

博士論文

アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の分布と系統

東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻

伊知地 稔

2012年3月22日

1. 序論

海洋における硝化は、生態系の基礎生産を制御する重要な反応過程の一つであり、硝化細菌が唯一の担い手であると考えられてきた。しかし、アンモニア酸化を行う古細菌の発見により、環境中における硝化のメカニズムに関する再検討が必要となっている。そうした中で、海洋古細菌によるアンモニア酸化は、栄養塩の再生だけでなく、新たな炭素固定過程として生物地球化学的な重要性が知られている。一方、海洋古細菌の分離株は *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 株のみであり、生物学的な知見が圧倒的に不足している。本研究では、アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の生理生態学的特性と、古細菌ドメインにおける系統学的な位置を明らかにする事を目的とした。特に、駿河湾の中深層に生息するアンモニア酸化古細菌 (Ammonia Oxidizing Archaea, AOA) の鉛直分布やニッチについて調べ、そこから特定の古細菌が高度に集積された系を得て、分布を制御する要因としてのアンモニア態窒素と水温の影響について調べた。さらに、これら集積系の解析によって、未培養な AOA 系統群の 16S rRNA 遺伝子配列を決定した。

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

海洋性 AOA 群集は、アンモニア酸化の鍵酵素遺伝子 (*amoA*) の配列によって、*Nitrosopumilus maritimus*-like cluster (NM)、Water Column cluster A (WCA)、Water Column cluster B (WCB) と呼ばれる 3 つの系統群に分かれる。既報研究では、系統群による鉛直方向での棲み分けが指摘され、NM と WCA は表層でよく見られることから Shallow Marine clade、WCB は中深層以深で多く見られることから Deep Marine clade と呼ばれている。海洋の水柱における AOA の好適な生息場所として、微生物活動の「ホットスポット」と呼ばれ、高濃度のアンモニア態窒素が局所的に存在する有機物粒子が挙げられるが、こうした粒子における付着性 AOA の分布については未だ調べられていない。本章では、系統群による分布や生息場所の違いを明らかにするために、

付着と自由生活という海洋微生物の二つの生態型に注目して、駿河湾における AOA の分布と多様性を解析した。2008 年 2 月に駿河湾の湾央から湾口までの 5 地点で、海水試料を鉛直的に採取後、孔径 3.0 μm と 0.22 μm のフィルターで連続的に濾過し、付着性画分と自由生活性画分に分けて解析した。定量 PCR 法を用いて Shallow Marine clade と Deep Marine clade の AOA について、それぞれの現存量 (*amoA* コピー数) を調べた。また、湾口部水深 500 m の海水試料を同様に濾過し、*amoA* 配列による群集構造解析を行った。両画分に分けた解析の結果、海水中における AOA の大部分は、自由生活であると初めて明らかにした。一方、付着性 AOA は単位海水当たりの現存量が少ないものの、*amoA* 配列に基づく OTU クラスタリング (カットオフ値 5%)、Chao1 法による種数推定、レアファクション解析から、自由生活性 AOA よりも多様性が高く、種数が多いと示された。一般に、アンモニア態窒素に乏しい海水においても、粒子上に付着し高濃度のアンモニア態窒素を得られるはずである。しかし、多くの海洋性 AOA は、低濃度のアンモニア態窒素利用に適応し、自由生活の生態型をしていると考えられる。また、付着性 AOA の物質循環への量的な寄与は、自由生活性 AOA に比べて小さいが、有機物粒子の存在が AOA の多様性維持に重要な役割を果たしていると示唆された。さらに、自由生活性 AOA は、既報と同様に、表層で Shallow Marine clade が優占し、中深層で Deep Marine clade が優占する分布パターンを示すのに対し、付着性 AOA には、そのような分布が見られなかった。

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

海洋性 AOA 群集の分布を決める要因として、既報研究ではアンモニア態窒素濃度や酸素濃度の重要性が指摘されてきた。特に、WCA の割合は、酸素及びアンモニア態窒素濃度と正の相関関係を示し、これらの環境要因の影響が示唆されている。一方、WCB ではそのような関係が見られず、その他の要因を考える必要がある。本章では、海洋性 AOA の主要系統群の分布を支配する要因を明らかにするために、アンモニア態窒素もしくは亜硝酸態窒素を添加した集積

培養系を用いて、AOAの群集構造と現存量に及ぼすアンモニア態窒素濃度と水温の影響を調べた。駿河湾湾口部の水深 500 mと 2,000 mの海水試料に基質として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ もしくは NaNO_2 を添加 (Nとして終濃度 50 μM) し、4°C、10°C、20°C ($n = 1$) に保持、震盪せずに暗条件で 1,200 日間の集積培養を行った。培養開始時に基質を添加後、300 日目までの培養期間中に最大で 3 回の基質添加を行った。集積培養における系統群別のクローン出現頻度と現存量の変化を解析した結果、WCBの割合と培養期間中における消長は培養温度によって大きく異なり、水温が海洋性AOAの主要系統群の分布を支配する要因として重要であると実験的に初めて示された。水深 500mと 2,000mのいずれの集積系においても、高温 (10°Cと 20°C) ではNMもしくはWCAが優占となり、低温 (4°C) ではWCBが優占となった。また、Shallow Marine clade (NMとWCA) は、いずれの温度でもアンモニア態窒素を添加するとさらに現存量が増加したので、Deep Marine clade (WCB) と比べてアンモニア態窒素に対する最大収量が高いと示唆された。既報研究で、NMとWCAはアンモニア態窒素の供給量が多い水族館や、沿岸近く、浅海で優勢になり、一方でWCBは低温な深海で優勢になると報告されている。前章においても同様な各系統群の鉛直的な棲み分けが示された。本章の研究で得られた結果から、こうした分布の違いは、生息環境におけるアンモニア態窒素濃度と水温の違いによって説明できると考えられる。また、同じ系統群内においても培養期間や温度によって出現するOTUが変化しており、種レベルでの環境要因に対する応答の違いと群集構造の変動が示唆された。

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

第 3 章の研究で、古細菌の *amoA* で見た OTU が 1 ないし 2 つしか存在しない培養系が得られた。優占した AOA の原核生物分類の汎用指標である 16S rRNA 遺伝子配列は、こうした培養系を用いると決定できる。本章では、これまで不明であった WCB を含む海洋性 AOA の系統学的位置を明らかにするために、駿河湾だけでなく、様々な海域で得た集積系から、NM 及び WCA

だけでなく、WCB が非常に高い割合で集積された系を選抜し、16S rRNA 遺伝子配列を決定した。海水試料は駿河湾と相模湾、大槌湾、サロマ湖、北極海で採取したものを、集積培養は前章と同様に行った。合計で 8 試料、73 の集積系について、定量 PCR 法を用いて Shallow Marine clade および Deep Marine clade の現存量を調べた。北極海で得られた集積系を用いた 16S rRNA 遺伝子解析の結果、WCB に属する AOA の系統学的位置を、NM 及び WCA と同じ *Thaumarchaeota* の Group I.1a 内に確定できた。WCB の古細菌は、分離株である *N. maritimus* に対して、*amoA* 配列の系統関係と同様に異なる系統群として区別できた。その相同性は、97% 以下であり、種以上の分類群レベルで異なると示唆された。本研究では、海洋性 AOA を構成する 3 つの主要系統群について、古細菌ドメインにおける系統学的な位置を初めて明らかにできた。また、3 つの主要系統群に含まれない新たな系統群の存在も示唆された。既報研究で、*amoA* 配列で区別される 3 つの系統群は、16SrRNA 遺伝子配列で区別されない同一の系統群であると予想されていた。しかし、既報と異なるプライマーセットを用いた解析によって、既報知見の一部は方法論的な問題によるアーティファクトである可能性が明らかとなった。これら海洋性 AOA の系統群は、16SrRNA 遺伝子配列の相同性が 97% 以下であり、生息場所を異にする別種、あるいは別属の古細菌であると考えられる。

5. 結論

本研究は、海洋性 AOA の海水中での鉛直的な棲み分け、付着と自由生活という二つの生態学的ニッチにおける系統群分布パターンや多様性の違いを示し、こうした分布を決める環境要因として、アンモニア態窒素濃度に加えて水温が主要因と成り得ると初めて明らかにした。さらに、未培養な海洋性 AOA の 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、古細菌ドメインにおける系統学的な位置を初めて明らかにした。この成果は、原核生物全体の群集構造解析において AOA の特定を可能にし、環境中における AOA の動態を原核生物群集全体の動態と比較しつつ、その現存

量や生産量への寄与を見積もるのを可能にした。今後、それぞれの系統群に特異的なプローブを用いた定量的な解析手法により、海洋環境中の硝化過程に関わる様々な課題へのアプローチが可能になると期待される。

目次

	頁
要約.....	iii
1. 総合序論.....	1
2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所.....	13
3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化.....	59
4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統.....	85
5. 総合考察.....	123
6. 謝辞.....	133
7. 引用文献.....	137

1. 総合序論

1.1. はじめに

硝化は、還元型窒素であるアンモニアが亜硝酸イオンと硝酸イオンに酸化される反応である。海洋においては、硝化の最終産物である硝酸態窒素が、生物学的に利用可能な窒素形態の大部分を占めており、基礎生産を制限する重要な要因となっている (Dugdale and Goering, 1967; Eppley and Peterson, 1979; Ward 2011; Yool et al., 2007)。また、硝化は温暖化ガスである亜酸化窒素の発生源として気候システムにも関係している (Dore et al., 1998)。全海洋には、約 600 Pg N ($P = 10^{15}$) という溶存無機態窒素の巨大な現存量が維持され、そのほとんどは硝酸態窒素である (Wada and Hattori, 1990)。硝酸態窒素濃度は有光層以深で高いことから、硝化が深海の重要な生物地球化学的過程であると言える (Dore and Karl, 1996; Zehr and Ward, 2002)。

近年、窒素循環と硝化に関する我々の理解を根本的に変えるような発見が相次ぎ (Ward et al., 2007)、ほんの十数年間における一連の研究によって、硝化と窒素循環に関するパラダイムが急激な変貌を遂げつつある (Francis et al., 2007)。19 世紀末に発見されてから約 100 年近く、独立栄養性硝化細菌がアンモニア態窒素を亜硝酸態窒素、次に硝酸態窒素に酸化できる唯一の生物だと考えられてきた (Könneke et al., 2005)。アンモニア酸化細菌 (Ammonia-Oxidizing Bacteria, AOB) と亜硝酸酸化細菌 (Nitrite-Oxidizing Bacteria, NOB) は、それぞれ 25 種と 8 種以上の分離株が知られており、多くの生物学的知見が蓄積している (Koops and Pommerening-Roser, 2001)。しかし、近年の二つの発見によってこの常識は覆され、硝化に対する我々の理解は大きく変化した (Ward 2011)。一つは、嫌氣的アンモニア酸化 (アナモックス) の発見である (Mulder et al., 1995)。従来から亜硝酸イオンを使ってアンモニウムイオンを窒素分子へ嫌氣的に酸化する反応は、熱力学的に有効であるとわかっていたが (Ward 2011)、実際にその能力がある生物が記載されたのは 1990 年代になってからである (Strous et al.,

1999)。もう一つは、アンモニア酸化を行う古細菌の発見である(Könneke et al., 2005)。海洋と陸上環境において、アンモニア酸化古細菌(Ammonia-Oxidizing Archaea, AOA)は、AOBよりも現存量が多いと報告されている(Leininger et al., 2006; Wuchter et al., 2006)。酸素の安定同位体を用いた研究から、AOAは亜酸化窒素の主要な供給者であると知られている(Santoro et al., 2011)。これらの発見は、陸域と水域環境における硝化の制御について、未だ多くの研究課題が残されている事を示している(Ward 2011)。例えば、深海におけるアンモニア酸化は、栄養塩の再生だけでなく、新たな炭素固定過程として、生物地球化学的な重要性が指摘されている(Teira et al., 2006; Martens-Habben et al., 2009)。

本論文では、アンモニア(NH_3)とアンモニウムイオン(NH_4^+)を合わせてアンモニア態窒素、同様に亜硝酸(HNO_2)と亜硝酸イオン(NO_2^-)を亜硝酸態窒素、硝酸(HNO_3)と硝酸イオン(NO_3^-)を硝酸態窒素と表記する。

1.2. 海洋古細菌

1992年、古細菌は非極限環境である海洋にも存在する証拠が分子生態学的手法で示された(DeLong, 1992; Fuhrman et al., 1992)。Woese and Foxによって古細菌という概念が提唱されて以来(Woese and Fox, 1977)、古細菌は2つの門、*Euryarchaeota*と*Crenarchaeota*に属し(Woese et al., 1990)、極限環境に生息する生物であると考えられていた。*Euryarchaeota*は、メタン生成古細菌と高度好塩古細菌、好酸性好熱性古細菌、少数の超好熱性古細菌を、*Crenarchaeota*は超好熱性古細菌を含む一群であった。海洋環境由来の古細菌は、こうした極限環境に生息する古細菌と系統的に異なり、Marine Group I - IVの四つの系統群に分類されている。このうち、Marine Group Iは、*Crenarchaeota*に属する系統群である(DeLong, 1992)。他の系統群は*Euryarchaeota*

に属する Marine Group II (DeLong, 1992) と Marine Group III (Fuhrman and Davis, 1997)、Marine Group IV (López-García et al., 2001) である。しかし、これらには分離株が存在せず、どのような機能を有しているか不明であった。

Marine Group I は、近縁な系統群が存在せず、超好熱性 *Crenarchaeota* (クレンアーキオータ) と姉妹群を形成し、単一系統のグループである (DeLong, 1992)。このグループは、ゲノムが読まれている二種の古細菌として、水族館の濾過槽から分離された *Candidatus N. maritimus* (Könneke et al., 2005; Walker et al., 2010) と、カイメンに共生している *Candidatus Cenarchaeum symbiosum* (Hallam et al., 2006a; Preston et al., 1996) を含んでいる。最近、この Marine Group I を含む古細菌の系統群は新しい門 *Thaumarchaeota* (タウムアーキオータ) として提案され (Brochier-Armanet et al., 2008)、それを支持する報告がなされている (Brochier-Armanet et al., 2012; Pester et al., 2011; Spang et al., 2010; Walker et al., 2010)。

海洋古細菌のうち、全海洋に幅広く分布しもっとも卓越したグループは、Marine Group I と Marine Group II である (DeLong et al., 1999; Karner et al., 2001)。Marine Group I の古細菌は、浮遊原核生物群集の主要なメンバーであり、深海の全原核生物の 40-50%、全海洋の浮遊原核生物の約 20% を占める事が知られている (Karner et al., 2001)。Marine Group II は温帯域の有光層で優勢であり、南極域の様な環境には存在しないと考えられている (Massana et al., 1998, 2000; Murray et al., 1999)。

1.3. アンモニア酸化古細菌

硝化原核生物に関する研究は、1890 年の Winogradsky による土壌性硝化細菌の発見により始まった (Winogradsky et al., 1890)。その後、1936 年に Rakesraw による海洋での硝化作用の発見 (Rakesraw et al., 1936)、1965 年に Watson による外洋で分離された硝

化細菌の形態と生理性状に関する報告がなされ (Watson et al., 1965)、海洋における硝化及び硝化細菌に関する研究が盛んに行われるようになった。

硝化は、19世紀末に発見されて以来、2種類の細菌による代謝過程であると考えられてきた (Fig. 1-1a) (Kowalchuk and Stephen, 2001; Arp and Stein, 2003)。アンモニアを亜硝酸イオンに酸化するアンモニア酸化の過程は、*Betaproteobacteria* または *Gammaproteobacteria* に属する一部の細菌が、続いて亜硝酸イオンを硝酸イオンに酸化する亜硝酸酸化の過程は、*Alphaproteobacteria* または *Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、*Nitrospira* に属する一部の細菌が行う。この過程は、アンモニア酸化の反応によって律速される事が知られている (Kowalchuk and Stephen, 2001)。

ところが、細菌ドメインにのみ与えられた能力であると考えられていた硝化を、古細菌も担っているとわかった (Fig. 1-1b)。近年、脂質バイオマーカーやマイクロオートラジオグラフィーと、同位体トレーサーを組み合わせた研究によって、Marine Group Iの古細菌は、主な炭素源として二酸化炭素を使う事が示された (Pearson et al., 2001; Wuchter et al., 2003; Herndl et al., 2005; Ingalls et al., 2006)。さらに、古細菌によるアンモニア酸化を示す最初の証拠が、土壌と海洋の試料におけるメタゲノム解析によってもたらされた (Venter et al., 2004; Treusch et al., 2005)。サルガッソー海で得られた表層海水試料のメタゲノムライブラリーからは、古細菌コンティグ上にアンモニア酸化に関与する鍵酵素であるアンモニアモノキシゲナーゼ (Ammonia monooxygenase, AMO) 遺伝子のホモログが同定された (Venter et al., 2004)。そして、硝化細菌の研究が始まってから100年以上経過した2005年、水族館の濾過槽から、アンモニア酸化能を持つ独立栄養性無機化学合成古細菌 *Candidatus N. maritimus SCM1* 株が初めて分離され、この株は Marine Group Iに属していた (Könneke et al., 2005)。また、AMOの α サブユニット遺伝子

(*amoA*)のPCR-クローニング解析から、海洋堆積物、河口、土壌(Francis et al., 2005)、
廃水処理リアクター(Park et al., 2006)などの様々な環境中にAOAが存在し、環境に特
有な系統群や、高い遺伝子多様性を有しているとわかった(Mincer et al., 2007)。現時
点で、アンモニア酸化能を持つ既知の古細菌はタウムアーキオータに属する古細菌に
限られている(Spang et al., 2010)。

1.4. アンモニア酸化古細菌の代謝系

アンモニア酸化と炭素固定を行う独立栄養性AOAについて、代謝経路やそれに関わる
遺伝子に関しての理解は不十分なままである。*Candidatus C. symbiosum* のゲノム解析
による代謝経路の再構築は、ウレアーゼと尿素取り込み、アンモニア輸送、硝酸還元酵
素、亜硝酸還元酵素をコードする遺伝子と同様に、*amoA* と *amoB*、 *amoC* を含む潜在
的にアンモニア酸化に関与する多くの遺伝子の存在を明らかにしたが(Hallam et al.,
2006b)、依然として未解明な部分も残っている(Francis et al., 2007; Hallam et al.,
2006b)。

細菌が行うアンモニア酸化の反応は、アンモニアをAMOによって NH_2OH
(hydroxylamine)に、ヒドロキシルアミン酸化還元酵素(Hydroxylamine oxidoreductase,
HAO)によって亜硝酸イオンに変換する(Fig. 1-2)。しかし、AOAは、二つ目の反応を担う
必須酵素、HAO遺伝子のホモログが、*Candidatus C. symbiosum*のゲノム上に見当たら
ず、細菌と異なる機構でアンモニア酸化を行っていると考えられている(Hallam et al.,
2006b)。Walker et al.(2010)は、*Candidatus N. maritimus* SCM1 株のゲノム解析結果か
ら、アンモニア酸化に関して二つの異なる経路を提案している。提案された経路の一つ
はhydroxylamineから、AOBのヘムを中心としたHAOの代わりに、銅を中心とした酵素に
よって反応が進むというものである。もう一つの経路は、hydroxylamineの代わりに

nitroxylを中間代謝物として産生するAMOにより反応が進むというものである。Hollibaugh et al. (2011)は、河口にある塩湿地の汽水試料を用いたメタトランスクリプトーム解析で、Walker et al. (2010)によって提案されたnitroxylを中間代謝物とした経路に関わる遺伝子の転写産物が検出されず、代わりにTreusch et al. (2005)とBartossek et al. (2010)によって報告されたが、生体内での機能はわかっていないクレンアーキオータの銅含有nitrite reductases遺伝子(*nirK*, 亜硝酸還元に関わる遺伝子)のホモログが検出されたと報告した。そして、それらの遺伝子によってコードされたタンパク質は、実験結果から全く異なる活性、または亜硝酸還元及び未知の活性を示すかもしれないと推測されている(Bartossek et al., 2010)。未知の活性とは、AMOと同様の活性を暗示していると考えられる。Walker et al. (2010)は、それらの機能を詳細に記述することなく、アンモニア酸化からエネルギー生産するのに使われる遺伝子のリストにそれらを含めていた。さらに、転写産物プールにおけるそれらのホモログの高い存在量から、それらは環境中においてアンモニア酸化経路の重要な役割を担っていると示唆されている(Hollibaugh et al., 2011)。

タウムアーキオータの炭素固定に関しては、大枠の代謝経路がわかってきており、炭素循環への寄与も推定されている。*Candidatus C. symbiosum* のゲノム解析から、3-ヒドロキシプロピオン酸の独立栄養的炭素同化経路をコードする遺伝子のホモログが同定され、タウムアーキオータが独立栄養である可能性が示唆された(Hallam et al., 2006a,b)。さらに、タウムアーキオータに属する既知の古細菌は、好氣的アンモニア酸化を通じたエネルギーに依存し(Hallam et al., 2006a; de la Torre et al., 2008; Hatzenpichler et al., 2008; Walker et al., 2010; Blainey et al., 2011)、3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクルを通じた炭素固定で(Berg et al., 2007; 2010; Walker et al., 2010)、偏性独立栄養化学合成を行うことがわかってきた。*Candidatus*

Nitrososphaera viennesis の分離株は、ピルビン酸の存在下で培養した時に増殖が向上したが、それでも細胞を構成する炭素の大部分は独立栄養に由来すると示された (Tourna et al., 2011)。さらに、海洋においてタウムアーキオータは、新生産に使われる全窒素を供給するのに十分な亜硝酸を生産し、基礎生産の 1%を担うと推定されている (Ingalls et al., 2006; Berg et al., 2007)。

1.5. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の分布

AOA の発見以来、アンモニア酸化に関わると考えられる古細菌の *amoA* は河口 (Francis et al., 2005) や、沿岸のアマモ場 (Ando et al., 2009)、酸素が欠乏した海盆 (Lam et al., 2007; 2009)、外洋水柱 (Agogue et al., 2008) を含む広範囲な海洋環境で見つかっている。さらに、海洋生態系で AOA の現存量が AOB よりも多いことから、海洋の硝化には古細菌が主要な役割を果たしていると考えられている (Wuchter et al., 2006; Lam et al., 2007, 2009; Beman et al., 2008, 2010; Church et al., 2010; Molina et al., 2010; Santoro et al., 2010)。

海洋性 AOA の明瞭な特徴は、水深に応じて系統的に異なる群集が優占している事である (Francis et al., 2005; Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007; Nakagawa et al., 2007; Beman et al., 2008)。異なる群集とは、*amoA* の系統によって分かれる 3 つの系統群、*Nitrosopumilus maritimus*-like cluster (NM)、Water Column cluster A (WCA)、Water Column cluster B (WCB) である (Francis et al., 2005; Hallam et al., 2006b; Könneke et al., 2005)。NM と WCA は表層でよく見られる事から Shallow Marine clade、WCB は中深層以深で多く見られる事から Deep Marine clade と呼ばれている (Mincer et al., 2007)。海水環境から得られる古細菌の *amoA* 配列のほとんど全ては、Water column / Sediment cluster に属し、この中に Shallow Marine clade と Deep Marine clade も含ま

れている(Francis et al., 2005; Nakagawa et al., 2007)。Beman et al.(2008)は、Shallow Marine clade と Deep Marine clade を特異的に検出するプライマーセットを開発し、Shallow Marine clade が表層でも深層でも検出され、Deep Marine clade が深層でしか検出されないと提示した。

1.6. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の分布を制御する要因

AOA の群集構造が水深によって異なる現象は、生物要因や環境要因の影響によって説明されているが、今のところ明確な証拠を伴った報告はなく、どのように AOA 群集の鉛直分布が決まるのかは明らかになっていない。Erguder et al. (2009)は、既報研究をまとめることで、AOA の生息場所を決定する可能性として、アンモニウム態窒素、有機炭素、温度、塩分、溶存酸素、pH、硫化物、リン等の様々な環境要因について概説している。Shallow Marine clade は光阻害への抵抗性を有し、有光層に適応している可能性が指摘されている一方で(Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007)、光は AOA 群集の分布を決定する重要な要因ではないという報告もなされている(Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007)。細菌の AMO は膜貫通型であり、著しい光照射によって失活すると知られている。AOA 群集に占める Shallow Marine clade の WCA の割合は、酸素・アンモニウム濃度と正の相関関係を、硝酸濃度と負の相関関係を、Deep Marine clade の WCB の割合は、酸素・アンモニウム濃度に負の相関関係を持つと報告されている(Molina et al., 2010)。amoA コピー数から推定した AOA の現存量は、表層と深層の二つの亜硝酸極大(Cooeln et al., 2007; Herfort et al., 2007; Beman et al., 2008)や硝酸濃度(Mincer et al., 2007)に正の相関関係を持つと報告され、亜硝酸や硝酸の生成への寄与が示唆されている。

1.8. 本研究の目的

本研究を開始した2007年以降も、海洋古細菌のアンモニア酸化に関する新しい知見が次々に発表されているが、その分離株はシアトル水族館の濾過槽から得られた *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* SCM1 株のみであり(Könneke et al., 2005)、生物学的な知見が圧倒的に不足している。本研究では、アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の生理生態学的特性と、古細菌ドメインにおける系統学的な位置を明らかにすることを目的とした。本論文では、駿河湾に生息する AOA を対象とした鉛直分布や生息場所の研究、中深層以深の海水による集積培養系を用いた生態学的特性の研究、16S rRNA 遺伝子の系統に関する研究について述べる。

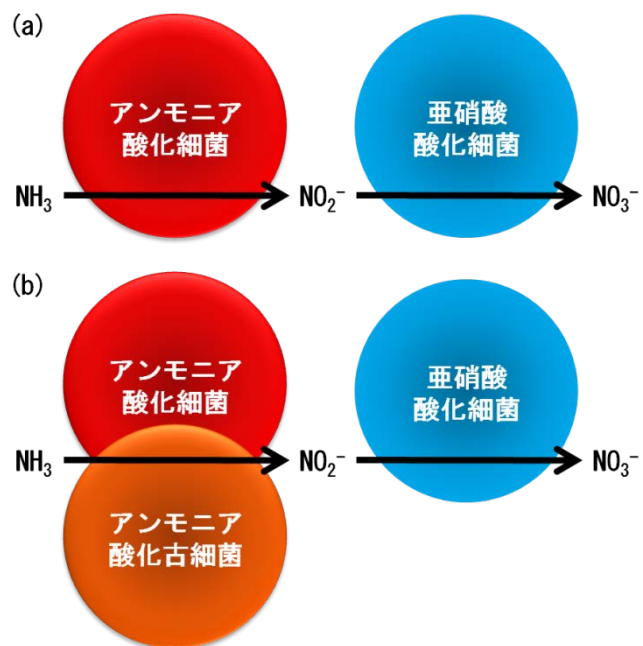


Fig. 1-1 View showing a frame format of nitrification process, indicating classically-known relationship among nitrification and bacteria (a), and newly-arrived relationship among nitrification, bacteria and archaea (b).

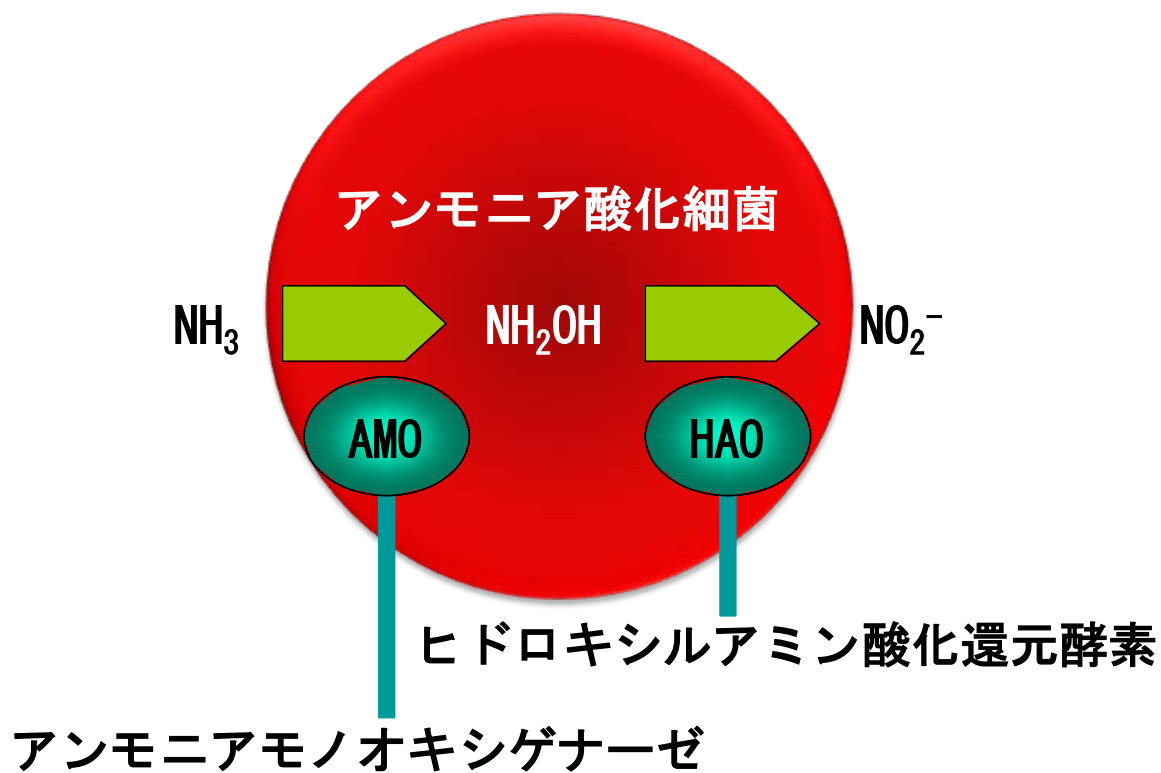


Fig. 1-2 View showing a frame format of bacterial ammonia oxidation process.

**2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する
海洋古細菌の群集構造と生息場所**

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

2.1. 序論

アンモニア酸化能を有する海洋古細菌は、水深に応じて系統的に異なる群集が優占し、Shallow Marine clade (NM と WCA) は表層でも深層でも検出されるが、Deep Marine clade (WCB) は深層でしか検出されないと報告されている (Beman et al., 2008)。この現象は、生物要因や環境要因の影響によって説明されているが、今のところ明確な証拠を伴った報告はなく、どのように AOA 群集の鉛直分布が決まるのかは明らかになっていない。

沈降粒子やマリンスノーなどの有機物粒子は微生物活動の「ホットスポット」と呼ばれ、海水中に比べて高濃度のアンモニア態窒素 (数十 μM 以上) が存在し、硝化原核生物の好適な生息場所になっていると考えられている (Karl et al., 1984; Alldredge and Silver 1988)。また、炭素の安定同位体でラベルした二酸化炭素の取り込みから、海洋中深層の沈降粒子が新たな懸濁態有機炭素の生産場所になっていると示唆されており、アンモニア酸化による炭素固定の寄与が推察されている (Karl et al., 1984)。

既報研究によって、浮遊性 AOA の鉛直分布パターンは明らかとなってきたが (Beman et al., 2008; Francis et al., 2005; Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007; Nakagawa et al., 2007)、沈降粒子やマリンスノーなどの有機物粒子中における AOA の分布については、全く調べられていない。海水中の細菌群集を付着性画分と自由生活性画分に分けて解析すると、その群集組成や活性、種数が大きく異なると知られている (DeLong et al., 1993; Moeseneder et al., 2001; Ghiglione et al., 2007; Eloë et al., 2011)。北西部地中海の水深 100、400、700 m において *Betaproteobacteria* に属する AOB は、付着性画分と自由生活性画分で出現する系統群が異なり、特に水深 400 m でその差が大きく、それぞれの系統群の生理学的特性に応じて、異なる環境を生息場所としているためと推察されている (Phillips et al., 1999)。

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

細菌群集や AOB 群集では、付着性画分と自由生活性画分で群集組成や現存量、活性に違いがあると報告されているが、古細菌ではそのような違いが報告されていない。AOA 群集にはそのような違いが存在するのだろうか。本章では、付着性と自由生活性という二つの生態型に注目して、沿岸から深海(最深部約 2,500 m)までの採取が行える駿河湾において、AOA の分布を定量PCR法で、その多様性を PCR-クローニング法で解析し、系統群による分布や生息場所の違いを明らかにすることを目的とした。

本論文では、海水中の浮遊性古細菌を、付着性古細菌と自由生活性古細菌に分けて解析する。それぞれは、有機物粒子に生息し孔径 3.0 μm のフィルターに捕集される画分、海水中に生息し孔径 3.0 μm のフィルターを通過後、孔径 0.2 μm のフィルターに捕集される画分として定義する。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 試料採集

海水試料は、2008 年 2 月に KT08-02 次淡青丸航海で、駿河湾の湾央から湾口までの 5 地点(St.1 - 5)で、12 L ニスキン採水器 12 本を装着した CTD カラーセル採水器を用いて鉛直的に採水した(Fig. 2-1, Table 2-1)。各深度 5 L の海水試料を現存量解析用には孔径 3.0 μm (付着性画分)のヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルター(Whatman, Maidstone, UK)と孔径 0.22 μm (自由生活性画分)のステリベクス GS フィルターユニット(Millipore, Billerica, MA)で連続的に濾過した。また、群集構造解析用には孔径 3.0 μm (付着性画分)と孔径 0.2 μm (自由生活性画分)のヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターを用いた。核酸抽出までこれらのフィルターを -20°C で保存した。

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

2.2.2. 環境要因の測定

塩分と水温、水深は CTD プロファイラー (SBE-911plus; Sea-Bird Electronics Inc., Bellevue, WA) で、溶存酸素濃度は DO センサー (SBE-43; Sea-Bird Electronics Inc.) を用いてそれぞれ測定した。

無機態窒素濃度は比色法を用いた気泡分節型連続流れ方式分析装置 (swAAt; BLTEC, Tokyo, Japan) で、Jodo et al. (1992) の方法をわずかに改変したメーカー指定の方法に従い測定した。検出限界は $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_2^-\text{-N} + \text{NO}_3^-\text{-N}$ が $0.15 \mu\text{M}$ で、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ が $0.05 \mu\text{M}$ であった。標準誤差は $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の測定値が 0.3% ($n = 21$)、 $\text{NO}_2^-\text{-N} + \text{NO}_3^-\text{-N}$ が 0.2% ($n = 30$)、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ が 0.1% ($n = 30$) であった。

2.2.3. 核酸抽出

現存量推定のための Q-PCR 用の核酸は、溶液量を変更したキサントゲン酸-SDS プロトコルによって抽出した (Tillett and Neilan 2000)。ヌクレオアポリカーボネートメンブレンフィルターは新しい 5 mL チューブに入れ、4 mL の Xanthogenate-sodium dodecyl sulfate buffer (XS buffer) (1% potassium ethyl xanthogenate, 100 mM Tris-HCl [pH 7.4], 20 mM EDTA [pH 8.0], 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 800 mM Ammonium acetate) を注入した。チューブは 70°C で 120 分間保温した。チューブ内の溶解物を新しい 5 mL チューブに移し、10 秒の攪拌後、氷上で 30 分間静置した。細胞残屑は $15,000 \times g$, 12 分間、 4°C で遠心しペレットにした。上清は新しい 5 mL チューブに移して、もう一度遠心し、再び上清を新しい 2 本の 5 mL チューブに移し、夾雑物を完全に除去した。上清に 2 mL の 100% イソプロパノール (室温) を加え、氷上で 10 分間静置した。1 本目の 5 mL チューブを $15,000 \times g$, 20 分間、 4°C で遠心し、イソプロパノールを静かに捨てた。2 本目の 5 mL チューブの溶液を 1 本目の 5 mL チューブに移して、遠

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

心し、イソプロパノールを静かに捨てた。4 mL の 70%エタノールを加え、遠心し、乾燥させた。200 μ L の大塚蒸留水を加え、核酸を懸濁した。ステリバクスGSフィルターユニットは 2 mL の XS buffer を注入した(2.5 mL シリンジ、25G \times 5/8 注射針を用いた)。フィルターユニットは 70°C で 120 分間保温した。フィルターユニットの溶解物を同じシリンジで回収し、新しい 5 mL チューブに移し、10 秒の攪拌後、氷上で 30 分間静置した。ここまでの工程を同じフィルターユニットでもう一度行った(2 回目は 70°C で 30 分間保温し、新しい 5 mL チューブに移した)。1 回目の細胞残屑は 15,000 $\times g$ 、12 分間、4°C で遠心しペレットにした。上清は新しい 2 mL チューブに移した。もう一度遠心し、上清を新しい 5 mL チューブに移し、夾雑物を完全に除去した。上清に 2 mL の 100%イソプロパノール(室温)を加え、氷上で 10 分間静置した。1 回目の 5 mL チューブを 15,000 $\times g$ 、20 分間、4°C で遠心し、イソプロパノールを静かに捨てた。2 回目の細胞残屑も 15,000 $\times g$ 、12 分間、4°C で遠心しペレットにした。上清は新しい 2 mL チューブに移した。もう一度遠心し、上清を 1 回目と同じ 5 mL チューブに移し、夾雑物を完全に除去した。上清に 2 mL の 100%イソプロパノール(室温)を加え、氷上で 10 分間静置した。5 mL チューブは 15,000 $\times g$ 、20 分間、4°C で遠心し、イソプロパノールを静かに捨てた。4 mL の 70%エタノールを加え、遠心し、乾燥させた。200 μ L の大塚蒸留水を加え、核酸を懸濁した。

群集構造解析用の核酸はヌクレオアポリカーボネートメンブレンフィルターから、ChargeSwitch[®] Forensic DNA Purification Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、メーカー指定の方法に従い抽出した。

2.2.4. DNA 濃度の測定

DNA濃度はQuant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen, Carlsbad,

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

CA)を用いて、メーカー指定の方法に従い測定した。

2.2.5. Q-PCR

AOAの現存量は*amoA*のコピー数で、タウムアーキオータの現存量はMarin Group Iの16S rRNA遺伝子のコピー数で推定した。Q-PCR増幅はLightCycler® 480 System IIリアルタイムPCR システム(Roche)を用いて、SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa)で行った。Q-PCRはShallow Marine cladeの*amoA*に特異的なフォワードプライマーであるArch-amoAFA(Beman et al., 2008)と、Deep Marine cladeの*amoA*に特異的なフォワードプライマーであるArch-amoAFB(Beman et al., 2008)、古細菌の*amoA*を対象としたユニバーサルなフォワードプライマーであるArch-amoAF(Francis et al., 2005)と、リバープライマーとして古細菌の*amoA*を対象としたユニバーサルなリバープライマーであるArch-amoAR(Francis et al., 2005)、及びMarin Group Iの16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーセットであるGL751FとGL956R(Mincer et al., 2007)を使い、既報とメーカー指定の方法に従い行った(Table 2-2, Fig. 2-2, Table 2-3)。Shallow Marine cladeの*amoA*と、Deep Marine cladeの*amoA*、古細菌の*amoA*、Marin Group Iの16S rRNA遺伝子のためのQ-PCR用標準試料は、それぞれkt162(AB592102)と、kt260(AB592180)、kt143(AB592083)、kt779(未取得)の遺伝子配列をクローニングし、制限酵素である*EcoR* I (kt162 と、kt260、kt143)または*Not* I (kt779)で直鎖状にしたベクターを用いた。Shallow Marine cladeの*amoA*と、Deep Marine cladeの*amoA*、古細菌の*amoA*、Marin Group Iの16S rRNA遺伝子アッセイのPCR効率は、それぞれ93.0-96.5%と、90.9-95.2%、91.2-92.5%、96.2-96.8%で、全てのアッセイで検量線の相関係数の r^2 値は少なくとも0.959であった。本論文ではShallow Marine cladeとDeep Marine cladeを合わせてTotal AOA、古細菌の*amoA*はGeneral AOAと呼称する。

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

2.2.6. 群集構造解析

St.5 の水深 500 m の試料から得られた DNA で、General AOA のクローンライブラリー作成のために PCR を行った。PCR 増幅は GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて、TaKaRa Ex Taq[®] (TaKaRa) で行った。PCR は古細菌の *amoA* を対象としたユニバーサルプライマーセットである Arch-*amoA*F と Arch-*amoA*R (Francis et al., 2005) を使い、既報とメーカー指定の方法に従って行った。クローニングは TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequence (Invitrogen) と *E. coli* DH5 α Competent Cells (TaKaRa) で、シーケンスは BigDye v.3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems) で行った。遺伝子配列間の相同性検索は BLAST と National Center for Biotechnology Information database で行った (Altschul et al., 1997)。塩基配列が 95% 以上の相同性をもつクローンは、CD-HIT suite (Huang et al., 2010) を用いて同じ OTU とした。塩基配列は MEGA5 (Tamura et al., 2011) 内の MUSCLE でアライメントした。系統樹は 562 塩基配列に基づいて、MEGA5 に実装された neighbor-joining 法で推定した (Saitou and Nei, 1987)。遺伝子間の距離は Maximum Composite Likelihood 法で計算した (Tamura et al., 2004)。ブーツストラップ値は 1,000 回繰り返して決定した (Felsenstein, 1985)。

2.2.7. その他の解析

遺伝子現存量とその比、環境要因間で相関係数を計算し、検定を行った。多様性解析 (レアファクションカーブと Chao1) は Rarefaction Calculator で行った (<http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>)。

2.3. 結果

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

2.3.1. 駿河湾の環境要因

採水深度と各層における環境要因の測定値をTable 2-4、2-5 に示した。水温は表層で13.3–14.9°C、湾奥(St.1&2)と湾央(St.3&4)で水深150 m付近まで、湾口(St.5)で水深20 m付近まで混合層が見られ、最深部の2,000 mで2.0°Cまで低下した(Table 2-4、Fig. 2-3、2-4)。クロロフィルは表面付近で最大濃度を示し、St.1とSt.2でそれぞれ10.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (水深4 m)と11.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (水深7 m)、St.3とSt.4、St.5でそれぞれ5.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (水深0 m)と8.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (水深0 m)、3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (水深0 m)であり、湾奥で高く、湾口に向けて低くなっていた(Fig. 2-4)。一方、水柱積算値(~ 200 m)はSt.1とSt.2、St.3、St.4、St.5でそれぞれ249.6 mg m^{-2} 、299.8 mg m^{-2} 、382.2 mg m^{-2} 、509.9 mg m^{-2} 、127.7 mg m^{-2} であり、湾央で高く、湾口で低くなっていた(Fig. 2-4)。PSUは34.2 – 35.0の範囲であり、St.1とSt.2の表面付近では値が低く淡水の影響があることを示した(Fig. 2-3、2-4)。溶存酸素濃度は1.8 – 7.8 mL L^{-1} の範囲であり、水深と共に低下する傾向にあった(Fig. 2-3)。また、水深900 m付近に酸素極小層が見られた(Fig. 2-3)。 σT は25.6 – 37.0の範囲であり、St.1とSt.2の表面付近では水深約10 mを境に急激に密度が高くなっていた(Fig. 2-3 & 2-4)。また、全ての地点で表層下部まで安定していた σT は、それ以深で水深に伴い高くなった(Fig. 2-3 & 2-4)。T-Sダイアグラムを作成した所、特徴的な水塊構造の違いは見られなかった。(Fig. 2-5)。

アンモニア態窒素と亜硝酸態窒素濃度は表層で高く、深層に向かって減少し、似たような傾向を示した(Table 2-5, Fig. 2-6)。ただし、St.5の水深2,000 mで高い濃度を示した(Table 2-5, Fig. 2-6)。硝酸態窒素とリン酸態リン濃度は表層で低く、深層に向かって増加し、似たような傾向を示した(Table 2-5, Fig. 2-6)。全菌数は 1.87×10^7 – 3.24×10^8 cells L^{-1} の範囲で、表層から深層に向かって減少していた(Table 2-5, Fig. 2-6)。

2.3.2. Total AOA と General AOA の現存量

Total AOA と General AOA が共に検出された試料において ($n = 20$)、Total AOA の現存量は General AOA より 2.74 - 24.0 倍の範囲で高く、平均で 7.53 倍、中央値で 5.13 倍高かった (Table 2-6, 2-7, Fig. 2-7)。そこで、本章では高い現存量が得られた Total AOA を AOA の現存量とした。

2.3.3. 付着性アンモニア酸化古細菌及び Marine Group I の現存量

Total AOA は表層の混合層からは全く検出されず、密度躍層よりも深い層で検出される傾向にあり、コピー数は検出限界以下 (7.54×10^2 copies L^{-1}) から 1.63×10^5 copies L^{-1} であった (Table 2-6, Fig. 2-8a)。Marine Group II については、表層 0 m と密度躍層よりも深い層で検出される傾向にあり、コピー数は検出限界以下 (3.35×10^2 copies L^{-1}) から 1.89×10^6 copies L^{-1} であった (Table 2-6, Fig. 2-8a)。

Total AOA に占める Shallow Marine clade と Deep Marine clade の割合は、それぞれ 48.2 - 75.4% と 24.6 - 51.8% の範囲で変動し、いずれの地点、深度においても約 50% 以上が Shallow Marine clade であった (Fig. 2-9a)。

また、Total AOA が検出された試料について ($n = 12$)、Total AOA と Marine Group I の現存量 (コピー数) の関係を調べたところ、両者は有意な正の相関 ($P < 0.001$ 、Pearson's product-moment correlation coefficient) を示し、Marine Group II に対する Total AOA の回帰直線の傾きは $0.09 (R^2 = 1.00)$ となった (Table 2-6, Fig. 2-10a)。

2.3.4. 自由生活性アンモニア酸化古細菌及び Marine Group I の現存量

Total AOA 及び Marine Group II は、分析した全ての地点、深度から検出され、その現

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

存量はそれぞれ $2.37 \times 10^3 - 1.30 \times 10^7$ copies L⁻¹及び $8.76 \times 10^3 - 8.99 \times 10^7$ copies L⁻¹であった (Table 2-7, Fig. 2-8b)。

Total AOA に占める Shallow Marine clade と Deep Marine clade の割合はそれぞれ 19.2 - 92.8%と 7.2 - 80.8%の範囲で変動した (Fig. 2-9b)。Shallow Marine clade は、表層で優占し混合層内では約 80%以上を占めた (Fig. 2-9b)。一方、深度と共に Deep Marine clade の割合が増加し、200 m 以深では 50%以上を占めていた (Fig. 2-9b)。

Total AOAとMarine Group Iの現存量(コピー数)の関係を調べたところ($n = 22$)、両者は有意な正の相関($P < 0.001$, Pearson's product-moment correlation coefficient)を示し、Marine Group IIに対するTotal AOAの回帰直線の傾きは $0.12 (R^2 = 0.52)$ となった (Table 2-7, Fig. 2-10b)。さらに、クロロフィルa濃度が高かった湾奥と湾央の混合層($n = 10$)、それ以外($n = 12$)で、同様に解析したところ、両者は共に有意な正の相関($P < 0.001$, Pearson's product-moment correlation coefficient)を示し、Marine Group IIに対するTotal AOAの回帰直線の傾きはそれぞれ $0.39 (R^2 = 0.99)$ と $0.10 (R^2 = 0.94)$ となった (Table 2-7, Fig. 2-10b)。

2.3.5. 付着性と自由生活性アンモニア酸化古細菌及び Marine Group I の現存量比較

付着性 Total AOA が検出された試料において($n = 12$)、一部の試料(St1 の 300 m と St.4 の 300 m)を除き、海水の単位容積あたりの自由生活性 Total AOA の現存量は付着性 Total AOA より 1 - 4 桁高かった。例外的に、St1 の 300 m と St.4 の 300 m から得られた試料で、自由生活性 Total AOA の現存量は、それぞれ付着性 Total AOA の 2.1 倍と 2.5 倍であった (Fig. 2-11a)。

同様に、付着性 Marine Group I が検出された試料において($n = 16$)、一部の試料

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

(St1 の 300 m と St.4 の 300 m)を除き、海水の単位容積あたりの自由生活性 Marine Group Iの現存量は付着性 Marine Group Iより1 - 4桁高かった。例外的に、St1 の 300 m と St.4 の 300 m から得られた試料で、自由生活性 Marine Group Iの現存量は、共に付着性 Marine Group Iの1.4倍であった(Fig. 2-11b)。

2.3.6. 環境要因と現存量の関係

古細菌の *amoA* 数と Marine Group I の 16S rRNA 遺伝子数および各遺伝子数同士の比と、環境要因との関連性を相関解析によって明らかにした。Shallow Marine clade / Total AOA は全 AOA に占める Shallow Marine clade の AOA の割合(この比に正の相関関係が認められる場合には、Deep Marine clade / Total AOA に負の相関関係が認められることになるので、Deep Marine clade / Total AOA は Table 2-8 には表記していない)、Total AOA / Marine Group I は Marine Group I の古細菌が AOA である割合を示す。各遺伝子数と各遺伝子同士の比は、付着性画分で Total AOA / Marine Group I が溶存酸素濃度に有意な正の相関を、リン酸態リン濃度に有意な負の相関を示した(Table 2-8)。自由生活性画分で Shallow Marine clade / Total AOA と Total AOA / Marine Group I が水温と濁度、クロロフィル a 濃度、溶存酸素濃度、アンモニア態窒素濃度、TDC に対し有意な正の相関を、圧力、 σT 、飽和酸素濃度、硝酸態窒素・リン酸態リン濃度に対し有意な負の相関を示した(Table 2-8)。浮遊画分は、自由生活性画分と同様であり、さらに Total AOA / Marine Group I と PSU においても有意な正の相関を示した(Table 2-8)。

2.3.7. アンモニア酸化古細菌の系統と多様性解析

付着性画分から 84 クローン、自由生活性画分から 41 クローンの *amoA* 配列を決定し

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

た。これらの配列は、40 OTUs(カットオフ値 5%)に分類された(Fig. 2-12、Table 2-9)。付着性画分と自由生活性画分に共通する OTUs に含まれているクローンの割合はそれぞれ 48.8%と 70.7%であった。付着性画分の OTUs は WCA と WCB、および NM または WCB に近縁な系統に、自由生活性画分の OTUs は NM と WCA、WCB に属していた(Table 2-9)。WCA、WCB に属するクローンは両画分に出現したが、付着性画分にはのみ NM に近縁なクローンである kt493 及び kt502 と、WCB に近縁なクローンである kt513 が、自由生活性画分にはのみ NM に属する OTU3 が出現した(Table 2-9)。付着性群集の方が自由生活性群集よりも多様性が高く(Fig. 2-13)、Chao1 法による OTUs 数の推定値は、それぞれ 58 と 19 であった。WCA と WCB 以外に属するクローンは、付着性群集と自由生活性群集で、それぞれ全クローン数のわずか 4%と 5%程度であった。自由生活性群集では WCA のクローン(26.8%)よりも WCB のクローン(68.3%)が多く出現したのに対し、付着性群集では WCA と WCB のクローンの出現頻度がそれぞれ 50.0%と 46.4%と同程度であった(Table 2-9)。

2.4. 考察

2.4.1. アンモニア酸化古細菌の生息場と分布の特徴

本研究では、海水環境における AOA の現存量について、付着性画分と自由生活性画分に分けて調べることにより、AOA が主に自由生活性であると初めて明らかにした。海洋環境からの分離株である *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* SCM1 株は、アンモニア態窒素に対する高い基質親和性をもち、基質の閾値も ≤ 10 nM であり、貧栄養な海洋環境での硝化に AOA は直接的に関与しているようである(Martens-Habbena et al., 2009)。一般に、アンモニア態窒素に乏しい海水環境においても、粒子への付着で高濃度のアンモニア態窒素を得られるはずであるが、多くの海洋性 AOA は、

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

SCM1 株と同様に低濃度のアンモニア態窒素利用に適応し、自由生活性の分布を示していると考えられる。

自由生活性AOAの現存量は付着性AOAと比較して多く、既報研究は主に自由生活性AOAの分布を反映していると考えられる。AOAの分布と環境要因の関係を明らかにしてきた既報研究では、AOAの現存量や群集組成を付着性画分と自由生活性画分に分けずに行われてきた(Beman et al., 2008; Coolen et al., 2007; Hallam et al., 2006b; Herfort et al., 2007; Mincer et al., 2007; Molina et al., 2010)。一般に、外洋域においては細菌の付着基盤としての有機物粒子が少なくなり、単位海水当たりの全細菌数に占める付着細菌の割合は小さい。例えば、大西洋亜熱帯域の中深層(130 - 650 m)で、一個のマリンスノーに付着した菌数は $3 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ($\sim 3 \times 10^7$) cellsで 10 - 267 mLの周辺海水のそれと同じであるが、マリンスノーが少ないために、単位海水当たりの付着性菌数 ($2 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ cells L⁻¹) は全菌数の 0.05%以下になると報告されている(Alldredge and Youngbluth, 1985)。今回の結果もこうした一般的な細菌や古細菌の分布パターンを反映したものであると考えられる。

自由生活性AOAは全層に存在していたが、表層と深層で優占するAOAの系統群がはっきりと違っていた。この結果は、Shallow Marine cladeのWCAが表層で、Deep Marine cladeのWCBが中深層以深で優占するという従来知見を支持するものである(Beman et al., 2008; Francis et al., 2005; Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007)。

一方で、付着性AOAは、いずれの地点、深度においてもShallow Marine cladeが優勢であり、自由生活性AOAと異なる要因に群集構造が影響されている。自由生活性AOAの現存量は複数の環境要因と有意な相関を示したにもかかわらず、付着性AOAは有為な相関を示す環境要因が少なかった。つまり、本研究で測定していない

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

要因が付着性 AOA に影響すると考えられる。例えば、微小な生息場における局所的な環境要因や、沈降に伴い急激に変動する環境要因、緩やかに変動する AOA の現存量、系統群組成の時間スケールの差異である。また、付着性画分を構成すると考えられる粒子ではアンモニア態窒素濃度が周辺海水より高くなる事が知られている (Alldredge and Silver 1988; Karl et al., 1984)。

付着性 AOA は表層で検出されず、混合層下部でのみ検出される傾向にあったので、中深層以深が付着性 AOA の重要な生息場である。これは、表層から漸深層にかけて沈降粒子の分解(無機化)が進む事でアンモニア態窒素が供給され、付着性 AOA にとって生息に有利な環境となっているためと考えられる (Karl et al., 1984)。表層で粒子に付着した AOA は、従属栄養原核生物が粒子中の有機物を無機化するのに伴うアンモニア態窒素の供給により、沈降に伴いながら徐々に増殖している可能性がある。Woebken et al. (2007) はナミビア沖の湧昇域における研究から、粒子中でアンモニア酸化によって生産された亜硝酸イオンからアナモックスが起きているという仮説を提案している。本研究で示された粒子中における AOA の存在は、彼らの仮説を支持するものである。

海水中に古細菌の「ホットスポット」となる粒子の存在が示された。一部の試料で付着性画分と自由生活性画分における AOA と Marine Group I の現存量が同程度であった。マリンスノーに付着した全菌数は周辺海水のそれよりも 2 - 5 桁高い事や (Alldredge and Silver, 1988)、中深層においてマリンスノーが深度と共に増減しているのが潜水艇からの観察と、粒子の測定から知られている (Alldredge and Youngbluth, 1985; Silver and Alldredge, 1981)。

Deep Marine clade の WCB は表層で検出されたので、光阻害ではなく水温が分布を決定する要因の可能性がある。本研究の採水地点は、水温が最も高くても 14.9°C で

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

あった。Beman et al. (2008)は Deep Marine clade が深層でしか検出されないの、光阻害の影響を受けると結論付けたが、彼らの採水地点は 0 m で約 30°C、水温躍層中の 40 - 45 m でも 20 - 23°Cと水温が高かった(Beman et al. 2008)。

アンモニア態窒素・溶存酸素濃度だけでなく、生息深度によって変動する水温も、AOA の群集構造に影響する重要な因子であると示唆された。水温とアンモニア態窒素、溶存酸素濃度は自由生活性の Shallow Marine clade / Total AOA に対し有意な正の相関を示したので、それらの要因は Deep Marine clade / Total AOA に対し有意な負の相関を示す。アンモニア態窒素・溶存酸素濃度が Shallow Marine clade / Total AOA と Deep Marine clade / Total AOA にそれぞれ正と負の相関関係を示すと報告されている(Molina et al., 2010)。

2.4.2. 海洋古細菌に占めるアンモニア酸化古細菌の割合

アンモニア酸化能を Marine Group I に属する海洋古細菌以外が有している可能性はあるが、一般に、アンモニア酸化能を有する古細菌の系統 (Marine Group I) のうちのどれくらいが AOA であるか、すなわち AOA と Marine Group I の比 (AOA/ Marine Group I) は、古細菌の *amoA* 数と Marine Group I の rRNA 遺伝子数を求めることで推定できると考えられている (De Corte et al., 2009; Mincer et al., 2007; Wuchter et al., 2006)。これまでに海洋環境から見いだされた全ての AOA は、16S rRNA 遺伝子配列によって Marine Group I に属し (Hallam et al., 2006a; Könneke et al., 2005; Matsutani et al., 2011; Santoro et al., 2011)、*rrn* オペロンと *amo* オペロンをゲノム上に 1 コピーのみ有すると知られている (Blainey et al., 2011; Hallam et al., 2006b; Kim et al., 2011; Walker et al., 2010)。また、Fosmid と BAC ライブラリーの解析からも、Marine Group I の SSU rRNA 遺伝子と *amoA* が 1:1 の関係にある事が報告されている (Mincer et al.,

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

2007)。ただし、いくつかの例外も存在する。*amoA* が検出できないが、Marine Group I に属する古細菌が、仏領西インド諸島のグアドループ島にあるマングローブの生える沼地で見つかり、Marine Group I に属する古細菌が全てアンモニア酸化能を有しているわけではない可能性も示されている (Muller et al., 2010)。また、イエローストン国立公園の温泉で見つかった pSL12 クレード (Barns et al., 1996) と系統的に近いが、Marine Group I と異なるタウムアーキオータの系統群がモンレー湾やハワイ沖の Station ALOHA などの海洋環境で見つかり、この系統群は *amoA* 現存量と同調する分布をしていたために、アンモニア酸化能を有していると示唆されている (Mincer et al., 2007)。しかし、この系統群は深海堆積物や (Vetriani et al., 1999)、深海の高塩分で嫌氣的な海盆 (van der Wielen et al., 2005)、地中海の中深層の様な海洋環境でごく稀に見つかるだけである (Zaballos et al., 2006)。

付着性画分と自由生活性画分の AOA / Marine Group I から、付着性古細菌の大部分はアンモニア酸化能を持たず、自由生活性古細菌は表層から深層、および沿岸から外洋に向かいアンモニア酸化能をもつ割合が減ると示唆された。AOA / Marine Group I は付着画分の全層と、自由生活性画分の深層と外洋表層が同程度 (それぞれ 0.09 と 0.10)、自由生活性画分の沿岸表層がそれらの約4倍 (0.39) であった。これらは、北大西洋の北部中深層以深 (約 0.1) と亜熱帯域表層 (0.4) で報告されている AOA / Marine Group I の値に近似している (Agogué et al., 2008)。北大西洋では、表層で大部分の Marine Group I がアンモニア酸化能を有し、亜熱帯と熱帯の深層でほとんどの Marine Group I がアンモニア酸化以外のエネルギー源を使っているだろうと報告されている (Agogué et al., 2008)。ただし、Agogué et al. (2008) は、AOA の現存量が少なくなると同時に、熱帯の漸深層で多様性が低くなる *amoA* 配列は、緯度方向と鉛直方向で出現する系統と違いがあり、深海の Marine Group I が利用したプライマーセ

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

ットで検出できない特有な配列の *amoA* を持つ可能性がある」と指摘している。溶存酸素濃度が付着性の AOA / Marine Group I に正の相関関係を示したので、嫌気環境になりやすいと考えられる粒子中において周辺環境の溶存酸素濃度が高いと、Marine Group I の古細菌に占める AOA の割合は高く保たれる可能性がある。

自由生活性画分の古細菌に占める AOA の割合 (AOA / Marine Group I) は、クロロフィル濃度が高い混合層とそれ以外で異なっており、高い水温とアンモニア供給量に影響されると示唆された。この割合は、水温とクロロフィル濃度、溶存酸素、アンモニア態窒素濃度と正の相関関係に、硝酸態窒素・リン酸態リン濃度と負の相関関係にあった。また、黒潮続流域でも AOA / Marine Group I は表層 (0 m) から中深層 (1,000 m) に向かい 0.20 から 0.11 に減少した (Ijichi et al., unpublished)。従って、AOA / Marine Group I は、有機物生産が高く、アンモニア供給量が多い沿岸や表層で高く、そうではない外洋や深層で低くなる傾向にある。新しく形成された若い深層水が存在する北部北大西洋では、AOA は表層から漸深層まで水柱を通して豊富であると報告されており、タウムアーキオータに占める AOA の割合は、北部 (65-30°N) で表層から漸深層の範囲で約一桁しか減少しないが、亜熱帯と赤道 (30°N-5°S) で表層から漸深層に向けて少なくとも 2 桁減少した (Agogue et al., 2008)。

2.4.3. アンモニア酸化古細菌の多様性

付着性 AOA は物質循環への量的な寄与が自由生活性 AOA に比べて小さいが、多様性指数が高く、推定種数も多いので、有機物粒子の存在は AOA の多様性維持に重要な役割を果たしている」と示唆された。付着性 AOA の生息場である粒子と自由生活性 AOA の生息場である周辺海水では、いくつかの環境要因において濃度などの値が極端に異なることがある。例えば、沈降粒子 (Karl et al., 1984) やマリンスノー

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

(Alldredge and Silver 1988)ではアンモニア態窒素濃度が周辺海水の数千倍になる事が報告されており、こうした微小環境の存在によって多様な AOA が維持されていると考えられる。北西部地中海の水深 0-1,000 m では、現存量も多様性も付着性細菌が浮遊性細菌より低いと報告されている (Ghiglione et al., 2007)。また、プエルトリコ海溝の超深海で、付着性細菌は、自由生活性細菌よりも推定種数が多く、自由生活性細菌と群集構造が異なる一方で、古細菌にはそのような違いのないと報告されている (Eloe et al., 2011)。本研究によって初めて、古細菌は付着性と自由生活性で多様性指数と推定種数、群集構造に違いがあると明らかになった。

自由生活群集は、WCA と WCB が優占しており、それらの系統群に属するクローンの出現頻度が、Shallow Marine clade と Deep Marine clade の現存量推定値と同様のパターンを示していた。この結果も、Shallow Marine clade、特に WCA が表層で、Deep Marine clade の WCB が中深層以深で優占するという従来知見を支持するものである (Beman et al., 2008; Francis et al., 2005; Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007)。

付着性画分では約 50%、自由生活性画分では約 70%のクローンが、両画分に共通する OTUs に含まれていたことから、付着性 AOA が自由生活性 AOA の起源であり、海洋性 AOA は付着と自由生活という二つの生活形態を相互に利用しながら生存していると示唆された。Moeseneder et al. (2001)は、浮遊性細菌が新しく生産された粒子に移動しやすいと考えられる表層で、付着性と自由生活性の細菌群集組成が似ていると予想したが、そのような結果は得られず、限られた細菌のみが付着生活をし、細菌は自由生活性と付着生活を行きしないようだと結論付けた。また、付着・自由生活のみを行う AOA の存在も否定できないので、今後、付着性と自由生活性 AOA の系統に関して詳細な解析が必要であろう。

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

amoA の系統解析では、海洋性 AOA に二つの新しい系統群が存在する可能性が示された。付着性群集に、NM と WCB に近縁だが、独立した系統群を形成するクローンが、それぞれ出現していた (Fig. 2-12)。NM に近縁なクローンである kt493 と kt502 は、カリフォルニア州ロサンゼルス近郊のハンティントンビーチの波打ち際の堆積物から得られた Sediment cluster に属するクローン HB C 0604 D10 (EU022977) に近縁であり (Francis et al., 2005)、それらのクローンと共に、NM を始めとする既知の系統群と異なる系統群を形成するので、*Nitrosopumilus maritimus*-like cluster-associated (NMA) と呼称する。NMA は堆積物と海水中の粒子由来のクローンが存在しており、コスモポリタンな AOA 群集の動態を明らかにする上で重要な系統群であると考えられる。また、WCB に近縁だが、独立した系統群を形成するクローンである kt513 は、近縁な遺伝子配列情報が現時点で存在しないが、WCB を始めとする既知の系統群と異なる系統群を形成するので、Water Column cluster D (WCD) と呼称する。

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

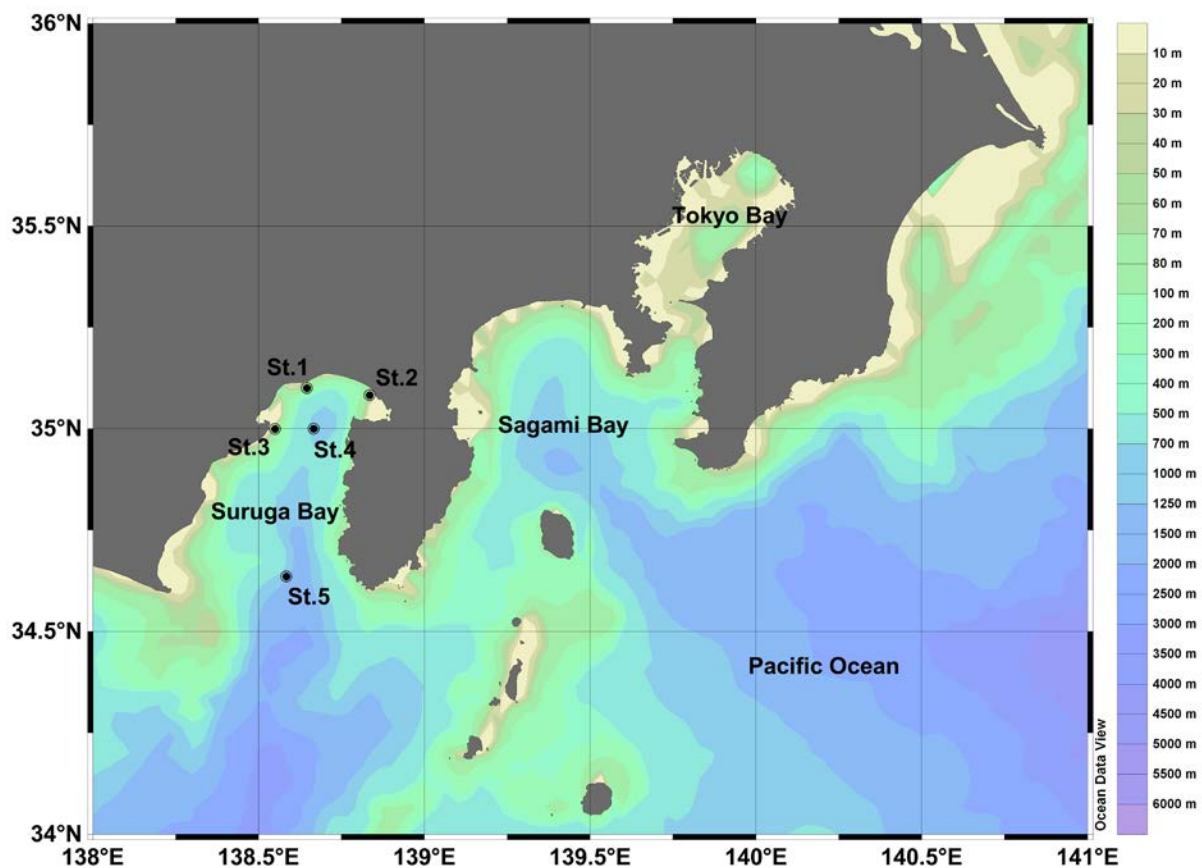


Fig. 2-1 Locations of the Suruga Bay and sampling stations. Image form Ocean Data View 4 covers the east coast of Shizuoka to Ibaraki, Japan and depicts water depths.

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-1 Data of sampling stations in the Suruga Bay.

Station name	Collected date (mon/day/yr)	Collected time (hh:mm)	Longitude	Latitude	Max depth (m)	Collected depth (m)
St.1	2/26/2008	07:35-07:49	138°E 38' 72"	35°N 06' 01"	304	0, 150, 300
St.2	2/26/2008	12:11-12:16	138°E 50' 10"	35°N 04' 98"	78	0, 73
St.3	2/26/2008	14:17-14:35	138°E 32' 95"	34°N 59' 97"	302	0, 10, 50, 100, 200, 300
St.4	2/27/2008	13:04-13:42	138°E 39' 96"	35°N 00' 00"	1,421	0, 100, 300, 500, 1,000
St.5	2/25/2008	16:53-19:11	138°E 35' 04"	34°N 38' 12"	2,330	0, 100, 300, 500, 1,000, 2,000

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-2 Primers used for detection and quantification of archaeal 16S rRNA gene and *amoA*.

Target	Gene	Name	Fragment length (bp) ^a	Annealing temperature (°C)	Sequence (5' to 3')	Reference
General AOA (Universal)	<i>amoA</i>	Arch-amoAF	635	53	STAATGGTCTGGCTTAGACG	Francis et al. (2005)
	<i>amoA</i>	Arch-amoAR			GCGGCCATCCATCTGTATGT	Francis et al. (2005)
Shallow Marine clade (NM+WCA)	<i>amoA</i>	Arch-amoAFA	338	56	ACACCAGTTTGGYTACCWTC DGC	Beman et al. (2008)
	<i>amoA</i>	Arch-amoAR			GCGGCCATCCATCTGTATGT	Francis et al. (2005)
Deep Marine clade (WCB)	<i>amoA</i>	Arch-amoAFB	338	55	CATCCRATGTGGATTCCATCDTG	Beman et al. (2008)
	<i>amoA</i>	Arch-amoAR			GCGGCCATCCATCTGTATGT	Francis et al. (2005)
Marine Group I	16S rRNA	GI_751F	246	58	GTCTACCAGAACAYGTTC	Mincer et al. (2007)
	16S rRNA	GI_956R			HGGCGTTGACTCCAATTG	Mincer et al. (2007)

a, According to the open reading frames published previously for the *amoA* or 16S rRNA gene sequences of *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* SCM1.

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所



Fig. 2-2 Primer positions in archaeal *amoA* of *Candidatus Nitrosopimilus maritimus* SCM1

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-3 Described and expected clones used for designing *amoA*-specific primers.

Primers or clones	Clades or clusters	NCBI accession number	5' to 3' (-3 to 17) ^a	5' to 3' (278 to 300)	5' to 3' (613 to +21)
Arch-amoAF			S T A A T G G T C T G G C T T A G A C G		
Sargasso Sea	Water Column / Sediment clade	AACY01435967	C T A A T G G T C T G G C T T A G A C G		
German soil	Soil / Sediment clade	AJ627422	G T A A T G G T C T G G C T T A G A C G		
Arch-amoAR					A C A T A C A G A T G G A T G G C C G C
Sargasso Sea	Water Column / Sediment clade	AACY01435967			A C A T A C A G A T G G A T G G C C G C
German soil	Soil / Sediment clade	AJ627422			A C A T A C A G A T G G A T G G C C G C
Arch-amoAFA				A C A C C A G T T T G G Y T A C C W T C D G C	
GOC-G-60-1		EU340464		A C A C C A G T T T G G C T A C C A T C A G C	
GOC-G-60-3		EU340466		A C A C C A G T T T G G C T A C C A T C A G C	
GOC-G-60-7		EU340470		A C A C C A G T T T G G C T A C C A T C A G C	
GOC-G-60-10		EU340473		A C A C C A G T T T G G C T A C C A T C A G C	
GOC-G-60-11	Shallow Marine clade	EU340474		A C A C C A G T T T G G C T A C C G T C G C	
GOC-G-60-12	(Water Column cluster A)	EU340475		A C A C C A G T T T G G C T A C C A T C A G C	
GOC-G-450-2		EU340489		A C A C C A G T T T G G C T A C C A T C A G C	
GOC-G-450-5		EU340492		A C A C C A G T T T G G C T T C C G T C A G C	
GOC-G-450-10		EU340497		A C A C C A G T T T G G C T T C C G T C A G C	
GOC-C-450-20		EU340554		A C A C C A G T T T G G C T T C C G T C A G C	
Arch-amoAFB				C A T C C R A T G T G G A T T C C A T C D T G	
GOC-G-450-3		EU340490		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C A T G	
GOC-G-450-6		EU340493		C A T C C G A T G T G G A T T C C A T C T T G	
GOC-G-450-11		EU340498		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C T T G	
GOC-G-450-14		EU340501		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C G T G	
GOC-C-450-4	Deep Marine clade	EU340538		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C A T G	
GOC-C-450-7	(Water Column cluster B)	EU340541		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C A T G	
GOC-C-450-12		EU340546		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C A T G	
GOC-C-450-13		EU340547		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C G T G	
GOC-C-450-14		EU340548		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C G T G	
GOC-C-450-15		EU340549		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C A T G	
GOC-C-450-19		EU340553		C A T C C A A T G T G G A T T C C A T C A T G	

a, According to the open reading frames published previously for the *amoA* sequences of *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* SCM1.

R; A or G. Y; T or C. W; A or T. S; C or G. M; A or C. K; T or G. D; A, T or G. H; A, T or C. B; T, C or G. V; A, C or G. N; A, C, G or T. I; イノシン.

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-4 Environmental parameters by CTD profiler and DO sensor.

Station	Depth (m)	Pressure (dB)	Temperature (°C)	Conductivity (mmho cm ⁻¹)	Chlorophyll a (mg L ⁻¹)	PSU	σ _T	Saturated oxygen (mL L ⁻¹)	Dissolved oxygen (mL L ⁻¹)
St.1	0	0	13.3	40.47	6.28	34.23	25.73	5.91	6.37
	150	151.4	12.9	40.36	0.21	34.49	26.03	5.96	4.94
	300	302.9	9.6	37.21	0.12	34.34	26.50	6.40	3.04
St.2	0	0	13.7	40.84	9.93	34.22	25.64	5.87	6.94
	73	73.6	13.5	41.04	1.10	34.55	25.94	5.88	5.01
St.3	0	0	13.5	41.00	5.87	34.55	25.93	5.88	5.33
	10	10.1	13.5	41.00	3.95	34.55	25.94	5.88	5.78
	50	50.3	13.5	41.01	1.70	34.55	25.94	5.88	5.39
	100	100.6	13.5	41.05	2.11	34.57	25.96	5.88	5.49
	200	201.2	11.4	38.93	0.11	34.41	26.24	6.15	3.77
	300	301.9	9.9	37.51	0.10	34.35	26.46	6.36	3.15
St.4	0	0	13.3	40.58	8.38	34.37	25.85	5.91	6.39
	100	100.9	13.5	41.02	2.26	34.57	25.96	5.88	5.66
	300	302.8	9.6	37.21	0.09	34.33	26.49	6.40	3.23
	500	505.1	7.0	34.84	0.10	34.27	26.84	6.79	2.53
	1000	1011.7	3.6	32.21	0.10	34.43	27.37	7.36	1.86
St.5	0	0	14.9	42.47	3.23	34.64	25.71	5.71	6.81
	100	100.4	13.7	41.27	0.53	34.57	25.91	5.85	5.79
	300	301.4	9.3	36.88	0.10	34.33	26.55	6.45	3.43
	500	502.8	6.6	34.49	0.10	34.27	26.90	6.86	2.82
	1000	1007.1	3.6	32.13	0.10	34.40	27.35	7.37	1.99
	2000	2019.8	2.0	31.33	0.11	34.61	27.66	7.66	3.37

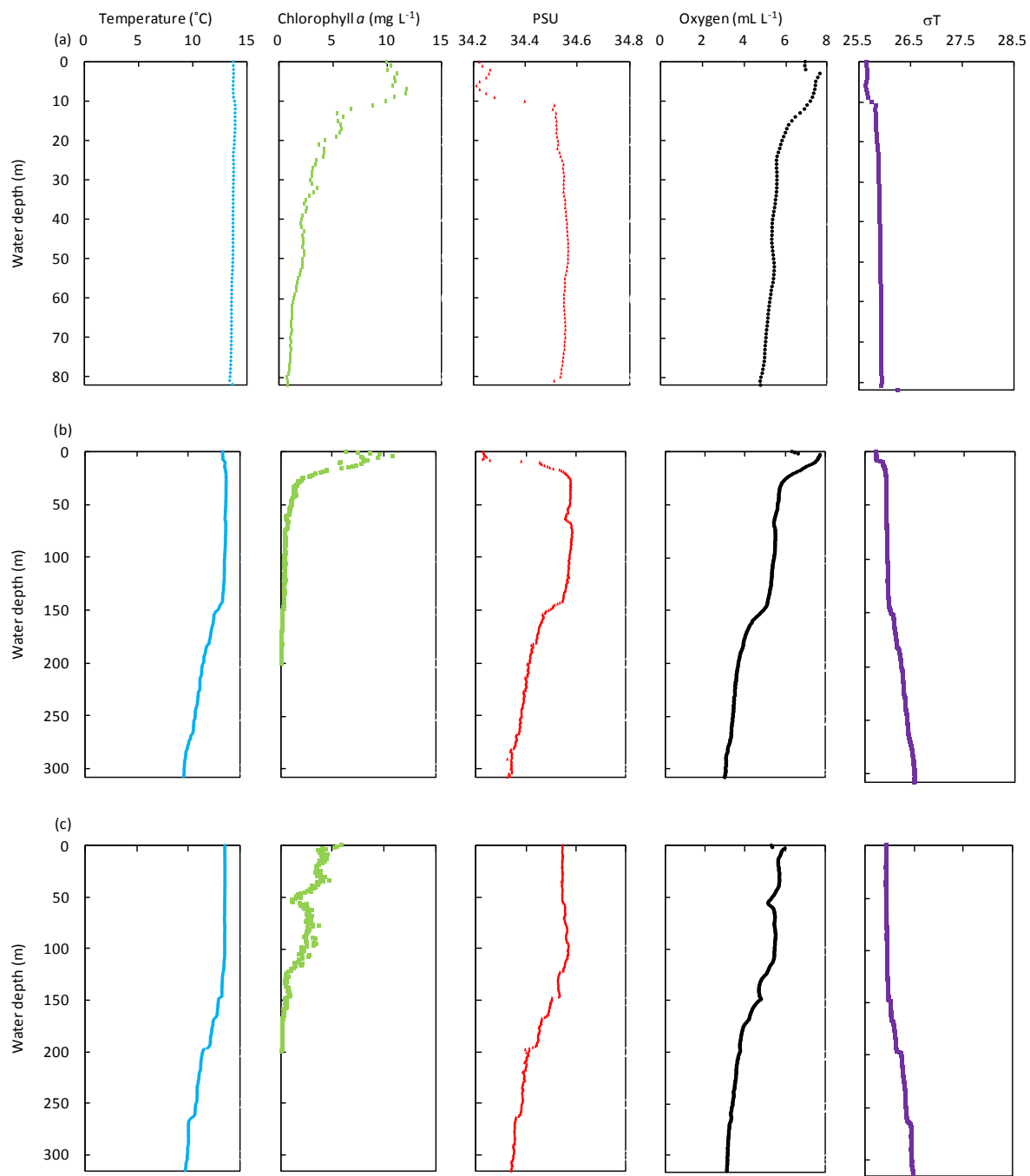
2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-5 Environmental parameters by auto-analyzer and epi-fluorescence microscopy.

Station	Depth (m)	NH ₄ ⁺ -N (μM)	NO ₂ ⁻ -N (μM)	NO ₃ ⁻ -N (μM)	PO ₄ ⁻ -P (μM)	Total prokaryotic abundance Average (± SD)(cells L ⁻¹)
St.1	0	1.31	0.30	3.50	0.23	1.52 × 10 ⁸ (± 1.47 × 10 ⁷)
	150	ND	0.10	16.10	1.25	NT
	300	0.39	0.15	24.25	1.93	7.68 × 10 ⁷ (± 2.79 × 10 ⁷)
St.2	0	0.57	0.13	2.43	0.16	1.62 × 10 ⁸ (± 2.29 × 10 ⁷)
	73	0.40	0.28	10.79	1.22	1.23 × 10 ⁸ (± 1.21 × 10 ⁷)
St.3	0	0.41	0.26	7.56	0.75	3.24 × 10 ⁸ (± 4.11 × 10 ⁷)
	10	0.46	0.27	7.59	0.78	3.07 × 10 ⁸ (± 4.79 × 10 ⁷)
	50	0.42	0.23	8.61	0.90	1.74 × 10 ⁸ (± 5.79 × 10 ⁷)
	100	0.62	0.27	8.49	0.88	1.53 × 10 ⁸ (± 1.79 × 10 ⁷)
	200	0.12	ND	19.19	2.04	7.12 × 10 ⁷ (± 7.71 × 10 ⁶)
	300	0.28	0.04	23.46	2.47	5.68 × 10 ⁷ (± 5.26 × 10 ⁶)
St.4	0	0.76	0.32	4.95	0.49	1.97 × 10 ⁸ (± 1.73 × 10 ⁷)
	100	0.41	0.25	7.27	0.79	1.45 × 10 ⁸ (± 7.16 × 10 ⁶)
	300	0.10	ND	23.50	2.55	3.81 × 10 ⁷ (± 9.05 × 10 ⁶)
	500	0.12	ND	31.70	2.10	3.31 × 10 ⁷ (± 4.50 × 10 ⁶)
	1000	0.07	ND	39.20	2.60	2.87 × 10 ⁷ (± 2.92 × 10 ⁶)
St.5	0	0.18	0.16	7.21	0.52	1.77 × 10 ⁸ (± 2.96 × 10 ⁷)
	100	0.12	0.21	9.38	0.69	1.10 × 10 ⁸ (± 2.98 × 10 ⁶)
	300	0.19	ND	24.30	1.88	3.38 × 10 ⁷ (± 2.84 × 10 ⁶)
	500	0.31	ND	31.30	2.45	3.91 × 10 ⁷ (± 4.88 × 10 ⁶)
	1000	0.05	ND	39.80	4.40	2.26 × 10 ⁷ (± 1.15 × 10 ⁶)
	2000	0.91	0.34	39.06	3.60	1.83 × 10 ⁷ (± 3.07 × 10 ⁶)

ND, Not Detection; NT, Not Test. Total prokaryotic abundance cited Kondo et al. (unpublished).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所



2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Continuation

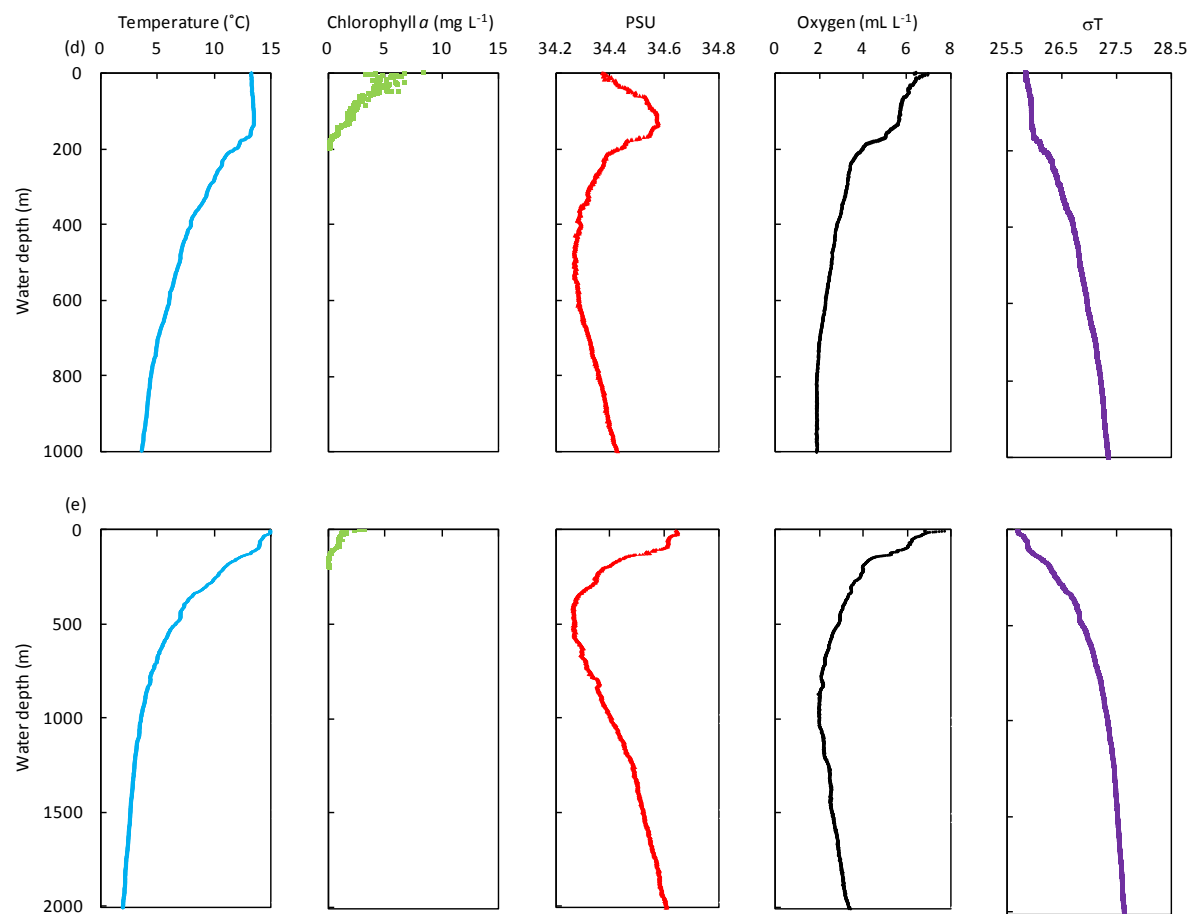
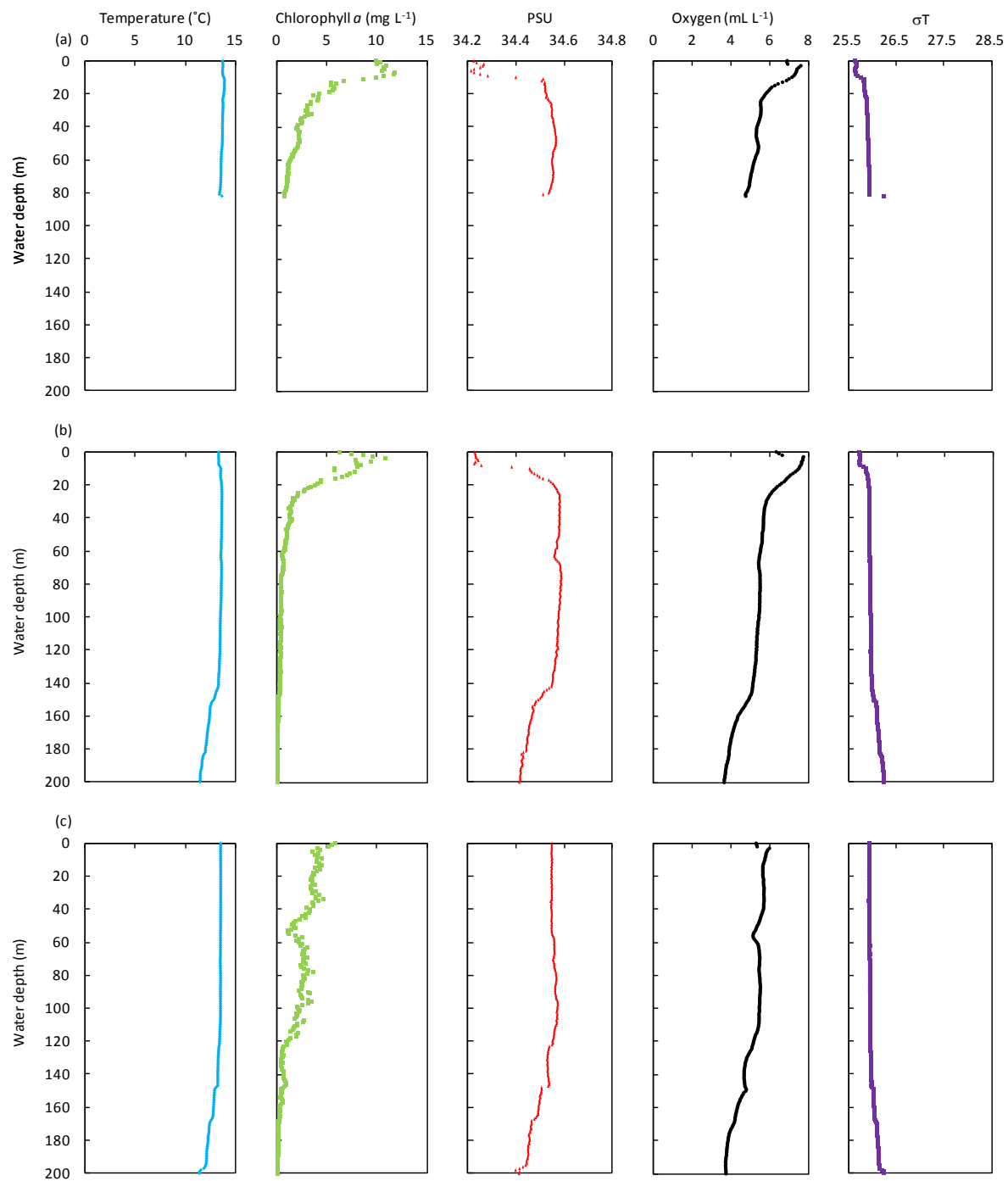


Fig. 2-3 Profiles from 0 m to sampling max depth of temperature, chlorophyll *a*, PSU, dissolved oxygen and σT at St.2 (a), St.1 (b), St.3 (c), St.4 (d) and St.5 (e).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所



2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Continuation

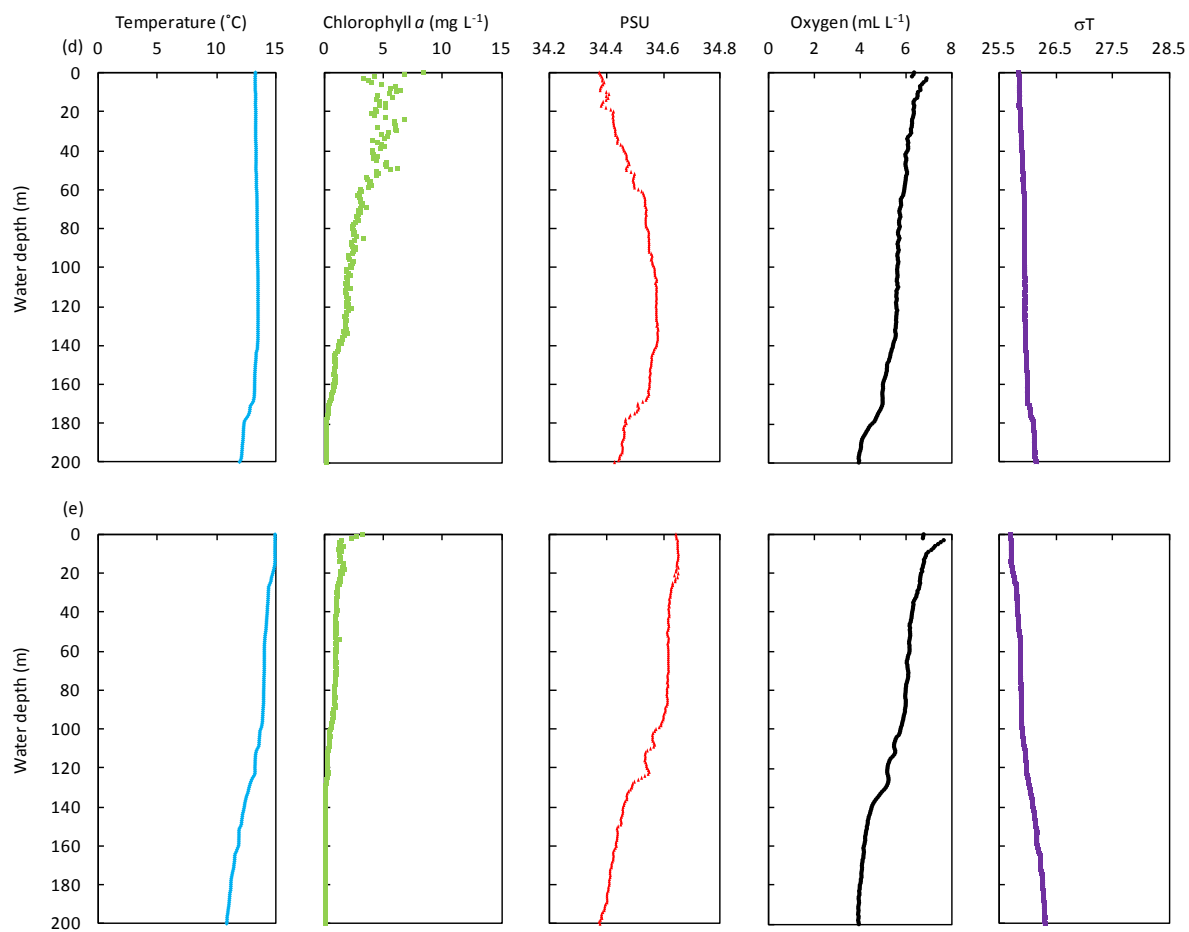


Fig. 2-4 Profiles from 0 to 200 m of temperature, chlorophyll a , PSU, dissolved oxygen and σT at St.2 (a), St.1 (b), St.3 (c), St.4 (d) and St.5 (e).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

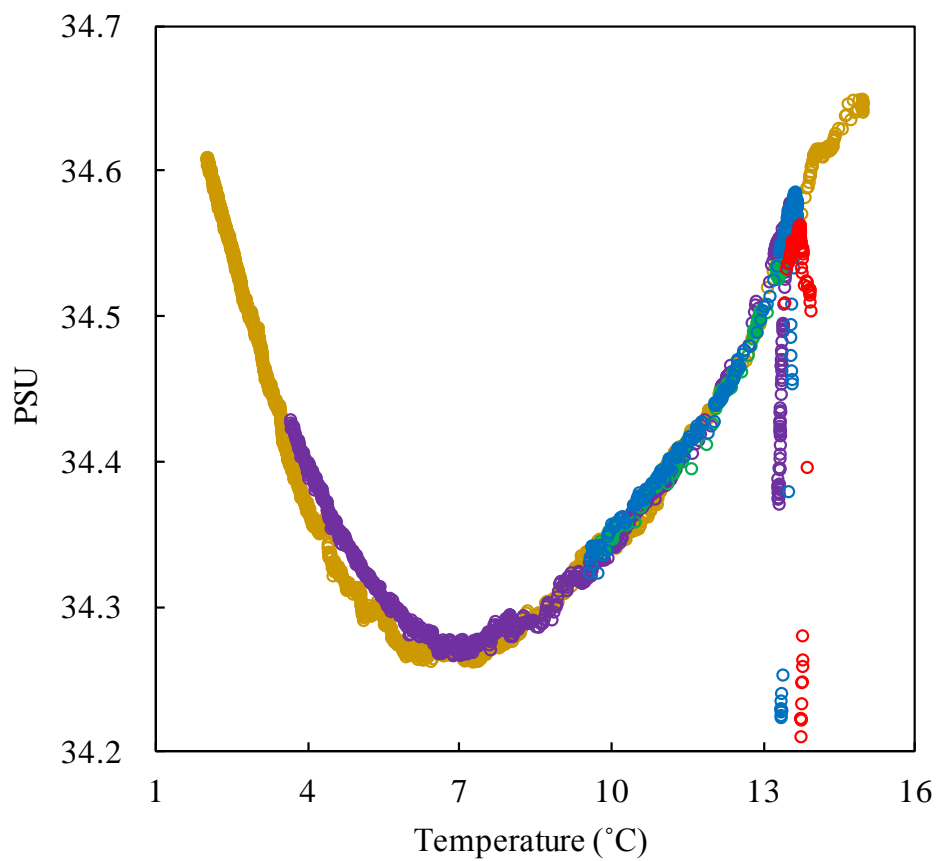
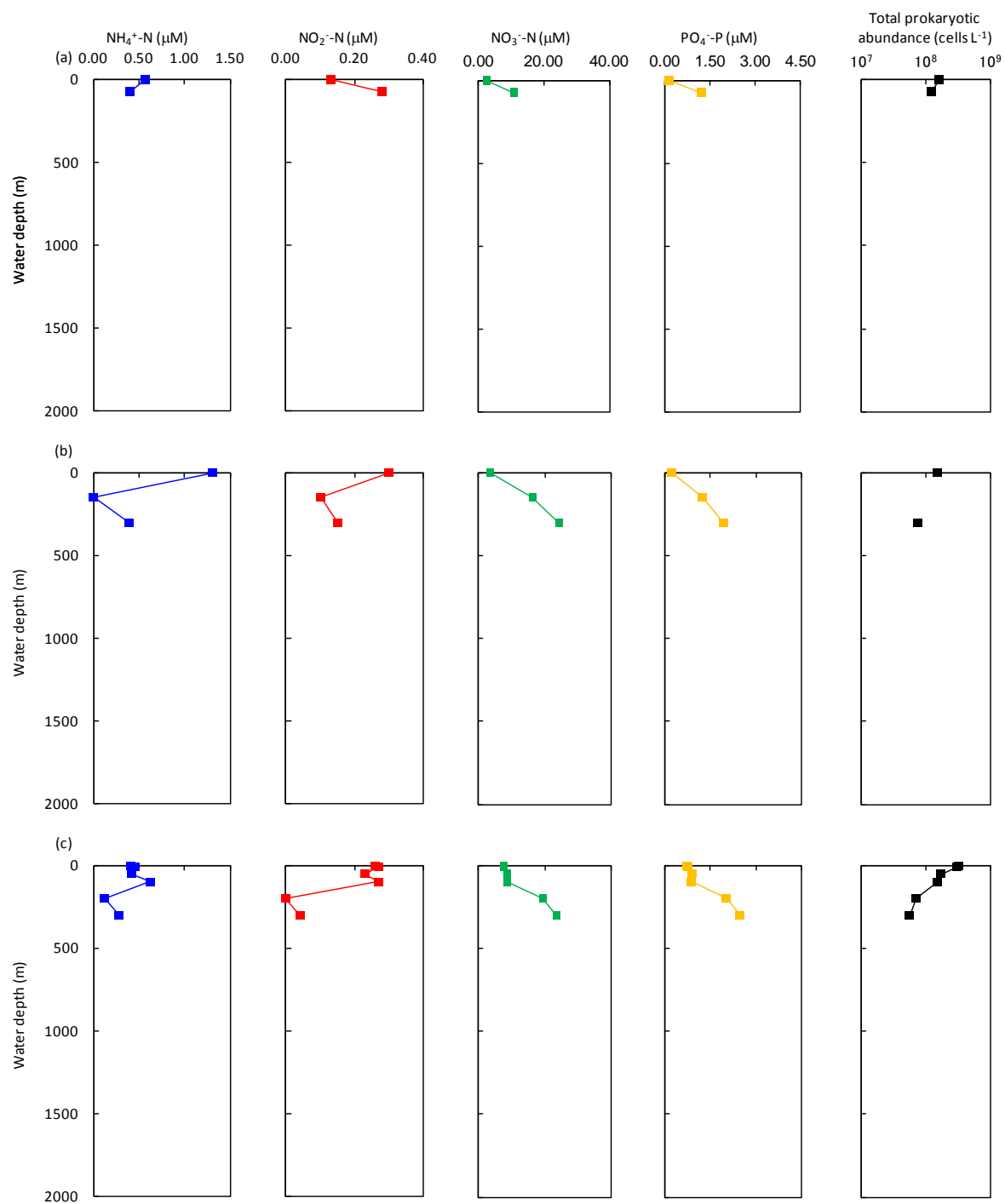


Fig. 2-5 T-S diagram at St.2 (red open circle), St.1 (blue open circle), St.3 (green open circle), St.4 (purple open circle) and St.5 (brown open circle) in the Suruga Bay.

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所



2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Continuation

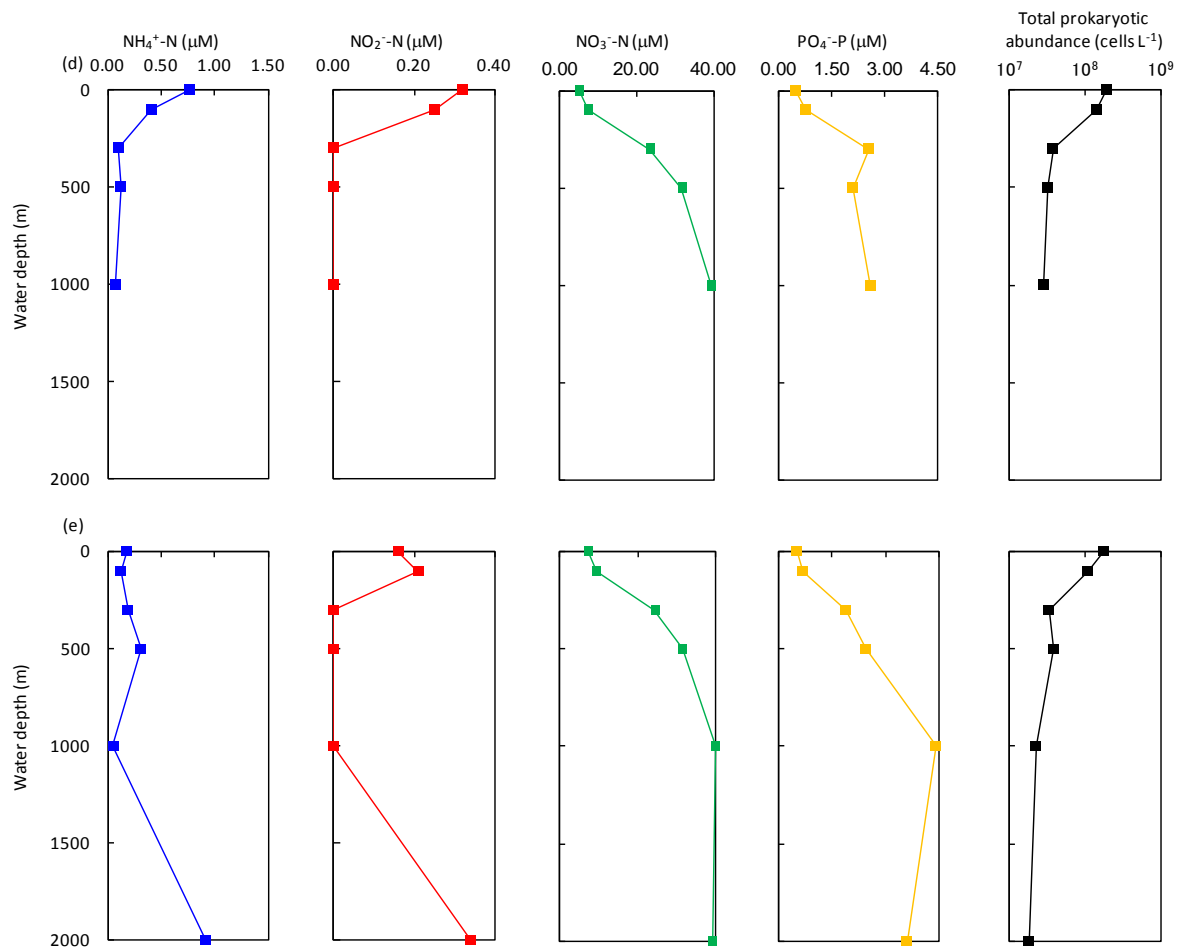


Fig. 2-6 Profiles from 0 to 2,000 m of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, $\text{PO}_4^-\text{-P}$ and Total prokaryote abundance at St.2 (a), St.1 (b), St.3 (c), St.4 (d) and St.5 (e).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-6 Gene abundances from attached prokaryote.

Station	Depth (m)	Ambient Seawater (copies L ⁻¹)				
		Shallow Marine clade Average (± SD)	Deep Marine clade Average (± SD)	Total AOA Average	General AOA Average (± SD)	Marine Group I Average (± SD)
St.1	0	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	< 3.35 × 10 ²
	150	2.02 × 10 ³ (± 2.45 × 10 ²)	1.02 × 10 ³ (± 2.93 × 10 ²)	3.04 × 10 ³	< 6.70 × 10 ²	2.34 × 10 ⁴ (± 2.95 × 10 ³)
	300	8.63 × 10 ⁴ (± 1.32 × 10 ⁴)	7.67 × 10 ⁴ (± 2.08 × 10 ³)	1.63 × 10 ⁵	3.00 × 10 ⁴ (± 3.34 × 10 ³)	1.89 × 10 ⁶ (± 1.40 × 10 ⁴)
St.2	0	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	6.16 × 10 ³ (± 2.29 × 10 ³)
	73	9.96 × 10 ² (± 3.28 × 10 ²)	< 1.06 × 10 ²	9.96 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	7.45 × 10 ³ (± 2.78 × 10 ³)
St.3	0	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	8.30 × 10 ² (± 5.81 × 10 ²)
	10	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	< 3.35 × 10 ²
	50	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	< 3.35 × 10 ²
	100	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	< 3.35 × 10 ²
	200	3.57 × 10 ³ (± 6.18 × 10 ²)	2.87 × 10 ³ (± 1.66 × 10 ²)	6.44 × 10 ³	1.33 × 10 ³ (± 1.76 × 10 ²)	7.03 × 10 ⁴ (± 5.49 × 10 ³)
	300	4.32 × 10 ² (± 1.38 × 10 ²)	3.17 × 10 ² (± 2.27 × 10 ²)	7.49 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	5.83 × 10 ³ (± 3.73 × 10 ³)
	0	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	1.12 × 10 ³ (± 7.68 × 10 ²)
St.4	100	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	< 3.35 × 10 ²
	300	1.38 × 10 ⁴ (± 2.52 × 10 ³)	1.46 × 10 ⁴ (± 2.42 × 10 ³)	2.84 × 10 ⁴	6.81 × 10 ³ (± 4.15 × 10 ²)	3.59 × 10 ⁵ (± 8.42 × 10 ³)
	500	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	< 3.35 × 10 ²
	1000	1.82 × 10 ⁴ (± 1.49 × 10 ³)	1.92 × 10 ⁴ (± 6.19 × 10 ²)	3.74 × 10 ⁴	6.73 × 10 ³ (± 2.46 × 10 ²)	3.82 × 10 ⁵ (± 1.66 × 10 ⁴)
	0	< 6.48 × 10 ²	< 1.06 × 10 ²	< 7.54 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	3.01 × 10 ³ (± 6.11 × 10 ²)
St.5	100	3.93 × 10 ² (± 8.29 × 10 ¹)	2.03 × 10 ² (± 5.07 × 10 ¹)	5.95 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	4.45 × 10 ³ (± 5.87 × 10 ²)
	300	1.44 × 10 ³ (± 2.25 × 10 ²)	5.36 × 10 ² (± 1.51 × 10 ²)	1.97 × 10 ³	< 6.70 × 10 ²	1.37 × 10 ⁴ (± 5.69 × 10 ²)
	500	3.03 × 10 ² (± 7.25 × 10 ¹)	3.27 × 10 ² (± 1.66 × 10 ¹)	6.30 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	5.15 × 10 ³ (± 5.84 × 10 ²)
	1000	< 6.48 × 10 ²	4.72 × 10 ² (± 1.06 × 10 ²)	4.72 × 10 ²	< 6.70 × 10 ²	1.28 × 10 ⁴ (± 3.81 × 10 ³)
	2000	7.85 × 10 ² (± 2.03 × 10 ²)	2.56 × 10 ² (± 6.09 × 10 ¹)	1.04 × 10 ³	< 6.70 × 10 ²	8.02 × 10 ³ (± 3.00 × 10 ³)

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-7 Gene abundances from free-living prokaryote.

Station	Depth (m)	Ambient Seawater (copies L ⁻¹)				
		Shallow Marine clade	Deep Marine clade	Total AOA	General AOA	Marine Group I
		Average (\pm SD)	Average (\pm SD)	Average	Average (\pm SD)	Average (\pm SD)
St.1	0	$9.91 \times 10^4 (\pm 1.09 \times 10^3)$	$9.95 \times 10^3 (\pm 6.68 \times 10^2)$	1.09×10^5	$6.40 \times 10^3 (\pm 3.07 \times 10^2)$	$2.12 \times 10^5 (\pm 4.17 \times 10^3)$
	150	$4.10 \times 10^5 (\pm 8.51 \times 10^3)$	$2.94 \times 10^5 (\pm 1.99 \times 10^4)$	7.05×10^5	$2.29 \times 10^5 (\pm 1.38 \times 10^4)$	$4.44 \times 10^6 (\pm 5.44 \times 10^5)$
	300	$1.32 \times 10^5 (\pm 3.16 \times 10^3)$	$2.03 \times 10^5 (\pm 1.50 \times 10^4)$	3.35×10^5	$1.22 \times 10^5 (\pm 9.29 \times 10^3)$	$2.73 \times 10^6 (\pm 4.55 \times 10^5)$
St.2	0	$1.10 \times 10^5 (\pm 1.50 \times 10^3)$	$9.20 \times 10^3 (\pm 9.01 \times 10^2)$	1.19×10^5	$7.77 \times 10^3 (\pm 1.64 \times 10^2)$	$2.28 \times 10^5 (\pm 4.66 \times 10^4)$
	73	$5.05 \times 10^5 (\pm 5.21 \times 10^4)$	$7.29 \times 10^4 (\pm 1.42 \times 10^4)$	5.78×10^5	$5.38 \times 10^4 (\pm 2.57 \times 10^4)$	$1.21 \times 10^6 (\pm 1.50 \times 10^5)$
St.3	0	$5.40 \times 10^6 (\pm 2.01 \times 10^5)$	$7.15 \times 10^5 (\pm 1.41 \times 10^5)$	6.12×10^6	$6.66 \times 10^5 (\pm 2.26 \times 10^4)$	$1.37 \times 10^7 (\pm 2.77 \times 10^6)$
	10	$1.20 \times 10^7 (\pm 9.57 \times 10^4)$	$9.32 \times 10^5 (\pm 1.31 \times 10^5)$	1.30×10^7	$1.10 \times 10^6 (\pm 9.45 \times 10^3)$	$3.38 \times 10^7 (\pm 3.01 \times 10^6)$
	50	$1.36 \times 10^6 (\pm 3.82 \times 10^3)$	$1.27 \times 10^5 (\pm 2.26 \times 10^3)$	1.48×10^6	$6.18 \times 10^4 (\pm 2.33 \times 10^3)$	$4.32 \times 10^6 (\pm 7.98 \times 10^4)$
	100	$3.37 \times 10^6 (\pm 1.59 \times 10^5)$	$3.44 \times 10^5 (\pm 1.71 \times 10^4)$	3.71×10^6	$3.79 \times 10^5 (\pm 3.95 \times 10^3)$	$1.01 \times 10^7 (\pm 3.46 \times 10^5)$
	200	$4.19 \times 10^5 (\pm 1.43 \times 10^4)$	$7.70 \times 10^5 (\pm 2.47 \times 10^4)$	1.19×10^6	$< 1.17 \times 10^3$	$3.09 \times 10^7 (\pm 8.77 \times 10^5)$
	300	$3.28 \times 10^6 (\pm 2.05 \times 10^5)$	$4.95 \times 10^6 (\pm 8.46 \times 10^5)$	8.23×10^6	$2.24 \times 10^6 (\pm 5.33 \times 10^5)$	$8.99 \times 10^7 (\pm 7.66 \times 10^6)$
St.4	0	$6.00 \times 10^3 (\pm 4.38 \times 10^2)$	$9.00 \times 10^2 (\pm 2.73 \times 10^2)$	6.90×10^3	$< 1.17 \times 10^3$	$3.59 \times 10^4 (\pm 1.57 \times 10^3)$
	100	$2.02 \times 10^3 (\pm 1.87 \times 10^2)$	$3.44 \times 10^2 (\pm 1.62 \times 10^2)$	2.37×10^3	$< 1.17 \times 10^3$	$8.76 \times 10^3 (\pm 8.04 \times 10^2)$
	300	$1.98 \times 10^4 (\pm 1.15 \times 10^3)$	$5.13 \times 10^4 (\pm 8.53 \times 10^3)$	7.11×10^4	$2.43 \times 10^4 (\pm 4.73 \times 10^3)$	$5.08 \times 10^5 (\pm 2.61 \times 10^5)$
	500	$5.79 \times 10^4 (\pm 3.49 \times 10^2)$	$1.53 \times 10^5 (\pm 1.53 \times 10^3)$	2.11×10^5	$6.68 \times 10^4 (\pm 1.11 \times 10^4)$	$1.85 \times 10^6 (\pm 5.12 \times 10^4)$
	1000	$1.45 \times 10^5 (\pm 4.34 \times 10^3)$	$2.51 \times 10^5 (\pm 1.26 \times 10^4)$	3.96×10^5	$1.27 \times 10^5 (\pm 4.40 \times 10^3)$	$2.87 \times 10^6 (\pm 6.63 \times 10^4)$
St.5	0	$2.53 \times 10^6 (\pm 3.62 \times 10^4)$	$4.00 \times 10^5 (\pm 1.76 \times 10^4)$	2.93×10^6	$< 1.17 \times 10^3$	$3.05 \times 10^7 (\pm 4.70 \times 10^5)$
	100	$2.14 \times 10^6 (\pm 3.39 \times 10^5)$	$6.07 \times 10^5 (\pm 3.29 \times 10^4)$	2.75×10^6	$< 1.17 \times 10^3$	$3.07 \times 10^7 (\pm 4.58 \times 10^5)$
	300	$3.92 \times 10^6 (\pm 3.11 \times 10^5)$	$4.92 \times 10^6 (\pm 3.88 \times 10^5)$	8.84×10^6	$2.67 \times 10^6 (\pm 4.66 \times 10^5)$	$7.66 \times 10^7 (\pm 5.22 \times 10^6)$
	500	$2.64 \times 10^5 (\pm 1.73 \times 10^4)$	$8.13 \times 10^5 (\pm 3.82 \times 10^4)$	1.08×10^6	$1.73 \times 10^5 (\pm 7.19 \times 10^4)$	$1.61 \times 10^7 (\pm 6.27 \times 10^4)$
	1000	$1.94 \times 10^5 (\pm 5.99 \times 10^3)$	$8.13 \times 10^5 (\pm 1.92 \times 10^4)$	1.01×10^6	$< 1.17 \times 10^3$	$1.95 \times 10^7 (\pm 3.38 \times 10^6)$
	2000	$7.31 \times 10^4 (\pm 1.68 \times 10^4)$	$1.67 \times 10^5 (\pm 2.28 \times 10^4)$	2.40×10^5	$5.54 \times 10^4 (\pm 2.70 \times 10^4)$	$4.64 \times 10^6 (\pm 9.86 \times 10^5)$

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

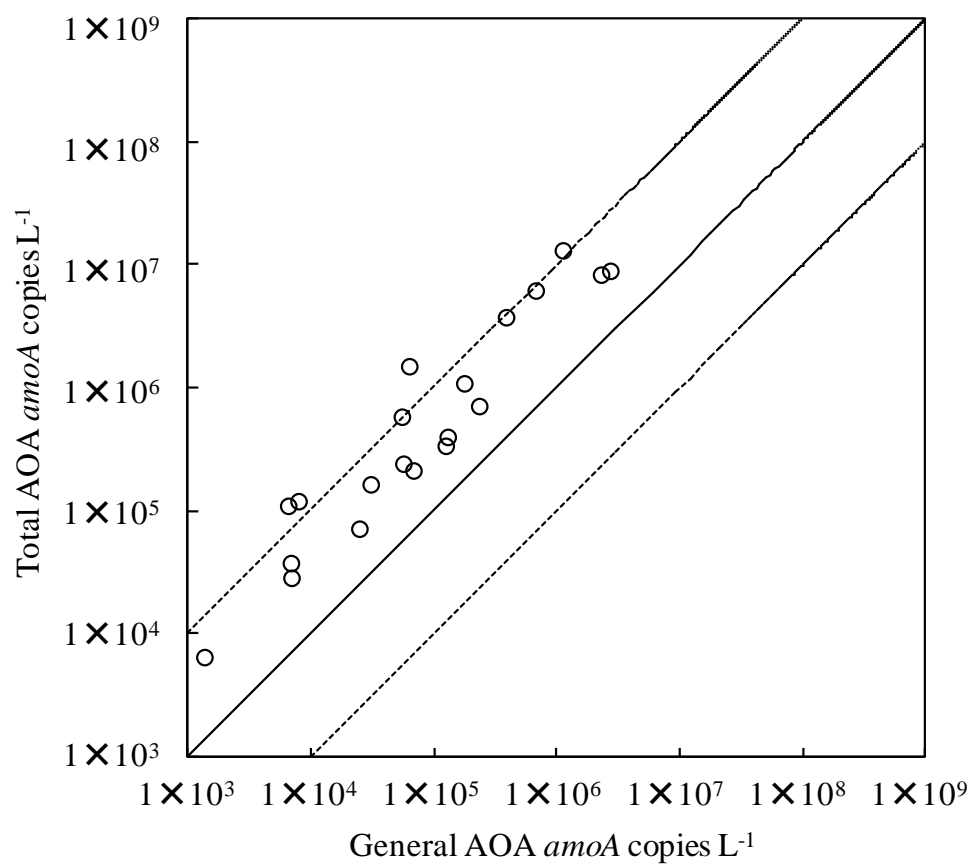


Fig. 2-7 Ratio of Total AOA *amoA* genes versus General AOA *amoA* genes in the sample from environmental samples (open circle) ($n = 22$).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

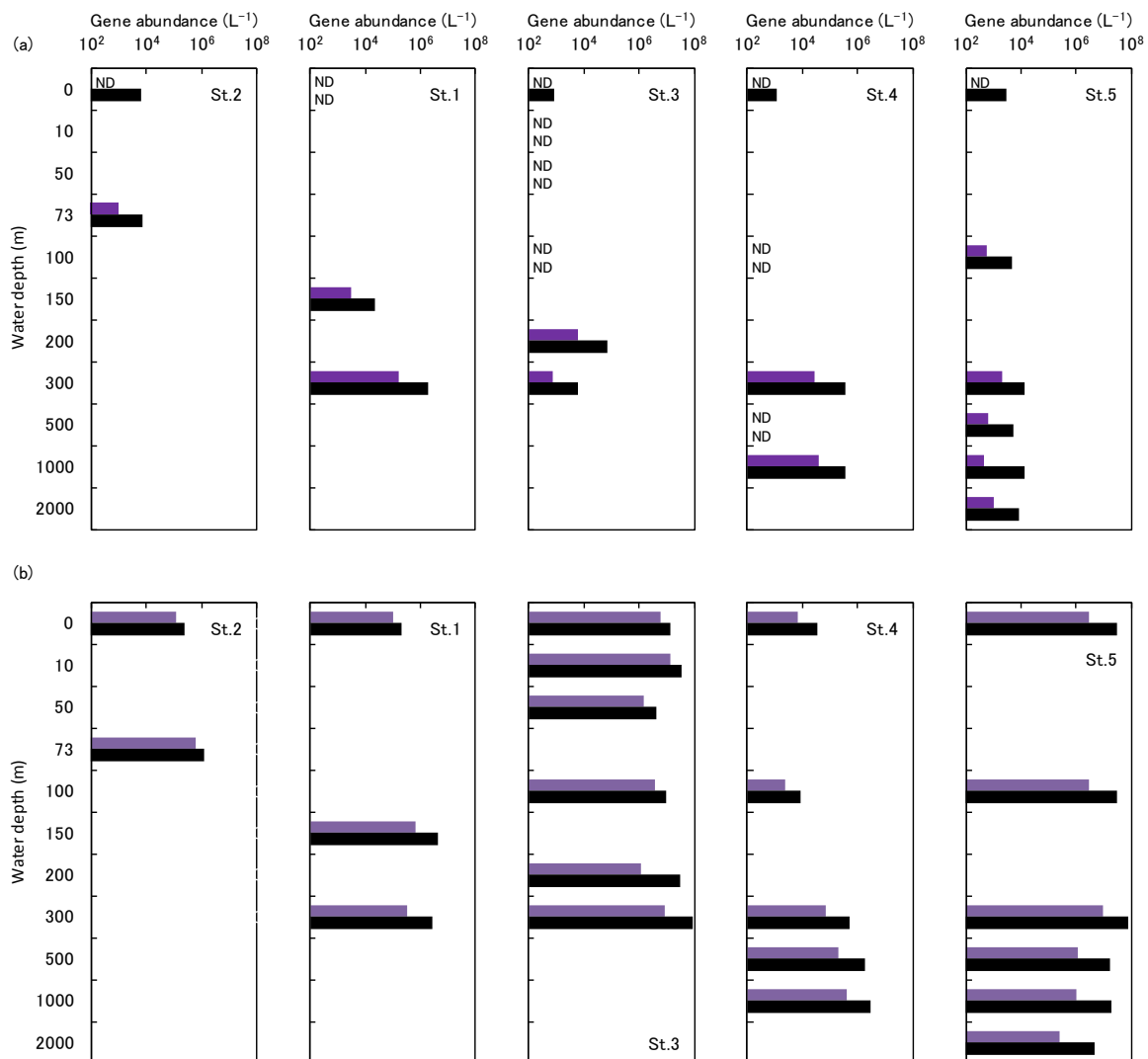


Fig. 2-8 Profiles from 0 to 2,000 m of Total AOA (purple) and Marine Group I (black) abundance from Attached (a) and Free-living (b).ND, No detected.

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

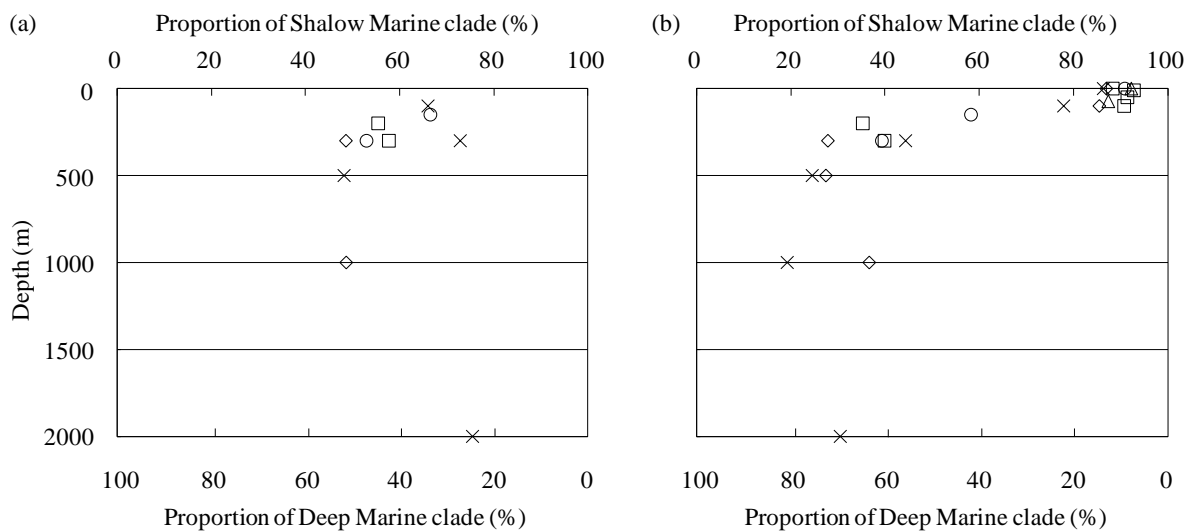


Fig. 2-9 Depth Profiles of each cluster's proportion in Total AOA from Attached (a) and Free-living (b) at St.2 (open triangle), St.1 (open circle), St.3 (open square), St.4 (open diamond) and St.5 (cross).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

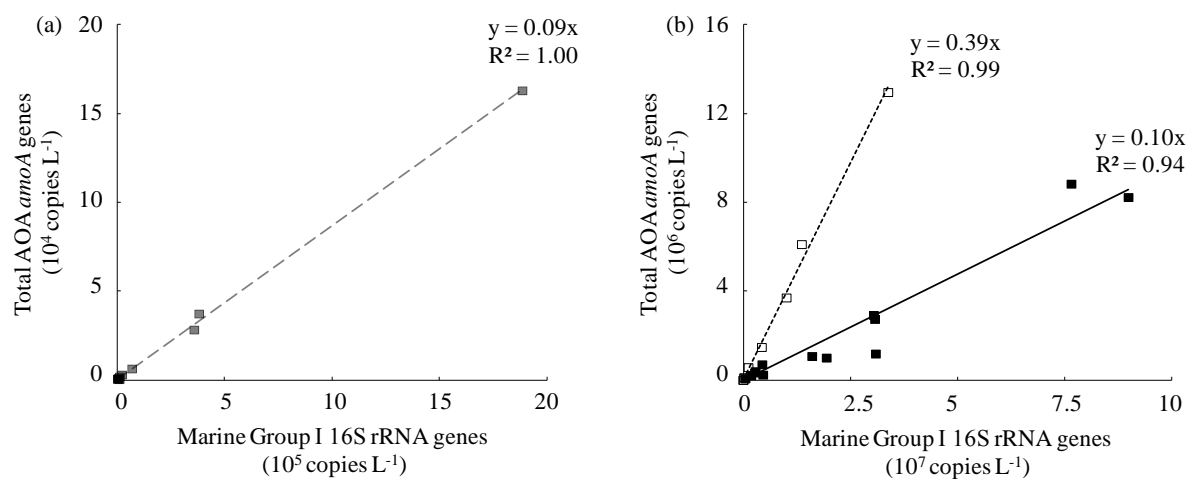


Fig. 2-10 Ratio of Total AOA *amoA* genes versus Marine Group I 16S rRNA genes in the sample from Attached (a) at 0-2,000 m (black square) ($n = 12$), and Free-living (b) at 0-100 m except St.5 0-100 m (open square) ($n = 10$) and 150-2,000 m including St.5 0-100 m (black square) ($n = 12$).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

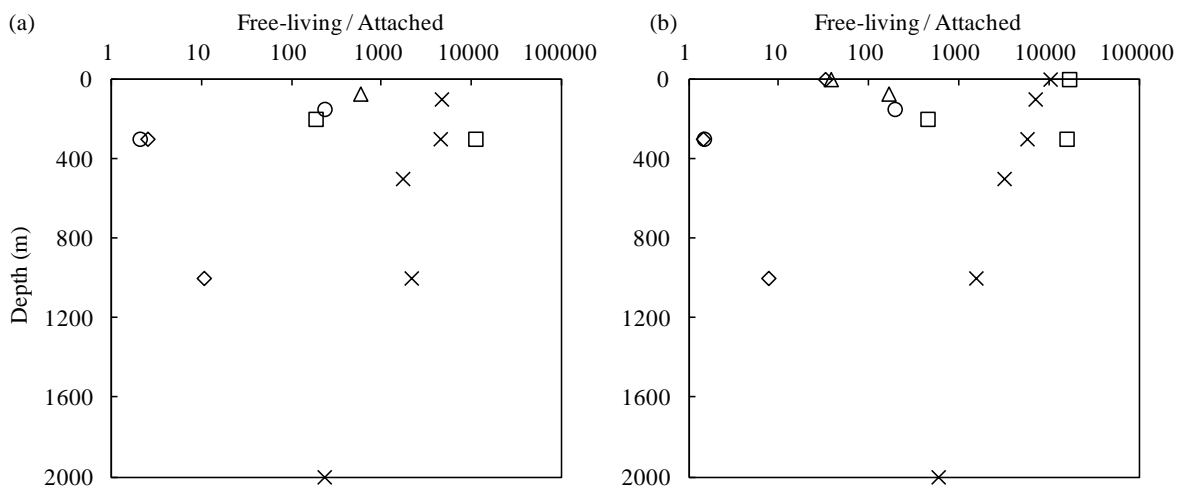


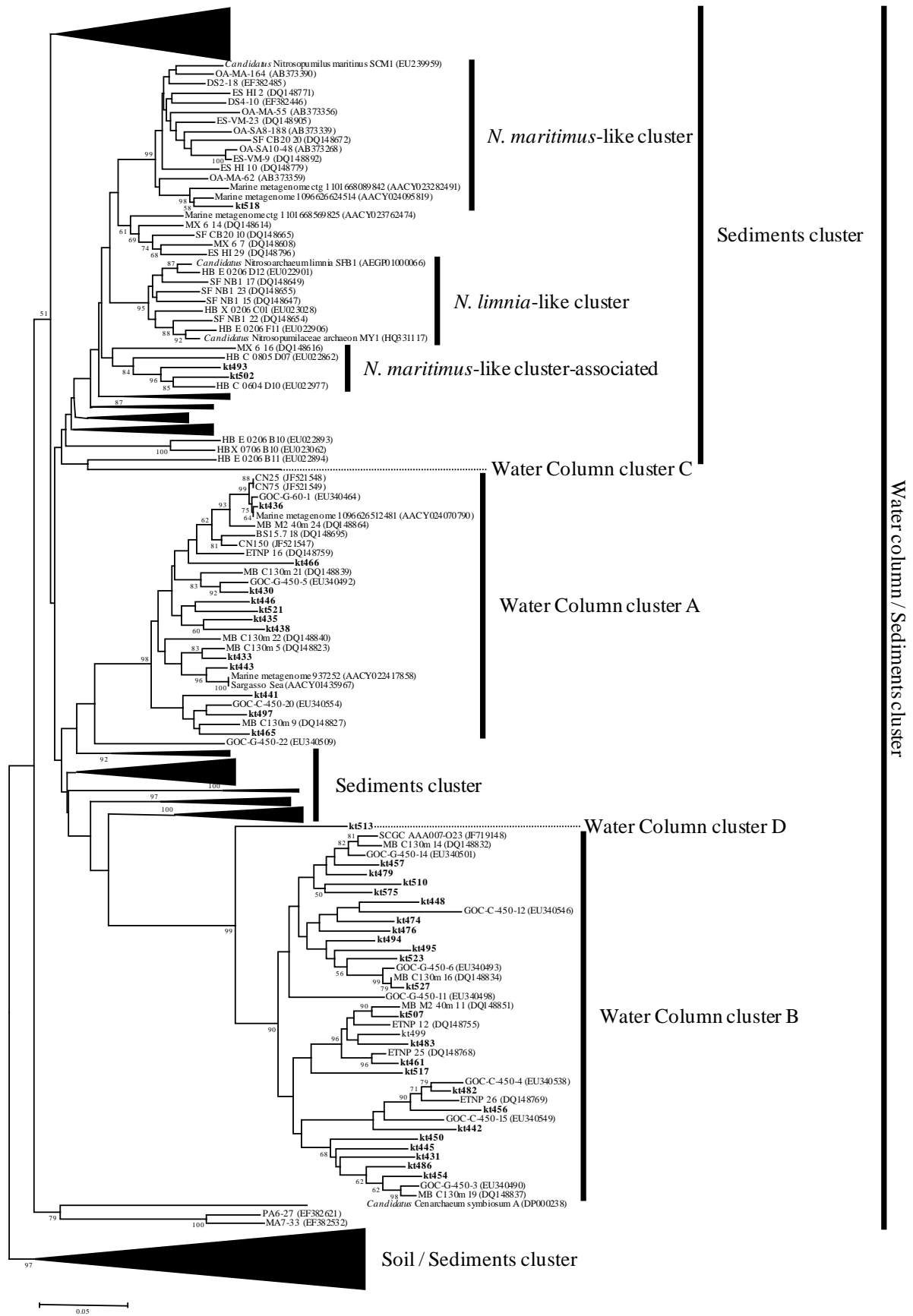
Fig. 2-11 Depth Profiles of among Free-living and Attached abundances ratios from Total AOA (a) and Marine Group I (b) at St.2 (open triangle), St.1 (open circle), St.3 (open square), St.4 (open diamond) and St.5 (cross).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-8 Result of the correlative analyses between the environmental variables and, gene abundances and ratios.

		Pressure	Temperature	Conductivity	Chlorophyll a	PSU	σT	Saturated oxygen	Dissolved oxygen	NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	PO ₄ ⁻ -P	TDC
Attached	Total AOA / Marine Group I								0.59				-0.62	
Free-living	Shallow Marine clade / Total AOA	-0.66	0.85	0.87	0.70	-0.85	-0.82	0.93	0.46		-0.93	-0.90		0.84
	Shallow Marine clade													0.62
	Deep Marine clade										-0.57			
	Marine Group I										-0.54			
Planktonic (Attached plus Free-living)	Total AOA / Marine Group I	-0.51	0.59	0.58	0.68	-0.63	-0.57	0.64	0.55		-0.70	-0.67		0.68
	Shallow Marine clade / Total AOA	-0.67	0.86	0.87	0.70	-0.86	-0.83	0.93	0.46		-0.93	-0.90		0.84
	Shallow Marine clade													0.62
	Deep Marine clade										-0.57			
	Marine Group I										-0.55			
	Total AOA / Marine Group I	-0.50	0.59	0.59	0.68	0.03	-0.63	-0.57	0.64	0.55	-0.70	-0.67		0.69

Only significant ($P < 0.05$) values are shown. *TDC* Total direct count



2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Fig. 2-12 Phylogenetic tree based on archaeal *amoA* sequences (562 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of *amoA* obtained in this study. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 5%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

Table 2-9 Frequencies of various archaeal *amoA* sequences represented as OTUs ($\geq 95\%$ similarity threshold) by 500 m depth and fraction size.

Cluster	OTU name	Representative clone	Attached fraction	Free-living fraction	
<i>Nitrosopumilus maritimus</i> -like cluster-associated	OTU1	kt493	1		
	OTU2	kt502	1		
<i>Nitrosopumilus maritimus</i> -like cluster	OTU3	kt518		2	
Water Column cluster A	OTU4	kt430	2		
	OTU5	kt433	8	1	
	OTU6	kt435	3	4	
	OTU7	kt436	17	4	
	OTU8	kt438	5	1	
	OTU9	kt441	1		
	OTU10	kt443	2		
	OTU11	kt446	1		
	OTU12	kt465	1		
	OTU13	kt466	1		
	OTU14	kt497	1		
	OTU15	kt521		1	
	Water Column cluster B	OTU16	kt431	4	
		OTU17	kt442	1	
		OTU18	kt445	2	
OTU19		kt448	1		
OTU20		kt450	1		
OTU21		kt454	5		
OTU22		kt456	1		
OTU23		kt457	2		
OTU24		kt461	2	3	
OTU25		kt474	1		
OTU26		kt476	2		
OTU27		kt479	1		
OTU28		kt482	1		
OTU29		kt483	2		
OTU30		kt486	4	12	
OTU31	kt494	2			
OTU32	kt495	1			
OTU33	kt499	3			
OTU34	kt507	1	3		
OTU35	kt510	1	1		
OTU36	kt517	1			
OTU37	kt523		1		
OTU38	kt527		6		
OTU39	kt575		2		
Water Column cluster D	OTU40	kt513	1		
Total no.			84	41	

OTU operational taxonomic unit

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

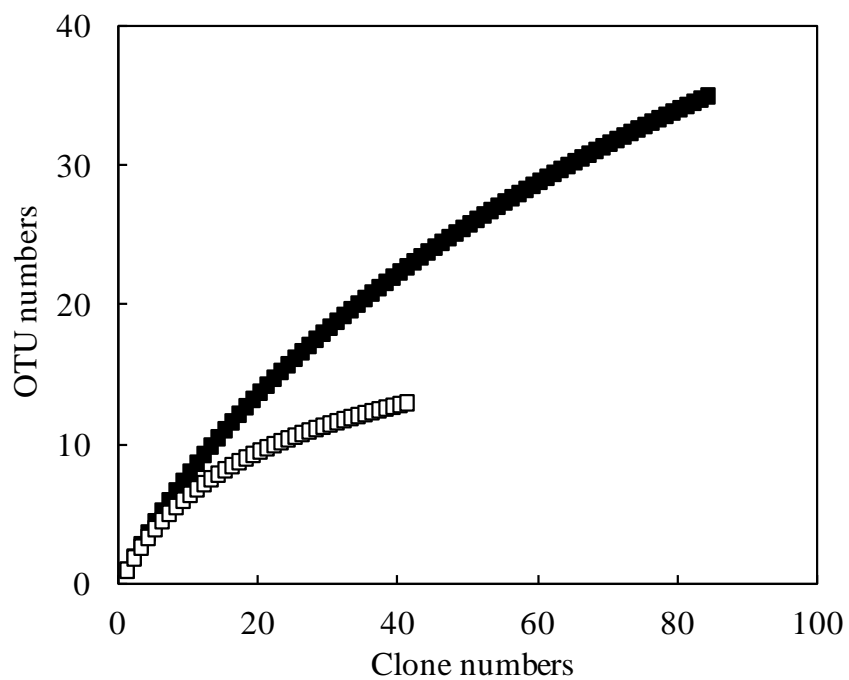


Fig. 2-13 Rarefaction curves showing the relative richness of archaeal *amoA* sequences from attached fraction (black square) and free-living fraction (open square) of 500 m depth at St.5.

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の
集積培養と群集構造の変化

3.1. 序論

前章においては、付着性と自由生活性という二つの生態型に注目して、駿河湾における AOA の分布と多様性を解析し、その大部分が自由生活性であり、深度によって主要系統群が変化すること、一方で付着性 AOA は多様度が高く、深度による系統群の棲み分けが見られないことが示された。こうした AOA 系統群の分布の違いはどのような環境要因に影響されるのだろうか？

AOA は深度によって出現する主要な系統群に違いがあるので (Francis et al., 2005; Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007; Nakagawa et al., 2007; Beman et al., 2008)、分布を決定づける環境要因に関する研究がなされてきている。Erguder et al. (2009) は、これまでの研究をまとめて、AOA の生息場所を左右する可能性がある環境要因を報告している (Erguder et al., 2009)。海洋では、AOA の分布を決める要因として、光、アンモニア態窒素濃度、溶存酸素濃度の重要性が指摘されている (Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007; Molina et al., 2010)。海洋性 AOA の分離株である *Candidatus N. maritimus* SCM1 株は、植物プランクトン (珪藻) や既知の AOB を含む化学合成生物に比べ、アンモニア態窒素に対してより高い親和性を示す (Martens-Habbena et al., 2009)。この海洋性 AOA の特性は、しばしば窒素制限になりやすい海洋環境への適応の結果であると考えられている。Shallow Marine clade に属する WCA の割合は、酸素及びアンモニア態窒素濃度と正の相関関係を示すことから、これらの環境要因の影響が示唆されるが、Deep Marine clade に属する WCB ではそのような関係は見られず、逆に酸素・アンモニウム濃度に負の相関関係を持つ事が報告されており、その他の要因を考える必要がある (Molina et al., 2010)。その他の要因として、光阻害への抵抗性 (Hallam et al., 2006b; Mincer et al., 2007) が指摘されているが、いずれも明確な証拠は得られていない。

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

水温は、深度と共に低下して中深層以深で一定になり、Shallow Marine clade と Deep Marine clade の割合と、それぞれ負と正の相関関係にある事が 2 章で明らかになっているので、アンモニア態窒素・溶存酸素濃度、光環境と共にその分布を決定する重要な要因と考えられるが、これまで検討されてこなかった。現場観測だけでは、様々な環境要因の複合的な影響が考えられ、AOA の群集構造に各要因がどのように影響しているのか明確にできない。本章の研究では、集積培養系を用いた群集構造と現存量の変動から、生息環境が海洋性 AOA の主要な系統群 (NM、WCA、WCB) の分布に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。アンモニア態窒素の添加で付着性画分の環境を、そのコントロールとして亜硝酸態窒素の添加で自由生活性画分の環境を、水温を変化させることで鉛直的な環境の違いを模した。各環境要因が AOA の群集構造と現存量に対し、どのような影響を及ぼすのかを明らかにできれば、AOA の主要な系統群の分布が鉛直的に異なる理由を明確に説明できるようになる。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 試料採集

集積培養を行うための海水試料は、前章で記述した KT08-02 次淡青丸航海で、AOA と Marine Group I の分布を調べた 5 地点のうち、群集構造解析に用いた駿河湾湾口 St.5 の水深 500 m と 2000 m から採取した。採水時の AOA 群集を調べるために、1 L の海水を孔径 0.2 μm のヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターにろ過した。核酸抽出までこれらのフィルターを -20°C で保存した。培養のための海水試料は 4°C で保持し、サンプリング後 4 日以内に研究室に運び、すぐに基質を添加して集積培養を開始した。

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

3.2.2. 環境要因の測定

水温と溶存酸素濃度、無機態窒素濃度は、2.2.2 で測定した。

3.2.3. 集積培養を用いた温度操作実験

海水試料にアンモニア酸化の基質として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、または亜硝酸酸化の基質として NaNO_2 を添加 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ または $\text{NO}_2^-\text{-N}$ として終濃度 $50 \mu\text{M}$) し、 4°C 、 10°C 、 20°C ($n=1$) に保持、震盪せずに暗条件で 1,200 日間の集積培養を行った。海水の初期量は 500 mL とし、スクリーキャップをした 1 L ポリプロピレンボトルで培養を行った。培養開始時に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または NaNO_2 を添加した後、300 日目までの培養期間中に最大で 3 回の基質添加を行った。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または NaNO_2 を加えるタイミングは、ボトル中の無機態窒素の増減をモニタリングする事で決定し、添加した基質が検出されなくなった培養系に新たな添加を行った。また、300 日目以降は基質の添加を行わなかった。無機態窒素のモニタリングに合わせて、 $30\text{--}50 \text{ mL}$ の海水試料を核酸抽出のために培養系から分取し、海水中の微生物細胞を遠心 ($15,300 \times g$, 30 分 , 4°C) によって集めた。核酸抽出まで菌体ペレットは -20°C で保存した。

無機態窒素濃度は 2.2.2 と同じ方法で測定した。検出限界は $\text{NH}_4^+\text{-N}$ で $0.25 \mu\text{M}$ 、と $\text{NO}_2^-\text{N} + \text{NO}_3^-\text{-N}$ で $0.5 \mu\text{M}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ で $0.25 \mu\text{M}$ であった。標準誤差は $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の測定値が 0.5% ($n=6$)、 $\text{NO}_2^-\text{N} + \text{NO}_3^-\text{-N}$ が 0.4% ($n=6$)、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ が 0.3% ($n=6$) であった。

3.2.4. 硝化速度

培養開始時から 266 日目までに消費された全てのアンモニア態窒素が、古細菌によるアンモニア酸化に使われた場合と、産生された全ての硝酸態窒素が古細菌によるアン

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

モニア酸化に由来する場合を仮定し、それぞれの値をAOAの現存量と経過日数で割る事で、 $\text{fmol NH}_3 \text{ cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ として算出した。

3.2.5. 核酸抽出

核酸はヌクレオポリアリカーボネートメンブレンフィルターまたは菌体ペレットから、2.2.3の群集構造解析用の核酸と同様の方法で抽出した。

3.2.6. DNA 濃度の測定

2.2.4と同様に測定した。

3.2.7. Q-PCR

2.2.5と同様に測定した。Shallow Marine cladeの*amoA*と、Deep Marine cladeの*amoA*、General AOAの*amoA*、Marin Group Iの16S rRNA遺伝子アッセイのPCR効率は、それぞれ 93.5–96.5%と、87.2–95.2%、88.1–92.5%、96.8–97.0%で、全てのアッセイで r^2 値は少なくとも0.968であった。

3.2.8. 群集構造解析

アンモニア態窒素の消費を開始するのに長いラグタイムを要した4°Cで培養した水深2,000 mの試料ボトルで、アンモニア態窒素濃度の減少と同時に亜硝酸態窒素濃度の増加が観察された(アンモニア酸化を意味する)266日目に、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した6つの培養系で行った。PCR増幅は2.2.6と同様に行った。PCRはGeneral AOAの*amoA*を対象としたユニバーサルプライマーセットであるArch-*amoA*FとArch-*amoA*R (Francis et al., 2005)、ベータプロテオバクテリアの*amoA*を対象とした*amoA*-1Fと*amoA*-2R

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

(Rotthauwe et al., 1997)、ガンマプロテオバクテリアの*amoA*を対象とした*amoA*-3Fと*amoA*-4R(Purkhold et al., 2000)を使い、既報とメーカー指定の方法に従って行った。クローニングとシーケンス、遺伝子配列間の相同性検索、系統解析は 2.2.6 と同様に行った。

3.3. 結果

3.3.1. 環境要因

水温は水深 500 m と 2,000 m でそれぞれ 6.6 と 2.0°C であった。溶存酸素濃度は水深 500 m と 2,000 m でそれぞれ 126 と 150 μM であった。アンモニア態窒素濃度は水深 500 m と 2,000 m でそれぞれ 0.31 と 0.91 μM であった。亜硝酸態窒素濃度は水深 500 m と 2,000 m でそれぞれ < 0.05 と 0.34 μM であった。硝酸態窒素濃度は水深 500 m と 2,000 m でそれぞれ 31.3 と 39.1 μM であった。

3.3.2. 硝化ポテンシャル

300 日目までに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した培養系では、アンモニア態窒素の消費と亜硝酸態窒素の生成が、 NaNO_2 を添加した培養系では、水深 2,000 m、4 °C の培養系を除いて、亜硝酸態窒素の消費と硝酸態窒素の生成が見られた (Fig. 3-1)。さらに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した系では、水深 2000 m、4°C の培養系を除いて、亜硝酸態窒素の消費と硝酸態窒素の生成が見られた (Fig. 3-1)。アンモニア態窒素や亜硝酸態窒素の消費開始までにかかった日数は、低温よりも高温で培養した培養系ほど短かった (Fig. 3-1)。その後、1,200 日目までに全ての実験区でアンモニア態窒素または亜硝酸態窒素の減少と、硝酸態窒素の増加が確認された (Fig. 3-2)。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した系の 266 日目における硝化速度は、アンモニア態窒素に基づ

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

いて推定すると、水深 500 m の 4、10、20 °C の培養系でそれぞれ 0.90、3.56、5.50 fmol NH₃ cell⁻¹ day⁻¹、水深 2,000 m の 4、10、20 °C の培養系でそれぞれ 0.28、0.84、0.71 fmol NH₃ cell⁻¹ day⁻¹ であった。また、亜硝酸・硝酸態窒素に基づいて推定すると、水深 500 m の 4、10、20 °C の培養系でそれぞれ 0.78、3.85、5.04 fmol NH₃ cell⁻¹ day⁻¹、水深 2,000 m の 4、10、20 °C の培養系でそれぞれ 0.27、0.81、0.68 fmol NH₃ cell⁻¹ day⁻¹ であった。硝化速度は、どの培養温度でも水深 500 m の培養系が水深 2,000 m の培養系よりも高く、水深 500 m の培養系では培養温度が高くなると共に高くなり、水深 2,000 m の培養系では 4 °C より 10、20 °C の培養系で高く、20 °C の培養系が 10 °C の培養系より若干高かった。

3.3.3. 集積培養におけるアンモニア酸化古細菌の群集構造

General AOA の *amoA* はすべての試料で増幅したが、ベータプロテオバクテリアとガンマプロテオバクテリアの *amoA* は増幅しなかった。365 クローンのシーケンスは 95% の相同性により 37 OTUs にグループ化された (Table 3-1)。ストップコドンを含んでいた 3 クローンは解析から外した。全てのクローンは 3 つの系統群、NM、WCA、WCB に分かれた (Fig. 3-3)。

培養前の海水試料から得られた多くのクローンは、両深度で WCB に属する割合が高く、水深 500 m と 2,000 m でそれぞれ 88% と 100% であった (Fig. 3-4)。アンモニア態窒素を加えた培養系で得られたクローンは、水深 500 m の 4、10、20 °C の培養系がそれぞれ 26、69、100%、2,000 m がそれぞれ 31、100、100% であった。NM や WCA に属する割合が高くなる傾向は、高温 (10°C と 20°C) で培養した培養系で顕著であり、水深 500 m の培養系では WCA が、水深 2,000 m の培養系では NM が集積されていた (Fig. 3-4)。

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

培養前後、及び培養系間の群集構造の違いは、統計的に有意であった(カイ二乗検定、 $P < 0.005$)。また、優勢する OTUs は培養系ごとに異なり(例えば水深 500 m の系では OTU4、5、9、12、水深 2,000 m の系では OTU1,2)、いくつかの OTUs は培養後にのみ現れた(OTU1,2,10,11,22,23,26,28,32,37) (Table 3-1)。特に、アンモニア態窒素を添加した水深 500 m、20 °C の培養系は、WCA に属する 1 OTU のみが、水深 2,000 m の 10 °C と 20 °C の培養系はともに NM に属する 2 OTUs のみが検出され、これらの培養系では特定の OTUs のクローンが集積されていた(Table 3-1)。

3.3.4. 集積培養におけるアンモニア酸化古細菌の現存量

環境試料と集積培養の Total AOA と General AOA が共に検出された試料において(それぞれ $n = 2$ と $n = 34$)、Total AOA の現存量は General AOA よりそれぞれ 1.47-1.76 倍と 0.51-558 倍の範囲で高く、平均で 1.61 倍と 134 倍、中央値で 1.61 倍と 26.2 倍高かった(Fig.3-5)。そこで、本章では高い現存量が得られた Total AOA を AOA の現存量とした。

Shallow Marine clade の現存量は、266 日目に亜硝酸態窒素添加区よりアンモニア態窒素添加区で増加していた(Fig.3-6)。水深 500 m の海水試料を用いたアンモニア態窒素添加区で、現存量は培養前に比べ 266 日目で 2 桁程度増加していた(Fig.3-6a,b,c)。4°C の培養系において培養後に増加した現存量は、培養終了後まで維持されていた(Fig.3-6a)。10°C の培養系において 266 日目に増加した現存量は、915 日目以降に 1 桁程度減少していた(Fig.3-6b)。20°C の培養系において 266 日目に増加した現存量は、978 日目以降に培養前と同程度まで減少していた(Fig.3-6c)。水深 2,000 m の海水試料を用いたアンモニア態窒素添加区で、現存量は培養前に比べ 266 日目で 3 桁程度増加していた(Fig.3-6d,e,f)。4°C の培養系において培養後に

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

増加した現存量は、培養終了後まで若干減少したが維持されていた (Fig.3-6d)。10°Cの培養系において266日目に増加した現存量は、915日目以降に1桁程度減少していた (Fig.3-6e)。20°Cの培養系において266日目に増加した現存量は、978日目以降に1-2桁程度減少していた (Fig.3-6f)。水深500 mの海水試料を用いた亜硝酸態窒素添加区で、現存量は培養前に比べ266日目で1桁程度増加していた (Fig.3-6g,h,i)。4°Cの培養系において培養後に増加した現存量は、培養終了後まで維持されていた (Fig.3-6g)。10°Cの培養系において266日目に増加した現存量は、1,200日目に培養前と同程度になっていた (Fig.3-6h)。20°Cの培養系において266日目に増加した現存量は、1,200日目に維持されていた (Fig.3-6i)。水深2,000 mの海水試料を用いた亜硝酸態窒素添加区で、現存量は培養前に比べ266日目で2桁程度増加していた (Fig.3-6j,k,l)。4°Cの培養系において現存量は、1,200日目でも培養前より2桁程度高った (Fig.3-6j)。10°Cの培養系において266日目に増加した現存量は、1,200日目に維持されていた (Fig.3-6k)。20°Cの培養系において266日目に増加した現存量は、1,200日目に維持されていた (Fig.3-6c)。

Deep Marine cladeの現存量は、266日目に両添加区で増加せず、培養温度が高い実験区で検出限界以下になった (Fig.3-6)。水深500 mの海水試料を用いたアンモニア態窒素添加区で、現存量は培養前に比べ266日目に増加しないか、20°Cの実験区で検出限界以下になった (Fig.3-6a,b,c)。4°Cの培養系において現存量は、培養終了後まで維持されていた (Fig.3-6a)。10°Cの培養系において現存量は、培養終了後まで維持されていた (Fig.3-6b)。20°Cの培養系において現存量は、培養後に減少し、978日目以外で検出限界以下になった (Fig.3-6c)。水深2,000 mの海水試料を用いたアンモニア態窒素添加区で、現存量は培養前に比べ266日目に増加せず、10°Cと20°Cの培養系で検出限界以下だった (Fig.3-6d,e,f)。4°Cの培養系において現存量は、

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

978 日目まで維持されていたが、1,200 日目に検出限界以下になった (Fig.3-6d)。10°Cの培養系において現存量は、培養後に減少し、915 日目以外で検出限界以下になっていた (Fig.3-6e)。20°Cの培養系において現存量は、培養後に検出限界以下になっていた (Fig.3-6f)。水深 500 m の海水試料を用いた亜硝酸態窒素添加区で、現存量は培養前に比べ 266 日目に増加せず、20°Cの培養系で検出限界以下だった (Fig.3-6g,h,i)。4°Cの培養系において現存量は、266 日目まで維持されていたが、それ以降検出限界以下だった (Fig.3-6g)。10°Cの培養系において現存量は、1,200 日目まで培養前と同程度であった (Fig.3-6h)。20°Cの系において現存量は、培養後に検出限界以下だった (Fig.3-6i)。水深 2,000 m の海水試料を用いた亜硝酸態窒素添加区で、現存量は培養後に検出限界以下だった (Fig.3-6j,k,l)。

3.4. 考察

3.4.1. 水温はアンモニア酸化古細菌の群集構造に影響する

Deep Marine clade の WCB の割合と培養期間中における消長は、培養温度によって大きく異なった。土壌試料由来のマイクロゾウムにおいても、AOA の群集構造が温度に影響され、特に高温の系において変化が速いと報告されている (Tourna et al., 2008)。例えば、水深 500 m と 2,000 m のいずれの海水試料も群集構造は、高温 (10°C と 20°C) で Shallow Marine clade の NM もしくは WCA が優占し、低温 (4°C) で Deep Marine clade の WCB が優占した。また、Deep Marine clade の現存量は、アンモニア態窒素を添加しても増加せず、水温が高くなると減少し検出されなくなった。これは、WCB が低温かつアンモニア態窒素濃度の低い (ナノモルレベル) 環境に適応しているためと考えられる。

一方で、Shallow Marine clade の培養期間中における消長は、アンモニア態窒素濃

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

度によって大きく異なった。Shallow Marine clade は、いずれの温度でも、アンモニア態窒素を添加する事で現存量がより増加したことから、Deep Marine clade よりもアンモニア態窒素に対する最大収量が高いと示唆された。実際、培養に用いた 50 μM というアンモニア態窒素濃度で、炭素固定活性が促進されると報告されている (Yakimov et al., 2011)。

以上から、水温とアンモニア態窒素は、海洋性 AOA の主要系統群 (NM, WCA, WCB) の分布を支配する要因として、重要であると示唆された。既報研究で、Shallow Marine clade の NM と WCA はアンモニア態窒素の供給量が高い環境である水族館や、沿岸近く、浅海で優勢になり、一方で Deep Marine clade の WCB は低温な環境である深海で優勢であると報告されている (Beman and Francis, 2008; Hu et al., 2011a,b; Santoro et al., 2010; Urakawa et al., 2008)。前章においても、それぞれの系統群の鉛直的な棲み分けが示された。

硝化活性は、pH が 0.1 程度低下すると、8 - 38% 減少すると知られており (Beman et al., 2011)、本実験においても水温による二酸化炭素の溶解度の違いが pH を変化させ、硝化活性に影響していた可能性がある。硝化で産生された亜硝酸・硝酸態窒素による pH の低下や、培養温度による pH の違いが、AOA の群集構造と現存量に影響しなかったかを確認するために、アンモニア態窒素を添加した集積培養系 (978 日目) で、pH を測定したところ、両深度とも 4°C と 10°C、20°C でそれぞれ 7.6 と 7.8、8.0 であった。さらに、これらを室温 (25°C) に 1 日間、気体交換のために静置してから pH を測定すると、 8.06 ± 0.02 (AVE \pm SD) になった。従って、この pH の違いは、硝化によって生じたプロトンの影響ではなく、水温による二酸化炭素の溶解度の違いによって生じたものであると考えられる。一般に、pH が下がると化学平衡でアンモニア態窒素のうちアンモニウムイオンの割合が高くなり、逆に pH が上がるとアンモニアの割合が高くなる。今後、

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

海水の pH を酸性側にコントロールした条件で、AOA の群集構造と現存量がどう変化するかを評価する実験が必要である。しかし、両添加区において、各 clade の現存量はそれぞれ同様の傾向を示していたので、pH が硝化活性に影響していた可能性は低い。

AOA の現存量が水温の影響を受ける理由として、炭素固定活性への影響が考えられる。古細菌の炭素固定に関与していると考えられているアセチル CoA カルボキシラーゼ α サブユニット (acetyl-CoA carboxylase alpha subunit) 遺伝子 (*accA*) についても、古細菌の *amoA* の現存量と同様に 3 つの系統群が存在し、深度によって分布が違っていると知られている (Hu et al., 2011a,b; Yakimov et al., 2009)。しかし、AOA の現存量とバルクの炭素固定活性には、水温に関係なく正の相関関係があると示されており (Agogue et al., 2008)、細胞あたりの炭素固定活性には、見かけ上の水温への依存性はないと考えられる。

溶存二酸化炭素濃度と同様に、溶存酸素濃度も水温によって変化すると考えられる。培養期間中の溶存酸素濃度は、それぞれの培養温度毎に溶解度平衡に達していると考えられ、4°C と 20°C での飽和酸素濃度は 324 μM と 231 μM である (PSU 35, 1 atm, Benson and Krause, 1984)。しかし、大気圧下と微好気 (45 $\mu\text{M O}_2$) 下で炭素固定活性に有意な違いがないと報告されたので (Yakimov et al., 2011)、その影響はないと考えられる。

水温は、系統群レベルで影響するだけでなく、種レベルでの群集構造の変動に影響すると示唆された。同じ系統群内においても水温によって出現する OTUs が違っており、水深 500 m の海水では、WCA の主要な OTUs が 4°C と 10°C、20°C の培養系でそれぞれ異なっていた。水深 2,000 m の海水でも同様に、4°C の培養系における NM の主要な OTUs は、それ以外の培養系と異なっていた。これらは、種レベルで生理学

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

的特性に違いが存在し、同系統群でも海域や水塊によって出現する種が異なる可能性を示している。

既往研究においては、圧力や光の影響によって、AOAのアンモニア酸化活性が阻害される事が示唆されており、今後はこれらの環境要因についても検討する必要がある。AOAの分離株である*Nitrosopumilus maritimus*と*Nitrosotalea devanaterra*は $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射ですらアンモニア酸化活性が阻害されたと報告されている(Merbt et al., 2012)。また、淡水湖の堆積物から集積培養されたAOAに、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光、赤色光、青色光を照射したところ、赤色光以外では増殖が阻害されたと報告されている(French et al., 2011)。Yakimov et al. (2009)は、DNAに基づくPCR-クローニングでDeep Marine cladeのクローンしか得られなかった試料が、RNAに基づくそれではShallow Marine cladeのクローンしか得られなかったため、大気圧と太陽の下で船上作業している間に、減圧や光阻害がDeep Marine cladeのAOAの代謝活動に影響し、遺伝子発現の強い減衰に繋がったのではないかと述べている。さらに、深海層の海水試料における炭素固定活性は、白昼($12,000 \text{ lux} \approx 222 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)の光量で阻害されると報告されている(Yakimov et al., 2011)。

3.4.2. 水温と硝化ポテンシャル

硝化速度は水温に影響されたので、古細菌の硝化活性は生息場所によって異なると示唆された。北海では、硝酸態窒素に基づいて推定された現場の硝化速度が $\sim 7 \text{ fmol NH}_3 \text{ cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、アンモニア態窒素に基づいた集積培養系が $2 - 4 \text{ fmol NH}_3 \text{ cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり(Wuchter et al., 2006)、*Candidatus N. maritimus* SCM1 株では $\sim 4 \text{ fmol NH}_3 \text{ cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった(Könneke et al., 2005)。本研究の水深 500 mの $10 \text{ }^\circ\text{C}$ と $20 \text{ }^\circ\text{C}$ の培養系は、既報研究の培養系や分離株と同程度の硝化速度であったが、そ

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

れ以外の培養系で硝化速度が低かった傾向は、培養温度によるpHの差が影響した可能性がある。海洋酸性化に伴いpHが低下すると、硝化活性は海洋水柱で減少すると示唆されている(Beman et al., 2011; Kitidis et al., 2011)。しかし、硝化活性は海洋堆積物で変化しないと示唆されており(Kitidis et al., 2011)、pHの影響は、AOAの群集構造、もしくは生息環境によって異なると考えられる。

添加したアンモニア態・亜硝酸態窒素が検出限界以下になったのちも硝酸態窒素が蓄積し続け、1,200 日を経ても AOA が検出された。これらの細胞は、常法で検出できないほど低濃度のアンモニアを利用できると示唆される。これは、*Candidatus N. maritimus* SCM1 株がアンモニウムの取り込みにとっても低い半飽和定数を示した結果からも示唆される(Martens-Habben et al., 2009)。さらに、Deep Marine clade の現存量は、アンモニア態窒素を添加しても増加しないので、アンモニア態窒素が希薄な深海環境に優占する AOA 群集は、水族館のろ過槽から分離された SCM1 株よりもはるかに低濃度のアンモニウム態窒素に適応しているかもしれない。

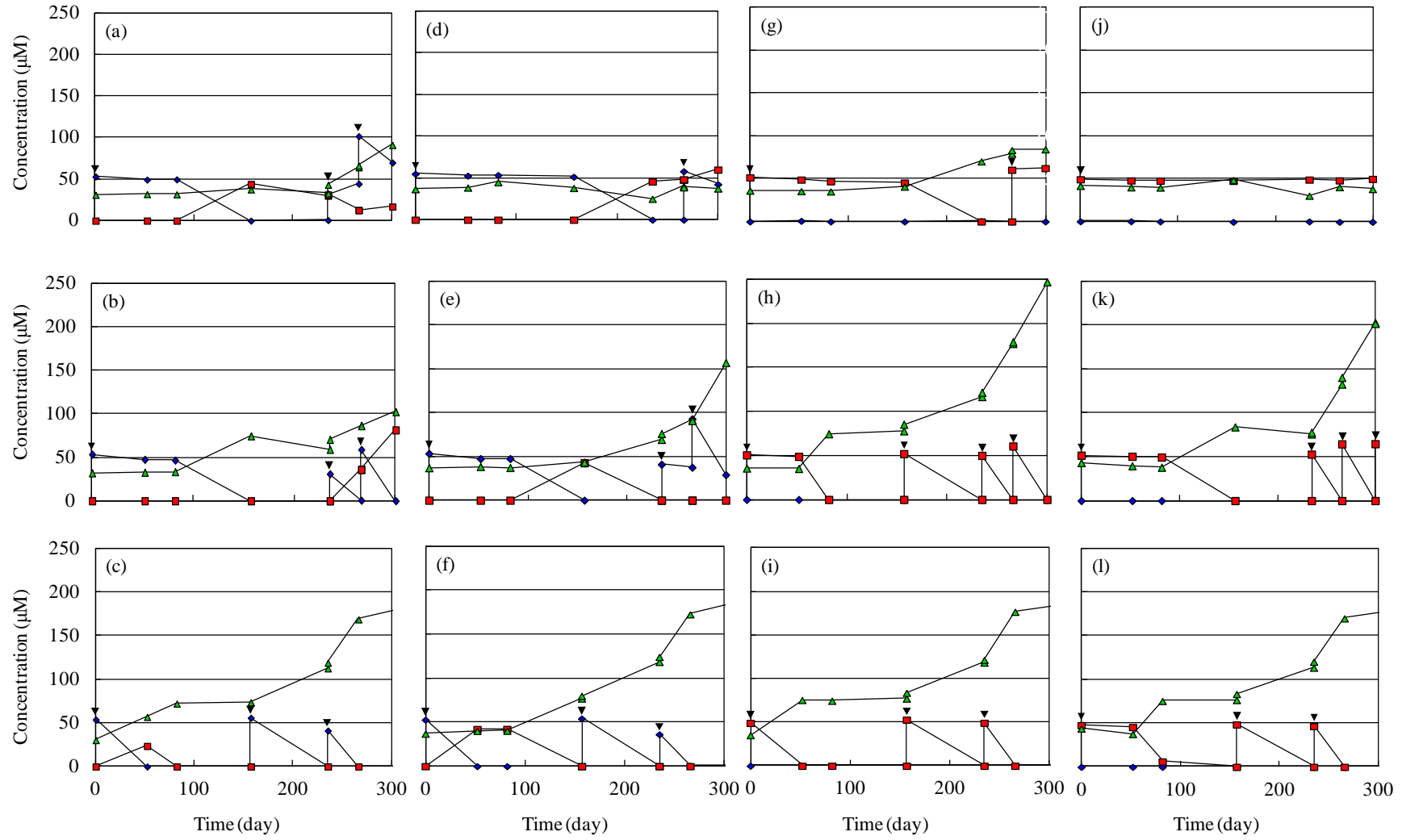
4°Cから20°Cの範囲で硝化が起こり、基質の添加を止めた300日目以降も硝酸が蓄積し続けた。これは、駿河湾の表層から深層の水柱で古細菌の仲介する硝化の存在を示しており、アンモニア態窒素が制限されている深海で硝化が起きているのを培養実験的に初めて明らかにした。地球表面の約71%は海に覆われており(Mrita, 2000)、さらに深海(水深1,000 m以深は1-5°C)は世界の海の約88%を占めると見積もられているので(Menard and Smith, 1966)、深海で好冷性のアンモニア酸化原核生物が全球的な窒素・炭素循環に重要な役割を果たしているのかどうかを明らかにするのは重要であると考えられている(Nakagawa et al., 2007)。これまで、同位体や遺伝子を用いた研究からは、深海で硝化が起きていると示す証拠が得られてきたが(Church et al., 2010; Santoro et al., 2010)、本研究は初めて直接的に生元素変換を観察し、それに

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

伴い硝化が起きているのを明らかにした。この事は、日本海北東の水深 2000 m、4°C の水柱での亜硝酸生成を示した以前の報告を支持する (Nakagawa et al., 2007)。さらに、検出を試みた全ての試料で AOB の存在が確認できなかった結果も、古細菌が駿河湾でのアンモニア酸化に重要な役割を果たしているのを意味する。以前にも、深海で *Betaproteobacteria* の AOB の現存量が検出限界以下であり AOA より桁違いに少なく、*Gammaproteobacteria* の AOB の現存量が検出限界以下であったと報告されている (Mincer et al., 2007; Nakagawa et al., 2007)。

AMO のアミノ酸配列で分けられたグループである Shallow Marine clade と Deep Marine clade は (Mincer et al., 2007)、本研究で水温の影響を受けていると明らかになったので、AMO の温度特性が AOA の生息環境を決定する重要な要因である可能性が高い。アンモニア態窒素を添加した水深 2,000 m、4 °C の培養系から得られたクローンのうち 1 クローン (kt372) は、*Candidatus N. maritimus* のアンモニアモノオキシゲナーゼ α サブユニットのたんぱく質配列の 181 番目のアミノ酸に相当する位置へ、グリシンとアラニンの挿入を予測させる 6 bp の挿入を含んでいた。同様な挿入は、*Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* を含む系統群である cluster IV に存在すると報告されており、この株は 72 °C で増殖すると知られている (de la Torre et al., 2008)。今後、こうした挿入によるアミノ酸配列の変化が AMO の立体構造や温度特性に影響する可能性を明らかにしていく必要がある。

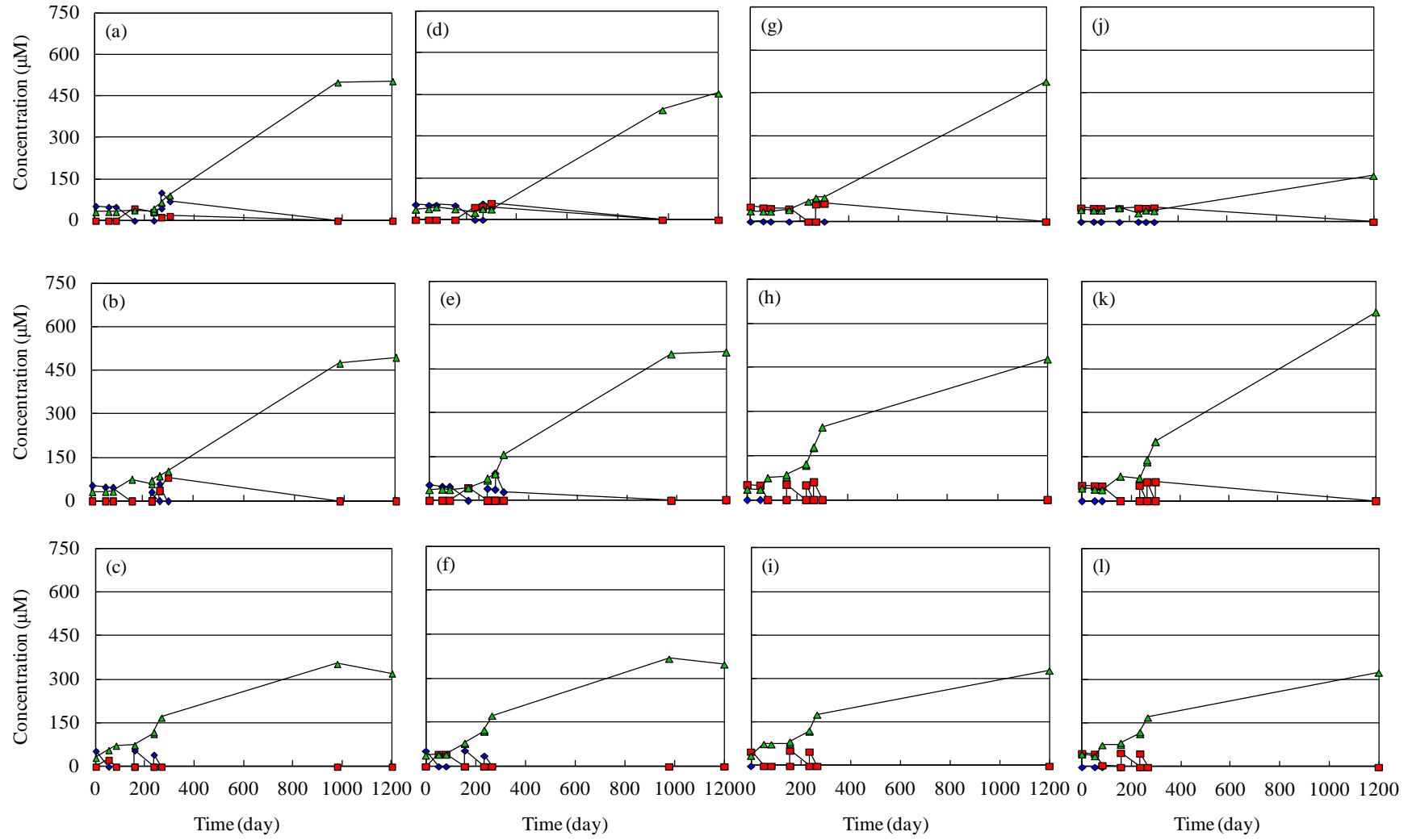
3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化



3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

Fig. 3-1 Changing inorganic nitrogen concentrations during 300-day incubations adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of seawater samples collected from 500-m depth and incubated at 4°C (a), 500 m and 10°C (b), 500 m and 20°C (c), 2,000 m and 4°C (d), 2,000 m and 10°C (e), and 2,000 m and 20°C (f) and adding NaNO_2 of seawater samples collected from 500-m depth and incubated at 4°C (g), 500 m and 10°C (h), 500 m and 20°C (i), 2,000 m and 4°C (j), 2,000 m and 10°C (k), and 2,000 m and 20°C (l) (n = 1). $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (blue diamond); $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (red square); $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (green triangle); Addition of substrate (black triangle).

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化



3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

Fig. 3-2 Changing inorganic nitrogen concentrations during 1,200-day incubations adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of seawater samples collected from 500-m depth and incubated at 4°C (a), 500 m and 10°C (b), 500 m and 20°C (c), 2,000 m and 4°C (d), 2,000 m and 10°C (e), and 2,000 m and 20°C (f) and adding NaNO_2 of seawater samples collected from 500-m depth and incubated at 4°C (g), 500 m and 10°C (h), 500 m and 20°C (i), 2,000 m and 4°C (j), 2,000 m and 10°C (k), and 2,000 m and 20°C (l) (n = 1). $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (blue diamond); $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (red square); $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (green triangle).

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

Table 3-1 Frequencies of various archaeal *amoA* sequences represented as OTUs ($\geq 95\%$ similarity threshold) by depth of collection and temperature of incubation

Cluster	OTU name	Representative clone	Clone numbers at 500 m depth				Clone numbers at 2000 m depth				Total numbers	
			Initial	Incubation temperature			Initial	Incubation temperature				
			6.6°C	4°C	10°C	20°C	6.6°C	4°C	10°C	20°C		
NM	OTU1	kt016	8				33	2	5		48	
	OTU2	kt143						18	15		33	
WCA	OTU3	kt011	1	5			3				9	
	OTU4	kt099	1		18						19	
	OTU5	kt162	1			33					34	
	OTU6	kt235	1								1	
	OTU7	kt253	2	1	9						12	
	OTU8	kt003	2	2				1			5	
	OTU9	kt004	14	13	1		9	20			57	
	OTU10	kt005		2							2	
	OTU11	kt006		1				3			4	
	OTU12	kt015	5	10			1	20			36	
	OTU13	kt017	5	7	1		1	6			20	
	OTU14	kt034	1								1	
	OTU15	kt039	1								1	
	OTU16	kt069					1				1	
	OTU17	kt075					2				2	
	OTU18	kt083					1				1	
	OTU19	kt094					1				1	
	OTU20	kt097	1				1				2	
	OTU21	kt108	2		6						8	
	OTU22	kt115		1	2						3	
	OTU23	kt129			1						1	
	OTU24	kt240	1								1	
	OTU25	kt260	2	1			6	15			24	
	OTU26	kt262		1							1	
	OTU27	kt266		1			1	3			5	
	OTU28	kt274		1				1			2	
	OTU29	kt291	1								1	
	OTU30	kt292	1								1	
	OTU31	kt311	1								1	
	OTU32	kt335						1			1	
	OTU33	kt390					4	5			9	
	OTU34	kt393	4				3	3			10	
	OTU35	kt401	1				1	1			3	
	OTU36	kt402	1		1			1			3	
	OTU37	kt405						2			2	
	Total numbers			49	54	39	33	32	118	20	20	365

OTU operational taxonomic unit, *NM* Nitrosopumilus maritimus-like cluster, *WCA* Water Column Cluster A, *WCB* Water Column Cluster B

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

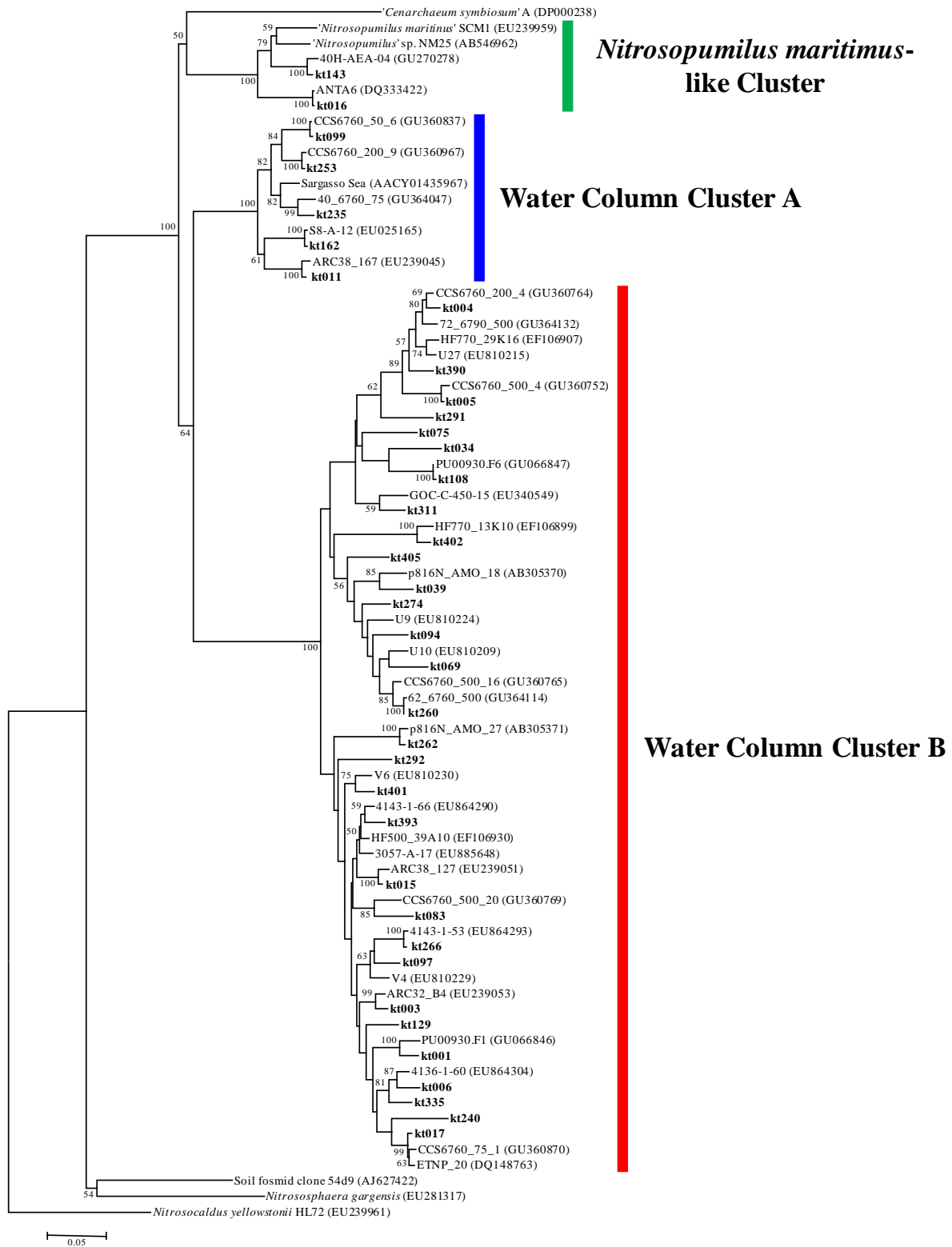


Fig. 3-3 Phylogenetic tree based on archaeal *amoA* sequences (577 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of *amoA* obtained in this study. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 5%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

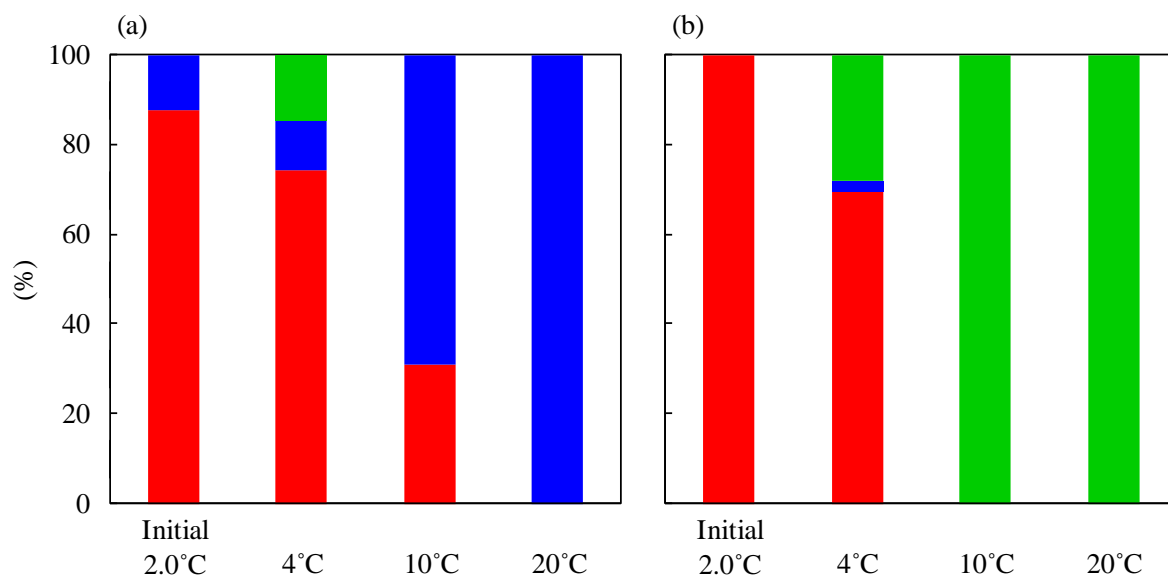


Fig. 3-4 Proportions (%) of archaeal *amoA* sequence types detected in clone libraries. *Nitrosopumilus maritimus*-like cluster (Green), Water Column Cluster A (Blue), and Water Column Cluster B (Red). Bar lengths represent relative abundances at the onset (initial) and at the end of incubations of seawater samples from 500 m (a) and 2,000 m (b) at three different temperatures (4, 10, and 20°C).

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

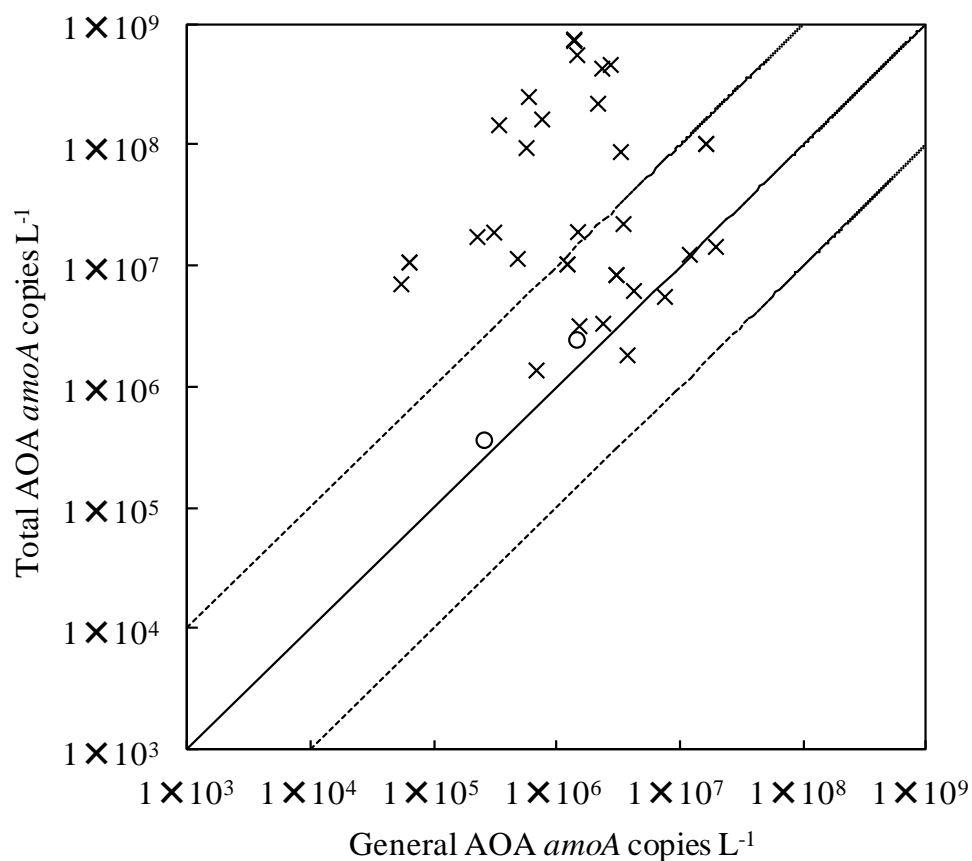
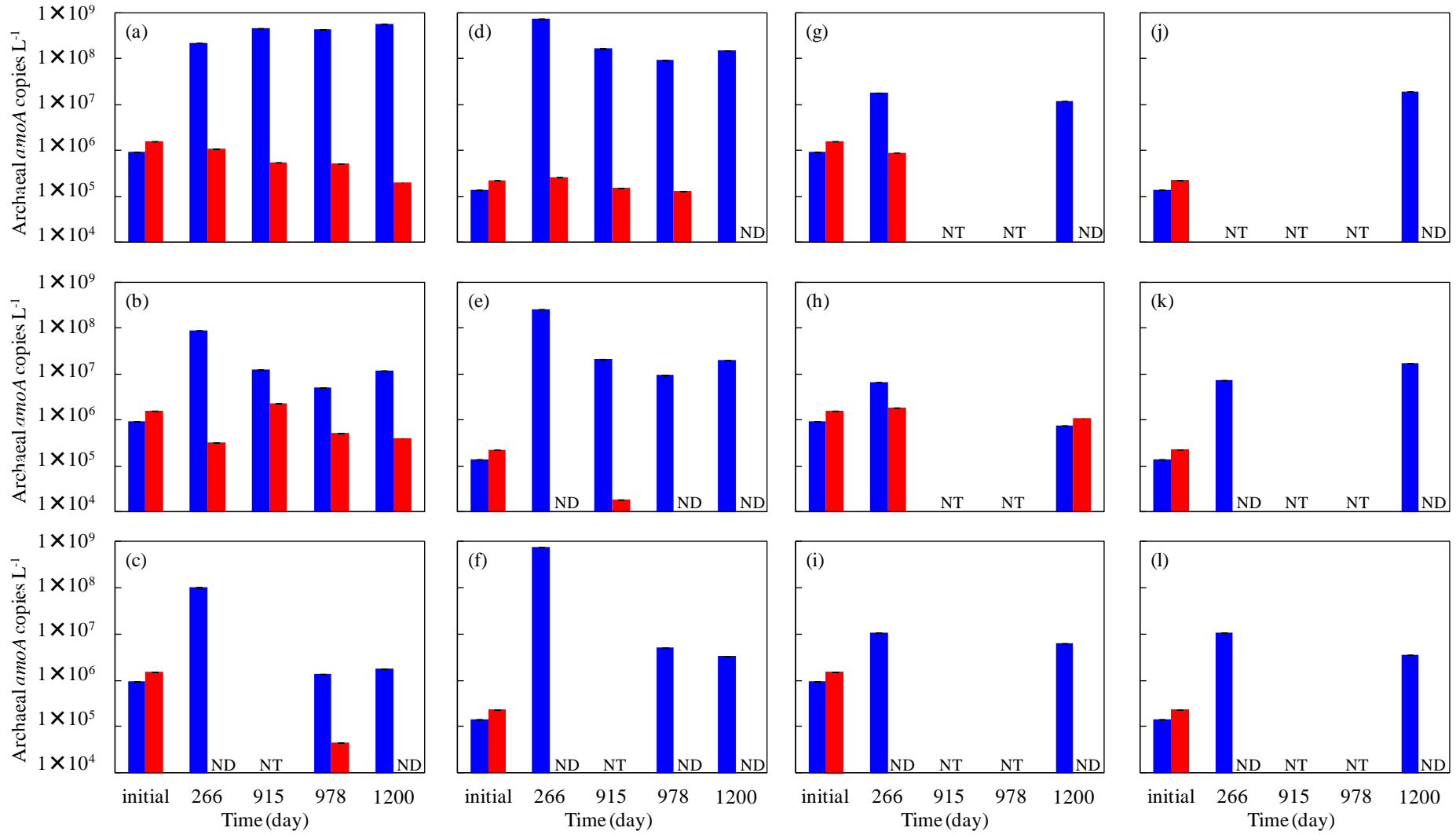


Fig.3-5 Ratio of Total archaeal *amoA* genes (Total AOA) versus General archaeal *amoA* genes (General AOA) in the sample from environmental samples (open circle) ($n = 2$) and enrichment samples (cross) ($n = 34$).

3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化



3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

Fig.3-6 Changing gene abundances during 1,200-day incubations adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of seawater samples collected from 500-m depth and incubated at 4°C (a), 500 m and 10°C (b), 500 m and 20°C (c), 2,000 m and 4°C (d), 2,000 m and 10°C (e), and 2,000 m and 20°C (f) and adding NaNO_2 of seawater samples collected from 500-m depth and incubated at 4°C (g), 500 m and 10°C (h), 500 m and 20°C (i), 2,000 m and 4°C (j), 2,000 m and 10°C (k), and 2,000 m and 20°C (l) (n = 1). Shallow Marine clade (blue), and Deep Marine clade (red). ND, No detected (Detection limits were $< 1.27 \times 10^4$ copies L^{-1} at 266 days and $< 1.03 \times 10^5$ copies L^{-1} at 1200 days). NT, No test.

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

4.1. 序論

既報研究によって、海洋古細菌である Marin Group I (Group I.1a) の一部は、アンモニア酸化能を有するとわかってきた。堆積物や土壌に生息するものも含めて、AOA を含む一群は、古細菌ドメインの第三の門 *Thaumarchaeota* として独立させるべきであるという提案がなされ (Brochier-Armanet et al., 2008)、それを支持する報告がされてきた (Brochier-Armanet et al., advance online publication; Pester et al., 2011; Spang et al., 2010; Walker et al., 2010)。海洋性 AOA としては、*amoA* の配列で分けられた系統群である NM、WCA、WCB の 3 つが知られている。

第 3 章の集積培養によって、古細菌の *amoA* レベルで見た OTU が 1 ないし 2 つしか存在しない培養系を得ることができた。こうした培養系を用いることによって、特定の AOA が属する系統群の 16S rRNA 遺伝子配列を決定することができる (Ando et al., 2009; Santoro and Casciotti, 2011)。培養株のある NM (Könneke et al., 2005) と、集積培養系で同様の解析がなされた WCA (Santoro and Casciotti, 2011) については、すでに 16S rRNA 遺伝子による系統学的位置が示されているが、WCB については未だ分かっていない。本研究も含めアンモニア態窒素を添加した多くの集積培養系では、NM 及び WCA が優占するためと考えられる。本章における研究では、駿河湾だけでなく、様々な海域で得た集積培養系をスクリーニングすることにより、NM と WCA だけでなく、WCB が非常に高い割合で集積された培養系を見出すことができた。本章の研究目的は、これらの集積培養系を用いて、これまで不明であった WCB を含むアンモニア酸化能を有する海洋古細菌群集の系統学的位置を明らかにする事である。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 試料採集

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

海水及び汽水、氷柱試料は相模湾と駿河湾、サロマ湖、大槌湾、北極海で採水した。相模湾の海水試料は、2007年7月にKT07-16次淡青丸航海で、3地点(St.P、T-6、S)から12Lニスキン採水器12本を装着したCTDカラーセル採水器を用いて採水した(Table 4-1)。採水時のAOA群集を調べるために、1Lの海水試料を孔径0.2 µmのヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターにろ過した。核酸抽出までこれらのフィルターを-20°Cで保存した。培養のための海水試料は4°Cで保持し、サンプリング後8日以内に研究室に運び、すぐに基質を添加して集積培養を開始した。駿河湾の海水試料は3章と同じ試料を用いて、解析には3章の培養系も使用した。サロマ湖の汽水試料は、2008年3月に1地点(St.M)で、厚さ38cmの氷に穴を空けて5Lバンドン採水器を用いて採水し、氷柱試料は、同地点で厚さ44cmの氷を円柱状にくり抜いて、その下20cmを採取した(Table 4-1)。採水時のAOA群集を調べるために、0.5Lの汽水試料を孔径0.2 µmのヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターにろ過した。核酸抽出までこのフィルターを-20°Cで保存した。培養のための汽水と氷柱試料は4°Cで保持し、サンプリング後8日以内に研究室に運び、すぐに基質を添加して集積培養を開始した。大槌湾の海水試料は、2009年6月に1地点(St.OB)で、20Lバンドン採水器2本を装着した採水器を用いて採水した(Table 4-1)。採水時のAOA群集を調べるために、5Lの海水試料を孔径0.22 µmのステリベクスGSフィルターユニットにろ過した。核酸抽出までこのフィルターを-20°Cで保存した。培養のための海水試料は10°Cで保持し、基質の添加はせず、すぐに集積培養を開始した。北極海では2009年9月にMR09-03次海洋地球研究船みらい航海で、カナダ海盆の氷縁付近で水深500mと2,000mから12Lニスキン採水器36本を装着したCTDカラーセル採水器を用いて採水した(Table 4-1)。培養実験のための海水試料は4°Cで保存し、研究室に運び、サンプリング後4ヶ月程馴致してから実験に供した。

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

4.2.2. 集積培養

4.2.2.1. 相模湾

海水試料にアンモニア酸化の基質として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含んだATCC1953 培地、または亜硝酸酸化の基質として NaNO_2 を含んだATCC481 培地を添加し、 10°C または 20°C ($n=1$) に保持、暗条件で 1,426 日間の集積培養を行った (Table 4-2)。スクリーキャップをした 1 L ポリプロピレンボトルで培養を行った。一部の海水試料は、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターでろ過し、ろ液を培養に供した。スクリーキャップをした 1 L ガラスボトルで培養を行った。培養開始時に基質を添加した後、培養期間中に再び基質添加を行った。基質を加えるタイミングは、ボトル中の無機態窒素の増減をモニタリングする事で決定し、添加した基質が検出されなくなった系には新たな添加を行った。また、527 日目以降は基質の添加を行わなかった。無機態窒素のモニタリングに合わせて、30-50 mL の海水試料を核酸抽出のために培養系から分取し、海水試料中の微生物細胞を遠心 ($15,300 \times g$, 30 分、 4°C) によって集めた。核酸抽出まで菌体ペレットは -20°C で保存した。

4.2.2.2. 駿河湾

3 章で得られた 12 個の集積培養系、及び海水試料を孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターでろ過し、ろ液を培養した 12 個の系を使用した (Table 4-2)。スクリーキャップをした 1 L ガラスボトルで培養を行った。その他の条件は 3.2.3 と同様である。

4.2.2.3. サロマ湖

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

汽水試料と融解した氷柱試料にアンモニア酸化の基質として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または亜硝酸酸化の基質として NaNO_2 を添加し、 4°C ($n = 1$) に保持、震盪せずに暗条件で 1,190 日間の集積培養を行った (Table 4-2)。スクリーキャップをした 1 L ポリプロピレンボトルで培養を行った。一部の海水試料は、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターでろ過し、ろ液を培養に使用した。スクリーキャップをした 1 L ガラスボトルで培養を行った。培養開始時に基質を添加した後、培養期間中に再び基質添加を行った。基質を加えるタイミングは、ボトル中の無機態窒素の増減をモニタリングする事で決定し、添加した基質が検出されなくなった系には新たな添加を行った。また、291 日目以降は基質の添加を行わなかった。無機態窒素のモニタリングに合わせて、30 mL の汽水試料と融解した氷柱試料を核酸抽出のために培養系から分取し、海水中の微生物細胞を遠心 ($15,300 \times g$, 30 分、 4°C) によって集めた。核酸抽出まで菌体ペレットは -20°C で保存した。

4.2.2.4. 大槌湾

海水試料に基質は添加せず、 10°C ($n = 1$) に保持、震盪せずに暗条件で 743 日間の集積培養を行った (Table 4-2)。一部の海水試料は、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のヌクレポアポリカーボネートメンブレンフィルターでろ過し、ろ液を培養に使用した。スクリーキャップをした 1 L ガラスボトルで培養を行った。培養開始から 743 日目に、30 mL の海水試料を核酸抽出のために培養系から分取し、海水中の微生物細胞を遠心 ($15,300 \times g$, 30 分、 4°C) によって集めた。核酸抽出まで菌体ペレットは -20°C で保存した。

4.2.2.5. 北極海

馴致した北極海の海水試料を Ultrafiltration membranes (material, polyethersulfone;

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

filter code, PBCC; diameter, 90 mm; NMWL, 5,000; Milliore, Billerica, MA, USA)を用いて Inoue et al. (2007) の方法に従い濃縮した後、基質を添加して振盪せずに暗所、4°C ($n = 1$) で 521 日間の集積培養を行った (Table 4-2)。スクリーキャップをした 50 mL ポリプロピレンコニカルチューブで培養を行った。0 日目は 5 mL の試料を核酸抽出のために遠心後 (6,300× g , 30 分、4 °C)、521 日目は 1 mL の試料を遠心した (15,300× g , 30 分、4 °C)。核酸抽出まで菌体ペレットは -20 °C で保存した。

4.2.3. 核酸抽出

核酸はヌクレオアポリカーボネートメンブレンフィルターと菌体ペレットから、2.2.3 の群集構造解析用の核酸と同様の方法で、ステリベクス GS フィルターユニットから 2.2.3 の現存量解析用の核酸と同様の方法で抽出した。

4.2.4. DNA 濃度の測定

2.2.4 と同様に測定した。

4.2.5. Q-PCR

2.2.5 と同様に測定した。Shallow Marine cladeの *amoA* と、Deep Marine cladeの *amoA*、General AOAの *amoA*、Marin Group Iの 16S rRNA 遺伝子アッセイの PCR 効率、それぞれ 90.7-96.5% と、84.2-95.2%、87.6-92.5%、95.4-97.7% で、全てのアッセイで r^2 値は少なくとも 0.975 であった。

4.2.6. 群集構造解析

得られた DNA は、古細菌の *amoA* と 16S rRNA 遺伝子、細菌の 16S rRNA 遺伝子のク

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

ローンライブラリー作成のために PCR 増幅を行った。PCR 増幅は 2.2.6 と同様に行った。PCR は古細菌の *amoA* を対象としたユニバーサルプライマーセットである Arch-amoAF と Arch-amoAR (Francis et al., 2005)、古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象としたユニバーサルプライマーセットである Ar20F と U1390R (DeLong et al., 2006)、細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象としたユニバーサルプライマーセットである 27F と 1492R (DeLong et al., 1992 modified) を使い、既報とメーカー指定の方法に従って行った。クローニングとシーケンス、遺伝子配列間の相同性検索、系統解析は 2.2.6 と同様に行った。

4.3. 結果

4.3.1. 集積培養系の選抜

環境試料と集積培養では、Total AOA と General AOA が共に検出された試料において(それぞれ $n = 5$ と $n = 26$)、Total AOA の現存量は General AOA よりそれぞれ 1.47-101 倍と 0.51-547 倍の範囲で高く、平均で 21.6 倍と 82.7 倍、中央値で 1.76 倍と 2.53 倍高かった (Fig.4-1)。そこで、本章では高い現存量が得られた Total AOA を AOA の現存量とした。

相模湾と駿河湾、サロマ湖、大槌湾、北極海から得られた試料で作成した 84 個の集積培養系のうち、現存している 76 個の系で各遺伝子の現存量を測定した。AOA に占める WCB の割合は、0.03 - 85.81% であり、最も WCB の割合が高かったのは北極海由来の ART-22 であった (Table 4-3)。

4.3.2. Shallow Marine clade の集積培養系

駿河湾湾口の水深 500 m と 2,000 m の海水試料を、20°C、暗条件で 266 日間にわた

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

って集積した培養系(それぞれKT-130とKT-132)は、*amoA*配列の群集構造解析(カットオフ値2%)によると、それぞれWCAに属するクローンからなる1 OTU(代表クローンはkt041)と、NMに属するクローンからなる2 OTUs(代表クローンはkt167とkt166)になっていた(Fig.4-2、Table 4-4)。それらのOTUsのNMに属する*Ca. N. maritimus* SCM1株(Könneke et al., 2005)に対する*amoA*配列の相同性(594 bp)は系統群ごとに80%と92 - 93%、WCAに属するCN25(Santoro and Casciotti, 2011)に対する*amoA*配列の相同性(594 bp)は系統群ごとに91%と79 - 82%であった。KT-130とKT-132における16S rRNA遺伝子配列の群集構造解析(カットオフ値2%)では、全てのクローンが*Thaumarchaeota*のGroup I.1aに属する1 OTU(代表クローンはkt719)にクラスタリングされ、そのOTUのSCM1株に対する16S rRNA遺伝子配列の相同性(1,307 bp)は98%、CN25に対する16S rRNA遺伝子配列の相同性(1,307 bp)は93%であった(Fig.4-3、Table 4-5)。

培養前と培養後でTotal AOA/General AOAとAOA / Marine Group Iが、KT-130はそれぞれ1.76から6.52と0.17から0.97、KT-132はそれぞれ1.47から558.82と0.08から5.42になった。

Shallow Marine clade用のプライマーセットによる群集構造解析によると、KT-130では、培養前に47クローン中38クローンがNMに、8クローンがWCA(WCA1)系統群に、1クローンがWCA2系統群に属し、培養後に22クローン中17クローンがNMに、5クローンがWCA1系統群に属した(Fig.4-4、Table 4-6)。培養後のOTUsは、SCM1株に対する*amoA*配列の相同性(295 bp)が系統群ごとに94 - 97%と88%、CN25に対する*amoA*配列の相同性(295 bp)が系統群ごとに85 - 89%と94%であった。KT-132では、培養前に47クローン中37クローンがNMに、8クローンがNMの属するSediment cluster Aの1系統群であるSediment cluster A-1系統群(Nakagawa et al.,

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

2007) に、2 クローンが WCA に属し、培養後に 22 クローン全てが NM に属した (Fig.4-4、Table 4-6)。培養後の OTUs は、SCM1 株に対する *amoA* 配列の相同性 (295 bp) が 94 - 96%、CN25 に対する *amoA* 配列の相同性 (295 bp) が 85 - 88% であった。

細菌群集構造解析により、KT-130 では培養前も後も *Nitrospina* 属に近縁なクローンが得られたが、KT-132 では培養前に *Nitrospina* 属に近縁なクローンが、培養後に *Nitrospira* 属に近縁なクローンが得られた (Table 4-11)。

4.3.3. Deep Marine clade の集積培養系

北極海カナダ海盆で得られた ART-22 は、WCB の割合が 85.8% と最も高かったので、*amoA* 及び 16S rRNA 遺伝子の群集構造解析を行った。この培養系は、水深 500 m の海水に亜硝酸態窒素添加し、4°C、暗条件で 521 日間にわたって集積培養したものであった。解析の結果、*amoA* 配列では WCA に属する 3 クローンからなる 2 OTUs と、WCB に属する 20 クローンからなる 8 OTUs になっていた (Fig.4-2、Table 4-9)。それらの OTUs は系統群ごとに 79 - 80% と 68 - 73% の相同性 (594 bp) で SCM1 株に近縁で、95 - 97% と 68 - 75% の相同性 (594 bp) で CN25 に近縁であった。そして、16S rRNA 遺伝子配列は、3 OTUs になっており、すべて Group I.1a に属していた (Fig.4-3、Table 4-10)。それらの OTUs は 92-93% の相同性 (1,307 bp) で SCM1 株に近縁で、91 - 92% の相同性 (1,307 bp) で CN25 に近縁であった。

ART-22 は、培養前と培養後で Total AOA/General AOA が 2.39 から 1.76、AOA / Marine Group I が 0.18 から 0.23 になった。

4.4. 考察

北極海で得られた培養系を用いた解析の結果、WCB に属する AOA の 16S rRNA 遺伝

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

子における系統学的位置が推定できた (Fig.4-5)。WCB に属する AOA は、NM に属する *Candidatus* N. maritimus SCM1 株 (Könneke et al., 2005)、WCA に属する CN25 (Santoro and Casciotti, 2011) と、*amoA* 配列における系統関係と同様に、16S rRNA 遺伝子配列においても異なる系統群として区別できた。その 16S rRNA 遺伝子配列における相同性は NM と WCA に対して 93% 以下であり、WCB の AOA は NM、WCA と種レベル、あるいは属レベル以上に異なる古細菌であると示唆された。Swan et al. (2011) は、2 地点の亜熱帯循環域で原核生物を対象にシングルセルソーティングと全ゲノム増幅を行い、*amoA* を含んでいる Group I.1a の増幅ゲノム (SCGC AAA007-O23) が得られたと報告した。このゲノムの公開配列情報から、16S rRNA 遺伝子及び *amoA* 配列を取得し解析を行ったところ、*amoA* 配列は WCB に属し (Fig.4-2)、その相同性 (594 bp) が ART-22 の WCB に属する OTUs と 84 - 97%、16S rRNA 遺伝子配列は Group I.1a に属し (Fig.4-6)、その相同性 (435 bp) が ART-22 の OTUs と 98 - 100% であった。

WCA と NM に属する AOA がそれぞれ集積されていた KT-130 と KT-132 から得られた 16S rRNA 遺伝子配列は、kt719 というクローンに代表される同一の OTU となり、Group I.1a に属していた。よって、WCA と NM は 16S rRNA 遺伝子において同一の系統群に属する事が示唆された。しかし、Total AOA/General AOA の値が培養後に高くなったので、General AOA 用のプライマーセットでは群集構造を正しく評価できていない可能性が示唆された。そこで、定量 PCR に使用した Shallow Marine clade 用のプライマーセットを使い、これらの集積培養系の *amoA* 配列に基づく群集構造を再解析したところ、KT-130 と KT-132 は共に NM が優占しているとわかった。特に、KT-130 において、初めに行った General AOA 用プライマーセットによる解析では、WCA のみが検出されたが、Shallow Marine clade 用のプライマーセットによる再解析によって WCA よりも NM が優占しているとわかった。さらに、General AOA 用のプライマーセットを使った解析では、一部

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

の AOA を検出できていない可能性が明らかになった。つまり、この集積培養系から得られた 16S rRNA 遺伝子配列は、WCA ではなく NM に由来するものであると確かめられた。また、Santoro and Casciotti (2011) は、WCA に属する AOA の 3 つの集積培養 (CN25、CN75、CN150) を得て (Fig.4-2)、全ての AOA の 16S rRNA 遺伝子における系統学的位置が Group I.1a であると報告した (Fig.4-3) (Santoro and Casciotti, 2011)。しかし、CN150 という培養系は他の 2 つの培養系と 16S rRNA 遺伝子の系統樹上で異なる位置に存在し (Fig.4-5)、SCM1 株と同じ系統群に属していた (Santoro and Casciotti, 2011)。彼女らの *amoA* 解析においても、General AOA 用プライマーセットが使用されており、CN150 に共存する NM の AOA の存在を見落としている可能性が高い。よって本研究と同様に、CN150 の集積培養系から検出された 16S rRNA 遺伝子配列は、WCA ではなく NM の AOA に由来すると考えられる。

既報研究から、海洋水柱では Shallow Marine clade のうち WCA が優占していると考えられてきたが、実際は NM が優占している可能性が高い。NM を含む Sediment cluster は漸深層・深海層の水柱や堆積物からも検出されている (Dang et al., 2010; Dong and Shao, unpublished; Nakagawa et al., 2007; Nunoura et al., unpublished)。KT-130 と KT-132 で、培養前の海水試料について Shallow Marine clade の定量 PCR 産物からクローン解析を行った所、それぞれ 80.9% と 95.7% のクローンが NM もしくは Sediment cluster A-1 系統群であった (Table 4-6)。この結果は、表層海水試料で行われたメタゲノム解析で得られた 16 個の *amoA* 配列のうち 13 個が NM で、3 個が WCA であった報告からも支持される (Tully et al., 2012)。さらに、本研究で得られた 3 つの培養系において、培養前の海水試料から検出された全ての 16S rRNA 遺伝子配列は、WCA に属する CN25 (Santoro and Casciotti, 2011) と異なる系統群に属した。

KT-130 から得られた 1 クローン (kt837) は、WCA に近縁な別系統群に属していた

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

(Fig.4-4)。この系統群は、従来からの WCA を WCA1 として WCA2 と呼ばれており (Moraru et al., 2010)、近縁なクローン GOC-G-450-22 (EU340509) と GOC-G-450-23 (EU340510) がカリフォルニア湾の水深 450 m から得られている (Beman et al., 2008)。

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-1 Data of sampling stations in the Sagami Bay, Otsuchi Bay.

Cruise / Sampling location name	Sample type	Station name	Collected date (mon/day/yr)	Collected time (hh:mm)	Longitude	Latitude	Max depth (m)	Collected depth (m) / Temperature (°C)
KT07-16	Sea-water	St.P	7/11/2007	09:33-09:57	139°E 11' 59"	34°N 36' 00"	1,517	500 / 6.0
		St.T-6	7/10/2007	12:59-14:33	139°E 29' 34"	34°N 24' 00"	2,363	500 / 6.0
		St.S	7/12/2007	18:10-20:14	138°E 19' 51"	34°N 03' 00"	3,599	1,500 / 2.5
Saloma Lake	Brackish-water	St.M	3/4/2008	9:29	143°E 34' 25"	44°N 04' 13"	7	3 / -0.4
	Ice cylinder			11:29				—
Otsuchi Bay	Sea-water	St.OB	6/1/2009	—	141°E 58' 51"	39°N 21' 26"	66	55 / 13.9
MR09-03	Sea-water	St.36	9/21/2009	4:23	151°W 40' 19"	78°N 29' 97"	3,837	500 / 0.85 2,000 / -0.4

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-2 List of enrichment cultures and culture conditions.

Culture name	Cruise / Sampling location name	Station name	Sample type	Collected depth (m)	Preparation	Culture condition						Remarks column
						Volume (mL)	Temperature (°C)	Shaking	Substrate name	Nitrogen source	Final concentration (μM)	
KT-004	KT07-16	P	Sea-water	500	—	500	10	Shake culture	ATCC481	NaNO ₂	30.0	Changing static culture at 72 days
KT-004a	KT07-16	P	Sea-water	500	< 10.0	500	10	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-004 at 166 days
KT-004b	KT07-16	P	Sea-water	500	—	500	10	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-004a at 492 days
KT-006	KT07-16	T-6	Sea-water	500	—	500	10	Shake culture	ATCC1953	(NH ₄) ₂ SO ₄	22.7	Changing static culture at 72 days
KT-006a	KT07-16	T-6	Sea-water	500	< 10.0	500	10	Static culture	ATCC1953	(NH ₄) ₂ SO ₄	45.4	Inoculating KT-006 at 166 days
KT-006b	KT07-16	T-6	Sea-water	500	—	500	10	Static culture	ATCC1953	(NH ₄) ₂ SO ₄	45.4	Inoculating KT-006a at 492 days
KT-006c	KT07-16	T-6	Sea-water	500	< 0.2	500	10	Static culture	ATCC1953	(NH ₄) ₂ SO ₄	45.4	Inoculating KT-006a at 492 days
KT-009	KT07-16	T-6	Sea-water	500	—	500	10	Shake culture	ATCC481	NaNO ₂	30.0	Changing static culture at 72 days
KT-009a	KT07-16	T-6	Sea-water	500	< 10.0	500	10	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-009 at 166 days
KT-009b	KT07-16	T-6	Sea-water	500	—	500	10	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-009a at 492 days
KT-021	KT07-16	P	Sea-water	500	< 0.2	1000	20	Shake culture	ATCC1953	(NH ₄) ₂ SO ₄	11.4	Changing static culture at 72 days
KT-021a	KT07-16	P	Sea-water	500	—	1000	20	Static culture	ATCC1953	(NH ₄) ₂ SO ₄	11.4	Inoculating KT-021 at 72 days
KT-021b	KT07-16	P	Sea-water	500	< 0.4	500	20	Static culture	ATCC1953	(NH ₄) ₂ SO ₄	45.4	Inoculating KT-021 at 166 days
KT-021c	KT07-16	P	Sea-water	500	< 0.4	500	20	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-021 at 166 days
KT-021d	KT07-16	P	Sea-water	500	< 0.2	1000	20	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-021c at 492 days
KT-022	KT07-16	P	Sea-water	500	< 0.2	1000	20	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	12.0	Changing static culture at 72 days
KT-022a	KT07-16	P	Sea-water	500	< 0.4	500	20	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-022 at 166 days
KT-022b	KT07-16	P	Sea-water	500	< 0.2	1000	20	Static culture	ATCC481	NaNO ₂	60.0	Inoculating KT-022a at 492 days
KT-122	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-123	KT08-02	St.5	Sea-water	500	< 0.2	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-124	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-125	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	< 0.2	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-126	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	10	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-127	KT08-02	St.5	Sea-water	500	< 0.2	500	10	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-128	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	10	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-129	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	< 0.2	500	10	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-130	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	20	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-130a	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	20	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	Inoculating KT-130 at 266 days
KT-131	KT08-02	St.5	Sea-water	500	< 0.2	500	20	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-132	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	20	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-132a	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	20	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	Inoculating KT-132 at 266 days
KT-133	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	< 0.2	500	20	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
KT-134	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-135	KT08-02	St.5	Sea-water	500	< 0.2	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Culture name	Cruise / Sampling location name	Station name	Sample type	Collected depth (m)	Preparation	Culture condition						Remarks column
						Volume (mL)	Temperature (°C)	Shaking	Substrate name	Nitrogen source	Final concentration (μM)	
KT-136	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-137	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	< 0.2	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-138	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	10	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-138a	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	10	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	Inoculating KT-138 at 301 days
KT-139	KT08-02	St.5	Sea-water	500	< 0.2	500	10	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-140	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	10	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-141	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	< 0.2	500	10	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-142	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	20	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-142a	KT08-02	St.5	Sea-water	500	—	500	20	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	Inoculating KT-142 at 266 days
KT-143	KT08-02	St.5	Sea-water	500	< 0.2	500	20	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-144	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	20	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
KT-144a	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	—	500	20	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	Inoculating KT-144 at 266 days
KT-145	KT08-02	St.5	Sea-water	2000	< 0.2	500	20	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
SAL-005	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	—	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0	
SAL-006	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	—	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
SAL-007	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	—	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0	
SAL-008	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	—	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
SAL-009	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	—	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0	
SAL-010	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	—	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
SAL-011	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	< 0.2	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0	
SAL-012	Saloma lake 2008	St.M	Brackish-water	3	< 0.2	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
SAL-013	Saloma lake 2008	St.M	Ice cylinder	—	—	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0	
SAL-014	Saloma lake 2008	St.M	Ice cylinder	—	—	500	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
SAL-015	Saloma lake 2008	St.M	Ice cylinder	—	< 0.2	500	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	
SAL-016	Saloma lake 2008	St.M	Ice cylinder	—	< 0.2	200	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	50.0	
OB-1	Otsuchi Bay 2009	St.OB	Sea-water	55	—	1000	10	Static culture	—	—	—	
OB-2	Otsuchi Bay 2009	St.OB	Sea-water	55	< 0.2	1000	10	Static culture	—	—	—	
ART-17	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	1000.0	Adding LP
ART-18	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	1000.0	Adding LP
ART-19	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	Adding LP and CY
ART-20	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	Adding LP
ART-21	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	1000.0	
ART-22	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	1000.0	
ART-23	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	Adding CY

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Culture name	Cruise / Sampling location name	Station name	Sample type	Collected depth (m)	Preparation	Culture condition						Remarks column
						Volume (mL)	Temperature (°C)	Shaking	Substrate name	Nitrogen source	Final concentration (μM)	
ART-24	MR09-03	St.36	Sea-water	500	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	
ART-25	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	1000.0	Adding LP
ART-26	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	1000.0	Adding LP
ART-27	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	Adding LP and CY
ART-28	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	Adding LP
ART-29	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	1000.0	
ART-30	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	100 mM NaNO ₂	NaNO ₂	1000.0	
ART-31	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	Adding CY
ART-32	MR09-03	St.36	Sea-water	2000	> 5kD	10	4	Static culture	—	—	—	

LP Lysozume (150 μg mL⁻¹) and Polymyxin (200 μg mL⁻¹), CY Casamino acids and Yeast extract (0.1 g L⁻¹ each)

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

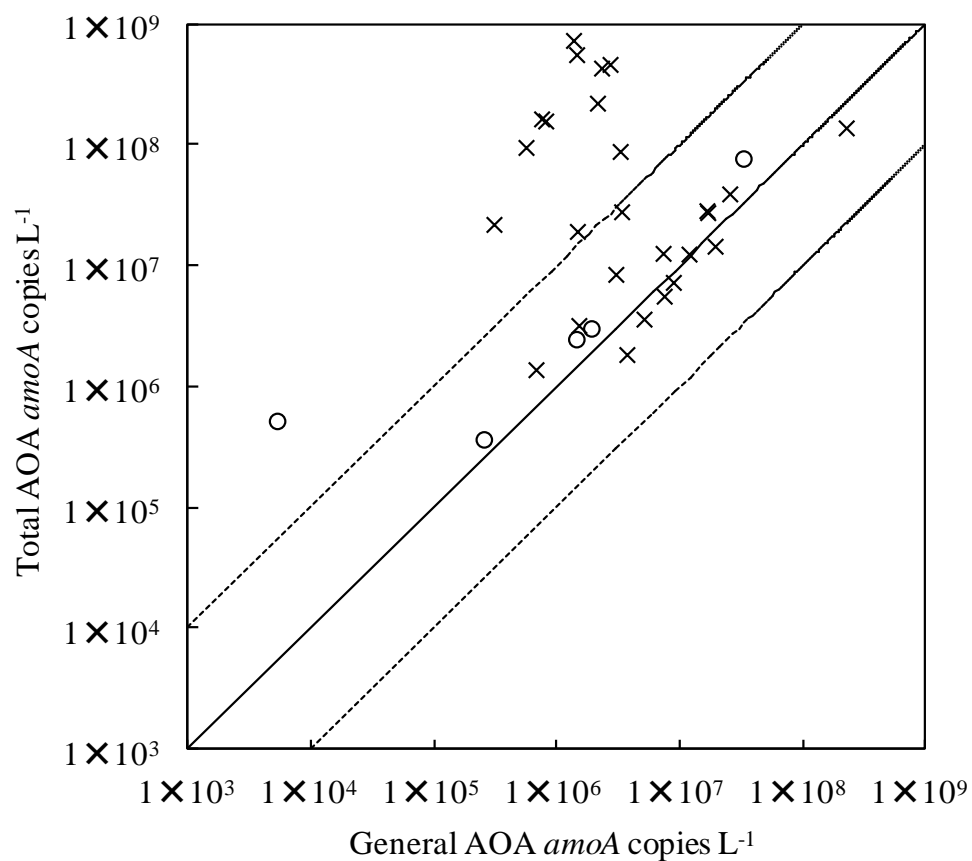


Fig.4-1 Ratio of Total archaeal *amoA* genes (Total AOA) versus General archaeal *amoA* genes (General AOA) in the sample from environmental samples (open circle) ($n = 5$) and enrichment samples (cross) ($n = 26$).

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-3 Gene abundances of ambient seawater and enrichment cultures.

Sample / Culture name	Elapsed days	Ambient Seawater / Enrichment culture (10^5 copies L^{-1})								
		Shallow Marine clade		Deep Marine clade		WCB / Total AOA	General AOA		Marine Group I	
		Average	\pm SD	Average	\pm SD		Average	\pm SD	Average	\pm SD
St.P depth 500 m	—	11.7820	0.0946	18.6961	1.4072	0.6134	18.7476	1.3458	242.3904	9.2787
KT-004	166	1343.9368	7.5174	ND	—	—	4.4462	0.1260	455.4616	5.4660
KT-004a	254	8.3970	0.5462	ND	—	—	ND	—	4.0759	0.5157
	492	71.7340	3.6739	0.0805	0.0128	0.0011	ND	—	28.3565	3.0131
	1426	991.2433	7.7446	ND	—	—	1.7839	0.3066	198.8270	7.4069
KT-004b	1426	176.5523	5.2602	ND	—	—	6.9955	0.2581	59.5094	5.8346
KT-006	166	6875.2235	17.8856	ND	—	—	16.2783	1.0135	1915.2288	18.6323
KT-006a	254	12255.7346	2849.2577	ND	—	—	43.8306	2.0043	2841.9045	406.4837
	492	1583.9306	51.0744	0.4249	0.1098	0.0003	7.9745	0.3337	494.8561	16.2567
	1426	132.9376	6.7256	ND	—	—	40.0182	1.9690	234.0588	1.7898
KT-006b	1141	246.8833	2.6306	ND	—	—	32.5960	3.2023	242.9374	7.6706
	1426	492.8321	4.2995	ND	—	—	72.2938	2.9294	500.0137	11.9838
KT-006c	1141	0.1324	0.1165	ND	—	—	ND	—	ND	—
	1426	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—
KT-009	166	280.9213	0.8042	0.3265	0.3671	0.0012	33.0600	2.4440	243.1504	5.2401
KT-009a	254	2458.8433	672.4591	ND	—	—	9.4379	3.4396	624.9954	147.5542
	492	220.6592	3.6817	0.3798	0.0807	0.0017	3.0249	0.0476	94.8297	5.2880
	1426	127.5636	1.2953	ND	—	—	124.4938	3.4658	671.9034	18.5711
KT-009b	1426	73.2873	1.1902	ND	—	—	65.4190	3.8828	366.5529	12.4356
KT-021	99	8.2840	1.6099	ND	—	—	ND	—	2.4103	0.3334
	166	2506.2593	25.8087	ND	—	—	4.3595	0.1385	516.1682	5.9298

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Sample / Culture name	Elapsed days	Ambient Seawater / Enrichment culture (10^5 copies L^{-1})									
		Shallow Marine clade		Deep Marine clade		WCB / Total AOA	General AOA		Marine Group I		
		Average	\pm SD	Average	\pm SD		Average	\pm SD	Average	\pm SD	
KT-021b	254	55006.7370	10233.1730	ND	—	—	135.5592	12.0004	17218.7538	3980.5447	
	1427	4652.4900	81.5640	ND	—	—	4.8992	0.2548	905.6803	29.4830	
	254	3875.3422	296.1618	ND	—	—	6.9155	0.0113	1101.8468	68.3370	
	1427	212.9271	10.1509	ND	—	—	ND	—	49.7333	0.3745	
KT-021c	254	7790.8335	145.1434	ND	—	—	9.7374	2.1458	1917.6046	14.0668	
	492	723.2954	5.6384	ND	—	—	1.0749	0.0672	161.7991	4.4027	
	1427	341.4790	6.1180	ND	—	—	ND	—	84.0236	6.4167	
KT-021d	1427	10.5027	0.6780	ND	—	—	ND	—	1.9056	0.2494	
KT-022	166	37.3223	1.1328	0.2239	0.1315	0.0060	ND	—	54.5087	0.4351	
	254	21.6100	0.2818	ND	—	—	ND	—	3.4171	0.8048	
	1427	30.5789	0.0830	ND	—	—	ND	—	6.1096	0.5132	
KT-022a	254	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—	
	492	6.5276	0.6909	ND	—	—	ND	—	2.3152	0.3403	
	1427	101.7142	0.0957	ND	—	—	ND	—	70.4967	1.0468	
KT-022b	1427	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—	
St.5 depth 500 m > 0.2	—	9.2694	0.1051	15.5741	0.1324	0.6269	14.1519	0.8006	187.0963	18.5493	
KT-122	266	2213.6745	12.0884	10.8276	0.2244	0.0049	21.0299	0.3941	524.2516	7.0948	
	915	4647.8895	35.8400	5.3919	0.2633	0.0012	26.6245	0.9904	1923.8711	32.8185	
	978	4332.8253	62.7306	5.2718	0.2321	0.0012	22.7189	0.4095	1829.0795	132.3691	
	1200	5600.1636	236.7741	1.9862	0.2671	0.0004	14.2353	1.5807	1222.3307	30.5368	
St.5 depth 500 m 0.2 - 0.05	—	ND	—	0.0009	0.0002	—	ND	—	0.0209	0.0108	

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Sample / Culture name	Elapsed days	Ambient Seawater / Enrichment culture (10^5 copies L ⁻¹)								
		Shallow Marine clade		Deep Marine clade		WCB / Total AOA	General AOA		Marine Group I	
		Average	± SD	Average	± SD		Average	± SD	Average	± SD
KT-123	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	3.2181	0.3318
St.5 depth 2,000 m	—	1.4147	0.0318	2.2694	0.0207	0.6160	2.5010	0.0885	47.5942	0.2952
KT-124	266	7343.6498	17.2621	2.5488	0.2849	0.0003	13.4298	0.0478	1685.3026	9.6264
	915	1647.3406	8.8167	1.5108	0.1306	0.0009	7.3856	0.5098	731.9909	15.6719
	978	956.0145	19.6246	1.3324	0.6569	0.0014	5.5123	0.6807	487.8108	21.4167
	1200	1477.7417	4.8902	ND	—	—	3.3012	0.3759	278.5520	3.2798
KT-125	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	0.3057	0.0628
KT-126	266	883.3737	4.0146	3.2441	0.1692	0.0037	32.1966	1.5412	309.6876	6.5011
	915	123.0138	7.2590	22.8711	1.6110	0.1568	190.4872	17.8203	1227.6509	59.8859
	978	51.1073	5.8267	5.2237	0.4674	0.0927	73.4197	4.3695	430.8116	16.0551
	1200	121.5367	13.1619	4.0455	0.3738	0.0322	116.9090	4.6226	530.2029	13.7394
KT-127	266	880.3191	7.1318	ND	—	—	1.4468	0.0538	106.9751	1.8497
	915	1375.7150	149.4753	13.0192	20.8649	0.0094	2221.7597	411.3016	12536.4458	524.1287
	1200	2014.7347	29.8310	ND	—	—	1196.8607	33.5145	7063.6073	65.7932
KT-128	266	2527.5279	12.1958	ND	—	—	5.7637	0.0875	766.3550	9.8172
	915	212.6943	9.2053	0.1875	0.1062	0.0009	ND	—	119.2179	5.4850
	978	95.6387	7.5192	ND	—	—	ND	—	65.2639	6.0495
	1201	196.6568	14.9552	ND	—	—	ND	—	40.5175	1.6948
KT-129	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	0.5171	0.1142
KT-130	266	1034.6503	7.7890	ND	—	—	158.7271	0.5783	1071.5421	18.7274
	978	13.4305	0.9746	0.4610	0.4080	0.0332	6.6479	0.5513	39.5762	1.8525

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Sample / Culture name	Elapsed days	Ambient Seawater / Enrichment culture (10^5 copies L^{-1})								
		Shallow Marine clade		Deep Marine clade		WCB / Total AOA	General AOA		Marine Group I	
		Average	\pm SD	Average	\pm SD		Average	\pm SD	Average	\pm SD
KT-130a	1201	18.2174	1.3842	ND	—	—	ND	—	5.0166	0.5751
	915	250.5214	1.6756	ND	—	—	ND	—	337.1475	8.2305
KT-131	1201	225.2314	1.8416	ND	—	—	33.8274	3.7254	365.7012	6.0799
	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—
KT-132	266	7515.1542	49.5521	ND	—	—	13.4484	0.2643	1387.1550	6.5218
	978	50.5348	1.2684	ND	—	—	ND	—	21.1082	1.5304
KT-132a	1201	34.3720	0.2833	ND	—	—	ND	—	5.2956	1.0313
	915	193.8417	3.3831	ND	—	—	ND	—	69.1398	1.4105
KT-133	1201	139.1106	2.5644	ND	—	—	ND	—	36.8268	3.2138
	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—
KT-134	266	184.6596	3.6045	8.7009	0.5262	0.0450	14.4412	0.5841	149.0499	2.4521
	1200	116.0835	2.0825	ND	—	—	4.6786	0.4166	35.6790	1.6361
KT-135	1200	0.3905	0.1051	ND	—	—	ND	—	ND	—
KT-136	1200	191.6259	7.0427	ND	—	—	3.0110	0.4394	51.2553	3.3190
KT-137	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	0.8935	0.5600
KT-138	266	67.2261	1.2173	18.1259	0.4425	0.2124	29.6551	0.7738	223.7989	3.4178
	1201	7.6946	0.9533	10.8333	1.1262	0.5847	36.4781	0.7901	195.3483	5.1001
KT-138a	1201	24.6356	1.2589	7.6024	1.3343	0.2358	14.8375	0.1955	170.6811	1.8046
KT-139	1200	7.4606	1.4372	ND	—	—	8.8580	0.1509	29.5435	2.9345
KT-140	266	71.6375	1.5358	ND	—	—	0.5300	0.0454	16.4991	1.3159
	1201	176.0418	3.4769	ND	—	—	2.2006	0.3375	33.6304	2.3299

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Sample / Culture name	Elapsed days	Ambient Seawater / Enrichment culture (10^5 copies L ⁻¹)								
		Shallow Marine clade		Deep Marine clade		WCB / Total AOA	General AOA		Marine Group I	
		Average	± SD	Average	± SD		Average	± SD	Average	± SD
KT-141	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	0.7124	0.4737
KT-142	266	104.5981	0.2294	ND	—	—	11.8633	1.5335	65.9317	2.9275
	1201	63.0337	2.6596	ND	—	—	41.1295	0.6197	166.8490	1.6706
KT-142a	1201	33.8006	1.0532	ND	—	—	23.1379	0.4038	157.0250	17.5273
KT-143	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—
KT-144	266	108.4335	0.4720	ND	—	—	0.6176	0.0367	22.9324	0.7022
	1201	36.2268	4.5158	ND	—	—	ND	—	4.5811	0.2232
KT-144a	1201	0.8504	0.2997	ND	—	—	ND	—	ND	—
KT-145	1200	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—
Saloma lake 2008 St.M Brackish-water		5.2223	0.0123	0.0129	0.0018	0.0025	0.0520	0.0229	ND	—
SAL-005	1190	93.3450	20.3411	ND	—	—	ND	—	19.2914	3.2876
SAL-006	1190	125.2948	1.6620	ND	—	—	2.7040	0.3425	46.3760	4.4652
SAL-007	1190	136.7311	5.5353	ND	—	—	ND	—	23.9481	0.3348
SAL-008	1190	23.2434	1.4452	ND	—	—	22.7712	0.9548	57.8013	2.7336
SAL-009	1190	192.7645	11.9908	ND	—	—	ND	—	40.1380	0.9954
SAL-010	1190	197.9831	6.2825	ND	—	—	ND	—	37.7771	5.2990
SAL-011	1190	680.4140	41.6443	ND	—	—	ND	—	121.0146	21.2720
SAL-012	1190	85.7870	7.9001	ND	—	—	ND	—	13.8182	3.7454
SAL-013	1190	656.2561	56.5918	ND	—	—	597.5634	43.9596	2888.8437	596.3067
SAL-014	1190	294.2303	2.8051	ND	—	—	25.3523	1.8192	147.9594	5.1914
SAL-015	1190	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Sample / Culture name	Elapsed days	Ambient Seawater / Enrichment culture (10^5 copies L^{-1})								
		Shallow Marine clade		Deep Marine clade		WCB / Total AOA	General AOA		Marine Group I	
		Average	\pm SD	Average	\pm SD		Average	\pm SD	Average	\pm SD
SAL-016	1190	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	—
Otsuchi Bay 2009 Sea-water	—	28.7825	0.0193	ND	—	—	ND	—	6.8863	0.8304
OB-1	743	34.8416	1.7923	ND	—	—	3.1510	0.4104	14.0941	2.5659
OB-2	743	14.9026	0.2664	ND	—	—	ND	—	2.9644	0.6159
MR09-03 St.36 depth 500 m	—	361.6257	8.0500	413.2623	30.2542	0.5333	323.5974	14.4542	4198.3967	75.7850
ART-17	521	29.0668	8.7399	44.2000	0.3924	0.6033	87.1311	8.4046	696.5895	26.8599
ART-18	521	18.0544	9.4003	18.3501	1.8851	0.5041	50.2984	14.4202	389.1575	59.1997
ART-19	521	8.1851	1.0980	ND	—	—	ND	—	117.8640	33.3522
ART-20	521	63.7486	19.6181	212.8589	42.8087	0.7695	165.9653	28.4808	1022.0024	55.5423
ART-21	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	46.9684	37.2656
ART-22	521	40.7190	13.9292	246.1622	68.2653	0.8581	163.3998	22.6002	1235.2229	243.1430
ART-23	521	40.7190	13.9292	86.6217	11.5855	0.6802	71.9049	20.0926	546.0130	104.4134
ART-24	521	162.5189	17.7494	232.7286	64.3585	0.5888	250.5954	18.5734	1726.0543	519.1004
MR09-03 St.36 depth 2,000 m	—	ND	—	23.0329	1.9473	—	14.5468	1.0568	319.8197	6.1792
ART-25	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	346.4808	53.1226
ART-26	521	ND	—	ND	—	—	54.0830	5.7890	1121.9206	36.6188
ART-27	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	29.4308	14.6748
ART-28	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	221.2886	79.6828
ART-29	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	41.9315	37.8590
ART-30	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	34.7298	25.6412
ART-31	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	149.2942	61.5274

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Continuation

Sample / Culture name	Elapsed days	Ambient Seawater / Enrichment culture (10^5 copies L ⁻¹)								
		Shallow Marine clade		Deep Marine clade		WCB / Total AOA	General AOA		Marine Group I	
		Average	± SD	Average	± SD		Average	± SD	Average	± SD
ART-32	521	ND	—	ND	—	—	ND	—	168.6057	68.9522

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

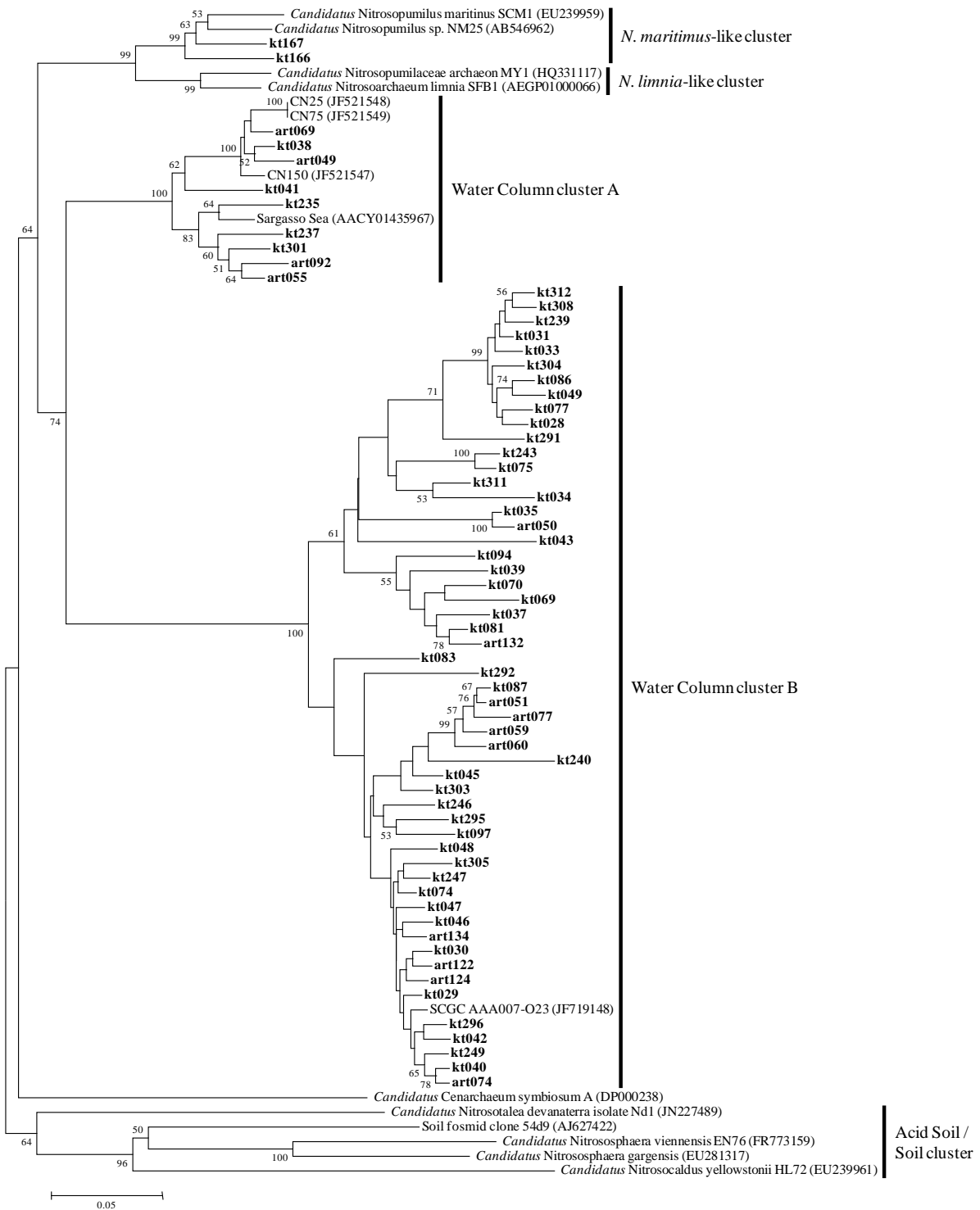


Fig.4-2 Phylogenetic tree based on archaeal *amoA* gene sequences (456 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of *amoA* gene obtained in this study. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 5%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

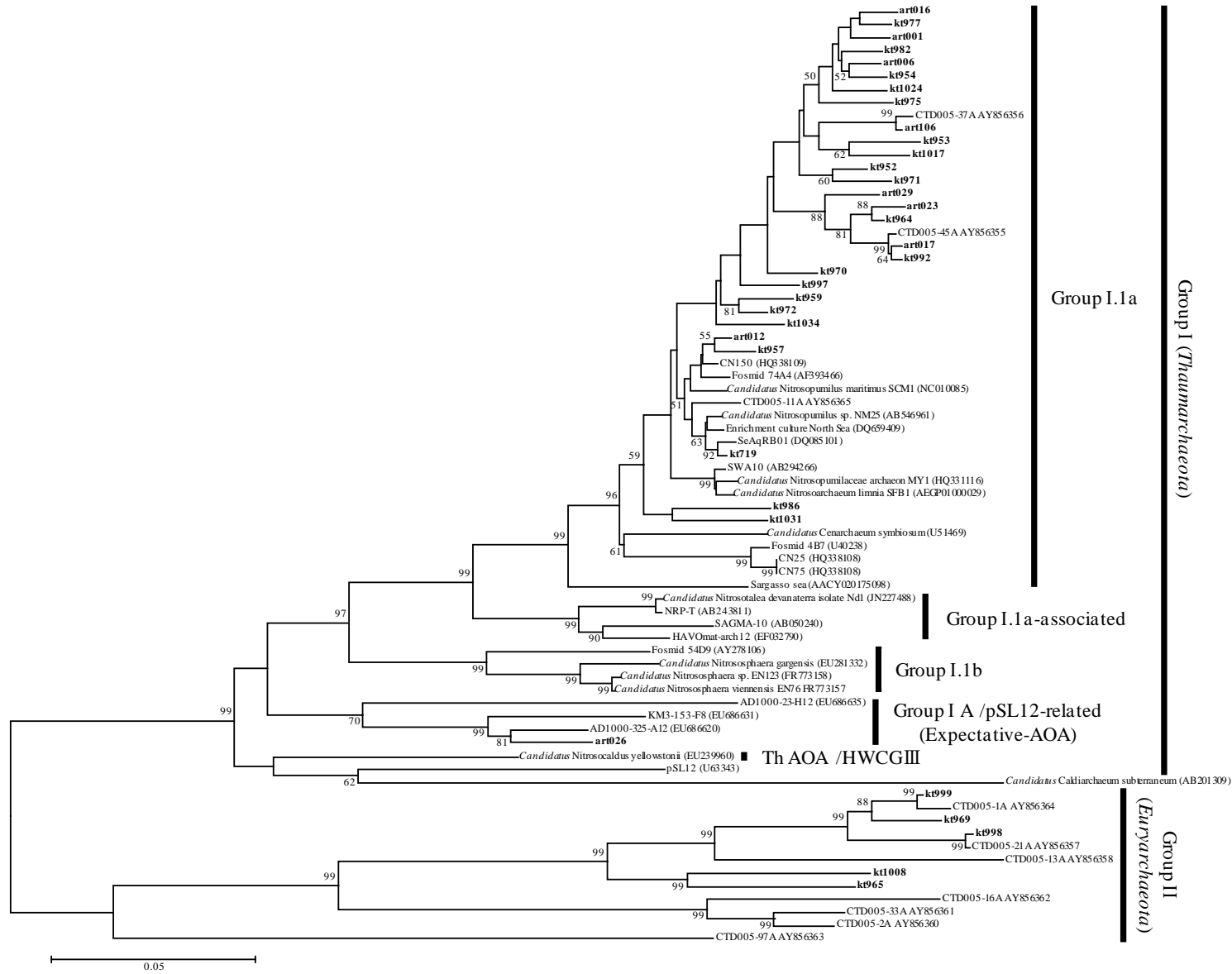
4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-4 Frequencies of various archaeal *amoA* sequences represented as OTUs ($\geq 98\%$ similarity threshold) using Primer set for General AOA from Suruga Bay, Japan.

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Cluster	OTU name	Representative clone	Clone numbers of KT-130		Clone numbers of KT-132	
			Initial	Incubated seawater	Initial	Incubated seawater
NM	Arc-amoA4-1	kt167				15
	Arc-amoA4-2	kt166				5
WCA	Arc-amoA4-3	kt041	1	33		
	Arc-amoA4-4	kt301	2			
	Arc-amoA4-5	kt038	1			
	Arc-amoA4-6	kt235	1			
	Arc-amoA4-7	kt237	1			
WCB	Arc-amoA4-8	kt033	5		2	
	Arc-amoA4-9	kt081	1		5	
	Arc-amoA4-10	kt049	1		4	
	Arc-amoA4-11	kt087	3		1	
	Arc-amoA4-12	kt029	4			
	Arc-amoA4-13	kt077			4	
	Arc-amoA4-14	kt028	2		1	
	Arc-amoA4-15	kt046	1		1	
	Arc-amoA4-16	kt047	1		1	
	Arc-amoA4-17	kt035	2			
	Arc-amoA4-18	kt239	2			
	Arc-amoA4-19	kt086			2	
	Arc-amoA4-20	kt030	1			
	Arc-amoA4-21	kt031	1			
	Arc-amoA4-22	kt034	1			
	Arc-amoA4-23	kt037	1			
	Arc-amoA4-24	kt039	1			
	Arc-amoA4-25	kt040	1			
	Arc-amoA4-26	kt042	1			
	Arc-amoA4-27	kt043	1			
	Arc-amoA4-28	kt045	1			
	Arc-amoA4-29	kt048	1			
	Arc-amoA4-30	kt240	1			
	Arc-amoA4-31	kt291	1			
	Arc-amoA4-32	kt292	1			
	Arc-amoA4-33	kt295	1			
	Arc-amoA4-34	kt296	1			
	Arc-amoA4-35	kt303	1			
	Arc-amoA4-36	kt304	1			
	Arc-amoA4-37	kt305	1			
	Arc-amoA4-38	kt308	1			
Arc-amoA4-39	kt311	1				
Arc-amoA4-40	kt312	1				
Arc-amoA4-41	kt069			1		
Arc-amoA4-42	kt070			1		
Arc-amoA4-43	kt074			1		
Arc-amoA4-44	kt075			1		
Arc-amoA4-45	kt083			1		
Arc-amoA4-46	kt094			1		
Arc-amoA4-47	kt097			1		
Arc-amoA4-48	kt243			1		
Arc-amoA4-49	kt246			1		
Arc-amoA4-50	kt247			1		
Arc-amoA4-51	kt249			1		
Total numbers			49	33	32	20

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統



4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Fig.4-3 Phylogenetic tree based on archaeal 16S rRNA gene sequences (1,192 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of 16S rRNA gene obtained in this study. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 5%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-5 Frequencies of various archaeal 16S rRNA gene sequences represented as OTUs ($\geq 98\%$ similarity threshold) from Suruga Bay, Japan.

OTU name	Representative clone	Most related group	Most related species		Clone numbers of KT-130		Clone numbers of KT-132				
			Accession No.	Similarity (%)	Initial	Incubated seawater	Initial	Incubated seawater			
OTU1	kt719	Marine groupI	<i>Candidatus Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	CP00086	98	2	48	1	37		
OTU2	kt957				97	2	0	2	0		
OTU3	kt959				96	1	0	0	0		
OTU4	kt1034				96	0	0	1	0		
OTU5	kt972				96	2	0	0	0		
OTU6	kt997				96	0	0	1	0		
OTU7	kt1031				95	0	0	1	0		
OTU8	kt986				95	2	0	0	0		
OTU9	kt970				94	1	0	0	0		
OTU10	kt975				93	1	0	0	0		
OTU11	kt992				93	1	0	0	0		
OTU12	kt1024				93	0	0	1	0		
OTU13	kt952				93	3	0	0	0		
OTU14	kt964				93	1	0	1	0		
OTU15	kt982				93	1	0	0	0		
OTU16	kt954				93	8	0	6	0		
OTU17	kt971				93	1	0	0	0		
OTU18	kt1017				93	0	0	1	0		
OTU19	kt977				93	3	0	17	0		
OTU20	kt953				92	1	0	2	0		
OTU21	kt999	Marine groupII	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469	DQ4518	77	0	0	3	0		
OTU22	kt969				77	1	0	2	0		
OTU23	kt965				78	1	0	0	0		
OTU24	kt1008				<i>Methanothermobacter thermoflexus</i> DSM 7268(T)	X99047	77	0	0	1	0
OTU25	kt998				<i>Thermogymnomonas acidicola</i> JCM 13583(T)	AB269873	77	0	0	4	0
Total number						32	48	44	37		

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

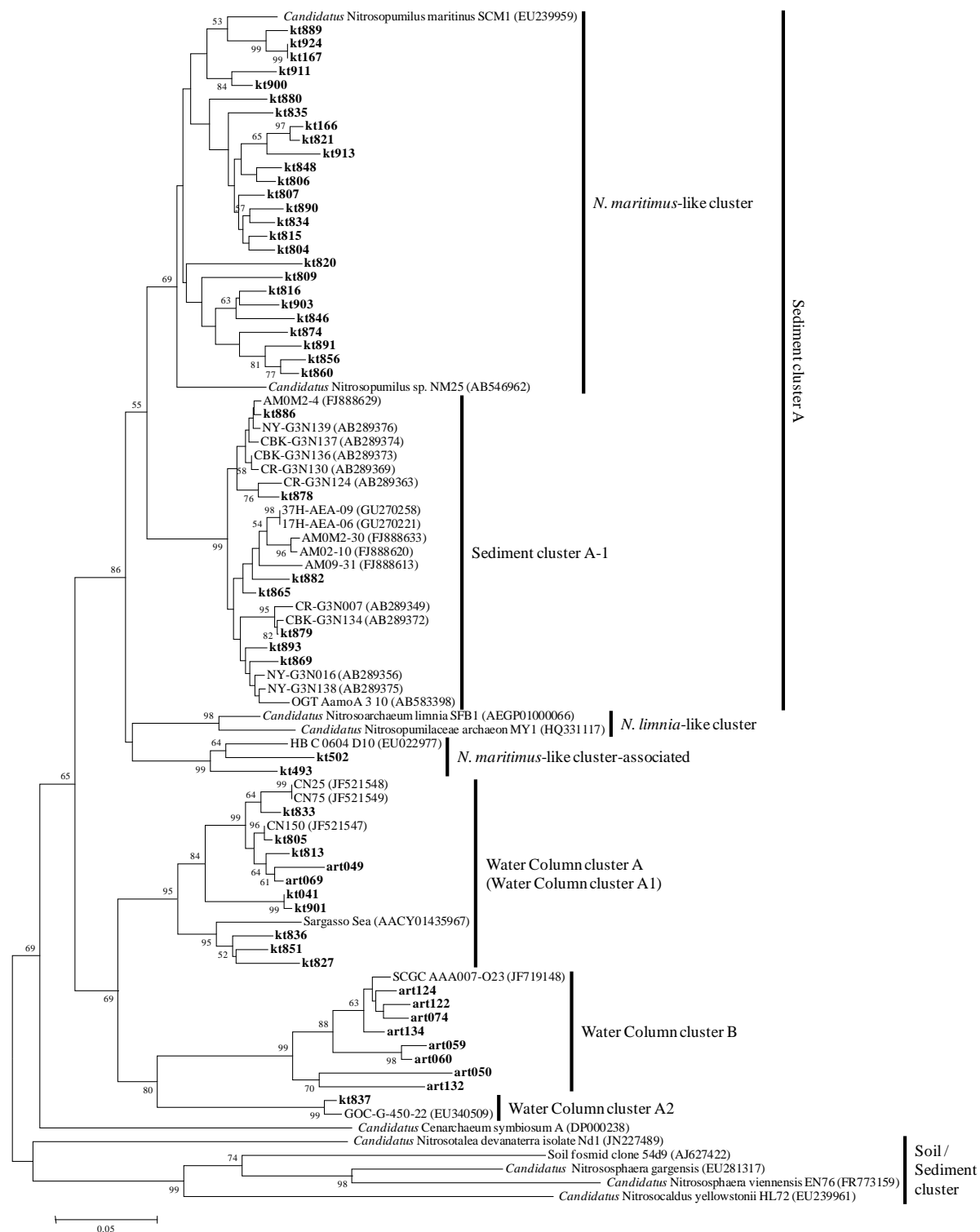


Fig.4-4 Phylogenetic tree based on archaeal *amoA* gene sequences (286 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of *amoA* gene obtained in this study. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 5%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-6 Frequencies of various archaeal *amoA* sequences represented as OTUs ($\geq 98\%$ similarity threshold) using Primer set for Shallow Marine clade from Suruga Bay, Japan.

Cluster	OTU name	Representative clone	Clone numbers of KT-130		Clone numbers of KT-132	
			Initial	Incubated seawater	Initial	Incubated seawater
<i>N. maritimus</i> -like cluster	Arc-amoA4-52	kt924				21
	Arc-amoA4-53	kt900		10		
	Arc-amoA4-54	kt903		5		
	Arc-amoA4-55	kt911		1		
	Arc-amoA4-56	kt913		1		
	Arc-amoA4-57	kt821		3		1
	Arc-amoA4-58	kt806		12		4
	Arc-amoA4-59	kt804		6		1
	Arc-amoA4-60	kt807		4		12
	Arc-amoA4-61	kt834		4		6
	Arc-amoA4-62	kt809		3		
	Arc-amoA4-63	kt815		1		
	Arc-amoA4-64	kt816		1		
	Arc-amoA4-65	kt820		1		
	Arc-amoA4-66	kt835		1		
	Arc-amoA4-67	kt846		1		
	Arc-amoA4-68	kt848		1		
	Arc-amoA4-69	kt856				7
	Arc-amoA4-70	kt874				2
	Arc-amoA4-71	kt860				1
	Arc-amoA4-72	kt880				1
	Arc-amoA4-73	kt889				1
	Arc-amoA4-74	kt890				1
	Arc-amoA4-75	kt891				1
	Sediment cluster A-1	Arc-amoA4-76	kt865			
Arc-amoA4-77		kt869				1
Arc-amoA4-78		kt878				1
Arc-amoA4-79		kt879				1
Arc-amoA4-80		kt882				1
Arc-amoA4-81		kt886				1
Arc-amoA4-82		kt893				1
Water Column cluster A (Water Column cluster A1)	Arc-amoA4-83	kt851	1			1
	Arc-amoA4-84	kt813	1			
	Arc-amoA4-85	kt827	1			
	Arc-amoA4-86	kt833	1			
	Arc-amoA4-87	kt836	1			
	Arc-amoA4-88	kt901		5		
Water Column cluster A2	Arc-amoA4-89	kt805	3			1
	Arc-amoA4-90	kt837	1			
Total numbers			47	22	47	22

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-9 Frequencies of various archaeal *amoA* gene sequences represented as OTUs ($\geq 98\%$ similarity threshold) of environmental sample and enrichment culture ART-22 from the Canada basin, Arctic Ocean.

Cluster	OTU name	Representative clone	Initial	Incubated seawater
WCA	OTU1	art049	4	1
	OTU2	art055	3	0
	OTU3	art069	3	2
	OTU4	art092	1	0
	OTU5	art050	20	7
	OTU6	art051	5	0
	OTU7	art059	4	1
WCB	OTU8	art060	3	1
	OTU9	art074	1	3
	OTU10	art077	2	0
	OTU11	art122	0	5
	OTU12	art124	0	1
	OTU13	art132	0	1
	OTU14	art134	0	1
Total numbers			46	23

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-10 Frequencies of various archaeal 16S rRNA gene sequences represented as OTUs ($\geq 98\%$ similarity threshold) of environmental sample and enrichment culture ART-22 from the Canada basin, Arctic Ocean.

OTU name	Representative clone	Most related group	Most related species		Initial	Incubated seawater	
			Accession No.	Similarity (%)			
OTU1	art012	Marine groupI	<i>Candidatus Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	CP000866	98.1	7	0
OTU2	art029				94.1	1	0
OTU3	art106				93.4	0	1
OTU4	art006				93.0	8	0
OTU5	art001				92.4	9	1
OTU6	art017				92.4	3	0
OTU7	art023				91.9	1	0
OTU8	art016				91.7	14	22
OTU9	art026	pSL 12	<i>Candidatus Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	CP000866	80.0	2	0
Total numbers						45	24

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

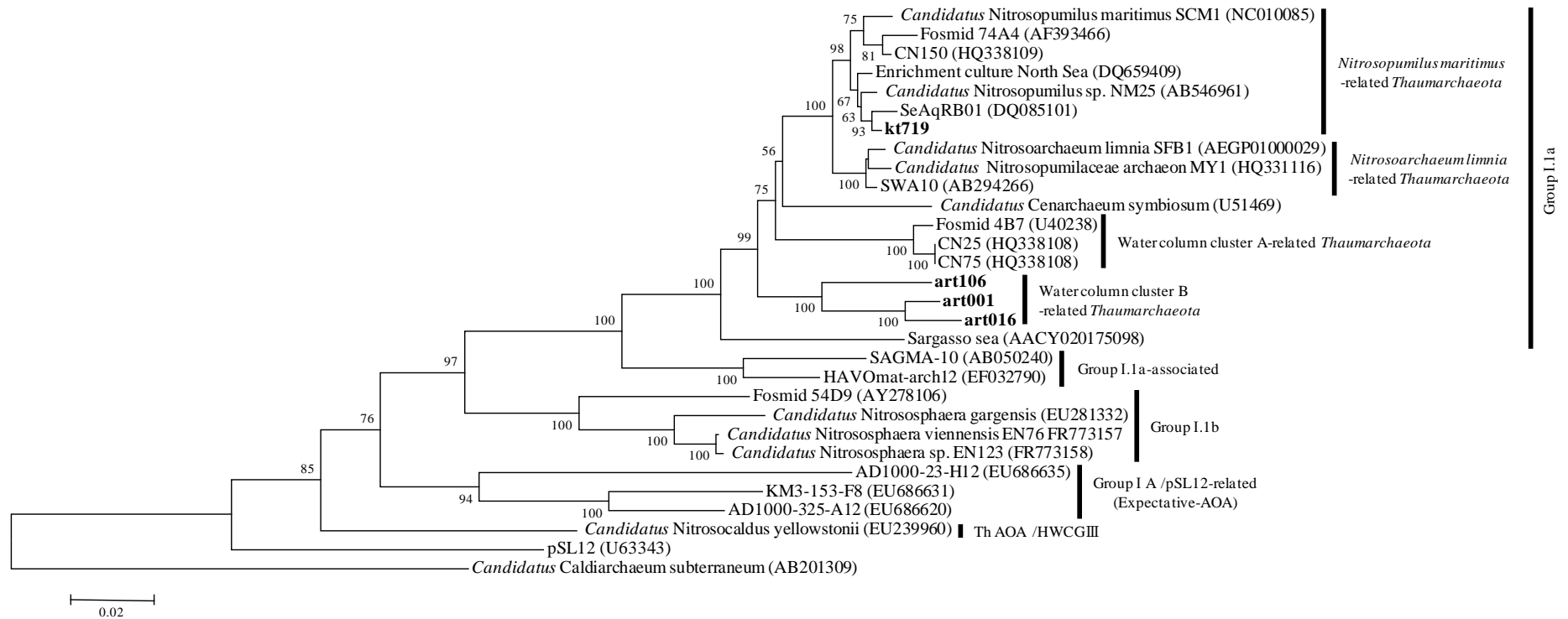


Fig.4-5 Phylogenetic tree based on archaeal 16S RNA gene sequences (1,260 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of 16S RNA gene obtained in this study. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 2%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

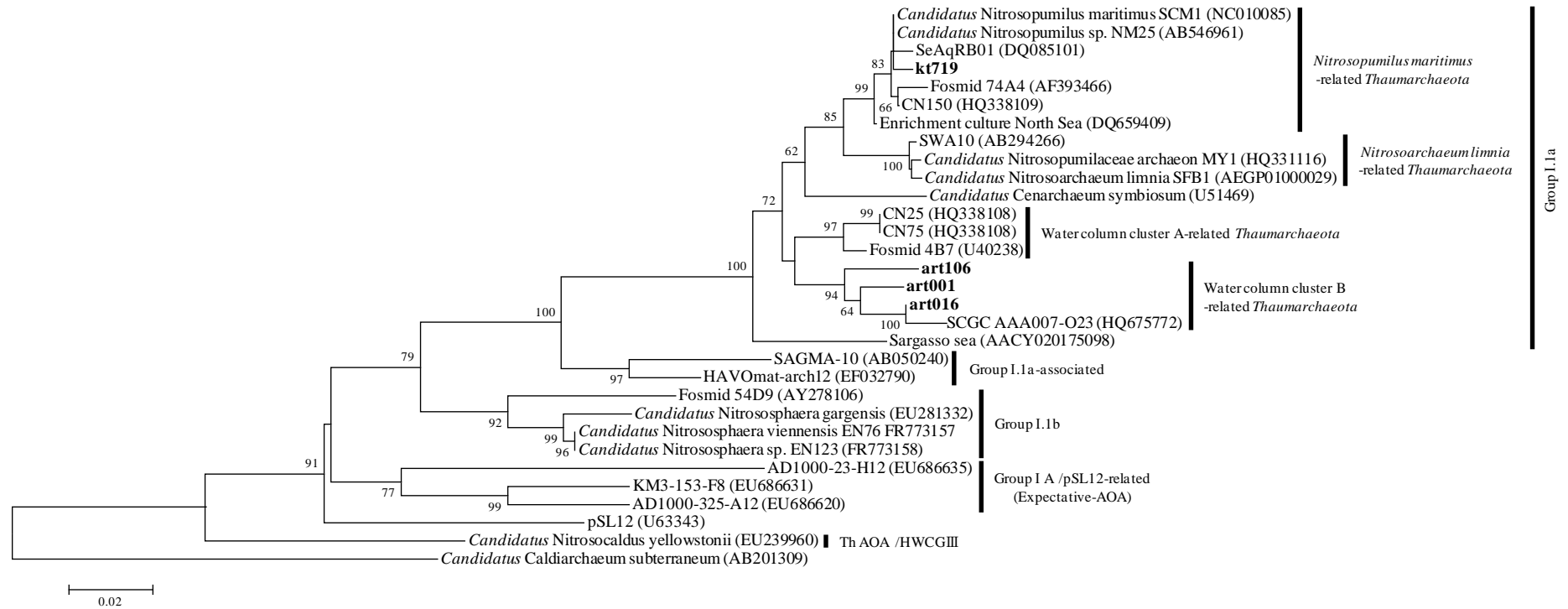


Fig.4-6 Phylogenetic tree based on archaeal 16S RNA gene sequences (434 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of 16S RNA gene obtained in this study. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 2%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

Table 4-11 Frequencies of various bacterial 16S rRNA gene sequences represented as OTUs ($\geq 97\%$ similarity threshold) from Suruga Bay, Japan.

OTU name	Representative clone	Most related group□	Most related species		Clone no. of KT-130		Clone no. of KT-132			
			Accession No.	Similarity (%)	Initial	Incubated seawater	Initial	Incubated seawater		
Bac16S_1	kt1182	<i>Nitrospira</i>	<i>Candidatus Nitrospira bockiana</i>	EU084879	87				1	
Bac16S_2	kt1184		<i>Nitrospira marina</i> Nb-295	X82559	92				1	
Bac16S_3	kt1046	<i>Proteobacteria</i> <i>Deltaproteobacteria</i>			91	1				
Bac16S_4	kt1068				91	1				
Bac16S_5	kt1075				89	1				
Bac16S_6	kt1084		<i>Nitrospina gracilis</i> Nb-211	L35504	91	1				
Bac16S_7	kt1143				92			1		
Bac16S_8	kt1130				88		1			
Bac16S_9	kt1052				89	1				
			Other				42	44	22	21
			Total numbers				46	45	23	23

5. 総合考察

5.1. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の系統関係

同様な分布パターンを示す AOA と海洋古細菌の系統群間には、対応する系統関係が存在すると明らかになった。*amoA* 配列で知られている AOA の系統群と同様に、16 S rRNA 遺伝子配列で知られている海洋古細菌の系統群にも深度による分布の違いが知られている (Beman et al., 2008)。MGI では I- α 、I- β 、I- γ の 3 つの系統群が存在し、I- α は表層由来のクローンを、I- γ は深層由来のクローンを割合的に多く含むと報告されている (Massana et al., 2000)。I- α は NM、I- β は WCA、I- γ は WCB とそれぞれ対応する関係にある (Fig. 5-1)。よって、AOA と海洋古細菌の系統群間の関係からも、Shallow Marine clade のうち NM が海洋水柱で優占していると支持された。

5.2. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の分布

本研究によって、Shallow Marine clade のうち海洋水柱で優占する系統群に関して問題点が指摘された。つまり、使用するプライマーセットによって特定の系統を見逃してしまう可能性が示されたが、今後、第二世代シーケンサーを用いた PCR を介さない群集構造解析によって、Shallow Marine clade の系統群組成が明らかになると考えられる。PCR を介さないメタゲノム解析で、Tully et al. (2012) は、原核生物群集でタウムアーキオータの割合が高い海域ですら、2,827,702 reads のうち 16 reads のみが *amoA* を含んでいたと報告している (Tully et al., 2012)。この研究における *amoA* の出現頻度が約 0.0006% 以下であるから、1 ランあたり ~1,000,000 reads の Roche 社製 GS FLX+ System を用いても 5 reads しか検出されない。数十配列による系統解析を行うには、少なくとも様々な海域と深度で数十回のメタゲノム解析が必要である。

5.3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の分布を制御する要因

海洋性 AOA の鉛直的な棲み分けは、生息環境におけるアンモニア態窒素濃度と水温の違いによって生じている可能性が示された。つまり、Shallow Maine clade はアンモニア態窒素濃度が高いと現存量が増加し、Deep Marine clade は水温が高いと現存量が減少するので、水温とアンモニア濃度が高い表層で Shallow Maine clade が、低い深層で Deep Marine clade が優占するという仮説である。この仮説を裏付けるためには、表層水を用いて、本研究と同様な培養実験を行うのが有効である。海水試料に、アンモニア態窒素を添加、及び無添加の条件で、現場温度と、それよりも高温と低温で培養し、アンモニア態窒素濃度と水温が AOA の群集構造と現存量へどのように影響するか評価する。もし、この説が正しいとすると、Shallow Maine clade は全ての条件で現存量が増加し、Deep Marine clade は低温で培養した時に現存量を維持、もしくは多少の増加するはずである。

5.4. アンモニア酸化古細菌の代謝と分布

硝化速度が水温に影響されると示唆された。アンモニア酸化酵素活性への直接的な影響に加えて、水温による pH の違いが影響していた可能性がある。硝化活性は、pH が低下するとアンモニア酸化に利用できるアンモニア濃度が化学平衡によって低下するため、減少すると考えられる (Beman et al., 2011)。今後、アンモニア態窒素濃度ではなく、アンモニア酸化に利用できるアンモニア濃度を pH とアンモニア態窒素濃度から推定し、AOA 群集の応答を評価するのが重要と考えられる。

本研究では扱わなかったが、炭素固定活性に影響する要因の評価も必要である。バルクの炭素固定活性は白昼 (12,000 lux) の光量で阻害され (Yakimov et al., 2011)、AOA の現存量とバルクの炭素固定活性には正の相関関係があると報告されている (Agogué et al., 2008)。

5.5. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の系統

本研究によって、海洋性 AOA を構成する 3 つの主要系統群について、16S rRNA 遺伝子における系統学的な関係を初めて明らかにできた。既報研究で、WCA に属する AOA が集積された一部の培養系は、16S rRNA 遺伝子配列で NM と同一の系統群に入ることが報告されており、*amoA* 配列で区別される 3 つの系統群は、16S rRNA 遺伝子配列では区別されない同一の系統群であることが予想された。しかしながら、WCB の集積培養系を用いた 16S rRNA 遺伝子配列決定、及び Shallow Marine clade を対象とした既報研究と異なるプライマーセットを用いた再解析によって、既報研究の一部は方法論的な問題によるアーティファクトであり、3 つの主要系統群は 16S rRNA 遺伝子配列においても 3 つの系統に明確に区別できると明らかになった。これら海洋性 AOA の各系統群は、16S rRNA 遺伝子の相同性が 93% 以下で系統学的に非常に近縁であるが、明確に区別できるゲノム構造を持ち、生息場所を異にする別種、あるいは別属の古細菌であると考えられる。

海洋性 AOA の主要系統群において 16S rRNA 遺伝子の系統的位置が確定したことで、古細菌もしくは原核生物の群集構造解析における AOA の特定が可能となった。この成果により、環境中における AOA の動態を古細菌や原核生物群集全体の動態と比較しつつ、その現存量や生産量への寄与を見積もることが格段に容易になると考えられる。機能遺伝子をターゲットとする方法に比べ、16S rRNA をターゲットにすると検出が容易になり、汎用性も高くなる。それぞれの系統群に特異的なプローブを作成することによって、定量的な解析が容易となり、フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡による FISH 法で物質循環研究を中心とする様々な課題へのアプローチが可能になると期待される。

5.6. アンモニア酸化古細菌の現存量推定の問題点

従来から、Q-PCR に使用されている *amoA* を検出するプライマーセットには特異性の問題が指摘されており (Agogué et al., 2008; Konstantinidis et al., 2009; Mincer et al., 2007)、それらの評価をする必要性が今後の課題として挙げられている (Christman et al., 2011)。本研究によって、精度の高いプライマーセットの開発で、AOA の分布や群集構造に対する見方が変わってくる可能性が示された。本研究で行った全ての環境中と集積培養系における AOA の現存量を、横軸に General AOA、縦軸に Total AOA をとって示した (Fig. 5-2)。実線上に印がのっていれば両現存量は等しく、破線上では現存量に 10 倍の違いがある事を示す。Total AOA の現存量は General AOA と比較して、環境中が平均で 10.3 倍、中央値で 4.33 倍、最小で 1.47 倍、最大で 258 倍、集積培養が平均で 112 倍、中央値で 11.1 倍、最小で 0.51 倍、最大で 559 倍も高く、標準偏差がそれぞれ 19.6 と 166 であった。つまり、General AOA の現存量は過小評価になっており、真の群集構造を表していないと考えられる。また、環境中と集積培養系で標準偏差に大きな違いがあり、集積培養の方で多様性が低くなっているのを考慮すると、それぞれのプライマーセットで検出される遺伝子配列は、系統樹上に入り組んで存在していると容易に想像できる。現時点では、これらを確認するのに十分な遺伝子配列情報が存在しないために、それぞれのプライマーセットで検出される遺伝子配列間の詳細な検討はできない。しかし、現段階で利用できる遺伝子配列情報を元に、新しくプライマーセットが設計できるのを確認済みなので、既存のプライマーと共に定量・群集構造解析を行えば、最適なプライマーセットを決定できる。

5.7. 硝化能を有する原核生物に関する研究の展望

AOA は、全球的な窒素・炭素循環において重要な役割を担っていると考えられており、

寄与の定量的な見積りを行っていく必要がある。現在のアンモニア酸化と炭素固定活性は、採水した海水試料を用いるために、採水中の温度や圧力変化に起因する AOA 群集へのストレスが、正確な測定を妨げている可能性が高い。今後は、ROCS 等の現場型培養器を用いたアンモニア酸化と炭素固定活性の測定を行い、従来のデータと比較していく事が重要であると考えられる。

地球上の物質循環を理解するために、海洋の炭素・窒素循環を駆動する AOA に関するゲノム情報は増やしていく必要がある。海洋環境由来の AOA に関するゲノム情報は、水族館の濾過槽から分離された *Nitrosopumilus maritimus*(Walker et al., 2010)と、カイメンに共生している *Cenarchaeum symbiosum*(Hallam et al., 2006a)からのみ知られている。これらは、いわゆる海洋を代表する AOA とは言い難く、海洋の水柱環境から得られた AOA のゲノム情報が必要である。現在、Swan et al. (2011) が報告した WCB に属する Group I.1a のシングル増幅ゲノムの公開配列情報は、16S rRNA 遺伝子及び *amoA* 配列のみであり、詳細はわかっていない。今後は、本研究で得られた集積培養系を用いたメタゲノム解析を行おうと考えている。

AOB についても AOA や NOB と同様に未培養な系統群が多数知られており(Kim et al., 2008)、分離培養を試み、生理学的な特徴を把握していく必要がある。特に、沿岸や表層では、AOA と同等の現存量があると考えられているので、AOA と同時に測定するのが重要である。本研究で得られている集積培養系を解析する事で、AOB が集積されている培養系を特定し、分離培養を試みようと考えている。

中深層では *Nitrospina* 属が、漸深層では *Nitrospina* 属だけでなく、*Nitrospira* 属に近縁な細菌も潜在的に亜硝酸酸化を担っている可能性が示唆された。NOB は、海洋水柱に存在する系統群を把握したのちに、系統群ごとに解析していく事が重要であると考えている。既報研究で、*Nitrospina* 属の細菌が中深層における亜硝酸酸化生物として重要

である可能性(Mincer et al., 2007; Santoro et al., 2010)、超深海で *Nitrospina* 属に近縁なクローンが得られた(Elloe et al., 2011)と報告されているが、分布や現存量がよくわかっていない。自然環境中で細菌群集全体に占める NOB の割合が低いために、16S rRNA 遺伝子を対象に解析を行うと検出されない場合が多い。また、亜硝酸酸化能を多様な分類群の一部の細菌が有しているので、亜硝酸酸化酵素を遺伝子マーカーとして解析するのに多くの労力が必要である。つまり、海洋水柱に分布する NOB の系統群をまず特定する事が必要である。これに関しては、本研究で得られている集積培養系で亜硝酸酸化が起きており、この集積培養系を解析する事で容易に遂行できると考えられる。

5.8. さいごに

現在は、第二世代シーケンサーと共に生物情報学的手法が微生物生態学に導入され、微生物情報生態学が盛んに行われるようになってきている。この流れは、20 世紀末に分子生物学的手法が微生物生態学に導入され分子微生物生態学が発展してきたのを考えれば当然と言えよう。新しい手法が、これまで明らかにできなかった謎を解き明かす鍵になるのは、経験的に知っている人もいれば、話として知っている人もいるだろう。ところが、非培養法がもてはやされ培養法がおさなりになっていた時、培養法によって新しい事実が明らかになってきたのを思い出して欲しい。また、(メタ)ゲノム解析が盛んに行われるようになって、それで生物の全てが明らかにできるような気になっていたが、実際は解析に必要なデータが不十分で、データベースを充実させるには古典的な手法を用いるしかない事に気づいて唾然としなかつただろうか。生物情報学的手法が盛んに利用されるのは、良い事だし、賛成である。しかし、遺伝子配列の情報だけでは微生物生態に直結させるのは難しい。微生物が生息している場所の情報、環境情報についても同時に精度よく、さらにマイクロスケールで計測していく必要があるだろう。そうする事で初めて、

生物情報学と環境情報学が融合し、新しい微生物生態学である微生物情報学を発展できると信じている。

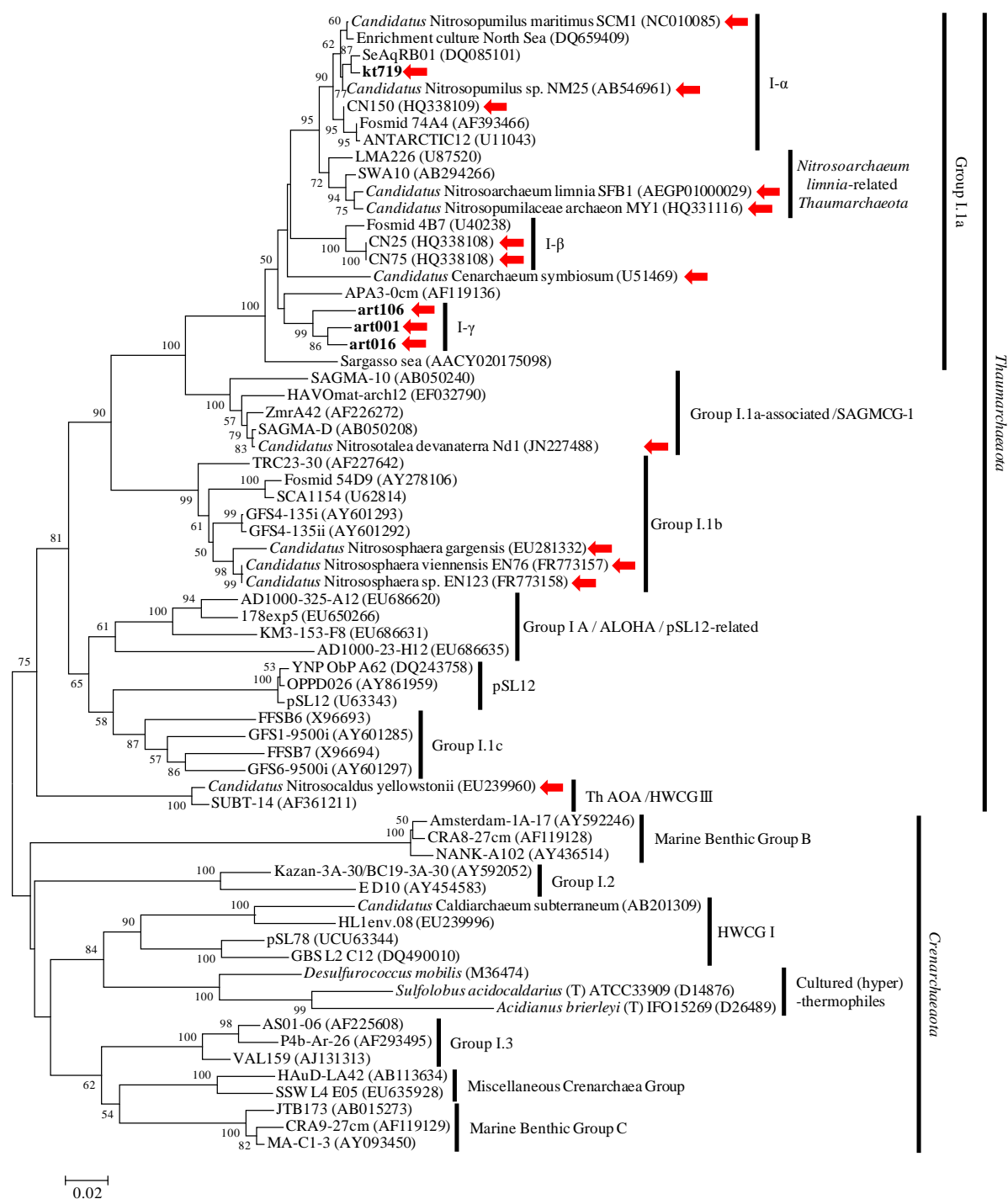


Fig. 5-1 Phylogenetic tree based on thaumarchaeal and crenarchaeal 16S RNA gene sequences (506 bp) and constructed by neighbor-joining analysis. Boldface type indicates representative clones of 16S RNA gene obtained in this study. Red arrows indicate clones of enrichment culture and isolates knowing *amoA* sequence. The scale bar represents an estimated sequence divergence of 2%. Numbers at nodes indicate bootstrap values ($\geq 50\%$).

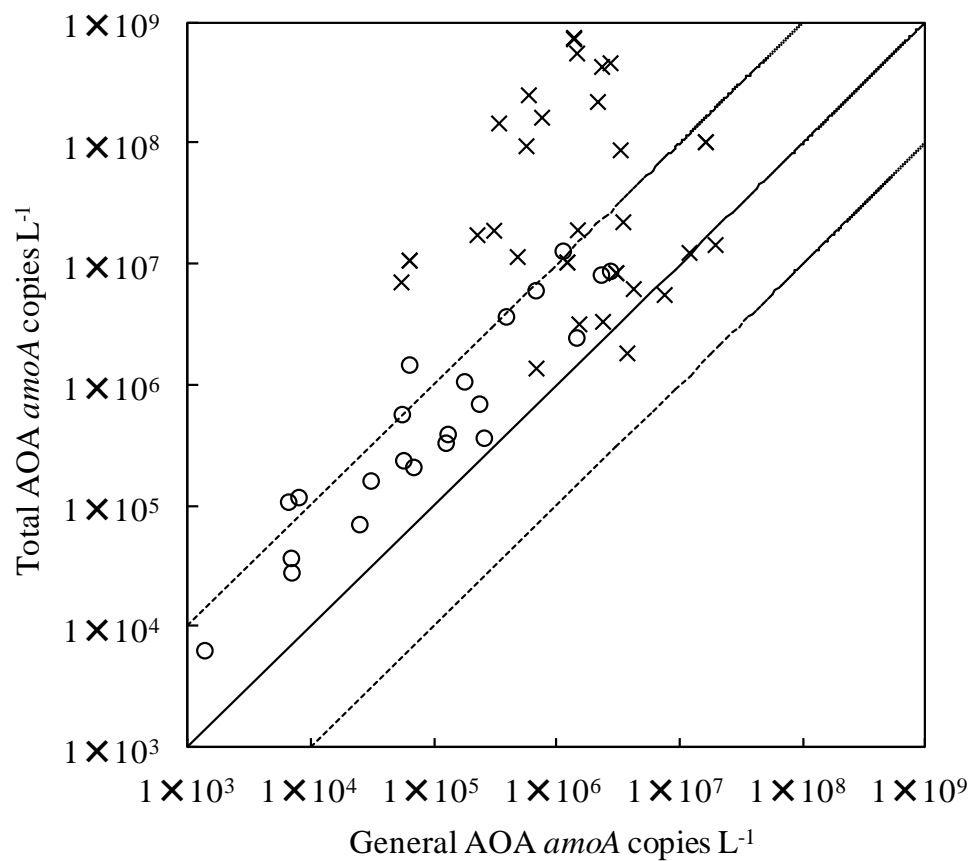


Fig. 5-2 Ratio of Total AOA *amoA* genes versus General AOA *amoA* genes in the sample from environmental samples (open circle) ($n = 25$) and enrichment samples (cross) ($n = 60$).

6. 謝辭

6. 謝辞

本研究を遂行するに当たり御指導して頂き、本論文を完成させるのに御助力して頂き、主査をして頂いた東京大学 大気海洋研究所 海洋生命システム研究系 海洋生態系動態部門 微生物分野 准教授 浜崎恒二先生に心より感謝いたします。

副査をして頂き、有用な示唆を下された東京大学 大気海洋研究所 附属研究施設 地球表層圏変動研究センター 生物遺伝子変動分野 教授(海洋生命システム研究系 海洋生態系動態部門 微生物分野 兼務教授) 木暮一啓先生、中央大学 理工学部 生命科学科 教授 諏訪裕一先生、東京大学 農学生命科学研究科 水圏生物学専攻 水圏生物環境学研究室 教授 古谷研先生、長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科 水産科学領域 准教授 和田実先生に心より感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり御指導して頂き、公私ともに支えて下さいました東京大学 大気海洋研究所 附属研究施設 地球表層圏変動研究センター 生物遺伝子変動分野 講師 岩崎渉先生、同 海洋生命システム研究系 海洋生態系動態部門 微生物分野 助教 西村昌彦先生、同 研究連携領域 海洋アライアンス連携分野 特任研究員 野村英明博士、同 附属研究施設 地球表層圏変動研究センター 生物遺伝子変動分野 特任研究員 千浦博博士、同 吉澤晋博士、同 高橋唯博士、同 海洋生命システム研究系 海洋生態系動態部門 微生物分野 特任研究員 神谷英里子博士、同 谷口亮人博士(現 近畿大学 研究員)、同 海洋科学特定共同研究員 井上雄介博士、同 Yuna Seo 博士(現 産業技術総合研究所)、同 特任研究員 多田雄哉博士(現 Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Germany)、同 金子亮博士、同 都丸亜希子博士、同 朴相和博士、同 崔英順博士に感謝します。

6. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、KT07-16、KT08-02 次淡青丸航海、平成 20 年度蒼鷹丸第三次航海、2009 年海洋地球研究船「みらい」北極海総合観測航海(MR09-03)でお世話になりました船長、船員、乗船研究者・技術者の皆様、東京大学 大気海洋研究所 附属研究施設 国際沿岸海洋研究センター 職員の皆さんに感謝します。

本研究を遂行するに当たり御教授頂き、公私ともに支えて下さいました京都大学 教授 中野伸一先生、福井県立大学 准教授 近藤竜二先生、京都大学 助教 吉永郁生先生、つくば環境微生物研究所 茂野俊也博士、Florida Gulf Coast University, Assistant Professor, Dr. Toshi Urakawa、東京大学 大気海洋研究所 海洋地球システム研究系 海洋化学部門 生元素動態 分野 教授 永田俊先生、同 准教授 小川浩史先生、同 助教 宮島利宏先生、同 職員の皆さん、同 海洋無機化学分野 准教授 小畑元先生、同 助教 中山典子先生、同 附属研究施設 国際沿岸海洋研究センター 沿岸保全分野 助教 福田秀樹先生に感謝します。

本研究を遂行するに当たり、公私ともに支えて下さいました東京大学 大気海洋研究所 海洋生命システム研究系 海洋生態系動態部門 微生物分野 職員・学生の皆さん、同 浮遊生物分野 教授 津田敦 先生、同 助教 西川敦先生、同 職員・学生の皆さん、同 底生生物分野 教授 小島茂明先生、同 教職員・学生の皆さん、同 附属研究施設 国際連携研究センター 教授 西田周平先生、同 職員・学生の皆さん、同 地球表層圏変動研究センター 海洋生態系変動分野 准教授 伊藤幸彦先生、同 地球表層圏変動研究センター 教職員の皆さん、同 海洋地球システム研究系 海洋物理学部門 海洋大気力学分野 教授 新野宏先生、同 教職員・学生の皆さん、同 海洋大循環分野 安藤広二郎さん、同 共同利用・共同研究 支援施設 共同利用共同研究推進センター 塚本久美子さん、同 李雅利さん、小熊健治さん、

6. 謝辞

棚橋由紀さん、石川浩治さん、同 職員の皆さん、同 広報室 佐伯かおるさん、同 渡邊由紀子さん、同 事務部 日暮仁美さん、同 大岡真緒さん、大気海洋研究所 教職員・学生の皆さん、堤真氏(岡山在住)に感謝いたします。

私が博士課程の学生として東京大学 大気海洋研究所 海洋生命システム研究系 海洋生態系動態部門 微生物分野に入学するまでにお世話になりました愛媛大学 上田拓史先生(現高知大学 教授)、同 伊谷行先生(現 高知大学 准教授)、同 助教 金本自由生先生、同 教授 鈴木聡先生、同 助教 野中里佐先生(現 独協医科大学 助教)、同 研究員 小林剛博士(現 同 助教)、同 大林由美子博士(現 横浜国立大学 研究教員)、同 准教授 北村真一先生、同 教授 柳澤康信(現 学長)、同 准教授 大森浩二先生、同 准教授 中島敏幸先生、同 准教授 井上幹生先生、同 研究員 大西秀次郎先生(現 同 技術員・船長)、同 稲葉愛美博士(現 東京大学 研究員)、愛媛大学時代の研究室でお世話になりました職員・学生及び愛媛大学ソフトテニス部の監督、顧問、部員の皆さん、愛媛大学の教職員・学生の皆さん、東京大学 旧海洋研究所 先端研究センター 生態解析分野 教授 窪川かおる先生(現 海洋アライアンス 特任教授)、同 准教授 天川裕史先生(現 大気海洋研究所 海洋地球システム研究系 海洋化学部門 大気海洋分析化学分野 特任研究員)、同 助教 大村亜希子先生(現 大気海洋研究所 海洋地球システム研究系 海洋底科学部門 プロジェクト研究員)、同研究室でお世話になりました職員・学生の皆さんに感謝いたします。

7. 引用文献

Agogué H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ (2008) Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying archaea in the deep North Atlantic. *Nature* 456: 788–791

Allredge AL, Silver MW (1988) Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progress in Oceanography* 20: 41–82

Allredge AL, Youngbluth MJ (1985) The significance of macroscopic aggregates (marine snow) as sites for heterotrophic bacterial production in the mesopelagic zone of the Subtropical Atlantic. *Deep-Sea Research Part a—Oceanographic Research Papers* 32: 1445–1456

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402

Ando Y, Nakagawa T, Takahashi R, Yoshihara K, Tokuyama T (2009) Seasonal changes in abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria and their nitrification in sand of an eelgrass zone. *Microbes and Environments* 24: 21–27

Arp DJ, Stein LY (2003) Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38: 471–495

Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, Pace NR (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9188–9193

Bartossek R, Nicol GW, Lanzen A, Klenk HP, Schleper C (2010) Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing archaea: diversity and genomic context. *Environmental Microbiology* 12: 1075–1088

Beman JM, Popp BN, Francis CA (2008) Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine crenarchaeota in the Gulf of California. *The ISME Journal* 2: 429–441

Beman JM, Sachdeva R, Fuhrman JA (2010) Population ecology of nitrifying archaea and bacteria in the Southern California Bight. *Environmental Microbiology* 12: 1282–1292

Beman JM, Steele JA, Fuhrman JA (2011) Co-occurrence patterns for abundant marine archaeal and bacterial lineages in the deep chlorophyll maximum of coastal California. *The ISME Journal* 5: 1077–1085

Benson BB, Krause D Jr. (1984) The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in freshwater and seawater inequilibrium with the atmosphere. *Limnology and Oceanography* 29: 620–632

Berg IA, Ramos-Vera WH, Petri A, Huber H, Fuchs G (2010) Study of the distribution of autotrophic CO₂ fixation cycles in crenarchaeota. *Microbiology-Sgm* 156: 256–269

Berge ND, Reinhart DR, Batarseh ES (2007) Strategy for complete nitrogen removal in bioreactor landfills. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 133: 1117–1125

Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, Francis CA, Quake SR (2011) Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. *Plos One* 6: 251–258

Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008) Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nature Reviews Microbiology* 6: 245–252

Brochier-Armanet C, Gribaldo S, Forterre P (2012) Spotlight on the thaumarchaeota. *The ISME Journal* 6: 277–230

Christman GD, Cottrell MT, Popp BN, Gier E, Kirchman DL (2011) Abundance, diversity, and activity of ammonia-oxidizing prokaryotes in the coastal Arctic Ocean in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2026–2034

Church MJ, Wai B, Karl DM, DeLong EF (2010) Abundances of crenarchaeal *amoA* genes and transcripts in the Pacific Ocean. *Environmental Microbiology* 12: 679–688

Coolen MJL, Abbas B, van Bleijswijk J, Hopmans EC, Kuypers MMM, Wakeham SG, Damste

JSS (2007) Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environmental Microbiology* 9: 1001-1016

Dang HY, Luan XW, Chen RP, Zhang XX, Guo LZ, Klotz MG (2010) Diversity, abundance and distribution of *amoA*-encoding archaea in deep-sea methane seep sediments of the Okhotsk Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 72: 370-385

De Corte D, Yokokawa T, Varela MM, Agogue H, Herndl GJ (2009) Spatial distribution of Bacteria and Archaea and *amoA* gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. *The ISME Journal* 3: 147-158

de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Konneke M, Stahl DA (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* 10: 810-818

DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5685-5689

DeLong EF, Franks DG, Alldredge AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography* 38: 924-934

DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU, Martinez A, Sullivan MB, Edwards R, Brito BR, Chisholm SW, Karl DM (2006) Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science* 311: 496-503

DeLong EF, Taylor LT, Marsh TL, Preston CM (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5554-5563

DeLong EF, Wu KY, Prezelin BB, Jovine RVM (1994) High abundance of archaea in antarctic marine picoplankton. *Nature* 371: 695-697

Dore JE, Karl DM (1996) Nitrification in the euphotic zone as a source for nitrite, nitrate, and

nitrous oxide at Station ALOHA. *Limnology and Oceanography* 41: 1619–1628

Dore JE, Popp BN, Karl DM, Sansone FJ (1998) A large source of atmospheric nitrous oxide from subtropical North Pacific surface waters. *Nature* 396: 63–66

Dugdale RC, Goering JJ (1967) Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnology and Oceanography* 12: 196–206

Eloe EA, Shulse CN, Fadrosch DW, Williamson SJ, Allen EE, Bartlett DH (2011) Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment. *Environmental Microbiology Reports* 3: 449–458

Eppley RW, Peterson BJ (1979) Particulate organic-matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature* 282: 677–680

Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 855–869

Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels HJCT, van Alen T, Luesken F, Wu ML, van de Pas-Schoonen KT, den Camp HJMO, Janssen-Megens EM, Francoijs KJ, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten MSM, Strous M (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464: 543–548

Felsenstein J (1985) Confidence-limits on phylogenies – an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791

Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* 1: 19–27

Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14683–14688

French E, Kozłowski J, Bollmann A (2011) Differences in growth behavior of ammonia oxidizing archaea and ammonia oxidizing bacteria. 16th European N-cycle Meeting–2nd International Conference on Nitrification, Nijmegen. WT11 (W36): 80

Fuhrman JA, Davis AA (1997) Widespread archaea and novel bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. *Marine Ecology–Progress Series* 150: 275–285

Fuhrman JA, Mccallum K, Davis AA (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 356: 148–149

Ghiglione JF, Mevel G, Pujo–Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M (2007) Diel and seasonal variations in abundance, activity, and community structure of particle–attached and free–living bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* 54: 217–231

Hallam SJ, Konstantinidis KT, Putnam N, Schleper C, Watanabe Y, Sugahara J, Preston C, de la Torre J, Richardson PM, DeLong EF (2006a) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18296–18301

Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Paul M. Richardson, DeLong EF (2006b) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine crenarchaeota. *Plos Biology* 4: 0521–0536

Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M (2008) A moderately thermophilic ammonia–oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2134–2139

Herfort L, Schouten S, Abbas B, Veldhuis MJW, Coolen MJL, Wuchter C, Boon JP, Herndl GJ, Damste JSS (2007) Variations in spatial and temporal distribution of archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 242–257

Herndl GJ, Reinthaler T, Teira E, van Aken H, Veth C, Pernthaler A, Pernthaler J (2005) Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Applied*

and *Environmental Microbiology* 71: 2303–2309

Hollibaugh JT, Gifford S, Sharma S, Bano N, Moran MA (2011) Metatranscriptomic analysis of ammonia-oxidizing organisms in an estuarine bacterioplankton assemblage. *The ISME Journal* 5: 866–878

Hu AY, Jiao NZ, Zhang CLL (2011a) Community structure and function of planktonic crenarchaeota: changes with depth in the South China Sea. *Microbial Ecology* 62: 549–563

Hu AY, Jiao NZ, Zhang R, Yang Z (2011b) Niche partitioning of marine group I crenarchaeota in the euphotic and upper mesopelagic zones of the East China Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7469–7478

Huang Y, Niu BF, Gao Y, Fu LM, Li WZ (2010) CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26: 680–682

Ingalls AE, Shah SR, Hansman RL, Aluwihare LI, Santos GM, Druffel ERM, Pearson A (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6442–6447

Inoue K, Nishimura M, Nayak BB, Kogure K (2007) Separation of marine bacteria according to buoyant density by use of the density-dependent cell sorting method. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1049–1053

Jodo M, Kawamoto K, Tochimoto M, Coverly SC (1992) Determination of nutrients in seawater by segmented-flow analysis with higher analysis rate and reduced interference on ammonia. *Journal of Automatic Chemistry* 14: 163–167

Karl DM, Knauer GA, Martin JH, Ward BB (1984) Bacterial chemolithotrophy in the ocean is associated with sinking particles. *Nature* 309: 54–56

Karner MB, DeLong EF, Karl DM (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507–510

Kim BK, Jung MY, Yu DS, Park SJ, Oh TK, Rhee SK, Kim JF (2011) Genome sequence of an ammonia-oxidizing soil archaeon, "*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*" MY1. *Journal of Bacteriology* 193: 5539–5540

Kim OS, Junier P, Imhoff JF, Witzel KP (2008) Comparative analysis of ammonia monooxygenase (amoA) genes in the water column and sediment–water interface of two lakes and the Baltic Sea. *Fems Microbiology Ecology* 66: 367–378

Kitidis V, Laverock B, McNeill LC, Beesley A, Cummings D, Tait K, Osborn MA, Widdicombe S (2011) Impact of ocean acidification on benthic and water column ammonia oxidation. *Geophysical Research Letters* 38

Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546

Konstantinidis KT, Braff J, Karl DM, DeLong EF (2009) Comparative metagenomic analysis of a microbial community residing at a depth of 4,000 meters at station ALOHA in the North Pacific Subtropical Gyre. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5345–5355

Koops HP, Pommerening-Roser A (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 1–9

Kowalchuk GA, Stephen JR (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 55: 485–529

Lam P, Jensen MM, Lavik G, McGinnis DF, Muller B, Schubert CJ, Amann R, Thamdrup B, Kuypers MMM (2007) Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7104–7109

Lam P, Lavik G, Jensen MM, van de Vossenberg J, Schmid M, Woebken D, Dimitri G, Amann R, Jetten MSM, Kuypers MMM (2009) Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:

4752-4757

Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806-809

Lopez-Garcia P, Moreira D, Lopez-Lopez A, Rodriguez-Valera F (2001) A novel haloarchaeal-related lineage is widely distributed in deep oceanic regions. *Environmental Microbiology* 3: 72-78

Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* 461: 976-981

Massana R, DeLong EF, Pedros-Alio C (2000) A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1777-1787

Massana R, Taylor LJ, Murray AE, Wu KY, Jeffrey WH, DeLong EF (1998) Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic archaea in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. *Limnology and Oceanography* 43: 607-617

Matsutani N, Nakagawa T, Nakamura K, Takahashi R, Yoshihara K, Tokuyama T (2011) Enrichment of a novel marine ammonia-oxidizing archaeon obtained from Sand of an eelgrass zone. *Microbes and Environments* 26: 23-29

Menard HW, Smith SM (1966) Hypsometry of ocean basin provinces. *Journal of Geophysical Research* 71: 4305-4325

Merbt SN, Stahl DA, Casamayor EO, Marti E, Nicol GW, Prosser JI (2012) Differential photoinhibition of bacterial and archaeal ammonia oxidation. *Fems Microbiology Letters* 327: 41-46

Mincer TJ, Church MJ, Taylor LT, Preston C, Kar DM, DeLong EF (2007) Quantitative

distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environmental Microbiology* 9: 1162–1175

Moeseneder MM, Winter C, Herndl GJ (2001) Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnology and Oceanography* 46: 95–107

Molina V, Belmar L, Ulloa O (2010) High diversity of ammonia-oxidizing archaea in permanent and seasonal oxygen-deficient waters of the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology* 12: 2450–2465

Moraru C, Lam P, Fuchs BM, Kuypers MMM, Amann R (2010) GeneFISH – an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environmental Microbiology* 12: 3057–3073

Morita RJ, (2000) Low-temperature environments. *In* E. Lederberg (ed.) *Encyclopedia of Microbiology* second ed., Academic Press, San Diego. 3: 93–98

Mulder A, Vandegraaf AA, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16: 177–183

Muller F, Brissac T, Le Bris N, Felbeck H, Gros O (2010) First description of giant archaea (*Thaumarchaeota*) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. *Environmental Microbiology* 12: 2371–2383

Murray AE, Wu KY, Moyer CL, Karl DM, DeLong EF (1999) Evidence for circumpolar distribution of planktonic archaea in the Southern Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 18: 263–273

Nakagawa T, Mori K, Kato C, Takahashi R, Tokuyama T (2007) Distribution of cold-adapted ammonia-oxidizing microorganisms in the deep-ocean of the northeastern Japan Sea. *Microbes and Environments* 22: 365–372

Park HD, Wells GF, Bae H, Criddle CS, Francis CA (2006) Occurrence of ammonia-oxidizing

archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5643–5647

Pearson A, McNichol AP, Benitez–Nelson BC, Hayes JM, Eglinton TI (2001) Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: A case study using compound–specific Delta C–14 analysis. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 65: 3123–3137

Pester M, Schleper C, Wagner M (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology* 14: 300–306

Phillips CJ, Smith Z, Embley TM, Prosser JI (1999) Phylogenetic differences between particle–associated and planktonic ammonia–oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in the northwestern Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 779–786

Preston CM, Wu KY, Molinski TF, Delong EF (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 6241–6246

Purkhold U, Pommerening–Roser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5368–5382

Rakestraw NW (1936) The occurrence and significance of nitrite in the sea. *Biological Bulletin* 71: 133–167

Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine–scale analysis of natural ammonia–oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4704–4712

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor–joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425

Santoro AE, Buchwald C, McIlvin MR, Casciotti KL (2011) Isotopic signature of N₂O produced by marine ammonia-oxidizing archaea. *Science* 333: 1282–1285

Santoro AE, Casciotti KL (2011) Enrichment and characterization of ammonia-oxidizing archaea from the open ocean: phylogeny, physiology and stable isotope fractionation. *The ISME Journal* 5: 1796–1808

Santoro AE, Casciotti KL, Francis CA (2010) Activity, abundance and diversity of nitrifying archaea and bacteria in the central California Current. *Environmental Microbiology* 12: 1989–2006

Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology* 3: 479–488

Silver MW, Alldredge AL (1981) Bathypelagic marine snow – deep-sea algal and detrital community. *Journal of Marine Research* 39: 501–530

Spang A, Hatzenpichler R, Brochier-Armanet C, Rattei T, Tischler P, Spieck E, Streit W, Stahl DA, Wagner M, Schleper C (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum *Thaumarchaeota*. *Trends in Microbiology* 18: 331–340

Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446–449

Swan BK, Martinez-Garcia M, Preston CM, Sczyrba A, Woyke T, Lamy D, Reinthaler T, Poulton NJ, Masland EDP, Gomez ML, Sieracki ME, DeLong EF, Herndl GJ, Stepanauskas R (2011) Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science* 333: 1296–1300

Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11030–11035

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739

Teira E, Lebaron P, van Aken H, Herndl GJ (2006) Distribution and activity of bacteria and archaea in the deep water masses of the North Atlantic. *Limnology and Oceanography* 51: 2131–2144

Tillett D, Neilan BA (2000) Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology* 36: 251–258

Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology* 10: 1357–1364

Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, Konneke M, Schintlmeister A, Urich T, Engel M, Schlöter M, Wagner M, Richter A, Schleper C (2011) *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 8420–8425

Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 7: 1985–1995

Tully BJ, Nelson WC, Heidelberg JF (2012) Metagenomic analysis of a complex marine planktonic thaumarchaeal community from the Gulf of Maine. *Environmental Microbiology* 14: 254–267

Urakawa H, Tajima Y, Numata Y, Tsuneda S (2008) Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 894–900

van der Wielen PWJJ, Bolhuis H, Borin S, Daffonchio D, Corselli C, Giuliano L, D'Auria G, de

Lange GJ, Huebner A, Varnavas SP, Thomson J, Tamburini C, Marty D, McGenity TJ, Timmis KN, Party BS (2005) The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science* 307: 121–123

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu DY, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74

Vetriani C, Jannasch HW, MacGregor BJ, Stahl DA, Reysenbach AL (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4375–4384

Wada E and Hattori A (1990) Nitrogen in the sea: forms, abundance, and rate processes. CRC Press, Ohio.

Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pinel N, Arp DJ, Brochier-Armanet C, Chain PSG, Chan PP, Gollabgir A, Hemp J, Hugler M, Karr EA, Konneke M, Shin M, Lawton TJ, Lowe T, Martens-Habben W, Sayavedra-Soto LA, Lang D, Sievert SM, Rosenzweig AC, Manning G, Stahl DA (2010) *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8818–8823

Ward BB (2011) Nitrification: an introduction and overview of the state of the field. *In* Ward BB, Arp DJ, Klotz MG (ed.), *Nitrification*, ASM Press, Washington, DC. 3–8

Ward BB, Capone DG, Zehr JP (2007) What's new in the nitrogen cycle?. *Oceanography* 20: 101–109

Watson SW (1965) Characteristics of a marine nitrifying bacterium, *Nitrosocystis Oceanus* sp. n.. *Limnology and Oceanography* 10: 274–289

Winogradsky S (1890) Sur les organismes de la nitrofication. *Compt. Rend.* 110: 1013–1016

8. 引用文献

Woebken D, Fuchs BA, Kuypers MAA, Amann R (2007) Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4648–4657

Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of prokaryotic domain – primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5088–5090

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (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

Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Damste JSS (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 12317–12322

Wuchter C, Schouten S, Boschker HTS, Damste JSS (2003) Bicarbonate uptake by marine crenarchaeota. *FEMS Microbiology Letters* 219: 203–207

Yakimov MM, La Cono V, Denaro R (2009) A first insight into the occurrence and expression of functional *amoA* and *accA* genes of autotrophic and ammonia-oxidizing bathypelagic crenarchaeota of Tyrrhenian Sea. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 56: 748–754

Yakimov MM, La Cono V, Smedile F, DeLuca TH, Juarez S, Ciordia S, Fernandez M, Albar JP, Ferrer M, Golyshin PN, Giuliano L (2011) Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (Central Mediterranean Sea). *The ISME Journal* 5: 945–961

Yool A, Martin AP, Fernandez C, Clark DR (2007) The significance of nitrification for oceanic new production. *Nature* 447: 999–1002

Zaballos M, Lopez-Lopez A, Ovreas L, Bartual SG, D'Auria G, Alba JC, Legault B, Pushker R,

Daae FL, Rodriguez-Valera F (2006) Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 389-405

Zehr JP, Ward BB (2002) Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1015-1024

