

深海生物ハオリムシの体内と体外の微生物相

—類似と相違—

木村 浩之*¹ 東出 幸真*² 長沼 毅*¹

動物にも関わらず消化器官を持たないハオリムシは、トロフォソームと呼ばれる器官の中に化学合成細菌を共生させて栄養を得ている。しかし、その共生細菌は親から子へと伝わる（垂直伝播する）ことには否定的な見解がある(Cary *et al.*, 1993)。一方、ハオリムシが生活史の中で共生細菌をどの時期に、どのように獲得しているのかはよく分かっていない。そこで、われわれは相模湾初島沖で採取したハオリムシの体内細菌とその周囲堆積物中の微生物相を比較した。ハオリムシのトロフォソーム内容物と堆積物から、それぞれDNAを抽出し、PCRにより16S rDNAクローン・ライブラリーを作成した。16S rDNAクローンを制限酵素断片パターン(RFLP)よりグループ化した。その結果、ハオリムシ体内細菌は6グループ（40クローン中）、堆積物中の細菌は13グループ（74クローン中）に分けることができた。さらに、これらのグループの代表的な16S rDNAの部分塩基配列（約500 bp）を決定し、属レベルで種同定を行った。同定された細菌は、全てプロテオバクテリアに属し、 α , β , γ , δ , ϵ サブグループに分類されることが分かった。また、ハオリムシ体内細菌の中には、堆積物中の細菌と非常に近縁なものがあった。これらの結果より、メタン湧水域に棲息するハオリムシは複数種の細菌を体内に持ち、また周囲の環境中から体内共生細菌を獲得（水平伝播）している可能性が示唆された。

キーワード：ハオリムシ、メタン湧水帯、体内共生細菌、堆積物、微生物相

Endosymbiotic and ambient microflorae of vestimentiferan tube worm

Hiroyuki KIMURA *³ Yukimasa HIGASHIDE *⁴ Takeshi NAGANUMA *³

The gutless tubeworms, vestimentiferans, are known to bear endosymbiotic chemoautotrophic bacteria in the specialized tissue which is called trophosome. The endosymbionts are observed to be host-specific, however, the pathway of symbiont acquisition is still unclear. Comparison of the endosymbiotic and ambient microflorae of vestimentiferan tube worm is thought to facilitate understanding the acquisition path. Bacterial DNA (16S rDNA) was extracted and PCR-amplified both from the trophosome of the seep vestimentifera, *Lamellibrachia* sp., and the habitat sediment. Total 40 and 74 PCR-clones from the trophosome and sediment samples, respectively, were recovered. These per-clones were further divided into 6 and 13 groups respectively, based on the restriction-fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S rDNA amplicons. Partial 16S rDNA sequences (ca. 500 bp) of representative clones of the RFLP-groups were analyzed and homology-searched on DNA databases. All the RFLP-groups belonged to Proteobacteria, but to different subdivisions of α , β , γ , δ and ϵ . Some of the RFLP-groups were very closely related to those from the ambient sediment. These results indicate that: 1) the seep worm has more than one endosymbiont, as opposed to the conventional monospecific view; and 2) the seep worm may acquire the endosymbionts from the ambient environment (horizontal transmission) as well as from the parents (vertical transmission).

Keywords: Vestimentifera, tubeworm, cold seep, endosymbiont, sediment, microflora

* 1 広島大学大学院 生物圏科学研究科

* 2 広島大学大学院 生物圏科学研究科 (現 のと海洋ふれあいセンター)

* 3 School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

* 4 School of Biosphere Sciences, Hiroshima University (present: Noto Marine Center)

1. はじめに

地球生態系における食物連鎖の大部分は光合成起点で太陽に依存している。しかし、海底熱水噴出孔やメタン湧水域周辺には、地球内部由来の硫化水素やメタンを利用する化学合成細菌や、それらの細菌を体内に共生させて栄養を得るハオリムシ、シロウリガイといった特異な生物が棲息している。これらは“地球内部に依存した生物”といえる。

特にハオリムシは、後生動物（ゴカイの仲間）であるにも関わらず、口、腸、肛門といった消化器官を持たない。その代わりに、トロフォソーム（栄養体）とよばれる組織に細菌を共生させている（Jones, 1981）。熱水噴出孔周辺に棲息するハオリムシの場合、エラから体内に取り込んだ硫化水素をその共生細菌に供給することで、共生細菌が合成した栄養を受け取り生きている（Cavanaugh, 1985）。

トロフォソームは、ハオリムシ全体の40%~60%（湿重）を占め（Felbeck and Childress, 1988）、この組織中に化学合成細菌が $10^9 \sim 10^{10}$ 細胞/gの密度で共生している（Cavanaugh *et al.*, 1981）。よって、ハオリムシが生きていくために十分な数の細菌がトロフォソーム内に共生していると言える。

ハオリムシが棲息する熱水噴出孔やメタン湧水域は、短命で空間的に限られている（Young *et al.*, 1996）。このような環境で子孫を残すためにハオリムシは、非常に成長速度が速いことがある（Gaill *et al.*, 1997）。そして、ハオリムシの精子は鞭毛による運動性が高く、雌は多数の卵を生むことが知られている（Cary *et al.*, 1989）。よって、ハオリムシは条件が良ければ非常に増殖能力の高い生物であると言える。

ハオリムシの共生細菌のリボソームRNA遺伝子の解析によって、熱水噴出孔に生息するハオリムシ（*Riftia pachyptila*）の共生細菌の90%以上は単一種で（Felbeck and Childress, 1988）、それは主にγ-プロテオバクテリアの硫黄栄養細菌（*Thiobacillus*属）に近縁であることが知られている（Distel *et al.*, 1988）。

一方、メタン湧水域に棲息するハオリムシの場合、顕微鏡観察により栄養体部で数種類の形態の異なる細菌が観察されたり（Naganuma *et al.*, 1997）、共生細菌を含んでいるハオリムシの栄養体部で硫化水素とともにメタンの酸化が確認されたという報告がある（Fisher and Childress, 1984）。また、ハオリムシと近縁種であるヒゲムシ類には、メタン酸化細菌と硫黄酸化細菌の両方を体内に持つものが存在する（Schmaljohann *et al.*, 1990）。さらに、熱水性二枚貝でもメタン酸化細菌と硫黄酸化細菌の共存が確認されている（Distel *et al.*, 1995）。

以上のことから、熱水噴出孔周辺に棲息するハオリムシと異なり、メタン湧水域に棲息するハオリムシの栄養体部には複数種の細菌が存在し、特に、硫黄酸化細菌とメタン酸化細菌が同時に存在する可能性がある（長沼, 1998）。

そこで、本研究では、ハオリムシの体内細菌に着目し、

相模湾海底メタン湧水域に棲息するハオリムシ（*Lamellibrachia* sp.）の組織内（厳密な意味での共生細菌かどうかは調査中）と、その周域環境の堆積物中に生息する細菌の遺伝子を解析した。また、ハオリムシ体内と周囲堆積物中の2つの微生物相を比較した。その結果に基づき、ハオリムシ体内細菌は多様か、共生細菌はどこからきたのか、などについて検討し、謎の深海生物ハオリムシの生活戦略についても考察を行う。

2. 材料と方法

2.1 ハオリムシ、堆積物試料の採取とDNAの抽出

海洋科学技術センターの潜水調査船「しんかい2000」により、相模湾初島沖深海底（水深1,170m）のメタン湧水域（Masuzawa *et al.*, 1992）に生息するハオリムシ（*Lamellibrachia* sp.）を採取した。また、柱状コアを用い、その周辺の海底堆積物を採取した。採取後直ちにハオリムシをチューブと生体に分けた。そして、生体を共生細菌を含む組織トロフォソーム（栄養体）、エラ、筋肉などに解体した。さらに、トロフォソームと海底堆積物を船上にて-80℃で冷凍保存した。このとき、トロフォソームは滅菌蒸留水及びエタノールで洗い、堆積物に関してはコアの中心部のものをDNA抽出に用いるなど、雑菌の混入が起こらないよう十分な配慮を加えた。

冷凍保存したハオリムシ組織と海底堆積物を研究室に持ち帰り、それぞれ細菌のDNAの抽出を行った。海底堆積物においては、フェノール・クロロホルム抽出を用いた。ハオリムシ組織（トロフォソーム）からは、フェノール・クロロホルム抽出法を用いた場合、有機物や無機物（イオンなど）が多く含まれていたためうまくDNAを抽出できなかった。そこで、イオン交換クロマトグラフィーによるDNA抽出キットASAP（Boehringer-Mannheim）を用いることで酵素的遺伝子増幅（PCR）ができる程度にきれいなDNAを得ることができた。

2.2 16S rDNAクローン・ライブラリー作成とシーケンス

PCRにより堆積物とチューブワーム組織からそれぞれ抽出した16S rRNA遺伝子（16S rDNA）の増幅を行った。増幅範囲は、細菌の系統分類によく用いられる16S rDNAの約1.4 k塩基対（bp）とした。必要なプライマーセットとしてEubac27F（AGAGTTTGATCCTGGCTCAG）とEubac1492R（GGTACCTTGTTACGACTT）（DeLong, 1992）を使用した。50 μlのPCR反応液はPCR Thermal Cycler PERSONAL（TaKaRa）を使用し、DNAの変性を95℃で30秒、プライマーのアニーリングを52℃で1分、エクステンションを72℃で1分のサイクルを25回行った。得られたPCR産物は1%アガロースゲルで電気泳動を行い、増幅されたかどうか確認した。

増幅された遺伝子はクローニング用ベクターに組み

込み、さらに大腸菌に組み込まれた。PCR産物のクローニングにはTAクローニングキット(Invitrogen)を用いた。Taq DNAポリメラーゼがPCR産物の3'末端にアデニン(A)残基をひとつ余分に付加する性質を利用したクローニング法で1500 bp程度のPCR産物を効率よく取り込むことができた。増幅された遺伝子を持つ大腸菌(クローン)をできるだけ多数回収し、16S rDNAクローン・ライブラリーを作成した。

16S rDNAクローン・ライブラリーのそれぞれの大腸菌を単離培養し、組み換え体プラスミドDNAを精製し、それらを制限酵素を用いて切断した。1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、切断されたプラスミドDNAの制限酵素切断パターン(RFLP)によりグループ分けを行った。

さらに自動DNAシーケンサー Model 373A (ABI社)を用いて、それぞれのグループの16S rDNAの塩基配列(約500 bp)を決定した。そして、得られた配列の相同性検索により属レベルでの同定を行った。また、16S rDNAの塩基配列を基に系統樹(図1, 2)を作成した。その際、解析にはClustal W (Thompson *et al.*, 1994)を使用し、NJ法 (Saitou and Nei, 1987)により系統樹を表した。枝上の数値はブートストラップ値を示し、ブートストラップは100回行った。

3. 結果と考察

3.1 制限酵素断片パターンと系統学的解析

PCRで増幅されたハオリムシ体内細菌及び海底堆積物中の細菌の16S rRNA遺伝子についてクローニングを

行った。その結果、ハオリムシ体内細菌から40株、堆積物中の細菌から74株のクローン菌体を得ることができた。また、クローンから精製したプラスミドDNAの制限酵素断片パターン(RFLP)を調べたところ、ハオリムシ体内細菌は6グループ、堆積物中の細菌は13グループに分けることができた。本研究により、ハオリムシ体内細菌は少なくとも6グループあることが分かったが、これはハオリムシ体内細菌は複数種からなるということを示したことになる。

ハオリムシ体内細菌6グループ及び堆積物中の細菌13グループについて、約500 bpの16S rDNAの塩基配列を決定した。その結果に基づき、系統分類学的な解析を行い、属レベルで細菌を同定した。それぞれの細菌のクローン数と種組成を表1に示した。さらに、これらの16S rRNA遺伝子の塩基配列をもとに系統樹(図1, 2)を作成した。(ハオリムシ体内細菌はTW、堆積物中の細菌はSBで示した。)ハオリムシ体内細菌は、プロテオバクテリアで、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ サブグループに属することがわかった。また、メタン湧水域堆積物中の細菌は、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma \cdot \delta \cdot \epsilon$ サブグループに属するプロテオバクテリアであった。今回、同定した *Enterobacter* (TW-1, SB-12), *Pseudoalteromonas* (TW-6, SB-2), *Pseudomonas* (TW-5, SB-1), *Rhodobacter* (TW-3, SB-6)において、ハオリムシ体内細菌と堆積物中の細菌は近縁であることが分かった(図2)。

なお得られたクローン数と種組成を論ずる上で、PCRでの遺伝子増幅の際にかかるバイアスが問題となる。現在のところ得られるクローンの割合が現場での

表1 ハオリムシ体内細菌と堆積物中の細菌のクローン数と種組成
Table1 Clone number and compositions of endosymbiotic and sediment microflora.

ハオリムシ体内細菌 (TW)			海底堆積物中の細菌 (SB)		
<i>Enterobacter</i>	15	37.5%	<i>Pseudomonas</i>	11	14.9%
<i>Acinetobacter</i>	7	17.5%	<i>Pseudoalteromonas</i>	10	13.5%
<i>Rhodobacter</i>	5	12.5%	<i>Psychrobacter</i>	9	12.2%
<i>Pseudoalteromonas</i>	5	12.5%	<i>Halomonas</i>	8	10.8%
<i>Zoogloea</i>	4	10%	<i>Desulfocapsa</i>	8	10.8%
<i>Pseudomonas</i>	4	10%	<i>Rhodobacter</i>	7	9.4%
合計	40	100%	<i>Shewanella</i>	6	8.1%
			<i>Mycobacterium</i>	4	5.4%
			<i>Vibrio</i>	3	4.0%
			<i>Zoogloea</i>	2	2.7%
			<i>Solemya gill symbiont</i>	2	2.7%
			<i>Enterobacter</i>	2	2.7%
			<i>Arcobacter</i>	2	2.7%
			合計	74	100%

種組成を正確に反映しているとはいえない。実際、16S rRNA 遺伝子のコピー数が微生物の種類によって異なるという問題は深刻である (Farrelly *et al.*, 1995)。しかし、これまでのさまざまな環境からの報告や結果から、得られるクローンの割合は微生物群集組成を全く反映しないというわけでもないようである (Suzuki *et al.*, 1996)。現在のところ、ハオリムシの体内細菌の培養例は報告されていない。よって、クローニングを用いたこの方法は、現場の微生物群集組成を明らかにするのに有効である。また、今後、クローンの割合がどの程度現場の微生物相を反映しているかを明らかにしていくことが重要である。

3.2 メタン湧水域の堆積物中細菌

相模湾初島沖メタン湧水域のハオリムシ周辺の堆積物中から多く見つかったのはプロテオバクテリアで、 α ・ β ・ γ ・ δ ・ ϵ -サブグループに属する細菌群 13 グループが検出された。プロテオバクテリアは非常に多様な性質を持った細菌を含むことが知られている (Woese, 1987)。

一般に硫黄栄養細菌は γ -プロテオバクテリアに属し、硫酸還元細菌は δ -プロテオバクテリアに属している。今回、メタン湧水域堆積物中より δ -サブグループに属するプロテオバクテリアが多数同定された (SB-5, SB-8)。メタン湧水域の堆積物中ではメタンを選

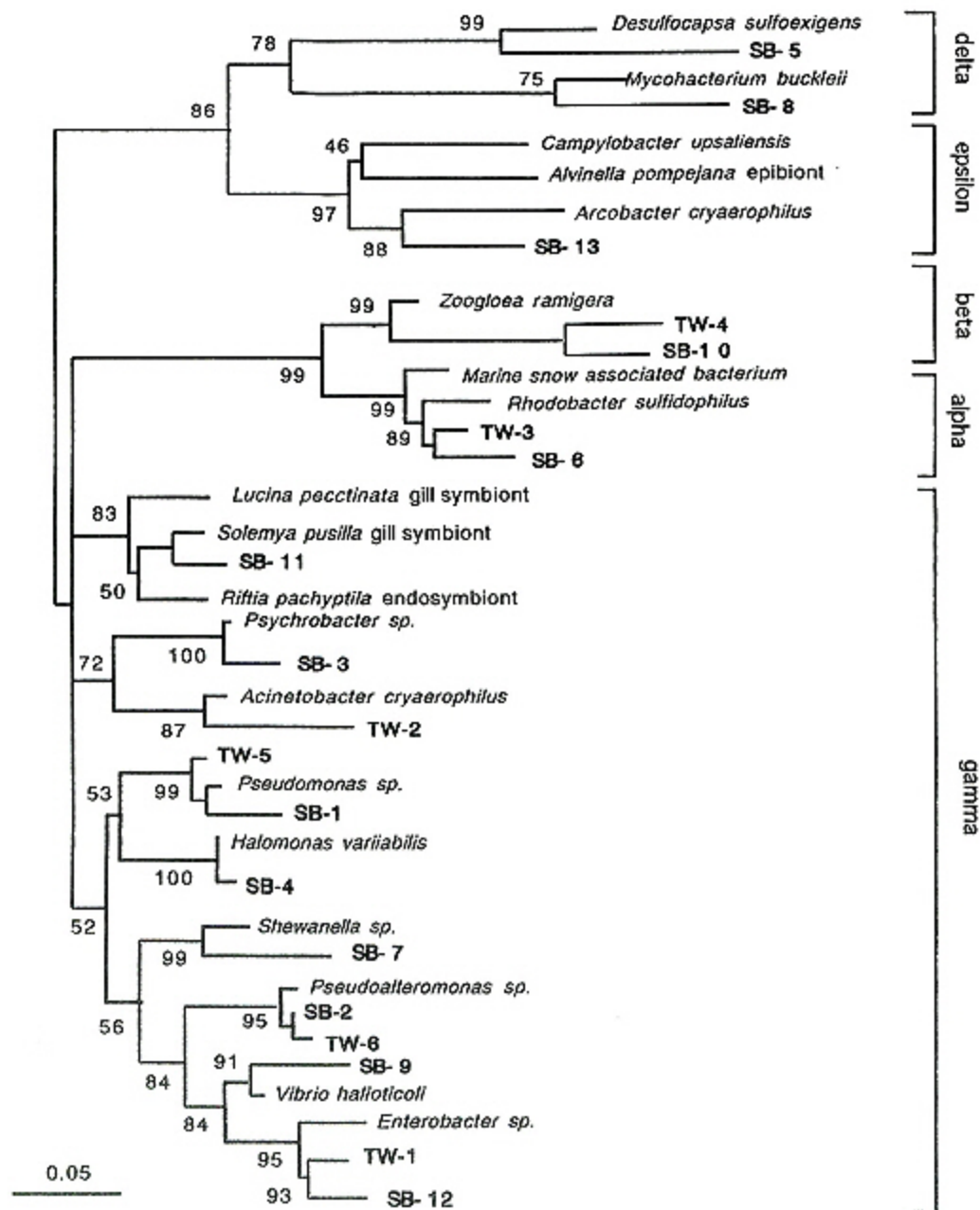
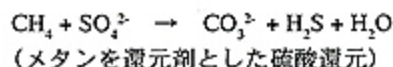


図1 ハオリムシ体内細菌 (TW) と相模湾堆積物中細菌 (SB) の 16S rDNA (約 500 塩基) の塩基配列に基づく系統樹。

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of endosymbiotic microflorae of tube worm (TW) and ambient microflorae (SB)

元剤とする硫酸還元が微生物的に行われているという報告もある(増澤,1995)。

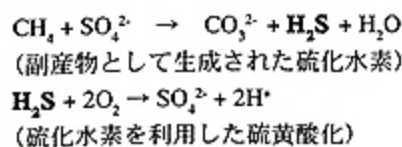


これらの堆積物中の細菌を培養することは現在のところ成功していないため、正確なことを言うことはできないが、今回、同定された硫酸還元細菌はメタンが豊富にある還元的環境を反映していると思われる。

また、 γ -プロテオバクテリアに属する硫酸化細菌に近縁な細菌も同定された(SB-11)。ここで同定した硫酸化細菌は、海水中で浮遊する free-living な硫酸化細菌よりむしろ還元環境に存在する二枚貝に細胞内共生する細菌に近縁であった。

さらに、深海性還元環境に高密度に生息する熱水性ゴカイ *Alvinella* (Haddad *et al.*,1995)や熱水性エビ *Rimicaris* (Polz and Cavanaugh,1995)の細胞外共生菌(エビビオント)である ϵ -プロテオバクテリアと近縁な細菌が同定された(SB-13)。 ϵ -プロテオバクテリアには、硫酸化を行う細菌も含まれている。

メタン湧水域の堆積物中では、微生物によるメタンを還元剤とする硫酸還元や、その副産物として生成された硫化水素を利用した硫酸化といった硫酸循環が行われている(Masuzawa *et al.*, 1992; 増澤, 1995)。



本研究では、これらの硫酸循環に関与していると思われる細菌が多数同定された。これらの細菌は、地球内部由来のメタンや硫酸還元により生成された硫化水素を利用する化学合成細菌であると考えられ、地球内部に依存した生物ということが出来る。またこれらは、間接的にはあるがメタン湧水域の堆積物中に特徴的な還元環境を反映していると思われる。

3.3 ハオリムシ体内細菌

ハオリムシのトロフォソーム内容物からは、*Rhodobacter* 属に含まれるクローン(TW-3)が同定されたが、*Rhodobacter* 属の中には硫酸化細菌も含まれている(Brune *et al.*, 1986)。同じくハオリムシのトロフォソーム内容物から *Enterobacter* 属に含まれるクローン(TW-1)が同定されたが、*Enterobacter* 属は腸内細菌科に属する細菌である。口も消化管もないハオリムシにこのような腸内細菌が存在するのは、トロフォソームが消化器官(栄養摂取器官)的であることを示唆する。

熱水噴出孔周辺に棲息するハオリムシ (*Riftia pachyptila*)の場合、共生細菌の90%以上は単一種であり

(Felbeck and Childress, 1988)、それは主に γ -プロテオバクテリアの硫酸化細菌(*Thiobacillus* 属)に近縁であると言われている(Distel *et al.*,1988)。熱水噴出孔周辺では、海水中に豊富に硫化水素が存在する。そのため、熱水噴出孔周辺に棲息するハオリムシは海水中より硫化水素を十分に取り込むことができ、硫酸化細菌一種のみを体内に共生させることで、生命維持に必要なエネルギーを十分に得ることができると思われる。

一方、メタン湧水域では、海底堆積物中において微生物によるメタンを還元剤(電子供与体)とした硫酸還元が起こり、その副産物として硫化水素が発生している(Masuzawa *et al.*, 1992; 増澤, 1995)。しかし、この硫化水素は底泥中に限られており海水中では欠乏している(Masuzawa *et al.*, 1992)。

本来、ハオリムシはエラを通して海水中から硫化水素を体内に取り込み、これを共生細菌に供給することによって栄養を得ていると考えられている。しかし、メタン湧水域では海水中に硫化水素が欠乏しているため、メタン湧水域に棲息するハオリムシは、十分な硫化水素を海水中より取り込むことができないと思われる。この問題に対し、ハオリムシはエラからだけではなく生管後端からも堆積物の硫化水素を取り込んでいると考える研究者もいる。しかし、ハオリムシの生管後端は細く、少なくとも栄養源となる硫化水素を取り込むための能動的な器官とは考えにくい。そのため、熱水噴出孔周辺に棲息するハオリムシと異なりメタン湧水域のハオリムシは十分な量の硫化水素を体内に取り込むことができないと思われる。

そこで推測されるのは、メタン湧水域に棲息するハオリムシは、海水中に存在するメタンも利用しているのではないかとということである。メタン湧水域周辺の海水中にはメタンは豊富に存在するので、堆積物中で起こっているメタンを還元剤とした硫酸還元が、ハオリムシ体内でも起こっているのではないだろうか?そして、硫化水素がハオリムシ体内で生成され、その硫化水素を利用する体内細菌も存在するのではないかと推測される。

実際に、ハオリムシと非常に近縁種であるヒゲムシ類には、メタン酸化細菌と硫酸化細菌の両方を体内に持つものが存在する(Schmaljohann *et al.*, 1990)。さらに、熱水性二枚貝でもメタン酸化細菌と硫酸化細菌が共に共生していることが確認されている(Distel *et al.*,1995)。これらのことから、メタン湧水域に棲息するハオリムシも複数種の細菌(化学合成細菌を含む)を体内に共生させ、体内共生微生物相(microbial consortium)を形成していると推測される。そして、メタンや硫化水素といった数種類の化学物質を用いた代謝経路により栄養を得ている可能性がある。このように、メタン湧水域のような海水中に硫化水素の欠乏した環境下でも、ハオリムシは栄養を確保することができるのではないかとと思われる。

本研究において、ハオリムシ体内より6グループの細菌が同定された。このことは、遺伝子レベルでハオ

リムシの栄養体内に複数種の細菌が存在し、前述したような体内共生微生物相を形成していることを示唆している。またこれらの体内細菌の中には、硫酸酸化細菌を含む *Rhodobacter* 属も同定された(TW-3)。しかし、現在のところハオリムシ体内細菌の培養に成功した例がないので、どの種の体内細菌がメタンを利用しているのか、またその他の細菌はどのような役割を果たしているのかについては分かっていない。

3.4 ハオリムシ体内細菌の起源

3.4.1 親から子への垂直伝播

そもそも体内細菌はどのような経路でハオリムシ体内に共生したのか？後生動物が微生物を体内に共生させる経路を考える場合、第一に考えられるのは垂直伝播(vertical transmission)であろう。

垂直伝播とはミトコンドリアのように共生細菌を卵細胞の中に有し、直接、親から子へ伝えられる母系遺伝のことである。ハオリムシと同様に体内に共生細菌を持つ二枚貝(シロウリガイ類)の場合、卵細胞内に細菌が観察されている(Endow and Ohta, 1990)。さらに、リボソーム RNA 遺伝子の解析により、それは共生細菌であることが確認された(Cary and Giovannoni, 1993)。よって、二枚貝(シロウリガイ類)は、体内共生細菌を卵細胞の中に有し、親から子へと伝える垂直伝播により獲得していると言われている。

一方、ハオリムシは、卵にも精子にも共生細菌は観察されておらず、その遺伝子も検出されていない(Cary *et al.*, 1993)。また、東太平洋海膨に棲息する異種のハオリムシの体内に、同種あるいはきわめて近縁である共生細菌が存在することが報告された(Laue and Nelson, 1997)。さらに、ハオリムシと共生細菌の両方の遺伝子を解析し系統関係を調べたところ、これらは相互進化している可能性は低いという報告もある(Feldman *et al.*, 1997)。

よって、ハオリムシの共生細菌は、ミトコンドリアのように直接、親から子へ垂直伝播するとは考えにくい。

3.4.2 周囲環境からの獲得

本研究において同定したハオリムシ体内細菌と海底堆積物中の細菌を比較した場合、*Enterobacter* (TW-1, SB-12), *Pseudoalteromonas* (TW-6, SB-2), *Pseudomonas* (TW-5, SB-1), *Rhodobacter* (TW-3, SB-6) において非常に近縁であった(図1, 2)。さらに、以前の報告(Naganuma *et al.*, 1997)では、同じ相模湾初島沖のメタン湧水域に生息するハオリムシ(*Lamellibrachia* sp.)から、 ϵ -プロテオバクテリアに属する *Arcobacter* が同定された。この細菌は、今回海底堆積物中から同定された ϵ -プロテオバクテリアに属する細菌(SB-13)と非常に近縁であった。つまり、ハオリムシ体内細菌と周囲環境中の細菌(ここでは堆積物中の細菌)の微生物相

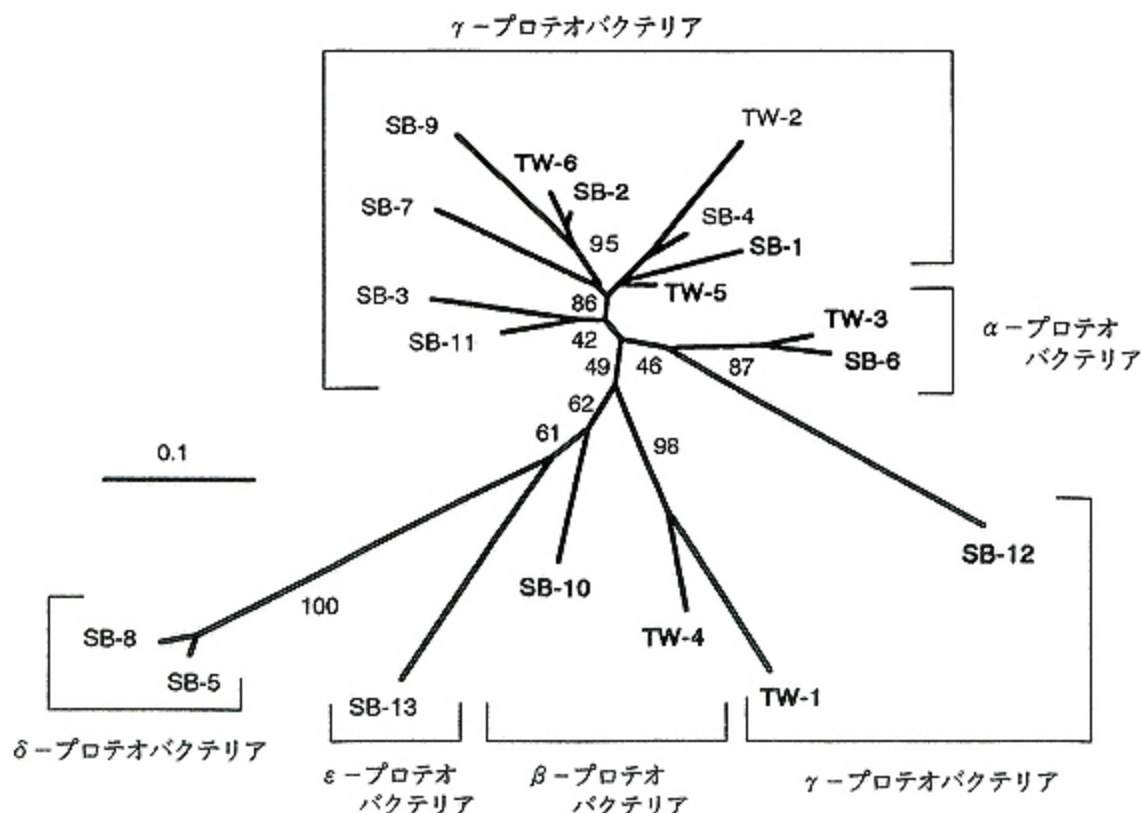


図2 ハオリムシ体内細菌(TW)と相模湾堆積物中細菌(SB)の無根系統樹
Fig.2 Dendrogram showing the relationships among endosymbiotic (TW) and Sediment (SB) microflora.

が類似していることが示唆された。

ハオリムシは口や消化器官を持たない生物である。しかし、浮遊生活をおくる幼生初期に一時的に、口や消化管を有することが確認されている(Jones and Gardiner, 1988; Southward, 1988)。

よって、ハオリムシは口や消化管を有す幼生初期に周囲環境(海水や堆積物など)より共生細菌を獲得する可能性が非常に高いと思われ、予想されるハオリムシの生活史を図示した(図3)。このように成長段階のある時期に、周囲環境から共生細菌を獲得することを水平伝播(horizontal transmission)という。

3.4.3 ハオリムシ体内細菌と堆積物中細菌の微生物相

本研究にて、同定したハオリムシ体内細菌とその周辺の堆積物中細菌の微生物相は、ある程度類似していることがわかった。しかし、今回同定された体内細菌と堆積物中細菌の種の比率が大きく異なっていた。例えば、*Enterobacter*属に含まれる細菌(TW-1)はハオリムシ体内では37.5%と割合が高いが、海底堆積物中では2.7%と低い(SB-12)。また、*Pseudomonas*属に含まれる

細菌(TW-5)はハオリムシ体内では10%と最も低い割合を示したが、海底堆積物中(SB-1)では14.9%と最も高い割合を示している。

このことから、周囲環境の種組成のまま細菌がハオリムシ体内に取り込まれたとすると、その後、比較的ハオリムシと共生しやすい細菌とそうでない細菌がいると思われる。今後、ハオリムシが環境中より細菌を細胞内に取り込み共生させるにいたるメカニズムや、体内共生微生物相内での栄養物質のやり取りを明らかにすることが重要な研究課題である。

謝 辞

本研究でのサンプル採取において、援助、協力してくださった依田代志男司令をはじめとする海洋科学技術センターの潜水調査船「しんかい2000」ならびに無人探査機「ドルフィン3K」運航チームの方々、母船「なつしま」の乗組員の方々に厚く御礼申し上げます。また、深海調査航海でお世話になりました海洋科学技術センターの服部陸男先生に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

PCR、クローニング、シーケンスを行う際、さまざま

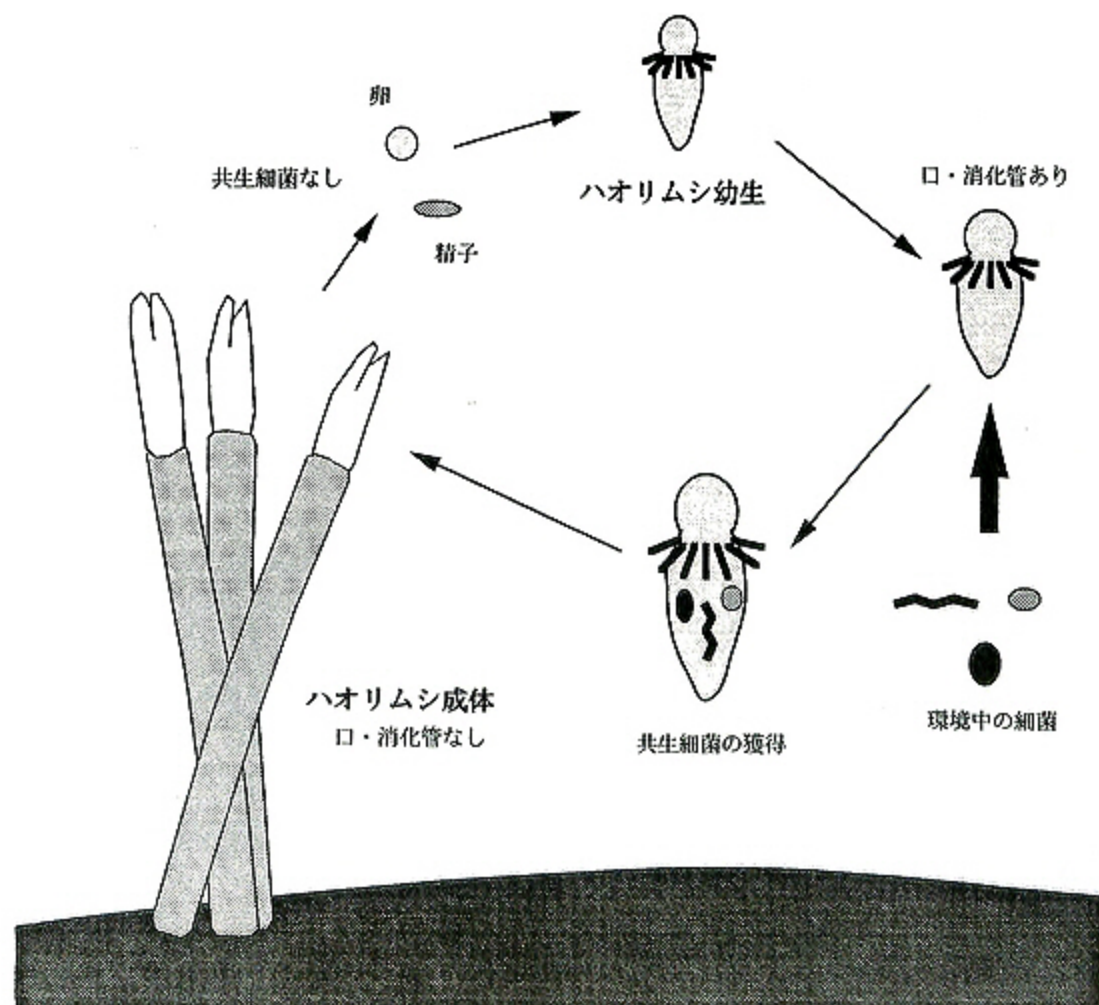


図3 予想されるハオリムシの生活史
Fig. 3 Predictable life cycle of vestimentiferan, tube worm

な助言, 協力をしてくださった国税庁醸造研究所の明野照美氏にお礼を申し上げます。

引用文献

- Brune, D. C. and H. G. Truper (1986): Noncyclic electron transport in chromatophores from photolithotrophically grown *Rhodobacter sulfidophilis*. *Arch. Microbiol.*, **145**, 295.
- Cary, S. C., H. Felbeck and N. D. Holland (1986): Observations on the reproductive biology of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **53**, 89-94.
- Cary, S. C. and S. J. Giovannoni (1993): Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5695-5699.
- Cary, S. C., W. Warren, E. Anderson and S. J. Giovannoni (1993): Identification and localization of bacterial endosymbionts in hydrothermal vent taxa with symbiont-specific polymerase chain reaction amplification and *in situ* hybridization techniques. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2**, 51-82.
- Cavanaugh, C. M., S. L. Gardiner, M. L. Jones, H. W. Jannasch and J. B. Waterbury (1981): Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila*: possible chemoautotrophic symbiont. *Science*, **213**, 340-342.
- Cavanaugh, C. M. (1985): Symbiosis of chemoautotrophic bacteria and marine invertebrates from hydrothermal vents and reducing sediments. *Bull. Biol. Soc. Wash.*, **6**, 373-388.
- DeLong, E. F. (1992): Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5685-5689.
- Distel, D. L., D. J. Lane, G. J. Olsen, S. J. Giovannoni, B. Pace, N. R. Pace, D. A. Stahl and H. Felbeck (1988): Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *J. Bacteriol.*, **170**, 2506-2510.
- Distel, D. L., H. K. W. Lee and C. M. Cavanaugh (1995): Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9598-9602.
- Endow, K. and S. Ohta (1990): Occurrence of bacteria in the primary oocytes of vesicomid clam *Calyptogena soyoeae*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **64**, 309-311.
- Farrelly, V., F. A. Rainey and E. Stackebrandt (1995): Effect of genome size and *rnm* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2798-2801.
- Felbeck, H. and J. J. Childress (1988): *Riftia pachyptila* a highly integrated symbiont. *Oceanol. Acta.*, **8**, 131-138.
- Feldman, R. A. and B. B. Michael (1997): Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **6**, 268-277.
- Fisher, C. R. and J. J. Childress (1984): Substrate oxidation by trophosome tissue from *Riftia pachyptila* Jones (Phylum pogonophora). *Mar. Biol. Lett.*, **5**, 171-183.
- Francoise, G., B. Shillito, F. Menard, G. Goffinet and J. J. Childress (1997): Rate and process of tube production by the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **148**, 135-143.
- Haddad, A., F. Camacho, P. Durand and S. C. Cary (1995): Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 155-1562.
- Jones, M. L. (1981): *Riftia pachyptila* Jones: observations on the vestimentiferan worm the Galapagos Rift. *Science*, **213**, 333-336.
- Jones, M. L. and S. L. Gardiner (1988): Evidence for a transient digestive tract in Vestimentifera. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **101**, 423-433.
- Lauc, B. E. and C. N. Douglas (1997): Sulfur-oxidizing symbionts have not co-evolved with their hydrothermal vent tube worm hosts: an RFLP analysis. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **6**, 180-188.
- 増澤敏行 (1995): 深海“冷湧水”生態系—相模湾初島沖深海シロウリガイ群集, 月刊海洋, 号外 **8**, 180-187.
- Masuzawa, T., N. Handa, H. Kitagawa and M. Kusakabe (1992): Sulfate reduction using methane in sediments beneath a bathyal “cold seep” giant clam community off Hatushima Island, Sagami Bay, Japan. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **110**, 39-50.
- 長沼 毅 (1998): 深海化学合成共生系—チューブワーム共生系—, 蛋白質 核酸 酵素, **43**, No.9, 1219-1226.
- Naganuma, T., C. Kato, H. Hirayama, N. Moriyama, J. Hashimoto and K. Horikoshi (1997): Intracellular Occurrence of ϵ -Proteobacterial 16S rRNA sequences in the Vestimentiferan trophosome. *J. Oceanogr.*, **53**, 193-197.
- Naganuma, T., J. Naka, Y. Okayama, A. Minami and K. Horikoshi (1997): Morphological diversity of the microbial population in a vestimentiferan tubeworm. *J. Mar. Biotechnol.*, **5**, 119-123.
- Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh (1995): Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7232-7236.
- Saitou, N. and M. Nei (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- Schmaljohann, R., E. Faber, M. J. Whitticar and P. R. Dando (1990): Co-existence of methane- and sulphur-based

- endosymbioses between bacteria and invertebrates at a site in the Skagerrak. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **61**, 119-124.
- Southward, E. C. (1988): Development of the gut and segmentation of newly settled stages of *Ridgeia* (Vestimentifera): implications for relationship between Vestimentifera and Pogonophora. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **68**, 465-487.
- Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni (1996): Bias caused by template annealing the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 625-630.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- 浦川秀敏・塚本久美子・大和田紘一 (1997): 16S rRNA 遺伝子を用いた海洋堆積物における微生物コミュニティの解析. *月刊海洋*, **29**, No.12, 750-758.
- Young, C. M., E. Vazquez, A. Metaxas and P. A. Tyler (1996): Embryology of vestimentiferan tube worms from deep-sea methane /sulphide seeps. *Nature*, **381**: 514-516.

(原稿受理 : 1999 年 8 月 18 日)