

JNC TY 7400 2000-002

深部地質環境に対する微生物の影響に関する研究
(先行基礎工学共同研究)

2000年5月

広島大学，京都大学，核燃料サイクル開発機構
東濃地科学センター

本資料は、核燃料サイクル開発機構の開発業務を進めるために作成されたものです。したがって、その利用は限られた範囲としており、その取扱には十分な注意を払ってください。この資料の全部または一部を複写・複製・転載あるいは引用する場合、特別の許可を必要としますので、下記にお問い合わせください。

〒509-5162 岐阜県土岐市泉町定林寺 959-31

核燃料サイクル開発機構
東濃地科学センター

Inquiries about copyright and reproduction should be addressed to:

Neotectonics research group,
Tono Geoscience Institute,
Japan Nuclear Cycle Development Institute
959-31, Jourinji, Izumi, Tokishi, Gifu 509-5102,
Japan

深部地質環境に対する微生物の影響に関する研究

(研究報告)

長沼 肇¹⁾, 今中忠行²⁾, 跡見晴幸²⁾, 村上 由記¹⁾, 岩月 輝希³⁾,

要旨

近年地下には地表よりも大きいバイオマスが存在している可能性が示唆され、地下生物圏の存在が注目され始めている。これらの微生物は、深部地質環境における酸化・還元や溶解・沈殿に影響を与えていた可能性がある。地下深部の微生物について基礎的な知見を得るために、岐阜県東濃地域において、微生物現存量や活性に関する調査研究を行った。地下水中の全菌数は、概ね 10^7 cells/ ml (堆積岩層) ~ 10^6 cells/ ml (花崗岩層) であり、全般的に堆積岩層で一桁高くなっていた。一方、微生物の種類(形態)および形態種数は深度ごとにかなり異なっていた。酸化還元状態との関連を見ると、花崗岩層の深度 180~330m の酸化還元電位は $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe(OH)}_3$ の酸化還元境界に相当し、ここに鉄関連細菌生菌数のピークが見られ、深度 500m 以深の酸化還元電位は $\text{HS}^-/\text{SO}_4^{2-}$ の酸化還元境界にあたり、硫酸還元菌の存在しうる酸化還元電位があると想定される深度帯(深度 300~500m)に硫酸還元の存在が認められた。深部地質環境における微生物の存在量と活性は、地下の地球化学プロセスと密接な関係にあることが示唆された。

1) 広島大学, 2)京都大学

3) 核燃料サイクル開発機構 東濃地科学センター

Abundance of deep subsurface microbial communities in the Tono area, central Japan

Takesi Naganuma¹⁾, Tadayuki Imanaka²⁾, Haruyuki Atom²⁾,
Yuki Murakami¹⁾, Teruki Iwatsuki³⁾,

Abstract

There are strong but circumstantial indications of microbial life widespread at depth in the crust of the Earth. We report the abundance of total and selected bacteria in the interstitial water of granite and sedimentary rocks in the Tono area, central Japan. Maximum abundance of 10^5 to 10^6 cells/ml was observed in the granite and sedimentary rock waters, respectively. Sulfate-reducing and iron-oxidizing/reducing bacteria were detected at depths having specific pH and oxidation/reduction potential (Eh). Those pH and Eh regimes were corresponding to the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ and $\text{H}_2\text{S}/\text{SO}_4^{2-}$ interface conditions. It is implied that these bacteria are involved in geochemical processes such as precipitation, dissolution and cycling of sulfur, iron, and related elements.

1) Hiroshima Univ. 2) Kyoto Univ.

3) Japan Nuclear Cycle Development Institute (JNC), Tono Geoscience Center

目次

1. 深部地質環境における微生物生態系の多様性と機能	
1.1 地下微生物生存量の見積もり	1
1.2 地下生物圏の物理化学的制限	2
2. 調査地域の概要	3
3. 試料の採取方法	5
4. 結果・考察	
4.1 地下水中の微生物現存量	5
4.2 地下深部における微生物のエネルギー代謝	9
4.3 微生物と地下の物質変換・移動	11
5. 今後の課題	12
6. 深度地下における微生物生態系とその物質循環系	
6.1 東濃地科学センターの地下水から分離された微生物	15
6.1.1 実験方法	15
6.1.2 実験結果	16
6.2 嫌気的長鎖アルコール分解菌 M4 株	22
6.2.1 実験方法	22
6.2.2 実験結果	24
6.3 深度地下環境からの新規微生物の分離と解析	26
6.4 考察	
6.4.1 東濃地下から分離された微生物	27
6.4.2 嫌気的アルコール、アルデヒド分解菌 M4 株	29
6.4.3 深度地下環境からの新規微生物の分離	29

参考文献

1. 深部地質環境における微生物生態系の多様性と機能

本章では、微生物活動による地下水の酸化還元や物質移動への影響評価を行うために基礎的な知見を得ることを目的として、岐阜県東濃地域の堆積岩および花崗岩を対象に行われた地下微生物の生物量、多様性、機能などについての調査研究の成果について述べる。

近年、地下深部への科学的アクセス手段の整備に伴い、地下微生物の存在に関する知見が急速に増え始め、地下生物圏フロンティアの存在が重要視されるようになった (Amy and Haldeman, 1997)。しかしながら、我が国において、地下深部に存在する微生物については、採取方法の不備などの問題のため、種類や量などの基礎的な情報さえ得られていないのが現状である。地層中の微生物は、地下水の酸化還元電位に影響を与えるだけでなく、地層中の有機物を分解し、有機コロイド等を生成する可能性が指摘されており（図1），これまでの無機化学的な研究結果をくつがえす可能性もある。

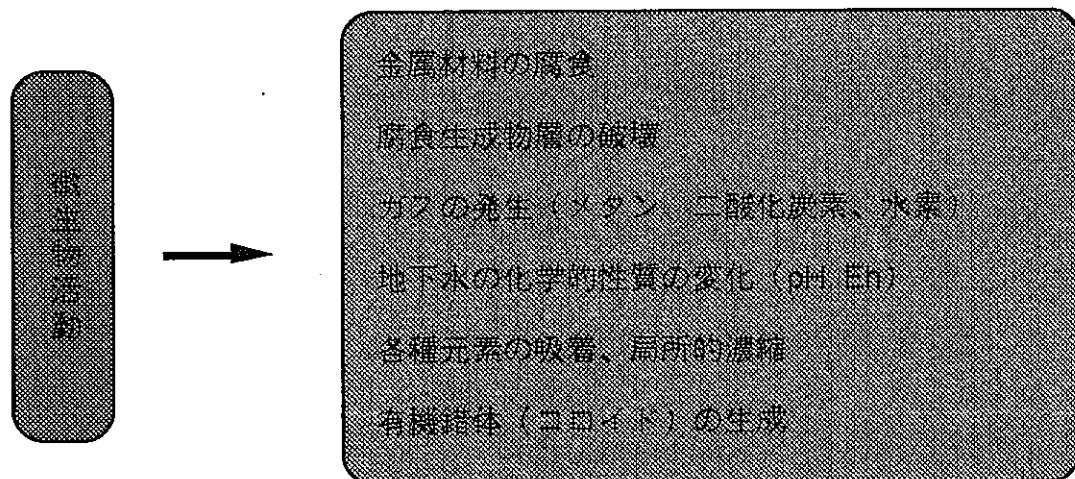


図1. 地下深部において想定される微生物活動の影響

1.1 地下微生物生存量の見積もり

地下の微生物バイオマスは、地下 5km までに約 2×10^{14} t にものぼるという推測もあり (Gold, 1992)、地下微生物のバイオマスは、従来調べられてきた陸域・水域生物圏の全バイオマス— 1.0×10^{12} t—よりも大きい可能性がある。また、地下（陸上地下・海底下）に存在している原核生物のバイオマスは、地球

上における全原核生物のバイオマスの約92%にも上るという推測もある(表1; Parkes et al., 1994, Whitman et al, 1998)。

表1. 地球上における全原核生物のバイオマスに対する地下微生物の割合

	原核生物の細胞数 ($\times 10^{28}$ cells/ml)	原核生物のバイオマス ($\times 10^{15}$ gC)	地球上の全原核生物の バイオマスに対する 割合 (%)
水圏	12	2.2	0.6 (0.4)*
海底下	355	303	85.8 (55.5)
土壤	26	26	7.4 (4.8)
陸上地下	25~250	22~215	6.2 (39.4)
総計	415~640	353~546	100 (100.1)

*()内は原核生物のバイオマスを見積りの最大値で計算した場合

これらの見積りは地下環境の空隙率、水分量等をもとに行なわれており、条件さえ満たせば、微生物の生存領域は地下深くまで広がっている可能性を示している。最近の研究報告によれば、玄武岩の中から硫酸還元細菌、鉄還元細菌、メタン生成古細菌等の微生物が検出されており、これらの現場環境での活性も測定されている (Stevens et al, 1995)。また、石英の流体包有物中で微生物らしきものの存在が確認されている (Bargar et al, 1985)。これらの研究成果によって、地下深くの火成岩の中でも微生物が存在できる可能性が指摘されている (Krumholz et al, 1997)。地下微生物研究は、欧米を中心に世界各地で進められている。スウェーデンのエスピボ鉱山で行われている地下微生物研究では、微生物の現存量は花崗岩の地下水中に約 10^5 cells/ml (全菌数)、硫酸還元菌は最高密度で約 10^3 cells/ml と求められている (Pedersen, 1997, Pedersen et al. 1997)。また、米国エネルギー省関連の研究結果からは、堆積岩中の鉄還元細菌の細胞密度は、多いところで約 10^4 cells/ml にものぼると報告されている (Fredrickson and Onstott, 1996, McKinley et al, 1997)。

1.2 地下生物圏の物理化学的制限

地下に生息する微生物は、以下のような条件によってその増殖を左右されていると考えられる。

- 1) 高温／高压
- 2) 酸化還元電位／pH
- 3) 空隙率／透水性

- 4) 水分活性
- 5) エネルギー／生体構成元素
 - ・無機物
 - ・有機物

温度・圧力に関して言えば、地下温度上昇率は一般的に約 25～30°C/km 前後、海底下では約 15°C/km 程度とされている。既知の微生物の生育上限温度は約 120°C なので、単純に温度だけで考えれば、微生物は大陸地下約 4～5 km、海底下約 8 km まで生育可能である。一方、水圧上昇率は 100 気圧/km、岩盤圧力上昇率は 250（浅い岩盤）～300（マントル付近）気圧/km である。既知の生物の生育上限圧力を 2000 気圧とすると、地下 8 km まで生息可能となる。

地下深部は、一般的に還元的な環境であるため、ここに生息する微生物は主に嫌気性細菌であると考えられる。

また、微生物の生存に必須の条件の一つとして、「空間」「水分」があげられる。どんなに栄養分が豊富に存在していても、微生物が生息もしくは増殖するための空間がなければ、微生物は存在することができない。したがって、地下微生物の現存量は、空隙率、透水性にかなり左右されているものと予想される。また、水分が存在していても、微生物にとってその利用度が低ければ意味がない。水は地下環境中で、「結合水」と「自由水」として存在しており、結合水は鉱物表面におもに存在している。ここで微生物が利用できるのは「自由水」のみである。

地下微生物がこのような高温、高圧、強還元的等の条件の下で存在していることは確実であり、またその環境中で活性を持っている可能性もあり、地下微生物の存在範囲は非常に広いと予想される。

2. 調査地域の概要

試料は主に東濃地域（図 2）の瑞浪層群（第三紀堆積岩）および土岐花崗岩から採取した。瑞浪層群（層厚約 200m）は、下から土岐夾炭累層、明世累層、生猿累層よりなり、基盤である土岐花崗岩（白亜紀後期）を不整合に覆って

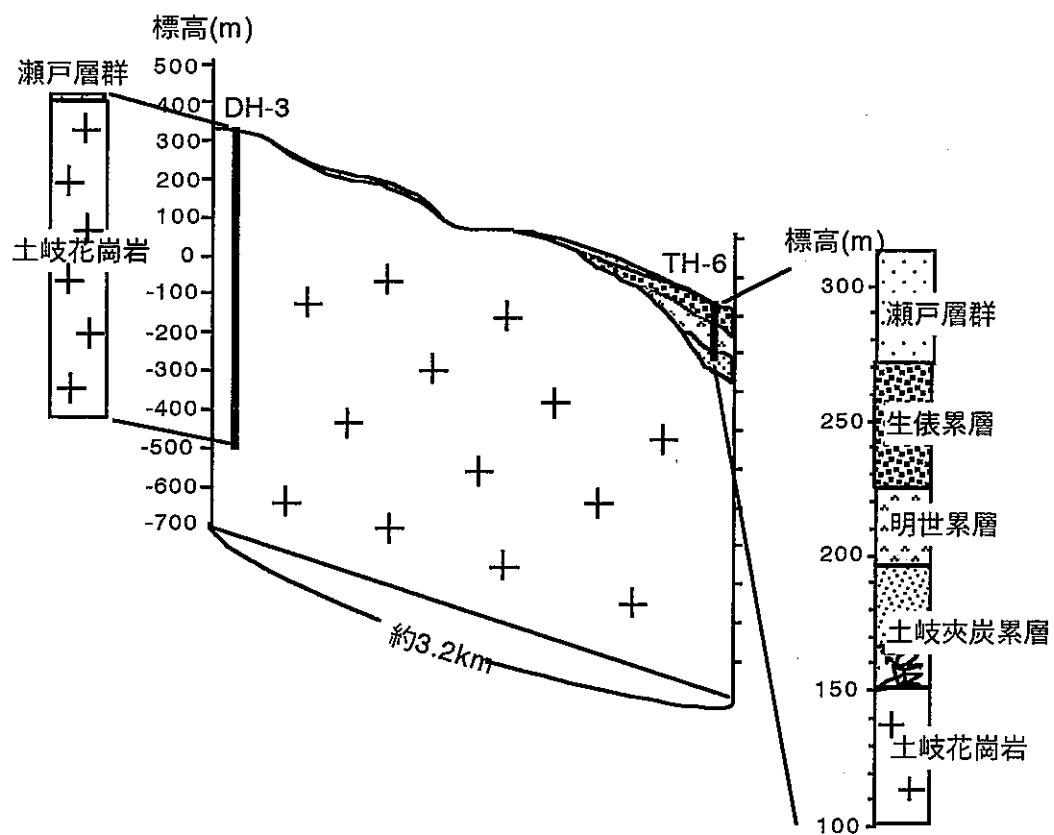
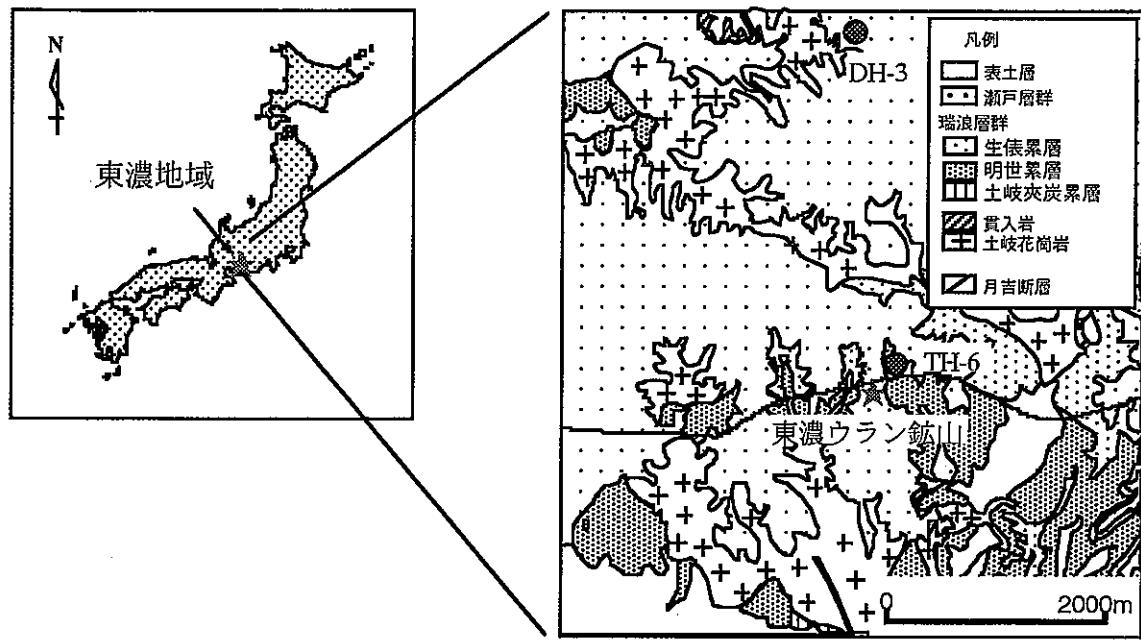


図2. 東濃地域の地質と調査試錐孔

る。土岐夾炭層下部は淡水成であり、凝灰質の砂岩・泥岩・礫岩からなり亜炭層が挟まれている。明世累層は海成で多くの化石を含んでおり、泥質細粒砂岩・凝灰岩泥岩・凝灰岩からなっている。生俵累層も同じく海成で化石を含んでおり、泥岩・凝灰岩・泥質細粒礫岩からなっている。

3. 試料の採取方法

深部地下環境の微生物研究を行なう時にもっとも懸念される問題は、陸上や掘削泥水からの雑菌混入等による汚染の可能性である。試料採取中はもちろんのこと、試錐孔掘削時や掘削後の雑菌混入を防ぐ技術が必要となる。そのため、掘削による影響を可能な限り避けるために試錐用泥剤を用いずに掘削された試錐孔として、基盤の土岐花崗岩に掘削された試錐孔 DH-3 号孔（深度；～840m）及び、堆積岩に掘削された試錐孔 TH-6 号孔（深度；～約 200m）（図 2）を調査に利用した。地下水の採水においては、掘削水の混入や異なった深度の地下水の混合が起こらないよう、パッカーを備えた MP (Multiple piezometer) システムを用いた。この装置により、地下水が存在していた環境を保持した状態（被圧・不活性）で採水が可能である。

4. 結果・考察

4.1 地下水中の微生物現存量

表 2 に調査結果を示す。DH-3 号孔における微生物現存量（全菌数）は約 $10^5 \sim 10^6$ cells/ml も存在していた（図 3）。また、深くなるにつれて嫌気性細菌密度が増加していた。（村上 他, 1999a,b）

TH-6 号孔においては、泥質の砂岩・礫岩を主とする明世累層（深度 104m 地点）、泥質砂岩～細礫岩を主とする土岐夾炭層上部層（深度 132m 地点）、亜炭を多く含む炭質泥岩を主とする土岐夾炭層下部層（深度 153m 地点）、土岐花崗岩（深度 177.5m 地点）という、深度によってそれぞれ異なった岩相条件となっており、ここでの微生物現存量は約 10^6 cells/ml であった（図 4）。これは、光合成生産の行なわれる海洋表層（有光層）の細菌密度とほぼ同レベルである。

一般的に有機物濃度も低く、間隙も小さいと考えられている花崗岩であるが、その帶水層には驚くべき数の微生物が存在していた。深度が増しても微生物密度は減少せず、むしろ増加している深度もあった。この原因として、岩石の部分部分で鉱物組成・変質の程度・空隙率・酸素濃度等が異なっていることが考

表2 東濃地域における地下水中の微生物存在量

試錐孔	岩種	深度 (G.L - m)	全菌数 (cells/ml)	好気性生菌数 (CFU/ml)		チオ硫酸細菌 (CFU/ml)	従属栄養好 気性細菌 (CFU/ml)	鉄関連細菌 (CFU/ml)	硫酸還元菌 (CFU/ml)	脱窒菌 (CFU/ml)	硝化菌 (CFU/ml)
				1/2LB-G	×10(1/2LB-G)						
TH-6	明世累層	-104	1.6791E+06	—	—	—	5.00E+06	1.00E+05	4.20E+03	m.a.	n.d.
TH-6	土岐夾炭累層	-132	1.4850E+06	—	—	—	5.00E+06	1.00E+05	2.00E+02	b.l.	n.d.
TH-6	土岐夾炭累層	-153	2.2488E+06	—	—	—	5.00E+06	1.00E+05	n.a.	b.l.	n.d.
TH-6	土岐花崗岩	-177.5	1.9334E+06	—	—	—	5.00E+06	7.51E+03	2.40E+02	b.l.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-19	3.1429E+05	9.07E+03	2.21E+04	8.83E+03	5.00E+05	7.51E+03	n.a.	n.d.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-130	6.7757E+05	3.60E+03	1.48E+04	5.43E+03	3.33E+06	1.00E+05	n.a.	b.l.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-209	1.1036E+06	2.00E+02	3.60E+03	0.00E+00	3.33E+06	4.50E+04	n.a.	b.l.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-330	1.6021E+06	7.40E+03	1.13E+04	7.23E+03	1.00E+03	1.00E+05	n.a.	n.d.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-458	2.2426E+06	9.10E+03	1.62E+04	8.97E+03	5.00E+06	1.76E+04	1.70E+04	no data	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-485	1.1404E+06	2.23E+03	6.17E+03	1.97E+03	1.00E+03	1.76E+04	3.30E+01	b.l.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-600	1.0302E+06	3.07E+03	7.60E+03	3.30E+03	5.00E+05	1.00E+05	n.a.	b.l.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-645	6.6131E+05	3.37E+03	5.87E+03	1.20E+03	5.00E+05	1.00E+05	n.a.	b.l.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-767	1.2522E+06	1.33E+03	6.73E+03	2.03E+03	1.00E+03	4.50E+04	n.a.	b.l.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-790	9.0854E+05	9.03E+03	1.24E+04	7.43E+03	5.00E+05	9.19E+03	n.a.	n.d.	n.d.
DH-3	土岐花崗岩	-840	8.9319E+05	3.70E+03	5.73E+03	2.33E+03	1.67E+05	1.76E+04	n.a.	n.d.	n.d.

n.d. = not detect n.a. = not aggressive, m.a. = moderately aggressive, b.l. = background level

えられる。例えば、比較的割れ目の数が多いか、もしくは割れ目帯にあたる深度では、微生物密度も高くなっていた。これは、堆積岩の地下水中においても同じことがいえる。

このような現位置の環境条件の違いは、検出される微生物種の違いにも反映されている。従属栄養性細菌・硫酸還元菌・鉄酸化細菌・鉄還元細菌等は、現位置の環境に存在する有機物、Fe、S 等の濃度や利用能にかなり左右されないと考えられる。例えば、鉄関連細菌（鉄酸化細菌もしくは鉄還元細菌）が比較的多く検出された深度は、ちょうど鉄の化学種の酸化還元境界 ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe(OH)}_3$ または $\text{FeS}_2/\text{Fe}^{2+}$, $\text{FeS}_2/\text{FeCO}_3$) に相当している（図5）。この境界が存在する深度では、他の環境よりも鉄の利用能が高いと考えられる。そのため、鉄関連細菌が生存しやすい環境条件となったのであろう。これらの事実は、言い換えば、微生物は増殖するための環境条件さえ整えば生息できるという事実を示唆している。なお、生菌数を測定する際には培養法を用いたため、実際に地下環境で生きている微生物のうち、ほとんどが生きているが培養できないために検出されていない VBNC (Viable but non-culturable) 菌と予想される。したがって、VBNC 菌を考慮すると、東濃地域の地下環境で生育する微生物バイオマスはかなり大きいものであると想像できる。これらの微生物が現場環境で活動能力を持っているか否かについては、これから解明しなければならない課題の一つである。

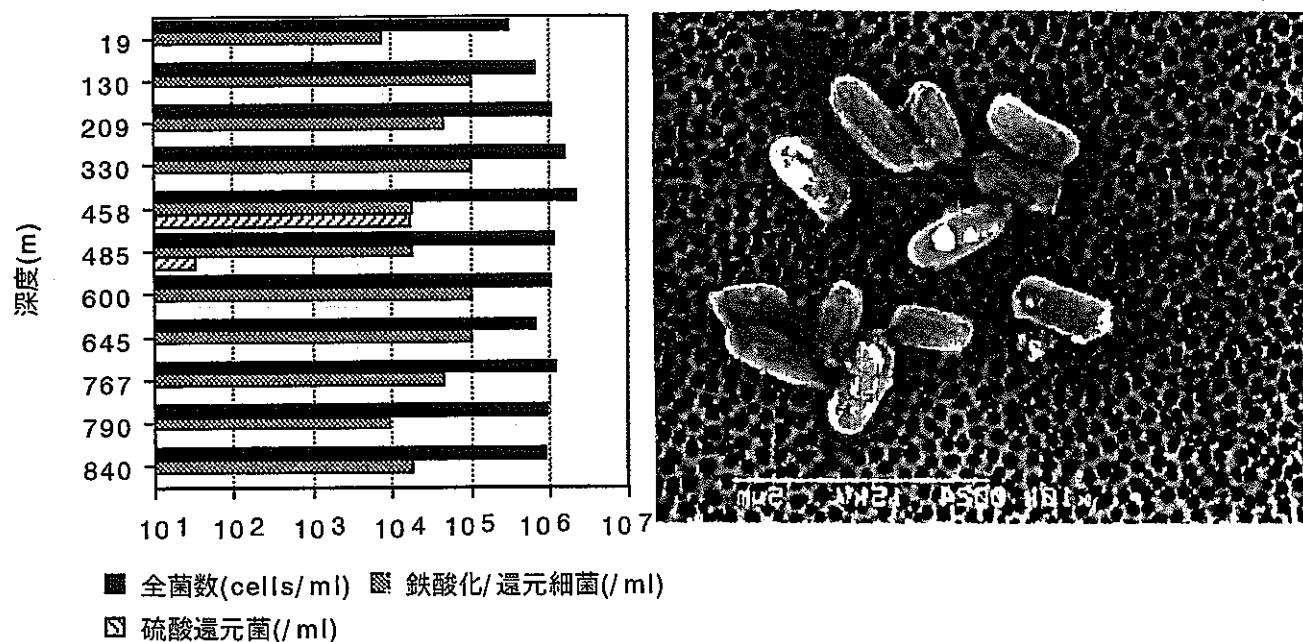


図3. 花崗岩の地下水中における微生物現存量と分離された微生物

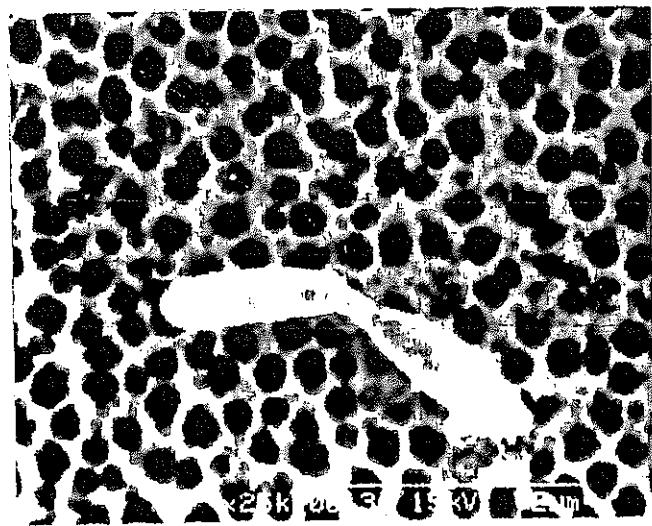
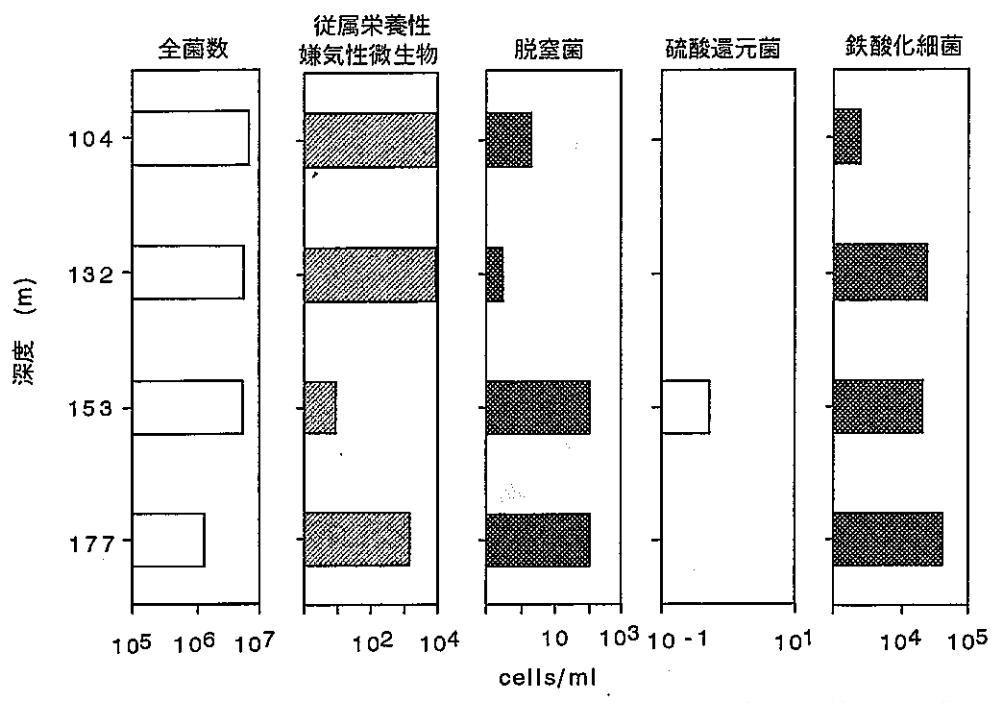


図4. 堆積岩の地下水中の微生物現存量と分離された微生物（増殖過程）

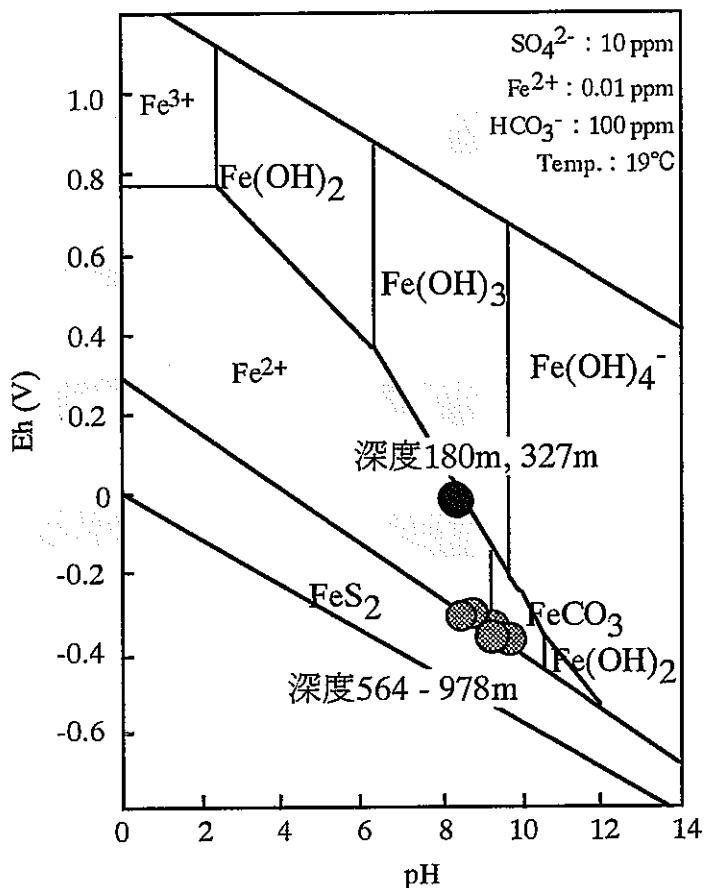


図5. 花崗岩中の地下水の酸化還元電位と鉄と硫黄の化学種の相平衡図

4.2 地下深部における微生物のエネルギー代謝

微生物が増殖し生命を維持していくためには、エネルギーを獲得しなければならない。地球上の生物の一次生産は、光合成と化学合成の2つに分かれている。どちらも無機物（多くの場合、水と二酸化炭素）から有機物を生産するプロセスであるが、このプロセス（炭酸固定）には還元力が必要である。この還元力を作り出すのに、光エネルギーを用いるのが光合成である。しかし、地下環境には光がまったく届かないため、地下において一次生産を行なっている生物は化学合成細菌であると考えられる。化学合成における化学エネルギーは、主に無機物が酸化される際に遊離するエネルギーである。このときの無機物は電子供与体として用いられ、硫黄・鉄・マンガンなどがそれにあたる。電子受容体としては主に分子状酸素が用いられる(Adams, 1993, Vargas, 1998)。しかし地下には、分子状酸素もほとんど存在していない。したがって、地下微生物はエネルギー獲得を分子状酸素を用いない酸化によって行なっていると考えられ

る。例えば、以下のような反応が考えられる(図6)。

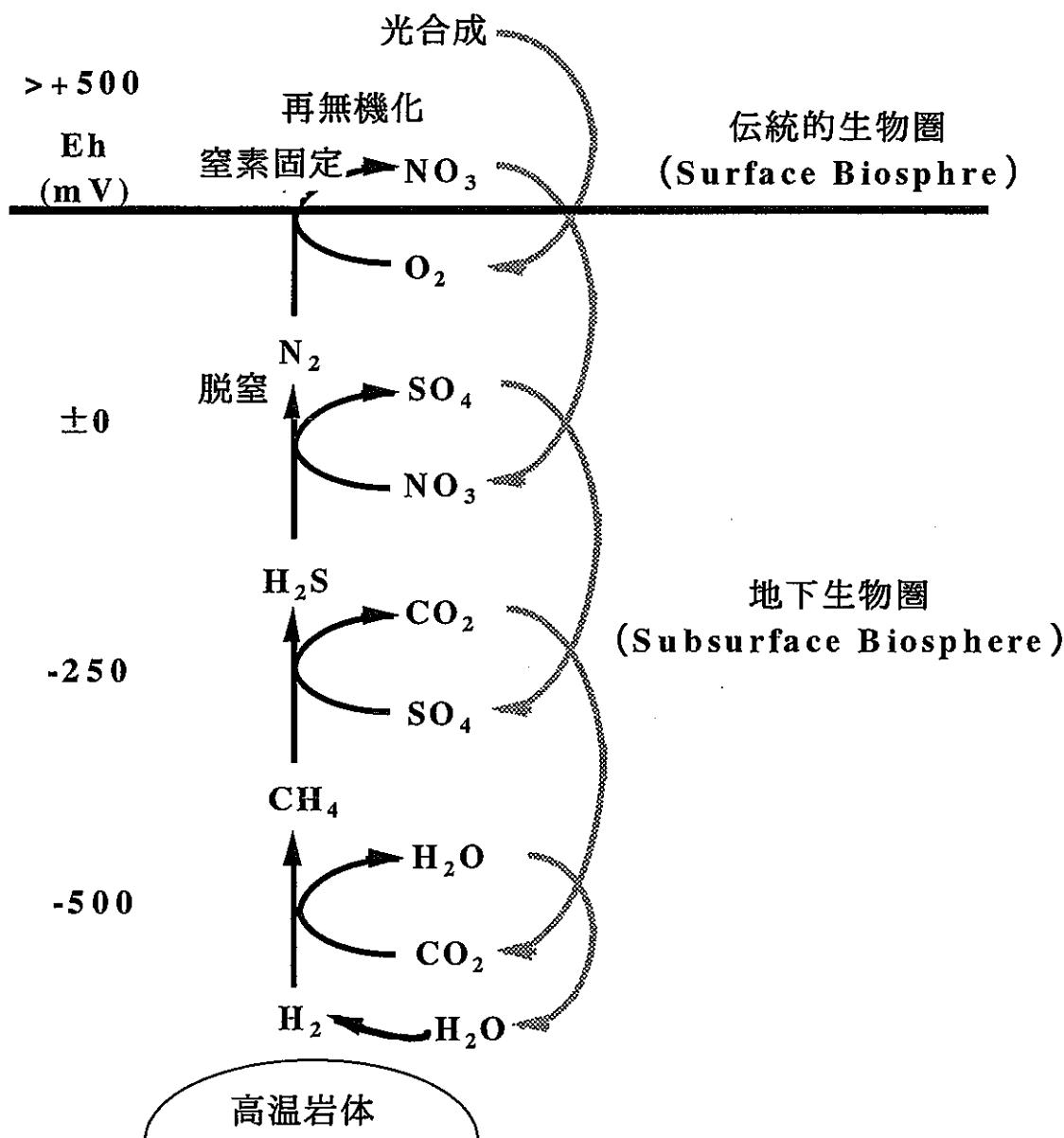
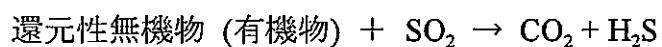
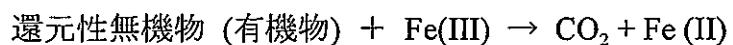
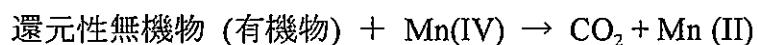
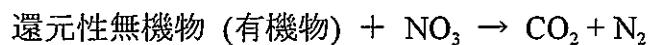
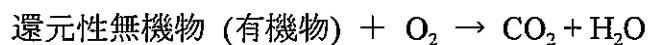
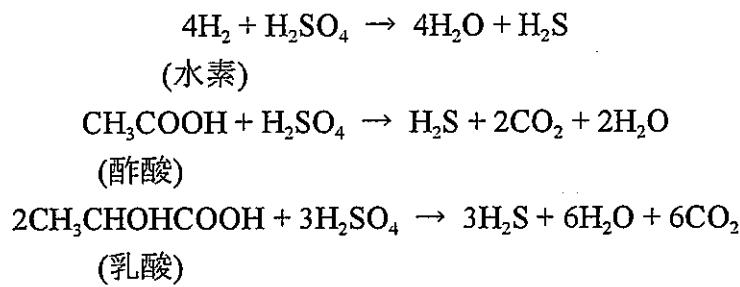
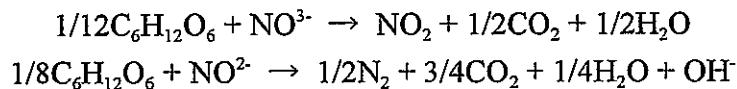


図6. 地下深部の嫌気性環境で想定される微生物反応系

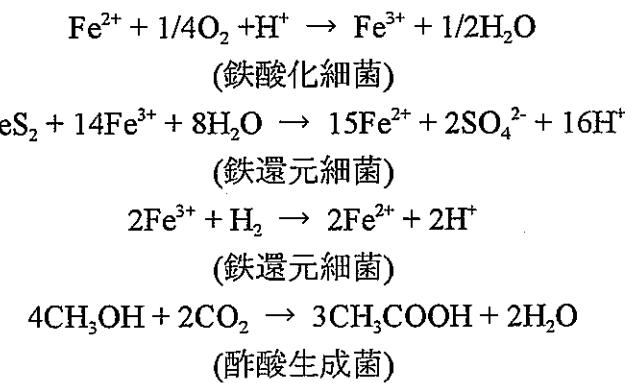
硫酸還元菌の場合、主に水素、酢酸、乳酸などの基質を SO_4^{2-} を酸化剤(電子受容体)として酸化する。つまり、硫酸還元とは SO_4^{2-} を用いた酸化のことである。この酸化プロセスの産物として H_2S と CO_2 を生成する。



上記の反応では H_2S が生成するが、これはまた別の化学合成細菌(硫黄酸化細菌)のエネルギー代謝基質になる。つまり、ここには硫酸還元($\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$)から硫化水素酸化 ($\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$)へのエネルギー代謝の連鎖があることになる。また、脱窒細菌の場合、硝酸イオンを酸化剤(電子受容体)として用いている。

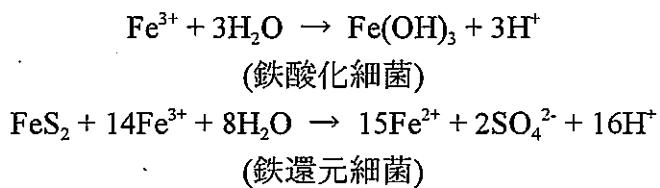


このように、地下生物圏は、地上から浸透してきた有機物、地下で生産された有機物を利用する従属栄養性細菌と、地下にもともと存在していた無機物を利用する独立化学合成細菌によって成り立っていると考えられる。また、地下深部には鉄酸化細菌、鉄還元細菌、酢酸生成菌の存在が確認されており(Pedersen, 1997)、地下微生物だけで完結した生態系が形成されている可能性もある。

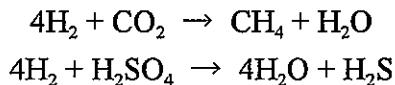


4.3 微生物と地下の物質変換・移動

地下環境中の微生物は、そこに存在するメタンや硫化水素、水素、鉄、マンガンなどの物質を利用して増殖している可能性が高い (Banfield and Nealson, 1997)。これらのガスや化合物は微生物の活動によっても生産されたり形が変化する。例えば、微生物の増殖によって水酸化鉄や黄鉄鉱 (Pyrite; FeS₂) が生成されたり、黄鉄鉱を溶解する微生物も報告されている (Banfield and Nealson, 1997)。さらに、鉄還元細菌の反応によって磁鉄鉱 (Magnetite; Fe(II)Fe₂(III)O₄) が生成されることもわかっている。



また、メタン生成菌、硫酸還元菌によって以下のような反応が起こる。



また、生成された鉱物に微生物が付着し、もしくは微生物の膜に生成鉱物が貯えられ、地下水の流れとともに地下環境中を移動している可能性も指摘されている (田崎 他, 1996)。鉱物の溶解反応に関しても同様の現象 (逆の反応) が起こっていると予想される。また、地下微生物の増殖により、酸化還元境界等の環境変化が起こっている可能性があり、それによって微生物が地下環境中の鉱物の形成に関与していることも十分考えられる。

5. 今後の課題

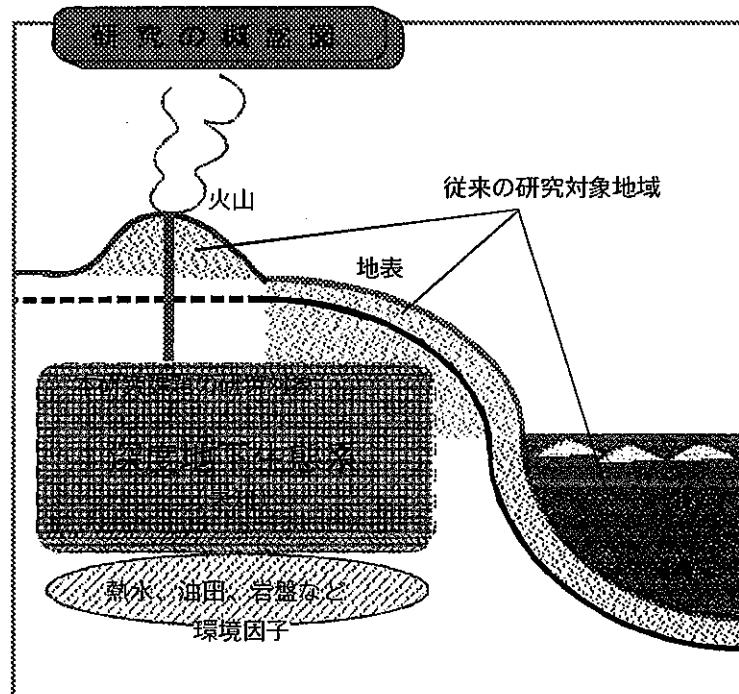
東濃地域の堆積岩および花崗岩中の微生物について、その存在量と活性についての知見を得ることができた。現段階では、微生物の存在量と酸化還元状態に何らかの関係があるということを断言できる。微生物が酸化還元状態を決めるのか、酸化還元状態が微生物の存在量、活性を決めるのかについては未だ不明である。しかしながら、現在得られつつある硫黄同位体比などのデータから、硫酸還元のメカニズムは無機化学的過程よりも生物化学的過程の方が優勢であると推測される。今後、還元環境下での微生物生態系の規模と酸化還元環境に

与える影響の程度について把握するために、地下環境において優勢な微生物種とその活性をコントロールする要因を明らかにしていく必要がある。

6. 深度地下における微生物生態系とその物質循環系の解析

深度地下環境は古くから無菌状態であると信じられていたため、その生態系の研究はほとんど為されてないといってよい。しかし、最近我々は、超好熱菌、石油分解菌など地下から地表に出現したとも予想される嫌気性菌を分離しており、深度地下には未知の生物が多種類存在している可能性が示唆され始めた。そこで本研究ではこの未開拓の深度地下極限環境から新規な微生物を分離し、それらが有するであろう特殊酵素、代謝系や環境適応戦略を解析していくことを目標に設定している。

これまでに東濃地科学センターや油田地帯、地下堆積岩などから採取した地下土壤サンプル、水サンプルについて、直ちに嫌気状態のグローブボックス内で操作を行い、各種微生物の分離を行った。



まず、形態的に異なるものをそれぞれ分離し、遺伝子解析による菌の同定と分類を行い、得られた微生物に対する考察を行った。また、地下環境には石油などの炭化水素を主成分とした物質が無酸素状態で蓄積していることから、日本の油田地帯(静岡県相良、新潟県長岡)より油、土壤サンプルを採取して、嫌気的に長鎖アルコール、アルカンなどの炭化水素を分解できる菌株の分離も行った。

6.1 東濃地科学センターの地下水から分離された微生物

6.1.1 実験方法

微生物の培養

嫌気条件の気相成分としては窒素：水素：二酸化炭素 = 90 : 5 : 5 の混合ガスを用いた。また、寒天培地としては、最少無機塩培地(M9)を用いた(Na_2PO_4 6g/l, KH_2PO_4 3g/l, NH_4Cl 1g/l, NaCl 0.5g/l, MgSO_4 0.24g/l, CaCl_2 11.1mg/l, trace elements)。好気培養も行ったが、培地としては LB 培地を用いた(Bacto-tryptone 10g/l, yeast extract 5g/l, NaCl 10g/l)。30°C、37°C で嫌気、好気条件下で培養を行った。

微生物の染色体 DNA の抽出

LB 培地 5ml に菌を植菌したのち 30°C で 16 時間培養した。15000 × g, 5 min, 4°C で遠心した後、菌体を 500ul の TE 飽和 phenol を加えて良く攪拌した。遠心した後、上清を新しいチューブに移して等量の isopropanol を加えて良く攪拌したのち遠心して DNA の沈殿を回収した。沈殿を 70% ethanol で洗浄、減圧乾燥した後に 50ul の TE を加えて溶解させた。

16S リボソーム遺伝子の塩基配列決定

PCR による 16S リボソーム遺伝子の增幅

Bacteria 由来の 16S リボソーム遺伝子の塩基配列から、以下に示すプライマーを作成し、目的遺伝子の部分断片を PCR 法によって増幅してシーケンシングの鋳型として用いた。PCR の反応条件は以下に示す。

RS-1 primer

5' AAACTCTAAAGTGAATTGACGG 3'

RS-3 primer

5' ACGGGCGGTGTGTAGC 3'

PCR の反応条件

Template DNA	3 μ l	94°C	1min	
RS-1 primer (20pmol)	1 μ l	94°C	30sec	
RS-3 primer (20pmol)	1 μ l	55°C	30sec	25cycle
2.5mM dNTPs	5 μ l	72°C	1min	
10×buffer	5 μ l	72°C	5min	
蒸留水	35 μ l			
Ex taq (Takara Co.)	0.5 μ l			

得られた約 500bp の DNA 断片はシーケンシングキット(Big dye-therminator, Applide biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

また遺伝子の相同性検索は相同性検索ソフトウェア BLAST を用いて行った。

6.1.2 実験結果

- ・嫌気地下水サンプル

培地 M9

嫌気 30°C

分離菌株 6 株

最終地点	嫌気
A(132m)	2
B(153m)	1
C(104m)	2
D(177.5m)	1

これらの株はすべて好気、栄養培地でも増殖可能であり、嫌気性から好気性に移して液体培養した後、PCR で 16S リボソーム遺伝子を增幅し direct sequence を行った。

A132-a

forward

TTTGTTNGGC ANACTNCCTT TTGCAGCTNN CACCGNGACT ACTAGCGATT
NCGACTTCAC GNAGTCNAGN TNGCAGTACT GCGATTCCGG ACTACGACTA

GGTTNTATCG GGATTAGCTN NCCCTTGCG GGNTCGGCAA ACCCTCTCGT NACCAGCCNT TGTANCACG CCGTGTAGCC CNAANCTATA NGTGGCACAT GTAGGTACTA TGCACNGNNC ATATCCANAN TTNTTTCTAC NCGAANNNCNG NTAATANGCC NAGCCTTCCA TNTATGCAGC NGCTCTAACT CNANATGTAA			
gb:MS16SRB1S <i>M.sulfidovorans</i> mRNA for 16S ribosomal RNA.>emb:MS...	52	5e-04	
gb:MM16SR <i>M.marina</i> gene for 16S ribosomal RNA (ATCC 35842).>emb...	52	5e-04	
gb:MM16S5989 <i>M.marina</i> mRNA for 16S ribosomal RNA.>emb:MM16S5989...	52	5e-04	
gb:UB13H16SR Unidentified bacterium 16S rRNA gene, partial stra...	50	0.002	
gb:AB008000 <i>Variovorax paradoxus</i> MBIC3839 gene for 16S rRNA, pa...	50	0.002	
gb:AF106609 <i>Delftia acidovorans</i> 16S ribosomal RNA gene, partial...	50	0.002	

A132-b

forward

CCTCNTAC NGAACAGTNC GGCAGNTTTT GNGGGTACCT NGTGCAACGC
GAAAAACCTT ACCCACCTT GACATGTACG GAATCCTTA GAGATAGAGG
AGTGCTCGAA AGAGAGCCGT AACACAGGTG CTCGCATGGC TGTCGTCAGC
TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCTTGTC
ATTAGTTGCT ACATTAGTT GGGCACTCTA ATGAGACTGC CGGTGACAAA
CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TATAGGTGGG
GCTACACACG TCATACAATG GCTGGTACAG AGGGTTGCCA ACCCGCGAGG
GGGAGCCAAT CCCATAAAGC CAGTCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT

reverse

CCCCNNNTNA CTGNNCCTNC CCCGTTTTC TGATCCCCCG ATTACTAGCG
ATTCCGACTT CACGCAGTCG AGTTGCAGAC TGCGATCCGG ACTACGACTG
GCTTTATGGG ATTGGCTCCC CCTCGCGGGT TGGCAACCCT CTGTACCAGC
CATTGTATGA CGTGTGTAGC CCCACCTATA AGGGCCATGA GGACTTGACG
TCATCCCCAC CTTCCCTCCGG TTTGTACCG GCAGTCTCAT TAGAGTGCC
AACTAAATGT AGCAACTAAT GACAAGGGTT GCGCTCGTTG CGGGACTTAA
CCCAACATCT CACGACACGA GCTGACGACA GCCATGCAGC ACCTGTGTTA
CGGCTCTCTT TCGAGCACTC CTCTATCTCT AAAGGATTCC GTACATGTCA

gb:UAU45667 Unidentified activated sludge bacterium AI047 16S r...	686	0.0
gb:UAU45686 Unidentified activated sludge bacterium AI423 16S r...	686	0.0

gb:ASY18617 Acidovorax sp. BSB421 16S rRNA gene.>emb:ASY18617 A...	686	0.0
gb:B7087RRNA Unidentified activated sludge bacterium 7087 16S r...	686	0.0
gb:AF078765 Acidovorax facilis 16S ribosomal RNA gene, partial ...	686	0.0
gb:UC04B16S Type 0803 filamentous bacterium 16S rRNA gene (stra...	686	0.0
gb:AF078767 Acidovorax sp. 7078 16S ribosomal RNA gene, partial...	686	0.0
gb:UC05B16S Type 0803 filamentous bacterium 16S rRNA gene (stra...	680	0.0
gb:AF078764 Acidovorax delafieldii 16S ribosomal RNA gene, part...	678	0.0
gb:D87103 Pseudomonas sp. DNA for 16S rRNA, partial sequence.>e...	678	0.0

B-153c

forward

```
TTTTGCCCC CNCAGCGGTG NATGATGTGG CTTAATTGCA TGCAACGCGA
AAAACCTTAC CCACCTTGA CATGGCAGGA AGTTCCAGA GATGGATTG
TGCTCGAAAG AGAACCTGCA CACAGGTGCT GCATGGCTGT NANTCAGCTC
GTGTCGTGAG ATGTTGGTT AAGTCCCAGCA ACGAGCGCAA CCCTTGTCA
TAGTTGCTAC ATTCAAGTTGA GCACTCTAAT GAGACTGCCG GTGACAAACC
GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAGTCCTC ATGGCCCTTA TAGGTGGGGC
TACACACGTC ATACAATGGC TGGTACAGAG GGTTGCCAAC CCGCGAGGGG
GAGCTAATCC CATNTAACCA GTCTAGTCC GGATCGCAGT CTGCAACTCG
```

reverse

```
GGGCANGNTT CATTGGCA TGCTGANCAG
GATACTAGCG ATTCCGACTT CACGCAGTCG AGTTGCAGAC TGCGATCCGG
ACTACGACTG GTTTATGGG ATTAGCTCCC CCTCGCGGGT TGGCAACCC
CTGTACCAGC CATTGTATGA CGTGTGTAGC CCCACCTATA AGGGCCATGA
GGACTTGACG TCATCCCCAC CTTCTCCGG TTTGTCACCG GCAGTCTCAT
TAGAGTGCTC AACTGAATGT AGCAACTAAT GACAAGGGTT GCGCTCGTTG
CGGGACTTAA CCCAACATCT CACGACACGA GCTGACGACA GCCATGCAGC
ACCTGTGTGC AGGTTCTCTT TCGAGCACGA ATCCATCTCT GGAAACTTCC
```

gbnu:DSP237966 Delftia sp. EK3 16S rRNA gene, isolate EK3.	712	0.0
gb:AB015567 Unidentified beta proteobacterium 16S rRNA gene, st...	698	0.0
gb:AF078774 Delftia acidovorans 16S ribosomal RNA gene, partial...	696	0.0
gb:AB020186 Delftia acidovorans gene for 16S rRNA, partial sequ...	696	0.0

gb:AF149849 Comamonas sp. MC1 16S ribosomal RNA gene, partial s...	696	0.0
gb:CSPAJ2803 Comamonas sp. 16S rRNA gene, isolate 158.>emb:CSPA...	696	0.0
gb:AB021417 Comamonas acidovorans DNA for 16S rRNA, strain IAM ...	688	0.0
gbnu:AF172067 Comamonas testosteroni 16S ribosomal RNA gene, pa...	648	0.0
gb:AB007997 Comamonas testosteroni MBIC3841 gene for 16S rRNA, ...	648	0.0

C-104d

forward

GNTATTTNN TTTACGTGGN ANCAGCGGTT TTGATGTGGC TAATTCGATG
 CAACCGCGAAA AACCTTACCC ACCTTGACA TGGCAGGAAG TTTCCAGAGA
 TGGATTCTGTG CTCGAAAGAG AACCTGCACA CAGGTGCTGC ATGGCTGTG
 TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCC CGCAACG AGCNGCAACC
 CTTGTCATTA GTTGCTACAT TCAGTTGAGC ACTCTAATGA GTACTGCCGG
 TGACAAACCG GAGGAAGGTG GNGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT
 AGGTGGGGCT ACACACGTCA TACAATGGCT GGTNCAGAGG GTTGCCAACC

reverse

TTAATTNGG GNACAGCTTC CTTTGGCATG CTGCTCCGCG
 ATACTAGCGA TTCCGACTTC ACGCAGTCGA GTTGCAGACT GCGATCCGGA
 CTACGACTGG TTTTATGGGA TTAGCTCCCC CTCGCGGGTT GGCAACCCCTC
 TGTACCAGCC ATTGTATAGA CGTGTGTAGC CCCACCTATA AGGGCCATGA
 GGACTTGACG TCATCCCCAC CTTCTCCGG TTTGTCACCG GCAGTCTCAT
 TAGAGTGCTC AACTGAATGT AGCAACTAAT GACAAGGGTT GCGCTCGTTG
 CGGGACTTAA CCCAACATCT CACGACACGA GCTGACGACA GCCATGCAGC
 ACCTANNGTG CAGGTTCTCT TTGAGCACG AATCCATCTC TGGAAACTTC

gbnu:DSP237966 Delftia sp. EK3 16S rRNA gene, isolate EK3.	611	e-172
gb:AB015567 Unidentified beta proteobacterium 16S rRNA gene, st...	597	e-168
gb:AF078774 Delftia acidovorans 16S ribosomal RNA gene, partial.	595	e-167
gb:AF149849 Comamonas sp. MC1 16S ribosomal RNA gene, partial s..	595	e-167
gb:AB020186 Delftia acidovorans gene for 16S rRNA, partial sequ...	595	e-167
gb:CSPAJ2803 Comamonas sp. 16S rRNA gene, isolate 158.>emb:CSPA...	595	e-167
gb:AB021417 Comamonas acidovorans DNA for 16S rRNA, strain IAM ...	595	e-167
gb:AB007996 Comamonas testosteroni MBIC3840 gene for 16S rRNA, ...	547	e-153

C-104e

forward

CCTTG GCCCCAGCGG TNTTGTGTG GCTTAATTG
 AAGCAACGCG AAGAACCTTA CCAGGCCTTG ACATCCAATG AACTTTCAG
 AGATGGATTG GTAGCCTTCG GGAACATTGA GACAGGTGCT GCATGGCTGT
 CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCCTAA CGAGCGAAC
 CCTTGTCTT AGTTACCAGC ACGTTATGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC
 CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT
 TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAG AGGGTTGCCA
 AGCCGCGAGG TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA

reverse

GNTNTNTTN TTTCNNTGG GCCAGNTCC TTTGACTTCT GNTCGCGATA
 CTAGCGATTG CGACTTCACG CAGTCGAGTT GCAGACTGCG ATCCGGACTA
 CGATNCGGTT TTATGGGATT AGCTCCACCT CGCGGCTTGG CAACCCTCTG
 TACCGACCAT TGTAGCACGT GTGTAGCCA GGCGTAAGG GCCATGATGA
 CTTGACGTCA TCCCCACCTT CCTCCGGTTT GTCACCGGCA GTCTCCTTAG
 AGTGCCACC ATAACGTGCT GGTAACTAAG GACAAGGGTT GCGCTCGTTA
 CGGGACTTAA CCCAAATTGT NACGACACGA GCTGACGACA GCCATGCAGC
 ACCTGTCTCA ATGTTCCCGA AGGCACCAAT CCATCTCTGG

gb:PSP011507 Pseudomonas sp. (strain DhA-51) 16S rRNA gene, par...	698	0.0
gb:PSEATCC27 Pseudomonas tolaasii 16S rRNA gene.>emb:PTATCC27 P...	692	0.0
gb:AF105380 Pseudomonas sp. PsB 16S ribosomal RNA gene, partial...	690	0.0
gb:D86000 Pseudomonas putida 16S ribosomal RNA gene, strain: NC...	690	0.0
gb:PSP011504 Pseudomonas sp. (strain BKME-9) 16S rRNA gene, par...	690	0.0
gb:D85995 Pseudomonas putida 16S ribosomal RNA gene, strain: AT...	690	0.0
gb:PAZ76656 P. aureofaciens 16S rRNA gene.>emb:PAZ76656 P. aureof...	690	0.0
gb:PSU85868 Pseudomonas sp. ACAM213 16S ribosomal RNA gene, par..	690	0.0
gb:AF068259 Pseudomonas jessenii 16S ribosomal RNA gene, comple...	690	0.0

D177.5-g

forward

CGGNTTCNTA CGNNCCGTCA CGGC GTTTT TGCGGGACNC TNGATGCAAC
GCGAAGAAC C TTACCTGN TT TGACATATA CCGGAACCTG CAGAGATGTG
GCCCTTCTTG TGGNCGGTAT ACAGGTGGTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT
GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGAAC GAGCGCAACC CCTATCTTAT
GTTGCCAGCA CGTTATGGTG GNGACTCGTA AGAGTTGCC GGGGTCAACT
CGGAGGAAGG TGGGGACGAC GCCAAGTCAT CATGCCCTT ATGTCCAGGG
CTTCACACAT GCTACAATGG CCACGTACAG AGGGCTGCGA GACCGTGAGG
TGGAGCGAAT CCCTTAAAGC TGGTCTCAGN TCGGATCGGG GTCTGCAACT

reverse

NCCTTCNTAN TGNGCGTN TT CCCGTTTNC GNTGANCCGT GATTCTAGCG
ACTNCGACTT CACGGTGTG AGNTGCAGAC CCCGATCCGA ACTGAGACCA
GCTTTAAGGG ATTGCGCTCCA CCTCACGGTC TCGCAGCCCT NTGTACTGGC
CATTGTAGCA TGTGTGAAGC CCTGGACATA AGGNGCATGA TGACTTGACG
TCGTCCNCAC CTTCCNCGN GTTGACCCCG GCNGTCTCTT ACGAGTCCCC
ACCATAACGT GCTGGCAACA TAAGATAGGG GTTGCCTCG TTGCGGGACT
TAACCCAACA TCTCACGACA CGAGCTGACG ACAGCCATGC ACCACCTGTA
TACCGACCAC ANGGGGGGCC ACATCTCTGC AGCTTCCGG TATATGNNA

gb:AB010911 Rhodococcus sp. gene for 16S rRNA, strain:SRB1948-A...	601	e-169
gb:RER131637 Rhodococcus erythropolis 16S rRNA gene, strain DCL...	601	e-169
gb:RSP16SRRN Rhodococcus sp strain PH114 16s rRNA gene.>emb:RSP...	601	e-169
gbnu:RER237967 Rhodococcus erythropolis 16S rRNA gene, isolate ...	601	e-169
gb:RSU87968 Rhodococcus sp. X309 16S ribosomal RNA gene, comple...	601	e-169
gb:NSU82666 Nocardoides simplex 16S ribosomal RNA gene, comple...	601	e-169
gb:AF181691 Rhodococcus sp. 7/1 16S ribosomal RNA gene, partial...	601	e-169

分離菌株の 16S リボソーム遺伝子に基づく分類

菌株	属名(推定)
C104-d	<i>Delftia</i>
C104-e	<i>Pseudomonas</i>
A132-a	<i>Methylophaga</i>

A132-b	Unidentified (未同定菌種)
B153-c	<i>Delftia</i>
D177.5-g	<i>Rhodococcus</i>

6.2 嫌気的長鎖アルコール分解菌 M4 株

我々はいくつかの油田地帯の土壤サンプルを分離源として、嫌気的に長鎖アルコール、アルデヒドを分解できる微生物の分離を試みた。その結果、長鎖アルコール、アルデヒドを分解できる M4 株を分離した。本菌は地下から湧出してくる油成分を栄養源として生息していると考えられ、地下環境での石油生成を考える上で興味深い。そこで本菌の生物学的特徴と炭素源の代謝に関する酵素を中心に研究を行った。

6.2.1 実験方法

好気条件下では、通常は酸素を最終電子受容体として菌は生育する。しかし、嫌気条件では酸素に代わる何らかの物質が最終電子受容体として必要であり、それぞれ菌によって種類が異なる。そのため嫌気性菌を分離するためには用いる培地の検討が必要となる。本実験では以下の培地を用いた。

培地組成

SO 培地

Fe(III)citrate	13.7g
NaHCO ₃	2.5
NH ₄ Cl	1.5
NaH ₂ PO ₄	0.6
KCl	0.1
CH ₃ COONa	2.5
Na ₂ SO ₄	2.8
KNO ₃	2.0
Vitamin solution	5.0ml
Trace element solution	10.0ml
Distilled water	985.0ml

Trace element solution (/L)		Vitamin solution (/L)	
Nitrilotriacetic acid	1.5 g	Niacin	10mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.0	Biotin	4
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.5	D-Ca-pantothenate	10
NaCl	1.0	Lipoic acid	10
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	Folic acid	4
CoCl ₂ · 7H ₂ O	0.18	p-Aminobenzoic acid	10
CaCl ₂ · 7H ₂ O	0.1	Thiamine-HCl · 7H ₂ O	10
ZnCl ₂	0.18	Riboflavin	10
CuCl ₂ · 7H ₂ O	0.01	Pyridoxine-HCl	10
KAl(SO ₄) ₂ · 7H ₂ O	0.02	Vitamin B12	10
H ₃ BO ₃	0.01		
NaMoO ₄ · 7H ₂ O	0.01		
NiCl ₂ · 7H ₂ O	0.025		
NaSeO ₃ · 7H ₂ O	0.3		
NaWO ₄ · 7H ₂ O	0.025		

SO 培地に炭素源としてそれぞれ長鎖アルカン、長鎖アルコール、長鎖アルデヒドを 1%加えて絶対嫌気条件下、30°Cで培養した。

分離操作の際は、S0 培地を用いてきたが、これには NaHCO₃ が含まれており、pH が不安定になることが判った。そこで NaHCO₃ を除いた S2 培地を作成し、これを用いて M4 株の生理的特性を検討した。

S2 培地

NH ₄ Cl	1.5
Na ₂ HPO ₄	6.0
KH ₂ PO ₄	3.0
KCl	0.1
Na ₂ SO ₄	2.8
KNO ₃	2.0
Vitamin solution	5.0ml
Trace element solution	10.0ml
Distilled water	985.0ml

6.2.2 実験結果

炭化水素資化能の検討

M4 株は長鎖のアルカン、アルケン、アルデヒド、アルコールの混合物を加えた培地で嫌気条件で分離されてきた微生物なのでこれらの炭素源のうちどのようなものを嫌気的に資化できるかを検討した。

まず、すべての化合物を混合して培養した。

a なし

- | | |
|----------|--|
| b アルカン | $C_{10}-C_{18}$ のアルカン混合物 |
| c アルケン | $C_{10}-C_{18}$ のアルケン混合物 |
| d アルコール | $C_{10}-C_{13}$ のアルコール混合物 |
| e アルデヒド | $C_{10}-C_{13}$ のアルデヒド混合物 |
| f 炭素源混合物 | $C_{10}-C_{18}$ のアルコール混合物、 $C_{10}-C_{14}$ のアルデヒド混合物に b, c をそれぞれ少量ずつ溶媒として加えたもの |

培養結果

	a	b	c	d	e	f
M4	-	-	-	+++	++	++

嫌気条件下においてアルカン、アルケンは資化できず、アルコール、アルデヒドは共に資化可能であった。

最終電子受容体の検討

培地を考案する際に、最終電子受容体の候補として硝酸イオンと硫酸イオンを培地に加えていた。実際にアルコールやアルデヒドが嫌気的に分解されるときにどの化合物が電子受容体として用いられているのかを確認した。

まず、以下に示す 3 種類の異なる培地をもちいて培養を行い、菌の生育を観察した。

S2 培地

S2 培地 (NO_3^- なし)

S2 培地 (SO_4^{2-} なし)

電子受容体の検討

	なし	アルコール	アルデヒド
S2 培地	-	++	++
S2 培地 (NO_3^- なし)	-	-	-
S2 培地 (SO_4^{2-} なし)	-	++	++

この結果、硝酸を含まない培地では菌の増殖は見られなかった。このことから本菌株は嫌気的条件下で硝酸イオンを最終電子受容体としていると考えられた。一方、培養過程で容器が陽圧になっていることが観察された。そこで本菌株は何らかの気体成分を発生させている可能性が考えられた。この気体を同定するためにガスクロマトグラフィーで分析したところ、 N_2 ガスが検出された。

のことから、本菌株は長鎖アルコールを单一炭素源として嫌気的に生育する際に、硝酸イオンを最終電子受容体として窒素を発生する脱窒細菌であることが判明した。

嫌気的長鎖アルコール代謝関連酵素の解析

アルコールは好気条件下ではそれぞれアルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼによってアルデヒド、脂肪酸へと変換され、さらに β 酸化経路によって分解されていく。これらの反応に酸素分子は関与していないことから、嫌気条件下でも同様の機構で反応が進行していくものと考えられた。しかし、これまでのところ、これらの酵素が嫌気条件下でも同様の働きをしていることは証明されていない。そこで嫌気的に培養した M4 株から無細胞抽出液を調製し、嫌気的アルコール代謝に関連するであると予想されるアルコールデヒドロゲナーゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼを取得することを行った。

アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼの反応機構は類似しており、ともに NAD^+ などの電子受容体が電子を受け取ることによって基質が酸化される。

そこで無細胞抽出液に NAD+ あるいは NADP+を補酵素として、基質は C₁₀ のアルコールとアルデヒドを用いて酵素活性の測定を行った。

その結果、NAD+を補酵素として、C₁₀ のアルコールを基質としたときに最も大きな吸光度の上昇が観察された。これは無細胞抽出液、補酵素、基質のいずれか一つでも除くと観察されなかった。従って、今回用いた無細胞抽出液中には NAD+依存型アルコールデヒドロゲナーゼの活性が存在することが示唆された。

6.3 深度地下環境からの新規微生物の分離と解析

我々は新規な酵素のみならず、深度地下環境から地表微生物にはない特徴を有する興味深い新規微生物の分離にも成功した。

①低温菌 SN16A 株と KB700A 株：我々は、様々な国内の地下土壤サンプルを取得し、それから 0°C以下の低温でも生育できる新規微生物の分離を試みた。比較的浅い地下環境から分離した SN16A 株は 25°Cの至適生育温度を持ち、-5°Cから 37°Cの温度範囲で生育がみられた。本菌はグラム陽性菌でありその 16S rRNA 配列

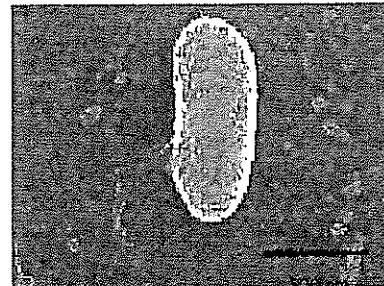


図 5. KB700A 株の
電子顕微鏡写真

は、最も近い微生物属 (*Arthrobacter*) でも 95%の相同性しか示さず、新属新種の微生物である可能性が示唆された。また、KB700A 株（図 5）は地下 700m の水サンプルから分離され、-10°Cという生物的には極限的な低温でも増殖することを見いだした。本菌はさらに、リパーゼ、プロテアーゼなどを生産しており、低温でも活性を有する加水分解酵素として洗剤などへの利用も考えている。

採取場所	菌株
四条畷市 地下 16m	SN16A
	SN16B
	SN16C
	SN16D
	SN16E
兵庫県柏原町 地下 700m	KB700A
	KB700B
	KB700C
	KB700D
	KB700E

6.4 考察

6.4.1 東濃地下から分離された微生物

今回の実験で一見、無菌的とも思われる花崗岩層の地下水から様々な微生物を分離することに成功した。これらの微生物は嫌気的条件下で分離されてきたがそのほとんどは通性嫌気性であり、好気従属栄養でも生育可能な菌であった。一般的に嫌気的独立栄養細菌は増殖に数週間から数年はかかるとされており、1週間程度の短時間での培養ではまず従属栄養細菌が先に分離されてきたと考えられる。これだけの種類の従属栄養細菌が存在しているということは地下環境に一次生産者になる独立栄養細菌が生息している可能性が十分にあり、特殊な生態系を作り出している可能性が考えられた。今後はこのような独立栄養細菌にも注目していく必要がある。

次に菌株の同定を行ったところ、地上では珍しい菌株や未同定の菌株が見いだされた。そのほとんどは生化学的な研究がなされていないものであった。現在までの知見をまとめて各菌株の特徴を述べる。

104m 地点から分離された菌は *Delftia* 属、*Comamonas* 属と近縁であることが判った。ただ、同じ地点から分離されてきた *Pseudomonas* 属の菌は多様な性質を持つ種類からなるためより詳しい性質を調べるまではどのような菌か

判らない。

また、132m 地点の地下水から分離された *Methyllophaga* 属の菌株はメタン資化性菌でありメタンを栄養源として従属的に増殖する。一方 *Delftia* 属の菌株はほとんど研究されていないが、一つだけ含ハロゲン有機物 dichloropropene を分解する菌として報告がある。

また、同じ 132m 地点に生息する菌は未同定のものである可能性が強く、非常に珍しいものであると考えられる。これと若干似ている *Acidovorax* 属の菌は nitrobenzene など芳香族炭化水素を分解する菌として研究されており、難分解性の化合物を分解して増殖していると考えられる。ただ、これらの菌は好気的な条件下で有機物の分解を示すものであり、地下でどのように酸素、あるいは酸素に変わる電子受容体を獲得しているのかは興味深い点である。

さらに、153m 地点から分離された菌も *Delftia* 属、*Comamonas* 属と近縁であり、*Comamonas* 属は (2,4-dichlorophenoxy-)propionate や chlorophenol などの含ハロゲン有機物を分解する菌として知られている。この性質は *Delftia* 属の菌と同様であり、この地下環境には難分解性のハロゲン化有機物を分解できる貴重な菌が生息していることが推測された。

177m 地点から分離された *Rhodococcus* 属は naphthalene などの芳香族炭化水素を分解するものが知られており、属は異なるが上述した他の *Delftia* 属、*Comamonas* 属と性質が似ている。

これらの結果を総合して考えると、東濃の地下環境にはメタン資化性菌や難分解性炭化水素や含ハロゲン炭化水素を分解、資化できる従属栄養微生物が生息していることが考えられる。これらの菌は環境浄化という観点から非常に有用な微生物であり、これらの菌自身、あるいはこれらの菌が生産する酵素についての研究が望まれる。興味深い点はこれらの菌がなぜ地下環境から分離されてきたのかという点である。ひとつの理由としては地下環境という貧栄養下の環境に生息するためにもともと分解しにくいものでも資化できる能力を持っているのかもしれない。いずれにしても今回分離された菌は地上ではなかなか見られない珍しい種類が検出されたことから、今後の研究が期待される。

6.4.2 嫌気的アルコール、アルデヒド分解菌 M4 株

本菌株は嫌気条件下で長鎖アルコールを唯一の炭素源として嫌気的に生育する際に硝酸イオンを最終電子受容体として窒素を発生する脱窒細菌であることが明らかとなった。また、本菌は Gram 陰性の桿菌であり、16S rRNA の塩基配列を決定したところ、*Pseudomonas* 属の細菌であることが示唆された。炭素源およびエネルギー源として炭素鎖長 10 から 18 のアルコール、10 から 14 のアルデヒドを嫌気的に資化できることが判明した。

硝酸呼吸を行う菌は硝酸イオンを還元し、何らかの化合物を酸化することによってエネルギーを獲得するのであるが、このとき硝酸イオンが還元される経路としては硝酸から窒素へと変換される Denitrification と硝酸からアンモニアへと変換する Ammonification がある。

この Denitrification 経路では気体の圧力が低いほどエネルギー的に有利となり、菌の生育が促進されると考えられている。

本菌株も溶存気体を除くことによって良好な生育が見られたことから、発生した気体を除くことによってより生育が良くなることが予測される。

さらに、本菌内には高い NAD 依存型 aldehyde dehydrogenase 活性が検出された。本酵素は細胞膜と相互作用しており、炭素鎖長 7 から 14 のアルデヒドに特異的な酵素であった。

6.4.3 深度地下環境からの新規微生物の分離

近畿地方の深度 16-700m の地中から微生物を分離したところ低温でも生育する好冷菌を分離することに成功した。その中でも KB700A 株は-10°Cでも増殖可能であることが明らかとなった。これまで好冷菌は極地や高山地帯での分離例が報告されているが、以外にもそれほど深くない地下に 0°C以下でも増殖を続ける菌が生息していることが明らかとなった。一般に深度が大きくなると地熱の影響で温度が上昇するが、場所によっては地下水などの影響で局所的に温度の低い場所があり、このような場所に好冷菌などの微生物が適応、生息しているのかもしれない。これらの低温菌の生産する酵素は産業的に有用なものがあると期待されている。今後、これらの菌が生産する不凍タンパク質などによ

る低温耐性機構、低温でも活性を持つ酵素などの研究が望まれている。

以上、地下環境には今まであまり研究されていない、非常に興味深い特徴を持った微生物が生息していることが示唆された。今回、試料を採取したのは広大な地下環境のごくわずかではあるが、実験結果に示すように多種多様な微生物を分離することができた。それらのものの中には基礎研究だけでなく応用に関しても有望な菌株が見られた。今後、より詳しい研究が進展することが期待される。

参考文献

- Adams, M.W.W., 1993 : Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. Ann. Rev. Microbiol, 47, pp. 627-658
- Amy, P. S., Haldeman, D. L. 1997 : Microbiology of the Terrestrial Subsurface, CRC Press
- Banfield, J. F., Nealson, K. H. 1997 : Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals, Mineral. Society American.
- Bargar, K. E., Fournier, R. O., Theodore, T. G. 1985 : Particles in fluid inclusions from Yellowstone National Park - Bacteria? , Geology, 13, pp. 483-486
- Fredrickson , J. K., Onstott , T. C. 1996 : Microbes Deep inside the Earth. Scientific American, October
- Gold, T. 1992 : The deep, hot biosphere. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 89, pp. 6045-6049
- Krumholz, L. R., McKinley, J. P., Ulrich, G.A., Sulflita, J.M., 1997: Confined subsurface microbial communities in Cretaceous rock. Nature, 386, pp. 64-66
- McKinley, J. P., Stevens, T. O., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Colwell, F. S., Wagnon, K. B., Smith, S. C., Rawson, S. A., Bjornstad, B. N. 1997 : Biogeochemistry of anaerobic lacustrine and paleosol sediments within anaerobic unconfined aquifer. Geomicrobiology Journal, 14, pp. 23-39
- 村上 由記, 岩月 輝希, 長沼 肇 1999a : 深部地質環境における微生物生態系, 月刊海洋, 号外 No. 19, pp. 108-115
- 村上 由記, 岩月 載希, 長沼 肇 1999b : 深部地質環境における微生物群集—東濃地域を例として—, 原子力バックエンド研究, Vol.5, No.2, pp. 59-66
- Parkes, R. J. , Cragg, S.J., Bale, J.M., Getliff, K.G., Rochelle, P.A., Fry, J.C., Weightman, A.J. and Harvey, S.M. 1994 : Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean Sediments. Nature, 371, pp. 410-414
- Pedersen, K. 1997 : Microbial life in deep granitic rock. FEMS Microbiology Reviews, 20, pp. 399-414
- Pedersen, K. Ekendahl, S., Tullborg, E-L., Furnes, H., Thorseth, I-G., Tumyr, O. 1997 : Evidence of ancient life at 207 m depth in a granitic aquifer. Geology, Vol. 25, pp. 827-830
- Stevens, T. O., McKinley, J. P. 1995 : Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. Science, 270, pp. 450-454

田崎和江，山村健，長井広恭，小岩崎浩一 1996：バクテリアがつくりだす縞模様，月刊 地球，18, pp. 9-16

Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E.L., Lovely, D., 1998 : Microbial evidence for Fe(III) reduction on early earth. Nature, 395, pp. 65-67

Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. 1998 : Prokaryotes : The unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, pp. 6578-6583