

排水処理リアクターを用いた嫌氣的メタン酸化反応を担う深海底難培養性アーキアの培養

長岡技術科学大学 学生会員 ○青木仁孝, 山口隆司
(独) 海洋研究開発機構 井町寛之

1. はじめに

深海底環境において生成される莫大な量のメタンは、海水中に放出される前に微生物による嫌氣的メタン酸化反応によりその多くが酸化分解されていることが推定されている。その反応は *archaeal anaerobic methanotroph* (ANME) と呼ばれるアーキアが硫酸還元細菌等と共生することでその反応を担うと考えられている。さらに最近の研究では、ANME 以外のアーキアも嫌氣的メタン酸化反応に直接あるいは間接的に関与していることが指摘されている。しかしながら、これらの嫌氣的メタン酸化反応を担うアーキアは、その増殖の遅さ(倍加時間が数ヶ月)や他の微生物との共生に依存した生育をする特徴を持つ難培養性微生物であるために従来の培養法では培養することが極めて困難なことが知られており、これまでに純粋分離株の報告はない。そのために、嫌氣的メタン酸化反応を担うアーキアの詳細な生理学的・遺伝学的特徴は十分に理解されていない。そこで我々は、嫌氣的メタン酸化反応を担うアーキアを効率良く培養するために、排水処理リアクターとして開発された下降流懸垂型スポンジ (down-flow hanging sponge: DHS) リアクターを利用した培養法¹⁾を利用することとした。本発表では、DHS リアクターを利用することで嫌氣的メタン酸化反応を担うアーキアの集積培養に成功した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 植種源と DHS リアクター

植種源には、化学分析の結果から嫌氣的メタン酸化反応が起きていることが確認されている南海トラフの冷湧水帯の深海底堆積物(和歌山県沖, 水深 2,500 m)を使用した。DHS リアクターには、塔長 1,200 mm, 内径 68 mm の円筒形をした密閉型アクリル製容器を用いた。リアクター内部には、1 辺が 3 cm の立方体スポンジ担体をナイロン製の糸で数珠なりに連結してリアクター上部から吊り下げた。水理的滞留時間は 20 時間とし、10 °C の恒温器内で連続運転を行った。嫌氣的メタン酸化反応の電子受容体である硫酸を含む人工海水は、窒素ページ後、pH 7.5 に調整してリアクター上部から供給した。メタンガスはリアクター下部から供給した(Fig.1)。DHS

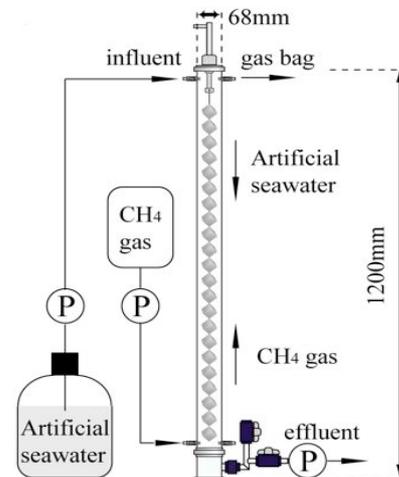


Fig.1 Schematic diagram of the DHS reactor used in this study.

リアクターは大気圧下での運転を行った。

2.2 嫌氣的メタン酸化活性の測定

¹³C 標識メタンをトレーサーとして用いる方法²⁾に若干の変更を加えて測定した。

2.3 16S rRNA およびその遺伝子に基づいた解析

アーキアの 16S rRNA に基づいたクローン解析および 16S rRNA 遺伝子に基づいた Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析は、Arch21F と Ar912R のプライマーセットを用いて行った。T-RFLP 解析では、制限酵素 *HhaI* および *HaeIII* を用いた。クローン解析により得られた配列は、分子系統解析ソフト ARB により分子系統学的な解析を行った。Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法あるいは catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法によるアーキア細胞の検出は、各アーキアグループの 16S rRNA に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて行った。

3. 実験結果および考察

3.1 DHS リアクターを用いた嫌氣的メタン酸化微生物群集の培養

現在、DHS リアクターは約 2000 日間の連続運転を行っている。安定的にリアクターが運転できているかを確認するために、ほぼ毎日、流出水の pH および酸化還元電位の測定を行った。リアクターの運転初期には、リアクター内部を安定的に嫌気状態に保てないという問題が発生した。そのため、人工海水のタンクやその蓋の部

キーワード: 嫌氣的メタン酸化反応, 難培養性アーキア, 培養, DHS リアクター

連絡先: 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学環境・建設系 0258-47-1611 (内線 6646)

分の材質の変更や人工海水に添加している還元剤の変更,さらには人工海水に微量のグルコース (0.01 g/L) を添加することでリアクター内部にいる好気性菌に酸素を消費させる等の工夫を行った. その結果, 運転開始 380 日目以降の流出水の酸化還元電位は, $-200 - -300$ mV となり, 安定的に嫌気状態を保てるようになった.

DHS リアクター内にアーキアが培養されているのかの確認を行うため, 運転開始 285, 903, 1376, 1529 および 1732 日目にリアクター内のスポンジ担体の一部を採取し, アーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づいた T-RFLP 解析を行った. その結果, 全てのサンプルにおいて複数の断片由来の蛍光(ピーク)を確認することができたことから, 多様なアーキアが 1700 日以上 of 長期間にわたり DHS リアクター内に保持されていることが強く示唆された. なお, いくつかのピーク強度は運転期間内で増減していることから, いくつかのアーキアグループの存在量は運転期間において増減していることも示唆された.

また, 運転開始 1529 日目にスポンジ担体から回収したサンプルに関しては, 嫌氣的メタン酸化活性の測定を行った. その結果, $393 \text{ nmol g}_{\text{dry weight}}^{-1} \text{ day}^{-1}$ の嫌氣的メタン酸化活性を有していることが明らかとなり, 嫌氣的メタン酸化活性を有する微生物群がリアクター内で培養されていることが強く示唆された.

3.2 DHS リアクター内で培養されたアーキアの同定

DHS リアクター内のアーキアが生きた状態で存在しているのかの確認と, 培養できているのであればどのようなアーキアが存在しているのかを調べるために, 運転開始 903 日目にリアクター内のスポンジ担体の一部を採取し, RNA を鋳型とした 16S rRNA のクローン解析を行った. その結果, 嫌氣的メタン酸化反応を担っているとされる ANME に属するクローンが全クローンの約 4 割を占め, 高頻度に検出された. 加えて, 深海底堆積物環境に普遍的かつ優占的に存在する未培養アーキアグループである, Deep Sea Archaeal Group (DSAG) や Marine Benthic Group-D (MBG-D) 等に属するクローンも検出された. なお, 細菌の 16S rRNA に基づいたクローン解析では, ANME の共生相手と考えられている *Deltaproteobacteria* 網の硫酸還元細菌に近縁なクローンが最も多く検出された.

3.3 DHS リアクター内で培養されたアーキアの FISH 法による特異的検出

16S rRNA のクローン解析により検出されたアーキアを標的として FISH 法による特異的検出を試みた. その結果, FISH 法では ANME-1 と *Methanococcoides* 属の 2 種類の

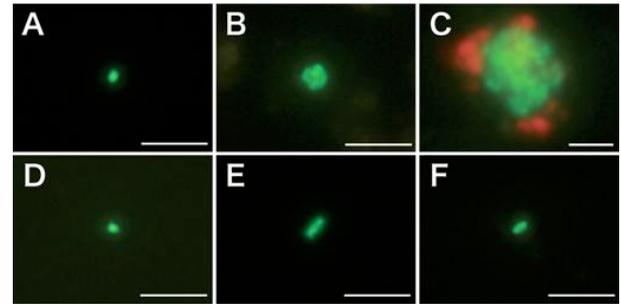


Fig.2 CARD-FISH images of archaeal cells cultivated in the DHS reactor. (A) single ANME-2a cell; (B) monospecies ANME-2c aggregate; (C) ANME-2c (green)/bacteria (red) aggregate; (D) DSAG cell; (E) MBG-D cell; (F) MCG cell. Bars represent 5 μm .

アーキア細胞を検出することに成功した. 通常, 深海底堆積物のような微生物代謝活性の低いサンプルに通常の FISH 法を適用しても, 検出は困難であることが知られている. 従って, DHS リアクターを用いた培養により, これらのアーキアの代謝活性が高められたことが示唆された. FISH 法で検出されなかったアーキアに対しては, 高感度 FISH 法である CARD-FISH 法を適用した. その結果, ANME-2a, ANME-2c, DSAG, MBG-D および Miscellaneous Crenarchaeota Group (MCG) に属するアーキア細胞の検出に成功した (Fig.2). ANME-2a および ANME-2c は, 共生相手である硫酸還元細菌等と物理的に密着した凝集体を形成し生育することが報告されているが, 本リアクターから検出された ANME-2a アーキア細胞は細菌との凝集体を形成しておらず, 全てシングルセルで存在していた. 一方, ANME-2c は細菌との凝集体, あるいは単独の凝集体を形成して存在していることが確認できた. そのため, 本リアクター内に存在する ANME-2a および ANME-2c アーキアは共生相手である硫酸還元細菌等と物理的に密着した凝集体を形成しなくとも生育していることが示唆された.

4. まとめと今後の予定

排水処理技術の 1 つである DHS リアクターを用いることで難培養性と言われている嫌氣的メタン酸化反応を担うアーキアを培養することに成功した. 16S rRNA を標的とした分子生物学的手法の結果は, リアクター内には多様なアーキアが培養されていることを強く示唆していた. 今後は, FISH 法と他の分子生物学的手法を組み合わせた解析 (例えば, FISH-nanoSIMS 解析や特異的細胞分取技術とゲノム解析等) によりアーキアの機能推定を行い, 得られた情報に基づき従来のバッチ式培養法等により純粋分離を試みる予定である.

参考文献

- 1) Imachi *et al.* (2011) *ISME J.* 5: 1913-1925.
- 2) Yoshioka *et al.* (2010) *Geobiology* 8: 223-233.