

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06180

研究課題名（和文）ナノ地球微生物学：微生物が作り出す酸化鉄ナノ粒子から探る真の元素循環プロセス

研究課題名（英文）Nanogeomicrobiology: Nano-sized Bacteriogenic Iron Oxides (NanoBIOS) and Their Role in Elemental Cycling

研究代表者

加藤 真悟 (Kato, Shingo)

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

研究者番号：40554548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、鉄を酸化してエネルギーを得て、その副産物としてナノサイズの酸化鉄を産出するバクテリアに着目して、その生理・生態を明らかにするための研究を行なった。汽水性の鉄酸化細菌を世界で初めて分離培養することに成功し、その存在を明らかにした。淡水・海水性の鉄酸化細菌についても、培養だけでなく、（メタ）ゲノム解析を駆使して、その空間分布や生理機能、多様性について多くの新しい知見を得た。それらの結果に基づいて、鉄酸化菌が産出する酸化鉄が、自然環境中で、鉄、炭素、リンなどの元素循環にどのように寄与しているのかを議論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノサイズの酸化鉄は、膨大な表面積を誇り、そこに銅や鉛など様々な重金属元素を吸着し、自然界では移流によって運ばれることで、吸着した元素のキャリアーとしての役割を果たす。本研究による成果は、自然環境中で、淡水・汽水・海水域のすべてにおいて鉄酸化菌が存在し、そこでの元素循環に関わっていることを示している。ブラックボックス化している自然環境中の元素循環の一端を明らかにしたと言える。また、鉄酸化菌を用いた金属回収や水質浄化技術の基盤構築としても、重要な意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：This study focused on iron-oxidizing bacteria (FeOB) that produce extracellular ferric iron biominerals. For the first time, we reported isolation and cultivation of FeOB growing in brackish water, but not in freshwater nor normal seawater. We also provided novel insights into spatial distribution, diversity, and physiology of freshwater and marine FeOB using culture-dependent and independent analyses. Our results suggest that FeOB and biogenic iron biominerals play a considerable role in elemental cycling in natural environments.

研究分野：微生物生態学

キーワード：鉄酸化菌 バイオミネラル ナノ粒子 元素循環

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然界から単一種の微生物を「分離」して、実験室内で「培養」する手法は、微生物学の最も基本であり、対象とする微生物の生理や生態を知る上では最も効果的である。鉄酸化菌は、20  $\mu\text{M}$  以下の低酸素条件下でしか増殖できないため、難培養性微生物の代表格として著名である。そのため、その存在は150年以上前から認識されていたにもかかわらず、分離株の数は10株にも満たず、その生理・生態についての理解は極めて限定的なものであった。申請者はこれまでに、淡水性1株と海水性1株、さらには世界初の例となる汽水性の鉄酸化菌2株の分離培養に成功している。既知の鉄酸化菌はpH 7.5以上では生育しないが、申請者が分離した汽水性鉄酸化菌はpH 8.0(海洋環境の一般的な値)でも生育する。一方で、培養に依存しない環境DNA解析によって、世界各地の地下/海底下流体の湧出域から鉄酸化菌の存在を示す間接的な証拠が得られている。申請者のこれまでの成果は、鉄酸化菌が淡・汽・海水問わずあらゆる地下/海底下流体の湧出域に普遍的に存在し、鉄の酸化とそれに伴う様々な元素の沈殿・吸着を制御して、地球規模での元素循環プロセスに貢献していることを予期させる。

ナノサイズの酸化鉄は、膨大な表面積を誇り、そこに銅や鉛など様々な重金属元素を吸着し、自然界では移流によって運ばれることで、吸着した元素のキャリアーとしての役割を果たす。微量の重金属は全ての生物が生命活動を営む上で必須であるが、大量の重金属は生物活動を妨げる毒になる。つまり、ナノ酸化鉄の実態を明らかにすることは、生態系の成り立ちを理解することに直結する。自然界に存在するナノ酸化鉄は、一部の例外を除いて全て微生物によって作られたものであり、なおかつ有機物と複合体を形成しているとみて間違いない。実際に、ナノサイズの有機物-酸化鉄複合体が地下/海底下流体の湧出域から見つかっており、その環境中での役割に注目が集まっている。しかしながら、その分布範囲や化学組成、生産源など、その実態はほとんど未知である。

数少ない分離株のなかで、ある種の鉄酸化菌は、Biogenic iron oxides (BIOS)と呼ばれる有機物と酸化鉄で構成された数百マイクロメートル長の繊維状の細胞外構造体を産出する。BIOSは、生物活動に直接関わるリンや重金属を吸着することが知られており、現場環境中でのそれらの元素の挙動と、さらにはそれらの元素を利用する生物の活動をも制御している。しかしながら、長い繊維状のBIOSは、すぐにその場に沈殿してしまうため、吸着元素のキャリアーとしての役割についてはまったく議論されていない。

申請者はこれまでに、ある種の鉄酸化菌はナノサイズの酸化鉄(NanoBIOS)を産出することを見出してきた。本研究では、「NanoBIOSは地球規模での元素循環を制御している」という作業仮説を立てた。本研究の特色は、「ナノ」スケールでの現象を正しく理解し、「地球」と「微生物」の真の関わり合いを解き明かす『ナノ地球微生物学』という新しい融合研究分野を切り拓く、という点である。その一環として、本研究では申請者が発見したNanoBIOSに着目し、その実態に迫る。

### 2. 研究の目的

本研究では、モデル地における「鉄酸化菌の生態と、その副産物であるNanoBIOSの実態」の解明を通じて、「鉄酸化菌は地下/海底下流体の湧出域に普遍的に存在し、そこでNanoBIOSを産出することで、地球規模での元素循環を制御している」という作業仮説を検証するための基盤構築を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 淡水性鉄酸化細菌

申請者が以前分離した *Ferriphaselus amnicola* OYT1 株の完全ゲノム配列を、Illumina Miseq と Nanopore MinION を用いて決定した。バイオリアクターを用いて、酸素濃度を1%以下にコントロールしながら、OYT1 株の大量培養を行なった。菌密度は顕微鏡観察により決定した。鹿児島県の鉄が豊富な地下熱水をもとにして長期間培養されたフロー式リアクターの試料を採取し、Miseq を用いてショットガンシーケンシングをし、メタゲノム解析を行なった。茨城県つくば市に鉄マットを発見し、新たなモデル地として設定した。温度、pH、鉄濃度等をハンディタイプのセンサーおよび比色分析により決定した。鉄マットを採取し、濃度勾配培養法により、淡水性鉄酸化細菌の集積培養を行った。限界希釈法により純化を行った。純化した株からDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的にしてPCRを行い、そのPCR増幅産物の塩基配列決定を行った。Miseq を用いて、ショットガンシーケンシングを行い、ほぼ完全ゲノムを決定した。

#### 汽水性鉄酸化細菌

米国チェサピーク湾の水深10メートル付近の海水を採取し、濃度勾配培養法により、汽水性鉄酸化細菌の集積培養を行った。限界希釈法により純化を行った。純化した株からDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的にしてPCRを行い、そのPCR増幅産物の塩基配列決定を行った。PacBio シーケンサーを用いて、完全ゲノムを決定した。透過型電子顕微鏡(TEM)および走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて、分離株が産出する細胞外構造体の形態を観察した。SEMに付属のエネルギー分散型X線分析(EDX)装置を用いて、細胞外構造体の元素分析を行なった。培養温度やpH、塩濃度を変えて、分離株の生育条件の決定を行なった。

#### 海洋性鉄酸化細菌

鉄が多く含まれる海底の硫化物およびマンガンクラストを採取して、DNA を抽出した。Miseq を用いてショットガンシーケンシングをし、メタゲノム解析を行なった。鉄酸化細菌のマーカー遺伝子となる *Cyc2* 遺伝子の探索を行なった。マンガンクラスト試料については、16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコン解析および定量 PCR、SEM 観察を行なった。さらに、凍結薄片を作成し、細胞を染色したのちに蛍光顕微鏡観察を行なった。

#### 4. 研究成果

##### 淡水性鉄酸化細菌

これまでにショートリードシーケンサーを用いて OYT1 株のゲノム決定を行なっていたが、完全ゲノムの決定には至っていなかった。本研究ではロングリードシーケンサーの MinION と、正確性の極めて高い Illumina Miseq シーケンサーを用いることで、OYT1 株の完全ゲノム配列 (2.72 Mbp) の決定に成功した。特徴的ならせん状の細胞外構造体 (ストーク) を産出する淡水性鉄酸化菌の完全ゲノム配列の世界初の報告例である。ほぼ同一な配列を持つ 1000bp 以上の遺伝子 (リボソーム RNA 遺伝子、トランスポサゼ、インテグラーゼ) が見つかり、そのコピー数を正確に決定することができた。OYT1 株のゲノム進化には、トランスポサゼやインテグラーゼが関わっていることが示唆された。これらの成果は *Microbiol. Resour. Announc.* 誌 (オープンアクセス) にて誌上発表した。バイオリアクターを用いた大量培養は、約 1% 酸素濃度で培養を行うと、細胞の増殖は見られるものの、細胞外構造体の産出がほとんど確認できなかった。最終年度に所属先が変わり、リアクターの移動や再設置に時間がかかり、条件を振って繰り返し実験を行うことが困難だったため、この問題は今後の課題として残ったが、酸素濃度が 1% では高すぎる、攪拌することで産出が抑制されてしまう等の可能性を示唆した。また、研究協力者が 2 人とも渡航してしまうという予想外のこともあり、細胞外構造体の鉍物分析についても今後の課題として残された。

鹿児島島の鉄を多く含む地下熱水からのリアクター培養物のメタゲノム解析の結果、41 個の MAG (metagenome-assembled genome) を得ることに成功した。“*Calescamantes*”, “*Fervidibacteria*”, “*Parcubacteria*”, “*Dadabacteria*”, “*Fischerbacteria*”, GAL15, “*Aigarchaeota*”等の、まだ分離培養株が報告されていないような門レベルの系統群に含まれる MAG が数多く得られた。鉄酸化菌のマーカー遺伝子の一つである *Cyc2* 遺伝子が、“*Fischerbacteria*”と *Chlorobi* に属する MAG から見つかった。“*Fischerbacteria*”の MAG からは、*Cyc2* 以外にもルビスコ遺伝子が見つかり、世界で初めて、この系統群には好熱性の鉄酸化独立栄養が存在することを示唆した。これらの成果は、*Microbes Environ.* 誌 (オープンアクセス) にて誌上発表した。

茨城県つくば市で発見した鉄マットからの集積培養の結果、酸化鉄と細胞で構成されるバンドを培養液中につくる微生物の培養に成功した。同様のバンドは、微好気性鉄酸化細菌でも見られる。限界希釈を繰り返して純化を試みたところ、鉄酸化細菌の *Sideroxydans* や、*Thiomonas*, *Thiobacillus* に近縁な 16S rRNA 遺伝子をもつ微生物の培養に成功した。PCR からのダイレクトシーケンシングでは、それらの 16S rRNA 遺伝子のみが検出されたが、Miseq によるショットガンシーケンシングを行なったところ、まだわずかに別の微生物のコンタミネーションが確認されたため、純化を進めている。顕微鏡観察により、それらの微生物は、ストークは作らずに不定形の細胞外構造体をつくることが確認された。

##### 汽水性鉄酸化細菌

米国チェサピーク湾の海水を対象に、MPN (Most Probable Number) 法により、環境試料中の汽水性鉄酸化菌を数えたところ、全菌数に対して <0.01% しか存在しない超マイナー微生物であることがわかった。同試料から汽水性鉄酸化菌の分離培養を試みたところ、2 株の純粋培養株を得ることに成功した。塩濃度を変えて培養を行なったところ、両株は、淡水 (0%) でも海水 (3.5%) でも増殖できず、中間の 1.7% 付近の塩濃度で良好に増殖を示すことが明らかになった。これらは世界初の汽水性鉄酸化菌の分離例である。それぞれ、CP-5 株および CP-8 株と名付けた。これらの株も、培養液中に酸化鉄と細胞で構成されるバンドをつくることがわかった。ゲノム完全長は、それぞれ 2.54 Mbp, 2.30 Mbp であり、若干の長さの違いがあった。16S rRNA 遺伝子配列やゲノム配列、生理性状を比較した結果、それぞれが新種であると判断し、*Mariprofundus aestuarium*, *Mariprofundus ferrinatatus* と命名した。系統解析の結果、どちらも *Zetaproteobacteria* 綱に属することがわかった。SEM および TEM 観察により、両株はストークとは異なる形態の細胞外構造体を産出することがわかった。EDX 分析によって、この構造体は鉄で構成され、さらにはリンを吸着することがわかった。これらの結果から、チェサピーク湾の水塊において、鉄酸化菌は鉄やリン、さらには電子の輸送に関わっていることが示唆された。以上の成果は、*Geobiology* 誌および *Front. Microbiol.* 誌 (オープンアクセス) にて誌上発表した。

##### 海洋性鉄酸化細菌

南マリアナトラフで採取した還元型の鉄を多く含む海底下の硫化鉍物と、拓洋第五海山で採取した酸化型の鉄を多く含むマンガンクラストを対象にして、メタゲノム解析を行なった結果、どちらの試料からも、30 個以上の MAG を得ることができた。硫化鉍物から得られた MAG の

詳細な解析を進めたところ、優占して存在する *Nitrospirae* 門や *Deltaproteobacteria* 綱に属する新規の未培養バクテリアの MAG から水素や硫黄を酸化して、鉄を還元するために使われる遺伝子が検出された。この結果は、硫化鉄物をエネルギー源とする独特な化学合成生態系が存在することを示唆する。この硫化鉄物のメタゲノム解析の成果は、*Environ. Microbiol.* 誌にて誌上発表した。さらに、別の硫化鉄物のメタゲノム解析を進め、そこには *Zetaproteobacteria* 綱に属する系統学的に新規の鉄酸化バクテリアが存在することが示唆された(論文準備中)。マンガンクラストの解析の結果からは、明確に鉄酸化細菌の存在を示す証拠は得られなかった。マンガンクラストは、ナノサイズの鉄やマンガンの酸化物粒子の集合体であるため、鉄酸化細菌の寄与が予想されていたが、それを覆す結果であった。どのように酸化鉄を含むクラストが形成されるのか、今後の課題として残された。得られたクラストの成果は、*Microbes Environ.* 誌 (オープンアクセス) および *PLOS ONE* 誌 (オープンアクセス) にて誌上発表した。

以上のように、淡水・汽水・海水を対象にして、鉄酸化細菌の生理生態研究を推し進めてきた。得られた成果については、いくつか誌上発表することができた。当初設定した研究計画は、いくらか軌道を修正する必要性に迫られたが、その時々状況に応じて柔軟に対処し、結果的に順調に進められたと判断した。本研究で設定した「鉄酸化菌は地下/海底下流体の湧出域に普遍的に存在し、そこで NanoBIOS を産出することで、地球規模での元素循環を制御している」という作業仮説を検証するための基盤を十分に構築できた。今後は、本研究で構築した基盤をもとにして、『ナノ地球微生物学』のさらなる発展を目指す。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kato S, Okumura T, Uematsu K, Hirai M, Iijima K, Usui A, Suzuki K. Heterogeneity of microbial communities on deep-sea ferromanganese crusts in the Takuyo-Daigo Seamount. *Microbes Environ.* 33:366-377 (2018) (査読有)
- ② Kato S, Yuki M, Itoh T, Ohkuma M. Complete genome sequence of *Ferriphaselus amnicola* strain OYT1, a neutrophilic, stalk-forming, iron-oxidizing bacterium. *Microbiol. Resour. Announc.* 7:e00911-18 (2018) (査読有)
- ③ Kato S, Shibuya T, Takaki Y, Hirai M, Nunoura T, Suzuki K. Genome-enabled metabolic reconstruction of dominant chemosynthetic colonizers in deep-sea massive sulfide deposits. *Environ. Microbiol.* 20:862-877 (2018) (査読有)
- ④ Kato S, Sakai S, Hirai M, Tasumi E, Nishizawa M, Suzuki K, Takai K. Long-term cultivation and metagenomics reveal ecophysiology of previously uncultivated thermophiles involved in biogeochemical nitrogen cycle. *Microbes Environ.* 33:107-110 (2018) (査読有)
- ⑤ Chiu BK, Kato S, McAllister SM, Field EK, Chan CS. Novel pelagic iron-oxidizing *Zetaproteobacteria* from the Chesapeake Bay oxic-anoxic transition zone. *Front. Microbiol.* 8:1280. doi: 10.3389/fmicb.2017.01280 (2017) (査読有)
- ⑥ Nitahara S\*, Kato S\*, Usui A, Urabe T, Suzuki K & Yamagishi A. Archaeal and bacterial communities in deep-sea hydrogenetic ferromanganese crusts on old seamounts of the northwestern Pacific. *PLoS ONE* 12(2): e0173071. (2017) (査読有) \*Equal contribution
- ⑦ Field EK, Kato S, Findlay AJ, MacDonald DJ, Chiu BK, Luther III GW, Chan CS. Planktonic marine iron oxidizers drive iron mineralization under low-oxygen conditions. *Geobiology* 14: 499-508. (2016) (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 加藤 真悟, 鈴木 庸平, 伊藤 隆, 大熊 盛也, 鈴木 勝彦, メタゲノム解析から探る未培養アーキア系統群 Marine Benthic Group E の生態, 極限環境生物学会 2018 年度 (第 19 回) 年会, P-24, 松江, 日本, 12/2018, ポスター
- ② 加藤 真悟, 鈴木 庸平, 伊藤 隆, 大熊 盛也, 鈴木 勝彦, 未培養アーキア系統群 Marine Benthic Group E の生態と進化, 日本 Archaea 研究会 第 31 回講演会, 09B, 神戸, 日本, 8/2018, 口頭
- ③ Shingo Kato, Sanae Sakai, Miho Hirai, Eiji Tasumi, Manabu Nishizawa, Katsuhiko Suzuki, Ken Takai, Ecophysiology of previously uncultivated thermophiles revealed by long-term continuous cultivation and metagenomics, 日本微生物生態学会 第 32 回大会, P1-087, 沖縄, 日本, 7/2018, ポスター
- ④ 加藤真悟, 伊藤隆, 大熊盛也, 中性 pH 付近で生育する微好気性鉄酸化細菌の多様性, 日本微生物資源学会 第 25 回大会, O-3, つくば, 日本, 6/2018, 口頭
- ⑤ Shingo Kato, Katsuhiko Suzuki, Heterogeneity of microbial life on bathyal and abyssal ferromanganese crusts in the Takuyo-Daigo and Takuyo-Daisan seamounts, 日本地球惑星科学連合 連合大会 2018 年大会, MZZ41-03, 千葉, 日本, 5/2018, 口頭
- ⑥ 加藤真悟, 深海底熱水域周辺の冷たい海底下環境に存在する「もう一つの化学合成生態系」, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2PW09-2, 神戸, 日本, 12/2017,

- 口頭
- ⑦ 加藤 真悟, 鈴木 勝彦, 硫化鉄物を「食べる」化学合成生態系が暗くて冷たい深海底に存在する?, 環境微生物系学会合同大会 2017, O-009, 仙台, 日本, 8/2017, 口頭
  - ⑧ Beverly Chiu, Erin K. Field, Shingo Kato, Sean McAllister, George W Luthuer, and Clara S. Chan, Novel Fe-oxidizing Zetaproteobacteria floating in the Chesapeake: kinetics and genomic insights into microbial Fe cycling in a stratified marine water column, AGU Fall Meeting 2016, B11F-0526, San Francisco, CA, USA, 12/2016, ポスター
  - ⑨ 加藤真悟, 鈴木勝彦, メタゲノム解析により推定した硫化物鉄床に存在する未培養微生物の代謝機能, 第 17 回極限環境生物学会年会, O4-04, 神奈川, 日本, 11/2016, 口頭
  - ⑩ Shingo Kato, Katsuhiko Suzuki, Metabolic potential of uncultured bacteria in massive sulfide deposits below the deep seafloor revealed by metagenomic analyses, 5th International Workshop on Deep-Sea Microbiology, O-19, Kyoto, Japan, 9/2016, 口頭
  - ⑪ Shingo Kato, Nano-sized biogenic iron oxides produced by neutrophilic Fe-oxidizing bacteria and its implications for biogeochemical cycling, 日本地球惑星科学連合 連合大会 2016 年大会, BCG09-01, 千葉, 日本, 5/2016, 口頭 (招待講演)
  - ⑫ Beverly Chiu, Erin K. Field, Shingo Kato, and Clara S. Chan, Using kinetics to demonstrate a novel iron-oxidizing bacteria's potential link to the deposition of banded iron formations, Northeastern Geobiology Symposium 2016, P10, Massachusetts, USA, 4/2016, ポスター

## 6. 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：柏原 輝彦、齋藤 誠史

ローマ字氏名：Teruhiko Kashiwabara, Masafumi Saitoh

※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、研究者個人に帰属されます。