

絶対嫌気環境下で酢酸分解を担う共生微生物系の
生理学的性質および共生機構に関する研究

筑波大学大学院
農学研究科
応用生物化学専攻

服 部 聡

目次

| | | |
|-----|---|----|
| 序章 | 総論..... | 1 |
| 第一節 | 研究の背景..... | 1 |
| 1-1 | 嫌気環境下における有機物分解と関連する微生物群..... | 1 |
| 1-2 | 熱力学的見地から見た嫌氣的有機物分解..... | 5 |
| 1-3 | 種間水素伝達と種間ギ酸伝達..... | 6 |
| 1-4 | 嫌気環境下における酢酸代謝..... | 8 |
| 第二節 | 本論文の目的及び構成..... | 18 |
| 第二章 | 酢酸酸化共生細菌およびメタン生成細菌の純粋分離および同定..... | 19 |
| 第一節 | はじめに..... | 19 |
| 第二節 | 実験方法..... | 19 |
| 2-1 | 分離源..... | 19 |
| 2-2 | 培地及び培養、単離方法..... | 19 |
| 2-3 | 16S rDNA 遺伝子の同定..... | 21 |
| 2-4 | 各種生理試験..... | 21 |
| 2-5 | 機器分析..... | 22 |
| 2-6 | DNA G+C 含量の測定..... | 23 |
| 2-7 | キノン分析..... | 23 |
| 2-8 | 電子顕微鏡観察..... | 23 |
| 第三節 | 結果および考察..... | 24 |
| 3-1 | 酢酸酸化共生微生物系の集積培養..... | 24 |
| 3-2 | 水素・ギ酸資化性メタン生成細菌の純粋分離および 生理学的、系統学的解析..... | 25 |
| 3-3 | 酢酸酸化共生細菌および、酢酸酸化共生微生物系の純粋分離..... | 25 |
| 3-4 | 酢酸酸化共生細菌 PB 株の諸性質の検討..... | 27 |
| 第三章 | 酢酸酸化共生細菌 <i>Thermacetogenium phaeum</i> PB 株の代謝経路の解明..... | 38 |
| 第一節 | はじめに..... | 38 |
| 第二節 | 実験方法..... | 38 |
| 2-1 | 供試菌体..... | 38 |

| | | |
|------|------------------------------|----|
| 2-2 | 培地及び培養方法..... | 38 |
| 2-3 | 無細胞抽出液の調製法..... | 39 |
| 2-4 | 酵素活性の測定..... | 39 |
| 第三節 | 結果および考察..... | 41 |
| 3-1 | 単独培養時における PB 株の代謝経路の同定..... | 41 |
| 3-2 | 共生培養時における PB 株の代謝経路の同定..... | 43 |
| 第四章 | 酢酸酸化共生微生物系における共生機構の検討..... | 46 |
| 第一節 | はじめに..... | 46 |
| 第二節 | 実験方法..... | 46 |
| 2-1 | 供試菌体..... | 46 |
| 2-2 | 培地および培養方法..... | 47 |
| 2-3 | 無細胞抽出液の調整法..... | 47 |
| 2-4 | 酵素活性測定法..... | 47 |
| 2-5 | 分析操作..... | 47 |
| 2-6 | 熱力学計算..... | 48 |
| 第三節 | 結果および考察..... | 49 |
| 3-1 | 異なる 2 種類の共生微生物系における生育実験..... | 49 |
| 3-2 | 共生微生物系の選択的溶菌と酵素活性の測定..... | 51 |
| 3-3 | 2 種類の酢酸酸化共生微生物系の熱力学的考察..... | 53 |
| 第五章 | 総括..... | 55 |
| 謝辞 | | 59 |
| 引用文献 | | 60 |

省略語句

| | | |
|-----------------|---|---|
| BES | ; | 2-bromoethanesulfonic acid |
| CODH | ; | carbonmonoxide dehydrogenase |
| [Co]Enz. | ; | corrinoid enzyme |
| DTE | ; | dithioerythritol |
| EMP | ; | Embden-Meyerhof-Parinas |
| FTHFS | ; | formyl tetrahydrofolic acid synthetase |
| G+C | ; | guanine-plus-cytosine |
| [H] | ; | reducing equivalent |
| H ⁺ | ; | proton |
| NTA | ; | nitrilotriacetic acid |
| MK-7 | ; | menaquinone with 7-isoprene units |
| PCR | ; | polymerase chain reaction |
| rDNA | ; | ribosomal DNA |
| THF | ; | tetrahydrofolic acid |
| ΔG^0 | ; | Gibbs free energy changes under standard condition at pH 0 |
| $\Delta G^{0'}$ | ; | Gibbs free energy changes under standard condition at pH 7 |
| $\Delta G'$ | ; | Gibbs free energy changes under physiological condition at pH 7 |
| ΔH^0 | ; | standard enthalpy changes |
| ΔS | ; | entropy changes |
| ε | ; | molar absorption coefficient |

序章 総論

第一節 研究の背景

1-1 嫌気環境下における有機物分解と関連する微生物群

地球上には我々が生活している酸素の存在する世界（好氣的環境）の他に、酸素の少ない、あるいは全く酸素のない世界（嫌氣的環境）が存在している。嫌氣的環境は、水田・土壌・河川・海洋の低泥・沼・動物の消化管などの自然環境や、産業・家庭排水の嫌気処理施設中など、到る所に数多く存在しており、その中には酸素非存在下でも生育することの可能な嫌気性細菌とよばれる微生物が驚くほど多数生息し、活発な生命活動を行っている。これらの嫌気性細菌のうち、酸素が存在すると、その毒性により全く生育不可能となる細菌が存在し、それらは絶対嫌気性細菌と呼ばれている。絶対嫌気性細菌は好気性細菌と比べ、生育するために利用可能な食料（基質）が限られている為、たとえ好気性細菌と同じ基質が存在していたとしても、単独ではこれを完全に分解無機化することが出来ず、基質資化性の異なる複数の微生物群を必要とする(Stams 1994)。これは有機物の物質代謝という観点から見ると、ある基質が上位の細菌群により利用され、その結果分解生成した排泄物を基質資化性の異なる下位の微生物群が基質として利用してゆくという、いわゆる食物連鎖的な分解過程を経る(Schink 1991)。嫌気環境下における有機物の完全分解（無機化）に必要とされる微生物群の種類は、系内に存在するイオン種によって大きく左右される。例えば、硫酸イオンなどが豊富な環境下では、最低 2 種類の異なる物質代謝能を有する微生物群が必要とされ、有機物はこれらの微生物群の連携によって最終的に硫化水素と二酸化炭素を生成し、無機化される。一方、これらのイオンが存在しない環境下では、有機物の完全分解には最低 3 種類の異なる微生物群の連携が必要となり、最終的にメタンと二酸化炭素を生成して一連の有機物分解を完遂する(Schink 1997)。このように、嫌気性細菌は系内の環境に依存した独特の微生物生態系を形成して生育している。Fig. 1-1 にメタン生成環境下および硫酸イオン存在下における有機物分解の概略図を示し、これらの分解を担う嫌気性微生物群に関する知見を以下に記載した。

1-1-1 一次発酵性細菌群（酸生成細菌群）

多糖、タンパク質、脂質などの高分子化合物は、一次発酵細菌群（primary fermenting bacteria）と呼ばれる細菌群が有する加水分解酵素によって単糖、アミノ酸などの低分子化合物に分解、資化され、発酵産物として酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低級脂肪酸や、エタノールなどのアルコール類を生成する。一次発酵細菌群は揮発性脂肪酸などの酸を生成するので、別名、酸生成細菌

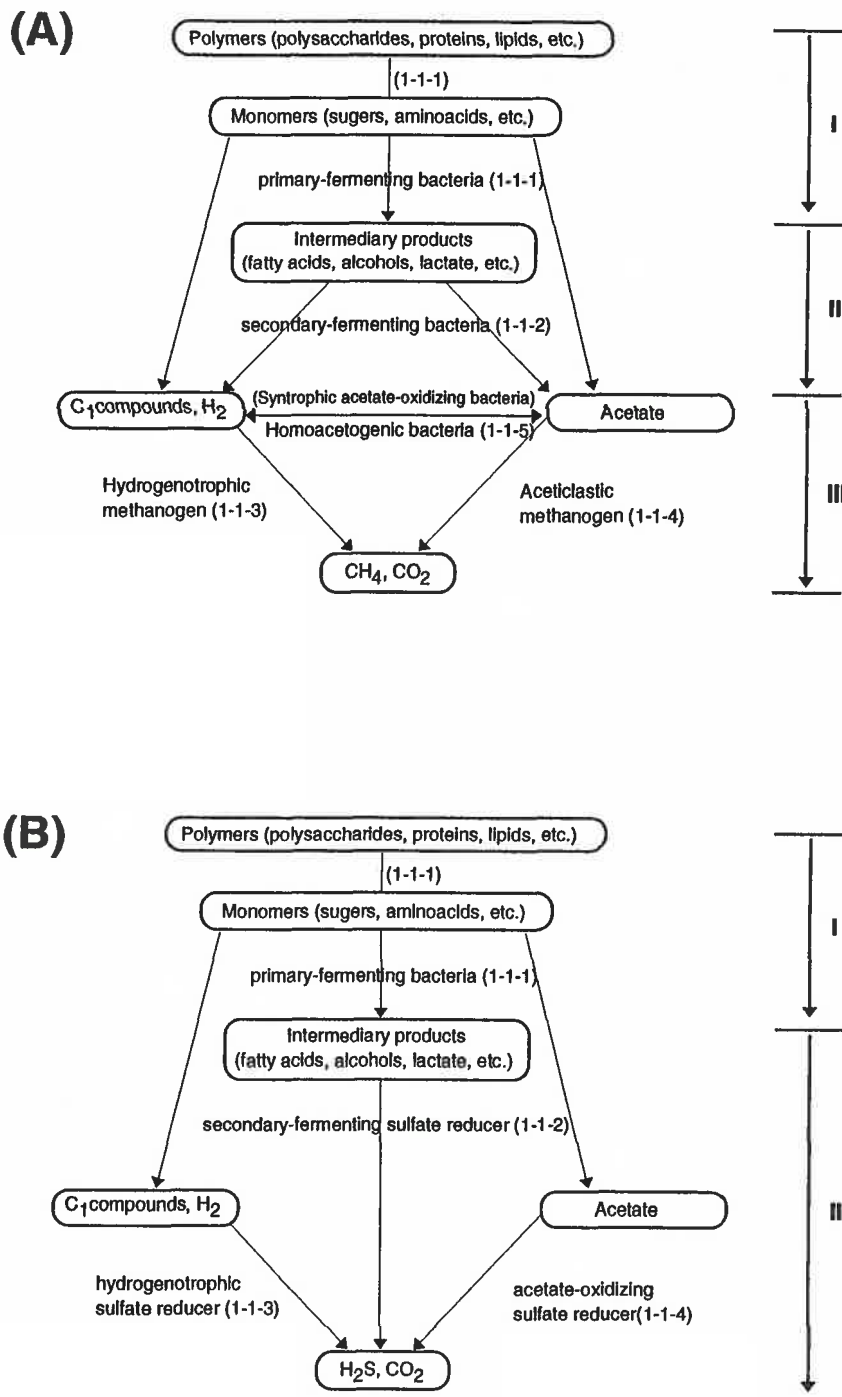


Fig. 1-1. Carbon and electron flow through the various trophic groups of microorganisms involved in (A) methanogenic, or (B) sulfidogenic degradation of organic materials. Figures are based on Schink (1997).

菌 (acidogen)とも呼ばれる。一次発酵細菌群には *Clostridium* 属, *Propionibacterium* 属など、多種多様な細菌が含まれる。

1-1-2 二次発酵性細菌群（共生細菌群）

一次発酵性細菌群の発酵産物として生成した低級脂肪酸、アルコール等は、次の微生物群である二次発酵性細菌群 (secondary fermenting bacteria) によって分解され、酢酸・水素および二酸化炭素を生成する。メタン生成環境下においては、二次発酵性細菌群は熱力学的な理由（後述）から単独ではこれらの物質を資化することが出来ず、次の細菌群であるメタン生成細菌群との共生関係が不可欠となることから、別名、共生細菌群 (syntrophic bacteria) とも呼ばれている (Schink 1997)。なお、上記の基質の他にも安息香酸などの芳香族化合物も一部の共生細菌群によって嫌氣的に分解される。Table 1-1 に現在までに報告されている代表的な共生細菌を示した。

1-1-3 水素資化性細菌群

一次発酵性細菌群および二次発酵性細菌群によって生成した発酵生成物のうち、水素及びギ酸、メチルアミン等の C_1 化合物は水素消費細菌群によって分解される。これらの細菌群の種類は系内に存在するイオン種によって著しく異なる。例えば、硫酸イオン、硝酸イオン、鉄イオン等の効率的な電子受容体が存在する場合、水素は各々のイオンを還元できる水素資化性の嫌気性細菌（例；硫酸還元細菌、硝酸還元細菌、鉄還元細菌）により資化される。一方、これらの効率的なイオンが存在しない場合、水素は水素資化性メタン生成細菌群によって資化され、メタンガス（及び CO_2 ）を生成する。水素資化性メタン生成細菌には、*Methanobacterium* 属、*Methanobrevibacter* 属などを始めとして、極めて多くの属種が報告されている。

1-1-4 酢酸資化性細菌群

一次および二次発酵性細菌群によって生成した発酵生成物のうち、酢酸（およびメタノール等の C_1 化合物）は酢酸資化性細菌群によって分解される。これらの細菌群の種類は水素資化性細菌群と同様、系内に存在するイオン種によって著しく異なる。嫌気環境下で微生物が酢酸を分解するときに電子受容体として利用する代表的なイオンとしては、硫酸 (SO_4^{2-})、亜硫酸 (SO_3^{2-})、硝酸 (NO_3^-)、鉄 (Fe^{3+})、マンガン (Mn^{2+})、フマル酸 ($CHCOO^-$)² などが知られている。なお、上記のようなイオンが系内に存在しないときは、酢酸は酢酸資化性メタン生成細菌（*Methanosarcina* 属、*Methanosaeta* 属）または酢酸酸化共生微生物系（第一節 1-4 参照）によって分解され、最終的にメタン及び二酸化炭素を生成する。

Table 1-1. Representative bacteria catalyzing syntrophic substrate oxidation via interspecies electron transfer.

| Isolates | Substrate range | Year | References |
|--|---|------|-----------------------|
| Oxidation of Primary alcohols | | | |
| strain S | Ethanol | 1967 | Bryant et al. |
| <i>Thermoanaerobium brockii</i> | Ethanol, Sugars | 1981 | Ben-Bassat et al. |
| <i>Dsulfotribrio vulgaris</i> | Ethanol+Sulfate | 1982 | Laanbroek et al. |
| <i>Pelobacter venetianus</i> | Ethanol, Propanol | 1983 | Schink et al. |
| <i>Pelobacter carbinolicus</i> | Ethanol, 2,3-Butanediol | 1984 | Schink |
| <i>Pelobacter acetylenicus</i> | Ethanol, Acetylene | 1985 | Schink |
| Oxidation of Aromatic compounds | | | |
| <i>Syntrophus buswellii</i> | Benzoate, Crotonate | 1984 | Mountfort et al. |
| | | 1995 | Wallrebenstein et al. |
| <i>Syntrophus gentianae</i> | Benzoate, Gentisate, Hydroquinone | 1984 | Szewzyk et al. |
| <i>Syntrophus buswellii</i> | Benzoate, Crotonate, 3-Phenylpropionate | 1995 | Auburger et al. |
| <i>Syntrophus aciditrophicus</i> | Benzoate, Crotonate, Hydroquinone | 1999 | Jackson et al. |
| Oxidation of Butyrate and higher homologs | | | |
| <i>Syntrophomonas wolfei</i> | C ₄ -C ₈ | 1981 | McInerney et al. |
| <i>Syntrophospora bryantii</i> | C ₄ -C ₁₁ , 2-Methylvalerate | 1985 | Stieb et al. |
| <i>Syntrophomonas sapovorans</i> | C ₄ -C ₁₈ | 1986 | Roy et al. |
| <i>Thermosyntropho lipolytica</i> | C ₄ -C ₁₈ | 1996 | Svetlitsnyi et al. |
| <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> | C ₄ -C ₁₀ | 2000 | Sekiguchi et al. |
| Oxidation of Propionate | | | |
| <i>Syntrophobacter wolnii</i> | Propionate, Propionate+Sulfate | 1980 | Boone et al. |
| <i>Syntrophobacter pfennigii</i> | Propionate, Propionate+Sulfate | 1995 | Wallrebenstein et al. |
| <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> | Propionate, Crotonate, Fumarate | 1998 | Harmsen et al. |
| <i>Smithella propionica</i> | Propionate, Crotonate | 1999 | Liu et al. |
| strain SI | Propionate, Pyruvate | 2000 | Imachi et al. |
| Oxidation of Acetate | | | |
| strain AOR | Acetate, Ethanol, Ethyleneglycol, H ₂ | 1984 | Zinder and Koch |
| <i>Clostridium ultunense</i> | Acetate, Formate, Cysteine | 1994 | Schnürer et al. |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i> | Acetate, Acetate + Fe (III) or Fumarate or Sulfur H ₂ + Fe(III) | 1998 | Cord-Ruwisch et al. |

1-1-5 ホモ酢酸生成細菌群

一次および二次発酵性細菌群によって生成した水素及び C_1 化合物は、上記の水素資化性メタン生成細菌以外にもホモ酢酸生成細菌群と呼ばれる細菌群により資化され、主生成物として酢酸を生成する。ホモ酢酸生成細菌の基質資化性は極めて多岐に富んでおり、水素を基質とした独立栄養的生育だけでなく、糖類、アルコール、有機酸、メトキシ芳香族化合物、アミノ酸などを利用した従属栄養的生育も可能となっている。即ち、ホモ酢酸生成細菌群は一次および二次発酵性細菌群としての性質も保有する細菌群といえる。ホモ酢酸生成細菌群は CO_2 を電子受容体として使用して還元力を消費可能であるという生理学的な特徴を有しており、発酵性細菌群と区別される。

なお、ホモ酢酸生成細菌群はその基質資化性の広さだけでなく、硝酸、チオ硫酸、硫黄、フマル酸など、数多くのイオンを電子受容体として使用可能であることが明らかになってきている (Heijthuisen and Hansen 1989; Beaty and Ljungdahl 1991; Matties et al. 1993; Seifritz et al. 1993)。代表的なホモ酢酸生成細菌としては、*Moorella* 属、*Acetobacterium* 属、*Acetogenium* 属、*Butyribacterium* 属、*Sporomusa* 属、*Peptostreptococcus* 属、*Clostridium* 属などが知られている。

1-2 熱力学的見地から見た嫌氣的有機物分解

冒頭で述べたように、嫌気環境下における有機物分解には基質資化性の異なる複数の嫌気性微生物が関与しているが、これらの嫌気性微生物群が獲得可能なエネルギーは好気性の微生物群と較べて遙かに少ない。例えばグルコースを基質とした場合、好気性微生物は標準自由エネルギー変化で -2890 kJ/mol と極めて多くのエネルギーを獲得することができる。一方、嫌気性微生物がグルコースから獲得できるエネルギーは -390 kJ/mol と、好気性微生物の僅か 15%程度しか得ることが出来ない（メタン生成環境下）。これは、嫌気環境下では効率的な電子受容体である分子状酸素 (O_2) が存在しないため、基質を十分酸化しきれない（＝エネルギーを十分獲得できない）ことが原因となっている。



また、現在までにグルコースからメタン生成を単独で行う嫌気性微生物は全く報告されていない。即ち、嫌気性微生物はこの僅かなエネルギーを上述べた基質資化性の異なる複数の微生物群によって更に共有しあう事により各々の生命を維持している (Fig. 1-1 参照)。他方で、同一の基質資化性を有する微生物群の中においては、分配された僅かなエネルギー（基質）を巡る競合が絶えず起こっており、一種類あたりの嫌気性微生物が獲得可能なエネルギーが如何に少ないかが推察される。このようなエネルギー収率の悪い条件下では、そこに生息する嫌気性微生物群は少して

もエネルギー損失を防ぐ為に、より密接な連携をとっている。この連携関係を広義の共生と呼ぶ (Schink 1991)。嫌気環境下、特にメタン生成環境下における共生の度合いは化学的観点から見ると基質および生成物濃度に依存しており、その度合いは嫌気微生物生態系を構成する各々の微生物群によって異なる。例えば一次発酵細菌群においては、糖や有機酸の資化に伴って排出された生成物の濃度がある程度増加しても致命的な生成物阻害を受けることなく単独で生育することが出来る。一方、二次発酵細菌群の場合、低級脂肪酸やアルコールを資化に伴い排出した酢酸や水素（またはギ酸）などの生成物によって容易に阻害を受ける。特に、水素（ギ酸）の蓄積は二次発酵細菌群にとって致命的となる。そのため、同細菌群がこれらの基質を資化する場合には、常に水素（ギ酸）を低く維持する必要がある。しかしながら、その濃度は自身では実現不可能な程の低濃度が要求されるため、そのままでは最早、単独で基質の利用（酸化）を行うことができず、生育不可能となってしまう。これを解消するため、二次発酵細菌群にとっては自身の生成物を消費してもらうことが可能な細菌群との共生が必須となる。メタン生成環境下においては、水素（またはギ酸）資化性メタン生成細菌群が二次発酵細菌群の生成物を消費する重要な役割を担っている。メタン生成細菌群にとっては二次発酵細菌群の排出物は自身の生育基質であり、これらの基質が恒常的に供給されないと生育不可能となる。このように異なる代謝活性を有する微生物が互いに存在しないと生育不可能となるような密接な相互依存関係を絶対共生 (obligate syntrophy) と呼び、これを担う二次発酵細菌のことを別名、共生細菌 (syntrophic bacteria) と呼ぶ (McInerney et al. 1981; Schink 1991)。

共生微生物系の相互依存関係は熱力学的観点からしばしば説明される。Table 1-2 に共生微生物系に関与する代表的な揮発性脂肪酸・アルコール・芳香族化合物の基質酸化反応および、これらの反応に共役する生成物消費反応を示した（両者の反応に介在する物質として水素を仮定した）。熱力学的には水素生成を伴う基質酸化反応は極めて進行しずらく、その反応はいずれも吸エルゴン反応となる（標準状態）。しかしながら、これらの反応は生成物（＝水素）消費反応と共役することにより全体として発エルゴン反応となり、反応が進行可能となる。このように、嫌気環境下で共生系が成立するためには、極めて密接な相互依存関係が要求される。

1-3 種間水素伝達と種間ギ酸伝達

前述したような共生細菌群と下位細菌群における生成物（基質）のやりとりは、物理化学的には電子の授受と見なすことが出来る。そこで、これらの共生微生物系における電子のやり取りは種間電子伝達 (interspecies electron transfer) と呼ばれている (Wolin and Miller 1982)。実際に種間電子伝達を担う物質は水素であると推察されており、そのやりとりは種間水素伝達 (interspecies

Table 1-2. Changes of Gibbs free energies under standard conditions in hydrogen-producing reactions and hydrogen-consuming reactions.

| Reactions | Substrates | Products | ΔG^0 (kJ/mol) |
|-------------------------------------|---|--|-----------------------|
| Hydrogen-producing reactions | | | |
| Primary alcohols | | | |
| Ethanol oxidation | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | + 9.6 |
| Fatty acids | | | |
| Butyrate oxidation | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$ | $2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | + 48.3 |
| Propionate oxidation | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$ | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$ | + 76.0 |
| Acetate oxidation | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$ | $2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$ | +104.7 |
| Aromatic compounds | | | |
| Benzoate oxidation | $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 6\text{H}_2\text{O}$ | $3\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}^+ + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$ | + 49.5 |
| Phenol oxidation | $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + 5\text{H}_2\text{O}$ | $3\text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | + 10.2 |
| Hydrogen-consuming reactions | | | |
| Methanogenesis | $4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ | $\text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ | -135.4 |
| Sulfidogenesis | $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+$ | $\text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ | -152.8 |
| Homoacetogenesis | $4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ | $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ | -104.7 |

hydrogen transfer)と呼ばれ、嫌気性細菌の共生機構として広く認知されている(Wolin and Miller 1982)。一方、これらの共生微生物系を介する物質は水素だけでなくギ酸も関与しているのではないかという説、つまり種間ギ酸伝達(interspecies formate transfer)の可能性も提唱されている(Thiele and Zeikus 1988)。種間ギ酸伝達が起こり得る根拠としては、(1)水素とギ酸の標準酸化還元電位(E^0)が非常に近似している ($E^0_{H^+/H_2} = -414 \text{ mV}$, $E^0_{CO_2/formate} = -420 \text{ mV}$)ため、水素がギ酸と置き換わっても化学反応上は進行可能なこと(Schink 1997)、(2)水素代謝に関わる酵素(Hydrogenase)だけでなく、ギ酸の代謝に関わる酵素(Formate dehydrogenase)も共生微生物系を構成する各々の微生物細胞中に認められていること(Stams 1994)、(3)ギ酸と水素の拡散係数および濃度平衡を考慮すると、種間水素伝達だけでは共生微生物系における速やかなメタン生成を説明できないこと(Boone et al. 1989)、(4)いくつかの共生微生物系においては電子の受け取り手の微生物がギ酸資化能を有していないと共生系が成立しないこと(Dong et al. 1994a; Dong et al. 1994b; Dong and Stams 1995)等が挙げられる。一方、種間ギ酸伝達に関して否定的な提案も報告されている。その根拠としては、(1)生体内ではギ酸と水素は、ギ酸：水素転換酵素 Formate:Hydrogen Lyase (FHL) によって容易に相互変換されるため、種間水素伝達と種間ギ酸伝達のどちらにより共生微生物系が成り立っているのかを証明することが極めて難しいこと(Bleicher and Winter 1994)、(2)いくつかの共生細菌は、水素資化能のみを有する（即ちギ酸資化能を持たない）下位細菌群との共生により生育可能であること(Wofford et al. 1986; Lee and Zinder 1988b)、(3)共生培養系におけるギ酸濃度が μM オーダーレベルと極めて低濃度に維持されており、定量的な検出が非常に困難であること(Stams 1994)、(4)細胞質中ではギ酸は水素分子とは異なり極性物質として存在しているため、細胞の脂質2重膜を透過するのが困難であること(Schink 1997)、等が挙げられる。種間電子伝達を担う物質が水素とギ酸のどちらであるのかは、現在も議論が続いている(Schmidt and Ahring 1993; Schmidt and Ahring 1995)。

1-4 嫌気環境下における酢酸代謝

1-4-1 嫌氣的有機物分解における酢酸の役割

酢酸は嫌氣的な有機物の分解過程において最も多く生成する中間代謝産物であり、有機物の完全無機化において鍵となる化合物である。実際、メタン生成環境下においては、有機物分解で生成した全メタンガスのうちの 70-80%が酢酸を経由しているという報告がされている(Mountfort and Asher 1978; Mackie and Bryant 1981)。一方、酢酸は嫌気有機物分解過程における律速物質でもあり、これが蓄積すると全体的な有機物分解が破綻してしまう。従って、酢酸の生成と消費を担う嫌気性細菌群の存在は、全体的な嫌氣的有機物分解を完遂する為に必須であり、極めて重要

な役割を果たしている。

1-4-2 酢酸の生成に関与する代謝経路

嫌気環境下で酢酸の生成に関与する微生物としては、一次発酵細菌群、共生細菌群、ホモ酢酸生成細菌群の3つに大別される(第一節 1-1)。一方、酢酸の生成方法による分類としては、脱水素反応による酢酸生成(=酸化的酢酸生成)と、水素付加反応による酢酸生成(=還元的酢酸生成)の2つに分けることが出来る(Dolfing 1988)。酸化的酢酸生成は一次発酵細菌群および共生細菌群によって行われ、その生成は EMP 経路などによる基質の酸化に伴って生成する。一方、還元的酢酸生成は還元力を用いた CO_2 の固定に伴って生成する特徴を有している。還元的酢酸生成は更に還元的クエン酸回路と還元的 Carbonmonoxide dehydrogenase/acetyl-CoA 経路(CODH/acetyl-CoA 経路)と呼ばれる2つのタイプに大別される(Thauer 1988; Diekert and Wohlfarth 1994b)。還元的クエン酸回路は通常のクエン酸回路の逆反応を行うことにより、還元力を CO_2 に固定して菌体の生合成(同化)を行う代謝経路で、独立栄養性の硫酸還元細菌である *Desulfobacter hydrogenophilus* 等に見出されている(Schauder et al. 1987)。Fig. 1-2 に *D. hydrogenophilus* における還元的クエン酸回路を示した。

一方、還元的 CODH/acetyl-CoA 経路は還元力の固定による菌体の同化だけでなく、異化的な代謝にも利用される。還元的 CODH/acetyl-CoA 経路に関する研究はホモ酢酸生成細菌 *Moorella thermoacetica* (旧名 *Clostridium thermoaceticum*) を対象として盛んに行われ、1980 年代までにその代謝経路がほぼ同定されている(Ljungdahl 1980)。なお、*Desulfovibrio* 属など、ある種の水素資化性硫酸還元細菌においても還元的 CODH/acetyl-CoA 経路と類似した経路が認められている(Jansen et al. 1984; Jansen et al. 1985)。Fig. 1-3 に *M. thermoacetica* における還元的 CODH/acetyl-CoA 経路を示した。同経路の基本的な原理は 8mol の還元力を 2mol の CO_2 に固定して Acetyl-CoA を合成し、最終的に酢酸を生成するものである。即ち、その代謝経路はまず 1mol の CO_2 が 6mol の還元力によりメタノールレベルにまで還元され、その一方でもう 1mol の CO_2 が 2mol の還元力によって CO レベルまで還元される。これらは Acetyl-CoA synthetase によって Acetyl-CoA に合成された後、Acetyl phosphate を経て酢酸を生成する。この間、メチル基側の還元過程で基質レベルの脱リン酸化により 1ATP が消費されるが、Acetyl phosphate からの酢酸生成反応で基質レベルのリン酸化により 1ATP 生成するため、全体的なエネルギー収支はゼロとなる。同経路においては基質レベルのリン酸化を触媒する反応は、この2つ以外に知られていない。このため、還元的 CODH/acetyl-CoA 経路を用いる嫌気性細菌は基質レベルのリン酸化ではなく、化学浸透圧機構(chemiosmotic mechanism)を利用した ATP 生産を行っていることが示唆されてい

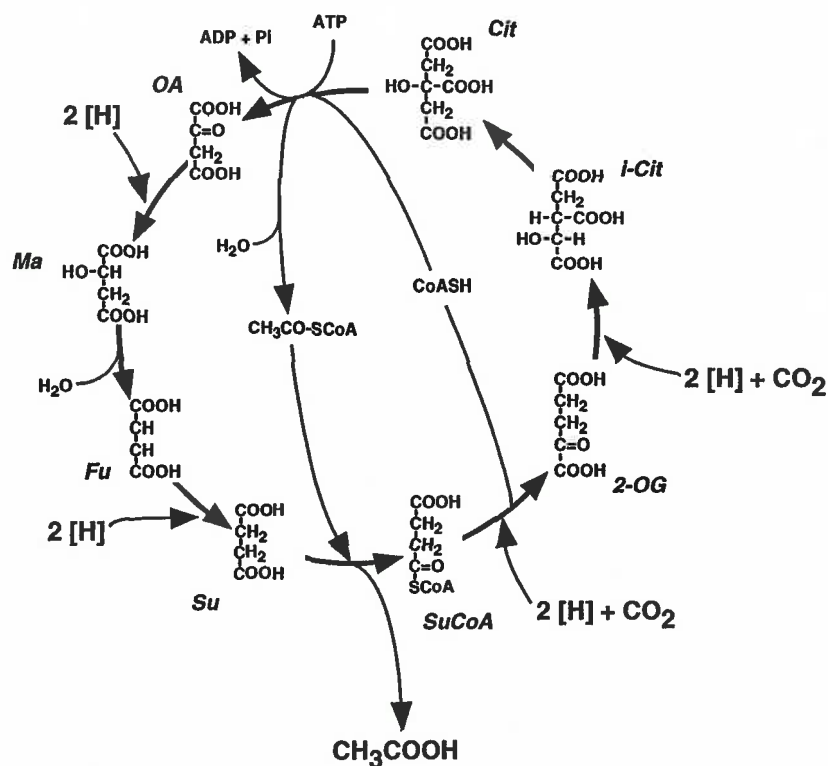


Fig. 1-2. Anaerobic acetogenesis via reductive citric acid cycle in *Desulfobacter hydrogenophilus*. Cit, citrate; I-Cit, iso-citrate; 2-OG, 2-oxoglutarate, SuCoA, succinyl-CoA; Su, succinate; Fu, fumarate; Ma, malate, OA, oxalacetate.

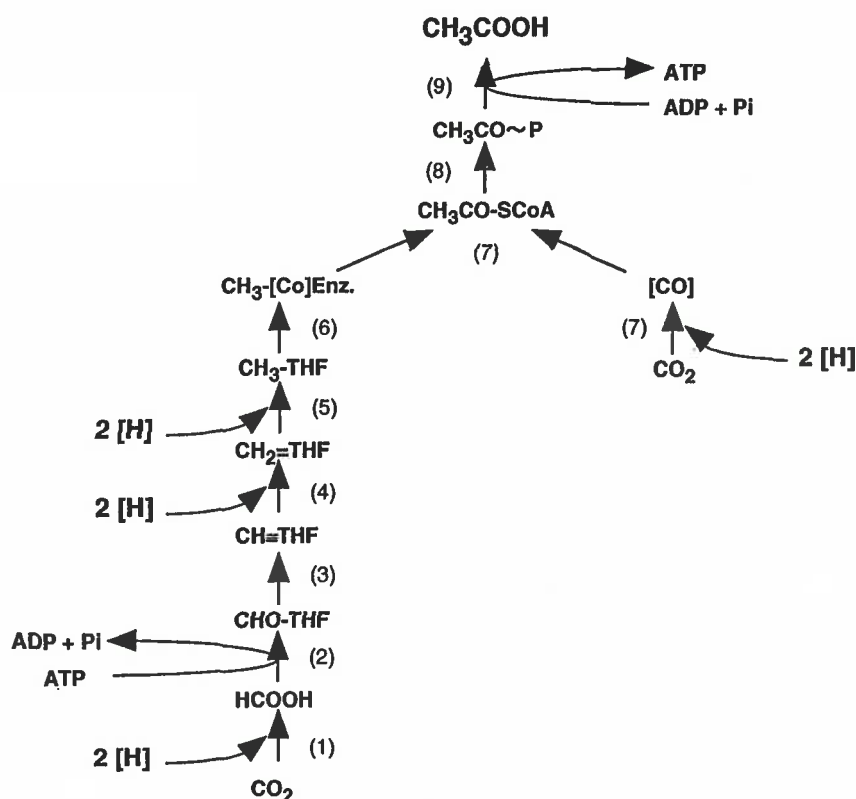


Fig. 1-3. Anaerobic acetogenesis via reductive CODH/Acetyl-CoA pathway in *Moorella thermoacetica*. Numbers in parentheses indicate enzyme reactions which are shown in Table 1-3.

る(Diekert and Wohlfarth 1994b)。化学浸透圧機構は、ある種のイオンが細胞膜を透過することにより発生する細胞膜内外のイオン濃度勾配差を利用して膜結合型 ATPase により ATP を生成する機構である(Mitchell 1966)。同機構を用いた ATP 生産には、イオン濃度勾配差を形成するための反応が必要となるが、還元的 CODH/acetyl-CoA 経路においては熱力学的な考察から、Methyltransferase と Methyl-THF reductase がこれを担う反応として推察されている(Diekert and Wohlfarth 1994b)。なお、上記の反応と共役する ATPase として H^+ -ATPase と Na^+ -ATPase がモ酢酸生成細菌中に存在することが明らかとなっており、濃度勾配を形成するイオンに H^+ または Na^+ が関与しているものと推察されている(Ivey and Ljungdahl 1986; Heise et al. 1992)。Table1-3 に CODH/acetyl-CoA 経路を担う各酵素の化学反応式および標準自由エネルギー変化を示した。

1-4-3 酢酸の分解に関与する代謝経路

嫌気環境下における酢酸の分解は多くの酢酸資化性細菌が担っているが(第一節 1-1-4)、酢酸分解に関与する代謝経路としてはクエン酸回路および、酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路の2つに集約される。それぞれの代謝経路は基本的に第一節 1-4-2 に示した還元的酢酸生成の逆反応と見なされている。クエン酸回路による酢酸の嫌気的な分解は、1970 年代に報告され始め、1983 年に完全酸化型硫酸還元菌 *Desulfobacter postgatei* においてその存在が詳細に報告された(Brandis-Heep et al. 1983)。同回路を酢酸の代謝に用いる絶対嫌気性細菌としては、硫黄還元細菌 *Desulfuromonas* 属や鉄還元細菌 *Geobacter* 属などが知られている(Gebhardt et al. 1985; Champine and Goodwin 1991)。絶対嫌気性細菌におけるクエン酸回路は好気性細菌のものと比べ、Acetyl-CoA の合成など、いくつかの反応で異なる酵素および補酵素を使用している点以外は、基本的に好気性生物のものと類似した代謝経路を有している(Thauer 1988)。Fig. 1-4 に、*Desulfobacter postgatei* が酢酸代謝に用いるクエン酸回路を示した。

一方、もう一つの酢酸の代謝経路である酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路に関しては、*Desulfotomaculum* 属や *Desulfobacterium* 属、*Desulfococcus* 属など、複数の完全酸化型硫酸還元菌において報告されている(Schauder et al. 1986; Spormann and Thauer 1988)。酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路の原理は還元的 CODH/acetyl-CoA 経路の逆反応、即ち、酢酸から Acetyl phosphate を経由し生成した Acetyl-CoA がメチル基とカルボニル基に分割された後、各々の基が酸化過程を経て、最終的に 8mol の還元力[H]と 2mol の CO_2 を生成するものである (Fig. 1-5)。硫酸還元菌における酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路の場合、還元的 CODH/acetyl-CoA 経路とは逆に、酢酸から Acetyl-CoA を生成する過程で基質レベルの脱リン酸化により 1ATP が消費されるが、メチル基の酸化過程で基質レベルのリン酸化により 1ATP を回収するため、結果として還元的な経路

Table 1-3. Reactions and enzymes of CODH/Acetyl-CoA pathway and their thermodynamic values.

| Reaction No. | Enzyme | Reactions | | $\Delta G^{0'}$ (kJ/mol) | |
|--------------|--------------------------------|--|--|--------------------------|-------------------|
| | | | | reductive acetogenesis | acetate oxidation |
| (1) | Formate dehydrogenase | $\text{CO}_2 + 2[\text{H}]$ | $\text{HCOO}^- + \text{H}^+$ | + 3.4 | - 3.4 |
| (2) | Formyl-THF synthetase | $\text{HCOO}^- + \text{THF} + \text{ATP} + \text{H}^+$ | $\text{CHO-THF} + \text{ADP} + \text{Pi}$ | - 8.4 | + 8.4 |
| (3) | Methenyl-THF cyclohydrolase | $\text{CHO-THF} + \text{H}^+$ | $\text{CH}\equiv\text{THF}^+ + \text{H}_2\text{O}$ | - 4.0 | + 4.0 |
| (4) | Methylene-THF dehydrogenase | $\text{CH}\equiv\text{THF}^+ + 2 [\text{H}]$ | $\text{CH}_2=\text{THF} + \text{H}^+$ | - 23.0 | + 23.0 |
| (5) | Methylene-THF reductase | $\text{CH}=\text{THF} + 2 [\text{H}]$ | $\text{CH}_3\text{-THF}$ | - 42.0 | + 42.0 |
| (6) | Methyltransferase | $\text{CH}_3\text{-THF} + [\text{Co}]\text{Enz.}$ | $\text{THF} + \text{CH}_3\text{-}[\text{Co}]\text{Enz.}$ | ND | ND |
| (7) | Acetyl-CoA synthetase (= CODH) | $\text{CH}_3\text{-}[\text{Co}]\text{Enz.} + [\text{CO}] + \text{CoA}$ | $\text{Acetyl-CoA} + [\text{Co}]\text{Enz.}$ | ND | ND |
| (6 + 7) | | $\text{CH}_3\text{-THF} + \text{CO} + \text{CoA}$ | $\text{Acetyl-CoA} + \text{THF}$ | - 38.0 | + 38.0 |
| (7) | CO dehydrogenase (CODH) | $\text{CO}_2 + 2 [\text{H}]$ | $\text{CO} + \text{H}_2\text{O}$ | + 21.0 | - 21.0 |
| (8) | Phosphotransacetylase | $\text{Acetyl-CoA} + \text{Pi}$ | $\text{Acetyl phosphate} + \text{CoA}$ | + 9.0 | - 9.0 |
| (9) | Acetate kinase | $\text{Acetyl phosphate} + \text{ADP}$ | $\text{Acetate} + \text{ATP}$ | - 13.0 | + 13.0 |

Based on Diekert and Wohlfarth (1994). $\Delta G^{0'}$ were calculated for $2 [\text{H}] \equiv \text{H}_2$; ND, not determined.

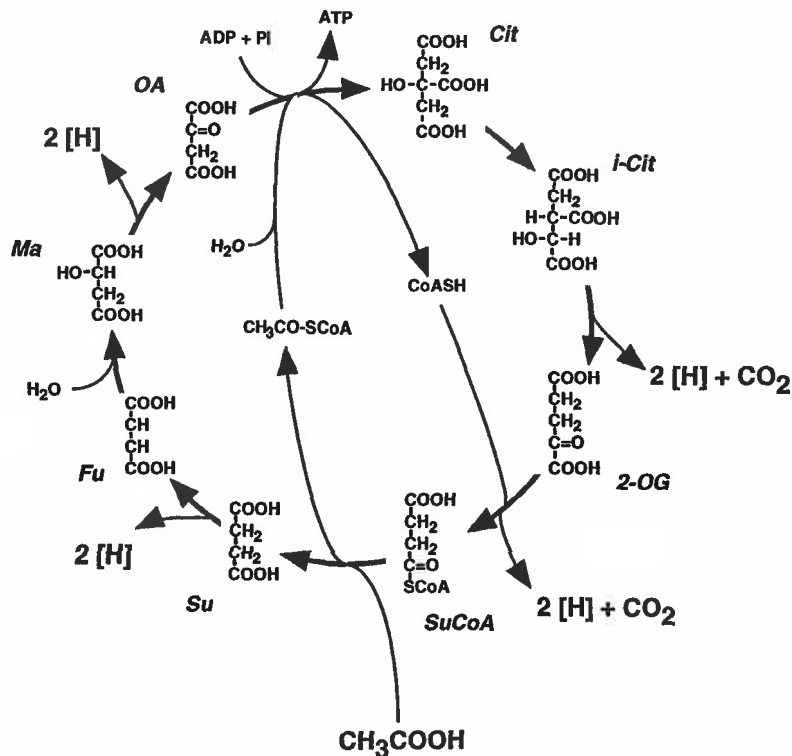


Fig. 1-4. Anaerobic acetate degradation via citric acid cycle in *Desulfobacter postgatei*. *Cit*, citrate; *i-Cit*, iso-citrate; 2-OG, 2-oxoglutarate, *SuCoA*, succinyl-CoA; *Su*, succinate; *Fu*, fumarate; *Ma*, malate, *OA*, oxalacetate.

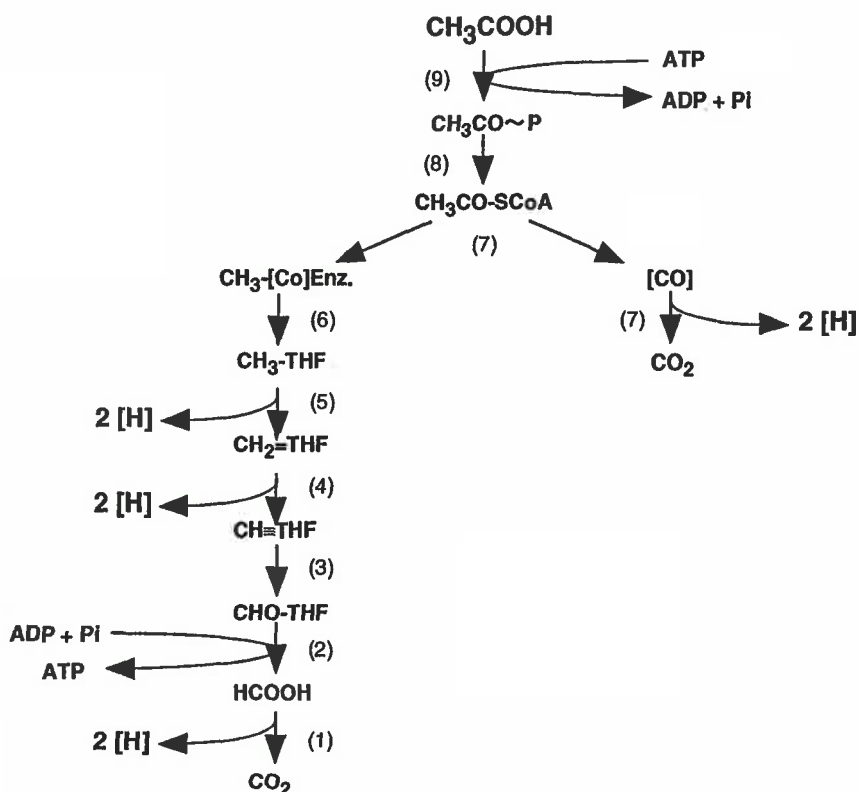


Fig. 1-5. Anaerobic acetate degradation via oxidative CODH/Acetyl-CoA pathway in *Desulfotomaculum acetoxidans*. Numbers in parentheses indicate enzyme reactions which are shown in Table 1-3.

と同様、全体的なエネルギー収支はゼロとなる。このため、酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路におけるエネルギー獲得機構も還元的 CODH/acetyl-CoA 経路と同様、化学浸透圧機構（chemiosmotic mechanism）を利用した ATP 生産を行っているものと推察されている(Thauer 1988)。なお、酢酸資化性メタン生成細菌においても酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路と類似した経路が見出されている(Blaut 1994)。しかしながら、その原理は Acetyl-CoA の分割後、メチル基の酸化が行われずにカルボニル基の酸化のみ行われる点で異なっている。この場合、カルボニル基の酸化により生成した還元力はメチル基の還元に使われ、最終的にメタンを生成することから、酢酸資化性メタン生成細菌における酢酸の分解は、発酵と見なされる。

上述したように、酢酸の嫌氣的分解にはクエン酸回路と CODH/acetyl-CoA 経路の存在が確認されているが、各々の代謝経路に関与する酵素系は全く異なるものであることが明らかとなっている。それぞれの代謝経路が有する特徴的な酵素としては、クエン酸回路では 2-oxoglutarate dehydrogenase、CODH/acetyl-CoA pathway では Carbonmonoxide dehydrogenase が知られており、代謝経路の推定を行うときのマーカー酵素として用いられる(Schauder et al. 1986)。

1-4-4 酢酸酸化共生系の発見

第一節 1-1-4 で述べたような効率的な電子受容体が環境中に存在する場合、酢酸酸化反応によって放出された還元力は最終的に各種のイオンによって消費される。この時の酢酸の酸化反応はいずれも発エルゴン反応となり、自発的に進行することが可能となる (Table 1-4)。このため、これらの反応を行う嫌気性細菌（鉄還元細菌、硝酸還元細菌、硫酸還元細菌など）は、生育するためのエネルギーを酢酸から十分獲得することができる。一方、メタン生成環境下のように効率的な電子受容体となり得るイオンが存在しない時は、酢酸は酢酸資化性メタン生成細菌によって発酵的に分解され、メタンと二酸化炭素を生成する（酢酸開裂反応）。



この反応により酢酸資化性メタン生成細菌が酢酸から得られるエネルギーは標準自由エネルギー変化で僅か- 36 kJ/mol しか獲得することが出来ない。更に厳しい酢酸の分解条件として、効率的なイオンが全く存在せず、かつ、酢酸開裂によるメタン生成も行われない場合、酢酸の酸化によって放出された還元力[H]を受け取る役割を担うのはプロトン（または炭酸イオン）となる。しかし、プロトンは電子受容体としては極めて効率が悪く、プロトン還元（水素生成）を伴う酢酸酸化反応の標準自由エネルギー変化は吸エルゴン反応 ($\Delta G^\circ = +95 \text{ kJ/mol}$) となり、標準条件下では最早、自発的に進行することは不可能となってしまう (Table 1-4)。同反応は嫌氣的有機物酸化の

Table 1-4. Acetate degradation in the presense of various compounds.

| Conpounds | Reactants | Products | ΔG^0 (kJ/mol) |
|-----------|---|--|-----------------------|
| Iron | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 24\text{Fe}(\text{OH})_3$ | $8\text{Fe}_3\text{O}_4 + 2\text{CO}_2 + 38\text{H}_2\text{O}$ | - 717 |
| Manganese | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 4\text{MnO}_2 + 2\text{CO}_2$ | $4\text{MnCO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ | - 727 |
| Nitrate | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{NO}_3^- + 3\text{H}^+$ | $\text{NH}_4^+ + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ | - 505 |
| Fumarate | $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ | $4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4^{2-} + 2\text{CO}_2$ | - 249 |
| Sulfate | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} + 3\text{H}^+$ | $\text{H}_2\text{S} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ | - 63 |
| Sulfur | $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{S}^0 + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ | $4\text{H}_2\text{S} + 2\text{CO}_2$ | - 39 |
| Acetate | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$ | $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ | - 36 |
| Proton | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ | $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2$ | + 95 |

中でも最も進行しづらい反応の1つであるが、理論的には生成物の消費、即ち水素を消費する反応が共役することによって、酢酸酸化を行うことが可能となる。即ち、プロトン還元を伴う酢酸酸化反応(式 A)と、水素からのメタン生成反応(式 B)が共役することで、トータルの反応系として発エルゴン反応(式 A+B)となり、酢酸からメタンを生成することが出来る(Baker 1936)。

(式 A) 酢酸酸化反応



(式 B) 水素からのメタン生成反応



(式 A+B) 酢酸酸化によるメタン生成反応



しかしながら、このような反応を生物学的に触媒する可能性、つまり、水素生成を伴う酢酸酸化によって生育する微生物と水素を消費して生育する微生物との2者共生微生物系による酢酸の分解は、長い間不可能であると考えられていた。これは、上述したように酢酸酸化と水素消費メタン生成反応が共役することによって得られるエネルギーが標準状態で-36kJ/mol と極めて少なく、このエネルギーを2者の微生物がさらに分割しあって(一種類あたり約-18 kJ/mol)生育することは熱力学的に不可能であると考えられていたためである。実際にこれらの共生系の存在が長い間確認されることはなかったが、近年、これを覆す発見として、1984年に Zinder and Koch によって、55°C の産業廃水処理施設から世界で初めて2種類の微生物の共生により酢酸を分解する純粋な共生微生物系が報告された。彼らは後に、この共生系を分離源として、酢酸の代わりにエチレングリコールを基質として用いることにより、酢酸酸化共生細菌を水素資化性メタン生成細菌に依存せずに単独で培養することにも成功している(Lee and Zinder 1988c)。Zinder and Koch の分離した共生系は硫酸イオンなどの効率の良い電子受容体が一切存在しない環境下、55°C で酢酸を嫌氣的に酸化して生育することが可能な高温性の酢酸酸化共生細菌 AOR 株と、典型的な水素資化性メタン生成細菌である *Methanobacterium thermoautotrophicum* THF 株との2者共生微生物系から構成されていた。各々の細菌は単独では酢酸を資化できず、酢酸の分解が明らかに共生によって行われていることが示された。なお、この他の酢酸酸化共生細菌としては、中温環境下でメタン生成細菌との共生により酢酸を分解する共生細菌 *Clostridium ultunense*、硫酸還元細菌との共生により酢酸を分解する共生細菌が報告されている(Galouchko and Rozanova 1996; Schnürer et al. 1997)。更に近年、上記の様なメタン生成細菌との共生微生物系の他に、鉄還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* が、硝酸イオンの存在下で硝酸還元細菌(または硫酸還元細菌)との共生により酢酸を酸化可能なことが判明した(Cord-Ruwisch et al. 1998)。同菌は鉄還元、硫黄還元、フマル酸還

元を行うことにより、酢酸を単独で酸化することが可能であることが報告されている(Caccavo et al. 1994)。

1-4-5 酢酸酸化共生細菌に関する研究と問題点

基質資化性テスト等、その後の研究の結果、AOR 株は単独ではエチレングリコールの他にも、ピルビン酸、 H_2/CO_2 等を資化して酢酸を生成するホモ酢酸生成細菌として生育可能なことが明らかとなっている(Lee and Zinder 1988c)。一方、共生培養時には AOR 株は中間生成物として、20 Pa ~50 Pa 程度の極微量の水素を生成することが報告されている(Lee and Zinder 1988b)。このことは、酢酸酸化共生細菌 AOR 株が単独培養時には H_2/CO_2 から酢酸を生成して生育し、水素資化性メタン生成細菌との共生培養時には逆に酢酸を酸化して H_2/CO_2 を生成するという、見かけ上、可逆的な反応を行っていることを示している（このことから、AOR 株は別名"Reversibacter"とも呼ばれている）。その後、Lee and Zinder (1988a)は AOR 株の無細胞抽出液を用いていくつかの酵素活性を嫌氣的に測定し、単独培養時およびメタン生成細菌との共生培養時のいずれにおいても CODH 活性を有することを示した。この結果は、同菌が単独培養時および共生培養時の双方で CODH/acetyl-CoA 経路を用いていること示唆している。なお、同様の結果は中温性の酢酸酸化共生細菌 *C. ultunense* においても示されている(Schnürer et al. 1997)。

近年、硝酸還元細菌（または硫酸還元細菌）との共生微生物系を担う *G. sulfurreducens* の共生培養時における代謝経路の同定が試みられ、同菌がクエン酸回路を用いて共生による酢酸酸化を行っている事が明らかになった(Galushko and Schink 2000)。これは、既知の酢酸分解経路（クエン酸回路および CODH/acetyl-CoA 経路）の双方において、共生微生物系による酢酸酸化が可能であることを示す、興味深い報告である。

このように、多くの研究者の努力の結果、酢酸酸化共生細菌に関する有益な知見が得られてきたが、一方で下記に述べるような問題点も残されている。

(1) 研究対象となる酢酸酸化共生細菌のサンプルの不足；

現在までに単離されている酢酸酸化共生細菌は、AOR 株の他に数例しか報告がなされていない(Lee and Zinder 1988c; Caccavo et al. 1994; Galouchko and Rozanova 1996; Schnürer et al. 1996)。このうち、高温性の酢酸酸化共生細菌 AOR 株については菌の維持管理が極めて困難で死滅してしまったといわれており、現在は利用不可能となっている。*C. ultunense* については利用は可能なものの、共生系における生育速度が極めて遅く (Doubling time = 640 h 以上)、かつ共生系を構成し

た後の植え継ぎが成功しない（＝ 実験の度に酢酸酸化共生細菌と水素資化性メタン生成細菌とを再構成しなければならない）など、ハンドリングが困難となっている。

(2) 共生培養系における酢酸酸化共生細菌の解析方法の問題；

生化学的研究、とりわけ代謝経路の研究を行うためには、酢酸酸化共生細菌をパートナーの水素資化性細菌（メタン生成細菌など）と物理的または化学的に分離して、各々の酵素活性を測定する必要がある。これは、例えば酢酸酸化共生細菌の代謝活性と水素資化性メタン生成細菌が、各々類似した酵素（特に水素・ギ酸代謝関連酵素）を有しているため、これらを一緒に混合してしまうと、どちらの細菌由来の酵素活性なのかを判断することが出来ず、目的とする細菌の代謝活性の測定が正確に出来ないためである。にもかかわらず、既知の酢酸酸化共生細菌を含む多くの共生系の代謝経路の研究には、共生系を構成する2種類の細菌をフレンチプレスを用いて同時に破碎する方法が多く採用されている(Wofford et al. 1986; Lee and Zinder 1988a; Schnürer et al. 1997; Schöcke and Schink 1998; Galushko and Schink 2000)。これは、物理的分離手法（Percoll濃度勾配を用いた遠心分離）や生化学的分離手法（Lysozyme 等の溶菌酵素による細胞壁の選択的破壊）などを用いた共生細菌の選択的分離が極めて困難なことに起因している。

とりわけ (1)は深刻な問題で、サンプルの欠如が原因で酢酸酸化共生細菌に関与するあらゆる研究（例；代謝経路の解明、系統学的位置、微生物生態系における役割など）が著しく滞っているのが現状である。このような背景から、新規の酢酸酸化共生細菌の獲得が切望されている。

第二節 本論文の目的及び構成

本研究はこれらの現状を踏まえた上で、新規の絶対嫌気性酢酸酸化共生細菌を単離・同定し、その代謝経路を明らかにすると共に、同共生微生物系における共生機構を解明することを試み、最終的に酢酸酸化共生細菌に関する基礎的知見を獲得することを目的とした。

本論文の構成は以下のとおりである。序章において、嫌気環境下における嫌気共生細菌の概論を記した。第二章では、酢酸酸化共生微生物系および共生系を構成する絶対嫌気性細菌の純粋分離を行い、その生理学的性質および系統学的性質を明らかにした。第三章では、生化学的手法を用いることにより、単独培養時および共生培養時における酢酸酸化共生細菌の代謝経路を解明することを試みた。第四章では、異なる2種類の酢酸酸化共生微生物系を構築することにより、同共生微生物系における種間ギ酸伝達の可能性を検討した。最後に第五章で、全体的な総括を行った。

第二章

酢酸酸化共生細菌およびメタン生成細菌の純粋分離および同定

第一節 はじめに

ごく最近まで、メタン生成環境下において酢酸を分解する微生物は、酢酸資化性メタン生成細菌 (*Methanosarcina*, *Methanosaeta* 属) のみ報告されていた。しかし 1984 年に、酢酸を異なる 2 種の微生物の共生により嫌氣的に分解してメタンを生成する酢酸酸化共生微生物系が純粋分離され、その存在が明らかとなった(Zinder and Koch 1984)。しかしながら、その後の報告は極めて少なく、2000 年現在、酢酸からメタンを生成する純粋な酢酸酸化共生微生物系は、上記のものを含めて 2 例のみしか報告されていない(Zinder and Koch 1984; Schnürer et al. 1994)。報告例が少ない原因としては、(1) 生育速度が極めて遅く、酢酸資化性メタン生成細菌との基質競合に負けてしまい、純粋分離が極めて困難になること、(2) 栄養要求性が複雑なこと、等が考えられる。このように研究対象となるサンプルが極めて少ない為、酢酸酸化共生細菌に関するあらゆる研究が滞っている現状となっている。そこで本章では、メタン生成環境下から新たに酢酸酸化共生微生物系を獲得することを目的とし、共生系を構成する 2 種の微生物 (酢酸酸化共生細菌と水素資化性メタン生成細菌) を単離することを試みた。同時に、酢酸酸化共生細菌の生理学的、系統学的な解析も試みた。

第二節 実験方法

2-1 分離源

クラフトパルプ製造工程より排出された廃水を処理する高温メタン発酵汚泥 (55°C) を接種源とし、10 年間、酢酸 (80 mM) を基質として 55°C で馴養した培養液を分離源とした。

2-2 培地及び培養、単離方法

分離および培養に用いた基本培地は嫌氣的炭酸バッファ培地作成法(Widdel and Pfennig 1977)に基づいて調製した (培地組成を Table 2-1 に記した)。培養、分離には 50 mL 容 (または 100 mL 容) の血清バイアルを使用し、容器内部に N_2/CO_2 (80:20, v/v %) を吹き込みながら培地を 20 mL (または 40 mL) 添加した。十分なガス置換後、培地の pH が 6.8-7.1 (25°C 環境下) の範囲内に保持されているのを確認後、ブチルゴム栓およびアルミキャップで密封し、オートクレーブ滅菌した。培地には還元剤として $Na_2S \cdot 9H_2O$ および Cysteine-HCl $\cdot 1H_2O$ を添加した (最終濃度 0.3 g/L)。酢酸酸化共生微生物系 (酢酸酸化共生細菌と水素資化性メタン生成細菌の 2 者培養系) の集積培養

Table 2-1. Composition of basal medium for cultivation and isolation of microbes used in this study.

| Fresh Water Basal Medium | | | Trace element solution | | |
|--------------------------------------|------|------|---|-------|------|
| KH ₂ PO ₄ | 0.3 | g/l | NTA | 12.8 | g/l |
| NaCl | 0.6 | g/l | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 1.35 | g/l |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0.1 | g/l | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.1 | g/l |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.08 | g/l | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.024 | g/l |
| NH ₄ Cl | 1.0 | g/l | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.1 | g/l |
| KHCO ₃ | 3.5 | g/l | ZnCl ₂ | 0.1 | g/l |
| Trace element solution | 5.0 | ml/l | CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0.025 | g/l |
| Vitamin solution | 10.0 | ml/l | H ₂ BO ₃ | 0.01 | g/l |
| Se / W solution | 1.0 | ml/l | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.024 | g/l |
| Vitamin solution | | | NaCl | 1.0 | g/l |
| | | | NiCl ₂ ·6H ₂ O | 0.12 | g/l |
| | | | Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O | 0.004 | g/l |
| | | | Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O | 0.004 | g/l |
| D-Biotin | 2.0 | mg/l | Others | | |
| Folic acid | 2.0 | mg/l | Resazurin (redox indicator) | 1.0 | mg/l |
| Pyridoxine-HCl | 10.0 | mg/l | Na ₂ S·9H ₂ O | 0.3 | g/l |
| Thiamine-HCl | 5.0 | mg/l | Cysteine-HCl·H ₂ O | 0.3 | g/l |
| Riboflavin | 5.0 | mg/l | | | |
| Nicotinic acid | 5.0 | mg/l | | | |
| DL-Calcium panthothenate | 5.0 | mg | | | |
| Vitamine B ₁₂ | 0.1 | mg/l | | | |
| p-Aminobenzoic acid | 5.0 | mg/l | | | |
| DL-Lipoic acid | 5.0 | mg/l | | | |

は、上述した馴養培養系を用い、酢酸 (80 mM)を唯一の基質として 55℃ で希釈継代培養(10^{-1} - 10^{-5})を繰り返すことにより行った。酢酸酸化共生細菌のみの集積培養は、酢酸酸化共生微生物系の集積培養系を基に行い、その時の生育基質としては酢酸の代わりに代表的な発酵性基質であるピルビン酸 (終濃度 40 mM) を用いた。なお、共存するメタン生成細菌は、培地内にメタン生成細菌の特異的阻害剤である BES (2-Bromoethanesulfonate)を終濃度 20 mM 添加し希釈培養することにより除去した。水素資化性メタン生成細菌の集積培養も、酢酸酸化共生微生物系の集積培養系を基に行った。その時の基質には H_2/CO_2 (80:20, v/v %)を用い、これを基本培地の気相部に 151 kPa で充填、継代培養を繰り返すことにより集積培養を行った。単離操作は、十分に洗浄した寒天 (2% Agar Noble, Difco)を用いて、嫌氣的に寒天培地を作成し、寒天希釈法 (ロールチューブ法) でコロニーを形成させることにより行った。分離後の純度の検定は、0.1 % yeast extract+1 % Bacto Tryptone (Difco)存在下で培養を行い、生育状況および夾雑細菌の有無を顕微鏡観察により調べた。

2-3 16S rDNA 遺伝子の同定

分離菌体の 16S rDNA 遺伝子は、Hiraishi (1992)の DNA 抽出法、即ち Proteinase K および界面活性剤による溶菌手法により培養液から抽出した DNA を用いて PCR 増幅を行った。酢酸酸化共生細菌の 16S rDNA 遺伝子の増幅には、真正細菌特異的プライマー (EU8F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') および真正細菌、古細菌に共通の Universal プライマー (UNIV1491R; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')を用いた(Weisburg et al. 1991)。メタン生成細菌の 16S rDNA 遺伝子の増幅には、古細菌特異的プライマー (Ar10F; 5'-TCTGGTTGATCCTGCCAGAG-3')および Universal プライマー(1491R)を用いた(Weisburg et al. 1991)。PCR 反応液の組成は以下の通りである (100 ng template DNA, 1x reaction buffer, 20 nmol dNTPs, 2.5 units Ampli Taq Gold, 40 pmol primers in 100 μ l reaction)。塩基配列の決定には、Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、自動塩基配列解析装置 (ABI PRISM 377 DNA Sequencer, PERKIN ELMER)を用いて解析した。分子系統解析は CLUSTAL W package(Thompson et al. 1994)によってアライメントした配列を MEGA package(Kumar et al. 1994)によって進化距離の推定および系統樹の作成を行った。解析方法は近隣結合法(Saitou and Nei 1987)を適用した。なお、系統樹のトポロジーの確からしさは 100 回のブートストラップ解析により検定した(Felsenstein 1985)。

2-4 各種生理試験

各基質の利用性試験は 20 mL 容の嫌気試験管に基本培地を調製し、これに各基質溶液を無菌的

に添加後、菌体を 10% 植菌したものを 55℃ で静置培養を行った (Table 2-2)。生育の有無の判定は濁度の増加(Abs₆₆₀)を分光光度計 (Model 100-10, Hitachi)で、基質および生成物の増減を測定することにより行った。電子受容体試験には生育基質として酢酸 (40 mM)を用い、これに以下の無機イオンおよび有機イオンを使用した。Na₂SO₄ (20 mM), NaSO₃ (2.5 mM), NaNO₃ (20 mM), NaNO₂ (2.5 mM), Na₂S₂O₃ (20 mM), Fe³⁺/NTA complex (5 mM), fumarate (10 mM)。電子受容体使用の有無は濁度の増加、基質および各種イオンの減少を測定することで判定した。最適生育条件の検討には、ピルビン酸(40 mM)を基質として使用し、菌体濁度の増加を測定し、それぞれの比増殖速度(μ)を算出することにより行った。生育温度の検討は 30-70℃ の範囲で行った。最適 pH の検討の際には 10% K₂CO₃ または 1M HCl を用いて基本培地の pH を適宜調製 (pH 5.4-9.1, 25℃)し、55℃ で培養した。最適塩濃度(NaCl)の検討には、塩化ナトリウムを基本培地に直接添加し (試験 NaCl 濃度範囲 0.05-5%)、55℃ で培養した。

2-5 機器分析

酢酸、ピルビン酸を始めとする有機酸の測定には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて以下の条件で測定した。

| | | |
|---------------|---|--|
| Instrument | ; | model LC-6A (Shimadzu) |
| Detector type | ; | UV (210 nm) |
| Column | ; | SCR-101H (Shimadzu) |
| Column temp. | ; | 40℃ |
| Eluent | ; | 11 mM HClO ₄ in milli-Q water |
| Flow rate | ; | 1 mL/min |

アルコールの測定には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて以下の条件で測定した。

| | | |
|---------------|---|--|
| Instrument | ; | model LC-6A (Shimadzu) |
| Detector type | ; | RI (Refractive Index) |
| Column | ; | SCR-101H (Shimadzu) |
| Column temp. | ; | 40℃ |
| Eluent | ; | 11 mM HClO ₄ in milli-Q water |
| Flow rate | ; | 1 mL/min |

メタン、水素の測定にはガスクロマトグラフィーを用いて以下の条件で測定した。

| | | |
|----------------|---|-------------------------------|
| Instrument | ; | model GC-8AIT (Shimadzu) |
| Detector type | ; | TCD |
| Column | ; | molecular sieve 5A 60/80 mesh |
| Column temp. | ; | 60℃ |
| Detector temp. | ; | 110℃ |
| Carrier | ; | Argon |
| Flow rate | ; | 27 mL/min |

各種イオンの測定には HPLC を以下の条件で使用した。

| | | |
|---------------|---|---|
| Instrument | ; | model LC-6A (Shimadzu) |
| Detector type | ; | CDD (current-conductivity detector), Gain 10 μ S/cm |
| Column | ; | IC-A3 (Shimadzu) |
| Column temp. | ; | 40°C |
| Eluent | ; | 8 mM <i>p</i> -Hydroxybenzoate and 3.2 mM Bis-tris |
| Flow rate | ; | 1.2 mL/min |

2-6 DNA G+C 含量の測定

DNA G+C 含量は制限酵素消化した抽出 DNA を HPLC で分離することにより測定した (Tamaoka and Komagata 1984)。即ち、DNA を常法に従い抽出後、P1 nuclease により加水分解したサンプルを以下の条件で分離した。なお、制限酵素及び標準サンプルには DNA GC Kit (Yamasa) を使用した。

| | | |
|---------------|---|---|
| Instrument | ; | model LC-6A (Shimadzu) |
| Detector type | ; | UV (270 nm) |
| Column | ; | CLC-ODS reverse phase (Shimadzu) |
| Column temp. | ; | 40°C |
| Eluent | ; | 10% Potassium phosphate and 5% methanol |
| Flow rate | ; | 1 mL/min |

2-7 キノン分析

キノン分子は HPLC を使用して分離、測定した (Tamaoka et al. 1983)。即ち、集菌した菌体（湿重量約 2g）を Chloroform/Methanol (2:1)、Acetone、Hexane により順次抽出し、これをシリカカラム (Sep-Pak vac, Waters) を通して精製した。キノン分子の検出は HPLC を以下の条件で用いることにより行った。

| | | |
|---------------|---|----------------------------------|
| Instrument | ; | model System Gold (Beckman) |
| Detector type | ; | UV (270 nm) |
| Column | ; | Zorbax ODS (Shimadzu) |
| Column temp. | ; | 40°C |
| Eluent | ; | Methanol/di-isopropylether (4:1) |
| Flow rate | ; | 1 mL/min |

2-8 電子顕微鏡観察

透過型電子顕微鏡観察には Hitachi-S4500 透過型電子顕微鏡を用いた。サンプルの調製として、菌体を 5% グルタルアルデヒド、2% 四塩化オスミウムで固定後、1% 酢酸ウランおよび 0.3% クエン酸鉛で染色した。これを低粘度樹脂 (Spurr resin) で包埋後、ミクロトーム (Reinhardt-Nissei

ULTRACUT N)で超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡 (HITACHI-H7000)により観察した。

第三節 結果および考察

3-1 酢酸酸化共生微生物系の集積培養

酢酸酸化共生微生物系の集積培養には、酢酸 (80 mM) を基質として 55°C で 10 年間、馴養した培養系を使用した(Kamagata and Mikami 1989)。この馴養培養系は当初、酢酸資化性メタン生成細菌である *Methanosaeta* 属, *Methanosarcina* 属や水素資化性メタン生成細菌の *Methanobacterium* 属に形態的に類似した微生物が優占していたが、約 10 年間の馴養培養の結果、酢酸資化性メタン生成細菌は消失し、最終的に同培養系は *Methanobacterium* 属に類似した短桿菌および形態的に異なる長桿菌、その他若干の夾雑細菌から構成されていた。本章では、この馴養培養系を分離源として、酢酸酸化共生微生物系の集積培養を試みた。

酢酸を基質とした液体希釈培養 (10^5) を数回繰り返した後、顕微鏡観察を行ったところ、形態的に異なる 2 種類の細菌が優占している培養液を得た。この培養系を蛍光顕微鏡観察したところ、そのうちの 1 種類の細菌はメタン生成細菌に特異的に存在する補酵素 F_{420} の自家蛍光を有しており、その形態は *Methanobacterium* 属に類似していた。一方、優占しているもう 1 種類の細菌からは自家蛍光は観察されず、メタン生成細菌ではないことが示唆された。同菌は末端に孢子を有する長桿菌であり、前述のメタン生成細菌と明らかに異なった形態をしていた。同培養系は酢酸の分解に伴い化学量論的にほぼ等量のメタンを生成した。また、顕微鏡観察下では酢酸資化性メタン生成細菌は確認されなかったことから、本培養系は過去に報告された酢酸からメタンを生成する酢酸酸化共生微生物系(Zinder and Koch 1984)と類似していることが示唆された。しかし、これらの培養系は酵母エキスやグルコース等を系内に添加すると夾雑細菌が増殖し、純化されておらず、更なる集積培養を要した。夾雑細菌を除去するため、酢酸を基質とした液体希釈培養に加えて抗生物質の添加を試みたところ、酢酸のみでの培養条件下では夾雑細菌が確認されない高度に純化された酢酸酸化共生微生物系の集積培養系を獲得できた。しかしながら、本集積培養系は極めて高度に純化されているものの、依然として夾雑細菌を完全に除去することが出来ず、結果として酢酸を基質とした単離手法では純粋な 2 者微生物系 (酢酸酸化共生細菌と水素資化性メタン生成細菌) からなる酢酸酸化共生微生物系を獲得することは出来なかった。そこで、方針を変更し、酢酸酸化共生微生物系を構成しているものと思われる 2 種類の細菌 (酢酸酸化共生細菌と水素資化性メタン生成細菌) を酢酸以外の基質を用いることにより、それぞれ別々に純粋分離することを試みた。

3-2 水素・ギ酸資化性メタン生成細菌の純粋分離および生理学的、系統学的解析

高度に純化された酢酸酸化共生微生物系の集積培養系を単離源として、これらを構成する細菌のうちの一つである水素資化性メタン生成細菌を純粋分離することを試みた。 H_2/CO_2 を唯一の基質として液体希釈培養を繰り返したところ、 10^{-8} 希釈培養液には顕微鏡観察では最早、共生微生物系の集積培養系で存在していた有孢子細菌は確認されず、同一の形態を有するメタン生成細菌のみが存在していた。そこで、 H_2/CO_2 を基質として更に寒天希釈培養を行いコロニーを形成させ、これを液体培養することにより、純粋な水素資化性メタン生成細菌を獲得した (Fig. 2-1)。本菌の進化系統学的位置を明らかにするため、16S rDNA 遺伝子を分子マーカーとして塩基配列を決定し、系統解析を行った。その結果、本菌は高温性のメタン生成細菌である *Methanothermobacter* 属のクラスターに属することが明らかとなった (Fig. 2-2)。本菌に最も近縁なメタン生成細菌は *Methanothermobacter thermautotrophicum* ΔH 株であり、その相同性は 99.1%であったことから、本菌を *M. thermautotrophicum* TM 株と命名した。*Methanothermobacter* 属は、これまで *Methanobacterium* 属に一括して分類されていたが、近年、16S rDNA 遺伝子による再分類の結果、新属として再分類された高温性のメタン生成細菌群である (Wasserfallen et al. 2000)。*Methanothermobacter* 属は、物質代謝の観点からはギ酸資化能の可否により 2 つに大別され得る。例えば、TM 株と近縁な *M. thermautotrophicum* ΔH 株は水素資化能を有するが、ギ酸資化能を持たない“水素資化型”のメタン生成細菌であり、*M. thermoflexus* は水素に加えてギ酸資化能も有する“水素・ギ酸資化型”のメタン生成細菌である。なお、TM 株においては H_2/CO_2 以外にもギ酸を資化可能であったことから、同菌は *Methanothermobacter* 属に属する“水素・ギ酸資化型”のメタン生成細菌であることが明らかとなった。

3-3 酢酸酸化共生細菌および、酢酸酸化共生微生物系の純粋分離

これまでに純粋分離されている酢酸酸化共生細菌は、酢酸を基質とした純粋な 2 種の細菌からなる酢酸酸化共生微生物系として分離された後、基質を酢酸からピルビン酸やエチレングリコール等に置き換えて使用することにより、水素資化性メタン生成細菌に依存することなく酢酸酸化共生細菌のみを純粋分離するという手法を用いている (Zinder and Koch 1984; Lee and Zinder 1988c; Schnürer et al. 1994; Schnürer et al. 1996)。そこで、これらの知見を応用し、前述した高度に集積された酢酸酸化共生微生物系を接種源として酢酸以外の複数の基質を使用することにより、酢酸酸化共生細菌の純粋分離を試みた。テストした基質のうちの 1 つであるピルビン酸で培養したところ、形態上 3 種類の細菌が優占して生育する培養系を獲得することが出来た。この培養系にはメタン生成細菌や糸状性細菌などと共に、酢酸酸化集積培養系において観察された有胞

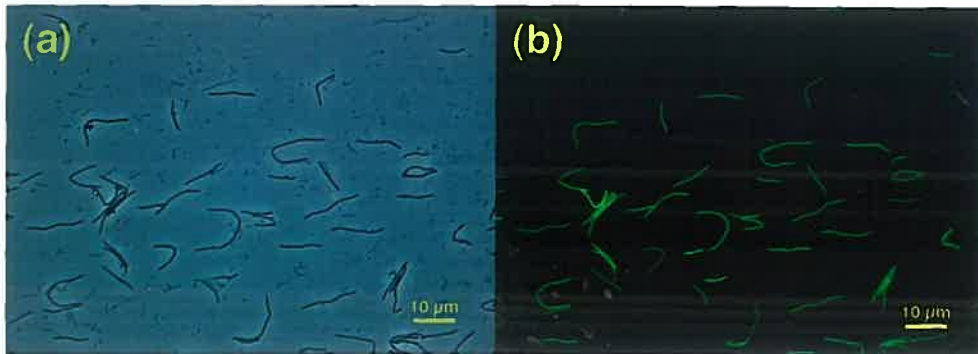


Fig. 2-1. Micrographs of strain TM. (a) phase-contrast micrograph of strain TM, (b) epifluorescence micrograph of the same field as (a).

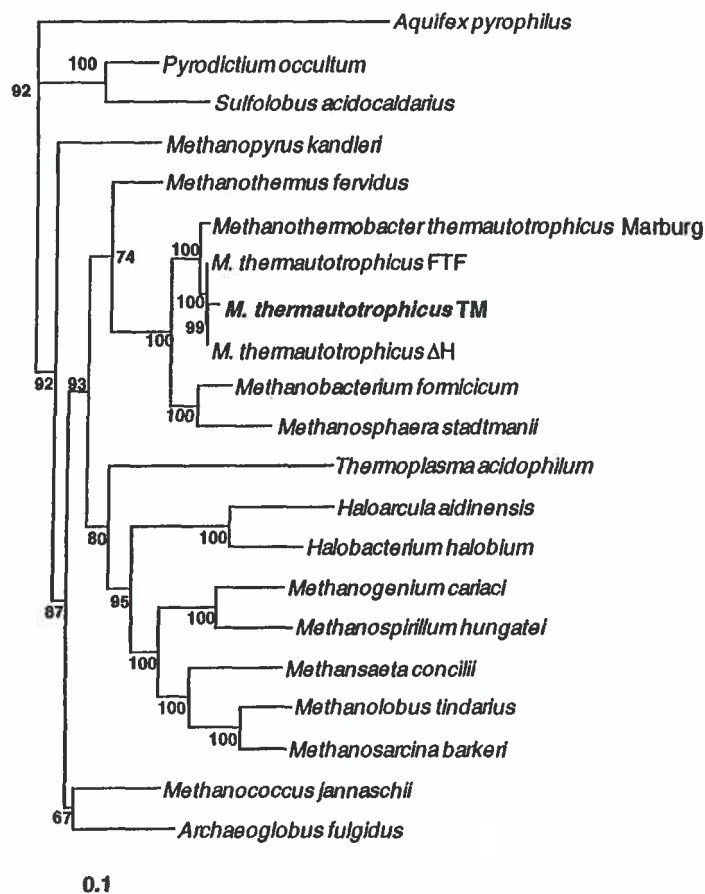


Fig. 2-2. Phylogenetic position of strain TM within a member of the genus *Methanothermobacter*. The tree was based on 16S rDNA sequences and was constructed using the neighbor-joining method. Numbers at nodes represent bootstrap values for the nodes (100 times resampling analysis). Bar represents 0.1 base substitutions per nucleotide position.

子細菌と形態的に類似した細菌が優占していた。本培養系を用い、メタン生成細菌特異的阻害剤である BES 存在下で、ピルビン酸を基質として液体希釈培養 (10^{-1} - 10^{-8})を繰り返した後、同基質を用いて寒天希釈培養(10^{-1} - 10^{-8})を行うことにより、有孢子細菌の純粋分離を試みた。その結果、培養 2 ヶ月後に 10^{-7} 希釈寒天培地に直径 2 mm 程度の黄土色のコロニーが出現した。このコロニーは顕微鏡観察の結果、上述した有孢子細菌のみから構成されていた。同コロニーを採取しピルビン酸を基質として液体培養したものに酵母エキスやグルコースなどを添加しても、夾雑細菌はもはや現れず、完全に純化された培養系を獲得できた。そこで、この有孢子細菌を PB 株と命名した (Fig. 2-3)。PB 株は共生微生物系の集積培養系に存在していた有孢子細菌と形態的に類似しており、本菌が酢酸酸化共生細菌である可能性が示唆された。そこで、本菌を酢酸を唯一の基質とした培地に植菌し、水素資化性メタン生成細菌 TM 株を追加植菌後、55°C で混合培養を試みたところ、培養 40 日後に酢酸の分解および化学量論的に等量のメタン生成が観察された。コントロール実験として酢酸を唯一の基質とし、PB 株または TM 株を各々単独で培養したが、両者とも全く生育しなかった。これらから、PB 株は共生によってのみ酢酸を分解可能な酢酸酸化共生細菌であることが明らかとなった (Fig. 2-4)。なお、混合培養で再構成された酢酸酸化共生微生物系は、その後安定して生育し、約 3 週間で酢酸を分解可能であることが明らかとなった (Fig. 2-5)。以上の結果から、異なる 2 種の微生物から構成される純粋な酢酸酸化共生微生物系および、酢酸酸化共生細菌 PB 株を純粋分離することに成功した。

3-4 酢酸酸化共生細菌 PB 株の嗜性質の検討

3-4-1 基質資化性の検討

PB 株は単独培養ではアルコール類 (メタノール、エタノール、n-プロパノール、n-ブタノール)、メトキシ芳香族化合物 (バニリン酸、シリンガ酸、トリメトキシ安息香酸)、有機酸 (ギ酸、ピルビン酸) など幅広い基質を利用して生育可能であることが明らかとなった (Table 2-2)。また、PB 株は H_2/CO_2 を基質として独立栄養的に生育することが可能であった。一方、糖類 (グルコース、フラクトースなど) などの典型的な発酵性基質は資化しなかった。なお、使用した全ての基質からの主な生成物は酢酸であった。Table 2-3 に代表的なホモ酢酸生成細菌の基質と生成物の化学量論比を示す。本実験における PB 株の基質および生成物の測定値から簡潔に化学量論比を算出し、Table 2-3 と比較したところ、PB 株が資化した基質及びその量論比は既知のホモ酢酸生成細菌の量論比と殆ど一致した (Table 2-4)。この結果から、PB 株は典型的なホモ酢酸生成細菌の代謝様式を有していることが示唆された。Table 2-2 に示した基質資化性テストの結果のうち、特筆すべき点としては、PB 株は単独培養時には水素から酢酸を生成して生育することが可能であるという

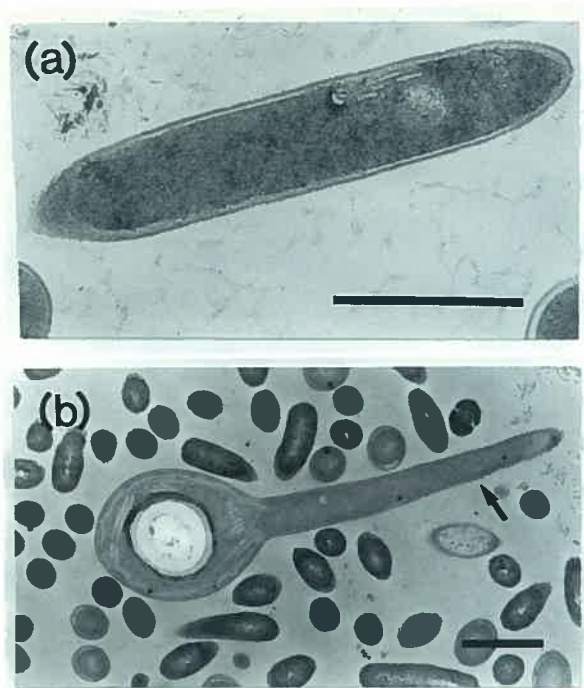


Fig. 2-3. Transmission electron micrographs of strain PB in pure or coculture. (a) Pure culture of strain PB grown on methanol, (b) Syntrophic coculture of strains PB and TM grown on acetate. The arrow in (b) indicates the strain PB cell. Bars represent 1 μm .

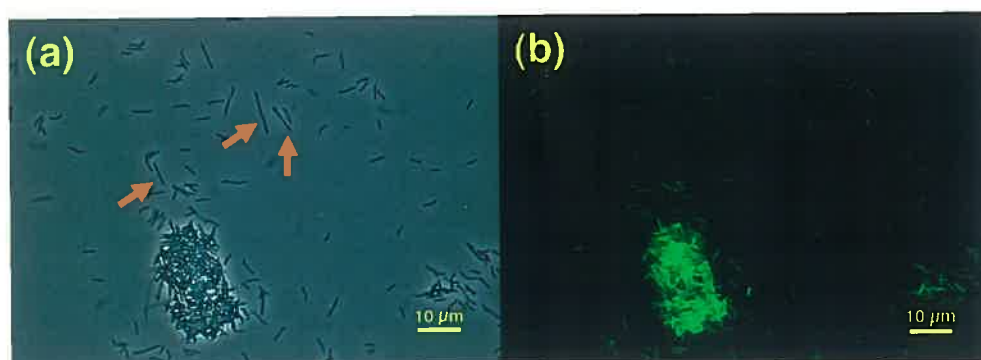


Fig. 2-4. Micrographs of syntrophic acetate-oxidizing coculture. (a) Strain PB in coculture with methanogenic strain TM, (b) Epifluorescence micrograph of the same field as (a). The arrows in (a) indicate the strain PB cells.

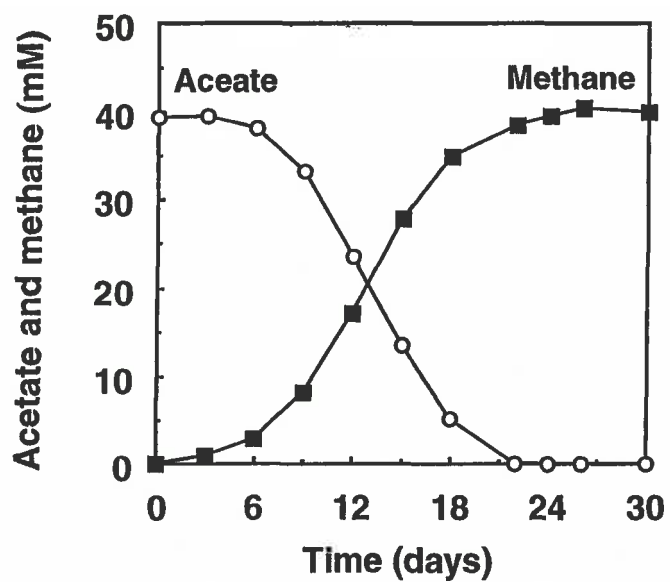


Fig. 2-5. Syntrophic degradation of acetate to methane by a reconstituted coculture of strain PB and strain TM.

Table 2-2. Organic and inorganic compounds tested as electron donors, acceptors, and carbon sources for strain PB.

Utilized as electron donor

H₂/CO₂(80:20 v/v %, 151 kPa), Formate (40 mM), Pyruvate, 3,4,5-Trimethoxybenzoate (10 mM), Syringate (10 mM), Vanillate (10 mM), Methanol, Ethanol, n-Propanol, n-Butanol, 2,3-Butanediol, Ethanolamine, Glycine.

Tested but not utilized as electron donor

1,2-Propanediol, Ethylene glycol, Glycerol, Citrate, Fumarate, Malate, Lactate, Sarcosine, Betaine, Methylamine, Dimethylamine, Trimethylamine, Glucose, Fructose, Galactose, Maltose, Sucrose, Lactose, Yeast extract (0.1 %).

Utilized as electron acceptor with acetate (40 mM)

Sulfate, Thiosulfate.

Tested but not utilized as electron acceptor with acetate (40 mM)

Fe³⁺/NTA (5 mM), Sulfite (2.5 mM), Nitrate, Nitrite (2.5 mM), Fumarate (10 mM).

Unless otherwise indicated, the compounds were added at a final concentration of 20 mM.

Table 2-3. Representative growth-supportive substrates and overall substrate-product stoichiometries of acetogenic bacteria that can form acetate as their predominant reduced end product.

| Substrate | Reactant | Product |
|------------------------|---|--|
| Acetoin | $2\text{CH}_3\text{COCHOHCH}_3 + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ | $5\text{CH}_3\text{COOH}$ |
| 2,3-Butanediol | $4\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3 + 6\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ | $11\text{CH}_3\text{COOH}$ |
| Citrate | $4\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$ | $9\text{CH}_3\text{COOH} + 6\text{CO}_2$ |
| Glucose | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | $3\text{CH}_3\text{COOH}$ |
| Cellobiose | $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{H}_2\text{O}$ | $6\text{CH}_3\text{COOH}$ |
| Hydrogen | $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2$ | $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Formate | 4HCOOH | $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Methanol | $4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{CO}_2$ | $3\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Ethanol | $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$ | $3\text{CH}_3\text{COOH}$ |
| Carbonmonoxide | $4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O}$ | $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$ |
| Methoxylated aromatics | | |
| e.g., syringate | $2 \text{ syringate}[-\text{OCH}_3]_2 + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ | $2 \text{ gallate}[-\text{OCH}_3]_2 + 3\text{CH}_3\text{COOH}$ |
| e.g., vanillate | $4 \text{ vanillate}[-\text{OCH}_3]_2 + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ | $4 \text{ protocatechuate}[-\text{OCH}_3]_2 + 3\text{CH}_3\text{COOH}$ |
| Methyl chloride | $4\text{CH}_3\text{Cl} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ | $3\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{HCl}$ |
| Pyruvate | $4\text{CH}_3\text{COCOOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ | $5\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$ |
| Oxalate | $4(\text{COOH})_2$ | $\text{CH}_3\text{COOH} + 6\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ |

Table 2-4. Stoichiometry of substrates and products with pure culture of strain PB.

| Substrate | Substrate consumed (mM) | Products (mM) | | |
|------------|-------------------------|---------------|------------|----------|
| | | Acetate | Propionate | Butyrate |
| Hydrogen | 91.7 | 23.4 | -* | - |
| Formate | 43.3 | 9.9 | - | - |
| Pyruvate | 30.8 | 40.2 | - | - |
| Methanol | 37.3 | 28.0 | - | - |
| Ethanol | 33.8 | 45.3 | - | - |
| n-Propanol | 18.2 | 26.8 | 33.2 | - |
| n-Butanol | 18.0 | 13.4 | - | 36.2 |

*, not detected.

点である。つまり、水素資化性メタン生成細菌との共生培養時には PB 株は酢酸から水素を生成して生育し（第四章参照）、単独培養時には逆に水素から酢酸を生成して生育するという特徴、即ち基質と生成物の逆転が起きても生育可能な生理学的特徴を有する細菌であることが推察された。過去に単離された、メタン生成細菌と共生微生物系を構成する酢酸酸化共生細菌は、単独培養時には H_2/CO_2 やギ酸等から酢酸を生成して生育するホモ酢酸生成細菌であることが明らかとなっている (Lee and Zinder 1988c; Schnürer et al. 1996)。このため、本菌もこれらの酢酸酸化共生細菌と類似した生理学的特徴を所有していることが示唆された。Table 2-5 に、これらの酢酸酸化共生細菌と PB 株の性質を比較したものを示した。

3-4-2 電子受容体テストの検討

PB 株の電子受容体の利用性を検討するために、酢酸を電子供与体として各種のイオンを添加し培養を行った。その結果、PB 株は硫酸イオンおよびチオ硫酸イオンを電子受容体として単独で酢酸を資化可能であることが明らかとなった (Table 2-2)。即ち、PB 株はホモ酢酸生成細菌としてだけでなく、完全酸化型の硫酸還元細菌またはチオ硫酸還元細菌でもあることが判明した。なお、本菌は硫酸イオン、チオ硫酸イオン以外のイオン（鉄イオン、硝酸イオン、フマル酸など）は利用しなかった。過去に報告されたメタン生成細菌と共生微生物系を構成する酢酸酸化共生細菌も単独ではホモ酢酸生成細菌として生育するが、硫酸還元およびチオ硫酸還元能はなく (Table 2-5)、本菌が既知の酢酸酸化共生細菌とは生理学的に明らかに異なる性質を有していることが判明した。

3-4-3 生育条件および化学分類的性質の検討

新たに単離された酢酸酸化共生細菌 PB 株は Table 2-5 に示した性質を有していた。PB 株は単独培養時は長さ 2-3 μm の単桿菌もしくは連鎖桿菌であったが、その生残性は極めて低く、基質の枯渇に伴い、速やかに溶菌した (Fig. 2-6)。一方、水素資化性メタン生成細菌との共生培養時には細胞は 10-12 μm に伸長し主に単桿菌として存在し、かつ孢子の形成が顕著に見られた。これは共生培養時には生育基質が貧弱（酢酸）であるため活発な細胞分裂が抑制され、孢子形成が促進されているものと推察された。なお、共生培養時における PB 株の生残性は高く、少なくとも 6 ヶ月以上の生残性を示した。PB 株の生育可能な温度範囲は 40-65°C の中度高温域であり、至適生育温度は 58°C であった。また、生育 pH 域は 5.9-8.4、至適 pH は 6.8 であった (Fig. 2-7)。PB 株は最大 4.5% の NaCl 存在下で生育可能であったが、その生育は著しく阻害された。PB 株のグラム染色の結果はグラム陰性を示した。しかし、透過型電子顕微鏡による観察の結果、その細胞壁は典型的なグラム陽性のものであったことから、本菌をグラム陽性細菌と同定した (Fig. 2-3)。PB

Table 2-5. Characteristics of strain PB and other syntrophic acetate-oxidizing bacteria.

| Characteristics | strain PB* | strain AOR† | <i>C. ultunense</i> ‡ |
|------------------------------|------------------|---------------|-----------------------|
| Cell size (µm) | 0.4-0.7 x 2-12.6 | 0.4-0.6 x 2-3 | 0.5-0.7 x 0.5-7 |
| Spore formation | + | - | + |
| Gram type | + | + | + |
| Temperature range (°C) | 40-65 | 50-65 | 15-50 |
| Optimum temperature (°C) | 58 | 60 | 37 |
| pH range | 5.9-8.4 | ND | 5-10 |
| Optimum pH | 6.8-7.1 | ND | 7 |
| DNA G+C content (mol%) | 53.5 | 47 | 32 |
| Major menaquinone | MK-7 | ND | ND |
| Supplement required | none | Yeast extract | Yeast extract |
| Utilization of substrate : | | | |
| In pure culture | | | |
| Hydrogen/CO ₂ | + | + | - |
| Formate | + | + | + |
| Ethylene glycol | - | + | + |
| Methanol | + | - | - |
| Ethanol | + | - | - |
| n-Propanol | + | - | ND |
| n-Butanol | + | - | - |
| 1,2-Propanediol | - | + | - |
| 2,3-Butanediol | + | - | ND |
| Ethanolamine | + | - | - |
| Glycerol | - | - | - |
| Pyruvate | + | + | + |
| 3,4,5-Trimethoxybenzoate | + | - | - |
| Syringate | + | ND | - |
| Vanillate | + | ND | - |
| Glycine | + | - | - |
| Betaine | - | + | + |
| Methylamine | - | - | - |
| Cysteine | + | ND | + |
| Glucose | - | - | + |
| Acetate | - | - | - |
| Acetate plus sulfate | + | - | - |
| In coculture with methanogen | | | |
| Acetate | + | + | + |

ND, not determined.

* In this study.

† Data from Lee & Zinder (1988).

‡ Data from Schnürer et al. (1996).

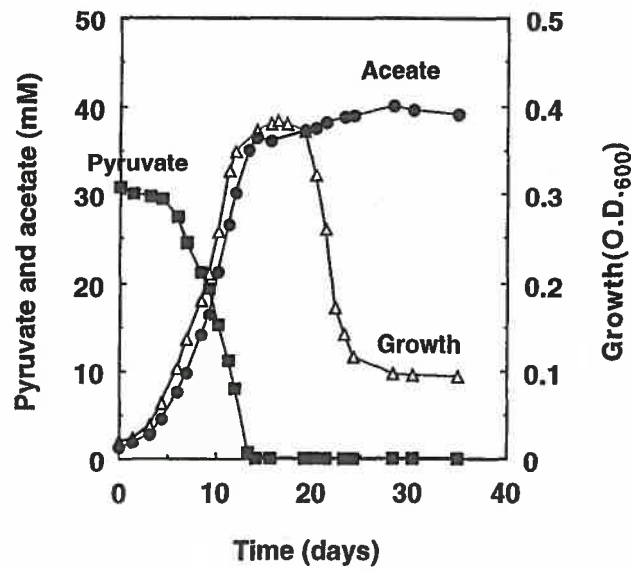


Fig. 2-6. Degradation of pyruvate to acetate by pure culture of strain PB.

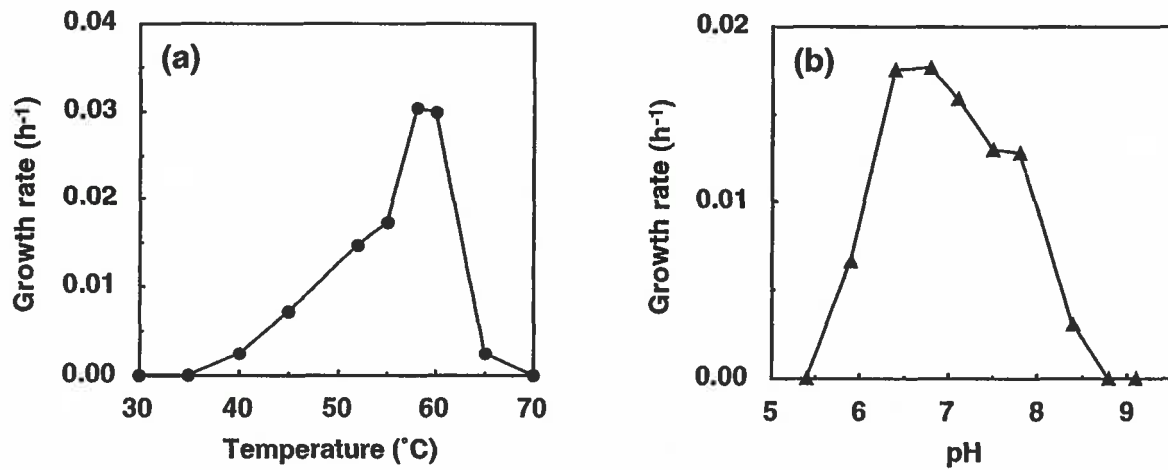


Fig. 2-7. Effect of temperature (a) and pH (b) on the growth of strain PB.

株の DNA G+C 含量は 53.5 mol%であった。また、キノン分析の結果、メナキノン 7 (MK-7) が検出された。メナキノンは嫌気性細菌に多く認められる疎水性の電子運搬体であり、嫌気呼吸における電子伝達鎖の構成成分となっている。メナキノンはその側鎖の違いにより複数種に分類化されており (MK-6, MK-7, MK-9 など)、細菌の化学分類の指標とされている (Collins and Jones 1981)。PB 株において検出された MK-7 は、ホモ酢酸生成細菌である *Moorella* 属や、完全酸化型硫酸還元細菌の *Desulfotomaculum* 属においてもその存在が報告されている (Das et al. 1989; Widdel 1992)。これらから、化学分類学上もホモ酢酸生成細菌、硫酸還元細菌と PB 株が何らかの相関性を有していることが示唆された。

3-4-4 系統的性質の検討

PB 株の系統進化的位置を推定するために、16S rDNA 配列を分子マーカーとして系統解析を行った。その結果 PB 株は、Gram positive low G+C bacteria のクラスターに属する細菌であることが解った (Fig. 2-8)。同クラスターには代表的なホモ酢酸生成細菌である *Moorella thermoacetica* および完全酸化型の硫酸還元菌である *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* が含まれていた。上述した基質資化性、電子受容体テスト、化学分類の結果からも明らかなように、PB 株は生理学的に双方の細菌と類似した性質を有していたが、系統学的性質においても両者の細菌に密接な関連性があることが示唆された。ただし、*D. thermoacetoxidans* および *M. thermoacetica* のどちらにおいても水素資化性メタン生成細菌との共生微生物系により酢酸を分解する能力は報告されておらず、PB 株のみが共生による酢酸酸化を可能にする何らかの決定的な機能を有している可能性が推察された。一方、これまでに報告されたメタン生成細菌と共生微生物系を構成する酢酸酸化共生細菌のうち、中温性の酢酸酸化共生細菌 *C. ultunense* は明らかに PB 株と系統的に離れており、同株との相関性は低いことが示唆された (Fig. 2-8)。高温性の酢酸酸化共生細菌 AOR 株に関しては遺伝子情報が報告されていないため、PB 株との系統関係を解析することはできなかった。なお、系統解析の結果、PB 株と最も近縁な細菌は *Thermoterrabacterium ferrireducens* であった (Fig. 2-8)。*T. ferrireducens* は不完全酸化型の鉄還元細菌で、孢子形成能がなく、基質資化性のタイプも発酵性細菌のものであり、PB 株とは生理学的に明らかに異なるものであった (Slobodkin et al. 1997)。また、*T. ferrireducens* と PB 株の 16S rDNA 遺伝子の相同性も僅か 87.4% であった。前述したように、生理学的特性として、共生による酢酸の酸化能力・水素からの還元的酢酸生成能力・完全酸化型の硫酸還元能力を全て有する細菌はこれまでに報告されておらず、本菌が初めての報告例となった。さらに、系統学的にも PB 株は既存の細菌とは明らかに異なっていたことから、本菌が新属新種の細菌であることが示唆された。そこで、本菌を新属新種の酢酸酸化共生細菌

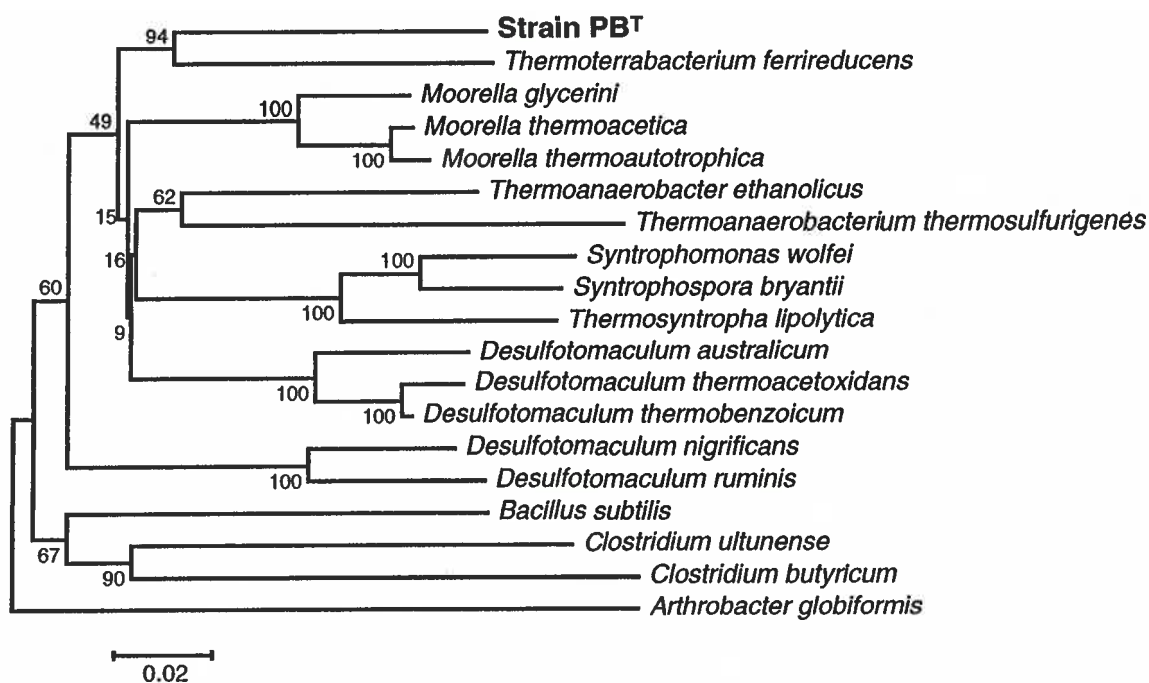


Fig. 2-8. Phylogenetic position of strain PB within a member of the *Bacillus-Clostridium* subphylum of the Gram-positive bacteria. The tree was based on 16S rDNA sequences and was constructed using the neighbor-joining method. Numbers in parentheses are the same as Fig. 2-2. Bar represents 0.02 base substitutions per nucleotide positions.

Thermacetogenium phaeum と命名・提唱した (Hattori et al. 2000)。なお、本菌は国際的な細菌認定機関である International Committee on Systematic Bacteriology の直属の下部機関 International Association of Microbiological Societies が発行する国際雑誌 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology に新属新種の細菌として掲載されている。なお、PB 株および、PB 株とメタン生成細菌 TM 株からなる酢酸酸化共生微生物系は、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) にそれぞれ寄託した。(Pure culture of strain PB = DSM 12270^T; Syntrophic acetate-oxidizing coculture strain PB and strain TM = DSM 12269^T)

第三章

酢酸酸化共生細菌 *Thermacetogenium phaeum* PB 株の代謝経路の解明

第一節 はじめに

序章でも述べたように、嫌気環境下での酢酸の代謝には、クエン酸回路および CODH/Acetyl-CoA 経路の 2 つの代謝経路が知られている。これまでの研究の結果、メタン生成細菌と共生微生物系を構成する既知の酢酸酸化共生細菌においては、酸化的方向および還元的方向のどちらの方向にも CODH/Acetyl-CoA 経路を使用して生育していることが示唆されている(Lee and Zinder 1988a; Schnürer et al. 1997)。また、*G. sulfurreducens* は硝酸還元細菌（または硫酸還元細菌）と共生培養時には、酢酸を酸化をクエン酸回路を用いて行っていることが報告されている(Galushko and Schink 2000)。しかしながら、これらの酢酸酸化共生細菌における代謝経路の同定には問題が残っている。それは、酢酸酸化共生細菌の代謝経路の同定を行うための酵素活性測定時に、共生微生物系を構成する 2 種類の細菌（酢酸酸化共生細菌と水素消費細菌）を同時に破碎したものを使用しているという点である。2 種の細菌は互いに類似した酵素活性を有しているため、菌体の同時破碎を行うと双方の酵素を合わせた活性を測定することになり、結果として酢酸酸化共生細菌の代謝経路の同定に重大な誤差をもたらす可能性が推察される。そこで本章においては、これらの問題を踏まえ、第二章で単離した酢酸酸化共生細菌 *Thermacetogenium phaeum* PB 株を用い、単独培養時および共生培養時における、正確な代謝経路を同定することを試みた。

第二節 実験方法

2-1 供試菌体

第二章で単離した酢酸酸化共生細菌 *Thermacetogenium phaeum* PB 株の単独培養系および、PB 株と水素資化性メタン生成細菌 *Methanobacterium thermautotrophicum* TM 株との共生培養系を用いた。どちらの培養系も継代培養を繰り返して安定化しているものを使用した。

2-2 培地及び培養方法

基本的な培地および培養方法は第二章に従った。培養は 800 mL 容の慶応型減菌びんに 500 mL の培地を添加して行った。PB 株の単独培養にはメタノール（40 mM）を唯一の基質として使用した。また、水素資化性メタン生成細菌との共生培養時には酢酸（80 mM）を唯一の基質として使用した。

2-3 無細胞抽出液の調製法

無細胞抽出液の調製に関わる全ての操作は無酸素条件下で行った。使用する試薬溶液および緩衝液は、真空ポンプによる脱気、 N_2 ガスによる置換を3サイクル以上繰り返すことにより、脱酸素処理を行った。単独培養時および共生培養時における PB 株の無細胞抽出液の調製法を以下に示す。培養菌体を嫌気チャンバー (Don Whitley Scientific Limited) 内で脱酸素処理した嫌気遠心ボトルに分注後、嫌氣的に遠心分離 (Beckman, Avanti HP-25I; 9,600 $\times g$, 10 min.) を行い集菌した。これを嫌気バッファ (10 mM Tris/HCl pH7.5, 2.5 mM DTE) で洗浄・集菌し、最終的に 5 mL の嫌気バッファに懸濁した。PB 株単独培養時には、この懸濁液を嫌氣的にフレンチプレスで破碎 (137 MPa, 5 サイクル) した。水素資化性メタン生成細菌 TM 株との共生培養時における PB 株の無細胞抽出液の調製法には、溶菌酵素による抽出法を用いた。即ち、上述した共生微生物系の懸濁液に脱酸素処理した Mutanolysin (Sigma) および Lysozyme (Sigma) を添加して 37°C, 100 rpm で振とう培養することにより、PB 株の細胞壁を選択的に破碎した。破碎菌体および未破碎菌体は嫌氣的に超遠心分離 (Beckman, TL100; 30,000 $\times g$, 20 min.) し、その上清を無細胞抽出液 (粗酵素溶液) とした。酵素活性画分の分離には、前述した粗酵素溶液をさらに超遠心分離 (120,000 $\times g$, 60 min.) し、上清を可溶性画分、沈殿を膜画分とした。なお、共生培養系のサンプルは、溶菌酵素がメタン生成細菌に与える影響を調べるため、抽出後の PB 株画分 (溶菌処理液) および TM 株画分をサンプルとして、蛍光分光光度計 (Perkin Elmer, LS50B) を用いてメタン生成細菌に特異的な補酵素 F_{420} の蛍光強度を波長 458 nm で測定した。

2-4 酵素活性の測定

酵素活性の測定は全て嫌気環境下で行い、その反応温度は 55°C で行った。CODH/acetyl-CoA 経路およびクエン酸回路に関与する酵素活性は、常法に従い嫌氣的に測定した (Brandis-Heep et al. 1983; Meßmer et al. 1993)。各酵素活性は最低 3 回以上の測定データの平均値を採用した。また、全タンパク濃度は BCA protein assay kit (Pierce) を用いた色素結合法により、562 nm での吸光度により定量した。各酵素活性の単位は $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (protein) で表した。

下記(A)-(E)の酵素活性の測定には全量 1.5 mL のセミマイクロキュベットを使用した。キュベットは天然ゴムで密栓後、内部を N_2 ガスで十分にガス置換し、酸素を除去した。次に、嫌気バッファで内部を十分リンスしたステンレスシリンジ (Hamilton) を用いて下記に記した各酵素測定用の反応液を採取し、キュベットに添加した。反応液は 亜二チオン酸ナトリウム ($Na_2S_2O_4$) により若干還元状態にし、これに粗酵素溶液を嫌氣的に添加して反応を開始させた。酵素活性は各種電子受容体の吸収変化を分光光度計によって連続的に測定した。なお、Hydrogenase, CO dehydrogenase

(CODH) 活性の測定時には、反応液をそれぞれ H₂, CO で飽和させ、キュベットの気相を同様のガスでそれぞれ置換し(各 100 kPa)、酵素反応の基質とした。

A) Hydrogenase

buffer ; 50 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM DTE
substrate ; 100% Hydrogen (100 kPa)
reductant ; Na₂S₂O₄ (0.3 mM)
e⁻ acceptor ; Benzyl viologen (2 mM)
wave length ; 578 nm ($\epsilon = 8.65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

B) Formate dehydrogenase

buffer ; 50 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM DTE
substrate ; Formate (40 mM)
reductant ; Na₂S₂O₄ (0.3 mM)
e⁻ acceptor ; Benzyl viologen (2 mM)
wave length ; 578 nm ($\epsilon = 8.65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

C) CO dehydrogenase

buffer ; 50 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM DTE
substrate ; 100% Carbon monoxide (100 kPa)
reductant ; Na₂S₂O₄ (0.3 mM)
e⁻ acceptor ; Benzyl viologen (2 mM)
wave length ; 578 nm ($\epsilon = 8.65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

D) Methylene-THF (tetrahydrofolate) reductase

buffer ; 100 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 2 mM NH₄Cl, 50 mM 2-Mercaptoethanol
substrate ; THF (0.5 mM), Formaldehyde (1 mM)
reductant ; Na₂S₂O₄ (0.3 mM)
e⁻ acceptor ; Methyl viologen (2 mM)
wave length ; 578 nm ($\epsilon = 9.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

E) 2-oxoglutarate dehydrogenase

buffer ; 50 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM DTE
substrate ; 2-oxoglutarate (3 mM), CoA (0.2 mM)
reductant ; Na₂S₂O₄ (0.3 mM)
e⁻ acceptor ; Benzyl viologen (2 mM)
wave length ; 578 nm ($\epsilon = 8.65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

F) Formyl-THF synthetase

酵素活性の測定には 5 mL 容の嫌気バイアルを使用した。THF と Formate および粗酵素液を添加し、ATP の添加により反応を開始し、経時的にサンプルを採取した。採取したサンプルは直ちに酸素に晒し、2% HClO_4 を添加、懸濁、急冷することにより反応を停止させた（この操作は同時に不安定な Formyl-THF から、化学的に安定な Methenyl-THF への非生物学的変換を伴っている）。これを 37°C, 15 min. インキュベート、8,000 $\times g$, 10 min. 遠心処理後、その上清を採取し、Methenyl-THF の吸光度 350 nm を測定した。

| | |
|-------------|---|
| buffer | ; 100 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 2 mM NH_4Cl , 50 mM 2-Mercaptoethanol |
| substrate | ; Formate (40 mM), THF (final 2 mM), ATP (final 5 mM) |
| wave length | ; 350 nm ($\epsilon = 24.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) |

G) Methylene-THF dehydrogenase

嫌気バイアル内（5 mL 容）で THF と Formaldehyde を混合し、非生物学的に Methylene-THF を合成した。これに NAD^+ (or NADP^+) を添加した。反応は粗酵素液の添加により開始した。サンプルを経時的に採取後、急冷して反応を止め、直ちに 350 nm の吸光度を測定した。

| | |
|----------------|---|
| buffer | ; 100 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 50 mM 2-Mercaptoethanol |
| substrate | ; THF (final 0.5 mM), Formaldehyde (final 2.5 mM) |
| e^- acceptor | ; NAD^+ or NADP^+ (final 2 mM) |
| wave length | ; 350 nm ($\epsilon = 24.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) |

第三節 結果および考察

3-1 単独培養時における PB 株の代謝経路の同定

第二章における基質資化性および化学量論値などから、本菌が他のホモ酢酸生成細菌と同様、還元的 CODH/acetyl-CoA 経路（酢酸生成方向）を有していることが推察された。そこで本実験ではまず、PB 株の単独培養時における代謝経路を同定するため、同経路を担う酵素群を対象にして嫌氣的に酵素活性を測定することを試みた。実験の結果、PB 株の無細胞抽出液中に還元的 CODH/acetyl-CoA 経路に関連する酵素活性が認められた（Table 3-1）。一方、クエン酸回路のキー酵素である 2-oxoglutarate dehydrogenase 活性は確認されなかった。過去に報告された酢酸酸化共生細菌のうち、メタン生成細菌と共生系を構成するものは、単独培養時にはホモ酢酸生成細菌として生育し、その代謝経路には還元的 CODH/acetyl-CoA 経路を使用していることが報告されている (Lee and Zinder 1988a; Schnürer et al. 1997)。このことから、本菌もこれらの酢酸酸化共生細菌と同様、単独培養時には還元的 CODH/acetyl-CoA 経路を使用していることが推察された。

Table 3-1. Enzyme activities in the cell extracts of strain PB grown on methanol.

| Enzyme | Specific activity ($\mu\text{mol/min./mg}$) | Total activity ($\mu\text{mol/min.}$) | Rate of total activity (%) | Recovery of total activity (%) |
|------------------------------|--|--|-------------------------------|-----------------------------------|
| Hydrogenase | | | | |
| crude | 73.5 | 4275 | 100 | 75.6 |
| soluble | 71.1 | 2344 | 54.8 | |
| membrane | 124 | 890 | 20.8 | |
| Formate dehydrogenase | | | | |
| crude | 40.3 | 2342 | 100 | 96.4 |
| soluble | 59.3 | 1955 | 83.5 | |
| membrane | 42.4 | 302 | 12.9 | |
| Formyl-THF synthetase | | | | |
| crude | 0.021 | 1.09 | 100 | 101 |
| soluble | 0.024 | 0.88 | 80.2 | |
| membrane | 0.013 | 0.23 | 21.0 | |
| Methylene-THF dehydrogenase | | | | |
| crude | 9.2 | 604 | 100 | 75.3 |
| soluble | 8.9 | 455 | 75.2 | |
| membrane | 0.083 | 1.9 | 0.3 | |
| Methylene-THF reductase | | | | |
| crude | 8.9 | 431 | 100 | 83.9 |
| soluble | 3.1 | 105 | 24.4 | |
| membrane | 14.1 | 257 | 59.5 | |
| Carbonmonoxide dehydrogenase | | | | |
| crude | 133 | 7714 | 100 | 117 |
| soluble | 195 | 7921 | 103 | |
| membrane | 105 | 1075 | 13.9 | |
| 2-oxoglutarate dehydrogenase | | | | |
| crude | No activity | - | - | - |
| soluble | - | - | - | |
| membrane | - | - | - | |

本実験においては、とりわけ、還元的 CODH/acetyl-CoA 経路の Key enzyme である CODH 活性が 133 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ と極めて高い活性を示し、本菌が同経路を異化的レベルで使用していることが示唆された。一方、同経路を担う酵素のうち、Formyl-THF synthetase (FTHFS) 活性は 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ と、CODH 活性と比較すると極めて低い活性であった。なお、過去に報告されている FTHFS 活性は、ホモ酢酸生成細菌である *Acetobacterium woodii* では極めて高いものの、既知の酢酸酸化共生細菌においては、一様に低い数値であった(Lee and Zinder 1988a; Schnürer et al. 1997)。このことから、PB 株を含む酢酸酸化共生細菌には FTHFS の測定法が最適ではない可能性、言い換えると FTHFS に類似した酢酸酸化共生細菌独自の酵素が存在している可能性が推察された。本実験においては、PB 株の無細胞抽出液を超遠心分離により膜画分と可溶性画分に分離して各種の酵素活性を測定したが、その中の一つ、Methylene-THF reductase は膜画分に 59.5%と、多くの活性が回収された。序章にも述べたが、還元的方向に CODH/acetyl-CoA 経路を用いた場合、獲得可能なエネルギー形式は基質レベルのリン酸化ではなく化学浸透圧機構によるイオン濃度勾配を利用したものであり、これに関与する膜結合酵素は Methylene-THF reductase または Methyltransferase であることが推察されている(Diekert and Wohlfarth 1994b)。これらの知見および本実験の結果から、PB 株は既知のホモ酢酸生成細菌と同様のエネルギー獲得様式を有していることが示唆された。

3-2 共生培養時における PB 株の代謝経路の同定

次に、共生培養時において酢酸酸化共生細菌 PB 株が、どのような代謝経路を使用して酢酸を酸化しているのかを明らかにするために、水素資化性メタン生成細菌 TM 株との共生培養系を使用して、共生培養時における PB 株の酵素活性を測定することを試みた。酢酸酸化共生細菌の選択的分離には生化学的分離手法(溶菌酵素)を適用した。条件検討の結果、溶菌酵素として Mutanolysin および Lysozyme を同時使用、かつ、37°C で緩やかに振とう培養することにより、グラム陽性細菌である PB 株のみを選択的に溶菌させることに成功した。メタン生成細菌 TM 株に対する溶菌酵素の影響をチェックするために、蛍光分光光度計を用いてメタン生成細菌が特異的に有する補酵素 F₄₂₀ の蛍光強度を測定した結果、PB 株画分への補酵素 F₄₂₀ の混入度合いは 6%程度であり、PB 株がほぼ選択的に溶菌されていることが示された。そこで、これを用いて共生培養時における PB 株の酵素活性を測定した。測定の結果、単独培養時と同様、共生培養時においても CODH/acetyl-CoA 経路を担う酵素群の活性が認められた (Table 3-2)。一方、別の酢酸分解経路であるクエン酸回路のキー酵素、2-oxoglutarate dehydrogenase の活性は認められなかった。これらより、PB 株はメタン生成細菌との共生培養時にも CODH/acetyl-CoA 経路を使用しており、その時の使用方向

Table 3-2. Enzyme activities in the cell extracts of strain PB which were syntrophically grown on acetate.

| Enzyme | Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$) | Total activity ($\mu\text{mol}/\text{min.}$) | Rate of total activity (%) | Recovery of total activity (%) |
|------------------------------|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| Hydrogenase | | | | |
| crude | 31.8 | 252 | 100 | 56.6 |
| soluble | 23.7 | 141 | 56.0 | |
| membrane | 0.8 | 1.3 | 0.5 | |
| Formate dehydrogenase | | | | |
| crude | 48.9 | 410 | 100 | 89.4 |
| soluble | 40.2 | 283 | 68.9 | |
| membrane | 30.6 | 84.0 | 20.5 | |
| Carbonmonoxide dehydrogenase | | | | |
| crude | 99.0 | 831 | 100 | 89.7 |
| soluble | 88.9 | 625 | 75.3 | |
| membrane | 43.7 | 120 | 14.5 | |
| 2-oxoglutarate dehydrogenase | | | | |
| crude | No activity | - | - | - |
| soluble | - | - | - | |
| membrane | - | - | - | |

は酸化的方向に用いていることが示唆された。また、測定した酵素活性は、単独培養時における還元的 CODH/acetyl-CoA 経路で見られたものと同等の活性を示しており、本菌が共生培養下においても異化的レベルで同経路を使用していることが示唆された。とりわけ CODH/acetyl-CoA 経路のキー酵素である CODH は $99 \mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ という高活性であった。同経路を使用する完全酸化型の硫酸還元細菌および、既知の酢酸酸化共生細菌における CODH 活性は数 $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ オーダーであり、PB 株がこれらの細菌と比べ、遙かに高い CODH 活性を有していることが判明した。

序章で述べたように、酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路におけるエネルギー獲得機構も還元的 CODH/acetyl-CoA 経路と同様、化学浸透圧機構 (chemiosmotic mechanism) を利用した ATP 生産を行っているものと推察されている (Thauer 1988)。酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路において熱力学的に最も進行し易い反応は、CODH による CO の酸化反応となっている (第一章 Table 1-3)。また、興味深い知見として、ホモ酢酸生成細菌 *Moorella thermoacetica* の反転小胞膜に CO を曝すことにより、プロトン濃度勾配が形成されるという報告がされている (Diekert et al. 1986)。これは、膜結合型の CODH による CO の酸化反応に共役して ATP 生成が行われ得ることを示唆するものである。CO の酸化反応は酸化的 CODH/acetyl-CoA 経路の一端を担っていることから、同経路においても CODH が化学浸透圧機構による ATP 生産に関与している事が推察される。PB 株においては、CODH の活性画分は可溶性画分に多く回収されたものの (75.3%)、膜画分にもその活性が認められた (14.5%)。これらの知見から、共生培養時における PB 株のエネルギー獲得機構に CODH が関与していることが推察された。

メタン生成細菌と共生系を構成する既知の酢酸酸化共生細菌においても、代謝経路の同定は試みられており、いずれの細菌においても単独培養時および共生培養時の各々で CODH/acetyl-CoA 経路を使用していることが示唆されている (Lee and Zinder 1988a; Schnürer et al. 1997)。しかしながら、これらの報告はフレンチプレスを用いた酢酸酸化共生細菌およびメタン生成細菌の同時破碎による方法に基づいており、酢酸酸化共生細菌の選択的分離がなされておらず、その酢酸酸化共生細菌の正確な酵素活性および、酵素活性画分の同定が行われていなかった。本章の結果は既知の酢酸酸化共生細菌の中でメタン生成細菌等が混入することなく、共生培養時における酢酸酸化共生細菌の正確な代謝経路の同定が行われた初めての報告である。

第四章

酢酸酸化共生微生物系における共生機構の検討

第一節 はじめに

第三章までに生理的性質・系統学的位置の解明、代謝経路の同定など、酢酸酸化共生細菌 PB 株に関する若干の知見が得られた。一方、共生微生物系という観点から酢酸酸化共生細菌を捉えると、どのような共生機構により酢酸酸化共生細菌はメタン生成細菌と共生微生物系を成立させているのだろうか？ 現在、認知されている嫌気共生微生物系における共生機構としては、2 種の微生物間における物質（電子）の授受、即ち、種間電子伝達（interspecies electron transfer）が挙げられる(Wolin and Miller 1982)。また、種間電子伝達を担う実際の物質としては、水素（＝種間水素伝達）であると推察されている(Wolin and Miller 1982)。一方で、水素だけでなくギ酸も微生物間の電子伝達物質として成立しているのではないかという説、即ち、種間ギ酸伝達の存在も提唱されている(Thiele and Zeikus 1988)。しかしながら、種間ギ酸伝達に関しては未だに明確な証拠は得られていない。その原因としては、水素とギ酸が炭酸イオン存在下で簡単に相互転換されてしまうこと、共生微生物系におけるギ酸濃度が極めて低濃度（ μM レベル）にあるため、検出が困難であること等が挙げられる。これらの背景から、現在でも種間ギ酸伝達の存在の可否に関しては未だに議論が成されている(Schmidt and Ahring 1993; Schmidt and Ahring 1995)。そこで本章では、酢酸酸化共生細菌 PB 株とメタン生成細菌から構成される酢酸酸化共生微生物系を対象として、その共生機構がどのようにして成立しているのかを明らかにすることを試みた。

第二節 実験方法

2-1 供試菌体

実験には 2 種類の酢酸酸化共生微生物系を構築した。即ち、酢酸酸化共生細菌 PB 株と水素・ギ酸資化性メタン生成細菌 TM 株との再構成による共生微生物系(PB/TM 共生系)、および PB 株と水素資化性（ギ酸資化不可能）メタン生成細菌 *M. thermautotrophicum* ΔH 株との再構成による共生微生物系（PB/ ΔH 共生系）の 2 つを作成した。どちらの共生微生物系とも最低 3 回以上、80 mM の酢酸を唯一の生育源として継代培養し、安定化させたものを使用した。生育実験においては、PB/TM 共生系および PB/ ΔH 共生系の双方とも、同量（乾燥菌体重量として 0.5 mg）接種し、同一の培養条件で実験を行った。

2-2 培地および培養方法

第二章に従った。

2-3 無細胞抽出液の調整法

全ての操作は嫌気環境下で行った。酢酸酸化共生細菌 PB 株の無細胞抽出液の調製には第三章に記載された溶菌処理法を用いた。メタン生成細菌 TM 株の無細胞抽出液の調製には PB 株の溶菌処理後に残ったメタン生成細菌の細胞を使用した。即ち、PB 株溶菌処理液を 9,600 xg, 10 min.遠心分離することにより上清 (PB 株溶菌画分) と沈殿 (メタン生成細菌の生細胞画分) に分離した。沈殿画分は嫌気バッファ (50 mM Tris/HCl pH7.5, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM DTE) で数回洗浄して残存する PB 株の抽出液を完全に除去した後、嫌気バッファでメタン生成細菌の懸濁液を調製した。これを用いて嫌氣的フレンチプレス処理 (137 MPa, 5 cycle) を行い菌体を破碎した。破碎した菌体は 30,000 xg, 20 min.遠心分離し、得られた上清をメタン生成細菌の無細胞抽出液 (=粗酵素液) とした。なお、元々の共生微生物系が有する酵素活性と、選択的分離後の各々の細菌が有する酵素活性の割合を算出するため、選択的分離前の共生微生物系をフレンチプレス処理 (137 MPa, 5 cycle) により同時破碎し、共生微生物系 (酢酸酸化共生細菌とメタン生成細菌) の混合無細胞抽出液を作成した。

2-4 酵素活性測定法

第三章と同様にして測定した。また、無細胞抽出液の全タンパク質濃度も第三章に従って測定した。

2-5 分析操作

酢酸は第二章に記載した HPLC と同様の条件で測定した。ギ酸の分析は HPLC を用い、ポストカラム pH 緩衝化-電気伝導度検出法により測定した。なお、ギ酸の検出限界は 5 μM であった。

| | | |
|----------------------|---|---|
| Instrument | ; | LC-10AD (Shimadzu) |
| Detector type | ; | CDD (current-conductivity detector), Gain 1 μS/cm |
| Column | ; | SCR-102H |
| Column temp. | ; | 48°C |
| Eluent | ; | 5 mM <i>p</i> -toluene sulfonate |
| pH buffering reagent | ; | 0.1 mM EDTA, 20 mM Bis-Tris |
| Flow rate | ; | 0.8 mL/min |

メタンは第二章と同様の条件でガスクロマトグラフィーを使用することにより測定した。水素の検出には、半導体検出器付きのガスクロマトグラフィーを使用した。測定条件は以下に示す通りである。本測定装置における水素の検出限界は 3 Pa であった。

| | | |
|----------------|---|----------------------------------|
| Instrument | ; | model GS-15 (Sensortech) |
| Detector type | ; | SCD (semi-conductivity detector) |
| Column | ; | molecular sieve 13X 60/80 mesh |
| Column temp. | ; | 40°C |
| Detector temp. | ; | 40°C |
| Carrier | ; | Pure air |
| Flow rate | ; | 10 mL/min |

2-6 熱力学計算

酢酸酸化共生微生物系における熱力学の計算には、以下に示すような 2 種類の酢酸酸化反応式を使用した。

(1) 種間水素伝達による酢酸酸化反応式 (H⁺還元) ΔG° (kJ/mol)



(2) 種間ギ酸伝達による酢酸酸化反応式 (HCO₃⁻還元)



生理学的条件下における自由エネルギー変化(ΔG') は、ネルンストの式を用いて算出した。

(1) 種間水素伝達

$$\Delta G' = \Delta G^\circ + RT \ln [\text{HCO}_3^-]^2 [\text{H}_2]^4 / [\text{CH}_3\text{COO}^-]$$

(2) 種間ギ酸伝達

$$\Delta G' = \Delta G^\circ + RT \ln [\text{HCOO}^-]^4 / [\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{HCO}_3^-]^2$$

基質および生成物のモル濃度は、2 種の共生系の生育の中間点、即ち酢酸が約半分消費された時点での値を使用した (PB/TM 共生系 ; 18 mM Acetate, 55 mM HCO₃⁻, 24 Pa H₂, 4.3 μM Formate、PB/ΔH 共生系 ; 21 mM Acetate, 57 mM HCO₃⁻, 46 Pa H₂, 25 μM Formate)。なお、標準自由エネルギー変化 (ΔG°) は以下の式を用いて 55°C, pH 7 における値 (ΔG°') に補正した。ΔH°、ΔS は各種の化合物における数値を使用して算出した(Thauer et al. 1977; Lide 1999)。

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S$$

$$\Delta G^\circ = \Delta G^\circ + RT \ln [10^{-7}]$$

R ; 8.314(J/mol.K), T ; 273+55(Kelvin), [] ; モル濃度 (M),

ΔH°; 標準エンタルピー変化, ΔS; エントロピー変化

第三節 結果および考察

3-1 異なる2種類の共生微生物系における生育実験

酢酸(40 mM)を唯一の基質として、酢酸酸化共生細菌 PB 株を異なる2種類のメタン生成細菌と混合培養を行った。その結果、PB 株は水素・ギ酸資化性メタン生成細菌 TM 株および、水素資化性メタン生成細菌ΔH 株のどちらとも共生関係を構築し、酢酸を分解することが可能であることが明らかとなった (Fig. 4-1)。PB/ΔH 共生系を構成するメタン生成細菌ΔH 株は水素資化能を有するが、ギ酸資化能は有していない。このことから、PB/ΔH 共生系においては少なくとも種間水素伝達のみで共生微生物系が成り立つことが示唆された。これまでに報告された酢酸酸化共生細菌 AOR 株も異なる基質資化性を有するメタン生成細菌との共生微生物系、即ち水素・ギ酸資化性メタン生成細菌 *M. thermautotrophicum* THF 株および水素資化性メタン生成細菌ΔH 株との2種類の共生微生物系を構築することが可能であることが報告されている(Lee and Zinder 1988b)。これらの結果から、現在までに知られている酢酸酸化共生微生物系における種間電子伝達には、少なくとも水素がその役割を担っていることが強く示唆された。一方、AOR 株における2種類の共生微生物系は、その生育に明確な差異が現れなかったという報告があるのに対し(Lee and Zinder 1988b)、PB 株を使用した2つの共生微生物系には、明らかな生育の差異が見られた (Fig. 4-1)。即ち、PB/TM 共生系においては 20 mM の酢酸を 12 日で完全分解したのに対し、PB/ΔH 共生系は同量の酢酸を分解するのに 70 日以上と、実に 5 倍以上もの時間を費やした。なお、PB/ΔH 共生系においてはこれ以後、酢酸の分解が完全に停止した。

生育の差異だけでなく、水素分圧、ギ酸濃度も2種の共生微生物系において顕著な差異が認められた。水素分圧に関しては、PB/TM 共生系では培養開始と共に急激に上昇し、培養 7 日間のうちに最大で約 40 Pa に到達した。以後、水素分圧は振幅しながら、20-30 Pa の範囲を維持していた。本共生系は酢酸の枯渇に伴って水素分圧も減少し、最終的に検出限界以下 (3 Pa)となった。一方、PB/ΔH 共生系における水素分圧は、PB/TM 共生系と比較してゆるやかな増加を示した。しかしながら、水素分圧の維持レベルは高く、40-60 Pa と PB/TM 共生系のそれよりも2倍程高い値を維持しており、明らかに PB/TM 共生系とは異なる挙動を示した (Fig. 4-1)。ギ酸の濃度に関しては、PB/TM 共生系は培養開始から終了まで 10 μM 以下に維持されていたのに対し、PB/ΔH 共生系においては培養に伴いギ酸濃度が上昇してゆき、培養 70 日目には 25 μM に達し、やはり明らかな差異が認められた (Fig. 4-1)。既知に報告されている酢酸酸化共生細菌 AOR 株を用いた2種の共生微生物系においては、その生育、水素分圧に差異は認められておらず、ギ酸は測定限界 10 μM 以下であった(Lee and Zinder 1988b)。本研究は既知の報告と異なる結果となった。

これらの結果から、PB/ΔH 共生系と PB/TM 共生系における生育の差異は、明らかに水素分圧と

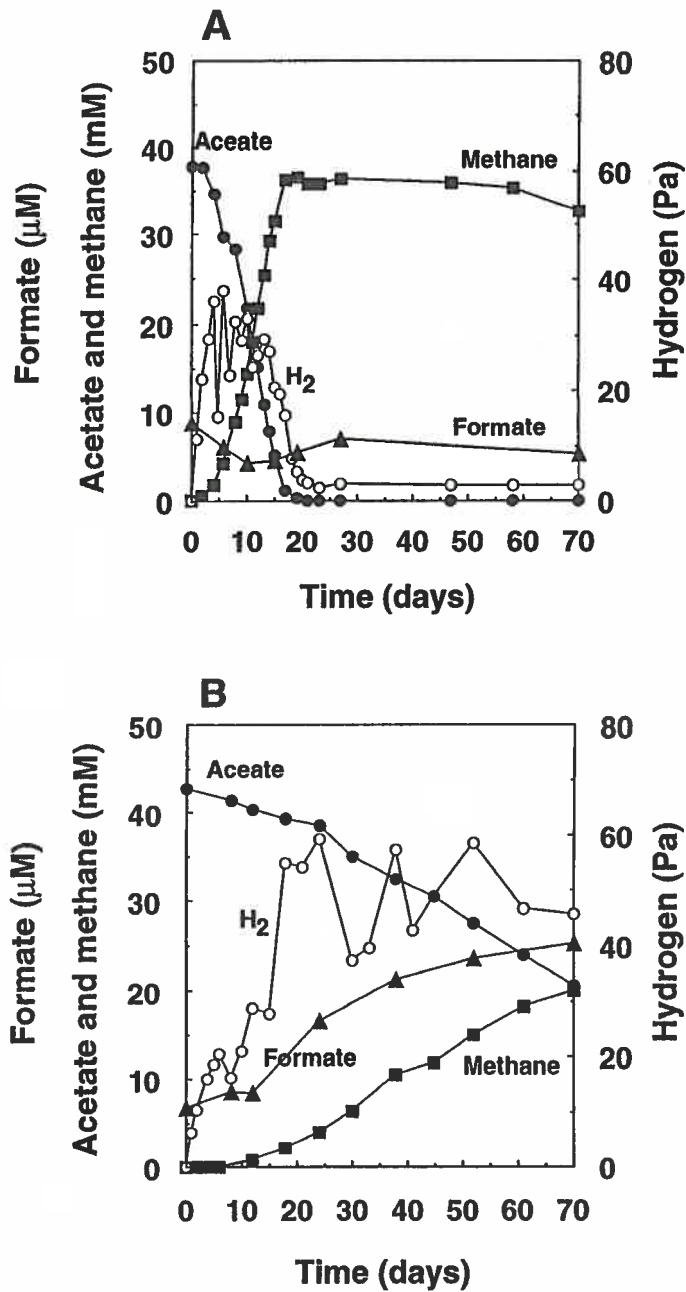


Fig. 4-1. Acetate oxidation and H₂, formate, methane production in the two reconstructed syntrophic acetate-oxidizing cocultures. (A) *T. phaeum* in coculture with a formate/H₂-utilizing methanogen strain TM. (B) *T. phaeum* in coculture with an H₂-utilizing methanogen strain ΔH.

ギ酸濃度に依存している事、即ち、水素およびギ酸の存在が酢酸酸化共生微生物系の生育に決定的な影響を及ぼしている事が示唆された。なお、PB/ Δ H 共生系と PB/TM 共生系は完全に同条件で培養を行っていることから、これらの差異は使用したメタン生成細菌の種類に依存しているものであることが推察された。実験に使用した2種のメタン生成細菌は系統解析の結果、非常に近縁(99.7%)であり、同族同種と判定された(第二章参照)。また、遺伝子解析の結果、両メタン生成株が保持する水素代謝に関する遺伝子 Hydrogenase の配列は殆ど同一であることが判明した(データ記載せず)。2種のメタン生成細菌の水素の閾値(threshold)は双方とも 3 Pa 以下であり、大きな差異は確認されなかった。これらより、PB 株を用いた2種の共生微生物系の生育実験において確認された一連の差異は、使用したメタン生成細菌の水素資化能というよりは、むしろギ酸資化能の有無が影響したものであることが推察された。即ち、酢酸酸化共生細菌 PB 株と水素・ギ酸資化性メタン生成細菌 TM 株の共生微生物系(PB/TM 共生系)においては、種間水素伝達の他に種間ギ酸伝達も同時に働いている可能性が示唆された。

3-2 共生微生物系の選択的溶菌と酵素活性の測定

前述したように、生育実験の結果から、PB/TM 共生系においては種間水素伝達のみならず、種間ギ酸伝達も存在している可能性が示唆された。一方、実際の共生微生物系において種間水素伝達および種間ギ酸伝達が機能するには、共生系を構成する PB 株および TM 株の双方が、水素代謝酵素(Hydrogenase= H_2 ase)およびギ酸代謝酵素(Formate dehydrogenase=FDH)を有している必要がある。これらの酵素活性が存在しているか否かを明らかにするため、第三章と同様にして溶菌酵素を用いた共生微生物系の選択的分離を行い、PB 株および TM 株の無細胞抽出液をそれぞれ調製して、 H_2 ase, FDH の酵素活性を嫌氣的に測定した。測定の結果、 H_2 ase, FDH の酵素活性が PB 株および TM 株の双方において認められた(Table 4-1)。これは、両者の細菌が水素およびギ酸の代謝を個別に行っていることを示しており、生化学的にも種間水素伝達と種間ギ酸伝達の双方が成立し得る環境であることが示唆された。本共生系において種間水素伝達と種間ギ酸伝達のどちらが優先的に働いているのかを検討するため、共生微生物系を構成する各々の細菌の H_2 ase, FDH の全活性を比較した(Table 4-1)。それぞれの細菌における酵素活性の割合は、選択的分離前の PB/TM 共生系の H_2 ase, FDH の全酵素活性をそれぞれ 100%として計算した。その結果、選択的分離後のメタン生成細菌 TM 株の H_2 ase 全活性は 73%回収された。一方、同様に求めた TM 株の FDH 全活性は 3.1%と、 H_2 ase と比較すると極めて活性割合が低かった。これらの結果から、PB/TM 共生系においては種間ギ酸伝達が働いている可能性はあるものの、主な電子のやりとりは種間水素伝達によって行われていることが示唆された(Fig. 4-2)。

Table 4-1. Enzyme activities in the cell extracts of syntrophic acetate-oxidizing coculture and respective organisms.

| Enzyme | Specific activity ($\mu\text{mol/min./mg}$) | Total activity ($\mu\text{mol/min.}$) | Rate of total activity (%) | Recovery of total activity (%) |
|-----------------------|--|--|-------------------------------|-----------------------------------|
| Hydrogenase | | | | |
| PB/TM | 17.3 | 350 | 100 | 109 |
| PB | 18.3 | 126 | 35.9 | |
| TM | 28.1 | 256 | 73.1 | |
| Formate dehydrogenase | | | | |
| PB/TM | 14.9 | 264 | 100 | 109 |
| PB | 43.8 | 281 | 106 | |
| TM | 1.0 | 8.2 | 3.1 | |

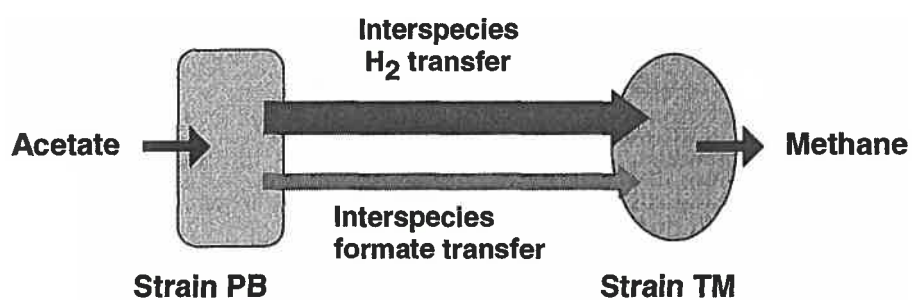


Fig. 4-2. Simplified model for interspecies electron transfer from syntrophic acetate-oxidizing bacterium to methanogen.

3-3 2種類の酢酸酸化共生微生物系の熱力学的考察

これまでの結果から、2種類の酢酸酸化共生微生物系（PB/TM、PB/ Δ H）による酢酸の分解には、水素およびギ酸が決定的な影響を及ぼしていることが示唆された。そこで、これら2種の物質が酢酸の分解に及ぼす影響を調べるため、熱力学的な解析を行った。Fig. 4-3 に示されるように、本実験条件下においては（ ≈ 20 mM Acetate, 55 mM HCO_3^- ）、理論上、水素 39 Pa, ギ酸 20 μM 以下に維持されていなければ酢酸酸化は起こり得ない。PB/TM 共生系、PB/ Δ H 共生系の双方において実際に検出された水素分圧より H^+ 還元（水素生成）による酢酸酸化反応を仮定して、その自由エネルギー変化（ $\Delta G'$ ）を算出したところ、PB/TM 共生系における酢酸酸化反応は発エルゴン反応（ $\Delta G^0 = -5.4$ kJ/mol）であったのに対し、PB/ Δ H 共生系では吸エルゴン反応となった（ $\Delta G' = +1.4$ kJ/mol）。同様にして、 HCO_3^- 還元（ギ酸生成）による酢酸酸化反応を仮定して、自由エネルギー変化（ $\Delta G'$ ）を算出したところ、やはり PB/TM 共生系における酢酸酸化反応は発エルゴン反応（ $\Delta G' = -15.2$ kJ/mol）であったのに対し、PB/ Δ H 共生系では吸エルゴン反応となった（ $\Delta G' = +1.9$ kJ/mol）。

PB/ Δ H 共生系においては、水素およびギ酸どちらの条件においても、酢酸酸化反応が進行し得る限界値を越えており、理論的には自発的に進行することが出来ない。しかしながら、実際の環境条件と理論条件が完全に一致することは無いにしても、少なくとも PB/ Δ H 共生系における酢酸酸化反応は、反応が進行し得るボーダーライン上にあることが推察された。即ち、僅かな水素分圧およびギ酸濃度の差異が共生微生物系による酢酸分解に極めて大きな影響を与えていることが熱力学的に示唆された。

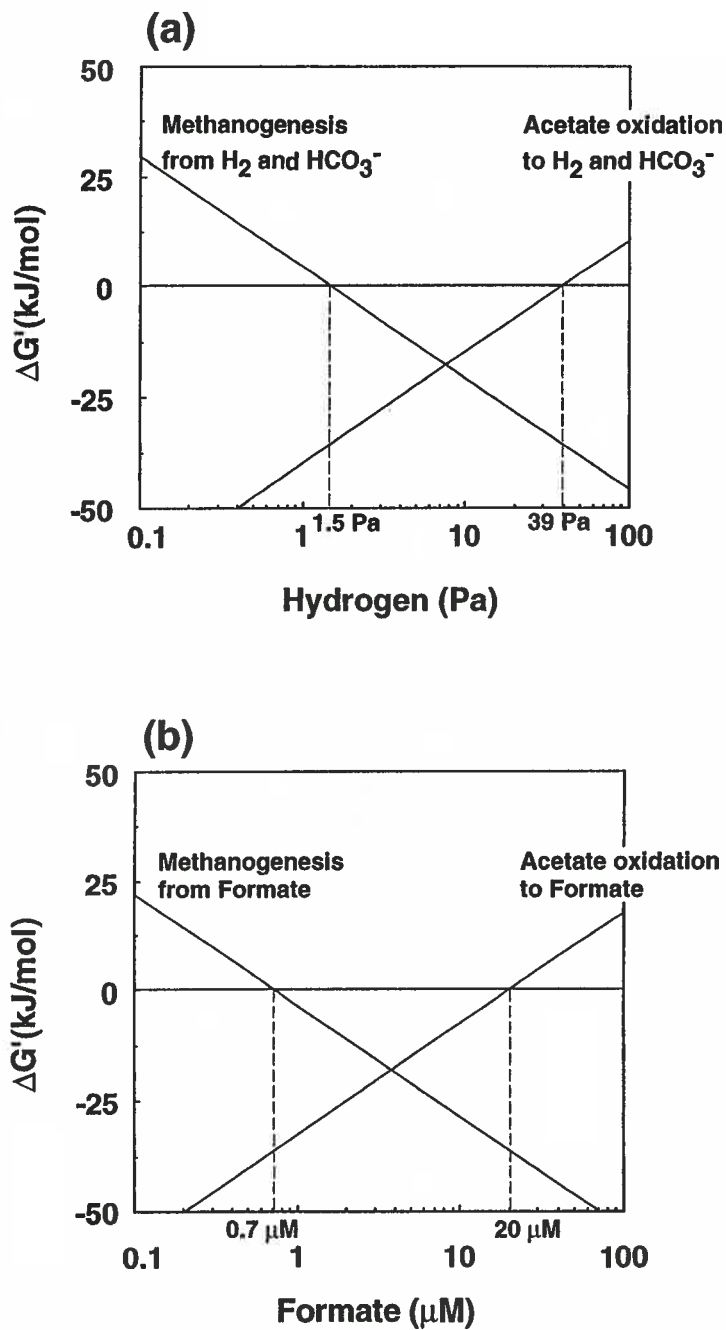


Fig. 4-3. Free energy changes in acetate oxidation and methanogenesis at mid-point growth of the two syntrophic acetate-oxidizing cocultures. (a) Methanogenesis from acetate *via* H_2 . (b) Methanogenesis from acetate *via* formate.

第五章 総括

本研究は、絶対嫌気性酢酸酸化共生細菌の純粋分離および同定（各種生理学的性質・系統学的性質）を行い、且つ、同共生細菌が使用する代謝経路の解明を試みた上で、共生細菌とメタン生成細菌との共生機構を明らかにすることにより、未だ知見の少ない酢酸酸化共生微生物系に関する基礎的知見を獲得しようというものであった。

序章で記載したように、酢酸酸化共生微生物系の単離例は数例しか報告がなされていない(Zinder and Koch 1984; Caccavo et al. 1994; Schnürer et al. 1994; Galouchko and Rozanova 1996)。報告された酢酸酸化共生微生物系については生理学的性質や代謝経路など、幾つかの貴重な知見が得られつつあるものの(Lee and Zinder 1988b; Lee and Zinder 1988a; Schnürer et al. 1997; Cord-Ruwisch et al. 1998)、絶対的なサンプル不足に起因して、詳細な研究が滞った状態となっていた。このような背景から、本研究では始めに酢酸酸化共生微生物系および、酢酸酸化共生細菌を新たに獲得することを試みた。

酢酸酸化共生微生物系の単離例が少ない原因として、その生育速度が極端に遅く、純粋分離の過程で同一の基質を巡る他の細菌との競合に負けてしまうこと（wash out）が考えられる。そこで本研究では、酢酸以外の基質を使用することにより複数の嫌気性細菌を純粋分離した後、これらの細菌を酢酸存在下で混合培養することにより、純粋な酢酸酸化共生微生物系を再構築する方法を試みた（第二章）。この手法により、酢酸酸化共生細菌 PB 株、水素・ギ酸資化性メタン生成細菌 TM 株、および両者の細菌から再構成された酢酸酸化共生微生物系を純粋分離することが出来た。同方法は、酢酸酸化共生微生物系に限らず、他の生育速度の遅い共生細菌（プロピオン酸酸化細菌、酪酸酸化細菌など）の獲得にも有効な手法であると思われる。

純粋分離した酢酸酸化共生細菌 PB 株は、58°C、pH 7 に最適生育条件を有する高温性のグラム陽性細菌であり、その形態は末端に孢子形成能を有する桿菌であった。同菌は多くの嫌気性細菌における電子伝達鎖の構成成分であるメナキノ 7（MK-7）を有しており、嫌気呼吸を行って生育している可能性が示唆された。また、PB 株の基質資化パターンから、同菌が典型的なホモ酢酸生成細菌であることが明らかとなった。一方、PB 株は硫酸イオン（またはチオ硫酸イオン）存在下ではメタン生成細菌との共生に依存せずに酢酸を単独で酸化して生育可能であり、同菌がホモ酢酸生成細菌としてだけでなく、完全酸化型の硫酸還元細菌（またはチオ硫酸還元細菌）でもあることが判明した。既知の酢酸酸化共生細菌を含む全ての嫌気性細菌においては、ホモ酢酸生成能・完全酸化型の硫酸還元能・メタン生成細菌との共生による酢酸酸化能の 3 つの生理学的性質

を同時に有している細菌は全く報告されておらず、本菌が初めての報告となった。このような生理学的性質に加え、系統学的性質も、PB 株が既知のいずれの細菌とも異なる系統に属することが明らかとなった。そこで、本菌を *Thermacetogenium phaeum* として新属・新種提案した (=DSM 12270^T)。

第二章で示唆された重要な点は、PB 株は単独では水素を基質として生育可能で、酢酸を生成物とするという点である。これは即ち、メタン生成細菌との共生培養時における PB 株の基質（＝酢酸）と生成物（＝水素）が逆転しても生育可能であることを意味しており、同菌が極めて興味深い代謝経路を有していることが推察された。そこで、第三章において、PB 株がどのような代謝経路を有しているのかを明らかにすることを試みた。単独培養系およびメタン生成細菌との共生培養系における PB 株の酵素活性を嫌氣的に測定した結果、どちらの培養系においても CODH/acetyl-CoA 経路に関与する酵素群の活性が認められた。同経路はホモ酢酸生成細菌や一部の完全酸化型の硫酸還元細菌が有する代謝経路で、ホモ酢酸生成細菌の場合は同経路を還元的方向（還元力[H]を用いて CO₂を固定して酢酸を生成する方向）に用い、完全酸化型の硫酸還元菌の場合は同経路を逆方向（酢酸を酸化して還元力[H]と CO₂を生成する方向）に用いている。これらの菌が CODH/acetyl-CoA 経路を有しているという事実は、PB 株がホモ酢酸生成細菌または完全酸化型の硫酸還元細菌であったという第二章の結果を支持する事となった。

以上の結果から、PB 株は単独培養時およびメタン生成細菌との共生培養時の双方において、CODH/acetyl-CoA 経路を使用している可能性が示唆された。同経路に関与する酵素群は、メタン生成細菌と共生系を構成する既知の酢酸酸化共生細菌においても、単独培養時および共生培養時の双方で活性が認められている。一方、硝酸還元細菌と共生系を構成する酢酸酸化共生細菌においては、酢酸の酸化は CODH/acetyl-CoA 経路ではなく、クエン酸回路で行われることが示唆されている (Galushko and Schink 2000)。これらの結果は、共生による酢酸の嫌氣的酸化が複数の代謝経路によって行われていることを示している。同時に、現時点では少なくともメタン生成細菌との共生系を構成するタイプの酢酸酸化共生細菌は CODH/acetyl-CoA 経路を使用していることが示唆された。なお、本研究における酢酸酸化共生細菌の代謝経路の同定には、既知の酢酸酸化共生細菌で行われた方法とは技術的に異なった方法を適用した。その技術的な差異とは、酵素活性測定の為の菌体の破碎方法であった。上述した既知の酢酸酸化共生細菌においては、共生する相手（メタン生成細菌あるいは硝酸還元細菌、硫酸還元細菌）との共生培養時にフレンチプレスを用いた菌体の同時破碎方法を採用していたが、本研究では溶菌酵素による酢酸酸化共生細菌の選択的分離法を採用した。この手法により菌体の同時破碎によるメタン生成細菌の酵素活性の混入を

回避し、共生培養時における“純粋な”酢酸酸化共生細菌の酵素活性を測定することに成功した。本研究は、パートナーの微生物との共生培養時における酢酸酸化共生細菌の代謝経路の同定が正確に行われた初めての報告である。

このように、単独培養時および共生培養時の双方において、PB 株は CODH/acetyl-CoA 経路を使用していることが示唆されたものの、同菌がそれぞれの培養時において、どのようにしてエネルギーを獲得しているのかについては、未だに詳細な知見は得られておらず、更に詳細な生化学的研究（反転小胞膜を用いた膜酵素と H⁺-ATPase の共役実験、脱共役実験など）が必要とされる。ただし、CODH/acetyl-CoA 経路のエネルギー獲得機構に関与する酵素であると推察されている Methylene-THF reductase、CODH 活性が、PB 株の単独培養時および共生培養時において膜画分に回収されたという結果は、酢酸酸化共生細菌におけるエネルギー獲得機構を解明する糸口となり得る、有用な情報であると思われる。

第四章においては、これまでの知見を基にして、酢酸酸化共生微生物系における共生機構を明らかにすることを試みた。嫌気共生微生物系の共生機構は種間水素伝達だけでなく、種間ギ酸伝達の関与も推察されている(Wolin and Miller 1982; Thiele and Zeikus 1988)。しかしながら、後者については未だに直接的な証明が成されておらず、議論的となっている。本研究では、異なる基質資化性を有するメタン生成細菌と PB 株とを各々再構成することにより、2 種類の酢酸酸化共生微生物系を作成し、両者の生育速度、水素分圧、ギ酸濃度、および水素・ギ酸代謝に関与する酵素活性を測定、比較し、種間ギ酸伝達が存在しているか否かを明らかにすることを試みた。2 種類の共生微生物系のうちの1つは、酢酸酸化共生細菌 PB 株と水素・ギ酸資化可能なメタン生成細菌との共生微生物系(PB/TM 共生系)で、もう1つの共生微生物系は PB 株と水素資化能のみを有するメタン生成細菌を用いた共生微生物系(PB/ Δ H 共生系)を作成した。実験の結果、PB/TM 共生系の方が PB/ Δ H 共生系よりも5倍速く酢酸を分解可能であり、かつ、系内の水素濃度およびギ酸濃度も、PB/TM 共生系の方が遙かに低濃度に維持されていた。また、PB/TM 共生系を構成する各々の細菌の酵素活性を測定したところ、水素代謝酵素 Hydrogenase とギ酸代謝酵素 Formate dehydrogenase の活性が両者の細菌において検出された。これらの結果から、本共生微生物系における共生機構としては、種間水素伝達および種間ギ酸伝達の双方が働いている可能性が推察された。既知の酢酸酸化共生細菌における種間電子伝達の研究は、高温性酢酸酸化共生細菌 AOR 株のみ報告されている(Lee and Zinder 1988b)。AOR 株も PB 株と同様、基質資化性の異なる2種のメタン生成細菌との共生微生物系を構成可能であったが、その生育速度および水素濃度には差異が認められず、種間ギ酸伝達は成立していないと報告している。酢酸酸化共生微生物系における

共生機構に、種間ギ酸伝達が関与している可能性を示したのは本研究が初めてであった。

以上、本研究の結果、酢酸酸化共生微生物系の獲得、酢酸酸化共生細菌の生理学的性質、系統的性質の決定、代謝経路の同定、微生物間共生機構の解明など、酢酸酸化共生微生物系およびこれを構成する酢酸酸化共生細菌に関連する基礎的な知見を獲得することが出来た。しかしながら、酢酸酸化共生微生物系の研究に関しては未だに解明されていない点が多く存在している。例えば、酢酸酸化共生細菌のエネルギー獲得機構の解析、共生微生物系および単独培養系における遺伝子発現解析、嫌気リアクターや自然環境において酢酸酸化共生微生物系が果たす役割の解明等、多くの研究課題が考えられる。冒頭で述べたように、酢酸酸化共生微生物系の単離例は極めて少なく、更に、単離した共生微生物系の消失やハンドリング困難さに起因して、研究サンプルとして使用することが実質上極めて困難となっていた。本研究の過程で純粋分離された酢酸酸化共生微生物系は、比較的ハンドリングが容易であり、酢酸酸化共生微生物系の研究を行う上で最適なサンプルであると思われる。今後、本共生微生物系を用いることにより、上述したような酢酸酸化共生微生物系に関する研究が更に進展することが可能になるものと思われる。

謝辞

本論文は筆者が筑波大学大学院博士課程農学研究科応用生物化学専攻に在籍中に行った研究をまとめたものです。筑波大学応用生物化学系 祥雲弘文 教授には、研究の全般にわたり、御懇篤なご指導ご鞭撻を賜るだけでなく、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所および、ドイツ連邦共和国コンスタンツ大学生物学部における技術研修・共同研究の機会も頂戴いたしました。このような機会に恵まれましたのは、祥雲先生の暖かいご配慮があつてのものでした。心より深く感謝致します。筑波大学農林学系 柿蔭眞 教授、同大学応用生物化学系 小林達彦 教授、中村顕 助教授には、論文をまとめるにあたり貴重なご教示、ご助言を賜りました。ここに深く感謝致します。同大学応用生物化学系 高谷直樹 講師には多くの激励とご助言を頂きました。深く感謝の意を表します。生命工学工業技術研究所微生物機能部複合微生物研究室室長 金川貴弘 博士ならびに同研究室主任研究員 鎌形洋一 博士には、大変魅力的な研究課題を頂いたことから始まり、その実質的な研究の進め方から論文の作成まで、多大なご助力とご教示を賜りました。両博士のご助力がなければ本研究は完成し得なかったものと、ここに心より厚く御礼申し上げます。同研究所 統括研究調査官 中村和憲 博士、同研究員 花田智 博士、陶山哲志 研究員、重松亨 博士（現 熊本大学工学部助手）、鈴木利彦 博士、山田一隆 博士（現 株式会社環境エンジニアリング）、天知誠吾 博士（現 千葉大学園芸学部助手）、関口勇治 博士（現 長岡科学技術大学環境システム系助手）には、研究を行う上で欠かせない技術のご教示と多くのご助言を賜りました。ここに謹んで感謝致します。ドイツ連邦共和国コンスタンツ大学生物学部 Bernhard Schink 教授には、共同研究の機会を頂きました。その間、研究計画全般にわたる多大なご指導、ご教授を賜りました。また、研究のみならず余暇の過ごし方など、異国での生活、文化に触れる機会を頂くことにより、人間的に極めて貴重な経験をさせて頂きました。ここに深く感謝致します。筑波大学応用酵素学研究室の皆様、生命工学工業技術研究所の皆様をはじめとする関係各機関の方々には、研究のみならず、様々なご助力ご助言を賜りました。記して感謝致します。最後に常に健康に気遣い、励まして下さいました父母に感謝いたします。

引用文献

Auburger G, Winter J (1995) Isolation and physiological characterization of *Syntrophus buswellii* strain GA from a syntrophic benzoate-degrading, strictly anaerobic coculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:241-248

Baker HA (1936) On the biochemistry of methane fermentation. *Arch Mikrobiol* 7:404-419

Beaty PS, Ljungdahl LG (1991) Growth of *Clostridium thermoaceticum* on methanol, ethanol, or dimethylsulfoxide. In: American Society for Microbiology (ed), Abstracts, Ann Meet Am Soc Microbiol, Washington DC, K-131, p 236

Ben-Bassat A, Lamed R, Zeikus JG (1981) Ethanol production by thermophilic bacteria: metabolic control of end product formation in *Thermoanaerobium brockii*. *J Bacteriol* 146:192-199

Blaut M (1994) Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 66:187-208

Bleicher K, Winter J (1994) Formate production and utilization by methanogens and by sewage sludge consortia : interference with the concept of interspecies formate transfer. *Appl Microbiol Biotech* 40:910-915

Boone DR, Bryant MP (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 40:626-632

Boone DR, Johnson RL, Liu Y (1989) Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake. *Appl Environ Microbiol* 55:1735-1741

Brandis-Heep, Gebhardt A, Thauer RK, Widdel F, Pfennig N (1983) Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei* 1. Demonstration of all enzymes required for the operation of the citric acid cycle. *Arch Microbiol* 136:222-229

Bryant MP, J. WM, Wolfe RS (1967) *Methanobacillus omerianskii*, a symbiotic association of two

species of bacteria. Arch Mikrobiol 59:20-31

Caccavo FJR, Lonergan DJ, Lovley DR, Davis M, Stolz JF, McInerney MJ (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. Appl Environ Microbiol 60:3752-3759

Champine JE, Goodwin S (1991) Acetate catabolism in the dissimilatory iron-reducing isolate GS-15. J. Bacteriol 173:2704-2706

Collins MD, Jones D (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol Rev 45:316-354

Cord-Ruwisch R, Lovley DR, Schink B (1998) Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. Appl Environ Microbiol 64:2232-2236

Das A, Hugenholtz J, Halbeek vH, Ljungdahl LG (1989) Structure and function of a menaquinone involved in electron transfer in membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. J Bacteriol 171:5823-5829

Diekert G, Schrader E, Harder W (1986) Energetics of CO formation and CO oxidation in cell suspensions of *Acetobacterium woodii*. Arch Microbiol 144:386-392

Diekert G, Wohlfarth G (1994a) Energetics of acetogenesis from C1 units. In: Drake HL (ed) Acetogenesis. Chapman and Hall, New York, pp 157-179

Diekert G, Wohlfarth G (1994b) Metabolism of homoacetogens. Antonie van Leeuwenhoek 66:209-221

Dolfing J (1988) Acetogenesis. In: Zehnder AJB (ed) Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley and Sons, New York, pp 417-468

Dong X, Cheng G, Stams AJM (1994a) Butyrate oxidation by *Syntrophospora bryantii* in co-culture

with different methanogens and in pure culture with pentenoate as electron acceptor. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:647-652

Dong X, Plugge CM, Stams AJM (1994b) Anaerobic degradation of propionate by a mesophilic acetogenic bacterium in coculture and triculture with different methanogens. *Appl Environ Microbiol* 60:2834-2838

Dong X, Stams AJM (1995) Localization of the enzymes involved in H₂ and formate metabolism in *Syntrophospira bryantii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67:345-350

Felsenstein J (1985) Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791

Galouchko AS, Rozanova EP (1996) Sulfidogenic oxidation of acetate by a syntrophic association of anaerobic mesophilic bacteria. *Microbiology (English translation Mikrobiologia)* 65:134-139

Galushko AS, Schink B (2000) Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic coculture. *Arch Microbiol* 174:314-321

Gebhardt NA, Thauer RK, Linder D, Kaufers P-M, Pfennig N (1985) Mechanism of acetate oxidation to CO₂ with elemental sulfur in *Desulfuromonas acetoxidans*. *Arch Microbiol* 141:392-398

Harmsen HJM, Van Kuijk BLM, Plugge CM, Akkermans ADL, De Vos WM, Stams AJM (1998) *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48:1383-1387

Hattori S, Kamagata Y, Hanada S, Shoun H (2000) *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1601-1609

Heijthuisen JHFG, Hansen TA (1989) Selection of sulphur sources for the growth of *Butyrivacterium methylotrophicum* and *Acetobacterium woodii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:186-192

Heise R, Muller V, Gottschalk G (1992) Presence of a sodium-translocating ATPase in membrane vesicles of the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. Eur J Biochem 206:553-557

Hiraishi A (1992) Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. Lett Appl Microbiol 15:210-213

Imachi H, Sekiguchi Y, Kamagata Y, Ohashi A, Harada H (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

Ivey DM, Ljungdahl LG (1986) Purification and characterization of F₁-ATPase from *Clostridium thermoaceticum*. J Bacteriol 165:252-257

Jackson BE, Bhupathiraju VK, Tanner RS, Woese CR, McInerney MJ (1999) *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. Arch Microbiol 171:107-114

Jansen K, Fuchs G, Thauer RK (1985) Autotrophic CO₂ fixation by *Desulfovibrio baarsii*: demonstration of enzyme activities characteristic for the acetyl-CoA pathway. FEMS Microbiol Lett 28:311-315

Jansen K, Thauer RK, Widdel F, Fuchs G (1984) Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formate, carbon dioxide, carbon monoxide, and acetate assimilation by *Desulfovibrio baarsii*. Arch Microbiol 138:257-262

Kamagata Y, Mikami E (1989) Diversity of acetotrophic methanogens in anaerobic digestion. In: Hattori T, Ishida Y, Maruyama Y, Morita RY, Uchida A (eds) Recent Advances in Microbial Ecology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp 459-464

Kumar S, Tamura K, Nei M (1994) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. Comput Appl Biosci 10:189-191

Laanbroek HJ, Voogd IL (1982) Alcohol conversion by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. Arch Microbiol 133:178-184

Lee MJ, Zinder SH (1988a) Carbon monoxide pathway enzyme activities in a thermophilic anaerobic bacterium grown acetogenically and in a syntrophic acetate-oxidizing coculture. Arch Microbiol 150:513-518

Lee MJ, Zinder SH (1988b) Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. Appl Environ Microbiol 54:1457-1461

Lee MJ, Zinder SH (1988c) Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidize acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂/CO₂. Appl Environ Microbiol 54:124-129

Lide DR (1999) CRC Handbook of Chemistry and Physics: a ready-reference book of chemical and physical data, 80th. ed., CRC Press, Boca Raton.

Liu Y, Balkwill DL, Aldrich HC, Drake GR, Boone DR (1999) Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. Int J Syst Bacteriol 49:545-556

Ljungdahl LG (1980) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 40:415-450

Mackie RI, Bryant MP (1981) Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60 C. Appl Environ Microbiol 41:1363-1373

Matties C, Freiburger A, Drake H (1993) Fumarate dissimilation and differential reductant flow by *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium aceticum*. Arch Microbiol 160:273-278

McInerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov., sp.

nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 41:1029-1039

Meßmer M, Wohlfarth G, Diekert G (1993) Methyl chloride metabolism of the strictly anaerobic, methyl chloride-utilizing homoacetogen strain MC. *Arch Microbiol* 160:383-387

Mitchell P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Cambridge Philos Soc* 41:445-502

Mountfort DO, Asher RA (1978) Changes in proportions of acetate and carbon dioxide used as methane precursors during the anaerobic digestion of bovine waste. *Appl Environ Microbiol* 35:648-654

Mountfort DO, Brulla WJ, Krumholz LR, Bryant MP (1984) *Syntrophus buswellii* gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. *Int J Syst Bacteriol* 34:216-217

Roy F, Samain E, Dubourguier HC, Albagnac G (1986) *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch Microbiol* 145:142-147

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425

Schauder R, Eikmanns B, Thauer RK, Widdel F, Fuchs G (1986) Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch Microbiol* 145:162-172

Schauder R, Widdel F, Fuchs G (1987) Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*. *Arch Microbiol* 148:218-225

Schink B (1984) Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov., and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C₂ compounds. *Arch Microbiol*

Schink B (1985) Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. Arch Microbiol 142:295-301

Schink B (1991) Syntrophism among prokaryotes. In: Barows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (eds) The prokaryotes, 2nd edn. Springer Berlin Heidelberg, New York, pp 279-299

Schink B (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiol Mol Biol Rev 61:262-280

Schink B, Stieb M (1983) Fermentative degradation of polyethylene glycol by a new strictly anaerobic gram-negative nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. Appl Environ Microbiol 45:1905-1913

Schmidt JE, Ahring BK (1993) Effects of hydrogen and formate on the degradation of propionate and butyrate in thermophilic granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor. Appl Environ Microbiol 59:2546-2551

Schmidt JE, Ahring BK (1995) Interspecies electron transfer during propionate and butyrate degradation in mesophilic, granular sludge. Appl Environ Microbiol 61:2765-2767

Schnürer A, Houwen FH, Svensson BH (1994) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. Arch Microbiol 162:70-74

Schnürer A, Schink B, Svensson BH (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

Schnürer A, Svensson BH, Schink B (1997) Enzyme activities in and energetics of acetate metabolism by the mesophilic syntrophically acetate-oxidizing anaerobe *Clostridium ultunense*. FEMS Microbiol Lett 154:331-336

Schöcke L, Schink B (1998) Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase of *Syntrophus gentianae*, a syntrophic benzoate-degrading fermenting bacterium. Eur J Biochem 256:589-594

Seifritz C, Daniel S, Gößner A, Drake H (1993) Nitrate as a preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. J Bacteriol 175:8008-8013

Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, Ohashi A, Harada H (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

Slobodkin A, Reysenbach AL, Strutz N, Dreier M, Wiegel J (1997) *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a continental hot spring. Int J Syst Bacteriol 47:541-547

Spormann AM, Thauer RK (1988) Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfotomaculum acetoxidans*: Demonstration of enzymes required for the operation of an oxidative acetyl-CoA/carbonmonoxide dehydrogenase pathway. Arch Microbiol 150:374-380

Stams AJM (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie van Leeuwenhoek 66:271-294

Stieb M, Schink B (1985) Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. Arch Microbiol 140:387-390

Svetlitsnyi V, Rainey F, Wiegel J (1996) *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short- and long-chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. Int J Syst Bacteriol 46:1131-1137

Szewzyk U, Schink B (1989) Degradation of hydroquinone, gentisate, and benzoate by a fermenting bacterium in pure culture or defined mixed culture. Arch Microbiol 151:541-545

Tamaoka J, Katayama-Fujimura Y, Kurahashi H (1983) Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. J Appl Bacteriol 54:31-36

Tamaoka J, Komagata K (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 25:125-128

Thauer RK (1988) Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. *Eur J Biochem* 176:497-508

Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41:100-180

Thiele JH, Zeikus JG (1988) Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. *Appl Environ Microbiol* 54:20-29

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680

Wallrabenstein C, Gony N, Springer N, Ludwig W, Schink B (1995a) Pure culture of *Syntrophus buswellii*, definition of its phylogenetic status, and description of *Syntrophus gentianae* sp. nov. *System Appl Microbiol* 18:62-66

Wallrabenstein C, Hauschild E, Schink B (1995b) *Syntrophobacter pfennigii* sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. *Arch Microbiol* 164:346-352

Wasserfallen A, Nolling J, Pfister P, Reeve J, de Marcario EC (2000) Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfei* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:43-53

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for

phylogenetic study. J Bacteriol 173:697-703

Widdel F (1992) The Genus *Desulfotomaculum*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) The prokaryotes. 2nd edn. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, pp 517-533

Widdel F, Pfennig N (1977) A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) *acetoxidans*. Arch Microbiol 112:119-122

Wofford NQ, Beaty PS, McInerney MJ (1986) Preparation of cell free extracts and the enzymes involved in fatty acid metabolism in *Syntrophomonas wolfei*. J Bacteriol 167:179-185

Wolin MJ, Miller TL (1982) Interspecies hydrogen transfer: 15 years later. In ASM News:561-565

Zinder SH, Koch M (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. Arch Microbiol 138:263-272