

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681044

研究課題名(和文) 陸域地下圏のメタンフラックスに關与する未知アーキア系統群の発見と新生物機能の解明

研究課題名(英文) Discovery of novel archaeal lineages and their ecophysiological functions in terrestrial subsurface environment

研究代表者

玉木 秀幸 (Tamaki, Hideyuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：00421842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000円、(間接経費) 6,360,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、陸域地下圏環境に棲息する未知・未培養アーキア群とその周辺微生物の実態を明らかにし、メタンフラックス等の重要な生物地球化学プロセスに果たす未知微生物群の役割の解明を目的とした。特に、次世代シーケンス解析技術を最大限活用しながら、氷河堆積物、地下湧熱水環境、油ガス田環境等の陸域地下圏環境から門や綱レベルで未知のアーキア系統群や門レベルの未知細菌系統群を発見した。さらに、陸域地下圏環境試料を対象にシングルセルゲノム解析を実施し、一部の未知微生物群についてゲノム断片の獲得に至った。また、いくつかの未知アーキアについては集積培養化ならびに純粋培養化に至り、生理生態機能を解明した。

研究成果の概要(英文)：This study investigated phylogeny and ecophysiological functions of uncultured archaea and their related bacteria likely contributing to biogeochemical processes in terrestrial subsurface environments by polyphasic approaches including geochemical, microbiological and the advanced molecular ecological approaches. In particular, the present study discovered unidentified phylum or class level lineages in the domain Archaea in terrestrial subsurface environments such as glacial till, deep high temperature groundwater, deep oil & natural gas fields, etc. Single cell genome analysis provided genome fragments of some of the uncultured archaea and bacteria found in the terrestrial subsurface environments. Furthermore, we have succeeded in obtaining enrichment culture and pure culture of uncultured archaea from terrestrial subsurface environments and characterized their phylogenetic and ecophysiological functions.

研究分野：ゲノム生物学

科研費の分科・細目：応用ゲノム科学

キーワード：アーキア 未知微生物 環境ゲノム 培養 次世代シーケンス 陸域地下圏 メタン生成

1. 研究開始当初の背景

近年、地下圏環境において膨大かつ多様な微生物の存在が明らかにされてきている。その数は地球上の全微生物の 90% を占めるとも言われており (Whitman et al., PNAS 95: 6578-6583 (1998))、地下微生物が地球規模の重要な物質循環プロセス (メタンフラックス等) に大きく関与している可能性が示唆されている。こうした地下微生物の実体とその役割を明らかにするため、地球科学的研究に加え、微生物学的、分子生態学的解析が行われてきているが、陸上圏や海洋圏などに比べると報告例が圧倒的に少なく、地下微生物の多様性や機能、地球科学的役割については未だ十分に明らかにされていない。

中でもアーキアは、メタン生成・消費や硝化作用を司る生物群であり、地球科学的にも非常に重要であるが、そもそも純粋分離株の数がバクテリアに比べ圧倒的に少なく、ゲノム情報、生理・生態学的情報も限られており、地球上で最も未知な生物群であると言える。陸上・海洋圏では、アーキアの存在比はバクテリアに比べて非常に低いのが一般的であるが、近年、深部海底下において、アーキアが優占するいわゆるアーキアワールドが発見されるなど、地下圏におけるアーキアの重要性に高い関心が集まっている (Lipp et al., Nature 454: 991-994 (2008))。一方で、研究開始当初、海底下アーキアの機能はほとんど明らかにされておらず、さらに陸上地下圏においては、アーキアの存在比、多様性、生理生態学的情報は極めて限られていた。

2. 研究の目的

本提案では、国内外の陸域地下圏環境 (沖積層堆積物環境、氷河堆積物環境、深部油ガス田環境、地下湧熱水環境等) を対象とし、従来の地球化学的、微生物学的解析だけでなく、次世代シーケンサーを活用した新しい分子生態解析手法による複眼的アプローチにより、これまでにない解像度で、未知アーキア群の多様性と機能を明らかにし、陸域地下圏における地球生物化学プロセス (メタンフラックス等) に果たす役割の解明に資することを目的とした。特に、本研究では、陸域地下圏環境に存在する未知アーキア系統群ならびに未知細菌系統群を探索し、その未知機能の解明に注力して研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、国内外の多様な陸域の地下圏環境 (沖積層堆積物環境 (日本)、氷河堆積物環境 (米国)、地下湧熱水環境 (日本)、深部油ガス田環境 (日本)) からサンプルを採取、保存した。サンプルは、分子生態学的解析用と地化学分析用に分けて採取、保存した。

地化学分析については、現場において測定可能な試料の場合には、電気伝導度、酸化還元電位、溶存酸素量、pH 等を測定した。また適宜水質分析ならびにガス成分の分析を行うとともに、必要に応じて炭素安定同位体比、水素安定同位体比の測定を実施した。

採取したサンプルから DNA、RNA の同時抽出・精製を行うとともに、Illumina もしくは 454 を用いた次世代シーケンズ解析を実施し、地下圏微生物の網羅的な多様性解析を実施した。また必要に応じて、16S rRNA 遺伝子を対象としたサンガーシーケンズを行うとともに取得したほぼ全長の 16S rRNA 遺伝子配列情報をもとに分子系統学的解析を実施し、未知の微生物系統群を探索、同定した。

興味深い未知アーキア系統群やバクテリア系統群が見出された地下圏試料については、一部、米国エネルギー省の共同ゲノム研究所等の協力を得ながらシングルセルの分取、シングルセルからのゲノム増幅、ゲノム解読を実施した。

微生物学的解析では、各種地下圏試料中の微生物活性 (メタン生成、メタン酸化、硫酸還元等) について、培養法を用いて測定した。また興味深い未知アーキアや未知バクテリアを含む地下圏試料については、無酸素条件下での培養技術を駆使しながら、集積培養法を試みた。

4. 研究成果

(1) 陸域地下圏環境からの未知アーキア系統群の探索と機能推定

本研究では、まず、採取、保存した各地下圏環境から DNA ならびに RNA を抽出し、次世代シーケンズ解析ならびにサンガー法による塩基配列解読を併用して、多様な陸域地下圏環境において未知アーキア系統群ならびにその周辺微生物を探索し、それらの機能推定に関する研究を行った。その結果、関東の沖積層堆積物環境には、未知の嫌氣的メタン酸化アーキア系統群 ANME-1d が存在することを見出した。ANME-1d は、DNA ならびに RNA 解析の両方で高頻度に検出されていたこと、また実際にコアの垂直方向の嫌氣的メタン生成活性と ANME-1d のポピュレーションに関係性があることから、この未知アーキア系統群が沖積層堆積物環境で活きた状態で嫌氣的メタン酸化プロセスに関与している可能性が示唆された。

また米国の氷河堆積物環境試料を対象に、次世代シーケンズ解析ならびにサンガー法による塩基配列解析を実施したところ、アーキア群集の多様性が非常に高いことが明らかとなった。さらに、同環境から、門レベルあるいは綱レベルで未だ知られていない未知のアーキア系統群を複数発見した (GWM、GWM2、GWM3 等) (図 1)。これらのアーキア系統群は、DNA ならびに RNA 両方の解析で検出されたことから、氷河堆積物環境において、

活きた状態で存在し、重要な生物地球化学プロセスに関与している可能性が示唆された。また未知アーキアとともに門レベルの未培養細菌系統群である OP3 や JS1 も検出されており、未知微生物系統群が多様に存在している可能性が示唆された。

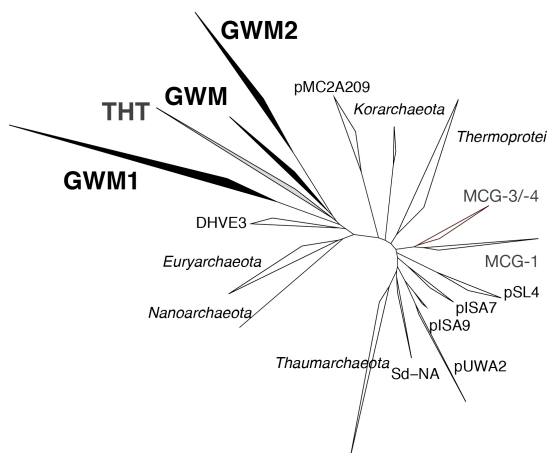


図 1. 16S rRNA 遺伝子に基づいたアーキアドメインの分子系統樹。陸域地下圏環境から見出された未知のアーキア系統群を黒で示した。

また関東甲信越地方の地下湧熱水環境を対象としたアーキアの多様性解析においても、門あるいは綱レベルの未知アーキア系統群を発見した。これらのアーキアは、マイナーポピュレーションではあるものの、単純硫黄泉に存在していることから、地下環境における硫黄循環に関与している可能性が示唆された。また同環境からは、*Chloroflexi* 門や *Actinobacteria* 門に属するが、綱や目レベルの未知細菌系統群も検出された。

また、東北地方の油ガス田環境を対象とした解析では、アーキア群集の多くはメタン生成アーキアであることが判明した。一方で、細菌群集については、門レベルの未知系統群が優占して存在していることが明らかとなった。この未知細菌系統群は、RNA ベースの解析でも検出されており、油田環境において同細菌系統群は活きた状態で存在し、メタンフラックス等の重要な物質循環プロセスに寄与している可能性が示唆された。

以上のように、陸域地下圏環境には非常に多様で未知のアーキアやバクテリアが存在していることが明らかとなった。そこで、これらのシングルセルを分取してゲノムを増幅し、シングルセルゲノムを獲得することを試みた。特に、氷河堆積物環境の試料は、細胞の分散状態が非常に良く、フローサイトメーターによりシングルセルのソーティングが容易であると考えられたため、氷河堆積物試料を対象に実施した。その結果、門レベルの未培養細菌系統群として知られる OP3 や JS1、また遺伝子レベルでも未知の門レベルのクラスターに属するシングルセルゲノムの獲得に成功した (図 2)。OP3 や JS1 についてはゲノム断片の解読を完了し、地下圏にお

ける代謝機能の一旦が明らかとなった。今後、他の陸域地下圏環境試料からもシングルセルゲノムを獲得・解読し、未知アーキアや未知バクテリアの生物機能を明らかにできれば、未だ知られざる未知アーキアとその周辺微生物の陸域地下圏における重要な生理生態機能が詳細に明らかになると考えられる。実際に、本研究において、地下湧熱水環境等からも未知微生物のシングルセルの分取に成功しており、一部、シングルセルゲノムの獲得・解読を進めており、これらのゲノム情報を今後の陸域地下圏アーキアの機能解明に役立ててゆきたい。

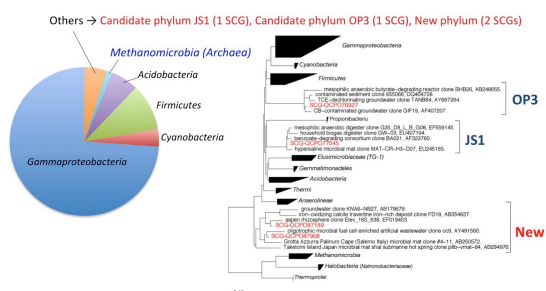


図 2. 氷河堆積物環境からのシングルセルゲノムの獲得。メタン生成アーキアや門レベルの未培養細菌系統群のゲノム断片の獲得に至った。

(2) 陸域地下圏環境に棲息する未知アーキアと未知バクテリアの集積培養化の試み

本研究では、未知アーキア系統群や未知バクテリア系統群が比較的高いポピュレーションで検出された陸域地下圏環境試料を対象に、それらの未知微生物の集積培養化を試みた。特に、陸域地下圏環境は酸素のほとんどない嫌気的環境であることから、無酸素環境下で液体培養を行うことで対象微生物の集積培養化を試みるとともに、新しい嫌気性微生物プレート培養法等を最大限活用しながら純粋分離を試みた。その結果、深部油ガス田環境からは、系統分類学的に新規なメタン生成アーキアの純粋分離に至り、新学名提案を行い、正式に認定された。また、純粋分離には至っていないものの、深部油ガス田から系統学的に極めて新規性の高く、脂肪酸分解に関与する嫌気性共生細菌群 (*Firmicutes* 門) や鉄還元に関与する未知細菌 (*Deferribacteres* 門) の集積培養化にも成功した。さらに、深部油ガス田を模擬した高温高压培養システム (50 MPa, 55°C) を構築し、実際に油ガス田試料を長期間 (2年間) にわたって継代培養したところ、現場環境と類似した微生物コミュニティを保ったまま集積培養することができた。この集積培養システムを用いる事で、今後、同コミュニティを構成する中核微生物群の未知機能の解明が大きく前進するものと考えられる。

さらに、本研究では、地下湧熱水環境から未知アーキアの集積培養化を試みた。その結果、*Crenarchaeota* 門に属するが、系統学的に新規性の高いアーキア (既知の

Archaeoglobus に 92-93% の遺伝子配列相同性を示した) をほぼ純粋に近い形で培養することができた (図 3)。また、このアーキアは従属栄養性の生物であることが示唆された。さらに、同じく地下湧熱水環境から、網もしくは目レベルで新しいアーキア系統群の集積培養化に至った。生育量は決して多くはなく、バクテリアも存在しているものの、安定して 5 回以上継代培養できており、現在も維持培養されている。これまでの検討結果において、この未知アーキアが芳香族系化合物の分解に関与する可能性が示唆されている。現在、この集積培養物についてもシングルセルの分取、ゲノム解読を進めており、今後、これらの未知アーキア系統群の代謝ポテンシャルの解明に役立つものと期待される。

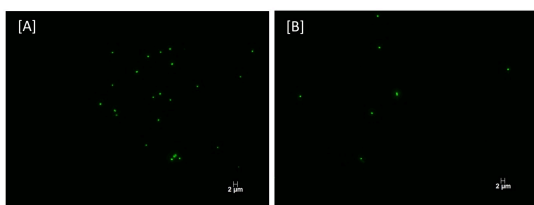


図 3. 集積培養に成功した未知アーキア. [A] *Archaeoglobus* に 92-93% の相同性を示す新規アーキア. [B] 網もしくは目レベルの未知アーキア.

以上のように、本研究では、沖積層堆積物環境、氷河堆積物環境、地下湧熱水環境、深部油ガス田環境等の陸域の地下圏環境を対象に、地化学的アプローチ、微生物学的アプローチ、分子生態学的アプローチを相互補完的に組み合わせながら研究を展開し、実際に、各地下圏環境から未知アーキア系統群を複数見出すとともに、検出された未知アーキアならびに周辺微生物群についてシングルセルゲノム情報を解読するとともに、集積培養化に成功するなど、重要な成果を挙げた。本研究で得られた知見と生物・ゲノム情報は、今後、陸域地下圏の未知アーキアの生理生態学的役割の解明に資するものであり、未知アーキア系統群が地球規模の物質循環プロセスにどのような貢献をしているかを解明する基盤になるものと期待される。特に、本件で得たメタゲノム情報、シングルセルゲノム情報を最大限活用して、最適な培養系をデザインし、未知微生物を培養して詳細な生理生態機能を明らかにするとともに、陸域地下圏環境における重要な物質循環プロセス (メタン生成、メタン酸化、原油やケロジェン等の根源有機物の分解等) に果たす役割の解明に役立ててゆきたい。

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 15 件)

- ① Nobu M, Narihiro T, Tamaki H, Qiu YL, Sekiguchi Y, Woyke T, Goodwin L, Davenport KW, Kamagata Y, Liu WT: The genome of *Syntrophorhabdus aromaticivorans* strain UI provides new insights for syntrophic aromatic compound metabolism and electron flow, *Environmental Microbiology*, 受理済、査読有
- ② Dong Y, Kumar CG, Chia N, Kim PJ, Miller PA, Price ND, Cann I, Flynn T, Sanford R, Krapac IG, Locke RA, Hong P, Tamaki H, Liu WT, Hernandez AG, Wright CL, Mikel MA, Walker JL, Sivaguru M, Fried G, Yannarell AC, Mackie R, Fouke BW: *Halomonas sulfidaeris*-dominated Communities Inhabit 1.8km-deep Saline Sandstone Reservoirs, *Environmental Microbiology*, 受理済、査読有
- ③ Takeuchi M, Katayama T, Yamagishi T, Hanada S, Tamaki H, Kamagata Y, Ohshima K, Hattori M, Marumo K, Nedachi M, Maeda H, Suwa Y, Sakata S: *Methyloceanibacter caenitepidi* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively methylotrophic bacterium isolated from marine sediments near the hydrothermal vent area, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 受理済、査読有
- ④ 鎌形洋一、玉木秀幸: 無酸素環境におけるメタンの生成と消費サイクル、生物の科学 遺伝、64: 586-590 (2013) 査読有
- ⑤ 玉木秀幸: 大量シーケンス情報解析時代の未知微生物探索、日本乳酸菌学会誌、24: 26-33 (2013) 査読有
- ⑥ 玉澤聡、玉木秀幸: メタゲノム解析により見出された温泉環境に優占する未培養巨大鎌状細菌の硫黄代謝、バイオサイエンスとインダストリー、71: 338-340 (2013) 査読有
- ⑦ Mayumi D, Dolfing J, Sakata S, Maeda H, Miyagawa Y, Ikarashi M, Tamaki H, Takeuchi M, Nakatsu CH, Kamagata Y: CO₂ concentration dictates alternative methanogenic pathways in oil reservoir, *Nature Communications*, 4:1998, doi: 10.1038 ncomms2998 (2013) 査読有
- ⑧ Iino T, Tamaki H, Tamazawa S, Ueno Y, Ohkuma M, Suzuki K, Igarashi Y, Haruta S: *Candidatus Methanogramum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*, *Microbes and Environ.*, 28: 244-250 (2013) 査読有
- ⑨ Katoh H, Tamaki H, Tokutake Y, Hanada S, Chohnan S: Identification of pantoate kinase and phosphopantothenate synthetase from *Methanospirillum hungatei*, *J. Bioscience Bioengineering*, 115: 372-376 (2013) 査読有

- ① Nobu M, Narihiro T, Tamaki H, Qiu YL, Sekiguchi Y, Woyke T, Goodwin L,

- 有
- ⑩ Nakamura K, Takahashi A, Mori C, Tamaki H, Mochimaru H, Nakamura K, Takamizawa K and Kamagata Y: *Methanothermobacter tenebrarum* sp. nov., a hydrogenotrophic thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field in Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63: 715-722 (2013) 査読有
 - ⑪ 玉木秀幸、鎌形洋一: 環境ゲノム情報時代の未知微生物探索研究、*化学と生物*, 50: 730-741 (2012) 査読有
 - ⑫ Tamazawa S, Takasaki K, Tamaki H, Kamagata Y, Hanada S: Metagenomic and Biochemical Characterizations of Sulfur Oxidation Metabolism in Uncultured Large Sausage-Shaped Bacterium in Hot Spring Microbial Mats, *PLoS One*, 7: e49794 (2012) 査読有
 - ⑬ Tamaki H, Wright CL, Li X, Lin Q, Hwang C, Wang S, Thimmapuram J, Kamagata Y & Liu WT: Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 Next-Generation Titanium Sequencing platform, *PLoS One* 6: e25263 (2011) 査読有
 - ⑭ Takeuchi M, Yoshioka H, Seo Y, Tanabe S, Tamaki H, Kamagata Y, Takahashi HA, Igari S, Mayumi D and Sakata M: A distinct freshwater-adapted subgroup of ANME-1 dominates active archaeal communities in terrestrial subsurfaces in Japan, *Environ. Microbiol.* 13: 3206-3218 (2011)
 - ⑮ Nakamura K, Tamaki H, Kang MS, Mochimaru H, Lee ST and Kamagata Y: A six well plate method: less laborious and effective method for cultivation of obligate anaerobic microorganisms, *Microbes Environ.* 26: 301-306 (2011)

[学会発表] (計 14 件) (招待講演 7 件)

- ① 玉木秀幸: 培養法で切拓く未知微生物の新機能、日本農芸化学会 2014 大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学 (東京都)、(招待講演)
- ② 玉木秀幸: 分離培養を通して見える複合微生物生態系の世界、第 44 回中部化学連合関係学協会支部連合秋季大会、2013 年 11 月 2 日、静岡大学 (静岡県)、(招待講演)
- ③ 玉木秀幸: 第三のドメイン「アーキア」: その世界的な研究動向と最新のトピック、第 29 回日本微生物生態学会、2013 年 11 月 25 日、鹿児島大学 (鹿児島県)、(招待講演)
- ④ 玉木秀幸: 環境オミックス情報解析時代の未知・未培養微生物の探索と資源化、日本微生物資源学会第 20 回大会、2013

年 6 月 28 日、つくば国際会議場 (茨城県)、(招待講演)

- ⑤ 玉木秀幸: 大量シーケンス情報解析時代の未知微生物探索、2012 年度日本乳酸菌学会秋期セミナー、2012 年 11 月 30 日、明治大学 (東京都)、(招待講演)
- ⑥ 玉木秀幸: Close Encounters of the Third Kind in Microbial Ecology、イリノイ大学環境土木工学科分子生態学セミナー、2012 年 11 月 9 日、イリノイ (米国) (招待講演)
- ⑦ 玉木秀幸: 第三種接近遭遇 -Close Encounters of the Third Kind in Microbial Ecology-、日本微生物生態学会第 28 回大会若手交流会 (招待講演)、2012 年 9 月 19 日、豊橋技術科学大学 (愛知県)
- ⑧ 持丸華子、眞弓大介、吉岡秀佳、坂田将、玉木秀幸、鎌形洋一: Diversity and activity of methanogenic microbial community in a high-temperature biodegraded oil field、日本微生物生態学会第 28 回大会、2012 年 9 月 20 日、豊橋技術科学大学 (愛知県)
- ⑨ 眞弓大介、坂田将、前田治男、宮川善洋、五十嵐雅之、玉木秀幸ほか: 高温高压培養で切拓く陸域地下微生物群集の未知機能、日本微生物生態学会第 28 回大会シンポジウム、2012 年 9 月 20 日、豊橋技術科学大学 (愛知県) (招待講演)
- ⑩ 持丸華子、吉岡秀佳、眞弓大介、坂田将、玉木秀幸、鎌形洋一: 深部地下油層環境における原油の生分解と生物的メタン生成、日本地球化学会、2012 年 9 月 11 日、九州大学 (福岡県)
- ⑪ 持丸華子、眞弓大介、吉岡秀佳、坂田将、玉木秀幸、鎌形洋一: Methanogenic diversity and activity in a high-temperature biodegraded oil field、14th International Society for Microbial Ecology、2012 年 8 月 21 日、コペンハーゲン (デンマーク)
- ⑫ 竹内美緒、吉岡秀佳、徐維那、田辺晋、玉木秀幸ほか: 関東平野の沖積層において新たに発見された陸域における微生物による嫌氣的メタン酸化活動、第 22 回環境地質学シンポジウム、2012 年 12 月 7 日、つくば市 (茨城県)
- ⑬ 吉岡秀佳、竹内美緒、田邊晋、高橋浩、玉木秀幸ほか: Microbial activities of methanogenesis and methane oxidation in terrestrial subsurface environment of the Kanto Plain in Japan、American Geophysical Union's 45th annual fall meeting、2012 年 12 月 7 日
- ⑭ 眞弓大介、坂田将、前田治男、五十嵐雅之、宮川善洋、玉木秀幸ほか: Impact of CO₂ geosequestration on the methanogenic ecosystem in a high temperature petroleum reservoir、8th International Symposium of Subsurface Microbiology、2011 年 9 月 11 日、Garmisch-Partenkirchen (ドイツ)

〔図書〕（計 1 件）

- ① 玉木秀幸：環境と微生物の辞典、朝倉出版（2014）

〔その他〕

- ① プレスリリース：CO₂ 地中貯留がもたらす地下微生物生態系への影響を解明
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2013/pr20130613/pr20130613.html、各種新聞報道がなされた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉木秀幸 (HIDEYUKI TAMAKI)

研究者番号：00421842