

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18201003

研究課題名（和文）海洋中深層における非極限性古細菌の分子生態学的研究

研究課題名（英文）Molecular Ecology of Non-Extremophilic Archaea in Deep Ocean

研究代表者

木暮 一啓（KOGURE KAZUHIRO）

東京大学・海洋研究所・教授

研究者番号：10161895

研究成果の概要：

近年の研究から、海洋の中心層には古細菌が広く分布することが分かってきた。1000m以深では、数的には原核生物のうちの半数近くを占めることが見出されてきたが、今のところ分離株が全くなく、その生態、系統、物質循環に対する寄与などについては殆ど未知の状況である。これらの環境は低温、高圧、貧栄養で特徴付けられるが、こうした環境は従来から知られていた古細菌の好熱性、好塩性、嫌気性などの性質からはずれがある。従ってこれらを非極限性の古細菌と呼ぶことにする。本研究はこの一群を中心とした古細菌に対する学際的研究である。

本研究では様々な課題を扱ったが、最大の成果は外洋域中心層から複数の古細菌を分離し、その系統的位置づけおよび性情等についての検討を開始できたことである。これは我々の知る限り、世界で初めてのことである。さらに、それが系統的には好塩性の古細菌に近縁であることが分かったことから、非極限性古細菌群集の起源や古細菌の進化上の広がりなどについて新たな仮説を提示できる段階に至った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	22,100,000	6,630,000	28,730,000
2007年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
年度			
年度			
総計	40,500,000	12,150,000	52,650,000

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：海洋中深層 古細菌 ゲノム解析 窒素代謝 有機物代謝

1. 研究開始当初の背景

海洋の中深層に分布する非極限性の古細菌については、以下のことが知られていた。第一に、1000m 以深では原核生物のおおむね半分近くが古細菌であること。第二に、外洋中深層から古細菌が分離、培養された例は皆無であること。第三に、近縁種として水族館から分離された株は、硝化細菌であること。第四に、マイクロオートラジオグラフィを用いた検討により、独立栄養、従属栄養のいずれの細菌群も存在すること。第五に外洋の古細菌群集の群集組成の情報はまだ極めて限られている。16S rDNA の塩基配列情報により、それらは Marine Group I, II, III, IV に分類されている。

2. 研究の目的

上記のような状況において、当初掲げた基本的な問いは、以下の二つである。非極限性古細菌は進化の過程でどのような系統から生じ、どのような過程を経て中深層に広く分布するに至ったのだろうか。そして現世の海洋でどのような機能を果たしているのだろうか。本研究はこうした基礎的な疑問に答えるために、作業仮説として以下を考えた。すなわち、「古細菌が海洋中深層に広く分布する以前に、海洋の物質循環の基本は真正細菌の代謝能によりそのかなりが出来上がっていた。このため、古細菌はその増殖に必ずしも好適でない環境に侵入するとともに、比較的分解しにくい有機物、あるいは利用可能な無機化合物をエネルギー源とするに至った。」この作業仮説に答えるための基本的なアプローチは次の2つである。

1. 非極限性古細菌のゲノム構造を知ることにより、進化的疑問に答える。

2. 海洋中深層に分布する非極限性古細菌の窒素代謝能、炭素代謝能を解析する。

3. 研究の方法

主な項目は以下のようである。

・学術研究船淡青丸（東大海洋研究所、海洋研究開発機構）KT-06-09 次, 31、07-16 次および、KT-08-13 次航海、同白鳳丸、KH-08-3 次航海、海洋調査船なつしま（海洋研究開発機構）YK08-11 次航海にて海水試料を鉛直的に取得し、群集構造の解析および実験的な研究に使った。

・現場の海水から核酸を抽出し、16S rDNA

の塩基配列を解析することにより、群集構造の鉛直的な変化を調べた。PCR-DGGE に続く多次元尺度法と階層クラスタ分類法で解析し、古細菌群集と真正細菌群集を比較した。

・外洋の海水に安定同位体でラベルした炭酸水素ナトリウムを添加して培養を行い、その後 DNA を抽出して塩化セシウム平衡密度勾配超遠心法によって密度別に分取し、密度が増加した DNA について 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリを作成した。

・外洋海水および海洋研究所の飼育水槽から古細菌の分離を試みた。とりわけ好塩性の古細菌に着目して培養を行った。

・水槽内のアンモニア酸化性の古細菌の群集構造に与える温度の影響を調べることであり、これらのグループが天然環境中でどのような分布および機能を持つかについて考察した。

4. 研究成果

・外洋における古細菌と真正細菌の群集構造の変動パターンは、表層から深層にかけての大きなスケールでは共通性を持っていた。しかし、表層域では古細菌の変動が小さいのに対し、真正細菌は大きいことが確認された。これは、真正細菌は表層域で光合成によって生産された有機物の減少に、敏感に応答するが、古細菌の応答はより小さいこと、古細菌は真正細菌に遅れて海洋に侵入したことを示唆する。

・外洋の測点 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリを作成し、0 m から 44、500 m から 44、3000 m から 46 の配列を解読した。BLAST 検索の結果、得られたクローンは Uncultured archaea の Marine group I, II, III および IV に大別された。Marine group II は大きく二つに分かれたため、サブグループ A, B を設定した。出現頻度を比較すると、表層 0 m では Marine group II が多く、深層に向かって Marine group I と III が増加した。Marine group IV は 500 m にひとつのみ現れた。

・駿河湾沖の測点 (34°05'N, 138°33'E) の深層 1500 m の海水に、安定同位体でラベルした炭酸水素ナトリウムを添加して 2 週間培養した。培養に伴って同位体を取り込み、その密度が増加した DNA を解析したところ、顕著な取り込みを示す特定の系統群が存在するのではなく、古細菌の中で広く分布してい

ることが確認された。

・好塩菌に着目して海洋研究所の水槽およびアラビア海から古細菌の分離培養を試みた。その結果、水槽試料から17株、アラビア海試料から5株の高度好塩古細菌を得た。これらのうち16株はHalococcus属、2株はHalorubrum属、残り4株は新しいGenusであることが16S rRNA遺伝子の解析から推定された。現在新種および新属登録のための解析を行っている。

・以上の系統解析、栄養摂取様式の解析結果から、古細菌は真正細菌に遅れて海洋環境に侵入したこと、真正細菌は植物プランクトンを出発点とする物質循環に対応した栄養選択性および分布様式を持つのにに対し、古細菌はより低栄養環境に侵入するとともに、その一部は独立栄養によって増殖していることが示唆された。さらに、好塩性の古細菌が外洋から初めて複数分離されたこと、それがMarine group IVに属することから、このグループは中深層に広く分布する古細菌の少なくとも一部の起源となっている可能性が考えられる。今後その全ゲノム配列の解析が得られれば、より詳細な考察が可能になると考えられる。

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)

[雑誌論文](計13件)

Aoi Y, Kinoshita T, Hata T, Ohta H, Obokata H, Tsuneda S. 2009. Hollow-Fiber Membrane Chamber as a Device for In Situ Environmental Cultivation. Applied and Environmental Microbiology. 75: 3826-3833. (査読有)

Taniguchi, A, Hamasaki, K. 2008. Community structures of actively growing bacteria shift along a north-south transect in the western North Pacific. Environmental Microbiology 10: 1007-1017. (査読有)

Mori K, Sunamura M, Yanagawa K, Ishibashi J, Miyoshi Y, Iino T, Suzuki K, Urabe T. 2008. First cultivation and ecological investigation of a bacterium affiliated with the candidate phylum OP5 from hot springs. Applied and Environmental Microbiology. 74: 6223-6229. (査読有)

Urakawa H, Tajima Y, Numata Y, Tsuneda S. 2008. Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration system. Applied and Environmental Microbiology. 74: 894-900. (査読有)

Osaka T, Ebie Y, Tsuneda S, Inamori Y. 2008. Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing. FEMS Microbiology Ecology. 64: 494-506. (査読有)

Yamada K, Terahara T, Kurata S, Yokomaku T, Tsuneda S, Harayama S. 2008. Retrieval of entire genes from environmental DNA by inverse PCR with pre-amplification of target genes using primers containing locked nucleic acids. Environmental Microbiology. 10: 978-987. (査読有)

Abe H, Kondo Y, Jinmei H, Abe N, Furukawa K, Uchiyama A, Tsuneda S, Aikawa K, Matsumoto I, Ito Y. 2008. Rapid DNA chemical ligation for amplification of RNA and DNA signal. Bioconjugate Chemistry. 19: 327-333. (査読有)

Tanaka Y, Miyajima T, Koike I, Hayashibara T, Ogawa H. 2008. Production of dissolved and particulate organic matter by the reef-building corals Porites cylindrica and Acropora pulchra. Bulletin of Marine Science. 82: 237-245. (査読有)

Kinoshita K, Wada M, Kogure K, Furota T. 2008. Microbial activity and accumulation of organic matter in the burrow of the mud shrimp, *Upogebia Major* (Crustacea: Thalassinidea). Marine Biology. 153: 277-283. (査読有)

Nishimura M, Shimakita T, Matsuzaki T, Tashiro Y, Kogure K. 2008. Automatic counting of FISH-labeled microbes by an LED illuminated detecting apparatus. Fisheries Science. 74: 405-410. (査読有)

Hirayama H, Sunamura M, Takai K, Nunoura T, Noguchi T, Oida H, Furushima Y, Yamamoto H, Oomori T, Horikoshi K. 2007. Culture-dependent and -independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi Island, Japan. Applied and Environmental Microbiology. 73: 7642-7656. (査読有)

Hamasaki K, Taniguchi A, Tada Y, Long RA, Azam F. 2007. Actively growing bacteria in the Inland Sea of Japan, identified by combined bromodeoxyuridine immunocapture and

denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 73: 2787-2798. (査読有)

Inoue K, Nishimura M, Nayak BB, Kogure K. 2007. Separation of marine bacteria according to buoyant density by use of the density-dependent cell sorting method. Applied and Environmental Microbiology. 73: 1049-1053. (査読有)

[学会発表](計5件)

Hamasaki K, Taniguchi A. 2009. Diversity of active microbial communities in surface seawaters along a north-south transect in the South Pacific Ocean. at International Census of Marine Microbes 454 User Spring Meeting. April 7, At Woods Hole, USA.

Kogure, K. 2008. Biogeography, a case for microbes in marine environments. at Evolutionary Biology and Biodiversity Conservations. Nov. 10. Sao Paulo, Brazil

Kogure, K. 2008. Bactosphere, a new concept on bacterial surface. 49th Microbial Society of Korea General Meeting. May 16. Dejeon, Korea.

Aoi, Y.; Kaneko, Y.; Obokata, H.; Kinoshita, T.; Hata, T.; Tsuneda, S. 2008. New methodologies for isolation and cultivation of unculturable microorganisms: Hollow fiber membrane chamber and microbial cell chromatography. at 108th General Meeting of the American Society for Microbiology, June 03, Boston, USA

井上健太郎、木暮一啓. 2008. 海洋性古細菌の鉛直的な群集構造の変動と栄養特性. 第21回 日本 Archaea 研究会講演会 平成20年7月5日、沖縄

[図書](計1件)

木暮一啓(編集) 東海大学出版会、海洋生物の連鎖、2006年、340頁

[産業財産権]

出願状況(計0件)
特になし

取得状況(計0件)
なし

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木暮 一啓 (KOGURE KAZUHIRO)

東京大学・海洋研究所・教授

研究者番号: 10161895

(2) 研究分担者

小川 浩史 (OGAWA HIROSHI)

東京大学・海洋研究所・准教授

研究者番号: 50260518

砂村 倫成 (SUNAMURA MICHINARI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 90360867

河原林 裕 (KAWARABAYASHI HIROSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・セル工

ン지니어リング研究部門・主任研究員

研究者番号: 90195165

濱崎 恒二 (HAMASAKI KOUJI)

東京大学・海洋研究所・准教授

研究者番号: 80277871

常田 聡 (TSUNEDA SATOSHI)

早稲田大学・先進理工学部・教授

研究者番号: 30281645

西村昌彦 (NISHIMURA MASAHIKO)

東京大学・海洋研究所・助教

研究者番号: 10242174

(3) 研究協力者

井上健太郎 東京大学海洋研究所、
大学院学生