

嫌気性原生動物 *Cyclidium* sp.の共生関係を利用した環境中のメタン生成古細菌の分離培養の試み

長岡技術科学大学 ○綿貫夏帆 学生会員 阿久澤秀磨
正会員 幡本将史 渡利高大、山口隆司
産業技術総合研究所 平片 悠河

1. はじめに

嫌気性の原生動物の細胞内には、水素資化性メタン生成古細菌が共生しており、原生動物細胞内で発生した水素をメタンに転換していることが知られている¹⁾。これらの細胞内共生は、宿主の原生動物種が同じであっても構築される場合とされない場合が存在する。また、抗生物質等の添加によって、共生するメタン生成古細菌を失う場合もある²⁾。そして、こうした場合、原生動物は細胞外に存在する水素資化性メタン生成古細菌を再度取り込み、共生させることが報告されている³⁾。原生動物の細胞内には通常1種類のメタン生成古細菌が共生していることが知られている。そこで我々は、メタン生成古細菌との共生を確立させた原生動物を、マイクロマニピュレーターを用いて1細胞ずつ回収することで、環境中から1種類のメタン生成古細菌を分離・培養できるのではないかと考えた。しかし、この細胞内共生の構築のメカニズムはほとんど解明されておらず、どのような種の水素資化性メタン生成古細菌を共生させるかは明らかとなっていない。

そこで、本研究では都市下水処理 UASB 槽から分離した、細胞内に水素資化性メタン生成古細菌を共生させる嫌気性原生動物 *Cyclidium* sp.を用い、水田土壌などの環境サンプルと共培養することで自然環境中のメタン生成古細菌と新規に共生関係を構築させるかを調査した。また、実環境サンプルを用いて水素資化性メタン生成古細菌を培養し、*Cyclidium* sp.と共培養を行い新規なメタン生成古細菌の分離を試みた。

2. 実験方法

2.1 *Cyclidium* sp.を用いた共培養実験

Cyclidium sp.の培養には、CMV 培地(K_2HPO_4 0.125 g/L, $NaHCO_3$ 1.26 g/L, NH_4Cl 0.025 g/L, $NaCl$ 0.4 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 g/L, KCl 0.15 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.25 g/L, Vitamin sol. 2mL, Trace elements sol. 1mL, Se/W sol. 1mL)を使用し、pHは7.0に調整した。*Cyclidium* sp.は2-Bromoethanesulfonic Acid(BES)を10 mM添加し、共

生メタン生成古細菌を除去した後に実験に供した。*Cyclidium* sp.の基質(餌)は*Bacteroides* sp.を用い、最終濃度 10^8 cell/mLになるように培地に接種した。

2.2 メタン生成古細菌の集積培養

メタン生成古細菌を集積培養するため、ハス田および水田から土壌サンプルを採取した。メタン生成古細菌の培養には Widdel 培地(NH_4Cl 0.535 g/L, KH_2PO_4 0.136 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.204 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.147 g/L, $NaHCO_3$ 2.52 g/L, Vitamin sol. 2 mL/L, Trace elements sol. 1 mL/L, Se/W sol. 1 mL/L)を使用し、基質として分解に嫌気共生が必要な物質である酪酸(10 mM)およびプロピオン酸(10 mM)を唯一の炭素源として用いた。また、ペクチン(0.02%)およびセルロース(0.5g/L)を基質とした培養も行った。

2.3 FISH 法

Cyclidium sp.細胞内のメタン生成古細菌の確認にはFISH法を用いた。原生動物の固定には2%パラホルムアルデヒドを用い、固定時間は1時間とした。蛍光プローブは、古細菌に特異的な Arc915 を使用した。ホルムアミド濃度は35%とした。ハイブリダイゼーション後に、4',6-diamino-2-phenylindole(DAPI)による全菌染色を施した後、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

2.4 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析

メタン生成古細菌の集積培養サンプルおよび水田土壌と *Cyclidium* sp.の共培養系に対し16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物群集構造解析を行った。DNA抽出はNucleoSpin Tissue XSを用いて行った。PCR増幅には515F/806Rのプライマーセットを用いた。PCR増幅産物はMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製し、その後、Miseq(Illumina)により塩基配列を決定した。得られた16S rRNA 遺伝子データはQIIMEソフトウェアにより解析した。

3. 実験結果

3.1 FISHによる原生動物細胞内の古細菌検出結果

水田土壌と *Cyclidium* sp. の共培養を行い、培養 79 日目のサンプルを用いて、FISH 法により細胞内にメタン生成古細菌が共生しているか確認を行った。その結果、培養 79 日目の *Cyclidium* sp. 14 cell 中 2 cell から、培養開始時には確認できなかった古細菌に特異的な蛍光が検出された (図 1(f))。その後、培養 116 日目には *Cyclidium* sp. 14 cell 中 9 cell (図 1(i))、培養 166 日目には 22 cell 中 20 cell (図 1(l)) から古細菌に特異的な蛍光が検出され、培養期間が長くなるほど、細胞内にメタン生成古細菌が共生する割合が高くなった。この結果より、*Cyclidium* sp. は細胞内に再度メタン生成古細菌を取り込み、細胞内共生関係を構築し得ることが示唆された。また、*Cyclidium* sp. 1 cell を分離し、シーケンス解析を行った結果、*Cyclidium* sp. 細胞内に共生しているメタン生成古細菌は *Methanoregula* sp. であると判明した。

3.2 微生物群集構造解析結果

ハス田土壌に酪酸を添加した集積培養系と、水田土壌と *Cyclidium* sp. の共培養系を採取し、16S rRNA に基づいた微生物群集構造解析を行った。図 2 に集積培養系、共培養系よりそれぞれ得られた古細菌由来の 16S rRNA 配列を属レベルに分類した結果を示す。水田土壌では *Methanoregula* 属の存在量が 81% と優先していたのに対し、集積培養系では *Methanocella* 属が 53%、*Methanobacterium* 属が 29% 検出されていた。この結果より、集積培養系においては 2 種のメタン生成古細菌が集積されていることが示唆された。

4. 結論

水田土壌と共生メタン生成古細菌を除去した *Cyclidium* sp. の共培養を行った結果、*Cyclidium* sp. は環境中で優占しているメタン生成古細菌を獲得し、細胞内共生を再構築し得る事が明らかとなった。また集積培養系で複数種のメタン生成古細菌が集積していることが確認された。今後は、集積培養系からのメタン生成古細菌の分離培養を目的とし、BES を添加した *Cyclidium* sp. と集積培養系の共培養実験を実施していく。

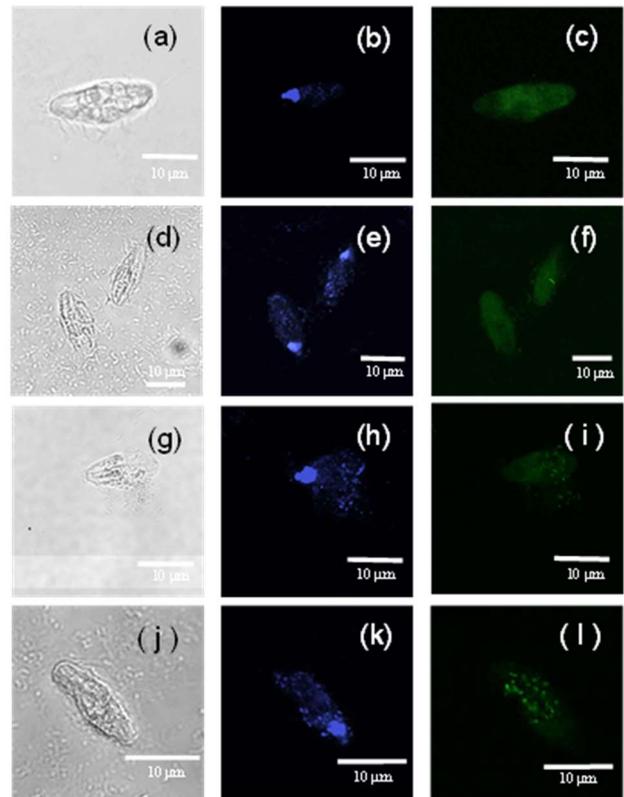


図 1 FISH 法による微生物検出; (a, b, c,) 培養 0 日目, (d, e, f,) 培養 79 日目, (g, h, i) 培養 116 日目, (j, k, l) 培養 166 日目; (a, d, g, j) 明視野, (b, e, h, k) DAPI 視野, (c, f, i, l) FITC ラベルプローブによる古細菌蛍光画像

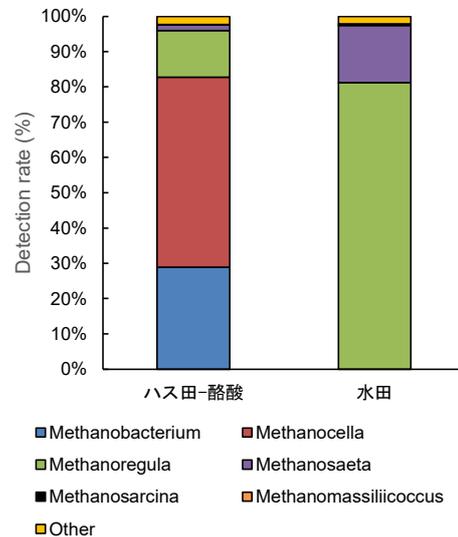


図 2 ハス田土壌に酪酸を基質として添加した添加集積培養系および水田土壌との共培養系の古細菌群集構造解析結果

参考文献

- 1) B. J. Finlay et al., (1994). FEMS Microbiology Letters, 117(2), pp 157-161
- 2) K. Yamada et al., (1997). FEMS Microbial. Letters, 149, pp129-132.
- 3) S. Wagener et al., (1990). Arch Microbial, 153, pp 496-501.