

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14812

研究課題名(和文) 従属栄養者を必要とする微生物の新しい独立栄養様式の発見

研究課題名(英文) Photoautotrophic growth achieved by interspecies interactions

研究代表者

春田 伸 (HARUTA, Shin)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：50359642

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)：光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* が優占化している温泉微生物群集について、昼夜の転写プロファイルの違いを明らかにした。それにより温泉環境中で本細菌は硫化水素を電子源として活発に独立栄養生育していると考えられた。しかし、純粋分離するとそのような生育は見られなかった。共存する他細菌による作用を検証したところ、発酵細菌または硫黄不均化細菌と共培養することで、*C. aggregans* が独立栄養条件下で生育できることが明らかとなった。特に、硫黄不均化による硫化水素の供給と元素硫黄の消費が *C. aggregans* の硫化水素を電子源とする独立栄養生育を支えていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Transcriptomic profiles were determined for *C. aggregans*-dominated microbial communities developed in hot springs. Comparative analysis of the profiles between day and night indicated that *C. aggregans* actively grows photoautotrophically using sulfide as the electron source. However, this growth was not observed in *C. aggregans* strains isolated from the hot springs. Effects of co-existing bacteria on the growth of *C. aggregans* were evaluated. Co-culture experiments found that fermentative bacteria and sulfur-disproportionating bacteria helped the autotrophic growth of *C. aggregans*. Results obtained in this study indicate that supply of sulfide and consumption of elemental sulfur by sulfur-disproportionation effectively support the sulfide-dependent photoautotrophic growth of *C. aggregans*.

研究分野：微生物生態学

キーワード：共生 光合成 独立栄養 炭酸固定

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでの研究で、温泉流水中に広く分布する好熱性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* を主要構成種とする微生物群集の特性を解析してきた(引用文献、)。 *C. aggregans* は緑色系状性・酸素非発生型光合成細菌で、炭酸固定経路遺伝子群を有しているが(引用文献)、実験室で培養すると、二酸化炭素を唯一の炭素源とした培地での生育は示さなかった。しかし、本菌は有機物量の限定された硫化水素泉に繁茂していること、本菌を主要構成種とする微生物群集に二酸化炭素・光依存的な硫化水素酸化活性が見られること(引用文献)から環境中では光と硫化水素を利用して、活発に炭酸固定していると予想していた。

この微生物群集では、発酵細菌や硫黄化合物を利用する嫌気呼吸細菌が、*C. aggregans* と共存している(引用文献、)。温泉流水中から微生物群集を採取し、有機炭素化合物を含まない独立栄養培地・光照射条件で継代培養を繰り返したところ、*C. aggregans* の生育が見られ、その培養系には発酵代謝能を有する他細菌が含まれていることが明らかになっていった。これらのことから、*C. aggregans* が炭酸固定能を十分に発揮するのに、他種細菌による種間相互作用が必要ではないかと考えられていた。

2. 研究の目的

本研究では、始原的な性質を持つと考えられる好熱性光合成細菌 *Chloroflexus* 属細菌の独立栄養様式について、他種細菌との共生・種間相互作用の観点から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

長野県中房温泉の 65 域の温泉流水中に繁茂する微生物群集を採取し、実験室に持ち帰り、代謝活性、転写プロファイル、を解析した。また、採取した微生物群集から細菌を分離培養し、それらを組み合わせた混合培養系を確立して、増殖特性および代謝物を解析した。

4. 研究成果

(1) *C. aggregans* を主要構成種とする微生物群集の解析

昼夜における網羅的転写解析

微生物群集について、メタトランスクリプトーム解析を実施した。昼(午後1時、11月18日)および夜(午前4時、11月19日)に微生物群集を採取し、すぐに冷凍して実験室に持ち帰った。それぞれの微生物群集から全 RNA を抽出し、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (イルミナ社)を用いて rRNA を除去後、HiSeq システム(イルミナ社)を使用したペアエンド法によって RNA-Seq 解析した。昼夜の両試料について、4 G ベース以上、4 千万リード

以上の塩基配列を取得した。*C. aggregans* のゲノム情報をもとに、微生物群集中の *C. aggregans* の転写物を推定した。その結果、昼には、*C. aggregans* の炭酸固定経路の酵素(acetyl-CoA carboxylase 等)をコードする遺伝子の転写量が顕著に増加していることが確認できた。また、硫化水素酸化に関わる酵素遺伝子の転写物の量も昼に採取した微生物群集で多くなっていた。これらのことから、*C. aggregans* は微生物群集内で温泉水から供給される硫化水素を電子源として光依存的な独立栄養生育をしていると考えられた。

硫黄化合物代謝

採取した微生物群集を対象に、嫌気・光照射条件における硫化水素の酸化過程を解析した。光照射依存的に硫化水素が減少することを確認し、それに伴う硫酸の生成を見出した。さらに、この反応が硫黄不均化反応の阻害剤であるモリブデン酸の添加で阻害されることが分かった。また、純粋分離した *C. aggregans* を用いた実験により、本菌が硫化水素を酸化するが、硫酸は生成しないことを確認した。

これらの結果から、微生物群集内において、*C. aggregans* は硫化水素を元素硫黄まで酸化するが、生成された元素硫黄は硫黄不均化菌が利用し、硫酸と硫化水素を生成していると考えられた。

(2) 緑色系状性細菌の純粋培養条件における独立栄養生育

長野県中房温泉から新たに 9 株の *C. aggregans* を分離し、光合成独立栄養条件での生育を評価した。硫化水素を光合成の電子源とした場合と異なり、水素を電子源とすると、いずれの分離株も生育した。*C. aggregans* の基準株 MD-66^T(他温泉由来)を同一条件で試験したが、水素依存的な独立栄養生育はみられなかった。

以上の解析から、長野県中房温泉に分布する *C. aggregans* は単独でも、水素があれば独立栄養することが確認できた。ただし、実際の温泉環境では、水素の供給は限定的であり、温泉水に豊富に含まれる硫化水素を利用した独立栄養生育様式があると考えられる。

(3) 発酵細菌との共培養

C. aggregans が優占化する微生物群集の主要構成種の 1 種は発酵細菌である(引用文献)。そこで、微生物群集から発酵細菌 *Fervidobacterium riparium* を分離し、光独立栄養条件における共培養効果を試験した。その結果、硫化水素添加条件で *C. aggregans* の生育を確認することができた(図1)。両者の細胞比を計数すると、*C. aggregans* : 発酵細菌 *F. riparium* は、約 100:1 であった。さらに、他の発酵細菌 *Thermovorax* sp. についても試験し、*F. riparium* と同様の共生作

用があることを見出した。ただし、*F. riparium*と比較して、*Thermovorax* sp.との共培養では、*C. aggregans*の生育がより活発であった。さらに、*C. aggregans*と*F. riparium*の共生系では、両者の細胞が寄り集まり、強固な細胞凝集体を形成したのに対し、*C. aggregans*と*Thermovorax* sp.の共培養では、分散性が高く、これら二種の発酵細菌間での違いが明らかになった。

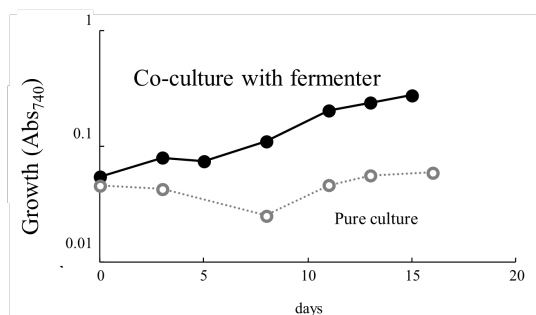


図1. 発酵細菌 *F. riparium* との共培養条件における *C. aggregans* の生育曲線

これら発酵細菌の *C. aggregans* に対する作用機構は不明であるが、共培養条件において発酵細菌による有機酸や水素の生成を確認しており、これらの代謝が *C. aggregans* の生育に影響を与えていると予想される。

(4) 硫黄不均化細菌との共培養

長野県中房温泉から分離されていた硫黄不均化細菌 *Caldimicrobium thiodismutans* (引用文献) との共培養による *C. aggregans* の生育を試験した。混合条件の最適化を図り、二酸化炭素を唯一の炭素源とする独立栄養条件で、両者が生育する条件を見出すことができた。共培養系では、硫黄不均化による硫酸の生成も確認できた。

C. aggregans は硫化水素を酸化して元素硫黄を生成するが、元素硫黄の蓄積は *C. aggregans* の生育を抑制する。一方、硫黄不均化細菌は、元素硫黄を消費し硫化水素と硫酸を生成する。以上のことから、硫黄不均化細菌は、電子源として硫化水素を供給するとともに元素硫黄を除去することで、*C. aggregans* の酸素非発生型光合成による独立栄養生育を支えていると考えられた。また、硫化水素の蓄積は硫黄不均化細菌の生育を抑制するため、*C. aggregans* による硫化水素の消費は硫黄不均化細菌の生育を促進する。このように *C. aggregans* と硫黄不均化細菌は互いに依存しあう関係にあり、両者の環境中での生育を支える重要な種間相互作用であると考えられた。

本研究では、微生物群集の特性解析を踏まえて、共培養系を確立し、2種細菌の共代謝による光合成独立栄養生育様式を示すことができた。

<引用文献>

Everroad, C. R., H. Otaki, K. Matsuura, and S. Haruta. Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. *Microbes Environ.* 2012. 27:374-381.

Otaki, H., C. R. Everroad, K. Matsuura, and S. Haruta. Production and consumption of hydrogen in hot spring microbial mats dominated by a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium. *Microbes Environ.* 2012. 27:293-299.

Klatt, C.G., D.A. Bryant, and D.M. Ward. Comparative genomics provides evidence for the 3-hydroxypropionate autotrophic pathway in filamentous anoxygenic phototrophic bacteria and in hot spring microbial mats. *Environ. Microbiol.* 2007. 9:2067-2078.

Kojima, H., K. Umezawa, and M. Fukui. *Caldimicrobium thiodismutans* sp. nov., a sulfur-disproportionating bacterium isolated from a hot spring, and emended description of the genus *Caldimicrobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. 66:1828-1831.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Kawai, S., A. Nishihara, K. Matsuura, and S. Haruta. Hydrogen-dependent photoautotrophic and chemolithoautotrophic growth of *Chloroflexus* sp., isolated from Nakabusa hot springs, Japan (2018) 16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Vancouver.

[図書](計 1 件)

Haruta, S. Thermophilic photosynthesis-based microbial communities-energy production and conversion- (2018) In: *Biotechnological Applications of Extremophilic Microorganisms* (Ed., Natuschka Lee) De Gruyter, Berlin.

[産業財産権] 該当なし

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春田 伸 (HARUTA SHIN)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：50359642

(2) 研究協力者

Jim Fredrickson

Pacific Northwest National Laboratory

(USA)・主任研究員