

日本海溝中軸底泥サンプル（深度、約7,300 m）の 微生物多様性の解析と、加圧継代培養

加藤 千明*¹ 柳林 美樹*¹

能木 裕一*¹ 堀越 弘毅*¹

無人潜水調査船「かいこう」による、日本海溝の中軸部分への潜航調査に参加し、深度約7,300 mの地点から無菌的に底泥サンプルを得ることに成功した。得られたサンプルから直接DNAを抽出し、バクテリアの16SリボソームRNAをコードする塩基配列の解析を行った。その結果、本底泥中から14通りの異なる塩基配列が得られ、系統解析により、これらの塩基配列は、その多くがガンマプロテオバクテリア由来のものであることがわかった。また、同サンプルを、深海微生物実験システムにより68 MPa、5℃の条件にて、2種の培地（MB培地、SRB培地）にて継代培養実験を行ったところ、SRB培地からは、*Shewanella benthica*と極めて近縁な細菌が増殖し、MB培地からは、16S rDNA配列において、全く新しいブランチを形成する新属の好圧性細菌と思われる細菌が増殖した。これら加圧継代培養で増殖した細菌は、その脂肪酸組成において、SRBからのものは、EPAを、MBからのものは、DHAを高濃度に生産していた。これら継代で得られた細菌は、一部泥からの分析と一致したが、新属と思われるものは一致していない。このことから、これらの結果は、深海実験微生物実験システムの培養条件を変化させることにより、現場環境中にはごくマイナーにしか存在していない細菌を回収できる可能性を示したものである。

キーワード：日本海溝、微生物学的多様性、好圧性微生物、深海微生物実験システム

Analyses of microbial diversity in the sediment obtained from Japan Trench at a depth of 7,326 m, and high pressure cultivation.

Chiaki KATO *² Miki YANAGIBAYASHI *²

Yuichi NOGI *² Koki HORIKOSHI *²

We got succeed to obtain the deep-sea sediment sample from the Japan Trench deepest sea bottom (depth of 7,326 m) using unmanned submersible, "KAIKO" system, without microbial contamination. DNAs were extracted directly from the sediment sample and 16S ribosomal RNA gene sequences were amplified, cloned and sequenced. The results indicated that 14 different sequences were obtained and most of them belonged into the gamma-Proteobacteria branch. This sample transferred to the DEEPBATH system to cultivate continually under 68 MPa condition and at 5℃ in the two kinds of media (Marine Broth; MB, Sulfate Reducing Bacterial medium; SRB), separately. From the SRB cultivation, *Shewanella benthica* and its related piezophilic bacteria were observed, however, from the MB cultivation, novel piezophilic genus could be observed by 16S rDNA analysis. This novel genus produced amount of docosahexaenoic acid (DHA) in their fatty acids fraction, and this genus was not identified by sediment DNA analysis. This suggested that this genus should be existing minor amount in the sediment, and the DEEPBATH system could be useful to recover such difficult culturable piezophiles.

Key words : Japan Trench, Microbial diversity, Piezophilic microorganisms, DEEPBATH system

* 1 深海環境フロンティア、深海微生物研究グループ

* 2 The DEEPSTAR Group, Frontier Research Program for Deep-Sea Extremophiles

1. はじめに

本研究室では、深海環境における微生物の多様性の解析と高水圧環境への微生物の適応機構の解明を目的とし、潜航調査等により得られた深海底泥サンプルを用いて各種の微生物の分離を行ってきている。そして我々は、なかでも、特に高水圧環境に適応した微生物、好圧性細菌、の分離に力を入れている。一般的に、深海環境から分離される微生物の多くは、陸上由来のものと思われるものが多く、その生育至適が中温域、大気圧にあるものが多い。深海環境への適応の分子機構を解明するためには、そうした微生物よりはむしろ深海環境にもともと適応していたものを材料とすることが、望ましいことは明らかである。そうした意味で、好圧性細菌に着目している。

好圧性細菌の研究の歴史は古く、1957年に ZoBell と Morita により開始されている¹⁾。以来サンプリングに関するハード面の開発にともない、1979年に Yayanos らにより初めて好圧性細菌が分離されるに至った²⁾。その後いくつもの好圧性細菌の分離が報告されるわけであるが、分類学的な検討はその加圧下における培養の困難さから、ほとんどなされてこなかった。我々が本分野の研究を開始する頃（1991年頃）までには、わずか2種の好圧性細菌の種名（*Shewanella benthica*, *Colwellia hadaliensis*）の登録が報告されているのみであった³⁻⁴⁾。そこで、我々の好圧菌のコレクションについて詳細な分類学的検討を行い、今日までに4種の新種の同定に成功し、それぞれ、*Photobacterium profundum*, *Shewanella violacea*, *Moritella japonica*, *Moritella yayanosii* と命名し報告した⁵⁻⁸⁾。

このように、好圧性細菌の多様性は、まだまだ未知なる部分が多く、分離源や分離方法を工夫することにより、さらに多種多様な微生物が見つかる可能性を秘めている。我々は、昨年度において、日本海溝深度

6,400m 地点より保圧採泥されたサンプルの加圧継代培養実験に関する報告を行っているが、そのときは、得られた好圧性細菌の種類は、既知のものと近縁なものであった⁹⁻¹⁰⁾。そこで今回は、サンプリング海域をそこよりもさらに1,000m 深い日本海溝中軸とし、そこからの微生物多様性の解析と、加圧継代培養実験を行い、いくつかの新しい好圧菌の存在を示すことに成功したので、ここに報告する。

2. 材料と方法、結果

2.1 日本海溝中軸からの底泥のサンプリング

1998年8月5日、無人潜水調査船「かいこう」潜航番号 #10K-87 において、日本海溝中軸域の海底（40° 03.07'・144° 16.49'）深度 7,326m より新種の二枚貝コロニーを見だし、その下側の泥を、無菌的に採泥することに成功した。得られたサンプルは、直ちに2ml ずつ小分けされ、液体窒素中に保管された。採泥現場の写真を、図1に示す。ここで見いだされた二枚貝は、シロウリガイとは種類の異なる貝で、現在解析が進行中であるが、世界最深部より見いだされた化学合成二枚貝である可能性が高い。そうした意味で、本採泥域は冷水輸出域の可能性が高く、微生物多様性の解析にとっては、極めて興味深い場所である。

2.2 底泥サンプルのDNA解析

以前報告した方法¹⁰⁾に従い、底泥サンプル約2mlより直接的にDNAを抽出し、PCR法によりバクテリアの16S rRNAをコードする遺伝子（16S rDNA）を増幅後、大腸菌にクローン化した。得られたクローンから、挿入断片のある組み換え体プラスミドを精製し、挿入断片の制限酵素切断パターン解析（RFLP; *MspI* と *RsaI* にて切断）を行い（図2）、種類別に分けた。その結果を表1に示す。

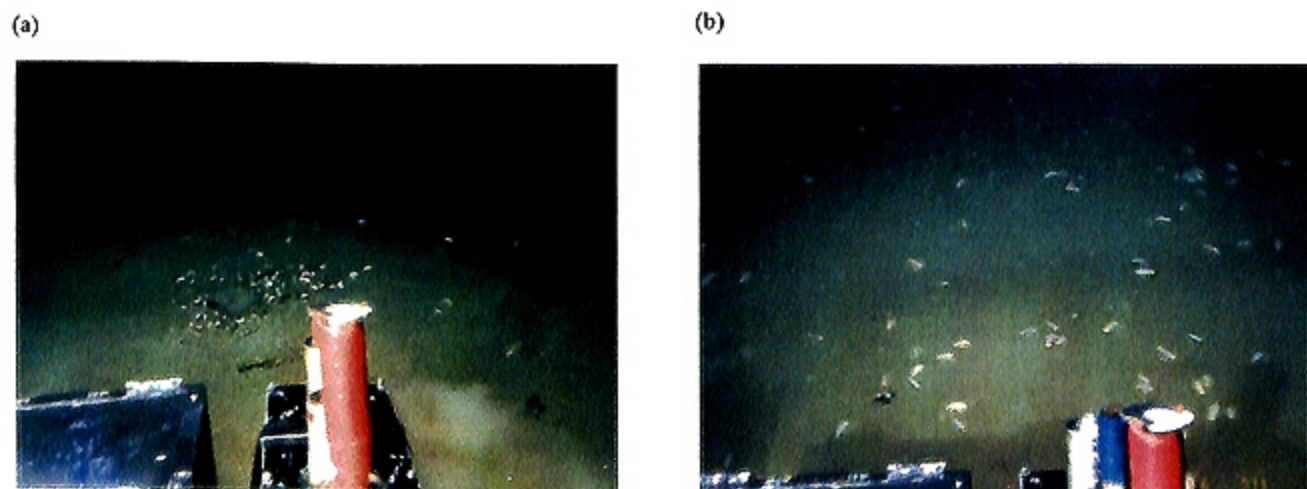


図1 日本海溝中軸域で発見された世界最深2枚貝コロニー (a) と、その周辺の様子 (b)。
Fig. 1 Community of deep-sea clams identified at the deepest bottom of the Japan Trench (a), and their environment (b).

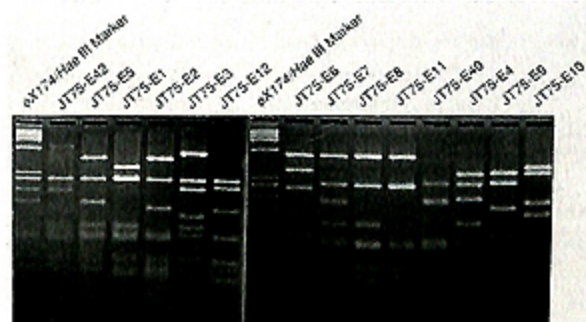


図2 底泥サンプルから増幅された16S rDNAのRFLP分析
Fig. 2 RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis of the amplified 16S rDNAs from the sediment.

表1 底泥サンプルから増幅された16S rDNAのRFLP分析の結果一覧

Table 1 Number of clones showing different RFLP patterns of amplified 16S rDNA gene from the DNAs extracted from the original sediment.

RFLPパターン	クローン数	16S rDNA 配列からの位置
JT73-E42	2	<i>Shewanella piezophilus</i> branch
JT73-E5	1	<i>Moritella</i> sp.
JT73-E1	1	<i>Codakia</i> sp. gill symbiont
JT73-E2	1	<i>Codakia</i> sp. gill symbiont
JT73-E3	1	<i>Codakia</i> sp. gill symbiont
JT73-E12	1	<i>Codakia</i> sp. gill symbiont
JT73-E6	1	unknown γ -Proteobacteria
JT73-E7	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
JT73-E8	3	<i>Pseudomonas</i> sp.
JT73-E11	9	<i>Pseudomonas</i> sp.
JT73-E40	1	unknown α -Proteobacteria
JT73-E4	1	unknown ϵ -Proteobacteria
JT73-E9	1	unknown Flavo-Cytophage group
JT73-E10	1	unknown Flavo-Cytophage group
合計クローン数	25	

2.3 深海微生物実験システムによる加圧培養実験

底泥サンプル約2mlを解凍後、約100mlの滅菌海水に懸濁後、深海微生物実験システムの保圧植菌システムにより約1.5lの培養槽2槽に約50mlずつ、68 MPa、4℃の状態を維持したまま植菌した。なお培地としては、マリンプロス2216培地 (MB)、硫酸還元菌分離用培地* (SRB) を用い、できるだけ好気状態を保って培養を行った。図3に、今回行った加圧継代実験のストラテジーを示した。加圧下での菌の移植等は、前回の方法¹⁰⁾に従って行った。なお初期の移植は、モニターにより微生物の生育がなかなか確認されなかったため、MB、SRBともに、2週間後に行った。得られた培養菌体は、遠心後小分けして液体窒素中に保存された。

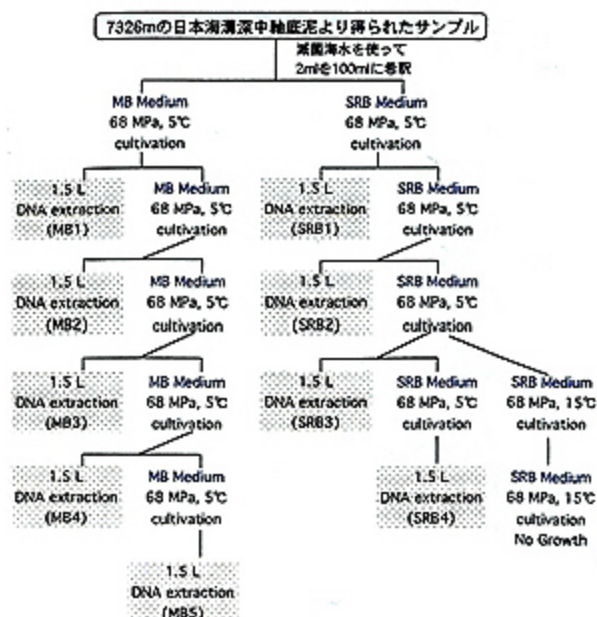


図3 深海微生物実験システムによる、加圧継代培養実験のストラテジー

Fig. 3 Strategy for cultivation of microorganisms in a sediment sample using the DEEP-BATH system.

2.4 加圧継代菌体のDNA解析

加圧継代した菌体から、所定の方法に従い¹⁰⁾ DNAを抽出し、16S rDNAをPCRにて増幅後、大腸菌にクローン化し、挿入断片のRFLP分析を行った。その結果を図4、及び表2に示した。

2.5 16S rDNA配列の系統解析

今回得られた、RFLPパターンの異なる全ての16S rDNAの塩基配列を、アプライドバイオシステムズ、パーキンエルマー社のDNAシケンサー 373S型を用いて、決定した。決定された塩基配列は、相同性検索を行った後、Clustal Wプログラムにより、近隣結合法を用いて系統樹を作成した。図5に得られた系統樹を示す。

2.6 加圧継代菌体における脂肪酸組成

加圧継代菌体を所定の方法により処理を行い¹⁰⁾、ヒューレットパッカード社製GCマススペクトルメーター HP5971A-MSDを用い、脂肪酸組成を解析した。その結果を、表3に示す。

3. 討 論

3.1 日本海溝中軸深度7,326m二枚貝コロニーの底泥における微生物の多様性解析

本底泥サンプルから14通りの16S rDNAのRFLPパターンが得られた(表1)が、全25クローン中13クローンの*Pseudomonas*近縁配列が得られた(表1、図5)。我々はこれまで、各深度別に得られた深海底泥サンプルや、日本海溝等の冷水湧出域から得られたサンプルから一般的に*Pseudomonas*近縁配列が得られるこ

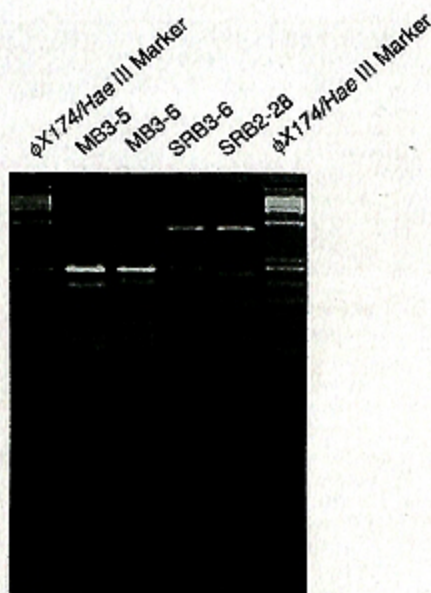


図4 継代菌体から得られた 16S rDNA の RFLP パターン分析

Fig. 4 RFLP analysis of the 16S rDNAs from the cultivated cells.

表2 継代菌体から増幅された 16S rDNA の RFLP 分析の結果一覧

Table 2 Number of clones showing different RFLP patterns of amplified 16S rDNA gene from the DNAs cultivated in MB (a) and SRB (b) media.

RFLPパターン	クローン数					16S rDNA 配列からの位置
	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	
MB3-5	11	10	7	14	11	New piezophiles genus?
MB3-6	0	0	1	0	0	New piezophiles genus?
合計クローン数	11	10	8	14	11	

(b) SRB 増殖による継代

RFLPパターン	クローン数				16S rDNA 配列からの位置
	SRB1	SRB2	SRB3	SRB4	
SRB3-6	0	17	9	14	<i>Shewanella piezophiles</i>
SRB2-28	0	1	0	0	<i>Shewanella piezophiles</i>
合計クローン数	0	18	9	14	

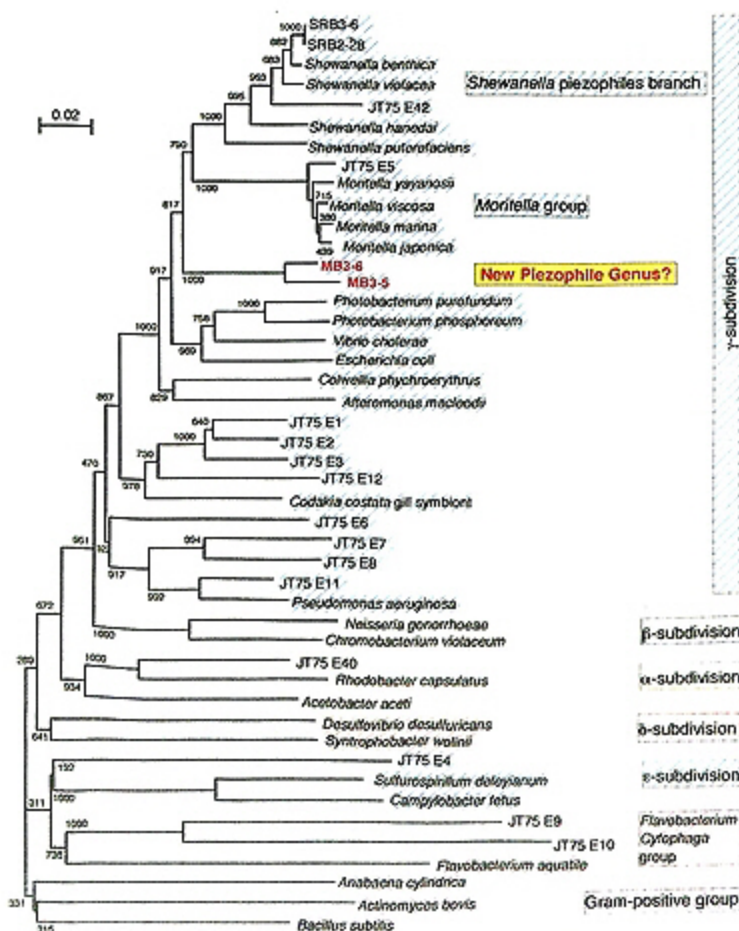


図5 日本海溝中軸底泥サンプル及び、加圧継代菌体より得られた 16S rDNA 塩基配列をベースに、作成した微生物進化系統樹。系統樹の作成にあたり近隣結合法を用いた。

Fig. 5 Phylogenetic tree showing the relationships between the sequences determined in this study and 16S rDNA sequences of other bacteria. The scale represents the average number of nucleotide substitutions per site. Numbers denote bootstrap probabilities.

表3 加圧継代培養により得られた各サンプルの脂肪酸組成
Table3 Fatty acid compositions of the cells obtained from MB and SRB cultures.

Fatty acid	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	SRB2	SRB3	SRB4
11:0						5	5	4
iso- 13:0						4	3	3
3OH- 12:0						1	1	1
14:1	12	11	12	12	11			
14:0	1	1	1	1	1	3	4	4
3OH- 13:0						8	8	6
iso- 15:0						10	9	9
15:0		1	1	1		3	2	2
3OH- 14:0	5	5	6	5	6			
16:1	46	44	44	49	50	24	23	21
16:0	21	20	21	18	18	12	11	11
17:1						3	2	1
17:0						1	1	
18:1	1	2	1	1	1	7	6	6
18:0						1		
20:4		1	1					
(EPA*) 20:5						17	22	29
22:1						1	1	1
(DHA*) 22:6	13	14	12	13	12			

*EPA: Eicosapentaenoic acid, DHA: Docosahexaenoic acid

とを報告している¹¹⁻¹³⁾。そして、前回の継代実験の結果からも、大気圧下の継代において、*Pseudomonas* 属細菌のみが増殖した¹⁰⁾ 事からも、こうした細菌が海洋底において常にマジョリティーとして存在していることが示された。次に、4クローンの化学合成生物 *Codakia* sp. に共生する細菌と近縁な配列が観察されたが、これは本サンプリング地点で見いだされた未同定の二枚貝群集が、日本海溝最深部における化学合成生物群集である可能性を示唆している。しかしながら、一般的に化学合成生物群集を育む冷水湧出域では共生細菌に硫化水素を供給する役割を担う硫酸還元細菌と思われる δ -*Proteobacteria* に属する配列が観察される^{10, 12, 13)} が、ここでは見いだされなかった。このことから、本海域の貝を取り巻く環境は、既知の冷水湧出域の微生物組成とは大きく異なっている可能性があり、硫化水素の供給源の探索をさらに進める必要があろう。また、本海底の水深が、7,326m ということで、これまで報告されている好圧性細菌、*Shewanella* 属、*Moritella* 属、と極めて近縁な配列2クローンも得られている。

3.2 SRB 培地により加圧継代された好圧性細菌

SRB 培地では、 δ -*Proteobacteria* に属する好圧性の硫酸還元細菌の増殖を期待していたわけであるが、今回は、16S rDNA 配列の比較から好圧性の *Shewanella benthica* と極めて近縁な細菌の増殖が観察された (図5)。本菌は、微好気条件下にて硫酸還元活性を有し硫化水素を生産することが知られている⁶⁾ ことから、こうした菌が SRB 培地で選択的に生育できたことはじつにリーズナブルである。事実本菌は、好圧性 *Shewanella* 属細菌に特徴的に存在する加圧応答オペロン遺伝子¹⁴⁾ を持っており (Data not shown)、また脂肪酸組成に同細菌が特徴的に持つ EPA を多量に含んでいる

た (表3)。しかしながら、本菌は、15°C、68MPa の条件下では全く生育できないことから、これまで知られていた菌とはかなり異なる生育特性を持っていると思われる。今後、同サンプルから、微生物を純粋分離し、さらに詳細に検討しなければならない。

3.3 MB 培地により加圧継代された好圧性細菌

MB 培地からは、16S rDNA 配列の比較から、既知のどの属にも属さない新属と思われる細菌の増殖が確認された。本好圧性細菌は、*Shewanella* 属、*Moritella* 属、*Planctomyces* と、大腸菌、*Escherichia coli* の間に位置している (図5)。脂肪酸組成からは、DHA の存在が示され (表3)、*Moritella* 属細菌と類似であった⁷⁾。本細菌は、これまで全く報告例のない好圧菌である可能性が高く、さらに詳細な検討が必要とされている。微好気状態の MB 培地からなぜこうした菌が増殖したかは、いまのところ謎であるが、深海底にはいまだ未知の好圧性細菌がたくさん存在していることの一つの示唆であると思われる。

4. まとめ

- (1) 日本海溝中軸深度 7,326m の海底に、未知の種の二枚貝群集を見だし、同底泥を無菌的に採泥することに成功した。
- (2) 同底泥サンプルの微生物学的多様性の解析の結果、海洋底に広く見いだされる *Pseudomonas* 属の他に、共生菌、好圧菌等の現場環境に特徴的な微生物の存在が示唆された。
- (3) 4°C、68 MPa の条件下での加圧継代実験により、SRB 培地からは、好圧性 *Shewanella* 属細菌が、MB 培地からは、新属と思われる好圧性細菌の増殖が確認された。

5. 謝 辞

深海底泥サンプルの取得にあたり、無人潜水調査船「かいこう」の福井班長を始めとするオペレーションチームの皆様方、母船「かいかい」の湯川船長を始めとする船乗員の皆様方に大変お世話になりました。また、深海微生物実験システムの利用に関しては、当センター研究業務部の平課長代理を始めとするシステム運用員の皆様方に大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) C. E. ZoBell, and R. Y. Morita, "Barophilic bacteria in some deep-sea sediments." *J. Bacteriol.*, **73**, 563-568 (1957).
- 2) A. A. Yayanos, A. S. Dietz, and R. Van Boztel, "Isolation of a deep-sea barophilic bacteria and some of its growth characteristics." *Science*, **205**, 808-810 (1979).
- 3) J. W. Deming, H. Hada, R. R. Colwell, K. R. Luehrsens, and G. E. Fox, "The ribonucleotide sequence of 5S

- rRNA from two strains of deep-sea barophilic bacteria." J. Gen. Microbiol., 130, 1911-1920 (1984).
- 4) J. W. Deming, L. K. Somers, W. L. Straube, D. G. Swartz, and M. T. Macdonell, "Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, *Colwellia* gen. nov." System. Appl. Microbiol., 10, 152-160 (1988).
 - 5) Y. Nogi, N. Masui, and C. Kato, "*Photobacterium profundum* sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment." Extremophiles, 2, 1-7 (1998).
 - 6) Y. Nogi, C. Kato, and K. Horikoshi, "Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* species, and *Shewanella violacea* sp. nov., a new barophilic bacterial species." Arch. Microbiol., 170, 331-338 (1998).
 - 7) Y. Nogi, C. Kato, and K. Horikoshi, "*Moritella japonica* sp. nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment." J. Gen. Appl. Microbiol., 44, 289-295 (1998).
 - 8) Y. Nogi, and C. Kato, "Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, and *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial species." Extremophiles, 3, 71-77 (1999).
 - 9) 柳林美樹, 加藤千明, 李麗娜, 能木裕一, 堀越弘毅, "日本海溝からの保圧採泥と, 泥中微生物フローラの継代による変遷." 日本農芸化学会 1998 年度大会 要旨集(Vol.72) p.11(1998).
 - 10) M. Yanagibayashi, Y. Nogi, L. Li, and C. Kato, "Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6,292 m during cultivation without decompression." FEMS Microbiol. Lett., 170, 271-279 (1999).
 - 11) C. Kato, L. Li, J. Tamaoka, and K. Horikoshi, "Molecular analyses of the sediment of the 11,000m deep Mariana Trench." Extremophiles, 1, 117-123(1997).
 - 12) L. Li, C. Kato, and K. Horikoshi, "Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths." Biodiv. Conserv., 8, 659-677 (1999).
 - 13) L. Li, C. Kato, and K. Horikoshi, "Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench at a depth of 6,400 m." J. Mar. Biotechnol., 1, 391-400 (1999).
 - 14) L. Li, C. Kato, Y. Nogi, and K. Horikoshi, "Distribution of the pressure-regulated operons in deep-sea bacteria." FEMS Microbiol. Lett., 159, 159-166 (1998).

(原稿受理: 1999 年 8 月 6 日)