

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05991

研究課題名(和文) 深海底熱水孔における優占微生物の環境適応戦略の多角的研究と地球環境修復への展開

研究課題名(英文) Understanding of a strategy for environmental adaptation of dominant chemolithoautotrophs living in deep-sea hydrothermal vents and their application for environmental remediation

研究代表者

美野 さやか(Mino, Sayaka)

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：00755663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、深海底熱水孔環境に普遍的に優占する化学合成独立栄養微生物を対象に、それらの持つ環境適応能の多角的解明と、それらのもつエネルギー代謝を活かした地球環境修復に向けた基盤構築である。本研究では、系統的に極めて類似した熱水孔環境微生物株が海域ごとに異なるエネルギー代謝の特徴を持つ傾向にあることを明らかにしたとともに、亜酸化窒素を還元する微生物の取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study are to understand the environmental adaptation of vent-associated microorganisms and to develop application studies using these microbes. In this study, we have cultured Sulfurimonas, which are isolated from different hydrothermal regions, under different medium conditions and have compared their phenotypic characteristics. We have also cultured and isolated N₂O reducing bacteria from deep-sea hydrothermal vents.

研究分野：微生物生態学

キーワード：深海底熱水活動域 イブシロンプロテオバクテリア 亜酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

深海底熱水孔環境は、化学合成独立栄養微生物に立脚した豊かな生態系を育んでいる。熱水孔微生物は、高濃度の無機化合物をエネルギー源として効率よく利用する特異な能力を有するとともに、安定かつ高い生理活性を持つことから化学工業や食品産業への応用展開が期待される未開拓生物資源でもある。化学合成独立栄養細菌のうち、*Epsilonproteobacteria* 綱に属する細菌群は、世界各地の熱水噴出孔におけるコスモポリタンとして広く知られている。先行研究から本微生物群が(1) 可塑的なゲノムを持つこと、(2) 環境シグナルセンサーを有することが明らかとなり、*Epsilonproteobacteria* は遺伝的多様性を高め、変動の激しい熱水孔環境に適応する能力を備えていることが推察される。また、世界各地の深海底熱水活動域において、その熱水の化学的特徴は海域ごとに異なることから、海域に独自の遺伝学的特徴を有する集団が存在することが考えられる。これまでに我々は、常温性 *Epsilonproteobacteria* の *Sulfurimonas* 属を対象に、multilocus sequence analysis (MLSA) 法を確立し、集団遺伝学的解析に基づき、世界各地の熱水活動域から分離された *Sulfurimonas* が、海域ごとに異なる遺伝的特徴を有することを見出した。本発見から、海域固有の集団が生じる過程で、*Epsilonproteobacteria* は各海域の熱水環境に適した生理学的特徴を獲得している可能性が考えられる。しかしながら、世界中の多様な熱水孔微生物の環境適応能を多角的に捉えるとともに、その能力を応用展開するには至っていない。

2. 研究の目的

深海底の熱水孔環境において、噴出熱水の物理化学的特徴は、その深度や熱水活動域を支える母岩の地質学的特徴等によって決定される。そのため、噴出熱水の物理化学的特徴 (pH, 最高温度, 各種ガス濃度等) は海域ごとに異なることが知られている。本研究では、深海底熱水孔環境に普遍的に優占する化学合成独立栄養細菌 *Epsilonproteobacteria* を対象に、(1) それらの持つ環境適応能を多角的に解明するとともに、(2) 環境適応能を評価する過程で見出されるエネルギー代謝を、地球環境修復へ応用展開するための基盤構築を目的とした。

具体的には、異なる海域から取得した *Epsilonproteobacteria* 株の利用可能なエネルギー基質を、培養に基づき評価する。さらに、エネルギー代謝に関わる鍵酵素の活性測定を行い、異なる海域由来の分離株におけるエネルギー代謝の相違点を明らかにする。また本研究では、地球環境修復に寄与する特徴として、地球温暖化ガスかつオゾン層破壊物質である亜酸化窒素 (N_2O) に注目し、 N_2O 還元能を持つ常温性〜好熱性の *Epsilonproteobacteria* を分離培養するとともに、その還元能の評価お

よび N_2O 還元至適条件の決定を行うことで、熱水活動域由来微生物を利用した応用研究の基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、「海域ごとに異なる *Epsilonproteobacteria* 集団は、その熱水活動域の物理化学的特徴に環境適応したエネルギー代謝を有する集団である」、という仮説のもと、*Epsilonproteobacteria* 綱 *Sulfurimonas* 属に属する分離株の環境適応能の評価に関わる研究を進めた。

さらに、*Epsilonproteobacteria* の多くが有する脱窒反応の N_2O を還元するエネルギー代謝に注目し、様々な熱水性試料から分離培養を試みるとともに、取得した微生物群集構造の決定や N_2O 還元活性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 培養に基づくエネルギー基質利用能評価

沖縄トラフ、中央インド洋海嶺、南部マリアナトラフに位置する深海底熱水活動域から分離した *Sulfurimonas* 属に属する計 22 株を対象に、エネルギー代謝に利用可能な基質の決定を行った。具体的には、水素、元素状硫黄、チオ硫酸、硝酸、酸素に注目し、電子供与体・受容体の組み合わせを変えた 8 種類の培地にて培養を行い、DAPI 染色法による全菌数測定により、細胞の増殖を評価した。その結果、沖縄トラフ由来株は、比較的多様な電子供与体・受容体が利用可能であったのに対し、他の海域由来の *Sulfurimonas* は、利用可能な電子供与体・受容体が制限される傾向にあることが明らかになった。また *Sulfurimonas* は硫黄酸化細菌として広く知られているとおり、各種還元型硫黄化合物を利用可能であるものの、その利用可能な還元型硫黄化合物の種類によって各海域の特徴が決定された。しかしながら、本研究で用いた培養条件では、各海域の噴出熱水の物理化学的特徴を反映するような傾向は認められなかった。

(2) ヒドロゲナーゼ活性測定

培養に基づくエネルギー代謝評価の結果、水素酸化代謝が 3 つの海域に共通して見られる傾向にあった。そこでエネルギー代謝の中でも、特に水素酸化に関わるヒドロゲナーゼに注目し、その活性を測定した。エネルギー基質利用能を評価した 22 株のうち、12 株を対象に、粗酵素液を抽出し、メチレンブルーを用いて 33°C、590 nm でヒドロゲナーゼの活性を測定した。その結果、沖縄トラフ内の特定の株で高い水素酸化のヒドロゲナーゼ活性が認められた。このことから、培養に基づいて水素酸化が認められた株であっても、水素を効率的に酸化しエネルギーを獲得するための生理学的特徴が異なることが示唆された。

(3) N_2O 還元活性測定とそれに関わる微生物群集構造

上述したエネルギー代謝評価において、脱窒が重要なエネルギー反応であることが明らかになった。そこで脱窒の中間産物として生成される N_2O に注目し、これを含む培地を用いて、深海底熱水活動域由来 N_2O 還元微生物の獲得を試みた。純粋分離培養の結果、常温性から好熱性にわたる複数の新規性の高い *Epsilonproteobacteria* 綱に属する N_2O 還元菌の獲得に成功した。そのうち、純粋分離が困難であったものについては、その群集構造をクローンライブラリー法および 16S メタゲノム解析によって調べた。その結果、 N_2O 還元微生物群集の優占種は *Epsilonproteobacteria* 綱 *Hydrogenimonas* 属に帰属することが明らかとなった。また、分離株および集積培養したものを対象に、様々な培養条件で培養した結果、攪拌培養が N_2O 還元活性の向上に効果的であることを見出した。さらに、その還元活性をガスクロマトグラフィーを用いて継続的に測定した結果、これらの微生物が高い N_2O 還元活性を示すことを明らかにした。

以上、本研究において、世界各地の熱水活動域に生息する微生物が海域ごとに異なる代謝を有することを示唆したとともに、深海底熱水活動域由来の新規 N_2O 還元微生物を獲得することに成功した。今後、現場環境を再現した培養条件を設定することにより、熱水孔環境における微生物の環境適応を理解し、応用展開を進展させることが可能となる。

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 2 件)

1. Mino S, Nakagawa S, Makita H, Toki T, Miyazaki J, Sievert SM, Polz MF, Inagaki F, Godfroy A, Kato S, Watanabe H, Nunoura T, Nakamura K, Imachi H, Watsuji TO, Kojima S, Takai K, Sawabe T. (2017). Endemicity of the cosmopolitan mesophilic chemolithoautotroph *Sulfurimonas* at deep-sea hydrothermal vents. *ISME J*, 11: 909-919 (査読有).
2. Fujiyoshi S, Tateno H, Watsuji T, Yamaguchi H, Fukushima D, Mino S, Sugimura M, Sawabe T, Takai K, Sawayama S, Nakagawa S. (2015). Effects of hemagglutination activity in the serum of a deep-sea vent endemic crab, *Shinkaia Crosnieri*, on non-symbiotic and symbiotic bacteria. *Microbes Environ*, 30: 228-234 (査読有).

[学会発表] (計 11 件)

1. 武藤久、美野さやか、中部沖縄トラフで発見された熱水活動域ノホサイトの微生物学的研究：新規微生物の分離培養と RNA を用いた微生物相解析、ブルーアース 2017、2017 年 3 月 2-3 日、日本大学理工

学部駿河台キャンパス (東京都千代田区)

2. 武藤久、美野さやか、深海底熱水活動域に形成されるチムニー構造物からの RNA 抽出～RNA を用いた微生物相解析を目指して、第 17 回極限環境生物学会、2016 年 11 月 25-26 日、東京工業大学すずかけ台キャンパス大会館 (神奈川県横浜市)
3. 美野さやか、深海底熱水活動域に普遍的に生息する化学合成独立栄養細菌の生物地理学的特徴の解明、第 31 回日本微生物生態学会、2016 年 10 月 22-25 日、横須賀市文化会館 (神奈川県横須賀市)
4. 武藤久、美野さやか、環境 RNA を用いた微生物相解析：熱水活動域チムニーの場合、第 31 回日本微生物生態学会、2016 年 10 月 22-25 日、横須賀市文化会館 (神奈川県横須賀市)
5. 永田亮佑、美野さやか、深海底熱水活動域から分離した新規イプシロプロテオバクテリアの生理生態学的性状、第 31 回日本微生物生態学会、2016 年 10 月 22-25 日、横須賀市文化会館 (神奈川県横須賀市)
6. Mino S, Limits to dispersal in a cosmopolitan chemolithoautotroph living in deep-sea hydrothermal vents, 8th Asian Symposium on Microbial Ecology, 2016 年 9 月 30-10 月 2 日、台北 (台湾)
7. Mino S, Population genetics and phenotypic differences of cosmopolitan mesophilic *Sulfurimonas* at deep-sea hydrothermal vents, 5th International Workshop on Deep-Sea Microbiology, 2016 年 9 月 10-11 日、京都大学益川ホール (京都府京都市)
8. 佐藤和叶、美野さやか、深海底熱水活動域に生息する化学合成細菌の分布様式は系統群ごとで異なるか？、農芸化学会北海道支部、2016 年 8 月 6-7 日、ホテル函館ロイヤル (北海道函館市)
9. 佐藤和叶、美野さやか、深海底熱水活動域に生息する好熱菌の分布様式の解明、第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2016 年 5 月 28-29 日、北海道大学函館キャンパス (北海道函館市)
10. 米山直毅、美野さやか、深海底熱水活動域由来の亜酸化窒素還元微生物群集の生理生態学的特徴の解明、第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2016 年 5 月 28-29 日、北海道大学函館キャンパス (北海道函館市)
11. 美野さやか、深海底熱水活動域に生息する化学合成独立栄養細菌の集団遺伝学：遺伝的多様性と分布パターンの解明、第 30 回日本微生物生態学会、2015 年 10 月 17-20 日、土浦亀城プラザ (茨城県土浦市)

[その他]

(1) 受賞 (計 2 件)

1. ポスター受賞、2016 年、第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、函館市 (受賞対象者：米山直毅)

2. 学生発表賞受賞、2016年、農芸化学会北海道支部、函館市(受賞対象者:佐藤和叶)

6. 研究組織

(1)研究代表者

美野 さやか (MINO Sayaka)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教

研究者番号: 00755663