

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15255

研究課題名(和文) 磁硫化鉄(グライタイト)がメタン菌の代謝を促進する機構の分子生物学的解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying the greigite-dependent enhancement of methanogenesis.

研究代表者

五十嵐 健輔 (Igarashi, Kensuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：90759945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、磁硫化鉄であるグライタイトが、メタン菌の代謝を促進するという新奇の現象が起こる機構を分子生物学的な観点から解明することを目的とした。研究の結果、グライタイト特有の鉱物的特性が代謝促進に必要であり、さらにグライタイトから溶出した鉄を含む化学種が代謝促進を引き起こすことが明らかになった。この代謝促進は、翻訳レベルでの代謝の底上げ、もしくは、グライタイトから遊離した触媒活性をもつ化学種による生化学反応の底上げに起因する可能性が示唆された。また、この代謝促進効果は、メタン菌を含む微生物群集においても見られたため、有機物からのメタン生産を目的とした技術への応用可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グライタイトによるメタン菌の代謝促進は、近年新たに発見された現象であり、その機構が未知である上に、代謝促進が起こる詳細な条件が不明であった。本研究により、その一端が明らかになり、地球の炭素サイクルに深く関わるメタン菌の生理と生態を理解する上で新しい知見を得ることが出来た。また、代謝の促進が現れる培養条件を特定することに成功し、本現象の応用展開、例えば、有機性廃棄物からの効率的なメタン生産技術などに展開できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Previous research has shown that greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) has bioactivity to enhance methanogenesis. This study aimed to elucidate the underlying mechanism of the enhancement. Culture experiments suggested that specific mineral characteristics of greigite accounted for its bioactivity. Furthermore, soluble chemical species that are released from greigite was found to possess the bioactivity. Transcriptome analysis unveiled that the greigite-dependent enhancement of methanogenesis could be involved in the increase in metabolic fluxes at translational levels. Abiotic experiments showed that greigite has catalytic activity toward CO<sub>2</sub> reduction by H<sub>2</sub>, indicating that greigite could also enhance the metabolic fluxes of methanogenesis by its catalytic activity. Enhanced methanogenesis by greigite was also observed in syntrophic anaerobic microbial communities, suggesting the potential of the greigite-dependent enhancement to applicational technologies.

研究分野：微生物学

キーワード：メタン菌 メタン生産 硫化鉄 生理活性物質 網羅的遺伝子発現解析 生命の起源

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

メタン菌はメタン生産を通じて地球の炭素サイクルに重要な役割を担っている。そして、その特徴的な代謝と生理から初期生命に近い生物として認識されている。メタン菌の生息環境には、生物・非生物的に発生したサルファイドと鉄とが反応して形成される種々の硫化鉄が豊富に存在しており、菌-硫化鉄間の相互作用が起こっていると考えられている。メタン菌と硫化鉄との相互作用の解明を目的としたこれまでの研究過程で、メタン菌を磁硫化鉄であるグライガイト( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ )の存在下培養するとメタン生産と増殖が著しく促進されることが発見された<sup>(1)</sup>。

グライガイトは、メタン菌などの独立栄養生物の代謝の根幹である還元的アセチル CoA 経路と深い関わりをもつことが指摘されている。還元的アセチル CoA 経路のキーとなる酵素・補酵素の活性中心には、グライガイト等の硫化鉄と構造的に類似する鉄イオウクラスターが存在することから(図1)、硫化鉄が原始的な炭酸固定反応を触媒し、それが徐々に還元的アセチル CoA 経路ではたらく鉄イオウクラスター含有酵素に進化していったというシナリオが提唱されている<sup>(2)</sup>。さらに、このシナリオでは、初期の生命は環境中のグライガイトなどから代謝に必要な鉄イオウクラスターを調達していたと推定されている。

以上の事から、グライガイトによるメタン菌の代謝促進は、グライガイトが細胞内に入り還元的アセチル CoA 経路を遺伝子発現と酵素活性の両面から活性化させたことに起因する、という仮説の構築に至った。

## 2. 研究の目的

グライガイトによるメタン菌の代謝促進の機構はまだ明らかになっていないため、上記の仮説の妥当性は不明であり、本現象の普遍化や応用利用への基盤はまだ構築できていない。そこで、本研究の目的は、本促進機構を分子生物学的手法により解明すること、そして、代謝促進が現れる培養条件の特定を行うことである。

## 3. 研究の方法

### (1) グライガイトによる代謝促進が起こるメタン菌の特徴

先行研究では、特に好熱性水素資化性のメタン菌を対象に代謝促進効果を解析していたため<sup>(1)</sup>、中温性、そして酢酸資化性のメタン菌への代謝促進効果は未知であった。そこで、それらの代表種としての、*Methanococcus maripaludis* C5 株および *Methanosarcina barkeri* MS 株を水素および酢酸資化条件で培養し、グライガイトによる促進効果を調査した。なお、各培養は微生物カルチャーコレクション(JCM または DSMZ)が推奨する条件に従った。促進効果の評価は先行研究<sup>(1)</sup>に従い、培養が定常期に達した際の最終菌密度を直接計数法、メタン生産量をガスクロマトグラフィー(GC-2014、Shimadzu)で定量することにより行った。

### (2) グライガイト特異的な促進効果

グライガイトの鉱物的特徴が促進効果に必要であるという予想から、グライガイト以外の鉱物による代謝促進効果を調査した。効果の定量には、先行研究<sup>(1)</sup>により代謝促進効果が明瞭に現れていた *Methanocaldococcus jannaschii* JAL-1 株を用いた。グライガイトを空气中で酸化させたもの、およびそれをサルファイドで還元しグライガイト構造を再生したものを用意し、促進効果を解析した。また、グライガイト以外の鉄塩として酸化鉄(ヘマタイト( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )、マグネタイト( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ))および、硫化鉄(アモルファス FeS、マキナワイト(FeS)、パイライト( $\text{FeS}_2$ ))の代謝促進効果も解析した。また、グライガイトから溶出する成分によって代謝促進が引き起こされる可能性を検証するために、グライガイトとメタン菌を透析膜(MWCO 20 kD、Repligen)で隔離した状態で培養を行った。

グライガイトから溶出した成分の解析のため、リン酸緩衝液(pH6.0、10 mM)中でグライガイト(最大 30 mg)をインキュベーションし、フィルター濾過物を ICP 発光分析装置(ICP-OES、ULTIMA2、HORIBA)および紫外可視分光法(UV-VIS、V-660、JASCO)で測定した。

### (3) 網羅的遺伝子発現解析

グライガイトによる著しい代謝促進効果が現れたメタン菌である *Mc. jannaschii* JAL-1 株を対象に、グライガイト存在下で特異的に発現変動が起こる遺伝子を特定するために、網羅的遺伝子発現解析を行った。グライガイトの有無、そして対照実験としてのアモルファス FeS の存在下

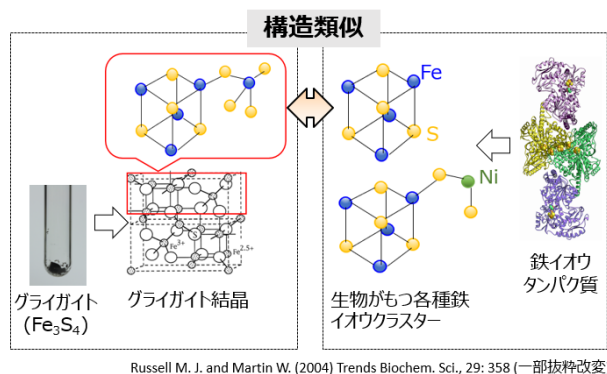


図 1. グライガイトと鉄イオウクラスターとの類似性

で培養を行い、対数増殖期中期に達した細胞から RNA を抽出した。HiSeq2000 プラットフォーム (Illumina) による FASTQ データの取得後、Trimmomatic によるクオリティコントロールを施し、得られたリードを TopHat または BMap を用いて既知のゲノムにマッピングした。マッピング結果から Cuffdiff を用いた解析により発現変動遺伝子を検出した。

#### (4) 栄養共生時の促進効果

*Mc. jannaschii* は従属栄養性好熱性細菌である *Thermosipho globiformans* MN14 株と水素による栄養共生によりメタン生産することが知られている<sup>(3)</sup>。そこで、このような栄養共生状態でもグライガイトによる代謝促進が起こるかを検証するために、タンパク質性有機物を含んだ MP 培地<sup>(3)</sup>を用い、グライガイトの添加または非添加条件で、*Mc. jannaschii* と *T. globiformans* による共培養を行った。

#### (5) 微生物群集に対する効果

自然界の複雑な微生物群集に対するグライガイトの効果を検析するため、非純化状態の微生物源を用いた実験を行った。メタン菌の活性が高く、かつ硫化鉄も豊富に存在する代表的な環境である水田土壌を微生物源として用い、水素と二酸化炭素の混合気の下、無機栄養培地で集積培養を行った。代謝促進効果の評価は、上述(1)と同じ方法で行った。集積培養物から DNA を抽出し、16S rRNA の V3-V4 領域をターゲットにしたメタゲノム情報の取得を MiSeq プラットフォーム (Illumina) により行った。得られた RAW データを先行研究<sup>(4)</sup>に従い処理し菌叢を解析した。

#### (6) グライガイトの触媒活性

代謝促進を引き起こすグライガイト自体にも水素と二酸化炭素を反応させる触媒活性があることが予想されている。そこで、水素と二酸化炭素をグライガイトの存在下で水熱反応させ、反応後の産物を、ガスクロマトグラフィー質量分析法、高速液体クロマトグラフィー質量分析法で解析することで、グライガイトの触媒活性を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) グライガイトによる代謝促進が起こるメタン菌の特徴

テストされた各メタン菌に対するグライガイトの代謝促進効果を図 2 にまとめた。先行研究で代謝促進が報告されたメタン菌<sup>(1)</sup> (*Mc. jannaschii* JAL-1 株、*Mc. indicus* SL43 株、*Mt. thermoautotrophicus* delta H 株、*Mp. kandleri* AV19 株)に加え、中温性水素資化性メタン菌 *Mc. maripaludis* で明瞭な代謝促進が見られた。一方、*Ms. barkeri* では水素資化および酢酸資化条件どちらにおいても促進が見られなかった。よって、代謝促進は Methanosarcinales 目以外のメタン菌で、かつ水素資化性のメタン菌の場合に現れることが示唆された。

#### (2) グライガイト特異的な促進効果

酸化鉄種(ヘマタイト、マグネタイト)およびグライガイト以外の硫化鉄種(アモルファス FeS、マキナワイト、パイライト)には、代謝促進効果が無いことが明らかになった(図 3)。また、グライガイトを空气中で酸化させ、部分的に酸化鉄化させたものでは、代謝促進効果が著しく低下した。さらに、それをサルファイドで還元しグライガイトに再生すると代謝促進効果が復帰したことから、グライガイト特有の鉱物的特徴が代謝促進に必須であることが示された。興味深いことに、グライガイトと菌を透析膜で隔離した状態でも代謝促進効果が見られたことから、透析膜透過性(20 kD 以下)の化学種が代謝促進に寄与していることが示唆された。

リン酸緩衝液でグライガイトをインキュベーション後の溶液にも代謝促進効果があることが判明した。この溶液を ICP-OES で分析したところ、最大 150  $\mu$ M の濃度で鉄原子が含まれて

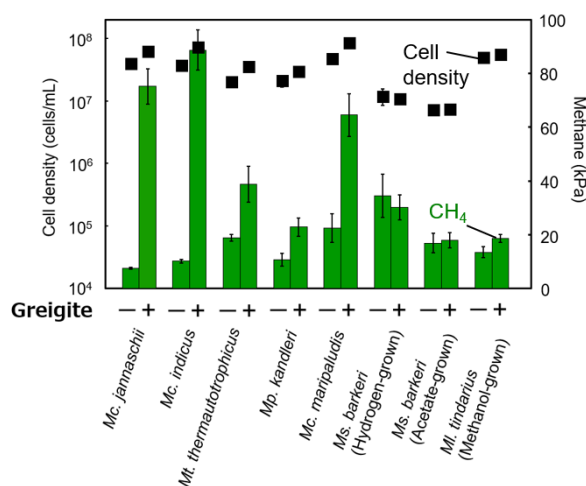


図 2. 種々のメタン菌に対するグライガイトの代謝促進効果

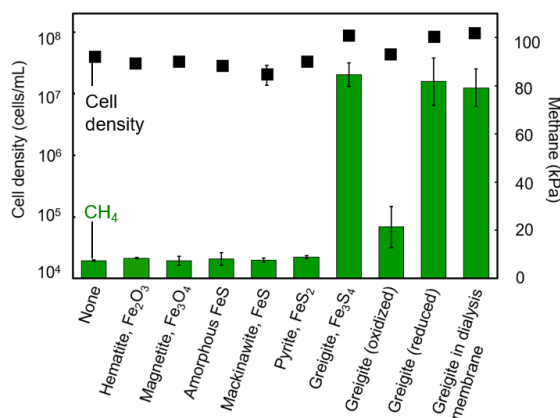


図 3. 種々の鉄塩が *Mc. jannaschii* の増殖とメタン生産に与える影響

いることが明らかになった。グライガイトが鉄イオウクラスターに類似した状態で溶液中に存在していると予想し、UV-VIS による測定を行ったが、溶存物質の濃度が低すぎたため、鉄を含む化学種の同定には至らなかった。

### (3) 網羅的遺伝子発現解析

グライガイトにより著しい代謝促進効果が見られた *Mc. jannaschii* を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。グライガイト添加ありと無し条件を比較し、統計的に有意な発現上昇が見られた代表的な遺伝子を表 1 に、発現減少が見られた遺伝子を表 2 にまとめた。当初の予想と異なり、鉄イオウタンパク質がキースト素であるメタン菌の中央代謝系、即ち還元的アセチル CoA 経路の遺伝子群には、著しい遺伝子発現の変化が見られなかった。一方で、tRNA のチオール化経路に關与する *tusA* や *tusD* などの遺伝子がグライガイト存在下で発現上昇していた。本経路は、特に Methanococcales 目に属するメタン菌において、メチオニンの *de novo* 合成に關わる重要な経路である。よって、グライガイトによる代謝促進は、翻訳レベルで影響を受けている可能性が示唆された(図 4A)。さらに、予想に反して、水素の利用速度に關与するはずであるヒドロゲナーゼの關連遺伝子に発現減少が見られた。よって、ヒドロゲナーゼ依存的な水素からの還元力の獲得反応は転写レベルではむしろ抑制されている可能性が浮上した。なお、アモルファス FeS を添加した培養では、添加物無しの培養とほぼ同じ結果を示したことから、本実験からもグライガイトの鉱物的特性が代謝の変化を引き起こすことが示された。現在、上記の結果を裏付けるためのプロテオーム解析を計画中である。

表 1. グライガイトの添加によって発現上昇が見られた *Mc. jannaschii* の代表的な遺伝子

Gene number	Gene name / description	log2(fold_change) <sup>†</sup>
MJ_0007	2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase, subunit beta ( <i>hgdB</i> )**	3.14
MJ_0990	tRNA 2-thiouridine synthesizing protein A ( <i>tusA</i> )	2.51
MJ_0009	Hypothetical protein	2.38
MJ_0989	tRNA 2-thiouridine synthesizing protein D ( <i>tusD</i> )	2.23
MJ_0010	BcpC phosphonopyruvate decarboxylase	2.05
MJ_0008	Sugar phosphate isomerase/epimerase	1.96
MJ_1310	Monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit C	1.92
MJ_0003	Hypothetical protein	1.87
MJ_0988	Bifunctional oligoribonuclease/PAP phosphatase ( <i>nrnA</i> )	1.69
MJ_1363	Energy-converting hydrogenase B subunit M*	1.52

\* Iron-sulfur protein \*\* Iron-sulfur protein containing 4Fe4S cluster(s) † fold-change = (+greigeite condition / negative control)

表 2. グライガイトの添加によって発現減少が見られた *Mc. jannaschii* の代表的な遺伝子

Gene number	Gene name / description	log2(fold_change) <sup>†</sup>
MJ_1165	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit E ( <i>fwdE</i> )**	-2.21
MJ_0517	Energy-converting hydrogenase A subunit M*	-2.08
MJ_1192.1	Methylviologen-reducing hydrogenase subunit	-2.06
MJ_0514.2	Energy-converting hydrogenase A subunit P **	-2.06
MJ_1167	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit G ( <i>fwdG</i> )	-2.03
MJ_1168	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit D ( <i>fwdD</i> )	-2.02
MJ_0512	Hypothetical protein	-1.99
MJ_0516	Energy-converting hydrogenase A subunit N*	-1.97
MJ_1166	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit F ( <i>fwdF</i> )	-1.90
MJ_0525	Energy-converting hydrogenase A subunit E*	-1.87

\* Iron-sulfur protein \*\* Iron-sulfur protein containing 4Fe4S cluster(s) † fold-change = (+greigeite condition / negative control)

### (4) 栄養共生時の促進効果

従属栄養性細菌 *T. globiformans*<sup>(5)</sup> との共培養条件<sup>(3)</sup> においても、グライガイトによるメタン生産速度の上昇(MP 培地で最大 1.4 倍)が見られた。以上より、特に高温下で、有機物からのメタン生産を利用したリアクターにおいてもグライガイトによるメタン生産の促進が可能であることが示唆された。現在、本共培養条件での遺伝子発現変動の解析を行っている。

### (5) 微生物群集に対する効果

水田土壌を微生物源とした集積培養において、グライガイト存在下では非存在下に比べ、増殖とメタンおよび酢酸生産速度の著しい上昇がみられた。このような増殖と代謝の促進は、他の硫化鉄種と酸化鉄種では見られず、単独培養と同様なグライガイト依存的な代謝促進効果を示された。グライガイト存在下での継代培養では、増殖と代謝の促進を維持しつつ、徐々にメタン生産より酢酸生産が優性となった。菌叢解析の結果、特にグライガイト存在下の集積培養で、メタン菌よりも酢酸生成菌が優占したことに加え、近縁種と比較的低い相同性(94%)を示す *Bacteroides* 属の細菌も集積されていることが明らかになった。本研究の成果は、環境微生物と硫化鉄物との相互作用へ新たな知見を提供するとともに、細胞外鉄イオウクラスター依存的な増殖を示す新規微生物の取得の足がかりになると期待される。

### (6) グライガイトの触媒活性

水素と二酸化炭素をグライガイトの存在下で水熱反応(数~100 気圧、60~100°C、鉱物はスラリー状態)させた結果、二酸化炭素の還元反応産物として、ギ酸、酢酸、そしてメタンが生成した。よって、グライガイト自体には水素から取得した電子を利用して二酸化炭素を還元する触媒活性があることが明らかになった<sup>(6)</sup>。なお、この発見は、メタン菌が、触媒活性もつ鉱物に駆動された初期生命から誕生したという仮説<sup>(2)</sup>を強く支持する知見である。

メタン菌を培養する際の条件(数気圧、37~80℃、鉱物は培地に懸濁状態)では、本触媒反応が進行しなかった。以上から、グライタイトが触媒として寄与する反応は、メタン菌の培養条件ではほとんど進行しないものの、細胞内に入った溶存化学種が間接的にメタン菌の代謝に影響を与えている可能性が示唆された。このことから、遺伝子発現に依存しない代謝促進機構が存在するという新しい可能性が考案された(図 B)。今後は、遺伝子発現依存(図 4A)、非依存(図 4B)の両方の機構が存在する可能性を考慮し、細胞内の酵素の活性解析も組み入れた新しい実験を行い、機構の全容解明を目指した研究を行う予定である。

## 総括

本研究により、グライタイトによるメタン菌の代謝促進機構の一端が明らかにされた。グライタイト特有の鉱物的特性が代謝促進に必要であり、さらにグライタイトから溶出した鉄を含む化学種が促進効果をもたらすことが示唆された。グライタイトによる代謝促進は、tRNA のチオール化経路を介して翻訳レベルでの活性上昇に起因する可能性が示された(図 4A)。応用利用の観点からは、特に Methanococcales 目に属するメタン菌が水素資化によってメタン生産する条件であれば、従属栄養生物との共培養条件など、広範な条件でグライタイトによる代謝促進効果を適用できる可能性が示された。さらに、環境微生物群集に対してもグライタイトによる代謝促進効果があることが明らかになり、新規微生物の集積と取得に関する新しい研究展開の可能性が示された。研究の過程で、グライタイト自体にも、メタン菌の代謝を模擬するような触媒活性があることが判明したため、本触媒活性が、間接的にメタン菌の代謝促進に寄与しているという新しい仮説の構築に至った(図 4B)。本研究により、メタン菌の代謝制御を可能にする新しい技術の構築に繋がる基礎知見が得られたばかりで無く、メタン菌の誕生過程への新しい示唆を提供することができた。

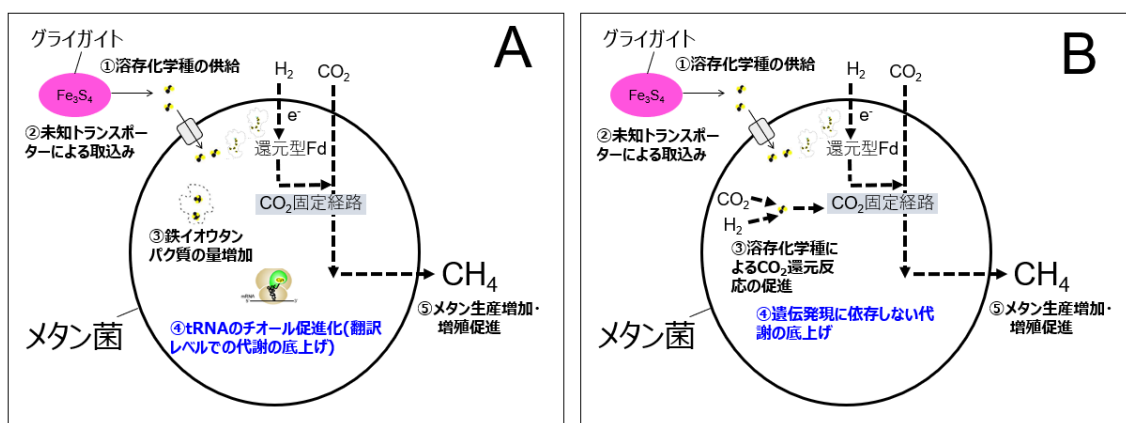


図 4. 本研究から推定されるグライタイト依存的な代謝促進機構の模式図

(A)遺伝子発現の変動(特に翻訳レベルでの代謝の底上げ)を介した促進機構。(B)グライタイトから遊離した化学種の触媒活性に起因する促進機構。

## 引用文献

- (1) Igarashi K., and *et al.*, (2016) *Geochim. Cosmochim. Acta*, 191: 47-57.
- (2) Martin W. and Russell M. J., (2003) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 358 : 59-85.
- (3) Igarashi K. and Kuwabara T., (2016) *Energy & Fuels*, 30: 4945-4950.
- (4) Tu Z., and *et al.*, (2019) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 46: 1657-1667.
- (5) Igarashi K. (2019) *Microbiol. Resour. Announc.*, 8:e01728-18.
- (6) Preiner M.\*, Igarashi K.\*, Muchowska K. B.\*, Yu M.\*, and *et al.*, (2020) *Nat. Ecol. Evol.*, 4: 534-542. (\*, equal contribution)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Preiner M., Igarashi K., Muchowska K. B., Yu M., Varma S. J., Kleinermanns K., Nobu M. K., Kamagata Y., Tuysuz H., Moran J., Martin W. F.	4. 巻 4
2. 論文標題 A hydrogen dependent geochemical analogue of primordial carbon and energy metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 534-542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41559-020-1125-6.	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 Igarashi K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft genome sequence of Thermosipho globiformans strain MN14.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01728-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01728-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 五十嵐健輔
2. 発表標題 鉱物をベースとした二酸化炭素還元触媒の合成と原始生命の誕生過程への示唆
3. 学会等名 令和二年度 分子・物質合成プラットフォーム 支援成果報告会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐健輔
2. 発表標題 生理活性をもつ磁硫化鉄が嫌気性微生物群集へ与える影響の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五十嵐健輔
2. 発表標題 生命の起源は水素栄養性か？ グライナイト仮説
3. 学会等名 SAT テクノロジーショーケース2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Igarashi K
2. 発表標題 Experimental study on role of metal sulfides and sulfide-peptide complexes in the first Metabolism
3. 学会等名 Hadean Bioscience International Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐健輔
2. 発表標題 Mechanism of greigite-dependent enhancement of methanogenesis
3. 学会等名 日本微生物生態学会32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐健輔
2. 発表標題 炭酸固定反応を触媒する硫化鉱物とそれを基盤とした原始酵素の再現
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐健輔
2. 発表標題 メタン菌による磁硫化鉄形成とそれを利用したメタン生産促進技術
3. 学会等名 2017年度日本生物工学会北日本支部 札幌シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五十嵐健輔
2. 発表標題 メタン菌の代謝が磁硫化鉄greigitelによって促進される機構の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第32回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース発表 「生命のもととなる可能性のある有機物の合成反応を実証」2020年3月3日 産総研WEBページ上 <a href="https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2020/pr20200303_2/pr20200303_2.html">https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2020/pr20200303_2/pr20200303_2.html</a></p>
--

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