

地下熱水系における微生物地球化学： 菱刈金山地下熱水系の研究例

西澤 学*

(2010年4月23日受付, 2010年9月21日受理)

Biogeochemistry of subsurface geothermal water system in the Hishikari gold mine

Manabu NISHIZAWA*

* Precambrian Ecosystem Laboratory,
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC),
2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan

This paper reviews biogeochemistry of subsurface geothermal water stream in the Hishikari gold mine, Japan. The stream, which is derived from a subsurface anaerobic aquifer containing plentiful CO_2 , CH_4 , H_2 , and NH_4^+ , emerges in a mine tunnel 320 m below the ground level, providing nutrients for a lush microbial community that extends to a distance of approximately 7 m in the absence of sunlight-irradiation. Based on the analysis of 16S rRNA genes amplified from environmental DNA, change of microbial community along the stream was detected. In the hot upper stream (69°C), the dominant bacterial phylotypes were methane-oxidizing *γ-Proteobacteria*, and hydrogen- and sulfur-oxidizing *Sulfurihydrogenibium* sp. In contrast, the dominant bacterial phylotypes in the middle and lower stream (62 and 55°C) were closely related to ammonia-oxidizing *Nitrosomonas* and nitrite-oxidizing *Nitrospira* spp. Changes in the microbial metabolic potential estimated by quantitative PCR analysis of functional genes encoding the particulate methane monooxygenase (*pmoA*), ammonia monooxygenase (*amoA*), and putative nitrite oxidoreductase (*nxrB*), supported the community shift suggested by the 16S rRNA gene analysis. Decreasing CH_4 , H_2 and NH_4^+ contents and increasing NO_2^- and NO_3^- contents in the mat-interstitial water along the stream were consistent with the observed transition of the bacterial community structure in the stream.

Key words: subsurface hot spring, microbiology, energy metabolism community shift

1. はじめに

地球には、鉱山の地下坑道や陸上に地熱水が噴出することのできる陸域の熱水域と中央海嶺や背弧海盆にできる海底熱水域がある。熱水域には特異な代謝特性をもつ化学合成菌など多様な微生物が生息し、また同じ熱水域でも水温が異なる場所では微生物相が異なる

* 独立行政法人海洋研究開発機構プレカンブリアンエコシステムラボ

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15

ことはよく知られている (Skirnisdottir *et al.*, 2000; Takai *et al.*, 2004; Hirayama *et al.*, 2005; Brazelton *et al.*, 2006; Boomer *et al.*, 2009)。熱水域における微生物生態と物質動態の解析は、極限環境下で微生物が行う地球化学作用や初期生命進化を追及する上で重要な研究課題である (Takai *et al.*, 2004; Nishizawa *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2006, 2008)。熱水域の微生物地球化学研究を行うとき、陸域熱水域（特に温泉）は海底熱水域に比べてアクセスが容易であるという利点をもつ。また前者は後者とちがって、熱水が冷たい海

水で急速に冷却することはないため微生物相の空間的变化がメートルスケールで起き（後者ではミリメートルからセンチメートルスケール）、微生物相と水温及びに他の環境因子の関係を解析しやすいという利点がある。

温泉の微生物相を規定する環境因子として、次の5つが候補としてあげられる。光、水温、pH、酸化還元電位、熱水化学組成の5つである。これら環境因子の中で、水温と硫化水素濃度が微生物相に与える影響はよく研究されている。たとえば、水温が70°Cを超えるような地熱水噴出点やその近傍では硫化水素濃度にかかわらず *Aquificales* 目のバクテリアが優先している (Skirnisdottir *et al.*, 2000)。*Aquificales* 目に属するバクテリアは、主として水素や硫黄を酸化することでエネルギーを獲得し二酸化炭素を唯一の炭素源とする化学合成独立栄養生物であるため (Takai *et al.*, 2002)、化学エネルギーに依存した生態系を地熱水噴出点近傍に形成する。一方で噴出点から離れた下流域（水温が70°C以下）で硫化水素濃度が低い環境では、シアノバクテリアや *Chloroflexi* 門の光合成バクテリアが優先し光エネルギーに依存した微生物生態系を形成している (Skirnisdottir *et al.*, 2000; Boomer *et al.*, 2009)。つまり、陸上温泉では化学合成微生物に支えられた生態系から光合成微生物に支えられた生態系への空間的なシフトが観察される。

一方、地下にできた温泉の微生物生態はどのようなものであろうか？ まず、地下は日光が当たらない暗黒の世界なので、光合成微生物に支えられた生態系は存在し得ない。一方で、もし地熱水が有機物を含む堆積岩と反応を起こしているならば、噴出した温泉は水素、硫化水素、メタン、アンモニアといった還元物質を豊富に含んでいるであろう (Takai *et al.*, 2002)。この場合、温泉水に溶存する還元物質を電子供与体とし、噴出地点の地下大気酸素を電子受容体としたエネルギー代謝を行う微生物が生育することは可能である。つまり光が当たらない地下温泉では光が当たる陸上温泉より、微生物相と水の化学組成が強くリンクしているはずである。

つまり地下温泉の研究を行えば、極限環境下での微生物種—代謝様式—代謝速度—熱水化学組成—温度をつなぐ関係が的確に得られる可能性がある。こうした知見は、同じく化学合成生物によって支えられた海底熱水域での微生物生態と物質動態を解明する上でも重要な基盤となる。しかし、地下温泉の研究例は限られ

ており、温泉水の化学データと微生物データを結合させた研究は鹿児島県菱刈金山の地下温泉に関するものだけである (Marteinsson *et al.*, 2001; Takai *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003a; Hirayama *et al.*, 2005; Nunoura *et al.*, 2005)。

そこで本総説では、この菱刈金山の地下温泉の微生物地球化学の研究を紹介する。また環境中での微生物代謝を理解する上で重要な情報源となる環境DNAとその解析手法についても簡単に説明する。なお、ここで紹介する解析手法は他書に詳述されている（たとえば、杉山ほか, 1999）。

2. 環境中の微生物コミュニティ内で起きる代謝と微生物種を解析する方法

2.1 環境DNA解析

環境に生息する微生物種の99.9%以上は難培養で単離が困難であるため、生理学的特徴が十分理解されている微生物種は極めて少ない (Pace, 1997)。したがって環境の生態系において、数的に主要な微生物であってもそれがどのような代謝を行っているのか不明なものも多い。一方、環境の生態系で起きる代謝と微生物種を解析する手法として環境DNAの解析が有効である (Stein *et al.*, 1996)。環境DNAとはある環境試料中の全微生物から培養を経ずに直接抽出したDNAをさす。DNAにはさまざまな酵素をコードする遺伝子が含まれている。その中には全ての生物が保有する生体分子（例、rRNA）の遺伝子に加えて、生物地球化学的に重要であるが一部の生物しか行えないような特殊な代謝を触媒する酵素の遺伝子（機能遺伝子: 例えば、*amoA* はアンモニア酸化酵素の α サブユニットの機能遺伝子である。Table 1）も含まれる。したがって環境DNAに含まれるrRNA遺伝子の種類からその環境に生息する微生物の種類が、機能遺伝子の種類からその環境で起きる代謝の情報が得られる。ここで環境DNAに機能遺伝子が存在していても、必ずしも環境中でその酵素が発現するとは限らないことに注意が必要である。しかし、環境DNA解析は1) 環境条件が変化したときに行いうる代謝の情報も得られる、2) DNAは安定な物質であるため dead chimney や海底堆積物のDNA解析から過去の微生物生態の情報が得られるという利点を持っている (Inagaki *et al.*, 2003b; Miyazaki *et al.*, 2009)。環境中で起きている代謝を調べるためには、環境水の化学組成やインキュベーション実験による活性測定、そして環境中の

Table 1 Biogeochemically important functional gene.

biogeochemical reaction	gene	Coding enzyme	Catalyzed reaction	Host microorganisms
dissimilate reaction				
ammonia oxidation	<i>amoA</i>	ammonia monooxygenase α subunit	$\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	ammonia-oxidizing <i>Proteobacteria</i> & <i>Crenarchaeota</i>
nitrite oxidation	<i>nxrB</i>	nitrite oxidoreductase β subunit	$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	nitrite-oxidizing bacteria
nitrate reduction	<i>napA</i>	periplasmic nitrate reductase α subunit	$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	nitrate-reducing bacteria
sulfate reduction	<i>dsrAB</i>	dissimilatory sulfite reductase	$\text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{e}^-$	sulfate-reducing prokaryote, sulfite-reducing prokaryote
methane oxidation	<i>pmoA</i>	methane monooxygenase α subunit	$\text{CH}_4 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	methane-oxidizing bacteria
methanogenesis	<i>mcrA</i>	Methyl-coenzyme M reductase α subunit	$\text{CoM-S-CH}_3 + \text{HS-CoB} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CoM-S-S-CoB}^a$	methanogenic archaea
assimilate reaction				
nitrogen fixation	<i>nifH</i>	nitrogenase reductase	nitrogenase (oxidized) $\rightarrow$ nitrogenase (reduced)	nitrogen-fixing prokaryote

mRNA を対象とした遺伝子解析が必要となる (Lam *et al.*, 2009; Miyazaki *et al.*, 2009)。なお, mRNA は一本鎖であるため物理的に切断されやすいだけでなく, 大気中に蔓延している RNA 分解酵素によって容易に分解するので, 分析に特別の注意を要する。

次に遺伝子の解析方法について述べる。環境試料の機能遺伝子の解析では, 目的の酵素を保有する培養菌株の研究から塩基配列が決定された機能遺伝子を基準にして, これと似た塩基配列をもつ遺伝子を検索する (相同性解析)。しかし, 基準の機能遺伝子に対してどこまで塩基配列が似ていれば同一の機能遺伝子であると認定するのか, その線引きは難しい。たとえば基準の機能遺伝子に対して塩基配列の相同性が70%程度であってもコードされた酵素の機能が異なる場合もあれば (*nifH* cluster I と *nifH* cluster IV; Staples *et al.*, 2007), 相同性が数十%程度でも同種の機能遺伝子であることもある (バクテリアとアーキアの *amoA*)。確立された機能遺伝子とは塩基配列が大きく異なる機能未知の遺伝子が, 前者の遺伝子と同じ機能を有するかどうかを知るためには, 機能志向型のメタゲノム解析 (未知遺伝子をプラスミドといわれる環状二本鎖 DNA に組み込み, 大腸菌の中で発現させて機能を解析する手法) が有効である。

2.2 PCR 法

環境 DNA の存在量は少ないため, 環境 DNAの中から目的の遺伝子を検出するためには, その遺伝子の量を天然存在量の 10^6 倍程度に増幅する必要がある。PCR 法は一对のプライマー (目的とする DNA 領域の両端でそれぞれ別の DNA 鎖にアニールする20~30塩基程度の DNA 断片) と DNA ポリメラーゼ (DNA 複製酵素) をもちいて, プライマーに挟まれた DNA 領域を連鎖反応で指数関数的に合成する方法であり, 目的遺伝子の量を数時間で 10^6 倍に増幅することができる。

また PCR 法で目的の遺伝子断片を増幅するとき, 二本鎖 DNA に結合すると蛍光を発する試薬 (インターカレーター) を反応系に加えて反応中の蛍光強度を計測すれば, 蛍光強度 (正確には蛍光強度の増幅パターン) から環境試料における目的遺伝子の濃度を定量的に求めることができる (定量 PCR 法, Smith and Osborn, 2009)。

ただし蛍光強度の増幅パターンはポリメラーゼ反応を阻害する物質の種類と濃度に応じて大きく異なる。天然試料 (堆積物や微生物マット) にはポリメラーゼ

反応を阻害する種々の物質が様々な割合で存在するため、遺伝子断片の量が同じであっても試料ごとに遺伝子増幅パターンが異なる可能性が高い (Smith and Osborn, 2009)。その結果、天然試料に含まれる目的遺伝子の正確な濃度の計測は困難とされ、定量 PCR 法で得られる濃度はあくまで参考値として捉えられている。

2.3 クローン解析

PCR で増幅した目的の遺伝子断片の種類 (塩基配列で分類した系統) とその相対存在率を求めたいとき、クローン解析は有効である。たとえば目的の遺伝子断片が rRNA 遺伝子であるならば、PCR で増幅された rRNA 遺伝子の種類と相対存在率がクローン解析から得られる。ただし、PCR 後の遺伝子産物は PCR 前の遺伝子断片比を正確に反映しない。その結果、もとの試料における各微生物系統の相対存在率を rRNA 遺伝子クローン解析で求めることは困難であり、解析結果はあくまで参考値として捉えられている。

3. 菱刈金山地下熱水域の研究例

3.1 地質設定

菱刈金山は、鹿児島県伊佐市の菱刈地区東部にある

日本最大の金鉱山である。Fig. 1に菱刈金山地下の地質構造を示す。菱刈金山は白亜紀の四万十超層群の頁岩を基盤岩とし、不整合を介して上位に第四紀の安山岩質火山岩が存在する。金鉱脈は基盤岩のフラクチャーに沿って鉛直方向に多数貫入しており、約百万年前のマグマの活動に伴う熱水の活動によって形成したと推定されている (Izawa *et al.*, 1990)。

地下320 m の坑道には、天水起源の地熱水が噴出して水深数 mm、幅数十 cm、長さ10 m 程度の温泉ができており、温泉には茶褐色の微生物マットが発達している。顕微鏡観察から、この微生物マットは桿菌、球菌、鉱物 (水酸化鉄など) で構成され、桿菌が菌体外に分泌した粘着質によって鉱物や球菌が付着していると考えられた (Fig. 2)。Hirayama *et al.* (2005) では、噴出口からの流域距離が1 m, 3 m, 7 m の地点をそれぞれ上流、中流、下流と定義して熱水と微生物試料の解析を行なった。

3.2 熱水化学組成

温泉水の物理化学的特徴を Table 2にまとめた。温泉水は弱酸性の淡水で (salinity 0.1%, pH 5)、噴出口での水温は70°Cである。源泉水は水素分子、メタン、アンモニウムに富む化学組成をもつ。この3つの化学成分の濃度は温泉水が上流から下流に向かって流

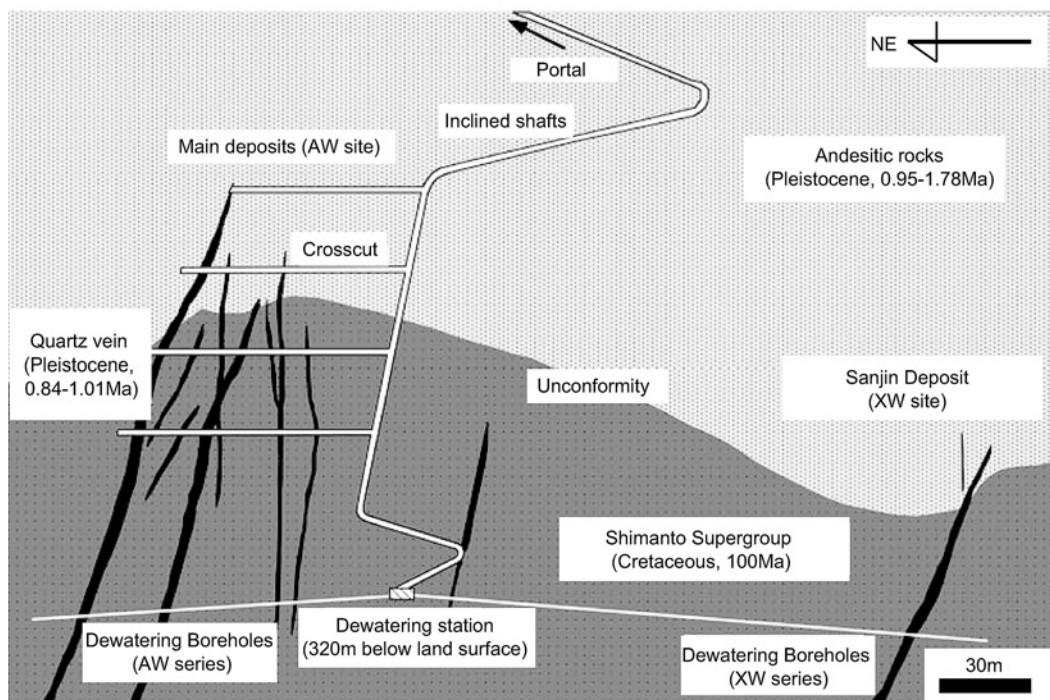


Fig. 1 Schematic cross section and the subsurface geologic structure in the Hishikari gold Mine (modified after Inagaki *et al.*, 2003a).

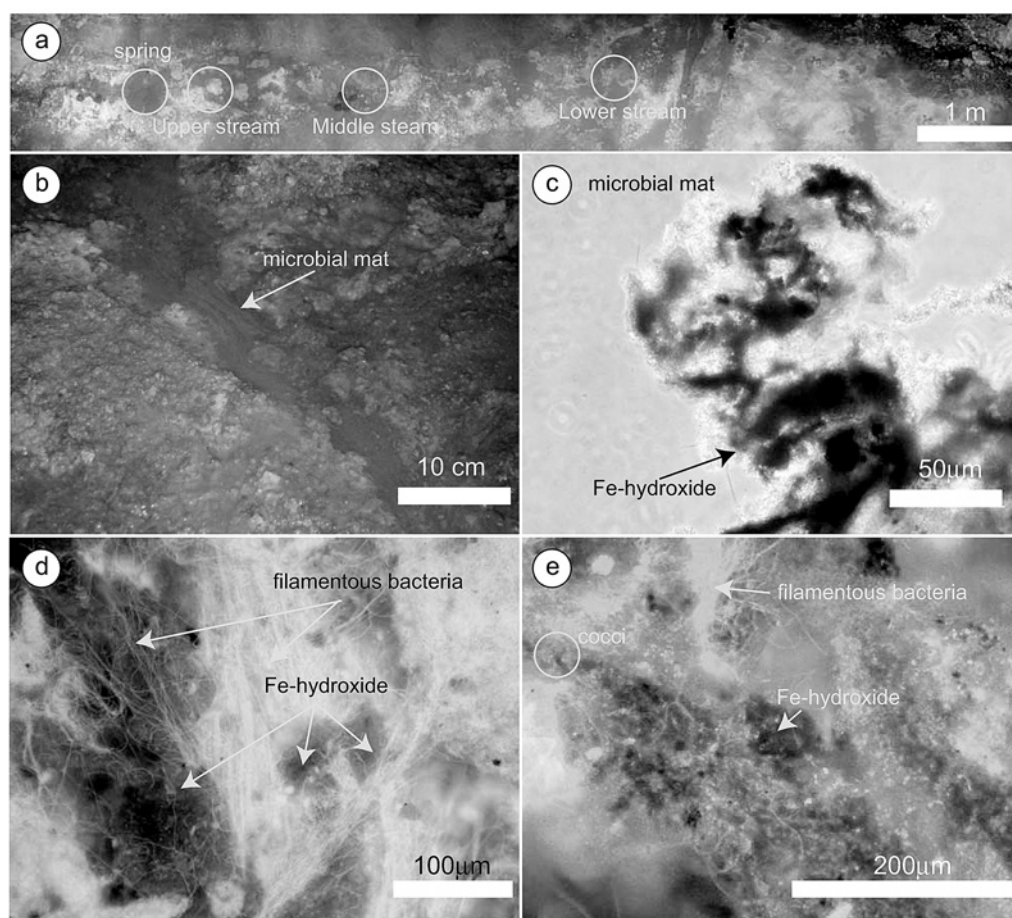


Fig. 2 Photographs of Hishikari subsurface geothermal water stream (a). Microbial mat developed in the upper stream (b, c). DAPI-stained microbial community in the mat developed in the upper stream (d, e). Filamentous bacteria in Figs. 2d and 2e are probably non-phototrophic bacteria belonging to phylum *Chloroflexi*.

Table 2 Physical properties of stream water and chemical components in mat-interstitial water of Hishikari subsurface geothermal water stream measured in November 2001 (Hirayama *et al.*, 2005).

	Temp. (°C)	pH	DO (mg/L)	ORP (mV)	Salinity (%)	NH ₄ ⁺ (μM)	NO ₂ ⁻ (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)	H ₂ ^a (μM)	CH ₄ ^a (μM)	SO ₄ ²⁻ (μM)
upper stream	69	5.1	0.3	-130	0.1	116	n.d.	n.d.	0.383	2.78	620
middle stream	62	4.9	0.4	-16	0.1	69	159	173	0.357	0.346	598
lower stream	55	4.8	0.6	40	0.1	52	304	224	0.048	0.025	617

S²⁻/HS⁻ content in hot subsurface aquifer water is reported to be 100 μM (Takai *et al.*, 2002).

a: chemical data measured in April 2009.

れる間にそれぞれ減少している。一方で、亜硝酸と硝酸の濃度は温泉水が上流から下流に向かって流れる間にそれぞれ上昇している。なお、硫酸濃度は流域によらずほぼ一定である。また坑道内の大気は地表の大気と組成が同じである。上流から下流にかけて観察され

た温泉水の化学組成の変化から、アンモニア酸化と亜硝酸酸化が流域の微生物マットで活発に行われていることが示唆される。また微生物による水素酸化とメタン酸化も活発に行われていることが同様に示唆される。一方、この微生物マットでは硫酸還元は活発に起

きていないことも予想される。

3.3 マットの微生物種組成, 機能遺伝子組成

化学組成のデータから予想された微生物マットでの主要なエネルギー代謝は微生物学データの裏付けを取ることによって確認されるものとなる。マットの環境 DNA に含まれるバクテリアの rRNA 遺伝子のクローン解析から、上流マットは好気性メタン酸化バクテリア (γ -*Proteobacteria*, 独立栄養), 通性嫌気性水素・硫黄酸化バクテリア (*Sulfurihydrogenobium* 属, 独立栄養) ならびに *Chloroflexi* 門に属する未培養のバクテリアが優先する (Table 3; Hirayama *et al.*, 2005)。一方で、中流・下流マットでは好気性アンモニア酸化バクテリア (*Nitrosomonas* 属, 独立栄養) と好気性亜硝酸酸化バクテリア (*Nitrospira* 属, 独立栄養) が優先する (Table 3)。

次に各流域のマットの環境 DNA に含まれる機能遺伝子の存在度をみる (Table 3, Fig. 1)。バクテリアのメタン酸化酵素の機能遺伝子 (*pmoA*) は上流マットに多いのに対して、バクテリアのアンモニア酸化酵素と亜硝酸酸化酵素の機能遺伝子 (*amoA*, *nrxB*) はともに中流マットと下流マットに多い。

熱水化学組成と環境 DNA の遺伝子組成の結果から、次の結論が得られる。1) 上流マットでは γ -*Proteobacteria* と *Sulfurihydrogenobium* 属によって好氣的メタン酸化と水素酸化がそれぞれ活発に行われている。2) 一方、中流マットと下流マットでは *Nitrosomonas* 属と *Nitrospira* 属によって好氣的アンモニア酸化と好氣的亜硝酸酸化がそれぞれ活発に行われている。なお、上流に優先する *Sulfurihydrogenobium* 属は元素状硫黄やチオ硫酸塩を酸化することでもエネルギーを得ることができる (Takai *et al.*, 2002)。しかし、マットの顕微鏡観察や温泉水の化学組成の結果を考慮すると、現場環境では元素状硫黄やチオ硫酸塩は少ないと考えられ、マットでは硫黄酸化は活発に行われていないと予想された。以上から、菱刈地下温泉では、マットに優先する化学合成独立栄養微生物のエネルギー代謝によって、温泉水の化学組成がわずか全長 10 m の流域内で大きく変化していることが明確になった (Fig. 3)。

3.4 陸上や地殻内熱水環境に形成された微生物生態系との比較

菱刈金山の地下温泉では熱水の化学組成と微生物種が強くリンクし、化学合成独立栄養微生物 (通性嫌気性水素・硫黄酸化バクテリア, 好気性メタン酸化バク

Table 3 Molecular characterization of microbial mat at Hishikari subsurface geothermal water stream (Hirayama *et al.*, 2005; Nunoura *et al.*, 2005).

	Bacterial community structures based on the bacterial 16S rRNA gene clone analysis			Bacteria/Archaea#		amounts of functional genes in microbial mat DNA assemblages				
	methane-oxidizing	Hydrogen/sulfur-oxidizing	ammonia-oxidizing	nitrite-oxidizing		particulate methane monooxygenase gene	bacterial ammonia monooxygenase gene	nitrite oxidoreductase gene		
	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Sulfurihydrogenobium</i> sp.	<i>Nitrosomonas</i> sp.	<i>Nitrospira</i> sp.		<i>pmoA</i>	bacterial <i>amoA</i>	<i>nrxB</i>		
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%/%)	(copy/μg DNA)	(copy/μg DNA)	(copy/μg DNA)		
upper stream	31	20			20/80	1.1 × 10 ⁸			1.0 × 10 ⁶	
middle stream			22	32	90/10	1.5 × 10 ⁷	2.8 × 10 ⁷		2.0 × 10 ⁷	
lower stream			4	41	98/2	2.5 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁶		1.4 × 10 ⁷	

#: Archaeal population in prokaryotic community was estimated by the 16S rRNA quantitative PCR (Nunoura *et al.*, 2005).

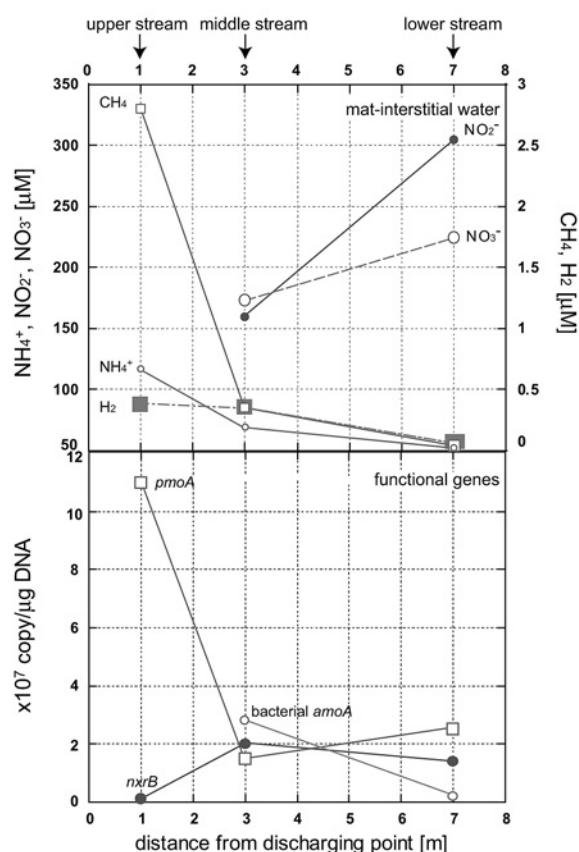


Fig. 3 Summary of geochemical and molecular biological results of microbial ecosystem in Hishikari subsurface geothermal water stream (Hirayama *et al.*, 2005).

テリア、好気性アンモニア酸化バクテリア、好気性亜硝酸酸化バクテリア)が優先した生態系が構成されていることがわかった。

一方で、陸上温泉では化学合成微生物(主に好気性水素酸化菌、好気性硫黄酸化菌、嫌気性硫黄還元菌、発酵菌など)が優先した生態系は水温 70°C 以上の水域に限られ、水温 70°C 以下の水域ではシアノバクテリアや *Chloroflexi* 門の光合成バクテリアが優先した微生物生態系が成立している (Skirnisdottir *et al.*, 2000; Shock *et al.*, 2010)。菱刈金山の地下温泉で優先する好熱性のアンモニア酸化バクテリアや亜硝酸酸化バクテリアは陸上温泉でも検出されているが、生態系において量的に卓越していない (Lebedeva *et al.*, 2005)。したがって、陸上温泉と地下温泉にそれぞれ発達する生態系の違いを生み出す最も重要な物理化学因子は太陽光である。

次に、菱刈金山の地下温泉の微生物生態系と源泉熱

水 (aquifer water) の微生物生態系を比較する。源泉熱水からは、上流マットで検出された通性嫌気性の水素・硫黄酸化バクテリア (*Sulfurihydrogenobium* 属)に加えて、温泉小川からは検出されなかった好気性メタン酸化バクテリア (γ -*Proteobacteria*)と未培養株 OPB 37の rRNA 遺伝子が検出された (Inagaki *et al.*, 2003a)。また、前の2種のバクテリアは培養実験で増殖したので、生菌であり、熱水帯水層内でも活動していると考えられる (Inagaki *et al.*, 2003a)。

源泉熱水の微生物生態系は地下温泉のそれに比べて、微生物系統の多様性が乏しい点が特徴としてあげられる。また、源泉熱水に優先する通性嫌気性の水素・硫黄酸化バクテリア (*Sulfurihydrogenobium* 属)は電子受容体として酸素だけでなく、源泉熱水に $10\sim 100\mu\text{M}$ 程度溶存する複数の化合物(硝酸、三価鉄、ヒ酸)を利用できることが培養実験から示された (Takai *et al.*, 2002)。このような特徴から、地殻内熱水環境では柔軟な代謝能をもつ菌が淘汰され、生態系で優先しているという仮説が立てられる。また、源泉熱水試料を使った培養実験で好気性のメタン酸化菌も増殖したので、この菌は源泉熱水に溶存する酸素($5\mu\text{M}$)とメタンを使って地殻内熱水環境で好氣的メタン酸化を行っている可能性がある (Inagaki *et al.*, 2003a)。このように還元的な地下水に嫌気性の生菌だけでなく好気性の生菌も相当の割合で含まれていることは、他の鉱山の地下水からも報告されているが、好気性微生物の地殻内での代謝活動は十分明らかにはなっていない (Murakami *et al.*, 2002)。

4. 最近の進展と今後の展望

環境 DNA 解析と温泉水化学解析を組み合わせることで、1) 菱刈金山地下温泉の微生物相は温泉水の化学組成(水素、メタン、アンモニア、亜硝酸)によって主に決定されること、2) 温泉水の化学組成、特に無機窒素化合物の組成は微生物代謝によって上流から下流にかけ大きく変化していること、3) 上流、中流、下流のマットで微生物相が大きく異なること、4) 各流域のマットの主要微生物は化学合成独立栄養であること、そして5) 各流域での主要なエネルギー代謝とバクテリア種の対応関係が解明できた (Hirayama *et al.*, 2005)。

しかし以下の3つの重要問題はまだ解決されていない。第一の問題は、菱刈マット生態系におけるアーキアの生物地球化学的役割である。原核生物のもう一つ

のドメインを構成するアーキアについて、マットにおける系統、存在度、ならびにエネルギー代謝に対する役割は Hirayama *et al.* (2005) では考慮されていない。この問題を解決するため、Nunoura *et al.* (2005) は菱刈マットについてアーキアの rRNA 遺伝子の解析を行い、マットに存在するアーキアの系統と存在度を報告した。まず定量 PCR 解析の結果、上流マットにはバクテリアに匹敵する量のアーキアが存在することが明らかになった（マット全微生物の80%）。またこのアーキアはクレンアーキア門の新規グループに属す未培養種であることが分かった（HWCG III: hot water crenarchaeotic group III）。存在量の観点から HWCG III は上流マットにおけるエネルギーフローや炭素フローにおいて重要な役割を果たしていると想像されたが、2005年の時点ではこのアーキアがマットで何を行っているのかは不明であった。しかしその後の研究により、HWCG III の近縁種がアンモニア酸化によってエネルギーを得て二酸化炭素を唯一の炭素源とする化学合成独立栄養生物であることが判明した（de la Torre *et al.*, 2008）。その結果、上流マットでは炭酸固定やアンモニア酸化において HWCG III の寄与が非常に大きいと予想できるが、これまでの測定データからは定量的な解析は困難である。

第二の問題は、生態系における窒素フローの問題である。菱刈金山の地下温泉ではアンモニア酸化や亜硝酸酸化が活発に行われていることは明らかとなったが、窒素化合物の濃度データだけではそれぞれのエネルギーフラックスは計算できない。なぜならば亜硝酸の濃度は、アンモニア酸化菌のアンモニア酸化だけでなく、多種の微生物が行う硝酸還元によっても増加するからである。また熱水中のアンモニウム濃度はアンモニア酸化菌のアンモニア酸化だけでなく、多種の微生物が行う同化によっても減少するからである。このように窒素化合物1種あたりの生成消滅反応は複数あるため、濃度の情報だけでは各反応の相対的寄与を計算することが困難である。菱刈マット生態系での窒素フローを解析するためには、各流域の硝酸、亜硝酸、アンモニウムの濃度と窒素同位体比のデータセット、 ^{15}N ラベルした窒素化合物（たとえば $^{15}\text{NO}_3^-$ ）を使ったインキュベーション実験で得られる窒素化合物の経時的な同位体データ、ならびにアーキアとバクテリアの種組成のデータが不可欠となる。

第三の問題は、生態系における炭素フローの問題で

ある。この問題についても定量的な解析はなされていない。

バクテリアだけでなくアーキアも含めたマット内での炭素フロー・窒素フロー・エネルギー代謝と微生物種の関係を明らかにするため、著者を含めた研究グループは2009年4月に菱刈金山地下熱水域の微生物地球化学的調査を再度実施し、統合的解析をすすめている。こうした分析にはアーキアタイプの *amoA* の定量を含めた種々の遺伝子解析や熱水化学解析に加えて、 ^{13}C 標識化合物を利用した生体化合物レベル・細胞レベルでの炭素フロー解析や、無機窒素化合物の安定同位体と ^{15}N 標識化合物を利用した活性測定に基づく窒素異化代謝速度の解析が含まれている。これらの分析は現在進行中であるが、アーキアを含めた微生物相—炭素フロー—エネルギーフロー—熱水化学組成の関係が解明されつつある。さらにこの研究から得られる知見は、アンモニアやメタンに富む海底熱水域（たとえば、沖縄トラフ）における微生物相—炭素フロー—エネルギーフロー—熱水化学組成の関係を解析する上でも重要な基盤となると期待される。

謝 辞

本総説を執筆する機会を与えてくださった高野淑識博士、沢田健博士に感謝いたします。また、本総説の研究内容について、高井研博士、宮崎淳一博士、平山仙子博士、布浦拓郎博士（海洋研究開発機構）ならびに匿名の二名の査読者から貴重なコメントをいただきました。本総説の執筆に当たり、科学研究費補助金（研究課題番号08J09252）の一部を使用しました。

文 献

- Brazelton, W. J., Ludwig, K. A., Sogin, M. L., Andreishcheva, E. N., Kelley, D. S., Shen, C. C., Edwards, R. L. and Baross, J. A. (2010) Archaea and bacteria with surprising microdiversity show shifts in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 1612–1617.
- Boomer, S. M., Noll, K. L., Geesey, G. G. and Dutton, B. E. (2009) Formation of multilayered photosynthetic biofilms in an alkaline thermal spring in Yellowstone National Park, Wyoming. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2464–2475.
- Brazelton, W. J., Schrenk, D. S. and Baross, J. A. (2006) Methane- and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City hydrothermal field ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 6257–

- 6270.
- de la Torre, J. R., Walker, C. B., Ingalls, A. E., Konneke, M. and Stahl, D. A. (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, **10**, 810–818.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E. and Oakley, B. B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 14683–14688.
- Hirayama, H., Takai, K., Inagaki, F., Yamato, Y., Suzuki, M., Nealson, K. H. and Horikoshi, K. (2005) Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles*, **9**, 169–184.
- Inagaki, F., Takai, K., Hirayama, H., Yamato, Y., Nealson, K. H. and Horikoshi, K. (2003a) Distribution and phylogenetic diversity of the subsurface microbial community in a Japanese epithermal gold mine. *Extremophiles*, **7**, 307–317.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K. H. and Horikoshi, K. (2003b) Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 7224–7235.
- Izawa, E., Urashima, Y., Ibaraki, K., Suzuki, R., Yokoyama, T., Kawasaki, K., Koga, A. and Taguchi, S. (1990) The Hishikari gold deposit: high-grade epithermal veins in Quaternary volcanics of southern Kyushu, Japan. *Journal of Geochemical Exploration*, **36**, 1–56.
- Lam, P., Lavik, G., Jensen, M. M., van de Vossenberg, J., Schmid, M., Woebken, D., Dimitri, G., Amann, R., Jetten, M. S. M. and Kuypers, M. M. M. (2009) Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 4752–4757.
- Lebedeva, E. V., Alawi, M., Fiencke, C., Namsaraev, B., Bock, E. and Spieck, E. (2005) Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiology Ecology*, **54**, 297–306.
- Marteinsson, V. T., Hauksdottir, S., Hobel, C. F. V., Kristmannsdottir, H., Hreggvidsson, G. O. and Kristjansson, J. K. (2001) Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4242–4248.
- Miyazaki, J., Higa, R., Toki, T., Ashi, J., Tsunogai, U., Nunoura, T., Imachi, H. and Takai, K. (2009) Molecular characterization of potential nitrogen fixation by anaerobic methane-oxidizing archaea in the methane seep sediments at the number 8 kumano knoll in the kumano basin, Offshore of Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 7153–7162.
- Murakami, Y., Fujita, Y., Naganuma, T. and Iwatsuki, T. (2002) Abundance and viability of the groundwater microbial communities from a borehole in the Tono Uranium Deposit area, Central Japan. *Microbes and Environment*, **17**, 63–74.
- Nishizawa, M., Sano, Y., Ueno, Y. and Maruyama, S. (2007) Speciation and isotope ratios of nitrogen in fluid inclusions from seafloor hydrothermal deposits at ~3.5 Ga. *Earth and Planetary Science Letters*, **254**, 332–344.
- Nunoura, T., Hirayama, H., Takami, H., Oida, H., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K. H. and Horikoshi, K. (2005) Genetic and functional properties of uncultivated thermophilic crenarchaeotes from a subsurface gold mine as revealed by analysis of genome fragments. *Environmental Microbiology*, **7**, 1967–1984.
- Pace, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**, 734–740.
- Shock, E. L., Holland, M., Meyer-Dombard, D., Amend, J. P., Osburn, G. R. and Fischer, T. P. (2010) Quantifying inorganic sources of geochemical energy in hydrothermal ecosystems, Yellowstone National Park, USA. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **74**, 4005–4043.
- Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G. O., Hjorleifsdottir, S., Marteinsson, V. T., Petursdottir, S. K., Holst, O. and Kristjansson, J. K. (2000) Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2835–2841.
- Smith, C. J. and Osborn, A. M. (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, **67**, 6–20.
- Staples, C. R., Lahiri, S., Raymond, J., Von Herbulis, L., Mukhopadhyay, B. and Blankenship, R. E. (2007) Expression and association of group IV nitrogenase NifD and NifH homologs in the Non-Nitrogen-Fixing archaeon methanocaldococcus jannaschii. *Journal of Bacteriology*, **189**, 7392–7398.
- Stein, J. L., Marsh, T. L., Wu, K. Y., Shizuya, H. and DeLong, E. F. (1996) Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *Journal of Bacteriology*, **178**, 591–599.
- 杉山純多・渡辺信・大和田絃一・黒岩常祥・高橋秀夫・徳田元 (1999) 新版微生物学実験法, 講談社, pp. 324.
- Takai, K., Hirayama, H., Sakihama, Y., Inagaki, F., Yamato, Y. and Horikoshi, K. (2002) Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order Aquificales in a subsurface gold mine. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3046–3054.
- Takai, K., Gamo, T., Tsunogai, U., Nakayama, N., Hirayama, H., Nealson, K. H. and Horikoshi, K. (2004) Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hy-

- drothermal field. *Extremophiles*, **8**, 269–282.
- Ueno, Y., Yamada, K., Yoshida, N., Maruyama, S. and Isozaki, Y. (2006) Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature*, **440**, 516–519.
- Ueno, Y., Ono, S., Rumble, D. and Maruyama, S. (2008) Quadruple sulfur isotope analysis of ca. 3.5 Ga Dresser Formation: New evidence for microbial sulfate reduction in the early Archaean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 5675–5691.