

日本海深度3,100mの海底に見い出された巨大バクテリアマットにおける高圧下の微生物学的多様性の解析

荒川 康*¹ 加藤 千明*² 能木 裕一*³ 岡村 行信*⁴ 竹内 章*⁵
宇佐美 論*¹ 掘越 弘毅*^{1, 3}

2001年度「しんかい6500」第624潜航において、日本海東縁部奥尻海嶺の海底で巨大バクテリアマット群を確認した。我々は日本海奥尻海嶺域の微生物の多様性を総合的に理解することを目的とし、無菌採泥及び、保圧採泥等を行った。得られたサンプルから直接DNAを抽出し、微生物の16S rDNA塩基配列を決定し微生物学的多様性解析を行った。加圧下ならびに大気圧下で微生物の分離も行い、DNA解析により16S rDNA塩基配列を決定し、多様性解析の結果と比較した。その結果バクテリアマットからは硫酸還元菌と思われる δ -プロテオバクテリアグループが数多く検出され、硫黄酸化細菌を中心としてその下部に種々の硫酸還元菌が存在することが示唆された。加圧下で分離した菌は全て*Moritella*属であり、大気圧下で分離した菌は*Shewanella*属、*Colwellia*属、*Pseudomonas*属も含まれていたことより、硫酸還元菌の周りに*Moritella*属を中心とする高水圧下に耐性の微生物が多く存在することが分かった。

キーワード：バクテリアマット、冷水湧出域、16S rDNA、微生物学的多様性

Microbial diversity of the bacterial mat sediment at a depth of 3,100m in Japan Sea

Shizuka ARAKAWA*⁶ Chiaki KATO*⁷ Yuichi NOGI*⁸ Yukinobu OKAMURA*⁹
Akira TAKEUCHI*¹⁰ Ron USAMI*⁶ Koki HORIKOSHI*^{6, 8}

Bacterial mat sediments were collected from at a depth of 3,100m in Japan Sea by the manned submersible *SHINKAI 6500* (dive #624, July 2001). We analyzed the microbial diversity of the bacterial mat sediment. Using the DNA extracted directly from the bacterial mat sediment samples, 16S rDNAs were amplified by PCR. The sequences of the amplified 16S rDNA selected by restriction fragment length polymorphism analysis were determined and compared with sequences in DNA databases. From the sequencing results, the bacterial mat sediment samples found abundantly delta-Proteobacteria and suggested that sulfate-reducing bacteria and sulfur-oxidizing bacteria existed. All the bacteria isolated from high pressure conditions were the genus *Moritella*. However, the bacteria isolated from atmospheric pressure condition were not only contained the genus *Moritella* but also the genus *Shewanella*, *Colwellia*, and *Pseudomonas*.

Keyword : Bacterial mat, cold-seep, 16s rDNA, microbial diversity

-
- * 1 東洋大学大学院 工学研究科応用化学専攻
 - * 2 海洋科学技術センター海洋生態・環境研究部
 - * 3 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
 - * 4 独立行政法人 産業総合研究所
 - * 5 富山大学 理学部
 - * 6 Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Toyo University
 - * 7 Marine Ecosystems Reserch Department, JAMSTEC
 - * 8 Frontier Research System for Extremophiles, JAMSTEC
 - * 9 Institute for Marine Resource and Environment, AIST
 - * 10 Department of Science, Toyama University

1. はじめに

深海は砂漠のような世界で生物密度の稀薄な場所であると考えられていた。しかし、「深海のオアシス」といわれる、驚くほど生物密度の濃い場所が点在することが知られてきている。これらの生物群集は熱水噴出孔生物群集と呼ばれており、そのバイオマスが各種の化学合成微生物群により支えられていることが分かってきている。また、深海底には熱水だけではなく、海底下の様々な化学物質を溶かし込んだ冷水が染み出す環境が存在し、こういった場所にも数多くの微生物が存在している。

日本海溝は、ユーラシアプレートに太平洋プレートが沈み込むことにより構成されている(図1)。太平洋プレートが沈み込む際、ユーラシアプレート側に大きな圧力が加わる。この圧力により断層が形成され、海底下にある間隙水が、断層を通過して海底面から湧き出る。このような現象を冷水湧出現象という。冷水湧出現象が起こる地点では、湧出してくる冷水に含まれる二酸化炭素や水素等がメタン生成古細菌によりメタンとなる。それが海水中に大量に含まれる硫酸イオンと共に硫酸還元菌のコンソーシアムに取り込まれ、硫化水素が生成される。これらの生物化学反応は、シロウリ貝やハナシ貝等の化学合成二枚貝が生息している底泥中で起こる。生成された硫化水素は二枚貝のえらによってその体内へ取り込まれ、貝に共生している硫黄酸化細菌により酸化され、硫酸イオンとして海水中へと放出される。そして二枚貝は、この反応時に生産される約190kcal/molのエネルギーに依存

することにより生きている(長沼, 1996)。このような化学物質の循環サイクルモデルが提唱された(図2; Li et al., 1999a)。深海底におけるバクテリアマットやシロウリ貝等の化学合成生物群集の存在は、冷水湧出現象に伴ったものであることが指摘されている(Li et al., 1999a, 1999b)。

1999年「しんかい6500」第485潜航、日本海東縁部奥尻海嶺における潜航調査により、1993年に発生した北海道南西沖地震(7.8; 42°47'N-139°12'E)の震源地付近にバクテリアマット群が発見された(Takeuchi et al., 2000)。海底下における地殻変動によってできた断層等に沿って通ってきた水が、冷水湧出現象を引き起こし、バクテリアマットが形成されたと考えられている。

これまで海底下の冷水湧出域における微生物の多様性の解析は、南海トラフ、日本海溝陸側斜面においてなされてきたが、これらはいずれもシロウリ貝群集周辺の泥の解析をおこなったもので、バクテリアマットを対象としたものではなかった。そこで、同じ冷水湧出域においてもバクテリアマットが形成される場合に、特徴的な微生物コミュニティの実態は明らかではなかった。

そのため、日本海奥尻海嶺域東縁部に存在する巨大バクテリアマットサンプルから直接DNAを抽出し、これまでの冷水湧出域生物群集における微生物学的多様性を総合的に理解することを目的とし、本研究を行った。また、新規深海微生物の分離を目的とし、継代培養の菌液から微生物の分離を行った。

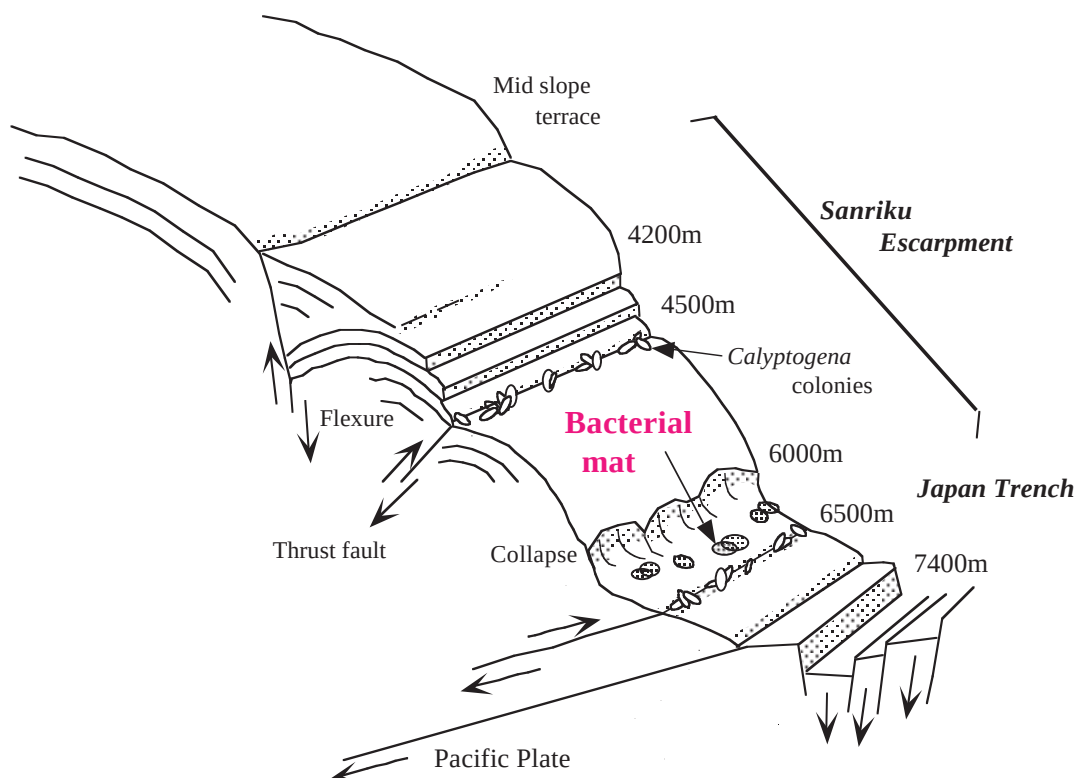


図1 日本海溝の断面図と冷水湧出域

Fig. 1 Structure of Japan Trench and cold-seepage.

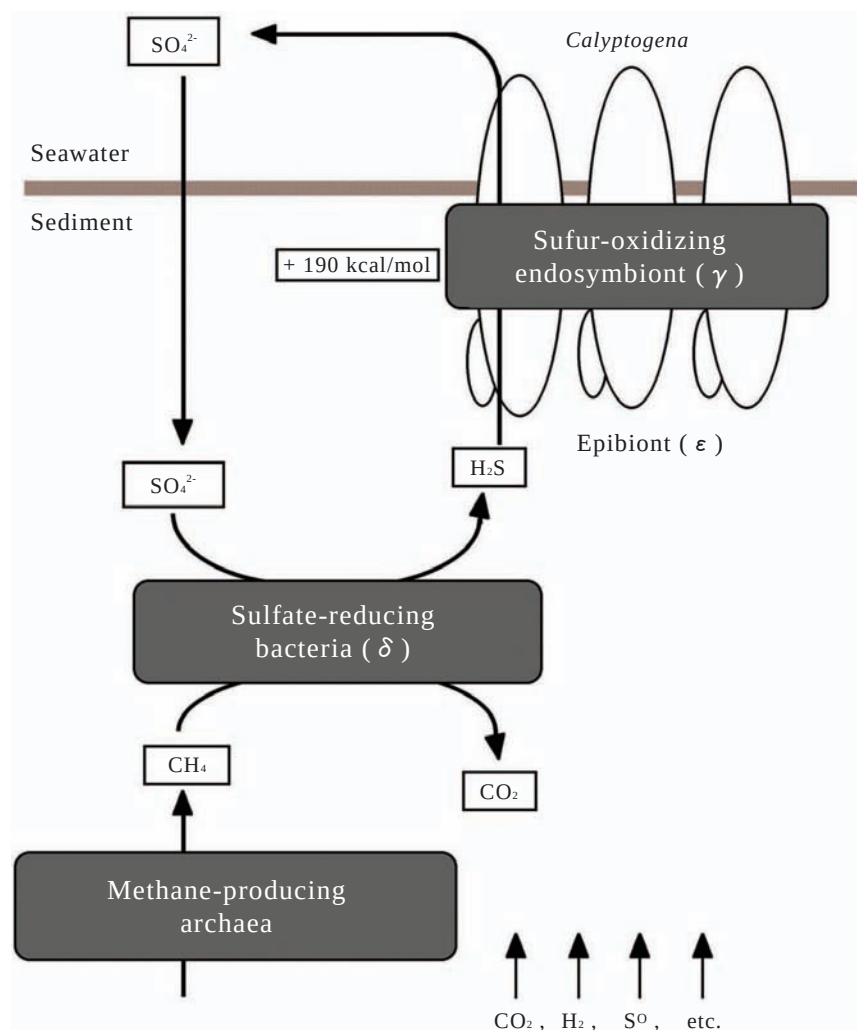


図2 冷水湧出域の化学合成2枚貝群集における微生物学的多様性とイオウサイクルのモデル図

Fig. 2 A model of sulfur circulation around the *Calyptogena* communities in the cold-seep environment, and its bacterial structures.

2. 材料と方法

2.1 試料及び分離方法

2001年「しんかい6500」による調査潜航(第624潜航)によって、後志トラフ南東部・茂津多岬沖(42°42.0634N, 139°40.0857E)の深度3,145mの海底に巨大バクテリアマットを確認し、無菌採泥および保圧採泥を行った。

保圧採泥されたサンプルは深海微生物実験システムにより、Marine Broth 2216培地で30MPa, 50MPa, 4°Cの条件で3代加圧継代培養を行った。

加圧継代培養で得られた菌液を、加圧培養用フィルムバック3枚に各々1μl, 10μl, 100μl入れ、ここに30°C程度に保温した液状の1%低融点寒天Marine Broth 2216培地を20ml加え懸濁した。バック内に空気が残らないようにしてシーラーで密封し、直ちに氷冷した。このバックをあらかじめ氷冷しておいた加圧容器に入れ、培養圧力(30MPa, 50MPa)にて、4°Cの条件で2週間、高圧力培養を行った。フィルムバック内で良好に生育した微生物の単一コロニーを、実体顕微鏡下で注射器を用いて各々10コロニーずつ採

取した。採取した菌液を氷冷したMarine Broth 2216培地に懸濁し、4°Cで数日間、加圧培養を行った。

同様に、加圧継代培養で得られた菌液を、Marine Broth 2216寒天培地プレートに各々5μl, 100μl滴下し、プレート上に広げ、4°Cで1週間、大気圧培養した。プレート上で良好に生育した微生物の単一コロニーを新しいプレート上に8コロニー線系し、4°Cで数日間培養した。

2.2 DNAの抽出

バクテリアマットサンプルからのDNAの抽出は、Ultra Clean™ Soil DNA Isolation Kit(MO BIO社)を用いて行った。2mlのビーズ入りチューブに0.25gのバクテリアマットサンプルを入れ、注意深く混合した。S1溶液を60μl加え、軽く混合した。さらにIRS溶液を200μl加え、ボルテックスで10分間攪拌した。10,000rpm, 4°Cの条件で30秒間遠心分離を行い、上清450μlを新しい1.5mlチューブに移した。ここに250μlのS2溶液を加え、ボルテックスで5秒間攪拌した。5分間氷上に放置した後、同条件で1分間遠心分離を行った。上清

450 μ lを新しい1.5mlチューブに移した。ここに900 μ lのS3溶液を加え、ボルテックスで5秒間攪拌した。チューブ内の700 μ lを、スピンフィルター付きの新しいチューブに移し、同条件で1分間遠心分離を行い、濾過液を捨てた。さらに、同じスピンフィルター付きのチューブに残液約650 μ lを移し、同条件で遠心分離を行い、濾過液を捨てた。液体が残っていない状態で、再度遠心分離を行った。次に、S4溶液を300 μ l加え、同条件で30秒間遠心分離を行い、濾過液を捨てた。50 μ lのS5溶液をフィルター上に滴下し、同条件で遠心分離を行った。スピンフィルターを取り除き、フィルターカップ残液を精製DNAサンプルとした。

各加圧継代培養からのDNAの抽出は、約1lの培養液を500ml遠心管プラスチック容器3本に分注し、6,000rpmで20分間遠心分離を行った。上清を捨て沈殿物に人工海水(NaCl 3.0g, KCl 0.7g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.3g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.8g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, 滅菌蒸留水1l)を約5mlずつ加え懸濁し、50mlチューブに移した。さらに人工海水約10mlを1本のプラスチック容器に加え、懸濁した。この懸濁液を用いて残りの2本も懸濁し、50mlチューブに加え、同条件で15分間遠心分離を行い集菌した。集菌後、上清を捨て溶液[50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA (pH8.0)]約2mlを加え懸濁した。Lysozyme (10mg/ml) 200 μ lを添加し、軽く攪拌しながら20分間氷上に放置した。EDTA溶液(0.5M)を200 μ l加え、軽く混合した。次に、10% SDS溶液を120 μ l加え、軽く混合した。RNase溶液(10mg/ml)を10 μ l加え、37°Cで30分間放置した。さらに、10 μ lのProteinase K (20 μ g/ml)を加え、45°Cで60分間放置した。等量のTE溶液[10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH8.0)]で飽和したフェノールを加え、注意深く混合した。フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出で除蛋白を行った。DNAはエタノール沈澱によりガラス棒に巻取り、乾燥後、500 μ lのTE溶液に溶解し、これを精製DNAサンプルとした。

分離した微生物からのDNAの抽出は、分離した微生物の培養液を6,000rpm, 4°Cの条件で10分間の遠心分離を行い集菌した。これ以降の作業は各加圧継代培養からのDNAの抽出と同様な方法で、菌体量が約1/10のスケールで行った。

DNAの抽出後、1.2%アガロースSで電気泳動を行い、DNA量の推定を行った。

2.3 16S rDNAの増幅

16S rDNA部分を増幅するためのプライマーとして、Eubac 27F (10pmol/ μ l)とEubac 1492R (10pmol/ μ l)を各1 μ l, Ex Taq Polymerase (5U/ μ l) (宝酒造)を0.25 μ l, DNA溶液(10ng/ μ l)5 μ lを加え全量を50 μ lとした。DNAの変成を95°Cで90秒、プライマーのアニーリングを55°Cで90秒、プライマーエクステンションを72°Cで90秒のサイクルを30回行った(Kato et al., 1997)。増幅されたDNAは1.2%アガロースSで電気泳動を行い、PCR産物の確認を行った。

2.4 ライゲーション及びトランスフォーメーション

TA Cloning® Kit (Invitrogen™)を用いて、そのプロトコルに従って行った。新しいチューブにSterile Water 5 μ l, 10×Ligation Buffer 1 μ l, pCR® vector (25ng/ μ l) 2 μ lを加えた。ここにPCR産物(～10ng) 1 μ l, T4 DNA Ligase 1 μ lを加え、静かに混合した。14°Cの浴槽で一晩培養後、チューブを氷上で冷やし、あらかじめ氷冷しておいたOne Shot cells (INV α F')に β -メルカプトエタノール(0.5M)を2 μ l加えた。次に培養液を2 μ l加え混合した。30分間氷冷した後、42°Cの恒温槽中に30秒間静置し、さらに氷冷した。クリーンベンチ内で、チューブにKit付属のSOC培地(Tryptone, Yeast extract, NaCl, KCl, MgCl_2 , MgSO_4 , Glucose)を250 μ l加え、振とう機で37°C, 約160rpmの条件で1時間培養した。LB Amp50プレート(Tryptone, Yeast extract, NaCl, 寒天, Ampicillin)にX-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside; 20mg/ml, ナカライテスク社) 40 μ lをプレート一面に塗布し乾燥後、SOC培地の培養液約100 μ lを塗布し、37°Cのインキュベーターで一晩培養した。

2.5 インサートチェック

PCRチューブにInsert Check-Ready-(TOYOBO)溶液を20 μ l入れ、一晩培養したプレートのうち白色のコロニーを選別した。選んだコロニーを爪楊枝の先で軽く突き、先端をPCRチューブに入れ懸濁した。これを94°Cで4分反応させた後、DNAの変成を94°Cで20秒、プライマーのアニーリングを60°Cで5秒、プライマーエクステンションを72°Cで30秒のサイクルを30回行った。遺伝子導入が確認されたクローン中の16S rDNAを増幅させるために、遺伝子導入が確認された反応液をテンプレートとして1 μ l加え、全量を50 μ lとし、PCR反応を行った。反応条件は16S rDNAの増幅と同条件で行った。

2.6 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析

10×Buffer 2 μ l, *Msp*I (TOYOBO; 20 units/ μ l) 0.25 μ l, *Rsa*I (TOYOBO; 12 units/ μ l) 0.25 μ l, インサートチェックのPCR反応液10 μ lを加え全量を20 μ lとし、37°Cのインキュベーターに3時間静置した。

3%アガロースX (ニッポンジーン)で電気泳動を行い、切断パターンをもとに16S rDNAのクラス分けを行い、各クラスから代表を一つ選別した。

2.7 Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 処理

TE溶液2.4 μ l, SAP (USB™) 0.3 μ l, ExoI (USB™) 0.3 μ lを加え、ここにRFLP分析より選別した各代表のPCR反応液を40 μ l加えた。37°Cで20分間酵素処理を行い、83°Cで30分間酵素を失活させて、未反応DNAを分解した。

2.8 16S rDNAシーケンスと系統樹

SAP処理を行ったサンプルの16S rDNAシーケンスは、PCR法で遺伝子を増幅し、オートシーケンサーを使用して解析した。DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit [アマシャム ファルマシア バイオテック(株)]を使用し、そのプロ

トコールに従って行った。プライマーとしてEubac 27F (1pM), Eubac 350F (1pM), Eubac 520R (1pM), Eubac 780F (1pM), Eubac 907R (1pM), Eubac 1100F (1pM), Eubac 1492R (1pM) を各々5 μ l, SAP処理を行った16S rDNA溶液を4 μ l加えた。20 μ lのPCR反応液は, DNAの変成を95°Cで20秒, プライマーのアニーリングを50°Cで15秒, プライマーエクステンションを60°Cで1分のサイクルを30回行い, 16S rDNA部分を増幅させた。これをDNAシーケンサー (ABI model 373S) でシーケンスを行った。これにより得られた16S rDNAシーケンスのデータは, DNA Sequencing software (PERKIN ELMER Corp.)により解析し, Factura™ (373 Sequencing system DATA collection ABI Prism™) およびAuto Assembler™ (PERKIN ELMER Corp.)を用いて16S rDNAの結合編集を行った。

FASTAのデータベースから, 結合編集した塩基配列の相同性検索を行い, 系統樹に加える既知種の塩基配列を選別した。

近隣結合法 (NJ法, neighbor-joining method) を利用し, ClustalW 1.7 (Thompson et al., 1994) プログラムを用いてNJ系統樹を作成した。

3. 結果

RFLP分析によって無菌採泥されたバクテリアマットで21タイプ, 各加圧継代培養と加圧下での分離株で1タイプ, 大気圧下での分離株で3タイプの微生物に分けられた。これらの各タイプについて16S rDNAの全塩基配列を決定し解析を行った。その結果, 無菌採泥されたバクテリアマットからは, 好圧性*Moritella*属に近縁な微生物を始め, 硫酸還元菌と思われる δ -プロテオバクテリアグループが数多く検出された。しかしながら, 得られた多くの塩基配列はデータベース上で近縁な微生物がなかった。各加圧継代培養からは30MPa, 50MPaのいずれの継代からも好圧性*Moritella*属細菌の配列のみが得られた。同様に, 加圧下で分離した微生物は全て*Moritella*属細菌の配列であった。しかし, 今回分離された菌において大気圧との生育比較を行った結果, 好圧性菌の性質は見られなかった。一方, 大気圧で分離した微生物は*Moritella*属細菌, *Shewanella*属細菌, *Colwellia*属細菌, そして*Pseudomonas*属細菌の4通りのパターンが得られた。(図3)にこれらのシーケンスを含む系統樹を示す。

4. 考察

バクテリアマットサンプルからは, 好圧性*Moritella*属に近縁な微生物を始め, 硫酸還元菌と思われる δ -プロテオバクテリアグループが数多く検出されたが, 多くの塩基配列はデータベース上で近縁な微生物がなく, これは全く新しい微生物コミュニティである可能性が示唆された。マットの主役と思われる硫酸酸化細菌の近縁配列はあったが, 既知のものとの相同性は極めて低かった。

通常2,500mを超える深海底からは, 好圧性好冷性の*Shewanella* Group 1が分離されるが, ここで分離された*Shewanella*属細菌は浅海陸域に存在する中温性の*Shewanella* Group 2だった (Kato and Nogi, 2001)。また, 今

回分離された*Shewanella*属細菌, *Moritella*属細菌, *Colwellia*属細菌, *Pseudomonas*属細菌の16S rDNA配列の最近縁種との相同性は, それぞれ97.4%, 99.9%, 98.1%, 99.9%であるため, 特に, *Shewanella*と*Colwellia*属細菌で新規微生物が含まれている可能性もある。

各加圧継代培養からは30MPa, 50MPaのいずれの継代からも*Moritella*属細菌の配列のみが得られた。同様に加圧下で分離した微生物は, 全て*Moritella*属細菌の配列であったことから, 今回の条件ではこの種の耐圧性深海微生物のみが選択的に生育することが判明した。

(図4)に示すように, 日本海奥尻海嶺域のバクテリアマットの微生物コミュニティは, 表層に存在する硫酸酸化細菌を中心として, その下部に硫酸還元菌と思われる δ -プロテオバクテリアグループが多く存在することが示唆された。そして, その周りには*Moritella*属細菌を中心とする耐圧性微生物が多く存在することが分かった。またバクテリアマット付近の海水の解析結果からは, 微生物起源と見られる軽い同素同位体比のメタンが大量に湧出していることが判明した (Okamura, et al., 2002)。さらに, 系統樹より, 南海トラフや太平洋側において, 常に見られる ϵ -プロテオバクテリアグループが検出されなかった。

これらより, 太平洋側の海溝域陸側斜面とは異なる日本海特有の微生物群集であることが示唆された。このことは, 日本海が一般海洋から閉ざされた海であるという, 地質学的な考察と一致している。今後は, 日本海域における地殻変動と微生物学的多様性の解明, 硫酸酸化細菌や, 硫酸還元菌の分離等を目的とした更なる検討を行っていく予定である。

5. 謝辞

最後に本研究を行うに当たり, 「しんかい6500」の潜航チームの方々, 並びに「よこすか」の乗組員の皆様に感謝を申し上げます。

6. 引用文献

- 1) Kato, C., Li, L., Tamaoka, J. and Horikoshi, K.: Molecular analyses of the sediment of the 11000m deep Mariana Trench. *Extremophiles*, 1, 117-123 (1997).
- 2) Kato, C. and Nogi, Y.: Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35, 223-230 (2001).
- 3) 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 6,400m. *Mar. Biotechnol.*, 1, 391-400 (1999a).
- 4) Li, L., Guenzennec, J., Nichols, P., Henry, P., Yanagibayashi, M. and Kato, C.: Microbial diversity in Nankai Trough sediments at a depth of 3843 m. *J. Oceanograph.*, 55, 635-642 (1999b).
- 5) 長沼毅: 科学, 66, 492 (1996).
- 6) Okamura, Y., Satake, K., Takeuchi, A., Gamo, T., Kato, C., Sasayama, Y., Nanayama, Ikehara, K. and Kodera, T.:

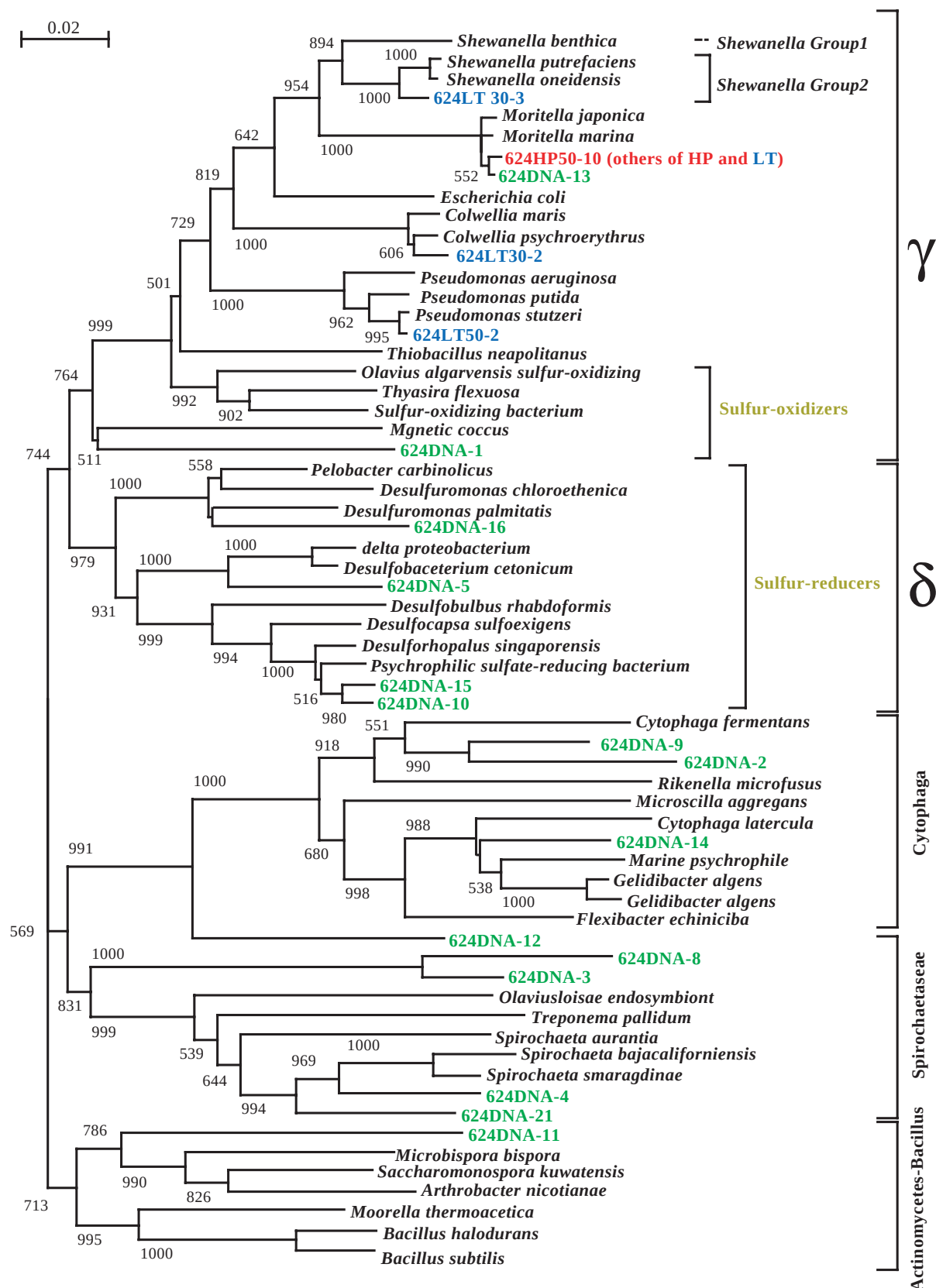


図3 16S rDNAによる系統解析樹はバクテリアマットに含まれていた微生物、赤は圧力下で分離した微生物、青は大気圧下で分離された微生物を示す。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the cold seep bacterial community based on the 16S rDNA sequences. The bacterial sequences contained in bacterial mats are indicated by green. The isolated bacteria from high pressure cultivations and atmospheric conditions are indicated by red and blue, respectively.

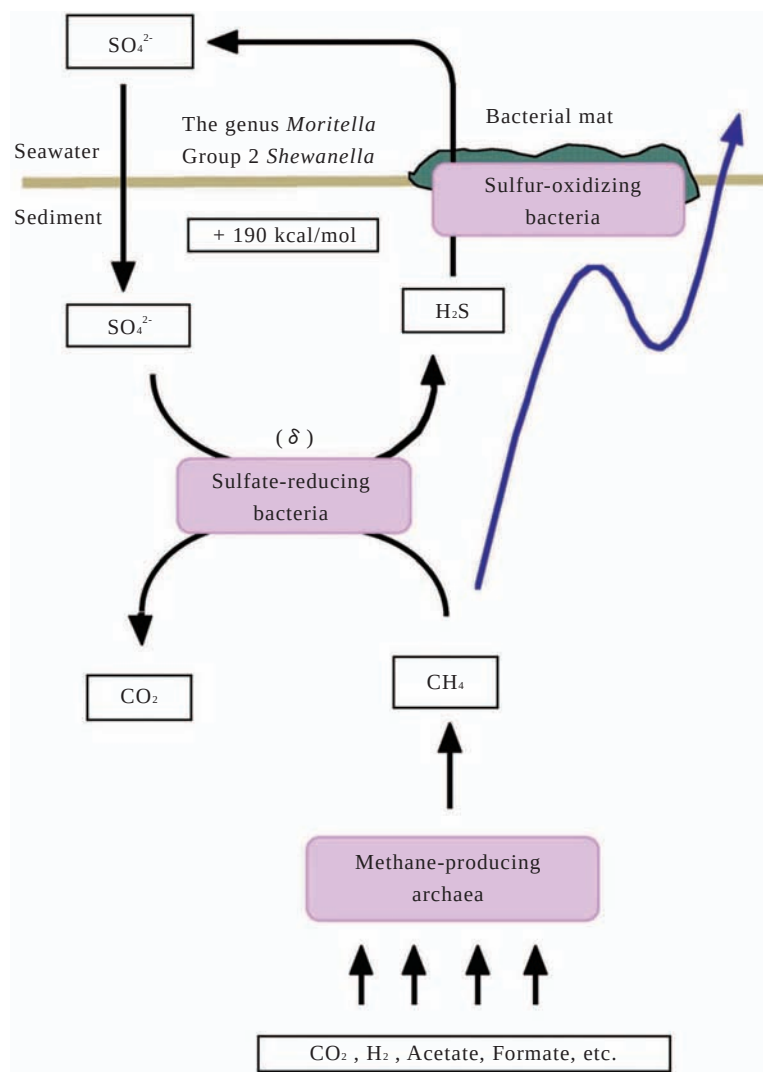


図4 日本海のパクテリアマットにおける微生物のモデル
Fig. 4 A model of bacterial structures in the Japan Sea bacterial mat.

ern margin of the Japan Sea. _preliminary results of Yokosuka/Shinkai 6500 YK01-06 Cruise-. JAMSTEC Deep Sea Res., 20, 77-114 (2002).

- 7) Takeuchi, A., Okamura, Y., Kato, Y., Ikehara, K., Zhang, J., Satake, K., Nagao, T., Hirano, M. and Watanabe, M.: Large earthquakes and bottom disturbances in the Okushiri ridge along the eastern margin of Japan Sea. JAMSTEC J.

Deep Sea Res., 16, 29-46 (2000).

- 8) Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680 (1994).

(原稿受理:平成14年7月31日)

