

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月30日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770099

研究課題名（和文） 鯨骨域における微生物多様性と変遷に関する研究

研究課題名（英文） Diversity and Succession of Microorganism in Whale-fall

## 研究代表者

宮崎 征行 (MIYAZAKI MASAYUKI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究副主事

研究者番号：50399573

## 研究成果の概要（和文）：

鯨骨域における原核生物の群集構造解析（環境抽出 DNA クローン解析）の調査を行った。その結果、アーキアについては変遷過程において異なるメタン菌が検出された。バクテリアについてはその多様度の高さにより全容を把握できていない。また、動物の骨などに生息する多毛類の一種（ホネクイハナムシ類）に共生している共生細菌の分離を行った。ホネクイハナムシ類共生菌については共生細菌の系統群に属する株5株の単離に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

The diversity and succession of microorganism in whale-fall were investigated. As the result, As for the archaea, the different methanogen was detected at succession process. However the bacteria could not gain an understanding of the whole by the height of the diversity. In addition to this, the symbiotic bacteria in *Osedax* spp. (Polychaeta) were isolated by agar plate. We succeeded in the isolation of five strains to belong to the phylogenetic group of the symbiotic bacteria.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,555,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：鯨骨生物群集・微生物多様性・変遷・ホネクイハナムシ類

## 1. 研究開始当初の背景

これまで鯨の遺骸などに形成される生物群集の研究は、1987年にカリフォルニア沖のサンタカタリナ海盆で発見された鯨の遺骸に依存した生物群集（鯨骨生物群集）である (Smith *et al.*, 1989)。この鯨骨生物群集は周囲の海底の生物群集とは異なる生態系を示し、熱水／冷水域の生物群集と酷似していた。この生物群集のエネルギー源は、鯨遺骸中に含まれる脂質などの有機物の腐敗

により発生するメタンや硫化水素などの還元的物質であり、熱水／冷水域と同様に、それら化学物質をエネルギーとする化学合成細菌が生産者であった。したがって、海底に不定期に落下する鯨骨が飛び石となり、熱水／冷水域に分布する生物の分散の一助となっているというステップストーン仮説が提唱された。実際、鯨骨生物群集を構成する生物種の中には熱水／冷水域で構成されている生物種が含まれていることが分子生

物学的手法により確認されている (Baco *et al.*, 1999)。しかし、現在までのところ、鯨骨域と熱水/冷水域に出現する生物は非常に限られており、また鯨骨域に暮らす動物の子孫が他の化学合成環境に定着した事を示す報告はない。

鯨の遺骸に形成される生物群集は、その分解過程により4つのステージに分けられている。0.5-1.5ヶ月~4ヶ月-24ヶ月(2年)は、Necropagous stage (A) と呼ばれ、腐肉食者(サメ/スタウナギ/甲殻類等)が集まり死骸の軟組織を高速で消費するステージである。4ヶ月-18ヶ月(1.5年)~24ヶ月(2年)は Osteolytic stage (B) で、周辺堆積物や鯨骨上に高密度だが多様性の低い群集(多毛類/甲殻類)が生息する。24ヶ月(2年)~48-600ヶ月(4-50年)は Sulphophilic stage (C) で、化学合成生物(化学合成細菌やその共生生物)を中心とした多様性の高い群集が生息する。48ヶ月(4年)以上は Suspension feeding stage (D) で周辺海域にも見られる種(懸濁物食者)によって形成される。これらのステージは海底の表面で見られる現象あり、鯨の遺骸から浸みだした脂質などの有機物は目に見えない海底下に染み込んでいく。染み込んだ表層では好氣的に、内部では嫌氣的な微生物による分解が行われていると考えられる。しかし、鯨骨生物群集は熱水/冷水域のような湧水活動による海水の循環は行われていない。また、循環が行われていなければ地球内部からの無機塩分のエネルギー供給もない閉鎖的空間である事が考えられる。では、海底下で分解を行う微生物はいったいどこから来るのか?その疑問にいくつかの仮説を立ててみた。

(1) 鯨骨の落下以前より海底下に存在している。

(2) 腐肉食者の付着や排泄物などから移動してくる。

(3) 海流により運ばれてくる。  
このように、海底下の循環が行われていなければ、沈降した海域により鯨骨生物群集を構成する生物種も大きく異なる事が考えられる。

これまでの鯨骨域の微生物叢の解析については、この鹿児島県野間岬沖鯨骨及びモンテレー湾鯨骨の2カ所しか行われておらず、データの乏しさゆえ、両極なものになってしまっている。そこで2005年4月上旬に熱海市に漂着し、相模湾初島北東沖に沈設されたマッコウクジラの遺骸の調査がカギとなる。これまで3回の調査を行い、沈設後9、16、32ヶ月後に調査が行われており、今後44、56ヶ月後の調査が行われる予定である。過去とこれから採取予定サンプルは、鯨骨分解過程の各ステージを網羅しており、微生物叢の遺伝子解析にはうってつけである。また、こ

れから採取予定のサンプルについては、鯨骨固有嫌気性微生物の分離培養を試み、生理生化学的特徴を明らかにする。本研究期間では、仮説(1)の部分に着目し、第3の鯨骨域における各ステージの微生物の役割が解明されると共に、それぞれの鯨骨域の生態学的特徴が明らかになると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の第1の目的は、砂漠のような通常海底に突如として出現する有機物の塊(鯨の遺骸等)に形成される生物群集における微生物の役割についての理解である。第2に鯨の遺骸などに形成される化学合成生態系を維持する微生物の単離を行うことである。さらには、深海底にスポット的に形成される生物群集の種の起源に関する知見を深めることが最終的な目標である。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプリング

相模湾初島北東沖に沈設されている Sagami 鯨 (35°04.99N, 139°13.014E, 928m)、Satomi 鯨 (35°04.929N, 139°12.978E, 923m) の2頭のマッコウクジラの遺骸の骨下もしくはその脇、それとコントロールとしてその周辺堆積物の採取を試みた。採取には海洋研究開発機構所有の調査船(なつしま、かいよう)及び無人潜水艇(ハイパードルフィン3000)により柱状採泥器を用いて、Sagami 鯨は沈設後9、16、32、44、49、56ヶ月、Satomi 鯨は1、5、13ヶ月の堆積物サンプルを採取した。また、鯨骨などの骨に生息し、体の一部に共生細菌を有するホネクイハナムシ類(多毛類の一種)についても採取した。

### (2) 遺伝子解析

採取したサンプルは船上にて凍結保存を行い機構に持ち帰った後、遺伝子抽出キットを用いてDNA抽出を行った。使用したプライマーセットは Archaea 用: Arc21F-Arc958R (DeLong, 1992) と Bacteria 用: Bac27F-Bac907R (Lane, 1991) を用いた。群集構造解析には tRFLP による制限酵素による切断パターン解析と 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った。tRFLP 解析で用いた制限酵素は *HhaI* を使用し、末端制限断片 (t-RFs) の決定には 3130xl ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) を使用した。16S rRNA 遺伝子のクローン解析は増幅された遺伝子サンプルをアガロースゲルで電気泳動を行い、目的サイズのバンドを切り出し、DNA 精製を行った。精製 DNA を TOPO TA cloning kit (Invitrogen) を用いて PCR 断片を pCR2.1 ベクターにライゲーションし、大腸菌への形質転換、青白選別法によるコロニーの選別、M13 プライマーを用いたインサートチェックを行った。適切なサイズの断片の導入が確認

されたクローンについて、3130x1 又は 3730x1 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列は DDBJ の BLAST による近縁種の検索を行った。また取得配列の系統位置を明確にするため ARB を用いた系統解析を行い、微生物種の系統群を決定した。

### (3) 微生物の単離

ホネクイハナムシ類の共生菌の分離には主に Marine Agar 2216 (Difco) を用いた。生育したコロニーは画線法により 2、3 回継代培養を行い、純化し単離した。得られた単離株について、16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析を行い、培養株の微生物種を決定した。得られた単離株については 10% グリセロール保存液中にて凍結保存を行った。また、菌根部に生息している共生細菌の確認については、菌根部から直接遺伝子を抽出した。16S rRNA 遺伝子のクローン解析については、先述した方法を用いてその配列を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子解析

鯨骨直下の表層及び深層部から得られたアーキアの 16S rRNA 遺伝子のクローン配列の系統解析 (概要) 結果を図 1 に示す。鯨骨域表層部と深層部から検出されたアーキアの系統的位置は *Methanomicrobiaceae* 科、*Methanosarcinaceae* 科と未培養系統群の MGI、MCG、DHVC、DHVE、DSAG、TMEG が検出された。

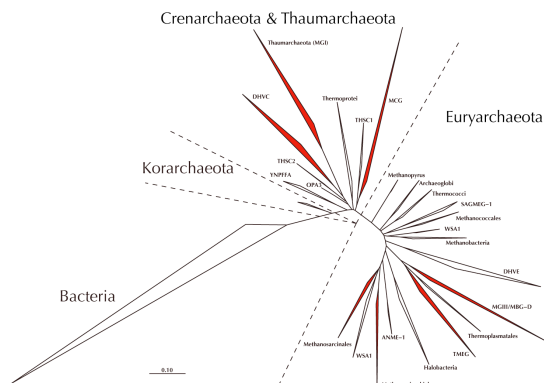


図 1 相模湾鯨骨域から検出したアーキアの系統的位置

メタン生成菌の 2 つの科の系統群は先行研究で行われたモンテレー湾の鯨骨域でも同様の系統群のアーキアが検出されている。

周辺域の堆積物と鯨骨直下の表層部及び深層部の堆積物については tRFLP 解析を行った。得られたピークの同定には先に得られたクローン解析結果から末端制限断片 (tRFs) について求めた。(図 2、3) 鯨骨直下堆積物表層部では 9、32、56 ヶ月目ではアンモニア酸化アーキアの MGI が優占して検出された。

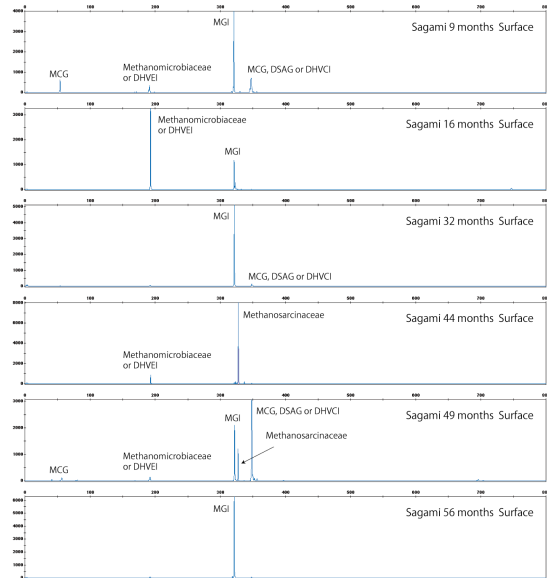


図 2 鯨骨直下における表層堆積物 (0-3 cm) の tRFLP 解析。鯨を沈設してから 9、16、32、44、49、56 ヶ月後 (上から)。

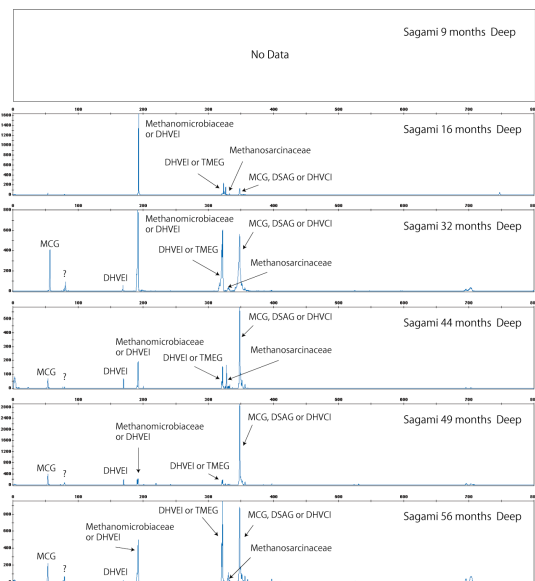


図 3 鯨骨直下における深層堆積物 (約 10 cm) の tRFLP 解析。鯨を沈設してから 9、16、32、44、49、56 ヶ月後 (上から)。

16 ヶ月目には *Methanomicrobiaceae* 科もしくは未培養系の DHVE のピークが高頻度で検出された。44、49 ヶ月後には *Methanosarcinaceae* 科に属すクローンが高頻度で検出された。一方、深層部は 16 ヶ月、32 ヶ月では *Methanomicrobiaceae* 科もしくは未培養系の DHVE のピークが高頻度で検出された。44 ヶ月目以降はコントロールとして鯨骨域から離れた場所で採取した堆積層で多く検出されている未分離の MCG、DSAG あるいは

は DHVC1 と同様のピークが優占していた。また、コントロールサンプルの表層部の優占種は MGI が優占的に検出された (trFLP データについては省略する)。バクテリアについては得られたクローン解析結果から tRFs を求めたが、1 つのピークに複数のグループが存在しており、*Hha* I の制限酵素が本サンプルでは適合しなかったと思われ、複数の制限酵素の検討が必要であることが示唆されたため、これらの結果については割愛した。

以上、遺伝子解析の結果から、鯨骨域で生息しているメタン生成菌は鯨の分解過程において棲み分けが行われている事が示唆された。鯨の遺骸について Osteolytic stage では主に水素や有機酸、アルコール類を利用する *Methanomicrobiaceae* 科のメタン生成菌が増殖していることが示唆された。水素については有機物を発酵し水素を生成しうる *Clostridium* 属が 16 ヶ月目のバクテリアのクローン解析結果から検出されてきている (データについては省略する) ことから、この生成した水素を利用して増殖していることが推定される。鯨の軟体部が消費され、鯨骨のみが露出されてくると *Methanosarcinaceae* 科のメタン生成菌の優先度が高くなっている。*Methanosarcinaceae* 科のメタン生成菌は (トリ、ジ) メチルアミンやメタノールを基質とする。メチルアミン類はトリメチルアミンオキシドとして海洋性生物 (主に魚類や甲殻類) に含有している。Osteolytic stage から Sulphophilic stage には甲殻類が多数生息しており、これら大型生物に含有しているトリメチルアミンオキシドが分解され、*Methanosarcinaceae* 科が基質として利用する (トリ、ジ) メチルアミンが増加した可能性が考えられる。このように鯨の遺骸が化学合成生態系を形成する過程においてメタン生成菌はその一助を担っていると思われる。

相模湾初島沖の鯨骨域におけるメタン菌の多様性は、これまでに報告 (Goffredi et al., 2008 ISME J) されたモンテレー湾の鯨骨域 (深度 2893 m) と酷似していた。相模湾の鯨骨域で検出されたメタン生成菌の変遷過程はモンテレー湾で検出された変遷過程と同様であった。しかし、相模湾の鯨骨域では嫌氣的メタン酸化アーキアのクローンが検出されてないことから、生成したメタンは別な酸化経路があるか、海底下に蓄積されている可能性が考えられる。

仮説で立てた海底下に存在している微生物はいったいどこからくるのか? という疑問については、鯨骨域周辺の一般海底堆積物からはメタン生成菌の存在は確認できなかった。しかし、Takano et al. (2010) が相模湾の海底で行ったアーキアのクローン解析結果からは *Methanosarcinales* 目のクローンが検出されている。この結果から、本海域

には初めから海底下に存在している可能性はあるが、その増殖については鯨の遺骸に集まってくる多様な生物/微生物によるものと考えられる。また、鯨骨環境における微生物叢の理解についてはバクテリアの解析が不可欠であり、地球化学的な手法も視野に入れ明らかにしたい。

(略号)

- MGI : Marine group I
- MCG : Miscellaneous Crenarchaeotic Group
- DHVE : Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota
- DHVC : Deep-sea Hydrothermal Vent Crenarchaeota
- DSAG : Deep-Sea Archaeal Group
- TMEG : Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group

## (2) 微生物の単離

相模湾の鯨骨に生息しているホネクイハナムシ類から約 105 株を分離した。分離した微生物の 16S rRNA 遺伝子の配列を決定し、BLAST 検索を行ったところ、これら分離株は  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\varepsilon$ -*proteobacteria* 綱と *Bacteroidetes* 門に属していた。ホネクイハナムシ類の共生細菌は *Gammaproteobacteria* 綱 *Oceanospirillaceae* 科に属すとされており (Goffredi et al., 2005 EM & 2007 AEM, Verna et al., 2010 EM)、相同性検索から 5 株含まれている事が判明した。これら 5 株

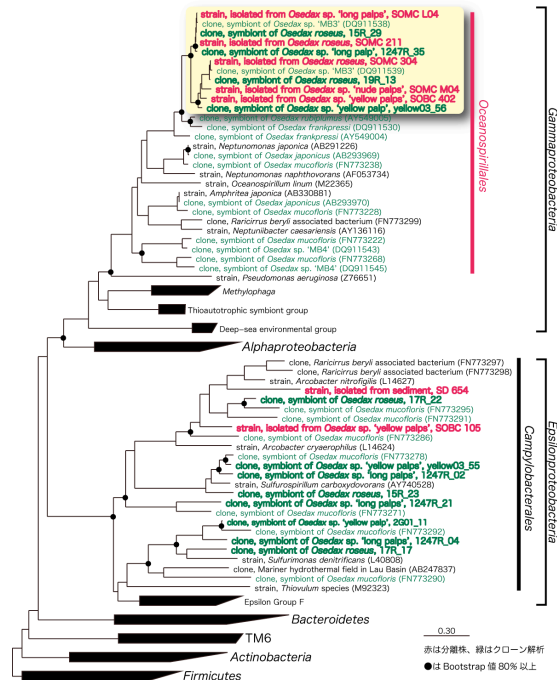


図 4 分離株と菌根部の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく NJ 法による系統樹。赤色は分離株、緑色は菌根部から抽出した遺伝子から得られたクローン配列

については菌根部から直接抽出した遺伝子を用いた。16S rRNA 遺伝子のクローン解析結果と同じ配列であったため、共生細菌である可能性が高いことが示唆された (図 4)。これらの株はモンテレー湾に生息している *Osedax* sp. MB3 に共生している共生細菌のクローン配列とも同じクラスターを形成した。近縁種には *Neptunomonas* 属であり、16S rRNA 遺伝子の相同値が 94%と離れていることから、種レベルもしくは属レベルで異なる可能性が高い。また、菌根部の表面上に生息していると推定されている *Epsilonproteobacteria* 綱 *Arcobacter* 属についてもホネクイハナムシから 2 株、環境中から 2 株の分離に成功した。今後の研究において、これらの分離株はホネクイハナムシ類における宿主-共生関係の解明において非常に重要な役割を果たすと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

①宮崎征行、深海底のオアシス、独立行政法人海洋研究開発機構 横須賀本部一般公開、2011 年 11 月 26 日、独立行政法人海洋研究開発機構 横浜研究所

②宮崎征行、深海底のオアシス、独立行政法人海洋研究開発機構 横須賀本部一般公開、2011 年 10 月 1 日、独立行政法人海洋研究開発機構 横須賀本部

③ Masayuki Miyazaki, Masaru Kawato, Yuichi Umezu, Florence Pradillon, Yoshihiro Fujiwara, Isolation of symbiont-like bacteria from *Osedax* spp. The 26th International Prize for Biology, 8. Dec. 2010, Tsukuba International Congress Center, Japan

④宮崎征行、Florence Pradillon、河戸勝、梅津裕一、能木裕一、藤原義弘。ホネクイハナムシ類からの共生細菌の分離、Blue Earth' 10, 東京海洋大学, 東京, 2010 年 3 月 2~3 日 (ポスター発表)

⑤ Masayuki Miyazaki, Nogi Yuichi, Yoshihiro Fujiwara, Masaru Kawato, Takahiko Nagahama, Chiaki Kato, Kaoru Kubokawa, Tomoko Yamamoto, Toshiro Yamanaka, Hiroshi Miyake, Koki Horikoshi. Microbial diversity and succession of whale-fall off Kagoshima, Japan. 4th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems, Abstract PIII-12, Bankoku Shinryokan, Okinawa, 2. Jun. 2009 (poster)

#### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

宮崎 征行 (MIYAZAKI MASAYUKI)  
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究副主事  
研究者番号：50399573

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし

#### (4) 研究協力者

藤原 義弘 (FUJIWARA YOSHIHIRO)  
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究副主幹  
研究者番号：20344294

河戸 勝 (KAWATO MASARU)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究副主任  
研究者番号：50533866