

# 拓洋第5海山における海洋性マンガングラストの微生物群集解析

○仁田原 翔太・加藤 真悟・山岸 明彦、NT09-02 航海乗船研究員一同（東京薬科大学大学院 生命科学研究所）

## 【背景・目的】

海底面には、鉄やマンガン酸化物の沈着物がしばしば観察される。これらの鉄-マンガン酸化物を被覆した岩石は、マンガングラストもしくはマンガノジュールと呼ばれる。これらのマンガングラストやマンガノジュールは、深さ 5~6 km の海底面の 70% を覆っていると推定されている (Rona 2003)。

Santelli らは、東太平洋から採取したマンガングラストの微生物群集を、16S rRNA 遺伝子を用いて解析し、そこに非常に多様な微生物が  $10^7$  から  $10^9$  cells/g と豊富に存在していることを示した (Santelli et al. 2008)。

しかしマンガングラスト上の微生物群集の解析例は 1 サンプルのみについてしかないため、マンガングラスト上の微生物の多様性、その群集構造、存在量についての一般性について議論できない。そこで、拓洋第5海山から水深を変えて、マンガングラストを採取し、解析することで、マンガングラスト上の微生物の群集組成、多様性、存在量また、深さごとの微生物の分布について明らかにすることを目的とする。

## 【方法】

2009年2月に行われたNT09-02航海において、拓洋第5海山からマンガングラストやノジュール、周辺海水、堆積物を採取した。採取深度は1200 m、1419 m、2209 m、2991 mである。

これらの試料からDNAを抽出し、原核生物と古細菌それぞれの16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーとアンモニアモノオキシゲナーゼ、 $\alpha$ -サブユニット遺伝子 (*amoA*) に特異的なプライマーを用いてPCR増幅を行った。その増幅産物をもとにクローンライブラリーを作成した。ランダムに選択したクローンの塩基配列を決定し、得られた配列情報をもとに分子系統解析を行い、微生物群集組成や多様性を決定した。また、定量PCRを用いて、真正細菌と古細菌の16S rRNA遺伝子および*amoA*遺伝子のコピー数を決定した。

## 【結果・考察】

定量PCRの結果、マンガングラスト中に真正細菌と古細菌はそれぞれ、 $10^7$ ~ $10^8$  cells/g程度存在することがわかった。4つのマンガングラスト試料のうち、3つにおいて古細菌の比率が高く(50~83%)、マンガングラストの微生物群集において古細菌が大きな割合を占めることが示された。また*amoA*遺伝子に着目すると、4つのマンガングラスト試料のうち3つにおいて、真正細菌と古細菌の*amoA*遺伝子のコピー数は同程度であった(24-44%)。それにもかかわらず、堆積物中では真正細菌の*amoA*遺伝子の方のコピー数が多かった(92-96%)。

各深度でのマンガングラストの微生物群集組成を種レベル(相同性 97%以上)での系統型で比較した結果、*Nitrosospira*属に近縁な系統型、Marine Group Iに属する系統型が深度にかかわらず共通して検出された。特にMarine Group Iは各マンガングラスト試料から多く検出された(11-25%)。これらは独立栄養性アンモニア酸化菌が属するグループである。つまり、これらのアンモニア酸化菌がマンガングラスト上において、一次生産者としての役割を担っていることが示唆された。

同じ水深から得られたマンガンクラスト、堆積物と周辺海水とで種レベルで系統型を比較すると、マンガンクラストや堆積物の固形試料と海水試料とで、ほとんど共通の系統型は存在しなかった(0-2種)。マンガンクラスト、堆積物、周辺海水から検出された Marine Group I について系統樹を作成し、系統型を比較してみると、固形試料と海水試料それぞれから検出された Marine Group I は、別々のクラスターを形成した。また、固形試料中の Marine Group I でもいくつかのクラスターに分かれた。これらのことから、海水中に存在するものとは異なる、様々なサブグループの Marine Group I がマンガンクラスト上に存在することが示唆された。

古細菌の *amoA* 遺伝子を BLAST 検索したところ、既知のアンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子と非常に相同性が高かった (95-98%)。これらの配列を元に系統樹を作成し得られた配列を既知の配列と比較したところ、16S rRNA 遺伝子の解析結果と同様に、固形試料と海水試料では別のクラスターを作った。また固形試料はいくつかのクラスターに分かれ、その中には既知配列が含まれないようなクラスターもあった。

真正細菌の *amoA* 遺伝子を BLAST 検索した結果、すでに培養された種の *amoA* 遺伝子との相同性は 80-85%であった。また、系統樹を作成したところ既知の *amoA* 遺伝子とは別のクラスターを形成した。これらのことから、未培養の新しいアンモニア酸化細菌がマンガンクラスト上に存在することが示唆された。

#### 【参考文献】

Rona PA (2003) Geology. Resources of the sea floor. *Science* 299: 673-674.

Santelli CM, Orcutt BN, Banning E, Bach W, Moyer CL, Sogin ML, Staudigel H & Edwards KJ (2008) Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* 453: 653-656.