

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2012

課題番号：23651011

研究課題名（和文）

深部地下圏におけるウイルスの分布と微生物個体群制御へのインパクト

研究課題名（英文）

Vial impact on prokaryotic population dynamics in deep groundwater

研究代表者

加藤 憲二 (KATO KENJI)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：70169499

研究成果の概要（和文）：北海道幌延地区の堆積層中の深度 140m の地下水中に $4.5 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ のウイルスの存在が確認された。また、同地下水を用いた擬似現場培養実験では、ウイルスの存在による原核生物の制御効果が明瞭にあらわれ、深部地下圏においてウイルスによる原核生物個体群の制御が行われていることが示唆された。さらに、地下水中に存在するウイルスの電子顕微鏡写真を撮影し、その形態から *Caudovirales* に属することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Observations were carried out by using boreholes drilled in sedimentary geological setting in Horonobe, Hokkaido. Groundwater obtained from 140 m deep contained $4.5 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ virus-like particles. Incubation experiment conducted pseudo in situ condition performed shortly after sampling showed that viral control of prokaryotic abundance was observed in 80 hours of incubation. A picture of virus-like particle was successfully taken by using Transparent Electron Microscopy, which showed the candidate of the virus-like particle was *Caudovirales*-like.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：物質循環、ウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) 地下には広大なバイオスフェアがある
主に海底掘削研究の成果から海底地下数
百メートルの深部にも地表に匹敵するか、あ
るいはこれを凌ぐ多数の原核生物が存在す
ることが明らかになり、地下圏に分布する細
菌 (*Bacteria*) と古細菌 (*Archaea*) からなる原
核生物のバイオマスは膨大で全植物の数割
にもなるだろうと推測されている (Whitman
et al. PNAS, 95:6572, 1998)。海洋、陸域、
大気に次ぐ巨大なバイオスフェアが地下圏
に広がっているのである。特に還元状態が進
んだ深部地下圏では、メタン生成古細菌が高

い活性を發揮することが知られはじめた。英
国の Parkes のグループは海底地下圏深部で
硫酸還元と共役したメタン酸化活性の可能
性を示唆した (Science, 320:1046, 2008)。
一方、陸域地下圏では Mochimaru ら
(Extremophile, 11: 453, 2007) が天然ガス
フィールド地下深部におけるメタン生成に
ついての研究を行っており、私たちのチーム
でも揚水した熱水中のメタン生成活性から
地下圏での活動について推測する研究成果
を最近発表した (Kimura, Mori, Nashimoto,
Hattori, Yamada, Koba, Yoshida, Kato.
Environmental Microbiology, 12:480, 2010)。

さらに今回研究対象とする堆積岩地質の深部地下圏に古細菌が高密度で存在することを私たちは明らかにしている (Kato *et al.* Environmental Microbiology Reports, 1:569, 2009)。

(2) 捕食圧によって細菌群集の構造は変わる

微生物においても捕食圧によって反応を担う個体群が入れ替わることによってその活性は影響を受けると考えられる。私たちは浅い地下圏での実験から、捕食圧が細菌群集の構造を変えることを見いだした (Nagaosa *et al.* Geomicrobiology J. 25:131, 2008: 加藤が責任著者)。地下圏においても捕食圧の解明は、ある時ある速度で進行する活性がどのような仕組みで維持されているかを理解する上で必須であることが示唆されている。

(3) なぜ深部地下圏か

地表システムへのメタン放出量を見積もることは、全球レベルでの物質循環を考える上で喫緊の課題であろう。また深部地下圏でのメタン生成の微生物反応は、海底では将来のエネルギー資源のひとつと見なされるメタンハイドレート生成に直接関わり、また、陸域ではメタン生成の基質のひとつとなる二酸化炭素の地中貯留問題を考える上でも必須の検討事項だと考えられる。

(4) 研究の流れ

海洋や陸水における原生動物による原核生物の捕食については微生物ループのコンセプトの提案を受け、1980年代後半から90年代に活発に研究がなされた。成書 (たとえば Stephen R. Carpenter ed. Complex Interactions in Lake Communities, Springer-Verlag, 1988) が幾冊も出版された。これにひきつづき、海洋や陸水中に原核生物以上の高密度でウイルスが存在することが発見されたのを受けて、ウイルスによる細菌群集の制御に関する研究が進み、海洋生態系においてその役割を生態系の中で位置づけた総説も出はじめた (Suttle, Nature Review Microbiology, 5:801, 2007)。

(5) 地下圏を対象とした原核生物への捕食圧研究はまだ少ない

地下圏が広大なバイオスフェアであるとの認識がなされて10余年が経つが、地下圏を対象とした原生動物による原核生物への捕食圧の研究については、水質汚染に関連して浅い地下圏を対象としてなされたもの (Kinner *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 64:618, 1997) 以外、まだ非常に限られた知見しか得られていない。

(6) 深部地下圏における捕食圧研究の例はない

酸素が無い (深部) 地下圏ではたして原生動物が生存しているか、という疑問が常識的にはあろう。しかし私たちはすでに溶存酸素濃度が 0.5 mg O₂/L を切る地下水中で原生動物による原核生物 (細菌) の捕食を確認しており (Nagaosa *et al.* 2008)、体内に嫌気性細菌を共生させた原生動物が地下深部に存在することは十分期待できる。このような原生動物が二次的か、主たる手段かはおくとして深部地下圏で原核生物を捕食するかどうかを明らかにすることは生態系の広がりを知る上でも非常に興味深いことではないだろうか。研究成果が少しずつ出はじめているが、100m以深の深部地下圏における原生動物による捕食に関する研究例は見あたらない (表 1)。

表 1. 地下圏における原生動物の捕食に関する論文数 (2010年10月現在)。

検索対象	+Grazing (捕食)	+Subsurface (地下圏)	捕食+地下圏
Protozoa (原生動物)	477	63	12
Protist (原生生物)	127	10	3

Web of Scienceを使用して検索

(7) 地下圏のウイルス研究はほとんど手つかずで、原核生物個体群の制御については皆無

地下圏におけるウイルス研究はきわめて限られており、関連分野の国際シンポジウム (第7回国際地下圏微生物シンポジウム、静岡、2008: 加藤が主催者、参加23カ国から240名) でも発表はなく、Web of Scienceを用いた検索結果からも、スウェーデンの地下圏研究所において450mの深度から見つかったウイルスの記載論文が一報 (Kyle *et al.* The ISME Journal, 2:571, 2008) あるのみである。絶対嫌気的な環境では、原生動物による原核生物制御よりもむしろウイルスによるコントロールが優占すると考えられる。しかしながら、今のところ研究発表例はまだ無く、世界初の知見の提供に挑むことができる課題である。

2. 研究の目的

本研究では、地下100m以深の深部地下圏の主に古細菌群集を対象に、原生動物の細菌個体群への捕食圧を見積もるとともに、ウイルスの現存量と、その構成を明らかにする。さらに還元環境と温度条件を設定した疑似現場法により、ウイルスによる原核生物の制御に関する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) サンプルングサイト

日本原子力研究開発機構・幌延深地層研究センター（北海道天塩郡幌延町）に掘削された立坑深度 140m (V-140) より得られた地下水を対象とした。

(2) 原核生物およびウイルスの定量

原核生物は 0.2 μm スクレポアフィルターにて、またウイルスは 0.02 μm アノディスクフィルターにてろ過した。フィルターを SYBRGreen I にて染色し、蛍光顕微鏡にて計数した。

(3) ウイルスによる原核生物個体群制御実験

採水された地下水を孔径 3 μm のフィルターで濾過し、原生動物を除去した [3 μm 濾過分画、原生動物除去水]。これを孔径 0.2 μm のフィルターで濾過し、濾液をさらに孔径 0.02 μm のフィルターで濾過した。得られた濾液は、[ウイルスフリー地下水] とした。ウイルスフリー地下水と原生動物除去水とを等量混ぜ、ウイルスの量を半減させた 1/2 ウイルス区、原生動物除去水のみ、原生動物除去区、無処理区の 3 処理区を用いて、現場水温 15°C 暗所で 80 時間培養した。ろ過操作を除く操作は窒素置換したグローボックスで行い、嫌気的狀態を保つようにした。

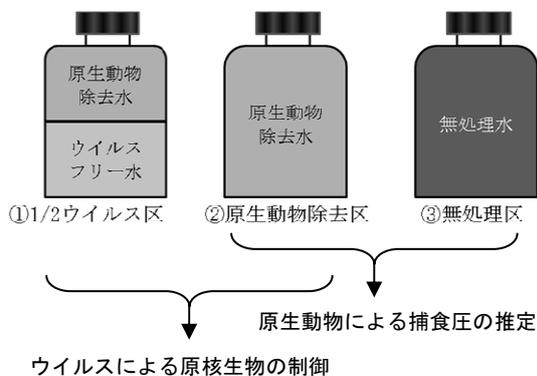


図 1. ウイルスによる原核生物個体群制御実験のスキーム.

(4) ウイルスの電子顕微鏡写真

2012 年 7 月 17 日、幌延深地層研究センターにて換気立坑深度 140m 地点の地下水を 0.2 μm タンジェンシャルフローユニットを用いて 100 倍に濃縮したサンプルをネガティブ染色にて透過型電子顕微鏡写真を得た。

4. 研究成果

(1) 地下圏におけるウイルスの定量

北海道幌延地区の堆積層中に設置された

地下坑道の深度 140m (V-140) から採取した地下水では原核生物並びにウイルス数についてそれぞれ、 $2.4 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ の値が得られた。VP 比は 1.8 と海洋や湖沼で得られている数字の 5 分の 1 程度であった。平行して進めた浅い井戸での結果は、 $1.8 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ならびに $3.8 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ と、やはり小さな VP 比 1.9 が得られた。地下圏のウイルス分布に関する定量的なデータはほとんどなく (Pedersen, 2008; 1.1-18)、この値が地下圏の実態の一端を示すと考えられ興味深い。

(2) ウイルスによる原核生物の個体群制御の解明

ウイルスによる原核生物の個体群制御の解明のため、孔径 3, 0.2, 0.02 μm のフィルターを用いたサイズ分画を組み合わせた擬似現場培養実験を行った結果、原核生物数の変化を図 2 に示した。

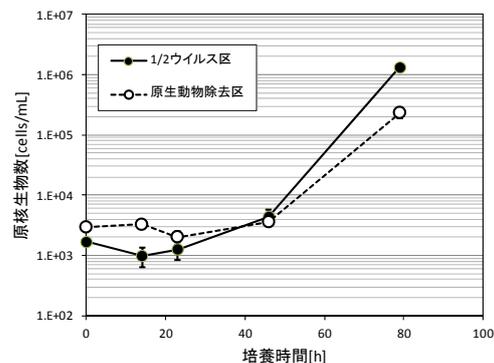


図 2. 北海道幌延 V-140 地下水の分画擬似現場培養実験における原核生物数.

1/2 ウイルス区、原生動物除去区ともに 46 時間までは顕著な増加は見られなかったが、46 時間以降 80 時間のあいだに急激に増殖するという同様の傾向を示した。46 時間から 80 時間後の 1/2 ウイルス区、原生動物除去区の増殖の差異がウイルス存在量の違いであると考えられる。1/2 ウイルス区の増殖速度は、原生動物除去区に比べ大きく、ウイルスによる原核生物個体群制御の可能性が示唆された。また、80 時間後の原核生物の細胞サイズは原生動物除去区のほうが 1/2 ウイルス区に比べて長径 3.4 μm 以上の細胞が占める割合が大きく、80 時間における分裂中の細胞の割合も多かった。このことから、原生動物除去区は 1/2 ウイルス区、に遅れて分裂している可能性が示唆され、ウイルスの存在は原核生物の増殖速度に影響を及ぼすことが考えられた。

(3) 深部地下圏に存在するウイルスの推定
得られた TEM 画像から粒子の形態的特徴よりウイルス(ファージ)の存在を確認した(図3)。六角形状の頭部とそこから伸びる尾部から成るこれらの粒子は、マイオウイルス科、ポドウイルス科、サイフォウイルス科の典型的な形状特徴と一致しており、これよりサンプル地下水中に上記の3科を含む *Caudovirales* (カウドウイルス目) のウイルスが存在する可能性が示唆された。

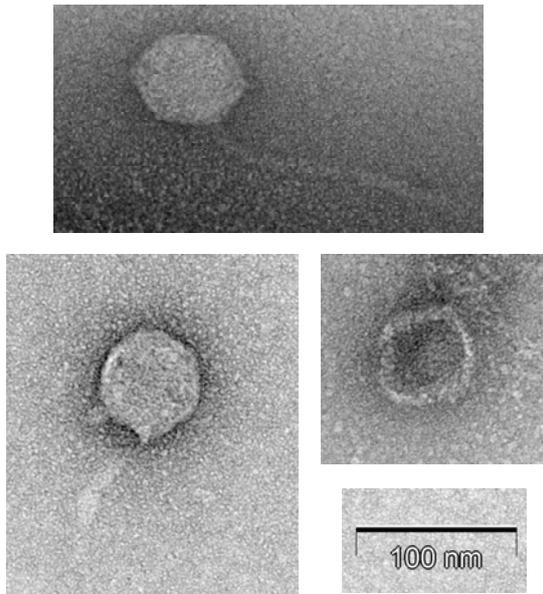


図3. 北海道幌延 V-140 地下水中のウイルス透過型電子顕微鏡写真.

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2件)

(1) Dao Thi Anh Tuyet, Kenji Kato, 13th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, 2013年09月08日~2013年09月13日, Congress Palace of Stresa (Stresa, Italy).

(2) Haruki Naruse, Kenji Kato, Gordon Research Conference in Hong Kong, 2013年08月11日~2013年08月16日, Mount Snow Resort (Hong Kong).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 憲二 (KATO KENJI)
静岡大学・理学部・教授
研究者番号: 70169499

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者

青木 和弘 (AOKI KAZUHIRO)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・地層処分研究開発部門・研究主席
研究者番号: 50421623