

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05783

研究課題名(和文) 分離培養した化学合成硫酸還元菌の細胞間共生系の構築

研究課題名(英文) Construction of artificial symbiosis by newly isolated chemosynthetic sulfate-reducing bacteria

研究代表者

宮崎 淳一 (Miyazaki, Junichi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究開発プログラム)・副主任研究員

研究者番号：50435848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「研究代表者によって深海熱水活動域から分離培養した2種の水素酸化硫酸還元菌(SRB)の電子伝達の多様性と誘導する仕組みを明らかにし、培養可能なメタン生成アーキアと新規共生系を創出することで、嫌氣的メタン酸化と異種細胞間電子伝達のシステムを解明すること」を最終目標として実施した。期間中は研究開始当初の2種に加えて、2種類のSRBを単離した。合計4種のSRBの特性解析を行った結果、環境の変化に応じて2種類のエネルギー獲得経路を使い分けることで環境適応すること、さらに電気によるエネルギー獲得のポテンシャルをもつSRBは他微生物と細胞間共生という戦略をとることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を実施することにより、生物機能を飛躍的に獲得し、地球上の生命の進化を考える上で極めて重要な生命現象である異種生物間の共生というスタイルへの理解を深められることが期待された。そして、この共生がどのようなトリガーで起こりうるかを、本研究において深海熱水活動域由来の水素酸化硫酸還元菌(SRB)4種のゲノム・特性解析を通して行い、特定の環境の変化にSRBが応答し、他微生物と電気的なエネルギーのやりとり(異種細胞間電子伝達)をすることで共生がはじまることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I was previously isolated two hydrogen-oxidizing sulfate reducing bacteria (SRB) from deep-sea hydrothermal vent site. And we found that these bacteria were taxonomically related to bacteria known as a partner of ANME consortium. Therefore we expected that various analyses of these bacteria led us to understand the directed electron transfer formed by ANMEs and SRBs. In this study, I clarified that SRB responded to environmental condition and controlled the multi energy metabolic systems. And it is suggested that SRB which had the potential to receive electrons directly from outside of the cell can survive by forming symbiotic interaction with other microbes.

研究分野：極限環境微生物学

キーワード：水素酸化硫酸還元菌 異種細胞間電子伝達 深海熱水活動域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

異種生物間の相互作用である共生は、酸素呼吸、光合成の獲得に始まり、高等生物の誕生など地球上における生命の成り立ち・進化を考える上で非常に重要な生命現象の1つである。共生は生物機能を飛躍的に獲得する画期的なシステムであり、共生が成立する環境、共生成立の過程、共生における各役割と獲得機能の駆動システム、共生する生物間の特異性を研究することは、将来的な新規有用生命の創出につながると考えられる。現在、様々な形の共生が存在することが知られているが、微生物の中には、生命活動を維持するエネルギーの獲得のために必要な電子伝達を異種細胞(微生物)間でネットワークを形成することで行っているものが存在する (Summers, et al. *Science* 2010 330:1413-5)。この異種細胞間電子伝達(DIET; Direct Electron Transfer)を行っていると考えられる微生物の組み合わせの1つが海底下で嫌氣的メタン酸化(AMO; Anoxic Methane Oxidation)を担う嫌氣的メタン酸化アーキア(ANME)と硫酸還元菌(SRB)による consortium である。しかしながら、AMO の発見から約 20 年経過するものの、いまだに両微生物共に分離培養に成功した報告はない。この共生体は超難培養微生物であり、その細胞倍加時間は 300 - 1000 日と見積もられている(Girguis, et al. *Appl Environ Microbiol.* 2003 69:5472-82)。そのため共生の根幹となる共生成立の過程、共生における各役割と獲得機能の駆動システム、共生する生物間の特異性の理解に不可欠な分子生物学的、生化学的な解析を詳細に進めることができていない。しかし、幸運なことに、2013 年にカリブ海にある世界最深熱水活動域 Beebe site の調査航海と 2016 年に南部沖縄トラフ熱水の Yokosuka site 調査航海(Miyazaki, et al. *Royal Society Open Science* 2017 4:171570)において採取された熱水チムニールから、それぞれ ANME-3、ANME-1 に特異的に細胞間共生する SRB と近縁で水素酸化を行う SRB を、本研究応募者が分離培養することに成功した(それぞれ MCR3-30M2 (94% identity), Yokosuka2-50M2 (94% identity)と名付けている。Fig. 1 & 2)。これら両 SRB のドラフトゲノム解析を行い、Yokosuka2-50M2(ゲノムサイズ 2.6Mbp)は、Krukenberg らが提唱している AMO の DIET (Fig. 3)に重要と考えられている cytochrome *c* および Pili タンパク質を形成する遺伝子セット全てを有していることが明らかとなった(Krukenberg, et al. *Environ Microbiol.* 2016 18:3073-91)。以上のことから本研究応募者が分離培養した 2 種の SRB は AMO および DIET システムを理解するのに適していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は 分離培養した SRB の特性を解析し、DIET に必要と考えられる因子がいつ、どのような状態で誘導されるか?(共生の成立過程)、 分離培養した SRB が既に培養可能な Methanogen と DIET による共生関係を築き上げることができるかどうか?(共生が成立する環境、共生生物間の特異性)、 できた場合はどうして共生できるようになったか?(共生の成立過程)、 Methanogen はどのようにメタン生成経路を逆行して嫌氣的にメタンを酸化するのか?(共生における各役割と獲得機能の駆動システム)を明らかにすることにある。現在までに AMO の現象は環境サンプルまたはバイオリアクターに頼った物のみであり、安定したサンプルの供給、短時間での培養実験ができていない。実験室内で新規共生関係を成立させるという独自のかつ今までにない創造性のある研究で、DIET 共生の成立、過程、環境条件だけでなく、AMO という生命現象をも明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

- (1)分離培養した SRB の特性解析(温度、pH、塩濃度、基質添加の有無および濃度変化などを行い、SRB がどのような動態確認)
- (2)ゲノム解析
- (3)既知 Methanogen とさまざまな条件での混合培養
- (4)深海熱水域におけるさらなる SRB の分離培養
- (5)SRB の電気培養系の構築

4. 研究成果

深海熱水活動域から単離した当初の 2 種に加えて、さらに 2 種の水素酸化硫酸還元菌(SRB)の単離を行った。そしてゲノム解析を行ったところ、SRB は数種のエネルギー代謝経路をもち、それを環境に応答して使い分けることが示唆された(Hashimoto et al., 2022)。そして特性解析を

行い、特にエネルギー供与体である水素の有無という環境の変化に応答することも明らかとなった。特に、4種のうちの1種は電子を直接受容することによってエネルギー源としていることが示唆されたので、電気による培養を確実にできる方法論の構築を行った。そして実際に電気培養によって生育が確認できることも明らかとなった。電気によるエネルギー獲得のポテンシャルをもつ水素酸化硫酸還元菌は他微生物と細胞間共生をすることで適応し、生存戦略を構築していることが示唆された。研究期間は終了したものの、引き続き電気培養におけるSRBの特性やトランスクリプトーム解析を行い、電気による生育の仕組みを明らかにし、他微生物と細胞間共生に必要なシステムを明らかにしていきたい。

当初の目標であったメタン生成アーキアとの共生はSRBとの混合培養などかなり試みたものの、成功できなかった。これは既知メタン生成アーキアに電子を与える機能などが無いことが推測される。そのため、研究期間が終了したが、環境サンプルに今回特性解析を行ったSRBを活用することにより細胞間共生の仕組みを明らかにすることを今後も続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Yurina, Shimamura Shigeru, Tame Akihiro, Sawayama Shigeki, Miyazaki Junichi, Takai Ken, Nakagawa Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Physiological and comparative proteomic characterization of <i>Desulfolithobacter dissulfuricans</i> gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, sulfur-disproportionating chemolithoautotroph from a deep-sea hydrothermal vent	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in 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） 10.3389/fmicb.2022.1042116	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yurina Hashimoto, Shigeru Shimamura, Akihiro Tame, Shigeki Sawayama, Junichi Miyazaki, Ken Takai, Satoshi Nakagawa
2. 発表標題 Physiological and metabolic characteristics of a novel sulfur-disproportionating bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney at the Suiyo Seamount, Japan
3. 学会等名 12th Asian Symposium on Microbial Ecology
4. 発表年 2022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
---------	---------