

2014年度 長岡技術科学大学大学院 工学研究科 博士学位論文

未培養メタン生成アーキアの系統学的位置の特定と
海底堆積物からの嫌気共生細菌の培養の試み

エネルギー・環境工学専攻

齋藤 弥生

主査：長岡技術科学大学	山口隆司 教授
副査：長岡技術科学大学	小笠原涉 准教授
長岡技術科学大学	高橋祥司 准教授
長岡技術科学大学	姫野修司 准教授
海洋研究開発機構	井町寛之 主任研究員

—目次—

第1章 序論

第1節 本研究の背景と目的 1

第2章 既往の知見

2-1 嫌気条件下における有機物分解 3
2-2 メタン生成アーキア 4
2-3 メタン生成環境における嫌気共生細菌 8
2-3-1. 嫌気酢酸酸化共生菌 12
2-3-2. 嫌気酪酸酸化共生菌 16
2-3-3. 共生機構 19
2-4 メタン生成アーキアと嫌気共生細菌の生育場所 20
2-4-1. メタン生成条件における排水処理システム 20
2-4-2. 枯渇油田地下圏域 21
2-4-3. 海洋環境 21
2-4-4. 水田 24
2-4-5. 動物の腸および糞便 25
2-5 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)ラベルを触媒酵素と
して用いた FISH 法 25
参考文献 28

第3章 未培養メタン生成アーキアの系統学的位置の特定の試み

第1節 目的及び概要 38

第2節 実験方法

2-1. 解析に用いた嫌気グラニュール汚泥の概要 39
2-2. クローンライブラリーの作成と分子系統解析 40
2-3. Clone-FISH 用のクローン作成方法 41
2-4. FISH 用サンプルの固定 41
2-5. FISH 法適用のためのグラニュール汚泥の分散化 42
2-6. 16S rRNA を標的とした FISH 法 42
2-7. *mcrA* 遺伝子に特異的なポリヌクレオチドプローブの合成 43
2-8. *mcrA* 遺伝子を標的とした FISH 法 44
2-9. WCHA1-57 アーキアの培養培地 44
2-10. WCHA1-57 アーキアの培養条件 44
2-11. WCHA1-57 アーキア細胞の増殖確認 45

第3節 実験結果および考察

3-1. 未知 *mcrA* 遺伝子の探索と 16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析 46
3-2. 標的 *mcrA* 遺伝子に特異的なポリヌクレオチドプローブの合成 49
3-3. ポリヌクレオチドプローブを用いた two-pass TSA FISH 53
3-4. 標的アーキア細胞の 16S rRNA を標的とした FISH 法および
CARD-FISH 法 55
3-5. WCHA1-57 アーキアの集積培養の試み 56

第4節 小括 56

参考文献 58

第4章 海底堆積物からの嫌気共生細菌集積培養の試み

第1節 目的および概要 62

第2節 実験方法

2-1. DHS リアクターによる嫌気共生細菌の一次集積培養の試み	
2-1-1. 植種源に用いた深海底コア堆積物サンプル	63
2-1-2. DHS リアクターの概要と運転条件	64
2-1-3. 化学分析	66
2-1-4. サンプルング	67
2-1-5. クローンライブラリーの作成と分子系統解析	68
2-2. バッチ式培養法による嫌気共生細菌の二次集積培養の試み	
2-2-1. 植種源	68
2-2-2. 培養培地	68
2-2-3. 培養条件	69
2-2-4. 集積培養系内の微生物種の同定	69
第3節 実験結果および考察	
3-1. DHS リアクターによる一次集積培養	69
3-1-1. 有機物濃度の変動	70
3-1-2. DHS リアクター内の菌叢解析及びガス分析	71
3-2. バッチ式培養法による嫌気共生細菌の二次集積培養の試み	
3-2-1. メタンガスの測定および顕微鏡観察	73
3-2-2. 酪酸集積培養系内の微生物種の同定	73
3-2-3. 酢酸集積培養系内の微生物種の同定	77
第4節 小括	78
参考文献	79
第5章 集積培養系からの嫌気共生細菌の純粋分離の試み	
第1節 目的および概要	82
第2節 実験方法	
2-1. 植種源	82
2-2. 培地および培養条件	82
2-2-1. 分離方法	83
2-3. 微生物種の同定	84
2-4. 推定酢酸酸化共生細菌培養系の純粋性確認	84
第3節 実験結果および考察	
3-1. 嫌気酪酸酸化共生細菌の純粋分離	84
3-2. 推定嫌気酢酸酸化共生細菌の純粋分離	86
第4節 小括	89
参考文献	89
第6章 酢酸集積培養系からの分離株の特性解析	
第1節 目的および概要	91
第2節 実験方法	
2-1. 共生系の再構築	
2-1-1. 再共生に使用したメタン生成アーキア	92
2-1-2. 培地および培養条件	93
2-1-3. 化学分析	94
2-2. 菌学的特性の検討	
2-2-1. 至適生育温度、NaCl 濃度、pH の検討	94
2-2-2. 脂肪酸と GC 含量の検討	95
2-2-3. 基質特異性の検討	95
第3節 実験結果および考察	
3-1. 嫌気酢酸酸化反応の証明	
3-1-1. 異なるメタン生成アーキアとの共生系構築の検討	96

3-1-2. 放射線同位体分析による嫌気酢酸酸化の検討	97
3-1-3. 活性炭に依存した酢酸酸化反応の促進検討	99
3-2. 菌学的特性の検討	
3-2-1. 至適生育温度、NaCl 濃度、pH、基質特異性の検討	100
3-2-2. GC 含量と脂肪酸組成の検討	101
第 4 節 小括	104
参考文献	105
第 7 章 総括	108
謝辞	111

第1章 序論

第1節 本研究の背景と目的

地球上において生産されるメタンは微生物由来が約 69%、化石燃料やバイオマスの燃焼由来が 25%であると推定されており (Conrad *et al.*, 2009)、地球上に存在するメタンの半分以上は微生物由来であると考えられている。微生物由来のメタンは嫌気的な環境で複数の微生物が連携しながら有機物を完全分解した時に生成される。微生物反応によって生成されたメタンは水田、湿地帯、海底、動物体内をはじめ多様な嫌気的環境から普遍的に確認されていること、さらに、メタンは温室効果ガス・重要なエネルギー源でもあると捉えられていることから、メタン生成アーキアを含む有機物分解に関与する微生物は地球規模の炭素循環に大きな影響を及ぼしていると考えられている。そこで、本論文では、地球上の炭素循環に関わる微生物の基礎的知見を集めることを目的とした。特にメタン生成過程に関与していると考えられる微生物の中でも、人為的な培養がなされておらず、16S rRNA 遺伝子を指標にした系統分類上の位置や菌学的特性が明らかになっていないメタン生成アーキアと嫌気共生細菌に着目した知見を示した。

第2節 本論文の構成

本論文は、有機物からのメタン生成に関与している未培養メタン生成アーキアとその共生細菌に焦点をあて、分子系統学的手法と培養を通じて遺伝子学的・生理学的特性を明らかにすることで地球上の炭素サイクルの基礎的知見を集めることを目的としたものである。

第1章 序論として本研究の背景と目的、および本論文の構成を述べた。

第2章 メタン生成アーキアと嫌気共生細菌の既往の知見についてまとめた。

第3章 嫌気性汚泥から目レベルでの未培養メタン生成アーキアの探索を行ったのち、系統学的情報を得るために *mcrA* 遺伝子および 16S rRNA を標的とした超高感度 FISH 法の検討を行った。

第4章 DHS リアクターとバッチ式培養法により海底堆積物から嫌気共生細菌の集積培養系の獲得を試みた。また、物質収支の証明により嫌気酪酸酸化共生菌の集積培養系の獲得に成功したことを証明した。

第5章 酢酸および酪酸を唯一の炭素源とした集積培養系から嫌気共生細菌の可能性のあるバクテリアの純粋分離を試みた。

第6章 酢酸を唯一の炭素源とした集積培養系から *Clostridiales* 目に属するバクテリアの分離培養を行い、菌学的特徴付けを行った。また、メタン生成アーキアとの共生系を再構築させることにより、分離したバクテリアが酢酸酸化能を有するか否か検討を行った。

第7章 総括として本研究で得られた知見をまとめた。

-参考文献-

Conrad, R. (2009). The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 285–292.

第2章 既往の知見

2-1. 嫌気条件下における有機物分解

酸素、硝酸、硫酸塩や酸化金属イオンなど CO_2 以外の電子受容体が存在しない嫌気環境における有機物分解は、代謝物質の異なる複数の微生物群集により生じることが知られている。この過程は大きく分類すると3過程に分けられ、最終的にメタンと CO_2 にまで分解される (Schink, 1997)。まず、分解の第一過程として、多糖、タンパク質、核酸、脂質などの高分子有機物が、初期発酵細菌 (primary-fermenting bacteria) によって加水分解される。加水分解後は、単糖、脂肪酸、アミノ酸やその他単位構成分子となり、同時に発酵産物として酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低級脂肪酸やアルコール類が生成される。このように、酸を生成することから初期発酵細菌は、酸生成細菌 (acetogen) とも呼ばれている。第二過程では、二次発酵性細菌 (secondary fermenting bacteria) によって、低級脂肪酸やアルコール類が酸化され、副産物として酢酸、ギ酸、水素、二酸化炭素、その他の C_1 化合物が生成される。ただし、二次発酵性細菌単体の反応では、ギブス自由エネルギー変化は吸エルゴン反応を示し、酸化反応が生じない。しかし、水素資化性メタン生成菌が水素を利用することで水素濃度が極めて低い状態になった時に発エルゴン反応となり酸化反応が進行し、同時にメタン生成菌によってメタンが生成される。二次発酵性細菌は、このように水素資化性メタン生成菌との共生を組むことで反応が進行するため、嫌気共生菌 (syntrophs) とも呼ばれている。水素資化性メタン生成菌の他に酢酸資化性のメタン生成菌酢酸を直接資

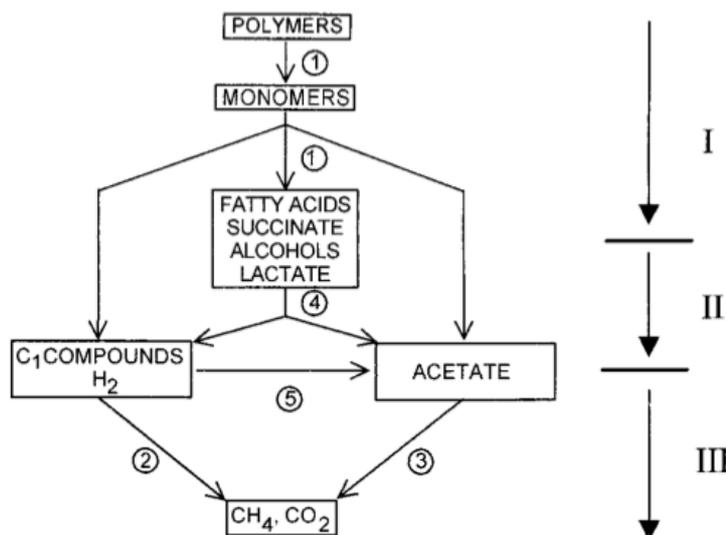


Figure 2-1 Carbon and electron flow through the various trophic groups of microorganisms involved in the methanogenic degradation of complex organic matter (Adapted from Schink (1997)). Groups of bacteria involved: 1, primary fermenting bacteria; 2, hydrogen-oxidizing methanogens; 3, acetate-cleaving methanogens; 4, secondary-fermenting (syntrophic) bacteria; 5, homoacetogenic bacteria. I, II and III, steps in degradation.

化することでメタンが放出される。また、 H_2/CO_2 やギ酸から酢酸を生成し、発酵性細菌群とは区別されるホモ酢酸生成菌も存在する (Diekert & Wohlfarth, 1994)ことが知られている。

2-2. メタン生成アーキア

アーキアには3つの門 (*Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota*) が存在し、それらの門に属する多様な分離株が報告されている。しかし近年、培養を介さない方法として環境中に存在する細胞をランダムに分取し、得られた細胞の全ゲノム配列を解読するシングルゲノム解析やメタゲノム解析により、分離株は存在しないものの系統学的に新規な7つの門 (“*Korarchaeota*”, “*Aigarchaeota*”, “*Diapherotrites*”, “*Parvarchaeota*”, “*Nanohaloarchaeota*”, “*Aenigmarchaeota*”, “*Nanohaloarchaeota*”) が新たに提案されている (Rinke *et al.*, 2013)。今までに環境中から分離されてきた全てのメタン生成アーキアはこれらの門の中でも *Euryarchaeota* 門に属していることが知られている。*Euryarchaeota* 門には、メタン生成アーキア以外にも分離株の大半が海洋温泉や深海熱水噴出孔から得られたことで知られている超好熱性 *Thermococci* 綱 (Leigh *et al.*, 2011)や、少なくとも 1.5 M の濃度の塩分が含まれている湖や土などからの分離例がある高度好塩菌 (Papke *et al.*, 2011)、好熱好酸性アーキアとして知られている *Thermoplasmata* 綱が属している。

今までに分離されたメタン生成アーキアは次の7つの目に分類される。*Methanococcales* 目、*Methanopyrles* 目、*Methanobacteriales* 目、*Methanosarcinales* 目、*Methanomicrobiales* 目、*Methanocellales* 目および *Methanomassiliicoccales* 目である。なお、*Methanomassiliicoccales* 目に属する最初の分離株 *Methanomassiliicoccus luminyensis* (Dridi *et al.*, 2012) は、2012年にヒトの排泄物から分離され、*Methanomassiliicoccales* 目は2013年に新目として提案されたばかりである (Iino *et al.*, 2013)。長年、*Thermoplasmata* 綱に属するメタン生成アーキアは存在しないと考えられてきたが、*M. luminyensis* が純粋分離されたことにより、メタン生成アーキアも属することが示された。今のところ、*Methanomassiliicoccales* 目に属するメタン生成アーキアの集積培養系の報告は幾つか報告されているが (e.g., Iino *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2012)、今のところ分離株は一株しか報告されていない。

メタン生成アーキアは、多様な環境下で生存が確認されているものの利用可能な基質は比較的限られており、その代謝経路は3経路が存在する (Liu & Whitman, 2008)。これらの基質を全て利用できるメタン生成アーキアは今のところ存在せず、利用できる基質は種によって異なる。一つ目の代謝経路は、最も多くのメタン生成アーキアが有する代謝経路であり、水素とギ酸を電子供与体として利用し、 CO_2 から CH_4 を生成する経路である。中には H_2 とギ酸の他にも電子供与体として 2-propanol、2-butanol、シクロペンタノール、エタノールなどのアルコール類を利用することができるメタン生成アーキアも存

在する。2つ目は、 C_1 化合物を含むモノメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、テトラメチルアンモニウム、ジメチルスルフィド、メタンチオール、メタンチオール、メタノールなどのメチル化合物を利用する代謝経路である。この代謝は coenzyme M レベルで C_1 pathway に入り、メチル化合物が還元されることでメタン生成が起きる。その反応に必要な電子を得るために、メチル化合物の還元と同時に還元型 C_1 pathway (reverse C_1 pathway) を利用してメチル化合物が酸化され CO_2 が生成される。3つ目は、酢酸を単独で資化する経路である。この代謝は、酢酸の C-1 カルボキシル基が酸化されることにより電子を得ることができ、その電子により酢酸の C-2 カルボキシル基がメタンへと還元される。加えて、同じ基質を資化するメタン生成アーキア同士でも基質への親和性が異なることから、環境の状態によって優占するメタン生成アーキアが異なる。今までに分離された水素資化のメタン生成アーキアの多くは生息環境とは異なる高水素分圧下 (約 200 kPa) で培養が行われてきており、培養や分離ができた種類が限られていたが、嫌気共生培養系により数十～数百 Pa 程度と非常に低い濃度の水素で培養することにより、非常に水素への親和性が高いメタン生成アーキアの分離に成功したとの報告 (Sakai *et al.*, 2007) や共培養系によって生成される水素濃度の違いによっても増殖してくるメタン生成アーキアが異なる (Sakai *et al.*, 2009) ことを証明した報告もある。その報告では、*Methanobacterium* 属や *Methanospirillum* 属は水素への基質親和性が低く高い水素濃度の時に優占しやすい傾向があり、*Methanobacterium* 属を除く、*Methanomicrobiales* 目や *Methanocellales* 目は水素への親和性が高く、低濃度の水素の時に優占しやすい傾向があることを述べている。また、唯一酢酸を資化できるのは、*Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属であり、うち、*Methanosaeta* 属は酢酸しか資化することができないことに加え、酢酸への親和性は *Methanosaeta* 属の方が高いことで知られている (Jetten *et al.*, 1992)。一方で、*Methanosarcina* 属を含む *Methanosarcinales* 目や *Methanomassillicoccales* 目はメタノール、メチルアミン等のメチル化合物を利用できる。

先に述べた通り、代謝経路は 3 種類あるが、全ての経路においてメタン生成アーキアに固有な酵素 Methyl coenzyme M reductase (MCR) (Ferry, 1999) が関与している。MCR は、メタン生成経路の末端物質である methyl coenzyme M からメタンに還元する反応を触媒する複合体酵素であり、この酵素の α サブユニットをコードしている遺伝子、*mcrA* 遺伝子は環境中から分離された全てのメタン生成アーキアにて存在していることが確認されている。MCR には McrI と McrII (Mrt) の 2 種類のイソ酵素が存在し、McrI は *mcrBDCGA* がコードし、McrII は *mrtBDGA* がコードしている (Pihl *et al.*, 1994)。*mcrB*, *mcrG*, *mcrA* と *mrtA* は MCR の β -、 γ -、 α -subunits をそれぞれコードしている (Lehmacher & Klenk, 1994)。*mcrA* 遺伝子は分離された全てのメタン生成アーキアが有しているのに対し、*mrtA* 遺伝子は、*Methanosphaera stadtmanae*、*Methanothermobacter marburgensis* や

Methanothermobacter thermautotrophicus などの *Methanobacteriales* 目に属するメタン生成アーキアだけが有している。酵素の観点では、McrI と McrII は環境条件によって発現量が異なることが知られている。McrI と McrII の発現機構については単独培養系による温度、pH、水素供給量の異なる条件下での実験の他にも共培養系を用いた低水素濃度条件下でも既に調べられており、McrI は基質親和性が高いが、McrII は基質親和性が低いことから、水素供給量が低い条件下では、McrI の発現量の方が高いことも明らかにされている(e.g., Reeve *et al.*, 1997; Enoki *et al.*, 2011)。このMCRをコードしている *mcrA* 遺伝子は環境中のメタン生成アーキアに限定した多様性解析の分子マーカーとして使われている。その理由は2点あり、1点目は上記に記述した通りメタン生成反応の最終反応を担う共通の遺伝子であること。2点目は、既に分離されているメタン生成アーキア内では *Methanosphaera stadtmanae* のみ相関関係の違いはあるものの (Luton *et al.*, 2002)、それ以外の既知メタン生成アーキアについては、目レベルでは、16S rRNA 遺伝子と *mcrA* 遺伝子に基づく系統樹において相関関係のずれは生じておらず (Luton *et al.*, 2002; Borrel *et al.*, 2013)、両遺伝子には強い相関関係があること (Fig. 2-3)。したがって、系統分類の指標に使われている 16S rRNA 遺伝子と同様に *mcrA* 遺伝子もメタン生成アーキアの多様性解析のマーカーとして利用されている。

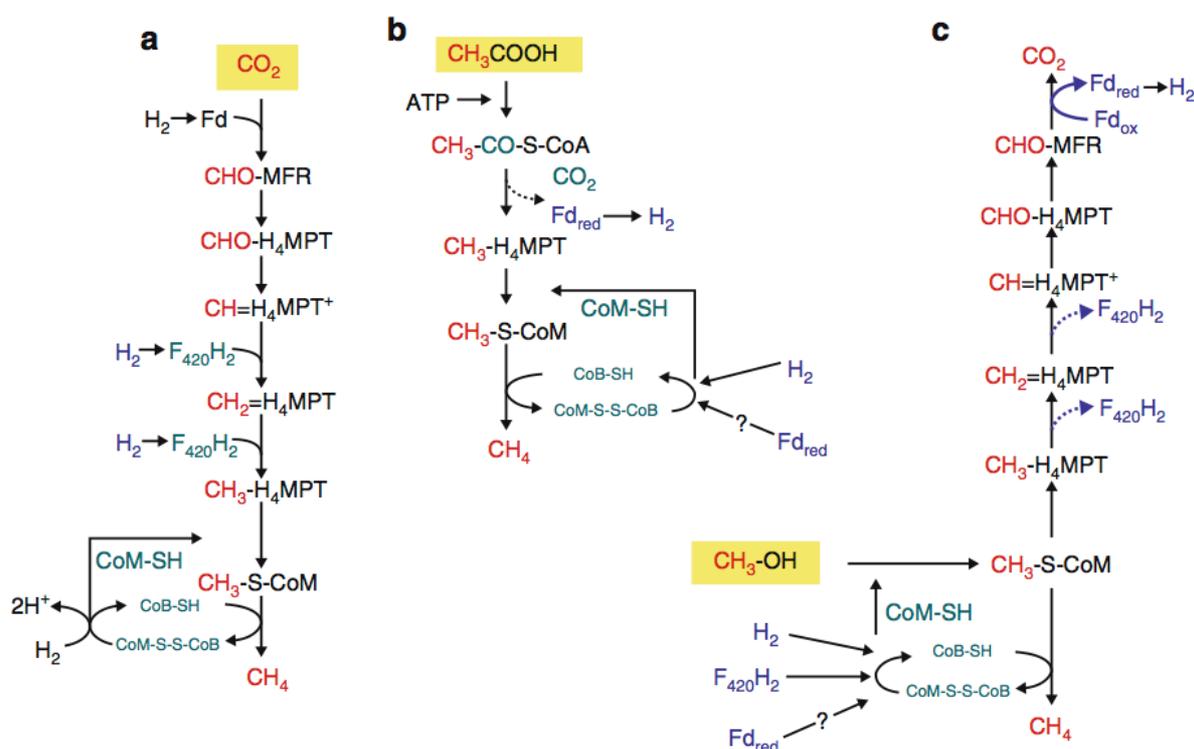


Figure 2-2 Scheme of methanogenesis from H₂/CO₂ and formate (a), acetate (b), and methanol (c). Adapted from Hedderich & Whitman (2013).

Table 2-1 Taxonomy and major energy substrates of methanogenic archaea. Hedderich & Whitman (2013); Sakai *et al.* (2014); Dridi *et al.* (2012).

Order, family, and genus	Morphology	Major energy substrates	Temperature optimum (°C)
Order <i>Methanobacteriales</i>			
Family <i>Methanobacteriaceae</i>			
Genus			
<i>Methanobacterium</i>	Rod	H ₂ /CO ₂ , formate, alcohols	37-45
<i>Methanothermobacter</i>	Rod	H ₂ /CO ₂ , formate	55-65
<i>Methanobrevibacter</i>	Short rod	H ₂ /CO ₂ , formate	37-40
<i>Methanosphaera</i>	Coccus	H ₂ /CO ₂ + methanol	37
Family <i>Methanothermaceae</i>			
Genus			
<i>Methanothermus</i>	Rod	H ₂ /CO ₂	80-88
Order <i>Methanococcales</i>			
Family <i>Methanococcaceae</i>			
Genus			
<i>Methanococcus</i>	Coccus	H ₂ /CO ₂ , formate	35-40
<i>Methanothermococcus</i>	Coccus	H ₂ /CO ₂ , formate	60-65
Family <i>Methanocaldococcaceae</i>			
Genus			
<i>Methanocaldococcus</i>	Coccus	H ₂ /CO ₂	80-85
<i>Methanotorris</i>	Coccus	H ₂ /CO ₂	88
Order <i>Methanomicrobiales</i>			
Family <i>Methanomicrobiaceae</i>			
Genus			
<i>Methanomicrobium</i>	Rod	H ₂ /CO ₂ , formate	40
<i>Methanoculleus</i>	Irregular coccus	H ₂ /CO ₂ , formate, alcohols	20-55
<i>Methanofollis</i>	Irregular coccus	H ₂ /CO ₂ , formate, alcohols	37-40
<i>Methanogenium</i>	Irregular coccus	H ₂ /CO ₂ , formate, alcohols	15-57
<i>Methanolactinia</i>	Rod	H ₂ /CO ₂ , alcohols	40
<i>Methanoplama</i>	Plate or disc	H ₂ /CO ₂ , formate, alcohols	32-40
Family <i>Methanospirillaceae</i>			
Genus			
<i>Methanospirillum</i>	Spirillum	H ₂ /CO ₂ , formate, alcohols	30-37
Family <i>Methanocorpusculaceae</i>			
Genus			
<i>Methanocorpusculum</i>	Small coccus	H ₂ /CO ₂ , formate, alcohols	30-40
<i>Methanocalculus</i>	Irregular coccus	H ₂ /CO ₂ , formate	30-40
Order <i>Methanosarcinales</i>			
Family <i>Methanosarcinaceae</i>			
Genus			
<i>Methanosarcina</i>	Coccus, packets	Methanol, MeNH ₂ , H ₂ /CO ₂ , Ac, DMS	35-60
<i>Methanococcoides</i>	Coccus	Methanol, MeNH ₂	23-35
<i>Methanohalophilus</i>	Irregular coccus	Methanol, MeNH ₂	35-40
<i>Methanohalobium</i>	Flat polygons	Methanol, MeNH ₂	40-55
<i>Methanobolus</i>	Irregular coccus	Methanol, MeNH ₂ , DMS	37
<i>Methanomethylovorans</i>	Coccus, packets	Methanol, MeNH ₂ , DMS, MT	34-37
<i>Methanomicrococcus</i>	Flat polygons	H ₂ /CO ₂ +Methanol, H ₂ /CO ₂ +MeNH ₂	39
<i>Methanosalsum</i>	Irregular coccus	Methanol, MeNH ₂ , DMS	35-45
Family <i>Methanosaetaceae</i>			
Genus			
<i>Methanosaeta</i>	Rod	Ac	35-60
Order <i>Methanopyrales</i>			
Family <i>Methanopyraceae</i>			
Genus			
<i>Methanopyrus</i>	Rod	H ₂ /CO ₂	98
Order <i>Methanocellales</i>			
Family <i>Methanocellaceae</i>			
Genus			
<i>Methanoella</i>	Rod, coccus	H ₂ /CO ₂ , formate	25-60
Order <i>Methanomassiliicoccales</i>			
Genus			
<i>Methanomassiliicoccus</i>	Coccus	H ₂ /CO ₂ + methanol	37

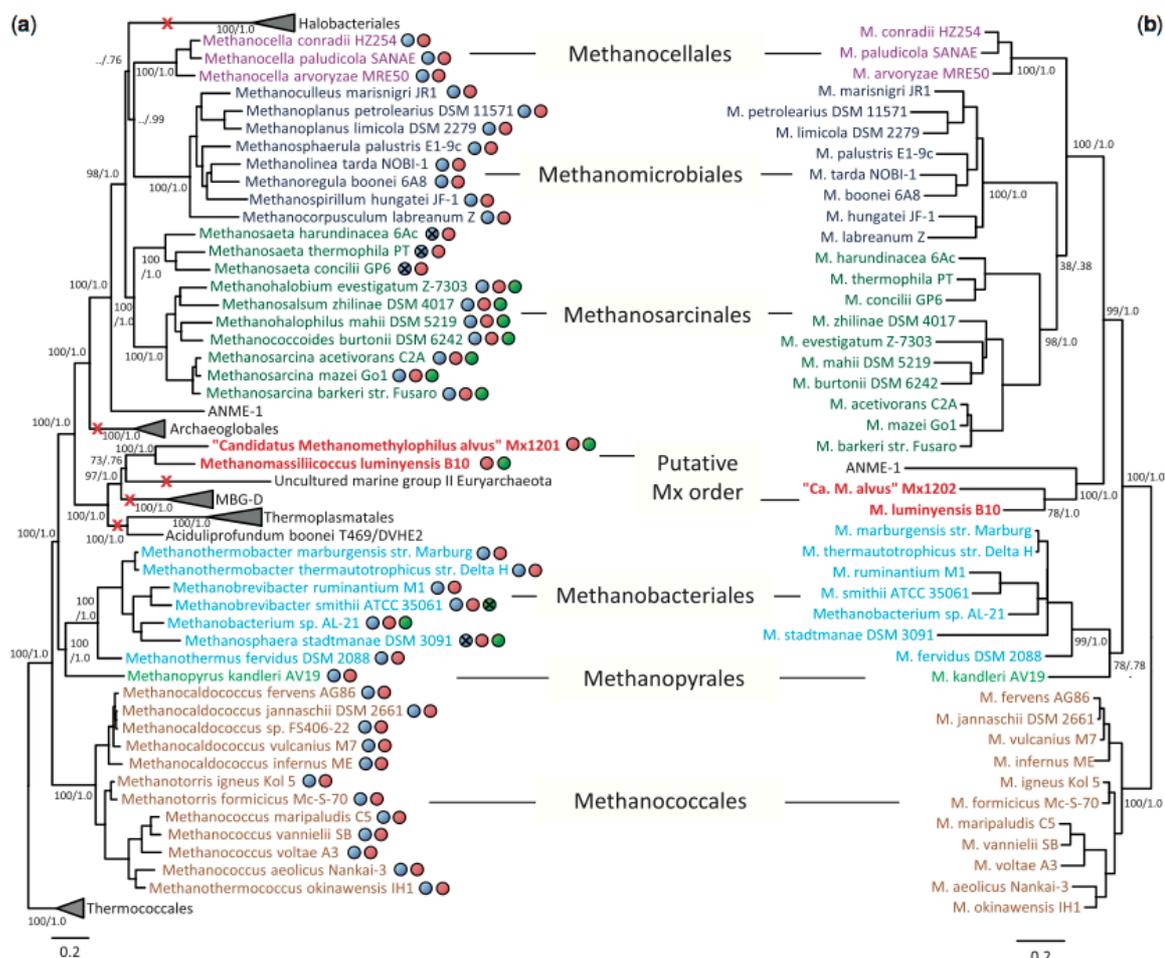


Figure 2-3 Phylogenetic positions of methanogenic archaea. (a) Bayesian phylogeny of *Euryarchaeota* based on a concatenation of 57 ribosomal proteins comprising 7,472 amino acid positions. (b) Maximum likelihood phylogeny of methanogens based on a concatenation of McrA-B-C-D-G protein sequences comprising 1,159 amino acid positions. Adapted from Borrel *et al.* (2013)

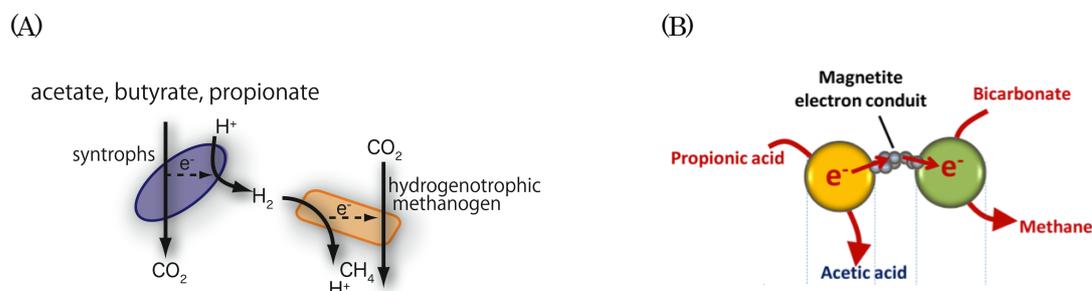
2-3. メタン生成環境における嫌気共生細菌

前述したように、嫌気環境下では中間代謝物質である酪酸、酢酸、プロピオン酸、安息香酸、エタノールなどの低級脂肪酸やアルコール、芳香族化合物の酸化反応は嫌気共生細菌担体では自由エネルギー変化が吸エルゴン反応になってしまうことから反応が進まない。特にプロピオン酸酸化や酢酸酸化の反応はエネルギー的に非常に進みにくい状態にある (Schink *et al.*, 1997)。しかし、水素資化性のメタン生成アーキアと共生関係を築き、水素を消費させ、ある一定の水素分圧まで下げれば自由エネルギー変化が発エルゴン反応になることから酸化反応を進ませることができ (Table 2-2 ; Fig.2-4 (A))。理論的には 25 °C、1 気圧の条件下で酢酸では 4 Pa、酪酸では 22 Pa 以下の水素分圧で反応が進むことが示されている (Nakamura & Kamagata, 2006)。

Table 2-2 Change of Gibbs free energies under standard conditions in hydrogen-releasing reactions during oxidation of fermentation intermediates. Adapted from Schink *et al.* (2006).

	G_0' (kJ per mol rct.)	No. of electron pairs
Primary alcohols		
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9.6	2
Fatty acids		
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48.3	2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$	+76.0	3
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$	+94.9	4
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2$	+25.2	1
Glycolic acid		
$\text{CH}_2\text{OHCOO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{H}_2$	+19.3	3
Aromatic compounds		
$\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}^+ + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$	+49.5	3
$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+10.2	2
Amino acids		
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{NH}_4^+ + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2$	+2.7	2

水素やギ酸の他にも電子キャリアとして、活性炭や導電性鉱物等の電子伝達性を有する固体を利用して、直接電子を伝達し、共生による有機物分解が起こる事象も報告されている (Kastening *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2012; Kato *et al.*, 2012; Fig.2-4 (B))。また、Fe (III)の存在下で伝導性のある鞭毛、いわゆるナノワイヤーを形成する鉄還元細菌 *Geobacter* sp. は (Reguera *et al.*, 2005)、形成したナノワイヤーを *Methanosaeta* sp. 細胞に結合させることで、ナノワイヤーを介した電子の授受が行うことができ、共生関係を構築することが報告されている (Reguera *et al.*, 2005; Rotaru *et al.*, 2014)。ところが、導電性鉱物による電子伝達は *Geobacter* sp.に限定した報告しかなされておらず、他のバクテリアでも同様のシステムで共生系が構築されているかは定かではない。

Figure 2-4 Syntrophic metabolisms of microorganisms. (A) Interspecies hydrogen transfer. (B) Interspecies electron transfer through magnetite particles. Adapted from Cruz Viggi *et al.* (2014).

今までに分離された嫌気共生細菌は全て *Firmicutes* 門、 δ -*proteobacteria* 門もしくは *Termotoga* 門に属しており (Table 2-3)、単独で生育する時は共生系を組んでいる時とは別の代謝経路を利用している。共生による酸化能の有無は系統に規則性はなく、現時点では固有の機能遺伝子マーカーは存在していない。しかし、ここ1年でメタン生成アーキアや硫酸還元菌との共生系による、低級脂肪酸を酸化するために必要であると考えられる細菌の遺伝子配列がゲノム DNA 情報から推測されてきている (Wrom *et al.*, 2014; Nobu *et al.*, 2014)。しかしながら、遺伝子情報だけではこの機能を有するか確かなことはわからず、最終的には培養を介した方法でなければ共生機能の有無を判断することは不可能である。

嫌気共生細菌の分離と嫌気共生系の証明が初めて行われたのは、1967年 (Bryant *et al.*, 1967) であり、エタノールが含まれた“*Methanobacillus omelianskii*” (現在では、*Methanobacterium bryantii* と呼ばれている) 集積培養系から嫌気エタノール酸化共生菌 “S organism” が分離されたことが、嫌気共生系研究の始まりである。共生系のシステムが発見されていなかった当初は、“*Methanobacillus omelianskii*” がエタノールからメタン生成までの代謝を請け負う特殊なメタン生成アーキアであると考えられていた。ところが、実際には純粋培養系だと思われていた“*Methanobacillus omelianskii*” 培養系内には、もう一細胞 “S organism” が培養されていたことが後に判明した。2種類の細胞を純粋分離した後に、それぞれエタノールを炭素源にして個別に培養したところ、メタンガスは生成されなかったが、再度共生関係を構築させて培養させたところ、メタンガスの生成と菌体の増殖が確認されている。この報告を基に嫌気共生系の存在が知られることになった。それから、現在までにいくつかの嫌気共生細菌が分離されてきたが、報告されている分離株は、全て *Firmicutes* 門か δ -*proteobacteria* に属している (Table 2-3)。特に、本研究では、酢酸および酪酸酸化共生菌に着目した考察が多いため、この2つに焦点をあてた知見を紹介する。

Table 2-3 List of previously cultivated anaerobic syntrophic bacteria. Schink & Stams (2006); Zhang *et al.* (2005); Sousa *et al.* (2007); Wu *et al.* (2006); Hatamoto *et al.* (2007); Chen *et al.* (2005); de Bok *et al.* (2005); Imachi *et al.* (2002); Imachi *et al.* (2007).

Syntrophic acetate oxidizing bacteria

Phylum	Order	Name
-	-	AOR
Firmicutes	<i>Thermoanaerobacterales</i>	<i>Syntrophaceticus schinkii</i> <i>Thermasetogenium phaeum</i> <i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>
	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridium ultunense</i>
<i>Thermotoga</i>	<i>Thermotogales</i>	<i>Thermotoga lettingae</i>

Syntrophic butyrate oxidizing bacteria

Phylum	Genus	Species	
Firmicutes	<i>Syntrophomonas</i>	<i>wolfei</i> <i>sapovorans</i> <i>bryantii</i> <i>curvata</i> <i>erecta</i> <i>zehnderi</i> <i>cellicola</i> <i>palmitatica</i>	
		<i>Thermosyntropha</i>	<i>lipolytica</i>
		<i>Syntrophothermus</i>	<i>lipocalidus</i>
δ -proteobacteria	<i>syntrophus</i>	<i>aciditrophicus</i> <i>buswellii</i>	

Syntrophic propionate oxidizing bacteria

Phylum	Genus	Species
δ -proteobacteria	<i>Syntrophobacter</i>	<i>fumaroxidans</i> <i>pfennigii</i> <i>sulfatireducens</i> <i>wolinii</i>
	<i>smithella</i>	<i>propionica</i>
Firmicutes	<i>Pelotomaculum</i>	<i>schinkii</i> <i>thermopropionicum</i> <i>propionicicum</i>
	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>thermobenzoicum</i>

Syntrophic ethanol oxidizing bacteria

Phylum	Genus	Species
-	-	S-strain
Firmicutes	<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>brockii</i>
δ -proteobacteria	<i>Pelobacter</i>	<i>venetianus</i> <i>acetylenicus</i> <i>carbinolicus</i>

Syntrophic aromatic compounds oxidizing bacteria

Phylum	Genus	Species
δ -proteobacteria	<i>Syntrophus</i>	<i>buswellii</i> <i>gentianae</i> <i>aciditrophicus</i>

2-3-1 嫌気酢酸酸化共生菌

嫌気酢酸酸化共生菌の反応式を Table 2-4 に示す。共生関係による酸化反応は、反応式(2) syntrophic acetate oxidation と反応式 (3) H₂-consuming methanogenesis の反応を合わせた、反応式(4)で生じる。結果、1 分子の酢酸から 1 分子のメタンが生じる。嫌氣的酢酸酸化共生細菌の代謝経路は、メタン生成アーキアと共生する酢酸酸化共生細菌 AOR 株、*C. ultunense* BS^T株と *T. phaeum* PB^T株の代謝活性試験により明らかにされている (Lee & Zinder, 1988; Schnürer *et al.*, 1996; Hattori *et al.*, 2005)。これら 3 株は、嫌気酢酸酸化共生細菌であると同時に単独培養では H₂/CO₂ やギ酸から酢酸を生成するホモ酢酸生成菌であることも報告されている。単独培養では還元的 Carbonmonoxide dehydrogenase/acetyl-CoA 経路 (CODH/acetyl-CoA 経路、Wood/Ljungdhal pathway と呼ばれている) を使用することで酢酸を生成し、共培養条件下では、その逆経路にあたる酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路を利用することで酢酸を酸化していることが報告されている。その途中の反応を触媒する formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) をコードしている遺伝子は、ホモ酢酸生成菌や嫌気酢酸酸化共生菌の存在の手がかりに分子マーカーとして利用されている (Lovell and Hui, 1991; Pester and Brune, 2006; Westerholm *et al.*, 2010)。ところが、2014 年の Nobu *et al.* の研究結果から、今まで報告されてきた嫌気酢酸酸化経路とは異なる代謝経路が存在する可能性を *T. lettingae* TMO^T 株のゲノム DNA 情報から報告されている (Fig. 2-5)。

現在までに 10 株の酢酸酸化細菌が分離され、それらは全て排水処理汚泥もしくは、バイオリアクターからの分離株である。そのうち、6 株は新属の嫌気酢酸酸化共生菌の提案であり、残りは新種での提案がなされている。系統分類的には *Firmicutes* 門と *Thermotoga* 門に属している。また、分離株の大半が孢子形成菌でもあり運動性を有している (Table 2-5)。

嫌気酢酸酸化集積培養系の最初の報告は 1984 年の Zinder & Koch の報告で、その集積培養系は高温のリグニンセルロース系の都市排水汚泥から得られた。その後、ホモ酢酸生成菌の基質である H₂/CO₂ を基質にすることで *Methanothermobacter* (当時の系統分類では *Methanobacterium*) と AOR 株の共

Table 2-4 Microbial reactions involved in acetate and hydrogen metabolism. Adapted from Hattori (2008).

Process	Reaction	ΔG ⁰ (kJ/mol)
(1) Aceticlastic methanogenesis	*CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O → *CH ₄ + HCO ₃ ⁻	-31.0
(2) Syntrophic acetate oxidation	*CH ₃ COO ⁻ + 4H ₂ O → H*CO ₃ ⁻ + 4H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	+104.6
(3) H ₂ -consuming methanogenesis	4H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → CH ₄ + 3H ₂ O	-135.6
(4) sum (2)+(3)	*CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O → H*CO ₃ ⁻ + CH ₄	-31.0
(5) H ₂ -consuming acetogenesis	4H ₂ + 2HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → CH ₃ COO ⁻ + 4H ₂ O	-104.6

Asterisks (*) represent the fate of the methyl group carbon of acetate. It was assumed that 100% of the labeled carbon was converted to CH₄ (reaction 1) or HCO₃⁻ (reaction 4). The standard Gibbs free energy change (ΔG⁰) values were calculated from reference 75.

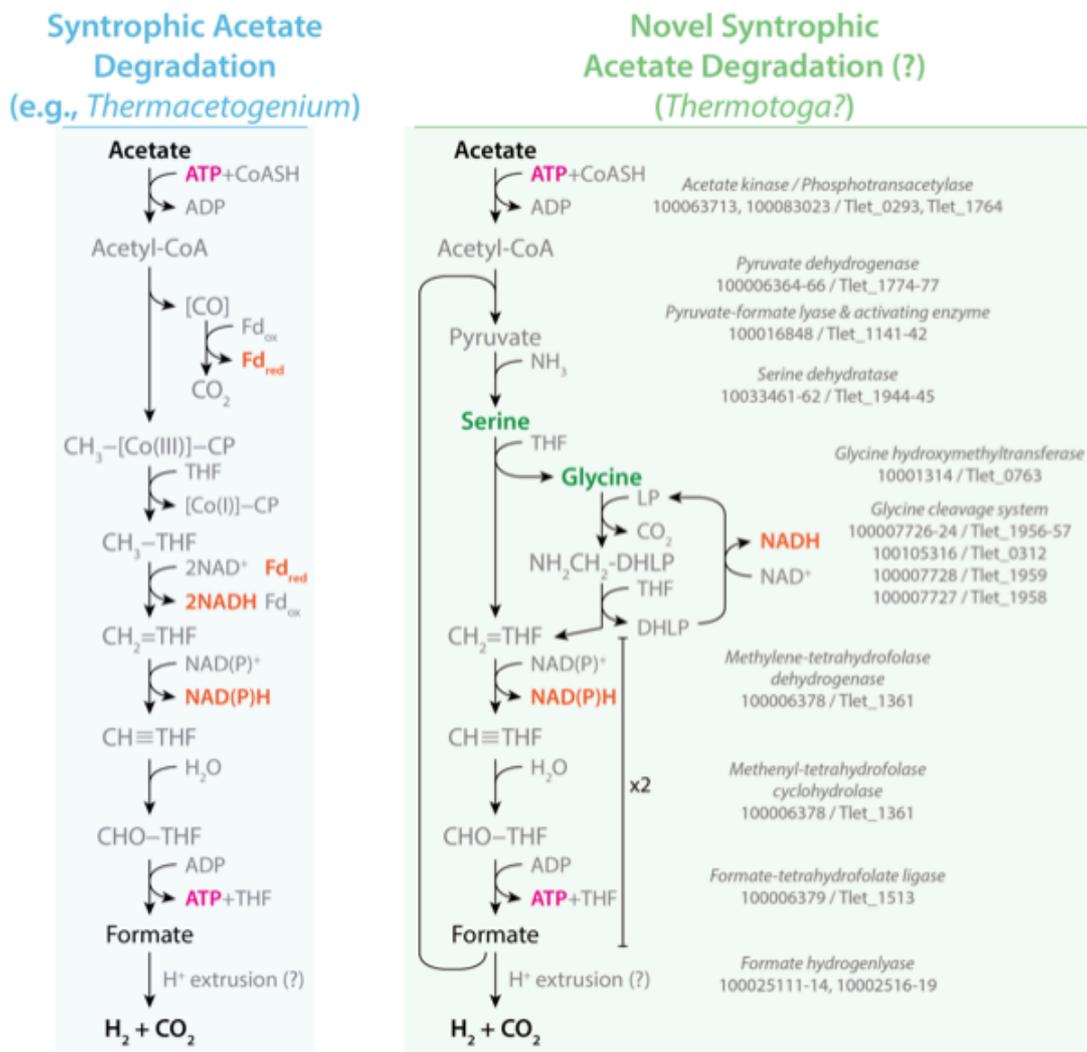


Figure 2-5 Syntrophic acetate degradation pathways previously proposed (left) and newly proposed syntrophic acetate degradation pathway (right). The corresponding *Pseudothermotoga lettingae* strain TMO loci are also noted. Co-reactants and co-products include adenosine triphosphate (ATP, magenta), adenosine diphosphate (ADP), oxidized/reduced ferredoxin (F_{ox} and F_{red}, orange), coenzyme A (CoA), tetrahydrofolate (THF), lipoylprotein (LP), oxidized/reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺ and NADH, orange), and oxidized/reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺ and NADPH, orange). Adapted from Nobu *et al.* (2014).

培養系から AOR 株を分離した (Lee & Zinder, 1988)。AOR 株は *Methanothermobacter* との共培養系において酢酸だけではなく、エタノールをも酸化することができ、エタノールを消費した後は、副産物として得た酢酸を、さらに酸化させることができる。なお、AOR 株は既に消失しており系統学的な報告はされていない。

次に分離された株は、1996 年に Schnürer *et al.* (1996) によって報告された *Clostridium ultunense* BS^T 株であり、系統的に *Clostridiales* 目の Family XI に属している。豚のエサを添加した高濃度塩化ア

ンモニウム (0.5 M) が含まれたラボスケールのメタン生成消化汚泥から酢酸を唯一の炭素源とした集積培養系から得られた。共培養系においては水素資化性メタン生成アーキアである *Methanoculleus* sp. の存在下で酢酸を酸化することが報告されている。この集積培養系には水素資化性のメタン生成アーキアしか存在せず、酢酸を基質とする BS^T 株と基質競合を起こす酢酸資化性のメタン生成アーキアは混在していなかったことが報告されている。これは混在していた塩化アンモニウムが要因であると考えられる。この集積培養系から得られた水素資化性のメタン生成アーキアは、どれも 0.2 M まで塩化アンモニウムに対して耐性があり、BS 株は 0.4 M まで耐性があることが証明されている。その一方で、酢酸資化性のメタン生成アーキアは水素資化性のメタン生成アーキアよりもアンモニアによって生育阻害を受けやすいとの報告もされている (Koster & Lettinga, 1984; Sprott & Patel, 1986)。このことから、BS^T 株は酢酸資化性メタン生成アーキアよりも有利にリアクター内に存在することで集積培養系の獲得に成功したと考えられる。また、単独培養での利用基質に関して BS^T 株は H₂/CO₂ では生育することができないが、休止細胞は H₂/CO₂ を利用することができる。また、ギ酸でも生育できることが報告されている。

3 番目に分離された株は、2000 年に Hattori *et al.* によって高温のクラフトパルプの排水処理メタン生成リアクターから分離された *Thermoacetogenium phaeum* PB^T 株である。この株は系統的に *Thermoanaerobacteriales* 目に属している。PB^T 株はピルビン酸を基質として分離された後 *Methanothermobacter thermoautotrophicus* TM 株と共生系の再構築を行うことで共生による酢酸酸化反応が確認されており、40 mM の酢酸を約 24 日で完全酸化することが報告されている。しかし、分離後の共生系の構築には時間がかかり、再共生させた 40 日後にメタンガスの検出が確認されている。他の共生パートナーとして *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH 株でも共生を組み合わせることができたが、酢酸酸化効率が大幅に下がったとも報告されている (Hattori *et al.*, 2001)。加えて、PB^T 株は他の酢酸酸化共生菌と比べると比較的広い基質特異性を有しており、特に多様な種類のアミノ酸を

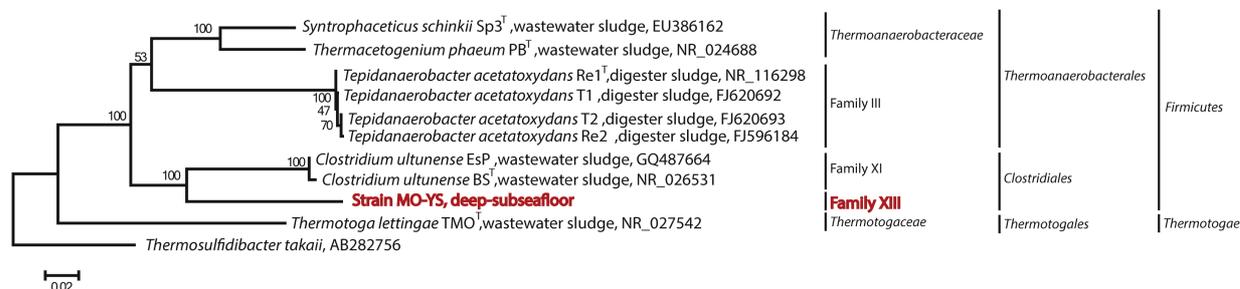


Figure 2-6 Neighbor-joining phylogenetic tree based on syntrophic acetate oxidizing bacteria and related bacterial 16S rRNA gene sequences. A 16S rRNA gene sequence of *Thermosulfidibacter takaii* (AB282756) was used as the out-group. The numbers show the bootstrap values obtained after 1,000 replicates. The scale bar indicates 2% sequence divergence.

利用することができる (Table 2-5)。また、この株の最大の特徴は、電子受容体として硫酸かチオ硫酸の存在下であればメタン生成アーキアとの共生関係が無くても酢酸を酸化することができる点である。この特性は、硫酸還元細菌に非常に似ており、例えば *Desulfotomaculum acetoxidans* や *D. thermoacetoxidans* である。これらは、硫酸を還元することにより酢酸の完全酸化をすることができると言われている (Widdel & Pfennig, 1977; Min & Zinder, 1990)。さらに、硫酸還元細菌が保有していると言われている、dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase 遺伝子を有していることも報告されている。

4番目に分離された株は、*Thermotogales* 目に属する *Thermotoga lettingae* TMO^T 株である。TMO^T 株は、メタノールを唯一の基質として添加している高温の硫酸還元バイオリクターから分離された (Balk *et al.*, 2002)。加えて TMO^T 株は他の酢酸酸化共生細菌の分離株とは異なり、メタノールを炭素源とした集積培養系にて得られた。*M. Thermoautotrophicus* ΔH との共培養系、もしくは、チオ硫酸の存在下でメタノールや酢酸を酸化することが報告されている。生育速度は低下してしまうものの、単独培養条件下でメタノールを利用することも可能である。その他の単独培養基質として、ギ酸や H₂/CO₂、ロイシン、イソロイシンとバリン等のアミノ酸もチオ硫酸の存在下で利用することができることが報告されている。

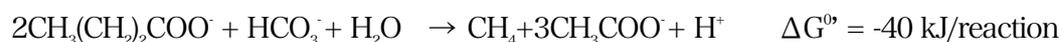
5番目と6番目に分離された株は、高濃度のアンモニウム濃度 (6 g NH₄⁺-N/l) が含まれている魚粉製造工場の排水を処理する汚泥から分離された (Westerholm *et al.*, 2010)。分離された株は、*Syntrophaceticus schinkii* Sp3^T と *Clostridium ultunense* EsP 株である。Sp3^T 株は *Thermoanaerobacteriales* 目に属し、酢酸酸化共生細菌の中では *T. phaeum* PB^T 株 (Hattori *et al.*, 2000) との 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が最も高く、92%の相同性を有している。ところがこの両者の特性は大きく異なっており、PB^T 株は硫酸やチオ硫酸を電子受容体として利用できるが、Sp3^T 株はそれらを電子受容体として利用することができない。加えて、基質利用性に関しても全く異なる挙動を示すことが報告されている。一方で、EsP 株は *Clostridiales* 目の Family XI に属し、BS^T 株と最も近縁であり 99%の相同性を有するが基質特異性が異なっている部分もある。それぞれの株の分離には酢酸を添加した集積培養系を植種源にして Sp3^T 株はベタインを基質として、Esp 株は乳酸を基質とした Agar shake method での分離に成功している。Sp3^T 株の分離後 *Methanoculleus* sp. と再共生させ、酢酸酸化能の有無を確認したところ、能力を有していたことが報告されている。

7-10 番目に報告された株は、*Thermoanaerobacteriales* 目に属する *Tepidanaerobacter acetatoxydans* であり、Re1^T 株、Re2 株、T1 株、T2 株が Westerholm *et al.* (2010) によって分離された。これらの株も高濃度の塩化アンモニウム (6.4-7 g NH₄⁺-N/l) が含まれている循環型の消化リアクタ

一や塩化アンモニウムに加え酢酸を添加した集積培養系から得られたことが報告されている。系統学的には、*S. schinkii* Sp3^T株や *T. phaeum* PB^T株と同一である *Thermoanaerobacterales* 目に属している。分離された4種類の株 (Re1^T株、Re2株、T1株、T2株)の16S rRNA 遺伝子上での相同性は99-100%の相同性を有しており、16S rRNA 遺伝子の相同性の数値で比較すると同じ種に分類される。ところが、全ゲノムを対象とした Rep-PCR 法による種別検討ではバンドパターンが異なる結果が報告されている。また、Re1^T株のゲノムとの DNA-DNA hybridization 法による検討でも、Re2株、T1株、T2株に対して92、102、81%の相同性をゲノム全体で有することが示された。これらの結果から、分離株は同種ではあるが異なる株として報告されている。分離された株は、*Methanoculleus* sp. MAB2株と再共生させたところ、T1株しか酢酸酸化反応を確認することができなかったが、酢酸の集積培養系から得られたため他の3種類の分離株についても酢酸酸化共生細菌として提案されている。共生系の再構築に成功した株については、再共生させてから酢酸酸化反応を確認するまでは約5週間の時間を要したことが記載されている。単独培養における利用基質としては、他の酢酸酸化共生菌よりも多様な糖を利用することが可能である反面、ギ酸や H₂/CO₂ が利用できないことが報告されている。

2-3-2. 嫌気酪酸酸化共生菌

嫌気酪酸酸化反応は水素資性メタン生成菌との反応で次の式で反応が進む。



2分子の酪酸から1分子のメタンと3分子の酢酸が生成される (Nakamura and Kamagata, 2006)。嫌気酪酸酸化共生細菌が酪酸を酸化する時は、代謝経路として acetoacetyl coenzyme A (CoA) と基質レベルのリン酸化により得た ATP を経由してβ-酸化させる、beta-oxidation pathway を利用する (Schink, 1997)。*Syntrophomonas wolfei* のゲノム解析による代謝経路の推定図によると CoA transferase によって触媒される acetyl-CoA により酪酸が butyryl-CoA になる。その後は、Crotonyl-CoA から 3-hydroxybutyryl-CoA と acetoacetyl-CoA を介し、2個の Acetyl-CoA が形成される。一つは酪酸の活性化に利用され、もう一方は、phosphotransacetylase によって ATP と acetate kinase が合成され、最終的に酢酸が生成される (Müller *et al.*, 2010)。

Table2-5. Differential characteristics between other syntrophic acetate-oxidizing bacteria.

Strain AOR (Lee & Zinder, 1988), *Clostridium ultunense* (Schnürer et al., 1996), *Thermoacetogenium phaeum* (Hattori et al., 2000), *Syntrophaceticus schinkii* and *Clostridium ultunense* (Westerholm et al., 2010), *Tepidanaerobacter acetatxydans* (Westerholm et al., 2010), *Thermotoga lettingae* (Balk et al., 2002), *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm et al., 2010).
Abbreviations, +, positive; -, negative; +/-, vary; (*), growth and methane production very poor; ND, not determined.
The number in parentheses for the optimum temperature and pH indicate the range allowing growth.

*¹ These substrates can be utilized in the presence of thiosulfate.
*² These substrates can be utilized in the presence of thiosulfate or sulfate.
*³ These substrates can be utilized in the presence of thiosulfate, elemental sulfur, Fe(III) or anthraquinone-2,6-disulfonate
*⁴ Strain TMO² does not require yeast extract during syntrophic growth on ethanol with hydrogenotrophic methanogens.

Characteristics	strain AOR	<i>Clostridium ultunense</i> strain BS ¹	<i>Thermoacetogenium phaeum</i> strain PB ¹	<i>Thermotoga lettingae</i> strain TMO ²	<i>Syntrophaceticus schinkii</i> strain Sp3 ¹	<i>Clostridium ultunense</i> strain EsP	<i>Tepidanaerobacter acetatxydans</i> strain Re1 ¹	<i>Tepidanaerobacter acetatxydans</i> strain Re2	<i>Tepidanaerobacter acetatxydans</i> strain T1	<i>Tepidanaerobacter acetatxydans</i> strain T2
Cell morphology		Straight or Slightly curved rods (Cells growth started were coccoid)	Rod	Rod	Cocci or Straight or slightly curved rod (depend on ammonia concentrations)	Straight or slightly curved rods	Irregularly rod	Irregularly rod	Irregularly rod	Irregularly rod
Cell size (µm)	0.4-0.6 x 2-3	0.5-0.7 x 0.5-7	0.4-0.7 x 2-12.6	0.5-1 x 2-3	0.5-1.0 x 2-5	0.5-0.7 x 3-7	0.3-0.5 x 1.5-15	0.4-0.6 x 2.0-9.0	0.4-0.6 x 2.0-10	0.6-0.8 x 1.5-10
Spre formation		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Optimum temp. (°C)	60 (50-65)	37 (15-50)	58 (40-65)	65 (50-70)	25-40	25-45	20-55	25-55	25-55	20-55
Optimum pH	ND	7 (5-10)	6.8 (5.9-8.4)	7 (6-8.5)	6.0-8.0	5.0-9.0	4.0-9.5	4.5-9.5	5.0-9.5	4.0-9.5
Optimum NaCl (g/l)	ND	ND	ND	10 (0-28)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G+C content (mol %)	47	32	53.5	39.2	ND	ND	38.4	ND	ND	ND
Major menaquinone	ND	ND	MK-7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Supplement required	Yeast extract	Yeast extract	None	Yeast extract†	Yeast extract	Yeast extract	None	None	None	None
Substrate utilization:										
In pure culture										
Yeast Extract	ND	ND	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H ₂ /CO ₂	+	-	+	+*	-	-	-	-	-	-
Formate	+	+	+	+*	-	-	-	-	-	-
Acetate	+	-	+*	+*	-	-	-	-	-	-
Ethylene glycol	+	+	+	ND	-	-	-	-	-	-
Methanol	-	-	+	+*	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	+	ND	+	+	+	+	+	+
Lactate	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Propanol	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1-Butanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2-Butanol	ND	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isobutanol	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-Propanol	ND	-	+	ND	-	-	-	-	-	-
1,2-Propanediol	+	-	-	ND	-	-	+	+	+	+
2,3-Butanediol	-	ND	+	-	-	-	-	-	-	-
1,2-Butanediol	-	ND	+	-	-	-	-	-	-	-
Ethanolamine	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glycerol	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,4,5-Trimethoxybenzo	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N,N-dimethylglycine	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Syringate	ND	-	+	ND	-	-	-	-	-	-
Vanillate	ND	-	+	ND	-	-	-	-	-	-
Glycine	-	-	+	ND	-	-	-	-	-	-
Betaine	+	+	-	+*	+	+	+	+	+	+
Methylamine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Cystein	ND	+	+	ND	+	+	+	+	+	+
Glucose	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Fructose	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Galactose	ND	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Sucrose	ND	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Mannose	ND	-	ND	+	-	-	+	+	+	+
Maltose	ND	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Lactose	ND	-	-	+	-	-	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
Cellobiose	ND	-	ND	+	-	-	+	+	+	+
Raffinose	ND	-	ND	ND	-	+	+	+	+	+
Malate	-	-	-	ND	-	-	+	+	+	+
Citrate	ND	-	-	ND	-	-	+	+	+	+
Benzoate	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
Fumarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	ND	-	ND	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	ND	-	ND	+	-	-	+	+	+	+
Salicin	ND	-	ND	ND	-	-	+	+	+	+
Sorbitol	ND	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Isoleucine	ND	ND	ND	+*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Leucine	ND	-	ND	+*	-	-	-	-	-	-
Valine	ND	ND	ND	+*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proline	ND	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Acetoin	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Arabinose	ND	-	ND	+	-	-	-	-	-	-
Asparagine	ND	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Histidine	ND	-	ND	ND	-	-	+	+	+	+
Methionine	ND	-	ND	ND	-	-	+	+	+	+
Serine	ND	-	ND	+	-	-	+	+	+	+
Phenylalanine	ND	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Casamino acids	-	-	ND	+	-	-	+	+	+	+
Tryptone	ND	ND	ND	ND	-	-	+	+	+	+
Tryptophan	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
Ethylene glycole	+	+	-	ND	-	-	-	-	-	-
Xylose	ND	-	ND	+	-	-	-	-	-	-
CO	+	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Dimethylamine	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Biotrypticase	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gelatin	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rhamnose	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pectin	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Starch	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Xylan	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-oxoglutarate	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Raffinose	ND	-	ND	ND	-	-	+	+	+	+
Trimethylamine	-	ND	-	+	ND	ND	-	-	-	-
Sarcosine	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetylene	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hexamethyltetraamine	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mandelate	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Choline	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Peptone	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Butyrate	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Succinate	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
In co-culture with methanogen										
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methanol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Betaine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Isoleucine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Valine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

今までに分離された嫌気酪酸酸化能を有する株は全て *Firmicutes* 門もしくは δ -*proteobacteria* 門に分類される。*Firmicutes* 門に属する株は *Syntrophomonadaceae* 科に属し、*syntrophomonas* 属、*thermosyntropha* 属、*Syntrophothermus* 属にそれぞれ分類される。一方で、 δ -*proteobacteria* 門に属する株は、*Syntrophaceae* 科の *Syntrophus* 属に属している。最初に環境中から分離された嫌気酪酸酸化細菌は、*Syntrophomonas wolfei* であり、土壌から分離された (McInerney *et al.*, 1981)。その時の共生のパートナーは *Desulfovibrio* sp. であることが記載されている。その他の酪酸酸化共生細菌は高温や中温の排水処理リアクター、アルカリ性の湖、無酸素状態にある海の泥など多様な環境条件下から分離株が獲得されている。それら共生細菌のパートナーは硫酸還元菌の他にも水素資化性メタン生成アーキア *Methanospirillum hungatei*、*Methanobacterium formicicum* や *Methanothermobacter thermautotrophicus* Δ H 株と多様なメタン生成アーキアと共生を築いていたことが報告されている。分離された酪酸酸化共生細菌の中でも *S. bryantii* は適度な塩分を好み、約 10 M の NaCl 濃度が推奨培地の組成として指定されている (Zhao *et al.*, 1990)。この濃度は他の酪酸酸化共生菌と比較して非常に高濃度であることがわかる。例えば、*S. palmitatica* は 1–200 mM 領域で生育することができ、至適濃度が 25 mM である (Hatamoto *et al.*, 2007)。また、*S. cellicola* は 0–450 mM が生育可能濃度で、至適が 100 mM 以下である (Wu *et al.*, 2006)。*S. curvata* は、0–100 mM の領域で生育が可能であり、50 mM 以下が至適生育濃度である (Zhang *et al.*, 2005)。唯一 *S. bryantii* に近い塩耐性を有していたのがアルカリ性の湖から分離された *T. lipolytica* である (Svetlitsnyi *et al.*, 1996)。この株は 5 M の NaCl で僅かに生育阻害を起し、10 M の NaCl で完全に生育阻害を起すことが報告されている。

単独基質に関しては、*S. wolfei* はクロトン酸を基質にすることで純粋培養ができるという報告が 1987

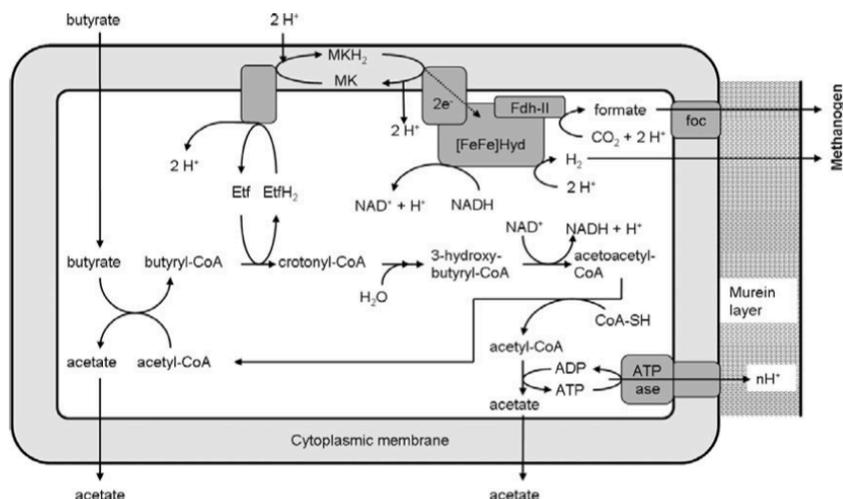


Figure 2-7 Hypothetical energy-transforming mechanisms in the butyrate-degrading *Syntrophomonas wolfei*. Adapted from Müller *et al.* (2010).

年に Beaty と Mcinerney らによってなされた。クロトン酸からは、酢酸と酪酸が代謝産物として生成される。それまでは、酪酸酸化共生菌を含む低級脂肪酸分解共生細菌は硫酸塩などの電子受容体を用いることが出来ないことから、水素を利用する微生物種との共生で資化し、生育することしかできないと考えられていた。そのため当時、この単独基質での生育報告は非常に重要な知見となった。それ以降、分離された株の基質特異性が調べられてきたが、*Syntrophomonas sapovorans* 以外の *Syntrophomonadaceae* 科に属する全ての酪酸酸化細菌は、クロトン酸を単独基質として利用することができる。ただし、クロトン酸を基質にして培養した時は生育速度が非常に遅く、*S. palmitatica* は $1.07 \pm 0.02/\text{day}$ (Hatamoto *et al.*, 2007)、*S. wolfei* や *S. lipocalidus* は 0.7、0.9/day (Beaty & Mcinerney, 1987; Sekiguchi *et al.*, 2000)である。*S. curvata* は、それらよりも生育速度が早く 2.2/day (Zhang *et al.*, 2004) であることが報告されている。

2-3-3. 共生機構

共生反応には、種間電子伝達が非常に重要な位置づけにある。種間電子伝達の方法として、水素とギ酸を電子キャリアとして利用する方法の他に活性炭や導電性鉱物等の電子伝達性を有する固体を利用する方法が考えられている。

共生系におけるギ酸濃度は非常に低濃度であることから、ギ酸による種間伝達が生じていることの明確な証拠は存在していなかったが、Hattori *et al.* (2001) は、嫌気共生酢酸酸化共生細菌 *T. phaeum* PB^T 株を用いて種間ギ酸伝達も水素伝達と同時に行っていることを証明した。この報告では、PB^T 株と水素およびギ酸を資化するメタン生成アーキア *M.thermautotrophicus* TM 株もしくは、水素資化性メタン生成アーキア *M.thermautotrophicus* ΔH 株を共培養させたところ PB^T 株と TM 株の組み合わせと比較し、PB^T 株と ΔH 株は酢酸酸化速度が5倍程遅くなるという結果が示された。この両者の培養系では水素分圧の変動やギ酸の蓄積濃度に対して顕著な違いが得られ、特にギ酸資化能力のないΔH 株との共生では高濃度のギ酸が蓄積された結果が出ており、その蓄積が生育に影響を及ぼしたことが示された。さらに、PB^T 株と TM 株には種間水素、ギ酸伝達に必要な Hydrogenase および Formate dehydrogenase の酵素活性の存在を明らかにしていることから、水素伝達に加えギ酸伝達も存在することが示されている。また、これらの種間伝達の詳細に関しては PB^T 株の他にも酪酸酸化共生細菌 *S. wolfei* や *S. bryantii* でも調べられている (Müller *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2010; Dong and Stams, 1995)。加えて、環境中におけるキャリアの選択は環境状態に依存するとの報告もある (Graentzdoerffer *et al.*, 2003)。

また、導電性鉱物を使用した報告では、Hematite や Magnetite、Ferrihydrite などを使って主に鉄還元細菌である *Geobacter* 属と、メタン生成アーキアとの共生による基質分解やメタン生成の促進 (Kato

et al., 2011; Kato *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015) に着目した研究がなされている。また、*Geobacter metallireducens* と *Geobacter sulfurreducens* の共培養系や *G. metallireducens* と *Methanosarcina bakeri* の共培養系に、biochar を入れて培養することで微生物間の電子伝達が促進され、基質分解効率の上昇や基質の酸化促進力が上昇したとの報告がある (Chen *et al.*, 2014)。それに加え、リアクターから得られたメタン生成グラニュール汚泥と活性炭を混合して培養したところ、メタン生成速度が促進されたとの報告もある (Liu *et al.*, 2012)。活性炭系の報告では鞭毛で直接電子を渡しているのではなく活性炭の表面にそれぞれの細胞が付着し、その固体を介すことで電子の授受が行われていると画像解析から考えられている。

2-4. メタン生成アーキアと嫌気共生細菌の生育場所

序論にも記載したようにメタン生成アーキアは、多様な環境に幅広く生存していることが知られている。主に、水田、枯渇油田、排水処理システム、海洋環境、動物の排泄物に着目した知見を紹介するが、それ以外にも湿地帯やバイオガスプラント、湖等幅広い環境下にメタン生成アーキアは生育している (e.g. Castro *et al.*, 2004; Rastogi *et al.*, 2008; Franzmann *et al.*, 1992)。

2-4-1. メタン生成条件における排水処理システム

微生物利用型の廃水処理システムには UASB リアクターが用いられている。この UASB プロセス内では高濃度有機物が含まれた排水を処理することにより、微生物の塊であるグラニュールが形成される。そのグラニュールは、外側、内側とで菌叢が変わっており有機物の分解の流れに沿って住み分けが行われている (Sekiguchi, 2006)。排水処理システム内で検出されるメタン生成アーキアの多くは *Methanosaeta* 属、*Methanosarcina* 属、*Methanospirillum* 属、*Methanobacterium* 属、*Methanomassiliicoccales* 目、高温処理システム内では *Methanothermobacter* 属に属していることが知られている。同様の環境では、既知のメタン生成アーキアに加え、未培養アーキアグループ WCHA1-57 (WSA2、ARC I とも呼ばれている) が高頻度に検出されている (e.g., Rivière *et al.*, 2009; Chouari *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 2008)。特に Rivière *et al.*, (2009) の報告ではアーキアドメインの中で存在率 51% の *Methanosarcinales* 目に続いて 36% の WCHA1-57 が存在したことが示されている。また、Chouari *et al.* (2005) らの報告でも、*Methanosarcinales* 目、*Methanomicrobiales* 目の検出率を上回る全体の 66% の検出率で WCHA1-57 グループが検出され、下水処理システムにおいては重要なアーキアだと考えられる。このアーキアの特徴として報告されていることは、メタン生成アーキアの典型的な基質であるギ酸や水素によって集積培養系の獲得に成功したとの報告はなされているが (Chouari *et al.*,

2005)、機能遺伝子の解析やその他の生理学的特性を示す解析はなされていない。したがって、利用基質や生育環境はメタン生成アーキアと類似しているが、メタン生成アーキアであることを示す確実な証拠は示されていない。

メタン生成アーキアに加えて、排水処理リアクター内の嫌気共生細菌についての研究も数多く行われている。今までに分離された嫌気共生細菌の大半は排水処理リアクターから獲得された株である。酪酸、酢酸、プロピオン酸、エタノール、安息香酸を基質とした共生細菌が得られている (e.g., Zhang *et al.*, 2004; Hattori *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Mountfort *et al.*, 1984)。

2-4-2. 枯渇油田域地下圏域

様々な油田域において発酵性細菌やホモ酢酸生成菌が存在することが知られている (e.g., Dahle *et al.*, 2008; Grabowski *et al.*, 2005)。また、*Methanocalculus* 属や *Methanoculleus* 属を含む酢酸、水素、メタノール、メチルアミンを資化するあらゆるメタン生成アーキアが高温から低温に至る油田において分離されている (Ollivier *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Nazina *et al.*, 2006)。加えて、既知の嫌気酪酸酸化共生細菌や嫌気酢酸酸化細菌と高い相同性を有するクローンが検出される場所の一つでもある (Mayumi *et al.*, 2011; Yamane *et al.*, 2011; Dahle *et al.*, 2008)。菌叢解析の結果でも示されているように油田内にはメタン生成活動が非常に活発な場所である。このような単一での菌体報告例だけではなく枯渇油田において、酢酸酸化共生細菌の存在・活性証明および油田中のメタン生成経路を証明した報告例もある (Mayumi *et al.*, 2011)。この報告では実際の油田中におけるメタン生成経路を解明するため模擬油層環境 (高温、高圧条件下) で枯渇油田の油層水と原油を植種源として培養したところ、培養開始時点では植種源に高濃度の酢酸が含まれていたが、培養が進行するにつれ、酢酸が減少し、その減少した酢酸と当量のメタンが生成された。このことから、嫌気酢酸酸化共生細菌を介したメタン生成反応が起きている可能性が示された。そのため、酢酸に ^{14}C ラベルをした培養実験を行ったところ主なメタン生成経路が炭酸還元反応であること、つまり水素資化性のメタン生成菌の経路であることが証明された。また、培養後の菌層解析の結果でも、既知の嫌気酢酸酸化共生菌に近縁な配列や水素資化性メタン生成菌の存在が確認できたことから、酢酸酸化共生細菌を介した経路がガス油田に存在することが明らかとなったことが報告されている。

2-4-3. 海洋環境

海底下深部で生成されたメタンは $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ の同位体組成の違いにより、その起源が調べられており、生物学的にメタンが生成される経路と非生物学的にメタンが生成される経路が存在する (Kawagucci *et*

al., 2013)。生物由来のメタンには大きく分けると2種類あり (Valentine *et al.*, 2004)、一種類目は水素を電子受容体として CO_2 還元を行う経路である。 CO_2 還元型の水素資化性メタン生成アーキアに利用される水素は、微生物による有機物発酵によって得られた水素と岩石破壊によって得られた無機物由来と由来すると考えられている (Wakita *et al.*, 1980; Kawagucci *et al.*, 2013)。2種類目は、微生物発酵で得られた酢酸、エタノール、トリメチルアミンなどの有機物からメタンを生成する代謝経路である。一方、非生物学的なメタン生成経路にも大きく2種類が存在する。(1) 非生物化学反応によってメタンが生成される経路である。非生物メタンは堆積物が存在しない熱水領域に多く存在しており、高温状態での化学反応により無機炭素化合物からメタンが生成される (McCollom & Seewald, 2007)。このような環境で生成されるメタンは、一般的に非生物メタンに限られると考えられている (Kawagucci & Toki, 2010)。(2) 熱分解によって有機物が分解することでメタンが生成される経路である (e.g., Giggensbach, 1997)。この反応は、有機物を含む堆積物が存在している熱水領域で起きることが知られている。熱分解によるメタン生成は、 100°C 程度の温度から盛んに起こると考えられており (Quigley & Mackenzie, 1988)、埋没された有機物が地下の熱源に近づき熱せられることで、アルケンが生成・分解されることで、カルボン酸が生成され、最終的に水素、メタン、 CO_2 、アルコールなどが最終産物として生成される (Seewald, 2003)。同様の環境にある日本海隠岐堆では、深さごとの従属栄養細菌の細胞数が数えられており、最深部である海底下400 mから500 mの堆積物中には300 m付近の堆積物と比較して、嫌気従属栄養細菌の細胞数が約100倍増加したことが報告されている (Cragg *et al.*, 1992)。この結果から、熱分解で得られた分解産物を微生物が利用していることが示唆された報告もある。さらに、同様の環境

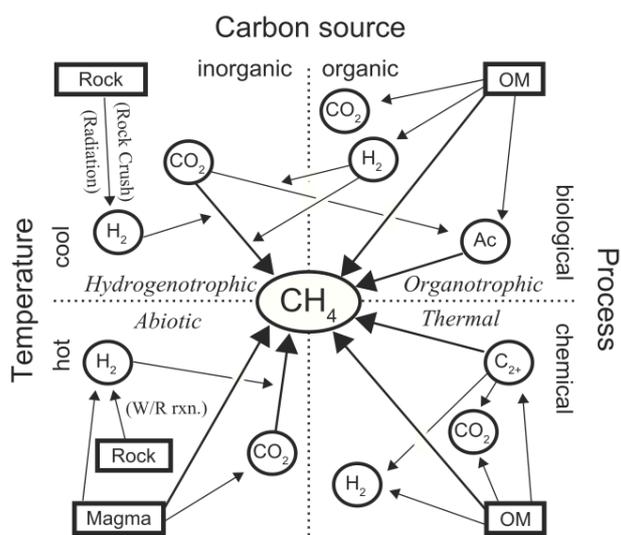


Figure 2-8 A schematic drawing illustrating methanogenic pathways in subseafloor geofluid systems. Adapted from Kawagucci *et al.* (2013).

下で、複数のフィールドにおいて $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ に加えて、同じくメタンの起源の指標となるメタンとエタンの存在比 (C_1/C_2)の測定が行われているが、その結果からも熱分解によるメタン生成以外にも、熱分解産物から得られる水素を利用して CO_2 還元型のメタン生成が起きていることが示唆されている (Kawagucci *et al.*, 2013)。メタンの起源の指標として、 $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ 値が使われているが、微生物由来のメタンは ^{13}C が欠乏することから、約 -110 から-50‰の値をとり、発酵型よりも CO_2 還元型由来のメタンの方が $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ は低い値を示す (Whiticar,

1999)。一方で、非生物メタンでは-20‰ から-5‰ (Kawagucci *et al.*, 2013)、有機物の熱分解メタンは、-50‰ から-20‰ の値を示すことが報告されている(Whiticar, 1999)。ところが2004年に中央インド洋灰嶺の水深 2,410-2,450 m に位置している深海熱水フィールドから分離された *Methanopyrus Kandleri* strain 116 は 40 MPa で培養したところ $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ の値が、今まで指標として使われていた値とは異なる -12‰ 以下であったことと、生物の存在が証明されていなかった環境 (130°C、40 MPa) の高圧条件下かつ高温で2時間生存出来ることが報告されたことから (Takai *et al.*, 2008)、非生物メタン起源だと考えられていたメタンの一部は微生物由来である可能性も示唆されている (Kawagucci & Toki, 2010)。

一般的に微生物由来のメタン生成は、海洋環境のように高い硫酸塩濃度 (27-28 mM) が存在する環境下では、硫酸塩還元菌との基質競合によりメタン生成活性は抑制されると考えられている。したがって、海底堆積物環境においてメタン生成活動がより活発となるのは、硫酸塩還元菌の代謝により硫酸塩が枯渇した堆積物深さ以深であると考えられている。海底堆積物からメタン生成アーキアの培養に成功した例は、現在までに数例報告されている。初めて単離されたメタン生成アーキアは、2002年にバルト海 (水深 241m) の表層堆積物から単離された *Methanosarcina baltica* である (Klein *et al.*, 2002)。この分離株は、メタノールやメチルアミン等のメチル化合物、または、酢酸を用いることでメタン生成を行うことが示されている。翌年の 2003 年には Mikucki *et al.* (2003) によって *Methanoculles submarinus* が分離された。この株は、南海トラフの水深 950 m、堆積物深さ 247 m から分離され、メタンハイドレートを形成する堆積物から初めて分離された。特徴付けの結果から酢酸を炭素源とし、水素あるいはギ酸をエネルギー源として、メタン生成および生育が可能であることが示された。さらに 2006 年には、同じ堆積物から H_2/CO_2 型のメタン生成により独立栄養的に生育が可能な *Methanococcus aeolicus* が単離されている (Kendall *et al.*, 2006)。加えて、最新の分離株の報告は 2011 年に行われており、排水処理分野で使用されている down-flow hanging sponge (DHS) リアクターを活用することで、下北八戸沖の深海掘削コア試料から *Methanobacterium*、*Methanobrevibacter*、*Methanosarcina*、*Methanococcoides* 属に分類されるメタン生成アーキアの分離に成功したことが報告されている (Imachi *et al.*, 2012)。MO-MB1 株 (*Methanobacterium* 属)は、 H_2/CO_2 で生育し、MO-MS1 株 (*Methanosarcina* 属)はメタノールを基質とする。また、MO-MCD 株 (*Methanococcoides* 属)はトリメチルアミンを、MO-MVB 株 (*Methanobrevibacter* 属)はギ酸を基質にすることができる。このように分離されたメタン生成アーキアはわずかではあるが、それらの利用基質の多様性から考えると、極めて多種多様なメタン生成菌が海底下に存在している可能性が示唆される。また、*mcrA* 遺伝子を対象としたメタン生成アーキアの分布調査も行われており、南海トラフ (Newberry *et al.*, 2004)、ペルー海溝

(Inagaki *et al.*, 2006)、ペルーマージン (Parkes *et al.*, 2005)、カスカディアマージン (Yoshioka *et al.*, 2010) にて解析が行われている。ペルー海溝においては、*Methanosarcinales* 目に属する *mcrA* 遺伝子のみが検出された一方で、それ以外の上述の堆積物においては *Methanosarcinales* 目 もしくは *Methanobacteriales* 目あるいは双方に属する *mcrA* 遺伝子が検出されている。さらに最近の研究では、anaerobic methanotroph (ANME) とよばれる嫌氣的メタン酸化反応を行うアーキアが、メタン生成反応にも寄与している可能性を示す報告がいくつか報告されている (e.g., Lloyd *et al.*, 2011; Bertram *et al.*, 2013)。ANME アーキアはメタン生成経路の全く逆反応によりメタンを分解することが推定されていることから、硫酸塩の有無に応じて代謝をシフトさせている可能性がある。

海底下における有機物分解は、一般的な有機物分解と同様に分解されやすい物質から分解されていき、中間物質である酢酸、酪酸、プロピオン酸やエタノールを経由し、最終的にメタンと CO_2 が生成する経路を通ると考えられている (Thauer *et al.*, 2011)。ところが、有機物分解の末端部分の反応を担うメタン生成アーキアについての知見は、前述したようにいくつか報告されているものの、その途中の分解経路やその分解に関与している微生物については明らかにされていない。中でも、メタン生成反応層での嫌気環境における酪酸、酢酸、プロピオン酸等の低級脂肪酸の微生物分解は嫌気共生細菌とメタン生成アーキアの共生系による分解でしか起こり得ないと考えられているが、その共生機能を有した嫌気共生細菌の分離株や集積培養系は存在しない。今までに海底下では 16S rRNA および遺伝子を対象とした菌叢解析が行われ、既知の嫌気共生細菌の 16S rRNA 遺伝子配列と相同性の高い配列は、我々の知る限りほとんど検出されていない。唯一、 *δ -proteobacteria* 門に属する嫌気エタノール共生細菌の分離株の 16S rRNA 遺伝子配列と相同性が高いクローンが検出されている (e.g., Hoshino *et al.*, 2013; Schreiber *et al.*, 2010)。しかし、 *δ -proteobacteria* 門は、硫酸塩が存在する環境から多様に検出されてきているため、この得られた配列が共生機能を有しているかは明らかではない。海底下においては、この共生経路によるメタン生成の直接的な証拠は未だに得られていないが、仮にこの経路によるメタン生成が存在する場合は複雑なものになると考えられる。

2-4-4. 水田

水田から放出されるメタンは、地球全体のメタン排出量の 10-25%にも昇るといふ試算が行われており (Erkel *et al.*, 2006)、主要なメタン放出源であることが知られている。水田中には、酸素、硝酸、鉄イオン、硫酸塩が存在するが、植物由来の炭素の流入量が多いことからそれらの物質の消費速度は非常に早く電子受容体が存在しない環境にあるためメタン生成アーキアが生息しやすい環境状態にある。水田におけるメタンガスは H_2/CO_2 もしくは酢酸に由来する。酢酸を資化するメタン生成アーキアとして

Methanosarcinales 目に属する *Methanosaetaceae* 科、*Methanosarcinaceae* 科、水素を資化するメタン生成菌として *Methanomicrobiales* 目、*Methanobacteriales* 目、*Methanocellales* 目、*Methanosaetaceae* 科が水田中に存在することが知られている。中でも稲根では *Methanocellales* 目が優占し、バルク土壌では *Methanosaetaceae* 科が優占することが報告されている。このように住み分けが生じる理由として *Methanosaetaceae* 科を含む多くのメタン生成アーキアは水田の洪水が起きた後、水田から流れでてしまうが稲根で生育している *Methanocellales* 目は流れずに水田に残留し、基質競合を起こしていた *Methanosaetaceae* 科不在の中で特に単独的に優占化すると考えられている (Krüger *et al.*, 2005)。 *Methanocellales* 目が水田に特異的に優占すると考えられる理由は他にもあり、水田の季節ごとの状態が関係している。水田は季節によって表面の水が無くなることで土がむき出しになることから、酸素耐性、耐熱性を有する必要がある。 *Methanocellales* 目は、比較的高い温度 (45-50°C) で活動することが可能であり (Wu *et al.*, 2006)、酸素耐性遺伝子を有していることも報告されている (Erkel *et al.*, 2006; Lü and Lu, 2012)。

また、分離されている嫌気プロピオン酸酸化共生菌の大半は排水処理汚泥から得られているが、水田に生育するプロピオン酸酸化共生菌に焦点をあてた報告も存在する。例えば、Lueders *et al.*, (2004) の報告では rRNA を対象とした stable-isotope probing 法 (SIP 法) をしたところ、*Syntrophobacter* spp. や *Smithella* spp. が水田中のプロピオン酸酸化反応に関与していることが示された。

2-4-5. 動物の腸および糞便

ヒト、牛、羊、ウサギ、シロアリ、ゴキブリなど様々な生物種にわたる腸や糞便には *Methanobacteriales* 目の *Methanobrevibacter* 属が最も優占しており、同様に *Methanosphaera* 属も腸内に特異的に生息するメタン生成菌として知られている (Liu & Whitman, 2008)。さらにヒトの腸から検出されるメタン生成アーキアは、*Methanobrevibacter smithii* と *Methanosphaera stadtmanae* の2種類に限定されており、腸内におけるメタン生成アーキアの多様性は非常に低いことで知られている (Dridi *et al.*, 2009)。これらの優位性の理由について述べている報告もある (Samuel & Gordon, 2007)。ところが、2012年にそれらのメタン生成アーキアに加え、ヒトの腸由来のメタン生成アーキアとして3種類目のメタン生成アーキア *Methanomassiliicoccus luminyensis* がヒトの糞便から分離された (Dridi *et al.*, 2012)。

2-5. 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) ラベルを触媒酵素として用いた FISH 法

FISH 法は、16S rRNA、mRNA、遺伝子を対象にして環境中の微生物を特異的に視覚的に検出させることができる手法である。ところが、FISH 法の課題として rRNA の含有量が少ない微生物、もとも

と発現量が少ない mRNA や遺伝子を対象にした場合、通常の FISH 法で用いられているオリゴヌクレオチドプローブ、すなわち 5'末端もしくは両末端に蛍光色素が付加されているプローブでは検出感度が低く細胞を検出することができないという問題がある。そのため、現在までに数多くの高感度 FISH 法が開発されている (e.g., Hodson *et al.*, 1995; Hoshino *et al.*, 2010; Maruyama *et al.*, 2003; Zwirgmaier *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2014; Kawakami *et al.*, 2012)。その中の一つで、酵素反応によるシグナル増幅法を用いる方法として catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH (tyramide signal amplification (TSA)-FISH) が報告されている。この手法は、プローブに標識されている Horseradish peroxidase; HRP が、過酸化水素の存在下で蛍光色素が標識されているチラミドをラジカル中間体に変換させ、その変換体が非特異的に細胞中のチロシンやトリプトファン等の芳香族化合物と反応することで、最終的に細胞に沈着し、通常の FISH 法よりも高感度に細胞を検出することができる。さらに、TSA 反応を 2 回繰り返すことで CARD-FISH よりも感度を向上させた two-pass TSA FISH 法も開発されている (Kubota *et al.*, 2006)。この手法では、最初に dinitrophenyl : DNP が標識されているチラミドを細胞内に沈着させた後、HRP 標識抗 DNP を細胞内に浸透させ、既に細胞に沈着している DNP と結合させる。その時点で、CARD-FISH 法を用いた時よりも多くの HRP が細胞中に存在することになる。最終的に蛍光色素が付加されたチラミドを細胞内に浸透させて細胞内の HRP と反応させることで CARD-FISH よりも感度が上がる。感度的には、16S rRNA を標的とした通常の FISH 法で活性汚泥中の *E. coli* 細胞を検出させるには $1,400 \pm 170$ copies/cell 以上の 16S rRNA が必要であるが CARD-FISH 法では 36 ± 6 から 54 ± 7 copies/cell 以上の 16S rRNA 含有量で検出することが可能であると言われている (Hoshino *et al.*, 2008)。さらに、TSA-FISH 法、two-pass TSA FISH 法とポリヌクレオチドプローブを併用した方法を用いることでゲノム DNA 遺伝子上の 1 遺伝子を検出例も報告されている (Moraru *et al.*, 2010; Kawakami *et al.*, 2012)。1 遺伝子を検出できた理由としては、オリゴヌクレオチドプローブを用いた CARD-FISH 法では HRP の修飾箇所は一箇所に対し、ポリヌクレオチドプローブでは数百 mer にわたり多くの抗 DNP が組み込まれていることにより、より多くの HRP をプローブに修飾することが可能である。このことから、ポリヌクレオチドプローブを用いた two-pass TSA FISH 法の感度はオリゴヌクレオチドプローブを用いた場合よりも向上し、一遺伝子を検出させることが可能になった。

CARD-FISH 法や two-pass TSA FISH 法は通常の FISH 法よりも高感度というメリットがある一方で、デメリットも存在する。通常の FISH 法に用いられる蛍光色素の分子量は 500–1,000 Da であるため、細胞に対して透過性処理を行わなくてもプローブを細胞内に浸透させることが可能である (Kubota, 2013)。それに対して HRP の分子量は 40 kDa もの大きさがあることから HRP を細胞内に浸透させる

ためには何らかの方法で透過性処理、すなわち細胞壁処理を必要とするメタン生成アーキアも存在する (Kubota, 2013)。メタン生成アーキアは種によって有している細胞壁構造が異なり、今までに純粋分離されたメタン生成アーキアには s-layer、pseudomurein、methanochondroitin と sheath の4種類の細胞壁構造が存在することが知られている (Kubota *et al.*, 2008)。そのうちの s-layer は、浸透圧や剪断力に敏感であることに加え、SDS により s-layer タンパク質は可溶化される。このことから、細胞壁構造 s-layer を有しているメタン生成アーキア *Methanococcus vannielii*、*Methanoculleus bourgensis*、*Methanlobus vulcani*、*Methanogenium organophilum* や *Methanosarcina mazei* は、特別な細胞壁処理を行わなくてもハイブリダイゼーションバッファーに含まれている SDS で HRP を細胞内に浸透させることができることが知られている (Kubota *et al.*, 2008)。加えて、Sheath を有する一部のメタン生成アーキア *Methanospirillum hungatei* と *Methanosaeta thermophila* は、得られた蛍光は弱く十分な浸透性が得られたわけでは無かったが、細胞の透過性処理を行わなくても HRP を細胞内に浸透させることが可能であったことが報告されている (Kubota *et al.*, 2008)。その一方で、pseudomurein、methanochondroitin や sheath を有する一部のメタン生成アーキアは何らかの方法で細胞壁処理を行わ

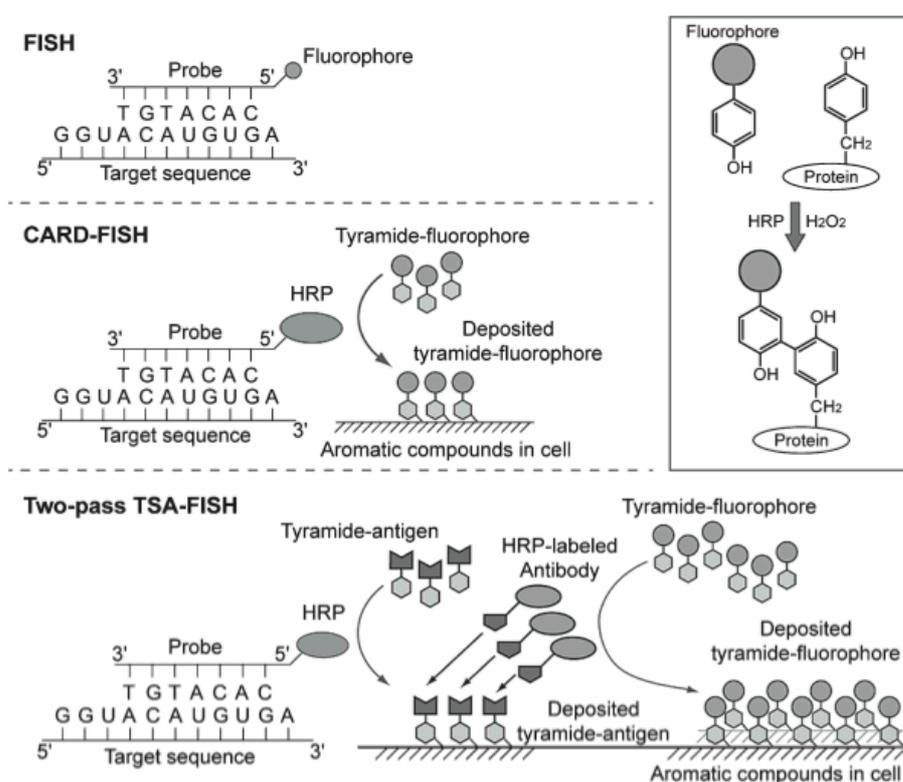


Figure 2-9 Schematic depiction of FISH, CARD-FISH, and two-pass TSA-FISH. Adapted from Kubota (2013).

なければ HRP を浸透させることができなかつたことが報告されている。以上のことから、CARD-FISH や two-pass TSA FISH を行う際には同時に細胞壁処理検討を行う必要があるというデメリットがあり、実際に lysozyme、achromopeptidase、proteinase K、pseudomurein endopeptidase (PeiW) などの酵素を用いた方法や HCl、マイクロ波を使った物理的な方法が標準的な細胞壁処理方法として多く用いられているが、どの方法に対して効果があるのか、試薬の至適条件範囲が狭く、至適条件を定めることに膨大な時間と労力を有する。

参考文献

- Balk, M., Weijma, J. and Stams, A. J. (2002). *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1361–1368.
- Beaty, P. S. & Mcinerney, M. J. (1987). Growth of *Syntrophomonas wolfei* in pure culture on crotonate. *Arch. Microbiol.* 147, 389–393.
- Bertram, S., Blumenberg, M., Michaelis, W., Siegert, M., Krüger, M. and Seifert, R. (2013). Methanogenic capabilities of ANME-archaea deduced from ¹³C-labelling approaches. *Environ. Microbiol.* 15, 2384–2393.
- Borrel, G., O'Toole, P. W., Harris, H. M., Peyret, P., Brugère, J. F., and Gribaldo, S. (2013). Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol. Evol.* 5, 1769–1780.
- Brayant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J., and Wolfe, R. S. (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv. für. Mikrobiologie.* 59, 20–31.
- Castro, H., Ogram, A., and Reddy, K. R. (2004). Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the florida everglades phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the florida, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6559–6658.
- Chen, S., Liu, X. and Dong, X. (2005). *Syntrophobacter sulfatireducens* sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1319–1324.
- Chen, S., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Liu, F., Fan, W., *et al.* (2014). Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Sci. Rep.* 4, 5019.
- Cheng, L., Qiu, T.L., Yin, X.B., Wu, X.L., Hu, G.Q., Deng, Y., and Zhang, H. (2007). *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen isolated from oil-production water, and proposal of *Methermicoccaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2964–2969.
- Cheng, L., Qiu, T. L., Li, X., Wang, W. D., Deng, Y., Yin, X. B., Zhang, H. (2008). Isolation and

- characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China. FEMS. Microbiol. Lett. 285, 65–71.
- Chouari, R., Le, Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., and Sghir, A. (2005). Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ. Microbiol.* 7, 1104–15.
- Cragg B. A., Harvey, S. M., Fry J. C., Herbert R. A. and Parkes R. J. (1992), Bacterial biomass and activity in the deep sediment layers of the Japan sea, Hole 798b, Proc. Ocean. Drilling program Sci. Results 127/128, 761–776.
- Cruz Viggli, C., Rossetti, S., Fazi, S., Paiano, P., Majone, M., and Aulenta, F. (2014). Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7536–43.
- Dahle, H., Garshol, F., Madsen, M. and Birkeland N. K. (2008). Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field, *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 37–49.
- de Bok, F. A., Harmsen, H. J., Plugge, C. M., de Vries M.C., Akkermans A.D., de Vos W. M., and Sams, A. J. (2005). The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1697–1703.
- Diekert, G and Wohlfarth, G. (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 209–221.
- Dong, X and Stams, A. J. (1995). Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation. *Anaerobe* 1, 35–39.
- Dridi, B., Henry, M., Khéchine, A. E., Raoult, D. and Drancourt, M. (2009). High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One* 4, e7063.
- Dridi, B., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Raoult, D., and Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1902–1907.
- Enoki, M., Shinzato, N., Sato, H., Nakamura, K., and Kamagata, Y. (2011). Comparative proteomic analysis of *Methanothermobacter thermautotrophicus* ΔH in pure culture and in co-culture with a butyrate-oxidizing bacterium. *PLoS One* 6, e24309.
- Erkel, C, Kube, M, Reinhardt, R and Liesack, W. (2006). Genome of rice cluster I archaea—the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science* 313, 370–372.
- Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS. Microbiol. Rev.* 23, 13–38.
- Franzmann, P. D., Springer, N., Ludwig, W., Conway D.M., and Rohde, M. (1992). A methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococoides burtonii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 573–581.
- Giggenbach, W. F. (1997). Relative importance of thermodynamic and kinetic processes in governing the chemical and isotopic composition of carbon gases in high heatflow

- sedimentary basins. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 3763–3785.
- Grabowski, A., Nercessian, O., Fayolle, F., Blanchet, D. and Jeanthon, C. (2005). Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 427–443.
- Graentzdoerffer, A., Rauh, D., Pich, A. and Andreesen, J. R. (2003). Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. *Arch. Microbiol.* 179, 116–130.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Fukayo, S., Ohashi, A., and Harada, H. (2007). *Syntrophomonas Palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2137–2142.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, and Shoun, H. (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 4, 1601–1609.
- Hattori, Luo, H., Shoun, H. and Kamagata, Y. (2001). Involvement of formate as an interspecies electron carrier in a syntrophic acetate-oxidizing anaerobic microorganism in coculture with methanogens. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 294–298.
- Hattori, S., Galushko, A. S., Kamagata, Y. and Schink, B. (2005). Operation of the CO dehydrogenase/Acetyl Coenzyme A pathway in both acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium *Thermacetogenium phaeum*, *J. Bacteriol.* 187, 3471–3476.
- Hattori, S. (2008). Minireview: Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments, *Microbes Environ.* 23, 118–127.
- Hedderich, R. and Whitman, B. W. (2013). Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing archaea. *The Prokaryotes*, 635–662.
- Hodson, R. E., Dustman, W. A., Garg, R. P. and Moran, M. A. (1995). In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4074–4082.
- Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. and Wagner, M. (2008). Quantification of target molecules needed to detect micro-organisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5068–5077.
- Hoshino, T. and Schramm, A. (2010). Detection of denitrification genes by in situ rolling circle amplification-fluorescence in situ hybridization to link metabolic potential with identity inside bacterial cells. *Environ. Microbiol.* 12, 2508–2517.
- Hoshino, T. and Inagaki, F. (2013). A comparative study of microbial diversity and community structure in marine sediments using poly (A) tailing and reverse transcription-PCR. *Front. Microbiol.* 4, 160.
- Iino, T., Tamaki, H., Tamazawa, S., Ueno, Y., Ohkuma, M., Suzuki, K., Igarashi, Y., *et al.* (2013). *Candidatus Methanogramum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales*

- ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. *Microbes Environ.* 28, 244–250.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A. and Harada, H. (2002). *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1729–1735.
- Imachi, H., Sakai, S., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., and Sekiguchi, Y. (2007). *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1487–1492.
- Imachi, H., Aoi, K., Tasumi, Eiji., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., *et al.* (2011). Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *ISME J.* 5, 1913–1925.
- Inagaki, F., Kuypers, M. M., Tsunogai, U., Ishibashi, J., Nakamura, K., Treude, T., Ohkubo, S., *et al.* (2006). Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14164–14169.
- Jetten, M. S. M., Stams, A. J. M. and Zehnder, A. J. B. (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp., *FEMS Microbiol. Lett.* 88, 181–198.
- Kastening, B., Hahn, M., Heins, M., Felde, U. Z. (1997). Electronic properties and double layer of activated carbon. *Electrochim. Acta.* 42, 2789–2799.
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K. (2011). Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 12, 3114–3123.
- Kato, S., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2012). Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10042–10046.
- Kawagucci, S. and Toki, T., (2010). Origin of methane in subseafloor geofluid systems, *Chikyukagaku* 44, 137–154.
- Kawagucci, S., Ueno, Y., Takai, K., Toki, T., Ito, M., Inoue, K., Makabe, A. and *et al.*, (2013). Geochemical origin of hydrothermal fluid methane in sediment-associated fields and its relevance to the geographical distribution of whole hydrothermal circulation. *Chem. Geol.* 339, 213–225.
- Kawakami, S., Hasegawa, T., Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H., Ohashi, A., and Kubota, K. (2012). Detection of single-copy functional genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes. *J. Microbiol. Methods* 88, 218–223.
- Kendall, M. M., Liu, Y., Sieprawaska, L. M., Stetter, K. O., Whitman, W. B., and Boone, D. R. (2006). *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1525–1529.
- Klein, D. V., Arab, H., Völker, H and Thomm, M. (2002). *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea. *Extremophiles.* 6, 103–110.
- Koster, I. W., and Lettinga, G. (1984). The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agr. Waste.* 9, 205–216.

- Krüger, M., Frenzel, P., Kemnitz, D., and Conrad, R. (2005). Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flooded Italian rice field. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 51, 323–331.
- Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., and Harada, H. (2006). Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH). *J. Microbiol. Methods.* 66, 521–528.
- Kubota, K., Imachi, H., Kawakami, S., Nakamura, K., Harada, H., and Ohashi, A. (2008). Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J. Microbiol. Methods* 72, 54–59.
- Kubota, K. (2013). CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes Environ.* 28, 3–12.
- Lee, M. J., and Zinder, S. H. (1988). Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂-CO₂. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 124–129.
- Lehmacher, A., and Klenk, H. P. (1994). Characterization and phylogeny of MCR II, a gene cluster encoding an isoenzyme of methyl coenzyme M reductase from hyperthermophilic *Methanothermobacter fervidus*. *Mol. Gen. Genet.* 243, 198–206.
- Leigh, J. A., Albers, S. V., Atomi, H., and Allers, T. (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 577–608.
- Liu, Y., and Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 171–189.
- Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2012). Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ. Sci.* 5, 8982–8989.
- Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2015). Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange. *Environ. Microbiol.* 17, 648–655.
- Lü, Z., and Lu, Y. (2012). *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from Chinese rice field soil. *PLoS One* 7, e35279.
- Lloyd, K. G., Alperin, M. J., and Teske, A. (2011). Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative anaerobic methanotrophic (ANME) archaea. *Environ. Microbiol.* 13, 2548–2564.
- Lovell, C. R., and Hui, Y. (1991). Design and testing of a functional group-specific DNA probe for the study of natural populations of acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2602–2609.
- Lueders, T., Pommerenke, B., and Friedrich, M. W. (2004). Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5778–5786.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., and Riley, P. W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to

- 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521–3530.
- Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. (2003). Detection of bacteria carrying the *stx₂* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5023–5028.
- Mayumi, D., Mochimaru, H., Yoshioka, H., Sakata, S., Maeda, H., Miyagawa, Y., Ikarashi, M. and *et al.* (2011). Evidence for syntrophic acetate oxidation coupled to hydrogenotrophic methanogenesis in the high-temperature petroleum reservoir of Yabase oil field (Japan). *Environ. Microbiol.* 13, 1995–2006.
- McCollom, T. M. and Seewald, J. S. (2007). Abiotic synthesis of organic compounds in deep-sea hydrothermal environments. *Chem. Rev.* 107, 382–401.
- McInerney, M. J., Bryant, M. P., Hespell R. B. and Costerton J. W. (1981). *Syntrophomonas wolfeigen*. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1029–1039.
- Mikucki, J. A, Liu, Y., Delwiche, M., Colwell, F. S. and Boone, D. R. (2003). Isolation of amethanogen from deep marine sediments that contain methane hydrates, and description of *Methanoculleus submarinus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3311–3316.
- Min, H., and Zinder, S.H. (1990). Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* sp. nov., *Arch. Microbiol.* 153, 399–404.
- Moraru, C., Lam, P., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M., and Amann, R. (2010). GeneFISH—an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environ. Microbiol.* 12, 3057–3073.
- Mountfort, D. O., Brulla, W. J., Krumholz, L. R. and Bryant, M. P. (1984). *Syntrophus buswellii* gen. nov. sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 216–217.
- Müller, N., Schleheck, D., and Schink, B. (2009). Involvement of NADH: acceptor oxidoreductase and butyryl-CoA dehydrogenase in reversed electron transport during syntrophic butyrate oxidation by *Syntrophomonas wolfei*. *J. Bacteriol.* 191, 6167–6177.
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J., and Plugge, C. M. (2010). Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 489–499.
- Nakamura, K., Kamagata, Y. (2006). Recent topics on methanogenic syntrophs. *J. Environ. Biotech.* 5, 81–89.
- Nazina, T. N., Shestakova, N. M., Grigor'yan, A. A., Mikhailova, E. M., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Feng, C. *et al.* (2006). Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang oil field (P. R. China). *Microbiology* 75, 55–65.
- Newberry, C. J, Webster, G., Cragg, B. A., Parkes, R.J., Weightman, A. J., and Fry, J.C. (2004). Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, ocean drilling program leg 190. *Environ. Microbiol.* 6, 274–287.
- Nobu, M. K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe, S. G., Woyke, T., and Liu, W. T. (2014).

- Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. ISME. J. doi: 10.1038/ismej.2014.256.
- Ollivier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Magot, M., Patel, K. C., Prensier, G., and Garcia, J. L. (1998). *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 821–828.
- Parkes, R. J., Webster, G., Cragg, B. A., Weightman, A. J., Newberry, C. J., Ferdelman, T. G., Kallmeyer, J., *et al.* (2005). Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. Nature 436, 390–394.
- Papke, R. T., White, E., Reddy, P., Weigel, G., Kamekura, M., Minegishi, H., Usami, R. *et al.* (2011). A multilocus sequence analysis approach to the phylogeny and taxonomy of the Halobacteriales. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 2984–2995.
- Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L., and Brune, A. (2012). “*Methanoplasmatales*,” *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8245–8253.
- Pester, M., and Brune, A. (2006). Expression profiles of *fts* (FTHFS) genes support the hypothesis that spirochaetes dominate reductive acetogenesis in the hindgut of lower termites. Environ. Microbiol. 8, 1261–1270.
- Pihl, T. D., Sharma, S. and Reeve, J. N. (1994). Growth phase-dependent transcription of the genes that encode the two methyl coenzyme M reductase isoenzymes and N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase in methanobacterium thermoautotrophicum delta H. J. Bacteriol. 176, 6384–6391.
- Quigley, T. M. and Mackenzie, A. S. (1988). The temperatures of oil and gas formation in the subsurface. Nature 333, 549–552.
- Rastogi, G., Ranade, D. R., Yeole, T. Y., Patole, M. S. and Shouche, Y. S. (2008). Investigation of methanogen population structure in biogas reactor by molecular characterization of methyl-coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes. Bioresour. Technol. 99, 5317–5326.
- Reeve, J. N., Nölling, J., Morgan, R. M. and Smith, D. R. (1997). Methanogenesis: genes, genomes, and who’s on first? J. Bacteriol. 179, 5975–5986.
- Reguera, G., McCarthy K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tominen, M. T. and Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. Nature. 1098–1101
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F., *et al.* (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. Nature 499, 431–437.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., *et al.* (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. ISME. J. 3, 700–714.
- Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Liu, F., Shrestha, M., Shrestha, D., *et al.* (2014). A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to Methanosaeta for the reduction of carbon dioxide to methane. Energy. Environ. Sci. 7, 408–415.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H., and Kamagata, Y. (2007). Isolation of

- key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4326–4331.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Tseng, I. C., Ohashi, A., Harada, H. and Kamagata, Y. (2009). Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4892–4896.
- Sakai, S., Conrad, R. and Imachi, H. (2014). The Family *Methanocellaceae*. *The Prokaryotes* 209–214.
- Samuel, B. S., Hansen, E. E., Manchester, J. K., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Fulton, R., *et al.* (2007). Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10643–10648.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280.
- Schink, B. and Stams, A. J. M. (2006). Syntrophism among Prokaryotes, *Prokaryotes*, 2, 309–335.
- Schnürer, A., Schink, B. and Svensson, B. H. (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 64, 1145–1152.
- Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A. and Amann, R. (2010). Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environ. Microbiol.* 12, 2327–2340.
- Seewald, J. S. (2003). Organic-inorganic interactions in petroleum-producing sedimentary basins. *Nature.* 426, 327–333.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. and Harada, H. (2000). *Syntrophothermuslipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 771–779.
- Sekiguchi, Y. (2006). Yet-to-be culture microorganisms relevant to methane fermentation processes. *Microbes Environ.* 21, 1–15.
- Sousa, D. Z., Smidt, H., Alves, M. M. and Stams, A. J. (2007). *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 609–615.
- Sprott, G. D. and Patel, G. B. (1986). Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 7, 358–363.
- Steinberg L. M. and Regan J. M. (2008). Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6663–6671.
- Svetlitsnyi, V., Rainey, F. and Wiegel, J. (1996). *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short- and long-chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1131–1137.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., *et al.* (2008). Cell

- proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 10949–10954.
- Valentine, D. L., Chidthaisong, A., Rice, A., Reeburgh, W. S., Tyler, S. C. (2004). Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens. Geochim. Cosmochim. Acta. 68, 1571–1590.
- Wakita, H., Nakamura, Y., Kita, I., Fujii, N. and Notsu, K. (1980). Hydrogen release: new indicator of fault activity. Science 210, 188–190.
- Westerholm, M., Roos, S. and Schnürer, A. (2010). *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. FEMS. Microbiol. Lett. 309, 100–104.
- Whiticar, M. J. (1999). Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. Chem. Geol. 161, 291–314.
- Widdel, F. and Pfennig, N. (1977). A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, Desulfotomaculum (emend.) acetoxidans. Arch. Microbiol. 112, 119–122.
- Worm, P., Koehort, J. J., Visser, M., Sedano-Núñez, V. T., Schaap, P. J., Plugge, C. M., *et al.* (2014). A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities. Biochim. Biophys. Acta. 1837, 2004–2016.
- Wu, C., Liu, X. and Dong, X. (2006). *Syntrophomonas cellicola* sp. nov., a spore-forming syntrophic bacterium isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar, and assignment of *Syntrophospora bryantii* to *Syntrophomonas bryantii* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2331–2335.
- Wu, X. L., Friedrich, M. W. and Conrad, R. (2006). Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils, Environ. Microbiol. 8, 394–404.
- Yamaguchi, T., Kawakami, S., Hatamoto, M., Imachi, H., Takahashi, M. Araki, N., *et al.* (2014). In situ DNA-HCR: A facilitated in situ hybridization chain reaction system for the detection of environmental microorganisms. Environ. Microbiol. doi: 10.1111/1462-2920.12745.
- Yamane, K., Hattori, Y., Ohtagaki, H., and Fujiwara, K. (2011). Microbial diversity with dominance of 16S rRNA gene sequences with high GC contents at 74 and 98 °C subsurface crude oil deposits in Japan. FEMS. Microbiol. Ecol. 76, 220–235.
- Yoshioka, H., Maruyama, A., Nakamura, K., Higashi, Y., Fuse, H., Sakata, S., *et al.* (2010). Activities and distribution of methanogenic and methane-oxidizing microbes in marine sediments from the Cascadia Margin. Geobiology 8, 223–233.
- Zhang, C., Liu, X. and Dong, X. (2005). *Syntrophomonas erecta* sp. nov., a novel anaerobe that syntrophically degrades short-chain fatty acids. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 799–803.
- Zhang, C., Liu, X. and Dong, X. (2004). *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 969–973.
- Zhao, H. X., Yang, D., Woese, C. R., and Bryantls, M. P. (1990). Assignment of *Clostridium bryantii* to *Syntrophospora bryantii* gen. nov., comb. nov. on the basis of a 16s rRNA sequence analysis of its crotonate-grown pure culture. Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 40–44.

- Zinder, S. H. and Koch, M. (1984). Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* 138, 263–272.
- Zwirgmaier, K. Ludwig, W and Schleifer, K. H. (2004). Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization–RING-FISH. *Mol. Microbiol.* 51, 89–96.

第3章

未培養メタン生成アーキアの系統学的位置の特定の試み

Presence of a novel methanogenic archaeal lineage in anaerobic digesters inferred from *mcrA* and 16S rRNA gene phylogenetic analyses. J. Water Environ. Technol. (2015)
(Yayoi Saito, Masataka Aoki, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Ken Takai and Hiroyuki Imachi)

第3章 未培養メタン生成アーキアの系統学的位置の特定の試み

第1節 目的及び概要

嫌気環境において有機物が完全分解されると最終的にメタンと CO₂ にまで生物学的な転換が起きる。その嫌氣的有機物分解の最終ステップであるメタン生成を担うメタン生成アーキアは、有機物からエネルギーを生産することができる非常に重要な生物であると捉えられている (Liu & Whitman, 2008)。その一方で、生物学的なメタン生成は、大気中の温室効果ガスであるメタンガス濃度を上昇させる直接的な要因でもありと考えられており、地球環境問題やエネルギー問題に対して重要視されてきたことから、微生物学、地球化学分野など広範囲にわたりメタン生成アーキアに着目した研究が数多く行われてきた。その結果、系統分類学上、7 目に渡る多種多様なメタン生成アーキアが培養・純粋分離され、菌学的・生理学的特性などが明らかにされている (Liu & Whitman, 2008)。その一方で、培養に依存しない方法としてメタン生成アーキア固有の機能遺伝子である methyl coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) 遺伝子を分子マーカーとしたメタン生成ポテンシャルを有する微生物の多様性解析も行われている (e.g., Nettmann *et al.*, 2008; Merkei *et al.*, 2010)。多様性解析によって環境中から検出されてきた *mcrA* 遺伝子配列を、既に純粋分離されているメタン生成アーキア (既知のメタン生成アーキア) の *mcrA* 遺伝子配列と比較することで、既知のメタン生成アーキアと系統分類学的に近縁であるかについて推定することができる。実際に *mcrA* 遺伝子に基づく環境中の菌叢解析を行うと既知のメタン生成アーキアの *mcrA* 遺伝子配列と近縁な配列が検出される一方で、目レベルで系統が異なる可能性がある配列 (未知 *mcrA* 遺伝子配列) が検出されてきている事例が報告されている (e.g., Steinberg & Regan, 2009; Fry *et al.*, 2009)。これらの事実は、我々が認知していない多様なメタン生成アーキアが未だに環境中に存在していることを示している。2012 年までメタン生成アーキアが存在しないと考えられていた *Thermoplasmata* 網におけるメタン生成アーキアの発見は、この事実を裏付ける報告となった。環境中の多くの微生物を人為的に純粋分離・培養することが難しい状態の中で、培養に非依存的な手法で代謝機能と 16S rRNA 遺伝子を指標とした系統を結びつけることは環境微生物学における重要な課題の一つと考えられている (e.g., Orphan *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2012; Pratscher *et al.*, 2011)。したがって、未知 *mcrA* 遺伝子を有するメタン生成アーキアの 16S rRNA 遺伝子上での系統学的位置を特定することは重要な課題の 1 つであると考えている。本章では系統学的位置が明らかになっていない未培養メタン生成アーキアの 16S rRNA 遺伝子配列情報を培養に非依存的な方法で明らかにすることを目的とし、ゲノム DNA 上にある 1 遺伝子の検出が可能である超高感度 FISH 法を用いて未知 *mcrA* 遺伝子を有する細胞の 16S rRNA 遺伝子配列を特定することを試みた。目的達成のため、以下の手順で実験を行った。(1) *mcrA* 遺伝子に基づくク

ローン解析により 16S rRNA 遺伝子上での系統学的位置が特定されておらず、既知のメタン生成アーキアと目レベルでの違いがある *mcrA* 遺伝子 (未知 *mcrA* 遺伝子) を探索し、解析対象を決める。(2) 標的 *mcrA* 遺伝子を有する細胞を可視化させるために *mcrA* 遺伝子を標的とした超高感度 FISH 法を適用させる。(3) フローサイトメーターによって可視化させた細胞を回収する。(4) 回収した細胞の 16S rRNA 遺伝子配列を解読する。さらに、未培養グループのアーキアがメタン生成アーキアであることの直接的な証拠を得るために、集積培養系の獲得も目指した。本章では、これらの実験結果について報告する。

第2節 実験方法

2-1. 解析に用いた嫌氣的グラニュール汚泥の概要

16S rRNA 遺伝子上での系統学的位置が明らかになっていない未培養メタン生成アーキアの *mcrA* 遺伝子の探索を行った。サンプル MS、AQ、LAQ と AN の4種類の嫌気グラニュール汚泥を対象に *mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析を行った (Table 3-1)。サンプル MS は、都市下水の処理に用いられているパイロットスケールの upflow anaerobic sludge blanket (UASB) リアクター内 (Takahashi *et al.*, 2011) から得られたグラニュール汚泥である。この UASB リアクターに流入する有機物量は都市下水に依存するため、日によって変動するが、サンプリングを行った日はリアクター容積 1L あたり 0.82 g-COD の有機物の流入があった (Table 3-1)。サンプル AQ と LAQ は海水魚飼育水の処理に用いられている upflow sludge blanket (USB) リアクターから得た。サンプル AQ および LAQ のリアクターでは脱窒素除去をメインに行っており、無酸素状態で脱窒素反応の進行と酸素消費を行わせるために適切な量の酢酸の供給が行われている。供給した酢酸は、人工的に供給した唯一の炭素源およびエネルギー源であり、その濃度は、海水中の硝酸態窒素の濃度と溶存酸素濃度に依存している (Table 3-1)。サンプル AN は海水魚の飼育水の処理を目的とした USB リアクターの種汚泥の慣らし培養を行っている脱窒素細菌群の培養器から得た。培養器には硝酸と酢酸を添加しており、それらの添加濃度は常に一定に保たれている (Table 3-1)。サンプル AQ、LAQ および AN は脱窒素反応が主微生物反応ではあるが、いくつかの報告ではメタン生成反応と脱窒素反応が同時に生じており、そのような状況下でも多様な系統のメタン生成アーキアが存在していることも報告されていることから (e.g., Mosquera-Corral *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2008)、AQ、LAQ および AN のリアクターサンプルも解析対象にした。DNA 抽出用に得られた全てのグラニュール汚泥は、phosphate-buffered saline (PBS: 130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl [pH7.4]) で洗浄を行った。

Table 3-1 Anaerobic granular sludge samples used in this study.

Sample name	Treating wastewater	Reactor operation temperature (°C)	Reactor volume (L)	Carbon source	Loading rates for organic substances (g-COD/L/day) ^d	Influent NO ₃ ⁻ conc. (mg-N/L)	C/N ^a
MS	Pilot-scale municipal sewage	Ambient	1,178	Sewage 272 mg-COD/L ^b	0.82	B.D.	N.D.
AQ	Pilot-scale aquarium tank seawater	25	8.8	0.9 mM Acetate ^c	0.56	14	1.3
LAQ	Lab-scale aquarium tank seawater	25	2.0	1.3 mM Acetate ^c	0.81	23	1.3
AN	Lab-scale acetate and nitrate-amended synthetic seawater	Ambient	1,000	2.5 mM Acetate	1.5	30	2.0

B.D.: below detection limit < 0.05 mg-NO₃⁻/L.

N.D.: not determined.

^aC/N: carbon to nitrogen ratio of wastewater.

^bCOD: chemical oxygen demand.

^cAcetate was major carbon source, but fish food residues and fish feces were potential carbon sources.

^dThe values were calculated based on the reactor volume.

2-2. クローンライブラリーの作成と分子系統解析

DNA 抽出は、ISOIL for beads beating kit (Nippon Gene)を用いて行った。Premix Ex TAq Hot Start Version (TAKARA Bio Inc.)を用いてPCR 増幅を行った。*mcrA* 遺伝子の増幅には MLf/MLr (Luton *et al.*, 2002) のプライマーペアを用いた。また、アーキアの 16S rRNA 遺伝子の増幅には Arc9F (Kato *et al.*, 2011) /1492R (5'-GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; Weisburg *et al.* (1991) のプライマーを一部改変) のプライマーペアを用いた。PCR 反応は、95°C-60 秒の初期変性の後、変性反応を 98°C-10 秒、アニーリング反応を 30 秒 (*mcrA* 遺伝子: 50°C、16S rRNA 遺伝子: 55°C)、伸長反応を 72°C (*mcrA* 遺伝子: 60 秒、16S rRNA 遺伝子: 90 秒) の条件で行った。PCR サイクルは、変性反応から伸長反応までを 25 サイクルから 35 サイクル行った。クローン化のための至適 PCR サイクル数は 5 サイクル刻みで検討を行い、最終的に *mcrA* 遺伝子の増幅には 35 サイクル、16S rRNA 遺伝子の増幅には 30 サイクルの PCR 増幅条件で行った。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動により確認を行った後、MinElute PCR purification kit (Qiagen)を用いて精製した。クローン化には TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。クローン化した遺伝子の配列解読は、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)とオートシーケンスアナライザー (3730xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems)を用いた。

得られた *mcrA* 遺伝子配列および 16S rRNA 遺伝子のクローン配列のうち、97%以上の相同性を示すクローン配列は 1 つのファイトタイプとして扱い、分類を行った。得られたファイトタイプの遺伝子配列を用いた相同性解析は、NCBI の BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) プ

プログラムにより行った。得られた配列のアライメントおよび系統解析は分子系統解析ソフトウェア ARB プログラムにより行った (Ludwig *et al.*, 2004)。その後、ARB プログラム内で系統樹の作成を行った。16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹は Jukes-Cantor 距離補正を用いた近隣結合法により作成した。一方で、*mcrA* 遺伝子に基づく系統樹の作成には、得られた遺伝子配列を ARB プログラム内でアミノ酸配列に変換後、167 アミノ酸配列を用いて percentage of acceptance of mutations 距離補正を用いた近隣結合法により作成した。これら2つの系統樹の作成の中で *Methanopyrus kandleri* の遺伝子配列をアウトグループに用いた。系統樹作成後には得られた樹形の確からしさを確認するために、MEGA version 6.06 package (Tamura *et al.*, 2013)にて1,000回のブートストラップ解析を行った。得られた配列 (アクセッション番号: LC002077 から LC002191)は、GenBank/EMBL/DDBJ データベースに登録した。

2-3. Clone-FISH 用のクローンの作成方法

標的の 16S rRNA 用の clone-FISH 用のクローンの作成は、Clone-FISH 法 (Schramm *et al.*, 2002) を参考に改良された Kubota *et al.* (2006) の方法に準拠して行った。クローン解析によりクローン化した 16S rRNA 遺伝子配列を再度、pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)にライゲーションし直した後に *lacI*^rが組み込まれている大腸菌 Novablue (DE3) competent cells (Novagen; Genotype : *endA1 hsdR17(12_{ik} 12_{mk} 12^r) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac (DE3) F'[proA⁺ B⁺ lacI^r Z ΔMI5::Tn10] (Tet^r)*) に対してトランスフォーメーションを行った。その後、Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside : IPTG により 16S rRNA を誘導させた。一方で、*mcrA* 遺伝子配列を標的にした gene two-pass TSA FISH に使用したポリヌクレオチドプローブ用のポジティブコントロールの clone-FISH のクローンは *mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析で得たクローンをそのまま用いた。

2-4. FISH 用サンプルの固定

Clone-FISH 用のクローンの固定は、16S rRNA 遺伝子配列が組み込まれたクローンの場合は 16S rRNA の誘導終了直後に行った。*mcrA* 遺伝子が組み込まれているクローンに関しては、クローン解析で得たクローンをそのまま固定した。また、リアクターから得られたグラニュール汚泥の固定作業はサンプリング直後に行った。固定作業は、終濃度2%のparaホルムアルデヒド/PBS buffer を添加し、4°Cで12時間静置した。その後 PBS buffer で細胞を洗浄し、50 % EtOH 溶液/PBS buffer 中にて-20°Cで保存した。

2-5. FISH 法適用のためのグラニュール汚泥の分散化

FISH を行う前に homogenizer でグラニュールの塊を分散化させた。グラニュールの分散化には、ultrasonic homogenizer (Model UH-50、SMT Co. Ltd)を使用した。分散条件は 0W-15 秒、15W-15 秒を氷上で 6 サイクル行った。

2-6. 16S rRNA を標的とした FISH 法

標準的な FISH 法は、Sekiguchi *et al.* (1999) の方法を参考に行った。サンプル中に含まれる夾雑物への DNA プロブの付着を防止するため、1% (w/v) blocking reagent (Roche Diagnostics) /PBS buffer によるハイブリダイゼーションを 1 時間行った。本研究で使用したプロブは、Table 3-2 に示す。使用したオリゴヌクレオチドプロブは、プロブ配列の 5'末端に Alexa Fluor 488 が付加されたもの、もしくは、5'末端および 3'末端に Alexa Fluor 488 が付加されているものを使用した。Arc864 プロブの至適 FA 濃度は、Clone-FISH により求めた。また、Catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法は、(Kubota *et al.*, 2006) を参考に行った。HRP 付加したラベルプロブを浸透させるための細胞壁処理は、次の 3 種類を行った。(1) proteinase K 処理：proteinase K 溶液 (2、10、30、50、80、100、125、160、200 µg/ml および 1 mg/ml の濃度で 100 mM Tris-HCl [pH 7.5] と 50 mM EDTA [pH 8.0]溶液に混合した proteinase K 溶液) を室温で 10 分間反応させた。(2) HCl 処理：HCl 溶液 (1、10 と 100 mM および 1 M)を室温で 1 分間反応させた。(3) 細胞壁処理を行わない。また、Clone-FISH 用の大腸菌に対しては、1 mg/ml lysozyme/TE buffer [pH 8.0] で 37°C-30 分間反応させた。細胞壁処理条件は、Kubota *et al.* (2008) および Molari *et al.*, (2012) を参考にした。細胞壁処理を行った後、内在性ペルオキシダーゼ活性を不活性化させるために 0.3% [v/v] H₂O₂/

Table 3-2 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study.

Probe name	Target group	Sequence (5' to 3')	%FA	Reference
EUB338 ^a		GCT GCC TCC CGT AGG AGT		Amann <i>et al.</i> (1990);
EUB338-I ^a	Bacteria	GCA GCC TCC CGT AGG AGT	20	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338-II ^a		GCA GCC ACC CGT AGG TGT		Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338-III ^a		GCT GCC ACC CGT AGG TGT		Daims <i>et al.</i> (1999)
NON338	Negative control for CARD-FISH	ACT CCT ACG GGA GGC AGC		Wallner <i>et al.</i> (1993)
ARC915 ^b	Archaea	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	50 (50) ^c	Stahl and Amann (1991)
Arc864 ^b	WCHA1-57 ^d	CCC TAC AGC ACA GGG CCA	20 ^e (60) ^{c,e}	Chouari <i>et al.</i> (2005)

^aThese probes were used in a mixture at an equal amount (mol).

^bThis probe is 5', 3' doubly labeled oligonucleotide probe was used in standard FISH analysis.

^cNumber in parenthesis is formamide (FA) concentration of the hybridization buffer in CARD-FISH analysis.

^dThe name of uncultured group according to reported by Dojka *et al.* (1998).

^eThese FA concentrations were determined by Clone-FISH experiment.

メタノールにより30分間、室温で処理を行った。その後の実験手順は、(Kubota *et al.*, 2006) に準じて行った。なお、本研究でCARD-FISHに使用したプローブはTable 3-2に示した。それらのプローブは5'末端に horseradish peroxidase (HRP) を標識したものを使用した。Tyramide は、Alexa Fluor 488 を使用した。CARD-FISH 反応のネガティブコントロールには HRP が付加された nonsense probe である NON338 (Wallner *et al.*, 1993) を用いた。微生物細胞の識別を行うためにプローブのハイブリダイゼーション反応を終えた FISH および CARD-FISH サンプルは、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI: 1 μ g/ml) を室温で10分間反応させた。微生物観察には、CCD カメラシステム (Olympus DP72) 付きの Olympus microscope (Olympus BX51F) を用いて観察を行った。

2-7. *mcrA* 遺伝子に特異的なポリヌクレオチドプローブの合成

ポリヌクレオチドプローブは Kawakami *et al.* (2012) の方法に若干の変更を加え、PCR により合成した。プローブ合成に使用した鋳型 DNA は、*mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析で得たクローンを用いた。クローン化された状態から MCR-2b *mcrA* 配列のみを獲得するために、MCR-2b *mcrA* クローンを鋳型にしてプライマーセット M13F/M13R にて PCR 増幅した。PCR 反応には Premix Ex Taq Hot Start Version (TAKARA Bio Inc.) を用いた。反応条件は 95°C-60 秒の初期変性の後、変性反応を 98°C-10 秒、アニーリング反応を 50°C-30 秒、伸長反応を 72°C-60 秒の条件で行った。PCR サイクルは、変性反応から伸長反応までを 30 サイクル行った。ここで得られた M13 領域を含む MCR-2b *mcrA* 遺伝子を鋳型として用いてプローブの合成を行った。プローブ合成には MLf/MLr (Luton *et al.*, 2002) のプライマーセットを用いた。PCR 反応は以下の反応液組成で行った。濃度は終濃度を示す。GeneAmp 1 \times PCR Gold buffer [(-)MgCl₂] (Life technologies)、200 μ M dVTP [V=A, C, G] (Roche Applied Science)、0.025 U/ μ l AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life technologies)、0.5 pmol/ μ l プライマー、1.5~4.5 mM Mg²⁺ 溶液、40~80 μ M DNP-11-dUTP (Perkin Elmer)、dTTP (Roche Applied Science) なお、dTTP の濃度は DNP-11-dUTP との合計濃度が 200 μ M になるように 120~160 μ M の範囲で調整した。これらを PCR 反応液とし、そこに調整した鋳型 DNA を加え、95°C-7 分のホットスタートを行った後、95°C-40 秒、50°C-30 秒、72°C-3 分、40 サイクルの条件で行った。合成したプローブは、MiniElute PCR Purification kit (QIAGEN) により生成した後、キャピラリー電気泳動 Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies) もしくは 1% ゲル電気泳動を用いて dUTP-11-DNP の取り込みを確認した。合成されたプローブの濃度は、バイオアナライザーによる解析で得たバンド画像から算出した。プローブ合成の際には、より高い DNP 取り込み量とプローブ

の収量を得るために、PCR 反応液に添加する dUTP-11-DNP 濃度、Mg²⁺濃度の添加濃度を検討した。

2-8. *mcrA* 遺伝子を標的とした FISH 法

ポリヌクレオチドプローブを使用した Tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法および Two-pass TSA-FISH 法は Kawakami *et al.* (2012)を参考に行った。HRP を浸透させるための細胞壁処理は次の3種類を行った。(1) Proteinase K 処理:proteinase K 溶液 (1.5、5.0、10、20、100 µg/ml、1.0 mg/ml の濃度で 100 mM Tris-HCl [pH 7.5]と 50 mM EDTA [pH 8.0]溶液に混合した proteinase K 溶液)を室温で 10 分間反応させた。(2) HCl 処理:HCl 溶液 (1、5、100、300、600 mM、1 M) を室温で 1 分間反応させた。(3) 細胞壁処理を行わない。また、Clone-FISH 用の大腸菌に対しては、1 mg/ml lysozyme/TE buffer [pH 8.0] で 37°C-30 分間反応させた。内在性ペルオキシダーゼ活性の不活性化には、0.3% [v/v] H₂O₂溶液/メタノールにより 30 分間、室温で処理を行った。それ以降の手順は、Kawakami *et al.* (2012)の方法に準拠して行った。また、Tyramide は Alexa Fluor 488 もしくは Cy3 を使用した。なお、作成したプローブの有効性は、固定した MCR-2b *mcrA* クローンで確認した。

2-9. WCHA1-57 アーキアの培養培地

培地組成は、Widdel & Pfennig (1981) を参考にした。なお、Imachi *et al.*, (2009) に記載されている組成で作成した。培地作成後、容量 15ml の試験管 (Hungert tube) に 9ml の培地を入れ、N₂/CO₂ (80/20, vol/vol) で気層部を置換後、ブチルゴム栓で密閉した。オートクレーブ滅菌後、還元剤として Na₂S・9H₂O (0.015%) と L-システイン塩酸塩九水和物 (0.015%) を孔径 0.22 µm のメンブレンフィルターを通過させて培地に添加した。

2-10. WCHA1-57 アーキアの培養条件

サンプル MS を植種源にした。培養基質には、メタン生成アーキアの一般的な生育基質である H₂/CO₂、ギ酸、エタノール系、メチル化合物や酢酸を用いた (Table 3-3)。その他には、低濃度の水素供給を狙い、バクテリアとの嫌気共生系を構築するために酪酸、プロピオン酸や酢酸を基質に用いた。その他には、多くのメタン生成アーキアが耐性を有することが報告されている抗生物質 ampicillin、kanamycin、strptomycin、vancomycin、cephalotin、D-cycloserine、penicillin G も基質と同時に培養系に添加した。なお、2005 年に Chouari *et al.* (2005)が WCHA1-57 様アーキアの集積培養系の

Table 3-3 Culture substrates for WCHA1-57 archaea in this study.

No.	Substrate
1	150kpa H ₂ +20 mM Formate+1mM Aceate+0.01% YE+0.5 mM coenzyme M+50μg/ml Amp+Kan+strept+van
2	5 mM butyrate
3	5 mM propionate
4	150 kpa H ₂ / CO ₂ +cephalotin (5μg/ml)+D-cycloserine (5μg/ml)+penicillinG(50μg/ml)
5	20 mM Formate+cephalotin (5μg/ml)+D-cycloserine (5μg/ml)+penicillinG(50μg/ml)
6	150 kpa H ₂ / CO ₂ +cephalotin (5μg/ml)+D-cycloserine (5μg/ml)+penicillinG(50μg/ml)+0.01%YE+1 mM acetate+0.5 mM coenzyme M
7	20 mM Formate+cephalotin (5μg/ml)+D-cycloserine (5μg/ml)+penicillinG(50μg/ml)+0.01%YE+1 mM acetate+0.5 mM coenzyme M
8	5 mM ethanol+50μg/ml Amp+Kan+strept+van
9	20 mM methanol+50μg/ml Amp+Kan+strept+van
10	5 mM methanol+100 kpa H ₂ /CO ₂ +0.1%YE+50μg/ml van
11	10 mM acetate+50μg/ml Amp+Kan+strept+van
12	5 mM 2-propanol
13	5 mM 2-butanol
14	1 mM methanethiol
15	5 mM cyclopentanol
16	5 mM trimethylamine+100 kpa H ₂ /CO ₂ +0.1%YE+50μg/ml van
17	5 mM butyrate + 1 mM methanol
18	5 mM propionate + 1 mM methanol

獲得に成功していることから、基質や抗生物質の濃度はその報告に記載されている条件を参考にした。

なお、各基質は予め作成した 800 mM のストック溶液 (N₂ガス置換およびオートクレーブ済) を容易しておき、各培養基質は植菌する前に培地に添加した。基質添加後、MS リアクターのグラニューロ汚泥を培地に 1.0 ml 植種し、10⁵もしくは 10¹⁰まで希釈系を作成した。培養は 30°C で行った。

2-11. WCHA1-57 アーキア細胞の増殖確認

WCHA1-57 アーキア細胞の増殖の有無は PCR 増幅により確認を行った。培養系から抽出した DNA に対して WCHA1-57 アーキアを特異的に増幅することが可能なプライマーセットで PCR 増幅を行い、増幅の有無から WCHA1-57 アーキア細胞が培養されてきているか確認した。増幅の確認に使用した PCR プライマーセットは、リバープライマーとして WCHA1-57 アーキアに特異的な Arc864 プロローブと同一の配列をプライマーとして用いた。フォワードプライマーには、アーキアに特異的なプライマー Arc9F を用いた。このプライマーセットの有効性と WCHA1-57 アーキアへの特異性の確認は、MS サンプルから抽出した DNA を鋳型にして行った。PCR 反応条件は、95°C-60 秒の初期変性の後、変性反応を 98°C-10 秒、アニーリング反応を 30 秒、伸長反応を 72°C-60 秒の条件で行った。アニーリング温度は 50、53、55、58、60、62、64、66°C の 8 条件を試した。最終的に最も非特異的な増幅が起きにくかった 62°C をアニーリング温度にした。PCR 反応サイクルは 25、30、35 サイクルを試したが、最終的に至適である 30 サイクルで行った。これらの条件で PCR 反応を行った結果、850bp と 1000bp 付近にバンドが検出された。Arc9F/Arc864 のプライマーセットの理論値付近である約 850 bp 付近のバンドを切り出し、クローン解析により配列解析を行った。その結果、850bp 付近に検出されたバンドは WCHA1-57 アーキアの 16S rRNA 遺伝子が増幅されたものであることが確認できた。

ことから、このプライマーセットの有効性が示された。したがって、培養系における WCHA1-57 細胞の増殖の有無の確認は、Arc9F/Arc864 のプライマーセットを用いて行い、PCR 反応のアニーリング温度は 62°C、反応サイクルは 40 サイクルで行った。

第3節 実験結果および考察

3-1. 未知 *mcrA* 遺伝子の探索と 16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析

目レベル以上の分類階層で系統学的位置が特定されていないメタン生成アーキアグループを環境中から探し出すために4種類のグラニューク汚泥に対して *mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析を行った。各サンプルに対して約90クローンずつコロニーを採取し、配列解析を行った (Table 3-3, Fig. 3-1a)。MS、AQ および AN サンプルにおいて検出されてきた *mcrA* 遺伝子配列を有する細胞の大半は、既に 16S rRNA 遺伝子上での系統学的位置が特定されている既知のメタン生成アーキア *Methanomicrobiales* 目、*Methanosarcinales* 目、*Methanobacteriales* 目そして *Methanomassiliicoccales* 目に属する配列であった。サンプル LAQ については、多様性が低く *Methanobacteriales* 目に属する配列のみが検出された。また、サンプル AN からは *Methanosarcinales* 目の中でも *Methanosarcinaceae* 科に属するクローンは検出されなかった。一方で、未知 *mcrA* 遺伝子は、サンプル LAQ を除く全てのサンプルにおいて検出された。各サンプルで検出されてきた未知 *mcrA* 遺伝子は、全て、未培養グループ MCR-2b (Steinberg & Regan, 2009) に属する配列であり、1.2%から4.3%の割合で検出された。MCR2-b グループに属する *mcrA* 遺伝子配列のファイロタイプの数、サンプル MS 及びサンプル AQ から1ファイロタイプが検出された。このことから、MS サンプルから検出された4クローンは全て同一のファイロタイプであることが明らかになった。一方でサンプル AN においては、検出された2配列は異なるファイロタイプであることが示された。これまでに MCR-2b に属する配列は、バイオガスプラント (e.g., Rastogi *et al.*, 2008; Nettmann *et al.*, 2008; Kampmann *et al.*, 2012)、都市下水消化汚泥 (e.g., Steinberg & Regan., 2009)、農場湿地帯 (e.g., Castro *et al.*, 2004) から検出され、メタン生成アーキアが生息する典型的な場所から検出されてきている。

Table 3-4 Phylogenetic affiliations of *mcrA* gene and 16S rRNA gene clones obtained from anaerobic granule sludge samples.

Phylogenetic affiliation	Sample name							
	MS		LAQ		AQ		AN	
	Number of clones	Number of phylotypes ^a	Number of clones	Number of phylotypes	Number of clones	Number of phylotypes	Number of clones	Number of phylotypes
<i>mcrA</i>								
<i>Methanomicrobiales</i>	34	19	- ^b	-	3	3	22	5
<i>Methanosarcinales</i>								
<i>Methanosaetaceae</i>	18	4	-	-	4	2	11	8
<i>Methanosarcinaceae</i>	2	2	-	-	3	1	-	-
<i>Methanomassiliicoccales</i>	1	1	-	-	2	2	5	4
<i>Methanobacteriales</i>	20	7	54	7	36	8	27	4
<i>Methanobacteriales mrtA</i>	12	3	37	7	37	11	27	8
MCR-2b ^c	4	1	-	-	1	1	2	2
Total	91	37	91	14	86	28	94	31
16S rRNA								
<i>Methanomicrobiales</i>	2	1						
<i>Methanosarcinales</i>								
<i>Methanosaetaceae</i>	68	2						
<i>Methanosarcinaceae</i>	1	1						
WCHA1-57 ^d	6	1						
Total	77	5						

^aA phylotype was defined as >97.0 % sequence identity.

^b-, Not detected.

^cThe name of uncultured group according to reported by Steinberg and Regan (2009).

^dThe name of uncultured group according to reported by Dojka *et al.* (1998).

未培養グループ MCR-2b を有する細胞の 16S rRNA 遺伝子上での系統学的位置を推測するために、併せてアーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析も行った。解析には MCR-2b *mcrA* クローンの検出率が最も高かった MS サンプルを用いた。クローニングで得られた 77 クローンの配列解析の結果、合計で 5 つのファイロタイプが検出され、*Methanomicrobiales* 目、*Methanosarcinales* 目および分離株が存在しない未培養アーキアグループ WCHA1-57 に属する配列が検出された (Table 3-4)。*mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析結果と同様に、アーキアの 16S rRNA 遺伝子の解析でも未培養グループが 1 つだけ検出された。検出されたクローンの大半：約 92.2% は、やはり既知のメタン生成アーキアの系統に属する配列だった。検出された配列のうち *Methanosarcinales* 目と *Methanomicrobiales* 目に属するファイロタイプは、*Methanosaeta* 属、*Methanomethylovorans* 属そして *Methanospirillum* 属に属する分離株の 16S rRNA 遺伝子配列と 98% 以上の高い相同性を有していた。MS サンプルにおけるアーキアの 16S rRNA 遺伝子と *mcrA* 遺伝子とに基づくクローン解析の結果を比較すると、*mcrA* 遺伝子に基づく解析結果では、*Methanobacteriales* 目や *Methanomassiliicoccales* 目に属する配列が検出されてきている一方で、16S rRNA 遺伝子に基づく解析では、それらの配列が検出されてこなかった。これらの相違は、PCR 増幅やクローニングにおけるバイアスにより発生したと考えられる。一方で、未培養グループに関しては全体の約 7.8% の割合で

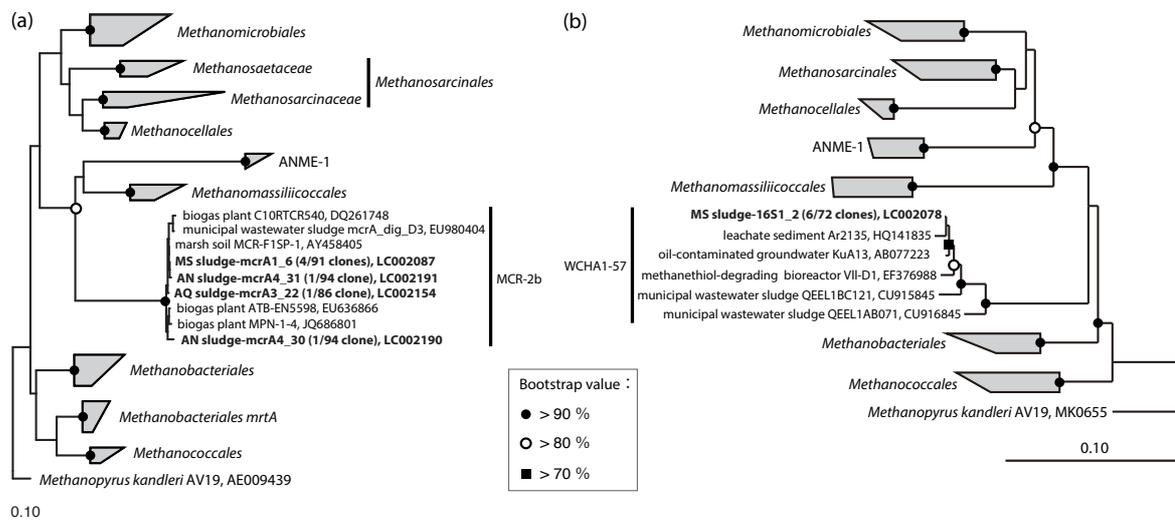


Figure 3-1 Phylogenetic trees of (a) deduced McrA amino acid sequences and (b) archaeal 16S rRNA gene sequences, featuring the position of the MCR2-b *mcrA* and WCHA1-57 16S rRNA gene phylotypes obtained in this study. Phylotypes in boldface were obtained in this study. The head of each phylotype name indicates the sample name. The numbers in parentheses indicate the number of identical clones obtained per number of clones analyzed for each phylotype. The accession numbers are shown after each phylotype name. The scale bars indicate 10% sequence divergence. The symbols at the nodes show the bootstrap values (>70% indicated only) obtained after 1,000 replicates.

WCHA1-57 未培養グループに属する配列が検出された。未培養アーキアグループ WCHA1-57 (WSA2 や ARC I と呼ばれている)は、*Euryarchaeota* 門に属し、亜門、目か網のレベルで括られ、純粋株が存在しない未培養アーキアグループであると考えられている (Sekiguchi, 2006)。サンプル MS から検出された WCHA1-57 ファイロタイプは、油に汚染された地下水から得られた KuA13 クローン (相同性は 99.6%; GenBank accession number AB077223; Watanabe et al., 2002) が最も近縁な配列であった。

次いで、本解析で得られたクローン配列を含む *mcrA* 遺伝子およびアーキアの 16S rRNA 遺伝子配列で構築した系統樹の比較を行った (Figure 3-1)。少なくとも既知のメタン生成アーキアにおいては目レベルでの *mcrA* 遺伝子とアーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹には強い相互関係があることが知られている (Luton et al., 2002; Borrel et al., 2013)。その事実を踏まえると、構築した系統樹では MCR-2b McrA クレードと WCHA1-57 アーキアクレードは一致し、相互関係を有していることが示唆された (Figure 3-1)。つまり、MCR-2b と WCHA1-57 は同一アーキア細胞由来である可能性を示唆している。また、2005 年に報告された Chouari et al. (2005) の報告では、メタン生成アーキアの典型的な生育基質であるギ酸や H_2/CO_2 を基質とした時に WCHA1-57 (ARC-I)様アーキアの集積培養系の獲得に成功したことが報告されている。その報告では、集積されてきた細胞の *mcrA* 遺伝

子の解析やメタンガスの生成の確認は行われていないため、WCHA1-57 アーキアがメタン生成アーキアであることの直接的な証拠は得られていない。現時点で WCHA1-57 アーキアと思われる細胞の集積培養系の獲得に成功しているのは、Chouari *et al.* のみである。現在までに WCHA1-57 の 16S rRNA 遺伝子配列は、メタン生成反応が生じる典型的な場所から多く検出されている。その多くは、嫌氣的消化汚泥である (e.g., Rivière *et al.*, 2009; Chouari *et al.*, 2005; Schauer-Gimenez *et al.*, 2010; Steinberg *et al.*, 2008)。嫌氣的消化汚泥の中でも Rivière *et al.* (2009) と Chouari *et al.* (2005) の報告においては WCHA1-57 アーキアファイロタイプの検出率がアーキアのクローンライブラリーの中で約70%以上を占めていたことが報告されている。また、嫌氣的消化汚泥以外では、油で汚染された土 (Watanabe *et al.*, 2002; Ramos-Padrón *et al.*, 2011)、湖の土 (Chan *et al.*, 2005) や埋立地 (Clementino *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2003) でも配列が検出されている。

以上に述べた点から、WCHA1-57 アーキアグループはメタン生成アーキアである可能性が考えられ、系統樹の相互関係から MCR-2b *mcrA* グループと WCHA1-57 アーキアグループに相互関係があることが強く示唆された。現在までに *mcrA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析を同時に行い、それぞれの系統樹を比較している論文は数多く報告されているが (e.g. Nettmann *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2004)、未培養グループが複数検出されたことによる解析結果の複雑さから WCHA1-57 と MCR-2b の相関性の言及をしている論文は存在しない。また、これらの未培養グループに対してメタゲノム解析やシングルゲノム解析による報告も現時点では存在しない。したがって、WCHA1-57 と MCR-2b の相互関係の可能性について述べたのは本論文が初めてであり、その相互関係を明らかにすることは新規知見になり得る。したがって、WCHA1-57 と MCR-2b の相互関係を有することの直接的な証拠を得るために MCR-2b *mcrA* 遺伝子もしくは、WCHA1-57 16S rRNA を対象とした FISH 法で細胞を回収し、遺伝子配列を解読することにした。

3-2. 標的 *mcrA* 遺伝子に特異的なポリヌクレオチドプローブの合成

プローブの両末端のみに HRP が修飾されているオリゴヌクレオチドプローブで two-pass tyramide signal amplification (TSA)-FISH を行うと 7 コピーの 16S rRNA が存在する *E.coli* の検出率は 50% 程度の感度でしかなかったことが報告されている (Kawakami *et al.*, 2010)。この程度の感度では細胞内に 1 コピーしか存在しない遺伝子を検出することは不可能である。ところが、2012 年に Kawakami *et al.* が報告している技術である two pass TSA-FISH 法とポリヌクレオチドプローブを組み合わせることで、98%以上の割合で *mcrA* 遺伝子を有するメタン生成アーキア細胞の検出できる技術が報告された。ポリヌクレオチドプローブには two-pass TSA FISH の酵素触媒反応に必要な HRP ラベルが数

百箇所にわたり修飾されることから、ゲノム DNA 上の一遺伝子を検出することができる方法として知られている。この FISH 法には超高感度であること以外に何点かメリットがあるが、その中でも (1) 得られたクローン配列を鋳型にプローブを合成することができる。(2) 少なくとも 93% 程度の特異性は担保され、本研究では、クローン解析で得た未知 *mcrA* 遺伝子配列を有する細胞を特異的に検出させたいこと、また、少なくとも目レベルでの違いで特異性をもたせれば良いことから 93% の特異性で十分であることから、ポリヌクレオチドプローブを適用した超高感度 FISH 法を適用することにした。

この FISH 法の感度は、ポリヌクレオチドプローブの合成に依存すると考えても過言ではない。細胞の検出率を高めるためには、合成されたプローブに、より多くの DNP が取り込まれている必要がある。その取り込み効率は、プローブを合成する際の PCR 反応液組成や PCR 反応条件で変化する。そこで、プローブの合成過程における次の試薬の添加濃度を中心に検討実験を行った。検討項目 1 点目は、添加する DNP-11-dUTP 濃度である。多くの DNP を取り込ませるためには、原理的に高濃度の DNP-11-dUTP を添加することが望ましいと考えられているが、過度の添加はプローブの収量を極端に減少させると言われている (Kawakami *et al.*, 2012)。したがって、必要最低限のプローブ収量を確保した上で DNP の取り込み量が最大となる PCR 反応液組成を検討した。2 点目は Mg^{2+} 濃度である。一般的に、PCR 法では反応液中の Mg^{2+} 濃度を高くすることで増幅産物の収量が増加することが知られている。また、dUTP を用いた PCR 法では dTTP を用いた時に比べ高い Mg^{2+} 濃度が必要であることが報告されている (Eckert & Kunkel, 1990)。これら 2 項目に加え、非特異的増幅が起きないように PCR 反応のサイクル数やアニーリング温度の条件検討も行った。

最初の条件検討として、 Mg^{2+} 濃度の検討を行った。通常の PCR 反応の至適 Mg^{2+} 濃度を把握するために DNP-11-dUTP を添加せず、dTTP を最大濃度である 200 μ M 添加した。 Mg^{2+} 濃度は、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mM で PCR 反応を行った。その結果、2.5 mM では、ほぼ非特異的な増幅は見られな

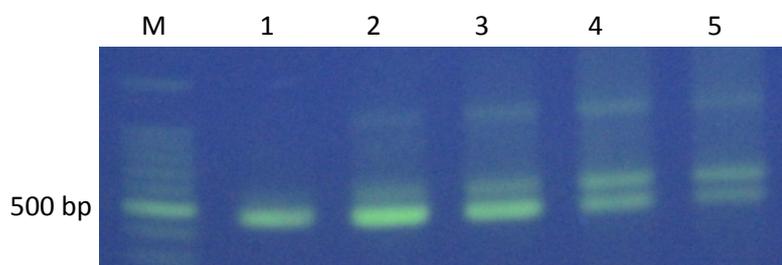


Figure 3-2 Gel electrophoresis analysis of PCR products amplified using MLf/MLr primer set. The Mg^{2+} concentration in PCR mixtures was 2.5 mM. The dUTP-11-DNP concentrations for each lane were as follows: lane 1, 3.0 mM; lane 2, 3.5 mM; lane 3, 4.0 mM; lane 4, 4.5 mM; lane 5, without dUTP-11-DNP; M, Marker.

かった (Fig. 3-2)。また、3.0 mM および 3.5 mM では僅かに非特異的な増幅が起きていたが、目的の配列部分が有意に増幅されていた (Fig. 3-2)。一方で 4.0 mM および 4.5 mM では特異的な増幅と非特異的な増幅が同程度生じていた。前述したように、DNP-11-dUTP を添加すると至適 Mg^{2+} 濃度が上昇する。このことを加味すると少なくとも 3.0、3.5 mM 以上の Mg^{2+} 濃度が必要である可能性が考えられた。したがって、非特異的な増幅が見られ始めた Mg^{2+} 濃度 3.0 mM および 3.5 mM の濃度条件下において DNP-11-dUTP と dTTP の添加濃度の検討を行った。DNP-11-dUTP の添加濃度は Kawakami *et al.* (2012) の報告を参考に 50 μM と 60 μM の 2 種類で検討を行った。DNP の取り込み量は泳動距離によって判断した。dUTP-11-DNP の分子量は dTTP に比べて大きいため、DNP が取り込まれると増幅産物の分子量が大きくなり、泳動距離が短くなることが既に報告されている (Kawakami *et al.*, 2012)。このことから、泳動距離が短いほどより多くの DNP を取り込んでいると判断できる。なお、MLf/MLr プライマーセットの増幅長は約 500 bp であるため、dUTP-11-DNP を取り込んでいない時は 500 bp 付近にバンドが検出される (Fig. 3-2)。 Mg^{2+} 濃度 3.0 mM と 3.5 mM 条件下で DNP-11-dUTP 濃度 50 μM と 60 μM の計 4 条件 (Table 3-5; Lane 1-4) でプローブ合成の検討を行ったところ、 Mg^{2+} 濃度が 3.5 mM、dUTP-11-DNP 濃度が 60 μM の時に泳動距離が最も短

Table 3-5 Composition of PCR mixtures for the synthesis of polynucleotide probes and the PCR amplification results based on the capillary electrophoresis analysis.

Lane	concentration			length (bp)	PCR product (ng/ μ l)
	Mg^{2+} (mM)	dUTP-11-DNP (μM)			
1	3.0	50		621	7.62
2	3.5	50		625	7.79
3	3.0	60		624	8.17
4	3.5	60		641	7.91
5	3.5	70		665	3.29
6	4.0	70		-	-
7	4.5	70		643	5.83
8	3.5	80		684	4.38
9	4.0	80		695	4.0
10	4.5	80		668	5.5

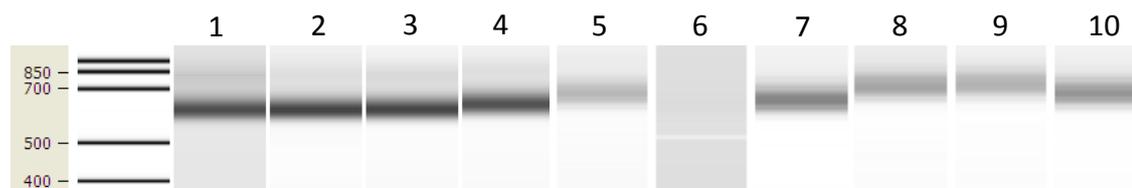


Figure 3-3 Capillary electrophoresis analysis of polynucleotide probes generated with MLf/MLr primer set. The Mg^{2+} and dUTP-11-DNP concentrations were indicated in Table 3-5.

くなった (Fig. 3-3; Lane 1-4)。それ以外の条件では泳動距離にほぼ違いは見られなかった。また、dUTP-11-DNP 濃度が 50 μM の条件下では Mg^{2+} 濃度による差は見られなかったが、dUTP-11-DNP 濃度が 60 μM では、 Mg^{2+} 濃度が 3.0 mM と 3.5 mM の時 (Fig. 3-3; Lane 3, 4) では DNP の取り込み量に明確な違いが出ており、dUTP-11-DNP 濃度が 60 μM の時は、少なくとも 3.5 mM の Mg^{2+} 濃度が必要であることが明らかになった。一方で条件 1 から 4 においてはプローブの収量には比較的大きな差が見られなかったことに加え、十分量のプローブが合成されていた。そこで、dUTP-11-DNP の取り込み量をさらに増加させるために dUTP-11-DNP の添加濃度をさらに上げた条件でも追加検討すべきであると判断した。そこで、次に dUTP-11-DNP 濃度 70 および 80 μM でプローブの合成検討を行った。添加 dUTP-11-DNP 濃度を高くすることから、 Mg^{2+} 濃度は 3.5 mM の条件に加え、4 および 4.5 mM での検討も同時に行った (Table 3-5; Lane 6-10)。その結果、これまでに行った条件の中で Mg^{2+} 濃度 4.0 mM、dUTP-11-DNP 濃度 80 μM (Fig. 3-3; Lane 9) の条件において dUTP-11-DNP の取り込み量は最も高くなった。その一方で、プローブの収量は他の条件と比較して大幅に減少した。さらに、 Mg^{2+} 濃度 4.5 mM、dUTP-11-DNP 濃度 80 μM (Fig. 3-3; Lane 10) では、逆に dUTP-11-DNP の取り込み量は減少した。この結果から、dUTP-11-DNP の最大添加濃度は、80 μM であり最大 Mg^{2+} 濃度は 4.0 mM であることが明らかになった。条件 1 から 10 における dUTP-11-DNP の取り込み量の差が、どの程度感度に影響を及ぼすかは明らかではない。しかし、プローブの収量の面で考えると条件 4 が最も理想的である。なぜならば、two-pass TSA FISH を行うには、1 穴あたり 20 μl のハイブリダイゼーション buffer に対して 2.5 ng/ μl のプローブを 1 μl 添加する必要がある。さらに、1 反応あたりで得られるプローブ溶液量は 10 μl 未満と少量であることから、現実的なプローブ収量の中で、最も dUTP-11-DNP の取り込み量が多い条件が条件 4 であると考えている。以上の見解により dUTP-11-DNP と dTTP の割合が 60 μM : 140 μM 、 Mg^{2+} 濃度が 3.5 mM の条件で作成したポリヌクレオチドプローブを使用した。なお、本研究でプローブを合成するために使用したプライマーとは結合位置が数塩基異なる ME3/ME2 のプライマーセット (Hales *et al.*, 1996) の領域で Kawakami *et al.* (2012)、本研究と同様の PCR 反応組成で合成したプローブを用いた場合、98% 以上の純菌細胞の検出に成功していることから、最大の DNP 取り込み条件ではないものの、十分な感度を得られると考え FISH 法に適用することとした。

3-3. ポリヌクレオチドプローブを用いた two-pass TSA FISH

合成したポリヌクレオチドプローブがプローブとして機能するか確かめるために MCR2-b *mcrA* 遺伝子が組み込まれた大腸菌クローンを用いて two-pass TSA FISH を行った。同時に至適 Formamide : FA 濃度の検討を行った。FA 濃度は 40、50、60、70% の条件で行った。その結果、60% が至適 FA 濃度であることが示され、蛍光が得られなかった細胞も数細胞存在したが、ほぼ全ての細胞において有意な蛍光を得ることが出来た (Figure 3-4)。このことから、合成したポリヌクレオチドプローブはプローブとして機能していることが示唆された。

次いで、環境サンプルに適用した。分子量の大きい HRP を細胞内に浸透させるために細胞壁処理を行う必要があるが、MCR-2b 細胞に対して細胞壁処理が必要な CARD-FISH および two-pass TSA FISH 法を適用させた例は今のところ報告されていない。したがって、HRP を細胞内に浸透させるための細胞壁処理検討を行った。Proteinase K、HCl および細胞壁処理無しの3条件でプローブ浸透性の効果を調べた。Kubota *et al.* (2008) によると細胞壁処理無し、proteinase K および PeiW の3条件のうち、どれかしらの方法を適用することにより既知のメタン生成アーキアの細胞を検出できたことが示されている。そのうちの一つである PeiW は *Methanothermobacter wolfei* の自己溶菌酵素を遺伝子組み換え体により作成した酵素であり、市販されていないことから PeiW を用いた細胞壁処理は行わなかった。Protease K や細胞壁処理無しの浸透性処理では HRP の透過性が向上しなかったメタン生成アーキアも存在することから、HCl による処理も検討項目に取り入れた。なお、細胞壁処理における各試薬濃度の至適条件範囲は、狭いことは指摘されており、特に proteinase K の至適濃度を定めることは非常に難しいと言われている (Kubota *et al.*, 2008)。したがって、それぞれの試薬濃度

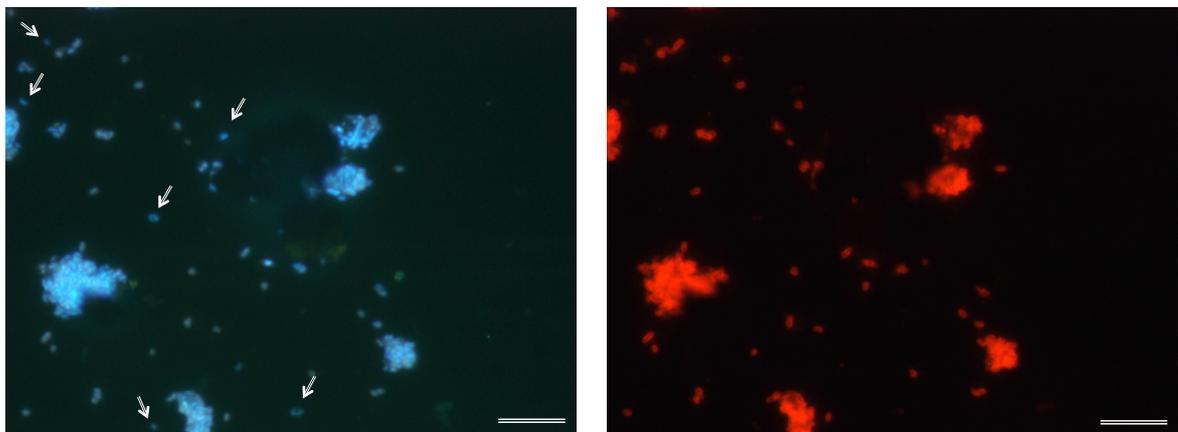


Figure 3-4 In situ hybridization with the synthesized polynucleotide probe on *Escherichia coli* possessing a MCR-2b *mcrA* gene clone. Photomicrographs of DAPI-stained cells (left) and epifluorescence (right) showed identical yields. Bars represent 10 μ m.

の条件検討には、より細かい濃度幅を設けた。

MS サンプルに対して細胞壁処理無し、Proteinase K、HCl による細胞壁処理を行った後、two-pass TSA FISH を行った。その結果、全ての細胞壁処理条件において細胞を検出することができなかった。この要因として考えられることが4点ある。1点目は、細胞壁処理が適切ではなかった可能性があること。2点目は、細胞から蛍光は得られているが、グラニュール汚泥中の MCR-2b 細胞の存在割合が低く、細胞を目視で確認できなかった可能性があることである。2006 年の MS リアクター内のアーキアとバクテリアの定量データではバクテリアとアーキアの比率は 99:1 であることが示されている (Imachi *et al.*, 2006)。リアクターに流れ込む都市排水や水温は調整しておらず常にリアクターの状態が変動するため、あくまでも参考値ではあるが、2006 年当時の定量値と今回のアーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析で得られた結果を基に (MCR-2b 細胞と WCHA1-57 細胞が同一であると仮定した時) 計算すると WCHA1-57 細胞はグラニュール汚泥中に約 0.08% の割合で存在することが明らかになった。これは、10000 細胞存在する中に約 1 細胞存在する程度の割合である。Hoshino *et al.* (2008) によれば、様々な細胞が混合した状態では、純菌に対して FISH を行った時よりも検出率が下がることが明らかにされている。このことから、目視で蛍光細胞を確認できなかった可能性も十分に考えられた。3点目は、合成したプローブではシングルコピーレベルで細胞の検出ができていない可能性が考えられることである。プローブの機能性確認には pUC 由来のプラスミドで作成したクローンを用いた。Qiagen Plasmid Purification Handbook (2005) によると、pUC 由来のプラスミドは、変異導入された ColE1 複製起点が含まれていることから細胞中のコピー数が高くなり、1細胞あたり 500-700 コピーのプラスミドが存在する特性を有していることが示されている。ハイコピーのプラスミドが存在しているクローンでプローブの有効性を確認したことから、シングルコピーレベルでの細胞検出ができていない可能性も考えられた。Moraru *et al.* (2010) の報告でも、1細胞あたり 200 コピーのプラスミドが含まれたクローンを対象に gene TSA-FISH を行った場合には検出率が 99% だったにも関わらず、シングルコピーの細胞に適用させた場合は 40% 前後にまで検出率が減少したという報告もなされていることから可能性としては捨てきれない。しかし、仮にシングルコピーレベルで細胞を検出できていたとしても、汚泥中に存在する細胞の割合の低さや細胞壁処理に問題があっては細胞の検出率は、かなり低くなることが予想される。したがって、細胞の存在割合や細胞壁処理に問題が無いことを判断するために、それらの疑問点を取り除くことができる手法を用いることにした。先の系統樹の比較により MCR-2b *mcrA* 遺伝子を有する細胞と同一細胞由来の可能性があると示唆された WCHA1-57 アーキアの 16S rRNA を標的とした FISH 法で細胞を検出させることにした。検出には細胞壁処理を必要としない 16S rRNA を標的とした標準的な FISH 法を用いた。

16S rRNA は通常、1 細胞あたり数百から数千コピー存在するため、高感度 FISH 法に頼らずに細胞を検出できる可能性があることから細胞壁処理を行う必要がなく、過剰・不十分な細胞壁処理により、細胞が検出できないという問題を解決できる。さらに、16S rRNA の発現量が低かった場合に備え、16S rRNA を標的とした CARD-FISH 法も行った。CARD-FISH の検出限界と細胞中に存在する 16S rRNA のコピー数を考えると、細胞壁処理さえ至適化することが出来れば原理的には高確率で CARD-FISH で WCHA1-57 アーキア細胞を検出することが出来ることが考えられた。

3-4. 標的アーキア細胞の 16S rRNA を標的とした FISH 法および CARD-FISH 法

通常の FISH 法を用いた WCHA1-57 アーキア様細胞の検出には、2005 年に Chouari *et al.* が成功している。その報告では、WCHA1-57 アーキア様細胞の集積培養系に対して WCHA1-57 アーキアに特異的なプローブ Arc864 で標準的な FISH 法を行うことにより、細胞の検出に成功したことが述べられている。本研究でもその報告にならい WCHA1-57 様細胞が検出された MS、AQ と AN サンプルに対して Arc864 プローブで FISH を行った。Chouari *et al.* の論文には、至適 FA 濃度が記載されていなかったことから Clone-FISH により至適 FA 濃度を求めたところ、20%が至適濃度であることが確認できた。また、16S rRNA を標的とした FISH での細胞の検出率は、細胞の固定方法や固定した時の菌の状態によって大きく左右される。したがって、サンプルのポジティブコントロールとしてアーキアに特異的なプローブ ARC915 およびバクテリアに特異的なプローブ EUB338 mix を用いて FISH を行った。その結果、どちらのプローブでも強い輝度で細胞を検出することができ、形態の異なるアーキアおよびバクテリア細胞を複数種検出することができたことから、サンプルの固定状態に問題は無いことが示された。一方で WCHA1-57 アーキア細胞に特異的な Arc864 プローブでは、どのサンプルからも有意な蛍光を得ることができなかった。この結果から代謝活性が弱く、発現している 16S rRNA 含量が FISH の検出限界以下である可能性が考えられたため、次に細胞壁処理を行った MS サンプルのみに CARD-FISH を行った。現在までに WCHA1-57 アーキア細胞に CARD-FISH を行った報告は無いため、細かい条件を設定して細胞壁処理検討を行った。ところが、試した全ての細胞壁処理条件にて有意な蛍光を得ることはできなかった。

結果的に MCR-2b *mcrA* 遺伝子を標的とした two-pass TSA FISH、WCHA1-57 16S rRNA を標的とした FISH と CARD-FISH の 3 種類の FISH を行ったが有意な蛍光を得ることができなかった。これらの結果を総合すると、細胞を検出できなかった原因として標的細胞の存在率が低く目視で確認できなかったことが高い可能性として考えられた。また、CARD-FISH を行っても細胞を検出できなかったことから、HRP を浸透させにくい細胞壁 (s-layer 以外) を有している可能性も十分に考えられ

た。

3-5. WCHA1-57 アーキアの集積培養の試み

FISH法で目的細胞を検出することが出来なかったため、MSサンプルを植種源にしてWCHA1-57アーキアの集積培養系の獲得を試みた。Chouari *et al.* (2005) の報告を参考に、水素、ギ酸を中心に培養系を構築した。MSサンプルには水素への親和性が低い *Methanobacteriales* 目が高い割合で存在していることから、高濃度の水素やギ酸で培養を行うと他のメタン生成アーキアが増殖してこないことが考えられた (Sakai *et al.*, 2009)。そのため、酪酸を基質にしたバクテリアとの共生系により、低濃度の水素供給が可能な培養系の構築も行った。また、酢酸を資化できる可能性があるとの報告もあることから (Rivière *et al.*, 2009) 酢酸を基質にした培養系も構築した。植菌した約一ヶ月から二ヶ月の間に、全ての培養系において培養液の濁り、もしくは顕微鏡観察から何らかの微生物細胞が増殖していることが確認できた。集積培養系内におけるメタン生成アーキアの顕微鏡観察は、メタン生成アーキア特有の自家蛍光 F_{420} を観察することにより、メタン生成アーキアが増殖と形態の確認を行った。Chouari *et al.* (2005) の論文に記載された写真によると WCHA1-57 アーキア様細胞の形態は、楕円形様の単独球菌であることが示されている。そのことを念頭に入れ顕微鏡観察を行った。全ての培養系において、次のいずれかのメタン生成アーキアの生育が確認され、形態から *Methanobacterium* 属、*Methanospirillum* 属、*Methanosaeta* 属、*Methanobacterium* 属、*Methanobrevibacter* 属様の生育が確認できた。また、18ある培養系のうち培養系1、4、6、7、17から F_{420} 様の自家蛍光を有する楕円形の球菌が培養されてきた。この形態は、*Methanobrevibacter* 属にも類似しているが、WCHA1-57 アーキア細胞でもある可能性が考えられた。そこで、培養系1、4、6、7、17について WCHA1-57 アーキアの 16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅させることができるプライマーセットで PCR 反応を行い、その増幅の有無により、WCHA1-57 アーキアが培養されてきているか確認を行った。その結果、有意な PCR 増幅は見られず、培養系1、4、6、7、17では WCHA1-57 アーキアが培養されてきていないことが示された。

4. 小括

本章では、環境中の未培養メタン生成アーキアグループに焦点をあてた研究を行った。機能 (*mcrA*) と系統 (16S rRNA) が結びついていないメタン生成アーキアに対し、培養に依存しない方法で、それらを結びつけることを試みた。4種類の嫌氣的グラニュール汚泥に対してメタン生成アーキア固有の機能遺伝子である *mcrA* 遺伝子を分子マーカーにしてクローン解析を行った。その結果、既

に純粋分離されているメタン生成アーキアの *mcrA* 遺伝子と近縁な配列が検出された一方で、既知のメタン生成アーキアと少なくとも目レベルで遠縁にある MCR-2b *mcrA* 遺伝子配列も検出された。同時にアーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析も行ったところ、分離株が存在しない未培養アーキアグループ WCHA1-57 16S rRNA 遺伝子配列が検出された。得られた *mcrA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子配列を基に系統樹を構築し、それぞれの系統樹を比較したところ WCHA1-57 16S rRNA 遺伝子と MCR-2b MCR は相互関係を有している可能性が示唆された。このことから、WCHA1-57 16S rRNA 遺伝子と MCR-2b *mcrA* 遺伝子配列は同一のメタン生成アーキア由来である可能性が考えられ、この仮説の正否を明らかにするために MCR-2b *mcrA* 遺伝子および WCHA1-57 16S rRNA を標的とした FISH を行い、可視化させた細胞をフローサイトメトリーで回収した後、遺伝子配列を獲得することを目指した。しかしながら、残念なことに FISH 法による細胞の可視化が出来なかった上に、集積培養系の獲得もならなかった。そのため、WCHA1-57 と MCR-2b の相互関係について直接的な証拠を得ることはできなかったが、その一方で、WCHA1-57 と MCR-2b の相互関係について言及した報告は今までに無いこと、WCHA1-57 アーキア細胞と MCR-2b 細胞を FISH 法で検出させるための細胞壁処理検討に関する知見も今までに報告されておらず、今後、これらのアーキア細胞に対する分子生物学的手法を適用する際に有用な知見と成り得ると考えている。

—参考文献—

- Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. and Stahl D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925.
- Borrel, G., O'Toole, P. W., Harris, H. M., Peyret, P., Brugère, J. F., and Gribaldo, S. (2013). Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol. Evol.* 5, 1769–1780.
- Castro, H., Ogram, A., and Reddy, K. R. (2004). Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6559–6568.
- Chan, O.C., Claus, P., Casper, P., Ulrich, A., Lueders, T. and Conrad, R. (2005). Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.* 7, 1139–1149.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J. and Sghir, A. (2005). Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ. Microbiol.* 7, 1104–1115.
- Clementino, M. M., Fernandes, C. C., Vieira, R. P., Cardoso, A. M., Polycarpo, C. R. and Martins, O. B. (2006). Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. *J. Appl. Microbiol.* 103, 141–151.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. and Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444.
- Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K. and Pace, N. R. (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3869–3877.
- Eckert, K. A., and Kunkel, T. A. (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18, 3739–3744.
- Fry, J. C., Horsfield, B., Sykes, R., Cragg, B. A., Heywood, C., Kim, G. T. *et al.* (2009). Prokaryotic populations and activities in an interbedded coal deposit, including a previously deeply buried section (1.6–2.3 km) above ~ 150 Ma Basement Rock. *Geomicrobiol. J.* 26, 163–178.
- Hales, B. A., Edwards, C., Ritchie, D. A., Hall, G., Pickup, R. W. and Saunders, J. R. (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 668–675.
- Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. and Wagner, M. (2008). Quantification of target molecules needed to detect micro-organisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5068–5077.
- Huang, L. N., Chen, Y. Q., Zhou, H., Luo, S., Lan, C. Y. and Qu, L. H. (2003). Characterization of methanogenic archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 171–177.

- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Loy, A., Qiu, Y. L., Hugenholtz, P., *et al.* (2006). Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with *Desulfotomaculum* Cluster I are widely distributed in methanogenic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2080–2091.
- Imachi, H., Sakai, S., Nagai, H., Yamaguchi, T. and Takai, K. (2009). *Methanofollis ethanolicus* sp. nov., an ethanol-utilizing methanogen isolated from a lotus field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 800–805.
- Kampmann, K., Ratering, S., Baumann, R., Schmidt, M., Zerr, W., and Schnell, S. (2012). Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 404–413.
- Kato, S., Itoh, T., and Yamagishi, A. (2011). Archaeal diversity in a terrestrial acidic spring field revealed by a novel PCR primer targeting archaeal 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 319, 34–43.
- Kawakami, S., Kubota, K., Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H. and Ohashi, A. (2010). Detection of single copy genes by two-pass tyramide signal amplification fluorescence *in situ* hybridization (two-pass TSA-FISH) with single oligonucleotide probes. *Microbes Environ.* 25, 15–21.
- Kawakami, S., Hasegawa, T., Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H., Ohashi, A., and Kubota, K. (2012). Detection of single-copy functional genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes. *J. Microbiol. Methods* 88, 218–223.
- Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., and Harada, H. (2006). Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence *in situ* hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH). *J. Microbiol. Methods* 66, 521–528.
- Kubota, K., Imachi, H., Kawakami, S., Nakamura, K., Harada, H., and Ohashi, A. (2008). Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J. Microbiol. Methods* 72, 54–59.
- Liu, Y. and Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 171–189
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, *et al.* (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., and Riley, P. W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521–3530.
- Merkel, A. Y., Chernykh, N. A., Kanapatskii, T. A., and Pimenov, N. V. (2010). Detection of methanotrophic archaea in pockmark sediments (Gdansk Deep, Baltic Sea) by sequence analysis of the gene encoding the α subunit of methyl-coenzyme M reductase. *Microbiology* 79, 849–852.
- Molari, M., Giovannelli, D., d'Errico, G., and Manini, E. (2012). Factors influencing prokaryotic community structure composition in sub-surface coastal sediments. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 97, 141–148

- Moraru, C., Lam, P., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M., and Amann, R. (2010). GeneFISH—an *in situ* technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environ. Microbiol.* 12, 3057–3073.
- Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Campos, J. L., Méndez, R., and Lema, J. M. (2001). Simultaneous methanogenesis and denitrification of pretreated effluents from a fish canning industry. *Water Res.* 35, 411–418.
- Mota, C. R., So, M. J., and de los Reyes F. L. 3rd (2012). Identification of nitrite-reducing bacteria using sequential mRNA fluorescence *in situ* hybridization and fluorescence-assisted cell sorting. *Microb. Ecol.* 64, 256–267.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., and Klocke, M. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1835–1850.
- Orphan, V.J. (2009). Methods for unveiling cryptic microbial partnerships in nature. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 231–237.
- Pratscher, J., Dumont, M. G., and Conrad, R. (2011). Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4170–4175.
- Ramos-Padrón, E., Bordenave, S., Lin, S., Bhaskar, I. M., Dong, X., Sensen C. W., *et al.* (2011). Carbon and sulfur cycling by microbial communities in a gypsum-treated oil sands tailings pond. *Environ. Sci. Technol.* 45, 439–446.
- Rastogi, G., Ranade, D. R., Yeole, T. Y., Patole, M. S., and Shouche, Y. S. (2008). Investigation of methanogen population structure in biogas reactor by molecular characterization of methyl-coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes. *Bioresour. Technol.* 99, 5317–5326.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., *et al.* (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME. J.* 3, 700–714.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Tseng, I. C., Ohashi, A., Harada, H., and Kamagata, Y. (2009). Low-hydrogen conditions by using the cultivation of methanogens under coculture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4892–4896.
- Schauer-Gimenez, A. E., Zitomer, D. H., Maki, J. S., and Struble, C. A. (2010). Bioaugmentation for improved recovery of anaerobic digesters after toxicant exposure. *Water Res.* 44, 3555–3564.
- Schramm, A., Fuchs, B. M., Nielsen, J. L., Tonolla, M., and Stahl, D. A. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. *Environ. Microbiol.* 4, 713–720.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., and Harada, H. (1999). Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1280–1288.
- Sekiguchi, Y. (2006). Yet-to-be cultured microorganisms relevant to methane fermentation processes. *Microbes Environ.* 21, 1–15.

- Stahl, D. A. and Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic, Stackebrandt E, Goodfellow M (eds.), John Wiley and Sons Ltd, Chichester, pp. 205–242.
- Steinberg, L. M. and Regan, J. M. (2008) Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6663–6671.
- Steinberg, L. M., and Regan, J. M. (2009). *mcrA*-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4435–4442.
- Sun, Y., Zuo, J., Chen, L. and Wang, Y. (2008) Eubacteria and Archaea community of simultaneous methanogenesis and denitrification granular sludge. *J. Environ. Sci. (China)* 20, 626–631.
- Takahashi, M., Yamaguchi, T., Kuramoto, Y., Nagano, A., Shimozaki, S., Sumino, H., *et al.* (2011). Performance of a pilot-scale sewage treatment: an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) and a down-flow hanging sponge (DHS) reactors combined system by sulfur-redox reaction process under low-temperature conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 753–757.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Wallner, G., Amann, R. and Beisker, W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.
- Watanabe, K., Kodama, Y., Hamamura, N. and Kaku, N. (2002). Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3899–3907.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Widdel, F., and Pfennig, N. (1981). Sporulation and further nutritional characteristics of *Desulfotomaculum acetoxidans*. *Arch. Microbiol.* 129, 401–402.

第4章

海底堆積物からの嫌気共生細菌の培養の試み

Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. ISME J. (2011)

(Hiroyuki Imachi, Ken Aoi, Eiji Tasumi, Yumi Saito, Yuko Yamanaka, Yayoi Saito, Takashi Yamaguchi, Hitoshi Tomaru, Rika Takeuchi, Morono Yuki, Fumio Inagaki and KenTakai)

第4章 海底堆積物からの嫌気共生細菌培養の試み

第1節 目的及び概要

海底堆積物には膨大なメタンが埋蔵されていると推定されている (Milkov, 2004)。海底堆積物環境で生成されたメタンは $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ の同位体組成の違いにより、メタンの起源が調べられており、(1) CO_2 還元型の微生物由来のメタン、(2) 酢酸・メチル化合物資化型の微生物由来のメタン、(3) 無機炭素化合物から化学反応によって生成される非生物メタン、および (4) 海底堆積物中の有機物が地下の熱源に温められることで発生する熱分解メタンが知られている (Milkov, 2005; Kawagucci *et al.*, 2013)。微生物によって生成されるメタンの量は莫大であり、世界中の海底に分布しているメタンハイドレートの多くは微生物起源であると考えられている (Kvenvolden, 1995; Milkov, 2005)。これらのことから、海底下において微生物起源のメタンは重要視されており、メタン生成アーキアについて多様な方向から研究が行われている。同位体分析の他には、分子生物学的手法でもメタン生成アーキアに関する詳細な解析も行われており、16S rRNA 遺伝子を対象にした多様性解析の結果では海底下に存在するアーキアのうちメタン生成アーキアの割合は平均 0.1%程度しかないことが報告されている (Fry *et al.*, 2008; Inagaki *et al.*, 2010)。さらに *mcrA* 遺伝子の定量でもアーキア全体の 1%未満の存在率であることが示されていることに加え (Colwell *et al.*, 2008)、2011年までは、純粹分離されたメタン生成アーキアの種数は非常に少なかったことから、海底下では未培養微生物を経由した新規メタン生成経路が存在する可能性も考えられていた (Inagaki *et al.*, 2006)。ところが、現在までに *Methanoculleus*、*Methanococcus*、*Methanobacterium*、*Methanobrevibacter*、*Methanosarcina*、*Methanococcoides* 属に分類される多様なメタン生成アーキアの培養・分離が報告され (Mikucki *et al.*, 2003; Kendall *et al.*, 2007; Imachi *et al.*, 2011)、メタン生成アーキアが海底下においてメタンを生成していることの直接的な証拠が得られつつある。その一方で、海底堆積物中における微生物代謝だけに依存した有機物の分解経路や、有機物の分解に関与している微生物の全貌は明らかになっていない。海底下においても、複数の微生物群との連携による一般的な有機物分解の経路が存在すると仮定すると、陸域環境や排水処理システムと同様に嫌気共生細菌を介した有機物分解が深海底堆積物環境でも生じている可能性は十分に考えられる。しかしながら、現在までに深海底堆積物由来における嫌気共生細菌の分離株や集積培養系は得られておらず、その存在は確認されていない。そこで、海底下に嫌気共生細菌が関与する有機物分解経路が存在することの直接的な証拠を得るための一歩として、海底堆積物からの嫌気共生細菌の培養・分離を試みた。本章では、その経過と結果について報告する。

第2節 実験方法

2-1. DHS リアクターによる嫌気共生細菌の一次集積培養の試み

2-1-1. 植種源に用いた深海底コア堆積物サンプル

2006年に地球深部探査船「ちきゅう」により下北半島東方沖80kmの地点で採取されたコア堆積物サンプルを用いた。コア堆積物は365mからなり、Site C9001 (41°10.6389'N, 142°12.081'E, 水深1180m)の地点から採取された。堆得られた積物コアの中でも0.42、4.66、18.34、48.11、106.7

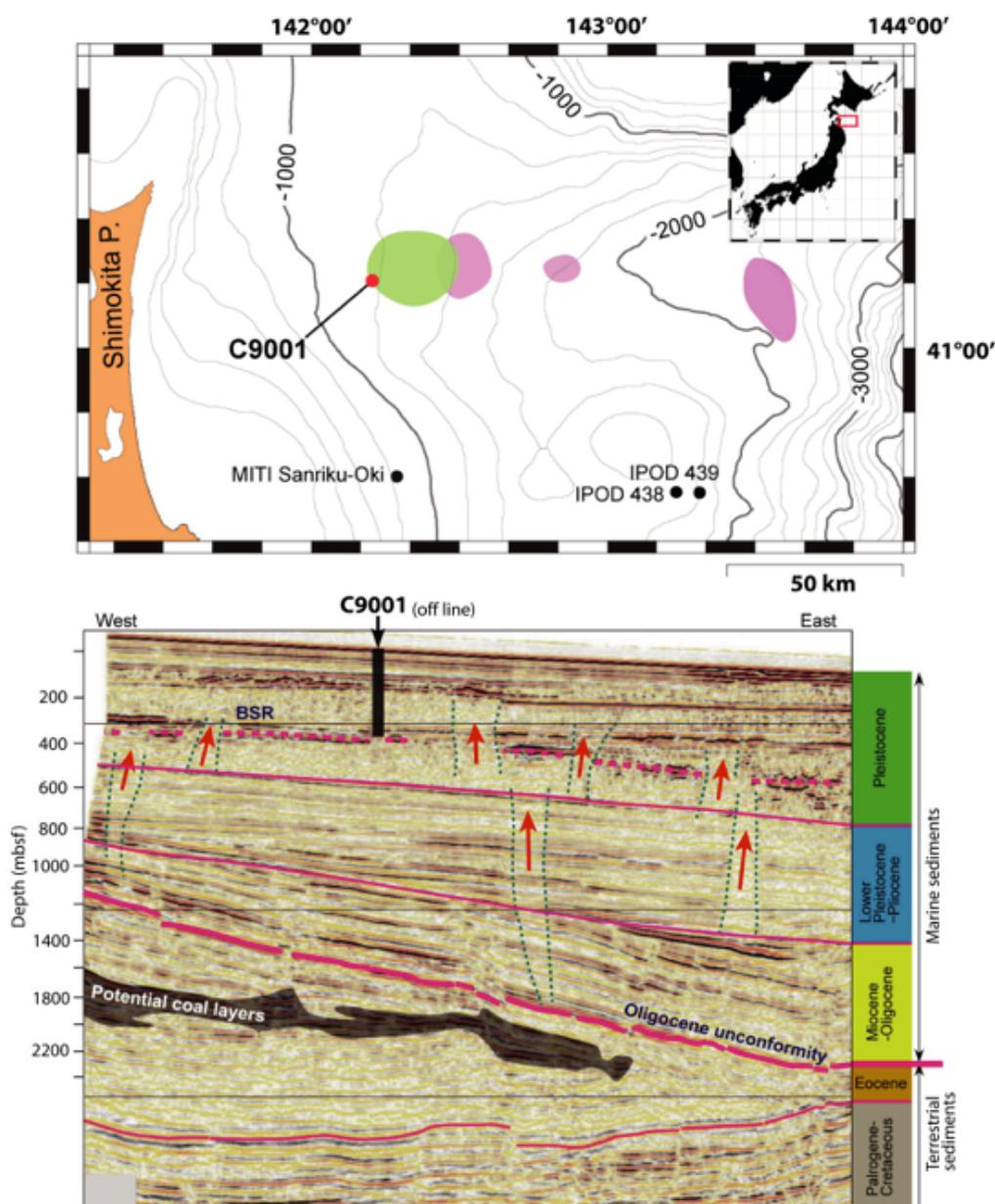


Figure 4-1 Sampling point of deep marine sediments off Shimokita Peninsula, Japan (site C9001) (Adapted from Aoike, 2007)

mbsf (meter below sea floor)の部位を培養に用いた (Fig. 4-1)。このサンプリング地点の堆積物は、次のような特性を有している。(1) 全有機物炭素量 (Total Organic Carbon: TOC) が0.99-1.91 wt%と豊富である (Kobayashi *et al.*, 2008)。(2) 1.2×10^6 から 1.3×10^9 cells/cm³の比較的豊富な微生物細胞が存在している (Morono *et al.*, 2009)。(3) 1,000-3,000 μ M 程度の高濃度のメタンガスが間隙水に含まれている。また、リアクターでの培養に用いた以外の堆積物部分ではあるが、砂層や火山灰堆積物層等の多孔質の層 (ca. 190, 217, 247, 275, 343 mbsf) では、メタンハイドレートや炭化水素の存在が確認されている (Kobayashi *et al.*, 2008)。以上の特性を有することからメタンを含む炭化水素の循環システムを研究するには適した場所であることが示されている。

2-1-2. DHS リアクターの概要と運転条件

DHS リアクターは、高さ 112 cm、断面 10 cm \times 10 cm、容積 10.7 l のポリ塩化ビニル製の密閉型リアクターを使用した (Fig. 4-2)。微生物の付着、保持には立方形のポリウレタンスポンジ担体 (3 cm \times 3 cm \times 3 cm、細孔 0.83 mm) にネットリング (大日本プラスチック (株)、材料: ポリプロピレン) を装着させたものを使用している。植種には、各深さの堆積物を有機物が含まれていないオートクレーブ済みの人工海水 (Table 4-1) に還元剤 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶液を添加した溶液でスラリー状にしたものをスポンジ内部にまで十分に染み渡らせ、ネットリングを装着させた。ネットリングを装着させることで、スポンジが押し潰されることを防いだ。そのスポンジ担体を 147 個 (スポンジ容量で 2.75 l) をランダムに充填させた。その後、リアクター内部を窒素パージで嫌気状態にして密閉した。全ての作業は 4°C に維持された低温室で行い、コア堆積物サンプルやリアクター内部の窒素パージを行い、嫌気に近い状態に維持しながら作業を行った。リアクターには、基質としてグルコース 0.4 mM、酢酸 0.7 mM、プロピオン酸 0.4 mM と生育補助剤として yeast extract 0.002% を含む人工海水 (Table 4-1) をリアクターの上部からリアクター内に流入させ、自然流下によりスポンジ担体に浸透させた。なお、培養開始 1,351 日後には嫌気共生細菌の集積を更に高めるためグルコースの供給を停止し、yeast extract の添加濃度を半分に減らした。本人工海水は二週間に一度 8 l 作成し、窒素で十分に曝気した後に還元剤 ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶液) を加え、作成した人工海水の入ったデュラン瓶をブチル栓で密閉することで嫌気状態を保てるようにした。さらにデュラン瓶に窒素ガスを充填したガスバックを繋げることで、デュラン瓶が陰圧になり空気が入り込まないようにした。人工海水の供給には、ガス浸透性が低く嫌気状態を保ちやすいポイントチューブ (Cole-Parmer) を用い、ポンプで送り込んだ。リアクターの水理学的滞留時間は 84 時間に設定し、Mster flex 社のポンプを用いて流入量の時間制御

(on: 1分、off: 29分)を行い、連続運転を行った。排出ガスはガスバックに回収した。リアクターを設置しているクロマトチャンバー内は 10°C に保ち、人工海水を入れた瓶を設置しているコールドチャンバー内は 4°C に維持管理している。

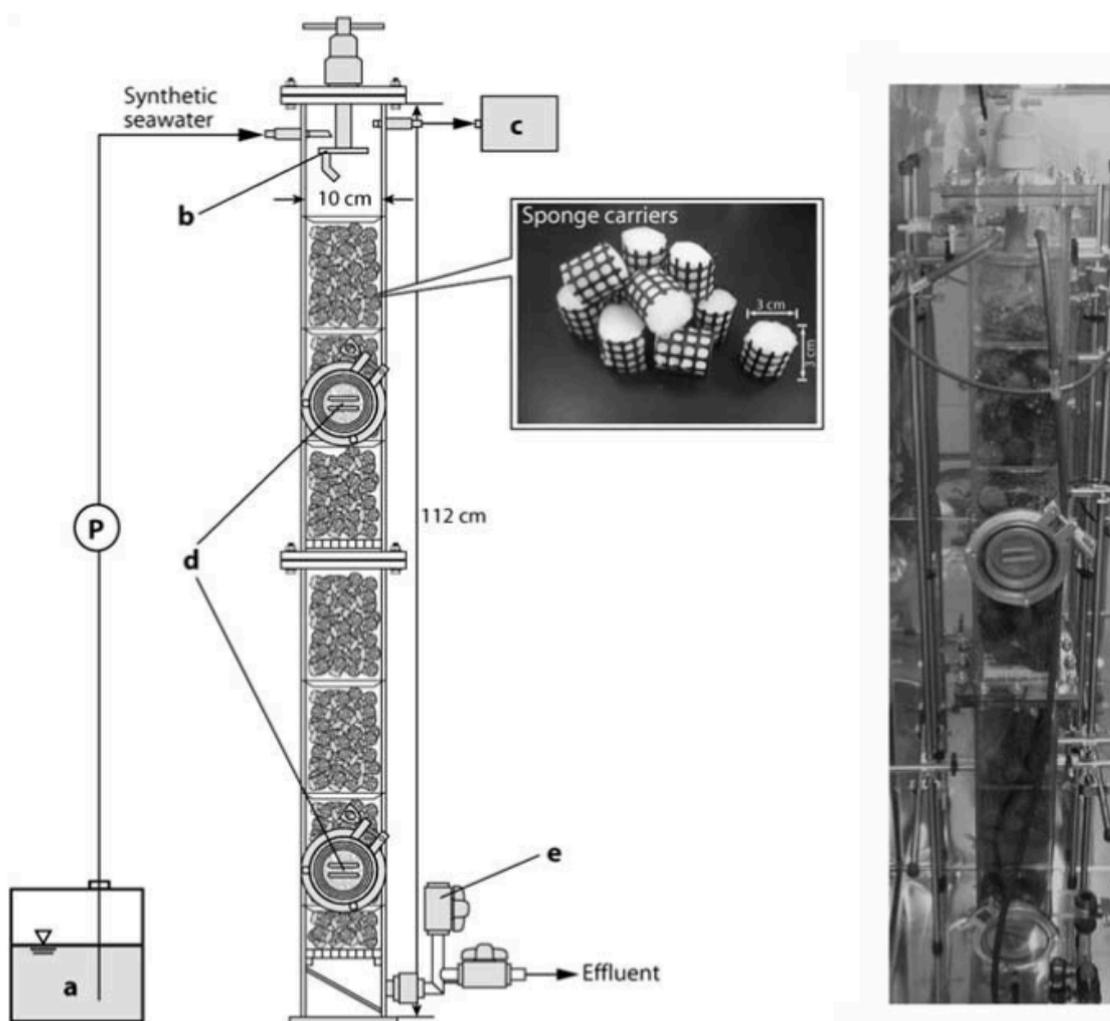


Figure 4-2 Schematic diagram and photographs of the DHS reactor used in this study. (a) Synthetic seawater tank, (b) distributor, (c) gas collecting bag, (d) sponge carrier-sampling port and (e) port for the pH/ORP sensor.

Table 4-1 Composition of the synthetic seawater medium used in this study.

Artificial seawater		pH 7.5	Trace mineral solution	
		g/L	mg/L	
NaCl		25	FeCl ₂	1270
NH ₄ Cl		0.5	MnCl ₂ · 4H ₂ O	198
KH ₂ PO ₄		0.1	CuCl ₂	1
MgCl ₂ · 6H ₂ O		4	H ₃ BO ₃	6
CaCl ₂ · 6H ₂ O		1	Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	24
NaHCO ₃		2	NiCl ₂	12
Trace mineral solution		1 (ml/L)	Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	1700
Vitamine solution		1 (ml/L)	Na ₂ WO ₄ · H ₂ O	3
Se/W solution		1 (ml/L)	CoCl	130
add to artificial seawater			ZnCl ₂	136
		mg/L	AlCl ₃	13
Glucose		85 (0)*	Vitamin solution mg/L	
CH ₃ COONa		58	Biotin	4.88
CH ₃ CH ₂ COOH		30	folic acid	8.82
Yeast Extract		20 (10)*	pyridoxine-HCl	4.12
Na ₂ S solution		1 (ml/L)	thiamine-HCl	6.74
Selenium and Tungsten (Se/W) stock solution			riboflavin	7.52
		mg/L	nicotinamide	2.44
Na ₂ SeO ₃		1.7	calcium pantothenate	9.54
NaWO-H ₂ O		3.3	vitamine B12	27.1
Na₂S stock solution (pH 7.5)			4-aminobenzic acid	2.74
		g/L	lipoic acid	4.12
Na ₂ S · 9H ₂ O		36		

(*) : Substrate concentration after 1,351 days of operation.

2-1-3. 化学分析

リアクター流出水のpH、ORP (oxidation-reduction potential; ORP) および温度は、pH/ORPメーター (Mettler Toledo, InPro3250) を使用して測定した。酢酸やプロピオン酸などの低級脂肪酸、琥珀酸およびフマル酸、乳酸などのその他の有機物質は、Shim-pack SCR-102H カラム (SHIMAZU; 移動層: 4 mM p-トルエンスルホン酸; カラム温度: 45°C) を使用して、高速液体クロマトグラフ

(HPLC: SHIMAZU) で測定した。グルコースとエタノールは、SCR101-H カラム (SHIMAZU; 溶離液: H₂O; カラム温度: 60°C) と屈折率検出器 (SHIMAZU RID-10A) を使用して、HPLC で測定した。全有機炭素 (Total Organic Carbon: TOC) は、日本工業規格 (JIS K0102 22.1) に従って、TOC 分析器 (TNC-6000, 東レ) を使用して分析した。メタノールは、DB-WAX カラム (Agilent Technologies) を使用して、ガスクロマトグラフ-マススペクトル分析法 (Gas Chromatography -Mass Spectrometry: GC-MS) (JMS-AM20, JEOL) により分析した。モノメチルアミンは、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸によって誘導された後、Mightysil RP-18 PA カラム (関東化学; アセトニトリル/H₂O [50/50→100/100] を移動層として使用し、勾配移動層システムによりカラムに供給する) と 340 nm の UV 分析器 (Waters 996 Photodiode array detector) を使用して、HPLC で測定した。トリメチルアミンとジメチルスルヒドは、ガスクロマトグラフ (Shimazu GC-2014) で測定した。トリメチルアミンの測定には、 β - β -ODPN 25 % Chromosorb W 60/80 AW-DMCS カラム (信和化学工業) と炎光光度検出器 (Flame Photometric Detector: FPD) を使用し、ジメチルスルヒドの測定には、PEG6000+KOH 120+2 Chromosorb W 60/80 AW-DMC カラム (信和化学工業) と水素炎イオン化検出器 (Flame ionization Detector: FID) を使用している。メタンは、熱伝導率探知器のついたガスクロマトグラフ (GC3200G, GL Science) で測定した。サンプリングしたガス中のメタンおよび二酸化炭素の炭素同位体組成は、SerCon ANCA-ORCHID GC 同位元素質量分光計 (SerCon) を使っている大洋日産で分析した。酵母エキスの組成は C₅H₇NO₂ であると仮定して TOC 濃度の計算を行った。

2-1-4. サンプリング

全てのサンプリング作業は 4°C に維持された低温室で行った。運転開始 357、560、761、1,855 日目にリアクター内からスポンジ担体を上部から 2 つ、下部から 2 つピンセットで取り出した。取り出したスポンジ担体はネットリングから外し、基質が含まれていない無機人工海水につけ込み、内部に保持されている堆積物を揉み出すようにして無機人工海水に溶かした。なお、1855 日目のみ上部と下部で分けて人工海水に溶かした。これらの作業は、嫌気環境を保つために終始窒素パージしながら、氷上で行った。作業中に酸素が混入し還元指示薬のレサズリンがピンク色に発色した場合には、還元剤として Ti (III)-NTA 溶液を加えることで、嫌気状態を保ちながらサンプリングを行った。Ti (III)-NTA 溶液の作成は、Moench & Zeikus (1983) の方法の準拠して行った。

2-1-5. クローンライブラリーの作成と分子系統解析

DNA 抽出は、ISOIL for beads beading kit (Nippon Gene)を用いて行った。抽出DNA は、Mag Extractor-PCR & Gel Clean up-kit (TOYOBO)を用いて精製した。バクテリアの 16S rRNA 遺伝子を標的とした増幅には EUB338, EUB338-I, EUB338-II および EUB338-III を当量ずつ混合させた EUCB-338F (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999)/1492R (Weisburg *et al.*, 1991)のプライマーセットを用いた。アーキアの 16S rRNA を標的とした増幅には、Arch21F (DeLong, 1992) /Ar912r (Miyashita *et al.*, 2009) のプライマーセットを用いた。PCR 反応には TaKaRa ExTaq (TaKaRa)を使用した。PCR 反応条件は、95°C-9分の初期変性の後、95°C-40秒、50°C-30秒、72°C-60秒の PCR サイクルを 20-35 サイクル行い、MinElute PCR purification kit (Qiagen)を用いて精製した。精製したPCR産物のクローン化の方法は第3章に記述した。クローン化された配列のうち、互いに 97%以上の相同性を示すクローン配列は 1つのファイロタイプして扱った。得られたクローンの系統分類や系統解析には、mothur program (<http://www.mothur.org>) (Schloss *et al.*, 2009)で行った。系統分類は、SILVA database ver.111に基づいて行った。

2-2. バッチ式培養法による嫌気共生細菌の二次集積培養の試み

2-2-1. 植種源

リアクターによる一次集積培養後のサンプルを植種源とし、バッチ式集積培養法にて嫌気共生細菌の集積培養系の獲得を試みた。嫌気酢酸酸化共生細菌の培養には、運転開始 631 日目のリアクターの一次集積サンプルを植種源とした。嫌気プロピオン酸酸化共生細菌の培養には 761 日目、嫌気酪酸酸化共生細菌の培養には、供給基質変更後の 1505 日目の集積物、嫌気エタノール共生細菌の培養には 1855 日目の集積系を植種にし、それぞれの基質を利用する嫌気共生細菌の培養を試みた。植種量は、20 ml の培地に対して 2 から 4 ml のリアクター集積培養液を植種した。

2-2-2. 培養培地

バッチ式集積培養法による嫌気共生細菌の培養に用いた培地は、DHS リアクターに供給していた人工海水を参考に作成した (Table 4-1)。容量 65 ml の血清バイアル瓶に 20 ml 培地を入れ、N₂/CO₂ (80/20, vol/vol) で気層部を置換後、ブチルゴム栓とアルミシールで密閉した。その後、オートクレーブ滅菌を行った。滅菌後、還元剤として Na₂S・9H₂O (0.015%) と L-システイン塩酸塩九水和物 (0.015%) を孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過させて培地に添加した。

2-2-3. 培養条件

培養基質は、10 mM 酢酸、5 mM 酪酸、5 mM プロピオン酸および5 mM エタノールを個別に培地に添加し、それぞれを基質として利用する嫌気共生細菌の培養を行った。各培養基質は予め作成した高濃度のストック溶液を植種する前に培地に添加した。培養は、10°C もしくは25°C のインキュベーター内で振とうは行わずに培養した。仮に嫌気共生細菌が増殖していればメタン生成アーキアも増殖してくるため、嫌気共生細菌の増殖確認はガスクロマトグラフ (Shimazu GC-3200) で培養系内のメタンガスの濃度を確認した。微生物の増殖が確認された酪酸と酢酸の集積培養系の継代には20 mM の酪酸もしくは酢酸を唯一の炭素源として添加した。

2-2-4. 集積培養系内の微生物種の同定

増殖が確認された集積培養系は、その培養液をサンプルとして菌体を回収しDNA抽出を行った。その後、アーキアおよびバクテリアの16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析により微生物種の同定を行った。PCR反応に使用したプライマーやPCR反応条件は、2-1-5に記述した。その後クローン化し、得られたクローン配列のうち、97%以上の相同性を示すクローン配列は1つのファイロタイプとして扱った。得られたファイロタイプの相同性解析は、NCBIのBLASTNプログラムにより行った。

第3節 実験結果および考察

3-1 DHSリアクターによる一次集積培養

嫌気共生細菌を含む有機物分解に関与する微生物群の一次集積系の獲得を試みた。基質としてDHSリアクター内にグルコースを供給することで堆積物中の一次発酵性細菌を集積させ、次に、それらが生成した代謝産物もしくは、基質として供給した酢酸とプロピオン酸を嫌気共生細菌とメタン生成アーキアの共生系により分解させることにより、堆積物中から嫌氣的有機物分解に関与する一連の微生物群の集積培養を行った。DHSリアクターを用いるメリットとしては、リアクター内のポリウレタンスポンジには孔隙が確保されていることから、供給培地や微生物をより長時間スポンジ内に滞留させることができ、増殖の遅い海底の微生物群を培養するには非常に適していることである。さらに、低濃度の栄養源を連続で供給できることや微生物の代謝産物の過度な蓄積による微生物の増殖抑制を防ぐことができる等、バッチ式集積培養法よりも効率的にメタン生成に関与している微生物群の集積が可能であると考えている。リアクター内の有機物分解に関与する微生物群の集積状況の確認は、有機酸濃度、ガス分析やアーキアおよびバクテリアの16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析によって判断し

た。本節ではそれらの分析結果について述べる。

3-1-1. 有機物濃度の変動

リアクター運転開始後、初期段階では供給したグルコースや yeast extract の分解に伴い、代謝産物として酢酸とプロピオン酸が生成され、357 日目までリアクター内に蓄積し続けた。それ以降では、酢酸とプロピオン酸の消費量が生成量よりも上回り始め、リアクターからの流出液中のプロピオン酸の濃度は、運転開始 420 日目から供給濃度を下回った。また、酢酸においては 826 日目から供給濃度を下回った (Table 4-2)。ガス分析や菌叢解析の結果から、有機物分解に関与している微生物群が集積されてきたと判断した後は、その微生物群の中でも嫌気共生細菌の優占的な集積培養を行うために運転開始 1,351 日目からグルコースの供給停止および yeast extract の供給濃度を半分量に減らした。嫌気共生細菌の集積を狙うために基質の供給量を変更したことで、酢酸やプロピオン酸の消費量が更に増加することが予想された。結果的に運転条件変更後の 1,855 日目では酢酸の消費量は基質変更後と比較すると増加した。その一方で、プロピオン酸の消費量は減少した。これらの変動は、供給基質を変更したことに依存する結果であるかまでは判断することはできないが、基質濃度変更後も変わらずに流出水に含まれる有機酸の濃度が供給濃度を確実に下回っていることから、微生物による酢酸とプロピオン酸の分解は生じていると考えられた。なお、一連の有機物分解の中で酪酸やエタノールが代謝産物として生成されてきていることが考えられるが、流出水中の酪酸およびエタノールの濃度は、

Table 4-2 Changes of substance concentrations during the DHS reactor operation.

	Theoretical values of	Sampling day of effluent seawaters and gases											
		179	230	289	357	420	491	560	631	693	761	826	1855
TOC (mg-C/l)	76.17	59	69	52	68	17	42	45	17	16	21	23	—
Glucose (mg-C/l)	34.18 (0*)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
Yeast extract (mg-C/l) ^a	10.47 (5.24*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetate (mg-C/l)	17.06	31	36	28	40	28	31	23	16	20	18	10	7
Propionate (mg-C/l)	14.46	12	19	11	18	11	12	12	7	8	6	5	9
Butyrate (mg-C/l)	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	N.D.
Ethanol	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	N.D.
Dissolved CH ₄ in effluent (mg-C/l)		0.01	0.02	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.2	—
CH ₄ in gas phase (mg-C/l)		0	0	1.5	3.5	3.6	8.4	10.1	8.0	5.9	9.0	3.6	—
Carbon balance (%) ^b		77	91	69	89	22	55	59	22	21	28	30	—
$\delta^{13}\text{C-CH}_4$ (‰) ^c		—	—	—	-74.9	-78.1	-64.5	-60.1	-60.9	-61.7	-62.8	-64.4	—
$\delta^{13}\text{C-CO}_2$ (‰) ^c		—	—	—	-15.5	-15.0	-15.6	-15.7	-15.7	-14.7	-15.5	-15.9	—

-: Not measured (It was assumed that yeast extract was completely degraded in the DHS reactor).

N.D.: not detected.

^a Yeast extract was calculated based on the assumption that the chemical component is C₅H₇NO₂.

^b The values of carbon balance were calculated by dividing total effluent-TOC including methane gases-TOC by total theoretical influent-TOC.

^c These values were obtained from the gases measurement in the gas collection bag.

検出限界以下の数値であった。

3-1-2. DHS リアクター内の菌叢解析及びガス分析

リアクター運転開始0、357、560、761、1855 日目のバクテリアおよびアーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析を行い、菌叢の変化の観察を行った (Fig. 4-3)。アーキアに関しては培養開始前には未培養アーキア Marine Benthic Group-B (MBG-B)、別名 Deep Sea Archaeal Group (DSAG)が約80%を占めていた。MBG-Bは、海底環境において検出される未培養アーキアである上にゲノム解析が行われていないことから代謝情報は明らかになっていない。その他には、海底堆積物から頻繁に検出されている未培養アーキアグループ MBG-D、FCG3、MCG および Marine Group I が検出された。その一方で、既知のメタン生成アーキアは検出されてこなかった。同時にメタンガスの測定も行ったが、0 日目ではメタンガスは検出されず、179 日目から検出された (Table 4-2)。それ以降ではメタンガスの生成量が徐々に増加し、357 日後には 179 日目と比較して 100 倍量のメタンが検出された (Table 4-2)。さらに、生成されたメタンガスに含まれる炭素の安定同位体組成は -60.1‰ から -78.1‰ の間であり (Table 4-2)、微生物反応によって生じたメタンガス (Whiticar, 1999)である可能性が高いことが強く示唆された。メタンガスの生成量が大幅に増加した 357 日目では、0 日目で最

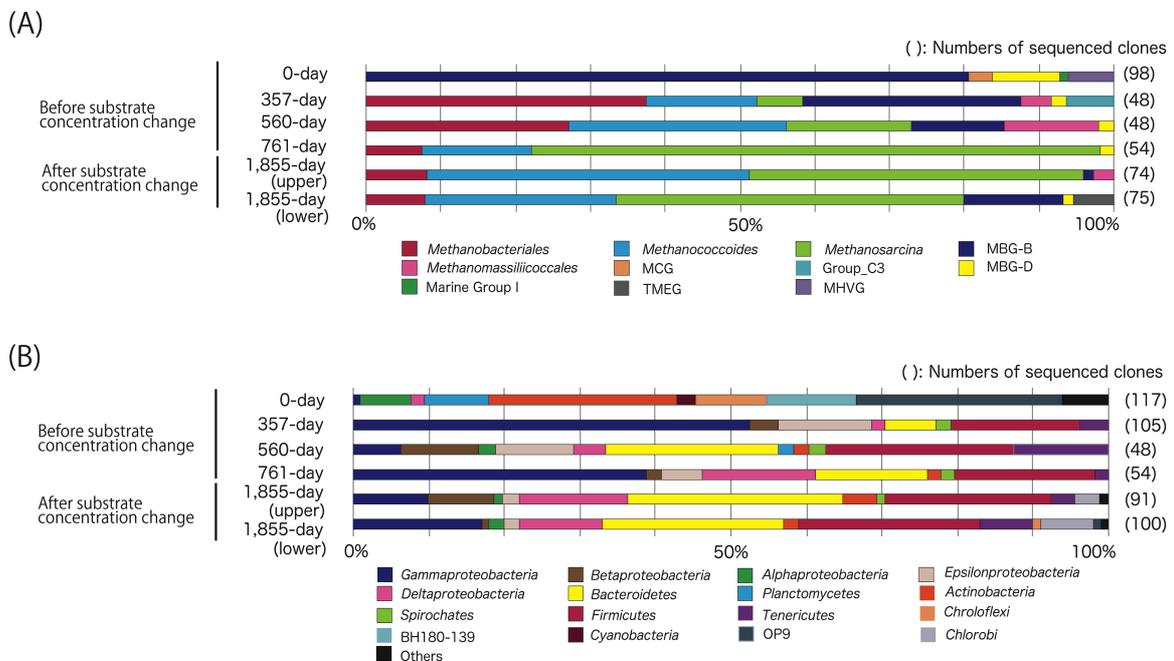


Figure 4-3 Archaeal and bacterial composition shown by clone analyses. Clonal composition of (A) archaeal 16S rRNA gene and (B) bacterial 16S rRNA gene. Clone libraries were constructed from samples on day 0, 357, 560, 761 and 1,855.

も優占していた MBG-B の割合が大幅に減少すると共に他の海底下から頻繁に検出される未培養アーキアの減少もみられた。一方で、0 日目には検出されてこなかった既知のメタン生成アーキアである *Methanobacteriales* 目、*Methanococcoides* 属、*Methanosarcina* 属と *Methanomassiliicoccales* 目の増殖が確認され、特に嫌気共生細菌にとって重要な位置づけにある水素資化の *Methanobacteriales* 目に属するメタン生成アーキアの検出率が最も高くなった (Fig. 4-3)。 $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ の値からも CO_2 還元型、つまり水素資化のメタン生成アーキアによるメタン生成が活発であることが示された (Table 4-2)。560 日目からは菌叢に変化が見られなくなり、761 日目では、水素資化の *Methanobacterium* 属、メチル化合物系を資化する *Methanococcoides* 属と水素、酢酸、メチル化合物系と幅広い基質利用性を有している *Methanosarcina* 属の3種類がアーキアの中でも優占した状態に変化した。特に *Methanosarcina* 属の検出率が最も高くなった。菌叢解析の結果では、培養期間と共に *Methanosarcina* 属の割合が増加していったが、 $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ の値からも酢酸資化型のメタンにシフトしていくことが示された (Table 4-2)。

バクテリアの菌叢解析の結果でもアーキアの結果と同様に、運転開始 357 日目から菌叢が大幅に変化した。培養開始前には、既に分離された嫌気共生細菌が属している δ -*proteobacteria* 綱や *Firmicutes* 門のクローンは検出されてこなかったが、560 日目以降には、 δ -*proteobacteria* 綱や *Firmicutes* 門をはじめとし多種多様なバクテリアが培養されてきた。中でも、*Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門、 δ -*proteobacteria* 綱、 γ -*proteobacteria* 綱、 β -*proteobacteria* 綱が優占した。1,351 日目以降は嫌気共生細菌の更なる集積をかけるためにグルコースの供給を停止し、yeast extract の添加濃度も減少させたが、基質濃度の変更前後では大きな菌叢の違いは見られず、結果的に 560 日目から 1855 日目まで菌叢に大きな変化は見られなかった。また、既知の嫌気共生細菌の分離株の 16S rRNA 遺伝子配列と同じか相同性の高い配列は、運転開始 0 日目から 1,855 日目までの間に検出されることはなかった。この結果は、嫌気共生細菌がリアクター内に培養されてきていないことを意味するものではないと考えている。なぜならば、嫌気共生細菌の分離株は数えられる程度でしか存在していない上に 16S rRNA 遺伝子配列情報だけでは、嫌気共生反応を有するか否かを判断することができないからである。最近では、共生系を構築する上で必要な遺伝子配列が推測されている論文が投稿されているが (e.g., Wrom *et al.*, 2014; Nobu *et al.*, 2014)、結局のところゲノム配列だけでは共生機能を実際に有しているかを判断することはできないと考えている。結果的にバクテリアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析の結果では、リアクター内に嫌気共生細菌が集積されてきているかを判断することは出来なかったが、リアクターに供給している酢酸やプロピオン酸が顕著に消費されてい

ることや水素資化性メタン生成アーキアがリアクター内で優占種の一つであることから、リアクター内に嫌気共生細菌が培養されてきている可能性は十分に考えられた。

3-2. バッチ式培養法による嫌気共生細菌の二次集積培養の試み

3-2-1. メタンガスの測定および顕微鏡観察

DHS リアクターによる一次集積培養では、海底堆積物中に存在している微生物の中でもメタン生成に関与する微生物群の集積を行った。本節では、その集積系の中でも、さらに、酪酸、酢酸、プロピオン酸とエタノールを基質とする嫌気共生細菌の優占的な集積を行うため、バッチ式培養により二次集積培養を行った。DHS リアクターの集積培養物を植種源として、酪酸、酢酸、プロピオン酸、エタノールをそれぞれ、唯一の炭素源としてバッチ培養を行った。培養温度は、リアクターの運転温度と同様の 10°C と 25°C に設定した。現在までの報告では、共生状態における嫌気共生細菌の培養には長期間要することが知られている。特に、環境サンプルからの嫌気共生細菌の集積培養には数ヶ月かかり、例えば、Hattori *et al.* (2000)の報告では、高温の排水処理リアクター内の汚泥を植種源にして 55°C でバッチ培養を行ったところ、最初にメタンが生成されるまでに 2 ヶ月の時間を要している。本研究で使用したリアクターでの培養温度は 10°C ではあるが、同じ堆積物から分離されたバクテリア *Pelolines submarina* MO-CFX[†] の至適生育温度は 25 から 30°C であり (Imachi *et al.*, 2014)、10°C が至適生育温度ではない可能性もあることが考えられた。したがって、25°C でも培養を行った。

培養開始後約 3-6 ヶ月後に、エタノールを除く全ての培養系からメタンガスの生成が確認され、顕微鏡観察ではメタン生成アーキアの F₄₂₀ 様自家蛍光存在が確認できた。一方、エタノールの集積培養系では培養開始約 1 年後に微生物細胞の増殖が顕微鏡により観察できたが、メタンガスの生成は確認できなかった。メタンガスの生成が確認できた酪酸、酢酸とプロピオン酸による集積培養系の継代を定期的に行ったところ、4 回目の継代でプロピオン酸による集積培養系からメタンガスが生成されなくなった。従って、安定的に継代をすることのできた酪酸と酢酸の集積培養系に研究的を絞ることにした。

3-2-2 酪酸集積培養系内の微生物種の同定

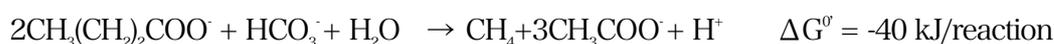
酪酸による集積培養系 (10°C、25°C)内に培養されてきた微生物種の同定を行うため、アーキアおよびバクテリアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析を行った。それぞれ 22 クローン前後の配列を解析した (Table 4-3)。

Table 4-3 Microbial compositions in butyrate-fed batch-type enrichment cultures. (A) Enrichment culture obtained at 25°C. (B) Enrichment culture obtained at 10°C.

(A)			
Number of clone/ Total of clone	Domain	Closest species	Sequence similarity (%)
24/24	Archaea	<i>Methanobacterium</i> sp. MO-MB1 (AB598270)	99
14/22	Bacteria	<i>Syntrophomonas bryantii</i> (HE654006)	99
7/22	Bacteria	<i>Geosporobacter subterraneus</i> (DQ643978)	98
(B)			
24/24	Archaea	<i>Methanobacterium</i> sp. MO-MB1 (AB598270)	99
8/23	Bacteria	<i>Geosporobacter subterraneus</i> (DQ643978)	95
7/23	Bacteria	<i>Syntrophomonas bryantii</i> (HE654006)	99
6/23	Bacteria	<i>Clostridium halophilum</i> (X77837)	92
1/23	Bacteria	<i>Bacteroidetes bacterium</i> (AB623230)	96
1/23	Bacteria	<i>Geosporobacter subterraneus</i> (DQ643978)	93

バクテリアのクローン解析の結果、酪酸の系では、培養温度 10°C、25°C の両方において嫌気酪酸酸化共生細菌 *Syntrophomonas bryantii* と 99% の相同性を有する配列が検出された。25°C の培養系内では、2 つのファイロタイプのバクテリアが検出された。*Syntrophomonas* sp. が最も優占しており、バクテリアのクローンライブラリーの約 64% を占めていた。他には *Clostridiales* 目の *Geosporobacter subterraneus* と 98% の相同性を有するクローンが検出された。また、10°C の培養系からは 5 つファイロタイプが検出され、*S. bryantii* との相同性が 99% の配列が 2 番目に多い 30% の割合で検出された。一方で、アーキアに基づくクローン解析の結果では、10°C と 25°C どちらの集積培養系からも本リアクターから既に純粋分離されている水素資化性メタン生成アーキア *Methanobacterium* sp. MO-MB1 株と 99% の相同性を有する配列のみが検出された。これらの集積培養系の継代を何度も行ったところ、安定した基質の分解ならびにメタンガスの生成が見られた。さらに顕微鏡観察を行ったところ、*Methanobacterium* sp. 様細胞と孢子形成菌が密着している状態を観察することができたため (Fig. 4-4)、*Syntrophomonas* sp. と *Methanobacterium* sp. が共生関係を築いている可能性が示唆された。結果的に 10°C よりも 25°C で培養した方が、混在菌が少ない状態で集積をかけることができた。

次に、嫌気共生系による酪酸分解が行われていることを物質収支の面からも確認した。既往の知見でも述べたように、嫌気酪酸酸化反応は水素資化性メタン生成アーキアとの共生反応で次の式で反応が進み、2 分子の酪酸から 1 分子のメタンと 3 分子の酢酸が生成される。



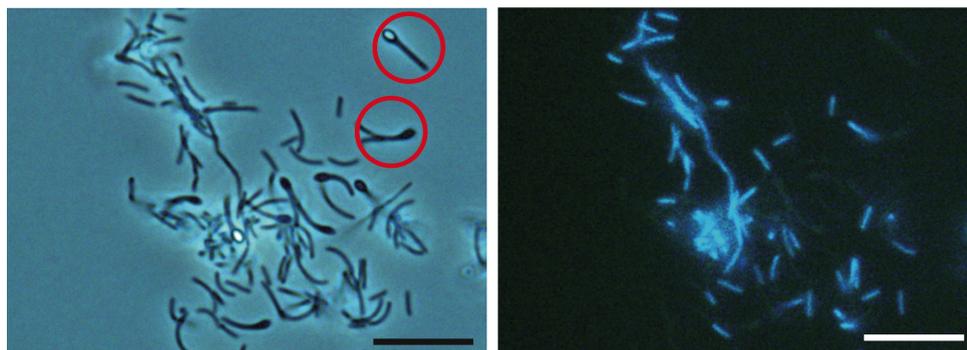


Figure 4-4 Photomicrographs of the butyrate-fed batch-type enrichment culture at 25°C. Phase-contrast micrograph (left) and fluorescence micrograph (right) show the identical field. Bars represent 10 μm .

そこで、経時的にメタンガス、酪酸と酢酸の濃度を測定し、最終的に Electron recovery を算出した。メタンガスの測定結果から、25°C で培養した場合、培養開始 7 日目から 21 日目までが対数増殖期にあり、それ以降は定常期に達して約 28 日間で 10 mM の酪酸を完全酸化することが示された (Fig. 4-5)。また、Electron recovery を計算したところ 101% になった (Table 4-4)。理論値であれば 3 分子の酢酸が生成されることを 4 分子の酢酸が生成されてきていることが示された。この要因として考えられることは、培養系に混在している微生物により、還元剤として添加されている L-システインをはじめとするアミノ酸やその他の代謝産物由来の発酵により酢酸生成をしている可能性と共生系によって生成された水素と CO_2 から Homoacetate 生成菌が酢酸を生成することの 2 点が考えられた。混在菌と最も相同性の高かった *G. subterraneus* はシステインを基質にすることはできないが、その他の多種多様なアミノ酸を基質として利用し、酢酸を生成することが報告されている (Klouche *et al.*, 2007)。また、今回のクローン解析では配列は得られなかったが、得られた酪酸集積培養系の中には *G. subterraneus* 以外にも共存菌が混在していることは明らかになっている (5 章に記載)。その一つである

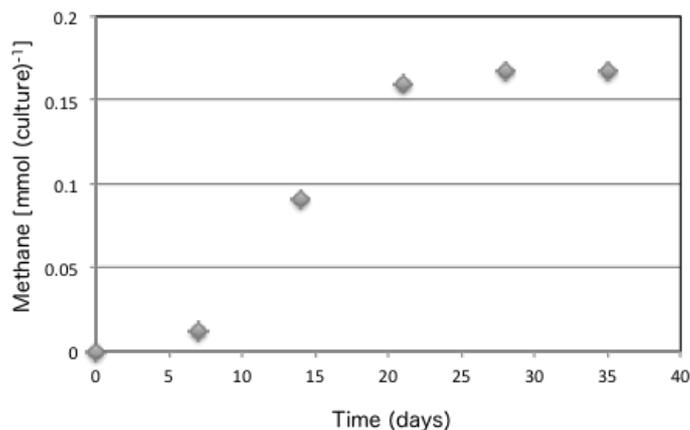


Figure 4-5 Methane production via butyrate degradation in the butyrate-fed enrichment culture.

Table 4-4 Butyrate degradation, and methane and acetate production by the butyrate-fed batch-type enrichment culture.

	Sampling days						Electron recovery (%)
	0	7	14	21	28	35	
Methane (mmol)	0	0.01	0.09	0.16	0.17	0.17	101
Butyrate (mmol)	0.41	—	—	—	—	0.01	
Acetate (mmol)	0.04	—	—	—	—	0.88	

Sedimentibacter sp. の中にもアルギニン、グリシンやリジンなどのアミノ酸を資化し、その代謝産物として酢酸、酪酸、プロピオン酸を生成することが報告されている。代謝産物の中でも生成される酢酸の濃度は特に高いことが示されている (Breitenstein *et al.*, 2002)。その一方で、酢酸以外の酪酸の消費やメタンガス生成は理論値通りの値を示しており、*Syntrophomonas* sp. と *Methanobacterium* sp. による嫌気酪酸酸化反応が確認できた。

今のところ、本論文以外に海底堆積物からの嫌気酪酸酸化共生細菌の集積培養系の獲得例は他に報告されていない。この結果は、海底環境にも嫌気酪酸酸化共生細菌が存在すること、それを介した酪酸酸化経路が存在する直接的な可能性を示す初めての報告となった。今回、海底堆積物から酪酸酸化共生系の獲得に成功した理由として考えられることは、酪酸酸化共生細菌が氷素資化性メタン生成アーキアと安定した共生関係を築くことができたことが大きいと考えられる。10°C と 25°C の集積培養系を比較すると継代を何度か繰り返した結果、25°C の培養系の方が最終的に混在菌は少なくなった。10°C の集積培養系では約1年かけて10 mM 酪酸を完全酸化するところ、25°C の培養系では約1ヶ月で完全酸化される。これらを基に考えると、25°C では、共生関係の安定性から、酪酸とその副産物である水素やその他の副産物を独占でき、かつ、比較的短い期間で継代を何度も繰り返すことができた結果、混在菌をマイナーにしていくことができたと考えている。加えて、地下圏では酪酸に関わる物質循環が重要である可能性があることにも起因すると考えている。嫌気酪酸酸化共生細菌である *Syntrophomonas* 属の16S rRNA 遺伝子配列と高い相同性を有するクローンは、消化汚泥、バイオガスプラントの他には枯渇油田や地下の炭層領域から多く検出されている (e.g., Mayumi *et al.*, 2011; Yamane *et al.*, 2011; Shimizu *et al.*, 2007)。このことから、海底下を含む地下圏において酪酸酸化は主流な代謝循環の一つである可能性が考えられ、*Syntrophomonas* sp. の集積培養系の獲得に成功したと考えている。さらに *S. bryantii* は、海洋領域の泥から分離されており (Stieb and Schink, 1985)、本研究で使用した培地に含まれる程度の NaCl 濃度 (25 g/l) でも十分に生育できることが報告されている (Zhao *et al.*, 1990)。既往の知見に記述したが、この濃度の塩濃度に耐性を有する他の酪酸酸化

共生細菌の分離株は知る限り存在しない。この耐塩性の性質を有していたことも大きな理由であると考えられる。

以上のことから海底のような地下領域においても嫌氣的酪酸酸化とその反応によるメタン生成が生じる経路が存在している可能性が示された。

3-2-3. 酢酸集積培養系内の微生物種の同定

酢酸による集積培養系では 25°C の培養系のみメタンガスの生成が確認された。集積培養系内に培養されてきた微生物種の同定を行うため、アーキアおよびバクテリアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析を行った。それぞれ 22 クローン前後の配列を解析した (Table 4-5 A)。アーキアのクローン解析の結果、水素資化性メタン生成アーキア *Methanoculleus* 属に属する配列のみが検出され、得られた 16S rRNA 遺伝子配列は、*M. hydrogenitrophicus* や *M. chikugoensis*、*M. marisnigri* らと相同性 97% を有していた。バクテリアは *Clostridiales* 目、*Sedimentibacter* 属、*Bacteroidales* 目に属する多様な配列が検出された。この中で最も優占していたのが *Clostridiales* 目の Family XIII に属する配列である。最も近縁なバクテリアは "*Clostridium aminobutyricum*" であり 16S rRNA 遺伝子配列の相同性は 92% だった。また、得られた *Sedimentibacter* 属のクローン配列は同一のリアクターから分離された MO-SED 株の配列と一致した。MO-SED 株の基質特異性試験の結果、嫌氣的な酢酸酸化をしないことは既に明らかとなっている (Imachi *et al.*, personal communication)。また、検出された配列と 99% の相同性を有し、同じ堆積物から分離された *Bacteroidales* 目に属する strain JAM-BA0302 は、従属栄養性の通性嫌気性細菌として提案されており、好気培養の時のみ酢酸を生育基質として利用でき、嫌気条件下では yeast extract のみを利用することができる (Takai *et al.*, 2013)。

Table 4-5 Microbial compositions in the acetate-fed enrichment culture. (A) The enrichment culture obtained after three months cultivation. (B) The enrichment culture obtained after two years cultivation.

(A)			
Number of clone/ Total of clone	Domain	Closest species	Sequence similarity (%)
10/10	Archaea	<i>Methanoculleus hydrogenitrophicus</i> (Fj977567)	97
5/10	Bacteria	<i>Clostridium aminobutyricum</i> (X76161)	92
3/10	Bacteria	Strain JN18_A14_H (DQ168650, genus <i>Sedimentibacter</i>)	98
2/10	Bacteria	Strain JAM-BA0302 (AB362263, order "Bacteroidales")	99
(B)			
24/24	Archaea	<i>Methanobacterium</i> sp. MO-MB1 (AB598270)	100
21/24	Bacteria	<i>Geosporobacter subterraneusu</i> (DQ643978)	98
1/24	Bacteria	<i>Clostridium halophilum</i> (X77837)	93
1/24	Bacteria	<i>Bacteroidetes bacterium</i> (AB623230)	96
1/24	Bacteria	Strain JAM-BA0302 (AB362263, order "Bacteroidales")	93

これらの結果を踏まえると培養されてきたバクテリアの中で *Clostridiales* 目に属するバクテリアが嫌氣的酢酸酸化を行っている可能性が考えられた。分離作業に入るまで継代を何度か繰り返したが、継代をしていく中で徐々にメタンガスの生成量が下がり、菌の増殖は見られるものの生成されるメタンガスの生成量は著しく減少したため、再度、集積培養系内のクローン解析を行った。その結果、先のクローン解析で検出された配列が検出されてきた一方で、集積培養系内の菌叢は大きく変化し (Table 4-5 B)、酢酸酸化共生細菌のパートナーである水素資化性メタン生成アーキアも *Methanoculleus* 属から *Methanobacterium* 属に変わっていた。しかし、培養系の中には水素資化性メタン生成アーキアの増殖が必ずみられ、酢酸酸化共生細菌と推定される *Clostridiales* 目に属するバクテリアも、継続的に培養されていることから *Clostridiales* 目に属するバクテリアが嫌気酢酸酸化共生細菌である可能性が十分考えられた。

第4節 小括

本章では、一次集積培養として DHS リアクターを用いた海底堆積物からのメタン生成に関与する微生物群の集積を行い、二次集積培養としてバッチ式集積培養法による酪酸、酪酸、プロピオン酸、エタノールなどの嫌気酸化共生細菌の培養および集積培養系の獲得を試みた結果について報告した。リアクターによる一次集積培養では、培養前と後では菌叢が大きく変化したこと、生成されてきたメタンガスの同位体分析の結果、有機酸の消費や水素資化性メタン生成アーキアの存在が確認できたことから嫌気共生細菌を含む有機物分解に関与している微生物がリアクター内で培養されてきている可能性が示唆された。リアクター内に増殖してきたバクテリアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析を行ったところ、既知の嫌気共生細菌の分離株と同じか相同性の高い配列は検出されなかったが、これまでに得られたデータを総合すると新規系統に属する嫌気共生細菌がリアクター内に培養されてきている可能性が示された。そこで、リアクター内の集積培養系を植種源として酪酸、酢酸、プロピオン酸、エタノールを唯一の炭素源とするバッチ式培養法にて嫌気酸化共生細菌の二次集積培養を試みた。集積培養系のうち、酪酸、酢酸とプロピオン酸を基質とした培養系からメタンガスの生成を確認することができた。継代を繰り返していく中で継続的にメタンガスの生成が安定的に確認された酪酸と酢酸の集積培養系に対して研究対象を置いた。酪酸の培養系からは 16S rRNA 遺伝子に基づく解析では既に酪酸酸化共生細菌として知られている *Syntrophomonas* sp. と水素資化性メタン生成アーキア *Methanobacterium* sp. MO-MB1 株が優占的に培養されていることが示された。同時に、物質収支の面から酪酸の完全分解が起きていることが明らかになり、*Syntrophomonas* sp. と

Methanobacterium sp. MO-MB1 による嫌気酪酸酸化集積培養系の獲得に成功していることが明らかになった。これらの結果から海底には、酪酸酸化共生細菌の存在とその代謝経路が存在する可能性が示された。一方で酢酸の集積培養系からは、少なくとも4種類のバクテリアの増殖が確認され、さらに、嫌気共生細菌の増殖に不可欠である水素資化性メタン生成アーキアの増殖が見られた。このことから、嫌気酪酸酸化共生細菌が増殖している可能性が考えられ、増殖が確認されたバクテリアの中でも“*Clostridium aminobutyricum*”との相同性が92%の16S rRNA 遺伝子配列を有する *Clostridiales* 目に属するバクテリアが嫌気酪酸酸化共生細菌である可能性が示された。

—参考文献—

- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925.
- Aoike, K. and CK06-06 Scientists. (2007). D/V Chikyu Cruise Offshore Shimokita Laboratory Operation Report. Center for Deep Earth Exploration, JAMSTEC: Yokohama, Japan, <http://sio7.jamstec.go.jp/JAMSTEC-exp-report/>.
- Breitenstein, A., Wiegel, J., Haertig, C., Weiss, N., Andreesen, J. R., and Lechner, U. (2002). Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 801–807.
- Colwell, F. S., Boyd, S., Delwiche, M. E., Reed, D. W., Phelps, T. J., and Newby, D. T. (2008). Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at Hydrate Ridge, Cascadia Margin. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3444–3452.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (1999). The Domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444.
- Delong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5685–5689.
- Fry, J. C., Parkes, R. J., Cragg, B. A., Weightman, A. J., and Webster, G. (2008). Prokaryotic biodiversity and activity in the deep seafloor biosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 181–196.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, and Shoun, H. (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol.*

- Microbiol. 4, 1601-1609.
- Imachi, H., Aoi, K., Tasumi, E., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., *et al.* (2011). Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. ISME. J. 5, 1913–1925.
- Imachi, H., Sakai, S., Lipp, J.S., Miyazaki, M., Saito, Y., Yamanaka, Y., *et al.* (2014). *Pelolinea submarina* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, filamentous bacterium of the phylum *Chloroflexi* isolated from subseafloor sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 812–818.
- Inagaki, F., Kuypers, M. M., Tsunogai, U., Ishibashi, J., Nakamura, K., Treude, T., *et al.* (2006). Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 14164–14169.
- Inagaki F. (2010). Deep subseafloor microbial community. In: Encyclopedia of Life Sciences. doi: 10.1002/9780470015902.a0021894.
- Kawagucci, S., Ueno, Y., Takai, K., Toki, T., Ito, M., Inoue, K., *et al.* (2013). Geochemical origin of hydrothermal fluid methane in sediment-associated fields and its relevance to the geographical distribution of whole hydrothermal circulation. Chem. Geol. 339, 213–225.
- Kendall, M. M., Wardlaw, G. D., Tang, C. F., Bonin, A. S., Liu, Y., and Valentine, D. L. (2007). Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 73, 407–414.
- Klouche, N., Fardeau, M. L., Lascourrèges, J. F., Cayol, J. L., Hacene, H., Thomas, P., and Magot, M. (2007). *Geosporobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., a spore-forming bacterium isolated from a deep subsurface aquifer. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1757–1761.
- Kobayashi, T., Koide, O., Mori, K., Shimamura, S., Matsuura, T., Miura, T., *et al.* (2008). Phylogenetic and enzymatic diversity of deep subseafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. Extremophiles 12, 519–527
- Kvenvolden, K.A. (1995). A review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate. Org. Geochem. 23, 997–1008.
- Mayumi, D., Mochimaru, H., Yoshioka, H., Sakata, S., Maeda, H., Miyagawa, Y., *et al.* (2011). Evidence for syntrophic acetate oxidation coupled to hydrogenotrophic methanogenesis in the high-temperature petroleum reservoir of Yabase oil field (Japan). Environ. Microbiol. 13, 1995–2006.
- Mikucki, J. A., Liu, Y., Delwiche, M., Colwell, F. S., and Boone, D. R. (2003). Isolation of a methanogen from deep marine sediments that contain methane hydrates, and description of *Methanoculleus submarinus* sp. nov.. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3311–3316.
- Milkov, A. V. (2005). Molecular and stable isotope compositions of natural gas hydrates: A revised global dataset and basic interpretations in the context of geological settings. Org. Geochem. 36, 681–702.
- Miyashita, A., Mochimaru, H., Kazama, H., Ohashi, A., Yamaguchi, T., Nunoura, T., *et al.* (2009). Development of 16S rRNA gene-targeted primers for detection of archaeal anaerobic methanotrophs (ANMEs). FEMS Microbiol. Lett. 297, 31–37.
- Moench, T. T., and Zeikus, J. G. (1983). An improved preparation method for a titanium (III)

- media reductant. *J. Microbiol. Methods* 1, 199–202.
- Morono, Y., Terada, T., Masui, N., and Inagaki, F. (2009). Discriminative detection and enumeration of microbial life in marine subsurface sediments. *ISME. J.* 3, 503–511.
- Nobu, M. K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe, S. G., Woyke, T., and Liu, W. T. (2014). Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME. J.* doi: 10.1038/ismej.2014.256.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., *et al.* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541.
- Shimizu, S., Akiyama, M., Naganuma, T., Fujioka, M., Nako, M., Ishijima, Y. (2007). Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology* 5, 423–433.
- Takai, K., Abe, M., Miyazaki, M., Koide, O., Nunoura, T., Imachi, H., *et al.* (2013). *Sunxiuqinia faeciviva* sp. nov., a facultatively anaerobic organoheterotroph of the *Bacteroidetes* isolated from deep seafloor sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1602–1609.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Whiticar, M. J. (1999). Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geology* 161, 291–314.
- Worm, P., Koehort J. J., Visser, M., Schaap, P. J., Plugge, C. M., Sousa, D. Z., and Stams, A. J. (2014). A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities. *Biochim. Biophys. Acta.* 12, 2004–2016.
- Yamane, K., Hattori, Y., Ohtagaki, H., and Fujiwara, K. (2011). Microbial diversity with dominance of 16S rRNA gene sequences with high GC contents at 74 and 98 °C subsurface crude oil deposits in Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 220–235.
- Zhao, H. X., Yang, D., Woese, C. R., Bryant, M. P. (1990). Assignment of *Clostridium bryantii* to *Syntrophospora bryantii* gen. nov., comb. nov. on the basis of a 16S rRNA sequence analysis of its crotonate-grown pure culture. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 40–44.

第5章

集積培養系からの嫌気共生菌の純粋分離の試み

第5章 集積培養系からの嫌気共生細菌の純粋分離の試み

第1節 目的及び概要

第4章では酪酸酸化共生細菌である *Syntrophomonas* sp. の集積と嫌気酢酸酸化共生細菌の可能性のあるバクテリアの集積に成功した。本章では、第4章で得た酪酸と酢酸の集積培養系から嫌気共生細菌の純粋分離を試みた結果を報告する。得られた酪酸集積培養系内の *Syntrophomonas* sp. は、既に分離されている *Syntrophomonas bryantii* との相同性が99%であり系統学的には新規性は無いものの、深海底堆積物中から分離・培養された *Syntrophomonas* sp. は存在しない。したがって、今回獲得することができた酪酸集積培養系から *Syntrophomonas* sp. の純粋分離を試みた。また、酢酸集積培養系で増殖が確認された、酢酸酸化共生細菌の可能性のある *Clostridiales* 目に属するバクテリアが、酢酸酸化能を有するか否かを明確にすること多様な種類のバクテリアが混在している状態では難しい。嫌気共生能の有無を確認する方法の一つとして、純粋分離をした後にメタン生成アーキアと混合させることで人工的に共生関係を再構築させた後、基質を酸化するか確かめる方法がある (e.g., Westerholm *et al.*, 2010; Hattori *et al.*, 2000)。本研究でも、その手法で確認を行うために目的のバクテリアを純粋分離することにした。また、目的の *Clostridiales* 目に属するバクテリアの16S rRNA 遺伝子は近縁種との相同性が92%離れていることや近縁種と基質利用性等の生理学的な特徴が異なる可能性があることから、新属を代表するバクテリアとして提案できる可能性があるため、菌学的性質を確認するためにも純粋分離を試みた。第5章では *Syntrophomonas* sp. と *Clostridiales* 目に属する2種類のバクテリアの純粋分離を試みた結果について報告する。

第2節 実験方法

2-1. 植種源

第4章で得られた酢酸および酪酸の集積培養系を植種源に用いた。

2-2. 培地および培養条件

メタン生成アーキアに依存せずに単独で生育させるための培養基質として、*Syntrophomonas* sp. の分離には10 mM クロトン酸を利用した。分離方法としては、ロールチューブ法を用いた。具体的には、クロトン酸を基質にしたロールチューブを行い、採取したコロニーは10 mM クロトン酸および0.05% yeast extract (Difco) を添加した液体培地に移し、25°C で培養を行った。

推定酢酸酸化共生細菌の *Clostridiales* 目バクテリアの分離は、(1) 希釈培養法と低温殺菌、(2) 抗生物質添加および (3) ロールチューブ法の3種類の分離操作により行った。分離基質は、10 mM クロ

トン酸および 0.05% yeast extract、20 mM ギ酸と 100 kPa H_2/CO_2 の3種類の基質を試した。その際に、メタン生成アーキアの生育阻害剤である 10 mM 2-BES (2-bromoethane sulfate) をそれぞれの培養系に添加した。培養系は 25°C、暗所で静置培養を行った。なお、培地や還元剤の作成方法や組成は、第4章に記載した通りに行った。分離方法の詳細については以下に記載した。

2-2-1. 分離方法

(1) 希釈培養法と低温殺菌

上記2種類を組み合わせた方法で分離を試みた。希釈培養法には、容量 15 ml の試験管 (Hunget tube) に 9 ml の培地を入れ、 N_2/CO_2 (80/20, vol/vol) で気層部を置換した。分離源となる集積培養系から培養体を 1 ml 採取し、1 本目の試験管に植種した。それを試験管 10 本目 (10^{-10})まで作成した。標的のバクテリアは孢子形成菌であることから、植種した後に 80°C (30 分間) もしくは 90°C (20 分間) のインキュベーターに入れ、混在菌の除去を狙った。

(2) 抗生物質添加

混在菌と耐性のある抗生物質が異なれば、混在菌の除去ができる可能性がある。Ampicillin、rifampicin、kanamycin、chloramphenicol、penicillinG、neomycin、streptomycin、vancomycin、tetracyclin を 50 μ g/ml の濃度で添加した。各抗生物質は 0.22 μ m のフィルター滅菌後に培地に添加した。

(3) ロールチューブ法

4% Agar Noble (Difco) 溶液を 68 ml の血清バイアル瓶に 5 ml 分注し、 N_2/CO_2 (80/20, vol/vol) 混合ガスで十分に気層部を置換後、ブチルゴム栓とアルミシールで密封した。この状態で保管し、使用する直前に 90°C で 3 分程度熱して寒天を溶解させた。

次に作成した寒天培地への培地および基質の添加と集積培養液の植種を行った。これらの作業は全て寒天が固化しないように 42°C のウォーターバス中で行った。寒天培地に混合させる前に 2 倍濃度の基質および人工海水培地を、溶解させた寒天培地に 5 ml ずつ加えた。次に、微生物培養液を適宜適量植種し、そこから 1 ml 引き抜き 2 本目に添加した。同様の操作を繰り返し、適宜希釈培養系を作成した。最後にバイアル瓶を氷水上で転倒回転させながら冷却し、バイアル瓶の壁面に均一な厚さの寒天培地を作成した。

寒天培地を固めた培養系は、25°C で静置培養した。微生物の増殖によるコロニーが確認され次第、顕微鏡でコロニーの観察を行った。得られたコロニーは、培地で懸濁した後基質入りの培地に植種し

て液体培地での培養を試みた。

2-3. 微生物種の同定

増殖が確認できた培養系については、DNAを抽出し、バクテリアの16S rRNA遺伝子に基づくクローン解析もしくは、ダイレクトシーケンスにより増殖してきた微生物種の同定を行った。PCR反応条件やプライマーは第4章に記載した通りに行った。

2-4. 推定酢酸酸化共生細菌培養系の純粋性の確認

分離株の純粋性は次の3種類の方法で確認を行った。(1) 16S rRNA遺伝子のダイレクトシーケンス、(2) 新たに設計した推定酢酸酸化共生細菌に特異的なプローブ Ace25B1_834 (5'-CCG AAG CCT CGC GAC CCC-3')によるFISH法。プローブの標識にはAlexa Fluor 488を使用し、5'末端に標識した。至適ホルムアミド濃度はClone-FISHにより求め、FA濃度30%でFISHを行った。(3) 無菌試験に用いられる培地として知られているThioglycollate培地(Difco)に追加で25 g/LのNaClを混合させた培地による培養。以上の方法により確認を行った。(1)のダイレクトシーケンスにはプライマーペアEUB338F mixと1492Rを使用した。PCR反応条件は第4章に記載した条件で行った。培地の作成方法は付属の調整方法に従った。嫌気性、微好気性、好気性のバクテリア、メタン生成アーキアおよび硫酸還元菌の混入の有無を確認するために、基質には(1) 100 Kpa H₂/CO₂と10 mM チオ硫酸、(2) 2 mM キシロース (3) 2 mM グルコース (4) 2 mM フルクトース (5) 2 mM スクロース (6) 2 mM セルビロース (7) (2)から(5)を混合させたもの (8)基質なしの計8条件を設定した。培養は、それぞれの基質で10°C、25°C、30°Cで行った。

第3節 実験結果および考察

3-1. 嫌気酪酸酸化共生細菌の純粋分離

Syntrophomonas sp. は、寒天培地上にコロニーを作ること、単独培養基質としてクロトン酸を利用できることが報告されている(Stieb & Schink, 1985)。したがって*Syntrophomonas* sp. の純粋分離にはクロトン酸を基質にしたロールチューブを行うことにした。最初の寒天培地へは培養液を0.5 ml添加し、希釈培養系は10⁰から10⁷までを作成した。基質を切り替えるにあたり、液体培地で事前に予備培養実験を行った。クロトン酸とメタン生成アーキアの生育阻害剤である2-BESを添加した場合と2-BESを添加せずにクロトン酸のみで培養した場合を比較すると、2-BESを添加せずにメタン生成アーキアが僅かに混在していた方が*Syntrophomonas* sp. の増殖には効果があった(データ非表

示)。したがって、2-BES は添加せずに 10 mM クロトン酸のみで寒天培養することにした。植種源には、10 mM 酪酸集積培養系を用いたが、培養系の状態としては酪酸が完全分解する直前で *Syntrophomonas* sp. と *Methanobacterium* sp. が優占している状態の培養系を使った。なお、*Syntrophomonas* sp. がクロトン酸を分解すると酪酸、酢酸と水素が代謝産物として生成される。このことから、培養基質をクロトン酸に基質を切り替えても生成された水素を利用し、*Methanobacterium* のコロニーも増殖してくることが予想された。したがって、*Methanobacterium* sp.が増殖する前の早い段階に形成されたコロニーを選択的に回収し、 10^1 と 10^2 の培養系から計 17 コロニー採取した。増殖してきたコロニーの形態を顕微鏡で観察したところ、全て類似した形態であった。いくつかのコロニーをピックアップして観察したところ *Syntrophomonas* sp. は運動性が無いことが報告されているにも関わらず (Hatamoto *et al.*, 2007)、観察した全てのコロニーは運動性のある桿菌だった。その後、遅れて 2 週間後に 10^3 の培養系からもコロニーが生えてきたが、枝分かれ状の菌糸を作っている *Actinomyces* 様の細胞が優占化していたため、コロニーの採取はしなかった。 10^1 と 10^2 の培養系から採取したコロニーは 10 mM クロトン酸を基質にした液体培地に植菌した。2 週間経過後に顕微鏡観察をしたが、菌の増殖は確認できなかった。*Syntrophomonas* 属は、クロトン酸での増殖は遅いことは知られているが (Beaty & Mcinerney, 1987; Sekiguchi *et al.*, 2000)、yeast extract を添加することで生育促進に繋がったとの報告があるため (Hatamoto *et al.*, 2007)、yeast extract を追加で添加した。その結果、添加 3 日で懸濁が見られ、顕微鏡観察を行ったところ、孢子形成菌が単独で培養されてきていた。DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子をダイレクトシーケンスで解析したところ *Syntrophomonas* sp.ではなく、*Sedimentibacter* sp.であった。また、得られた培養系に対して *Syntrophomonadaceae* 科に特異的なプローブ S-F-Sym-0700-b-A-23 (Hansen *et al.*, 1999; Hatamoto *et al.*, 2007) を用いて FA 濃度 15% で FISH を行ったが、有意な蛍光を得ることはできなかった。この結果からコロニーを植種した培養液中に *Syntrophomonas* sp.は生育してきていないことが明らかになった。酪酸を基質とした集積培養系では *Syntrophomonas* sp.は優占種であるにも関わらず、クロトン酸に基質を変えるとマイナーな種になってしまうことが明らかになった。これは、*Syntrophomonas* sp.はクロトン酸上では生育が非常に遅いため、*Sedimentibacter* や *Actinomyces* 系などのバクテリアの増殖速度に負けてしまうことが大きな要因であることが考えられる。残念ながら、現時点で *Syntrophomonas* sp.の純粋分離には至っていない。

3-2. 推定酢酸酸化共生細菌の純粋分離

単独生育基質として利用でき、増殖効率が良い基質を探した。メタン生成アーキアの生育阻害剤 2-BES を含む H_2/CO_2 、ギ酸およびクロトン酸の3種類の基質の検討を行った。 H_2/CO_2 とギ酸を選んだ理由は、既知の嫌気酢酸酸化共生細菌の中には単独で H_2/CO_2 やギ酸を利用するホモ酢酸生成菌である種も存在するため、 H_2/CO_2 とギ酸を基質に選んだ。また、標的としているバクテリアとの 16S rRNA 遺伝子の相同性 (92%) が最も高い “*Clostridium aminobutyricum*” や、91% の相同性を有する *Anaerovorax odorimutans* は、4-aminobutyrate を基質として単独で生育できることが知られている (Hardman *et al.*, 1960; Matthies *et al.*, 2000)。さらに “*C. aminobutyricum*” については、4-aminobutyrate を基質とした際の代謝経路も報告されており、4-aminobutyrate を利用した後はクロトン酸を経由し、最終的に酪酸を生成することができることが報告されている (Gerhardt *et al.*, 2000)。したがって、培養基質にクロトン酸を選び、さらに生育補助剤として、yeast extract を添加した系で培養した。その結果、クロトン酸のみでは菌の増殖は見られなかったが、クロトン酸と yeast extract で培養した系では目で濁っていることが見える程度の生育が確認でき、孢子形成細菌を含む桿菌が生育していた。また、ギ酸で培養した系では瓶の底に白い浮遊物が僅かに観察できる程度の生育状態であったが、顕微鏡観察で桿菌の増殖を確認することができた。ギ酸に対して yeast extract も同時に添加して培養を試みたが、生育状態はギ酸単体の時と違いは無かった。 H_2/CO_2 では菌の生育を顕微鏡観察でも確認することができなかった。増殖が確認されたクロトン酸と yeast extract の培養系およびギ酸の培養系の中に標的であるバクテリアが生育してきているかを確認するために 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析を行った。両方の培養系に対して 24 クローンの解析を行ったが、全てのクローンが標的のバクテリアであったことから、標的のバクテリアの選択的培養に成功したことが示された。さらに、蛍光顕微鏡での F_{420} の観察からメタン生成アーキアの増殖は確認されなかったことから、単独基質での培養に成功していることも示された。これらの結果から、濁度がより高いクロトン酸と yeast extract によって得られた集積培養系から標的のバクテリアの分離を試みることにした。

クロトン酸と yeast extract の集積培養系の継代を繰り返す中で、標的のバクテリアであると考えられる桿菌の他にも細胞が分岐している微生物の増殖が確認された。その集積培養系を植種源にして 10 mM クロトン酸と 0.05% yeast extract を基質としたロールチューブを行った。植種量は、0.2 ml で 10^0 - 10^8 まで希釈培養系を作成した。約 2 週間後にコロニーの形成が見られたため、10 個のコロニーを採取し、クロトン酸と yeast extract を含んだ液体培地に植菌した。菌体の増殖が確認できた培養系の観察したところ、分岐を起こしている細胞の増殖だけが確認された。その細胞の 16S rRNA 遺伝子

をダイレクトシーケンスで解析したところ、それらは *Actinobacteria* 綱に属する *Cellulomonas* 属の細菌であることが判明した。そこで、*Cellulomonas* 属の細菌の増殖を抑える方法として抗生物質添加を行うことにした。*Cellulomonas* 属の細菌に効果のある抗生物質を調べるためにロールチューブ法にて分離した *Cellulomonas* 属の細菌を抗生物質試験に使った。その結果、rifampicin、chloramphenicol と tetracyclin に対して完全な生育阻害を受けた。Vancomycin では抑制効果はあったが、増殖を完全に抑制しきれていなかった。この結果から、この4種類の抗生物質をそれぞれ基質と共に添加し、集積培養系を植種した。その結果、全ての抗生物質の系に対して孢子部分が大きく膨らんだ状態の細胞のみが数細胞増殖されてきた。目的の細胞であると考えられたが菌体の増殖効果も非常に低く、強い阻害を受けていることが示された。したがって、抗生物質を用いた目的細菌の純粋分離は難しいものと判断した。

目的の細菌は孢子を形成する特性を有していたことから、次に希釈培養法と低温殺菌を組み合わせた分離法を試みた。80°C-30分もしくは90°C-20分を行い、顕微鏡観察をしたところ、どちらからも目的の細菌らしき、運動性のある桿菌が観察され、*Cellulomonas* 属様の細胞は確認されなかった。より低温殺菌の効果が望める90°C-20分の低温殺菌を行った培養系を植種源とし、継代する前に再度90°C-20分の低温殺菌を行った。増殖が確認された後、 10^{10} まで希釈培養系を作成し、更に90°C-20分の条件で三度目の低温殺菌を行った。その後、 10^3 から得られた培養系を標的の細菌に特異的なプローブ Ace25B1_834 で FISH を行ったところ、増殖されてきた細胞は標的の細菌であることが示され、他の混在菌が存在しないことが明らかになった (Fig. 5-1)。また、16S rRNA 遺伝子を対象としたダイレクトシーケンスも行ったが、標的細菌の16S rRNA 遺伝子配列1波形のみが確認された。Thioglycollate 培地による純粋性の試験結果からも混在菌は確認できなかったことから純粋分離に成功したと判断した。純粋分離に成功した *Clostridiales* 目に属する株は、MO-YS 株と命名した。MO-YS 株が嫌気酢酸酸化共生細菌であることの証明が出来れば、海底堆積物から初めての分離株になり、嫌気酢酸酸化共生細菌を介した有機物分解経路が存在する可能性を示す証明となる。加えて、系統学的な方面でも価値を有し、科レベルで新規な嫌気酢酸酸化共生細菌の発見となる (Fig. 5-3)。

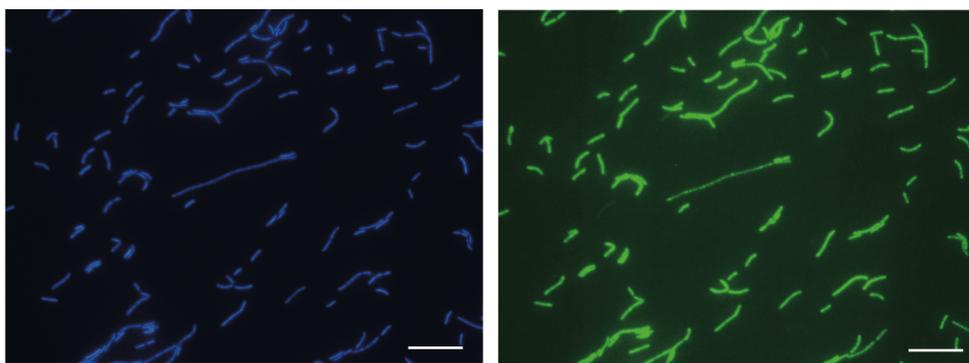


Figure 5-1 FISH analysis of strain MO-YS cells cultivated on 10 mM crotonate and 0.05% yeast extract. DAPI-stained total cells (A) and strain MO-YS specific probe hybridized cells (B; Alexa Fluor 488) show identical field. Bars represent 10 μ m.



Figure 5-2 Photomicrograph of strain MO-YS cells. Bar represents 10 μ m.

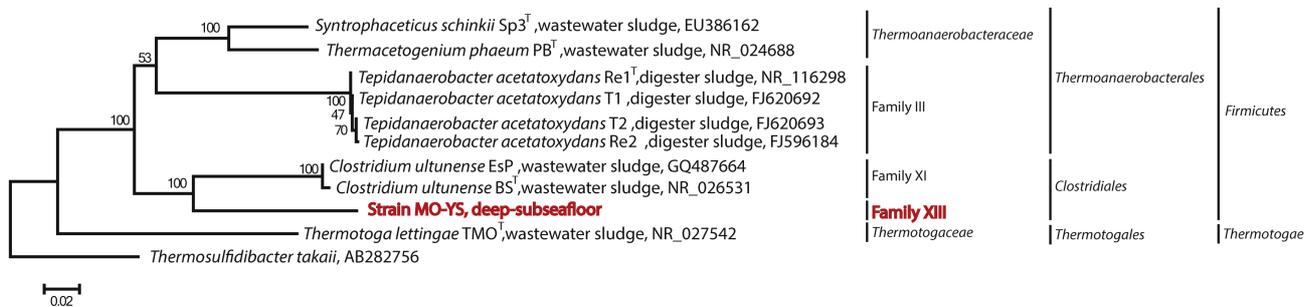


Figure 5-3 Neighbor-joining 16S rRNA gene phylogenetic tree showing the phylogenetic position of strain MO-YS and related syntrophic acetate-oxidizing bacteria. Scale bar indicates 2% sequence divergence. The numbers at the branch nodes show the bootstrap values obtained after 1,000 replicates.

4. 小括

本章では、第4章で得られた酪酸および酢酸集積培養系から、嫌気酪酸酸化共生細菌 *Syntrophomonas* sp. と嫌気酢酸酸化共生細菌の可能性のあるバクテリアの純粋分離を試みた結果について報告した。*Syntrophomonas* sp. の純粋分離には、クロトン酸を基質としたロールチューブ法を行ったが、混在菌のコロニーが優占したために、*Syntrophomonas* sp.のコロニーを得ることができず、現時点では純粋分離には至っていない。一方、酢酸集積培養系からの推定嫌気酢酸酸化共生細菌は、10 mM クロトン酸と 0.05% yeast extract の基質でメタン生成アーキアに依存せず、単独で生育が可能であることが明らかになった。単独基質への移行後は、90°C で20分間の低温殺菌と希釈培養法の組み合わせた方法により他の混在菌を死滅させ、純粋分離に成功した。ダイレクトシーケンス、無菌試験および推定嫌気酢酸酸化共生細菌に特異的なプローブにて FISH 法により純粋性が確認された。純粋分離したバクテリアを MO-YS 株と命名した。

—参考文献—

- Beatty, P. S. and McInerney, M. J. (1987). Growth of *Syntrophomonas wolfei* in pure culture on crotonate. Arch. Microbiol. 147, 389–393.
- Gerhardt, A., Çinkaya, I., and Linder, D. (2000). Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA. Arch. Microbiol. 174, 189–199.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Fukayo, S., Ohashi, A., and Harada, H. (2007). *Syntrophomonas Palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 2137–2142.
- Hansen, K. H., Ahring, B. K. and Raskin, L. (1999). Quantification of syntrophic fatty acid-oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligo-nucleotide probe hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4767–4774.
- Hardman, J. K., and Thressa, C. (1960). Metabolism of omega-amino acids. IV. gamma Aminobutyrate fermentation by cell-free extracts of *Clostridium aminobutyricum*. J. Biolo. Chem. 238, 2088–2093.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S. and Shoun, H. (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1601–1609
- Matthies, C., Evers, S., Ludwig, W., and Schink, B. (2000). *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1591–1594.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., and Harada, H. (2000). *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic,

fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 771–779.

Stieb, M. and Schink, B. (1985). Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. *Arch. Microbiol.* 140, 387–390.

Westerholm, M., Roos, S., and Schnürer, A. (2010). *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiol. Lett.* 309, 100–104.

第6章

酢酸集積培養系からの分離株の特性解析

第6章 酢酸集積培養系からの分離株の特性解析

第1節 目的及び概要

本章では、第5章で純粹分離に成功した *Clostridiales* 目に属する MO-YS 株の特性解析を2項目に分けて行った。1項目目は、水素資化性メタン生成アーキアとの共生系を再構築することで MO-YS 株が嫌気酢酸酸化能を有しているか確認を行った。また、同時に既知の嫌気酢酸酸化共生菌との基質特異性の違いを比較した。2項目目は、MO-YS 株と近縁な分離株との違いを把握するために MO-YS 株の基質特異性、至適生育条件、GC 含量および脂肪酸組成の観点から詳細な菌学的特性を調べた。

MO-YS 株は SILVA rRNA database SSU r121 の分類によると *Firmicutes* 門; *Clostridia* 綱; *Clostridiales* 目; Family XIII に属していることが示されている。さらに、作成した系統樹からも MO-YS 株は Family XIII に属する可能性が高いと考えられる (Fig. 6-1)。*Clostridia* 綱には、*Clostridiaceae*、*Christensenellaceae*、*Eubacteriaceae*、*Lachnospiraceae*、*Peptostreptococcaceae*、*Ruminococcaceae* 科が属しており、さらに上位分類群が定まっていない Family XI および Family XIII incertae sedis が存在する (Garrity *et al.*, 2005; Rajilić-Stojanović & Vos *et al.*, 2014)。Family XIII incertae sedis は、*Eubacteriaceae* 科から分けられたグループであり、現時点では、*Anaerovorax* 属、*Mogibacterium* 属と *Eubacterium* 属の一部の *Eubacterium* spp. が属している (Rajilić-Stojanović & de Vos *et al.*, 2014)。その中でも MO-YS 株は、16S rRNA 遺伝子の相同性と系統樹の樹形から *Anaerovorax* 属に属する“*Clostridium aminobutyricum*”、*Anaerovorax odorimutans* strain NorPut1^T と最も近縁であることが示唆された (Fig. 6-1)。最も近縁なバクテリアである“*C. aminobutyricum*”との相同性は、92%であり、この数値は菌学的性質の違いによっては新属提案ができる可能性を有している。さらに、*Anaerovorax* 属は系統樹の樹形から Family XIII incertae sedis に属している *Eubacterium* spp. とは異なる属に属することが示され、2000年に提案されたばかりであることに加え (Matthies *et al.*, 2000)、Family XIII incertae sedis の近縁には上位系統分類が定まっていない Family XII incertae sedis があること、それら2つのグループ付近では分離株が極端に少ない。これらのことから、MO-YS 株の系統分類や菌学的性質を調べ他の近縁種と比較することは、学術的に重要な知見に成り得ると考えている。本章では、MO-YS 株の菌学的性質を調べ、その近縁種である *Anaerovorax* 属、*Eubacterium* spp.、Family XII incertae sedis に属するバクテリアとの性質を比較した。

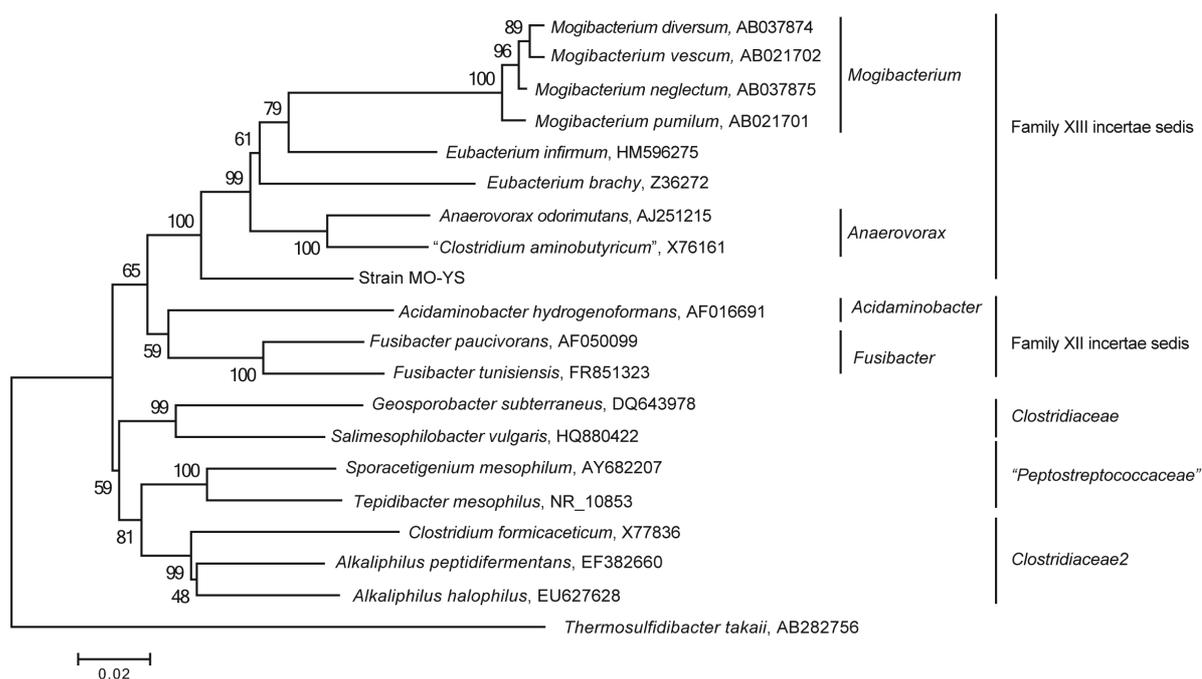


Figure 6-1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on *Clostridiales* family XIII and related bacterial 16S rRNA gene sequences. A 16S rRNA gene sequence of *Thermosulfidibacter takaii* (AB282756) was used as the out-group. The numbers at branch nodes show the bootstrap values obtained after 1,000 replicates. The scale bar indicates 2% sequence divergence.

第2節 実験方法

2-1. 共生系の再構築

2-1-1. 再共生に使用したメタン生成アーキア

共生系再構築には、以下の3種類の水素資化性メタン生成アーキアを用いた。本リアクターから純粋分離された *Methanobacterium* sp. MO-MB1 株 (Imachi *et al.*, 2011) とドイツの菌株保存機関である DSMZ (Braunschweig, Germany) から購入した *Methanoculleus submarinus* strain Nankai-1^T (DSM15122)、*Methanoculleus marisnigri* strain JR1^T (DSM1498) の3株を用いた。MO-MB1 株と同様に *M. submarinus* と *M. marisnigri* も海底から分離されたメタン生成アーキアである (Mikucki *et al.*, 2003; Romesser *et al.*, 1979)。*Methanobacteria* sp. MO-MB1 株の単独培養に使用した培地組成は、第4章に記載した組成に従った。また、*M. submarinus* と *M. marisnigri* の単独培養培地は、DSMZ の提示している推奨培地組成 (Medium 141) を参考にした。推奨培地から、Trypticase peptone を抜き、vitamin solution や trace elements solution は、第4章に記載した組成のものを用いた。基質は、全株とも 100 kPa H₂ を基質として 30°C で培養した。

2-1-2. 培地および培養条件

MO-YS 株と水素資化性メタン生成アーキアの共生系の構築のために使用した培地は、第4章に記載されている方法および組成で調整した。明記しない限り基質には、5 mM 酢酸と生育補助剤として 0.05% yeast extract を添加し、培養は 25°C、暗所で静置培養を行った。共培養系の構築にはそれぞれの菌を単独基質で培養させた後、以下の4種類の 방법으로共生系の構築を試みた。なお、MO-YS 株と *M. submarinus* および MO-YS 株と *M. marisnigri* の組み合わせは、培養方法 (1) の方法のみ行った。MO-YS 株と MO-MB1 株の組み合わせでは、培養方法 (2)、(3)、(4) の方法により再構築を試みた。

培養方法 (1)：容量 15ml の試験管 (Hunget tube) に 9ml の培地を入れ、単独基質で培養した MO-YS 株とメタン生成アーキアの培養液を 0.6 ml ずつ混合させた。培養温度は、25°C もしくは、*M. submarinus* は、至適生育温度が 45°C であることから (Mikuchi *et al.*, 2003)、30°C でも培養を行った。培養方法 (2)：容量 65 ml のバイアル瓶に対して 20 ml の培地を入れ、MO-YS 株とメタン生成アーキアの単独培養液をそれぞれ 4 ml ずつ植菌した。培養方法 (3)：単独基質の持ち込みを無くするため、洗浄した培養液を用いた。MO-YS 株培養液は、嫌気状態において人工海水で洗浄と置換を行い、MO-MB1 培養液は、気相部と液相部を N_2/CO_2 (80/20, vol/vol) ガスで置換させた。その後、容量 120 ml のバイアル瓶中の 20 ml の培地に対して洗浄の際に濃縮した MO-YS 株培養液 1 ml と MO-MB1 株の培養液 15 ml を混合した。なお、後の放射線同位体分析にはこの培養系を2回継代したものを用いた。培養方法 (4) 活性炭を電子伝達物質として培養系に混合させた。65 ml 容量のバイアル瓶に 0.75、2.25、あるいは、4.5 g の Granular activated carbon 8-20 mesh (Sigma-Aldrich, St Louin, MO, USA) を入れ、20 ml の培地を入れた後 N_2/CO_2 (80/20, vol/vol) パージを行い、オートクレーブを行った。その後、還元剤として $Na_2S \cdot 9H_2O$ (0.015%) と L-システイン塩酸塩九水和物 (0.015%) を孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過させて培地に添加した。植種源には、上記の培養方法 (2) の共培養系を1回継代したものを 4 ml、単独基質で培養した MO-YS 株培養液を 3 ml、単独基質で培養した MO-MB1 株培養液を 3 ml 混合させた。MO-MB1 株培養液は混合させる前に、 N_2/CO_2 (80/20, vol/vol) で気相部の置換を行った。なお、活性炭を混合させたことによる酢酸酸化およびメタン生成反応の促進効果を判断するためのスタンダードには、活性炭を混合させなかった系を設定した。ネガティブコントロールには、菌体を混合せずに活性炭のみの系と活性炭が混合された培地に MO-MB1 株培養液を 3 ml 添加したものを使った。

2-1-3. 化学分析

共生系の構築の確認には、以下の2点もしくは3点の項目から検証を行った。(1) 定期的にガスクロマトグラフィー (gas chromatography: GC) によるメタンガス生成の確認を行った。ガスクロマトグラフは GC-3200 (ジーエルサイエンス株式会社、検出器:TCD) を使用した。(2) 培養前と培養後に酢酸の濃度変化を高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) により測定した。HPLC は、Shimadzu (検出器:UV、カラム:Rezex RHM-Monosaccharide H+(8%)) を用いた。(3) 放射線同位体分析による酢酸酸化の確認を行った。その手順は、基質の添加と植菌後に、終濃度 0.5 MBq/vial の sodium acetate [$2\text{-}^{14}\text{C}$] (American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, USA) を添加し、 25°C 、暗所で培養した。培養終了後のガス分析の手順は、Handbook of Hydrocarbon and lipid microbiology の第3章の一部に改良を加えた次の方法で行った。終濃度 0.8 N の硝酸を培養系に添加することで培養液中の CO_2 をガス化させた後、ラジオ GC アナライザー-Model RAGA Star (Raytest, Straubenhardt) を接続した GC (GC-2014, Shimadzu, Shincarbon、TCD-RID) で $^{14}\text{C}\text{-CH}_4$ および $^{14}\text{C}\text{-CO}_2$ の測定を行った。

2-2. 菌学的特性の検討

2-2-1. 至適生育温度、NaCl 濃度、pH の検討

10 mM クロトン酸と 0.05% yeast extract を基質として至適生育温度、NaCl と pH の検討を行った。これらは、容量 15 ml の試験管にて 9 ml の培地に対して 0.3 ml ずつ植菌した系で行い、triplicate の培養系で実験を行った。至適生育温度検討は、NaCl 濃度が 25 g/L の培地で 4、10、15、20、25、30、37、40 と 45°C の条件で検討実験を行った。至適 NaCl 濃度検討は、 25°C で 0、5、10、15、25、35、45、50、55、65、75 g/L で行った。至適 pH の検討は、NaCl 濃度 25 g/L、 25°C で pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 で検討実験を行った。至適 pH の検討に用いた培地は、以下の手順で作成した。まず、通常の培地組成から $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と NaHCO_3 を抜いた培地成分を混合した。その後、pH 5.0、6.0、7.0、8.0 に調整し、 N_2 ガスでパージした後オートクレーブをかけた。予め個別に調整し、オートクレーブ済みの $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と NaHCO_3 を培地に添加した。基質を添加した後、NaOH もしくは HCl で pH を調整し、 N_2 パージ後、オートクレーブをかけた空の 15ml 容の試験管に 9 ml ずつ培地を分注したものを用いた。菌の生育具合は、 OD_{400} により求めた。

2-2-2. 脂肪酸組成と GC 含量の検討

脂肪酸組成の測定には、湿菌体重量 120 mg (培養液 1500 ml)を用いた。GC (%)含量の測定には、湿菌体重量 45 mg (培養液 400 ml) を用いた。大量の菌体を必要とするため、10 mM クロトン酸と 0.05% yeast extract を基質にして大量培養を行った。大量培養には、400 mL 培地を 1L メディウム瓶中で作成し、40 分間 N_2/CO_2 パージを行い溶存酸素の除去を行った。ブチル栓で密閉後オートクレーブにより滅菌を行った。その後は、100 g/L の濃度に調整した $Na_2S \cdot 9H_2O$ と L-システイン塩酸塩九水和物を孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過させて 400 ml の培地に対して 0.6 ml 添加した。培地が還元された後、1M クロトン酸 (pH7.5) を 4 ml、20% yeast extract を 1 ml 添加した。植種は、10 mM クロトン酸と 0.05% yeast extract で培養した MO-YS 株培養液を 10 ml 植菌した。その後、25°C で対数増殖中盤 (脂肪酸用)、もしくは定常期 (GC 含量測定用) まで培養した。その後、菌体を回収し、-20°C で凍結保存した。

脂肪酸の抽出には、Minnikin et al. (1984)の方法で調整した凍結乾燥細胞 (湿菌体重量:120 mg, 乾燥菌体:19 mg)を用いた。脂肪酸抽出は、Sherlock Microbial Identification System (MIDI, 1999) 法に準拠した。極性脂肪酸は two-dimensional thin layer chromatography (TLC)によって分離した (Minnikin et al., 1984; Komagata & Suzuki, 1988)。脂肪酸組成の測定は、Miyazaki et al. (2014) に準拠した。

ゲノム DNA の GC 含量の測定には HPLC 法を用いた。最初に、-20°C のフリーザーで凍結した菌体 (湿菌体重量:45 mg) からゲノム抽出を行った。ゲノム DNA の抽出方法および精製方法はフェノール・クロロホルム抽出法で行い、Saito & Miura (1963)に準拠した。最終的に 500 $\mu g/ml$ の DNA 溶液を 10 μl を解析に用いた。GC 含量の測定は HPLC (Nacalai tesque、COSMOSIL 5C18-PAQ Packed Column) により検出し、Tamaoka & Komagata (1984) の方法に準拠した。

2-2-3. 基質特異性の検討

MO-YS 株の近縁種と嫌気酢酸酸化共生細菌が利用可能な基質を参考に検討基質の選定を行った。塩濃度 25 g/L、pH7.5、Hungate tube にて 25 °C で検討試験を行った。植種には 10 mM クロトン酸と 0.05% yeast extract を基質として培養した培養液を使い、各試験管に 0.3 ml ずつ植菌した。各基質に加え、生育補助剤として 0.05% yeast extract を添加したためコントロールは、0.05% yeast extract のみの系を設定した。生育程度は、 OD_{400} の数値で経時的に増殖を確認した。検討した基質は、acetate (20 mM)、formate (20 mM)、 H_2/CO_2 + acetate (100 kPa, 1mM)、methanol (10 mM)、ethanol

(10 mM)、ethylene glycol (10 mM)、lactate (10 mM)、pyruvate (10 mM)、betaine (10 mM)、glycerol (10 mM)、putrescine (20 mM)、4-aminobutyrate (10 mM)、yeast extract (0.05%, 0.5%)、tryptone (0.1%)、peptone (0.5%)、1-propanol (10 mM)、2-propanol (10 mM)、1-butanol (10 mM)、1,2-propanediol (10 mM)、1,4-butanediol (10 mM)、2,3-butanediol (10 mM)、ethanolamine (10 mM)、trimethylamine (10 mM)、dimethylamine (10 mM)、methylamine (10 mM)、ethylamine (10 mM)、syringate (5 mM)、 β -alanine (10 mM)、vanillate (5 mM)、glucose (20 mM)、fructose (10 mM)、galactose (10 mM)、mannose (10 mM)、rhamnose (10 mM)、xylose (10 mM)、ribose (10 mM)、sucrose (10 mM)、maltose (10 mM)、lactose (10 mM)、cellobiose (10 mM)、trehalose (10 mM)、raffinose (10 mM)、cellulose (10 mM)、20種類のL型アミノ酸(各2 mM)である。また、酢酸もしくはグルコースを基質にして thiosulfate (10 mM)、sulfur (10 mM)、sulfate (10 mM)、sulfite (3 mM)、nitrate (5 mM)、iron(III)-nitrilotriacetate (5 mM)、fumarate (10 mM)が電子受容体として利用可能であるか検討を行った。なお、iron(III)-nitrilotriacetate (5 mM)を電子受容体としての利用に対する結論は、本論文に間に合わせる事ができなかった。

第3節 実験結果および考察

3-1. 嫌気酢酸酸化反応の証明

3-1-1. 異なるメタン生成アーキアとの共生系構築の検討

分離した株の酢酸酸化能の有無を確認する方法として、分離したバクテリアと水素資化性メタン生成アーキアとの共生系を人工的に再構築し、酢酸とメタン濃度の変動を観察する方法が広く行われている (e.g., Hattori *et al.*, 2000; Westerholm *et al.*, 2010)。本研究でもその方法を用いて検討実験を行った。酢酸の集積培養系を得た時に MO-YS 株と共に培養されてきた水素化性メタン生成アーキア *Methanoculleus* sp. と *Methanobacterium* sp. MO-MB1 株を共生パートナーとして用いた。なお、共生細菌から生成される副産物や電子伝達経路の違いにより、パートナーとなるメタン生成アーキアによっても酸化反応の促進が異なることが報告されており、特に、ギ酸資化能力を有していない *M.*

Table 6-1 Methane production in acetate-fed co-cultures.

Condition	Temperature (°C)	Species of methanogen	Amount of inoculation (ml)			Incubation time (month)	Maximum methane production (μ M)
			Methanogenic archaea	Strain MO-YS	Medium volume / vial volume (ml)		
(1)	25	<i>M. submarinus</i>	0.6	0.6	9 ml / 15 ml	6	481
(1)	30	<i>M. submarinus</i>	0.6	0.6	9 ml / 15 ml	6	517
(1)	25	<i>M. marisnigri</i>	0.6	0.6	9 ml / 15 ml	6	325
(2)	25	<i>Methanobacterium</i> sp. MO-MB1	4.0	4.0	20 ml / 65 ml	6	909
(3)	25	<i>Methanobacterium</i> sp. MO-MB1	15	1.0 (washed cell)	20 ml / 120 ml	6	362

thermautotrophicus ΔH との共生系では酸化速度が非常に遅くなったとの報告もあることから (Hattori *et al.*, 2001)、水素とギ酸の両方の資化能力を有している *M. marisnigri* と *M. submarinus* (Dianou *et al.*, 2001; Mikucki *et al.*, 2003) を共生パートナーとして使用した。

実験方法の項目 2-1-2 の培養方法 (1)、(2)、(3) (Table 6-1)での記載の通り、単独培養させた *M. marisnigri*、*M. submarinus* もしくは *Methanobacterium* sp. MO-MB1 と MO-YS 株の培養液をそれぞれ当量ずつ混合させて、5 mM 酢酸と 0.05% yeast extract を基質として培養した。培養期間はメタンガスの生成が完全に停止するまでの約 6 ヶ月間培養を行ったが、全ての培養条件において 300 から 900 μM 程度のメタンガスしか生成されなかった (Table 6-1)。嫌氣的酢酸酸化の理論式では、1 分子の酢酸から 1 分子のメタンが生成されるため、添加した 5 mM の酢酸のうち、1 mM から 300 μM 程度の酢酸しか消費されていない計算になる。生成されたメタンガス量は、メタン生成アーキアの種類による顕著な違いは見られなかった。酢酸はこれらの共生系にて酸化されているのか、生成されたメタンは酢酸酸化反応によるものなのかを確かめるために、培養液中の酢酸濃度の変動を確かめることにした。用いた培養系は、培養方法 (3) の記載の通り、単独基質で培養した後に培養液の洗浄を行った MO-YS 株と *Methanobacterium* sp. MO-MB1 との培養液を混合させ、酢酸と yeast extract 内で培養後、2 回継代したものを用いた。培養前と培養後の培養液中の酢酸濃度を測定したが、酢酸が減少するどころか、逆に 624 μM の酢酸が増加していた。この増量分は yeast extract が発酵した時に得られた代謝産物分であると考えられる。なぜならば、HPLC 解析の結果、yeast extract 中に含まれている特定の物質が大きく消費されていたためである。結果的に、培養後に酢酸濃度が増加したことから、培養液中の酢酸濃度の変化からは、酢酸酸化反応の有無を明らかにすることができなかった。加えて、yeast extract 中の何らかの物質が利用されていた形跡があったことから、少なくとも生成されたメタンの一部分は yeast extract に含まれる成分が分解されて生成した水素に由来する可能性が示唆された。

3-1-2. 放射線同位体分析による嫌気酢酸酸化の検討

先に述べたように培養液中の酢酸濃度の変動では酢酸酸化反応の有無を明らかにすることができなかった。したがって、次に ^{14}C をラベルした酢酸で酢酸の酸化量の推定と生成されたメタンが酢酸酸化反応由来のものであるかを確認した。酢酸の ^{14}C をラベルは、 $2\text{-}^{14}\text{C}$ を用いた。これは、メチル基の C にラベルされた酢酸 ($^*\text{CH}_3\text{COO}^-$) であり、酢酸が酸化されると、 H^*CO_3 が生成され、二酸化炭素の C がラベル化された状態になる (Table 6-3)。そのラベル化された CO_2 ガスがメタン生成アーキア

Table 6-2 Microbial metabolisms involved in methanogenesis. Adapted from Hattori (2008).

Process	Reaction	ΔG^0 (kJ/mol)
(1) Aceticlastic methanogenesis	$^*\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow ^*\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
(2) Syntrophic acetate oxidation	$^*\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^* + \text{CO}_3^{2-} + 4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	+104.6
(3) H_2 -consuming methanogenesis	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6
(4) sum (2)+(3)	$^*\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^* + \text{CO}_3^{2-} + \text{CH}_4$	-31.0
(5) H_2 -consuming acetogenesis	$4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-104.6

Asterisks (*) represent the fate of the methyl group carbon of acetate. It was assumed that 100% of the labeled carbon was converted to CH_4 (reaction 1) or HCO_3^- (reaction 4). The standard Gibbs free energy change (ΔG^0) values were calculated from reference 75.

によって還元されるとラベル化されたメタンが生成される。ラベル実験の結果、培養開始 14 日目にラベル化された CO_2 が少なくとも 2688 Bq 検出された (Table 6-3)。培養 28 日目では、ラベル化された CO_2 が減少した一方で、ラベル化された CH_4 が増加していることから、酢酸が酸化分解されていること、酸化分解によって生成された CO_2 が還元され、メタンの生成に利用されたことが示された。培養開始前の酢酸の ^{14}C 放射エネルギーは 547796 Bq であり、最終的に検出された放射エネルギーはメタンとして 55 Bq、 CO_2 として 2305 Bq の計 2360 Bq 検出されたことから、約 0.4% の酢酸が酸化されたことが結果として示された。この結果は、MO-YS 株が酢酸酸化ポテンシャルを有する可能性を示すものではあるが、酢酸の完全酸化までには至っていない。過去の文献にも、酢酸酸化共生細菌であるにも関わらず純粋分離した後に再度メタン生成アーキアとの共生系の構築を試みたところ、酢酸酸化反応が起きなくなった例も報告されている (Westerholm *et al.*, 2010)。この明確な理由は明らかにはなっていないが、MO-YS 株の混在菌でもあった *Sedimentibacter* sp. は、アミノ酸代謝に関与する遺伝子を豊富に有していることが示されており、*Dehalobacter* sp. と *Sedimentibacter* sp. の共培養系には、*Sedimentibacter* sp. の生成するアミノ酸が必須であることも報告されている (Maphosa *et al.*, 2012)。MO-YS 株の場合においても、混在菌を排除したことによりアミノ酸を含む共生系の構築に必要な物質が混在菌により生成されなくなったことから、共生系が構築できなくなったことも十分に考えられた。

Table 6-3 Amount of radiation of ^{14}C -labeled CH_4 and CO_2 in the co-culture of strain *Methanobacterium* sp. strain MO-MB1 and strain MO-YS.

day	Amount of radiation (Bq)	
	CH_4	CO_2
0	0	818
14	0	3506
28	55	3123

3-1-3. 活性炭に依存した酢酸酸化反応の促進検討

共生反応には、種間電子伝達が非常に重要な位置づけにある。種間電子伝達の方法として、水素とギ酸を電子キャリアとして利用する方法の他に活性炭や導電性鉱物等の電子伝達性を有する固体を利用する方法が考えられている。本実験では活性炭を培養系に混合させることで、MO-YS株とメタン生成アーキアの強固な共生系の構築、酢酸酸化とメタン生成反応を促進させることを試みた。活性炭は、高い電子伝達性があると言われており (Kastening *et al.*, 1997)、メタン生成リアクターから得たグラニューク汚泥を活性炭と共にバッチ培養を行ったところ、活性炭無添加の場合と比較してメタンの生成効率が上昇したとの報告がある (Liu *et al.*, 2012)。この報告を参考に実験系を構築した。Liu *et al.* (2012) の報告では、活性炭の量によってメタンの生成効率が異なっていたためにバイアル瓶1本あたり活性炭0.75 g、2.25 gと4.5 gの量で実験を行った。なお、活性炭を混合させていないものをスタンダードにした。培養は、メタン生成効率の傾向を捉えるまでの2ヶ月間行い、1週間ごとに生成されるメタンと水素の濃度の測定を行った。結果は、活性炭無しの系と比較したところ、顕著な違いが見られず、メタン生成の促進は本実験系において確認されなかった。Liu *et al.* (2012) の報告では、鉄還元細菌 *Geobacter metallireducens* と *Geobacter sulfurreducens* の共培養系と *G. metallireducens* と *Methanosarcina bakeri* の共培養系では、微生物細胞が活性炭に強く結合している様子が観察されている一方で、鞭毛や微生物間同士が接触することによる電子の授受は観察されなかったことが述べられている。細胞が活性炭に結合するメカニズム自体は明確になっていない。これらのことを踏まえると MO-YS 株が活性炭を介した電子授受を行うことが出来なかった要因として、上述の様な微生物細胞が活性炭に結合するシステムを有していない可能性が考えられた。その一方で、Hematite、Magnetite、Ferrihydrite と Ferric citrate などの導電性鉱物の利用した種間電子伝達 (Kato *et al.*, 2011) も知られているので、今後はこれらの物質を電子キャリアとして酸化反応を促進できるか検討したいと考えている。加えて、アミノ酸を添加した培養系も構築してみたいと考えている。

また、今回の共生系の実験は大気圧条件下で培養を行ったが、圧力をかけて培養することで常圧の時と比較して菌学的特性が異なることも報告されている (Takai *et al.*, 2008)。したがって、高圧条件下など深海堆積物環境に近い条件で培養を行うことで異なる挙動を示す可能性も考えられる。また、培養に依存する手法の他にも共生系を構築する上で必要だと推測されている遺伝子 (Wrom *et al.*, 2014; Nobu *et al.*, 2014) が MO-YS 株のゲノム上に存在するかを確認することも一つの方法であると考えており、現在ゲノム解析の準備をしている段階である。

3-2. 菌学的特性の検討

3-2-1. 至適生育温度、NaCl 濃度、pH、基質特異性試験の検討

塩濃度試験では、0, 5, 55 g/L では増殖がみられなかった。一方で 10, 15, 25, 35, 45, 50 g/L では増殖が確認できた。その中でも、25 g/L と 35 g/L での生育が最も良く、至適生育塩濃度は 25 g/L から 35 g/L の範囲にあると判断した。温度試験の結果は、3 ヶ月間培養したところ、4, 37, 40, 45°C では生育が見られなかった。一方で、10, 15, 20, 25, 30°C では増殖が確認できた。10°C の培養系を顕微鏡で確認したところ、細胞が長く変形していたため、細胞分裂を起こしにくい温度であることが明らかになった。また、至適生育温度は 25°C であることが示された。至適 pH 試験の結果は、pH 5.5-pH 8.5 の範囲で増殖が確認された。至適 pH は 6.5–7.0 であることが明らかになった。これらを総合するとクロトン酸と 0.05% yeast extract での MO-YS 株の生育条件は、塩濃度 10–50 g/L (至適: 25–35 g/L)、温度 10°C–30°C (至適: 25°C)、pH 5.5-8.5 (至適: pH 6.5–7.0) であることが明らかになった。MO-YS 株は 37°C 以上の温度では生育することができなかったが、他の近縁種は、40°C 以上でも生育できることが報告されている (Table 6-4)。

基質利用性試験を行ったところ、Formate, pyruvic acid, 4-aminobutyrate, yeast extract, triptone, peptone, glucose, fructose, mannose, xylose, ribose, sucrose, casamino acid, crotonic acid, carboxymethyl cellulose の 14 種類の基質が利用できることが示された。糖類は、単糖を中心に利用することができ、二糖である sucrose も利用可能であった。糖類を利用できた結果は、糖類を資化することの出来ない *A. odorimutans*, *Eubacterium* spp., *Mogibacterium* spp. と生理学的特徴が異なることを支持するものであった。なお、“*C. aminobutyricum*”は複数の糖類を利用できることが報告されているが (Hardman *et al.*, 1959)、その中でもグルコースとキシロースを利用できる点が MO-YS 株と一致した部分であった。その一方で、4-aminobutyrate を基質として利用できたことは、“*C. aminobutyricum*” や *A. odorimutans* とは共通の特性であることが示された。これらの結果から、16S rRNA 遺伝子の相同性、系統樹による情報に加え基質特異性の結果から、MO-YS 株は *Eubacterium* spp., *Mogibacterium* spp. よりも“*C. aminobutyricum*” や *A. odorimutans* に対して菌学的特性が類似していることが示された。また、Family XII の *Acidaminobacter hydrogeniformans* は多様なアミノ酸を利用できることに対し、MO-YS 株はアミノ酸を一切利用することが出来なかった。*Fusibacter* 属とは、生育可能温度は異なるものの、塩耐性を有していること、利用可能な糖が類似している蛍光があったが、系統樹の樹形から異なる属に属することが考えられた (Table 6-4, 6-5)。

今後は、MO-YSが利用出来た基質の中で“*C. aminobutyricum*”や*A. odorimutans*では基質利用性が確かめられていない基質を用いて追加試験を行うことより、詳細な生理学的特性の違いを評価する必要があると考えている。

なお、過去に報告された“*C. aminobutyricum*”の代謝経路によると、4-aminobutyrateからはクロトン酸と酪酸を生成する経路が存在することが明らかになっている (Gerhard *et al.*, 2000)。本研究で用いた堆積物からは、嫌気酪酸酸化共生菌の集積培養系も得られていることから、酪酸に関与する物質循環が本堆積物で生じている物質循環の一つである可能性が示された。

また、嫌気酢酸酸化共生菌の中にはチオ硫酸や硫酸塩を電子受容体として利用することで、メタン生成アーキアと共生関係を構築しなくても酢酸を酸化できる酢酸酸化共生菌も中には存在することが報告されている (Hattori *et al.*, 2000; Balk *et al.*, 2002)。したがって、MO-YS株においても利用可能な電子受容体の確認を行ったところ、MO-YS株は試した全ての物質を電子受容体として利用することができなかった (Table 6-5)。また、ホモ酢酸生成能を有するPB^T株のようにH₂/CO₂を利用することはできなかった。なお、Fe (III)については電子受容体としての利用性をまだ確認できていない。

3-2-2. GC含量と脂肪酸組成の検討

MO-YS株のGC含量は、34.7 mol%であることが明らかになった。また、主要な脂肪酸はC_{16:0}、C_{14:0}とC_{18:0}であり、それぞれ13.3、11.6、9.3%であることが示された。近縁種である*A. odorimutans*のGC含量は29.6 mol%であることが報告されている (Matthies *et al.*, 2000)。一方で、“*C. aminobutyricum*”および*A. odorimutans*の脂肪酸組成についてはこれまでに報告されていない。したがって、MO-YS株との明確な違いを確認するためには“*C. aminobutyricum*”および*A. odorimutans*の脂肪酸組成やGC含量も追加で解析し、比較検討する必要がある。

Table 6-4 Physiological characteristic of strain MO-YS and phylogenetically related isolates within Family XIII and Family XII incertae sedis "*Clostridium aminobutyricum*" (Gehardt et al., 2000), *Anaerovorax odorinatians* (Mathies et al., 1989; Mathies et al., 2000), *Fusibacter paucivorus* (Ravot et al., 1999), *Mogibacterium vesicum* (Nakazawa et al., 2000), *Mogibacterium neglectum* (Nakazawa et al., 2002) *Mogibacterium pumilum* (Nakazawa et al., 2000), *Acidaminobacter hydrogeniformans* (Stams & Hanssen, 1984) *Eubacterium brachy*, *timidum* (Holdeman et al., 1980), *Eubacterium saphemum* (Uematsu et al., 1993)

Characteristics	strain MO-YS (<i>Clostridiales</i>)	" <i>Clostridium</i> <i>aminobutyricum</i> " <i>bacteria</i>	<i>Anaerovorax</i> <i>odorinatians</i> strain Non-Pat 1 [†]	<i>Eubacterium</i> <i>brachy</i> strain ATCC 33089 [†]	<i>Eubacterium</i> <i>saphanum</i> ATCC 69989 [†]	<i>Mogibacterium</i> <i>timidum</i> ATCC 33093 [†]	<i>Mogibacterium</i> <i>vesicum</i> strain DS-2 [†]	<i>Mogibacterium</i> <i>pumilum</i> strain DS-18 [†]	<i>Mogibacterium</i> <i>diversum</i> strain HM-7 [†]	<i>Mogibacterium</i> <i>neglectum</i> strain P9a-4 [†]	<i>Acidaminobacter</i> <i>hydrogeniformans</i> strain gln 65 [†]	<i>Fusibacter</i> <i>paucivorus</i> strain SEBR 4211 [†]	<i>Fusibacter</i> <i>tunisensis</i> strain BELH1 [†]
	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>	<i>strictly anaerobic</i> <i>bacteria</i>
Cell morphology	shaped rod		asaccharolytic	asaccharolytic	asaccharolytic	asaccharolytic	asaccharolytic	asaccharolytic	asaccharolytic	asaccharolytic	rod	spindle-shaped rod	shaped rod
Cell size (µm)		0.4-0.8 x 1.2-1.7	0.7-0.8 x 1.9-2.7	0.4-0.8 x 1-3	0.5 x 1.0-1.2	0.8-1.6 x 1.6-3.1	0.2-0.3 x 1.0-1.5	0.2-0.3 x 1.0	0.2-0.3 x 1.0	0.2-0.3 x 1.5	0.5-0.6 x 1.5-3.7	1 x 2-5	0.5 x 2-5
Spore formation		+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Gram reaction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Motility		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Optimum temp. (°C)		25 (10-30)	37 (12-50)	37 (30-45)		37-45					30 (15-42)	37 (20-45)	37 (15-40)
Optimum pH		6.5-7.0 (5.5-8.5)	7.2-7.6 (6.1-8.0)								< 6.7	7.3 (5.7-8.0)	7 (5.8-8.4)
Optimum NaCl (g/l)		34.7	≤ 20	46	44-48		46				48.1	43	38.2
G+C content (mol %)												yeast extract	yeast extract
Supplement required		yeast extract											
Substrate utilization:													
In pure culture		+	-										
Yeast extract		-	-										
H ₂ /CO ₂		-	-										
butyrate		-	-										-
D-cellobiose		+	-										+
glucose		+	-										+
fructose		+	-										+
D-mannitol		+	-										+
D-ribose		+	-										+
Peptone		+	-										+
putrescine		-	+										-
4-aminobutyrate (γ-aminobutyric acid)		+	+										-
4-hydroxybutyrate (GHB)		-	+										-
aminobutyrate (2-aminobutyrate)		-	-										-
2,4-diaminobutyrate		-	-										-
Δ-aminovalerate		-	-										-
ornithine		-	-										-
β-aminobutyrate (3-aminobutyric acid)		+	-										-
crotonic acid		-	-										-
arabinose		-	-										-
dulcitol		+	+										-
galactose		-	+										-
lactose		-	+										-
maltose		-	+										-
inul-extract		+	-										+
mannose		-	-										-
melibiose		-	-										-
raffinose		-	-										-
rhamnose		-	-										-
sorbitol		+	+										-
sucrose		+	+										-
trehalose		-	-										+
xylose		+	-										-
cellulose		-	-										-
starch		+	+										-
formate		+	-										-
acetate		-	-										-

*. more rapid fermentation with methanogens

Continued

Characteristics	Strain MO-YS (Clostridiales)	"Clostridium aminobutyricum"	Aerovorax admiratus strain "NoPa1"	Eubacterium brachy strain ATCC 35889	Eubacterium sophianum ATCC 49889	Mogibacterium timidum ATCC 35093 ⁵	Mogibacterium vescum strain DS-2 ⁶	Mogibacterium pumilum strain D2-18 ⁷	Mogibacterium diversum strain BM-7 ⁸	Mogibacterium neglectum strain PY6-1 ⁹	Acidimicrobacter hydrogeniforma ns strain gta 65 ¹⁰	Fusibacter paucivorus strain SEBR 4211 ¹¹	Fusibacter tumbensis strain BELH1 ¹²
butyrate			-										
lactate	-												
propionate													
methanol	-												
ethanol	-												
bio-Tyrosinase													
caseinase	+												
gelatin													
adonitol		-											
amygdalin													
erythritol													
arabitol													
ascellin													
glycerol													
inositol													
methylase													
starch													
1,3-bisphosphoglycerate													
1,3-bisphosphoglycerate													
cellulose													
gelatine	-												
ethylene glycol	-												
ethylamine	-												
ethylencamine	-												
ethylenediamine	-												
ethanolamine	-												
methylamine	-												
dimethyl amine	-												
trimethylamine	-												
betaine	-												
choline	-												
amine	-												
glycine	-												
glucosamine	-												
malate	-												
fumarate	-												
succinate	-												
oxalate	-												
malonate	-												
glycerol	-												
1,4-butanediol	-	+											
tryptone	+												
liver extract	-												
glutamate	-												
pyruvic acid	+												
histidine													
acetoglutamate													
serine													
system													
arginine													
threonine													
lysine													
alanine													
valine													
leucine													
isoleucine													
dextrin													
dulcitol	-												
inulin	-												
pectin	-												
1-propanol	-												
2-propanol	-												
1-butanol	-												
1,2-propanediol	-												
2,3-butanediol	-												
xyngulate	-												
vanillate	-												
Electron donor	acetate, glucose, fumarate		glucose									glucose	glucose
Electron acceptor	inosulfate		-									glucose	glucose
	sulfur		-									+	+
	sulfite		-									+	+
	sulfate		-									+	+
	nitrate		-									+	+
FC (1B)			-									+	+

4. 小括

酢酸を唯一のエネルギー源とした集積培養系から純粋分離した MO-YS 株が酢酸酸化能を有するか確かめるために、はじめに、水素資化性メタン生成アーキアとの共生系の再構築を行った。次に酢酸酸化能の有無の確認を行うために ^{14}C ラベルを付加した酢酸を用いて代謝を追ったところ、酢酸酸化能を有していることは示されたが、酢酸の完全分解は確認出来なかった。そこで、電子伝達物質として活性炭を培養系に入れ、酢酸酸化とメタン生成の促進を試みたが、顕著な促進は観察されなかった。今後の課題としては、導電性鉱物が電子伝達物質として利用できる可能性があることから、それらや補助生育剤として必要な可能性が考えられるアミノ酸を混合させた培養系を構築すること、高圧条件など、自然環境に近い条件で培養を行っていく予定である。また、培養に依存した方法の他に、同時にゲノム解析情報からも共生系による酢酸酸化のポテンシャルの可能性について解析していく予定である。

至適生育温度、pH、塩濃度、ゲノム DNA の GC 含量、脂肪酸組成と基質特異性の観点から、近縁種との菌学的性質の違いを調べた。その結果、*Eubacterium* spp.、*Mogibacterium* spp.とは性質が大きく異なることが明らかになった。“*C. aminobutyricum*” と *A. odorimutans* に対しては、4-aminobutyrate を基質として利用できている部分は共通していた。しかし、*A. odorimutans* が糖類を利用できないことに対して、MO-YS 株は単糖を中心に複数の糖類を利用することができた。現時点では、MO-YS 株と周辺の変異株の性質がどの程度類似しているか明確にしきれておらず、現時点では同属に属するかまでは判断ができていない。今後、“*C. aminobutyricum*” や *A. odorimutans* では調べられておらず、MO-YS 株で利用できた基質の利用性や脂肪酸組成を調査することで、MO-YS 株の新属あるいは、新種提案の判断ができると考えている。

最後に、これは本題では無いが本実験で用いた堆積物からは、クロトン酸や酪酸の代謝に関わる微生物である MO-YS 株や *S. bryantii* の集積培養系が得られてきたことから、酪酸が関与するメタン生成反応が海底堆積物中で生じている可能性を示す 1 つの証拠となった。

—参考文献—

- Chen, S., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Liu, F., Fan, W., Nevin, K. P., *et al.* (2014). Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Sci. Rep.* 21, 5019.
- Dianou, D., Miyaki, T., Asakawa, S., Morii, H., Nagaoka, K., Oyaizu, H., Matsumoto, S. (2001). *Methanoculleus chikugoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1663–1669.
- Garrity, G.M., J.A. Bell and T. Lilburn. (2005). The Revised Road Map to the Manual. In Brenner, Krieg, Staley and Garrity (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays*. Springer, New York, pp. 159–220.
- Gerhardt, A., Çinkaya, I., and Linder, D., Huisman, G., Buckel, W. (2000). Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA, *Arch. Microbiol.* 174, 189–199.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S. and Shoun, H. (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 4, 1601–1609
- Hattori, S., Luo, H., Shoun, H., and Kamagata, Y. (2001). Involvement of formate as an interspecies electron carrier in a syntrophic acetate-oxidizing anaerobic microorganism in coculture with Methanogens. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 294–298.
- Hattori, S. (2008). Minireview: Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments, *Microbes. Environ.* 23, 118–127.
- Holdeman, L. V., Cato, E. P., Burmeister, J. A. and Moore, W. E. C. (1980). Descriptions of *Eubacterium timidum* sp. nov., *Eubacterium brachysp.* nov., and *Eubacterium nodatum* sp. nov. isolated from human periodontitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 163–169.
- Kastening, B., Hahn, M., Rabanus, B., Heins, M., and zum Felde, U. (1997). Electronic properties and double layer of activated carbon. *Electrochim. Acta.* 42, 2789–2799.
- Kato, S., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2011). Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 14, 1646–1654.
- Kato, S., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2012). Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10042–10046.
- Komagata, K. and Suzuki, K. (1988). Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol.* 19, 161–207.
- Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2012). Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ. Sci.* 5, 8982–8989.
- Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2015). Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange. *Environ. Microbiol.* 17, 648–655.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H and Whitman, W. B. Revised road map to the phylum Firmicutes.

- (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn., 1–13.
- Maphosa F., van Passel M. W., de Vos W. M. and Smidt, H. (2012). Metagenome analysis reveals yet unexplored reductive dechlorinating potential of *Dehalobacter* sp. E1 growing in co-culture with *Sedimentibacter* sp. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 604–616.
- Matthies, C., Mayer, F., and Schink, B. (1989). Fermentative degradation of putrescine by new strictly anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 151, 498–505.
- Matthies, C., Evers, S., Ludwig, W., and Schink, B. (2000). *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1591–1594.
- Mikucki, J. A, Liu, Y., Delwiche, M., Colwell, F. S., and Boone, D. R. (2003). Isolation of a methanogen from deep marine sediments that contain methane hydrates, and description of *Methanoculleus submarinus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3311–3316.
- Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G., Caldicott, A. B. and Goodfellow, M. (1984). Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *J. Chromatogr.* 188, 221–233.
- Miyazaki, M., Sakai, S., Ritalahti, K. M., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., *et al.* (2014). *Sphaerochaeta multiformis* sp. nov., an anaerobic, psychrophilic bacterium isolated from subseafloor sediment, and emended description of the genus *Sphaerochaeta*, *Int. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 4147–4154.
- Nakazawa, F., Sato, M., Poco, S. E., Hashimura, T., Ikeda, T., Kalfas, S., *et al.* (2000). Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov. and *Mogibacterium vescum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman *et al.* 1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 679–688.
- Nakazawa, F., Poco, S. E., Sato, M., Ikeda, T., Kalfas, S., Sundqvist, G., *et al.* (2002). Taxonomic characterization of *Mogibacterium diversum* sp. nov. and *Mogibacterium neglectum* sp. nov., isolated from human oral. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 115–122.
- Nobu, M. K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe S. G., Woyke, T., and Liu W. T. (2014). Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME J.* doi: 10.1038/ismej.2014.256.
- Rajilić-Stojanović, M. and de Vos, W. M. (2014), The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 996–1047.
- Romesser, J. A., Wolfe, R. S., Mayer, F., Spiess, E., and Walther-Mauruschat, A. (1979). *Methanogenium*, a new genus of marine methanogenic bacteria, and characterization of *Methanogenium cariaci* sp. nov. and *Methanogenium marisnigri* sp. nov.. *Arch. Microbiol.* 121, 147–153
- Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M., Patel, B. K. C., and Ollivier, B. (1999). *Fusibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium from an oil-producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1141–1147.
- Stams, A. J. M., and Hansen, T. A. (1984). Fermentation of glutamate and other compounds by *Acidaminobacter hydrogeniformans* gen. nov. sp. nov., an obligate anaerobe isolated from black mud. *Studies with pure cultures and mixed cultures with sulfate-reducing and*

- methanogenic bacteria. Arch. Microbiol. 137, 329–337.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., *et al.* (2008), Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 10949–10954.
- Tamaoka, J. and Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiol. Lett. 25, 125–128.
- Uematsu, H., Nakazawa, F., Ikeda, T., and Hoshino, E. (1993). *Eubacterium saphenus* sp. nov., isolated from human periodontal pockets. Int. Syst. Evol. Bacteriol. 43, 302–304.
- Westerholm, M., Roos, S., and Schn, A. (2010). *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. FEMS Microbiol. Lett. 309, 100–104.
- Worm, P., Koehort, J. J., Visser, M., Schaap, P. J., Plugge, C. M., Sousa, D. Z., and Stams, A. J. (2014). A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities. Biochem. Biophys. Acta. 1837, 2004–2016.

第7章 総括

本論文では、地球上の炭素循環に関わる微生物の基礎的知見を集めることを目的とした。特にメタン生成過程に関与していると考えられる微生物の中でも、人為的な培養がなされておらず、16S rRNA 遺伝子を指標にした系統分類上の位置や菌学的特性が明らかになっていないメタン生成アーキアと嫌気共生細菌に着目した知見を示した。

第一章では研究の背景、目的及び本論文の構成について述べた。

第二章では、環境中での微生物による有機物分解の流れ、メタン生成アーキアと嫌気共生細菌についての既往の知見を述べた。

第三章では、未培養メタン生成アーキアの系統学的位置の特定を試みた結果について述べた。排水処理汚泥を対象にメタン生成アーキア固有の機能遺伝子 methyl coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) 遺伝子と系統分類の指標に用いられている 16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析を行った。その結果、どちらの菌叢解析においても未培養グループに属する配列が 1 グループずつ検出された。*mcrA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹を作成し、2つの系統樹を比較したところ、MCR-2b と呼ばれる未培養グループに属する *mcrA* 遺伝子を有する細胞と WCHA1-57 と呼ばれる未培養アーキア由来の 16S rRNA 遺伝子を有する細胞は、同一である可能性が示唆された。MCR-2b と WCHA1-57 の系統関係について述べられた報告は今のところ存在しておらず、本研究結果は未培養メタン生成アーキアに関する新たな知見となった。また、この両者の関係性を明確化するために、ゲノム DNA 情報を獲得することを最終的な目的として WCHA1-57 アーキア細胞の 16S rRNA を標的とした catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法および MCR-2b 細胞の *mcrA* 遺伝子を標的とした two-pass tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法で目的細胞を検出させ、フローサイトメーターで目的細胞の回収を試みることにした。しかしながら、残念なことに FISH 法による細胞の可視化が出来なかったことから、ゲノム DNA 情報をも獲得することが出来なかった。その一方で、WCHA1-57 アーキア細胞を FISH 法で検出するための細胞壁処理検討に関する結果は、今後 WCHA1-57 アーキアに対する分子生物学的手法適用する際に有用な知見と成り得ることから、その詳細も併せて報告した。

第四章、第五章および第六章では、海底堆積物中の嫌気共生細菌に着目した研究結果について述べた。CO₂ 以外の電子受容体が存在せず嫌気環境状態にある深海底下では、メタン生成アーキアの純粋分離株の報告はいくつかあるものの、有機物分解に関与していると考えられている嫌気共生細菌が培養されてきた例、集積培養系や分離株の報告は無い。ところが、深海底堆積物環境においても陸域環

境や排水処理システムと同様に嫌気共生細菌を介した有機物分解が生じていると考えられているが、その直接的な証拠が存在しないため、実際に海底堆積物から嫌気共生細菌を培養・分離することで、その経路の存在の有無を確認することを試みた。

第四章では、難培養性微生物を効率良く集積培養させるための新規培養技術である下降流懸水型スポンジリアクター (down-flow hanging sponge: DHS) とバッチ式集積培養法を用いて海底堆積物から嫌気共生細菌の集積培養を試みた結果について述べた。培養基質としてグルコースを供給することで有機物分解に関与する一連の微生物群を DHS リアクター内で集積し、その集積培養サンプルを植種源としてバッチ式集積培養を行った。バッチ式集積培養では、嫌気共生細菌の集積率を上げるために、基質として酢酸、酪酸、プロピオン酸とエタノールを唯一の炭素源として 10°C もしくは 25°C でバッチ培養を行った。その結果として、10°C および 25°C の酪酸集積培養系から既に酪酸酸化共生菌として知られている *Syntrophomonas* sp. の集積が確認でき、海底下から初めて嫌気共生細菌の集積培養系の獲得に成功した。また、酢酸の集積培養系からも嫌気酢酸酸化共生菌の可能性を有する *Clostridiales* 目に属するバクテリアの増殖が確認された。

第五章では、酢酸集積培養系に増殖が確認された *Clostridiales* 目に属するバクテリアの純粋分離を試みた結果について述べた。*Clostridiales* 目に属するバクテリアが酢酸酸化共生細菌であることを確認するためには、純粋分離をする必要があった。純粋分離するための基質としてメタン生成アーキアに依存せずに単独で生育することができ、かつ、増殖効率が良い基質を探した。その結果、クロトン酸を基質に、生育補助剤として yeast extract で培養させたところ、目的のバクテリアが優占した。胞子を形成していたため、その特性を利用し、低温殺菌 (90°C で 20 分間) をしたところ、純粋分離に成功した。純粋分離に成功した MO-YS 株と最も相同性が高いバクテリアは “*Clostridium aminobutyricum*” であり、16S rRNA 遺伝子上で 92% の相同性を有していた。

第六章では、MO-YS 株の特性を解析した結果について述べた。第一に、水素資化性メタン生成アーキアと共生関係を再度構築させることで MO-YS 株が嫌気酢酸酸化能を有しているか確認を行った。*Methanobacterium* sp. と人工的に共生させ、¹⁴C をラベルした酢酸で酢酸の酸化量を推定したところ、約 0.4% の酢酸が酸化されていた。この結果は、酢酸酸化能を有する可能性を示すものであるが、酢酸の完全酸化を示すデータはこれまでのところ得られていない。この嫌気共生酢酸酸化能を明確なものにするために共生パートナーとして *Methanoculleus marisnigri*、*Methanoculleus submarinus* および *Methanobacterium* sp. の 3 種類と共培養を試みた他に、電子伝達物質として活性炭を培養系に混合させることで酢酸酸化とメタン生成反応の促進を試みた。しかしながら、これらの培養方法では有

意な結果は観察されなかった。したがって、今後は、補助生育基質として考えられるアミノ酸や電子伝達物質として導電性鉱物を混合した培養系の構築や、より自然環境に近い条件、例えば、高圧条件下での培養等より詳細な検討が必要であることが推測された。加えて、嫌気共生能の有無を推定するためにゲノム解析の準備も進めている。第二に、MO-YS 株の菌学的性質について調べた結果を記載した。その結果、近縁種である *Eubacterium* sp.、*Mogibacterium* sp.とは至適生育温度、ゲノム DNA の GC 含量と基質利用性試験において性質が大きく異なることが示された。2 番目に近縁な株である *A. odorimutans* とは、基質利用性の観点で類似している部分としていない部分があり、生育温度は異なることが示された。最後に、最も近縁な "*C. aminobutyricum*" についても MO-YS 株との共通の利用基質があることが示されたが、"*C. aminobutyricum*" は、基質試験が行われた物質が限られている上に詳細な菌学的特性が調べられていない。したがって、どの程度特性が似通っているか判断することが現時点ではできていない。今後は、*A. odorimutans* および "*C. aminobutyricum*" の詳細な菌学的特性を既往の文献に追加して調べることで MO-YS 株の特性と詳細な比較検討を行っていく予定である。

第四章、五章および六章を通して、海底下環境には、嫌気酪酸酸化共生細菌が存在する可能性を示す直接的な証拠を得ることができた。この結果により、嫌気共生細菌を介したメタン生成経路が存在する可能性が示唆された。加えて、酪酸を代謝する経路を有する嫌気酪酸酸化共生菌 *Syntrophomonas* sp.の集積培養系やクロトン酸や4-アミノ酪酸を基質にして生育する MO-YS 株の分離株を得ることができたことから、海底下において酪酸は重要な中間代謝物質の一つであることが考えられた。

以上のように、本論文は嫌気共生細菌とメタン生成アーキアに対する新規知見を提供し、地球上の炭素循環に関わる基礎的知見を与えたと考えている。

謝辞

本博士論文は、長岡技術科学大学大学院 工学研究科 エネルギー・環境工学専攻 博士課程の3年間の研究成果をまとめたものです。本研究を行うにあたり、長岡技術科学大学 山口隆司 教授、幡本将史 助教ならびに海洋研究開発機構 井町寛之 主任研究員には、手厚いご指導を頂きましたことを心より感謝申し上げます。山口 教授、幡本 助教には研究の助言はもちろんのこと、私が興味を抱いている分野の研究が満足にできるよう、井町 主任研究員と共同研究を行う機会を設けてくださったことを心より感謝申し上げます。また、井町 主任研究員には、研究の進め方から学会発表におけるプレゼンテーション資料の作成方法、論文執筆を進める上でご助言をいただくなど、多くの時間を割いて、格段なご指導いただいたことを心より感謝申し上げます。そして、井町 主任研究員の微生物を愛する気持ち、微生物の分離・培養にかける情熱を常に全身から感じておりました。何よりも培養を通して環境微生物学の面白さを教えていただいたことは自分の大切な時間となりました。また、海洋研究開発機構 酒井早苗 博士、田角栄二 技術副主任、宮崎征行 技術主事、齊藤由美 氏、山中結子 氏には、研究を進める上での貴重なアドバイス、データの収集にご協力頂きましたことを感謝致します。さらに、研究を円滑に進めることができるよう、実験室の整理整頓や機器のメンテナンス等細かい部分に渡り気を配っていただきましたこと、常に優しく、時に厳しく研究面から私生活に渡り、温かく見守っていただいたことに感謝致します。また、同研究所 高井研 深海・地殻内生物圏研究分野 分野長をはじめとする研究員各位にも、多大なる御指導、ご協力を頂きましたことを心より感謝申し上げます。

本研究室には、博士課程から在学しておりますが、修士課程で行ってきた研究テーマとは大きくかけ離れた研究を博士課程から始めることとなりました。その様な状況の中で、本学 水圏土壌環境研究室の皆様には、一から詳細な実験のノウハウや環境微生物分野の研究の考え方に至るまで数多くのことを教えていただきました。心より感謝致します。特に、本学 博士課程 青木仁孝 氏からは、私が研究を進める上で必要な実験技術の大半を伝授していただきました。そして、研究が行き詰まった際には、納得する答えが出るまでディスカッションに付き合ってくださいましたこと、感謝申し上げます。また、本学 小笠原渉 准教授、高橋祥司 准教授、姫野修司 准教授および井町寛之 主任研究員には学位審査にあたりまして、貴重なご助言と建設的なご意見を賜りました。そして、本学 金安将太郎 技術職員、渡邊高子 技術職員、本研究室 重野晶子 秘書には、研究や学生生活を送る上での格段のご便宜とご配慮を頂きました。記して感謝致します。

また、修士課程で所属していた本学 環境生物化学研究室の指導教員であった、解良芳夫 教授、高

橋祥司 准教授、阿部勝正 助教には、微生物実験の基礎を教えてくださいました。その基礎があったからこそ、博士課程で研究を無事に遂行できたと思っています。特に、高橋祥司 准教授にはミーティングの時間を豊富に設けていただき、実験に対して丁寧かつ適切な考察を行う訓練、発表資料のストラテジー作成の訓練、微生物単体には理解されていない分野が数多くあり、それを見つけ出す面白さを教えてくださいました。そのような丁寧な御指導をいただけたことは、自分の糧となりました。心より感謝申し上げます。

最後に、私の研究生生活、身体、精神的な部分に至るまで気遣い、常に支えてくれた両親、弟、妹、祖父、祖母に感謝の意を表し、本論文の結びと致します。

平成 27 年 3 月

斎藤 弥生