研究論文

嫌気性消化槽から単離した *Coprothermobacter* 属
IT3株の諸性質

—高温域における水素生成およびペプチド分解について—

タンディシヤボー カライ*・伊賀 佳美**・玉木 秀幸***

中村 浩平**・高見澤 一裕**

要 旨

Coprothermobacter 属細菌の嫌気性消化槽における役割を知るために、新たに同属細菌を牛フン嫌気性消化槽から単離・同定し、その諸性質を既報の同属細菌と比較検討した。新規単離菌 IT3株は同種の BT^T 株と比較して、高温域での性質に違いがみられた。60℃では IT3株は独立した細胞の凝集体であるが、BT^T 株はやや短いフィラメント状となった。70℃での $\mu_{\max}$ (hr⁻¹) は IT3株では0.273に対し、BT^T 株では0.217と低かった。水素生産は同等であったがペプチダーゼ活性は4倍高かった。*Coprothermobacter* 属細菌、特に *C. proteolyticus* は、バイオマス系廃棄物に含まれる広い範囲の天然物から水素や炭酸ガスを生成し、メタン発酵の前段階としてあるいは水素発酵のための細菌として重要な役割を担っていることが分かった。

キーワード：コプロサーモバクテリウム属、嫌気性消化槽、フィラメント状、水素発酵、ペプチダーゼ

1. はじめに

地球温暖化防止や脱原子力発電のための持続可能なエネルギーの一つとしてバイオマス系廃棄物のメタン発酵によるエネルギー回収が注目を集めている。対象のバイオマス系廃棄物としては、家畜糞尿、生ごみ、食品工業廃棄物、レストランやコンビニの食物残渣、下水処理場からの余剰汚泥と広範囲である。これまでの研究例では、メタンガス発生率として、下水汚泥から0.25Nm³/kgVSあるいは0.35Nm³/kgCOD_{Cr}、生ごみから0.35-0.45 Nm³/kgVS、牛フン0.21 Nm³/kgVS、豚糞0.27 Nm³/kgVSで比較的一定した発生率である¹⁾。

一般に有機物からのメタンガスへの転換効率は60-65%で、これ以上の変換率はあまり例がない。多くのバイオマス系廃棄物には必ずデンプン、セルロース、ヘミセルロース、リグニン、ペクチン、タンパク質等の天然高分子化合物が含まれており、それらがメタン

生成の原料となっている。しかし、現時点では、デンプン、セルロース、ヘミセルロースなどの炭水化物が主たるメタン生成の原料となっており、その他の物質は微生物分解を受けにくい材料となりにくい。これらの高分子化合物を加水分解できればメタン発酵の効率が上昇することが考えられる。そのため、メタン発酵の前段階である加水分解プロセスや酸生成プロセスの微生物学的研究が極めて大切となってくる²⁾。

この研究の流れの中で、*Coprothermobacter* 属細菌に注目した。*Coprothermobacter* 属細菌は1985年に初めて単離された細菌である³⁾。まず、*Coprothermobacter* 属細菌特異的 PCR プライマーを用いた PCR で、各種メタン発酵槽での *Coprothermobacter* 属細菌の分布を調べた。そして、乳牛糞を原料とする高温発酵タンクに多く分布することを見出した。また、水素発酵性細菌に占める *Coprothermobacter* 属細菌の割合が40%に達する発酵槽も存在することを報告した⁴⁾。

* 岐阜大学大学院連合農学研究科 Kalayi TANDISHABO

** 岐阜大学応用生物科学部 Yoshimi IGA, Kohei NAKAMURA, Kazuhiro TAKAMIZAWA

*** (独)産業技術総合研究所 Hideyuki TAMAKI

2012年8月27日受付

2012年10月11日受理

この調査と並行して、新たに *Coprothermobacter* 属細菌を単離し、既報の同属細菌と比較して、*Coprothermobacter* 属細菌のメタン発酵槽内での役割解明のための一助とすることにした。

2. 実験方法

2.1 集積培養と単離

帯広畜産大学に設置されている乳牛糞バイオガスプラントの消化槽混合液を分離源とした。このプラントは高温発酵法（55℃）で運転されている。嫌気培養方法は Hungate⁵⁾ に従って行った。基本培地として、ポリペプトン 1 g/L、酵母エキス 1 g/L を使用し、lignin organosolv (Aldrich) 2.5 g/L を集積培養時は添加した。なお、基本培地の初期 pH は 7.2 である。メタン菌の生育を抑制するために、BES (Sodium 2-Bromo-ethanesulfonate) を最終濃度 10 mM になるように添加した。培地はすべてオートクレーブにて 121℃ 15 分間滅菌した。培養温度は 55℃ で、集積は月に 1 回行った。その後、基本培地に寒天を 1.5% 加え、ロールチューブ法で生じたコロニーを単離した。単離した菌株は IT3 株と名付け、NBRC に登録した (NBRC 107680)。

2.2 比較菌株

ドイツの菌株保存機関である Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) から *C. proteolyticus* BT^T (DSM 5265)、*C. proteolyticus* I8 (DSM 9218)、*C. platensis* 3R^T (DSM 11748) を購入し、新規に単離した IT3 株と比較した。

2.3 分子遺伝学的解析

2.3.1 16SrRNA 遺伝子解析

菌体を凍結融解を繰り返して DNA を抽出し、抽出した DNA は、エタノール-酢酸ナトリウム沈殿によって精製した。そして、16S rRNA 遺伝子をプライマー 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3') を使用し、AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems 社製) を用い、定法に従い反応液を調製した。PCR 条件は、95℃、15 分間後に、94℃、60 秒間の熱変性、53℃、60 秒間のアニーリングと 72℃、2 分間の伸長を 35 回繰り返しで DNA を増幅し、そして最後に 72℃、20 分間伸長した。PCR 産物をエタノール-酢酸ナトリウム沈殿によって精製し、Applied Biosystems

3100 DNA シーケンサーを用いて DNA 配列を決定した。

2.3.2 DNA-DNA ハイブリダイゼーション

DNA は臭化セチルトリメチルアンモニウム溶解液 (CTAB) にて単離した⁶⁾。DNA-DNA ハイブリダイゼーションは、Hanninen らの方法⁷⁾ によって DIG ラベリングシステム (Roche Diagnostics GmbH) を用いたスロットブロットで評価した。ハイブリダイゼーション強度はソフトウェア ImageJ 1.38x を用いて異なる希釈率の条件で決定した。DNA の相同性は連続した希釈強度での重み付け平均から計算した。

2.3.3 G+C 含量

CTAB 法にて抽出した DNA を用いた。DNase, Alkaline phosphatase 処理後のヌクレオシド組成を HPLC で測定した⁸⁾。

2.4 生理学的・形態学的試験

2.4.1 形態観察

光学顕微鏡 (オリンパス社製、BH-2) を用い、必要に応じてグラム染色を行い観察した。

2.4.2 増殖

20 mL バイアルを用いた。そこに、基本培地 9 mL と 20 mM チオ硫酸を 0.5 mL 入れ、滅菌後無菌的に植菌率 5% となるように前培養液を加えた。前培養は 55℃ で 168 時間行い、その時点での吸光度を一定とした。

変形 Gompertz 式(1)に基づいて解析した。

$$Y = P \exp \{- \exp [\mu_{\max} e (\lambda - t) / P + 1]\} \quad (1)$$

$$\text{ここで、} Y = \ln[(OD - OD') / OD_0] \quad (2)$$

P : 増殖ポテンシャル

$\mu_{\max}$: 比増殖速度の最大値 (hr⁻¹)

λ : 増殖遅滞時間 (hr)

t : 培養時間 (hr)

OD : 660 nm での吸光度

OD' : 培地の 660 nm での吸光度

OD₀ : 培養開始時の 660 nm での吸光度

・水素生成実験

水素生成実験に用いた培地は PY 培地で、その組成は、ペプトン 5 g/L、酵母エキス 10 g/L、トリプチケースペプトン 5 g/L、ビタミン K₁ 1 mg/L である。

PY 培地で 24 時間前培養した菌液 1 mL を予め滅菌した PY 培地 9 mL が入った 30 mL 容 Hungate チューブに植菌し、1 日培養後の水素生成を測定した。なお、

電子受容体実験の場合は、培地からビタミン K₁を除いて行った。

2.4.3 基質利用試験

グルコース、シュクロース、乳糖、グリセロール、酵母エキス、ポリペプトンを基質としてそれらの利用試験を行った。基本培地からポリペプトンを除き、そこに最終濃度 2 g/L となるように各基質を入れ、660nm での吸光度の時間に伴う上昇やガス生成から判断した。

2.4.4 抗生物質耐性試験

抗生物質耐性は、所定濃度の抗生物質を添加した基本培地を用い、そこに24時間前培養した菌液を1%植菌し、3日間培養してこの間の660nmでの濁度を測定することで行った。使用した抗生物質と最終濃度は、バンコマイシン(2.5mg/L)、ネオマイシン(0.15g/L)、ポリミキシンB(20mg/L)、アジ化ナトリウム(0.5g/L)、カナマイシン(600ng/Lもしくは10mg/L)、クロラムフェニコール(34mg/L)、アンピシリン(50mg/L)、ストレプトマイシン(10mg/L)とした。

2.4.5 硫化水素発生実験

チオ硫酸からの硫化水素の生成実験には基本培地を用いた。

2.4.6 ペプチド分解試験

基質としてペプチド-MCAを用いた(Table 1)。ペプチド-MCA 基質は、ペプチドのC末端に4-Methyl-Coumaryl-7-Amide(MCA)が結合したものであり、加水分解されると7-Amino-4-Methyl-Coumarine(AMC)を生成する⁹⁾。遊離したAMCは蛍光物質であり、蛍光光度計を用いて定量することができる。このペプチド-MCAを用いて各菌株の持つプロテアーゼの合成基質に対する活性試験を行った。IT3, BT^T, I8の各菌株を660nmにおける吸光度がそ

れぞれ約0.15, 0.15, 0.10となるまで培養し、それぞれの培養液を8,000 gで20分間遠心分離した後、上清を Minisart 孔径0.2 μm フィルター(Sartorius stedim)でろ過した。これを粗酵素液として用いた。50mM リン酸緩衝液(pH 7.0)890 μLに、9種類の10μM ペプチド-MCA(Table 1)の溶液10 μLをそれぞれ加えた。これに粗酵素液100 μLを加え、70℃で1時間反応させた。1時間後、10%(w/v)トリクロロ酢酸1,000 μLを加え反応を停止させ、蛍光光度計 RF-1500(島津製作所製)で励起波長380 nm, 蛍光波長460 nmでの蛍光を測定した。既知濃度のAMCで作成した検量線より、加水分解で生じたAMC量を算出、菌体由来酵素による基質分解活性を求めた。粗酵素液の代わりに培地100 μLを加えたものをブランクとした。なお、1分間に1 μmol AMCの発現を1Uとした。粗酵素液のタンパク質濃度を Qubit (Invitrogen 製)で測定した。

粗酵素液の温度およびpH安定性実験は、次のようにして行った。0.20%(w/v)のカゼインを含んだ50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)400 μLに粗酵素液100 μLを加えた。これを55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95℃で1時間反応させ、10%(w/v)トリクロロ酢酸500 μLを加え反応を停止させた。室温で30分静置後、12,000 gで10分間遠心分離し、上清の280 nmにおける吸光度を測定した。

0.20%(w/v)のカゼインを含んだ pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5に調製した50 mM 緩衝液 Bis-tris/HCl 緩衝液, Tris/HCl 緩衝液, グリシン/NaOH 緩衝液400 μLに粗酵素液100 μLを加えた。緩衝液は pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0では Bis-tris/HCl 緩衝液, pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0では Tris/HCl 緩衝液, pH9.5, 10.0, 10.5ではグリシン/NaOH 緩衝液と

Table 1 Peptide-MCA(4-methyl-coumaryl-7-amide)substrates used for experiments

Name	Substrate for	Compound
Suc-L-L-V-Y-MCA	Chymotrypsin, Ingensin / Proteasome and Calpain	Succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine MCA
Suc-A-A-P-F-MCA	Chymotrypsin	Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanine MCA
Suc-A-A-A-MCA	Elastase	Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine MCA
Boc-E-K-K-MCA	Plasmin	T-Polycarbonate-L-glutamyl-L-lysyl-L-lysine MCA
Boc-V-L-K-MCA	Plasmin	T-Butyloxycarbonyl-L-valyl-L-leucyl-L-lysine MCA
Boc-F-S-R-MCA	Trypsin, Tryptase, 73K protease	T-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-arginine MCA
Bz-R-MCA	Trypsin	Benzoyl-L-argine MCA
L-MCA	Aminopeptidase	L-Leucine MCA
R-MCA	Cathepsin H	L-Arginine MCA

各緩衝液の pH の適応範囲に応じて 3 種類の緩衝液を用いた。これを 70℃ で 1 時間反応させた後、10% (w/v) トリクロロ酢酸 500 μ L を加え反応を停止させた。これを室温で 30 分放置し、12,000 g で 10 分間遠心分離し、上清の 280 nm における吸光度を測定した。

2.5 分析方法

水素ガスと炭酸ガスは、Unibeads C 60/80 (GL サイエンス) をカラムとしガスクロマトグラフ GC-8A (島津製作所製) で測定した。検出器は TCD である。有機酸は、Shim-pack SCR-102H カラムを用いて、Prominence HPLC システム (島津製作所製) で測定した。検出器は電気伝導計 (CDD-Avp) を用いた。吸光度は、UV-visible mini-1240 (島津製作所製) で測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 分子遺伝学的解析

BT^T 株の DNA を鋳型とした場合、IT3 株と BT^T 株の DNA 交雑度は $90 \pm 4\%$ ($n = 3$) であった。IT3 株と BT^T 株の G+C 含量はそれぞれ 45.2 mol% と 44.4

mol% であった。16S rRNA 遺伝子配列の BLAST を用いた比較では、IT3 株は極めて BT^T 株に近い (99% 相同) ことが判明した。

3.2 形態学的観察

IT3 株と BT^T 株ともにグラム陰性であった。55℃ では、IT3 株は桿状で BT^T 株よりもやや短い桿菌 (約 1 μ m) である。ビタミン K₁ を抜いた PY 培地での培養では、65℃ で IT3 株、BT^T 株ともにフィラメント状になった。しかし、60℃ では IT3 株は独立した細胞の凝集体となり、BT^T 株はやや短いフィラメント状であった (Fig. 1)。このような *Coprothermobacter* 属細菌の温度による細胞形態のフィラメント化はこれまでに報告されていない。

3.3 増殖

温度が増殖に及ぼす影響を調べた実験結果を Table 2 に示す。試験した 45℃ から 70℃ の範囲で IT3 株、BT^T 株ともに増殖した。μ_{max} を比較すると、55℃ の結果を除いて IT3 株の方が高い。一方、増殖遅滞時間 (λ) はほとんどの条件で IT3 株が短い。65℃ になるとほとんど差がなくなり、70℃ では逆になる。これらから、

Fig. 1 Microphotographs of gram-stained filaments of *C. proteolyticus* strains IT3 and BT^T grown in PY medium without vitamin K₁ (PY - K medium) at 60 °C (A and B) and 65 °C (C and D)

Scale bars: 10 μ m

Table 2 Parameters of the modified Gompertz equation for strain IT3 and *C. proteolyticus* strain BT^T

Temperature	Strain IT3						<i>C. proteolyticus</i> strain BT ^T					
	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	P	$\lambda(\text{h})$	n	R^2	D*	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	P	$\lambda(\text{h})$	n	R^2	D*
45 °C	0.0558	3.38	7.52	40	0.997	0.0787	0.0345	3.09	121.51	18	0.993	0.1075
55 °C	0.120	3.76	0.64	17	0.994	0.1634	0.158	2.39	3.49	8	1.000	0.1794
60 °C	0.165	3.60	0.13	17	0.991	0.1170	0.102	2.81	1.96	17	0.997	0.1292
65 °C	0.256	2.41	2.53	6	0.996	0.2472	0.209	1.87	2.55	6	0.994	0.2819
70 °C	0.273	2.09	2.50	6	0.996	0.2410	0.217	4.03	1.48	11	0.982	0.1998

* D values of the Kolmogorov-Smirnov test for a random normal distribution of residuals of less than 5 % (NIST DataplotTM).

70℃までの温度範囲ではIT3株の増殖が早い、これ以上の温度になると逆にBT^T株が増殖活性を維持すると考えられる。

3.4 水素生成実験

温度と水素生産の関係を Fig. 2に示す。55℃から65℃の範囲では常にIT3株の水素生産がBT^T株の水素生産よりも高いが、70℃以上では逆となり、IT3株の水素生産が温度の上昇とともに低下するのに対し、BT^T株の水素生産は75℃が一番高くなった。増殖実験で求めた諸パラメーターと比較すると70℃以上の高温域ではBT^T株の活性が高いと言える。なお、I8株の水素生産活性はデータには示さないが、著しく低かった。

3.5 基質利用試験

グルコース、酵母エキス、ポリペプトンを基質としたとき、増殖とともに水素と炭酸ガスを発生した。シュ

クロース、乳糖、グリセロールはほとんど利用されなかった (Table 3)。

3.6 抗生物質耐性試験

IT3株は、ネオマイシン (0.15mg/L) とカナマイシン (10mg/L) には感受性であったが、バンコマイシン (2.5 mg/L)、ポリミキシン B (20mg/L)、アジ化ナトリウム (0.5g/L)、カナマイシン (600 ng/mL もしくは10mg/L)、クロラムフェニコール (34mg/L)、アンピシリン (50mg/L)、ストレプトマイシン (10mg/L) には感受性がなかった。

3.7 ペプチド分解試験

IT3株、BT^T株、I8株の合成基質に対する活性試験の結果をそれぞれ Fig. 3に示した。IT3株由来のプロテアーゼは Suc-A-A-A-MCA を最もよく分解し、その比活性は0.120U/mg-protein だった。BT^T株由来のプロテアーゼは Suc-A-A-P-F-MCA を最も分解し、

Fig. 2 Effect of temperature on the hydrogen production in modified PY medium (without vitamin K_i)

Symbols: strain IT3 (▲); *C. proteolyticus* strain BT^T (□); *C. platensis* strain 3R^T (●). Hydrogen production in modified PY medium was measured in headspace after 24 hours and is expressed as mmoles per litre of culture medium.

Table 3 Comparisons of the main characteristics of reported strains of the genus *Coprothermobacter*

Character	<i>C. proteolyticus</i> strain IT3	<i>C. sp.</i> strain CT-1	<i>C. proteolyticus</i> BT ^T	<i>C. proteolyticus</i> I8	<i>C. platensis</i> 3RT ^T
16S rDNA Sequence identity with <i>C. proteolyticus</i> BT ^T	99%	99.4%	100%	ND	95%
Gram stain	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Morphology, arrangement	Short rods, filaments	Straight rods	Short rods, filaments	Rods	Short rods, pleomorph
G + C content (mol%)	45	ND	45	43.5	43
Optimal pH	Neutral	ND	6.8-7.4	6.8-7.4	7.0
Optimal temperature	60-70°C	ND	63-70°C	65-70°C	55°C
Fermentation end products from glucose	H ₂ , CO ₂	ND	Acetate, Alanine, Pyruvate, H ₂ , CO ₂	ND	Acetate, Alanine, Pyruvate, H ₂ , CO ₂
Major fermentation products from gelatin, casein, and other proteinaceous substrates, in pure or methanogenic culture	Acetate, H ₂ , CO ₂	Ammonia, Acetate, H ₂ , CO ₂ , Butyrate	Ammonium, Acetate, H ₂ , CO ₂ , Isobutyrate, Isovalerate	Ammonium, Acetate, H ₂ , CO ₂ , Isobutyrate, Isovalerate	Acetate, propionate, H ₂ , CO ₂
Production of ethanol from sugar metabolism	—	—	—	—	—
Reduction of:					
Thiosulfate	+	ND	+	+	+
Sulfate	—	ND	—	—	—
Nitrate	ND	ND	ND	ND	—
Growth on:					
Fructose	ND	ND	+	+	+
Maltose	ND	ND	+	+	+
Mannose	ND	ND	+	+	ND
Starch	ND	ND	+	+	+
Melibiose	ND	ND	+	+	+
Xylose	ND	ND	—	—	ND
Glucose	+	ND	+	+	—
Sucrose	+	ND	+	+	+
Lactose	—	ND	—	—	—
Glycerol	—	ND	—	—	—
Polypeptone	+	ND	+	+	+
Yeast extract	+	ND	+	+	+
Resistance to:					
Penicillin G (20 U/ mL)	ND	ND	—	—	+
Polymixin B (20 mg/L)	ND	ND	+	+	—
Kanamycin A (10mg/L)	—	ND	ND	ND	ND
Kanamycin A (600ng/L)	+	ND	+	ND	ND
Ampicillin (50mg/L)	+	ND	ND	ND	ND
Chloramphenicol (34mg/L)	+	ND	ND	ND	ND
Streptomycin (10mg/L)	+	ND	ND	ND	ND
Isolated from	Thermophilic methanogenic reactor, Japan	Thermophilic methanogenic packed-bed jar fermentor, Japan	Thermophilic anaerobic reactor, France	Thermophilic dry anaerobic composting process, Belgium	Mesophilic anaerobic digester, Uruguay
Type of waste	Dairy cattle manure	Pet food	Tannery wastes and cattle manure	Biokitchen waste	Wastewater from baker's yeast production
First report	2012	2011	1985	1994	1998
Lifestyle	Thermophilic	ND	Thermophilic	Thermophilic	Moderately thermophilic

T, type strain; ND, not determined

Fig. 3 Specific hydrolysis rates of peptide-MCA substrates at 70 °C by free-cell extracts of *C. proteolyticus* strains: IT3 (white bar) , BT^T (black bar) and I8 (shaded bar)

MCA: 4-methyl-coumaryl-7-amide. Types of peptidase substrates, their names and molecular weights, respectively ; aminopeptidase substrates: A-MCA, L-MCA; trypsin substrates: Bz-R-MCA, Boc-F-S-R-MCA, Boc-V-P-R-MCA, Boc-E-K-K-MCA; elastase substrate: Suc-A-A-A-MCA; chymotrypsin substrates: Suc-A-A-P-F-MCA, Suc-L-L-V-Y-MCA.

その比活性は0.050 U/mg-protein だった。I8株由来のプロテアーゼは Boc-F-S-R-MCA を最も分解し、その比活性は0.076 U/mg-protein だった。また、3菌株共に、Bz-R-MCA は最も分解量が少なかった。IT3株はBT^T株と比較して比活性が高いものが多く、中でも Suc-A-A-A-MCA を基質としたときは約3倍、Boc-E-K-K-MCA を基質としたときは約2倍の比活性を有することが明らかとなった。したがって、IT3株及びBT^T株、I8株はキモトリプシン様セリンプロテアーゼを持ち、IT3株がより強い活性を持つことが確認された。

BT^T株とI8株では85℃、IT3株では90℃で最も活性が高くなった。これは3菌株共に増殖の至適温度よりも約20℃高い温度である。また、増殖における至適温度では、プロテアーゼの活性は最大の時と比較して約20%であることが明らかとなった。pHではIT3株とBT^T株がpH9.0で、I8株がpH9.5で活性が最も高くなった。3菌株共にpH7.5から9.5という広い範囲で70%以上の活性があり、特にBT^T株ではpH7.5から10.0という広い範囲で80%以上の活性があった。

これまでに単離され報告されている *Copro-*

thermobacter 属細菌は、今回新たに単離したIT3株を含め5種で、*C. proteolyticus* 4種^{3, 11, 12)}、*C. platensis* 1種¹³⁾である。その諸性質の比較を Table 3に示す。*Coprothermobacter* 属細菌はいずれも嫌気性消化槽から単離されているが、*C. platensis* は最適温度が5-10℃低い。

C. proteolyticus に共通した特徴として、グラム陰性菌であり、60℃から70℃の高温領域に最適温度があること、グルコースやタンパク質から水素や炭酸ガスを生産すること、チオ硫酸を還元するが硫酸還元能はないこと、デンプン、ポリペプトンや酵母エキスを利用できることが挙げられる。

今回単離したIT3株は、BT^T株と比較して、高温域での性質に違いがみられる。60℃ではIT3株は独立した細胞の凝集体であるが、BT^T株はやや短いフィラメント状となる。70℃での μ_{max} (hr⁻¹)はIT3株では0.273に対し、BT^T株では0.217と低い値となる。水素生産は同等であるがペプチダーゼ活性は4倍高い。すなわち、同じ *C. proteolyticus* に分類されるが、IT3株はBT^T株よりも、高い温度域での生育とペプチド分解に適していると考えられる。

4. ま と め

Coprothermobacter 属細菌のメタン発酵槽内での役割解明のために、新たに *Coprothermobacter* 属細菌 IT3株を単離し、既報の同属細菌 BT^T 株および I8株と比較した。その結果、次のことが明らかとなった。

- ・ 60℃では IT3株は独立した細胞の凝集体であるが、BT^T 株はやや短いフィラメント状となった。
- ・ 70℃までの温度範囲では IT3株の増殖が早い、これ以上の温度になると BT^T 株が増殖活性を維持する。
- ・ 55℃から65℃の範囲では IT3株の水素生産が BT^T 株の水素生産よりも高いが、70℃以上では逆となる。
- ・ IT3株及び BT^T 株、I8株はキモトリプシン様セリンプロテアーゼを持ち、IT3 株がより強い活性を持つ。

Coprothermobacter 属細菌、特に *C. proteolyticus* は、バイオマス系廃棄物に含まれる広い範囲の天然物から水素や炭酸ガスを生成し、メタン発酵の前段階としてあるいは水素発酵のための細菌として重要な役割を担っていることが分かった。今後は、*Coprothermobacter* 属細菌とメタン生成菌の関連について研究を進めてゆきたい。

謝辞：資料提供ならびに数々のご助言を頂きました帯広畜産大学教授梅津一孝先生に厚く感謝いたします。さらに、産業技術総合研究所の村松瑞穂氏と岐阜大学応用生物科学部堀井康幸氏の技術的サポートに感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 菊池慎太郎編著：微生物工学，三共出版，82-85, 2004.
- 2) Cheon, J., Hidaka, T., Mori, S., Koshikawa, H., Tsuno, H.; Applicability of random cloning method to analyze microbial community in full-scale anaerobic digesters, J. Biosci. Bioengi., **106**, 134 - 140, 2008.
- 3) Ollivier, B.M., Mah, R.A., Ferguson, T.J., Boone, D.R., Garcia, J.L., Robinson, R. Emendation of the genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a proteolytic acetogen from a methanogenic enrichment, Int. J. Syst. Bacteriol., **35**, 425-428, 1985.
- 4) Tandishabo, K., Nakamura, K., Umetsu, K., Takamizawa, K.; Distribution of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters, J. Biosci. Bioengi., **114**, 518-520, 2012.
- 5) Miller, T.L., and Wolin, M.J.; A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes, Appl. Microbiol., **27**, 985-987, 1974.
- 6) Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (ed.). ; Short protocols in molecular biology, 5th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. 2002.
- 7) Hänninen, M.-L. , Happonen, I., Saari, S., Jalava, K.; Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp., Int. J. Syst. Bacteriol., **46**, 160-166, 1996.
- 8) Kamagata, Y., and Mikami, E.; Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanoseta* strain, Int. J. Syst. Bacteriol., **41**, 191-196, 1991.
- 9) Obayashi, Y. and Suzuki, S.; Proteolytic enzymes in coastal surface seawater: Significant activity of endopeptidases and exopeptidases, Limnology and Oceanography, **50**, 722-726, 2005.
- 10) Rainey, F.A., and Stackebrandt, E.; Transfer of the type species of the genus *Thermobacteroides* to the genus *Thermoanaerobacter* as *Thermoanaerobacter acetoethylicus* (Ben-Bassat and Zeikus 1981) comb. nov., description of *Coprothermobacter* gen. nov., and reclassification of *Thermobacteroides proteolyticus* as *Coprothermobacter proteolyticus* (Ollivier et al. 1985) comb. nov, Int. J. Syst. Bacteriol., **43**, 857-859, 1993.
- 11) Kersters, I., Maestrojuan, G.M., Torck, U., Vancanneyt, M., Kersters, K., Verstraete, W.; Isolation of *Coprothermobacter proteolyticus* from an anaerobic digest and further characterization of the species, Syst. Appl. Microbiol., **17**, 289-295, 1994.
- 12) Etchebehere, C., Pavan, M.E., Zorzopulos, J., Soubes, M., Muxi, L.; *Coprothermobacter platensis* sp. nov., a new anaerobic proteolytic thermophilic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge, Int. J. Syst. Bacteriol., **48**, 1297-1304, 1998.

Characterization of a Novel *Coprothermobacter* sp. Strain IT3 Isolated from an Anaerobic Digester
-Hydrogen Production and Peptidase Profiles at Higher Temperatures-

Kalayi TANDISHABO^{*}, Yoshimi IGA^{**}, Hideyuki TAMAKI^{***},
Kohei NAKAMURA^{**}, Kazuhiro TAKAMIZAWA^{**}

^{*} United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University

^{**} Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

^{***} Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of
Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

ABSTRACT

For revealing a role of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters, a novel strain was isolated from a cattle manure digester and its characteristics were compared with those of known *Coprothermobacter* species. The new isolate, a strain IT3, has a different habitat of higher temperature conditions than type strain BT^T. At 60 °C condition, strain IT3 shows aggregation of independent cells, while for strain BT^T formation of short filament. $\mu_{\max}$ (hr⁻¹) values at 70°C were recorded as 0.273 for strain IT3 and 0.217 for strain BT^T. Hydrogen production of each strain IT3 and BT^T was similar but peptidase activity of strain IT3 was 4 times higher than that of strain BT. *Coprothermobacter* spp., especially *Coprothermobacter proteolyticus*, have ability to produce hydrogen and carbon dioxide from many kinds of bioresources, and this study indicates that the bacteria work as important players in the preprocess of methane and hydrogen fermentation.

Key Words : *Coprothermobacter*, anaerobic digester, filament, hydrogen fermentation, peptidase