

日本海溝からの保圧採泥と継代培養による 泥中微生物フローラの変遷

柳林 美樹*¹ 加藤 千明*¹ 李 麗娜*¹ 能木 裕一*¹
稲田 哲哉*² 平 清*² 菊間 敏雄*² 鈴木 徹三郎*²
堀越 弘毅*¹

我々は、日本海溝深度6,292m（水圧約65MPa）の地点から、当海洋科学技術センターにて開発された深海微生物実験システムと保圧採泥器を使い、現場圧力と温度を維持した状態で採泥することに成功した。そして同システムにより、圧力と温度を変化させることなく希釈から継代培養までを行い、それらのサンプルのDNA解析実験と脂肪酸分析を行った。その結果、現場圧力の65MPaの条件では、継代培養初期に好圧性 *Shewanella* 属細菌と *Moritella* 属細菌の混合状態であったものが、培養後期には *Moritella* 属のみに変遷していく様が観察された。これに対し、コントロールとして行った大気圧下での培養では、常に *Pseudomonas* 属が占めていた。こうした深海底泥中の微生物フローラの変遷は、DNA解析及び脂肪酸分析の両方で同様に確認された。本報告は現場圧力を維持した状態で、深海底泥中の微生物フローラの変遷を追った初めての研究報告である。

キーワード：深海微生物、圧力、日本海溝、保圧採泥、深海微生物実験システム

Changes in bacterial community in Japan Trench sediment during cultivation without decompression

Miki YANAGIBAYASHI*³ Chiaki KATO*³ Lina LI*³
Yuichi NOGI*³ Tetsuya INADA*⁴ Kiyoshi TAIRA*⁴
Toshio KIKUMA*³ Kimio SUZUKI*³ Koki HORIKOSHI*³

In this study, we have analyzed changes in the microbial community of Japan Trench sediment obtained by the pressure retaining sampler (Shinkai 6500 dive #373, sampling point: inside of deep-sea fissure depth 6,292 m, about 65 MPa), during cultivation without decompression (65 MPa) and at atmospheric pressure.

Cultivation was repeated five times at 65 MPa without decompression, and at atmospheric pressure, in marine broth 2216 medium using the cultivation chamber of the DEEP-BATH system. After cultivation, mixed cells were harvested and DNA was extracted from them. Bacterial 16S rRNA genes were amplified by PCR from the extracted DNA, and amplified DNAs

*¹ 海洋科学技術センター深海環境フロンティア深海微生物研究グループ

*² 研究業務部施設・設備課

*³ The DEEPSTAR Group, Japan Marine Science and Technology Center

*⁴ Facilities and Equipment Division, Research Support Department, Japan Marine Science and Technology Center

were cloned and sequenced. The results indicated that: I) from 65 MPa cultivation, bacterial strains belonging to the *Shewanella* barophiles branch and the genus *Moritella* existed together at the beginning of cultivation, and *Moritella* strains became dominant towards the end of cultivation, II) from atmospheric pressure cultivation, strains belonging to the genus *Pseudomonas* were dominant at all times. We have also undertaken fatty acid analysis of the mixed cultivated cells, the results showed that the amount of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) which was observed in strains belonging to the *Shewanella* barophiles branch was decreasing, and the amount of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6) which was observed in the genus *Moritella* was increasing during high pressure cultivation. This latter result corresponds to be changed the 16S rRNA analysis. In conclusion, a microbial community from deep-sea sediment can be changed by cultivation conditions, the deep-sea adapted barophilic bacteria survived in the community under high pressure cultivation, and the genus *Pseudomonas* which exists in a wide spread environment was selected for the community under atmospheric pressure cultivation.

Key word : Deep-sea microorganisms, High Pressure, Japan Trench,
Pressure retaining sampler, DEEP-BATH system

1. はじめに

我々は、当センター所有の「しんかい6500」の平成9年度の潜水調査に参加し、日本海溝海側斜面、深度

6,292m地点に存在するマネキンサイト近辺 (Fujioka *et al.*, 1993) での再調査を行った (図1)。

今回の潜水では、深海底泥を現場圧力と温度を維持し

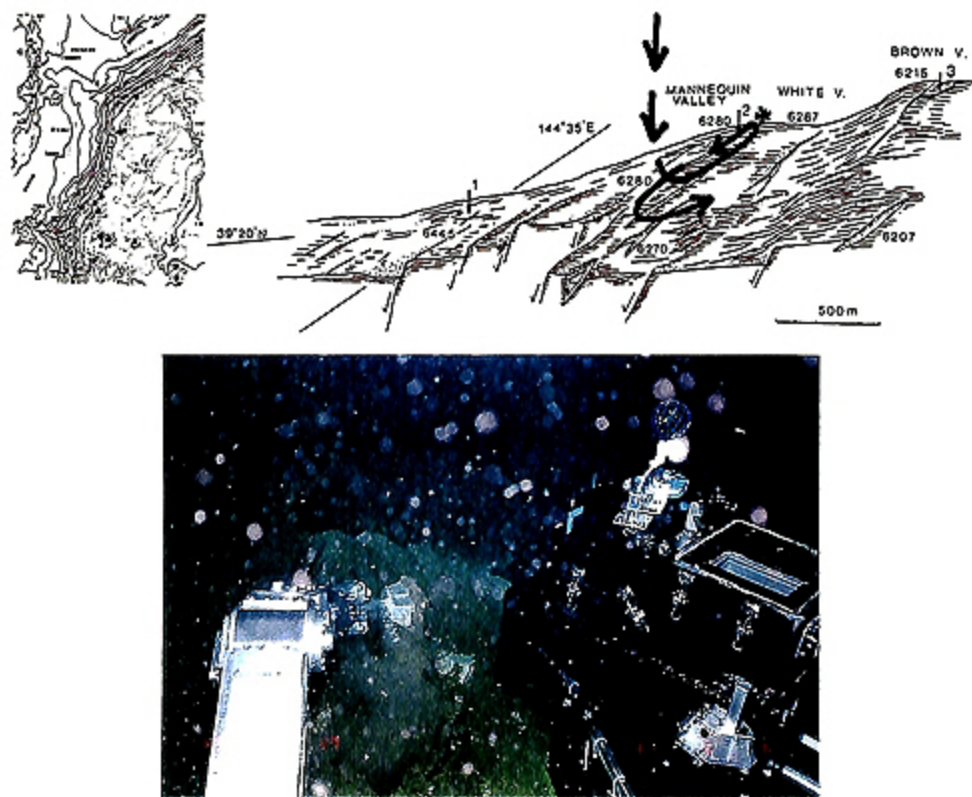
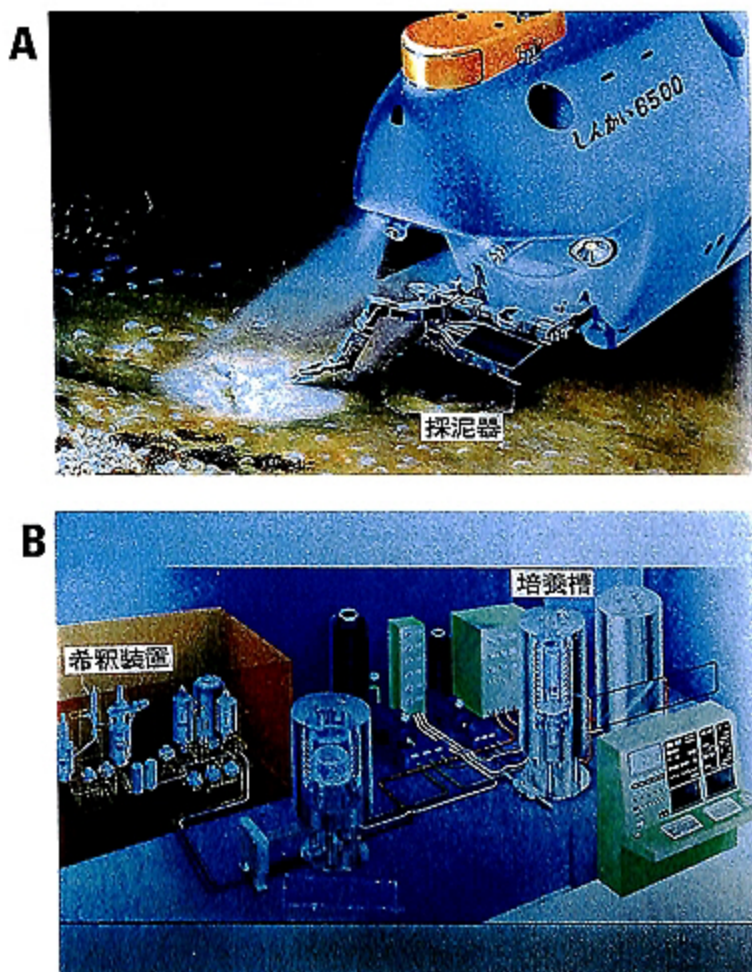


図1 日本海溝深度6,292m地点からの保圧採泥場所。ダイブ番号6K-373。

Fig. 1 Sampling by "SHINKAI 6500" dive#373 (observer: C. Kato) at Mannequin valley of Japan Trench ocean side slope, depth of 6,292 m.



全体概念図

図2 「しんかい6500」と深海微生物実験システム
Fig.2 "SHINKAI 6500" and DEEP-BATH System.

た状態で採泥し、その希釈から培養へ持ち込む一連の操作を減圧せずに行うことを目的とした実験計画を立てた。本計画を実行するにあたって、当センター深海総合研究棟1Fに設置された微生物実験システム (Kyo *et al.*, 1991) の利用は必須である。本微生物実験システムは、保圧採泥器、希釈装置、分離装置、そして培養槽の4つのサブシステムから構成されている (図2)。

本報告は保圧採泥器並びに希釈装置、そして培養槽を組み合わせた連続微生物培養実験の成功についての発表で、またその結果についてまとめたものである。培養槽だけを使った実験については昨年報告している (Yanagibayashi

et al., 1997) ので、今回は保圧採泥器と希釈装置についての説明のみとした。採泥器内部には、採泥現場の圧力を維持したままセンター内の施設まで持ち帰る事の出来る様に、保圧容器が収納され、またその外部を保温材で覆うことにより採泥時の温度を保てる仕組みとなっている。そして採泥器が1回でサンプル回収出来る量は5cc程である (図2-A)。希釈装置は温度の安定保持をするため、装置全体が低温室内に設置されており、また海底にて採取された泥サンプルは直接希釈装置の入口ポート部分に接続させる事も可能である。そしてその間も圧力は減少しないように保圧容器とは同圧に保たれていて、それらは別に設けられている制御室にて遠隔操作する事

が可能であり、細かい弁の指示や希釈濃度の調整といった事も手元のモニターにより確認しながら行うことが出来る (図2-B)。

採泥時に得られた5ccのサンプルは、希釈装置を使うことにより数倍から数百倍まで滅菌海水で希釈されるが、今回の実験では最終的に100倍まで希釈し、その内30ccづつを各培養槽の種菌として使用した。各槽の培養条件は現場圧力である65MPaすなわち650気圧と、コントロールとして0.1MPaすなわち大気圧下の2条件とし、温度は現場環境に近い状態を再現するために10℃に設定した。両槽計5回の継代培養とサンプリングを行い、その1回の培養はだいたい4日から5日のサイクルであった。培養日数に関しては制御室に設けられている増殖モニターによって、菌体の増殖を確認したうえで、生育がとまったところで培養液を回収し、その一部の培養液

を再度種菌として用いて次の培養に持ち込んだ。そうして得られた各培養サンプルをNB2からNB11と名づけ、元の採泥保圧サンプルをNB1とし、これらのサンプルを使って実験を行った (図3)。

2. 方法と結果

2.1 RFLP分析

DNA解析の実験手順について図4に示した (図4)。

採泥サンプルNB1とNB2-11の培養サンプルから、それぞれ所定の方法に従いDNAを抽出し、PCRにて16S rRNA遺伝子の増幅を行った (Kato *et al.*, 1997)。増幅されたDNAは、ベクターを使って大腸菌にクローニングされ、その大腸菌から組み換え体プラスミドDNAを精製した。次にPCR法にて再度、クローン化された16S rRNA遺伝子を増幅し、それらを *MspI* と *RsaI* の2種類の制限酵素を使って消化させた。その切断パターンからRFLP分析を行い種類分けを行ったところ、培養前の保圧サンプルNB1から得られたクローンのRFLP分析の制限酵素切断パターンは15種類であった (表1)。

表2に大気圧培養及び加圧培養から得られたクローンのRFLP分析の結果を示した。RFLP分析の結果、加圧培養実験から得られた切断パターンはAからGの7種類

Strategy of cultivation using DEEP-BATH system

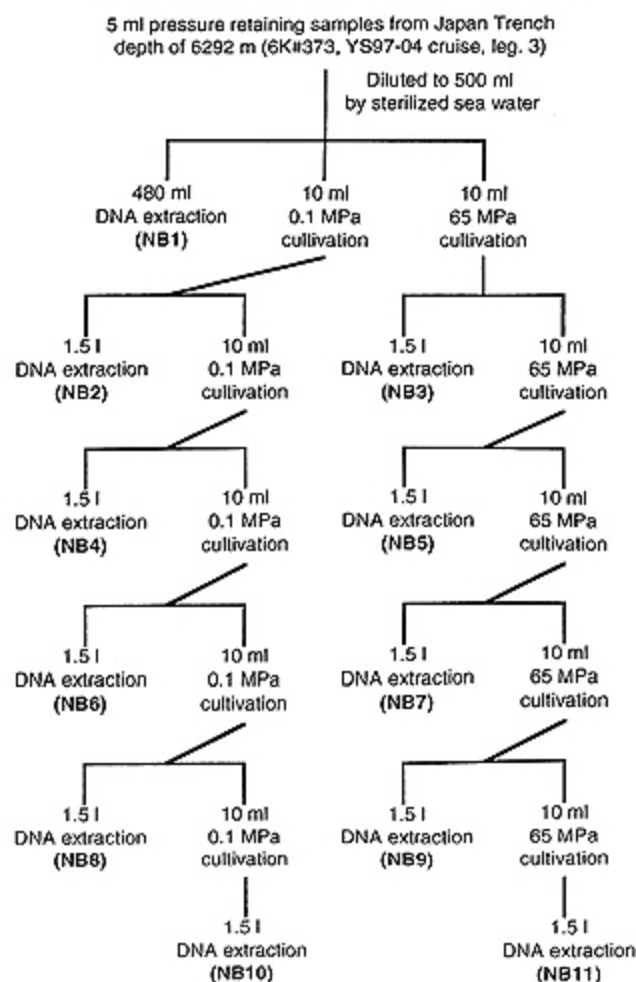


図3 保圧採泥サンプル中の微生物継代培養の手順

Fig. 3 Strategy for cultivation of microorganisms in a sediment sample maintained at ambient pressure.

Experimental Procedure

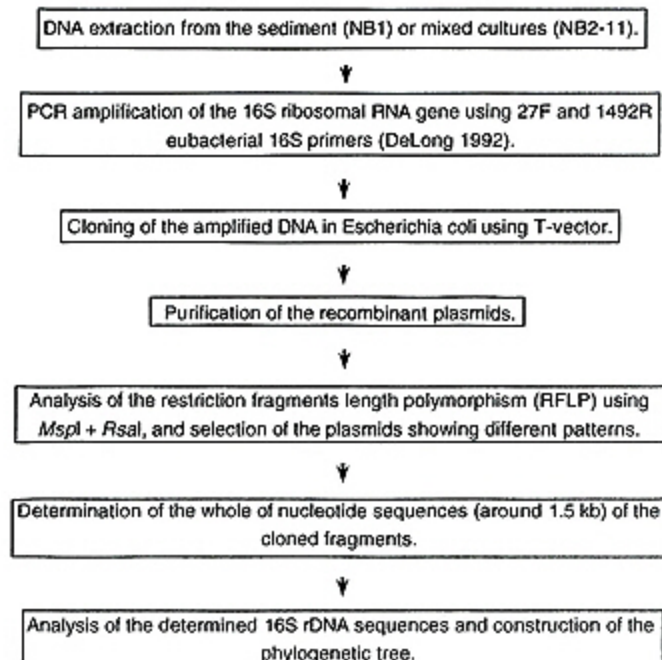


図4 DNA解析の実験手順

Fig. 4 Protocol for DNA analysis.

RFLP pattern	Number of the clones	16S rDNA accession number
NB1-a	2	AB013822
b	2	AB013823
c	2	AB013824
d	1	AB013825
e	6	AB013826
f	1	AB013827
g	1	AB013828
h	1	AB013829
i	1	AB013830
j	3	AB013831
k	3	AB013832
l	4	AB013833
m	1	AB013834
n	3	AB013835
o	1	AB013836
Total	32	

表1 保圧採泥サンプルのRFLP分析による結果

Table 1 Number of the clones shown different RFLP pattern of amplified 16S rDNA gene from the DNAs extracted from the original sediment (NB1) obtained by the pressure retaining sampler (65 MPa).

で、そして大気圧培養からはHからJの3種類の、合計10種類の切断パターンが培養サンプルで見られた。そのクローン数は加圧培養では培養初期のNB3から培養後期のNB11にかけて、パターンA,C,EからEに向かって収束していくのが表から読み取れる(表2-a)。なお、塩基配列の結果から、パターンDはAとEのハイブリッドであることが判明している。一方大気圧培養で得られたクローンでは、Hが常にメジャーに存在していた(表2-b)。

2.2 系統学的解析

これまでの加圧、大気圧、保圧、それらから得られたサンプルの、16S rRNA遺伝子のクローン化断片をRFLP分析し、パターンの異なるものだけを選出してアプライドバイオシステムズ社のDNA Sequencerを用いてそれらの塩基配列の決定を行った。そして、得られた配列の相同性解析を行った結果、図5のような系統樹が出来上がった。青色で示したものが加圧培養から得られたクローンで、継代培養初期にあたり、NB65-A,B,Cが含まれる好圧性 *Shewanella* 属ブランチ (Li et al., 1998) 及びNB65-E, F,Gが含まれる *Moritella* 属が検出されたのに対し、継代培養後期ではNB65-Eを代表とする *Moritella* 属のみに変遷していった。

また赤色で示したクローンNB0.1-H,I,Jは大気圧培養から得られたもので *Pseudomonas* 属に含まれていた。

そして緑色で示された培養前の保圧サンプルからのクローンであるNB 1シリーズは、本系統樹の中で広く分

RFLP pattern	DNA Samples (65 MPa)						16S rDNA accession number
	NB3	NB5	NB7	NB9	NB11	Total	
NB65-A	2	2	0	0	0	4	AB013837
B	0	1	1	0	0	2	AB013838
C	3	0	0	0	0	3	AB013839
D*	0	1	0	0	0	1	-
E	3	6	8	8	9	34	AB013840
F	0	0	0	2	0	2	AB013841
G	0	0	1	0	0	1	AB013842
Total	8	10	10	10	9	47	

*: D showed a fusion sequence of A and E.

RFLP pattern	DNA Samples (0.1 MPa)						16S rDNA accession number
	NB2	NB4	NB6	NB8	NB10	Total	
NB0.1-H	8	12	10	11	11	52	AB013843
I	0	1	0	0	0	1	AB013844
J	0	0	1	0	0	1	AB013845
Total	8	13	11	11	11	54	

表2 継代培養サンプルのRFLP分析による結果

Table 2 Number of the clones shown different RFLP pattern of amplified 16S rDNA gene from the DNAs cultivated at high pressure (65 MPa; a) and atmospheric pressure (0.1 MPa; b).

Fatty acids	% of total fatty acids of the samples (65 MPa)						<i>Moritella</i> sp. DB21MT-5
	NB3	NB5	NB7	NB9	NB11	<i>S. benthami</i>	
12:0	2	1	2	1	1	5	0
13:0*	4	4	3	0	0	11	0
14:0	10	11	13	15	16	17	25
14:1**	5	7	9	10	13	0	12
15:0*	7	5	4	0	0	5	0
15:1	7	5	4	1	1	0	0
16:0	11	11	9	10	10	15	9
16:1	30	34	36	47	43	37	45
18:1	4	4	4	5	4	1	1
20:5*	15	12	6	2	1	8	0
22:6**	4	5	8	9	11	0	8

*: Decreasing during high pressure cultivation. **: Increasing during the cultivation.

Fatty acids	% of total fatty acids of the samples (0.1 MPa)						<i>P. lemoignei</i> <i>P. fluorescens</i>
	NB2	NB4	NB6	NB8	NB10		
3OH-10:0	6	6	5	5	6	4	3
12:0	7	7	6	6	7	6	2
2OH-12:0	3	3	3	2	2	0	5
3OH-12:0	3	3	3	3	3	6	4
14:0	2	2	2	2	3	1	0
16:0	19	19	19	19	19	14	31
16:1	39	41	42	42	43	42	29
17:0	0	0	0	0	0	0	8
18:1	22	21	20	22	18	27	17

表3 継代培養サンプルの脂肪酸組成の比較

Table 3 Fatty acid compositions of the cells obtained from high pressure (65 MPa; a) and atmospheric pressure (0.1 MPa; b).

布し、その存在は多様性に富んでいることが確認できた。

2.3 脂肪酸分析

培養サンプルNB2からNB11の10サンプルを使って、菌体脂肪酸分析を行ったところ、表3のような結果が得

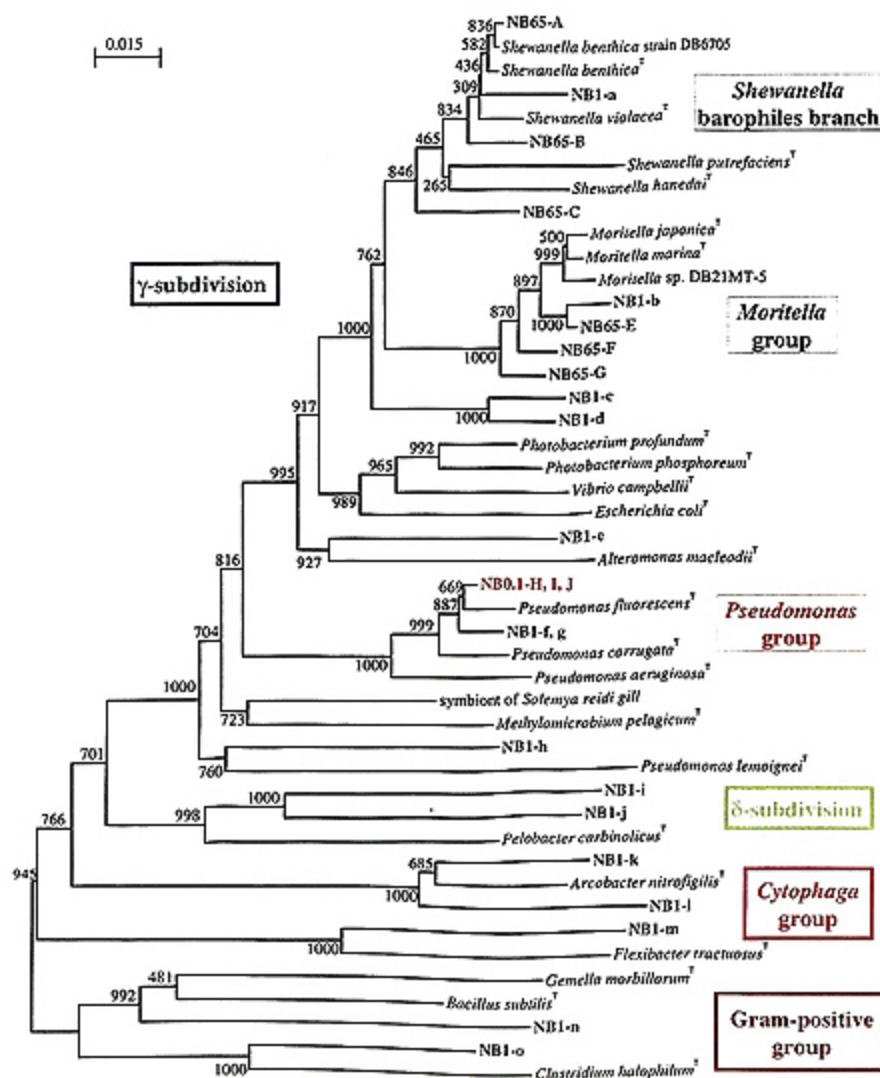


図5 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹
Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S ribosomal RNA gene sequences.

られた。表の上部が加圧培養からのサンプルの結果で、*で示された脂肪酸、iso-13:0, iso-15:0や20:5 (エイコサペンタエン酸：EPA)などは継代加圧培養によりその含有率が減少したものである。一方、**で示された14:1と22:6 (ドコサヘキサエン酸：DHA)は、継代加圧培養によりその含有率が増加する脂肪酸であった。この値を既知の代表的な微生物と比較すると、培養初期は *Shewanella* 属と *Moritella* 属の混合状態であったものが継代培養後期には *Moritella* 属に変遷していくことが読みとれる (表3)。図6にこれらの脂肪酸含有率の変化を図示した。また表3の下に示した結果が大気圧培養であり、継代培養の間その割合は一貫しており、大きな変化は見られず、その含有率から *Pseudomonas* 属細菌と良く一致した。

3 まとめ

以上の結果を以下にまとめた。

- 1) 日本海溝底からの保圧採泥に成功した。
- 2) 65 MPa の加圧下での継代初期では、好圧性 *Shewanella* 属細菌と *Moritella* 属細菌の混合状態だったものが、培養後期には *Moritella* 属細菌が優先的に生育することが確認された。
- 3) 0.1 MPa の大気圧培養では *Pseudomonas* 属細菌が始めから優先種として生育することを確認した。
- 4) 培養前の保圧サンプル中には、より高い微生物学的多様性が見られ、その多くは本実験条件下では生育が確認されなかった。

用いた培地の条件が、今回の実験では1種類のみとなっているので、今後は培地や圧力、温度そして採泥場所等を変えたさらなる実験を進め、比較検討を行う必要が

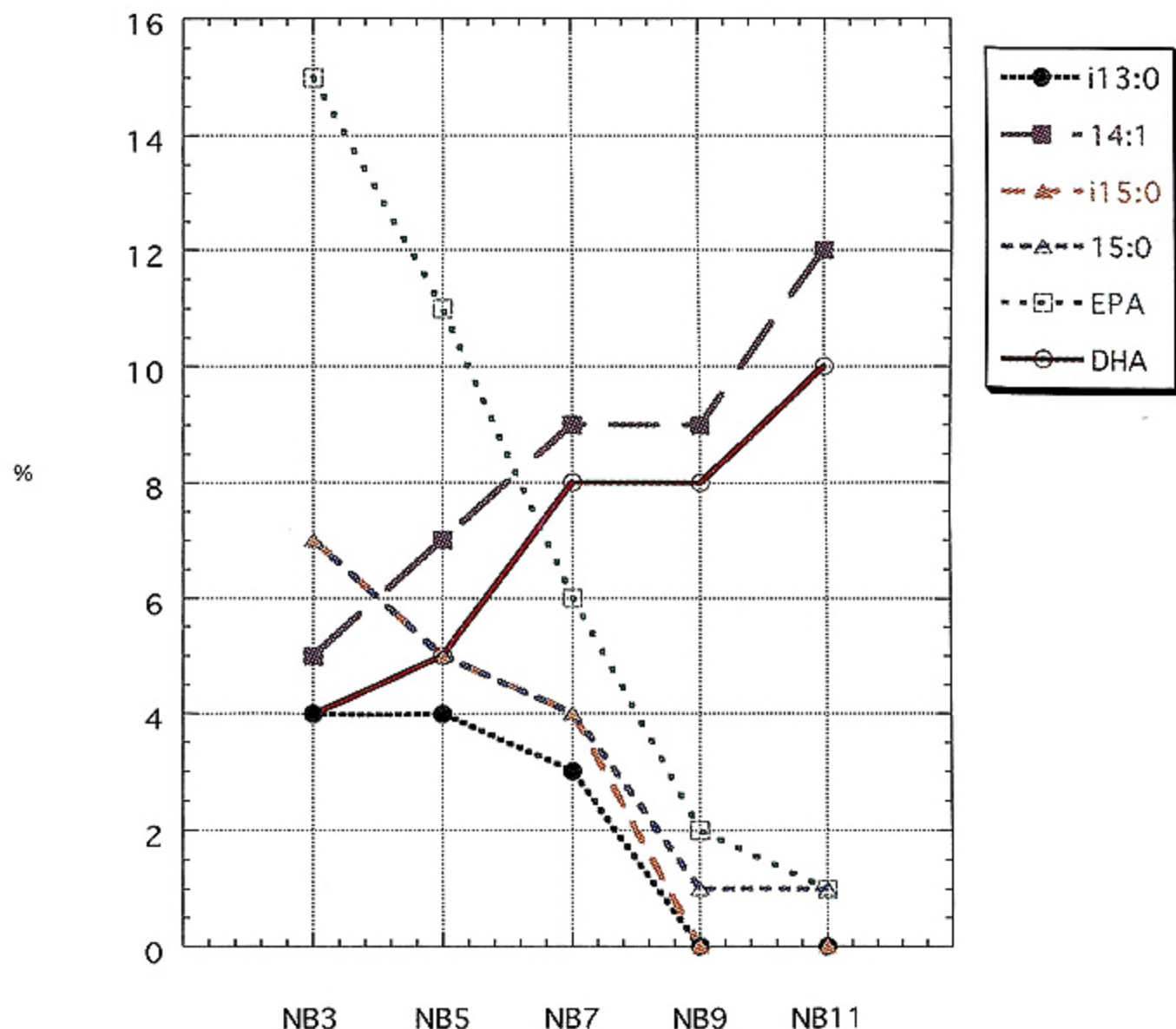


図6 加圧継代培養 (65 MPa) における脂肪酸プロファイルの変化
Fig.6 Changes in fatty acid profile during high pressure (65MPa) cultivation.

ある。また系統分析から、高い微生物学的多様性を含む培養前の採泥サンプルが、継代培養後期には、その多様性が著しく減少してしまったが、今後の計画として、今回培養出来なかった微生物をターゲットとした次なる調査に的を絞る、それらの分離を試みる事は、新しい微生物発見の一歩となると我々は考えている。

謝 辞

最後に今回これらの実験を行うにあたり、大変お世話になった「しんかい6500」運航チームの皆様方並びに母船「よこすか」の乗船員の皆様には、深くお礼申し上げます。

ます。

引用文献

- DeLong, E. F. (1992): Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5685-5689.
- Fujioka, K., Takeuchi, A., Horiuchi, K., Okano, H., Murayama, M. and Horii, Y. (1993): Contrasted nature between landward and seaward slopes of the Japan Trench off Miyako, Northwest Japan. *Proc. JAMSTEC Symp. Deep Sea Res.*, 9, 1-26.

- Kato, C., Li, L., Tamaoka, J. and Horikoshi, K. (1997): Molecular analyses of the sediment of the 11000 m deep Mariana Trench. *Extremophiles*, 1, 117-123.
- Kyo, M., Tsuji, T., Usui, H. and Itoh, T. (1991): Collection, isolation and cultivation system for deep-sea microbes study: concept and design. *Oceans*, 1, 419-423.
- Li, L., Kato, C., Nogi, Y. and Horikoshi, K. (1998): Distribution of the pressure-regulated operons in deep-sea bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 159, 159-166.
- Yanagibayashi, M., Kato, C., Canganella, F., Inada, T., Taira, K., Kikuma, T., Suzuki, K. and Horikoshi, K. (1997): The effects of temperature and pressure on the growth of *Thermococcus peptonophilus* isolated from deep-sea hydrothermal vents. *JAMSTECR*, 35, 85-90.

(原稿受理：1998年7月10日)