

サブテーマ2： 極限環境生物システムの比較研究

研究代表者： 神田啓史（プロジェクトディレクター）

共同研究者：

[国立極地研究所] 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

1. 研究目標

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。

以下の研究課題の下で研究を実施する。

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

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

2. 年次研究計画

平成18年度

ゲノム解析のための線虫の選択、凍結・乾燥耐性に関する基礎データ収集。ヌナタークや大陸

氷縁に接する地帯に分布する地衣類を中心とした露岩域植物多様性と生態。コケ坊主由来 18S/16S rRNA 遺伝子の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) による定性的キャラクター化およびクローン解析による生物相・微生物相の半定量的キャラクター化。リュツォ・ホルム湾露岩地域における湖沼および氷床縁から得られた試料の予察データ取得する。親生元素の分配傾向と安定同位体比の基礎データを獲得。バイオマーカー指標との相関。南極氷床コアからの無菌的な古代バクテリア又はそのゲノム DNA の分離。南極遺伝子資源 (南極同行により採取) からの極限環境バクテリアの分離等を行う。

平成 19 年度

南極産線虫の cDNA・ゲノムのライブラリーの構築、配列解析。又ナタークや大陸氷縁に接する地帯の地衣類等露岩域植物多様性との比較のために、昭和基地周辺からの試料の精査。湖沼生物について現世 (表層試料) の生態系での地域差を検証したのち、放射性炭素年代から時間軸を明らかにし、過去 (中層あるいは深層試料) の地球化学的な基礎データを取得し、過去から現世までの海水準変動と南極生態系の地史的遷移の因果を明らかにする。コケ坊主由来バルク DNA から PCR 増幅した独立栄養関連酵素 (RuBisCO など) の遺伝子の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) による定性的キャラクター化およびクローン解析による生物相・微生物相の半定量的キャラクター化を行う。

平成 20 年度

南極産線虫、露岩域植物多様性、湖沼生物の解析により、モデル生物との比較によるシステムの可塑性の解析を引き続き行う。とくに湖沼では底質中での分解速度定数と酸化還元状態を見積り、易分解性有機物 (Labile) から準難分解性有機物 (Semi-labile) および難分解性有機物 (Refractory) への遷移を明らかにし、親生無機元素の安定同位体比変動と併せて評価する。

平成 21 年度

本プロジェクトの最終年に当たり、南極産線虫の凍結・乾燥耐性遺伝子の探索ではモデル線虫 *Caenorhabditis elegans* への極限環境線虫の遺伝子の導入による耐性遺伝子の機能を解析する等、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を取りまとめる。また、極限環境生物のデータベース構築を行う。

3 . 平成 17 年度の研究進捗

1) 極限環境の生物

極限環境に生息する線虫の研究

平成 17 年度に計画していた 3 つの目標、南極に生息する線虫の収集・単離、種の同定、培養法の確立をすべて完了し、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。

南極又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（化学成分の分析、顕微鏡観察による形態精査）。また、ラングホブデ雪鳥沢の上流部（雪鳥池の上部で氷舌の影響を強く受ける大陸氷縁地帯に類似する環境）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。この作業の過程で、地衣体、孢子、地衣成分がナナバケチャシブゴケとは異なり生育地が大陸氷縁に限られる標本を日の出岬、ラングホブデ、スカルプスネス、スカレピークハルセン、スカーレン、ルンドボークスヘッタで得た。未記載のもので新種と思われるので *Rhizoplaca* sp としている。

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。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。

南極湖沼生物における地史的変遷

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以下の観測を行った。

- ・湖沼生態系の構成：湖底生物群集のサンプリングを行い、湖沼生態系を構成する生産者、消費者、分解者の種組成を明らかにした。また、航空機や気球を用いた空中写真撮影による面的な情報と、湖面からの音響探査による生物マットの厚さなどの情報から、湖沼底質のバイオマスを推定しつつある。
- ・物質生産と物質循環：現場実験と試料解析により、極めて貧栄養状態にある南極湖沼中で大きな生物量を保つ湖沼生態系がどのような物質生産によって支えられているのかを解明した。
- ・湖沼の環境変遷と陸上植生の記録：コアサンプラーを用いて採取した湖沼堆積物の柱状試料を解析することによって、湖沼の成立年代、その後の湖沼環境の変遷と生物相の遷移過程を明らかにした。

さらに、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。過去 1 万年前から現世までの多様な湖沼生態系を解明するためにルンドボークスヘッタ（丸湾大池および丸湾南池）、スカーレン（スカーレン大池）、スカルプスネス（舟底池、すりばち池、親子池、長池（仮称）、アビ池（仮称））およびラングホブデ（雪鳥池およびぬるめ池）の各地域において調査を実行した。湖沼堆積物試料は、生物擾乱が極めて少なく、層序

が整然としたラミナ構造が特徴的であった。

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。

海底熱水地帯の微生物解析

海底に存在する熱水噴出地帯では、熱水により還元型化合物が豊富に供給されており、それを利用して生育している生物が存在する。本研究の目的は、海底熱水噴出地帯で掘削を行い、その掘削孔から湧出する熱水を採水し、分子生物学的手法を用いた解析により海底下に存在する微生物相を明らかにすることである。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こっている。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。その後、無人潜水艇を用いて、掘削孔から湧出する熱水を採水することに成功した。今回はそれらの掘削孔から得られた熱水と、比較対象として天然ベントから得られた熱水、さらに周辺海水中の微生物の解析を行った。

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、北海道大学の福井先生らとの共同研究にて、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) 極限環境生物統合データベースの構築

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。

4) 極限環境生物の現地調査

南極氷山塊からの古代バクテリア及び古代ゲノム DNA の分離、南極雪原に於いて無菌的に掘削した氷床コアからのバクテリア及びゲノム DNA の分離、南極露岩帯に於いて無菌的に採取した土壌試料からのバクテリアの分離、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 の分離、南極露岩帯に於いて採取した苔類や地衣類からの苔、線虫、藻類、菌類、バクテリアの分離について検討した。

4. 平成17年度研究成果

(1) 知見・成果物・知的財産権等

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、我々は、国立極地研究所、神田啓史教授から分与された南極半島地域のコケ類サンプルから、線虫の分離、培養を試みた。これらのサンプル中には、複数の線虫種が確認されたため、まず初めに1ヶ所のコケ類サンプル中に何種類の線虫がいるのか、18S rRNA 遺伝子(18S rDNA)の配列に基づく分子系統樹データを用いて分類を行うことにした。そのために、線虫一頭からのゲノムDNAを抽出し、線虫の18S rRNA 遺伝子(18S rDNA)に特異的なプライマー、SSU18A(aagattagccatgcatg)SSU26R

(cattcttggcaaatgctttcg)を用いて、約1 kbの領域を増幅、個々の線虫の18S rDNAの配列決定を行った。我々はすでに、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(図1)。その結果、南極半島の線虫は、合計7種(*Plectus aquatilis*、*Aporcelaimellus obtusicaudatus*、*Subanguina radiculicola*、*Teratocephalus terrestris*、

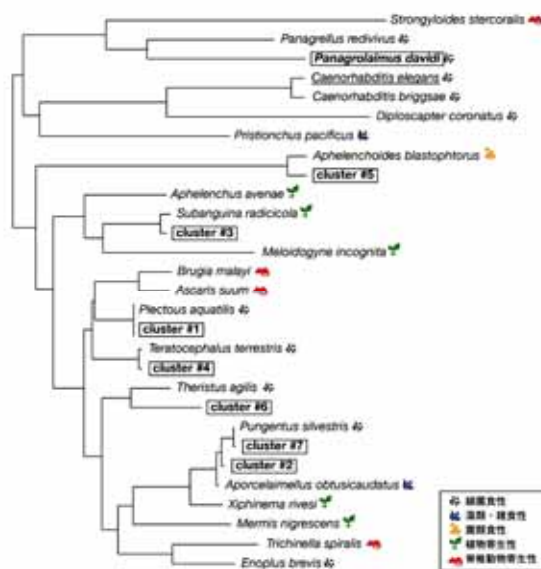


図1) 南極由来線虫 (cluster#1-#7) の系統解析

Aphelenchoides blastophtorus、*Theristus agilis*、*Pungentus silvestris*)に近縁の種であり(図2)、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。さらに *P. aquatilis* は、ベルギー、アメリカなどの温帯地域でも生息が報告されており、その近縁種が南極大陸で生息しているこ



図 2) *Plectus*, *Aporcelaimellus*, *Subanguina* 属線虫の形態 (同一縮尺)

とから、これらのゲノム配列、mRNA の発現レベルの比較を行うことによって、両者の違いがどの遺伝子によるものかを明らかにすることができるのではないかと考えている。我々は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を見いだした。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。今後は、この線虫の種について、ゲノムの配列データに加え、形態的特徴などを利用して正確に同定、あるいは新規な線虫であれば記載を行い、さらに凍結・乾燥への耐性について解析を進める。もしも、期待されるような高度な凍結・乾燥耐性があれば、例えば、低温、あるいは乾燥条件で飼育した線虫と、良好な条件で飼育した線虫から、それぞれ mRNA を抽出し、これら間の遺伝子発現の差異を調べ、凍結・乾燥に対する耐性遺伝子を見出すことが可能であると考えている。

さらにニュージーランド、オタゴ大学の D. Wharton 博士の協力により、南極口ス島にあるマクマード基地周辺で単離された線虫

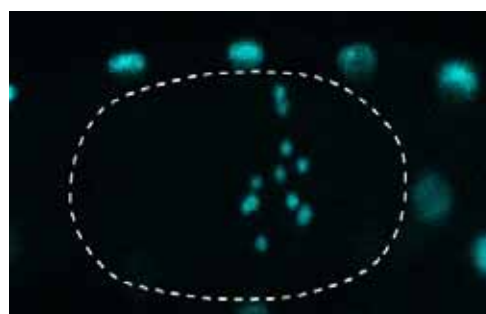


図 3) ディプロテン期の *P. davidi* 卵 (DAPI による染色体の染色)

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。我々は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、自家受精行い、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 (図 3)。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。

現在、これらを含めた複数の南極由来の線虫の、分類系統、培養法などの基礎データを集めている。生物の持つ凍結・乾燥耐性に関する遺伝子産物として、現在までに氷核の成長を阻害し、細胞の微細構造を破壊するような大きな結晶の成長を妨げる抗凍結タンパク AFP (anti-freezing protein) や、脱水によるタンパク質の凝集、失活を防ぐ LEA protein (late embryo abundant) などが知られている。しかし、これらのタンパク質だけでは生物の凍結・乾燥耐性の原因は説明できず、依然そのメカニズムは不明のままである。これに対して、最近の線虫を用いた研究から、凍結・乾燥の両方に耐性のためにはトレハロースなどの糖類によるタンパク質、細胞内小器官の保護作用が重要であること、また低温に対して、線虫が積極的に体、細胞からの脱水を行う事によって凍結を回避することなどが明らかになった。これらのことから凍結耐性と乾燥耐性は密接に関係している可能性が高いと考えられた。平成 18 年度は、これらのデータを基づいて、どの線虫サンプルを EST 解析、ゲノム解析に用いるかを決定し、実際のライブラリを構築する計画である。

南極ヌナタークに生育する地衣類

Acarospora gwynnii C.W. DODGE & E.D. RUDOLPH, *Carbonea capsulata* (C.W. DODGE & BAKER) *HaleRhizoplaca melanophthalma* (RAMOND) LEUCKERT & POELT の 3 種類を明らかにし (論文は別添)、ラングホブデ雪鳥沢上流部における *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分布図 (分布図は別添)。

Rhizoplaca melanophthalma ナナバケチャシブゴケ及び近縁種の標本毎の形質等一覧表 (未完)

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。

[実験 1]

実験 1 では、貧栄養条件・酸性条件・アルカリ性条件に的を絞り、スクリーニングを行った。サンプル溶液を各種の固体培地に 100µl ずつ植菌し、25 で培養した後、生育した菌体の 16S rRNA 配列解析を順次行ったところ 2 種の微生物について特に興味深い結果が得られた (表 1)。

表 1 16S rRNA の BLAST による解析

培地・菌体	比較した微生物種名	一致した塩基対	相同性 (%)
0.1 LB・120-1	<i>Phyllobacterium brassicacearum</i>	1171 / 1257	93.16
0.1 LB 2M・89	<i>Roseomonas cervicalis</i>	1222 / 1290	94.73

このうち、120-1 株を 6 種類の濃度の LB 液体培地に植菌し生育を測定した。結果を図 1 に示す。

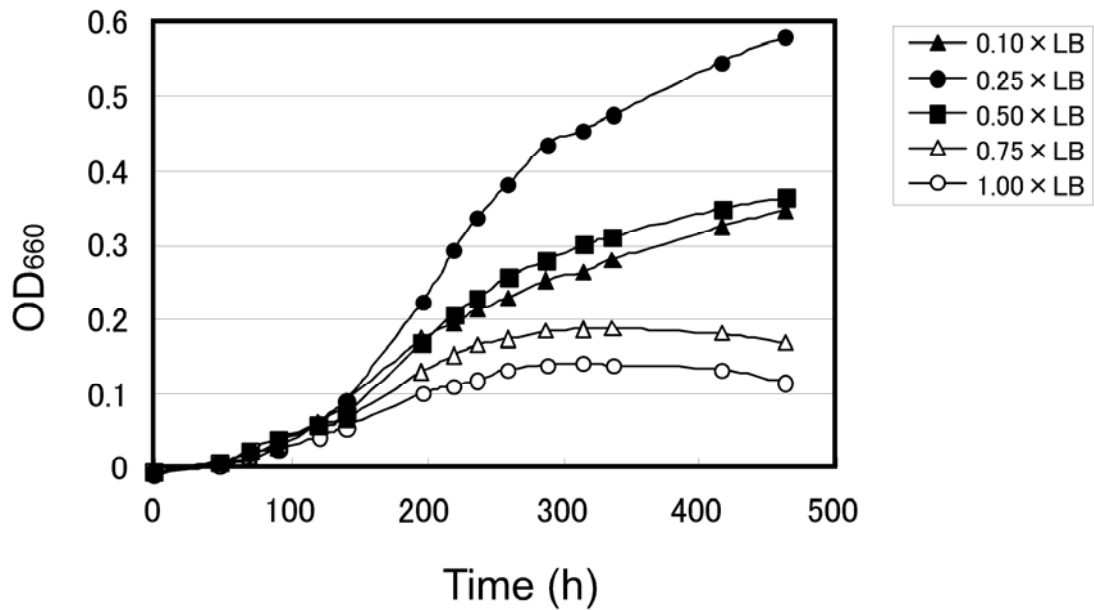


図 1 . 菌株 120-1 の至適栄養濃度測定

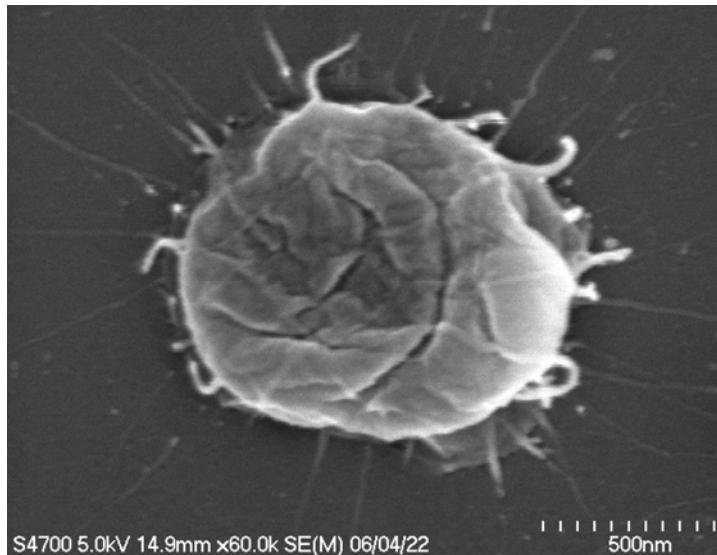


図 2 . 120-1 株の電子顕微鏡写真

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わかった。また電子顕微鏡観察も行った（図 2）。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。

[実験 2]

実験 2 では特に高塩・嫌気・光合成・貧栄養に焦点を絞って南極地域の様々な地点から採取したサンプルから新規微生物の分離と同定を試みた。

分離した多数の微生物について順次 16S rRNA の塩基配列を決定した。その中でも今まで知られている微生物と相同性が低く、新規の微生物であることが期待されている 2 種の菌 株を表 2 に示す。

表 2 16S rRNA の BLAST による解析

培地・菌体	比較した微生物種名	一致した塩基対	相同性 (%)
M9・107-2	<i>Devosia neptuniae</i>	1302 / 1368	95.18
0.1 LB 2M・60-2-1	<i>Psychroflexus torques</i>	1378 / 1436	95.96

本研究により NaCl 濃度 5M の高塩濃度条件で生育する細菌を 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 (図 1)。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



図 1 湖沼の類型化。右 : タイプ 1、中 : タイプ 2、左 : タイプ 4

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

25 m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。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（図2）。



図2 湖底の植生。左：コケ坊主、右：シアノバクテリアの群落

南極「コケ坊主」生態系における微生物相の解析

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、好氣的な外層の“生きたコケ組織”部分と、嫌氣的な内層の“分解した組織”部分に分け、

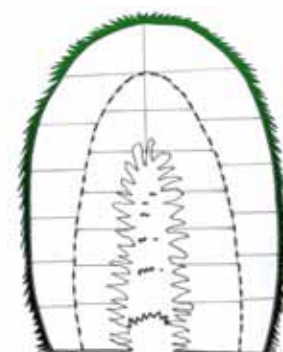


図1. コケ坊主上下・内外の14セクション

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（図2）、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、

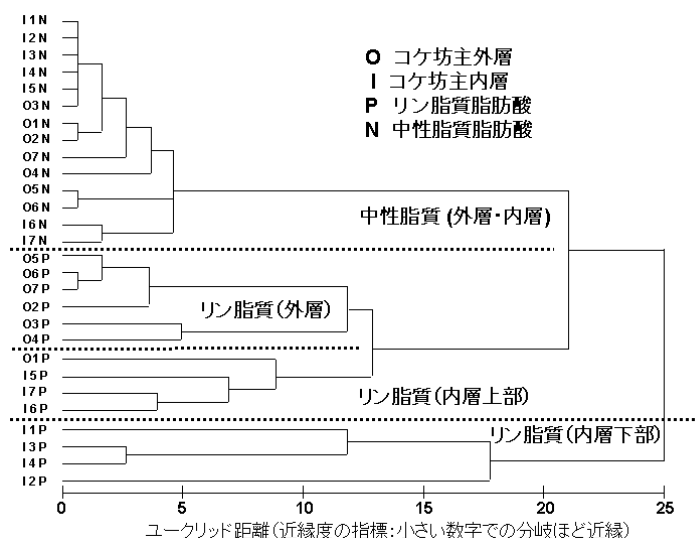


図2. コケ坊主14セクションのリン脂質脂肪酸および中性脂質脂肪酸の組成にもとづくデンドログラム

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。

その他、南極陸上ハビ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。また、上述の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、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)との関連では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

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。しかし得られたクローンの数の多さから、この海域の海底熱水系地下圏に優先する微生物である可能性がある。また古細菌のクローン解析の結果、データベース上のどの配列とも相同性の低いクローン(84-92%)が多数検出された。既に培養されている種のクローンは全く検出されなかった。それらのクローンは陸上温泉や他の海底熱水系から検出されているグループ(Terrestrial Hot Spring Crenarchaeota group)に属していた。また海底の堆積物から検出されているクローングループ(Marine Benthic Group E)に属するクローンも多数検出された。これらの結果から、南部マリアナトラフの海底熱水系付近の地下圏に生育する古細菌の大部分は、こうした未培養の古細菌であると推定された。

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、北海道大学の福井先生らとの共同研究にて、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(図 1)。

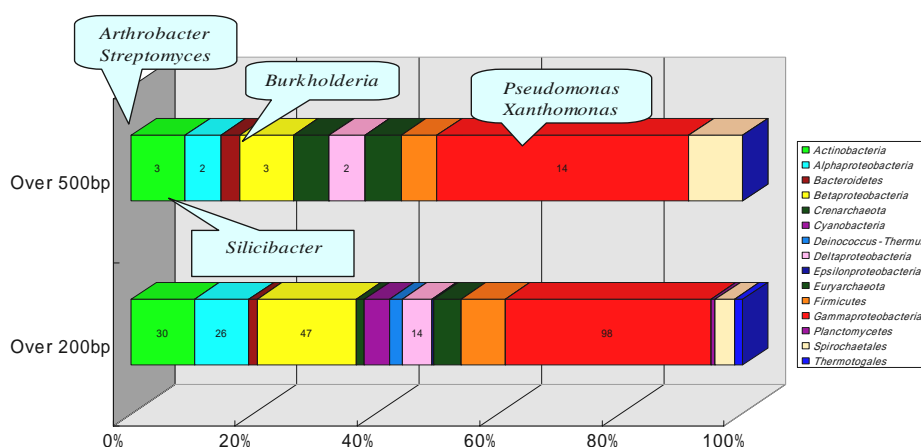


図 1 アカシボのメタゲノム解析により得られた DNA 断片を対象に、SOM 解析により予測された系統群の分布。ここで分布は、全件に対する各系統群の割合で表記している。ここで、over 200bp は 200bp 以上の配列、over500bp は 500bp 以上の配列を解析に使用した場合を示す。

本解析結果では、*-proteobacteria*, *-proteobacteria*, Actinobacteria に多くの DNA 断片配列が予測された。各系統群内で多く予測された属種について代表的な属を図 1 中に示す。福井先生らが行われた rDNA 等で解析され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行うことができるという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先生、成田先生らとの共同研究にて、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(図 2)。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(図 3)。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、「極地植物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。

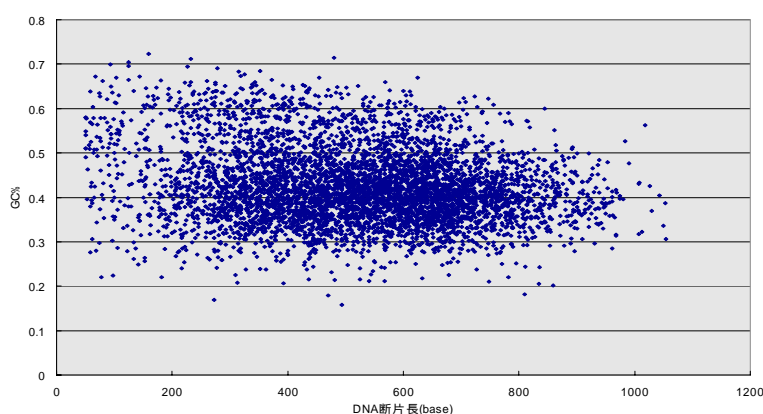


図 2、南極雪氷中より得られた DNA サンプルに対するメタゲノム解析によって得られた DNA 断片配列の配列長と GC 含量との分布

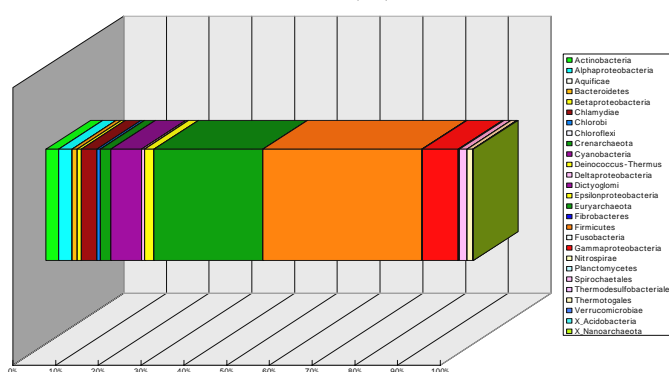


図 3、南極雪氷中より得られた DNA サンプルに対するメタゲノム解析によって得られた DNA 断片配列を対象に、SOM 解析により予測された系統群の分布。ここで分布は、全件に対する各系統群の割合で表記している。

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。

(<http://antmoss.nipr.ac.jp/database.html>)

4) 極限環境生物の現場調査

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

南極氷山塊からの古代バクテリア及び古代ゲノム DNA の分離について検討された。既に実験室内に建てたクリーン・ブース (無菌テント) 内のクリーン・ベンチ (無菌箱) に於いて数万年前の物と目される南極氷山塊を融解、濾過し、DNA 染色されるバクテリアと思しき粒子を検出しており、この粒子からゲノム DNA が増幅され、ゲノム DNA が複数のバクテリア由来である事が明らかにされた。今後は、a) 今回、(i) 第 47 次日本南極地域観測隊に同行した際に新たに分与された別の氷山塊を同様に無菌的に処理し、メタゲノム解析の為に提供する。その他、(ii) 過去 30 万年分の地球環境の推定に用いられたみずほ基地の氷床コアや (iii) 既に年代測定済みの北極の氷床コアについても同様にメタゲノム解析を行い、気候変動とゲノム多様性の相関を検証する。また、既にこの粒子を寒天培地 (最も栄養に富むとされる TB 培地) に蒔き、4°C から 45°C まで 5°C 間隔で培養を試みたが、今までの処、コロニーは生じていないので、b) 今後は、培地を様々に変え、嫌気的条件下でも培養を試みるが発明された、温度と酸素分圧の勾配を架けながら液体培地で震盪培養する装置を用いても培養を試みる事とする。更に、c) この粒子は、走査型電子顕微鏡による形態観察等、様々な解析の為に提供するものとする。



図 1

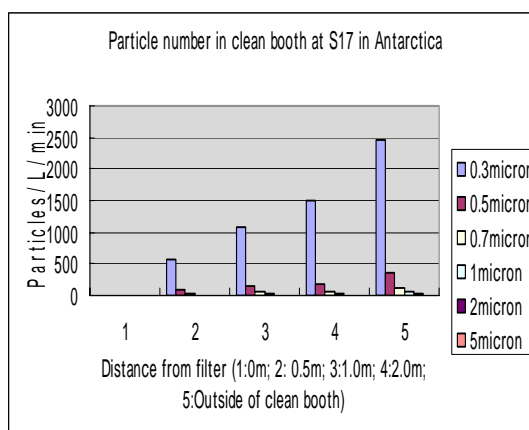


図 2

さらに、南極雪原に於いて無菌的に掘削した氷床コアからのバクテリア及びゲノム DNA の分離については今回、第 47 次日本南極地域観測隊に同行し、標高 600 メートルの雪原 (S17) に今回新たに開発した野外用クリーン・ブースを建て、ドリルの中に滅菌したチューブを仕込み、直接手で触れる事なく無菌的に掘削した氷床コア (図 1) を無菌的に処理し、バクテリアを分離、その紫外線耐性遺伝子や好冷遺伝子等、極限環境遺伝子を獲得する。又、メタゲノム解析の為に提供する。尚、S17 に建てた野外用クリーン・ブース内はその外よりも粒子数が少なく、実験室内に建てたクリーン・ブース内の粒子数と殆ど変わらなかった (図 2)。しかもバクテリアの大きさの粒子は検出されなかったので、今後の野外での無菌的な試料採取にはこれを用いる。

南極露岩帯に於いて無菌的に採取した土壌試料からのバクテリアの分離については、露岩帯（ルンドボークスコラネ及び東オングル島）の地面の上にクリーン・ベンチを置いて火焰滅菌した匙で無菌的に採取した土壌試料（図3）を無菌的に処理し、バクテリアを分離、その紫外線耐性遺伝子や好冷遺伝子等、極限環境遺伝子を獲得する。又、東京大学薬学部微生物薬品化学教室との

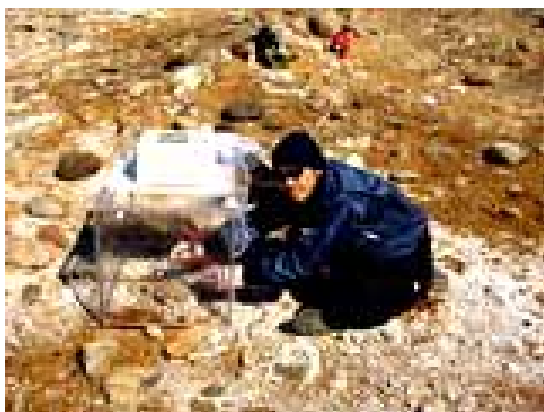


図3

共同研究により土壌試料から抗菌物質を探索する。その他、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の分離では、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。又、メタゲノム解析の為に提供する。また、南極露岩帯に於いて採取したコケ類や地衣類からの線

虫、藻類、菌類、バクテリアの分離については、露岩帯（ルンドボークスコラネ及び東オングル島）で採取したコケ類や地衣類から線虫、藻類や菌類、バクテリアを分離、保存し、共同研究者に提供する。

（2）成果発表及び著書執筆等

Abe Takashi, Sugawara, Hideaki, Shigehiko Kanaya, 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 Sugawara Hideaki, “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, Shigehiko Kanaya, 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)

Hara, K., Kakegawa, T., Yamashiro, K., Maruyama, A., Ishibashi, J., Marumo, K., Urabe, T. and

Yamagishi, A., Analysis of the Archaeal sub-seafloor community at Suiyo Seamount on the Izu-Bonin Arc, *Advances in Space Research*, 35, 1634-1642 (2005)

Hayashi Hidenori, Abe Takashi, Sakamoto Mitsuo, Ohara Hiroki, Ikemura Toshimichi, Sakka Kazuo, and

Benno Yoshimi, “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.
- 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 2300years inferred from organic components in lake sediment cores. *Polar Bioscience*, 19, 51-62, 2006.
- 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.
- Takano, Y., Marumo, K., Ebashi, T., Lallan P Gupta, Kawahata, H., Kobayashi, K., Yamagishi, A. and Kuwabara, T., In situ ore formation experiment: Amino acids and amino sugars trapped in artificial chimneys on deep-sea hydrothermal systems at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Pacific Ocean. *Bull. Chem. Soc. Japan*. **78**, 638-651 (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, YK. 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).
- 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)
- 山岸明彦 : 海底熱水系地下微生物圏. 海の研究 14:319-326 (2005)

口頭発表

- Abe Takashi, Ikemura Toshimichi, Kozuki Tokio, Nakagawa Satoshi, Kinouchi Makoto, Shigehiko Shigehiko Kanaya 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, Heizo Tokutaka, 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
- Abe Takashi, Sugawara Hideaki, and Ikemura Toshimichi: 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.
- 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
- 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. Abstracts, p. 23.
- 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)
- Naganuma T & Wilmotte A (2006) Microbiological and ecological responses to global environmental changes in Polar regions (MERGE): An international polar year (IPY) activity. The 13th International Symposium on Polar Sciences, 9-11 May 2006, Incheon, Korea.
- 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.
- Naganuma T, Ban S & Imura S (2005) Euryhaline halophiles from the meromictic lake, Suribati Ike, Antarctica. The 28th Symposium on Polar Biology, 8-9 December 2004, National Institute of Polar Research, Tokyo, Japan.
- Nishikawa Y, 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.
- 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