MINI REVIEW

地下生命圏研究の最先端と今後の展開

海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター
布浦拓郎

地下生命圏の概観

地下生命圏とは海洋底下 10cm 以深、陸上では 8m 以深と定義され(1)、Whitman ら(1998)は Cragg や Parks らによる海底下堆積物中の微生物細胞数等に基づき、地下生命圏のバイオマスは全地球のバイオマスの 90%を超えるとした(1,2)。しかし、地下環境は基本的には閉鎖系であり生命活動に必要なエネルギーの供給が滞るため、その大部分は極めて活性の低い静かな生態系であることが予想されている(Whitman らは世代時間を 5.5×10^5 日と見積もっている(1)。一方、活動的な地下微生物生態系とは、地球内部あるいは地表から供給されるエネルギーに規定された限られた環境に存在すると予測されている(3)。すなわち、地下生命圏の活動は、地球内部エネルギーあるいは地球表層から供給される有機物に支えられており、海洋底浅部堆積物に有機物を供給する大陸の配置まで含めれば、活動的な地下生命圏は全て地球の活動に規定されると考えられるようになってきている。

海底下生命圏研究の現在

静かな地下生命圏の代表とも言える海底下生命圏研究は、Parkes や Cragg らが ODP(Ocean Drilling Program)航海にて掘削されたコア試料より直接計数法を用いて微生物細胞の鉛直分布を明らかにしたことをきっかけに本格化した(2,4)。Whitman らは微生物が使う炭素フラックスより地下生命圏の平均的な世代時間を計算した(1)が、D'Hondt らは新たに硫酸及びメタン濃度の深度プロファイルより、微生物の代謝速度を計算し、物質循環に影響を及ぼす微生物活動は大陸周辺あるいは表層堆積物に限られると議論した(5)。しかし、これらの議論は培養法や遺伝子解析等の微生物学による検証が欠落しているという問題があった。

2000 年代に入るとコア試料を用いた遺伝子解析等の微生物学解析が徐々に進行し(6,7,8)、2003 年 ODP 史上初めての海底下生命圏解明を主目的とした掘削航海(Leg 201)がガラパゴス近傍赤道域及びペ

ルー沖にて行われた。注目すべき成果は続々と報告されているが、中でも興味深い成果はガラパゴス沖より採取された玄武岩直上の堆積物試料より、海底下ではその存在が予想されていなかった硝酸を始めとする多様な電子受容体が検出され、玄武岩-堆積物境界を流れる流体に支えられた活動的生命圏の存在が示唆されたことである(9)。しかし、残念ながら遺伝子解析等の結果はこれまで明らかになっていない。また、この航海で採取されたコア試料中のバイオマスは、これまでのアクリジンオレンジによる直接計数法だけでなく、rRNA を含む細胞を計数する事を目的とした CARD-FISH(catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization)による計数が試みられ、海底下約 400m までは rRNA を含む細胞が存在することが報告された(10)。筆者らの研究グループでは、この航海で採取したペルー沖堆積物の他、その後の ODP Leg 204 でカスカディア沖から採取した堆積物について 16S rRNA 遺伝子による群集構造解析を行っている。その結果、検出された微生物の多くは、全く未培養の系統に属し、Leg 201 で同じ試料より培養された種とは全く異なり、むしろオホーツク海のコア堆積物や南海トラフのメタンハイドレート胚胎層から検出された微生物相と類似していた(7,11,12,13)。これらの結果は大陸縁辺の海洋底堆積物中の微生物相にはある程度の共通性があること、また、その多くがこれまでの培養法では培養できないことを示している。一方で、これらの堆積物はいずれもメタンハイドレートを胚胎していたことから、海底下におけるメタン菌の優占が予想されていたものの、既知のメタン菌はごく僅かしか検出されず、メタンハイドレートの起源に迫ることは出来なかった。

Leg 201 以降も数多くの微生物研究者が ODP あるいは IODP(Integrated Ocean Drilling Program:2004 年 ODP から移行)の掘削航海に参加し、海底下生命圏に関する知見が集積されつつある。しかし、筆者らの解析でも示されたように、海洋底堆積物中の物質循環に重要な役割を果たすメタン菌の分布、メタン生成の基質等は全く明らかになっていないこと、生息する微生物の代謝が未解明であることなど、海洋

底堆積物中の微生物生態の解明には未だ遠い状況にあり、新しい方法論が必要であろう。

新しい生命科学の場としての活動的な地下生命圏

原核生物のゲノム解析から始まり、ヒトを含む‘高等生物’におけるゲノム解析さらにはプロテオームやメタボローム研究といった大型の‘オーム’プロジェクトが進行する現在の分子生物学において、本格的に始まった新たな大型プロジェクトの一つが、環境におけるゲノミクス(メタゲノミクス)であり、今後はプロテオミクスも本格化するであろう。環境のゲノミクス・プロテオミクスには、未培養の微生物の生理生態、あるいは一つの遺伝子プールまたは代謝ネットワークとしての微生物生態系を明らかにすることが期待される。微生物生態学は、分子生物学の方法論を導入することで、この10数年の間に急激に進歩を遂げてきた。メタゲノミクスの方法論自体は、1990年代よりDeLongらにより新たな微生物生態学の手法として取り組まれてきた(14,15)ものであるが、今や分子生物学本流の新しいフィールドとなりつつある。そして、活動的な地下生命圏は、この本格的にスタートしたホットな研究分野の中で非常に重要なターゲットである。

活動的な地下生命圏、中でも地球表層からの有機物に依存しない生態系は、電子受容体の不足する海洋底深部堆積物のような静かな生命圏(5,6)とは対照的に、電子受容体が豊富に供給される環境に観察される。これらの環境では、微生物生態系を支える物質、エネルギーの流れが明確であり、また、微生物分布自体がそれらの化学勾配に依存している(16,17)。これまでに直接的に観察された代表的な活動的な地下生命圏として、高濃度のメタンを伴う冷湧水帯、地下鉱山中の地下(熱)水系等が挙げられよう(16,17,18,19)。これらの場では、地上の環境とは異なる特異な微生物相が観察され、従来の微生物学及び地球化学等による解析と共に、メタゲノミクス単独あるいは生化学との複合研究による解析が試みられ、特異で培養困難な微生物の生理・生態あるいはその微生物生態系全体の解明に貢献している。

1. メタン冷湧水帯における環境ゲノム-生化学複合研究

地殻内から供給されるメタンが海水から供給される硫酸により酸化される嫌氣的メタン酸化は、地球における炭素フラックスを考える上で非常に重要な地球化学プロセスであり、この反応($\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$)はメタン生成菌である *Methanosarcinales* に近縁なアーキアと硫酸還元菌である δ -Proteobacteria からなる共生系により行われる

ことが明らかになっている(17,20)。この共生系はこれまでに単離されたことはなく、また、バイオリアクターを用いた堆積物中での集積培養系を用いた研究により、アーキアの分裂時間は3週間以上であることが明らかになるなど、まさに難培養微生物群集である(21)。このため、その発見当初よりメタン酸化反応はメタン生成の逆経路によることが予測されていたものの、従来の研究手法による証明は困難であった。そこで、Krügerらは、メタン酸化の鍵酵素と予測した Methyl Coenzyme M reductase の精製を、黒海のメタンシープより採取した嫌氣的メタン酸化微生物群集から F₄₃₀ を指標として試みるとともに、メタゲノムライブラリーを構築し、遺伝子、タンパク質両方向からの証明を試みた。その結果、残念ながら酵素活性は検出できなかったものの、メタン生成菌の F₄₃₀ とは少し分子量の異なる F₄₃₀ 様ニッケル化合物を含む Methyl Coenzyme M reductase 様タンパク質の生成に成功した(22)。そして、この Methyl Coenzyme M reductase 様タンパク質の N 末端配列をコードする遺伝子は、同時に作製された fosmid を用いたメタゲノムライブラリーから見出され、その遺伝子はまさに Methyl Coenzyme M reductase のホモログであった(22)。一方、Hallamらは Eel River Basin のメタンシープより採取した嫌氣的メタン酸化微生物群集より fosmid およびショットガンライブラリーを作製し、これまでに 111.3Mb もの塩基配列を明らかにした(23)。これまでに、メタン生成経路に関わる主要な酵素のホモログの殆どがメタゲノムライブラリーより見出されたされている。また、これらの遺伝子と嫌氣的メタン酸化アーキア 16S rRNA 遺伝子の検出数は高い相関を示し、メタン生成経路に関わる主要な遺伝子のホモログは嫌氣的メタン酸化アーキアに由来することが強く示唆されている。現在、さらなる環境ゲノミクスと個々の酵素に関する生化学研究が進められているが、ドイツのグループの研究でアミノ酸配列解析が重要な役割を果たしたことは、複合系においてもプロテオミクスが有効に働きうることを示唆しており、今後はメタゲノミクスと環境プロテオミクスの複合的な展開が期待される。

2. 地下鉱山酸性廃水 -初のショットガンライブラリーによる生態系全ゲノム解析-

鉱山では微生物による酸化及び黄鉄鉱の溶解により以下の反応が生じ、強酸性の廃水が生じることが知られている。 $(\text{FeS}_2 + 3.5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+)$ 、 $(14\text{Fe}_2\text{O}_3 + 3.5\text{O}_2 + 14\text{H}^+ \rightarrow 14\text{Fe}^{3+} + 7\text{H}_2\text{O})$ 、 $(\text{FeS}_2 + 14\text{Fe}^{3+} + 8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 15\text{Fe}^{2+} + 2\text{SO}_4^{2-} + 16\text{H}^+)$ (20)。Tysonらはカリフォルニア州の地下鉱山強酸性廃水(pH0.83, 42°C)中の微生物群集からショットガンライブラリーを作製し、76.2 Mbp の塩基配列を解析し

た(24)。この生態系にはいずれも鉄酸化菌である *Leptospirillum* group II & III、*Ferropasma* が優占し、マイノリティーとして真核生物及び *Sulfobacillus* が存在することが FISH 解析により明らかにされている。すなわち上述した嫌氣的メタン酸化微生物群集の場合とは異なり、本質的に培養が困難な微生物群集についての解析ではないが、一つの微生物群集全体のショットガンシーケンスによる解析を初めて試み、環境におけるゲノムレベルの多様性について議論した野心的な試みと言える。結果として、*Leptospirillum* group II についてはゲノムレベルでも非常に均一な、*Ferropasma* についても相当に均一なゲノム配列を見出している。さらに Tyson らは *Ferropasma* では塩基配列の僅かな多様性から同種内での微生物間の相同組み替えが頻繁に生じている可能性を議論した。もっとも、この議論については、未成熟なメタゲノムインフォマティクス(25)により、ショットガン法という短い遺伝子断片に依存した塩基配列を解析している点で疑問もあり、今後の新しいインフォマティクスに基づく検証が待たれるところである。いずれにせよ 76.2Mb という Venter らのサルガッソー海におけるメタゲノム解析(1600Mb)(26)とは比較にならない小規模の研究から、微生物群集内のゲノムの可塑性を論じることが出来たのは、活動的地下生命圏に特徴的な単純な微生物相によるものである。

3. 地下鉱山熱水系におけるメタゲノム解析-新しいインフォマティクス開発へ向けて-

筆者らのグループでは、菱刈金山地下熱水系(70°C)に見出した微生物群集について、フォスミドライブラリーを作製し、メタゲノム解析を行っている。なお、この微生物生態系は全く未培養の系統に属する HWCG(Hot Water Crenarchaeotic Group)アーキア及び、好熱性水素酸化細菌(*Sulfurihydrogenobium*、*Hydrogenophilus*)、好熱性メタノトロフ(*Methylothermus*)、未培養 *Chloroflexi* が優占し、その他、未培養の *Nitrospirales* 等が存在することが 16S rRNA 遺伝子クローン解析により示されている(16,27)。このプロジェクトの目的は、全く未培養の好熱性アーキアの性状を解析すると共に、新しいメタゲノムインフォマティクスのモデル系を構築することである。これまでの解析の結果、HWCG が好気性カルボキシドトロフ($\text{CO} + \text{O}_2 + \text{A(ox)} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{AH}_2(\text{red})$)である可能性が示された他、このアーキア群集ではゲノムが非常に均一であることが示唆されている(27)。現在、我々はランダムにクローンを選び、メタゲノムライブラリーの解析をさらに進めている。このプロジェクトから明らかになる HWCG アーキアのゲノム情報は、地下熱水生態系の理解に貢献するだけでなく、アーキアの進化

研究に大きく貢献するであろう。また、得られたデータをモデル系とし、菱刈金山熱水生態系より遙かに多様性に富む、海洋底堆積物生態系のメタゲノム解析に不可欠なメタゲノムインフォマティクスの開発を目指すところである。

4. 今後の展開

活動的な陸上地下生命圏には、化学勾配に依存した比較的単純な生物相が観察され、少なくとも上記の地下鉱山の *Leptospirillum* group II、*Ferropasma*、菱刈金山の HWCG アーキアに関してはゲノムの均一性までもが認められている。この特徴は、活動的地下生命圏が微生物生態、物質循環のみならず、比較ゲノムや微生物進化研究をメタゲノムの方法論から進める絶好の環境であることを示している。また、均一なゲノムではなくとも、メタゲノムインフォマティクスを開発する上でのモデル系として、比較的単純な生物相は貴重な存在であり、メタゲノミクスの発展に大きく寄与するであろう。さらに、環境ゲノムに続き展開されよう環境プロテオミクス、シミュレーションによる生態系研究が進行する課程においても、活動的地下生命圏研究が大きな役割を果たすことを期待したい。

地下生命圏研究の今後

海底下生命圏研究に代表される静かな生態系研究は、その生態系を構成する微生物の大部分が未培養の系統に属することが明らかになり、従来の手法による解析の限界が見えつつある。今後、静かな地下生命圏における微生物生態研究の進展には新しい培養法あるいは環境ゲノム解析による微生物代謝の解明は欠くことはできない。一方、海底下深部堆積物から検出される微生物の多くは、活動的な生態系の存在する海底表層付近からも検出されている(12,28)ことから、筆者は今後の地下生命圏研究に重要な場は必ずしも、深部地下ではないと考えている。微生物の活性の低い深部堆積物よりも活動的な海底表層堆積物からの培養の方が容易であることは想像に難くない。また、環境ゲノム解析においても、時には DNA 抽出さえ困難を伴う深部地下試料を用いた解析から十分な質を有するメタゲノムライブラリーの構築が図れるかどうかは技術的に難しい問題である。筆者は、解析、アクセスとも容易な活動的地下生命圏の解明が、地下生命圏の大部分を占める静かな生態系の解明にも不可欠であると考えている。

文献

1. Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J. (1998) *Proc Natl Acad Sci* 95: 6578-6583.
2. Parkes, R.J., Cragg, B.A. et al. (1994) *Nature* 371: 410-413.
3. 高井研、稲垣史生 (2003) *地学雑誌* 112: 234-249.
4. Parkes, R.J., Cragg, B.A. and Wellsbury, P. (2000) *Hydrogeology J* 8: 11-28.
5. D'Hondt, S., Rutherford, S. and Spivack, A.J. (2002) *Science* 295: 2067-2070.
6. Marcheri, J.R., Weightman, A.J. et al. (2001) *FEMS Microbiol Ecol* 34: 221-228.
7. Reed, D.W., Fujita, Y. et al. (2002) *Appl Environ Microbiol* 68: 3759-3770.
8. Newberry, C.J., Webster, G. et al. (2004) *Environ Microbiol* 6: 274-287.
9. D'Hondt, S., Jorgensen, B.B. et al. (2004) *Science* 306: 2216-2221.
10. Schippers, A., Neretin, L.N. et al. (2005) *Nature* 433: 861-864.
11. Inagaki, F., Nunoura, T. et al. (2005) in review
12. Inagaki, F., Suzuki, M. et al (2003) *Appl Environ Microbiol* 69: 7224-7235.
13. 稲垣史生 (2005) *日本微生物生態学会誌* 20: 5-6.
14. Schmidt, T.M., Delong, E.F., and Pace, N.R. (1991) *J Bacteriol* 173: 4371-4378.
15. Stein, J.L., Marsh, T.L., Wu, K.Y., Shizuya, H., and DeLong, E.F. (1996) *J Bacteriol* 178:591-599.
16. Hirayama, H., Takai, K., et al. (2005) *Extremophiles* 9: 169-184.
17. Boetius, A., Ravenschlag, K. et al. (2000) *Nature* 407, 623-626.
18. Takai, K., Moser, D.P. et al. (2001) *Appl Environ Microbiol* 67:5750-5760.
19. Baker, B.J. and Banfield, J.F. (2003) *FEMS Microbiol Ecol* 44: 139-152.
20. Orphan, V.J., Hinrichs, K.-U. et al. (2001) *Appl Environ Microbiol* 67,1922-1934.
21. Girguis, P.R., Cpzen, A.E. and DeLong, E.F. (2005) *Appl Environ Microbiol* 71: 3725-3733.
22. Krüger M, Meyerdierks, A. et al. (2003) *Nature* 426: 878-881.
23. Hallam, S.J., Putnam, N. et al. (2004) *Science* 305: 1457-1462.
24. Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P. (2004) *Nature* 428: 37-43.
25. Béjà, O. (2004) *Curr Opin Biotechnol* 15: 187-190.
26. Venter, C., Remington, K. et al. (2004) *Science* 304: 66 -74.
27. Nunoura, T., Hirayama, H. et al. (2005) *Environ Microbiol* published online
Takai, K. and Horikoshi, K. (1999) *Genetics* 152: 1285-1297.