

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K18184
研究課題名(和文) 安定同位体追跡と分離培養で読み解く地下圏の炭素・エネルギー循環を担う微生物動態
研究課題名(英文) Novel microbial players and energy metabolisms for the carbon flux under the methanogenic environments
研究代表者
青柳 智 (Aoyagi, Tomo)
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・研究員
研究者番号：10812761
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は微生物による嫌気酢酸酸化のカップリング反応である結晶性酸化鉄の還元を担う微生物の多様性と代謝メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、新規な鉄結晶性酸化鉄を還元する微生物は、これまで知られていない新しい電子伝達機構を有することが強く示唆された。また海底下コアサンプルを微生物接種源に用いて結晶性酸化鉄を基質に長期間集積培養を実施し、新たにFirmicutes門に属する鉄還元微生物の分離培養に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、嫌気環境の根元物質である酢酸、および地下圏に豊富に存在する結晶性酸化鉄の代謝に関わる未知微生物の多様性や代謝メカニズムの実体解明をめざすものであり、これは地球規模の炭素・エネルギー動態の評価や予測に直結する。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the diversity and energy metabolism of acetate-oxidizing crystalline iron(III) reducers. Novel iron(III) reducers, isolated from the crystalline iron(III) enrichment cultures, showed that higher ability of crystalline iron(III) reduction than that of the known species of *Geobacter* spp. This strongly suggested that the isolates have novel mechanisms for the transfer of electrons from microorganisms to crystalline iron(III). Deep seafloor core sediments were used as inoculum sources to enrich communities that were capable of the acetate oxidation and crystalline iron(III) reduction. Two species of the iron(III)-reducing Firmicutes bacteria were successfully isolated from the enrichment cultures.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境微生物 安定同位体追跡 鉄還元 酢酸酸化 炭素循環 環境分析 分離培養 電子伝達機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタンは主要な温室効果ガスであり、その発生は地球環境に重要な影響を及ぼす。地球の大部分を占める嫌気地下圏において、メタンは嫌気有機物分解の最終段階として酢酸または水素とCO₂からメタン生成古細菌により生成される。エネルギーの乏しい地下圏においても、高次有機物から低級脂肪酸や水素への変換は、微生物の発酵的代謝により起こり得る反応である。低級脂肪酸、特に嫌気有機物分解で必ず經由する中心代謝産物である酢酸は、嫌気環境で熱力学的に極めて安定である(酢酸酸化: $\Delta G^{0'} = +104 \text{ kJ/mol}$)。一方で、嫌気地下圏では、酢酸利用性メタン生成古細菌はほぼ検出されないものの、絶対的な量を有する酢酸は蓄積することなく代謝されることがしばしば観察される。このことは未知の酢酸分解メカニズムの存在を示唆するものである。

鉄は第4位の地殻構成元素であり、地下深部に至るまで結晶性酸化鉄として広く存在している。地下圏において硝酸や硫酸などのエネルギー順位の高い電子受容体が存在することは考えにくく、最も可能性の高い嫌気酢酸分解は、地下圏に豊富に存在する鉄鉱物(結晶性酸化鉄)と提案者らの研究で初めてその存在が明らかになった新規な鉄還元細菌群による、鉄鉱物と微生物間の電子伝達による嫌気酢酸酸化反応である。

結晶性酸化鉄を還元する微生物は、絶対的な量を有する酢酸をめぐりメタン生成古細菌と競合関係にあるため、その生理生態および動態は地球の炭素・エネルギー循環を理解する上で重要である。結晶性酸化鉄はこれまで微生物のエネルギー源として認識されておらず、当該還元反応を担う微生物についてはほとんど分かっていない。本研究はこれらの課題を解き明かすことを目的に行ったものである。

2. 研究の目的

本研究では、提案者らによる長年の研究の結果、結晶性酸化鉄を用いた微生物集積系から分離培養に成功した新規な鉄還元微生物の生理学試験とゲノム情報を融合させて、1)どのようなメカニズムで細胞外の結晶性酸化鉄へ電子を伝達するのかを明らかにすること、および海底地下コアサンプルを用いて、2)高感度安定同位体追跡法(Stable Isotope Probing [高感度 SIP])による嫌気酢酸代謝を担う微生物を網羅的に同定すること、加えて3)嫌気酢酸代謝を担う中核微生物群の高度集積化と分離培養により、実体のほとんど明らかになっていない地下圏の炭素・エネルギー循環の根幹反応を担う結晶性酸化鉄を還元する微生物の多様性と新しい代謝機能・生存戦略を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 結晶性酸化鉄を還元する微生物の細胞外への電子伝達メカニズムの解明
結晶性酸化鉄を用いた微生物集積系から分離した鉄還元と酢酸酸化反応を担う Deltaproteobacteria 綱に属する分離菌6種を結晶性酸化鉄4種(Goethite、Hematite、Lepidocrocite、Magnetite [10 または 20 mM])を電子受容体、酢酸(5 mM)を電子供与体として用いて1ヶ月間培養し、独自に最適化した高濃度塩酸での鉄抽出法による二価鉄の生成量を評価し、生理学的に特徴付けた。コントロール系として、既知鉄還元菌(*Geobactor sulfurreducens* や *Geobactor bemidjensis*)を用意した。分離菌6種のゲノム情報を獲得するため、メイトペアとペアドエンドによる2つのDNAライブラリを作成し、それぞれ次世代シーケンサーによる配列解読とこれら二つのデータセットを合わせたゲノム解析を実施した。

2) 結晶性酸化鉄を還元する未知微生物群の網羅的な同定
安定同位体(¹³C)で標識された酢酸を電子供与体、結晶性酸化鉄を電子受容体とした、高感度SIPを大深度コアサンプル(海底下1kmから2.5km)に適用する。その前の第一ステップとして、15の深度毎に分割されたコアサンプルの微生物群集を16S rRNA遺伝子をターゲットにした次世代シーケンサーによる大規模遺伝子解読により特徴付けを行なった。これはコアサンプルの試料自体に限られた量しかなく、かつ単位体積あたりの微生物数が陸上土壌の3から5オーダーよりもさらに少ない値で存在すること、の理由から高感度SIPを実施するコアサンプルを絞り込むために行ったものである。

3) 結晶性酸化鉄を還元する微生物群の高度集積化と分離培養
上記と同じ大深度コアサンプルを微生物接種源とし、約150の条件で結晶性酸化鉄を還元する新規微生物の集積・分離培養を試みた。提案者らの研究で初めて微生物還元を受ける事が発見された結晶性酸化鉄(Goethite、Lepidocrocite、Hematite、Magnetite)を電子受容体基質、酢酸を電子受容体基質として用いた。結晶性酸化鉄の還元により得られるエネルギーは僅かであること、コアサンプルの単位体積あたりの微生物数の少なさを考慮し、培養は4年以上継続した。培養試料からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を対象とした次世代シーケンサー解析を実施し、標的微生物が高度に集積された培養系から純粋培養系の構築を試みた。

4. 研究成果

1) 結晶性酸化鉄を還元する微生物の細胞外への電子伝達メカニズムの解明

培養試験の結果、分離菌 6 種は結晶性酸化鉄に対して還元活性を示し、そのうちいくつかの種では既知鉄還元菌と比べて 2~4 倍の顕著な二価鉄の生成が観察された。このことは、結晶性酸化鉄による集積培養系から分離した新規鉄還元微生物がこれまで知られていない細胞外への電子伝達機構を有することを強く示唆している。ドラフトゲノム配列解読の結果、分離菌のゲノムサイズは約 3.27 MB から 4.48 MB であった。なお一部の分離菌のゲノムについては現在もデータ解析を継続している。解析が完了した分離菌のゲノム配列をアノテーション解析した結果、細胞外電子伝達の主要な機構として知られるシトクロム *c* や導電性ナノワイヤーと推察される線毛遺伝子の保有が確認された。新しい細胞外電子伝達機構は未知遺伝子が関与する可能性が高いと想定されるため、今後ゲノム情報と結晶性酸化鉄での培養試験を融合させた比較ゲノムや網羅的遺伝子発現解析により、分離菌の生存戦略である細胞外電子伝達メカニズムの解明を進めてゆく。

2) 結晶性酸化鉄を還元する未知微生物群の網羅的な同定

高感度安定同位体追跡法（高感度 SIP）を海底下コアサンプルに適用する第一ステップとして、15 の深度別コアサンプル自体の微生物群集構造解析を行った。その結果、共通して Firmicutes 門、Betaproteobacteria 綱に属する新規細菌群が優占して検出されたが、その一方で一部のコアサンプルでは門レベルで全く未知の微生物も高頻度で検出された。また、これまでに海底下約 2.5km までの当該コアサンプルに微生物生細胞が存在し、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。これらを得て、結晶性酸化鉄の微生物還元も地下圏の最終電子受容プロセスである可能性が高く、それを高感度 SIP により直接的に証明するために、¹³C 酢酸と結晶性酸化鉄をコアサンプルに添加し、SIP 培養を開始している。

3) 結晶性酸化鉄を還元する微生物群の高度集積化と分離培養

微生物による還元が観察された結晶性酸化鉄での集積培養系では、溶解性鉄での培養では全く得られない新規な Proteobacteria 門や Firmicutes 門などに属する微生物が高度に集積していた。約 30 の高度集積系を対象に、酢酸と溶解性鉄での限界希釈培養および共存する主要な微生物が利用できないと想定された炭素源（糖類）と溶解性鉄での培養系も用意し、希釈培養を複数回実施した結果、Firmicutes 門に属する 2 種の純粋培養に成功した。長い年月をかけた結晶性酸化鉄とそれを還元する微生物による強固な固着関係の形成によって、海底下コアサンプルからの微生物の分離培養を達成することができた。これらの新しい分離菌も未知の細胞外電子伝達メカニズム解明へ向けた手掛かりになると推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Guo Yong, Aoyagi Tomo, Inaba Tomohiro, Sato Yuya, Habe Hiroshi, Hori Tomoyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Desulfuromonas sp. Strain AOP6, an Iron(III) Reducer Isolated from Subseafloor Sediment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01325-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomo AOYAGI, Cuong Tu HO, Takashi NARIHIRO, Daisuke MAYUMI, Atsushi OGATA, Hiroshi HABE, and Tomoyuki HORI
2. 発表標題 Diversity of acetate- and CO ₂ -assimilating microbiota under methanogenic conditions in Sasa-invaded wetland soil revealed by high-sensitivity rRNA-SIP
3. 学会等名 ISME 17（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青柳 智、Ho Cuong、成廣 隆、眞弓大介、尾形 敦、羽部 浩、堀 知行
2. 発表標題 笹侵食湿地土壤中メタン生成菌と基質競合する未知微生物の網羅的同定
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

1. 発表者名 Tomo AOYAGI, Hiroshi HABE, and Tomoyuki HORI
2. 発表標題 High-sensitivity stable isotope probing of elusive microbes that actively dissimilate but marginally assimilate substrate- ¹³ C in natural environments
3. 学会等名 MEWE2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳 智、羽部 浩、堀 知行
2. 発表標題 高感度rRNA-SIPと動態解析で探る環境微生物の代謝様式
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----