

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻  
平成 19 年度博士課程入学  
氏 名 伊知地 稔  
指導教員名 浜崎 恒二

論文題目 アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の分布と系統

### 1. 序論

海洋における硝化は、生態系の基礎生産を制御する重要な反応過程の一つであり、硝化細菌が唯一の担い手であると考えられてきた。しかし近年、アンモニア酸化を行う古細菌の発見により、環境中における硝化の制御について、見直しが必要となっている。そうした中で、海洋古細菌によるアンモニア酸化は、栄養塩の再生だけでなく、新たな炭素固定過程として、生物地球化学的な重要性が指摘されているが、その分離株は水族館の濾過槽から分離された *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 株のみであり、生物学的な知見が圧倒的に不足している。本研究では、アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の生理生態学的特性と、古細菌ドメインにおける系統学的な位置を明らかにする事を目的とした。特に、駿河湾の中深層に生息するアンモニア酸化古細菌 (Ammonia-Oxidizing Archaea, AOA) の鉛直分布やニッチについて調べ、そこから特定の古細菌が高度に集積された系を得る事で、分布を制御する要因としてのアンモニア態窒素と水温の影響について調べた。さらに、これら集積系の解析によって、未培養な AOA 系統群の 16S rRNA 遺伝子配列を決定する事ができた。

2. 駿河湾におけるアンモニア酸化能を有する海洋古細菌の群集構造と生息場所

海洋性 AOA 群集は、アンモニア酸化の鍵酵素遺伝子 (*amoA*) によって、*Nitrosopumilus maritimus*-like cluster (NM)、Water Column cluster A (WCA)、Water Column cluster B (WCB) と呼ばれる 3 つの系統群に分かれる。既往研究で系統群による鉛直方向での棲み分けが指摘され、NM と WCA は表層でよく見られる事から Shallow Marine clade、WCB は中深層以深で多く見られる事から Deep Marine clade と呼ばれている。海洋の水柱における AOA の好適な生息場所として、微生物活動の「ホットスポット」と呼ばれ高濃度のアンモニア態窒素が局所的に存在する有機物粒子が挙げられるが、こうした粒子における付着性 AOA の分布については未だ調べられていない。本章では、付着と自由生活という海洋微生物の二つの生態型に注目して、駿河湾における AOA の分布と多様性を解析し、系統群による分布や生息場所の違いを明らかにする事を目的とした。2008 年 2 月に駿河湾の湾中央から湾口までの 5 地点で、海水試料を鉛直的に採水し、孔径 3.0  $\mu\text{m}$  と 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターで連続的に濾過する事によって、付着性画分と自由生活性画分に分けて解析した。定量 PCR 法を用いて Shallow Marine clade と Deep Marine clade の AOA について、それぞれの現存量 (*amoA* コピー数) を調べた。また、湾口部水深 500 m の海水試料を同様に濾過し、*amoA* 配列による群集構造解析を行った。両画分に分けた解析の結果、海水中における AOA の大部分は、自由生活である事を初めて明らかにする事ができた。一方、付着性 AOA は単位海水当たりの現存量が少ないものの、*amoA* 配列に基づく (カットオフ値 5%) OTU クラスタリング、Chao1 法による種数推定、レアファクション解析から、自由生活性 AOA よりも多様性が高く、種数が多い事が示された。一般に、アンモニア態窒素に乏しい海水においても、粒子上に付着する事によって高濃度のアンモニア態窒素を得る事が可能となるはずであるが、多くの海洋性 AOA は、低濃度のアンモニア態窒素利用に適応する事で自由生活の生態型を示していると考えられる。また、付着性 AOA の物質循環への量的な寄与は自由生活性 AOA に比べて小さいが、有機物粒子の存在が AOA の多様性維持に重要な役割を果たしている事が示唆された。さらに、自由生活性 AOA は、既報と同様に、表層で Shallow Marine clade が優占し、中深層で Deep Marine clade が優占する分布パターンを示すのに対し、付着性 AOA には、そのような分布が見られなかった。

### 3. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の集積培養と群集構造の変化

海洋性 AOA 群集の分布を決める要因として、これまでアンモニア態窒素濃度や酸素濃度の重要性が指摘されてきた。特に、WCA 系統群の割合は、酸素及びア

ンモニア態窒素濃度と正の相関関係を示す事から、これらの環境要因の影響が示唆される。一方、WCB 系統群では、そのような関係は見られない事から、その他の要因を考える必要がある。本章では、海洋性 AOA の主要系統群の分布を支配する要因を明らかにするために、アンモニア態窒素もしくは亜硝酸態窒素を添加した集積培養系を用いて、AOA の群集構造と現存量に及ぼすアンモニア態窒素濃度と水温の影響を調べる事を目的とした。駿河湾湾口部水深 500 m と 2,000 m の海水試料に基質として  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  もしくは  $\text{NaNO}_2$  を添加 (N として終濃度 50  $\mu\text{M}$ ) し、4°C、10°C、20°C ( $n = 1$ ) に保持、震盪せずに暗条件で 1,200 日間の集積培養を行った。培養開始時に基質を添加後、300 日目までの培養期間中に最大で 3 回の基質添加を行った。集積培養における系統群別のクローン出現頻度と現存量の変化を解析した結果、WCB 系統群の割合と培養期間中における消長は、培養温度によって大きく異なる事が示され、海洋性 AOA の主要系統群の分布を支配する要因として、水温が重要な要因となりうる事が初めて示された。例えば、500m と 2,000m いずれの集積系においても、高温 (10°C と 20°C) では NM もしくは WCA 系統群が優占となり、低温 (4°C) では WCB 系統群が優占となった。また、Shallow Marine clade (NM と WCA) は、いずれの温度でも、アンモニア態窒素を添加する事でさらに現存量が増加した事から、Deep Marine clade (WCB) と比べてアンモニア態窒素に対する最大収量が高い事が示唆された。既往研究で、NM と WCA 系統群はアンモニア態窒素の供給量が多い水族館や、沿岸近く、浅海で優勢になり、一方で WCB は低温な深海で優勢になる事が報告されている。前章においても同様に、各系統群の鉛直的な棲み分けが示された。本章の研究で得られた結果から、こうした分布の違いは、生息環境におけるアンモニア態窒素濃度と水温の違いによって説明できると考えられる。また、同じ系統群内においても培養期間や温度によって出現する OTU が変化しており、種レベルでの環境要因に対する応答の違いと群集構造の変動が示唆された。

#### 4. アンモニア酸化能を有する海洋古細菌の多様性と系統

第 3 章の研究で、古細菌の *amoA* で見た OTU が 1 ないし 2 つしか存在しない培養系を得る事ができた。こうした培養系を用いる事で、特定の AOA 系統群の 16S rRNA 遺伝子配列を決定する事ができる。本章では、駿河湾だけでなく、様々な海域で得た集積系を選抜する事により、NM 及び WCA 系統群だけでなく、WCB 系統群が非常に高い割合で集積された系を見出し、これまで不明であった WCB 系統群を含む海洋性 AOA の系統学的位置を明らかにする事を目的とした。海水試料は駿河湾と相模湾、大槌湾、サロマ湖、北極海で採水したものを扱い、集積

培養は前章と同様に行った。合計で 8 試料、73 の集積系について、定量 PCR 法を用いて Shallow Marine clade および Deep Marine clade の現存量を調べた。北極海で得られた集積系を用いた 16S rRNA 遺伝子解析の結果、WCB 系統群に属する AOA の系統学的位置を、NM 及び WCA 系統群と同じ *Thaumarchaeota* の Group I.1a 内に確定する事ができた。WCB 系統群の古細菌は、分離株である *N. maritimus* に対して、*amoA* 配列の系統関係と同様に、異なる系統群として区別する事ができた。その相同性は、97%以下である事から種以上の分類群レベルで異なる事が示唆された。本研究では、海洋性 AOA を構成する 3 つの主要系統群について、古細菌ドメインにおける系統学的な位置を初めて明らかにする事ができた。また、3 つの主要系統群に含まれない新たな系統群の存在も示唆された。既往研究では、*amoA* 配列で区別される 3 つの系統群は、16SrRNA 遺伝子配列で区別されない同一の系統群である事が予想されたが、既報とは異なるプライマーセットを用いた再解析によって、既報知見の一部は方法論的な問題によるアーティファクトである事も明らかとなった。これら海洋性 AOA 系統群は、16SrRNA 遺伝子の相同性が 97% 以下である事から、生息場所を異にする別種、あるいは別属の古細菌であると考えられる。

## 5. 結論

本研究では、海洋性 AOA の海水中での鉛直的な棲み分け、付着と自由生活という二つの生態学的ニッチにおける系統群分布パターンや多様性の違いが示され、こうした分布を決める環境要因として、アンモニア態窒素濃度に加えて水温が主要因と成り得る事が初めて明らかになった。さらに、未培養な海洋性 AOA の 16S rRNA 遺伝子配列を決定する事により、古細菌ドメインにおける系統学的な位置が初めて明らかとなった。その結果、古細菌全体の群集構造解析における AOA の特定が可能となり、環境中における AOA の動態を古細菌群集全体の動態と比較しつつ、その現存量や生産量への寄与を見積もる事が格段に容易になる事が予想される。今後、それぞれの系統群に特異的なプローブを用いた定量的な解析手法により、海洋環境中の硝化過程に関わる様々な課題へのアプローチが可能になると期待される。