

地下生物圏

加藤 憲二 永翁 一代*

Expanding Subsurface Biosphere

Kenji KATO and Kazuyo NAGAOSA*

Abstract

Ocean Drilling Program (ODP) revealed that huge amount of bacteria exists in subsurface environment which extends probably up to 1.5 km beneath the seafloor, and a recent study suggests that this extends in continental subsurface as well. A study in shallow aquifer shows that bacteria exhibit high activity under the environmental constraint. Dynamic interaction between microorganisms and the Earth will be soon unveiled, which may enforce us to rewrite evolution of life and its interaction with the development of the Earth environment.

Key words : subsurface biosphere, microbes, oxygen constraint

キーワード : 地下生物圏, 微生物, 酸素制限

I. 地下圏に旺盛な生命活動があるということ

およそ10年前のことになる。アメリカ合衆国が保有するジョイデス・レゾリューション号を用いた海底掘削研究 (<http://www.oceandrilling.org/Default.html>) の一連の流れの中で、ジョン・パークスら地球化学者たちが、掘り出される掘削コアの中に細菌様の粒子を認め、これを計数したところ、海底下数百メートルに至っても、 1 cm^3 あたり 10^{6-8} 細胞の細菌がいることが明らかになった。この密度は海洋のそれを遙かに上回る。成果が世に出たのは1994年のことである (Parkes *et al.*, 1994)。細菌の計数方法は至極簡単である。堆積コアから間隙水を絞り出し、核酸染色剤を加えて染色する。高倍率の蛍光顕微鏡下で、直径が $0.5 \sim 2.3 \mu\text{m}$ でスムーズな形態をした、つまり細胞と認められそうな粒子の数を数えるのである。直接計数法である。海底下1000 mにも細菌が存在するという、私達の地球観や生

命観を打ち破る発見が世に示されたわけである。それを支持するように、海底下1.5 km位までは生命圏が存在するだろうという論文も出ている (Summit and Baross, 2001)。

ドイツ人口ベルト・コッホが1881年に平板培養法を確立して以来、この培養法をもとにした細菌計数法が細菌数の定量の主要な方法であった。しかしながら、この方法では自然界の細菌のごく一部分しか把握することができない。自然環境とかけ離れた培養条件を用いていることや、固相の培地の上で一定期間内に増殖し、目で見ることが出来るほどの大きさのコロニーを形成することが計数の条件であるなど、自然界の細菌の生態とはあまりにもかけ離れた条件で培養し、増殖させるというバイアスがかかるからである (Colwell and Grimes, 2004)。そのことが明らかになったのは、パークスたちも用いた直接計数法が1977年に確立されたことによる。直接計数法で得られた値は、培養法のそれに比べて100倍以上にも

* 静岡大学理学部地球科学教室

* Institute of Geosciences, Shizuoka University

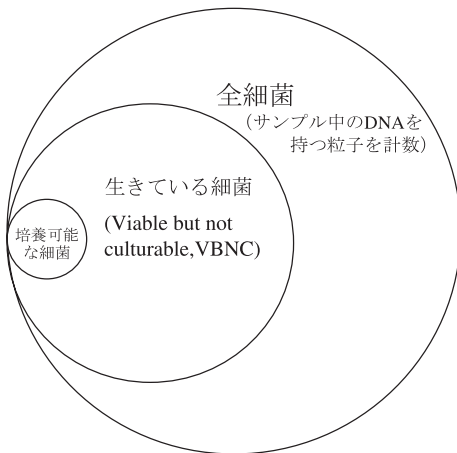


図 1 自然界の細菌群集のイメージ。高倍率の顕微鏡下で計数される全菌数の1%ほどしか培養できない。生きているが培養できない(VBNC)細菌が自然界には多数存在する。

Fig. 1 A conceptual figure of natural bacterial community by means of employed techniques.

成るのである。図1に自然界の細菌群集の構成についての概念図を示す(加藤, 1999)。しかしながら直接計数法にも大きな弱点がある。核酸(特にDNA)を持った細菌が存在しているが、それが生きているのか死んでいるのかが判定できないのである。その細菌は現場で活性を發揮しているのかどうかはわからない。しかしながら、パークスたちの発見は、地下に膨大な細菌バイオマスが存在することを示したことに違いはない。地球上の全海洋に勝るとも劣らない微生物の世界が地下圏に存在していた。

II. 生命活動には水が必要

細胞がエネルギーを作り出し、生合成を行う酵素反応には水が必須である。火星に生命が存在するか、ということも水があるのか、が最大の問題であった。2004年1月から始まったローバー(探査車)による調査で、かつて火星に大量の水があったことを示唆する河川地形が残されていることが明らかになり、また海中での沈殿で出来た可能性のあるジャロサイト(酸化鉄に水酸イオンと硫酸イオンが結びついた)がある地域での基盤

岩であると推察されるなど、火星には水があった可能性を示唆する報告が続いている。生命は存在した、であろう。では、それらは今、どこに、どのような形で残っているのか? 新しい問いかけと、その答えに向けたチャレンジが始まっている(残念ながら日本は、このチャレンジに乗り遅れているが)。

海底下1.5 km位までは生命圏が存在するだろうと予測する先のSummit and Baross(2001)の論文でも、間隙率から推定した海水の潜り込みに関する考察が推論の基礎となっている。マントルの中に水が潜り込むことなども議論されているが(上田ほか, 2002)、大陸の地下圏ではどうだろうか。水に関して直接ふれられていないが、アメリカ合衆国バージニア州の地下2800 mのガス帯(炭化水素の貯蔵庫)から細菌の分布と細菌による活性が認められるという報告がある(Onstott *et al.*, 1997)。コアサンプルを切り出し、細菌の存在を示唆する細胞成分であるリン脂質の分析や、細菌の培養法や直接計数法による計数を行った結果、コア1 gあたり 10^5 の細菌が存在することが示唆された。炭化水素の貯蔵庫の形成は微生物作用に依るところが大きいことを示している。水無くしてこのような微生物活動は営まれないだろう。

III. 酸素のない世界で

全海洋にも匹敵する膨大な細菌のバイオマスを抱えた生態系が、なぜ地下に存在するのだろうか? この問いを考えるには、細菌(bacteria)、つまりドメイン・バクテリア(domain Bacteria, 真正細菌にほぼ相当)とドメイン・アーキア(domain Archaea, 古細菌)から成る原核生物(Prokaryote)が、真核生物(domain Eukarya)とどのように異なるのかを整理しておく必要がある(表1)。

原核生物は小さい細胞からできていて、核やミトコンドリアあるいは葉緑体というような細胞内小器官をもたない。また、単細胞で、一般に有性生殖を行わないなどの特徴があるが、際だっているのは、そのエネルギー獲得様式の多様さであ

表 1 細菌の真核生物との対比 .

Table 1 Comparison of bacterial characteristics with eukaryote.

	原核生物 (細菌)	vs.	真核生物
細胞の大きさ	0.2 ~ 2 3 μm が一般的 (中には 10 μm に及ぶものもある).		一般に 10 ~ 100 μm .
DNA 体制	二重の膜に囲まれずむき出しである . 単細胞 .		二重の膜(核膜)に囲まれた核の中にある . 単細胞, 多細胞 .
増殖	一般に有性生殖は行わない .		有性生殖が一般的である (生殖隔離がおこなわれる).
細胞質 (原形質) 流動	行わない .		食作用, 飲作用, 原形質流動など細胞質流動を行う .
エネルギー代謝	きわめて多様 . 偏性(絶対)嫌気性, 好気性, 通性嫌気性 (酸素分圧によって代謝様式をスイッチする).		全ての生物が好気性 (一時的に嫌気呼吸することはある). 全ての生物が, エムデン・マイエルホーフ回路, クレブス回路, 水素伝達系をもつ . クレブス回路と水素伝達系はミトコンドリアに含まれる .
光合成	酸素発生型と酸素非発生型がある . いずれも葉緑体のような細胞内構造は持たない .		全て酸素発生型 . 光合成を行うものはその酵素を膜で囲まれた葉緑体の中に含む .
化学合成	これを行うことが出来るものがある . 炭素源は酵素 (Rubisco など) により CO_2 を固定する .		おこなわない .

る。生息環境としての地下圏を考える場合に重要となる原核生物の特徴は、エネルギー生産に（つまり生存に）酸素を必要としない生物群が存在することが重要な意味をもつ。

森林は言うにおよばず、海洋も河川や湖沼も、そして私たち人類が生存する物質系も太陽がもたらす光エネルギーを駆動力としている。光エネルギーを用いて二酸化炭素を固定し、これを電子供与体であり炭素源でもある有機物に変換する光合成に、その生存基盤を負っている。加えてその光合成は、水を光分解する過程で分子状酸素を環境中に供給している。

しかし、本稿で説明する地下圏の生態系には光は届かない。酸素の供給は、地上との水、あるいは空気による運搬に限られるので、地下へと浸透した水が酸素を持ち込まない限り、自ずと環境は嫌氣的になる（逆に、酸素を含んだ水が速やかに地下に浸透すれば、そこは一次的であれ酸化のな

環境になる）。地表の生態系では、富栄養化の進んだ海洋の沿岸や湖沼の底泥などでしか見ることのない微生物が地下圏では主役となる。

IV . 嫌氣的環境下での細菌のエネルギー代謝

底泥にたまった有機物を炭素源にすると同時に電子供与体として使い、硫酸を電子受容体としてこれを還元する硫酸還元細菌が嫌氣的環境下での代表的なエネルギー代謝系である。地下圏での硫酸の供給については海由来の堆積層が存在すれば、大きな供給源となる（村上ほか, 2003）。

さらに還元的なより深いところでは有機物分解の最終分解段階として有機物をメタンに変換するメタン生成古細菌がいる。地下の堆積層においても、地球表層の海洋や土壌の生態系から供給される有機物を、酸素を用いずに利用するこれらの細菌群が存在する。

生物の系統関係の議論は解析にかかる費用と時

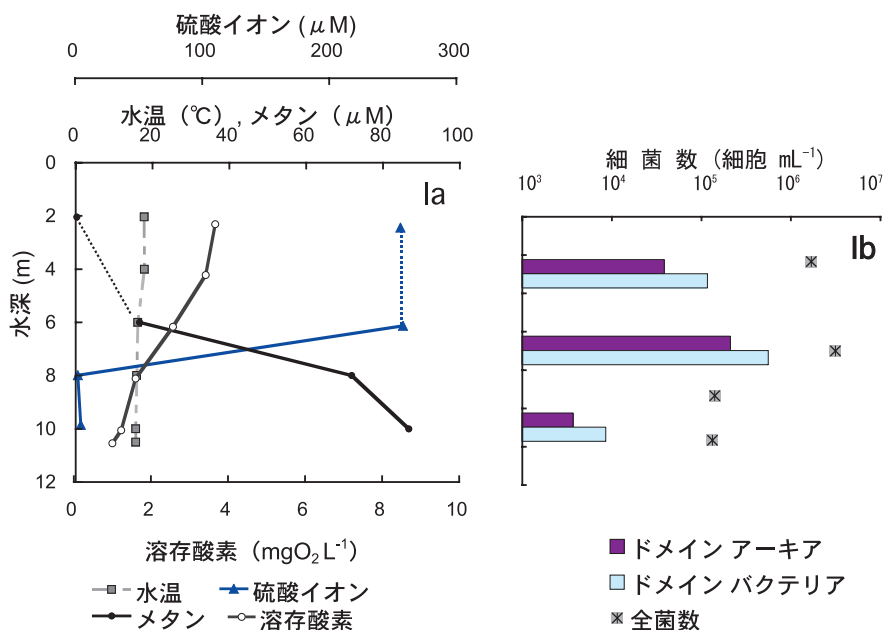


図 2 浅い地下圏帯水層の掘削井に形成される環境 (茨城, 2003.8.19, 未発表).

Fig. 2 Environment given by coring in a shallow aquifer.

間のコストから、非常に小さな DNA や RNA の断片を対象とした系統樹を用いるのが一般的である。生物界の多様性の議論や、極限環境に未知の細菌がたくさん存在することなども、これによって議論されている (Pace, 1997)。しかしながら、細菌では様々な生物を対象として機能遺伝子の解析が進み、それらの生物間での分布から、より信頼度の高い系統関係が示され始めた。ゲノム解析による進化研究である。還元的な極限環境における硫酸還元とメタン生成 (発酵) というふたつの代表的なエネルギー代謝を行うそれぞれの細菌の系統関係について、硫酸還元がより古い代謝系ではないかという興味深い報告がゲノム解析に基づいて発表された (House *et al.*, 2003)。地球環境の変化と生命の進化を考える上で興味深く、重要な知見である。

V. 低酸素環境と化学合成

地下圏では有機物を基質として用いる嫌気的な従属栄養細菌が活躍すると書いたが、その少し上方、およそ 0.1 mgO₂/L (1L あたり 0.1 mg の分

子状酸素が存在する濃度) から 1.5 mgO₂/L の範囲の低濃度に酸素が存在する微好気的な環境下で、鉄酸化や硫酸化あるいはメタンの酸化反応が進行する (Kato *et al.*, 2004)。これらの反応を担うのが、光合成と同様に二酸化炭素を炭素源として固定し、分子状酸素を電子受容体とする化学合成細菌 (Chemolithotrophic bacteria) である (分子状酸素の代わりに硫酸イオンを用いるメタン酸化の例も自然界で報告されている (Boetius *et al.*, 2000))。有機物に依存しない化学合成細菌の活動は、必然的に地球化学反応のかなり重要な部分を占めると考えられる。つまり、地下圏でも特に堆積層では細菌による変性作用が延々と続いていると考えられる。

ペダーセンのチームは、スウェーデンにおける地下圏での研究から溶存酸素濃度 1.0 ~ 1.5 mgO₂/L で細菌による鉄の酸化反応を進めることを見だしている (Anderson and Pedersen, 2003)。また、花崗岩中の地下水では硫酸の酸化還元にかわって鉄の酸化還元が活発に行われている可能性が高いことも指摘されている (村上ほか, 2003)。

硫酸酸化やメタン酸化は、深海底の熱水噴出孔や冷湧水が浸出する周辺に形成される、光に全く依存しない生態系の一次生産者としても知られているが、地下圏生態系の一次生産者でもある。深さ方向で考えると、酸素濃度の減少がすみ、0.1 ~ 1.5 mgO₂/L になり、電子供与対となる硫化水素などの還元物質が存在すると、化学合成細菌が盛んに活動する。その結果酸素濃度はさらに減少して、無酸素状態になると、有機物を用いる硫酸還元菌が登場し、さらにその下部では有機物分解の最終段階としてのメタン発酵が行われることになる。

VI . 地下水が作り出す環境と細菌の分布

地下環境の微生物研究は、培養に依らずに遺伝子によって細菌を系統分類する研究が過去 10 年間、世界中でさかんに行われた (Inagaki *et al.*, 2003 など)。その結果、実に多様な細菌が地下深部にいることが明らかになってきた。しかしながら、地下圏の現場の環境をしっかりと把握して微生物の分布や活性が実際にどのようになっているかを明らかにしようという研究はなかなか見あたらない。そこで、筆者たち静岡大学理学部と東京大学大学院のチームが、2003 年から茨城県潮来市にある茨城大学広域水圏教育研究センター内に数本の 10 m 程度の浅い井戸を掘って進めている、地下圏における微生物の分布と増殖活性を明らかにする研究を少し紹介したい。対象となる地層は沖積層である。

掘削コアは含水率も低く、物理化学的な性状に関する情報がなかなか得にくい。加えて、上に述べたが、細菌などの微生物が生命活動を繰り広げるのはそこに水が供給されたときである。その時に形成される環境を知ることが地下生命圏のアクティブな様子を知ることにつながるであろう。そのように考えて、新たに掘削した井戸に地下水が満たされるのを待って、地下水とそれをとりかこむ堆積層の環境が形成する環境を調べた。結果の一部を図 2 に示す。

地下水は地表の 2 m 下まで満たされた(これを水頭 water head という)。水温は 2 m で約摂

氏 20 度と高く、10 m にいたっても 20 度弱であった。pH は深度に依らず中性を示した。溶存酸素濃度は、表層では 4 mgO₂/L ほどであったが、深くなるに従って減少し、8 m で 2 mgO₂/L を下回り、10 m では約 1 mgO₂/L であった。溶存酸素が少し存在していたのだが、硫酸イオンは深度 8 m から 6 m にかけて急に増加している。この鉛直分布は、6 m 以深で盛んに硫酸還元反応が進行していることを物語っている。それを反映するように 6 m には 4 m よりも多い 1 mL あたり 10⁷ に近い多数の細菌が直接計数法によって計数された。この細菌密度は東京湾など富栄養化の進んだ内湾の夏期に見られる最大密度に匹敵する。更に目を引くのは、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法によって計数された真正細菌 (ドメイン・バクテリア) の数が 10⁶ cells/mL 近く存在したことである。FISH 法は細胞中の RNA を対象としていることから、活性の低い、つまり RNA 含量の小さな細菌は検出されにくい。つまり活性の高い真正細菌が 10⁶ cells/mL 近く存在したことが明らかになった。

一方、メタン濃度は 6 m で有意に検出され、8 m、10 m と深さ方向に急増している。この井戸には 6 m から 10 m までストレーナー (開口部分) が設置されている。このことはより深部でメタンが生産され、上層へ拡散していることを示している。10 m での細菌数は 10⁵ cells/mL を少し上回る程度であったが、FISH 法での計数結果は、メタン生成菌を含む古細菌 (ドメイン・アーキア) が 10⁴ cells/mL 近く存在したことを示している。

以上は地下の堆積層の空間が地下水で満たされた場合である。では、堆積層の中にはどれくらいの細菌がいたのだろうか。

VII . 堆積コアの中の細菌

掘り出したコアを対象に、コア深度 2.1 m、3.6 m、および 6.1 m から汚染をさけながら慎重にサンプルをとりだし、コア中の細菌の数を調べた。次に、加圧 (30 Mpa) によって間隙水を絞り出す装置にサンプルを入れて間隙水を絞り出し、その中の細菌数を調べた。堆積物中に

$3 \times 10^8 \sim 8 \times 10^6$ cells/cm³ の細菌が認められたが、間隙水中にはその 1 ~ 2 % にあたる 6×10^5 cells/cm³ の細菌が分布していることがわかった。さらに、堆積物中の細菌のおよそ 5 % ~ 10% が活性を有していることが細菌細胞の RNA 含量から推察された。用いた手法は、上述した FISH 法である。

次に、堆積物のサブサンプルからは溶媒を使って細菌 DNA を抽出し、酵素と温度変化で遺伝子を増幅させたりしながら遺伝子解析を行った。その結果、真正細菌と古細菌の何れもが存在することがわかった。遺伝子解析から得られた今回の結果では、古細菌の方がやや多様性が勝っていた。

この解析結果の中身を見て私達は大きな問題に直面した。古細菌では、メタン生成に関わるユーリアーキオータ門に含まれる 4 種類の細菌が認められたが、硫酸還元を担うはずのデルタ・プロテオバクテリア綱に属する真正細菌がなかなか見つからないのである。地下水で満たされた井戸では明らかに硫酸還元活性が支持されている (図 2)。細菌の母集団は堆積層の中にあるはずだから、解析に用いたサンプルが代表性を欠いたのだろうか。これに対するひとつの答えは以下になる。従来知られている硫酸還元菌に近くはないが、デルタ・プロテオバクテリア綱に属する未だ培養されていない細菌がいくつか見ついている。このような未知の細菌が硫酸還元反応を現場で担っているのではないだろうかという推測である。このように、地下圏から見つけ出される細菌はほとんどが未だに培養されていないもので占められている。言い換えるならば、地下生物圏は未知の細菌の宝庫である。これらの中には、私達が未だ知らないエネルギー代謝を見つける可能性も十分に残されているであろう。

今回の研究対象では、すべての深度で *Chloroflexi* (クロロフレキシ) 門が優占していた。*Chloroflexi* は古細菌に近く、系統樹の中では共通祖先に近いところで分岐する分類群で、4 つのグループに分けられることが報告されている (Hugenholtz *et al.*, 1998)。コアから得られたクローンは、*Chloroflexi*-1, -2, -4 に分類されるが、

データベースに登録されているこれらの細菌のほとんどは培養されていないことが大きな特徴である。もっとも浅い 2.1 m 層から見いだされた *Chloroflexi*-1 は、環境中の汚染された場所から得られたクローンを多く含むという特徴がある。*Chloroflexi*-2 のグループに分類されるクローンは全ての深度から得られたが、特に 3.6 m と 6.1 m から多く得られた。その類縁クローンは、冷湧水、メタン生産される環境やウラン鉱山から得られており、メタン酸化または硫酸還元反応、鉄酸化または硫黄酸化反応に関与する細菌であることが推察される。

一方、検出されたドメイン・アーキアに属する細菌のほとんどが Crenarchaeota (クレンアーキオータ) であった。Crenarchaeota は、低温の環境から高温の環境まで極限環境に限らず幅広くその存在が確認されている細菌である。類縁のクローンは、沿岸海底や、深海底の地下圏、冷湧水帯、メタンハイドレートの堆積物等から得られている。

VIII . 細菌はどこから来たか

掘削井から検出された細菌を遺伝子データベースで調べると、最も近いクローンがイエローストーン熱水中から見つけられていたりする。あるいは、深海底の地下帯水層や深海底下の古い地層から見つけられたクローンに近いものが含まれている (Inagaki *et al.*, 2003)。これは何を意味するのだろうか。イエローストーン熱水環境は、浅い堆積層とはいかにもかけ離れていそうであるが、微好気あるは還元的、というキーワードで両者を括ることができる。これらは化学合成細菌の生息環境である。また掘削対象とした地点は沖積層であるが、かつて海進が進んできた地帯でもある。海進域と深海底とはいかにも移動の距離の長さを思わせるが、細菌の分布の広がりには地球進化の時間スケールの中で考えなければならないことを示唆しているのではないだろうか。あるいは、北浦から太平洋に流れ出る川をも通る微生物集団の長大な旅があるのだろうか。興味が尽きない生命とその分布と地球環境の進化に関するテ

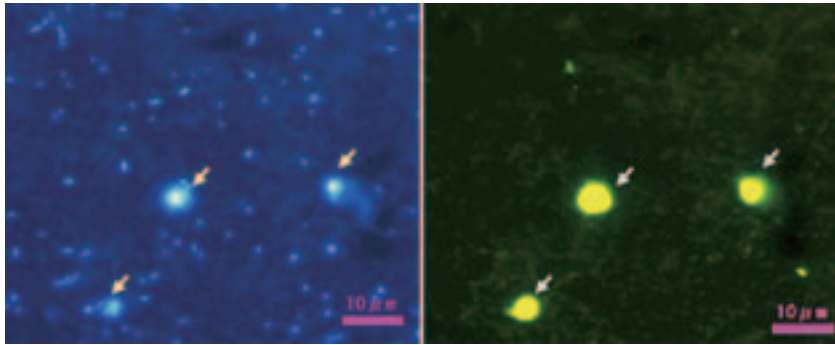


図3 掘削井中の細菌と原生動物。

左図：DAPIによるDNA染色．小さく光るのが細菌．
 右図：同じ視野に対し，原生動物を選択的に検出する遺伝子プローブによる原生動物の検出．矢印で示した大きく光っているのが原生動物．左のDNA染色図では細胞の中に一回り小さく核が明るく光っているのがわかる．

Fig. 3 Bacteria and protozoa stained with DAPI (left) and FITC protozoa (right).

マである。

胞子形成するようなグラム陽性細菌を除くならば，細菌といえども生存に必要な遺伝子セット (house keeping gene) をなくすことなく分布域を拡大していくためには，個体群としての消滅を避けるような環境が存在しなければならない。空間的に連続にそのような環境が分布することが細菌分布にも必要である。地下生物圏はこれを保証しながら拡大したのではないだろうか。この原稿ではふれることが出来ないが，わたしたちのもう一つの研究に高温極限環境下での微生物生態学がある。筆者らが日本の温泉で明らかにした，遺伝子系統樹の中でもっとも深く分岐する好熱性の化学合成細菌である硫黄酸化細菌と類縁の細菌が，大西洋中央海嶺の深海底熱水噴出孔から見いだされている (Reysenbach *et al.*, 2000)。陸上の温泉と深海底熱水噴出孔との空間的に大きな隔たりをこえて，細菌が分布を広げていったことをうかがうことが出来る。

IX . 現場で細菌の増殖を測る

では，細菌は地下圏でどのように活性を発揮し，増殖しているのでしょうか。わたしたちは，細菌の増殖活性を明らかにする目的で以下のような実験を行った。まず，掘削井を水洗いした

後，井戸に地下水を満した。さらにこれを交換し，2週間ほど放置した後に浸出水で満たされた井戸で，現場の細菌増殖を明らかにする実験を行った。深さ10mほどの井戸であるが，孔径が10cm程度と小さいため深部には微好気的な環境が形成されている。このような環境下での細菌の増殖はどの程度か。参考となる類似の先行研究例は無いように思われる。

現場の深度の地下水を培養して細菌の増殖を直接測定することにした。実際にこの掘削井戸で調べたところ，微好気環境の地下水中には $10^4 \sim 10^5$ cells/mLの原生動物が検出された (図3)。そこで，この細菌より大型の原生動物による捕食圧を除く目的で，採水した水を孔径 $3\mu\text{m}$ (あるいは $1\mu\text{m}$)のフィルターで濾過した。細菌は多くが直径 $1\mu\text{m}$ 以下であり，原生動物は $3 \sim 10\mu\text{m}$ のものが地下水中には多いようだ (表1と図3)。次に，捕食者を除いた濾液を両側が孔径 $0.2\mu\text{m}$ ，つまり細菌は出入りできないが基質となる物質は十分に出入りできるフィルターで仕切られた拡散容器 (Diffusion chamber : 図4)に入れて，元の深度に戻して約1週間培養した。その間の細菌数の変化から増殖速度を推定する。

2003年12月19日の掘削井 #4-2は，水柱全体が溶存酸素濃度 $0.20 \sim 0.40\text{ mg/L}$ と微好氣的



図 4 掘削井水中の細菌増殖速度の測定に用いた拡散容器(ディフュージョンチャンバー).

Fig. 4 Incubation equipment to measure bacterial in situ growth rate.

な状態であった。3 μm の濾過サンプルについてみると、培養開始前(2003年12月19日)の深度2 mには 1.1×10^6 cells/mL細菌が存在し、深度10 mでは 4.1×10^5 cells/mLの細菌がいた。8日間の培養後の細菌数は、2 mで 2.1×10^6 cells/mLに増えており、10 mでは 3.4×10^6 cells/mLへと顕著に増大していた。細菌の倍加時間(分裂して細菌数が倍になるのに要する時間)は深度2 mでは8.4日であり、深度10 mでは2.6日という速い速度であった。これによって細菌群集が大きな増殖活性を持つことが示された。増殖した細菌は、原生動物によって捕食され、微生物食物連鎖が地下圏でも動いていることが示された。また増殖した細菌のほとんどを真正細菌が占めていたことが明らかになった。また、原生動物自身も細菌の捕食によって増加することが別の実験で示されている。

X. どのような細菌が現場で活性を持つか

上の実験結果は、捕食圧を除いてみると明らかに細菌は増殖していることを示している。地下の微好気環境下においても、湖や海洋の表層の生態系と同様、高い活性で増殖する細菌は大きさ数マイクロメートルの微小な原生動物に捕食されてい

る。では、どのような細菌が増殖したのだろうか、という疑問と、さらに深い嫌気的な環境ではこのような捕食圧が細菌に対してかかっているのだろうか、という疑問が湧いてくる。後者については、世界的にも知見が無く、また筆者の研究室でもようやく深い地下圏での研究に取りかかったところなので、結果をご紹介するに至っていない。ここでは、前者の疑問について、得られた知見を紹介したい。

堆積物コア中の細菌に対して行った遺伝子解析と同様の解析を、現場培養で増殖した細菌群集に対しても試みた。その結果、深度2 mや6 mでは、コア中ではマイノリティであったアシネトバクテリアや水素酸化細菌に近いベータ・プロテオバクテリア、さらにはコアからはあまり検出されなかったアルファ・プロテオバクテリアが優先的に増殖した。アルファ・プロテオバクテリアには、メタン酸化細菌に類縁のクローンも複数認められた。実際にこのとき、水中のメタンは深度2 mでは検出されなかったが、6 mで約20 μM 、8 mで60 μM 、10 mで80 μM と深くなるほど有意な濃度で現存した。深部から供給されたメタンが、微好気的環境下でメタン酸化細菌によって利用され二酸化炭素に変換されている可能性がある。

堆積物の中にどのような細菌が分布しており(細菌遺伝子のプール)地下水が供給されるとどのような物理化学環境が形成され(地下に形成されるプール。但しサイズは大小様々だろう。)そして、地下の水環境の中でどのような細菌が増殖するのか、というターゲットを囲い込むような研究を行ったわけである。ここから得られたイメージを表そうとすると図5のようになるのではないだろうか。

調べられた茨城県潮来の堆積物1 gの中には $10^5 \sim 8$ の細菌数が認められるが、遺伝子でその多様性を調べるとそれは、10から100の異なったクローンで構成されている。その内の一割程度が活性をもっているが、水のさらなる供給があれば数種類の細菌が非常に大きな増殖を示す。増殖するのは、与えられた環境にフィットしたエネルギー

帯水層における微生物活性化のシナリオ

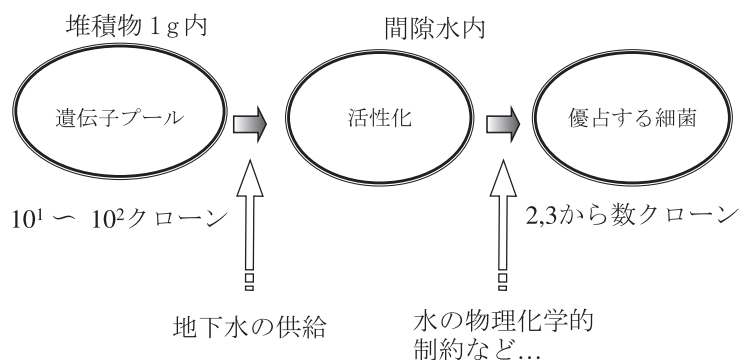


図 5 地下圏の遺伝子プールからみた細菌存在量とその中のある細菌が活性化される過程の生態イメージ。

Fig. 5 Microbial activation scenario in aquifer.

ギー代謝系を持つ数種類のクローンである。今回の研究地点では、それらはメタン酸化細菌や水素酸化細菌である可能性が高い。そのような地下生物圏における細菌の、環境に対応した生態のイメージがようやく見え始めた。

XI. 地下生物圏のひろがり

地球上の生命活動や、生物と地球環境との相互作用、そして生命の進化も含めて生命と地球の関係は、今まで地球の表層のみ対象として考えられてきた。しかしながら本稿で紹介したように、地下にも広大な生物圏が広がっており、旺盛な生命活動が営まれていることが明らかになってきた。地下生命圏の広がりを概観すれば、図6のようになるのではないだろうか。

地球上に細菌に似た生命が登場してからさほど時間がたたないうちに地下にも細菌はその分布域を広げ、地表とはわずかな交流を続けながらも地表とは別の生物圏を作り続けてきたと考えられる。そこには地表とは異なった進化の可能性も存在しているといえる。それはとりもなおさず、火星など生命が存在し得た(る)他の惑星における生命の存在様式に強い示唆を与えるのではないだろうか。

また、この地下圏での生命活動は水が支配して

いることを述べた。そしてその水が地下圏にも大量ではないが、予想外に深くまで供給されていることがわかり始めている。その地下圏が地表の生態系と大きく異なる環境特性は、1 km で 30 ~ 40 の温度上昇を伴うことである。暗黒で、無酸素、加えて熱い世界が地下圏に広がっている。そのような場で生命活動が静かであるうはずがないだろう。

紹介してきたように、地下生命圏に関する研究は、遺伝子解析の手法を応用することによって急速に発展している。研究は、未知の微生物を記述することから一気に、地下環境における微生物の活動、活性を明らかにすることに向けて進んでいる。その一端を、身近な浅い掘削井を用いた研究で紹介した。メタンが研究対象の重要な柱のひとつであることから容易に推測できるように、地質学的に生成したと考えられてきた化石燃料のどれくらいが微生物活動によってもたらされたものか、より精度の高い推定が今後 10 年の間に次々に成されるであろう。

もう一つ、ふれておかなければならないのは放射性廃棄物の地層処分問題である。20 世紀のエネルギー問題の負の遺産を引き継いだ 21 世紀の環境問題として、この問題がある。アジアにゴミを輸出したようなことにするのか？ あるいは、

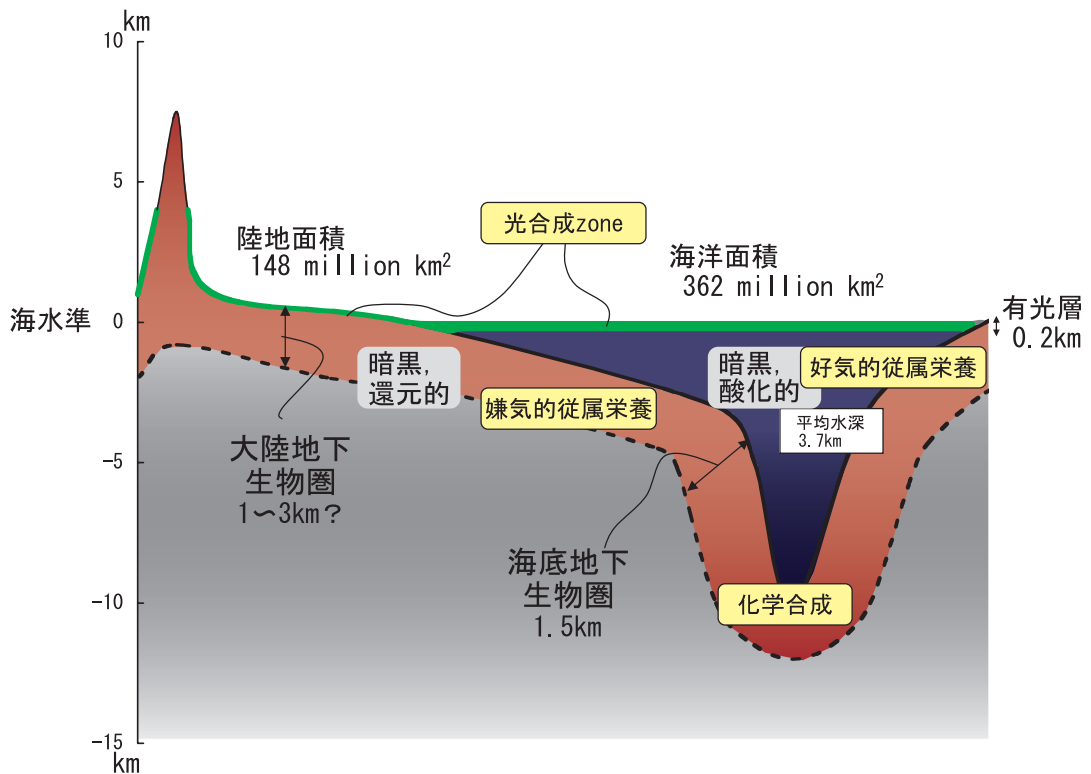


図 6 地下生物圏の広がり予想図．茶色の部分が地下生物圏．

Fig. 6 Extent of subsurface biosphere.

地下圏の微生物活動をより正確に評価することも含めて、科学技術的な議論に耐えうる形で国土の中にきちんと処分するのか、喫緊の課題である（難波ほか, 2004）。

【用語解説】

ドメイン・バクテリア：遺伝子解析によって生物界をバクテリア、アーキア、ユーカリアの三つのドメイン（domain）に分けるという考え方は、Carl Woeseらによって1990年に提唱された。従来の細菌に関する分類は、培養に基づいてその生化学的性状や形態などから成された。遺伝子解析による系統分類では、未だ培養されない（つまり、その生理学的な特性が明確にならない）細菌が圧倒的な多数を占める（Woese *et al.*, 1990）。

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) 法：1989年にWoeseと近い関係にあるPaceの研究室から提案された、細菌細胞の中のRNAの塩基配列を対象にして特定の細菌を検出する手法（DeLong *et al.*, 1989）。対象とする細菌群に特徴的な15ないし20の塩基配列に相補的な（つまりその塩基配列と対になり部分的に結合し二本鎖DNAになり得る）配

列をもつプローブ（釣り針）を合成し、その末端に蛍光マーカをつける。細菌の細胞膜を化学処理によって透過性を高くしておき、プローブを細胞の中に入れ、さらに洗い出す作業を行う。相補的な配列を持った細菌の細胞の中には蛍光マーカが残るので、これを高感度の顕微鏡で検出すれば、目的とする細菌群を識別することが出来る。

謝 辞

この稿を書くに当たっては、静岡大学理学部の木村浩之博士や私の研究室のメンバーのお世話になった。研究チームをまとめてくれた丸山智子博士に感謝したい。掘削井戸を用いた実験を成功させ、データの利用を許してくれた山下洋平君と斉藤 結さん、Dr. Nihal Welikalaには特に感謝したい。静岡大学大学院に在籍する木村希生さんは原稿を読んでコメントをくださった。共同研究者の東京大学大学院農学生命研究科の難波謙二博士と宮坂郁博士、茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター楢井久教授には掘削に際し大変お世話になり、また地質学からのアドバイスをいただいた。

静岡大学理学部北村晃寿助教授にも海進についての考え方を教えてくださいました。掘削や掘削井による野外実験は革新的実用原子力技術開発提案型公募事業に採択された「地層処分及ばす微生物影響のシミュレーションに関する技術開発」(代表: 石川島播磨重工業株式会社)の一環として成された。研究メンバーには折々の議論に参加して頂いた。以上の方々にお礼申し上げたい。

文 献

- Anderson, C.R. and Pedersen, K. (2003) *In situ* growth of Gallionella biofilms and partitioning of lanthanoides and actinides between biological material and ferric oxyhydroxides. *Geobiology*, **1**, 169 178.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Ricker, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B.B., Witte, U. and Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **407**, 623 626.
- Colwell, R.R. and Grimes, D. J. 編, 清水 潮・遠藤圭子訳 (2004) 培養できない微生物たち. 学会出版センター. Colwell, R.R. and Grimes, D. J. eds (2000) *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. ASM Press.
- DeLong, E.F, Wickham, G.S. and Pace, N. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single cells. *Science*, **243**, 136 1363.
- House, C.H., Runnegar, B. and Fitch-Gibbon, T. (2003) Geological analysis using whole genome-based tree building applied to the Bacteria, Archaea, and Eukarya. *Geobiology*, **1**, 15 26.
- Hugenholtz, P., Boebel, B.M. and Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, **180**, 4765 4774.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K.H. and Horikoshi, K. (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the sea of Okhotsk. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7224 7235.
- Kato, K., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Nakagawa, T., Maki, Y. and Hoaki, T. (2004) Microbial mat boundaries between chemolithotrophs and photolithotrophs in geothermal hot spring effluents. *Geomicrobiology J.*, **21**, 91 98.
- 加藤憲二 (1999) 微生物の世界野全貌が見えてきた バクテリアの惑星地球. 科学, **69**, 517 528.
- 村上由記・岩槻輝希・長沼 毅 (2003) 東濃地域における地下水化学と地下微生物の相互作用. 地学雑誌, **112**, 277 287.
- 難波謙二・宮坂 郁・加藤憲二・福永 栄 (2004) 地層処分と微生物. 月刊地球, **26** (地質環境の長期安定性下) 469 474.
- Onstott, T.C., Phelps, T.J., Colwell, F.S., Ringelberg, D., White, D.C. and Boone, D.R. (1997) Observations pertaining to the origin and ecology of microorganisms recovered from the deep subsurface of Taylorsville Basin, Virginia. *Geomicrobiology J.*, **15**, 353 385.
- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**, 734 740.
- Parkes, R. J., Cragg, B. A., Bale, S. J., Getliff, J. M., Goodman, K., Rochelle, P.A., Fry, J.C., Weightman, A.J. and Harvey, S.M. (1994) Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*, **371**, 410 413.
- Reysenbach, A.-L., Banta, A.B., Boone, D.R., Cary, S.C. and W.Luther, G. (2000) Microbial essentials at hydrothermal vents. *Nature*, **404**, 835.
- Summit, M. and Baross, A. (2001) A novel microbial habitat in the mid-ocean ridge seafloor. *PNSA*, **98**, 2158 2163.
- 上田誠也・水谷 仁・笠原順三・鳥海光弘 (2002) 水惑星地球の新しい姿. 科学, **72**, 170 179.
- Woese, C., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576 4579.

(2005年3月14日受付, 2005年9月15日受理)