

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660058

研究課題名(和文) 岩石内微生物の探索とその生存戦略および環境中における役割の解明

研究課題名(英文) Clarification of microbes in the rocks and its survival strategy and the function in the environment

研究代表者

宮永 一彦 (Miyanaga, Kazuhiko)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40323810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な環境から岩石を採取し内部の微生物叢について解析することを目的としている。16S rRNA遺伝子配列を指標とした次世代シーケンス解析を用いた微生物叢解析により、岩石内にも一般的な土壌細菌が存在していることが明らかとなった。岩石内と土壌の大きな違いは、岩石内は土壌と比べて動植物由来の有機物濃度が非常に低いため、土壌細菌の中でも比較的貧栄養下で生存可能な細菌、あるいは独立栄養細菌などが岩石内の微生物叢において大きな役割を占めている、と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the microbes in the rocks located in the various environments were clarified. Based on 16S rRNA gene analysis by next-generation sequencer for microbial consortia, it was revealed that the general soil bacteria exist in the rocks. The big difference between the rock inside and the soil is the concentrations of organic matters derived from plants and animals is very low. Therefore, it is considered that the bacterial strains which can survive under the relatively poor nutrient condition and/or autotrophic bacteria might inhabit within the rock and play an important role among the microbial community in the rocks.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：微生物叢解析 16S rRNA遺伝子 次世代シーケンス解析 土壌細菌 放線菌

1. 研究開始当初の背景

“微生物は深海の熱水噴出孔などの高温環境，アルカリ環境，高塩濃度環境など様々な極限環境に存在することが知られているが，岩石の内部にも微生物がいるのだろうか？”という発想から，環境中の石を採取し，石内部の微生物の検出を行った。これまでに“熱アルカリ処理による污泥可溶性実験において，污泥中に強アルカリ，高温の処理 (pH13, 60)を行って溶菌せずに厳しい環境を耐え凌ぐ細菌の存在を確認している。石内部の微生物に関しても，このような“環境変化に強い微生物”が棲息しているかどうか興味深く，本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では，様々な環境から岩石を採取し，内部の微生物叢について解析することを目的としている。予備の実験により，石の表面ではなく石の内部に存在している微生物を培養工学的な手法および分子生物学的手法により検出した。土壌や砂礫の表面に付着している細菌については研究や報告がなされているが，石(もしくは細孔)内に棲息する微生物についてはほとんど明らかになっていない。これらは一種の極限環境微生物であり，それらを同定し生態や特性を解明することで，新規な機能を持つ微生物探索の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生菌由来の遺伝子解析手法の検討

まず，比較的微生物量の多い環境試料である生物学的排水処理プロセス中(図 1)の下水流入水，污泥，処理水等を用いて，生菌由来の 16S rRNA 遺伝子を解析する手法の検討を行った。

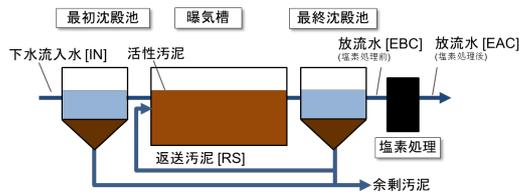


図 1 生物学的排水処理プロセス

死菌の細胞膜を選択的に透過し，死菌中の DNA に結合して不活化することで PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を阻害する薬剤であるエチジウムモノアジド (ethidium monoazide: EMA) (引用文献)，あるいは DNA を切断する酵素 (DNase I) を用いて，生菌の DNA のみを増幅することを試みた。DNase I は 0 (control)，10，50 U，EMA は 0 (control)，1，10，100 μg/mL の濃度になるようにそれぞれ調整した。DNase I 処理は，37℃，30 分間酵素反応を行い，反応終了後に 1 mg/mL Proteinase K を加えて 65℃，60 分間酵素反応を行い DNase I を不活化した。

前処理後の菌体サンプルを用いてビーズ

ピーティングによる菌体破碎およびフェノール-クロロホルム・エタノール沈殿法によりゲノムを抽出した。抽出したゲノムを鋳型として，SYBR-Green 法による定量 PCR (qPCR) には 341F/534R プライマーセット，次世代シーケンス解析には 27F/519R プライマーセットを用いてそれぞれ 16S rRNA 遺伝子の PCR を行った。得られた配列のデータは Trimmomatic (ver 0.36) によりトリミングした後，MacQIIME (ver.1.9.1) を用いて，アセンブル，キメラチェック (USEARCH ver.6.1) を行った。さらに，16S rRNA データベースを基に 97%以上の相同性を持つアセンブル配列を Operational Taxonomic Unit (OTU) として分類を行った。

(2) 単離菌体の同定

近年の DNA シーケンス技術の発展に伴い，培養を行わずに 16S rRNA 遺伝子配列を指標とした微生物叢解析が主流となっている。しかし，本解析では生菌・死菌の区別がつかないことや増殖を伴う評価が出来ないことなどの欠点もあるため，培養法による分離・同定も並行して行った。ある地域の岩石を無菌水に添加し 3 日間静置したものを R2A 寒天培地 (引用文献) (表 1) に塗布し，室温で 3 日間，好気培養を行った。

表 1 R2A 培地の組成

Component	Concentration [g/L]
Yeast Extract	0.5
Protease peptone No.3	0.5
Casamino acids	0.5
Glucose	0.5
Soluble starch	0.5
Sodium pyruvate	0.3
K ₂ HPO ₄	0.3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
Agar	15

形成されたコロニーを採取し 27F/1492R プライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った。さらに，得られた配列から，16S rRNA データベースによる菌種の同定を行った。

(3) 次世代シーケンサーによる菌叢解析

キャンパス内で採取した岩石の表面を 0.1% (w/v) SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液で洗浄した後，岩石を細かく粉砕した。それらを酵素処理法および陽イオン界面活性剤である CTAB (臭化セチルトリメチルアンモニウム) を用いた手法を用いて菌体よりゲノム DNA を抽出した。その後，MiSeq (Illumina 社) による菌叢解析を行うため，16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域をターゲットとした 2 段階の PCR を行った。1st PCR ではプライマー 341F と 805R を用いて，精製した DNA のターゲット領域を増幅した。

2nd PCR では、1st PCR 産物を鋳型として増幅した DNA の両末端にある共通配列に結合するサンプル識別用のプライマーを用いた。得られた PCR 産物を PCR 産物精製キット (QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN 社製) で精製後、DNA 濃度を NanoDrop™2000 および Quantus™ Fluorometer (Promega 社製) を用いて DNA 濃度測定を行った。調製後のサンプルは北海道システムサイエンス社へ委託し、Illumina MiSeq によるペアエンド法 300塩基読み取りによりシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生菌由来の遺伝子解析手法の検討

予備実験より、岩石内に微生物が存在することは明らかになっているが、河川水、土壌などの他の環境試料と比較してその絶対量は非常に少ない。そのため、最初に純粋菌2種類(大腸菌[グラム陰性菌]および黄色ブドウ球菌[グラム陽性菌])および複合微生物系の試料として都市下水処理場由来の活性汚泥を用いて 16S rRNA 遺伝子の定量 PCR をおこない、処理条件を検討した。その結果、DNase 処理は処理の有無によって 16S rRNA 遺伝子のコピー数に大きな違いが見られなかった。一方、0.1 mg/mL の EMA 処理において、EMA 処理有りの場合に処理水中の 16S rRNA 遺伝子のコピー数が EMA 処理無しの場合の 1/100 程度に減少したことにより、EMA が死菌の細胞膜を透過して死菌由来の 16S rRNA 遺伝子の PCR を阻害したものと考えられる。また、比較的微生物活性が高いと思われる汚泥に関しては、EMA の有無によらずほぼ同じ値を示した。これらの結果より、EMA 処理後に PCR 増幅された 16S rRNA 遺伝子は生菌由来であることが示唆された。しかし、EMA 自体も毒性を有するため、各試料によって EMA 濃度の最適化をする必要があることも明らかとなった。

また、排水処理プロセスの各試料に関して、EMA 処理あり/なしで微生物叢解析を行った。流入水および放流水で、菌叢の大きな変化が見られた(図 2)。特に塩素処理後の放流水[EAC]では、EMA 処理なしでは *Clostridia*,

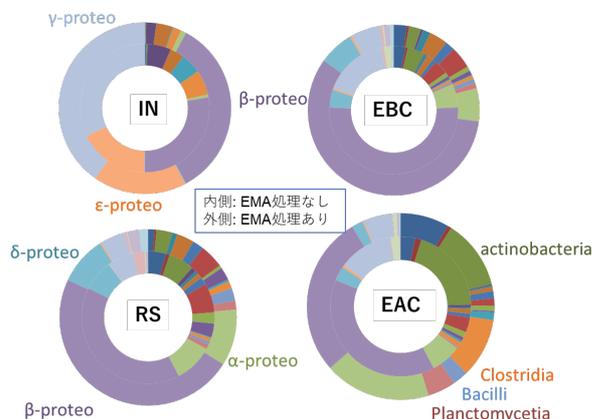


図 2 排水処理プロセスの各試料における微生物叢

Bacilli, *Planctomycetia* などの割合が非常に低かったにもかかわらず、EMA 処理ありでは 10%程度占めていた。この結果は、塩素処理による各微生物への影響の違いを反映していると考えられる。

特に、*Clostridia*, *Bacilli* などの *Firmicutes* 門の多くは芽胞を形成する能力を有しており、塩素処理における酸化ストレスから逃れることが可能であることが示唆された。更に、*Planctomycetia* は通常の細菌とは異なり、ペプチドグリカンを含まず、糖タンパク質より構成されており、細胞内に核膜様の構造を形成していることが知られており、これらが塩素の酸化力からゲノムを保護した可能性も考えられる。反対に、EMA 処理無しの場合、死菌のゲノムにもプライマーが結合することにより、これらの属の割合が相対的に低かったと思われる。また、下水流入水[IN]の菌叢は、他の試料と比較すると *-proteobacteria* や *-proteobacteria* の割合が多く、これらはそれぞれ腸内細菌叢を反映した結果であると考えられる。EMA 処理なしの場合、*Clostridia*, *Bacilli* が検出されていたのに対し、EMA 処理ありではその割合が非常に低かった。この理由として、嫌気的条件下である腸内で生存していたこれらの細菌が、下水中に放出され、好気的な環境に暴露されることにより、死滅あるいは物理化学的ストレスを受けたためであると考えられる。一方、微生物の活性が比較的高い汚泥においては、生菌の割合が比較的高いため、EMA 処理ありと処理なしの間で、菌叢の大きな違いは見られなかった。

(2) 単離菌体の同定

R2A 寒天培地上に形成させたコロニーをいくつか単離し、16S rRNA 遺伝子による同定を行った。その結果、*Rhodococcus corynebacterioides*, *Acinetobacter schindleri*, *Sphingomonas panni*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycooides* などが生存していた(図 3)。

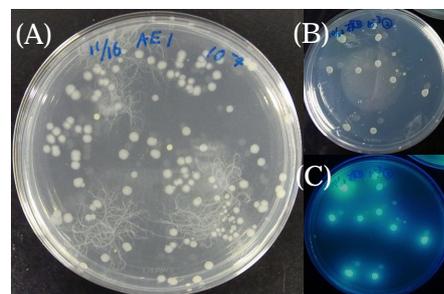


図 3 岩石中より単離した微生物: (A) *Bacillus mycooides*, (B),(C) *Pseudomonas fluorescens* (B) 白色光, (C): 紫外光[365 nm])

一部は、遺伝子解析手法で得られた優占種の属に入るものであった。さらに、*B. mycooides* はアンモニア細菌の一種であり、タンパク質や有機性窒素源からアンモニアを

生成することが可能であり、岩石内や岩石間の窒素循環に大きく関与していることが示唆された。また、*B. mycoides* は寒天培地上では非常に増殖が早く、さらに植物毛状根あるいは粘菌のように数多く分岐しながら増殖していく様子が観察された(図3(A))。集塊やフィルム形態では細孔を塞いでしまうため、これら分岐したものが岩石の細孔内全体に伸長しながら、他の細菌と共生しているものと思われる。さらに、*Pseudomonas fluorescens* は、その名が表すとおり、紫外光(365nm)照射下で蛍光を発していた(図3(B)(C))。*P. fluorescens* は過酸化物を水に変換するカタラーゼ陽性であり、これらの酵素によって、外界の酸化ストレスなどに耐性を示していると考えられる。

(3) 次世代シーケンサーによる菌叢解析

前述の通り、環境中の細菌叢における生菌のみを遺伝子解析する条件を検討した。しかしながら、処理に用いる試薬(EMA)自体も生菌率に影響する可能性があること、菌の活性が比較的高い試料では、処理の有無により菌叢に大きな差はみられないことが明らかとなった。岩石中は大きな環境変化もないため、その場に存在している微生物は数量的には僅かながらも、ほぼ全ての微生物は何らかのストレス耐性を有しながら生存しているものと考えられる。そのため、EMA処理をすることによる菌体への影響も考慮し、岩石中の微生物を対象とする場合、EMA処理をせずにゲノム抽出および16S rRNA遺伝子のPCRを行うこととした。

キャンパス内から採取した岩石内よりゲノムを抽出し、次世代シーケンサーによる16S rRNAメタゲノム解析を行った。図4に門レベル、科レベルでまとめた結果を示す。

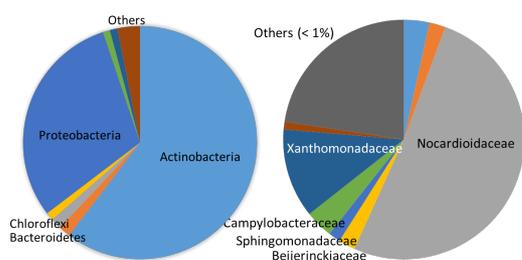


図4 岩石中の微生物叢(左:門, 右:科)

その結果、放線菌門(*Actinobacteria*)、プロテオバクテリア綱(主にキサントモナス属)、プロテオバクテリア綱(主にリゾビウム属、スフィンゴモナス属)がそれぞれ、54%、14%、9%存在していた。これらは、一般的な土壌細菌であった。培養法により単離した細菌の中には、最も優占していた放線菌門である*Rhodococcus corynebacterioides*もあり、これらは貧栄養などの劣悪な環境でも他の菌種と比べると比較的有利に生存することができると考えられる。*Rhodococcus*属(ノカルディア科[*Nocardiaceae*])はゲノム中の

GC含量が他と比べて高い(66%程度)ことが明らかとなっており、あらゆる環境で2本鎖DNAが安定して存在していることも一つの要因であると思われる。さらに、今回の期間では確認できなかったが、*Rhodococcus*属は広範囲の化合物を異化することも知られており、特に貧栄養の環境下である岩石内では、異化基質の種類が限られている他の細菌よりも有利に生存できることも大きな特徴であると言える。さらに*Sphingomonas*属は、細胞壁がリポ多糖ではなく、スフィンゴ脂質から構成されており、機械的かつ化学的にも安定であるため、有害な環境因子に対して細胞表面を保護する役目を有していると考えられている。そのため、これらの属も、他の微生物と比べて有利に生存していると思われる。

他にも、*Xanthomonas*属は大量の細胞外多糖(EPS)を産生する 경우가多く、自然環境中でバイオフィルムを形成することにより、有害な環境因子の影響を受けにくくなっていると思われる。

岩石内の微生物は、下水、汚泥、河川、土壌などの環境中の微生物と比べて、多様性はそれほど高くないものの、いくつかの特徴的な属種の微生物が存在していることが明らかとなった。それらは主に土壌に生存する土壌微生物であった。それぞれ、増殖形態、異化基質の多様性、細胞壁の組成、バイオフィルム形成、酸化ストレス耐性、など様々な因子により、他の微生物と比べて優先的に生存していることが示唆された。

岩石内と土壌の大きな違いは、岩石内は土壌と比べて動植物由来の有機物濃度が非常に低いこと、土壌細菌の中でも比較的貧栄養下で生存可能な細菌、あるいは独立栄養細菌などが岩石内の微生物叢において大きな役割を占めている、と考えられる。

さらに、土壌や砂礫に関わる微生物は固体表面に存在するのが主であると考えられるが、本研究により、岩石中にも微生物が存在していることが明らかとなった。これらは、一般的な土壌細菌に含まれる種であるが、岩石中ではそれぞれ独自の戦略により、棲息している可能性があることが示唆された。当初予定した、岩石の様々な環境(温度、汚染物質、含水率、海水淡水など)、岩石の種類による菌叢の比較までは達成できなかったが、今後の展開として、それらの因子が岩石内微生物にどのように関わっているかを調べることで、環境浄化やストレス耐性微生物の分離源の選定に有用な知見となることが期待される。

< 引用文献 >

P.B.Gedalanga and B.H.Olson. Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples. *Appl. Microbiol and Biotechnol.*, 82, 2009, 587-596.

D.J.Reasoner and E.E. Geldreich, A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol., 49(1),1985, 1-7.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

宮永 一彦, 斎藤 優樹, 丹治 保典,
ヨウ素酸化細菌が産生する分子状ヨウ素の
反応性, 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014
年 9 月 17 日, 九大(福岡・福岡)

K.Miyanaga, Y.Saito, Y.Tanji, Biocidal
mechanism of iodine by Iodide-Oxidizing
Bacteria (IOB) isolated from burin in
natural-gas related facilities, 2014 年 7
月 6 日 ~ 2014 年 7 月 10 日, Singapore
(Singapore)

宮永 一彦, 小林 七海, Hein Nandar,
丹治 保典, 生物学的排水処理プロセスにお
ける微生物叢解析, 化学工学会第 47 回秋季
大会, 2015 年 9 月 9 日, 北大(北海道・札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮永 一彦 (MIYANAGA Kazuhiko)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号: 40323810

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者 該当なし