

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04244

研究課題名(和文) 地下圏炭素・エネルギー動態のミッシングリンク：結晶性酸化鉄が主導する微生物新機能

研究課題名(英文) A missing link of the subseafloor carbon and energy dynamics: Microbial metabolism responsible for crystalline iron(III) oxide reduction

研究代表者

堀 知行 (Hori, Tomoyuki)

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・主任研究員

研究者番号：20509533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで微生物-鉄鉱物相互作用に基づき構築した高度集積培養系および新たに取得した海底地下堆積物試料を対象として、分離培養法、次世代シーケンサーによる大規模微生物種同定技術、比較ゲノム解析、高感度安定同位体追跡法を組み合わせて利用することで、結晶性酸化鉄の還元に関与する嫌氣的メタン酸化菌や嫌氣的酢酸酸化菌の生理生態学的性質(機能、分布、相互作用等)を明らかにした。これにより海底地下圏炭素・エネルギー動態の理解を深めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究標的のC1およびC2化合物である「メタンおよび酢酸」と地球第4位の構成元素である「鉄」は地球根源物質であるため、その代謝に関わる未知微生物群の実態解明は地下生命圏の代謝活動全体を紐解くことに直結する。比較ゲノム解析や高感度安定同位体追跡法を駆使することで、海底堆積物中で結晶性酸化鉄を利用し生存するための微生物代謝戦略の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, the ecophysiological traits of the anaerobic methane and acetate oxidizers potentially involved in crystalline iron(III) oxide reduction were assessed using a combination of isolation/cultivation, 16S rRNA gene sequencing, comparative genomics and high-sensitivity stable isotope probing. The main targets were the hitherto constructed iron-reducing enrichment cultures and newly obtained marine sediments. Consequently, a better understanding of the subseafloor carbon and energy dynamics was acquired.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境分析 地球化学 深海環境 環境 微生物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微生物生態学および地下深部掘削技術の進展は、地球内部の地殻には多種多様な未知微生物群が生き続けていることを明らかにした。この事は、好気性生物が繁栄する地球表面だけが生命活動の主要な場ではなく、海底地下および陸域地下に存在する広大な嫌気生命圏も地球炭素・エネルギー循環に大きな影響を与えることを強く示唆している。安定同位体比検出技術により地球深部微生物群が極めて低速ではあるが<sup>13</sup>C 標識有機物を取り込むことが報告され、本研究代表者を乗船研究員として実施された統合国際深海掘削計画第 337 次研究航海 (IODP 337)「下北八戸沖石炭層生命圏掘削」では海底下 2.5km の大深度地下圏に至るまで微生物が存在し、特に石炭層付近において生物学的メタン生成が活発に起こっていることが証明された。しかし、地下生命圏において「(石炭等に由来する)高次有機物が生物学的にメタンや CO<sub>2</sub> に変換される」という炭素・エネルギーの変換が明らかになったものの、嫌気環境において熱力学的に極めて安定な酢酸やメタンの分解機構やそれに関与する地下微生物群についてはほぼ分かっていない。近年、メタン嫌気分解に関する研究が活発に行われ、多くの知見が蓄積されている。嫌氣的メタン酸化は様々な無機電子受容体(硫酸、硝酸、亜硝酸、鉄、マンガン)の還元と共役することが分かってきた。また地下圏では酢酸資化性メタン生成菌はほぼ検出されないが、酢酸は蓄積することなく分解されている。一方、高次有機物の豊富な泥層とメタンハイドレートなどが存在する砂層の境界域にはナノサイズの硫化鉄「ナノパイライト (FeS<sub>2</sub>)」が頻繁に観察され、さらに IODP337 で掘削した地下深部の石炭層付近においてもナノサイズの磁鉄鉱「ナノマグネタイト (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)」が高濃度で検出されている。これら微小鉄鉱物は生物代謝活動によって生じた可能性が高い。よって、地下圏でのメタンおよび酢酸の嫌氣的酸化と共役する電子受容プロセスの第一候補は、豊富に存在する鉄鉱物への電子伝達(結晶性酸化鉄の還元)であると予想した。

### 2. 研究の目的

本研究は、これまで微生物-鉄鉱物相互作用に基づき取得した高度集積培養系および新たに取得した海底地下堆積物試料を対象として、地下圏炭素・エネルギー動態に重要な役割を担う未知微生物群(結晶性酸化鉄の還元に関与する嫌氣的メタン酸化菌や嫌氣的酢酸酸化菌)の純粹分離と遺伝学的特徴づけを行う。加えて、近年開発・環境試料適用を達成した未培養微生物機能同定法「高感度 Stable Isotope Probing (SIP)」と次世代シーケンサー解析を融合利用することで、当該未知微生物群を分離することなく、海底地下におけるその生理生態学的性質(機能、分布、相互作用等)を明らかにする。これらを通して、結晶性酸化鉄の微生物還元がミッシングリンクを繋ぐ地下物質ダイナミクスの根本的理解を目指す。

### 3. 研究の方法

海底地下コア試料の単位体積あたりの微生物数は、海底下深度 10~1,000m の範囲においては陸上土壌の 3~5 オーダー少ない値で存在するが、IODP337 で取得した海底下 2.5km までのコア試料ではさらにその値が激減した。微生物菌体量の乏しさを打開すべく、これまでに構築してきた、微生物-鉄鉱物相互作用を利用した微生物集積培養系を第一の対象とした。具体的には、結晶性酸化鉄 (Goethite、Lepidocrocite、Hematite、Magnetite 等) を電子受容体基質として利用し、一段目嫌気培養を数回継代しながら長期間行った。次世代シーケンサーを用いた微生物の大規模同定技術により標的とする未知微生物群(結晶性酸化鉄の還元に関与する嫌氣的メタン酸化菌や嫌氣的酢酸酸化菌)の集積程度を追跡した。得られた高度集積系内において微生物が長い年月をかけて付着した結晶性酸化鉄を接種源として、エネルギー順位の高い溶解性鉄やその他電子受容体基質を用いた二段目培養を実施することにより、標的微生物の取得を試みた。純粹分離された微生物については、次世代シーケンサーを用いて完全長ゲノム解析またはドラフトゲノム解析を行なった。分子系統的に新規な微生物分離株については、その近縁種のゲノム情報をデータベースより取得し、比較ゲノム解析を行うことで、その生理生態学的な意義について考察した。一方、分離培養が困難な標的微生物種については、新たに取得した海底地下堆積物試料に未培養微生物機能同定法「高感度 Stable Isotope Probing (SIP)」と次世代シーケンサー解析の融合法を適用し、その生理生態学的性質の解明を試みた。具体的には、海底地下堆積物試料に<sup>13</sup>C 標識基質を加えて培養し、そこから微生物 RNA を抽出し超遠心に供することで、<sup>13</sup>C 標識基質を分解し取り込んで重くなった標的微生物由来の RNA を密度分離・回収した。得られた重い RNA の RT-PCR 増幅産物を次世代シーケンサーにより大規模に塩基配列解読することで、標的微生物を分子系統的に特徴づけた。さらに 16S rRNA 遺伝子配列に基づいて海底地下堆積物中の分解菌の深度分布を調査し、生物地球化学的なパラメータとの比較からその機能や他の微生物との相互作用について考察した。

### 4. 研究成果

高い結晶性を示す酸化鉄 (Goethite、Lepidocrocite、Hematite、Magnetite 等) を電子受容体、メタンと酢酸を電子供与体として、200 以上の培養条件で、大深度海底コア試料や陸域土壌試料の継代培養を継続した。その結果、嫌氣的メタン酸化菌として、鉄還元能が報告されている

嫌氣的メタン酸化アーキア (ANME: anaerobic methanotrophic archaea) が確認されるとともに、分子系統的に新しい細菌群が集積された。嫌氣的酢酸酸化菌の培養では Bacillota 門細菌が相対存在量 90%以上で存在する集積培養系を得た。さらに、エネルギー順位の高い電子受容体基質 (硝酸、硫酸、糖類等) や共存する非標的微生物の利用できない電子供与体基質を用いた二段目培養を行った。その結果、海底堆積物や陸域土壌から鉄還元・酢酸酸化微生物の純粋分離株を複数取得した。そのうち海底堆積物由来 Desulfuromonas 属細菌分離株の完全長ゲノムを解読・決定し、近縁種との比較ゲノム解析から、特筆すべき代謝潜在性を明らかにした。具体的には、当該分離株のゲノムの中には、鞭毛生合成遺伝子群に加え、走化性感知システムや c 型シトクロムに關与する多様で多数の遺伝子群が存在していた。近縁種分離株のゲノムでは鞭毛生合成遺伝子群が欠落するとともに走化性やシトクロムの關連遺伝子のいくつかが欠けており、一方でゲノム再編成を仲介する転移遺伝因子の拡張と酸素耐性關連遺伝子群が示された。これにより、海底堆積物中で結晶性酸化鉄を利用し生存するための Desulfuromonas 属細菌の代謝戦略の一端が明らかになった。次に、新たに取得した海底地下堆積物試料を対象に、<sup>13</sup>C 標識メタンを用いた高感度 SIP 実験を実施した。<sup>13</sup>C 標識メタンを基質として当該堆積物を嫌氣的に培養した結果、<sup>13</sup>C 標識 CO<sub>2</sub> の有意な生成が觀察され、さらに嫌氣的メタン酸化アーキアの異なる系統群 (ANME-1 と ANME-2) によるメタン由来 <sup>13</sup>C の取り込みが見出された。これらの 2 種類の系統群の海底深度分布は、生物地球化学的パラメータに關係しており、それぞれで特徴的な生態的ニッチを形成していることが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8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 <i>Desulfuromonas</i> 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 -
1. 著者名 堀 知行	4. 巻 19-1
2. 論文標題 地球炭素循環に寄与する結晶性酸化鉄還元微生物の選択的分離培養	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 51~57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Ihara Hideyuki, Hori Tomoyuki, Aoyagi Tomo, Hosono Hiroki, Takasaki Mitsuru, Katayama Yoko	4. 巻 34
2. 論文標題 Stratification of Sulfur Species and Microbial Community in Launched Marine Sediment by an Improved Sulfur-Fractionation Method and 16S rRNA Gene Sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 199~205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME18153	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 -
1. 著者名 Guo Yong, Aoyagi Tomo, Hori Tomoyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative insights into genome signatures of ferric iron oxide- and anode-stimulated <i>Desulfuromonas</i> spp. strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-021-07809-6	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 -

1. 著者名 Guo Yong, Aoyagi Tomo, Hori Tomoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of the Ferric Iron-Reducing Geobacter sp. Strains AOG1 and AOG2, Isolated from Enrichment Cultures on Crystalline Iron(III) Oxides	5. 発行年 2021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.00913-21	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 -

1. 著者名 Guo Yong, Ihara Hideyuki, Aoyagi Tomo, Hori Tomoyuki, Katayama Yoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Sulfurovum spp. TSL1 and TSL6, Two Sulfur-Oxidizing Bacteria Isolated from Marine Sediment	5. 発行年 2022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.00922-21	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 -

1. 著者名 TERADA Akihiko, HORI Tomoyuki, KUBOTA Kengo, KURISU Futoshi, KASUGA Ikuro, KINDAICHI Tomonori, ITO Tsukasa	4. 巻 45
2. 論文標題 Recent Progress in Cutting-edge Monitoring Tools for Microbiomes in Engineered Systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society on Water Environment	6. 最初と最後の頁 91~105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2965/jswe.45.91	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 -

1. 著者名 Aoyagi Tomo, Katayama Yoko, Aizawa Hidenobu, Takasaki Mitsuru, Hori Tomoyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Nitrate-Driven Trophic Association of Sulfur-Cycling Microorganisms in Tsunami-Deposited Marine Sediment Revealed by High-Sensitivity <sup>13</sup> C-Bicarbonate Probing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 8410~8421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.0c08191	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究グループホームページ  
<https://unit.aist.go.jp/env-mri/121env-eco/ja/index.html>

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
---------	---------