

海底下の地下生物圏：過去と現世のリンクを担う 生物地球化学プロセス

高野 淑 識*・大河内 直 彦*, **, ***

(2010年4月23日受付, 2010年8月6日受理)

Deep biosphere and its biogeochemical processes: a linkage between past and present microbes in sub-seafloor

Yoshinori TAKANO* and Naohiko OHKOUCHI*, **, ***

- * Institute of Biogeosciences,
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC),
2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan
- ** Department of Environmental Science and Technology,
Tokyo Institute of Technology,
4259 Nagatsuda, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8502, Japan
- *** Department of Earth and Planetary Sciences, the University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Deep-sea sediments harbor a novel biosphere with uncultured prokaryotic lineages and their global biogeochemical processes. Exploring these habitats poses interdisciplinary challenges for the biogeochemical and geomicrobiological community. The limits of deep biosphere are on-going subject, which were not yet known in terms of environmental properties, including depth, temperature, energy availability, and geologic age; subseafloor microbes play a significant role in chemical reactions that were previously thought to have been abiotic processes. These limits are set by a variety of physical and chemical properties such as temperature, availability of energy and nutrients, pH, pressure, water availability, and salinity. In addition, molecular analyses and cultivation experiments demonstrate a high diversity of microbial life in the sub-seafloor, although the relative abundances and roles of archaea, bacteria, eukarya, and viruses have been largely unknown. Recent intensive researches on deep biosphere revealed that carbon isotopic signatures of sedimentary archaeal membrane polar lipids indicate utilization of sedimentary organic carbon by the living archaeal community. Further deep drilling of marine sediments and igneous crust offers a unique opportunity to explore how life persists and evolves in the Earth's deep sub-seafloor ecosystems. Here, we overviewed about historical background of the deep biosphere and its latest progresses in terms of biogeochemical processes together with prokaryotic ecology and limit of life on the Earth.

Key words: deep biosphere, geological setting, physico-chemical condition, prokaryotic ecology, sub-seafloor biogeochemical processes

* 独立行政法人海洋研究開発機構海洋・極限環境生物圏領域

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15

** 東京工業大学大学院総合理工学研究科

〒226-8502 神奈川県横浜市緑区長津田4259

*** 東京大学大学院理学系研究科

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

1. はじめに

海底下の「地下生物圏」には、何が棲息していて、どこまで広がり、どのような仕組みで成り立っているのか。この問いは、科学者だけではなく、人類共通のものと捉えられる。1800年代後半には、HMS チャレンジャー号の海洋調査などにより、海洋の生態系の知見が細々と蓄積されていた。1970年後半には、潜水調査船アルビン号によるガラパゴス海嶺調査で海底熱水系と周辺に広がる特異な生態系が初めて報告された (Lonsdale, 1977; Corliss *et al.*, 1979)。同じ頃、日本周辺でも海底の生態系調査が積極的に行われるようになり、熱水および冷湧水系の特異な化学合成生物群集が報告された (e.g., Okutani and Egawa, 1985; 藤倉ら, 2008)。1990年代に入り、海底下に広大な「地下生物圏」が存在していることが徐々に認知されるようになり (Gold, 1992)、分子レベルで海底下の生物地球化学的な記載を行う手法が広まった (e.g., Parkes *et al.*, 1994; Stevens and McKinley, 1995; Whitman *et al.*, 1998; Hinrichs *et al.*, 1999)。一方、陸上では、深部地中処理のアセスメントと併せて、陸上地殻内の岩石・水文学的調査とともに「地下生物圏」の研究も進められてきた (e.g., Pedersen and Ekendahl, 1990; Pedersen, 1993, 1997; 村上・長沼, 2000)。2000年ごろから、分子生物学の本格的な参入が加わり、海底下から採取された試料に応用され、様々な考え方が導入された (e.g., Parkes *et al.*, 2000; Boetius *et al.*, 2000; Summit and Baross, 2001; Orphan *et al.*, 2001; D'Hondt *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2003; D'Hondt *et al.*, 2004; Schippers *et al.*, 2005)。この頃から、日本国内においても海底下の地下生物圏に関する試みから、様々な熱水域・冷湧水域・付加帯域等の科学提案が議論されるようになった (加藤・高井, 2000; 高井・稲垣, 2003; 長沼, 2003; 丸山・浦辺, 2003; 加藤・永翁, 2005; 平, 2005; 浦辺ほか, 2005)。

「Deep Biosphere」という言葉が徐々に浸透し、2000年代後半に入ると、更に新しい分析手法の開発と共に国際的な機運が高まってきた (e.g., Jorgensen and D'Hondt, 2006; D'Hondt *et al.*, 2007; Jorgensen and Boetius, 2007; Pearson, 2008; 浦辺ら, 2009; Schrenk *et al.*, 2010)。どこからが「地下生物圏」ではなく、化学 (ガス・水および火成岩、堆積岩、変成岩等) と物理 (温度、圧力、pH 等) のみが支配する

「非生物圏」となるのか。地球深部での事象について、その根源的な問いに答えるための分野の一つが、「生物地球化学」であり、サンプルへのアクセスの一つが、統合国際深海掘削計画 (IODP: Integrated Ocean Drilling Program) や国際陸上科学掘削計画 (ICDP: International Continental Scientific Drilling Program) といった「地球掘削科学」と位置付けられる。では、具体的に地下生物圏の研究は、どこまで明らかになっているのか。次に新しい展開を図るには、どのようなアプローチが求められているか。本総説では特に、ごく最近になって明らかになってきた海底下の「地下生物圏」について、生物地球化学的な視点から概観した。

2. 全球のエネルギー流量と海底下の地質学的セッティング

2.1 エネルギー流量、海底堆積物の厚さと年齢

まず、全球のエネルギー流量を概観する。太陽定数 (1.37 kW m^{-2}) および地球の表面積から地球大気上端に入射するエネルギー流量は、最大で $350 \sim 400 \text{ W m}^{-2}$ である (Bishop and Rossow, 1991; ISCCP)。その外因性エネルギーの大部分は、太陽での水素の核融合反応に起因する。一方、地球内部のエネルギー流量は、平均で 60 mW m^{-2} と見積もられており (e.g., Hofmeister and Criss, 2005)、外因性エネルギーに対して $3 \sim 4$ 桁小さい。地球の内因性エネルギーは、地球内部での放射壊変に起因し、主にプレート境界で発散されやすい。海洋底のプレートの拡大速度は、中央海嶺でもっとも速く、最大 $15 \sim 20 \text{ cm yr}^{-1}$ である (Fig. 1)。拡大速度が速いほど、地球内部エネルギーの発散の場になりやすいことから、プルーム (周辺海水と化学組成や濁度・温度などの物理的特徴が異なる物質流) の頻度が高くなる。海水の硫酸は、リチャージされる駆動力があれば、ほぼ無限に供給されることから、熱水系周辺では、塊状硫化物の沈殿反応が進み、熱水鉱床が形成される。また、熱水性の微生物群集が着生し、それを利用する二次的な微生物・生物群集が成育している。

プレート拡大軸や島弧火山列では、プレート拡大速度や形成時期から時間軸が推定できるため、火成活動に伴う熱水のディスチャージおよび熱水鉱床の分布等を照合することによって、母岩中もしくは母岩上部に捕獲された生物群集や地殻内・熱水孔下の地下生物圏を理解することができる (e.g., Stevens and

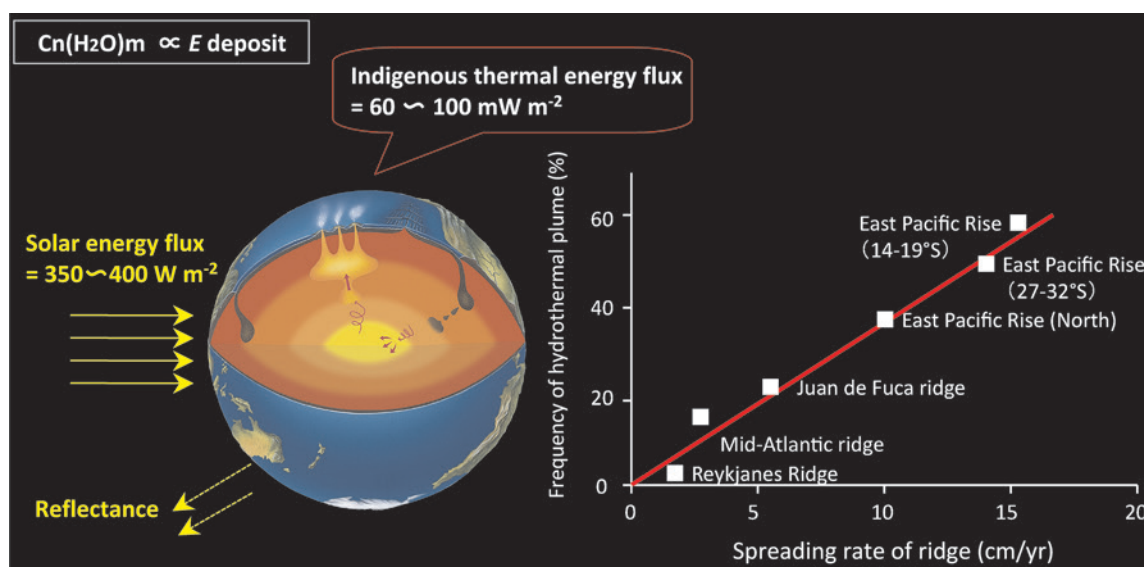


Fig. 1 Comparison between solar energy flux (cf: Solar constant, 1.37 kW m^{-2}) and indigenous thermal energy flux on the Earth surface (Pollack *et al.*, 1993; Hofmeister and Cris, 2005). Correlation of crustal spreading rate and its frequency of hydrothermal plume were also noted (modified from Baker and Urabe, 1996; Baker *et al.*, 1998).

McKinley, 1995; Reysenbach and Cady, 2001; Takai *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2005; 浦辺ら, 2005; Fisher *et al.*, 2007)。スポット的あるいは線的に位置するブルームは、現世の内部エネルギーを起点としている。したがって、束縛条件は「化学フラックス」と「熱水循環系 (Venting) の寿命」であり、過去からのある時間スケールの中で現世に生きる微生物が恩恵を受けている (Brazelton *et al.*, 2010)。

次に、海洋底の年齢を Fig. 2に、海洋堆積物の厚さを Fig. 3に示す。プレートが生まれる中央海嶺は、年齢が若く、概して遠洋性であるため、堆積物による被覆が少ない。逆に、プレートの沈み込み帯の付近や大陸縁辺部の高一次生産海域は、分厚い堆積物に覆われている (Fig. 3)。一次生産された有機物のうち、約1%程度がゆっくり海底にまで沈降し、無機質な生物遺骸とともに海底に蓄積され、無機物・真核生物・原核生物に由来する粒子などに過去の水柱記録が残されている。このため、大陸縁辺部や高一次生産海域は、堆積学的な層序を高分解で読み解き、古海洋学的な記述を行なうには相応しい環境となる。

全球的な外因性の熱流量を考慮すれば、面的な広がりを持つ、一次生産が集約された堆積相の厚い海底下が、原核生物の生物相密度も比較的高く、現世に生きる微生物にとって過去の恩恵（特に、従属栄養プロセ

ス: Biddle *et al.*, 2006; Lipp *et al.*, 2008) を受けやすい地質学的セッティングと言える。したがって、「現世」の微生物が、「過去」の層準に「生きている」という構図が明確に見えてくる。どの程度まで深く、過去の層準に生きている微生物の活性があるか、という問いは、これまでも注目されてきた (e.g., 海底下842 m depth, $\sim 55^\circ\text{C}$, 3.5 Ma; Wellsbury *et al.*, 2002)。現在、ニューファンドランド沖の海底下1626 mから生きている活性を示す微生物の報告 ($60\sim 100^\circ\text{C}$, 111 Ma; Roussel *et al.*, 2008) があり、層序学的に「過去」の時間軸上で「現世」の原核生物が棲息している最深度の記録とされる。

2.2 海洋の水柱および海底下の微生物相

海洋の有光層では、真核・原核の光合成生物が、基礎生産者となっている。その生産量は、一次捕食者、二次捕食者およびウイルスまで含む微生物ループを包括した水柱中のバイオマスを規定する一次因子になっている (ウイルスの役割は、後述)。有光層以深では、海洋性アーキア (Archaea, 古細菌ともいう) のうちクレンアーキオータ (Crenarchaeota) が卓越しており (Fig. 4)、有光層で卓越しているバクテリアとの棲み分けが観測されている (Karner *et al.*, 2001)。浮遊性の海棲アーキアは、炭素源について独立栄養性アーキア (Wuchter *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 2010) と

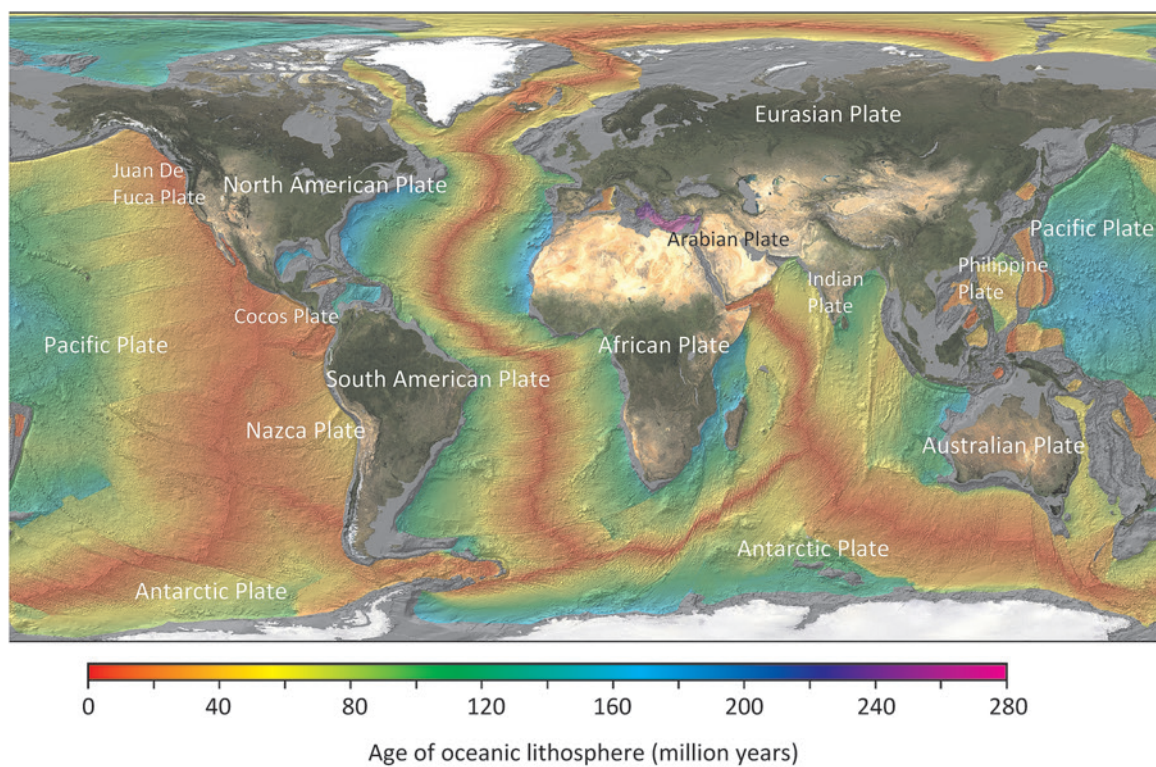


Fig. 2 Age of oceanic lithosphere and present distribution of plate (data from Muller *et al.*, 2008: courtesy from E. Lim, NOAA National Geophysical Data Center).

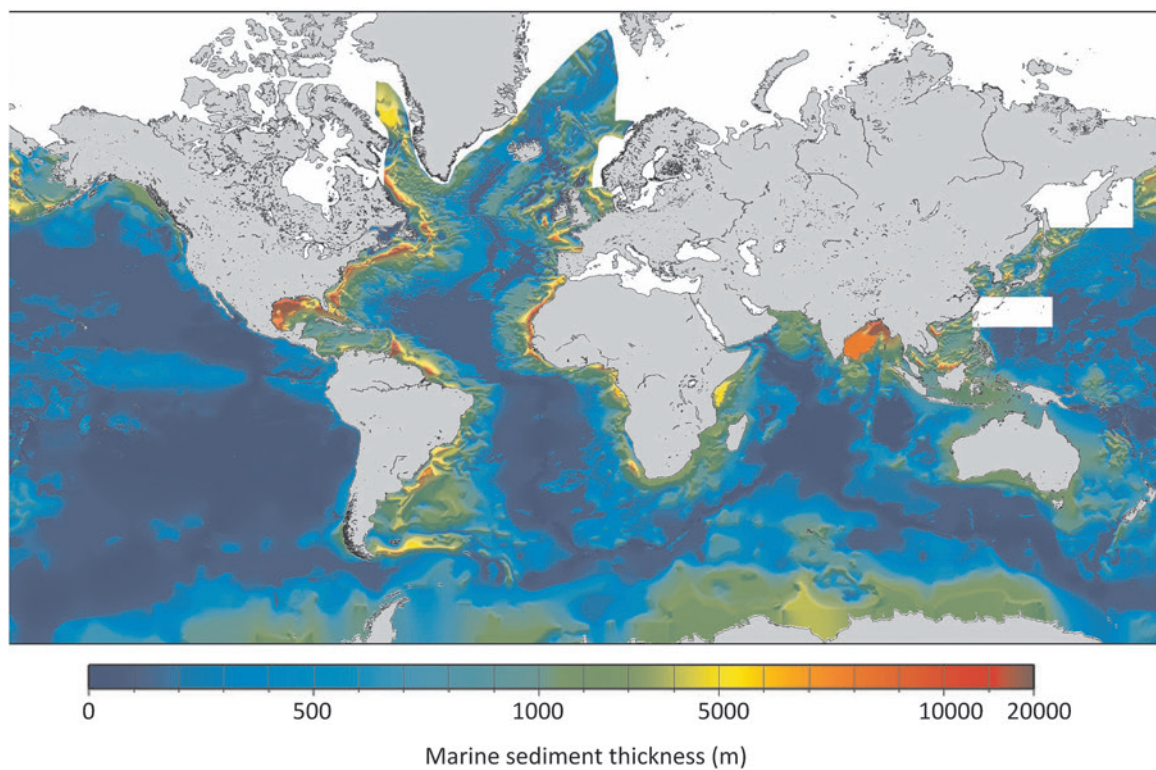


Fig. 3 Marine sediment thickness of the world's oceans and marginal seas compiled by the NOAA National Geophysical Data Center. The data values are in meter and represent the depth to acoustic basement (<http://www.ngdc.noaa.gov>).

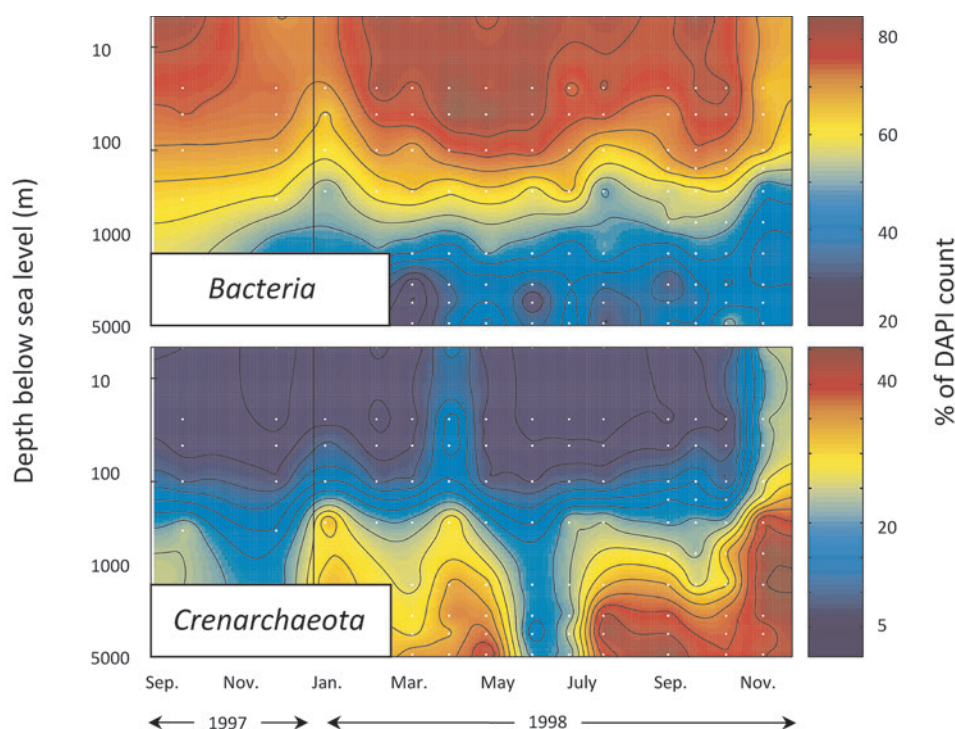


Fig. 4 Contour plots of relative abundances with depth of bacteria and pelagic crenarchaeota during one year sampling effort at the Hawaii Ocean Time-series station, ALOHA, in the North Pacific subtropical gyre. Contour lines are percentages of bacteria and pelagic crenarchaeota as compared with total microbial abundance at each depth. Total cell abundance was assessed using the DAPI nucleic acid stain. Bacteria and archaea were enumerated using whole-cell rRNA targeted fluorescent in situ hybridization with fluorescein-labelled polynucleotide probes (modified from Karner *et al.*, 2001).

従属栄養性アーキア (Ouverney and Fuhrman, 2000) の双方が実験的に確認されている。近年、窒素源については、独立栄養性アンモニア酸化アーキアの動態が、注目されている (e.g., Konneke *et al.*, 2005; Coolen *et al.*, 2007; Nicol and Schleper, 2006; Francis *et al.*, 2007)。

一方、海底下に生きている全原核生物バイオマスのうち、アーキアが優勢多数を占めているという報告がある (e.g., Lipp *et al.*, 2008; Biddle *et al.*, 2006, 2008; Pearson, 2008)。海底堆積物中で深度とともに全菌数が徐々に減少していくことは、これまで知られていた (Parkes *et al.*, 2000)。Lipp *et al.* (2008) による「アーキアワールド仮説」は、極性頭部に糖質等の官能基に持つ易分解性の、「現在生きている」あるいは「ごく最近まで生きていた」とされる原核生物の極性脂質 (Intact Polar Lipids, IPLs) の定量的評価と16S rRNA法を併せて検証している。海底堆積物中での

IPLsの寿命時間に関する推定は、Lipp and Hinrichs (2009) に詳しい。アーキアに由来するIPLsの相対量は、深くなるにつれて増大していることが分かる (Fig. 5-c)。また、堆積物に含まれる全有機炭素の割合 (TOC%) とIPLsをプロットすると、明瞭な正の相関が見られた (Fig. 5-d)。アーキア由来の代表的なIPLsについて言えば、コア脂質 (Core lipid, CL) のGDGT (glycerol dialkyl glycerol tetraethers) に糖質鎖であるモノグリコシル基 (monoglycosyl-) が結合していれば、1-gly-GDGTとなり、ジグリコシル基 (diglycosyl-) が結合していれば、2-gly-GDGTになる。この他、糖鎖だけでなくホスホグリコール基 (phosphoglyco-) などの様々な極性官能基を保有するアーキアが知られている (Fig. 6)。極性頭部が付いているGDGTsは、特にIPL-GDGTsと呼ばれ、コア脂質だけからなるものをCL-GDGTsと呼ぶ。

Lipp *et al.* (2008) により、海底下で現世に生きて

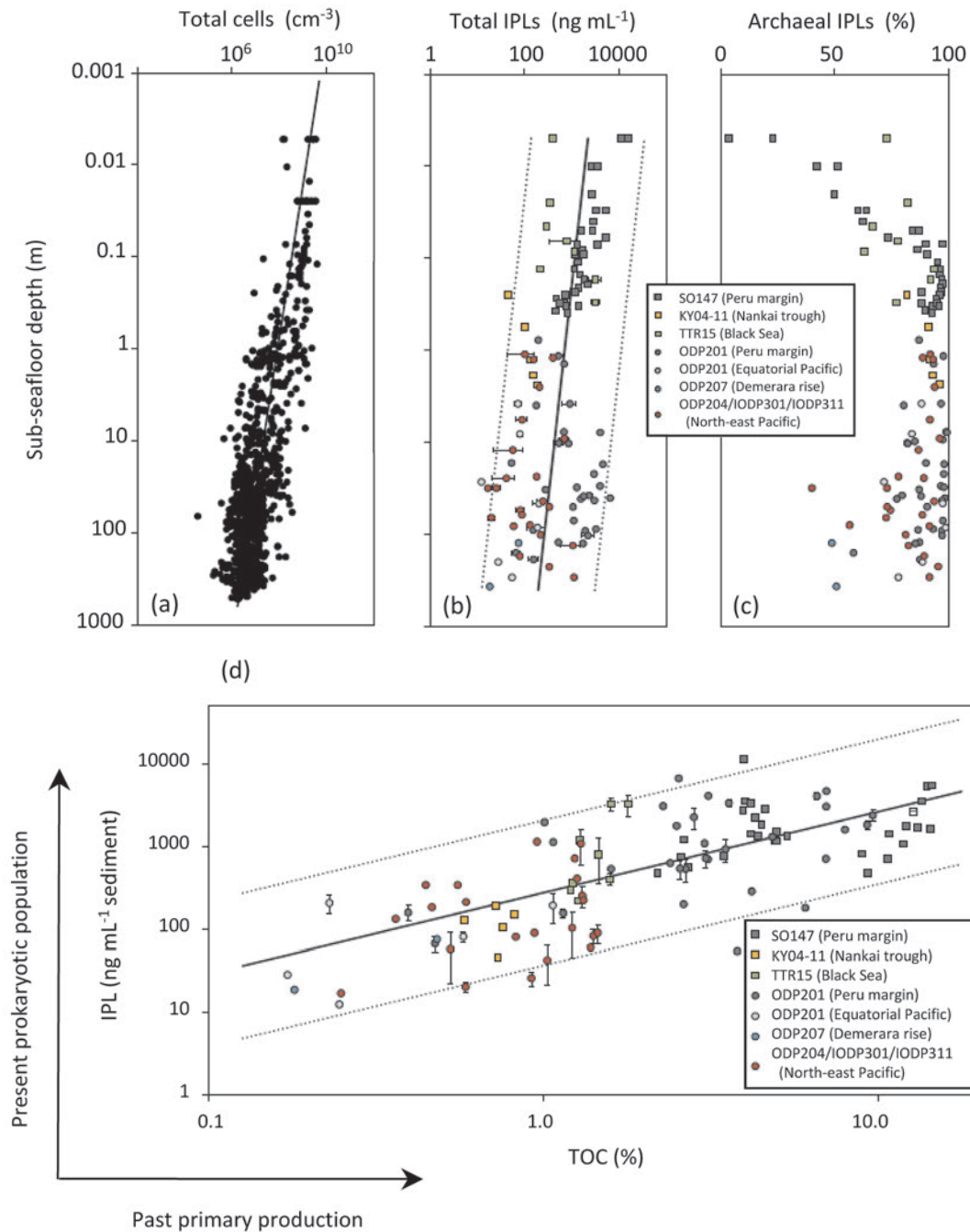


Fig. 5 Comparison of vertical distribution in marine sediment for (a) total microbial cells (bacterial profile: Parkes *et al.*, 2000), (b) total intact polar lipids (IPLs). Error bars show the standard deviation of repeated injection of total lipid extracts. Regression lines show total microbial IPLs and 95% prediction interval (dotted lines, standard error of estimate, 0.60), both of which are generated using least-squares analysis (Lipp *et al.*, 2008). (c) Relative contribution of archaeal IPLs to total microbial IPLs. The limit of detection was assumed to be the bacterial proportion for samples without detectable bacterial IPLs (Lipp *et al.*, 2008). (d) Correlation of concentrations of IPLs and TOC. Error bars show standard deviation of repeated injection of total lipid extracts. Regression lines show $\log[\text{IPL}]_{\text{total}}$ versus $\log[\text{TOC}]$ (solid line; $\log[\text{IPL}]_{\text{total}} = 0.979 \times \log[\text{TOC}] + 2.436$, $N = 101$, $R^2 = 0.56$, $P < 0.0001$, least squares analysis) and 95% prediction interval (Lipp *et al.*, 2008).

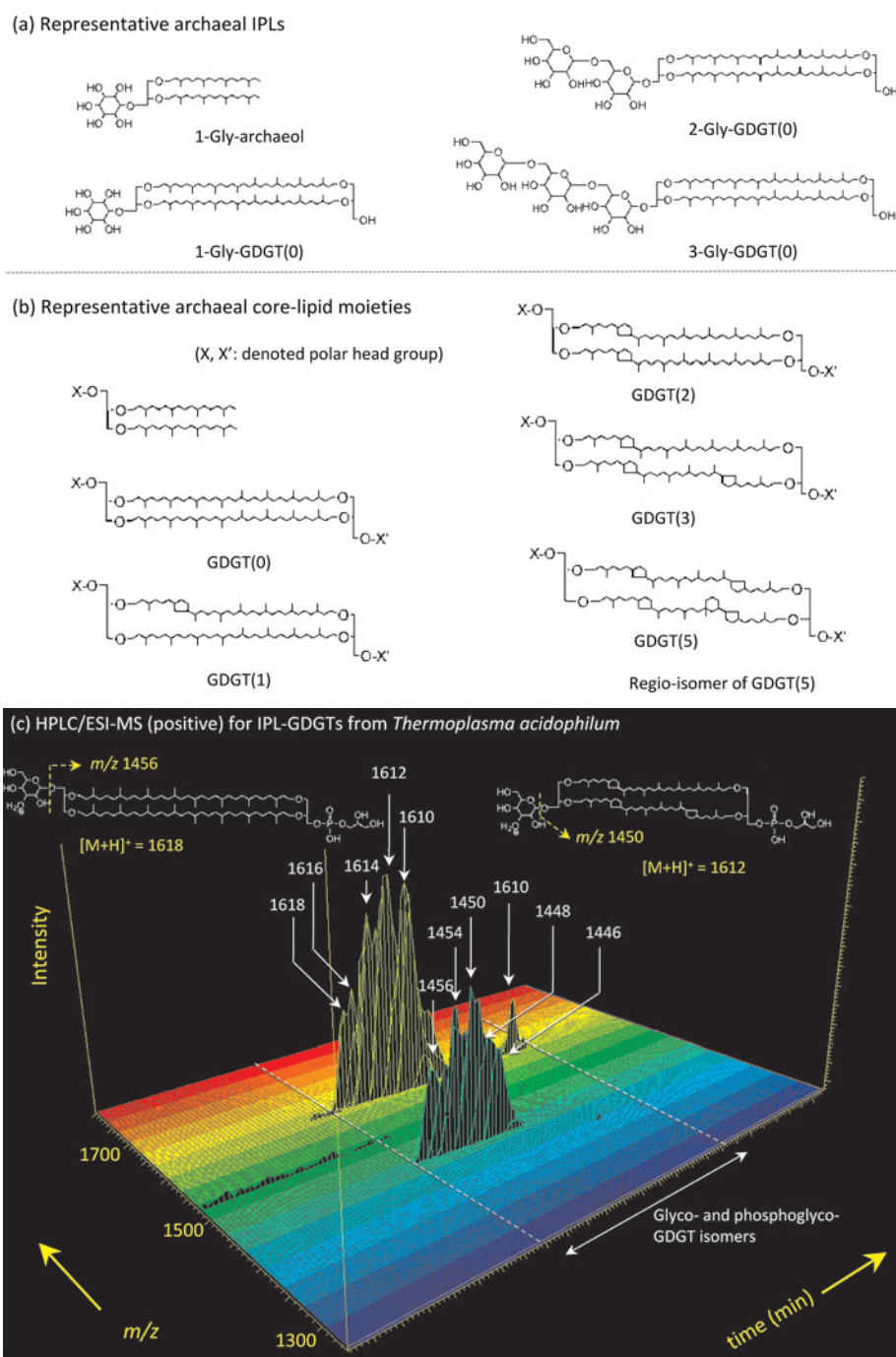


Fig. 6 (a) Representative archaeal IPLs and (b) its core-lipid moieties are shown with its core-lipid moieties of di-ether and GDGT (glycerol dialkyl glycerol tetraethers), for example, 1-Gly-archaeol, 1-Gly-GDGT (0), 2-Gly-GDGT (0), 3-Gly-GDGT (0). See also, Sinninghe Damsté *et al.* (2002), Sturt *et al.* (2004), Koga and Morii (2007), Koga and Nakano (2008), Roussel *et al.* (2008), Lipp and Hinrichs (2009). (c) Representative total ion chromatogram of intact polar lipids (e.g., glyco- and phosphoglyco-GDGTs) from *Thermoplasma acidophilus* by high performance liquid chromatography combined with electron spray ionization mass spectrometry (HPLC/ESI-MS, Agilent 1100 series) on positive mode, showing IPL separation and its regio-isomers of GDGT moieties (Takano *et al.*, 2010d). Three axis stands for retention time (min), m/z , intensity.

いる原核生物は、過去の基礎生産に依存していることが実証され、ペルー沖の既報で示唆されていたアーキアの従属栄養性 (Biddle *et al.*, 2006) が改めて裏付けられた。この発見は、Sturt *et al.* (2004) による液体クロマトグラフ／電子スプレーイオン化／マルチステージ質量分析法 (HPLC/ESI-MSⁿ) の改良や DNA/RNA の新しい抽出・精製法の確立に支えられている (Morono *et al.*, 2009; Lipp and Hinrichs, 2009)。

3. アーキアの多様性、過去の物質収支と現世の原核生物のリンケージ

自然界に分布するアーキアには、未知の部分が多数残されている (e.g., 古賀・亀倉, 1998; 石野, 2009)。1990年前半に海洋性アーキアが存在が示された (DeLong, 1992; DeLong *et al.*, 1994)。海底下のアーキアは、過去に堆積した有機物を起点にしたメタン生成、あるいは嫌氣的メタン酸化に関わることはよく知られてきた (e.g., Hinrichs *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000)。底質に棲むアーキア (benthic archaea) のユーリアーキオータ (*Euryarchaeota*) のうち、嫌氣的メタン酸化を担う ANME (Anaerobic Methanotroph)-1, ANME-2, ANME-3 と呼ばれる系統分類群は、硫酸還元バクテリアとコンソーシアムを作ることによって、海底下でメタンを生化学的に分解している。



すなわち、温室効果ガス「メタン」が海水中に湧き出るのを面的に防いでいる。

海底下に棲むそれ以外のアーキアは、どうだろうか。コンタミネーションに十分に注意を払ったコア試料採取を行い、その16S rRNAによる解析で明らかになってきたように (Fig. 7)、海底下のアーキアは、ユーリアーキオータおよびクレンアーキオータともに多様性に富んでいる (Fry *et al.*, 2008 and literatures within)。この多様性を生み出す要因は、まだ明らかにされていない点が多いが、過去と現世のリンクを担う存在としてアーキアが重要な役割を果たしていることは確実と言える。すなわち、海底下の原核生物は、続成作用等の無機的なプロセスの進む中で、生化学的なプロセスを保持している。言い換えれば、生細胞の各有機物は、個々の生化学的機能を果たしている (Fig. 8)。それを細胞レベルの代謝でみた場合、生き残るために最低限必要なエネルギー (survival en-

ergy)、恒常性の維持に必要なエネルギー (maintenance energy)、細胞の複製とその成育に必要なエネルギー (growth energy) があり、それらのエネルギー的要求性は、比率にして1: 10³: 10⁶と見積もられている (Price and Sowers, 2004; Valentine, 2007)。このエナジエティックスに従えば、供給されるエネルギー量が、maintenance energyを下回る場合、将来的に不活性化あるいは細胞死滅を意味する。maintenance energyと同等である場合、代謝活動は維持され、maintenance energyを大幅に上回る場合、細胞増殖が可能になる (Fig. 9)。海底下に優勢なアーキアの性状は、まだ断片的にしか記載されておらず、我々が記述していない新しい生理機能・適応機能が備わっている可能性がある (Takano *et al.*, 2010c)。

4. 「ウイルス」という存在と生物地球化学

1946年に海洋性ウイルスが発見され、1970年代に微生物ループの概念が提唱された。ウイルス (virus) は核酸と殻タンパク質で構成され、液体を保有する細胞構造はなく、大きさはおよそ20~200 nmの「粒子」である。また宿主細胞の膜に由来する脂質二重膜の外套に覆われた種類もある。分類体系は、粒子構造と核酸成分 (DNA, RNA, 一本鎖, 二本鎖など) を基準としている。ウイルス粒子に代謝機能はないが、宿主細胞に感染して増殖することができる。細胞を基本とする生物 (原核生物, 真核生物) のすべてが宿主であり、感染することでウイルス遺伝子を子孫に残す偏性寄生性の生物と規定される (Madigan *et al.*, 2003)。

生物地球化学的な視点で見たウイルスの研究は、とくに海洋環境での宿主感染、微生物ループや溶存態有機物 (DOM) の動態解析と併せて進められてきた (e.g., Rohwer and Thurber, 2009)。海洋性ウイルス由来の脂質バイオマーカー探索もすでに行われている (Vardi *et al.*, 2009)。原 (2006) によると、海洋に浮遊しているウイルスの大部分は、原核生物 (バクテリア, アーキア) や原生生物 (原生動物, 微細藻類) を宿主とするウイルスと考えられており、海水中には、原核生物の少なくとも数倍から1桁多い程度のウイルス様粒子が存在する。世界中の海洋のウイルス総数は、平均で10⁶/mLを越え、ウイルス総数は、概して生物生産の高い海域で多い。ウイルスが感染してから増殖・分散するまでの増殖周期は、分単位のものから潜伏感染の年単位のものまで様々である。バクテリ

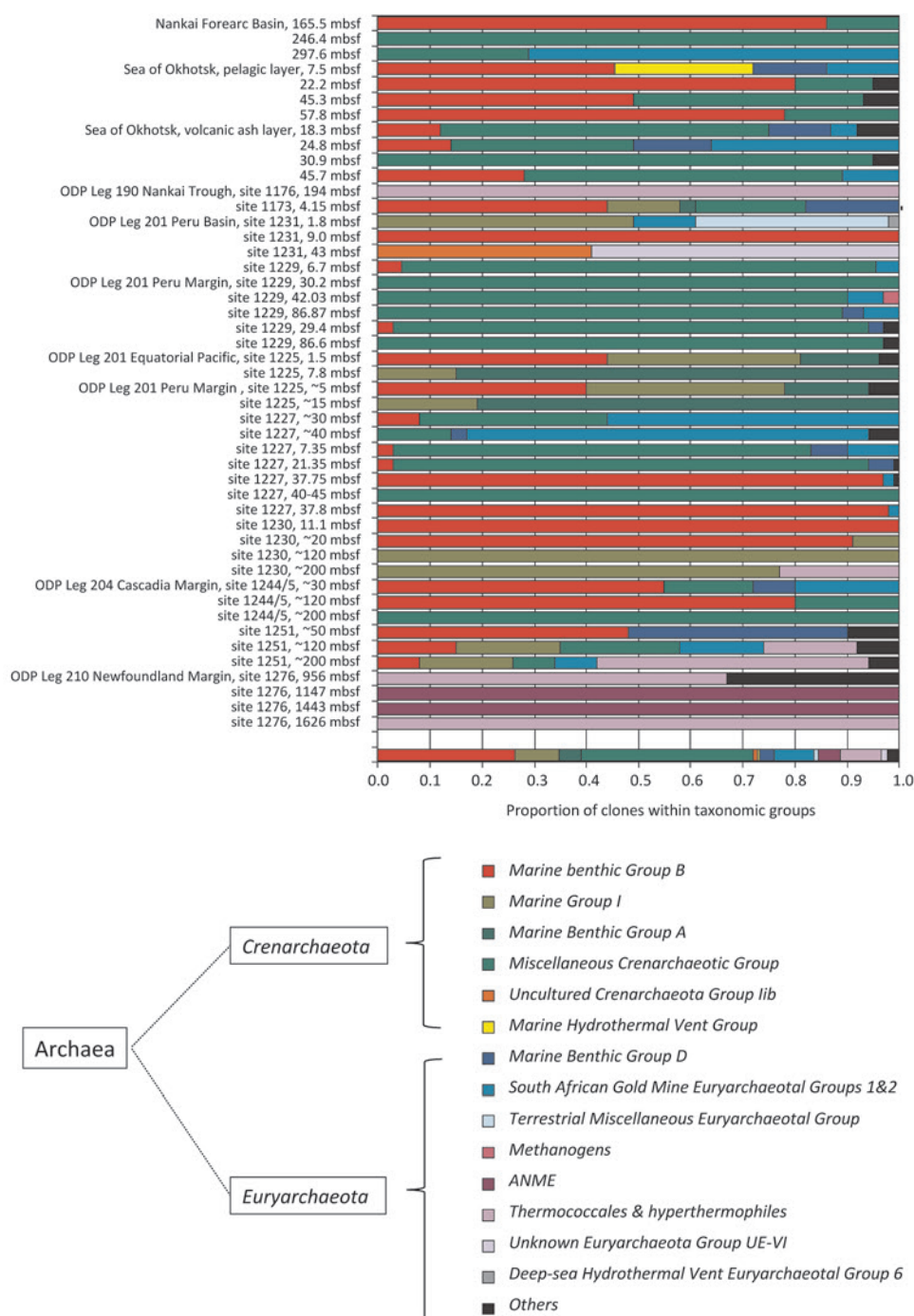


Fig. 7 Community composition of archaeal 16S rRNA genes from various sites and depths in the deep subseafloor biosphere. The profiles were modified from Fry *et al.*, 2008 and compilation from Reed *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Kormas *et al.*, 2003; Newberry *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2006; Biddle *et al.*, 2006; Teske, 2006; Inagaki *et al.*, 2006; Sorensen & Teske, 2006; Roussel *et al.*, 2008). As far as possible, the nomenclatures of subsurface unclassified archaeal groups are based on their first reported use and as reviewed by Teske & Sorensen (2008).

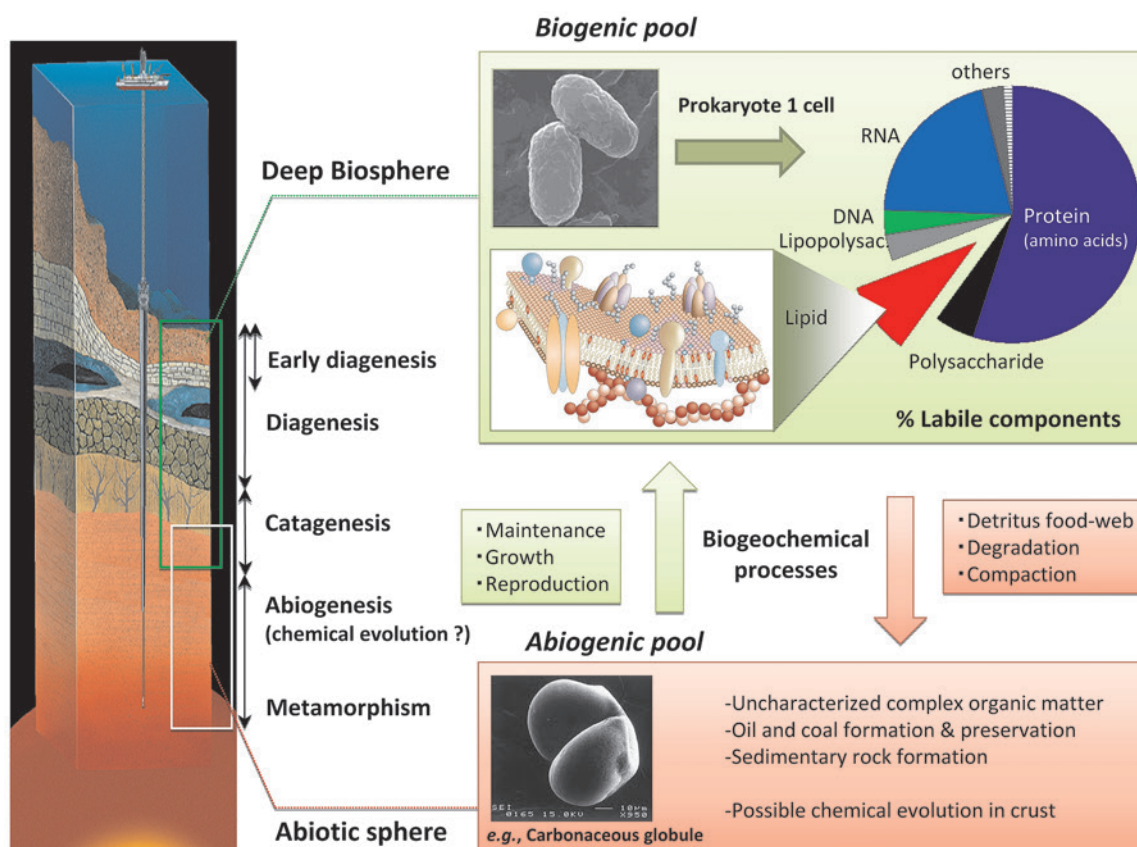


Fig. 8 Schematic view and biogeochemical processes in sub-seafloor under diagenesis, catagenesis, and abiogenesis. Labile organic matter in biogenic and abiogenic pool mainly intermediate between past and present linkages biogeochemical processes. Compiled by prokaryotic labile organic component (Neidhardt, 1996; Pietzsch, 2004), abiogenic carbonaceous globule (Berndt *et al.*, 1996). Photo courtesy: Y. Morono, F. Inagaki, and CDEX, JAMSTEC.

アの死滅要因の10~40%がウイルスによるものと推定されており、この細胞分解作用 (e.g., Middelboe and Jorgensen *et al.*, 2006) が供給する溶存有機物の供給は、海底下においても包括的に考慮していくべき重要な生物地球化学的プロセスの1つと位置付けられる (D'Hondt *et al.*, 2007)。

5. 海底下を流れる「酸化的な水」と 原核生物の呼吸

海底の堆積物—水境界 (sediment-water interface) およびその深部では、生物が深く関与する酸化還元反応が起きている。深度が増すにつれて酸化剤として働く溶存酸素 (O_2), 硝酸イオン (NO_3^-) が枯渇し、やがて硫酸イオン (SO_4^{2-}) が徐々に消失する (e.g., Froelich *et al.*, 1979; Fredrickson and Fletcher, 2001)。硫酸還元帯よりも深部、つまり更

に嫌氣的になると、メタン生成帯になる。この境界は、硫酸イオン—メタン境界 (Sulfate-methane interface: SMI) もしくは sulfate-methane transition: SMT, Fig. 10) と呼ばれ、海底下の一般的な酸化還元状態を知る手掛かりとなる。SMI 以深では、生物起源のメタンの他、炭素同位体的に軽いエタンの存在も知られている (e.g., Nakagawa *et al.*, 2003; Hinrichs *et al.*, 2006)。海底堆積物の SMI は、場所によって 100 m 以深になることもある (e.g., D'Hondt *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2010)。しかし、SMI よりも深い層準の還元環境に酸化剤が再び出現することがある。

Fig. 10に示すように、ペルー沖の海底下では、SMI 以深で硫酸イオンが再び出現する深度があり、SMI が2つ存在する (D'Hondt *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2005; Shipboard Scientific Party of Leg 201, 2003)。さらに、理由は明らかにされていないが、同じくペ

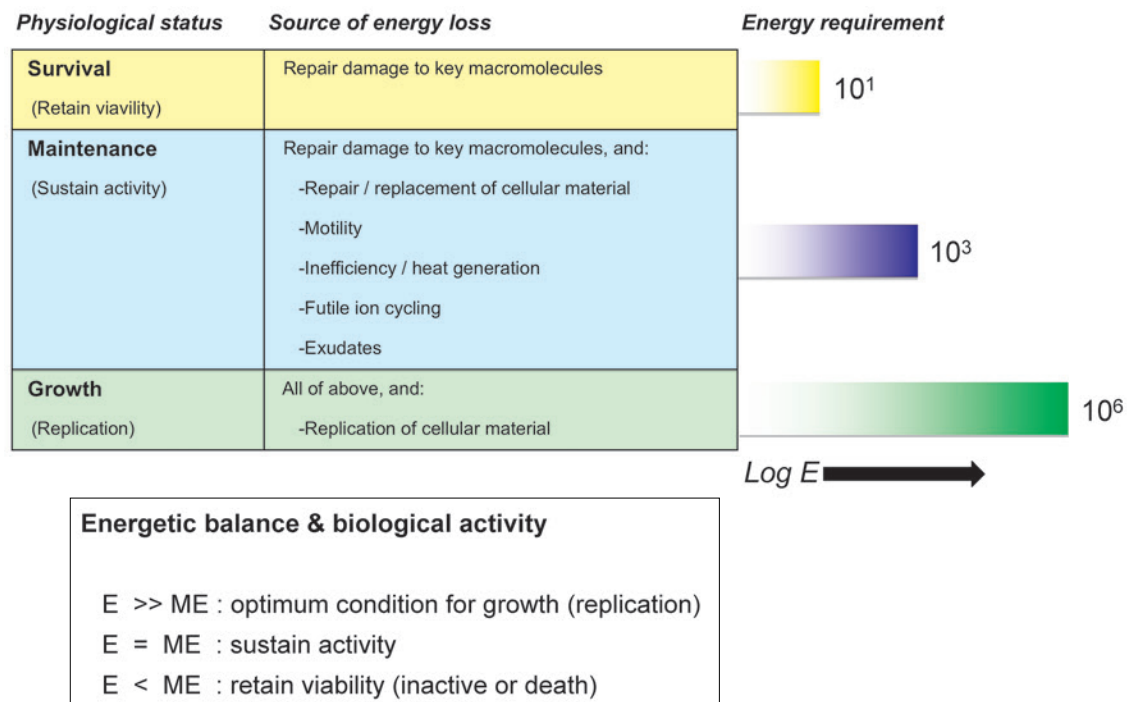


Fig. 9 Cellular energetics and requirements for conditions of survival, maintenance and growth are shown. The ratio of energy requirements (survival: maintenance: growth) has been estimated at 1: 10^3 : 10^6 (e.g., Price and Sower, 2004; Valentine, 2007). E, Energy supply; ME, Maintenance energy.

ルー沖の海底下の一部では、基盤岩付近で硝酸イオンの増大も確認されている (D'Hondt *et al.*, 2004)。SMI 以深での「酸化的な水」の存在は、ペルー沖特有の現象では無く、メキシコ湾やファンデフーカ (Engelen *et al.*, 2008) の掘削調査からも明らかになっている。メキシコ湾海底渓谷にある海盆の Brazos-Trinity 海盆では、1つの SMI が存在するが、それ以深でも硫酸イオンが枯渇せず、何らかに起源を持つ酸化的な間隙水の移動と微生物相の相関が分かっている (Shipboard Scientific Party of Exp 308, 2006; Nunoura *et al.*, 2009)。Fig. 10の (a)～(c)で示す SMI と全く異なる深度プロファイルも一部の深層調査で報告されている (D'Hondt *et al.*, 2002)。このような海底下を水平方向に移動する「酸化的な水」の存在は、堆積物中に棲息する原核生物の呼吸とエネルギー獲得に少なからず影響を与えていると推定されている (D'Hondt *et al.*, 2002, 2009; DeLong, 2004)。

6. 海底下の難培養性微生物と原核生物の生態解明に向けて：SIP 法の可能性

海底下の微生物は、培養が難しい群集と比較的培養

しやすい群集が知られる。前者は、とくにアーキアの群集 (e.g., Teske and Sorensen, 2008) が代表的で、後者は休眠胞子を形成できるバクテリア (e.g., D'Hondt *et al.*, 2004; Teske, 2006) が主体である。Fig. 11にペルー沖のコア試料を用いて行われた培養実験で成育したバクテリア群集を示す。全体の53%以上が、細胞壁に分厚いペプチドグリカン層を保有するグラム陽性バクテリア (*Actinobacteria*, *Firmicutes*) であった。この群集は、細胞壁の構成に必須である D-アミノ酸を比較的多く保有していることが特徴である。すなわち、D-アミノ酸ラセマーゼやトランスフェラーゼは、酵素としての分子構造が維持され、活性を保持していることが分かる。難培養性であるアーキア群と培養しやすいバクテリア群は、海底下で対極となる原核生物である。

海底下における原核生物の生態学を正確に記述していくことは、前述のような原核生物の性質上、技術的に難しい面がある。また、実験室において、海底と同じ物理・化学条件および、それらの微妙な環境勾配を忠実に再現するには、限界がある。このような問題解決に向けて、我々は、潜水艇を用いた海底での現場培

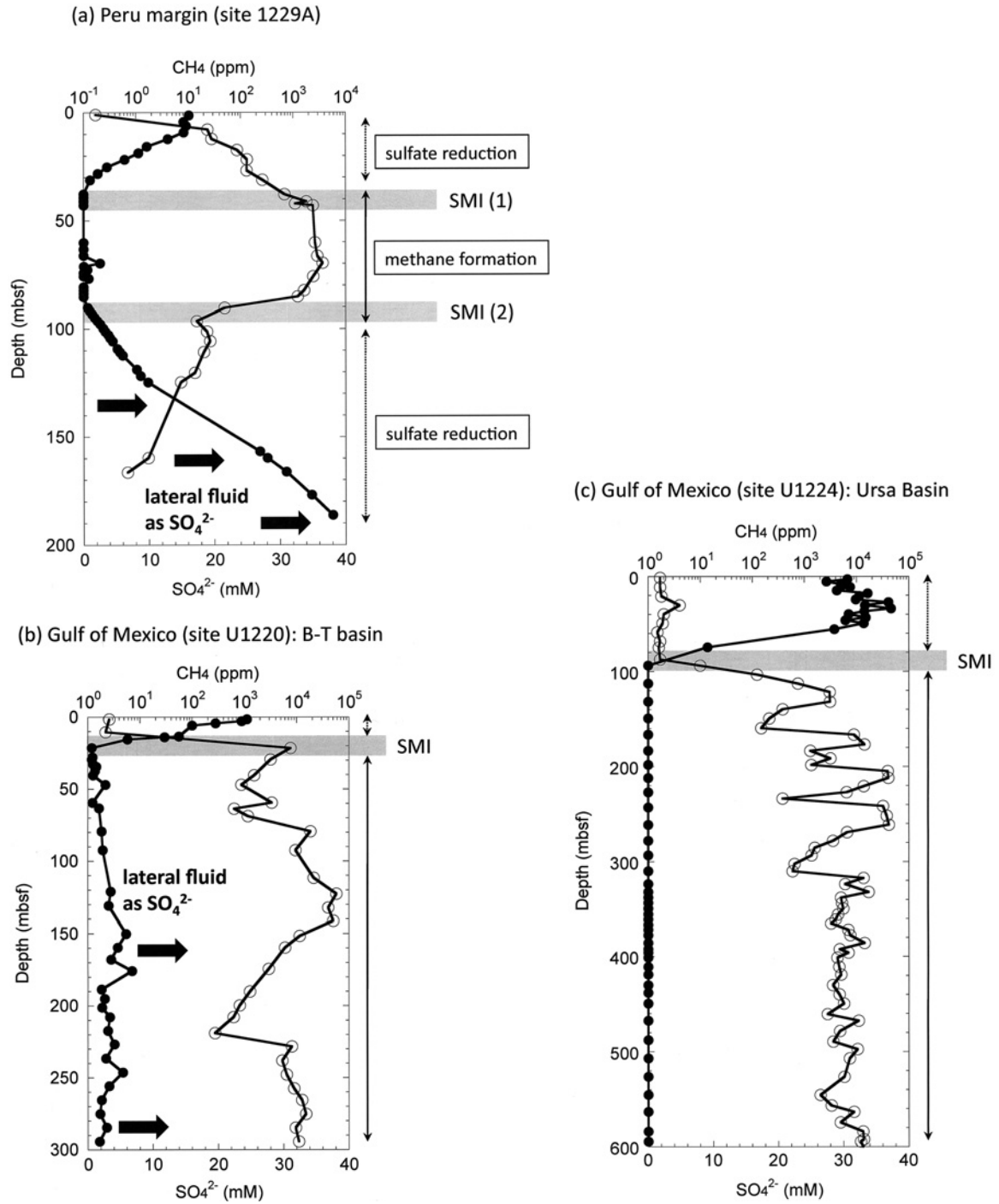


Fig. 10 Sulfate and methane interface (SMI) in (a) Peru margin at site 1229A (D'Hondt *et al.*, 2004), (b) Gulf of Mexico at Brazos-Trinity basin (Shipboard Scientific Party of Exp 308, 2006; Nunoura *et al.*, 2009), and (c) Ursa basin (Shipboard Scientific Party of Exp 308, 2006; Gay *et al.*, 2010). Lateral fluids of SO_4^{2-} ion beneath SMI were observed in (a) and (b).

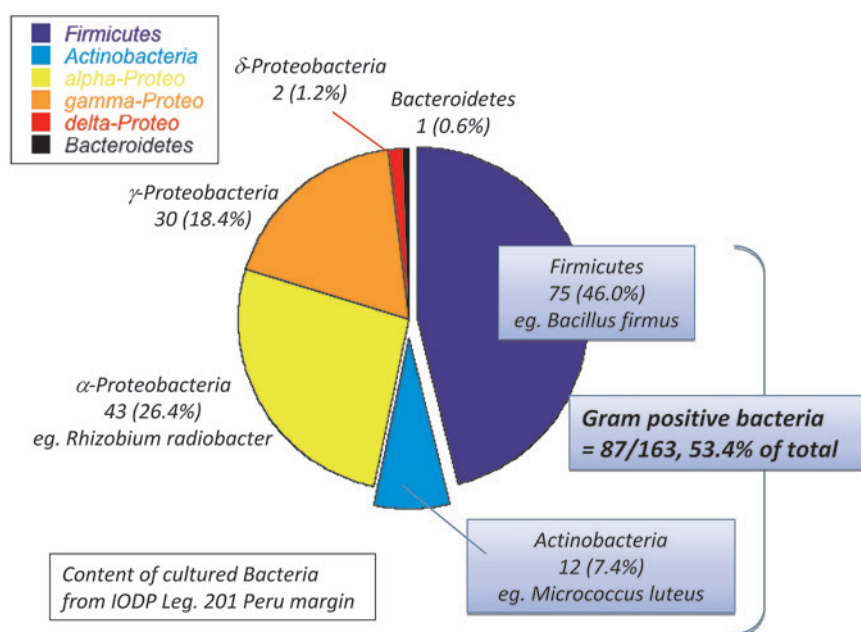


Fig. 11 Cultured bacterial isolates from Leg 201 sediments in open Pacific site and Peru margin sites (compiled by Takano *et al.*, 2010a from D'Hondt *et al.*, 2004).

養実験と ^{13}C , ^{15}N 標識を用いた Stable-isotope probing (SIP) により、堆積物—水境界の原生生物の挙動理解 (e.g., Nomaki *et al.*, 2005, 2008, 2009; Takano *et al.*, 2010d), そして堆積物中で起きている原核生物の生物地球化学的動態を解説しようと試みている (Fig. 12). ^{13}C -トレーサーを分子レベルおよび分子内の部位的同位体組成で注意深く追跡することで、海洋堆積物に棲息するアーキアの新しい代謝の仕組みが見えつつある (Takano *et al.*, 2010c)。

7. 地下生物圏の限界と非生物圏での物質進化の可能性

原核生物が成育する温度や pH などの物理・化学条件の研究 (Rothschild and Mancinelli, 2001) とその記録更新は、まさに日進月歩である。成育温度についていえば、1997年に 113°C (Blochel *et al.*, 1997) へ、続いて 121°C へ (Kashefi and Lovley, 2003), 現在は 122°C (Takai *et al.*, 2008) とされる。温度以外にも地下の原核生物には、様々な制約がある。我々は、海底下の地下生物圏がどの深度まで広がっているか、という根源的な問題には、まだ答えられないが、ある境界を越えると、化学と物理のみが支配する無機的な「非生物圏」になることは、自明である (e.g., Hoehler, 2007)。

岩石と水の存在下で、超高压・超高温をかけると様々な揮発性成分や難揮発性成分が非生物的に生成することは、以前から知られている (e.g., Berndt *et al.*, 1996; 鈴木ほか, 2009)。大西洋中央海嶺の Lost City hydrothermal field から採取された炭化水素は、炭素・水素の同位体比 ($\delta\text{D} \cdot \delta^{13}\text{C}$) から Fischer-Tropsch 反応 (FT) に由来すると見積もられている (Proskurowski *et al.*, 2008)。すなわち、現世の物質進化 (化学進化) の痕跡らしい兆候が見えている。同じく Lost City の炭酸塩マウンドからは、蛇紋岩が育んでいる特異な生態系 (Kelly *et al.*, 2005) や生物起源の脂質成分が検出されている (Bradley *et al.*, 2009)。近年、様々な仮説に基づくモデル研究や、より厳密な条件下での実験による検証も進められている。初期生命の誕生とその揺らぎ期には、FT 反応や Strecker 反応に代表されるように、適切なエネルギー源と物質進化の反応場が、不可欠である (Martin *et al.*, 2008)。しかし、海底下深部の非生物圏で実際に有機物としての物質進化が起きているかどうかは、観測や検出の難しさもあり、厳密には不確かな点が多い。例えば、「アミノ酸」という有機化合物は、生物学的なプロセスと非生物学的なプロセス (化学的なプロセス) の両方で生成される。その両者をどう識別するか、というような新しい分析法 (e.g., Takano *et al.*,

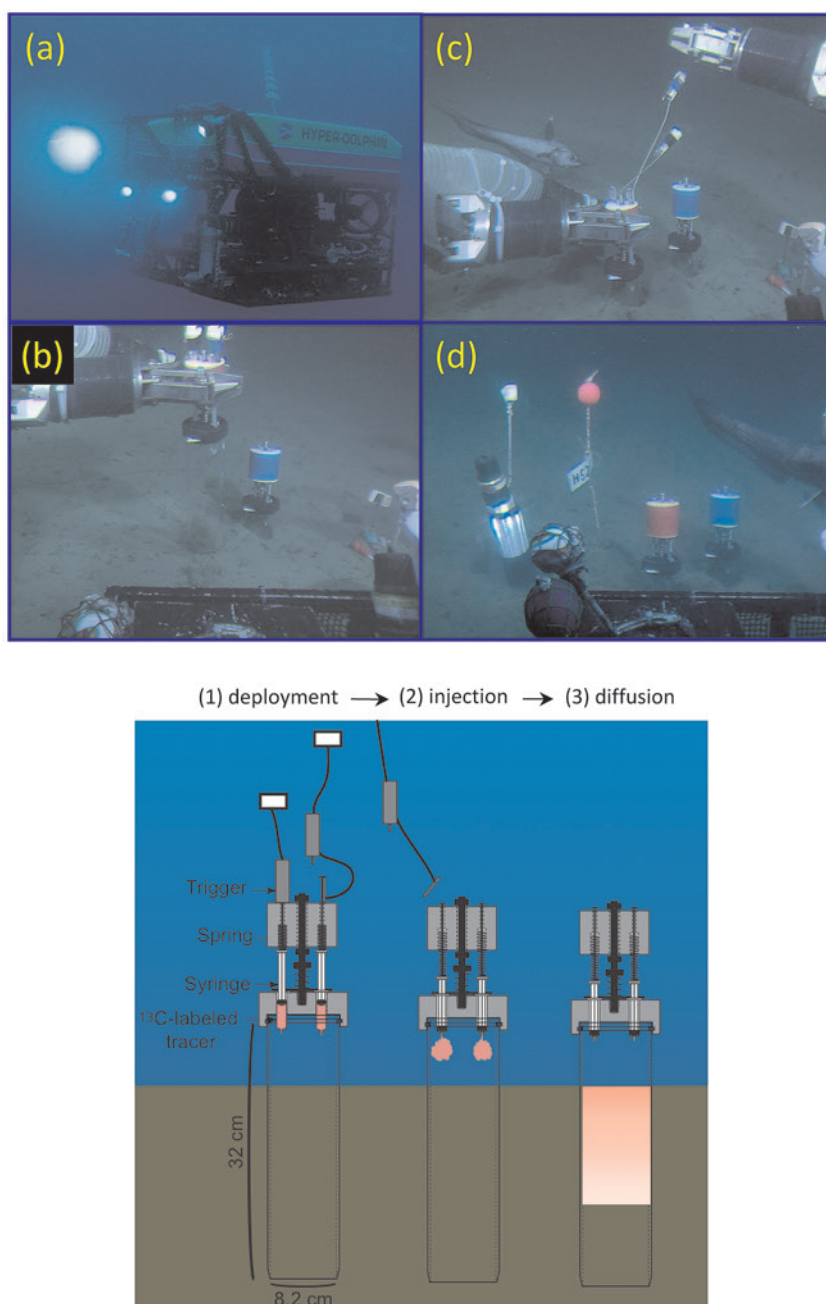


Fig. 12 Schematic apparatus of *in situ* incubation chamber and a photograph of the experimental setup captured by (a) the remotely operated vehicle *Hyper-Dolphin* (photo courtesy: H. Nomaki, JAM-STECC). (b) deployment of *in situ* incubation chamber in the deep sea sediment at Sagami Bay (1453 m below sea-level), (c) injection of stable isotope tracer (e.g., ^{13}C -, ^{15}N -substrate), (d) *in situ* ^{13}C -incubation experiment for 405 days (Takano *et al.*, 2010c).

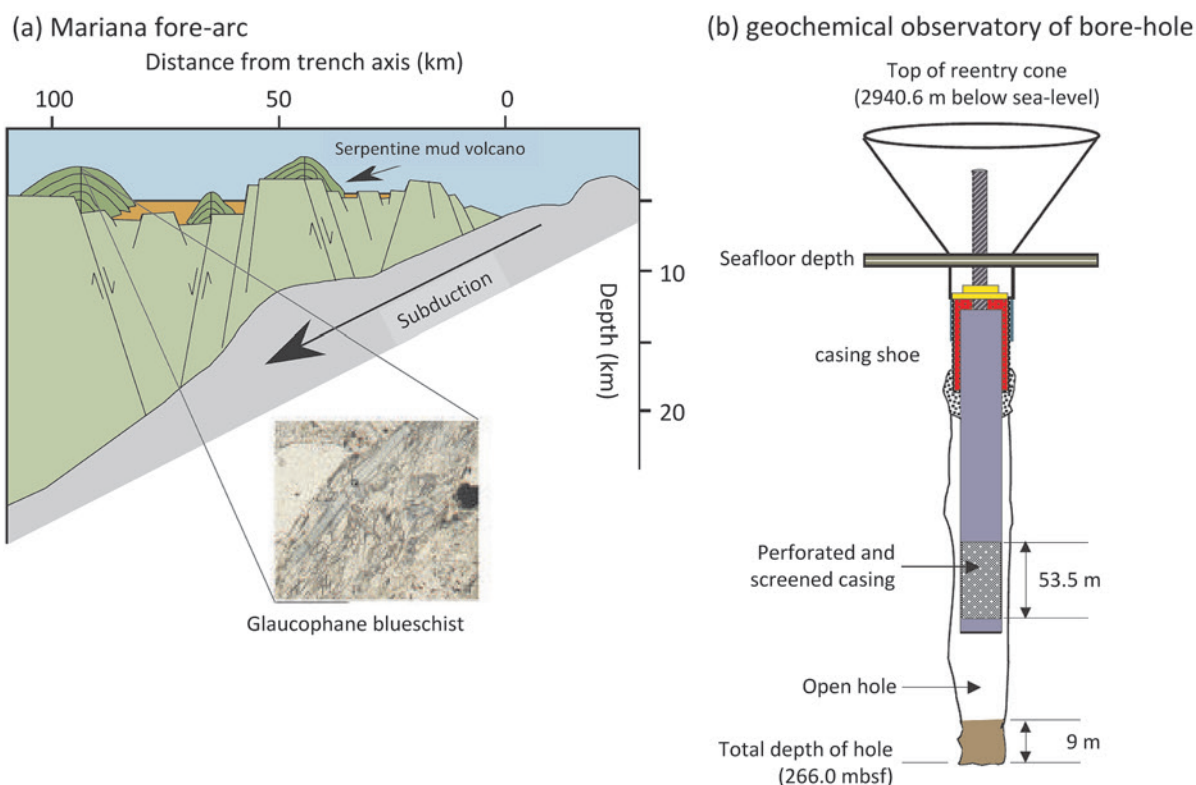


Fig. 13 (a) Geological setting of mud volcanoes in the Mariana fore-arc emit serpentinite and blueschist that derive from the mantle wedge and subducting plate, respectively. Mineral equilibria in blueschist clasts recovered during Leg 125 constrain the slab to be 150°C to 250°C at 16 km to 20 km. A borehole observatory was installed in one of the serpentinite mud volcanoes during ODP Leg 195 to provide fluid samples that derive from the subducting slab (Fryer *et al.*, 1999). (b) Casing configuration for the geochemical observatory installed in Hole 1200C on South Chamorro Seamount (Shipboard Scientific Party of Leg 195, 2002).

2009, 2010a, b) が必要になる。次いで、実際の深層掘削サンプル解析および物理化学モデルと統合した室内実験的アプローチが求められていることはいうまでもない (e.g., Takai *et al.*, 2006; McCollom and Seewald, 2007; Martin *et al.*, 2008; McCollom and Bach, 2009)。

今後、海底下の掘削孔内 (e.g., Shipboard scientific party Leg 195, 2002) を用いて、例えば、蛇紋岩海山の地殻内流体 (Fryer *et al.*, 1999; Hyndman and Peacock, 2003; Wheat *et al.*, 2008) のような化学的動態の把握と併せて、様々な実験的研究 (Fig. 13) が行われていくと予想される。海底下での具体的な科学的検証は、統合国際深海掘削計画 (IODP, <http://www.iodp.org/>), 国際陸上科学掘削計画 (ICDP, <http://www.interridge.org/>) のような大型プログラム等との連携が推進力となる。

8. おわりに

本総説では、最近明らかになってきた科学的証拠に基づいて、海底下の「地下生物圏」を概観した。ここで述べた、過去と現世のリンクを担う「生物地球化学プロセス (Biogeochemical process)」は、「原核生物の生態学 (Prokaryotic ecology)」, 「生命圏の限界 (Limit of life)」と並び、今後の重要な研究課題となろう。いずれもチャレンジングな研究であり、それらの体系的な解明には、新しい分析法・解析法の確立および異分野と有機的・複合的なリンクが必要になる。2009年にドイツ・ブレーメンで行われた IODP New Ventures in Exploring Scientific Targets (INVEST) や事前の国内会議では、Deep Biosphere を含めた様々な分野横断課題 (Interdisciplinary Subject) の目新しい議論が行われた (川幡ほか, 2010)。

また、純然とした基礎科学が果たすべき社会への還元という視点や具体的なアプローチも議論<<http://www.marum.de/iodp-invest.html>>されているので、そちらも併せて参照して頂きたい。

謝 辞

本稿は、北海道大学創成科学機構の斎藤 裕之 博士および1名の匿名研究者によって査読して頂き、有用なコメントを頂いた。海洋研究開発機構の山本啓之博士には、ウイルスに関して議論させて頂いた。本研究の一部は、科学研究費補助金 (Y. T., N. O., 19GS 0211) で行った。

引用文献

- Baker, E. T., Massoth, G. J., Feely, R. A., Cannon, G. A. and Thomson, R. E. (1998) The rise and fall of the CoAxial hydrothermal site, 1993-1996. *Journal of Geophysical Research-Solid Earth*, **103**, 9791-9806.
- Baker, E. and Urabe, T. (1996) Extensive distribution of hydrothermal plumes along the superfast spreading East Pacific Rise, 13°30'-18°40'S. *Journal of Geophysical Research-Solid Earth*, **101**, 8685-8695.
- Berndt, M. E., Allen, D. E. and Seyfried, W. E. (1996) Reduction of CO₂ during serpentinization of olivine at 300 degrees C and 500 bar. *Geology*, **24**, 351-354.
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hugler, M., Alber, B. E. and Fuchs, G. (2010) Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 447-460.
- Biddle, J. F., Lipp, J. S., Lever, M. A., Lloyd, K. G., Sorensen, K. B., Anderson, R., Fredricks, H. F., Elvert, M., Kelly, T. J., Schrag, D. P., Sogin, M. L., Brenchley, J. E., Teske, A., House, C. H. and Hinrichs, K. U. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3846-3851.
- Biddle, J., Fitz-Gibbon, S., Schuster, S., Brenchley, J. and House, C. (2008) Metagenomic signatures of the Peru Margin subsurface biosphere show a genetically distinct environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 10583-10588.
- Bishop, J. K. B. and Rossow, W. B. (1991) Spatial and temporal variability of global surface solar irradiance. *Journal of Geophysical Research*, **96**, 16839-16858. See also, International Satellite Cloud Climatology Project (ISCCP) from <http://isccp.giss.nasa.gov/>
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. and Stetter, K. O. (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles*, **1**, 14-21.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B. B., Witte, U. and Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **407**, 623-626.
- Bradley, A. S., Fredricks, H., Hinrichs, K. -U. and Summons, R. E. (2009) Structural diversity of diether lipids in carbonate chimneys at the Lost City Hydrothermal Field. *Organic Geochemistry*, **40**, 1169-1178.
- 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.
- Coolen, M. J. L., Abbas, B., van Bleijswijk, J., Hopmans, E. C., Kuypers, M. M. M., Wakeham, S. G. and Sinninghe Damste, J. (2007) Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environmental Microbiology*, **9**, 1001-1016.
- Corliss, J., Dymond, J., Gordon, L., Edmond, J., von Herzen, R., Ballard, R., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A. and Crane, K. (1979) Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, **203**, 1073-1083.
- DeLong, E. (1992) Archaea in Coastal Marine Environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 5685-5689.
- DeLong, E., Wu, K., Prezelin, B. and Jovine, R. (1994) High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature*, **371**, 695-697.
- DeLong, E. F. (2004) Microbial life breathes deep. *Science*, **306**, 2198-2200.
- D'Hondt, S., Inagaki, F., Ferdelman, T., Jorgensen, B., Kato, K., Kemp, P., Sobecky, P., Sogin, M. and Takai, K. (2007) Exploring Subseafloor Life with the Integrated Ocean Drilling Program. *Scientific Drilling*, **7**, 26-38.
- D'Hondt, S., Rutherford, S. and Spivack, A. (2002) Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, **295**, 2067-2070.
- D'Hondt, S., Jorgensen, B. B., Miller, D. J., Batzke, A., Blake, R., Cragg, B. A., Cypionka, H., Dickens, G. R., Ferdelman, T., Hinrichs, K. U., Holm, N. G., Mitterer, R., Spivack, A., Wang, G. Z., Bekins, B., Engelen, B., Ford, K., Gettemy, G., Rutherford, S. D., Sass, H., Skilbeck, C. G., Aiello, I. W., Guerin, G., House, C. H., Inagaki, F., Meister, P., Naehr, T., Niitsuma, S., Parkes, R. J., Schippers, A., Smith, D. C., Teske, A., Wiegel, J., Padilla, C. N. and Acosta, J. L. S. (2004) Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science*, **306**, 2216-2221.
- D'Hondt, S., Spivack, A., Pockalny, R., Ferdelman, T.,

- Fischer, J., Kallmeyer, J., Abrams, L., Smith, D., Graham, D. and Hasiuk, F. (2009) Subseafloor sedimentary life in the South Pacific Gyre. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 11651–11656.
- Edwards, K., Bach, W. and McCollom, T. (2005) Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *TRENDS in Microbiology*, **13**, 449–456.
- Engelen, B., Ziegelmuller, K., Wolf, L., Kopke, B., Gittel, A., Cypionka, H., Treude, T., Nakagawa, S., Inagaki, F. and Lever, M. (2008) Fluids from the oceanic crust support microbial activities within the deep biosphere. *Geomicrobiology Journal*, **25**, 56–66.
- Fisher, R. C., Takai, K. and Le Bris, N. (2007) Hydrothermal vent ecosystems -special issue feature. In: *Oceanography* (edited by Devey, W. C., Fisher, R. C. and Musek, M. K.), 14–171.
- Francis, C., Beman, J. and Kuypers, M. M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME Journal*, **1**, 19–27.
- Fredrickson, J. K. and Fletcher, M. (2001) Subsurface Microbiology and Biogeochemistry. Wiley-Liss Inc., New York, p. 341.
- Froelich, P., Klinkhammer, G., Bender, M., Luedtke, N., Heath, G., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B. and Maynard, V. (1979) Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **43**, 1075–1090.
- Fry, J., Parkes, R., Cragg, B., Weightman, A. and Webster, G. (2008) Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, **66**, 181–196.
- Fryer, P., Wheat, C. and Mottl, M. (1999) Mariana blueschist mud volcanism: Implications for conditions within the subduction zone. *Geology*, **27**, 103–106.
- 藤倉克則・丸山正・奥谷喬司 (2008) 潜水調査船がみた深海生物—深海生物研究の現在. 東海大学出版会, 1–487.
- Gay, A., Takano, Y., Gilhooly, III, W. P., Berndt, C., Heeschen, K., Suzuki, N., Saegusa, S., Nakagawa, F., Tsunogai, U., Jiang, S. Y. and Lopez, M. (2010) Geophysical and geochemical evidence of large scale fluid flow within shallow sediments in the eastern Gulf of Mexico, offshore Louisiana. *Geofluids*, in press.
- Gold, T. (1992) The Deep, Hot Biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 6045–6049.
- 原成光 (2006) 単細胞生物の死滅要因としてのウイルス. 海洋生命系のダイナミクス3—海洋生物の連鎖 (木暮一啓編). 東海大学出版会, pp. 145–161.
- Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G. and DeLong, E. F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, **398**, 802–805.
- Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Bach, W., Spivack, A. J., Hmelo, L. R., Holm, N. G., Johnson, C. G. and Sylva, S. P. (2006) Biological formation of ethane and propane in the deep marine subsurface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14684–14689.
- Hoehler, T. (2007) An energy balance concept for habitability. *Astrobiology*, **7**, 824–838.
- Hofmeister, A. and Criss, R. (2005) Earth's heat flux revised and linked to chemistry. *Tectonophysics*, **395**, 159–177.
- Hyndman, R. and Peacock, S. (2003) Serpentinization of the forearc mantle. *Earth and Planetary Science Letters*, **212**, 417–432.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K. and Horikoshi, K. (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 7224–7235.
- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M. and Colwell, F. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 2815–2820.
- 石野良純 (2009) 特集アーキア: 第3の不思議な生物. 蛋白質核酸酵素, **54**, 101–107.
- Jorgensen, B. and D'Hondt, S. (2006) Ecology: A starving majority deep beneath the seafloor. *Science*, **314**, 932–934.
- Jorgensen, B. and Boetius, A. (2007) Feast and famine-microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 770–781.
- Karner, M. B., DeLong, E. F. and Karl, D. M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, **409**, 507–510.
- Kashefi, K. and Lovley, D. R. (2003) Extending the upper temperature limit for life. *Science*, **301**, 934–934.
- 加藤千明・高井研 (2000) 深海極限世界の微生物. 宇宙生物科学, **14**, 341–352.
- 加藤憲二・永翁一代 (2005) 地下生物圏. 地学雑誌, **114**, 434–444.
- 川幡穂高・INVEST 国内運営委員会 (2010) IODP, INVEST 会議国内報告書. 月刊地球, **32**, 67–70.
- Kelley, D. S., Karson, J. A., Fruh-Green, G. L., Yoerger, D. R., Shank, T. M., Butterfield, D. A., Hayes, J. M., Schrenk, M. O., Olson, E. J., Proskurowski, G., Jakuba, M., Bradley, A., Larson, B., Ludwig, K., Glickson, D., Buckman, K., Bradley, A. S., Brazelton, W. J., Roe, K., Elend, M. J., Delacour, A., Bernasconi, S. M., Lilley, M. D., Baross, J. A., Summons, R. T. and Sylva, S. P. (2005) A serpentinite-hosted ecosystem: The lost city hydrothermal field. *Science*, **307**, 1428–1434.

- Kimura, H., Asada, R., Masta, A. and Naganuma, T. (2003) Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea: *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 644–648.
- 古賀洋介・亀倉正博 (1998) 古細菌の生物学. 東京大学出版, 1–301.
- Koga, Y. and Morii, H. (2007) Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **71**, 97–120.
- Koga, Y. and Nakano, M. (2008) A dendrogram of archaea based on lipid component parts composition and its relationship to rRNA phylogeny. *Systematic and Applied Microbiology*, **31**, 169–182.
- Konneke, M., Bernhard, A., Jose, R., Walker, C., Waterbury, J. and Stahl, D. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, **437**, 543–546.
- Kormas, K., Smith, D., Edgcomb, V. and Teske, A. (2003) Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS microbiology ecology*, **45**, 115–125.
- Lipp, J. S., Morono, Y., Inagaki, F. and Hinrichs, K. -U. (2008) Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*, **454**, 991–994.
- Lipp, J. and Hinrichs, K. (2009) Structural diversity and fate of intact polar lipids in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 6816–6833.
- Lonsdale, P. (1977) Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Research*, **24**, 857–858.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parler, J. (2003) Brock Biology of Microbiology, Pearson Education, Inc.
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D. and Russell, M., (2008) Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 805–814.
- 丸山明彦・浦辺徹郎 (2003) 海底熱水系地下生物圏へのアプローチ. 地学雑誌, **112**, 309–322.
- McCollom, T. and Bach, W. (2009) Thermodynamic constraints on hydrogen generation during serpentinization of ultramafic rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 856–875.
- McCollom, T. M. and Seewald, J. S. (2007) Abiotic synthesis of organic compounds in deep-sea hydrothermal environments. *Chemical Reviews*, **107**, 382–401.
- Middelboe, M. and Jorgensen, N. (2006) Viral lysis of bacteria: an important source of dissolved amino acids and cell wall compounds. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **86**, 605–612.
- Muller, R., Sdrolias, M., Gaina, C. and Roest, W. (2008) Age, spreading rates, and spreading asymmetry of the world's ocean crust. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, **9**, Q04006, doi: 10.1029/2007 GC001743.
- 村上由紀・長沼毅 (2000) 地下深部に広がる微生物ハビタット—深部地下生物圏—. *Microbes and Environment*, **15**, 125–131.
- Morono, Y., Terada, T., Masui, N. and Inagaki, F. (2009) Discriminative detection and enumeration of microbial life in marine subsurface sediments. *ISME Journal*, **3**, 503–511.
- 長沼毅 (2003) 極限生物圏. 地学雑誌, **112**, 226–233.
- Nakagawa, F., Tsunogai, U., Yoshida, N. and Adams, D. D. (2003) Stable isotopic compositions of bacterial light hydrocarbons in marginal marine sediments. Land and marine hydrogeology (Eds., M. Taniguchi, K. Wang, and T. Gamo). Elsevier Science, pp. 141–150.
- Neidhardt, F. (1996) *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Washington DC.
- Newberry, C., Webster, G., Cragg, B., Parkes, R., Weightman, A. and Fry, J. (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environmental Microbiology*, **6**, 274–287.
- Nicol, G. and Schleper, C. (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *TRENDS in Microbiology*, **14**, 207–212.
- Nomaki, H., Heinz, P., Nakatsuka, T., Shimanaga, M. and Kitazato, H. (2005) Species-specific ingestion of organic carbon by deep-sea benthic foraminifera and meiobenthos: in situ tracer experiments. *Limnology and Oceanography*, **50**, 134–146.
- Nomaki, H., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N., Suga, H., Toyofuku, T., Shimanaga, M., Nakatsuka, T. and Kitazato, H. (2008) Benthic foraminifera as trophic links between phytodetritus and benthic metazoans: carbon and nitrogen isotopic evidence. *Marine Ecology-Progress Series*, **357**, 153–164.
- Nomaki, H., Ohkouchi, N., Heinz, P., Suga, H., Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Matsumoto, K. and Kitazato, H. (2009) Degradation of algal lipids by deep-sea benthic foraminifera: an in situ tracer experiment. *Deep Sea Research Part I*, **56**, 1488–1503.
- Nunoura, T., Soffientino, B., Blazejak, A., Kakuta, J., Oida, H., Schippers, A. and Takai, K. (2009) Subseafloor microbial communities associated with rapid turbidite deposition in the Gulf of Mexico continental slope (IODP Expedition 308). *FEMS Microbiology Ecology*, **69**, 410–424.
- Okutani, T. and Egawa, K. (1985) The first underwater observation on living habitat and Thanatocoenoses of Calyptogenia soyoe in bathyal depth of Sagami Bay. *Venus*, **44**, 285–289.
- Ouverney, C. C. and Fuhrman, J. A. (2000) Marine planktonic Archaea take up amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4829–4833.
- Orphan, V., House, C., Hinrichs, K., McKeegan, K. and DeLong, E. (2001) Methane-Consuming Archaea Revealed by Directly Coupled Isotopic and Phylogenetic Analysis. *Science*, **293**, 484–487.

- Parkes, R., Cragg, B., Bale, S., Getliff, J., Goodman, K., Rochelle, P., Fry, J., Weightman, A. and Harvey, S. (1994) Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*, **371**, 410–413.
- Parkes, R. J., Cragg, B. A. and Wellsbury, P. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in sub-seafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal*, **8**, 11–28.
- Parkes, R., Webster, G., Cragg, B., Weightman, A., Newberry, C., Ferdelman, T., Kallmeyer, J., J rgensen, B., Aiello, I. and Fry, J. (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature*, **436**, 390–394.
- Pearson, A. (2008) Who lives in the sea floor? *Nature*, **454**, 952–953.
- Pedersen, K. and Ekendahl, S. (1990) Distribution and activity of Bacteria in deep granitic groundwaters of south-eastern Sweden. *Microbial Ecology*, **20**, 37–52.
- Pedersen, K. (1993) The deep subterranean biosphere. *Earth-Science Reviews*, **34**, 243–260.
- Pedersen, K. (1997) Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiology Reviews*, **20**, 399–414.
- Pietzsch, J. (2004) Mind the membrane. *Nature*.
<<http://www.nature.com/horizon/livingfrontier/background>>
- Pollack, H., Hurter, S. and Johnson, J. (1993) Heat flow from the Earth's interior: analysis of the global data set. *Reviews of Geophysics*, **31**, 267–280.
- Price, P. B. and Sowers, T. (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 4631–4636.
- Proskurowski, G., Lilley, M. D., Seewald, J. S., Fruh-Green, G. L., Olson, E. J., Lupton, J. E., Sylva, S. P. and Kelley, D. S. (2008) Abiogenic hydrocarbon production at Lost City hydrothermal field. *Science*, **319**, 604–607.
- Reed, D., Fujita, Y., Delwiche, M., Blackwelder, D., Sheridan, P., Uchida, T. and Colwell, F. (2002) Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3759–3770.
- Reysenbach, A. -L. and Cady, S. L. (2001) Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *TRENDS in Microbiology*, **9**, 79–86.
- Rohwer, F. and Thurber, R. V. (2009) Viruses manipulate the marine environment. *Nature*, **459**, 207–212.
- Roussel, P. E., Lipp, J. S., Fredricks, H. F., Arnds, J., Boetius, A., Elvert, M. and Hinrichs, K. -U. (2008) Intact polar lipids of anaerobic methanotrophic archaea and associated bacteria. *Organic Geochemistry*, **39**, 992–999.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001) Life in extreme environments. *Nature*, **409**, 1092–1101.
- Roussel, E. G., Cambon-Bonavita, M. A., Querellou, J., Cragg, B. A., Webster, G., Prieur, D. and Parkes, R. J. (2008) Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science*, **320**, 1046–1046.
- Schippers, A., Neretin, L. N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T. G., Cragg, B. A., Parkes, R. J. and Jorgensen, B. B. (2005) Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature*, **433**, 861–864.
- Schrenk, M., Huber, J. and Edwards, K. (2010) Microbial Provinces in the Subseafloor. *Annual Review of Marine Science*, **2**, 279–304.
- Shipboard Scientific Party of IODP Exp 308 (2006) “Gulf of Mexico Hydrogeology: Overpressure and fluid flow processes in the deepwater Gulf of Mexico: slope stability, seeps, and shallow-water flow, *Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program (IODP)*, Vol. 308, College Station TX (Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc.). doi: 10.2204/iodp.proc.308.101.2006.
- Shipboard Scientific Party of Leg 195 (2002) Leg 195 Summary. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Initial Reports*, **195**, 1–63.
- Shipboard Scientific Party of Leg 201 (2003) Controls on microbial communities in deeply buried sediments, eastern Equatorial Pacific and Peru Margin sites 1225–1231, *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Initial Reports*, **201**, 1–81.
- Sinninghe Damste, J. S. S., Schouten, S., Hopmans, E. C., van Duin, A. C. T. and Geenevasen, J. A. J. (2002) Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *Journal of Lipid Research*, **43**, 1641–1651.
- Sorensen, K., Lauer, A. and Teske, A. (2004) Archaeal phylogenotypes in a metal-rich and low-activity deep subsurface sediment of the Peru Basin, ODP Leg 201, Site 1231. *Geobiology*, **2**, 151–161.
- Sorensen, K. and Teske, A. (2006) Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4596–4603.
- Stevens, T. and McKinley, J. (1995) Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science*, **270**, 450–454.
- Sturt, H. F., Summons, R. E., Smith, K., Elvert, M. and Hinrichs, K. U. (2004) Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry - new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 617–628.
- Summit, M. and Baross, J. (2001) A novel microbial habitat in the mid-ocean ridge subseafloor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 2158–2163.
- 鈴木勝彦・中村謙太郎・加藤真吾・山岸明彦 (2009) 海底熱水循環系の生物地球化学的理解に向けた実験的アプローチ.

- 地学雑誌, **118**, 1131–1159.
- 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 hydrothermal field. *Extremophiles*, **8**, 269–282.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T. and Horikoshi, K. (2008) Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 10949–10954.
- Takai, K., Nakamura, K., Suzuki, K., Inagaki, F., Nealson, K. H. and Kumagai, H. (2006) Ultramafics-Hydrothermalism-Hydrogenesis-HyperSLiME (UltraH³) linkage: a key insight into early microbial ecosystem in the Archean deep-sea hydrothermal systems. *Paleontological research*, **10**, 269–282.
- 高井研・稲垣史生 (2003) 地殻内微生物圏と熱水活動. 地学雑誌, **112**, 234–249.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, O. N., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2009) Compound-specific nitrogen isotope analysis of D-, L-alanine and valine: application of diastereomer separation to $\delta^{15}\text{N}$ and microbial peptidoglycan studies. *Analytical Chemistry*, **81**, 394–399.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010a) Enantiomer-specific isotope analysis (ESIA) of D- and L-alanine: nitrogen isotopic hetero- and homogeneity by microbial process and chemical process. *Earth, Life, and Isotopes* (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba). Kyoto University Press, pp. 387–402.
- Takano, Y., Kashiya, Y., Ogawa, O. N., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010b) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Communication of Mass Spectrometry*, **24**, 2317–2323.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, O. N., Nomaki, H., Morono, Y., Inagaki, F., Kitazato, H., Hinrichs, K. -U. and Ohkouchi, N. (2010c) Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nature Geoscience*, **3**, 858–861.
- 高野淑識・力石嘉人・大河内直彦 (2010d) 微量湿式分析による分子レベル同位体比の品質管理と確度向上：特に天然存在比の正確な評価と Stable Isotope Probing (SIP) 法の応用に向けて. *Researches in Organic Geochemistry*. In press.
- 平朝彦 (2005) マントル生命を探せ—「ちきゅう」の挑戦—. 石油技術協会誌, **70**, 305–314.
- Teske, A. P. (2006) Microbial communities of deep marine subsurface sediments: Molecular and cultivation surveys. *Geomicrobiology Journal*, **23**, 357–368.
- Teske, A. and Sorensen, K. B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME Journal*, **2**, 3–18.
- 浦辺徹郎・丸山明彦・丸茂克美・島伸和・石橋純一郎 (2005) アーキアン・パーク計画が明らかにしたもの. 海の研究, **14**, 129–137.
- 浦辺徹郎・沖野郷子・砂村倫成・石橋純一郎・高井研・鈴木勝彦 (2009) 海底下の大河—海洋地殻内熱水循環の多様性と生物地球化学プロセス—. 地学雑誌, **118**, 1027–1036.
- Valentine, D. L., (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 316–323.
- Vardi, A., Van Moo-y, B. A. S., Fredricks, H. F., Pependorf, K. J., Ossolinski, J. E., Haramaty, L. and Bidle, K. D. (2009) Viral glycosphingolipids induce lytic infection and cell death in marine phytoplankton. *Science*, **326**, 861–865.
- Wheat, C., Fryer, P., Fisher, A., Hulme, S., Jannasch, H., Mottl, M. and Becker, K. (2008) Borehole observations of fluid flow from South Chamorro Seamount, an active serpentinite mud volcano in the Mariana forearc. *Earth and Planetary Science Letters*, **267**, 401–409.
- Webster, G., Parkes, R., Cragg, B., Newberry, C., Weightman, A. and Fry, J. (2006) Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS microbiology ecology*, **58**, 65–85.
- Wellsbury, P., Mather, I. and Parkes, R. (2002) Geomicrobiology of deep, low organic carbon sediments in the Woodlark Basin, Pacific Ocean. *FEMS microbiology ecology*, **42**, 59–70.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. and Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 6578–6583.
- Wuchter, C., Schouten, S., Boschker, H. T. S. and Sinninghe Damsté, J. S. S. (2003) Bicarbonate uptake by marine Crenarchaeota. *FEMS Microbiology Letters*, **219**, 203–207.