

令和元年6月20日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14647

研究課題名(和文) 蛇紋岩水系地下生命圏に生息する未知微生物群の代謝解明

研究課題名(英文) Metabolic diversity in serpentized ecosystem

研究代表者

鈴木 志野 (Suzuki, Shino)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・特任主任研究員

研究者番号：10557002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛇紋岩化反応反応は、岩石-水反応であり、この反応により、強アルカリ超還元的な湧水が作られる。これまでに培養例もゲノム情報も登録されていなかったNPL-UPA2門に属する微生物が、複数の蛇紋岩化反応サイトで確認された。その一つである米国The Cedarsで確認されたNPL-UPA2門の微生物のゲノム情報を決定し、Unc8名付けた。このUnc8は Wood-Ljungdahl (WL) 経路を有する酢酸生成菌であると推定されたが、ヒドロゲナーゼの欠損が見られたため、水素ではなく、このゲノムから推定するに、一酸化炭素によるエネルギー代謝を行っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

橄欖岩-水の反応で作られる水素は、その環境に生きる生命の重要なエネルギー源となりうる。この反応は初期地球では現在より多く起きていたこと、そして、超塩基性岩は、宇宙空間にも多く存在することなどが推定されているため、単に環境微生物学領域のみならず、アストロバイオロジーや初期生命研究にも大きく貢献するものである。現存する類似環境には、その進化の過程で最適化したエネルギー代謝を有する者が生き残っているはずである。この類似環境に生きる生命のもつ特異な代謝システムが明らかになったことは、時空間を超えた生命のハビタビリティの理解の拡大につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Serpentinization is a water-rock reaction to produce a highly alkaline fluid, and hydrogen. The MAG of the phylum NPL-UPA2, named Unc8, is about 1 Mbp and its biosynthetic properties suggest it is capable of independent growth. With regard to energy metabolism, the MAG of Unc8 encodes all enzymes for Wood-Ljungdahl (WL) pathway, a ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) and electron carriers for flavin-based electron bifurcation (Etf, Hdr). Furthermore, the transcriptome of Unc8 in the waters of The Cedars showed enhanced levels of gene expression in the key enzymes of the WL pathway, which indicated that the Unc8 is an acetogen. However, the MAG of Unc8 encoded no well-known hydrogenase genes, suggesting that the energy metabolism of Unc8 might be focused on CO as the carbon and energy sources for the acetate formation. Given that CO could be supplied via abiotic reaction associated with deep subsurface serpentinization, CO-associated metabolism could provide advantageous approach.

研究分野：環境微生物

キーワード：メタゲノム メタトランスクリプトーム 極限微生物 蛇紋岩化反応

1. 研究開始当初の背景

マントル起源の超塩基性岩（橄欖岩など）が隆起している場合、地下圏において、地球表面の水と反応し、蛇紋岩に変質する。この反応は、蛇紋岩化反応と呼ばれている。この岩と水の反応により、高濃度の水素、そして、メタン、カルシウムイオン、および水酸化イオンなどが生成、放出されるため、この反応が活発に起きている水圏は、自然界で最も高い pH を示し、また、非常に還元性であるという特徴を持つ。米国 The Cedars 蛇紋岩水系も、地下の蛇紋岩化反応に支えられたサイトであり、pH=11~12.5、Eh=-550 mV~-900 mV の強アルカリ超還元水を有する。

橄欖岩-水の反応で作られる水素は、その環境に生きる生命の重要なエネルギー源となりうる。この反応は初期地球では現在より多く起きていたこと、そして、超塩基性岩は、宇宙空間にも多く存在することなどが推定されているため、単に環境微生物学の研究者のみならず、アストロバイオロジーや生命の誕生に関連する研究者も蛇紋岩化反応サイトに生きる生命の研究を行っている。特に、それらの環境における生命のエネルギー代謝についての理論研究が多くなされており、蛇紋岩化反応湧水と生命のエネルギー代謝については、メタン菌や硫酸還元が優位であるといった説も提唱されている。

近年、研究代表者は The Cedars を対象とした研究で、蛇紋岩湧水は強アルカリ・超還元性であることに伴う様々な理由により生命活動が困難で、限られた数の微生物しか存在しないこと、そして、The Cedars 強アルカリ湧水中から 79 の微生物ゲノムを回収し、解析した結果、この環境の最優占種は生合成系、呼吸系を著しく欠損した真正細菌で、その代謝は現在の人知では説明つかないこと、メタン菌、硫酸還元菌はほとんど存在しないことなどを突き止めた（一部本研究成果）。つまりこれは、実環境においては、生命は我々の理論で想定されたものとは異なる様式で生命活動を営んでいることを意味し、同時に現地球においても蛇紋岩化反応に依存した生命の理解が未熟であることを示した。

2. 研究の目的

これまでの The Cedars 蛇紋岩水系を対象とした研究から、この環境において、ゲノムにコードされる遺伝子セットだけでは、どのようにその生命が営まれているのかの仮説を立てることすら困難な、異質な構造をもつ生命体が多く存在することを突き止めた。よって、本研究ではこの水系に優占的に存在する微生物群を対象とし、メタトランスクリプトミクスを用い、それらの微生物の利用し得る基質と微生物の関連性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、蛇紋岩水系に存在する微生物群集のメタトランスクリプトミクスを行い、さらに、ゲノム・ビニング法により再構築された個々の微生物のゲノム情報に当てはめることで、この環境中のどの微生物が、どのような遺伝子発現挙動を行っているのかを明らかにした。

4. 研究成果

(1) NPL-UPA2 の分布と蛇紋岩反応サイトにおける NPL-UPA2 のゲノム比較

The Cedars の 2 つの泉のメタゲノムデータから、ゲノム・ビニングを行い、79 のゲノムの再構築に成功した。そのうち、未培養でゲノム情報も一切決定されていない NPL-UPA2 に属する MAG を Unc8 と名付けた。Mate-Pair によりさらに塩基配列を決定し、Unc8 の MAG の完成度を高めた。その結果、得られた MAG は、24 個のコンティグから構成され、ゲノムサイズは 996215bp、CheckM により推定されたゲノム完成度は 87.6% であった。

NPL-UPA2 門は蛇紋岩化反応サイトのほか、海洋堆積物、深海の嫌気性ブレイン、地殻水などに存在することが明らかとなっている。よって、浅水性蛇紋岩化反応サイトであるニューカレドニア・Prony Bay のメタゲノムと Unc8 (米国 The Cedars 由来) とを比較した。その結果、非常に類似したゲノム構造を有す

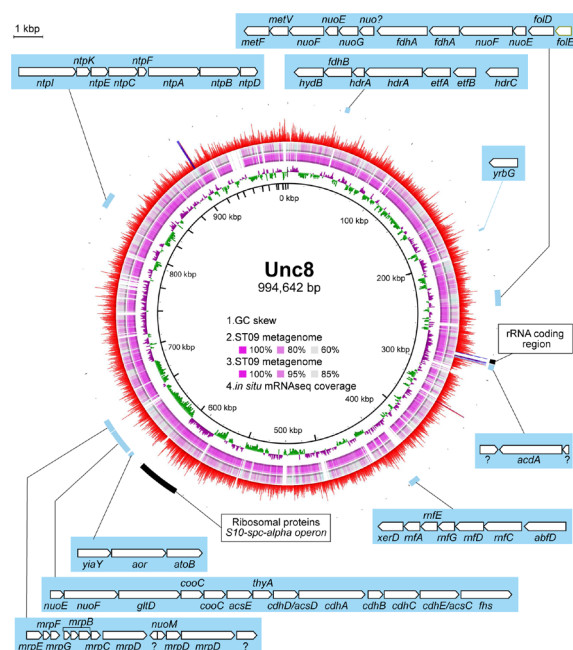


Fig. 1 Unc8 と Prony Bay メタゲノムとの比較解析
重要な遺伝子を青色でハイライトした。Prony Bay メタゲノムを異なる Similarity cut off で比較した。その結果、両サイトには、ゲノム構造が非常に類似した微生物が存在することが明らかになった。

る微生物が Prony Bay にも存在することが示された。

(2) Unc8 の機能性遺伝子

Unc8 のゲノムは約 1Mbp と真正細菌の中では比較的小さいが、アミノ酸、核酸、脂質、糖、ペプチドグリカンなどの合成経路をすべて有している。よって、自立的生命であると推定された。また、リン酸 (PstABCs)、鉄 (FepBDC)、タンゲステン (TupABC)、コバルト・ニッケル (CbiOQML) を輸送するための ABC トランスポーターをコードしていた。またカルシウムとナトリウムのアンチポーター (YrbG)、カリウムの取り込みシステム (TrkAH)、マグネシウム トランスポーター (MgtE)、ナトリウム・プロトンアンチポーター

(MrpEFGBBBCD, MrpDD) が存在することが分かった (Fig. 2)。Mrp は、細胞内 pH を維持するために重要なタンパク質であることが知られているため、これは、この強アルカリ環境で、重要な役割を果たす可能性がある。多様な無機イオンのトランスポーターをコードするのに対し、他のトランスポーターは 3 つしかコードせず (basic amino acid/polyamine antiporter, biopolymer transport protein, glycoside/pentoside/hexuronide:cation symporter)、このことは、有機・無機の炭素を外界から取り込むことが困難な生命であると示唆された。このことは、イオン物質ではなく、透過性物質 (ガスなど) をエネルギー源、炭素源として利用している可能性が示唆された。また、嫌気性であろうとも、現地球に生きるほぼすべての生命は、酸素ストレス耐性関連遺伝子 (カタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼ) をコードすることが知られているが、Unc8 はそれをコードしていないことが分かった。このことは、この Unc8 様生命が超還元的環境から見出されたことと関連するかもしれない。

Unc8 が可能なエネルギー代謝は、非常に限られている。少なくとも、TCA サイクル、最終電子受容体の還元酵素 (例えば、シトクローム・オキシダーゼ、硫酸還元酵素、硝酸還元酵素など)、電子伝達系といった遺伝子もっていない。よって、いわゆる「呼吸」はできない。また、グルコースのトランスポーターも

なく、環境中にも糖が存在しにくい環境であることから、解糖系を用いた糖発酵も難しい可能性が高く、実際、ほとんど遺伝子発現が見受けられない。また、アミノ酸のトランスポーター

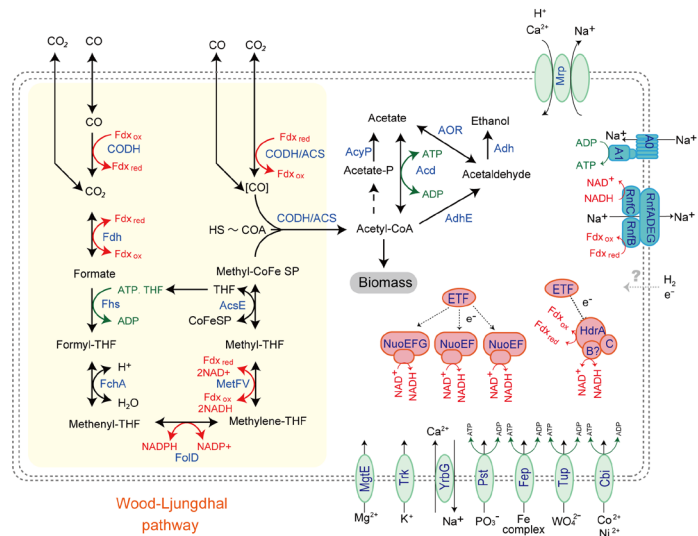


Fig. 2 Unc8 のエネルギー代謝

略称は以下の通り。CODH-Carbon monoxide dehydrogenase, Fdh-Formate dehydrogenase, Fhs-Formyl-THF synthase, Fch-Formyl-THF cyclohydrolase, FdD-Methylene-THF dehydrogenase, MetFV-Methylene-THF reductase, AcsE-Methyltransferase, CODH/ACS-Carbon monoxide dehydrogenase/Acetyl-CoA synthase complex, AcyP-Acylphosphatase, Acd-ADP forming Acetyl-CoA synthetase, Adh-Alcohol dehydrogenase, Nuo-NADH-quinone oxidoreductase, ETF-Electron transfer flavoprotein, HdrABC-Heterodisulfide reductase, Mrp-Multiple resistance and pH antiporter, A1AO-ATPase, an Archaeal type ATPase, Rnf-proton/sodium-translocating ferredoxin-NAD:oxidoreductase complex, MgtE-Magnesium transporter, Trk-Potassium uptake system, YrbG-Ca²⁺/Na⁺ antiporter, Pst-ABC-type Phosphate transporter, Fep-Iron transporter, Tup-Tungstate transporter, Cbi-Cobalt/Nickel transporter.

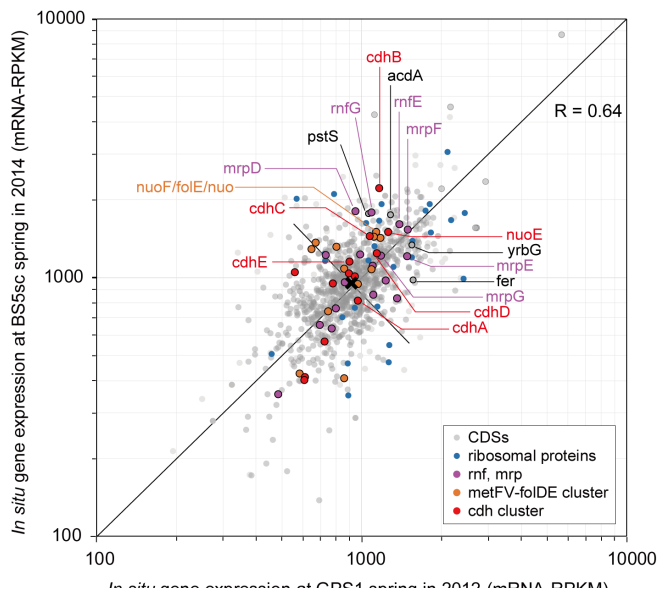


Fig. 3 The Cedars における Unc8 の遺伝子発現プロット

GPS1 と BS5sc の二つの泉における各々の遺伝子の遺伝子発現プロットを示した。酢酸生成に関連する重要な遺伝子は、色付けした。そのほかの遺伝子は灰色でプロットした。

も見当たらず、アミノ酸発酵も難しい可能性が高い。

Unc8 は Wood-Ljungdahl 経路 (還元のアセチル CoA 経路、WL 経路) を持つことから、酢酸生成によりエネルギー代謝がなされていると推定された。また、ATP 合成酵素があり、Rnf 遺伝子 (proton/sodium-translocating ferredoxin-NAD:oxidoreductase complex) や Mrp タンパクをコードすることから、WL 経路で作られる還元型のフェレドキシンや NADH を利用し、膜電位を作り、ATP 産生を行っていると考えられた。そして、遺伝子発現からもこの経路を用いている可能性が高いことが示された (Fig. 3)。しかしながら、Unc8 は既知のヒドロゲナーゼを一切コードしていないことが明らかとなり、この WL 経路を動かすための還元力が水素ではないことが示唆された。一般に酢酸生成菌の主なエネルギー代謝は、水素と二酸化炭素から酢酸を作ることと考えると考えられている ($4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($\Delta G_0 = -95 \text{ kJ/mol}$)) が、ヒドロゲナーゼをコードしていないということは、水素を利用できないことを示唆している。高濃度水素を含む環境において、水素を利用できない酢酸生成菌の存在は、一見矛盾をはらむように見える。一つの仮説としては、これまでの研究で、多くの蛇紋岩化反応サイトでは、フィッシャー・トロプシュ型の反応により、非生物学的にメタンが作られる可能性が示唆されているが、このプロセスの中間代謝産物として、一酸化炭素を作ると考えられている。もし、Unc8 のエネルギー代謝は一酸化炭素が駆動している ($4 \text{ CO} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ CO}_2$ ($\Delta G_0 = -165.5 \text{ kJ/mol}$)) と考えると、熱力学的にも、ゲノムがコードする遺伝子群および遺伝子発現パターンのどれも説明がつく。残念ながら、地球深部における一酸化炭素濃度を測定するのは困難であるため、環境データが得られていないため、その点は、今後明らかにしていく必要がある。

また、本研究では、機能遺伝子の系統学的解析も進めたが、その結果、Unc8 は、古細菌由来の遺伝子を、酢酸生成代謝に多く用いていることが明らかとなった。メタン生成と酢酸生成は、水素と二酸化炭素からそれぞれメタン、酢酸を作る反応であり、メタン生成は古細菌、酢酸生成は真正細菌と系統分類学的にも大きく分かれている。しかし、それぞれのシステムを司る遺伝子間では、その交換がなされているもの多く存在し、Unc8 もメタン菌の利用する遺伝子群 (Hdr など) を利用することが明らかとなった。本研究により、Unc8 のゲノム情報が詳細に調べられたため、これまで NPL-UPA2 門を新たに、*Ca. Horikoshibacteria* と提唱した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件) 査読あり # 共筆頭著者、* 責任著者

- 1) S. Suzuki*, K.H. Nealson, S. Ishii (2018) Genomic and in-situ transcriptomic characterization of the candidate phylum NPL-UPL2 from highly-alkaline highly-reducing serpentinized groundwater. *Frontier in Microbiology* 9: 3141
- 2) J. M. Marques*, G. Etiope, M.O. Neves, P.M. Carreira, C. Rocha, S.D. Vance, L. Christensen, A.Z. Miller, S. Suzuki (2018) Linking serpentinization, hyperalkaline mineral waters and abiotic methane production in continental peridotites: an integrated hydrogeological-bio-geochemical model from the Cabeço de Vide CH₄-rich aquifer (Portugal) *Applied Geochemistry* 96: 287-301
- 3) S. Suzuki#, S. Ishii#, T. Hoshino, A. Rietze, A. Tenney, P. L Morrill, F. Inagaki, J. G. Kuenen, K. H Nealson (2017) Unusual metabolic diversity of hyperalkaliphilic microbial communities associated with subterranean serpentinization at The Cedars. *The ISME Journal* 11: 2584-2598 Selected as Editor's Choice The best of The ISME journal 2016-2017
- 4) J.M. Marques*, M.O. Neves, A.Z. Miller, C. Rocha, S. Vance, L. Christensen, G. Etiope, P. M Carreira, S. Suzuki (2017) 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
- 5) L. Kohl, E. Cumming, A. Cox, A. Rietze, L. Morrissey, S. Q Lang, A. Richter, S. Suzuki, K. H. Nealson, P. L Morrill* (2016) 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: Biogeosciences* 121: 1203-1222.

[学会発表] (計 14 件) † 招待講演

- 1) S. Suzuki† (2018) 「Extensive Loss of Methanogenic Pathway: Adaptive Strategy of Methanosarcinales to the Hyperalkaline Setting Associated with Serpentinization」 Gordon Research Conference Microbial One Carbon Metabolism (USA)
- 2) 鈴木志野† (2018) 「初期地球類似環境に見られる特異な微生物代謝システム」細胞を創る会 11.0 (仙台)
- 3) S. Suzuki (2018) 「Microbial adaptive evolution to the extreme geochemistry occurring at the serpentinization systems」日本微生物生態学会 第 32 回大会 (沖縄)
- 4) S. Suzuki† (2018) 「Unusual metabolic strategies identified in a hyperalkaliphilic microbial community associated with the serpentinization」日本地球惑星科学連合大会

(千葉)

- 5) **S. Suzuki**[†] (2018) 「Microbial adaptive evolution to the oxic/anoxic interfaces in serpentinizing systems」 日本地球惑星科学連合大会 (千葉)
- 6) **鈴木志野**[†] (2018) 「岩に生かされる生命たち」 第 61 回中海底工学フォーラム (東京)
- 7) **鈴木志野**[†] (2018) 「Integration of cultivation and genomics unveils survival strategies of extremophilic microbial life」 第 91 回日本細菌学会 シンポジウム (福岡)
- 8) **鈴木志野**[†] (2018) 「蛇紋岩化反応に支えられる微生物群 ～氷の衛星で生命は検出できるのか?」 第三回アストロバイオロジーキャンプ (山形)
- 9) **S. Suzuki**[†] (2017) 「Microbial community associated with subterranean serpentinization」 KIOST international seminar 2017・シンポジウム (韓国)
- 10) **鈴木志野**[†] (2017) 「微生物ゲノムで紐解く蛇紋岩生命圏」 InterRidge-Japan 研究会 (宮城)
- 11) **鈴木志野**[†] (2017) 「極限への適応：培養と環境ゲノミクスで紐解く生命の生存戦略」 環境微生物系学会合同学会 2017・シンポジウム (宮城)
- 12) 花田祐一、石井俊一、Ana Z. Miller, Jose; M. Marques、Kenneth H. Nealson、**鈴木志野** (2017) 「Hyperalkaliphiles：蛇紋岩深部流体と地球表層の境界に形成される超アルカリ性生命圏」 環境微生物系学会合同大会 2017 (宮城)
- 13) **S. Suzuki**[†] (2017) 「Metabolic Diversity of Hyperalkaliphilic Microbial Communities Associated with Serpentinization at The Cedars」 Goldschmidt 2017 (France)
- 14) **S. Suzuki**[†] (2017) 「Microbial adaptation to the extreme environment revealed by genome-centric metagenomics」 第 12 回国際ゲノム会議 (東京)

※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。