

嫌気共生培養法と特異的細胞分取技術を用いたメタン生成古細菌の分離・培養

水圏土壌環境制御研究室 矢代悠人

指導教員 山口隆司

1. はじめに

メタン生成古細菌 (以下、メタン菌) を分離・培養し、その詳細な生理学的特徴を調査することは非常に重要な課題の一つであるが、メタン菌の分離・培養は一般に困難であることが知られている。ある標的のメタン菌を純粋分離しようとした場合、その集積培養系内には非標的のメタン菌が混在している場合がほとんどで、それらは共に共通の基質を利用する 경우가しばしばある。従って、培養に依存した従来の分離手法を用いても、標的のメタン菌を選択的に培養することは難しく、純粋分離するには相当の時間と労力を必要とするという問題点を抱えていた。そこで本研究では、なるべく培養を介さず、機械的に効率よくメタン菌を分離する方法として、フローサイトメトリー (以下、FCM) の特異的細胞分取技術を応用したメタン菌の新規分離手法の開発を行った。

また、本研究の最終目標は新規なメタン菌の分離・培養であるから、嫌気共生培養法および従来の分離手法を用いたメタン菌の分離・培養の試みもあわせて行った。

2. 新規分離手法の開発

2-1. FCM および新規分離手法の概要

FCM は定常的に流れている液滴 (droplet) に細胞が含まれ、そこにレーザーが照射された際に生じる蛍光や散乱光のデータに基づいて標的の細胞のみを特異的に分取 (sorting) することができる装置である (Fig. 1 参照)。一般に細胞の内部構造を反映する Side scatter (SSC) や細胞の形態を反映する Forward scatter (FSC) と言った散乱光をパラメータとして解析し、それらに基づいて標的細胞を識別することができる。これに加えて、メタン菌には F₄₂₀ という補酵素があるために紫外線付近の波長を持った光を当てると青白い自家蛍光を発する特徴を有している。従って、メタン菌について 408 nm の波長を持った Violet レーザーを用いて FCM 解析を

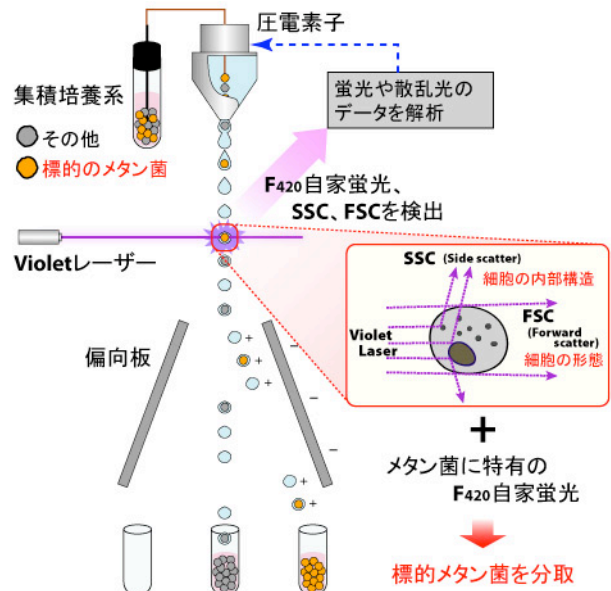


Fig. 1 Principle of specific cell (methanogens) sorting technique.

行えば、SSC や FSC だけでなくメタン菌特有の F₄₂₀ 自家蛍光も解析することが可能であると考えられる。SSC や FSC、F₄₂₀ 自家蛍光といったパラメータをうまく組み合わせることによって、標的のメタン菌のみを識別し、特異的に分取することができれば、従来の培養に依存した分離手法を用いるよりも、なるべく培養を介さず、より簡単に短時間で分離・培養することが理論的には可能である。

2-2. 実験方法

実験には Becton Dickinson の FACS Aria という機種のプロセスサイトメータを用いた。また、系統学的分類、細胞形態、細胞壁構造を網羅するように選出した 11 種のメタン菌や大腸菌を用いて各解析を行った。

2-3. 実験結果

2-3-1. F₄₂₀ 自家蛍光に基づいたメタン菌識別実験

F₄₂₀ 自家蛍光によってメタン菌を識別できるか検証するために大腸菌 (*Escherichia coli*) とメタン菌

(*Methanococcus maripaludis*) を用いてFCM解析を行った。Fig. 2 にそれぞれのFCM挙動および混合した際のFCM挙動を示す。縦軸は細胞形態を表すFSC、横軸は蛍光強度である。その結果、F₄₂₀自家蛍光に依存した蛍光強度の違いによってメタン菌を識別できることが証明された。

2-3-2. メタン菌のFCM挙動の把握

系統学的分類、細胞形態、細胞壁構造を網羅するように選出した11種のメタン菌についてFCM解析を行い、得られるFCM挙動についての把握を行った。その結果、系統学的分類および細胞壁構造の違いはFCM挙動に著しい影響を与えるものではなかった。しかしながら、桿菌と球菌に代表される細胞形態の違いによって得られるFCM挙動にある傾向が観察された。Fig. 3 に桿菌を代表して *Methanospirillum hungatei*、および球菌を代表して *Methanosphaera stadtmanae* のFCM挙動を示す(縦軸:細胞の内部構造を表すSSC、横軸:蛍光強度)。桿菌では右肩上がりのある程度幅を持ったFCM挙動である傾向が観察され、球菌では桿菌に比べ集団としてまとまりのよいFCM挙動である傾向が観察された。これに加えて、SSC、FSCおよびF₄₂₀自家蛍光強度といった各パラメータはそれぞれのメタン菌毎に固有の値を持っていたため、メタン菌が混在した中からある特定のメタン菌を識別し、分取することは可能であると推察された。

2-3-3. 混合系における標的メタン菌の分取実験

これまでの実験により得られた基礎データをもとに、人為的に構築した2種のメタン菌の混合からそれぞれのメタン菌をどの程度の特異性を持って分取することができるのかを検証するために、桿菌+桿菌 (*Methanobacterium formicicum* + *Methanocella paludicola*)、桿菌+球菌 (*Methanobacterium formicicum* + *Methanosphaera stadtmanae*) および球菌+球菌 (*Methanosphaera stadtmanae* + *Methanoculleus chikugoensis*) の3パターンの混合系について実験を行った。それぞれ混合する前に pure culture の状態で一度FCM解析を行い、FCM挙動の把握と単位時間あたりのイベント数を確認した。そしてイベント数が等しくなるように2種のメタン菌を混合し、再度FCM解析を行った。そして混合したそれぞれのメ

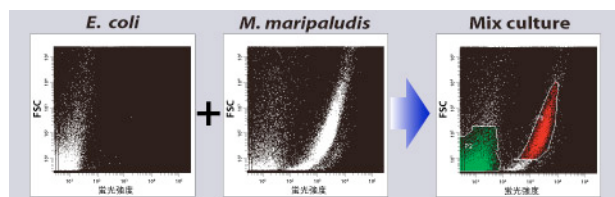


Fig. 2 FCM behaviors of *E. coli*, *M. maripaludis* and these artificial mixture.

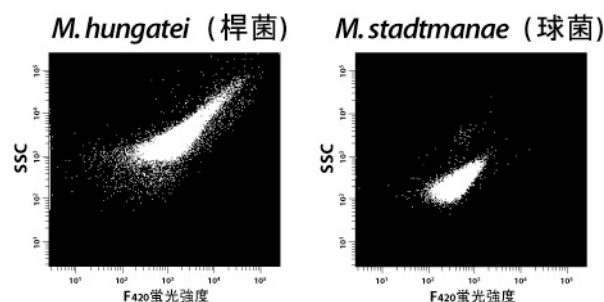


Fig. 3 FCM behaviors of rod-shaped methanogen (*Methanospirillum hungatei*) and coccoid-shaped methanogen (*Methanosphaera stadtmanae*).

タン菌の集団と思われる位置に設定した gate によって分取したメタン菌細胞について顕微鏡観察を行った。その際、全2,000細胞をカウントし、そのうちの標的メタン菌細胞の存在割合を算出することによって、分取したメタン菌の特異性を数値で評価した。桿菌+桿菌の混合系の解析結果では、P1(赤)の gate から分取されたメタン菌2,000細胞中、標的の *M. paludicola* は67.9%であり、P2(緑)の gate から分取されたメタン菌細胞のうち95.8%は標的の *M. formicicum* であった (Fig. 4)。同様に、桿菌+球菌の混合系ではP1(赤)の gate から分取された標的の *M. stadtmanae* は85.7%であり、P2(緑)の gate から分取された標的の *M. formicicum* は79.8%であった (Fig. 5)。球菌+球菌の混合系ではP1(赤)の gate から分取された標的の *M. stadtmanae* は96.6%であり、P2(緑)の gate から分取された標的の *M. chikugoensis* は97.4%であった (Fig. 6)。以上の3つの混合系において標的のメタン菌を分離しようとした場合、70-95%以上の特異性を持って分取できることが示唆された。ある集積培養系において、標的のメタン菌の population が著しく低く、培養による選択的集積が不可能な場合でも、本分離手法を用いることによって、標的メタン菌の集積度合いを迅速に効率良く上げることが可能であると推察された。

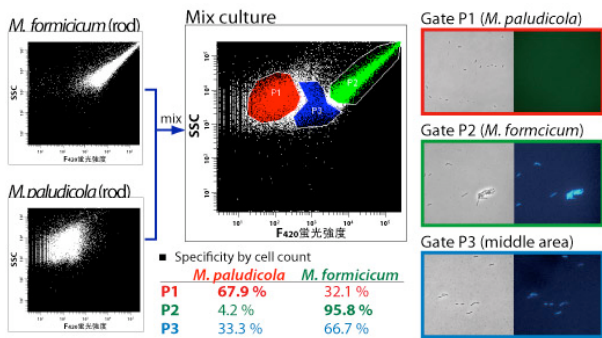


Fig. 4 FCM behaviors of artificial mix culture of rod- and rod-shaped methanogens (*Methanobacterium formicicum* and *Methanocella paludicola*) and these specificities that sorted each methanogens.

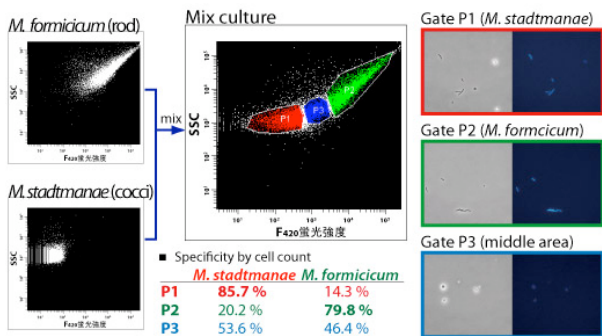


Fig. 5 FCM behaviors of artificial mix culture of rod- and coccoid-shaped methanogens (*Methanobacterium formicicum* and *Methanosphaera stadtmanae*) and these specificities that sorted each methanogens.

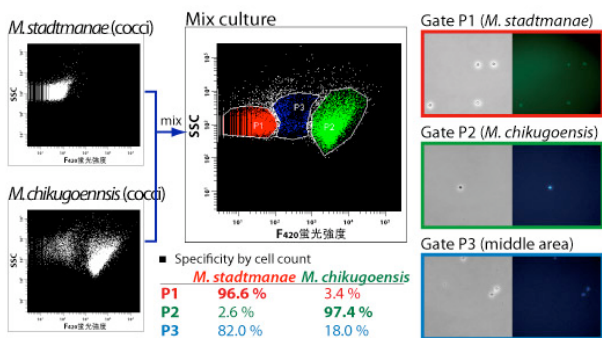


Fig. 6 FCM behaviors of artificial mix culture of coccoid- and coccoid-shaped methanogens (*Methanosphaera stadtmanae* and *Methanoculleus chikugoensis*) and these specificities that sorted each methanogens.

2-3-4. FCM 回収細胞の culturability の評価

嫌気性微生物であるメタン菌を空气中設置されたフローサイトメータで扱っていたという問題を抱えていた。これでは、たとえ標的のメタン菌を特異的に分取できたとしても、その後培養に繋げることはできない。この問題を解決する最もシンプルな改善策はフローサイトメータを嫌気チャンバー内

に設置することだが、これは現実的に考えて不可能であった。そこで以下の3つの対策を講じたうえで、FCM 回収細胞の culturability を評価した。

- 1) シース液 (droplet を形成する液体) に還元剤を投入することによって droplet を嫌氣的にした。
- 2) サンプルチューブに多量の培養液サンプルを入れ、FCM に供されるサンプルへの空気の汚染を可能な限り抑えた。
- 3) コレクションチューブに還元剤入りの培地を入れておき、分取されてきたメタン菌が着水するように工夫することで、直接空気に暴露されないように改善した。

以上のような対策を講じた結果、FCM で分取したメタン菌細胞でも再度培養することが可能であった。例えば、一般に培養し易い *Methanobacterium formicicum* や *Methanothermobacter thermautotrophicus* といったメタン菌だけでなく、*Methanoregula sp.* のような培養が困難と言われるメタン菌についても培養することは可能であった。

2-4. 小括 (新規分離手法開発)

大別して4ステップの基礎実験を行うことによって本新規分離手法の有用性、実用性を評価してきた。その結果、メタン菌が混在した系からそれぞれのメタン菌を 70-95%以上の特異性を持って分取することが可能であった。加えて、FCM で分取したメタン菌でも再度培養することは可能であった。以上の結果から、本新規分離手法は、ある集積培養系内に存在する標的メタン菌の集積度合いを培養を介することなく且つ迅速に高めることが可能であり、標的メタン菌の分離・培養を助ける“メタン菌分離支援技術”として有効であることが示された。一度で完全に純粋分離することは決してできないが、本分離手法を適用することで、迅速且つ効率的に標的メタン菌の population を高め、純粋分離に至る近道となる可能性が示唆された。

3. 新規なメタン菌の分離・培養の試み

3-1. 培養条件および解析方法

4種の嫌気性消化汚泥 (G3; treating municipal sewage sludge, SMS; treating brewery wastewater sludge, YMS; treating brewery wastewater sludge, KTS; treating food processing wastewater sludge) を植種源として嫌

気共生培養によって新規なメタン菌の分離培養を試みた。培地は Imachi らの方法に従った (Imachi *et al.*, 2009)。培養基質はプロピオン酸 (20 mM) および酪酸 (20 mM) を用いた。還元剤には sodium sulfide/cysteine (1.5 mM) および titanium (III) citrate (1 mM) を用いた。以上のような培養条件をそれぞれ duplicate で、全 32 の培養系を構築した。

植種汚泥および集積培養系における微生物の同定には、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット、Ar109f および Uni1490r を用い、TA cloning kit (Invitrogen) によってクローンライブラリを作成した。得られたクローンの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定には BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) と automated sequence analyzer (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) を用いた。系統解析には ARB program を用いた。

3-2. 培養結果および系統解析結果

まず、植種源に用いた嫌気性汚泥内の古細菌の群集構造を調べるため、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った (結果示さず)。次に、上記培養条件に従って嫌気共生培養を行った。酪酸を基質として用いた培養系では約 1 週間、プロピオン酸を基質とした培養系では約 1 ヶ月で微生物の増殖が観察された。全ての集積培養系において基質の分解に伴ってメタンが生成されており、その時の水素分圧は約 10-30 Pa 程度であった。

続いて、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行い、集積培養系内のメタン菌の同定を試みた。各集積培養系から無作為に 10 クロンの選択し、それらクローンの塩基配列を決定した後、分子系統解析を行った。その結果、全ての集積培養系から *Methanomicrobiales* 目の group E1/E2 に属するクローン配列が検出され、中でも特に G3 および SMS を植種源とした集積培養系からは高頻度に検出された (Fig. 7)。

Group E1/E2 は *Methanomicrobiales* 目の中の科レベルの clade であり (Hales *et al.*, 1996; Bräuer *et al.*, 2006b; Galand *et al.*, 2002; Cadillo-Quiroz *et al.*, 2006)、ここ数年でようやく分離株 (Bräuer *et al.*, 2006a; Cadillo-Quiroz *et al.*, 2008; Imachi *et al.*, 2008) が報告されたグループである。加えて、地球上の様々な嫌

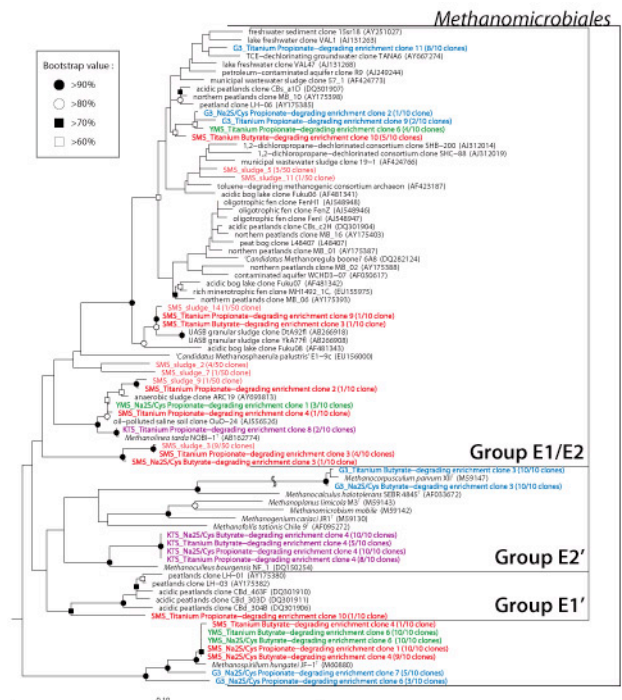


Fig. 7 Phylogenetic tree showing 16S rRNA gene clones obtained in this study among the order *Methanomicrobiales*. The based tree was constructed with the neighbor-joining method. The bootstrap values (percentage) obtained with 1000 resampling analysis.

気環境からクローンが検出されており、非常に多様性の大きいグループである。

3-3. 分離の試みおよび純粋性の評価

嫌気共生培養によって group E1/E2 に属するようなメタン菌を集積培養することに成功した。そこで嫌気共生培養による希釈培養を行い、標的メタン菌の集積を試みた。それに次いで、ロールチューブ法および希釈培養法を用いて、標的メタン菌の分離を試みた。ロールチューブ法を用いた培養系では 2 ヶ月程度経ってもコロニーの形成は観察されなかった。しかしながら、これと同時に希釈培養系 (植種源; SMS 汚泥、培養基質; プロピオン酸、還元剤; titanium (III) citrate) から形態的に単一の標的のものと思われるメタン菌をほぼ純粋化することに成功した。これには riphampicin という RNA 合成を阻害する抗生物質を加えて培養を行ったことによって、標的メタン菌を純粋化することができたと推察された。Group E1/E2 に属する 'Candidatus Methanoregula boonei' は riphampicin を加えて培養することによって group E1/E2 に属する新規なメタン

菌を培養することに成功したと報告しているためである (Bräuer *et al.*, 2006a)。

純粋化したと思われるメタン菌の純粋性を確かめるため、培養に基づいた評価と Direct sequence による評価を行った。硫酸や糖を基質として培養を行った結果、標的メタン菌以外のメタン菌や硫酸還元菌、その他雑多な細菌等が増殖してこないことを確認し、培養ベースで本培養系が純粋であることが証明された。続いて Direct sequence による評価では、単一のきれいな波形データおよび塩基配列が決定され本培養系が純粋であることを証明した。このとき Bacteria に特異的なプライマーを用いて PCR を行ったが、それ由来のバンドは確認されなかった。

3-4. 菌学的特徴の決定および比較

本研究において分離・培養に成功したメタン菌の菌学的特徴の決定を行った。その結果を Table 1 にまとめる。桿菌状のメタン菌で幅 0.5 μm 、長さ 1.0-2.6 μm であった。このとき細胞によっては 7 μm 以上にもなるものも観察された。培養後期には球菌状に変化する様子が観察された。また、細胞には節のようなものが様々な場所に観察され、細胞分裂は asymmetrical におこる様子が観察された (Fig. 8)。

このメタン菌はギ酸および水素を利用してメタン生成を行い、増殖する。増殖に際しての至適 pH は 7.4 (range; 7.0-7.6) であり、至適温度は 30-33 $^{\circ}\text{C}$ (range; 10-40 $^{\circ}\text{C}$) であった。G+C 含量は HPLC によって算出したところ、56.2 mol% であった。acetate (1 mM) もしくは Yeast extract (0.01 %) を増殖に要求した。coenzyme-M (0.5 mM) は要求性はなかったものの、増殖を著しく促進させた。

16S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析を行った結果、新規メタン菌は *Methanomicrobiales* 目の group E1/E2 に属しており、'*Candidatus Methanoregula boonei*' と最も近縁であった (16S rRNA 遺伝子の相同性; 96.3%)。メタン生成に関わる機能遺伝子 *mcrA* (methyl-coenzyme M reductase) の塩基配列についても 16S rRNA 遺伝子同様に最も近縁な種は '*Candidatus Methanoregula boonei*' であった (*mcrA* 遺伝子の相同性; 85.4%)。この 96.3% という値は種レベルで違うということを示している (Stackebrandt & Goebel, 1994; Keswani & Whitman, 2001)。また、order *Methanomicrobiales* の中の既知メ

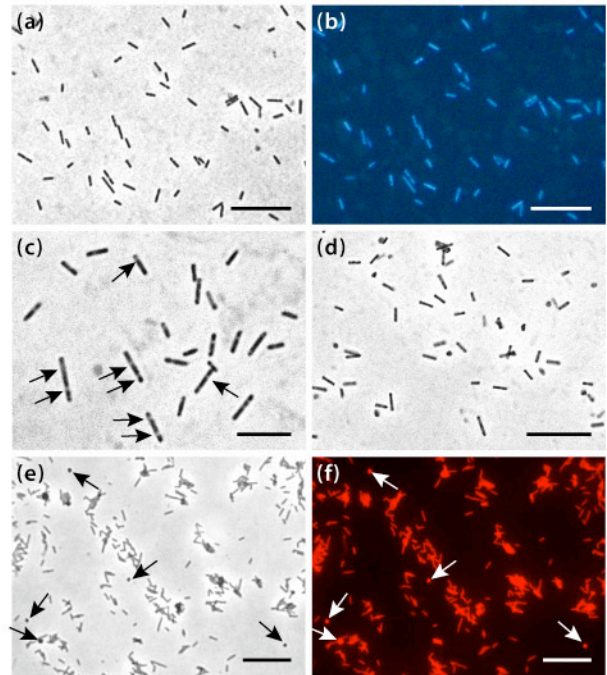


Fig. 8 Photomicrographs of strain SMSPT^T grown on formate (40 mM) media supplemented with acetate (1 mM), yeast extract (0.01 %) and coenzyme-M (0.5 mM).

(a & b) Photomicrographs of a middle-exponential phase culture obtained by phase contrast (a) and fluorescence (b) microscopy indicating the presence of the methanogen-specific coenzyme F₄₂₀ in identical fields. (c) Asymmetrical cell division in rod cells of strain SMSPT^T, and arrows indicate the asymmetrical division points. (d) Phase contrast micrograph of a late-exponential phase culture contained rod and coccoid type cells. (e & f) FISH of SMSPT^T cells. Phase contrast (e) and fluorescence (f) images of strain SMSPT^T cells stained with probe SMSPT29. Arrows in (e, f) indicate that the coccoid cells. Bars, 10 μm (a-b, & d-f) and 5 μm (c).

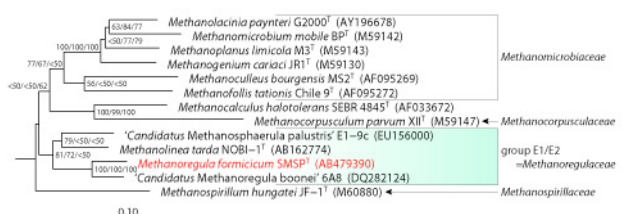


Fig. 8 Phylogenetic tree of the order *Methanomicrobiales* based on comparative analysis of 16S rRNA gene sequences, showing the placement of the isolated methanogenic archaeon strain SMSPT^T (*Methanoregula formicicum*). The tree was calculated based on a distance matrix analysis of 16S rRNA gene sequence (neighbor-joining tree). Bootstrap percentage was obtained from neighbor-joining (first value), maximum-parsimony (second value) and maximum-likelihood (third value) methods based on 1000 replicates. The accession number of each reference sequence is shown in parentheses. Bar, 0.1 nucleotide changes per sequence position.

タン生成古細菌である genus *Methanoculleus* に属する種間の相同性は 96.3-96.9 % であり、genus *Methanofollis* に属する種間の相同性は 95.2-95.6 % であったことから、この新規メタン菌は '*Candidatus Methanoregula boonei*' と同属にすべきであると考えられる。加えて、細胞の形態や増殖温度を見ても新

Table 1 Differential characteristics between strain SMSP[†], other members in the group E1/E2 within the order *Methanomicrobiales*.

Data from strain SMSP[†] is from this study. Data from other species are taken from the following studies: '*Candidatus Methanoregula boonei*' (Bräuer *et al.*, 2006a), '*Candidatus Methanosphaerula palustris*' (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2008), and '*Methanolinea tarda*' (Imachi *et al.*, 2008). Abbreviations, ND, not determined; -, negative; +, positive; ±, variable. Numbers in parentheses for the optimum temperature, pH and NaCl concentration indicate the range allowing growth. *Irregular coccoid cells with 0.5-1.0 µm in diameter are observed in the middle to late-exponential culture. †Cells sometimes become up to 7 µm long. ‡Cells sometimes become spherical with a diameter of 0.3-0.8 µm. §Growth is greatly stimulated. ¶The G+C content of the genome DNA was determined by full genome sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). #Cells often form multicellular filaments longer than 8 µm in the syntrophic propionate-degrading enrichment culture.

| Characteristic | strain SMSP [†] | ' <i>Candidatus Methanoregula boonei</i> ' 6A8 | ' <i>Candidatus Methanosphaerula palustris</i> ' E1-9C | <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1 [†] |
|---|--------------------------|--|--|---|
| Cell morphology | Rod* | Rod‡ | Cocci | Rod |
| Cell width (µm) | 0.5 | 0.2-0.3 | 0.5-0.8 | 0.7-1.0 |
| Cell length (µm) | 1.0-2.6† | 0.8-3.0 | 0.5-0.8 | 2-8# |
| G + C content (mol%) | 56.2 | 54.5¶ | 55.4¶ | 56.3 |
| Optimum temperature (°C) | 30-33 (10-40) | 37 (10-40) | 30 (7-37) | 50 (35-55) |
| Optimum pH | 7.4 (7.0-7.6) | ~5 (4.0-5.8) | 5.3-5.5 (4.8-6.5) | 7 (6.7-8.0) |
| Optimum NaCl (g l ⁻¹) | 0 (0-10) | ND | ND | 0 (0-15) |
| Formate utilization for growth and methane production | + | - | ND | + |
| Coenzyme-M requirement for growth | -§ | + | + | ND |

規メタン菌は '*Candidatus Methanoregula boonei*' と非常に似た特徴を持っている。新規メタン菌および '*Candidatus Methanoregula boonei*' を含む Group E1/E2 に属するメタン生成古細菌 4 種についてその特徴を表にまとめた (Table 1)。例えば、細胞の形態はどちらも桿菌と球菌の 2 タイプあることは共通しているし、細胞分裂が asymmetrical におこることも共通している。さらに、至適温度は新規メタン菌が 30-33 °C、'*Candidatus Methanoregula boonei*' が 37 °C と中温域に集中しているし、増殖可能な温度範囲は 10-40 °C と同じである。しかし、至適 pH 値だけは新規メタン菌が pH 7.4 と中性付近であるのに対し、'*Candidatus Methanoregula boonei*' が pH 5.1 と酸性側によっている。以上のような理由から、この新規メタン菌は *Methanoregula* 属 (candidatus) の新種であると考えられた。また、group E1/E2 を new family として提案可能であると考察した。

3-5. 小括 (新規なメタン菌の分離・培養の試み)

嫌気共生培養法を用いることによって、*Methanoregula* 属 (candidatus) の新種であるメタン菌を分離・培養することに成功した。この新規メタン菌を *Methanoregula formicicum* strain SMSP として提案するべく、International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) ジャーナルに投稿する論文を執筆した。そしてこの論文で group E1/E2 を new family、'*Methanoregulaceae*' として提案した。

4. 総括

メタン菌の新規分離手法を開発した結果、標的メタン菌の分離・培養を助ける“メタン菌分離支援技術”として有効な手法を開発した。

嫌気共生培養法を用いて新規なメタン菌の分離・培養を試みた結果、group E1/E2 に属する新規なメタン菌 '*Methanoregula formicicum* strain SMSP' を分離・培養することに成功した。

5. 参考文献

- Bräuer, S. L., Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J. B. & Zinder, S. H. (2006a). Isolation of novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature* **442**, 192-194.
- Bräuer, S. L., Yashiro, E., Ueno, N. G., Yavitt, J. B. & Zinder, S. H. (2006b). Characterization of acid-tolerant H₂/CO₂-utilizing methanogenic enrichment cultures from an acidic peat bog in New York State. *FEMS Microbiol Ecol* **57**, 206-216.
- Cadillo-Quiroz, H., Bräuer, S., Yashiro, E., Sun, C., Yavitt, J. & Zinder, S. (2006). Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environ Microbiol* **8**, 1428-1440.
- Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J. B. & Zinder, S. H. (2008). Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of novel hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2059-2068.
- Galand, P. E., Saarnio, S., Fritze, H. & Yrjälä, K. (2002). Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 441-449.
- Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Kamagata, Y., Ohashi, A. & Harada, H. (2008). *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 294-301.
- Keswani, J. & Whitman, W. B. (2001). Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 667-678.
- Imachi, H., Sakai, S., Nagai, H., Yamaguchi, T. & Takai, K. (2009). *Methanofollis ethanolicus* sp. nov., an ethanol-utilizing methanogen isolated from a lotus field. *Int J Syst Evol Microbiol* in press.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.