

平成21年6月30日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19880041

研究課題名(和文) 海底下微生物圏に生息する微生物の遺伝子及び代謝レベルからの解析

研究課題名(英文) Studies on subseafloor microorganisms based on genes and metabolic pathways

研究代表者

宮崎淳一(MIYAZAKI JUNICHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター・研究員

研究者番号：50435848

研究成果の概要：本研究は地球最大の微生物圏である海底下微生物圏において生息する微生物のエネルギー代謝機構の解明を安定同位体を用いた取り込み実験によって行うものである。そしてこれとフォスミド作成に適した DNA 抽出系と組み合わせることによって将来のメタゲノム解析に役立てていきたい。初年度は海底堆積物からフォスミドを作成するのに最適な抽出系を構築した。次年度は安定同位体を添加して海底堆積物を培養した。現在も培養を続けており、今後はここから DNA を抽出し、海底下微生物はどのようにエネルギー代謝を行っていくのかを明らかにしていきたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：海底下微生物、安定同位体、微生物代謝活動、メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

海底下生物圏とは海底から 10cm 以深 (cmbsf; cm below seafloor) の地下生物圏であるが、この海底下生物圏は炭素含有量やアクリジンオレンジによる菌体直接計数などから地球最大の生物圏であると考えられている (Parks, R. J., *et al.*, 1994, *Nature*, 371, p410, Whitman, W. B., *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, p6578)。以前は海底下には生命は存在しないと考えられてきた。しかし、近年行われた ODP (Ocean Drilling Program) 及び IODP (Integrated Ocean Drilling Program) による掘削航海により、この海底下生物圏にも微生物は存在す

ること、そして今までに培養されたことのない系統に属する未知の微生物で優占されていることが明らかとなってきた (Inagaki, F., *et al.*, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, p2815)。これは環境浄化や食品加工といった産業や将来のエネルギー資源として、今までにない新規の有用微生物又は有用遺伝子の獲得への絶好のターゲットであると考えられる。しかしながら、これら微生物に関する情報は 16S rRNA の塩基配列情報のみであり、微生物が生きていくのに必要なエネルギー代謝を含む代謝活動はもちろんのこと、微生物の生活に関わる情報は何一つ無い。したがって、地球最大の微生物圏であるにもかかわらず

らず、海底下微生物圏に生息する微生物はどのようにその生命活動を維持しているのかが全くわかっていないのが現状である。将来的にこれらの微生物を産業の分野で応用していくためには分離・培養できることが必要となるが、そのためにはその微生物のエネルギー代謝活動に関する情報は必須となる。特に近年将来のエネルギー源として期待されているメタンハイドレートはその炭素同位体分析から生物によってつくられたものと考えられているが(Kvenvolden, K. A., 1995, *Org. Geochem.* 23, p997)、掘削航海後の解析によってメタン生成又は嫌氣的メタン酸化古細菌は検出されていないことからその形成過程は謎のままとなっており(Inagaki, F., et al., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, p2815)、エネルギー資源として採取した後も微生物によって再生するのに関しては評価できない。したがって、本研究はこの海底下生物圏の微生物に関して少なくとも 16S rRNA 以外の情報を集め、将来的にはどのような代謝活動を行っているのかを明らかにすることを目的として行う。つまり、本研究は将来、網羅的に行う海底下微生物圏のメタゲノム解析の第一歩として行っていきたい。具体的には海底由来の堆積物から DNA を培養することなしに抽出する系の構築、そしてフォスミドライブラリを構築を行いたい。もう一つは化学レベルから海底下微生物圏において炭酸固定及び窒素固定を行う微生物を特定していききたい。メタゲノム研究は現在、未培養の微生物の生命活動を推定するのに最も有効な方法であると考えられ、実際に Sargasso sea の海洋中のメタゲノム解析から、好氣的なアンモニア酸化に関わる酵素アンモニアモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子が見つかり周辺遺伝子の配列解析及びコドン使用率の観点から海洋中に多く分布している Marine group-1 に属する古細菌由来のものであることが示唆された(Venter, J. C., et al., 2004, *Science*, 304, p66)。そしてこの知見から Marine group-1 に属する古細菌 *Nitrosopumilus maritimus* が分離・培養され、実際に好氣的なアンモニア酸化をしていたことから、海洋中で窒素循環に重要なアンモニアの酸化は Marine group-1 に属する古細菌が中心的な役割を行っているということが明らかとなった(Könneke, M., et al., 2005, *Nature*, 437, p543)。このようにメタゲノム解析は環境中の化学物質の循環に関わる微生物の代謝活動に大きく貢献していることから海底下微生物圏の微生物活動を明らかにするのに非常に有効な方法となる。しかしながら、海底由来の堆積物からの DNA 抽出はすでに DNA 抽出法が確立されている陸上の土壌とは異なり、メタゲノム解析に適した DNA 抽

出法が確実に構築されていない。これは 1 グラムあたりの微生物量が少ないことや土壌成分が DNA 抽出の効率や質に影響を与えているためだと考えられる。したがって、これらを克服し海底下微生物圏に対しても行えるメタゲノム研究の基盤を創り上げたい。また現在、環境中における微生物によるエネルギーなどの代謝活動の解明に stable-isotope probing (SIP) という手法が大きく貢献できることがわかってきている(Radajewski, S., et al., 2000, *Nature*, p646)。この方法は DNA に含まれる元素である炭素、窒素にしか適用できないが、安定同位体を用いることによって化学の点から例えばメタンを消費できるのか、二酸化炭素を消費できるのか、窒素をどういった形で取り込むのかといった代謝が明らかにできることが期待できる。以上の 2 つの方法を組み合わせることによって海底下微生物圏の微生物活動を明らかにする第一歩ができあがる。しかし、大規模な掘削を必要としかつ微生物の密度が低い海底下深部のサンプルでは本研究を行うことは難しい。そこで 2007 年 6 月に乗船(YK07-09)し、採取するメタン冷湧水帯周辺の海底由来堆積物を用いて、将来的に行われる大型掘削船「ちきゅう」による大規模掘削に対して適用できるようにする(実際は YK07-09 航海は「しんかい 6500」の安全確認航海のため中止となったため、2008 年に YK08-04 航海にて行った)。さらにこの南海トラフのメタン冷湧水帯周辺の海底由来の堆積物には過去及び研究代表者の研究から海底下深部と系統的に近い古細菌が 16S rRNA 遺伝子の解析から明らかとなっている。したがってこの南海トラフのメタン冷湧水帯周辺の堆積物を研究の対象とすることによって地球深部に生息する微生物と同じ代謝活動が推定できると確信している。

2. 研究の目的

海底下に生息する微生物はどのように炭素化合物を取り入れ、どのように窒素化合物を取り入れているのかなどエネルギー代謝は全くもってわかっていない。本研究はこれを明らかにするために、海底堆積物に安定同位体を添加することによって、そこに生息する微生物の代謝経路を明らかにしようとするものである。そしてここから DNA 抽出すれば安定同位体を取り込んだ微生物の DNA は質的に重いことから超遠心分離できる。したがって、本方法は代謝特異的な微生物の同定だけでなくその特定した微生物のゲノム解析も可能とする。本研究は安定同位体を取り込んだ代謝特異的微生物の同定だけでなく、発展系として海底由来堆積物からフォスミドライブラリを構築するのに最適な DNA 抽出系を構築できれば、海底下微生物圏にお

ける主要なエネルギー代謝に結びついたメタゲノム解析への基盤を構築できることが期待できる。

3. 研究の方法

平成 19 年度は「しんかい 6500」の修理・安全確認のため、予定されていた YK07-09 南海トラフ調査航海が中止となった。そのため、当初予定されていた安定同位体を用いた取り込み実験ができなくなった。しかし、前年度の南海トラフ調査航海 (YK06-09) 時に採取した海底堆積物が冷凍保存状態で残っていたことから、当初の計画を前倒しして海底堆積物から fosmid ライブラリを作製するのに最適な DNA 抽出系の構築を行った。また、窒素ガスの安定同位体である $^{15}\text{N}_2$ を海底堆積物の取り込み実験を行ったときにどの微生物が取り込むのかを推定できるように窒素固定微生物の探索を行うことにした。方法は窒素固定を行うのに必須の遺伝子である *nifH* の保存領域を利用して行った。こうして増幅した *nifH* 遺伝子をクローニングし塩基配列をシーケンスによって決定後、相同性解析を行った。さらに他の窒素固定遺伝子の探索、そして RNA 抽出後の発現解析を行い、どのような微生物が海底由来堆積物中で窒素循環の中心を担うのかを明らかにした。平成 20 年度は「しんかい 6500」による YK08-04 南海トラフ調査航海が無事に行われた。ここで南海トラフの海底堆積物を採取後、船上にて安定同位体 ($^{14}\text{CH}_4$ and/or $^{15}\text{N}_2$) 添加した培地にこの堆積物を封入し、 4°C にて約 3 ヶ月培養を行った。その後平成 19 年度に構築した DNA 抽出法によって DNA 抽出を行い、超遠心によって安定同位体が取り込まれた DNA のみを分離し、その DNA がどの微生物由来かを特定することを試みた。

4. 研究成果

(1) 平成 19 年度は冷凍保存されていた海底堆積物から fosmid 作製に適した DNA 抽出系の構築を行った。海底堆積物から市販されているキットを利用して抽出すると、fosmid 作成には適さない断片化した DNA が抽出されてしまうためである。DNA の断片化を防ぎつつ、かつ多量に抽出できる方法を構築することは、将来のメタゲノム解析において非常に重要となってくる。様々な条件を検討した結果、CTAB+SDS を含む buffer にて溶菌後、クロロホルム抽出を 3 回繰り返し、イソプロパノールで DNA を沈殿させることによって、約 40kb 以上の長さをもつ、fosmid 作製に適した良質な DNA を多量に抽出できることが明らかとなった (Fig. 1)。

ここで抽出された DNA から $^{15}\text{N}_2$ を取り込むことが予想される微生物 (窒素固定を行う微生物)

物) 及び $^{13}\text{CO}_2$ または $^{13}\text{CH}_4$ を取り込むことが予想される微生物を特定するためにそれぞれの代謝に重要となる機能遺伝子に保存された配列から PCR を行うことによって同定した。これは今後安定同位体取り込み実験を行う上で予測を立てるのに必要となる。機能遺伝子として窒素固定を行うのに必要な *nifH* 遺伝子を使用した。その結果、窒素固定は嫌氣的メタン酸化細菌によって行われていることが推定された。また、fosmid 作成に適した DNA が抽出できたおかげで、窒素固定に関わる遺伝子クラスターをクローン化することに成功した。 (Fig. 2)

また、この遺伝子の系統解析を行うことによって、海底下のメタン冷湧水帯とよばれる active などところでは嫌氣的メタン酸化細菌が炭素循環だけでなく、窒素循環においても非常に重要な一次生産者である可能性が示された。

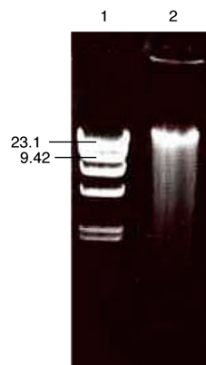


Fig. 1. 本研究によって構築された DNA 抽出系の電気泳動による確認。レーン 1 はマーカー、レーン 2 は海底堆積物から抽出された DNA。

Fig. 2 (Miyazaki et al.)

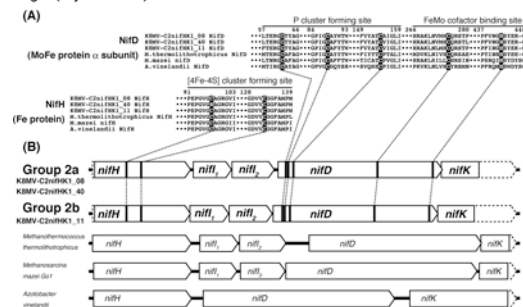


Fig. 2. 本研究によってクローン化された海底下堆積物からの *nif* 遺伝子クラスター。

さらに、RNA を海底由来堆積物から抽出することにも成功した。これは生きている微生物のみを特定できかつ、現場環境でどのような遺伝子が発現することによってエネルギー代謝を行っているかを判断できる。その結果、窒素固定は実際に海底由来堆積物中で行われていることが明らかとなった (Fig. 3)。ま

た、発現した *nifH* の RNA を逆転写後、クローニングし、塩基配列解析を行った結果、ほぼ嫌氣的メタン酸化細菌に特定されることが明らかとなった (Fig. 4)。

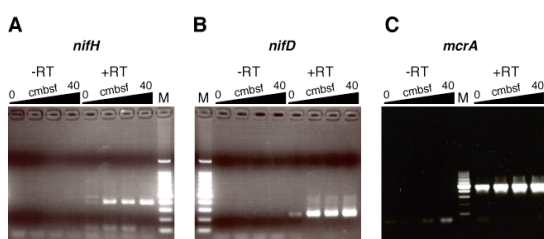


Fig. 3. RT-PCR による窒素固定遺伝子 (*nifH*, *nifD*)、メチルコエンザイム M レダクターゼ遺伝子 (*mcrA*) の発現解析。

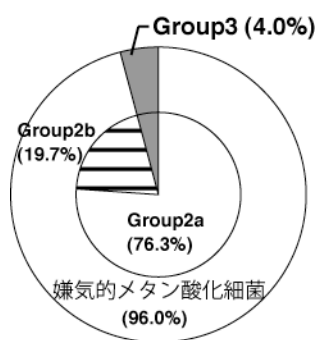


Fig. 4. 発現した *nifH* のクローン解析の由来。

(2)平成 20 年度は YK08-04 南海トラフ調査航海において採取した海底堆積物を安定同位体存在下で培養を行い、取り込み実験を行った。4 ヶ月後、DNA を構築した DNA 抽出系で抽出したものの、安定同位体を含んだ重い DNA が抽出できなかった。これは海底下微生物の増殖速度が非常に遅いことから (倍加時間が約 9 ヶ月とも言われている)、うまくいかなかった可能性がある。現在はさらに培養を続けている。今後ここから平成 19 年度に構築した DNA 抽出法によって、この安定同位体を添加した培地中の海底由来堆積物から DNA を抽出し、エネルギー代謝に特化したメタゲノム解析が行えるかどうかを評価していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①宮崎淳一 (2009) 「地学雑誌」118 巻 3 号,

泥火山に生息する生物とその代謝活動, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

①Junichi Miyazaki (2008 年 11 月 17 日, ポスター発表) Culture -dependent and -independent analysis of two hydrothermal fields in central Indian ridge, International Symposium of Subsurface Microbiology, 静岡市・グランシップ

②Junichi Miyazaki (2008 年 8 月 18 日, ポスター発表) Microbial communities of two deep-sea hydrothermal fields in Central Indian Ridge, 8 th International Symposium of Microbial Ecology, オーストラリア・ケアンズコンベンションセンター

③Junichi Miyazaki (2008 年 2 月 28 日, 招待口頭発表) Nitrogen fixation by anaerobic methanotroph. International symposium on environmental microbiology, —How do microbes control nutrient cycling in anaerobic environment—, 首都大学東京

④宮崎淳一 (2007 年 9 月 17 日, ポスター発表), メタン冷湧水帯における窒素固定菌の分布, 第 23 回日本微生物生態学会, 愛媛大学

⑤Junichi Miyazaki (2007 年 8 月 23 日, 招待口頭発表) Nitrogen fixation in anoxic methane-seep sediments. Gordon Research Conferences —Archaea; Ecology, Metabolism & Molecular Biology—, Andover, NH, USA.

⑥Junichi Miyazaki, (2007 年 8 月 20 日, ポスター発表) Nitrogen fixation in anoxic methane-seep sediments. Gordon Research Conferences —Archaea; Ecology, Metabolism & Molecular Biology—, Andover, NH, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 淳一 (MIYAZAKI JUNICHI)
独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター・研究員
研究者番号: 50435848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし