

西太平洋マヌス海盆における海底熱水噴出域深部の 地下微生物圏

木村 浩之* 長沼 毅*

Deep Subsurface Biosphere of a Hydrothermal Vent Field in the Manus Basin of the Western Pacific

Hiroyuki KIMURA * and Takeshi NAGANUMA *

Abstract

Occurrence and distribution of microorganisms in the subsurface of deep-sea hydrothermal vents (sub-vents) were investigated using sub-vent rock samples (cores, approximately 6.5 cm in diameter) collected by the Ocean Drilling Program (ODP). The central parts of the cores (subcores, approximately 1.5 cm in diameter) were extracted in an anaerobic chamber. The degree of contamination by drilling fluid (surface seawater in ODP) was tested using perfluorocarbon (PFC) tracers. The test showed that PFC-traced contamination was limited to core surfaces and was not detected in subcores. Therefore, subcores were used in microbiological analyses for direct counts, adenosine 5-triphosphate (ATP) measurements, thermophilic incubations, and 16S ribosomal RNA gene (16S rDNA) sequences. Microbial cells in the subcores were observed from depths shallower than 97.9 meters below the seafloor (mbsf) by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-epifluorescence microscopy. Similarly, ATP was detected only from depths shallower than 44.8 mbsf by the luciferin-luciferase method. Portions of subcores from various depths, 9.7–301.5 mbsf, were directly incubated anaerobically with a heterotrophic medium at temperatures of 60 °C and 90 °C. After two weeks, an increase in cell numbers was observed for 60 °C-cultures from 59.8–99.4 mbsf samples, and for 90 °C-cultures from 69.1–128.9 mbsf samples. The 16S rDNA sequences suggest that microorganisms from the 60 °C- and 90 °C-cultures are closely related to the thermophilic species belonging to the genera *Geobacillus* and *Deinococcus*, respectively. These results indicate 1) existence of microbial habitats in the sub-vent region of subseafloor, and 2) habitat segregation of thermophilic bacteria over the sub-vent thermal gradient.

Key words : sub-vent biosphere, thermophiles, deep-sea hydrothermal vent field, Ocean Drilling Program

キーワード : サブベント生物圏, 好熱菌, 海底熱水噴出孔域, 国際深海掘削計画

* 広島大学大学院生物圏科学研究科

* School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

I. はじめに

東太平洋海膨 21°N という今や古典的な海域に 300 を超える高温熱水の噴出とそこに生息する特異な生物群集が 1979 年に発見されて以来、熱水噴出域から好熱菌および超好熱菌を含む多数の微生物が単離されてきた (Reysenbach *et al.*, 2002 によるレビュー参照)。ほぼ同じ頃に発展した“培養に依存しない微生物群集の種組成解析”, すなわち 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) などをターゲットとした遺伝子解析が、熱水環境に生息する微生物の群集解析にも適用されるようになり、海底熱水域の微生物組成は熱水環境の特性を反映することがわかってきた。例えば、熱水による高温環境では好熱菌が優先し、また、嫌気的なガス成分が多量に供給されている熱水域にはそれを栄養として生育する独立栄養細菌が卓越している等のことが報告されて来ている (Moyer *et al.*, 1995; Jeanthon, 2000; Takai *et al.*, 2001)。

深海熱水域は高温熱水 (> 300) が低温海水 (2 程度) に放出される環境にあり、温度・pH・酸化還元電位などに関する鋭い環境勾配が形成されている。それゆえに、海底熱水域に生息する微生物群集は高い多様性を示すと言われている。しかし、これまでの微生物研究対象は、海底熱水循環系の中でも熱水やチムニー、堆積物といった海底面付近に限られていた。

米国ワシントン大学の Deming と Baross は、海底熱水とその周辺海水に含まれる核酸および脂肪酸の分布調査を行った (Deming and Baross, 1993)。そして、海底熱水域に分布する有機物のかなりの部分は熱水系に依存した微生物由来のものであることを明らかにした。

さらに 1996 年にファン・デ・フーカ海嶺の熱水噴出域で行われた国際深海掘削計画 (Ocean Drilling Program, ODP) の第 169 掘削航海 (Fouquet *et al.*, 1998) では、海底熱水域の掘削により 350 の熱水を掘り当てた。その熱水中には、海底下の微生物マットの一部と思われる白い浮遊物が無数に観察され、海底下に微生物の生息場所

が存在する可能性が示唆された。

このような熱水噴出孔下の微生物圏 (サブベント生物圏) の存在を“可能性”から“事実”として確認するために、そして、サブベント微生物の多様性やその分布などを明らかにする企図の一環として、ODP 第 193 掘削航海 (2000 年 11 月 ~ 2001 年 1 月) が、西太平洋マヌス海盆海底熱水噴出域の PACMAMUS site で行われた (Binns *et al.*, 2002)。本稿では、海底熱水噴出域掘削とその際に回収された岩石コアを用いた微生物研究の方法論について記述し、一つのサブベント生物圏の例として紹介する。

II. マヌス海盆における熱水活動の特徴

ニューブリテン島弧-海溝系に属すマヌス海盆は、西太平洋の背弧海盆のひとつである (図 1)。本海域では、トランスフォーム断層で区切られた 3 つのセグメント (西マヌス拡大軸, WMSC; マヌス拡大軸, MSC; 南東海嶺, SER) で海底拡大が見られる。中央に位置する MSC の南部では、現世の背弧海盆における最速拡大 (10 cm y^{-1}) が知られている。海底熱水活動は MSC と SER で見つかっている。MSC での海底熱水活動は、1986 年にドイツの調査船ゾネの海底写真観測によって初めて確認された。また 1990 年には、275 の熱水を噴出する熱水チムニー群“ウィーンの森”が、ソ連 (当時) の潜水艇ミールによって観察された。

マヌス海盆におけるもう一つの活動的熱水噴出域 (SER) は、1986 年の PAPATUA 航海 (米国スクリップス海洋研) や 1990 年の白鳳丸 KH-90-3 航海 (東大海洋研) によって調査され 2 カ所の熱水噴出域が指摘された。そのうちの 1 カ所は、直径 1 ~ 2 km のカルデラ状凹地であることが分かった (DESMOS site)。1991 年には SER でさらにもう 1 カ所の熱水噴出域が発見され、PACMANUS site と命名された (Binns and Scott, 1993)。そして、2000 年の日仏共同 MANAUTE 航海でフランスの潜水艇ノティールが DESMOS site の東側で 220 ~ 280 の新たな熱水噴出域 (SuSu site) を発見した (Auzende *et al.*, 2000)。

その後も潜水調査船「しんかい2000」などの調査により、比較的狭い範囲に多様な熱水噴出孔が発見され、一種の“熱水噴出孔の博物館”といった様相を呈している。別の観点では、鉱物資源を巡る鉱区権設定と生態系保存および生物資源の利用・開発などの思惑が激しく交差している生々しい現実の場でもある。

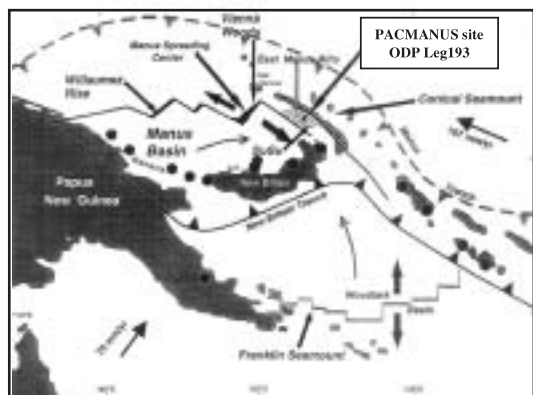
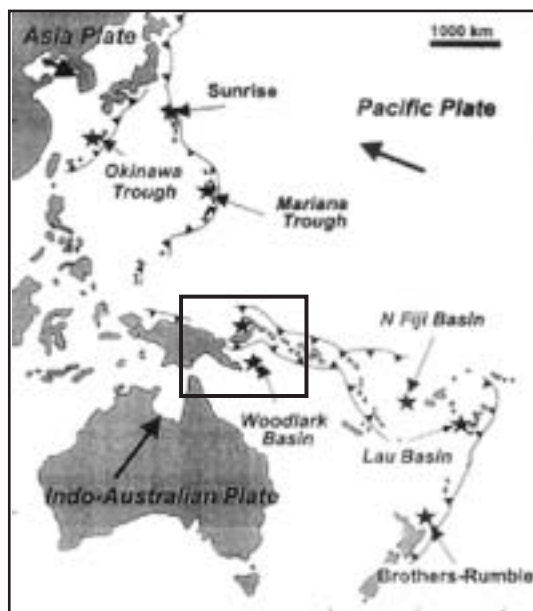


図 1 マヌス海盆周辺のテクトニクスと海底熱水噴出域の分布。

Fig. 1 A map showing the tectonics of the Manus Basin region and the location of the hydrothermal active fields.

III. 熱水域の海底掘削と岩石サンプル

ODP 第 193 掘削航海は、マヌス海盆の SER に位置する PACMANUS site (水深 1640 ~ 1690 m) をターゲットとした。本サイトは石英安山岩よりなる比高 500 m、長さ 20 km の Y 字型をした Pual (バプア語でフォークの意味) 海丘の尾根に位置し、熱水噴出域が北東-南西方向に約 1 km にわたって分布している。ここでの掘削は、PACMANUS site 南西部の Site 1188 (Snowcap) と、北東部の Site 1189 (Roman Ruins) の 2 カ所で行われた (図 2; Binns *et al.*, 2002)。

Site 1188 は、85 ~ 104 の比較的中温の熱水噴出が観察された場所である。本サイトでは“Hole 1188”と名付けられた孔が掘削され、最終的に海底下 387 m (meters below seafloor; mbsf) までの掘削に成功した。海底面から 48.2 mbsf までの浅部からは、多孔質の安山岩や石英安山岩が回収され、さらに深部からは熱変質を受けた火山岩が回収された (図 3)。地下深部から採取

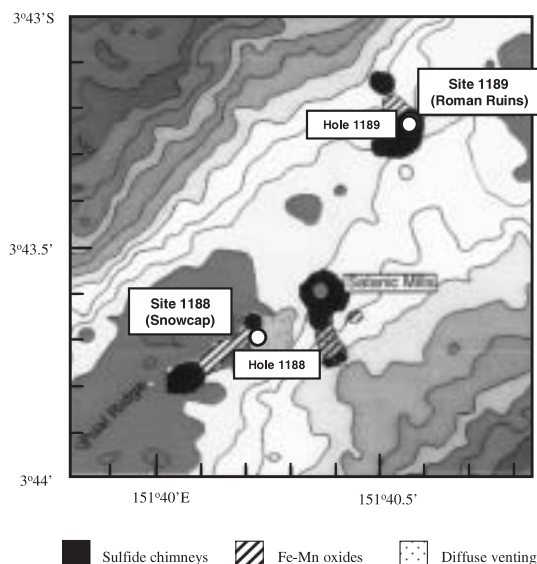


図 2 PACMANUS site における海底熱水域と掘削サイト。

Fig. 2 Distribution of hydrothermal deposits and drilling sites at the PACMANUS site.

された火山岩には、多数の熱水脈が観察された。また、その熱水脈中には黄鉄鉱や黄銅鉱などの硫化物結晶が見られた。掘削終了から 8 日後に行われた孔内温度測定の結果、Hole 1188 の最深部付近(363.4 mbsf)の現場温度は少なくとも 313 で

あったことがわかった。(表 1)

“ローマの遺跡”と呼ばれた Site 1189 は、220 ~ 268 の熱水の噴出が知られていた地点である。本サイトでは“Hole 1189”と名付けられた孔が掘削され、最終的に 206 mbsf までの掘削に成功した。海底面から 19.4 mbsf までの浅部には多孔質の安山岩や石英安山岩が見られ、以深からは熱変質を受け熱水脈が発達した火山岩が回収された。掘削終了直後の孔内温度、すなわち、まだ“真の現場温度”に回復していない孔内温度は、106.3 mbsf で 68 であった(表 1)。なお Site 1189 での海底掘削は航海の最後に行われたので、孔内温度が“真の現場温度”に回復するまで待てないという事情があった。逆に言うと、106.3 mbsf の現場温度は 68 を優に超えていたと考えられる。

IV . 掘削流体による汚染調査とコア処理

コアリングにおいて、掘削流体とコア試料の接触は不可避である。したがってコア試料を用いる地下微生物研究では、掘削流体によるコア試料の汚染の「防止」よりも、汚染の「検出」の方が現実的に重要である。ODP では掘削流体に表層海水を使用しており、表層海水中の微生物 (10^{5-6} cells ml⁻¹) による汚染が深刻な問題である。そのため、第 185 航海から汚染検出法として直径 0.52 μ m の蛍光微小ビーズ (FMB) やパーフルオロカーボン (PFC) などの汚染トレーサーが掘削流体に添加され、コア試料における FMB や PFC の有無をもって汚染の有無の判定が行われることになった (Smith *et al.*, 2000a, b)

約 0.5 ~ 1.0 μ m の微生物とほぼ同サイズである微小蛍光ビーズは、汚染源としての掘削水微生物

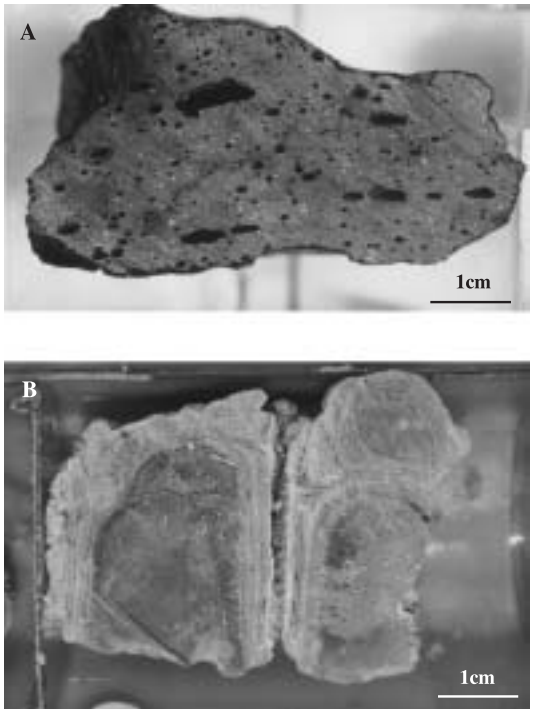


図 3 Hole 1188 の 32.5 mbsf から回収されたやや多孔質の石英安山岩 (A) と 344.5 mbsf より回収された脈状で、無斑晶の火山岩 (B)。

Fig. 3 Photographs showing fresh moderately vesicular rhyodacite from 32.5 mbsf in Hole 1188 (A), and veined, aphyric and volcanic rock from 344.5 mbsf in Hole 1188 (B).

表 1 各孔の掘削深度、孔内最高温度 (観測深度) および温度勾配。

Table 1 Depth for core recovery, the maximum temperatures and temperature gradients in the boreholes.

Hole	Depth	Maximum temperature	emperature gradient
1188	0-387 mbsf *	313°C (363.1 mbsf)	0.86°Cm ⁻¹
1189	0-206 mbsf	68°C (106.3 mbsf)	0.64°Cm ⁻¹

* mbsf, meters below seafloor

表 2 掘削水による汚染度の検定：ガス・クロマトグラフィーによって定量された岩石コアの表面（core-surface）および中心部（subcore）から削り出した岩石片中のパーフルオロカーボン（PFC）量。コアライナー内部に残っていた掘削水を拭き取った脱脂綿（cotton swab）とラボ内の空気（laboratory air）もそれぞれポジティブ対照およびネガティブ対照として測定した。

Table 2 Evaluation of contamination by drilling: gas chromatographic detection of perfluorocarbons (PFC) tracers in the rock fragment from core surfaces and interiors (subcores). The cotton swabs that wiped the inside of core liners and the laboratory atmosphere were used as positive and negative controls for PFC determination, respectively.

Samples	Sample weight (g)	Total PFC weight (g)
Cotton swab	-	7.84×10^{-10}
Core-surface	5.23	2.73×10^{-10}
Subcore	5.81	nd *
Subcore	6.13	nd
Laboratory air	-	nd

* nd, not detected

のトレーサーとして掘削水に添加され、蛍光顕微鏡観察で検出および計数される。このビーズが岩石コアの中心部で観察された場合、掘削水中の微生物もコア中心部まで混入している可能性が非常に高くなる。一方、PFC は分子量 350、沸点 76 の化学トレーサーで、ガス・クロマトグラフィーにより 10^{-12} ~ 10^{-11} g まで検出および定量が可能である。微生物サイズの汚染トレーサーである微小蛍光ビーズは比較的割れ目が多く透水性の高い堆積物や堆積岩で用いられ、移動性（浸透性）の高い PFC は比較的割れ目の少ない火成岩などに対する汚染トレーサーとして用いられる。

ODP 第 193 航海は海底熱水域の火成岩をターゲットとしたので、汚染トレーサーには PFC を用いた（Kimura *et al.*, 2003）。船内に取り込まれた掘削流体（表層海水）に PFC トレーサーを添加して海底掘削を行い、Hole 1188 の 86.9 ~ 96.6 mbsf から熱変質を受けた火成岩の岩石を回収した。直径約 6.5 cm の岩石コアの表面およびコアの中心部（サブコア：直径約 1.5 cm）から岩石片を削り出した。これらの岩石片をそれぞれブチル栓で密封することができる 60 ml のガラス瓶（バイアル瓶）に詰め、PFC を気化させるため約 70 で熱処理し、バイアル瓶内の気相をガス・クロマトグラフィー分析にかけて PFC の検出および定

量を行った。また、コアライナーの内部に残っていた掘削水を拭き取った脱脂綿を、PFC が確実に検出されると思われるポジティブ対照とした。さらに、ラボ内の空気を PFC が検出限界以下となると予想されるネガティブ対照とした。その結果、コア表面の岩石片（5.23 g）からは 2.73×10^{-10} g の PFC が検出された。一方、サブコア（5.81 g と 6.13 g）中の PFC 量は検出限界以下であった（表 2）。したがって、コア表面は掘削流体により汚染されているが、コア中心部まで掘削流体が浸透せず、それ由来の微生物混入も免れていると判断された。このように非汚染と判断されたサブコアを微生物調査に用いた。また、熱水噴出孔下の現場環境は嫌氣的であると考えられるので、微生物の培養等にかかる作業は嫌気グローブボックス内（N₂, 70%；CO₂, 20%；H₂, 10%；O₂, 0%）で無酸素状態を保持して行った。

V. 微生物細胞の計数と ATP 濃度測定

熱水噴出孔下から回収したサブコアを破碎し、1 cm³ 程度の碎片を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過した滅菌海水と激しく混合した。さらに、超音波処理することによって微生物をサブコア碎片から分離した。混合液を約 10 分間静置してサブコア碎片を沈殿させ上澄み液をろ過した。サブコア碎

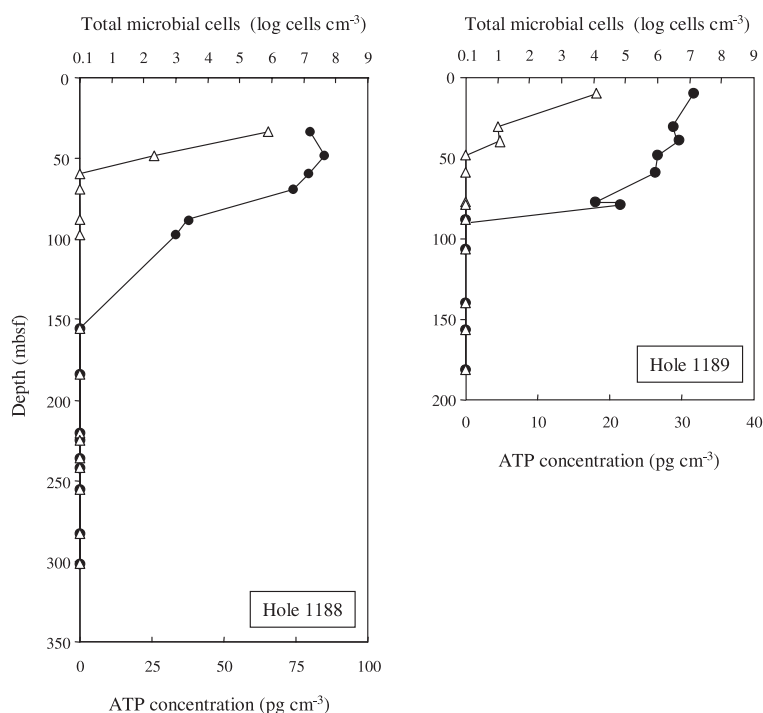


図 4 各深度から回収されたサブコア中の微生物全菌数 (●) と ATP 濃度 (△)。

Fig. 4 Depth profiles of total cell counts (circles) and ATP concentrations (triangles) in subcore samples.

片と微生物細胞を孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルター上に集めた後、 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ の 4',6'-アミノ-2-フェニルインドール (DAPI) で蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で微生物の形態観察および計数を行った。その結果、Hole 1188 の 68.9 mbsf 以浅あるいは Hole 1189 の 48.6 mbsf 以浅のサブコア中から、 $10^6 \sim 10^8 \text{ cells cm}^{-3}$ の微生物が検出され、最大値は Hole 1188 の 48.8 mbsf の $4.4 \times 10^7 \text{ cells cm}^{-3}$ および Hole 1189 の 9.7 mbsf の $1.3 \times 10^7 \text{ cells cm}^{-3}$ であった (図 4)。一方、Hole 1188 の 97.9 mbsf 以深あるいは Hole 1189 の 77.7 mbsf 以深のサブコア中からは微生物を検出できなかった。船上ではアクリジンオレンジや SYBER Green I などの DAPI 以外の蛍光染色液を用いた蛍光顕微鏡観察も検討した。しかし、微生物蛍光とバックグラウンド蛍光の強度比 (S/N 比に相当する) の点

などにおいて、DAPI 染色が最も優れていた。

微生物の計数と並行して、微生物現存量の指標となるアデノシン三リン酸 (ATP) を定量した。サブコア碎片約 1 cm^3 をトリクロロ酢酸溶液と混合攪拌して ATP を抽出した。混合液を静置して岩石片を沈降させた後、上澄液を別のチューブに移した。この上澄液の中の ATP をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による生物発光法で定量した。

熱水噴出孔下の ATP 分布は、浅部 (Hole 1188 の 48.8 mbsf 以浅, Hole 1189 の 39.1 mbsf 以浅) のサブコアから ATP が検出されたが、それ以深では検出できないというものだった。最大値は Hole 1188 の 33.8 mbsf の $65.5 \text{ pg ATP cm}^{-3}$ および Hole 1189 の 9.7 mbsf の $18.2 \text{ pg ATP cm}^{-3}$ であった (図 4)。炭素に対する ATP の比 (28–510; Karl, 1980) および海洋細菌 1 細胞あたりの炭素

量 (39 fg cell^{-1} ; Vrede *et al.*, 2002) を用いて, ATP 濃度からサブコア中の生菌数を見積もることが可能である (Egeberg, 2000)。この変換係数は微生物群集や環境条件によって変動するが, その変動幅はさほど大きなものではないと仮定した。この変換係数と ATP 濃度から生菌数を求めたところ, ATP が検出された浅部において $10^4 \sim 10^6 \text{ cells cm}^{-3}$ と算出され, これは蛍光顕微鏡法による計算値の 0.5 ~ 5.6% に相当した。

VI. サブコアを用いた高温嫌気培養

熱水噴出孔下から回収したサブコアを用いて 60 と 90 での嫌気培養を行った。培養温度を 60 と 90 にしたのは, サブコアの回収深度 69.1 mbsf および 106.8 mbsf での現場温度が各々 おおよそ 59.4 と 91.8 と推測されたからである。この推定の根拠は, Hole 1188 の 363.4 mbsf の孔内温度が 313 であり (表 1), この温度勾配 0.86 m^{-1} となることである。ただし, 孔内温度が過小評価されたであろう Hole 1189 については, 孔内温度勾配が 0.64 m^{-1} , サブコア回収深度 99.4 ~ 128.9 mbsf の現場温度が 63.6 ~ 82.5 と算出されるが, 実際にはこれよりも高温であったと考えられる。

微生物増殖が観察された培養温度と概ね一致した (表 3)。グルコースやペプトン, 酵母エキス, 微量金属元素, 硫黄粉末 (S^0) を加えた嫌気性従属栄養培地を作成し, さらに, 培養瓶内の気相を嫌気混合ガス (H_2 , 10%; CO_2 , 20%; N_2 , 70%; O_2 , 0%) で満たした。各深度から回収したサブコアを酸素に触れないようにグローブボックス内で培養液に加え, 60 と 90 の高温水槽中でそれぞれ培養した。2 週間後, 蛍光顕微鏡下で微生物増殖の有無を確認した。

嫌気培養試験の結果, Hole 1188 の 59.8 ~ 87.9 mbsf のサブコアに 60 培養で微生物増殖が見られ, 同 69.1 ~ 106.8 mbsf のサブコアでは 90 培養で増殖が見られた (表 3)。また, Hole 1189 における 60 培養では 79.1 ~ 99.4 mbsf 由来のサブコアに, 90 培養では 99.4 ~ 128.9 mbsf 由来のサブコアにそれぞれ増殖が観察された (表 3)。

培養液中には連結した細胞や分裂中の細胞が多く観察されたことから, 培養瓶中で確かに微生物が増殖したものと考えられる (図 5)。また, 微生物の増殖が観察されたサブコアの回収深度より浅部および深部のサブコアからは, 微生物増殖が観察されなかった。本嫌気培養によって, 顕微鏡観察や ATP 濃度測定で検出できなかった深部の岩石中にも微生物が存在することが明らかとなった。

VII. 16S rDNA をターゲットとした遺伝子解析

高温嫌気培養で増殖が確認された試験管について, 微生物の遺伝子解析を行った。実は, “継代培養”を試みたのだが, 途中で微生物が増えなくなったので, “初代培養”の残液から微生物のゲノム DNA を抽出して, “培養に依存しない”遺伝子解析を行なったのである。ここでは微生物の系統分類の指標である 16S rDNA の全長の約 90% にあたる約 1400 塩基対について塩基配列を決定し, 進化系統に関する遺伝子解析を行った。

高温培養のうち, 60 培養から回収された 16S rDNA は, *Geobacillus* 属のものと近縁であることが明らかとなった (図 6)。特に, 海底油田由来の *G. thermoleovorans* (Nazina *et al.*, 2001) の 16S rDNA とは 98 ~ 99% という高い相同性を, また地中海の浅海熱水噴出孔から単離された *G. vulcani* (Caccamo *et al.*, 2000) とは 97 ~ 98% の高い相同性を示した。*Geobacillus* 属の多くは 45 ~ 70 付近で増殖可能な地下由来の好熱性微生物であり, 本研究で行った 60 培養という温度条件と整合的である。

一方, 90 培養由来の 16S rDNA は, *Deinococcus* 属のものと近縁であった (図 7)。中でも, 陸上温泉由来の *D. geothermalis* (Ferreira *et al.*, 1997) の 16S rDNA とは 95 ~ 96% の相同性を示したほか, アイスランドの陸上温泉下 1500 ~ 2000 m (76 ~ 91.4) から遺伝子だけ解析された *Deinococcus* sp. (Marteinsson *et al.*, 2001) の 16S rDNA とも 96 ~ 97% という高い相同性を示した。*Deinococcus* 属は一般に紫外線や乾燥・低温などへの耐性があるので, 高温耐性もまた想定

表 3 高温嫌気培養によって微生物の増殖が観察された岩石コアの回収深度および孔内温度勾配から算出された各深度での孔内温度 .

Table 3 Distribution of the viable microbes detected from 2-week thermophilic incubations, and borehole temperatures estimated by the temperature gradient.

Depth (mbsf)	Hole 1188		Borehole temperature (°C)
	60°C	90°C	
9.7	-	-	8.3
39.1	-	-	33.6
48.8	-	-	42.0
59.8	+	-	51.4
69.1	+	+	59.4
87.9	+	+	75.6
106.8	-	+	91.8
126.5	-	-	108.8
155.2	-	-	130.1
184.2	-	-	158.4
222.2	-	-	191.1
224.8	-	-	193.3
236.4	-	-	203.3
242.2	-	-	208.3
255.8	-	-	220.0
283.1	-	-	243.5
301.5	-	-	259.3

Depth (mbsf)	Hole 1189		Borehole temperature (°C)
	60°C	90°C	
31	-	-	19.8
40.5	-	-	25.9
50.2	-	-	32.1
69.8	-	-	44.7
79.1	+	-	50.6
99.4	+	+	63.6
118.1	-	+	75.6
128.9	-	+	82.5
140.1	-	-	89.7
156.9	-	-	100.4
175.9	-	-	112.6

- : 微生物の増殖なし , + : 微生物の増殖が観察された (10^4 cells ml⁻¹ 以上) , ++ : 活発な微生物の増殖が観察された (10^5 cells ml⁻¹ 以上) .
- : no growth, +: positive but weak growth (final cell counts > 10^4 cells ml⁻¹), ++ : active growth (final cell counts > 10^5 cells ml⁻¹) .

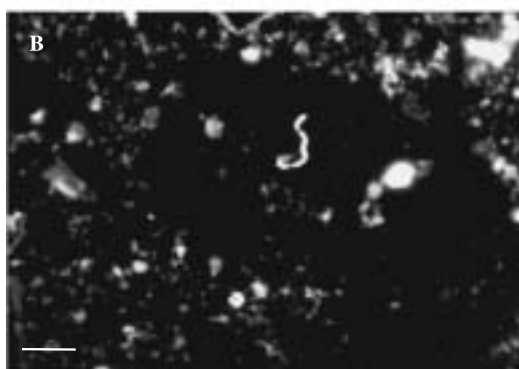
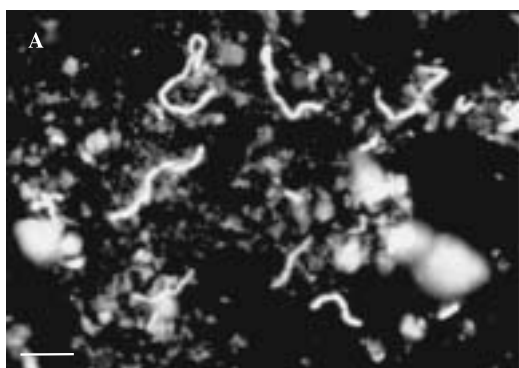


図 5 嫌気培養によって増殖した微生物の蛍光顕微鏡写真 .

Hole 1189 の 99.4 mbsf からのサブコアを用いた 60 °C 嫌気培養 (A) と 118.1 mbsf からのサブコアを用いた 90 °C 嫌気培養 (B) . スケールは 40 μ m .

Fig. 5 Photomicrographs of microbial cells grown during the cultures at 60 °C with subcores from 99.4 mbsf in Hole 1189 (A) and the cultures at 90 °C with subcores from 118.1 mbsf in Hole 1189 (B) , by DAPI-staining and epifluorescence microscopy. Scale bars, 40 μ m.

されていた。しかし, *Deinococcus* 属は好気性細菌に分類されており, 嫌気的な生育は考えられていなかった。これに対して, *D. geothermalis* の近縁種が 65 °C の嫌気環境下で増殖することや(未記載種 : Marteinsson *et al.*, 2001), *D. radiodurans* が嫌気環境下で Fe (III), Cr (VI), U (VI), Tc (VII) などの重金属を還元すること(Fredrickson *et al.*, 2000) が知られるようになってきた。した

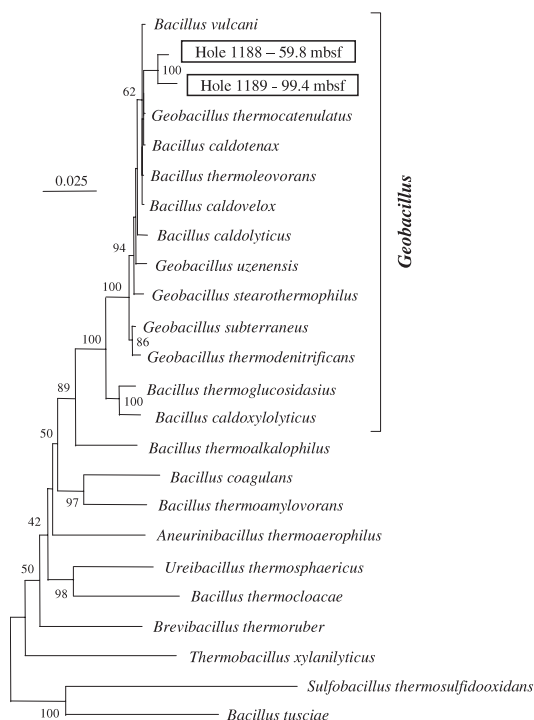


図 6 60 °C 嫌気培養で増殖した微生物と *Geobacillus* 属の 16S rDNAs (1486 塩基対) をもとに作成した系統樹 .

Fig. 6 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences (1486 bp) of the monospecific bacterial populations grown in the 60 °C cultures and genus *Geobacillus*.

がって, 熱水噴出孔下に *Deinococcus* 属が嫌気的に生育していたとしても不思議ではない。また, しばしば高強度のガンマ線が海底熱水域で観察されているので, ガンマ線耐性を持つ *Deinococcus* 属のメンバーが熱水噴出孔下で優占的に生育している可能性もある。

VIII . おわりに

サブコアの高温嫌気培養による増殖微生物の遺伝子解析では, 真正細菌である *Geobacillus* や *Deinococcus* などの遺伝子を検出・同定したが, 古細菌に属する好熱細菌および超好熱細菌の遺伝子は検出できなかった。しかし, この結果は海底熱水域直下における好熱性古細菌の存在や分布を

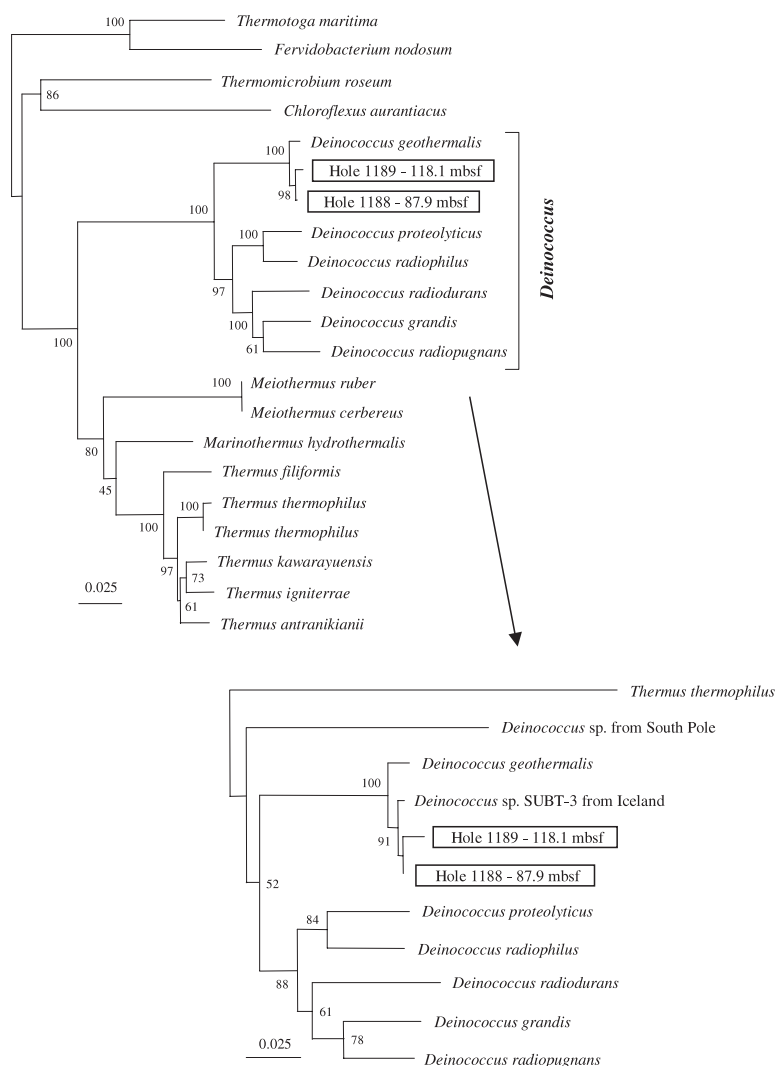


図 7 90 嫌気培養で増殖した微生物の 16S rDNA 塩基配列 (1388 塩基対) をもとに作成した系統樹および, *Deinococcus* 属の 16S rDNA 塩基配列 (577 塩基対) を中心に作成した系統樹.

Fig. 7 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences (1388 bp) of the monospecific bacterial populations grown in the 90 - cultures, and based on 16S rDNA sequences (577 bp) of genus *Deinococcus*.

否定するものではなく、培養条件の適否の問題であると思われる。今後は、好熱古細菌や好熱真正細菌を含む多種多様な微生物群集を増殖させるための網羅的培養（栄養、温度、圧力、酸化還元状態など）の条件検討が重要となるだろう。

一方、サブコアからの直接 DNA 抽出も試みたが、それには失敗した。これは、十分量のサンプル（十分量のサブコアを切出せるほどの岩石コア）を確保できなかったためであり、また、サブコア中の微生物数が少なかったためである。今後は少量

のサブコアや少数の微生物から DNA の抽出・解析を行う技術の開発・確立が重要となる。もちろん、掘削流体による汚染防止の努力も諦めることなく、“汚染の最小化”に向けたプロトコル開発も必要であらう。

文 献

- Auzende, J.-M., Ishibashi, J.-I., Beaudoin, Y., Charlou, J.-L., Delteil, J., Donval, J.-P., Fouquet, Y., Ildefonse, B., Kimura, H., Nishio, Y., Radford-Knoery, J. and Ruellan, E. (2000) Extensive magmatic and hydrothermal activity documented in Manus Basin. *EOS, Trans. AGU*, **81**, 449, 452–453.
- Binns, R.A. and Scott, S.D. (1993) Activity forming polymetallic sulfide deposits associated with felsic volcanic rocks in the eastern Manus back-arc basin, Papua New Guinea. *Econ. Geol.*, **88**, 2226–2236.
- Binns, R.A., Barriga, F.J.A.S., Miller, D.J., et al. (2002) *Proc. ODP, Init. Repts.*, 193. [Online] Available from World Wide Web: http://www-odp.tamu.edu/publications/193_IR/193ir.htm. [Cited 2002–02–12]
- Caccamo, D., Gugliandolo, C., Stackebrandt, E. and Maugeri, T.L. (2000) *Bacillus vulcani* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 2009–2012.
- Deming, J.W. and Baross, J.W. (1993) Deep-sea smokers: Windows to a subsurface biosphere? *Geochim. Cosmochim. Acta.*, **57**, 3219–3230.
- Egeberg, P.K. (2000) Adenosine 5'-triphosphate (ATP) as a proxy for bacteria numbers in deep-sea sediments and correlation with geochemical parameters (Site 994) In Paull, C.K., Matumoto, R., Wallace, P.J. and Dillon, W.P. eds.: *Proc. ODP Sci. Results*, **164**, 393–398.
- Ferreira, A.C., Nobre, M.F., Rainey, F.A., Silva, M.T., Wait, R., Burghardt, J., Chung, A.P. and da Costa, M.S. (1997) *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 939–947.
- Fouquet, Y., Zierenberg, R.A., Miller, D.J., et al. (1998) *Proc. ODP, Init. Repts.*, **169**. [Online] Available from World Wide Web: http://www-odp.tamu.edu/publications/169_IR/169TOC.HTM. [Cited 1998–01–17]
- Fredrickson, J.K., Kostandarithes, H.M., Li, S.W., Plymale, A.E. and Daly, M.J. (2000) Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2006–2011.
- Jeanthon, C. (2000) Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie. Leeuwenhoek*, **77**, 117–133.
- Karl, D.M. (1980) Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.*, **44**, 739–796.
- 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.
- Marteinsson, V.T., Hauksdóttir, S., Hobel, C.F.V., Kristmannsdóttir, H., Hreggvidsson, G.O. and Kristjánsson, J.K. (2001) Phylogenetic Diversity Analysis of Subterranean Hot Springs in Iceland. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4242–4248.
- Moyer, C.L., Dobbs, F.C. and Karl, D.M. (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1555–1562.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. and Ivanov, M.V. (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1331–1337.
- Reysenbach, A.-L., Götz, D. and Yernool, D. (2002) Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs. In Staley, J.T. and Reysenbach, A.-L. eds.: *Biodiversity of Microbial Life, Foundation of Earth's Biosphere*. Wiley-Liss, Inc., 345–421.
- Smith, D.C., Spivack, A.J., Fisk, M.R., Haveman, S.A., Staudigel, H. and the Leg 185 Shipboard Scientific Party (2000a) Methods for quantifying potential microbial contamination during deep ocean coring. *ODP Tech. Note*, **28** [Online] Available from World Wide Web: <http://www-odp.tamu.edu/publications/tnotes/tn28/INDEX.HTM>.
- Smith, D.C., Spivack, A.J., Fisk, M.R., Haveman, S.A., Staudigel, H. and Ocean Drilling Program Leg 185 Shipboard Scientific Party (2000b) Tracer-based estimates of drilling-induced microbial contamination of deep-sea crust. *Geomicrobiol. J.*, **17**, 207–219.

Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F. and Horikoshi, K. (2001) Distribution of archaea in black smoker chimney structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3618–3629.

Vrede, K., Heldal, M., Norland, S. and Bratbak, G. (2002) Elemental composition (C, N, P) and cell

volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2965–2971.

(2002年12月26日受付, 2003年4月8日受理)