

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780085

研究課題名 (和文) 海底下微生物の脱ハロゲン呼吸代謝に関する研究—新規な生態系と遺伝子機能の探索

研究課題名 (英文) Organohalide respiration in the subseafloor microbial ecosystem—Investigation of RDH genes and dehalogenation activity

研究代表者

二神 泰基 (FUTAGAMI TAIKI)

九州大学・大学院農学研究院・寄附講座教員

研究者番号：60512027

研究成果の概要 (和文)：

海底下生命圏における微生物の代謝活動を支える電子受容体の一つとして有機ハロゲン化合物が候補に挙げられる。本研究では、東太平洋赤道域、ファンデフカ海盆、ペルー沖、下北半島沖、および南海トラフの堆積物コア試料中 (最深部 358.6 meters below seafloor) から 32 種類の新規な還元的デハロゲナーゼホモログ遺伝子を取得した。また、南海トラフ前弧海盆 (Site C0001, C0002) に 2,4,6-トリブロモフェノール、2,4,6-トリヨードフェノールおよびトリクロロエテンの脱ハロゲン活性を検出した。以上より、海底下に脱ハロゲン微生物が広く存在することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Halogenated organic matter incorporated in marine sediments is one source of electron acceptors for anaerobic microbial respiration. A total of 32 putative reductive dehalogenase homologous genes were detected in sediments from the southeast Pacific off Peru, the eastern equatorial Pacific, the Juan de Fuca Ridge flank off Oregon, and the northwest Pacific off Japan, collected at a maximum depth of 358.6 m below the seafloor. In addition, dehalogenation activity toward 2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-triiodophenol, and trichloroethene was observed in sediment slurry from the Nankai Trough Forearc Basin. These results suggest that dehalorespiration is an important energy-yielding pathway in the subseafloor microbial ecosystem.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：脱ハロゲン呼吸、還元的デハロゲナーゼ、脱ハロゲン化反応、海底下生命圏

1. 研究開始当初の背景

有機ハロゲン化合物を電子受容体とする嫌氣的エネルギー獲得系は脱ハロゲン呼吸と称される。その過程でハロゲン原子を水素原子へと置換する反応が進行することを利

用して、土壌や地下水を汚染する有機塩素化合物を効率よく脱塩素・無毒化する技術が、欧米をはじめ我が国でも利用されている。環境汚染物質の分解者として知られるこれらの脱ハロゲン呼吸細菌は、自然環境下で生起

する有機ハロゲン化合物を電子受容体として生きる微生物生態系から進化したものと考えられる。生物地球化学的に生起する有機ハロゲン化合物は 3800 種類以上もあり、特に、海洋環境は有機ハロゲン化合物が生産される場所として知られている。例えば藻類、海綿、プランクトンなどの海洋生物は多様なハロアルカン、ハロフェノール類を生産することが知られている。

一方、近年の海底下深部の探査研究により、世界各地の海底堆積物中（深度 1.6 km まで）に 1 cm^3 あたり 10^5 を超える大量の微生物細胞が存在することが明らかにされた。その値から海底下全体でのバイオマス総数は 3.5×10^{30} と試算されており、水圏 (1.2×10^{29}) や陸域 ($2.5 \times 10^{29} \sim 2.5 \times 10^{30}$) をしのぐ海底下生命圏として認識されている。しかし、その環境は還元物質に富み酸化物質に乏しく、微生物細胞がどのような代謝活動によって存在しているのか、様々な議論を呼んでいる。現在は、海水や陸域などの表層世界から海底下に供給される電子受容体を用いる呼吸カスケードとして、硝酸や硫酸が消費され尽くされた深部では二酸化炭素に依存するメタン・酢酸生成が優占することが定説となっている。

2. 研究の目的

本研究では、海洋環境において安定的に生産される有機ハロゲン化合物が、海底下生命圏を支える重要な電子受容体のひとつではないかという仮説を実証し、海底堆積物より新規な脱ハロゲン呼吸細菌および関連遺伝資源を取得することを目的として行った。

例えば、ハロアルカン、ハロフェノールといった各種ハロゲン化脂肪族化合物および芳香族化合物を電子受容体とする際の酸化還元電位 ($E' 0$) は $+260 \sim +480\text{ mV}$ と計算され、硝酸呼吸 ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$; $E' 0 = +433\text{ mV}$) に匹敵する。海水からの沈降有機物や陸域より供給される植物由来有機物等に含まれる微量のハロゲン化合物が海底下生命圏を支える重要な電子受容体に成り得る可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 還元的デハロゲナーゼホモログ (RDH) 遺伝子の検出に使用したサンプル

Ocean Drilling Program (ODP) Leg201 (ペルー沖、および東太平洋赤道域)、海洋研究開発機構“ちきゅう”慣熟航海 CK06-06 (下北半島沖)、Integrated Ocean Drilling Program (IODP) Expedition 301 (ファンデフカ海盆) および IODP Expedition 315 (南海トラフ) において採取された堆積物コア試料を使用した。

(2) コア試料からの DNA 抽出および RDH 遺

伝子の検出

各コア試料から ISOIL bead-beating kit (日本ジーン) および MagExtractor DNA 精製キット (東洋紡) を使用して、DNA を抽出した。得られた DNA は低濃度であったため、Multiple displacement amplification (MDA) 法により増幅した後、PCR 鋳型として用いた。脱ハロゲン呼吸の末端レダクターゼである還元的デハロゲナーゼのホモログ遺伝子 (RDH 遺伝子) を縮重 PCR によって増幅した。縮重プライマーとして、既報の RRF2、B1R、dehaloF3、dehaloF4、dehaloF5、dehaloR2、dehaloR3、dehaloR4、ceRD2S、ceRD2L、および RD7 を使用した。得られた増幅断片を pCR2.1 プラスミドベクター (Invitrogen) に TA クローニングし、シーケンス解析を行った。

(3) RDH の配列解析

得られた配列を FastGroupII により分類し、95% 以上の相同性をもつものを同一の phylotype とした。これらの RDH 遺伝子がコードするアミノ酸配列と既報の還元的デハロゲナーゼおよび RDH のアミノ酸配列を用いて Neighbor joining 法により系統樹を作成した。ClustalW によりアラインメントを行った。また、MEGA ver. 4.0 を使用し、Pairwise gap deletion により系統樹を作成した。

(4) 脱ハロゲン活性測定に用いた南海トラフのサンプル

IODP Expedition 315 および 316 により採取された南海トラフの堆積物試料における脱ハロゲン活性を測定した。Site C0001 (0.7, 6.1, 10.8, 28.1, 50.3, 66.3, 82.0, 102.2 mbsf)、Site C0002 (1.9, 4.7, 9.2, 13.4, 20.2, 30.0, 66.6, 155.4 mbsf)、Site C0004 (0.8, 4.0, 10.4, 19.7, 36.6, 57.7, 75.0, 86.3 mbsf)、Site C0006 (0.7, 2.6, 3.8, 4.7, 11.1, 19.2, 35.6, 46.5 mbsf)、Site C0007 (2.3, 4.3, 8.2, 15.0, 30.2, 148.8 mbsf)、および Site C0008 (3.1, 7.3, 7.5, 9.7, 16.6, 36.5, 93.7 mbsf) より取得された約 10 cm のホールラウンドコア試料の内部 20 cm^2 を、各 Site 毎に培地と混合した。培地組成は、(KCl, 1.3 g; KH_2PO_4 , 0.2 g; NaCl, 23 g; NH_4Cl , 0.25 g; CaCl_2 , 0.062 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 g; NaHCO_3 , 2.5 g; $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$, 0.056 g; $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 0.041 g; casamino acid, 0.05 g; resazurin sodium salt, 0.25 mg; trace element solution A および B, 1 mL; HCl により pH7.5 に調整) である。還元剤として、Titanium(III)-NTA を使用した。

その後、各種の有機ハロゲン化合物

(2,4,6-トリクロロフェノール、2,4,6-トリプロモフェノール、2,4,6-トリヨードフェノール、トリクロロエテン、*cis*-1,2-ジクロロエテン、*trans*-1,2-ジクロロエテン、テトラクロロメタン、トリクロロメタン、ジクロロメタン、およびジプロモメタン) を添加し、

これらの化合物に対する脱ハロゲン活性を測定した。

(5) 脱ハロゲン活性の測定

ハロフェノール類およびフェノールを高速液体クロマトグラフィー（島津製作所製 LC-10ADvp）により定量した。カラムは TSKgel ODS-100z（東ソー）、移動相組成はメタノール：水：酢酸（65:35:0.1）、検出器は UV 検出器を使用した。

一方、クロロエテン類、エテン、およびハロメタン類をガスクロマトグラフィー（アジレント製 7890A）により行った。カラムは DB-624、検出は Flame ionization detector を使用した。

(6) 南海トラフ脱ハロゲン集積物の微生物群集構造解析

脱ハロゲン活性が測定された培養物から、Freezer mill による細胞破砕および TRIzol により RNA を抽出した。細菌の 16S rRNA 遺伝子を RT-PCR により増幅し、クローン解析を行った。プライマーとして、B27F-U1490R を使用した。また、RT-PCR には SuperScriptIII (Invitrogen) を用いた。得られた増幅産物を pCR2.1 ベクターにクローニングし、シーケンス解析を行った。配列情報の解析は (3) と同様に FastGroupII により分類 (>97% identity) した後、BlastN および Ribosomal database project (RDP) Classifier により解析した。

4. 研究成果

(1) 世界各地の海洋堆積物試料における RDH 遺伝子の有無

RDH 遺伝子の増幅バンドは、東太平洋赤道域 (3.2, 46.7 mbsf)、ペルー沖 (0.3, 16.6 mbsf)、ファンデフカ海盆 (2.5 mbsf)、下北半島沖 (1.0, 13.5, 78.5, 191.5, 216.8, 358.6 mbsf)、南海トラフ (1.9, 9.2, 20.2, 66.6 mbsf) に検出された。これらのうち、東太平洋赤道域 (3.2, 46.7 mbsf)、ペルー沖 (0.3 mbsf)、および下北半島沖 (1.03, 13.52, 216.77 mbsf) の増幅産物のクローン解析を行った。92 クローンをシーケンス解析した結果、32 種類の RDH 遺伝子が検出された。これらの RDH はすべて既報の還元的デハロゲナーゼおよび RDH 遺伝子発現産物とは高い相同性をもたない新規なものであった (33.06% から 64.27%)。系統解析の結果、いずれも *Desulfitobacterium* 属細菌、*Dehalobacter* 属細菌、および *Sulfurospirillum* 属細菌のもつ RDH 遺伝子よりも *Dehalococcoides* 属細菌のもつ RDH 遺伝子に近縁であった (図 1)。これは、検出された RDH 遺伝子が、すべて *Dehalococcoides* のもつ RDH 遺伝子を基に設計された縮重プライマー (RRF2 および B1R) により増幅されたことによると考察した。

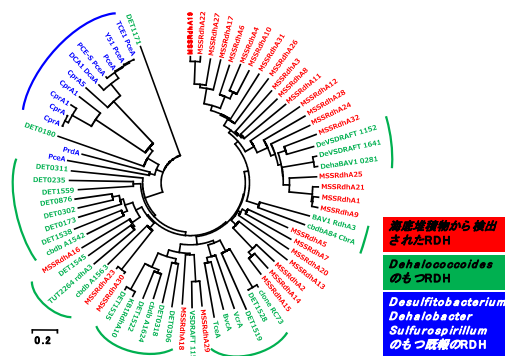


図 1. 海洋堆積物試料に検出された RDH の系統樹

以上より、世界各地の海洋コアに多様な RDH 遺伝子が分布していることが明らかとなり、海底下（太平洋域）に RDH 遺伝子をもつ脱ハロゲン呼吸細菌が広く存在している可能性が示された。また、16S rRNA 遺伝子の解析により、海底下堆積物試料中には *Chloroflexi* が高頻度で検出されることが報告されている。したがって、これらの海底下の *Chloroflexi* の中に陸域で報告されている *Dehalococcoides* と同様に RDH 遺伝子をゲノム上に保持し、脱ハロゲン呼吸代謝を行うものが存在する可能性があるかと仮説を立てた。

(2) 南海トラフにおける脱ハロゲン活性の測定

IODP Expedition 315, 316 によって採取された南海トラフの海底堆積物試料 (Site C0001, C0002, C0004, C0006, C0007, C0008) における脱ハロゲン活性を測定した (テーブル 1)。まず、表層から深部にわたるコア試料を Site 毎に混合し、各種の有機ハロゲン化合物に対する活性を測定した。その結果、前弧海盆に位置する Site C0001 および Site C0002 において 2,4,6-トリプロモフェノール (2,4,6-TBP) と 2,4,6-トリヨードフェノールがフェノールへ脱ハロゲン化された。2,4,6-TBP は、2,4-ジプロモフェノール、4-プロモフェノールを経てフェノールへと脱臭素化された (図 2)。加えて、Site C0002 ではトリクロロエテンが *cis*-ジクロロエテンへ脱塩素化された。

次に、Site C0002 の各深度 (1.9, 4.7, 9.2, 13.4, 20.2, 30.0, 66.6, 155.4 mbsf) 毎に 2,4,6-TBP に対する脱ハロゲン活性を測定した。その結果、表層 (1.9, 4.7 mbsf) において脱ハロゲン化反応が生じたが、培養 200 日間において、その他の深部コア試料に活性は認められなかった。一方、脱ハロゲン呼吸の機能遺伝子である還元的デハロゲナーゼ遺伝子は、Site C0002 の表層 (1.9 mbsf) だけでなく 9.2, 20.2, 66.6 mbsf においても縮重 PCR (プライマー RRF2-B1R を使用) によ

り検出された。したがって、海底堆積物中に脱ハロゲン呼吸細菌が存在することが示唆されたが、深部環境における実際の代謝活性についてはさらなる解析が必要である。また、脱ハロゲン活性は、分析した計 6 Site のうち、前弧海盆に位置する Site C0001 および C0002 のみに見られた。このことから、微生物の代謝活性は、陸域より供給される物質に影響を受けている可能性があると考えた。

テーブル 1 脱ハロゲン活性の測定に用いた南海トラフのサンプルリスト

サンプリング場所 site and hole (Expedition name)	水深 (m)	コアセクション	堆積物深度 (mbsf)
Site C0001 Hole C0001E (IODP expedition 315)	2198.0	1H-2	0.7
		2H-2	6.1
		2H-6	10.8
		4H-5	28.1
		6H-7	50.3
		8H-6	66.3
		10H-2	82.0
Site C0002 Hole C0002D (IODP expedition 315)	1937.1	12H-3	102.2
		1H-3	1.9
		1H-6	4.7
		2H-4	9.2
		2H-8	13.4
		3H-5	20.2
		4H-5	30.0
Site C0004 Hole C0004C (IODP expedition 316)	2627.0	6H-3	66.6
		8H-3	86.6
		16H-4	155.4
		1H-1	0.5
		1H-4	4.0
		2H-4	10.4
		3H-4	19.7
Site C0006 Hole C0006C (IODP expedition 316)	3880.5	5H-2	36.6
		7H-3	57.7
		9H-2	75.0
		11H-1	86.3
		1H-1	0.7
		1H-5	4.7
		1H-4	3.8
Site C0007 Hole C0007A (IODP expedition 316)	4081.0	1H-3	2.3
		1H-1	4.3
		1H-5	8.2
		1H-3	15.0
		3H-1	30.2
		16H-1	148.8
		Site C0008 Hole C0008B (IODP expedition 316)	2797.0
1H-7	7.3		
1H-4	3.1		
2H-3	7.5		
2H-5	9.7		
3H-2	16.6		
5H-3	36.5		
13H-6	93.7		

菌そう解析の結果、脱ハロゲン活性を示した試料において Desulfomonadales が優先していることが明らかになり、Chlofoxlexi は検出されなかった。これは、海底下の脱ハロゲン反応に RDH 遺伝子をもつ *Dehalococcoides* like organisms が関与するという上述の仮説を支持しない結果であり、海底下の脱ハロゲン反応と *Dehalococcoides* like organisms との関連はより詳細な解析が必要である。

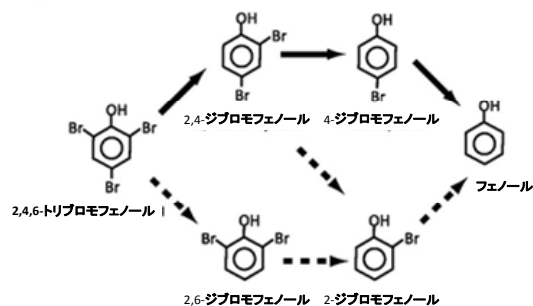


図 2 南海トラフ堆積物試料における 2, 4, 6-ブロモフェノールの脱臭素化経路

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) Futagami T, Morono Y, Terada T, Kaksonen AH, Inagaki F. Dehalogenation activities and distribution of reductive dehalogenase homologous genes in marine subsurface sediments. *Appl Environ Microbiol.* 査読有. 75:6905-6909 (2009).

[学会発表] (計 2 件)

1) Futagami T. Dehalogenation activity of subseafloor microbial communities in Nankai Trough sediments. International Scientific Seminar: Understanding and application of organohalide respiration: from genomes to structures. Kavli Royal Society Centre, UK 4-5th July 2011.

2) 二神泰基、諸野祐樹、寺田武志、稲垣史生. 南海トラフ海底堆積物にみられる脱ハロゲン活性について. 第 25 回日本微生物生態学会. 2009 年 11 月. 広島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二神 泰基 (FUTAGAMI TAIKI)
九州大学・農学研究院・寄附講座教員
研究者番号：60512027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし