

嫌気共生培養系を利用した新規培養法によるメタン生成古細菌の分離・培養

長岡技術科学大学 ○(学) 酒井 早苗 (正)井町寛之・大橋晶良・原田秀樹
産業技術総合研究所 (正) 鎌形洋一

1. はじめに

メタン生成古細菌は嫌気環境下における有機物分解過程の最終段階を担う重要な微生物というだけでなく、地球温室効果ガスであるメタンの生成や次世代エネルギーとして注目されているメタンハイドレート形成にも関与していると言われている。従って、メタン生成古細菌を分離し、その詳細な生理学的特徴を把握することは環境問題やエネルギー問題を考える上で極めて重要な課題の1つである。

現在までに命名・記載されているメタン生成古細菌の数は100種程度であるが、近年の16S rRNA 遺伝子情報の蓄積とその分子系統解析の結果から未だ分離培養されていないメタン生成古細菌（と思われる古細菌）が自然環境中に多数存在していることが明らかとなっている。しかしながら、これら未培養メタン生成古細菌は分離が困難とされており、事実、近年新規なメタン生成古細菌の分離報告は極めて少ない。

我々は、新規なメタン生成古細菌を分離できない原因の1つとして、従来までの培養方法に問題があるのではないかと考えた。従来メタン生成古細菌の培養は自然環境中ではあり得ない高水素分圧下（ca. 200 kPa）で行われてきた。しかし、このような条件下で培養を行うと、増殖速度が速くかつ基質に対して高い親和性を要求しないメタン生成古細菌が優占的に培養される可能性が高い。そこで、より自然環境に近い低分圧の水素を供給することができれば未培養メタン生成古細菌を培養できるのではないかと考えた。そして、低分圧の水素を連続的に供給可能な方法として、‘嫌気共生培養系’に着目した。嫌気共生培養系とは、嫌気（メタン生成）環境下でエタノール、酪酸およびプロピオン酸などの分解が、その物質を分解する細菌（＝嫌気共生細菌）とメタン生成古細菌の水素を介した強固な共生関係によって進行する系のことである。これら嫌気共生培養系は、その増殖速度が遅いこと、基質の分解によって生成される水素の分圧は数十～数百 Pa 程度と非常に低いことが知られている。このことは嫌気環境下で共生系によって分解される基質を用いて培養を行うことによって、より自然環境に近い低分圧の水素を緩やかに供給できるため、水素に対して高い親和性を持つメタン生成古細菌（＝新規なメタン生成古細菌）を培養できる可能性を示している。

そこで本研究では、嫌気共生培養系を利用した新規培養法を用いて、今まで人為的に培養が全く出来なかった系統分類群に属するメタン生成古細菌の分離・培養を試みた。

2. 実験方法

水田土壌、河川・湖沼の底泥、嫌気性汚泥など様々な嫌気環境サンプル10種類を植種源に用いて集積培養を行った。培養基質には、水素（ca.200 kPa）、ギ酸（40 mM）、エタノール（10 mM）、酪酸（20 mM）およびプロピオン酸（20 mM）を用い、培養温度37℃で嫌気的に培養を行った。

集積培養系内のクローン解析には古細菌の16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いた。16S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析には近隣接合法を用いた。

3. 結果および考察

(1) 集積培養と集積培養系内のメタン生成古細菌の同定

10種類の嫌気環境サンプルを植種源として、嫌気環境下で嫌気共生細菌とメタン生成古細菌の共生によって分解されるエタノール、酪酸、プロピオン酸を基質として集積培養を行った。また、対照系として従来のメタン生成古細菌の培養方法と同様に高分圧の水素および高濃度のギ酸を基質とした培養も行った。培養日数は、水素およびギ酸の培養では約3日、エタノールでは約1週間、酪酸およびプロピオン酸の培養系では1-3ヶ月程度を要した。また、その時の培養系内の水素分圧は、エタノールでは20-100 Pa、酪酸およびプロピオン酸では20 Pa程度と低く保たれていた。全ての集積培養系内において基質の減少に伴ってメタンが生成されており、それら集積培養系内を顕微鏡で観察する

Keywords: メタン生成古細菌、水素分圧、嫌気共生培養系、分離

〒940-2188 長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 水圏土壌環境制御研究室

とメタン生成古細菌に特有の F_{420} の自家蛍光を持つ微生物が優占的に培養されていた。次に、これら集積培養系内に生育している微生物を調べるために、全ての集積培養系（全 58 集積系）に対して古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析を行った。その結果、全てのクローン配列は既知のメタン生成古細菌が属している *Euryarchaea* 門に属した。また、これらクローンの多様性を培養した基質に注目して解析すると、高分圧の水素あるいはギ酸で培養した場合には、その大多数のクローンは *Methanobacteriales* 目に属していた。一方、エタノール、酪酸およびプロピオン酸集積培養系から回収されたクローン配列の多くは、*Methanomicrobiales* 目やクローン配列でのみ構成されているグループである Rice Cluster I に属していた。この結果は、メタン生成古細菌のグループによって、水素に対する親和性が異なっているということを示唆するものであった。

(2) 新規なメタン生成古細菌の分離・培養

上記の集積培養系内の古細菌のクローン解析の結果から、いくつかのプロピオン酸集積培養系内に *Methanomicrobiales* 目や Rice Cluster I に属する新規なメタン生成古細菌由来と思われるクローン配列が高頻度に検出されていることが明らかとなった。そこで、これら未培養なメタン生成古細菌がプロピオン酸集積培養系内に存在しているかどうかを確かめるために、それぞれのクローン配列に特異的な DNA プローブを作成し、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法による目的微生物の検出を行った。その結果、嫌気共生細菌様以外のほとんどの微生物が作成した DNA プローブに反応していたことから、新規なメタン生成古細菌がプロピオン酸集積培養系内に優占的に生育していることが確認された。

次に、これら集積培養系内から目的のメタン生成古細菌の分離を試みた。プロピオン酸集積培養系を植種源として、一般的にメタン生成古細菌が利用可能な水素やギ酸などを基質に用いて、希釈培養法やロールチューブ法による分離を試みた。しかしながら、その際高分圧の水素や高濃度のギ酸で培養を行うと、先のクローン解析では検出されていなかった *Methanobacterium bryantii* などに近縁なすでに分離されているメタン生成古細菌が生育してきた。そこで、培養温度を変えたり希釈培養を繰り返したりといったさまざまな試みの結果、約 1 年半を費やし *Methanomicrobiales* 目に属する新属を代表するメタン生成古細菌 TNR 株と *Methanomicrobia* 綱の Rice Cluster I に属する目レベルで新規なメタン生成古細菌 SANAE 株を分離することに成功した (Fig. 1)。これら新規なメタン生成古細菌の分離を最も妨げた原因は、それらの増殖速度の遅さにあると考えられる。実際に分離株の倍加時間を決定したところ、両株ともに 3 日程度であり、今までに分離されている水素資化性のメタン生成古細菌 (数十分～数時間) の中では最も遅かった。以上、従来法および嫌気共生培養による集積培養とそのクローン解析の結果、そして分離株の倍加時間の結果は、最初の予測通り低分圧の水素を連続的に供給可能な嫌気共生培養系を用いれば、今までに培養できなかったメタン生成古細菌を選択的に培養・分離できる可能性を示した。

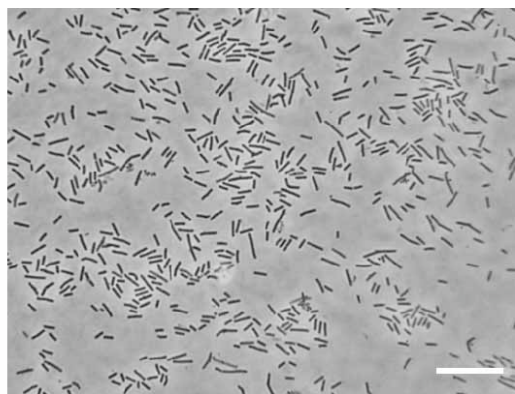


Fig.1 Photomicrograph of strain SANAE, a novel methanogen belonging to the candidate order Rice cluster I. Bar represents 10 μ m.

4. まとめ

様々な嫌気環境から、嫌気共生培養系を利用した新規培養法により未培養系統分類群に属するメタン生成古細菌の分離を試みた。その結果、*Methanomicrobiales* 目に属する属レベルで新規なメタン生成古細菌 TNR 株と *Methanomicrobia* 綱に属する目レベルで新規なメタン生成古細菌のグループである Rice Cluster I に属するメタン生成古細菌 SANAE 株を純粋培養することに成功した。以上、嫌気共生培養系を用いることにより、試験管内に自然環境を模擬した低水素分圧環境を再現し、水素に対する基質親和性が高くかつ増殖速度の遅い (=新規な) メタン生成古細菌を集積培養した後、水素やギ酸などで単独培養させるという戦略は、今後、未培養のメタン生成古細菌を分離する有効な手法の 1 つとなりえると考えられる。