

令和 4 年 2 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K14412

研究課題名(和文) 化学合成・光合成微生物生態系の炭素及び硫黄安定同位体化学指標の構築

研究課題名(英文) Construction of Carbon and Sulfur isotopic signatures in chemotrophic and phototrophic microbial ecosystem

研究代表者

中川 麻悠子(Nakagawa, Mayuko)

東京工業大学・地球生命研究所・特任助教

研究者番号：20647664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず化学合成細菌・光合成細菌の純粋培養を行い、脂肪酸の炭素・水素同位体比分析を行った。硫黄同位体比に関しては硫酸還元と硫黄不均化に注目し、それぞれの四種硫黄同位体的特徴付けに取り組んだ。フィールド研究に関しては、コスタリカの温泉水及び堆積物分析による炭素循環解析、成層湖涌池における微生物相と炭素循環解析、モンゴルの永久凍土帯湖底堆積物試料中硫黄同位体分析による気候変動解析に携わった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学合成・光合成細菌バイオマス中脂肪酸の炭素・水素同位体比はそれぞれ炭素固定回路とエネルギー代謝を反映した分別範囲を示した。また、異なる環境下における硫黄代謝の硫黄同位体分別係数を明らかにした。それらの純粋培養結果で得られた分別範囲は堆積物試料中の炭化水素化合物や硫黄化合物がどのような微生物代謝で供給されたかを解析するために重要な基礎データとなる。実際にフィールド調査にて堆積物の炭素・硫黄同位体比解析により、新たに微生物の寄与を含んだ炭素循環モデルの提案や永久凍土が気候変化によって融解した影響による硫黄同位体的特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, pure cultures of chemosynthetic and photosynthetic bacteria were conducted and analyzed the carbon and hydrogen isotope ratios of fatty acids. For sulfur isotope ratios, sulfate reduction and sulfur disproportionation were focused and characterized their quadruple sulfur isotopic signatures.

As for field studies, I was involved in carbon cycle analysis by analyzing hot spring water and sediments in Costa Rica, microbial community and carbon cycle analysis of stratified lake Waku-ike, and climate change analysis by analyzing sulfur isotopes in permafrost lake sediment samples in Mongolia.

研究分野：生物地球化学

キーワード：炭素同位体 硫黄同位体 微生物 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球環境の変化や生命活動の痕跡を読み取る上で、堆積記録中の化学成分組成やその同位体比解析は我々に極めて有用な情報を与えてくれる。嫌気水環境中では硫黄の複数ある酸化状態を利用した生態系が構成され、酸化還元環境によって利用される S 代謝が異なるため、環境中に排出された硫黄化合物の四種硫黄同位体($\delta^{34}\text{S}$)は変化すると考えられる。これまで硫酸還元菌に関しては代謝速度、酵素系まで含めた解析が行われてきている (Wing and Halevy, 2014)が、その他の硫黄代謝 (硫黄酸化、硫黄還元、硫黄不均化など) についての四種硫黄同位体分別に関する報告は 0~ 数例しかない。

硫黄代謝をする細菌には多様な独立及び従属栄養細菌が存在し、炭素同位体比($\delta^{13}\text{C}$)も同時に解析することで生態系の栄養段階 (化学合成/光合成独立栄養と従属栄養の割合) まで特徴づけられると考えられる。現在、好気水環境に関して独立栄養生物の寄与を細菌毎に特徴のある脂肪酸種 (FA) と溶存態無機炭素 (DIC) 及び懸濁態有機炭素 (POC) の $\delta^{13}\text{C}$ から定量的に見積もるモデルが提案されている (Middelburg, 2014; Bade et al. 2006)。しかし、嫌気水環境中の微生物に対してそれらが全て報告されている研究は少なく、モデル構築に使用するデータセットとして不十分である。日々新たな微生物が発見されている中、統一的に多様な化合物毎の同位体比を報告することが必要である。

一方、模擬的な太古代海洋環境 (熱水系、成層湖など) に生息する細菌叢及び分子系統樹解析の根に近い細菌情報から、生態系の主要な独立栄養代謝は化学合成から光合成へ進化したと考えられている (Nisbert et al. 2007)。38-25 億年前の地質記録には -40 - -20‰ という低い有機物 $\delta^{13}\text{C}$ 値が報告されており (Ueno et al. 2001 他)、主に化学合成細菌に見られる還元的 Acetyl-CoA 経路または光合成細菌の一部が持つ Calvin 回路をもった独立栄養細菌の存在が提唱されている。それらの炭素固定回路を持つ細菌は現在、門レベルで複数存在し、シアノバクテリアやメタン菌であると結論づけるには個々の細菌が示す同位体分別情報や当時の環境で構築され得る生態系としての基礎情報が不足している。そこで、堆積記録から当時の生態系を明らかにするため、本研究では、まず代謝毎の脂肪酸 C 及び S 同位体比データをこれまでの報告値の収集及び培養実験により新たに加える。そして天然環境にて微生物相解析を行い、同位体比情報から炭素・硫黄循環に関わる微生物活動を相補的に理解することを実践する。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 嫌気水環境中から単離された独立栄養細菌の純粋培養実験により炭素固定回路 (還元的 TCA 回路)・硫黄代謝 (硫酸還元・硫黄不均化・硫黄還元・硫黄酸化) の同位体分別係数を明らかにする。(2) 先行研究も含めた炭素及び硫黄同位体分別情報を温泉・成層湖における微生物活動の理解と寄与推定を行う。

3. 研究の方法

(1) 純粋培養実験による代謝過程毎の同位体分別係数の決定

6 種類の化学合成細菌、3 種の光合成細菌について溶存態・懸濁態の有機・無機炭素同位体比及びバイオマス中の脂肪酸炭素・水素同位体比の分析を行い、同位体分別係数を求めた。

硫酸還元・硫黄不均化・硫黄還元代謝に関して、基質及び生成物の四種硫黄同位体分析を行い、分別係数を求めた。

表 1 培養実験を実施した微生物種

微生物種	培養温度	栄養段階	炭素固定回路	硫黄代謝
<i>Hydrogenobacter thermophiles</i> TK-6	70	化学合成独立	rTCA	硫黄酸化
<i>Thermovibrio ammonificans</i> HB-1	75	化学合成独立	rTCA	
<i>Phorcisia thermohydrogeniphila</i> HB-8	75	化学合成独立	rTCA	
<i>Thermovibrio sp.</i> HB-7	75	化学合成独立	rTCA	
<i>Desulfurobacterium sp.</i> TB-9	65	化学合成独立	rTCA	
<i>Caminibacter mediatlanticus</i> TB-1	55	化学合成独立	rTCA	
<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	40	光独立	rTCA	硫黄酸化
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	55	光独立	Calvin	
<i>Caldimicrobium thiodismutans</i>	75, 60	化学合成独立	rACP	硫黄不均化
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	37	従属	TCA/解糖系	硫酸還元

(2) 嫌気環境水環境における微生物活動解析

夏季成層湖・涌池にて、溶存態・懸濁態/有機・無機炭素同位体分析、メタ 16S rRNA 解析による微生物相解析を行い、優先する独立栄養細菌の分布と脂肪酸種及びその炭素同位体比がどのように変化しているか、代謝過程が検出される検証した。

コスタリカ全域の温泉採取を行い、吹き出し口から供給されるヘリウム、二酸化炭素、溶存無機炭素及び溶存有機炭素の濃度及び同位体比から、それらの成分の由来を解析した。

4. 研究成果

(1) 純粋培養実験による代謝過程毎の同位体分別係数の決定

還元的 TCA 回路による炭素同位体分別

還元的 TCA 回路を持った微生物種のバイオマス炭素同位体比は炭素源となっている DIC から -10.8 ~ -7.4‰の分別を示し、これまでの同様培養温度における分別報告値の範囲内にあり、バイオマス炭素同位体比の DIC からの分別が生育温度に依存していることを示唆した。脂肪酸炭素同位体比に関して、脂肪酸種間での変化は 0.4 ~ 2.2‰であり、7 菌種ともバイオマスよりも 1.6 ~ 11.5‰高い値を示した。この結果は先行研究である 6 報中、5 報でバイオマスに対して高い値をとる報告と同様であった。菌種間での 4 種の *Desulfurobacteriaceae* 門は、 $5.23 \pm 0.78\%$ と菌種間で同様の値をとり、*Chlorobiaceae* 門は 11.5‰と最も高い値を示した。還元的 TCA 回路以外の炭素固定回路である Calvin 回路や還元的アセチル CoA 経路ではバイオマスに対して脂肪酸の炭素同位体比は低くなっており、還元的 TCA 回路によって生成したアセチル CoA に CO₂ が取り込まれる際に大きな同位体分別を伴って相対的に低い炭素同位体比をもつピルビン酸が生成するのに対して、アセチル CoA からの脂質合成の際に同位体分別は大きくないためだと考えられている (van der Meer et al., 1998; Janke et al., 2001)。本研究ではクエン酸からアセチル CoA とオキサロ酢酸を生成する過程が 1 段階酵素反応で進む菌種と 2 段階酵素反応で進む菌種を扱ったが、その過程の違いは見られなかったため、この分岐過程における分別の影響は小さいと考えられた。同じ還元的 TCA 回路をもつ 7 菌種間で電子受容体・供与体が異なり、代謝フラックスを変えるため、バイオマス-脂肪酸間の炭素同位体比に最大 11.5‰の分別を与えることが示唆された。

硫黄不均化による四種硫黄同位体分別

硫酸還元と利用される酵素がほとんど同じである硫黄不均化であるが、四種硫黄同位体の動態が硫酸還元と異なるため、堆積記録から硫黄不均化の存在を検出することが期待されている。そこで本研究では長野県中房温泉から単離された好熱性硫黄不均化菌であり、系統的に古い

Thermodesulfobacteriota 門に属する *Caldimicrobium thiodismutans* の培養実験から、高温環境で齎される硫酸と硫化物の四種同位体的特徴づけとその生化学的な理解を深めるための代謝モデル構築を行った。

C. thiodismutans は炭素源に CO₂ ガス、硫黄源は元素状硫黄を用いた培地で 75°C で培養した (Kojima et al., 2016)。生成した硫化水素を取り除くため、スラリー状の酸化鉄 (III) を加えた。回収された硫酸：硫化物の割合は 1 : (3.8±1.3) であり、先行研究で 1 : (1~2) と報告されていた結果と異なっていた。これは高温で 1mM 以上硫化水素が溶存し、S42- ~ S62- のポリスルフィドが形成されやすくなる環境であり、この溶存態硫黄を硫黄不均化に利用したことが推察された。四種硫黄同位体分析の結果、硫化物は硫酸塩の $\delta^{34}\text{S}$ より約 10.2‰ 小さく、30°C で培養された不均化菌より小さい値であったが、 ^{33}S と ^{36}S の質量依存指数は 0.520 ± 0.002 および 1.87 ± 0.01 で、これまで報告されている硫黄及び亜硫酸の不均化と同様の値であった。本研究の結果により高温環境での硫黄不均化菌により生成する硫酸、硫化物は低温環境とは量比と分別は異なるが、質量依存指数は付近化に特有で、硫酸還元菌の指数と異なるため、判別に利用できる可能性が示唆された。

(2) 嫌気環境水環境における微生物活動解析

涌池における炭素循環について

好気及び嫌気生態系での特徴付けを行うため、成層湖の好気層及び嫌気層における微生物相と脂質同位体比の解析を行なった。微生物相解析から、優占する独立栄養細菌に注目し、単離報告されている近縁種から保有する炭素固定回路と脂肪酸を調査し、観測された結果と比較した。特徴的な脂肪酸種について、溶存態・懸濁態炭素化合物の同位体比と比較して解析を行うことで、優占している炭素固定回路の特徴が再現された。特に、嫌気層では *Epsilonproteobacteria* 門の *Arcobacter* や *Sulfuricurvum* などの化学合成独立栄養細菌が優占しており、それらが特徴的に保有する C18:1 脂肪酸について、POC 炭素同位体比よりも低い値を示し還元的 TCA 回路の特徴と合っていた (図 1)。ただし、植物及び植物プランクトン由来の脂肪酸が主要成分であるため、堆積物から嫌気層で見られた脂肪酸やその同位体比的特徴は見いだせなかった。

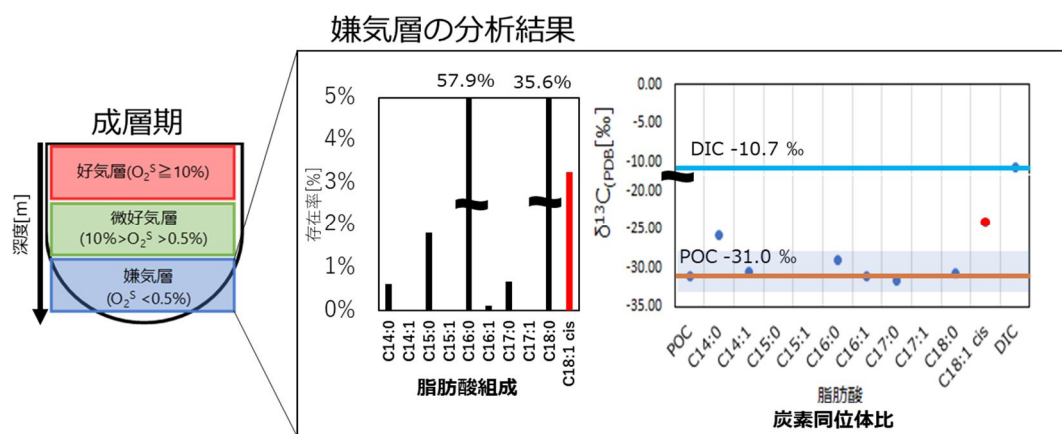


図 1 嫌気層における脂肪酸組成とその炭素同位体比分析結果

コスタリカ全域の温泉中溶存炭素同位体比分析による炭素循環解析

沈み込み帯から表層へ供給される二酸化炭素が表層へ噴出する量及びプロセスを生物・非生物プロセスを含めて解析するため、コスタリカ全域の温泉・噴出口試料の微生物相解析と溶存態・懸濁態炭素同位体比解析を行い、炭素循環への微生物寄与解析を行なった。温泉水中に溶存無機炭素の安定炭素同位体変化から、温泉水中へ溶存する前に地殻中のカルシウムなどと結合し、沈み込み帯から供給される炭素のうち約91%が炭酸塩として取り除かれていることを示した。更に溶存無機及び有機炭素の同位体比の差が一定であることから炭酸塩として取り除かれた後に微生物が炭素固定を行って生合成した有機物が溶存していることが示唆された(図2)。

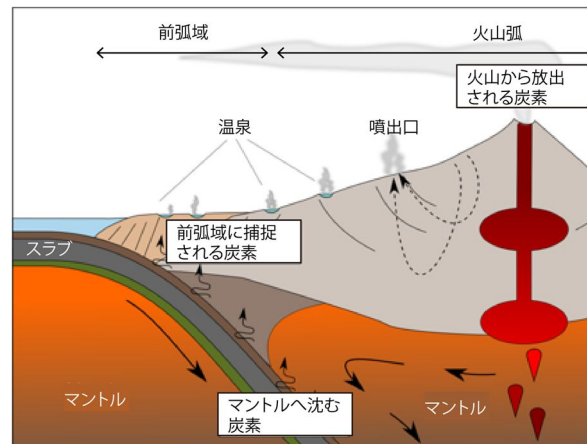


図2 沈み込み帯における炭素循環の概要

これまで沈み込み帯から表層へ炭素が供給される過程について生物活動の影響は考慮されていなかったが、前述の解析により、表層へ二酸化炭素として放出される最終段階で微生物による炭素固定の影響が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katsuta Nagayoshi, Matsumoto Genki I., Hase Yoshitaka, Tayasu Ichiro, Haraguchi Takashi F., Tani Eriko, Shichi Koji, Murakami Takuma, Naito Sayuri, Nakagawa Mayuko, Hasegawa Hitoshi, Kawakami Shin ichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Siberian Permafrost Thawing Accelerated at the Bolling/Allerod and Preboreal Warm Periods During the Last Deglaciation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geophysical Research Letters	6. 最初と最後の頁 13961 ~ 13971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1029/2019GL084726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Taguchi Koudai, Yamamoto Tomonari, Nakagawa Mayuko, Gilbert Alexis, Ueno Yuichiro	4. 巻 34
2. 論文標題 A fluorination method for measuring the isotopologue of C ₂ molecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 e8761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.8761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Barry Peter H., Nakagawa Mayuko, Giovannelli Donato, Maarten de Moor J., Schrenk Matthew, Seltzer Alan M., Manini Elena, Fattorini Daniele, di Carlo Marta, Regoli Francesco, Fullerton Katherine, Lloyd Karen G.	4. 巻 6
2. 論文標題 Helium, inorganic and organic carbon isotopes of fluids and gases across the Costa Rica convergent margin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 2052-4463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41597-019-0302-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mariscal, C., Barahona, A., Aubert-Kato, N. Nakagawa, M., et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Hidden Concepts in the History and Philosophy of Origins-of-Life Studies: a Workshop Report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Origins of Life and Evolution of Biospheres	6. 最初と最後の頁 111-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11084-019-09580-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 PH Barry et al. (共著者37名中25番目)	4. 巻 568
2. 論文標題 Forearc carbon sink reduces long-term volatile recycling into the mantle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 487 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1131-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishida Akifumi, Thiel Vera, Nakagawa Mayuko, Ayukawa Shotaro, Yamamura Masayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Effect of light wavelength on hot spring microbial mat biodiversity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0191650	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fullerton Katherine M., PH Barry et al. (共著者25名中11番目)	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of tectonic processes on biosphere?geosphere feedbacks across a convergent margin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Geoscience	6. 最初と最後の頁 301 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41561-021-00725-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Peter H Barry
2. 発表標題 Helium and carbon isotopes in southern Costa Rica and western Panama
3. 学会等名 AGU Fall Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 麻悠子
2. 発表標題 多次元アイソトポログ解析で分子の起源・環境を知る
3. 学会等名 第73回 イオン反応研究会 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 MJ de Moor, PH Barry, KG Lloyd, D Giovannelli, M Schrenk, M Nakagawa, CJ Ramirez, K Pratt, DR Hummer, TM Lopez
2. 発表標題 Chemical and biological carbon sinks in the Costa Rican Forearc: First insights from the Biology Meets Subduction project
3. 学会等名 AGU Fall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 KM Fullerton, D Giovannelli, M Nakagawa, MO Schrenk, KG Lloyd
2. 発表標題 Multivariate and Network Analysis of Microbe-Environment Interactions Across a Geochemically Active Subduction Zone in Northern Costa Rica
3. 学会等名 AGU Fall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Nakagawa, D Giovannelli, C Vetriani, M Kameya, A Gilbert, K Yamada, and N Yoshida
2. 発表標題 Carbon and Hydrogen stable isotopic signatures of fatty acids produced by reductive tricarboxylic acid cycle
3. 学会等名 Extremophiles 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Nakagawa
2. 発表標題 Carbon and hydrogen stable isotopic signatures of fatty acids produced by reductive tricarboxylic acid cycle
3. 学会等名 Stable Isotopes in Biosphere Systems Workshops (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村 優, 中川麻悠子, 丹 佑太, 豊田 栄, 山田桂太, 吉田尚弘
2. 発表標題 酸素濃度の異なる微生物生態系における脂肪酸 C 及び H 解析
3. 学会等名 2018年度地球化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川麻悠子
2. 発表標題 安定同位体的指標を用いた生態系における一次生産の寄与評価
3. 学会等名 光合成セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川麻悠子・大八木英夫・丹佑太・豊田栄・吉田尚弘
2. 発表標題 成層湖における季節及び深度毎の微生物相変化による炭素循環への影響
3. 学会等名 2017年度日本地球化学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mayuko Nakagawa, Gilbert Alexis, Maxime Julien, Keita Yamada, Naohiro Yoshida
2. 発表標題 RELATIVE CONTRIBUTION ESTIMATIONS OF METABOLIC PROCESSES IN MICROBIAL ECOSYSTEMS WITH USING MULTIPLE ISOTOPIC ANALYSIS.
3. 学会等名 AbSciCon 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川麻悠子, 梅澤和寛, 小島久弥, 福井学, 吉田尚弘, 上野雄一郎
2. 発表標題 好熱性硫黄不均化菌の四種硫黄同位体指標
3. 学会等名 2020年度日本地球化学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------