

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19366

研究課題名(和文)酸性温泉光合成性微生物マットの実験的培養による微生物間相互作用の解明

研究課題名(英文)Characterization of microbial interaction based on cultivation of a microbial mat of a sulfuric hot spring

研究代表者

宮城島 進也(Miyagishima, Shin-ya)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：00443036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：自然環境における微生物間相互作用を研究室内で解析する一例として、生物組成が比較的単純であり、環境も年間を通じて比較的安定な、硫酸酸性温泉の微細藻類を主とする微生物マットを現地の温泉水を用いて培養し実験を行った。その結果、当該温泉水には、マット内で優占する単細胞紅藻シアニジウムの増殖に必要な無機窒素源が不足していること、これらはマット内の窒素固定バクテリアによって供給され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

これまで、自然環境における微生物間相互作用に関する理解は、主に各自然環境における観測結果(相関関係)からの推定に基づく場合が多く、因果関係が示された例は少ない。微生物間相互作用における因果関係を捉えるには、自然環境を模した培養を実験室内で行い、これに摂動を与えた際の変化を捉える必要がある。本研究は、そのような研究例を示すことを目的とした。その結果、目的通り、複数の微生物からなる微生物マットを現地の環境水で培養することに成功し、無機窒素源を介した微生物間相互作用の可能性を実験的に捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：As an example of experimental systems of microbial interaction in laboratory, we cultured and analyzed a microbial mat from a sulfuric hot spring in the hot spring water. The mat contains a microalga (the unicellular red alga Cyanidium sp.) as a main organism and a relatively limited species of prokaryotes and the water composition and temperature are relatively stable throughout a year. We found that the hot spring water itself was not sufficient, and the addition of an inorganic nitrogen source was required for the growth of Cyanidium which is probably supplied by nitrogen-fixing bacteria in the microbial mat.

研究分野：植物生理学

キーワード：微生物マット 硫酸酸性温泉

## 酸性温泉光合成性微生物マットの実験的培養による微生物間相互作用の解明

### 1. 研究開始当初の背景

自然界における各生物の活動は、周囲の他生物との相互作用、環境変動に応答した活動変動によって維持される。従って、単一生物種の実験室内純粋培養を用いた解析のみからは、各生物の自然界における生き様を理解することは不可能である。これに対し近年、多種の微生物群集からなるマット等を対象とした研究が急速に進んでおり、各生物種の単離培養では解明できなかった、異種微生物間の相互作用、生物群集全体としての代謝フロー等が次々と理解されつつある。これまでに、様々な微生物群集における種間相互作用モデルが提唱されているが、これらは、各自然環境における観測結果からの推定である。つまり、実際に他生物による代謝産物に依存した生育、これらに基づいた共存関係等に関する因果関係は示されておらず、自然界における微生物間相互作用が真に理解されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

上記の問題を解決するための一つの方策として、実環境から実験室内に持ち込んだ生物群集を、実環境を模した条件下で培養し、これに人為的な環境変動を与え、各生物種の応答と群集内の環境変動を観測する研究系が考えられる。そこで本研究では以下のように微細藻類を中心とした微生物マットを研究室内で培養し、その変化を解析するための研究系の立ち上げを目的とした。解析効率を考慮した以下の理由から、硫酸酸性温泉における光合成性微生物マットを研究材料とした。(1) 高温酸性 (40–50°C、pH 1–3) 環境の微生物マット組成は比較的単純である (Walker et al., 2005)。マットが薄い (~0.5 mm) ため深度による環境差が小さい。光合成生物として単細胞紅藻イデココゴメ類のみが優占し、我々はそのゲノムサイズが真核生物の中で最小クラスであることを明らかにした (Matsuzaki et al., 2004)。従って、メタゲノム解析が比較的容易である。(2) 温度と環境水組成が一日さらに年間を通じてほぼ一定であることが予想され、変動するのは光強度 (昼夜) のみであると予想された。

### 3. 研究の方法

当初は研究所 (静岡県三島市) に近い箱根の硫酸酸性温泉からの試料調達を計画していたが、火山活動の影響により試料が得られる地域への立ち入りが不可能となってしまった。そこで、草津温泉から試料を調達することに計画を変更した。

#### (1) 硫酸酸性温泉においてイデココゴメ類が優占するマットの生育環境と組成の解析

草津温泉 (西の河原) においてマットの存在する環境 (水温、水深と最大光強度、pH) を測定し、石に付着したマット及び温泉水を研究室に持ち帰った。持ち帰った温泉水については、一般に微細藻類の増殖律速因子として知られる無機窒素源 ( $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$ )、リン酸、鉄に加えて、その他藻類の増殖に必要な微量金属類 (Ca、Mg、Zn、Mn、Cu、Co、Mo) の濃度測定を行った。また、生息環境の季節変動の可能性を検討するために、水環境の調査は夏 (7月) と冬 (2月) の2回行った。マットの微生物組成については 16S アンプリコンシーケンス法により解析した。

#### (2) 微生物マットの研究室内培養と解析

研究室に持ち帰ったマットを、現地の (i) 温泉水、(ii) 温泉水に  $\text{NH}_4^+$  (10 mM) と  $\text{PO}_4^{3-}$  (2 mM) の両方、またはいずれか一方を無機合成培地と同等の濃度加えた培地、(iii) 無機合成培地において、現地と同じ水温で、光照射下で培養した。またマット内の非光合成性の原核生物群が単細胞紅藻イデココゴメ類に与える影響を考察するために、当該マット内で優占していたイデココゴメ類の1種であるシアニジウム (*Cyanidium* sp.) を単離し、上記と同様に (i)–(iii) の条件下で3週間培養した。上記の培養下で、シアニジウムの増殖の程度を比較する (濁度測定、顕微鏡観察) とともに、微生物叢の変化 (16S アンプリコンシーケンス解析) を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 硫酸酸性温泉においてイデココゴメ類が優占するマットの生育環境と組成の解析

草津温泉 (西の河原) においてイデココゴメ類が優占する微生物マットが一面に見られる場所の温泉水は季節によらず 40–45°C、pH 1.5–2.0 であった。環境水に含まれる無機窒素源は、ほとんどが  $\text{NH}_4^+$  であり (~25  $\mu\text{M}$ )、 $\text{NO}_3^-$  および  $\text{NO}_2^-$  はほとんど含まれていないことが判明した。リン酸濃度は ~25  $\mu\text{M}$  であった。これらは季節によらずほぼ一定であり、その他金属類の濃度も一定であることが判明した。これら温泉水の成分分析の結果、当該温泉水には、イデココゴメ類の増殖に必要な無機窒素源が不足するが、その他の成分は増殖に十分であると考えられた (以下 2 における検証結果とも一致する)。

顕微鏡観察の結果、マット内で青緑色を呈するのはすべてイデココゴメ類のシアニジウム (*Cyanidium* sp.) であること、マット内にはイデココゴメ類以外に微小な原核生物群が含まれていることが判明した。16S アンプリコンシーケンス解析の結果、これらの原核生物群は主に 5 属

の Actinobacteria、それぞれ 1 属の Firmicutes、Alpha-proteobacteria、Gamma-proteobacteria と Euryarcheota からなることが判明した。また、微量ではあるが、2 価の鉄を酸化することで窒素固定を行う *Leptospirillum* (~0.4%) と *Acidithiobacillus* (~0.02%) が含まれていた。

## (2) 微生物マットの研究室内培養と解析

草津温泉のマットから単離したシアニジウムを (i) 温泉水、(ii) 温泉水に  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{PO}_4^{3-}$  の両方、またはいずれか一方を合成培地と同等の濃度加えた培地、(iii) 無機合成培地において、現地と同じ水温で、光照射下で 3 週間培養した。その結果、シアニジウムは (i) ではまったく増殖せず、(ii)  $\text{NH}_4^+$  を加えた場合のみ ( $\text{PO}_4^{3-}$  の添加の有無に関係なく) (iii) と同等の速度で増殖できることがわかった。バイオマットを同様に培養したところ、単離シアニジウムと同様に (ii)  $\text{NH}_4^+$  を加えた場合のみ ( $\text{PO}_4^{3-}$  の添加の有無に関係なく) (iii) と同等の速度でマットに含まれるシアニジウムが増殖した。しかしながら単離シアニジウムの場合とは異なり、マットに含まれるシアニジウムは、速度は (iii) に比べてかなり遅いが、(i) でも増殖することが判明した。

上記のバイオマットの現地温泉水を用いた研究室内培養において、マット内の微生物叢が維持されるかどうかを、16S アンプリコンシーケンスにより解析した。その結果、主要な微生物叢は、温泉水に  $\text{NH}_4^+$  を加えた場合も加えなかった場合も大きな変化なく維持されることが示されたが、マット内の主要な窒素固定バクテリアである *Leptospirillum* は培養中に検出限界以下まで減少してしまうことがわかった。

上記のように、本研究の目的通り、研究室内において微生物マットを現地の環境水で培養することが可能となった。また本研究系により、草津温泉水にはシアニジウムの増殖に十分な無機窒素源が含まれていないこと、当該環境におけるシアニジウムの増殖は、還元的な温泉水を用いて窒素固定を行うバクテリアに依存している可能性が高いことが判明した。また、無機窒素源以外は、当該温泉水はシアニジウムの増殖に十分な成分を含んでいることが明らかとなった。本研究で行った微生物マットの研究室内培養では、窒素固定バクテリアである *Leptospirillum* の減少が起きてしまったため、今後の研究においては、培養中に培養液の還元的な状況を維持するなどの改良が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 酸性温泉に生息する微細紅藻イデコゴメ類の産業利用に向けた基礎研究
3. 学会等名 JST/OPERA機能性バイオ共創コンソーシア 第8回機能性バイオシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣岡 俊亮、藤原 崇之、大沼 亮、兼崎 友、広瀬 侑、渡辺 智、吉川 博文、三角 修己、宮城島 進也
2. 発表標題 単細胞紅藻における有性生殖過程の探索
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 細胞内共生と光合成生物の進化・多様化
3. 学会等名 第51回日本原生生物学会公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ya Miyagishima
2. 発表標題 Cyanidiales for interdisciplinary and international studies
3. 学会等名 International Symposium: Cyanidioschyzon merolae as an arising model for unicellular eukaryotes（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 ミトコンドリアと葉緑体のようなエネルギー変換器はどのように誕生したか - 微細藻類を用いて細胞内共生による生命進化を探る
3. 学会等名 大隅基礎科学創成財団 第三回創発セミナー（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------