

令和元年9月29日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02419

研究課題名(和文) 生物界の暗黒物質「未知アーキア」の解明 分離培養で開拓する多様な新生物機能

研究課題名(英文) Cultivation and characterization of archaeal dark matters

研究代表者

井町 寛之 (IMACHI, Hiroyuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任研究員

研究者番号：20361933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：ドメイン・アーキアに属する微生物の多くはこれまで培養がなされることがないため、その性状について不明な点が多い。本研究では、培養が難しいが生態学的あるいは進化学的に重要であると認識されている未培養のアーキアに焦点を当て、その培養ならびに詳細な生理・遺伝学的な特徴を明らかにすることを目的として研究を進めた。新規微生物培養法であるリアクター培養法や分子生物学的手法と併用しながら進めたバッチ式培養法により、複数種の未知アーキアを培養することに成功した。また、DSAGとよばれる未培養アーキア群に属するアーキアの培養に世界に先駆けて成功し、その生理・遺伝学的特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物を培養し、その詳細な性状を調べることは生物学を基礎とするあらゆる学術・産業分野において重要な課題である。しかしながら、環境中に生息する微生物の多くは人為的に培養されておらず、特にドメイン・アーキアに属する微生物の培養例は少ない。本研究では、これまで環境中に普遍的かつ優占的に存在する事が予見されていた複数種のアーキアの培養に成功した。特に進化学的観点から現在大きな注目を集めているDSAGアーキアの培養に世界で初めて成功したことは画期的な成果である。

研究成果の概要(英文)：Cultivation of microorganisms is crucial to develop our understanding of microbial physiology, genetics and ecology. However, many microorganisms, particularly members of the domain Archaea, remain uncultured under laboratory conditions. In this study, we attempted to cultivate and isolate fastidious but ecologically important uncultured Archaea. To isolate such archaeal members, we used bioreactor enrichment containing such uncultured archaea as inoculum, which we established from deep-sea methane seep sediment during our previous JSPS KAKENHI projects. After many cultivation attempts combined with molecular-based techniques, we successfully enriched several uncultured archaea and eventually obtained an archaeon belonging to the DSAG group. In addition, we revealed a part of physiology and genetic properties of the DSAG archaeon.

研究分野：環境微生物学

キーワード：アーキア 培養 バイオリアクター 海底堆積物 嫌気性微生物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物を培養あるいは分離してその詳細な生理学・遺伝学的特徴を捉えることは生物学を基礎とするあらゆる分野において最も基本かつ重要な課題である。しかしながら、環境中に生息する大多数の微生物は人為的に培養が困難なことが知られている。特にアーキアはバクテリア(真正細菌)やユーカリア(真核生物)の2つの生物ドメインと比較すると、これまで人為的に培養された種の数が非常に少ないため、最も理解が進んでいない生物群であると認識されている。それは16S rRNA遺伝子やゲノム情報に基づいた分子系統解析の結果がはっきりと示している。アーキアを門、綱や目といった分類学上の高い階層で鳥瞰すると、それらの大半は分離株がない、機能が不明な未知の生物グループであることがわかる。これら未知アーキアは希少な存在ではなく、環境中に普遍的かつ数多く存在していることが知られており、まさに宇宙物理学分野の暗黒物質問題と似ている。言わば、未知アーキアは生物界の暗黒物質であると言える。

2. 研究の目的

生物界の暗黒物質である未知なアーキアを培養あるいは純粋分離することで、メタゲノム解析等の分子生物学的手法に依存した解析だけでは絶対に明らかにすることができない、アーキアの持つ多様で新しい生物機能を明らかにすることを目的とする。本研究課題の期間では、主に海底堆積物に生息する嫌気性の未知アーキアに焦点を当てて研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 嫌気性未知アーキアの集積培養方法

海底堆積物に生息する嫌気性未知アーキアの培養には、下降流懸垂型スポンジ(down-flow hanging sponge: DHS)リアクターを用いた。リアクター上部から嫌気的にした人工海水を、リアクター下部からメタンと二酸化炭素を混合したガスを供給した。DHSリアクターは10°Cの恒温器内で運転を行った。植種源には南海トラフの冷湧水帯海底堆積物(和歌山県沖、水深約2,500 m、有人潜水調査船「しんかい 6500」により2006年5月に採取)を用いた。本DHSリアクターは先3回の若手研究(A)(課題番号18687006, 21687006および24687011)の期間中に作成・運転を開始し、現在に至るまで継続的に運転を行っている。

(2) 未知アーキアのさらなる集積培養、増殖モニタリングおよびゲノム解析

DHSリアクター内で集積培養された未知アーキアをさらに集積培養あるいは分離するために、様々な嫌気培地が入った試験管やバイアル瓶を数百本準備し、DHSリアクターの集積培養物を植種した。その後、数ヶ月から1年程度の恒温器の中で静置培養を行った。試験管やバイアル瓶内に増殖した微生物種の特定には16S rRNA遺伝子に基づいたクローニングあるいはMiSeqを使ったtag-sequencing解析により行った。集積培養に成功したアーキアについては、そのアーキアの16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーを設計し、定量PCRにより増殖のモニタリングを行った。集積培養できたアーキアのゲノム配列の決定には、Nextera Mate Pair Library Preparation kitを用いてMate-Paired Libraryを作成し、Illumina社のMiSeqにより塩基配列の決定を行った。

(3) 顕微鏡によるアーキアの細胞観察およびアミノ酸の取り込み実験

アーキア細胞の視覚的検出にはin situ DNA-hybridization chain reaction(HCR)法を用いた。詳細な細胞構造観察には走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いた。Deep-Sea Archaeal Group(DSAG)グループに属するアーキアのアミノ酸利用性について確認を行うため、¹³Cおよび¹⁵Nで標識されたアミノ酸混合液を用いた培養実験を行った。120日間の培養を行った後に、超高空間分解能二次イオン質量分析計(NanoSIMS)を用いて解析を行った。

4. 研究成果

先の若手研究(A)(課題番号24687011)において、ANME、MBG-DやDSAG等の海底下に優占化している多様な未知アーキアをDHSリアクター内に集積培養することができていることを16S rRNA遺伝子に基づいた解析により明らかにしていた。本研究期間においては、DHSリアクター集積培養物を植種源として、従来型の試験管等を利用したバッチ培養と16S rRNA遺伝子解析を併用しながら、個々の未知アーキアのさらなる集積培養および分離を試みた。その結果、5種類の新しい門、綱あるいは目を代表する未知アーキアの高度な集積培養をすることに成功し、さらにDSAGと呼ばれていた未培養系統分類群に属するアーキアの分離に成功した。得られた結果について、以下に分離に成功したDSAGアーキアを中心にまとめる。

カザミノ酸と数種類の抗生物質を添加した嫌気性培地が入った試験管において、培養開始から1年後に僅かな微生物細胞の増殖が観察された。増殖してきた微生物種を同定するために、16S rRNA遺伝子に基づいたクローン解析を行った。硫酸還元細菌である*Halodesulfobivrio*属細菌が本培養系では優占化していることが推定されたと同時に、DSAG群に属するアーキアの配列が非常に少ない割合ながらも検出された。そこで、このDSAGアーキアを追跡するために、定量PCR、クローニングあるいはtag-sequencing解析を用いてその増殖をモニタリングしながら慎重に継代培養を続けた。DSAGアーキアの継代培養をすることに成功はしたが、その過程において、本アーキアの増殖は極度に遅く、その菌体収量は極めて低いことを発見した。本アーキアの培養物は常に30~60日間の遅滞期を有し、最大の菌体収量に到達するまでに3ヶ月以

上を要した。その最大の菌体収量は $\sim 10^5$ 16S rRNA gene copies/mlであり、その倍加時間は約14~25日と推定された。培養温度や基質の種類や濃度を変更しても、増殖速度または菌体収量の変化は見られなかった。一方で、培養の試行錯誤の過程において、カザミノ酸だけでなく20種類のアミノ酸および粉ミルクを培地に添加するとその増殖は安定することを見出した。さらなる特徴付けのために、上記の培養条件でDSAGアーキアを培養し、新しい培地に継代培養する前に常にqPCRを用いて増殖を確認した。

6回の継代培養後、DSAGアーキアを13%、*Halodesulfovibrio*属を85%と、*Methanogenium*属を2%含む高度に集積された培養物を得ることに成功した。in situ DNA-HCR法と走査型電子顕微鏡による観察により、DSAGアーキアは*Halodesulfovibrio*および*Methanogenium*属の微生物細胞と近接していることが明らかとなった。メタゲノム解析とNanoSIMS解析により、本DSAGアーキアはいくつかのアミノ酸あるいはペプチドを硫酸還元細菌やメタン生成アーキアとの中間水素(あるいはギ酸)伝達により利用することが明らかとなった。事実、硫酸還元細菌やメタン生成アーキアの増殖を阻害するモリブデン酸や2-ブロモエタンスルホン酸を培地に添加すると、DSAGアーキアの増殖は妨げられた。継代培養を続けたところ、*Halodesulfovibrio*属細菌は培養系内から排除することができ、最終的にDSAGアーキアと*Methanogenium*属アーキアの純粋な2種類の微生物種から構成される共培養系として分離に成功した。海底堆積物のサンプリング、DHSリアクターを利用した前培養、そして試験管を用いた集積培養と分離まで、合計で12年間の時間をかけて分離するに至った。DSAGアーキアの培養および分離に成功したのは世界初の成果である。

続いて、培養に成功したDSAGアーキアのさらなる特徴づけを行った。本アーキアの細胞は運動性がない小さな球菌であり、その直径は約550nm程度であった。本アーキア細胞の多くは細胞外高分子様の物質で覆われた凝集体を形成していた。単独あるいは分裂中の細胞は細胞外高分子様の物質は少なかった。透過型電子顕微鏡を用いた細胞切片の観察により本アーキアは他の大多数のアーキアに類似した膜構造を有することが示唆された。また、水素を消費してくれるパートナー微生物の入れ替えは可能であり、*Methanobacterium*属アーキアとの共生させることもできた。さらに、 ^{13}C と ^{15}N で標識されたアミノ酸の混合物の取り込みをNanoSIMS定量することにより、本アーキアのアミノ酸利用率を確認した。本アーキア細胞は炭素よりも多くの窒素を取り込んでいたことから、混合栄養型の微生物である可能性が示唆された。興味深いことに、二酸化炭素とメタンの ^{13}C 標識された割合はパートナーとなるメタン生成アーキア種類によって異なり、本DSAGアーキアはパートナーへの電子移動に水素とギ酸の両方を利用していることが強く示唆された。

DSAGアーキア以外にも4種の未知アーキアを集積培養することに成功した。これらアーキアの増殖もDSAGアーキアと同様に非常に遅く、菌体収量も低いため、菌体の濁度によりその増殖を判定することができない。そこで、各アーキア種の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーセットを作成し、定量PCRにより、それらアーキアの増殖のモニタリングを行った。集積培養が進んだ一部のアーキア種についてはゲノム配列の決定まで終了した。加えて、これら未知アーキアを集積培養するための様々な試行錯誤を通じて、新しい門、綱や目を代表するような分類学的に新規性が極めて高いバクテリアも複数種培養に成功した。

以上、本研究課題期間において、複数種の未知アーキアの培養に成功した。その中でも、進化生物学ならびに生態学的に極めて重要であると広く認識されているDSAGグループに属するアーキアを世界に先駆けて分離することに成功したことは画期的な成果である。今後、これら培養に成功したアーキアの詳細な生理・遺伝学的特徴についてさらに調査を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

- ① Nakahara N, Nobu MK, Takaki Y, Miyazaki M, Tasumi E, Sakai S, Ogawara M, Yoshida N, Tamaki H, Yamanaka Y, Katayama A, Yamaguchi T, Takai K and Imachi H. 2019. *Aggregatilinea lenta* gen. nov., sp. nov., a slow-growing, facultatively anaerobic bacterium isolated from subseafloor sediment, and proposal of the new order *Aggregatilineales* ord. nov. within the class *Anaerolineae* of the phylum *Chloroflexi*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 69: 1185-1194. 査読有, DOI: 10.1099/ijsem.0.003291
- ② Imachi H, Tasumi E, Takaki Y, Hoshino T, Schubotz F, Gan S, Tu T-H, Saito Y, Yamanaka Y, Ijiri A, Matsui Y, Miyazaki M, Morono Y, Takai K, Hinrichs K-U, and Inagaki F. 2019. Cultivable microbial community in 2-km-deep, 20-million-year-old subseafloor coalbeds through ~1000 days anaerobic bioreactor cultivation. Scientific Reports 9, Article number: 2305. 査読有, DOI: 10.1038/s41598-019-38754-w
- ③ Hidalgo, CA, Nobu MK, Narihiro T, Tamaki H, Liu W-T, Kamagata Y, Stams AJM, Imachi H, and Sousa DZ. 2018. Novel energy conservation strategies and behavior of *Pelotomaculum schinkii* driving syntrophic propionate catabolism. Environmental Microbiology 20: 4503-4511. 査読有, DOI: 10.1111/1462-2920.14388
- ④ Takano Y, Chikaraishi Y, Imachi H, Miyairi Y, Ogawa N, Kaneko M, Yokoyama Y, Kruger M and Ohkouchi N. 2018. Insight into anaerobic methanotrophy from $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -amino acids and

¹⁴C/¹²C-ANME cells in seafloor microbial ecology. Scientific Reports 8, Article number 14070.

査読有, DOI: 10.1038/s41598-018-31004-5

- ⑤ Ijiri A, Inagaki F, Kubo Y, Adhikari RR, Hattori S, Hoshino T, Imachi H, Kawagucci S, Morono Y, Ohtomo Y, Ono S, Sakai S, Takai K, Toki T, Wang DT, Yoshinaga MY, Arnold GL, Ashi J, Case DH, Feseker T, Hinrichs K-U, Ikegawa Y, Ikehara M, Kallmeyer J, Kumagai H, Lever MA, Morita S, Nakamura K, Nakamura Y, Nishizawa M, Orphan VJ, Roy H, Schmidt F, Tani A, Tanikawa W, Terada T, Tomaru H, Tsuji T, Tsunogai U, Yamaguchi YT and Yoshida N. 2018. Deep-biosphere methane production stimulated by geofluids in the Nankai accretionary complex. Science Advances 4:eao4631. 査読有, DOI: 10.1126/sciadv.aao4631
- ⑥ Matsushita S, Komizo D, Cao TTL, Aoi Y, Kindaichi T, Ozaki N, Imachi H and Ohashi A. 2018. Production of biogenic manganese oxides coupled with methane oxidation in a bioreactor for removing metals from wastewater. Water Research. 130: 224-233. 査読有, DOI: 10.1016/j.watres.2017.11.063
- ⑦ Tu T-H, Wu L-W, Lin Y-S, Imachi H, Lin L-H and Wang P-L. 2017. Microbial community composition and functional capacity in a terrestrial ferruginous, sulfate-depleted mud volcano. Frontiers in Microbiology 8: Article 2137. 査読有, DOI: 10.3389/fmicb.2017.02137
- ⑧ Kato S, Miyazaki M, Kikuchi S, Kashiwabara T, Saito Y, Tasumi E, Suzuki K, Takai K, Cao TTL, Ohashi A and Imachi H. 2017. Biotic manganese oxidation coupled with methane oxidation using a continuous-flow bioreactor system under marine conditions. Water Science and Technology. 76: 1781-1795. 査読有, DOI: 10.2166/wst.2017.365
- ⑨ Yamaguchi YT, Chikaraishi Y, Takano Y, Ogawa NO, Imachi H, Yokoyama Y and Ohkouchi N. 2017. Fractionation of nitrogen isotopes during amino acid metabolism in heterotrophic and chemoautotrophic microbes across Eukarya, Bacteria, and Archaea: Effects of nitrogen sources and metabolic pathways. Organic Geochemistry. 111: 101-112. 査読有, DOI: 10.1016/j.orggeochem.2017.04.004
- ⑩ Mochimaru H, Tamaki H, Katayama T, Imachi H, Sakata S and Kamagata Y. 2016. *Methanomicrobium antiquum* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from deep sedimentary aquifers in a natural gas field. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 66: 4873-4877. 査読有, DOI: 10.1099/ijsem.0.001444
- ⑪ Browne P, Tamaki H, Kyrpides N, Woyke T, Goodwin L, Imachi H, Bräuer, S Yavitt J B, Liu W-T, Zinder S and Cadillo-Quiroz H. 2016. Genomic composition and dynamics among *Methanomicrobiales* predict adaptation to contrasting environments. The ISME Journal 11: 87-99. 査読有, DOI: 10.1038/ismej.2016.104
- ⑫ Nishizawa M, Sakai S, Konno U, Nakahara N, Takaki Y, Saito Y, Imachi H, Tasumi E, Makabe A, Koba K and Takai K. 2016. Nitrogen and oxygen isotope effects of ammonia oxidation by thermophilic *Thaumarchaeota* from a geothermal water stream. Applied and Environmental Microbiology 82: 4492-4504. 査読有, DOI: 10.1128/AEM.00250-16
- ⑬ Okumura T, Kawagucci S, Saito Y, Matsui Y, Takai K and Imachi H. 2016. Hydrogen and carbon isotope systematics in hydrogenotrophic methanogenesis under H₂-limited and -enriched conditions: Implications for the origin of methane and its isotopic diagnosis. Progress in Earth and Planetary Science. 3: 14, 査読有, DOI 10.1186/s40645-016-0088-3

[学会発表] (計 9 件)

- ① Imachi H, Cultivation of microbial dark matters in subseafloor biosphere. The 6th DSM 2018 International Workshop on Deep-Sea Microbiology. The Hotel ILLUA, Busan, South Korea. 2018 年 10 月 4 日
- ② Imachi H, Cultivation of uncultured subseafloor microbes using down-flow hanging sponge (DHS) bioreactors. Deep Life Cultivation workshop. Millennium Hotel, Rotorua, New Zealand. 2017 年 11 月 6 日
- ③ 井町寛之、微生物暗黒物質は暗黒ではない—海底下生命圏からの未培養微生物の培養を例として—、環境微生物系学会合同大会 2017、東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市、2017 年 8 月 31 日
- ④ 中原望、海底堆積物から分離した新規 *Chloroflexi* 門細菌の生理代謝機能の解明、環境微生物系学会合同大会 2017、東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市、2017 年 8 月 31 日
- ⑤ Nakahara N, Cultivation of microbial dark matters from marine sediments: novel bacteria affiliated with uncultured groups of the phylum *Chloroflexi*. JpGU-AGU Joint Meeting 2017, Makuhari, Chiba, Japan. 2017 年 5 月 22 日
- ⑥ 中原望、海底堆積物に生息する微生物ダークマター *Chloroflexi* 門細菌の分離・培養、第 31 回日本微生物生態学会大会、横須賀市文化会館、神奈川県横須賀市、2016 年 10 月 23 日
- ⑦ Nakahara N, Takaki Y, Konishi M, Tamaki H, Yamaguchi T, Takai K and Imachi H. Cultivation of previously uncultured *Chloroflexi*, a bacterial dark matter in subseafloor biosphere. ISME 16, Montreal, Canada. 2016 年 8 月 23 日
- ⑧ Imachi H, Identifying methanogenic community members obtained from 2-km deep coalbed.

ISME 16, Palais des congrès de Montréal, Montreal, Canada. 2016 年 8 月 23 日

- ⑨ Imachi H., Identifying 2 km-deep methanogenic community members using a long-term bioreactor cultivation. Goldschmidt2016, PACIFICO Yokohama, Yokohama, Japan. 2016 年 6 月 29 日

〔図書〕 (計 6 件)

- ① Imachi H., Takaki Y. and Nakahara N. 2018. Genus *Pelolinea*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Edited by W. B. Whitman, J. Chun, S. Dedysh, P. De Vos, B. P. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, M. E. Trujillo and O. I. Nedashkovskaya, 4 pages, Wiley, DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01484
- ② Sakai S and Imachi H. 2016. Order *Methanocellales*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Edited by W. B. Whitman, J. Chun, S. Dedysh, P. De Vos, B. P. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, M. E. Trujillo and O. I. Nedashkovskaya, 1 page, Wiley, DOI: 10.1002/9781118960608.obm00128
- ③ Sakai S and Imachi H. 2016. Family *Methanocellaceae*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Edited by W. B. Whitman, J. Chun, S. Dedysh, P. De Vos, B. P. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, M. E. Trujillo and O. I. Nedashkovskaya, 1 page, Wiley, DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00270
- ④ Sakai S and Imachi H. 2016. Genus *Methanocella*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Edited by W. B. Whitman, J. Chun, S. Dedysh, P. De Vos, B. P. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, M. E. Trujillo and O. I. Nedashkovskaya, 6 pages, Wiley, DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01366
- ⑤ Imachi H. and Sakai S. 2016. Family *Methanoregulaceae*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Edited by W. B. Whitman, J. Chun, S. Dedysh, P. De Vos, B. P. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, M. E. Trujillo and O. I. Nedashkovskaya, 4 pages, Wiley, DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00271
- ⑥ Imachi H. and Sakai S. 2016. Genus *Methanolinea*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Edited by W. B. Whitman, J. Chun, S. Dedysh, P. De Vos, B. P. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, M. E. Trujillo and O. I. Nedashkovskaya, 4 pages, Wiley, DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01367

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高木 善弘
ローマ字氏名：(TAKAKI, Yoshihiro)
所属研究機関名：国立研究開発法人海洋研究開発機構
部局名：深海・地殻内生物圏研究分野
職名：主任技術研究員
研究者番号 (8 桁)：10399561

研究分担者氏名：諸野 祐樹
ローマ字氏名：(MORONO, Yuki)
所属研究機関名：国立研究開発法人海洋研究開発機構
部局名：高知コア研究所
職名：グループリーダー代理
研究者番号 (8 桁)：30421845

研究分担者氏名：玉木 秀幸
ローマ字氏名：(TAMAKI, Hideyuki)
所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所
部局名：生物工学領域
職名：研究グループ付
研究者番号 (8 桁)：00421842

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。