

海洋性古細菌群集の鉛直的構造とその変動

海洋物質循環学分野 47-66705 井上 健太郎

指導教員 木暮 一啓 教授

キーワード ; 古細菌、群集構造、栄養特性

I はじめに

地球上の生物は、真核生物、真正細菌、古細菌の三つのドメインに分類される (Woese *et al.*, 1990)。古細菌はその発見から約30年しか経過しておらず、他の二群に比べて研究の歴史が圧倒的に短い。さらに、従来の研究は好熱性、好塩性のものなど、その特殊性に注目して行われてきた。しかし近年、こうした特殊性を持たない海洋環境にも広く古細菌が存在し、その細胞数は原核生物全体の約1/3に相当することが判明した (Karner *et al.*, 2001)。特に1000 mを越える深層では、その比率が約半分に至る。すなわち、古細菌は特殊な環境に限定された少数派ではなく、海洋の物質循環に大きく関与している菌群である。古細菌と真正細菌は、ほぼ同じサイズの原核生物として共存しているが、系統的にもかけ離れ、その相対的な存在比率は深層に向かって古細菌が増加する。この違いはどのように生じ、何を意味しているのだろうか。この疑問は、海洋生態系の基礎的な重要課題であるが、現在、これに答えるために我々が持っている古細菌に関する知見は、あまりにも少ない。

本研究は上記の疑問を念頭に置き、海洋性古細菌の生態的役割を明らかにするため、①古細菌群集の鉛直的組成解析、②鉛直的な群集構造の変動パターン解析、③異なる栄養条件への応答性解析、および④炭酸を取り込む古細菌の特定化を行い、真正細菌との間で比較検討した。

II 材料と方法

用いた試料は、学術研究船淡青丸 (東大海洋研究所、海洋研究開発機構) KT-06-09, 31次および07-16次航海で得た。上記課題①のため、駿河湾沖S1測点 (33°05'N, 138°05'E) の深度0 m, 500 m, 3000 mの試料について古細菌16S rRNA遺伝子クローンライブラリを作成した。課題②のためには、PCR-DGGE法により古細菌と真正細菌群集の構造変動を鉛直的に比較した。解析には多次元尺度法とプロクラステス解析無作為化検定、および階層クラスタ分類法を用いた。課題③では、駿河湾沖S1測点から、0, 1000, 2000, 3000 mの海水を採取し、孔径0.2 μmのフィルターでろ過して細菌および懸濁物を除去した。これらのろ液に深層3000 mの細菌群集を添加後1週間室温で静置培養し、その群集構造変動をPCR-DGGE法で解析した。課題④では、駿河湾沖S3測点 (34°05'N, 138°33'E) の深層1500 mの海水に安定同位体標識された炭酸水素ナトリウムを添加して2週間培養し、得られたDNAを塩化セシウム平衡密度勾配超遠心法によって密度別に分取し、密度が増加したDNAと変化しなかったDNAについて古細菌16S rRNA遺伝子のクローンライブラリを作成した。

III 結果と考察

① 測点S1の古細菌16S rRNA遺伝子クローンライブラリを作成し、0 mから44、500 mから44、3000 mから46の配列を解読した。BLAST検索の結果、得られたクローンはUncultured archaeaのMarine group I, II, IIIおよびIVに大別された。出現頻度を比較すると、表層0 mではMarine group IIが多く、深層に向かってMarine group IとIIIが増加した。Marine group IVは500 mにひとつのみ現れた。② 古細菌と真正細菌の群集構造の変動は、表層から深層にかけての大きなスケールでは共通性を持ち、浅層や深層といったクラスタ内では変動の幅が異なる傾向にあった。具体的には、表層で古細菌の変動は小さく、真正細菌は大きいことが確認された。言い換えると、真正細菌は古細菌に比べて浅い有光層でその群集構造を大きく変えてから深層に至り、古細菌は比較的深い層で構造を変えて深層に至る。つまり真正細菌は光合成によって生産された有機物の減少に、より敏感に応答し、古細菌は有機物の減少に対して応答が小さいということが示唆された。③ 海水交換培養実験の結果、真正細菌は培養海水の深度によらずほぼ一様な群集に変移した。これに対し、古細菌群集は海水の深度に応じて異なる群集に変移した。この結果から、古細菌は異なる栄養基質を異なる群集がそれを選択的に利用する傾向があるのに対し、真正細菌は栄養基質の種類にあまり依存することなく特定のグループが優占的にそれらを利用する傾向があることが分かった。④ ¹³C炭酸を取り込むことで密度を増したDNA画分から得られたクローンは、測点S1の環境配列と系統的に近く、炭酸を取り込む能力は特別な系統群ではなく、環境中に生息する古細菌に広く保有されていることが示された。

本研究では、古細菌の鉛直的群集構造、水深に応じた異なる栄養条件への古細菌と真正細菌の応答の違い、炭酸取り込み能を持つ古細菌の系統的な位置づけなどを明かにした。本研究の結果を総合すると、古細菌の深海への進入については以下のように考えられる。

古細菌が地球上に発生した頃、海洋には既に真正細菌が繁栄していた。新参者である古細菌が生き残るためには、真正細菌が不得手とするような環境に適応する必要があり、それが深層であった。深層は有機物濃度が低くかつ低温であることから、生物の活発な生息には必ずしも好適な環境ではない。しかし低濃度ながら真正細菌が利用しない様々な有機物が存在し、古細菌は深海の物理化学的環境に徐々に適応しながらそれらを利用するようになった。同時に、有機物ではなく無機化合物からエネルギーを生産する独立栄養性の古細菌群が海洋深層を生息域とするに至った。

今後、懸濁物、底泥、嫌気環境、淡水などの多様な環境から試料を得て真正細菌との比較検討を行うとともに、異なる栄養条件に対する応答性、増殖様式などの解明を通じてこの進化過程の仮説を実証し、海洋性古細菌の起源を明らかにしていきたい。

参考文献

1. Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a Natural System of Organisms : Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4576-4579.
2. Karner, M.B., DeLong, E.F., and Karl, D.M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**: 507-510.

Spatial structure and dynamics of marine *Archaeal* community

Marine Biogeochemical Cycles #47-66705 INOUE Kentaro
Supervisor Prof. KOGURE Kazuhiro

Keywords: *Archaea*, community structure, nutritional property

I Introduction

Life on this planet consists of three domains, known as the *Bacteria*, the *Archaea*, and the *Eukarya* (Woese *et al.*, 1990). Among the three, the *Archaea* was found only about 30 years ago and our knowledge on this group is still very limited. Since its finding, the organisms in the domain *Archaea* have been traditionally regarded as “extremophiles” of which distributions are quite restricted to certain habitats. However, recent studies show that marine planktonic *archaea* make up a surprisingly large percentage of deep water communities, that is up to 30% of all prokaryotes in the ocean (Karner *et al.*, 2001). Thus *archaea* are distributing widely and present as significant numbers, but little is known about their community structure and function. The purpose of this study is to clarify ecological characteristics of marine *archaea* by analysis of i) vertical community structure, ii) community structure dynamics, iii) response under different nutritional condition, and iv) specification of bicarbonate uptaking *Archaea*.

II Materials and Methods

Water samples were collected during research cruise KT-06-09, 31 and KT-07-16, by R/V *Tansei Maru* (Ocean Research Institute, the University of Tokyo and JAMSTEC). With these samples;

i) Clone libraries of *Archaeal* 16S rRNA genes were generated from DNA extracted from 0, 500, 3000 m samples taken at St. S1 (33°05'N, 138°05'E).

ii) PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) was carried out with *Bacterial* and *Archaeal* specific primer sets, and band patterns were compared by multi dimensional scaling method (MDS), Procrustes randomization test, and hierarchical cluster analysis.

iii) *Bacterial* and *Archaeal* mixed community that was present in water sample obtained from 3000 m depth at St. S1 was incubated in different depth (0, 1000, 2000, 3000 m) sea water for a week at room temperature, and community structures were analyzed by PCR-DGGE.

iv) Mixed community in 1500 m depth at St. S3 (34°05'N, 138°33'E) were incubated with stable isotope (carbon 13) labeled bicarbonate for two week at room temperature. Obtained DNA solution was fractionated into 50 fractions by caesium chloride density gradient equilibrium ultracentrifugation method, and clone libraries of 16S rRNA genes were generated from DNA taken from heavy and light fractions.

III Result and Discussion

i) Clone libraries were generated with PCR products from the sample at St. S1. Forty

four sequences, 44 and 46 sequences were obtained from 0 m, 500 m and 3000m depth samples, respectively. Most of the sequences were closely affiliated with uncultured *Archaeal* clones known as Marine group I, II, III, and IV. Marine group II clone were most abundant component in the surface water, and Marine group I and III clone increased with depth. Only one Marine group IV clone appeared at 500 m depth.

ii) Vertical changes in *Bacterial* and *Archaeal* community structure were analyzed by DGGE and MDS. Both groups showed similar pattern on MDS, indicating that the similar or synchronous vertical change in the structure. However, the range of vertical changes at smaller scale showed dissimilar trends, *i.e.*, *Archaeal* community structure had changed little, in contrast *Bacterial* community structure had showed more marked change in shallower layers.

iii) When prokaryotic cells from 3000m depth were inoculated into filtered seawater obtained from different depth, the community structure of *Bacteria* and *Archaea* showed dissimilar shift. *Bacterial* community ended up with similar banding patterns regardless of the depth, while *Archaeal* community showed variation depending on the depth. This result indicates that they have differed response and strategies for nutrient acquisitions.

iv) Every clone from heavy fraction DNA of carbon 13 bicarbonate incubation system was closely-related with environmental clones of St. S1. It was indicated that *Archaeal* species possessing the ability of bicarbonate incorporation are scattering in the *Archaeal* marine groups.

Bacterial communities were stated by their function as nutritional property, adaptabilities for physicochemical conditions, and/or interworking of individuals. This study concluded that the reason for *archaeal* dominance in deep waters is involved in their nutritional properties. Moreover, *Archaeal* evolution process was speculated with these findings.

When *Archaea* was diverged from its ancestor and appeared on earth, *Bacteria* had already been present in the ocean. *Archaea* had to explore new habitat where *Bacteria* had been scarce or where bacterial metabolic capabilities were not very efficient. The deep sea is characterized by low nutrient concentration and the presence of variety organic compounds at extremely low concentrations. Therefore, *Archaea* was demanded to develop new metabolic and physiological characteristics that made possible to use such organic compounds. Another strategy was to develop autotrophic metabolism, which is typically seen among nitrifying group. Thus, it is assumed that *Archaea* adapted to deep sea environment with oligotrophic and/or autotrophic way of life.

In order to verify this speculation, further phylogenetic, nutritional and functional analyses with various samples from different part of the planet will be required.

References

1. Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4576-4579.
2. Karner, M.B., DeLong, E.F., and Karl, D.M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**: 507-510.