

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25701003

研究課題名(和文) 地下圏炭素・エネルギー動態に関する中核微生物群の同定と新機能解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of microorganisms involved in the carbon and energy cycles in the deep biosphere

研究代表者

堀 知行 (HORI, Tomoyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・主任研究員

研究者番号：20509533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、結晶性酸化鉄を還元する嫌氣的酢酸酸化菌に焦点を当て、海底地下試料を微生物接種源として、数百種類の微生物集積系の取得に成功した。次世代シーケンズの結果、Firmicutes門に属する鉄還元微生物群が地下圏の物質・エネルギー循環に中心的に関与していることが強く示唆された。さらに未培養微生物機能同定法であるStable Isotope Probing (SIP) と次世代シーケンズを組み合わせることで、従来法より約500倍の検出感度を有する超高感度SIPを確立した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on anaerobic acetate oxidizers involved in the reduction of crystalline iron(III) oxides and successfully obtained their enrichment cultures from deep subseafloor core sediments. High-throughput sequencing of 16S rRNA genes revealed that iron reducers affiliated within the phylum Firmicutes may play a pivotal role in the carbon and energy cycles in the deep biosphere. Further, in order to investigate the ecophysiological features of the iron reducers, we established the ultra-high-sensitivity stable isotope probing of 16S rRNA.

研究分野：微生物生態学

キーワード：環境分析 深海環境 地球化学 環境 微生物

1. 研究開始当初の背景

- (1) 地下深部掘削および微生物生態学の進展により、地球内部に広がる地殻には多種多様な未知微生物群が圧倒的なバイオマス量で生き続けていることが明らかになってきた。本発見は、好気性生物が繁栄する地球表層部が生命活動の主要な場であるという常識を覆し、陸域地下および海底地下に存在する広大な嫌気生命圏が地球上炭素・エネルギー循環の直接の担い手のひとつであることを強く示唆している。
- (2) ごく最近の成果では、ナノスケール同位体比検出技術 NanoSIMS により地球深部の未培養微生物群が極めて低速ではあるが  $^{13}\text{C}$ -有機物を取り込むこと、固定化担体バイオリクターを用いた海底地下コアの連続培養によって生物学的メタン生成が起こることが報告されている。これにより地下生命圏において「高次有機物が生物学的にメタン・ $\text{CO}_2$ に変換される」という炭素・エネルギーの流れが推定されている。高次有機物から低級脂肪酸への分解は、微生物の発酵的代謝によると考えられ、エネルギーの乏しい地下圏でも十分に起こり得る反応である。しかしながら、「低級脂肪酸（特に酢酸）」の分解機構やそれに関与する地下微生物群は全くの未知と言っても過言ではない。
- (3) 嫌気分解過程で最大のフラックスを有する「酢酸」は、嫌気環境で熱力学的に極めて安定である（酢酸酸化： $\Delta G^{\circ} = +104 \text{ kJ/mol}$ ）。陸域の嫌気酢酸分解に関して、その約 70%が酢酸資化性メタン生成菌によるメタン変換であることが知られている。一方、地下圏では、酢酸資化性メタン生成菌はほぼ検出されないものの、酢酸は蓄積することなく代謝されている。地下微生物群は熱力学的に極めて安定な酢酸を分解するために、その酸化反応で生じる電子を速やかに体外に放出しなければならないが、硝酸や硫酸などのエネルギー順位の高い電子受容体は地下圏にほぼ存在しない。これらを鑑みると、酢酸の嫌氣的酸化にカップリングする電子伝達機構は、地下圏に豊富に存在する鉄鉱物の還元反応である可能性が高い。
- (4) 地下深部では、有機物の豊富な「泥層」とメタン・ $\text{CO}_2$  ハイドレートなどが存在する「砂層」の境界域にナノサイズの硫化鉄「ナノパイライト ( $\text{FeS}_2$ )」が頻繁に観察される。この地質学的空間分布を基に考えれば、砂層と泥層の境界は「有機物からメタン・ $\text{CO}_2$  への変換」が旺盛に

起こり得る生物活動域と推定される。とりわけ、「酢酸」を嫌氣的に酸化しナノパイライトを生成するような生物反応が強く示唆されるものの、これら酸化と還元を連結させる微生物学的根拠はこれまでに知られていなかった。我々の研究により、嫌気土壌圏において新規な未培養微生物群が生物難利用性の結晶性酸化鉄を低速ながら還元し、酢酸を嫌氣的に酸化していることが発見された。これらの微生物機能は、鉄鉱物を豊富に含む地下深部でこそ重要である可能性が高く、嫌氣的な酢酸酸化とナノパイライト生成を同時に実現可能にする代謝駆動力として極めて有力である。

- (5) 本研究で標的とする嫌気分解過程の中心中間産物「酢酸」と地殻中第 4 位の構成元素「鉄」は地球の根源物質であるため、その代謝に関わる未知微生物群の実体解明は、地下圏の生命活動全体を紐解くことに直結する。

2. 研究の目的

- (1) 未だ実体の明らかでない「地下圏炭素・エネルギーフラックスの根幹反応を担う未培養微生物群（結晶性酸化鉄を還元する嫌氣的酢酸酸化菌）」の生理生態を、分離培養技術と次世代シーケンサー解析との融合法によって明らかにすることで、今なお進行しつつあると予想されるメタンハイドレート形成やナノパイライト生成などの地下物質ダイナミクスに対して科学的知見を提供することを目的とした。
- (2) さらに、次世代シーケンス (MiSeq, Illumina) による微生物種の大規模同定法と Stable Isotope Probing (SIP) を融合させた超高感度な未知微生物機能同定法を確立し、これにより分離培養を経ることなく、地下微生物群の生理生態の根本的理解に資する技術基盤を構築することを目指した。

3. 研究の方法

- (1) 統合国際深海掘削計画 (IODP) 第 337 次研究航海「下北八戸沖石炭層生命圏掘削」で取得した海底地下コア試料 15 種 (海底下深度 1289~2458m) を微生物接種源として用いた。海底地下コア試料の単位体積あたりの微生物数は陸上土壌に比べて極めて少ない。ここでは得られる微生物菌体量の乏しさを打開するために、海底地下試料を直接解析するのではなく、第一ステップとして中核微生物群の高度集積系を構築した。電子受容体基質として溶解性のクエン酸鉄 (III) または NTA-

鉄(III)、結晶性の酸化鉄鉱物 5 種 (Goethite, Lepidocrocite, Hematite, Magnetite, Hornblende) を用い、電子供与体基質として酢酸を用いた。基礎培地として淡水および海水の Widdel 培地を採用した。集積培養は 2 年間以上継続し、集積系の全てから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子断片を PCR 増幅した後、複数回の精製を経て、次世代シーケンス (MiSeq, Illumina) へと供した。最終的に各集積系から数万種の微生物を系統的に特徴づけた。

- (2) 未知微生物機能同定法 SIP において  $^{13}\text{C}$  標識 rRNA の検出を従来法である Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) から次世代シーケンスへと置き換えることによって達成される検出感度増強を評価した。具体的には、大腸菌に由来する  $^{13}\text{C}$  標識された RNA を枯草菌に由来する非標識 RNA に 1% ~ 0.0001% の割合で混合することによって、異なる  $^{13}\text{C}$  標識 RNA 濃度を有する複数の標準試料を作成した。それらを超遠心に供し、各密度画分に含まれる 16S rRNA を T-RFLP および次世代シーケンスによりスクリーニングした。なお大腸菌の非標識 RNA を枯草菌の非標識 RNA と混合した非標識系も対照として用意し、同様の実験に供した。

#### 4. 研究成果

- (1) 結晶性酸化鉄を還元する嫌氣的酢酸酸化菌の取得を目指した長期間培養により高度集積系を数百種獲得することに成功した。得られた集積系のいくつかから鉄還元およびメタン生成などの重要な生物地球化学反応が観察された。さらに次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) を用いた大規模遺伝子配列解読により各集積系の構成微生物を数万種レベルで同定した結果、Firmicutes 門に属する鉄還元微生物群が地下圏の物質・エネルギー循環に中心的に関与していることが強く示唆された。
- (2) T-RFLP に基づく SIP では、大腸菌の  $^{13}\text{C}$  標識 RNA が 1~0.5% 含まれる条件で、大腸菌に由来するピークが最高密度画分で主要となった。しかし  $^{13}\text{C}$  標識 RNA の 0.05% 含有条件では大腸菌ピークを確認するのは困難であった。一方、次世代シーケンスを用いた場合、 $^{13}\text{C}$  標識 RNA を 0.05% ~ 0.001% 含む低混合率条件でも、大腸菌に由来する RNA の最高密度画分における集積が観察された。この  $^{13}\text{C}$  標識 RNA の高感度検出は、定量 RT-PCR の解析によっても支持された。これらから、 $^{13}\text{C}$  標識 RNA のスクリーニング法を T-RFLP から次

世代シーケンスへ置き換えることで rRNA-SIP の 500 倍の高感度化が達成された。ここで確立された超高感度 SIP は地下微生物群の機能解明に極めて有効であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① “Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in natural environments”, 堀知行, 青柳智, 伊藤英臣, 成廣隆, 笈川あずさ, 鈴木清史, 尾形敦, Michael. W. Friedrich, Ralf Conrad, 鎌形洋一, *Front Microbiol.*, vol.6(386), pp.1-16, 2015, 査読有
- ② “Dynamic transition of chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria in response to amendment with nitrate in deposited marine sediments” 青柳智, 木村真人, 山田奈海葉, Navarro R. Ronald, 伊藤英臣, 尾形敦, 迫田章義, 片山葉子, 高崎みつる, 堀知行, *Front Microbiol.*, vol.6(426), pp.1-12, 2015, 査読有
- ③ “High-resolution dynamics of microbial communities during dissimilatory selenate reduction in anoxic soil”, Navarro R. Ronald, 青柳智, 木村真人, 伊藤英臣, 佐藤由也, 菊池義智, 尾形敦, 堀知行, *Environ. Sci. Technol.*, vol.49, pp.7684-7691, 2015, 査読有
- ④ “Ultra-high-sensitivity stable-isotope probing of rRNA by high-throughput sequencing of isopycnic centrifugation gradients”, 青柳智, 花田智, 伊藤英臣, 佐藤由也, 尾形敦, Michael W. Friedrich, 菊池義智, 堀知行, *Environ. Microbiol. Rep.*, vol.7, pp.282-287, 2015, 査読有
- ⑤ “未培養微生物の代謝活性を検出する超高感度安定同位体プローブ法の開発”, 青柳智, 堀知行, *バイオサイエンスとインダストリー*, vol.73, pp.225-227, 2015, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① “超高感度 rRNA-Stable Isotope Probing による未知環境微生物群の機能解析”, 堀知行, 青柳智, 田中亮一, 尾形敦, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌, 2016/03/27-30
- ② “海底由来堆積物の嫌気分解過程における微生物間相互作用の解明”, 青柳智, Navarro R. Ronald, 眞弓大介, 尾形敦, 片山葉子, 高崎みつる, 堀知行, 第 50 回日本水環境学会年会, 徳島,

2016/03/16-18

- ③ “*Geobacter* sp. AOG5 株で見出された結晶性酸化鉄に対する高い還元活性”，青柳智，佐藤由也，花田智，尾形敦，鎌形洋一，堀知行，第 6 6 回日本生物工学会大会，札幌、2014/09/09-11
- ④ “High-throughput sequencing of isopycnic centrifugation gradients improves the sensitivity of rRNA-based stable isotope probing”，青柳智，伊藤英臣，佐藤由也，尾形敦，花田智，菊池義智，堀知行，ISME15，韓国ソウル，2014/08/24-29
- ⑤ “Metabolic potential and community structure of anaerobically respiring microorganisms enriched from deep subseafloor sediments of the Shimokita Coalbed, Japan”，堀知行，青柳智，Navarro R. Ronald，佐藤由也，伊藤英臣，星野辰彦，諸野祐樹，稲垣史生，鎌形洋一，ISME15，韓国ソウル，2014/08/24-29
- ⑥ “次世代シーケンサーの適用による超高感度 rRNA-Stable Isotope Probing-微生物生態系機能の実態解明に向けた技術進展-”，堀知行，第 17 回日本水環境学会シンポジウム，滋賀，2014/09/08-10
- ⑦ “Enrichment, isolation and characterization of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in anoxic soil environments”，堀知行，青柳智，成廣隆，伊藤英臣，尾形敦，花田智，鎌形洋一，2nd Thunen Symposium on Soil Metagenomics，ドイツ Braunschweig，2013/12/11-13
- ⑧ “次世代シーケンサーの適用による RNA-SIP の高感度化”，青柳智，佐藤由也，伊藤英臣，花田智，菊池義智，堀知行，日本農芸化学会 2014 年度大会，東京，2014/03/27-30
- ⑨ “結晶性酸化鉄を還元する新しい微生物の分離培養と生理学的特徴”，青柳智，堀知行，伊藤英臣，尾形敦，成廣隆，花田智，鎌形洋一，第 29 回日本微生物生態学会大会，鹿児島、2013/11/23-25

[その他]

所属研究グループホームページ

<https://unit.aist.go.jp/emri/114envmicrob/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀 知行 (HORI, Tomoyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・主任研究員

研究者番号：20509533