

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02501

研究課題名(和文) 地下圏に生きるCandidate Phyla Radiationの生存戦略に迫る

研究課題名(英文) Life strategies of Candidate Phyla Radiation in deep subsurface

研究代表者

鈴木 志野 (Suzuki, Shino)

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所・准教授

研究者番号：10557002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Candidate Phyla Radiation (CPR) 細菌は、ゲノムサイズが小さく、rRNA遺伝子にイントロンを持ち、アミノ酸、核酸、脂質の完全な生合成経路を持たず、電子伝達系、呼吸代謝系も有さない細菌で、おそらく共生菌であると考えられている。本研究では、CPRの高品質なゲノム情報を抽出し、翻訳系・解糖系を中心に、これらの生命の特徴を洗い出すための進化的解析を推し進めるとともに、CPR細菌が多く存在する白馬八方の微生物群集を対象として生態学的・生理学的研究を推し進めた。当初、米国The Cedars中心に研究を展開する予定だったが、COVID19の影響により計画を変更した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CPR系統群は、バクテリアの多様性の15%以上を占めるにも関わらず、その生理・生態の理解があまり進んでいない。CPR細菌は、地下圏のみならず、口腔内や排水処理施設など、人間生活にも密接に関わる環境にも多く存在することが近年明らかにされており、これらの理解は、微生物-人類の関わりにおける理解を深めることに貢献する。また、生命間でかなり保存性が高いと考えられた機能分子・機能システム(翻訳系や解糖系)においても、我々が想定していた以上にCPRは多様であることをが分かった。これらの多様な機能分子情報を用いて、その進化を捉えなおすことで、学術的意義のある成果を創出することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Candidate Phyla Radiation (CPR) bacteria are small in genome size, have introns in their rRNA genes, lack complete biosynthetic pathways for amino acids, nucleic acids, and lipids, and have no electron transport or respiratory metabolic systems, and are probably epibiotic bacteria. In this study, we extracted high-quality genomic information on CPR from the database and performed evolutionary analysis to identify the characteristics on the translational and glycolytic systems. In addition, we also performed ecological and physiological studies on the microbial community of Hakuba Happo, where many CPR bacteria are present. The original plan was to conduct research focused on The Cedars in the U.S., but due to the impact of COVID19, the plan was changed.

研究分野：地球生命科学

キーワード：メタゲノム 蛇紋岩水系 極限環境微生物学 アストロバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

人類は到達可能なありとあらゆる環境から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的解析を行った。そして、地球上のバクテリア・アーキアの多様性の大部分を理解したかのように見えた。しかし、2015、2016 年、Jill Banfield 教授（カリフォルニア大学・パークレー校）らのグループにより、微生物の多様性に関する革新的な論文が発表された（Brown et al. (2015) Nature, Hug et al. (2016) Nature Microbiology)。それは、我々が 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析では全容が把握しきれなかったバクテリア群集が、バクテリアの多様性の少なくとも 15%以上を占めるというものであった。この系統群は Candidate Phyla Radiation (CPR) と名付けられ、Parcubacteria (OD1)、Microgenomates (OP11)、WWE3、Berkelbacteria (ACD58)、Saccharibacteria (TM7)、WS6、Peregrinibacteria (PER)、Kazan 門、CPR1-3 といった系統門（もしくはスーパー門。分類学階級は定まっていない）がこの CPR に含まれると記された。CPR に属する細菌は、微生物の細胞回収に慣習的に用いられてきた 0.2 μm 孔の膜フィルターを通り抜けるほど細胞サイズが小さく、またその多くが rRNA 遺伝子内にイントロンを持つという、バクテリアとしては稀有な特徴を持つため、これまでの rRNA 配列に基づく多様性解析でその大部分が見過ごされてきていた。

Banfield らは地下水の 0.2 μm 孔の濾液から細胞を回収し、メタゲノムおよびゲノム・ビニング（ゲノム再構築）解析を行った。その結果から、CPR 細菌は 1) ゲノムサイズが小さく、2) rRNA 遺伝子にしばしばイントロンを持ち、3) アミノ酸、核酸、脂質の完全な生合成経路を持たず、4) 電子伝達系、呼吸代謝系も有していない絶対発酵細菌であると記した。一方で、CPR 細菌は転写、翻訳、複製に関する一連の遺伝子群は有しており、また、線毛や細胞壁（ペプチドグリカン）の合成系も有していることが分かった。ゲノムから見える CPR 細菌の姿は「外界と隔てる殻はあり、次世代を残す能力がある」一方で「必要な材料、エネルギーを作る術を持たない」というものであった。この特徴から寄生や共生性細菌であると提唱した研究者もいるが、現在のところその生存戦略についてはわかっていない。

一方、申請者らは米国 The Cedars のカンラン岩体から湧出する強アルカリ (pH=12)・超還元 ($E_h = -700 \text{ mV}$) 水（蛇紋岩湧水）を中心に、蛇紋岩化反応と呼ばれる「鉱物—水反応」に支えられる地球深部生命圏の研究を行ってきた。申請者らは The Cedars 湧水のメタゲノム、ゲノム再構築解析を行い、この蛇紋岩湧水に生息する微生物の生存戦略を明らかにしようと試みた。その結果、CPR 細菌の 1 つである OD1 細菌 5 種が、この湧水微生物群集の約 70% を占め、それらのゲノムは既報の OD1 細菌よりもサイズが小さく (400-500 kbp)、発酵経路も部分的に欠落していることが明らかとなり、環境ゲノム情報からではこの細菌の主要なエネルギー代謝を予測することはできなかった。しかしながら、地下圏の OD1 細菌の可視化に世界で初めて成功し、OD1 細菌が湧水中で活発にゲノム複製をしていることを示すなどし、その生態の一部を明らかにすることに成功した。

2. 研究の目的

OD1 細菌は他の環境ではおおむね 5% 未満の存在比率であるが、The Cedars では、蛇紋岩湧水微生物相の約 70% を占める。これは、CPR (OD1) 細菌が微生物叢中に占める割合としては世界最高である。また申請者は、他大陸の 3 つの異なる蛇紋岩湧水のメタゲノムデータを解析したが、そのすべての蛇紋岩湧水で The Cedars と系統的に近縁な OD1 細菌が優占種として存在することを見出した。このことは、蛇紋岩湧水には OD1 細菌が優占化する理由があることを示しており、OD1 細菌の生態を明らかにするために最適な環境であると考えられた。よって、本研究では The Cedars 蛇紋岩湧水中の微生物群集を主な対象として、OD1 細菌の生存戦略の全体像に迫る。

3. 研究の方法

本研究は、The Cedars 蛇紋岩湧水中の微生物を対象として、OD1 細菌の生存戦略の全体像に迫る予定だったが、COVID19 の影響を大きく受け、実験計画の変更を余儀なくされた。国内外のフィールドサンプリングが困難な時期は、すでにサンプル取得していた様々な地下サンプルを用いて、メタゲノム解析後、Metagenome Assembled Genome (MAG) を決定し、高品質な OD1 細菌 MAG の回収に努めた。また、COVID19 対策として、各種国内の地下環境サンプルを中心にメタゲノム解析を行い、OD1 細菌の多いサンプルを探索した。そして、COVID19 が若干落ち着き始めた 2022 年に、The Cedars ではなく、同様に蛇紋岩化反応が起きていることが明らかとなっていた白馬八方でサンプリングを行った。The Cedars と比べ、基礎情報が不足していたため、初期的データの取得から始める必要があったが、メタゲノム解析、微生物培養解析などを行うことで、OD1 細菌の生態に迫る研究を推進した。

4. 研究成果

CPR 細菌のゲノムは、ここ数年の間に急速にデータベースに登録がなされる一方で、その品質には、バラツキがあった。CPR 細菌のように、多くの遺伝子を欠損している生命の生存戦略や進化を考えるにあたっては、どういった遺伝子を欠損しているのか？が生存戦略を考える重要な因子となるため、高品質なゲノムを得る必要があった。よって、まずはデータベース上にあるすべての CPR ゲノムに関して、CheckM により品質を精査し、高品質なゲノム (Metagenome Assembled Genome) を回収した。さらに、リボソーム蛋白の有無や rRNA 配列の有無など、マニュアルで精査し、約 500 のゲノムを回収した。回収したゲノムを以下の系統樹に示した (図 1)

(1) ゲノム配列から明らかとなった CPR 細菌の生存戦略

① 翻訳系

回収した 500 程度の CPR 細菌のゲノム配列に基づき、系統樹を作成した。リボソームは、RNA と蛋白質からなる複合体で、生命が普遍的に有し、翻訳機能を司る重要な分子である。リボソームの構成因子である rRNA やリボソーム蛋白のみならず、リボソームの生合成を促進するリボソーム生合成因子もゲノム内で保存性が高い。バクテリアでは平均して 40 程度の生合成関連遺伝子を保持しているが、CPR 細菌は平均して 20 程度しか生合成関連遺伝子を保持していないことが明らかとなった。CPR 細菌以外のバクテリアでは普遍的に保存されている幾つかの生合成関連遺伝子を CPR 細菌は欠失していることが明らかとなった。これに基づき、現在、リボソームの進化についての解析を進めている。

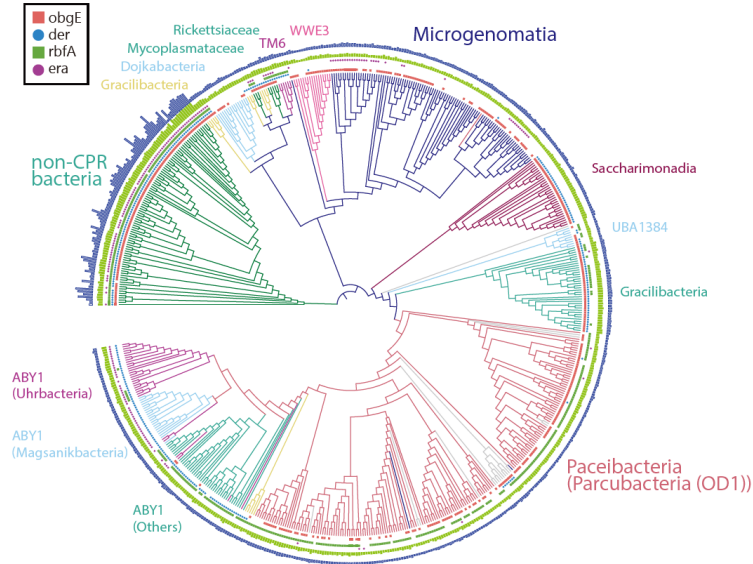


図 1. CPR 細菌の系統樹

② 解糖系

CPR 細菌が唯一保持している代謝経路としては、解糖系がある。グルコースをピルビン酸に異化することでエネルギーを取り出す解糖系は、9つの酵素により反応が進行する。これらの酵素は一般的なバクテリアでは普遍的に保存されている。しかしながら、CPR ではそれらの酵素の保存性が低く (図 2)、フルクトース 6 リン酸をフルクトース 1,6 ニリン酸に変換するホスホフルクトキナーゼについては CPR 細菌全く保持していなかった。したがって、解糖によるエネルギー取得が CPR は困難と推察された。しかしながら、更に解析を進めると、CPR はフルクトース 6 リン酸をグリセルアルデヒド 3 リン酸に変換するペントースリン酸経路 (PPP) を保持しており、ホスホフルクトキナーゼを使わない代わりに、PPP を利用することで解糖系を進行させることが可能であることが分かった。よって、CPR 独自でエネルギー代謝を行う場合は、解糖系での代謝が可能であることが示唆された。

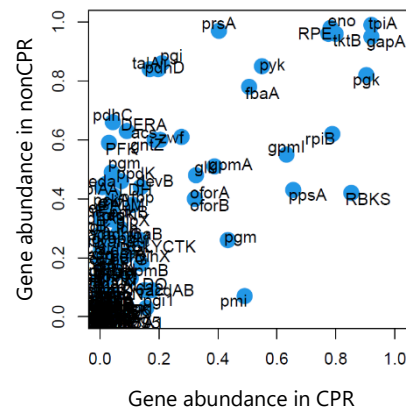


図 2. 解糖系関連遺伝子の分布

(2) 白馬八方での微生物回収と微生物培養

The Cedars でのサンプリングがコロナ禍で実現しなかったことから、2022 年、同様に蛇紋岩化反応の起こっている国内のサイトである白馬八方での微生物サンプリングを行い、CPR 細菌の培養を試みた。結論的には、CPR 細菌の培養は困難であったが、100 以上の品質を用いて培養した中で、いくつかの条件で図 3 に示すように、CPR 細菌 (ここでは、

Nealsonbacteria) の濃集が確認された。よって、現在、継代が可能であるか検証中である。

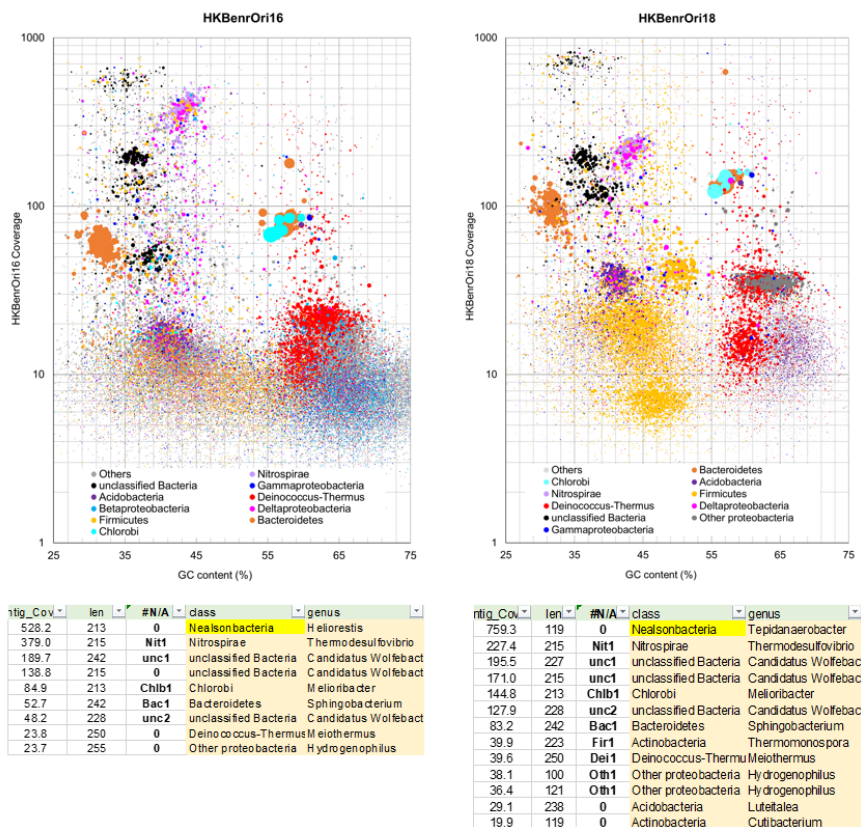


図3. 集積培養のメタゲノム解析

(3) 成果のまとめと考察

研究開始当初目指した地下圏に生きる Candidate Phyla Radiation の生存戦略に関して、当初の研究計画の変更は、COVID19 により余儀なくされたが、CPR 細菌に関する新たな知見を得ることができた。特に、大規模なゲノムデータ解析は、当初予定した計画以上に進展させることができ、CPR 細菌は、生命システム全体のみでなく、個々の (分子) 機能においても、その特殊性が際立っていることを明らかにした。特に、これまで保存性が高いと思われていたリボソーム蛋白、リボソーム生合成因子においても欠失が確認され、リボソーム生合成因子においては、大規模な遺伝子の欠失がおきていることが、複数の門にまたがるスーパー系統門全体の特徴として確認された。また、解糖系においても、多くの欠失が確認されたが、CPR の持つペントースリン酸経路など迂回的なエネルギー代謝経路を用いることで、解糖系におけるエネルギー代謝が可能であろうことが示された。これまで得られているいくつかのメタトランスクリプトーム解析と照らし合わせることで、そのことに確証を得る予定である。このように、これまで保存性がかなり高いと考えられていた各種機能において、CPR はその多様性を示す存在となった。このことは、保存性が高いと考えられた機能システムが、我々が想定していた以上に多様であることを示すと同時に、それらは、各々の機能システムの進化の知のギャップを埋める上で大きく貢献するであろうことが示された。よって、今後も CPR を含めた生命の進化的解析を推進する予定である。

また、研究当初、CPR 細菌の培養例はほとんどなかったが、好気性の CPR 細菌に関しては Saccharimonadia 細菌の培養が報告されるようになった。それによると、少なくとも Saccharimonadia 細菌は、宿主表層に付着し、宿主から必要なものを獲得して生息する寄生性細菌であることが指摘されている。CPR 細菌の中でも、OD1 細菌 (現在では Paceibacteria) は、現在も培養例がなく、これらが、Saccharimonadia 細菌の生存戦略と同様なのかは不明である。いずれにしても、なぜ、全く関係のない他者を寄生させるのか、ウイルスや、細胞内共生菌のように他者の中に入ることなく、必要なものを獲得する仕組みとは何なのか? CPR 細菌の生理学的特性においても、多くの謎がある。よって、引き続き、これらの解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 M. K. Nobu*, R. Nakai, S. Tamazawa, H. Mori, A. Toyoda, A. Ijiri, S. Suzuki, K. Kurokawa, Y. Kamagata and H. Tamaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Unique H ₂ -utilizing lithotrophy in serpentinite-hosted systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 95,104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-022-01197-9	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 Cook Melissa C., Blank Jennifer G., Suzuki Shino, Nealson Kenneth H., Morrill Penny L.	4. 巻 126
2. 論文標題 Assessing Geochemical Bioenergetics and Microbial Metabolisms at Three Terrestrial Sites of Serpentinization: The Tablelands (NL, CAN), The Cedars (CA, USA), and Aqua de Ney (CA, USA)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Geophysical Research: Biogeosciences	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） 10.1029/2019JG005542	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 Bird Lina J., Kuenen J. Gijb, Osburn Magdalena R., Tomioka Naotaka, Ishii Shun'ichi, Barr Casey, Nealson Kenneth H., Suzuki Shino	4. 巻 71
2. 論文標題 Serpentinimonas gen. nov., Serpentinimonas raichei sp. nov., Serpentinimonas barnesii sp. nov. and Serpentinimonas maccrorryi sp. nov., hyperalkaliphilic and facultative autotrophic bacteria isolated from terrestrial serpentinizing springs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	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） 10.1099/ijsem.0.004945	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 Cook Melissa C., Blank Jennifer G., Rietze Amanda, Suzuki Shino, Nealson Kenneth H., Morrill Penny L.	4. 巻 126
2. 論文標題 A Geochemical Comparison of Three Terrestrial Sites of Serpentinization: The Tablelands, the Cedars, and Aqua de Ney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Geophysical Research: Biogeosciences	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） 10.1029/2021JG006316	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 Philip Eickenbusch, Ken Takai, Olivier Sissman, Shino Suzuki, Catriona Menzies, Sanae Sakai, Pierre Sansjofre, Eiji Tasumi, Stefano M Bernasconi, Clemens Glombitza, Bo Barker Jorgensen, Yuki Morono, Mark Alexander Lever	4. 巻 10
2. 論文標題 Origin of short-chain organic acids in serpentinite mud volcanoes of the Mariana convergent margin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.01729	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 該当する

1. 著者名 P. Fryer, C G. Wheat, T. Williams, S. Suzuki et al.	4. 巻 378
2. 論文標題 Mariana serpentinite mud volcanism exhumes subducted seamount materials: implications for the origin of life	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society A	6. 最初と最後の頁 20180425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsta.2018.0425	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 該当する

1. 著者名 Suzuki Shino, Nealson Kenneth H., Ishii Shun'ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Genomic and in-situ Transcriptomic Characterization of the Candidate Phylum NPL-UPL2 From Highly Alkaline Highly Reducing Serpentinized Groundwater	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.03141	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 該当する

1. 著者名 Marques J.M., Etiopé G., Neves M.O., Carreira P.M., Rocha C., Vance S.D., Christensen L., Miller A.Z., Suzuki S.	4. 巻 96
2. 論文標題 Linking serpentinitization, hyperalkaline mineral waters and abiotic methane production in continental peridotites: an integrated hydrogeological-bio-geochemical model from the Cabeço de Vide CH ₄ -rich aquifer (Portugal)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Geochemistry	6. 最初と最後の頁 287 ~ 301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apgeochem.2018.07.011	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12件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木志野
2. 発表標題 ゲノム情報から紐解く蛇紋岩生命圏
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shino Suzuki
2. 発表標題 How does an extreme environment drive microbial adaptive evolution? ; A case of integrative studies of deep subsurface setting
3. 学会等名 10th ELSI Symposium (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shino Suzuki
2. 発表標題 Life in serpentized setting; Implications for metabolic strategies of early life
3. 学会等名 Life in the Universe 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木志野
2. 発表標題 極限環境に生きる生命から考える地球外生命の可能性
3. 学会等名 大学共同利用機関シンポジウム2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shino Suzuki
2. 発表標題 Carbon fixation in highly alkaline and highly reducing serpentized setting
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木志野, 石井俊一, ケンニールソン
2. 発表標題 化学特性の異なる蛇紋岩化反応サイトにおける 比較ゲノム微生物学的解析
3. 学会等名 JpGU（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木志野
2. 発表標題 強アルカリ・超還元的な蛇紋岩水系に生きる微生物の世界
3. 学会等名 第二回ExCELLSシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木志野
2. 発表標題 蛇紋岩生命圏の世界
3. 学会等名 日本微生物生態学会 奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木志野
2. 発表標題 岩に生かされる生命たち：地球深部強アルカリ環境をすみかとする微生物の生き様に迫る
3. 学会等名 第61回海中海底工学フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shino Suzuki
2. 発表標題 Unusual metabolic strategies identified in a hyperalkaliphilic microbial community associated with the serpentinization
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2018年大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shino Suzuki
2. 発表標題 Extensive Loss of Methanogenic Pathway: Adaptive Strategy of Methanosarcinales to the Hyperalkaline Setting Associated with Serpentinization
3. 学会等名 Gordon Research Conference（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木志野
2. 発表標題 初期地球類似環境に見られる特異な微生物代謝システム
3. 学会等名 細胞を創る研究会11.0（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------	---------