

# 嫌氣的メタン酸化古細菌の検出および培養の試み

水圏土壌環境制御研究室 宮下 藍

指導教員 山口隆司

## 1. はじめに

大気中へのメタン放出の抑制に関わる極めて重要な反応である嫌氣的メタン酸化反応は anaerobic methanotroph (ANME) -1、ANME-2 および ANME-3 と呼ばれる古細菌群が硫酸/硝酸還元細菌と共生することでその反応を担っていると推定されている<sup>1)2)3)</sup>。しかしながら、これら ANME 古細菌群はその増殖の遅さ<sup>4)</sup>や他の細菌との共生に依存した生育をする<sup>5)</sup>といった特徴を持つことから、人為的に培養することすら困難であり、分離株は存在しない。そのために ANME 古細菌の環境中での生態や生理学的特徴といった詳細な情報を得ることができていない。言い換えれば、嫌氣的メタン酸化反応を担っている ANME 古細菌群を分離し、純粋菌株を得ることができれば、嫌氣的メタン酸化反応の理解、温室効果ガスの削減、ひいては地球規模での炭素、硫黄および窒素循環の理解を大きく促進させることができるはずである。

本研究では、嫌氣的メタン酸化反応を担っている ANME 古細菌群を分離することを最終目標とした。ただし、上述したように嫌氣的メタン酸化反応を担う微生物の分離・培養は極めて難しいとされているため、従来の方法では最終目標に到底辿り着けない。そこで、我々は従来の培養法に分子遺伝学的手法を組み合わせた以下のような戦略を考えた。(1) ANME 古細菌が多く含まれている環境サンプルの取得、(2) (1) の ANME 古細菌を多く含む環境サンプルを特定するために、各 ANME 古細菌群の 16S rRNA に特異的なプライマーセットを作成し、16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析および定量 PCR を行う、(3) (2) の結果から特定した ANME 古細菌群を多く含む環境サンプルを植種源とし、嫌氣性微生物培養器による ANME 古細菌群の培養を行う、(4) (2) で確立した定量 PCR によりモニタリングをしな

がら ANME 古細菌の適切な培養条件を決定する、(5) ANME 古細菌が嫌氣性微生物培養器の中に高濃度で集積培養がなされていることを確認できたら、最終的に様々な培養法で分離を試みる。

## 2. 実験方法

古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析ならびに特異的なプライマーの設計には分子系統解析ソフト ARB を用いた。

海洋性の ANME 古細菌の培養には南海トラフおよび下北半島東方沖の深海堆積物 (海洋研究開発機構より提供) を植種源として用いた。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 海洋環境および陸域環境における ANME 古細菌の検出

嫌氣的メタン酸化反応は海洋堆積物においてよく観察される反応であるため、ANME 古細菌研究のほぼ全ては海洋環境を中心に進められてきた。実際に、私が研究を行っている海洋研究開発機構においても以前の研究結果から南海トラフおよび下北半島東方沖の海洋堆積物中で嫌氣的メタン酸化反応が起きていることが明らかとなっており、ANME に属するクローン配列も検出している。そこで、これらの海洋堆積物を ANME 古細菌の培養に用いることとした。培養を開始する前に、ANME 古細菌が海洋堆積物内に含まれていることを確認するために古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。その結果、全古細菌中の約 25% 程度を ANME 古細菌群が占めていることを確認した。続いて、本研究では海洋堆積物サンプルだけでなく陸域環境からも ANME 古細菌群の培養を試みることにした。

**Table 1. Samples from anaerobic environments analyzed in this study.**

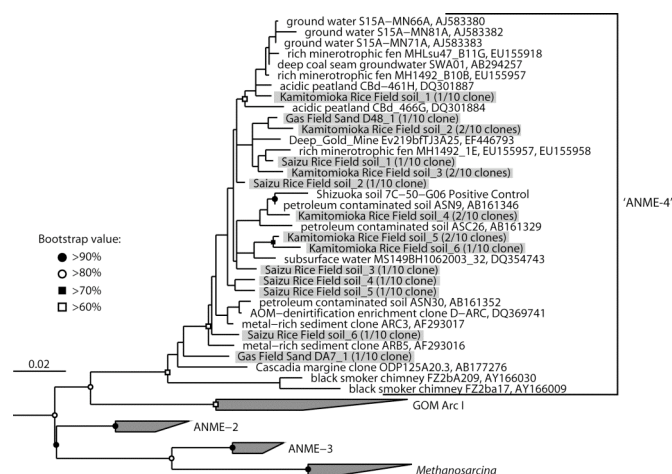
Sample no.	Sample type and Abbreviated name	Temperature (°C)	pH	ORP (mV)	DO (mg/liter)	Conductivity (S/m)	Treating waste/wastewater	Location (Latitude/Longitude)
1	水溶性ガス田 DA-50	27.5	7.3	-230	0.30	0.09	—	Chiba, Japan (—)
2	水溶性ガス田 FA-53	30.2	7.3	-232	0.31	0.09	—	Chiba, Japan (—)
3	水溶性ガス田 MOB-D48	21.5	8.0	-229	0.12	4.28	—	Chiba, Japan (35°24'31"N, 140°21'37"E)
4	水溶性ガス田 MOB-DA7	26.2	7.8	-225	0.18	4.86	—	Chiba, Japan (35°23'27"N, 140°16'43"E)
5	水田土壌 KT-RF	19.7	6.4	-187	1.27	60.50	—	Niigata, Japan (37°25'29.5"N, 138°47'11.5"E)
6	水田土壌 FS-RF	17.5	6.2	-140	3.87	29.70	—	Niigata, Japan (37°25'11.8"N, 138°47'14.9"E)
7	水田土壌 SZ-RF	20.5	6.1	-112	3.50	41.20	—	Niigata, Japan (37°25'33.8"N, 138°47'29.1"E)
8	蓮田土壌 NS-LF	20.1	6.2	-170	0.00	74.50	—	Niigata, Japan (37°30'57.2"N, 138°52'33.6"E)
9	畑土壌 TW-TF	—	—	—	—	—	—	Niigata, Japan (37°25'28.5"N, 138°46'56.6"E)
10	メタン発酵汚泥 TY-MDS	35	7.1	—	—	—	Municipal sewage sludge	Toyama, Japan (—)
11	メタン発酵汚泥 NUT-MDS	37	8.1	—	—	—	Municipal solid waste	Our laboratory
12	メタン発酵汚泥 JE-MDS	55	8.0	—	—	—	soil sludge	Niigata, Japan (—)
13	メタン発酵汚泥 SO-MDS	52	7.2	—	—	—	Wastewater from food process factory	Shizuoka, Japan (—)

その理由は、海洋性の ANME 古細菌は今まで多くの微生物学者が培養を試みているのにも関わらず、誰も全く培養できていないことにある。さらに、最大の理由としては海洋性の ANME 古細菌の倍加時間が極度に遅いことにある (40 日以上あるいは約 7.5 ヶ月と推定)。加えて、最近になって初めて、ANME 古細菌が淡水環境にも存在しているということが報告され、その淡水性の ANME 古細菌 (ANME-4) の倍加時間は数週間程度であると推定されている<sup>9)</sup>。これらのことから、海洋性の ANME 古細菌よりも陸域に生息している ANME 古細菌の方が培養できる可能性が高いと考えた。しかしながら、陸域環境における ANME 古細菌の情報は極めて乏しく、どのような陸域環境に ANME 古細菌が存在しているかは全くわかっていない。

そこでまず、現在までに国際塩基配列データベースに登録されている ANME 古細菌およびそれらに近縁な塩基配列情報を収集しデータベースを構築し、それらのデータベースと分子系統解析ソフト ARB を用いて古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを計 24 種類設計した。そして、これらのプライマーを用いて様々な嫌気環境から採取した 13 種類の環境サンプル (水田土壌、水溶性ガス田やメタン発酵汚泥等, Table 1) について PCR とクローニングを行うことにより、これらのサンプルに ANME 古細菌が

存在しているかどうかを調査した。その結果、水溶性ガス田からは ANME-1、ANME-2a および ANME-4 に属するクローン配列が、水田土壌からは ANME-4 に属するクローン配列を検出することに成功した (Fig. 1)。

これらの結果を ANME 古細菌が検出されたサンプルの水質分析結果と照らし合わせて考えると、これらの環境、特に水田土壌では硫酸および硝酸の濃度が低いことから、水田土壌から検出された ANME-4 古細菌は硫酸あるいは硝酸還元細菌と共生しているのではなく、鉄還元細菌と共生をしている可能性が考えられた (鉄還元を伴った嫌氣的メタン酸化反応は理論上起こりえる反応であるが、その反応を行う微生物の報告は今のところない)。



**Fig.1 Phylogenetic tree of 'ANME-4' Archaea based on comparative analysis of 16S rRNA gene sequences and showing the clones obtained in this study.**

これらのサンプルについては、まだ real-time PCR による ANME 古細菌の定量が完了していないため、これらを植種源とした ANME 古細菌の培養はこれからの課題である。

### 3.2 微生物学的廃水処理装置を参考にしたリアクターによる ANME 古細菌の培養の試み

ANME 古細菌の培養は微生物学的廃水処理技術で用いられている散水ろ床方式の down-flow hanging sponge (DHS) リアクターを参考にしたリアクターで行うことにした。微生物学的廃水処理技術で用いられるリアクターは、高濃度の微生物を長い時間リアクター反応層に保持することが可能であり、微生物と基質の接触効率が高いことから ANME 古細菌のような増殖速度の遅い微生物の培養に適していると考えた。特に本研究で用いた DHS リアクターは、スポンジを担体として用いるために、汚泥滞留時間を長く確保でき(=増殖の遅い ANME 古細菌をリアクターの内部に保持できる)、スポンジ担体が気相中にさらされているので、スポンジ内部にまで基質が届く(=ANME 古細菌の菌体量を稼げる)という点で優れていると考えた。

まず、先の解析で ANME 古細菌が多く含まれていることを確認した南海トラフと下北半島東方沖の海洋堆積物を植種源として本リアクターの運転を開始した。リアクターは第 1 世代型 (DHS-G1) と第 3 世代型 (DHS-G3, Fig. 2) の 2 台を用いた。リアクターの上部から電子受容体となる硫酸が含まれている人工海水を、下部から電子供与体となるメタンガスを供給し、10°C で運転を行った。毎日 pH、ORP、温度を測定しリアクターの経時変化を確認した (Fig. 3)。リアクターの ORP は硫酸還元細菌を培養することを考えると -200mV 以下を維持していることが理想だが、実際は -100~100mV となり不安定であった。そこで還元剤を  $\text{Na}_2\text{S}$  からさらに還元力の強い Ti (III)-NTA に変更した。また硫酸還元細菌による硫酸の減少を確認するために 1 ヶ月に 1 回程度水質分析を行ったが、明確なメタン消費および硫酸の減少は確認できなかった。

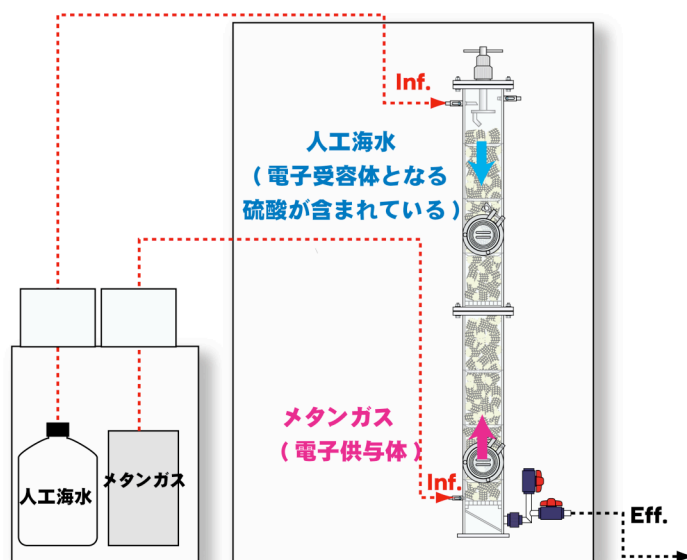
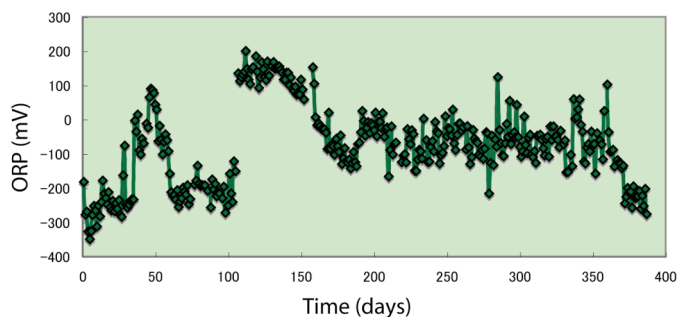


Fig. 2 Overall view of DHS-G3 reactor system for cultivation of ANME archaea.

DHS-G1 reactor (植種源: 南海トラフ深海堆積物)



DHS-G3 reactor (植種源: 下北半島東方沖深海堆積物)

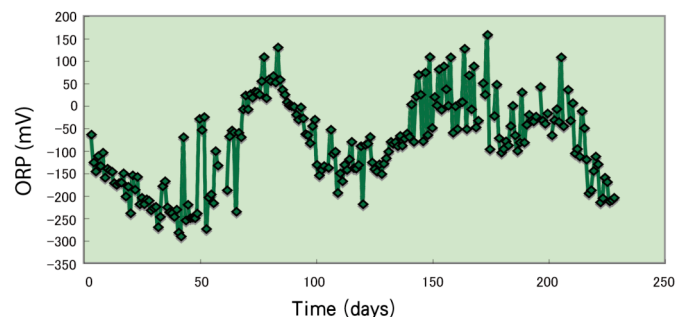


Fig. 3 Time courses of DHS-G1 and DHS-G3 reactor of ORP .

そこで、ANME 古細菌がうまくリアクター内に保持されていないのではないかと考え、DHS-G1 リアクターの運転開始 9 ヶ月後にリアクター内部からスポンジを取り出して古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った (Fig. 4)。その結果、植種前と 9 ヶ月の培養後の ANME 古細菌の割合に大きな変化はなく、リアクター内にきちんと汚泥が保持されていることが示唆された。そこで次は、リアクター内に保持されている微生物が活性化されていない可能性を考え、FISH 法を行った。FISH 法には、古細菌に特異的なプローブ Ar915 (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT -3') と細菌に特異的なプローブ EUB338 (5'-GC(A/T) GCC (T/A)CC CGT AGG (A/T)GT -3') を用いた。その結果、DHS-G1 (Fig.5, A-B) ならびに DHS-G3 (Fig.5, C-D) リアクターにおいて細菌と古細菌が共に活性化されていることを確認した。

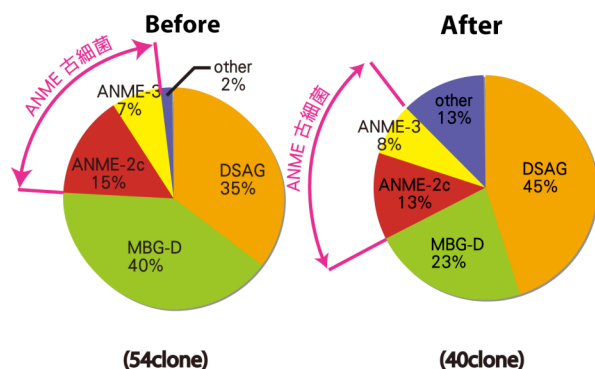


Fig. 4 Circle graph showing the rate of clones obtained in Nankai Trough sediment (left) and DHS-G1 reactor sponge (right).

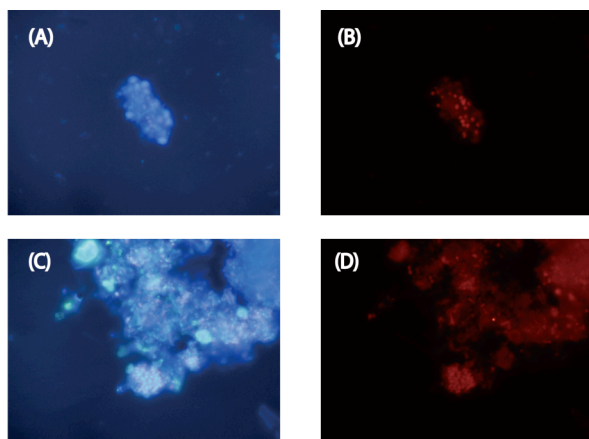


Fig. 5 Hybridization with fluorescein-monolabeled probe Ar915. DAPI staining (left) and fluorescent (right) micrographs are shown for DHS-G1 (A-B) and DHS-G3 (C-D) reactor.

#### 4. まとめ

本研究では、初めて水田やガス田から ANME 古細菌を検出することに成功した。また、DHSリアクターシステムを用いた ANME 古細菌の培養の試みは、現時点で培養には至っていないものの、クローン解析によりリアクター内に微生物が保持されていることを確認している。さらに FISH 法により、リアクター内の微生物は活性化されていることが明らかとなった。従って、この先 DHSリアクター内で ANME 古細菌が培養される可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) Hinrichs, K.U., Hayes, J.M., Sylva, S.P., Brewer, P.G., DeLong, E.F. 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*. 398 : 802-805.
- 2) Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F. 2001. Methane - consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*. 293 : 484-487.
- 3) Niemann, H., Elvert, M., Hovland, M., Orcutt, B., Judd, A., Suck, I., Gutt, J., Joye, S., Damm, E., Finster, K., Boetius, A. 2005. Methane emission and consumption at a North Sea gas seep (Tommellten area). *Biogeosciences Discussions*. 2:1197-1241.
- 4) Girguis, P.R., Cozen, A.E., DeLong, E.F. 2005. Growth and population dynamics of anaerobic methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a continuous-flow bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (7) : 3725-3733.
- 5) Orphan, V.J., Hinrichs, K.U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P., Hayes, J.M., DeLong, E.F. 2001. Comparative Analysis of Methane - Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1922-1934.
- 6) Raghoebaring, A.A., Pol, A., van de Pas - Schoonen, K.T., Smolders, A.J., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I., Schouten, S., Damsté, J.S., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Strous, M. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*. 440 : 918-21.