

平成30年6月14日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05608

研究課題名（和文）海底下に潜む未知の生命 - 多面的アプローチで明らかにする地球深部微生物の実態

研究課題名（英文）Exploration of subseafloor microbial biosphere through technical developments

研究代表者

諸野 祐樹 (MORONO, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・グループリーダー代理

研究者番号：30421845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、超高空間分解能二次イオン質量分析計（NanoSIMS）による元素同位体分析や分子生物学的解析等を駆使し、最大で1億年前に堆積した海底下試料中に存在する未知微生物の姿形を捉えると同時に、それら微生物が「生きているのか？」「機能・役割は？」「代謝活性は？」という基本的かつ重要な問いに答えることを目標とした。多様な海底下環境で採取した試料から申請者が開発した独自の技術によって微生物細胞を分取し、安定同位体基質取り込み、細胞DNA解析やアミノ酸組成分析等、多面的な解析を実施した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to study microorganisms inhabiting subseafloor biosphere, which is one of the largest microbial biosphere on the Earth. Through developments of techniques to detect, separate, and selectively separate (sort) microbial cells with cleanest possible handling environment, we successfully detected very low biomass in the sediment and probe its metabolic activity through NanoSIMS (Nano-scale Secondary Ion Mass Spectroscopy) analysis.

研究分野：地球微生物学

キーワード：海底下生命圏 NanoSIMS 安定同位体 セルソーター

1. 研究開始当初の背景

20世紀後半から行われた国際海洋掘削によって、世界各地の海洋底(深度約1.6 kmまで)の地層(泥など)には1cm³(角砂糖程度のサイズ)あたり10万細胞を超える微生物が存在することが知られている^{1,2}。これまで地球上の様々な場所で行われてきた微生物検出計測結果を総合し、海底下生命圏に存在するバイオマス(生命由来の炭素原子)の数~10%にも達することが示されている。これは水圏や陸上地下など、地球上の別の場所に広がる生命圏に匹敵する地球最大級の生命圏が地球内部に存在していることを示し、さらに、それら生命のDNA解析からは海底下に存在する微生物の大部分がこれまで知られている微生物と系統的に異なる未知の生物であることが分かってきている⁵など。これら、膨大に存在する反面、未知の部分が大きい海底下微生物は、全地球規模での元素循環や海底下資源の生成等に関与していると考えられ、環境およびエネルギーを含む諸分野から注目を集めている。

実際に微生物を顕微鏡下で計数(数える)を試み、または細胞内に存在するDNAの塩基配列を通じて微生物生命の多様性に関する測定は多数行われてきた。しかし、実際海底下に存在する個々の微生物について「どんな微生物種が」、「どれくらいの割合で活性をもって生きて」いるのかについては、上記の解析からは直接的データが得られない。一方、培養によって微生物を増殖させ、性質を調べる単離が海底下微生物の場合は極端に困難であるという事実もあり、様々な化学物質の組成を海底下深度に対して測定した深度プロファイルと、微生物群集の多様性構造を突き合わせて推測するしか手立てがなく、地球最大の生命圏とも言われる海底下で起こっている元素循環は微生物反応をブラックボックスとして長く議論されてきた。

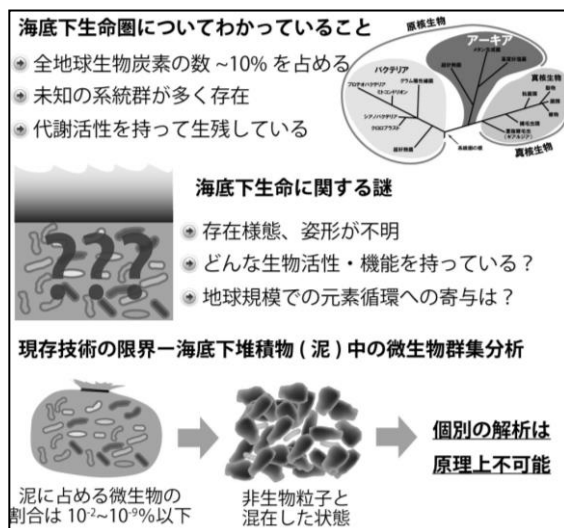


図1: 本研究の背景

2. 研究の目的

このような状況を打開する一つの方法として、本研究では超高空間分解能二次イオン質量分析計(NanoSIMS、図2)を用い、個々の細胞レベルにおいて微生物が与えたエサを取り込む活性、つまり生命活動のシグナルを取得することを通じ、未知の海底下環境における微生物生命活動を明らかにすることを目的とした。



図2: 超高空間分解能二次イオン質量分析計(NanoSIMS)

NanoSIMSは、非常に細く絞った一次イオンビームによって微小領域を分析することを目的としてデザインされた走査型二次イオン質量分析計である。NanoSIMSにおける最小50 nmの一次イオンビーム径は、通常のSIMSでは対応できない数百nmのサイズである海底下微生物の解析に十分適用可能であり、ナノスケールでの元素同位体組成測定を行うことが出来る。栄養源(エサ)として与える基質(例えばブドウ糖など)を構成する元素を安定同位体(天然に安定して存在する重さの異なる元素)である¹³Cや¹⁵Nで置換し、一定期間の培養(取り込みを検出するためには必ずしも細胞が大量に増殖する必要は無い)を行った後に分析を行えば、基質を代謝する(与えたエサを取り込む)微生物を同位体組成の異常として細胞単位で検出することが出来る(重たいエサを食べるので微生物の細胞を構成する元素が少しだけ重くなる、つまり細胞単位の体重測定のようなもの)。また、NanoSIMSによる高精度な同位体比測定を用いれば、海底下に多数存在している「培養困難な」微生物でも、ごく少量の¹³C、¹⁵N基質(微生物の炭素含量を50 fg[10⁻¹⁵g]とするとその1%分、500 ag[10⁻¹⁸g])を取り込みさえすればNanoSIMSによって十分識別可能な差が生じ、たとえ増殖速度の極めて遅い微生物であっても基質の取り込みを定量的に捉えることができる。これに加え、細胞から抽出するDNAの配列解析も併せて実施することで、微生物細胞の種類とその代謝活性、すなわち、「どの微生物が」「どの物質を消費、生成して」いるのかという問いに答えを与え、これまでのバルク分析では手に入らなかった情報にアクセスできるようになり、海底下生命圏のさらなる理解を深めることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 本研究においてはまず、研究対象とする海底下試料として、開始前に取得済みであった試料(統合国際掘削計画第337次掘削航海、下北半島沖海底下掘削試料)を用いたほか、研究初年度の平成27年度に国際深海掘削計画第357次掘削航海、アトランティス岩体蛇紋岩生命圏掘削に乗船研究者として参画、平成28年度には第370次航海、室戸沖限界生命圏掘削調査(T-limit)の共同首席研究者として参加し、新たな試料を獲得した。獲得した試料は後述する超高度クリーン環境において地上微生物の汚染を排除しつつさらに掘削によって海水の影響を受けた部分を除去し、地層由来の微生物のみが含まれるよう、表面部分を削ぎ落してから培養液を添加し、基質取り込み実験を行った。

(2) 海底下掘削試料中の微生物細胞数は海底下の深度が深くなると減少することが知られている。これに対し、人間の手を含む陸上実験環境には多数の微生物が存在し、元々細胞数が少ない試料への汚染が起こることが懸念された。そこで、ISOクラス1(1m³に0.1μmの粒子が1個以下)の超高度クリーン環境、さらに徐電機によって静電気による粒子の飛散を抑える実験環境を構築し、分子生物学的手法を用いて検証を実施した。

(3) 上記実験品質管理を徹底的に施したうえで、極小バイオマスをNanoSIMS解析に供するため、密度勾配を利用して海底下試料中から効率的に細胞を濃縮する手法、および微生物細胞内に存在するDNAを染色する試薬(SYBR Green I)によって染色し、生じる蛍光とその色の違いによって高速分取する方法⁵を用いた。これにより海底下堆積物の大半を構成する非生物粒子と微生物細胞とを分画し、0.1mm程度の微小領域に細胞を濃縮した。上記のように調製した試料についてJAMSTEC高知コア研究所に設置されているNanoSIMSを用いて各細胞の基質取り込みについて調べた。

4. 研究成果

(1) 微生物細胞数の少ない海底下試料を地上微生物によって汚染させることなく、かつ掘削による海水微生物の影響も排除するために、超高度クリーン実験空間における試料処理技術の確立、および実験環境のバリデーションを実施した。実際の海底下堆積物試料、及びでの海底下堆積物処理、及び陰性対照実験(ネガティブコントロール)の結果から、海底下堆積物中において6-10細胞/cm³の微生物検出感度(世界最高感度)を達成することに成功した(雑誌論文①、⑥、⑫、学会発表②、③など)。これは、人間が見えるスケールに置き換えると、オリンピックで用いられる水泳プール中にミリメートルサイズの砂粒が6-10粒存在している状態に相当し、現在においてもこれに匹敵する検出感度を実現した研究者は他に存在しない。これにより、

地球上で最も貧栄養環境だと考えられている南太平洋環流域の堆積物には、海底下岩盤に至るまで微生物生命が存在すること(雑誌論文⑫)や下北半島沖の海底下約2.5kmまで微生物生命が存在すること(雑誌論文⑥)、または、アトランティス岩体域の蛇紋岩生命圏における超高感度微生物検出を実現した。

(2) 海底下堆積物中の大半を構成する非生物粒子(泥粒子や微小鉱物、固形有機物粒子など)と微生物細胞を分画し、さらに微生物細胞中のDNAを染色して高速選別・分取(セルソーティング)することで、海底下に生息する微生物細胞を取り出して分析することを可能とした。具体的には、室戸沖の限界生命圏掘削調査において、世界で初めて、海底下堆積物に存在した微生物細胞を培養を介さず、そのままの状態でも透過電子顕微鏡観察することに成功した(図2、雑誌論文①、及びNHKサイエンスゼロ出演)。また、海底下

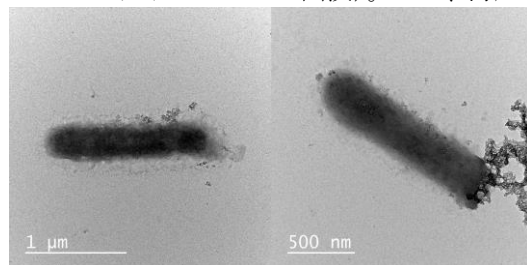


図3: 室戸沖海底下303mより取り出した微生物細胞の透過電子顕微鏡写真

に生息する微生物細胞のアミノ酸含量の測定(雑誌論文④、⑤、学会発表④、⑤など)等、これまで、堆積物中に埋もれていることで実現できなかった微生物細胞に対する分析を実現した。海底下環境では、海底面付近の表層堆積物で1cm³あたり10億細胞程度の微生物細胞が存在するが、そのような膨大な数が存在していても、微生物細胞が堆積物に占める堆積割合は0.1%程度に留まり、99.9%は非生物粒子に占められている。微生物細胞の数が減少する深部に至っては、密度による細胞分離操作を行っても非生物粒子の方が多く、細胞を見つけ出すことが困難となっている。このような海底下試料において微生物細胞を特異的に取り出す技術を確立したことは、今後様々な分析への応用が期待でき、海底下生命の包括的理解へのブレークスルーをもたらすと期待している。

(3) 上記の細胞分離、セルソーティング技術を安定同位体基質をエサとして与えて培養した海底下堆積物試料に適用し、一細胞レベルでの微生物基質取り込み活性の検出を実施した。2012年に地球深部掘削船「ちきゅう」により八戸沖の水深1,180mの海底から採取された海底下約1.6kmの泥岩層(頁岩)と2.0km付近の石炭層(褐炭)試料について実施した培養から、泥岩層や石炭層に含まれる成分であるメチル化合物を代謝し、メタンや二酸化炭素を排出する地下微生物生態系の機能を確認、それらの微生物細胞の倍加時

間が、少なくとも数十年から数百年以上であることを明らかにした。また、石炭層に生息する微生物群の方が泥岩層に生息する微生物群よりメチル化合物の ^{13}C を同化しやすい傾向が認められた。さらに、直接ゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子断片の網羅的な解読により微生物の種類を調べた結果、それらの多くが約 2000 万年前の陸域の森林土壌や浅海の堆積物環境に由来する固有の地下微生物であることが確認された。また、長期生存のための内生孢子（細胞内に作られる孢子のこと）を作る微生物種や、好熱性細菌と推測される微生物種が検出された（雑誌論文②）。この成果は、カリフォルニア工科大学との共同研究の成果であり、2017 年コザレリ賞を受賞した（コザレリ賞：2017 年に米国科学アカデミー紀要[PNAS]に掲載された 6 分野[物理学および数理科学、生物科学、エンジニアリングおよび応用科学、バイオメディカルサイエンス、行動科学および社会科学、応用生物・農業および環境科学]中の論文のうち、科学的卓越性と独創性を反映した各 1 論文にのみ授与される。本研究は応用生物・農業・環境科学部門で受賞した）。

<引用文献>

- 1 Parkes, R. J., Cragg, B. A. & Wellsbury, P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeol J* V8, 11-28 (2000).
 - 2 Roussel, E. G. et al. Extending the Sub-Sea-Floor Biosphere. *Science* 320, 1046, doi:10.1126/science.1154545 (2008).
 - 3 Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 6578-6583, doi:10.1073/pnas.95.12.6578 (1998).
 - 4 Kallmeyer J., R. Pockalny, R. Adhikari, D. Smith, S. D'Hondt (2012). Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 16213-16216.
 - 5 Inagaki, F. et al. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2815-2820 (2006).
5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 21 件)
- ① Heuer, V.B., Inagaki, F., Morono, Y., Kubo, Y., Maeda, L., and the Expedition 370 Scientists, 2017. Temperature Limit of the Deep Biosphere off Muroto. *Proceedings of the International Ocean Discovery Program*, 370: College Station, TX (International Ocean Discovery Program), DOI: 10.14379/iodp.proc.370.2017, 査読なし
 - ② Elizabeth Trembath-Reichert, Yuki Morono, Akira Ijiri, Tatsuhiko Hoshino, Katherine S Dawson, Fumio Inagaki, Victoria J Orphan, Methyl-compound use and slow growth characterize microbial life in 2-km-deep subseafloor coal and shale beds, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 201707525, DOI: 10.1073/pnas.1707525114, 査読有り
 - ③ Xihan Chen, Thorbjørn Joest Andersen, Yuki Morono, Fumio Inagaki, Bo Barker Jørgensen, Mark Alexander Lever, Bioturbation as a key driver behind the dominance of Bacteria over Archaea in near-surface sediment, 2017, 7:2400, DOI: 10.1038/s41598-017-02295-x, 査読有り
 - ④ Stefan Braun, Yuki Morono, Sten Littmann, Marcel Kuypers, Hüsnü Aslan, Mingdong Dong, Bo B Jørgensen, Bente Aa Lomstein, Size and Carbon Content of Sub-seafloor Microbial Cells at Landsort Deep, Baltic Sea, *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1375, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01375, 査読有り
 - ⑤ Stefan Braun, Yuki Morono, Kevin W Becker, Kai-Uwe Hinrichs, Kasper U Kjeldsen, Bo B Jørgensen, Bente Aa Lomstein, Cellular content of biomolecules in sub-seafloor microbial communities, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2016, 188: 330-351, DOI: 10.1016/j.gca.2016.06.019, 査読有り
 - ⑥ Fumio Inagaki, Kai-Uwe Hinrichs, Yusuke Kubo, Marshall W. Bowles, Verena B. Heuer, Wei-Li Hong, Tatsuhiko Hoshino, Akira Ijiri, Hiroyuki Imachi, Motoo Ito, Masanori Kaneko, Mark A. Lever, Yu-Shih Lin, Barbara A. Methe, Sumito Morita, Yuki Morono, et al., Exploring deep microbial life in coal-bearing sediments down to 2.5km below the seafloor, *Science*, 2015, 349: 420-424, DOI: 10.1126/science.aaa6882, 査読有り
 - ⑦ Takuro Nunoura, Yoshihiro Takaki, Shigeru Shimamura, Jungo Kakuta, Hiromi Kazama, Miho Hirai, Noriaki Masui, Hitoshi Tomaru, Yuki Morono, Hiroyuki Imachi, Fumio Inagaki, Ken Takai, Variance and potential niche separation of microbial communities in subseafloor sediments off Shimokita Peninsula, Japan, *Environmental Microbiology*, 2015, 2016, 18:1889-1906, DOI: 10.1111/1462-2920.13096, 査読有り
 - ⑧ Hoshino Tatsuhiko, Kuratomi Takashi, MORONO YUKI, Hori Tomoyuki, Oiwane Hisashi, Kiyokawa Shoichi, INAGAKI FUMIO, Ecophysiology of Zetaproteobacteria Associated with Shallow Hydrothermal Iron-Oxyhydroxide Deposits in Nagahama Bay of Satsuma Iwo-Jima, Japan, *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1554, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01554, 査

- 読有り
- ⑨ 諸野 祐樹、伊藤 元雄, NanoSIMS により基質の流れを可視化する—未培養微生物のシングルセルレベルでの生理生態解析, 水環境学会誌, 2015, 38: 375-379, 査読無し
- ⑩ Nishio, Y., Ijiri, A., Toki, T., Morono, Y., Tanimizu, M., Nagaishi, K., and Inagaki, F., Origins of lithium in submarine mud volcano fluid in the Nankai accretionary wedge, Earth Plant. Sci. Lett., 2015, 414:144-155, DOI: 10.1016/j.epsl.2015.01.018, 査読有り
- ⑪ Morono, Y., Terada, T., Yamamoto, Y., Xiao, N., Hirose, T., Sugeno, M., Ohwada, N., Inagaki F, Intact preservation of environmental samples by freezing under an alternating magnetic field, Environ. Microbiol. Rep.2015, 7:243-251, DOI: 10.1111/1758-2229.12238, 査読有り
- ⑫ D'Hondt S, Inagaki F, Zarikian CA, Abrams LJ, Dubois N, Engelhardt T, Evans, H, Ferdelman T, Gribsholt B, Harris RN, Hoppie BW, Hyun J-H, Kallmeyer J, Kim J, Lynch JE, McKinley CC, Mitsunobu S, Morono Y, et al., Presence of oxygen and aerobic communities from seafloor to basement in deep-sea sediment, 2015, 8: 299-304, DOI: 10.1038/NMGE02387, 査読有り

[学会発表] (計 44 件)

- ① 諸野祐樹、寺田武志、星野辰彦、伊藤元雄、稲垣史生, Biosphere in subseafloor environment and its ecophysiology, 日本細菌学会総会シンポジウム「Sleeping Microbes: 眠れる微生物の秘めた力」(招待講演), 2017/03/20, 東北大学(宮城県仙台市)
- ② 諸野 祐樹、寺田 武志、伊藤 元雄、稲垣史生, Technological breakthroughs in search of the deep subseafloor biosphere, Japan Geoscience Union Meeting 2016 (招待講演), 2016/05/22, 幕張メッセ(千葉県千葉市)
- ③ D'Hondt Steven, Pockalny Robert, Spivack Arthur, Inagaki Fumio, Murray Richard, Adhikari Rishi Ram, Britta Gribsholt, Kallmeyer Jens, McKinley Claire, MORONO YUKI, Roy Hans, Justine Sauvage, Wiebke Ziebis, Oxic and Anoxic Regions of Subseafloors, 2015 AGU Fall Meeting (国際学会) (招待講演), 2015/12/17, Moscone Center (USA)
- ④ Stefan Braun, Morono Yuki, Sten Littmann, Jorgensen Bo Barker, Lomstein Bente Aa. Size and Carbon Content of Sub-seafloor Microbial Cells, 2015 AGU Fall Meeting (国際学会), 2015/12/17, Moscone Center (USA)
- ⑤ Braun Stefan, Morono Yuki, Kevin Becker,

- Hinrichs Kai-Uwe, Jorgensen Bo Barker, Lomstein Bente Aa. Analysis of biomolecules of sub-seafloor microbial cells separated from the sediment matrix, 3rd International Workshop on Microbial Life under Extreme Energy Limitation (国際学会), 2015/09/22, Aarhus (Denmark)
- ⑥ Morono Yuki, Technical developments to explore sedimentary biosphere: current status, limitation, and future Perspectives, CDEBI Sediment Workshop (招待講演), 2015/06/25, University of Southern California(USA)
- ⑦ Morono Yuki, Terada Takeshi, Ito Motoo, Inagaki Fumio, Probing metabolic activity of aerobic microbial cells in ultraoligotrophic sediments of the South Pacific Gyre, Deep Carbon Observatory International Science Meeting (招待講演) (国際学会), 2015/05/08, Lisbon(Portugal)

[その他]

放送出演

NHK サイエンスZERO 「生命の限界を探れ! “海底地下生命”大探査」出演
2016年11月13日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸野 祐樹 (MORONO, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・グループリーダー代理
研究者番号: 30421845

(2) 研究協力者

伊藤 元雄 (ITO, Motoo)

星野 辰彦 (HOSHINO, Tatsuhiko)

稲垣 史生 (INAGAKI, Fumio)