

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16234

研究課題名(和文) 熱水の化学合成生態系における原始的な窒素固定細菌の生態的役割

研究課題名(英文) Ecological role of primitive nitrogen-fixing bacteria in hydrothermal chemosynthetic ecosystems

研究代表者

西原 亜理沙(Nishihara, Arisa)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・学振特別研究員

研究者番号：80837774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、熱水化学合成微生物群集から新たに70度以上で窒素固定をする Firmicutes門に属する発酵細菌を分離した。分離株のゲノム解析を行ったところ、従来の窒素固定細菌とは異なり、特徴的な窒素固定遺伝子群を保持していることが分かった。また、窒素固定遺伝子の系統解析の結果、分離株の窒素固定遺伝子は超好熱性アーキアが持つものと系統的に近いことが分かった。窒素固定遺伝子の系統樹から、分離細菌は超好熱性アーキアと共に窒素固定能を得ており、初期に誕生した窒素固定生物であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒素固定細菌は原始地球が高温であった約35億年前に、化学合成生態系で出現したとされるにも関わらず、これまで高温ではあまり研究されてこなかった。高温の化学合成生態系における窒素固定の研究は、生態系における窒素固定細菌の生態的役割だけでなく、窒素固定の進化的観点においても重要な研究課題である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we isolated a novel fermentative bacterium belonging to the phylum Firmicutes from the hydrothermal chemosynthetic microbial community that is able to fix nitrogen at temperatures above 70 degrees Celsius. Genome analysis of the isolates revealed that the isolate possess a distinctive set of nitrogen-fixing genes, which is different from that of conventional nitrogen-fixing bacteria. Phylogenetic analysis of the nitrogen-fixing genes revealed that the genes of the isolate are phylogenetically close to those of hyperthermophilic Archaea. The phylogenetic tree of nitrogen-fixing genes indicates that the isolate has acquired nitrogen-fixing ability together with hyperthermophilic archaea, and is an early nitrogen-fixing organism.

研究分野：生態学

キーワード：微生物生態系 物質循環 窒素固定 微生物培養 進化 発酵細菌

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

窒素ガスを窒素化合物(アンモニア態窒素)に変換する窒素固定細菌は、地球上の窒素循環に重要である。窒素固定細菌による窒素化合物生産量は、地球上のアンモニア態窒素の7割を占めるとも見積もられている[Fowler D et al., Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2013]。特に、一次生産が活発な生態系など、有機炭素が多い環境では、微生物の消費などによって窒素化合物がしばしば枯渇するため、窒素固定細菌による窒素化合物生産が重要となる[B. M. Bebout et al., Microbial Mats. 1994]。これまでは、光合成(植物など)を一次生産とした生態系で、窒素固定細菌の生態的役割に着目した研究が多くなされてきた。一方で、化学合成を一次生産とした化学合成生態系では、窒素固定の研究は極めて少ない[N. Dubilier et al., Nat. Rev. Microbiol. 2008]。地球史上では、光合成出現以前は、化学合成細菌が一次生産者として生態系を支えていた説が有力である[K. O. Stetter, Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2006]。現在でも、光が届かない「深海」や「洞窟」、70°Cを超える高温の「温泉」など、光合成生物が存在しない環境下では、化学合成細菌が一次生産を支えている。化学合成生態系で窒素循環を明らかにすることは、光合成出現以前の原始地球の生態系における物質循環プロセスを理解する上で非常に重要である。

窒素固定の機能は、原始地球が高温であった約35億年前に熱水化学合成生態系で出現し、現在は全原核生物の7.8%が窒素固定能を有していると推定されているが[M. Nishizawa et al., Appl. Environ. Microbiol. 2014; S. Poudel et al., J. Bacteriol. 2018]、70°Cを超える高温環境から窒素固定細菌が分離された例は申請者の研究に限られ[Nishihara et al., Microbes Environ. 2018]、高温環境における窒素固定細菌の実態は長く不明であった。



図1:温泉の小川に発達する微生物集塊

2. 研究の目的

本研究では、生態系が単純である熱水化学合成微生物群集において窒素固定細菌の働きと群集への貢献度を明らかにし、そこに存在する原始的な窒素固定細菌の生理学的性質を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、長野県の中房温泉(≥70°C)に発達する熱水化学合成生態系の微生物集塊(図1)を対象に、まず、窒素固定の生態系における寄与を、トランスクリプトーム解析を用いて調べた。次に、先行研究によって窒素固定候補者として予想された微生物について、単離培養を行い、窒素固定能を調べた。続いて、単離した微生物についてゲノム解析を行い、高温環境における窒素固定細菌の遺伝子システムを調べた。

4. 研究成果

(1) 窒素固定の生態系における寄与の解明

熱水化学合成微生物群集における微生物の機能遺伝子の発現解析を行なった。その結果、窒素固定遺伝子が環境中で発現していることが明らかとなり、窒素固定細菌による窒素化合物生産が、熱水化学合成微生物群集の生態系の維持に寄与していることが示唆された。

(2) 新規窒素固定細菌の分離と生理特性の解明

以前の申請者らの研究[A. Nishihara et al., Microbes Environ. 2018]による機能遺伝子に基づいたメタゲノム解析により、Firmicutes 門、Nitrospira 門および Aquificae 門の3つの門で、窒素固定細菌の候補者が存在することが示唆されていた。それらの候補者のうち、Aquificae 門(*Hydrogenobacter* 属細菌)でのみ、申請者らによって培養株が得られ、70度以上で窒素固定活性が示されていたが[A. Nishihara et al., Microbes Environ. 2018]、本研究では、新たに70度以上で窒素固定を行う Firmicutes 門に属する発酵細菌 NA-01 株を分離した。分離細菌の生理特性を調べるため、様々な条件で培養を行なったところ、嫌気条件かつ従属栄養条件(発酵条件)で生育し、最高で78度まで窒素固定活性および窒素固定依存的な生育を示すことがわかった。この温度は、現在バクテリアで報告されている窒素固定最高温度である70度[A. Nishihara et al., Microbes Environ. 2018]を大きく上回る結果となった。また、NA-01株は16S rRNA解析に基づく相同性解析から *Caldicellulosiruptor* 属細菌に属することがわかった。さらに、同属内の近縁種とのゲノムの相同性から(図2)、本単離株は新種であることがわかったため、その他の生理学的特徴を調べ、新種として国際誌 IJSEM に発表した[Y. Chen et al., IJSEM 2021]。

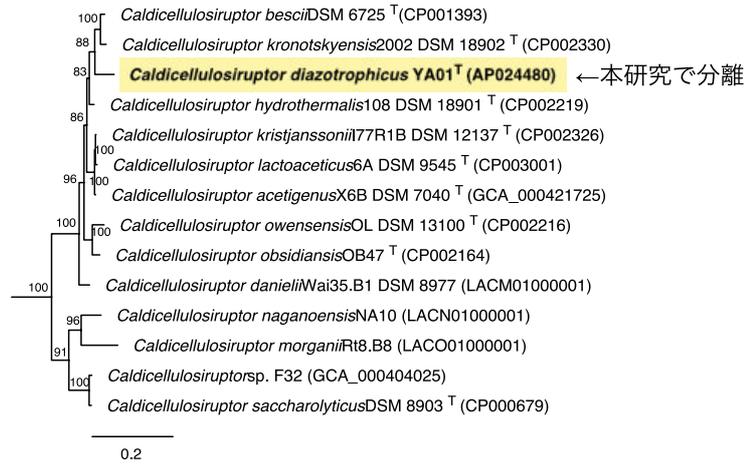


図 2: リボソームタンパク質(concatenated sequences of 40 single-copy)に基づいた *Caldicellulosiruptor* 属細菌の系統樹

(3) NA-01 株の窒素固定遺伝子の解析

単離株 NA-01 のゲノム解析を行ったところ、従来の窒素固定バクテリアとは異なり、特徴的な窒素固定遺伝子群を保持していることが分かった。従来の窒素固定バクテリアは窒素固定のオペロンを構成する最小遺伝子セットと言われる 6 遺伝子 (NifHDKENB) を同一のオペロン内に有する。一方で、NA-01 株は 6 遺伝子 (NifHDKENB) のうち、MoFe protein cofactors の合成に関与する Nif N 遺伝子を欠いていることがわかった (図 3)。Nif N 遺伝子を欠いているにも関わらず、窒素固定を行うことが示されている窒素固定微生物は、92 度の温度条件で窒素固定が報告されている超好熱性アーキアの *Methanocaldococcus* FS406-22 に次いで 2 例目である。

また、窒素固定遺伝子を系統解析した結果、NA-01 株の窒素固定遺伝子は超好熱性アーキアが持つ遺伝子と系統的に近いことが分かった。さらに詳細に窒素固定遺伝子の系統解析を行なったところ、NA-01 株は超好熱性アーキアと共に窒素固定能を得ており、初期に誕生した窒素固定生物であることが分かった。NA-01 株の窒素固定能と窒素固定遺伝子の特徴を明らかにした研究成果は国際誌 (*Microbes and Environments*) に発表した [Y. Chen & A. Nishihara et al., *Microbes Environ.* 2021]。

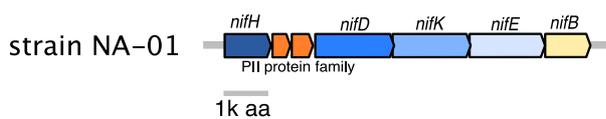


図 3: *Caldicellulosiruptor* 属細菌 NA-01 株の窒素固定遺伝子オペロン

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 YUXIN CHEN, ARISA NISHIHARA, and SHIN HARUTA	4. 巻 -
2. 論文標題 Nitrogen-fixing ability and nitrogen fixation related genes of thermophilic fermentative bacteria in the genus <i>Caldicellulosiruptor</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	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） なし	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 -

1. 著者名 Chen Yuxin, Nishihara Arisa, Iino Takao, Ohkuma Moriya, Haruta Shin	4. 巻 71
2. 論文標題 <i>Caldicellulosiruptor diazotrophicus</i> sp. nov., a thermophilic, nitrogen-fixing fermentative bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan	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 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005014	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishihara, A., S.E. McGlynn, V. Thiel, M. Tank, Nobu. MK, H. Tamaki, S. Haruta
2. 発表標題 Ecology and Physiology of Thermophilic Nitrogen-Fixing Aquificae in Terrestrial Hot Springs.
3. 学会等名 21th International Congress on Nitrogen Fixation. (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Nishihara, A., S.E. McGlynn, V. Thiel, M. Tank, Nobu. MK, H. Tamaki, S. Haruta
2. 発表標題 Evidence of active nitrogen-fixation in hyperthermophilic bacteria from terrestrial hot springs.
3. 学会等名 第33回 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年～2020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
---------	---------