

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18611

研究課題名(和文) 深海環境における貧栄養性好圧菌の実態を探る

研究課題名(英文) Development of a continuous bioreactor for piezophiles

研究代表者

宮崎 征行 (MIYAZAKI, Masayuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・技術副主任

研究者番号：50399573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は培養が困難であるが故に知見の少なかった好圧菌の多様性を明らかにすることを目的とした。これまでバッチ式でしか培養することができなかった好圧菌において、高圧連続培養装置を開発することで、より自然な環境を再現した状態での培養が可能となる。本研究では、最大圧力が50 MPaの高圧連続培養システムを製作し、伊豆小笠原海溝のサンプルを用いて培養を行った。しかし、度重なる送液ポンプから水漏れが発生し断念せざるを得なかった。直接的な原因は水漏れであったが、安定状態の圧力の振れ幅も大きく、高圧連続培養を行うには送液方法が改善課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深海に生息している微生物は、深くなればなるほど高い圧力を受けて生息している。これまで好圧菌の培養はバッチ培養でしか培養できず、栄養の高い培地での培養が基本となっていた。実際の深海環境を考えると、高圧、貧栄養、低温、暗黒といった環境であるため、そこに生息している微生物の培養を考えると、貧栄養での培養を検討する必要性が考えられる。貧栄養性菌の培養には連続培養法があるが、これを高圧培養に応用することで深海微生物培養の一助となる。本研究では連続高圧培養装置を製作し、その評価を実施した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we develop high hydrostatic pressure continuous flow reactor because we can cultivate piezophiles only in batch culture. By developing this device, it becomes possible to perform culture that reproduces the natural environment. Therefore, the purpose of this study was to clarify the diversity of the piezophiles, which had little knowledge because it was difficult to culture. We produced a high hydrostatic pressure continuous flow reactor with a maximum pressure of 50 MPa, and performed culture using samples from the Izu/Ogasawara Trench. However, we abandoned this research because water leaked from the high hydrostatic pressure pump. In addition, since the pressure was not stable, the solution feeding method was an improvement subject for high hydrostatic pressure continuous flow reactor.

研究分野：環境微生物

キーワード：高圧連続培養 好圧菌 貧栄養微生物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

海洋は地球表面の約70%を占めており、水深が200 mより浅い部分の面積は全体の約8%に過ぎず、深海と呼ばれる200 mよりも深い部分の面積は92%に達していることになる。海水面の大気圧は0.1 MPaであり、水深が100 m深くなると、約1 MPa圧力が高くなる。海洋に生息している生物は深くなればなるほど、高い圧力を受けていることになり、深さが10,000 m (≒100 MPa) を超えるような海溝部において、高い圧力に適応した生物が生息していることが確認されている。このような環境は、暗黒、低温、貧栄養、そして強大な高水圧といった環境因子を持つ極限環境の世界であると言われている。1978年、Yayanos [1]は5700 mの深海から甲殻類のヨコエビ目を、現場圧力を保ったままサンプリングできるトラップを用いて採取し、現場の温度(2-4°C)と圧力(約58 MPa)を5ヶ月間保った。このサンプルから、世界で初めて約50 MPaに最適増殖圧力を有する好圧菌(piezophiles)の分離に成功した[2]。この細菌は大気圧環境下より、高水圧下において良好な増殖を示すのが特徴である。現在までの研究で、好圧菌と呼ばれる高水圧環境を好む原核生物は、種レベルで細菌26種、アーキア12種が記載報告されている。門レベルの高次分類で見ると( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -) *Proteobacteria* (23種)、*Firmicutes* (1種)、*Actinobacteria* (1種)、*Thermotoga* (1種)、*Euryarchaeota* (12種)の、合わせて5つの門から分離されており[3]、そのほとんどが低い温度で生育する好冷菌(psychrophile)か、高い温度で生育する好熱菌(thermophiles)である[4]。これは好熱菌、好冷菌、酸性菌、アルカリ菌といった極限環境の因子で生息する微生物と比べると遙かに少ない種数である。また、好圧菌はアンモニア酸化菌やメタン菌の様な特定な機能遺伝子の多様性解析は出来ないため、好圧菌の多様性を知るためには培養といった手法に頼らざるを得ない。しかし、培養技術の遅れやサンプリングの難しさのせいで、好圧菌の存在が明らかになってから約40年経ったが、その存在はあまり知られていない。

これまで分離されている計38種の好圧菌は $\gamma$ -*Proteobacteria*の低温性細菌5属(*Shewanella*, *Moritella*, *Photobacterium*, *Psychromonas*, *Colwellia*)か好熱性の*Euryarchaeota*の3属(*Palaeococcus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*)が大半を占めており、かなりの偏りが生じている。1つの問題としては菌体濃度を求めるため、栄養価の高い培地を用いていた事にある。そのために、これらの従属栄養性の微生物が増殖してしまい、増殖の遅い貧栄養微生物は影に隠れてしまう。深海環境は貧栄養であるため、貧栄養の微生物の特徴としては、増殖が遅く菌体の濃度も高くない[5]。研究代表者らのグループではこの点に着目し、栄養価の高い培地を除き、貧栄養性菌や独立栄養性菌をターゲットとした培地でバッチ培養したところ好圧性を維持した別の系統に属す菌の分離に成功した[6]。また、Inagakiらの研究で堆積物サンプルを連続培養することにより、世界最深部からの微生物群集の培養に成功している[7]。これら2つの研究成果から高圧培養と連続培養を合わせた培養装置を開発できれば、知見の少なかった貧栄養性や独立栄養性の好圧菌について培養出来るのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、バッチ式でしか培養することができなかった高圧培養において、高圧連続培養装置を開発することで、より自然な環境を再現した状態での培養が可能となる。これにより、ほとんど認識できていない好圧性の貧栄養性菌や独立栄養性菌の存在を明らかにし、その多様性を見いだすことができる。そこで、連続式の高圧培養器を開発し、培養が困難であるが故に知見の少なかった好圧菌の多様性を明らかにすることを目的とする。本研究によって開発される高圧連続培養システムは、高圧培養技術の発展や超深海生命圏の研究において重要なツールとなるはずである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高圧連続培養機的设计

高圧連続培養装置は、バッチ式培養で使用していた既存の高圧容器を改造し用いる事とし、理化学高圧機器を取り扱っているシン・コーポレーションに改造を依頼した。耐圧容器の耐圧上限は深度7,000 mの70MPaとし、送液ポンプは高圧定量プランジャーポンプを使用した。送液ラインの滅菌が不可能な事から、送液配管の途中にヒーターを設置し、100°Cまで加温し滅菌を行った。高圧容器は低温インキュベーター内に設置し、4°Cを保持した。

#### (2) 培養用サンプル

培養に用いたサンプルは2016年に行われた海底広域研究船「かいめい」慣熟航海で採取した。海域は伊豆・小笠原海溝で、採水方法はフルデプスCTD多連採水装置を用いて一定の水深で採水を行った。採取した海水を0.22  $\mu$ mのフィルターでろ過し、10%グリセロールを含んだ海水に浸漬し-80°Cにて凍結保存した。

#### (3) 高圧連続培養

培養条件はPachiadaki et al. [8]の論文を参考に次の栄養塩を含んだ海水培地を作製した。27.5 (g/L) NaCl, 0.7 (g/L) KCl, 5.4 (g/L) MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 6.8 (g/L) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.4 (g/L) CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2 (g/L) NaHCO<sub>3</sub>, 1.74 (g/L) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.76 (mg/L) NaNO<sub>2</sub>, 1.00 (mg/L) casamino acids, 0.60 (mg/L) urea, 0.65 (mg/L) NaOCN, 1 ml trace element, 1 ml vitamin solution, 1 ml Se/W solution.

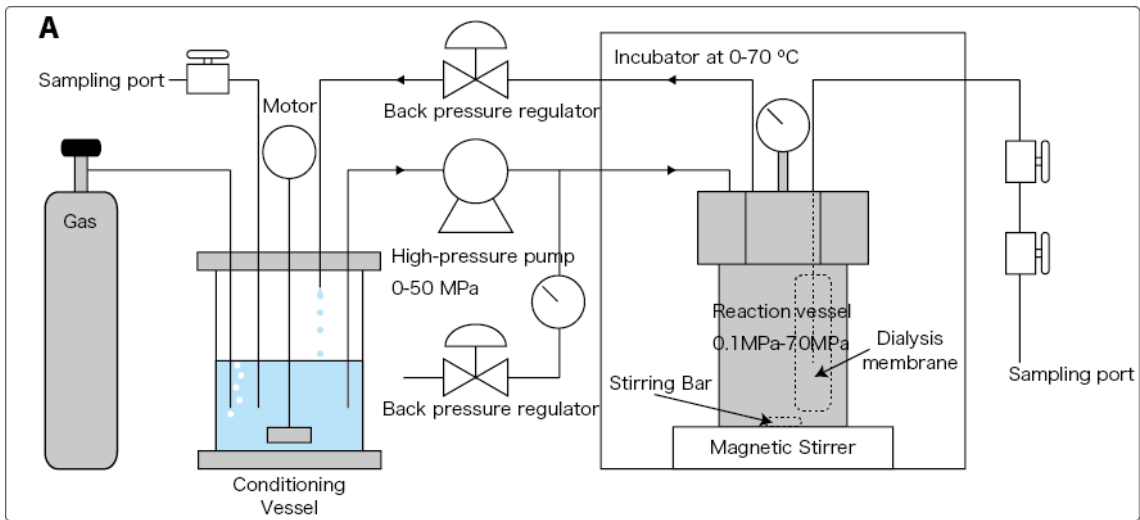


図1 高圧連続培養機の概略図

サンプルは先述のとおり、伊豆・小笠原海溝 (34°01.7N 142°23.2E) の深度 5,600 m から採取した海水を用いた。浸漬した濾紙ごと vortex ミキサーを用いて攪拌し、高圧容器内にセットした半透膜内にサンプリングポートから懸濁液を注入した。送液ポンプを稼働し、高圧容器内に上述の培地を流し込み、圧力が安定した 30MPa になるよう背圧弁を調整し、培養を行った。

#### 4. 研究成果

高圧連続培養装置の設計図を基に図2の培養システムを組み上げた。仕様は次のようにした。耐圧は送液ポンプの性能に依存し 0.1~50 MPa となった。(耐圧容器は最大 70 MPa) 温度は 0~70° C、データロガーを介して装置内の温度と圧力データを PC 内に自動記録できるようにした。培地は攪拌機を用いて攪拌し、窒素と空気と酸素濃度を一定に調整した。定期的な栄養塩濃度測定のため、培地槽から直接採取出来るようサンプリングポートを取り付けた。

超純水を用いた試験運転では 2 週間の圧力保持に成功した (図3)。ただ、平均圧力は 32.1MPa、圧力幅が 25.3-36.1MPa と当初想定していたよりも大きな圧力変化が観察された。より高い圧力での耐圧を観察するため、45 MPa に設定し耐圧試験を行った所、送液ポンプのプランジャー部分から液漏れが発生した。原因はプランジャーシールの破損で、送液ポンプが長時間の高圧状態に耐えられない可能性が示唆された。そのため、本培養は試験運転で安定していた 30 MPa 付近の圧力で本培養を行う事とした。

本培養は培地槽と耐圧容器に培地を満ちし、透析膜内に伊豆・小笠原海溝で採取した深度 5,600m のサンプルを入れ、高圧連続培養を行った。培養開始から 3 日間は順調であったが、培養 4 日目に圧力低下が確認され、原因を探っていたところ、送液ポンプのプランジャー部分からの液漏れが発見された。修理を検討したが過去同じ症状が出た箇所であった為、送液方法を変更する必要性が生じた。そのため、連続培養での実験を断念せざるを得なかった。同じサンプルを使用して行ったバッチ培養の亜硝酸酸化反応について確認を行ったが、亜硝酸から微量の硝酸に酸化される反応は見られず、培地初期に含まれていた硝酸が消費されていた。このことからバッチ培養での亜硝酸酸化細菌の分離については困難である事が示唆された。高圧連続培養システムについて、送液方法の変更や配管の簡略化、海水をそのまま使用するため錆びない素材を用いるなどの改善が課題となった。



図2 高圧連続培養システム

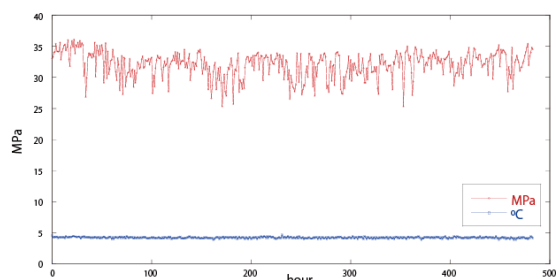


図3 連続運転中の圧力変化

<引用文献>

- [1] Yayanos, A. A. (1978) Recovery and maintenance of live amphipods at a pressure of 580 bars from an ocean depth of 5700 meters. *Science*. 200, 1056-1059.
- [2] Yayanos, A. A. et al. (1979) Isolation of a Deep-Sea Barophilic Bacterium and Some of Its Growth Characteristics. *Science*. 205, 808-810.
- [3] Zhang, Y. et al. (2015) Current developments in marine microbiology: high-pressure biotechnology and the genetic engineering of piezophiles. *Curr Opin Biotechnol*. 33, 157-164.
- [4] Jebbar, M. et al. (2015) Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles*. 19, 721-740.
- [5] Fang, J. et al. (2010) Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry *Trends Microbiol*. 18, 413-422.
- [6] Takai, K. et al. (2009) Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep - sea hydrothermal vent chimney. *Environ Microbiol*. 11, 1983-1997.
- [7] Inagaki F. et. al. (2015) Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor *Science*. 349, 420-424.
- [8] Pachiadaki M. G. et al. (2017) Major role of nitrite-oxidizing bacteria in dark ocean carbon fixation *Science*. 358, 1046-1051.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎征行、田角栄二、布浦拓郎、高井研
2. 発表標題 高圧で連続培養可能なバイオリアクターの開発
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----