

日本海溝で採取した深海底岩石内の微生物群集構造変化

崎濱 由梨^{*1} 稲垣 史生^{*2} 高井 研^{*2} 小松 徹史^{*2} 井上 明^{*1, 2} 掘越 弘毅^{*1, 2}

1999年「しんかい6500」第487潜航において、三陸沖日本海溝(40°6.7'N, 144°10.9'E)の陸側斜面6337mの海底から重さ約17Kgの岩石を採取した。本調査研究は、地殻内微生物研究の一モデルとして岩石内部の微生物群集構造を培養法と16S rRNA遺伝子(rDNA)を用いた分子生物学的手法によって解析した。研究対象の岩石は、主に無機炭素、カルシウム、ケイ素からなり、層状構造をした堆積岩である。岩石中心部の単一層から中心部へ向けた4箇所(S1~S4)を無菌的に切り出し解析用試料とした。蛍光位相差顕微鏡による直接細胞計数や各種条件下での培養法の結果より、岩石内の微生物は表面よりはむしろ約5.5~7.0cm内部の箇所(S3)が多く、岩石の外側と中心部とでは菌相が異なっていることが明らかとなった。rDNAのT-RFLP(Terminal-restriction fragment length polymorphism)解析においても、明らかに岩石中心部において多型シグナルが変化していた。さらにクローン化したrDNA塩基配列の系統解析から、岩石の外側には深海に典型的な海洋性細菌である α 及び γ プロテオバクテリアに属する細菌が優占的に検出されたが、中心部には陸域の土壌中に見られるような β プロテオバクテリアとグラム陽性細菌が優占的に検出された。これらの微生物群集構造は、海洋性細菌の岩石内部への侵食を示唆しており、中心部には外来微生物の侵食以前に内在していた元来環境の微生物群集が残されていると考察した。

キーワード：微生物群集構造, 16S rDNA, 内岩性微生物, 地殻内微生物圏

Shift of microbial community structures in a deep-sea sedimentary rock collected at the Japan Trench

Yuri SAKIHAMA^{*3} Fumio INAGAKI^{*4} Ken TAKAI^{*4}
Tetsushi KOMATSU^{*4} Akira INOUE^{*3, 4} Koki HORIKOSHI^{*3, 4}

Microbial community structures in a deep-sea sedimentary rock collected from a site in the Japan Trench at a depth of 6337m by means of the manned submersible *Shinkai 6500* during a scientific cruise aboard the R/V *Yokosuka* in May 1999 (dive number, 6K#487) were analyzed down to the inside using enrichment culture methods and culture-independent molecular phylogenetic techniques. The rock was subsampled into four sections (S1 to S4; from the surface to the inside), and cell density of DAPI-stained cells and colony-forming units (CFU) were determined. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of PCR-amplified 16S rRNA gene (rDNA) sequences indicated that a shift in bacterial ribotype structures occurred in the sections at different depths from the surface. rDNA clone analysis revealed a significant change in microbial rDNA community structures. Bacterial rDNA community structures in the sections S1 to S3 were comprised of typical marine bacteria mainly members of the α - and γ -subclass of *Proteobacteria*, while rDNA signatures for the β -subclass of *Proteobacteria* and the High G+C Gram Positive Group were obtained from the most inner structure. The transition of bacterial rDNA community structure revealed the possible infiltration of seawater and microorganisms into the rock and strongly suggested the existence of unusual endolithic microbial communities in isolation during the geological time scale of history of the rock.

Keywords : microbial community structure, 16S rDNA, endolithic microbes, subsurface biosphere

*1 東洋大学大学院工学研究科応用科学専攻

*2 海洋科学技術センター極限環境生物フロンティア研究システム地殻内微生物研究領域

*3 Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Toyo University

*4 Subground Animalcule Retrieval (SUGAR) Project, Frontier Research System for Extremophiles, Japan Marine Science and Technology Center

1. はじめに

近年、深海掘削計画(Ocean Drilling Project; ODP)や陸上掘削の成果から、これまで無生物の世界であると考えられてきた海底下地下環境にも微生物が存在することが明らかとなってきた(Stetter et al. 1993; Parkes et al. 1994; Bale et al. 1997; Wellsbury et al. 1997)。これらの地殻内微生物圏は、生物密度は低いものの、その圧倒的な空間の広がりから、全地球における生物存在量の半分を占める巨大な生物圏であるとも考えられている(Whitman et al. 1998)。しかしながら、その微生物の分布と多様性、堆積プロセスや地球化学的環境因子との関わりなどについては未解明の部分が多い。実際に、OD21深海地球ドリリング計画(Ocean Drilling in the 21st century)においても、地殻内生物圏の解明が重要課題の一つとなっている。従来の環境微生物学では、専ら環境中に生息する微生物の分離・培養法による評価が主であったが、1990年代からPCR(Polymerase Chain Reaction)法によって増幅した遺伝子を用いた分子生物学的手法が主流となった。現在では非常にDNAの少ない岩石内部試料や熱水などの特殊極限環境試料においても効率的にDNAを抽出・精製し、PCR法によって特定の遺伝子配列を増幅することが可能である(Inagaki et al. 1997; Takai and Sako 1999; Takai and Horikoshi 1999a, 1999b; Takai and Horikoshi 2000; Inagaki et al. 2001a, 2001b, 2001c; Takai et al. 2001)。地殻内のコア堆積物・岩石試料を微生物学的に研究する際、実際に試料中に存在している(もしくは生存している)微生物の分離・培養を試みる直接的手法と、過去の地質形成時に堆積した微生物の生体高分子を解析することで古微生物群集を推測するという間接的手法の2通りのアプローチがある。我々は、地殻内試料を扱う試験研究というスタンスから、深海底より採取した岩石試料について、内岩性微生物の群集構造を培養法と分子生物学的手法の双方のアプローチから検討した。

2. 方法

2.1. 試料採取と微生物用試料の調製

1999年5月に実施された「しんかい6500」による潜航調査(第487潜航)によって、日本海溝三陸沖(40°6.7'N, 144°10.9'E)の深度6337mの海底から約17kgの岩石を採取した。(図1)採取した岩石は船上4℃で保管し、陸上研究施設で直ちに微生物用試料を調製した。まず、岩石をクリーンベンチ内にいれ、バーナーで表面を火焰殺菌した。あらかじめ滅菌しておいたロックトリマーとスパチュラをもちいて、岩石中心部の同一層序から、表面から中央部に向けた4つのサイトから約10gの試料を採取した:S1, 1.5-3.0cm; S2, 3.5-5.0cm; S3, 5.5-7.0cm; S4, 7.5-9.0cm。採取した試料は滅菌したステンレスすり鉢で冷やしながら粉末状に砕き、実験室内で-20℃で保存した(図2)。

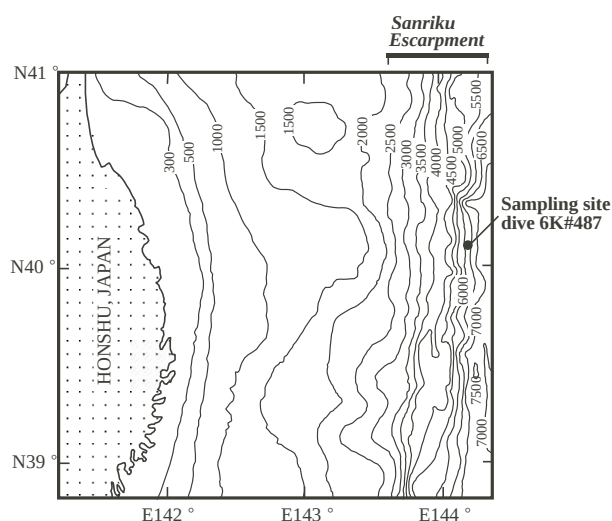


図1 岩石試料の採取地点。しんかい6500第487調査潜航によって三陸海底崖6337mの地点から岩石を採取した。

Fig. 1 Bathymetric map of the sampling point. The rock sample was collected from the Sanriku Escarpment at a depth of 6337m.

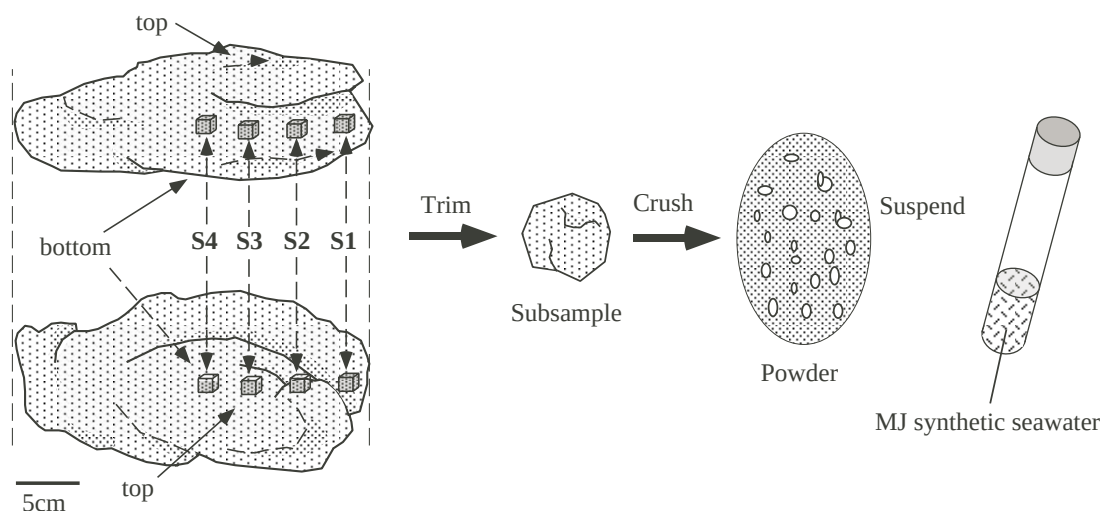


図2 岩石試料の概略図と微生物解析用のサブサンプリングの手順。岩石表面から中心部にむけて、同一の層順から無菌的に試料を調製した。

Fig. 2 Explanatory sketch of the deep-sea rock and schematic procedures of subsampling. Inner parts of four sections, from the surface to inside (S1-S4), were subsampled horizontally from the same layer in a microbial-free condition.

2.2. 炭素含量の測定

粉末状の岩石サンプルを蒸留水で洗浄しながら、孔径0.4 μm のヌクレポアフィルターでろ過し、50 $^{\circ}\text{C}$ で一昼夜乾燥した。その後デシゲーター内で放冷し、乾燥重量を測定し各捕集期間の全粒子を算出した。

全炭素含有率(TC; Total carbon concentration)は前処理された試料を2~10mg秤量し、アルミ箔キャップに入れて全炭素測定用のペレットを調製した。全有機炭素(TOC; Total organic carbon concentration)は、試料約10mgを500 $^{\circ}\text{C}$ であらかじめ燃焼させ、秤量した後、塩酸噴霧中のドラフト内で一昼夜放置し CaCO_3 を溶解させた。試料はその後再度乾燥し再秤量し、アルミ箔キャップにいれて全有機炭素測定用のペレットを作成した。調製したペレットのTC及びTOCをELEMENTAL ANALYZER 2400CHN(Parkin-Elmer, CA, USA)により測定した。

2.3. 化学成分組成分析

粉末状の岩石試料を、金属成分をあらかじめ除去したグラファイトるつぼに入れ、サンプルを秤量した後、約7倍重量のホウ酸リチウム(LiBO_2)を加えてよく混合し、高温炉内にて950 $^{\circ}\text{C}$ 15分間加熱融解した。溶状の試料を8%硝酸溶液に入れ完全溶解させ秤量し、ICP-AES optime 3300DV(Parkin-Elmer, CA, USA)を用いて分析した。

2.4. 直接細胞計数

各岩石部位(S1~S4)から0.2g程度をエッペンチューブに採取し、200 μl の4%中性ホルマリンを加えよく攪拌した。次ぎに10mg/mlの4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)溶液を等倍量加えよく攪拌した後、10分間暗所に静置した(Porter & Feig 1980)。試料溶液はフィルター(0.22- μm -pore-size, 13-mm-diameter polycarbonate filter: Advantec, Tokyo)で濾過し、位相差蛍光顕微鏡によって一試料あたり50視野の細胞数を直接計数し、1g当たりの微生物量に換算した。

2.5. 生菌数の評価

生菌数は各種培養条件によるColony Forming Unit(CFU)によって評価した。培地はMarin broth 221(DIFCO)の1.5%アガロース固体培地を使用しpHを4.5, 7.0, 10.0に調製した。pH4.5は0.2 NH_2SO_4 , pH10は0.1M NaOH/KClで調整した。培養は温度10 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 55 $^{\circ}\text{C}$ で2週間行った。視認できるコロニーをカウントしCFUに換算した。

2.6. DNA抽出と16S rDNAの増幅

各粉末状試料を約2g取り、Ultra Clean Large Scale Soil DNA Kit(MO Bio Lab.)を使用して抽出した。抽出したDNAはエタノール沈殿で濃縮した後、PCRによって16S rDNAを増幅した。DNAポリメラーゼはLATaq, GCbuffer I(宝酒造)を使い、プライマーはBac27FとUni1492Rのプライマーセット(DeLong 1992)を用いた。PCR反応はGene Amp PCR system 9600(Perkin-Elmer, USA)を用いて行い、反応条件は、96 $^{\circ}\text{C}$ 20秒, 54 $^{\circ}\text{C}$ 45秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2分を35サイクル行なった。

2.7. 解析

抽出したDNAを鋳型にBac27FとFAM蛍光ラベルした927R(Lane 1991)のプライマーセットでPCRによって上記と同条件で増幅した。増幅したPCR産物はアガロースゲル電気泳動後、Gene Clean DNA purification kit(MO Bio Lab.)を用いて切り出し精製、エタノール沈殿によって濃縮した。精製したrDNAを制限酵素Hha I で37 $^{\circ}\text{C}$, 8時間消化し、ABI 377シーケンサーとGeneScan software ver. 3.0(PE Applied Biosystems, USA)を用いて末端断片長を解析した(Liu et al. 1997)。

2.8. 16S rDNAクローン解析

各試料からPCRで増幅した16S rDNAをTA cloning Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて大腸菌にクローニングし、rDNAライブラリーを構築した。rDNAがクローン化された大腸菌コロニーをランダムに選出し、d-Rhodamine sequencing kit(PE Applied Biosystems)とBac27Fプライマー(DeLong 1992)を用いて部分塩基配列を決定した。決定した約300bpの塩基配列をDNASISプログラムver. 3.5を用いて97.0%以上の相同性でグルーピングし、各代表クローンの塩基配列をFASA及びgapped-BLASTプログラムによってデータベースに登録されている既知配列と相同性検索を行った。

3. 結果

3.1. 岩石の特性

本岩石は層状構造を持つ堆積岩で、形態は濃い灰色で角礫を含まないサブアンギュラーであった(図2)。CaとSiを比較的多く含み、若干のFe, Alを含んでいた。TCはS1, S2の表層試料よりも内部試料の方が高い傾向にあり、S3が最も多く7.993%であった(表1)。TOCはどの部位でも一様に約0.3-0.4%と少なかった(表2)。岩石に希塩酸を滴下したところ、二酸化炭素を発生したことから含有する炭素成分の多くは炭酸塩の形で存在すると推測された。

3.2. 岩石内における微生物量の評価

DAPI蛍光染色による微生物の直接計数の結果、1gあたり約 $5 \times 10^6 \sim 9 \times 10^6$ 細胞存在し、 10^6 のオーダーの中でTCと同様の傾向を示した(図3A)。各種培養条件下におけるCFU測定においても同様に、S3までは表層から内部に向けてとCFUが増加し、中心部S4で減少する傾向が認められた(図3B, 3C)。また30 $^{\circ}\text{C}$ のS3, S4においてのみpH4.5でコロニーを形成する微生物が認められた(図3C)。55 $^{\circ}\text{C}$ におけるコロニーの形成は認められなかった。

3.3. T-RFLP法による微生物群集構造の解析

制限酵素Hha I で消化したrDNAをT-RFLP解析したところ、8つの主要な断片長を示すピークが検出された(図4)。ピークb1, b4, b8は表層のS1セクションには検出されないピークであり、そのうちピークb4は中心部S4においてのみ検出された。また、約750bpのピークb7は表層のS1からS3で検

表1 深海底岩石試料の化学成分組成

Table 1 Chemical composition of the deep-sea rock collected at the Japan Trench at the depth of 6337m.

Element	wt%	Element	wt%
Si	15.7	K	0.80
Ca	14.2	Ba	0.50
Al	3.10	Ti	0.20
Fe	1.90	Mn	0.08
Mg	1.51	P	0.07
Na	0.86	Sr	0.04

表2 岩石内部の各セクションにおける全炭素含量(TC), 全有機態炭素含量(TOC), 全無機炭素含量(IOC)

Table 2 Total carbon (TC), total organic carbon (TOC) and inorganic carbon (IOC) concentrations in inside sections of the deep-sea rock

Section	Vertical depth from the rock surface (cm)	TC (wt%)	TOC (wt%)	IOC (wt%)
S1	1.5-3.0	6.399	0.392	6.006
S2	3.5-5.0	6.995	0.367	6.628
S3	5.5-7.0	7.993	0.332	7.660
S4	7.5-9.0	7.230	0.332	6.898

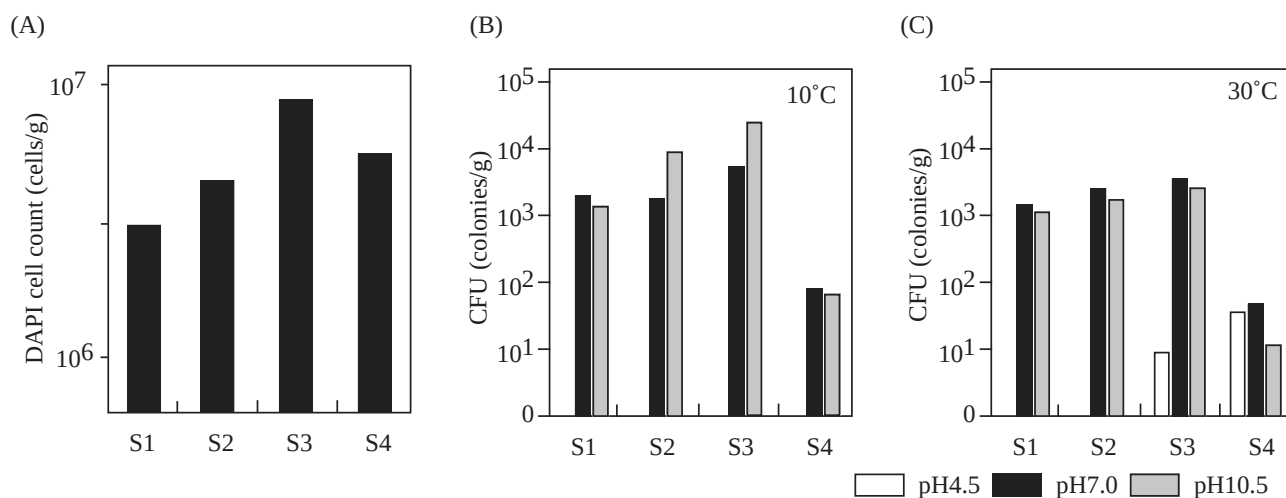


図3 岩石試料の内岩性微生物量の評価。(A)DAPI蛍光染色細胞の顕微鏡直接計数による全細胞数。(B)培養温度10℃におけるpH4.5, 7.0, 10.0でのCFUカウント。(C)培養温度30℃におけるpH4.5, 7.0, 10.0でのCFUカウント。55℃においては、コロニーの形成は認められなかった。

Fig. 3 Microbial mass estimation in each section of the deep-sea rock. (A) Total direct count of DAPI-stained cells by epifluorescence microscopy. (B) Colony forming units in cultures incubated at pH 4.5, 7.0, 10.5 at 10 °C. (C) Colony forming units in cultures incubated at pH 4.5, 7.0, 10.5 at 30 °C. No colony was obtained by cultivation at temperatures greater than 55 °C.

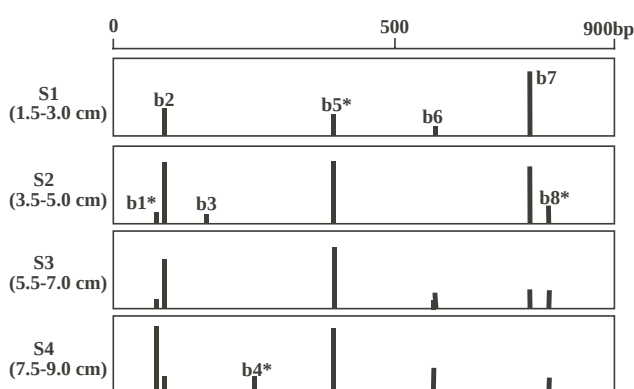


図4 T-RFLP解析による内岩性微生物群集構造のフィンガープリンティングパターン。16S rDNAを制限酵素Hha Iで8時間消化したものをを用いた。アスタリスクは内部に進むにつれ増加するピークを示す。

Fig. 4 T-RFLP fingerprint patterns of bacterial 16S rDNA digested with Hha I for 8 h. The peak gaining or specific to the inner section is indicated by an asterisk.

出されたが、内部に移行するにつれ減少する傾向にあり、S4では検出されなかった。本解析によって岩石表層と中心部では微生物群集構造が異なることが示唆された。

3.4. rDNAクローンによる微生物種の解析

岩石試料から構築した107のrDNAクローンについて、その部分塩基配列を決定しクローンタイプ解析を行った。その結果、S1で9タイプ、S2は10タイプ、S3は8タイプ、S4では12タイプのクローンにグループ化された(表3, 図5)。S1では *Flexibacter-Cytophaga-Bacterioides* group (FCB group)の *Chryseobacterium meningoseptum* に相同性を示したクローンが5クローン、 α -プロテオバクテリアに相同性を示したクローンが2クローン検出され、 γ -プロテオバクテリアに相同性を示したクローンが最も多く22クローン検出された。

S2では、FCB groupに属するクローンは1クローンのみ検出された。 α -プロテオバクテリアに相同性を示すrDNAクローンは最も多く25検体中17クローンで、主に *Erythrobacter* 属と *Caulobacter* 属に高い相同性を示した。 γ -プロテオバクテ

表3 16S rDNAのクローンタイプ解析
Table 3 Phylogenetic bacterial rDNA clone type analysis

Section	Phylogenetic group	C lone type	Related organism or clone	Similarity (%)	Number of related clones
S1	FCB group*	SB1.2	<i>Chryseobacterium meningoseptium</i> CIP 6057	86.1	5
					5 / 29
	α -Proteobacteria	SB1.20	<i>Caulobacter</i> sp. FWC38	97.5	1
		SB1.25	<i>Olavius loisae</i> endosymbiont 3	90.5	1
					2 / 29
	γ -Proteobacteria	SB1.3	<i>Fundibacter jadensis</i>	99.1	7
		SB1.8	<i>Methylophaga sulfidoborans</i>	92.4	5
		SB1.5	<i>Halomonas variabilis</i> SW48	98.5	4
		SB1.10	<i>Methylophaga sulfidoborans</i>	98.5	2
		SB1.13	<i>Idiomarina</i> sp. KM231	92.4	3
		SB1.29	Gamma proteobacterium HTB010	96.5	1
					22 / 29
S2	FCB group*	SB2.15	<i>Flavobacterium salegens</i>	89.6	1
					1 / 25
	α -Proteobacteria	SB2.15	<i>Erythrobacter citreus</i>	99.3	6
		SB2.1	<i>Caulobacter</i> sp. FWC33	99.0	4
		SB2.27	<i>Erythrobacter citreus</i>	95.4	2
		SB2.7	<i>Paracoccus denitrificans</i>	96.0	2
		SB2.5	Manganese-oxidizing bacterium SI85-9A1	96.0	2
		SB2.6	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	97.4	1
					17 / 25
	γ -Proteobacteria	SB2.9	<i>Halomonas variabilis</i> SW48	99.8	4
		SB2.2	<i>Methylophaga sulfidoborans</i>	94.0	2
		SB2.14	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	91.6	1
					7 / 25

表3の続き

S3	α -Proteobacteria	SB3.19	<i>Porphyrobacter</i> sp. MBIC3936	91.8	4
		SB3.7	<i>Erythrobacter citreus</i>	99.5	4
		SB3.4	<i>Brevundimonas</i> sp. V4.B0.07	98.5	3
		SB3.10	<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	98.1	2
					13 / 22
	γ -Proteobacteria	SB3.11	<i>Halomonas variabilis</i> SW48	98.0	6
		SB3.2	<i>Pseudomonas</i> sp. BT1	97.7	3
		SB3.11	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. MED4	97.4	2
		SB3.16	<i>Methylophaga sulfidoborans</i>	94.5	1
					12 / 22
S4	High G+C Gram Positives	SB4.15	<i>Aeromicrobium erythreum</i>	96.7	5
		SB4.7	<i>Arthrobacter oxydans</i>	99.4	3
		SB4.7	Unknown Actinomycete MC4	90.9	1
		SB4.7	<i>Rhodococcus globerulus</i>	99.3	1
					10 / 31
	α -Proteobacteria	SB4.35	<i>Sinorhizobium</i> sp. S005	99.3	2
		SB4.13	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	99.7	1
		SB4.34	<i>Caulobacter intermedius</i>	95.6	1
		SB4.37	Uncultured alpha proteobacteirum clone CR-PA53	97.5	1
					5 / 31
	β -Proteobacteria	SB4.1	<i>Burkholderia glathei</i>	93.5	7
		SB4.3	<i>Herbaspirillum</i> sp. B39	94.5	5
		SB4.39	Uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC087	98.5	2
		SB4.8	<i>Telluria mixta</i>	96.9	2
					16 / 31

Bald letters indicate the number of clones belonging to the phylogenetic group among the total number in each section.

*FCB group; *Flexibacter-Cytophaga-Bacterioides* group.

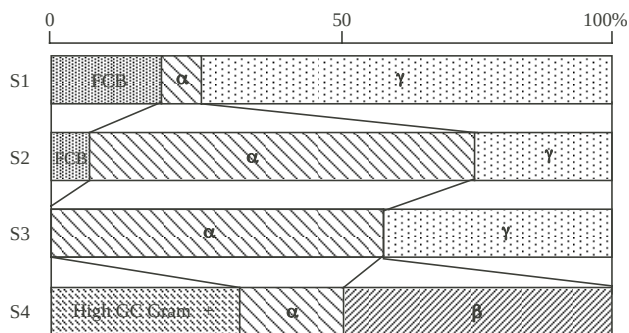


図5 深海底岩石内の内岩性rDNAタイプ構造。

Fig. 5 Endolithic ribotype (rDNA type) structures in a deep-sea sedimentary rock. FCB; *Flexibacter-Cytophaga-Bacterioides* group, α , β , γ ; α , β , γ - subclass of *Proteobacteria* class, Gram +; High G+C Gram Positives group.

リアは7クローン検出されたが、S1で優占的であった *Fundibacter jadensis* は検出されず、*Halomonas* 属と *Methylophaga* 属が検出された。

S3では、解析した22クローンが α -プロテオバクテリアと γ -プロテオバクテリアの2つのプロテオバクテリアのサブクラスに分けられた。 α -プロテオバクテリアのグループでは、*Erythrobacter* 属は以前検出されるものの、*Porphyrobacter* 属と *Brevundimonas* 属、*Sulfobacter* 属が新たに検出された。 γ -プロテオバクテリアにおいては、*Halomonas* 属に相同性を示すクローンが6クローン検出された。また、日本海溝の海底堆積土より分離された好圧性細菌である *Pseudomonas* sp. BT1に97.7%の相同性を示すクローンも検出された (Kaneko et al. 2000)。

S4におけるrDNAクローンタイプは他の3セクションとは大きくことなり、 γ -プロテオバクテリアのクローンは検出されずに、High G+C Gram Positivesと β プロテオバクテリアのクローンが多く検出された。High G+C Gram Positivesでは、*Aeromicrobium* 属や *Erythrobacter* 属のような陸域土壌に生息する放線菌に相同性を示すクローンが検出された。 β プロテオバクテリアでは、土壌に多く生息している *Burkholderia* 属や *Herbaspirillum* 属に相同性を示すクローンが検出された。

4. 考察

深海底で採取された岩石内の微生物群集の分布と多様性は、顕微鏡による直接計測法、各種培養条件におけるCFUカウント、16S rDNAのT-RFLP解析とクローンタイプ解析などの多面的解析によって、岩石中心部のセクションS4では群集が大きく異なることが明らかとなった(表3, 図5)。培養法によるアプローチでは、30℃におけるCFUカウントにおいて、セクションS3とS4にのみ酸性条件でコロニーを形成する生菌が検出され、実際に岩石外側とは異なる細菌が中心部に生息していることを示した。また、rDNAを用いた分子生物学的アプローチでは、T-RFLP解析・クローンタイプ解析とともに群集構造が変化しており、S4に陸域土壌に見られるよう

な菌相が検出された。岩石の外側の試料では、FCB group, α -及び γ -プロテオバクテリアに属する典型的な海洋性細菌が多く検出されていることから、岩石が海水に晒された後、海水中に生息する細菌が海水とともに岩石内部へ侵食した可能性がある。試料を採取した日本海溝陸側斜面は地滑りなどの斜面の崩壊が頻繁に起こっており、本試料は陸側斜面から崩落した可能性が高い。本報告では、堆積岩の形成年代を決めるには至らなかったが、表面が所々角張っているため、崩落したのであれば比較的新しく、遠くない場所に由来すると推測される。岩石中心部S4の微生物群集構造は海洋性細菌とは異なり、放線菌や β -プロテオバクテリアが優占していたが、これらの微生物は岩石が崩落する以前の環境中に存在(または生息)していた微生物群集を反映している可能性がある。

謝辞

本調査研究を遂行するにあたり、「しんかい6500」の潜航チームの方々、並びに「よこすか」の乗組員の方々に多大なご協力を賜りました。記して心から謝意を表します。

引用文献

- 1) DeLong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5685-5689.
- 2) Inagaki F, Hayashi S, Doi K, Motomura Y, Izawa E, Ogata S. 1997 Microbial participation in the formation of siliceous deposits from geothermal water and analysis of the extremely thermophilic bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 41-48.
- 3) Inagaki F, Motomura Y, Doi K, Taguchi S, Izawa E, Lowe DR, Ogata S. 2001a. Silicified microbial community at Steep Cone hot spring, Yellowstone National Park. *Microb Environ* 16: 125-130.
- 4) Inagaki F, Takai K, Komatsu T, Kanamatsu T, Fujioka K, Horikoshi K. 2001b. Archaeology of Archaea: Geomicrobiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea subseafloor environment. *Extremophiles* (in press).
- 5) Inagaki F, Sakihama Y, Takai K, Komatsu T, Inoue A, Horikoshi K. 2001c. Transition of microbial community structures and presence of unusual microorganisms in a deep-sea rock. *Geomicrobiol J* (in press).
- 6) Kaneko H, Takami H, Inoue A, Horikoshi K. 2000. Effects of hydrostatic pressure and temperature on growth and lipid composition of the inner membrane of barotolerant *Pseudomonas* sp. BT1 isolated from the deep-sea. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 72-79.
- 7) Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. eds. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., pp. 115-175. John Wiley and Sons, New York.
- 8) Liu W-T, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. 1997.

- Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63 : 4516-4522.
- 9) Parkes RJ, Cragg BA, Bale SJ, Getliff JM, Goodman K, Rochelle PA, Fry JC, Weightman AJ, Harvey SM. 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature* 371 : 410-413.
 - 10) Porter KG, Feig YS. 1980. The use of DAPI for identifying and counting microflora. *Limnol Oceanogr* 25 : 943-948.
 - 11) Stetter KO, Huber R, Blchl E, Kurr M, Eden RD, Fielder M, Cash H, Vance I. 1993. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature* 365 : 743-745.
 - 12) Takai K, Sako Y. 1999. A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments. *FEMS Microbiol Ecol* 28 : 177-188.
 - 13) Takai K, Horikoshi K. 1999a. Genetic diversity of Archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152 : 1285-1297.
 - 14) Takai K, Horikoshi K. 1999b. Molecular phylogenetic analysis of archaeal intron-containing genes coding for rRNA obtained from a deep-subsurface geothermal water pool. *Appl Environ Microbiol* 65 : 5586-5589.
 - 15) Takai K, Horikoshi K. 2000. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microbiol* 66 : 5066-5072.
 - 16) Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K. 2001. Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol* 67 : 3618-3629.
 - 17) Wellsbury P, Goodman K, Barth T, Cragg BA, Barnes SP, Parkes RJ. 1997. Deep marine biosphere fueled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature* 388 : 573-576.
 - 18) Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes : the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 6578-6583.

(原稿受理：平成13年7月25日)