

フローサイトメータを利用した新規なメタン生成古細菌の分離・培養の試み

長岡技術科学大学、(独) 海洋研究開発機構 ○矢代 悠人
(独) 海洋研究開発機構 酒井 早苗
長岡技術科学大学 山口 隆司
(独) 海洋研究開発機構 井町 寛之

1. 研究背景と目的

メタン生成古細菌(メタン菌)は地球温暖化ならびに天然ガス生成といった環境とエネルギーという人類にとって極めて重要な問題に直結している微生物群である。従って、環境中からメタン菌を分離・培養し、その詳細な菌学的特徴を調査することは非常に重要な課題の1つである。しかしながら現在、分離され命名までされたメタン菌の数は100種程度と少なく、その分離・培養は一般に困難であることが知られている。そこで我々は、メタン菌の新規な培養法である「嫌気共生培養法」—嫌気共生細菌と呼ばれる発酵性細菌と水素資化性メタン菌の水素を介した微生物異種間の共生関係を応用した培養方法—を用いることにより様々な環境から新規なメタン菌の分離・培養を試みた結果、従来の培養法では培養が困難だとされてきた新規なメタン菌を集積培養することに成功し、最終的に純粋分離することに成功した[1,2,3,4]。

これまでの結果が示すように、嫌気共生培養法は培養が困難だとされてきたメタン菌の分離・培養を可能にする非常に有効な手法である。しかしながら、本手法にも克服・改善すべき点がある。それは、嫌気共生培養法を用いた集積培養系内に純粋分離したいメタン菌が培養されていた場合に、それを純粋分離するまでに多くの手間と時間がかかることである。嫌気共生培養法の特徴から、集積培養系内には標的とするメタン菌以外にも分離の標的としないメタン菌や嫌気共生細菌等が混在した状態で培養されてくる。従って、最終的に集積培養系内から標的としたメタン菌のみを純粋分離するには、希釈培養やロールチューブ法といった従来の分離手法を用いた分離作業をさらに行う必要がある。その際、分離の標的としていないメタン菌が増殖してしまい、標的のメタン菌の培養が妨げられてしまうことがしばしば問題となっている。加えて、標的とするメタン菌の増殖速度が遅いことがあるために、分離作業に長い期間を要する等の問題もある。事実、我々は嫌気共生培養法による集積培養後、標的としたメタン菌を純粋分離するまでに少なくとも半年から1年以上の期間を要している。つまり、集積培養系から純粋分離するまでの過程が、分離・培養の際の律速段階となっている。以上のことから、今後も嫌気共生培養法を様々な環境サンプルに適用し人為的に分離されていないメタン菌を数多く分離・培養するためには、分離作業過程の効率化が必要不可欠であると考えられる。

そこで我々は、嫌気共生培養法を用いた集積培養系内から標的のメタン菌を純粋分離するための新たな方法として、フローサイトメータを用いた目的細胞(メタン菌)の特異的分取を考案した。メタン菌はF₄₂₀といった自家蛍光を有する特徴的な補酵素を持っており、UVレーザーを搭載したフローサイトメータがあれば、理論的には標的のメタン菌細胞を特異的に分取することができるはずである。そして、もしフローサイトメータの分取機能を用いてメタン菌を分取することが可能となれば、分離作業をより簡便かつ短期間で行うことが可能となるはずである。

本研究では、メタン菌の集積培養法として有効な嫌気共生培養に加え、フローサイトメータを用いることで新規なメタン菌の分離・培養を試みた。

2. 実験方法

メタン菌を培養するための植種源には下水(汚泥A)および食品加工廃水(汚泥B,CおよびD)を処理していた4種類の嫌気性廃水処理プロセスから採取した嫌気性汚泥を用いた。培養温度はそれぞれの廃水処理リアクターの運転温度に準じ設定した。基質にはプロピオン酸(20 mM)および酪酸(20 mM)を、嫌気度を保つための還元剤にはsodium sulfide/cysteineおよびtitanium(III) chlorideを用い、全16種類の培養系を構築した。古細菌の16S rRNA遺伝子に基づいたクローン解析には、古細菌に特異的なプライマーセットArc109f/Univ1490rを用いた。クローン配列の塩基配列決定はApplied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザを用いた。分子系統解析には分子系統解析ソフトARBを用いた。フローサイトメータはBD(Becton Dickinson)社のFACSAriaを使用した。

キーワード: メタン生成古細菌, フローサイトメータ, F₄₂₀, 分離・培養, 嫌気共生培養法

連絡先: 〒237-0061 神奈川県横浜須賀町2-15 (独)海洋研究開発機構 極限環境生物圏研究センター TEL(046)867-9709

3. 嫌気共生培養法を用いた新規なメタン菌の培養

まず、メタン菌の培養を開始する前に、植種源とする嫌気性汚泥にどのような種類のメタン菌がいるかを調べるため、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。各汚泥から作成したクローンライブラリから 50 クローンを選択し、塩基配列決定および分子系統解析を行った結果、*Methanosaeta* 属や *Methanobacterium* 属に属する分離株と近縁なクローンが多く検出された。一方で、既知のメタン菌の 16S rRNA 遺伝子との相同性が 92-95%と低く分類学的に新規なメタン菌由来であると考えられる

クローン配列も検出された。特に、食品加工廃水を処理していた嫌気性汚泥（汚泥 B）から得られたクローンの約 50%は分類学的に新属あるいは新種を代表するようなメタン菌由来の配列であり、それらの多くは *Methanomicrobiales* 目クローンクラスター（16S rRNA 遺伝子クローン配列だけで構成されている未培養微生物群）に属していた。

次に、上記 4 種の嫌気性汚泥を植種源として、プロピオン酸および酪酸を唯一のエネルギー源とした嫌気共生培養を行った。酪酸を基質として用いた培養系では約 1 週間、プロピオン酸を基質とした培養系では約 1 ヶ月で微生物の増殖が観察された。全ての集積培養系において基質の分解に伴ってメタンが生成されており、その時の水素分圧は約 10-30 Pa 程度であった。集積培養系内の顕微鏡観察の結果、培養系内には形態的に異なる数種の微生物が存在しており、メタン菌に特有な F₄₂₀ 様の自家蛍光を発する微生物が観察された（Fig. 1）。

続いて、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行い、集積培養系内のメタン菌の同定を試みた。各集積培養系から無作為に 10 クローンを選択し、それらクローンの塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。その結果、A 汚泥を植種源としたプロピオン酸集積培養系と B 汚泥を植種源とした酪酸集積培養系から *Methanomicrobiales* 目のクローンクラスター MM-1 に属するクローン配列が高頻度に検出された（それぞれ 7/10 クローンと 6/10 クローン）。この他にも既知種との相同性が 92-93%程度の *Methanomicrobiales* 目の新属を代表するようなクローン配列が B 汚泥のプロピオン酸集積培養系（5/10 クローン）および D 汚泥の酪酸集積培養系から（5/10 クローン）検出された。以上の結果から、人為的に培養がなされたことがなかった *Methanomicrobiales* 目に属する新規なメタン菌を集積培養することに成功した。

4. フローサイトメータを用いた分離の試み

これまで、フローサイトメータを用いてメタン菌を生きたまま分取した報告はない。そこで本研究では、嫌気共生培養法によって得られた新規なメタン菌を含んでいる集積培養系をフローサイトメータに供する前に、純粋菌株を用いて検討を行うこととした。まず、大腸菌 (*Escherichia coli*) およびメタン菌 (*Methanococcus maripaludis*) の純粋菌株をそれぞれフローサイトメータに供し、蛍光強度や細胞の形態等の特徴を観察した (Fig. 2, A および B)。その結果、F₄₂₀ を有さない大腸菌細胞とメタン菌の細胞では明確な蛍光強度の差が観察できた。続いて、これらを人為的に混合したサンプルについて同様の観察を行ったところ、Fig. 2, C に示すように、二つの大きな細胞集団のピークが観察され、蛍光強度の違いによってメタン菌のみを識別することが可能であることが強く示唆された。

5. 今後の予定

フローサイトメータによるメタン菌の分取について実験条件や分取条件等の検討、最適化を行い、嫌気共生培養法によって得られた集積培養系から新規なメタン菌の分離を行う予定である。

6. 参考文献

- [1] Sakai, S. et al., 2007. Appl. Environ. Microbiol., 73: 4326-4331.
- [2] Imachi, H. et al., 2008. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58: 294-301.
- [3] Sakai, S. et al., 2008. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., in press.
- [4] Jones, S., 2007. Nature Rev. Microbiol., 5: 476.

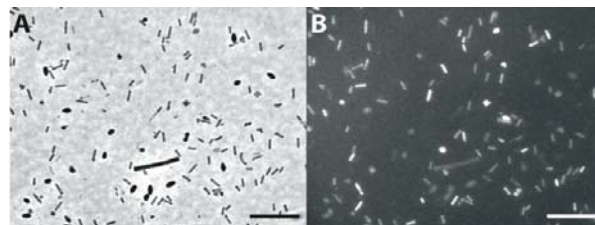


Fig. 1 Photomicrographs of a syntrophic, propionate-degrading enrichment culture that contains a novel methanogen belonging to clone cluster 'MM-1' within the order *Methanomicrobiales*. Phase contrast (A) and epifluorescent micrograph (B) indicating F₄₂₀ autofluorescence methanogen-like cells for an identical field. Bars represent 10μm.

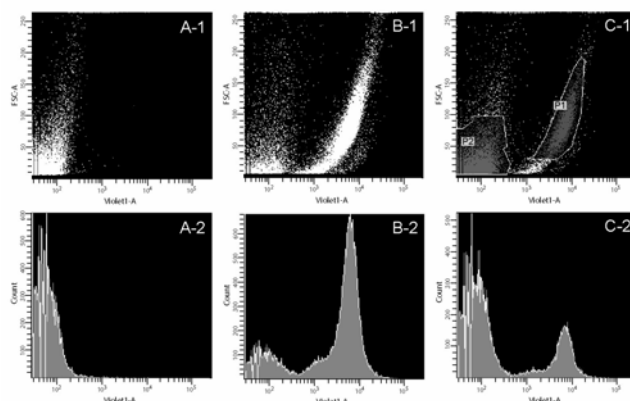


Fig. 2 Flow cytometric analysis of *E. coli* and *M. maripaludis* cells. Behavior of forward scatter (panel 1) and distribution of cell counts (panel 2) to autofluorescence intensity are shown. Panel A, *E. coli*; Panel B, *M. maripaludis*; Panel C, artificially-mixed sample of *E. coli* and *M. maripaludis*. In the Panel C, P1 region indicates high-fluorescence intensity cells derived from *M. maripaludis* cells. P2 region demonstrates low-fluorescence intensity cells taken from *E. coli* cells.