

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770033

研究課題名(和文) 海底下深部炭素フローの端緒を担う微生物の系統・機能・生理生態の解明

研究課題名(英文) Phylogeny, function and physiology of microbes playing important roles in carbon flow in the marine subsurface environments

研究代表者

星野 辰彦 (HOSHINO, Tatsuhiko)

独立行政法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・研究員

研究者番号：30386619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、最も単純な炭素酸化物であるCO<sub>2</sub>を、堆積物内部の嫌気環境下で資化することのできる微生物を推定することを目的として研究を行った。世界各地の海底下1 - 400mから得られたセディメントよりDNAを抽出し、嫌気的一酸化炭素デヒドロゲナーゼのサブユニットをコードする遺伝子の増幅を試みたところ、およそ20%のサンプルから遺伝子の増幅が確認された。さらにそれらの遺伝子断片の配列を決定し系統学的な解析を行った。その結果、本研究で得られたcooS遺伝子は既に知られているものとは全く異なるものであることが分かり、海底下においては未だ知られていない微生物によりCO<sub>2</sub>が資化されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： In the past decades, microbial community in the marine subsurface environments have been studied, and total biomass of microbial cells in the marine subsurface was estimated to contribute to 0.6% of the total living biomass carbon on the Earth. However, roles of those deep life were still largely unknown. In this study, we first investigated diversity of cooS gene, which encodes beta subunit of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase, in the seafloor environments. DNA was extracted from marine sediments obtained at Gulf of Mexico, Fuan de Fuca, South Pacific Gyre, Nankai Trough, and off Shimokita peninsula by IODP expeditions. Fragment of cooS gene was amplified by PCR and sequenced. The sequencing results indicated that diversity of cooS gene in the sediments were very small comparing to 16S rRNA gene. Almost all obtained sequences were not related to the known cooS gene sequences in the database and formed distinct clusters in a phylogenetic tree.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生態・環境

キーワード：地下生命圏 炭素フラックス 一酸化炭素 機能遺伝子 微生物生態

### 1. 研究開始当初の背景

1987年に報告されたPCR法は、コッホ、パスツールの時代より綿々と続いて来た単離・培養に基づいた細菌学・微生物学の研究手法を一変させた。この方法の恩恵は、培養可能な細菌が0.1%以下と言われている自然環境中の微生物生態研究にとって特に大きく、自然環境中にどのような微生物がどの程度存在するのかといった解析は、PCRを基盤としたクローニング、シーケンスといった培養を伴わない一連の手法により急速に進展した。

PCRに基づいた方法では、まずサンプルからDNAを抽出し目的の部位をDNAプライマーにより増幅する。系統解析・同定を目的とする場合は16S rRNA遺伝子をターゲットとするが、この場合は微生物の機能、すなわち「何をしているのか」といった情報が欠落する。一方、微生物の持つある機能をターゲットにする場合は、目的の機能をコードする遺伝子を解析対象とするが、逆に系統に関する情報つまり「誰が」といった情報が欠落する。この問題は、DNAを抽出しバルクとして扱っていることに起因しており、「機能」と「系統」をリンクすることは長年にわたって微生物生態学の大きな課題であった。この課題を克服するためには、一個一個のバクテリアをパッケージとして扱うシングルセルアプローチが有効である。しかしながら、機能遺伝子のシングルセルレベル検出は困難であり、機能と系統のリンクは殆ど行なわれてこなかった。それに対し、研究代表者は *in situ* rolling circle amplification (*in situ* RCA) を応用し、バクテリアの内部の複数の機能遺伝子、16S rRNA 遺伝子を同時に *in situ* で検出することに世界で初めて成功し、「機能」と「系統」のリンクを行なうことを可能にした (Hoshino et al., *Environ. Microbio.*, 2010)。

一方で、2004年に掘削地球科学史上初めて行なわれた地下生命圏掘削深査航海以降、生物が全く存在しない領域であると考えられていた海底下深部環境に微生物が棲息していることが認識されている。そのバイオマスは地球上の全生命体のバイオマスの1/10-1/3に匹敵すると見積もられ、その持続的な生命活動は地球規模の物質循環や生態系維持に、地質学的なスケールで重要な役割をはたしていることが明らかになりつつある (Whitman et al. *PNAS.*, 1998)。海底下地殻内部に存在する微生物群は、地上や海水中に存在するものと大きく異なることが分かっており、エネルギー/栄養が非常に限られた高温・高圧の極限環境に適応した微生物群が存在することが示唆されている。2006年には、海洋研究開発機構が行なった掘削航海により下北沖水深1,200mの海底からサンプルが採取され、海底下1cm<sup>3</sup>あたりに数千万から一億と極めて大量の微生物が存在することが報告された (Morono et al., *ISME*

J., 2009)。そして、この地下生命圏は海底下2,000m以深の石炭層由来の栄養によって維持されていることが予想された。しかしながら、その大量の微生物叢の構成、そこで何をしているのか? 石炭を起点とした炭素フラックスに関わっているキープレイヤーは誰なのかといった疑問は解決していない。これらの疑問を解決することは、地球レベルの物質循環や、生物の habitable zone に関する認識に新しい洞察を与えることが期待される。

### 2. 研究の目的

海底下における炭素フラックスの端緒を担う微生物群集について明らかにする。特に、最も単純な炭素酸化物である一酸化炭素を海底下深部の嫌気的条件下で資化できる微生物、すなわち一分子の一酸化炭素を一分子の水により酸化し二酸化炭素と水素を生じる *Hydrogenogen*、または、4分子の一酸化炭素を2分子の水で酸化し酢酸を生成する *Acetogen* などの微生物群の存在を *CO* デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を解析することにより検出し、その多様性について系統的に評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) サンプル

国際統合国際深海掘削計画 (IODP) によりファンデフカ海嶺、メキシコ湾、熊野灘南海トラフ、下北半島沖、および南太平洋還流の海底下1m—400mまでの堆積物 (Figure 1) から得られた下記試料からDNAを抽出した。抽出にあたっては海底下の微生物からも効率的にDNAを抽出可能な方法を開発し、適用した。この方法では、これまででは効率よくDNAを抽出することが困難であった細胞壁の構造が強固である古細菌からも、効率よくDNAを抽出することが可能である。



Figure 1 Sampling location 1: Juan de Fuca, 2: Gulf of Mexico, 3: Nankai Trough, 4: Off Shimokita peninsula, 5: South Pacific Gyre

#### (2) PCR 増幅・シーケンシング

嫌気的一酸化炭素デヒドロゲナーゼ複合体のβサブユニットをコードする遺伝子である *cooS* をターゲットとしたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、目的の遺伝子の一部を増幅した。

得られた増幅産物をアガロースゲルにより電気泳動し、目的の長さのPCR産物を切

り出し精製を行なった。その後、生成された遺伝子断片をベクターに挿入し、クローニングを行なった。得られたおよそ 1.3 kb の *cooS* 遺伝子断片の配列はサンガー法により決定した。

### (3) データ解析

公共のデータベース上に公開されている *cooS* 遺伝子の配列をダウンロードし、本研究で得られた配列との系統学的関係を解析した。配列の取得、アミノ酸配列の推定およびアライメントは FunGene (<http://fungene.cme.msu.edu>) を利用して行なった。系統学的な関係の推定に関しては Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて行なった。

## 4. 研究成果

各試料の異なる深度から抽出した約 50 の DNA 試料から *cooS* 遺伝子の増幅を試みた。そのうち 10 試料から目的のサイズの増幅産物が得られた (Table 1)。

Table 1 Sample properties of sequences obtained in this study

| Site                    | Depth [mbsf*] | Number of sequences |
|-------------------------|---------------|---------------------|
| Gulf of Mexico          | 46.2          | 31                  |
|                         | 392.2         | 45                  |
| Off Shimokita Peninsula | 1.4           | 6                   |
| Off Shimokita Peninsula | 47.5          | 6                   |
| Juan de Fuca            | 2.5           | 33                  |
|                         | 4.6           | 28                  |
| South Pacific Gyre      | 1.7           | 37                  |
| Nankai Trough           | 0.8           | 26                  |
|                         | 138.4         | 75                  |

\* denotes meters below seafloor

メキシコ湾、下北半島沖、南海トラフのサンプルについては、海底下 1 m 付近の浅部から連続的にサンプリングしたが、結果として中間層から増幅は得られず、浅部と深部からのみ増幅産物が得られた。得られた遺伝子断片の配列を決定したところ、16S rRNA 遺伝子の多様性と比較してかなり多様性が低く、*cooS* 遺伝子を持つ微生物群のポピュレーションが小さいことが分かった。

また、公共のデータベース上に存在するおよそ 1000 の *cooS* 遺伝子配列と得られた配列を合わせて系統学的に解析したところ、本研究で得られた *cooS* 遺伝子配列と系統学的に近縁な配列は存在せず、海底下セディメントにおいて一酸化炭素酸化ポテンシャルを有している微生物は、海底下に特異的に存在するものであることが示唆された。

海底下のセディメントにおいては、表層部分では海水由来の硫酸が豊富に存在することから硫酸還元細菌が優占し、硫酸が枯渇す

るとメタン生成古細菌が優占化する。この境界、Sulfate-Methane Interface では嫌気的なメタン酸化が起こることが知られており、メタン酸化古細菌が多く存在している。

表層セディメントからの硫酸イオンプロファイルが測定されているメキシコ湾および南海トラフのサンプルについて検討したところ硫酸が枯渇する直前付近で *cooS* 遺伝子が検出されていることから、これらの *cooS* 遺伝子は、硫酸還元細菌由来のものであることが予想され、これらの細菌は  $4CO + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow 4CO_2 + HS^-$  の反応を行なうことのできる細菌であることが示唆された。

一方、メキシコ湾の海底下 392m、下北半島沖の 48m、南海トラフの海底下 138m の堆積物深部で検出された *cooS* 遺伝子に関しては、嫌気的一酸化炭素酸化反応と共役して起こりうる反応である上記の硫酸還元は硫酸が枯渇しているため起こらない。可能性としては、メタン生成古細菌由来であることも考えられるが、このような深部の環境ではメタン生成に必要な水素や酢酸が多量には存在していない。そのため、これらの *cooS* 遺伝子は、 $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$  の反応を担う Hydrogenogens または  $4CO + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+$  の反応を担う Acetogen 由来である可能性も高い。



Figure 2 Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The analysis involved 284 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

得られた *cooS* 遺伝子配列をアミノ酸配列に翻訳し、系統学的な位置関係を解析すると上記の仮説を支持する結果となった (Figure 2)。つまり、海底下深部における *cooS* と海底下浅部における *cooS* は異なるクラスターに分類される一方で、メキシコ湾と南海トラフの深部サンプル由来の配列は同一のクラスターに分類された。

本研究では、海底下セディメントに存在する *cooS* 遺伝子について初めて解析し、海底下に存在する *cooS* 遺伝子群がこれまで報告されているものと大きく異なること、深度に応じて異なる *cooS* 遺伝子が存在しており、深部から得られた *cooS* 遺伝子に関しては Hydrogenogen や Acetogen 由来である可能性が示唆された。

一方で *cooS* 遺伝子は微生物間で広く水平伝播することが知られており、系統学的なマーカーとして用いることができない、すなわち *cooS* 遺伝子を持っている微生物が「誰なのか」を同定することは非常に難しい。今後は、本研究で得られた *cooS* 遺伝子をターゲットとして微生物細胞を *in situ* 検出しソーティングしたのち、16S rRNA 遺伝子配列を同定し、海底下深部において一酸化炭素を資化できるポテンシャルを持っている微生物を系統学的に同定していくことが必要である。

#### 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1件)

Yuki Morono, Takeshi Terada, Tatsuhiko Hoshino, Fumio Inagaki, A hot-alkaline DNA extraction method for deep subseafloor archaeal communities, Applied and Environmental Microbiology, vol. 80, 2014, 1985-1994 (査読有り) DOI: 10.1128/AEM.04150-13

##### [学会発表](計2件)

Tatsuhiko Hoshino, Masazumi Tsutsumi, Yuki Morono, Fumio Inagaki, A global molecular ecological survey of subseafloor microbial communities, Goldschmidt 2013, 26, Aug., 2013, Fortezza de Basso, Florence, Italy

Terada Takeshi, Yuki Morono, Tatsuhiko Hoshino, Fumio Inagaki, An improved hot-alkaline DNA extraction method for high cell-lysis efficiency of subseafloor microbial communities, Goldschmidt 2013, 26, Aug., 2013, Fortezza de Basso, Florence, Italy

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

星野 辰彦 (HOSHINO, Tatsuhiko)  
独立行政法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・研究員