

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840166

研究課題名(和文) 技術革新により実現する共生メタン酸化細菌の戦略的分離培養

研究課題名(英文) Strategic isolation culture of ectosymbiotic methanotroph by engineering innovation

研究代表者

和辻 智郎 (WATSUJI, Tomo-o)

独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・研究員

研究者番号：50409091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄の深海熱水噴出孔に生息するゴエモンコシオリエビは腹側の体毛に付着するメタン酸化細菌や独立栄養性硫黄酸化細菌をエサにして生活する。また、メタン酸化細菌はメタンを唯一のエネルギー源・炭素源として生育できる。このことから、本研究ではメタンだけを添加した水槽でゴエモンコシオリエビの飼育を試みた。その結果、共生メタン酸化細菌を維持しながら一年以上の長期飼育に成功した。また、メタン添加水槽に適応した共生メタン酸化細菌の分離培養を試みたが、純粋培養には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Shinkaia crosnieri in deep-sea hydrothermal vents in the Okinawa Trough has ingested epibiotic methanotrophs and thioautotrophs associated with setae in the ventral aspect. Therefore, we tried to rear *S. crosnieri* in an aquarium with added methane and succeeded in the rearing of *S. crosnieri*, which kept the association with epibiotic methanotrophs, during more than one year. We tried to isolate the epibiotic methanotrophs associated with *S. crosnieri* in the methane-added aquarium. But the epibiotic methanotrophs were not isolated in pure culture.

研究分野：極限環境共生学

キーワード：深海外部共生 メタン酸化細菌 メタン添加飼育

1. 研究開始当初の背景

1977年に深海熱水噴出孔が見つかった以来、噴出孔の周囲にはバクテリアを体に付着させた無脊椎動物(エビ、コシオリエビ、ゴカイ)が発見されてきた。しかしながら、宿主に付着したバクテリア(外部共生菌)のエネルギー代謝や宿主に対する役割は明らかではなかった。これまでに研究代表者は沖縄トラフの深海熱水噴出域に生息し、外部共生菌を腹側の体毛に宿すゴエモンコシオリエビを用いて、外部共生菌相にメタンや硫化水素を利用して増殖するメタン酸化細菌や独立栄養性硫酸化細菌が優占化していることを世界に先駆けて明らかにした(Watsuji *et al.*, 2010, 2012, 2014)。また、標識したメタンや二酸化炭素を生きた宿主動物に与える標識炭素の追跡実験を初めて外部共生研究に導入することで、ゴエモンコシオリエビはメタン酸化細菌と硫酸化細菌から栄養を受け取ることが明確に実証した(Watsuji *et al.*, 2010)。さらに、研究助成期間中ではあるが、ゴエモンコシオリエビは体毛に付着する外部共生菌を顎脚を用いて収穫し、食べることで栄養源としていることを証明した(Watsuji *et al.*, 2015)。

これらの成果により、ゴエモンコシオリエビは体に付着するメタン酸化細菌や硫酸化細菌を栄養源とすることが証明された地球上で唯一の動物となった。

2. 研究の目的

ゴエモンコシオリエビは体毛に付着するメタン酸化細菌を食べて栄養源とすることから、メタン酸化細菌のエネルギー源と炭素源であるメタンを与えるだけでゴエモンコシオリエビを飼育できると予想された。そこで、本研究では第一の目的としてメタンだけを添加した水槽で体毛に付着するメタン酸化細菌を維持しながらゴエモンコシオリエビを長期間飼育できるかを確かめた。また、ゴエモンコシオリエビのメタン飼育によって体毛に集積されると予想されるメタン酸化細菌を分離培養することを本研究の第二の目的とした。

3. 研究の方法

メタンを溶存させた水槽を維持管理し、ゴエモンコシオリエビを飼育した。メタン飼育によるゴエモンコシオリエビの外部共生菌相の変遷を調べるため、飼育前後の個体を用いて外部共生菌相を解析した。菌相はユニバーサルプライマーを用いたPCRで増幅した16S rDNAの配列や外部共生菌相のメタン酸化細菌や硫酸化細菌に対して特異的にハイブダイズするプローブを用いたFISHによって解析された。また、菌相中のメタン酸化細菌がメタン飼育前後において質的量的な変化を受けるかどうかを調べるため、機能遺伝子を用いたメタン酸化細菌の系統解析、メタン酸化細菌に特異的なプライマーを用いた

リアルタイムPCRによるメタン酸化細菌数の定量、メタン酸化活性に基づいた相対的なメタン酸化細菌の存在量の推定を行った。

メタン添加水槽の環境に順応したメタン酸化細菌を外部共生菌相から分離培養するため、水槽の海水成分と同じにした培地や既知のメタン酸化細菌の培養に適した培地に飼育後の個体の体毛を入れて目的の菌の継代培養を試みた。

4. 研究成果

(1) ゴエモンコシオリエビのメタン飼育

当初の予定では4ヶ月間の飼育を目指していたが、予想以上に個体の調子が良かったため、節目となる12ヶ月間まで飼育を続けた。外部共生菌を宿す動物をメタンを与えるだけでこれほど長期間飼育することに成功した例はこれまでにないため、大きな成果となった。ゴエモンコシオリエビの生息場所は銅、金、銀などの金属を豊富に含む有望な熱水鉱床であることが確認され、2023年からその住処である熱水鉱床の掘削・回収を行う事業性評価プロジェクトが開始される予定である。このような背景から、環境破壊によって日本固有の深海動物であるゴエモンコシオリエビが被害を受けるということが現実になりそうなる状況にある。また、絶滅を防ぐためには掘削前にゴエモンコシオリエビの一部を回収・飼育して、掘削後に元の生育場所に帰すことが有効な手段であると考えられる。この手段において、本研究で培ったゴエモンコシオリエビの長期飼育技術が実用段階で役立つ。今後は、ゴエモンコシオリエビの繁殖や成長に必要な脱皮に関する技術を獲得することが重要な研究テーマとなると考えられる。

(2) メタン飼育前後の外部共生菌の変遷

同サイズのゴエモンコシオリエビ1個体あたりの外部共生菌相に含まれるメタン酸化細菌に特異的な機能遺伝子(*pmoA*)の本数を定量した結果、飼育前と後の3匹の個体の平均がそれぞれ 7.2×10^9 本と 5.4×10^8 本であった。このことから、飼育後のメタン酸化細菌の存在量は飼育前の13分の1になることが示された。また、飼育後の3匹のゴエモンコシオリエビを用いてそれぞれの個体のメタンの消費活性を測定すると平均で $0.81 \pm 0.07 \mu\text{mol}/\text{時間}(\text{h})$ であった。このメタン酸化活性は飼育前のものの約2分の1であった。これらの結果から、飼育後の菌相に活動性が認められるメタン酸化細菌が含まれることが示された。また、飼育後のゴエモンコシオリエビが宿すメタン酸化細菌数は7分の1に減少するが、メタン酸化活性は2分の1にしか落ちないことから、飼育後のメタン酸化細菌の細胞当たりのメタン酸化活性は飼育前のものの6倍以上高くなると見積もられた。電子顕微鏡観察から飼育後の外部共生菌相は飼育前のものと比べて明ら

かに菌体量が減少することから、飼育後の菌相ではメタン酸化細菌の基質となるメタンの拡散が容易になったと示唆された。

外部共生菌相から得られた *pmoA* 転写産物の配列情報から、飼育後の菌相中の活動的メタン酸化細菌は系統的に飼育前のものと非常に近縁であることが判明した。この結果より、メタン添加水槽で飼育したゴエモンコシオリエビは飼育前の外部共生菌相に存在したメタン酸化細菌を維持していたことが強く示唆された。これらのメタン酸化細菌はメタン飼育によって新たに環境中から獲得された可能性もあるが、いずれにせよ飼育前のゴエモンコシオリエビが宿しているメタン酸化細菌と系統的に近い細菌をメタン添加水槽でゴエモンコシオリエビは宿していることを示した。

外部共生菌相解析の結果、飼育前の菌相ではこれまでに機能を明らかにした プロテオバクテリアに属するメタン酸化細菌とプロテオバクテリアと プロテオバクテリアに属する硫黄酸化細菌が優占化していた。飼育後の菌相では プロテオバクテリアに属するメタン酸化細菌と硫黄酸化細菌が検出されたが、プロテオバクテリアに属する硫黄酸化細菌が検出されなくなった。また、16S rRNA 遺伝子の配列情報から プロテオバクテリアの硫黄酸化細菌は飼育後に多様性を減少させ、それらのクローン配列は従属栄養性の硫黄酸化細菌である *Cocleimonas flava* と高い相同性を示した。また、飼育後の菌相には上記のクローン以外にも プロテオバクテリアのメタノール資化性菌を含むプロテオバクテリア、Bacteroidetes、Verrucomicrobia、Planctomycetes、Actinobacteria と近縁なクローン配列が検出された。飼育後の菌相はメタンを出発物質とし、メタン由来の有機物質に依存して形成される北極の湖の菌相と類似していた(He *et al.*, 2015)。メタン添加水槽は閉鎖系であることから、水槽中のメタン酸化細菌が作り出すメタノールが蓄積しやすい環境にあり、また水槽は低温であるため、メタンが溶けた北極の湖で形成される菌相と相関性があったと示唆された。これらの結果から、ゴエモンコシオリエビをメタンで飼育すると、外部共生菌相から プロテオバクテリアと プロテオバクテリアの独立栄養性硫黄酸化細菌を失うが、プロテオバクテリアの従属栄養性硫黄酸化細菌は飼育環境下で生存すると考えられた。また、メタン添加水槽で飼育されたゴエモンコシオリエビの外部共生菌相はメタン酸化細菌だけ構成されていなかったことから、メタン由来の有機物で形成される細菌群にもゴエモンコシオリエビは栄養を支えられることが明らかとなった。

(3)メタン酸化細菌の純粋培養

メタン添加水槽の人工海水と同じ成分である培地や既知のメタン酸化細菌の培地を

用いて飼育後のゴエモンコシオリエビが宿すメタン酸化細菌の分離培養を数多く試みた。しかしながら、毛を植菌した後のバイアル瓶中のメタンは消費されるが、継代培養したバイアルのメタンの消費は認められなかった。また、継代培養したバイアルからはメタン酸化細菌に特異的な遺伝子の PCR 産物が得られなかった。つまり、菌相からメタン酸化細菌の純粋培養を目指す以前に宿主から切り離されたメタン酸化細菌を培養することができなかった。この結果は外部共生菌相のメタン酸化細菌の生育には宿主であるゴエモンコシオリエビが必須であることを示すかもしれない。今後はメタン酸化細菌に対してゴエモンコシオリエビが果たす役割を探ることが共生メタン酸化細菌の培養に向けて重要になると考えられた。一方でメタン飼育後の外部共生菌相から新規性の高いメタノール資化性菌の純粋培養には成功した。

<引用文献>

Watsuji T, Nakagawa S, Tsuchida S, Toki T, Hirota A, Tsunogai U *et al* (2010). Diversity and function of epibiotic microbial communities on the galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*. *Microb Environ* 25: 288-294.

Watsuji T, Nishizawa M, Morono Y, Hirayama H, Kawagucci S, Takahata N *et al* (2012). Cell-specific thioautotrophic productivity of epsilon-proteobacterial epibionts associated with *Shinkaia crosnieri*. *PLoS one* 7: e46282.

Watsuji T, Yamamoto A, Takaki Y, Ueda K, Kawagucci S, Takai K (2014). Diversity and methane oxidation of active epibiotic methanotrophs on live *Shinkaia crosnieri*. *ISME J* 8: 1020-1031.

Watsuji T, Yamamoto A, Motoki K, Ueda K, Hada E, Takaki Y *et al* (2015). Molecular evidence of digestion and absorption of epibiotic bacterial community by deep-sea crab *Shinkaia crosnieri*. *ISME J* 9: 821-831.

He R, Wooller MJ, Pohlman JW *et al* (2015). Methane-derived carbon flow through microbial communities in arctic lake sediments. *Environ Microbiol*, DOI: 10.1111/1462-2920.12773

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 5件)

Watsuji, T., Yamamoto, A., Motoki, K.,

Ueda, K., Hada, E., Takaki, Y., Kawagucci, S., and Takai, K. (2015). Molecular evidence of digestion and absorption of epibiotic bacterial community by deep-sea crab *Shinkaia crosnieri*. *ISME J* **9**: 821-831. 査読有
DOI:10.1038/ismej.2014.178

Watsuji, T., Takano, H., Yamabe, T., Tamazawa, S., Ikemura, H., Ohishi, T., Matsuda, T., Shiratori-Takano, H., Beppu, T., and Ueda, K. (2014). Analysis of the tryptophanase expression in *Symbiobacterium thermophilum* in a coculture with *Geobacillus stearothermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 10177-10186. 査読有
DOI:10.1007/s00253-014-6053-4.

Nakagawa, S., Shimamura, S., Takaki, Y., Suzuki, Y., Murakami, S.-i., Watanabe, T., Fujiyoshi, S., Mino, S., Sawabe, T.-o., Maeda, T., Makita, H., Nemoto, S., Nishimura, S.-I., Watanabe, H., Watsuji, T., and Takai, K. (2014). Allying with armored snails: the complete genome of gammaproteobacterial endosymbiont. *ISME J* **8**: 40-51. 査読有
DOI:10.1038/ismej.2013.131

Konishi, M., Nishi, S., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Watsuji, T., Nagano, Y., Yabuki, A., Nakagawa, S., Hatada, Y., and Horiuchi, J.-i. (2014). Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15, Lacking the Phytopathogenic *fas* Genes, Produces a Novel Glucotriose Lipid Biosurfactant. *Mar Biotechnol* **16**: 1929-1940. 査読有
DOI: 10.1007/s10126-014-9568-x.

〔学会発表〕(計2件)

和辻智郎、ゴエモンコシオリエビをメタンで飼育する～栄養面を支える共生メタン酸化細菌～、微生物生態学若手勉強会 YMCJ2015、2015年4月24日、東京大学 大気海洋研究所(千葉県、柏市)

和辻智郎、共生メタン酸化細菌を維持させてゴエモンコシオリエビを飼う、ブルーアース 2015、2015年3月19日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都、品川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和辻 智郎 (WATSUJI, Tomo-o)
独立行政法人海洋研究開発機構
深海・地殻内生物圏研究分野・研究員
研究者番号: 50409091