

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Ocky Karna Radjasa

世界の海洋の平均水深は3,800mといわれるが、面積にしても約60%はそれよりも水深の深い水域である。深海は低温、低栄養、高水圧、暗黒に代表される極限環境の一つであるが、浅海に比べて微生物に関する研究の歴史は浅い。従ってそこに生息する微生物の種類や系統学的位置、生理的性質についてはこれまで限られた知見しか得られていない。しかしながら、近年新たな微生物資源として深海の細菌に注目が集まり、深海には予想以上に多様な細菌が棲息している可能性が示されている。また、海洋の物質循環を理解する上で深海微生物の種類やその活動を明らかにすることも求められている。このような背景のもと、本研究では、異なる海域の深海から好冷細菌と好圧細菌を分離することでそれらの細菌の多様性を調べ、低温、高圧に適応した細菌の系統を明らかにしようとしたものである。

1. 低温に適応した細菌

北西太平洋海域の表層水(0-200m)と深層水(1,000-9,671m)から4℃で増殖する78株の耐冷細菌を分離し、16S rDNAの制限酵素(HhaI)による切断パターンを解析した。その結果、表層からは6つの、また深層からは8つの表現型が認められ、*Pseudoalteromonas*属、*Photobacterium*属そして*Vibrio*の各属が表層と深層からともに分離されたことが分かった。表層のみから分離された属は*Pseudomonas*属と*Halomonas*属であった。全体としては、*Vibrio*科細菌が表層、深層ともに優占していることが示唆された。

次に、南海トラフの深海域(約4,000m)より分離された海水から5株、堆積物から6株、合計11株の好冷細菌は、耐圧細菌でもあり、40MPaの水圧でも増殖することが分かった。16S rDNAによる系統解析の結果、11株は全て γ *Proteobacteria*に属し、堆積物からの6株のうち、1株が*Moritella*属である以外は全てが*Shewanella*属であった。一方、海水からの分離株は*Colwellia*属、*Moritella*属と、現段階では仮同定として*Psychromonas*属とされている3属が認められた。

南西太平洋サンゴ海の深海堆積物より合計57株の好冷細菌を分離した。*HhaI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI*の4塩基認識制限酵素を用いたRFLP(Restriction fragment length polymorphism,制限酵素フラグメント多型性)解析の結果、3つの異なった遺伝子型が認められた。それぞれの型の代表株の16S rDNAの系統解析の結果、*Moritella*属、*Shewanella*属、*Colwellia*属に近い系統を持つことが分かった。

2. 高圧に適応した細菌

世界最深として知られるマリアナ海溝は好圧細菌の研究に最適な環境である。現在までにマリアナ海溝からはいくつかの好圧細菌が分離され研究されている。白鳳丸KH-98-2の研究航海において、マリア

ナ海溝約10,500mより細菌を分離した。ニスキンバタフライ採水器で海水を採取し、孔径0,2 μ mのヌクレポアフィルターでろ過後、1/5 ZoBell 2216E液体培地、4℃、採水現場の圧力である100MPaで培養した。培養後、菌液を段階希釈し、2%低融点アガロースを用いた1/5 ZoBell 2216E培地に接種した。100MPaで増殖したコロニーを切り出し、再び液体培地に接種し、同じ圧力下で培養し、この過程を3回以上繰り返すことにより細菌を純粋分離した。100MPaで増殖するが、常圧では増殖しない偏性好圧細菌19株について研究を行った。*HhaI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI*の4塩基認識制限酵素を用いたRFLP解析の結果、2つの異なった遺伝子型が認識された。この2つの型の代表株の16S rDNAの系統解析の結果、一つの遺伝子型の代表株MTW-1株は好圧細菌 *Shewanella benthica*に近い系統を持ち、もう一方の遺伝子型の代表株MTW-13株は培養される細菌では報告はなく、海水、堆積物より直接抽出したDNAをクローニングして得られるクローンと近縁であることが分かった。このクローンNB-1dは、圧力保持型採泥器を用いて採取された日本海溝の堆積物からのクローンである。MTW-13株はクローンNB1-dと独立した系統を形成し、現在までに報告のある培養可能な好冷、好圧細菌とは全く異なることが示された。このことは今回分離されたMTW-13株が、今までに分離されていない好圧細菌であり、新属、新種の可能性をもつことを強く示唆する。今後、この株の所属、新種としての提案も視野に入れ分類学的特性について研究を進める予定である。

海水から分離された好圧細菌の研究は堆積物と比較して少ない。淡青丸KT-00-9航海の際、伊豆・小笠原海溝約5,500m、6,000mより細菌を分離した。60MPaで純粋分離された6株の好圧細菌の *HhaI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI*の4塩基認識制限酵素を用いたRFLP解析の結果、2つの異なった遺伝子型が認められた。この2つの型の代表株の16S rDNA塩基配列による系統解析の結果、一つの遺伝子型の代表株JTW-863は、マリアナ海溝より分離された好圧細菌 *Moritella yayanosii*に近い系統を持つことが明らかになった。

これまで一連の研究によって、低温、高水圧の環境に適応して棲息する微生物が広範な海洋から得られ、その系統関係が多様であることを明らかにしており、学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値があるものと認めた。