

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月30日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21244077

研究課題名（和文） 極限環境微生物代謝による生体元素同位体分別・平衡効果の体系的研究

研究課題名（英文） Systematic research of stable isotopic fractionation and equilibrate effects during metabolisms of extremophiles

研究代表者

高井 研（TAKAI KEN）

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・プログラムディレクター

研究者番号：80359166

研究成果の概要（和文）：「水素消費、水素生成微生物代謝に伴う水素同位体平衡効果」に関する研究をほぼすべて完了した。「硫黄還元菌による元素状硫黄から硫化水素生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」についても分析が完了し、確認すべき再実験を行った。また一方、「硫黄不均化菌による元素状硫黄から硫化水素及び硫酸生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」については現在、消費・生成された硫黄化合物の多種同位体比のより正確かつ綿密な分析を進めている。すべての実験系において、一般的原理を導くような画期的な成果が得られ、その成果の論文化を進めている。

研究成果の概要（英文）：We completed the experiments for effect of H₂-consuming and -producing metabolisms on stable hydrogen isotopic equilibrium, effect of S₀-reducing metabolisms on multiple sulfur isotopic equilibrium and fractionation and effect of sulfur-disproportionating metabolisms on multiple sulfur isotopic fractionation. All the data have provided very new insights into understanding the systematics of stable isotopic fractionation and equilibrate effects during metabolisms of extremophiles. Several research papers are now under preparation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	34,800,000	10,440,000	45,240,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

研究分野：地球生物学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地質学

キーワード：地球史、微生物活動、水素代謝、硫黄代謝、質量非依存分別

1. 研究開始当初の背景

生命活動の根源をなすエネルギー獲得や生体分子の合成といった代謝においては、タンパク質酵素の基質分子への選択特異性により、分子に含まれる同位体の質量差による反応速度のわずかな差異が引き起こす安定同位体分別効果や、分子の細胞内及び細胞間

のやり取りに伴う物理化学的障壁による安定同位体分別効果、さらにはタンパク質酵素の触媒作用に伴う同位体交換反応の促進による安定同位体平衡促進効果、といった分子中の元素の安定同位体比に大きな影響を与える作用が知られている。そのため、環境中に存在する分子中の軽元素（水素・炭素・窒

素・酸素・硫黄)の安定同位体比は、生命活動の影響を強く受け、かつその影響は地球史にわたって保存され得ることが知られる。このような生体元素の安定同位体比は、約 40 億年の地球と生命の共進化過程を研究する上で、極めて強力な指標として多くの画期的な研究の土台となっている。しかし、果たしてその指標あるいは基準はどの程度正しいのであろうか？

研究代表者は、地球史に刻み込まれた同位体化石のほとんどが、その時間的・空間的な生成・変遷過程の中で深海や地殻内といった極限環境を経て現存しているのに対し、これまでの研究極限環境での生物活動の影響がほとんど考慮されていないことに着目した。研究代表者が世界トップクラスの極限微生物の現場環境での生理・生態研究を主導していることも踏まえ、極限環境微生物代謝による生態元素同位体分別・平衡効果の体系的な研究に着手した。その一つに、深海熱水環境に生息する超好熱メタン菌によるメタン生成に伴う炭素同位体分別効果の研究がある。超好熱メタン菌は、最古の微生物の最有力候補と考えられ、かつ約 35 億年前の熱水活動域においてもその活動の痕跡が示唆されている。超好熱メタン菌のメタン生成に伴う炭素同位体分別は従来-25~-40‰という極めて大きいと信じられてきた。ただし、その効果は実験室で、常圧下の培養実験で得られたものである。研究代表者らによって新たに開発された高圧培養法を用いて超好熱メタン菌の現場環境中での生息条件でのメタン生成に伴う炭素同位体分別効果を調べたところ、-10‰以下というこれまでの常識を覆す結果が得られた。この研究成果はたった一例に過ぎない。しかし、すでに従来の常識が通用せず、これまで未知のままであった効果が新たにわかってきたという例は、研究代表者の研究だけでなく、徐々に報告されている。これらの研究は、極限環境微生物代謝による生態元素同位体分別・平衡効果は、必ずしも従来の基準に従わず、その基準を体系的に作り直す必要があるということ強く意味するものである。

2. 研究の目的

約 40 億年にわたる地球と生命の共進化過程を研究する上で最も強力な化学化石である生体元素(水素・炭素・窒素・酸素・硫黄)の安定同位体比は、ごく限られた微生物種の実験室内条件での微生物代謝の分別効果を基準として、その解釈が行われてきた。「果たして限定例から導かれる基準は正しいのか？様々な環境での微生物作用に一律に適用可能なのか？」。本研究は、この疑問に明解な解答を与えることを目的とする。さらに、地球と生命の共進化過程のみならず、現世の

物質循環の解明において未知の部分である極限環境における微生物作用の寄与を考える上で必要不可欠な基準である生体元素同位体分別・平衡効果の体系的な研究を目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者高井研(海洋研究開発機構・海洋極限環境生物圏領域)が、深海・地殻内といった極限環境から分離された硫黄酸化、硫黄還元、硫黄不均化、水素酸化、水素生成発酵の各代謝を行う微生物を、様々な物理的・化学的条件下で培養を行い、培養中の微生物細胞密度、エネルギー・炭素源の消費・生成を経時的に測定する。これらのデータは、微生物の代謝における反応速度論的な生態元素同位体分別・平衡効果を明らかにする上で、極めて重要なデータとなる。また、高温・高圧条件下での培養においては、研究代表者が開発した培養法及び海洋研究開発機構が有する各種高温高圧反応装置を用いて行う。一方各培養条件下での、経時的な硫化水素、チオ硫酸、元素状硫黄、亜硫酸、硫酸、水素、水、二酸化炭素等の代謝基質・反応物を抽出・分離・同位体比の測定を研究分担者の上野雄一郎と研究協力者の川口慎介が行う。

2009 年度には、本研究提案の最も肝であるサーモフィッシャーサイエンティフィック社の MAT253 同位体比質量分析計を購入し、4 種硫黄同位体分析及び分子状水素の水素同位体分析のための測定システムを組み上げた。測定システムの完全な立ち上げには 1 年を要した。一方、同位体比測定システム立ち上げの間にも、微生物の培養実験を進めた。2009 年度にはまず、分析システムの立ち上げがより煩雑でない「水素消費、水素生成微生物代謝に伴う水素同位体平衡効果」についての実験を行った。

2010 年度には、2009 年度購入・立ち上げを行った MAT253 同位体比質量分析計を活用し、微生物の培養実験で得られた水素、水、メタン、硫化水素、元素状硫黄、硫酸といった代謝基質や代謝生成物の水素同位体、多種硫黄同位体の分析を進めた。2009 年度には、計画通り「水素消費、水素生成微生物代謝に伴う水素同位体平衡効果」に関する結果が蓄積されたが、いくつかの微生物種については、データの信頼性が乏しい部分があり、2010 年度にはその確認実験を実施した。また一方、「硫黄還元菌による元素状硫黄から硫化水素生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」については、2010 年度にはすでにいくつかの菌で分析が終了した。また一方、2010 年度には「硫黄不均化菌による元素状硫黄から硫化水素及び硫酸生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」の実験を進めた。2009 年度には、新規硫黄不均化菌の生理学的特徴が明らかにされ、

増殖に伴う元素状硫黄の消費及び硫化水素生成、硫酸生成が定量された。同じ実験系において、消費・生成された硫黄化合物の多種同位体比の分析を進めた。2010年度には、新たな硫黄不均化菌を、深海熱水環境から分離を試みた。

2011年度には、2010年度に続き、微生物の培養実験で得られた水素、水、メタン、硫化水素、元素状硫黄、硫酸といった代謝基質や代謝生成物の水素同位体、多種硫黄同位体の分析を進めるとともに、得られたデータから同位体平衡及び同位体分別効果についての解析を行い、体系的理解の基盤を構築した。2010年度までに、計画通り「水素消費、水素生成微生物代謝に伴う水素同位体平衡効果」に関する結果がほぼすべて得られ、データ解析ならびに論文執筆を進めた。「硫黄還元菌による元素状硫黄から硫化水素生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」については、2010年度に分析が完了した。こちらについても、確認すべき再実験を行いつつ、データ解析ならびに論文執筆を進めた。また一方、2010年度には「硫黄不均化菌による元素状硫黄から硫化水素及び硫酸生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」を明らかにするため、新規硫黄不均化菌の生理学的特徴、増殖に伴う元素状硫黄の消費及び硫化水素生成、硫酸生成の定量を行い、その多種同位体分析を進めた。

4. 研究成果

2009年度に購入したサーモフィッシャーサイエンティフィック社の MAT253 同位体比質量分析計について、ほぼ1年かけて4種硫黄同位体分析及び分子状水素の水素同位体分析のための測定システムを組み上げた。

まず「水素消費、水素生成微生物代謝に伴う水素同位体平衡効果」について、極限環境から分離された水素資化メタン菌4種、水素資化酢酸菌1種、水素資化硫酸還元菌1種、水素資化硫黄還元菌3種、水素資化硝酸還元菌3種、水素生成発酵菌を用いて、各培養条件における水素消費・生成と細胞増殖に伴う水素同位体平衡効果を調べた。その結果、当初の予想通りに、異なる水素消費代謝によって、水素消費に伴う水素同位体平衡効果に相違が見出された。しかもその相違は、同じ水素消費代謝における培養条件の違いによって生じる相違とは全く異なる程度の大きな違いであり、単位量水素消費当たりの水素同位体平衡効果が、各水素消費代謝の指標となりうることを意味した。つまり、ある環境に置いて水素の消費速度と水素同位体平衡速度が測定できれば、その生息環境に生息する微生物の群集解析や機能定量を行う事なしに、その環境における各水素消費代謝を見積もることができるという画期的な成果が得られた。またその相違が、水素消費の鍵酵素で

あるヒドロゲナーゼの反応速度論的な特性に依存する事および対象微生物の水素親和性に依存する事が推測された。これらの成果については、現在論文化が進められている。

この研究を進める間に、水素資化メタン菌によって生成されたメタンの水素原子に水素分子から直接水素元素が取り込まれることが示唆される結果が得られた。これまでは水素資化メタン菌によって生成されたメタンの水素原子はすべて水に由来すると考えられてきた経緯があり、その検証を進めたところ、水素同位体平衡速度が遅い場合、つまり大量の水素がスムーズに生産物へ変換される条件では、メタンの水素原子に水素分子から直接水素元素が取り込まれる事が世界で初めて明らかになった。その新発見は、これまでの自然環境中のメタンの起源や生成経路を明らかにする上で、極めて重要な示唆を与える大きな成果と言える。

「硫黄還元菌による元素状硫黄から硫化水素生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」についても超好熱菌から常温菌に至る10種の菌について各培養条件における硫黄還元と細胞増殖に伴う硫黄同位体分別効果を調べた。その結果、全体としては ^{34}S については+5〜-5%程度の分別効果が認められたが、詳細な代謝経路の違いによって、分別効果に差があることが分かった。また ^{33}S や ^{36}S についてはほとんど分別効果がないことも明らかになった。微妙な ^{34}S 分別効果は、酵素による動的分別効果というよりは代謝系の反応速度論的な特性を反映するものであり、分別と平衡のマスバランスによって規定されることが推測された。前述の水素同位体の結果と合わせて考えると、「特有の微生物代謝に特有の安定同位体分別効果」という概念は、定性的に用いることは可能かも知れないが、そのメカニズムが極めて環境条件に大きく左右されるものであるかということをはっきりと示す結果と言える。

「硫黄不均化菌による元素状硫黄から硫化水素及び硫酸生成に伴う多種硫黄同位体分別効果」については最も時間がかかったが、これまでに知られるデルタプロテオバクテリアやファーミキューテスに属する硫酸還元菌の亜種としての硫黄不均化菌以外で初めてディフェリバクテリア綱やサーモデスルフォバクテリア科の硫黄不均化菌の分離に成功し、その元素状硫黄から硫化水素及び硫酸生成に伴う多種硫黄同位体分別効果について調べた。また同時並行的に、そのゲノム配列を決定し、硫黄不均化代謝経路の解読に挑戦した。その結果、ディフェリバクテリア綱やサーモデスルフォバクテリア科の硫黄不均化菌の代謝経路は、硫酸還元菌の亜種としての硫黄不均化菌の経路と全く異なっている事が、増殖生理や代謝特性の検討から

明らかになっただけでなく、ゲノム配列情報からも確認された。そして、これまで比較的大きな ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S 分別効果があると考えられてきた硫黄不均化菌の硫黄同位体分別効果が、その代謝経路の違いに依存するものであることを突き止めた。すなわち硫酸還元菌の亜種としての硫黄不均化菌は、硫酸還元代謝経路を部分的に逆転されることによって不均化反応を制御しており、その場合硫酸還元菌の同位体分別と同じ特性を示すが、硫黄還元菌の亜種としての硫黄不均化菌は、硫黄還元代謝経路を部分的に逆転されることによって不均化反応を制御しており、その場合硫酸還元菌の同位体分別と同じ特性を示す。これは安定同位体分別効果の分析だけでなく、微生物学、微生物生理学、ゲノム情報学をすべて統合した研究によって導き出されたエレガントな結論であり、まさしく本研究でなければ解明不可能だった科学的成果と言える。そして、最終的に熱力学的なエネルギー代謝に対する考察から、硫黄不均化代謝経路は、あくまで緊急避難的な代謝経路であり、多くの硫酸還元菌や硫黄還元菌に備わる非常用のエネルギー代謝である事を突き止めた。本研究によって、これまで断片的に理解されていたに過ぎない極限環境微生物のエネルギー代謝に伴う安定同位体平衡・分別効果が、「絶対的な特質」ではなく、その代謝が進行する場に置けるエネルギー状態に左右されるエネルギー状態の指標に過ぎないことが体系的に理解された。今後、本研究成果が着実に論文化される事によって、その理解が広く認識される事が期待できる。

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 4 件)

- ① Nakagawa, M., Ueno, Y., Hattori, S., Umemura, M., Yagi, A., Takai, K., Koba, K., Sasaki, Y., Makabe, A., and Yoshida, N. (2012) Seasonal change in microbial sulfur cycling in monomictic Lake Fukami-ike, Japan. *Limnol. Oceanography*, in press. (査読有)
- ② Yamamoto, M., and Takai, K. (2011) Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-*Proteobacteria* in deep-sea hydrothermal fields. *Front. Microbiol.*, 2:192 (doi: 10.3389/fmicb.2011.00192). (査読有)
- ③ Kawagucci, S., Toki, T., Ishibashi, J., Takai, K., Ito, M., Oomori, T., and Gamo, T. (2010) Isotopic variation of molecular hydrogen in 20^o-375^oC hydrothermal fluids as detected by a new analytical method. *J.*

Geophys. Res., 115, G03021. (査読有)

- ④ Yamamoto, M., Nakagawa, S., Shimamura, S., Takai, K., and Horikoshi, K. (2010) Molecular characterization of inorganic sulfur-compounds metabolisms in a deep-sea epsilon-proteobacterium *Sulfurovum* sp. NBC37-1. *Environ. Microbiol.* 12, 1144-1153. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Kobayashi, M., Kawagucci, S., Hattori, S., Yamada, K., Ueno, Y., Takai, K., Yoshida, N. Hydrogen isotope systematics of H₂-H₂O-CH₄ during hydrogenotrophic methanogenesis, AGU Fall Meeting 2011, Dec. 10, 2011, Moscone Center, San Francisco, California.
- ② 川口慎介, 小林真理子, 服部祥平, 山田桂太, 上野雄一郎, 高井研, 吉田尚弘. メタンの4つの水素はすべて水に由来するのか: H₂-H₂O-CH₄ の水素同位体システムティクスから考える水素資化メタン生成代謝におけるメタンの水素同位体比決定機構, 日本微生物生態学会第27回大会, Oct. 8, 2011, 京都大学, 京都.
- ③ Takai, K., Novel sulfur disproportionation of a deep-sea vent thermophile, International Union of Microbiology Societies Congress 2011, Sep. 8, 2011, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan.
- ④ 小林真理子, 川口慎介, 服部祥平, 山田桂太, 上野雄一郎, 高井研, 吉田尚弘. H₂-H₂O-CH₄ の水素同位体システムティクスから考える微生物由来メタンの水素同位体比決定機構の解明, 2011年度日本地球化学会, Sep. 6, 2011, 北海道大学, 札幌.
- ⑤ Hasegawa, H., Yamamoto, M., Nunoura, T., Kawagucci, S., Ueno, Y., Takai, K., Novel sulfur disproportionation of a deep-sea vent thermophile, Goldschmidt 2010, June 8, 2010, Knoxville Convention Center, Tennessee.
- ⑥ 川口慎介, 高井研, 化学合成生態系における H₂ 消費を安定同位体比を用いて評価する, 地球惑星科学連合 2010 年大会, May 24, 2010, 幕張メッセ, 千葉.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 研 (TAKAI KEN)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・プログラムディレクター

研究者番号: 80359166

(2) 研究分担者

上野 雄一郎 (UENO YU-ICHIRO)
東京工業大学大学院・理工学研究科・准教授
研究者番号：90422542