

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340023

研究課題名(和文) 海洋微生物による酸化的メタン生成：好気性メタン酸化菌にメタン生成能はあるか？

研究課題名(英文) Aerobic production of methane by marine microorganisms: Can methanotrophs be methane producers?

研究代表者

平山 仙子 (Hirayama, Hisako)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任研究員

研究者番号：90359167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：有機リン化合物であるホスホネートは海洋における好氣的メタン生成の謎を解く鍵物質として、また海洋微生物の貴重なリン源として近年注目されている。本研究ではメタン酸化細菌を含む複数の海洋微生物の単離株を用いた培養実験と、それらのゲノムの全塩基配列解析を通して、アルキルホスホネートが多くの海洋微生物にとってリン源として利用される可能性を示すと同時に、新規アルキルホスホネート分解酵素遺伝子の候補を見出した。

研究成果の概要(英文)：Phosphonates are organic phosphorus compounds containing C-P bond, and may be important phosphorus sources for marine microorganisms. It is also suggested that methylphosphonate, the simplest form of phosphonate, is a key compound in aerobic production of methane in the sea. In this study, the ability to utilize alkylphosphonates as phosphorus sources was demonstrated in some marine bacterial strains including methanotrophs by cultivation experiments. The genes related to phosphonate metabolism were found in genome sequences of two methanotrophic strains. Those genes are candidates for those encoding novel alkylphosphonate lyases.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ホスホネート メタン メタノトロフ メタン酸化菌

## 1. 研究開始当初の背景

通常、無酸素嫌気条件下で生成するメタンが、酸素の豊富な海洋表層～垂表層に過飽和濃度で存在する現象が以前より知られていたが、この現象がメチルホスホン酸の微生物分解によって説明できるのではないかと、との議論がある (Karl et al. 2008)。これは、メチルホスホン酸の炭素-リン (C-P) 結合が微生物の持つ結合分解酵素 (C-P リアーゼ) によって分解されると、酸素存在下でもメタンが生成するというものであり、またその反応が実際に海洋で起き得るだろうというものである。一方この現象のみならず、安定な C-P 結合を有するホスホネートが海洋において注目されている。それはホスホネートがリン酸に代わるリン源として、微生物にとって重要な物質である可能性が示唆されているからである。海洋微生物によるホスホネート代謝は興味深く、また生態学的重要性が高いと考えられるものの、その機構や分布についての知見は非常に少ない。

## 2. 研究の目的

メチルホスホン酸の分解によって生じたメタンはメタン酸化菌以外の生物にとっては単なる副産物であり、その代謝能を持たない以上は老廃物として外界へ放出するしかない。一方メタン酸化菌にとっては、生じたメタンは生育に必須なエネルギー源および炭素源となる。したがってメタン酸化菌にとって、メチルホスホン酸を分解するアルキルホスホネート分解酵素を有することは生存戦略上大変有利なことと言える。しかし、これまでメタン酸化菌についてホスホネート分解能を調べた例は全くない。メタン酸化菌に限らず、ホスホネート分解能を培養株で確認した例が少ないため、分解酵素に関する知見も限られている。

本研究では、メタン酸化菌を含む複数の海洋微生物がホスホネートを唯一のリン源として生育できるか調べることで、ホスホネート分解酵素の有無を確認する。さらにゲノムより分解酵素遺伝子を探索し、ホスホネート分解酵素と分解能の遍在性について考察する。また、分解産物として生じる側鎖の代謝についても考察する。

## 3. 研究の方法

(1) 様々な系統の海洋微生物がホスホネートを唯一のリン源として生育できるか調べるため、まず本研究室で単離された海洋性メタン酸化細菌 3 株 (*Methylobacter marinus* MR-1 株, *Methylomarinum vadi* IT-4<sup>T</sup> 株, *Methylomarinovum caldicuralii* IT-9<sup>T</sup> 株)、海洋性硫酸酸化細菌 2 株 (*Thiomicrospira thermophila* I78<sup>T</sup>, *Sulfurivirga caldicuralii* MM1<sup>T</sup>) の計 5 株の海洋細菌を使い培養実験を行った。リン酸塩の代わりにメチルホスホン酸とエチルホスホン酸をそれぞれ唯一のリン源として加えた培地を用い、各細菌を各

至適条件下で培養した。また分解産物として放出されると予想されるガスを TC-BOND Q カラム (0.32 mm × 30 m) を装着した GC-4000-FID ガスクロマトグラフシステム (ジーエルサイエンス社) で分析した。

(2) メタン酸化細菌 2 株についてゲノム解析を行い、ドラフトゲノム配列情報を得た。ゲノム配列よりホスホネート分解酵素遺伝子の探索を行い、細菌におけるホスホネート代謝遺伝子の遍在性について考察した。

## 4. 研究成果

(1) メチルホスホン酸とエチルホスホン酸を唯一のリン源として添加しバッチ法にて培養した場合、基質の至適濃度は 5-20 mM 程度であった。試験した 5 株すべてがこの濃度範囲で生育することを確認したが、リン酸塩をリン源にした場合に比べてメチルホスホン酸およびエチルホスホン酸をリン源にした場合には、多少の生育速度の低下が認められた。一方、1 mM では生育するものの一部の細胞で形態変化が認められた。また 50 mM ではすべての株で生育が著しく抑制されるか、または生育が認められなかった。エチルホスホン酸をリン源としてメタン酸化細菌を培養し、定常期に達した culture の試験管の気相を GC 分析したところ、分解産物として期待したエタンは検出されなかった。この結果から、試験したメタン酸化細菌がエタンを資化した可能性が考えられる。分解産物の代謝経路を明らかにするため、現在同位体標識基質を用いた分析を進めている。

(2) メタン酸化細菌 2 株のドラフトゲノム解析を行った。得られたゲノムサイズは *M. marinus* MR-1 株が 5.19 Mb、*M. vadi* IT-4<sup>T</sup> 株が 4.33 Mb であった。培養実験の結果から各菌株がアルキルホスホネートをリン源として利用できること、すなわちアルキルホスホネートを基質とした C-P リアーゼを有することが示唆されたことから、ゲノム配列から該当する酵素遺伝子を探索した。

その結果 *M. marinus* MR-1 株と *M. vadi* IT-4<sup>T</sup> 株から共に 1 つまたは 2 つのホスホネートトランスポーター遺伝子が検出され、これらの菌株がホスホネートを細胞内に取り込むことができることが推察された。さらに、機能がはっきり分かっていないものの alkylphosphonate utilization protein とアノテーションされている遺伝子が検出された。しかし *M. marinus* MR-1 株と *M. vadi* IT-4<sup>T</sup> 株から検出された alkylphosphonate utilization protein 遺伝子はそれぞれ 342 bp と 585 bp と配列長が異なる上、アミノ酸配列に全く相同性は認められなかった。また、現在唯一アルキルホスホネートを分解する酵素として知られている大腸菌タイプの C-P リアーゼとも相同性は認められなかった。なお、大腸菌のアルキルホスホネート分

解反応にはゲノム上に並ぶ複数(少なくとも6つ)の遺伝子が関与し、少なくとも3段階の酵素反応を経て分解されるという複雑な機構で説明されている。しかし *M. marinus* MR-1 株と *M. vadi* IT-4<sup>T</sup> 株のゲノム配列から検出された alkyolphosphonate utilization protein 遺伝子は、ともに単独で存在しており、現時点では他に関与すると推察される遺伝子は見当たらないことから、よりシンプルな反応機構であると推察される。

今回検出された遺伝子については、その機能や特性はまだ確認されておらず、アルキルホスホネートを基質とする C-P リアーゼ活性の有無については現段階では断定できないものの、活性を有する可能性は大いにあると考えられることから、今後研究を進める中で検証する。

(3) *M. marinus* MR-1 株から検出された遺伝子の翻訳アミノ酸配列(113 aa)を細菌ゲノムデータベースに対して Blast 検索したところ、このタンパクと非常に相同性の高いタンパク(identity 70%以上)の遺伝子が *Proteobacteria* (*Beta-* および *Gammaproteobacteria*), *Firmicutes*, *Fusobacteria*, および *Actinobacteria* の各門の細菌のゲノムから多数検出された。同様に *M. vadi* IT-4<sup>T</sup> 株から検出された遺伝子の翻訳アミノ酸配列(194 aa)を Blast 検索したところ、高い相同性を有するタンパク(identity 60%以上)の遺伝子が *Proteobacteria* (*Alpha-*, *Gamma-*, *Delta-*, および *Zetaproteobacteria*) と *Bacteroidetes* の各門の細菌のゲノムから多数検出された。

今後詳細な検証が必要であるが、調べた限りでは同じ細菌に両遺伝子が重複して存在することはなかった点が大変興味深い。また、*Gammaproteobacteria* のメタン酸化細菌から検出されるのは *M. marinus* MR-1 株で検出されたタイプの遺伝子であり、*M. vadi* IT-4<sup>T</sup> 株から検出されたタイプの遺伝子は現時点では検出されなかった。

(4) 多くの生物が共通にもつ ATP、核酸、リン脂質などの生体物質では、リンはリン酸化合物(C-O-P結合)の形態を取る。しかし一部のリンをホスホネート(C-P結合)の形態でもつ生物がいることが以前より知られており、またホスホネートが決して自然界で珍しい物質ではないことも徐々に分かってきた。最近の報告では、海水中の溶存高分子有機物中のリンの約 20-30%がホスホネートの形態で存在することが分かり (Kolowitz et al., 2001)、またある種の海洋無脊椎動物は体内にホスホネートを蓄積していることも知られている。したがって海洋におけるリンの循環を考えると、安定な C-P 結合を切断する C-P リアーゼを持つ微生物の存在が不可欠である。しかしメチルホスホン酸を含むアルキ

ルホスホネートを基質とする C-P リアーゼとしてその活性が確認されているのは、現在のところ複数の遺伝子が関わる大腸菌タイプの酵素に限られる。そのため、現時点では大腸菌タイプの遺伝子を指標に未知の海洋微生物のアルキルホスホネート代謝能、とりわけ好氣的メタン生成をもたらすメチルホスホン酸分解能が調べられ、議論されている。しかし本研究では、機能が分かっていない2つの遺伝子が、それぞれ大腸菌タイプとは異なる新規のアルキルホスホネート C-P リアーゼである可能性を示した。前述のように、系統的に非常に多様な細菌がこれら2つの遺伝子と相同的な遺伝子を有していることを考え合わせると、アルキルホスホネート代謝能を有する海洋微生物は、現在の見積もりをはるかに凌ぐ存在量を誇るかも知れない。また同時に、海洋表層での好氣的メタン生成にはマイナーなものまで含め多種多様な微生物が寄与している可能性がある。

本研究で注目した2つの遺伝子とその産物について、今後、発現解析や活性測定などを行いその挙動と諸性質を明らかにすることによって、海洋微生物によるアルキルホスホネート代謝の新たな一面を見出すことができると考える。さらに、海洋のメタンパラドックスと呼ばれてきた謎の好氣的メタン生成の完全解明に役立つ知見を得られると期待する。

#### <引用文献>

Karl, D. M. et al. (2008) Nat. Geosci., 1, 473-478.

Kolowitz, L. C. et al. (2001) Limnol. Oceanogr., 46, 309-320.

#### 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 7件)

平山 仙子, 重要な生態学的機能をもつ海洋のメタン酸化菌, 化学と生物, 査読無, 54, 2016, 310-311

DOI:10.1271/kagakutoseibutsu.54.310

Flynn, J.D., Hirayama, H., Sakai, Y., Dunfield, P.F., Klotz, M.G., 他16名,

Draft genome sequences of

gammaproteobacterial methanotrophs

isolated from marine ecosystems,

Genome Announcements, 査読有,4,

2016, e01629-15

DOI:10.1128/genomeA.01629-15

Sharp, C.E., Smirnova, A.V., Kalyuzhnaya, M.G., Bringel, F., Hirayama, H. 他13名, Draft genome sequence of the moderately halophilic methanotroph *Methylohalobius crimeensis* strain 10Ki, Genome Announcements, 査読有, 3, 2015, e00644-15

DOI:10.1128/genomeA.00644-15

土岐 知弘, 平山 仙子, 大嶋 将吾, 屋我地島沿岸海底のメタン湧出域から採取したバクテリアマットの微生物群集構造, 琉球大学理学部紀要, 査読無, 100, 2015, 5-12

Nogi, Y., Abe, M., Kawagucci, S., Hirayama, H., *Psychrobium conchae* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic marine bacterium isolated from the Iheya North hydrothermal field, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 査読有, 64, 2014, 3668-3675

DOI:10.1099/ijs.0.066738-0

Hirayama, H., Abe, M., Miyazaki, M., Nunoura, T., Furushima, Y., Yamamoto, H., Takai, K., *Methylomarinovum caldicuralii* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a shallow submarine hydrothermal system, and proposal of the family *Methylothermaceae* fam. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 査読有, 64, 2014, 989-999

DOI:10.1099/ijs.0.058172-0

平山 仙子, 海洋の好気性メタン酸化菌の分布, 多様性, 窒素代謝, 生物の科学 遺伝, 査読無, 6, 2014, 492-497

[学会発表](計 1件)

Osborne, K.A., Rush D., Birgel, D., Hirayama, H., Poulton, S., Boetius, A., and Talbot, H.M., Novel amino-bacteriohopanepolyol lipid biomarkers for aerobic methane oxidation, 27<sup>th</sup> International Meeting on Organic Geochemistry, 2015年9月14日, Prague, Czech Republic

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平山 仙子 (Hirayama, Hisako)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任研究員  
研究者番号：90359167