

水田土壌において嫌氣的プロピオン酸酸化に関わる栄養共生細菌とメタン生成古細菌に関する研究

岩手大学大学院 連合農学研究科

寒冷圏生命システム学専攻

熱・生命システム学講座

(弘前大学)

北村 浩二

目次

第1章 緒論.....	1
第2章 プロピオン酸酸化系の解析.....	7
第1節 要約.....	7
第2節 序論.....	9
第3節 材料と方法.....	10
1. 土壌試料.....	10
2. 培地と培養.....	10
2-1. 使用培地と培養方法.....	10
2-2. 気相および液相の分析.....	10
3. 顕微鏡観察.....	10
4. 細菌 16S rRNA 遺伝子の解析.....	13
4-1. PCR 反応.....	13
4-2. 電気泳動および PCR 産物の精製.....	13
4-3. 細菌 16S rRNA 遺伝子のクローニング.....	13
4-4. 配列決定および系統解析.....	14
5. プロピオン酸集積培養液における細菌群集の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 解析.....	14
5-1. PCR 反応.....	14
5-2. DGGE 解析.....	14
5-3. DGGE バンドの塩基配列決定.....	14
5-4. 集積培養液の経時的解析.....	15
6. プロピオン酸集積培養液からのメタン生成古細菌の分離.....	17
6-1. メタン生成古細菌の分離.....	17
6-2. 分離菌株の培養.....	17
6-3. 形態的特徴の観察.....	17
6-4. 生理・生化学・形態学的試験.....	20
6-5. 増殖への温度、pH, 塩濃度の影響.....	21
6-6. 基質利用性試験.....	21
6-7. DNA G+C 含量.....	21
6-8. 16S rRNA 遺伝子配列の決定および系統学的解析.....	22
6-9. Methyl CoM reductase subunit A 遺伝子(<i>mcrA</i>)の塩基配列決定および系統解析.....	25
6-10. 塩基配列の受付番号.....	25
7. プロピオン酸酸化細菌の分離の試み.....	26

7-1. 材料および培養	26
7-2. 純粋性の評価	26
7-3. 段階希釈法	26
7-4. 加熱処理	26
7-5. アガーシェイク法	26
7-6. ノーブルアガーを用いたアガーシェイク	26
7-7. 増殖促進因子の添加	26
7-8. 単独で増殖可能な基質の探索	27
7-9. モリブデン酸ナトリウムの添加	27
8. プロピオン酸集積培養液に存在する細菌の分離	28
8-1. 細菌の分離	28
8-2. 分離菌株の培養	28
8-3. 形態的特徴の観察	28
8-4. 生理学試験	28
8-5. 系統学的解析	32
8-6. DNA G+C 含量	32
8-7. 塩基配列の受付番号	33
第4節 結果	34
1. プロピオン酸酸化集積培養液の分析	34
1-1. 気相および液相の経時的変化	34
1-2. プロピオン酸集積培養液の顕微鏡観察	34
1-3. 16S rRNA 遺伝子配列に基づくプロピオン酸酸化細菌の推定	37
2. プロピオン酸集積培養液における細菌群集の DGGE 解析	37
2-1. 集積培養液 C165-1, C166-1 の DGGE 解析	37
2-2. 集積培養液の経時的な気相、液相の測定および DGGE 解析	37
3. プロピオン酸集積培養液からのメタン生成古細菌の分離	45
3-1. 169 菌株の特徴	45
3-2. FR-3 菌株の特徴	58
3-3. SR-20 菌株の特徴	58
4. プロピオン酸酸化細菌の分離	62
5. プロピオン酸集積培養液に共存する細菌の分離	63
5-1. 4F6E 菌株の特徴	63
5-2. 4F6B 菌株の特徴	68
5-3. 6E 菌株の特徴	68
5-4. 7A 菌株の特徴	68

第5節 考察.....	74
1. 水田土壌を起源とするプロピオン酸集積培養.....	74
2. プロピオン酸集積培養液の水素資化性メタン生成古細菌.....	77
3. プロピオン酸酸化細菌.....	83
4. プロピオン酸集積培養液に共存する細菌.....	83
5. プロピオン酸酸化系における微生物間の相互作用に関する考察.....	90
第3章 水田土壌において嫌氣的プロピオン酸酸化に関わる栄養共生細菌の計数.....	94
第1節 要約.....	94
第2節 序論.....	94
第3節 材料と方法.....	95
1. 培養方法と試料採取.....	95
1-1. 使用培地および使用菌株.....	95
1-2. 土壌の採取、前処理と保存、土壌管理と採取日.....	95
2. 土壌の分析（水分や全炭素、全窒素分析）.....	95
2-1. 土壌の水分含量の測定.....	95
2-2. 土壌 pH の測定.....	97
2-3. 土壌中の全窒素および全炭素の測定.....	97
3. MPN 法を用いた栄養共生プロピオン酸酸化細菌の計数.....	97
3-1. MPN 法の培養方法.....	97
3-2. メタン生成古細菌の種類と前培養.....	97
3-3. TCD ガスクロマトグラフおよび HPLC 測定による陽性の判定と計数値の算出.....	97
4. 陽性試験管の DGGE 解析.....	99
4-1. DGGE および DGGE バンドの塩基配列の決定.....	99
4-2. DGGE 用プライマーセットの検討.....	99
第4節 結果.....	101
1. 土壌分析.....	101
2. 異なる水素消費パートナーを用いた MPN 計数.....	101
3. MPN 高次希釈培養液の PCR-DGGE 解析.....	101
3-1. 採取時期および水素消費パートナーごとの DGGE 解析.....	101
3-2. MPN-PCR-DGGE で検出された細菌 16S rRNA 遺伝子配列の解析.....	113
第5節 考察.....	118
第4章 総合考察.....	122

参考文献.....127

白話文體與白話文體之研究，見於《白話文體與白話文體之研究》（台北：國語日報社，1979）。

謝辭.....134

這篇論文能順利完成，首先要感謝我的指導老師——陳其南先生。從論文構思、資料搜集、寫作過程到最後的修改，陳老師都給予我極大的鼓勵與支持。他不僅在學術上給予我嚴格的訓練，更在生活上給予我無微不至的關懷。他的教導與鼓勵，是我完成這篇論文的最大動力。此外，我也要感謝我的家人與朋友們。在寫作過程中，他們給予我無盡的鼓勵與支持，讓我能堅持下來。最後，我要感謝所有參與這篇論文評閱的專家學者，你們的意見對我來說無價。這篇論文的完成，離不開所有關心我的人。謝謝大家！

第1章 緒論

近年問題化している地球温暖化の原因の一つとして大気中の温室効果ガスがあげられる。メタン (CH_4) は二酸化炭素 (CO_2) に次いで重要な温室効果ガスであり、人為的温室効果の約 20% に寄与していると言われている (Griggs & Noguer, 2002)。メタンの 70-80% は生物由来 (Wahlen *et al.*, 1989) であり、湛水した土壌を含む嫌気的環境において、ほとんどがメタン生成古細菌によって生成されている。メタンの発生源としては湿地、土壌堆積物、水田土壌、下水、埋め立てや家畜などが知られている。これらのメタン発生源のうち約 25% が水田に由来するとされており (Cicerone & Oremland, 1988)、湛水した水田のメタン生成速度は年間 60Tg (Keller *et al.*, 1994) から 110Tg (Cicerone & Oremland, 1988) と推定されていることから、水田はメタンの重要な発生源の一つである。

メタンは湛水土壌中の有機物が嫌気的に分解された産物として生成される。安定同位体を用いた実験から、放出されるメタンは稲わらや根からの滲出物、土壌中の有機物から生成されることが示されており (Holzapfel-Pschörn *et al.*, 1986)、稲わらの水田土壌への鋤込はメタンの放出を強く促進することが証明されている (Schütz *et al.*, 1989)。稲わらはセルロース (32~37%)、ヘミセルロース (29~37%)、そしてリグニン (5~15%) に加えて、二酸化ケイ素のような無機物も含んでおり、特に稲わらに含まれる多糖類 (セルロースやヘミセルロース) が、有機物をメタンと二酸化炭素へと変換する複合的な微生物群の基質になると考えられている (Glissmann & Conrad, 2002; Tsutsuki & Ponnamperna, 1987)。

湛水された水田土壌のような嫌気的環境においては、有機物は主として細菌と古細菌からなる原核生物群の共同作業によって最終的にメタンや二酸化炭素にまで分解される。稲わらのセルロースなどの高分子物質は、それぞれに対応した加水分解酵素を分泌する微生物により加水分解され、構成単位である単糖が生成する。続いて単糖は、単糖利用性の微生物群により酢酸、プロピオン酸、酪酸や、エタノールなどのアルコール類、水素、二酸化炭素などに分解される。水田においてメタン生成の直接の基質は主として酢酸、水素であり、メタンの約 70% が酢酸由来、残り約 30% は水素由来であると考えられている (Krumböck & Conrad, 1991)。このうち水素は約 95-97% が嫌気的プロピオン酸酸化に伴う種間水素転移によりメタン生成古細菌に供給されることから (Conrad *et al.*, 1989)、水田土壌の嫌気的有機物分解においてプロピオン酸酸化細菌とメタン生成古細菌の種間水素転移は重要な過程であると考えられる。

プロピオン酸は重要な中間代謝物質であるが、嫌気的な酸化分解反応は生化学的標準状態 (pH7.0) では吸エルゴン反応 ($\Delta rG^\circ = +76.1\text{kJ/mol}$) であり、本来進行不可能である (Boone & Bryant, 1980a; Schink & Stams, 1992)。しかし生成物の水素分圧がメタン生成菌により十分低く保たれることで反応全体が発エルゴン反応 ($\Delta rG^\circ = -102.4\text{kJ/mol}$) になり、プロピオン酸酸化細菌とメタン生成菌の両者がエネルギーを得られるようになる (Boone & Bryant, 1980a; Schink & Stams, 1992) (表 1-1)。プロピオン酸酸化細菌は水素を

除去されなければプロピオン酸を分解できず、またメタン生成菌はメタン生成の基質となる水素の供給をプロピオン酸酸化細菌に依存しており、このような関係を栄養共生関係という。プロピオン酸酸化細菌は基本的にはメタン生成菌のような水素消費者との栄養共生状態でなければ増殖できないため、プロピオン酸酸化細菌の集積培養は増殖に長時間を要するのみならず、集積過程で増殖が停止することもある。そのため、プロピオン酸酸化細菌をメタン生成菌との共生状態で純粋分離を行うために、段階希釈や熱処理を行った培養液を共生パートナーとなる純粋なメタン生成古細菌や硫酸還元細菌と混合し、液体培養またはロールチューブ法、アガーシェイク法を用いて人工的に共生状態を作り出す方法など、さまざまな工夫が凝らされている(Boone & Bryant, 1980a; Chen *et al.*, 2005; de Bok *et al.*, 2005b; Harmsen *et al.*, 1998a; Imachi *et al.*, 2002; Imachi *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 1999; Wallrabenstein *et al.*, 1995)。

現在までに知られている栄養共生プロピオン酸酸化細菌について表 1-2 に示した。硫酸還元反応を伴うプロピオン酸酸化により単独で増殖可能であり、さらに栄養共生プロピオン酸酸化も可能な細菌としては *Syntrophobacter fumaroxidans*(Harmsen *et al.*, 1998a), *Syntrophobacter pfennigii*(Wallrabenstein *et al.*, 1995), *Syntrophobacter wolinii*(Boone & Bryant, 1980b), *Syntrophobacter sulfatireducens*(Chen *et al.*, 2005), *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum*(Plugge *et al.*, 2002)が報告されている。また硫酸塩を利用できず、栄養共生プロピオン酸酸化を行う細菌としては現在までに *Smithella propionica*(Liu *et al.*, 1999), *Pelotomaculum thermopropionicum*(Imachi *et al.*, 2002a), *Pelotomaculum schinkii*(de Bok *et al.*, 2005a), *Pelotomaculum propionicicum*(Imachi *et al.*, 2007a)が分離されている。このうち *Smithella propionica* および *Pelotomaculum thermopropionicum* はプロピオン酸以外の基質 (フマル酸塩やクロトン酸塩) を利用することで単独での増殖が可能である。しかし、*Pelotomaculum schinkii* および *Pelotomaculum propionicicum* は単独で増殖可能な基質は知られていないため、絶対共生細菌であると考えられている。以上のように現在までに分離された嫌気性栄養共生プロピオン酸酸化細菌は少なく、硫酸塩を利用しない絶対共生的なプロピオン酸酸化細菌の水田土壌からの分離は報告されていない。そのため、湛水された水田土壌において、嫌氣的有機物分解の重要な一過程である栄養共生プロピオン酸酸化の詳細については明らかにされていない。嫌氣的プロピオン酸酸化経路は現在までにランダム化 (メチルマロニル CoA) 経路とアクリル酸経路の 2 通りが知られており、水田土壌では主にランダム化 (メチルマロニル CoA) 経路 (図 1) が働いていることが示されている(Krylova *et al.*, 1997; Schink, 1997)。¹³C を使用した RNA-SIP に基づく研究により、イタリアの水田土壌において *Syntrophobacter* 属, *Smithella* 属, *Pelotomaculum* 属に属する細菌が栄養共生共生的にプロピオン酸を酸化していることが示唆されているが、純粋分離までは行われていない(Lueders *et al.*, 2004)。プロピオン酸酸化細菌の生態を解明するためには、純粋な培養物を得て生理生化学的な解析を

進めることが重要である。また、上記 3 属の細菌が水田土壤に普遍的に存在し、栄養共生プロピオン酸酸化を行っているのか、地域により更に異なる栄養共生細菌が関与するのも明らかにされていない。水田土壤における栄養共生プロピオン酸酸化細菌の生菌数についてもポット栽培された土壤における計数 (MPN 法) しか報告されておらず (Krylova *et al.*, 1997)、実際の圃場で、また経時的に計数を行った例はなく、生菌数の季節変動や優占種の推定もなされていない。

この研究では、平成 15 年に本研究室の佐々木が弘前大学生物共生教育研究センター附属金木農場の水田土壤を接種源として開始した集積培養液を材料として、栄養共生プロピオン酸酸化に関わる細菌および古細菌の純粋培養と併せてプロピオン酸酸化系の解析を行うことを目的とする。メタン生成古細菌は水素+二酸化炭素や蟻酸、酢酸のような特定の基質をエネルギー源かつ炭素源として生育し、メタンを生成する偏性嫌気性の原核生物である。水田土壤におけるメタン生成の主な基質は水素+二酸化炭素と酢酸であり、水素は上述したように、95–97%が種間水素転移により栄養共生細菌から水素メタン生成古細菌に供給されている (Conrad *et al.*, 1989)。メタン生成古細菌は湛水した水田土壤のような嫌氣的有機物分解において重要な役割を担うだけでなく、温室効果ガスであるメタンを放出する原因でもある。しかし水田土壤から分離され、記載までされたのは *Methanobacterium oryzae* Fpi (Joulian *et al.*, 2000), *Methanobrevibacter arboriphilus* SA (Asakawa *et al.*, 1993), *Methanosarcina mazei* TMA (Asakawa *et al.*, 1995), *Methanoculleus chikugoensis* MG62 (Dianou *et al.*, 2001), *Methanocella paludicola* SANAE^T (Sakai *et al.*, 2008), *Methanocella arvoryzae* MRE50^T (Sakai *et al.*, 2010) の 6 例と少なく (表 1–3)、水田土壤におけるメタン生成古細菌と栄養共生細菌との相互関係についても十分に知られていない。メタン生成古細菌の分離は水田土壤に生息するメタン生成古細菌の生態を知る手がかりになるだけでなく、水田土壤に生息するプロピオン酸酸化細菌の共生パートナーとして利用できると考えられるため、水田土壤における栄養共生関係を研究するうえで重要である。

第 2 章では、水田土壤を起源とするプロピオン酸集積培養液を材料としてプロピオン酸酸化系の解析を行った。メタン生成古細菌、栄養共生プロピオン酸酸化細菌および集積培養液に存在する他の細菌の分離を試み、得られた微生物株について特徴付けを行った。分離した水素資化性メタン生成古細菌 169 菌株は新種 *Methanobacterium kanagiense* 169 菌株として記載した。第 3 章では、水田土壤に生息する培養可能な栄養共生プロピオン酸酸化細菌の計数および PCR-DGGE 法を用いた解析を通して優占種の推定を行った。

表 1-1. 嫌氣的プロピオン酸酸化とメタン生成の理論式

反応式	ΔrG° (kJ/mol)
1) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	+76.1
2) $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 3\text{CH}_4 + 4\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-102.4
3) $\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6
4) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0

表 1-2. 既知の栄養共生プロピオン酸酸化細菌

温度	硫酸還元能	菌名	分離源	文献
中温性	+	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	下水消化槽	(Boone & Bryant, 1980b)
中温性	+	<i>Syntrophobacter pfennigii</i>	下水プラント汚泥	(Wallrabenstein <i>et al.</i> , 1995)
中温性	+	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	UASB リアクター	(Harmsen <i>et al.</i> , 1998b)
中温性	+	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>	UASB リアクター	(Chen <i>et al.</i> , 2005)
高温性	+	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> subsp. <i>thermosyntrophicum</i>	UASB リアクター	(Plugge <i>et al.</i> , 2002)
中温性	-	<i>Smithella propionica</i>	家庭下水汚泥	(Liu <i>et al.</i> , 1999)
高温性	-	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	UASB リアクター	(Imachi <i>et al.</i> , 2002b)
中温性	-	<i>Pelotomaculum schinkii</i>	UASB リアクター	(de Bok <i>et al.</i> , 2005)
中温性	-	<i>Pelotomaculum propionicicum</i>	UASB リアクター	(Imachi <i>et al.</i> , 2007)

表 1-3. 水田土壌から分離・記載されたメタン生成古細菌

生物名	文献
<i>Methanobacterium oryzae</i> Fpi	(Joulian <i>et al.</i> , 2000)
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> SA	(Asakawa <i>et al.</i> , 1993)
<i>Methanosarcina mazei</i> TMA	(Asakawa <i>et al.</i> , 1995)
<i>Methanoculleus chikugoensis</i> MG62	(Dianou <i>et al.</i> , 2001)
<i>Methanocella paludicola</i> SANAE ^T	(Sakai <i>et al.</i> , 2008)
<i>Methanocella arvoryzae</i> MRE50 ^T	(Sakai <i>et al.</i> , 2010)

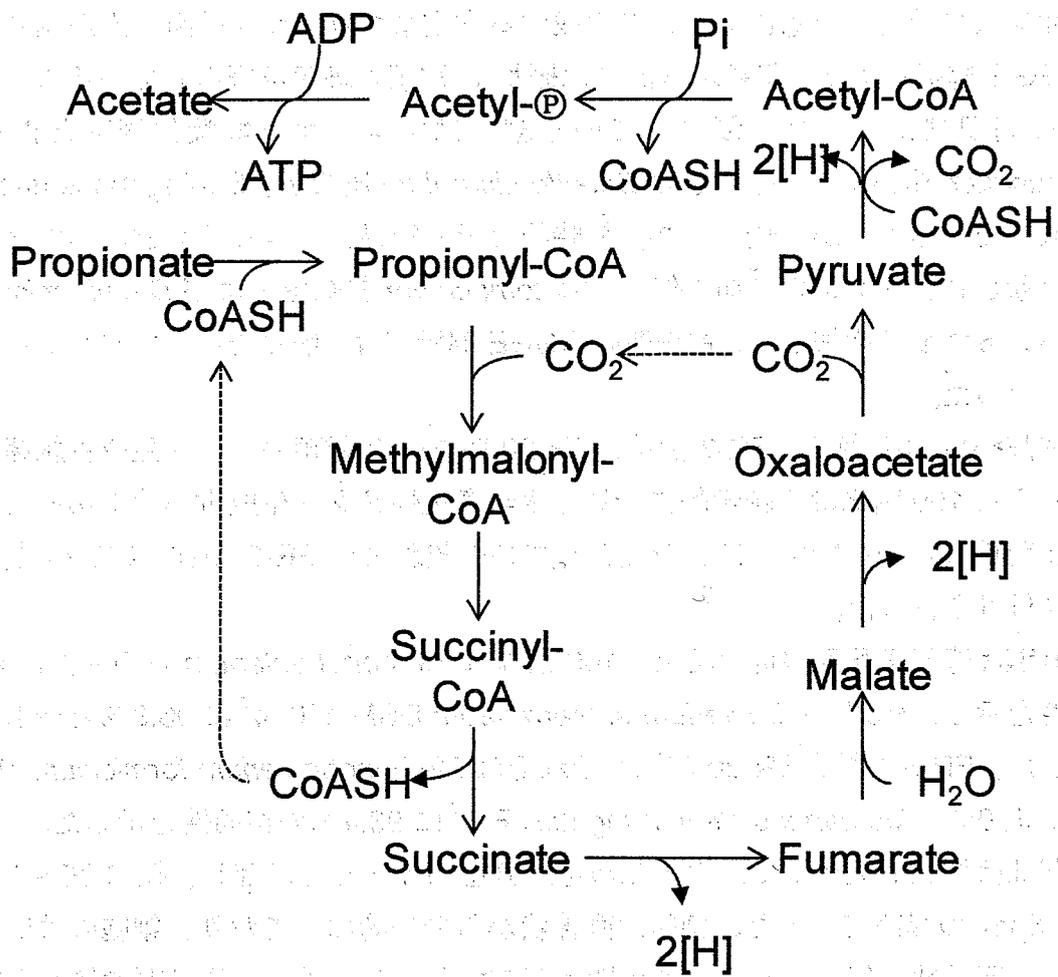


図1. 嫌気的プロピオン酸酸化経路（メチルマロニル CoA 経路）(Schink, 1997)

第2章 プロピオン酸酸化系の解析

第1節 要約

弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育センター金木農場の水田土壌を接種源とし、プロピオン酸を基質として開始した集積培養液について解析を行った。プロピオン酸集積培養液では培養期間を通して水素分圧および酢酸濃度は低く保たれ（最大 4ppm, 0.5mM）、プロピオン酸の消費とともにメタンが生成する安定なプロピオン酸酸化系が確立された。PCR-DGGE 解析により、集積培養液には概ね 3 種類の細菌が優占していることが示唆された。塩基配列に基づき、優占している細菌はプロピオン酸酸化細菌と推定される *Pelotomaculum* 属細菌と、その他の *Desulfomicrobium* 属細菌、Sphingobacteriaceae 科に属する細菌であることが示唆された。経時的解析の結果、プロピオン酸の消費とともにメタンが蓄積され、メタンの増加に伴い *Pelotomaculum* 属細菌および *Desulfomicrobium* 属細菌のバンド強度が増加した。古細菌の DGGE 解析では、培養を通してバンドパターンは変化しなかった。

集積培養液から 169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株の 3 種類のメタン生成古細菌を分離した。このうち 169 菌株は系統学的に新規な水素資化性メタン生成古細菌であった。本章では、169 菌株の詳細な特徴付けと新種としての記載および FR-3 菌株、SR-20 菌株の部分的な特徴付けを行った。

16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、169 菌株は *Methanobacterium* 属の菌株に 90%以上の相同性を示し、*Methanobacterium subterraneum* DSM 11074^T に 96.8%と最も高い相同性を示した。FR-3 菌株、SR-20 菌株はそれぞれ *Methanobacterium formicicum* strain MF^T に対して 100%、*Methanospirillum hungatei* JF-1^T に 98.4%の相同性を示した。

169 菌株は嫌氣的条件下で水素+二酸化炭素を基質として増殖し、幅 0.35~0.5 μ m、長さ 1.6~5 μ m の桿菌であった。細胞は直線状からやや湾曲しており、細胞の端は丸みを帯びていた。運動性は無く、グラム染色性は不定であった。透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、169 菌株は鞭毛を持たず、細胞長軸の両末端付近に数本から十数本の繊毛を有し、細胞壁は厚さ約 6nm のグラム陽性型の構造を示した。増殖の最適 pH は 7.5-8.5、最適温度は 40 $^{\circ}$ C、最適増殖 NaCl 濃度は 0.5% (w/v) であった。*Methanobacterium subterraneum* DSM 11074^T とは細胞形態、グラム染色性、増殖基質の利用性、および G+C 含量で異なっていたことから、169^T 菌株(= DSM 22026^T = JCM 15797^T)を基準菌株として新種 *Methanobacterium kanagiense* を提案し、記載した(Kitamura et al. *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from Japanese rice field soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* June 2011. 61:1246-1252)。

FR-3 菌株は嫌氣的条件下で水素+二酸化炭素または蟻酸ナトリウムを基質として増殖し、幅 0.5~0.6 μ m、長さ 3~6 μ m の桿菌であった。細胞は直線状からやや湾曲し、細胞の端は丸みを帯びており、運動性は無かった。

SR-20 菌株は嫌氣的条件下で水素+二酸化炭素を基質として増殖し、幅 0.5~0.6 μm 、長さ 4~10 μm の桿菌であった。細胞は波状に湾曲しており、細胞の端は丸みを帯びていた。細胞は運動性を有していた。

集積培養液から栄養共生プロピオン酸酸化細菌の分離を試み、段階希釈、加熱処理、増殖因子の添加、単独で増殖可能な基質の探索、モリブデン酸ナトリウムの添加、ノーブルアガーを用いたアガーシェイクなど様々な方法を試験したが、分離には至らなかった。

集積培養液に存在する他の細菌の分離を試みたところ、基質としてリンゴ酸または 0.1% 酵母エキス+プロピオン酸を用いることで 4F6B 菌株、4F6E 菌株、6E 菌株、7A 菌株の計 4 種類の細菌を分離した。16S rRNA 遺伝子配列解析に基づき、4F6B 菌株は *Mucilaginibacter daejeonensis* (86%)、4F6E 菌株は *Aminobacterium colombiense* DSM 12261^T (89.5%)、6E 菌株は *Meniscus glaucopis* strain ATCC 29398 (89.1%)、7A 菌株は *Desulfomicrobium norvegicum* strain DSM 1741 (98.9%) にそれぞれ最も近縁であることが示された。

4F6B 菌株は幅 0.5-0.6 μm 、長さ 0.6-1.0 μm の短桿菌で運動性は無く、グラム染色性は陰性であった。増殖基質としてピルビン酸、2-オキソグルタル酸を利用した。好気培養試験の結果は陰性であった。

4F6E 菌株は幅 0.8 μm 、長さ 2.0-2.5 μm のコマ状桿菌で、運動性を有し、グラム染色性は陰性であった。増殖可能な温度範囲は 15°C から 55°C、最適増殖温度は 25~40°C の範囲であった。0% から 1.5% までの NaCl 濃度範囲で増殖可能であり、最適増殖 NaCl 濃度は 0% から 0.5% であった。好気培養試験の結果は陰性であった。増殖基質としてリンゴ酸、ピルビン酸、2-オキソグルタル酸、ヒスチジン、セリン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、リシン、グリシン、トリプトファン、カザミノ酸を利用した。電子顕微鏡観察の結果、1 細胞につき 2~3 本の鞭毛が観察された。また、鞭毛の基部は細胞側面の窪みにあることが示された。

6E 菌株は幅 0.8 μm 、長さ 2.0 μm の桿菌で運動性は無く、グラム染色性は陰性であった。好気培養試験の結果は陰性であった。増殖基質としてリンゴ酸、フマル酸、ピルビン酸、コハク酸、クエン酸を利用した。

7A 菌株は幅 1.0 μm 、長さ 1.4-3.0 μm の桿菌で、運動性を有しグラム染色性は陰性であった。増殖因子として酵母エキスを必要とした。発酵性基質としてピルビン酸を利用し、電子供与体基質としてピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸、乳酸、エタノール、水素+二酸化炭素、蟻酸を利用した。酪酸およびコハク酸は電子受容体としてわずかに利用された。電子受容体として硫酸塩を利用した。

第2節 序論

メタンは温室効果ガスの一つであり、水田土壌は大気中のメタンの重要な発生源の一つと考えられているが、このメタンはメタン生成古細菌により生成される。

メタン生成古細菌は水素+二酸化炭素や蟻酸、酢酸のような特定の基質をエネルギー源かつ炭素源として生育し、メタンを生成する偏性嫌気性の原核生物である。水田土壌におけるメタン生成の主な基質は水素+二酸化炭素と酢酸であり、水素はその95~97%が種間水素転移により供給されている(Conrad *et al.*, 1989)。種間水素転移は異なる生物間の水素の授受を指しており、例としては揮発性脂肪酸(VFA)分解細菌がプロピオン酸を嫌氣的に酸化する過程で生成した水素が水素資化性メタン生成古細菌に利用される現象が挙げられる(上木勝司、永井史郎, 1993)。プロピオン酸の嫌氣的酸化反応は水素資化性メタン生成古細菌のような水素消費者により水素が低分圧(約10Pa以下)に保たれて初めて可能となるため、この関係は栄養共生関係と呼ばれている(Schink & Stams, 1992)。イタリアの水田土壌において、プロピオン酸は栄養共生的に分解されていることが示唆されており(Krylova & Conrad, 1998; Lueders *et al.*, 2004)、水田土壌における栄養共生関係は、嫌氣的な有機物分解過程の最終段階であるメタン生成の基質を供給するため重要であると考えられる。しかしVFA分解細菌は嫌氣的かつ栄養共生を行っている状態で培養する必要があり、熱力学的に不利な反応を行うためしばしば増殖が遅く、分離が困難であるため、水田土壌から栄養共生または硫酸還元を行うプロピオン酸酸化細菌が分離された例はまだ報告されていない。また水田土壌から分離され、記載までされたメタン生成古細菌は6例と少なく、水田土壌においてメタン生成古細菌とプロピオン酸酸化細菌がどのような相互関係にあるかも十分に研究されていない。従ってメタン生成古細菌の分離は水田土壌に生息するメタン生成古細菌の生態を明らかにするだけでなく、水田土壌に生息するプロピオン酸酸化細菌の共生パートナーとして利用できる可能性が考えられる。水田から分離したメタン生成菌を用いてプロピオン酸酸化細菌を分離することでより実際の生態を反映した研究を行うことができるため、水田土壌における栄養共生プロピオン酸酸化に関して重要な知見が得られると考えられる。

本章では水田土壌を起源とするプロピオン酸集積培養を構築し、気相と液相の経時的解析を行った。また、クローン解析およびPCR-DGGE解析を用いた優占種の推定を試みた。さらに集積培養液を接種源として、水素資化性メタン生成古細菌の分離、同定を行った。そして分離したメタン生成菌を用いて集積培養液で優占するプロピオン酸酸化細菌の分離を試み、さらに共存している細菌の分離および特徴付けを行った。

第3節 材料と方法

1. 土壌試料

水田土壌は平成 15 年 8 月に弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育研究センター金木農場から採取した。水田土壌は約 10cm の深さまで表層の土壌を除き、出来る限り水稻根や植物遺体を含まないようにして 3 箇所から採取した。採取した土壌はチャック付きポリ袋に詰め、出来る限り空気が入らないようにして密閉し持ち帰った。3 箇所から採取した土壌をそれぞれ等量ずつよく混合し、2mm 幅の目の篩を通して粗大な有機物を除き、試料とした。土壌試料はチャック付きポリ袋に詰め、空気を追い出した上で密閉し、使用まで 4°C 以下で保存した。

2. 培地と培養

2-1. 使用培地と培養方法

プロピオン酸集積培養には Widdel の嫌気性細菌用完全合成培地（表 2-1、ただし硫酸塩を含まない。以下ミネラル培地とする）(Widdel & Pfennig, 1982)を用いた。特に断らない限り培地は pH を 7.2-7.5 に合わせて使用した。集積培養は 125ml 容量のバイアル瓶に分注した 100ml のミネラル培地 (20mM プロピオン酸ナトリウムを含む) に水田土壌を 5g 接種し、気相を窒素ガス (100%) で置換してブチルゴム栓とアルミシールで密閉し、30°C、暗所で静置した。この培養液を集積 1 回目とし、基質であるプロピオン酸ナトリウムおよび中間代謝物として生成する酢酸が完全に消費された時点で、20mM プロピオン酸ナトリウムを含む新しいミネラル培地に堆積物を含む 1ml を移植した。移植した培養液は同様にして移植を行い、安定なプロピオン酸酸化系を構築した。

2-2. 気相および液相の分析

集積培養液の気相（水素、メタン）を TCD ガスクロマトグラフ、液相（プロピオン酸、酢酸）を FID ガスクロマトグラフによって経時的に分析した。それぞれの分析条件は表 2-2, 2-3 に示した。

3. 顕微鏡観察

集積培養液中の微生物は落射蛍光顕微鏡（光学顕微鏡, OLYMPUS MX50 高級システム顕微鏡；位相差装置, OLYMPUS BX-PHD 位相差装置；蛍光装置, OLYMPUS BL-FLA ユニバーサル落射蛍光装置；写真撮影装置, デジタルカメラ Canon EOS Kiss X3）を用いて行なった。

表 2-1. Widdel の嫌気性細菌用完全合成培地

KH_2PO_4	0.2g
NH_4Cl	0.25g
NaCl	1.0g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4g
KCl	0.5g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15g
Resazrin-Na	2.0mg
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.36g
NaHCO_3	2.52g
Trace Element Solution SL7	1.0ml
Solution A	1.0ml
Solution B	2.0ml
Solution C	1.0ml
Distilled water	to 1.0L

Solution A

NaOH	0.5g
$\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.0mg
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.0mg
Distilled water	1.0L

Solution B

4-Aminobenzoic acid	4.0mg
D-(+)-Biotin	1.0mg
Thiamine chloride	10mg
Distilled water	100ml

Solution C

Cyanocobalamine	5.0mg
Distilled water	100ml

Trace element solution SL7

25% HCl	10ml
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.5g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	190mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100mg
ZnCl_2	70mg
H_3BO_3	62mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17mg
Distilled water	1L

表 2-2. TCD ガスクロマトグラフ測定条件

ガスクロマトグラフ：ガスクロマトグラフ GC-8A (島津製作所株式会社)
カラム：WG-100
キャリアーガス：アルゴン (0.5kPa)
検出器：熱伝導度検出器
定温槽温度：60℃
試料注入部温度：120℃
インテグレータ：クロマトパック C-R8A (島津製作所株式会社)

表 2-3. FID ガスクロマトグラフ測定条件

ガスクロマトグラフ：ガスクロマトグラフ GC-8A (島津製作所株式会社)
カラム：ステンレスカラム (内径 3mm、長さ 2m)
充填剤：ポラパック N
キャリアーガス：窒素 (1.7kg/cm²)
検出器：水素炎イオン化検出器 (水素 0.5kg/cm²、空気 0.5kg/cm²)
定温槽温度：170℃
試料注入部温度：200℃
インテグレータ：クロマトパック C-R6A (島津製作所株式会社)

4. 細菌 16S rRNA 遺伝子の解析

4-1. PCR 反応

プロピオン酸集積培養液を 1ml 採取し、10,000rpm, 5 分間遠心した。培養液の上清をデカントで大部分除き、さらに 10,000rpm, 5 分間遠心した後に培養液の上清を 30 μ l ほど残して除いた。ボルテックスで再懸濁した細胞懸濁液 1 μ l を鋳型として以下の組成の PCR 反応液を調製し PCR 反応を行った。1.25 U の Taq DNA ポリメラーゼ(HotStarTaq; Qiagen), 5 μ l の 10 \times PCR buffer (Qiagen)[Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, pH8.7(20 $^{\circ}$ C)], 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M のプライマーペアを混合し、滅菌蒸留水で容量を 50 μ l にした。PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社)を用いて以下の条件で行った: 95 $^{\circ}$ C, 15 min のポリメラーゼの活性化、(95 $^{\circ}$ C 1 分間の熱変性、55 $^{\circ}$ C 1 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C 90 秒間の伸長反応) \times 35 サイクル、72 $^{\circ}$ C で 6 分間の最終伸長反応。アニーリング温度およびサイクル数は使用するプライマーまたは実験により適宜変更した。プライマーはアニーリング温度 55 $^{\circ}$ C で S-D-Bact-0011-a-S-17 (5'- GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') (Alm *et al.*, 1996)および S-D-Bact-1492-b-A-19 (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3') (Stubner & Meuser, 2000)を使用した (*E. coli* の 16S rRNA 遺伝子配列の 11 から 1492 に一致する)。

4-2. 電気泳動および PCR 産物の精製

PCR 産物の確認はアガロースゲル電気泳動で行った。アガロースゲルは 1 \times TAE バッファー[20mM Tris-HCl, 20mM acetic acid, 1mM EDTA(pH8.0)]にアガロース (TAKARA H14, タカラバイオ) を 1.5%(w/v)添加して調製した。PCR 産物 5 μ l に 6 \times ローディングダイ [0.2%プロモフェノールブルー、50%グリセロール、10mM EDTA(pH8.0)]1 μ l を混合し、HindIII λ DNA マーカーとともに電気泳動した。電気泳動終了後、5 分間エチジウムブロマイド溶液に浸して DNA を染色し、トランスイルミネーターでゲルに UV を照射し、蛍光バンドを確認した。PCR 産物は UltraCleanTM PCR clean-up DNA Purification kit (MO BIO Laboratories, Inc.) を用いてキットの説明書に従って精製した。

4-3. 細菌 16S rRNA 遺伝子のクローニング

TAKARA の DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いて、16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅断片を pUC19 プラスミドベクターに連結し、エレクトロポレーション法(Dower *et al.*, 1988)により *Escherichia coli* JM109 competent cell に導入した。*E. coli* 細胞をアンピシリン、IPTG, X-gal を添加した LB 寒天平板培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C で培養した。LB 寒天平板上に形成された白色のコロニーを滅菌した竹串で釣菌し、pUC19 の挿入隣接配列を標的としたプライマー M13F, M13R を用い、6-1 に記載した方法に従って PCR 増幅させた。PCR 反応後、アガロースゲル電気泳動を行い目的の位置(約 1500bp)にバンドが出現したコロニーについ

て釣菌を行い、アンピシリンを添加した SuperBroth[Bacto tryptone 2.5%(w/v), Yeast extract 1.5%(w/v), NaCl 0.5%(w/v)]で一晩培養した。培養液から QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) を用いて形質転換大腸菌からプラスミドを抽出した。

4-4. 配列決定および系統解析

塩基配列の決定は Thermo Sequenase Cy5.5 dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて、表 2-4 に示したプライマー (1pmol/ μ l) で行った。PCR 反応条件は 95 °C, 2 min のポリメラーゼの活性化、(95°C30 秒間の熱変性、60°C30 秒間のアニーリング、72°C90 秒間の伸長反応) \times 35 サイクルで行った。アニーリング温度およびサイクル数は使用するプライマーにより適宜変更した。

5. プロピオン酸集積培養液における細菌群集の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 解析

5-1. PCR 反応

集積培養液中に存在する細菌群集構造を明らかにするため、PCR-DGGE 解析を行った。DGGE 解析用の細菌 16S rRNA 遺伝子配列の可変 V3 領域 (*E. coli* の 16S rRNA 遺伝子配列の 341 から 534 に一致する) の PCR 増幅は、プライマー 341fGC と 534r (表 2-5) を用い、鋳型 DNA として 4-1 と同様に集積培養液から調製した細胞懸濁液を 1 μ l 添加し、以下の条件で PCR 反応を行った: 94°C で 2 分間の熱変性、(94°C30 秒の熱変性、66°C30 秒のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応) \times 40 サイクル、72°C で 5 分間の最終伸長反応。PCR 産物を 1.5%アガロースゲル上で電気泳動を行い確認した後に DGGE に供した。

5-2. DGGE 解析

DGGE は DCode system (Bio Rad Laboratories) を用いてメーカーの使用説明書に従って行った。45~70%の変性剤 (100%の変性剤は、6M 尿素と 40%(v/v)ホルムアミドを含む) 濃度勾配をかけた 10%(w/v)ポリアクリルアミドゲルに、PCR 産物 2.5 μ l をアプライし、80V、60°C、16 時間の電気泳動を行った。その後、1 \times TAE バッファー (100ml) で 1 万倍に希釈した SYBR Gold 溶液にポリアクリルアミドゲルを浸して 4°C で 30 分間染色し、水洗後、トランスイルミネーター (ULTRA-VIOLET RADIATION OBLIGATORY EYE PROTECTION/VILBR LOURMAT) に載せ、デジタルカメラでバンドを撮影した。

5-3. DGGE バンドの塩基配列決定

DGGE バンドの塩基配列を決定するために、トランスイルミネーター上で DNA を含むゲル切片を切り取り、200 μ l の滅菌 TE バッファーが入っている 1.5ml 用チューブに移し、4°C で一晩浸漬した。この DNA 溶液の純度を確認するため、1 μ l の DNA 溶液を鋳型にし

て、プライマーセット 341fGC/534r を用いて再度上述の操作で PCR 増幅を行い、増幅産物を 2 回目の DGGE にかけた。目的とするバンドのみ現れ、DNA の純度が確認できた DGGE バンド試料については、塩基配列を 1pmol のプライマー 534r を用いてシーケンシング用 PCR を行い、塩基配列を決定した。

5-4. 集積培養液の経時的解析

プロピオン酸集積培養液 C166-1 の培養液について経時的な気相、液相の測定および DGGE 解析を行った。

基質として 20mM プロピオン酸を含む 100ml の培地に対して 10ml の集積培養液を接種し、よく混合した後 10ml ずつねじ口試験管に分注した。培養開始直後を 0 日とし、その後 14 日ごとに TCD ガスクロマトグラフで気相の分析を行い、培養液を採取して FID ガスクロマトグラフおよび DGGE 解析に供した。TCD および FID ガスクロマトグラフ、DGGE 解析は 2-2, 5-2 に記載した方法に従って行なった。ただし、TCD 測定は微差圧計 (マノスターゲージ W081FN, 山本電機製作所) により大気圧との差圧を測定した後に行なった。古細菌の DGGE 解析にはプライマーセット 0348aF-GC:691R (表 2-5) (Watanabe *et al.*, 2004) を使用した。培養および測定は 2 連で行った。

表 2-4. 細菌 16S rRNA 遺伝子配列決定に使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	Tm 値(°C)	参考文献
M13/pUC19 reverse sequencing primer	GAGCGGATAACAATTTACACACAGG	70	
0011F	GTTTGATCCTGGCTCAG	52	1
Bact 350F	TACGGGAGGCAGCAG	50	2
Bact 350R	CTGCTGCCTCCCGTAG	54	2
Bact-520F	GTGCCAGCAGCCGCGG	58	3
Bact 520R	ACCGCGGCTGCTGGC	54	3
Bact-1100F	GCAACGAGCGCAACCC	54	4
Bact-1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG	52	4
Bact1392R	ACGGGCGGTGTGTRC	51	5
Pelo1	CATGTGGTTTAATTTCGACGC	57.7	This study
Pelo2	CTTCGCCTCCCTTTGTAC	57	This study
T7 promoter sequencing primer	TAATACGACTCACTATAGGG	56	

1:(Alm *et al.*, 1996; Kane *et al.*, 1993), 2:(Hansen *et al.*, 1999), 3:(Takami *et al.*, 1997), 4:(Kane *et al.*, 1993), 5:(Kane *et al.*, 1993; Lane, 1991)

表 2-5. DGGE 解析に使用したプライマーセット

プライマー名	配列(5'-3')	標的	参考文献
341f-GC	GC clump CCTACGGGAGGCAGCAG	全細菌	1
534r	ATTACCGCGGCTGCTGG		
0348af-GC	GC clump TCCAGGCCCTACGGG	古細菌	2
691R	GGATTACARGATTTAC		

GC clump: cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg g

1: Muyzer *et al.*, 1993, 2:Watanabe *et al.*, 2004

6. プロピオン酸集積培養液からのメタン生成古細菌の分離

6-1. メタン生成古細菌の分離

7 回の継代培養を経た集積培養より、水素+二酸化炭素 (80 : 20, 2atm) を基質とした嫌気性ロールチューブ法(Hungate & Macy, 1973)による純化操作を繰り返すことにより水素資化性メタン生成菌の分離を行った。メタン生成古細菌の分離には 2mM 酢酸ナトリウムを添加したミネラル培地を用い、嫌気性ロールチューブ法では寒天 (1.5%, w/v) を添加して使用した。培養に用いた水素+二酸化炭素および窒素ガスは全て還元銅で微量の酸素を除いた。

6-2. 分離菌株の培養

6-1 で得られた水素資化性メタン生成古細菌の純粋な分離菌株 (169、FR-3、SR-20 の 3 菌株) は、2mM 酢酸ナトリウムを添加したミネラル培地を用い、水素+二酸化炭素 (80 : 20, 2atm) を基質として培養を行った。移植は 10ml のミネラル培地を分注したねじ口付き耐圧試験管に、分離菌株の培養液 1ml を接種して行った。気相は常に窒素ガスで置換して操作し、ブチルゴム栓とポリカーボネート製のキャップで密閉した。その後気相を水素+二酸化炭素 (80 : 20, 2atm) で置換し 30℃、暗所で静置した。TCD ガスクロマトグラフを用いて気相を分析することで、基質の消費とメタンの生成を観察した。

各菌株の純粋性は 20mM 硫酸塩+20mM 乳酸塩、0.2%ペプトン+0.1%グルコース、0.1%酵母エキスを添加した条件で分離菌株の培養を行い、増殖の有無で判定した。169 菌株および FR-3 菌株は増殖因子として酢酸を必要としなかったため、純粋分離後の培養に酢酸を含まない培地を使用した。

6-3. 形態的特徴の観察

6-3-1. 形態および運動性の観察

169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株についてミネラル培地にて培養した細胞を採取し、落射蛍光装置 (OLYMPUS, BL-FLA) を備えた位相差顕微鏡 (OLYMPUS, MX50) で細胞形態および運動性を観察した。

6-3-2. 繊毛および鞭毛の観察

169 菌株の細胞をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で微細構造の観察を行った。

3 日間培養した 169 菌株の細胞を遠心分離 (7,000rpm、10 分間、4℃) して集菌し、上清を除いて滅菌脱イオン水を加え、再懸濁して洗浄し、培地成分を除いた。再度同様の洗浄を行った後に、滅菌脱イオン水で適宜希釈した。

観察のために細胞を載せるメッシュには、使用直前に親水化処理した銅メッシュ (直径 3mm の円形、フォルムパール膜を張り、カーボン蒸着で補強) を用いた。カーボンの蒸着

面に細胞懸濁液を 1 滴載せ、乾燥を防ぐためシャーレの中で 10 分ほど静置し細胞をメッシュに吸着させた。染色液として 0.5%リンタングステン酸を直接 1 滴載せ、針先で液を混合して 1 分ほど静置した。ろ紙で余分な水分を除き、40°Cのデシケータで 10 分間乾燥した後に透過型電子顕微鏡 (JEOL-JEM2000EX、日本電子、80kV) で観察を行った。

最適な染色条件を決定するため、2.5%グルタルアルデヒド (以下 GA) 固定の有無、メッシュに試料を載せる方法と試料にメッシュを載せる方法、界面活性剤 (0.3%ドライウェル) を含むリンタングステン酸で染色する方法を試験した。培養の時期によっても繊毛の数などが異なる可能性を考慮し、10 日間培養した細胞についても同様にして観察を行った。

6-3-3. 超薄切片の観察

6-3-2 と同様に、169 菌株の培養液を遠心分離により集菌し、1ml の Kellenberger 緩衝液 (表 2-7) に懸濁して洗浄した後に、再度集菌し上清を除いた。細胞ペレットの 5~6 倍から 10 倍程度の固定液を入れて懸濁し、4°Cで 1 昼夜固定した。集菌した固定後の細胞に Kellenberger 緩衝液を加えて懸濁、20 分放置を 3 回繰り返した。集菌して上清を除き、Kellenberger 緩衝液を約 600 μ l 加え、4°C、60~90 分固定した。Kellenberger 緩衝液で 3 回洗浄し、その後脱イオン水で 2 回洗浄した。約 1%の酢酸ウランを含む脱イオン水に 2 時間浸した後に、脱イオン水で 1~2 回洗浄して集菌した。

2%寒天溶液を融解後約 45°Cに保持し、集菌ペレットに 30 μ l 加えて保温しながら攪拌し、スライドガラス上に全量滴下して固め、カミソリで約 1mm³または約 1×1×5mm の角柱に切り出した。切り出した寒天片を常温で 50, 70, 90, 95%エタノールに 1 時間ずつ漬けた。100%エタノールに 30 分、2 回漬け、100%エタノールを交換した。以下、漬けるときは 4°Cで漬けた。別の容器に入れ替え、100%エタノール:プロピレンオキシド (以下 P.O.) =1:1 に 1 時間漬けた。上清を除き、P.O.に 1 時間漬け、上澄みを 3 分の 2 ほど捨てて液量を減らした。

P.O.: SPURR 樹脂=3:1, 1:1, 1:3 に 60 分ずつ漬け、さらに SPURR 樹脂を足した (P.O.: SPURR 樹脂=1:5 程度)。デシケータ内に一晩放置してプロピレンオキシドを揮発させ、SPURR 樹脂だけを残した。カプセルに試料と SUPRR 樹脂を入れ、40°Cで 2 時間、さらに 70°Cで 18 時間置いて硬化させた。

実体顕微鏡で観察しながら両刃のカミソリの刃で余分な部分をトリミングし、試料を露出させた。ウルトラマイクロトーム (LKB2188 Ultratome Nova、LKB 社製) で調製した超薄切片をクエン酸鉛^{*}で 10 分染色、6%酢酸ウランで 30 分染色し、デシケータに保存した。試料はネガティブ染色と同様に透過型電子顕微鏡で観察した。

^{*}クエン酸鉛は、沈殿の生成を防ぐためシャーレ内に置いた NaOH の粒で二酸化炭素を除いた。

表 2-6. 酢酸ペロナール緩衝液 (Michaelis 緩衝液)

Na-ペロナール	2.94g
Na-アセテート	1.94g
NaCl	3.40g
脱イオン水	100ml

(Kellenberger et al., 1958)

表 2-7. Kellenberger 緩衝液

酢酸ペロナール緩衝液	5.0ml
0.1M HCl	7.0ml
脱イオン水	13.0ml
1M-CaCl ₂ *	0.25ml
HCl で pH6~6.2 に調整	25ml

(Kellenberger et al., 1958)

*固定液 (25%グルタルアルデヒドを緩衝液で 10 倍希釈)

2%オスミウム酸を等量程度加えて終濃度 1%オスミウム酸とした。

表 2-8. SPURR 樹脂組成

ERL	0.5g
DER	0.3g
NSA	0.13g
S-1	0.2g

*SPURR 樹脂/Spurr 樹脂低粘度包埋キット (Polyscience 社)

SPURR 樹脂は上記の比率で試薬を混合し、3 回ほど減圧して脱気し、パラフィルムを巻いて 4°C に保存した。

6-4. 生理・生化学・形態学的試験

6-4-1. グラム染色

各菌株の培養液を 1ml 採取し、遠心分離により集菌した後に適当な細胞密度になるように滅菌蒸留水を加え、再懸濁した。この細胞懸濁液をスライドガラス上に 5~10 μ l 滴下し、白金耳で薄く広げて風乾した。この試料を B&M 法(Bartholomew & Mittwer, 1952)を用いてグラム染色した。

メタノールを満載し、30~60 秒固定後、水気をよく切ったのちに 1%クリスタル紫を静かに満載し、直ちに 5%NaHCO₃ を 5~6 滴滴下し、30 秒後緩やかな流水で丁寧に水洗した。次に 2%ヨウ素液を満載し、30 秒作用させ、丁寧に水洗した。次に試料が乾燥する前にアセトン・エタノール等量混合液で 5 秒間脱色し、直ちに水洗した。対比染色としてパイフェル液を満載し、5 秒間ほど染色後水洗し、風乾した。グラム染色の標準菌株として *Escherichia coli* JM109 株、*Lactobacillus casei* シロタ株を用いて比較した。

6-4-2. コロニー形態

169 菌株についてロールチューブ法またはアガーシェイク法を行い、コロニーの形態観察を行った。ロールチューブ法は 169 菌株の分離と同様に行った。アガーシェイク法は寒天の終濃度を 0.9%とし、ロールチューブを作製せず垂直に立てて寒天を固化させた他はロールチューブと同様に操作した。

6-4-3. 増殖因子試験

169 菌株の増殖に対するビタミンの要求性および増殖促進・抑制にかかわる因子について試験した。ビタミンの要求性はビタミンを含まない培地に繰り返し移植することで判定した。また、増殖促進・抑制因子については 0.1%グルコース、2mM 酢酸ナトリウム、0.1%トリプトン、0.1%ポリペプトン、0.1%カザミノ酸、0.025%システイン塩酸塩、0.1%トリプチケースペプトン、0.1%酵母エキス、20mM 蟻酸をそれぞれ培地に添加し、10 日間培養後培地に何も添加しないコントロールとメタン生成を比較した。

6-4-4. 抗生物質の増殖に対する影響

169 菌株の増殖に対する抗生物質の影響を試験した。バンコマイシン塩酸塩、ベンジルペニシリンカリウム、ナリジキシン酸、ストレプトマイシン硫酸塩、アンピシリンナトリウム、ネオマイシン三硫酸塩水和物、バシトラシン、クロラムフェニコールを 0.20 μ m 孔のフィルター (Sartorius, Minisart RC 15) で濾過滅菌し、終濃度 100, 500, 1000, 2000 μ g/ml で添加した培地に移植を行った。40°Cで培養して比増殖速度を測定し、抗生物質を含まないコントロールと比較して抗生物質の増殖に対する影響を調べた。培養は 2 連で行った。

6-5. 増殖への温度、pH、塩濃度の影響

ミネラル培地 10ml に分離菌株の培養液 1ml を接種して培養し、培養が定常期に達したものを前培養液として使用した。各試験に応じて調製した培地 10ml に前培養液 1ml を接種して本培養とした。分離菌株の増殖は、目視により増殖の有無を確認するか、デジタル比色計 (mini photo 10, 三紳工業) を用い 420nm の光学密度 (O.D.) を経時的に測定することにより追跡した。O.D. の測定結果から増殖曲線を作成し、比増殖速度を算出した。

169 菌株の培養温度を 4°C、15°C、20°C、30°C、37°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C に設定し、分離菌株の増殖速度に対する温度の影響および増殖可能温度範囲を調べた。培地の NaCl 濃度を 0~15% (w/v) の範囲で変えて培養し、増殖速度への影響および増殖可能濃度範囲を試験した。pH5 付近から 10 付近の間で異なる pH 値の培地で培養し、増殖速度への影響および増殖可能 pH 範囲を試験した。pH の異なる培地は NaHCO₃ 濃度または Na₂CO₃ 濃度を低 pH 側は 30mM、高 pH 側は 100mM に設定し、5%Na₂CO₃ または 2N HCl を用いて最終的な pH に調整して使用した。最適 pH 試験において、培養前と培養終了後に培養液の pH を pH メーター (HORIBA, pH METER M-11) で測定した。

6-6. 基質利用性試験

169 菌株の基質利用性はミネラル培地を用いて試験した。10ml の培地に試験基質を終濃度が 20mM になるように添加し、前培養液を 1ml 添加した。メタノール、蟻酸塩、酢酸塩、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、3-メチル-1-ブタノール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、シクロペンタノールの保存溶液はブチルゴム栓で密閉してオートクレーブ滅菌し、ピルビン酸はオートクレーブ滅菌した 0.20 μm 孔のメンブレンフィルター (Minisart RC15, Sartorius) を用いてろ過滅菌した。水素+二酸化炭素 (80:20, v/v) を基質とした場合は試験管内の気相を 2atm の水素+二酸化炭素で置換した。

6-7. DNA G+C 含量

169 菌株のゲノム DNA はシュードムレインエンドイソペプチダーゼ (Pei) で細胞を処理する方法を用いて抽出した (Nakamura *et al.*, 2006)。Methanothermobacter wolfei 由来の Pei は大腸菌で発現した組み換え酵素 (rPeiW) として、岐阜大学の中村浩平助教授にご恵与いただいた。rPeiW は 0.5mg/ml 濃度で H バッファー (50mM HEPES, pH7.0, 5mM ジチオスレイトール、20.8mM Na₂S) に溶解した状態で使用した。169 菌株の細胞は対数期後期に 7000rpm; 10 分 4°C で遠心分離して集菌し、H バッファーに最懸濁して洗浄した。この洗浄操作を再度行い、細胞密度がおおよそ 10¹⁰ cells/ml になるように H バッファーに最懸濁した。窒素ガス気流下で 5ml 容量のバイアル瓶に細胞懸濁液を 1ml 移し、ブチルゴム栓

とアルミニウムキャップで密閉した。バイアル瓶はウォーターバスで前後に振盪 (150rpm) しながら 70°C で 10 分間予熱し、0.1ml の rPeiW 溶液を添加し、さらに 70°C で 1 時間振とうしながら保温した。ゲノム DNA はフェノール/クロロホルム抽出に続いて RNaseA 処理を行い、さらにフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。10 μ l の精製 DNA (1 μ g/ μ l) に 2U/ml の Nuclease P1(ヤマサ醤油)を 10 μ l 添加して加水分解し、モノヌクレオチドを得た。G+C 含量は島津 LC-10ADVP システムを用いた逆相 HPLC により測定した。モノヌクレオチドの分離は 40°C、流速 1.5ml/min の 10mM リン酸バッファー (pH3.5) を移動相として YMC-Pack ODS-AQ カラム (150 \times 6.0 mm id, 5 μ m particle size, 12nm pore; YMC) を用いて分離した。各デオキシリボヌクレオチドは 270nm の UV で測定し、標準液としてデオキシリボヌクレオチドの等モル混合液を使用した。

6-8. 16S rRNA 遺伝子配列の決定および系統学的解析

6-8-1. 古細菌 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株の培養液を 1ml 採取し、10,000rpm, 5 分間遠心した。培養液の上清をデカントで大部分除き、さらに 10,000rpm, 5 分間遠心した後に培養液の上清を 30 μ l ほど残して除いた。ボルテックスで再懸濁した細胞懸濁液 1 μ l を鋳型として以下の組成の PCR 反応液を調製し PCR 反応を行った。1.25 U の Taq DNA ポリメラーゼ(HotStarTaq; Qiagen), 5 μ l の 10 \times PCR buffer (Qiagen)[Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, pH8.7(20°C)], 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M のプライマーペアを混合し、滅菌蒸留水で容量を 50 μ l にした。PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社)を用いて以下の条件で行った: 95 °C, 15 min のポリメラーゼの活性化、(95°C 1分間の熱変性、55°C1分間のアニーリング、72°C90秒間の伸長反応) \times 35 サイクル、72 °C で 6 分間の最終伸長反応。アニーリング温度およびサイクル数は使用するプライマーまたは実験により適宜変更した。プライマーは古細菌 16S rRNA 遺伝子に特異的な ArckF (5'-TTG ATC CTG SCG GAG GCY ACY GCT-3') と ArckR (5'-CCA GCC GCA GRT TCC CCT ACG GC-3') (Oyaizu, 1999)を用いて PCR 増幅を行った。

6-8-2. PCR 産物の確認および精製

PCR 産物の確認はアガロースゲル電気泳動で行った。アガロースゲルは 1 \times TAE バッファー[20mM Tris-HCl, 20mM acetic acid, 1mM EDTA(pH8.0)]にアガロース (TAKARA H14, タカラバイオ) を 1.5%(w/v)添加して調製した。PCR 産物 5 μ l に 6 \times ローディングダイ [0.2%プロモフェノールブルー、50%グリセロール、10mM EDTA(pH8.0)]1 μ l を混合し、HindIII λ DNA マーカーとともに電気泳動した。電気泳動終了後、5 分間エチジウムブロマイド溶液に浸して DNA を染色し、トランスイルミネーターでゲルに UV を照射し、蛍光バンドを確認した。PCR 産物は UltraCleanTM PCR clean-up DNA Purification kit (MO BIO

Laboratories, Inc.) を用いてキットの説明書に従って精製した。

6-8-3.16S rRNA 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

4-3 と同様にしてクローニング及び塩基配列の決定を行った。配列決定に用いたプライマーについては表 2-9 に示した。系統樹は外群として *Methanococcus aeolicus* の 16S rRNA 遺伝子配列を用い、4-3 に従って作成した。

表 2-9. 古細菌 16S rRNA 遺伝子配列決定に使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	参考文献
M13/pUC19 reverse sequencing primer	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	
0348aF	TCCAGGCCCTACGGG	1
1100aR	TGGGTCTCGCTCGTTG	1
A109F	ACKGCTCAGTAACACGT	2
Arch-907F	AAACTTAAAGGAATTGGCGG	3
1392R	ACGGGCGGTGTGTRC	1
Bact-520F	GTGCCAGCAGCCGCGG	4
PARCH-519R	TTACCGCGGCKGCTG	5
T7 promoter sequencing primer	TAATACGACTCACTATAGGG	

1:(Achenbach & Woese, 1995), 2:(Grosskopf *et al.*, 1998), 3:(Litchfield *et al.*, 2006), 4:(Takami *et al.*, 1997), 5:(Ovreas *et al.*, 1997)

6-9. Methyl CoM reductase subunit A 遺伝子(*mcrA*)の塩基配列決定および系統解析

6-9-1. Methyl CoM reductase subunit A 遺伝子(*mcrA*)の PCR 増幅

5-1 に記載した方法に従って各菌株の細胞懸濁液を鋳型としてダイレクト PCR を行った。プライマーはメタン生成古細菌の *mcrA* 遺伝子に特異的な *mcrA*-f (5'-TTG ATC CTG SCG GAG GCY ACY GCT-3') と *mcrA*-r (5'-CCA GCC GCA GRT TCC CCT ACG GC-3') (Luton *et al.*, 2002)を用いて PCR 増幅を行った。6-2 に記載した方法に従って PCR 産物の確認および精製を行った。

6-9-2. *mcrA* 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

5-3 に記載した方法に従って、*mcrA* 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定を行った。クローン化した DNA の全配列を決定し、近縁なメタン生成古細菌株の *mcrA* 遺伝子配列との配列相同性マトリックス及び系統樹を作成した。系統樹は推定 McrA アミノ酸配列に基づき ClustalW(Thompson *et al.*, 1994)でアラインメントを行い、MEGA4.0(Tamura *et al.*, 2007a)を用いて近隣結合法により作成した。外群として *Methanopyrus kandleri* DSM6324^T の *mcrA* 遺伝子配列を用いた。

6-10. 塩基配列の受付番号

本研究で分離した 169 菌株の 16S rRNA 遺伝子配列および *mcrA* 遺伝子配列は、受付番号 AB368917 および AB551869 で、GenBank/EMBL/DDBJ データベースに登録した。

7. プロピオン酸酸化細菌の分離の試み

7-1. 材料および培養

上述した方法に従って集積培養液 C165-1 を移植し、集積培養液 C166-1 を得た。この集積培養液 C166-1 を分離源としてプロピオン酸酸化細菌の分離を試みた。分離操作には特に断らない限り基質として 20mM プロピオン酸ナトリウムを添加したミネラル培地を使用した。

7-2. 純粋性の評価

分離操作を行った培養液は上述した方法に従って気相および液相の分析を行うとともに、顕微鏡観察または PCR-DGGE により汚染細胞の有無を確認した。

7-3. 段階希釈法

接種源を段階希釈することで栄養共生プロピオン酸酸化細菌の純粋化を試みた。希釈は 0.03% システイン塩酸塩を含む滅菌水 9ml に対して接種源を 1ml 添加し、 10^1 希釈とした。同様に段階希釈を行い 10^7 希釈まで作製し、20mM プロピオン酸ナトリウムを添加した 169 菌株の前培養液 9ml にそれぞれの希釈液を 1ml ずつ接種して培養した。169 菌株の前培養は上述した方法に従って行った。

7-4. 加熱処理

集積培養液を 55,65,75,85°C でそれぞれ 30 分間加熱処理し、移植を行った。移植には通常通りのミネラル培地、前培養した 169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株の培養液をそれぞれ使用し、経時的に気相を分析しプロピオン酸の分解を観察した。

7-5. アガーシェイク法

集積培養液を接種源として上述した方法に従ってアガーシェイクを行った。ただし培地には予め前培養した *M. kanagiense* 169 菌株の培養液を使用し、基質として 20mM プロピオン酸ナトリウムを添加した。

7-6. ノーブルアガーを用いたアガーシェイク

集積培養液を接種源として上述した方法に従ってアガーシェイクを行った。ただし固化材としてノーブルアガー（終濃度 0.9%）を用い、培地には予め前培養した 169 菌株の培養液を使用した。基質として 20mM プロピオン酸ナトリウムを添加した。

7-7. 増殖促進因子の添加

栄養共生プロピオン酸酸化細菌の増殖因子となりうる物質を探索するため、増殖因子と

なる可能性のある物質を添加した培地を使用して集積培養液の移植を行った。増殖因子候補物質として終濃度 0.1%の酵母エキス、0.1%酵母エキス+カザミノ酸、0.05%ポリペプトン、10%培養上清(集積培養液の上清を 0.2 μm 孔フィルターで濾過滅菌したもの)、1mM FeCl_2 について試験した。

7-8. 単独で増殖可能な基質の探索

栄養共生プロピオン酸酸化細菌が単独で増殖可能な基質を探索するため、乳酸ナトリウム、フマル酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、エタノール、コハク酸ナトリウムを基質として添加した培地に集積培養液を移植した。各基質はそれぞれ終濃度 20mM になるように添加した。

7-9. モリブデン酸ナトリウムの添加

集積培養液において栄養共生プロピオン酸酸化細菌に次いで優占していた *Desulfomicrobium* 属細菌の増殖抑制を目的として、1~10mM の終濃度でモリブデン酸ナトリウムを添加した培地に集積培養液を移植した。

8. プロピオン酸集積培養液に生息する細菌の分離

8-1. 細菌の分離

プロピオン酸集積培養液を 75℃で 30 分間熱処理した培養液を接種源として集積培養液に存在する細菌の分離を行った。20mM リンゴ酸および 0.1%酵母エキスを基質として、培養温度 30℃でロールチューブ法(Hungate & Macy, 1973)を繰り返し、4 種類の純粋な培養物 (4F6B, 4F6E, 6E, 7A 菌株) を得た。

8-2. 分離菌株の培養

培地はミネラル培地を用い、温度試験以外の培養はすべて 30℃で行った。増殖に対する塩濃度の影響は、ミネラル培地を基本培地とし、NaCl 濃度を变化させた培地を使用して調べた。

また、通常の培養については、それぞれ 0.1%酵母エキスを添加したミネラル培地にて 20mM リンゴ酸ナトリウムを基質として培養を行った。移植は 10ml の新しい培地に 1ml の培養液を接種することで行った。

8-3. 形態的特徴の観察

各分離菌株の形態的特徴について、3. 顕微鏡観察に従って位相差顕微鏡を用いて観察した。

8-4. 生理学試験

生理学試験は好気培養試験および基質利用性試験を除き 4F6E 菌株のみ行った。

8-4-1. 生理学試験に使用した培養液と培地条件

生理学試験に使用する接種用培養液は 100ml のミネラル培地に 20mM リンゴ酸と 0.1%酵母エキスを添加した培地にて培養したものを用いた。

4F6E 菌株の温度試験と塩濃度試験はミネラル培地に 1.0%酵母エキスを添加したもの、基質利用性試験はミネラル培地に 0.2%酵母エキスを添加したものを基本培地として使用した。7A 菌株の基質利用性試験には 0.1%酵母エキスを添加した培地を基本培地として使用した。

8-4-2. 温度試験

基本培地に 20mM リンゴ酸を添加した培地に培養液を 1ml ずつ接種し、4℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃および 60℃で 2 週間から 4 週間培養した。増殖は目視及びデジタル比色計 (mini photo 10, 三紳工業) を用い 420nm の光学密度 (O.D.) を測定した。

8-4-3. 塩濃度試験

基本培地の塩濃度を 0%、0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% および 5.0% に調整し、20mM リンゴ酸を添加した培地に培養液を 1ml ずつ接種し 40°C で 2 週間培養した。増殖は目視及びデジタル比色計 (mini photo 10, 三紳工業) を用い 420nm の光学密度 (O.D.) を測定した。

8-4-4. 基質利用性試験

試験する各基質を添加した基本培地に、培養液を 10% (v/v) ずつ接種し、4F6E 菌株は 40°C で、4F6B、6E、7A 菌株は 30°C で 2 週間培養した。増殖は吸光度測定装置 (A₄₂₀) と目視で判定した。有機酸は 1M 溶液を調製し (リンゴ酸のみ 0.5M 溶液とした)、脱気、ガス置換の後オートクレーブ (121°C、15 分) したものを使用した。アミノ酸はねじ口試験管に終濃度 20mM となるように各アミノ酸を量りとり、ガス置換の後オートクレーブ (115°C、10 分) し、そこに基本培地を添加したものを使用した。カザミノ酸は 1% 溶液を調製し、脱気、ガス置換の後オートクレーブ (121°C、15 分) したものを使用し終濃度 0.2% になるように基本培地に添加した。4F6B 菌株および 6E 菌株について試験した基質を表 2-10 に、4F6E 菌株について試験した基質を表 2-11 に、7A 菌株について試験した基質を表 2-12 に示す。7A 菌株の基質利用性試験では、発酵性基質としての利用性に加えて、硫酸ナトリウム (終濃度 20mM) を電子受容体とした場合の電子供与体としての基質利用性も試験した。また、共生的基質利用性は表 2-12 に示した基質のうち、H₂+CO₂ および蟻酸を除く基質について、硫酸塩を除いた培地に共生パートナーとして *M. formicicum* FR-3 菌株の培養液を 10% (v/v) 添加して試験した。

表 2-10. 4F6B,6E 菌株の基質利用性試験に用いた基質

有機酸	
蟻酸	リンゴ酸
酢酸	ピルビン酸
プロピオン酸	乳酸
酪酸	クエン酸
コハク酸	2-オキシグルタル酸
フマル酸	

表 2-11. 4F6E 菌株の基質利用性試験に用いた基質

アミノ酸	有機酸
L-アラニン	ピルビン酸
L-システイン	フマル酸
L-アスパラギン酸	コハク酸
L-グルタミン酸	リンゴ酸
L-フェニルアラニン	プロピオン酸
グリシン	クエン酸
L-ヒスチジン	酢酸
L-イソロイシン	乳酸
L-リシン	酪酸
L-ロイシン	2-オキシグルタル酸
L-メチオニン	蟻酸
L-アスパラギン-水和物	
L-プロリン	
L-グルタミン	
L-アルギニン	
L-セリン	
L-トレオニン	
L-バリン	
L-トリプトファン	
L-チロシン	

基質は終濃度 20mM で試験し、カザミノ酸（終濃度 0.2%）も試験した。

L-システイン、L-ヒスチジン、L-リシンは塩酸塩を使用し、

有機酸はナトリウム塩を使用した。

表 2-12. 7A 菌株の基質利用性試験に用いた基質

蟻酸	フマル酸
酢酸	ピルビン酸
プロピオン酸	乳酸
酪酸	エタノール
コハク酸	H ₂ +CO ₂
リンゴ酸	

H₂+CO₂は 2atm で試験し、それ以外は終濃度 20mM で試験した。

有機酸はナトリウム塩を使用した。

8-4-5. 電子受容体試験

7A 菌株の電子受容体の利用性について試験した。電子供与体基質として 20mM 乳酸ナトリウムを添加し、電子受容体として亜硫酸ナトリウム (3mM, 20mM)、チオ硫酸ナトリウム (20mM)、硫酸ナトリウム (20mM)、硝酸ナトリウム (20mM)、フマル酸ナトリウム (20mM)、DMSO (20mM) をそれぞれ添加した。培養 14 日後に OD₄₂₀ の値を測定し電子受容体を添加しないネガティブコントロールと比較して増殖の有無を確認した。

8-4-6. 好気培養試験

4F6B 菌株、4F6E 菌株、6E 菌株が通性嫌気性細菌であるかを確認するため好気培養を行った。培地はミネラル培地 (Na₂S、レサズリンを除く) に 0.1%酵母エキスと 20mM リンゴ酸を添加した培地を使用し、好気条件にて 30°C で培養した。増殖の有無は目視にて判定した。

8-5. 系統学的解析

4F6B 菌株、4F6E 菌株、6E 菌株の 16S rRNA 遺伝子全塩基配列の決定のため、プライマーに S-D-Bact-0011-a-S-17 と S-D-Bact-1492-b-A-19 を用いて増幅 PCR を行った。PCR 産物の精製の後、S-D-Bact-0011-a-S-17 と S-D-Bact-1492-b-A-19 に加え、Bact350R、Bact520F、Bact1100F、Bact1392R (表 2-4) をプライマーに用いてシーケンス PCR を行い、エタノール沈殿の後、シーケンシングを行った。PCR 産物のシーケンシングは BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンス反応を行い、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) で泳動・解析を行った。得られた塩基配列は GenBank/EMBL/DDBJ 遺伝子データベースを BLAST プログラム (Altschul *et al.*, 1990) により検索を行った。また、各菌株で得られた 16S rRNA 遺伝子全配列を用いて既知細菌株 16S rRNA 遺伝子配列との相同性比較を行い、近縁な細菌株 16S rRNA 遺伝子配列との系統樹を作成した。系統樹の作成には MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007b) に内包されるプログラムを使用した。

8-6. DNA G+C 含量

4F6E 菌株のゲノム DNA は以下の方法で調製した。培養液を採取し、10000rpm、10 分間遠心して集菌した。培養上清を捨て、集菌した細胞に 0.3ml の TESS buffer (25mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 50mM NaCl, 25% Sucrose) を加えて懸濁後、リゾチーム溶液 0.3ml (10mg/ml in 50/20 TE buffer [50mM Tris-HCl, 20mM EDTA, pH7.5]) を加えゆっくりと攪拌し、37°C で 30 分間静置した。10% SDS 溶液 30 μ l とプロテイナーゼ K 溶液 (10mg/ml in 50mM Tris-HCl [pH7.2]) を 20 μ l 加え、50°C、3 時間静置した。ゲノム DNA はフェノール/クロロホルム抽出に続いて RNaseA 処理を行い、

第4節 結果

1. プロピオン酸酸化集積培養液の分析

1-1. 気相および液相の経時的変化

集積培養液のメタン、水素、プロピオン酸、酢酸の経時的変化を図2-1に示す。集積培養液では、プロピオン酸の消費に伴いメタンの生成が観察され、初濃度 12.9mM のプロピオン酸から生成したメタンの最終濃度は 44.2%であった。酢酸は培養 27 日後に最大値の 0.5mM、水素は培養 34 日後に最大値の 4ppm に達したが、いずれもその後低下し低濃度に保たれた。

1-2. プロピオン酸集積培養液の顕微鏡観察

集積培養液に含まれる細胞を位相差顕微鏡・落射蛍光顕微鏡で観察した。図2-2は集積培養液で観察された細胞の集合体である。幅約 1 μ m×長さ 2~4 μ m の直線状の桿状細胞と 0.5 μ m×2~5 μ m の直線状からやや湾曲した桿状細胞が最も多く観察され、次いで矢印で示した約 1.0~1.5 μ m×2.5~3 μ m の米粒型の桿状細胞が多く観察された。図2-2Bは図2-2Aと同視野の蛍光顕微鏡写真で、Aで見られた2種類の桿状細胞の両方で F₄₂₀ の自家蛍光が観察されたが、米粒型の桿状細胞では全く蛍光は見られなかった。

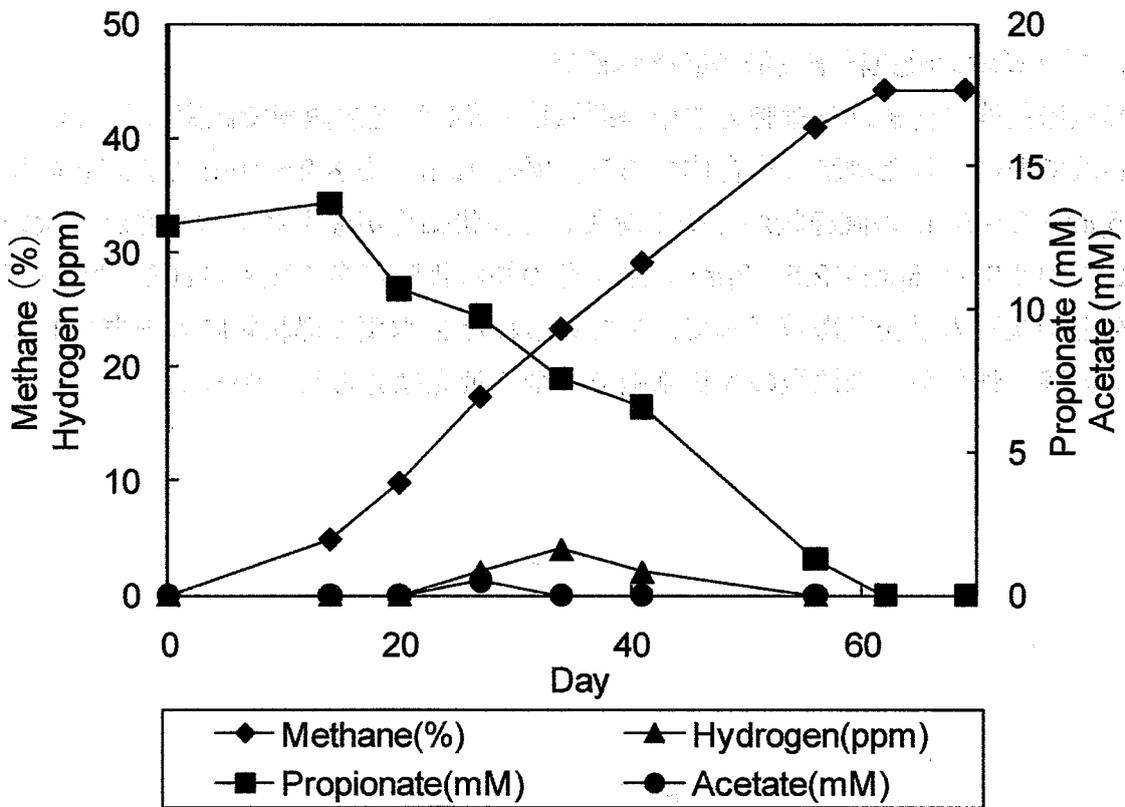


図 2-1. 集積培養液におけるメタン、水素、プロピオン酸、酢酸の経時的変化

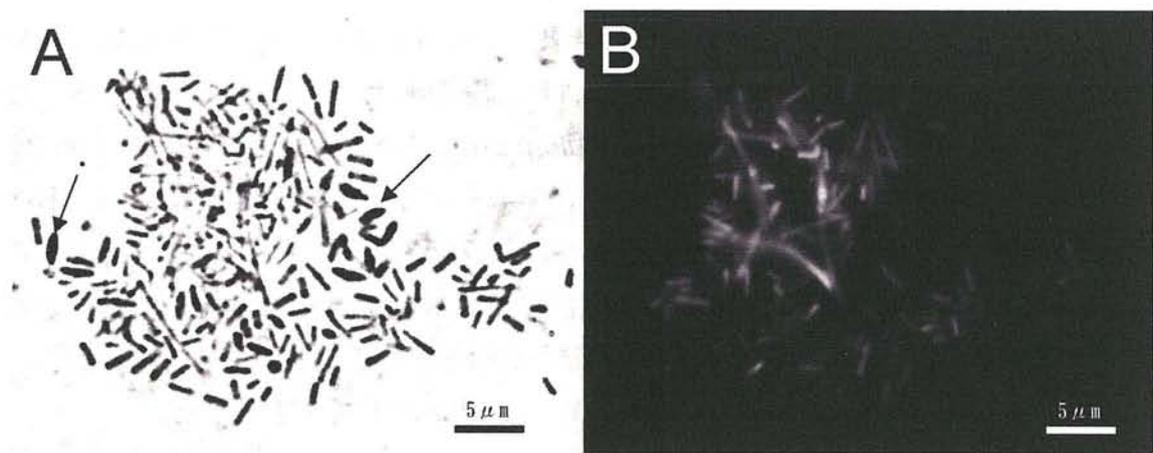


図 2-2. プロピオン酸集積培養液で観察された細胞の集合塊 (×1000 倍)
A:明視野観察、B:蛍光観察。米粒型の桿状細胞を矢印で示した。

1-3. 16S rRNA 遺伝子配列に基づくプロピオン酸酸化細菌の推定

培養液 C165-1 からクローン C165-1-1(1490bp)が得られた。BLAST 検索の結果から C165-1-1 と高い相同性を持つ既知の配列について表 2-12 に示した。クローン C165-1-1 はプロピオン酸酸化細菌として知られる *Pelotomaculum propionicum* の 16S rRNA 遺伝子配列に対して最も高い 95.2%の相同性を示したが、*Cryptanaerobacter phenolicus* に対しても高い相同性を示した (94.7%)。

C165-1-1 と近縁な細菌株 16S rRNA 遺伝子配列に基づき作成した系統樹を図 2-3 に示した。系統樹においても C165-1-1 は *P. propionicum* および *C. phenolicus* と近縁であることが支持された。

2. プロピオン酸集積培養液における細菌群集の DGGE 解析

2-1. 集積培養液 C165-1, C166-1 の DGGE 解析

プロピオン酸集積培養液 C165-1 および C166-1 から移植して得られた集積培養液 C166-1 について PCR-DGGE 解析を行った結果、総計 12 本のバンドのうち蛍光強度の高いバンドが 3 本検出された (図 2-4, B-7,8,11)。塩基配列に基づき、バンド B-7 は栄養共生プロピオン酸酸化細菌である *Pelotomaculum propionicum* (AB154390)に 95.2%、バンド B-8 は *Desulfomicrobium aestuarii* (AM419442)に 100%、バンド B-11 は Sphingobacteriaceae 科 *Flavobacterium mizutaii* (X67853)に 92.6%の相同性を示した (表 2-14)。バンド B-7 はクローン C165-1-1 と移動度が等しかった。蛍光強度の低いバンドも複数検出されたが、バンド B-10 以外は塩基配列を決定することができなかった。バンド B-10 は *Sedimentibacter saalensis* (AJ404680)に 93.3%の相同性を示した。

2-2. 集積培養液の経時的な気相、液相の測定および DGGE 解析

集積培養液 C166-1 について培養 0,14,28,42,56,70,98 日後に TCD および FID ガスクロマトグラフを用いた分析と DGGE 解析を行った。DGGE 解析を行った結果、培養期間を通して集積培養液ではバンド B-7 の *Pelotomaculum* 属細菌と、バンド B-8 の *Desulfomicrobium* 属細菌が優占していることが示された (図 2-5)。プロピオン酸の消費とともにメタンが蓄積され、メタンの増加に伴い *Pelotomaculum* 属細菌および *Desulfomicrobium* 属細菌のバンドの蛍光強度が増加する傾向が観察された。

図 2-6 に集積培養液 C166-1 の古細菌を標的とした DGGE 解析結果を示した。169 菌株、FR-3 菌株、SR-20 菌株と *Methanosaeta* 属菌株に近縁なバンドをそれぞれ別々に PCR 後混合したサンプルを古細菌マーカーとして C166-1 の DGGE パターンと比較した (レーン 1, 15)。経時的解析の結果、集積培養液では *Methanospirillum* sp. SR-20 菌株のバンド A-3 および *Methanosaeta* 属に近縁なバンド A-4 が優占しており、培養を通してバンドパターンは変化しなかった。レーン 14 の接種源では *Methanospirillum* sp. SR-20 菌株のバン

ド A-3 の強度はごく低かったが、移植後培養とともにバンド強度が増加する傾向が観察された。対照的に *Methanosaeta* 属に近縁なバンド A-4 は常に一定の強度で存在していた。バンド A-4 の配列は *Methanosaeta harundinacea*(AY970347)に 99.1%(328/331)の相同性を示した

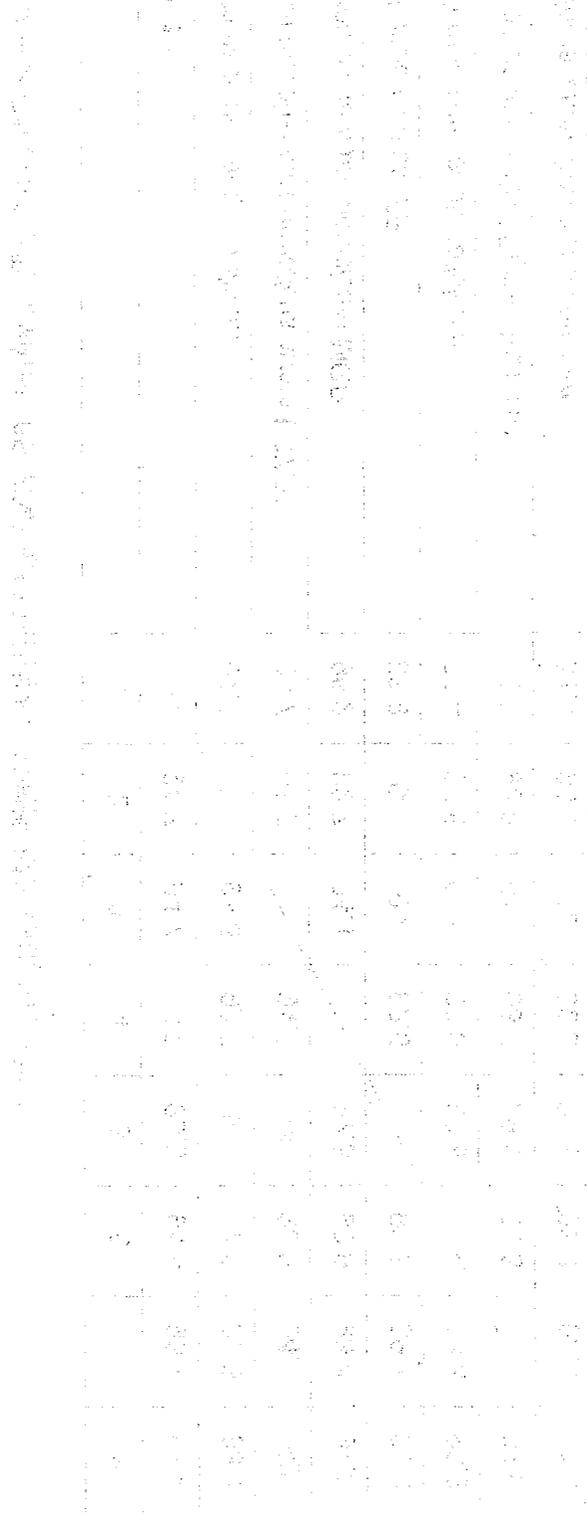


表 2-13. クローン C165-1-1 と既知細菌株 16S rRNA 遺伝子配列との相同性比較 (値は%を示す)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 C165-1-1	/	94.7	94.7	95.2	93.9	94.4	93.7	91.4
2 <i>Pelotomaculum terephthalicum</i>	94.7	/	93.5	92.7	94	97.5	93.8	93.1
3 <i>Cryptanaerobacter phenolicus</i> strain LR7.2 ^T	94.7	93.5	/	94.1	94	93.9	94.4	92
4 <i>Pelotomaculum propionicicum</i> MGP ^T	95.2	92.7	94.1	/	92.5	92.9	93.4	92.5
5 <i>Pelotomaculum</i> sp. FP	93.9	94	94	92.5	/	93.8	99.1	91.3
6 <i>Pelotomaculum isophthalicum</i>	94.4	97.5	93.9	92.9	93.8	/	93.6	93.8
7 <i>Pelotomaculum schinkii</i> type strain HH ^T	93.7	93.8	94.4	93.4	99.1	93.6	/	92.5
8 <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	91.4	93.1	92	92.5	91.3	93.8	92.5	/

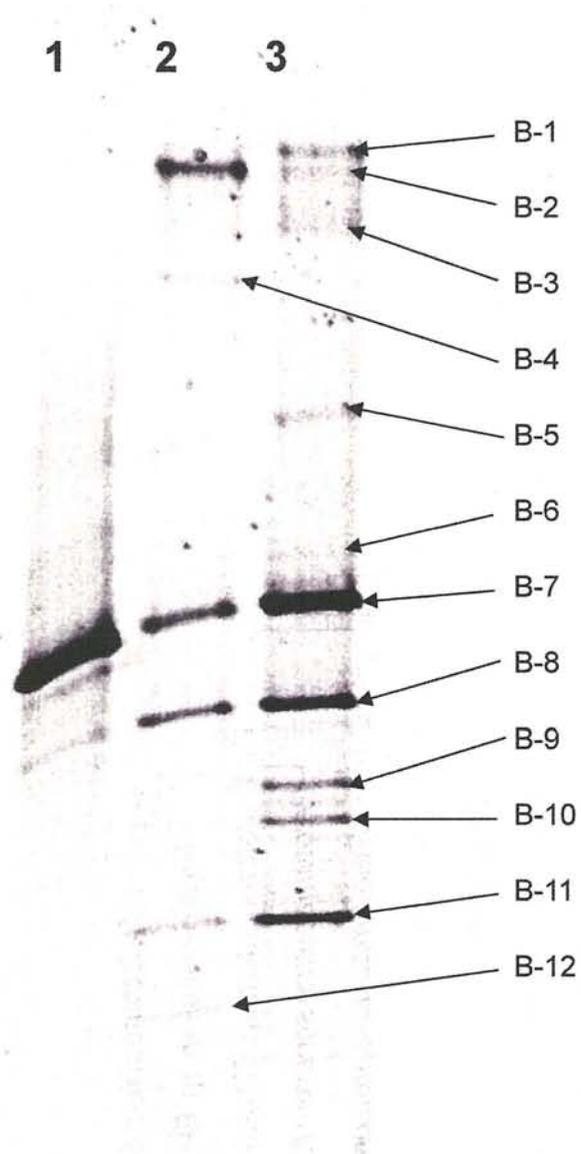


図 2-4. プロピオン酸集積培養液の DGGE 解析

レーン 1 : クローン C165-1-1, 2 : 集積培養液 C165-1, 3 : 集積培養液 C166-1

B-7(C165-1-1):*Pelotomaculum propionicicum* (AB154390) に 95.2%, B-8:*Desulfomicrobium aestuarii* (AM419442) に 100%, B-10:*Sedimentibacter saalensis* (AJ404680) に 93.3%, B-11:Sphingobacteriaceae 科 *Flavobacterium mizutaii* (X67853) に 92.6%の相同性を示した。



表 2-14. DGGE バンドの配列に近縁な生物名および相同性

バンド	生物名	相同性(%)*
B-7	<i>Pelotomaculum propionicicum</i> (AB154390)	95.2
B-8	<i>Desulfomicrobium aestuarii</i> (AM419442)	100
B-10	<i>Sedimentibacter saalensis</i> (AJ404680)	93.3
B-11	<i>Flavobacterium mizutaii</i> (X67853)	92.6

*16S rRNA 遺伝子配列に対する相同性を示す

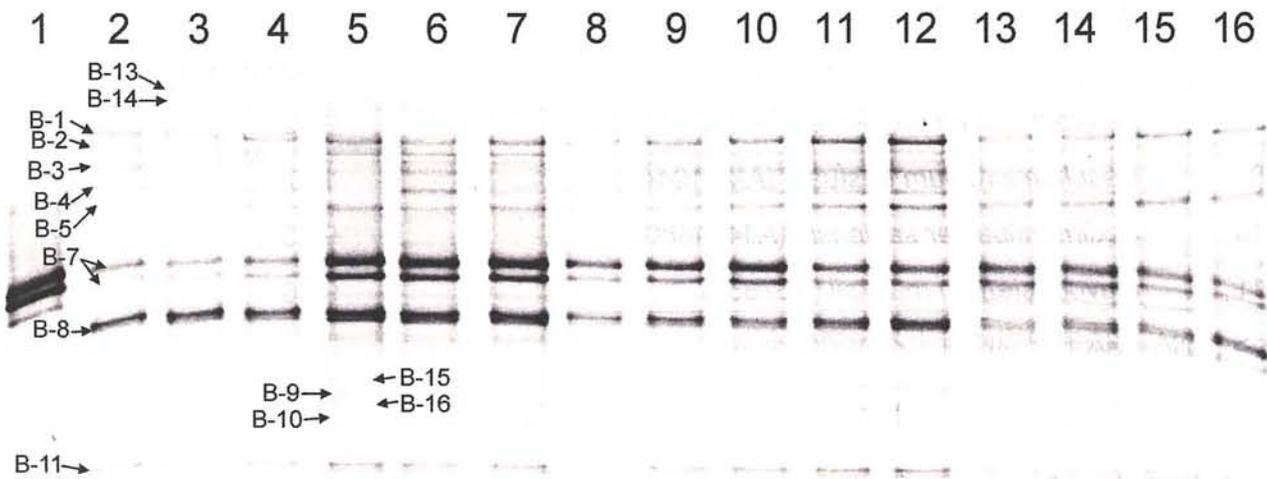
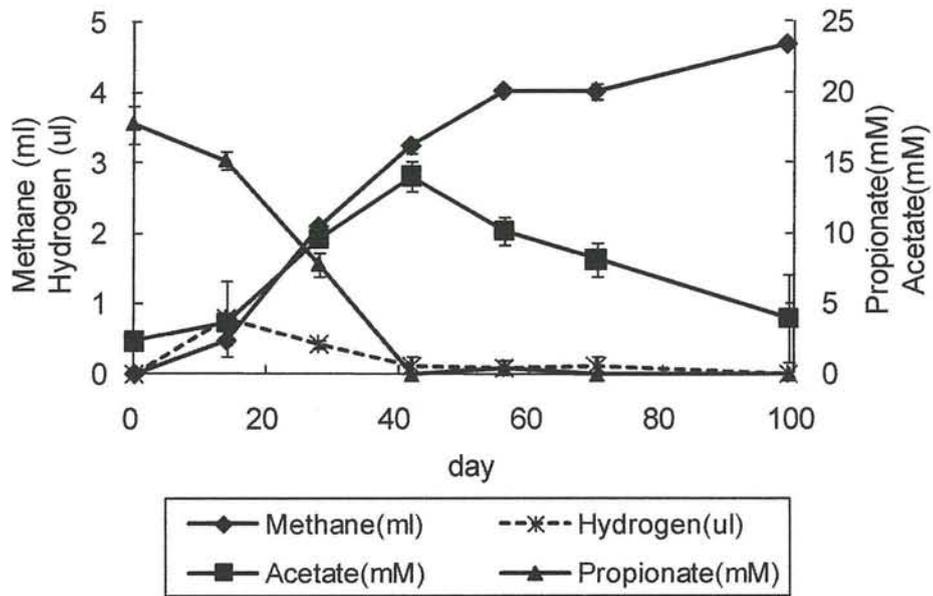


図2-5. 集積培養液 C166-1 の経時的解析

レーン 1: クローン C165-1-1, 2: 集積培養液 C166-1(接種源), 3~4: 培養 0 日目, 5~6: 14 日, 7~8: 培養 28 日目, 9~10: 培養 42 日目, 11~12: 培養 56 日目, 13~14: 培養 84 日目, 15~16: 培養 98 日目

バンド B-1~11 は図 2-4 と対応しており、B-13~16 は新たに検出されたバンドを示す。

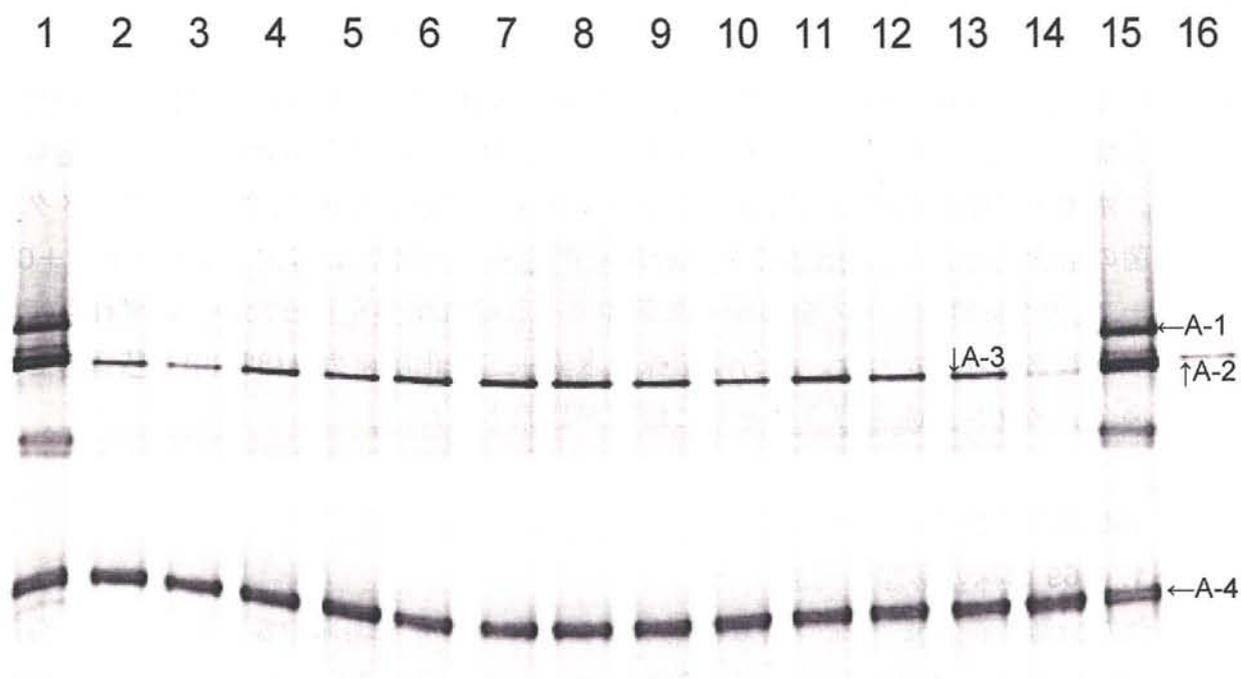


図2-6. 集積培養液 C166-1 の経時的解析 (古細菌 DGGE)

レーン 1, 15 : 169 菌株, FR-3 菌株, SR-20 菌株, *Methanosaeta* sp.混合マーカー,

2~3 : 培養 0 日目, 4~5 : 培養 14 日目,

6~7 : 培養 28 日目, 8~9 : 培養 42 日目,

10~11 : 培養 56 日目, 12~13 : 培養 70 日目,

14 : 集積培養液 C166-1(接種源), 16 : 169 菌株

バンド A-1 : *Methanobacterium formicicum* FR-3 菌株, A-2 : 169 菌株,

A-3 : *Methanospirillum hungatei* SR-20 菌株, A-4 : *Methanosaeta harundinacea*(AY970347) に 99.1%

3. プロピオン酸集積培養液からの水素資化性メタン生成古細菌の純粹分離

水田土壌由来のプロピオン酸集積培養液からメタン生成古細菌 169 菌株、FR-3 菌株、および SR-20 菌株が分離された。分離源であるプロピオン酸集積培養液では、蛍光性の桿菌と非蛍光性の桿菌が混在した細胞の集合塊（～約 100 μm ）が顕微鏡下で多く観察された。観察された蛍光性の細胞の中でも優占していると考えられたのは直線状からやや湾曲した桿状の細胞で、運動性を持たず、形態的に *Methanobacterium* 属菌株に類似していた。また、集合塊を形成せず浮遊している、湾曲した蛍光性の桿菌で、運動性のある細胞も観察された。水素+二酸化炭素を基質としてロールチューブ分離を繰り返し、純粹なメタン生成古細菌の培養液を得た。分離菌株を 20mM 硫酸塩+20mM 乳酸塩、0.2%ペプトン+0.1%グルコース、0.1%酵母エキスを添加した条件でそれぞれ培養を行ったが、いずれも汚染細胞の増殖は観察されなかった。各分離菌株は水素+二酸化炭素ガス(80:20)を基質として培養した場合、メタン生成を行うとともに増殖が観察された。

3-1. 169 菌株の特徴

3-1-1. 169 菌株の形態的特徴

得られた分離菌株 169 菌株の顕微鏡観察及びメタン生成と増殖の観察を行った。分離菌株を位相差顕微鏡、落射蛍光顕微鏡により観察し、写真撮影を行った（図 2-7）。169 菌株は幅約 0.35～0.5 μm 、長さ約 1.6～5 μm の桿菌であり、連鎖して長さ 30 μm に達する細胞も観察された。細胞の形状は直線状からやや湾曲しており、細胞の両端は丸みを帯びていた。胞子を形成せず、運動性はなく、グラム染色性は不定であった。分離菌株の細胞は図に示したように、メタン生成古細菌に特有の F₄₂₀ の自家蛍光を有していた。

169 菌株の細胞は蒸留水および 2% SDS 水溶液に 90 分以上懸濁した場合でも溶解しなかった。

3-1-2. 電子顕微鏡による微細構造の観察

169 菌株について電子顕微鏡による微細構造の観察を行った。ネガティブ染色により、細胞の両末端付近には直径約 5nm の繊毛が最大 10 本程度観察されたが、鞭毛は観察されなかった（図 2-8a）。細胞の表面には斑紋状の模様が観察された（図 2-8b）。超薄切片の観察において 169 菌株はグラム陰性の真正細菌に特有の外膜を持たず、厚さ約 6nm のグラム陽性型の構造をもつ細胞壁が観察された（図 2-8c）。

3-1-3. 最適温度試験

増殖に対する温度の影響は 4℃から 60℃の間で試験した。増殖とメタン生成は 15℃から 45℃の間で観察され、40℃で最も高い比増殖速度（0.038h⁻¹）を示した（図 2-9）。4℃および 50℃以上では増殖は観察されなかった。

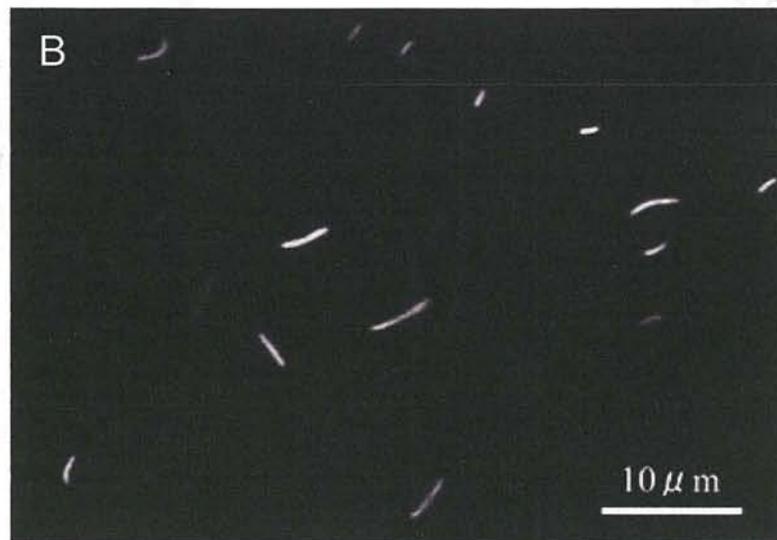


図 2-7. 169 菌株の顕微鏡観察 (×1000 倍)

A: 明視野顕微鏡観察, B: 落射蛍光顕微鏡観察

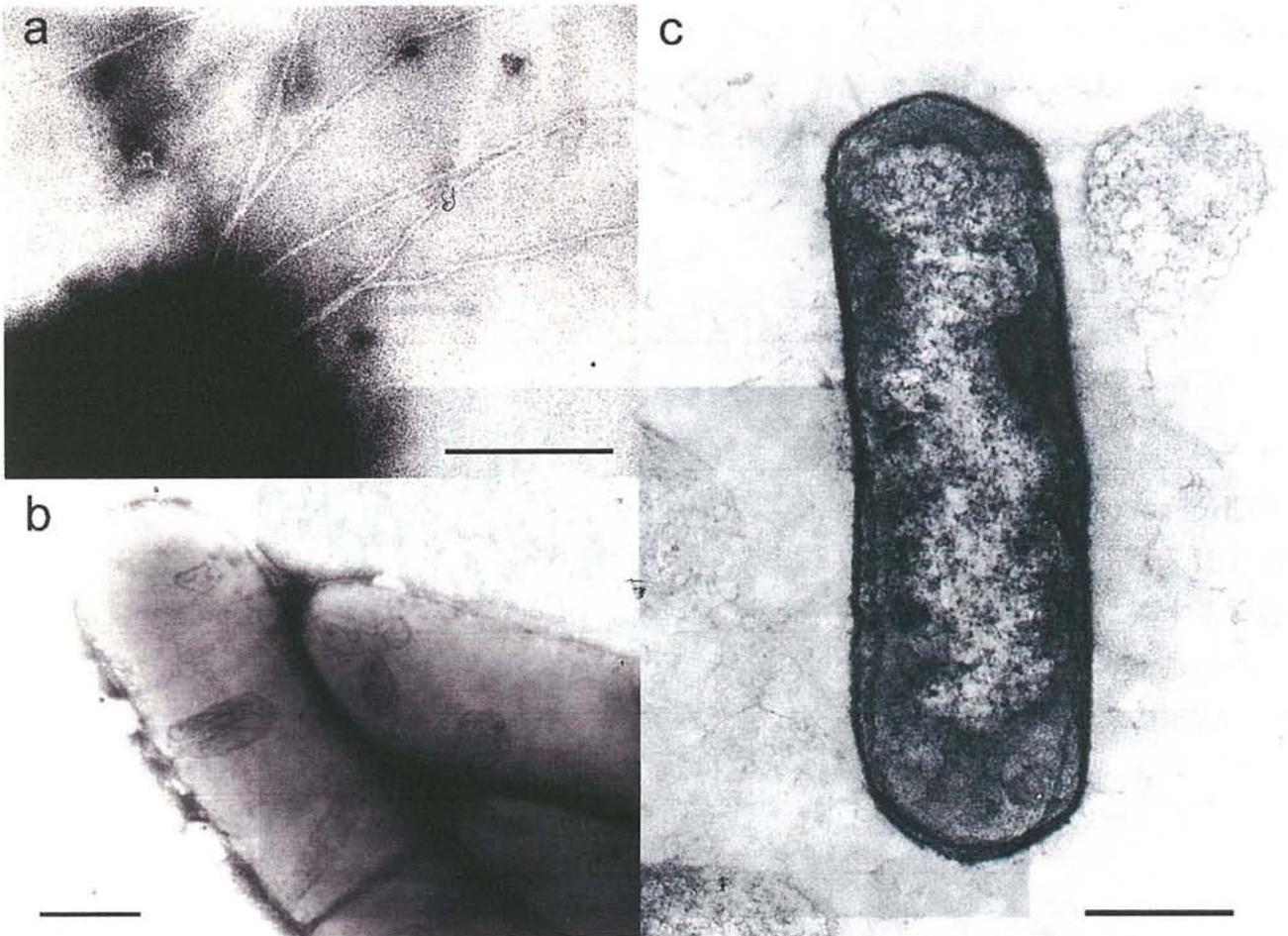


図 2-8. 透過型電子顕微鏡による 169 菌株の微細構造の観察
a および b, ネガティブ染色像, c, 超薄切片像. スケールバーは 200nm を示す.

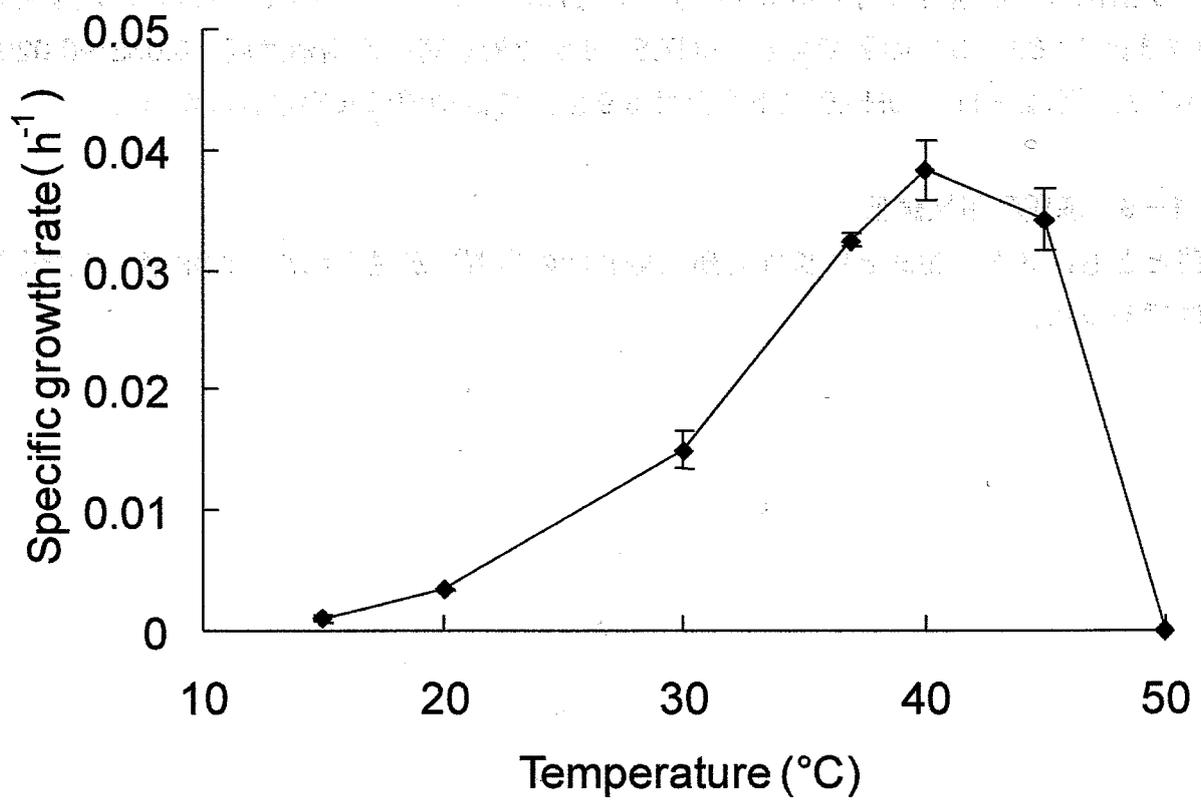


図 2-9.169 菌株の増殖に対する温度の影響
n=3, エラーバーは標準偏差を示す。

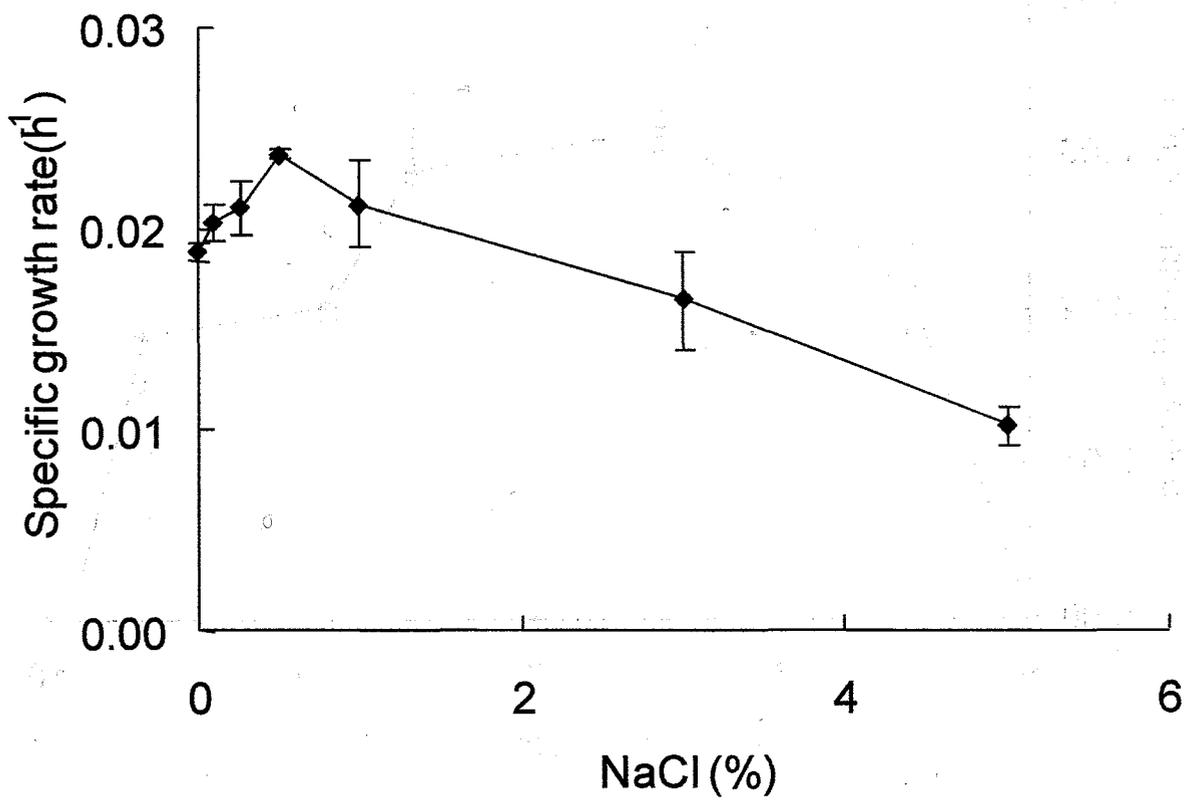


図 2-10. 169 菌株の増殖に対する NaCl 濃度の影響
n=3, エラーバーは標準偏差を示す。

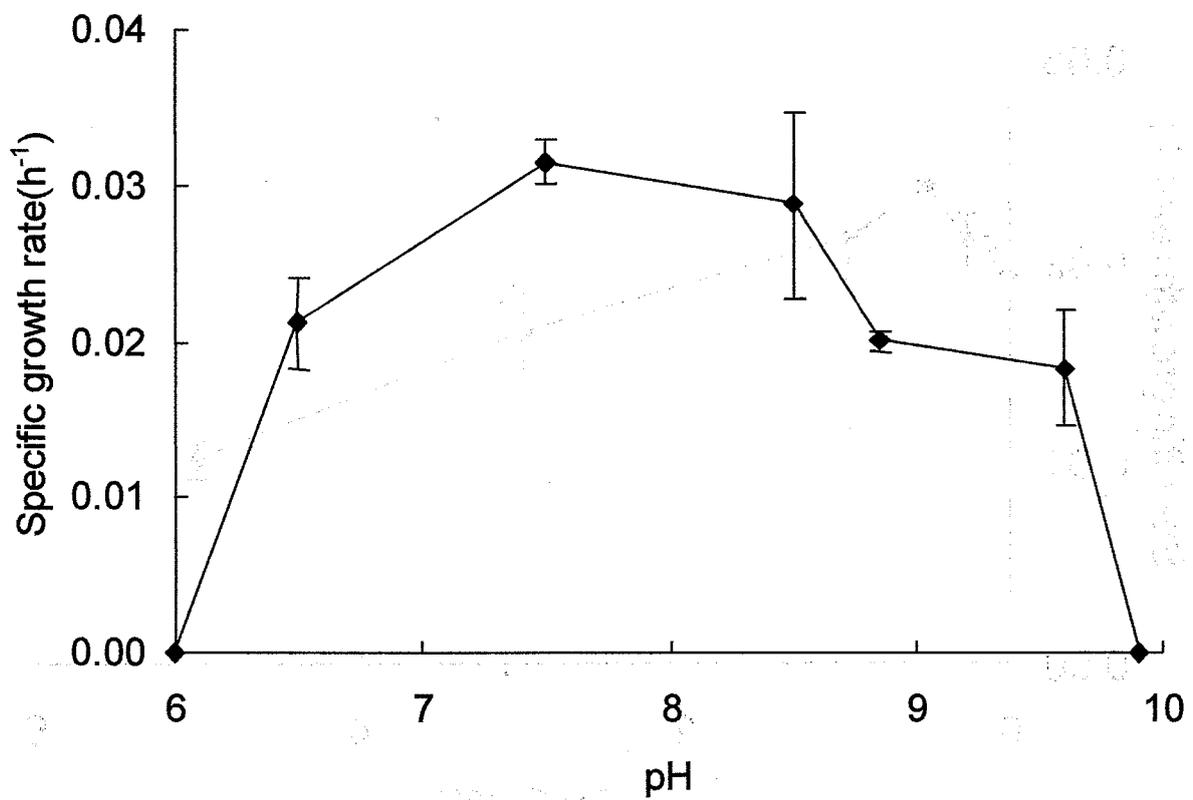


図 2-11. 169 菌株の増殖に対する pH の影響

n=3, エラーバーは標準偏差を示す。

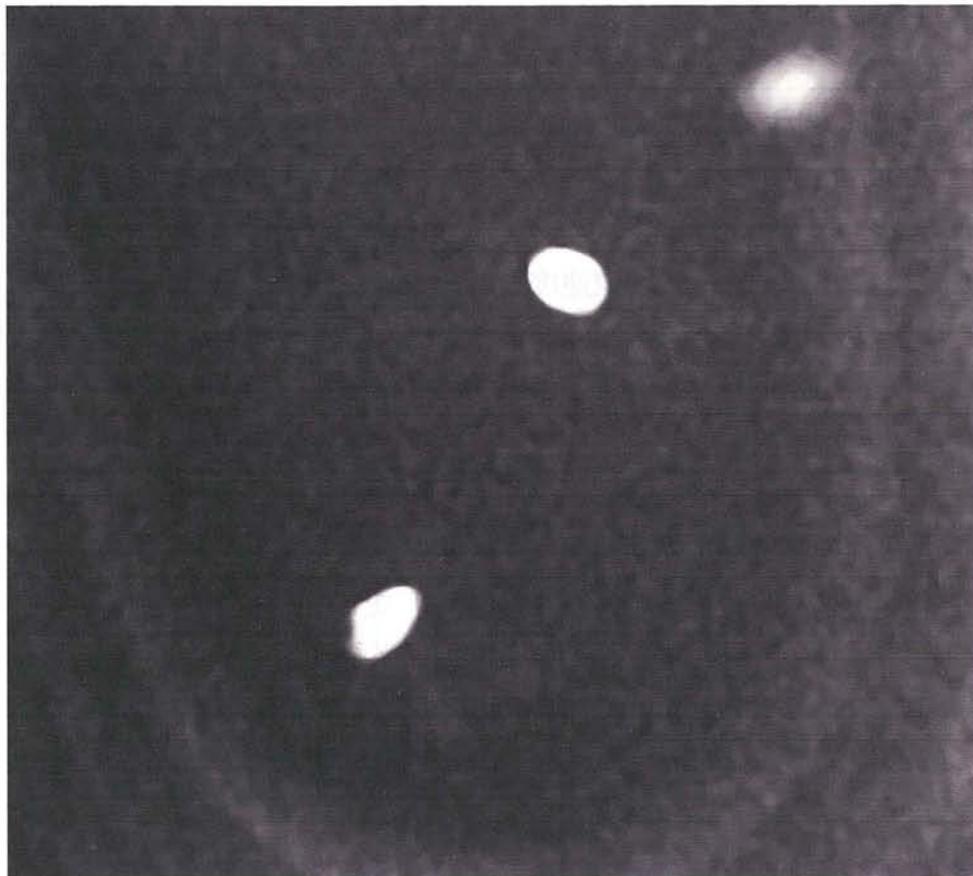


図 2-12. 169 菌株の高層寒天におけるコロニー形態

3-1-7. コロニー形態

培養90日後までに高層寒天培地に形成されたコロニーは直径0.1~0.5mm程度の大きさで、白色から乳白色の球状~円盤状であった(図2-12)。

3-1-8. 増殖因子

169菌株はビタミン無添加培地に5回移植を繰り返しても増殖し、増殖にビタミンを必要としなかった。0.1%グルコース、2mM酢酸ナトリウム、0.1%トリプトン、0.1%ポリペプトン、0.1%カザミノ酸、0.025%システイン塩酸塩、0.1%トリプチケースペプトン、0.1%酵母エキスはメタン生成を促進しなかった。20mM 蟻酸の添加によりメタン生成量はコントロールの約35%に抑制された。

3-1-9. 抗生物質に対する応答

169菌株は2000mg l⁻¹アンピシリン、バンコマイシン、1000mg l⁻¹ペニシリンにより増殖を阻害されなかった。2000mg l⁻¹ペニシリン、100mg l⁻¹ナリジキシン酸、ストレプトマイシンを添加した場合はそれぞれ増殖速度がコントロールの約61.0%、53.8%、52.1%に減少した。これらの抗生物質はさらに高濃度でより強い増殖抑制を引き起こした。1000mg l⁻¹ナリジキシン酸、100mg l⁻¹ネオマイシン、バシトラシン、クロラムフェニコールにより増殖は完全に阻害された。

3-1-10. 169菌株の系統学的解析

169菌株の16S rRNA 遺伝子部分配列(1465bp)を決定し、169菌株と近縁なメタン生成古細菌の配列に基づく相同性マトリックスおよび系統樹を作成した(表2-14, 図2-13)。169菌株は *Methanobacterium* 属菌株の中温性の種に最も近縁であった。16S rRNA 遺伝子配列の相同性は *M. subterraneum* DSM 11074^T と *M. formicum* DSM1535^T に対して最も高い値を示した(それぞれ96.8%、96.4%)。また、McrA 推定アミノ酸配列に基づく系統樹(図2-14)においても *M. subterraneum* DSM 11074^T と系統的に近縁であることが確認された。

3-1-11. G+C 含量の測定

169菌株のゲノムDNAのG+C含量はHPLCを用いた測定と、モノヌクレオチドの等モル混合液(ヤマサ醤油)との比較により計算された。169菌株のゲノムDNAのG+C含量は39.3mol% G+Cと計算された。

表 2-15. 169 菌株と近縁な既存菌株との 16S rRNA 遺伝子配列相同性→トリックス

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 strain 169	100	94.7	95.4	95.4	94.5	96.4	96.4	95	96.2	96.8	96.7
2 <i>M. alcaliphilum</i> WeN4 ^T	94.7	100	94.2	93.8	95	96.5	96.4	95.1	96.7	96.3	96.3
3 <i>M. beijingense</i> 4-1	95.4	94.2	100	99.6	95.1	94.5	94.6	94	94.7	94.6	94.7
4 <i>M. beijingense</i> 8-2 ^T	95.4	93.8	99.6	100	94.7	94.4	94.3	93.5	94.4	94.2	94.2
5 <i>M. bryantii</i> RH2	94.5	95.0	95.1	94.7	100	95.2	95.1	93.7	95	95.2	95.1
6 <i>M. formicicum</i> DSM1312	96.4	96.5	94.5	94.4	95.2	100	99.9	96.5	97.9	97.5	97.5
7 <i>M. formicicum</i> DSMZ1535 ^T	96.4	96.4	94.6	94.3	95.1	99.9	100	96.2	97.9	97.3	97.3
8 <i>M. palustre</i> F ^T	95.0	95.1	94.0	93.5	93.7	96.5	96.2	100	98.3	96.1	96.1
9 <i>M. palustre</i> 21	96.2	96.7	94.7	94.4	95.0	97.9	97.9	98.3	100	97.4	97.5
10 <i>M. subterraneum</i> A8p ^T	96.8	96.3	94.6	94.2	95.2	97.5	97.3	96.1	97.4	100	100
11 <i>M. subterraneum</i> C2BIS	96.7	96.3	94.7	94.2	95.1	97.5	97.3	96.1	97.5	100	100

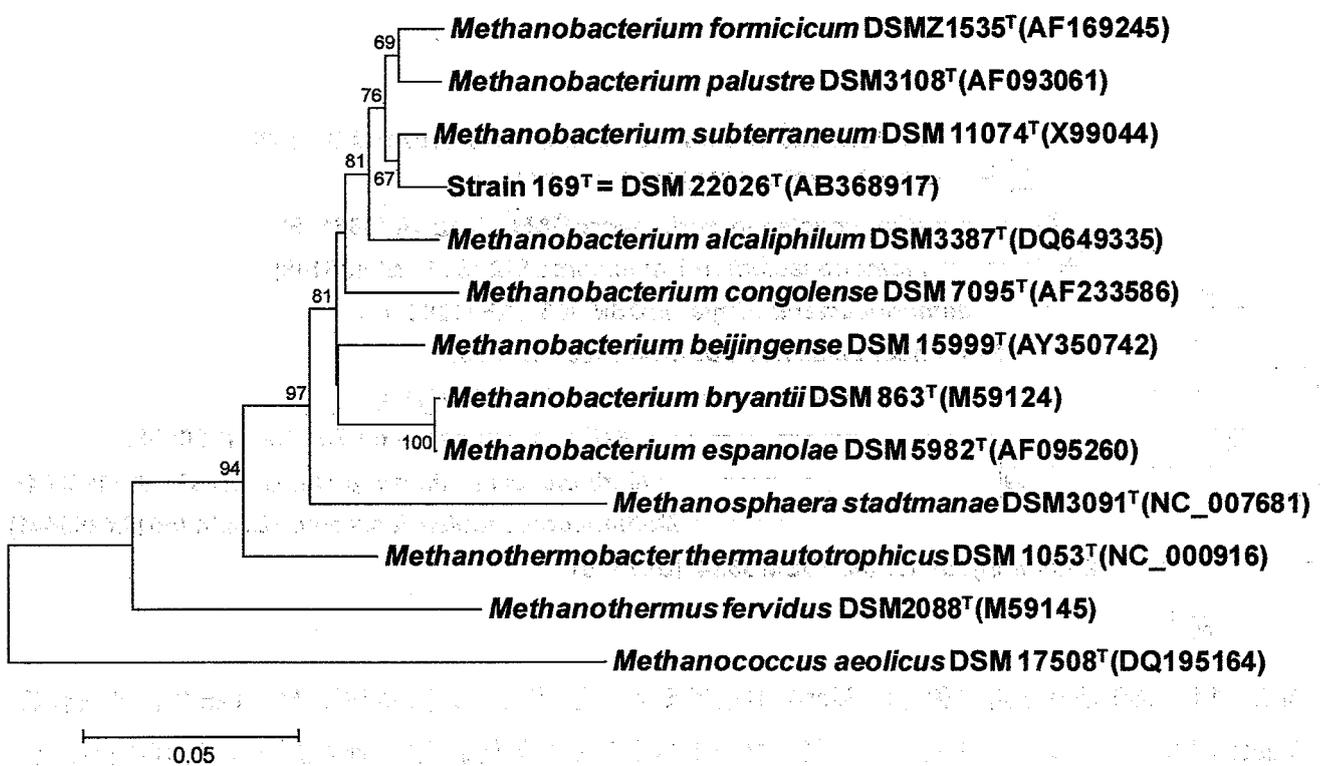


図 2-13. 169 菌株と近縁菌株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹. ClustalW(Thompson *et al.*, 1994)でアラインメントを行った後、MEGA4.0(Tamura *et al.*, 2007a)を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。

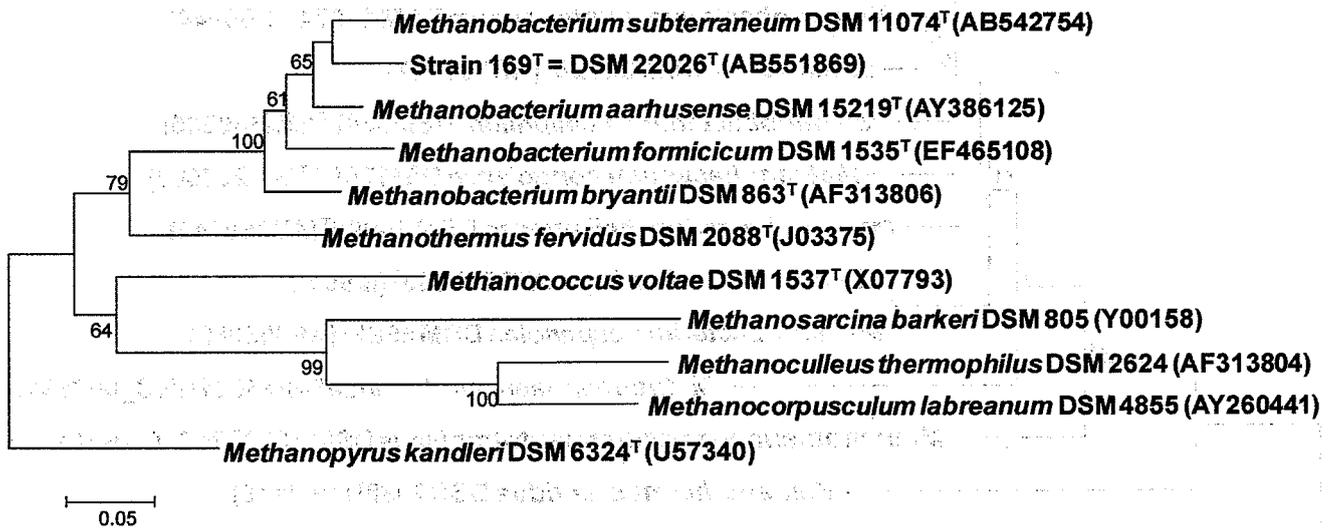


図 2-14. 169 菌株と近縁菌株の McrA 推定アミノ酸配列に基づく系統樹。MEGA5.0 に含まれる ClustalW でアラインメントを行った後、ブートストラップ解析および近隣結合樹の描画を行った。スケールバーは配列座位あたりのアミノ酸置換数を示す。

アウトグループには *Methanopyrus kandleri* DSM6324^T(U57340)を使用した。

3-2. FR-3 菌株の特徴

FR-3 菌株は幅約 0.5~0.6 μm , 長さ約 3~6 μm の桿菌であり、細胞の形状は直線状からやや湾曲しており、細胞の両端は丸みを帯びていた。胞子を形成せず、運動性はなかった。また、分離菌株の細胞は図に示したように、メタン生成古細菌に特有の F₄₂₀ の自家蛍光を有していた (図 2-15)。増殖基質として水素+二酸化炭素または蟻酸を利用し、メタンを生成した。16S rRNA 遺伝子配列は *Methanobacterium formicicum* strain MF^T (AY196659) に対して 100% と最も高い値を示した。

3-3. SR-20 菌株の特徴

SR-20 菌株は幅約 0.5~0.6 μm , 長さ約 4~10 μm の桿菌であり、細胞は湾曲し、両端が丸みを帯びていた。胞子を形成せず、運動性を有していた。また、分離菌株の細胞は図に示したように、メタン生成古細菌に特有の F₄₂₀ の自家蛍光を有していた (図 2-16)。増殖基質として水素+二酸化炭素またを利用し、メタンを生成したが蟻酸は利用しなかった。16S rRNA 遺伝子配列は *Methanospirillum hungatei* JF-1^T に対して 98.4% と最も高い値を示した。

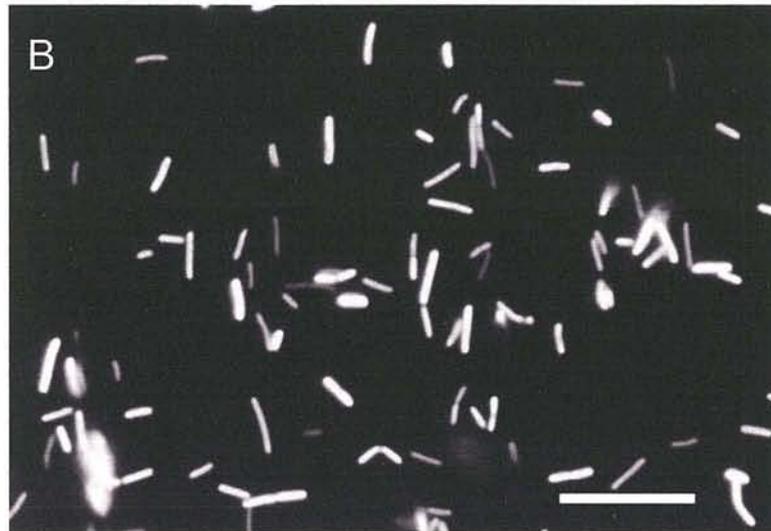
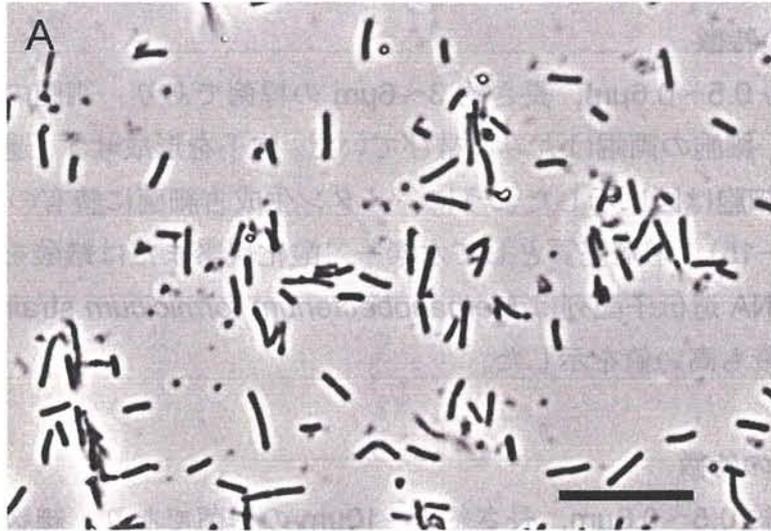


図 2-15. FR-3 菌株の顕微鏡観察 (倍率×1000 倍)

A:明視野顕微鏡観察, B:落射蛍光顕微鏡観察、バーは 10 μ m を示す。

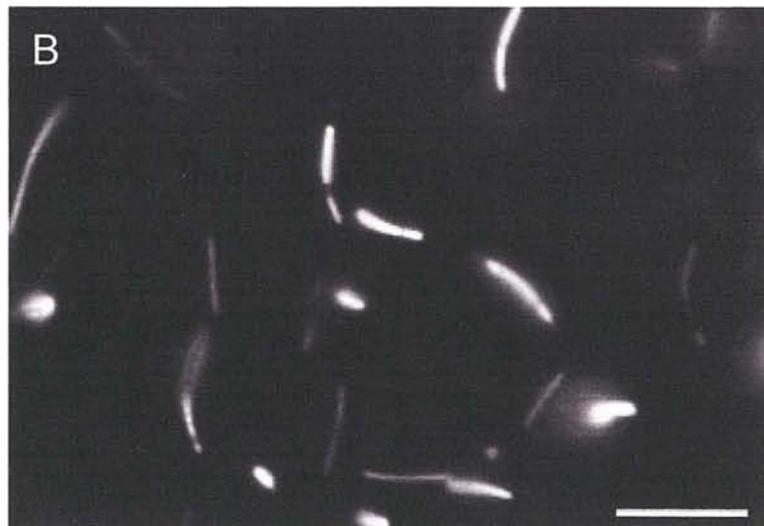


図 2-16. SR-20 菌株の顕微鏡観察 (倍率×1000 倍)

A:明視野顕微鏡観察, B:落射蛍光顕微鏡観察、バーは 10 μ m を示す。

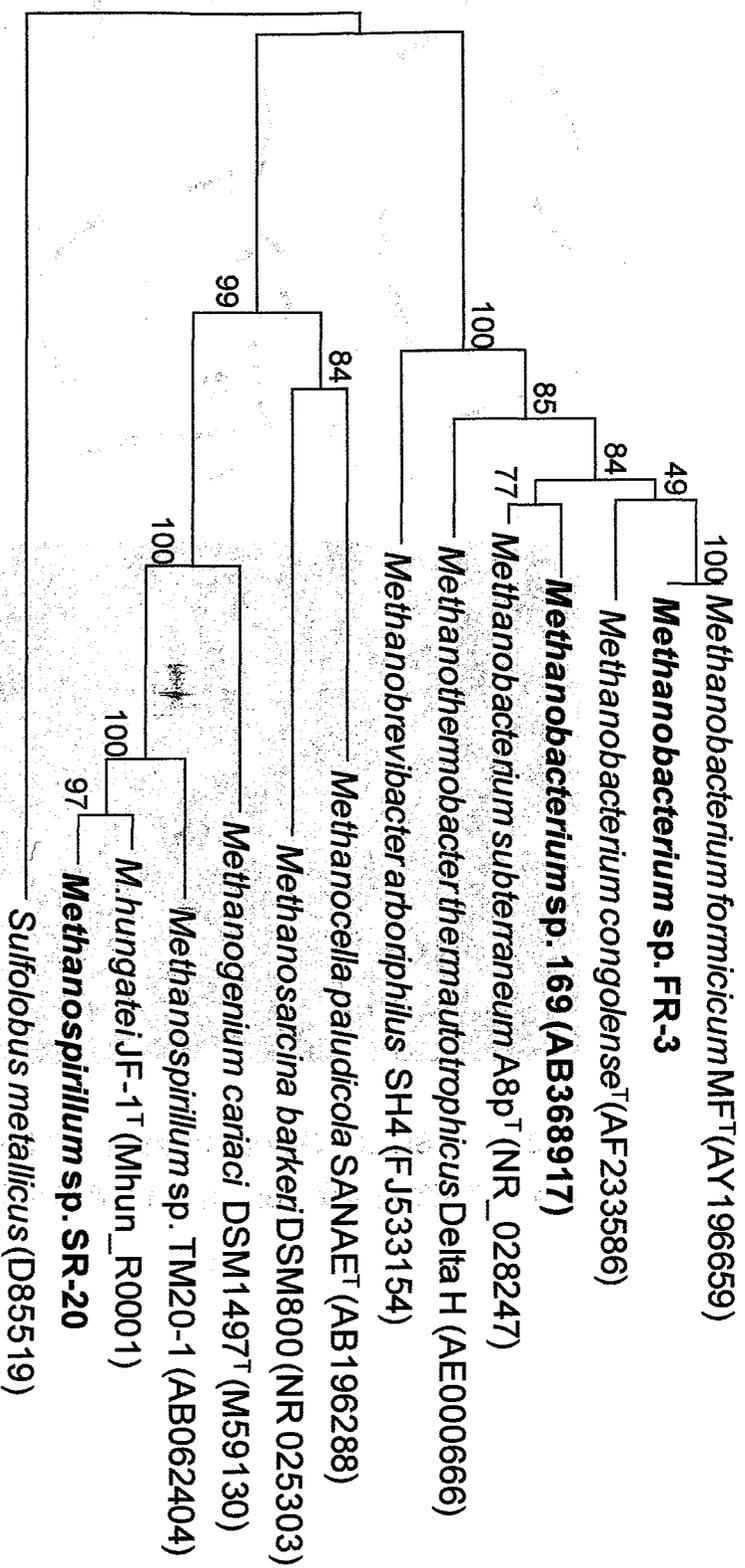


図2-17. 169菌株, FR-3菌株, SR-20菌株と近縁菌株の16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹. ClustalW(Thompson *et al.*, 1994)でアライメントを行った後、MEGA4.0(Tamura *et al.*, 2007a)を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。ノードの値はブートストラップ値を示す。スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。アウトグループには *Sulfolobus metallicus* (D85519)を使用した。

4. プロピオン酸酸化細菌の分離

栄養共生プロピオン酸酸化細菌の純粋化・分離のため、段階希釈、加熱処理、アガーシェイク法、増殖因子の添加やモリブデン酸ナトリウムの添加について検討した。

段階希釈においては、 10^7 希釈まで作製した希釈培養液のうち増殖が観察された 10^5 希釈と 10^6 希釈について PCR-DGGE 解析と顕微鏡観察を行ったが、汚染細胞は脱落せず存在していた。

加熱処理においては $55^{\circ}\text{C}\sim 85^{\circ}\text{C}$ 、30 分間の処理を行ったが、目的とするプロピオン酸酸化細菌以外の汚染細胞は脱落せず、PCR-DGGE 解析では加熱処理前に検出されなかったバンドが複数検出された。*Pelotomaculum* 属細菌に相当するバンドは加熱処理後も存在していたが、バンド強度は加熱処理前と比較して相対的に低くなる傾向が見られた。さらに加熱処理した培養液は移植後、メタン生成が非常に遅くなり、 85°C では停止した。

アガーシェイク法による分離操作では、培養 4 日後からコロニーが形成されたが、コロニーを釣菌し、20mM プロピオン酸ナトリウムを添加した 169 菌株、FR-3 菌株の培養液に接種しても増殖は観察されなかった。そこでコロニーを直接顕微鏡観察したところ *Desulfomicrobium* 属細菌に類似した細胞の塊が観察された。12 ヶ月培養しても *Pelotomaculum* 属細菌のコロニーは形成されなかった。ノーブルアガーを用いたアガーシェイクでは *Pelotomaculum* に類似した細胞を含むコロニーが形成されたが、DGGE 解析の結果、釣菌培養液には *Pelotomaculum* は含まれておらず、プロピオン酸の分解も進行しなかった。

0.1%酵母エキス、ペプトンの添加によりメタン生成は促進される傾向が観察されたが、1mM FeCl_2 の添加によるメタン生成の促進は観察されなかった。いずれも顕微鏡観察および PCR-DGGE 解析により *Pelotomaculum* 以外の汚染細胞の増加が示唆された。

硫酸還元細菌である *Desulfomicrobium* の増殖はモリブデン酸の添加により抑制されなかった。また、メタン生成はモリブデン酸の濃度を 0.1mM から 1mM、10mM と上げるに従いより強く抑制された。

単独で増殖可能な基質の探索においては、PCR-DGGE 解析を行ったところプロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸、フマル酸、エタノールいずれの基質でも *Pelotomaculum* および *Desulfomicrobium* のバンドが観察された。ピルビン酸では *Pelotomaculum* のバンド強度が減少し、*Spirochaetes* に近縁なバンドが検出された。 75°C 30 分の加熱処理を行った培養液を接種源として、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸、フマル酸、エタノール、ピルビン酸を基質とした培地に移植を行ったが、*Pelotomaculum* の選択的な増殖は観察されず、汚染細胞のバンドが多数検出された。結果として今回用いたいずれの方法によっても *Pelotomaculum* 属細菌の純粋分離には至らなかった。

5. プロピオン酸集積培養液に共存する細菌の分離

5-1. 4F6E 菌株

4F6E 株の細胞の形態は湾曲しており、大きさは幅 $0.8\mu\text{m}$ 、長さ $2.0\text{-}2.5\mu\text{m}$ であった。グラム染色性は陰性で、孢子を形成せず、運動性が確認された (図 2-18)。また、4F6E において、ネガティブ染色した細胞の透過型電子顕微鏡観察により鞭毛をもつことが確認された (図 2-19)。また、鞭毛の基部が細胞のくぼみ部分に存在していることが示された。

5-1-2. 増殖に対する温度の影響

経時的な吸光度の測定と目視の結果から、4F6E 菌株の増殖可能な温度範囲は 15°C から 55°C 、増殖至適温度は 25°C から 40°C であることが示された。 4°C 、 10°C および 60°C での増殖は観察されなかった。

5-1-3. 増殖に対する塩濃度の影響

経時的な吸光度の測定と目視の結果から、増殖可能な塩濃度範囲は 0% から 1.5% までで、至適増殖 NaCl 濃度は 0% から 0.5% であることが示された。また、NaCl 濃度が 2.0% 以上の増殖は観察されなかった。

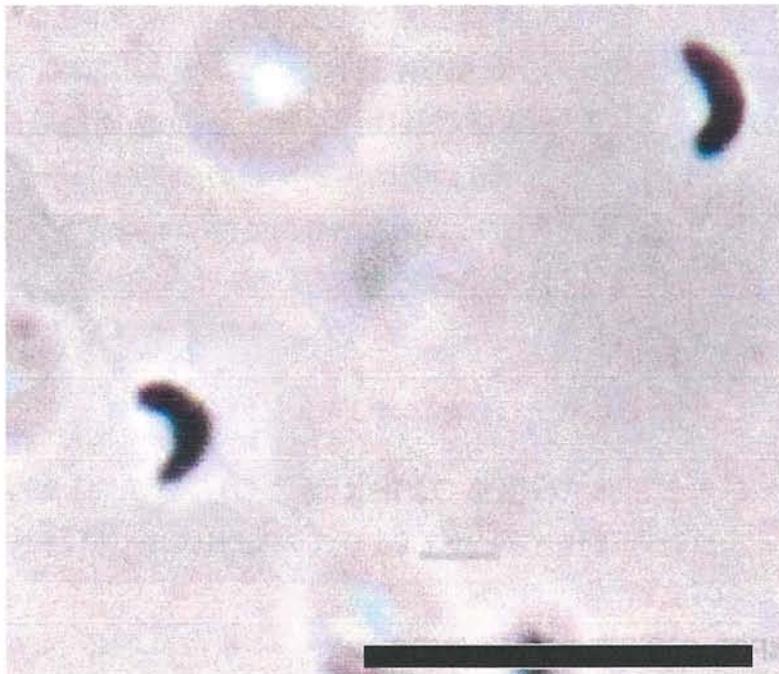


図 2-18. 4F6E の顕微鏡観察 (倍率×1000 倍)
バーは 10 μ m を示す。

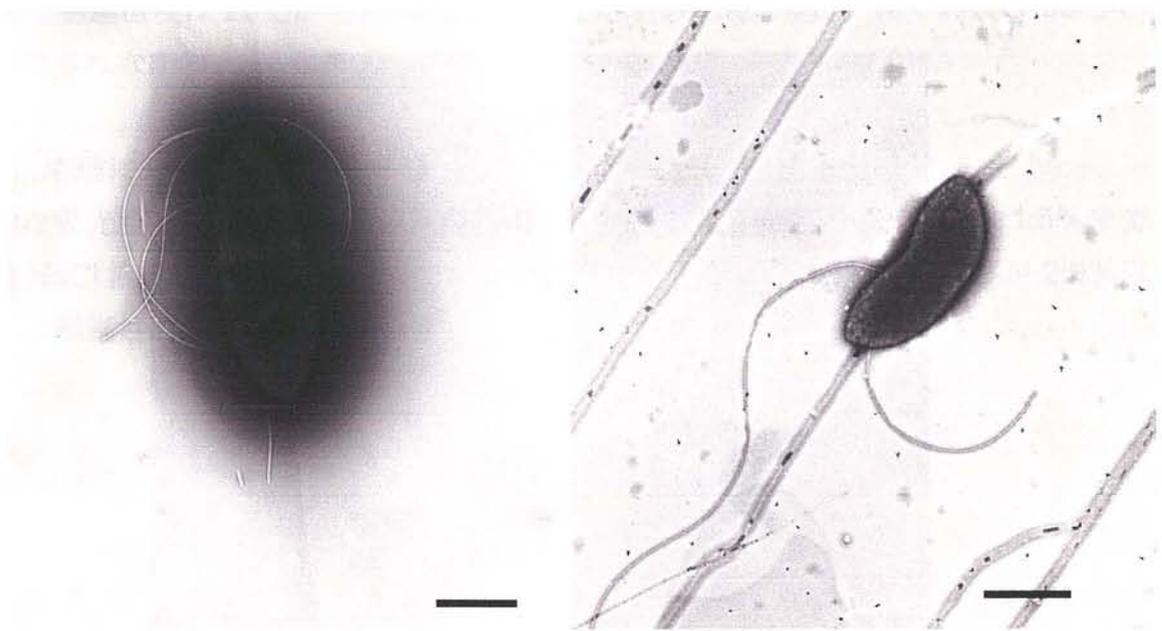


図 2-19. 4F6E の透過型電子顕微鏡写真

リンタングステン酸によりネガティブ染色した細胞を 5,000 倍で観察した。

スケールバーは $1\mu\text{m}$ を示す。

5-1-4. 基質利用性試験

経時的な吸光度の測定と目視の結果から、試験した 11 の有機酸のうち、リンゴ酸、ピルビン酸、2-オキソグルタル酸の利用が確認された。また、20 のアミノ酸のうち、ヒスチジン、セリン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、リシン、グリシン、トリプトファンの利用が確認された。また、カザミノ酸の利用が確認された。

5-1-5. 好気培養試験

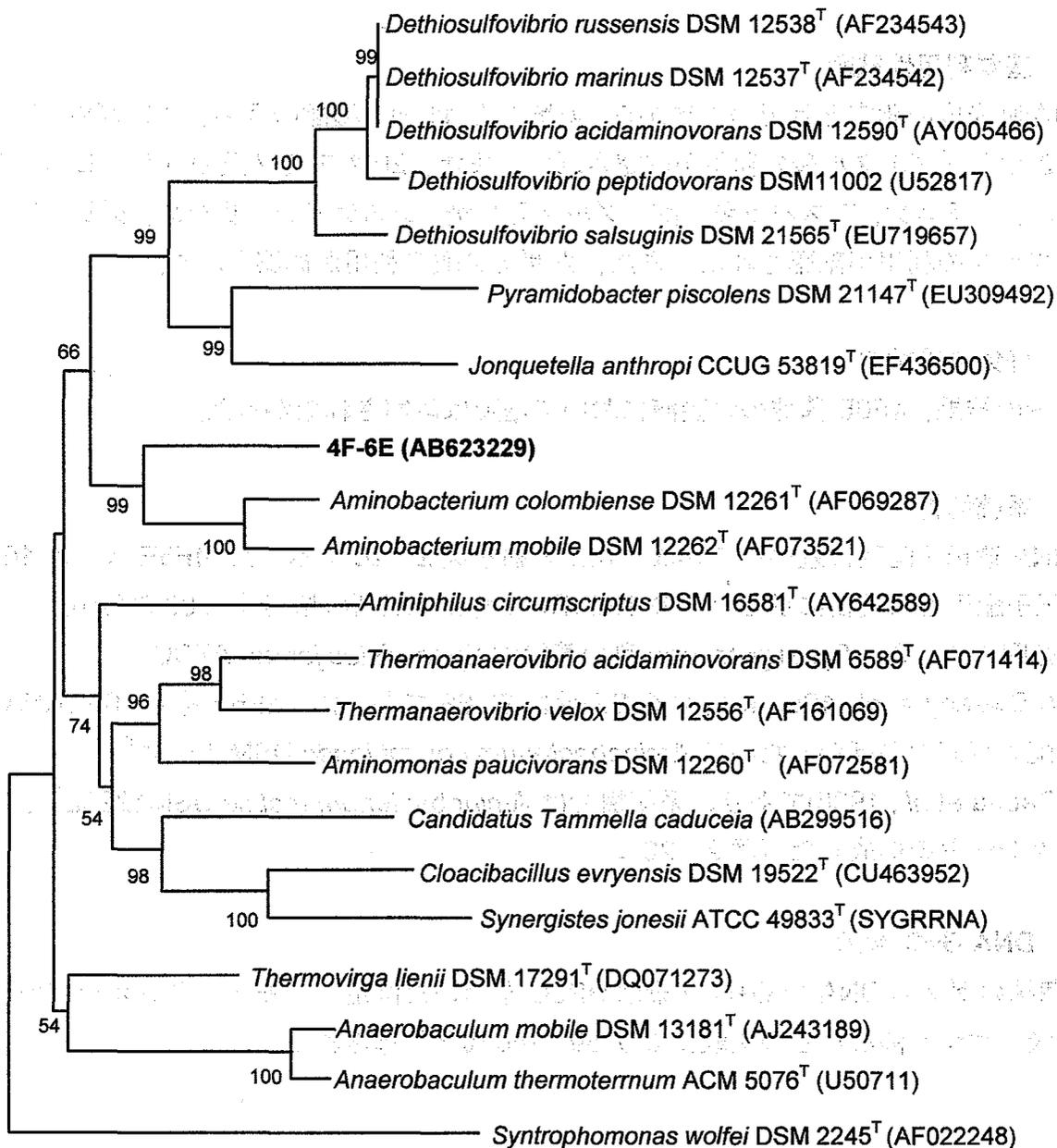
好気培養の結果、4F6E 菌株の培養液において増殖は観察されなかった。

5-1-6. 系統解析

16S rRNA 遺伝子配列に基づいて作成した系統樹を図 2-20 に示した。4F6E 菌株の 16S rRNA 遺伝子配列と系統樹に示した株の 16S rRNA 遺伝子配列の相同性は 83.6% から 89.5% の範囲であった。Synergistaceae 科の基準種 *Synergistes jonesii* ATCC 49833^T (McSweeny *et al.*, 1993) に対する相同性は 83.6% であった。4F6E 株と 16S rRNA 遺伝子の配列相同性が高かったのは *Aminobacterium colombiense* DSM 12261^T (89.5%) (Baena *et al.*, 1998) であり、系統樹では *Aminobacterium mobile* DSM12262^T と共に共通のクレードを形成した (図 2-20)。

5-1-7. DNA G+C 含量

4F6B 菌株のゲノム DNA の G+C 含量は HPLC を用いた測定と、モノヌクレオチドの等モル混合液 (ヤマサ醤油) との比較により 59.1 mol% と計算された。



0.02

図2-20. 4F6E株と *Synergistaceae* 科の細菌種との16S rDNA配列に基づいた系統樹。系統樹作成に用いた配列はすべて基準種由来である。()内には配列のアクセッション番号を示した。各ノード値はブートストラップ値を示し、スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。*Syntrophomonas wolfei* DSM 2245^Tをアウトグループとした。

5-2. 4F6B 菌株

4F6B 株の細胞の形態は短桿状で、大きさは幅 0.5-0.6 μm 、長さ 0.6-1.0 μm であった。グラム染色性は陰性で、孢子を形成せず、運動性はなかった(図 2-21)。好気培養の結果、4F6B 菌株の培養液において増殖は観察されなかった。基質利用性試験において、ピルビン酸、2-オキシグルタル酸を培地に添加した場合に、ネガティブコントロールと比較して高い OD₄₂₀ の値を示し、増殖基質としての利用を示唆した(表 2-15)。16S rRNA 遺伝子配列解析に基づき、4F6B 菌株は最も相同性が高い菌種でも 86% (*Mucilaginibacter daejeonensis*) (An et al., 2009) と系統的に近縁な種が存在せず、系統樹においても同様の結果が示された(図 2-24)。以後 *Bacteroidetes bacterium* 4F6B 菌株と表記する。

5-3. 6E 菌株

6E 菌株の細胞の形態は桿状で、大きさは幅 0.8 μm 、長さ 2.0 μm であった。グラム染色性は陰性で、孢子を形成せず、運動性はなかった(図 2-22)。好気培養の結果、6E 菌株の培養液において増殖は観察されなかった。基質利用性試験において、リンゴ酸、フマル酸、ピルビン酸、コハク酸、クエン酸を培地に添加した場合に、ネガティブコントロールと比較して高い OD₄₂₀ の値を示し、増殖基質としての利用を示唆した(表 2-16)。16S rRNA 遺伝子配列解析に基づき、6E 菌株は *Meniscus glaucopsis* strain ATCC 29398 (89.1%) (IRGENS, 1977) に最も近縁であることが示され、系統樹において *Bacteroidetes* に位置づけられることが示唆された(図 2-24)。以後、*Bacteroidetes bacterium* 6E 菌株と表記する。

5-4. 7A 菌株

7A 菌株は幅 1.0 μm 、長さ 1.4~3.0 μm の桿菌で、運動性を有しグラム染色性は陰性であった(図 2-23)。増殖因子として酵母エキスを必要とした。0.1%酵母エキスの存在下では 0.01%の場合と比較して良く増殖した。発酵性基質としてピルビン酸を利用し、リンゴ酸は利用しなかった。硫酸ナトリウムを電子受容体とした場合、電子供与体基質としてピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸、乳酸、エタノール、水素+二酸化炭素、蟻酸を利用した。酪酸およびコハク酸は電子供与体としてわずかに利用した(表 2-17)。メタン生成菌 *M. formicum* FR-3 菌株との共培養では、基質としてピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸、乳酸、エタノールを利用して増殖し、共培養の結果としてメタンが生成された。基質として乳酸ナトリウムを使用した場合、電子受容体として硫酸塩、亜硫酸塩、チオ硫酸塩、DMSO を利用し、フマル酸塩及び硝酸塩をわずかに利用した(表 2-18)。16S rRNA 遺伝子配列解析に基づき、7A 菌株は *Desulfomicrobium norvegicum* strain DSM 1741^T (98.9%) に最も近縁であることが示され、系統樹においても *Desulfomicrobium* と同一のクレードに位置づけられた(図 2-25)。以後 *Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株と表記する。

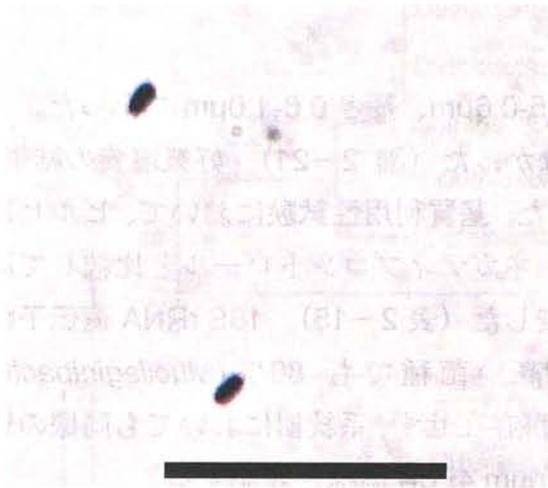


図 2-21. 4F6B 菌株の顕微鏡写真
倍率×1000 倍、バーは 10 μ m を示す

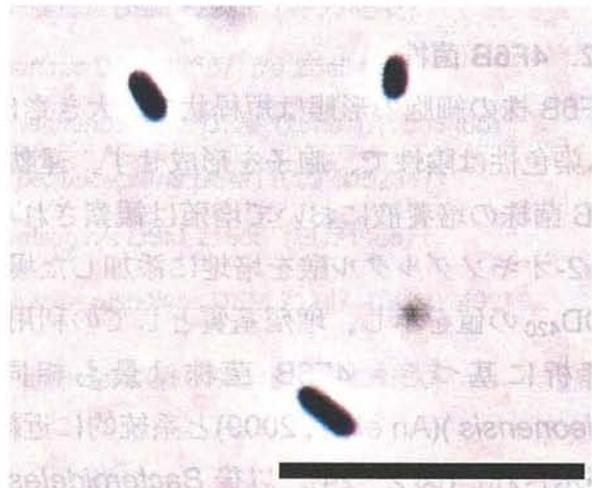


図 2-22. 6E 菌株の顕微鏡写真
倍率×1000 倍、バーは 10 μ m を示す

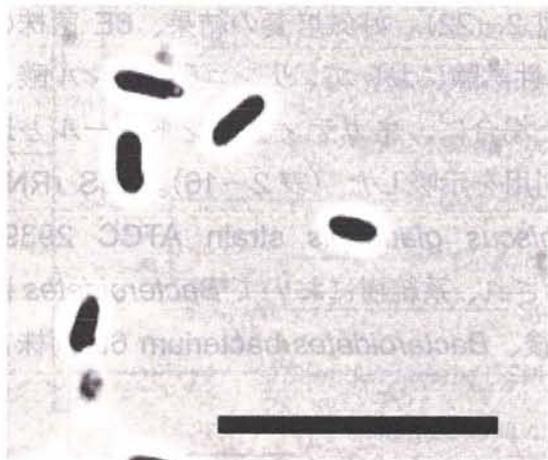


図 2-23. *Desulfomicrobium* sp. 7A 株の
顕微鏡写真
倍率×1000 倍、バーは 10 μ m を示す

表 2-16. 4F6B 菌株および 6E 菌株の基質利用性

物質名	4F6B 菌株	6E 菌株
蟻酸	-	-
酢酸	-	-
プロピオン酸	-	-
酪酸	-	-
コハク酸	-	+
リンゴ酸	-	+
フマル酸	-	+
ピルビン酸	+	+
乳酸	-	-
クエン酸	-	+
2-オキソグルタル酸	+	-

+: 利用した, -: 利用しなかった, (+): わずかに利用した

表 2-17. *Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株の基質利用性

物質名	発酵性基質	電子供与体*	共培養での基質利用性**
蟻酸	-	+	-
酢酸	-	-	-
プロピオン酸	-	-	-
酪酸	-	(+)	-
コハク酸	-	(+)	-
リンゴ酸	-	+	+
フマル酸	-	+	+
ピルビン酸	+	+	+
乳酸	-	+	+
エタノール	-	+	+
H ₂ +CO ₂	-	+	N.D.

基質は H₂+CO₂ を除いて終濃度 20mM で試験した。H₂+CO₂ は 2atm で試験した。

*電子受容体として 20mM 硫酸ナトリウムを添加した。

***M. formicicum* FR-3 菌株との共培養で利用性を試験した。

+ : 利用した, - : 利用しなかった, (+) : わずかに利用した

N.D. : not determined

表 2-18. *Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株の電子受容体利用性

電子受容体*	利用性
硫酸ナトリウム	+
亜硫酸ナトリウム	+
チオ硫酸ナトリウム	+
フマル酸ナトリウム	(+)
硝酸ナトリウム	(+)
DMSO	+

電子受容体は終濃度 20mM で試験した。

電子供与体基質 : 20mM 乳酸ナトリウム

+ : 利用した, - : 利用しなかった, (+) : わずかに利用した

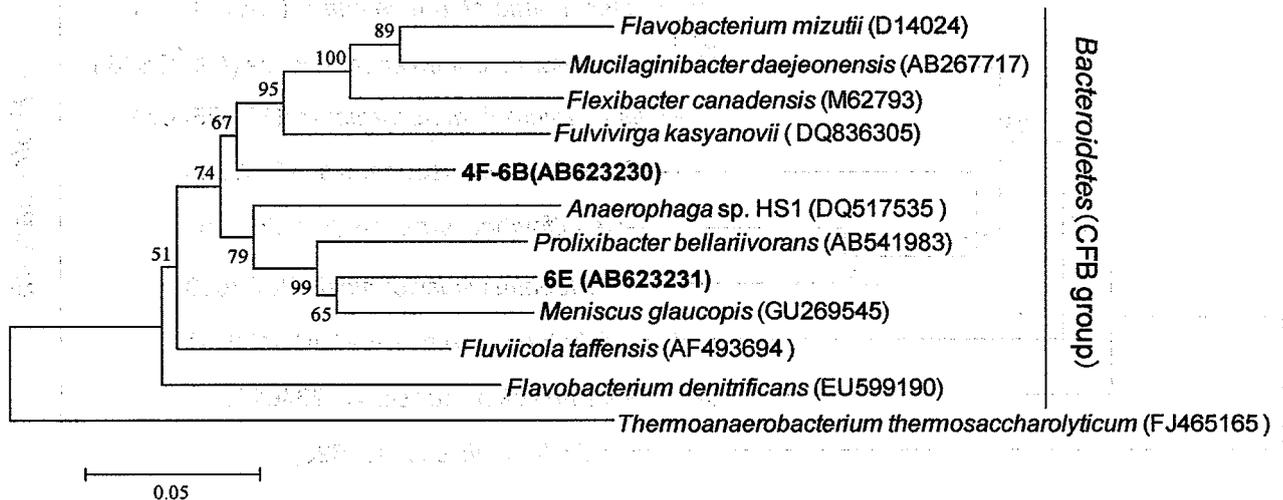


図 2-24. 4F6B 菌株および 6E 菌株と近縁種の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹

()内には配列のアクセッション番号を示した。各ノード値はブートストラップ値を示し、スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (FJ465165) をアウトグループとした。

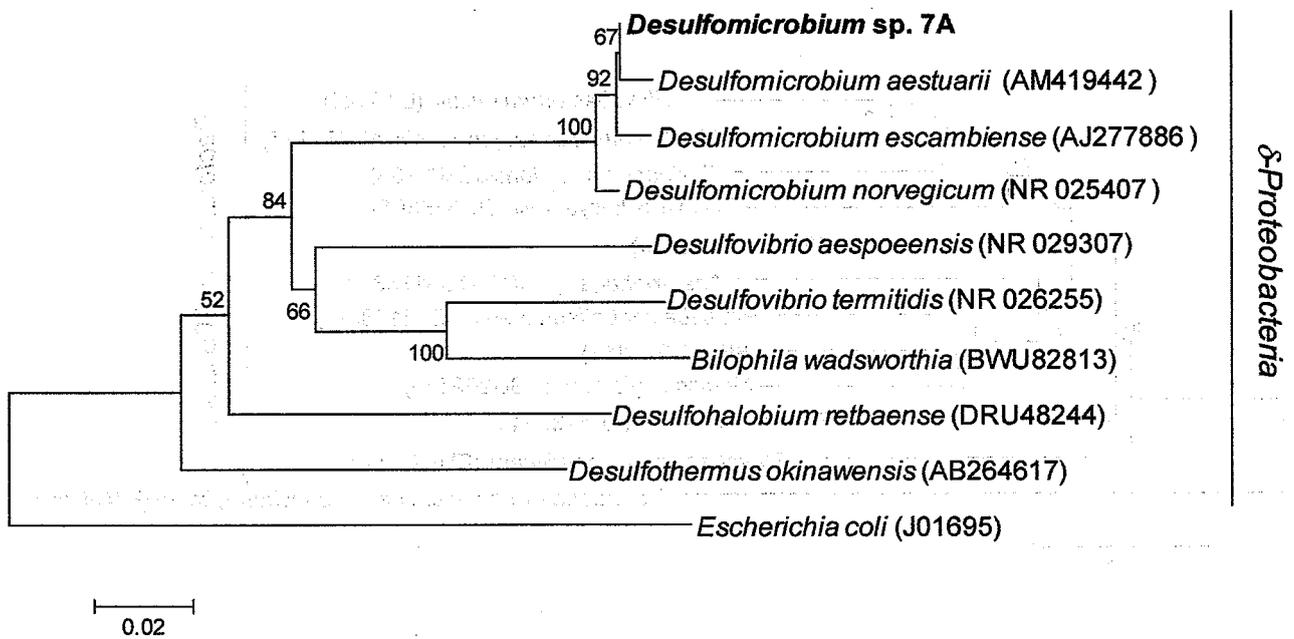


図 2-25. 7A 菌株と近縁種の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹 ()内には配列のアクセッション番号を示した。各ノード値はブートストラップ値を示し、スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。 *Escherichia coli* (J01695)をアウトグループとした。

第5節 考察

1. 水田土壌を起源とするプロピオン酸集積培養

表 1-1 に水素+二酸化炭素または酢酸からのメタン生成反応の理論式と、プロピオン酸の嫌氣的な酸化反応において考えられる理論式を示した(Schink & Stams, 1992; 上木勝司、永井史郎, 1993)。嫌氣的環境におけるプロピオン酸は式 1 の反応で酢酸、水素、二酸化炭素へと分解されると考えられるが、式 1 は生化学的標準状態では吸エルゴン反応であり、本来進行不可能な反応である。そこで式 3 の水素+二酸化炭素からのメタン生成反応が共役して生成物の水素が除去されることで反応全体が発エルゴンのになり、反応の進行が可能となる(式 2)。Scholten ら(Scholten & Conrad, 2000)は、栄養共生プロピオン酸酸化細菌 *Syntrophobacter fumaroxidans* と水素利用メタン生成菌 *Methanospirillum hungatei* との二種共生培養で、プロピオン酸の消費に伴いメタンと酢酸が生成することを報告している。また、Dong ら(Dong *et al.*, 1994)は栄養共生プロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* と水素利用メタン生成菌 *Methanothermobacter thermoautotrophicus* strain ΔH に酢酸利用性メタン生成菌 *Methanosaeta thermophila* を加えた三種共生培養では、酢酸が一時的に蓄積し速やかに消費されることを報告している。今回の実験において、集積培養液でわずかに水素と酢酸の蓄積が見られたことから、表 1-1 に示した式 1 でプロピオン酸の分解が起こったものと思われる。続いて生成した水素は式 3 のメタン生成反応によって除かれ、式 2 のように反応が進行したと考えられる。さらに Imachi ら(Imachi *et al.*, 2000)の報告と同様に酢酸が速やかに消費されたことから、酢酸利用メタン生成菌が培養液に存在し、式 4 で酢酸を分解したことが示唆された。

プロピオン酸酸化経路のもうひとつの可能性として、アクリル酸経路による酸化が考えられる。*Smithella* 属菌株はアクリル酸経路によりプロピオン酸を酢酸と酪酸に不均化し、栄養共生的に β 酸化を行い酢酸へと分解する(de Bok *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1999)。しかしながら、集積培養液で優占する細菌が *Pelotomaculum* 属に近縁であり、*Smithella* 属が検出されていないこと、これまでに水田土壌で *Smithella* 属菌株によるプロピオン酸酸化が証明されていないこと(Krylova *et al.*, 1997)から、アクリル酸経路によるプロピオン酸酸化が起こっている可能性は低いと考えられた。水素と酢酸がいずれも低い濃度に保たれていたことから、集積培養液ではプロピオン酸酸化菌と水素利用メタン生成菌、酢酸利用メタン生成菌との、プロピオン酸の安定な分解共生系が確立されていたことを明らかにした。

プロピオン酸集積培養液では、蛍光性の桿菌と非蛍光性の桿菌が混在した細胞の集合塊(～約 100 μm) が顕微鏡下で観察され、蛍光性の細胞は特有の補酵素 F₄₂₀ の蛍光を有することからメタン生成古細菌であると考えられた。一方米粒型の非蛍光性桿菌(図 2-2)はプロピオン酸集積培養液中に常に存在し、かつ蛍光性の桿菌と集合体(グラニュール)を形成する頻度が高いことから、プロピオン酸酸化細菌であると推察された。このような集合体の形成は嫌氣性消化槽(UASB リアクター)においても報告されており(Schmidt &

Ahring, 1995)、栄養共生プロピオン酸酸化において種間水素／蟻酸転移を維持するために重要であると考えられている(Boone *et al.*, 1989; De Bok *et al.*, 2004a)。

プロピオン酸集積培養液から得られたクローン C165-1-1 と近縁な細菌株 16S rRNA 遺伝子配列を用いて作成した系統樹 (図 2-3) と相同性比較の結果から C165-1-1 はプロピオン酸酸化菌として知られる *Pelotomaculum* のクレードの中に位置する種レベルで新規な細菌であることが示唆された。

プロピオン酸集積培養液 C165-1 および C166-1 の DGGE 解析では、クローン C-165-1-1 と移動度を等しくするバンドが常に存在しており (図 2-4)、プロピオン酸の消費、メタンの生成に伴いバンド強度が相対的に増加する傾向が観察されたことから (図 2-5)、*Pelotomaculum* に近縁な C165-1-1 が集積培養液において優占してプロピオン酸酸化を行っている」と推察された。

集積培養液中には *Pelotomaculum* に近縁なバンドの他にも *Desulfomicrobium* 属、または *Sphingobacteriaceae* 科に属するバンドが検出された(図 2-4)。各バンドの配列とクローン C165-1-1、4F6B 菌株、4F6E 菌株、6E 菌株、7A 菌株の配列を比較し、さらに集積培養液の DGGE バンドと比較した結果、*Desulfomicrobium* 属のバンドは 7A 菌株に、*Sphingobacteriaceae* 科に属するバンドは *Bacteroidetes bacterium* 4F6B 菌株に相当することが明らかにされた (図 2-26)。

集積培養液 C166-1 の古細菌特異的プライマーを用いた経時的な DGGE 解析において 169 菌株や FR-3 菌株が検出されなかった。この理由としては、分離に用いた時点の集積培養液から移植を繰り返したことで優占する水素資化性メタン生成古細菌の種類が変化していた可能性が考えられた。日常の顕微鏡観察においても、移植を繰り返すごとに *Methanobacterium* 属に類似した形態の細胞に対する *Methanospirillum* SR-20 菌株および *Methanosaeta* 属古細菌に類似した形態の細胞の割合が増加していたことが DGGE 解析に反映されたと考えられる。また、169 菌株および FR-3 菌株はプライマー 0348aF-GC/691R を使用した場合、SR-20 菌株と比較して PCR 増幅効率が不良であり (データは示していない)、PCR 増幅効率の違いにより 169 菌株および FR-3 菌株が検出されなかった可能性も考えられた。以上のことから、最終的に集積培養液 C166-1 において *Methanospirillum* SR-20 菌株がメタン生成古細菌として優占し、栄養共生プロピオン酸酸化細菌の水素消費パートナーとして、*Methanosaeta* 属古細菌が酢酸の分解者として働いていることが強く示唆された。

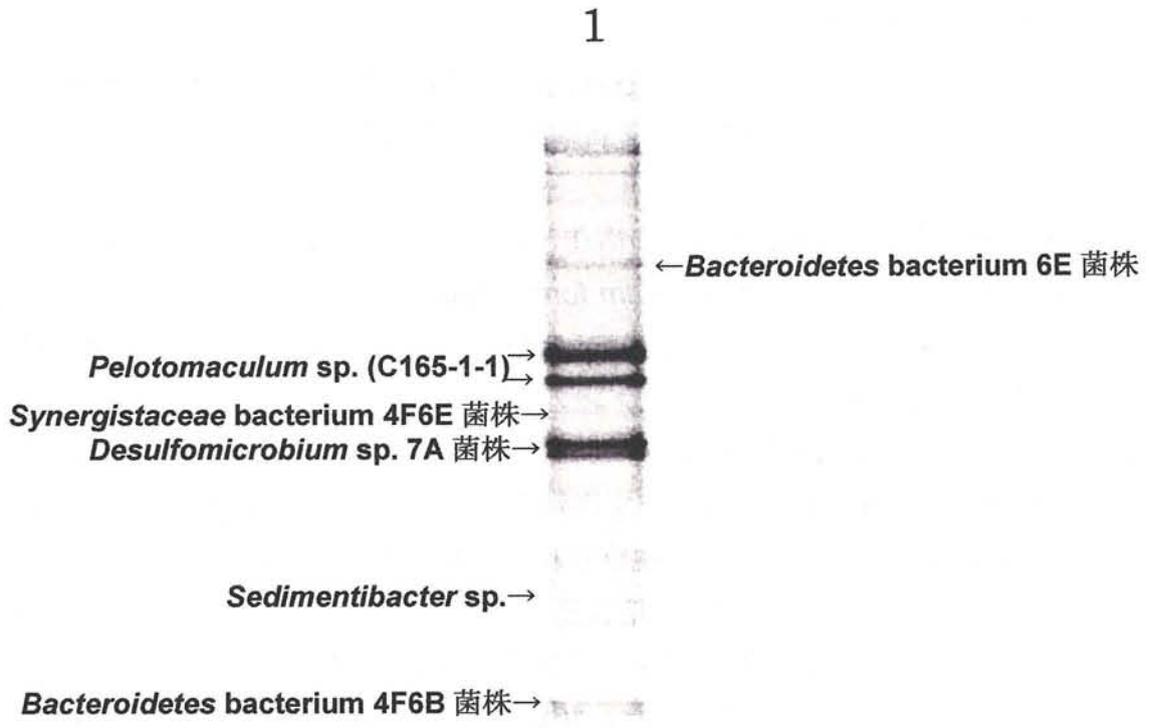


図 2-26. 集積培養液および集積培養液に共存する細菌の DGGE 解析
 レーン 1: プロピオン酸集積培養液 C166-1

2. プロピオン酸集積培養液の水素資化性メタン生成古細菌

水田土壌由来のプロピオン酸集積培養液からメタン生成古細菌 169 菌株、FR-3 菌株、および SR-20 菌株を純粋に分離した。16S rRNA 遺伝子配列の解析結果から、169 菌株および FR-3 菌株は *Methanobacterium* 属菌株、SR-20 菌株は *Methanospirillum* 属菌株に近縁なメタン生成古細菌であると考えられた。

分離菌株のうち 169 菌株は最初に分離され、かつ 16S rRNA 遺伝子配列の他菌株との相同性から新規性が高いと考えられたため、新種として提唱するために詳細な特徴付けを行った。

169 菌株の微細構造のうち、斑紋状の構造と機能の関係については明らかではないが、メタン生成古細菌である *Methanobacterium formicicum* や *M. bryantii* のネガティブ染色においても類似した構造が観察されている(Langenberg *et al.*, 1968)。*M. formicicum* は直径 7nm の網目状繊維構造を持ち、緊密なクランプを形成すると報告されているが、169 菌株では繊維構造は観察されず、*M. formicicum* との差異が示された(Langenberg *et al.*, 1968)。*M. subterraneum* DSM11074^T は 3.6°C でも増殖すると報告されているが、169 菌株は 4°C では増殖せず、増殖可能温度範囲に差が観察された。169 菌株の基質利用性試験において、培養とともにメタン生成と明確な増殖(培養液の白濁)が観察されたのは水素+二酸化炭素だけであった。169 菌株は試験した他の基質を増殖およびメタン生成に利用しなかったため、偏性水素資化性であると考えられた。169 菌株は有機物の添加も必要とせず、ビタミンを添加しない培地に移植を繰り返しても増殖したため、独立栄養的に増殖し、増殖にビタミンが必須ではないことを明らかにした。理由は明らかではないが 20mM 蟻酸塩の添加によりメタン生成が抑制される現象が観察された。細菌のタンパク質合成を阻害するストレプトマイシン、ネオマイシンや細菌細胞壁合成を阻害するバシトラシンにおいてメタン生成が抑制または阻害された原因は明らかではないが、169 菌株に対して抑制的または阻害的な効果を持つという結果が示された。ナリジキシン酸では培養後の pH がいずれも 6.5 付近にまで低下していたため、pH の低下によりコントロールより低い値を示した可能性もあるが、100mg l⁻¹ から 500mg l⁻¹ の間で急激な比増殖速度の低下が見られたため、ナリジキシン酸の濃度依存的な増殖抑制も起こったと推察される。ナリジキシン酸は細菌の DNA ジャイレースのサブユニット *gyrA* と相互作用することで DNA の複製と転写を阻害すると考えられているが、既知のメタン生成古細菌の分離菌株について感受性を試験した例は *M. subterraneum* の 1 例しかなく(Kotelnikova *et al.*, 1998)、ナリジキシン酸がメタン生成古細菌の生育を阻害するという報告はない。一方で、*M. ivanovii*, *M. thermoautotrophicum* などのメタン生成古細菌は DNA ジャイレースのサブユニット *gyrB* と相互作用するクーマイシン及びノボピオシンに感受性であり、*Methanosarcina barkeri* はサブユニット *gyrA* と相互作用するシプロフラキサシンに感受性であると報告されており(Sioud *et al.*, 1988)、メタン生成古細菌や高度好塩菌においても真正細菌の DNA ジャイレースに類似した酵素

が存在することが示唆されている。現在までにメタン生成古細菌が DNA ジャイレースを有しているという直接的な証拠は得られていないが、169 菌株がナリジキシン酸により生育が抑制された理由として DNA ジャイレースに類似した酵素を持つ可能性が考えられる。*M. subterraneum* は 500 mg l^{-1} のナリジキシン酸および 100 mg l^{-1} のストレプトマイシンに非感受性であると報告されているが (Kotelnikova *et al.*, 1998)、169 菌株は感受性を示したため、両菌株の抗生物質に対する応答に差異があることが明らかにされた。16S rRNA 遺伝子配列の相同性検索および 16S rRNA 遺伝子配列に基づき作製した系統樹 (図 2-13) から、169 菌株は *M. subterraneum* と系統的に近縁である事が示唆された。16S rRNA 遺伝子配列の相同性においては 97%未満が別種とする基準と考えられているが、169 菌株は既知のメタン生成古細菌の標準菌株に対していずれも 97%未満の相同性を示したため、*Methanobacterium* 属に属する新種であることが示唆された。*Methanobacterium* 属に属する偏性水素資化性と考えられている菌株と 169 菌株との 16S rRNA 遺伝子配列相同性マトリックスを表 2-19 に示した。169 菌株は最大でも 95.5%の相同性しか示さず、表 2-19 に示したいずれの菌株とも別種であることが示唆された。

表 2-19. 169 菌株と近縁な偏性水素資化性メタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子配列の相同性マトリックス

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 strain 169	100	94.7	94.5	95.5	94.0	93.9	93.1	91.4	90.3
2 <i>M. alcaliphilum</i> str. WeN4 ^T	94.7	100	95.0	95.1	94.7	94.9	93.7	92.0	91.0
3 <i>M. bryantii</i> str. RiH2	94.5	95.0	100	94.7	94.4	94.6	97.5	96.0	95.0
4 <i>M. aarhusense</i> str. H2-LR ^T	95.5	95.1	94.7	100	94.8	95.1	93.4	91.9	90.6
5 <i>M. congolense</i> str. C ^T	94.0	94.7	94.4	94.8	100	99.1	92.7	91.2	90.2
6 <i>M. curvum</i> str. Px1	93.9	94.9	94.6	95.1	99.1	100	92.7	91.6	90.7
7 <i>M. ivanovii</i> str. OCM140	93.1	93.7	97.5	93.4	92.7	92.7	100	95.8	95.6
8 <i>M. uliginosum</i> str. Kf1-F1	91.4	92.0	96.0	91.9	91.2	91.6	95.8	100	96.1
9 <i>M. espanolae</i> str. GP9 ^T	90.3	91.0	95.0	90.6	90.2	90.7	95.6	96.1	100

16S rRNA 遺伝子配列の相同性検索の結果、169 菌株は *M. formicicum* DSMZ1535^T に 96.4%、*M. subterraneum* DSM 11074^T に 96.8%と、別種とする基準の 97%未満を下回ってはいたが高い相同性を示したため、169 菌株が新種であることを確証するためより詳細に形態・生理・生化学的特徴の比較を行った。

表 2-20 に 169 菌株および *Methanobacterium* 属の他種の形態的・生理的特徴について示した。Kotelnikova ら(Kotelnikova et al., 1998)によると *M. subterraneum* が 0.1~0.15 μ m × 0.6~1.2 μ m と細胞長が短く、繊維状の形態をとらないのに対し、169 菌株は 0.35~0.5 × 1.6~5 μ m と *M. subterraneum* に比べて細胞長が長く、繊維状の形態を取ることがあり、*M. subterraneum* とは異なる特徴を示した。また、グラム染色性は *M. subterraneum* が陽性とされている(Kotelnikova et al., 1998)のに対し、169 菌株はグラム不定であった。基質利用性については、*M. formicicum* と *M. subterraneum* が蟻酸を利用すると報告されている(Bryant & Boone, 1988; Kotelnikova et al., 1998)のに対し、169 菌株は蟻酸を利用せず、増殖に水素+二酸化炭素のみを用いる偏性水素資化性であった。また、169 菌株は pH6.5 から 7.0 で良好に増殖したが、*M. formicicum* と *M. subterraneum* は増殖が不良であると報告されている(Bryant & Boone, 1988; Kotelnikova et al., 1998)。 *M. formicicum* が酢酸塩の添加により増殖が促進される(Bryant & Boone, 1988)のに対し、169 菌株は促進されなかった。169 菌株と系統的に最も近縁であった *M. subterraneum* は 100mg l⁻¹ のストレプトマイシン及び 500 mg l⁻¹ ナリジキシン酸に対して非感受性であると報告されており(Kotelnikova et al., 1998)、両菌株の抗生物質に対する応答に差異があることが示唆された。 *M. subterraneum* の G+C 含量は 54.5%であるとされているのに対し、169 菌株は 39.3mol% と *M. subterraneum* に対して低い値を示した。形態、生理・生化学的特徴における以上の点について *M. formicicum* および *M. subterraneum* と 169 菌株は明らかに異なっていたことから、169 菌株は *Methanobacterium* 属に属する新種であると考えられた。169^T 菌株(= DSM 22026^T = JCM 15797^T)を基準菌株として新種 *Methanobacterium kanagiense* を提案し、記載した(Kitamura et al. *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from Japanese rice field soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* June 2011. 61:1246-1252)。

新種 *Methanobacterium kanagiense* の記載

Methanobacterium kanagiense sp. nov. の記載

Methanobacterium kanagiense (ka.na.gi.en'se. N.L. n. adj. *kanagiense* pertaining to Kanagi, Aomori, Japan, where the organism was isolated)

グラム不定を示し、細胞の形態は桿状[1.6~5.0 μ m (長さ) × 0.35~0.5 μ m (直径)]で、細胞の両末端に繊毛を有する。高層寒天培地中のコロニーは円盤状でクリーム色のコロニーを形成する。孢子形成能は確認されない。15~45℃で増殖し、最適増殖温度は 40℃。

増殖可能 pH 範囲は 6.5~9.6 で、増殖最適 pH 範囲は 7.5~8.5、増殖可能 NaCl 濃度範囲は 0~7%(w/v)で、増殖最適 NaCl 濃度は 0.5%。増殖基質として水素+二酸化炭素のみを利用し、メタンを生成する。蟻酸、メチルアミン、酢酸、ピルビン酸、メタノールや他のアルコールは増殖基質として利用しない。増殖にビタミンを必要とせず、有機物の添加なしにミネラル培地で独立栄養的に増殖する。増殖は酢酸または酵母エキスにより促進されない。DNA G+C 含量は 39.3 mol%。

基準菌株は 169^Tであり、JCM と DSMZ に、それぞれ DSM 22026^T、JCM 15797^Tの寄託番号で寄託した。この菌株は水田土壌を起源とする嫌気性のプロピオン酸酸化集積培養液から分離された。

表 2—20. *Methanobacterium kanagiense* sp. nov と他の *Methanobacterium* 属菌種の形態的・生理的性質の比較

Characteristic	<i>M. kanagiense</i> 169 ^T	<i>M. formicicum</i> DSM 1535 ^T	<i>M. subterraneum</i> DSM 11074 ^T	<i>M. alcaliphilum</i> DSM 3387 ^T	<i>M. palustre</i> DSM 3108 ^T
Morphology:					
Size(μm)	0.35-0.5 × 1.6-5	0.4-0.8 × 2-15	0.1-0.15 × 0.6-1.2	0.5-0.6 × 2-25	0.5 × 2.5-5
Long rods	+	+	-	+	+
Filaments	+	+	-	+	+
Gram stain results	variable	variable	+	-	+
Fimbriae	+	+	ND	ND	ND
Catabolic substrates:					
H ₂ /CO ₂	+	+	+	+	+
Formate	-	+	+	-	+
Growth requirements:					
Chemoautotrophic	+	+	+	-	+
Acetate stimulates growth	-	+	-	-	ND
Compounds stimulating growth	-	-	-	YE, P	ND
Conditions supporting most rapid growth:					
pH range (optimum)	6.5-9.6 (7.5-8.5)	6.6-7.8 (ND)	6.5-9.2 (7.8-8.8)	7.0-9.9 (8.1-9.1)	ND (7)
Temperature range, °C (optimum)	15-45 (40)	25-50(37-45)	3.6-45(20-40)	ND (37)	20-45 (33-37)
Salinity, M(optimum)	0-1.2 (0.086)	NT	0-1.4(0.2-1.25)	ND	0-0.3 (0.2)
Mol% G + C	39.3	41-42	54.5	57	34
Reference	This study	1	2	3	4

For symbols see definitions: -, negative; +, positive; YE, yeast extract; P, peptones. ND, not determined. NT, not tested

1, Bryant & Boone, 1987; 2, Kotelnikova et al., 1998; 3, Worakit et al., 1986; 4, Zellner & Winter, 1987

FR-3 菌株は形態的特徴、基質利用性から *Methanobacterium* 属のメタン生成菌と近縁であることが示唆された。16S rRNA 遺伝子配列の相同性が *Methanobacterium formicicum* strain MF^T に対して 100%であった結果から、水素・蟻酸資化性メタン生成古細菌 *Methanobacterium formicicum* と同種であることが示された。

SR-20 菌株は形態的特徴および 16S rRNA 遺伝子配列解析の結果から、*Methanospirillum* 属に属する水素資化性メタン生成古細菌であると考えられた。SR-20 菌株の 16S rRNA 遺伝子配列は *Methanospirillum hungatei* JF-1^T に対して最も高い 98.4%の相同性を示し、別種とする基準値 (97%未満) を上回っていた。しかし *Methanospirillum hungatei* JF-1^T がメタン生成基質として蟻酸を利用すると報告されているのに対して、SR-20 菌株は利用せず、基質利用性における差異が観察された。新種であるかどうかの判定にはさらに詳細な生理・生化学的特徴付けや DNA-DNA ハイブリダイゼーションなどの検討が必要であると考えられた。

3. プロピオン酸酸化細菌

栄養共生プロピオン酸酸化細菌の分離のため、段階希釈、加熱処理、アガーシェイク法、増殖因子の添加やモリブデン酸ナトリウムの添加など複数の方法を検討した。しかしいずれの方法によっても純粋分離に至らなかったことから、集積培養液 C166-1 に存在する *Pelotomaculum* 属細菌の分離において本研究で行った方法は効果的でないことが示された。

4. プロピオン酸集積培養液に共存する細菌

16S rDNA 配列に基づいた簡易同定から 4F6E 株は *Synergistaceae* 科の細菌株であることが分かっている。4F6E 株の以下の特徴—絶対嫌気性、非孢子形成、グラム染色陰性、桿菌、増殖に酵母エキスを必要とする、アミノ酸分解性細菌である—は *Synergistaceae* 科細菌の共通の特徴であり、形態学、生理学的な面からも 4F6E 株が *Synergistaceae* 科に属することが示唆された。

4F6E 株の 16S rRNA 遺伝子配列の *Synergistaceae* 科の基準種(Type species)である *Synergistes jonesii* ATCC 49833^T (McSweeney *et al.*, 1993) の 16S rRNA 遺伝子配列に対する類似性は 83.6%と、別属であるとする目安 95.0%未満(Ludwig *et al.*, 1998)よりも低い値であった。さらに、最近縁種である基準種 *Aminobacterium colombiense* DSM 12261^T (Baena *et al.*, 1998) の 16S rRNA 遺伝子配列に対する類似性は 89.5%と、別属であるとする目安 95.0%未満よりも低い値であった。そのため、4F6E 株は *Synergistaceae* 科の新規細菌株であることが示唆された。しかし、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統樹 (図 2-20) では、*Aminobacterium colombiense* DSM 12261^T、*Aminobacterium mobile* DSM 12262^T (Baena *et al.* 2000) と高いブートストラップ値で支持される共通のクレードを形成し、また、*A. colombiense* DSM 12261^T と *A. mobile* DSM 12262^T の 16S rRNA 遺伝子配列

の類似性は同属であるにも関わらず91.3%と低い値を示していることから、4F6E株は、*Aminobacterium*属に属する可能性が考えられた。そこで、表2-20に、4F6E株と*A. colombiense* DSM 12261^Tと*A. mobile* DSM 12262^Tの特徴比較を示した。生理的な性質で共通していたのはいずれの菌株も同程度のNaCl耐性を示すことのみで、増殖温度範囲、利用できる基質には差異があった。以上のことから4F6E株は*Aminobacterium*属とは別属である可能性も否定できない。*A. colombiense*と*A. mobile*は*Methanobacterium formicicum*と共培養することで、単独では利用できないアミノ酸を数種類利用できることが報告されている(表2-20)(Baena *et al.*, 2000b; Baena *et al.*, 1998)。そのため、4F6E株と*Aminobacterium*属とを明瞭に関係付けるためには*M. formicicum*との共培養でのアミノ酸利用性試験を行う必要がある。

表 2-20. 4F6E 株 *A. colombiense* DSM 12261^T と *A. mobile* DSM 12262^T の特徴比較

	4F6E	<i>A. colombiense</i> DSM 12261 ^{T1}	<i>A. mobile</i> DSM 12262 ^{T2}
細胞形態	Curved	Curved	Curved
細胞サイズ (μm)	0.8×2.0-2.5	0.2-0.3×3.0-4.0	0.3×4.0-5.0
運動性	+	-	+
ゲノム DNA の G+C 含量(mol% G+C)	59.1	46	44
増殖温度範囲 (°C)	15-55	20-42	35-42
増殖至適温度 (°C)	25-40	37	37
増殖 NaCl 範囲 (% v/v)	0-1.5	0-1.5	0-1.5
増殖至適 NaCl 濃度 (% v/v)	0-0.5	0.05-0.5	0.05-0.5
基質利用性試験：			
ピルビン酸	+	+	+
コハク酸	-	-	-
リンゴ酸	+	+	-
フマル酸	-	-	-
クエン酸	-	-	-
α-ケトグルタル酸	+	+	+
乳酸	-	-	-
酢酸	-	-	-
プロピオン酸	-	-	-
酪酸	-	-	-
蟻酸	-	ND	ND
L-セリン	+	+	+
L-トレオニン	-	+	+
L-システイン	+	+	+
L-アラニン	+	+	+
L-グルタミン酸	+	+	+
L-バリン	+	+	+
L-イソロイシン	-	+	+
L-プロリン	-	-	-
L-メチオニン	-	+	-
L-アスパラギン酸	+	+	+

L-ロイシン	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-フェニルアラニン	1000	-	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-ヒスチジン	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-アスパラギン	1000	-	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-グルタミン	1000	-	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-アルギニン	1000	-	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-リシン	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
グリシン	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-チロシン	1000	-	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+
L-トリプトファン	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+	1000	+

¹S. Baenaら、(Baena *et al.*, 1998)、²S. Baenaら(Baena *et al.*, 2000a)のデータを使用。¹と²は *M. formicicum*との共培養時のみ利用。+：利用した，-：利用しなかった。*は、いずれの菌株もカザミノ酸を利用した。

16S rRNA 遺伝子配列解析に基づき、4F6B 菌株は *Mucilaginibacter daejeonensis* に、6E 菌株は *Meniscus glaucopis* に最も近縁であることが示唆された。4F6B 株の *Mucilaginibacter daejeonensis* に対する 16S rRNA 遺伝子配列の類似性は 86%、6E 菌株の *Meniscus glaucopis* に対する 16S rRNA 遺伝子配列の類似性は 89.1%と、いずれも別種であるとする目安の 97%未満、別属であるとする目安 95.0%未満(Ludwig *et al.*, 1998)よりも低い値を示したため、4F6B 菌株および 6E 菌株は少なくとも新種であると考えられた。

7A 菌株は、16S rRNA 遺伝子配列解析に基づき *Desulfomicrobium norvegicum* DSM 1741(Sharak Genthner *et al.*, 1997)に最も近縁であることが示された。*Desulfomicrobium norvegicum* DSM 1741 に対する 16S rRNA 遺伝子配列の類似性は 98.9%であり、別種であるとする目安の 97%未満を上回っていた(Ludwig *et al.*, 1998)。しかし、*Desulfomicrobium norvegicum* が発酵性基質としてフマル酸、リンゴ酸を利用するのに対し(Sharak Genthner *et al.*, 1997)、7A 菌株はいずれも利用せず (表 2-15)、両者の基質利用性に明らかな差異が観察された。従って 7A 菌株が *D. norvegicum* とは種レベルで異なる可能性も考えられた。以後、7A 菌株を *Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株と表記する。

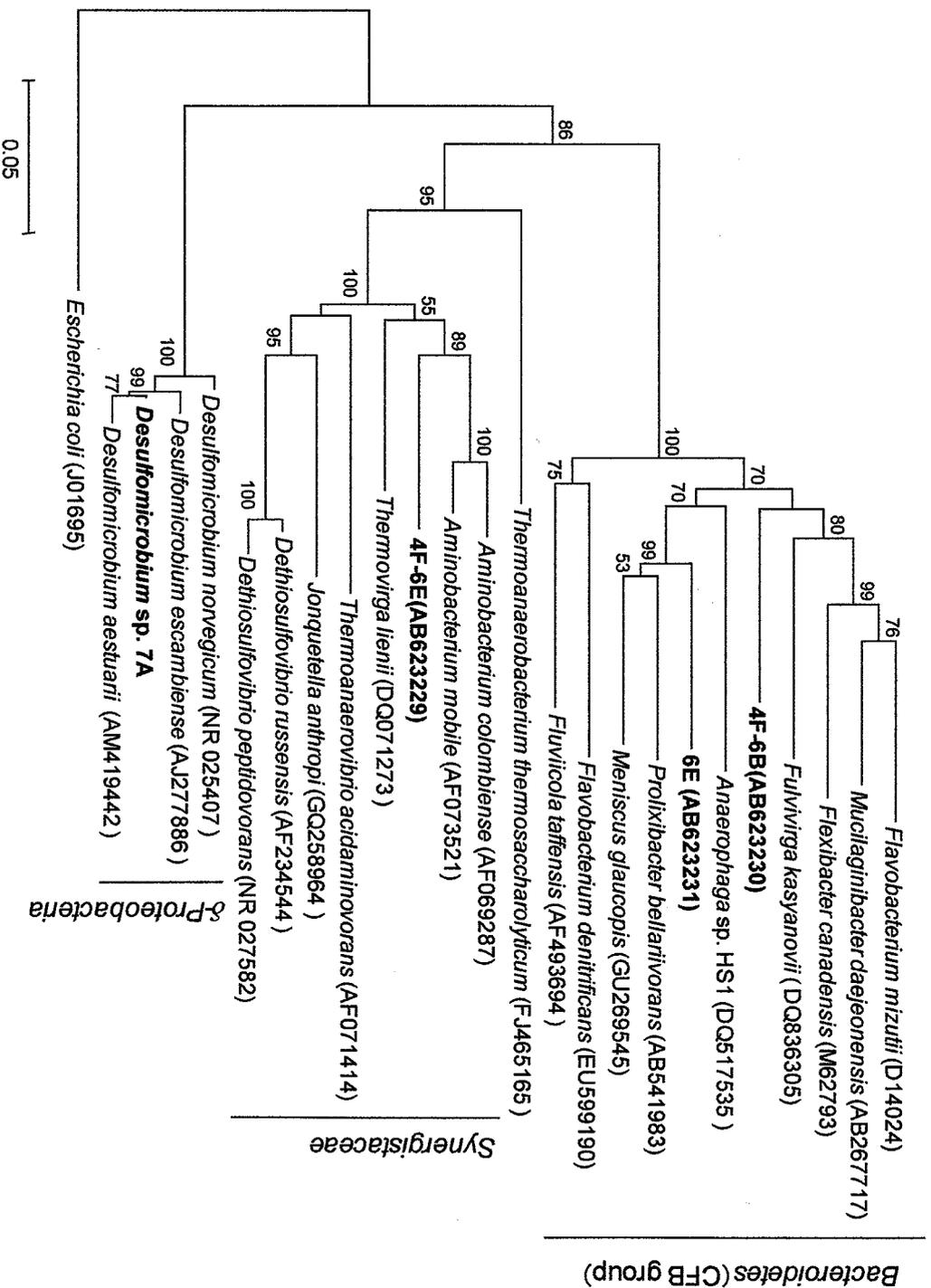


図 2-27. 4F6B 菌株、4F6E 菌株、6E 菌株、7A 菌株の最近縁種との 16S rDNA 配列に基づく近隣結合樹。()内には配列のアクセシオン番号を示した。各ノード値はブートストラップ値を示し、スケールバーは配列座位あたりの塩基置換数を示す。*Escherichia coli* (J01695) をアウトグループとした

5. プロピオン酸酸化系における微生物間の相互作用に関する考察

プロピオン酸集積培養液からは水素資化性メタン生成古細菌として *Methanobacterium kanagiense* 169 菌株、*Methanobacterium formicicum* FR-3 菌株、*Methanospirillum hungatei* SR-20 菌株が分離され、酢酸資化性メタン生成古細菌として *Methanosaeta* 属菌株の存在が確認された。栄養共生プロピオン酸化細菌と推定された *Pelotomaculum* 属細菌の純粋分離には至らなかったが、共存する細菌として *Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株や *Synergistaceae* bacterium 4F6E 菌株、*Bacteroidetes* bacterium 4F6B 菌株、*Bacteroidetes* bacterium 6E 菌株が分離された。

M. kanagiense 169 菌株、*M. formicicum* FR-3 菌株、*Methanospirillum hungatei* SR-20 菌株は栄養共生プロピオン酸化における水素消費パートナーとして、*Methanosaeta* 属菌株はプロピオン酸の酸化により生成される酢酸の消費者として働いていたと推察される。

Desulfomicrobium sp. 7A 菌株は発酵性基質としてピルビン酸を利用し、メタン生成菌との共生状態では、基質としてリンゴ酸、フマル酸、ピルビン酸を利用した (表 2-17)。また、*Synergistaceae* bacterium 4F6E 菌株はピルビン酸、リンゴ酸を利用し、*Bacteroidetes* bacterium 4F6B 菌株はピルビン酸、*Bacteroidetes* bacterium 6E 菌株はフマル酸、コハク酸、リンゴ酸、ピルビン酸を利用した (表 2-22)。これらの基質はすべてプロピオン酸の嫌氣的酸化経路であるメチルマロニル CoA 経路における中間代謝物である (Schink, 1997)。共存している細菌が継代培養を繰り返しても脱落せず、これらの基質を共生状態または発酵により利用できるという結果は、集積培養液において共存細菌が栄養共生プロピオン酸化により生成される中間代謝物を利用して増殖している可能性を示唆した。

しかし、プロピオン酸酸化の中間代謝物を利用して増殖する微生物の存在を裏付ける直接的な証拠はなく、RNA-SIP を用いた研究において *Smithella* 属細菌がプロピオン酸を不均化して生成した中間代謝物の ^{13}C -酪酸を *Syntrophomonas* 属細菌が取り込み増殖した可能性が言及されたのみである (Lueders *et al.*, 2004)。現在までに *Pelotomaculum* 属細菌や *Syntrophobacter* 属細菌に関しては間接的な証拠も示されておらず、中間代謝物の消費が栄養共生プロピオン酸酸化細菌に対して有益に働くかどうかは明らかではない。

データは示していないが、本研究で用いた集積培養液においては、少なくとも島津有機酸分析システムによるイオン排除型 HPLC 分析の検出限界 (約 0.1mM) を越える濃度の酢酸およびプロピオン酸以外の代謝物は検出されず、プロピオン酸酸化細菌から中間代謝物が漏出したとしても極めて微量であることが考えられた。しかし、*Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株の DGGE 解析におけるバンドの蛍光強度は C165-1-1 と同等程度であり (図 2-5)、その存在量は微量な中間代謝物により増殖した結果とは考え難い。従って、プロピオン酸酸化細菌が生産した中間代謝物のかなりの量を、共存する *Desulfomicrobium* sp. 7A 菌株などが利用し速やかに消費していると推察される。近年、安定同位体を用いた DNA-SIP と NMR によるメタボローム解析と DGGE 解析の組み合わせにより代謝産物と微生物群の相

互関係を解析する手法が開発され、実際にグルコース利用性細菌の代謝産物が他の細菌に利用される代謝産物の動態をモニタリングすることに成功している(Date *et al.*, 2010)。また、NMRと安定同位体標識を用いることで生きた細菌の代謝産物を解析する手法が開発され、*Bifidobacterium longum*の産生したアミノ酸を*Escherichia coli* O157が利用するという細菌間相互作用が明らかにされている(Nakanishi *et al.*)。これらの手法をプロピオン酸酸化集積培養液に適用することで、プロピオン酸酸化細菌と共存細菌の代謝産物の流れを明らかにすることが可能になると期待される。

一方で、近年種間電子伝達や中間代謝物を利用する以外の共生関係も自然界に広く存在することが明らかにされてきている(福井作蔵・秦野琢之, 2008)。アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素の相補による微生物間共生も報告されており、例としてビフィズス菌*Bifidobacterium*に対するプロピオン酸菌*Propionibacterium freudenreichii*の培養上清(増殖促進活性物質として2-amino-3-carboxyl-1,4-naphthoquinoneを含む)の添加が増殖を促進する現象などが挙げられる(Mori *et al.*, 1997)。近年分離された*Syntrophobacter sulfatireducens*(Chen *et al.*, 2005)は、培養液中に共存していた*Proteiniphilum acetatigenes*(Chen & Dong, 2005)の存在下で栄養共生プロピオン酸酸化が促進されたという報告がなされている。*Desulfomicrobium* sp. 7A菌株や*Synergistaceae* bacterium 4F6E菌株、*Bacteroidetes* bacterium 4F6B菌株、*Bacteroidetes* bacterium 6E菌株は*P. acetatigenes*と系統的な類縁関係は低かったが、類似した栄養共生プロピオン酸酸化の促進効果を有する可能性が考えられる。これらの菌株がビタミンなどの増殖促進物質を分泌し、栄養共生細菌の代謝・増殖に対して有益に働いている可能性も考えられる。本研究でプロピオン酸酸化細菌を純粋分離することができなかった理由の一つとして、共存する細菌の分泌物がプロピオン酸酸化細菌の増殖に必須であるか、または増殖を促進している可能性も否定出来ない。プロピオン酸酸化細菌と水素消費パートナーの共生関係に付随する形で、共存する細菌が増殖基質の供給に対して増殖因子の分泌を行う、共生関係が存在することが示唆された。

Desulfomicrobium sp. 7A菌株や*Synergistaceae* bacterium 4F6E菌株のような細菌の代謝がプロピオン酸酸化細菌に与える影響は現時点では不明であるが、実際の水田土壌においてはさらに多様な細菌がプロピオン酸酸化細菌と共存していることは容易に想像される。環境中ではプロピオン酸酸化細菌である*Pelotomaculum*属細菌と水素資化性メタン生成古細菌*Methanobacterium*属古細菌、*Methanospirillum*属古細菌との一対一の単純な系ではなく、中間代謝物を利用する複数の細菌が関与しながら栄養共生プロピオン酸酸化が行われていると推察される(図2-28)。従って栄養共生プロピオン酸酸化に関わる微生物の生態を明らかにするために、プロピオン酸酸化細菌とメタン生成古細菌との純粋な共培養に対する*Desulfomicrobium* sp. 7A菌株や*Synergistaceae* bacterium 4F6E菌株の添加がプロピオン酸酸化に与える影響を評価する必要がある。

表 2-22. 共存菌株におけるプロピオン酸酸化経路に関わる基質の利用性

物質名	4F6E	4F6B 菌株	6E 菌株	7A 菌株	共培養での 基質利用性*
	発酵性基質	発酵性基質	発酵性基質	発酵性基質	
蟻酸	—	—	—	—	—
酢酸	—	—	—	—	—
プロピオン酸	—	—	—	—	—
酪酸	—	—	—	—	—
コハク酸	—	—	+	—	—
リンゴ酸	+	—	+	—	+
フマル酸	—	—	+	—	+
ピルビン酸	+	+	+	+	+

+ : 利用した、— : 利用しなかった、(+) : わずかに利用した。 N.T. : not tested

**M. formicicum* FR-3 菌株との共培養で利用性を試験した。

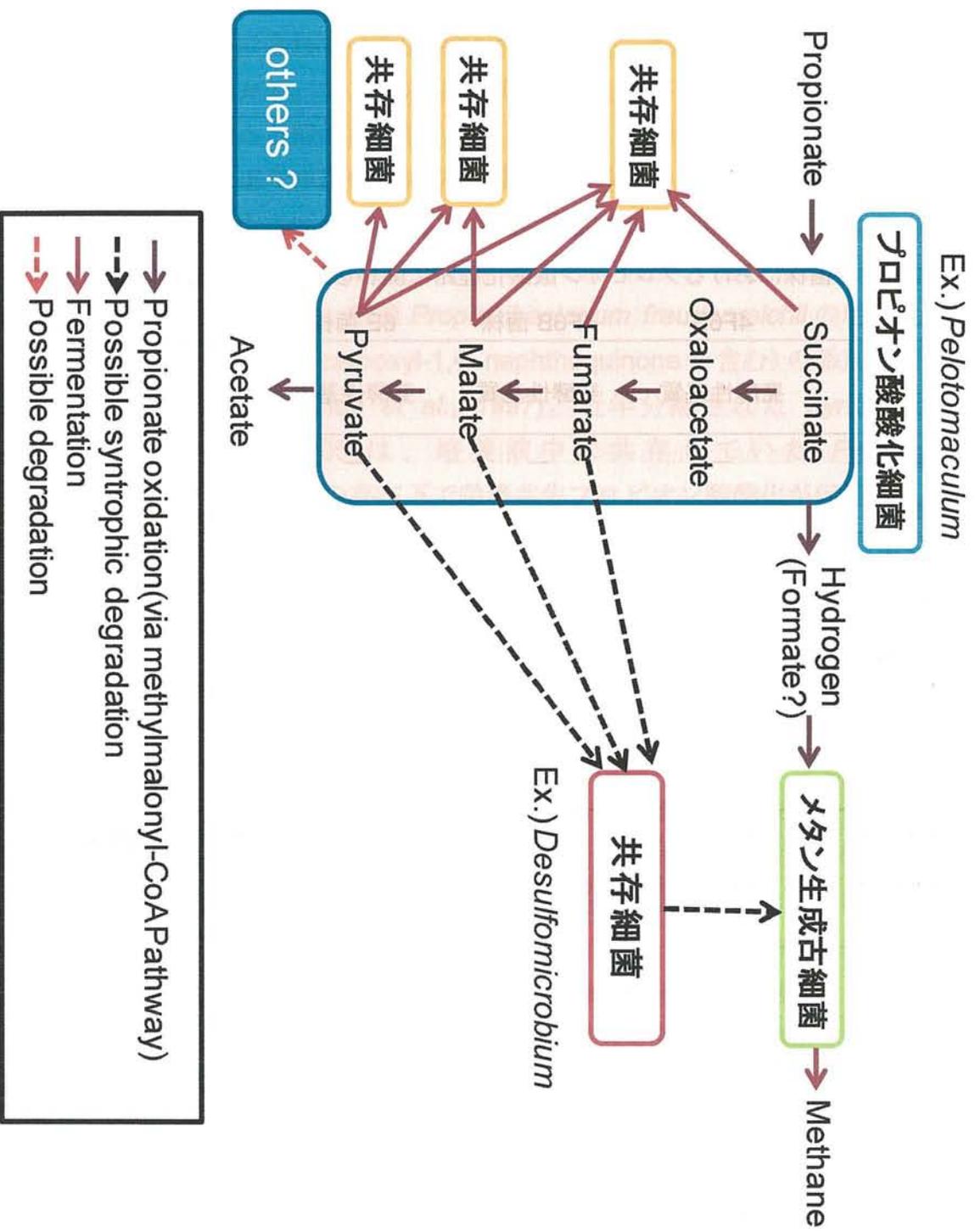


図 2-28. 集積培養液から得られたデータに基づく栄養共生プロピオン酸化系における代謝物を介した相互作用の推定モデル