

プロジェクト名：地球生命システムの環境・遺伝基盤の解明とモデル化・予測に向けた研究

プロジェクトディレクター： 神田 啓史

1. 研究目標

生命と地球環境は互いに影響しあって今日に至っている。どのように相互作用して、生命は進化し、多様化してきたかのメカニズムを理解するために、数10万～100万年を経て封印されてきた過去のタイムカプセルである氷床コア中の微生物や極限環境に生きる生物の遺伝子構成や発現パターン・機能を解析し、地球及び生命システムを解明することを目標とする。

本研究においては、地球及び生命システムの理解のために、国立極地研究所が保存している生物資源と極地環境情報、国立遺伝学研究所のゲノム解析技術、及び統計数理学研究所・国立情報学研究所の情報解析技術、さらに大学等の外部機関と連携して融合的な研究基盤を推進する。

2. 研究概要

1) 研究の理念

新領域融合研究センターの三つの課題、生命システム、地球環境システム、及び複雑システムモデル化・情報処理の融合研究領域を進めるにあたって、企画の当初から、南極氷床コアの生物相の研究に最新のゲノム解析の手法が加わることにより、地球環境変動と微生物の進化・多様化の研究や地球と生命の相互作用のシミュレーション研究と一挙につながるなど、これまでの枠組みでは考えられなかった成果が期待されると考えられていた。この観点に立って、本研究プロジェクト「地球生命システムの環境・遺伝基盤の解明とモデル化・予測に向けた研究」では、生物の時間的変動と環境による変動に着目して、以下の二つのサブテーマに沿って研究を進める。サブテーマの研究内容は相互に関係し、共通部分も多いため、明確に分けることはできないが、研究目的を遂行するために便宜的に設けたものである。各サブテーマにはさらに共同研究者が具体的に実施する研究課題がある。

2) 二つのサブテーマ

「古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析」

地球生命の時間的な変動と環境との関連において、DNA情報取得の唯一の可能性は凍結地帯であると考えられ、極域の氷床コア解析はきわめて興味深い。とくに南極の約100万年を経て封印された氷床コアから抽出された微生物等を年代順にゲノム情報を得ることにより、微生物がいつ、どのような環境と相互作用して生命システムを多様化・進化してきたのかが明らかにできる。このためには、極微量の難培養性微生物の扱いや混合系のゲノム解析など、新分野が開ける可能性がある。

「極限環境生物システムの比較研究」

生物学においては実験モデル生物を使用した生命システムの研究が進んでいるが、その解明には

多様なシステムの比較が必要である。このためには極低温や強紫外線という南極などの極限環境下で生息する生物の遺伝子構成や発現パターン・機能を解析してその適応戦略を明らかにし、他地域の生物との比較を通して地球全体で生命システムを理解する。

3) 期待される効果

氷床氷からの微生物の抽出法、検出法が可能になれば、地球環境に飛来する生物の過去数10万年～100万年前の過去の生物のタイムカプセルの復元が期待される。これらの環境には“進化が遅れた”過去の微生物が生き残っている可能性があり、地球上ではこの場所以外では入手できない貴重な“生きた微生物化石”の宝庫ともいえる。遺伝的変異を主とした進化的研究、新規及び有用微生物の発見につながる先端的な研究が期待できる。

極限環境から得られた試料を無菌的に処理し、微生物を抽出、検出する方法を開発することが、本研究の独創性である。とくに現場で得られた試料を無菌的に処理ができる現場実験施設のフイージビリスタディ、及び現地から日本に持ち帰った後の処理法、試料の保存法、抽出法、検出法、とくに現場の環境データ、生態学的特長を考慮した上での、全菌数計数、16S rRNA 遺伝子等による群集解析をルーチン的に実現させることも新しい領域として期待できる。

機構の4研究所が中心となって、機構外の大学、研究機関の研究グループと連携して融合的に研究を進め、極地環境における生物資源とゲノム解析技術及び、統計・情報解析技術を融合させることにより、これまでにない新しいアプローチを取りえる可能性がある。

3. 年次計画

テーマ	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
	予備研究	プロジェクト初年度		中間評価		
古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析	←					→
極限環境生物システムの比較研究	←					→

平成16年度（予備研究）

平成16年度の予備研究では1)地球生命システムの遺伝・環境基盤の解明とモデル化予測に向けた研究、2)極限域の生物・微生物の特異性解析と生物体検出法の開発、3)環境微生物遺伝資源解析のための情報基盤の整備ならびに新規微生物探索、4)地球生命システム解明に向けた情報基盤形成の4課題が提案された。それぞれの課題について情報交換しつつ、かつ、国立極地研究所に保存されている南極、北極の極地砂漠域、湖沼域、雪氷域から得られた氷床氷、氷山水、蘚苔・地衣類、藻類、シアノバクテリア、微生物試料（原生動物、微小動物を含む）について、冷凍試料が

らの生物復元の予備実験を通して、今後の共同研究の可能性について調査、検討した。その結果、最終的には「地球生命システムの遺伝・環境基盤の解明とモデル化予測に向けた研究」として一本化し、新領域融合プロジェクトの傘テ - マとして研究を開始することになった。

平成17年度（プロジェクト開始）

南極氷床試料から無菌的に微生物を抽出する設備、装置の開発を通して微生物抽出法の確立を目指す。実際に南極での現地観測を実施し、現地で採取した浅層氷床コア、冰山氷等による微生物抽出を試みる。一方、国立極地研究所に収納されている両極の極限環境より収集された蘚苔類、地衣類、藻類、シアノバクテリア、微小動物の保存法、再生能力に関する実験、データベースを構築する。

具体的には、「古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析（時間軸）」では、微生物解析方法の開発、アイスコア中に含まれる微生物、および極限環境下で生息する生物解析、難培養微生物のゲノム解析手法の開発、抗生物質耐性遺伝子の分析手法の開発、南極ドームふじ基地氷床コアの深層掘削、北極スパールバル諸島の氷床コアの研究等を目的とする。一方、「極限環境生物システムの比較研究（環境軸）」では環境微生物遺伝資源解析のための情報基盤の整備、南極産線虫、露岩域植物多様性、及び湖沼生物等の極限環境生物の解析、極限環境生物統合データベースの構築を目的とする。その他、4 研究所を中心に、研究計画の策定、情報交換、成果発表などを目的として、研究集会を設ける。

平成18年度

平成17年度末に、南極ドームふじ基地で3028.52mの深層氷床コアの掘削に成功した。これにより南極氷床コア3,000m分の試料からの微生物解析を目的としたクリーンルーム、氷床コア融解装置等の分析機器の整備、充実が急務となっている。時間軸と生物進化を目標とした氷床コアから抽出される微生物の研究は、物理的、化学的データとが一体となって解析される。これまでの氷床コアそのものを融解して、微生物を無菌的に抽出する方法はサンプル量の多い浅層掘削氷床サンプル、氷河生物、冰山氷などでは有効であるが、2500m以深のサンプルは物理、化学、生物情報を効率よく収集する装置の開発や解析方法を確立することが重要である。また、本年度予定されている氷床下の岩盤掘削のために、現地観測と岩盤の採取方法について検討する。

平成17年度においては、比較的サンプル量の多い氷床コアを対象にした新型融解装置が完成したので、すぐに解析が可能な北極（スパールバル）の氷床コアからの微生物抽出、解析を開始する。この解析を基礎にして、十分に解析法を習熟した段階で南極ドーム氷床コアの解析に着手する。また、氷床コア解析のアイスコンソーシアム（ICC）の協力体制を整えつつ、平成17年度に採取した南極の浅層氷床コア及び極限環境から生物を抽出する。氷床コアと極限環境より得られた微生物の抽出法の開発と設備、装置の設計を進め、試料の保存法を考慮して、新型氷床氷融解装置による微生物を抽出する。その他、難培養微生物のゲノム解析法、耐性遺伝子の

分析手法の開発、微生物の顕微解析法、微生物の非培養及び培養、増殖による遺伝学的解析、極限環境微生物の生理性状、分離株解析、分類学的解析、氷床の年代等環境データの整理、Web マイニングによる微生物情報取得、及び環境及び微生物のデータベースの構築を目指す。

一方、環境軸と生物システムの比較研究として、南極、スピッツベルゲン、アラスカ、チベット、チリなどの極地及び周辺域の様々な環境から収集されてきた氷床コアをはじめとした氷雪、湖沼水、岩石及び微生物試料を現場から国内の研究機関に輸送し、これらを無菌的に処理して、微生物を抽出し、遺伝・環境基盤の解析を進める。微生物の解析としては従来の培養法と平行して非培養法の開発を進め、最終的に微生物の種の決定、全ゲノムなどの遺伝子解析を行なう。新規微生物の探索手法の開発では、G-InforBIO (SOMのスタンドアロン版)の系統分類解析への機能拡充、環境由来配列データへのアノテーション付与とデータベース公開、短い断片配列に対する系統推定法の改良、環境サンプルによる SOM を利用した系統分類法の検証、得られたメタゲノム配列中に存在する遺伝子領域を対象とし、アミノ酸組成による生育環境の予測を行う。南極産線虫の極限環境への適応戦略を明らかにするために、線虫の持つ高度な凍結、乾燥に対する耐性の機構を分子レベルで解明し、さらには有用遺伝子の発見を目指す。生きた線虫の単離、同定を行い、mRNA、ゲノム DNA を採集、EST 解析、ゲノム配列の決定を開始する。その他、地衣類を中心とした極限露岩域植物多様性研究、湖沼生物・微生物等の遺伝子解析を行う。

平成 19 年度 (中間評価)

平成 19 年度は本研究の 5 年計画 3 年目に当たり、中間評価が加わる。これまでの研究の理念に沿った二つのサブテーマの研究経過と成果を見直す中で、最終的な目標である地球環境変動と微生物の進化・多様化、地球と生命の相互作用のシミュレーション研究に向けての自己評価を行う。また、生物資源とゲノム解析技術及び、統計・情報解析技術における機構内外の研究機関、大学との連携、融合研究の成果についても自己評価を行う。

平成 17、18 年度に採取した南極の浅層氷床コア及び極限環境から生物を抽出する。試料の受け入れ、保存法を考慮してこれまでに開発してきた氷融解装置によって微生物を抽出する。南極氷床コアについては 3028.52m までの深層氷床コア (ドームふじ氷床コア) の解析、及び、平成 18 年度に達成される予定の氷床下岩盤の微生物分離の準備を開始すると同時に、難培養微生物のゲノム解析法、耐性遺伝子の分析手法の開発、微生物の顕微解析法、微生物の非培養及び培養、増殖による遺伝学的解析、南極産線虫、露岩域植物多様性、湖沼生物・微生物等の極限環境微生物の遺伝子解析、生理性状、分離株解析、分類学的解析を引き続き目指す。さらに、氷床の年代等環境データの整理、Web マイニングによる微生物情報取得、分類学的解析及びデータベース構築を行う。

平成 20 年度

ドームふじ氷床コア及び氷床岩盤微生物の抽出、遺伝学的解析、難培養微生物のゲノム解析手

法の開発、ゲノム解読、遺伝子/ゲノム進化の解析を行う。他に、南極産線虫、露岩域植物多様性、湖沼生物・微生物等の極限環境微生物の遺伝子解析、生理性状、分離株解析、分類学的解析を目指し、モデル生物との比較によるシステムの可塑性の解析を行うとともに、融合研究推進のための情報共有システムを開発・整備する。

難培養微生物のゲノム解析法、耐性遺伝子の分析手法の開発、微生物の顕微解析法、微生物の非培養及び培養、増殖による遺伝学的解析、Webマイニングによる微生物情報取得、及び環境及び微生物のデータベースの構築を昨年に引き続き目指す。

平成21年度

本プロジェクト研究の最終年度に当たり、ドームふじ氷床コア及び氷床岩盤から抽出された微生物の遺伝的解析、及び遺伝子とゲノム進化の解析を通して、過去100万年の時系列での微生物の進化過程を解明する。また、極限環境生物とモデル生物との比較によるシステムの可塑性の解析によって環境と遺伝基盤の根源的な原理を理解し、地球上に生命が生み出されて以来、今日までに存続、適応し、多様化してきた生命の環境との関わりを理論的に解明し、地球生命メカニズムのモデル化と将来の地球生命の形を予測することができる。

4. 平成17年度研究実施体制

「古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析」では微生物抽出法の開発と設備、装置の設計を進め、実験室内と冷凍庫内における二つの氷床コア融解装置の試作品製作、氷床コア解析コンソーシアムの立ち上げなどの議論を展開し、準備を整えている。

とくにドームふじ氷床深層コア研究の研究実施体制については、氷床コアの微生物研究は幾つかの体制の枠組みの中で実施することになっている。国立極地研究所にある氷床コア研究委員会（外部委員を含む）がドームふじ深層コア研究と管理の責任を担い、この委員会はアイスコアの管理、研究計画立案、解析の実施については、アイスコアコンソーシアム（ICC）に付託することで具体的な研究計画が進むことになっている。ICCは現在、化学解析、物理解析、ガス解析、年代決定、新領域研究などの研究グループで構成されており、これらはICCの運営委員会でさらに検討される。現在のところ、氷床コア微生物研究は、宇宙線生成核種研究等と共に、新領域研究グループに属している。従って、氷床からの微生物の抽出法、解析法などの確立を成し遂げたときに、研究状況、コアの管理状況を含む具体的な研究計画が提出され、ICC運営委員会で検討された後、氷床コア研究委員会の承認の下で始めて、ドームふじ氷床深層コアの利用が可能となる。

一方、「極限環境生物システムの比較研究」では、国立極地研究所保存の試料利用については、大学共同利用機関として、極地研との共同研究体制の下で実施することになっている。また、南極の現地に参加する場合は、日本南極地域観測隊の観測実施計画のもとで、計画を策定して実施している。さらに極限環境生物試料のデータベースの構築に関する研究では、最終的には新しいデータベースの所属などについて検討する必要がある。

これらの研究を進めていく中で、平成 17 年度は以下の情報・システム研究機構の 4 研究所と
11 大学等計 33 名による研究実施体制で臨んだ。

[国立極地研究所]

神田啓史（研究代表者）、藤井理行、本山秀明、東久美子、藤田秀二、伊村智、工藤栄、
内田雅己、瀬川高弘

[国立遺伝学研究所]

仁木宏典、小原雄治、小方康至、阿部貴志、菅原秀明、成田貴則、鹿児島浩

[国立情報学研究所]

藤山秋佐夫、武田秀明、市瀬龍太郎、荒井紀子、小林悟志

[統計数理研究所] 長谷川政美

[京都府立大学] 牛田一成

[東京工業大学] 幸島司郎、植竹敦

[総合地球環境学研究所] 竹内望

[北海道大学] 福井学、高野淑識

[総合研究大学院大学] 池村淑道

[玉川大学] 吉村義孝

[東京薬科大学] 山岸明彦

[広島大学] 長沼毅

[京都大学] 今中忠行

[秋田大学] 井上正鉄

[島根大学] 大谷修司

5 . 平成 17 年度の研究進捗

・ サブテーマ「古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析」

【要約】微生物の分離法に関する基礎的情報を得るために、南極、北極域から得られた微量なアイスコアサンプルから DNA 解析を行うための研究手法の開発を行った。各種微生物の DNA 量とサイズ・形態、内部構造、蛍光強度等の微生物情報を解析し、微生物を分取・分注させる分析方法の開発を行なった。遺伝研、極地研双方にクリーンルームを設置し、分析環境の整備、氷床コアを無菌環境下で融解させる装置改良を行い、研究体制を整えた。また、アイスコア中の微生物及び生物起源物質を環境指標としたアイスコア解析法を検討するために、ヒマラヤ、パタゴニア、ロシア・アルタイ山脈の氷河アイスコア中の微生物及び微生物起源物質を解析した。さらに氷床コアの難培養微生物、新規微生物検出のためのゲノム解析手法の開発として、メタゲノム解析、全ゲノム DNA 増幅の開発、および培養可能な生物のゲノムシーケンス、低コストシーケンス法、高効率クローニング法

等の開発を行った。

研究課題

- 1) 微生物解析方法の開発
- 2) アイスコア中の微生物及び生物起源物質解析による古環境復元
微生物及び生物起源物質を環境指標としたアイスコア解析法
氷河生態系におけるバクテリアの生態調査
- 3) 氷床コアゲノム解析法の開発
低コストシーケンス法の開発
高効率クローニング法の開発
- 4) 難培養微生物のゲノム解析手法の開発
- 5) 抗生物質耐性遺伝子の分析手法の開発
- 6) 南極ドームふじ基地氷床コアの深層掘削

1) 微生物解析方法の開発

南極氷床及び冰山氷からのバクテリア分離法の確立、アイスコア中の微生物及び生物起源物質分析法を改良した。アイスコアからコンタミネーションを回避しながら微生物などの生物成分を抽出するために、フィルンと氷との2種類に対応した融解装置の試作品を作成した。アイスコアサンプル中に含まれる微生物に対して、レーザースキャニングサイトメーター、および共焦点レーザー顕微鏡を用いて各種微生物のDNA量とサイズ・形態の分析を行ない、アイスコア中の微生物の基礎的情報を得るための手法の開発を行なった。また、フローサイトメトリーとセルソーターを利用して、微生物の情報を(大きさ・内部構造・蛍光強度)解析し、目的微生物を分取・分注させる分析方法の開発を行なった。さらに、氷河、およびアイスコア試料中に含まれるバクテリア、シアノバクテリア、菌類の微生物分離、培養、種同定をおこなった。また少量のアイスコアサンプルからの培養方法の改良を比較検討した。

2) アイスコア中の微生物及び生物起源物質解析による古環境復元

微生物及び生物起源物質を環境指標としたアイスコア解析法を検討するために、ヒマラヤ、パタゴニア、ロシア・アルタイ山脈の氷河アイスコア中の微生物及び生物起源物質を解析した。南極コアの生物成分と比較するために、南米チリ共和国中部火山群 Mocho 火山、及び Osorno 火山山頂氷河において10mアイスコアを採取、及び氷河表面の微生物試料の高度別採取を行った。チリ科学研究センターの共同研究者に依頼して、南極氷床の Patriot Hill - Lake Ellsworth ルート上における雪氷微生物解析用サンプル採取を行った。さらにアラスカ、グルカナ氷河で高度別に採取された氷河表面の微生物試料を分析し、雪氷微生物、特に雪氷中で増殖するバクテリア特定と、その生態に関する調査を行った。

3) 氷床コアゲノム解析法の開発

低コストシーケンス法と高効率クローニング法の開発を行った。これまでの PCR による希釈はすでに限界であり更なるコストダウンが難しいこと、ポリ配列の増幅に誤りが高頻度にかかるなどの理由で TempliPhi (GE healthcare) への切り替えを検討し、より低コストであることが分かった。

全ゲノム DNA 増幅産物は比較的短い断片が多く、そのままクローニングを行うとほとんどのクローニングが 100bp 程度のインサートのみであったため、スピノクロマトグラフィ法により 400bp 以下の DNA 断片の除去、DNA 共沈剤の存在下でエタノール沈殿、TA ベクターへのクローニングを行い、高効率クローニング法を開発した。

4) 難培養微生物のゲノム解析手法の開発

ゲノム断片 DNA 中に含まれる配列情報、遺伝子情報、および各種解析結果を系統的に保存し、ユーザーが目的の遺伝子を容易に探索するためのシステム開発が必要である。このような環境中より得られた未知遺伝子資源に由来する情報の開示に特化した情報システムを開発した。また、ニューラルネットワーク・アルゴリズム自己組織化マップ (SOM) 法を初めとするデータマイニング手法を用いて、日本の尾瀬のアカシボ (融雪時における積雪赤褐色化) 中に含まれる DNA サンプルによるメタゲノム解析など、環境微生物ゲノムの多様性や新規性を推定するための新規な系統分類法、ならびに新規性の高い未知微生物ゲノムを効率的に探索するシステムの開発を行った。

5) 抗生物質耐性遺伝子の分析手法の開発

南極 (ジェームスロス島アイスクラップ)、アラスカ (アラスカ山脈・グルカナ氷河)、中国蘭州 (甘粛省・祁連山脈・July first 氷河) の雪氷試料から様々な抗生物質に対する抵抗性遺伝子の検出・定量手法の開発をおこなった。試料を解凍した後、DNA を常法によって抽出し、対象とした抗生物質遺伝子 120 種のフォワードプライマー混合物と LabelStar Reverse Transcriptase を用いて 65 で 2 時間反応させた。各種雪氷試料より抗生物質耐性遺伝子の存在が確認され、この方法論が南極及び北極のアイスコア試料に適用できる可能性が示唆された。

6) 南極ドームふじ基地氷床コアの深層掘削

ドーム氷床深層コア掘削、コア現場処理と掘削孔検層を実施した。第二期ドーム氷床深層掘削計画として進めていた深層掘削は、第 47 次及び第 46 次南極観測隊と共同で、3029m までの深層掘削に成功した。コア現場処理もブリットルゾーンの一部を残して終了した。深層掘削孔の検層は深度 10 ヶ所について実施した。本掘削計画には新領域融合研究プロジェクトから 2 名が参加した。

・ サブテーマ「極限環境生物システムの比較研究」

【要約】南極大陸に生息できる数少ない陸上動物群である線虫のゲノム解析を行い、極限環境への適応戦略について検討した。混合系のゲノム解析アルゴリズムの開発、高速共焦点レーザーキャン

顕微鏡、多光子レーザースキャン顕微鏡の導入による顕微微生物解析法の開発を行った。南極地域由来新規微生物の分離と同定、南極ヌナタークに生育する地衣類等の露岩域の植物多様性解析、南極湖沼生物における地史的変遷、南極「コケ坊主」生態系における微生物相を解析した。また、多様な環境に生息する生物種を網羅的に解析する自己組織化マップ(SOM)の系統分類解析への機能拡充、系統推定システムの有用性の検討、メタゲノムの系統推定の試み、汎用的なソフトウェア化、環境由来のDNA配列を解析するためのデータベース構築について検討した。また、その他、冷凍試料データベース構築を検討した。既存のDBとのリンケージにより使いやすいシステムが実現可能となった。植物試料の3次元画像の取り込み、CG化画像による構造再現、南極産生物のゲノム情報のデータベース化のフェージビリティスタディを行った。本プロジェクト研究に関連する調査派遣として、南極ドームふじ基地の深層氷床コア掘削プロジェクトに2名、南極湖沼、氷床表面の微生物、有機化学、生態学調査に3名を派遣。チリの氷河生態系調査、韓国南極基地に其々1名を派遣した。

研究課題

1) 極限環境の生物

極限環境に生息する線虫の研究

南極ヌナタークに生育する地衣類

南極地域由来新規微生物の分離と同定

南極湖沼生物における地史的変遷

南極「コケ坊主」生態系における微生物相の解析

海底熱水地帯の微生物解析

2) 環境微生物遺伝資源解析のための情報基盤の整備ならびに新規微生物探索手法の開発

3) 極限環境生物統合データベースの構築

4) 極限環境生物の現地調査

1) 極限環境の生物

極限環境(南極)に生息する線虫の研究

南極に生息する線虫の収集・単離、種と同定、培養法の確立を目指す3つの目標、をすべて完了し、平成18年度の計画である凍結・乾燥耐性に関する基礎データ収集を開始した。線虫の初期発生における秒・分単位での細胞分裂を観察するために、高速共焦点レーザースキャン顕微鏡を用い、1秒間に120コマの撮影を可能にした。多光子レーザースキャンでは線虫卵の中の10 μ m以上の正確な分裂パターン、細胞配置の観察を可能にした。これらの予備実験により、南極産線虫の遺伝子導入の可能性について検討した。

南極ヌナタークに生育する地衣類

やまと山脈の地衣類を明らかにするとともに、セルウンゲン(シール岩)の地衣類相解明の足が

かりをつけた。また、ラングホブデ雪鳥沢の上流部に *Rhizocarpon flavum* ナンキョクチズゴケ及び *Buellia subfrigida* ミズギワノスミイボゴケが特異的に分布することを示す分布図を作成した。ラングホブデで得られた多数の *Rhizoplaca melanophthalma* ナナバケチャシブゴケ標本を中心に、化学変異・形態変異を精査して、その分布位置を地形図に記すとともに生育環境を整理した。

南極地域由来新規微生物の分離と同定

南極海、露岩地域の土壌、各種湖沼（淡水湖、低塩湖、中塩湖、高塩湖）の水・堆積物など約 260 種類の試料を採取した。微生物のキーワードを好冷菌、好塩菌、貧栄養菌、嫌気性菌、光合成菌、共生菌群として分離を試みた。試料を無菌水に懸濁・希釈した後、寒天培地に塗布し 5 または室温で培養した。生じたコロニーについて単一コロニー分離を繰り返して純化した後、液体培養した。それぞれの株について 16S rRNA の塩基配列を決定することにより、分類の基礎資料とした。

南極湖沼生物における地史的変遷

水質及び採泥調査、湖水の塩分や堆積物の特徴から地史的データによる湖沼の類型化を図った。また、これらの類型化は珪藻、蘚類、藍藻類などのフローラの多様性に深く関係すると考えられ、試料解析した。さらに長年に亘って蓄積されてきた環境変動の証拠品とも考えられる湖底に蓄積された堆積物コアを解析した。

昭和基地周辺の数多くの多様な湖沼を観測対象とし、湖水の物理・化学的性質や生物相の多様性、堆積物からの古環境の復元などを目的に、湖沼生態系の構成、物質生産と物質循環、湖沼の環境変遷と陸上植生の記録について観測した。最終氷期以降の南極湖沼生物における地史的変遷の復元に関する研究として、大陸氷床および露岩周氷域の雪氷試料、発達史の異なる種々の湖沼堆積物試料の系統的な採取を行なった。

南極「コケ坊主」生態系における微生物相の解析

南極湖沼にはコケ類と藍藻類からなる搭状の特異な形態を持つ底生植物群落、“コケ坊主 (Moss Pillar)”が見出されている。これまでにサイズ、年齢、シュート密度、乾燥重量、炭素量、窒素量、クロロフィル量などが計測されているが、コケ坊主を構成している蘚類や藻類以外は種組成が明らかにされていなかった。本研究では一つの完全なコケ坊主を上下・内外の 14 セクションに分割し、各部由来のリン脂質脂肪酸および中性脂肪酸についてガスクロマトグラフィー (GC) および GC 質量分析 (GC-MS) を行い、生物相・微生物相を概観的にキャラクタライズすることができた。南極陸上ハピタットを特徴づける環境要因のひとつに、ほぼ淡水の融雪水・融氷水からほぼ塩分飽和の池沼まで広範囲の塩分分布および塩分変動がある。これに適応した微生物として、広塩菌を特異的に単離・培養したところ、ハロモナス科に属する微生物を数十株取得することができた。現在、その系統分類および生物地理(両者を合わせて系統地理 phylogeography と呼ぶ)に関する解析を行っているところである。化学合成独立栄養微生物の単離・培養として、ハロモナス科広塩菌の生理特性を調べたところ、ある菌株はイオウ酸化化学合成独立栄養 (thioautotrophy) を営めることが分かった。thioautotrophy は好気・嫌気の酸化還元境界での生育に適しており、たとえば、このよ

うな菌株は好気的な低塩分表層と嫌気的な高塩分底層という成層構造を有する南極「すりばち池」からよく単離できた。このような生育環境はコケ坊主における酸化還元勾配に類似しており、コケ坊主における生物地球化学プロセスの理解促進に資する知見を得られることが期待できる。なお、独立栄養を営むハロモナス科菌の発見はこれが初めてである。

国際極年 (International Polar Year, IPY) 関連として、IPY の中核研究のひとつとして、南極コケ坊主をモデル生態系とした微生物生態調査を展開する。これは IPY の中核研究 No.55 として承認されている。これに関連して、別の IPY 中核研究である「南極氷床下湖生態系」(SALE) との連携も検討しており、本プロジェクトにおける氷床微生物ゲノム解析の進展に資するものと考えられる。

海底熱水地帯の微生物解析

今回の調査対象は、マリアナ海溝が南北から東西方向に大きく向きを変える場所にある南部マリアナトラフの熱水地帯である。この海域では島弧火山列と近接し背弧拡大が起きている。過去の調査により二カ所の海底熱水系が発見された。それぞれ、拡大軸上に存在する Snail site (別名 Fryer site) と、拡大軸上から少し離れた場所に位置する海山頂部に存在する Pika site である。これら二ヶ所の熱水地帯で BMS (Benthic Multi-coring System) による海底掘削が行われた。サンプルとして得られた熱水試料を用いて微生物の解析が行われた。

2) 環境微生物遺伝資源解析のための情報基盤の整備

氷床コアのメタゲノム解析より得られた DNA 断片配列を対象とした系統推定の検証として、北海道大学 (福井教授) との共同研究にて、尾瀬のアカシボ (融雪時における積雪赤褐色化) 中に含まれる DNA サンプルを用いたメタゲノム解析を行い、今回メタゲノム解析で得られた 200base 以上の 309 本の DNA 断片配列を対象に、開発した系統推定システムにて系統推定を行った。

3) 極限環境生物の現地調査

南極湖沼群、及び氷床表面の微生物、有機化学、生態学的研究を目的として、南極の夏期調査に 3 名を派遣。また、チリの氷河生態系調査に 1 名を派遣。

第 47 次日本南極地域観測隊に同行し、主に環境遺伝学、考古遺伝学、そして野外遺伝学の創成・南極遺伝子資源の無菌的な獲得と古代ゲノム、極限環境遺伝子の分離・を目標に、南氷洋に於いて無菌的に採取した海洋深層水からのバクテリア及びゲノム DNA を分離した。また、南極大陸沖 100km の各地点 (19 箇所) に於いて採取した水深 3 千~4 千メートルの海洋深層水を処理し、バクテリアを分離、その耐圧遺伝子や好冷遺伝子等、極限環境遺伝子を獲得する。さらに、メタゲノム解析の為に提供する。南極露岩帯(ルンドボークスコラネ及び東オングル島)に於いて採取したコケ類や地衣類からの線虫、藻類、菌類、バクテリアを分離、保存し、共同研究者に提供する。南極雪原 (S17) に建てたクリーン・ブース 内で無菌的に掘削した氷床コアをフリーザーに保存したまま持ち帰り、今回改装になった南極地域遺伝子資源保存室に収納した。

4) 極限環境生物統合データベースの構築

極限生物データベースシステムの一環として、冷凍試料データベース構築を検討した。基地のDBとのリンケージにより実現可能。植物試料の3次元画像の取り込み、CG化画像による構造再現、南極産生物のゲノム情報のデータベース化のフィジビリティスタディを行った。

国立極地研究所に保存してある極地冷凍植物試料(蘚苔類、地衣類、藻類、シアノバクテリア)の整理と予備的に作成されたデータベースを再検討した。また、極地より得られた極地研保管の全植物試料を対象にした極地植物多様性画像データベースのシステムについて検討した。

6. 平成17年度の研究成果

(1) 知見・成果物・知的財産権等

・サブテーマ「古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析」

1) 微生物解析方法の開発

フィルンと氷とのアイスコアからコンタミネーションを回避しながら、微生物などの生物成分を無菌環境下で採取する融解装置の開発をおこなった。氷表面にバクテリアと同程度の大きさの蛍光ビーズを塗布して融解実験をおこなったところ、氷表面の融解水からのみ蛍光ビーズが検出され、氷内部から採取された融解水からは検出されなかったことから、開発した融解装置を用いる事でコンタミネーションが起こりうる氷表面を除去することに成功した。アイスコアサンプル中に含まれる微生物に対して、各種微生物のDNA量とサイズ・形態の分析や、撮影した画像の画像解析をおこない、アイスコア中の微生物の基礎的情報を得るための手法の構築をおこなった。また共焦点レーザー顕微鏡を用いてそれぞれの微生物の持つ波長特性による分布や蛍光波長ピーク差を分析することで、特定の微生物種のみを検出しバイオマスを算出させる分析方法の開発をおこなった。さらにフローサイトメトリーを利用して、氷河サンプルの微生物量・群集構造の高速解析を行うことができ、アイスコア解析に応用できる可能性が開けてきた。

2) アイスコア中の微生物及び生物起源物質解析による古環境復元

微生物及び生物起源物質を環境指標としたアイスコア解析法

ヒマラヤ、パタゴニア、ロシア・アルタイ山脈の氷河アイスコア中の微生物及び微生物起源物質を解析し、いずれの地域でもアイスコア中の雪氷微生物、特に雪氷藻類がアイスコアの年代決定に利用できること、また、ヒマラヤでは雪氷藻類のバイオマスが融解期の環境指標となることを明らかにした。例えばロシア・アルタイ山脈のソフィスキー氷河アイスコア採取地点における雪氷藻類量と酸素同位体比(^{18}O)の垂直分布の関係から雪氷藻類量は ^{18}O 値が高い温暖期の積雪中に多く、 ^{18}O 値が低い低温期に少ないことがわかる。つまり雪氷微生物は、その増殖に液体の形の水が不可欠なため融解期にだけ増殖する。したがって、その季節変動はアイスコアの年代決定に利用できる

ことが明らかになった。

南米パタゴニア南氷原のティンダル氷河で採取したアイスコアにおいても、融解期に氷河表面で増殖する雪氷藻類が、融解期を示す季節マーカーとして利用可能であることがわかり、この氷河の年間涵養量が、少なくとも水当量で十数メートル以上という世界で最大級であることが明らかになった。さらに、ネパールヒマラヤで採取されたアイスコアの分析により、雪氷藻類バイオマスがその年の夏の環境条件、特に夏期の質量収支（積雪量）量と逆相関の関係にあることが明らかになり、アイスコア中の雪氷藻類は、年代決定に利用できるだけでなく、環境指標としても利用できることが明らかになった。

氷河生態系におけるバクテリアの生態

雪氷中で最も普遍的に見られ、氷床コアにも多く含まれる微生物はバクテリアであるが、氷河や氷床の雪氷環境では、どんな種類のバクテリアが増殖しているのか、また、それらの生態に関しては、まだほとんど明らかになっていない。そこで、アラスカのグルカナ氷河で高度別に採取された氷河表面の雪氷試料中のバクテリア遺伝子を分析した。その結果、この氷河の雪氷中では限られた種類（約11種）のバクテリアが増殖しており、その多くが新種であること、また、その種類相が高度とともに変化することが明らかになった。つまり、アイスコアに含まれる氷河の雪氷中で増殖するバクテリアの量や種類から、過去の環境を復元できる可能性が示された。

同時に、氷河で増殖しているバクテリアを特定することを目的に、氷河の環境に近い、低温・貧栄養条件で培養実験を行った。希釈した R2A, BG11, BBM 培地などの貧栄養培地を作成し、現場及び実験室でサンプルを植菌し、0, 15, 25 で培養した。その結果、いずれの高度においても、0 の培養温度において多くのコロニーが出現し、低温に適応したバクテリアが多く存在していることが示唆された。各高度、各種培地から約500株を分離し、コロニー形状などから選抜した約50株について16SrDNA解析によって微生物種を同定したところ、*Cryobacterium* sp.等の低温菌の他、既知種との相同性が低く新種と思われる株が多数出現した。氷河には数多くの未知微生物が存在していることが示唆された。これらの分離株について、今後詳細な生理試験等を行うことにより、氷河生態系における役割を類推できる可能性がある。

3) 氷床コアゲノム解析法の開発

低コストシーケンス法の開発

低コストシーケンス法の開発を行った。これまでシーケンス鑄型の増幅にはPCRを用いてきた。しかし、希釈はすでに限界であり更なるコストダウンが難しいこと、ポリ配列の増幅に誤りが高頻度にかかるなどの理由で別の方法へ切り替えを検討した。その結果、Rolling Circular Amplification法を用いたTempLiPhi (GE healthcare) がより低コストであることが分かった。さらに鑄型増幅の正確性が高いためシーケンスの成功率も高くなることが確認された。17年度中に、PCRからTempLiPhi

への完全切替を完了した。Adapter-ligation PCR法を用いた全ゲノムDNA増幅 GenomePlex complete whole-genome amplification Kit (Sigma-Aldrich)を用いて氷山水抽出物の全ゲノムDNA増幅の検討を行った。氷山溶解液 100ml 相当のサンプルを用いたところ良好な増幅が認められた。

高効率クローニング法の開発

全ゲノムDNA増幅産物は比較的短い断片が多く、そのままクローニングを行うとほとんどのクローンが 100bp程度のインサートのみであった。そのため、スピンドロマトグラフィ法により 400bp以下のDNA断片の除去を行った。DNA共沈剤の存在下でエタノール沈殿を行った後、TAベクターへのクローニングを行った。この結果、 10^5 cfuのライブラリーを作製することに成功した。得られた形質転換体のうち、5,700 クローンの両端のシーケンスを行った。このデータは阿部助手に解析を依頼した。

4) 難培養微生物解析法の開発

サブテーマ「極限環境生物システムの比較研究」の中の環境微生物遺伝資源解析のための情報基盤の整備を参照

5) 抗生物質耐性菌の分析手法の解析

南極雪氷試料、アラスカ氷河試料、中国氷河試料により、ハイブリダイゼーションした結果、中国やアラスカの氷河氷試料において検出頻度が高いのは、南極雪氷試料よりも土壌粒子の飛来や混入による影響が大きいことを考慮する必要がある。しかし、南極氷試料からもアミノグリコシド系とクロラムフェニコールに対する抵抗性遺伝子が検出されたことは、興味深い。なぜこの2系統の抗生物質なのか、さらにはその伝播経路についても、今後の解析に期待をいだかせる結果となった。

6) 南極ドームふじ基地氷床コアの深層掘削

過去 100 万年の気候・環境変動の学際的解明のために、平成 18 年 1 月 23 日 19 時 22 分（日本時間 24 日 1 時 22 分）第 47 次南極地域観測隊のチームがドームふじ基地での氷床深層掘削において、深さ 3,028.52 メートルまでの氷床コアの採取に成功した。ドーム氷床深層掘削計画は、平成 15(2003)年から 3 年計画の 3 年目として氷床下 3,030 メートルの岩盤を目標にしていたもので、今回採取した氷床コアは、EU が採取した 80 万年前のものを超え、100 万年の地球環境変動の復元ができると期待される。

・ サブテーマ「極限環境生物システムの比較研究」

1) 極限環境の生物

極限環境に生息する線虫の研究

極限環境（南極）に生息する線虫の進化・適応戦略を解明するため、南極半島地域のコケ類サンブルから、線虫の分離、培養を試みた。すでに、ほぼ全種類の線虫を網羅する 640 種類の線虫 18S rDNA 配列について系統解析を終えており、南極由来の線虫の配列データとこれを比較して、これらの線

虫の系統的な位置を推定した。その結果、南極半島の線虫は、合計 7 種 (*Plectus aquatilis*、*Aporcelaimellus obtusicaudatus*、*Subanguina raditicola*、*Teratocephalus terrestris*、*Aphelenchoides blastophorus*、*Theristus agilis*、*Pungentus silvestris*) に近縁の種であり、1ヶ所のコケ類サンプルには平均して3種類の線虫が生息していることがわかった。この中で、*P. aquatilis* に近縁の線虫は、南極半島から約 3,000 km 離れた昭和基地周辺のコケ類の凍結サンプルにも同じ種の死体が含まれていたことから、この線虫種は南極大陸の非常に広い範囲に分布している種であることが示唆された。この種が細菌食性の線虫であり、大腸菌を植え付けた寒天培地の上で、20 度で飼育が可能であることから、現在、この線虫を大量に培養するためにさらに詳細な培養条件の検討を行っている。

一方、ニュージーランド、オタゴ大学の D. Wharton 博士の協力により、南極ロス島にあるマクマード基地周辺で単離された線虫 *Panagrolaimus davidi* を入手した。*P. davidi* は、細胞内凍結に耐えることが知られている（現在までのところ）唯一の生物であり、さらに体の水分の 90% 近くを失うような乾燥に対し強い抵抗性を持つ興味深いサンプルである。発生学的な興味から、この種の生殖腺における染色体の動態を観察し、さらに胚発生の過程を追って撮影した。この結果、自家受精を行う 6 本の染色体を持つモデル線虫 *Caenorhabditis elegans* とは異なり、*P. davidi* は単為発生を行う種であること、染色体は約 10 本であることが判明した。また、14 時間で孵化する *C. elegans* とは異なり、孵化まで約 5 倍の 60 時間かかることを明らかにした。興味深いことに *P. davidi* は、一年を通してほとんどが氷点下となる南極に生息しているにも関わらず、その発育の至適温度は 25 度であり、7 度以下では全く生長しない。このことから、*P. davidi* は温暖な環境で生息していた祖先種から、南極の寒冷化が起こった数千万年の間に進化したものと考えられ、この種もまた、温暖環境に生息する近縁種との比較ゲノム解析の興味深い対象となることを期待している。

南極ヌナタークに生育する地衣類

南極東クイーンモードランドに位置するヌナタークやまと山脈で見出された固着地衣類の同定研究を行った。結果的に *Acarospora gwynnii* C.W. DODGE & E.D. RUDOLPH (ナンキョクハウネンゴケ)、*Carbonea capsulata* (C.W. DODGE & BAKER) Hale, *Rhizoplaca melanophthalma* (RAMOND) LEUCKERT & POELT (ナナバケチャシブゴ) の 3 種類を明らかにした。さらに、分類が混乱している昭和基地沿岸域のラングホブデ雪鳥沢上流部に生育する *Rhizocarpon flavum* (ナンキョクチズゴケ) と *Buellia subfrigida* (ミズギワノスミイボゴケ) の分布図を明らかにし、*Rhizoplaca melanophthalma* 及び近縁種の標本毎の形質を再検討した。

南極地域由来新規微生物の分離と同定

南極地域における微生物の探索と分類を目的として、南極海、露岩地域の土壌、各種湖沼（淡水湖、低塩湖、中塩湖、高塩湖）の水・堆積物など約 260 種類の試料を採取した。微生物のキーワードを好冷菌、好塩菌、貧栄養菌、嫌気性菌、光合成菌、共生菌群として分離を試みた。培地として栄養培地 (LB 培地)、各濃度の塩含有培地 (LB + NaCl)、貧栄養培地 (1/10 × LB 培地) などを用

いた。まず試料を無菌水に懸濁・希釈した後、寒天培地に塗布し5 または室温で培養した。生じたコロニーについて単一コロニー分離を繰り返して純化した後、液体培養した。それぞれの株について16S rRNAの塩基配列を決定することにより、分類の基礎資料とした。

現在までに、白、ピンク、赤、黄、黄緑、緑、黒の色調を示すコロニーや5M NaCl存在下で生育する好塩菌、新規な貧栄養菌なども分離できた。それらの中で興味深いものについて塩基配列を決定するとともに電子顕微鏡観察、生理学的検討を行っている。測定の結果、0.05倍濃度のLB培地が至適であり、120-1株が高度な貧栄養要求性を示すことが分かった。また電子顕微鏡観察も行った。現在、全ゲノム配列を解析中であり、今後は生育条件等の検討を進めていく予定である。

本研究によりNaCl濃度5Mの高塩濃度条件下で生育する細菌を1種、光合成細菌、また既知の微生物と16S rRNAの相同性が低い上記2種の菌株を得、またこの他にも興味深い微生物を多数分離している。今後はこれらの詳しい同定や機能解析を行うことで、これらの微生物の環境適応戦略や代謝経路を解明し、南極地域の生態系のさらなる理解や有用な生体分子の確保を進めていきたい。

南極湖沼生物における地史的変遷

水質及び採泥調査、湖水の塩分や堆積物の特徴から南極昭和基地周辺に散在する湖沼群は以下の4タイプに分類された。タイプ1：氷河融水を直接受ける湖。夏季に多量の氷河融水の流入を受けるために、湖水の塩分は非常に低く、0.02psu以下である。また、水温も低く夏季でも3℃以下である。タイプ2：氷河融水を間接的に受ける湖。氷河融水が河川を通じて流入している湖で、湖水の塩分は0.1psu以下の淡水である。冬季の湖水温は3~4℃である。夏季の後半の短い期間では、約8℃まで湖水が上昇する。タイプ3：氷河融水を受けず、雪田の融水に涵養される湖。流域に氷河のない湖沼で、冬季に積もった氷田の融水が流入している湖である。湖水の流入量が少なく、塩分が0.1~2.0psuの淡水~低塩分塩湖を示す。湖水温はタイプ2と同様な挙動を示す。タイプ4：海水起源の湖水で排水口のない湖。湖水面の標高は25m以下で、完新世に海洋から孤立した湖である。これらの4タイプの湖にはそれぞれ特徴ある生物相を持つことも分かってきた。さらに、地史的な特長から分類された4つの湖のタイプが、コケ坊主の生育条件とどのように関わっているのかをより詳細に検討するために、昭和基地周辺の73の湖を徹底的に調査した結果、いずれの湖沼における湖底植物群集は上記の2種の蘚類の1種、あるいは2種から構成されていることが確認できた。また、淡水の38池でオオハリガネゴケが確認され、26池でナシゴケが確認された。その結果、ナシゴケは完全な淡水の池ではなく、やや、塩分を含む湖水を好むことが分かってきた。ナシゴケについてはさらなる分類学的な研究が必要であるが、これまでの報告から、南極半島、クイーンモードランド(インド基地周辺)に確認されている。

調査湖沼のほとんどから、表面水、もしくは深度別の各層における各種水質データ、湖底植生(藻類、ラン藻、コケ植物)の冷凍サンプル、湖底堆積物のコア等が得られている。それらの一時処理や解析はほぼ終了した。残されたデータについても、今後早急に解析を終える予定である。

南極「コケ坊主」生態系における微生物相の解析

一つの完全なコケ坊主を上下・内外の14セクションに分割し、各部由来のリン脂質脂肪酸および中性脂肪酸についてガスクロマトグラフィー（GC）およびGC質量分析（GC-MS）を行い、生物相・微生物相を概観的にキャラクタライズすることができた。

Bryum sp. や *Leptobryum* sp などの水生蘚類は、緑藻類やラン藻類と共生し「コケ坊主」と呼ばれるユニークな構造を形成する。コケ坊主の地理学的分布は、東部南極大陸の昭和基地付近の特定の湖に限定されており、その生息場所の湖沼学的特徴が明らかになってきた。また、コケ坊主の光合成の特性も研究されている。しかし、コケ坊主やその生息場所内で生じる生化学的プロセスはまだ研究されていない。生化学的プロセスの解明には地球化学的手法や生物学的手法が有用であるが、本研究では、後者の“生物学的手法”を用いてコケ坊主という生態系ないし共生系の構造の推定を行った。スカルプスネスにあるB-4池から採集したコケ坊主を、分子学的アプローチを使う代わりに、群集構造の概観と群集間の比較に有効な脂肪酸分析を行った。コケ坊主は、好気的な外層の“生きたコケ組織”部分と、嫌気的な内層の“分解した組織”部分に分け、それぞれ上下方向に7分割し、計14部分に分けた。そして、それぞれの部分のリン脂質脂肪酸（PLFA；主に細菌や真核生物の細胞膜由来でバイオマーカーとなる）と中性脂質脂肪酸（NLFA；主に蓄積脂質やPLFAの分解産物由来）をガスクロマトグラフ（GC）とGC質量分析計（GC-MS）を使って定性・定量を行った。

14画分の脂肪酸組成の比較を行った結果、NLFAよりPLFAに多様性が見られた。PLFA組成では、内外層上部・内層下部・外層下部の3グループに大別することができた。全体では、18:3(n-3)・18:2(n-6)・16:0が見られ、3グループ間で有意な差のある特徴的な脂肪酸は、内外層上部では18:3(n-3)・18:2(n-6)・飽和脂肪酸、内層下部では18:1・19:0cyc、外層下部ではa15:0・i15:0・16:1であった。PLFA組成は真核生物およびバクテリアの細胞膜の脂肪酸の組成を反映し、生細胞の種組成の推定に用いられる。得られたPLFA組成には18:3(n-3)・18:2(n-6)が優占していたが、これはコケ+藻類+シアノバクテリアなど生物の優占的存在を示唆する。逆に、内層下部や外層下部には光合成独立栄養生物は少数派で、内層下部ではバクテリア、外層下部にも別群のバクテリアが優占し、コケ坊主各部で生物種組成に差異のあることが示唆された。NLFA組成では内部と外部間に大きく違いが見られたが、PLFAほど多様性は見られなかった。主なNLFAは、18:3(n-3)と18:2(n-6)で過半数以上を占め、ほとんどが、真核生物特有の脂肪酸で、コケや藻類が蓄積した脂肪酸由来であると考えられた。コケ坊主各部（14セクション）のリン脂質脂肪酸および中性脂肪酸の組成は、遺伝子解析の結果と合わせて、論文等で公表する予定である。

海底熱水地帯の微生物解析

採水した熱水に含まれる微生物をフィルターろ過により濃縮してからDNAを抽出した。次に、真正細菌、もしくは古細菌の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法により16S rRNA遺伝子の部分配列を増幅した。得られたrDNA断片をクローニング後その配列を決定し、系統学的解析により微生物相を明らかにした。系統解析の結果、掘削孔から得られた熱水中の微生物相と、その周辺の海水中の微生物相とは明確に異なっていた。これは採水の際に周辺海水由来の微生物の

混入が検出限界以下であったことを示している。掘削孔から得られた熱水中からは硫黄依存の独立栄養微生物と、従属栄養微生物のrDNA クローンが多く検出された。このことから、南部マリアナトラフの海底熱水系地下には、還元型硫黄を利用している微生物が一次生産の一端を担っている生態系が存在すると推定される。また掘削孔から得られた熱水中のrDNA クローンの分子系統解析により、古細菌、真正細菌ともに新規の微生物の存在が示唆された。とりわけ、真正細菌のクローン解析においては、第6番目のプロテオバクテリアサブグループ(APM-proteobacteria)の存在が推定された。このグループに属する微生物は未だ培養に成功した例はなく、生理学的性質は不明である。

2) 環境微生物遺伝資源解析のための情報基盤の整備

氷床コアのメタゲノム解析より得られた DNA 断片配列を対象とした系統推定の検証として、北海道大学(福井教授)との共同研究にて、尾瀬のアカシボ(融雪時における積雪赤褐色化)中に含まれる DNA サンプルを用いたメタゲノム解析を行い、今回メタゲノム解析で得られた 200base 以上の 309 本の DNA 断片配列を対象に、開発した系統推定システムにて系統推定を行った。解析結果では、*-proteobacteria*, *-proteobacteria*, *Actinobacteria* に多くの DNA 断片配列が予測された。福井教授らが rDNA 等で解析した微生物群集解析との結果との整合性も得られており、群集比較解析を rDNA 等のオーソログ配列を用いることなく本手法の有用性を示すことができると考えられる。

さらに、遺伝研グループの小方、成田氏との共同研究にて、南極雪氷中より採取された DNA サンプルに対するメタゲノム解析により得られた DNA 断片配列を対象に、開発した手法を用いて系統推定を試みた。まず初めに、得られた配列(Forward 鎖、Reverse 鎖をクローンごとにマージした配列を使用)5,422 本を対して、GC 含量での特徴を見たところ、GC 含量が 20% ~ 70%まで幅広い分布を示していた。GC 含量は、ゲノムの特徴を図る指標の一つとして良く知られており、GC 含量が幅広い分布を示すことから、得られた DNA 断片配列は広範囲な微生物種由来の DNA 断片配列が得られていると推測できる。また、DNA 断片配列の 500bp 以上の配列、3,035 本を対象に、今回開発した系統推定システムにて系統推定を実施した。本解析結果では、系統群としては、*Firmicutes*, *Euryarchaeota*, *Cyanobacteria*, *-proteobacteria* に多くの DNA 断片配列が予測された。予測された属種について調べたところ、*Firmicutes* では *Bacillus* 属、*Euryarchaeota* では *Methanosarcina* 属、*Cyanobacteria* では *Nostoc* 属に多くの配列が予測された。*Nostoc* 属については、「極地生物多様性画像データベース(<http://antmoss.nipr.ac.jp/database.html>)」にて *Nostoc commune* が南極昭和基地周辺にて生息していたとの報告があり、本解析結果とも整合があると考えられる。本解析結果より予測された属数の総和は 106 属であり、多くの微生物種が南極の雪氷中に存在している可能性が高いと考えられる。本解析結果は、ある地点でのサンプリング地点から得られた DNA サンプルを対象としており、現状では得られた結果に対しての検証は難しいが、来年度以降、南極の雪氷中の異なるサンプリング地点におけるメタゲノム解析を行うことによって、本解析結果と併せて相対的な検証が可能となり、より確かな南極雪氷中に存在する微生物叢の推定が可能と考えている。最後に本解析の汎用的

なソフトウェア化を行い、公開を行っている。

本研究での知見：SOMによる環境由来DNA配列の系統推定システム(G-InforBIO)：
<http://wdcm.nig.ac.jp/inforbio/G-InforBIO/download.html>

3) 極限環境生物統合データベースの構築

冷凍植物試料(蘚苔類、地衣類、藻類、シアノバクテリア)のデータベースの構築について検討した。具体的には国立情報学研究所と共同で、植物の立体動画像の取り込み、植物の培養の可能性、線虫などの微小生物抽出の可能性について検討した。極地植物多様性画像データベースのシステムについては、地衣類、淡水藻類のデータを追加し、公開した(極地生物多様性画像データベース <http://antmoss.nipr.ac.jp/database.html>)。

(2) 成果発表及び著書執筆等

研究論文掲載：

- Abe Takashi, Sugawara Hideaki, Kanaya Shigehiko, Kinouchi Makoto, Matsuura Yasaburo, Tokutaka Heizo and Ikemura Toshimichi, "A large-scale Self-Organizing Map (SOM) constructed with the Earth Simulator unveils sequence characteristics of a wide range of eukaryotic genomes", *Proceedings of Workshop 2005 on Self-Organizing Maps*, pp. 187-194. 2005.
- Abe Takashi, Ikemura Toshimichi, Kanaya Shigehiko, Kinouchi Makoto, and Hideaki Sugawara, "A novel bioinformatics strategy for phylogenetic study of genomic sequence fragments: self-organizing map (SOM) of oligonucleotide frequencies", *Proceedings of Workshop 2005 on Self-Organizing Maps*, pp. 669-676. 2005.
- Abe Takashi, Sugawara Hideaki, Kinouchi Makoto, Kanaya Shigehiko, Ikemura Toshimichi, "Novel Phylogenetic Studies of Genomic Sequence Fragments Derived from Uncultured Microbe Mixtures in Environmental and Clinical Samples", *DNA research*, 12, 281-290. (2005).
- Aizen, V. B., Aizen E. M., Fujita, K., Nikitin, S. A., Kreutz, K. J., Takeuchi, N. (2005) Stable-isotope time series and precipitation origin from firn cores and snow samples, Altai glaciers, Siberia. *Journal of Glaciology*, 51(175), 637-6
- Aizen, V. B. , Aizen, E. M. , Joswiak, D.R. , Fujita, K., Takeuchi, N. and Nikitin, S. A. (2006) Climatic and atmospheric Circulation Pattern Variability from Ice-core isotope/geochemistry Records (Altai, Tien Shan and Tibet), *Annals of Glaciology*, 43, accepted.
- Fujita, K., Thompson, L. G., Kajikawa, Y., Ageta, Y., Yasunari, T., Sakai, A., and Takeuchi, N. (2006) Thirty-year history of glacier melting in the Nepal Himalayas. *Journal of*

Geophysical Research, 111, D03109, doi:10.1029/2005JD005894.

Hayashi, Hidenori, Takashi Abe, Mitsuo Sakamoto, Hiroki Ohara, Toshimichi Ikemura, Kazuo Sakka, and Yoshimi Benno, "Direct cloning of genes encoding novel xylanases from human gut", *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 251-259.

伊村 智, 工藤栄. 昭和基地周辺の南極湖沼における潜水調査報告. 南極資料. 50(1), 103-113, 2006

伊村 智. 南極の湖沼の謎に挑む. 極地, 41(2), 10-15, 2005.

Koshima, S., Takeuchi, N., Uetake, J., Shiraiwa, T., Uemura, R., Yoshida, N., Matoba, S. and Godoi, M.A. (2006): Estimation of net accumulation rate at a Patagonian glacier by ice core analyses using snow algae. *Global and Planetary Change*, in press.

Matsumoto, G.I., Komori, K., Enomoto, A., Imura, S., Takemura, T., Ohyama, Y., Kanda, H. Environmental changes in Syowa Station area of Antarctic during the last 2300 years inferred from organic components in lake sediment cores. *Polar Bioscience*, 19, 51-62, 2006.

Miyake, T., Nakazawa, F., Sakugawa, H., Takeuchi, N., Fujita, K., Ohta, K., Nakawo, M. (2006) Concentrations and source variations of n-alkanes in a 21-m ice core and snow samples at Belukha Glacier, Russian Altai Mountains, *Annals of Glaciology*, 43, accepted.

Naganuma T, Hua PN, Okamoto T, Ban S, Imura S & Kanda H (2005) Depth distribution of euryhaline halophilic bacteria in Suribati Ike, a meromictic lake in East Antarctica. *Polar Biology*, 28(12): 964-970.

Nakazawa, F., Fujita, K., Takeuchi, N., Fujiki, T., Uetake, J., Aizen, V., and Nakawo, M. (2005) Dating of seasonal snow/firn accumulation layers using pollen analysis. *Journal of Glaciology*, 51(174), 483-490.

Ogawa M, Kuramochi T, Takayama S, Tanimoto D & Naganuma T. Inferring the feeding habit of the deep-sea "big-mouth" ascidian tunicate, *Megalodicopia hians*, by the fatty acid analysis. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 8(2), 185-193, 2005.

Takano, Y., H. Mori, T. Kaneko, Y. Ishikawa, K. Marumo, and K. Kobayashi: Phosphatase and microbial activity with biochemical indicators in semi-permafrost active layer sediments over the past 10,000 years. *Applied Geochemistry*, 21, 48-57 (2006).

Takano Y., K. Kobayashi, Y. Ishikawa and K. Marumo: Emergence of the inflection point on the racemization rate constant of D- and L- amino acids in the early stage of terrestrial diagenesis. *Organic Geochemistry*, 37, 334-341 (2006).

高野 淑識 : 地球物質中の易分解性有機物と初期高分子化反応 (Labile organic matter and initial polymerization process in geochemical materials.) . 海洋 , 37 (12), 858-865 (2005).

Takeuchi, N., Matsuda, Y., Sakai, A. and Fujita, K. (2005) A large amount of biogenic surface

dust (cryoconite) on a glacier in the Qilian Mountains, China. *Bulletin of Glaciological Research*, 22, 1-8.

Takeuchi, N., Uetake, J., Fujita, K., Aizen, V., and Nikitin, S. (2006) A snow algal community on Akkem Glacier in the Russian Altai Mountains. *Annals of Glaciology*, 43, accepted.

Uchiyama, Taku Takashi Abe, Toshimichi Ikemura, Kazuya Watanabe, "Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes", *Nature Biotechnology*, 1, 88-93. (2005)

Uetake, J., S.Kohshima, F.Nakazawa, K.Suzuki, M.Kohno, T.Kameda, S.Arkipov, and Y.Fujii, (2006): Biological ice-core analysis of the Sofiyskiy Glacier in the Russian Altai mountains, *Annals Glaciol.*, in press.

Yoshimura, Y., Kohshima, S., Takeuchi, N., Seko, K. and Fujita, K. (2006): Snow algae in a Himalayan ice core: new environmental markers for ice core analyses and their correlation with summer mass balance. *Annals Glaciol.*, in press.

口頭発表

Abe Takashi, Ikemura Toshimichi, Kozuki Tokio, Nakagawa Satoshi, Kinouchi Makoto, Kanaya Shigehiko and Sugawara Hideaki, "A novel bioinformatics approach for phylogenetics analyses of environmental and clinical samples on the basis of Self-Organizing Map (SOM)", Human Genome Meeting 2005 (Kyoto, Japan), April 2005.

Abe Takashi, Ikemura Toshimichi, Kanaya Shigehiko, Kinouchi Makoto, Sugawara Hideaki : A novel bioinformatics strategy for phylogenetic study of genomic sequence fragments, Self-Organizing Map (SOM) of oligonucleotide frequencies. Workshop 2005 on Self-Organizing Maps (Paris, France), Sept. , 2005.

Abe Takashi, Sugawara Hideaki, Kinouchi Makoto, Kanaya Shigehiko, Matsuura Yasaburo, Tokutaka Heizo, and Ikemura Toshimichi: A large-scale Self-Organizing Map (SOM) constructed with the Earth Simulator unveils sequence characteristics of a wide range of eukaryotic genomes. Workshop 2005 on Self-Organizing Maps (Paris, France), Sept. , 2005.

阿部貴志, 池村淑道, 金谷重彦, 木ノ内誠, 菅原秀明, "自己組織化地図法(Self-Organizing Map)に基づいた環境由来 DNA 配列からの微生物多様性解明", 日本微生物資源学会第12回大会(かずさ), 2005年6月.

阿部貴志, 池村淑道, 木ノ内誠, 金谷重彦, 菅原秀明, "環境由来 DNA 配列を用いた自己組織化地図法(Self-Organizing Map)による培養困難な微生物群の系統推定手法の開発", 第28回日本分子生物学会年会(博多), 2005年12月.

- 阿部貴志、池村淑道、田中尚人、金谷重彦、木ノ内誠、菅原秀明、”環境由来 DNA 配列を用いた自己組織化地図法(Self-Organizing Map: SOM)による微生物群集比較”, 第 8 回微生物ゲノム研究のフロンティア(かずさ) 2006 年 3 月
- Abe Takashi, Hideaki Sugawara, and Toshimichi Ikemura: Phylogenetic classification of environmental and clinical samples without orthologous sequence sets and sequence alignment on the basis of Self-Organizing Map (SOM). 2006 Sokendai International Symposium (Hayama, Japan), Jan., 2006.
- Ban, S., Kimura, S., Imura, S., Kudo, S., and Matsuzaki, M. Characteristics of plankton community structure in hyper-saline meromictic Lake Suribati Ike as compared with other freshwater lakes around Syowa Oasis. 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.
- Hua P, Naganuma T, Imura S & Kanda H (2006) Euryhaline halophiles in a saline lake near Syowa Station, Antarctica. International Conference on Alpine and Polar Microbiology, 27-31 March 2006, Innsbruck, Austria.
- Imura, S. Japanese limnetic research project in Antarctica. 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.
- 井上源喜, 小林智恵子, 竹村哲雄, 伊村智, 神田啓史. 湖底堆積物コア中の有機成分による南極昭和オアシスの B-3 池および B-4 池における過去 3400 年間の環境変動と生物組成変動に関する研究. 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.
- 伊村智, 工藤栄, 瀬戸浩二. 南極湖沼における潜水観察. 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.
- 木村成子, 伴修平, 工藤栄, 伊村智, 松崎雅広. 深さの異なる 2 つの塩湖における微生物群集の鉛直構造. 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.
- Kato Singo, Ishibashi J., Sunamura M, Utsumi M., Kakegawa T., Kawarabayashi Y., Chiura, H. Marumo K., Urabe T. and Yamagishi A.: Microbial community in the hydrothermal systems at south Mariana Trough. International Symposium on Extremophiles and Their Applications. 2005. 11.29-12.2 (Tokyo)
- 加藤真悟、石橋純一郎、砂村倫成、掛川武、内海真生、河原林裕、千浦博、丸茂克美、浦辺徹郎、山岸明彦。南部マリアナトラフにおける海底熱水系地下圏の微生物相の解析。ブルーアース'06, 2006 年 2 月 23-24 日、(横浜)
- 加藤真悟、内海真生、河原林裕、千浦博、石橋純一郎、丸茂克美、浦辺徹郎、山岸明彦。千葉南部マリアナトラフにおける海底熱水系微生物相の解析。地球惑星科学関連学会 2005 年合同大会。2005 年 5 月 22-26 日、(千葉)
- 加藤真悟、石橋純一郎、砂村倫成、内海真生、河原林裕、千浦博、丸茂克美、浦辺徹郎、小林智織、加藤真悟、掛川武、佐藤誠悟、益田晴恵、丸茂克美、浦辺徹郎、山岸明彦。南部マリアナトラフにおける熱水生堆積物の微生物相の解析。ブルーアース'06, 2006 年 2 月 23-24 日、(横浜)
- Kudoh, S. Limnological features of Skarvsnes lakes, Syowa Oasis in east Antarctica. 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.

- Kohshima S., Y.Yoshimura, N.Takeuchi, T. Segawa and J. Uetake, Characteristics of Glacier Ecosystems and Glaciological Importance of Glacier Microorganisms, International Conference on Alpine and Polar Microbiology at Innsbruck, Austria, 27-31 March, 2006
- 松崎雅広, 伴修平, 工藤栄, 伊村智, 高橋陽介. 南極すりばち池から分離したDMSO呼吸細菌と脱窒細菌の解析. 第28回極域生物シンポジウム, 2005.
- 三宅絵里, 澤辺智雄, 大内真理子, 堀口健雄, 松崎雅広, 伊村智. 南極すりばち池の真核微生物群集. 第28回極域生物シンポジウム, 2005.
- Naganuma T & Wilmutte A (2006) Microbiological and ecological responses to global environmental changes in Polar regions (MERGE): An international polay year (IPY) activity. The 13th International Symposium on Polar Sciences, 9-11 May 2006, Incheon, Korea. Proceedings, p. 21-24.
- Naganuma T (2006) Molecular and physiological characterization of euryhaline halophilic microorganisms from Antarctic saline habitats. Subglacial Antarctic Lake Environments (SALE) in the International Polar Year (IPY), Advanced Science and Technology Planning Workshop, 24-26 April 2006, Grenoble, France. Abstracts, p. I-3-B.
- Naganuma, T, Ban S and Imura S (2005). Euryhaline halophiles from the meromictic lake, Suribati Ike, Antarctica. Rhe 28th Symposium on Polar Biology, 8-9 December 2004, National Institute Polar Research, Tokyo, Japan.
- Naganuma T, Imura S & Kanda H (2005) Peptide D-amino acids in microorganisms isolated from Antarctic lacustrine samples. The 28th Symposium on Polar Biology, 8-9 December 2005, National Institute of Polar Research, Tokyo, Japan.
- 佐々木正史, 遠藤登, 伊村智, 工藤栄. 南極リュツオ・ホルム湾露岩域の内水面における溶存メタンおよび氷盤気泡中メタンガス. 第28回極域生物シンポジウム, 2005.
- 澤辺智雄, 三宅絵里, 松崎雅広, 伊村智, 伴修平. 南極すりばち池における自由生活型細菌と粒状物付着型細菌群集の比較. 第28回極域生物シンポジウム, 2005.
- 瀬戸浩二, 佐藤高晴, 伊村智, 工藤栄, 今中忠行, 坂井三郎, 上村剛史, 奥田将己. 超高塩分塩湖すりばち池の環境特性と環境変動. 第28回極域生物シンポジウム, 2005.
- 瀬戸浩二, 佐藤高晴, 伊村智, 今中忠行, 上村剛史, 奥田将己, 神田啓史. 南極の塩湖舟底池における堆積物の特徴と古環境変遷. 地質学会, 2005.
- 瀬戸浩二, 伊村智, 今中忠行, 佐藤高晴, 奥田将己, 上村剛史, 神田啓史. 南極湖沼の水質特性と底質環境. 日本陸水学会第70回(大阪)大会, 2005.
- 西川佳宏, 長沼毅, 伊村智, 神田啓史. 南極湖沼試料から単離した微生物におけるペプチド性D体アミノ酸. 第28回極域生物シンポジウム, 2005.
- 大塚泰介, 工藤栄, 伊村智, 大谷修司. Skarvsnes 湖沼群の珪藻、特にコケ坊主に関連して. 第28回

- 極域生物シンポジウム, 2005.
- 奥田将己, 伊村智, 神田啓史. 昭和基地周辺における蘚類分布と周辺微環境の関係評価 . 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.
- Segawa, T., Takeuchi, N. and Kohshima S., Altitudinal change in bacterial flora on the Gulkana Glacier, Alaska, analyzed by 16S rRNA gene. International Conference on Alpine and Polar Microbiology at Innsbruck, Austria, 27-31 March, 2006
- Segawa, T., Takeuchi, N. and Kohshima S., Altitudinal change in bacterial flora on the Gulkana Glacier, Alaska, analyzed by 16S rRNA gene. International Glaciological Society, Symposium on High-Elevation Glaciers and Climate Records, Lanzhou, China, 5-9 September 2005
- Takeuchi, N., Uetake, J., Fujita, K., Aizen, V., and Nikitin, S. , A snow algal community on the Akkem Glacier in the Altai Mountains, Russia, International Glaciological Society, International Symposium on High-Elevation Glaciers and Climate Records, Lanzhou, China, 5-9 September 2005
- Uetake J., S.Kohshima, F.Nakazawa, N Takeuchi, K Fujita, Y.Fujii, M Nakawo, Biological ice core analysis in the Belukha Glacier, Altai mountains, Russia, International Glaciological Society, Symposium on High-Elevation Glaciers and Climate Records, Lanzhou, China, 5-9 September 2005
- Uetake J., S.Kohshima, F.Nakazawa, N Takeuchi, K Fujita, Y.Fujii, M Nakawo, Biological ice core analysis in the Belukha Glacier, Altai mountains, Russia, International Conference on Alpine and Polar Microbiology at Innsbruck, Austria, 27-31 March, 2006
- 山沖和之, 今井正江, 井上源喜, 長島秀行. 南極の岩石内微生物群集より分離した単細胞緑藻の系統 . 第 28 回極域生物シンポジウム, 2005.
- 山岸明彦. 南部マリアナトフにおける海底 熱水系地下圏の微生物. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005 年 12 月 7-10 日、(福岡)
- Yamagishi, A. (Invited Lecture) Extermophiles: The keys to astrobiology. PACIFICHEM2005(2005 環太平洋国際化学会議), 2005, 12.15-20, Hawaii, USA Yoshimura, Y., Kohshima, S., Takeuchi, N., Seko, K. and Fujita, K., Snow algae in a Himalayan ice core: new environmental markers for ice core analyses and their correlation with summer mass balance. International Glaciological Society, Symposium on High-Elevation Glaciers and Climate Records, Lanzhou, China, 5-9 September 2005

7 . 研究集会

本研究プロジェクトに関わる集会は各研究課題に応じて、各研究所、大学などで実施されてきたが、公式な研究集会が2回開催された。研究集会の概要をまとめる。

平成17年8月30日(火) 第1回新領域融合研究プロジェクト「地球生命システム」研究集会が国立極地研究所(6階講堂)において、開催された。

集会の趣旨について神田啓史が説明した。プロジェクトへの取り組みと提案として、仁木宏典、神田啓史、藤山秋佐夫、本山秀明によって紹介があった。極地での観測プロジェクトでは南極観測プロジェクトについて、伊村 智、工藤 栄が紹介し、北極での観測については、神田啓史が紹介した。それぞれの研究課題について牛田一成(京都府立大学)、幸島司郎(東京工業大学生命理工学)、吉村義隆(玉川大学)、長沼 毅(広島大学生物圏科学)、井上正鉄(秋田大学)、小方康至(国立遺伝学研究所)、阿部貴志(国立遺伝学研究所)、鹿児島 浩(国立遺伝学研究所)、成田貴則(国立遺伝学研究所)によって研究の提案と進捗状況が報告された。本集会には約30名の参加があり、16名の研究者から研究報告、研究提案があり、本年度の研究を進めていく上で有意義な集会であった。

平成18年2月13日(月)、第2回新領域融合研究プロジェクト「地球生命システム」研究集会が国立遺伝学研究所(図書館3階セミナー室)において開催された。

集会にあたって、およびプロジェクトの全体計画について神田啓史より説明があった。引き続き、プロジェクトの成果として、神田啓史、瀬川高弘、伊村 智、仁木宏典、阿部貴志、鹿児島浩、成田貴則、小林悟志、吉村義隆、長沼 毅について進捗状況、及び研究成果について報告があった。次年度プロジェクト計画についての意見交換があった。本研究集会で用意したジョン・プリスク(モンタナ州立大学)による特別講演が行われた。南極ポストーク氷床コア微生物研究の第1人者であり、氷床コア解析のこれまでの経過と今後の計画について興味深い講演であった。その後、遺伝研に設置された高速共焦点レーザー顕微鏡、多光子レーザー顕微鏡の見学、及び極限環境より収集された微生物研究に欠かせない前室、実験室、エア・シャワー室、無菌テント、クリーンベンチを完備した無菌実験室施設を見学した。本集会には約20名の参加があり、本年度の成果の取りまとめに有意義な集会であった。