

海底下に棲息する微生物の代謝を *in-situ* ¹³C-tracer 法で解明する



高野 淑識
Takano Yoshinori



野牧 秀隆
Nomaki Hidetaka



大河内 直彦
Ohkouchi Naohiko

((独)海洋研究開発機構, 海洋・極限環境生物圏領域)

1 研究の背景

海底下に棲んでいる微生物は、この10年程度で急速にクローズアップされ、“Deep Biosphere (地下生物圏)”という言葉が、広く知られるようになった。Deep Biosphere 研究は、微生物学、生態学、地球化学、地質学等を分野横断する地球生命科学という学際領域の中心トピックの1つになっている。それらの潮流により、“小さな力持ち”とも言える海底下の微生物の存在が、地球の炭素循環にも重要な役割を果たしていることが徐々に認識されるようになった。この一連の背景には、有人/無人潜水艇による潜航調査等による海底へのアクセス、地球深部掘削船「ちきゅう (Chikyu)」等による海底下へのアクセス、後述する安定同位体の高精度・微量分析技術の向上が挙げられる。

本題に入る前に微生物の分類に少し触れる。地球の生命は、大きく3つに分類できる(図1)。アーキア (Archaea: 古細菌), バクテリア (Bacteria: 真正細菌), ユーカリア (Eukaryota: 真核生物) である。大学生や大学院生向けのレクチャーでは、頭文字を取って「ABE (アベ)」と覚えてくださいと説いている。クラス

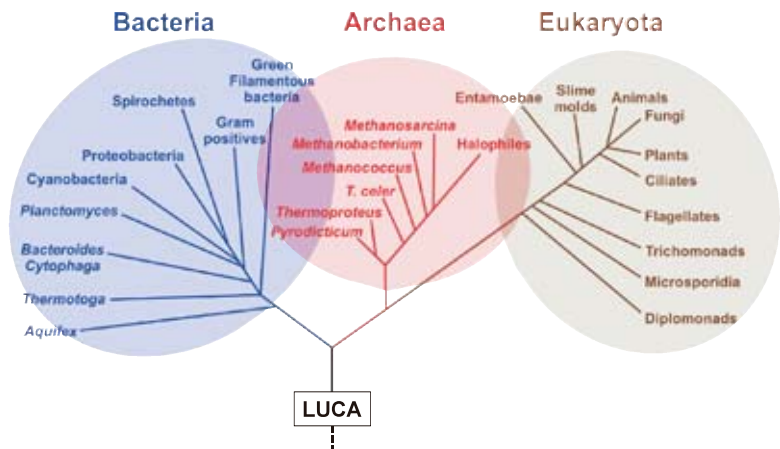


図1 地球生物の分子系統樹とアーキア (古細菌), バクテリア (真正細菌), ユーカリア (真核生物), 及びそれらの共通祖先 (LUCA, Last Universal Common Ancestor) 文献 11) を一部改変

に“阿部君や安部さん”がいると、彼らは生物界の基本的な分類を忘れることはない。前者の2つは、細胞に核を持たないことから原核生物(Prokaryote)とも呼ばれる。一方、微生物の定義は、“通常肉眼では見えず、顕微鏡でなければ見られないような小さな生物の総称”である。本稿は、海底現場で炭素同位体トレーサー法(*in-situ* ^{13}C -tracer法)の利用技術を応用し、海底下に棲息するアーキア群集の代謝を読み解いた研究^{1,2)}の紹介である。

微生物の代謝を“*in-situ* ^{13}C -tracer法”で診断する身近な例は、胃がんの原因とされるピロリ菌(*Helicobacter pylori*)の臨床試験を思い浮かべていただければ分かりやすい。 ^{13}C -尿素の錠剤を服用し、呼気の $^{13}\text{CO}_2$ を調べれば、ピロリ菌固有のウレアーゼ酵素活性から陽性・陰性をスクリーニングできる(図2)。微生物の代謝を調べるトレーサーに ^{13}C -安定同位体を用いるという点では、本研究の原理と同じである。

2 海底下のアーキア代謝を“*in-situ* ^{13}C -tracer法”で診断する

第3の生物界とも呼ばれるアーキアは、1977年にWoeseとFoxにより提案された。当初は、高温環境や高塩環境、あるいは動物の腸内などに適応する特殊な微生物という程度の知見であった。しかし近年、海洋や海底堆積物中におけるその分布や量が、従来考えられていたよりも大きいことが明らかになり、大きな注目を浴びている^{3,4)}。ところが、海洋性のアーキアは、培養が難しく、海水や海底堆積物中でどのような活動を行っているのか、またどれくらいの活性を持っているのか(どれくらいの速度で代謝しているのか)といった基本的な性状でさえも未知な部分が多い^{5,6)}。そこで我々は、世界で初めて深海底の現場(深さ1,453 m, 最大405日間)でアーキアを培養する新たな実験手法“*in-situ* ^{13}C -tracer法”を開発し、精密なバイオマーカー解析により、アーキア由来の膜脂質の分子内同位体比を評価した。深海底の現場で実

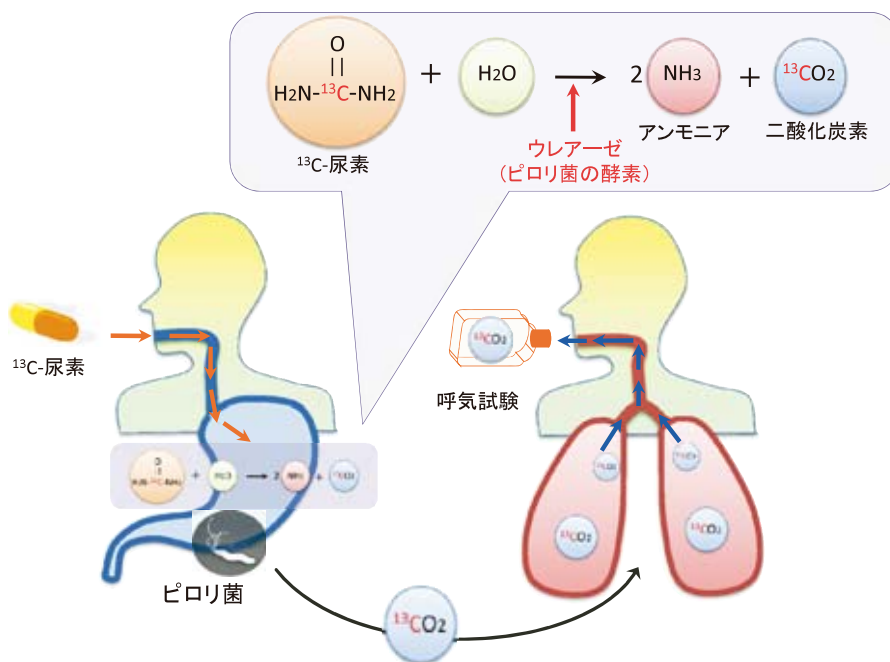
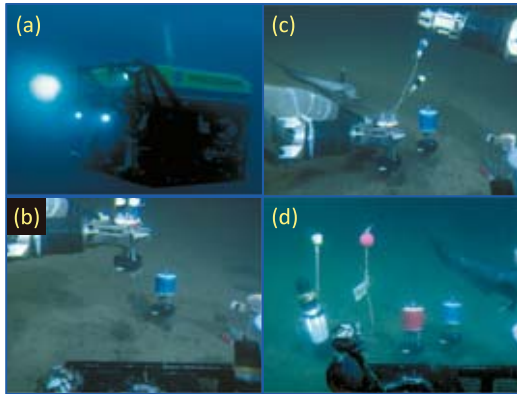


図2 ^{13}C -尿素呼気試験法によるピロリ菌の陽性・陰性スクリーニングの原理



(e)

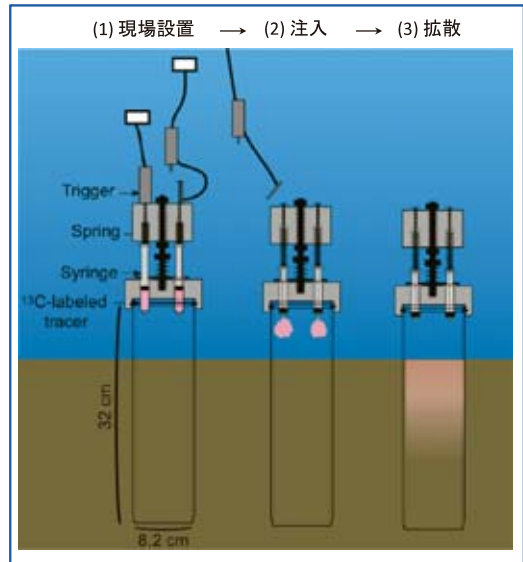


図3 (a) 本研究の“*in-situ* ^{13}C -tracer 法”に用いた潜水艇ハイパードルフィン, (b) 現場培養器の設置, (c, d) ^{13}C -基質の注入操作, (e) 海底での現場培養器と断面図

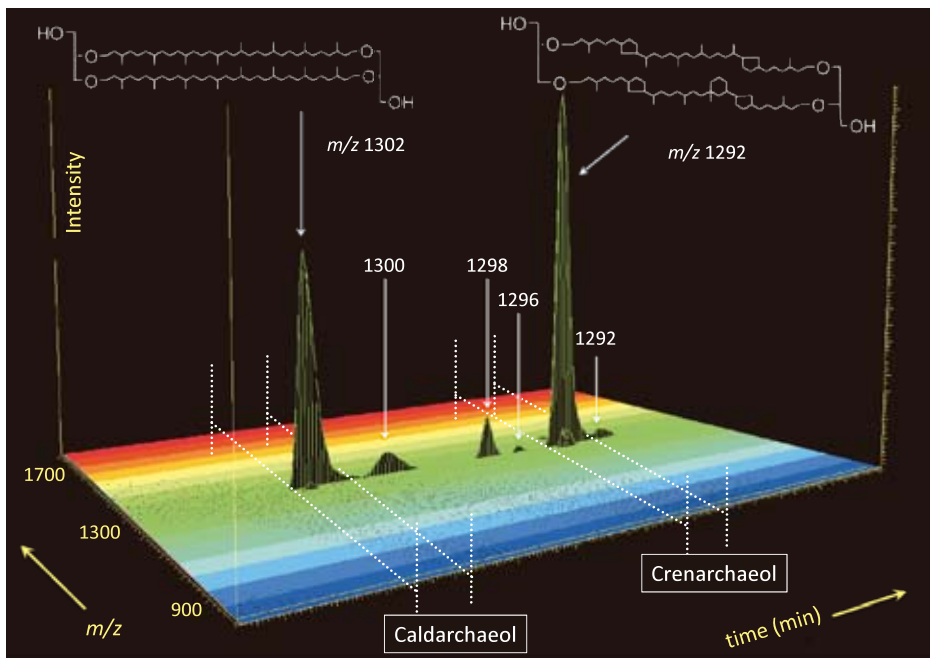


図4 堆積物から抽出したカルドアーキオール (分子量 1302), クレンアーキオール (分子量 1292) の液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/APCI-MS) でのクロマトグラム
質量数 1300, 1298, 1296 の分子は, 各々 glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGT) のうち GDGT (1), GDGT (2), GDGT (3)

験を行うアドバンテージは、微生物が棲息する海底と同じ物理・化学条件及び、それらの微妙な環境勾配を忠実に再現できることである。

海洋研究開発機構が所有する無人潜水艇ハイパードルフィン（研究支援母船なつしま）を利用して、海底（相模湾底，水深 1,453 m）に長さ 30 cm ほどの現場培養コアチャンバーを数本突き刺し，コアの内部に ^{13}C -グルコースをシリンジで注入した（図 3）。注入後，数日～1 年以上経ってからコアを内部の堆積物とともに 1 本ずつ回収し，堆積物の中からエーテル脂質（カルドアーキオール，クレンアーキオール：図 4）と呼ばれるアーキアの細胞膜の成分を実験室で

単離した後，その炭素同位体比を超微量元素分析/同位体質量分析計（Nano-EA/IRMS）で測定した。エーテル脂質とは 2,3-*sn*-グリセロールがイソプレノイドと呼ばれる炭化水素化合物にエーテル結合した構造を持つ有機分子で，アーキアだけによって合成される。このエーテル脂質を更に化学的に切断して，2,3-*sn*-グリセロールとイソプレノイドという 2 つの化合物に分離した。そして，両者に含まれる炭素の同位体比をガスクロマトグラフ/燃焼/同位体質量分析計（GC/C/IRMS）で測定した。以上により，海底でシリンジから注入したグルコース起源の ^{13}C が，底生性アーキアの分子内のどの部位に，

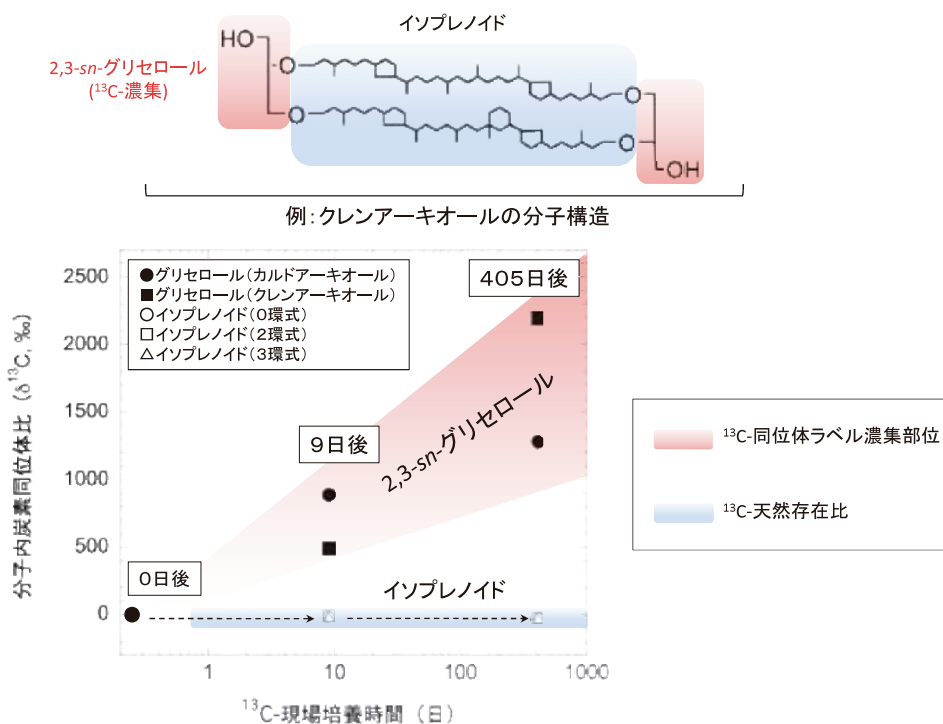


図 5 相模湾海底において行った現場培養実験（405 日）とアーキア脂質の分子内炭素同位体比の経時変化

ここで， $\delta^{13}\text{C} = [({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{sample}} / ({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{standard}} - 1] \times 1000$ であり，千分偏差 (‰ vs. PDB) で表示する。今回分析に用いたアーキアの細胞膜の成分であるエーテル脂質の 1 つ，クレンアーキオールの構造を示す。2,3-*sn*-グリセロールは，時間の経過に伴って ^{13}C -濃度が上昇しており，シリンジから導入されたグルコースの炭素を使って 2,3-*sn*-グリセロールを新たに合成したことが分かる。それに対し，イソプレノイドはほとんど ^{13}C -トレーサーを取り込んでいないことが分かる。 ^{13}C -濃度の増加傾向は，カルドアーキオールと呼ばれるもう一方の化合物も同様な結果を示した

どの程度含まれているのか評価できる。また、アーキアの群集構造（ユーリアーキオータ門、クレンアーキオータ門）は、16S rRNA 及び定量 PCR で評価した¹⁾。

3 海底堆積物中のアーキアは、遺骸由来の膜脂質を“再利用”している

測定の結果、2,3-*sn*-グリセロールには大量の¹³Cが見いだされたが、イソプレノイドにはほとんど見いだせなかった（図5）。このことは、¹³C-グルコースが、アーキアの細胞中で2,3-*sn*-グリセロールを合成するための材料として用いられた一方で、メバロン酸経路によるイソプレ

ノイド合成のための材料としては用いられなかったことを示している。つまり、イソプレノイドは自ら作り出したものではなく、かつて自分たちの先祖・仲間が合成、その死後も堆積物に残されていた、細胞外（堆積物中）にあったイソプレノイドをいったん細胞内に取り込み、2,3-*sn*-グリセロールと反応させてエーテル脂質を合成し、自らの細胞膜に利用するという“リサイクル”をしていたと考えることができる。

本研究によって、堆積物に棲息するアーキア（図6）の代謝には、膜脂質を再利用するプロセスが存在することを初めて明らかにした。現在、イソプレノイドへの¹³Cの取り込み速度を

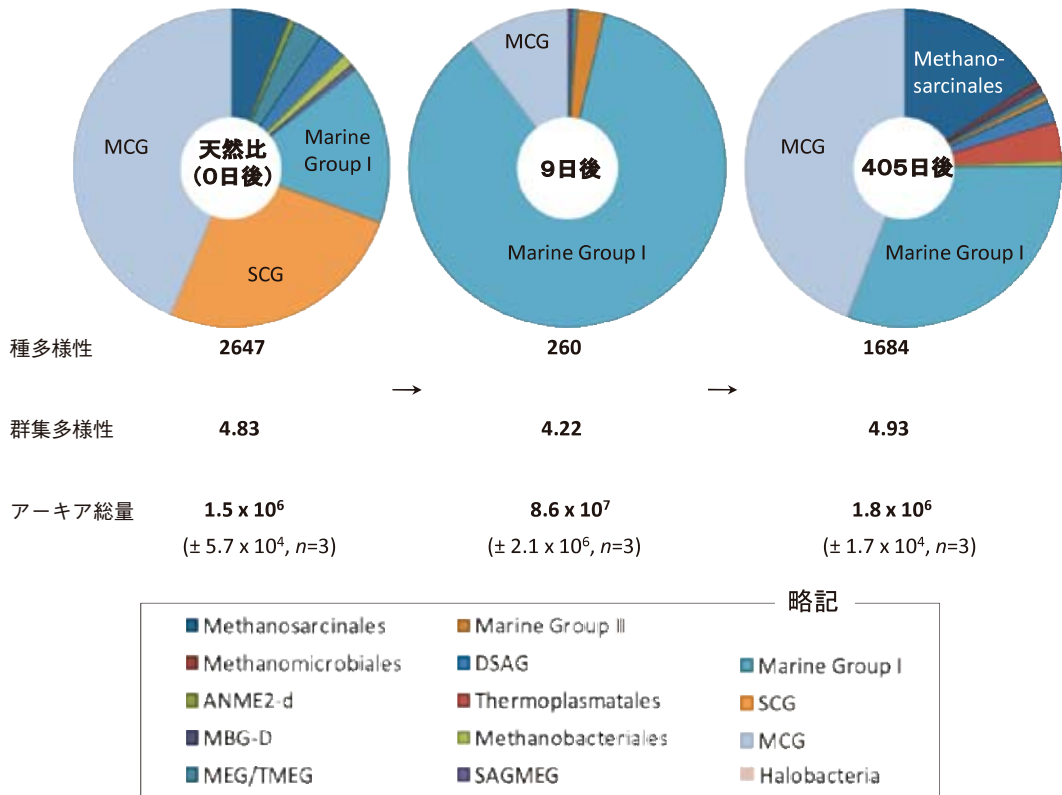


図6 相模湾海底において行った現場培養実験（405日間）とアーキアの群集構造解析の経時変化
略記：ANME2-d, Anaerobic oxidation of methane 2-d; MBG-D, Marine Benthic Group D; MEG/TMEG, Miscellaneous Euryarchaeotal Group/Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group; GSAG, Deep-Sea Archaeal Group; SAGMEG, South African Goldmine Euryarchaeotal Groups; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group

調べることによってアーキアの活動度（成長・再生などのスピード）を推定する研究例があるが、本研究によって、これまでの手法では、実際のアーキアの活動度を過小評価しており、従来推定されてきたアーキアの炭素循環への役割が更に大きいことを予期させる。

4 地球生命科学へのインパクト、産業界・社会への波及効果

本研究は、深海底に生息しているアーキアが、わずかなエネルギー源を有効に活用するために発達させたと考えられる新しい代謝経路を提示した。アーキアの代謝エネルギー論では、細胞の複製には、維持生存の1万倍以上のエネルギーが必要とされる⁷⁾。このため、アーキアの先祖や仲間が遺した“使用済み”の膜成分をリサイクルすることで、必要エネルギー量を最小にセーブすることができる。アーキアはエネルギーの低い深海底において、周囲の環境に含まれる有機物を使い回す究極のエコ戦略を採用することによって、エネルギーをセーブしながら暮らしているという生態的特徴が明らかになった。

今回の我々の発見は、安定同位体の高精度・微量分析技術の飛躍的な向上がなければ、観察できなかった。Nano-EA/IRMS システムの超微量化技術⁸⁾、GC/C/IRMS システムによる分子レベルの同位体比及び分子内の同位体比の精度・確度の保証⁹⁾が、本研究の発見を強力にサポートしている。高精度に有機分子の安定同位体比を追跡・解読する分析技術は、単に地球生命科学の範囲だけではなく、様々な波及効果が既に生まれようとしている¹⁰⁾。例えば、生物の食性解析や食品の産地偽装などの環境・認証分析、アンチドーピングなどの薬理・臨床検定にも一部実用化が始まっており、様々な社会システムの技術革新に貢献できると期待される。

【謝辞】

本研究の一部は、科学研究費補助金 (No.

22684030, 22244071, 22740340) で行った。

参考文献

- 1) Takano, Y. *et al.*, Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nature Geoscience*, **3**, 858–861 (2010)
- 2) Nomaki, H. *et al.*, Different ingestion patterns of $\delta^{13}\text{C}$ -labeled bacteria and algae by deep-sea benthic foraminifera. *Marine Ecology Progress Series*, **310**, 95–108 (2006)
- 3) Lipp, J.S., Morono, Y., Inagaki, F. and Hinrichs, K.-U., Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*, **454**, 991–994 (2008)
- 4) Biddle, J.F. *et al.*, Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3846–3851 (2006)
- 5) Teske, A. and Sorensen, K.B., Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all?. *ISME Journal*, **2**, 3–18 (2008)
- 6) Cavicchioli, R., Archaea-timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 51–61 (2010)
- 7) Valentine, D.L., Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 316–323 (2007)
- 8) Ogawa, O.N., Nagata, T., Kitazato, H. and Ohkouchi, N., Ultra sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses. *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, 339–353 (2010)
- 9) Chikaraishi, Y. and Naraoka, H., $\delta^{13}\text{C}$ and δD relationships among three *n*-alkyl compound classes (*n*-alkanoic acid, *n*-alkane and *n*-alkanol) of terrestrial higher plants. *Organic Geochemistry*, **38**, 198–215 (2007)
- 10) Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K., *Earth, Life, and Isotopes*. Kyoto University Press, pp.415 (2010)
- 11) Woese, C., On the evolution of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 8742–8747 (2002)