

令和元年6月20日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19435

研究課題名(和文) 地下圏に存在する電気に依存する生命圏の探索

研究課題名(英文) Exploration of subsurface microbial electrosphere

研究代表者

石井 俊一 (Ishii, Shunichi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・研究員

研究者番号：10556913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多種多様な地下圏微生物群から「固体に電子を供与し呼吸する微生物」や「電気をエネルギー源とする微生物」の集積培養を行い、地下圏に存在する電気に依存する生命圏の探索に挑戦した。その結果、酢酸あるいは水素が発電微生物の重要な栄養基質であり、海水地下圏からは *Geoalkalibacter* 属、汽水地下圏からは *Geobacter* 属の発電微生物が見出された。また、海水地下圏において *Methanocalculus* 属と *Methanobacterium* 属の電気メタン合成微生物が見つかった。また、最新のメタオミクス解析により、その代謝機能や電子授受機能の一端が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、地下圏において電気に依存して生きる微生物が新たに発見された。また、海水性の条件と汽水性の条件で異なる電気微生物が見つかった。電気微生物のある一群は、固体表面の電極電位に対して多様な応答を見せる事が明らかになった。これらの結果は、異なる表面電極電位を有する鉱物や、酸化還元電位勾配を有する地下環境に適応し、多種多様な電気微生物が生息している事を示唆している。本研究により、電気生命圏を形成しうる様々な電気微生物群が地下環境に存在している事が判明し、未だに知られていない地下圏微生物の生き様に関する新たな知見を加える事ができた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we explored “electrogenic microbes that donate electrons to solids and breathe” and “electrotrophic microbes that use electricity as energy source” from various environmental microbiome by accumulation cultures in the bioelectrochemical reactors. As a result, acetate or hydrogen is an important substrate for electrogenic microbes. As for the electrogenic microbes, *Geoalkalibacter* spp. were enriched from seawater environment, while *Geobacter* spp. were enriched from freshwater environment. In addition, electrometotrophic microbes of the genera *Methanocalculus* and *Methanobacterium* were observed in the reactors that filled with seawater-based subsurface groundwater. The MetaOMICs analyses revealed metabolic functions of the electrogenic microbes that affiliated with *Geobacter* subsurface clade, and their electron transfer pathways.

研究分野：電気微生物学

キーワード：電気微生物 発電菌 電気メタン合成菌 微生物燃料電池 メタトランスクリプトミクス メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

現在の地球上には、 $10^{29}$  ~  $10^{30}$  個とも言われる膨大な数の微生物が存在しており、そのうちのかなりの部分が、海洋地下圏や土壌地下圏に存在していると考えられている。このように、非常に大きなリソースである地下圏微生物のライフスタイルを知る事は、地球全体の物質循環を知るためにも重要であるが、そのアクセスの難しさもあり、なかなか進んでいない。

そもそも地下圏とは、どのような世界であろうか？地下圏は、砂や泥に支配される空間であり、水、有機物や無機物質のフラックスが、地上に比べ極度に制限される世界である。微生物も我々人類と同様に『成長(増殖)するための食べ物(エネルギー源)』と『呼吸してATPを作り出すための酸素(電子受容体、好気微生物の場合)』が必要である。通常、表層で酸素は消費され尽くされてしまうため、地下圏は無酸素の嫌気条件になり、酸素に替わる電子受容体が必要である。そのような環境中には、酸素の代わりに地下圏に大量に存在する金属酸化物(鉄酸化物等)に電子を移送して呼吸する固体鉄還元微生物が広範に存在する事が知られている。一方、地下圏におけるエネルギー源とは何であろうか？地上では、光合成に代表されるように太陽光のエネルギーに満ちている。一方、地下圏には、石炭やメタンハイドレードなどの化石燃料、マントルに起因する熱などのエネルギー、深成岩と水の反応やプレート運動によって形成される水素などの化学物質がエネルギー源として考えられている。最近、これらに加えて、大地に常に流れている微弱な地電流などの電気エネルギーが微生物の生命活動を支えるエネルギー源ではないか？という可能性が出てきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、海洋研究開発機構の保有する多種多様な掘削コア等に含まれる地下圏微生物群を用い、地下圏における「固体に電子を供与し呼吸する微生物」や「電気をエネルギー源とする微生物」の存在の有無を明らかにする。これにより、地下圏に存在する電気に依存する生命圏の探索に挑戦する。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気化学リアクターによる電気微生物の抽出

一槽空気正極式微生物電気化学リアクター、一槽二電極式微生物電解セル、あるいは堆積物微生物燃料電池を用いて、電気に依存して生育する微生物群集の集積培養を電極上で行った(図1)。一槽空気正極式微生物電気化学リアクターは、容量400 mL、作用極として炭素繊維108 cm<sup>2</sup>、対極としてプラチナで被覆した空気正極を用い、ポテンシオスタットで電極電位を設定して連続培養を行った(図1B)。一槽二電極式微生物電解セルは、陽極、陰極共に炭素繊維(3 cm × 6 cm、有効表面積36 cm<sup>2</sup>)を使用し、電極間に600 mVの電圧を印加して連続培養を行った(図1C)。堆積物微生物燃料電池は、市販のマドワットを用い、JAMSTECの所有する掘削コアをスラリー化して供与し微生物発電を行った(図1D)。

一槽空気正極式微生物電気化学リアクターには、港湾堆積物(図1A)を植菌し、ポテンシオスタットで電極電位を-200 mV, -50 mV, +100 mV (vs SHE)に設定し、スクロースを添加して発電電気微生物群の集積培養を行った。培地は汽水最少培地を使用し、ガス相はN<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (=80:20)に置換した。液相はスターラーにて攪拌し、30°Cで一年以上の長期培養を行った。

一槽二電極式微生物電解セルには、南関東ガス田より天然ガスを胚胎する層準から湧出する地下水中の地下圏微生物群を植菌し、陰極に電気メタン合成微生物群、陽極に発電電気微生物群の集積培養を行った。その際、液相に酢酸を添加する運転と、地下圏の有機物のみでの運転を行い、集積される微生物群と生成する電流値を比較した。液相はスターラーにて攪拌し、ポテンシオスタットで600 mVの電圧を印加し、30°Cで一年以上の長期培養を行った。各電気化学リアクターでは、発生する電流をポテンシオスタットにて5分毎にロギングし、必要に応じて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて有機酸の濃度や、ガスクロマトグラフィー(GC)を用いて気相中のメタン分圧を定量した。ガスの産生量は、ガスパックに捕集し、定量した。

堆積物微生物燃料電池には、海洋研究開発機構の保有する下北沖

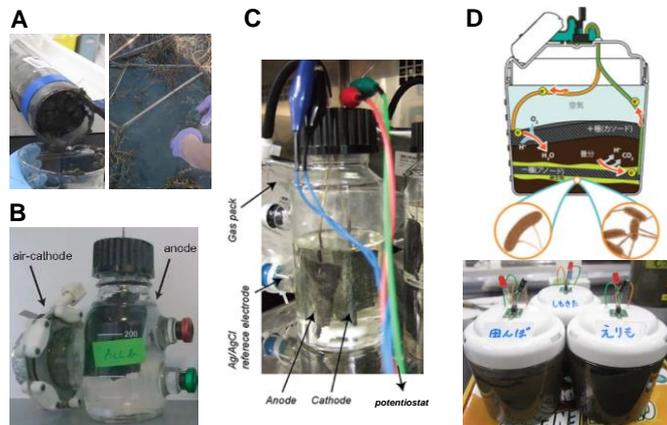


図1. 本研究で使用した植種源(A)と微生物電気化学リアクター(B-D)

堆積物と襟裳沖堆積物の掘削コアをスラリー化して植菌し (図 1 A)、LED ライトの点灯の有無から、地下圏に電気微生物群が生息しているのかを評価した。対照実験として、田んぼ土壌を植菌したのも同時に運転した。

## (2) 16S rRNA を用いた微生物群集構造解析

微生物電気化学リアクター中に形成される電気微生物群集を同定するため、16S rRNA を用いた微生物群集構造解析を行った。微生物電気化学リアクターから電極を約 1cm<sup>2</sup>ほどハサミで切り取ると共に、そして浮遊微生物のサンプリングを行い、冷凍保存した。これらのサンプルから、MOBIO PowerBiofilm DNA isolation kit を用いて DNA を抽出した後、ユニバーサルプライマーを用いて 16S rRNA の配列を特異的に増幅し、次世代シーケンサ (MiSeq) にてシーケンスした。得られたリードはアセンブリ後、QIIME プログラムにより OTUs を作成し、SILVA にて各 OTUs の系統的位置を同定した。得られた微生物群集構造と環境メタデータを統計解析に供し、各電極上に形成される電気微生物群の機能を推定した。

## (3) メタオミクスを用いた電子輸送機序の解析

地下圏における電気エネルギーに依存する微生物の種類、およびその電子授受反応に関連する遺伝子を解明するため、刺激応答型メタトランスクリプトミクスを行った。本研究では、一槽空気正極式微生物電気化学リアクターにて、電極電位を -200 mV, -50 mV, +100 mV (vs SHE) に設定して集積された発電微生物群集を用い、①設定電位を変更してより高電流を流す条件、②開回路運転を行い、電流産生がゼロになる条件、③発酵性基質であるスクロースの存在の有無という 3 つの刺激を加える事により、刺激の前後での遺伝子発現量の差異から、電極との電子授受反応に寄与する遺伝子を同定すると共に、各構成微生物が、どのような代謝を行っているのかを抽出した。

具体的には、各刺激前後の電極から DNA と RNA を共抽出し、それぞれを Illumina HiSeq でシーケンスした。その後、DNA をアセンブリし、構成微生物群集の優占微生物の Metagenome-assembled genome (MAG) を作成し、MetaGeneMark を用いて ORF calling した。各 ORF を鋳型として、RNA のリードをマッピングし、その重複度から各反応条件における比遺伝子発現量を定量した。遺伝子発現量は、RPKM (Reads per Kilobase per million mapped sequence reads) にて算出した。この発現量を比較する事により、各条件における発電微生物群集中の構成メンバーの代謝機能の同定と、電子授受反応に関連する遺伝子群の同定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 電気化学リアクターによる電気微生物の抽出

まず、地下圏における電気に依存する微生物の動態を知るため、港湾堆積物、下北沖掘削コア、襟裳沖掘削コア、海底の蛇紋岩海山の掘削コア、そして南関東ガス田において地下から湧出する天然ガス田湧出地下水の地下圏微生物群を微生物電気化学リアクターに供し、発電微生物の集積培養あるいは電気メタン合成微生物の集積培養を行った (図 1)。その結果、天然ガス田の湧出地下水に 600mV の電圧を印加したものと、港湾堆積物を植菌し電位を設定して運転したものでは良好な電流産生が見られ、電気に依存して生きる微生物バイオフィームが電極上に形成される事が分かった。

下北沖深部 (海底下 2000m) 掘削コアのものもバイオフィームの形成は見られたが、電流産生は小さく、電気に依存している微生物は少量であると考えられた。蛇紋岩海山の掘削コアからは電流産生が見られず、電気に依存している微生物反応は起こっていないと考えられた。また、襟裳沖浅部掘削コアや下北沖浅部掘削コアをスラリー化して堆積物燃料電池に供したものは、田んぼ発電と同等、あるいはより高活性で発電する事が示され、海洋の浅部堆積物には、発電微生物および電気合成微生物が生息している事が示唆された。

これらの各種集積培養のうち、良好な電流産生が見られた、天然ガス田を胚胎する地下水を用いた電気メタン合成微生物の培養と港湾堆積物を用いた電極電位を設定したスクロースからの発電微生物の培養に着目して、以後の微生物群集構造解析および、メタオミクス解析を行った。

### (2) 16S rRNA を用いた微生物群集構造解析

天然ガス田を胚胎する地下水を用いた電気メタン合成培養では、酢酸 (10 mM) を添加したものと、地下水中に存在する溶存有機物 (TOC、約 70 mg/L) のみで運転したものの二系統で集積培養を行い、それぞれの電極上に形成されるバイオフィーム中の微生物群集構造を比較した。

酢酸を添加した集積培養における陰極、陽極、浮遊細胞の微生物群集中の各構成種の経時変化を統計的に処理し、Weighted canonical correspondence analysis (wCCA) に供する事により、各微生物群がどこに生息しているのかを解析した (図 2)。その結果、陽極に生育する酢酸分解性の発電菌は、集積初期では *Desulfuromonas* 属細菌が優勢であるが、長期間の運転により、*Geobacteraceae* 科の *Geoalkalibacter* 属細菌が優占して来る事が分かった。ま

た、陰極バイオフィームに存在する電気メタン合成微生物として *Methanocalculus* 属と *Methanobacterium* 属が機能している事が示唆された。

一方、地下水中の溶存有機物のみを電子源とした集積培養においても、微生物群集構造の変遷を解析した。集積の初期段階では、*Acetobacterium* 属と *Desulfuromonas* 属の微生物が見られたが、集積が進むと陽極に *Geoalkalibacter* 属、陰極に *Methanobacterium* 属と *Methanocalculus* 属の各微生物の比率が増加していた。この傾向は、酢酸を添加したものと同様である事から、地下圏中の多様な有機物が存在する環境においても、電圧印加で誘起される電気微生物群は、酢酸を分解して電極で呼吸する発電微生物 (= *Geoalkalibacter*) と電極から電子 (あるいは水素) を受け取ってメタンを生成する電気メタン合成微生物 (= *Methanobacterium* と *Methanocalculus*) を主体とする事が分かった。これは、地下圏中で電気微生物群が担う役割が、リグニン様物質や長鎖脂肪酸、タンパク質や核酸等の高分子化合物分解の下流プロセスを担っている事を強く示唆している。一方で、*Thermovirga* 属と *Thioalbus* 属に属する微生物群が集積と共に全場所で増加傾向にある事から、これらの微生物群は地下圏からの湧出地下水中の雑多かつ低濃度の有機物を分解し、酢酸を陽極上の発電微生物に供与している可能性が高い。これらの優占微生物の代謝特性を明らかにするためにはさらなる解析が必要であり、今後の課題である。

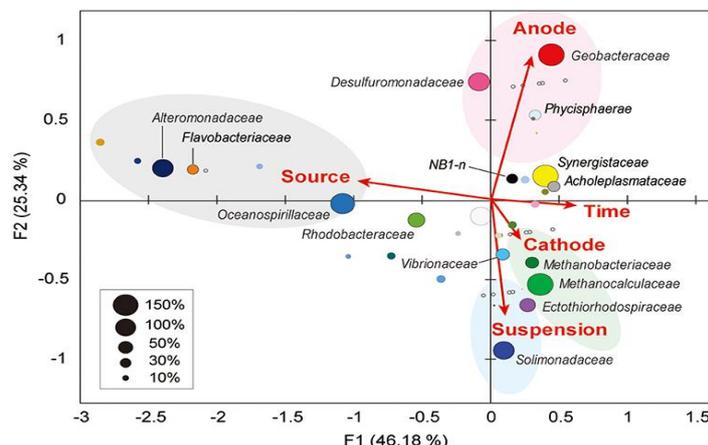


図 2. 酢酸添加の電圧印加培養における各構成微生物群のwCCA解析。赤矢印は環境パラメータを示し、バブルは各構成微生物群 (科レベル) を示し、その大きさは群集中での存在量の総和を示す。(発表論文①)

### (3) メタオミクスを用いた電子輸送機序の解析

地下圏における電気エネルギーに依存する微生物の種類、およびその電子授受反応に関連する遺伝子を解明するため、刺激応答型メタトランスクリプトミクスを行った。まず、電極電位を-200 mV, -50 mV, +100 mV (vs SHE)に設定し、スクロースを用いて集積された発電微生物群集をそれぞれメタゲノム解析に供し、群集構造解析から発電微生物と予想さ

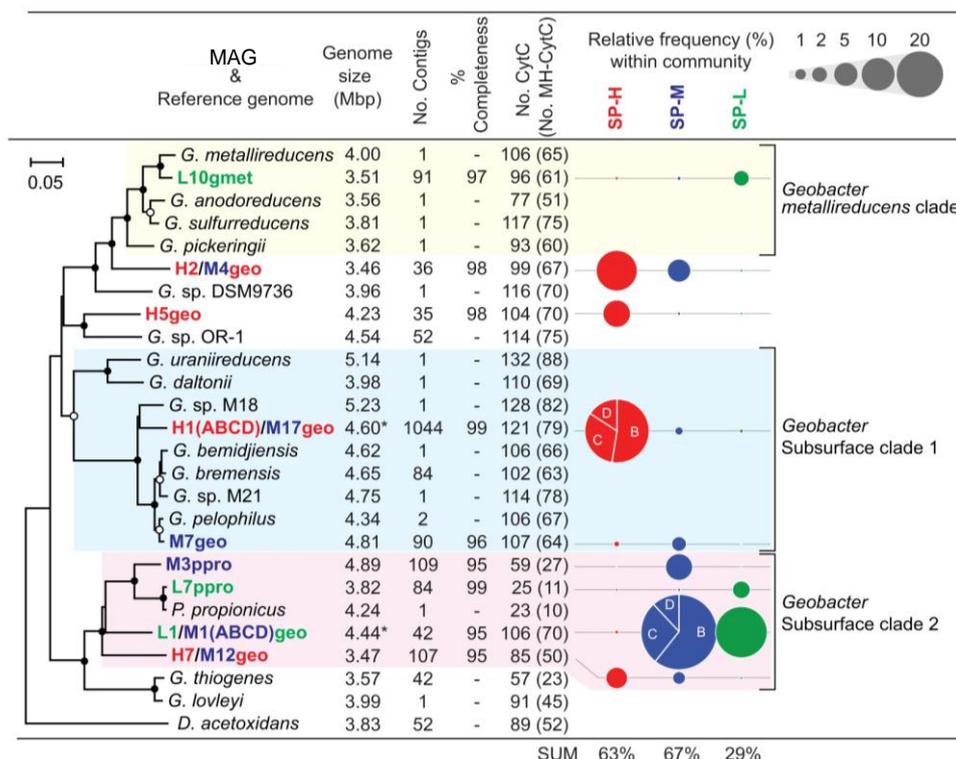


図 3. メタゲノムから抽出された *Desulfuromonadales* 目に属するドラフトゲノム (太字) の系統的位とゲノムスタッおよび各集積培養 (SP-H, +100 mV; SP-M, -50 mV; SP-L, -200 mV) 中の存在量比。CytC, シトクローム C; MH-CytC, マルチヘム型シトクローム C) (発表論文③)

れた *Desulfuromonadales* 目に属する微生物のドラフトゲノム (Metagenome-assembled genome, MAG) を抽出した (図 3)。その結果、モデル微生物 *Geobacter sulfurreducens* を含む *Geobacter metallireducens* clade に属する微生物は L10gmet の一種類のみで、残りの 8 個の MAG は、地下圏で良く見られる *Geobacter subsurface* clade、あるいは、どの Clade にも属さない微生物群である事が分かった。電極との電子授受に重要なシトクローム C の存在数を解析すると、*Pelobacter propionicus* に近縁な二種の MAG (M3ppro と L7ppro) を除き、100 個程度ゲノム中にコードしており、電子授受反応に特に重要な機能を果たすマルチヘム型のもが 50 個以上と、非常に多く存在している事が分かった。これは、*Pelobacter* に近縁な二種を除き、他の *Geobacter subsurface* clade に属する微生物も多様なマルチヘム型シトクローム C を用いて発電反応を行っている事を強く示唆している。

続いて、これらの MAG のうち、特に存在量の多い四種 (H1geo、H2/M4geo、M1/L1geo、M3ppro) に関して、その遺伝子発現プロファイルから、代謝特性と電子授受機構の解析を行った。遺伝子発現プロファイルは、*Geobacteraceae* 科の基礎代謝経路のマーカー遺伝子のうち、まず特に発現量が多いものを抽出し、そのうち電流産生の有無とスクロースの有無 (=発酵の有無) での遺伝子発現比較から、各微生物の基質と電子授受経路を同定した (図 4)。

この結果、発電性の電気微生物は、外部の電気刺激や基質条件によって、電子授受経路を含む多種の代謝経路を巧みに制御し生きているという事を示している。特に電極などの固体状の電子受容体における表面電位は非常に重要であり、開回路条件 (Open circuit; OC = 無電流条件) では、鞭毛によって電極を離れ、マルチヘム型シトクローム C などを利用して新たな電子受容体を探る遺伝子発現応答が、非常に速やかに見られた (45-120 min)。また、*Geobacter subsurface* clade に属する微生物群の電子授受経路に関しては、モデル微生物である *Geobacter sulfurreducens* で解明された OmcZ-OmcS-OmcABC-ExtABC-PpcA-MacA-ImcH-CbcL 系では無く、それぞれの MAG によって異なる経路を利用している事が分かった。特に CbcA-OmcQ を含む遺伝子アイランドは普遍的に存在すると共に、その遺伝子発

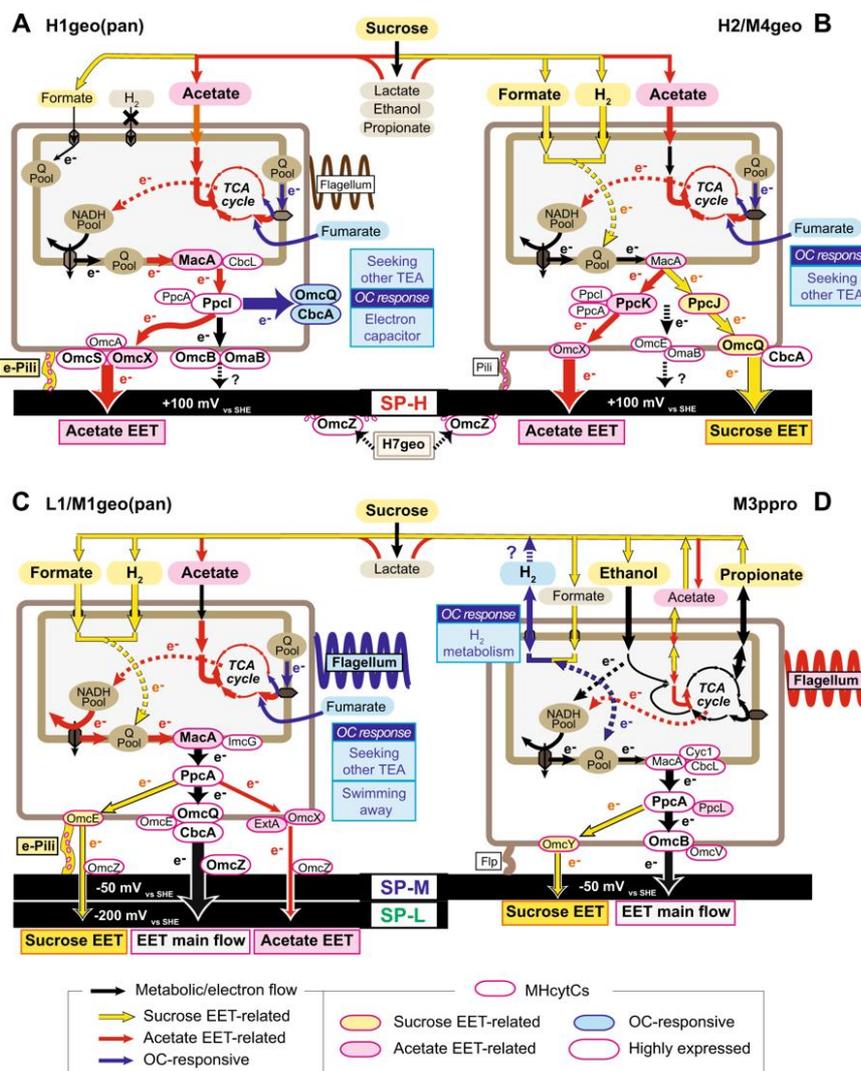


図 4. メタゲノムから抽出された 4 つの MAG の代謝マップと、各刺激に対する代謝経路の応答。発酵時 (黄色)、有機酸分解時 (赤色)、無電流刺激時 (青色) の応答をハイライトした。(発表論文③)

現量と刺激応答が特に大きく、地下圏に多く存在する電気微生物が主に利用している重要な導電性タンパク質である可能性が高い。これは、電気微生物の生理、生態、そして進化プロセスを明らかにするためには、今後も幅広い電気微生物の探索と、その電子授受経路の解明が必要である事を強く示唆している。

これらの研究の結果、酢酸あるいは水素が発電微生物の重要な栄養基質であり、海水地下圏では *Geoalkalibacter* 属、汽水地下圏では *Geobacter* 属に属する発電微生物が機能している事が示された。その中で、*Geobacter subsurface clade* に属する微生物は、モデル発電微生物である *Geobacter sulfurreducens* とは異なる電子輸送経路を有しており、また無電流条件や基質条件などの刺激に対し、マルチヘム型シトクローム C などの発現量を速やかに変えて適応する事が分かった。また、海水地下圏における電気メタン合成微生物として *Methanocalculus* 属と *Methanobacterium* 属が機能している事が示唆された。本研究結果より、地下環境には地下電気生命圏を形成しうる様々な微生物群が存在する事が分かり、その代謝機能や電子授受機能の一端が解明された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① [Shun'ichi Ishii](#), Hiroyuki Imachi, Kenjiro Kawano, Daisuke Murai, Miyuki Ogawara, Katsuyuki Uemastu, Kenneth H Neelson, Fumio Inagaki (2019) Bioelectrochemical Stimulation of Electromethanogenesis at a Seawater-Based Subsurface Aquifer in a Natural Gas Field. *Font Energy Res.* 6:144. 査読有り
- ② Atsushi Kouzuma, [Shun'ichi Ishii](#), Kazuya Watanabe (2018) Metagenomic insights into the ecology and physiology of microbes in bioelectrochemical systems. *Bioresour Technol.* 255: 302-3047. 査読有り
- ③ [Shun'ichi Ishii](#), Shino Suzuki, Aaron Tenney, Kenneth H Neelson, Orianna Bretschger (2018) Comparative metatranscriptomics reveals extracellular electron transfer pathways conferring microbial adaptivity to surface redox potential changes. *ISMEJ* 12: 2844-2863. 査読有り
- ④ [石井俊一](#) (2018) 発電微生物群集中の発電菌とその機能遺伝子. *環境バイオテクノロジー学会誌* 18: 35-42. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① [石井俊一](#) 「メタトランスクリプトーム解析によって解き明かす電気微生物の表面電極電位変化への応答」日本微生物生態学会第 32 回大会 (2018) (沖縄県、宜野湾市)
- ② [Shun'ichi Ishii](#), Hiroyuki Imachi, Kenjiro Kawano, Daisuke Murai, Fumio Inagaki 「Bioelectrochemical stimulation of methanogenic microbial communities in a seawater-based subsurface aquifer system」6<sup>th</sup> international meeting on microbial electrochemistry and technologies (ISMET6) (2017) (Portugal, Lisbon)
- ③ [石井俊一](#) 「システムゲノミクスで解き明かす“発電微生物”の多様な生き様」環境微生物系学会合同大会 (招待講演) (2017) (宮城県、仙台市)

※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。