

東日本大震災による津波打ち上げ海底堆積物の嫌気微生物分解機構
**Mechanisms underlying anaerobic biodegradation processes of marine sediments
deposited by the Great East Japan Earthquake**

青柳 智

《一章》 諸言

海底堆積物は沿岸部の養殖漁場の下や外界水との交換の乏しい閉鎖系の海域において蓄積しやすく、海域の貧酸素化や底泥中で生成される硫化水素が問題となっている。日本では、戦後の急速な工業化や養殖業の発展に伴って、有機性堆積物の蓄積が河口や沿岸域において報告され始めた。1960年代には田子の浦などで有機性排水を起源とする堆積物が船舶の航行を妨げるまで過度に蓄積された。この事象は魚介類の大量死や硫化水素ガスの発生を引き起こし、環境問題（公害）として認識された。その後、1970年には水質汚濁防止法により全国一律に適用される公共用水域への排水基準が定められ、これまでに堆積物の蓄積を防止する様々な対策が講じられてきている。堆積物の蓄積は富栄養化が進行した閉鎖系海域の問題として捉えられてきたが、2011年3月の東日本大震災に起因する大津波によって、海底堆積物が岩手県、宮城県、福島県、茨城県の太平洋沿岸の広範囲にわたって大量に打ち上げられた。このことから、河川水や生活排水、産業排水、養殖漁場での残餌や排泄物などに由来する有機汚濁物質の負荷が自然浄化能を超え、外洋に面する沿岸域においても大量の堆積物が分解されずに蓄積され続けたという衝撃的な事実が明るみとなった。堆積物の蓄積は周辺環境へ悪影響を及ぼし、水産業を盛んに営んでいる日本や諸外国において解決すべき普遍的かつ喫緊の課題である。

海底堆積物の蓄積には、微生物による呼吸（有機物分解・物質変換）が深く関わっている。微生物は有機物の酸化で生じる電子を最終電子受容体に渡すことでエネルギーを獲得し、生命活動を行っている。酸素を最終電子受容体とする微生物代謝を好気呼吸、無機物を利用する場合を嫌気呼吸と呼び、好気微生物と嫌気微生物がそれぞれを担う。また、電子受容体の還元はその酸化還元電位の高い順に進行し、好気環境では酸素が優先的に還元されるが、嫌気環境では、硝酸、鉄(III)、硫酸の順で還元され、これらが枯渇すると最終的にCO₂を還元するメタン生成が起こる。沿岸の底泥では、陸域や養殖漁場などに由来する有機物が底生生物や好気微生物によって分解される。これらの働きにより酸素が消費されると、海中に豊富に存在している硫酸を電子受容体とする硫酸還元菌の働きが活発となり、その還元反応により生成される硫化水素が周辺生態系へ悪影響を与えることが知られている。

過度に蓄積された海底堆積物の対策には浚渫や覆砂など土木工学的な方法が採用されることが多いが、浚渫土の処理、底質や流動環境の変化、それらによる水域生態系への負荷が問題となっている。近年では海底へ酸素を供給することで好気微生物を活性化させるなど、微生物を

利用した堆積物分解の研究がなされてきているが、曝気などによる堆積物の巻き上がりは水質汚濁を発生させ、水質の悪化によって生態系のバランスが崩壊（例えば、特定の生物が異常発生）し、再び貧酸素状態に陥る「負の連鎖」を引き起こす可能性がある。一方で、海底堆積物中には無酸素状態であり、嫌気微生物が堆積物の分解に重要な役割を担うと予想される。しかしながら、その分解機構のほとんどは不明である。

自然環境に存在する微生物を対象とした研究では長い間、培養法に基づいて分類と生理機能解析がなされてきた。しかし、環境中の微生物の多くが難培養性のため、それらがどれくらい多様で、どのような代謝機能を有しているのかを理解することは困難であった。これを克服すべく、特定の遺伝子を標的として、環境試料を解析する分子生物学的手法が発展されてきた。環境試料から核酸を直接抽出し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読することによって微生物群集の構成種を同定できる。DGGE（Denaturing gradient gel electrophoresis）や T-RFLP（Terminal-restriction fragment length polymorphism）法による解析は、微生物群集の全体像をバンドまたはピークパターンとして視覚的に捉えることを可能にした。近年登場した次世代シーケンサーは、高速かつ大規模に塩基配列を解読できる。これにより、一度に数千万種の微生物を同定するなど、DGGE や T-RFLP 等と比べて、多種多様な微生物群集を網羅的に捉え、環境中に非常に僅かな微生物を個々に検出することができるようになった。さらに、環境中の微生物の系統と機能を結びつける方法として、SIP（Stable isotope probing）が開発され、未培養微生物の代謝機能の解明に利用されている。海底堆積物の嫌気分解の全容解明において、こういった微生物が、どれくらい存在し、どのような役割を担っているのかを明らかにするために、上記の次世代シーケンサー解析や SIP などの分子生物学的手法が強力な手段となる。

東日本大震災の大津波は甚大な被害をもたらした一方で、打ち上げられた海底堆積物は沿岸管理法の再考を促すだけでなく、その嫌気分解機構を解析する貴重な研究試料である。本研究は宮城県東松島市の水田に打ち上げられた海底堆積物を対象にして、嫌気分解ポテンシャルの評価とその分解過程に関わる鍵微生物の同定を目的とした。本論文は六章から成り、本章では研究背景および目的を述べた後、二章では海底中に豊富に存在する硫酸と鉄(III)を電子受容体とした堆積物の嫌気分解性の評価を行った。次に、三章ではエネルギー順位のより高い電子受容体「硝酸」を添加した時の堆積物の変容とそれに関与する鍵微生物群を明らかにした。四章では、SIP と次世代シーケンサー解析の融合による環境微生物機能の超高感度同定法（超高感度 SIP 法）を開発した。続く五章では、超高感度 SIP 法の適用により、硝酸添加で引き起こされる堆積物の嫌気分解過程の詳細を解明した。最終章では、全体のまとめと海底堆積物の嫌気分解を促進する要素について考察と展望を述べた。

《二章》 硫酸還元・鉄還元条件における堆積物分解ポテンシャル評価

【目的】硫酸と鉄(III)は海底中に豊富に存在し、嫌気条件下における有機物分解の主要な電子受容体である。本章では、硫酸または酸化鉄（lepidocrocite）を海底堆積物に添加し、各種の化学分析と次世代シーケンサー解析によって堆積物の嫌気分解性を評価することを目的とした。

【方法】宮城県東松島市の水田土壌に打ち上げられた海底堆積物を試料とし、人工海水培地へ嫌氣的に懸濁した。硫酸または lepidocrocite を終濃度 20 mM で添加した後、25°C 暗所で培養した。培養 0、2、5 日にサンプリングを行い、系内の気相、液相、堆積物固相を化学分析に供した。また、堆積物から DNA と RNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的に微生物群集を次世代シーケンサーにより解析した。

【結果】硫酸、lepidocrocite 添加系どちらにおいても物理化学パラメータは大きく変化しなかった（図 2.1）。培養開始後すぐに気液平衡による CO₂ の発生がみられた。培養 5 日目において、硫酸濃度のわずかな減少（1.4–1.9 mM）が両添加系において観察された。一方で、鉄(II)濃度は培養期間を通じてどちらの添加系においてもほぼ一定であった。また、培養期間中に揮発性脂肪酸（VFA）は検出されず、TOC もほぼ一定濃度で検出された。堆積物中の微生物群集構造および代謝活性に大きな変化は見られなかった（図 2.2）。どちらの添加系も Deltaproteobacteria 綱に属する細菌群が微生物群集全体（DNA）の 30%以上、代謝活性画分（RNA）の 75%以上を占めた。この微生物群は Desulfobulbaceae 科細菌を主要とした硫酸還元菌で構成されていた。

【考察】硫酸および lepidocrocite を添加した堆積物では、硫酸還元が微弱に進行するものの、鉄(III)還元はほとんど起きなかった。どちらの添加系においても、硫酸還元菌として知られる Deltaproteobacteria 綱の細菌群が代謝活性を有する主要な微生物として検出された。これらの結果から、海底堆積物中では硫酸還元菌が主要構成種であるが、嫌気呼吸活性は低く、堆積物は安定状態となっていることが示された。

【結論】海底中に豊富に存在する硫酸と鉄(III)を電子受容体とした嫌気微生物による有機物分解は、堆積物中では非常に微弱であることが示された。

【関連論文】 T. Hori, M. Kimura, T. Aoyagi, R. R Navarro, A. Ogata, A. Sakoda, Y. Katayama, and M. Takasaki. “Biodegradation potential of organically enriched sediments under sulfate- and iron-reducing conditions as revealed by the 16S rRNA deep sequencing” *J Water Environ Technol.* 12(4):357-66. 2014

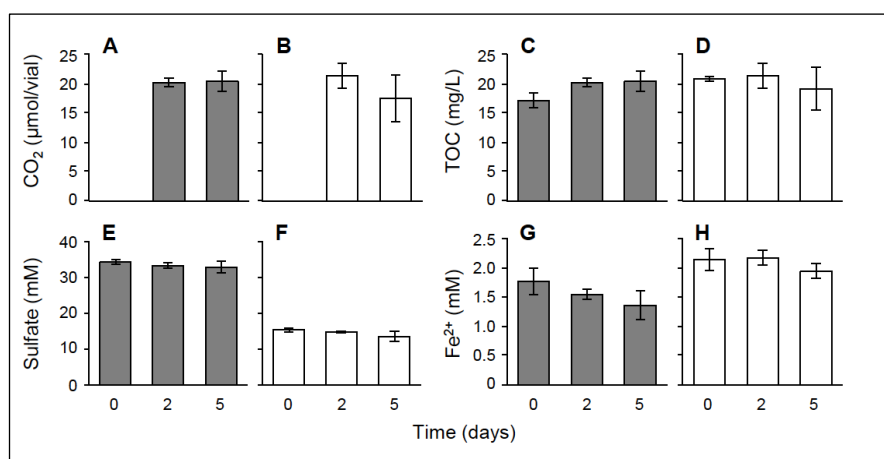


図 2.1 硫酸還元、鉄(III)還元条件における海底堆積物の物理化学パラメータ
 灰色のバーは硫酸添加系、白色のバーは lepidocrocite 添加系を示す。

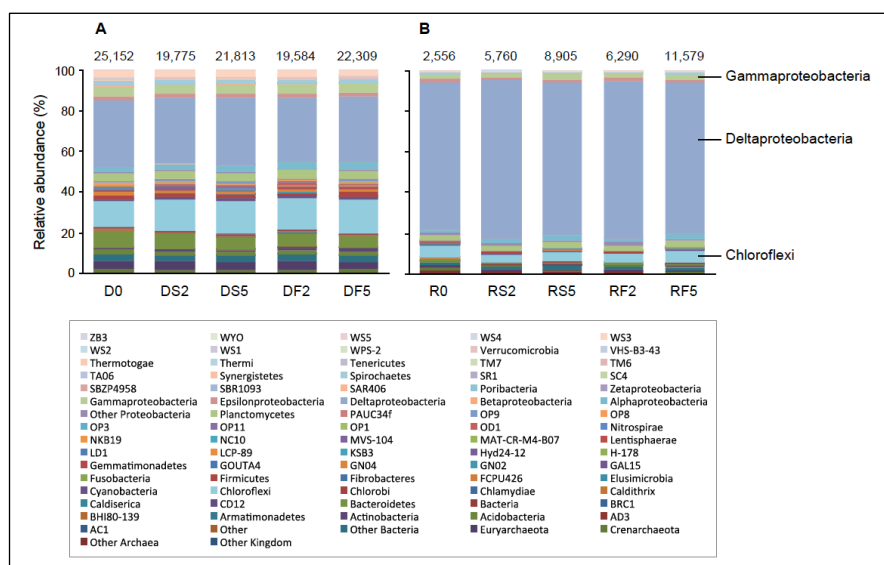


図 2.2 海底堆積物中の微生物群集構造と代謝活性
 A: 微生物の存在量 (DNA)、 B: 代謝活性 (RNA)
 バーの下にライブラリ名 (D0, R0 は培養 0 日目、DS2、DS5、RS2、RS5 は硫酸添加系の培養 2、5 日目、DF2、DF5、RF2、RF5 は lepidocrocite 添加系の培養 2、5 日目) をそれぞれ示す。バーの上には解析した配列数を示す。

《三章》硝酸還元条件における海底堆積物の変容と鍵微生物の同定

【目的】本章では、硫酸や鉄(III)よりエネルギー順位の高い電子受容体基質である硝酸を添加することで引き起こされる堆積物の変容を化学分析で明らかにすると共に、それに関与する微生物を次世代シーケンサー解析と分離培養により同定することを目的とした。

【方法】二章と同様に、海底堆積物を人工海水培地へ嫌氣的に懸濁した。硝酸を終濃度 20 mM で添加した後、25°C 暗所で培養した。なお、対照区として無添加系を用意した。培養 0、2、5 日にサンプリングを行い、系内の気相、液相、堆積物固相を化学分析に供した。この時、堆積物から DNA と RNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的に次世代シーケンサーにより解析した。さらに、硝酸添加によって優占化する微生物の分離培養を試みた。

【結果】培養 5 日間における硝酸添加系と無添加系では物理化学パラメータが大きく異なった（図 3.1）。気相において、硝酸添加系では培養 5 日目に N_2O が発生した。液相では、添加した硝酸が次第に減少し 5 日目には枯渇し、硫酸濃度が培養 5 日目に急上昇した。また、硝酸添加系の培養 5 日目には、堆積物の固相中に含まれる S 成分の有意な減少が観察された。これらの結果から硝酸を添加した堆積物系内では脱窒と硫酸化反応が起きていたことが示唆された。微生物群集解析の結果、硝酸添加系では堆積物中の構成微生物種が劇的に変化していた（図 3.2）。特に、Epsilon-と Gamma-proteobacteria 綱に属する細菌群は堆積物中の微生物群集のうち、培養 0 日目ではそれぞれ 2%と 5%の相対存在量であったが、培養 5 日目にはそれぞれ 44%と 17%にまで増加し、堆積物中で優占化した。より詳細に解析すると、Epsilonproteobacteria は *Sulfurimonas* 属細菌、Gammaproteobacteria は *Thioalkalispira* 属などの Chromatiales 目の細菌群で構成されていた。優占微生物の分離培養を試みた結果、*Sulfurimonas* 属と *Thioalkalispira* 属細菌の新規な 3 菌株（HDS01 株、HDNS4 株、HDS22 株）の分離培養に成功した（図 3.3）。硝酸添加系の培養 5 日目に最も優占化した新規な硫酸化菌である HDS01 株と HDS22 株は硫酸化と脱窒を行い、独立栄養的に生育することが生理機能試験により明らかとなった。また、硝酸添加系の培養 5 日目には、発酵性の細菌、鉄(III)還元菌、低級脂肪酸の共生酸化菌や酢酸資化性のメタン生成菌の代謝活性の上昇が観察された。

【考察】硝酸の添加は堆積物系内の硫酸化と脱窒反応を引き起こしたが、消費した硝酸濃度（17.7 mM）と生成した硫酸濃度（11.3 mM）の比は、硫化水素の酸化と脱窒との共役反応の化学量論と非常に近かった。本堆積物では、硫化物が硝酸還元と共役する電子供与体として利用されたと推察される。また、硝酸の添加によって堆積物では硫酸化細菌が劇的に優占化および代謝活性化した。その中でも最優占した *Sulfurimonas* sp. HDS01 株と *Thioalkalispira* sp. HDS22 株は硫酸化合物と硝酸によって独立栄養的に生育した。硝酸添加系では無添加系と比べて培養 5 日目の CO_2 濃度が低かった（図 3.1）ことをふまえると、これらの細菌群が直接的に堆積物内の硫酸化脱窒に関与し、 CO_2 固定により劇的に増殖していたことが明らかとなった。一方で、硝酸添加系の培養 5 日目には鉄(III)還元菌やメタン生成菌などの代謝活性化が観察された。硝酸の添加後、化学合成硫酸化細菌によって固定された炭素源が堆積物中に供給され、他の嫌気呼吸を行う微生物が電子供与体としてそれを利用したことが示唆された。これにより、堆積物中の微生物生態系が再編成をし始めている様子が示唆された。

【結論】硝酸の添加に誘発され、堆積物中にわずかに存在していた *Sulfurimonas* 属、Chromatiales 綱の細菌群が脱窒と硫酸酸化によって独立栄養的に急激に生育した。その後固定された炭素源が他の嫌気微生物群に供給されることで、海底堆積物の嫌気分解過程が進みつつある事が示唆された。

【関連論文】T. Aoyagi, M. Kimura, N. Yamada, R. R. Navarro, H. Itoh, A. Ogata, A. Sakoda, Y. Katayama, M. Takasaki, and T. Hori. “Dynamic transition of chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria in response to amendment with nitrate in deposited marine sediments” *Front in Microbiol.* 6:426.

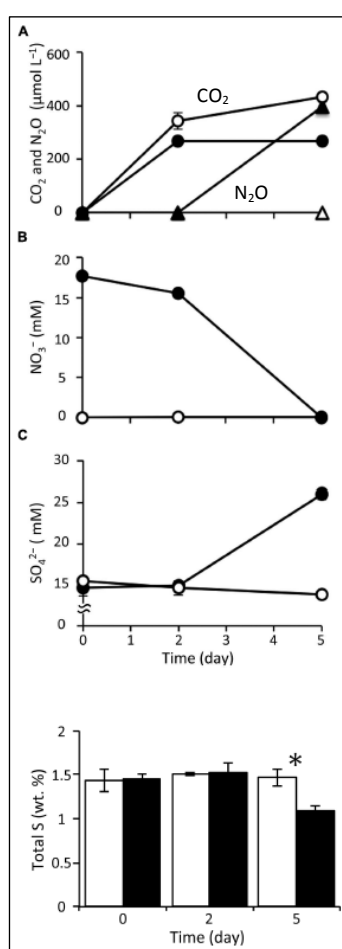


図 3.1 硝酸還元条件における海底堆積物の物理化学パラメータの変化
黒色のプロットおよびバーは硝酸添加系、白色のプロットおよびバーは無添加系を示す。アスタリスクは2つの培養系間の固相中の元素含有量の差が有意であることを示す (* : p<0.05)。

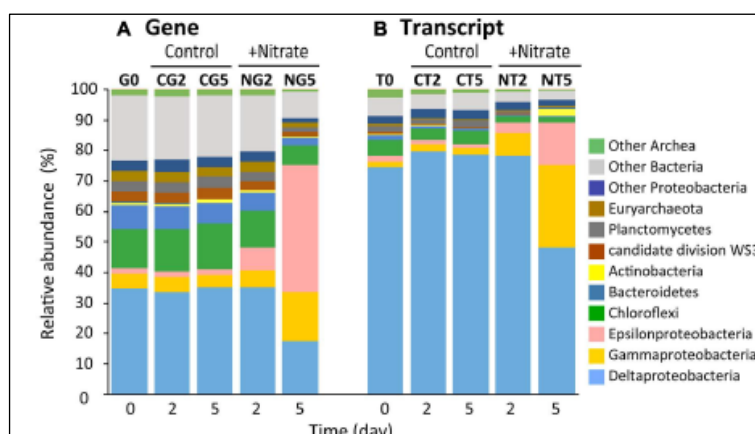


図 3.2 海底堆積物中の微生物群集構造と活性の変化

A : 微生物の存在量 (DNA)、 B : 代謝活性 (RNA)
バーの上にライブラリ名 (G0、T0 は培養 0 日目、NG2、NG5、NT2、NT5 は硝酸添加系の培養 2、5 日目、CG2、CG5、CT2、CT5 は無添加系の培養 2、5 日目) を示す。

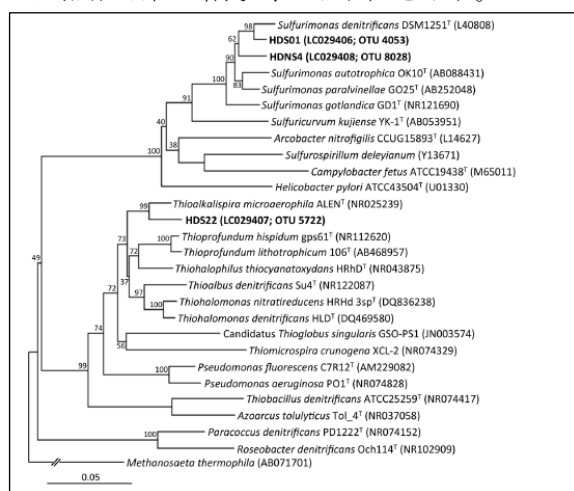


図 3.3 分離菌の系統学的位置

16S rRNA 遺伝子に基づいた Epsilon-および Gamma-proteobacteria 細菌の類縁関係を示す。太文字が本研究で得られた分離菌 HDS01 株、HDS22 株、HDNS4 株を示す。分岐した枝が近接しているものほど系統的に近縁である。枝に示されている数値は 1,000 回のブートストラップ計算に基づく系統関係の信頼性を表す。

《四章》 超高感度 Stable Isotope Probing の開発

【目的】 RNA-stable isotope probing (RNA-SIP) は、安定同位体基質で環境試料を培養した後、同位体標識された RNA を超遠心で分離して塩基配列を決定することにより、基質を取り込んだ微生物を同定する手法である。そのため標識 RNA のスクリーニングの解像度・感度は、rRNA-SIP における標識 RNA の検出に直接影響を及ぼす。次世代シーケンサーは僅かだが有意に標識された RNA の高感度検出に有効と考えられるが、検出感度の関係性は明らかにされていない。本章では、次世代シーケンサーの適用による RNA-SIP の高感度化を試み、従来法 (T-RFLP) と比較してどの程度まで rRNA-SIP の感度が増強され得るかを評価した。

【方法】 大腸菌に由来する完全に ^{13}C 標識された RNA を枯草菌に由来する非標識 RNA に 1%~0.0001%の割合で混合することにより、異なる ^{13}C -RNA 濃度を有する複数の標準試料を作成した。それらを超遠心に供し、各密度画分に含まれる rRNA を T-RFLP (従来法) およびイルミナシーケンスによりスクリーニングした。大腸菌の非標識 RNA を枯草菌の非標識 RNA と混合した非標識系も対照として用意し同様の実験に供した (概要を図 4.1 に示す)。

【結果・考察】 大腸菌の ^{13}C -RNA が 1%~0.5%含まれる条件では、大腸菌に由来する T-RF ピークが密度の上昇に伴って増大し、最高密度画分で主要となった (図 4.2)。 ^{13}C -RNA の 0.05%含有条件では大腸菌の T-RF ピークが最高密度画分で僅かに観察されたが、より複雑な微生物群集構造が想定される実環境試料の解析においてこのような僅かなピークを再現的に検出するのは難しい。一方、イルミナシーケンスでは ^{13}C -RNA を 0.05%~0.001%含む低混合率条件においても大腸菌に由来する RNA の有意な集積が最高密度画分で見出された (図 4.3)。また、この ^{13}C -RNA の超高感度検出は、大腸菌に特異的なプライマーを用いた定量 RT-PCR の解析結果によっても支持された。

【結論】 ^{13}C -RNA のスクリーニング法を T-RFLP からイルミナシーケンスへ置き換え大量の塩基配列を解読する事によって、rRNA-SIP の 500 倍の高感度化が達成された。この超高感度 rRNA-SIP 法は、存在量は極めて少ないが重要な反応を担う未知微生物なども含めた海底堆積物の嫌気分解過程の全容解明へ向けた強力な手法となる。

【関連論文】 (1) T. Aoyagi, S. Hanada, H. Itoh, Y. Sato, A. Ogata, M. W. Friedrich, Y. Kikuchi, and T. Hori. "Ultra-high-sensitivity stable-isotope probing of rRNA by high-throughput sequencing of isopycnic centrifugation gradients" *Environ Microbiol Rep.* 7, 282-287. 2015. (2) 青柳智、堀知行「未培養微生物の代謝機能を同定する超高感度 Stable isotope probing の開発」*バイオサイエンスとインダストリー*(B&I)、7, 225-227. 2015.

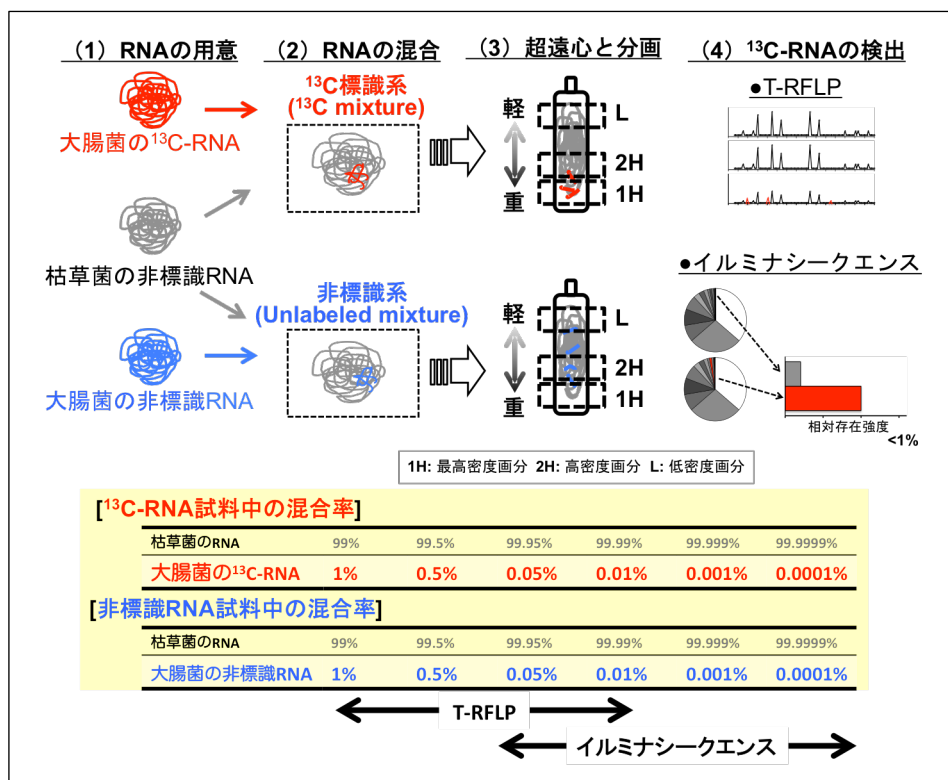


図 4.1 T-RFLP とイルミナシーケンスによる ^{13}C -RNA 検出感度評価の概要

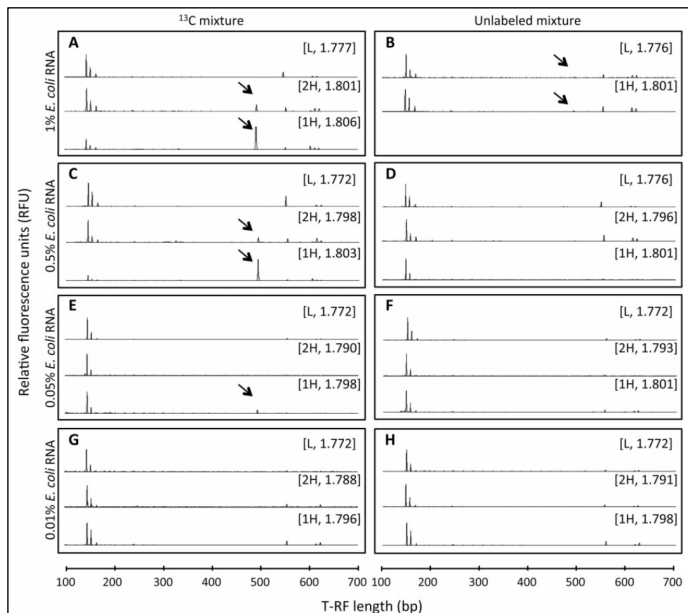


図 4.2 T-RFLP による ^{13}C -RNA の検出

1H: 最高密度画分、2H: 高密度画分、L: 低密度画分
矢印のピークは大腸菌由来、その他のピークは枯草菌由来の T-RF を示す。角括弧の中は[画分名、浮遊密度(g/ml)] をそれぞれ示す。

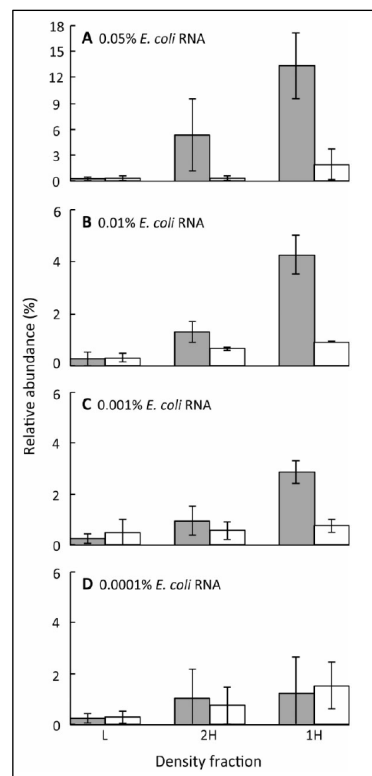


図 4.3 次世代シーケンサー解析による ^{13}C -RNA の検出
1H: 最高密度画分、2H: 高密度画分、L: 低密度画分
灰色のバーは ^{13}C 標識系の大腸菌 RNA、白色のバーは非標識系の大腸菌 RNA を示す。

《五章》堆積物分解過程における微生物間相互作用の解明

【目的】三章において、硝酸の添加によって堆積物の嫌気分解過程が進行し、微生物生態系の再構築が起り始めていることが示唆された。しかし、堆積物の嫌気分解過程においてどのような微生物間で電子供与体・炭素源の伝達が起っているのかは不明である。それらを明らかにするために、四章で開発した超高感度 SIP 法を海底堆積物試料に適用した。

(現在実験データ解析中)

《六章》総括

本研究の始まりは、東日本大震災の津波被害によって、外洋に面した沿岸域でも海底堆積物が過度に蓄積していることが判明し、これまでの人間活動がいかに自然環境に対して高負荷であったかを目の当たりにしたことである。堆積物の過度な蓄積による水産業や周辺生物生態系への悪影響が懸念されるため、海底堆積物の嫌気分解機構の解明は重要な課題である。津波によって打ち上げられた海底堆積物は、堆積物の表層から深層および太平洋沿岸域の底泥生態系を含んでいると考えられ、これまでその多くが不明であった堆積物分解機構を解明するための、実態を反映した貴重なモデル堆積物である。本研究ではこの堆積物を試料にして、エネルギー順位の異なる電子受容体を添加することで、堆積物が嫌氣的に分解されるのか、さらにその分解にどのような微生物が関与するのかを詳細に明らかにした。各種クロマトグラフ法、CHNS 元素分析法などの多様な化学分析によって、堆積物変容過程の物理化学的パラメータを継時的に追跡することに成功した。また、次世代シーケンサー解析により、培養 5 日という短期間の評価でも堆積物中の微生物群集の遷移と活性を高解像度で捉えることができた。さらに SIP と次世代シーケンサー解析の融合による超高感度な微生物機能同定法を適用することで、堆積物の嫌気分解過程における微生物間の炭素源伝達を詳細に解明することに成功した。

海底環境を模倣した硫酸と鉄(III)の添加条件では微生物還元活性は微弱で、堆積物は分解されずに安定状態であることが明らかとなった。その一方で、エネルギー順位の高い電子受容体である硝酸を添加すると、堆積物中にわずかに存在していた化学合成硫黄酸化細菌群が脱窒と硫黄酸化の共役反応を行い、得られたエネルギーによって堆積物中の CO_2 を固定して劇的に増殖した。さらに、その固定された CO_2 が他の嫌気呼吸を担う微生物群（鉄還元菌やメタン生成菌）の炭素源となり、硫黄酸化細菌を起点として堆積物中の微生物生態系の再構築と嫌気分解過程が進行し始めることが明らかとなった。また、底泥中に集積した硫化物が海底生態系を不安定化させ、それにより陸域や養殖漁場に由来する粗粒有機物などが分解されずに蓄積して難分解

性の海底堆積物が形成されている可能性がある。将来、海底堆積物の循環利用技術や蓄積防止策の確立のためには、堆積物に含まれる有機物成分とその分解についてより詳細に解明する必要がある。

環境基準は科学的知見に基づき人の健康や生活環境を維持するために十分なレベルで設定されている。具体的に水域では、有機物（TOC、BOD、COD）、浮遊物質（SS）、溶存酸素（DO）、pH、大腸菌群数等の基準値が定められており、全国の河川や海域における有機物指標の達成率は過去 20 年間 70%～90%を維持している。しかし、東日本大震災が明るみにした海底堆積物の過剰な蓄積は、これまでの沿岸域管理法は海底への堆積物の蓄積を制御不能であり、自然生態系が大量の堆積物により深刻な悪影響を受けてしまう可能性があることを示している。本研究により、堆積物分解を促進して自然の循環過程に乗せるためには、化学合成硫黄酸化菌の増殖を促進することが有効な解決策のひとつであることが示された。硝酸添加によって増殖する化学合成硫黄酸化菌は海底生態系の一次生産者として炭素源を供給し他の嫌気微生物を活性化しながら、堆積物中の硫化物を減少させる。こうした底泥環境の改善は難分解性有機物を分解する底生生物の回復を促すと期待される。本研究で得られた知見は、今もなお蓄積し続けていると推定される海底堆積物の原位置での効率的分解や循環利用に対して有益な科学的知見を与えるものである。