

日本海溝の冷水湧出域堆積物に生息する微生物群集の多様性

稲垣 史生^{*1} 崎濱 由梨^{*3} 加藤 千明^{*2} 井上 明^{*1, 3} 掘越 弘毅^{*1, 2, 3}

深海底冷水湧出域は海底下から炭化水素や硫化物に富む還元的な冷水が断層面に沿って湧出し、海底熱水孔環境と同様に化学合成生物群集による多様性に富んだ特異的な生態系が形成されている。冷水湧出域や熱水噴出孔のような環境は、生命活動における海洋のオアシス的場所としてのみならず、海底下に広がる未知の地下生物圏に開かれた窓としても重要な研究対象となっている。本報告では、2000年6月のYK00-04航海調査によって得られた日本海溝冷水湧出域の海底堆積物を対象に、実際に生きている微生物群集の多様性を、鉛直的に明らかにする事を目的とした。RT-PCR (Reverse Transcribed-PCR) によって増幅された遺伝子断片を相同性解析と系統解析、T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析などの分子生物学的手法によって解析したところ、イプシロンおよびデルタプロテオバクテリアの系統群からなる特異的な微生物相が明らかとなった。これらの結果から、海水と冷水との酸化還元境界には極めて特異な微生物生態系が構成されており、その微生物活動は海洋における硫黄循環に重要な役割を果たしていることが推察された。

キーワード：冷水湧出、微生物群集構造、RT-PCR、16S crDNA、地殻内微生物圏

Microbial diversity in the cold seep sediment at the Japan Trench

Fumio INAGAKI^{*4} Yuri SAKIHAMA^{*6} Chiaki KATO^{*5}
Akira INOUE^{*4, 6} Koki Horikoshi^{*4, 5, 6}

Depth profiles of naturally occurring bacterial community structures associated with the deep-sea cold seep sediment in the Japan Trench at a depth of 5,343m were evaluated using molecular phylogenetic analyses of RNA reverse transcribed-PCR (RT-PCR) amplified 16S rDNA fragments. A total of 137 clones of bacterial crDNA (complimentary rDNA) phylotypes (phylogenetic types) obtained at 3 different depths (2-4cm, 8-10cm, and 14-16cm) were identified in partial crDNA sequencings. crDNA phylotypes from the cold seep sediment were dominantly composed of δ - and ϵ -Proteobacteria (36% and 42% respectively). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis also indicated the majority of δ - and ϵ -Proteobacteria. Almost all sequences of crDNA belonging to ϵ -Proteobacteria were affiliated with same cluster (ϵ -CSG: ϵ -proteobacterial cold seep group), and were closely related with rDNA sequences from deep-sea hydrothermal vent environments. Our results suggest that the bacterial community at the cold seep site was a specific redox-front type of microbial habitat.

Keywords : cold seep, microbial community structure, RT-PCR, 16S crDNA, subsurface biosphere

*1 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

*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深海微生物研究領域

*3 東洋大学大学院工学研究科応用化学専攻

*4 SUGAR Project, Frontier Research System for Extremophiles, Japan Marine Science and Technology Center

*5 The DEEPSTAR group, Japan Marine Science and Technology Center

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

1. はじめに

海洋における冷水湧出域や海底熱水噴出孔環境は、地球の内部エネルギーに強く影響を受けた還元的な地下水が湧出する場所であり、チューブワームやシロウリガイといった化学合成生物が群生する海底のオアシスである。それらの特異な環境は多くの真核生物にとっての生命活動の場であると同時に、メタンや硫化物などの湧水中に含まれる無機栄養に依存する多様な微生物の生息および進化の場所でもある。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; Wellsbury et al. 1997)。冷水湧活動に伴う海底下の断層面や帯水層、また海底熱水孔環境下や地下深部高温域は、地表に比べて比較的エネルギー変動の小さい安定的な海底下環境の中で生命活動を維持する上でのホットスポットであると推測される。しかしながら、そのような海底下環境における微生物の分布と多様性、代謝特性と地球化学的環境因子との関わりなどについては、解析試料の採取が極めて困難なこともあり、未だ明らかにされていない。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、それらの地殻内生物圏の解明や未知微生物資源の探索が重要課題の一つとなっている。

一方、1990年代におけるPCR(Polymerase Chain Reaction)法を利用した分子生物学の著しい発展によって、従来までの培養法に依存した環境微生物学的手法では困難であった様々な環境の微生物生態が明らかとなった。現在では非常にDNAの少ない岩石内部試料(Inagaki et al. 1997; Inagaki et al. 2001a; Takai et al. 2001; Inagaki et al. 2002)や海底下堆積物(Inagaki et al. 2001b)、湧出熱水(Takai and Horikoshi 1999a, 1999b)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し微生物相を推定することが可能となった。

2000年6月に行われたYK00-04航海調査では、日本海溝のシロウリガイが群生する冷水湧出域から採取した柱状堆積物を対象に、実際に生きている微生物群集を反映した菌相解析をするためにDNAではなくRNAを用いた群集構造解析を試みた。さらに異なる深さでの鉛直的菌相変化をT-RFLP法によって解析した。その結果、これまでの調査では得られなかった特異な微生物群集が明らかとなった。本報告では、分子生物学的手法による微生物群集構造解析の結果と、それらの微生物活動の環境生態学的重要性について述べる。

2. 方法

2.1. 試料採取

2000年6月に実施されたYK00-04航海調査における「しんかい6500」第550潜航によって、日本海溝三陸沖(39°5.5'N, 143°53.3'E)の深度5343mの海底に見られたシロウリガイが群生する冷水湧出域から、プッシュコアサンプラーを用いて約15cmの堆積物を採取した。また、比較として少し離れた深

度5204mの場所から通常の海底堆積物を採取した(396.6'N, 143°53.1'E)(図1)。採取した岩石は船上の簡易クリーンボックス内にて約2cm間隔で分割し(図2)、それぞれを滅菌したプラスチックチューブに入れ-20℃で保管した。

2.2. 直接細胞計数

堆積物0.5gをエッペンチューブに取り分け、200μl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 and 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。

2.3. RNA抽出

各粉末状試料を約10g取り、7.0mLの抽出バッファー(25mM 酢酸ナトリウム, 5mM EDTA, 5%(w/v) SDS)に懸濁した。5gの滅菌グラスビーズ(粒径0.1mm, Sigma)と、抽出バッファーで中性化したフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール溶液(24:24:1(v/v/v))を加えた。室温で2分間激しく振とうした後、60℃で1時間放置した。さらに2分間浸透した後、遠心分離によって上層を取り分け、3mLの10M酢酸アンモニウムと等量のイソプロパノールを加えRNAを沈殿させた。遠心後70%エタノールで洗い、乾燥させた後滅菌水に溶解した。抽出した粗RNA溶液は、RNeasy Midi Kit(Qiagen, Valencia, CA)によってDNAの分解と精製を行った。使用した全ての溶液・器具は0.1%のDEPC処理とオートクレーブによってRNA分解酵素を不活性化したものを使用した。

2.4. RT-PCR

RNAからの逆転写反応は、96℃で2分間プレヒーティングした後、ランダムプライマーを用いてSuperScript Preamplification System(Gibco BRL, Tokyo)によって行った。増幅された鋳型DNA(cDNA)から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℃20秒、54℃45秒、72℃2分を32サイクル行なった。

2.5. T-RFLP解析

RT-PCRによって得られたcDNAを鋳型にPCRによってFAM蛍光ラベルしたBac27FとBac927R(Lane 1991)のプライマーセットを用いてPCRによって上記と同条件で増幅した。増幅したcrDNAはアガロースゲル電気泳動後、Gene Clean DNA purification kit(MO Bio Lab., Solana beach, CA)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℃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)。

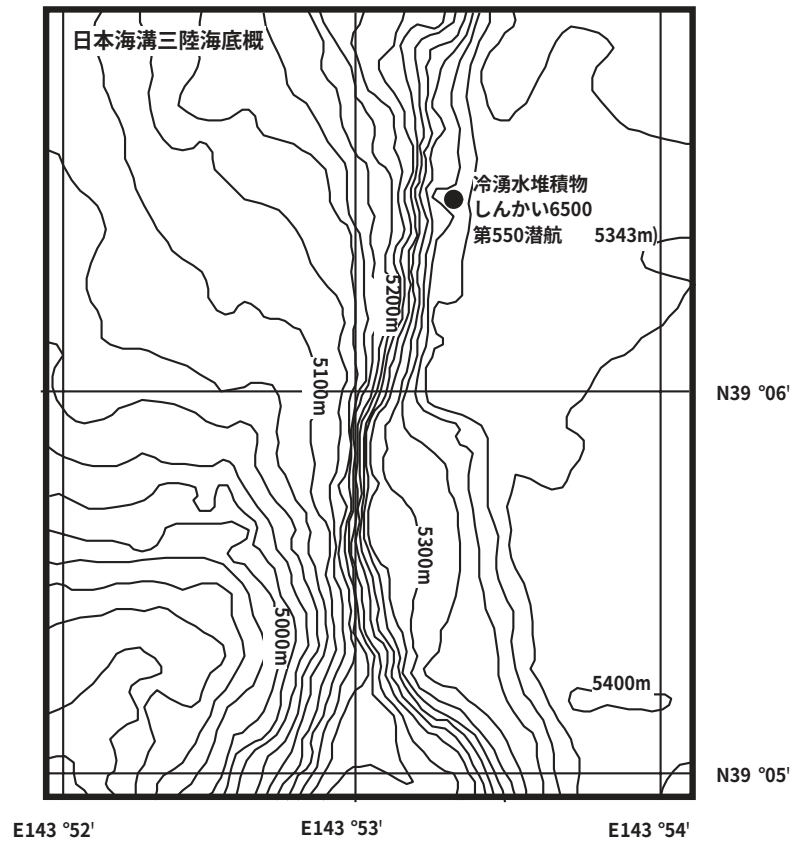


図1 冷泉湧出域堆積物の採取地点。
Fig. 1 Sampling point of the cold seep sediment.

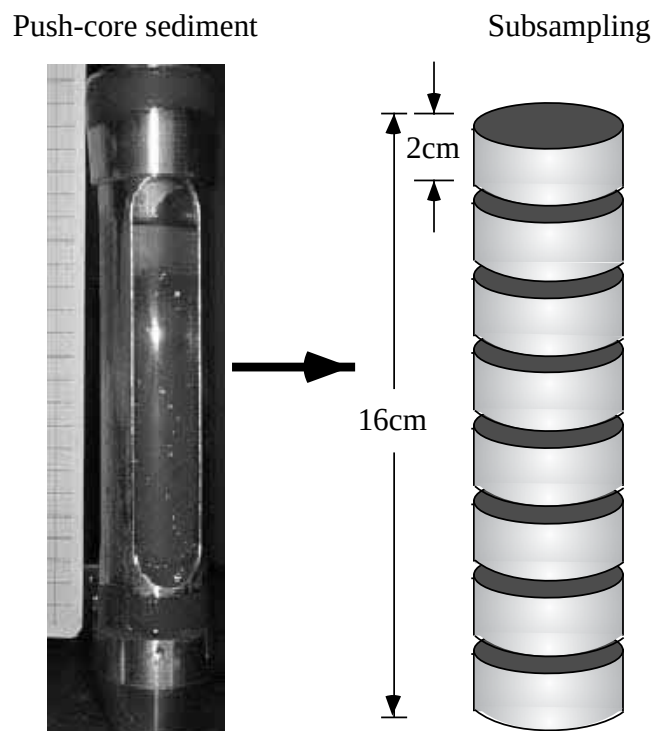


図2 柱状採泥器によって採取した堆積物と深さ毎の堆積物の分割。
Fig. 2 Sediment core sample collected by a push-core sampler and subsampling at the different depths.

2.6. 16S crDNAクローンタイプ解析と系統解析

各試料からPCRで増幅した16S crDNAをTA cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて大腸菌にクローニングし, crDNAクローンライブラリーを構築した。crDNA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350bp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の相同性検索を行ってクローンタイプとした。各クローンタイプの代表crDNAクローンは約900bpの全塩基配列を決定し, 近縁な複数菌株の16S rDNA塩基配列(もしくは環境から直接検出されたrDNA配列)を含む進化系統樹をDDBJ CLUSTAL-X Systemを用いて作成した。

3. 結果及び考察

3.1. 冷水湧出域堆積物中の微生物量

DAPIによって染色した細胞の直接計数の結果を図3に示す。海底表層の堆積物では, 冷水湧出域と普通の海底堆積

物共に1gwet当たり 10^7 以上の細胞が存在していた。普通の海底堆積物では深くなるにつれて次第に微生物量が減少していくのに対して, 冷水湧出域では減少傾向は認められず, 深さ16cmの堆積物中にも 10^7 以上の細胞が存在していた。この結果は, 活動的冷水湧出域の堆積物環境における微生物活動範囲が普通の海底堆積物とは異なり, 冷水の流路に沿った海底表層堆積物中の水圏環境に微生物が均一に多く存在していることを示唆している。

3.2. 冷水湧水域堆積物で生息する微生物群集の鉛直的多様性

冷水湧水環境から採取した柱状堆積物について2-4cm, 8-10cm, 14-16cmの異なる3段階の深さから16S crDNAクローンライブラリーを構築した。無作為に選出したクローンの部分配列を決定し, データベースに登録されている既知配列との相同解析によってcrDNAクローンタイプを決定した。2-4cmの部位からは42クローン, 8-10cmの部位から48クローン, 14-16cmの部位から47クローンの合計137クローンについて解析を行った。その結果, どの深さにおいても硫酸還元菌を多く含む δ -プロテオバクテリアのグループと硫黄酸化細菌を含む ϵ -プロテオバクテリアが優占的に生息していることが明らかとなった(表1)。表層域では δ -プロテオバクテリアが最も

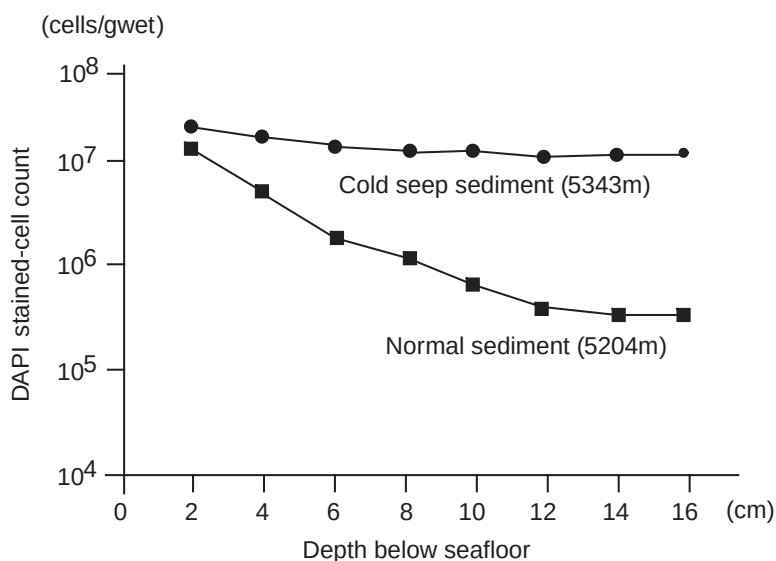


図3 DAPI蛍光染色した細胞数の深さ毎の変化。

Fig. 3 Depth profile of the number of DAPI-stained cells along the depth.

表1 冷水湧出域堆積物の異なる深さから検出したcrDNAクローン数

Table 1 Number of crDNA clones detected from cold seep sediments at 3 different depths

Section	Subclass of Proteobacteria					Gram-positives	OP8	Unknown	Total
	α	β	γ	δ	ϵ				
2-4 cm	4	0	1	19	17	1	0	0	42
8-10 cm	0	0	7	18	18	2	1	2	48
14-16 cm	0	5	2	12	23	3	0	2	47
Total	4	5	10	49	58	6	1	4	137

表2 冷水湧出域堆積物から構築したcrDNAクローンの相同性解析

Table 2 Similarity analysis of bacterial crDNA clones obtained from the cold seep sediment at the Japan Trench

Phylogenetic affiliation	Representative clone	Accession No.	Number of relative clone	Similar rDNA sequences (similarity %)
α -Proteobacteria	CS2.11	AB069785	1	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (94.5)
	CS2.19	AB069787	3	<i>Mesorizobium loti</i> (88.8)
β -Proteobacteria	CS8.30	AB069808	4	<i>Pseudomonas saccharophila</i> (98.6)
	CS8.31	AB069809	1	<i>Methylophilus methylotrophus</i> (92.8)
γ -Proteobacteria	CS2.30	AB069790	1	<i>Cyclocasticus pugetii</i> (89.5)
	CS5.15	AB069795	5	<i>Marinobacter aqueolei</i> (87.7)
	CS5.20	AB069797	3	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (90.5)
	CS5.30	AB069800	1	<i>Leucothrix mucor</i> (89.6)
δ -Proteobacteria	CS2.2	AB069783	2	<i>Desulfobacterium anilini</i> (89.9)
	CS2.7	AB069784	7	<i>Desulfocapsa sulfoexigens</i> (91.0)
	CS2.17	AB069786	1	<i>Desulfobacterium phenolicum</i> (91.9)
	CS5.5	AB069791	3	<i>Desulfocapsa sulfoexigens</i> (96.4)
	CS5.24	AB069899	1	<i>Desulfohalobus elongatus</i> (90.2)
	CS8.12	AB069803	30	<i>Desulfosarcina variabilis</i> (91.4)
	CS8.26	AB069806	3	<i>Desulfosarcina variabilis</i> (93.1)
	CS8.29	AB069807	2	<i>Desulfosarcina variabilis</i> (91.7)
ϵ -Proteobacteria	CS2.1	AB069782	19	Benzene mineralizing consortium SB-17 (93.2)*
	CS2.26	AB069788	7	VC2.1 Bac1(93.0)*
	CS2.28	AB069789	3	Benzene mineralizing consortium SB-17 (94.0)*
	CS5.17	AB069796	25	Benzene mineralizing consortium SB-17 (94.2)*
	CS8.5	AB069802	4	VC2.1 Bac1(92.1)*
Gram positives	CS5.11	AB069794	1	<i>Fusibacter paucivorans</i> (91.1)
	CS5.21	AB069798	1	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (84.8)
	CS8.2	AB069801	4	<i>Bacillus halodurans</i> (94.1)
OP8 ^d	CS8.15	AB069804	1	OPB95 (87.5)*
Unknown	CS5.7	AB069792	1	<i>Desulfuromonas palmitatis</i> (83.9)
	CS5.10	AB069793	1	Benzene mineralizing consortium SB-15 (97.2)*
	CS8.21	AB069805	2	Benzene mineralizing consortium SB-45 (97.4)*

* Environmental rDNA clones.

優先的に検出されたのに対して、14-16cmの部位ではその優占順位が逆転し ϵ -プロテオバクテリアが多く検出された。硫黄酸化細菌であろうと考えられている ϵ -プロテオバクテリアの海洋環境からの分離例は非常に少なく生理機能は未知の部分が多いが、表層域では海水からの硫酸の供給と、海底下からの硫化水素の供給に応じた酸化還元フロント型の微生物生息域が発達しているものと推察される。

さらに表層2-4cmの部位で唯一 α -プロテオバクテリアが検出され、最下層14-16cmの部位から β -プロテオバクテリアが検出されたことも特徴的である。普通の深海底堆積物から比較的多く検出される γ -プロテオバクテリアはどの部位にも検出されたものの、その検出頻度は全体で約7%程度であり、過去に通常のDNAを用いた手法によって解析されたものに比べて極端に低い値を示した(表1)(Li et al. 1999a; 1999b)。

表2にcrDNAクローンタイプ解析によって選定した代表クローンの全塩基配列とデータベースに登録されている既知配列との相同性検索の結果を示す。全体的に97%以下の相同性を示し、深海底冷水湧出域環境は新属新種レベルの新規な微生物の宝庫であると言える。特に優占的であった δ -プロテオバクテリアでは、*Desulfosarcina*属に近縁なcrDNA配列が優占的に検出された(表2)。 δ サブクラスの系統解析では、高頻度で検出されたCS8.12をはじめ、CS8.29、CS8.26の配列はそれぞれ*D. variabilis*の下流に位置している(表3A)。*Desulfosarcina*属細菌はサンタバーバラのメタン湧出域でも優占種として検出されている(Orphan et al. 2001)。また、7クローン検出されたCS2.7のクローンタイプは、データベースとの相同性検索の結果では*Desulfocapsa sulfoexigens*と最も高い相同性をしめしたが(表2)、系統解析によって*D. sulfoexigens*の上流に位置する*Desulforhopalus vacuolatus*と

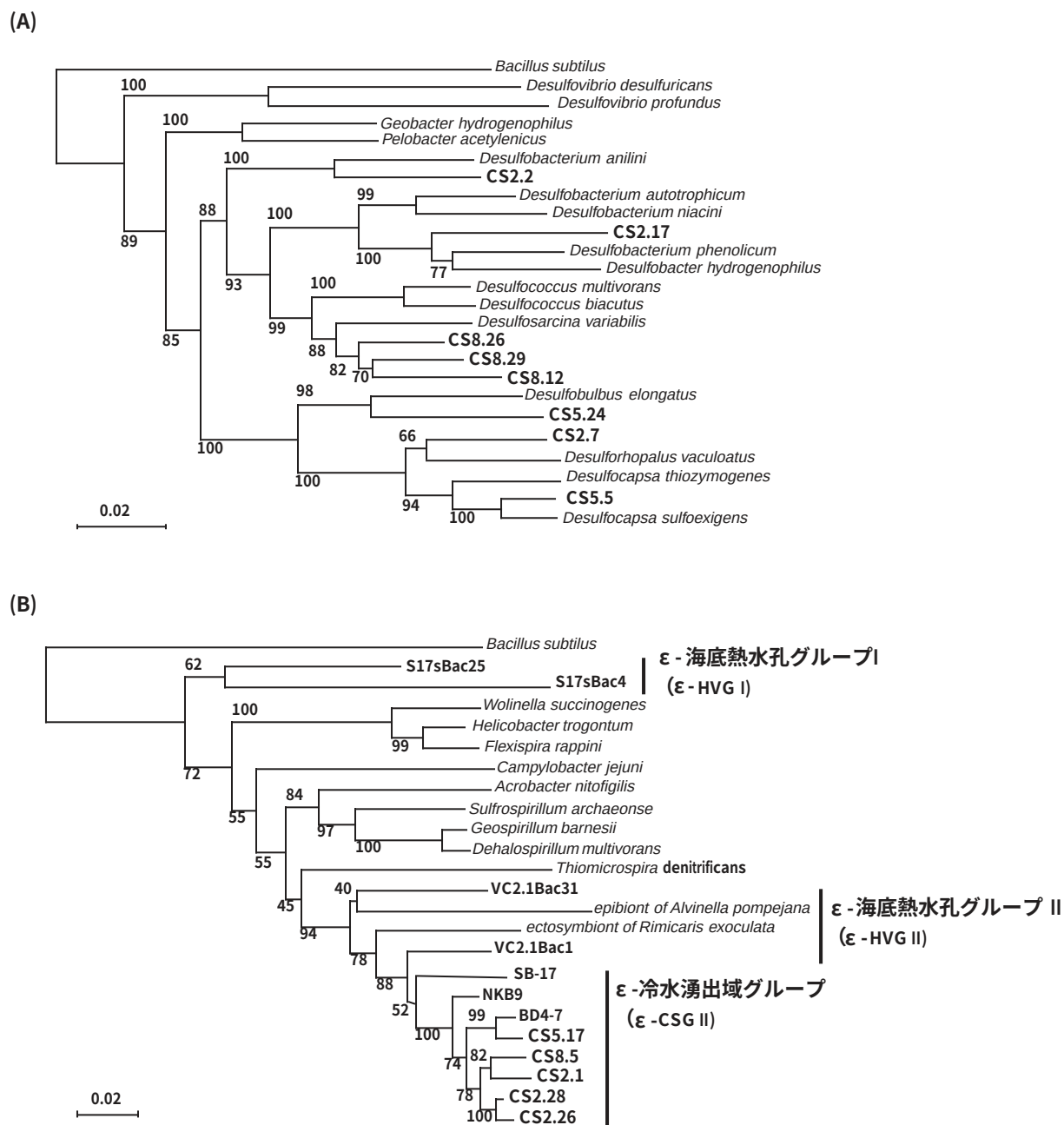


図4 日本海溝冷水湧出域から検出されたcrDNAの分子進化系統樹。(A)δ-プロテオバクテリア, (B) ε-プロテオバクテリア。系統樹はNJ法によって作成した。分岐の数値は100回のブートストラップ値を示す。

Fig. 4 Phylogenetic relationship between the representative crDNA clone sequences from the cold seep sediment and rDNA sequences of related pure cultures and environmental clones among subclass of δ- (A) and ε-Proteobacteria. The trees were constructed by neighbor-joining analysis. The values of 100 bootstrap trial replications are given for nodes in trees.

近縁であることが示唆された(表4A)。

また ε-プロテオバクテリアでは, Guaymas Basinの熱水孔域に隣接する炭化水素に富んだ冷水湧出域の堆積物中に検出されたrDNA遺伝子と94%前後の相同性を示した配列が優占的に検出された(表2) (Phelps et al. 1998)。また, 大西洋中央海嶺の海底熱水孔に直接設置したベントキャップから検出されたVC2.1 Bac1と93%程度の相同性を示す配

列が検出された(表2) (Reysenbach et al. 2000)。海洋環境中から検出された ε-プロテオバクテリアはほとんどが海底熱水孔環境もしくは冷水湧出環境であり, 代表塩基配列の系統解析の結果, それらの進化系統はジオグラフィカルな分岐を示した。熱水孔環境由来の ε-プロテオバクテリアは ε-サブクラスの根本付近から分岐する ε-海底熱水孔グループI(ε-HVG I: ε-proteobacterial Hydrothermal Vent

Group I)と、下流に位置する ϵ -海底熱水孔グループII (ϵ -HVG II: ϵ -proteobacterial Hydrothermal Vent Group II)の2種類のグループに分けられる。一方、日本海溝や南海トラフなどで検出された ϵ -プロテオバクテリアの系統枝(Li et al. 1999a; 1999b)は、Guaymas Basinの熱水孔域に近い場所の冷水湧出域から検出されたSB-17を境に、 ϵ -HVG IIの下流に ϵ -冷水湧出域グループ(ϵ -CSG: ϵ -proteobacterial Cold Seep Group)を形成している(表4B)。進化系統樹における環境rDNA配列の分布から、おそらくは ϵ -CSGと ϵ -HVG IIに属する細菌は、互いに類似する硫化水素に富む酸化還元境界環境に生息し、 ϵ -CSGは ϵ -HVG IIが生息する海底熱水孔環境から断層面に沿った冷水湧出域に進化・適応したものと推察される。

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、22の主要な断片長を示すピークが検出された(図5)。ピーク4と5は検出された δ -プロテオバクテリアの制限酵素断片長一致している(ピーク4; CS5.5, CS5.24 [93bp], ピーク5; CS8.12, CS8.26, CS8.29 [95bp])。また、ピーク14, 15, 16はそれぞれ ϵ -プロテオバクテリアに属するCS2.1 [538bp], CS5.17 [544bp], CS2.26 [547bp]と一致している。crDNAクローンタイプ解析の結果と同様に、T-RFLP解析によっても δ 及び ϵ -プロテオバクテリアの優占が示され、尚かつ δ -プロテオバクテリアのcrDNAに相当するピーク4と5が深くなるにつれ減少する傾向にあり、逆に ϵ -プロテオバクテリアのcrDNAに相当するピーク14, 15, 16が増加する傾向が認められた。

3. まとめ

1993年にDemingとBarossは熱水プルーム中に存在する超好熱菌の存在から深海底熱水孔環境は「地下生物圏の窓」

であるとの学説を発表した(Deming and Baross 1993)。冷水湧出域の物理的因子や地球化学エネルギーの勾配は海底熱水孔環境に及ばないものの、海底下から硫化水素に富む還元的な水が湧出する点など両者の共通項は多い。特に海水と湧出水の間に生じる酸化還元フロントは、海洋性 ϵ -プロテオバクテリアの限られた生息場所となっている。また、分子生物学的手法による微生物群集構造の解析は、生態学的意義のみならず分離・培養による新規微生物資源の獲得にとって重要である。さらに、「地下生物圏の窓」の研究は、将来的に海底下の掘削コア試料を分析する際の表層域でのレファレンスとして大変重要である。本研究では、DNAよりも分解されやすいRNAを用いた解析によって、より生きている微生物の生態を高解像度で評価することができた。また、 δ -プロテオバクテリアに属する硫酸還元菌と硫黄酸化細菌と思われる ϵ -プロテオバクテリアの深海底冷水湧出域での優占は、微生物による海洋の硫黄循環に大きく寄与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) Deming JW, Baross JA. 1993 Deep-sea smokers: windows to a subsurface biosphere? *Geochim Cosmochim Acta* 57 : 3219-3230.
- 2) DeLong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5685-5689.
- 3) Inagaki F, Hayashi S, Doi K, Motomura Y, Izawa E, Ogata S. 1997 Microbial participation in the formation of

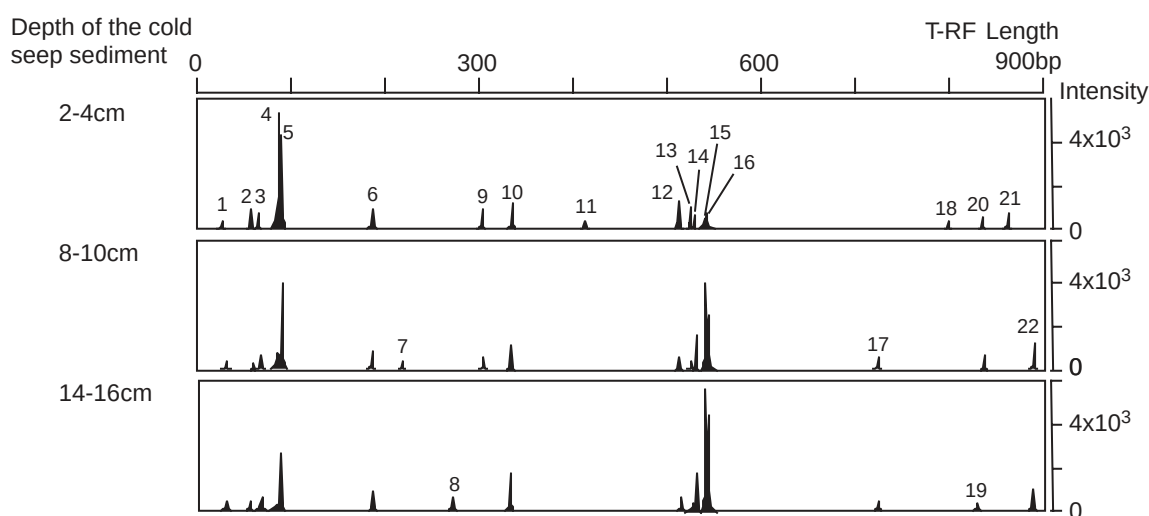


図5 T-RFLP解析による冷水湧出域堆積物のバクテリア群集構造の鉛直変化。

Fig. 5 Shift of bacterial community structures in the cold seep sediment analyzed by T-RFLP using RT-PCR mediated crDNA fragments.

siliceous deposits form geothermal water and analysis of the extremely thermophilic bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* 24 : 41-48.

- 4) 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.
- 5) 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 seafloor environment. *Extremophiles* 5 : 385-392.
- 6) Inagaki F, Sakihama Y, Takai K, Komatsu T, Inoue A, Horikoshi K. 2002. Transition of microbial community structures and presence of unusual microorganisms in a deep-sea rock. *Geomicorbiol J* 19 (in press).
- 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) Li L, Kato C, Horikoshi K. 1999a Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench. *Mar Biotechnol* 1 : 391-400.
- 9) Li L, Kato C, Horikoshi K. 1999b Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers Conserv* 8 : 659-677.
- 10) 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.
- 11) Orphan VJ, Hinrichs K-U, Ussler III W, Paull CK, Taylor LT, Sylva SP, Hayes JM, DeLong EF. 2001 Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 67 : 1922-1934.
- 12) 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.
- 13) Phelps CD, Kerkhof LJ, Young LY. 1998 Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralize benzene. *FEMS Microbiol Ecol* 27 : 269-279.
- 14) Porter KG, Feig YS. 1980. The use of DAPI for identifying and counting microflora. *Limnol Oceanogr* 25 : 943-948.
- 15) Reysenbach A-L, Longnecker K, Kirshtein J. 2000 Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* 66 : 3798-3806.
- 16) Stetter KO, Huber R, Blöchl 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.
- 17) Takai K, Horikoshi K. 1999a Genetic diversity of Archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152 : 1285-1297.
- 18) 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.
- 19) Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K. 2001. Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol* 67 : 3618-3629.
- 20) 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.

(原稿受理：平成14年1月15日)