

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820389

研究課題名(和文) 海洋性細菌が産生する特異な有機分子の構造解析：海水中CO₂から有機物生産へ研究課題名(英文) Structural analysis of peculiar organic materials produced by marine bacteria:
Mechanism for microbial conversion of CO₂ in the seawater to organic materials

研究代表者

牧田 寛子 (MAKITA, Hiroko)

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・技術副主任

研究者番号：40553219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、現在の海洋環境中で行われている「生育に伴う有機高分子生産」という微生物機能に着目し、海水中の二酸化炭素を利用した物質生産の可能性、つまり光合成に依存しない海水からのCO₂除去にも繋がるCO₂資源化システムの構築・提案を目指した。本研究の実施によって、鉄を唯一のエネルギー源とし、海水中のCO₂固定により生育する海洋性鉄酸化細菌の大量培養手法の構築、新種の鉄酸化細菌の単離、そしてそれら細菌が菌体外に産生する有機高分子の組成・構造を明らかにすることに成功した。これらの結果から、微生物機能を用いて海水中のCO₂から有機物質の生産(CO₂の資源化)システム構築への知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：This research aims to investigate the possibility of substance production utilizing carbon dioxide in the seawater independent of photosynthesis, and to construct a circulation system to remove CO₂ from the environment using microbial functions. In order to achieve the purpose, it is necessary to establish a new mass-culturing method of chemotrophic bacteria and to evaluate the usefulness of extracellular organic materials they produce. In this study, we succeeded in developing a mass-culturing method of marine iron oxidizing bacteria using CO₂ in the seawater as the carbon source for their growth. Moreover, we succeeded in isolating a number of new iron-oxidizing bacteria using this method, as well as in clarifying the composition and structure of extracellular organic materials they produce. Through the present research, we obtained crucial knowledge required for the development of a system to produce organic materials from CO₂ in the seawater by microbial activity.

研究分野：微生物生態学

キーワード：鉄酸化細菌 CO₂固定 有機物生産 海洋環境

1. 研究開始当初の背景

光の届かない深海や地殻内では、地球地殻に普遍的に存在する鉄が化学合成微生物の一次生産活動における重要なエネルギー源の一つである。したがって鉄を利用する微生物は海洋や地殻中に多く存在すると予想され、近年では海洋での鉄利用微生物の分布や伝播についての研究が進みつつある。海洋性鉄利用微生物に関する近年の研究の中で特に際立った成果は、鉄酸化細菌 *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1 株(Ref. 1)が単離されたことである。本細菌は、二価鉄を酸化し CO_2 を固定することで生育する化学合成独立栄養細菌である。海底に見られるほぼ全ての鉄酸化物を含む微生物マットにおいて、それらが存在することが示されている。本細菌の最大の特徴は、海水中の CO_2 を炭素源として自身の増殖に利用する他、菌体外に多量に産生する有機高分子へと変換する点である。それらの有機高分子は天然環境中で、鉄酸化物を周囲に吸着・保持した状態で観察される。本細菌を含む鉄利用微生物(特に鉄酸化細菌)は、淡水・海水問わず菌体外に有機高分子を産生するものが多く、それらの有機高分子が支持体となって、有機物・金属複合体からなる特徴的な構造物(螺旋状や中空糸状)を形成することが認められている。このような構造物は、陸上では金属塩を含む河川や湖沼で見られる茶色い沈殿物中で良く観察されるが、その構造物について、そしてその利用性についてはほとんど研究対象とはされていなかった。近年、それらの構造物の金属吸着能や有用性が注目されてきているが、未だ研究例が少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、海洋性鉄酸化細菌が産生する特異な菌体外有機高分子の組成・構造を解明し、有機高分子の有用性とそれらの機能の評価を行い、最終的には微生物機能を用いて海水中の CO_2 から有機物質を生産(CO_2 を資源化)するシステムを提案することを目的とした。

3. 研究の方法

鉄を唯一のエネルギー源とし、海水中の CO_2 固定により生育する海洋性鉄酸化細菌が菌体外に産生する有機高分子の組成・構造および有用性を明らかにするために、以下の3項目を実施した。(1)微生物学的および電気化学的手法を用いた大量(高密度)培養系の構築、(2)分析に足る量の菌体外有機高分子の取得、(3)菌体外有機高分子の構造解析の実施。得られた知見から、海水中の CO_2 からの有機高分子生産システムの構築を検討した。

4. 研究成果

初年度は、菌体外有機高分子試料の大量取得を目指し、種々の培養手法を用いた大量培養系の構築(スケールアップ)を検討した。スケールアップの評価方法は、培養によって得られる菌体数および菌体外物質と鉄酸化物の複合体である沈殿物の重量とそれら沈殿物中の有機

炭素含量の比較により行った。さらに、エネルギー源である二価鉄(塩化鉄溶液)の培地中の濃度および添加のタイミングを検討し、増殖傾向や沈殿物量、有機物量への影響を調べた。これらの検討により、6Lの培養系までスケールアップすることに成功し、また500mLの系においては多量の沈殿物を回収できる事が示された(10mLの系と比較して約60倍)。しかし、培養スケールが大きくなるにつれて、沈殿物中の有機炭素含量は減少してしまった。このことは、培養に用いる培養槽を大きくしたことにより、増殖(代謝)の過程で生じる鉄酸化物よりも、培地気相中の酸素によって無機的に酸化されることで生じる鉄酸化物の方が増加してしまうためだと考えられた。そこで、鉄源となる塩化鉄溶液を分割し添加することで、より有機物含量の高い沈殿物が得られるか検討を行った。その結果、鉄源の分割添加を行った系では、無機的な鉄酸化物の少ない沈殿物が得られることが明らかとなった。

2年度目は、初年度の検討によって確立した培養手法を用いて、菌体外有機高分子を含む沈殿物試料を回収し、試料の構造解析法の検討を行った。培養によって集められた試料には、菌体外高分子の他に菌体細胞と多量の鉄酸化物が含まれている。菌体外高分子の分析の際に問題となるのが、高分子を覆う鉄酸化物の存在である。鉄酸化物は、比色定量法での反応やHPLC分析を行う際の標識化を阻害する。したがって、できる限り鉄酸化物を除去することが必要である。そこで、まず酸や還元剤などの化学的手法を用いた鉄の除去方法を検討した。作用させる反応溶液(酸、還元剤)の種類、濃度、反応時間、温度などを変化させ、培養によって集めた試料中の鉄の溶解を試みた。なお、反応溶液に作用させた後の菌体および有機高分子の様子は、光学顕微鏡および電子顕微鏡により確認した。検討の結果、鉄除去のための最適な反応溶液組成および条件を導き出すことができた。

最終年度は、有機高分子の組成に迫るべく、大量培養によって得られた沈殿物(有機高分子と酸化鉄の複合体)の分析を実施した。当初、有機高分子の分析には培養の過程で生成される酸化鉄の除去が不可欠と考えていた。しかしながら、酸化鉄を完全に除去するために酸や還元剤を用いて酸化鉄の溶解・除去を行うと、特徴的な構造が崩れてしまう。たとえ構造が崩れても組成は変わらないはずだが、例えば多糖の構造のうち結合の弱い側鎖などは外れてしまうことが予想された。さらに、還元剤や酸の残存が分析に影響することが判明した。そこで、酸化鉄を含む状態で、有機高分子の分析を試みた。その結果、顕微質量分析などの質量分析法を用いることで、部分的な構造を明らかにすることに成功した。また本研究で構築した培養手法を用いることで、世界で2例目となる深海底からの新

種の化学合成独立栄養鉄酸化細菌 (ET2 株) の単離に成功した(Ref. 2)。新たに単離された鉄酸化細菌も、既知の鉄酸化細菌と同様に菌体外に多量の有機高分子を産生することが明らかとなった。さらに、本培養法を用いることで、深海環境から混合栄養性の鉄酸化細菌の単離や、浅海からは鉄酸化細菌と鉄還元菌が共役する培養系を構築することにも成功した。以上のように、本研究では鉄を唯一のエネルギー源とし、海水中の CO₂ 固定により生育する海洋性鉄酸化細菌の培養手法を構築し、鉄酸化細菌の大量培養および新種の鉄酸化細菌の単離、そしてそれら細菌が菌体外に産生する有機高分子の組成・構造を明らかにすることに成功した。これらの結果から、微生物機能を用いて海水中の CO₂ から有機物質を生産(CO₂を資源化)するシステム構築への知見を得ることができた。

<引用文献>

- (1) Emerson, D., Rentz, J.A., Lilburn, T.G., Davis, R.E., Aldrich, H., Chan, C. and Moyer, C.L. (2007) A novel lineage of *Proteobacteria* involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS ONE*, 2: e667. doi: 10.1371/journal.pone.0000667.
- (2) Makita H., Tanaka E., Mitsunobu S., Miyazaki M., Nunoura T., Uematsu K., Takaki Y., Nishi S., Shimamura S, Takai K. (2017) *Mariprofundus micogutta* sp. nov., a novel iron-oxidizing zetaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal field at the Bayonnaise knoll of the Izu-Ogasawara arc, and a description of *Mariprofundales* ord. nov. and *Zetaproteobacteria* classis nov. *Archives of Microbiology* 199(2):335-346. doi: 10.1007/s00203-016-1307-4.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 9 件)

1. **Makita H.**, Tanaka E., Mitsunobu S., Miyazaki M., Nunoura T., Uematsu K., Takaki Y., Nishi S., Shimamura S, Takai K. (2017) *Mariprofundus micogutta* sp. nov., a novel iron-oxidizing zetaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal field at the Bayonnaise knoll of the Izu-Ogasawara arc, and a description of *Mariprofundales* ord. nov. and *Zetaproteobacteria* classis nov. *Archives of Microbiol.* 199(2):335-346. doi: 10.1007/s00203-016-1307-4. 査読あり
2. 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. *The ISME Journal*, 11(4):909-919. doi: 10.1038/ismej.2016.178. 査読あり

3. **Makita H.**, Kikuchi S., Mitsunobu S., Takaki Y., Yamanaka T., Toki T., Noguchi T., Nakamura K., Abe M., Hirai M., Yamamoto M., Uematsu K., Miyazaki J., Nunoura T., Takahashi Y., Takai K. (2016) Comparative Analysis of Microbial Communities in Iron-Dominated Flocculent Mats in Deep Sea Hydrothermal Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19):5741-5755. doi: 10.1128/AEM.01151-16. 査読あり
4. **牧田真子** (2016) 茶色い沈殿物は面白い。生物工学会誌 バイオメディア 第94巻・第6号 P.343, 査読なし, https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9406/9406_biomedial_1.pdf
5. Kikuchi S., **Makita H.**, Konno U., Shiraishi F., Ijiri A., Takai K., Maeda M., Takahashi Y. (2016) Limited reduction of ferrihydrite encrusted by goethite in freshwater sediment. *Geobiology*, 14(4):374-389. doi: 10.1111/gbi.12181. 査読あり
6. Mitsunobu S., Zhu M., Takeichi Y., Ohigashi T., Suga H., Jinno M., **Makita H.**, Sakata M., Ono K., Mase K., Takahashi Y. (2016) Direct Detection of Fe(II) in Extracellular Polymeric Substances (EPS) at the Mineral-Microbe Interface in Bacterial Pyrite Leaching. *Microbes and Environments*, 31(1):63-69. doi: 10.1264/jsme2.ME15137. 査読あり
7. Nogi Y., Mori K., **Makita H.**, Hatada Y. (2016) *Thalassobius abyssi* sp. nov., a marine bacterium isolated from the cold-seep sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 574-579. doi: 10.1099/ijsem.0.000758. 査読あり
8. Mitsunobu S., Zhu M., Takeichi Y., Ohigashi T., Suga H., **Makita H.**, Sakata M., Ono K., Mase K., Takahashi Y. (2015) Nanoscale Identification of Extracellular Organic Substances at the Microbe-Mineral Interface by Scanning Transmission X-ray Microscopy *Chemistry Letters*, 44(1):91-93. doi: [10.1246/cl.140880](https://doi.org/10.1246/cl.140880). 査読あり
9. Kikuchi S., **Makita H.**, Takai K., Yamaguchi N., Takahashi Y. (2014) Characterization of biogenic iron oxides collected by the newly designed liquid

culture method using diffusion chambers.
Geobiology, 12(2): 133-145.
doi: 10.1111/gbi.12073. 査読あり

[学会発表] (計 19 件)

1. **Makita H.**, Kikuchi S., Mitsunobu S., Tanaka E., Takaki Y., Yamanaka T., Toki T., Noguchi T., Nakamura K., Abe M., Hirai M., Yamamoto M., Uematsu K., Miyazaki J., Nunoura T., Takahashi Y and Takai K. Microorganisms Involved in the Formation of Iron-Dominated Flocculent Mats in Deep-Sea Hydrothermal Environments, 4th International Geoscience Symposium "Precambrian World 2017", March 5, 2017. 九州大学西新プラザ、福岡県福岡市
2. 鈴木優美、**牧田寛子**、関野優也、田中英美子、光延聖、大橋優莉、深海環境における鉄鉱物利用微生物の解明、第 17 回極限環境生物学会年会、2016 年 11 月 25 日、東京工業大学すずかけ台キャンパス、東京都町田市
3. 鈴木優美、**牧田寛子**、関野優也、田中英美子、光延聖、大橋優莉、深海環境における鉄鉱物利用生態系の解明、日本化学会秋季事業 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016、2016 年 11 月 16 日、タワーホール船堀、東京都江戸川区
4. **牧田寛子**、田中英美子、菊池早希子、光延聖、鈴木優美、関野優也、大橋優莉、高井研、深海熱水活動域での酸化鉄皮膜形成に関わる微生物、日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会、2016 年 10 月 23 日、横須賀市文化会館、神奈川県横須賀市
5. 大橋優莉、光延聖、坂田昌弘、鈴木優美、**牧田寛子**、野崎達生、川口慎介、深海底での微生物現場培養実験から紐解く鉄を基盤とした海底下微生物圏：放射光源 X 線分析法を駆使した微生物による地殻内エネルギー獲得戦略の解明、日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会、2016 年 10 月 23 日、横須賀市文化会館、神奈川県横須賀市
6. 鈴木優美、**牧田寛子**、関野優也、田中英美子、光延聖、大橋優莉、現場培養による深海性鉄利用微生物の解明、日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会、2016 年 10 月 23 日、横須賀市文化会館、神奈川県横須賀市
7. 鈴木優美、**牧田寛子**、光延聖、大橋優莉、深海環境における微生物生態系の解明、第 3 回海水・生活・化学連携シンポジウム、2016 年 10 月 13 日、日本大学工学部、福島県郡山市
8. Kikuchi S., **Makita H.**, Konno U., Shiraishi F., Ijiri A., Takai K., Takahashi Y. Limited Reduction of Ferrihydrite Encrusted by Goethite in Freshwater Sediment. *Goldschmidt 2016*. 2016. June. 28. パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
9. 鈴木優美、**牧田寛子**、関野優也、田中英美子、光延聖、大橋優莉、高村岳樹、高井研、深海環境でのパイライト利用微生物群の解明、日本微生物生態学会第 30 回大会(JSME2015)、2015 年 10 月 18 日、土浦市亀城プラザ、茨城県土浦市
10. **牧田寛子**、田中英美子、布浦拓郎、平井美穂、鈴木優美、関野優也、菊池早希子、光延聖、高橋嘉夫、高井研、海洋環境での酸化鉄皮膜形成に関わる微生物、2015 年度日本地球化学会第 62 回年会、2015 年 9 月 17 日、横浜国立大学、神奈川県横浜市
11. 鈴木優美、**牧田寛子**、関野優也、田中英美子、光延聖、大橋優莉、高村岳樹、高井研、深海環境でのパイライト利用微生物群の解明、2015 年度日本地球化学会第 62 回年会、2015 年 9 月 17 日、横浜国立大学、神奈川県横浜市
12. 大橋優莉、光延聖、坂田昌弘、鈴木優美、**牧田寛子**、野崎達生、川口慎介、深海底での微生物現場培養実験から紐解く鉄を基盤とした海底下微生物圏：放射光源 X 線分析法を駆使した微生物による地殻内エネルギー獲得戦略の解明、2015 年度日本地球化学会第 62 回年会、2015 年 9 月 17 日、横浜国立大学、神奈川県横浜市
13. **牧田寛子**、大学での学びと社会・仕事の関係性、神奈川工科大学主催 第 8 回キャリア設計「企業人の講義を通して、学びと仕事の関係性を理解する」、2015 年 6 月 5 日、神奈川工科大学、神奈川県厚木市、招待講演
14. **牧田寛子**、海の底の生態系、第 4 回 KAIT サイエンスカフェ、2015 年 1 月 14 日、神奈川工科大学、神奈川県厚木市、招待講演
15. **牧田寛子**、布浦拓郎、平井美穂、高木善弘、菊池早希子、光延聖、土岐知弘、山中寿朗、宮崎淳一、中村謙太郎、高橋嘉夫、高井研、深海底熱水活動域に存在する酸化鉄皮膜地帯での微生物調査、2014 年度日本地球化学会第 61 回年会、2014

- 年 9 月 16 日、富山大学、富山県富山市
16. 菊池早希子、**牧田寛子**、今野祐多、白石史人、高井研、高橋嘉夫、微生物生成水酸化鉄の堆積物中で起きる鉄および炭素の生物地球化学的循環、2014 年度日本地球化学会第 61 回年会、2014 年 9 月 16 日、富山大学、富山県富山市
 17. Kikuchi S., **Makita H.**, Konno U., Shiraishi F., Takai K. and Takahashi Y. Biogeochemical cycles of iron and carbon in biogenic iron-rich sediment. 15th International Symposium on Microbial Ecology (15th ISME) 2014. Aug. 26. The Coex Convention Center Seoul, South-Korea.
 18. **牧田寛子**、菊池早希子、布浦拓郎、光延聖、平井美穂、高木善弘、山中寿朗、土岐知弘、中村謙太郎、阿部真理子、宮崎淳一、野口拓郎、渡部裕美、高橋嘉夫、高井研、Biosignature found in iron oxide mineralogy of iron-oxidizing microbe origin? 日本地球惑星科学連合 2014 年大会 JpGU2014、2014 年 4 月 30 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
 19. 菊池早希子、**牧田寛子**、今野祐多、白石史人、高井研、高橋嘉夫、微生物活動により生じた水酸化鉄の堆積後に起こる鉄および炭素の循環、日本地球惑星科学連合 2014 年大会 JpGU2014、2014 年 4 月 30 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

〔図書〕(計 1 件)

1. Yamanaka T., Nagashio H., Nishio R., Kondo K., Noguchi T., Okamura K., Nunoura T., **Makita H.**, Nakamura K., Watanabe H., Inoue K., Toki T, Iguchi K., Tsunogai U., Nakada R., Ohshima S., Toyoda S., Kawai J., Yoshida N., Ijiri A., Sunamura M. 「The Tarama Knoll: Geochemical and Biological Profiles of Hydrothermal Activity」 Subseafloor Biosphere Linked to Hydrothermal Systems (2015) 666 (497-504), Springer Japan.

〔その他〕

< ホームページ >

研究代表者ホームページ

<http://www.jamstec.go.jp/sugar/j/members/personal/HirokoMakita.html>

< アウトリーチ活動 >

1. ICFA 国際児童親善友好協会ワークショップでの講演

開催日:2016 年 4 月 29 日

開催場所:神奈川公会堂

2. NPO 法人日本エコツアーリズム協会主催「第 34 回 JES フォーラム」での講演

開催日:2016 年 7 月 8 日

開催場所:モンベル渋谷店

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧田 寛子(MAKITA, Hiroko)

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・技術副主任

研究者番号: 40553219