

令和 4 年 6 月 20 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：19K20462

研究課題名（和文）永久凍土の大融解に伴う微生物学的インパクトに迫る

研究課題名（英文）Characterization of microbial assemblages associated with large-scale thawing of permafrost

研究代表者

中井 亮佑（Nakai, Ryosuke）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：90637802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アラスカ永久凍土層の氷試料を標的として、氷中に含まれる未知・未培養微生物の実態解明に取り組んだ。その結果、氷中にはActinobacteriaとProteobacteriaが主に優占することと、未培養候補門やAcidobacteria等の新規微生物が局所的に準優占することが見出された。メタゲノム解析により、有機物分解やガス生成に関わる生態機能をもつ未培養系統群も検出された。現在、それらと現場の地質学的・地球化学的データとの関連を考察中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球環境変動によって大融解が促される永久凍土は、有機炭素の巨大な貯蔵庫である。この種の凍土には、肉眼では見えないが、多種多様な微生物（特にバクテリアやアーキアなど原核生物）を含んでいる。凍土融解による物質循環インパクトを考察するうえでは、それら微生物の実態と代謝機能の情報も重要であると考えられる。本研究で得た微生物群集構造とその生理生態の知見は、凍土融解時に現場で増殖して機能しうる微生物を考究するための基盤的知見になる。

研究成果の概要（英文）：This study investigated unseen/uncultured microorganisms present in the ice complex of the Alaskan permafrost. Microbiome analysis revealed that bacterial members belonging to Actinobacteria, Proteobacteria, Chlamydiae, Planctomycetes, and Firmicutes, as well as archaeal members affiliated with Euryarchaeota and Thaumarchaeota were dominant in the studied samples. Some samples also contained novel lineages belonging to uncultivated candidate divisions, Acidobacteria, and Gemmatimonadetes. Metagenomic analysis also detected uncultivated members with metabolic potentials related to organic matter degradation and gas production, and the relationship between the metabolic characteristics obtained and the geochemical data is currently being analyzed. In addition, culturing efforts have led to the isolation of phylogenetically novel proteobacterial strains.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物 細菌 バクテリア 永久凍土 環境影響評価

## 1. 研究開始当初の背景

地球規模の気候変動によって大融解が促される永久凍土は、有機炭素の巨大な貯蔵庫である。数万年の時をかけて蓄えられたその有機炭素は約 9500 億トンに達すると見積もられており (Mascarelli et al., *Nature Reports Climate Change*, 2009)、炭素循環における大きな不確定要素の一つとして IPCC 報告書でも取り上げられている。また永久凍土中には、体積の約 80% が氷でできた巨大氷が存在することが知られる。この種の氷は、古環境情報を記録した有用な媒体としてみなされているため、氷中の土粒子やガス微量成分を調べることで、過去の地球環境を読み解くことができる (Meyer, *Quaternary Science Reviews*, 2010)。さらに、永久凍土層には微生物 (特にバクテリアやアーキアなど原核生物) もまた閉じ込められている。特に、気候変動ガスの発生に直接関与するメタン生成菌は、凍土融解時に現場で優占する微生物として注目されている (Steven et al., *Extremophiles*, 2006)。近年の環境 DNA 解析 (環境中の DNA から微生物の多様性を調べる解析) の普及も重なり、凍土中の微生物種の多様性は明らかになりつつある。一方で、メタン生成菌以外の微生物群の生理・生態機能は未だ不明な点が多い (Jansson & Tas, *Nature Reviews Microbiology*, 2014)。凍土融解による物質循環インパクトを考察するうえで、そこに含まれる多種多様な微生物の実態と生態生態を明らかにすることが必要であると考える。

## 2. 研究の目的

本研究では、永久凍土層の氷試料を用いて、氷に閉じ込められた未知微生物群の実態に迫ることを目的とする。本目的を達成するために、従来の微生物群集構造解析に加えて、環境 DNA のまるごと解読、いわゆるメタゲノム解析などオミクス解析によって、微生物が持つ潜在能力を網羅的に評価する。その中で、申請者らが独自に確立してきた超微小微生物の回収技術も併用することで、微生物群の系統的・機能的な多様性を高解像度で解き明かす。また、本手法で凍土層の古い層から新しい層まで時系列に解析することで、微生物多様性の変遷とその分布パターンを捉える。特に、気候変動ガスを発生する鍵微生物群の分布は、長年の凍土研究で蓄積されてきた地質学的・地球化学的データとの比較および統合することで、凍土融解時の物質循環インパクトを考察するうえで基盤的知見になると考える。

## 3. 研究の方法

### (1) 永久凍土層における微生物群集構造解析

本研究では、アラスカ永久凍土層の氷試料を用いた。氷試料から微生物を回収するうえで問題となるのが試料に付着したヒト由来微生物の混入である。本研究では、微生物を模した人工 DNA 分子 (ベクター等) を氷試料の表面に塗った後で DNA 抽出を行った。PCR 等によって人工 DNA をいつでも検出できる系を準備することで、実験が終わるたびに、実験作業に由来するコンタミの有無を確かめた。コンタミの可能性を最小限化して氷表面を融解・除去した後、内部の氷だけを融かした。次に、さまざまな孔径のフィルターを用いて微生物を捕集した。特に、孔径 0.2 マイクロメートルフィルターによるろ過のろ液をさらに小さな孔径 0.1 マイクロメートルフィルターで捕集することによって、試料中の超微小微生物を濃縮することも試みた。雑菌混入を防ぎながら大量の試料を処理するには、このような方法が申請者らの先行研究において有効であった (Nakai et al., *Marine Biotechnology*, 2012)。本手法により、一般微生物と超微小微生物の両方をそれぞれ分けて回収することができる。濃縮した微生物細胞から DNA を抽出した後は、16S rRNA 遺伝子 (微生物の系統分類に用いられる DNA 領域) を PCR 増幅そして塩基配列を解読した。得られた DNA 情報をもとに分子系統解析を行うことで、氷中に存在する微生物群集の系統的な多様性を明らかにした。

### (2) 凍土氷中の微生物の生理・生態学的特性解析

氷中に含まれる微生物がもつ潜在的な代謝能力を明らかにするため、上記(1)で抽出した環境 DNA を用いて、網羅的な塩基配列解読とその生物情報解析 (メタゲノム解析) を行った。配列解読には高速シーケンサ (イルミナ社の NovaSeq) を使用した。取得した DNA 配列情報については、複数の配列解析ソフトウェアを用いてその遺伝子機能の推定を試みた。得られた機能遺伝子群の種類や特性をもとに、培養されていない未知微生物のもつ生理生態を特徴づけた。

### (3) 凍土氷中の微生物の分離培養と系統解析

本項目は当初の研究計画では予定していなかったが、年度毎の研究推進方針に記載の通り、上記(2)で必要な高分子 DNA の抽出に課題があったことと、また、COVID-19 の状況によって実験計画に影響が生じたことから、メタゲノム解析がやや遅れたため、氷試料からの微生物の分離培養試験も実施することにした。培養に依存した方法では一部の微生物しか解析できないが、増殖特性や生理生態に関する情報を得ることができる。本研究では、複数の微生物単離用培地を用いて微生物を培養し、得られた菌株の増殖特性や分子系統・ゲノム情報を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 永久凍土の氷中に見られる微生物群集構造

本研究では、アラスカ永久凍土に由来する氷試料を用いて(全 16 サンプル)微生物群集構造解析を進めた(図 1; 論文公表前のため、試料の詳細は省略)。QIIME2 と SILVA データベースによって系統解析した結果、Actinobacteria、Proteobacteria、Chlamydiae、Planctomycetes および Firmicutes に属するバクテリア、また、Euryarchaeota および Thaumarchaeota に帰属するアーキアが主に優占すること、既知の系統群に分類できない未培養候補門(candidate divisions)の微生物が局所的に存在することを見出した。この中には、(1)新規性は低いものの、標的とした地域の凍土環境で優占的な Actinobacteria の新規系統、また(2)一部の試料のみに特徴的に見られる難培養性の Acidobacteria や Gemmatimonadetes に帰属する系統群も見出された。特に Acidobacteria のある種のグループは、超微小微生物を標的とした孔径 0.2 マイクロメートルフィルターの濾過画分からも検出されたことから、現場で極小の細胞サイズで存在している可能性がある。さらに、微生物群集データとその由来となる凍土氷の推定年代をもとに、各系統の変動を予察的に解析したところ、遺伝子配列の検出頻度は高くないものの、メタン生成菌として知られる *Methanobacterium* 属の増減の傾向が見られた。

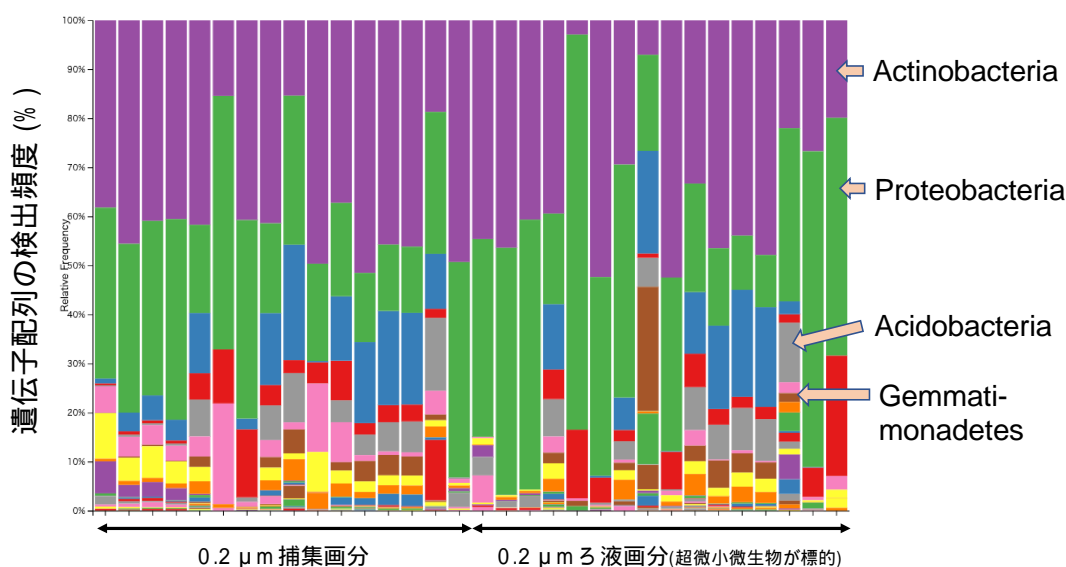


図1. 凍土氷から検出された原核微生物の系統とその遺伝子配列の検出頻度

##### (2) 凍土氷中の微生物の生理・生態学的特性

本研究では、氷試料から高分子 DNA の回収効率に課題があり、複数の試料で十分な DNA 収量が得られず、網羅的なゲノム解読(メタゲノム解読)が実施できなかった。そのため、新規微生物系統群が卓越する試料を優先的にメタゲノム解析に供し、そこから複数の配列解析ソフトウェア(MaxBin2 や DRAM 等)を用いて、個々の微生物ゲノムを再構築し解析することに注力した。その代謝関連遺伝子の解析から、凍土融解時に現場の環境に影響する有機物分解やガス生成に関わる機能をもつ未培養系統群を見出した。現在、得られた微生物系統群の代謝特性と、現場の地質学的・地球化学的データとの関連を考察しながらデータを整理しており、これらが完了した後で、国際学術誌に論文を投稿する計画である。

##### (3) 凍土氷からの微生物の分離培養

研究推進方針に記載の通り、当初の予定に加え、凍土氷からの微生物分離培養に着手したところ、貧栄養培地と低温条件による培養で特に多くの微生物菌株を単離することができた。この中には、公共のデータベース上に近縁な基準菌株が存在しない Alphaproteobacteria 網の新規細菌、また、過去に氷床環境から検出された極小微生物に近縁な Betaproteobacteria 網の新規細菌等を単離することができた(図 2)。分離菌株の一部については、増殖特性や生理性状の解析、ゲノム情報解析が終了しており、現在論文をまとめて国際誌に投稿し査読中である。

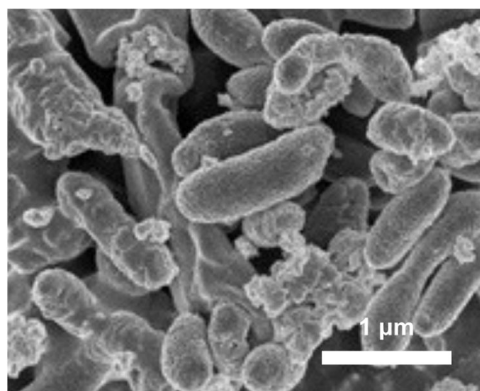


図2. Betaproteobacteria 網に属する新規細菌

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 Shimada Sho*, Nakai Ryosuke* (*equal contribution), Aoki Kotaro, Kudoh Sakae, Imura Satoshi, Shimoeda Norifumi, Ohno Giichiro, Watanabe Kentaro, Miyazaki Yasunari, Ishii Yoshikazu, Tateda Kazuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of the First Cultured Psychrotolerant Representative of Legionella from Antarctica Reveals Its Unique Genome Structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e00424-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/Spectrum.00424-21	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 中井 亮佑	4. 巻 19
2. 論文標題 極地に生きる未知微生物は何者か？	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 極限環境生物学会誌	6. 最初と最後の頁 25-31
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6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中井 亮佑
2. 発表標題 今こそ注目！すごい微生物たちの世界
3. 学会等名 Anti-disciplinary Science Group in Keio・The 59th Scienc-ome (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井 亮佑
2. 発表標題 極地微生物ハンティングのこれまでとこれから
3. 学会等名 極限環境生物学会 第21回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Shimada, Ryosuke Nakai, Kotaro Aoki, Norifumi Shimoeda, Giichiro Ohno, Sakae Kudoh, Satoshi Imura, Kentaro Watanabe, Yasunari Miyazaki, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda
2. 発表標題 Chasing Legionella spp. in Antarctic human-made and natural environments
3. 学会等名 The 11th Symposium on Polar Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中井亮佑
2. 発表標題 とっても小さい放線菌等の実体と新機能
3. 学会等名 第67回日本放線菌学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井亮佑、草田裕之、玉木秀幸
2. 発表標題 培養アプローチで迫る稀少微生物たちの実体
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井 亮佑
2. 発表標題 稀少微生物たちの実態と新機能を探る
3. 学会等名 第14回 札幌微生物勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本遺伝学会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典 -継承と多様性の源-	

〔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		
米国	アラスカ大学フェアバンクス校		