

海底熱水系地下生物圏へのアプローチ

丸山明彦* 浦辺徹郎**

New Approach to Unknown Biosphere Under Seafloor Hydrothermal Sites

Akihiko MARUYAMA * and Tetsuro URABE **

Abstract

To improve our understanding on the unknown sub-vent biosphere, which is the biosphere under seafloor hydrothermal sites, new ideas and techniques for this extreme environment are proposed. Modifications were made to the Benthic Multi-coring System (BMS) which is a tethered submarine rock drill to use its great advantages in approaching and getting uncontaminated samples from the sub-vent biosphere. Besides, drilled boreholes are used for *in situ* filtering, trapping, and incubation of microbes not only to get valuable information about sub-vent microbial diversity and its functions, but also to acquire novel bio/gene resources. New techniques, which are evaluated and applied to the multidisciplinary science project "Archaean Park", have proved to be essential for studies of the deep biosphere. A technical assessment indicates that there is no perfect method for getting uncontaminated samples from the deep biosphere, and care should be taken during laboratory handling to minimize the shortcomings of the method. On the other hand, a proper combination of sub-seafloor sampling and analytical methods will provide us with fascinating clues to the origins of life on the Earth.

Key words : drilling, hydrothermal vent, subsurface biosphere, microbe

キーワード : 掘削, 熱水, 地下生物圏, 微生物

1. はじめに

原始地球における「生命の起源」プロセスに関してはさまざまな考え方が提唱されており、意見の一致を見ていない(Ward and Brownlee, 2000)。ただそれらに共通しているのは、メタン、硫化水素、アンモニア、水素などの還元物質が豊富に存在し、それらが高温・高圧下で反応して生体分子がつくられ、鉱物表面等の持つ触媒作用で重合

して高分子化したものと考えられている(たとえば, Martin and Russell, 2002)。その後, 上記のような還元物質利用型生物の中からシアノバクテリアのような光利用酸素発生型生物が生まれてきたことにより, 少なくとも地球表層環境では多種多様な酸素利用型生物の適応放散の歴史が始まった。これに伴い, 地球環境は, 大局的には高温で無酸素, 還元物質に富んだ世界から, 低温で酸素に豊む世界へと徐々に進化してきたものと見なさ

* 産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門

** 東京大学大学院理学研究科地球惑星科学専攻

* Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

** Department of Earth and Planetary Science, University of Tokyo

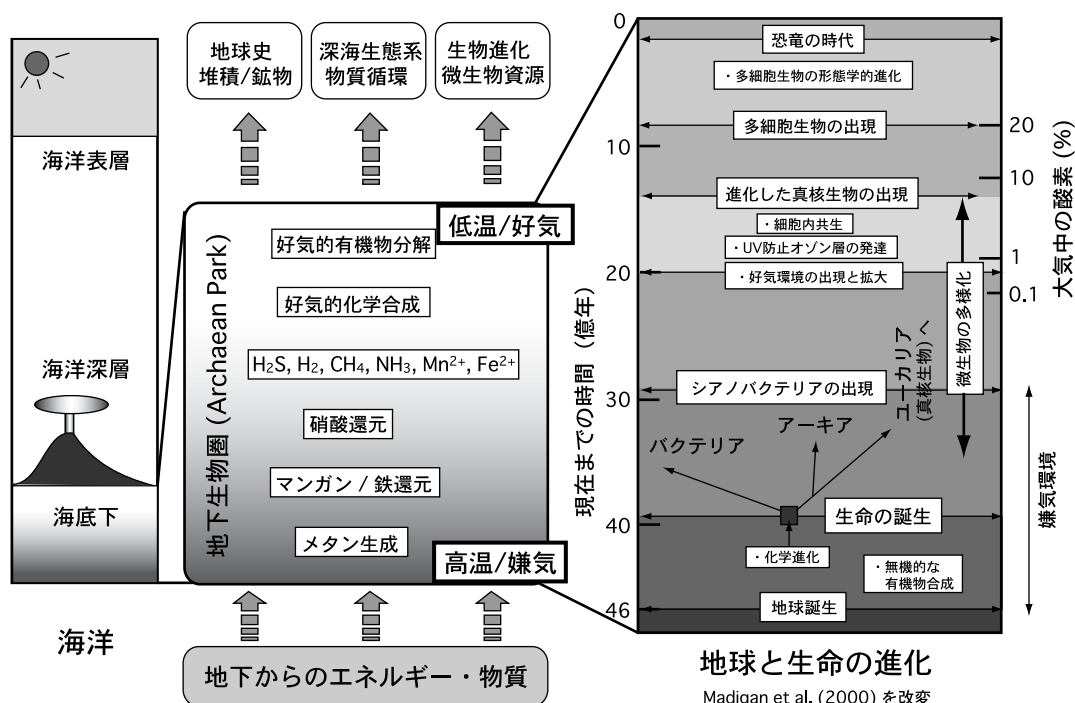


図 1 海底熱水地下生物圏研究の意義。
その環境には微生物進化の歴史が凝縮されている。

Fig. 1 Background and meaning of deep-sea hydrothermal subsurface biosphere study.

れている(図1右)。

この地球環境の変遷を凝縮したような場を、我々は現在の海底熱水系に見ることができる。すなわち、マグマ発散物の影響を強く受ける海底下深部は高温で無酸素、還元物質に富む一方、海底面上は低温で酸化である。これに加え、この海底熱水系は、場所を変えつつも38億年の昔から現在まで断続的に存在していることが分かっている(Franklin *et al.*, 1981)ことから、地球誕生以来現在までの経時的な環境変化が、この海底下深部から海底面上にかけての鉛直的な環境傾斜の中に凝縮されているものと見なせるだろう(図1中央)。したがって、原始生命体から、より進化を遂げた生物までもがこの環境中で綿々と生き長らえていることが期待される。

リボソーム中の16S rRNAの遺伝子(16S rDNA)の塩基配列を基に描いた分子系統樹(図2)が、それぞれの生物がどのような近縁関係にあ

るのか、それらがどういう経過をたどって導かれたものかの道筋を示す代表例として現在広く受け入れられている。この系統樹の根元に位置する(系統的に古い)微生物の大半は好熱菌であり、その多くが海底熱水系に由来していることが分かってきた(たとえば、Jannasch, 1995; Madigan *et al.*, 2000)。すなわち、海底熱水系は原始地球生命の誕生の場であり、生命の直系の子孫が連綿と生き長らえている可能性があると考えられるに至っている(たとえば、大島, 1995)。しかし、高温で還元的な場が見られるはずの海底熱水系地下生物圏への直接的なアプローチはほとんどなされていない。というのも直接的なアプローチを行うためには、多くの技術的課題を解決せねばならず、新しい考え方や装置開発が不可欠だからである。ここでは、これら現実的な問題点への対応策を論じるとともに、科学技術振興調整費総合研究課題「海底熱水系における生物・地質相互作用の解明に

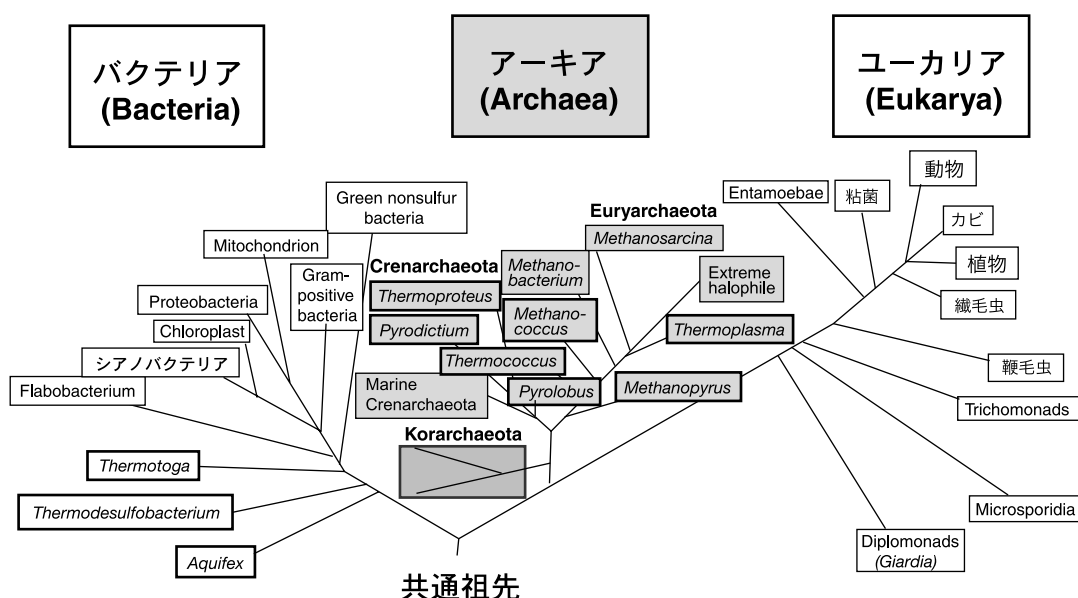


図 2 生物系統樹に相当すると考えられている 16S rDNA の分子系統樹。
太枠は好熱菌を示す。Madigan *et al.* (2000) を改変。

Fig. 2 Universal phylogenetic tree, based on 16S rDNA sequences. (modified from Madigan *et al.*, 2000)

関する国際共同研究(アーキアンパーク計画)」が
目指している研究の一端を紹介する。

II. コンタミネーションの排除について

これまでの海底熱水系の研究は、海底面上の熱水噴出口における試料採取に基づいたものがほとんどで、硫化物チムニー中から得られる微生物群集が、地下のそれを代表しているという大きな仮定を置いていた。アーキアンパーク(AP)計画の予察的な結論からいえば、これは誤りであり、チムニー中の微生物群集は、直下の地下の群集と大きく異なっている。掘削により地下の試料を直接得ることが不可欠なのである。

海底熱水系に限らず、掘削による地下微生物研究の成否のカギを握るのは、雑菌混入(コンタミネーション)の排除である。海陸を問わず、掘削にはドリルビットの冷却・潤滑と掘削に伴う掘り屑除去のため、ベントナイトなどの粘土鉱物やポリアクリルアミドのような薬剤を混入したボーリング泥水(循環水)が用いられる。これまでの地

下微生物の研究では、微生物研究を行う上で避けて通れない滅菌と殺菌操作をしていない循環水が用いられてきたため、その信頼性を著しく低下させていた。深海底掘削計画(ODP)でも海水を循環水として使っており、得られたコア試料の汚染度チェックが不可欠な課題となっていた。そこで最近 ODP では、蛍光剤や循環水中に微生物サイズの微細な蛍光ビーズを混入し、表層の汚染の範囲を示すことにより、コア試料の中央部を無菌的にくり抜くという手法を試行した(Smith *et al.*, 2000)。ただし、地下生物圏の生物量(バイオマス)が、地球表層のそれとほぼ同じ程度であるとする考え(たとえば、Whitman *et al.*, 1998)のほとんど唯一の根拠となっている ODP コア中の微生物量データ(Parks *et al.*, 1994)は、汚染度のチェックが厳しくされる以前ののものであり、今後の再確認が求められている。

もちろん、汚染してしまったものの汚染度を知るという方法より、そもそも汚染をさせないという方法の方が優れているのはいうまでもない。掘

表 1 現存する ODP 掘削船と海底設置型掘削装置 BMS の比較。

Table 1 Comparison between a drill-ship-type drilling system used in the Ocean Drilling Project and a portable Benthic Multi-coring System (BMS).

	掘削船	海底設置型掘削装置
掘削深度	～ 2 km	～ 20 m
掘削口径	大 (209 mm)	小 (66 mm)
コア径	62 mm	44 mm
孔内計測	可能	不可能
コンタミへの対応	コンタミのチェック実施	無菌掘削可能
海底面直下の掘削	孔口部が安定するまで	海底面を乱さず掘削可能，試料採取は行わない
掘削岩質	露岩地域はビットが安定せず掘削困難	露岩をいとなない

削コア中の微生物群集解析の信頼性が向上する以外に，掘削により開口した掘削孔からの噴出熱水を同様の解析に用いることなどができるからである。掘削孔からの熱水は，付近の自然の熱水噴出口から得られる熱水と比較して，チムニー中の微生物による汚染が無いので非常に価値が高い。熱水噴出口に形成されるチムニーは，多孔質で環境勾配が急なことから，さまざまな微生物が高密度に生息しており，それらの一部がチムニーを通過する熱水に容易に混入してしまう問題があった。しかし，掘削孔に金属製のケーシングパイプが挿入されている場合は，コンタミネーションの危険性を大幅に軽減することが可能となる。

III. 海底設置型掘削装置による除菌掘削

海底の掘削を行う方法として，ODP や IODP (統合深海掘削計画) のように，槽 (リグ) を持つ専用掘削船を用いる方法と，本論文で紹介する海底設置型掘削装置による方法とがある。これらの 2 つの手法はお互いに補完的なものであり (表 1)，前者は大深度・大口径掘削を得意とし，後者は簡便で小回りが利き，海底面直下の地層や岩石の構造を乱さず採取できるなど，それぞれの利点が存在している。海底設置型掘削装置としては，イギリス地質調査所 (BGS) や Monterey 湾水族館研究所 (MBARI) の，掘り管 (コアバレル) が一本だけの簡単な装置が一般的である。しかし，これらの装置は 1 メートル程度の掘削しか可能でなく，地下生物圏の調査には能力不足であった。一方，



図 3 世界で唯一実地運用されている我が国の海底設置型掘削装置の概観。

Fig. 3 Benthic Multi-coring System (BMS) only one portable driller is in practical use.

複数のコアバレルを交換できるものとしては，オーストラリアの PROD など存在するが，世界で唯一実用化され，実績を有するのは我が国の BMS (金属鉱業事業団所有：表 1, 図 3) のみである。BMS は 20 メートルの掘削が可能であり，10 メートルを超える掘削が日常的に行われている

(松本・皿田, 1996)。

BMS が掘削船より優れている最大の特徴の一つは、除菌掘削ができるということである。BMS は通常、海底上約 5 メートルの近底層海水を循環水として用いるが、通常の除菌に用いる孔径約 0.2 マイクロメートル(場合によっては 0.1 マイクロメートル)のフィルターを、前処理フィルターとともに装着することにより、海底面上の海水の現場ろ過による無菌化が可能である。この考えを実現するため、我々は多段フィルター・システムを BMS に取り付け、事実上の無菌掘削に成功した。この無菌掘削により、熱水系地下生物圏への人為的擾乱を、最小限に抑えることができたと思われる。

ただし、無菌掘削を行っても、完全に汚染されていないコアが得られる訳ではない。海底から海面までコアを回収する際に、コアが海水に触れる可能性があるからである。

我々はこのような掘削後の汚染を防ぐ方法についても試行を行った。これについてやや詳しく見てみよう。掘削されたコアは海底面でコアバレル中に格納され、コアバレルごと船上に回収される。そこで、あらかじめコアバレル中に無菌ゲルを詰めておくことにより、掘進によりそこに入ってくるコアがゲルに包まれ、その後海水とは接触しない状態が実現されれば、汚染を防ぐことができる。我々は海洋科学技術センターの辻井 薫博士の協力を得てこの手法を試したが、高温の熱水に対するゲルの安定性や性状に改良すべき点が見つかり、現在は用いていない。

しかしゲルを用いないケースでも、海水による汚染の程度は限定的である。コアバレル上部には逆流防止弁が付いており、回収時に海水がバレルの中に入ってくるのを防いでいる。このため実際のケースでは、コア表面をべっとりと覆っている細粒の掘り屑がほとんど洗い流されずに残っていることが多い。一方、下端のコアとビットの間のすき間からは海水が浸入する可能性がある。いずれにせよ現在の BMS は地質目的に設計されているので、掘削後のコアの海水による汚染を完全には防ぎきれないが、将来、ゲルの性能の向上を

図ったり、掘削後にコアバレルの下端開口部に閉鎖機構を持たせることにより、近い将来、微生物学的に理想的なコア試料の獲得が可能になるであろう。

IV . 汚染以外の問題について

熱水系地下生物圏からの微生物試料採取を困難にする要因はコンタミネーションだけではない。掘削後、コアは温度、圧力、酸化還元状態などさまざまな環境変化を受けるが、それらの多くは生物活性を下げ、生菌獲得を困難にする方向に働く。特に表層海水や空気中に含まれる酸素は、地下生物圏に生息が予測される嫌気性菌に重大ないし致命的な影響を与える。

もちろん、海水中の微生物による汚染や、環境変化による生物活性の低下を受けた試料であっても、コア試料からの生菌獲得は可能である。汚染についていえば、通常の海水中にはいない特殊な微生物を対象にすれば、海水からの汚染が問題とならない洋上処理が可能である。また菌の死滅の問題も、出現率とその生残率の積が 0 ではなくればよいということになる。ただ条件の良くない試料から得られる結果は、上記の条件を満たす微生物の一群にバイアスがかかっていることに留意する必要がある。

幸いにも、遺伝子解析と非培養法による直接的かつ定量的な解析手法の進歩により、時間と労力をかければ、得られた微生物が地下にいたのかという根本的な問題に答えることが可能になってきた。つまり上記のような問題は残されているものの、その制約を十分に理解してかかれば、BMS から得られる生菌獲得は、現状では最も優れた直接アプローチということがいえる。

我々は BMS のもう一つの利点である、掘削孔からの噴出熱水中より微生物試料を採取することにも取り組んでいる。それがコアからの情報を補完するとともに、コアからは得られない地下の微生物群集を探る有効なアプローチとなり得るからである。熱水を採取する方法の優れている点は、コア / 熱水中の微生物現存量が少ないケースでも、大量の熱水をろ過濃縮したり、噴出熱水中にある

種の多孔質付着担体を設置してその環境中で培養させて量を増やしたりすることにより、解析に必要な量の微生物試料を確保することができることにある。また、将来ごく少量で分析可能な手法が開発されれば、人工流体含有物やスケール鉱物の粒間にトラップされた微生物の研究にも大きな可能性がでてこよう。ここで人工流体含有物というのは、あらかじめ割れ目を入れておいた鉱物（たとえば石英）を熱水中に吊るし、割れ目の充填をさせて流体をトラップする方法のことである。

V. 採水/フィルター装置について

一般海域でも同様であるが、活動的海洋底において微生物試料を採取する場合、それには大きく分けて2つの用途がある。1つは上述した生菌獲得を目的とするものであり、もう1つは細胞やその含有物の採取を目的とする場合である。噴出熱水中の生菌獲得を目的とする場合には、まず潜水艇用に開発された採水器の使用を検討することになるが、限られた潜水時間内にコンタミネーションの無い試料を採取できる理想的な採水器というものは残念ながら現在存在しない。熱水の化学分析の場合であれば1%以下の海水の混入は大きな問題とならないが、微生物の場合、熱水中の菌数が周囲の底層海水のそれより2ケタ低いことも多く、わずかな混入が致命的となる場合がある。AP計画では1つの試料からなるべく多種のデータを学際的に得ることを目的としているため、海洋研(ORI)型と呼ばれるポンプ式採水器を多用した。採水器を用いる方法は微生物と無機成分との相互関係を知る上で優れているからである。

それとは別に、高温噴出口において超好熱菌のような微生物を採取するために、噴出孔(ベント)を漏斗で覆うようにして熱水中の微生物をトラップするベントキャップ型微生物捕獲器が米国で開発されている(Karl *et al.*, 1988)(図4)。これは定量性には劣るものの、比較的確実に超好熱菌試料が得られるという利点を有している。そこでAP計画でも、海底面上の天然ベントのみならず掘削孔内からの熱水試料採取を視野に入れた新しい微生物捕獲器や現場培養器の開発を進めた。

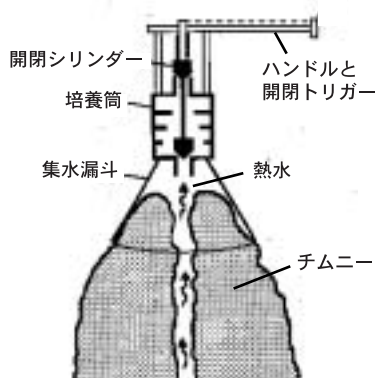


図4 天然チムニー上で超好熱菌採取に用いられているベントキャップ型の微生物捕獲培養器。

Fig. 4 Vent cap-type *in situ* growth chamber: an instrument for collecting and incubating microbes in hot fluids, deployed on the top of a chimney.

一方、微生物の細胞やその含有成分の獲得を主な目的とする場合には、塩ビチューブの両端を、トリガーで駆動された蓋で閉める方式のニスキン型採水器により化学的に純度の高い試料が得られることが確認されている。この装置は、噴出直後の熱水試料採取には限界があるものの、比較的多量の試料が容易に採取できるという大きな利点がある。噴出直後の熱水については、共通の採水管を通じて多数の熱水試料を別々のシリンダーに採取できるORI型ポンプ式採水器が多用されている。

分子遺伝学的な解析を目的とし遺伝子増幅(PCR)手法を基礎にする場合、微生物バイオマスの高い海域であれば、上記のいずれの採水器を用いても試料が全く不足するという事態は生じない。しかし、より定量性を重視した遺伝子解析を行う場合や微生物含有脂質等の微量化学成分を対象にする場合、また、一般深海域程度の微生物バイオマスの低い試料を対象とする場合には、この試料量の確保が研究上最大のネックとなる。この限界を打ち破るためには、深海域で潜水艇からの操作により大量の微生物試料を定量的に採取するための装置(現場微生物大量濃縮装置)が必要不可欠となる。既に、そのプロトタイプが考案され使用されており、脂質解析や遺伝子解析への適用が試



図 5 海底面上で噴出熱水中の微生物をフィルター上へ捕獲する装置（バイオカラム）。流速や温度の経時的な連続測定も可能。

Fig. 5 Bio-column: an instrument for collecting microbes in hydrothermal fluids on the seafloor by *in situ* filtration.

みられている (Cowen, 1997)。AP 計画で開発された装置は、水中ポンプと多段バルブを持ち、カートリッジフィルターに海水や熱水を大量にろ過して微生物を濃縮、回収する仕組みで、流量計によりそのろ過量が測定できるようになっている (Maruyama, 1997)。装置の基本形は ORI 型ポンプ式採水器と同様であるので、両者を一体化させたハイブリット採水システムを AP 計画潜水航海では標準的に用いて実績を上げている。

最近米国において、バイオカラムまたはバイオフィルターと呼ばれる微生物・有機物捕集装置が試作された。これは、海底に設置する直径約 30 cm、高さ約 1 m の円柱で、その内部を湧水が通過するように設計されている。底部で流速の経時変化を記録するとともに、カラム中に設置されたフィルターや樹脂で各種有機物や微生物を捕集する仕組みを持っている (図 5)。ただこのバイオカラムは、採取装置というより、むしろ集めた微生物の現場培養装置と考えた方がよいかもしれない。

またこの装置は、時系列情報が得られないという欠点を持っている。これは、微生物の定量解析や現場での微生物の増殖生理を研究対象とする場合には特に問題となる。すみやかに試料処理が行

われなければ、その採水器の中で微生物の活性が増加または減少するし、回収までに長時間かかる場合には、その群集組成が大きく変わってしまう可能性がある。この問題に対処するためには、熱水中の微生物の増殖をその場ですみやかに停止させ、細胞を固定し回収する装置が必要となる。既にそのプロトタイプは、時系列現場培養装置に付属する微生物採取システムとして活用されている (丸山, 1999)。これはテフロン製の耐熱性試料採取ラインに細胞固定剤をあらかじめ封入しておき、滅菌された注射筒内に試料を吸引採取すると同時に微生物細胞がその場で固定される仕組みである。この基本機構を活用すれば、海底面上で微生物試料を一定時間ごとに採取したり、地下生物圏環境に近い状態で現場培養し、すみやかに細胞固定、試料採取を行うことも可能である。

VI. 熱水系地下微生物生態系 —ファンデフーカ海嶺の例—

熱水地下生物圏の広がりや時空間的な変動過程、さらには物理、化学、地質学的な要因との相互関連性を解き明かすというのが AP 計画の目的である。そのためには、微生物群集全体を視野に入れた研究展開を志向することが必要となる。微生物群集全体の情報を得るためには、個々の微生物だけを選択的に培養し検出するという通常のアプローチは不向きで、微生物群集変動解析の手法が必要となる。

アメリカ海軍の SOSUS と呼ばれる原子力潜水艦探知システム (ハイドロフォン・アレー) が平和利用され、ファンデフーカ海嶺における群発地震がリアルタイムで観測できるようになったおかげで、海嶺において地殻変動や海底噴火現象が頻繁に起こっていることが分かってきた (Baker *et al.*, 1987, 1989, 1995)。さらに噴火現象が見られた直後には大量の熱水噴出が起こり、メガブルームと呼ばれる巨大な熱水ブルームが形成される。噴火直後に潜水調査を行うと、海水中に白いふわふわした懸濁物 (フロック) が多数見られたり、溶岩流の表面の陥没した穴からフロックが沸き上がっている現象が観察されたりする。その後、

微生物学的な調査が実施され、そういった濁りの中に多数の好熱菌や超好熱菌が見出されている (Delaney *et al.*, 1998)。同様な結果は、浅海域での海底噴火時の調査によっても得られている (Huber *et al.*, 1990)。このフロック様懸濁物の全てが微生物細胞で、その微生物の全てが (超) 好熱菌であるかどうかは明らかではなく、海水の濁りには別の原因も考えられている。しかし、潜水艇により撮影された映像は、これらの微生物が海底熱水地下環境にかなり大量に生息していることを強く印象付けた。その後、他の海域でも同様の現象が見出されたことから、この (超) 好熱菌の大量噴出現象は海底噴火により引き金を引かれた海底熱水活動に普遍的なものである可能性が高まっている。そしてこのことが、海洋全体に大規模な熱水地下生物圏の存在を想定させる根拠となった。

さらに、嫌氣的な熱水を恒常的に噴出している高温熱水噴出孔、いわゆるブラックスモーカーチムニー直近の底層海水の調査において、チムニーに近づくほど懸濁態 DNA 濃度が高まることが示され、それが海底面下からもたらされているという推測がなされている (Deming and Baross, 1993)。その後の研究では、海底面上に突き出たチムニーそのものにアーキア (古細菌, Archaea) を含むたくさんの微生物が付着していることが示されており (Harmsen *et al.*, 1997; Chevaldonne and Godfroy, 1997)、そこからの巻き上がりによる供給の可能性も高まっている。いずれにしても、チムニーが好熱菌や超好熱菌の好適な住処となっており、上記の爆発的な場合と同様に海水中への微生物の供給源となっていることはほぼ確実である。

VII. 熱水系地下微生物生態系 — 東太平洋海嶺南部の例 —

突発的な噴火に伴う微生物噴出現象の頻度は不明であるが、通常の熱水活動域の海底面上における調査でも海底からの微生物噴出現象は観測されており、海底面下に多数の微生物の生息が推定されている。超高速拡大軸である東太平洋海嶺

(EPR) 南部では堆積物がほとんど見られない海底面において、張力割れ目や枕状溶岩の間から湧出する低温熱水に懸濁した微生物の放出が見られる。この場合、微生物のほとんどは好気性のイオウ酸化細菌や従属栄養細菌で、蛍光 *in situ* hybridization 法 (FISH 法) による全群集解析によると、好熱菌や超好熱菌の仲間を多く含む Domain Archaea (アーキア) はほとんど見られず、Domain Bacteria (バクテリア) の優占が確認されている (丸山, 1999)。しかし、海底面下における熱水の噴出経路も重要な意味を持っていると推定され、低温であっても突発的な熱水上昇の後であれば好熱菌や超好熱菌が見出される可能性は高いとする考えもある (Holden *et al.*, 1998)。

一方、東太平洋海嶺南部海域のブラックスモーカーや低温の湧出域の直上 100–200 m に形成される熱水ブルーム中には、大量の微生物細胞が見出され (Maruyama *et al.*, 1998)、その供給源あるいは生成源は熱水噴出孔であると推定された。このような活発な海嶺域での熱水化学組成は、その地下のマグマ活動の遷移を反映し時空間的に変化している。そして、メタンや硫化水素といった揮発性成分に富むブラックスモーカーに対応するブルームには微生物が多く、逆にそれらの成分に乏しい熱水の場合はブルーム中にも微生物が少ないという相関が見出されている (Urabe *et al.*, 1995)。

熱水ブルーム中では、微生物の数が多いのみならず、その大半のものが球菌で占められていることがいくつかの地点で明らかになっている。他方、海底面上で低温熱水の熱水化学成分濃度と微生物密度との関係を解析した結果、海水と熱水が中程度に混じり合った低温熱水中で周辺海水中より高い微生物密度が検出されたほか、それらの微生物は、周辺海水中より極端に高い桿菌比率を有することも分かった。ブルーム中に多い球菌は、これら海底面上の微生物とは別の系統に属するものであるか、それとも同じ菌だが生理状態を反映して小型化、球菌化しているだけなのかは興味ある問題である。

この低温熱水が好適な微生物増殖環境になって

いることは注目に値する。実際の熱水環境で何が律速要因となり、どういった物理・化学環境が微生物増殖に至適だったのかは依然不明であるが、熱水と海水との混合はむしろ海底面下で広範に起こっていると考えられることから、そこにおいても大規模な熱水系地下生物圏の発達が起こっている可能性が高い。

以上のように、海底からの微生物噴出に関する研究の過程で、海底面下には好気的な低温熱水環境のみでなく、嫌気的な高温熱水環境にも莫大な数の微生物が生息していると考えられるに至った。そして、上記のもの以外にも、これまでの海底熱水循環の概念の上に微生物の観測データが加わることで、地下での微生物活動について新しい考えが生まれつつある (Delaney *et al.*, 1998)。今後、こういった中央海嶺での熱水活動域での掘削研究により、これら海底面上で見出された微生物現象のいくつかが実際に検証されることが大いに期待される。さらに、掘削孔内やそこから海底面上に噴出する熱水を対象とし、見出される微生物の量や種類、代謝活性を分子、細胞、培養レベルでそれぞれに明確にするとともに、物理・化学データと対比して解析することにより、この活発な地下生物圏の中のさらに活発な微生物増殖環境の実態に迫ることが可能だと思われる。

VIII. 放出された微生物の行方

地理的に孤立した海底熱水系からも、好熱菌をはじめとした分子系統学上始原的な微生物やその遺伝子がスポット的に検出されてきている (たとえば, Takai and Sako, 1998)。これらの微生物の多くは、一般に嫌気的な高温環境を必要とすることから、総延長 80,000 km の海嶺の地下環境を通して地球上全体にその生息範囲を広げているとするのが考えやすい。酸化的な海水中でのこれら微生物の生存率はそう高くないと考えられるので、通常、海流に乗って現在世界中で 200 ヶ所程度しか知られていない海底熱水地帯に到達するのは、確率的に難しいと思われるからである。一方、固着性の強い底棲生物の多様性や生物地理の研究からは、大西洋中央海嶺に見られる熱水生物群集と

太平洋のそれが最も初期に分岐したことが示唆されており、その後、太平洋において島弧熱水系を含めた広範な活動的海洋底に分散適応が果たされたとする仮説が提唱されている (Tunnicliffe and Fowler, 1996)。これは、底棲生物の卵や幼生が浮遊能力や飢餓生存能に劣っており、広範な移動が妨げられてきたことを意味している。果たして、微生物ではどうなのであろうか？

最近、深海域の微生物の由来をめぐって大変興味深い知見が得られている。すなわち、日本海溝の水深 6,000 メートルの海水中より分離した低温細菌を詳細に調べた結果、その表層海水中や海底堆積物中から得られた低温細菌より、南極の土壌や海水中に見出される細菌と分子系統学的・分類学的・増殖生理学的により近縁関係にあることが分かった (Maruyama *et al.*, 2000)。これは、微生物の側から見て日本海溝と南極海がかなり近い関係にあることを示唆している。これまでに、日本海溝には南極海から深層海流が流れ込んでいることが知られており (Stommel, 1958; Broecker, 1990)、この海洋深層水の大循環に乗って微生物がグローバルに移動し、深海環境に適応・進化している可能性が高いと考えられる。この場合、細胞膜の物性から見て、微生物はまず表層域で低温適応を果たし、次に圧力への適応力を獲得して行ったものと推測可能である (Delong and Yayanos, 1985, 1986)。同様に、海嶺から放出された嫌気菌が、嫌気的な深層海流や熱水ブルームに乗り、遠く離れた単独の海底火山のような熱水活動域に運ばれた可能性は否定できない。このように、熱水地下生物圏から放出され、海底熱水系環境を求めて漂う微生物が、一般深海中からも見出される可能性はあるだろう。

IX. 地球史の中での熱水地下生物圏の変遷

分子系統学上始原的な生物が現世の活動的海洋底から見出されることをもって、熱水系地下生物圏が地球生命発生・揺籃の地ではないかと指摘されていることは既に述べた。しかし、これまでに得られた微生物の情報からは、この生物の共通祖先 (コモノート) の実体を解明するまでには至っ

ておらず、より祖先型に近い生物（始源生物）の発見が切望されている。この問題に答えるには、熱水活動の変遷についての地球史的な検証が不可欠である。図 6 は、海洋における微生物の適応進化の様相を模式化したものだが、熱水地下生物圏と一般海域の微生物群集とでは、当初その形成過程は異っていたと考えられる。ただ、閉鎖的な嫌気環境とは違い、開放的な好気環境に生息する微生物達は、上層海水中で繰り広げられる微生物相互間の競争の影響を強く受けてきたことは確実である。海嶺の熱水活動は、地球史的には 38 億年前にまでさかのぼることができ、長い歴史と連続性を有する現象であることから、微生物がそれを有効に利用しその生息範囲を光合成生物達と棲み分けながら、あるいは積極的に相互作用を行いながら、地球全体に拡大してきた可能性は高い。深海底熱水環境の微生物多様性に関する分子レベルでの解明は緒についたばかりであり、多様性から一歩踏み込んだ議論を進めるためには、さらに情報の蓄積が不可欠である。微生物は、その大きさはミクロであるが、過去から現在に至るまでこの地球環境に大きな影響を及ぼしてきた生物達であり、熱水地下生物圏を起源とする微生物達の深海域での行方を理解することは、海の科学全体にも影響を及ぼし得るグローバルな問題の解明を促すものとして期待される。

それでは、どうやってこの始源的な生物を探索すればよいのであろうか？ 最も直接的な証明方法は始源生物を生きたまま入手するということである。しかし、これまでの微生物研究は、このアプローチが多く時間と労力を要する大変困難な作業であることを示している。

生物は互いに相互作用しあい、種固有と思われる遺伝的性質すらも非常にダイナミックに変化させ適応・進化している。この変化の度合は、個々の生物の活動の大きさや生物間相互作用の複雑さ、さらに環境条件の多様性が増すに従い大きくなり、祖先の性質とは異なってくる。我々人間が日常的に眼にする生物圏はこの変化が激しいところであり、その結果として進化の根幹部に位置する始源的生物（生命誕生時の生物と近い特徴を

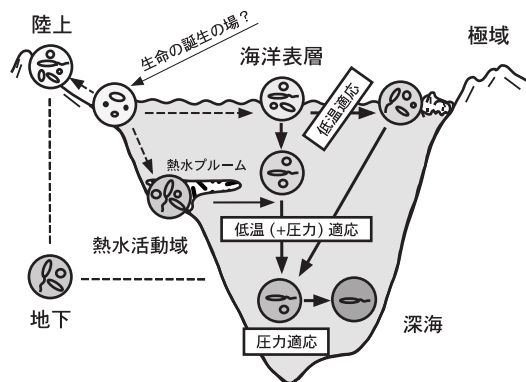


図 6 海洋における微生物の適応進化過程の概念図。

Fig. 6 Conceptual scheme of microbial adaptation and evolution processes in the ocean.

持った生物)の存在の可能性が低い。しかるに、熱水地下生物圏は環境の厳しさから生物間相互作用が単純であることが期待される。このような条件は、始源生物がより高い確率で現存し得る可能性を示唆するものであろう。

始源生物が独立栄養化学合成細菌なのか従属栄養細菌なのかについては 2 説あり決着が付いていない。よって地下生物圏における始源的細胞の探査は、前者の独立栄養化学合成細菌説の可能性を検証するものと考えられ、極めて重要な意味を持っている。現存する全ての生物において、機能情報を受け継いでいるものは遺伝子 DNA であり、RNA によりその命令が仲介され、実際に細胞を形づくるタンパク質他の生体分子の生産が制御されている。したがって、現存する生物の共通祖先として位置づけられる始源的生物細胞には、何はともあれこれらの核酸が含まれていなければならない。この生物の特性に着目し、細胞内核酸を染色して微生物細胞のみを検出する手法が、微生物分野では既に広く用いられている（たとえば、Kepner and Pratt, 1994）。しかし、自然環境試料の中でも土壌や海底堆積物試料のようなさまざまな無機、有機の夾雑物を多量に含む試料では、核酸と自家蛍光や非特異的蛍光との分別認識が困難な場合が多く、海底地下生物圏を対象として先行している研究の全微生物計数データの信頼性は

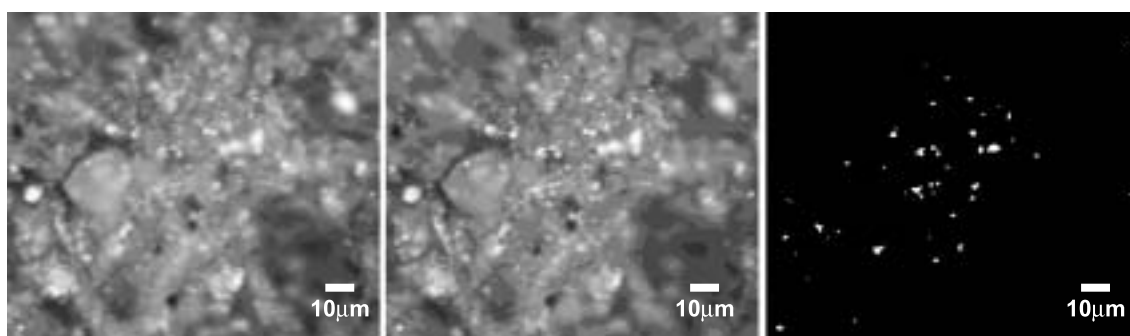


図 7 堆積物中の微生物細胞を蛍光スペクトル解析により高精度に分別検出した例。

左) 従来の B 励起法での蛍光画像, 中) 530-550 nm の蛍光を抽出した画像, 右) 蛍光スペクトル画像解析後の画像。接眼レンズ×10, 対物レンズ×20, SYBR Green II 染色による。

Fig. 7 An example of the highly reliable detection of microbial cells in marine sediment using a fluorescence spectral imaging technique.

そう高くない(たとえば, Parkes *et al.*, 1994)。一方で, DNA や RNA を特異的に染めることを目的としたさまざまな蛍光波長を持つ染色剤や, それらを検出するために必要な高性能冷却 CCD カメラやスペクトル解析装置, 画像解析装置が, 近年めざましい進展をみせている。これらを用いれば, 自然環境からの微生物試料であっても, 微生物細胞のみを特異的に検出し, それぞれの核酸含有量を見積もり, 細胞の活性や生活環を推定することも不可能ではない。実際に, これらの装置や染色剤を駆使することで, DAPI 等一般的な染色剤では識別困難であった堆積物中の微生物を良好に分別検出することが可能となってきた(図 7; Sunamura *et al.*, 2003)。

リボゾームの RNA (rRNA) の塩基配列の一部が, 生物の種類やグループ, ドメイン(一番上の系統分類単位で, バクテリア, アーキア, ユーカリアの 3 つからなる)に特異的な配列を有していることから, それぞれを標的とした蛍光標識オリゴヌクレオチド DNA プローブが開発されている(Amann *et al.*, 1995)。これら既存のものや新たに遺伝子解析の結果得られた塩基配列(A, T, G, C の列び)を用いることで, 特定微生物の選択的な検出が可能である。また Gro E や ATP synthetase, Rubisco 等, ある程度普遍的に存在することが明確となっている機能遺伝子群をターゲット

とした展開も大変有効である。たとえば前者の例として, 日本海溝由来の特定の微生物を対象とした特異的検出手法の検討では, 自然海水中の微生物が混在する中でこの深海微生物細胞だけを特異的に検出し, かつこれまでより高い定量性をもって解析することが可能となっている(Maruyama and Sunamura, 2000)。この手法を用いることで, 東太平洋海膨の海底熱水活動域で入手した低温熱水試料の中からバクテリアドメインの細胞や Beggiatoa 様巨大細胞を検出することに成功している(丸山, 1999)。したがって, 始源的生物細胞が既存のドメインに属する塩基配列を有するものであれば, これらの手法をベースにさらに改良を加えることにより, 多数の細胞の中からその細胞のみを特異的に検出し, さらにその分子系統学的な位置を探ることが可能である。

しかし, もし始源的生物細胞が既存のドメインに属する塩基配列を有していない場合, 上述した分子の塩基配列に着目した手法では検出が困難である。しかし, これらの細胞がセントラルドグマ(DNA → RNA → タンパク質)に基づいて生命活動を営んでいる以上, 核酸分子によりその存在を認識することは可能である。さらに, 既知情報の中から特定の遺伝子配列を持つ DNA プローブをデザインしたり, Direct PCR 法により現場試料から得られる塩基配列情報の中からホモロジー(相

同性) 検索を通して特別なプローブをデザインすることも可能であり、核酸分子による細胞認識に基づき、既存ドメイン外の細胞の属性を探ることも不可能ではない。また、微生物ゲノム(全遺伝領域)の一部ではなくその全体を対象に、混合微生物群集の遺伝情報を直接塩基配列解析することにより、遺伝子解析や遺伝情報側からその種類や機能を推定することも考えられる。AP 計画では、これらの新しい展開に向けた基盤的な手法開発も進めている。

一方、始源的生物細胞が自己複製を核酸に依存していない場合も想定されなくはない。すなわち、熱水地下生物圏のような太古の地球環境をとどめる場では、化学進化研究の過程で推測されているようなマイクロスフェア(微小球体)(Yanagawa *et al.*, 1988; Yanagawa and Kobayashi, 1992) が現存する可能性も残されている。類似の細胞様物質は、無菌的な微生物培養液を高温高压にすることでも得られることが明らかになっている(Trent *et al.*, 1984)。この場合、細胞そのものの認識を核酸分子以外のものに依存せざるを得ず、対象とする分子の適格性や用いる標識物質の非選択的吸着能等を事前、事後に十分検討することが不可欠となる。また、蛍光染色法以外の検出手法を併用することも極めて有効だと考えられる。蛍光染色手法に限れば、この細胞様物質の最大の特徴である膜を標的とすることが、まずもって最も現実的であろう。いずれにしても、この核酸分子を含まない生命体の検出は、極めてチャレンジングなテーマであり、培養法を併用した自己複製能の検証等も不可欠な課題と考えられる。

以上述べたように、未知なる始源的細胞の出現を想定した新しい検出、解析手法の開発を進めることは極めて重要であり、微生物の細胞レベルでの解析精度を著しく高めることにもつながる。また、始源的生物に関する分子系統学的な解析結果の信頼性は、実際の細胞試料にフィードバックすることにより著しく高まることになるし、その逆の流れもあり得る。これらの手法や方法論を駆使することにより、熱水地下生物圏の微生物試料が

ら全く新しい発見がもたらされる可能性は飛躍的に高まるものと考えられる。

謝 辞

本調査研究は、文部科学省科振費総合研究「海洋における生物・地質相互作用の解明に関する国際共同研究(アーキアン・パーク計画)」により実施した。海底掘削装置の調査にあたっては丸茂克美博士(産総研海洋資源環境)および辻井 薫博士(海洋科学技術センター)、潜水艇用採水システムについては石橋純一郎博士(九州大理)、海域調査については島 伸和博士(神戸大理)にそれぞれご協力頂いた。また、AP 計画生物系参加研究者の難波謙二(東京大農)、内海真生(筑波大農林工)、加藤憲二(静岡大理)、帆秋利洋(株)大成建設技術研)、長沼 毅(広島大生物生産)、桑原朋彦(筑波大生物)、山岸明彦(東京薬科大生命)、福井 学(東京都立大理)、千浦 博(国際基督教大教養)、久留主泰朗(茨城大農)、花田 智(産総研生物機能工)、河原林裕(産総研糖鎖工)博士らとの議論が有益であった。ここに厚く感謝の意を表したい。

文 献

- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169.
- Baker, E.T., Massoth, G.J. and Feely, R.A. (1987) Cataclysmic venting on the Juan de Fuca Ridge. *Nature*, **329**, 149-151.
- Baker, E.T., Lavelle, W., Feely, R.A., Massoth, G.J. and Walker, S.L. (1989) Episodic venting on the Juan de Fuca Ridge. *J. Geophys. Res.*, **94**, 9237-9250.
- Baker, E.T., Massoth, G.J., Feely, R.A., Embley, R.W., Thomson, R.E. and Burd, B.J. (1995) Hydrothermal event plumes from the CoAxial seafloor eruption site, Juan de Fuca Ridge. *Geophys. Res. Lett.*, **22**, 147-150.
- Broecker, W.S. (1990) The great ocean conveyor. *Oceanography*, **4**, 79-89.
- Chevaldonne, P. and Godfroy, A. (1997) Enumeration of microorganisms from deep-sea hydrothermal chimney samples. *FEMS Microbiol. Lett.*, **146**, 211-216.
- Cowen, J. (1997) Geochemical processes in hydrothermal plumes. *Onboard Report: Southern East Pacific Rise Ridge Flux '97 Second Cruise. JAMSTEC*, 342-346.
- Delaney, J.R., Kelley, D.S., Lilley, M.D., Butterfield, D.A., Baross, J.A., Wilcock, W.S.D., Embley, R.W.

- and Summit, M. (1998) The quantum event of oceanic crustal accretion: Impacts of diking at mid-ocean ridges. *Science*, **281**, 222–230.
- Delong, E.F. and Yayanos, A.A. (1985) Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science*, **228**, 1101–1103.
- Delong, E.F. and Yayanos, A.A. (1986) Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 730–737.
- Deming, J.W. and Baross, J.A. (1993) Deep-sea smokers: Windows to a subsurface biosphere? *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 3219–3230.
- Franklin, J.M., Lydon, J.M. and Sangster, D.F. (1981) Volcanic-associated massive sulfide deposits. *Econ. Geol. 75th Anniversary Vol.*, 485–627.
- Harmsen, H.J.M., Prieur, D. and Jeanthon, C. (1997) Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and entichment culture of thermophilic subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2876–2883.
- Holden, J.F., Summit, M. and Baross, J.A. (1998) Thermophilic and hyperthermophilic microorganisms in 3–30 hydrothermal fluids following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **25**, 33–41.
- 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.
- Jannasch, H.W. (1995) Microbial interactions with hydrothermal fluids. In Humphris, S.E., Zierenberg, R.A., Mullineaux, L.S. and Thomson, R.E. eds.: *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*. American Geophysical Union Geophysical Monograph, **91**, 273–296.
- Karl, D.M., Taylor, G.T., Novitsky, J.A., Jannasch, H.W., Wirsén, C.O., Pace, N.R., Lane, D. J., Olsen, G.J. and Giovannoni, S.J. (1988) A microbiological study of Guaymas Basin high temperature hydrothermal vents. *Deep-Sea Res.*, **35**, 777.
- Kepner, R.L. and Pratt, J.R. (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and present. *Microbiol. Rev.*, **58**, 603–615.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000) *Brock Biology of Microorganisms*. Ninth Edition. Prentice Hall International.
- Martin, W. and Russell, M. (2002) On the origins of cells: A hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil. Tran. Royal Soc. B*, **10**, 1098–1183.
- Maruyama, A. (1997) *In Situ Particle Sampling System. On board Report: Southern East Pacific Rise Ridge Flux '97 Second Cruise. JAMSTEC*, 131–132.
- 丸山明彦 (1999) 活動的海洋底における微生物活動の規模と役割. 月刊海洋, 号外, **19** (総特集「海嶺の熱水活動と地下生物圏」), 170–179.
- Maruyama, A. and Sunamura, M. (2000) Simultaneous direct counting of total and specific microbial cells in seawater, using a deep-sea microbe as target. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2211–2215.
- Maruyama, A., Urabe, T., Ishibashi, J., Feely, R. A. and Baker, E. T. (1998) Global Hydrothermal primary production rate estimated from the southern East Pacific Rise. *Cahiers de Biologie Marine*, **39**, 249–252.
- Maruyama, A., Honda, D., Kiramura, K. and Higashihara, T. (2000) Phylogenetic analysis of psychrotrophic bacteria isolated from the Japan Trench including the description of a new deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 835–846.
- 松本勝時・皿田 滋 (1996) 深海用ボーリングマシン・システムの開発. 資源と素材, **112**, 1015–1020.
- 大島泰郎 (1995) 生命は熱水から始まった. 東京化学同人.
- 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.
- Smith, D.C., Spivack, A.J., Fisk, M.R., Haveman, S.A., Staudigel, H. and ODP Leg 185 Shipboard Scientific Party (2000) Tracer-based estimates of drilling-induced microbial contamination of deep sea crust. *Geomicrobiol. J.*, **17**, 207–219.
- Stommel, H. (1958) The abyssal circulation. *Deep-Sea Res.*, **5**, 80–82.
- Sunamura, M., Maruyama, A., Tsuji, A. and Kurane, R. (2003) Spectral imaging detection and counting of microbial cells in marine sediment. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 57–65.
- Takai, K. and Sako, Y. (1998) A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **28**, 177–188.
- Trent, J.D., Chastain, R.A. and Yayanos, A.A. (1984) Possible artefactual basis for apparent bacterial growth at 250 °C. *Nature*, **307**, 737–740.
- Tunnicliffe, V. and Fowler, C.M. (1996) Influence of sea-floor spreading on the global hydrothermal vent fauna. *Nature*, **379**, 531–533.
- Urabe, T., Baker, E.T., Ishibashi, J., Feely, R.A., Marumo, K., Massoth, G.J., Maruyama, A.,

- Shitashima, K., Okamura, K., Lupton, J. E., Sonoda, A., Yamazaki, T., Aoki, M., Gendron, J., Greene, R., Kaiho, Y., Kisimoto, K., Lebon, G., Matsumoto, T., Nakamura, K., Nishizawa, A., Okano, O., Paradis, G., Roe, K., Shibata, T., Tennant, D., Vance, T., Walker, S. L., Yabuki, T. and Ytow, N. (1995) The effect of magmatic activity on hydrothermal venting along the superfast-spreading East Pacific Rise. *Science*, **269**, 1092–1095.
- Ward, P.D. and Brownlee, D.E. (2000) *Rare Earth: Why Complex life is Uncommon in the Universe*. Copernicus.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J. (1998) The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090.
- Yanagawa, H. and Kobayashi, K. (1992) An Experimental approach to chemical evolution in submarine hydrothermal systems. *Origins of Life Evol. Biosphere*, **22**, 147–159.
- Yanagawa, H., Ogawa, Y., Kojima, K. and Ito, M. (1988) Constraction of protocellular structures under simulated primitive earth conditions. *Origins of Life Evol. Biosphere*, **18**, 179–207.
- (2003年3月25日受付, 2003年4月24日受理)