

メタン生成にかかわる共生微生物系の研究と最新動向

Recent topics on Methanogenic Syntrophs

中村 浩平, 鎌形 洋一*
KOHEI NAKAMURA and YOICHI KAMAGATA

産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6-10

* Tel: 029-861-6591 Fax: 029-861-6587

* E-mail: y.kamagata@aist.go.jp

Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

キーワード: 共生微生物, 種間水素伝達, メタン生成菌, 水素発生型有機酸酸化細菌

Key words: syntrophs, inter-species hydrogen transfer, methanogen, hydrogen-generating organic acid-oxidizing bacteria

(原稿受付 2005年9月30日/原稿受理 2005年10月26日)

1. はじめに

メタンはまったく異なる二つの顔を持っている。すなわち、環境中から大気に拡散すれば温室効果ガスとなり、濃集しているときにはエネルギー源(天然ガス、メタンハイドレートや排水・廃棄物からの回収メタン)となりうる。メタンの生成起源については、微生物起源と地熱作用による有機物分解起源のものがあり、メタンハイドレートや天然ガスのような化石資源などについては現在もその起源について議論が絶えない。しかし、多くの研究結果はこれらの化石資源も、(少なくとも一部は)微生物によって作られた可能性を示唆している。

生物的メタン生成に直接関わっているのはメタン生成アーキア(以降メタン生成菌と呼ぶ)である。メタン生成菌とは、無酸素環境下でメタンを生成し、分子系統上アーキア(日本語では古細菌あるいは始原菌)に属する原核微生物の総称である。その棲息場所は、海洋熱水湧出孔のような極限環境から、海洋底泥、土壌、水田、反芻動物やシロアリの消化管、湿地、湖沼底泥といった我々の生活環境に身近な場所まで広範囲に及んでいる⁴⁰⁾。また、物理化学的な環境という観点から見ても、好冷性のものから超好熱性、好アルカリ性のものまで多種多様である。しかしどのメタン生成菌もすべて絶対嫌気性であり、メタンを生成しうる基質もごく限られた低分子化合物である点では共通している。これまでに分離されたメタン生成菌は基質資化性の点で、水素・炭酸ガスのみを利用するもの、酢酸のみを利用するもの、メタノールやメチルアミンなどのメチル化合物などを利用するもの、またエタノールのような低級アルコールなどを利用するものなどに分けられる。このうち、水素・二酸化炭素(一部ギ酸資化能を有す)のみを利用するもの(hydrogenotrophic)と酢酸を利用しうるもの(aceticlastic)

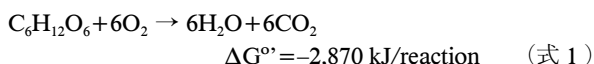
が、有機物からのメタン生成において特に重要な役割を果たしている。では、これらの基質をいったい誰がどのようにして提供しているのであろうか?メタン生成菌の生育する無酸素環境下では、実際さまざまな微生物が共存し、種々の有機物の分解を担っており、メタン生成菌の生育に必要な基質はこの有機物分解過程で生じることが知られている^{25,26)}。

本稿では、微生物起源メタン発生の根幹を担う、メタン生成菌と水素発生型有機酸酸化共生細菌との共生微生物系による嫌氣的有機物分解について述べるとともに、メタン生成菌の水素濃度依存的遺伝子発現に関する知見について述べたい。

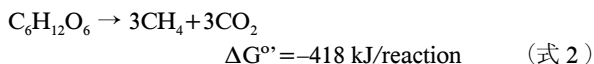
2. メタン生成共生系

2.1. メタン生成菌は嫌氣的有機物分解のアンカー

メタン生成菌の生育する無酸素環境とはどのような環境なのか、エネルギー獲得の点から考えてみよう。有酸素環境で、グルコース1分子を水と二酸化炭素に分解するとき(式1)に得られるGibbsの自由エネルギー変化は-2,870 kJである。



一方、メタン発生のともなう無酸素環境条件下ではグルコースはメタンと二酸化炭素に分解される(式2)。このときのGibbsの自由エネルギー変化は-418 kJである。



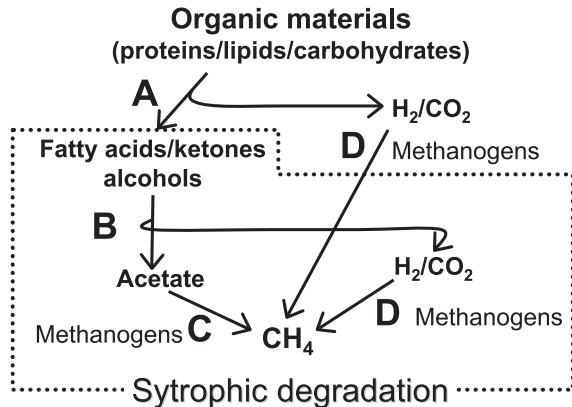
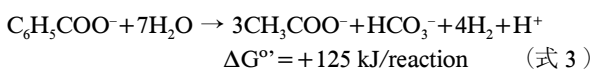


図1. 無酸素環境下における有機物分解模式図。

これらの反応で得られる自由エネルギー変化が全て ATP 生産に用いられるわけではないが、単純に自由エネルギー変化の差を比較するだけでも、無酸素環境での生育がどれだけ酸素環境に比べて不利かがわかる。しかも有酸素環境下では、式1で示したグルコースの完全酸化は単一の微生物でも可能である。一方、無酸素環境下では式2で示した単純な有機物の分解でさえも複数の微生物の関与無しでは進行しない。

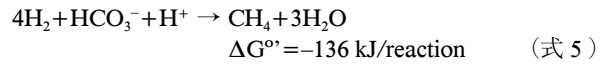
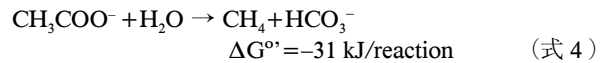
無酸素環境下における有機物分解がどのように進行するか、その過程を模式的に示した(図1)。タンパク質、脂質や炭水化物は加水分解を経て代謝され(A)、低級脂肪酸、ケトン類やアルコールといった低分子有機化合物、および水素、二酸化炭素が発酵産物として生じる。これらの低分子有機化合物はさらに水素、二酸化炭素、酢酸にまで分解される(B)。環境中に硝酸塩、Fe³⁺、硫酸塩などのような電子受容体が存在しない場合、水素、二酸化炭素、酢酸はメタン生成菌によって利用される(C, D)。発酵により得られた低級脂肪酸やアルコール類の酸化は(反応B)、本来ならば高度に吸エルゴン反応であり酸化方向へ反応は進行しない。しかし、水素や酢酸(特に水素)を利用するメタン生成菌が共役することで(C, D)、Bの反応は発エルゴン反応となる。全反応を通して生じる水素はメタン生成菌が利用することによって、その濃度は極めて低い状態(見かけ上 ~100 Pa)に維持される。したがって低級脂肪酸やアルコールの分解には、これらを酸化する細菌と水素を利用するメタン菌の極めて強固な共生関係が必要である。

このような共生関係を以前筆者らが得た安息香酸分解微生物コンソーシアムを例にして見てみよう¹⁴⁾。無酸素環境下における安息香酸の分解も高度に吸エルゴン反応(式3)である(注:ここで紹介するGibbsの自由エネルギー変化量は断りのない限り、全て標準状態(25°C, 1 atm)のものであり、その値はThauerらの報告³⁴⁾に基づいて算出した)。

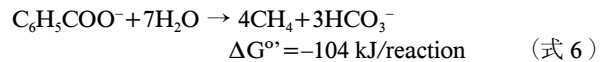


このコンソーシアムでは、安息香酸は細菌によって酢酸、水素および二酸化炭素に分解される(式3)。そして、酢酸は酢酸資化性メタン生成菌 *Methanosaeta* によ

り、水素と二酸化炭素は水素資化性の *Methanogenium* によりメタンに還元される(式4, 5)。



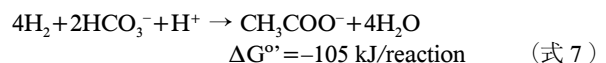
その結果、安息香酸のメタン生成を伴う分解は最終的に発エルゴン反応となる(式6)。



このように安息香酸分解コンソーシアムでは、3種の微生物が共同して安息香酸をメタンに還元し、分解により生じるエネルギーを共有することで共生関係が成立している。

この例で示したように、メタン生成を伴う微生物共生系とは、有機物を酸化し、水素ならびに酢酸を産生する微生物と水素資化性メタン生成菌と酢酸資化性メタン生成菌の共生関係をいう。このうち微生物間での水素のやりとりは反応全体を円滑に進める上でことのほか重要であり、このことを種間水素伝達とよんでいる。メタン生成菌はこのような関係において、共生微生物の生育を支持している一方、共生微生物の生成するエネルギー源(主に水素と酢酸)に依存しながら、無酸素環境における有機物の最終分解者として機能していると言える。

ただこのような水素を介した微生物間のエネルギーのやり取りは、なにもメタン生成菌固有のものではない。多くの硫酸還元菌(sulfate reducer)、ある種の酢酸生成菌(acetogen)、金属還元細菌(metal reducer)なども無酸素環境における有機物の共生的酸化を担っている(水素からの酢酸生成は式7を参照)。しかし、硫酸還元菌のように硫酸塩を使って水素を消費する場合、海洋環境のような硫酸塩が豊富にある場所を除けば、環境中の硫酸塩濃度は限られている。また、酢酸産生もシロアリ体内に存在するときのように、水素と二酸化炭素から生じる酢酸が宿主のエネルギー源かつ炭素源になるような環境を除けば、ごく限られた環境でしか起こりえない。

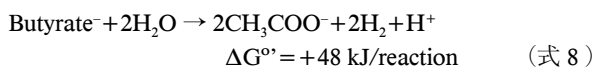


これらの事実を踏まえると、環境中に最も豊富に存在する二酸化炭素を電子受容体として“炭酸呼吸”を行うメタン生成菌は、嫌氣的有機物分解の最終段階を担う最も重要な微生物群と言ってよい。

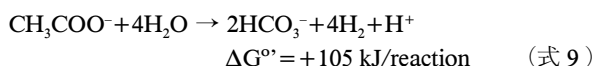
2.2. 水素発生型有機物分解とメタン生成のエネルギー論

水素発生を介した有機物分解とメタン生成について、もう少し詳しく述べたい。前述のように低級脂肪酸のような有機物を、無酸素環境で酸化するためには水素濃度は極めて低い濃度に保たれてなくてはならない。これは水素濃度が高いと、嫌氣的有機物酸化反応の標準自由エ

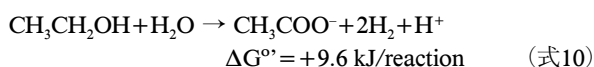
エネルギー変化は正となり、吸エルゴン反応となるためである。例えば標準状態 (25 °C, 1 atm) における酪酸の嫌氣的酸化の自由エネルギー変化は、+48 kJ/reaction である (式 8)。



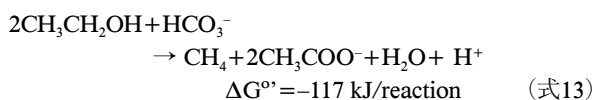
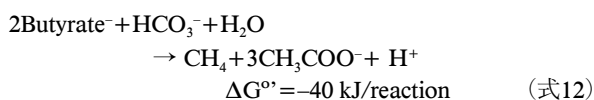
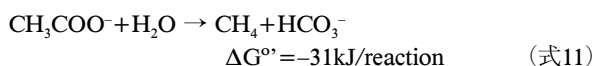
このように酪酸の嫌氣的分解は極めて進行し難く、理論上水素濃度が $10^{-3.67} \text{ atm}$ (22 Pa) 以下となって初めて自由エネルギー変化が負、つまり発エルゴン反応となる。ここで水素濃度を分圧で示したが、気体の水への溶解はその分圧に比例する (ヘンリーの法則) ことから、水素分圧は水素濃度に直接反映すると考えてよい。また、この嫌氣的有機物酸化の反応の起こりやすさは有機物の種類によっても異なる。例えば酢酸の標準状態における嫌氣的酸化は、酪酸のものよりさら吸エルゴン反応となり、+105 kJ/reaction である (式 9)。



この反応は酪酸酸化よりさらに起こりづらく、発エルゴン反応になるには水素濃度は $10^{-4.39} \text{ atm}$ (4 Pa) 以下になる必要がある。一方、エタノールの嫌氣的酸化は、酪酸よりもはるかに小さい吸エルゴン反応である (式 10)。



エタノールの嫌氣的酸化は、酪酸よりも格段に起こりやすく、水素濃度が理論上 0.144 atm (14,590 Pa) 以下で反応が進行する。これらの有機物の酸化によって生じる水素を、水素資化性のメタン生成菌が取り除くことによって、メタン生成を伴った有機物の酸化が起こる。酢酸、酪酸、エタノールのメタン生成を伴ったときの酸化により得られる自由エネルギー変化はそれぞれ -31, -40, -117 kJ/reaction (式 11, 12, 13) となる。



嫌氣的酸化の際の自由エネルギー変化が負になる水素濃度が低くなればなるほど、得られる自由エネルギー変化 (メタン生成 1 モルあたり) が小さくなるのがわかる。このように水素を生じる嫌氣的有機物分解には、メタン生成菌の存在が不可欠なのである。

2.3. さまざまな環境中のメタン生成微生物共生系

実際の無酸素環境中ではメタン生成菌はどのように細

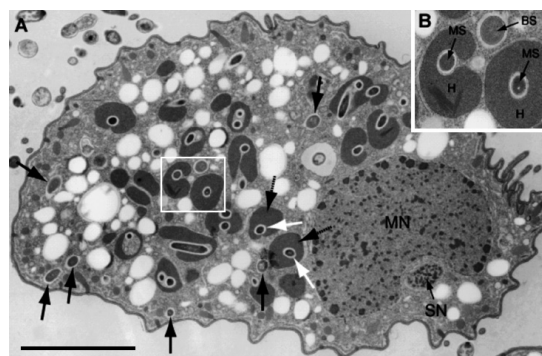


図 2. 嫌氣性原生動物 *Trimyema compressum* 細胞の超薄切片透過型電子顕微鏡像。

A. MN: 巨核, SN: 小核, bar=5 μm. B. A の白枠部を拡大. H: ヒドロゲノソーム, MS: 細胞内共生メタン生成菌, BS: 細胞内共生細菌。

菌と共生しているであろうか? その最も良い例をメタン発酵リアクター (上昇流嫌氣性スラッジブランケット) 内で形成される微生物バイオフィームに見ることができ (12,29)。関口ら, 井町らの研究による共焦点顕微鏡を用いた FISH 解析は, グラニュール内で両者がきわめて高い近接性を保ちながら微小コロニーを形成していることを初めて視覚的に示したものである。そこではプロピオン酸分解菌によりプロピオン酸から水素が生じ, *Methanobacteriaceae* 科のメタン生成菌により水素が消費されている可能性が明瞭に示されている。熱力学的観点から考えても, 嫌氣的なプロピオン酸分解においては, 水素の授受は近傍で行われるほうが都合が良く, 両者がグラニュール内で緊密に存在することは非常に理にかなっている。

同様の共生系は嫌氣性原生動物内にも見られる。無酸素環境から単離された嫌氣性原生動物 *Trimyema compressum* は, 細菌を捕食消化し, 発酵によりエネルギーを生産する。その際に生じる水素を体内に共生するメタン生成菌が利用する³⁹⁾。*T. compressum* は好氣性の原生動物のようにミトコンドリアを持たないが, かわりにヒドロゲノソームとよばれる細胞小器官を持っている。ヒドロゲノソームは, 発酵の際に生じる電子を H^+ に受け渡し, 水素を生成する小器官である。*T. compressum* の電子顕微鏡切片像には, ヒドロゲノソームに近接したメタン生成菌が多く見られる (図 2)。*T. compressum* は細菌を捕食して生育しており, 細菌の消化過程で過剰な水素が蓄積すると生育が滞ってしまうが, 水素を利用するメタン生成菌により系内の水素濃度は低く保たれる。両者の利益を考えると, メタン菌が嫌氣性原生動物内に共生し, さらにはヒドロゲノソームに近接して存在することは極めて理にかなっている。同様の原生動物とメタン生成菌の共生関係は, ルーメンやシロアリ後腸に存在する嫌氣性原生動物内にも見出されている^{35,36)}。

これらの共生関係からもわかるように, 共生状態にあるメタン生成菌は, 水素の供給者である共生微生物と近接しながら生育している。この関係を利用することによって共生微生物の分離培養が可能である。

2.4. メタン生成菌と共生する新規な細菌群の分離培養

前述の例に示したような有機物分解共生微生物の多くは、難培養性であるが、分離培養にはメタン生成菌を共存させた分離方法をしばしば用いる。標的とする共生微生物の基質を含んだ培地に、あらかじめ培養したメタン生成菌を添加し、そこに分離源となる試料を段階希釈して接種し、共生微生物の集積・分離を行う。

筆者らの研究グループや長岡技術科学大学の研究グループは我が国において、数少ない絶対嫌気性共生微生物の分離培養を試みている研究グループであり、これまでに数々の新規有機酸分解共生細菌を分離している(表1)^{9,11,23,28,30}。低分子脂肪酸分解菌としては、*Thermacetogenium phaeum*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Syntrophothermus lipocalidus* を分離しているが、それぞれメタン生成菌が共存するときに、酢酸、プロピオン酸、酪酸を分解する。*Sporotomaculum syntrophicum* は、メタン生成菌共存下、安息香酸を分解する。*Anaerolinea thermophila* はそれ自体シロ糖などで単独で生育できるが、メタン生成菌共存下でその生育速度は著しく増加する。

これらの細菌は、メタン生成菌との二者共培養系として得られた後、メタン生成菌の利用できない発酵基質(ピルビン酸やクロトン酸等)を用いることで完全純粋培養にも成功している。しかしながら、メタン生成菌との共生状態でのみ生育する微生物もいくつか知られている。de Bok らにより最近分離された *Pelotomaculum shinckii* は、同属の *P. thermopropionicum* のようにピルビン酸やフマル酸による単独培養ができず、プロピオン酸を基質とし、メタン生成菌との共培養状態のみで維持可能な絶対共生細菌である⁹。また、Qui らによってテレフタル酸を基質とし、メタン生成菌の共存下でのみ培養可能な新規共生細菌の存在も明らかにされている²²。このように有機物分解共生細菌には、メタン生成菌との共生を絶対条件として特定の基質のみを利用できるタイプと、発酵基質を利用して単独で生育可能な比較的基質利用性の広いタイプが存在する。次に我々が分離した共生微生物の中でも、幅広い基質利用性とユニークな異化代謝経路を持つ酢酸分解菌 *T. phaeum* について、最近得られた知見とともに紹介したい。

2.5. *Thermacetogenium phaeum* の酢酸産生分解経路

前述のとおり、無酸素環境下における酢酸分解は極めて吸エルゴン反応である(式9)。酢酸分解細菌 *T. phaeum* PB 株(以降 PB 株)は水素資化性のメタン生成菌(式5)とともに共生することで、反応全体は発エルゴン反応となり(式11)、酢酸はメタンに還元される。嫌気消化汚泥から十数年間にわたって酢酸による集積培養系が維持され¹³、その系から PB 株は *Methanothermobacter* 属メタン生成菌とのほぼ純粋な二者共培養系まで集積された。その後の分離操作は極めて困難を伴ったが、最終的に PB 株はピルビン酸を基質としたロールチューブ法で純化された⁹。分離された PB 株を酢酸存在下で、*Methanothermobacter* 属メタン生成菌と共培養することで、メタン産生が起これ、酢酸分解共培養系の再構築が可能であった。

PB 株は偏性嫌気性細菌であり、孢子形成能を有するグラム陽性桿菌であった。単独培養時の生理学的特徴を解析した結果、低級アルコール類、メトキシ芳香族化合物や有機酸のような種々の基質を利用可能であり、これらの基質からの主要な代謝産物は酢酸であった。さらに興味深いことに PB 株はメタン生成菌との共培養系では酢酸を水素と二酸化炭素に酸化し、単独培養時には水素と二酸化炭素から酢酸を産生することが明らかになった。さらに驚くべきことに、この微生物は硫酸塩やチオ硫酸を電子受容体として酢酸を完全に酸化することが可能な硫酸還元細菌でもあった。これまでに知られているメタン生成を伴う共生酢酸酸化細菌には、このような完全酸化型の硫酸還元能が知られていないことから、PB 株の性状は際立っている^{15,27}。

嫌気性のホモ酢酸菌の水素と二酸化炭素からの酢酸生成は CO dehydrogenase (CODH)/acetyl-CoA synthase 経路(図3)によって行われるが、嫌気的に酢酸を酸化する反応には同経路とクエン酸回路の二つが存在する。PB 株のピルビン酸を基質とした単独培養時(酢酸生成)、およびメタン生成菌との共培養時(酢酸酸化)の PB 株細胞抽出液の酵素活性を測定した結果、両培養時に 2-oxoglutarate oxidoreductase 活性は見出されず、CODH 活性が検出された。これらの事実より、PB 株は水素-二酸化炭素還元による酢酸産生、酢酸酸化の両方向の反応を CODH/acetyl-CoA synthase 経路によって行っていることが明らかとなった⁹。

表1. 近年分離されたメタン生成を伴う有機物分解共生細菌群の例。

共生細菌名	共生分解基質	パートナーのメタン生成菌 ^a	文献
<i>Thermacetogenium phaeum</i> PB [†]	酢酸	TM 株	Hattori et al. (9)
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI [†]	プロピオン酸	ΔH 株	Imachi et al. (11)
<i>Syntrophothermus lipocalidus</i> TGB-C1 [†]	C ₄ ~C ₁₀ までの直鎖脂肪酸, イソ吉草酸	ΔH 株	Sekiguchi et al. (28)
<i>Sporotomaculum syntrophicum</i> FB [†]	安息香酸	<i>Methanospirillum hungatei</i>	Qiu, Y. L. et al. (23)
<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 [†]	酵母エキス+グルコース, シロ糖, 澱粉等 ^b	ΔH 株	Sekiguchi, Y. et al. (30)

^aTM, *M. thermotrophicus* TM; ΔH, *M. thermotrophicus* ΔH. PB 株の場合、集積時に TM 株との共培養系が得られた。SI, TGB-C1, FB 株の分離の際には、それぞれのメタン生成菌が分離源試料とともに添加された。

^bUNI-1 株は、基質分解にメタン生成菌を必須とするわけではないが、共培養下の増殖速度は単独培養時の2倍であった。

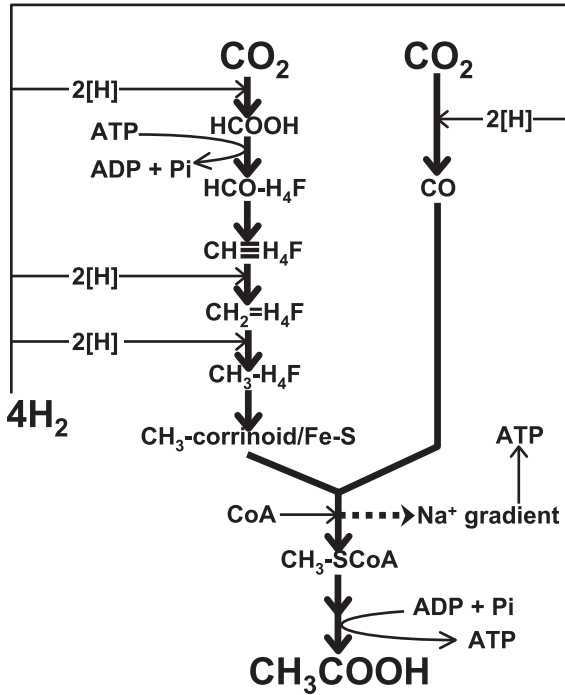


図3. 酢酸生成菌の CODH/acetyl-CoA 経路。
4分子の水素と二酸化炭素から、1分子の酢酸と ATP を
生産する。*T. phaeum* PB 株はメタン生成菌と共存下、酢
酸をこの経路を逆向きに進行させ分解する。

さらに PB 株の単独培養時と共培養時のタンパク質発
現プロファイルと比較し、両培養条件下で特異的に発現
するタンパク質を見出した。先にも述べたように PB 株
とメタン生成菌の共培養系の再構築は可能であるが、少
なくとも 3 週間は生育遅滞期が続く。共培養時で特異的
に発現するタンパク質は、おそらく酢酸酸化の中央代謝
以外の共生的酢酸酸化の際に重要な役割を担う何らかの

タンパク質で、このタンパク質の発現誘導が酢酸酸化の
立ち上がりのボトルネックになっていると考えられる。ま
た、メタノールやピルビン酸を使った単独培養の際に発
現したタンパク質は、これらを代謝するタンパク質 (メ
タノール脱水素酵素やピルビン酸-フェレドキシン酸化
還元酵素) である可能性もある。どのようなタンパク質
が共生的酢酸酸化の際に発現するかは非常に興味深い点
である。また、一般的な絶対嫌気性ホモ酢酸産生菌の水
素による二酸化炭素還元では、CODH/acetyl-CoA synthase 経路の膜結合タンパク質によるイオン勾配形成が、
ATP 生産に共役していると考えられている。しかし PB
株のような二酸化炭素還元、酢酸酸化の両方向を行う場
合、どの反応段階でそのような共役がおきているのか全
く不明である。

PB 株のようなメタン生成菌との共生による酢酸酸化
を行う細菌の報告例は非常に少なく^{15,27)}、その共生状態
での代謝経路に関する報告例は一例しかない¹⁶⁾。微生物
起源のメタン発生の終端の一翼を担う酢酸酸化細菌の、
共生的酢酸酸化反応のエネルギー産生メカニズムや、共
生時特異的遺伝子発現に関する研究は今後の課題となる
だろう。さらには、このような共生状態特異的な遺伝子
発現を行っているのは、なにも酢酸酸化細菌だけではない。
水素の消費者側であるメタン生成菌も、共生状態特
異的な遺伝子発現を行っている。

3. 共生状態のメタン生成菌の生化学

3.1. メタン生成経路の同一機能酵素群

Methanothermobacter thermautotrophicus ΔH 株 (以
降 ΔH 株) は、あらゆるメタン生成菌の中でもいちば
ん良く知られ、かつ研究が行われてきた株である。また
高温性の有機酸分解共生細菌を分離する際にも使用され
てきた中度高温性水素資化性メタン生成菌 (生育至適温

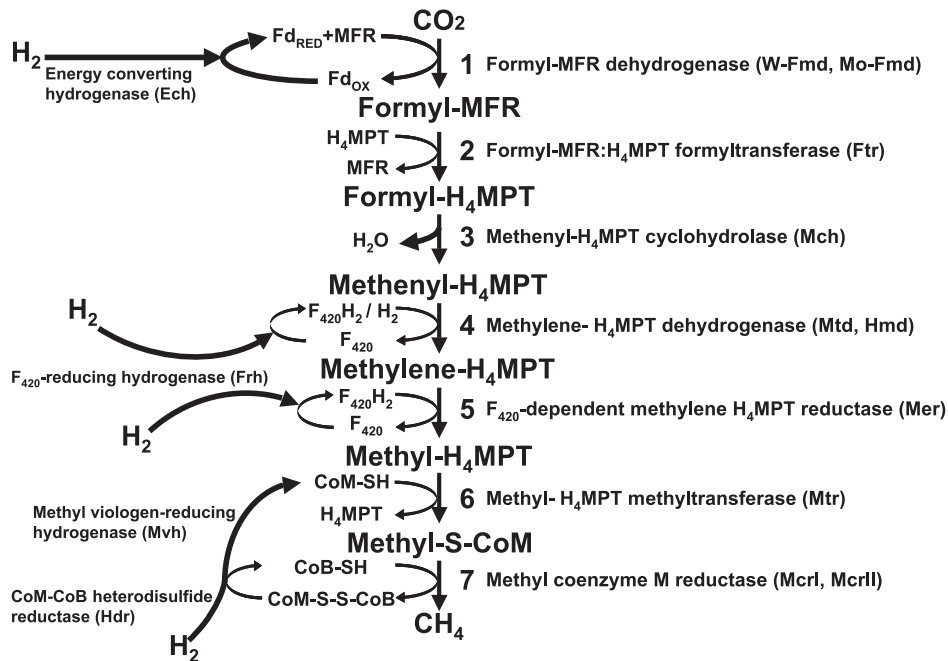


図4. 水素資化性メタン生成菌のメタン生成経路。
Fd_{RED}: 還元型フェレドキシン, Fd_{OX}: 酸化型フェレドキシン, MFR: methanofuran, H₄MPT: tetrahydromethanopterin.

度 65°C) である。水素資化性メタン生成菌は 4 モルの水素によって 1 モルの二酸化炭素を還元してメタンを生成し、その過程でエネルギーを獲得する。メタン生成経路は 7 つの段階からなっており (図 4), ここで用いられる酵素や補酵素はすべてメタン生成菌に固有のものである (ここでは、その詳細について述べないので文献⁹⁾を参照されたい)。大変興味深いことに ΔH 株や、その近縁種である *Methanothermobacter marburgensis* は、この経路の 3 つの段階に、それぞれ 2 つの同一機能酵素をもつ。二酸化炭素を methanofuran に固定する formyl-methanofuran dehydrogenase (Fmd), methenyltetrahydro-methanopterin を還元する methenyltetrahydromethanopterin dehydrogenase (Mtd), そしてメタン生成経路の最終段階を担う methyl-S-CoM を還元し、メタンを生成する methyl-S-CoM reductase (Mcr) である。それぞれの酵素は、異なる補因子を持つ Mo 型と W 型 Fmd¹⁰⁾, 基質の還元異なる様式を用いる F₄₂₀ 依存型 Mtd と水素依存型 Mtd³⁸⁾ (または Hmd とよび、最近補欠分子族を持つことが示唆されている^{3,18,31)}, そして分子量が異なるもののサブユニット構造を同じくする McrI と McrII (Mrt) である⁹⁾。Fmd の発現は環境中でどちらの補因子が存在するかで決定する。Mtd や Mcr に関しては、さまざまな異なる条件下 (温度, pH, 水素供給量) でそれらの発現が検討され^{20,24)}, 特に水素供給量の違いによって McrI, II の発現に差が見られ、水素供給量が低いときに McrI, 高いときに McrII が高発現することが明らかになっている。基質親和性は高いが分子活性の低い McrI と、その逆に基質親和性は低いが高分子活性の高い McrII を水素供給量 (濃度) の差で使い分けられていると考えられる。 ΔH 株および *M. marburgensis* はともに高温の嫌気消化汚泥から分離され、このような水素濃度の違いによる Mcr の使い分けは、これらのメタン生成菌が棲息する環境で有利に働くと考えられる。つまり、与えられる有機物の成分によって、共生的分解により生じる水素濃度は低濃度から高濃度のものまで広範囲であると考えられ、水素濃度依存的なエネルギー獲得経路をもつメタン生成菌であれば、このような環境下で優位に立つ可能性がある。しかしながら、これまでに調べられている水素濃度依存的な発現制御の実験は全てメタン生成菌単独培養によるものである。

では、実際に種間水素伝達の起こっている状態のメタン生成菌は、どのような遺伝子を発現しているのだろうか? 我々はメタン生成菌として全ゲノム配列が解読されている ΔH 株³²⁾ と、有機酸分解共生細菌と低水素濃度供給する基質存在下で共培養を行い、モデル種間水素伝達系を構築し、共培養時に起こっているメタン生成菌の遺伝子発現パターンと単独培養時のものを、プロテオーム的手法による比較解析を行った。

3.2. 共生状態におけるメタン生成菌のプロテオーム解析

筆者らは、以前、 ΔH 株と分子系統的に極めて近縁の *Methanothermobacter thermautotrophicus* TM 株 (以降 TM 株) と酢酸酸化細菌 PB 株を酢酸存在下で共培養を行い、TM 株の低水素濃度供給下の生理状態と、水素を高濃度で供給した単独培養時の TM 株で、メタン生成

経路タンパク質群の発現に注目して比較解析を行った¹⁷⁾。共培養時では、見かけの水素濃度は 20~80 Pa と極めて低い濃度で培養期間を通して維持されたのに対し (図 5B), 単独培養時には培養開始時の 850 kPa から急激に減少した (図 5A)。共培養時と単独培養時の TM 株の遺伝子発現パターンを 2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2-DE) および N 末端アミノ酸解析を用いて比較した結果、共培養時では McrI のみを発現し、単独培養時では McrII と McrI をともに発現した。

さらに筆者らは、 ΔH 株と酪酸酸化細菌 *Syntrophothermus lipocalidus* TGB-C1 株 (以降 TGB-C1 株) を酪酸存在下で共培養し、 ΔH 株の単独培養時の遺伝子発現パターンと 2-DE—MALDI-TOF-MS を用いてより詳細なプロテオーム比較解析を行った (投稿中)。TM 株と PB 株の酢酸を用いた共生培養時と同様に、 ΔH 株と TGB-C1 株の酪酸を用いた共培養時でもみかけの水素濃度は、培養を通じて ~80 Pa と低濃度で維持された。培養温度 (55°C) における酪酸、酪酸の嫌氣的分解の水素分圧閾値 (理論値) は、それぞれおよそ 39 Pa, 273 Pa であり、TM 株—PB 株による酪酸での培養時には、一時その閾値を越えたが、 ΔH 株—TGB-C1 株による酪酸での培養時には常にそれを下回った。両培養条件下の ΔH 株とその遺伝子発現パターンを比較した結果、多くの発現量の異なるタンパク質が検出された。単独培養時で特に高発現していたタンパク質は McrII であり、その

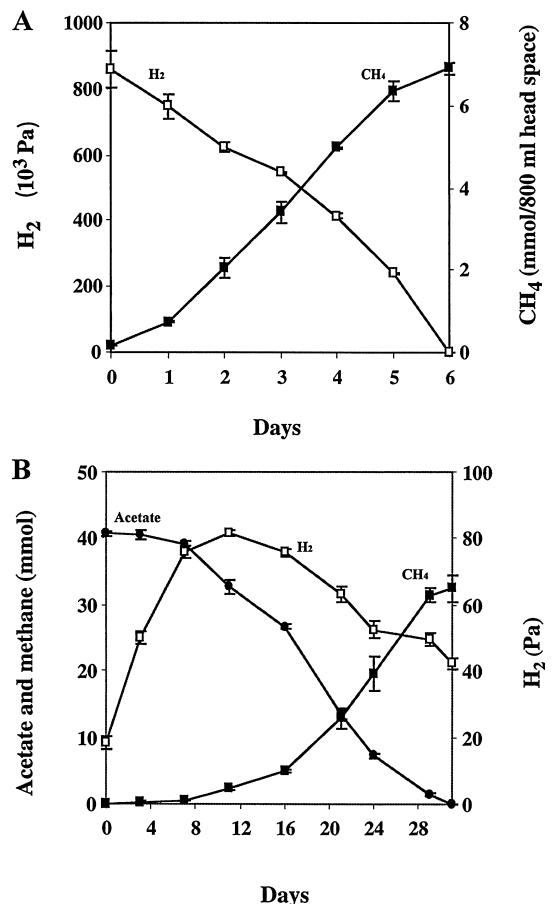


図 5. 水素資化性メタン生成菌 *M. thermautotrophicus* TM 株単独培養時 (A), 酢酸存在下 TM 株—PB 株共培養時 (B) のメタン・水素 (酢酸) 濃度変遷。

他多くのメタン生成経路以外のタンパク質群が高発現していた。また、若干であるが *McrI* も検出された。一方、共培養時で高発現したタンパク質は、ほとんどがメタン合成経路のタンパク質群で、*McrI*, F_{420} 依存型 *Mtd*, *methylenetetrahydrometanopterin reductase (Mer)*, および F_{420} 還元型ヒドロゲナーゼ (*Frh*) であった。*Mer* も F_{420} 依存型 *Mtd* と同様、還元型 F_{420} を使って還元を行う酵素であり、共培養時では *McrI* と F_{420} が関与する酵素が高発現することが特徴的であった。また、若干ではあるが共培養条件でも *McrII* が発現していた。

このように共生的有機酸分解細菌との共培養系を用いることで、メタン生成菌に極低濃度の水素を連続的に供給することを可能とし、そのときのメタン生成菌の遺伝子発現に関する知見を得ることができた。前述のように酢酸や酪酸を基質とした種間水素伝達系では、メタン生成菌は *McrI* を高発現させた。一方、単独培養時では *McrII* を主に発現させた。このことは自然環境中では *Mcr* アイソザイムをもつメタン生成菌が、有機酸分解細菌と共同して有機酸を分解する際には、主として *McrI* を利用していることを示唆するものである。一方、実験室のような場では高水素濃度でメタン生成菌を単独培養するのが常識だが、この時にはメタン生成菌は *McrII* を高発現させている。それでは、実際の環境中ではどのようなときに *McrII* を発現させて用いているのであろうか？これについては今後の研究が待たれるところである。

さまざまな水素発生基質の存在する環境中で、 ΔH 株のような2つの性質の異なる *Mcr* を持つメタン生成菌は、周囲の水素濃度に応じて二つの遺伝子の発現制御を行っていると考えられる。では、その機構はいったいどのようなものだろうか？水素依存的遺伝子発現制御系では、*Cupriavidus eutropha* (旧名、*Ralstonia eutropha*³⁷⁾ の *regulatory hydrogenase* が知られている³⁸⁾。*C. eutropha* は、ある限られた基質を用いて酸素呼吸によって生育でき、それらが枯渇し、かつ水素が存在するときに初めて、*regulatory hydrogenase* のシグナル伝達によりヒドロゲナーゼ遺伝子群を発現することが知られている。したがって ΔH 株のような水素に絶対的に依存しているメタン生成菌とは、その発現制御機構は本質的に異なると考えられる。筆者らは、この *Mcr* アイソザイムの発現制御機構に F_{420} が関与しているのではないかと考えている。 F_{420} はメタン生成経路に必須な水素(電子)伝達体である。その構造は *FAD* に類似し、構造的には異なるが、その性質は補酵素としての *NAD* に類似する。*FAD* や *NAD* のような電子伝達体の酸化還元状態が、酸化還元電位のセンシング機構に関与する *NifL—NifA* や *Rex* のようなタンパク質が細菌では知られている^{2,19)}。 F_{420} の酸化還元状態と水素濃度の関係を示す報告もされており⁹⁾、また、 ΔH 株には、ゲノム情報から機能不明の二成分性シグナル伝達タンパク質群がいくつか知られている。 ΔH 株のようなメタン生成菌は、水素濃度=酸化還元電位のセンシング機構に、 F_{420} による二成分性転写制御機構を使ってもおかしくないのではなからうか？著者らの知る限りアーキアでは、*Halobacterium salinarum* のシグナル伝達による光・化学走化性制御の報告^{21,33)} はあっても、シグナル伝達による転写制御系の例は皆無である。このような点からも、 ΔH 株の水素濃度センシ

ング機構の解明は非常に注目に値するといつて過言ではない。

4. ま と め

ここで紹介してきたメタン生成微生物共生系とは、有機物の分解によって生じる(主として)水素のやり取りによって成立している強固な共生系である。有機物からのメタン生成は地球環境のあらゆるところに認められ、そのすべてにおいてこの微生物共生系が成立していると言つて過言ではない。また、共生微生物は常にメタン生成菌に依存しているわけではなく、自身で自己完結的に利用できる基質が存在しているときにはそれを利用するといった柔軟性を併せ持っている。そして、共生という状態は、それぞれの微生物にとって特異的な遺伝子の発現をもたらしている。

我々の生活にとって両刃の剣でもあるメタンの発生メカニズムを知ることは非常に重要であり、それは分子生物学的な興味に留まらず、地球科学的な観点からも注目される研究領域である。生物学的メタン生成の根幹を担うメタン生成共生微生物系の多様性について、これからも多くの知見が得られていくだろう。しかし、その共生状態における微生物の遺伝子レベルの解析は、今まさに始まったばかりであり、今後の大きな研究課題となつてゆくであろう。

謝 辞

本稿で紹介した筆者らの研究の一部は以下の方々(敬称略)によってなされたものである。記して感謝の意を表したい。産業技術総合研究所: 関口勇地, 服部 聡(現 山形大学), 新里尚也(現 琉球大学), 榎 美歩, 邱 艶玲。長岡技術科学大学: 井町寛之, 山田剛史, 大橋晶良, 原田秀樹。なお本研究開発の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託をうけて、「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発」プロジェクトの一環として実施したものである。また、筆者(中村)は日本学術振興会特別研究員制度から援助を受けている。

文 献

- 1) Bonacker, L.G., S. Baudner, E. Morschel, R. Bocher, and R.K. Thauer. 1993. Properties of the two isoenzymes of methyl-coenzyme M reductase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur. J. Biochem.* 217: 587-595.
- 2) Brekasis, D., and M.S. Paget. 2003. A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* 22: 4856-4865.
- 3) Buurman, G., S. Shima, and R.K. Thauer. 2000. The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett.* 485: 200-204.
- 4) de Bok, F.A.M., H.J.M. Harmsen, C.M. Plugge, M.C. de Vries, A.D.L. Akkermans, W.M. de Vos, and A.J.M. Stams. 2005. The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1697-1703.

- 5) de Poorter, L.M., W.J. Geerts, and J.T. Keltjens. 2005. Hydrogen concentrations in methane-forming cells probed by the ratios of reduced and oxidized coenzyme F₄₂₀. *Microbiology* 151: 1697–1705.
- 6) Ferry, J.G. 1999. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 13–38.
- 7) Friedrich, B., T. Buhrke, T. Burgdorf, and O. Lenz. 2005. A hydrogen-sensing multiprotein complex controls aerobic hydrogen metabolism in *Ralstonia eutropha*. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 97–101.
- 8) Hattori, S., A.S. Galushko, Y. Kamagata, and B. Schink. 2005. Operation of the CO dehydrogenase/acetyl coenzyme A pathway in both acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium *Thermacetogenium phaeum*. *J. Bacteriol.* 187: 3471–3476.
- 9) Hattori, S., Y. Kamagata, S. Hanada, and H. Shoun. 2000. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1601–1609.
- 10) Hochheimer, A., D. Linder, R.K. Thauer, and R. Hedderich. 1996. The molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase operon and the tungsten formylmethanofuran dehydrogenase operon from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Structures and transcriptional regulation. *Eur. J. Biochem.* 242: 156–162.
- 11) Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, S. Hanada, A. Ohashi, and H. Harada. 2002. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1729–1735.
- 12) Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3608–3615.
- 13) Kamagata Y., and E. Mikami. 1989. Diversity of acetotrophic methanogens in anaerobic digestion. pp. 459–464. In Hattori, T., Y. Ishida, Y. Maruyama, R.Y. Morita, and A. Uchida (ed.), *Recent Advances in Microbial Ecology*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- 14) Kamagata, Y., N. Kitagawa, M. Tasaki, K. Nakamura, and E. Mikami. 1992. Degradation of benzoate by an anaerobic consortium and some properties of hydrogenotrophic methanogen and sulfate-reducing bacterium in the consortium. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 213–218.
- 15) Lee, M.J., and S.H. Zinder. 1988. Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂-CO₂. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 124–129.
- 16) Lee, M.J., and S.H. Zinder. 1988. Carbon monoxide pathway enzyme activities in a thermophilic anaerobic bacterium grown acetogenically and in a syntrophic acetate-oxidizing coculture. *Arch. Microbiol.* 150: 513–518.
- 17) Luo, H.W., H. Zhang, T. Suzuki, S. Hattori, and Y. Kamagata. 2002. Differential expression of methanogenesis genes of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum*) in pure culture and in cocultures with fatty acid-oxidizing syntrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1173–1179.
- 18) Lyon, E.J., S. Shima, G. Buurman, S. Chowdhuri, A. Batschauer, K. Steinbach, and R.K. Thauer. 2004. UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* 271: 195–204.
- 19) Martinez-Argudo, I., R. Little, N. Shearer, P. Johnson, and R. Dixon. 2004. The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *J. Bacteriol.* 186: 601–610.
- 20) Morgan, R.M., T.D. Pihl, J. Nolling, and J.N. Reeve. 1997. Hydrogen regulation of growth, growth yields, and methane gene transcription in *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH. *J. Bacteriol.* 179: 889–898.
- 21) Nordmann, B., M.R. Lebert, M. Alam, S. Nitz, H. Kollmannsberger, D. Oesterhelt, and G.L. Hazelbauer. 1994. Identification of volatile forms of methyl groups released by *Halobacterium salinarium*. *J. Biol. Chem.* 269: 16449–16454.
- 22) Qiu, Y.L., Y. Sekiguchi, H. Imachi, Y. Kamagata, I.C. Tseng, S.S. Cheng, A. Ohashi, and H. Harada. 2004. Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomer-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1617–1626.
- 23) Qiu, Y.L., Y. Sekiguchi, H. Imachi, Y. Kamagata, I.C. Tseng, S.S. Cheng, A. Ohashi, and H. Harada. 2003. *Sporotomaculum syntrophicum* sp. nov., a novel anaerobic, syntrophic benzoate-degrading bacterium isolated from methanogenic sludge treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Arch. Microbiol.* 179: 242–249.
- 24) Reeve, J.N., J. Nolling, R.M. Morgan, and D.R. Smith. 1997. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J. Bacteriol.* 179: 5975–5986.
- 25) Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262–280.
- 26) Schink, B., and M. Friedrich. 1994. Energetics of syntrophic fatty acid degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 85–94.
- 27) Schnürer, A., B. Schink, and B.H. Svensson. 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1145–1152.
- 28) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 771–779.
- 29) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1280–1288.
- 30) Sekiguchi, Y., T. Yamada, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata. 2003. *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1843–1851.
- 31) Shima, S., E.J. Lyon, M. Sordel-Klippert, M. Kauss, J. Kahnt, R.K. Thauer, K. Steinbach, X. Xie, L. Verdier, and C. Griesinger. 2004. The cofactor of the iron-sulfur cluster free hydrogenase hmd: structure of the light-inactivation product. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 2547–2551.
- 32) Smith, D.R., L.A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwani, A. Caruso, D. Bush, and J.N. Reeve. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179: 7135–7155.
- 33) Spudich, E.N., T. Takahashi, and J.L. Spudich. 1989. Sensory rhodopsins I and II modulate a methylation/demethylation system in *Halobacterium halobium* phototaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 7746–7750.
- 34) Thauer, R.K., K. Jungermann, and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41: 100–180.

- 35) Tokura, M., I. Chagan, K. Ushida, and Y. Kojima. 1999. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microbiol.* 39: 123–128.
- 36) Tokura, M., M. Ohkuma, and T. Kudo. 2000. Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 233–240
- 37) Vandamme, P., and T. Coenye. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2285–2289.
- 38) von Bunau, R., C. Zirngibl, R.K. Thauer, and A. Klein. 1991. Hydrogen-forming and coenzyme-F420-reducing methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase are genetically distinct enzymes in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Marburg). *Eur. J. Biochem.* 202: 1205–1208.
- 39) Yamada, K., Y. Kamagata, and K. Nakamura. 1997. The effect of endosymbiotic methanogens on the growth and metabolic profile of the anaerobic free-living ciliate *Trimyema compressum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 129–132.
- 40) Zinder, S.H. 1993. Physiological ecology of methanogens, pp. 128–206. In Ferry, J.G. (ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Chapman & Hall, New York.