

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370005

研究課題名(和文) 環境オミクス手法による寒冷圏水界の微生物学的硫黄循環の解明

研究課題名(英文) Eco-omics analyse of microbial sulfur cycle in aquatic environments of cryosphere

研究代表者

福井 学 (Fukui, Manabu)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：60305414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：寒冷圏水界における微生物学的硫黄循環は、炭素及び窒素循環とも深く関連した生態系における重要なプロセスであるが、依然不明な点が多い。本研究は、環境から微生物由来のゲノム及びタンパク質を直接解析する環境オミクス手法により、微生物学的硫黄循環の潜在的な代謝経路および活性を網羅的に解明することを目的とした。地理的に異なる淡水湖沼を調査した結果、新属の硫黄酸化細菌 *Sulfuricella denitrificans* が硫黄代謝に鍵となる主であることが判明し、ゲノム解析からその代謝経路を明らかにした。さらに同菌種において低温環境特有のタンパク質発現パターンもプロテオーム解析から明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Microbial sulfur cycle in aquatic systems of cryosphere is still unclear although the significance of systems linking carbon and nitrogen cycles has been pointed out. Analysis of *aprA* gene, which encodes a key enzyme in dissimilatory sulfate reduction and sulfur oxidation, showed that newly isolated *Sulfuricella denitrificans*-like sulfur oxidizer is a key species from geographically distant lakes in Antarctica and Japan. The complete genome sequence analysis indicated their unique sulfur metabolic pathway adapting freshwater environment. The proteomics results suggest that maintenance of proper translation is critical for growth under low-temperature.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生態・環境

キーワード：硫黄循環 メタゲノム プロテオミクス 硫酸還元 湖沼 硫黄酸化 機能遺伝子 群集構造

1. 研究開始当初の背景

硫黄は生体において乾重当たり約 1 % (w/w) 含まれているが、その存在状態は多様である。硫黄の酸化還元状態はマイナス 2 価 (例えば、硫化物) からプラス 6 価 (例えば、硫酸塩) まで広いレンジであり、生態系においても様々な状態で存在している。したがって、硫黄化合物からエネルギーを獲得できる微生物や硫黄化合物を電子受容体として利用できる微生物が自然界には存在する (左図: 水界の好気-嫌気境界層で見られる硫黄循環と微生物)。生命が誕生した頃の地球表面は、現在よりずっと温度が高く、80 °C を越えていたと考えられている。当時の地球において利用可能なエネルギー源は、水素や還元型硫化物 (硫化水素) 等の限られたものであり、それらの電子受容体は硫酸塩や硝酸塩であったと推定される。オーストラリア・ノースポールのバライト岩石中に含まれる硫化物の硫黄安定同位体比解析から、微生物学的硫酸還元 (電子供与体として水素を利用し、電子受容体として硫酸塩を硫化物に還元) は 34.7 億年前の地球ですで行われていたことが示されている (Shen et al., 2001, Nature)。このことは、高温環境下で硫化物の酸化のための電子受容体 (例えば、硝酸塩) が存在すれば、嫌気的な硫黄循環システムと微生物群集が成立していたことを示唆する。その後、ゆっくりと地球表面は温度が下がり、原始的な光合成 (酸素非発生型)、さらに酸素発生型光合成の出現により、有機物生産が爆発的に生じ、同時に還元的环境から酸化的環境へと移行した (Canfield et al., 2006, Phil. Trans. R. Soc. B)。申請者は、こうした水界の微生物学的硫黄循環システムの変遷過程を熱水環境や中温環境の比較から推定に成功した: 陸上温泉熱水系 (Nakagawa et al., 2002a, 2002b; Nakagawa & Fukui, 2003)、深海熱水系 (Nakagawa et al., 2004)、部分循環汽水湖 (Koizumi et al., 2004a, b; Koizumi et al., 2005)、淡水湖沼 (Koizumi et al., 2004c; Koizumi et al., 2006; Kojima et al., 2006; Kojima et al., 2007 など)。

しかし、地球上に現在する寒冷圏や極域などの低温環境下における微生物学的硫黄循環は十分解明されていない。これは、低温環境での微生物代謝が中温環境や高温環境に比べて遅いため解析が困難であることによる。しかし、寒冷圏水界における微生物学的硫黄循環は、炭素及び窒素循環とも深く関連しているため、生態系において重要なプロセスであり、地球温暖化に対して脆弱である。したがって、その解明は急務の課題であると言える。

2. 研究の目的

寒冷圏水界における微生物学的硫黄循環は、炭素及び窒素循環とも深く関連しており、生態系において重要なプロセスであり、地球温暖化に対して脆弱である。しかし、硫黄循

環は個々の素過程が複雑に絡み合っているため、従来の代謝測定法や微生物群集解析法では現場の物質代謝を解明することが困難である。そこで、本研究は、水界現場から微生物由来のゲノム及びタンパク質を直接解析する環境オミクス手法により、微生物学的硫黄循環の潜在的な代謝経路および活性を網羅的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

硫黄循環は個々の素過程が複雑に絡み合っているため、従来の代謝測定法や微生物群集解析法では現場の物質代謝を解明することが困難である。従来、微生物の生態解析にはスモールサブユニットリボソーム RNA (SSUrRNA) 遺伝子が用いられて来た。この遺伝子は、微生物の系統関係、特異的検出、および群集構造解析には有効であるが、生態系での機能を類推することが困難な場合が多い。それを克服するための最も有効な手段は、微生物が保有する機能遺伝子やタンパク質に着目することである。本研究では、硫黄循環システムにおける微生物の機能解析には、硫酸還元キーエンザイムである異化的亜硫酸還元酵素 (DSR) と硫黄酸化キーエンザイムである亜硫酸酸化酵素 (SOX) の構造タンパク質およびその遺伝子 (それぞれ、*dsrA*、*soxB*) を標的とする。以上のように、現場環境から微生物由来のゲノムやタンパク質を直接解析することを、本研究では「環境オミクス手法」(メタゲノミクスとメタプロテオミクスと組み合わせた解析法) と呼ぶこととする。環境中において、微生物が死滅しても微生物由来 DNA は分解され難いが、タンパク質は分解され易い傾向がある。微生物の機能発現の検出と言う観点からすれば、機能遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) を検出定量する方法が最も感度が高いが、mRNA の半減期が数十分であること、野外調査で mRNA を大量に採取し、分解を抑えて研究室に持ち帰ることは現実的ではない。したがって、現場の微生物代謝経路のポテンシャルをメタゲノミクスで、代謝活性をメタプロテオミクスで捉える手法は、今後有効な方法であると考えられる。

本研究では、中温淡水湖 (山梨県みずがき湖、滋賀県琵琶湖)、寒冷圏淡水湖 (北海道オコタンペ湖) 及び部分循環湖 (北海道春採湖)、そして、極地淡水湖 (丸湾大池、スカレン大池、親子池) 及び部分循環塩湖 (すりばち池) の嫌気-好気境界層から湖水を採取し、ゲノム及びタンパク質を抽出する。メタゲノム中の硫黄循環に関与する機能遺伝子の塩基配列を解析し、遺伝的多様性を解明する。タンパク質 (メタプロテオーム) を二次元電気泳動法及びリニアイオントラップ質量分析計により解析し、硫黄代謝酵素を解明する。従来法で得られた、SSUrRNA 情報に基づく微生物群集構造およびトレーサー法による微生物代謝活性の結果と合わせて、

「場のメタボリックマップ」を作成する。

4. 研究成果

(1) 寒冷圏淡水湖沼生態系は地球環境変動に対して脆弱であると考えられている。その脆弱性評価指標の一つとして、微生物学的硫黄循環プロセスに着目した。地理学的位置の異なる日本の3湖沼（北海道オコタンペ湖、山梨県みずがき湖、滋賀県琵琶湖）及び南極沿岸の4湖沼（スカーレン大池、丸湾大池、親子池、すりばち池）において、硫黄代謝基幹酵素アデノシン 5' ホスホ硫酸リダクターゼ（APS）をコードする遺伝子（*aprA*）をマーカーとして、硫黄代謝微生物の多様性を調べた（表1）。その結果、各淡水湖沼からベータプロテオバクテリアに属する硫黄酸化細菌 *Sulfuricella denitrificans* 様のクローンが共通して検出され、さらにいくつかの湖沼では硫黄酸化細菌群集において優占する結果が得られた（表2）。この結果は、*Sulfuricella denitrificans* に代表される硫黄酸化細菌の環境応答が生態系機能を評価する上で鍵となることを示している。今度、*Sulfuricella denitrificans* を鍵種として、環境応答性に関してタンパク質レベルでの機能発現及び代謝の可塑性を解明し、寒冷圏生態系機能を網羅的に評価するシステムの確立に資する。

湖	試料	遺伝子	湖水のパラメーター			
			水温 (°C)	Cl ⁻ (mM)	SO ₄ ²⁻ (mM)	DO (mg/l)
日本	塩川ダム湖 (部分循環湖) 水 (25 m)	<i>aprA dsrA</i>	4.8	1.2	0.12	0.5
	塩川ダム湖 (部分循環湖) 水 (35 m)	<i>aprA dsrA soxB sgr</i>	5.1	1.8	0.10	0.18
	塩川ダム湖 (部分循環湖) 水 (43 m)	<i>aprA dsrA soxB sgr</i>	5.4	1.9	0.09	0.11
南極	琵琶湖 堆積物 (0-2 cm)	<i>aprA</i>	8.1	0.29	0.10	3.3
	オコタンペ湖 堆積物 (0-1 cm)	<i>aprA</i>	7.4	0.06	0.42	9.7
	スカーレン大池 堆積物 (0-10 cm)	<i>aprA</i>	6	3.3	0.15	14
	親子池 堆積物 (0-5 cm)	<i>aprA</i>	7.4	4.8	0.23	4.4
	丸湾大池 堆積物 (0-2 cm)	<i>aprA</i>	4	0.05	0.01	b-

a 琵琶湖、オコタンペ湖、スカーレン大池、親子池、丸湾大池は底水のパラメーターを示す
b データなし

表1 調査した湖沼の概要及び物理化学的因子。

分類群	OTUs	クローン数							最近縁種	相関性 (%)
		琵琶湖	オコタンペ湖	スカーレン大池	親子池	丸湾大池 (0-2)	丸湾大池 (2-4)	合計		
<i>aprA</i> lineage II	OTU25	3	1	3	4	0	0	11	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	88-92
	OTU26	0	0	0	12	0	19	31	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	92-98
	OTU27	0	0	0	3	1	0	4	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	88-92
	OTU28	0	0	1	5	0	0	6	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	82-86
<i>aprA</i> lineage I	OTU29	2	0	3	1	0	0	6	<i>Thiodictyon</i> sp. f4	93-97
	OTU30	0	1	0	0	0	1	2	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i>	96-97
硫黄還元菌	OTU38	5	3	3	18	38	37	104	<i>Thiocapsa rosea</i>	87-94
	OTU40	0	0	0	0	9	0	9	<i>Thiobacillus thioparus</i>	91-97
不明	合計	21	25	21	37	4	1	109	<i>Thiobacillus plumbophilus</i>	79-81
不明	合計	25	8	23	19	0	5	80		
不明	合計	56	38	54	99	52	63	362		

* 91%以上の配列相関性を示したものを同一OTUとし、SOB由来のクローンを2つ以上含むOTUを表示した

表2 湖沼から直接抽出した核酸から得られた硫黄代謝基幹酵素遺伝子 *aprA* による硫黄代謝微生物の解析結果。

(2) 寒冷圏湖沼の硫黄循環プロセスに主要な役割を担う新規硫黄酸化細菌の単離に成

功し、3つ新属を提案した (Kojima and Fukui, 2010, 2011, 2014)。物質循環過程のより本質的な理解のため、多くの湖沼で検出されるにおける *Sulfuricella denitrificans* の完全長ゲノム配列の決定に成功した：全塩基長 3.1Mb、GC 含量 56.1%、CDS 数 2,982、rRNA オペロン数 2、tRNA 数 45。ゲノム配列情報から硫黄酸化関連遺伝子数を特定した (53)。その結果、*Sulfuricella denitrificans* の硫黄代謝経路の構築を行い、淡水環境に特異的な経路を見いだした。さらにタンパク質（実際の現場で発現されている機能）の網羅的な解析を行い、*Sulfuricella denitrificans* において低温環境特有のタンパク質発現パターンも明らかにした (Watanabe, Kojima and Fukui, 2012) (図1)。

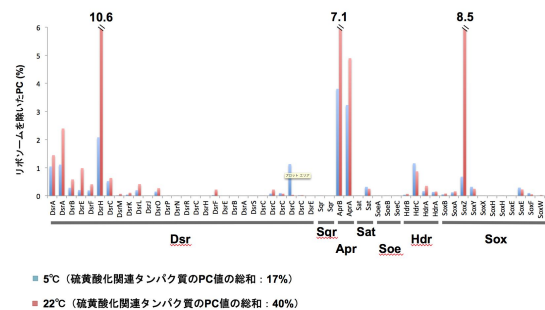


図1 異なる培養温度における *Sulfuricella denitrificans* の硫黄代謝関連タンパク質の発現変動

(3) 寒冷圏湖沼であるオコタンペ湖（北海道）堆積物において硫黄循環に主要な役割を担っている硝酸蓄積型硫黄酸化細菌 *Thioplaca* に関して、環境試料から直接抽出した DNA を基にメタゲノム解析を行ったところ、完全長ゲノム配列の構築に成功した。その機能解析を行ったところ、炭素、窒素及び硫黄代謝に関する経路及び遺伝子の同定に成功し、それらの遺伝子発現をメタプロテオーム解析により確認できた。以上の結果を基に、モデルとしての寒冷圏湖沼生態系の硫黄循環に関する「場のメタボリックマップ」のプロトタイプを提案するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計24件)

Kyoko Kubo, Hisaya Kojima, and Manabu Fukui. Vertical distribution of major sulfate-reducing bacteria in a eutrophic shallow meromictic lake. *Systematic and*

Applied Microbiology .: in press. 査読有

Tomohiro Watanabe, Hisaya Kojima, Yoshinori Takano and Manabu Fukui. Diversity of sulfur-cycle prokaryotes in freshwater lake sediments investigated using aprA as functional marker gene. *Systematic and Applied Microbiology* **36**: 436-443.2013. 査読有、doi: 10.1099/ijs.0.051854-0

Miho Watanabe, Hisaya Kojima and Manabu Fukui. *Desulfotomaculum intricatum* sp. nov., a sulfate-reducer isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 3574-3578. 2013. 査読有、doi: 10.1099/ijs.0.051854-0

Takato Matsui, Hisaya Kojima, and Manabu Fukui. Effects of temperature on successive anaerobic decomposition of high-molecular organic matter under sulfate-reducing conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **119**: 139-144. 2013. 査読有、doi.org/10.1016/j.ecss.2013.01.003

Yuriko Higashioka, Hisaya Kojima, Miho Watanabe and Manabu Fukui. *Desulfatitalea tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from tidal flat sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63** : 761-765. 2013. 査読有、doi:10.1099/ijs.0.043356-0

Tomohiro Watanabe, Hisaya Kojima, and Manabu Fukui. Draft genome sequence of a psychrotolerant sulfur-oxidizing bacterium *Sulfuricella denitrificans* skB26 and proteomic insights into cold adaptation. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6545-6549. 2012. 査読有、doi:10.1128/AEM.01349-12

Fumiko Nemoto, Hisaya Kojima, Akifumi Ohtaka and Manabu Fukui. Filamentous sulfur-oxidizing bacteria of the genus *Thioploca* from Lake Tonle Sap in Cambodia. *Aquatic Microbial Ecology* **66**: 295-300. 2012. 査読有、doi:10.3354/ame01578

Fumiko Nemoto, Hisaya Kojima, and Manabu Fukui. Diversity of freshwater *Thioploca* species and their specific association with filamentous bacteria of the phylum *Chloroflexi*. *Microbial Ecology* **62** : 753-764.2011. 査読有、doi:10.1007/s00248-011-9916-6

Yuriko Higashioka, Hisaya Kojima and Manabu Fukui. Temperature-dependent differences in community structure of bacteria involved in degradation of petroleum hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Journal of Applied and Microbiology* **110**: 314-322. 2011. 査読有、doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04886.x

Hisaya Kojima, and Manabu Fukui. *Sulfuricella denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing autotroph isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**:2862-2866. 2010. 査読有、doi:10.1099/ijs.0.016980-0

〔学会発表〕(計25件)

福井 学. 水界の硫黄循環システムと微生物群集. 日本進化学会第15回大会. 2013年8月30日. 茨城県つくば市(筑波大学)

福井 学. 脱窒とカップリングした嫌氣的メタン酸化. 日本微生物生態学会第28回大会.2012年9月21日.愛知県豊橋市(豊橋科学技術大学)

福井 学. 水界の硫黄循環システムと微生物群集. 地球惑星科学合同大会2012年度大会. 2012年5月24日. 千葉県船橋市(幕張メッセ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/micro-e-col/MicroEcol.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 学 (FUKUI, Manabu)
北海道大学・低温科学研究所・教授
研究者番号: 60305414

(2) 研究分担者

小島 久弥 (KOJIMA, Hisaya)
北海道大学・低温科学研究所・助教
研究者番号: 70400009