嫌気性微生物の代謝特性：メタン生成古細菌を中心として

Metabolic properties of hydrogenotrophic methanogens in conjunction with syntrophic hydrogen producing anaerobes

産業技術総合研究所 生物遺伝子資源研究部門

鎌形 洋一 Yoichi KAMAGATA

関口 勇地 Yuji SEKIGUCHI

Key words: methanogens; strict anaerobes; syntrophy; interspecies electron transfer

はじめに

無酸素環境には、未知微生物を含め多様な嫌気性微生物が生息している。ほぼ無酸素環境であったと思われる原始地球に初めて登場した生命体はその後何十億年にもわたって進化しながら、嫌気性微生物群として今なお地球上の主要な構成微生物であり続けている。このうちメタン生成古細菌（メタン菌）は物質の嫌気的な分解における最終段階を担う微生物として最も重要な微生物群である。メタン菌は基質をメタンに転換する過程でエネルギーを獲得する絶対嫌気性古細菌の総称であるが、その最大の生理学的な特徴は、水素、メチル化合物、ギ酸、酢酸など、極めて限られた低分子の基質のみをエネルギー源とすることである。メタン菌は古くから“メタン発酵菌”などと呼ばれているが、実際には膜電位を用いたエネルギー獲得系を有する微生物であり、メタン生成にかかわる酵素・補酵素系はメタン菌に固有なものが大部分である¹⁾。

地球上で年間に発生するメタンの量は 10^8 トンレベルであると言われている。このうち、化石ガスの漏出、火山活動などに由来するものもあるが、少なく見積もっても、全体の80%以上のメタンが生物由来であり、そのすべてにメタン菌がかかわっていると考えられる。主要な生物的发生源は湿地帯、水田、家畜、シロアリであり、いずれもメタン菌の活動が最も盛んな環境である。メタンは広く薄く大気に拡散すれば、二酸化炭素と並ぶ温室効果ガスとなるが、有機性廃棄物の嫌気的な生物処理プロセスなどによって集約的に回収できれば、エネルギー源として活用できる資源である^{2), 3)}。メタン菌の生態学的・生理学的性質を理解することは、“両刃の剣”であるメタンの発生メカニズムを知るうえでたいへん重要である¹⁾。

メタン生成古細菌を中心とした微生物共生系

メタン菌にとって水素と酢酸はとりわけ重要な基質であ

る。というのも、無酸素環境下においては、多くの発酵性微生物の最終産物が水素、炭酸ガス、酢酸だからである(図1)。分子状水素は高エネルギー物質ではあるが、無酸素環境では非常に限られた微生物群しか利用できない。酢酸は水素に比べると、さらに利用者の少ない基質で、メタン菌、硫酸還元細菌、金属還元細菌など、嫌気的な呼吸システムをもつ微生物の中でも、さらに限られた微生物種しか利用できない。このような点で、メタン菌は最終的な有機物分解者として位置づけられるが、実際の生態系においては、酢酸や水素を供給する発酵性微生物の生育を支えるという、もう一つの重要な役割を担っている。芳香族や脂肪酸などから酢酸や水素を生産する微生物の中には、メタン菌と極めて密接な連携なしでは、有機物の嫌気的酸化を行えないものが数多く存在する¹⁾。これらの発酵性微生物は嫌気環境における共生微生物(syntroph)群と呼ばれ、発酵性微生物とメタン菌との間で水素(還元力)伝達を行っている。

筆者らは、このようなメタン菌を中心とする微生物共生系を各微生物種に特異的な蛍光オリゴヌクレオチドプローブを用いた fluorescence *in situ* hybridization などの手法を用いて実際の複雑系の中で視覚化することに成功している(図2)^{4)~7)}。メタン菌の周囲には水素を生成する共生微生物群が近接性を保ちながら微小コロニーを形成している場合が多い。また、筆者らは、従来まで難培養であったさまざまな共生微生物をメタン菌との“純粋な共生系”として単離している^{6), 8)~11)}。これらの共生微生物の多くは、ある特別な基質を与えた場合には純粋な生育が可能であったり、さらには硫酸還元能をもったりするが、嫌気環境における代表的な中間物質(飽和低級脂肪酸など)を基質とした場合には、メタン菌なしでは全く生育することができない。これらの共生細菌は基質の酸化過程で生ずる水素を常時メタン菌に供給し、メタン菌はそれをエネルギー源として生育することによって全体の反応が進行可能になる。

また、反すう動物ルーメン内や一般の無酸素環境に存在する嫌気性の原生動物は、しばしば細胞質内にメタン菌を

共生させている。これは、捕食した微生物を消化する過程で発生する過剰量の還元力が消化効率に悪影響を与えることを防ぐために、独立栄養性のメタン菌を細胞内に共生させていると考えられる¹²⁾。この種の原生動物は細胞質内に還元力を水素に変換することができる極めて特殊な小器官(ヒドロゲノゾーム)を発達させており、メタン菌はヒドロゲノゾームに埋め込まれるように共生している(図2)。こうして水素の授受はヒドロゲノゾームとメタン菌の間で行われる。

メタン生成古細菌のメタン生成遺伝子の発現

近年多くの古細菌の全ゲノム解析が解読されているが、メタン菌についてもすでに *Methanothermobacter* および *Methanococcus* の2種についてその全容が明らかになっている(ごく最近、*Methanopyrus kandleri* および *Methanosarcina acetivorans* の全ゲノム解析も完了した)。これ

図1 メタン生成古細菌は無酸素環境における物質分解の最終段階を担っている。A, Bの反応はさまざまな発酵性微生物により行われる。C, Dの反応はそれぞれ酢酸資化性メタン菌および水素資化性メタン菌によって行われる。この図から明らかに、無酸素環境下の有機物分解はほとんどすべて水素と酢酸を経由する。

図2 メタン生成古細菌とさまざまな微生物の共生系

(A) メタン発酵リアクター内で発達する複合微生物顆粒の中に見られるプロピオン酸化微生物(矢印)とそれを取り巻くメタン菌の微小コロニー。(B) プロピオン酸化菌とメタン菌の純粋な2者培養系(矢印がプロピオン酸化菌)。左は位相差顕微鏡像、右は落射蛍光像。自家蛍光を発しているのがメタン菌。(C) 嫌気性原生動物の細胞切片の透過型電子顕微鏡像。水素発生小器官(ヒドロゲノゾーム)に囲まれるように内部共生するメタン菌(矢印)。

らの解析およびそれ以前に行われていた遺伝学的解析で明らかになったメタン菌の最も興味ある特徴としては、7段階からなる水素からのメタン生成過程に isofunctional な二つの遺伝子をもつ反応が4カ所も存在しているという点が挙げられる(図3)。筆者らは、脂肪酸を酸化し微量の水素を発生し続ける微生物との共生系を構築させたメタン菌と、高分圧(約1 atm)の水素/二酸化炭素で純粋に培養したメタン菌で、それぞれ発現するメタン生成遺伝子を Northern blot や二次元電気泳動などを用いて解析し

図3 水素と二酸化炭素からのメタン生成経路
反応の第1, 4, 7段階目(それぞれ、FWDとFMD, MTDとMTHおよびMCRとMRT)および水素の取り込みにかかわる部分(FRHとMVH)にそれぞれ isofunctional な酵素が存在していることが知られている。例えばメタン菌を低級脂肪酸分解共生菌と共生培養したときには7段階目にかかわる遺伝子のうちMCR (*mcrBDCGA*) をコードする遺伝子が高発現する。

た^{13), 14)}。その結果、共生培養状態では、特定の生合成遺伝子、とりわけメタン生合成の最終段階を担う methylcoenzyme M reductase の二つの遺伝子のうち一方が、高発現していることを明らかにした (図 3)。高発現している methylcoenzyme M reductase system I (*mcrBDCGA*) は発現が抑制されているもう一方の酵素 (system II, *mrtBDGA*) に比べ、比活性は低いが基質に対する親和性が高いことが知られている。共生系においては、水素の授受が極めて低濃度で行われているため、水素により親和性の高い酵素が優先的に発現する機構が存在すると予想される。これに対して高水素分圧では両遺伝子が発現していた。自然環境やメタン発酵リアクターなどのような人工生態系においては、一般に水素分圧が 1 atm に達するような高分圧環境が存在するとは考えられない。これらの環境における水素はほとんど例外なく、水素を生産する発酵性微生物によって供給され、水素は速やかにメタン菌などによって消費されることから、見かけ上の水素分圧は常に低く保たれている。筆者らが行った共生培養を用いた実験系は、こういった実環境により近い状態におけるメタン菌の遺伝子発現状態を観察できたことになる。

おわりに

われわれはふだん酸素の存在をほとんど意識することはないが、海洋などの水圏を別にして、酸素は環境のほんのわずかに表層部にしか存在しない。一步深く入り込めば広大な無酸素環境が広がっており、微生物のおそらく 90% 以上は酸素の乏しい環境に存在しているといって過言ではない。酸素の存在しない環境における有機物の分解は、多くの場合、メタン菌の存在なしでは完結しない。もし、メタン菌がいなければさまざまな悪臭をもつ脂肪酸などであふれてしまうだろうし、分解反応自体も途中で停止してしま

うだろう。メタン菌の果たす役割は極めて大きいと言える。上述のように、メタン菌が棲息する“実際の環境”でのメタン菌の代謝特性を明らかにすることは地球温暖化ガスとしてのメタン発生機構の解明、また、エネルギー生産型のメタン発酵水処理システムの効率化などにつながっていくものと考えられる。

- 1) 鎌形洋一: バイオサイエンスとインダストリー, **56**, 169-174 (1998).
- 2) 鎌形洋一, 関口勇地: 水環境学会誌, **21**, 630-634 (1998).
- 3) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, and H. Harada: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 277-282 (2001).
- 4) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Harada, and K. Nakamura: *Microbiology*, **144**, 2655-2665 (1998).
- 5) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1280-1288 (1999).
- 6) H. Imachi, Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3608-3615 (2000).
- 7) K. Yanagita, Y. Kamagata, M. Kawaharasaki, T. Suzuki, Y. Nakamura, and H. Minato: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1737-1742 (2000).
- 8) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 771-779 (2000).
- 9) H. Imachi, Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, S. Hanada, A. Ohashi, and H. Harada: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press (2002).
- 10) Y. Sekiguchi, H. Takahashi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5740-5749 (2001).
- 11) S. Hattori, Y. Kamagata, S. Hanada, and H. Shoun: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1601-1609 (2000).
- 12) K. Yamada, Y. Kamagata, and K. Nakamura: *FEMS Microbiol. Lett.*, **149**, 129-132 (1997).
- 13) S. Hattori, H-W. Luo, H. Shoun, and Y. Kamagata: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 294-298 (2001).
- 14) H-W. Luo, H. Zhang, T. Suzuki, S. Hattori, and Y. Kamagata: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1173-1179 (2002).