

令和元年6月9日現在

機関番号：82626

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26106004

研究課題名（和文）冥王代類似環境微生物

研究課題名（英文）Hadean Eon Microbiome

研究代表者

鎌形 洋一（KAMAGATA, YOICHI）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究部門付

研究者番号：70356814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 188,900,000円

研究成果の概要（和文）：冥王代類似環境に棲息する微生物のメタゲノム解析、生理生態機能の解明を進めた。細胞密度が希薄な白馬ならびに米国の蛇紋岩熱水系から濃縮操作を経てゲノム解析に必要な微生物菌体を得た。大規模なメタゲノム解析により白馬ならびに米国蛇紋岩熱水系には未知門として知られているOD1やWS2など特異な微生物が主要構成集団であることが明らかとなった。また、エネルギー代謝に関しては、原始エネルギー代謝の中核を担っていたと考えられているWood-Ljungdahl経路ならびにその多様な変型代謝系が見出された。OD1を初めとする主要未知微生物のゲノム全体は極めて不完全で単独では生存が困難と思える解析結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命の最初の誕生場は地球深くに沈み込み地上にはもはや存在しない。それでも鉱物と水から生命誕生に必要な水素が生まれている地下熱水環境は少ないながらも現存しており、そうしたところに生存する現世の微生物のゲノム構造を解析したり、生理学的特徴を明らかにできれば、生命誕生の痕跡に触れることができるかもしれない。本研究はそうした人類の知的好奇心と想像力をかき立てるものである。また、生命を地球化学の反応から考察することは地球の歴史や生命の歴史を辿るばかりではなく、すべての生物反応は触媒反応である、という今日の化学工業やバイオテクノロジーの原点に直結する命題を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Serpentinization is a process by which water reacts with ultramafic mantle rock to produce serpentine, ultrabasic fluid, and H₂. Serpentinization should have been a common reaction on early earth and such geological settings are believed to be a cradle of life. The place where life emerged no longer exists, but the extant serpentinization site can be regarded as analog of such place. To trace the origin of life, microbial communities in serpentinization sites were analyzed using genome-centric approaches. Cells were harvested through filtration of water samples and used for further investigation. Meta-genomics revealed that the uncultivated microbes including the candidatus phyla OD1 and WS2 dominate the community. It also revealed the idiosyncrasy in their genome structures together with the presence of acetyl-CoA pathway, the primordial fashion of CO₂ fixation and energy metabolism. Our research will provide further insights into the life in the earliest era.

研究分野：環境微生物

キーワード：冥王代 生命の起源 生命の誕生場 蛇紋岩熱水系 未知未培養微生物 メタゲノム 嫌気性微生物
原始エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

原始的な生命が誕生した時期は、地球誕生から約 6 億年の間つまり 46 億年から 40 億年前の「冥王代」と考えられている。しかし、冥王代の岩石記録は現在の地球表層には残っておらず、地質学的試料が極めて乏しいため、冥王代の研究は、地球科学ではこれまで missing link とされてきた。生命科学においても、単純な分子から複雑な有機化合物や高次構造体を合成するボトムアップアプローチ「化学進化」と、原始的生命システムの誕生以降を扱うトップダウンアプローチ「生物進化」との間には missing link が存在する。これらの 2 つの missing link を克服するため、地球惑星科学と生命科学の学際融合研究を進め世界に先駆けて「冥王代生命学」を創成することとなった。

2. 研究の目的

豊富なエネルギー源としての水素が大量に発生する蛇紋岩熱水系を最も古い生命の揺りかごの場として捉え、現世において存在している長野県白馬八方の蛇紋岩熱水系ならびに米国カリフォルニア州 The Cedars の蛇紋岩熱水系の微生物の特性ならびにゲノム情報から、冥王代で誕生したであろう原始微生物 (LUCAs: Last Universal Common Ancestors) がどのようなものであったか、その痕跡に迫ることを目的とする。また、計画班を構成するインフォーマティクスの研究者を中心に、既存のすべての微生物ゲノム情報からどの遺伝子が生命維持に絶対的に必要であるかについて解析を行い、初期生命に必須だった遺伝子モジュールを明らかにする。さらに、人工膜に様々な遺伝子や膜タンパク質等を埋め込み、自律増殖的な疑似生命体を創成可能か否かの基盤実験を行う。

3. 研究の方法

白馬八方蛇紋岩熱水系においては原位置濾過システムを構築して、大量の地下熱水試料を大量濾過し、フィルター上に集めた微生物細胞から全 DNA 抽出・精製を実施した。抽出バイアスを抑えるよう改良したビーズ破砕法を用いて全 DNA を抽出・精製後、得られた微量 DNA を用いて、Illumina HiSeq 2500 による高速シーケンシングを実施し、約 70GB の良質な DNA 塩基配列データを取得した。ゲノムの再構築を試みた。具体的にはまず、SPAdes により DNA 配列断片群を重ね合わせて contig を得た。次に、Maxbin を用いて個々の微生物由来と考えられる contig を抽出し、それぞれのゲノムを高精度に再構築した。最後に、再構築に成功したゲノム情報をもとに、遺伝子機能予測を行うとともに、ゲノムワイドな分子系統解析を行うことで、同蛇紋岩熱水中の未知微生物群の系統的位置を特定するとともに、生理・生態特性の解析を実施した。大規模な系統解析、大規模遺伝子モジュール解析には各種汎用パイプラインを用いた。微生物の培養には嫌気性微生物を培養するための各種装置ならびに培地を用いた。

4. 研究成果

1) 蛇紋岩熱水系の環境ゲノム解析ならびに培養の試み

まず白馬八方蛇紋岩熱水系中には未培養の *Nitrospira* 門、未培養系統群 (candidatus phylum OD1) および未培養系統の *Actinobacteria* 門・*Firmicutes* 門などが優占的に存在していることを明らかにした (Fig.1)。次に白馬八方蛇紋岩熱水系細菌群の高品質なゲノム再構築を試みた。熱水系中の微生物細胞濃度は 10^3 cells/ml 程度と極めて低いため、大量の熱水試料を濃縮することによって微生物細胞の回収を行い、ここから全 DNA を抽出、環境ゲノム解析を実施した。その結果、未培養系統群 (OD1 や WS2) および未培養系統の *Actinobacteria* 門・*Firmicutes* 門をはじめとする白馬八方蛇紋岩熱水系細菌群の高品質なゲノムを再構築することに成功した。同様に The Cedars の環境ゲノム解析も進め多数のゲノム情報を

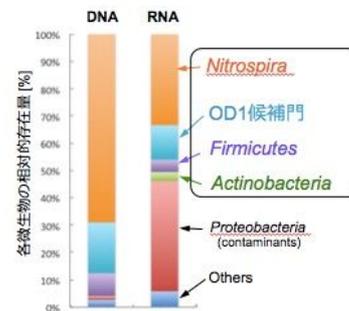


Fig. 1. 白馬熱水系における主要微生物構成

得た。その結果、驚くべき事に、OD 1を初めとするゲノムは著しく小さく (Fig. 2)、エネルギー代謝に関わる遺伝子のほとんどが見当たらないこと、解糖系の上流部分が見当たらないこと、アミノ酸合成遺伝子のほとんどが欠損していることなど、自律増殖が極めて困難な微生物群であることが明らかとなった。

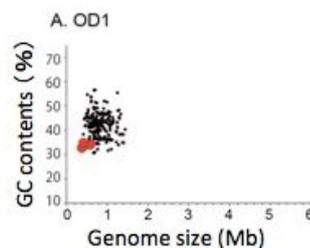
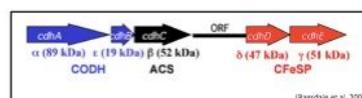


Fig. 2. Genome sizes of OD1

環境ゲノム解析として並行して進めた培養試験では、酢酸生成菌 (acetogen) や周辺微生物を標的として、 $H_2 + CO_2 \cdot Fe^{(0)}$ ・ギ酸・酢酸等を添加した集積培養系を設け、温度やpHも複数設定し、多数の培養条件下で集積培養を行った。しかしながら、一部の細菌で増殖を認めたものの継代培養には至らず、蛇紋岩熱水系の微生物はおしなべて高度に難培養であることが明らかになった。こうした結果は上述のような自律増殖が困難と思われるようなゲノム解析結果と整合するものであり、不完全なゲノムを相互に補うかのように微生物間共生による生存戦略が取られていることが強く示唆された。

2) 蛇紋岩熱水系微生物群集に広く見出された代謝系

上述のゲノム解析の結果から蛇紋岩水系には、多様な未知のacetogenが棲息している可能性が示唆された。多くの細菌群に、acetyl-CoA 経路 (Wood Ljungdahl 経路)ならびにこれに類似の経路の存在が認められた。興味深いことに、acetyl-CoA 経路を持つ系統的に異なる何れの細菌も、 CO_2 の固定 (CO_2 の初期還元、ならびに生成するCOとメチル基の縮合反応によるacetyl-CoAの生成) を担う鍵酵素CODH/ACS複合体のサブユニットがBacteria型と Archaea型の両方の遺伝子に由来するハイブリッド型であることが明らかになった (Fig. 3)。現在これらの遺伝子を完全人工合成し、他の微生物における発現実験によってその生化学的機能を検証しつつある。



α, β, ϵ : bacteria type
 γ, δ : archaea type

Fig. 3. CODH/ACS subunits ($\alpha - \epsilon$ subunits)

3) 初期生命における最小遺伝子モジュールの推定

細菌種を超えて保存されている必須遺伝子をバイオインフォマティクスにより同定した。初期生命体は現在のような堅牢な細胞壁構造は持たず、現世の微生物のL-formのような生命体と仮定した。その結果、同定した代謝経路はL-form細菌の維持に必須な中央代謝系、脂質合成系に加え、転写・翻訳・複製機構と細胞内外のイオン強度を制御するためのポンプが必須であることを判明し、少なくとも祖先細菌ではこうした遺伝子モジュールが使われていた可能性が高いことを示した (Fig. 4)。

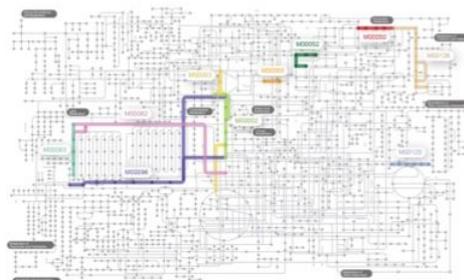


Fig. 4 Minimum metabolic modules

4) 人工生命体構築のための基盤実験

A02 班 (化学進化班) と共同で人工膜ベシクル内において試験管内脂質合成系を駆動させ細胞分裂を模倣できる可能性を検証する解析系を構築し検証作業を進めた。これまでに光駆動型 ATPase の合成が可能な人工膜系を初めて構築することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 40 件)

1. Suzuki, S., Kuenen, J.G., Schipper, K., van der Velde, S., Ishii, S., Wu, A., Sorokin, D.Y., Tenney, A., Meng, X-Y., Morrill, P.L., Kamagata Y., Muyzer, G. and Nealson, K.H. Physiological and genomic features of highly alkaliphilic hydrogen-utilizing Betaproteobacteria from a continental serpentinizing site. *Nature Communications* 5: e4900 (2014).
2. Kato S., Yoshida R., Yamaguchi T., Sato T., Yumoto I., Kamagata Y. The effects of elevated CO_2 concentration on competitive interaction between aceticlastic and

- syntrophic methanogenesis in a model microbial consortium. *Frontiers in Microbiology* 5: e575 (2014).
3. Yano M., Mori H., Akiyama Y., Yamada T., Kurokawa K., *BMC Bioinformatics* 15: e406 (2014).
 4. Kato, S., Yumoto I., and Kamagata Y.: Isolation of acetogenic bacteria that induce biocorrosion by utilizing metallic irons as the sole electron donor. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 67-73 (2015).
 5. Katayama, T., Yoshioka H., Muramoto Y., Usami J., Fujiwara K., Yoshida S., Kamagata Y., Sakata S. Physicochemical impacts associated with natural gas development on methanogenesis in deep sand aquifers. *ISME Journal* 9: 436-446 (2015).
 6. Kamagata, Y. Keys to cultivating uncultured microbes: elaborate enrichment strategies and resuscitation of dormant cells. *Microbes and Environments* 30: 289-290 (2015).
 7. Wang T., Mori H., Zhang C., Kurokawa K., Xing X.H., Yamada T. DomSign: a top-down annotation pipeline to enlarge enzyme space in the protein universe. *BMC Bioinformatics* 16: e96 (2015).
 8. Uchiyama T., Irie M., Mori H., Kurokawa K., Yamada T. FuncTree: Functional analysis and visualization for large-scale omics data. *PLoS One* 10: e0126967 (2015).
 9. Kohl L., Cumming E., Cox A., Rietze A., Morrissey L., Lang Q. S., Richter A., Suzuki S., Nealson K. H., Morrill L. P. Exploring the metabolic potential of microbial communities in ultra-basic, reducing springs at The Cedars, CA, USA: Experimental evidence of microbial methanogenesis and heterotrophic acetogenesis. *Journal of Geophysical Research* 121: 1203-1220 (2016).
 10. M. T. Akiyama, Oshima T., Chumsakul O., Ishikawa S., Maki, H. Replication fork progression is paused in two large chromosomal zones flanking the DNA replication origin in *Escherichia coli*. *Genes to Cells* 21: 907-914 (2016).
 11. Takezaki N., Nishihara H. Resolving the phylogenetic position of Coelacanth: The closest relative is not always the most appropriate outgroup. *Genome Biology and Evolution* 8: 1208-1221 (2016).
 12. Mayumi D., Mochimaru H., Tamaki H., Yamamoto K., Yoshioka H., Suzuki Y., Kamagata Y., Sakata S. Methane production from coal by a single methanogen. *Science* 354: 222-225 (2016).
 13. Marques J. M., Neves M. O., Miller A. Z., Rocha C., Vance S., Christensen L., Etiope G., Carreira P. M., Suzuki S. Water-rock interaction ascribed to hyperalkaline mineral waters in the Cabeço de Vide serpentinized ultramafic intrusive massif. *Procedia Earth and Planetary Science* 17: 646-649 (2017).
 14. Suzuki S., Ishii S., Hoshino T., Rietze A., Tenney A., Morrill P. L., Inagaki F., Kuenen J. G., Nealson K. H. Unusual metabolic diversity of hyperalkaliphilic microbial communities associated with subterranean serpentinization at The Cedars. *ISME Journal* 11: 2584-2598 (2017).
 15. Mori H., Maruyama T., Yano M., Yamada T., Kurokawa K. VITCOMIC2: Visualization tool for the phylogenetic composition of microbial communities based on 16S rRNA gene amplicons and metagenomic shotgun sequencing. *BMS Systematic Biology*. 12

16. Suzuki S., Neelson K. H., Ishii S. Genomic and in-situ transcriptomic characterization of the candidate phylum NPL-UPL2 from highly alkaline highly reducing serpentized groundwater. *Frontiers in Microbiology* 9: 646-649 (2018).
 17. Higashi K., Kawai Y., Baba T., Kurokawa, K., Oshima, T. Essential cellular modules for the proliferation of the primitive cell. *Geoscience Frontiers* 9 (2018).
 18. Mariscal, A.M., Kakizawa, S., Suzuki, Y. *et al.* Tuning Gene Activity by Inducible and Targeted Regulation of Gene Expression in Minimal Bacterial Cells. *ACS Synthetic biology* 7: 1538-1552 (2018).
 19. 戎崎俊一, 西原秀典, 黒川顕, 森宙史, 鎌形洋一, 玉木秀幸, 中井亮佑, 大島拓, 原正彦, 鈴木鉄兵 原子炉間欠泉に駆動された冥王代原初代謝経路 地学雑誌 *in press* (2019).
 20. 馬場知哉, 柿澤茂行, 森宙史, 車兪澈, 黒川顕, 大島拓. 最小ゲノム：細胞が生きるために必要な遺伝子数はいくつか？ 地学雑誌 *in press* (2019).
- ほか

〔学会発表〕(招待講演 計40件)

1. 鈴木志野, Shunichi Ishii, Yuichi Hanada, Lina J. Bird, J. Gijs Kuenen, Kenneth H. Neelson. Comparative genomics identifies *Serpentinomonas* adaptation to the calcium-rich highly-alkaline serpentizing ecosystem. *Extremophiles* 2016 2016年9月15日 京都大学
2. 柿澤茂行 Tuning gene activity by inducible and targeted regulation of gene expression in minimal bacterial cells. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. 2018年7月19日 Portsmouth, USA.
3. 鎌形洋一 Cultivation-dependent studies in microbial ecology (plenary talk). International Society for Microbial Ecology. 2018年8月17日 Leipzig, Germany.

ほか

〔図書〕(計3件)

1. Narihiro, T. and *Y. Kamagata : Anaerobic cultivation. *In: Manual of Environmental Microbiology* 4th edition (Edited by Marylynn Yates). American Society of Microbiology. 2-1-2 12pp (2016).

ほか

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：情報処理システム、情報処理方法、及びプログラム

発明者：黒川顕、東光一、森宙史

権利者：同上

種類：特許

番号：2017-012340

出願年：2017年

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：玉木秀幸

ローマ字氏名：Hideyuki Tamaki

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：生物プロセス研究部門

職名：主任研究員

研究者番号(8桁): 00421842

研究分担者氏名：柿澤茂行
ローマ字氏名：Shigeyuki Kakizawa
所属研究機関名：産業技術総合研究所
部局名：生物プロセス研究部門
職名：主任研究員
研究者番号（8桁）：10588669

研究分担者氏名：鈴木志野
ローマ字氏名：Shino Suzuki
所属研究機関名：海洋研究開発機構
部局名：高知コア研究センター
職名：主任研究員
研究者番号（8桁）：10557002

研究分担者氏名：大島拓
ローマ字氏名：Taku Ohshima
所属研究機関名：富山県立大学
部局名：工学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50346318

研究分担者氏名：西原秀典
ローマ字氏名：Hidenori Nishimura
所属研究機関名：東京工業大学大学院
部局名：生命理工学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：10450727

研究分担者氏名：黒川顕
ローマ字氏名：Ken Kurokawa
所属研究機関名：国立遺伝学研究所
部局名：情報研究系
職名：教授
研究者番号（8桁）：20343246

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森宙史
ローマ字氏名：Hiroshi Mori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。