

化学合成硫黄酸化細菌を起点とする  
津波打上げ堆積物の嫌気分解機構

**Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria initiate anaerobic degradation  
processes in land-deposited sediments**

青柳 智

石巻専修大学 理工学研究科 論文博士 学位論文

平成 27 年 12 月 27 日

## 目次

一章 緒言	1
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の評価	
2.1 はじめに	5
2.2 材料と方法	5
2.2.1 堆積物試料	
2.2.2 堆積物の硫酸還元・鉄(III)還元ポテンシャル評価系	
2.2.3 堆積物の物理化学的分析	
2.2.4 核酸の抽出と polymerase chain reaction (PCR) および reverse transcription (RT)-PCR	
2.2.5 次世代シーケンスとデータ解析	
2.3 結果	8
2.3.1 堆積物の物理化学パラメータ	
2.3.2 堆積物の微生物群集構造と代謝活性微生物	
2.4 考察	10
2.5 まとめ	11
三章 硝酸還元条件における堆積物の嫌気分解とそれに関する微生物の系統解析	
3.1 はじめに	21
3.2 材料と方法	21
3.2.1 堆積物の硝酸還元ポテンシャル評価系	
3.2.2 堆積物の物理化学的分析	
3.2.3 堆積物からの抽出した DNA と RNA に基づく次世代シーケンサー解析	
3.2.4 優占微生物の分離培養と系統解析	
3.2.5 塩基配列データベースへの登録	
3.3 結果	23
3.3.1 堆積物の物理化学パラメータ	
3.3.2 堆積物の微生物群集構造と代謝活性種	
3.3.3 優占した硫黄酸化細菌とその化学合成無機栄養的な増殖	
3.4 考察	27
3.5 まとめ	30
四章 超高感度 Stable Isotope Probing の開発	
4.1 はじめに	49
4.2 材料と方法	50

4.2.1 RNA 標準溶液の準備	· · · · ·	52
4.2.2 RNA の混合と密度勾配超遠心	· · · · ·	
4.2.3 RT-PCR および T-RFLP 解析	· · · · ·	
4.2.4 RT-PCR および次世代シーケンサー解析	· · · · ·	
4.2.5 最高密度画分における定量 RT-PCR (qRT-PCR)	· · · · ·	
<b>4.3 結果および考察</b>	· · · · ·	<b>52</b>
4.3.1 T-RFLP による $^{13}\text{C}$ 標識 RNA の検出	· · · · ·	
4.3.2 次世代シーケンサー解析による $^{13}\text{C}$ 標識 RNA の高感度検出	· · · · ·	
4.3.3 定量 RT-PCR による高密度画分における $^{13}\text{C}$ -RNA の集積検出	· · · · ·	
<b>4.4 まとめ</b>	· · · · ·	<b>55</b>
<b>五章 堆積物の分解過程における微生物間相互作用の解明</b>	· · · · ·	
5.1 はじめに	· · · · ·	65
5.2 材料と方法	· · · · ·	65
5.2.1 堆積物の硝酸還元条件における $^{13}\text{C}$ -重炭酸塩トレーサー実験系	· · · · ·	
5.2.2 堆積物の物理化学的分析	· · · · ·	
5.2.3 堆積物からの DNA と RNA の抽出と定量	· · · · ·	
5.2.4 全 RNA を鋳型とする RT-PCR	· · · · ·	
5.2.5 RNA の密度勾配遠心と RNA 密度画分を鋳型とする RT-PCR	· · · · ·	
5.2.6 次世代シーケンスとデータ解析	· · · · ·	
5.3 結果	· · · · ·	67
5.3.1 堆積物の物理化学パラメータ	· · · · ·	
5.3.2 堆積物の微生物の増殖と代謝活性微生物	· · · · ·	
5.3.3 高密度画分 RNA の微生物群集構造	· · · · ·	
5.3.4 実験後期において代謝活性化された微生物	· · · · ·	
5.4 考察	· · · · ·	71
5.5 まとめ	· · · · ·	74
<b>六章 総括</b>	· · · · ·	<b>89</b>
<b>謝辞</b>	· · · · ·	<b>93</b>
<b>参考文献</b>	· · · · ·	<b>95</b>
<b>原著論文リスト</b>	· · · · ·	<b>106</b>
<b>博士論文要旨</b>	· · · · ·	<b>107</b>

## 《一章》緒言

地球の物質循環に重要な役割を担う微生物生態系の形成には、環境変化に対する微生物の応答と微生物同士の相互作用が深く関わっている。たとえば、温度、圧力、pH、NaCl濃度、電子受容体や電子供与体（栄養源）といった環境因子を人為的に変化させ、それに応答する微生物の系統を解析することで、複雑な微生物群集の中から物質循環・変換に中心的に関与する微生物が特定されてきた（1-5）。地殻中から大気圏に至るまで地球上のあらゆる環境に微生物は生息しているが、植物が一次生産者として支えるような酸素の存在する好気的な環境は地表面付近に限られ、地球のほとんどは酸素の欠乏した嫌気的な環境であり、このような嫌気環境における生態系は微生物を主体として形成されている。微生物のエネルギー獲得形式には基質レベルのリン酸化（発酵的代謝）または酸化的リン酸化（呼吸）がある。特に嫌気呼吸微生物は、有機物の酸化で生じる電子を酸素以外の最終電子受容体に渡すことでエネルギーを獲得している。電子受容体の還元は酸化還元電位の順位に従って連続的に進行し、嫌気環境ではまず  $\text{NO}_3^-$ 、次に  $\text{Fe(III)}$ 、更に  $\text{SO}_4^{2-}$  の順で微生物に利用され、これらが枯渇すると  $\text{CO}_2$  を還元するメタン生成が最終的に起こる。さらに、微生物の有機物（電子供与体）に対する利用性と親和性は、微生物が用いる電子受容体の種類と密接に関連しており、酸化還元電位の高い電子受容体を利用するエネルギー獲得量の大きい微生物ほど様々な有機物をより低い濃度域まで分解できる。嫌気環境では、このような電子受容体と電子供与体に対する応答性の違いにより、微生物群集の構成種が変遷していく。例えば、水田や海洋といった生態系において、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe(III)}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  などの電子受容体を添加し、嫌気代謝経路の変更に伴う微生物群集の遷移および代謝活性化を検出することで、主要元素（炭素、窒素、鉄、硫黄）の循環機構が解明されてきている（6-8）。しかしながら、ひとつの自然環境での構成種が数万種にものぼるとされる複雑な微生物生態系に対して、これまでの研究では数十種類の優占微生物や特定の機能を有する微生物の変遷のみを解析しており、環境変化に対する微生物群集の応答やその形成に関する詳細なメカニズムの解明は為されていない。

海底堆積物は沿岸域から外洋域に至るまで地球の海底全体に分布し、地形や周辺地域産業などの環境要因を反映した物性や粒度組成および微生物生態系を形成している。これまでに人間活動による影響を受けやすく環境変化の大きい閉鎖系沿岸域の海底（特に養殖漁場の下など）において堆積物の蓄積が世界中で報告されてきている（9-13）。その一方で 2011 年の東日本大震災に起因する大津波により東北地方太平洋沿岸の広範囲に大量の堆積物が打ち上げられたことから（14）、外洋に面した開放系沿岸域においても堆積物が蓄積され続けてきた事実が明るみとなった。通説として、沿岸域海底では陸域や養殖漁場の残餌などを由来と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、海水中に 20-30 mM の濃度で存在している  $\text{SO}_4^{2-}$  を電子受容体とする硫酸還元菌の有機物分解が活発となり、硫

酸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(15, 16)。海底堆積物は海水と接している上層部分を除いて嫌気状態であり(17)、上述した  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe}(\text{III})$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  を電子受容体としてエネルギーを獲得するような嫌気微生物が物質の変換や循環に重要な役割を担うと予想される。しかしながら、海底堆積物中の嫌気微生物による電子受容体還元活性の有無に代表される嫌気分解のポテンシャル、さらに還元活性を有する微生物種や微生物間の相互作用(代謝ネットワーク)など、海底堆積物の嫌気分解メカニズムについては未だ解明されていない。

自然環境に存在する微生物を対象とした研究では、1980年代まで分離培養法に基づいて微生物の分類・同定と代謝機能の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の多様性を有し、どのような生態学的役割を担っているのかを分離培養法だけで理解することは困難であった。これを克服すべく、系統分類に用いられる 16S rRNA 遺伝子を標的として環境試料を直接解析する分子生物学的手法が確立・改良してきた。環境試料から核酸を抽出し、16S rRNA 遺伝子の PCR (Polymerase chain reaction) 増幅およびその塩基配列を解読することによって、分離培養を介すことなく微生物の系統学的位置を推定できるようになった。また、1980—1990 年代に確立された DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis)(18) や T-RFLP (Terminal-restriction fragment length polymorphism)(19) 法による解析は、微生物群集の全体像を DNA のバンドまたは DNA 制限酵素処理断片の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。さらに近年の塩基配列解読技術の進歩は目覚ましく、特に次世代シークエンサーの登場は、環境中の微生物群集に由来する膨大な塩基配列データを高速に取得することを可能にした(20-22)。16S rRNA 遺伝子の次世代シークエンサー解析により、一度に数千万種の微生物の系統学的位置を推定することが可能となり、環境中の優占微生物に加えて、菌密度が極めて低い微生物をも個々に検出することができるようになった(23)。一方で、環境中に存在する微生物の系統学的情報を得るだけでは、塩基配列データベース上に類縁種の登録がない未知・未培養の微生物が環境中でどのような生理機能を有しているかについて解明するの是不可能である。そこで環境中の微生物の系統と機能を結びつける手法として、安定同位体基質の微生物生体内への取り込みを追跡する「Stable isotope probing (SIP)」が開発された(24)。この手法は安定同位体基質を取り込んだ微生物の核酸の検出と微生物が代謝変換した化学物質(電子供与体および受容体)の情報を組み合わせることで、微生物生態系の中でどのような微生物がどういった役割を担っているのかを調べることが可能であり、様々な環境における未だ分離培養されていない微生物(以降、「未培養微生物」と表記)の代謝機能の解明に利用されてきている(25-29)。

海底堆積物の蓄積は問題視されていながらも微生物の分解ポテンシャルに対する知見は浅いままである。本研究は東日本大震災に伴う津波によって宮城県東松島市大曲地区に打ち上げら

れた堆積物を試料に用い、その嫌気分解に焦点を当てた。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Fe(III)およびSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>は嫌気環境の主要な電子受容体であることから、微生物の堆積物分解ポテンシャルの評価に重要である。堆積物中においてこれら電子受容体の還元により起こり得る嫌気分解経路を図1.1に示す。本研究では海水・海底中に普遍的に存在するSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>またはFe(III)を電子受容体とした場合、および嫌気環境では高いエネルギー順位に位置する「硝酸塩」を添加した場合について、堆積物の嫌気分解の潜在性を評価し、各種の化学分析、次世代シークエンサー解析やSIP法などの分子生物学的手法と分離培養法を組み合わせて、微生物群集の応答および微生物間相互作用の高解像度な特徴付けを通して堆積物中の嫌気分解メカニズムの解明を試みた。本論文は六章から成り、本章（一章）で研究の背景および目的を述べた後、二章では海水・海底中に豊富に存在するSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>とFe(III)を電子受容体とした場合の堆積物の嫌気分解潜在性の評価を示す。次に三章では、より高いエネルギーを持つ電子受容体「硝酸塩」を添加した時の堆積物の分解とその際の代謝経路の変換において重要なきっかけとなる微生物群を明らかにした研究成果を示す。さらに四章ではSIPと次世代シークエンサー解析の融合による環境中の微生物群が有する代謝機能の超高感度同定法（超高感度SIP法）の開発について説明し、続く五章では超高感度SIP法により追究が可能となった硝酸塩添加で引き起こされる堆積物の嫌気分解過程の詳細について示した。最終章では本研究で用いた津波打上げ堆積物の嫌気分解並びに海底堆積物の嫌気分解について考察と展望を述べた。

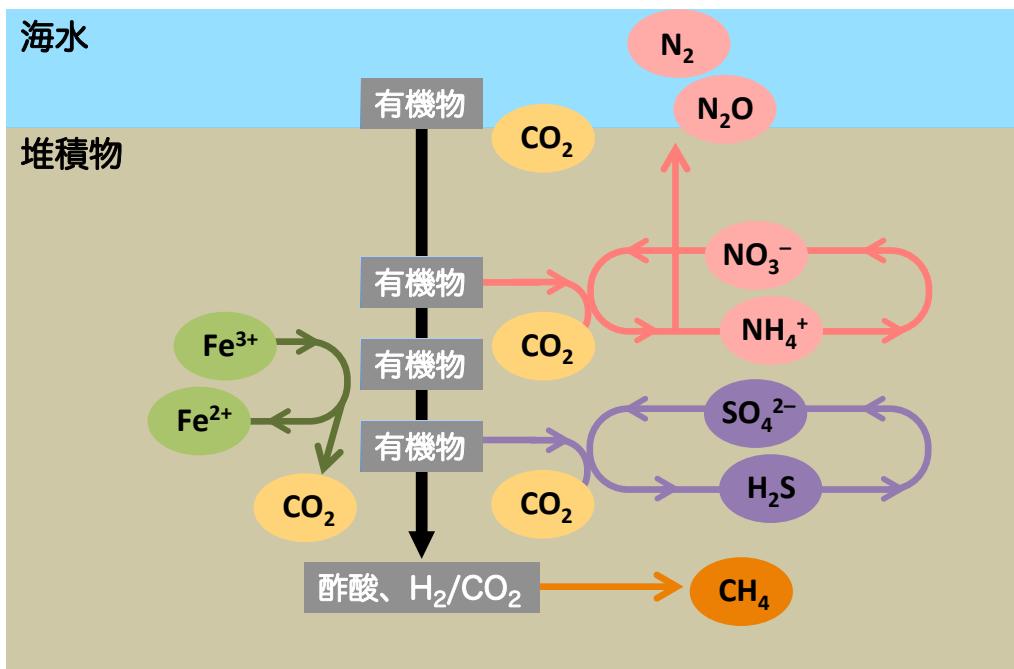


図 1.1 想定される堆積物中の嫌気分解経路

## 《二章》硫酸還元・鉄還元条件における堆積物分解 ポテンシャルの評価

### 2.1 はじめに

$\text{SO}_4^{2-}$ と Fe(III)は、海水中および海底中にそれぞれ 20–30 mM と 5 wt%程度と豊富に存在する、嫌気環境下の有機物分解の主要な電子受容体であり (30–32)、Fe(III)の多くは lepidocrocite 等の結晶性酸化鉄として存在する (33)。しかしながら、海底堆積物において  $\text{SO}_4^{2-}$  または Fe(III)を還元する微生物活性の有無および活性を持つ微生物種や微生物間相互作用などは不明である。本章では、硫酸塩または酸化鉄 (lepidocrocite) を津波によって打上げられた堆積物に追加投入し、それら電子受容体の還元反応の促進を試みた。さらに各種の化学分析と次世代シーケンサー解析によって硫酸還元活性および鉄還元活性の有無とその時の微生物群集構造を解析した。

### 2.2 材料と方法

#### 2.2.1 堆積物試料

本研究では 2011 年 3 月の東日本大震災に起因する津波により、宮城県東松島市大曲地区の水田土壤 ( $38^{\circ}25'N$ ,  $141^{\circ}14'E$ ) の上に打ち上げられた堆積物を試料とし、2011 年 9 月に採取したものを用いた (図 2.1)。津波によって打ち上げられた堆積物が海由来かどうかを調べるために、化学分析やそこに含まれる微生物の組成を調査が必要である。本堆積物はシルトを 47%–50% を含んでおり、粘性を有する特性を示す (34)。また、金属組成解析の結果、石巻湾海底泥が Al や Fe を乾燥堆積物 1 kgあたりそれぞれ約 21 g と 22 g 含んでいるのに対して、この津波打上げ堆積物試料はそれらの金属を同様に高い濃度 (1 kgあたりそれぞれ 100 g と 70 g) で含有することが明らかになっている (34, 35)。これらの金属組成の比較解析から、津波打上げ堆積物が海底由来であることを強く示唆するものである (34)。なお、陸上に打ち上げられた後の 1 年半に及ぶ堆積物の経時調査によって、表層から数ミリより内部の空気に暴露されていない堆積物中の金属組成及び微生物群集構造は時間経過によってほとんど変化しないことが明らかとなっており (35)、粘性を有する本堆積物試料はこのような嫌気条件下で生物学的および化学的に安定であることが推察される。

水田土壤の上に打ち上げられた堆積物の表層から 1–4 cm を採取し、空気との接触が少ないようビニール袋に堆積物を詰めて研究室に持ち帰り、すぐに 4°C 暗所にて保存した。なお、実験には空気との接触が少ない堆積物の中心部の試料を用いた。本研究では堆積物試料の嫌気分解ポテンシャル評価を目的とするため、堆積物試料の調整においては実験時の安定な測定・追跡が可能な懸濁化による方法を採用した。具体的には図 2.2 に示すように、0.56 mm メッシュを通過した堆積物試料と海水の組成を模擬した人工海水 (ダイゴ人工海水 SP; Nihon Pharmaceutical) を 1:4 (w/w) の割合で懸濁および  $\text{N}_2$  ガスを吹き付けながら嫌気化し、50 mL ガラスバイアルに

20 mL ずつ分注してブチルゴム栓とアルミシールで密栓した。その後、堆積物中の嫌気微生物群集を活性化するために(36)、25°C の暗所にて 1 ヶ月間静置した。なお、中緯度の沿岸域海底の温度は季節により 10–30°C の間で変動するが (37)、本研究では微生物による還元活性のポテンシャル評価を目的とするため、微生物の高い代謝活性を望める 25°C の温度設定を採用した。1 ヶ月間静置の後、実験開始前に 10 kPa で 3 分間ガスバージを行い、気相を N<sub>2</sub> で置換した。

### 2.2.2 堆積物の硫酸還元・鉄(III)還元ポテンシャル評価系

図 2.3 に実験の概要を示す。SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> と Fe(III) の還元活性評価に十分なような濃度と実験時間を設定した。具体的には、硫酸塩（硫酸ナトリウム；Wako）または lepidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH；particle size, <250 μm；Alfa Aesar) を 20 mM 追添加した後、25°C の暗所で 5 日間嫌気的に静置した。なお、lepidocrocite は粉末固体であるため、0.035 g ずつ計量した試薬と人工海水 1 mL の混合物を調整してシリソジと針により添加した。各添加系を(i) 硫酸塩添加系、(ii) lepidocrocite 添加系とし、それぞれ三連で実験を行った。

### 2.2.3 堆積物の物理化学的分析

実験開始後 0、2、5 日に、二つの添加系内の気相、液相、堆積物固相をサンプリングした。気相においてはシリソジにて 0.5 mL を採取後すぐにガスクロマトグラフによる分析を行うとともに、10 mL を採取し、真空にした 10 mL ガラスバイアルに充填後 4°C にて保存した。堆積物懸濁液を 2 mL スクリューチューブ 6 本に均一にピペットマンにより採取し、3 分間の遠心分離 (20,000 × g、4°C) により液相（上清）と固相（堆積物）に分離後、分析を行うまで –80°C にて保存した。残りの堆積物懸濁液をバイアル瓶から 50 mL 遠沈管へ移し、–80°C にて保存した。なお、分離した液相を孔径 0.22 μm のセルロースアセテート (Advantec) のメンブレンフィルターにて濾過した後に化学分析に供した。気相中の CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O、CH<sub>4</sub> の各ガス成分の分析にはパックドカラム (ShinCarbon ST；Shinwa Chemical Industries) を装着したガスクロマトグラフ (GC-14B；Shimadzu) を使用した。液相中の全有機炭素 (Total organic carbon; TOC) の測定には不揮発性有機態炭素 (Non-Purgeable Organic Carbon) 法にてサンプル中の無機態炭素 (Inorganic carbon; IC) を除去した後、全有機炭素分析装置 (TOC-L；Shimadzu) を用いた。また液相中の揮発性脂肪酸 (Volatile fatty acid; VFA) の濃度を RSpak KC-811 カラム (Showdex) を装着した高速液体クロマトグラフ (Alliance e26951；Waters) によって決定した。なお VFA の検出限界濃度は 10 μM であった。堆積物懸濁液中の Fe(II) と全鉄の濃度を、6M HCl による鉄抽出およびフェロジンアッセイに基づいて測定した(38)。液相中の SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 濃度を IonPac AS-11 カラムを装着したイオンクロマトグラフ (DX-500；Dionex) によって決定した。堆積物固相における示唆熱・熱重量 (Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis; TG/DTA) 分析を DTG-60 (Shimadzu)

によって行った。なお、これらの分析条件の詳細を表 2.1 に示す。

#### 2.2.4 核酸の抽出と polymerase chain reaction (PCR) および reverse transcription (RT) -PCR

本研究では堆積物から直接抽出した DNA および RNA、すなわち特徴の異なる 2 種類の核酸に基づいて次世代シーケンサーによる塩基配列解読を行う。微生物生体内において、DNA は遺伝情報の保存の役割を担い、RNA は酵素などの生体機能に関わるタンパク質の発現に関与するため常に合成と分解が繰り返されている。このことから、DNA に基づいた 16S rRNA 遺伝子解析では堆積物生態系を構成する微生物の存在量を把握でき、一方の RNA に基づいた 16S rRNA 転写産物解析では堆積物生態系の中で動的な、即ち代謝活性を有する微生物種を見出すことができる。また、嫌気環境下では電子供与体と電子受容体の酸化還元反応で得られるエネルギーが好気環境と比べて少なく、さらにそれらの濃度が低く維持されている場合が多いため、嫌気呼吸微生物は生育速度が遅い（細胞分裂に要する時間 [平均世代時間や増殖までのラグタイム] が長い）という特徴を有することが知られている (29, 39-41)。例えば、通性嫌気性細菌である大腸菌を至適条件下で好気的に培養した時の平均世代時間は 20 分程度であるが、嫌気微生物の中には平均世代時間が長い場合には数週間に及ぶもの（メタン生成古細菌等）が報告されている (40)。従って、RNA に基づいた次世代シーケンサー解析は DNA のそれよりも環境変化に対する微生物群集の応答を高感度に捉えることが可能である。

実験 0、2、5 日に採取した堆積物からの微生物核酸（DNA と RNA）の抽出を界面活性剤による溶菌とビーズビーター (Multi-Beads Shocker; Yasui Kikai) による細胞破碎によって行った (42)。なお、全 DNA を RNase (Type II-A; Sigma) 処理の後、ポリエチレングリコール沈殿により精製した。全 RNA の精製については DNase (RQ-1; Promega) 処理とイソプロパノール沈殿により行った。両核酸試料をトリス-EDTA 溶液 (10 mM Tris、1 mM EDTA、DNA 用 : pH 8.0、RNA 用 : pH 7.0) 30 µl に溶解した。得られた DNA と RNA を鋳型として、それぞれ Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) と one-step RT-PCR system Access Quick (Promega) による PCR および RT-PCR を行った。ここでは、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的とするプライマーセット「515f/806r」を用いた (43)。なお、両プライマーには MiSeq シーケンサー用のアダプター配列が組み込まれており、リバースプライマー (806r) には複数サンプルを同時に塩基配列解読するための 6 塩基のバーコード配列が含まれる (43)。PCR および RT-PCR 条件をそれぞれ表 2.2 と表 2.3 に示した。全ての PCR 産物および RT-PCR 産物を 1.2% アガロースゲルによる電気泳動を行い、一定の濃度であることを確認した。なお、RNA に対しては逆転写酵素 (reverse transcriptase) を添加せずに RT-PCR をを行い、その增幅産物が得られないことによって DNA の混入が無いことを確かめた。

## 2.2.5 次世代シークエンスとデータ解析

得られた PCR および RT-PCR の增幅産物を AMPure XP (Beckman coulter) および QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて二段階で精製した。その精製物濃度を Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) と VersaFluor Fluorometer (Bio-Rad; Excitation; 480 nm, Emission; 520 nm) を用いた蛍光定量および GoTaq qPCR (Promega) と Real-Time-PCR Detection system MyIQ2 (Bio-Rad) を用いた定量 PCR により測定し、試料間で同じ濃度になるように調整した。なお、定量 PCR 条件を表 2.4 に示した。次世代シークエンサーによる配列解読には、2 nM に調整した精製物試料とコントロール DNA (PhiX; Illumina) との混合液を用意し、MiSeq Reagent kit (ver.1 300-cycles; Illumina) と次世代シークエンサー MiSeq (Illumina) による大規模塩基配列解読を行った。Greengene データベース (44)とのホモロジー検索によって、得られた配列データに残存する PhiX の配列を検出・除去した。次にペアエンドシークエンスデータ (5'、3' それぞれ約 150 bp) を ea-utils, version 1.1.2-301 (45)の fastq-join tool によって結合した (約 250 bp)。シークエンスの精度が Q30 (99.9%) 以上の配列だけを QIIME, version 1.7.0 (46)により選抜し、Mothur, version 1.31.2 (47)によってキメラ配列を検出・除去した。その後、それぞれの配列を QIIME により系統学的に解析した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 堆積物の物理化学パラメータ

本章では、海水中と海底中に豊富に存在する「 $\text{SO}_4^{2-}$ 」と「Fe(III)」を電子受容体とする、嫌気微生物の分解ポテンシャルを評価した。堆積物懸濁液に硫酸塩 20 mM または酸化鉄 (lepidocrocite) 20 mM を追添加し、5 日間嫌気条件下において静置した。その結果、図 2.4 に示すように、硫酸塩または lepidocrocite の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。気相では、実験開始後すぐに  $\text{N}_2$  ガス置換に伴う脱気および  $\text{CO}_2$ -重炭酸塩気液平衡による  $\text{CO}_2$  の発生がみられたが (図 2.4A、B)、その他のガス成分 ( $\text{CH}_4$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ ) は検出されなかった。実験 0 日目において、硫酸塩添加系の液相中の  $\text{SO}_4^{2-}$  濃度および lepidocrocite 添加系の Fe(III) 濃度 (全鉄濃度から Fe[II] 濃度を差し引いた値) はそれぞれ約 34.2 mM と 600 mM であったが、両添加系の実験 5 日目において  $\text{SO}_4^{2-}$  濃度の減少は僅か (1.4–1.9 mM) であった (図 2.4E、F)。一方で鉄還元の生成物である Fe(II) の濃度は、実験期間を通じてどちらの添加系においても増加しなかった (図 2.4G、H)。これらの結果は、 $\text{SO}_4^{2-}$  や Fe(III) を電子受容体とした嫌気呼吸が微弱であったことを示している。また TOC は実験期間中においてほぼ一定濃度であり (図 2.4C、D)、さらに揮発性脂肪酸 (VFA) は検出されなかった (データは割愛する)。堆積物固相における TG/DTA 曲線は、実験 0 日目と両添加系の実験 5 日目において顕著な違いはなかった (図 2.5)。DTA 曲線は 100°C と 500°C 付近に吸熱ピークが見られ、最初の吸熱ピークは付着水の脱水に基づくも

の、二番目の吸熱ピークは脱炭酸に由来するものと推察された(48)。室温から700°CまでTG曲線において、13%–15%の緩やかな減少がみられた。この減少画分は有機化合物やポリマー等の分解に起因すると推定される。また、熱分解後の残渣成分として金属化合物やシリカ等が85–87%程度を占め、これらが堆積物固相中に多く含まれていたと示唆された(48)。

### 2.3.2 堆積物の微生物群集構造と代謝活性微生物

微生物は一般的な分子系統遺伝子である16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいてドメイン、門、綱、目、科、属、種という階層で分類されており、その塩基配列はDDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)やGenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)といった国際塩基配列データベースに登録されている。データベースには純粋培養された微生物「既知微生物」及び未だ純粋培養されていない微生物「未培養微生物(uncultured microorganisms)」までの16S rRNA遺伝子の塩基配列の情報が現在までに膨大に蓄積されている。本研究では、細菌と古細菌の2つの「ドメイン」を標的とする。現在までに細菌は28の「門」に分類されており、中でもProteobacteria門は細菌最大の多様性を持つ分類群のひとつであり、「綱」の階層でギリシャ文字のalphaからzetaまで大きく6つに分けられている。16S rRNA遺伝子に基づく次世代シークエンサー解析では、まず初めに津波打上げ堆積物中の微生物群集を「門」という高い階層で特徴付けるが、Proteobacteria門についてはその多様性の高さから例外的に「綱」による分類を採用する。次に、大きな変遷を示すなどで注目すべき「門」または「綱」の微生物群を対象に「目」、「科」、「属」、「種(OTU:Operational taxonomic unit)」といった、より低い階層において分類し、既知の微生物との比較により、本堆積物から検出された微生物が環境中でどのような役割を担うかを推定する。これは系統的に近縁な微生物種ほどその生理学的機能が類似するためである。

DNAとRNAに基づいた次世代シークエンサー解析によって、堆積物中の微生物群集構造を解析した(図2.6)。得られた次世代シークエンスライブラリの名前を(i)実験0日目のDNAとRNAをそれぞれD0( $n=25,152$ ;  $n$ は系統的に解析した16S rRNA遺伝子断片の配列数を示す)とR0( $n=2,556$ )、(ii)硫酸塩添加系の実験2、5日目のDNAをそれぞれDS2( $n=19,775$ )とDS5( $n=21,813$ )、実験2、5日目のRNAをそれぞれRS2( $n=5,760$ )とRS5( $n=8,905$ )、(iii)lepidocrocite添加系の実験2、5日目のDNAをそれぞれDF2( $n=19,584$ )とDF5( $n=22,309$ )、実験2、5日目のRNAをそれぞれRF2( $n=6,290$ )とRF5( $n=11,579$ )と定義した。

実験期間中、堆積物中のDNAに基づいた系内に存在する微生物の組成およびRNAに基づいた代謝活性を有する微生物の組成に大きな変化は見られなかった(図2.6)。DNAシークエンスライブラリではDeltaproteobacteria綱細菌が全体の30%以上を示す主要構成微生物であり、Chloroflexi門が12%、Bacteroidetes門が7%と続いた(図2.6A)。なお、実験開始0日目(D0ライブラリ)における微生物群集構造は堆積物試料採取地において経時調査を行っていた下層の

堆積物の微生物群集構造 (35)とほとんど同じであり、人工海水と堆積物の懸濁およびその懸濁状態の 1 ヶ月間の維持（静置）によるバイアスはほとんどなかったことが示された。

一方、RNAに基づいたシークエンスライブラリでは Deltaproteobacteria 級細菌が全体の 75%以上を占めていた（図 2.6B）。この Deltaproteobacteria 級細菌について、詳細に解析したところ、いずれの試料のシークエンスライブラリにおいても Desulfobulbaceae 科細菌が最も優占した（Deltaproteobacteria 級細菌群の中で 70%）。続いて Pelobacteriaceae 科細菌、Desulfobacteraceae 科細菌が主要となり、これらは全て硫酸還元菌として知られる微生物群であった。

## 2.4 考察

本章では海水と海底に普遍的に存在する「 $\text{SO}_4^{2-}$ 」と「Fe(III)」を電子受容体とする嫌気分解に焦点を当て、津波打上げ堆積物に硫酸塩または酸化鉄（lepidocrocite）を追添加して培養し、各種の化学分析による堆積物中の物理化学的パラメータの追跡と DNA および RNA に基づく微生物群集構造の大規模解析を組み合わせることで、堆積物中の硫酸還元および鉄還元のポテンシャル評価を行った。

硫酸塩および lepidocrocite を添加した堆積物では培養期間中に、 $\text{SO}_4^{2-}$ 還元が僅かに進行するものの（図 2.4E、F）、Fe(III)還元はほとんど起きなかつた（図 2.4G、H）。Fe(III)還元が起きなかつたのは、堆積物中に含まれる Fe(III)が難利用性の結晶構造を持つこと、または鉄還元菌の利用可能な有機物（電子供与体）が枯渇していたこと、海水環境が鉄還元菌の生育には適していないこと等がその原因として考えられた。また、実験期間中一定の TOC 濃度が検出され、VFA が検出されなかつたことから、VFA を分解産物とする有機物の発酵的分解は僅かであったことが示唆された。このように、堆積物中で VFA が検出されないまたは数  $\mu\text{M}$  程度の低濃度で維持されることは、他の海底堆積物においても報告されている（49, 50）。一方、どちらの添加系においても、Deltaproteobacteria 級細菌の中で硫酸還元菌として知られる微生物群が代謝活性を有する微生物として検出された（図 2.6B）。これらをより低い階層で解析すると Desulfobulbaceae 科、Pelobacteriaceae 科、Desulfobacteraceae 科に属するいずれも硫酸還元能を有する細菌群に帰属された。このような硫酸還元菌は地中海、メキシコ湾、エジプト湾、東京湾、有明海などの様々な地域の海底堆積物においてしばしば主要な構成微生物として検出されており（51-55）、本堆積物でも同様に Deltaproteobacteria 級の硫酸還元菌群が優占微生物であることが示された。原位置の海底堆積物の鉛直プロファイル解析により一般に、メタン生成古細菌の占める割合は深度依存的に増加し、 $\text{SO}_4^{2-}$ 濃度が減少してメタン生成古細菌存在量が 10%程度になった場合に  $\text{CH}_4$  の生成が観察されることが知られる（56, 57）。本堆積物中のメタン生成古細菌の存在量は 3%程度であったことから、本堆積物試料は硫酸還元がほんの僅かに進行しながらもメタン生成が起こらない嫌気環境域で蓄積されたものであることが推測される。しかし、本堆積物中では硫酸

還元菌が主要構成種であるものの、電子供与体となりうる乳酸や蟻酸、酢酸などのVFAが枯渇しているという化学分析の結果から、硫酸還元の分解ポテンシャルは極めて低く、堆積物試料は分解されずに安定的に長期間存在しうることが示された。

## 2.5 まとめ

化学分析および次世代シーケンサー解析を用いることによって、海水や海底中に豊富に存在する  $\text{SO}_4^{2-}$  や Fe(III) を電子受容体とした嫌気微生物の有機物分解は本堆積物中では微弱であることが強く示唆され、これらの嫌気条件下で堆積物が生分解を受けずに蓄積し続ける科学的根拠を示すことができた。RNAに基づいた次世代シーケンサー解析により硫酸還元菌を代謝活性細菌群として検出したが、堆積物中の他の微生物に比べてその代謝活性が相対的に高いことが示されたのみで、単位堆積物当たりの絶対的な代謝活性については以降の課題として挙げられた（五章にて調査）。

表 2.1 各種化学分析装置の分析条件

ガスクロマトグラフの分析条件	
ガスクロマトグラフ	GC-14B (Shimadzu)
カラム	ShinCarbon ST (Shinwa Chemical Industries)
検出器	TCD, FID
移動相	Ar
流量	20.8 mL/min
カラム温度	60°C・3 min, 60–120°C (毎分10°C昇温), 120°C・9 min
高速液体クロマトグラフの分析条件	
高速液体クロマトグラフ	Alliance e26951 (Waters)
カラム	RSpak KC-811 (Showdex)
検出器	PDA
移動相	10 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
流量	0.75 mL/min
カラム温度	50°C
イオンクロマトグラフの分析条件	
イオンクロマトグラフ	DX-500 (Dionex)
カラム	IonPac AS-11
検出器	Electrochemical detector
NaOH gradient	0–30 mM over 13 min
流量	1.2 mL/min
サプレッサ	ASRS 300
示唆熱・熱重量の分析条件	
示唆熱・熱重量測定装置	DTG-60 (Shimadzu)
雰囲気ガス	Ar
流量	100 mL/min
セル	白金
温度プログラム	10–700°C (毎分10°C昇温), 700°C・1 min

表 2.2(A) PCR 反応液組成

Solution	Voume ( $\mu$ L)
Template	2
5×Q5 Reaction buffer	10
2.5 mM dNTP	1
10p 515f (with adaptor for MiSeq)	2
10p 806r (with adaptor and barcode for MiSeq)	2
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0.5
Water	32.5
Total: 50 $\mu$ L/PCR tube	

表 2.2(B) PCR 反応温度・時間

Step	Temperature (°C)	Time (min: sec)	Cycle
Initial denaturation	98	1:30	1
Denaturation	98	0:10	
Annealing	54	0:30	30
Extention	72	0:30	
Final extention	72	2:00	1

表 2.3(A) RT-PCR 反応液組成

Solution	Volume (μL)
Template	2
Access Quick master mix	25
10p 515f (with adaptor for MiSeq)	2
10p 806r (with adaptor and barcode for MiSeq)	2
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	0.5
AMV reverse transcriptase	1
Water	17.5
Total: 50 μL/PCR tube	

表 2.3(B) RT-PCR 反応温度・時間

Step	Temperature (°C)	Time (min: sec)	Cycle
Reverse transcription	48	45:00	1
Initial denaturation	94	3:00	1
Denaturation	94	0:30	
Annealing	54	0:45	30
Extention	72	1:30	
Final extention	72	5:00	1

表 2.4(A) 定量 PCR 反応液組成

Solution	Volume (μL)
Template	4
2× Go Taq qPCR master mix	10
4p P5 (MiSeq adaptor sequence 5')	1
4p P7 (MiSeq adaptor sequence 3')	1
Water	4
Total: 20 μL/PCR tube	

表 2.4(B) 定量 PCR 反応温度・時間

Step	Temperature (°C)	Time (min: sec)	Cycle
Initial denaturation	95	2:00	1
Denaturation	95	0:30	
Annealing & extention	60	0:45	40
Melting curve	60–95 (0.5°C)	0:10	71



図 2.1 津波によって打ち上げられた堆積物

A : 宮城県東松島市大曲の試料採取地 B : 人工海水へ懸濁した堆積物

水田上に 50 cm 程度の厚みで打ち上げられた堆積物表面は赤褐色であった。これは堆積物中に豊富に含まれる Fe が空気にさらされて酸化されたためと推察される。表層から数 mm 下の堆積物は写真 A の下部のように黒色を呈していた。実験には表層下 1–4 cm の堆積物を用いた。

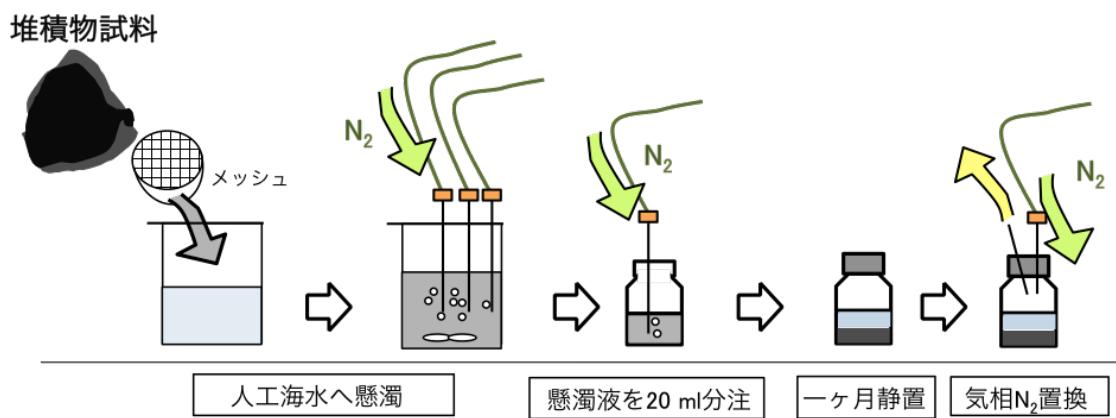


図 2.2 堆積物試料の嫌気懸濁化の概要

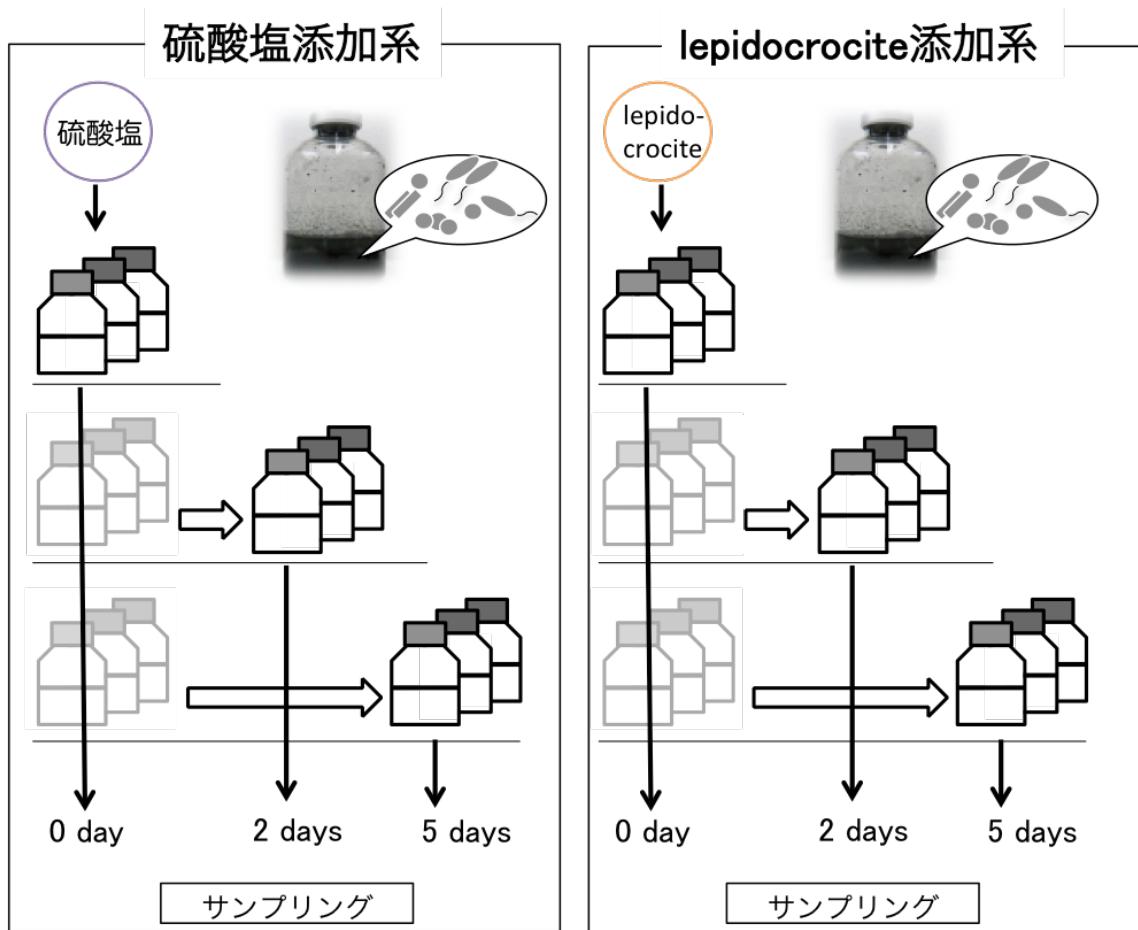


図 2.3 堆積物の硫酸還元と鉄(III)還元ポテンシャル評価系概要

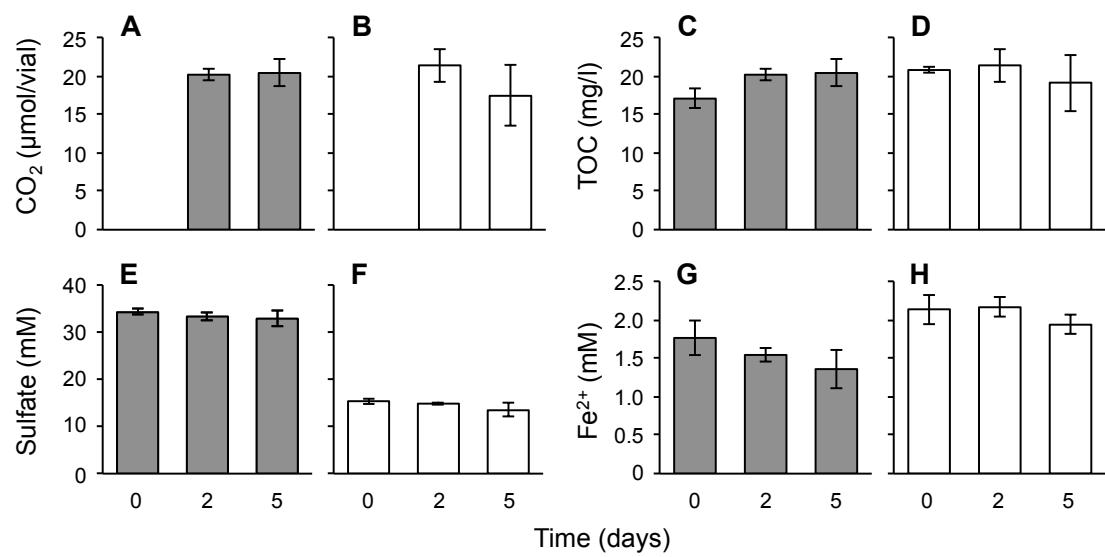


図 2.4 硫酸還元と鉄(III)還元条件における堆積物の物理化学パラメータ

灰色のバーは硫酸塩添加系、白色のバーは lepidocrocite 添加系を示す。A と B は CO<sub>2</sub> 濃度、C と D は TOC 濃度、E と F は SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度、そして G と H は Fe(II)濃度を示す。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

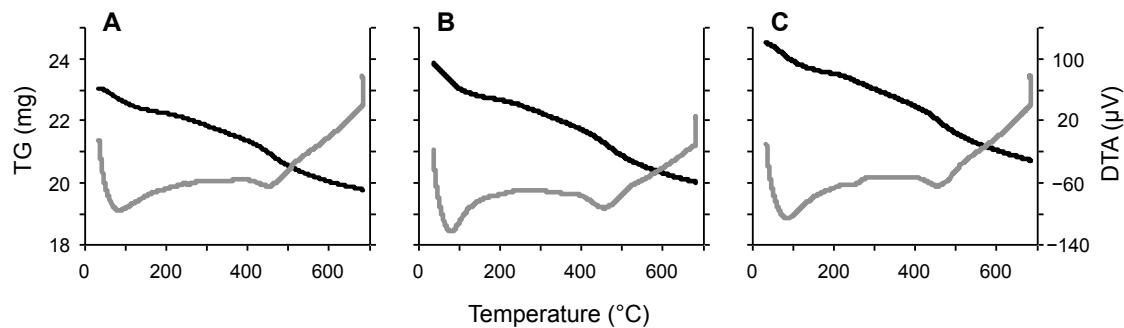


図 2.5 硫酸還元と鉄(III)還元条件における TG/DTA パターン

実験 0 日目 (A)、硫酸塩添加系実験 5 日目 (B) および lepidocrocite 添加系実験 5 日目 (C) における堆積物固相の代表的な TG/DTA パターンを示す。黒色の線が TG 曲線、灰色の線が DTA 曲線を示す。

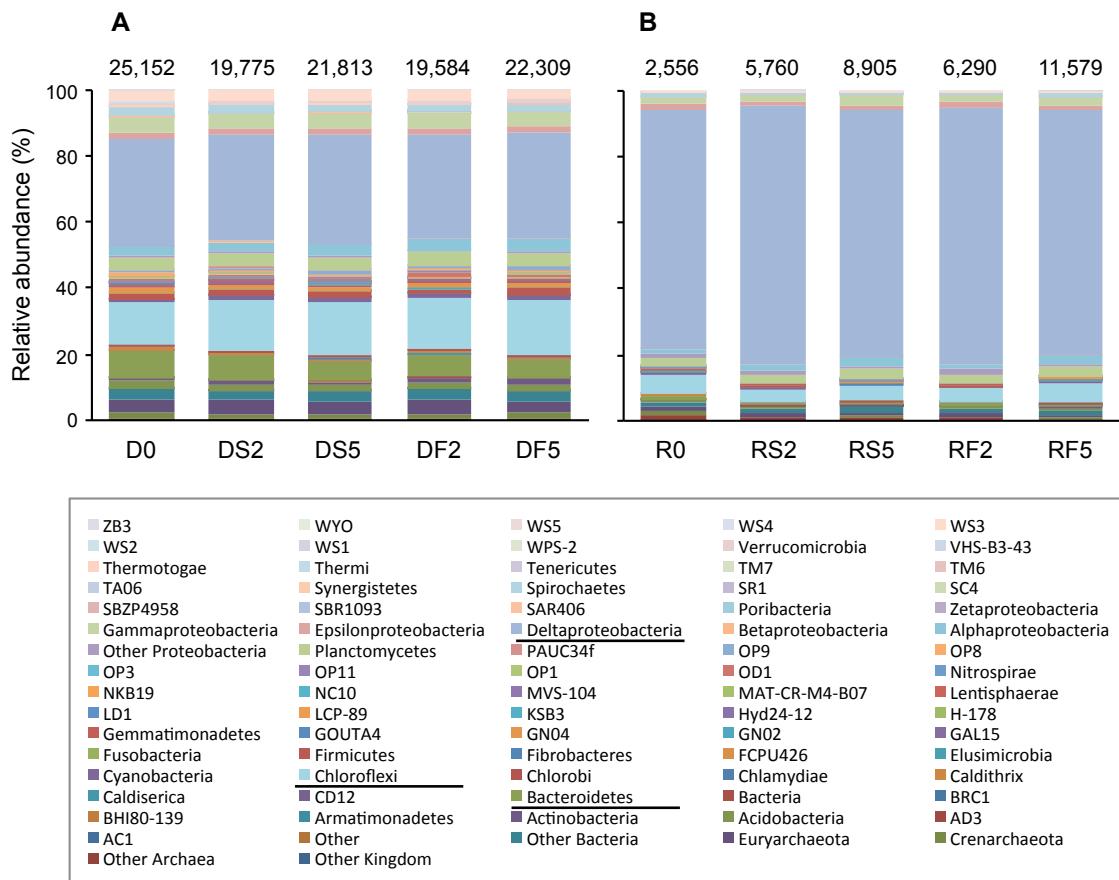


図 2.6 堆積物中の微生物群集構造と代謝活性微生物

A : 微生物の存在 (DNA)、 B : rRNA 発現 (RNA)

次世代シークエンスデータの系統解析結果に基づいた「門」または「綱」の分類階層における微生物群集構造を示す。微生物の系統はグラフ下の枠内に示した凡例の色と対応する。アンダーラインは主要構成の微生物群を示す。バーの下にライブラリ名 (D0、R0 は実験 0 日目、DS2、DS5、RS2、RS5 は硫酸塩添加系の実験 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。バーの上には系統学的に解析した 16S rRNA 遺伝子断片の配列数をそれぞれ示す。

## 《三章》硝酸還元条件における堆積物の嫌気分解と それに関する微生物の系統解析

### 3.1 はじめに

前章において、 $\text{SO}_4^{2-}$ やFe(III)が存在する条件では堆積物の嫌気分解がほとんど起こらず、堆積物は安定状態であることが明らかとなった。このことから堆積物の嫌気分解にはより高エネルギーの電子受容体「 $\text{NO}_3^-$ 」が有効であると考えられる。農業排水などを起源として、沿岸域における $\text{NO}_3^-$ 濃度はおよそ $0.5 \mu\text{M}$ – $400 \text{ mM}$ の間で大きく変動することが知られ(58-61)、堆積物の嫌気分解ポテンシャルを評価する上で無視できない電子受容体であるものの、微生物によるその還元活性は未だ解明されていない。本章では、 $\text{SO}_4^{2-}$ やFe(III)よりもエネルギー順位の高い電子受容体基質「硝酸塩」を添加することで引き起こされる堆積物の嫌気分解過程を化学分析で明らかにすると共に、それに関する微生物を次世代シークエ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。

### 3.2 材料と方法

#### 3.2.1 堆積物の硝酸還元ポテンシャル評価系

図3.1に実験の概要を示す。二章と同様に、堆積物試料を人工海水へ嫌気的に懸濁、一ヶ月間の静置の後、系内気相を $\text{N}_2$ ガスで置換した。 $800 \text{ mM}$ に調整した硝酸塩(硝酸ナトリウム; Kanto chemical)を $0.5 \text{ mL}$ (終濃度 $20 \text{ mM}$ )で添加して $25^\circ\text{C}$ の暗所にて静置した([i] 硝酸塩添加系)。なお対照区として、硝酸塩の代わりに滅菌水を $0.5 \text{ mL}$ 添加した「(ii)無添加系」を用意した。さらに $121^\circ\text{C}$ で1時間の高温高圧滅菌を3回繰り返して堆積物中の微生物を死滅させた後に硝酸塩を $20 \text{ mM}$ の濃度で添加した、「(iii)硝酸塩添加滅菌系」を用意した。各添加系について、三連で実験を行った。

#### 3.2.2 堆積物中の物理化学的分析

実験0、2、5日に、二つの添加系(硝酸塩添加系、無添加系)の気相、液相、堆積物固相を二章と同様にサンプリングを行った。硝酸塩添加と無添加系内の気相( $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CH}_4$ )、液相(TOC、VFA、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、鉄[II]、全鉄)および堆積物固相のTG/DTAについては二章と同様の条件にて分析した。また液相中の栄養塩( $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{PO}_4^{2-}$ および $\text{SiO}_2$ )の濃度をオートアナライザーQuA Atro 2-HR(Bletc)を用いた比色分析(62)によって定量した。この栄養塩分析については硝酸塩添加滅菌系の実験5日目のサンプルに対しても同様に行った。さらに堆積物固相を凍結乾燥し、その固相中に含まれる元素成分(炭素、水素、窒素、硫黄)の含有率をCHNS分析装置(FLASH 2000 Organic Elemental analyzer; Thermo Scientific)により測定した。なお、この分析条件の詳細を表3.1に示した。

### 3.2.3 堆積物からの抽出した DNA と RNA に基づく次世代シークエンサー解析

二章と同様に実験 0、2、5 日にサンプリングした堆積物から DNA と RNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的にした PCR または RT-PCR 増幅を行い、得られた増幅産物ライプラリを次世代シークエンサー (MiSeq) による大規模塩基配列解読に供した。得られたペアエンドの次世代シークエンスライプラリから非標的の PhiX 配列、 $\leq Q30$  の低い精度の配列、キメラ配列を二章と同様に取り除き、それぞれの配列を QIIME により系統学的に解析した。97%以上の配列相同性を有する 16S rRNA 遺伝子は、同一の「種 (OTU ; Operational taxonomic unit)」に由来すると判断した。それぞれの OTU の代表塩基配列を DDBJ nucleotide sequence database の BLAST program を用いた相同性検索に供し、最も近縁な既知微生物を推定した。また実験期間における堆積物中の微生物多様性の推移を QIIME により多様性指数 ( $\alpha$  多様性指数 ; Chao1、Shannon、Simpson ; (63-65)) を算出することで求めた。さらに微生物群集構造の違いを二次元プロットとして視覚的に簡潔に表すため次世代シークエンスデータの PCoA (Principal coordinate analysis) 解析を行った。ここでは、群集中の微生物の種類微生物の種類 (系統情報) と存在量 (割り振られた配列数) の関係から群集構造の違いを見出す (2 次元プロット上の距離を算出する) Weighted UniFrac 解析を採用した。

### 3.2.4 優占微生物の分離培養と系統解析

堆積物への硝酸塩添加により優占化する微生物群 (硫黄酸化細菌) を分離培養するために、「限界希釀培養法」を用いた (概要を図 3.2 に示す)。具体的には、環境試料を液体培地によって段階的に希釀し、微生物の生育が観察される最も希釀率の高い培養物を接種源として再度希釀培養を行った。このステップを複数回繰り返すことで純粋菌株の分離を行う。この培養には 50 mL ガラスバイアルを用い、基礎培地として改変型 Widdel 海水培地 (pH7 ; 表 3.2 に組成を示す) を 18 mL 分注し、気相を N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) で置換した後、ブチルゴム栓とアルミシールで密栓した。1 代目の培養には基礎培地に堆積物懸濁液を 2 mL (10%, v/v) 接種した。電子受容体として硝酸塩 (20 mM)、電子供与体として単体硫黄 (20 mM) あるいは硫黄化合物 (チオ硫酸ナトリウム [20 mM]、または Na<sub>2</sub>S [2 mM]) を培地に添加し、25 °C の暗所でそれぞれ集積培養を開始した。集積培養開始から一週間後、単体硫黄または硫黄化合物の様態の変化を指標に集積培養物の 5%を新しい培地に植え継ぎ、そこから 10 の 8 乗までの希釀段階を用意した。このような継代・希釀培養を 4 回繰り返し、3 菌株の純粋培養系を獲得した。なお、蛍光顕微鏡 BX-51 (Olympus、Excitation; 372 nm, Emission; 456 nm) による細胞形態観察、および 16S rRNA 増幅産物の次世代シークエンサーによる微生物群集構造解析により、他の菌の混入・増殖が無いことを確認した。さらに二章と同様の条件で分離菌株から抽出した DNA を鋳型として、16S rRNA

遺伝子の塩基配列のほぼ全長をカバーするプライマーセット「B27f/B1525r (66)」を用いた、Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase による PCR を行った。なお PCR 条件を表 3.3 に示す。PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR purification kit (Promega) により精製した後、pGEM-T Easy vector systems (Promega) による TA クローニングを行った。得られたリガーゼ反応液を ECOS competent *E. coli* JM109 (Nippon Gene) を用いた形質転換に供し、プラスミド DNA を Wizard SV Plasmid DNA Purification System (Promega) によって精製した。その後、精製したプラスミド DNA を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を用いたダイターミネーター反応を行い、DNA シークエンサー 3730xl (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を解読した。得られた塩基配列を ClustalX ver.2.0 (67)にて Multiple alignment を行い、MEGA ver. 5.2 (68)を用いて neighbor-joining 法と maximum likelihood 法にて系統樹を作成した（系統学的特徴づけ）。系統樹の枝の分岐に関する信頼性は 1,000 回のブートストラップ値の計算により求めた。また分離菌を硝酸塩 (20 mM) 及び単体硫黄 (20 mM) またはチオ硫酸塩 (20 mM) を基質として 25°C の暗所にて 1 ヶ月間静置培養し、その間の  $\text{SO}_4^{2-}$  と  $\text{NO}_3^-$  の濃度を測定することで化学合成無機栄養的な増殖能を求めた（生理学的特徴づけ）。

### 3.2.5 塩基配列データベースへの登録

本章のシークエンサー解析で得られた 16S rRNA 遺伝子の塩基配列データは MG-RAST data base (<http://metagenomics.anl.gov>)においてプロジェクト名「Dynamic transition of chemolithotrophic sulfur oxidizers in deposited marine sediment in 2015」の ID 番号 4620652.3–4620661.3 (10 個のシークエンスライブラリ) として登録された。また分離菌 3 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列データは DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) へアクセス番号 LC029406–LC029408 として登録された。

## 3.3 結果

### 3.3.1 堆積物の物理化学パラメータ

$\text{SO}_4^{2-}$  や Fe(III)よりも高エネルギーの電子受容体である硝酸塩を添加した時に引き起こされる、堆積物の分解過程を化学分析により評価した。堆積物懸濁液に硝酸塩 20 mM または対照として滅菌水のみを添加し、それぞれを硝酸塩添加系および無添加系として 5 日間嫌気的に静置した。その結果、硝酸塩添加系と無添加系の物理化学パラメータは大きく異なった。気相において、硝酸塩添加系のみで実験 2 日目に  $\text{N}_2\text{O}$  が発生した（図 3.3A）。両添加系で実験開始後に  $\text{CO}_2$  濃度が上昇し、実験 2 日目には硝酸塩添加系で 258–286  $\mu\text{M}$ 、無添加系では 318–378  $\mu\text{M}$  となった（図 3.3B）。これは実験開始前の  $\text{N}_2$  ガス置換に起因する脱気および  $\text{CO}_2$ -重炭酸塩気液平衡によるものと示唆された。 $\text{CO}_2$  濃度はその後、実験 5 日目に硝酸塩添加系で 255–285  $\mu\text{M}$  となり 2 日

目の値とほぼ変わらずに推移したが、無添加系で  $434 \mu\text{M}$  にまで増加した。また、どちらの添加系においても実験期間中に  $\text{CH}_4$  は検出されなかった。

また硝酸塩添加系の液相では、 $\text{NO}_3^-$  が実験開始後 2 日間で  $17.8 \text{ mM}$  から  $15.5 \text{ mM}$  の濃度まで減少し、実験終了時には消失した（図 3.3C）。なお、 $\text{NO}_2^-$  は実験期間を通じて検出されなかった。 $\text{NH}_4^+$  濃度は実験 2 日目にわずかに増加し  $1.25 \text{ mM}$  となったが、その後 5 日目に  $0.78 \text{ mM}$  に減少した（図 3.4A）。 $\text{SO}_4^{2-}$  濃度は実験 2 日目までは  $14.6\text{--}15.5 \text{ mM}$  で維持し、その後実験 5 日目には  $26.0 \text{ mM}$  にまで著しく上昇した（図 3.3D）。これは、堆積物中に元々存在していた硫黄化合物が  $\text{SO}_4^{2-}$  にまで酸化されたと推察される。TOC は実験期間を通じて約  $22.6 \text{ mg L}^{-1}$  で、一定の濃度であった（図 3.4B）。さらに揮発性脂肪酸（VFA）が検出されなかつことから、TOC の成分として VFA は含まれていなかつことが推察される。また、微生物の生育促進因子である  $\text{SiO}_2$  と  $\text{PO}_4^{2-}$  の濃度は実験期間を通して減少した（図 3.4C, D）。興味深いことに、無添加系におけるこれらの物理化学パラメータはほとんど変化しなかつた（図 3.3, 3.4）。加えて、硝酸塩添加滅菌系においても、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SiO}_2$  および  $\text{PO}_4^{2-}$  濃度の減少は見られなかつた（データは割愛する）。これらのことから、硝酸塩添加系で観察された脱窒反応と硫黄酸化反応は微生物代謝活性に依るものと示唆された。

堆積物固相では、硝酸塩添加系の硫黄成分の含有率が実験開始時に  $1.5 \text{ wt\%}$  であったものが、実験 5 日目には  $1.1 \text{ wt\%}$  にまで減少した（図 3.5）。この減少量は硫黄成分が一定の値で推移した無添加系と比べて有意であった ( $P < 0.05$ )。液相の化学分析結果と合わせると、硝酸塩添加系において堆積物固相中の還元態の硫黄化合物が  $\text{SO}_4^{2-}$  に酸化されて液相へ放出されたと示唆される。他の元素成分（窒素、炭素、水素）の含有率について、硝酸塩添加系と無添加系の間で有意差は検出されなかつた（図 3.6）。実験開始時および両添加系の実験 5 日目における TG/DTA 曲線もほとんど差は見られず（図 3.7）、これにより堆積物固相中の主要成分は硝酸塩添加によりほとんど影響を受けなかつたことが示唆された。

### 3.3.2 堆積物の微生物群集構造と代謝活性種

DNA および RNA に基づいた次世代シーケンサー解析により、堆積物への硝酸塩添加後の実験過程における存在微生物群（DNA）と代謝活性を有する微生物群（RNA）の推移を解析した（表 3.4）。硝酸塩添加系（“N”: Nitrate）と無添加系（“C”: Control）に対して DNA（16S rRNA 遺伝子 [“G”: genes]）および RNA（16S rRNA 転写産物 [“T”: transcripts]）に基づく計 10 個のシーケンスライブラリを構築した。また得られたシーケンスライブラリ名を上記の頭文字と実験期間から以下のように定義した：(i) 実験 0 日目の DNA と RNA をそれぞれ G0 と T0、(ii) 硝酸塩添加系の実験 2、5 日目の DNA をそれぞれ NG2、NG5、および同実験時間の RNA をそれぞれ NT2、NT5、(iii) 無添加系の実験 2、5 日目の DNA をそれぞれ CG2、CG5、同実験時間の

RNA をそれぞれ CT2、CT5。合計で 280,651 配列（1 シークエンスライブラリあたり平均 28,065 配列）を系統学的に解析した。それぞれのライブラリで得られた配列数を表 3.4 に示す。

シークエンスライブラリから無作為に抽出した同じ配列数 ( $n = 7,374$ ) に基づいて計算された堆積物中の微生物多様性の値 ( $\alpha$  多様性指数： Chao1、Shannon、1/Simpson) を表 3.4 に示す。推定される総種数を示す Chao1 の値が、硝酸塩添加系ライブラリ (NG2、NG5、NT2、NT5) で無添加系ライブラリ (CG2、CG5、CT2、CT5) よりも有意に低かった。これは、硝酸塩添加に応答して堆積物中の微生物の種数が減少したことを示唆している。さらに、微生物群集の均等性を示す Shannon および 1/Simpson の値は、硝酸塩添加系の DNA ライブラリでは  $G0 > NG2 > NG5$  であったが、無添加系の G0、CG2、CG5 の間ではほぼ同等であった（均等性が大きいほど微生物群集の構成に偏りが少ないと判断され、微生物多様性は高いとされる）。これらの指數値が減少していく傾向は硝酸塩添加系の RNA ライブラリ T0、NT2、NT5 でも観察されたが、無添加系の T0、CT2、CT5 では見られなかった。これにより、硝酸塩添加の後次第に堆積物中の微生物群集の均等性が減少していったことが示唆された。総合すると、硝酸塩の添加によって堆積物中の微生物群集の多様性は低くなり、群集の中である特定の微生物が優占化したことが示唆された。さらに培養期間中の微生物群集構造を比較するために、シークエンスライブラリから無作為に抽出した同じ配列数 ( $n = 9,336$ ) を用いて各試料間の Weighted UniFrac に基づく二次元距離として表した PCoA プロットを作成した（図 3.8）。PCoA の二次元図では、硝酸塩添加系のライブラリはそれぞれ離れた場所へプロットされたが、無添加系のライブラリはほぼ同じ場所にプロットされた。この結果は、硝酸塩添加系では時間経過に伴って堆積物中の微生物群集構造が劇的に遷移していたことを意味する。さらに、実験開始 2 日間よりも、実験 2 日目から 5 日目の方がより大きな変化が観察された。加えて、DNA（存在微生物群）と RNA（代謝活性を有する微生物群）のライブラリ間ではプロットの場所が離れていたことから、微生物群集の限られた構成種のみが硝酸塩の添加により rRNA を高発現した（代謝活性化された）ことが強く示唆された。

次世代シークエンスデータを系統解析に供した結果、硝酸塩添加系では堆積物中の構成微生物種 (DNA) および代謝活性種 (RNA) が劇的に変化していた（図 3.9）。特に堆積物中の Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級に属する細菌群それぞれの相対存在量 (DNA) は、実験 0 日目で 2% と 5% であったが、実験 5 日目には 44% と 17% にまで劇的に増加した（図 3.9A）。Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級細菌は RNA に基づく解析においても同様に顕著な増加が見られた（図 3.9B）。Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級細菌群のうち実験 5 日目に存在する微生物 (NG5 ライブラリ) の優占上位 10 種 (OTU) について図 3.10 に示す。Epsilonproteobacteria 級では、OTU 4053 が最も優占化し、NG5 ライブラリにおける相対存在量および NT5 ライブラリでの相対強度はそれぞれ 42.7% と 14.7% にまでに達した（図 3.10A、B）。またこの OTU は硫黄酸化細菌として知

られる *Sulfurimonas denitrificans* (NR074233) と系統学的に近縁であった (16S rRNA 遺伝子で 98.4%の配列相同性を有する)。Gammaproteobacteria 細菌では、Chromatiales 目細菌の OTU 5722 と OTU 3944 が NG5 ライブラリにおいて、それぞれ 12.5% と 1.9%の相対存在量を占めた(図 3.10C)。これらの OTU に近縁な微生物はそれぞれ *Thioalkalispira microaerophila* (NR025239; 96.8%配列相同性) と *Thioalbus denitrificans* (NR122087; 100%配列相同性) であり、いずれも硫黄酸化能を有することが知られている。さらに、図 3.11 には Epsilon- と Gamma-proteobacteria 細菌群のうち実験 5 日目に代謝活性を有する微生物 (NT5 ライブラリ) の上位 10 種 (OTU) を示す。Epsilonproteobacteria 細菌において、NG5 ライブラリと NT5 ライブラリの上位種を比較すると、その構成にはほとんど違いがなく (図 3.10A、B；図 3.11A、B)、堆積物中で優占的に存在していた微生物 1 種 (OTU 4053) のみが高い rRNA 発現を示す代謝活性種であった。その一方で、Gammaproteobacteria 細菌では、NG5 と NT5 のライブルリ間における上位種の違いは顕著であった (図 3.10C、D；図 3.11C、D)。NG5 ライブルリで相対存在量が低いが NT5 ライブルリでは上位種として検出される Chromatiales 目細菌群は堆積物中の菌密度が低いものの rRNA の発現 (タンパク質合成) が活発であると推定される。このような微生物は得られるエネルギーを細胞分裂 (増殖 : 同化代謝) のためというよりも恒常性維持 (異化代謝) に利用していると考えられた。以上をまとめると、DNA と RNA に基づいた高解像度な微生物群集構造解析により、硝酸塩が添加された堆積物中では硫黄酸化細菌として知られる *Sulfurimonas* 属細菌と Chromatiales 目細菌群が劇的に増殖または代謝活性化したことが明らかとなった。

NT5 と CT5 ライブルリ間の比較から、Epsilon- と Gamma-proteobacteria 細菌群以外にも硝酸塩添加に依存して rRNA 発現が実験 5 日目に大きくなった微生物種 (OTU) が多数検出された。ここでは、NT5 ライブルリの相対強度が、CT5 ライブルリと比較して 5 倍以上になった OTU (硝酸塩添加によって顕著に代謝活性化された微生物種) を表 3.5 に示す。硫黄酸化以外の嫌気呼吸を行う複数の微生物の代謝活性化が見い出された。例えば、発酵性細菌や従属栄養的な硝酸還元菌として知られる *Cellulomonas* sp. (OTU 566) の NT5 ライブルリにおける相対強度は CT5 ライブルリと比べて 430 倍増大していた。鉄還元能を有する *Geobacter* spp. (OTUs 8007, 245, 3917)、*Pelobacter* sp. (OTU 2865)、*Geothrix* sp. (OTU 2401) は 13–94 倍の相対強度の上昇が観察された。加えて、水素資化性メタン生成古細菌との共生細菌である低級脂肪酸酸化細菌の *Syntrophobacteriaceae* 科細菌 (OTU 11860) 及び酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta* sp. (OTU 3178) についても硝酸塩添加に依存した高い rRNA 発現が観察された。

一方、無添加系における堆積物中の微生物群集構造は実験期間中ほとんど変化しなかった (G0、CG2、CG5、T0、CT2、CT5；図 3.9)。ここでは、いずれのライブルリでも Deltaproteobacteria 細菌に属し、硫酸還元菌として知られる *Desulfobacteraceae* 科 と *Desulfobulbaceae* 科の細菌群が主要となった。これらそれぞれの細菌群は実験 5 日目の相対存在量 (CG5 ライブルリ) で 11.5% と

7.7%、rRNA 発現を示す代謝活性種（CT5 ライブラリ）の中で 6.3%と 50%を占めた。このような硫酸還元菌群の優占はこれまで様々な海底堆積物において報告されている(52, 54)。しかしながら堆積物の無添加系において、硫酸還元菌は相対的に高い rRNA 発現を示しているが、 $\text{SO}_4^{2-}$  濃度は実験開始から 5 日目までほとんど減少しなかった（図 3.3C）。これらの結果は、硝酸塩無添加系の堆積物中では、元々存在していた硫酸還元菌の代謝活性が相対的に高く見積もられてしまうが、硫酸還元は微弱であるという二章の結論を支持するものである。硝酸塩添加系および無添加系における単位堆積物当たりの絶対的な代謝活性については以降の課題として挙げられた（五章にて調査）。

### 3.3.3 優占した硫黄酸化細菌とその化学合成無機栄養的増殖

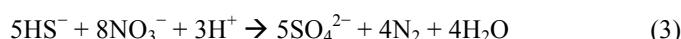
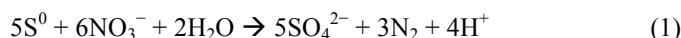
硫黄化合物と硝酸塩を唯一のエネルギー源とした液体培地による限界希釀培養法により、津波打上げ堆積物から 3 株（HDS01、HDS22、HDSN4）の純粋培養株を取得した（図 3.12、表 3.6）。なお、16S rRNA 遺伝子增幅産物の次世代シーケンス解析により、各々の分離菌株が 99.9%以上に集積（純化）されていることを確認した（データは割愛する）。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長に基づく系統解析から、これらの分離菌株は系統樹上で新しいクラスターを形成し、HDS01 株と HDSN4 株は最近縁種 *Sulfurimonas denitrificans* (NR074233) に対してそれぞれ 96.7%と 95.8% の塩基配列相同性を示し、HD22 株は *Thioalkalispira microaerophila* (NR025239) に対して 95.2% の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性を示した。種を判定する基準に関して、古典的な系統分類で用いられる染色体 DNA-DNA 分子交雑試験では相同性 70%で同一種と判断するのと同様に、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性が 97.0%以上であることが同一種としての閾値として示されており (69)、絶対的ではないが、この数値が微生物種を系統学的に分類する場合の目安とされている。本研究で得られたいずれの分離菌株も既知菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に対して 97.0%以下の低い相同性を示すことから、*Sulfurimonas* 属および *Thioalkalispira* 属の新種であることが強く示唆された。また HDS01 株と HDS22 株は、硝酸塩添加系の堆積物中で最も優占化した硫黄酸化細菌群（それぞれ OTU 4053 と 5722）に一致した（図 3.10A、C）。さらに分離菌 HDS01 株と HDS22 株を単体硫黄またはチオ硫酸塩を電子供与体に硝酸塩を電子供与体とした液体培地にて培養したところ、 $\text{NO}_3^-$  の減少および  $\text{SO}_4^{2-}$  の生成が確認された。このことから、両菌株は硫黄化合物と硝酸塩を基質として化学合成無機栄養的に生育できることが示された（表 3.6）。

### 3.4 考察

本章では  $\text{SO}_4^{2-}$  や Fe(III)よりも高エネルギーの電子受容体「 $\text{NO}_3^-$ 」を電子受容体とする嫌気分解に焦点を当て、津波打上げ堆積物への硝酸塩の添加に応答した物理化学パラメータと微生物群集構造の変化を解析した。各種クロマトグラフ法、CHNS 元素分析などの多様な化学分析によ

って、堆積物分解の指標となる物理化学的パラメータ ( $\text{NO}_3^-$  や  $\text{SO}_4^{2-}$  など) を経時的に追跡することに成功した。また DNA と RNA に基づいた次世代シークエンサー解析により、硫黄酸化細菌の急激な増殖と代謝活性化を高感度かつ高解像度に捉えることができた。硝酸塩添加により優占化した系統的に新規な硫黄酸化細菌の分離培養に成功し、これら分離株の硝酸塩と硫黄化合物による化学合成無機栄養的な生育を明らかにした。さらに実験終了時における発酵性細菌、鉄還元菌、酢酸資化性メタン生成古細菌の 16S rRNA 発現が確認されたことから、硝酸塩添加依存的に電子供与体が他の嫌気微生物のエネルギー源として堆積物内に供給されたことが強く示唆された。各種化学分析、次世代シークエンサー解析、分離培養法を組み合わせることで、堆積物における微生物群集の劇的な環境応答を解明することができた。

堆積物試料への硝酸塩の添加により脱窒反応と硫黄酸化反応が誘発された（図 3.3）。実験期間中の TOC 濃度はほとんど変化がなかったことから（図 3.4B）、従属栄養的な硝酸還元反応はほぼ起きていないことが示唆された。電子供与体となる有機物が枯渀した条件下では、脱窒反応と共に硫黄酸化反応が起きることがこれまでに黒海やバルト海の海底堆積物で報告されている（70-72）。本研究では、硝酸塩添加の後、堆積物中の硫黄元素が有意に減少した（図 3.5）。このことから、元々存在していた硫黄成分、例えば単体硫黄や硫黄化合物（チオ硫酸、硫化水素等）が脱窒反応と共に酸化反応により  $\text{SO}_4^{2-}$  にまで酸化されたことが強く示唆される。単体硫黄及びこれらの硫黄化合物の酸化反応と脱窒反応は以下の化学反応式のように進行する（73, 74）。



硝酸塩添加系では、実験期間を通して消費された  $\text{NO}_3^-$  濃度は 17.7 mM、生成された  $\text{SO}_4^{2-}$  濃度は 11.3 mM であった（図 3.3B、C）。このときの  $\text{NO}_3^-/\text{SO}_4^{2-}$  の比は 1.57 であり、上記(3)式の硫化水素酸化反応と脱窒反応の共役反応の化学量論比とほぼ一致した。硫酸還元反応の最終生成物である硫化水素の蓄積は海底堆積物においてこれまでに多く報告されてきている（16, 51, 71）。これらのことから、本堆積物中に蓄積していた硫化物が脱窒反応と共に酸化反応の電子供与体として主に使われたと推察される。

硝酸塩添加系において、Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級の硫黄酸化細菌の劇的な増殖が次世代シークエンサー解析により明らかとなった（図 3.10）。その中の優占種である OTU 4053 と OTU 5722 に対応する微生物の分離培養に成功し、HDS01 株は *Sulfurimonas* 属、HDS22 株は *Thioalkalimicrobium* 属に帰属する細菌であることが示唆された（図 3.12、表 3.6）。これらの分離菌株は、既知菌の 16S rRNA 遺伝子配列に対して 95.2%–96.7% の相同性を示し、硝酸塩と硫黄成分（単体硫黄およびチオ硫酸塩）を唯一のエネルギー源として化学合成無機栄養的に生育可能である

ことが解明された。化学合成硫黄酸化細菌である OTU 4053 (HDS01 株) および OTU 5722 (HDS22 株) それぞれの堆積物中での相対存在量は、実験開始時に 0.03% と 0.5% であったのが実験 5 日目には 42.7% と 12.5% へと劇的に急上昇した。この劇的な増殖に伴って rRNA 発現（タンパク質合成）も増加した（図 3.11B、D）。加えて、硝酸塩添加系では無添加系と比べて実験 5 日目の CO<sub>2</sub> 濃度が有意に低かったことから（図 3.3A）、このとき堆積物系内では化学合成硫黄酸化細菌群による炭酸固定が起きていたことが示唆された。これらの結果は、OTU 4053 や OTU 5722（即ち、HDS01 株と HDS22 株）が堆積物内の脱窒反応と硫黄酸化反応および炭酸固定反応に直接的に関与していたことを示唆している。次世代シークエンサーによる高解像度な系統解析により、これらの分離菌株以外にも Chromatiales 目細菌群が硝酸塩添加により増殖および代謝活性化したことが観察され（図 3.10、3.11）、本系統に属する複数の細菌群も協働的に堆積物中の硫黄、窒素、炭素の循環に関与していたと示唆された。

さらに、上述の化学合成硫黄酸化細菌群の他に、硝酸塩添加系の実験終了時において顕著に rRNA 発現（タンパク質合成）を示した微生物群が複数検出された（表 3.6）。電子受容体として働く SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、Fe(III)、CO<sub>2</sub> は元々堆積物内に存在しており（図 3.3B、D、図 3.4E）、適当な電子供与体（有機物）が供給されれば、それらの酸化還元反応（嫌気呼吸）は起こりうる状況であった。次世代シークエンサーを用いた高解像度解析により、実験 5 日目には従属栄養性硝酸還元菌や発酵性細菌 (*Cellulomonas* sp.) や鉄還元菌 (*Geobacter* sp., *Pelobacter* sp., *Geothrix* sp.)、さらに酢酸資化性のメタン生成古細菌 (*Methanosaeta* sp.) に近縁な微生物群の硝酸塩添加に依存した rRNA 発現の上昇が明らかとなった（表 3.6）。これらのことから、硝酸塩の添加後、化学合成硫黄酸化細菌によって固定された炭素が堆積物中に供給され、他の嫌気呼吸を行う微生物のエネルギー源・栄養源として利用されたことが示唆された。このような堆積物中の嫌気微生物間の代謝ネットワークの解明には、安定同位体追跡法（Stable isotope probing (24)）の適用が効果的であると考えられた。

系統の大きく異なる二種類の硫黄酸化細菌 (*Sulfurimonas* 属細菌および Chromatiales 目細菌) は同様の生理学的機能（硫黄酸化能、脱窒能、炭酸固定能）を有しながらも堆積物中で共存していた（図 3.10）。*Sulfurimonas* 属は一種（OTU 4053 [HDS01 株]）が優占化および代謝活性化したが（図 3.10）、その一方で Chromatiales 目細菌群は複数種（例えば OTU 5722 [HDS22 株]、OTU 3944 や OTU 1143）の代謝活性化が観察された。OTU 5722 と OTU 6560 以外の Chromatiales 目細菌は rRNA 発現が大きいものの、その菌密度は極めて小さかったことから（図 3.11C、D）、この細菌群は硫黄化合物と硝酸塩との異化代謝が活発であるが、堆積物中の炭酸または CO<sub>2</sub> を固定して増殖する同化代謝をあまり行っていなかったことが予想される。近年のゲノム解析の結果により *Sulfurimonas* 属細菌と Chromatiales 目細菌は、硫黄酸化反応と硝酸還元反応および炭酸固定反応において異なる代謝経路を有していることが報告されている(75-79)。特に、*Sulfurimonas*

属細菌は還元的 TCA (reductive tricarboxylic acid) 回路、Chromatiales 目細菌は CBB (Calvin–Benson–Bassham) 回路により炭酸または CO<sub>2</sub> 固定を行っていることが報告されている。生成される最終産物は還元的 TCA 回路では有機酸、CCB 回路では糖であり、それぞれの生体構成分子の生合成が異なる等、興味深い代謝経路の違いが報告されている。さらに、Chromatiales 目細菌群の中には、エネルギーが限られた条件でのみ、即ち 1–2 mM 程度の低い NO<sub>3</sub><sup>−</sup> 濃度においてのみ生育可能な微生物の存在も知られる(80)。今後の分離菌株の全ゲノム解読や共培養試験等による詳細な解析により、堆積物における硫黄酸化細菌の棲み分け機構の解明が期待される。これらのことから、堆積物中では複数種の化学合成無機栄養硫黄酸化細菌がそれぞれ異なる代謝経路や生理特性を有することにより生態的ニッチを形成していると予想される。

### 3.5 まとめ

本章では SO<sub>4</sub><sup>2−</sup> や Fe(III) より高エネルギーの電子受容体「NO<sub>3</sub><sup>−</sup>」を津波打上げ堆積物へ添加した時の分解ポテンシャル評価と微生物群集の応答を解析した。微生物群集中において全体の 0.5% 以下でわずかに存在していた *Sulfurimonas* 属および Chromatiales 目に属する細菌群が、硝酸塩添加により誘発される脱窒と硫黄酸化に直接的に関与し増殖した。その後、従属栄養生の嫌気呼吸微生物群の代謝活性化が観察されたことから、この時の堆積物中では炭素源が供給されていたことが示唆された。優占した硫黄酸化細菌は化学合成無機栄養的に生育することが可能であったことから、硫黄酸化細菌が堆積物中の一次生産者となることで、堆積物の嫌気分解過程が進みつつあることが強く示唆された。

表 3.1 化学分析装置の条件

有機元素成分 (CHNS 分析装置) 分析条件	
CHNS元素分析装置	FLASH 2000 (Thermo Scientific)
カラム	CHNS/NCS PQS (Thermo Scientific)
検出器	TCD
移動相	He
流量	130 mL/min
カラム温度	65°C

表 3.2(A) 改変型 Widdel 海水培地の組成

Modified Widdel medium		
Reagent	g /L	Final concentration (mM)
NH <sub>4</sub> Cl	0.535	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.136	1
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.04	15
NaCl	20.45	350
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.147	1
NaHCO <sub>3</sub>	2.52	30
Trace element solution	1 mL	-
Vitamin solution	2 mL	-
Water	Up to 1000 mL	

表 3.2(B) 改変型 Widdel 海水培地 Trace element solution (1000 倍濃縮液) の組成

Trace element solution		
Reagent	g /L	Final concentration (μM)*
FeCl <sub>2</sub>	1.27	10
CoCl <sub>2</sub>	0.13	1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.198	1
ZnCl <sub>2</sub>	0.136	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.1
NiCl <sub>2</sub>	0.013	0.1
AlCl <sub>3</sub>	0.0133	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0242	0.1
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.0017	0.01
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.0033	0.01
CuCl <sub>2</sub>	0.0013	0.01

表 3.2(C) 改変型 Widdel 海水培地 Vitamin solution (500 倍濃縮液) の組成

Vitamin soluiton		
Reagent	mg /L	Final concentration (μM)*
Biotin	5	20
p-aminobenzoic acid	5	20
Pantothenate	5	20
Pyridoxine	10	20
Nicotinamide	5	20
Thiamine	5	20
Lipoic acid	5	20
Folic acid	5	20
Vitamin B12	5	20
Riboflavin	5	20

\* 実際の培地における終濃度を示す。

表 3.3(A) PCR 反応液の組成

Solution	Volume ( $\mu$ L)
Template	2
5×Q5 Reaction buffer	10
2.5 mM dNTP	1
30p B27f	0.5
30p B1525r	0.5
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0.5
Water	20.5
Total: 50 $\mu$ L/PCR tube	

表 3.3(B) PCR 反応温度・時間

Step	Temperature (°C)	Time (min: sec)	Cycle
Initial denaturation	98	1:30	1
Denaturation	98	0:10	
Annealing	52	0:30	35
Extention	72	1:00	
Final extention	72	2:00	1

表 3.4 16S rRNA 遺伝子（DNA）とその転写産物（RNA）の次世代シークエンスデータに基づく堆積物中の微生物多様性指数（ $\alpha$  多様性指数）

16S rRNA	Sequence library name*	No. of sequences	Alpha-diversity**		
			Chao1	Shannon	1/Simpson
Genes	G0	40,869	2620±159	9.27±0.34	130.1±6.4
	GN2	23,005	4593±184	8.89±0.03	84.7±1.6
	GN5	40,169	3131±294	5.50±0.05	5.4±0.1
	GC2	34,022	4951±157	9.37±0.03	137.7±4.9
	GC5	33,723	4730±189	9.24±0.02	110.2±5.4
Transcripts	T0	9,336	4313±249	6.81±0.02	16.1±0.2
	TN2	13,527	4237±198	6.71±0.03	18.8±0.5
	TN5	16,191	3020±219	5.70±0.04	15.8±0.3
	TC2	36,721	4594±213	6.89±0.04	18.0±0.5
	TC5	33,088	3950±207	6.78±0.04	17.8±0.3

\* G0、T0 は実験 0 日目、NG2、NG5、NT2、NT5 は硝酸塩添加系の実験 2、5 日目、CG2、CG5、CT2、CT5 は無添加系の実験 2、5 日目をそれぞれ示す。

\*\* それぞれの多様性指数は各シークエンスライブラリから同じシークエンス数 ( $n = 7,374$ ) を無作為に 10 回選抜して計算した。その平均値と標準誤差を示す。

表 3.5 硝酸塩添加系実験 5 日目に 16S rRNA の高発現がみられた微生物種 (OTU : Operational taxonomic unit)

OTU ID	Closely related species	Similarity (%)	Acc. No.	Phylum/Class	Family	Relative abundance (%)*	Increase ratio (fold)**	Putative function***	Marine bacteria ****
4053	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	98.4	NR121690	Epsilonproteobacteria	Helicobacteraceae	14.64	2421.7	Sulfur oxidation	+
566	<i>Cellulomonas oligotrophica</i>	98.8	KF817659	Actinobacteria	Cellulomonadaceae	2.60	430.2	Fermentation, nitrate reduction	+
13536	<i>Thioalkalispira microaerophila</i>	97.6	NR025239	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	0.82	269.8	Sulfur oxidation	+
11183	<i>Thioalbus denitrificans</i>	96.8	NR122087	Gammaproteobacteria	Ectothiorhodospiraceae	0.43	143.1	Sulfur oxidation	+
8007	<i>Geobacter bremensis</i>	100	KF800712	Deltaproteobacteria	Geobacteraceae	6.78	93.5	Iron(III) reduction	-
3944	<i>Thioalbus denitrificans</i>	100	NR122087	Gammaproteobacteria	Ectothiorhodospiraceae	13.37	38.8	Sulfur oxidation	+
2401	<i>Geothrix fermentans</i>	99.2	NR036779	Acidobacteria	Holophagae	0.21	34.7	Iron(III) reduction	+
14834	<i>Thioalbus denitrificans</i>	96.8	NR122087	Gammaproteobacteria	Ectothiorhodospiraceae	0.20	33.7	Sulfur oxidation	+
7917	<i>Thiopseudomonas lithotrophicum</i>	95.2	NR112829	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	0.09	30.7	Sulfur oxidation	+
2865	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	95.2	NR075013	Deltaproteobacteria	Pelobacteraceae	0.09	28.6	Iron(III), sulfate reduction	+
425	<i>Geobacter luteola</i>	99.6	NR114303	Deltaproteobacteria	Geobacteraceae	6.02	26.5	Iron(III) reduction	-
20	<i>Thiopseudomonas lithotrophicum</i>	94.5	NR112829	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	0.07	22.5	Sulfur oxidation	+
12681	<i>Thiopseudomonas lithotrophicum</i>	96.4	NR112829	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	0.33	22.1	Sulfur oxidation	+
5722	<i>Thioalkalispira microaerophila</i>	96.8	NR025239	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	10.17	21.4	Sulfur oxidation	+
15348	<i>Thiopseudomonas lithotrophicum</i>	95.3	NR112829	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	0.31	17.4	Sulfur oxidation	+
13687	<i>Desulfovibrio butyratiphilus</i>	95.3	NR112679	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	0.09	15.3	Butyrate oxidation, sulfate reduction	+
3917	<i>Geobacter pelophilus</i>	97.6	NR026077	Deltaproteobacteria	Geobacteraceae	0.12	12.9	Iron(III) reduction	-
14604	<i>Desulfocapsa sulfexigens</i>	93.3	KF952439	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	0.06	10.2	Sulfur disproportion	+
12930	<i>Thioalkalispira microaerophila</i>	97.6	NR025239	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	0.12	9.7	Sulfur oxidation	+
17265	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	98.4	NR074118	Deltaproteobacteria	Syntrophaceae	0.09	7.7	Sulfate reduction	+
9626	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	94.5	NR025150	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	4.05	6.2	Sulfate reduction	+
1714	<i>Thiopseudomonas lithotrophicum</i>	96.0	NR112829	Gammaproteobacteria	Thioalkalispiraceae	0.06	6.1	Sulfur oxidation	+

\*NT5 ライブドリににおける相対存在量を示す (0.05% 以下を除外した)。

\*\*CT5 ライブドリの相対存在量と比較して増加率を算出した。

\*\*\*最近縁種の生理機能からそれぞれの OTU の有する機能を推定した。

\*\*\*\*最近縁種が海洋および高濃度の塩を含む環境から分離培養された OTU には「+」、陸上および淡水環境から最近縁種が分離培養された OTU には「-」を示した。

表 3.6 分離菌株の系統学的・生理学的性質  
 (既知微生物の 16S rRNA 遺伝子に対する配列相同性と硫黄化合物による生育)

Strain name	Closest relative species	Similarity (%)	Accession No.	Sulfur compounds*		Related OTU
				Sulfur ( $S^0$ )	Thiosulfate	
HDS01	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	96.7	NR074133	+	++	4053
HDS22	<i>Thioalkalispira microaerophila</i>	95.2	NR025239	+	+	5722
HDNS4	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	95.8	NR074133	-	-	8028

\* 硫黄化合物と硝酸塩を基質にして分離菌を一ヶ月間嫌気的に培養し、 $SO_4^{2-}$ の生成濃度および $NO_3^-$ の減少濃度がそれぞれ 10 mM 以上の場合には「++」、1 mM 以上 10 mM より低い場合には「+」、1 mM よりも低い場合には「-」を示す。

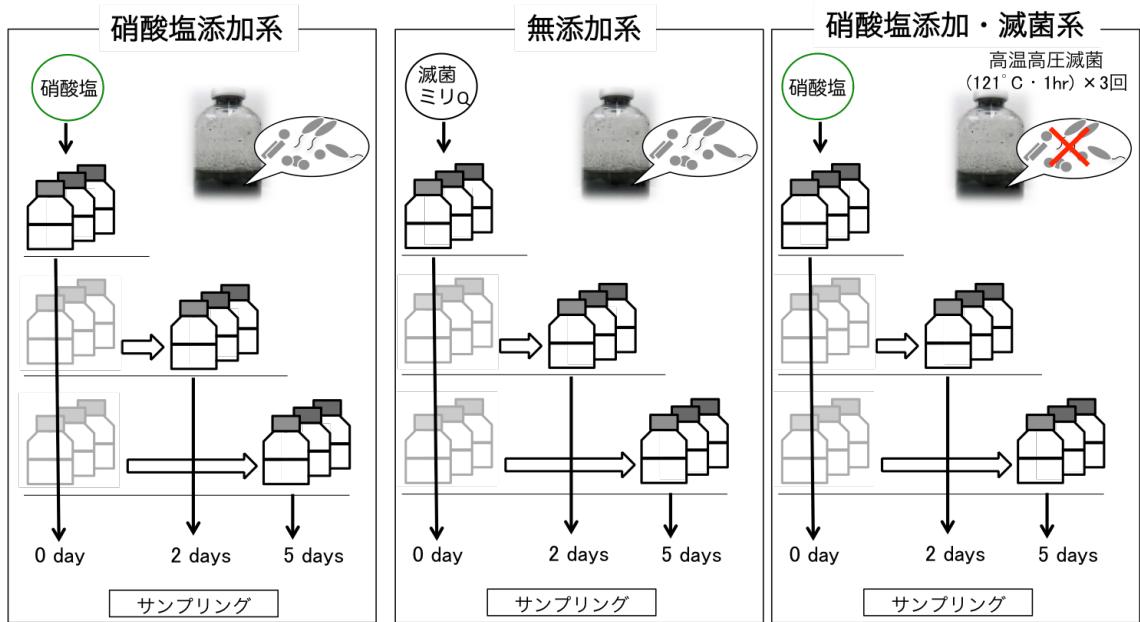


図 3.1 堆積物の硝酸還元ポテンシャル評価系の実験概要

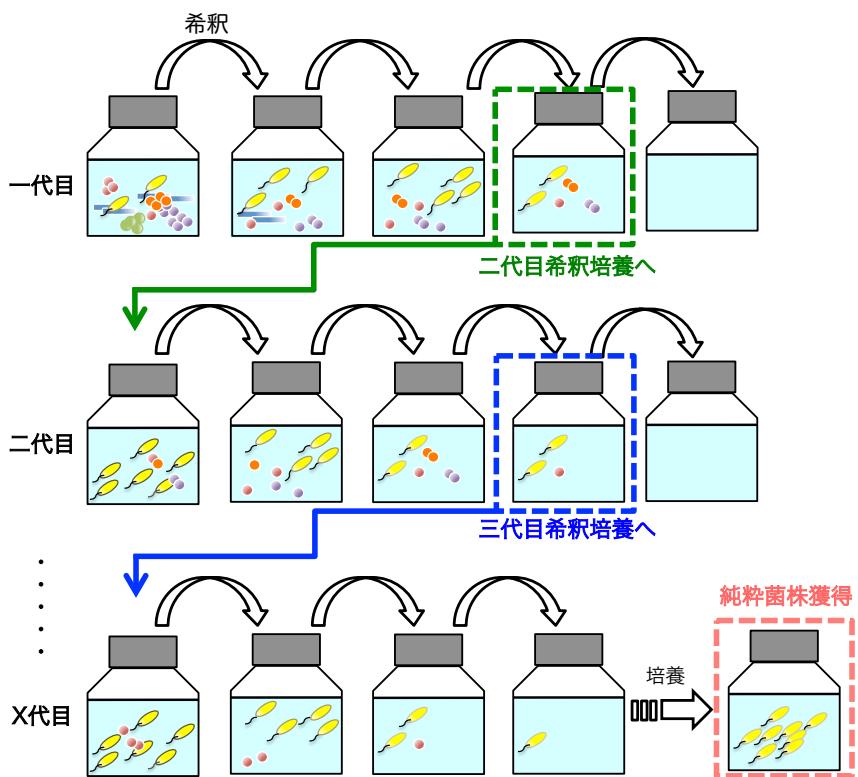


図 3.2 限界希釀培養法による微生物の分離培養の概要

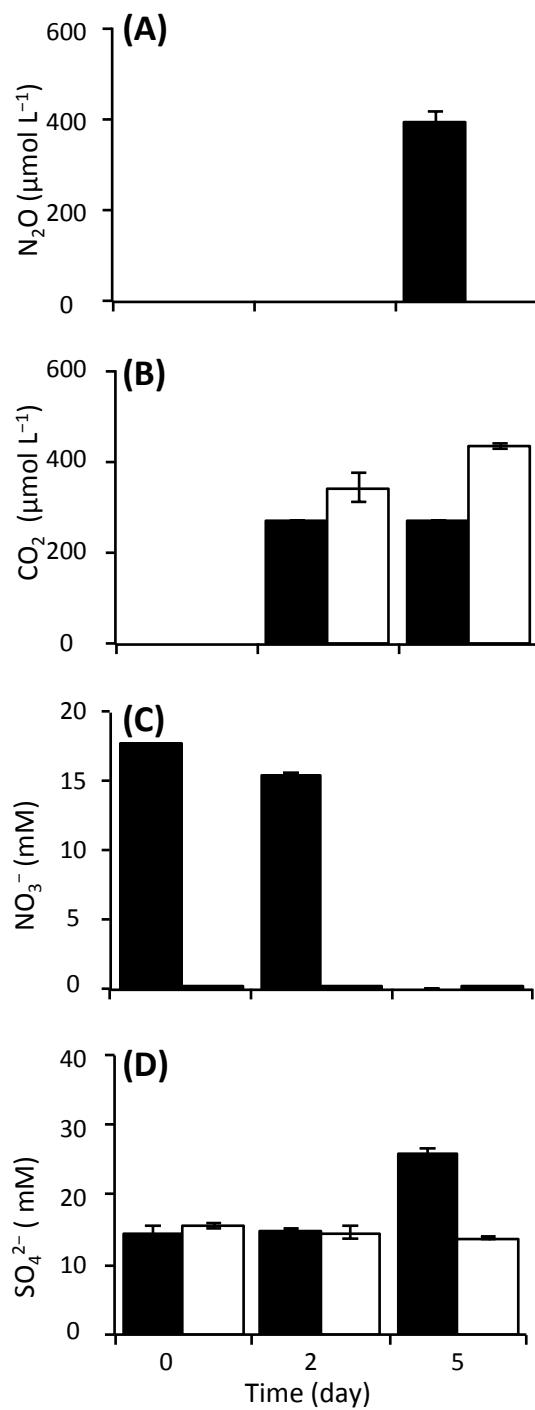


図 3.3 硝酸還元条件における堆積物の物理化学パラメータの変化-1

黒色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは無添加系を示す。A は気相の  $N_2O$ 、B は気相の  $CO_2$ 、C は液相中の  $NO_3^-$ 、D は液相中の  $SO_4^{2-}$  の濃度をそれぞれ示す。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

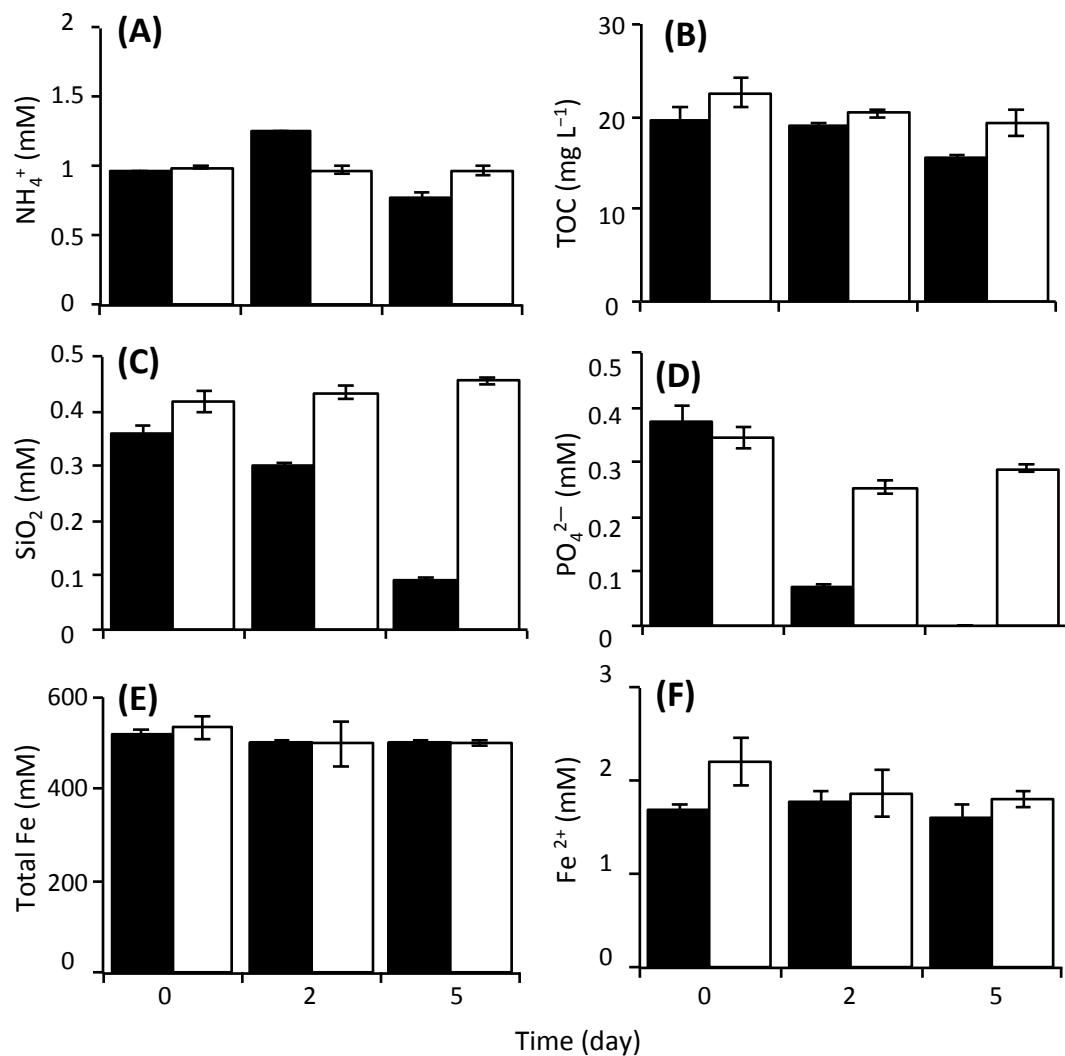


図 3.4 硝酸還元条件における堆積物の物理化学パラメータの変化-2

黒色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは無添加系を示す。A は液相中の  $\text{NH}_4^+$ 、B は液相中の TOC、C は液相中の  $\text{SiO}_2$ 、D は液相中の  $\text{PO}_4^{2-}$ 、E は堆積物懸濁液中の全 Fe、F は堆積物懸濁液中の  $\text{Fe}^{2+}$  の濃度をそれぞれ示す。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

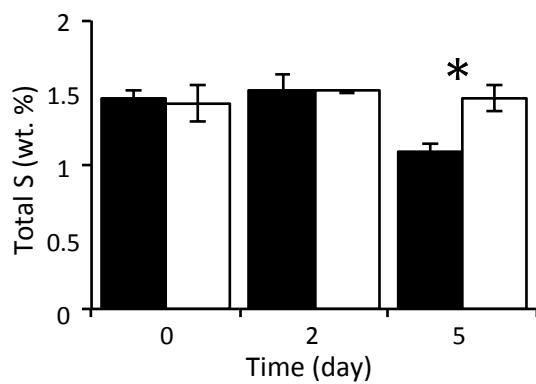


図 3.5 硝酸還元条件における堆積物固相中の硫黄成分含有率の変化

黒色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは無添加系を示す。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。アスタリスクは2つの添加系間の固相中の元素含有率の差が有意であることを示す (\*:  $p < 0.05$ )。

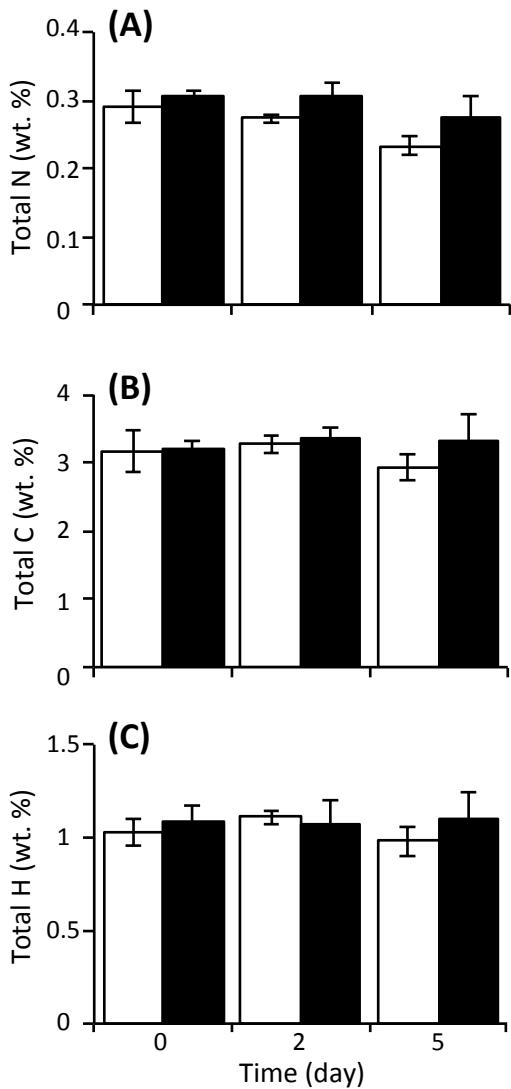


図 3.6 硝酸還元条件における堆積物固相中の窒素、炭素、水素成分含有率の変化  
 黒色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは無添加系を示す。乾燥堆積物中の窒素 (A)、炭素 (B) および水素 (C) の含有率を示す。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

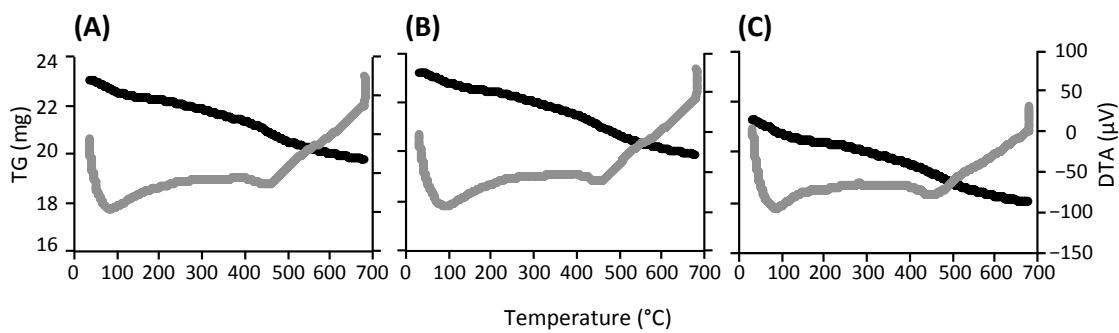


図 3.7 硝酸還元条件における堆積物固相の TG/DTA パターン

実験 0 日目 (A)、無添加系実験 5 日目 (B) および硝酸塩添加系実験 5 日目 (C) の堆積物固相における代表的な TG/DTA パターンを示す。黒色の線が TG 曲線、灰色の線が DTA 曲線を示す。

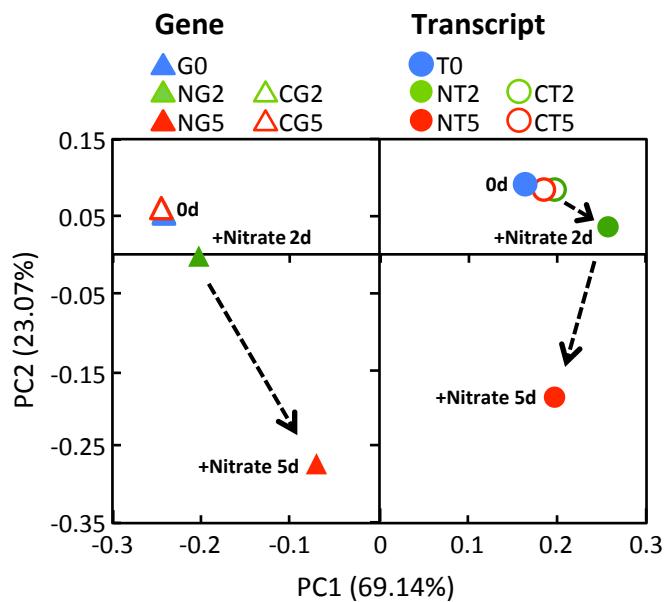


図 3.8 16S rRNA 遺伝子(DNA)とその転写産物 (RNA) の次世代シークエンスデータに基づく PCoA (Principal coordinate analysis) 解析による微生物群集構造の変遷

試料間の微生物群集構造の違いを各シークエンスライブラリから無作為に抽出された同じ配列数 ( $n = 9,336$ ) により算出された Weighted UniFrac 距離に基づき PCoA プロットとして示す。塗りつぶされたシンボル (▲、●) が硝酸塩添加系、白抜きのシンボル (△、○) が無添加系をそれぞれ示す。三角が DNA (Gene)、丸が RNA (Transcript) に基づいたデータを示す。プロットの色は実験期間を示し、実験 0 日目が青色、2 日目が緑色、5 日目が赤色で表されている。

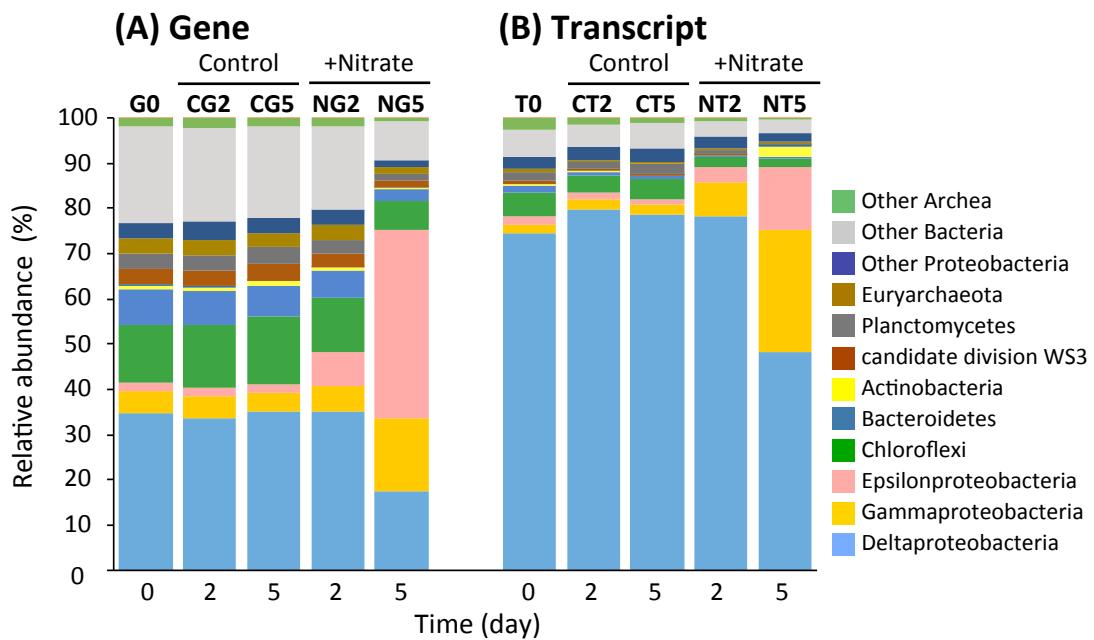


図 3.9 硝酸還元条件における堆積物中の微生物群集構造と代謝活性微生物

A : 微生物の存在 (DNA)、 B : rRNA 発現 (RNA)

次世代シークエンスデータの系統解析結果に基づく「門」または「綱」の分類階層による微生物の群集構造を示す。微生物の系統はグラフ右側に示した凡例の色と対応する。バーの上にライラリ名 (G0、 T0 は実験 0 日目、 NG2、 NG5、 NT2、 NT5 は硝酸塩添加系の実験 2、 5 日目、 CG2、 CG5、 CT2、 CT5 は無添加系の実験 2、 5 日目) を示す。

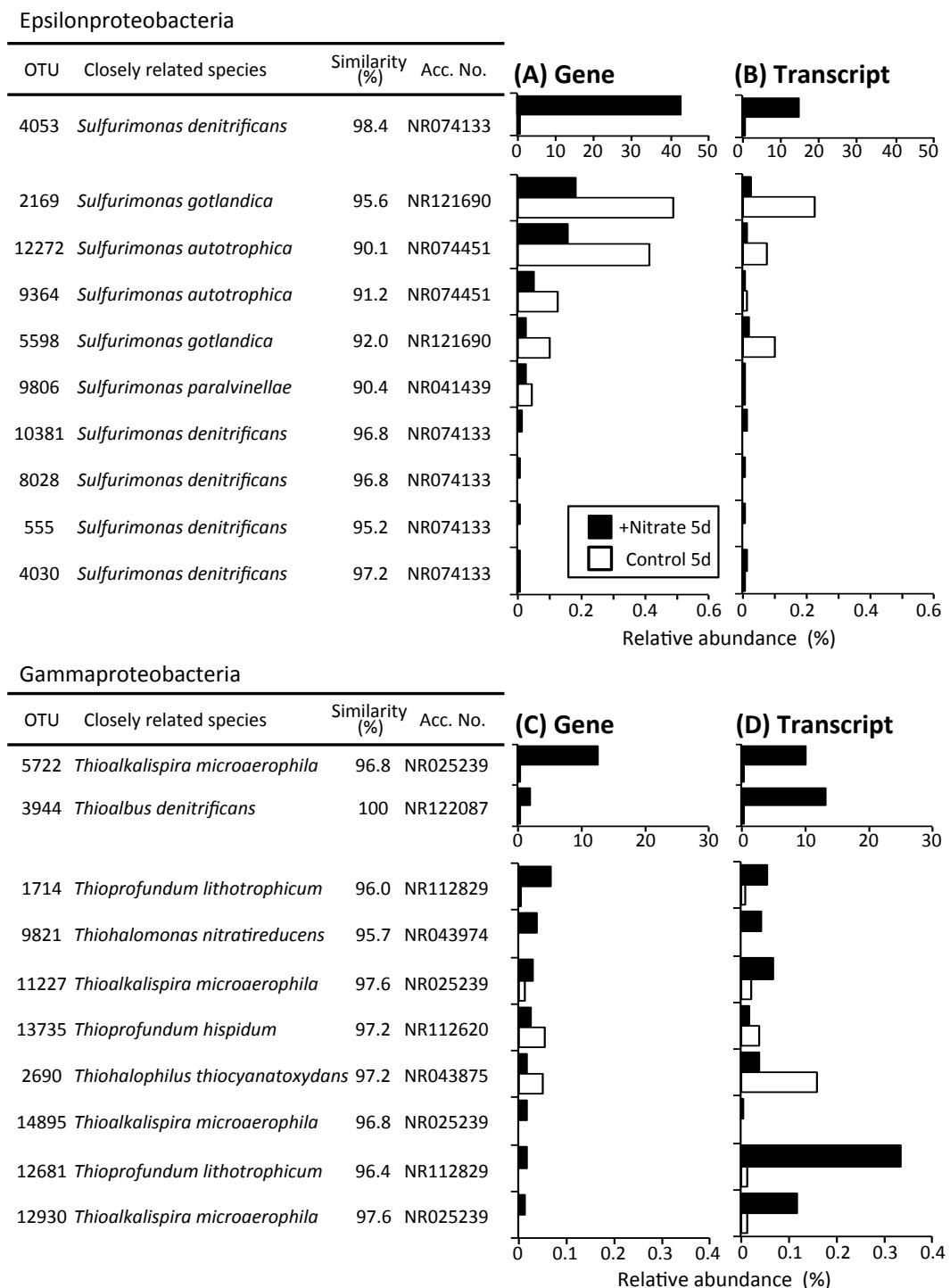


図 3.10 Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級細菌群の実験 5 日目に優占する微生物

上位 10 種 (OTU : Operational taxonomic unit)

黒色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは無添加系を示す。実験 5 日目の NG5 ライブラリ (DNA) における Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級細菌群の優占 (相対存在量) 順で OTU を並べ (A, C)、その OTU の NT5 ライブラリ (RNA) における相対強度も B および D にそれぞれ示す。

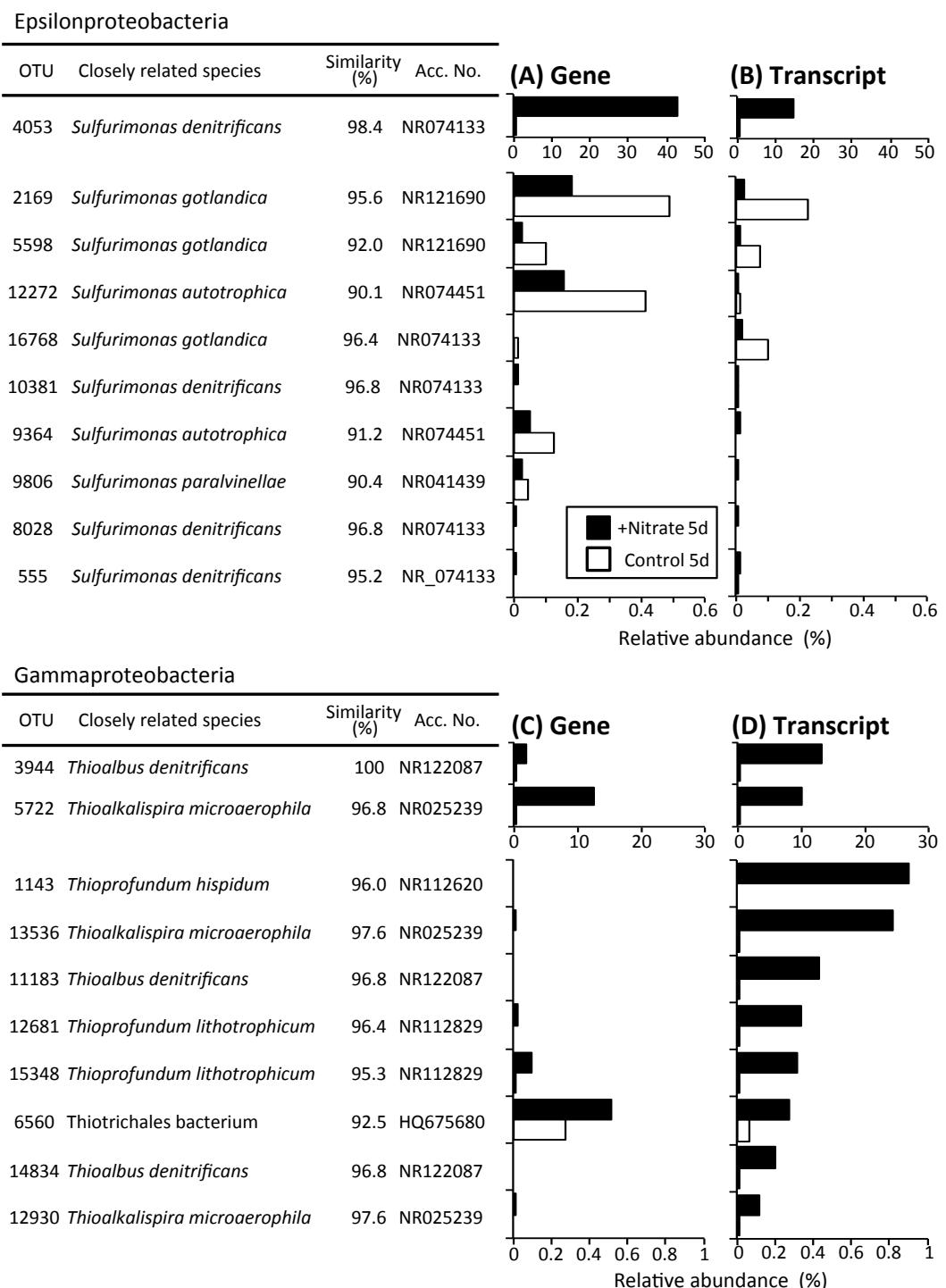


図 3.11 Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級細菌群の実験 5 日目に代謝活性を示す  
微生物上位 10 種 (OTU : Operational taxonomic unit)

黒色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは無添加系を示す。実験 5 日目の NT5 ライブラリ (RNA) における Epsilon- と Gamma-proteobacteria 級細菌群の rRNA 発現 (相対強度) 順で OTU を並べ (B、D)、その OTU の NG5 ライブラリ (DNA) における相対存在量も A および C にそれぞれ示す。

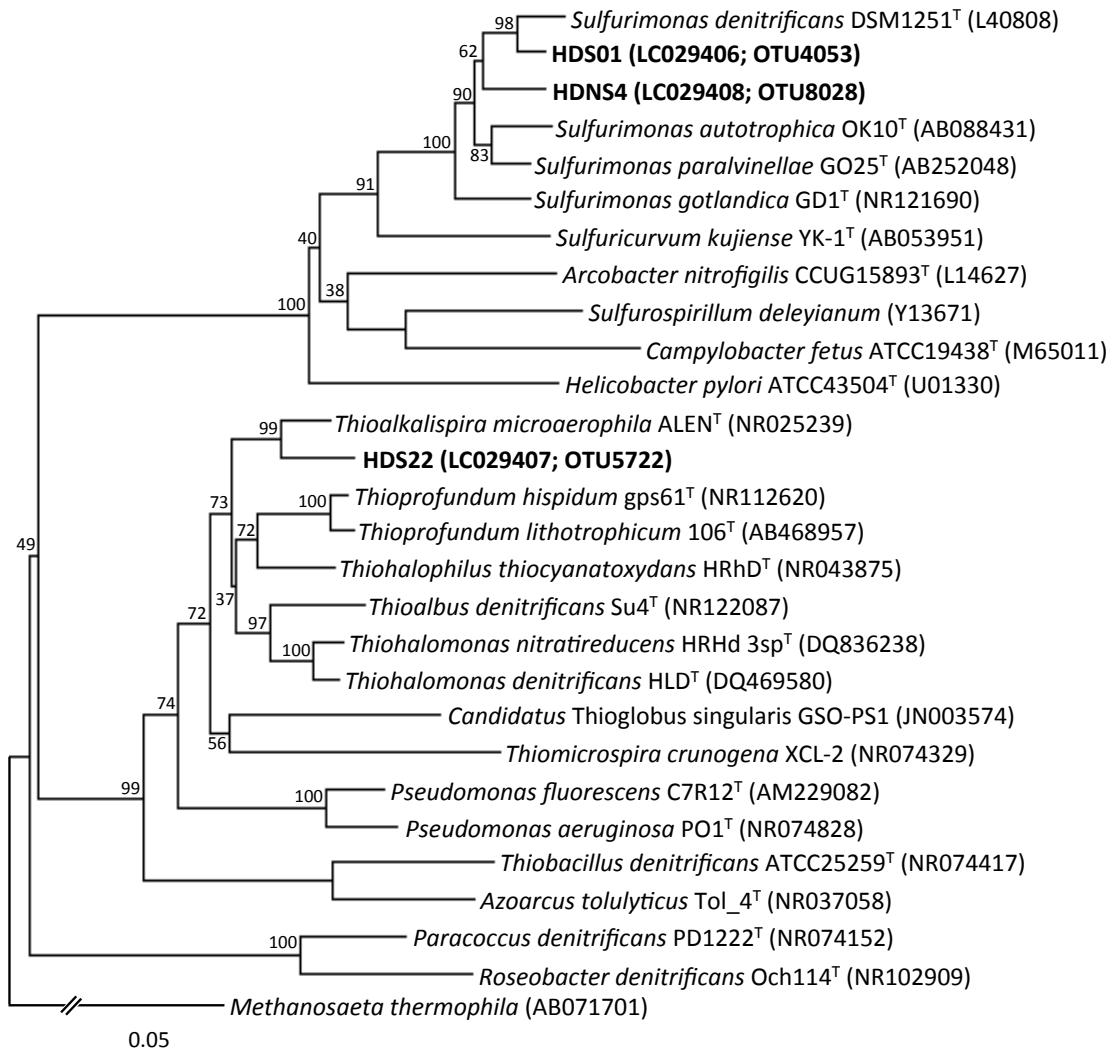


図 3.12 分離菌株の系統学的位置

16S rRNA 遺伝子に基づいた Epsilon- および Gamma-proteobacteria 級細菌の類縁関係を示す。この系統樹は 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を用いて neighbor-joining 法により作成した。太文字が本研究で純粋分離に成功した分離菌 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。スケールバーは配列が 5% 異なった場合の長さを示す。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枝の分岐の信頼性を表す。

## 《四章》超高度 Stable Isotope Probing の開発

### 4.1 はじめに

Stable isotope probing (SIP) は環境中の未知・未培養微生物の「系統」と「代謝機能」を直接的に結びつける手法である。 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  や  $^{18}\text{O}$  といった安定同位体を含む化合物が基質として利用され、それらを代謝分解し、生合成経路を介して生体成分へ取り込む微生物が特定されてきた(81-83)。SIP 法で対象とする微生物成体成分にはリン脂質脂肪酸 (phospholipid-derived fatty acids ; PLFA) (81)や核酸 (DNA、 rRNA、 mRNA) (24, 84, 85)、およびタンパク質 (86)がある。その中でも核酸に基づく SIP は DNA-SIP と RNA-SIP に分けられる。細胞分裂 (増殖) が伴わないと DNA 合成は起こらないが、細胞内での酵素反応に必要なタンパク質の発現のために RNA は盛んに合成される。そのため RNA-SIP では増殖に依存せず代謝活性を有する微生物の同位体基質の取り込みを検出できる。このような RNA-SIP 法の強みを活かし、これまでに様々な環境試料において、未知・未培養微生物のメタン酸化、酢酸酸化菌、鉄還元、アンモニア酸化、炭酸固定などの代謝機能が明らかにされてきた (25, 87-90)。rRNA-SIP で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 を密度勾配超遠心によって密度に従って分離・分画し、T-RFLP、DGGE や single strand conformation polymorphism による RNA 密度画分における微生物群集のプロファイル比較から、同位体標識された微生物群を選び分け、クローンライブリ解析によりその塩基配列を決定する (19, 91)。

これまでに rRNA-SIP における標識 rRNA 検出の高感度化のための改良が多く為されてきた (92, 93)。例えば、密度勾配超遠心により形成された RNA 密度勾配をペリスタポンプによって分画・分離し、その後回収された全ての RNA 密度画分を定量 RT-PCR (qRT-PCR) に供することにより、 $^{13}\text{C}$  標識および非標識 rRNA の密度分布を定量的に把握することができるようになった (94)。さらに、 $^{13}\text{C}$  標識基質を含む実験系と、同じ濃度の非標識基質を含む対照実験系を用意し、それぞれの RNA 密度画分の群集構造を比較することで、完全に  $^{13}\text{C}$  標識された rRNA でなくとも、有意に  $^{13}\text{C}$  標識された rRNA の検出ができるようになった (8)。このような技術進展により、実環境により近い条件で活発に安定同位体基質を取り込む微生物を同定できるようになってきた。しかしながら、rRNA-SIP における標識 rRNA の検出限界 (どの程度の  $^{13}\text{C}$  標識 rRNA 量までを検出可能なのか) については検証されていない。

近年登場した次世代シークエンサーは、一度に数千万シークエンスを解読できる超ハイスクープット性能を持ち、T-RFLP や DGGE 解析のおよそ 1,000–10,000 倍の高解像度で微生物群集構造を解析できると報告されている (95, 96)。実際、安定同位体基質を取り込んだ微生物の検出法として、T-RFLP や DGGE のプロファイル比較が次世代シークエンサーによる微生物群集構造解析に置き換えられ始めている (97, 98)。しかし、これらの研究では  $^{13}\text{C}$  で完全に標識された DNA または rRNA を対象とした解析に終始しており、次世代シークエンサーが極めて有効と考えられ

る「僅かだが有意に<sup>13</sup>C 標識された RNA」の高感度検出には利用されていない。次世代シーケンサーの適用による rRNA-SIP の高感度化に関して、その定量的評価は未だ為されていない。

次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) は 1 回のランで複数の試料を対象として、合計で数千万の 16S rRNA 遺伝子配列を解読することが可能な超ハイスループット性能を有している (43, 99)。本章では、従来 rRNA-SIP 法で頻繁に用いられてきた T-RFLP による<sup>13</sup>C-rRNA の検出限界と比較して、次世代シーケンサー「MiSeq」の適用で rRNA-SIP の感度がどの程度まで増強され得るのかを評価した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 RNA 標準溶液の準備

図 4.1 に実験の概要を示す。*Escherichia coli* K12 株 (ATCC 10798) と *Bacillus subtilis* 168 株 (BGSC 1A700) に由来する 3 種類の RNA 標準溶液を作成した：(i) *E. coli* に由来する完全に<sup>13</sup>C 標識された RNA、(ii) *E. coli* に由来する非標識 RNA、(iii) *B. subtilis* に由来する非標識 RNA。<sup>13</sup>C 標識された RNA については、[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] 標識グルコース (99 atom%; Sigma-Aldrich) を唯一のエネルギー・炭素源として培養した *E. coli* の菌体から抽出した。一方の非標識 RNA を抽出した *E. coli* 菌体および *B. subtilis* 菌体を、ともに非標識グルコース (Wako) を唯一のエネルギー・炭素源として培養した。これらの培養に用いた基礎培地 (pH7.2) の組成は以下の通りである (g L<sup>-1</sup>) : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6.97 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、3.42 ; MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O、0.18 ; NH<sub>4</sub>Cl、1.0 ; CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O、0.13 ; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O、0.018 ; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O、0.00035 ; MnSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O、0.00031 ; グルコース、2 (100)。培養には 100 mL の三角フラスコを用い、<sup>13</sup>C 標識グルコースまたは非標識グルコースを添加した基礎培地 20 mL に *E. coli* または *B. subtilis* を植菌し、それぞれ 37°C、150 rpm にて一晩 (およそ 14 時間) 好気的に培養した。培養液を 2 mL スクリューチューブに回収し、3 分間の遠心分離 (20,000 × g, 4°C) により菌体と上清に分け、菌体を -80°C にて保存した。二章および三章と同様の方法で保存していた菌体から RNA を抽出し、RQ1 DNase (Promega) にて DNA 消化後、イソプロパノール沈殿により精製した RNA をトリス-EDTA 溶液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7.0) 30 μL に溶解した。得られた RNA 溶液を RiboGreen RNA quantification kit (Life Technologies) とプレートリーダー SH-900Lab (Corona Electric; Excitation; 500 nm, Emission; 525 nm) を用いた蛍光定量に供した。

### 4.2.2 RNA の混合と密度勾配超遠心

*E. coli* に由来する完全に<sup>13</sup>C 標識された RNA を、*B. subtilis* に由来する非標識 RNA に対して 1%、0.5%、0.05%、0.01%、0.001% および 0.0001% の割合で混合し、異なる<sup>13</sup>C-RNA 濃度を有する複数の RNA 混合標準試料を作成し、これを「<sup>13</sup>C 混合系」とした (図 4.1)。1% の<sup>13</sup>C 混合系

とは *E. coli* の  $^{13}\text{C}$  標識 RNA と *B. subtilis* の非標識 RNA が 1:99 の割合で含まれる混合液を示す。対照系として、*E. coli* に由来する非標識 RNA を *B. subtilis* に由来する非標識 RNA へと混合した「非標識混合系」も用意した。 $^{13}\text{C}$  混合系と非標識混合系における *E. coli* と *B. subtilis* の RNA 混合溶液 (RNA 量: 500 ng) をセシウムトリフルオロ酢酸 (cesium trifluoroacetate [CsTFA]; Wako)、ホルムアミド、およびグラジエント溶液 (0.1 M Tris、0.1 M KCl、1 mM EDTA) に混合し、20°C、 $128,000 \times g$  にて 60 時間以上の超遠心に供した (94)。1%、0.5%、0.05% および 0.01% の RNA 混合試料は T-RFLP 解析用としてそれぞれ二連で超遠心に供し、0.05%、0.01%、0.001% および 0.0001% の RNA 混合試料は次世代シークエンスと定量 RT-PCR 解析用にそれぞれ三連で超遠心に供した。超遠心で形成された RNA の密度勾配をペリスタポンプにて一定量ごとに分画し、各画分の浮遊密度 (CsTFA BD [buoyant density]) を屈折計 (AR200; Reichert) により測定した (94)。得られた RNA 画分をイソプロパノール沈殿により精製し、トリス-EDTA 溶液 25 μL に溶解した。

#### 4.2.3 RT-PCR および T-RFLP 解析

$^{13}\text{C}$  混合系および非標識混合系から得られた RNA 密度画分を one-step RT-PCR system (Access Quick; Promega) とプライマーセット B27f/B907r (25) を用いて RT-PCR を行った。なお、Beckman D4 (Sigma-Aldrich) により蛍光標識されたフォワードプライマー (B27f) を用いた。RT-PCR の条件を表 4.1 に示す。1% アガロースゲルによる電気泳動により、浮遊密度  $1.750\text{--}1.806 \text{ g mL}^{-1}$  の RNAにおいて 16S rRNA 増幅が認められた。なお、逆転写酵素を添加しない RT-PCR により増幅産物が得られないことから、鑄型 RNA 中に DNA の混入が無いことを確かめた。得られた RT-PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) によって精製し、それぞれ 200 ng の増幅産物を制限酵素 *Msp* I (New England Biolabs) で消化した。その遺伝子断片と DNA Size Standard kit-600 (Beckman coulter) の混合物を DNA シークエンサー GenomeLab GeXP (Beckman coulter) に供し、キャピラリー電気泳動により制限酵素断片 (T-RF [Terminal-restriction fragment]) をその長さごとに分離し、CEQ8000 Genetic Analysis system (Beckman Coulter) を用いて T-RF の鎖長 (bp) とピーク高を求めた。

#### 4.2.4 RT-PCR および世代シークエンサー解析

最高密度画分 (heaviest fraction; “1H”、浮遊密度:  $1.797\text{--}1.798 \text{ g mL}^{-1}$ )、2 番目に高い密度画分 (second-heaviest fraction; “2H”、浮遊密度:  $1.790\text{--}1.792 \text{ g mL}^{-1}$ )、低密度画分 (light fraction; “L”、浮遊密度:  $1.765\text{--}1.776 \text{ g mL}^{-1}$ ) の RNA を one-step RT-PCR system (Access Quick; Promega) による RT-PCR に供した。ここでは MiSeq アダプター配列を含む「515f/806r」をプライマーセットとして用いた(43)。なお、リバースプライマー (806r) には複数サンプルを同時に配列解読する

ための 12 塩基のバーコード配列が含まれる(43)。RT-PCR の条件を表 4.2 に示す。1.2%アガロースゲルの電気泳動により、T-RFLP 解析用のサンプルと同等の輝度の増幅産物が得られたことを確認した。その後の実験および解析のステップについては二章および三章と同様に行った。なお、MiSeq 解析用の試薬として MiSeq Reagent kit (ver.2 300-cycles; Illumina) を用いた。 $^{13}\text{C}$  混合系と非標識混合系で得られた遺伝子配列数の比較において、その違いが有意か否かを判定するために Student の t 検定を行った。

#### 4.2.5 最高密度画分における定量 RT-PCR (qRT-PCR)

最高密度画分 (heaviest fraction; “1H”、浮遊密度 :  $1.797\text{--}1.798 \text{ g mL}^{-1}$ ) の RNA を SuperScript III Platinum SYBR Green one-step qRT-PCR kit (Life Technologies) と real-time PCR detection system (MyIQ2; Bio-Rad) を用いた定量 RT-PCR (qRT-PCR) に供した。ここでは全ての細菌に由来する 16S rRNA および *E. coli* に由来する 16S rRNA の定量を行った。具体的には、プライマーセット「Gamma395f/Gamma871r」(101)を Gammaproteobacteria 綱細菌 (ここでは *E. coli*) の特異的検出に用いた。さらにプライマーセット「515f/806r」(23)を全細菌 (ここでは *E. coli* と *B. subtilis*) の検出に用いた。検量線作成のため、*E. coli* の DNA からプライマーセット「B27f/B907r」(25) を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅させ、その断片を異なる濃度 ( $10\text{--}10^8 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$ ) で含む DNA 溶液を用意した。定量 RT-PCR の条件を表 4.3 に示す。なお、 $60^\circ\text{C}$  から  $95^\circ\text{C}$  のマルティングカーブ解析により非特異的な PCR 産物の生成が無いことを確認した。

### 4.3 結果および考察

本研究では、 $^{13}\text{C}$  標識 RNA の検出法を従来の T-RFLP による群集構造プロファイルから次世代シークエンスによる大規模配列解読へ置き換えることにより、どの程度まで rRNA-SIP の検出感度が増強され得るかを評価した。まず初めに  $^{13}\text{C}$ -rRNA の検出感度評価系を立ち上げるために、 $^{13}\text{C}$ -RNA を僅かに含む RNA 混合標準試料の調整が必須であった。現行の同位体比質量分析 (IR/MS) では  $^{13}\text{C}$  原子組成率 ( $^{13}\text{C}$  atom%) で 10%以下の  $^{13}\text{C}$ -RNA を安定的に定量するのが難しいため (102)、本研究では  $^{13}\text{C}$  atom%ではなく  $^{13}\text{C}$ -RNA と非標識 RNA の混合率を採用することにした。RNA の混合溶液が標準試料として有効か否かを本実験開始前に検証した。具体的には、*E. coli* に由来する  $^{13}\text{C}$  標識された RNA を *E. coli* に由来する非標識 RNA に 20%、15%、10%、5%、1%の割合で混合した試料を密度勾配超遠心に供し、各密度画分 RNA に含まれる 16S rRNA を定量 RT-PCR (qRT-PCR) により定量した。20%および 1%の割合で  $^{13}\text{C}$  標識 RNA が含まれる混合試料の解析結果を図 4.2 に示す。高密度画分と低密度画分にそれぞれ  $^{13}\text{C}$ -rRNA と非標識 rRNA が明確に分かれて分布したのは、 $^{13}\text{C}$ -RNA 混合率 20%の試料だけであった。このことは、非標識 RNA からの  $^{13}\text{C}$ -rRNA の明確な分離には 20 atom%以上の  $^{13}\text{C}$  標識 RNA が必要というこれ

までに<sup>13</sup>C原子組成率により評価されていた結果と一致し(102)、RNA混合溶液が<sup>13</sup>C-rRNAの検出感度を評価する標準試料として問題ないことを確認した。これにより、本研究では希釈混合系を採用することで、僅かだが有意に標識された<sup>13</sup>C-RNA標準試料(<sup>13</sup>C-RNA混合率:1%-0.0001%)を用意することができた。

#### 4.3.1 T-RFLPによる<sup>13</sup>C標識RNAの検出

*E. coli*に由来する完全に<sup>13</sup>C標識されたRNAを、*B. subtilis*に由来する非標識RNAに対して1%、0.5%、0.05%および0.01%の割合で混合し、異なる<sup>13</sup>C-RNA濃度を有する複数の標準試料を作成し、これを「<sup>13</sup>C混合系」とした(図4.1)。対照として、同様の割合で*E. coli*に由来する非標識RNAと*B. subtilis*に由来する非標識RNAを混合した「非標識混合系」を用意した。<sup>13</sup>C混合系および非標識混合系を密度勾配超遠心により密度ごとに分画し、各密度画分RNAの16S rRNAをT-RFLPにより解析した。最高密度画分(heaviest fraction; “1H”、浮遊密度:1.796–1.806 g mL<sup>-1</sup>)、2番目に高い密度画分(second-heaviest fraction; “2H”、浮遊密度:1.788–1.801 g mL<sup>-1</sup>)、低密度画分(light fraction; “L”、浮遊密度:1.772–1.777 g mL<sup>-1</sup>)のRNAから得られた代表的なT-RFLPプロファイルを図4.3に示す。16S rRNAのMsp I制限酵素サイトから、496 bpのT-RFが*E. coli*に由来し、それ以外のT-RFは*B. subtilis*に由来すると確認された。

1%および0.5%の<sup>13</sup>C混合系において、*E. coli*由来の496 bpのT-RFは浮遊密度の増加に従って優占化し、浮遊密度1.806 g mL<sup>-1</sup>および1.803 g mL<sup>-1</sup>の1H画分においてそれぞれ全体に対して半分以上のピーク高となった(図4.3A、C)。0.05%の<sup>13</sup>C混合系において、496 bpのT-RFは1.798 g mL<sup>-1</sup>の1H画分において僅かに(全体に対して6.1%)検出されたが、2HおよびL画分では検出されなかった(図4.3E)。また1H画分の浮遊密度は<sup>13</sup>C標識RNAの混合率が少なくなるに従って1.806 g mL<sup>-1</sup>から1.798 g mL<sup>-1</sup>へと低くなった。このことは1H画分の浮遊密度は試料中に含まれる<sup>13</sup>C-RNAが少なくなるに従って小さくなることを示している。0.01%の<sup>13</sup>C混合系において、496 bpのT-RFはいずれの密度画分からも検出されなかった(図4.3G)。一方、1%の非標識混合系において、496 bpのT-RFは全ての密度画分から極めて小さいピーク高(全体に対して0.8%–1.3%)で検出された(図4.3B)。なお、浮遊密度1.806 g mL<sup>-1</sup>の<sup>13</sup>C混合系の1H画分に対応する非標識混合系のRNA画分からはRT-PCR增幅産物が得られなかった。このことは非標識混合系では浮遊密度1.806 g mL<sup>-1</sup>の最高密度画分に含まれるRNA濃度が極めて低かったことを示している。0.5%–0.01%の非標識混合系において、496 bpのT-RFはいずれの密度画分からも検出されなかった(図4.3D、F、H)。これらの結果から、T-RFLP解析では<sup>13</sup>C標識された*E. coli*のRNAが0.05%含まれる条件まで<sup>13</sup>C-rRNAの検出が可能であった。しかしながら、複雑な微生物群集構造プロファイル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カー(6.1%)を再現的に検出することは難しいと予想された(19, 25, 103)。またT-RFの鎖長が

近い微生物が存在した場合には、T-RF ピークがオーバーラップしてしまうことも想定される。これらを踏まえると、T-RFLP 解析により確実に  $^{13}\text{C}$ -rRNA が検出できるのは  $^{13}\text{C}$ -RNA が 0.5% 以上含まれる条件までと判断された。

#### 4.3.2 世代シーケンサー解析による $^{13}\text{C}$ 標識 RNA の高感度検出

次世代シーケンサー解析は 0.05%、0.01%、0.001% および 0.0001% の  $^{13}\text{C}$  混合系および非標識混合系を対象に行った（図 4.1）。シーケンスライブラリを 1H、2H および L 画分の RNA から構築した。合計で 3,934,451 シーケンス（1 ライブラリあたり平均で 54,645 遺伝子配列）を系統学的に解析した。シーケンスライブラリを構築した RNA 密度画分の浮遊密度および系統学的に解析した遺伝子配列数を表 4.4 に示す。

シーケンスライブラリ全体に対する *E. coli* に由来する 16S rRNA 遺伝子断片（以降 *E. coli* 遺伝子断片と表記する）の相対存在量を図 4.4 に示す。0.05% の  $^{13}\text{C}$  混合系において、*E. coli* 遺伝子断片の相対存在量は浮遊密度の上昇に従って大きくなつたが、非標識混合系ではほぼ一定の値（0.32%—1.93%）であった（図 4.4A）。特に、1H 画分における *E. coli* 遺伝子断片の相対存在量は非標識系の 1H 画分と比べて 6.9 倍の増加を示した ( $P = 0.035$ 、 $n = 3$ )。さらに 0.01% および 0.001% の  $^{13}\text{C}$  混合系において、1H 画分における *E. coli* 遺伝子断片の相対存在量は非標識系の 1H 画分と比較して、それぞれ 4.6 倍と 3.8 倍で増大しており、その違いはいずれも有意差を示した（それぞれ  $P = 0.016$  と  $P = 0.026$ 、 $n = 3$ ）（図 4.4B、C）。一方、0.0001% の条件においては、 $^{13}\text{C}$  混合系と非標識混合系との間で *E. coli* 遺伝子断片の相対存在量に有意な差はみられず、1H、2H および L 画分間でほぼ一定の値（0.25%—1.55%）であった（図 4.4D）。これらの結果から、0.05%—0.001% の  $^{13}\text{C}$  標識 RNA を含む条件において、次世代シーケンサー解析では 1H 画分（浮遊密度  $1.793\text{--}1.801 \text{ g mL}^{-1}$ ）に集積された  $^{13}\text{C}$ -rRNA を検出することができた。

#### 4.3.3 定量 RT-PCR による高密度画分における $^{13}\text{C}$ -RNA の集積検出

次世代シーケンサー解析に供した 0.05%、0.01%、0.001% および 0.0001% の  $^{13}\text{C}$  混合系および非標識混合系の 1H 画分を対象に、定量 RT-PCR（qRT-PCR）により全細菌および *E. coli* に由来する 16S rRNA 遺伝子を定量した（表 4.5）。

0.05%、0.01%、0.001% の  $^{13}\text{C}$  混合系において、*E. coli* 由来の 16S rRNA 濃度はそれぞれ  $1.98 \times 10^5 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$ 、 $7.98 \times 10^3 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$ 、 $4.51 \times 10^2 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$  であった。これは、 $^{13}\text{C}$  標識 RNA の混合率が低くなるに従って、1H 画分に含まれる *E. coli* 16S rRNA の数が減少していることを示している。また 0.0001% の  $^{13}\text{C}$  混合系の 1H において、*E. coli* の 16S rRNA は検出されず、その濃度は検出限界 ( $4.10 \times 10 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$ ) よりも低かったためと考えられる。一方で、1H 画分中の全細菌の 16S rRNA は、およそ  $10^6\text{--}10^7 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$  の濃度であった。0.05%、0.01% および 0.001% の  $^{13}\text{C}$

混合系における、全細菌の 16S rRNA に対する *E. coli* の 16S rRNA の存在率はそれぞれ 1.005%、0.252%および 0.005%となった。この結果とは逆に、非標識混合系の全ての 1H 画分において、*E. coli* の 16S rRNA は検出されなかった（検出限界の  $4.10 \times 10 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$  以下）。定量 RT-PCR 結果から、 $^{13}\text{C}$  標識 RNA の混合率 0.05%–0.001%の条件において、密度勾配超遠心による  $^{13}\text{C}$ -rRNA の最高密度画分「1H」への集積が明らかとなり、これは世代シーケンサーによる解析結果と一致した。定量 RT-PCR と次世代シーケンサー解析の間で 1H 画分における  $^{13}\text{C}$ -rRNA の存在率が異なるが（図 4.4、表 4.5）、これはそれぞれの手法の遺伝子定量原理の違いによるものと考えられた。

#### 4.4 まとめ

$^{13}\text{C}$ -rRNA の検出法を T-RFLP による群集構造プロファイルの比較から次世代シーケンスによる大規模配列解読に置き換えることにより、rRNA-SIP の高感度化を達成した。具体的には、T-RFLP では  $^{13}\text{C}$  標識 RNA を 0.5%含む条件まで、次世代シーケンサー解析では 0.001%含む条件まで、最高密度画分（浮遊密度  $1.793\text{--}1.801 \text{ g mL}^{-1}$ ）における  $^{13}\text{C}$ -rRNA の有意な集積を見出すことができた。rRNA-SIP 以外の未培養微生物機能同定法として Chip-SIP (104) や FISH-NanoSIMS (nano-scale secondary ion mass spectrometry) (105, 106) が報告されており、これらは同位体標識された微生物の高感度検出が可能である。しかし、これらの実施には既存のデータベースの情報を基に設計される核酸プローブが必要不可欠である。一方で rRNA-SIP 法は、標的とする代謝機能を有する未知・未培養微生物の塩基配列情報を環境中から直接獲得できる点で優位性を持つ。本研究で確立した超高感度 rRNA-SIP 法は、存在量は極めて少ないが重要な物質循環・変換を担う未知微生物の機能解明、とりわけ津波打上げ堆積物の嫌気分解に関与する微生物群の機能決定に強力な手法となると考えられる。

表 4.1(A) RT-PCR 反応液の組成

Solution	Voume ( $\mu$ L)
Template	2
Access Quick master mix	25
30p B27f (with fluorescent dye)	0.5
30p B907r	0.5
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	0.5
AMV reverse transcriptase	1
Water	20.5
Total: 50 $\mu$ L/PCR tube	

表 4.1(B) RT-PCR の反応温度・時間

Step	Temperature (°C)	Time (min: sec)	Cycle
Reverse transcription	48	45:00	1
Initial denaturation	94	3:00	1
Denaturation	94	0:30	
Annealing	52	0:45	16
Extention	72	1:30	
Final extention	72	5:00	1

表 4.2(A) RT-PCR 反応液の組成

Solution	Volume ( $\mu$ L)
Template	2
Access Quick master mix	25
10p 515f (with adaptor for MiSeq)	2
10p 806r (with adaptor and barcode for MiSeq)	2
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	0.5
AMV reverse transcriptase	1
Water	17.5
Total: 50 $\mu$ L/PCR tube	

表 4.2(B) RT-PCR の反応温度・時間

Step	Temperature ( $^{\circ}$ C)	Time (min: sec)	Cycle
Reverse transcription	48	45:00	1
Initial denaturation	94	3:00	1
Denaturation	94	0:30	
Annealing	54	0:45	25
Extention	72	1:30	
Final extention	72	5:00	1

表 4.3(A) Gammaproteobacteria 級細菌 (*E. coli*) 特異的定量 RT-PCR の反応液組成

Solution	Volume ( $\mu$ L)
Template	2
2×SYBR Green Reaction Mix	12.5
4p Gamma395f	1
4p Gamma 871r	1
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0.5
Water	8
Total: 25 $\mu$ L/PCR tube	

表 4.3(B) Gammaproteobacteria 級細菌 (*E. coli*) 特異的定量 RT-PCR の反応温度・時間

Step	Temperature ( $^{\circ}$ C)	Time (min: sec)	Cycle
Reverse transcription	56	3:00	1
Initial denaturation	95	5:00	1
Denaturation	95	0:15	
Annealing	56	0:30	40
Extention	72	1:00	
Melting curve	60–95 ( $0.5^{\circ}$ C)	0:05	71

表 4.3(C) 全細菌 16S rRNA の定量 RT-PCR の反応液組成

Solution	Volume ( $\mu$ L)
Template	2
2×Go Taq qPCR Master Mix	10
4p 515f	1
4p 806r	1
GoScript RT Mix for 1-Step RT-qPCR	0.5
Water	5.4
Total: 20 $\mu$ L/PCR tube	

表 4.3(D) 全細菌 16S rRNA の定量 RT-PCR の反応温度・時間

Step	Temperature ( $^{\circ}$ C)	Time (min: sec)	Cycle
Reverse transcription	48	15:00	1
Initial denaturation	95	0:10	1
Denaturation	95	0:10	
Annealing	60	0:30	40
Extention	72	0:30	
Melting curve	60–95 ( $0.5^{\circ}$ C)	0:05	71

表 4.4 次世代シークエンサー解析を行った RNA 密度画分の CsTFA 浮遊密度と系統学的に解析した遺伝子配列数

Mixing ratio of the <i>E. coli</i> RNA	Mixtures	Density fraction		Number of sequences	
		Fraction*	BD**	Sequences from total bacteria ***	Sequences from <i>E. coli</i> ***
0.05%	<sup>13</sup> C mixture	1H	1.796 ( $\pm 0.005$ )	29,956 (min=26,367, max=32,394)	4,076 (min=2,611, max=5,660)
		2H	1.789 ( $\pm 0.005$ )	29,092 (min=23,903, max=31,917)	1,457 (min=257, max=2,147)
		L	1.767 ( $\pm 0.002$ )	35,644 (min=32,384, max=39564)	102 (min=16, max=163)
	Unlabeled mixture	1H	1.797 ( $\pm 0.006$ )	43,860 (min=31,310, max=65,264)	687 (min=201, max=1,356)
		2H	1.791 ( $\pm 0.004$ )	60,643 (min=39,135, max=86,749)	223 (min=75, max=393)
		L	1.769 ( $\pm 0.004$ )	98,095 (min=40,907, max=191,184)	376 (min=30, max=928)
0.01%	<sup>13</sup> C mixture	1H	1.798 ( $\pm 0.004$ )	24,242 (min=12,480, max=32,934)	1,025 (min=582, max=1,562)
		2H	1.791 ( $\pm 0.004$ )	31,892 (min=23,654, max=36,115)	415 (min=320, max=603)
		L	1.768 ( $\pm 0.003$ )	40,282 (min=35,156, max=47,652)	111 (min=14, max=209)
	Unlabeled mixture	1H	1.797 ( $\pm 0.006$ )	32,140 (min=22,384, max=45,271)	301 (min=203, max=429)
		2H	1.792 ( $\pm 0.006$ )	43,090 (min=28,150, max=51,622)	284 (min=204, max=342)
		L	1.768 ( $\pm 0.005$ )	256,922 (min=42,636, max=683,517)	410 (min=183, max=883)
0.001%	<sup>13</sup> C mixture	1H	1.798 ( $\pm 0.002$ )	53,443 (min=25,790, max=99,112)	1,519 (min=852, max=2,846)
		2H	1.792 ( $\pm 0.001$ )	31,085 (min=29,923, max=32,490)	299 (min=144, max=516)
		L	1.772 ( $\pm 0.003$ )	34,104 (min=19,913, max=51,043)	67 (min=14, max=107)
	Unlabeled mixture	1H	1.799 ( $\pm 0.006$ )	26,614 (min=20,610, max=37,767)	215 (min=98, max=372)
		2H	1.790 ( $\pm 0.006$ )	29,930 (min=25,523, max=34,642)	175 (min=80, max=323)
		L	1.770 ( $\pm 0.006$ )	45,079 (min=32,490, max=66,080)	287 (min=26, max=710)
0.0001%	<sup>13</sup> C mixture	1H	1.797 ( $\pm 0.004$ )	98,871 (min=32,114, max=231,738)	589 (min=178, max=934)
		2H	1.791 ( $\pm 0.005$ )	35,972 (min=24,266, max=44,891)	425 (min=95, max=1,046)
		L	1.770 ( $\pm 0.004$ )	36,069 (min=22,278, max=45,296)	90 (min=20, max=177)
	Unlabeled mixture	1H	1.797 ( $\pm 0.005$ )	107,160 (min=35,212, max=249,377)	1,862 (min=1709, max=4,557)
		2H	1.790 ( $\pm 0.007$ )	42,608 (min=36,019, max=46,497)	327 (min=98, max=717)
		L	1.770 ( $\pm 0.001$ )	44,692 (min=36,911, max=49,897)	138 (min=10, max=211)

\* 密度画分の名前を最高密度画分”1H” (heaviest fraction)、2 番目に高い密度画分”2H” (second-heaviest fraction) そして低密度画分”L” (light fraction) と表記する。\*\* RNA 密度画分の CsTFA 浮遊密度 (BD [ $\text{g mL}^{-1}$ ]) はそれぞれ三連にて超遠心・分画したサンプルを測定した。その平均値と標準誤差を示す。\*\*\* 三連の次世代シークエンサー解析により検出された *E. coli* に由来する 16S rRNA 遺伝子断片の配列数を示す。左側には平均の配列数、右側には三連で解析した中の最低および最高の配列数をそれぞれ示す。

表 4.5 最高密度画分（1H）における *E. coli* と全細菌の定量 RT-PCR による 16S rRNA 定量

Mixing ratio of the <i>E. coli</i> RNA	<sup>13</sup> C mixture			Unlabeled mixture	
	16S rRNA of <i>E. coli</i> * (copies $\mu\text{L}^{-1}$ )	Bacterial 16S rRNA* (copies $\mu\text{L}^{-1}$ )	Percentage of <i>E. coli</i> RNA (%)	16S rRNA of <i>E. coli</i> (copies $\mu\text{L}^{-1}$ )	Bacterial 16S rRNA (copies $\mu\text{L}^{-1}$ )
0.05%	1.98 ( $\pm 1.07$ ) $\times 10^5$	4.42 ( $\pm 3.34$ ) $\times 10^7$	1.005 ( $\pm 1.117$ )	ND	2.47 ( $\pm 0.02$ ) $\times 10^6$
0.01%	7.98 ( $\pm 4.31$ ) $\times 10^3$	3.23 ( $\pm 0.30$ ) $\times 10^6$	0.252 ( $\pm 0.154$ )	ND	2.31 ( $\pm 0.04$ ) $\times 10^6$
0.001%	4.51 ( $\pm 0.22$ ) $\times 10^2$	1.99 ( $\pm 0.29$ ) $\times 10^6$	0.005 ( $\pm 0.002$ )	ND	1.72 ( $\pm 0.02$ ) $\times 10^6$
0.0001%	ND**	1.43 ( $\pm 0.40$ ) $\times 10^6$	ND	ND	1.39 ( $\pm 0.06$ ) $\times 10^6$

\*定量 RT-PCR による定量を三連で行い、その平均値と標準誤差を示す。

\*\* ND (not detectable) は検出限界値 (16S rRNA 濃度 :  $4.10 \times 10$  copies  $\mu\text{L}^{-1}$ ) よりも低かったことを示す。

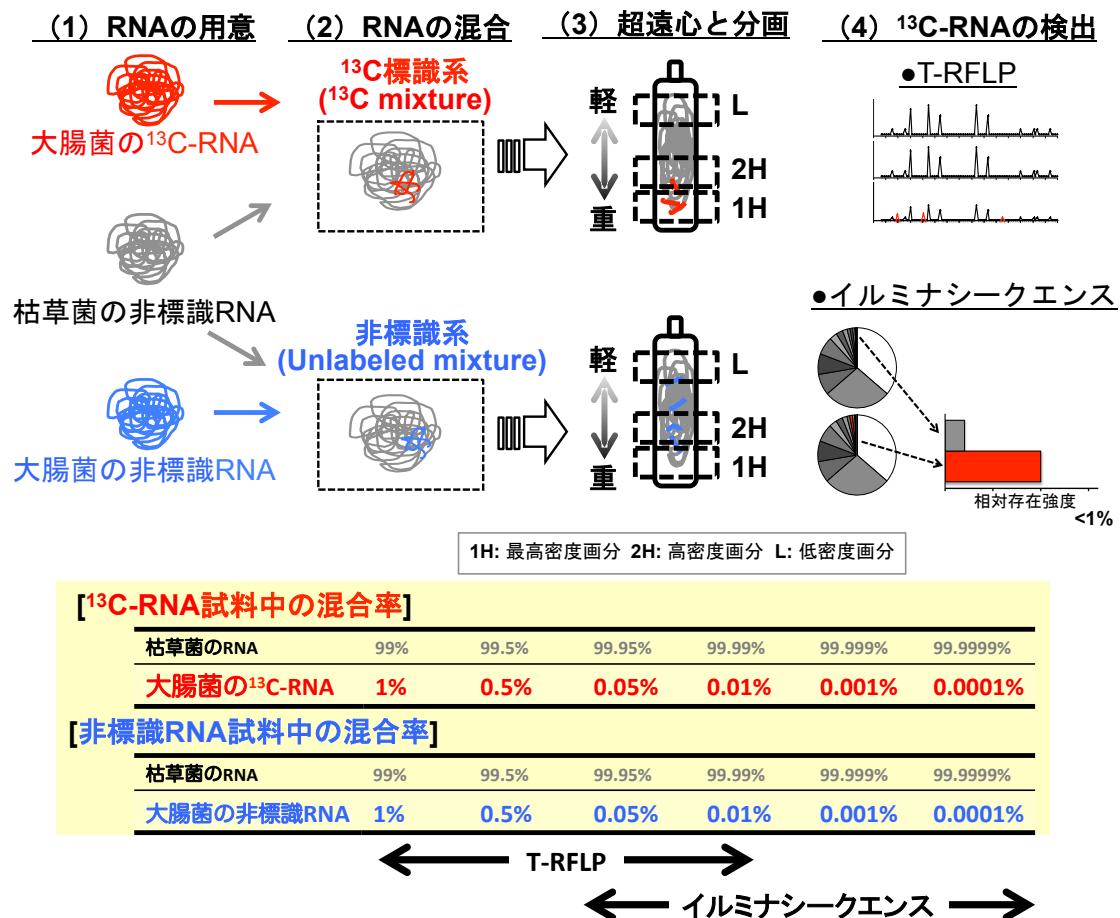


図 4.1 T-RFLP と次世代シークエンサー解析による <sup>13</sup>C-RNA の検出感度評価の概要

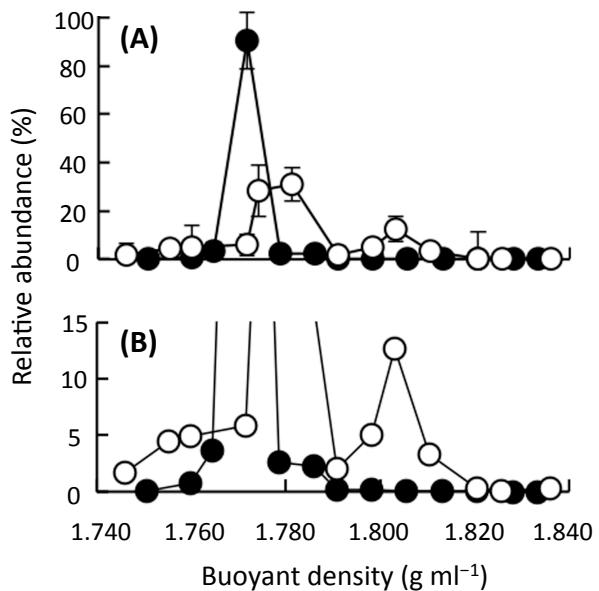


図 4.2 <sup>13</sup>C-RNA と非標識 RNA を混合した RNA 試料の密度勾配超遠心による非標識 RNA からの <sup>13</sup>C-RNA の分離

<sup>13</sup>C-RNA が 20% (○)、および 1% (●) 含まれる RNA 試料の密度画分 RNA における *E. coli* の 16S rRNA の相対存在量を示す (A)。B は Y 軸 15% 以下に範囲を絞った同じ図を示す。<sup>13</sup>C で標識された *E. coli* の RNA を非標識の *E. coli* の RNA へと混合し、密度勾配超遠心・分画の後、各密度画分 RNA に含まれる 16S rRNA を定量 RT-PCR (プライマーセット「515f/806r」と Go Taq qRT-PCR system; 表 4.3 と同条件) により定量した。RNA 密度画分における 16S rRNA 相対量を三連で解析し、その平均値を示す。エラーバーは三連の標準誤差を示す。

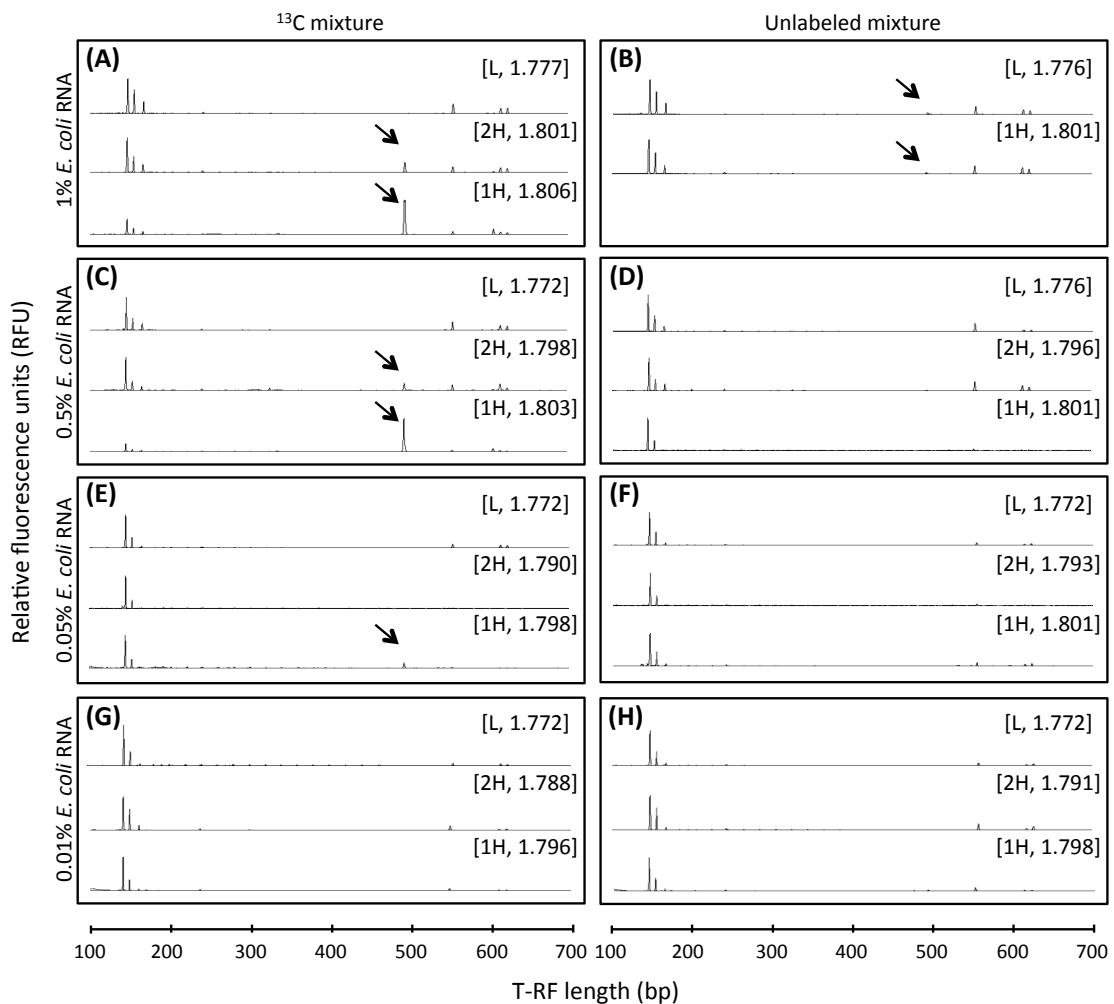


図 4.3 T-RFLP による <sup>13</sup>C-RNA の検出

*E. coli* 由来の RNA が 1%-0.01% の <sup>13</sup>C 混合系 (A, C, E, G) および非標識混合系 (B, D, F, H) の最高密度画分 (1H)、2 番目に高い密度画分 (2H) および低密度画分 (L) の RNA から得られた代表的な T-RFLP プロファイルを示す。矢印のピーク (496 bp の T-RF) は *E. coli* 由来、他のピークは *B. subtilis* 由来の T-RF を示す。角括弧の中は [画分名、浮遊密度(g mL<sup>-1</sup>)]をそれぞれ示す。

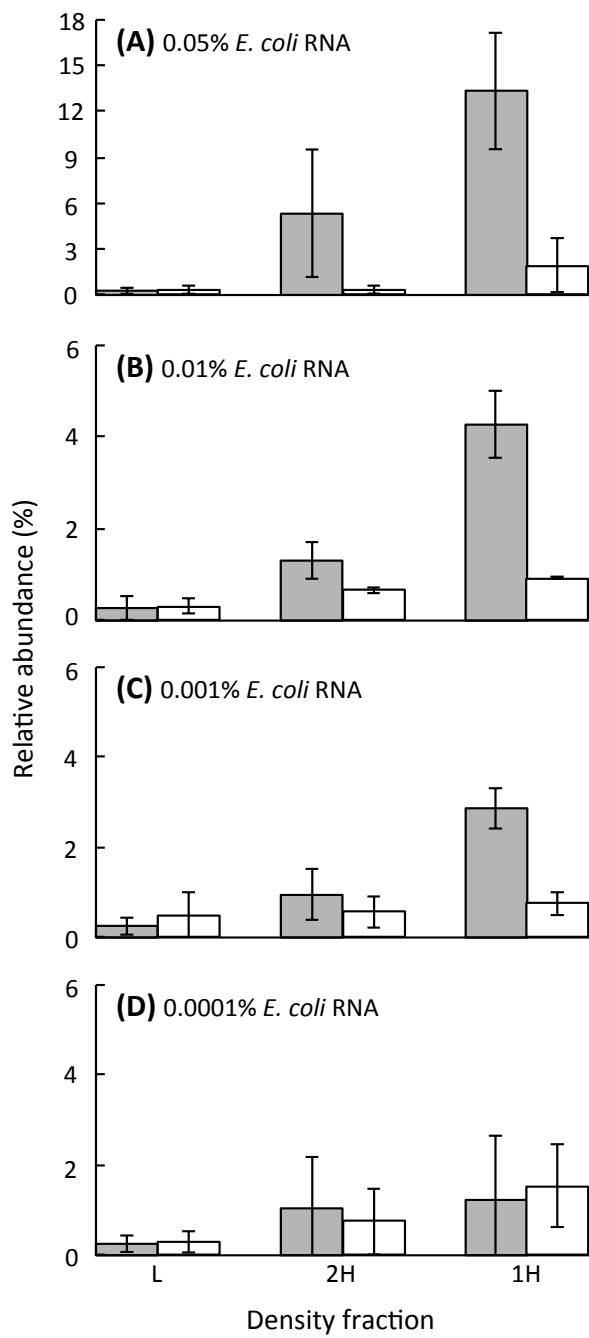


図 4.4 次世代シークエンサー解析による  $^{13}\text{C}$ -RNA の検出

$^{13}\text{C}$  混合系（灰色）および非標識系（白色）における、次世代シークエンサー解析による *E. coli* に由来する 16S rRNA 遺伝子断片の相対存在量を示す。*E. coli* 由来の RNA が 0.05% (A)、0.01% (B)、0.001% (C) および 0.0001% (D) の割合で含まれる RNA 混合試料の最高密度画分 (1H)、2 番目に高い密度画分 (2H) および低密度画分 (L) の RNA を次世代シークエンサー解析により系統学的に解析した。エラーバーは三連の系統解析における標準誤差を示す。

## 《五章》堆積物分解過程における微生物間相互作用の解明

### 5.1 はじめに

三章において、津波打上げ堆積物への硝酸塩の添加により硫黄酸化細菌が劇的に増殖した後、複数の従属栄養性嫌気微生物群の代謝活性化（rRNA 高発現）が観察された。このことは、化学合成硫黄酸化細菌の独立栄養的な生育と固定された炭素の直接的な伝達または劇的な増殖に伴う間接的要因により、堆積物の嫌気分解及びそれに連動した微生物生態系の再構築が起こり始めたことを強く示唆している。しかし、硫黄酸化菌群が堆積物中の炭酸または  $\text{CO}_2$  を固定するのか、そうであるなら固定された炭素がどのような嫌気呼吸微生物群に直接的に受け渡されているのか、または硫黄酸化細菌の劇的な増殖が他の嫌気呼吸微生物群の活性化に間接的な影響を及ぼしているのかについては不明である。Stable Isotope probing (SIP) 法では、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  や  $^{18}\text{O}$  といった安定同位体で標識された基質を環境試料に添加して、短期間実験することで同位体基質を直接代謝して取り込む微生物を特定できるが、さらにその同位体基質による実験を長期間継続することによって、同位体標識された分解産物や微生物細胞自体が他の微生物に代謝され取り込まれる事象、即ち微生物間の「食物連鎖（フードウェブ）」や「栄養共生（クロスフィーディング）」の解明も可能である（92, 107, 108）。本章では、前章で開発した超高感度 rRNA-SIP 法を用いることで、堆積物への硝酸塩添加により誘発される硫黄酸化細菌の急激な増殖が炭酸固定反応に依るのか、またそうであるならば硫黄酸化細菌を起点とする微生物間の炭素伝達（代謝ネットワーク）の解明を試みた。

### 5.2 材料と方法

#### 5.2.1 堆積物の硝酸還元条件における $^{13}\text{C}$ -重炭酸塩トレーサー実験系

二章および三章と同様に、津波打上げ植物試料を人工海水に嫌気的に懸濁し、50 mL ガラスバイアルに 18.5 mL ずつ分注した。その後、ブチルゴム栓とアルミシールで密栓し、25°C 暗所にて一ヶ月間静置した。なお、本章では 2011 年 12 月に二章で示した場所および方法で採取し、実験室内で嫌気的に保管していた同じ堆積物試料を用いた。一ヶ月間の静置の後、系内気相を  $\text{N}_2$  ガスで置換した。図 5.1 に示した実験概要の通りに 3 種類の添加系を用意した：(i)  $[^{13}\text{C}]$ -重炭酸塩（重炭酸ナトリウム；99 atom%；Cambridge Isotope Laboratories）10 mM および硝酸塩 20 mM を添加した「 $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系」、(ii) 非標識重炭酸塩（重炭酸ナトリウム；Wako）10 mM および硝酸塩 20 mM を添加した「非標識重炭酸塩添加系」、および(iii) 非標識重炭酸塩 10 mM を添加したが硝酸は添加しない「硝酸塩無添加系」。それぞれの添加系について三連で実験を行った。基質添加後 25°C の暗所にて 21 日間嫌気条件下で静置した。なお、一ヶ月間の静置の後の堆積物上清中の IC (Inorganic carbon) 濃度は約  $100 \text{ mg L}^{-1}$  であり、これを重炭酸塩へ換算したところ約 10 mM であった。即ち、重炭酸塩を添加した系内における  $\text{CO}_2$ -炭酸成分の半分が  $^{13}\text{C}$  標識

となるように設定した。

### 5.2.2 堆積物中の物理化学的分析

二章および三章と同様にして、二つの添加系(<sup>13</sup>C重炭酸塩添加系および非標識重炭酸塩添加系)の気相、液相、堆積物固相を実験開始0、4、7、9、14、21日目にサンプリングした。気相中のCO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O、CH<sub>4</sub>ガスの分析にはパックドカラム(ShinCarbon ST; Shinwa Chemical Industries)を装着したガスクロマトグラフ(GC-2014; Shimadzu)を使用した。また、系内の液相の物理化学パラメータ(TOC、VFA、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、鉄[II]、全鉄)および堆積物固相のC、H、N、Sの各元素含有率については二章および三章と同様の条件にて分析を行った。また液相中のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度をIonPac AS-11カラムを装着したイオンクロマトグラフ(DX-500; Dionex)によって決定した。なお、これらの分析条件の詳細を表5.1に示した。

### 5.2.3 堆積物からのDNAとRNAの抽出と定量

実験開始0、4、7、9、14、21日目にサンプリングした堆積物からのDNAとRNAの抽出を二章、三章および四章と同様の方法により行った(42)。堆積物懸濁液2mLからのDNAをRNase(Type II-A; Sigma)処理した後、ポリエチレングリコール沈殿により精製した。堆積物懸濁液2mLから抽出したRNAをDNase(RQ-1; Promega)処理し、イソプロパノール沈殿により精製した。これら精製されたDNAおよびRNAをトリス-EDTA溶液(10mM Tris、1mM EDTA、DNA用:pH 8.0、RNA用:pH7.0)50μLに溶解した。実験期間中の全RNAをRiboGreen RNA quantification kit(Life Technologies)とプレートリーダーSH-900Lab(Corona Electric; Excitation: 500 nm, Emission: 525 nm)を用いた蛍光定量に供した。実験0、4、21日目のDNA量として16S rRNA遺伝子コピー数をGoTaq qPCR(Promega)とReal-Time-PCR Detection system MyIQ2(Bio-Rad)を用いた定量PCRにより決定した。ここでは「515f/806r(23)」をプライマーセットとして用いた、定量PCRの分析条件を表5.2に示す。なお、検量線作成のため、*E. coli*に由来するDNAを鋳型としてプライマーセット「B27f/B907r(25)」を用いたPCRを行い、得られた16S rRNA遺伝子増幅断片を異なる濃度(10<sup>2</sup>–10<sup>8</sup> copies μL<sup>-1</sup>)で含有するDNA溶液を用意した。

### 5.2.4 全RNAを鋳型とするRT-PCR

二章および三章と同様に、抽出した全RNAを鋳型にしてMiSeq用のアダプター配列を含むプライマーセット「515f/806r(43)」とone-step RT-PCR system Access Quick(Promega)によるRT-PCR增幅を行った。なお、リバースプライマー(806r)には複数サンプルを同時に配列解読するための12塩基のバーコード配列が含まれる(82)。RT-PCRの条件を表5.3に示す。

### 5.2.5 全 RNA の密度勾配超遠心と RNA 密度画分を鑄型とする RT-PCR

四章と同様の条件で RNA の密度勾配超遠心および分画を行った。具体的には、<sup>13</sup>C 重炭酸塩添加系および非標識重炭酸塩添加系の実験 4、9、14 日目の堆積物から抽出した RNA 500 ng をセシウムトリフルオロ酢酸（CsTFA；Wako）溶液と混合し、それぞれ三連で密度勾配超遠心分離に供した（94）。密度勾配超遠心で形成された密度勾配をペリスタポンプにて一定量ごとに分取し、各画分の浮遊密度（CsTFA BD）を屈折計（AR200；Reichert）によって測定した（27）。得られた RNA 密度画分をイソプロパノール沈殿により精製し、トリス-EDTA 溶液（pH 7.0）30 μL に溶解した。最高密度画分（heaviest fraction；“1H”、浮遊密度：1.793–1.803 g mL<sup>-1</sup>）、2 番目に高い密度画分（second-heaviest fraction；“2H”、浮遊密度：1.791–1.796 g mL<sup>-1</sup>）、低密度画分（light fraction；“L”、浮遊密度：1.767–1.774 g mL<sup>-1</sup>）の RNA を one-step RT-PCR system（Access Quick；Promega）とプライマーセット「515f/806r」を用いた RT-PCR に供した。なお、RT-PCR の条件を表 5.3 に示す。

### 5.2.6 次世代シークエンスとデータ解析

RT-PCR 産物を 1.2% アガロースゲルの電気泳動に供し、標的とする遺伝子断片の増幅を確認した。二章、三章および四章と同様の条件で RT-PCR 産物を精製・定量し、その後 MiSeq Reagent kit（ver.2 300-cycles；Illumina）と次世代シークエンサー（MiSeq）による大規模塩基配列解読に供した。得られたペアエンドシークエンスの連結、ライブラリからの PhiX 配列の除去、Q30 よりも精度の低い塩基配列およびキメラ配列の除去を二章から四章と同様の手順で行い、得られた塩基配列を QIIME により系統学的に解析した。97%以上の配列相同性を有する 16S rRNA 遺伝子は、同一の微生物種（OTU：Operational taxonomic unit）に由来すると判断した。それぞれの OTU の代表塩基配列を DDBJ nucleotide sequence database の BLAST program を用いた相同性検索に供し、最も近縁な既知微生物を推定した。

## 5.3 結果

### 5.3.1 堆積物の物理化学パラメータ

津波打上げ堆積物試料に <sup>13</sup>C 重炭酸塩（10 mM）および硝酸塩（20 mM）を添加し、21 日間暗所にて嫌気条件下で静置し、この添加系を「<sup>13</sup>C 重炭酸塩添加系」とした。対照区として、非標識重炭酸塩（10 mM）および硝酸塩（20 mM）を添加した「非標識炭酸塩添加系」を用意した。なお、非標識炭酸塩（10 mM）のみを添加した「硝酸塩無添加系」も用意した（図 5.1）。実験期間を通して <sup>13</sup>C 重炭酸塩添加系と非標識炭酸塩添加系における堆積物中の物理化学パラメータはほとんど同様に推移した（図 5.2）。気相では、培養開始後に N<sub>2</sub>O が発生し、実験 4 日目に約 400 μM の濃度まで上昇したが、その後の実験経過に伴って徐々に N<sub>2</sub>O は減少し、実験 14 日目

以降には検出されなかった（図 5.2A）。これは、実験初期に硝酸還元（脱窒）により発生した  $\text{N}_2\text{O}$  が実験 14 日目までに  $\text{N}_2$  にまで還元されたことを示している。また、硝酸塩を添加した  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系および非標識重炭酸塩添加系において、培養開始前の  $\text{N}_2$  ガス置換に起因する脱気および  $\text{CO}_2$ -重炭酸の気液平衡により実験 4 日目までに生じた  $\text{CO}_2$  がその後の実験期間を通じて 271–365  $\mu\text{M}$  の濃度でほぼ一定に推移したが、硝酸塩無添加系における  $\text{CO}_2$  濃度は実験 21 日目に 587  $\mu\text{M}$  という高い値を示した（図 5.2B）。この結果および三章の結果から、硝酸塩添加系では硫黄酸化細菌の炭酸または  $\text{CO}_2$  固定により気相中の  $\text{CO}_2$  濃度が低く抑えられたと考えられた。またいずれの添加系においても実験期間中に  $\text{CH}_4$  は検出されなかった（データは割愛する）。

$^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系および非標識重炭酸塩添加系の液相において、添加した  $\text{NO}_3^-$  は実験開始後すぐに著しく減少し、実験 4 日目には 1.3–2.3 mM の濃度となり、実験 7 日目以降は検出されなかった（図 5.2C）。気相の化学分析結果と合わせると、系内では添加した硝酸塩が  $\text{N}_2\text{O}$  または  $\text{N}_2$  にまで還元（脱窒）されたことが示された。 $\text{SO}_4^{2-}$  濃度は実験 0 日目にはおよそ 25 mM であったが、実験 4 日目までに 36.5–38.1 mM に上昇し、その後実験 14 日目には 38.7–40.8 mM にまで達した。実験 14 日目から実験最終日まではわずかな減少（約 2 mM）に転じた（図 5.2D）。堆積物懸濁液中の Fe(II) 濃度と TOC 濃度はそれぞれ 19–20 mM と 10–15  $\text{mg L}^{-1}$  で、実験期間中ほぼ一定に維持された。（図 5.3A,B）。なお、揮発性脂肪酸（VFA）は検出されなかったことから（データは割愛する）、VFA を生成する発酵的代謝が微弱であったことが推察される。一方で、硝酸塩無添加系においてはこれらの物理化学パラメータはほぼ変化しなかった（図 5.2, 5.3）。

堆積物固相において、硝酸塩を添加した  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系および非標識重炭酸塩添加系の硫黄成分の含有率は、実験 0 日目の 1.7 wt% から実験 9 日目の 0.9 wt% にまで減少したが、その後やや増加して実験最終日には 1.3 wt% となった（図 5.4）。液相の化学分析結果と合わせると、実験開始 9 日目までは堆積物中の還元態の硫黄化合物が  $\text{SO}_4^{2-}$  にまで酸化されて液相に放出され、その後の実験後期には液相中の  $\text{SO}_4^{2-}$  が還元され、その最終産物である硫化物が再び堆積物固相に沈殿したと推察される。それでもなお硝酸塩添加系では、実験終了時における堆積物固相中の硫黄成分含有率は、実験期間を通して変動のなかった硝酸塩無添加系の硫黄成分含有率よりも有意に低かった。また、他の元素成分（窒素、炭素、水素）の含有率については、硝酸塩を添加した  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系および非標識重炭酸塩添加系、硝酸塩無添加系の間において顕著な差はみられなかった（図 5.5）。

### 5.3.2 堆積物中の微生物の増殖と代謝活性微生物

単位堆積物当たりの絶対的な微生物存在量（DNA）および代謝活性（RNA）を探るために、3 つの添加系（ $^{13}\text{C}$  標識重炭酸塩添加系、非標識重炭酸塩添加系、硝酸無添加系）の堆積物懸濁液

の一定体積 (1 mL) 中における DNA 量 (ここでは 16S rRNA 遺伝子濃度) を定量 PCR により測定し、さらに RNA 濃度を蛍光定量により決定した。ここで、<sup>13</sup>C 標識重炭酸塩添加系と非標識重炭酸塩添加系については、加えた基質量が同様のため、DNA 量および RNA 量ともに同様の傾向を示した。よって、これら 2 つの硝酸塩添加系の代表として非標識重炭酸塩添加系の結果を図 5.6 に示す。硝酸塩を添加した堆積物では実験開始から 4 日間で 16S rRNA 遺伝子濃度が  $4.07 \times 10^5$  copies mL<sup>-1</sup> から  $1.25 \times 10^6$  copies mL<sup>-1</sup> に上昇し、実験最終日には  $2.43 \times 10^6$  copies mL<sup>-1</sup> にまで達した。硝酸塩無添加系では実験最終日の 16S rRNA 遺伝子濃度は、実験開始時とほぼ変わらず一定の値をとった。これにより、硝酸塩添加系は、硝酸塩無添加系に比べて顕著な微生物の増殖が確認された (図 5.6A)。一方、RNA 濃度は実験 0 日目には約 80 ng mL<sup>-1</sup> であったが、硝酸塩添加後急激に上昇し、実験 9 日目までにおよそ 530 ng mL<sup>-1</sup> にまで達し、その後 450–530 ng mL<sup>-1</sup> の間で一定に推移した (図 5.6B)。このことは硝酸塩の添加により堆積物中での rRNA 発現 (タンパク質合成) が盛んになり、さらに系内の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が消失した 9 日目以降も同様に高いレベルの rRNA 発現が継続していたことを示している。硝酸塩無添加系では実験終了時 (21 日目) に RNA 濃度の増加が見られず、実験開始時の低い水準 (約 80 ng mL<sup>-1</sup>) のままであった。

また、RNA に基づいた次世代シーケンサー解析により、硝酸塩添加系における堆積物中の代謝活性を有する微生物群の推移を解析した。合計で 1,926,210 配列 (1 ライブラリあたり平均で 49,390 配列) を系統学的に解析した (図 5.7A : 単位体積当たりの RNA 量を加味しない相対的な群集構造の情報)。なお、<sup>13</sup>C 標識重炭酸塩添加系と非標識重炭酸塩添加系については、ほぼ同様の結果であったため、ここでは非標識重炭酸塩添加系のデータを示した。実験開始 0 日目の Gamma- および Epsilon-proteobacteria の 16S rRNA 転写産物の相対存在強度はそれぞれ全体に対し 1% と 0.7% であったが、硝酸塩添加後の実験 4 日目にはそれぞれ 30% と 22% となり、三章と同様に本章でも再現的に硫黄酸化細菌を主要メンバーとする微生物群の著しい rRNA 発現 (代謝活性化) が観察された。さらに NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が消失した 9 日目以降も実験終了までこれらの微生物群の rRNA 発現レベルは維持された。rRNA、mRNA、tRNA からなる全 RNA のほとんど (80–90%) は rRNA に由来するため (109)、上述の堆積物単位体積当たりの RNA 量 (図 5.6B) を加味した絶対的な代謝活性微生物種の推移を求めた (図 5.7B)。興味深いことに、硝酸塩添加系において、実験初期の 9 日間で堆積物単位体積 (1 mL) 中の Gamma-、Epsilon、Delta-proteobacteria 級細菌群の爆発的な rRNA の発現が確認され、これらの rRNA 発現レベルはその後の培養期間でも維持された。一方で、実験開始時および硝酸塩無添加系の実験終了時 (21 日目) では極めて低い rRNA 発現が示され、二章と三章での課題とされていた硫酸還元菌が代謝活性種として検出されながらも硫酸還元が見られない事象は堆積物単位体積当たりの rRNA 発現の絶対量が小さいことに起因すると考えられた。続いて、超高感度 rRNA-SIP による <sup>13</sup>C 重炭酸塩を取り込んだ微生物の検出、さらにその後の <sup>13</sup>C 伝達 (微生物間食物連鎖および栄養共生) の解析を行った。

### 5.3.3 高密度画分 RNA の微生物群集構造

$^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系および非標識重炭酸塩添加系の実験 4、9、14 日目のサンプルに対して超高感度 rRNA-SIP を適用した。四章で  $^{13}\text{C}$ -rRNA の顕著な集積が見られた最高密度画分 (heaviest fraction; “1H”、浮遊密度 :  $1.793\text{--}1.803 \text{ g mL}^{-1}$ )、2 番目に高い密度画分 (second-heaviest fraction; “2H”、浮遊密度 :  $1.791\text{--}1.796 \text{ g mL}^{-1}$ )、低密度画分 (light fraction; “L”、浮遊密度 :  $1.767\text{--}1.774 \text{ g mL}^{-1}$ ) の RNA を 16S rRNA に基づいた次世代シークエンサー解析に供した。なお、実験 9 および 14 日目の  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系では、 $^{13}\text{C}$  の微生物 rRNA への過度な取り込みに起因して、四章で定義した 1H 画分 (浮遊密度 :  $1.793\text{--}1.803 \text{ g mL}^{-1}$ ) よりもさらに高い密度の RNA 画分 (浮遊密度 :  $1.802\text{--}1.810 \text{ g mL}^{-1}$ ) が得られたが、比較すべき対照系 (非標識重炭酸塩添加系) において対応する密度画分の RT-PCR 増幅産物が得られなかつたことから、ここでの系統解析から除外した。合計で 2,492,366 配列 (1 ライブラリあたり平均 46,155 配列) の 16S rRNA 遺伝子断片を系統学的に解析した。 $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系の 1H 画分における Epsilon- および Gamma-proteobacteria 級細菌群の相対存在量が非標識系の 1H 画分と比べて 1.3–1.5 倍と 1.1–1.5 倍にそれぞれ増加していた (図 5.8)。

より詳細な分類階層 (種 : OTU [Operational taxonomic unit]) レベルで解析した結果、実験 4、9、14 日目の  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系の 1H 画分における相対存在量が、非標識重炭酸塩添加系の 1H 画分に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に上昇した OTU を表 5.4A、B、C にそれぞれ示す。実験 4 日目には Chromatiales 目に属する *Thioalkalispira* sp. や *Thioprofundum* sp. (OTU 22867、OTU 6741、OTU 16829) および *Sulfurimonas* sp. (OTU 5673) が有意に  $^{13}\text{C}$  炭酸を取り込んだ硫黄酸化細菌群として検出された。同様に  $^{13}\text{C}$  同化微生物として検出された *Desulfofustis* sp. (OTU 11272) は硫酸還元能を有し独立栄養的に生育することが知られている。実験 9 日目には、三章にて分離培養した *Sulfurimonas* sp. HDS01 株 (OTU 15708) および *Thioalkalispira* sp. HDS22 株 (OTU 7305) がともに  $^{13}\text{C}$  炭酸塩を取り込んだ微生物として検出された。さらに、いずれも海洋環境にてその存在がよく知られる、硫酸還元と有機物酸化の共役反応を行う *Desulfobulbus* sp. (OTU 16518)、鉄還元能および硫酸還元能を有する *Pelobacter* sp. (OTU 10107)、および硝酸還元能を持つ *Actibacterium* sp. (OTU 19375) に由来する  $^{13}\text{C}$  標識 rRNA も検出された。加えて、実験 14 日目では、*Sulfurimonas* sp. HDS01 株 (OTU 15708) および *Thioalkalispira* sp. HDS22 株の近縁種 (OTUs 3457, 23164, 4952, 5479, 14571, 10805, 22397)、さらには *Thioprofundum* spp. (OTU 20245、OTU 19078) を含む Chromatiales 目細菌群など、多様な硫黄酸化細菌群の  $^{13}\text{C}$  標識 rRNA が検出された。また、ここでも、硫酸還元能を有する *Desulfobulbus* spp. (OTUs 16534, 4705, 5155, 21595, 23055, 17063) が有意に  $^{13}\text{C}$  を取り込む微生物群として特定された。さらに  $^{13}\text{C}$  標識 rRNA が検出された OTU 14981 の近縁微生物 *Thalassomonas* sp. は海洋において硝酸還元能を有すると報告されており

(110)、 $\text{NO}_3^-$ 減少への関与が推察される。また OTU 3299 の 16S rRNA 遺伝子は、最近縁種との配列相同性が 90%以下であり、このような系統的に新規な微生物群（機能未知細菌群）も  $^{13}\text{C}$  標識されていた。なお、 $^{13}\text{C}$  標識された OTU の相対存在強度の相対的なばらつきを示す変動係数 (coefficient of variation) については、実験 4 日目及び 14 日目では 0.09–0.75 であり、実験 9 日目の 0.04–0.21 と比べて大きかった。このことは、 $\text{NO}_3^-$ 消失前の実験初期（4 日目）においては、高エネルギーの電子受容体である  $\text{NO}_3^-$ をめぐって多様な微生物が代謝活性化していたこと、中期（9 日目）においては初期から中期の間に  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を取り込んだ微生物や  $\text{N}_2\text{O}$  を電子受容体として利用できるような特定の微生物が代謝活性化し、後期（14 日目）においては固定された複数の有機化合物が基質となるため、この有機物分解を行う多様な微生物が代謝活性化したことが示唆される。これらの結果を総合すると、 $^{13}\text{C}$  重炭酸塩および硝酸塩を添加した堆積物中において、実験開始後、分離菌 HDS01 株、HDS22 株を含む複数の硫黄酸化細菌が  $^{13}\text{C}$  重炭酸を取り込み、その後固定された  $^{13}\text{C}$  炭素は主に硫酸還元菌へ、その他にも鉄還元菌、硝酸還元菌などの様々な嫌気代謝機能を有する嫌気微生物群や機能未知細菌群へ直接的に伝達されたことが強く示唆された。

#### 5.3.4 実験後期において代謝活性化された微生物

硝酸塩添加系において実験終了時（21 日目）に  $^{13}\text{C}$  標識されなかったものの、rRNA 発現の上昇がみられた複数の微生物（代謝活性種）が検出された（図 5.9： $^{13}\text{C}$  標識重炭酸塩添加系と非標識重炭酸塩添加系で同様の結果を示したため、ここでは後者のデータを示す）。例えば、OTU 566 は亜酸化窒素還元脱窒菌 ( $\text{N}_2\text{O}$  還元菌) として知られる *Azoarcus communis* と近縁（16S rRNA 遺伝子配列相同性：93.2%）で、その rRNA 発現量が硝酸塩無添加系と比べて 2.6 倍大きかった。同様に、硝酸塩添加により rRNA の高発現がみられた OTU 10365 は、沿岸域海底堆積物の硫酸還元条件で、炭化水素分解菌として rRNA-SIP により特定された *Desulfosarcina variabilis* と近縁（配列相同性：96.8%）であった(103)。加えて、OTU 4956 および OTU 21431 は海底堆積物から分離された水素資化性メタン生成古細菌 *Methanoculleus* sp. 及び *Methanospaerula* sp. に近縁の微生物であった。さらに、海底堆積物から分離され、水素資化性メタン生成古細菌と共生的に低級脂肪酸の酸化を行うことが知られる *Algidiimarina* 属細菌群と近縁（配列相同性：>94.5%）の OTU 9760 と OTU 6952 の硝酸塩添加に依存した代謝活性化が観察された。

#### 5.4 考察

本章では、硝酸塩を添加した津波打上げ堆積物において化学合成硫黄酸化菌群が炭酸固定を行うのかを実証し、さらに固定された炭素が他の嫌気呼吸微生物群に直接的に受け渡されているのか、または間接的に他の嫌気微生物へ影響を及ぼしているのかという問い合わせるべく、

四章で確立した超高感度 rRNA-SIP 法を堆積物試料の微生物群集へと適用することで、化学合成硫黄酸化細菌群を起点とする微生物間相互作用（代謝ネットワーク）を解明した。まず初めに微生物核酸（DNA と RNA）の定量を行うことで堆積物単位体積当たりの微生物存在量（DNA）および代謝活性量（RNA）の絶対評価に成功した。これにより、二章および三章で未解決の課題となっていた「硫酸還元菌が代謝活性種として検出されるにも関わらず硫酸還元が微弱である」という事象が、硫酸還元菌 rRNA の絶対的発現量が小さいことに起因するとの明確な結果を得た。次に超高感度 rRNA-SIP により、硫黄酸化細菌が  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を固定し、その後この固定された  $^{13}\text{C}$  炭素が硫酸還元菌を主とする嫌気呼吸微生物群に直接的に伝達される様子（微生物間食物連鎖および栄養共生）を高解像度に捉えることができた。さらに RNA に基づいた次世代シーケンサー解析により、硫黄酸化細菌からの直接的な炭素伝達は無いものの、硫黄酸化細菌の増殖に伴う間接的な影響により実験終了時（21 日目）に代謝活性化される微生物群（ $\text{N}_2\text{O}$  還元菌やメタン生成古細菌など）を見出すことに成功した。

実験 4 日目までに添加した  $\text{NO}_3^-$  の減少、 $\text{N}_2\text{O}$  の生成、 $\text{SO}_4^{2-}$  濃度の増加および堆積物固相中の硫黄成分の減少が観察され、三章と同様に本章でも津波打上げ堆積物への硝酸塩の添加によって硫黄酸化反応と脱窒反応が再現的に引き起こされたことを確認した（図 5.2、5.4）。硝酸塩添加系における  $\text{CO}_2$  濃度も硝酸塩無添加系に比べて有意に低かったことから（図 5.2B）、系内での炭酸固定反応の進行も示唆された。また実験を続けると、実験開始 7 日目には発生した  $\text{N}_2\text{O}$  が次第に減少し、実験 14 日目には消失した（図 5.2A）。このことから、実験中期から後期には  $\text{N}_2\text{O}$  還元が起きていたことが示された。加えて、実験 14 日目から 21 日目にかけて硫黄酸化反応により上昇していた  $\text{SO}_4^{2-}$  の濃度が僅かに（2 mM）減少し、同時期に堆積物固相の硫黄成分含有率が 0.4 wt% 増加した（図 5.2D、5.4）。このことから、実験開始直後は添加した  $\text{NO}_3^-$  を電子受容体、堆積物固相中の還元態の硫黄化合物を電子供与体とする酸化還元反応（脱窒反応および硫黄酸化反応の共役）が活発に起っていたが、実験後期（実験 14–21 日目）には液相中に放出された  $\text{SO}_4^{2-}$  を電子受容体とする硫酸還元反応が僅かに起きたことが示された。実験期間中の TOC 濃度は約 10–15 mg L<sup>-1</sup> の間でほぼ一定に推移しており（図 5.2F）、特に rRNA-SIP でその存在が示唆された実験後期の電子受容体（ $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、Fe[III]）の還元反応に関して、その共役する酸化反応に用いられる電子供与体（有機物）は化学分析では特定することができなかった。これは、嫌気呼吸微生物群の基質となる低級脂肪酸などの代謝フラックスが非常に速く、堆積物中で蓄積されずに速やかに利用されることに起因すると考えられた。

堆積物懸濁液の単位体積（1 mL）あたりの RNA 濃度は硝酸塩の添加によって約 80 ng mL<sup>-1</sup> から >500 ng mL<sup>-1</sup> にまで急激に増加した（図 5.6）。さらに化学分析の結果から、系内の微生物代謝が活発になった時期を推定し、実験 4、9、14 日目を超高感度 rRNA-SIP の実施ポイントとした。実験期間を通して、 $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系と非標識重炭酸塩添加系における物理化学パラメー

タと微生物群集構造はほぼ同様に推移した。堆積物から抽出した RNA を密度勾配超遠心により密度ごとに分け、最高密度画分 (1H) 中の 16S rRNA の相対存在量を  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩添加系と非標識重炭酸塩添加系の間で比較することにより、硫黄酸化細菌による  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩の固定化を証明し、さらに固定化された  $^{13}\text{C}$  を取り込んだ微生物群を実験経過に伴い特定した(表 5.4)。実際に、実験 4、9、14 日目において、硫黄酸化能を持つ Epsilon-proteobacteria 級細菌群 (*Sulfurimonas* spp. ; OTU 5673、OTU 15708) および Gamma-proteobacteria 級細菌群 (Chromatiales 目に属する OTUs 22867、6741、16829、15708、7305、3457、23164、4952、5479、14571、10805、22397) による  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩の取り込みを確認した。三章にてこれらの微生物群の近縁種である分離菌株(HDS01 株、HDS22 株) の化学合成無機栄養性を示しているが、超高感度 rRNA-SIP を用いることで、2 種の分離株に留まらず、堆積物中で実際に重炭酸を固定する硫黄酸化細菌を複数見出すことができた。また  $\text{NO}_3^-$  や  $\text{N}_2\text{O}$  の消失した実験 14 日目においても脱窒と硫黄酸化の共役反応を行う硫黄酸化細菌(例えば OTUs 3457、4952、5479、14571、10805、22397; HDS22 株および OTU 15708 ; HDS01 株) の OTU が検出された。このことは、実験初期や中期で  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を取り込んだ微生物由来の  $^{13}\text{C}$ -rRNA が残存すること、 $\text{NO}_3^-$  や  $\text{N}_2\text{O}$  の消失した後も硫黄酸化細菌の rRNA 発現が慣性的に維持されていること、あるいは細胞内への  $\text{NO}_3^-$  の蓄積 (111) に依ることを示している。一方で、*Desulfotustis* sp. (OTU 11272) は炭酸固定を行う硫酸還元菌として知られており(112)、この微生物も硝酸塩添加後の実験 4 日目に  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を同化(固定化)したと推定された。その後、実験 9 日目から 14 日目の間では、従属栄養性で硫酸還元能と鉄還元能を有する *Desulfobulbus* spp. (OTUs 16518、16534、4705、5155、21595、23055、17063) 及び *Pelobacter* sp. (OTU 10107)、従属栄養細菌で硝酸還元能を持つ *Actibacterium* sp. (OTU 19375) および *Thalassomonas* sp. (OTU 14981)、さらに近縁種の存在しない機能未知微生物 OTU 3299 が  $^{13}\text{C}$  炭素を取り込んだ微生物として検出された。これらの従属栄養性の嫌気呼吸微生物群は硫黄酸化細菌などが固定した  $^{13}\text{C}$  を直接的に利用していたことが推察される。実際の化学分析の結果で、実験 14 日から 21 日にかけて  $\text{SO}_4^{2-}$  濃度が僅かに減少していたことから(図 5.2D)、硫黄酸化細菌に固定化された  $^{13}\text{C}$  由来の有機物を電子供与体として *Desulfobulbus* spp. などが硫酸還元を行っていたことが示唆された。

一方、硝酸塩の添加に依存して実験 21 日目に代謝活性化された嫌気呼吸微生物群が複数検出された(図 5.9)。この中で  $\text{N}_2\text{O}$  還元菌として知られる *Azoarcus* sp. (OTU 5622) は実験中期(実験 7-14 日目)の  $\text{N}_2\text{O}$  減少(図 5.2A)に関与していると推察された。この細菌に由来する rRNA の  $^{13}\text{C}$  標識が検出されなかったことから、ここでの代謝活性化は実験初期に見られる硫黄酸化細菌群の独立栄養的な増殖の間接的影響によるものと示唆された。また炭化水素分解菌として知られる *Desulfosarcina* sp. (OTU 10365) の高い rRNA 発現が同様に観察された。この *Desulfosarcina* 属細菌は鉱物油で汚染された沿岸海底堆積物中で硫酸還元菌の共存によって難分解性物質であ

るアルカンおよびアルケン分解能を発揮するという興味深い報告がある (113)。さらには嫌気有機物分解の最終段階を担う水素資化性のメタン生成古細菌 *Methanoculleus* sp., *Methanospaerula* sp. (OTUs 4956, 21431) および水素資化性のメタン生成古細菌と共生的に有機物分解を行う *Algidiomarina* spp. (OTUs 9760, 6952) の rRNA 発現も観察された。

実験期間を通じて堆積物固相の硫黄成分および液相中の  $\text{SO}_4^{2-}$  の増減が観察され(図 5.2D、5.4)、実験初期の *Sulfurimonas* 属および Chromatiales 目の化学合成硫黄酸化細菌群の  $^{13}\text{C}$  重炭酸の固定に引き続いて、 $^{13}\text{C}$  炭素化合物を取り込んだ主要な微生物は硫酸還元菌 *Desulfobulbus* spp. であった (表 5.5)。このことから、硫黄循環に直接的に関与する微生物群が炭素の受け渡しを密接に行っていたことが明らかとなった。硫黄酸化細菌と硫酸還元菌の共存は海底堆積物や深海等において度々報告されており、本研究で観察されたような硫黄酸化細菌から硫酸還元菌への炭素の直接的な伝達はヨーロッパの沿岸海底堆積物においても近年報告されている (114)。さらに、海洋や淡水の堆積物中では *Desulfobulbus* 属の硫酸還元菌群が *Methanosaeta* 属古細菌と生態的ニッチを分け合って有機物分解を担うこと、また他の微生物 (*Desulfosarcina* 属細菌等) の代謝活性化を促すことが明らかになってきている (113, 115)。このような異種の微生物間での棲み分けや生育を促進する作用は微生物生態系の形成にとって大きな要因となる (116-118)。本堆積物内でも、硫酸還元菌群の代謝活性化が有機物分解を担う他の嫌気呼吸微生物群の代謝活性化に効果的な作用を与えた可能性は高い。

## 5.5 まとめ

硝酸塩を添加した津波打上げ堆積物に超高感度 rRNA-SIP を適用することで、*Sulfurimonas* 属や Chromatiales 目の硫黄酸化細菌群が硫黄酸化反応と脱窒反応の共役により  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を固定化したこと、さらに固定化された  $^{13}\text{C}$  由来の炭素化合物が実験経過に伴って硫酸還元菌を主とした嫌気呼吸微生物群へ取り込まれたことが明らかになった。固定化炭素の直接的伝達に加え、硫黄酸化細菌の独立栄養的増殖の間接的作用として、実験終了時 (21 日目) に硝酸塩添加に依存した  $\text{N}_2\text{O}$  還元菌、炭化水素分解菌、水素資化性メタン生成古細菌、有機物分解共生細菌群の高い rRNA 発現が観察された。超高感度 rRNA-SIP や化学分析、次世代シーケンサー解析の融合により、硫黄酸化細菌の炭酸固定を起点とする堆積物の嫌気分解メカニズムの一端が明らかとなった。

表 5.1 化学分析装置の条件

ガスクロマトグラフの分析条件	
ガスクロマトグラフ	GC-2014 (Shimadzu)
カラム	ShinCarbon ST (Shinwa Chemical Industries)
検出器	TCD, FID
移動相	Ar (TCD), He (FID)
流量	31.4 mL/min
カラム温度	70°C • 3min, 70–200°C (毎分20°C昇温)

イオンクロマトグラフの分析条件	
イオンクロマトグラフ	DX-500 (Dionex)
カラム	IonPac AS-11
検出器	Electrochemical detector
移動相	10 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
流量	1.2 mL/min
NaOH gradient	0–30 mM over 13 min
サプレッサ	ASRS 300

表 5.2(A) 定量 PCR 反応液の組成

Solution	Voume ( $\mu$ L)
Template	4
2× Go Taq qPCR master mix	10
4p 515f	1
4p 806r	1
Water	4
	Total: 20 $\mu$ L/PCR

表 5.2(B) 定量 PCR 反応温度・時間

Step	Temperature (°C)	Time (min: sec)	Cycle
Initial denaturation	95	2:00	1
Denaturation	95	0:15	40
Annealing & extention	60	1:00	
Melting curve	60–90 (0.5°C)	0:10	71

表 5.3(A) RT-PCR 反応液の組成

Solution	Volume ( $\mu$ L)
Template	2
Access Quick master mix	25
10p 515f (with adaptor for MiSeq)	2
10p 806r (with adaptor and barcode for MiSeq)	2
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	0.5
AMV reverse transcriptase	1
Water	17.5
Total: 50 $\mu$ L/PCR tube	

表 5.3(B) RT-PCR 反応温度・時間

Step	Temperature ( $^{\circ}$ C)	Time (min: sec)	Cycle
Reverse transcription	48	45:00	1
Initial denaturation	94	3:00	1
Denaturation	94	0:30	
Annealing	54	0:45	24*
Extention	72	1:30	21–22**
Final extention	72	5:00	1

\* 全 RNA の RT-PCR : 実験 0、4、7、9、14 および 21 日目のサンプルの RT-PCR は 24 cycles で実施した。

\*\* rRNA-SIP における密度画分 RNA の RT-PCR : 実験 4 日目のサンプルは 22 cycles、実験 7 および 14 日目のサンプルは 21 cycles で RT-PCR を実施した。なお、RT-PCR 産物の 1.2%アガロースゲル電気泳動により、 $^{13}\text{C}$  系と非標識系の対応する画分間における RT-PCR 増幅が同程度であることを確認した。

表 5.4(A) 実験 4 日目の最高密度画分 (1H) において検出した  $^{13}\text{C}$  標識された OTU (Operational taxonomic unit)

OTU ID	Closest relative species	Similarity (%)	Acc. No.	Phylum/Class	Family	Relative abundance (%)*	Coefficient of variation	Increasing ratio (fold)**	P value	*** Putative function	**** Marine bacteria
22867	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	95.7	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0142 ( $\pm 0.005$ )	0.33	3.7	0.0453	Sulfur-oxidation	+
6741	<i>Thiopropfundum hispidum</i>	92.8	NR112620	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0105 ( $\pm 0.007$ )	0.66	2.5	0.0390	Sulfur-oxidation	+
16829	<i>Thiopropfundum lithotrophicum</i>	95.6	NR112829	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0528 ( $\pm 0.017$ )	0.33	1.9	0.0103	Sulfur-oxidation	+
5673	<i>Sulfurimonas</i> sp. HDS01	92.5	LC029406	Epsilonproteobacteria	<i>Helicobacteraceae</i>	0.0808 ( $\pm 0.023$ )	0.28	1.9	0.0059	Sulfur-oxidation	+
11272	<i>Desulfovustis glycolicus</i>	93.3	NR026354	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	0.9457 ( $\pm 0.123$ )	0.13	1.3	0.0223	Sulfate-reduction	+

表 5.4(B) 実験 9 日目の最高密度画分 (1H) において検出した  $^{13}\text{C}$  標識された OTU (Operational taxonomic unit)

OTU ID	Closest relative species	Similarity (%)	Acc. No.	Phylum/Class	Family	Relative abundance (%)*	Coefficient of variation	Increasing ratio (fold)**	P value	*** Putative function	**** Marine bacteria
16518	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	93.5	NR025150	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	0.0027 ( $\pm 0.001$ )	0.33	4.3	0.0351	Sulfate-reduction	+
19375	<i>Actibacterium atlanticum</i>	98.8	KJ159064	Alphaproteobacteria	<i>Rhodobacteraceae</i>	0.0054 ( $\pm 0.0002$ )	0.06	4.0	0.0414	Nitrate-reduction	+
7305	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	97.2	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.1310 ( $\pm 0.008$ )	0.06	1.8	0.0002	Sulfur-oxidation	+
15708	<i>Sulfurimonas</i> sp. HDS01	100	LC029406	Gammaproteobacteria	<i>Helicobacteraceae</i>	40.6493 ( $\pm 1.438$ )	0.04	1.7	0.0072	Sulfur-oxidation	+
10107	<i>Pelobacter seleniigenes</i>	98.8	NR044032	Deltaproteobacteria	<i>Pelobacteraceae</i>	0.0767 ( $\pm 0.016$ )	0.21	1.6	0.0382	Sulfate-reduction, iron(III)-reduction	+

\*三連にて密度勾配超遠心・分画した  $^{13}\text{C}$  炭酸塩添加系の 1H 画分 RNA において構築されたシークエンスライブラリにおける各 OTU の相対存在量の平均値と標準誤差を示す。

\*\* 非標識炭酸塩添加系の 1H 画分 RNA のシークエンスライブラリの相対存在量と比較して増加率を算出した。

\*\*\* 最近縁種の生理機能からそれぞれの OTU の有する機能を推定した。

\*\*\*\*最近縁種が海洋および塩を高濃度に含む環境から分離培養された OTU には「+」、陸上および淡水環境から最近縁種が分離培養された OTU には「-」を示す。

表 5.4(C) 実験 14 日目の最高密度画分 (1H) において検出した  $^{13}\text{C}$  標識された OTU (Operational taxonomic unit)

OTU ID	Closest relative species	Similarity (%)	Acc. No.	Phylum/Class	Family	Relative abundance (%)*	Coefficient of variation	Increasing ratio (fold)**	P value	Putative function	***	****
											Marine bacteria	
3457	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	98.4	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0067 ( $\pm 0.002$ )	0.31	10.7	0.0162	Sulfur-oxidation	+	
16534	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	94.5	NR025150	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	0.0190 ( $\pm 0.004$ )	0.21	10.1	0.0149	Sulfate-reduction	+	
23164	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	96.0	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0473 ( $\pm 0.008$ )	0.17	8.4	0.0314	Sulfur-oxidation	+	
4705	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	94.0	NR025150	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	0.0050 ( $\pm 0.001$ )	0.14	8.0	0.0378	Sulfate-reduction	+	
4952	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	98.4	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0045 ( $\pm 0.001$ )	0.31	7.1	0.0145	Sulfur-oxidation	+	
23326	<i>Sulfurimonas</i> sp. HDS01	97.6	LC029406	Gammaproteobacteria	<i>Helicobacteraceae</i>	0.0045 ( $\pm 0.001$ )	0.31	7.1	0.0145	Sulfur-oxidation	+	
3299	<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i>	89.0	KF952443	Proteobacteria	unknown	0.0122 ( $\pm 0.005$ )	0.41	6.5	0.0283	unknown	+	
5479	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	98.0	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0090 ( $\pm 0.003$ )	0.31	4.7	0.0236	Sulfur-oxidation	+	
14571	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	98.0	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0077 ( $\pm 0.001$ )	0.11	4.1	0.0478	Sulfur-oxidation	+	
10805	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	98.4	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0100 ( $\pm 0.004$ )	0.43	4.0	0.0454	Sulfur-oxidation	+	
5155	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	92.5	NR025150	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	0.0045 ( $\pm 0.001$ )	0.31	3.6	0.0110	Sulfate-reduction	+	
21595	<i>Desulfobulbus propionicus</i>	91.3	NR074930	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	0.0047 ( $\pm 0.003$ )	0.75	2.5	0.0068	Sulfate-reduction	+	
20245	<i>Thiopropfundum hispidum</i>	93.3	NR112620	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0045 ( $\pm 0.001$ )	0.31	2.4	0.0134	Sulfur-oxidation	+	
22397	<i>Thioalkalispira</i> sp. HDS22	98.8	LC029407	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.1052 ( $\pm 0.019$ )	0.18	2.1	0.0198	Sulfur-oxidation	+	
19078	<i>Thiopropfundum hispidum</i>	98.8	NR112620	Gammaproteobacteria	<i>Thioalkalispiraceae</i>	0.0070 ( $\pm 0.003$ )	0.49	1.9	0.0048	Nitrate-reduction	+	
14981	<i>Thalassomonas sediminis</i>	92.5	DQ660392	Gammaproteobacteria	<i>Colwelliaceae</i>	0.0266 ( $\pm 0.014$ )	0.51	1.8	0.0189	Sulfur-oxidation	+	
23055	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	92.9	NR025150	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	2.5298 ( $\pm 0.211$ )	0.08	1.8	0.0237	Sulfate-reduction	+	
17063	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	91.7	NR025150	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbaceae</i>	0.5753 ( $\pm 0.058$ )	0.10	1.7	0.0126	Sulfate-reduction	+	
15708	<i>Sulfurimonas</i> sp. HDS01	100	LC029406	Gammaproteobacteria	<i>Helicobacteraceae</i>	32.4952 ( $\pm 2.770$ )	0.09	1.3	0.0422	Sulfur-oxidation	+	

\*三連にて密度勾配超遠心・分画した  $^{13}\text{C}$  炭酸塩添加系の 1H 画分 RNA において構築されたシーケンスライブリにおける各 OTU の相対存在量の平均値と標準誤差を示す。

\*\* 非標識炭酸塩添加系の 1H 画分 RNA のシーケンスライブリの相対存在量と比較して増加率を算出した。

\*\*\* 最近縁種の生理機能からそれぞれの OTU の有する機能を推定した。

\*\*\*\*最近縁種が海洋および塩を高濃度に含む環境から分離培養された OTU には「+」、陸上および淡水環境から最近縁種が分離培養された OTU には「-」を示す。

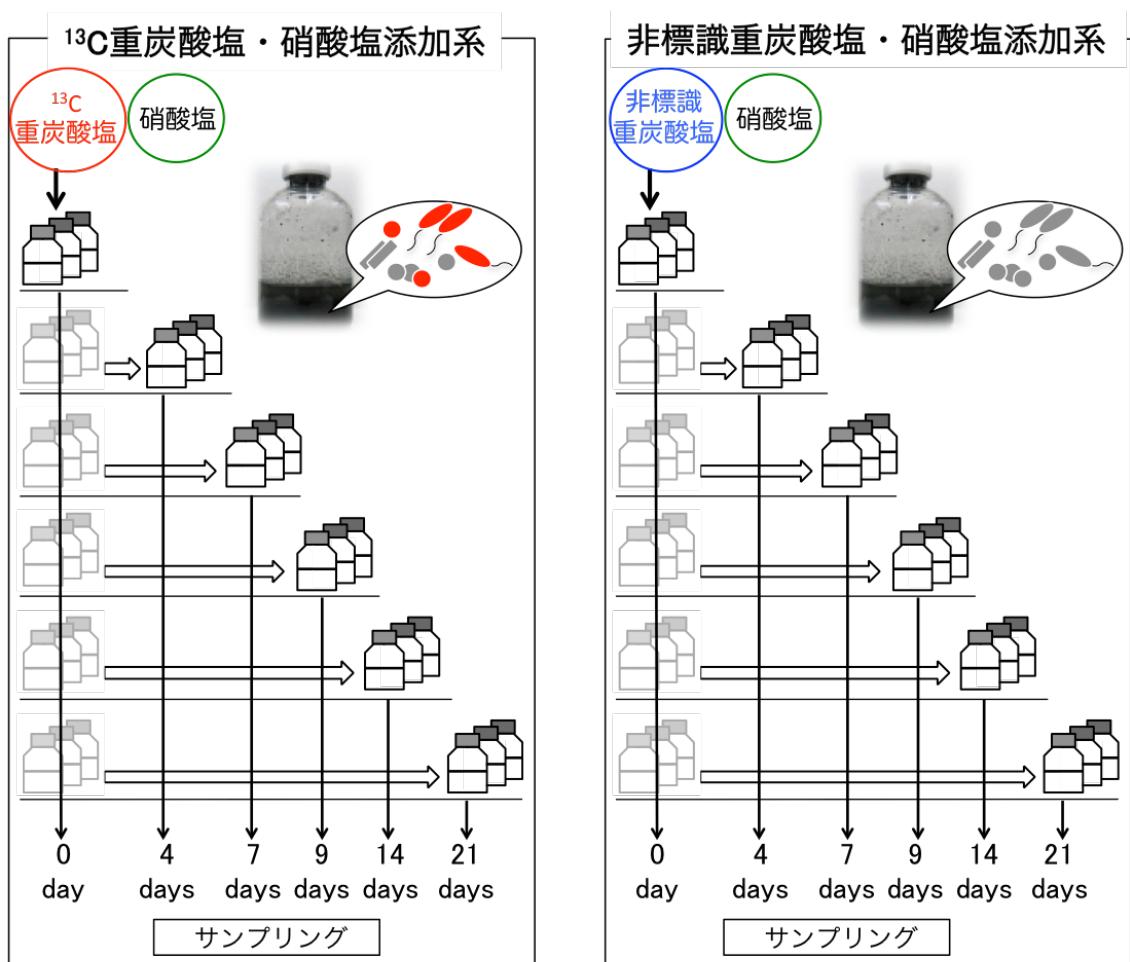


図 5.1 硝酸還元条件における<sup>13</sup>C-重炭酸塩トレーサー実験系の概要

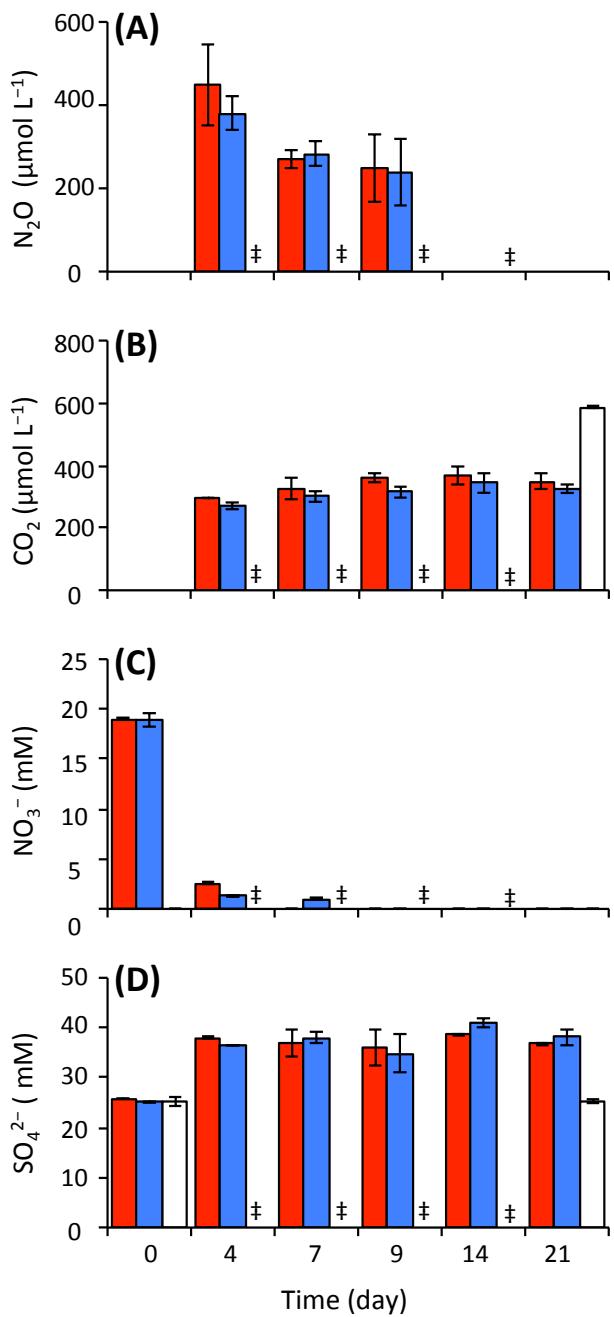


図 5.2 硝酸塩添加による堆積物の物理化学パラメータの変化 1

赤色のバーは  $^{13}\text{C}$  標識炭酸塩・硝酸塩添加系、青色のバーは非標識炭酸塩・硝酸塩添加系、白色のバーは硝酸塩無添加系を示す。A は気相の  $\text{N}_2\text{O}$ 、B は気相の  $\text{CO}_2$ 、C は液相中の  $\text{NO}_3^-$ 、D は液相中の  $\text{SO}_4^{2-}$  の濃度をそれぞれ示す。図中「‡」は分析未実施を意味する。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

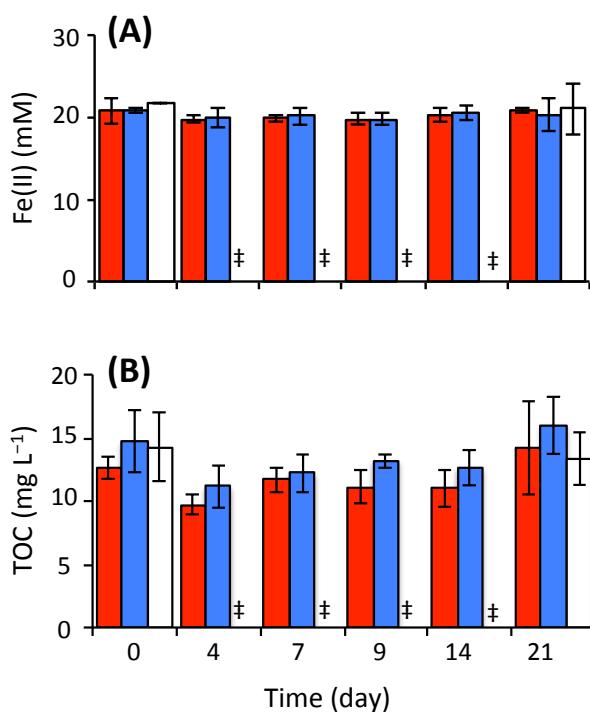


図 5.3 硝酸塩添加による堆積物の物理化学パラメータの変化 2

赤色のバーは<sup>13</sup>C 標識炭酸塩・硝酸塩添加系、青色のバーは非標識炭酸塩・硝酸塩添加系、白色のバーは硝酸塩無添加系を示す。A は堆積物懸濁液中の Fe(II)、B は液相中の TOC の濃度をそれぞれ示す。図中「‡」は分析未実施を意味する。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

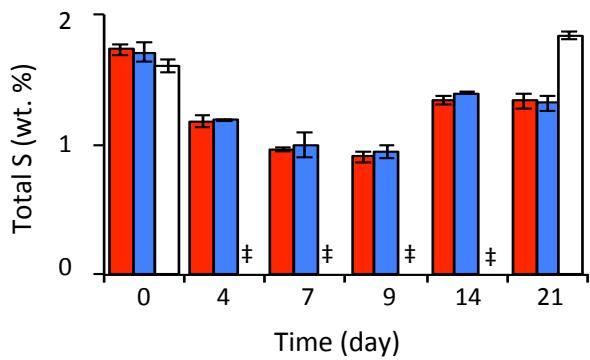


図 5.4 硝酸還元条件における堆積物固相中の硫黄成分含有率の変化

赤色のバーは<sup>13</sup>C 標識炭酸塩・硝酸塩添加系、青色のバーは非標識炭酸塩・硝酸塩添加系、白色のバーは硝酸塩無添加系を示す。図中「‡」は分析未実施を意味する。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

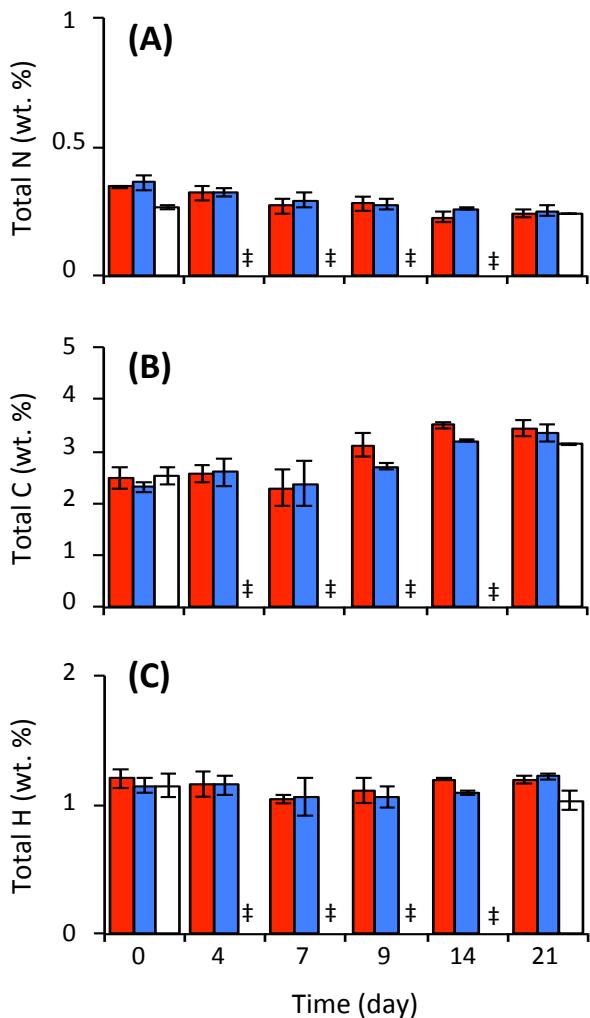


図 5.5 硝酸還元条件における堆積物固相中の窒素、炭素、水素成分含有率の変化

赤色のバーは<sup>13</sup>C 標識炭酸塩・硝酸塩添加系、青色のバーは非標識炭酸塩・硝酸塩添加系、白色のバーは硝酸塩無添加系を示す。乾燥堆積物中の窒素(A)、炭素(B)および水素(C)の含有率を示す。図中「‡」は分析未実施を意味する。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

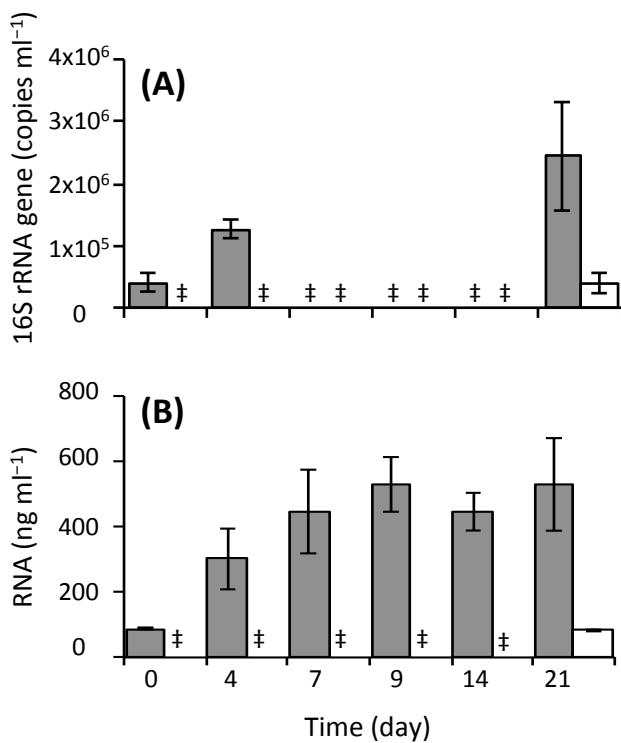


図 5.6 硝酸還元条件における堆積物中の DNA・RNA の濃度変化

灰色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは硝酸塩無添加系を示す。A は堆積物懸濁液 1 mL あたりの 16S rRNA gene のコピー数 (DNA) を示す。B は堆積物懸濁液 1 mL あたりの全 RNA の濃度を示す。図中「‡」は分析未実施を意味する。エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

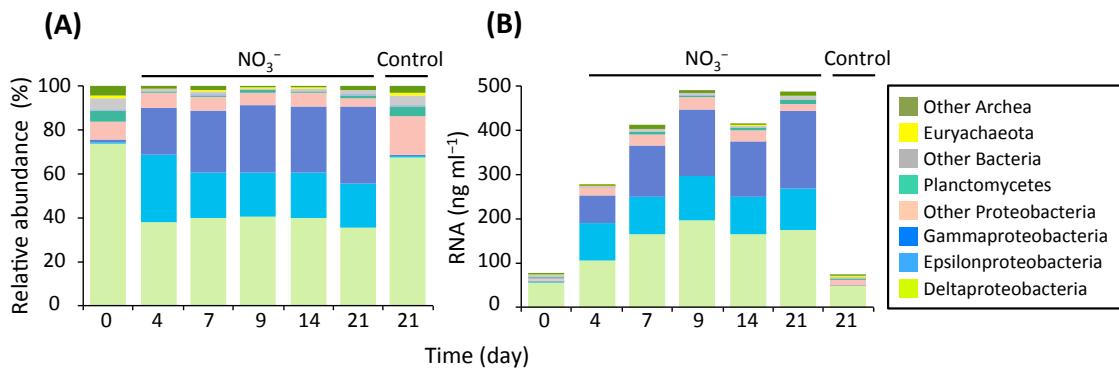


図 5.7 硝酸還元条件における堆積物中の代謝活性化微生物群

RNAに基づいた 16S rRNA 転写産物の次世代シークエンサー解析による門または綱の分類階層における堆積物中の微生物群集の遷移を示す。微生物の系統はグラフ右側に示した凡例の色と対応する。バーの上に硝酸塩添加系 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) および無添加系 (control) を示す。A は得られたシークエンスライブラリにおける各微生物群の相対的な rRNA 発現を示す。B は最も高い RNA 濃度を示した実験 9 日目を 1 として、実験時間ごとの RNA 濃度の差から見積もられた rRNA 発現微生物の割合を示す。シークエンスライブラリをそれぞれ三連で系統解析し、その平均を示す。

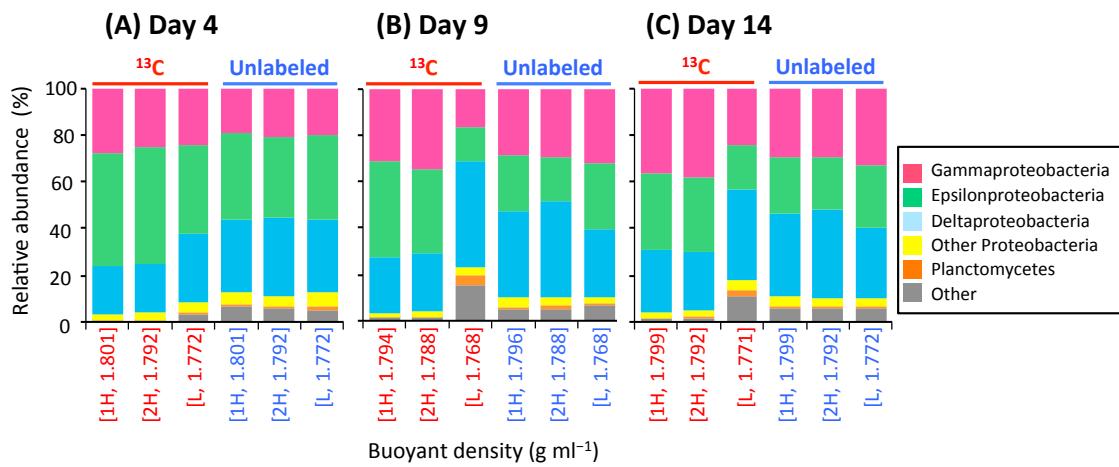


図 5.8 1H、2H および L 画分 RNA 中の微生物群集構造

実験 4 日目 (A)、実験 9 日目 (B)、実験 14 日目 (C) の最高密度画分 (heaviest fraction; “1H”、浮遊密度:  $1.793\text{--}1.803 \text{ g mL}^{-1}$ )、高密度画分 (second-heaviest fraction; “2H”、浮遊密度:  $1.791\text{--}1.796 \text{ g mL}^{-1}$ ) そして低密度画分 (light fraction; “L”、浮遊密度:  $1.767\text{--}1.774 \text{ g mL}^{-1}$ ) の RNA における 16S rRNA 転写産物の次世代シークエンサー解析による門 (Proteobacteria 門は綱) 階層での群集構造を示す。微生物の系統はグラフ右側に示した凡例の色と対応する。バーの上に  $^{13}\text{C}$  炭酸塩添加系 ( $^{13}\text{C}$ ) および非標識炭酸塩添加系 (Unlabeled) を示す。それぞれ密度勾配超遠心分離と系統解析を三連で行い、その平均を示す。また、角括弧の中は [画分名、浮遊密度の平均値( $\text{g mL}^{-1}$ )]をそれぞれ示す。

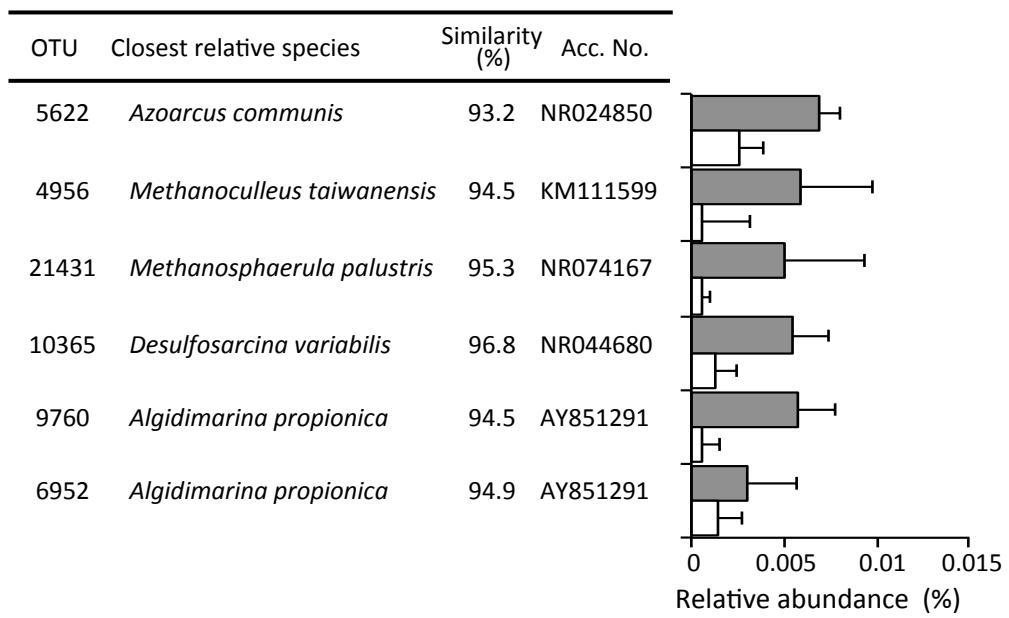


図 5.9 硝酸塩添加実験 21 日目に代謝活性化した OTU (Operational taxonomic unit)

灰色のバーは硝酸塩添加系、白色のバーは無添加系を示す。実験 21 日目の RNA に基づいた 16S rRNA 転写産物の次世代シークエンサー解析により、硝酸塩添加系において高い rRNA 発現が見られた OTU の相対存在量を示す。シークエンスライブリにおける平均値をそれぞれ示し、エラーバーは三連の添加系における標準誤差を示す。

## 《六章》総括

本研究では、海底由来と推定される津波打上げ堆積物を試料にして、その嫌気分解ポテンシャル評価および嫌気分解メカニズムの解明を通して、海底堆積物における嫌気分解機構の理解を深めた。津波打上げ堆積物中に存在する微生物は、一般的な海底堆積物に存在するものとほぼ同様であった。また揮発性脂肪酸（VFA）が低濃度に維持されていることや硫黄成分が高濃度に蓄積されていることは一般的な海底堆積物で報告されている性質と一致する。堆積物が津波によって水田土壤へ打上げられたことによる、曝気や攪拌ならびに河川や陸域由来の成分の影響はゼロではないが、極めて小さいことが予想された。

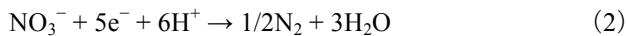
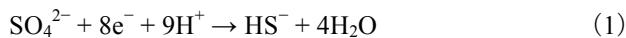
津波打上げ堆積物の嫌気分解ポテンシャルおよび嫌気分解メカニズムを解明すべく、嫌気環境中でエネルギー順位の高い電子受容体「 $\text{NO}_3^-$ 」に焦点を当て、硝酸塩添加により引き起こされる堆積物の分解過程、微生物群集の環境応答、微生物間相互作用に関して新規な知見を見出した。各種クロマトグラフ法、CHNS 元素分析などの多様な化学分析によって、堆積物分解の指標となる物理化学的パラメータを経時的に追跡することに成功した。また次世代シークエンサー解析により、堆積物中の微生物群集構造の推移（存在微生物群と代謝活性を有する微生物群）を高解像度で捉えることができた。加えて、硝酸塩添加によって優占化する系統的に新規な硫黄酸化細菌の分離培養に成功し、これら細菌の生理機能を明らかにできた。さらに SIP と次世代シークエ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開発し、それを堆積物の嫌気分解過程に適用することで、微生物種間の炭素源伝達を詳細に解明することに成功した。なお、本研究で見出された堆積物の嫌気分解経路を図 6.1 に示す。

$\text{SO}_4^{2-}$  および Fe(III)還元条件では硫酸還元菌群の rRNA 発現が検出されたが、硫酸還元反応は微弱であった。このことは堆積物の単位体積当たりの硫酸還元菌由来 rRNA の発現量の少なさからも支持された。これにより堆積物が分解されずに蓄積され続けてきた科学的根拠を示すことができた。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塩を添加すると、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反応と硫黄酸化反応の共役により、堆積物中の炭酸を固定して劇的に増殖することが明らかとなった。さらに本研究で分離した系統学的位置が大きく異なる二種類の硫黄酸化細菌 (*Sulfurimonas* sp. HDS01 株、*Thioalkalispira* sp. HDS22 株) は同様の生理学的機能を有しながらも堆積物中で共存していた。また優占種が高い代謝活性を示す *Sulfurimonas* 属に対して、HDS22 株などの Chromatiales 目に属する細菌群は低い菌密度でありながら高い代謝活性を示すという逆の生態学的特徴を示し、硫黄酸化を担う細菌間でその生理生態学的特徴が異なるという興味深い事象が観察された。これらのことから、堆積物中では複数種の硫黄酸化細菌がそれぞれで異なる代謝経路や生理特性を有する事により生態的ニッチを形成していると予想される。今後は、分離菌の全ゲノム解読や共培養試験等のより詳細な解析から、堆積物中での硫黄酸化細菌群の棲み分け機構の解明が為されていくものと

期待される。

また堆積物の嫌気分解過程における炭素の流れに着目すると、化学合成硫黄酸化細菌によって固定された炭素が他の嫌気呼吸を担う硫酸還元菌や鉄還元菌、および機能未知の細菌群により直接的に利用される事が明らかとなつた。加えて実験後期には硝酸塩の添加に依存して様々な嫌気微生物群、例えば  $N_2O$  還元菌、炭化水素分解菌、有機物分解の最終段階に関与する水素資化性のメタン生成古細菌および有機物分解共生細菌などの rRNA 発現の増大が観察された。これらの微生物の代謝活性化は、硫黄酸化細菌の独立栄養的な増殖の間接的な作用によるものと考えられた。以上から、硝酸塩を添加した堆積物試料中においては硫黄酸化細菌を起点とした微生物生態系の再構築と嫌気分解過程、即ち硫酸還元、炭化水素分解、メタン生成の進行が強く示唆された。本研究では 16S rRNA 遺伝子の高解像度解析から、堆積物の嫌気分解過程を担う微生物群を見出してきたが、海底堆積物中の物質循環・変換の全貌を解明するためには、微生物の深度プロファイルや原生動物や底生生物などの真核生物を含めた生物生態系全体の機能遺伝子 (mRNA) の発現を経時的に解析することが有効と考えられる。

一般的に、海水において硫酸は 20–30 mM の濃度で豊富に存在する一方で、硝酸は平均して 0.04 mM 以下の濃度で存在する。また、硫酸還元と脱窒反応では、1 mol の硫酸と硝酸を還元するためには機物酸化で得られる電子（還元力）がそれぞれ 8 mol と 5 mol 必要である（下記式 1、2 を参照）。有機物酸化によって得られる電子が豊富に存在し、硫酸濃度が 20 mM、硝酸濃度が 0.04 mM の場合には、硫酸還元反応には 160 mol、脱窒反応には 0.2 mol の電子が利用される試算される。



しかし、硫酸還元反応に用いられる電子供与体（電子の供給源）は揮発性脂肪酸（VFA）等の低分子有機化合物が主要である一方、脱窒反応は本研究で見出したように堆積物中の硫化物（FeS や  $HS^-$  など）をも電子の供給源として利用することができる。そのため、難分解性有機物を多く含み VFA が枯渢している本堆積物試料おいても、脱窒条件下においては各種硫黄成分が電子供与体としてはたらくことが可能で、それによって化学合成硫黄酸化細菌を起点とする嫌気分解過程の進行および微生物群集の劇的な再構成が生じたと推定された。本研究では、硫酸還元条件下における硫酸還元が約  $0.4 \text{ mM}^{-\text{day}}$ 、硝酸還元条件下では脱窒が約  $3.5 \text{ mM}^{-\text{day}}$  で進行し、推定電子要求量は 1 日あたりそれぞれ 3.2 mol および 17.5 mol であったことからも、本堆積物中の脱窒反応の優位性が推察される。また海水中の硝酸濃度は  $0.5 \mu\text{M}$ – $400 \text{ mM}$  で変動し、河川などから海水への硝酸態窒素の流入量は地球全体で年間 560 Tg (T は 10 の 12 乗) と推計されている。これは地球の全窒素循環の 9%–35% を占める規模であり (119)、海底堆積物における硝酸還元条件下の嫌気分解機構は地球物質循環を理解する上でも極めて重要である。

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大量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。本研究で見出した、硫黄酸化反応と脱窒反応の共役による化学合成硫黄酸化菌の劇的な増殖およびそれによる堆積物中の硫化物の減少は、底泥環境を改善し、好気生物の回復を促すと期待される。堆積物試料中からVFAなどの低分子有機物は検出されなかったものの、TOCは一定濃度で存在していた。また同じ堆積物試料を用いた好気条件における堆積物分解評価においても有機物の減少はほとんどみられなかった(35)ことからも、堆積物には微生物にとって利用困難な高分子の有機物が蓄積していたことが強く示唆される。堆積物に含まれる有機物の循環・変換には、高分子の有機化合物を分解できる好気微生物や底生生物の代謝活性化が有効と考えられる。また化学合成硫黄酸化細菌は堆積物中の炭酸を有機物へと変換できるため、一次生産者として他の嫌気微生物に炭素源を供給し、直接的または間接的に堆積物中の嫌気分解過程を促進させており、微生物生態系の再構築の重要な起点となることが本研究により初めて明らかとなった。本研究の成果は、海底堆積物中の物質変換・元素循環の全容解明に向けて有益な科学的知見を与えるものである。

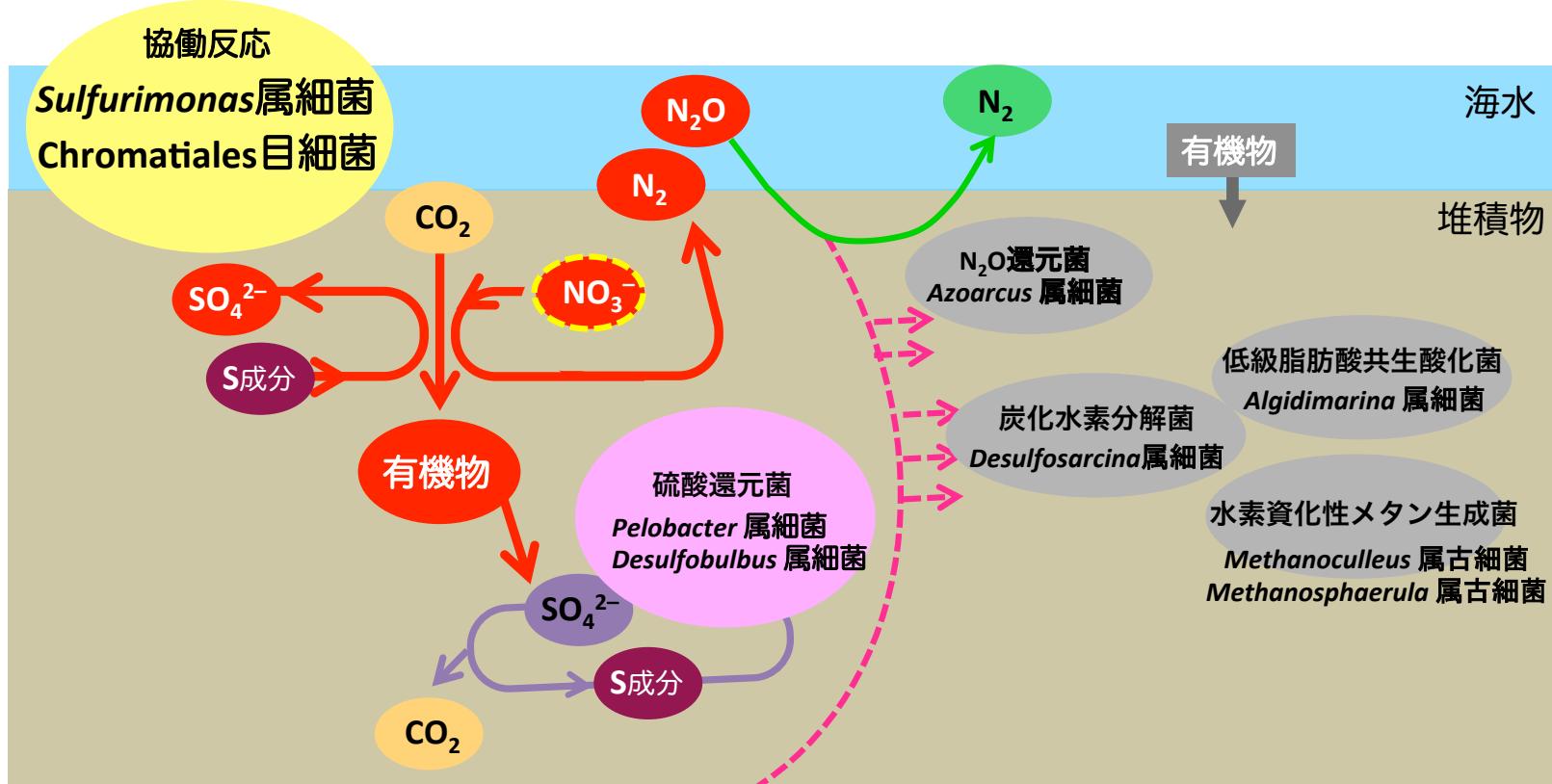


図 6.1 本研究で見出された硝酸塩添加によって誘発される堆積物の嫌気分解経路

赤色矢印は硫黄酸化細菌（黄色枠内：*Sulfurimonas* 属細菌と Chromatiales 目細菌）が直接的に引き起こす物質変換を示す。桃色枠内は硫黄酸化細菌から直接的に炭素を伝達された硫酸還元菌を示す。灰色枠内は硫黄酸化細菌と硫酸還元菌といった硫黄循環を担う微生物群の代謝活性化に依って共代謝的に代謝活性化した微生物群を示す。

## 謝辞

本研究は 2011 年 4 月から現在に至るまで産業技術総合研究所 環境管理研究部門 環境微生物研究グループにて私が取り組んだ成果ですが、多くの方々のご助言やご支援により得られたものです。ここに感謝の気持ちを記し、御礼に代えさせて頂きます。

石巻専修大学 高崎みつる教授には適切なご助言とご指導を賜りました。常に広い心で見守って頂きながらも、時折頂いた厳しいご指導は研究に取り組む私自身の姿勢を正して下さいました。また論文博士の取得についてご快諾くださり、お忙しい中様々な面でサポートして頂きましたこと深く感謝しております。今後とも変わらぬご指導を賜りますよう、宜しくお願ひ申し上げます。

東京農工大学 片山葉子教授には研究の随所において、有益なご助言を賜りました。お忙しい中、ディスカッションをする時間を割いてくださり、お陰様でより良い方向へ進むことができました。また論文博士につきましても副査を引き受けて頂き、ご指導・サポートをして頂きましたこと、心から御礼申し上げます。今後とも変わらぬご指導を賜りますよう、宜しくお願ひ申し上げます。

石巻専修大学 柴田清孝教授、並びに、玉置仁准教授には本博士論文において大変丁寧なご助言を賜りました。突然のお願いにも関わらず快く副査を引き受けて頂き、親身にディスカッションをして頂きましたこと、深く感謝しております。今後とも変わらぬご指導を賜りますよう、宜しくお願ひ申し上げます。

また本博士論文において親切にご指導して頂きました石巻専修大学の多くの先生に深く感謝いたします。適切なアドバイス頂き、論文博士の取得をサポートして頂きましたこと、厚く御礼申し上げます。今後とも変わらぬご指導を賜りますよう、宜しくお願ひ申し上げます。

産業技術総合研究所 堀知行 主任研究員には研究全般、論文執筆において多大なるご助言、ご指導、サポートをして頂きました。心より感謝しております。自分勝手な行動があった私を、温かくも厳しく、前向きに導いて頂いたことで一歩ずつ着実に進むことができました。またどんなに厳しい時でも研究の種を蒔いておくこと、基本に忠実ながらも着想や発想を大事にする姿勢は今後の研究生活に活かしていきます。

産業技術総合研究所 尾形敦 副部門長・研究グループ長には、博士取得に関して広い心でご理解を頂き、さらにはサポートをして頂きましたこと心より御礼申し上げます。また同研究所 田尾博明 前部門長にも親切に励まして下さいましたこと深く御礼申し上げます。

北海道農業研究センター 花島大 主任研究員、熊本県産業技術センター 田中亮一 研究主任、産業技術総合研究所 山田奈海葉 研究員、ならびに、協和発酵バイオ 木村真人氏には本研究を行う上で大変お世話になりました。研究生活をご一緒できたことを嬉しく思っております。

産業技術総合研究所 伊藤英臣 研究員には次世代シークエンサー解析の情報処理で大変お世

話になりました。お陰様で研究が一層深まりました。感謝申し上げます。また、同 Ronald Navarro 氏には次世代シーケンサー解析を行う上で大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。同 菊池義智 主任研究員には研究を温かく見守って頂き、適切なアドバイスを頂きました。御礼申し上げます。

所属研究グループでいつもお世話になっている、愛澤秀信様、飯村洋介様、佐藤由也様、稻葉知大様、萱嶋由美子様、片山明美様、逸見敦子様、柳澤真紀様、飯島孝行様、松尾和幸様、ならびに、技術研修生の学生の皆様にも感謝申し上げます。

産業技術総合研究所 玉木秀行 主任研究員、成廣隆 主任研究員、加藤創一郎 研究員、眞弓大輔 研究員、牧野（伊藤）彩花氏、中外テクノス 佐藤朋之氏、ならびに、北海道ハイテクノロジー専門学校 笥川あづさ氏には公私にわたって大変お世話になりました。お陰様でいつも元気に過ごすことができました。心より感謝いたします。

最後になりますが、会社を辞めることに理解を頂き、さらには博士取得を応援して温かく見守ってくれました家族に深く感謝いたします。

2015年9月27日

青柳 智

## 参考文献

1. **Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y.** 2006. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1623-1630.
2. **Kotsyurbenko OR, Friedrich MW, Simankova MV, Nozhevnikova AN, Golyshin PN, Timmis KN, Conrad R.** 2007. Shift from acetoclastic to H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis in a west Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2344-2348.
3. **Lydmark P, Almstrand R, Samuelsson K, Mattsson A, Sorensson F, Lindgren PE, Hermansson M.** 2007. Effects of environmental conditions on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant. *Environ. Microbiol.* **9**:2220-2233.
4. **Ontiveros-Valencia A, Ziv-El M, Zhao HP, Feng L, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R.** 2012. Interactions between nitrate-reducing and sulfate-reducing bacteria coexisting in a hydrogen-fed biofilm. *Environ. Sci. Technol.* **46**:11289-11298.
5. **Mayumi D, Dolfing J, Sakata S, Maeda H, Miyagawa Y, Ikarashi M, Tamaki H, Takeuchi M, Nakatsu CH, Kamagata Y.** 2013. Carbon dioxide concentration dictates alternative methanogenic pathways in oil reservoirs. *Nat comm.* **4**:1998.
6. **Lueders T, Friedrich MW.** 2002. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2484-2494.
7. **Labrenz M, Jost G, Pohl C, Beckmann S, Martens-Habbena W, Jurgens K.** 2005. Impact of different in vitro electron donor/acceptor conditions on potential chemolithoautotrophic communities from marine pelagic redoxclines. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6664-6672.
8. **Hori T, Muller A, Igarashi Y, Conrad R, Friedrich MW.** 2010. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by <sup>13</sup>C-acetate probing. *ISME J.* **4**:267-278.
9. **Pearson TH, Rosenberg R.** 1978. Macrofaunal succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol.* **16**:229-311.
10. **Kemp WM, Sampou P, Caffrey J, Mayer M, Henriksen K, Boynton WR.** 1990. Ammonium recycling versus denitrification in Chesapeake Bay sediments. *Limnol. Oceanogr.* **35**:1545-1563.
11. **Armenteros M, Pérez-García JA, Ruiz-Abierno A, Díaz-Asencio L, Helguera Y, Vincx M,**

- Decraemer W.** 2010. Effects of organic enrichment on nematode assemblages in a microcosm experiment. *Mar. Envi. Res.* **70**:374-382.
12. **Kunihiro T, Takasu H, Miyazaki T, Uramoto Y, Kinoshita K, Yodnarasri S, Hama D, Wada M, Kogure K, Ohwada K, Tsutsumi H.** 2011. Increase in Alphaproteobacteria in association with a polychaete, *Capitella* sp. I, in the organically enriched sediment. *ISME J.* **5**:1818-1831.
13. **Katsev S, Chaillou G, Sundby B, Mucci A.** 2007. Effects of progressive oxygen depletion on sediment diagenesis and fluxes: A model for the lower St. Lawrence River Estuary. *Limnol. Oceanogra.* **52**:2555-2568.
14. **Inui T, Yasutaka T, Endo K, Katsumi T.** 2012. Geo-environmental issues induced by the 2011 off the Pacific Coast of Tohoku Earthquake and tsunami. *Soil. Founda.* **52**:856-871.
15. **Van Cappellen P, Wang Y.** 1996. Cycling of iron and manganese in surface sediments; a general theory for the coupled transport and reaction of carbon, oxygen, nitrogen, sulfur, iron, and manganese. *Am. J. Sci.* **296**:197-243.
16. **Berg P, Rysgaard S, Thamdrup B.** 2003. Dynamic Modeling of Early Diagenesis and Nutrient Cycling. A Case Study in an Artic Marine Sediment. *Am. J. Sci.* **303**:905-955.
17. **Nielsen LP, Risgaard-Petersen N, Fossing H, Christensen PB, Sayama M.** 2010. Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. *Nature* **463**:1071-1074.
18. **Myers RM, Maniatis T, Lerman LS.** 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods. Enzymol.* **155**:501-527.
19. **Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4516-4522.
20. **DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU, Martinez A, Sullivan MB, Edwards R, Brito BR, Chisholm SW, Karl DM.** 2006. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science.* **311**:496-503.
21. **Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C.** 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**:806-809.
22. **Reed DC, Slomp CP, Gustafsson BG.** 2011. Sedimentary phosphorus dynamics and the evolution of bottom-water hypoxia: A coupled benthic–pelagic model of a coastal system. *Limnol. Oceanogra.* **56**:1075-1092.

23. **Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R.** 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl 1**:4516-4522.
24. **Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ.** 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5367-5373.
25. **Hori T, Noll M, Igarashi Y, Friedrich MW, Conrad R.** 2007. Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:101-109.
26. **Vandieken V, Pester M, Finke N, Hyun J-H, Friedrich MW, Loy A, Thamdrup B.** 2012. Three manganese oxide-rich marine sediments harbor similar communities of acetate-oxidizing manganese-reducing bacteria. *ISME J.* **6**:2078-2090.
27. **Ishii S, Ohno H, Tsuboi M, Otsuka S, Senoo K.** 2011. Identification and isolation of active N<sub>2</sub>O reducers in rice paddy soil. *ISME J.* **5**:1936-1945.
28. **Berg C, Beckmann S, Jost G, Labrenz M, Jurgens K.** 2013. Acetate-utilizing bacteria at an oxic-anoxic interface in the Baltic Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**:251-261.
29. **Aoki M, Ehara M, Saito Y, Yoshioka H, Miyazaki M, Saito Y, Miyashita A, Kawakami S, Yamaguchi T, Ohashi A, Nunoura T, Takai K, Imachi H.** 2014. A Long-Term Cultivation of an Anaerobic Methane-Oxidizing Microbial Community from Deep-Sea Methane-Seep Sediment Using a Continuous-Flow Bioreactor. *PLoS ONE.* **9**:e105356.
30. **Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF.** 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science.* **320**:1034-1039.
31. **Hans Wedepohl K.** 1995. The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**:1217-1232.
32. **Lalonde K, Mucci A, Ouellet A, Gelinas Y.** 2012. Preservation of organic matter in sediments promoted by iron. *Nature.* **483**:198-200.
33. **Cornell RM, Schwertmann U.** 2004. The Iron Oxides: Structure, Properties Reactions Occurrence and Uses, The Iron Oxides. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.*
34. 鈴木あゆみ. 2014 年度修士論文. 東日本大震災における津波堆積物の特性および起源の分布に関する検討. 新潟薬科大学大学院応用生命科学研究科.
35. 猪原英之. 2014 年度修士論文. 津波で打ち上げられた海洋堆積物の硫黄酸化細菌を起点とする物質循環. 東京農工大学大学院農学府.
36. **Zengler K, Richnow HH, Rossello-Mora R, Michaelis W, Widdel F.** 1999. Methane

- formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*. **401**:266-269.
37. **Talley LD, Pickard GL, Emery WJ, Swift JH.** 2011. Chapter 9 - Atlantic Ocean, 245-301. In Descriptive Physical Oceanography (Sixth Edition). *Academic Press*, Swift LD, L.P.J.E.H.
38. **Braunschweig J, Bosch J, Meckenstock RU.** 2013. Iron oxide nanoparticles in geomicrobiology: from biogeochemistry to bioremediation. *N. Biotechnol.* **30**:793-802.
39. **Tanaka Y, Hanada S, Manome A, Tsuchida T, Kurane R, Nakamura K, Kamagata Y.** 2004. *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:955-959.
40. **Sakai S, Imachi H, Sekiguchi Y, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y.** 2007. Isolation of Key Methanogens for Global Methane Emission from Rice Paddy Fields: a Novel Isolate Affiliated with the Clone Cluster Rice Cluster I. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4326-4331.
41. **Narihiro T, Kamagata Y.** 2013. Cultivating Yet-to-be Cultivated Microbes: The Challenge Continues. *Microbes Environ.* **28**:163-165.
42. **Noll M, Matthies D, Frenzel P, Derakshani M, Liesack W.** 2005. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ. Microbiol.* **7**:382-395.
43. **Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R.** 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* **6**:1621-1624.
44. **DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL.** 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5069-5072.
45. **Erik A.** 2011. Erik Aronesty. *ea-utils*
46. **Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R.** 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. **7**:335-336.
47. **Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF.** 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent,

- community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:7537-7541.
48. **Rashid MA, Buckley DE, Robertson KR.** 1972. Interactions of a marine humic acid with clay minerals and a natural sediment. *Geoderma* **8**.
49. **Parkes RJ, Wellsbury P, Mather ID, Cobb SJ, Cragg BA, Hornibrook ERC, Horsfield B.** 2006. Temperature-activation of organic matter and minerals during burial sustains the deep biosphere over geological time scales. *Org. Geochem.* **845**-852.
50. **Finke N, Jorgensen BB.** 2008. Response of fermentation and sulfate reduction to experimental temperature changes in temperate and Arctic marine sediments. *ISME J.* **2**:815-829.
51. **Holmer M, Kristensen E.** 1992. Impact of marine fish cage farming on metabolism and sulphate reduction of under-lying sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **80**.
52. **Kirsten S H, Donald E C.** 1997. Sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **61**:5351-5361.
53. **Pachiadaki MG, Kallionaki A, Dahlmann A, De Lange GJ, Kormas KA.** 2011. Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb. Ecol.* **62**:655-668.
54. **Jaekel U, Musat N, Adam B, Kuypers M, Grundmann O, Musat F.** 2013. Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps. *ISME J.* **7**:885-895.
55. **Kondo R, Shigematsu K, Kawahara N, Okamura T, Yoon Y, Sakami T, Yokoyama H, Koizumi Y.** 2012. Abundance of sulphate-reducing bacteria in fish farm sediments along the coast of Japan and South Korea. *Fish. Sci.* **78**:123-131.
56. **Muyzer G, Stams AJ.** 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:441-454.
57. **Stams AJ, Plugge CM.** 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:568-577.
58. **Kendall C, Elliott EM, Wankel SD.** 2008. Tracing Anthropogenic Inputs of Nitrogen to Ecosystems, p375-449, Stable Isotopes In Ecology and Environmental Science. *Blackwell Publishing Ltd.*
59. **Korth F, Deutsch B, Frey C, Moros C, Voss M.** 2014. Nitrate source identification using its isotopic ratios in combination with a Bayesian isotope mixing model in the Baltic Sea. *Biogeosciences Discuss.* **11**:5869-5901.
60. **Mayer B, Boyer E, Goodale C, Jaworski N, van Breemen N, Howarth R, Seitzinger S,**

- Billen G, Lajtha K, Nadelhoffer K, Van Dam D, Hetling L, Nosal M, Paustian K.** 2002. Sources of nitrate in rivers draining sixteen watersheds in the northeastern U.S.: Isotopic constraints. *Biogeochemistry*. **57-58**:171-197.
61. **Gu C, Laverman AM, Pallud CE.** 2012. Environmental controls on nitrogen and sulfur cycles in surficial aquatic sediments. *Front. Microbiol.* **3**:45.
  62. **Hansen HP, Koroleff F.** 2007. Determination of nutrients. In Methodsof seawater analysis:159-229. *Grasshof K, Kremling K, Ehrhardt M*.
  63. **Chao A.** 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* **11**:265-270.
  64. **Simpson EH.** 1949. Measurement of diversity. *Nature*. **163**.
  65. **Shannon CE.** 1948. A Mathematical Theory of Communication. *AT&T Tech. J.* **27**:379-423.
  66. **Lane DJ.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics:115–175. *E. Stackebrandt and M. Goodfellow*.
  67. **Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**:2947-2948.
  68. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**:2731-2739.
  69. **STACKEBRANDT E, GOEBEL BM.** 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **44**:846-849.
  70. **Böttcher ME, Lepland A.** 2000. Biogeochemistry of sulfur in a sediment core from the west-central Baltic Sea: Evidence from stable isotopes and pyrite textures. *J. Mar. Syst.* **25**:299-312.
  71. **Zopfi J, Ferdelman TG, Fossing H.** 2004. Distribution and fate of sulfur intermediates—sulfite, tetrathionate, thiosulfate, and elemental sulfur—in marine sediments. *Geol. Soc. Spec. Pap.* **379**:97-116.
  72. **Thang N, Brüchert V, Formolo M, Wegener G, Ginters L, Jørgensen B, Ferdelman T.** 2013. The Impact of Sediment and Carbon Fluxes on the Biogeochemistry of Methane and Sulfur in Littoral Baltic Sea Sediments (Himmerfjärden, Sweden). *Est. Coast.* **36**:98-115.
  73. **Cardoso RB, Sierra-Alvarez R, Rowlette P, Flores ER, Gomez J, Field JA.** 2006. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnol. Bioeng.*

- 95:1148-1157.
74. **Zhang Z, Lo IC, Zheng G, Woon K, Rao P.** 2015. Effect of autotrophic denitrification on nitrate migration in sulfide-rich marine sediments. *J. Soils. Sediments.*:1-10.
75. **Sievert SM, Scott KM, Klotz MG, Chain PS, Hauser LJ, Hemp J, Hugler M, Land M, Lapidus A, Larimer FW, Lucas S, Malfatti SA, Meyer F, Paulsen IT, Ren Q, Simon J.** 2008. Genome of the epsilonproteobacterial chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1145-1156.
76. **Kovaleva OL, Tourova TP, Muyzer G, Kolganova TV, Sorokin DY.** 2011. Diversity of RuBisCO and ATP citrate lyase genes in soda lake sediments. *FEMS Microb. Ecol.* **75**:37-47.
77. **Grote J, Schott T, Bruckner CG, Glockner FO, Jost G, Teeling H, Labrenz M, Jurgens K.** 2012. Genome and physiology of a model Epsilonproteobacterium responsible for sulfide detoxification in marine oxygen depletion zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:506-510.
78. **Handley KM, Bartels D, O'Loughlin EJ, Williams KH, Trimble WL, Skinner K, Gilbert JA, Desai N, Glass EM, Paczian T, Wilke A, Antonopoulos D, Kemner KM, Meyer F.** 2014. The complete genome sequence for putative H - and S-oxidizer *Candidatus Sulfuricurvum* sp., assembled de novo from an aquifer-derived metagenome. *Environ. Microbiol.* **11**:3343-3462.
79. **Thomas F, Giblin AE, Cardon ZG, Sievert SM.** 2014. Rhizosphere heterogeneity shapes abundance and activity of sulfur-oxidizing bacteria in vegetated salt marsh sediments. *Front Microbiol.* **5**:309.
80. **Sorokin DY, Tourova TP, Lysenko AM, Muyzer G.** 2006. Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology*. **152**:3013-3023.
81. **Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, Bos D, de Graaf W, Pel R, Parkes RJ, Cappenberg TE.** 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by <sup>13</sup>C-labelling of biomarkers. *Nature*. **392**:801-805.
82. **Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu SF, Nelson TA.** 2007. Stable isotope probing with <sup>15</sup>N achieved by disentangling the effects of genome G+C content and isotope enrichment on DNA density. *Applied and environmental microbiology* **73**:3189-3195.
83. **Schwartz E.** 2007. Characterization of growing microorganisms in soil by stable isotope probing with H<sub>2</sub><sup>18</sup>O. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2541-2546.
84. **Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*. **403**:646-649.
85. **Huang WE, Ferguson A, Singer AC, Lawson K, Thompson IP, Kalin RM, Larkin MJ, Bailey MJ, Whiteley AS.** 2009. Resolving genetic functions within microbial populations: in

- situ analyses using rRNA and mRNA stable isotope probing coupled with single-cell raman-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:234-241.
86. **Jehmlich N, Schmidt F, von Bergen M, Richnow HH, Vogt C.** 2008. Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *ISME J.* **2**:1122-1133.
87. **Moreno AM, Matz C, Kjelleberg S, Manefield M.** 2010. Identification of ciliate grazers of autotrophic bacteria in ammonia-oxidizing activated sludge by RNA stable isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:2203-2211.
88. **Pratscher J, Dumont MG, Conrad R.** 2011. Ammonia oxidation coupled to CO<sub>2</sub> fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**:4170-4175.
89. **Qiu Q, Noll M, Abraham W-R, Lu Y, Conrad R.** 2008. Applying stable isotope probing of phospholipid fatty acids and rRNA in a Chinese rice field to study activity and composition of the methanotrophic bacterial communities in situ. *ISME J.* **2**:602-614.
90. **Schwarz JIK, Lueders T, Eckert W, Conrad R.** 2007. Identification of acetate-utilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA. *Environ. Microbiol.* **9**:223-237.
91. **Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y.** 2006. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J. Microbiol. Methods.* **66**:165-169.
92. **Dumont MG, Murrell JC.** 2005. Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature reviews. Microbiology.* **3**:499-504.
93. **Neufeld JD, Vohra J, Dumont MG, Lueders T, Manefield M, Friedrich MW, Murrell JC.** 2007. DNA stable-isotope probing. *Nat. protoc.* **2**:860-866.
94. **Lueders T, Manefield M, Friedrich MW.** 2004. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* **6**:73-78.
95. **Pilloni G, Granitsiotis MS, Engel M, Lueders T.** 2012. Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. *PLoS One.* **7**:e40467.
96. **Cleary DF, Smalla K, Mendonca-Hagler LC, Gomes NC.** 2012. Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *PLoS One.* **7**:e29380.

97. **Pilloni G, von Netzer F, Engel M, Lueders T.** 2011. Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. *FEMS Microbiol. Ecol.* **78**:165-175.
98. **Zemb O, Lee M, Gutierrez-Zamora ML, Hamelin J, Coupland K, Hazrin-Chong NH, Taleb I, Manefield M.** 2012. Improvement of RNA-SIP by pyrosequencing to identify putative 4-n-nonylphenol degraders in activated sludge. *Water. Res.* **46**:601-610.
99. **Bartram AK, Lynch MD, Stearns JC, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD.** 2011. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:3846-3852.
100. **Kindler R, Miltner A, Richnow H-H, Kästner M.** 2006. Fate of gram-negative bacterial biomass in soil—mineralization and contribution to SOM. *Soil Biol. Biochem.* **38**:2860-2870.
101. **Muhling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, Joint I.** 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* **2**:379-392.
102. **Manefield M, Whiteley AS, Ostle N, Ineson P, Bailey MJ.** 2002. Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **16**:2179-2183.
103. **Akuzawa M, Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y.** 2011. Distinctive responses of metabolically active microbiota to acidification in a thermophilic anaerobic digester. *Microb. Ecol.* **61**:595-605.
104. **Mayali X, Weber PK, Brodie EL, Mabery S, Hoeprich PD, Pett-Ridge J.** 2012. High-throughput isotopic analysis of RNA microarrays to quantify microbial resource use. *ISME J.* **6**:1210-1221.
105. **Li T, Wu TD, Mazeas L, Toffin L, Guerquin-Kern JL, Leblon G, Bouchez T.** 2008. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environ. Microbiol.* **10**:580-588.
106. **Behrens S, Losekann T, Pett-Ridge J, Weber PK, Ng WO, Stevenson BS, Hutcheon ID, Relman DA, Spormann AM.** 2008. Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3143-3150.
107. **Lueders T, Kindler R, Miltner A, Friedrich MW, Kaestner M.** 2006. Identification of Bacterial Micropredators Distinctively Active in a Soil Microbial Food Web. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5342-5348.

108. **Glaubitz S, Lueders T, Abraham W-R, Jost G, Jürgens K, Labrenz M.** 2009.  $^{13}\text{C}$ -isotope analyses reveal that chemolithoautotrophic Gamma- and Epsilonproteobacteria feed a microbial food web in a pelagic redoxcline of the central Baltic Sea. *Environ. Microbiol.* **11**:326-337.
109. **O'Neil D, Glowatz H, Schlumpberger M.** 2001. Ribosomal RNA Depletion for Efficient Use of RNA-Seq Capacity, Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.*
110. **Jean WD, Shieh WY, Liu TY.** 2006. *Thalassomonas agarivorans* sp. nov., a marine agarolytic bacterium isolated from shallow coastal water of An-Ping Harbour, Taiwan, and emended description of the genus *Thalassomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1245-1250.
111. **Kojima H, Ogura Y, Yamamoto N, Togashi T, Mori H, Watanabe T, Nemoto F, Kurokawa K, Hayashi T, Fukui M.** 2015. Ecophysiology of *Thioploca ingrica* as revealed by the complete genome sequence supplemented with proteomic evidence. *ISME J.* **9**:1166-1176.
112. **Lie TJ, Clawson ML, Godchaux W, Leadbetter ER.** 1999. Sulfidogenesis from 2-aminoethanesulfonate (taurine) fermentation by a morphologically unusual sulfate-reducing bacterium, *Desulforhopalus singaporesis* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3328-3334.
113. **Kleindienst S, Herbst FA, Stagars M, von Netzer F, von Bergen M, Seifert J, Peplies J, Amann R, Musat F, Lueders T, Knittel K.** 2014. Diverse sulfate-reducing bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *ISME J.* **8**:2029-2044.
114. **Vasquez-Cardenas D, van de Vossenberg J, Polerecky L, Malkin SY, Schauer R, Hidalgo-Martinez S, Confurius V, Middelburg JJ, Meysman FJR, Boschker HTS.** 2015. Microbial carbon metabolism associated with electrogenic sulphur oxidation in coastal sediments. *ISME J.* **9**:1966-1978.
115. **Oakley BB, Carbonero F, Dowd SE, Hawkins RJ, Purdy KJ.** 2012. Contrasting patterns of niche partitioning between two anaerobic terminal oxidizers of organic matter. *ISME J.* **6**:905-914.
116. **Stegen JC, Lin X, Konopka AE, Fredrickson JK.** 2012. Stochastic and deterministic assembly processes in subsurface microbial communities. *ISME J.* **6**:1653-1664.
117. **Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JB.** 2012. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**:497-506.
118. **Wu WM, Hickey RF, Zeikus JG.** 1991. Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3438-3449.
119. **Walsh JJ.** 1991. Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of

carbon and nitrogen. *Nature*. **350**:53-55.

## 原著論文リスト

### 【本研究関連】

- 1) **Aoyagi T, Kimura M, Yamada N, Navarro RR, Itoh H, Ogata A, Sakoda A, Katayama Y, Takasaki M, and Hori T.** 2015. Dynamic transition of chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria in response to amendment with nitrate in deposited marine sediments. *Front Microbiol.* **6.246:** 1-12.
- 2) **Aoyagi T, Hanada S, Itoh H, Sato Y, Ogata A, Friedrich MW, Kikuchi Y, and Hori T.** 2015. Ultra-high-sensitivity stable-isotope probing of rRNA by high-throughput sequencing of isopycnic centrifugation gradients. *Environ Microbiol Rep.* **7:** 282-287.
- 3) **Hori T, Kimura M, Aoyagi T, Navarro RR, Ogata A, Sakoda A, Katayama Y, and Takasaki M.** 2014. 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:** 357-366.

### 【その他】

- 1) **Hori T, Aoyagi T, Itoh H, Narihiro T, Oikawa A, Suzuki K, Ogata A, Friedrich MW, Conrad R, and Kamagata Y.** 2015. Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in natural environments. *Front Microbiol.* **6.386:** 1-16.
- 2) **Navarro RR, Aoyagi T, Kimura M, Itoh H, Sato Y, Kikuchi Y, Ogata A and Hori T.** 2015. High resolution dynamics of microbial communities during dissimilatory selenate reduction in an anoxic soil. *Environ Sci Technol.* **49:** 7684-91.
- 3) **Tago K, Itoh H, Kikuchi Y, Hori T, Sato Y, Nagayama A, Okubo T, Navarro RR, Aoyagi T, Hayashi K, and Hayatsu M.** 2014. A fine-scale phylogenetic analysis of free-living *Burkholderia* species in sugarcane field soil. *Microbes Environ.* **29:** 434-7.

## 化学合成硫黄酸化細菌を起点とする津波打上げ堆積物の嫌気分解機構

### **Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria initiate anaerobic degradation processes in land-deposited sediments**

青柳 智

#### 《一章》緒言

地球の物質循環に重要な役割を担う微生物生態系の形成には環境変化に対する微生物の応答と微生物同士の相互作用が深く関わっている。たとえば、温度、圧力、pH、NaCl濃度、電子受容体や電子供与体（栄養源）といった環境因子を人為的に変化させ、それに応答する微生物の系統を解析することで、複雑な微生物群集の中から物質循環・変換に中心的に関与する微生物が特定されてきた。地殻中から大気圏に至るまで地球上のあらゆる環境に微生物は生息しているが、植物が一次生産者として支えるような酸素の存在する好気的な環境は地表面付近に限られ、地球のほとんどは酸素の欠乏した嫌気的な環境であり、このような嫌気環境における生態系は微生物を主体として形成されている。微生物のエネルギー獲得形式には基質レベルのリン酸化（発酵的代謝）または酸化的リン酸化（呼吸）がある。特に嫌気呼吸微生物は、有機物の酸化で生じる電子を酸素以外の最終電子受容体に渡すことでエネルギーを獲得している。電子受容体の還元は酸化還元電位の順位に従って連続的に進行し、嫌気環境ではまず  $\text{NO}_3^-$ 、次に Fe(III)、更に  $\text{SO}_4^{2-}$  の順で微生物に利用され、これらが枯済すると  $\text{CO}_2$  を還元するメタン生成が最終的に起こる。さらに、微生物の有機物（電子供与体）に対する利用性と親和性は用いることが可能な電子受容体の種類と密接に関連しており、酸化還元電位の高い電子受容体を利用するエネルギー獲得量の大きい微生物ほど様々な有機物をより低い濃度域まで分解できる。嫌気環境では、このような電子受容体と電子供与体に対する応答性の違いにより、微生物群集の構成種が変遷していく。しかしながら、ひとつの自然環境での構成種が数万種にものぼるとされる複雑な微生物生態系に対して、これまでの研究では数十種類の優占微生物や特定の機能を有する微生物の変遷のみを解析しており、環境変化に対する微生物群集の応答やその形成に関する詳細なメカニズムの解明は為されていない。

海底堆積物は沿岸域から外洋域に至るまで地球の海底全体に分布し、地形や周辺地域産業などの環境要因を反映した物性や粒度組成および微生物生態系を形成している。これまでに人間活動による影響を受けやすく環境変化の大きい閉鎖系沿岸域の海底（特に養殖漁場の下など）において堆積物の蓄積が世界中で報告されてきている。その一方で 2011 年の東日本大震災に起因する大津波により東北地方太平洋沿岸の広範囲に大量の堆積物が打ち上げられたことから、外洋に面した開放系沿岸域においても堆積物が蓄積され続けてきた事実が明るみとなった。通説として、沿岸域海底では陸域や養殖漁場の残餌などを由来と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、海水中に 20–30 mM の濃度で存在している  $\text{SO}_4^{2-}$  を電子受容体とする硫酸還元菌の有機物分解が活発となり、硫酸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。海底堆積物は海水と接している上層部分を除いて嫌気状態であり、上述した  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe(III)}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  を電子受容体としてエネルギーを獲得するような嫌気微生物が物質の変換や循環に重要な役割を担うと予想される。しかしながら、海底堆積物中の嫌気微生物による電子受容体還元活性の有無に代表される嫌気分解ポテンシャル、さらに還元活性を有する微生物種や微生物間の相互作用（代謝ネットワーク）など、海底堆積物の嫌気分解メカニズムについては未だ解明されていない。

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、分離培養法に基づいて微生物の分類・同定と代謝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の多様性を有し、どのような生理生態学的機能を有しているのかを分離培養法だけで理解することは困難であった。これを克服すべく、系統分類に用いられる 16S rRNA 遺伝子を標的として環境試料を直接解析する分子生物学的手法が確立・改良されてきた。これにより、環境試料から抽出した核酸を鑄型に 16S rRNA 遺伝子の PCR (Polymerase chain reaction) 増幅およびその塩基配列を解読することによって、分離培養を介すことなく微生物の系統学的位置を推定できるようになった。さらに高速かつ大規模な塩基配列データを取得できる次世代シーケンサーの登場により、一度に数千万種の微生物の 16S rRNA 遺伝子配列の決定が可能となり、複雑な微生物群集を網羅的に捉え、かつ環境中の菌密度が極めて低い微生物をも個々に検出できるようになった。一方で、環境中に存在する微生物の系統学的情報を得るだけでは、塩基配列データベース上に類縁種の登録がない未知・未培養微生物を含む微生物が環境中でどのような生理機能を有しているかについて解明するのは困難である。そこで、環境中の微生物の系統と機能を結びつける手法として、安定同位体基質の微生物生体内への取り込みを追跡する「SIP (Stable isotope probing)」法が開発してきた。

本研究は東日本大震災に伴う津波によって宮城県東松島市大曲地区の水田土壤の上に打ち上げられた堆積物を試料に用い、海底・海水中に普遍的に存在する  $\text{Fe(III)}$  と  $\text{SO}_4^{2-}$  を電子受容体とした場合および嫌気環境では高いエネルギー順位に位置する「硝酸塩」を添加した場合の嫌気分解に焦点を当てた。それぞれの電子受容体還元条件下で堆積物の嫌気分解ポテンシャル評価を行い、各種の化学分析、次世代シーケンサー解析や SIP 法などの分子生物学的手法と分離培養法を組み合わせて、微生物群集の応答および微生物間相互作用の高解像度な特徴付けを通して堆積物中の嫌気分解メカニズムの解明を試みた。

## 《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】 $\text{SO}_4^{2-}$  と  $\text{Fe(III)}$  は、それぞれ海水中と海底中に豊富に存在する嫌気有機物分解の主要な

電子受容体であり、Fe(III)の多くは lepidocrocite 等の結晶性酸化鉄として存在する。しかしながら、海底堆積物において  $\text{SO}_4^{2-}$  と Fe(III)を還元する微生物活性の有無および活性微生物種や微生物間相互作用などは不明である。そこで、本章においては、これらを明らかにすることを目的として、硫酸塩または酸化鉄（lepidocrocite）を津波打上げ堆積物に追加投入し、それら電子受容体の還元反応の促進を試みた。さらに各種の化学分析と次世代シーケンサー解析によって硫酸還元活性および鉄還元活性の有無と微生物群集構造を解析した。

【方法】宮城県東松島市の水田土壤に打ち上げられた堆積物試料を採取し、人工海水へ嫌気的に懸濁した。硫酸塩または lepidocrocite をその還元活性評価に十分なよう 20 mM の濃度上昇となるように添加し、25°C 暗所で静置した。実験 0、2、5 日目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 領域を標的に次世代シーケンサーにより微生物群集構造（DNA）および代謝活性微生物（RNA）を解析した。

【結果】硫酸塩、lepidocrocite の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）。実験開始後すぐに気液平衡による  $\text{CO}_2$  の発生がみられた。実験 5 日目において、 $\text{SO}_4^{2-}$  濃度のわずかな減少（1.4–1.9 mM）が両添加系で観察された。一方で、Fe(III)還元の生成物である Fe(II)の濃度は、実験期間を通じてどちらの添加系においても増加しなかった。また TOC は実験期間中においてほぼ一定濃度であり、さらに揮発性脂肪酸（VFA）が検出されなかったことから、VFA を分解産物とする有機物の発酵的分解は微弱であったことが示唆された。堆積物中の DNA に基づいた微生物群集構造および RNA に基づいた代謝活性を有する微生物の組成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 級に属する細菌群が微生物群集全体における存在量（DNA）の 30%以上、rRNA 発現量（RNA）の 75%以上を占めていた。この Deltaproteobacteria 級の微生物群については Desulfobulbaceae 科細菌を主要とした硫酸還元菌で構成されていることが明らかとなった。

【考察】硫酸塩および lepidocrocite を添加した堆積物では、 $\text{SO}_4^{2-}$  還元が微弱に進行するものの、Fe(III)還元はほとんど起きなかつた。両添加系からは、様々な地域の海底堆積物でしばしば検出される Deltaproteobacteria 級に属する硫酸還元菌群の rRNA 発現が観察された。本堆積物中では硫酸還元菌が主要構成種であるが、電子供与体となりうる VFA 等の枯渇から硫酸還元の分解ポテンシャルは極めて低く、堆積物は安定状態となっていることが示された。

【結論】海水や海底中に豊富に存在する  $\text{SO}_4^{2-}$  や Fe(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り、これらの嫌気条件下で堆積物が生分解を受けずに蓄積し続ける科学的根拠を示すことができた。

【関連論文】 Hori T, Kimura M, Aoyagi T, Navarro RR, Ogata A, Sakoda A, Katayama Y, and

Takasaki M. 2014. 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**: 357-366.

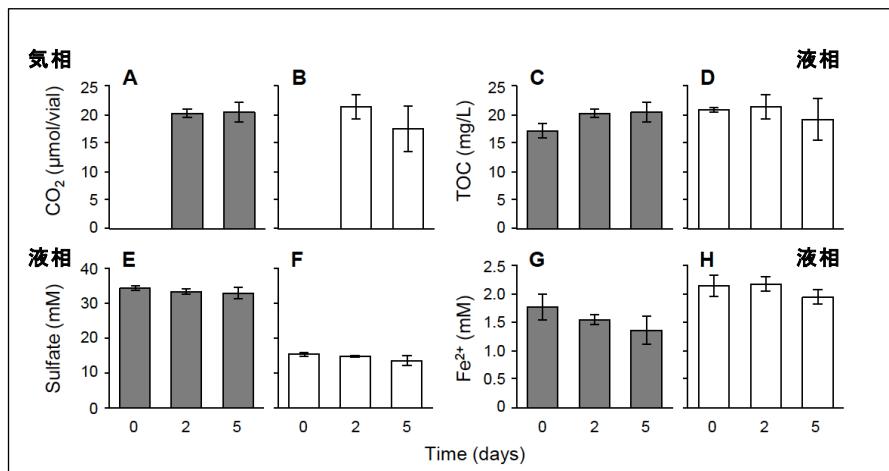


図 2.1 硫酸還元、鉄(III)還元条件における海底堆積物の物理化学パラメータ  
灰色のバーは硫酸塩添加系、白色のバーはlepidocrocite 添加系を示す。

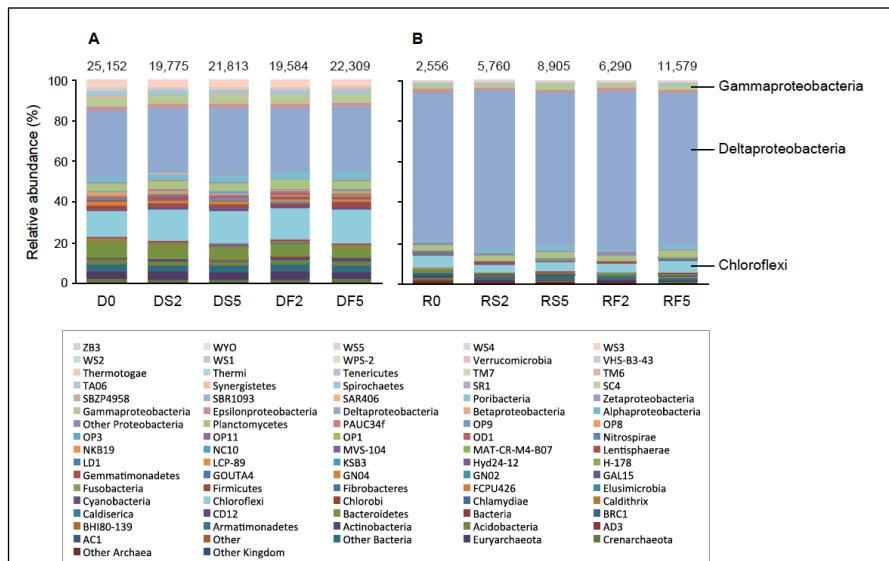


図 2.2 堆積物中の微生物群集構造と代謝活性微生物  
A : 微生物の存在 (DNA)、B : rRNA 発現 (RNA)  
バーの下にライプラリ名 (D0, R0 は実験 0 日目、DS2, DS5, RS2, RS5 は硫酸塩添加系の実験 2, 5 日目、DF2, DF5, RF2, RF5 は lepidocrocite 添加系の実験 2, 5 日目) をそれぞれ示す。バーの上には解析した配列数を示す。

### 《三章》硝酸還元条件における堆積物の嫌気分解とそれに関与する微生物の系統解析

**【目的】**本章では、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>やFe(III)よりもエネルギー順位の高い電子受容体基質であるNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を添加することで引き起こされる堆積物の分解過程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とした。

【方法】二章と同様に、堆積物試料を人工海水へ嫌気的に懸濁した。硝酸塩を還元活性評価に十分なように 20 mM の濃度で添加し、25°C の暗所で静置した。なお対照区として、硝酸塩無添加系を用意した。実験 0、2、5 日目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微生物群集構造 (DNA) および代謝活性微生物 (RNA) を解析した。さらに、硝酸塩添加によって優占化する微生物の分離培養を行った。

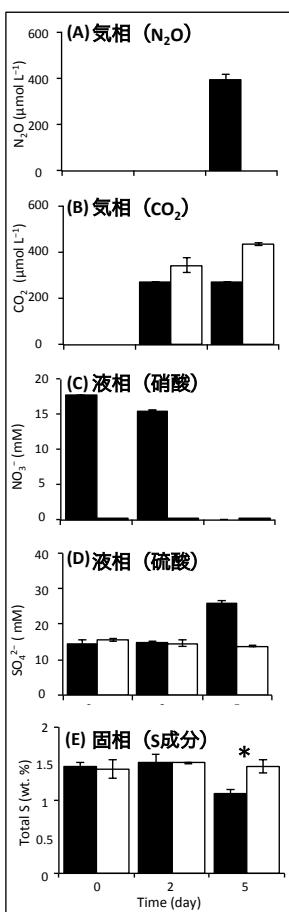
【結果】硝酸塩添加系と無添加系では実験 5 日間における物理化学パラメータが大きく異なった (図 3.1)。気相において、硝酸塩添加系では実験 5 日目に N<sub>2</sub>O が発生した。液相では、添加した NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が次第に減少して、5 日目には枯渇した。一方、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度は実験 5 日目で急上昇した。また硝酸塩添加系の実験 5 日目には、堆積物の固相中に含まれる S 画分が有意に減少した。これらの結果から硝酸塩を添加した堆積物系内では脱窒と硫黄酸化反応が起きていたことが示唆された。微生物群集解析の結果、硝酸塩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 級に属する細菌群における堆積物中の相対存在量 (DNA) は、実験 0 日目ではそれぞれ 2% と 5% であったが、実験 5 日目にはそれぞれ 44% と 17% にまで増加した。これらの微生物群を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* 属細菌に帰属する系統学的に新規な 3 菌株 (HDS01 株、HDNS4 株、HDS22 株) の分離培養に成功した (図 3.3)。また、硝酸塩添加系の実験 5 日目に最も優占化した硫黄酸化菌 (HDS01 株と HDS22 株) は硫黄酸化と脱窒を共役させ、さらに化学合成無機栄養的に生育できる微生物であった。加えて、硝酸塩添加系の実験 5 日目において、rRNA 発現量が経時的に増大した微生物、即ち代謝活性化した微生物が複数種観察された。これらは、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古細菌に近縁な微生物であった。

【考察】硝酸塩の添加により引き起こされた堆積物系内の硫黄酸化と脱窒反応において、消費された NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度 (17.7 mM) と生成された SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度 (11.3 mM) の比は、硫化水素酸化と脱窒の共役反応の化学量論比とほぼ一致していた。本堆積物中の硫化物が硝酸還元 (脱窒) と共に電子供与体として利用されたと推察される。また硝酸塩の添加によって、堆積物中では硫黄酸化細菌が優占化し、さらに主要な代謝活性種としても検出された。その中でも最も優占化した *Sulfurimonas* sp. HDS01 株と *Thioalkalispira* sp. HDS22 株は、分離培養後の試験によって系統的に新規であることおよび硫黄化合物と硝酸塩によって化学合成無機栄養的に生育することが明らかとなった。硝酸塩添加系では無添加系と比べて実験 5 日目の CO<sub>2</sub> 濃度が有意に低かった (図 3.1) ことを踏まえると、これらの新規な細菌群が直接的に堆積物系内の硫黄酸化・脱窒に

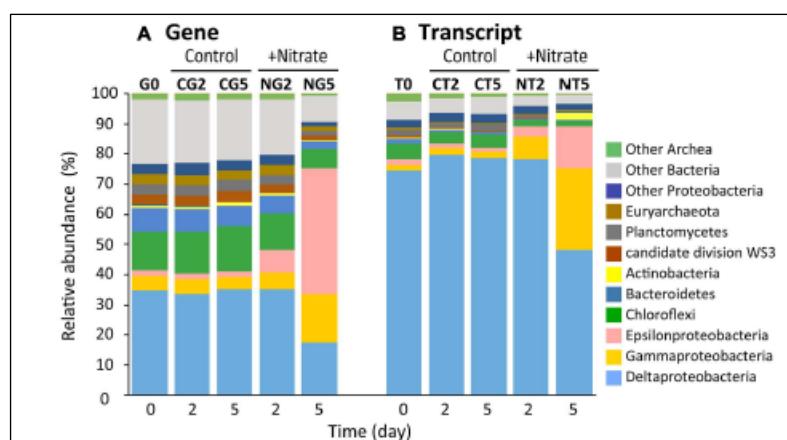
関与し、炭酸固定により劇的に増殖したことが強く示唆された。一方、硝酸塩添加系の実験 5 日目には、鉄還元菌やメタン生成古細菌などの従属栄養性の嫌気微生物に由来する rRNA 発現の増加が観察された。これにより、硝酸塩の添加系の実験 5 日目には、堆積物中に炭素源が供給されたことが示唆された。

**【結論】** 堆積物中でわずかに存在していた *Sulfurimonas* 属、Chromatiales 目の細菌群が硝酸塩の添加によって誘発される脱窒と硫黄酸化に直接的に関与し、急激に増殖した。この優占化した硫黄酸化細菌は化学合成無機的に生育することが可能であったことから、硫黄酸化細菌が堆積物中の一次生産者となり、固定された炭素が他の嫌気微生物群の栄養源として利用され堆積物の嫌気分解過程が進みつつあることが強く示唆された。

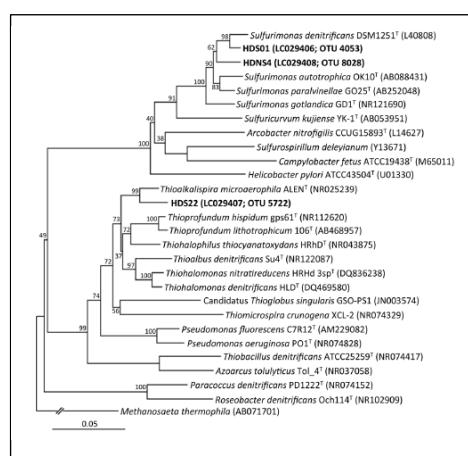
**【関連論文】** Aoyagi T, Kimura M, Yamada N, Navarro RR, Itoh H, Ogata A, Sakoda A, Katayama Y, Takasaki M, and Hori T. 2015. Dynamic transition of chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria in response to amendment with nitrate in deposited marine sediments. *Front Microbiol.* **6**: 246: 1-12.



**図 3.1 硝酸還元条件における堆積物の物理化学パラメータ**  
黒色のバーは硝酸塩添加系、白色の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代謝活性微生物**  
A : 微生物の存在 (DNA)、B : rRNA 発現 (RNA)  
バーの上にライプラリ名 (G0, T0 は実験 0 日目、NG2, NG5, NT2, NT5 は硝酸塩添加系の実験 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 分離菌株の系統学的位置**  
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】rRNA-stable isotope probing (rRNA-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 を密度勾配超遠心で分離して塩基配列を決定することにより、基質を分解し取り込んだ微生物の系統学的位置を推定する手法である。そのため標識 RNA の選り分けにおける解像度・感度は、rRNA-SIP において同位体基質を取り込んだ微生物の検出に直接影響を及ぼすと予想される。本章では、僅ではある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次世代シークエンサーの適用により、rRNA-SIP の感度が従来法と比較してどの程度まで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  $^{13}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$ -RNA 濃度を有する複数の標準試料を作成した。それらを密度勾配超遠心に供し、各密度画分に含まれる rRNA を T-RFLP (Terminal-restriction fragment length polymorphism ; 従来法) および次世代シークエンス (イルミナシークエンス) により解析した。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、同様の実験を行った (概要を図 4.1 に示す)。

【結果・考察】大腸菌の  $^{13}\text{C}$ -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、最高密度画分において最優占となった (図 4.2)。 $^{13}\text{C}$ -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。しかし、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ことは難しい。一方、イルミナシークエンスでは  $^{13}\text{C}$ -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  $^{13}\text{C}$ -RNA の有意な集積を最高密度画分において見出すことができた (図 4.3)。また、この最高密度画分における  $^{13}\text{C}$ -RNA の集積は大腸菌に特異的なプライマーを用いた定量 RT (Reverse transcription) -PCR の解析結果によっても支持された。

【結論】 $^{13}\text{C}$ -RNA の検出法を T-RFLP による群集構造プロファイルの比較からイルミナシークエンスによる大規模塩基配列解読へ置き換えることにより、rRNA-SIP の 500 倍の高感度化を達成した。この超高感度 rRNA-SIP 法は、存在量は極めて少ないが重要な物質循環・変換を担う未知微生物の機能解明、とりわけ海底堆積物の嫌気分解に関与する微生物群の機能決定に強力な手法となると考えられた。

【関連論文】(1) **Aoyagi T, Hanada S, Itoh H, Sato Y, Ogata A, Friedrich MW, Kikuchi Y, and Hori T.** 2015. Ultra-high-sensitivity stable-isotope probing of rRNA by high-throughput sequencing of isopycnic centrifugation gradients. *Environ Microbiol Rep.* 7: 282-287. (2) 青柳智、堀知行 2015. 「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.

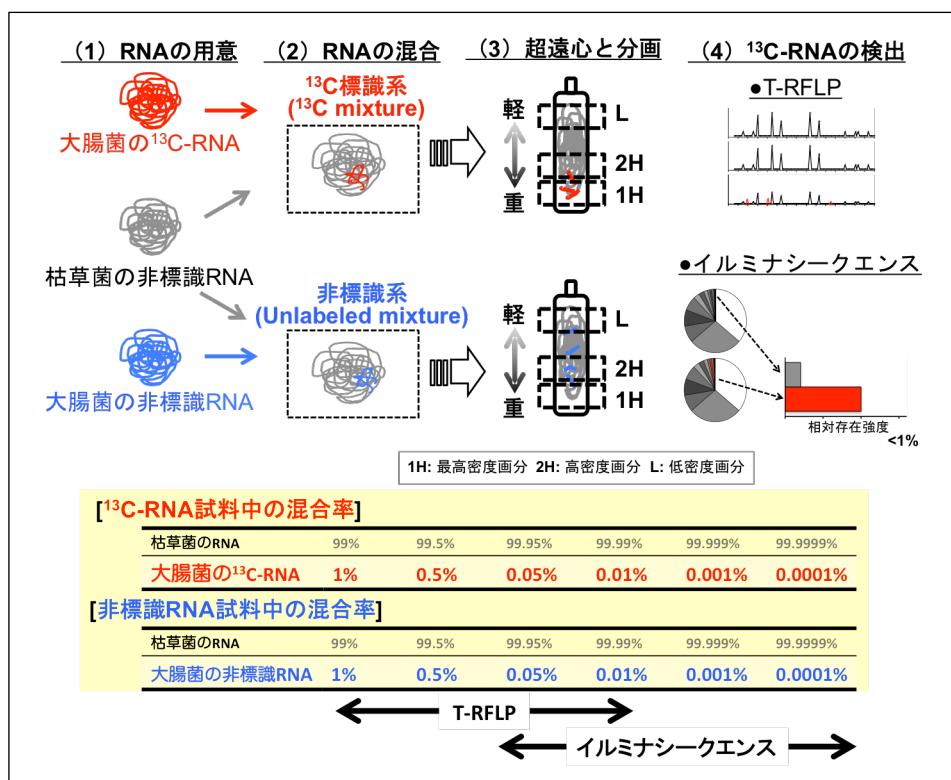


図 4.1 T-RFLP とイルミナシークエンスによる <sup>13</sup>C-RNA の検出感度評価の概要

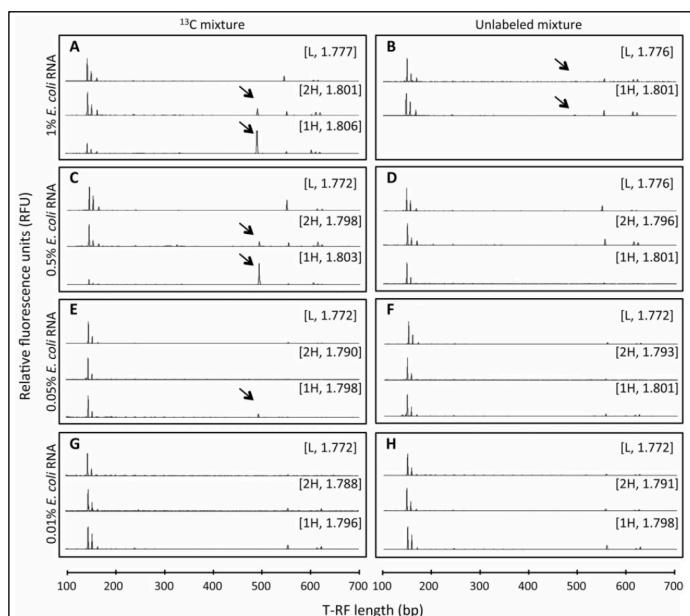


図 4.2 T-RFLP による <sup>13</sup>C-RNA の検出

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。

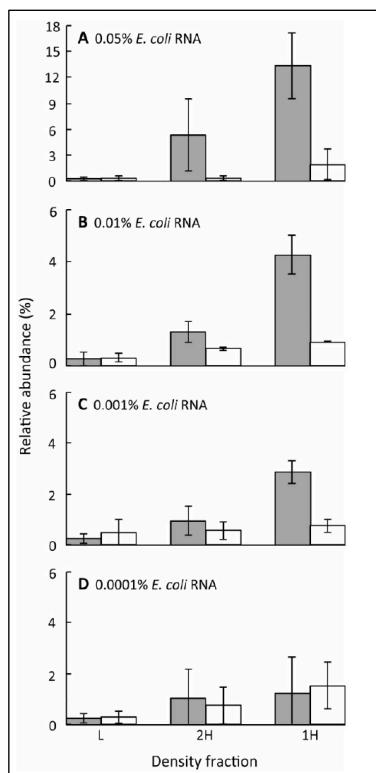


図 4.3 次世代シーケンサー解析による <sup>13</sup>C-RNA の検出

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 <sup>13</sup>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、津波打上げ堆積物への硝酸塩の添加により硫黄酸化細菌が劇的に増殖した後、複数の従属栄養性嫌気微生物群の代謝活性化（rRNA 高発現）が観察された。このことは、硫黄酸化細菌が固定した炭素またはそれ以外の因子により、堆積物の嫌気分解および微生物生態系の再構築が起こり始めていたことを強く示唆している。しかし、硫黄酸化菌群が堆積物中の炭酸または  $\text{CO}_2$  を固定するのか、そうであるならば固定された炭素がどのような微生物に直接的に受け渡されているのか、または間接的に影響を及ぼしているのかについては不明である。本章では、前章で開発した超高感度 rRNA-SIP 法を用いることで硫黄酸化細菌の炭酸固定を起点とする微生物間の相互作用（代謝ネットワーク）の解明を試みた。

【方法】二章、三章と同様に、堆積物試料を人工海水へ嫌気的に懸濁した。 $^{13}\text{C}$  標識系として、 $^{13}\text{C}$  標識重炭酸塩を 10 mM、硝酸塩を 20 mM の濃度上昇になるように添加し、25°C の暗所で培養した。非標識系は非標識重炭酸塩を 10 mM と硝酸塩を 20 mM の濃度で添加した。それぞれ実験 0、4、7、9、14、21 日目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。また実験 4、9、14 日の堆積物から抽出した RNA を密度勾配超遠心により密度ごとに分離・分画し、各密度画分に含まれる 16S rRNA 遺伝子（V4 領域）を次世代シーケンサーにより解析した。なお、非標識重炭酸塩 10 mM のみを添加した硝酸塩無添加系も用意した。

【結果】実験期間を通して  $^{13}\text{C}$  標識系と非標識系における系内の物理化学パラメータはほとんど同様に推移した（図 5.1）。硝酸塩添加系では実験開始後 4 日目には  $\text{N}_2\text{O}$  が発生し、実験経過に伴い減少した。また気液平衡による  $\text{CO}_2$  の生成は実験 21 日目において硝酸塩添加系の方が無添加系と比べて有意に低かった。液相において、添加した  $\text{NO}_3^-$  は実験開始後すぐに減少し、実験 7 日目には消失した。 $\text{SO}_4^{2-}$  濃度は実験 14 日目まで増加し、その後最終日までにわずかに (2 mM) 減少した。Fe(II) 濃度および TOC 濃度は実験期間中にやや変動したものの、ほぼ一定であった。また堆積物固相中に含まれる S 成分は実験 9 日目まで減少し、実験 14 日目からやや増加した。実験 4、9、14 日目の堆積物から抽出した RNA を超遠心分離・分画し、次世代シーケンサー解析に供した。その結果、高密度画分における  $^{13}\text{C}$  標識系と非標識系の微生物群集全体の構成に大きな違いはなかったものの、詳細な分類階層（種）で解析すると、実験 4、9 日目に *Sulfurimonas* 属細菌（HDS01 株）や実験 4、9、14 日目には *Thioalkalispira* sp. HDS222 株などの Chromatiales 目細菌が  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を取り込んだ微生物として同定された（図 5.2）。また実験 9、14 日目には、鉄還元能および硫酸還元能を有する *Desulfobulbus* 属や *Pelobacter* 属と近縁な細菌群、また近縁種を持たない系統的に新規な細菌群の  $^{13}\text{C}$ -rRNA が検出された。一方、硝酸塩添加系の実験 21 日目において、 $\text{N}_2\text{O}$  還元菌、炭化水素分解菌、水素資化性メタン生成古細菌、有機物共生酸化細菌に近縁の微生物群が同位体標識されなかったものの、rRNA 発現の上昇（代謝活性化）が観

察された。

【考察】堆積物において、*Sulfurimonas* 属や Chromatiales 目に属する硫黄酸化細菌は硫黄酸化と脱窒の共役反応により  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を固定して劇的に増殖することが示された。固定された  $^{13}\text{C}$  は培養経過に伴い、硫酸還元菌を主とする嫌気呼吸微生物群へ取り込まれた。これらの細菌群は硫黄酸化細菌が固定した  $^{13}\text{C}$  炭素を栄養源として直接的に利用したことが強く示唆された。実際に実験後期には  $\text{SO}_4^{2-}$  の僅かな減少も観察されたことから、これらの硫酸還元菌が固定された  $^{13}\text{C}$  を利用して  $\text{SO}_4^{2-}$  の還元を行っていたことを示している。一方で、実験 21 日目には  $\text{N}_2\text{O}$  還元菌や水素資化性のメタン生成古細菌、有機物分解共生細菌に由来する rRNA が高発現したものの、同位体標識されなかつたことから、これらの嫌気微生物群の代謝活性化は硫黄酸化細菌の固定した炭素に依るものではなく、間接的な要因が影響を及ぼしていると推察された。

【結論】化学合成硫黄酸化細菌は脱窒と硫黄酸化により系内の  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩を固定して急激に増殖した。その後、固定された  $^{13}\text{C}$  は硫黄循環に関する複数の硫酸還元菌及び他の嫌気微生物へと伝達された。さらにこれらの嫌気微生物群の代謝活性化による間接的な影響により、嫌気有機物分解の最終段階を担う水素資化性メタン生成古細菌や有機物分解共生細菌群の rRNA 発現が観察され、硫黄酸化細菌を起点とした堆積物の嫌気分解メカニズムの一端が明らかとなった。

【関連論文】準備中

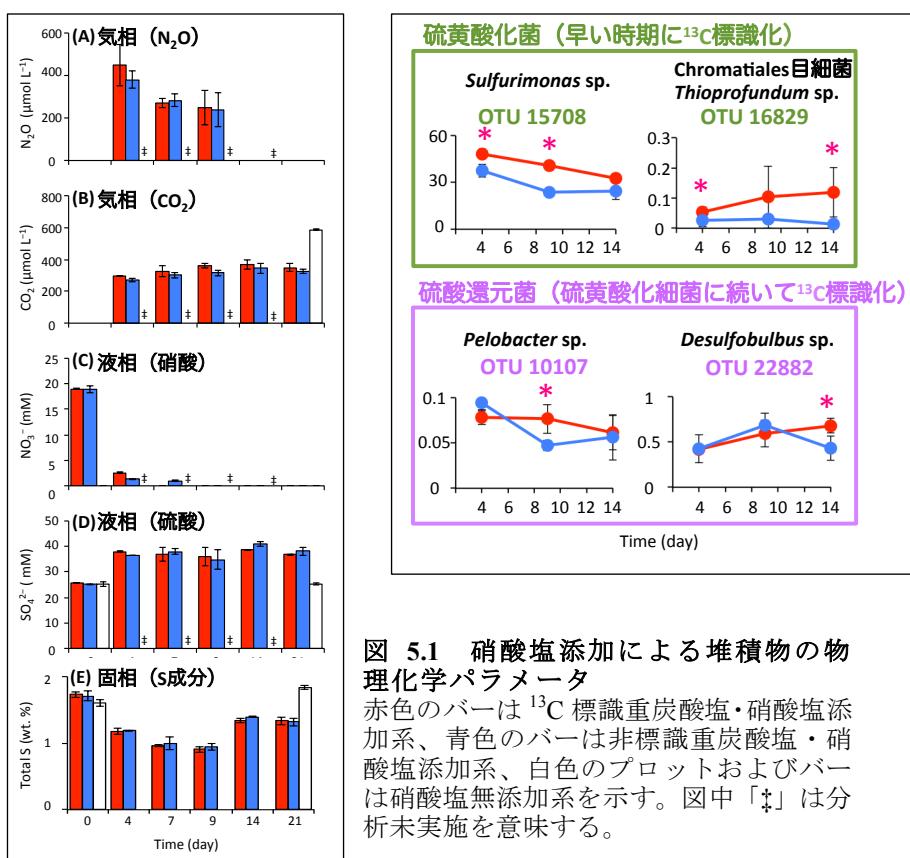


図 5.1 硝酸塩添加による堆積物の物理化学パラメータ

赤色のバーは  $^{13}\text{C}$  標識重炭酸塩・硝酸塩添加系、青色のバーは非標識重炭酸塩・硝酸塩添加系、白色のプロットおよびバーは硝酸塩無添加系を示す。図中「‡」は分析未実施を意味する。

図 5.2  $^{13}\text{C}$  重炭酸塩または固定化された  $^{13}\text{C}$  を取り込んだ微生物群  
赤色のプロットは  $^{13}\text{C}$  標識重炭酸塩・硝酸塩添加系、青色のプロットは非標識重炭酸塩・硝酸塩添加系を示す。アスタリスクは 2 つの添加系間の相対強度の差が有意であることを示す (\* :  $p < 0.05$ )。

## 《六章》総括

本研究では津波打上げ堆積物の嫌気分解ポテンシャルおよび嫌気分解メカニズムを解明すべく、嫌気環境中でエネルギー順位の高い電子受容体「 $\text{NO}_3^-$ 」に焦点を当て、硝酸塩添加により引き起こされる堆積物の分解過程、微生物群集の環境応答、微生物間相互作用に関して新規な知見を見出した。各種クロマトグラフ法、CHNS 元素分析などの多様な化学分析によって、堆積物分解の指標となる物理化学的パラメータを経時的に追跡することに成功した。また次世代シークエンサー解析により、堆積物中の微生物群集構造の推移（存在する微生物群と代謝活性を有する微生物群）を高解像度で捉えることができた。加えて、硝酸塩添加によって優占化する系統的に新規な硫黄酸化細菌の分離培養に成功し、これら細菌の生理機能を明らかにできた。さらに SIP と次世代シークエ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開発し、それを堆積物の嫌気分解過程に適用することで、微生物種間における炭素源伝達を詳細に解明することに成功した。

$\text{SO}_4^{2-}$  および Fe(III)還元条件では硫酸還元菌群の rRNA 発現が検出されたが、硫酸還元反応は微弱であった。このことは堆積物の単位体積当たりの硫酸還元菌由来 rRNA の発現量の少なさからも支持された。これにより堆積物が海底環境において分解されずに蓄積され続けたてきた科学的根拠を示すことができた。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塩を添加すると、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反応と硫黄酸化反応の共役により堆積物中の炭酸を固定して劇的に増殖することが明らかとなった。さらに本研究で純粋分離に成功した系統学的位置が大きく異なる二種類の硫黄酸化細菌 (*Sulfurimonas* sp. HDS01 株、*Thioalkalispira* sp. HDS22 株) は同様の生理学的機能を有しながらも堆積物中で共存していた。また優占種が高い代謝活性を示す *Sulfurimonas* 属に対して、HDS22 株などの Chromatiales 目に属する細菌群は低い菌密度でありながら高い代謝活性を示すという逆の生態学的特徴を示し、硫黄酸化を担う細菌間でその生理生態が異なるという興味深い事象が観察された。これらのことから、堆積物中では複数種の硫黄酸化細菌がそれぞれで異なる代謝経路や生理特性を有する事により生態的ニッチを形成していると予想される。今後は、分離菌の全ゲノム解読や共培養試験等のより詳細な解析から、堆積物中の硫黄酸化細菌群の棲み分け機構の解明が為されていくものと期待される。

また堆積物の嫌気分解過程における炭素の流れに着目すると、化学合成硫黄酸化細菌によって固定された炭素が他の嫌気呼吸を担う硫酸還元菌や鉄還元菌、および機能未知の細菌群により直接的に利用される事が明らかとなった。加えて実験後期には硝酸塩の添加に依存して様々な嫌気微生物群 ( $\text{N}_2\text{O}$  還元菌、炭化水素分解菌、有機物分解の最終段階に関与する水素資化性のメタン生成古細菌および有機物分解共生細菌など) の rRNA 発現の増大が観察された。これら

の微生物の代謝活性化は、硫黄酸化細菌の独立栄養的増殖の間接的作用によるものと考えられた。以上から、硝酸塩を添加した堆積物中において硫黄酸化細菌を起点とした微生物生態系の再構築と嫌気分解過程の進行が強く示唆された。本研究では 16S rRNA 遺伝子の高解像度解析から、堆積物の嫌気分解過程を担う微生物群を見出してきたが、海底堆積物中の物質循環・変換の全貌を解明するためには、微生物の深度プロファイルや原生動物や底生生物などの真核生物を含めた生物生態系全体の機能遺伝子 (mRNA) の発現を経時的に解析することが有効と考えられる。

一般的に、海水において硫酸は 20–30 mM の濃度で豊富に存在する一方で、硝酸は平均して 0.04 mM 以下の濃度で存在する。また、硫酸還元と脱窒反応では、1 mol の硫酸と硝酸を還元するためには機物酸化で得られる電子（還元力）がそれぞれで 8 mol と 5 mol 必要である。機物酸化によって得られる電子が豊富に存在し、硫酸濃度が 20 mM、硝酸濃度が 0.04 mM の場合には、硫酸還元反応には 160 mol、脱窒反応には 0.2 mol の電子が利用されると試算される。しかし、硫酸還元反応に用いられる電子供与体（電子の供給源）は揮発性脂肪酸（VFA）等の低分子有機化合物が主要である一方、脱窒反応は本研究で見出したように堆積物中の硫化物（FeS や HS<sup>-</sup>など）をも電子の供給源として利用することができる。そのため、難分解性機物を多く含み VFA が枯渢している本堆積物試料おいても、脱窒条件下においては各種硫黄成分が電子供与体としてはたらくことが可能で、それによって化学合成硫黄酸化細菌を起点とする嫌気分解過程および微生物群集の劇的な再構成が生じたと推定された。本研究では、硫酸還元条件下における硫酸還元が約 0.4 mM<sup>-day</sup>、硝酸還元条件下では脱窒が約 3.5 mM<sup>-day</sup> で進行し、推定電子要求量は 1 日あたりそれぞれ 3.2 mol および 17.5 mol であったことからも、本堆積物中での脱窒反応の優位性が推察される。また海水中の硝酸濃度は 0.5 μM–400 mM で変動し、河川などから海水への硝酸態窒素の流入量は地球全体で年間 560 Tg (T は 10 の 12 乗) と推計されている。これは地球の全窒素循環の 9%–35% を占める規模であり、海底堆積物における硝酸還元条件下の嫌気分解機構は地球物質循環を理解する上でも極めて重要である。

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大量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。本研究で見出した、硫黄酸化反応と脱窒反応の共役による化学合成硫黄酸化菌の劇的な増殖およびそれによる堆積物中の硫化物の減少は、底泥環境を改善し、好気生物の回復を促すと期待される。堆積物中から VFA などの低分子有機物は検出されなかったものの、TOC は一定濃度で存在していた。また、同じ堆積物試料を用いた好気条件における堆積物分解の評価においても、有機物の減少はほとんどみられなかつたことからも、本堆積物試料には微生物にとって利用困難な高分子の有機物が蓄積していたことが強く示唆される。堆積物に含まれる有機物の循環・変換には、高分子の有機化合物を分解できる好気

微生物や底生生物の代謝活性化が有効と考えられる。また化学合成硫黄酸化細菌は堆積物中の炭酸を有機物へと変換できるため、一次生産者として他の嫌気微生物に炭素源を供給し、直接的または間接的に堆積物中の嫌気分解過程を促進させており、微生物生態系の再構築の重要な起点となることが本研究により明らかとなった。本研究の成果は、海底堆積物中の物質変換・元素循環の全容解明に向けて有益な科学的知見を与えるものである。