

令和元年6月17日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05886

研究課題名（和文）高感度同位体追跡と分離培養で拓く地下圏炭素・エネルギー動態の基軸をなす新生物機能

研究課題名（英文）Novel microbial metabolism responsible for the carbon flux in deep subseafloor sediments as revealed by isolation and stable isotope probing

研究代表者

堀 知行 (Hori, Tomoyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：20509533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,700,000円

研究成果の概要（和文）：研究では、深度の異なる15の海底コア堆積物試料を微生物接種源に用い、結晶性酸化鉄とメタンまたは酢酸を基質とした長期間集積培養を行った。その集積過程を次世代シーケンサーにより網羅的に明らかにするとともに、エネルギー順位の高い溶解性鉄やその他電子受容体基質を用いた二段目培養を適用することで、ナノマグネタイト蓄積が観察された深度付近からFirmicutes門に属する2種の鉄還元菌の分離培養に成功した。このことは、海底下深部の炭素循環に結晶性酸化鉄還元微生物が密接に関与していることを強く示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で標的とする炭素化合物「メタンおよび酢酸」と地球第4位の構成元素「鉄」は地球上最大の根源物質であるため、その代謝に関わる未知微生物群の実体解明は、地下圏の生命活動全体を紐解くことに直結する。陸域土壌からよく検出されるDeltaproteobacteria綱に属する鉄還元・酢酸酸化菌が地下深部からは取得されなかったことから、海底下では陸上圏とは異なる結晶性酸化鉄の還元機構が存在していることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, the anaerobically methane-oxidizing and acetate-oxidizing iron reducers were enriched from 15 different deep subseafloor core sediments with crystalline iron oxides as electron acceptors. The enrichment process was monitored by high-throughput sequencing. The obtained enrichment cultures were transferred to energetically favorable media including soluble Fe(III) or the other electron acceptors, resulting in the successful isolation of two species of the iron-reducing Firmicutes bacteria. This indicates that the acetate-oxidizing crystalline iron (III) reducers were responsible for the carbon flux in the deep subseafloor sediments.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境分析 深海環境 地球化学 環境 微生物

## 1. 研究開始当初の背景

地下深部掘削および微生物生態学の進展により、地球内部に広がる地殻には多種多様な未知微生物群が圧倒的なバイオマス量で生き続けていることが明らかになってきた。申請者らに乗船研究員として実施された統合国際深海掘削計画第 337 次研究航海 (IODP337)「下北八戸沖石炭層生命圏掘削」によって、海底下 2.5km の大深度に至るまで微生物生命圏が存続し、特に石炭層付近において生物学的メタン生成が活発に起こっていることが強く示唆された。これにより、地下生命圏において「高次有機物が生物学的にメタン・CO<sub>2</sub>に変換される」という炭素・エネルギーの流れが推定された。このうち H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>からの生物学的メタン生成は、比較的よく特徴づけられている。また高次有機物から低級脂肪酸への分解は、微生物の発酵的代謝によると考えられ、エネルギーの乏しい地下圏でも十分に起こり得る。しかしながら、「メタン」および「低級脂肪酸 (特に酢酸)」の分解機構やそれに関与する地下微生物群については、ほとんど知られていない。

近年、メタンおよび酢酸の嫌気分解研究が活発化し、多くの知見が集積されてきた。これまでに嫌氣的メタン酸化は、無機電子受容体 (硫酸、硝酸、亜硝酸) の還元反応とカップリングし進行することが分かっている。一方、酢酸に関しては、陸域の嫌気土壌においてそのほとんどが酢酸資化性メタン生成菌によってメタンへと変換されることが知られている。メタンおよび酢酸の嫌氣的酸化とカップリングする第一の電子伝達機構 (還元反応) は「地下圏に豊富に存在する鉄鉱物への電子伝達 (結晶性酸化鉄の還元)」が有力である。実際に、IODP337 で掘削した地下深部においてナノ結晶性酸化鉄が高濃度で検出されている。さらに、嫌氣的メタン酸化と鉄還元のカップリングの可能性についても近年多く報告されている。これらの微生物新機能は、鉄鉱物を豊富に含む地下深部でこそ重要である可能性が高く、嫌氣的なメタン酸化および酢酸酸化とナノ結晶性酸化鉄生成を同時に実現可能にする代謝駆動力として働いている可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究は、未だ実体の明らかでない「地下圏炭素・エネルギー動態の基軸をなす未知微生物群 (鉄還元とカップリングする嫌氣的メタン酸化菌と嫌氣的酢酸酸化菌)」を、分離培養法と高感度 Stable Isotope Probing (SIP)、次世代シーケンサーによる大規模遺伝子解読とを有機的に組み合わせることで明らかにし、それらの微生物新機能の解明を通して、地下生命圏で進行しつつあるメタンハイドレート形成やナノ結晶性酸化鉄生成などの物質ダイナミクスの本質的理解を目指すものである。

## 3. 研究の方法

地下微生物-鉄鉱物相互作用を利用した集積・分離培養法に加え、未培養微生物機能同定法「高感度 SIP」と次世代シーケンサーを用いた大規模遺伝子解読を組み合わせ活用することで、地下圏炭素・エネルギー動態の中核微生物群の種類・分布・新機能を解明する。

海底地下コア試料の単位体積あたりの微生物数は、海底下深度 10 m から 1km の範囲においては陸上土壌の 3 から 5 オーダー少ない値で存在するが、国際深海掘削 IODP337 で取得した大深度コア試料 (1km から 2.5km) ではさらにその値が激減する。得られる微生物菌体量の乏しさを打開するために、解析スケールや分析感度を上げるのはもちろんであるが、本研究では海底地下試料を直接解析するのではなく、第一ステップとして地下圏微生物-鉄鉱物相互作用を利用した微生物集積培養系を構築する。

地下微生物と鉄鉱物の電子伝達の際に形成される相互作用を利用する。すなわち、長い年月をかけて微生物が付着した結晶性酸化鉄を接種源として利用し、長期間の継代培養を行う。さらに次世代シーケンサーを用いた微生物の大規模同定技術により、稀少種としての存在が想定される嫌氣的メタン酸化菌を、優占種である嫌氣的酢酸酸化細菌の中から見出す。前者の培養系では、標的の嫌氣的メタン酸化菌が炭酸固定により一旦増殖してしまえば、その死細胞等を炭素源とする嫌氣的酢酸酸化細菌による鉄還元が進行すると予想される。そこで、メタン培養系 (嫌氣的メタン酸化菌+嫌氣的酢酸酸化細菌) と酢酸培養系 (嫌氣的酢酸酸化細菌のみ) の構成微生物種の比較により、メタン培養系のみで検出される微生物を嫌氣的メタン酸化細菌候補として抽出する。さらに、得られた高度集積系内において、微生物が長い年月をかけて付着した結晶性酸化鉄を接種源として、エネルギー順位の高い溶解性鉄やその他電子受容体基質を用いた二段目培養を実施することにより、標的微生物の取得を試みる。

一方、得られたメタン培養系や酢酸培養系に対して高感度 SIP を適用すべく、高感度 SIP を環境試料へと適用し、本手法が未知微生物機能の高感度同定に有効であることを示す。

## 4. 研究成果

鉄鉱物が豊富な海底地下圏における「鉄還元とカップリングする嫌氣的メタン酸化菌と嫌氣的酢酸酸化菌」を探索すべく、国際深海掘削計画 (IODP) 第 337 次研究航海「下北八戸沖石炭

層生命圏探査」に乗船研究者として参画した。これまでに海底下約 2.5km までの地球深部に微生物細胞が存在し、現場の有機物が微生物により分解され、さらにメタン生成が第一の最終電子受容プロセスであることが示されている。一方で、同堆積物を対象とした地球化学的データによると、ある特定の海底下深度において生物活動由来と思われるナノマグネタイトが高濃度で検出され、結晶性酸化鉄還元が地下深部の最終電子受容プロセスの一端を担っていることが強く示唆された。

本研究では、深度の異なる 15 の海底コア堆積物試料と対照試料（陸域土壌試料）を微生物接種源に用い、結晶性酸化鉄とメタンまたは酢酸を基質とした長期間集積培養を行った。その結果、一部の集積系で結晶性酸化鉄の還元による色の変化が観察された。次世代シーケンサーを用いて微生物種を大規模に同定した結果、メタン培養系では、鉄還元型の嫌氣的メタン酸化菌として 2016 年に報告された *Methanosarcinales* 目アーキアに加えて、*Nitrospira* 門に属する新規細菌が優占化することを見出した。また酢酸培養系では、*Firmicutes* 門に属するこれまでに鉄還元能が報告されていない複数種の細菌が集積されていることが明らかになった。これらの標的微生物群を分離培養するため、集積度の高い培養系を対象として、エネルギー順位の高い電子受容体基質である溶解性鉄を用いた培地による限界希釈培養を行った。さらに、その他の考えられる高エネルギー順位の電子受容体基質（硝酸、亜硝酸、硫酸）、または酢酸以外の電子供与体基質（糖類）による限界希釈培養条件を適用した。次世代シーケンサー解析を用いて、その集積度を追跡したところ、標的微生物が相対存在量の 80%以上を占める高度集積系の存在が確認された。最終的に、ナノマグネタイト蓄積が観察された深度付近から *Firmicutes* 門に属する 2 種の鉄還元・酢酸酸化菌の分離培養に成功した。これにより、海底下深部の炭素循環に結晶性酸化鉄還元微生物が密接に関与していることが強く示唆された。陸域土壌試料から多く検出された *Deltaproteobacteria* 綱に属する鉄還元・酢酸酸化菌が地下深部からは取得されなかったことから、海底下では陸上とは異なる結晶性酸化鉄の還元機構が存在していることが推察された。

一方で、高感度 SIP を環境試料に適用し、難分解性物質の分解に関与する未知微生物の同定に成功した。これにより、地下微生物機能の高感度解析のための基盤整備を行った。現在、海底下の結晶性酸化鉄の微生物還元をより直接的に証明するため、海底コア堆積物試料自体に  $^{13}\text{C}$ -酢酸と結晶性酸化鉄を投入し、内在する微生物による  $^{13}\text{C}$ -酢酸の酸化分解および  $^{13}\text{C}$  取り込みの高感度検出を試みている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Aoyagi T, Morishita F, Sugiyama Y, Ichikawa D, Mayumi D, Kikuchi Y, Ogata A, Muraoka K, Habe H, Hori T. Identification of active and taxonomically diverse 1,4-dioxane degraders in a full-scale activated sludge system by high-sensitivity stable isotope probing. *ISME J.* 12(10):2376-2388. 2018 (査読有)  
DOI: 10.1038/s41396-018-0201-2.
- ② Aoyagi T, Koike H, Morita T, Sato Y, Habe H, Hori T. Draft Genome Sequence of *Geobacter pelophilus* Strain Dfr2, a Ferric Iron-Reducing Bacterium. *Genome Announc.* 5(24). 2017 (査読有)  
DOI: 10.1128/genomeA.00537-17.
- ③ Fang J, Kato C, Runko GM, Nogi Y, Hori T, Li J, Morono Y, Inagaki F. Predominance of Viable Spore-Forming Piezophilic Bacteria in High-Pressure Enrichment Cultures from ~1.5 to 2.4 km-Deep Coal-Bearing Sediments below the Ocean Floor. *Front Microbiol.* 8:137. 2017 (査読有)  
DOI: 10.3389/fmicb.2017.00137.
- ④ Ihara H, Hori T, Aoyagi T, Takasaki M, Katayama Y. Sulfur-Oxidizing Bacteria Mediate Microbial Community Succession and Element Cycling in Launched Marine Sediment. *Front Microbiol.* 8:152. 2017 (査読有)  
DOI: 10.3389/fmicb.2017.00152.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 結晶性酸化鉄の微生物還元とその地球炭素循環との関わり、堀知行、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ② Tracing interspecies carbon transfer of sulfur-oxidizing bacterial communities in deposited marine sediments by ultra-high-sensitivity stable isotope probing of rRNA、青柳 智、Navarro R. Ronald、眞弓 大介、羽部 浩、片山葉子、高崎みつる、堀知行、16th International Symposium on Microbial Ecology、2016
- ③ Isolation of sulfur-oxidizing bacteria playing the critical role in element cycling in tsunami sediment under aerobic conditions、猪原 英之、堀知行、高崎みつる、片山葉子、16th International Symposium on Microbial Ecology、2016

- ④ Ultra-high-sensitivity rRNA-SIP reveals nitrate-driven metabolic interaction of sulfur-oxidizing bacterial communities in deposited marine sediments、青柳 智、Navarro R. Ronald、眞弓 大介、羽部 浩、片山葉子、高崎みつる、堀 知行、11th International Congress on Extremophiles、2016

[図書] (計2件)

- ① 高感度 Stable Isotope Probing (SIP)による廃水処理槽内の1,4-ジオキサン分解菌の同定、青柳 智、森下史朗、杉山豊、市川大輔、眞弓 大介、菊池 義智、尾形 敦、村岡健次、羽部 浩、堀 知行、「環境と測定技術」46巻2号、pp.17-27、2019
- ② 廃水中の難分解性1,4-ジオキサンを分解する未知微生物群の動態、青柳 智、羽部 浩、尾形 敦、堀 知行、「バイオサイエンスインダストリー協会」77巻1号、2019

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/emri/114envmicrob/index.html>

※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。