海底堆積物内に封入し、メタン生成菌の力で天然バイオガスに転換する持続的炭素循環や環境保全技術への応用展開研究を行いたいと考えている。

(2) 嫌気性メタン酸化アーキアの培養の試み

海底堆積物からのメタン生成アーキアの培養にも用いた DHS リアクターを利用して、嫌氣的メタン酸化アーキアの培養を試みた。植種源には海洋研究開発機構の有人潜水艇「しんかい 6500」で採取された南海トラフの冷湧水帯堆積物 (和歌山県沖、水深約 2,500 m) を用いた。安定的にリアクターが運転できているかを確認するために、ほぼ毎日、流

出水の pH および ORP の測定を行った。リアクターの運転初期に、リアクター内部を安定的に嫌気状態が保てないという問題が発生した。人工海水のタンクやその蓋の部分の材質の変更や人工海水に添加している還元剤の変更、さらには人工海水に微量のグルコース (0.01 g/L) を添加することでリアクター内部にいる好気性菌に酸素を消費させる等の工夫を行った。その結果、運転開始 380 日目以降の流出水の ORP は -200 - -300 mV となり、安定的に嫌気状態を保てるようになった。その後、1 ヶ月に 1 回程度の頻度で化学分析を行ったが、明瞭なメタンの消費および硫酸の減少は確認できなかった。しかしながら、捕集したガスからは反応の副生成物である硫化水素臭を感じた。過去に報告されている硫酸還元に依存した嫌氣的メタン酸化反応の活性測定データが放射性あるいは安定同位体でラベルした基質を用いた解析により取得されていることと併せて考えると、おそらくリアクター内で嫌氣的メタン酸化反応は起きているが、今回の分析では感度不足のため測定出来なかったのではないかと考えている。続いて、どのような種類の微生物が培養されているかを調べるために、運転開始 903 日目にリアクター内のスポンジ担体の一部を採取し、16S rRNA およびその遺伝子のクローン解析を行った。その結果、嫌氣的メタン酸化反応を担うことが推定されている ANME アーキアと、ANME アーキアの共生相手と考えられている *Deltaproteobacteria* 綱の硫酸還元細菌が最も高頻度に検出された。加えて、非常に興味深い結果として、2 年半に及ぶ長期間の集積培養を行ったにも関わらず、ANME アーキアや硫酸還元細菌群以外の多様かつ未培養系統分類群に属するクローンが検出された。その中でも特に、Deep-Sea Archaeal Group (DSAG) や Marine Benthic Group-D (MBG-D) と呼ばれる海底環境において普遍的かつ優占的に存在する ANME 以外の未培養アーキア群に属するクローンが多数検出された。次に、クローン解析で検出された未培養アーキアを標的とした DNA プローブの設計を行い、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いたシングルセルレベルでの視覚的検出を試みた。これまでの研究から、いくつかのアーキアは細胞壁が堅固なために DNA プローブが細胞内に侵入しにくいことや rRNA の発現量がバクテリアと比較して少ないことが知られている。そこで FISH 法による検出の最適化においては、Proteinase K 等の溶菌酵素による細胞壁処理の検討や高感度 FISH 法である catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法での検出も併せて行った。その結果、ANME アーキア群 (ANME-1、ANME-2a と ANME-2c) に加え、ANME 以外の未培養アーキア群である DSAG、

MBG-D と Miscellaneous Crenarchaeota Group (MCG) の視覚的検出に成功した。通常、深海堆積物のような微生物代謝活性の低いサンプルは、FISH 法による検出が困難なことが知られている。従って、この FISH 法による結果は、DHS リアクターを用いた培養方法が確かに微生物の代謝活性を高めていることを強く示唆していた。さらに、ANME アーキアの細胞は共生相手の硫酸還元細菌と共生体を形成して存在することが知られていたが、本研究で検出された大多数の ANME アーキア細胞が単独で存在していた。この理由は今のところはっきりはわからないが、共生相手と物理的に密接しなくても嫌氣的メタン酸化反応を行える能力がある可能性を示唆するものであった。以上の本研究成果は、培養方法を工夫さえすれば、実験室の環境の条件でも嫌気性メタン酸化アーキアのような培養が極度に難しいと考えられてきた海底下の未培養アーキアを培養できることを強く示すものであった。

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 12 件)

- ① Kawakami, S., T. Hasegawa, H. Imachi, T. Yamaguchi, H. Harada, A. Ohashi and K. Kubota. 2012. Detection of single-copy functional genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes. *J. Microbiol. Methods*. 88: 218-223. 査読有
- ② Sakai, S., M. Ehara, I-C. Tseng, T. Yamaguchi, S. L. Bräuer, H. Cadillo-Quiroz, S. H. Zinder and H. Imachi. 2012. *Methanolinea mesophila*, sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a rice field in Taiwan, and proposal of the new archaeal family *Methanoregulaceae* fam. nov. within the order *Methanomicrobiales*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1389-1395. 査読有
- ③ Sakai, S., Y. Takaki, S. Shimamura, M. Sekine, T. Tajima, H. Kosugi, N. Ichikawa, E. Tasumi, A. T. Hiraki, A. Shimizu, Y. Kato, R. Nishiko, K. Mori, N. Fujita, H. Imachi and Ken Takai. 2011. Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the order *Methanocellales*. *PLoS ONE* 6(7): e22898. doi:10.1371/journal.pone.0022898. 査読有
- ④ Imachi, H., K. Aoi, E. Tasumi, Y. Saito, Y. Yamanaka, Y. Saito, T. Yamaguchi, H. Tomaru, R. Takeuchi, Y. Morono, F. Inagaki and K. Takai. 2011. Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *ISME J.* 5: 1913-1925. 査読有
- ⑤ Yashiro, Y., S. Sakai, M. Ehara, M. Miyazaki, T. Yamaguchi and H. Imachi. 2011. *Methanoregula formicica* sp. nov., a novel methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61 : 53-59. 査読有
- ⑥ Nunoura, T., M. Hirai, H. Imachi, M. Miyazaki, H. Makita, H. Hirayama, Y. Furushima, H. Yamamoto and K. Takai. 2010. *Kosmotoga arenicorallina* sp. nov. a thermophilic and obligately anaerobic heterotroph isolated from a shallow hydrothermal system occurring within a coral reef, southern part of the Yaeyama Archipelago, Japan, reclassification of *Thermococoides shengliensis* as *Kosmotoga shengliensis* comb. nov., and emended description of the genus *Kosmotoga*. *Arch. Microbiol.* 192: 811-819. 査読有
- ⑦ Sakai, S., R. Conrad, W. Liesack and H. Imachi. 2010. *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2918-2923. 査読有
- ⑧ Kawakami, S., K. Kubota, H. Imachi, T. Yamaguchi, H. Harada and A. Ohashi. 2010. Detection of single copy genes by two-pass tyramide signal amplification fluorescence in situ hybridization (two-pass TSA-FISH) with single oligonucleotide probes. *Microb. Environ.* 25: 15-21. 査読有
- ⑨ Miyazaki, J., R. Higa, T. Toki, J. Ashi, U. Tsunogai, T. Nunoura, H. Imachi and K. Takai. 2009. Molecular characterization of potential nitrogen fixation by anaerobic methane oxidizing archaea in the methane-seep sediments at the No. 8 Kumano Knoll in the Kumano Basin, offshore of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7153-7162. 査読有
- ⑩ Hatamoto, M., K. Nakai, A. Ohashi and H. Imachi. 2009. Sequence specific bacterial growth inhibition by peptide nucleic acid targeted to the mRNA binding site of 16S rRNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 1161-1168. 査読有
- ⑪ Sakai, S., H. Imachi, Y. Sekiguchi, I-C. Tseng, A. Ohashi, H. Harada and Y. Kamagata. 2009. Cultivation of methanogens under low hydrogen conditions by using coculture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4892-4896. 査読有
- ⑫ Miyashita, A., H. Mochimaru, H. Kazama, A. Ohashi, T. Yamaguchi, T. Nunoura, K. Horikoshi, K. Takai and H. Imachi. 2009.

Development of 16S rRNA gene-targeted primers for detection of archaeal anaerobic methanotrophs (ANMEs). FEMS Microbiol. Lett. 297: 31-37. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 青木仁孝、廃水処理リアクターを用いた嫌氣的メタン酸化反応を担う未知アーキアの培養、第 28 回土木学会新潟会研究調査発表会、ハイブ長岡、長岡、2011 年 11 月 22 日
- ② Imachi, H, Cultivation of Methanogenic Community from Marine Subsurface Sediments Using a Continuous-Flow Bioreactor, 8th International Symposium for Subsurface Microbiology ISSM 2011, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 2011 年 9 月 12 日
- ③ 青木仁孝、深海底堆積物環境に生息する難培養性アーキアの分離培養の試み、第 24 回日本 Archaea 研究会、慶應義塾大学先端生命科学研究所メタボロームキャンパス、鶴岡、2011 年 9 月 2 日
- ④ 田角栄二、深海底堆積物から分離したメタン生成アーキアの菌学的特徴とその圧力応答、第 26 回日本微生物生態学会大会、筑波大学大学会館、つくば、2010 年 11 月 25 日
- ⑤ 酒井早苗、Isolation and characterization of novel bacteria which were frequently detected in marine subsurface sediments、第 26 回日本微生物生態学会大会、筑波大学大学会館、つくば、2010 年 11 月 25 日
- ⑥ 江原真之、FISH 法による深海底未知アーキアの検出、第 26 回日本微生物生態学会大会、筑波大学大学会館、つくば、2010 年 11 月 25 日
- ⑦ 江原真之、嫌氣的メタン酸化反応を担う深海底未培養アーキアの培養、第 45 回日本水環境学会年会、北海道大学、札幌、2010 年 3 月 17 日
- ⑧ Imachi, H., Cultivation of methanogenic microbial community from deep subseafloor sediment using continuous-flow bioreactor. 110th ASM (American Society for Microbiology) annual meeting, San Diego, USA, 2010 年 5 月 22 日
- ⑨ 青井健、微生物学的廃水処理リアクターを利用した難培養性深海メタン生成アーキアの培養、第 44 回日本水環境学会年会、福岡大学七隈キャンパス、福岡、2010 年 3 月 16 日
- ⑩ 青井健、微生物学的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 25 回日本微生物生態学会、広島大学東広島キャンパス、東広島、2009 年 11 月 21 日

- ⑪ 井町寛之、嫌氣的メタン酸化アーキアの培養の試み、第 25 回日本微生物生態学会、広島大学東広島キャンパス、東広島、2009 年 11 月 21 日
- ⑫ 江原真之、廃水処理リアクターを用いた深海底未知アーキアの培養、第 27 回土木学会新潟会研究調査発表会、朱鷺メッセ、新潟、2009 年 11 月 10 日

〔その他〕

- ① プレス発表、「新しい培養手法により効率的にメタン生成菌を培養することに成功～海底下における天然バイオガス発生メカニズムの解明や応用開発研究に糸口～」、2011 年 6 月 7 日に文部科学省にてレク付きプレス発表を行った。翌朝の日刊工業新聞や日経産業新聞等で記事として紹介された。
- ② TV 出演、中京テレビ、トヨタエコスペシャル、2010 年 7 月 19 日放送
- ③ TV 出演、NHK、サイエンス ZERO 「二酸化炭素を資源に変える」、2010 年 5 月 15 日放送

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・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員
研究者番号：20361933

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし