

分子生物学的手法と嫌気共生培養系を利用した新規メタン生成古細菌の単離の試み

水圏土壌環境研究室 牧 敬子
 指導教官 大橋 晶良
 原田 秀樹

1. 研究背景と目的

1-1. 研究目的

近年の遺伝子解析技術の発展に伴い、16S rRNA 遺伝子情報の蓄積とその分子系統解析技術は日々躍進を続けている。その結果、環境中にはいまだクローンとしての存在は確認されているものの、分離培養がなされていない微生物が多く存在していることが明らかになってきている (Fig.1)。本研究で対象とするメタン生成古細菌もそのひとつである。

メタン生成古細菌は嫌気環境下における有機物分解の最終段階であるメタン生成を担う微生物として知られており、現在 26 属 96 種の分離がなされている。その研究は Hungate らによって嫌気性微生物の培養法が確立され、さらに 1980 年代の分子生物学的手法を用いた解析法の発展に伴い、その分離例を増やしていった。

しかしここ最近新規のメタン生成古細菌の分離報告は極めて少ない。その理由のひとつとして、通常水素資化性のメタン生成古細菌を培養しようとしたとき、自然環境ではありえないような高水素分圧(200kPa 程度)で行っている点が挙げられる。実際の環境中における水素分圧は通常数十 Pa 程度であるが (Table.1)、それとかけ離れた条件で培養を行った場合、例えば高水素分圧での培養では水素に対する親和性の比較的低い水素資化性のメタン生成古細菌が優占して生育する可能性が考えられる。このような培養法では環境中にある微生物の中には培養できないものがあるのも当然であるといえよう。しかし逆にこのことから実際の環境に近い環境を構築すれば、今まで培養できなかった微生物を培養できる可能性も示唆される。

そこで低い分圧で水素をコンスタントに供給できる系からの新規メタン生成古細菌の分離を試みることにしたが、これを機械的に行うのは現状では非常に困難である。このことから本研究では低水素分圧条件でのみ反応が進むことが知られている嫌気共生培養系に着目した。

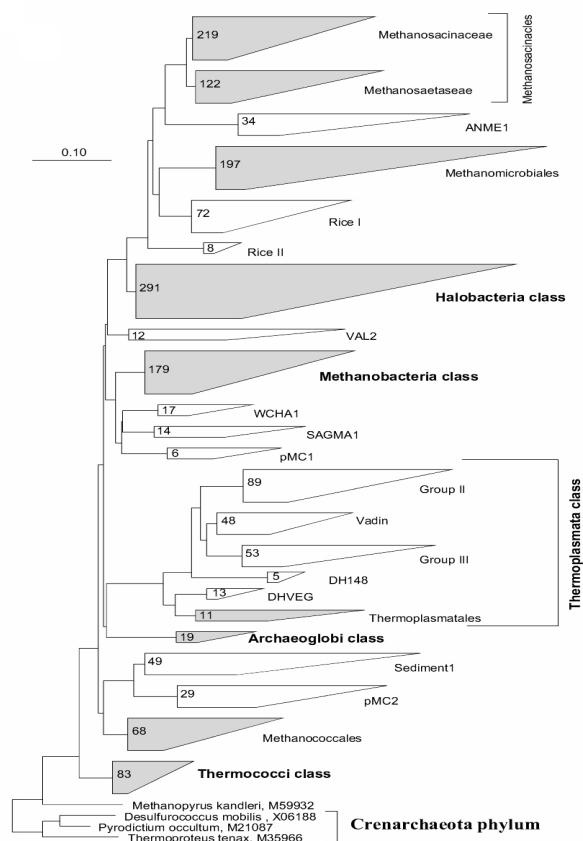


Fig.1 Phylogenetic trees showing present archaeal diversity derived from comparative analysis of 16S rRNA gene sequences. The trees were constructed using the ARB software package with an ARB sequence database consisting of more than 2500 complete and partial sequences. The numbers inside the wedges indicate total numbers of sequences included in each group. Phyla with cultivated representatives are in grey. Phyla known only from environmental sequences are in white and named after the first clones found from within the group. The scale bar represents 0.1 changes per nucleotide. (Refer to G. Jurgens, 2002)

Table. 1 Representative H₂ concentration in methanogenic habitats

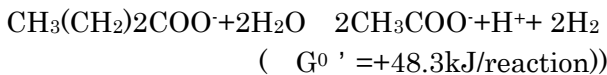
Habitat	H ₂ concentration (Pa)	Reference
Lake Mendota sediments	4.8	(1)
Knaak Lake sediments	3.7	(1)
Rice paddy	2.7	(2)
Sewage sludge	27	(1)
Rumen Fluid (basal level)	187	(3)
Rumen Fluid (post-feeding)	2000	(3)

(1) Conrad *et al.*, 1986, (2) Conrad *et al.*, 1987, (3) Smolenski and Robinson, 1988 METHANOGENESIS, Edited by James G. Ferry

1-2. 嫌気共生培養系を利用した新規メタン生成古細菌の分離

嫌気共生培養系とは脂肪酸、エタノール、安息香酸などの分解が、その物質を分解する細菌(嫌気共生細菌)と水素資化性メタン生成古細菌との水素を介した共生関係により進行する系のことである。これはすなわちプロピオン酸などの脂肪酸で嫌氣的に培養を行った場合、その分解を担う嫌気共生細菌とその際に生成される水素もしくはギ酸を除去する水素資化性メタン生成古細菌の2種類の微生物が系内に生育してくることを示す。

Fig.2 は酪酸の分解反応および水素からのメタン生成反応時の自由エネルギー変化に及ぼす水素分圧の影響を表したものである。安息香酸、プロピオン酸、エタノール、酪酸の濃度は1mMとして算出している。例えば酪酸を共生系で分解させる場合、嫌気条件下での低級脂肪酸の酸化反応は吸エルゴン反応であるため、生成物の濃度を下げないことにはこの反応は進行しない。酪酸からの水素生成反応を示す。



しかしメタン生成古細菌のような水素を利用可能な菌の共存があると、水素分圧が低下し、この反応は進行可能となる。ただしこの反応は水素分圧が 0.1P ~ 100Pa 程度に保たれていなければ進まない。ここから脂肪酸などの基質で培養を行えば、低分圧の水素をコンスタントにかつゆるやかに供給できると考えられ、これを利用することで低水素分圧で生育可能、もしくは新規の水素資化性メタン生成古細菌を選択的に培養できる可能性があるといえる。本研究ではいくつかの嫌気性環境サンプルを植種源とした嫌気共生培養系を利用することで新規のメタン生成古細菌の分離・培養を試みた。

2. 実験方法

集積培養を行うための植種源には高温(55)および中温(35)域で運転されている嫌気消化汚泥およびグラニューク汚泥、水田土壌の計6種類を使用した。これらを人工培地に植種し、エタノール(10mM)、酪酸(20mM)、プロピオン酸(20mM)もしくは安息香酸(5mM)を、比較系としての培養

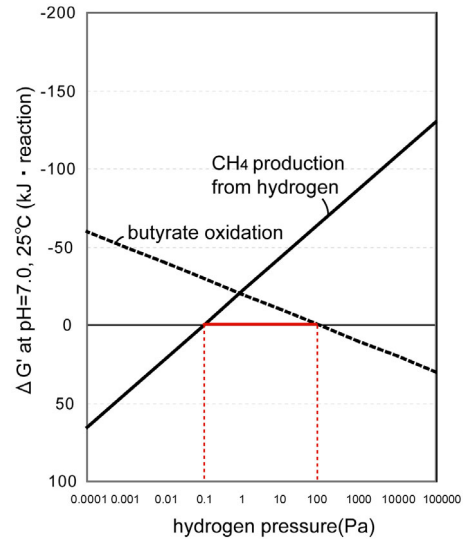


Fig.2 Thermodynamics relation of change of free energy and hydrogen partial pressure

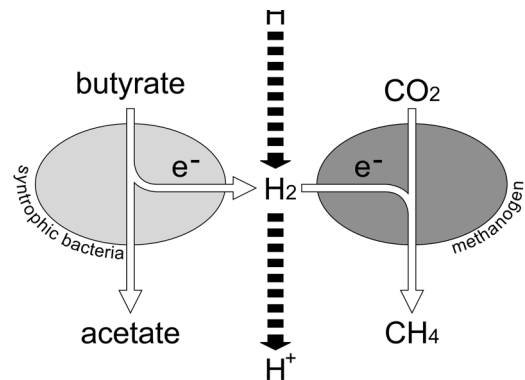


Fig.3 Theory of anaerobic syntrophic cultures by butyrate oxidation

系には水素(約 200kPa)を添加し、嫌氣的に培養した。サンプルからの DNA 抽出にはビーズビーター法を用いた。クローン解析には古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的な PCR プライマーセットを用いた。

3. 実験結果と考察

3-1. サンプル内の古細菌の構造解析のためのプライマーセットの改良

本研究では環境サンプル及び集積培養系内に存在する古細菌の構造解析を行ったが、このとき古細菌の 16S rDNA に特異的な DNA プライマーセットが必要であった。しかし既存のプライマーでは古細菌すべてを網羅することができず、特にクローンクラスターの検出ができなかったため、既存のプライマーとすでに分離されている古細菌の配列やクローンクラスターに含まれる配列と比較し、必要に応じて改良した。本研究では

UNIV1500R(Weisburg et al., 1991)-A109f(R. Gorbokopf et al., 1998)を改良したものを用いた(配列は Fig.4 に示すとおり)。

3-2. 環境サンプル内の古細菌の構造解析結果

植種源とした環境サンプル6種類内に存在する古細菌の構造解析を行ったところ、各サンプルについて古細菌の広い多様性が確認された。また一部のサンプルでは存在率は低いものの、クローンクラスターに属す配列もいくつか検出された。

3-3. 集積培養系の解析結果

環境サンプルを各種基質で集積培養を行った結果を以下に示す。

高水素分圧での培養

高水素分圧で培養を行った集積培養系(水素を基質として培養した系)のほとんどは、*Methanobacteriales* に属すすでに分離がなされている菌種 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*など)に近縁な古細菌の配列に高い相同性を示す微生物が系内で優占化し、そのときの水素分圧は 300kPa 程度であった。

低水素分圧での培養

低水素分圧で培養を行った集積培養系(水素以外を基質として培養した系)のほとんどは、*Methanomicrobiales* に属すすでに分離がなされている菌種 (*Methanospirillum hungatei*など)に近縁な古細菌の配列に高い相同性を示す微生物が系内で優占化し、そのときの水素分圧は 10 ~ 20Pa 程度であった。

ほとんどの集積培養系は上記のような結果になったが、一部の集積培養系ではクローンクラスターに属すクローンの配列がかなり優占的に得ることができた。その例を以下で述べる。

新規の *Methanomicrobiales* に属す古細菌

高温焼酎廃水グラニュール汚泥を高分圧の水素で培養したとき(水素分圧約 280kPa)、その系内では *Methanothermobacter thermautotrophicus* に 100%の相同性を示す微生物が 10 クローン中 10 クローン存在し

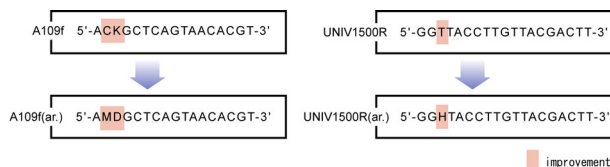


Fig.4 Improvement of DNA primer set for analysis of community structure of Archaea in anaerobic samples.

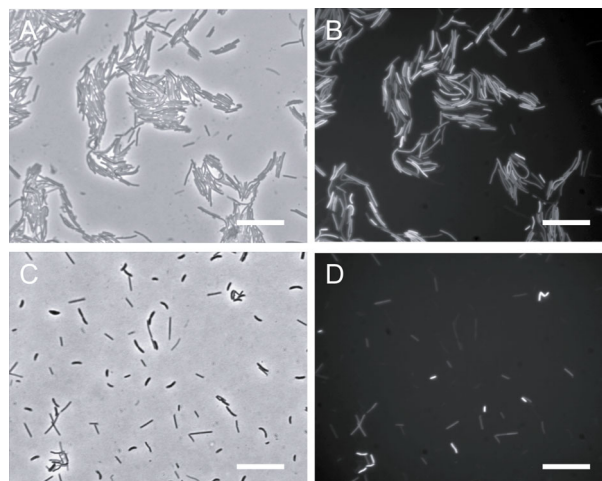


Fig.5-1 Photograph of S(Thermophilic shocho waste water granulesludge) enrichment culture. (A), (C) Phase contrast, (B),(D) Fluorescence of like-F420. (A), (B) Propionate(20mM) enrichment culture, (C), (D) Hydrogen (about 200kPa) enrichment culture; bar 10mm

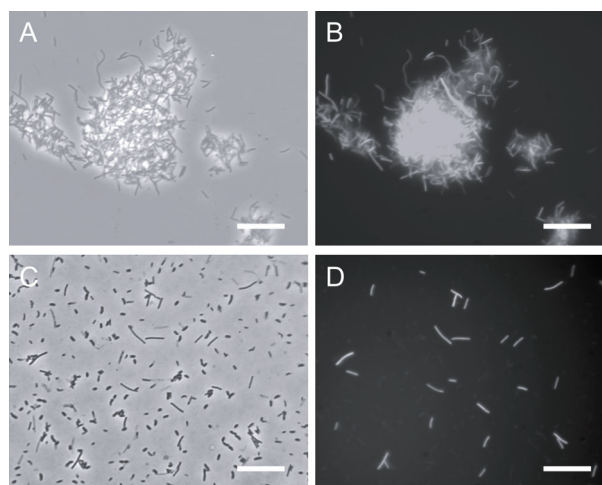


Fig.5-2 Photograph of PS(rice paddy field soil) enrichment culture. (A), (C) Phase contrast, (B),(D) Fluorescence of like-F420. (A), (B) Butyrate(20mM) enrichment culture, (C), (D) Hydrogen (about 200kPa) enrichment culture; bar 10mm

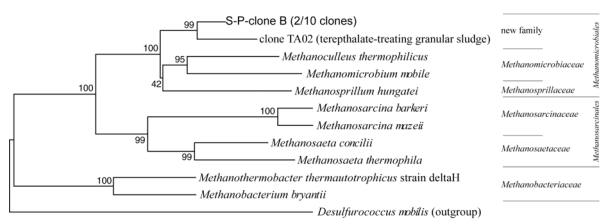


Fig.5-1 Phylogenetic tree showing the placement of a 16S rDNA clone recovered from a thermophilic propionate-degrading enrichment culture. The tree was constructed with the neighbor-joining method. The scale bar represents the number of changes of nucleotides per sequence position. The numbers at the nodes show the bootstrap values (percentage) obtained with 1,000 resamplings.

ていた。しかし同じ環境サンプルをプロピオン酸で集積培養を行った場合、その系内から Methanomicrobiales に属す科レベルで新しい古細菌の配列が得られた (Fig.5-1 および Fig.6-1)。

クローンクラスターに属す古細菌

長岡市の水田土壌を高分圧の水素で培養したとき (水素分圧約 290kPa)、その系内には *Methanobacterium* に高い相同性を示す微生物が 10 クローン中 9 クローン存在していた。しかし同じ環境サンプルを酪酸で集積培養を行った場合、その系内には完全なクローンクラスターである rice cluster に含まれるクローンの配列がかなりの高頻度 (4/10 クローン) で検出された (Fig.5-2 および Fig.6-2)。

rice cluster とは主に水田土壌から得られたクローンのみで構成された古細菌に含まれるクローンクラスターであり、環境中にかなりの率で存在していることが知られている (R. Gorbkopf et al., 1998)。

これらクローンクラスターに含まれる配列は元の環境サンプルの解析を行った時には全く検出されず、また高水素分圧の水素での集積培養系でも全く検出されなかったことから、低水素分圧での培養によってはじめて培養できた新規の古細菌であることが示唆された。

4. まとめ

嫌気共生培養系を利用して低分圧の水素を供給できる系を構築することで、今までは培養できなかった微生物の培養が可能であることが示唆された。

また高水素分圧での培養では *Methanobacteriales* に、低水素分圧での培養では *Methanomicrobiales* に属すメタン生成古細菌が主に培養されたことから、メタン生成古細菌の水素に対する親和性は 16S rDNA による系統によって分かっているのではないかという知見が得られた。

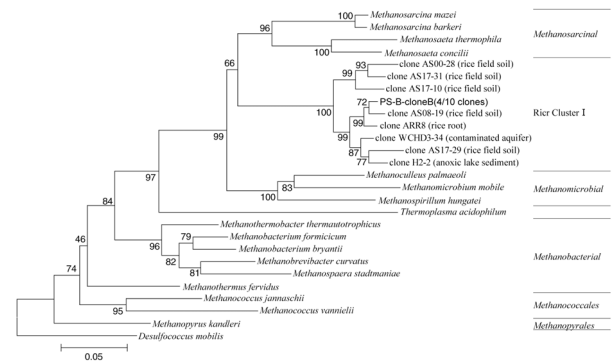


Fig.6-2 Phylogenetic tree showing the placement of a 16S rDNA clone recovered from a mesophilic butyrate-degrading enrichment culture. The tree was constructed with the neighbor-joining method. The scale bar represents the number of changes of nucleotides per sequence position. The numbers at the nodes show the bootstrap values (percentage) obtained with 1,000 resamplings.

【参考文献】

1. R. Gorbkopf, P. H. Janssen, W. Liesack, 1998, Diversity and Structure of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as Examined by Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval, Appl. Environ. Microbiol., 64:960-969
2. G. Jurgens, 2002, Molecular phylogeny of Archaea in boreal forest soil, freshwater and temperate estuarine sediment, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry