

日本海溝微生物調査航海 (YK99-05, Leg.4) 報告

加藤 千明^{*1} 能木 裕一^{*1} 小松 徹史^{*1}
佐藤(伊藤)孝子^{*1} 三浦 健^{*1} Eric ALLEN^{*2}
Federico LAURO^{*2} 栗野 悟^{*3} 野口 鎮男^{*3}

平成11年6月28日から7月7日まで、有人潜水調査船「しんかい6500」による日本海溝微生物調査, YK99-05, Leg. 4, が実施された。天候不良のため予定していた4潜航全てを実施することはできなかったが、調査時間の短縮はあったものの3回の潜航調査を行うことができ、陸側斜面1回、海側斜面2回の潜航に成功した。これらの潜航行動では、保圧採泥を始めとする各種の深海底泥サンプルの取得を行い、微生物分離用のサンプルとした。本稿では、同航海調査の概要並びに得られたサンプルからの微生物の分離について報告する。

キーワード : 日本海溝, 微生物調査, YK99-04, leg.4 航海, 好圧性微生物, 深海微生物実験システム

Report of Japan Trench Microbial Investigation Cruise on YK99-05, leg. 4.

Chiaki KATO^{*4} Yuichi NOGI^{*4} Tetsushi KOMATSU^{*4}
Takako I. SATO^{*4} Takeshi MIURA^{*4} Ellic ALLEN^{*5}
Federico LAURO^{*5} Satoru KURINO^{*6} Shizuo NOGUCHI^{*6}

In this cruise, YK99-05, leg 4, we were planning to have four dives, where we investigated to land slope side (cold-seep) twice, and to pacific ocean plate side (sea bottom fissure) twice. Then we succeeded three times dives, that one time was performed at the land slope, and twice were performed at the ocean plate side. The purposes of these dives were to study microbial diversity of the deep-sea sediment and isolation of novel piezophilic bacteria. We would also like to confirm the environmental changes of the diving site compared with the previous dives. The results of this cruise are described in this report.

Keywords : Japan Trench, Microbial investigation, YK99-05, leg.4 cruise, Piezophilic bacteria, DEEPBATH system

*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 カリフォルニア大学サンディエゴ校・スクリpps海洋研究所
*3 海洋科学技術センター・研究業務部・施設設備課
*4 The DEEPSTAR Group, Japan Marine Science and Technology Center
*5 Scripps Institution of Oceanography, University of California at San Diego
*6 Research Supporting Division, Japan Marine Science and Technology Center

1. 過去の日本海溝微生物調査の概要と、得られた成果について

日本海溝の深度6,000 m以深への潜航調査は、平成3年(1991年)に有人潜水調査船「しんかい6500」が、本格的に研究目的で運用されてから始まっている。平成3年度の調査では、7月6日から15日まで5回の潜航調査(潜航番号63～67)が実施され、海溝陸側斜面における三陸海底崖直下の世界最深化学合成生物群集(当時の記録)シロウリガイ群集の発見¹⁾、およびプレート側(海側)斜面海底における多数の亀裂の発見²⁾がなされた。特に後者の亀裂の発見は、1933年の三陸大津波の震源域に位置するため、そうした海底の地震発生のメカニズムと深く関連している可能性が示唆された²⁾。

本航海調査までに、過去において5回の微生物学的調査を目的とした潜航が、日本海溝において実施された。表1に各潜航のサマリーを示す。

これまでの潜航調査により、各種の底泥サンプルが採取されたが、深海高水圧環境に適応した微生物(好圧性およ

び耐圧性細菌)に限っていえば、表2に示す各種菌株が分離されている。これらの微生物は、高濃度の高度不飽和脂肪酸(EPA, DHA等)をその細胞膜画分に蓄積しており、その医薬応用を含めた有用性が検討されている。また同時に、新たな分野として期待されている、高水圧下における生理学(圧力生理学; Piezophysiology)の研究のための生物材料としての利用が考えられている。

これまでの日本海溝微生物調査の成果を要約すると次のようになる。

- (1) 日本海溝底より種々の好圧性、耐圧性微生物の分離に成功した³⁾。
- (2) それらの微生物コレクションの中から、新種の好圧性細菌, *Moritella japonica* (strain DSK1) を分類同定し、新種登録を行った⁴⁾。
- (3) *Shewanella benthica* DB6705株から、加圧に応答して発現する遺伝子(加圧応答遺伝子)をクローン化し、その圧力による発現制御が転写のレベルで行われていることを明かとした⁵⁾⁶⁾。

表1 これまでの日本海溝微生物調査一覧(平成3年～10年)

Table 1 Dive summary of previous investigation at Japan Trench in the DEEPSTAR program (1991~1998)

Dive #	Date	Dive points	Waterdepth (m)	investigator	Affiliation	Purpose of the dive
64	'91. 7. 7	40° 06.80'N 144° 11.60'E	6500	C. Kato	DEEPSTAR JAMSTEC	Isolation of novel deep-sea microorganisms.
129	'92. 7.16	40° 06.07'N 144° 11.00'E	6358	Y. Masuchi	DEEPSTAR JAMSTEC	Investigation of <i>Calymene</i> community, and isolation of piezophiles.
131	'92. 7.20	39° 20.50'N 144° 35.70'E	6470	C. Kato	DEEPSTAR JAMSTEC	Investigation of sea bottom fissure, and isolation of piezophiles.
273	'95. 7.20	40° 06.60'N 144° 11.10'E	6395	A. Inoue	DEEPSTAR JAMSTEC	Sampling of pressure retaining sediment, and isolation of novel bacteria.
373	'97. 6. 6	39° 20.50'N 144° 35.80'E	6360	C. Kato	DEEPSTAR JAMSTEC	Sampling of pressure retaining sediment from the fissure, and isolation of piezophiles.

表2 当研究室において日本海溝底より分離された好圧性微生物の一覧表

Table 2 Piezophilic and piezotolerant bacteria isolated from the sediment obtained from the Japan Trench.

Bacterial strain	Properties	Species	Species
Piezophilic bacteria			
DB6705	Optimal growth at 50 MPa, 10 °C No growth at 0.1 MPa	Japan Trench, at 6,356 m depth	<i>Shewanella benthica</i>
DB6906	Optimal growth at 50 MPa, 10 °C No growth at 0.1 MPa	Japan Trench, at 6,269 m depth	<i>Shewanella benthica</i>
Moderately piezophilic bacteria			
DSK1	Optimal growth at 50 MPa, 15 °C	Japan Trench, at 6,356 m depth	<i>Moritella japonica</i> *
Piezotolerant bacteria			
DSK25	Optimal growth at 0.1MPa, 35 °C	Japan Trench, at 6,500m depth	<i>Sporosarcina</i> sp.

*, 当研究室において分離された新種の好圧性細菌。

- (4) 日本海溝底泥における微生物学的多様性を、培養手順をふまえることなく解析した。また、深海微生物実験システムを用い、保圧採泥された底泥サンプル中の好圧菌を、圧力をリリースすることなく解析することに成功した^{7,8)}。
- (5) 海溝陸側斜面に見いだされた世界最深(当時)化学合成生物、ナギナタシロウリガイ群集を支える冷水湧出域内側の泥の中における微生物学的多様性の解析を行い、メタン生成古細菌、硫酸還元細菌の存在を証明し、これらの微生物を介した化学合成生物群集を支えるイオウサイクルの実態を明かした⁹⁾。
- (6) これらの成果を含め、日本海溝から分離された微生物の報告は、全部で42報となり、他海域からの報告と比較して群を抜いている。報告の内訳は、英文のオリジナルが14編、総説、本が10編、そして日本語の論文で18編となっている。

以上のように、日本海溝の5回の潜航調査によりこれだけの成果が上っており、本海域の調査は私共深海環境フロンティアにとって、もっとも効率良く成果の上がっているところであるといえる。

2. 平成11年度、YK99-05航海Leg.4潜航調査の概要

YK99-05, leg.4航海は、低気圧の接近もあり潜航中止が相次ぎ、予定していた4潜航を実施することはできなかった。当初の計画では、日本海溝陸側斜面2潜航、海側斜面2潜航において、それぞれの海域において最初の潜航で現場サンプル採取装置を仕掛け、次の潜航で回収するという予定であったが、結果的にこれをやり遂げることはできなかった。しかしながら、2回の完全潜航(陸側斜面、海側斜面それぞれ1潜航、6K#487, #488)に成功し、天候不良のため緊急浮上せざるを得なかった1回の潜航(6K#489)においても、底泥のサンプリングだけは行うことができ、満足すべきサンプリングの結果であった。これは、天候等の大変な状態の中、常に最良の手を打って下さった、「しんかい6500」運行チーム、母船「よこすか」の船長を始めとする船乗員の皆さまの御協力のたまものである。表3に、今回の3潜航の概略を示した。

6K#487潜航(潜航者：加藤千明)は、日本海溝陸側斜面においてなされ、三陸海底崖直下の深度約6,400 mラインに

位置する、シロウリガイ群集をめざして潜航した。着底後、シロウリガイを発見することはできたが、過去において観察されたような大群衆というようなコロニーはなく、南北方向にぼつぼつと存在している感じであった(写真1)。これは、おそらく三陸海底崖において度重なる小規模な地震に伴う、斜面崩壊が考えられ、それによりシロウリガイ群集の大規模なコロニーは埋まってしまったと思われる。これまでの潜航において、本潜航ポイントにおいては、数多くの潜航マーカーが仕掛けられてきているにもかかわらず、一度もそれらが再確認されたことはなかった。こうしたことから、ここはかなり不安定な潜航ポイントであることが推定され、再訪の極めて難しい場所であるということが考えられる。本潜航においては、シロウリガイ群集の下側の、冷水湧出域の泥を初めて無菌的に保圧採泥することに成功し、各種の微生物分離用のサンプルの採取を行った。

次に、6K#488潜航(潜航者：小松徹史)は、度重なる潜航中止の後、陸側斜面の潜航を断念し、海側斜面、海底の亀裂(通称、マネキンバレー)をめざし実施された。潜航後、海底の亀裂を発見し、平成4年度の6K#130潜航(潜航者：藤岡換太郎)において仕掛けられたマーカー(通称、藤岡マーカー)を視認し、そこがマネキンバレーであることを確認した

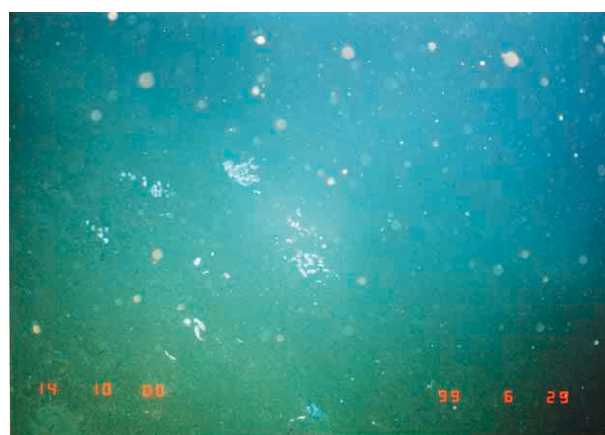


写真1 日本海溝陸側斜面三陸海底崖直下に広がる、シロウリガイ群集。深度、6,340 m。

Photo 1 *Calymene* communities at just under the Sanriku-Sea Flour Slope at a depth of 6,340 m.

表3 日本海溝微生物調査、YK99-05, leg.4航海における潜航調査の概略

Table 3 Dive table of the investigation at Japan Trench in the cruise of YK99-05, leg.4.

Dive #	Date	Dive points	Waterdepth (m)	investigator	Affiliation	Purpose of the dive
487	'99. 6.29	40° 6.7027'N 144° 11.0070'E	6398	C. Kato	DEEPSTAR JAMSTEC	Isolation of novel deep-sea piezophilic microorganisms, and study of microbial diversity in Japan Trench sediment. Observation of <i>Calymene</i> community.
488	'99. 7. 4	39° 20.5135'N 144° 35.6262'E	6411	T. Komatsu	DEEPSTAR JAMSTEC	Isolation of novel deep-sea microorganisms, and study of in situ cultivation. Observation of deep-sea fissure, again.
489	'99. 7. 5	39° 20.4589'N 144° 35.7610'N	6311	T. I. Sato	DEEPSTAR JAMSTEC	Isolation of novel piezophilic microorganisms, and sampling of the several sediments from the fissure.



写真2 日本海溝海側斜面, マネキンバレー北端に設置された #130 dive marker (藤岡マーカー) の視認。深度, 6,279 m。
Photo 2 Observation of #130 dive marker at north side of Manequin Valley at a depth of 6,279 m.

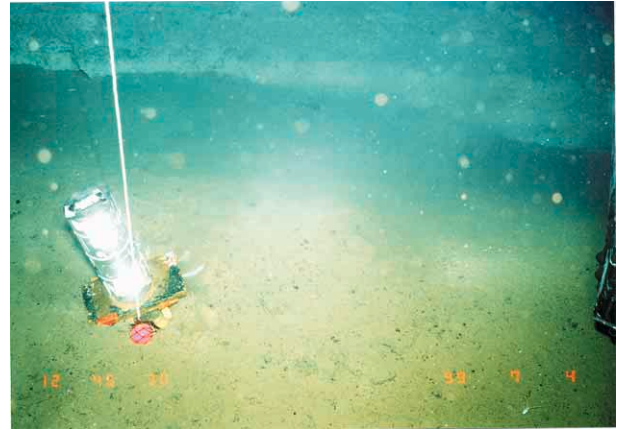


写真3 現場微生物採集装置のセッティング。藤岡マーカー回収後, 同ポイントに設置された。深度, 6,279 m。
Photo 3 Setting the Deep-sea Bacterial Trapping System instead of #130 dive marker at a depth of 6,279 m.

表4 本調査により得られたサンプルの一覧
Table 4 List of the samples obtained by these dives

Dive #	Pressure retaining sediment	Push core sediments	Sterilizing sediments	Rock sample	Animal sample
6K#487	1	4	—	4	—
6K#488	—	4	3	1	Isopoda 1
6K#489	—	1	1	—	—

(写真2)。藤岡マーカーポイントにおいて着底し, 底泥の採取等のサンプリングを行い, 微生物採取用の現場培養器を設置した(写真3)。その後, マネキンバレーを北から南に向け走破し, 亀裂の形状の変化のビデオテープによる記録を行った。平成3年度の6K#67潜航(潜航者:小川勇二郎)において発見され, 平成4年度の6K#130潜航にて再確認された, 亀裂の底のマネキンの首は, 平成7年度の6K#373潜航(潜航者:加藤千明)において, 泥の中に埋もれてしまったことが視認されたが, 今回の潜航でもそのことは再視認された。しかしながら, 亀裂そのものは, それほど大きく変形したようにはみえず, かなり安定性が高い場所であると思われる。これは, 陸側斜面の三陸海底崖直下とは相当異なり, 現場培養実験等の長期にわたる実験観察に適した場所であることが確認された。

最後に, 6K#489潜航(潜航者:佐藤孝子)は, #488潜航と同じくマネキンバレー目指して実施された。しかしながら, 潜航中の天候の急変により, 潜航行動の中止が決定され, 本潜航そのものは, 着底後直ちに浮上するというまことに残念な結果に終わった。しかしながら, 短時間の海底滞在時間にもかかわらず, 底泥サンプルの採取を行うことができたことは, 不幸中の幸いであった。

以上3潜航において得られたサンプルを表4に示す。これらのサンプルは, 航海終了後, 新規好圧性微生物の分離, および日本海溝における微生物学的多様性の解析等の研究課題に供給された。

3. 進行中の研究課題。

本日本海溝微生物調査航海, YK99-05, leg.4 から約1年強が過ぎ, 得られたサンプルを用いて, 以下の各研究課題において研究が進行中である。各研究課題の詳しい成果は, 実験終了次第それぞれ正式な形で報告する予定であるが, ここでは, その進行中の成果の概略について述べる。

3.1. 保圧サンプルのDEEPBATHシステムによる継代培養実験と, 新規好圧菌の探索。

6K#487潜航において, 冷湧水域の泥サンプルを保圧採泥器により採取したが, その後本保圧サンプルを深海微生物実験システムにより, 65 MPa, 5℃の条件下で, それぞれ, マリンプロス培地(MB), 硫酸還元菌用分離培地(SRB)を用い保圧継代培養を行った。3代の継代を行い, 得られたそれぞれのMix cultivationから直接DNAを抽出し, そこに含まれる加圧下で培養された微生物の遺伝子同定を行った。その結果, 新種の好圧菌が実験システム中にて生育していることが示唆され, 限界希釈および加圧バッグ法による, 新規好圧性細菌の分離を試みている。現在のところ, *Psychromonas*属に含まれると思われる新種の絶対好圧菌を数株分離することに成功したが, 順次分類学的検討を進めているところである。本成果に関しては, 分類学的検討が終了次第, 新種の好圧性細菌として, 報告する予定である。

3.2. 岩石中に存在する微生物の分離と現場環境中の役割の検討

今回の調査では、いくつかの岩石サンプルも併せ採取したが、同岩石中に存在する微生物の検討を行った。得られた岩石の表面をアルコールにて、殺菌処理を行い、表面から、数センチおきに順次内側の岩石部分を無菌的に切り出し、それぞれのサンプルに含まれている微生物を、培養法および直接DNAを抽出し遺伝子解析する方法などにより、解析した。その結果、岩石中に数多くの微生物が存在していることが示され、そのうちのいくつかは新規微生物である可能性が示唆されている。現在、順次分離された微生物の性質が明かされつつあり、実験が終了次第、岩石の遺伝子解析の結果と含め、報告する予定となっている。

3.3. 新規好圧性嫌気性微生物の分離

本研究課題は、国際共同研究協力の協定を結んでいる、アメリカカリフォルニア大学サンジエゴ校スクリップス海洋研究所 (SIO), Douglas Bartlett博士との共同研究として進行中である。今回の調査に、同博士から2名の博士課程の学生が派遣され船上でのサンプル処理を共同で行った。ここでは、特に冷水湧域において重要な役割をはたしていることが考えられる、新規の硫酸還元菌の分離を目的に実施された。こうした微生物は、絶対嫌気性で極端に酸素を嫌うものが多く、これまで通常の方法では分離が困難であると考えられてきた。そこで、今回は、柱状コアサンプルから、船内ラボに設置された、簡易嫌気チャンバーを用い、その中でサンプル処理を行うという方法をとった。現在、アメリカサイドで菌の分離作業が進んでいるが、一連の操作を加圧下で行わねばならないという困難な課題が生じており、まだ分離できたという話は聞いていない。今後、共同で繰り返し同海域の調査を行うことにより、こうした困難な課題を克服していかねばならないと感じている。

4. 今後の日本海溝微生物調査の課題。

以上のように、今回の調査では、予定よりも少ない潜航回数であったにもかかわらず、当初予定していた研究課題に供給できるサンプルを得ることができ、大成功の潜航調査航海であったといえる。今後、各課題の成果が取りまとめ次第、順次報告する予定であるが、ここでは、今後の日本海溝微生物調査の課題について、以下に4項目を提案したい。

- (1) 陸側斜面冷水湧出域および海側斜面亀裂域における、海底面からの深さ別の微生物学的多様性を解明し、生物活動・プレート活動・断層活動との関連を明かとする。

本課題では、これまで、海底下の地殻活動と微生物活動との相関性についてほとんど議論されたことが無いということから、考えられたものである。すなわち、日本海溝では、地質地球物理学的な調査と、生物微生物学的な調査がもっともバランスよく行なわれている海域であり、今後も引き続きこうした異分野間の協力がよくなされることが期待されている。

これまで、地殻活動やプレートテクトニクスといった活動と、生物微生物の活動とは別次元で議論されてきたが、熱水鉱床の生物群集や、冷水湧域における生物群集のアクティビティは、そうした地球物理学的な活動と決して切り離すことはできないことがわかってきている。したがって、今後は、微生物活動の方から、地殻活動にいかなる影響を与えているのかといった、新しい切り口が必要であることは言うまでもない。本課題はそうした、観点から提案されている。

- (2) 海底底泥サンプルを嫌氣的に回収する方法を開発し、冷水湧出域で確認された硫酸還元菌、メタン生成古細菌等のメタン・硫黄循環に関わる微生物の分離を行う。

前述したように、深海底泥サンプルを嫌氣的に回収するのは容易なことではない。しかも、それを加圧下で処理をするシステムを考えると、多くの困難が予想される。ここでは、現場の微生物学者だけではなく、技術開発に関わっているメンバーとの協力体制が必要不可欠である。幸いなことに、微生物実験システム (DEEPBATH-system) は、嫌気下での微生物の加圧培養をより得意としていることから、いかに嫌氣的に保圧採泥をするかという課題が克服できれば、比較的スムーズに仕事が進みそうである。

- (3) ピストンコア等で地殻内サンプルを回収し、そこから地殻内微生物の分離を行う。

日本海溝底の、興味の一つは、陸側斜面に広がる断層活動に伴う冷水湧出があげられる。この冷水湧出にともない鉛直方向に微生物の分布が層状をなしていることが推定される。この微生物分布の多様性を明らかにするためには、ピストンコアサンプラーを正確に、冷水湧出域に差し込まねばならない。こうした作業には、日本海溝のシロウリガイ群集を狙うことが望ましい。これまでの調査により、階段状になった三陸海底崖の直下には、必ずシロウリガイ群集を見いだしてきており、数回のピストンコアのトライアルがあれば、かならず冷水湧出域を狙うことができると考えられるからである。

- (4) 新規の好圧性微生物の分離等、その他いろいろ...

好圧性微生物の世界は、現在のところ全てプロテオバクテリアガンマサブグループに含まれる、4属6種しか報告されていない。しかしながら、これまでの深海調査により、まだまだ多くの種類の好圧菌が存在していることが示唆されている。しんかい環境中の微生物の生態を理解するためには、今後も新規微生物の発見へのたゆまぬ努力を続けていかなければならないのは、当然のことであろう。そうした意味でも、日本近海で最大深度を誇る、日本海溝底の調査は、魅力あふれるものである。また、深海底には陸上環境では見られない特徴を持った有用微生物の存在が推定されており、こうした有用微生物のスクリーニングも、引き続きおこなっていく必要がある。

謝 辞

本稿を終わるにあたり、日本海溝微生物調査、YK99-05, leg.4航海において、積極的に調査への支援を惜しまな

かった,「しんかい6500」運行チームの今井司令を中心とする皆さま,母船「よこすか」の田中船長を始めとする船上員の皆さまに心より感謝いたします。また,得られたサンプルの処理,現在進行中の研究課題で共に汗を流している当海洋科学技術センター深海環境フロンティアの皆さまに感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 藤岡換太郎, 村山雅史, “日本海溝陸側斜面の世界最深のシロウリガイ群集とメガシアー。” 深海シンポジウム報告書, 8, 17-27 (1992).
- 2) 堀田宏, 小林和男, 小川勇二郎, “日本海溝北部海側斜面の地殻構造「しんかい6500」第65, 66, 67潜航報告。” 深海シンポジウム報告書, 8, 1-15 (1992).
- 3) Kato, C., Sato, T. and Horikoshi, K. “Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples.” *Biodivers. Conserv.*, 4, 1-9 (1995).
- 4) Nogi, Y., Kato, C. and Horikoshi, K. “*Moritella japonica* sp. nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment.” *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44, 289-295 (1998).
- 5) Kato, C., Smorawska, M., Sato, T. and Horikoshi, K. “Cloning and expression in *Escherichia coli* of a pressure-regulated promoter region from a barophilic bacterium, strain DB6705.” *J. Mar. Biotechnol.*, 2, 125-129 (1995).
- 6) Kato, C., Smorawska, M., Sato, T. and Horikoshi, K. “Analysis of a pressure-regulated operon from the barophilic bacterium strain DB6705.” *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 166-168 (1996).
- 7) Li, L., Kato, C. and Horikoshi, K. “Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths.” *Biodivers. Conserv.*, 8, 659-677 (1999).
- 8) Yanagibayashi, M., Nogi, Y., Li, L. and Kato, C. “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).
- 9) Li, L., Kato, C. and Horikoshi, K. “Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench at a depth of 6,400 m.” *Mar. Biotechnol.*, 1, 391-400 (1999).

(原稿受理: 2000年10月10日)