

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25年5月16日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22688006

研究課題名（和文） 光エネルギー駆動型の物質生産能を有する複合微生物系の創成

研究課題名（英文） Development of microbial community producing useful materials driven by light energy

研究代表者

春田 伸 (HARUTA SHIN)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：50359642

研究成果の概要（和文）：温泉地から採取した微生物集塊をもとに、光照射依存的に二酸化炭素からメタンガスを生成する安定な複合微生物系を構築できた。本系では、シアノバクテリアによる酸素発生型光合成を主な一次生産経路とし、従属栄養細菌による酸素消費と有機物の酸化が進行し、発酵代謝によって水素が生成され、この水素はメタン生成に利用されると考えられた。また、複合系の形成および維持に関わる微生物種間相互作用を複数、発見することができた。

研究成果の概要（英文）：A microbial community which produced methane under illumination was developed using hot spring microbial mats as a source of microorganisms. In this microbial community, oxygenic photosynthesis by thermophilic cyanobacteria mainly worked as a primary production, heterotrophic bacteria consumed oxygen and degraded organic compounds provided by cyanobacteria, and hydrogen gas produced by fermentation was utilized for methane production by methanogenic archaea. Among these microorganisms, we found several types of interspecies relationship which may help to develop and maintain the microbial community.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：微生物生態学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：光合成、微生物生態系、メタン

1. 研究開始当初の背景

高等植物を一次生産者とするマクロ生態系と同様に、微生物生態系においても光合成は主要な一次生産プロセスであるが、その生産する化学エネルギーがどのように従属栄養細菌を支えているのかは不明である。

それまでの我々の研究では、温泉水の流水中や河床の礫上に発達する微生物集塊には

光合成細菌と従属栄養細菌が共存していることを見出していた。また温泉水中から採取した微生物集塊に水素ガスの生成活性があることを確認していた。

2. 研究の目的

光合成細菌が炭酸固定した有機物を従属栄養細菌が受け取るという物質循環の根源

をなす微生物種間の相互作用を明らかにする。その知見をもとに光合成細菌を軸として複数の微生物種が共存する複合微生物系を創成し、光エネルギーによって駆動する物質生産システムを構築する。

3. 研究の方法

(1) 複合微生物系の構築

45℃から 60℃の温泉水中に観察される微生物集塊を接種源として、照射する光や二酸化炭素の供給量を調整しながら、連続培養を試行した。生成するガスの量および組成を分析するとともに、微生物叢の変化を解析した。

(2) 複合微生物系における細菌の種間関係

複合微生物系から構成種（酸素発生型光合成細菌、酸素非発生型光合成細菌、好気従属栄養細菌、嫌気従属栄養細菌等）を分離して、その生理学的性質（生育特性、炭素源利用性等）を解析するとともに、それらを様々な組み合わせで混合し、その混合効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 複合微生物系の構築

55℃の温泉水中に発達する微生物集塊（厚さが約 1 cm の微生物マット）をマット状の構造を維持したまま 55℃光照射条件で培養を続けると、酸素ガスの発生とともに、水素およびメタンの生成が見られた。しかし、二酸化炭素を唯一の炭素源とする培地を供給しても、ガスの生成活性は約 1 ヶ月しか継続できなかった。一方、マット状の塊を分散し完全攪拌混合型の培養装置で集積培養（図 1）した結果、光照射条件で二酸化炭素を供給すると、酸素、水素、メタンがガス成分として放出する系ができた。培養液の pH は 7.8 から 8.2 で、この系は一年以上にわたって安定に維持できた。



図 1 複合微生物系の培養液の様子

① 構築した複合微生物系の性質

集積培養当初は、硫化水素の生成も観察さ

れたが、培養経過によって、硫化水素生成は抑制された。また、生成ガスの水素：メタン：酸素：二酸化炭素比は、集積培養当初、1:5:<0.1:10 であったが、光照射条件を変化させながら培養を続けることで、その比は 1:350:60:10 となり、水素ガスの発生を抑制し、メタンガスに集約できた。

② 複合微生物系の構成種

培養液を蛍光顕微鏡観察すると、酸素発生型光合成細菌であるシアノバクテリアと偏性嫌気性であるメタン生成アーキアが共存している様子が観察された（図 2）。これらは同一の細胞集塊のなかにもみられた。照射する光の強度を変化させることで、シアノバクテリアの存在量を変化させることができた。

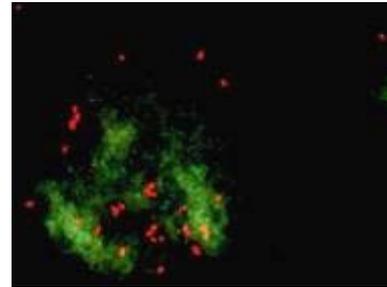


図 2 培養液の蛍光顕微鏡写真
赤、シアノバクテリア；青、メタン菌
（それぞれの細菌が示す自家蛍光による）

16S rRNA 遺伝子を対象にした PCR T-RFLP 法およびクローンライブラリー法を用いて、菌叢を解析した。安定な培養が達成されている数か月にわたって、細菌叢、アーキア叢のどちらも大きな変化はなく、菌叢は安定していると考えられた。アーキアは、水素酸化性メタン菌である *Methanothermobacter thermautotrophicus* が検出された。細菌は、光合成細菌の他には、発酵性細菌が中心で、中でも *Tepidanaerobacter* 属細菌および *Coprothermobacter* 属細菌が高頻度に検出された。*Coprothermobacter* 属細菌はプロテアーゼ生産菌として知られる。その他、好気呼吸、水素酸化、硫酸還元活性を有する細菌が検出された。

(2) 複合微生物系における細菌の種間関係

好熱性シアノバクテリア（9 株）、好気従属栄養細菌（81 株）、緑色系状性光合成細菌（3 株）、発酵性細菌（4 株）を分離した。これらを主な対象として、種間相互作用の解析を行った。

① 光合成細菌に細胞凝集を引き起こす細菌 複合微生物系の主たる一次生産者である 単細胞性シアノバクテリア

”*Thermosynechococcus*” sp. は、純粋培養

条件では細胞凝集性は見られないが、環境中や今回構築した複合微生物系では、しばしば微生物集塊を形成している様子が観察された(図3)。そこで、“*Thermosynechococcus*” sp. の細胞凝集に影響を与える共存細菌を探索した。

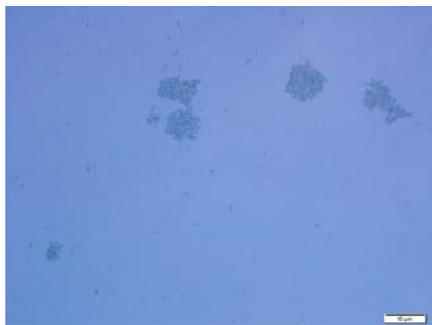


図3 複合系内のシアノバクテリア凝集

“*Thermosynechococcus*” sp. に共存している好気従属栄養細菌を分離した。得た分離株それぞれについて“*Thermosynechococcus*” sp. の培養液に添加し、その作用を評価したところ、顕著な細胞凝集を引き起こす株を見出すことに成功した。16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した結果、効果があった株は既知種との相同性が低く *Flavobacteriales* 目に属する新種と考えられた。本株を単独で培養したときには、細胞の凝集は観察されない。共培養によって形成した細胞凝集体を顕微鏡観察するとシアノバクテリア細胞と本株の細胞が混在している様子が観察され(図4)、二種細胞が共凝集していると考えられた。混合によって多糖の生産性等、シアノバクテリアの性質に変化がみられていないことから、異種細胞同士の特異な相互作用と考えられる。これまでシアノバクテリアについて報告されていない新たな種間相互作用の様式と考えられる。

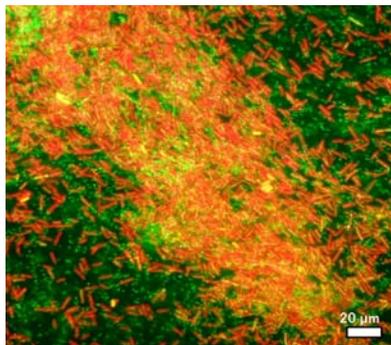


図4 シアノバクテリアと他細菌の共凝集
赤、シアノバクテリア細胞;緑、共存細菌の細胞

② 光合成細菌の独立栄養生育を助ける細菌
複合微生物系の構成種の一つである緑色糸状性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans*

はこれまで純粋培養条件での独立栄養生育は示されていなかった。

C. aggregans に対する共存細菌の作用を検証したところ、発酵性細菌との組み合わせで、*C. aggregans* が光独立栄養条件で生育し、かつ発酵性細菌の生育も支えることを明らかにした。本発見は、*C. aggregans* の光独立栄養生育を示した初めての報告であるばかりでなく、「二種混合による独立栄養」という新しい代謝様式の提案である。

③ プロテアーゼ生産菌の役割

従属栄養細菌の探索の過程でプロテアーゼ生産菌が多種得られてきた (*Bacillus* 属、*Meiothermus* 属等)。複合系における役割を調べるため光合成細菌に対する影響を解析した。

プロテアーゼ生産菌は、光合成細菌の細胞を溶菌し、炭素源として利用できることが分かった。細菌間の捕食-被食関係といえる。この種間関係は、一次生産産物を複合系内で広く活用していく経路のひとつになっていると考えられる。

光合成細菌 *C. aggregans* は滑走運動により細胞集塊を形成するという性質が知られていた。従属栄養細菌によって生成されたプロテアーゼは *C. aggregans* の細胞集塊形成速度を上昇させることを見出した。また *C. aggregans* はプロテアーゼから遠ざかるという方向性をもって運動したことから、光合成細菌の逃避行動と考えられた。複合系における物質変換は、このような捕食と逃避、一次生産のバランスによって成立している可能性が考えられた。

(3) 総括

温泉地に観察される微生物集塊をもとに、光エネルギーを利用して、二酸化炭素からメタンガスを生成する複合微生物系を構築できた。シアノバクテリアと *C. aggregans* とは異なる波長の光を利用することから、本複合系は一次生産に幅広い光を吸収・変換していると考えられる。

本複合微生物系は、さまざまな種間相互作用によって支えられていると考えられた。光合成によって合成した有機物は、プロテアーゼによって積極的に複合系内の微生物に分配される一方で、*C. aggregans* の光合成による一次生産は、従属栄養細菌による補助を受けていると考えられる。

本研究では、細胞凝集性を促進させる微生物種間相互作用も見出した。細胞の凝集は、細胞間の物質の効果的な授受だけでなく、不均一な微環境を形成し、それによって酸素発生、酸素消費、発酵、嫌気呼吸といった多様な代謝が一つの系内に共存できていると考えられる。

光合成によって生産された有機物の一部は酸素消費のために利用されてしまうが、酸素消費活性を系内に保持することは、メタン生成に至る経路を乱すような化合物（有機酸、アンモニア等）の過剰な蓄積を防止するのに役立っていると考えられる。そのため、光エネルギーのメタンガスへの変換効率を犠牲にするものの、メンテナンスフリーの安定な系になっているのではないだろうか。この系は、太陽光に依存した自然生態系を凝集した系とも考えられ、生態系の物質・エネルギー循環機能を理解していくための一つのモデル系として提案できる。

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 3 件）

- ① Iino, T., H. Tamaki, S. Tamazawa, Y. Ueno, M. Ohkuma, K. Suzuki, Y. Igarashi and S. Haruta. Candidatus Methanogranum caenicola: a Novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of Methanomassiliicoccaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata. Microbes and Environments. 査読有, vol.28, 2013, in press.
DOI:10.1264/jsme2.ME12189
- ② Everroad, C. R., H. Otaki, K. Matsuura, and S. Haruta. Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. Microbes and Environments. 査読有, vo. 27, 2012, pp.374-381.
DOI:10.1264/jsme2.ME11350
- ③ Otaki, H., C. R. Everroad, K. Matsuura, and S. Haruta. Production and consumption of hydrogen in hot spring microbial mats dominated by a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium. Microbes and Environments. 査読有, vo. 27, 2012, pp.293-299.
DOI:10.1264/jsme2.ME11348

〔学会発表〕（計 20 件）

- ① 川合瑞希、松浦克美、春田伸「単細胞性シアノバクテリアに細胞凝集を誘導する従属栄養性細菌の探索」日本農芸化学会 2013 年度大会 2013. 3. 25. 仙台
- ② 春田伸「シアノバクテリア（藍藻）における再分類—その必要性と問題—」第 32 回 日本微生物系統分類研究会年次大会

2012. 11. 16. つくば

- ③ 岩田聡実、大滝宏代、花田智、松浦克美、春田伸 「Autotrophic growth of anoxygenic phototroph, Chloroflexus aggregans, supported by a heterotroph」第 28 回日本微生物生態学会 2012. 9. 20. 豊橋
- ④ 福島俊一、大滝宏代、松浦克美、春田伸 「Illumination changed the response to oxygen of a facultative anaerobic photosynthetic bacterium, Chloroflexus aggregans」第 28 回日本微生物生態学会 2012. 9. 20. 豊橋
- ⑤ 大滝宏代、岩田聡実、春田伸、松浦克美 「Cyclic electron flow in hot spring microbial mats is driven by anoxygenic phototrophic bacterium」第 28 回日本微生物生態学会 2012. 9. 20. 豊橋
- ⑥ Haruta, S., M. Kawai and K. Matsuura. 「Driving force behind speciation of thermophilic cyanobacteria in hot spring microbial mats」14th International Symposium on Microbial Ecology. 2012. 8. 19. Copenhagen (Denmark).
- ⑦ Morohoshi, S., K. Matsuura and S. Haruta 「Exogenous protease promoted cell aggregation of a filamentous bacterium Chloroflexus aggregans」14th International Symposium on Microbial Ecology. 2012. 8. 19. Copenhagen (Denmark).
- ⑧ Iwata, S., H. Otaki, S. Hanada, K. Matsuura and S. Haruta 「Photoautotrophic growth of Chloroflexus aggregans in an enrichment culture derived from hot spring microbial mats」14th International Symposium on Microbial Ecology. 2012. 8. 19. Copenhagen (Denmark).
- ⑨ 春田伸、大滝宏代、諸星聖、松浦克美「微生物生態系の成立様式を電子の流れで理解する」日本農芸化学会 2012 年度大会 2012. 3. 25. 京都
- ⑩ Fukushima, S., H. Otaki, K. Matsuura, and S. Haruta 「Growth of the filamentous photosynthetic bacterium Chloroflexus aggregans around the border between anaerobic and microaerobic environments」日本生態学会第 59 回大会 2012. 3. 19. 大津
- ⑪ 諸星聖、松浦克美、春田伸 「Growth of the filamentous photosynthetic bacterium Chloroflexus aggregans around the border between anaerobic and microaerobic environments」日本生態学

- 会第 59 回大会 2012. 3. 19. 大津
- ⑫ 岩田聡実、大滝宏代、花田智、松浦克美、春田伸 「緑色糸状性光合成細菌 Chloroflexus aggregans の独立栄養条件での生育」第 27 回日本微生物生態学会 2011. 10. 9. 京都
 - ⑬ 溝口啓太、松浦克美、春田伸 「温泉微生物マットから分離した糸状性光合成細菌 Chloroflexus aggregans のバイオフィルム形成」第 27 回日本微生物生態学会 2011. 10. 9. 京都
 - ⑭ 大滝宏代、岩田聡実、春田伸、松浦克美 「温泉バイオマット中における糸状性光合成細菌の光独立栄養的な生育を促進する元素硫黄の酸化と還元」第 27 回日本微生物生態学会 2011. 10. 9. 京都
 - ⑮ 春田伸、松浦克美 「陸上温泉に分布する好熱性シアノバクテリアの遺伝学的多様性と種分化」第 27 回日本微生物生態学会 2011. 10. 9. 京都
 - ⑯ Otaki, H., S. Iwata, S. Haruta, and K. Matsuura 「Hydrogen transfer and electron cycling in the anoxygenic photosynthetic microbial mats」International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011. 9. 8. 札幌
 - ⑰ Haruta, S., H. Otaki, S. Morohoshi, K. Matsuura 「Elaborate microbial ecosystems evolved in hot springs」3rd Korea-Japan Symposium on Microbial Ecology. 2011. 5. 12. 光州 (韓国)
 - ⑱ 春田伸、松浦克美 「陸上温泉に分布する好熱性シアノバクテリアの遺伝学的多様性」日本農芸化学会 2011 年度大会 2011. 3. 26. 京都
 - ⑲ 諸星聖、松浦克美、春田伸 「緑色糸状光合成細菌 Chloroflexus aggregans の滑走運動促進物質の探索」第 26 回日本微生物生態学会 2010. 11. 25. つくば
 - ⑳ Hara, N., S. Haruta, and K. Matsuura 「Laboratory cultivation of hot spring microbial mat containing sulfur-oxidizing bacteria and sulfate-reducing bacteria」第 26 回日本微生物生態学会 2010. 11. 25. つくば

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春田 伸 (HARUTA SHIN)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：5 0 3 5 9 6 4 2

(2) 研究協力者

松浦克美 (MATSUURA KATSUMI)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：3 0 1 8 1 6 8 9