様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｈ０３３１９

研究課題名（和文）局所ゲノム・鉱物解析による深部岩石環境に生息する極小原核生物の生態解明

研究課題名（英文）Study of the ecology of ultra-small prokaryotes in deep rock environments by local genomic and mineral analyses

研究代表者
鈴木　庸平（Suzuki, Yohey）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・准教授

研究者番号：００３５９１６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,800,000円

研究成果の概要（和文）：深部岩石内部で優占する極小原核生物のCPRとDPANNを対象にするため、南部マリアナトラフの深海底熱水噴出孔から採取した金属硫化物チムニー試料を用いた。代表者が先行研究で開発した技術により、岩石内部の微生物を細胞単位で可視化し、細胞の周囲にはアモルファスシリカが存在することを確認した。DPANNのゲノムほぼ完全な構築に成功し、解糖系に必要な遺伝子の大部分を持っていることも明らかにした。
また、断面ダメージを与えることのない薄片作成法を確立し、薄片で微生物が存在する箇所から、高精度マイクロミルシステムにて局所サンプリングし、微生物の存在を確認することに成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義
熱水が盛んに噴出しているチムニー内部には、微生物の生存に必要な栄養が供給されているため、微生物の生息は知られている。しかし、熱水噴出が終了した後に、海底に取り残されているチムニー内部は栄養に乏しく、生命の生息が可能かについては不明であった。今回の研究チームによる生態系の発見は、熱水からのエネルギー供給による一次生産に立脚するという、従来の深海底熱水噴出孔生態系の概念を一変した。また、発見した極小原核生物は、より始原的であり、生命進化初期に誕生したグループであることが遺伝子解析により明らかになった。そのため、本研究の成果により生命の誕生から初期進化に関する研究が進展すると期待される。

研究成果の概要（英文）：A metal sulfide chimney sample collected from a deep-sea hydrothermal vent in the southern Mariana Trough was studied for the ecology oft CPR and DPANN. In order to detect CPR and DPANN, microorganisms were visualized inside the rock sample using the imaging technology developed in previous research.
Ultra-small cells were observed by Nano-solid analysis in the metal sulfide chimney sample. By Raman spectroscopy, we also confirmed the presence of amorphous silica around the ultra-small cells. In addition, we succeeded in constructing a nearly complete genome of DPANN from the chimney sample. Local sampling was attempted by making a thin section with a diamond band saw. After fluorescently staining the thin sections, the locations of microorganisms were localized by fluorescence microscopy. For local sampling, a high-precision micromill system was used. Although we were not able to obtain genomic data from the locally obtained sample, mineral analysis was successful.

研究分野：地球微生物学、鉱物学、地球化学

キーワード：DPANN　ゲノム解析　メタゲノム解析　岩石内生命

※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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

光合成由来の有機物に依存しない暗黒生態系は、光合成生物の最古の化石が見つかる 34 億年以前に、その起源を遡ることができる(Tice & Lowe 2004)。地球の内部エネルギーに依存する暗黒生態系は、マグマが冷却されて岩石が形成される過程で、マグマからの H_2、CH_4、CO、 SO_2 等を含む揮発成分と、岩石-水反応で放出される還元物質である H_2、Fe(II)、HS^-、NH_4^+、CH_4 を含む炭化水素を代謝してエネルギー獲得すると考えられている。岩石がマグマから形成した直後は熱水循環を伴い、岩石−水反応により生成する還元物質が豊富に供給されるため、高温岩石圏が暗黒生態系研究の当初のターゲットであった。一方、岩石が時間と共に冷却するとエネルギー供給量が著しく低下し、緩慢な流体移動または速度の遅い鉱物溶解反応への依存度が高まるため、広大な領域を占める低温岩石圏の生命生存可能性は不明な点が多かった(Yamashita, Suzuki et al. 2019 *Sci. Rep.*)。

大陸地殻の主要構成岩石である花崗岩(御影石で知られる)内部の低温環境は、光合成生物誕生前の地球での存在が地質記録から知られており、初期地球の生態系を類推する上で重要な研究対象である。応募者は、その花崗岩深部の原核生物の研究において世界をリードしている。これまで、地下施設で採取した高品質の地下水試料の地球化学分析とメタゲノム解析を組み合わせ、

- マグマの熱源が完全に冷え切った土岐花崗岩の低温環境で、深度 300 メートルから採取した地下水は、光合成由来の有機物に欠乏しており、安定同位体組成からマグマ起源と推定されるメタンを硫酸で酸化する古細菌が生息することを明らかにした(Suzuki et al. 2014 PLOS One; Ino, Banfield, Suzuki et al. 2018 *ISME J*)。
- 土岐花崗岩の地下水中には CPR に分類される細菌門の Parcubacteria、DPANN に分類される古細菌門の Pacearchaeota と Micraarchaeota が優占することを明らかにし、それらの分類群に属する数種のほぼ完全なゲノムの構築に成功している(Hug, Suzuki, Banfield et al. 2016)。

CPR と DPANN は、ゲノム(0.4~1.0 Mbp)と細胞サイズ(0.1~0.3 μm)が小さく、極小原核生物と呼ばれる。極小原核生物は、リボソーマルタンパク質配列の普遍系統樹上で細菌と古細菌の根元付近で分岐するため、地球初期生命を推察する上で重要な分類群である(Castelle et al. 2018)。また、極小原核生物のゲノム中の 50%以上の遺伝子が機能不明であり、その代謝様式については不明な点が多く残されている。極小原核生物のゲノム中には、アミノ酸や核酸といった生命維持に必須物質の生合成遺伝子の多くを欠損するため、他の微生物に細胞外共生すると考えられている。一方で、地下深部試料から得られた極小原核生物のゲノムサイズは比較的大きく(0.7~1.0 Mbp)、生合成遺伝子の数も比較的多く、岩石内部では細胞密度が低く共生関係を築くには不利なため、共生しないで増殖している可能性も十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、深部岩石内部で優占する極小原核生物である CPR と DPANN を対象として、岩石内部の分布と鉱物との相関性を明らかにする。鉱物と小さな細胞の関係が明らかになった局所部を対象にして、応募者が開発した局所 DNA 解析技術を用いてゲノム解読を試みる。また、岩石まるごと培養を行い、岩石内部での活性と代謝様式について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

岩石試料の採取と薄片作成(2020-2021 年)

南マリアナトラフの Pika サイトの熱水噴出域で採取したチムニー試料は、薄片作成のため LR White 樹脂に包埋した後、精密切断機アイソメット (BUEHLER 社製)を用いて切断し、表面をコランダム粉末とダイヤモンドペーストにて研磨した。また、3 年目は、精密ダイヤモンドバンドソー (Meiwa Fosis Corporation DWS 3500P) を用いて樹脂埋めしていない岩石を切断し薄片を作成した。

イメージング質量顕微鏡による解析

イメージング質量顕微鏡(iMScope TRIO, Shimadzu)で観察した領域の mass spectrometry(MS)データは、四重極型、イオントラップ型、飛行時間型の質量分析計(MALDI-TOF)を装備した大気圧マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析/イオン化システムにて取得した。

DNA 抽出及び 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析による解析

岩石試料からの DNA 抽出は、申請者らが開発したアルカリ加熱抽出法(Kouduka, Suzuki et al 2012)を用いて行った。試料から抽出した DNA 溶液をテンプレートに、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、全微生物が有する 16S リボソーム RNA 遺伝子を増幅した。増幅したリボソーム RNA 遺伝子の次世代シーケンス解析は、イルミナ社の Miseq300PE を用いてペアエンドシーケンシング法にて実施した。

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)法による解析

LR-White 樹脂で包埋したチムニー試料の薄切片に対し、DPANN を対象にした Cy-5 標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーション処理した。処理後、DAPI 溶液 (4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩溶液)にて染色し、Olympus BX51 顕微鏡にて観察した。

顕微ラマン分光法による解析

薄片の黄鉄鉱の粒界をレーザーラマン分光装置(Horiba LabRam HR)を用いて、励起レーザー波長 532 nm で解析した。ラマンスペクトルは、鉱物のラマンデータベース RRUFF(http://rruff.info)から取得した標準スペクトルや文献で報告されているスペクトルと比較した。

フーリエ変換赤外分光装置(FT-IR)

樹脂埋め処理を施したそれぞれの試料に対し、高精度マイクロミルシステム(GEOMILL326)を用いて CaCO3 部分を削り出した。削り出した粉末試料について、DLATGS (重水素 L-アラニンでドープした三グリシン硫酸) 検出器を搭載した FT-IR (IRSpirit, Shimadzu Corporation, Kyoto) と付属品の 1 回反射型全反射測定装置 (QATR-S, Shimadzu Corporation, Kyoto) を用いて測定を行った。

エネルギー分散型 X 線分光装置付属の走査型電子顕微鏡(SEM-EDS)による解析

蛍光顕微鏡で観察した領域を電子顕微鏡観察するために、100%エタノール中で Vectashield を取り除き、50℃で乾燥後、一晩真空引きをおこなった。カーボン蒸着を行い、EDS 付属の電

界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM: Field Emission Scanning Electron Microscope; Hitachi S-4500)を用いて、加速電圧 15 kV で観察を行った。観察は二次電子像と反射電子像で行い、EDS により元素組成のデータ取得を行った。

顕微赤外分光法による解析

光熱変換赤外分光法(Optical-photothermal IR spectroscopy, O-PTIR)を用いた顕微赤外分光装置(mIRage IR microscope, Photothermal Spectroscopy Corporation)により、500 nm の領域から非破壊･その場分析を行った。波長 532 nm のレーザーを用いて、スペクトラは 1801 から 801 cm-1 の範囲から取得した。本装置を持ちいて培養した微生物細胞をシングルセルレベルで分析可能であることが Lima et al. (2022)により報告されている。

走査型軟X線分光顕微鏡(Scanning Fluorescence X-ray Microscopy: SFXM)による解析

走査型軟X線分光顕微鏡による測定は、SPring-8 のビームライン BL17SU で行われた。試料を高精度のステージに搭載して、厚い試料を観察する反射型に配置した試料にプローブを走査した(Oura et al. 2020)。フレネルゾーンプレート(Fresnel Zone Plate, FZP)を用いた光学系によりサブミクロンスケールに軟 X 線ビームを集光し、測定時のビーム径は 600-800 nm であった。試料から放出される蛍光 X 線をシリコンドリフト検出器で計数する蛍光 X 線分析(microprobe X-Ray Fluorescence analysis： μXRF)を行った。

ゲノム解析

抽出したゲノム DNA を用いて、KAPA Hyper Prep kit for Illumina (KAPA Biosystems)によるショットガンライブラリ構築を行い、MiSeq PE300 によるライブラリーの配列決定を行った。MAG の再構築は、MetaWRAP v.1.3.271 に含まれる Read_QC モジュールを使用した。SPAdes バージョン 3.13.0 を使用し、リードをコンティグにアセンブルし、ビニング処理した。Prokka を使用してアノテーションを行った後、MetaWRAP の Quant bins module で処理した。

4. 研究成果

R2 年度は、深部岩石内部で優占する極小原核生物である CPR と DPANN を対象にするため、南部マリアナトラフの深海底熱水噴出孔から採取した金属硫化物チムニー試料を用いた。微生物検出を行うために、代表者が先行研究で開発した岩石内部の微生物を細胞単位で可視化するイメージング技術を適応した。金属硫化物チムニーから作成した厚さ 3 μm の薄片を対象に、高空間分解能二次イオン質量分析装置を用いて、炭素、窒素、硫黄、リン等の生体主要元素の細胞レベルでのイメージングを行った。しかし、微生物細胞に関しては極小のため可視化不可だったため、薄片の厚さを 150 nm にし、ナノ固体分析手法を用いて解析した。結果、黄銅鉱(CuFeS2)の鉱物粒子間の狭い隙間に直径 100 nm 程度の極小微生物が密集していることを確認した。微生物の存在を確認したので、チムニー試料をマイクロドリルで削り、DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を実施した。得られた配列情報から、金属硫化物チムニー試料中には、DPANN に分類される始原的な古細菌が優占していることが確認された。さらに、金属硫化物チムニー試料に対し、ゲノムや遺伝子発現について解析を行うために DNA 抽出を実施し、2 年目以降への研究へと繋げた。また、岩石試料からの微生物検出法について、Frontiers in Microbiology にて発表した(Takamiya, H. Suzuki, Y.et al 2021)※。

※,Takamiya, H., Kouduka, M., & Suzuki, Y. (2021). The Deep Rocky Biosphere: New Geomicrobiological Insights and Prospects. *Frontiers in Microbiology,* 3666.

R3 年度は、初めに R2 年度に深海底熱水噴出孔から採取した金属硫化物チムニー試料中で観察された微小な球体が微生物であるかを確認した。
研究分担者のメタゲノム解析による先行研究で、深海熱水噴出孔の金属硫化物堆積物から DPANN を検出し、代謝の特徴が報告されている。また、DPANN の細胞サイズは直径 200 nm 未満と小さく、R2 年度に金属硫化物チムニー試料で観察された微生物細胞の大きさと一致する。そこで、DPANN のプローブ を用いた Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)法およびラマンにて金属硫化物チムニー試料を解析した。また、金属硫化物チムニー試料で小さい細胞が観察された周囲にはアモルファスシリカが存在することを確認した。また、金属硫化物チムニー中の DPANN のゲノムほぼ完全な構築に成功し、解糖系に必要な遺伝子の大部分を持っていることを、ゲノム解析により明らかにした。R2 年度及び R3 年度の成果「深海底熱水噴出孔で原始的な微生物を発見」は、国際誌で発表し※、プレスリリースを行った。

※Takamiya, H., Kouduka, M., Suzuki, Y. et al (2022). Copper-Nanocoated Ultra-Small Cells in Grain Boundaries Inside an Extinct Vent Chimney. *Frontiers in Microbiology, 13.*

R4 年度は、局所サンプリングおよび、サンプリングした試料の固体分析を行った。固体分析には、有機物、粘土鉱物、微生物の検出可能であることを先行研究にて確認したフーリエ変換赤外分光光度計を用いた。DPANN の存在が確認された深海底熱水噴出孔から採取した金属硫化物チムニー試料から、厚さ 3.0 mm の薄片を作成した。薄片作成には、ダイヤモンドバンドソー(メイワフォーシス株式会社)を用いることで、切断による試料のロスが少なく、断面ダメージを与えることのない切断を可能にした。薄片は蛍光染色した後、蛍光顕微鏡観察にて微生物が存在する箇所を特定し、高精度マイクロミルシステム(GEOMILL326)を用いて局所サンプリングした。削り出した試料は、フーリエ変換赤外分光光度計(顕微FTIR_IRTracer)にて固体分析した。固体分析の結果は、R2 年度と R3 年度に取得したデータを合わせ、論文化を進めており、R5 年度内に投稿予定である。

参考文献

- Tice MM & Lowe DR. (2004). *Nature*, *431*(7008), 549.
- Yamashita S, Suzuki Y, et al. (2019) *Scientific Reports*, 9, 11306.
- Suzuki Y, et al. (2014). *PloS one*, 9(12), e113063.
- Hug LA, Suzuki Y, Banfield FJ et al., (2016) *Nature Microbiol.* 1:16048.
- Castelle C J, Huang RH, & Banfield JF. et al. (2018). *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 629.
- Ménez B. et al.(2018). *Nature*, 564(7734), 59.
- Hazen RM (2012) Wiley-Blackwell Oxford, UK, pp. 315– 332.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

1．著者名 Takamiya Hinako、Kouduka Mariko、Suzuki Yohey	4．巻 12
2．論文標題 The Deep Rocky Biosphere: New Geomicrobiological Insights and Prospects	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Frontiers in Microbiology	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.785743	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〕

－

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
研究分担者	加藤　真悟 (Kato Shingo) (40554548)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発研究員 (82401)	
研究分担者	石村　豊穂 (Ishimura Toyoho) (80422012)	京都大学・人間・環境学研究科・准教授 (14301)	

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