

培養特性に基づくメタン発酵リアクター内 2-プロパノールおよびアセトン分解微生物の代謝的役割解明

新潟薬科大学 ○ 林 冬馬(非) 大類 正宣(非) 堀 沙織里(非) 重松 亨(非) 山口 利男(非) 井口 晃徳(正)
長岡技術科学大学大学院 NGUYEN Pham Hong Dao
国立環境研究所 竹村 泰幸 富岡 典子 青木 仁孝 珠坪 一晃

1. はじめに

2-プロパノール(IPA)およびアセトンは、半導体製造工程や天然ゴム製造工程等の廃水に含まれる有機溶剤であり、エネルギー消費の少ない嫌気性生物処理の適用が期待される。先行研究では、IPA およびアセトンを含む合成廃水を用い、上向流嫌気性汚泥床 (UASB) リアクターでの連続処理試験を実施し、COD 除去率 90%以上での連続処理が可能であることが示された。またリアクター下部でアセトンの蓄積が確認されたことから、IPA からアセトンへの変換が示唆され、メタン生成古細菌のメタン生成を阻害することが知られているクロロホルムの添加によって IPA 分解が速やかに停止したことから、メタン生成古細菌の関与が考えられた。また、アセトン単独供給では分解が不安定となる一方、IPA の混合供給によってアセトン分解が安定化する現象も確認された。汚泥内には *Methanothrix* 属や *Methanobacterium* 属が高頻度に検出され、酢酸および水素を介したメタン生成が推察されたが、各微生物の役割は明確でなかった。

そこで本研究では、リアクター由来の IPA 分解メタン生成古細菌 NY-NOIST 株と、IPA/アセトン分解細菌 NY-ODINIST 株に着目し、培養特性、ゲノム情報および遺伝子発現から両株の代謝的相互作用を検討した。

2. 材料と方法

各株を Widdel 無機塩培地に IPA またはアセトン 10 mM 添加して 30°C の静置条件で培養した。NY-NOIST 株については、ギ酸および H_2/CO_2 混合ガスを基質とする培養も行い、温度による増殖特性を調べた。増殖挙動は培養液の OD₆₆₀ を経時測定し、比増殖速度 (h^{-1}) と平均世代時間 (t_d) を算出した。NY-ODINIST 株では、培養液画像の平均輝度を画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health, NIH) で解析し、増殖指標とした。ゲノム解析には MinION (Oxford Nanopore Technologies) を用い、Hybracter による *de novo* アセンブリを行い、DFAST による遺伝子注釈、KEGG Mapper による代謝経路推定を行った。さらに NY-ODINIST 株をアセトンまたはトレオニンで培養し、計 6 試料 (各条件 $n=3$) について、Total RNA 抽出、rRNA 除去、ライブラリー作製および RNA-seq 解析を実施した。シーケンシングは DNBSEQ を用いたペアエンドシーケンシング (2×150 bp) で行い、得られたリードを Bowtie2 により NY-ODINIST 株の参照ゲノム配列にマッピングした。続いて、featureCounts を用いて遺伝子ごとのリードカウントを算出し、edgeR を用いて Quasi-likelihood-F-test を実施し、両培養条件間の遺伝子発現変動を解析した。

3. 結果と考察

3. 1. NY-NOIST 株の培養特性およびゲノム情報

NY-NOIST 株の 30°C 培養条件下における比増殖速度は、IPA、ギ酸、 H_2/CO_2 添加条件でそれぞれ 0.0161, 0.0656, 0.0289 h^{-1} であり、平均世代時間はそれぞれ 43.1, 10.6, 24.0 h であった。IPA での増殖は水素・ギ酸を添加した条件に比べ遅いものの、IPA を単独で利用できることが確認された。最適培養温度は 30°C であり、15°C および 45°C でも増殖が認められた。

ゲノム解析の結果、NADP⁺依存型アルコールデヒドロゲナーゼや NADPH 依存型 F₄₂₀ 還元酵素の候補遺伝子の存在が認められた。本株では IPA の酸化で得た還元力を NADPH を経由して F₄₂₀ へ受け渡し、メタン生成に利用している可能性が示された。ただし、これらの反応と電子伝達経路は酵素学的には実証されていない。

3. 2 NY-ODINIST 株の培養特性およびゲノム情報

NY-ODINIST 株はアセトンを基質とした培養の結果で単離されたが、IPA 添加条件でも増殖が認められた。比増殖速度は、アセトンおよび IPA 添加条件でそれぞれ 0.016 および 0.0135 h^{-1} 、平均世代時間は 43.32, 51.34 h であっ

た。一方、誘導期はアセトン添加条件の約 22 日間から IPA 単独添加条件では約 10 日に短縮した。したがって IPA の添加は、対数増殖期の増殖速度よりも、増殖開始まで代謝的準備に影響した可能性が考えられた。

ゲノム解析の結果、本株のゲノムには、Zn 依存型および鉄含有型アルコールデヒドロゲナーゼ候補遺伝子の存在が認められ、これらが IPA 酸化に関与する可能性が示された。また、Radical SAM タンパク質、molybdopterin 依存型酸化還元酵素などの嫌気的アセトン分解への関与を示唆する遺伝子群の存在が認められたが *Desulfococcus biacutus* 等で報告された既知の嫌気的アセトン代謝経路に関与する遺伝子群は認められなかった。また、酸素、硝酸、硫酸、金属、ならびにフマル酸還元などの主要な外部電子受容体を利用する呼吸系もゲノムからは明瞭でなく、既知の硫酸還元型アセトン分解とは異なる反応系の関与が示唆されたが、存在が認められた Radical SAM タンパク質等がアセトンを直接変換するかは現在のところ不明である。さらに [FeFe]ヒドロゲナーゼ、[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟因子、Rnf 複合体関連、ギ酸デヒドロゲナーゼ関連遺伝子の存在が認められ、アセトン分解で生じた還元力を H_2 またはギ酸として放出する代謝が示唆された。

3. 3 RNA-seq 解析

RNA-seq 解析では、対象とした候補遺伝子に統計学的に有意な発現差は認められなかったが、[FeFe]ヒドロゲナーゼ関連遺伝子はアセトン添加条件で、ギ酸デヒドロゲナーゼ候補遺伝子はトレオニン添加条件で相対的に高い発現を示した。これらの発現傾向のみから基質依存的な水素・ギ酸生成経路の切り替えを断定することはできない。一方、NY-ODINIST 株は水素資化性メタン生成古細菌との共培養下で増殖が顕著に促進されることが確認されている。アセトンから酢酸等への酸化反応は水素分圧の影響を受けるため、種間水素伝達 (interspecies hydrogen transfer) といったメタン生成古細菌による水素消費が反応を熱力学的に有利にする可能性がある。ただし、今回の培養実験のみでは水素の授受を直接証明できず、ギ酸を介した電子伝達やその他の培養環境の変化も否定できない。

4. まとめ

培養特性と分子解析を統合すると、リアクター内では NY-NOIST 株が IPA からアセトンへの変換を行い、NY-ODINIST 株がアセトンをさらに分解するという主たる機能分担が推定された。NY-ODINIST 株自体にも IPA 利用能が認められるため、両株の機能は完全には分離していないが、NY-ODINIST 株の主な寄与はアセトン分解にあると考えられる。アセトン分解に伴う還元力を水素等としてメタン生成古細菌が受け取ることで、低い水素分圧が維持され、嫌気的分解が熱力学的に促進されるという共生モデルを提案する(図 1)。この共生関係は IPA・アセトン含有廃水の安定的な処理を支える機構の一つと考えられる。

今後は、両株の共培養系を対象とした RNA-seq 解析を実施する予定である。共培養時と単独培養時の遺伝子発現プロファイルの比較から、IPA・アセトン代謝、水素代謝およびメタン生成に関わる代謝応答を解析することで、我々が提案する種間水素伝達を介した共生的嫌気的アセトン分解代謝モデルを検証する。

謝辞 本研究は、JSPS 科研費 JP25K01360 および JP25K07979 の助成を受けて実施した。

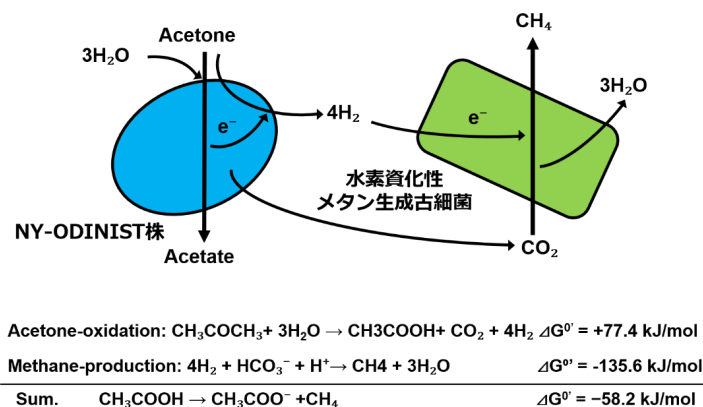


図 1. 種間水素伝達を介したアセトン分解の共生的代謝モデル