

# 地殻内微生物圏と熱水活動

地球と生命の共進化における接点

高井 研\* 稲垣 史生\*

## Deep Biosphere and Hydrothermal Activity: Potential Roles in the Co-evolution of Earth and Life

Ken TAKAI \* and Fumio INAGAKI \*

### Abstract

Seafloor hydrothermal system and deep subsurface are of great interest for microbiologists as paradise of unusual lives so-called "Extremophiles" in this planet. Such peculiar microorganisms have been believed to be minority in the earth throughout the long history after the early evolution of life. Recent investigations for microorganisms present in the active hydrothermal seafloor and subsurface have revolutionized the concept. Ubiquity, predominance and diversity of extremophiles in the present and past global environments signify the unresolved, but significant role in the co-evolution of earth and life. In this article, we summarize the expeditions for the microbial world in the seafloor hydrothermal system and deep subsurface and shed light on the foci of the future investigation.

**Key words** : deep biosphere, hydrothermal activity, extremophiles, hyperthermophiles, subvent biosphere

**キーワード** : 地殻内微生物圏, 熱水活動, 極限環境微生物, 超好熱菌, 熱水孔下微生物圏

### I. はじめに

1960年代から始まった「通常の生育環境では生きられず、人間から見て過酷に見える環境に適応し生育する微生物、すなわち極限環境微生物」の研究は、微生物の生理や代謝様式の多様性についての理解を一変させ、その特殊な生理及び蛋白質を用いたバイオテクノロジーの爆発的發展を促した。新たな極限環境微生物の探索やその遺伝子資源の開発を目指し、地球上のあらゆる極限環境の研究が行われてきたが、おそらく最もその探索が進んでいない地球最後の微生物圏フロンティアが

深海底熱水活動域であり、さらに地球の地殻内に存在することがわかってきた地殻内微生物圏であろう。本稿では、1990年代から現在にいたるその研究の歴史を解説し、一見無関係に見える二つの極限環境微生物の世界が、実は協同的に地球規模での微生物の分布や動態を考える上で重要な役割を果たしてきたのではないかという新しい考えを紹介したい。また、いくつかの研究例から示唆される深海底熱水活動域微生物生態系と地殻内微生物生態系の存在様式から、地球と生命の共進化における進化過程の姿を考察、議論してみたい。

\* 海洋科学技術センター・極限環境生物フロンティア・地殻内微生物研究領域

\* Subground Animalcule Retrieval (SUGAR) Project, Japan Marine Science & Technology Center (JAMSTEC)

## II. 地殻内微生物と地殻内微生物圏

### 1) 地殻内微生物圏の定義とその研究小史

地殻内微生物は英語における deep subsurface microorganisms の和訳である。一般に subsurface microorganisms を地下微生物と訳すが、deep subsurface microorganisms となった場合、深部地下微生物よりも地殻内微生物とした方が、語感がよく、イメージを喚起しやすいと思われることから、1999年頃から日本の地下微生物研究者のなかで用いられるようになった。従って地殻内微生物の定義は、deep subsurface microorganisms の定義と同一であると考えてよい。しかしながら、世界的に用いられている deep subsurface という言葉にも、はっきりとした定義があるわけでもなく、Fredrickson and Fletcher (2001)によっても、deep という言葉は 50 m 以深と書かれているのみである。本稿では、陸域及び海底表面の微生物活動や物質循環が即座に影響を及ぼさない程度の深さを持つ微生物圏（一つの目安として 2-3 m 以深）全体を地下微生物圏 (subsurface biosphere) と考える。さらに陸域及び海底表面の微生物活動や物質循環が容易に影響を及ぼさない程度の深さを持つ微生物圏（一つの目安として 200-300 m 以深）を特に地下微生物圏のなかの地殻内微生物圏 (deep subsurface biosphere) と呼ぶことにする。

地下微生物及び地殻内微生物の本格的な研究は、1990年代から始まった。そのため地下微生物学及び地殻内微生物学は、現在がまさに黎明期である。しかしながら、それまで全く研究例がなかったというわけではない。1920年代に Bastin らによってイリノイの油田の深部 (150-600 m) より得られた地下水から培養された硫酸還元菌が報告され (Bastin, 1926)、また数年後にはロシア人研究者によって炭化水素を多く含む岩石から培養された多様な微生物が報告されている。しかし、当時の掘削技術や試料処理・評価法が未熟であったことから、それらの微生物が地表からもたらされた可能性も考えられた。1970年代から1980年代にかけて、アメリカにおける地下水の水質汚染が問題

になるにつれ、比較的浅い地下の地下水や 50 m 以深の地下水に存在する微生物についての研究が行われるようになった。これらの研究では、サンプリングの方法が大きく改善され、表面からの微生物汚染が最小限に抑えられたために、極めて多様な微生物が地下環境に生育していることが明らかとなった。当時の研究の多くは、従来の培養法による方法論に基づいており、地下微生物圏を形成する微生物群集の極めて限られた微生物を検出したにすぎなかった。1980年代の後半から爆発的に広まった培養に依存しない分子系統学的手法 (高井・左子, 2000; 高井・稲垣, 2002) が様々な環境に適用されるにつれ、膨大な空間的広がりを持つ未知の地下微生物圏についての本格的な研究が、1990年代から始まった。地下微生物圏の空間的広がり、陸地及び海洋といった地球表面とほぼ同等の面積を有し、かつ鉛直方向にも数 km の広がりを持つと考えられる。この巨大な地下微生物圏の潜在生物量の見積もりは、Whitman *et al.* (1998)によっても1980年代前半の陸域地下の微生物調査 (Pedersen and Ekendahl, 1990; Hazen *et al.*, 1991; Pedersen *et al.*, 1996a, b) 及び ODP (Ocean Drilling Project) の成果 (Cragg *et al.*, 1992, 1995; Parkes *et al.*, 1994; Wellsbury *et al.*, 1997) を基に行われている。極めて大雑把な試算ではあったが、地球規模での生物生態系を考える上で、初めて地下微生物圏の重要性を示唆するものであった。その結果、全地球における潜在生物量の 90%以上が、陸域及び海底下の微生物圏に存在すること、かつ植物を含めた全生物量においても地下微生物圏が植物に匹敵する潜在量を有していることが示された。しかしながら、炭素循環のフラックスから推定される生物生産量 (1年あたりに生産される細胞数) に注目した場合、全地球生物圏において 0.2%以下となり、生物量に比べ、その活動が極めて低いことが推測されている。海底下微生物圏に対する最新の研究成果からも (Inagaki *et al.*, 2001, 2002a, b; D'Hondt *et al.*, 2002), 地殻内微生物圏の大部分は、現在活発な代謝活性を有する活動的な微生物ではなく、過去の微生物の遺物 (これには休眠細

胞, 死菌, あるいは核酸や脂質のような単なる分子化石が含まれる。我々はこのような微生物及び分子化石を Paleobe パレオブと呼ぶことを提唱している)によって占められていることがわかつつある。

## 2) 活動的地殻内微生物群集

では今現在活動的な地殻内微生物群集というものは、どのような場に存在していると考えられるのであろうか。端的に言う、それは活動的地殻内環境であると推測される。具体的には、プレート境界域(中央海嶺や沈み込み帯, 背弧域及び衝突帯), ホットスポットといった場, そして特定の物質(例えば, 石油, メタンハイドレートや重金属など)が不均一に分布するような場である(例えば, Ingebritsen *et al.*, 2000; Krumholz, 2000; Fredrickson and Fletcher, 2001)。このような場においては、地殻変動や物理的及び化学的勾配のためにエネルギーフロー及び物質移動が生じ、そのエネルギーフロー及び物質移動に依存した活動的な地殻内微生物群集が起こると考えられる。そのような観点から考えると、長期間比較的安定した条件で形成される海底下堆積物に比べて、その成因からして活動的である大陸や島弧のような地殻内環境は、活動的地殻内微生物群集の形成にとって有利な環境であると言える。

陸域における地殻内微生物の研究は、主に地下深部から採取された地下水やコアサンプル, 及び地下油田の石油中に含まれる地層水(formation water)を対象にしてきた。これらの環境は比較的有機物を多く含む堆積層であるが、花崗岩(Pedersen *et al.*, 1996a, b)や玄武岩層(Stevens *et al.*, 1993; Stevens and McKinley, 1995)を源とする貧栄養地下水についても解析されている。顕微鏡による微生物の観察及び計数, プレート培養や液体培地を用いた培養, さらにMPN法(Most Probable Number method)や希釈計数法によって好気性の従属栄養細菌, 嫌気性発酵細菌, 硫酸還元菌, 異化的鉄還元菌, 酢酸菌及びメタン菌が地殻内に生育していることが知られているが、純粋分離され、生理学的性質が明確にされている地殻内微生物は極めて稀である。これまでに陸域

地殻内環境より分離され、分類学的諸性質が明らかにされている例としては、アメリカバージニア州テイラーズピレの2700 m 地下の三畳紀堆積層より分離された絶対嫌気性従属栄養性の鉄及びマンガン還元好熱菌 *Bacillus infernox* Boone *et al.*, 1995), スウェーデンの花崗岩帯地下水(68 600 m)より分離されたメタン菌 *Methanobacterium subterraneum* (Kotelnikova *et al.*, 1998), 硫酸還元菌 *Desulfovibrio aespoensis* (Motamedi and Pedersen, 1998) 及びメタン酸化細菌 *Methylomonas scandinavica* (Kalyuzhnaya *et al.*, 1999), 南アフリカトランスバール州金鉱の3200 m 地下の先カンブリア紀の地層から分離された通性嫌気性従属栄養性の重金属還元好熱菌 *Thermus sp.* (Kieft *et al.*, 1999) 及び新属新種である絶対嫌気性超好アルカリ菌 *Alkaliphilus transvaalensis* (Takai *et al.*, 2001a) (図1), 日本の大分県八丁原地熱発電所の地下熱水系より分離された絶対好気性偏性従属栄養好熱菌 *Hydrogenobacter subterraneus* (Takai *et al.*, 2001b) (図2) などが知られている。さらに最近、鹿児島県菱刈金山の地下300 m を超える深さから採取された地下熱水より、これまで培養困難であると考えられてきた新属新種の好熱性水素及び硫黄酸化アクイフィカレイス *Sulfurohydrogenobium subterraneus* (Takai *et al.*, 2002b, 2003a) (図3) が分離された。これらの地殻内環境から分離された微生物の多くは、陸域表面に生息する微生物の分類上の常識を打ち破るような新奇性を有していることが明らかとなった。つまり、時間的・空間的に隔離され、かつ極めて過酷な環境に適応した地殻内微生物圏には、新奇かつ多様な微生物が生息していると考えられる。近年、培養に依存しない分子系統学的手法を用いた陸域地殻内微生物群集構造の解析も行われつつある(Boivin-Jahns *et al.*, 1996; Pedersen *et al.*, 1996a, b; Chandler *et al.*, 1998; Takai and Horikoshi, 1999a, 2000a, b; Takai *et al.*, 2001c, 2003e)。また、陸域地殻内には、海洋プレート上には存在しない極めて古い地層や岩石が存在するという特徴を有していることから、海底下微生物の研究では見えてこない

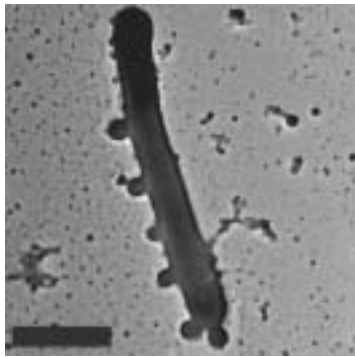


図 1 南アフリカトランスバール州金鉱山の 3200 m の地下から分離された新属新種の絶対嫌気性超好アルカリ菌 *Alkaliphilus transvaalensis* の電子顕微鏡写真 (Takai *et al.*, 2001a)  
最適増殖温度は 40 で、現在までに知られるあらゆる微生物のなかで最も強いアルカリ条件 (pH12.5) で増殖可能な微生物である。傍線は 1  $\mu$ m。

Fig. 1 An electron micrograph of a strictly anaerobic, extremely alkaliphilic bacterium *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., isolated from 3200 m deep subsurface environment in the South African Au mine (Takai *et al.*, 2001a). It is mesophilic but can grow at up to pH 12.5, which is the highest pH condition recorded so far for growth of life. Bar indicates 1  $\mu$ m.

ジュラ紀及び三畳紀以前の古環境変動、及び生物の進化の関連性を研究する新たな地球微生物学の展開が期待されている。

### 3) 沈み込み帯における海底下微生物圏

Whitman *et al.* (1998) の試算によると、地球における最大の微生物圏が海底下微生物圏となる。海底下微生物圏については、Parkes のグループが、ODP で回収された海底下 1000 m 近くの深さの堆積物コアを用いて、微生物量、メタン生成活性、硫酸還元活性を調べ、海底下のかなり深いところまで  $10^4$  cells/cm<sup>3</sup> を超える微生物が存在していることを明らかにしている (Parkes *et al.*, 1994; Wellsbury *et al.*, 1997)。また ODP Leg.128 で採取された日本海の海底下 500 m の堆積物から、好熱性好圧性硫酸還元菌 *Desulfovibrio profundus*

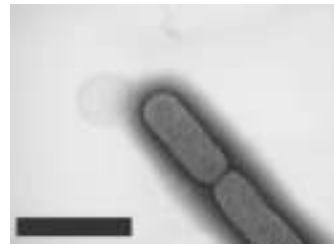


図 2 大分県八丁原地熱発電所地下 1500 m にある 300 を超える地下熱水溜りに由来する熱水から分離された絶対好気性偏性従属栄養好熱菌 *Hydrogenobacter subterraneus* の電子顕微鏡写真 (Takai *et al.*, 2001b)。  
最適増殖温度は 78 で、微好気性水素酸化独立栄養好熱菌グループである *Aquificales* 目の中で、水素をエネルギー源として利用できない(初)、完全好気性の(初)、偏性従属栄養菌(初)であった。傍線は 1  $\mu$ m。

Fig. 2 An electron micrograph of a strictly aerobic, extremely thermophilic heterotroph *Hydrogenobacter subterraneus* sp. nov., isolated from >300 deep subsurface geothermal water pool at a depth of 1500 m in the Hachobaru electric plant (Takai *et al.*, 2001b). It belongs to the order *Aquificales*, the most ancient lineage of Bacteria, but is the first example representing the inability of hydrogen-oxidation and the absolute heterotrophy. Bar indicates 1  $\mu$ m.

を分離している (Bale *et al.*, 1997)。しかしながら海底下微生物圏についての研究は、Parkes らの研究のほかは、その空間的広がりと重要性に関わらず極めて少なく、そもそも海底下環境を取り巻く地質学的背景及びテクトニックセッティングとの関わりから体系的に理解しようとする試みはほとんど行われていない。

海底下環境のテクトニックセッティング、地球物理学的特性、物質循環と活動的の海底下微生物圏を包括的に研究する上で、最も適した対象となり得るのが沈み込み帯における海底下微生物圏であり、現在の海底下微生物圏研究における最大の研究対象と考えられているのも、沈み込み帯における海底下メタンハイドレートの生成と消費に関わる微生物である。海底下メタンハイドレートの形

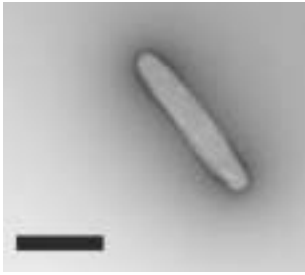


図 3 鹿児島県菱刈金山の地下 300m を超える深さから湧き出る地熱水から分離された、これまで培養困難であると考えられてきた新属新種の好熱性水素及び硫黄酸化アクイフィカレス *Sulfurohydrogenobium subterraneus* の電顕写真 (Takai *et al.*, 2002b, 2003a)。  
水素、硫黄をエネルギー源とし、酸素、硝酸、鉄、ヒ酸、セレン酸を電子受容体とする地殻内微生物であった。傍線は 1 μm。

Fig. 3 An electron micrograph of a previously uncultivated phylotype of *Aquificales*, *Sulfurohydrogenobium subterraneus* gen. nov., sp. nov., isolated hot geothermal aquifer in the lowest level of the Hishikari Au mine (Takai *et al.*, 2002b, 2003a).

The isolation and characterization clarify its enigmatic physiology, that is hydrogen- or sulfur-oxidizing, oxygen-, nitrate-, iron (III)-, selenate- and arsenate-reducing, thermophilic chemolithoautotroph. ar indicates 1 μm.

成過程及び融解に伴うメタンの消費過程を解き明かすことは、地球規模での炭素循環を理解する上でも、現在や過去の地球における環境変動を理解する上でも極めて重要な問題である。海底下メタンハイドレートの融解に伴う消費過程では、そのメタンフラックスが緩やかな場合、海底下の硫酸イオン/メタン減少境界領域で、硫酸還元と共役した微生物活動による嫌氣的メタン酸化が重要であるということが、古くから地球化学的データに基づき考えられていたが、その嫌氣的メタン酸化に関わる微生物の本質は長らく謎であった。近年の微生物学における分子生態学的手法の発展と新しい無機・有機地球同位体化学との融合によって、ある特定の系統群のメタン生成アーキア（古細菌あるいは始原菌）が単独的に、あるいは特定の系

統群の硫酸還元バクテリア（真正細菌）と共栄養的に嫌氣的メタン酸化を行っていることが明らかになりつつある (Hinrichs *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001a, b, 2002; Michaelis *et al.*, 2002)。一方でメタンが直接海水中に湧出するような条件下では、海水中で好氣的にメタンを消費するバクテリアが重要な役割を持つと予想されるが、それらのメタン酸化バクテリアの性状やそのメタン酸化フラックスについては、嫌氣的メタン酸化微生物群集以上に知見に乏しく、今後の研究における大きな課題と言える。

地球における巨大な炭素プールである海底下メタンハイドレートを構成するメタンについても、生成される場やプロセス、及び移動メカニズムは未だ明確にされていない。メタン生成の場及びその移動メカニズムとして、現在海底下に存在するメタンハイドレート層よりも浅い堆積物中で生成され深部に移動したとする浅部起源説、メタンハイドレート層の直下の深部起源説やもっと深部から来る超深部起源説などが考えられており、生成プロセスも堆積物中の有機物の熱変成と微生物起源のプロセスが示唆されている (例えば、Waseda, 1998)。特に近年、地球化学的分析から生物起源のメタンを多く含むと予想されるメタンハイドレートの形成に関わる微生物の探索とその分布についての研究が、重点的に行われてきている (Bidle *et al.*, 1999; Marchesi *et al.*, 2001; Lanoil *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2002) が、明確なメタン菌の存在及びメタン生成の証拠は見つかっていない。著者らの研究グループにおいても、メタン生成の場やプロセス及び移動メカニズムを明らかにするため、日本近海の cold seep 堆積物 (Inagaki *et al.*, 2002c) や、南海トラフ、マッケンジーデルタ、ペルーマージン (ODP Leg. 201)、カスカディアマージン (ODP Leg. 204) のメタンハイドレートコアについての研究を現在進めている。微生物活動によるメタンハイドレートの生成メカニズムが海底下深部にあるかどうかを確かめるには、ハイドレート層を貫いて、フリーガス層の高温域まで達するような掘削試料を解析することが不可欠である。これまでの ODP では、安全

性及び環境汚染防止の観点から、このような掘削は不可能であったが、海洋科学技術センターが現在建造中のライザー掘削船「ちきゅう」では可能である。近い将来、新しい深海掘削船を用いたIODPで、様々な海底下メタンハイドレートの生成メカニズムが学際的に解明されることが大いに期待される。

### III. 深海底熱水活動と熱水孔下微生物圏

#### 1) 深海底熱水活動の発見とその研究小史

1977年、ガラパゴスリフトにおいて奇妙な生物群集を伴った深海底熱水活動が発見された(Corliss *et al.*, 1979)。その発見はプレートテクトニクスや海洋エネルギー・物質フラックスを理解する上での根幹となっただけでなく、同時に太陽光に依存しない、地球内部エネルギーに基づいた化学合成のみに依存した微生物・生物群集の発見を意味していた(厳密に言うとこれらの微生物・生物群集の多くは光合成産物である酸素を利用しており、太陽光エネルギーの恩恵を間接的に受けているため「地球を食べる」生物群集と言うことはできない)。また陸上では起こり得ない300°Cを超えるような熱水環境の存在は、110°C以上で生育可能な超好熱菌の分離に結びつき、生命の最高生育温度の限界を大きく引き上げた。

その後、東太平洋海嶺や大西洋中央海嶺などの中央海嶺系だけでなく、西太平洋のプレート縁域においても、中央海嶺系の熱水活動とは異なる背弧海盆での熱水活動や島弧あるいはホットスポットにおける熱水活動が次々と発見され(例えば、Ishibashi and Urabe, 1995)、熱水活動の地球規模での分布やその成因についての研究が進んだ。一方微生物学の分野では、Stetterのグループによって深海底熱水活動域から多種多様な超好熱菌が分離されたが(Stetter, 1990)、目に見える生物群集とは異なり、微生物群集に対する系統的及び体系的な理解には程遠い状況であった。このような状況を打開するために、我々は1990年代中頃から広まった微生物生態学の新しい方法論、分子系統学的手法を駆使して、謎に包まれていた深海底熱水噴出孔環境における微生物多様性の解析を

行った(Takai and Fujiwara, 2002)。その結果、深海底熱水噴出孔表層環境には、それまでに存在すら知られていなかったような、極めて多様な、未知の始原的微生物が生育しており、それらの微生物群集組成が、熱水活動域の地質学的条件によって異なり、かつ各微環境における地球化学的要因に極めて強く影響された組成を示すことが明らかとなった(高井・掘越, 1999; Takai and Horikoshi, 1999b; Takai *et al.*, 2001d)。さらに300°Cを超える高温条件下(純粋に近い熱水や熱水とチムニーとの境界領域)においても、生存可能な超好熱菌の存在が示唆される結果が得られたことから、我々は、これらの深海底熱水噴出孔環境に生育する微生物の多くが、実はその下に広がる熱水孔下微生物圏から熱水によって運ばれてきたものであり、また熱水孔下微生物活動の影響を強く受けているのではないかと考えるようになった。

#### 2) 熱水孔下微生物圏とその探索

熱水噴出孔環境の下に活動的な微生物生態系が存在するという概念は、既に1993年にDemingとBarossによって提唱されていた(Deming and Baross, 1993)。彼らは、深海底熱水噴出孔環境における核酸や脂肪酸といった有機物の分布パターンから、深海底熱水噴出孔環境における有機物のかなりの部分が噴出する熱水に由来し、それらは深海底熱水孔の下に広がる微生物群集から熱水によって運ばれてきたものであるという考えを示した上で、熱水噴出孔が熱水孔下微生物圏に対して開かれた窓であるという概念を提唱した。実際に、タヒチ近海のマクドナルド海山(海面下40m)やファンデフカ海嶺の熱水活動域で火山噴火が起きた場合、周辺海水中に定常的な熱水活動では起こり得ない高密度の超好熱菌群集が放出され、その多くが定常的な熱水活動の下に存在していた熱水孔下微生物圏に由来する可能性が高いという報告(Huber *et al.*, 1990; Delaney *et al.*, 1998)も、熱水孔下微生物圏の存在を示唆するものであった。しかしながらこれらの結果は、熱水孔下微生物圏の存在を状況証拠的に示唆するものでしかなく、研究者の推測の域をでるものではなかった。一方、IODPでは、これまで深海底熱水活動域地下での熱水

循環と地球化学プロセス及び熱水鉱床の成因論を明らかにするため、玄武岩を母岩とする大西洋中央海嶺の低速拡大軸のTAG (Trans-Atlantic Geotraverse) サイト (ODP Leg. 158) (Reysenbach *et al.*, 1998), 陸性堆積物に覆われたファンデカ海嶺の Middle Valley サイト (ODP Leg. 169) (Cragg *et al.*, 2000), 背弧海盆型熱水活動域のマヌス海盆 PACMANUS サイト (ODP Leg. 193) において掘削が行われている。しかし残念ながら, Leg. 158 では熱水孔下の硫化物コアに微生物が検出されず, また Leg. 169 では微生物コンタミネーションの評価が確立されておらず, 検出された超好熱菌をはじめとする微生物群集を熱水孔下環境に起因させることができなかった。ようやく Leg. 193 において, 一定量の生きていると考えられる微生物が検出され (Kimura *et al.*, 2003; 木村ほか, 2003), 熱水孔下微生物の存在は証明されたと言えるが, それらの微生物が本当に熱水循環に依存した微生物なのかについては未だ明らかではない。このようにODPの長い歴史においても, 熱水孔下微生物圏の解明は達成されていない。近年, ODPのような大規模な掘削ではなく, 掘削ロボットを用いたピンポイントでの掘削によって, 熱水孔下微生物圏に対するアプローチ (アーキアンパーク計画) が, 日本の研究者によって推進されている (Urabe *et al.*, 2001; 丸山・浦辺, 2003)。BMS (Boring Machine System) を用いた掘削によって, 伊豆小笠原弧の水曜海山熱水活動域におけるテクトニクス, 地球物理学特性, 熱水化学特性や無機物質循環の解明に成果を挙げているが, 熱水孔下微生物圏の証明には, まだまだ道が険しいと言える。水曜海山の熱水環境における微生物群集の形成が比較的酸化的な表層域に限られているという一連の観察結果 (Sako *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2003b; Nakagawa *et al.*, 2003) からも示されるように, 水曜海山の熱水活動における特異な環境条件も大きな原因であるかもしれないが, 掘削ロボットで回収されるコアが表層部に限られ, 例えば熱水孔下環境のアナログであるチムニー構造物や熱水域堆積物コア及び熱水そのものを詳細に解析して, 深部環境についての類推を

重ねていく間接的方法論と, 得られる微生物情報の量的及び質的違いが少ないのもこの方法論の困難な点と言えるかもしれない。

著者らは, 熱水孔下環境とは, 本質的に熱水と海水との間における物理的, 地球化学的特性と微生物との相互作用に一次的に規定され得ると考えている。つまり, 熱水活動域の海底から調査潜水艇を用いてアクセスできるチムニー構造物や堆積物コアも, 熱水孔下と同様の物理的, 地球化学的そして微生物の相互作用の影響を受けており, 様々な(微)環境に生息する微生物の解析を通じて, 熱水孔下微生物圏に対する類推を間接的に重ねていくことが可能である。実際熱水活動域の表層環境では, 熱水循環に伴って形成されると予想される物理的, 地球化学的勾配が, 熱水活動の中心部から周辺部にかけて, 水平方向に同心円状に現れるケースがある。図4に, 中部沖縄トラフ伊平屋北部の熱水活動域の位置とその活動域の表層に観察されるイベントを示したが, 伊平屋北部の熱水活動域では, NBC と呼ばれる熱水マウンドを中心に, 南北方向の直線上に活発な熱水噴出が認められ, 南から SBC, CBC, NBC, NEC と呼ばれる巨大なマウンドが観察される。熱水の化学的性質から NBCの下に現在の熱水活動の中心が存在し, 熱水孔下で高温流体の二相分離が頻繁に起きていること, かつNBCの地下では気相とブラインの再混合が起きているのに対し, 周辺部では気相に富んだ熱水が卓越していることが考えられている。一方, 熱水マウンドが連立する方向に直交する方向には, 中心部から周辺部にかけて, 最も近いところで岩石の割れ目に沿った緩やかな熱水噴出とそれに伴うシンカイヒバリ貝コロニー, 少し離れたところに間欠的な気泡の噴出と周辺堆積物表面に広がった微生物マット, そしてかなり離れたところでの還元的な堆積物中に形成されたシロウリ貝コロニーという表層環境の変化が観察される (図4)。この変化は, 中心部から水平方向に流れてきた気相に富んだ熱水と表層域での海水との混合によって形成された様々な物理化学的勾配を反映したものであり, 海底下で起こり得る物理化学的勾配の表層におけるアナログであると考えられ,

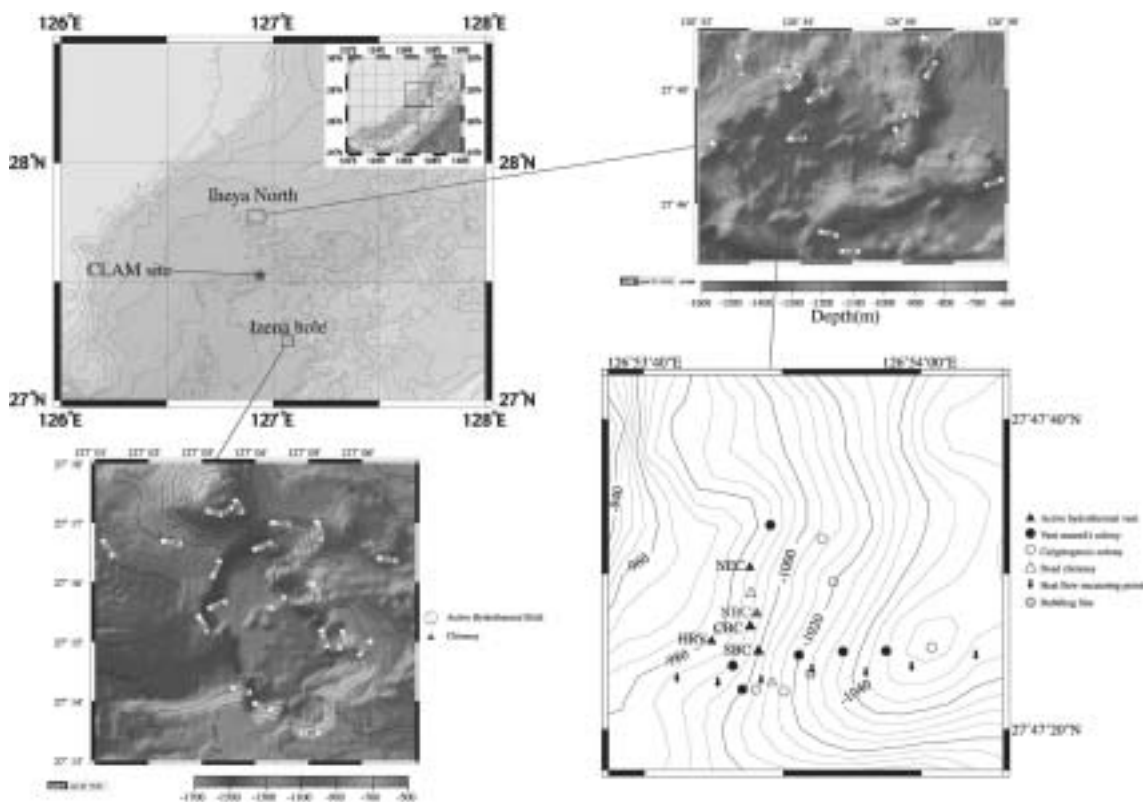


図 4 中部沖縄トラフ熱水活動域の位置及び海底地形図。  
 左上：中部沖縄トラフ全体図及び各熱水活動域の位置。左下：伊是名海穴における海底地形図。網掛は熱水地帯を示す。右上：伊平屋北部における海底地形図。右下：伊平屋北部熱水活動域の詳細図。  
 NEC : North End Chimney, NBC : North Big Chimney, CBC : Central Big Chimney, SBC : South Big Chimney, HRV : High Radioactive Vent.

Fig. 4 Location and bathymetry maps of deep-sea hydrothermal fields in the Mid-Okinawa Trough.  
 Left upper : Location of deep-sea hydrothermal fields in the Mid-Okinawa Trough. Left bottom : Bathymetry map of the Izena Hole. Right upper : Bathymetry map of the Iheya North. Right bottom : Local map of the seafloor hydrothermal events in the Iheya North.  
 NEC : North End Chimney, NBC : North Big Chimney, CBC : Central Big Chimney, SBC : South Big Chimney, HRV : High Radioactive Vent.

その各環境における微生物群集の解析は熱水孔下微生物圏の間接的アプローチである。海底掘削といった直接的なアプローチをする上では、このような掘削に依存しない方法論によって熱水孔下微生物圏の姿をあらかじめ把握しておくことが極めて重要であると思われる。また、極めて純粋に近い噴出熱水は、海水によって運ばれる表層微生物

の影響をほとんど受けない熱水孔下微生物圏の構成微生物を海底に運んでくる媒体である。すなわち純粋な熱水中の微生物の解析は、掘削という大がかりな方法論を用いることなく、熱水孔下微生物圏に直接的にアプローチできる唯一の方法論かもしれない。しかしながら、純粋な熱水を採取することは、現在の技術では極めて困難で、また熱



水中の微生物は、極めて細胞密度及び生存率が低いといった問題点があり、多くの問題点をはらんでいるのも事実である。著者らは、そのような問題点を克服するため、自己記録温度プローブ付き現場培養器 (Takai *et al.*, 2003d) を開発し、熱水によって運ばれてくる熱水孔下微生物の効率的回収に成功している。

これまで著者の研究グループでは、このような方法論で、マヌス海盆の PACMANUS サイト、水曜海山、インド洋中央海嶺の Kairei フィールド及び中部沖縄トラフ伊平屋北部の熱水活動域の研究を進めてきた (高井・掘越, 1999; Takai and Horikoshi, 1999b, 2000a, b; Takai *et al.*, 2000, 2001d, 2002a, 2003b, d; Takai, 2002; Takai and Fujiwara, 2002; Sako *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 2003)。これまでに得られた知見は膨大な量になるため、ここでは詳細に触れないが、要点をまとめると以下の様である。

- (1) 各熱水活動域の表層微生物群集とそこから予想されうる熱水孔下微生物群集は、熱水環境によって異なる (一般化できない)。
- (2) 地理的条件やテクトニックな背景よりも、むしろ堆積物の有無や母岩の性質、温度、pH といった物理化学的要因の影響が大きい (局所性)。
- (3) 熱水孔下における熱源の規模や深さ及び熱水の水理学的特性も極めて重要な因子である (Geohydrological structure の重要性)。
- (4) Kairei フィールドは大西洋中央海嶺やインド洋中央海嶺の、伊平屋北部は堆積物に富んだ熱水活動域のモデルケースになり得る。
- (5) 水曜海山は、極めて特異な環境であるが、島弧における一つのモデルになる可能性がある。

特に、2002 年に行われた「しんかい 6500」を用いたインド洋中央海嶺 Kairei フィールド熱水噴出孔潜航調査と「しんかい 2000」を用いた中部沖縄トラフ伊平屋北部の熱水噴出孔潜航調査の微生物学的研究から、それぞれの熱水活動域における熱水孔下微生物圏の姿が、垣間見えるような成果が得られている。

### 3) インド洋中央海嶺 Kairei フィールドで見つかったハイパースライム

インド洋中央海嶺 Kairei フィールドは、2001 年に世界で初めてインド洋において発見された深海底熱水活動域である (Hashimoto *et al.*, 2001)。その熱水活動域における生物群集についての研究は詳細に行われていたが、微生物群集についてはほとんど明らかにされていなかった (Van Dover *et al.*, 2001)。著者らがインド洋中央海嶺 Kairei フィールド熱水活動域の微生物群集構造を、網羅的定量的培養法及び分子生態学的手法を用いて解析を行ったところ、純粋に近い熱水によって、超好熱メタン菌 *Methanococcales* と超好熱発酵菌 *Thermococcales* が生きた状態で海底下環境から運ばれてきていることが明らかになった (投稿中)。さらに、同時に行われた熱水成分の詳細な地球化学及び同位体化学解析の結果からも海底下でメタン菌によるメタン生成が起きていることを強く示唆する結果が得られた (投稿中)。これらの結果から、熱水孔下環境に、超好熱メタン菌 *Methanococcales* と超好熱発酵菌 *Thermococcales* を中心とした超好熱性地殻内独立栄養微生物生態系 (英語で Hyperthermophilic Subsurface Litho-auto-trophic Microbial Ecosystem: Hyper-SLiME となるため、ハイパースライムと呼んでいる) が存在する可能性が極めて高いことが示唆された。ハイパースライムとは、熱水孔下微生物群集の存在様式を意味するものであるが、簡単に説明すると地球内部エネルギー (化学物質で言うならば水素、メタン、硫化水素、一酸化炭素及び二酸化炭素) のみに依存した「地球を食べる微生物」を一次生産者とする生態系である (Takai, 2002)。この微生物生態系は、惑星の内部エネルギーの供給と水の存在があれば形成され得る。太陽の活動が弱く、生命の営みに不利であった表層を避けて、原始地球に最初に誕生した微生物生態系 (最初の微生物は従属栄養性であると考えられるが、限りある有機物を消費し尽くすと絶滅してしまったであろう) の姿をそのまま残していると考えられる。また地球以外の惑星にも存在し得る可能性が最も高いと考えられている (McCollom, 1999; Fisk

and Giovannoni, 1999)。この地球を食べる微生物生態系は、1995年にコロンビア川玄武岩帯深部地下水中の微生物群集の解析を通じて、最初に提唱された(Stevens and McKinley, 1995)。彼らは、コロンビア川玄武岩帯深部地下水中には、表層からもたらされる光合成由来の有機炭素は極めて少ないにも関わらず、かなりの微生物量が存在しており、その優占種が、水素と二酸化炭素のみをエネルギー及び炭素源とするメタン菌と酢酸菌であることを見出した。しかもこれらの微生物を支えている水素と二酸化炭素が、地下水と玄武岩との化学反応で供給され得ることを実験的に示し、これらの微生物群集が、太陽光による光合成に全く依存しない地球内部エネルギーに支えられた地殻内化学合成独立栄養性微生物生態系(Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystem: SLiME)であるというスライム仮説を提唱した。しかしながらこのスライム仮説に対して、1998年に否定的な論文が発表され(Anderson *et al.*, 1998)、2002年には同じ著者らによって、アイダホの地下温泉中にメタン菌が優占する好熱性スライムの発見が発表された(Chapelle *et al.*, 2002)。この論文では、コロンビア川玄武岩帯深部地下水と玄武岩の化学反応による水素生成が地殻内の温度が低いために生成量が少ないことを考慮し、より高温での地下水と岩石の反応によってより大量の水素が生成されるという仮説に基づいていたが、微生物学的評価に様々な問題があり、好熱性スライムの存在を証明するには、明らかに不十分な内容であった。これらスライム仮説の証明において歴史的に問題となってきたすべての要素、すなわち a) 光合成一次生産に依存しない地殻内における水素と二酸化炭素の十分な供給、b) メタン菌が卓越した化学合成独立栄養微生物を一次生産者とする微生物群集の存在、c) その一次生産の活性、d) 水素及びメタンの量論的整合性と同位体による生物反応の確認、をすべてクリアする成果が、インド洋中央海嶺 Kairei フィールド熱水活動域の調査によって得られている。

#### 4) 中部沖縄トラフ熱水活動域における熱水孔下微生物圏への取り組み

中部沖縄トラフ熱水活動域における熱水孔下微生物圏については、著者が中心となって統合深海掘削計画(IODP)における掘削(IODP プロポーサル 601)を提案し、その実現に向けた取り組みを行っている。その主要な掘削対象が伊平屋北部の熱水活動域である。中部沖縄トラフ伊平屋北部の熱水噴出孔環境は、1995年の海洋科学技術センターによる深海曳航調査で発見され、1996年の「しんかい2000」の潜航調査によって、千葉ほかによってその熱水が初めて解析された(Chiba *et al.*, 1996)。その後現在までに20回の潜航調査が行われ、熱水活動のマッピングやセッティング、熱水や硫化物鉱物の化学的性質の検討や生物群集の記載に加え、詳細な微生物マッピングが行われている。これまでの潜航調査における表層域の観察により、図4に示されるように活発な熱水噴出は、NBCと呼ばれる硫化物マウンドを中心に、南北方向に広がりを見せている。おそらくこの方向性を持った断層が流体の通り道の役割を果たしており、それぞれ高さ20-30m、幅10-20mの巨大なマウンドの中腹から、フランジ状の構造を持った緩やかな熱水噴出や頂点からチムニーを伴った活発な噴出が観察される。このような巨大な硫化物鉱床は、海底下まで広がりを持っていることが予想され、この熱水活動域がかなり長い期間、同じ場所で続いてきたことを明確に示している。成熟した熱水鉱床は、熱水活動に依存した豊かな熱水孔下微生物圏を形成すると予想されることから、熱水孔下微生物圏の研究には極めて有利な熱水活動域であると言える。現在、伊平屋北部の熱水孔下微生物圏における微生物群集の分布、多様性、動態、生理機能を含めたモデルが明らかになりつつある。このモデルに対して、地球化学プロセスのモデル、さらには熱流量と精密海底重力測定の結果及び海底下部構造地震波探査による結果を踏まえた熱水孔下地殻構造及び熱水循環のモデルを重ね、将来の掘削によって直接検証を行ってゆく予定である。

#### IV. 深海底熱水活動と地殻内微生物圏の接点

1999年、著者は、西フィリピン海、水深5719mより得られた、過去250万年間の深海堆積物からなる14mのピストンコア中の微生物群集を、分子系統学的手法を用いて研究を行った。その結果、バクテリア群集では、深海に普遍的に存在する種組成が一様に見られたのに対し、アーキア群集では、海水の浸透がなくなる5m以深の堆積物中に、超好熱菌や高度好塩菌の遺伝子シグナルが検出された (Inagaki *et al.*, 2001)。これらの極限環境微生物は、低温かつ海水と同程度の塩濃度を有する堆積物間隙水では生育できないことから、現在活動的な地殻内微生物群集から由来するとは考えられなかった。結論として著者は、それらの極限環境微生物が、フィリピン海周辺に存在する深海底熱水活動域や火山帯の過去の熱水活動や火山活動によって運ばれ堆積した過去の微生物 (パレオブ) であると考察した。また、フィリピン海以外の深海底堆積層の研究においても、アーキア群集の優占種として同様の超好熱菌や高度好塩菌の遺伝子シグナルが検出されており (Inagaki *et al.*, 2002b)、陸域地下環境においても過去の堆積物中に海洋性超好熱菌の存在が示唆されつつある (Takai *et al.*, 2003c)。これら最新の研究成果から、これまで地球上の極めて限られた環境にのみ生息していると考えられていた極限環境微生物が、海底下微生物圏をはじめとした地殻内微生物圏において普遍的に存在し、重要な役割を果たしていることが初めて示唆された。

一方、これまでに行われてきた世界各地の深海底熱水活動域における超好熱菌の研究においては、地理的及び地質学的に異なる背景を有した様々な深海底熱水活動域 (中央海嶺系、島弧系、背弧系あるいは太平洋、大西洋、インド洋) で、一般的には極めて良く似た近縁な超好熱菌が生息していることが知られている。現在の海洋環境とは地理的に隔たりのある陸域地下の非連続的に存在する油田環境中にも、深海底熱水活動域に生息する *Thermococcales* と遺伝的に区別できない程近縁な *Thermococcales* が普遍的に存在することが知

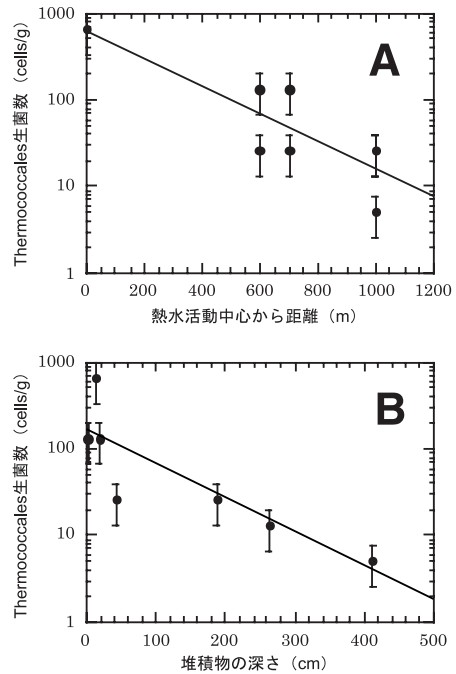


図 5 中部沖縄トラフ伊是名海穴周辺の堆積物中の *Thermococcales* 群集の生存量と熱水活動域からの距離と深度との相関図。  
A: *Thermococcales* 群集の生存量と熱水活動域からの水平距離との相関。  
B: *Thermococcales* 群集の生存量と堆積物の深さとの相関。  
*Thermococcales* 生存量は、熱水活動域からの距離が長くなる程、また堆積物の深度が増大する程、減少することが示された。

Fig. 5 Correlation of viable population of *Thermococcales* with distance and time duration of their propagation from the Izena hydrothermal field in Okinawa Trough, Japan.  
A: Correlation with distance from hydrothermal field.  
B: Correlation with depth of the sediments (time duration from their origin).

られている。地理的及び環境的に大きく隔たりがある局所的な高温域で、なぜこのような地球規模での類似性が見られるのか？ これも一つの大きな謎であった。この謎を説明するために、これま

での研究では、海水を通じた超好熱菌をはじめとした極限環境微生物の伝播が考えられてきた。前述のように、海洋環境の熱水活動域で火山噴火や大規模な突発的な熱水活動が起きた場合、周辺海水中に定常的な熱水活動では起こり得ない高密度の超好熱菌群集が放出されることが知られており、海中に放出された極限環境微生物が海水循環によって地球規模での海洋環境に伝播することは十分に考えられる。しかしながら、これまでこの海水を通じた伝播を実験的に証明した例はなく、また海水を通じた伝播だけでは、地理的及び環境的に大きく隔たりがある陸域地下の *Thermococcales* の分布が説明できない。著者の研究グループでは、海水を通じた伝播に加えて、もう一つ堆積物と共にプレートテクトニクスによって陸域にまで運ばれ付加する伝播機構が存在するのではないかと考えている。

そのような地球規模での極限環境微生物の普遍的分布を説明する、海水と堆積物を通じた二つの伝播機構の存在を検証するため、著者は沖縄トラフ熱水孔域周辺から様々な堆積物を採取し、超好熱性アーキアである *Thermococcales* 群集の生存量と試料の熱水活動域からの距離や深度との相関について解析を行った(図5)。その結果、熱水活動とは直接関係していない低温の深海堆積物中から活動的な *Thermococcales* 群集が検出され、その生存量は、熱水活動域からの距離が長くなる程、また堆積物中の深さが増加する程、減少することが示された。これらの結果は、生きている *Thermococcales* をはじめとする極限環境微生物が、熱水活動域から放出された後、海水を通じて運搬され、堆積物中に蓄積されてゆく過程を初めて実験的に示した例であった。さらに沖縄トラフにおける平均堆積速度を考えた場合、本研究結果から、*Thermococcales* はかなり長い期間(おそらく数千年から数万年)、生きたままの状態では海底下環境に存在していることが推測された。

これらの一連の研究成果は、これまで地球において極めて限られた特殊な環境にのみ生息していると考えられてきた極限環境微生物が、地殻内微生物圏においては普遍的に存在しており、その地

殻内微生物圏の存在が極限環境微生物の伝播に重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。

## V. おわりに

本稿では、地球に残された二つの極限環境フロンティアである深海底熱水活動域と地殻内に存在する微生物について、現在にいたるその研究の歴史と最新の成果を紹介してきた。その最新成果から、一見無関係に見える二つの極限環境微生物の世界が、実は協同的に地球規模での微生物の分布や動態を決定付ける重要な役割を果たしてきた可能性が見えつつある。さらに、深海底熱水活動域での熱水循環や沈み込み帯における湧水現象、あるいは陸域における火山活動や温泉は、地殻内微生物の世界を地球表層にもたらず原動力となっているだけでなく、地球と生命の共進化によっておそらくすっかり変貌してしまった地球表層環境のなかで、原始の地球における微生物の生息環境を再現している場と言える。そのような活動的地殻内微生物圏には、最古の微生物生態系でかつ光合成システム誕生以前の先カンブリア紀における最も重要な一次生産を担っていたであろうと推測されるハイパースライムのような独特の地殻内微生物の姿が見つかりつつある。そのような活動的地殻内微生物群集の存在様式だけでなく、地殻内微生物圏を研究する上でさらに重要な概念は、地殻内環境というものが、今現在の活動的微生物群集の場であると同時に、それが40億年にも及ぶ地球と生命の歴史を克明に保存してきた場でもあるとすることである。おそらく地球における熱水活動は、生命の誕生と初期進化過程から、多細胞生物の出現と多様性爆発、大量絶滅をへて現在に至るまで、生命とそのゆりかごである地球の進化を決定付ける大きな役割を果たしてきたに違いない。いま我々は、熱水活動域と地殻内環境における微生物の世界の研究を通じて、その地球と生命の共進化を解き明かす鍵を手に入れたと言える。

## 文 献

- Anderson, R.T., Chapelle, F.H. and Lovley, D.R. (1998) Evidence against hydrogen-based microbial ecosystems in basalt aquifers. *Science*, **281**, 976 977.
- Bale, S.J., Goodman, K., Rochelle, P.A., Marchesi, J.R., Fry, J.C., Weightman, A.J. and Parkes, R.J. (1997) *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulphate-reducing bacteria from deep sediment layers in the Japan Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 515 521.
- Bastin, E. (1926) The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. *Science*, **63**, 21 24.
- Bidle, K.A., Kastner, M. and Bartlett, D.H. (1999) A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B) *FEMS Microbiol. Lett.*, **177**, 101 108.
- Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Witte, U. and Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **407**, 623 626.
- Boivin-Jahns, V., Bianchi, A., Ruimy, R., Garcin, J., Daumas, S. and Christen, R. (1996) Comparison of phenotypical and molecular methods for the Identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3405 3412.
- Boone, D.R., Liu, Y., Zhao, Z., Balkwill, D.L., Drake, G.R., Stevens, T.O. and Aldrich, H.C. (1995) *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe (III) and Mn (IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 441 448.
- Chandler, D.P., Brockman, F.J., Bailey, T.J. and Fredrickson, J.K. (1998) Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in a deep subsurface paleosol. *Microb. Ecol.*, **36**, 37 50.
- Chapelle, F.H., O'Neill, K., Bradley, P.M., Methe, B.A., Ciufo, S.A., Knobel, L.L. and Lovley, D.R. (2002) A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature*, **415**, 312 315.
- Chiba, H., Ishibashi, J., Ueno, H., Oomori, T., Uchiyama, N., Takeda, T., Takemie, C., Ri, J. and Itomistu, A. (1996) Seafloor hydrothermal systems at North Knoll, Iheya Ridge, Okinawa Trough. *JAMSTEC J. Deep Sea Res.*, **12**, 211 219. (in Japanese with English abstract)
- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., Von Herzen, R.P., Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, A. and Van Andel, T.H. (1979) Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, **203**, 1073 1083.
- Cragg, B.A., Harvey, S.M., Fry, J.C., Herbert, R.A. and Parkes, R.J. (1992) Bacterial biomass and activity in the deep sediment layers of the Japan Sea, Hole 798B. *Proc. Ocean Drill. Program: Sci. Results*, **127/128**, 761 776.
- Cragg, B.A., Parkes, R.J., Fry, J.C., Weightman, A.J., Rochelle, P.A., Maxwell, J.R., Kastner, M., Hovland, M., Whiticar, M.J. and Sample, J.C. (1995) The impact of fluid and gas venting on bacterial populations and processes in sediments from Cascadia Margin accretionary system (sites 888 892) and the geochemical consequences. *Proc. Ocean Drill. Program: Sci. Results*, **146**, 399 411.
- Cragg, B.A., Summit, M. and Parkes, R.J. (2000) Bacterial profiles in a sulfide mound (site 1035) and an area of active fluid venting (site 1036) in hot hydrothermal sediments from Middle Valley (Northeast Pacific) *Proc. Ocean Drill. Program: Sci. Results*, **169**, 1 18.
- Delaney, J.R., Kelley, D.S., Milley, M.D., Butterfield, D.A., Baross, J.A., Wilcock, D.S.D., Embley, R.W. and Summit, M. (1998) The quantum event of oceanic crustal accretion: Impacts of diiking at Mid-Ocean Ridges. *Science*, **281**, 222 230.
- Deming, J.W. and Baross, J.A. (1993) Deep-sea smokers: Windows to a subsurface biosphere? *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 3219 3230.
- D'Hondt, S., Ruthertford, S. and Spivack, A.J. (2002) : Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, **295**, 2067 2070.
- Fisk, M.R. and Giovannoni, S.J. (1999) Sources of nutrients and energy for a deep biosphere on Mars. *J. Geophys. Res.*, **104** (E12) 11805 11815.
- Fredrickson, J.K. and Fletcher, M. eds. (2001) *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry*. John Wiley & Sons.
- Hashimoto, J., Ohta, S., Gamo, T., Chiba, H., Yamaguchi, T., Tsuchida, S., Okudaira, T., Watabe, H., Yamanaka, T. and Kitazawa, M. (2001) First hydrothermal vent communities from the Indian Ocean discovered. *Zoological Sci.*, **18**, 717 721.
- Hazen, T.C., Jimenez, L., Lopez de Victoria G. and Fliermans, C.B. (1991) Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microb. Ecol.*, **22**, 293 304.
- Hinrichs, K.U., Hayes, J.M., Sylva, S.P., Brewer, P.G. and DeLong, E.F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, **398**, 802 805.
- Huber, R., Stoffers, P., Cheminee, J.L., Richnow, H.H. and Stetter, K.O. (1990) Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume of erupting Macdonald Seamount. *Nature*, **345**, 179 182.

- Inagaki, F., Takai, K., Komatsu, T., Kanamatsu, T., Fujioka, K. and Horikoshi, K. (2001) Archaeology of archaea: Geomicrobiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea seafloor environments. *Extremophiles*, **5**, 385-392.
- Inagaki, F., Okada, H., Tsapin, A., Neelson, K. H. and Horikoshi, K. (2002a) Endolithic genetic record of ancient microbes in Cretaceous black shale. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **66**(S1) A354.
- Inagaki, F., Sakihama, Y., Takai, K., Komatsu, T., Inoue, A. and Horikoshi, K. (2002b) Profile of microbial community structure and presence of endolithic microorganisms inside a deep-sea rock. *Geomicrobiol. J.*, **19**, 535-552.
- Inagaki, F., Sakihama, Y., Inoue, A., Kato, C. and Horikoshi, K. (2002c) Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environ. Microbiol.*, **4**, 277-286.
- Ingebritsen, S.E., Sanford, W.E. and Toth, J. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in seafloor sediments: A review. *Hydrogeol. J.*, **8**, 11-28.
- Ishibashi, J. and Urabe, T. (1995) Hydrothermal activity related to arc-backarc magmatism in the Western Pacific. In Taylor, B. ed.: *Backarc Basins: Tectonics and Magmatism*. Plenum Press, 451-495.
- Kalyuzhnaya, M.G., Khmelenina, V.N., Kotelnikova, S., Holmquist, L., Pedersen, K. and Trotsenko, Y.A. (1999) *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep Igneous rock groundwater of Sweden. *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 565-572.
- Kieft, T.L., Fredrickson, J.K., Onscott, T.C., Gorby, Y.A., Kostandarithes, H.M., Bailey, T.J., Kennedy, D.W., Li, S.W., Plymale, A.E., Spadoni, C.M. and Gray, M.S. (1999) Dissimilatory reduction of Fe (III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1214-1221.
- 木村浩之・長沼 毅 (2003) 西太平洋マヌス海盆における海底熱水噴出域深部の地下生物圏. 地学雑誌, **112**, 250-261.
- Kimura, H., Asada, R., Masta, A. and Naganuma, T. (2003) Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus Basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 644-648.
- Kotelnikova, S., Macario, A.J. and Pedersen, K. (1998) *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 357-367.
- Krumholz, L.R. (2000) Microbial communities in the deep subsurface. *Hydrogeol. J.*, **8**, 4-10.
- Lanoil, B.D., Sassen, R., La Duc, M.T., Sweet, S.T. and Neelson, K.H. (2001) Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5143-5163.
- Marchesi, J.R., Weightman, A.J., Cragg, B.A., Parkes, R.J. and Fry, J.C. (2001) Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **34**, 221-228.
- 丸山明彦・浦辺徹郎 (2003) 海底熱水地下生物圏へのアプローチ. 地学雑誌, **112**, 309-322.
- McCollom, T.M. (1999) Methanogenesis as a potential source of chemical energy for primary biomass production by autotrophic organisms in hydrothermal systems on Europa. *J. Geophys. Res.*, **104** (E12), 30729-30742.
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M., Knittel, K., Gieseke, A., Peterknecht, K., Pape, T., Boetius, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Widdel, F., Peckmann, J., Pimenov, N.V. and Gulin, M.B. (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, **297**, 1013-1015.
- Motamedi, M. and Pedersen, K. (1998) *Desulfovibrio aespoensis* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium from deep groundwater at Aspo hard rock laboratory, Sweden. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 311-315.
- Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K. and Sako, Y. (2003) *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.
- Orphan, V.J., Hinrichs, K.U., Ussler, W.III, Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P., Hayes, J.M. and Delong, E.F. (2001a) Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1922-1934.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeehan, K.D. and DeLong, E.F. (2001b) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, **293**, 484-487.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeehan, K.D. and DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7663-7668.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., Bale, S.J., Getliff, J.M., Goodman, K., Rochelle, P.A., Fry, J.C., Weightman, A.J. and Harvey, S.M. (1994) Deep bacterial biosphere in Pacific ocean sediments. *Nature*, **371**, 410-413.
- Pedersen, K. and Ekendahl, S. (1990) Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeast Sweden. *Microb. Ecol.*, **20**, 37

- 52.
- Pedersen, K., Arlinger J., Hallbeck, L. and Pettersson, C. (1996a) Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S rRNA gene sequencing. *Mol. Ecol.*, **5**, 427-436.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Ekendahl, S. and Hallbeck, L. (1996b) 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to Aspö hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **19**, 249-262.
- Reed, D.W., Fujita, Y., Delwiche, M.E., Blackwelder, D.B., Sheridan, P.P., Uchida, T. and Colwell, F.S. (2002): Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a Forearc Basin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3759-3770.
- Reysenbach, A.-L., Holm, N.G., Hershberger, K., Prieur, D. and Jeanthon, C. (1998) In search of a subsurface biosphere at a slow-spreading ridge. *Proc. Ocean Drill. Program: Sci. Result*, **158**, 355-360.
- Sako, Y., Nakagawa, S., Takai, K. and Horikoshi, K. (2003) *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 59-65.
- Stetter, K.O., Fiala, G., Huber, H., Huber, R. and Segerer, A. (1990) Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, **75**, 117-124.
- Stevens T.O. and McKinley, J.P. (1995) Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science*, **270**, 450-454.
- Stevens, T.O., McKinley, J.P. and Fredrickson, J.K. (1993) Bacteria associated with deep, alkaline, anaerobic groundwaters in southeast Washington. *Microb. Ecol.*, **25**, 35-50.
- Takai, K. (2002) Possible occurrence of a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath deep-sea hydrothermal systems. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **66**(S1), A761.
- Takai, K. and Fujiwara, Y. (2002) Hydrothermal vents: Biodiversity in deep-sea hydrothermal vents. In Bitton, G. ed.: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, 1604-1617.
- 高井 研・掘越弘毅 (1999) 深海底熱水孔環境における微生物の多様性 海底下微生物圏への窓 . 月刊海洋, **19**, 190-196 .
- Takai, K. and Horikoshi, K. (1999a) 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.
- Takai, K. and Horikoshi, K. (1999b) Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, **152**, 1285-1297.
- Takai, K. and Horikoshi, K. (2000a) Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5066-5072.
- Takai, K. and Horikoshi, K. (2000b) *Thermosiphon japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Int. Extremophiles*, **66**, 5066-5072.
- 高井 研・左子芳彦 (2000) 極限環境ゲノム研究 その発展と展望 . *Microbes and Environments*, **15**, 45-57.
- 高井 研・稲垣史生 (2002) 極限環境微生物生態系と特殊微生物の探索 . 月刊バイオインダストリー, **19**, 7-17 .
- Takai, K., Sugai, A., Itoh, T. and Horikoshi, K. (2000) *Palaecoccus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 489-500.
- Takai, K., Moser, D.P., Onstott, T.C., Spoelstra, N., Pfiffner, S.M., Dohnalkova, A. and Fredrickson, J.K. (2001a) *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1245-1256.
- Takai, K., Komatsu, T. and Horikoshi, K. (2001b) *Hydrogenobacter subterraneus* sp. nov., an extremely thermophilic, heterotrophic bacterium unable to grow on hydrogen gas, from deep subsurface geothermal water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1425-1435.
- Takai, K., Moser, D.P., Onstott, T.C. and Fredrickson, J.K. (2001c) Archaeal diversity in deep subsurface South African gold mine environments and phylogenetic organization of archaeal domain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5750-5760.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F. and Horikoshi, K. (2001d) Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3618-3629.
- Takai, K., Inoue, A. and Horikoshi, K. (2002a) *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1089-1095.
- Takai, K., Hirayama, H., Sakihama, Y., Inagaki, F., Yamato, Y. and Horikoshi, K. (2002b) Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order *Aquificales* in a subsurface gold mine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3046-3054.
- Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K.H. and Horikoshi, K. (2003a) *Sulfurihydrogenobium sub-*

- terraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.
- Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K.H. and Horikoshi, K. (2003b) *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- or arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.
- Takai, K., Inagaki, F. and Horikoshi, K. (2003c) Distribution of unusual Archaea in subsurface biosphere. *AGU Monograph on Subseafloor Biosphere in the Mid-Ocean-Ridges*, in press.
- Takai, T., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y., Nealson, K.H. and Horikoshi, K. (2003d) Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated epsilon-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiol. Lett.*, **218**, 167-174.
- Takai, K., Mormile, M.R., McKinley, J.P., Brockman, F.J., and Fredrickson, J.K. (2003e) Subsurface microbial community structures associated with lithological and geochemical variations in Cretaceous rock. *Environ. Microbiol.*, in press.
- Urabe, T., Maruyama, A., Marumo, K., Seama, N. and Ishibashi, J. (2001) The archaean park project update. *InterRidge News*, **10**, 23-25.
- Van Dover, C.L. et al. (2001) Biogeography and ecological setting of Indian Ocean hydrothermal vents. *Science*, **294**, 818-823.
- Waseda, A. (1998) Organic carbon content, bacterial methanogenesis, and accumulation processes of gas hydrates in marine sediments. *Geochem. J.*, **32**, 143-157.
- Wellsbury, P., Goodman, K., Barth, T., Cragg, B.A., Barns, S.P. and Parkes, R.J. (1997) Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature*, **388**, 573-576.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6578-6583.

(2003年1月28日受付, 2003年3月24日受理)