

博士論文

南極湖沼に特有な水生コケ植物の共存生物相における種の
多様性および生物地球化学的機能に関する分子系統学的研究

平成 24 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

中井 亮佑

目次

	頁
要旨	6
第1章	
序論	9
1.1 はじめに一極限環境の微生物を調べる意義	9
1.2 南極生物圏	12
1.3 極域生物圏の微生物を調べる意義	13
1.4 南極湖沼生態系	14
1.5 遺伝子を用いて生物相の種の多様性を調べる	17
1.6 遺伝子を用いて生物相の生物地球化学的機能を調べる	18
1.7 本研究の目的	19
第2章	
南極湖沼に特有な水生コケ植物の共生生物相における原核生物の種多様性	21
2.1 研究の背景	22
2.2 材料と方法	24
2.2.1 調査湖沼と生物標本の採取	24
2.2.2 微生物の混合ゲノム DNA の抽出と精製	25
2.2.3 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅	26
2.2.4 PCR クローン・ライブラリーの構築と系統解析	26
2.2.5 16S rRNA 遺伝子解析の再現性の確認	27
2.3 結果と考察	27
2.3.1 16S rRNA 遺伝子に基づくコケ坊主内の原核生物の種の多様性	27
2.3.2 コケ坊主で最優占していた Proteobacteria	30
2.3.3 コケ坊主外層に特異的に検出された Cyanobacteria	30

2.3.4	コケ坊主内層に特異的に検出されたFirmicutes	31
2.3.5	コケ坊主は外層最深部から検出された candidate division と unclassified bacteria	31
2.3.6	第2のコケ坊主の 16S rRNA 遺伝子解析による再現性の評価	32
2.4	結論	35
第3章		
	南極湖沼に特有な水生コケ植物の共存生物相における真核生物の種多様性	36
3.1	研究の背景	37
3.2	材料と方法	38
3.2.1	調査湖沼と生物標本の採取	38
3.2.2	微生物の混合ゲノム DNA の抽出と精製	38
3.2.3	18S rRNA 遺伝子の PCR 増幅	38
3.2.4	PCR クローン・ライブラリーの構築と分子系統解析	39
3.3	結果と考察	40
3.3.1	18S rRNA 遺伝子に基づくコケ類と真核微生物の系統	40
3.3.2	コケ坊主から検出されたコケ類	43
3.3.3	コケ坊主で最優占していた novel clade の菌類	43
3.3.4	コケ坊主から検出された Alveolata, Metazoa および Rhizaria	44
3.3.5	コケ坊主から検出されたストラメノパイル	45
3.3.6	コケ坊主間のコケ類と真核微生物相の比較	46
3.4	結論	50
第4章		
	南極湖沼に特有な水生コケ植物の共存生物相における CO ₂ 固定酵素 (RuBisCO) 遺伝子の多様性	51
4.1	研究の背景	52
4.2	材料と方法	54
4.2.1	調査湖沼と生物標本の採取	54

4.2.2	微生物の混合ゲノム DNA の抽出と精製	54
4.2.3	RuBisCO 遺伝子の PCR 増幅	54
4.2.4	PCR クローン・ライブラリーの構築と分子系統解析	56
4.2.5	炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) の分析	56
4.3	結果と考察	57
4.3.1	コケ坊主から得られた RuBisCO 遺伝子の系統と分布	57
4.3.2	プロテオバクテリア由来 IA 型の RuBisCO 遺伝子における多様性	60
4.3.3	コケおよびシアノバクテリア由来 IB 型の RuBisCO 遺伝子における多様性	61
4.3.4	プロテオバクテリア由来 II 型の RuBisCO 遺伝子の系統と多様性	64
4.3.5	16S rRNA 遺伝子および RuBisCO 遺伝子それぞれから得られた微生物系統の比較	65
4.3.6	コケ坊主の外層と内層における炭素安定同位体比	66
4.4	結論	68
第 5 章		
南極湖沼に特有な水生コケ植物の共在生物相における窒素固定酵素および		
脱窒関連酵素遺伝子の多様性		
		69
5.1	研究の背景	70
5.2	材料と方法	73
5.2.1	調査湖沼と生物標本の採取	73
5.2.2	微生物の混合ゲノム DNA の抽出と精製	73
5.2.3	窒素固定遺伝子, アンモニア酸化酵素遺伝子, および脱窒関連酵素遺伝子群の PCR 増幅	73
5.2.4	PCR クローン・ライブラリーの構築と分子系統解析	75
5.2.5	窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) の分析	75
5.3	結果と考察	76
5.3.1	コケ坊主から得られた窒素固定酵素遺伝子と脱窒関連酵素遺伝子群	76
5.3.2	窒素固定酵素遺伝子 (<i>nifH</i>) の系統と多様性	78
5.3.3	銅含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子 (<i>nirK</i>) の系統と多様性	81
5.3.4	シトクロム含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子 (<i>nirS</i>) の系統と多様性	83

5.3.5 キノール型の一酸化窒素還元酵素遺伝子(<i>qnorB</i>)の系統と多様性	85
5.3.6 窒素安定同位体比分析の結果	88
5.4 結論	90
第6章	
総論	91
謝辞	97
引用文献	98
補足図表	115

要旨

南極大陸は地球上で最も寒冷な地であり、同時に最も乾燥した土地でもあるので、砂漠と高山の両方の特徴を併せもつ極限環境である。氷の大陸といわれる南極大陸であるが、その沿岸域には、氷に覆われずに大陸岩盤が剥き出しとなった露岩域と呼ばれる地帯が存在する。南極の大陸縁辺に存在する露岩域には、淡水湖から飽和塩分に近い塩湖まで、多様な水質を持つ湖沼が数多く点在している。これらのうち、淡水湖沼では水生コケ植物が異常な塔状の構造体「コケ坊主」を形成し、湖底一面に広がっている。このような水生コケ植物の大群落は南極湖沼にのみ特有な生物群集である。コケ坊主は、酸化的な外層と還元的な内層の二層構造を持ち、珪藻、緑藻、藍藻などと共生している。南極コケ坊主は、植物と微生物の新たな共生あるいは共生系であると考えられるが、その共生生物相に関する知見は、顕微鏡観察から藻類の存在が確認されているのみである。そこで本研究では、この特異な生態系に共生する生物相の種の多様性および生物地球化学機能を明らかにするため、分子生物学的手法を用いて、系統分類に汎用される遺伝子や代謝に関与する酵素の遺伝子（酵素遺伝子）の検出および解析を行った。

まず、第1章では、南極生物圏の微生物について、既報の仮説や既知の事実を概説する。なお、本研究では、水生コケ植物の共生生物相の「遺伝子」を対象とした。これは、自然環境に生息する全微生物数のうち培養可能なものは0.1–1%程度とされており、残りの99%以上は何らかの理由で培養困難であるため、培養法では微生物の多様性を正確に把握できないからである。この問題を解決するにあたって、本研究では、微生物を培養することなしに、微生物の遺伝物質（DNA）を抽出し、解析を行った。第1章では、遺伝子を用いた生物群集の解析方法についても概説する。

第2章では、水生コケ植物に共生する原核生物の種の多様性について述べる。完全なコケ坊主体2個体を用いて、原核生物、すなわちバクテリア（細菌）やアーキア（古細菌）の系統分類に汎用される16S rRNA遺伝子の多様性解析を行った。まず、コケ坊主を内層と外層、さらにそれらを上下縦方向に分け、計14部位からDNAを抽出した。そこから16S rRNA遺伝子のPCRクローン・ライブラリーを14組構築し、2個体で2688クローン（それぞれ1344クローンずつ）の16S rRNA遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定した。分子系統解析の結果、コケ坊主全体にはProteobacteriaに帰属するクローン（phylogroup）が優占的に存在し、外層には光合成細菌Cyanobacteria、内層には絶対嫌気性のグラム陽性細菌*Clostridium*属や硫酸還元菌がそれぞれ特徴的に存在することが示唆された。ただし、原核生物のうち、アーキア（古細菌）のrRNA遺伝子は検出されなかった。これらの特徴はコケ坊主の第2標本でも共通していた。以上のことから、

コケ坊主の中では、部位によってそれぞれに異なる微生物系統群が生息していることが示唆された。

第3章では、水生コケ植物に共在する真核生物の種の多様性について述べる。第2章の原核生物の種多様解析と同様、完全なコケ坊主2標本を用いて、真核生物の系統分類に汎用される18S rRNA遺伝子の多様性解析を行った。18S rRNA遺伝子のPCRクローン・ライブラリーを14組構築し、計2688クローンの18S rRNA遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定した。分子系統解析の結果、コケ坊主の主構成体であるコケ由来と思われるクローン（*phylotype*）が蘚類の既知種 *Leptobryum pyriforme* の18S rRNA遺伝子に相同性99.9%で最近縁であることが分かった。また、コケ坊主全体に *novel clade* の菌類が突出して優占しており、これがコケ坊主生態系における寄生者あるいは分解者として炭素循環に寄与している可能性が示唆された。さらに、外層には繊毛虫やクマムシに帰属する *phylotypes* が準優占する一方、内層には特異的にアメーバ様の単細胞真核生物 *Cercomonas* (Cercozoa) の *phylotype* が検出された。これらの特徴はコケ坊主の第2標本でも共通していた。以上より、コケ坊主の中では、コケ坊主全体に広く分布する真核微生物系統と、外層と内層の各層に特徴的に分布する系統が存在することが高い蓋然性をもって示された。

第4章では、南極湖沼に特有な水生コケ植物の共在生物相におけるCO₂固定酵素遺伝子の多様性について述べる。本研究では、これまでに16S/18S rRNA遺伝子の多様性解析により、コケ坊主の内外上下の微生物組成を明らかにしてきた。しかしながら、rRNA遺伝子に基づいた系統解析のみでは、微生物の機能を知ることは困難である。本章では、CO₂固定に与る酵素 *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (RuBisCO, E.C. 4.1.1.39) の遺伝子の多様性解析を試み、コケ類に共在する生物相が一次生産、すなわちCO₂固定に寄与する可能性を考察した。コケ坊主標本からI, II, およびIII型の全ての型のRuBisCO遺伝子を標的としたPCRを試み、そのPCRクローン・ライブラリーを構築した。そして、計1092クローンの塩基配列の決定と分子系統解析を行った結果、Proteobacteria由来のIA型のRuBisCO遺伝子に帰属する *operational RuBisCO unit* (ORU) がCyanobacteria由来のIB型のRuBisCO遺伝子と同じくらいの頻度で検出されて最優占することと、海底熱水プルームや深海に生息する二枚貝の内部共生細菌から得られた各RuBisCO配列にヌクレオチド配列で81-85%の範囲で最近縁なORUが準優占することが分かった。コケ類のIB型に帰属するORUは *Leptobryum sp.* のRuBisCO遺伝子にヌクレオチド配列で100%完全一致した。さらに、コケ坊主の外層に特異的に分布するCyanobacteria由来のIB型に帰属するORUや、内層特異的に紅色硫黄細菌由来と思われるII型のORUsが検出された。これらORUの層特異的な分布には、コケ坊主内に存在する酸化的な外層と還元的な内層の二層構造が反映されていると

考えられる。一方、Proteobacteria 由来 IC 型、不等毛藻およびハプト藻由来 ID 型、古細菌由来 III 型の RuBisCO 遺伝子は検出されなかった。以上のことから、南極コケ坊主生態系では、光エネルギーに依存せず、無機物を酸化する際に生じる化学エネルギーによって有機物を合成できる化学合成独立栄養細菌も一次生産者として重要な役割を果たしている可能性が示された。

第 5 章では、南極湖沼に特有な水生コケ植物の共生生物相における窒素固定酵素および脱窒関連酵素遺伝子の多様性について述べる。本章では、窒素固定、アンモニア酸化、および脱窒に関わる機能酵素遺伝子の多様性解析を試み、コケ類に共生する微生物相が窒素循環に寄与する可能性を考察した。コケ坊主標本から窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*)、アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*)、硝酸還元酵素遺伝子 (*napA*, *narG*)、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*)、一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*cnorB*, *qnorB*)、および亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) を標的とした PCR を試み、*nifH*, *nirK*, *nirS*, *qnorB* の増幅産物を得た。それらの PCR クローン・ライブラリーを構築し、計 5376 クローンの塩基配列の決定と分子系統解析を行った。その結果、コケ坊主全体では Gammaproteobacteria の紅色光合成細菌の *nifH*, Alphaproteobacteria のリゾビウム科の *nirK*, Betaproteobacteria の脱窒性硫黄酸化細菌の *nirS*, および Acidobacteria の putative *qnorB* に最近縁なクローンがそれぞれ優占的に検出された。また、外層に特異的な Cyanobacteria に帰属する *nifH*, 内層に準優占的な Deltaproteobacteria の硫酸還元菌に帰属する *nifH* など、コケ坊主の外層や内層の層特異的に分布する operational unit も得られた。以上の結果より、コケ坊主生態系において、窒素固定や脱窒の各プロセスには複数の異なる微生物系統が関与することが明らかとなった。

第 6 章では、本研究で得られた結果を踏まえたまとめを述べる。本研究は、南極湖沼に特有の水生コケ植物「コケ坊主」は、主構成種であるコケ類とそれに付随する共生微生物相が極限環境で協調的に物質生産および物質循環を行うミニ生態系であることを分子系統学的解析から示した。特に、コケ坊主の外層と内層、さらにはその上下縦方向に広く分布するバクテリアや真核微生物の rRNA 遺伝子が検出された一方、外層や内層の層特異的に存在するものもみられた。これらの傾向は、共生生物相の CO₂ 固定酵素、窒素固定酵素、および脱窒関連酵素のような生物地球化学的機能に関与する酵素遺伝子の多様性解析においてもみられた。つまり、コケ坊主の中では、部位によってそれぞれに異なる微生物コミュニティが存在し、その微生物コミュニティが種々の生化学的プロセスを担うことにより、その生態系の存立と維持に寄与していることが考えられる。本研究は、極限環境に成り立つこの特異な生物群集が、微生物の相乗効果 (synergy) によって成り立っていることを提案する。

第1章

序論

1.1 はじめに一極限環境の微生物を調べる意義

地球生物圏における極限環境あるいは「辺境」には、深海、地底、南北両極域、高山、砂漠などが考えられ、それら辺境生物圏の特徴は生息環境条件（圧力、塩分、温度、乾燥、pHなど）の極限性である。辺境生物圏を調べる目的の一つは「地球生物圏の辺境に生きる特異な微生物をモデルとして、地球生命の可能性(限界)と多様性を知ること」である(長沼, 2000)。

「微生物の可能性(限界)」については、辺境生物圏へのアクセス能力が向上するにつれ、我々が生物など存在しないと考えていた極限環境にも微生物が存在することが分かってきた。たとえば、インド洋の海底熱水噴出孔の熱水から分離された *Methanopyrus kandleri* という古細菌は 122°C という高温でも生育し、従来の 113°C ないし 121°C という生物生育の最高温度記録を更新した (Takai et al. 2008)。今後も辺境生物圏を探索するにつれ、地球生命の限界条件に関する知見が集積していくであろう。

また、地下へのアクセス手段の発達と微生物生態学の発展は、地中深く数千メートルまで微生物が存在し、そこには「呼吸の多様性」が見られることを明らかにしてきた。Whitman et al. (1998) は、国際深海掘削計画によって得られた海底下の微生物の情報 (Parkes et al. 1994; Wellsbury et al. 1997) と陸上地下の研究 (Hazen et al. 1991; Pedersen et al. 1996) を編纂し、地下生物圏にはおよそ 10^{30} という数の原核生物、すなわちバクテリア(細菌)とアーキア(古細菌)が生息しており、その全バイオマスは炭素重量にして約 5×10^{17} g に達すると見積もった(表 1)。これは海洋生物圏および陸域生物圏の全バイオマス約 6×10^{17} g に匹敵する膨大な量であった(Whitman et al. 1998)。なお、この地下生物圏は、海洋では海底面下 10 cm 以深、陸上では 8 m 以深を考えている。こうして地球内部に生物など生息できないという我々の常識が覆され、深部地下生物圏という新しい生物圏の概念が提案された。地下微生物の数・量は、その地中温度が微生物の生育温度の限界(前述の 122°C など)に達するまで、深くなるにつれて漸減することが考えられる。地中温度の上昇率を $15 \sim 30^\circ\text{C km}^{-1}$ と仮定すると、単純計算で深度 4~8 km くらいが地下生物圏として想定される。

表1 水圏と土壌, ならびに地下生物圏(海底下と陸上地下)に存在する原核生物(細菌と古細菌)の細胞数とバイオマスの概算 (Whitman et al, 1998 にもとづいて作成)

環境	原核生物の細胞数** ($\times 10^{29}$ 個)	原核生物のバイオマス ($\times 10^{15}$ g of C)	地球上の全原核生物バイオマスに対する割合 (%)
水圏	1.2	2.2	0.4 ~ 0.6
土壌	2.6	26	4.8 ~ 7.4
海底下*	35.5	303	55.5 ~ 85.8
陸上地下*	2.5 ~ 25	22 ~ 215	6.2 ~ 39.4

* 地下生物圏は、海洋では海底面下10 cm 以深、陸上では地表から 8 m 以深と考えられている。

** 蛍光顕微鏡によって計数した全菌数から求められた。

地下生物圏と我々が住む陸上生物圏との最も大きな違いは「光」であるが、その他にも高圧や高温という極限的な環境条件が存在し、また、分子状酸素 (O_2) が欠乏した「嫌気環境」(無酸素) であることも特徴である。そのような光の届かぬ辺境で微生物はどのようにして栄養を得ているのであろうか。我々は好気呼吸に酸化剤として O_2 を使用するが、地下生物圏では二酸化炭素 (CO_2) を酸化剤に使用する二酸化炭素呼吸からはじまり、硫酸呼吸、硝酸呼吸へと深度が浅くなるにつれてこれらの嫌気呼吸でエネルギーを獲得する地下微生物の割合が増加してくる。これらの嫌気呼吸は、伝統的にはメタン生成、硫酸還元、硝酸還元(脱窒)と呼ばれている(図 1)。地下生物圏においては、その場で利用できる酸化剤の種類、つまり、その酸化還元条件が微生物群集の種組成に影響していることが考えられる。また、この水素からメタンへ、メタンから硫化水素へ、硫化水素から窒素へ、という微生物による酸化還元反応の連鎖は、興味深いことに生成物が次の反応に順次使われており、その反応の変遷が地球微生物の進化を示唆している。実際、水素からメタンを生成するような超好熱性のメタン生成微生物は系統樹上で「全生物の共通祖先」(last universal common ancestor, LUCA) に最も近いところに位置することが知られている (Nisbet and Fowler 1998)。

このように、分子状酸素 (O_2) の存在しない嫌気的な環境では、様々な酸化剤を利用した微生物の「呼吸の多様性」が見られる。地下生物圏にまで微生物が広がっているという微生物生態学の知見は、ここ最近 20 年で得られたことであるが、これは生物学においても革命的な出来事であった。なぜなら、これまで物理学や化学が宇宙にも適用できる普遍的な学問であったのに対して、生物学は地球の生物にしか適用できないという限界を持つ学問であった。

しかしながら、地下微生物に見られるような光を全く必要としない微生物生態系の発見は、光の届かぬ惑星にも条件さえ揃えば生態系が存在しうることを、すなわち、生物学が他の惑星にも適用できることを明示し、普遍的な学問となるパラダイムシフトであった。

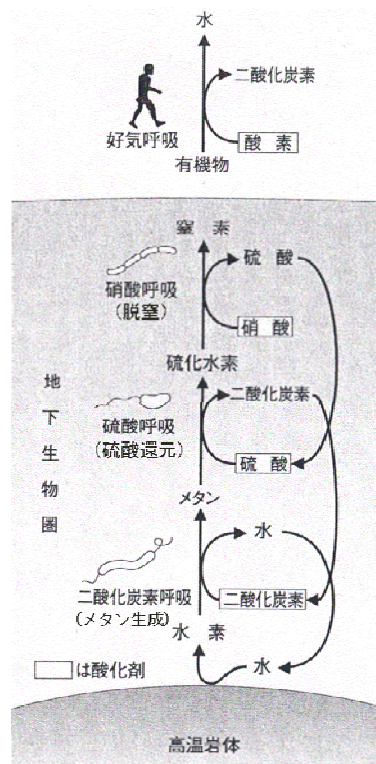


図1 地下生物圏における微生物の呼吸の多様性 (中井・長沼 2011)

極限微生物に関連した生物学のパラダイムシフトは今なお続いている。2010年、オランダの運河の堆積物から *Methylomirabilis oxyfera* という古細菌が発見された (Ettwig et al. 2010)。驚くべきことに、この微生物は、亜硝酸を還元して一酸化窒素にした後、これを分子状窒素 (N_2) と分子状酸素 (O_2) に変換し、その O_2 を使ってメタンを酸化するメタン酸化微生物である。つまり、メタンの酸化に必要な O_2 を自身で作って利用するのである。これまで光合成明反応だけが主要な生物的 O_2 発生過程であると考えられていたが、この発見により従来は脱窒として知られていた嫌気過程が O_2 発生源として新たに見直されたことになる。そして、亜硝酸由来の O_2 を用いたメタン酸化は、嫌氣的とも好氣的ともとれる。このようなメタン酸化の発見は、メタン酸化微生物の生態と進化に関する我々の認識を広げるものであり、地球史において光合成の登場以前に微生物が O_2 を獲得していた可能性を示すものとして注目されている。

1.2 南極生物圏

南極大陸は地球上で最も寒冷な地であり、同時に最も乾燥した土地でもあるので (Priscu 1998), 砂漠と高山の両方の特徴を併せもつ他に比肩すべきものない極限環境である。そのため、これまで様々な極限微生物調査や「火星生物圏」のアナログとして研究が進められている (Friedmann 1993)。南極大陸は面積 1,400 万 km² で、その面積と体積のほとんどは平均厚さ約 2,000 m の大陸氷河 (氷床) に占められている。南極氷床は全淡水の約 70 % にも達する地球最大の淡水資源であるが (Paterson 1994), 総計 10²⁴ という数の微生物が手付かずのまま閉じこまれており、その総炭素重量は 4×10¹⁰ g になると推測されている (Priscu et al. 2008)。これらの推測の根拠は氷床内微生物調査 (Priscu et al. 1999; Christner et al. 2001; Christner et al. 2006) などの先駆的研究である。これは全海洋の微生物の数 (10²⁹ 個) に比べれば少ないが、微生物の保持媒体として、氷床は積極的に評価されるべきである。さらに、微生物の保持媒体は氷床だけではない。南極氷床下には少なくとも約 150 個の氷床下湖 (subglacial lakes) が存在し (Siebert et al. 2005), それらは氷床下河川で連結していると考えられている (Fricker et al. 2007)。最近では、氷床下湖の数は約 350 個に達するという報告もある (Wright and Siebert 2011)。これらの氷床下湖のうち、最大のもはボストーク湖であり、ボストーク湖の面積は 14000 km² にもなると推定されている (Kapitsa et al. 1996)。氷床下湖から研究試料を得るため、ボストーク湖への氷床掘削が進められているが、2011 年 11 月現在、未だ貫通していない。なお、ボストーク湖への掘削孔は深度 3538 m までが氷床で、それより下はボストーク湖の湖水が凍った付加氷である (Petit et al. 1999)。この付加氷には微生物の細胞が観察され、その遺伝子解析によると、Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria に帰属する既知の微生物あるいはその近縁種であることが明らかとなっている (Priscu et al. 1999; Christner et al. 2001; Christner et al. 2006)。これには、氷床掘削に伴う雑菌の混入、いわゆるコンタミネーションの可能性もあり、議論の余地が残されている。また、氷床の最下面と基盤岩の間のミリメートルからセンチメートルの隙間を埋める液体の水も存在している。これもまた将来の辺境微生物探査の対象として有望である。

このように、南極生物圏については、大陸氷床上や氷床内の生物圏だけではなく、氷床下水圏といえる新たな生物圏も認識する必要がある。特に、氷床下水圏にはどのような微生物が生息しているのか、どのような進化が遂げられたのか、特に、地球生物圏から隔離された氷床下湖にこそ地球に固有な微生物が存在するという指摘もあり (Christner et al. 2008), 興味津々たる研究対象である。また、我々人類の氷床下湖への挑戦は、生命の存在が有力視され

る、木星の第2衛星エウロパの前哨戦としての場でもある。エウロパは氷に覆われた衛星であり、その氷殻の下には液体の水、つまり氷殻下「海」が存在すると考えられている。このように氷床下水圏における辺境微生物研究は、微生物生態学的な興味以上に、宇宙生物学、いわゆるアストロバイオロジーを考究する上でも期待されている。

また、南極生物圏のような極寒かつ極乾の環境の微生物を調べることは、生物生育温度の下限への挑戦でもある。現時点での微生物の最低生育温度は、バクテリアの *Psychromonas ingrahamii* で実測された -12°C が知られている (Breezee et al. 2004)。また、理論上の計算値では、バクテリアの *Shewanella gelidimarina* の -27°C が報告されている (Bowman 2002)。なお、動物では、ネパールのヒマラヤ氷河で生きる、昆虫のなかでもユスリカ *Diamesa* 属の一種が -16°C でも活動していることが知られている (Kohshima 1984)。

1.3 極域生物圏の微生物を調べる意義

北極と南極の両極域は、地球生物圏における微生物の分布（広がり）を研究するのに最も適した研究の場である。なぜなら、両極域の間にはその地理的な距離は勿論のこと、熱帯、亜熱帯、温帯、冷帯、寒帯といった様々な気候帯が存在する。つまり、微生物は分散の過程で極に到達するまでに異なる気候帯を経験し、周囲の劇的な環境変化にも耐えなければならない。このように、極域生物圏を探索することは極限環境にのみ優占するような特異な微生物を調べるだけでなく、微生物の多様性や全地球的な広がりを検証する上で重要である。

微生物生態学が始まって以来、長らく信じられてきた重要な仮説のひとつに、Baas-Beckingの仮説「everything is everywhere, but environment selects. (あらゆる微生物は至るところに存在するが、環境が選ぶ.)」がある (Baas Becking 1934; de Wit and Bouvier 2006)。この仮説は、微生物の高い分散能力に注目し、それぞれの微生物種は一様に分布しているが、その環境で増殖するかないかは、環境に適応しているかどうかで決まるというものである。(以下、Baas-Becking 仮説と呼ぶ)。微生物は、短い世代時間、小さい体積をもち、分散能力が高く、固有種を作りにくいと言われている (Finlay 2002)。そして、あらゆる細菌はあらゆる場所にすでに到達しており、個体数の非常に少ない個体群（種）も含めた群集構成種には、地理的な変異は小さいとも考えられている (Green and Bohannan 2006)。

Baas-Becking 仮説の前半「everything is everywhere」は汎存種に関わる部分であり、その一例として、SAR 11 という系統グループに属する *Pelagibacter ubique* という微生物がいる。これは、その学名の通り、海洋の漂泳域に (pelagic) 普遍的に (ubiquitous) 存在する細菌の

一種で、全海洋に約 2×10^{28} 個も存在し、全海洋における浮遊細菌の約 25 % をも占めると考えられている (Morris et al. 2002). 一方, Baas-Becking 仮説の後半「but environment selects」に関する固有種の報告もある (Whitaker et al. 2003). この仮説の後半部分は「but environment kills」とも捉えることができ、微生物は既にあらゆる場所に到達しているかもしれないが、環境条件による選択を受けて死に絶え、残った微生物こそがその環境に特有の微生物、つまり、固有種になるのであろう。固有種の例としては、クロマチウム属 (*Chromatium*) の紅色硫黄細菌 (purple sulfur bacteria) が挙げられる。クロマチウム属細菌は、光合成細菌 (photosynthetic bacteria) の 1 つであり、水の代わりに硫化水素を使用して光合成を行う独立栄養細菌である。つまり、硫化水素が安定的に供給されるような嫌気的な環境であって光が届くというような限られた環境下でのみ生存でき、日本では鹿児島県甬島の貝池でその存在が確認されている (Matsuyama 1987). このように、Baas-Becking 仮説の後半で示唆される固有種が成り立つためには「その特異な環境が安定している期間が長いこと」が必要である。

実際、南北極の両極の湖から、共通の細菌の遺伝子が検出されたという報告があるが (Pearce et al. 2007), これは 16S rRNA 遺伝子という単一遺伝子のごく一部 (ゲノム全体の 0.01% 以下の情報量) の比較に過ぎず、まだ検討の余地が多く残されている。極域生物圏に生息する微生物を調べることは、微生物の系統進化と生物地理—両者を合わせて系統地理 (phylogeography) ともいう—そして、それと表裏関係にあるはずの生理生化学的な適応を考える上で重要である。その一例として、まさに南極点の雪氷から採取された、氷点下 17°C でも活動可能な *Deinococcus* 属の細菌がある (Carpenter et al. 2000). *Deinococcus* 属の細菌は紫外線・放射線・過酸化水素・乾燥など種々の環境ストレスに耐性がある、極限環境に適応した細菌の代表であることが知られている (Shukura et al. 2007). 南極点で採取された菌株は、そのような *Deinococcus* 属の分布範囲 (系統地理) を拡大しただけでなく、生理的な特性における範囲、具体的には活動温度の下限も拡大したことになる。なお、まだ培養はされていないが、*Deinococcus* 属に近縁な遺伝子は北極の氷河からも検出されている (Schutte et al. 2010).

1.4 南極湖沼生態系

氷の大陸といわれる南極大陸であるが、その全面積の約 2.4 % (日本の面積 38 万 km^2 に近い) では、氷に覆われずに大陸岩盤が剥き出しとなった露岩域と呼ばれる地帯が存在する。露岩域は氷期—間氷期サイクルという地球規模の環境変動を受け、最終氷河期以降に形成された環境である。露岩域の陸上生態系は貧弱ではあるが、藻類・地衣類・蘚苔類などの植生

が見られ、その生理生態学的研究が行われている (Beyer and Bölter 2002). 南極の大陸縁辺に存在する露岩域には、淡水湖から飽和塩分に近い塩湖まで、様々な水質を持つ湖沼が数多く点在している (Imura et al. 2003; Gibson et al. 2006). そして、南緯 69 度、東経 39 度に位置する日本の南極昭和基地周辺にも幾つかの露岩域が存在し、100 個以上の多様な水質を持つ湖沼が点在している. ここで「多様な」と表現したのは理由がある. 東南極に位置する昭和基地周辺の露岩域の湖沼は、1. 氷河融水を直接受ける湖、2. 氷河融水を間接的に受ける湖、3. 雪田の融水に涵養される湖、4. 海水起源の湖と主として 4 つのタイプに分類できると考えられているが (Seto et al. 2002; Imura et al. 2006), 実際にはこのような典型的な湖沼は存在せず、これらの特徴が組み合わさっているからである.

現在、海水よりも高塩分を保持する湖沼では、そのほとんどが現在の海面高度より低い窪地にあること、これら湖沼の湖岸には海産生物の生物化石を産すること、および、湖底堆積物中に海由来の生物化石を有することから (三浦ら 2002; Kimura et al. 2009), 海洋起源の塩湖 (thalassohaline lake) と考えられている. 昭和基地周辺の湖沼では、海水の 5 倍以上の塩分を有するざくろ池、舟底池、およびすりばち池が知られている. すりばち池は上層に淡水化された水塊、下層には海水に近い水塊が存在する部分循環湖であり、好気的な淡水と嫌気的な塩水から *Halomonas* 属, *Idiomarina* 属, および *Marinobacter* 属の好塩菌が分離培養されている (Naganuma et al. 2005). 興味深いことに、好気的な淡水の上層から分離されなかった *Halomonas glaciei*, 嫌気的な塩水の下層からしか採れなかった *Marinobacter* sp., 両層から分離される *Halomonas* sp. など、二層構造に応じた微生物の分布が明瞭に見られた. なお、昭和基地周辺の湖沼において、原核生物、すなわちバクテリア (細菌) やアーキア (古細菌) を実際に分離培養し、系統学的位置を特定した報告、あるいは、環境中の遺伝子を指標として微生物相の分子系統解析を行った報告は、この好塩菌の報告以外には、同じすりばち池でのジメチルスルフォキシド呼吸細菌 (Matsuzaki et al. 2006), および部分循環湖ぬるめ池での微生物群集構造解析 (Kurosawa et al. 2010) の 2 例のみである.

南極の湖沼生態系は、一般的に、湖水中に存在する植物プランクトンの生物量に基づいて、貧栄養 (oligotrophic), あるいは極貧栄養 (ultra-oligotrophic) と分類される (Lizotte 2008). 極貧栄養の分類基準は、年間最大クロロフィル *a* 量が 2.5 mg m^{-3} , 年間平均が 1 mg m^{-3} 以下の湖沼である (Padisák 2004). 貧栄養であることに加え、南極湖沼は、年間のほとんど、もしくは全ての期間にわたって氷に覆われており、氷の厚さや積雪により湖水中の光環境が大きく変化する (Vincent et al. 1998). さらに、光の得られる短い夏の期間は、強光および強紫外線というストレスが多い時期である. 従って、南極

において液体状の水が存在する湖沼は、貴重かつ重要な生物活動の場であるが、陸上生態系と同様に極めて貧栄養であるため、南極湖沼の生態系も乏しいものであろうと理解されてきた。しかしながら、近年になって、南極の湖沼底では、藍藻、珪藻および緑藻などの藻類を中心とした微生物のマットが発達することが報告されてきた (Vincent 1988; Ellis-Evans et al. 1996; Tang et al. 1997; Quesada et al. 1999; Vincent 2000; Sabbe et al. 2004)。そして、その湖底の微生物群集は、カロテノイドやキサントフィル、スキトネミンやマイコスポリン様アミノ酸を作り出し (Vincent et al. 1993; Quesada et al. 1999; Hodgson et al. 2004)、その有害な光を調節あるいは防御していると考えられている (Kudoh et al. 2009)。このように、南極湖沼は、藻類を中心とした単純な生態系で成り立っていることから、近年の地球環境変動の影響を調べるモデルサイトとして、湖沼学的、生態学的研究が行われている (reviewed by Convey et al. 2006, 2011; Laybourn-Parry 2009)。

さらに、1995年、第36次日本南極地域観測隊が南極湖沼底に発達する水生コケ植物の大群落「コケ坊主」を発見した (Imura et al. 1999) (図2)。コケ坊主は、湖底の藻類マットから塔状に立ち上がる特異な生物群集であり、大きいものでは直径40 cm、高さ80 cmにもなる (Imura 2006)。コケ植物が湖沼底に群落を形成する現象自体は珍しいことではなく、グリーンランド、南極圏のキングジョージ島やリビングストン島、および南極大陸内陸部のドライバレーなど、南北両極域からの報告例がある (Quesada et al. 2008)。しかしながら、コケ坊主のような異常な構造体は、南極のみならず、世界の他の地域からも未だ報告例がなく、極めて特異な生態系である。なお、2004年1月から2005年2月までの1年間の連続観測で得られた湖沼環境データの解析によると、コケ坊主がみられる湖沼は、一次生産の指標とされるクロロフィル *a* 濃度が $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ から $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ の範囲であり (Tanabe et al. 2008)、極貧栄養湖沼に分類される。



図2 南極湖沼に特有な水生コケ植物の大群落「コケ坊主」(Nakai et al. 2011 を改変)

コケ坊主の発見以降、日本では、「南極湖沼生態系の構造と地史的遷移に関する研究計画 (Research on Ecology and Geohistory of Antarctic Lakes; REGAL-Project)」が組織され、昭和基地周辺の露岩域における湖沼の形状や水質に関するデータが調査されてきており、REGAL Project DataBase (<http://polaris.nipr.ac.jp/~penguin/Terrestrial/regal/DataBase/index.htm>) でその湖沼学的なデータが公開されている。また、2007年から2008年にかけての50年に一度の国際極年 (International Polar Year, IPY) では、Microbiological and Ecological Responses to Global Environmental Changes in Polar Regions (MERGE)がIPY認定プロジェクトとして、南北両極の微生物相の多様性と系統に関する調査研究が展開された (Naganuma and Wilmotte 2009)。

本研究では、コケ坊主に共在する微生物の遺伝子を標的として、後述する「分子生物学」的なアプローチを用いることで、その種多様性および生物地球化学的機能を明らかにする。

1.5 遺伝子を用いて生物相の種の多様性を調べる

本研究では、コケ坊主の共在生物相の「遺伝子」を対象として、分子生物学的手法を用いて、種の多様性とその生物地球化学的機能を調べる。本研究では、微生物を実際に分離培養することを行っていない。これは、自然環境に生息する全微生物数のうち培養可能なものは0.1–1%程度とされており、残りの99%以上は何らかの理由で培養困難であるため、培養法では微生物の多様性を正確に把握できないからである (Amann et al. 1995)。なお、これはあくまで全微生物数であり、全種数ではないことに注意しなければならない。また、培養法は、有機物濃度だけでなく、有機物の種類にも影響される。さらには、培養条件 (温度、塩分、pH など) にも影響される。つまり、万能培地や万能条件は存在せず、考え得るあらゆる培地とその組合せを網羅的に試し、培養する他ない。この問題を解決するにあたって、微生物を培養することなしに、DNAを環境中から直接取り出し、リボソームRNA (rRNA) 遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) で増幅させ、分子系統解析を進める手法が1990年代に開発された (Amann et al. 1995)。

rRNA 遺伝子が微生物の系統解析に用いられるようになったのは幾つかの利点がある (Woese 1987; Amann et al. 1995)。まず、rRNA 遺伝子は全ての生物に存在し、タンパク質合成機能をもつため遺伝子配列の保存性が高い。この保存性の高い領域を核酸マーカー (プライマーやプローブ) として利用し、生物種間で遺伝子配列が異なる領域を比較することで生物の系統分類が可能になる。特に、原核生物では16S rRNA 遺伝子、真核生物では18S rRNA 遺伝子が用いられ、その結果、環境中には従来の培養法では知りえなかった多種多様な微生物

物が生息することが報告されてきた (Giovannoni et al. 1990; Pace 1997; Karner et al. 2001) . 現在では, 地球上の様々な環境から16S/18S rRNA遺伝子が網羅的に解析されるようになり, 既存の生物系統から大きく隔たった系統が発見されている (Hugenholtz et al. 1998) . ちなみに, 環境中から得られたrRNA遺伝子のみで形成された推定上の分類群をcandidate divisionと呼ぶ (Hugenholtz et al. 1998) . このように, 遺伝子を標的とすることにより, 環境中に生息する微生物を網羅的に検出および解析することが可能となり, 今まで看過されていたcandidate divisionのような新規かつ新奇な微生物が存在することも明らかとなってきた.

原核生物の種数は, 「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol.2」によると, 2003 年時点では6466 種(真正細菌6185種, 古細菌281 種)である(Garrity et al. 2005) . その一方, rRNA 遺伝子に基づいた微生物の多様性解析が盛んに行われるようになり, 様々な環境由来の原核生物の16S rRNA 遺伝子塩基配列データが蓄積されつつある. 2011年8月9日時点では, ミシガン州立大学が提供しているrRNA 遺伝子のデータベース Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>) において, 1,921,179件の16S rRNA 遺伝子配列が登録されている.

ところで, 生物のゲノム配列が網羅的に決定される今日では, 種の定義もゲノム配列に基づいて明らかにされるべきものと考えられている (Tindall et al. 2010) . 特に, Konstantinidis and Tiedje (2005) によって提案されたaverage nucleotide identity (ANI) 法が, 近い将来, 微生物の系統分類の主流になると考えられている (Tindall et al. 2010) . この方法は, 微生物の全ゲノム配列からオーソログス(orthologus) 遺伝子, つまり, 同一祖先に由来する相同な遺伝子のうち, 種分化によって分かれた遺伝子を抜き出してその相同性を比較するという方法である. 2011年11月13日時点では, 米国生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information; NCBI) が提供している Genome Project (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) によると, 既に全ゲノム解析が完了している微生物は, 真正細菌1675種と古細菌120種の計1795種である.

1.6 遺伝子を用いて生物相の生物地球化学的機能を調べる

前述した 16S/18S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析では, 純粋培養されている近縁な分類群の微生物からその性質を推定することしかできず, その機能を知ることは困難である (Zwirgmaier et al. 2005) . また, 系統的学的に近縁なものが存在しない場合は, 機能を推定することもできない (Zwirgmaier et al. 2005) . そのため, rRNA 遺伝子の解析のみでは, コケ坊主の共生生物相がどのような機能を有するのか, 正確に把握できないと考えられる. そこで本研究では, コケ坊主の共生生物相の生物地球化学的機能を調べるため, 微生物の代謝反応を触媒する酵素の遺伝子 (酵素

遺伝子)を対象として検出および解析を行った。例えば、窒素固定反応を触媒する酵素を持つ微生物だけを環境中から検出したい場合、窒素固定細菌が共通して持つ窒素固定酵素(NifH)をコードする遺伝子(*nifH*)を標的として検出を試みた。このように、酵素遺伝子を指標とすることで特定の機能(例えば、二酸化炭素固定、窒素固定、アンモニア酸化など)を持つ微生物を検出することができる。更に、微生物の重要なエネルギー代謝を触媒する酵素の遺伝子情報は保存性が高く、rRNA 遺伝子のように微生物の進化系統を推定する指標としても利用することが可能である(for example, Wagner et al. 1998; Klein et al. 2001)。

1.7 本研究の目的

水生コケ植物の大群落「コケ坊主」は南極湖沼にのみ特有な生物群集である。コケ坊主は酸化的な外層と還元的な内層の二層構造を持ち、珪藻、緑藻、藍藻などと共在していることが報告されている(Imura et al. 1999; Ohtani et al. 2001; Ohtsuka et al. 2006)。南極コケ坊主は、植物と微生物の新たな共在あるいは共生系であると考えられるが、その共在生物相に関する知見は、顕微鏡観察から藻類の存在が確認されているのみである。そこで本研究では、この特異な生態系に共在する生物相の種の多様性および生物地球化学機能を明らかにするため、分子生物学的手法を用いて、系統分類に汎用される遺伝子や代謝に関与する酵素の遺伝子(酵素遺伝子)の検出および解析を行った。本研究の結果は、極域環境における植物と微生物の共在あるいは共生系、そしてそこで生じる生化学的なプロセス、および、生物多様性や生物地理の議論を深める材料を提供し得るものと考えられる。

ところで、この論文では「共在生物相」という言葉を使用しているが、それは英語の *association* に当てた言葉である。共在と似た言葉に共生と共存がある。共生(*symbiosis*)は「2種類(またはそれ以上)の異なる生物が同時に同じ空間に生息する状態」と定義される(de Bary, 1879)。さらに、共生は、宿主(*host*)にとって共生者(*symbiont*)が必須か否かによって必須共生(*obligate symbiosis*)と任意共生(*facultative symbiosis*)に分けられる。一般的に、必須共生においては、宿主と共生者の両者が得をする相利共生(*mutualism*)の関係が発達している。一方、任意共生については、一部で相利共生が発達するものの、共生によって共生者のみが利益を受け、宿主が何らかの害を受ける寄生(*parasitism*)の関係が多くみられる。本研究で扱うコケ坊主においては、コケ坊主と微生物が「共生」しているのか、つまり、コケ坊主(宿主)と微生物(共生者)の間に必須共生あるいは任意共生のような相互依存の関係があるのかどうか分からない。また、共存(*concomitance*)は「2種類以上のものがともに存

在すること」という意味であるが、その底には「本来なら競争的な関係が、何らかの努力によって穏やかになっている」という含意があるように思える。だからこそわざわざ「共存共栄」という表現があるのだ。最初から共栄の意味が自明として含まれているわけではない。コケ坊主は明らかに共栄的であり、それが成功を収めているので、「共存」ではない。

一方、この論文で共在を当てている英語の *association* には、共生 *symbiosis* ほど相互依存は強くないが、互助あるいは互恵のような緩やかな共栄的關係という含意がある。そして、それこそが、本研究で解明すべきコケ坊主の生態の鍵であるので、この論文では共在という言葉を使用することとした。

なお、微生物の群集構造や寡占度については、ある程度の時間を経た「積分」的なパラメータである。つまり、微生物が増殖し、それらが群集を形成するまでには、ある程度の時間が必要である。また、その微生物群集は、自然環境から種々のストレス（本研究で対象とする南極湖沼であれば、極貧栄養、強光、強紫外線など）を受けるので、ある種の微生物は死に絶える。そして、その環境に特異的あるいは特徴的な微生物群集が形成されていくと考えられる。このように、微生物群集の種の多様性は「積分」的な情報を内包している。一方、南極湖沼の現場で取得された湖沼学的な情報、例えば、イオン濃度はあくまで測定したときの瞬間的なデータであるため、「微分」的なパラメータであるといえる。従って、本研究の結果は、これまでに蓄積されてきた現場の環境データとお互いが補い合う関係であり、それらと比較することで、南極湖沼の生態系の状態を伺うのに資するデータになり得る。さらに、今後、現場で実測すべき環境データを提示することもまた可能である。

第 2 章.

南極湖沼に特有な水生コケ植物に共在する原核生物の種の多様性

要旨

南極湖沼に特有なコケ坊主は、湖底藻類マットから搭状に立ち上がる *Leptobryum* 属のコケを中心とした生物群集であり、酸化的な外層と還元的な内層の二層構造を持ち、藍藻や珪藻、微生物などと共在している。これまでに、生息場所における湖沼学的特徴やコケ坊主の光合成特性などについて研究されているが、その二層構造の生態系や共生系の構造についてはまだ明らかにされていない。本研究では、分子生物学的手法を用いて、コケ坊主と共在している微生物相を解析し、その生態系や共生系の構造について考察を行った。我々は完全なコケ坊主体 2 個体について 16S rRNA 遺伝子による分子系統解析を行った。まず、コケ坊主を内層と外層、さらにそれらを上下縦方向に分け、計 14 部位から DNA を抽出した。そこから原核生物の系統分類に汎用される 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を試み、その PCR クローン・ライブラリーを構築した。各ライブラリーから 96 クローンを無造作に選び、2 個体で 2688 クローン（それぞれ 1344 クローンずつ）の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定して分子系統解析を行った。その結果、コケ坊主全体には Proteobacteria に帰属する phylotype が優占的に存在し、外層には光合成細菌 Cyanobacteria、内層には絶対嫌気性のグラム陽性細菌 *Clostridium* 属や硫酸還元菌がそれぞれ特徴的に存在することが示唆された。また、コケ坊主の全体には窒素固定や脱窒を行う微生物種に近縁な phylotype が存在することも示された。以上のことから、コケ坊主 1 個体の中では、部位によってそれぞれに異なる微生物系統群が生息し、その微生物コミュニティによって窒素固定、脱窒と硫黄還元などが行われ、微生物コミュニティは好気的外層部と嫌気的内層部の酸化還元勾配の構造を確立、維持する役割を果たしている可能性が示唆された。

2.1 研究の背景

南極湖沼に特有な水生コケ植物の大群落「コケ坊主」は、湖底の藻類マットから塔状に立ち上がる生物群集である(第1章の図2). 大きいものでは直径40 cm, 高さ80 cmになる (Imura, 2006). コケ群落が塔状に立ち上がる理由は、水の動揺のない南極湖沼中で成長する群落が、光を求めて上に成長してゆくためだと考えられている (Imura et al. 2000). また、コケ坊主内層の放射性炭素年代測定年代測定から、表面から20 cm 程内部は250~300 年程前に形成されたことが示された (Imura et al. 2000; Kudoh et al. 2003a). 従って、高さ80 cm のコケ坊主ではその成長に1000~1200 年の時を要することになる. コケ坊主は、基本的には *Leptobryum* sp. というコケ種の植物体であり、それが密に絡み合っ一つの塔状の構造体を作り上げている. その中に一部 *Bryum* sp. が混在するものもある (Ohtani et al. 2001).

Imura et al. (1999) がコケ坊主を論文で初めて報告して以降、放射性炭素年代測定年代測定によるコケ坊主の成長速度の推定 (Imura et al. 2000), コケ坊主を構成するコケ種とその付着藻類 (Ohtani et al. 2001), 昭和基地周辺の水生コケ植物の分布 (Imura et al. 2003), コケ坊主のサイズ, 炭素量, 窒素量およびクロロフィル量 (Kudoh et al. 2003a; Imura 2006), 湖沼の水質や光環境 (Kudoh et al. 2003b; Tanabe et al. 2008), 光合成活性 (Kudoh et al. 2003c; Kudoh et al. 2009) が報告されてきた. 湖底堆積物の年代測定結果によると、コケ坊主がみられる昭和基地周辺の露岩域の湖沼群は、最終氷期以降の氷床後退後の数千年の間に成立したものであると推定されている (Iwasa et al. 2000; Matsumoto et al. 2006). Kimura et al. (2010) は、コケ坊主が発見されたほとけ池について、温度, 塩分, 溶存酸素および pH の鉛直プロファイルを初めて報告し、水深1 m と2 m の間に水温躍層と塩分躍層があることを明らかにしている. また、湖沼での長期連続観測により、このような成層構造は、夏に湖面を覆う氷が融けた後直ぐに消失することが報告されている (Tanabe et al. 2008; Kudoh et al. 2009).

特に、コケ坊主のユニークな構造上の特徴については詳細に報告されている. コケ坊主は、緑色の外層と、褐色の *Leptobryum* sp. 植物遺体が詰まっている内層の二層構造で形成されている (Imura et al. 1999; Imura et al. 2002) (図3). 外層は、緑の生きたコケ組織を中心に、その周りに付着している藍藻, 珪藻などとともに光合成がおこなわれている好気的な環境であるが、一方、内層は褐色の *Leptobryum* sp. 植物体で形成され、その多くが分解されて強い腐卵臭が発生している嫌気的な環境であり、コケ坊主内で、外層と内層の間に酸化還元勾配が存在する可能性が挙げられている (Kudoh et al. 2003a).

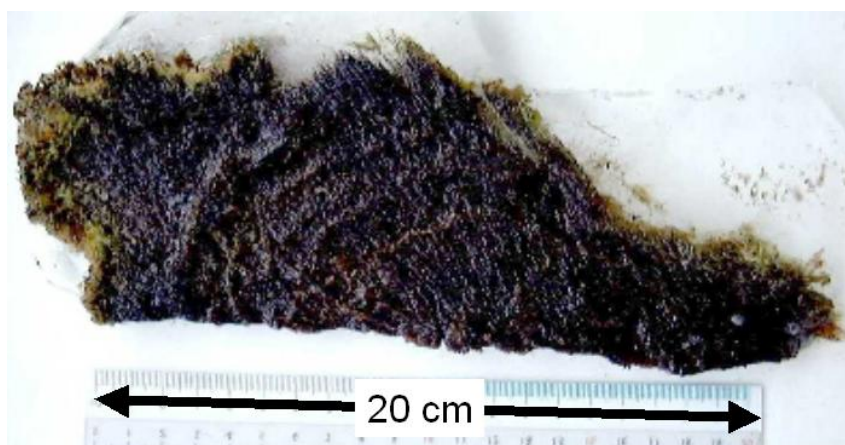


図3 コケ坊主の縦断面図

以上のように、南極コケ坊主に関しては形態学的な特徴および湖沼学的特徴に関する知見が蓄積されてきた。しかし、そのユニークな層構造の生態学系や共生系の構造については明らかにされていない。特にコケ坊主に共在する微生物相に関しては、その報告はほとんどない。そこで、この特異な生態系に生息する微生物の群集構造を明らかにするため、本研究では、分子生物学的手法を用いて、コケ坊主と共在している微生物相を解析し、その生態系や共生系の構造について考察を行った。我々は完全なコケ坊主2標本について16S rRNA遺伝子による分子系統解析を行った。本研究の結果は、コケ坊主をはじめとする極域環境における水生植物を中心とした生態系、環境生理学および生物多様性、そしてそこで生じる生化学的プロセスの議論を深める材料を提供し得るものと考えられる。

2.2 材料と方法

2.2.1 調査湖沼と生物標本の採取

コケ坊主標本の採取は、2000年1月19日、第42次日本南極地域観測隊により、東南極に位置する日本の昭和基地周辺スカルプスネス地域のほとけ池（69°28' S, 39°34' E）にて行われた（図4）。試料採取時、ほとけ池の湖面は凍っておらず、水温は3.7°C、電気伝導度は107.1 ms m⁻¹、溶存酸素濃度は12.0 mg L⁻¹、pHは7.01であった（Kudoh et al. 2003b）。また、湖水の各種イオン濃度については、リン酸イオン（PO₄⁻）は0 mg L⁻¹の検出限界以下、塩化物イオン（Cl⁻）は256.0 mg L⁻¹、亜硝酸イオン（NO₂⁻）は0 mg L⁻¹、硝酸イオン（NO₃⁻）は0 mg L⁻¹の検出限界以下、硫酸イオン（SO₄²⁻）は40.6 mg L⁻¹、ナトリウムイオン（Na⁺）は137 mg L⁻¹、アンモニウムイオン（NH₄⁺）は0 mg L⁻¹の検出限界以下、カリウムイオン（K⁺）は4.4 mg L⁻¹、マグネシウムイオン（Mg²⁺）は29.8 mg L⁻¹、カルシウムイオン（Ca²⁺）は19 mg L⁻¹であった（Kudoh et al. 2003b）。採取したコケ坊主標本は直径22 cm、高さ30 cmであった。採取標本は、直ちにヘリコプターで砕氷艦しらせの船上の研究室に運ばれ、遺伝子解析を行うまで-20°Cで冷凍保存された。

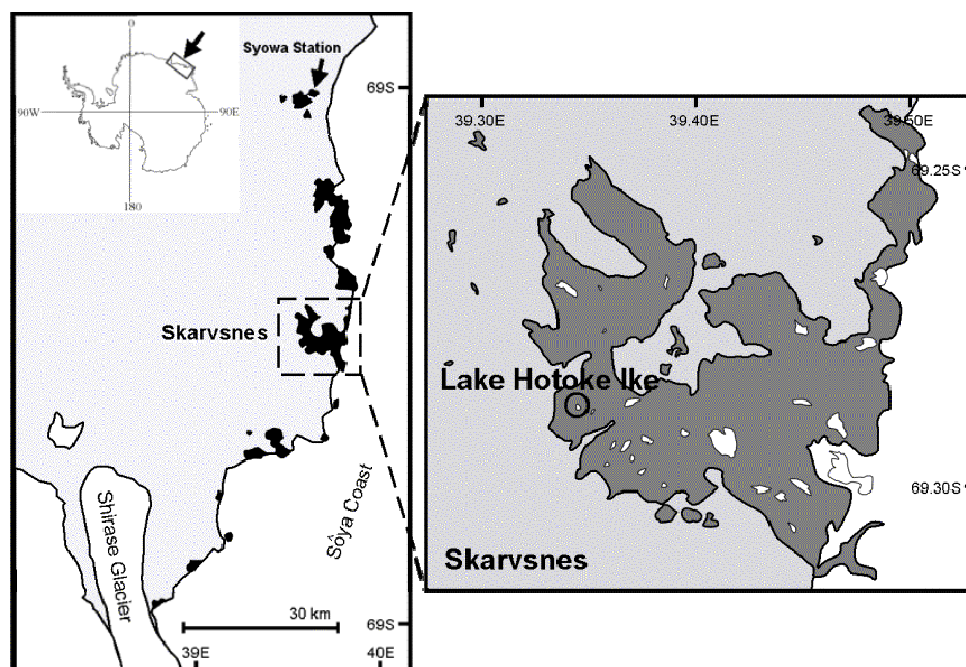


図4 東南極に位置する昭和基地周辺スカルプスネス地域のほとけ池（69°28' S, 39°34' E）

2.2.2 微生物の混合ゲノムDNAの抽出と精製

コケ坊主標本は、研究室に持ち帰った後、凍結したままで内層と外層、さらにそれらを上下縦方向に7つに分け、外層7画分、内層7画分の計14画分に分画した。分画した試料は、外層試料をO1~O7、内層試料をI1~I7と管理上の簡易名を付けた(図5)。次に、各画分を凍結乾燥させ、滅菌済みのすり棒で試料を粉碎し、遺伝子解析用の試料とした。微生物の混合ゲノムDNAは、各画分500mg(乾重量)を用いて、Miller et al. (1999)のビーズ破碎法を一部改変して抽出した。コケ坊主標本(100mg, 乾重量)を2mlスクリーキャップマイクロチューブに採り、そこに粒径0.1mmの滅菌済みジルコニウム/シリカビーズ(BioSpec Products Inc., Bartlesville, Oklahoma)1.2gを加えた。マイクロチューブに0.3mlのリン酸緩衝液(100mM NaH₂PO₄, pH 8.0)、0.3mlの溶菌緩衝液(10% SDS, 100mM NaCl, 500mM Tris-HCl, pH 8.0)、0.3mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)を加えた。マイクロチューブをミニビードビーター8(BioSpec Products)にセットして振盪した(3200rpm, 3min)。振盪後、チューブ内のビーズと破碎された細胞片は遠心分離(15,000rpm, 5min)により沈殿させて除去した。次に、その上清をMag Extractor-Genome-(Toyobo, Osaka, Japan)を説明書に則して用い、精製した。また、精製ゲノムDNAの濃度を算出するため、分光光度計GeneQuant pro RNA/DNA calculator(Amersham Pharmacia, St Albans, UK)を用いて、260nmの紫外吸光度(A₂₆₀)を測定した。さらに、純度の目安として260nmと280nmの吸光度の比(A₂₆₀/A₂₈₀)も測定した。

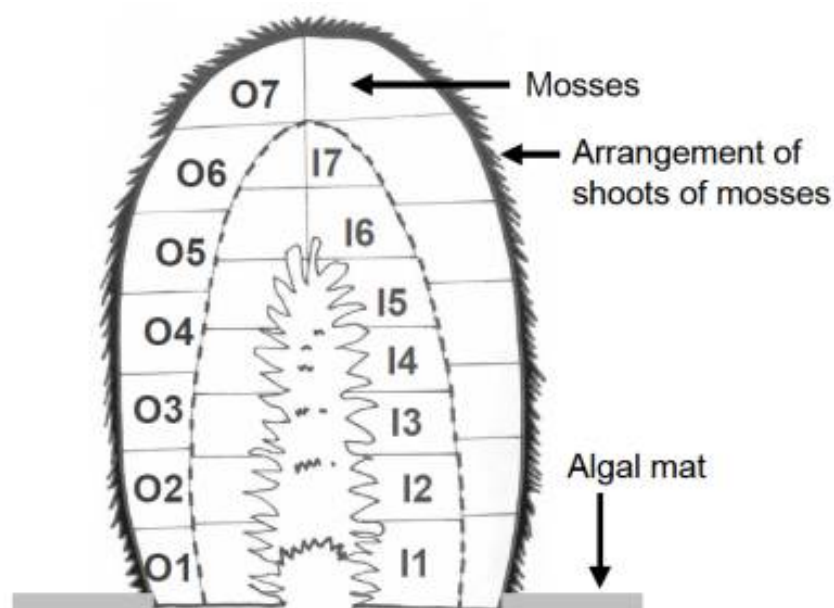


図5 分画したコケ坊主標本の概略図

2.2.3 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の PCR 増幅には、真正細菌に特異な 27F, 古細菌に特異な 21F, 及びユニバーサルな 1492R が用いられた (DeLong 1992) . PCR 増幅には TaKaRa Thermal Cycler PERSONAL TP240 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) と TaKaRa Ex Taq polymerase を使用した. PCR の反応条件は既報の条件に従った (Naganuma et al. 2007). PCR 増幅産物を TOPO TA cloning kit (Invitrogen, California, USA) を用いてクローニングした後, *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) に形質転換した. インサートされた 16S rRNA 遺伝子は DNA シークエンサー ABI 3730XL automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, USA) を使用して塩基配列が決定された.

2.2.4 PCR クローン・ライブラリーの構築と系統解析

得られた各クローンのヌクレオチド配列は, CD-hit program によって相同性が 97 %以上の配列を同種とみなし, 複数クローンを phylotype として統合した (Li and Godzik, 2006) . なお, phylotypes の基準 (criterion) を相同性 90%に低下させてつくった場合, 2 個体間で過半数の phylotypes が一致した. 2 クローン以上からなる phylotype は各塩基配列の変異部分を比較し, 16S rRNA 遺伝子の全塩基中で割合の高いクローンを代表とした. 得られた phylotype のキメラチェックには, RDPII chimera detection (Maidak et al. 2001) と Web-Pintail (Ashelford et al. 2005) を使用した. また, 分類した phylotype を既知の 16S rRNA 遺伝子と比較するため, NCBI が提供している BLAST program ver 2.2.17 を使用し, NCBI の nt-database や DDBJ の 16S rRNA 遺伝子 database を検索対象にして BLASTN 相同性検索を行った. 更に, RDPII の Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0 を使用し, 各 phylotype の系統分類を行った (Wang et al., 2007) . 微生物多様性に関する Rarefaction 分析を行うため, Rarefaction Caluculator (<http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>) を使用した.

2.2.5 16S rRNA 遺伝子解析の再現性の確認

本研究では, 16S rRNA 遺伝子解析の再現性を確認するため, ほとけ池で採取された別のコケ坊主1個体 (直径20cm, 高さ27cm, 第2標本) についても, 1番目のコケ坊主 (第1標本) と同様に, 外層7 画分, 内層7 画分の計14 画分に分画した後, 遺伝子解析を行った.

2.3 結果と考察

2.3.1 16S rRNA 遺伝子に基づくコケ坊主内の原核生物の種の多様性

DNA 抽出の結果、コケ坊主の外層からは平均収量 $1.5 \pm 0.3 \mu\text{g}$ 、内層からは平均 $2.4 \pm 0.4 \mu\text{g}$ の混合ゲノム DNA が抽出された。精製ゲノム DNA の純度の指標となる吸光度の比 (A_{260}/A_{280}) は全て 1.4 以上であった。また、PCR 増幅の結果、コケ坊主の外層 7 画分、内層 7 画分の計 14 画分全てからバクテリアの 16S rRNA 遺伝子が検出された。一方、アーキアの 16S rRNA 遺伝子については、数回の再試を行ったものの、コケ坊主の全画分どこからも PCR 産物が得られなかった。従って、真正細菌 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物のみをクローニングに使用した。

コケ坊主の第 1 標本 (the specimen A) から得られた 1344 クローンの塩基配列データについて、シーケンス波形の明瞭でないものとキメラシーケンスを除外し、最終的な解析対象として 1101 クローンを得た。これら 1101 クローンについては、核酸配列で 97% 以上一致するもの同士を *phylo*type としてグルーピングし、294 の *phylo*type を得た。Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0 による系統分類の結果、この 294 *phylo*types は、9 Cyanobacteria, 59 Alphaproteobacteria, 16 Betaproteobacteria, 5 Gammaproteobacteria, 30 Deltaproteobacteria, 1 Unclassified proteobacteria, 23 Bacteroidetes, 2 Nitrospirae, 12 Firmicutes, 41 Chloroflexi, 12 Actinobacteria, 36 Planctomycetes, 19 Acidobacteria, 10 Verrucomicrobia, 6 candidate divisions (1 OP11, 1 OD1, 2 TM7, 2 WS3), 13 Unclassified bacteria の 16 クラスターに帰属されることが分かった (表 2)。各 *phylo*type のコケ坊主 14 画分における分布、系統分類および BLASTN 相同検索結果は補足表 1 に示している。

コケ坊主全体には Proteobacteria に近縁な塩基配列が優占しており、さらに、外層では光合成細菌 Cyanobacteria が、内層では偏性嫌気性のグラム陽性細菌 Clostridia がそれぞれ特異的に検出された。これによりコケ坊主の外層と内層には、共通の微生物系統群と、各層に特異的な微生物系統群が存在することが示された。また、コケ坊主の外層最深部においては、既知の真正細菌のどのグループにも分類することができないようなグループ (candidate division OP11, OD1, TM7, Unclassified bacteria) が、計 19 *phylo*types 検出され、それが解析クローン全体の約 30% を占めていた。Rarefaction 分析の結果、コケ坊主外層の 2 画 (O1 および O3) を除いて、コケ坊主内層の方が外層よりも潜在的な生物多様性の可能性が高いことが分かった (図 6)。

表2 コケ坊主第1標本から得られた細菌の16S rRNA遺伝子のPCRクローンの分布およびphylotypeの系統

Phylotype	No. of phylotype	No. of clones	Distribution of clones																				
			Exterior section								Interior section												
			O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7							
Cyanobacteria	9	65	14	19	4	1	8	8	11	0	0	0	0	0	0	0	20	23	25	18	29	21	27
Alphaproteobacteria	59	347	19	23	26	27	34	27	28	20	23	25	18	29	21	27	10	8	7	5	3	4	6
Betaproteobacteria	16	74	4	6	6	4	6	3	2	0	5	0	1	0	0	1	0	5	0	1	0	0	1
Gammaproteobacteria	5	12	0	0	3	0	0	1	1	6	5	7	9	4	10	9	6	5	7	9	4	10	9
Deltaproteobacteria	30	112	4	2	11	19	9	10	7	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Unclassified proteobacteria	1	6	0	1	1	0	1	1	0	3	2	10	9	9	5	7	3	2	10	9	9	5	7
Bacteroidetes	23	62	2	3	2	3	2	1	4	2	3	2	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	1
Nitrospirae	2	12	0	0	1	0	0	0	0	13	5	5	4	7	8	5	9	9	5	8	5	6	5
Firmicutes	12	47	0	0	0	0	0	0	0	9	9	5	8	5	6	5	9	9	5	8	5	6	5
Chloroflexi	41	98	5	15	4	7	6	7	7	1	2	4	1	4	4	4	1	2	4	1	4	4	4
Actinobacteria	12	25	0	0	1	1	2	0	1	5	10	8	11	6	5	8	5	10	8	11	6	5	8
Planctomycetes	36	99	4	3	6	5	8	10	10	0	2	4	3	5	5	5	0	2	4	4	3	5	5
Acidobacteria	19	38	2	2	4	2	1	2	2	0	2	1	0	1	1	2	0	2	1	0	1	1	2
Verrucomicrobia	10	24	3	1	2	3	3	3	2	0	2	3	2	1	2	1	0	2	3	2	1	2	1
Candidate division	6	34	17	2	0	0	0	1	1	2	3	2	2	1	2	1	2	3	2	2	1	2	1
OP11	(1)	(10)	(7)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
OD1	(1)	(8)	(6)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
TM7	(2)	(10)	(4)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)
WS3	(2)	(6)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(1)	(2)	(1)
Unclassified bacteria	13	46	8	3	3	2	0	4	4	4	0	3	5	2	4	4	4	0	3	5	2	4	4
Total	294	1101	82	80	74	74	80	78	80	75	80	84	78	75	76	85	75	80	84	78	75	76	85

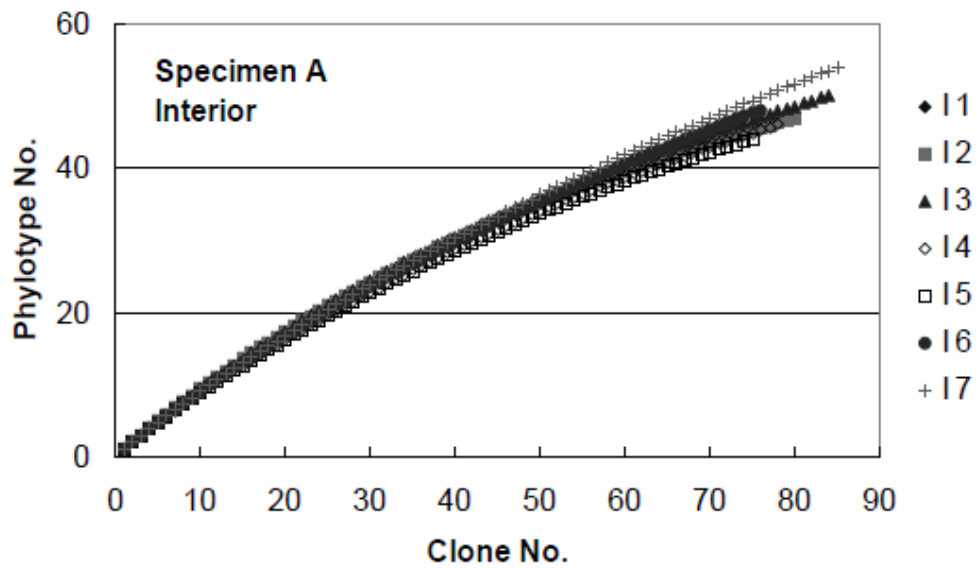
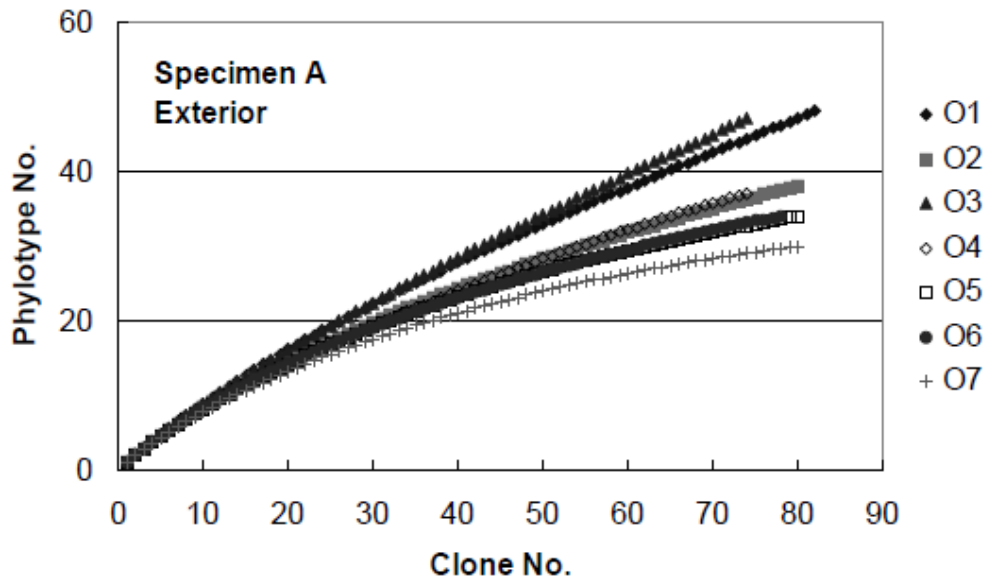


図6 コケ坊主の外層（O1～O7）および内層（I1～I7）における真正細菌の16S rRNA遺伝子の rarefaction curves

2.3.2 コケ坊主で最優占していた Proteobacteria

Proteobacteria に属する phylotype は, 111/294 種類 (クローン数は 551/1101; 全体の約 50 %) 得られ, コケ坊主の内層外層計 14 画全ての部位において最も優占していた (表 2) . 111 phylotypes の中では, Alphaproteobacteria に属する phylotype が 59/294 種類 (クローン数は 347/1101; 全体の約 31.5 %) が得られ, 特に MPB1-33 (クローン数は 157/347; 全体の 45.2 %) がコケ坊主内層外層計 14 画全部位からクローンが得られた. この phylotype は活性汚泥から得られた clone AS13 (EU283353) に相同性 99.4 %であり, 分離された株では未同定種 alpha proteobacterium A0839 に相同性 89.4 %であった. また, 他の phylotype でコケ坊主の内層外層計 14 画全部位からクローンが得られたのは, MPB1-27 (クローン数は 24/347; 全体の 6.9 %) で, これは重金属汚染土壌から得られた clone 655092 (AF236002) に相同性 96.6 %であった. この phylotype は, 分離された株では *Bradyrhizobium* 属に相同性 92.1 %であった.

Deltaproteobacteria に属する phylotype は, 30/294 種類 (クローン数は 112/1101; 全体の約 10.2 %) 得られた. この 30 phylotypes の中では, MPB1-104 (クローン数は 42/112; 全体の約 37.5 %) が最も優占し, これはハワイ火山国立公園の cave のシアノバクテリアマットから得られた clone HAVOmat82 (EF032751) に相同性 96 %であった. この phylotype は, 分離された株では *Geobacter* 属に相同性 85.9 %であった. また, 本研究において, 既知の分離された硫酸還元菌 *Desulfatirhabdium* 属, *Desulfonema* 属, Sulfate-reducing bacterium STP23 に近縁な phylotype がコケ坊主内層から得られ, 相同性はそれぞれ 94.9 %, 92.4 %および 97 %であった. これらは, 嫌気環境における微生物代謝として代表的な硫酸還元を行う微生物である. このことから, コケ坊主内部, 特に嫌气的環境であると考えられるコケ坊主内層において硫酸還元が営まれている可能性が示された.

Betaproteobacteria と Gammaproteobacteria は minor であったのでここでは議論しない.

2.3.3 コケ坊主外層に特異的に検出された Cyanobacteria

光合成細菌シアノバクテリアは, 南極の湖沼における主要な一次生産者である (Vincent 1988, 2000; Quesada et al. 2008) . 本研究において, Cyanobacteria に属する phylotype は, 9/294 種類 (クローン数は 65/1101; 全体の約 5.9 %) 得られ (表 2) , その全てのクローンはコケ坊主の好气的な環境, すなわち外層から得られた. 得られた phylotype は, 分離された株の中では *Leptolyngbya* 属, *Phormidium* 属, *Nostoc* 属, *Synechococcus* 属に近縁であり, その相同

性の範囲は94.2%~99.8%であった。この9 phylotypes の中では、MPB1-3(クローン数は30/65; 全体の約46.2%)が最も優占しており、コケ坊主外層の7 部位全てからクローンが得られた。このMPB1-3は、東南極ラースマンヒルズ (Larsemann Hills) の Reid lake の湖底微生物マットから得られた clone RJ088 (DQ181681) (Taton et al. 2006a) に相同性100%で完全に一致した。この phylotype は、分離された株では *Leptolyngbya frigida* ANT.LH64B.1 (AY493577) に相同性98.3%であり、この分離株も南極種である (Taton et al. 2006b) 。 Ohtani ら (2001) のコケ坊主の付着藻類に関する報告において、顕微鏡観察による *Leptolyngbya* 属の存在が確認されており、過去の報告と一致した。

2.3.4 コケ坊主内層に特異的に検出された Firmicutes

Firmicutes に属する phylotype は、12/294 種類 (クローン数は47/1101; 全体の約4.3%) 得られ (表2) , その内訳は、Bacilli, Clostridia がそれぞれ、1 および 11 phylotype 得られた。得られた Firmicutes のほとんどを占める偏性嫌気性の芽胞形成細菌 Clostridia に属するクローンは全てコケ坊主の内層から得られており、これは前述した脂肪酸分析の結果と一致している。これは、コケ坊主の内層が外層とは異なり、偏性嫌気性の Clostridia が生息できる嫌気的環境である可能性が高いことを示唆している。Clostridia に属する 11 phylotypes の中では、MPB1-149(クローン数は15/45; 全体の約33.3%)が最も優占し、これは分離された *Clostridium estertheticum* subsp. *Laramiense* に相同性96.5%であった。また、準優占していたMPB1-154 (クローン数は11/45; 全体の約24.4%) は、分離された *Clostridium bowmanii* に相同性98.4%であった。また、コケ坊主内層の最深部 (I1) においては、分離された硫酸還元菌 *Desulfosporosinus* 属に相同性が96.7%の phylotype も得られた。このことから、コケ坊主の内層では、前述した Deltaproteobacteria だけではなく、Firmicutes 門にも硫酸還元に関与する種類が知られており (Kaneko et al., 2007) , それらの種類に関連するクローンが検出されたものと思われる。

2.3.5 コケ坊主外層最深部から検出された candidate division と unclassified bacteria

コケ坊主から得られた294 phylotype のうち、既知の真正細菌のどのグループにも分類することができないようなグループに属する phylotype が 19 phylotypes (クローン数は80/1101; 全体の約7.3%) 得られた (表2) 。 そのうち、candidate division (OP11, OD1, TM7, WS3), Unclassified bacteria に属するクローンの約30% が、コケ坊主外層の最深部 (O1) から得られた。candidate division とは、環境中から得られた既知の系統群に属さない遺伝子クローンを

統合して作成された推定上の門のことである。この candidate division の代表例として、イエローストーン国立公園の温泉泥から検出された 16S rRNA 遺伝子を基に作られた candidate division OP11 があり (Hugenholtz et al. 1998) , 本研究でもコケ坊主の外層最深部 (O1) から OP11 に近縁な phylotype が得られている (クローン数は 7/82; 全体の約 8.5%)。また, 2004 年に candidate division OP11 の subdivision から独立した candidate division OD1 についても (Harris et al. 2004) , コケ坊主の外層最深部 (O1) において近縁な phylotype が 6/82 クローン (全体の約 7.3%) 得られた。これらの candidate division に属するクローンは, 淡水および海水中の堆積物 (Wise et al. 1997; Li et al. 1999) , 温泉泥 (Hugenholtz et al. 1998) , 地下水 (Watanabe et al. 2001; Miyoshi et al. 2005) , 土壌 (Kuske et al. 1997) および人の口腔 (Paster et al. 2001) などの様々な嫌気環境から得られている。本研究においては, 好氣的であると考えられる外層 (O1) からこれらの candidate division に属するクローンが多数得られているが, この理由としては, 外層 O1 が, 外層最深部であり, 試料採取時のコケ坊主直下堆積物を一緒に採取している可能性があり, 試料のコンタミネーションの可能性があると考えられる。これを解明するためには, 今後, 試料コケ坊主直下の堆積物中の微生物相解析を行い, コケ坊主内微生物相との比較解析を行うことが考えられる。

2.3.6 第 2 のコケ坊主の 16S rRNA 遺伝子解析による再現性の評価

本研究では, 遺伝子解析の再現性を確認するために, コケ坊主の第 2 標本 (the specimen B) でも, コケ坊主の第 1 標本 (the specimen A) と同様に, 試料コケ坊主を外層 7 画分, 内層 7 画分の計 14 画分に分画した後, 分割したコケ坊主の計 14 部位から DNA を抽出して PCR クローンライブラリー 14 組を構築し, 各ライブラリーから 96 クローンを無作為に選び, 1344 クローンの 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定して分子系統解析を行った。得られた 1344 クローンの塩基配列データから, シークエンス波形の明瞭でないものとキメラシーケンスを除外し, 1109 クローンを得た。これら 1109 クローンについては, phylotype 分類 (>97%) を行い, 270 の phylotype を得た (補足表 2)。

この 270 phylotype を the specimen A の phylotype と比較照合した結果, the specimen A と共通の phylotype (based on the 97%-criterion) が 103 個存在した。これは the specimen A の phylotype の 35%, the specimen B の phylotype の 38%である。これをもって微生物相の再現性について必ずしも示していると言えるわけではないかもしれないが, 微生物コミュニティ構造についてのある傾向を反映していると考えられる。なお, 仮に phylotype の規準 (criterion)を 16S

rRNA 遺伝子の相同性 97%以上（種のレベルに相当）ではなく 90%（科のレベルに相当）にした場合、*phylotype* の数が減るとともに、ふたつのコケ坊主間で共通する *phylotype* は増える；全体の半分かそれ以上の *phylotype* が共通することがわかった。一方、the specimen A および the specimen B において、Proteobacteria が最優占すること、さらに、Cyanobacteria が外層に、Firmicutes が内層に特異的にみられるという特徴は共通していた（表 3）。

表3 コケ坊主の第1標本と第2標本から得られた細菌の16S rRNA遺伝子のPCRクローンの分布と系統

Phylogenetic group	Specimen A		Specimen B	
	Exterior	Inner	Exterior	Inner
Cyanobacteria	65	0	169	0
Alphaproteobacteria	184	163	117	167
Betaproteobacteria	31	43	8	52
Gammaproteobacteria	5	7	9	5
Deltaproteobacteria	62	50	9	80
unclassified Proteobacteria	4	2	6	7
Bacteroidetes	17	45	36	26
Nitrospirae	1	11	0	4
Firmicutes	0	47	0	45
Chloroflexi	51	47	97	53
Actinobacteria	5	20	22	3
Planctomycetes	46	53	40	58
Acidobacteria	15	23	2	11
Verrucomicrobia	17	7	7	7
Caldiserica	0	0	0	1
Gemmatimonadetes	0	0	3	0
Candidate division	21	13	13	9
OP10	(0)	(0)	(5)	(4)
TM7	(5)	(5)	(0)	(3)
WS3	(0)	(6)	(0)	(0)
OP11	(8)	(2)	(7)	(2)
OD1	(8)	(0)	(1)	(0)
unclassified Bacteria	24	22	26	17
Subtotal	548	553	564	545
Total	1101		1109	

一方、外層における Cyanobacteria の存在頻度については、the specimen A が 11.9%，the specimen B が 30% と差が見られた。また、the specimen B における外層最深部での、candidate divisions や Unclassified bacteria の存在頻度は 17.5%であり、the specimen A における存在頻度 30% とは差が見られた。これらのことは、the specimen A および the specimen B の *phylotype frequency* からわかる（図 7）。つまり、the specimen A および the specimen B における系統存在度は、コケ坊主の外層よりも内層において類似しており、内層においては、ほぼ一致していることがわかる。つまり、これは、コケ坊主の外層の存在によって、外部からの影響が少なくなると考えられる内層部分においては、コケ坊主の各個体に存在する微生物コミュニティ（微生物相）の傾向がほぼ決まっている可能性が高いことを示すものと考えられる。ま

た、コケ坊主の外層における微生物系統群については、コケ坊主外層は湖水と直接接触しており、湖水中の微生物相と部分的に共通する **phylotypes** が存在する可能性が高く、それが本研究におけるコケ坊主外層の遺伝子解析結果にもとづく微生物系統群に反映されている可能性が高いことが推測される。

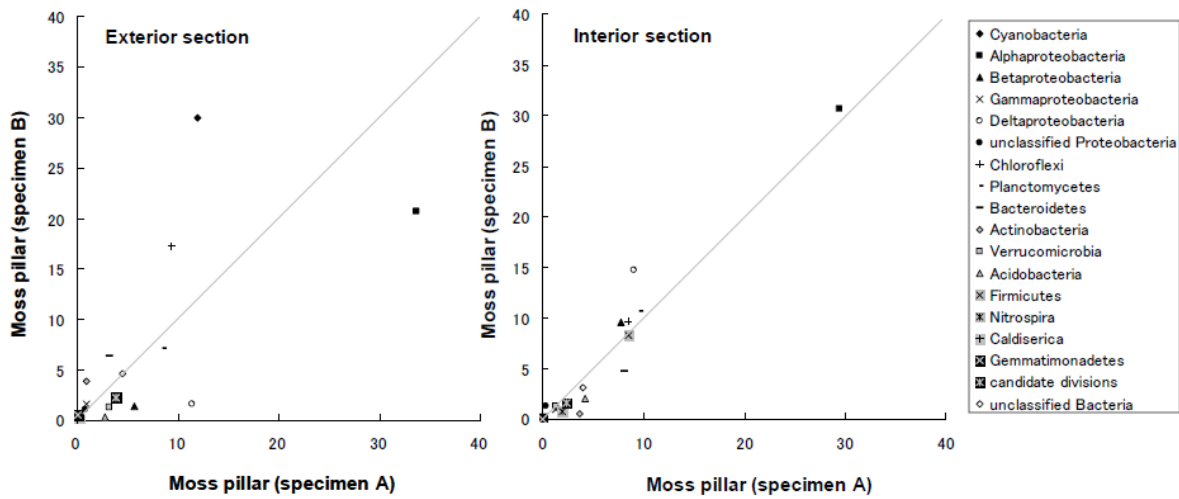


図7 コケ坊主の第1標本と第2標本における phylotype frequency

2.4 結論

本研究では、二つの完全なコケ坊主を用いて、16S rRNA 遺伝子による分子系統解析を行った結果、コケ坊主全体には *Proteobacteria* に帰属する *phylotype* が優占的に存在し、外層には光合成細菌 *Cyanobacteria*、内層にはグラム陽性細菌および硫酸還元菌、内層下部にはグラム陰性細菌がそれぞれ特徴的に存在することが示唆された。また、全部位において窒素固定や脱窒を行う微生物種に近縁な *phylotype* が存在することも示された。以上のことから、コケ坊主一個体の中では、部位によってそれぞれに異なる微生物系統群が生息し、その微生物コミュニティによって窒素固定、脱窒と硫黄還元などが行われ、微生物コミュニティは好気的外層部と嫌気的内層部において異なる生化学的プロセスに関与し、酸化還元勾配の構造を確立、維持する役割を果たしている可能性が示唆された。

第3章

南極湖沼に特有な水生コケ植物の共存する真核生物の種の多様性

要旨

南極湖沼に特有の生物群集「コケ坊主」は、主構成種であるコケ類 *Leptobryum* 属とそれに付随する微生物相が協調的に物質生産および物質循環を行う、自立度の高いミニ生態系である。これまでに 16S rRNA 遺伝子の多様性解析により、コケ坊主内外上下の藍藻やバクテリアの種組成を明らかにしてきた（第2章参照; Nakai et al. 2011）。しかしながら、コケ坊主の主要構成種であるコケ類、および真核微生物については詳細な同定あるいは系統解析がなされていなかった。本章では、分子生物学的手法を用いて、コケの系統学的位置とコケに共存している真核微生物相を明らかにすることにより、その生態系の構造について考察を行った。まず、完全なコケ坊主体を外層と内層、さらにそれらを上下縦方向に分け、計 14 部位に分割した。そこから 18S rRNA 遺伝子の PCR クローン・ライブラリーを 14 組構築した。そして、コケ坊主の第 1 標本と第 2 標本の 2 標本からそれぞれ 1344 クローンずつ、計 2688 クローンの 18S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定した。分子系統解析の結果、コケ坊主の主構成体であるコケ由来と思われるクローン (phylotype) が既知種 *Leptobryum pyriforme* の 18S rRNA 遺伝子に相同性 99.9% で最近縁であることが分かった。また、コケ坊主全体に novel clade の菌類が突出して優占しており、これがコケ坊主生態系における寄生者あるいは分解者として炭素循環に寄与している可能性が示唆された。さらに、外層には繊毛虫やクマムシに帰属する phylotypes が準優占する一方、内層には特異的にアメーバ様の単細胞真核生物 *Cercomonas* (Cercozoa) の phylotype が検出された。これらの特徴はコケ坊主の第 2 標本でも共通していた。以上のことから、コケ坊主一個体の中では、コケ坊主全体に広く分布する真核微生物系統と、外層と内層の各層に特徴的に分布する系統が存在することが高い蓋然性をもって示された。

3.1 研究の背景

南極の極貧栄養湖沼に特有な生物群集「コケ坊主」は、主構成種であるコケ類 *Leptobryum* sp. とそれに付随する微生物相が極限環境で協調的に物質生産および物質循環を行うミニ生態系であると考えられる。これまでに 16S rRNA 遺伝子の多様性解析を行い、コケ坊主内外上下の原核生物、すなわちシアノバクテリアやバクテリア（細菌）の種組成を明らかにしてきた（第2章参照; Nakai et al. 2011）。ただし、原核生物のうち、アーキア（古細菌）の rRNA 遺伝子は検出されなかった。しかしながら、そのコケ類や真核微生物に関しては、コケ類の *Leptobryum* sp. および *Bryum pseudotriquetrum* (Imura et al. 1999)、また、付着藻類として、珪藻の *Amphora* 属、緑藻の *Oedogonium* 属と *Cosmarium* 属、および、藍藻の *Leptolyngbya* 属が顕微鏡観察から報告された例に限られている(Ohtani et al. 2001; Ohtsuka et al. 2006)。コケ坊主生態系において、コケ類は主要な構成種である。また、コケ類に共在する真核微生物は、生態系の存立と維持に関与する重要な働きを担うと考えられる。そこで本研究では、この南極湖沼に特有な生態系を構成するコケ類と真核微生物相の系統と多様性を明らかにするため、18S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統学的解析を行った。本研究の結果は、極域環境におけるコケ類や真核微生物の生物地理とその多様性に関する議論を深める材料を提供し得るものと考えられる。

3.2 材料と方法

3.2.1 調査湖沼と生物標本の採取

第2章の原核生物の多様性解析で使用したコケ坊主標本と同じものを本研究にも使用した。標本の採取場所、湖沼の環境データなどの詳細は第2章に記した。本研究では、遺伝子解析結果の再現性を確認するため、また、コケ坊主間の真核微生物相を比較するため、ほとけ池で採取された別のコケ坊主1個体（直径20cm, 高さ27cm, 第2標本）についても、1番目のコケ坊主（第1標本）と同様に、外層7画分、内層7画分の計14画分に分画した後、遺伝子解析を行った。

3.2.2 微生物の混合ゲノム DNA の抽出と精製

第2章の原核生物の多様性解析の際、コケ坊主標本から抽出した混合ゲノム DNA を本研究にも使用した。ゲノム DNA の抽出と精製の詳細は第2章に記した。

3.2.3 18S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

18S rRNA 遺伝子のほぼ全長の PCR 増幅には、真核生物に特異な Euk-F と Euk-R が用いられた (Medlin et al. 1988)。PCR 反応には TaKaRa Thermal Cycler PERSONAL TP240 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) と TaKaRa Ex Taq polymerase を使用した。PCR の反応条件は既報の条件に従った (DeLong 1992)。PCR 増幅産物を TOPO TA cloning kit (Invitrogen, California, USA) を用いてクローニングした後、*Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, California, USA) に形質転換した。インサートされた 16S rRNA 遺伝子は DNA シークエンサーABI 3730XL automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, USA) を使用して塩基配列が決定された。

また、本研究では、コケ坊主の主要構成種である *Leptobryum* 属だけでなく、マイナーな構成種の *Bryum* 属の存在と分布を確認するため、*Bryum* 属の既知種の 18S rRNA 遺伝子配列 *B. capillare* (AF205945), *B. donianum* (AF023704), *B. caespiticium* (AF023703), *B. alpinum* (AF023700), および *B. argenteum* (BAU18529) を基に、フォワードプライマー Bry-F (5'-ACAAACTCCCGACTCCGG-3') と リバースプライマー Bry-R (5'-GATTACCCAGGCCTACCG-3') を設計した。PCR 増幅産物のサイズは約 1300 bp である。PCR 反応の条件は、PCR 反応は熱変性；95°C (2分) を1サイクル行った後、熱変性；95°C (1分), アニーリング；57°C (1分), 伸長；72°C (1.5分) を30サイクル行い、最後に伸長；72°C (15分間) の反応を行った。

3.2.4 PCR クローン・ライブラリーの構築と分子系統解析

得られた増幅産物は、TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてクローニングし、*Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) に形質転換した。形質転換体に挿入した 18S rRNA 遺伝子は DNA シークエンサーABI 3730XL automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, USA) を使用して塩基配列を決定した。得られた各クローンのヌクレオチド配列は、CD-hit program によって相同性が 97 %以上の配列を同種とみなし、複数クローンを phylotype として統合した (Li and Godzik 2006; Huang et al. 2010) 。 2 クローン以上からなる phylotype は各塩基配列の変異部分を比較し、18S rRNA 遺伝子の全塩基中で割合の高いクローンを代表とした。得られた phylotype のキメラチェックには、RDPII chimera detection (Maidak et al. 2001) と Bellerophon (Huber et al. 2004) を使用した。NCBI が提供している BLAST program ver 2.2.17 を使用し、NCBI の nt-database や DDBJ の 18S rRNA 遺伝子 database を検索対象にして BLASTN 相同性検索 (Altschul et al. 1997) を行った。また、分類した phylotype のヌクレオチド配列と既知の 18S rRNA 遺伝子の配列との進化距離を比較するため、ClustalW を用いた多重整列 (アラインメント) を行い、MEGA5.0 を用いて分子系統樹を構築した (Tamura et al. 2011) 。分子系統樹には、最尤法 (maximum likelihood method, ML 法) および塩基置換モデル GTR を使用した。また、系統樹の分岐の信頼性を評価するため、100 回の再試で bootstrap 値を計算した。

微生物多様性に関する Rarefaction 分析を行うため、Rarefaction Caluculator (<http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>) を使用した。

3.3 結果と考察

3.3.1 18S rRNA 遺伝子に基づくコケ類と真核微生物の系統

PCR 増幅の結果，コケ坊主の両標本の外層 7 画分，内層 7 画分の計 14 画分全てから真核生物の 18S rRNA 遺伝子が検出された．コケ坊主の第 1 標本から得られた 1344 クローンの塩基配列データについて，キメラシーケンスとシーケンス波形の明瞭でないものを除外し，最終的な解析対象として 1112 クローンを得た．これら 1112 クローンは，phyloTYPE 分類(97% 以上の一致)によって 52 phylotypes にグルーピングした．分子系統解析の結果，この 52 phylotypes は，1 Bryophyta, 13 Alveolata (1 Apicomplexa, 10 Ciliophora, 1 unclassified Alveolata), 7 Amoebozoa (1 Mycetozoa, 2 Tubulinea, 4 unclassified Amoebozoa), 1 Chlorophyta, 7 Fungi, 8 Metazoa (1 Nematoda, 2 Platyhelminthes, 1 Rotifera, 2 Tardigrada, 2 unclassified Metazoa), 3 Rhizaria, 2 Rhodophyta, 10 Stramenopiles (1 Chrysophyceae, 2 Dictyochophyceae, 1 Hyphochytriomycetes, 3 Labyrinthulida, 1 Oikomonadaceae, 1 Oomycetes, 1 unclassified Stramenopiles) の 9 種の異なる系統グループに帰属することが分かった(表 4; 各 phylotype のコケ坊主 14 画分における分布，系統分類および BLASTN 相同検索結果は補足表 3 に示している; 各 phylotype の分子系統樹は補足図 1 に示している)．

系統分類の結果，コケ坊主の主構成種であるコケ類に帰属する配列がクローン・ライブラリー中で優占せず，菌類に帰属する配列が全体の約 56%を占めた．これは，コケ類の DNA が十分に回収できていないことを示すと同時に，コケ以外では菌類がある一定数以上存在することを示唆している．このように，本研究では，抽出効率の偏りが生じにくいとされる，ジルコニウム/シリカビーズを用いた物理的破碎 (Purdy 2005) を DNA 抽出前に行っているものの，真核生物の種によって抽出効率に差が生じていることが分かった．試料中の生物群集をより正確に把握するためには，試料に含まれる全ての真核生物から偏りなく全ての DNA を回収することが理想である．このような標準的な手法の確立は，核酸に基づく研究における本質的な問題として残されている (Zhou et al. 1996; Lloyd et al. 2010)．そして，このような人為的要因が 18S rRNA 遺伝子の配列の検出頻度にどれ程の影響を与えているかを推定することは困難である．従って，生物体の破碎効率を上げ，さらに効率の良い DNA 抽出法を用いることが今後の課題である．

表4 ヌケ坊主第1標本から得られた真核生物の18S rRNA遺伝子のPCRクローンの分布およびphylotypeの系統

Phylogenetic group	No. of phylotype	No. of clones	Distribution of clones													
			Exterior section							Interior section						
			O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
Bryophyta	1	235	19	29	5	9	6	7	5	28	22	31	20	27	20	7
Alveolata	13	92	0	6	8	2	15	1	16	9	0	1	7	12	13	2
Apicomplexa	(1)	(8)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Ciliophora	(10)	(81)	(0)	(5)	(8)	(2)	(12)	(0)	(10)	(9)	(0)	(1)	(7)	(12)	(13)	(2)
unclassified Alveolata	(2)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Amoebozoa	7	29	0	0	0	0	0	4	0	0	4	2	3	4	1	11
Mycetozoa	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)
Tubulinea	(2)	(7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)
unclassified Amoebozoa	(4)	(21)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(3)	(2)	(2)	(4)	(1)	(8)
Chlorophyta	1	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Fungi	7	622	38	41	62	63	31	55	38	37	40	41	38	30	44	64
Metazoa	8	85	20	8	2	4	24	7	12	2	3	2	1	0	0	0
Nematoda	(1)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Platyhelminthes	(2)	(4)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)
Rotifera	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Tardigrada	(2)	(71)	(12)	(7)	(2)	(2)	(23)	(6)	(12)	(2)	(3)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)
unclassified Metazoa	(2)	(6)	(5)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Rhizaria	3	10	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1	4	1	0	0
Rhodophyta	2	9	0	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
Stramenopiles	10	27	4	1	4	1	3	3	6	1	1	0	0	3	0	0
Chrysophyceae	(1)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Dictyochophyceae	(2)	(3)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hyphochytriomycetes	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Labyrinthulida	(3)	(12)	(1)	(0)	(2)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	(2)	(0)	(0)
Oikomonadaceae	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Oomycetes	(1)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)
unclassified Stramenopile	(1)	(2)	(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Total	52	1112	81	87	82	81	82	78	79	77	72	78	74	77	79	85

Numbers from respective "Alveolata", "Amoebozoa", "Metazoa" and "Stramenopiles" phylotypes are in parentheses.

コケ坊主全体にはコケ由来と思われる phylotype と、菌類に帰属する phylotypes が優占すること、そして、外層には繊毛虫とクマムシに帰属する phylotypes が準優占することが分かった。一方、内層には特異的にアメーバ様の単細胞真核生物 *Cercomonas* (Cercozoa) の phylotype が検出された。これにより、コケ坊主の外層と内層には、共通の真核微生物系統と、各層に特徴的な系統が存在することが示された。既報の細菌の 16S rRNA 遺伝子の多様性解析結果においても (第 2 章参照; Nakai et al. 2011), コケ坊主の外層と内層のそれぞれに特異的な phylotype が準優占的に検出されている。本研究により、外層と内層では、細菌と真核微生物の両方ともに各層に特異的に分布する phylotype が存在することが分かった。また、rarefaction 分析の結果 (図 8), コケ坊主の外層の方が内層よりも潜在的な生物多様性の可能性が高いことが分かった。

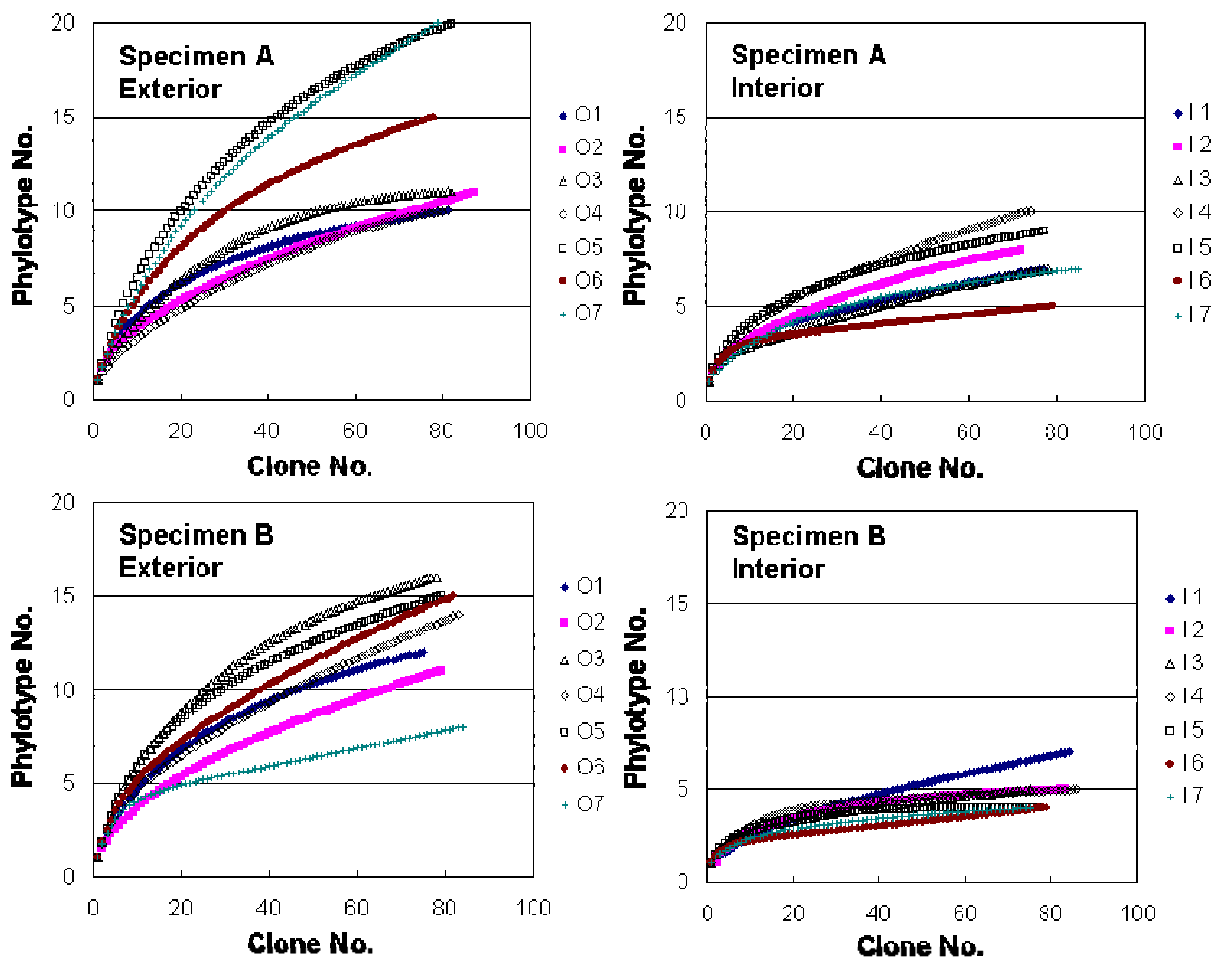


図 8 コケ坊主の外層 (O1~O7) および内層 (I1~I7) における真核生物の 18S rDNA 遺伝子の rarefaction curves

3.3.2 コケ坊主から検出されたコケ類

コケ類に帰属する配列は、コケ坊主の内層外層計 14 画全ての部位から 235 クローン得られ（全体の約 21%）、それらはたったひとつの *phyloptype* にまとめられた（表 4）。このコケ坊主の主構成体であるコケ由来と思われるクローン（*phyloptype*）は既知種 *Leptobryum pyriforme* の 18S rRNA 遺伝子（X80980）に相同性 99.9% で最近縁であり、データベース上の配列との間には 1 塩基の変異がみられた。これは、コケ坊主の主要構成種が *Leptobryum* 属であるという Imura et al. (1999) の先行研究と一致している。東南極の昭和基地周辺の湖沼に *Leptobryum* 属が存在することは Nakanishi (1977) によって初めて報告された。また、コケ坊主が発見された昭和基地周辺のスカルブスネス地域では、24 個の湖で *Leptobryum* 属の存在が確認され、そのうち、8 個の湖でコケ坊主を形成していることが明らかとなっている (Imura et al. 2003)。一方、南極における *Leptobryum* 属の他の報告例は、日本の昭和基地から 1000 km 離れた、シルマツヒャー・オアシスにあるインド基地周辺の湖沼のみに限られている (Tewari and Pant 1996)。このように、*Leptobryum* 属の分布は、昭和基地やインド基地の周辺の湖沼のみに限られており、その他の南極大陸の陸上や湖沼のどこからも報告例がない。どのような経路を経てこれらの湖沼中に定着したのかを調べるには、異なる環境から採取された複数の *L. pyriforme* を用いて、18S rRNA 遺伝子よりも進化速度の早い遺伝子に基づいた系統解析を行うことが考えられる。

また、本研究では、*Bryum* 属の 18S rRNA 遺伝子を検出できるプライマーを設計し、PCR 増幅を試みたが、検出限界以下であった。既報の報告でも、コケ坊主内のコケ種は *Leptobryum* 属が主であり、*Bryum pseudotriquetrum* はマイナーあるいは存在しないことが報告されている (Ohtani et al. 2001)。本研究で用いたコケ坊主試料の中にも、*Bryum* 属が存在しなかった可能性がある。

3.3.3 コケ坊主で最優占していた novel clade の菌類

菌類に帰属する配列は、622 クローン（全体の 56%）から 7 *phylotypes* がまとめられ、コケ坊主の内層外層計 14 画全ての部位において突出して優占していた（表 4）。さらに、得られた *phyloptype* の全てが既知の菌種の 18S rRNA 遺伝子と相同性が 90% 以下であり、高い新規性を示した。この 7 *phylotypes* の中では、MPE1-17 (574 クローン) が優占しており、フィヨルドの沿岸水域から得られた環境クローン (FR874399) に相同性 92.7% で最近縁であった。この *phyloptype* と他の MPE-18, MPE-20, MPE-22, MPE-23 の 4 *phylotypes* は、菌類の系統樹の中で

それ独自のクラスターを形成しており、このクラスターの中には先行研究で菌類の novel clade として報告された clone PFB12AU2004 (DQ244016) (Lefèvre et al. 2007) も含まれている。

この phylotype は、既知の培養された菌類では、ツボカビ目の *Entophlyctis helioformis* isolate AFTOL-ID 40 の 18S rRNA 遺伝子 (AY635826) に相同性 86.0% で最近縁であった。なお、本研究では、既知のツボカビ類 *Hyaloraphidium curvatum* に高い相同性 (99.0%) を示す MPE1-23 が得られている。

ツボカビ (chytrids) は鞭毛を持つ細胞 (遊走子) を作る菌類の総称であり、コケ、藻類、クマムシに寄生する寄生性のものだけでなく、分解性の腐生菌も知られている (Dewel et al. 1985; Gleason et al. 2008)。寄生性のツボカビは、後述するような繊毛虫と異なり、寄主を直接、消費利用することができるため、その真核微生物相にまで影響を与えうる。また、腐生菌は水中や土壌中で有機物を分解し栄養を得ており、その中にはセルロースなどの難分解性の有機物を分解するものも存在することから、生態系の中で重要な位置を占めると考えられている (Gleason et al. 2008)。Freeman et al. (2009) は、ヒマラヤ山脈やロッキー山脈のような高地の土壌、および、海洋性南極のアレクサンダー島の土壌では、ツボカビに近縁な配列がクローンライブラリーの 70% 以上占めることを報告しており、ツボカビが優占する特異な生態系の存在を明らかにしている。本研究においても、novel clade の菌類がコケ坊主画分からのクローンライブラリーの約 27-75% と突出して優占しており、これらの菌類が、ツボカビのように寄生者や分解者として関与するならば、コケ坊主生態系の存立と維持に関わる重要な役割を担っている可能性がある。

3.3.4 コケ坊主から検出された Alveolata, Metazoa および Rhizaria

Alveolata に帰属する配列は、92 クローン (約 8%) から 13 phylotypes にまとめられた (表 4)。その中では、繊毛虫に近縁な phylotype (81 クローン) が優占しており、コケ坊主の外層と内層の両方から検出された。繊毛虫は細菌を捕食する微生物であり、また、一部の繊毛虫は嫌気環境でも生育できることが知られている (Fenchel and Finlay 1995)。本研究においても、嫌気条件下での生育が確認されている、オキシトリカ科の繊毛虫 (Schwarz and Frenzel 2003) に近縁な phylotype が還元的な内層から得られており、これらが内層における主要な細菌捕食者になっている可能性がある。

Metazoa に帰属する配列は、85 クローン (全体の約 8%) から 8 phylotypes にまとめられた (表 4)。その中では、クマムシに近縁な 2 phylotypes (71 クローン) が優占しており、検出

されたクローンの約 90%がコケ坊主の外層から得られた。一つめの MPE1-42 (49/71 clones) は、既知種 *Diphascon pingue* isolate Tar698 の 18S rRNA 遺伝子 (FJ435736) に相同性 98.8%と比較的高い相同性を示した。また、もう一方の MPE1-43 についても、既知種 *Acutuncus antarcticus* isolate Acut_06_262 (EU266943) に相同性 99.8%を示した。この両種のクマムシは、東南極だけではなく、西南極のグレアム・ランドやサウス・オークニー諸島、および亜南極のサウスジョージア島での報告例があり (Convey and McInnes 2005)、南極の異なる地点に広く分布する種であることが分かった。また、Metazoa に帰属する phylotype の中には、既知の線虫やワムシの属に 97.7%以上の比較的高い相同性を示すものも得られており、コケ坊主が、クマムシだけでなく、様々な微小動物の住処となっていることが明らかとなった。

Rhizaria に帰属する配列は、10 クローン (全体の約 1%) から 3 phylotypes にまとめられた (表 4)。それらは全て Cercozoa に帰属しており、その中では、*Cercomonas alexieffi* の 18S rRNA 遺伝子 (AF411267) に相同性が 98.4%と高い phylotype が内層に特異的に存在していることが分かった。*Cercomonas* はアメーバ様の単細胞真核生物で、嫌気条件下で生育する種も報告されており、実際、嫌気環境からその塩基配列が検出されている (for example, Murase et al. 2006)。これらは、前述したオキシトリカ科の繊毛虫と同様、還元的な内層における主要な細菌捕食者であり、内層の細菌種組成に影響を与えているかもしれない。

3.3.5 コケ坊主から検出されたストラメノパイル

ストラメノパイルに帰属する配列は、27 クローン (全体の約 2%) から 10 phylotypes にまとめられた (表 4)。その中では、従属栄養性の単細胞真核生物 Labyrinthulida に近縁な配列が優占しており、系統樹の中でそれ独自のクラスターを形成していた。一般的に、Labyrinthulida の微生物は海洋、特に沿岸域に存在することが知られているが (Raghukumar 2002)、淡水性のものも知られている (Tong et al. 1997)。Labyrinthulida は、デンプンや脂肪酸などの易分解性有機物からセルロースのような難分解性有機物も分解することができる (Raghukumar 2002)。従って、その生物量は少ないかもしれないが、コケや緑藻の死骸の分解に関わる重要な微生物である可能性が高い。また、Labyrinthulida は、バクテリアの細胞サイズと比較すると約 5-20 μm と大きく、大型の繊毛虫に直接捕食されうること、および、その体内に脂肪酸を高濃度で蓄積することから (Kimura and Naganuma 2001)、コケ坊主生態系における食物網内の転送効率を高めている可能性がある。

また、本研究で検出されたストラメノパイルの中には、従属栄養性の Labyrinthulida だけで

はなく、独立栄養性の黄色鞭毛藻に近縁な配列も 3 clones 検出された。

3.3.6 コケ坊主間のコケ類と真核微生物相の比較

コケ坊主の第 1 標本の遺伝子解析結果の再現性を確認するため、また、コケ坊主間の真核微生物相を比較するため、本研究ではコケ坊主の第 2 標本からも 18S rRNA 遺伝子の全長情報の取得を試みた。コケ坊主の第 1 標本と同様に、内外上下の 14 画分から PCR クローン・ライブラリーを構築し（計 14 組）、各ライブラリーから 96 クローンを無作為に選び、総計 1344 クローンについて塩基配列を決定した。得られた 1344 クローンの塩基配列データから、キメラシーケンスとシーケンス波形の明瞭でないものを除外し、1119 クローンを得た。これら 1119 クローンは、phyloTYPE 分類（ $\geq 97\%$ ）によって 44 phyloTYPES にグルーピングした後、第 1 標本から得られた 52 phyloTYPES と比較した。その結果、第 1 標本と共通の phyloTYPE（based on the 97%-criterion）が 18 個存在した。つまり、34 phyloTYPES は第 1 標本のみに見られ、26 phyloTYPES は第 2 標本のみに見られ、18 phyloTYPES が共通ということになる（表 5 および表 6；各 phyloTYPE のコケ坊主 14 画分における分布、系統分類および BLASTN 相同検索結果は補足表 4 に示している；各 phyloTYPE の系統樹は補足図 1 に示している）。

両標本に共通の 18 phyloTYPES は、第 1 標本の phyloTYPE 全体の 35%、第 2 標本の phyloTYPE 全体の 41% を占めた。この共通な 18 phyloTYPES は、1 Bryophyta, 5 Alveolata (1 Apicomplexa, 4 Ciliophora), 3 Amoebozoa (2 Tubulinea, 1 unclassified Amoebozoa), 1 Chlorophyta, 1 Fungi, 2 Metazoa (1 Rotifera, 1 Tardigrada), 1 Rhizaria, 1 Rhodophyta, 3 Stramenopiles (1 Labyrinthulida, 1 Oikomonadaceae, 1 unclassified Stramenopiles) の 9 種の異なる系統グループに帰属した（表 6）。この共通性をもって微生物相の再現性を示していると言えるわけでないかもしれないが、微生物コミュニティ構造についてのある傾向を反映していると考えられる。なお、仮に phyloTYPE の規準（criterion）を 18S rRNA 遺伝子の相同性 97% 以上ではなく 89% にした場合、phyloTYPE の数が減るとともに、ふたつのコケ坊主間で共通する phyloTYPE は増える；全体の半分かそれ以上の phyloTYPE が共通することがわかった。

また、第 1 標本および第 2 標本からそれぞれ得られたコケ由来と思われるクローン（phyloTYPE）の配列は互いに 100% 完全一致した。さらに、コケ坊主全体に novel clade の菌類が突出して優占すること、外層には繊毛虫やクマムシに帰属する phyloTYPES が準優占すること、および、内層には特異的にアメーバ様の単細胞真核生物 *Cercomonas* (Cercozoa) の phyloTYPE が検出されるという特徴も共通していた（表 5）。以上のことから、コケ坊主一個体の中では、

コケ坊主全体に広く分布する真核微生物系統と、外層と内層の各層に特徴的に分布する系統が存在することが高い蓋然性をもって示された。

一方、外層における繊毛虫 (Alveolata) の存在頻度については、第 1 標本が 8.4%、第 2 標本が 14.6%と差が見られた。これは、コケ坊主外層は湖水と直接接触しており、湖水中の微生物相と部分的に共通する **phylo**type が存在する可能性が高く、それが本研究における遺伝子解析結果にもとづく微生物系統群に反映されている可能性が高いことが推測される。また、クマムシ (Metazoa) の存在頻度についても、第 1 標本が 11.2%、the 第 2 標本が 22.3% と差が見られた。Metazoa については、餌となるバクテリア、菌類、およびワムシなどを求めてコケ坊主間を移動することが考えられ、そのことが存在頻度に反映されている可能性がある。

Rarefaction 分析の結果、第 1 標本と同様、第 2 標本もコケ坊主外層の方が内層よりも潜在的な生物多様性の可能性が高いことが分かった (図 8)。

表5 コケ坊主第2標本から得られた真核生物の18S rRNA遺伝子のPCRクロームの分布およびphylogenyの系統

Phylogenetic group	No. of phylogeny	Distribution of clones																						
		No. of clones									Interior section													
		Exterior section			Interior section						Exterior section		Interior section											
O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	I17	
Bryophyta	1	176																7	10	18	6	16	20	12
Alveolata	11	83																0	0	1	0	0	0	0
Apicomplexa	(1)	(1)																(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Ciliophora	(8)	(76)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Dinophyceae	(1)	(5)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
unclassified Alveolata	(1)	(1)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Amoebozoa	3	4																0	0	0	0	0	0	0
Mycetozoa	(0)	(0)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Tubulinea	(2)	(3)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
unclassified Amoebozoa	(1)	(1)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Chlorophyta	3	10																1	0	0	0	0	0	0
Fungi	6	635																70	65	50	61	55	57	60
Metazoa	2	143																0	3	0	10	0	0	0
Nematoda	(0)	(0)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Platyhelminthes	(0)	(0)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Rotifera	(1)	(5)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Tardigrada	(1)	(138)																(0)	(3)	(0)	(10)	(0)	(0)	(0)
unclassified Metazoa	(0)	(0)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Rhizaria	11	47																5	4	5	8	6	2	3
Rhodophyta	2	3																1	0	0	0	0	0	0
Stramenopiles	5	18																0	1	1	1	0	0	0
Chrysophyceae	(1)	(11)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Dictyochophyceae	(0)	(0)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hyphochytriomycetes	(0)	(0)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Labyrinthulida	(2)	(3)																(0)	(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)
Oikomonadaceae	(1)	(1)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Oomycetes	(0)	(0)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
unclassified Stramenopile	(1)	(3)																(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Total	44	1119																84	83	75	86	77	79	75

Numbers from respective "Alveolata", "Amoebozoa", "Metazoa" and "Stramenopiles" phylotypes are in parentheses.

表6 コケ坊主の第1標本と第2標本から得られた18S rRNA遺伝子のphylotypeの比較 - 類似と相違

Phylogenetic group	A ^a Breakdown of the closest sequence/organism	B ^b	Breakdown of the closest sequence/organism	C ^c	Breakdown of the closest sequence/organism
Bryophyta	0	0		1	<i>Leptobryum pyriforme</i>
Alveolata	8	6		5	
Apicomplexa	(0)	(0)		(1)	lake clone
Ciliophora	(6)	(4)	<i>Homalogastra setosa</i> , <i>Bursaria truncatella</i> , <i>Cyrtolophosis mucicola</i> , two rhizosphere clones, sea ice clone	(4)	<i>Halteria grandinella</i> , <i>Obertruria georgiana</i> , <i>Onychodromopsis flexilis</i> , <i>Oxytricha longa</i>
Dinophyceae	(0)	(1)		(0)	
unclassified Alveolata	(2)	(1)	<i>Colpodella edax</i> , <i>Ochromonas</i> sp.	(0)	
Amoebozoa	4	0		3	
Mycetozoa	(1)	(0)	<i>Schizoplasmodium cavosteloides</i>	(0)	
Tubulinea	(0)	(0)		(2)	<i>Gephyramoeba</i> sp., <i>Lobosea</i> sp.
unclassified Amoebozoa	(3)	(0)	<i>Ceratiomyxella tahitiensis</i> , marine clone, soil	(1)	soil clone
Chlorophyta	0	2		1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Fungi	6	5	two lake clones, marine sediment clone, two rhizosphere clones, sulfide-rich spring clone	1	marine clone
Metazoa	6	0		2	
Nematoda	(1)	(0)	<i>Plectidae</i> sp.	(0)	
Platyhelminthes	(2)	(0)	<i>Castrada viridis</i> , <i>Mesostoma lingua</i>	(0)	
Rotifera	(0)	(0)		(1)	<i>Lepadella patella</i>
Tardigrada	(1)	(0)	<i>Acutuncus antarcticus</i>	(1)	<i>Diphascos pingue</i>
unclassified Metazoa	(2)	(0)	<i>Acutuncus antarcticus</i> , <i>Diphascos pingue</i>	(0)	
Rhizaria	2	10		1	<i>Cercomonas alexieffi</i>
Rhodophyta	1	1	<i>Cercozoa</i> sp., rhizosphere clone		
Stramenopiles	7	2		3	<i>Cyanidioschyzon</i> sp.
Chrysophyceae	(1)	(1)	<i>Cyanidioschyzon</i> sp.	(0)	
Dictyochophyceae	(2)	(0)	<i>Ochromonas sphaerocystis</i>	(0)	
Hypochytriomycetes	(1)	(0)	<i>Pteridomonas danica</i>	(0)	
Labyrinthulida	(2)	(1)	<i>Hyphochytrium catenoides</i>	(0)	
Oikomonadaceae	(0)	(1)	<i>Aplanochytrium kerguelense</i> , marine clone	(1)	marine clone
Oomycetes	(1)	(0)	<i>Pythiaceae</i> sp.	(1)	lake clone
unclassified Stramenopiles	(0)	(0)		(0)	
Total	34	26		18	

Numbers from respective "Alveolata", "Amoebozoa", "Metazoa" and "Stramenopiles" phylotypes are in parentheses.

^a Unique phylotypes to the specimen A's 18S rRNA gene libraries

^b Unique phylotypes to the specimen B's 18S rRNA gene libraries

^c Common phylotypes between 18S rRNA gene libraries from the specimens A and B

3.4 結論

本研究では、二つの完全なコケ坊主を用いて、18S rRNA 遺伝子による分子系統解析を行った結果、その生態系にはコケや藻類だけでなく、菌類や多様な微小動物が存在することが分かった。特に、独立栄養性の緑藻、紅藻および黄色鞭毛藻が一次生産者、そして、菌類、繊毛虫および Labyrinthulida が寄生者や分解者として主に関与し、生態系の存立と維持に寄与している可能性が高い (図 9)。また、得られた全 78 phylotypes のうちの 32 phylotypes (約 41%) が既知の属や種との相同性が 95%以下であること、また、unclassified な系統群が存在することも明らかとなった。このように、南極湖沼に特有なコケ坊主生態系には系統学的にみて極めて新規性の高い真核微生物が存在する。特に、今後は、コケ坊主内で突出して優占している菌類の遺伝学的、生理学的性質を解明するため、その分離培養あるいはゲノム解析を試みる必要がある。

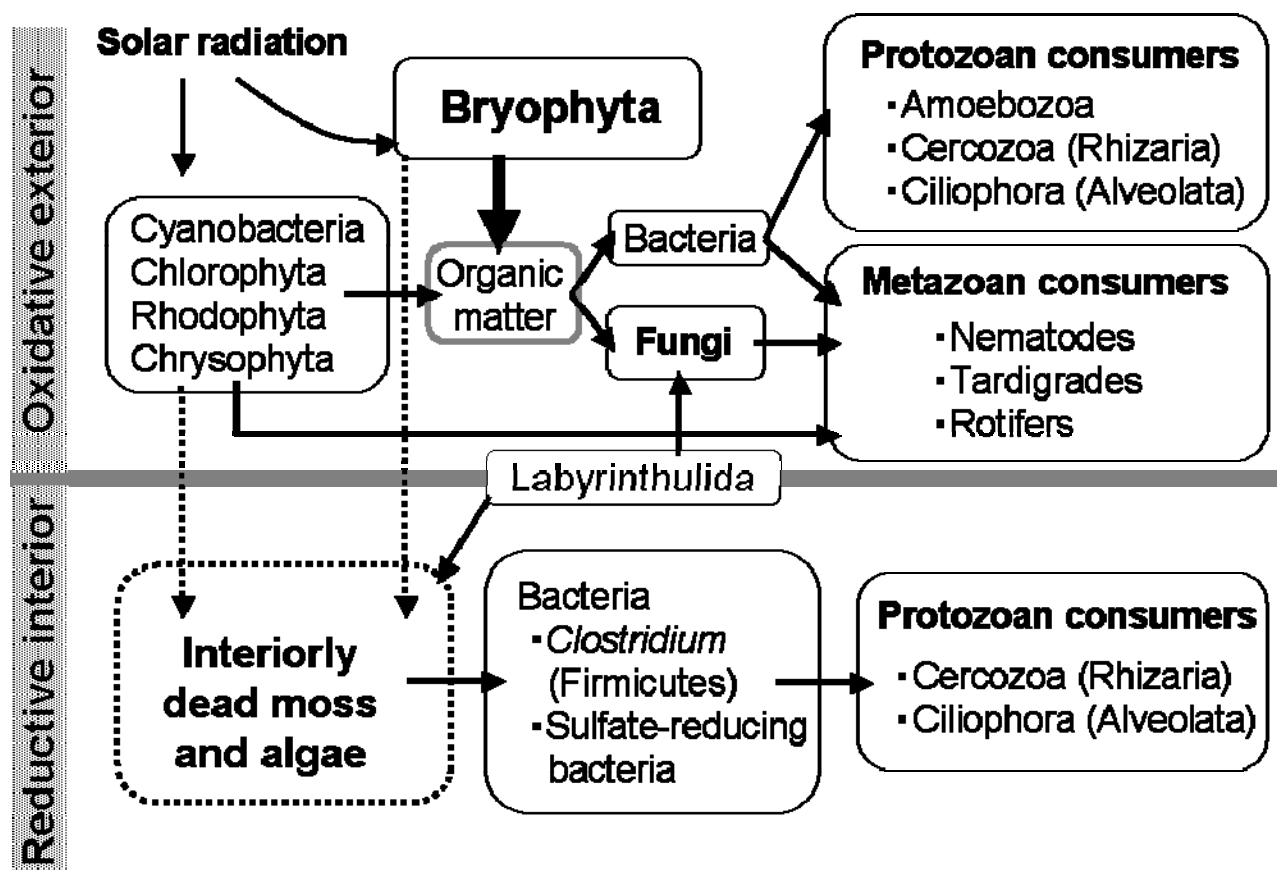


図 9 本研究と既報の 16S rRNA 遺伝子の多様性解析結果 (Nakai et al. 2011) から推測されるコケ坊主内の食物網

第 4 章

南極湖沼に特有な水生コケ植物の共生生物相における CO₂ 固定酵素 (RuBisCO) 遺伝子の多様性

要旨

南極コケ坊主は、コケ類とそれに付随する藻類や細菌が協調的に物質生産や物質循環を行う、自立度の高い生態系であると考えられる。これまでに 16S/18S rRNA 遺伝子の多様性解析の結果より、コケ坊主の内外上下の微生物組成が報告されてきた(第 2 章, 第 3 章参照; Nakai et al. 2011)。しかしながら、rRNA 遺伝子に基づいた系統解析のみでは、微生物の機能を知ることは困難である。本研究では、CO₂ 固定に与る酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO, E.C. 4.1.1.39) の遺伝子の多様性解析を試み、コケ類に共生する生物相が一次生産、すなわち CO₂ 固定に寄与する可能性を考察した。まず、コケ坊主を外層と内層、さらにそれらを上下縦方向に分け、計 14 部位から DNA を抽出した。そこから I, II, および III 型の全ての型の RuBisCO 遺伝子を標的とした PCR を試み、その PCR クローン・ライブラリーを構築した。そして、計 1092 クローンの塩基配列の決定と分子系統解析を行った結果、プロテオバクテリア由来の IA 型の RuBisCO 遺伝子に帰属する operational RuBisCO unit (ORU) がシアノバクテリア由来 IB 型の RuBisCO 遺伝子と同じくらいの頻度で検出されて最優占することと、海底熱水プルームや深海に生息する二枚貝 *Bathymodiolus azoricus* の内部共生細菌から得られた各 RuBisCO 配列にヌクレオチド配列で 81-85% の範囲で最近縁な ORU が準優占することが分かった。コケ類の IB 型に帰属する ORU は *Leptobryum* sp. の RuBisCO 遺伝子にヌクレオチド配列で 100% 完全一致した。さらに、コケ坊主の外層に特異的に分布するシアノバクテリア由来の IB 型に帰属する ORU や、内層特異的に紅色硫黄細菌由来と思われる II 型の ORUs が検出された。これら ORU の層特異的な分布には、コケ坊主内に存在する酸化的な外層と還元的な内層の二層構造が反映されていると考えられる。一方、プロテオバクテリア由来 IC 型、不等毛藻およびハプト藻由来 ID 型、古細菌由来 III 型の RuBisCO 遺伝子は検出されなかった。以上のことから、南極コケ坊主生態系では、光エネルギーに依存せず、無機物を酸化する際に生じる化学エネルギーによって有機物を合成できる化学合成独立栄養細菌も一次生産者として重要な役割を果たしている可能性が示された。

4.1 研究の背景

南極コケ坊主は、コケ類とそれに付随する藻類や細菌が協調的に物質生産や物質循環を行う、自立度の高い生態系であると考えられる。これまでに 16S rRNA 遺伝子の多様性解析より、コケ坊主内外上下のシアノバクテリアや細菌の種組成が報告されてきた(第2章参照; Nakai et al. 2011)。ただし、古細菌の rRNA 遺伝子は検出されなかった。また、18S rRNA 遺伝子の多様性解析の結果、コケ坊主には藻類だけでなく、菌類や繊毛虫、さらにクマムシ、ワムシ、線虫などの微小動物に近縁なクローン(phylotype)も検出され、極貧栄養な湖沼に成立しているコケ坊主生態系には、多種多様な微生物系統が存在することが明らかとなった(第3章参照)。しかしながら、rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析では、純粋培養されている近縁な分類群の微生物からその性質を推定することしかできず、その機能を知ることは困難である。また、系統的学的に近縁なものが存在しない場合は、機能を推定することもできない。そのため、極貧栄養な湖沼の中で、どのような生物相が一次生産に関わり、この生態系の存立、維持に寄与しているのか分からなかった。

そこで本章では、生態系の一次生産のうち CO₂ 固定に関わる酵素である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO, E.C. 4.1.1.39) の遺伝子の多様性解析を試み、コケ類に共在する生物相が一次生産に寄与する可能性を考察した。RuBisCO は、Calvin-Benson-Basham (CBB) 経路における CO₂ の固定に関与する酵素であり、生物界で数あるタンパク質の中でも最も多く存在するタンパク質である(Chase, 1993)。この RuBisCO は、ヘテロ 16 量体の I 型、ホモ 2 量体の II 型、およびホモ 10 量体の III 型の 3 つの型が知られている(Badger and Bek 2008)。また、I 型の RuBisCO は、green-like RuBisCO と red-like RuBisCO の大きく 2 つの型が分けられる。さらに、アミノ酸配列の相同性に基づいて、green-like RuBisCO は IA および IB 型、red-like RuBisCO は IC および ID 型の計 4 つの型に分類される。IA 型の RuBisCO は主にプロテオバクテリア、IB 型はシアノバクテリアと高等植物、IC 型はプロテオバクテリア、ID 型は不等毛藻およびハプト藻に存在する。II 型の RuBisCO は紅色非硫黄細菌や渦鞭毛藻に存在する。II 型の RuBisCO は I 型に比べて構造が単純であること、および酸素に対する親和性が低いことからより原始的な RuBisCO であると考えられている(Mcfadden, 1973)。また、III 型の RuBisCO は古細菌にのみ存在する。

極限環境中の RuBisCO 遺伝子における多様性については、深海(Elsaied and Naganuma 2001; Elsaied et al. 2002, 2006, 2007)、地下水(Alfreider et al. 2009)、洞窟(Chen et al. 2009)、ソーダ湖の堆積物(Kovaleva et al. 2011)、および塩湖(Humayoun et al. 2003; Giri et al. 2004)などでその分子系統学的解析の結果が報告されてきた。その一方、南極微生物の RuBisCO 遺伝子の多様性につ

いては, 分離培養株の RuBisCO は報告されているが (for example, Bowman et al. 1996; Liu et al. 2006), その遺伝的多様性の情報は限られている (Micukchi et al. 2010). 本研究の成果は, 南極微生物における RuBisCO 遺伝子の多様性と, 南極湖沼における炭素循環の議論を深める材料を提供し得るものと考えられる.

4.2 材料と方法

4.2.1 調査湖沼と生物標本の採取

第2章の原核生物の多様性解析で使用したコケ坊主標本と同じものを本研究にも使用した。標本の採取場所、湖沼の環境データなどの詳細は第2章に記した。

4.2.2 微生物の混合ゲノム DNA の抽出と精製

第2章の原核生物の多様性解析の際、コケ坊主標本から抽出した混合ゲノム DNA を本研究にも使用した。ゲノム DNA の抽出と精製の詳細は第2章に記した。

4.2.3 RuBisCO 遺伝子の PCR 増幅

IA, IB, IC, ID, II, および III 型の各 RuBisCO 遺伝子の PCR 増幅には表 7 に記した各プライマーを使用した。また、本研究では、コケ坊主の主構成種であるコケ類の RuBisCO 遺伝子を取得するため、コケ類の IB 型 RuBisCO 遺伝子に特異的な既報のプライマー (Tsubota et al. 1999) を使用した。PCR 増幅には TaKaRa Thermal Cycler PERSONAL TP240 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) と TaKaRa Ex Taq polymerase を使用した。PCR の反応条件は表 7 に示した既報の論文に従った (Tsubota et al. 1999; Elsaied and Naganuma 2001; Elsaied et al. 2007)。

表7 RuBisCO遺伝子のPCR増幅に用いたプライマー

Primer	Target	Sequence	Reference
IAB-595f	IA and IB	5'-GAC TTC ACC AAA GAC GAC GA-3'	Elsaied and Naganuma (2001)
IAB-1385r		5'-TCG AAC TTG ATT TCT TTC CA-3'	
rbcL7	IB in bryophytes	5'-TGG ATT TAA AGC TGG TGT TAA AG-3'	Tsubota et al. (1999)
rbcL1346hR		5'-GCA GCT AAT TCA GGA CTC C-3'	
IC-537f	IC	5'-ACS AAG CCC AAG CTG GGC CTG TCG GGC-3'	Elsaied et al. (2007)
IC1212r		5'-GAT GGT GCC GCC GAA CTG-3'	
ID-537f	ID	5'-GTA AAA CCT AA TTA GGT YTA TCT GGT-3'	Elsaied et al. (2007)
ID-1212r		5'-AAT AGT ACC ACC ACC AAA TTG-3'	
II-537f	II	5'-ATC ATC AAR CCS AAR CTS GGC CTG CGT CCC-3'	Elsaied and Naganuma (2001)
II-1113r		5'-MGA GGT GAC SGC RCC GTG RCC RGC MCG RTG-3'	
Arch-357f	III	5'-GCH GGR AAY ATY TTY RGM ATG AAR-3'	Elsaied et al. (2007)
Arch-891r		5'-KGC NGM ATG CAT RSM NCK GTG GSC RTG-3'	

4.2.4 PCR クローン・ライブラリーの構築と分子系統解析

得られた増幅産物は、TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてクローニングし、*Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) に形質転換した。形質転換体に挿入した RuBisCO 遺伝子は DNA シークエンサー ABI 3730XL automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, USA) を使用して塩基配列を決定した。Elsaied and Naganuma (2001) と van der Wielen (2006) の方法に従い、ヌクレオチド配列で 90%以上、アミノ酸配列では 100%一致する配列同士を operational RuBisCO unit (ORU) にグルーピングした。得られた ORU は、European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) で提供されている transeq (European Bioinformatics, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>) を用いてアミノ酸配列を取得した。塩基配列をアミノ酸配列に翻訳した際、ストップコドン(UAA, UAG, UGA)を含む配列については、この後の解析から除外した。各 ORU のヌクレオチド配列とアミノ酸配列と既知の酵素遺伝子の配列とを比較するため、NCBI の nt-database と nr-database を検索対象にして、BLAST 相同性検索(Altschul et al. 1997)を行った。また、BLAST 検索の結果を基に、目的の酵素遺伝子にヒットしない配列をこの後の解析から除外した。ORUと高い相同性を示したヌクレオチド配列やアミノ酸配列を用いて、CLUSTAL X multiple alignment program (Larkin et al. 2007) を用いてアラインメントを行った。アラインメント後の配列は、MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011) を用いて NJ 法 (Saito and Nei 1987) により系統樹を作成した。なお、本論文で示しているアミノ酸の相同性は類似度(similarity)ではなく、一致度(identity)である。

試料中の RuBisCO 遺伝子の潜在的な多様性は、Rarefaction Calculator (<http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>) を用いて推定した。

4.2.5 炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$)の分析

炭素は食物連鎖における同位体分別が通常1‰以下と小さいので(Hoefs 2004)、食物の同位体比が捕食者に強く反映されることになる。つまり、有機物の生産と分解の過程ではCO₂の出入りが伴うため、炭素安定同位体比の分析は環境中の物質代謝の特性を把握するのに有効である。そこで本研究では、遺伝子解析のために14画分に分けた研究試料を炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$)の分析にも使用した。 $\delta^{13}\text{C}$ の分析は同位体研究所(横浜, 日本)に委託され、Delta V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)を使用してConflo法にて分析した。本研究では、 $\delta^{13}\text{C}$ の分析の再現性を確認するため、ほとけ池で採取された別の完全なコケ坊主体(直径20cm, 高さ27cm, 第2標本)についても、1番目のコケ坊主(第1標本)と同様に、外層7画分、内層7画分の計14画分に分画し、分析を行った。

4.3 結果と考察

4.3.1 コケ坊主から得られた RuBisCO 遺伝子の系統と分布

IA 型と IB 型の両方の RuBisCO 遺伝子を標的とした PCR より、コケ坊主標本の外層 7 画分と内層 7 画分の計 14 画分全てから産物が得られた。また、コケ類の IB 型の RuBisCO 遺伝子ほぼ全長を標的とした PCR においても、全 14 画分から産物が検出された。一方、II 型の RuBisCO 遺伝子は、内層下部の I2 のみが PCR 陽性を示した。IC 型、ID 型、および III 型の RuBisCO 遺伝子を対象とした PCR では、数回の再試を行ったものの、コケ坊主のどの画分からも目的サイズに産物が得られなかった。Nakai et al. (2011) のコケ坊主生態系における 16S rRNA 遺伝子に基づいた細菌の種組成解析においても、古細菌の 16S rRNA 遺伝子が検出されていなかった。コケ坊主内では、古細菌は PCR の検出限界以下である程に存在量が少なく、あるいは存在せず、一次生産への寄与が小さいと考えられる。

PCR 産物から構築した 1092 クローンの塩基配列を決定した後、ストップコドンを含む配列と RuBisCO 遺伝子にヒットしない配列を除外し、最終的な解析対象として 884 クローンを得た。これら 884 クローンは、ORU 分類(ヌクレオチド配列で 90%以上一致、アミノ酸配列では 100%一致)によって 16 ORUs にまとめられた。分子系統解析の結果、この 16 ORUs は、IA、IB および II 型の RuBisCO にそれぞれ 4、10、および 2 の ORUs に帰属することが分かった(表 8; 各 ORU のヌクレオチド配列における BLAST 検索の結果は補足表 5 に示している)。

得られた IA 型と IB 型の 14 ORUs については、I 型の RuBisCO に特徴的な機能モチーフ(DFTKDDE) (Shinozaki et al. 1983; Newman and Gutteridge 1993)を有しており、二酸化炭素固定酵素として機能することが高い蓋然性をもって示された。また、本研究で取得した II 型の 2 の ORUs についても、既報の機能モチーフ(GGDFIKNDE) (Schneider et al. 1990)が保存されていた。Rarefaction 分析の結果、コケ坊主下部(O2, O3 および I3)の I 型の RuBisCO 遺伝子の潜在的な多様性が高いことが分かった(図 10)。

表8 コケ坊主から得られたRuBisCO遺伝子のPCRクローンの分布とORUの系統

ORU	Closest amino acid sequence	Accession No.	Identity (%)	Coverage (%)	Exterior section							Interior section						
					O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
RuBisCO Form IA																		
ORU1	tar oil contaminated aquifer clone D10gl104	ACH70420	93	249/268	12	17	19	14	11	17	4	30	29	26	24	27	29	
ORU2	hydrothermal vent plume clone Suiyo (I)-8	BAD14298	95	257/270	2	3	4	3	2	4	2	7	2	4	2	3	8	
ORU3	tropical deltaic mobile mud sediment clone fg5L762	AAX21124	90	243/270													4	
ORU4	tar oil contaminated aquifer clone D10gl104	ACH70420	89	239/268							1							
RuBisCO Form IB																		
ORU5	<i>Leptolyngbya laminosa</i> ETS-08	CAV30127	97	263/270	17	25	19	24	11	5	13	2	15	24	19	10	8	
ORU6	<i>Microcoleus vaginatus</i> FGP-2	ZP_08492630	98	265/270	1	1	1	3	4	4	2	2			1	3		
ORU7	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	NP_485564	97	262/270	6	4	1	2	3	13		2	5	2	10	9		
ORU8	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	ZP_05037744	93	252/270	1			2				1			2			
ORU9	<i>Raphidiopsis brookii</i> D9	ZP_06304977	91	247/270								2						
ORU10	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	NP_485564	83	223/270	5													
ORU11	<i>Leptolyngbya laminosa</i> ETS-08	CAV30127	96	259/270	2	5	3	4	11	12	14							
ORU12	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	NP_682296	93	252/270				3	2									
ORU13	<i>Leptolyngbya laminosa</i> ETS-08	CAV30127	93	250/270							6							
Form IB in bryophytes																		
ORU14	<i>Leptobryum</i> sp.		100	446/446	10	10	9	10	10	10	9	10	10	10	9	10	10	
RuBisCO Form II																		
ORU15	tar oil contaminated aquifer clone D10M33	ACH70392	93	124/133													35	
ORU16	polluted groundwater clone L4C16	ABY77470	97	129/133													10	

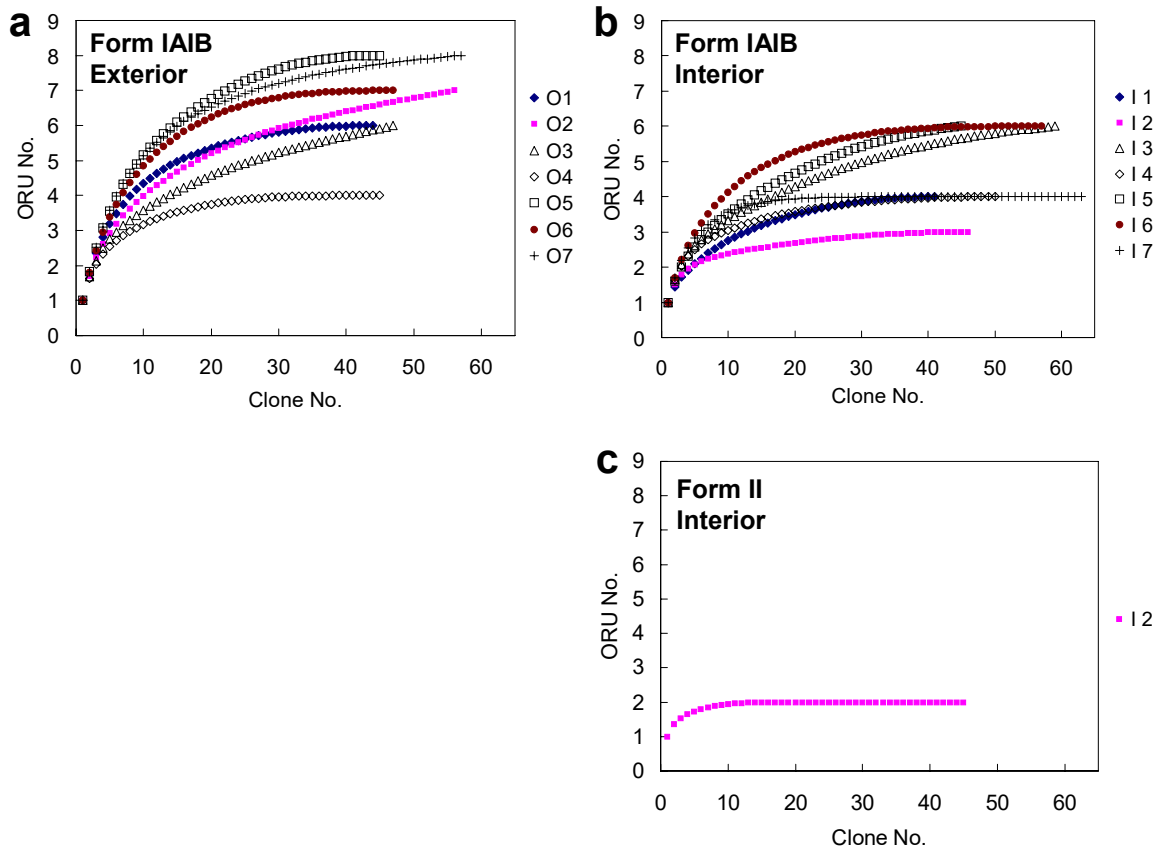


図 10 コケ坊主の外層 (O1~O7) および内層 (I1~I7) における RuBisCO 遺伝子の rarefaction curves

(a)コケ坊主外層から得られた IAIB 型の RuBisCO 遺伝子, (b)内層から得られた IAIB 型の RuBisCO 遺伝子, および (c)内層から得られた II 型の RuBisCO 遺伝子

4.3.2 プロテオバクテリア由来 IA 型の RuBisCO 遺伝子における多様性

プロテオバクテリア由来と思われる IA 型の RuBisCO 遺伝子に帰属する配列は、342 クローン(全体の約 49%)から 4 の ORUs がまとめられた。驚くべきことに、これはシアノバクテリア由来と思われる IB 型の RuBisCO 遺伝子と同じくらいの頻度で検出された。この 4 の ORUs の中では、ORU1 (288/342 クローン)が最優占しており、コケ坊主の外層と内層の 14 画分全ての部位から検出された(表 8)。この ORU1 はタール油で汚染された帯水層から得られた環境クローン(EU926498)に相同性 82%_{ND} (ヌクレオチドの相同性)および 93%_{AA} (アミノ酸の相同性)と最近縁であった。また、既知の分離株の RuBisCO 遺伝子とのデータベース検索では、ORU1 は、ヌクレオチド配列で *Thioalkalivibrio* 属の RuBisCO 遺伝子 (CP001905) に相同性 79%_{ND}, アミノ酸配列では *Bradyrhizobium* 属の RuBisCO 配列 (YP_001238690) に相同性 89%_{AA} とそれぞれ最近縁であり、系統樹上では *Bradyrhizobium* 属のクラスターに近接していた(図 11)。*Bradyrhizobium* 属細菌の中には、酸素の存在下で従属栄養的に生育するが、酸素の無い嫌気条件下では硝酸呼吸を行って生育できる種が知られている(van Berkum and Keyser 1985; Delgado et al. 2003)。さらには、微好気条件下で水素を電子供与体として二酸化炭素を固定できる種も知られている(Hanus et al. 1979; Lepo et al. 1980)。本研究で検出された RuBisCO を有する細菌も、*Bradyrhizobium* 属細菌のように好気、微好気そして嫌気条件下でも生育ができるため、コケ坊主全体に広く分布しているのかもしれない。なお、既報のバクテリアの 16S rRNA 遺伝子の多様性解析結果においても(Nakai et al. 2011)、コケ坊主の外層と内層の 14 画分全てから *Bradyrhizobium* 属に最近縁な *phylo*type が検出されていた。

さらに驚くべきことに、本研究では、海底熱水プルームや、深海に生息する二枚貝 *Bathymodiolus azoricus* の内部共生細菌の各 RuBisCO 遺伝子に相同性 81-85%_{ND} および 95%_{AA} と高い相同性を示す ORU2(49/342 クローン)がコケ坊主の全画分から検出された。系統樹内でもシンカイヒバリガイの内部共生細菌から検出された RuBisCO 配列(AAX48774) (Spiridonova et al. 2006)に最も近接していた(図 11)。シンカイヒバリガイは深海熱水噴出孔やメタン冷湧水域の化学合成生態系を代表する二枚貝類であり、世界各地の海域から記載報告がある(DeChaine and Cavanaugh 2006)。シンカイヒバリガイの鰓の細胞内には化学合成細菌が共生しており、シンカイヒバリガイはそれら共生細菌の一次生産に依存していると考えられている(McKiness and Cavanaugh 2005)。その共生化学合成細菌の組成は、シンカイヒバリガイの種によって異なり、硫黄酸化細菌のみの場合、メタンを酸化細菌のみの場合、また、硫黄酸化細菌とメタン酸化細菌の両方の場合、の 3 つのタイプが知られている(McKiness and Cavanaugh 2005)。また、この硫黄酸化細菌は、水素を水へと酸化する水素酸化にも関わっていると考えられている(Petersen et al. 2011)。本研究で検出された ORU3 は、既知の分離株

の RuBisCO 遺伝子とのデータベース検索では、ヌクレオチド配列で硫黄酸化細菌 *Thiohalophilus* 属の RuBisCO 遺伝子 (GQ888587) に相同性 82%_{ND}, アミノ酸配列では硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus* 属の RuBisCO 配列 (P0C917) に相同性 89%_{AA} とそれぞれ最近縁であることから、ORU2 の RuBisCO を有する細菌も硫黄酸化細菌であるかもしれない。ほとけ池の水中や、湖底のコケ類と藻類のマット表層では硫化水素ガスが検出限界以下である一方、そのマットの 5 mm 以上深い部分では 1 µg/g (wet) 以上の硫化水素が検出されている (Kudoh et al. 2009)。コケ坊主内では、硫黄酸化細菌が硫化水素を酸化することによって有機物を合成し、一次生産に寄与している可能性がある。

残りの 2 つの ORU は、熱帯の泥質堆積物から得られた環境クローン (AY773062) と帯水層から得られた環境クローン (EU926498) に相同性がそれぞれ 83%_{ND} および 90%_{AA}, 81%_{ND} および 89%_{AA} であった。

以上のことから、コケ坊主生態系では、光エネルギーに依存しない化学合成によって二酸化炭素を固定し、一次生産に寄与するプロテオバクテリアがコケ坊主全体に分布していることが明らかとなった。また、深海底と南極湖沼という、環境条件の大きく異なる二つの環境から非常に高い相同性を持つ RuBisCO 遺伝子が検出された。この RuBisCO を有する細菌はコスモポリタンのように分布していることが考えられ、他の南極湖沼にも存在する可能性がある。

4.3.3 コケおよびシアノバクテリア由来 IB 型の RuBisCO 遺伝子における多様性

IB 型の RuBisCO 遺伝子に帰属する配列は、360 クローン (全体の約 51%) から 9 の ORUs がまとめられた。この 9 の ORUs は、ORU10 を除いて、既知のシアノバクテリア *Anabaena*, *Arthrospira*, *Fischerella*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Raphidiopsis*, *Synechococcus*, および *Thermosynechococcus* の RuBisCO 遺伝子にそれぞれ 81-99%_{ND} および 91-98%_{AA} の範囲で比較的高い相同性を示した。シアノバクテリアは、南極の湖沼底にマットを形成することがよく報告されており、湖沼底における主要な一次生産者と考えられている (Vincent 1988, 2000; Quesada et al. 2008)。この 9 の ORUs の中では、ORU5 (209/360 クローン) が最優占しており、コケ坊主の外層と内層の 14 画分全ての部位から検出された (表 8)。この ORU5 は、既知種 *Leptolyngbya laminosa* ETS-08 の RuBisCO 遺伝子に相同性 90%_{ND} および 97%_{AA} と高い相同性を示し、系統樹内では南極の他の湖沼、マクマードドライバレーにあるボニー湖から得られた環境クローン (ACY74728) に近接していた (図 11)。ボニー湖は一年を通して湖面が氷に覆われており、その湖底では *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, および *Phormidium* spp. などのシアノバクテリアが存在することが顕微鏡観察

の結果から報告されている(Vincent et al. 1993; Wing and Priscu 1993). このボニー湖とほとけ池は約 3000km 離れており, 本研究により, 南極の遠く離れた異なる湖沼に系統学的には近縁な RuBisCO 遺伝子が存在することが明らかとなった. さらに, ORU13 もボニー湖から検出された環境クローン(ACY74730)と系統樹内で近接し, ひとつの独立したクラスターを形成していた.

さらに, 前述した ORU5 に系統樹内で同じクラスターに入り, かつ, *Leptolyngbya* 属の RuBisCO 遺伝子に相同性 87%_{ND} および 96%_{AA} を示す ORU11 (ORU5 との相同性は 89%_{ND} および 97%_{AA}) が外層から特異的に検出された. つまり, 系統学的に近縁な ORU の中でも, その分布特性が異なっていた. なお, 既報のバクテリアの 16S rRNA 遺伝子の多様性解析結果においても(Nakai et al. 2011), コケ坊主の外層に *Leptolyngbya* 属由来に近縁なクローン(phylogroup)が特異的に検出されている. 従って, ある種の *Leptolyngbya* 属の細菌がコケ坊主の外層特異的に存在する可能性が高い.

ORU10 は, 他の eight ORUs とは異なり, データベース上のどの RuBisCO 遺伝子とも相同性が低く, *Nostoc* 属の RuBisCO 遺伝子に 84%_{ND} および 83%_{AA} で最も近縁であった. この ORU10 はコケ坊主の外層最深部(O1)からのみ得られており, 系統樹内でも単独でひとつの独立したクラスターを形成していた(図 11).

本研究では, コケ類の IB 型の RuBisCO 遺伝子ほぼ全長を標的とした PCR を行い, コケ坊主の外層と内層の 14 画分全てから 1 の ORU が得られた(表 8). このコケ坊主の主構成体であるコケ由来と思われる ORU14 は, *Leptobryum* sp. の RuBisCO 遺伝子にヌクレオチド配列で 100%完全一致した. この配列は, ほとけ池のコケ坊主より分取した *Leptobryum* sp. から得られた RuBisCO 遺伝子である. これは, コケ坊主の主要構成種が *Leptobryum* 属であるという Imura et al. (1999) の報告と一致している. しかしながら, コケ坊主のマイナーな構成種である *Bryum* 属の RuBisCO 遺伝子に近縁となるクローンは得られなかった. 既報の報告でも, コケ坊主内のコケ類は *Leptobryum* 属が主であり, *Bryum pseudotriquetrum* はマイナーあるいは存在しないことが報告されている(Ohtani et al. 2001). また, 18S rRNA 遺伝子による多様性解析においても(第 3 章参照), コケ坊主全画分から *Leptobryum* 属の 18S rRNA 遺伝子に近縁なクローン(phylogroup)が検出される一方, *Bryum* 属に近縁なものは得られなかった. 従って, 本研究で用いたコケ坊主試料の中にも, *Bryum* 属が存在しなかった可能性がある.

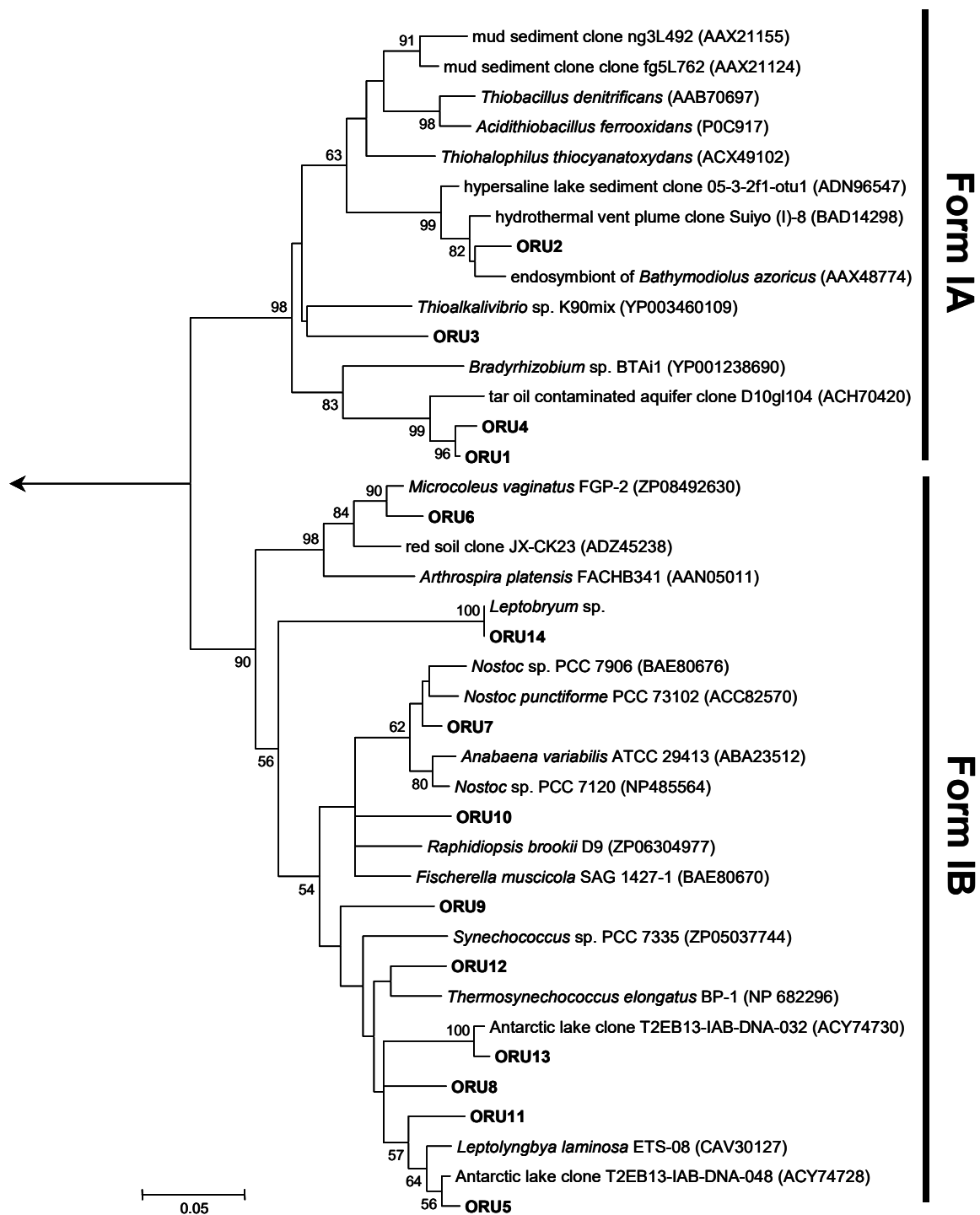


図 11 コケ坊主から得られた IA 型と IB 型の RuBisCO 遺伝子 (ORU1-ORU14) の分子系統樹 *Olisthodiscus luteus* (BAF80663) を外群とし、近隣結合法に基づき 1000 回の bootstrap により描画した。スケールは一塩基における塩基置換率を示す。系統樹の分岐の信頼性に関しては、bootstrap 値 (確率) が 50% 以上の分岐のみに数値を記している。

4.3.4 プロテオバクテリア由来II型のRuBisCO遺伝子の系統と多様性

II型のRuBisCO遺伝子に帰属する配列は、45クローンから2のORUsがまとめられた。一つ目のORU15(35/45クローン)は、ヌクレオチド配列でルーマニアのモビル洞窟から得られた環境クローン(FJ604806)に相同性92%_{ND}、アミノ酸配列ではタール油で汚染された帯水層から得られた環境クローン(ACH70392)に相同性93%_{AA}とそれぞれ最近縁であった。既知の分離株のRuBisCO遺伝子とのデータベース検索では、このORUはクロマチウム目の紅色硫黄細菌*Halothiobacillus* sp. RA13のRuBisCO遺伝子(AY099399)に相同性90%_{ND}および95%_{AA}と最近縁であった(図12)。*Halothiobacillus*属の細菌は、高い塩濃度(4M NaClや0.25M sodium thiosulfate)にも耐性を持つが、生育に塩は必須ではない(Kelly and Wood 2000)。また、二つ目のORU16(10/45クローン)もまたクロマチウム目の*Thioalkalicoccus limnaeus* B7-1のRuBisCO遺伝子(AEN02453)に相同性86%_{ND}および95%_{AA}と近縁であった(図12)。この*T. limnaeus*はロシアの東南シベリアにあるソーダ湖から分離された好アルカリ性細菌である(Bryantseva et al. 2000)。分離源のソーダ湖のpHは9.5-10.1の範囲であり(Bryantseva et al. 2000)、ほとけ池のpH7-8(Kimura et al. 2010)とは異なる。従って、本研究で得られたRuBisCO遺伝子を有する細菌が*Thioalkalicoccus*属であるならば、既知種とは生育特性が異なると考えられる。

一般的に、紅色硫黄細菌は硫化水素のような還元型の無機硫黄化合物を電子供与体とする光合成独立栄養的代謝を行う。前述した*Thioalkalicoccus*属の細菌は、バクテリオクロフィル*b*を光合成色素として細胞内に持っている(Bryantseva et al. 2000)。つまり、これらの細菌は硫化水素が安定的に供給されるような嫌気的な環境であって光が届くというような限られた環境下でのみ生育することができる。本研究では、II型のRuBisCO遺伝子を有する紅色硫黄細菌がコケ坊主の内層下部から検出されたが、内層下部の中でも、光が得られるより外層に近い部分に生息していると考えられる。

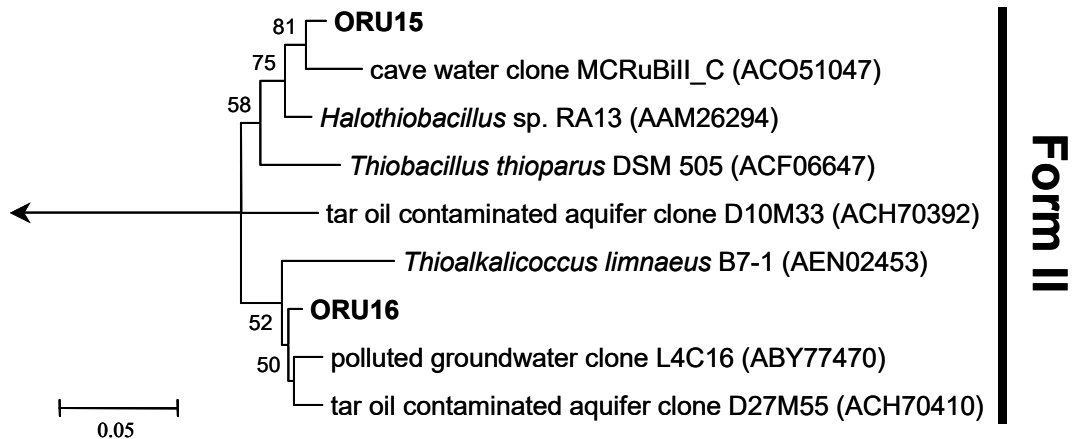


図 12 コケ坊主から得られた II 型の RuBisCO 遺伝子 (ORU15-ORU16) の NJ 系統樹 *Nostoc punctiforme* PCC73102 (ACC82570) を外群とし、近隣結合法に基づき 1000 回の bootstrap により描図した。スケールは、一塩基における塩基置換率を示す。系統樹の分岐の信頼性に関しては、bootstrap 値 (確率) が 50% 以上の分岐のみに数値を記している。

4.3.5 16S rRNA 遺伝子および RuBisCO 遺伝子それぞれから得られた微生物系統の比較

16S/18S rRNA 遺伝子 (第 2 章, 第 3 章参照; Nakai et al. 2011) および RuBisCO 遺伝子それぞれから得られた微生物系統を比較したところ、本研究で得られた 16 ORUs のうちの 10 の ORUs の帰属する系統は、rRNA 遺伝子解析で得られた phylotype の帰属する系統と属のレベルで同じであったが、種のレベルでは異なっていた。また、残りの 6 の ORUs は属レベルで異なる系統に帰属していた。16S rRNA 遺伝子および RuBisCO 遺伝子それぞれの系統解析の結果が整合的でない理由には、プロテオバクテリアやシアノバクテリアの種々の系統グループの間で RuBisCO 遺伝子の保存性が異なることが考えられている (Delwiche and Palmer 1996)。また、微生物間における遺伝子の水平伝播 (gene transfer) が起こることもその理由として指摘されている (Delwiche and Palmer 1996; Watson et al. 1999)。実際、環境 DNA から 16S rRNA 遺伝子と RuBisCO 遺伝子の両方の分子系統解析を行った際、得られた系統が整合的でない例も報告されている (for example, Elsaied et al. 2002)。このように、系統学的に異なる微生物でも生息域を同じくするならば同じ型の RuBisCO 遺伝子を有する、あるいは、同じ微生物種であっても株間で異なる RuBisCO を有する可能性がある。これを検証するには、実際に環境中から微生物を分離、培養し、その rRNA 遺伝子と RuBisCO 遺伝子の両方を調べるのが考えられる。

4.3.6 コケ坊主の外層と内層における炭素安定同位体比

炭素同位体比分析の結果、コケ坊主第1標本の外層の $\delta^{13}\text{C}$ 値は-28.6~-27.2、内層では-26.2~-24.0の範囲であり、外層よりも内層の方が $\delta^{13}\text{C}$ の値が高かった(表9)。第2標本においても、外層の $\delta^{13}\text{C}$ 値は-28.8~-26.6、内層は-26.4~-24.3の範囲となり、第1標本と同じ傾向がみられた(表9)。コケや藻類の腐敗が進む内層では、有機物の生産より分解が卓越し、軽い炭素から先に二酸化炭素(CO_2)になって放出されるので、残渣の炭素は相対的に重くなることが考えられる。このことがコケ坊主の外層と内層における $\delta^{13}\text{C}$ 値の差に反映されている可能性がある。また、一般的に、光合成由来の有機炭素 $\delta^{13}\text{C}$ 値は約-20‰であるが(Hoefs 2004)、コケや藻類による光合成が活発と思われる外層では-28.8~-26.6の範囲の予想より低い値が得られた。これは、ほとけ池の溶存 CO_2 (あるいは炭酸イオン、重炭酸イオン)の $\delta^{13}\text{C}$ 値が、どういう理由か低いと仮定すると、光合成による CO_2 固定が活発な外層において低い $\delta^{13}\text{C}$ 値が得られることが説明できる。ここでは、炭酸や重炭酸イオンを CO_2 に変える炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase)の同位体分別効果はないものとする(Simonsson et al. 1979)。このことを説明するためには、外層で固定される炭素がそもそも供給源からして軽いという前提を検証する必要があり、その溶存 CO_2 、重炭酸イオン、炭酸イオンの炭素の $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定することが今後の課題である。

表9 コケ坊主の外層と内層における炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$)

Sample	Exterior section							Interior section						
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
specimen A	-27.2	-27.7	-27.8	-28.6	-28.0	-28.1	-27.6	-26.0	-26.2	-26.0	-25.1	-24.1	-24.0	-24.1
specimen B	-26.7	-26.7	-28.2	-27.6	-26.6	-28.8	-27.5	-26.0	-25.6	-26.4	-24.3	-24.9	-25.2	-25.0

4.4 結論

本研究では、1 つの完全なコケ坊主標本を用いて、IA, IB, IC, ID, II, および III 型全ての RuBisCO 遺伝子の分布と多様性を調べた。その結果、プロテオバクテリア由来の IA 型の RuBisCO 遺伝子に帰属する ORU がシアノバクテリア由来 IB 型の RuBisCO 遺伝子と同程度に検出されたことと、深海環境から得られた ORUs に高い相同性を示す ORU がコケ坊主全画分に存在することが分かった。コケ類の IB 型に帰属する ORU は *Leptobryum* sp. の RuBisCO 遺伝子にヌクレオチド配列で 100%完全一致した。さらに、コケ坊主の外層に特異的に分布するシアノバクテリア由来の IB 型に帰属する ORU や、内層特異的に II 型の紅色硫黄細菌由来と思われる ORU が検出された。これら ORU の層特異的な分布には、コケ坊主内に存在する酸化的な外層と還元的な内層の二層構造が反映されていると考えられる。このように、南極コケ坊主生態系では、光エネルギーに依存せず、無機物を酸化する際に生じる化学エネルギーによって有機物を合成できる化学合成独立栄養細菌も一次生産者として重要な役割を果たしている可能性が示された。特に、約 4 ヶ月間にも及ぶ南極での極夜の間は、化学合成独立栄養細菌による CO₂ 固定が重要であると考えられる。これを確かめるためには、RNA に基づいた PCR クローン・ライブラリー解析,あるいは、メタトランスクリプトーム,メタプロテオーム解析を行い、現場で発現している RuBisCO 遺伝子の種類や量を調べることが考えられる。

第5章

南極湖沼に特有な水生コケ植物の共生生物相における窒素固定酵素および脱窒関連酵素遺伝子の多様性

要旨

南極コケ坊主は、コケ類とそれに付随する共生生物相が協調的に物質生産や物質循環を行う、自立度の高い生物群集であると考えられる。これまでに 16S/18S rRNA 遺伝子の多様性解析の結果より、コケ坊主内の生物相の種多様性が報告されてきた(第2章, 第3章参照; Nakai et al. 2011)。しかしながら、rRNA 遺伝子に基づいた系統解析のみでは、微生物の機能を知ることは困難である。本研究では、窒素固定、アンモニア酸化、および脱窒に関わる機能酵素遺伝子の多様性解析を試み、コケ類に共生する微生物相が窒素循環に寄与する可能性を考察した。まず、コケ坊主を外層と内層、さらにそれらを上下縦方向に分け、計14部位からDNAを抽出した。そこから、窒素固定酵素遺伝子(*nifH*)、アンモニア酸化酵素遺伝子(*amoA*)、硝酸還元酵素遺伝子(*napA*, *narG*)、亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirK*, *nirS*)、一酸化窒素還元酵素遺伝子(*cnorB*, *qnorB*)、および亜酸化窒素還元酵素遺伝子(*nosZ*)を標的としたPCRを試み、*nifH*, *nirK*, *nirS*, *qnorB*の増幅産物を得た。それらのPCRクローン・ライブラリーを構築し、計5376クローンの塩基配列の決定と分子系統解析を行った。その結果、コケ坊主全体では Gammaproteobacteria の紅色光合成細菌の *nifH*, Alphaproteobacteria のリゾビウム科の *nirK*, Betaproteobacteria の脱窒性硫黄酸化細菌の *nirS*, および, Acidobacteria の putative *qnorB* に最近縁なクローン(operational unit)がそれぞれ優占的に検出された。また、外層に特異的な Cyanobacteria に帰属する *nifH*, 内層に準優占的な Deltaproteobacteria の硫酸還元菌に帰属する *nifH* など、コケ坊主の外層や内層の層特異的に分布するクローン(operational unit)も得られた。これは、コケ坊主内に存在する酸化的な外層と還元的な内層の二層構造が反映されていると考えられる。以上の結果より、コケ坊主生態系において、窒素固定や脱窒の各プロセスには複数の異なる微生物系統が関与することが明らかとなった。また、コケ坊主内外の部位によってもそれぞれ異なる微生物コミュニティが窒素循環に寄与する可能性が示され、その相乗効果(synergy)が生態系の存立と維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5.1 研究の背景

南極コケ坊主は、コケ類とそれに付随する共生生物相が協調的に物質生産や物質循環を行う、自立度の高い生物群集であると考えられる。これまで 16S/18S rRNA 遺伝子の系統解析により、コケ坊主の共生生物相における種の多様性が明らかとなり(第2章, 第3章参照; Nakai et al. 2011), その大群落が豊かな微生物生態系の上に成り立っている可能性が示唆された。また, CO₂ 固定に与る酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO, E.C. 4.1.1.39)の遺伝子の多様性解析により, この生態系では, 光エネルギーに依存せず, 無機物を酸化する際に生じる化学エネルギーによって有機物を合成できる化学合成独立栄養細菌も一次生産者として重要な役割を果たしている可能性が示された(第4章参照)。

Kudoh et al. (2003b) の報告によると, コケ坊主がみられるほとけ池の表層水は, アンモニウムイオン(NH₄⁺), 亜硝酸イオン(NO₂⁻), および硝酸イオン(NO₃⁻)が 0 mg L⁻¹の検出限界以下であった。これは, もともと栄養塩が少ないためにそのイオン濃度が検出限界以下であるのか, それとも, 十分量の栄養塩があるものの, 微生物の活発な硝化作用や脱窒作用によってイオン濃度が検出されないのか, 分からない。従って, 南極湖沼底に成り立つコケ坊主生態系は, 湖水中, あるいは湖底堆積物から栄養塩を得て生長していると想像されるが, その利用実態は未だに不明である。

南極における主要な窒素源には, 海鳥のコロニーや, 窒素固定細菌であるシアノバクテリアが主として報告されている(Ino and Nakatsubo, 1986; Christie, 1987)。また, 窒素安定同位体標識法を用いた実験より, 蘚苔類がシアノバクテリアから放出された窒素化合物を吸収することが確認されている(Jones and Wilson 1978)。従って, コケ坊主がみられる南極湖沼底においても, 特に, シアノバクテリアによる窒素固定が重要な窒素源であると考えられる。しかしながら, 窒素固定能を持つ細菌は, シアノバクテリアだけではなく, バクテリアの他の9の phyla でも報告されており, 広範囲の系統に散在している(Eady 1992; Zehr et al. 2003)。更に, アンモニアから硝酸までの酸化反応である硝化, および, 窒素固定によって大気中から取り込まれた結合型窒素を分子状窒素として大気中に戻す脱窒反応もまた, 窒素の循環という観点から重要である。既報の 16S rRNA 遺伝子に基づいたバクテリアの多様性解析において(Nakai et al. 2011), 窒素固定細菌, 硝化細菌, および脱窒細菌に近縁なクローン(phylotype)が検出されている。しかしながら, rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析では, 純粋培養されている近縁な分類群の微生物からその性質を推定することしかできず, その機能を知ることには困難である。また, 系統的学的に近縁なものが存在しない場合は, 機能を推定することもできない。そのため, 極貧栄養な湖沼にみられるコケ坊主生態系において, どのような生物相が窒素固定や脱

窒のプロセスに関与し、その存立と維持に寄与しているのか分からなかった。そこで本研究では、生態系の窒素循環のうち窒素固定、アンモニア酸化、および脱窒に関わる酵素である、窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*)、アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*)、硝酸還元酵素遺伝子 (*napA*, *narG*)、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*)、一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*cnorB*, *qnorB*)、および亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) を標的とした多様性解析を試みた。

窒素固定酵素 (nitrogenase, Nif) は、空気中の分子状窒素 (N_2) からアンモニア (NH_3) への変換を触媒する酵素であり、それをコードする *nifH* が窒素固定微生物群の多様性解析に使用される (Zehr et al. 2003)。アンモニア酸化酵素 (ammonia monooxygenase, AMO) は、アンモニア (NH_3) を亜硝酸 (NO_2^-) に酸化する酵素であり、アンモニアから硝酸 (NO_3^-) までの酸化反応、つまり、硝化反応の最初のステップを担う酵素である。アンモニア酸化細菌には、Betaproteobacteria と Gammaproteobacteria のバクテリアの2つの系統のみが知られており (Kowalchuk and Stephen 2001)、AMO の活性中心をコードする *amoA* も系統ごとに異なり、*amoA* (β) と *amoA* (γ) の2種類が多様性解析に用いられる (Ward and O'Mullan 2002)。 NO_3^- が N_2 まで還元される脱窒には4つの過程があり、その各過程には主に4種類の酵素、すなわち、 NO_3^- から NO_2^- への還元を触媒する硝酸還元酵素 (nitrate reductase, NR)、 NO_2^- から一酸化窒素 (NO) への還元を触媒する亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase, Nir)、NO から亜酸化窒素 (N_2O) への還元を触媒する一酸化窒素還元酵素 (nitric oxide reductase, Nor)、 N_2O から N_2 の還元を触媒する亜酸化窒素還元酵素 (nitrous oxide reductase, Nos) が関与している (Ye et al. 1994)。硝酸還元酵素 NR には、膜結合型の Nar とペリプラズム結合型の Nap の2種が知られており、これらの酵素をコードしているのが *napA* (Flanagan et al. 1999) および *narG* (Philippot et al. 2002) である。亜硝酸還元酵素 Nir には銅含有型の Cu Nir とシクロム含有型の *cd₁* Nir の2種が知られており、これらの酵素をコードしているのが *nirK* (Braker et al. 1998; Michotey et al. 2000) および *nirS* (Braker et al. 1998) である。この *nirK* と *nirS* については、脱窒において最初に含窒素ガスが出る key step に関わる遺伝子であるため (Zehr et al. 2002)、他の脱窒関連酵素遺伝子と比較すると研究がより進んでおり、PCR 検出に用いるプライマーも改良されてきている (Throbäck et al. 2004)。一酸化窒素還元酵素 Nor には、電子供与体としてシクロムを使用する cNor とキノールを用いる qNor が知られており、これらの酵素をコードしているのが *cnorB* および *qnorB* である (Braker and Tiedje 2003)。亜酸化窒素還元酵素 Nos は銅を含有する酵素であり、この酵素をコードする *nosZ* が多様性解析に汎用される (Scala and Kerkhof 1998; Throbäck et al. 2004)。

窒素循環に寄与する機能酵素の遺伝的多様性については、これまで海水、沿岸域、海洋堆積物、湿地、水田土壌などでその分子系統学的解析の結果が多数報告されてきた (reviewed by Ward

2005). その一方, 南極環境では, 土壌における窒素固定や脱窒関連酵素遺伝子群の網羅的解析の報告例があるものの (for example, Yergeau et al. 2007; Jung et al. 2011), 湖沼では, 単一の機能酵素遺伝子の多様性解析の結果が報告されるのみで断片的な情報に留まっている (for example, Olson et al. 1998). 本研究の成果は, 南極微生物の機能遺伝子の系統と多様性, および, 極貧栄養湖沼に成り立つ湖底生物群集の存立と維持に関する議論を深める材料を提供し得るものと考えられる.

5.2 材料と方法

5.2.1 調査湖沼と生物標本の採取

第2章の原核生物の多様性解析で使用したコケ坊主標本と同じものを本研究にも使用した。標本の採取場所、湖沼の環境データなどの詳細は第2章に記した。

5.2.2 微生物の混合ゲノム DNA の抽出と精製

第2章の原核生物の多様性解析の際、コケ坊主標本から抽出した混合ゲノム DNA を本研究にも使用した。ゲノム DNA の抽出と精製の詳細は第2章に記した。

5.2.3 窒素固定遺伝子, アンモニア酸化酵素遺伝子, および脱窒関連酵素遺伝子群の PCR 増幅

窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*), アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*), および脱窒関連酵素遺伝子群 (*narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *qnorB*, *cnorB*, *nosZ*) の PCR 増幅には表 10 に記した各プライマーセットを用いた。なお、環境試料からの *nirK*, *nirS*, *nosZ* の PCR 検出に関して、既報の *nirK* 1F と *nirK* 5R, *nirS* 1F と *nirS* 6R, および *nosZ* 661F と *nosZ* 1773R の各プライマーセットは最も汎用されるプライマーではあるが、環境試料では非特異増幅が生じる場合があること、ある種の脱窒細菌および環境配列とは数塩基のミスマッチがあることから (Throbäck et al. 2004), 本研究では Throbäck et al. (2004) が薦めているプライマーセットも同時に使用した。PCR 増幅には TaKaRa Thermal Cycler PERSONAL TP240 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) と TaKaRa Ex Taq polymerase を使用した。PCR の反応条件は表 10 に示した各論文に従った。

表10 窒素固定酵素遺伝子, アンモニア酸化酵素遺伝子, および脱窒関連酵素遺伝子のPCR増幅に用いたプライマー

Primer	Target gene	Sequence (5' to 3') ^a	Product size (bp)	Reference
Nitrogenase gene				
nifH-F	<i>nifH</i>	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	457	Rösch et al. (2002)
nifH-R		TTGTTSGCSGCRACATSGCCATCAT		
Ammonia monooxygenase gene				
amoA 1F	<i>amoA</i> (β)	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	Rotthauwe et al. (1997)
amoA 2R		CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC		
amoA 3F	<i>amoA</i> (γ)	GGTGAGTGGGYTAACMG	510	Purkhold et al. (2000)
amoB 4R		GCTAGCCACTTCTTGG		
Nitrate reductase genes				
napA V16	<i>napA</i>	GCNCCNTGYMGNTTYTYGYGG	1040	Flanagan et al. (1999)
napA V17		RTGYTGRTRRAANCCCATNGTCCA		
napA V66	<i>napA</i>	TAYTTYTNHSNAARATHATGTAYGG	385	Flanagan et al. (1999)
napA V67		DATNGGRTGCATYTCNGCCATRTT		
narG 1960F	<i>narG</i>	TAYGTSGGSCARGARAA	650	Philippot et al. (2002)
narG 2650R		TTYTCRTACCCABGTBGC		
Nitrite reductase genes				
nirK 1F	<i>nirK</i>	GGMATGGTKCCSTGGCA	514	Braker et al. (1998)
nirK 5R		GCCTCGATCAGRTTRTGG		
nirK F1aCu	<i>nirK</i>	ATCATGTSCTGCCGG	470	Michotey et al. (2000); Throbäck et al. (2004)
nirK R3Cu		GCCTCGATCAGRTTGTGGTT		Throbäck et al. (2004)
nirS 1F	<i>nirS</i>	CCTAYTGGCCGCCRCART	890	Braker et al. (1998)
nirS 6R		CGTTGAACCTTRCCGGT		
nirS cd3aF	<i>nirS</i>	GTSAAAGTSAAGGARACSGG	410	Hallin and Lindgren (1999); Throbäck et al. (2004)
nirS R3cd		GASTTCGGRTSGTCTTGA		
Nitric oxide reductase genes				
cnorB 2F	<i>cnorB</i>	GACAAGNNNTACTGGTGGT	454	Braker and Tiedje (2003)
cnorB 7R		TGNCCRTGNGCNGCNGT		
qnorB 2F	<i>qnorB</i>	GGNCAYCARGGNTAYGA	637	Braker and Tiedje (2003)
qnorB 7R		GGNGGRTTDTACADGAANCC		
Nitrous oxide reductase gene				
nosZ 661F	<i>nosZ</i>	CGGCTGGGGGTGACCAA	1100	Scala and Kerkhof (1998)
nosZ 1773R		ATRTCAGATCARCTGBTCGTT		
nosZ F	<i>nosZ</i>	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	450	Throbäck et al. (2004)
nosZ 1622R		CGCRASGGCAASAAAGGTSCG		

^a Boldface letters denote degenerate positions: B, G + T; M, A + C; N, A + C + G + T; R, A + G; S, G + C; Y, C + T; W, A + T.

5.2.4 PCR クローン・ライブラリーの構築と分子系統解析

得られた増幅産物は、TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてクローニングし、*Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) に形質転換した。形質転換体に挿入した各酵素遺伝子は、DNA シークエンサー ABI 3730XL automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, USA) を使用して塩基配列を決定した。得られたヌクレオチド配列は、*nifH* 遺伝子は 97% 以上一致する配列同士 (Mohamed et al. 2008)、*nirK*, *nirS*, および *qnorB* 遺伝子は 95% 以上一致する配列同士 (Santoro et al. 2006) を operational units としてグルーピングした。それぞれの分類単位について、*nifH* は operational *nifH* unit (ONHU), *nirK* は operational *nirK* unit (ONKU), *nirS* は operational *nirS* unit (ONSU), *qnorB* は operational *qnorB* unit (OQBU) と管理上の名前を付けた。各 operational unit は、European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) で提供されている transeq (European Bioinformatics, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>) を用いてアミノ酸配列を取得した。塩基配列をアミノ酸配列に翻訳した際、ストップコドン (UAA, UAG, UGA) を含む配列については、この後の解析から除外した。各 operational unit のヌクレオチド配列とアミノ酸配列と既知の酵素遺伝子の配列とを比較するため、NCBI の nt-database と nr-database を検索対象にして、BLAST 相同性検索 (Altschul et al. 1997) を行った。また、BLAST 検索の結果を基に、目的の酵素遺伝子にヒットしない配列をこの後の解析から除外した。なお、本論文で示しているアミノ酸の相同性は類似度 (similarity) ではなく、一致度 (identity) である。

5.2.5 窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) の分析

本研究では、遺伝子解析のために14画分に分けた研究試料を窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) の分析にも使用した。 $\delta^{15}\text{N}$ の分析は同位体研究所 (横浜, 日本) に委託され、Delta V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) を使用して Conflo 法にて分析した。本研究では、窒素同位体分析の再現性を確認するため、ほとけ池で採取された別の完全なコケ坊主体 (直径20cm, 高さ27cm, 第2標本) についても、1番目のコケ坊主 (第1標本) と同様に、外層7画分、内層7画分の計14画分に分画し、分析を行った。

5.3 結果と考察

5.3.1 コケ坊主から得られた窒素固定酵素遺伝子と脱窒関連酵素遺伝子群

PCR 増幅の結果, *nifH*, *nirK*, *nirS*, および *qnorB* については, コケ坊主標本の外層 7 画分と内層 7 画分の計 14 画分全てから産物が得られた(表 11). その一方, *amoA*, *napA*, *narG*, *cnorB*, および *nosZ* は, 数回の再試を行ったものの, コケ坊主のどの画分からも目的サイズに産物が得られなかった. *amoA*, *napA*, *narG* が検出されなかったことについては, コケ坊主内の栄養塩の枯渇がそれら酵素遺伝子を有する微生物の生育の制限しているため, PCR の検出限界を下回った可能性が理由として挙げられる. このことは, ほとけ池の湖水中のアンモニウムイオン(NH_4^+), 亜硝酸イオン(NO_2^-), および硝酸イオン(NO_3^-)は全て検出限界以下であることから考えられる(Kudoh et al. 2003b). また, *nosZ* の増幅産物が得られなかったことから, 極貧栄養なほとけ池では窒素は NO_3^- から N_2 までの完全脱窒に至らず, 何らかの形で再利用されていることが想定され, この窒素循環を調べるのが今後の課題である. なお, 本研究は, PCR に基づいた多様性解析であるため, 未知のアンモニア酸化酵素や脱窒関連酵素を有する細菌を見落としている可能性がある. しかしながら, 既知種の既知の酵素遺伝子配列に基づいたプライマーでは各酵素遺伝子が PCR 検出限界以下, あるいは存在しないことが本研究によって明らかとなった.

各 PCR 産物から構築した計 5376 クローンの塩基配列を決定した後, ストップコドンを含む配列と標的の遺伝子にヒットしない配列を除外し, 最終的な解析対象として 4840 件の配列を得た. これらの配列は, operational units へのグルーピングによって, *nifH* は 29 ONHUs, *nirK* は 24 ONKUs, *nirS* は 19 ONSUs, および *qnorB* は 94 OQBUs ずつにまとめられた. 各 operational unit のコケ坊主内の 14 画分における分布, およびアミノ酸配列の BLAST 相同性検索結果は表 5, 6, 7, および, 8 に示した(各 operational unit のヌクレオチド配列の BLAST 検索結果は補足表 6, 7, 8, および 9 に示した).

表11 窒素固定酵素遺伝子, アンモニア酸化酵素遺伝子, および脱窒素関連酵素遺伝子のPCR増幅試験の結果

Primer	Target gene	Exterior section							Interior section						
		O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
Nitrogenase gene															
nifH-F	<i>nifH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nifH-R															
Ammonia monooxygenase gene															
amoA 1F	<i>amoA</i> (β)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amoA 2R															
amoA 3F	<i>amoA</i> (γ)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amoB 4R															
Nitrate reductase genes															
napA V16	<i>napA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
napA V17															
napA V66	<i>napA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
napA V67															
narG 1960F	<i>narG</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
narG 2650R															
Nitrite reductase genes															
nirK 1F	<i>nirK</i>	M	-	-	M	-	M	M	M	M	M	M	M	M	M
nirK 5R															
nirK F1aCu	<i>nirK</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nirK R3Cu															
nirS 1F	<i>nirS</i>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
nirS 6R															
nirS cd3aF	<i>nirS</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nirS R3cd															
Nitric oxide reductase genes															
cnorB 2F	<i>cnorB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cnorB 7R															
qnorB 2F	<i>qnorB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
qnorB 7R															
Nitrous oxide reductase gene															
nosZ 661F	<i>nosZ</i>	-	-	-	-	M	M	-	-	-	M	-	-	-	-
nosZ 1773R															
nosZ F	<i>nosZ</i>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
nosZ 1622R															

^a +, visible band of the expected size

^b M, multiple bands, not including band of expected size

^c -, no visible band

5.3.2 窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*) の系統と多様性

窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*) に帰属する配列は、1230 クローンから 29 ONHUs がまとめられた。この 29 ONHUs は、1 Cyanobacteria, 9 Alphaproteobacteria, 1 Betaproteobacteria, 10 Gammaproteobacteria, 5 Deltaproteobacteria, 1 Chlorobi, 1 Spirochaetes, 1 Verrucomicrobia の eight phylogenetic groups に系統分類された (表 12)。本研究により、コケ坊主内では、シアノバクテリアだけでなく、他の微生物系統も窒素固定能を有し、窒素源として重要な役割を果たしている可能性が示された。この 29 ONHUs の中では、ONHU12 (763/1230 クローン) が最優占しており、コケ坊主の外層と内層の 14 画分全ての部位から検出された (表 12)。この ONHU12 は、ヌクレオチド配列では南極のマクマード棚氷から得られた *nifH* (EU915051) に相同性 98%_{ND} (ヌクレオチドの相同性)、アミノ酸配列では既知種 *Thiocapsa roseopersicina* (Gammaproteobacteria) の *nifH* (ACC95826) に相同性 97%_{AA} (アミノ酸の相同性) とそれぞれ近縁であった。*T. roseopersicina* は、クロマチウム目の紅色光合成細菌の一種であり、硫化水素のような還元型の無機硫黄化合物を電子供与体として光合成独立栄養的代謝を行う (de Wit and Vangemerden 1987)。つまり、この細菌は硫化水素が安定的に供給されるような環境であって光が届くというような限られた環境下でのみ生育することができる。

ほとけ池の水注や、湖底のコケ類と藻類のマット表層では硫化水素ガスが検出限界以下である一方、そのマットの 5 mm 以上深い部分では 1 µg/g (wet) 以上の硫化水素が検出されている (Kudoh et al. 2009)。本研究により、コケ坊主内では、ある種の紅色光合成細菌が硫化水素を酸化することによって有機物を合成して一次生産に寄与するだけでなく、窒素固定能も有することが示された。なお、*T. roseopersicina* はシアノバクテリアとともに微生物マットを形成することが知られているが、その報告例は高塩分あるいは海洋環境に限られている (Stal et al. 1985; Jorgensen et al. 1986)。従って、本研究で得られた *nifH* を有する細菌が *T. roseopersicina* であるならば、既知種とは生育特性が異なると考えられる。

また、ONHU2 も O₂ を除くコケ坊主全体に分布しており、ヌクレオチド配列で湿地から得られた *nifH* (AY091872) に相同性 80%_{ND}、アミノ酸配列では *Bradyrhizobium* 属細菌の *nifH* (ACT67992) に相同性 89%_{AA} とそれぞれ最近縁であった。既報の 16S rRNA 遺伝子や CO₂ 固定に与る酵素 RuBisCO の遺伝子の多様性解析 (Nakai et al. 2011; 第 4 章参照) においても、*Bradyrhizobium* 属に近縁なクローンがコケ坊主全画分から検出されており、*Bradyrhizobium* 属細菌がコケ坊主の内外上下で優占していることが高い蓋然性を持って示された。

コケ坊主の外層では、Cyanobacteria に帰属する 1 の ONHU が特異的かつ準優占的に検出さ

れ、この ONHU1 (50/1230 クローン) はヌクレオチド配列で既知種 *Nostoc punctiforme* PCC 73102 の *nifH* (CP001037) に相同性 91%_{ND}, アミノ酸配列では *Nodularia spumigena* CCY9414 の *nifH* (ZP_01629115) に相同性 99%_{AA} とそれぞれ最近縁であった。Cyanobacteria は、光合成と窒素固定の両方ができる細菌であり、南極湖沼の主要な生産者として、また、湖底にマットを形成する細菌グループとしてよく知られている (Vincent 2000)。一方、コケ坊主の内層では、Deltaproteobacteria に帰属する ONHUs が準優占的に検出され、これらは既知の硫酸還元菌 *Desulfatibacillum*, *Desulfobulbus*, および *Desulfovibrio* に相同性 81-83%_{ND} および 93-97%_{AA} の範囲でそれぞれ近縁であった。本研究で検出された *nifH* を有する Deltaproteobacteria の細菌は、内層における硫酸還元だけでなく、窒素固定にも関与する可能性が示された。以上のように、コケ坊主の全体に分布する ONHU だけでなく、層特異的に分布するものが検出された。これは、コケ坊主内に存在する酸化的な外層と還元的な内層の二層構造が反映されていると考えられる。

表12 コケ坊主から得られた窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*) のPCRプローブの分布とONHUの系統

ONHU ID.	Closest amino acid sequence		Accession No.	Identity (%)	Closest amino acid organism	Accession No.	Identity (%)	Outer aerobic section							Inner anaerobic section						
	Accession No.	Identity (%)						O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14
Cyanobacteria																					
ONHU1	<i>Nodularia spumigena</i> CCY9414	ZP_01629115	99					9	10	11	4	2	11	3							
Alphaproteobacteria																					
ONHU2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67992	89																		
ONHU3	soil clone Yushu-2	AA148890	96		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67985	95	1	6	7	11	8	7	3	6	4	4	5	9		
ONHU4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67982	94												3	1	5				
ONHU5	peat soil clone SB-25	ABW90497	88		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67976	88								4	1	1		3		
ONHU6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67982	93					1								1	1		1		
ONHU7	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67982	96												1		1				
ONHU8	soil clone Yushu-12	AA148900	95		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67976	92								1		1				
ONHU9	peat soil clone SB-26	ABW90498	98		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67976	94									1					
ONHU10	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACT67992	87												1						
Betaproteobacteria																					
ONHU11	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	AAU85621	96												1	2	2	2	2		
Gammaproteobacteria																					
ONHU12	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	ACC95826	97					70	67	69	61	63	67	57	42	49	51	39	59		
ONHU13	<i>Methylobacter tundripaludum</i> SY96	ZP_08781925	99					7	4	1	2	3	2	2	3	6	3	3	1		
ONHU14	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	ACC95826	94												2	4	4	5	11		
ONHU15	<i>Methylococcus capsulatus</i>	CAD91850	95					1		3	1	1	2	2	1	5	5		3		
ONHU16	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	ACC95826	93					1	1					1	1				2		
ONHU17	rhizosphere clone 9002-4	ACL35446	100		<i>Thiocystis violascens</i> DSM 198	ZP_08926951	97								2						
ONHU18	mangrove rhizosphere clone 3-3	ACO36750	95		<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i> DSM 2111	ABN10974	94				2										
ONHU19	<i>Methylomonas rubra</i>	AAO49402	91												2						
ONHU20	mangrove rhizosphere clone 3-3	ACO36750	94		<i>Thiocapsa bogorovi</i>	ACC95825	92								1						
ONHU21	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	ACC95826	94											1							
Deltaproteobacteria																					
ONHU22	<i>Desulfotribrio aespoensis</i> Aspo-2	YP_004120783	97										3	7	2	25	11	21	7		
ONHU23	<i>Desulfotribrio aespoensis</i> Aspo-2	YP_004120783	93										4	4	3	4	13		1		
ONHU24	rhizosphere clone N012	ABD74290	95		<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01	YP_002430688	94						1	2	1				1		
ONHU25	<i>Desulfotribrio</i> sp. NDI32	ZP_08110622	94																		
ONHU26	<i>Geobacter uramireducens</i> Rf4	YP_001229952	97												1						
Chlorobi																					
ONHU27	termite gut clone Sm11	BAF52182	86		<i>Chloroherpeton thalassium</i> ATCC 35110	YP_001995946	86												1		
Spirochaeta																					
ONHU28	<i>Spirochaeta zuelzerae</i>	AAK01223	88																1		
Verrucomicrobia																					
ONHU29	Opitutaceae bacterium TAV2	ZP_03723745	93					1	92	88	91	83	95	91	70	91	87	82	89		
Total								91	92	88	91	83	95	91	70	91	87	82	89		

5.3.3 銅含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*) の系統と多様性

亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*) に帰属する 24 ONKUs は、23 Alphaproteobacteria, 1 Betaproteobacteria の 2 の phylogenetic groups に系統分類された (表 13). この 24 ONKUs の中では、ONKU1 (325/1222 クローン) が最優占しており、O5 と I5 を除くコケ坊主全ての部位から検出された (表 13). この ONKU1 は、耕地土壌から得られた *nirK* (DQ304232) に相同性 96%_{ND} および 97%_{AA} で最近縁であった。また、既知の分離株の *nirK* とのデータベース検索では、*Mesorhizobium* 属の *nirK* (FN600572) に相同性 86%_{ND} および 86%_{AA} で最近縁であった。他の ONKUs についても、*Bradyrhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属の *nirK* に最近縁となるものが検出された。根粒菌と呼ばれるこれらのリゾビウム科の細菌は、マメ科植物の根に共生する窒素固定細菌としてよく知られるが、土壌中に単生で生息するときは、嫌気条件下で脱窒を行うことが報告されている (Zablotowicz et al. 1978; Philippot et al. 2007). 本研究により、南極湖沼底においても、脱窒を行うリゾビウム科の細菌が分布している可能性が示された。

本研究で得られた *nirK* は、前述した *nifH* と比較すると、ほとんどのクローンがパッチ状に分布していた。一般的に、脱窒反応は、酸化還元境界および微好気環境などの比較的嫌気条件の厳しくない環境で活発であることが知られている (Nealson 1997; Lovley 2001). 本研究で検出されたような *nirK* を有する細菌は、コケ坊主の外層と内層の間に存在する酸化還元電位 ± 0 V 付近の微好気あるいは微嫌気条件において脱窒を行うことができるため、外層と内層の両方に分布しうる。このことが、コケ坊主内外上下のパッチ状の分布に反映していると考えられる。しかしながら、1 つの例外として、コケ坊主の内層からは既知の培養株のどの *nirK* とも近縁でない ONKU24 (67/1222 クローン) が準優占的に検出された。この ONKU24 を有する細菌は、アメリカ西海岸のサンフランシスコ湾の堆積物から得られた *nirK* (ADM94037) (Mosier and Francis 2010) に相同性 84%_{ND} および 90%_{AA} を示しており、微嫌気あるいは嫌気環境に特徴的に生息する細菌であると考えられる。

なお、*nirK* は銅を含有しているため、その発現は環境中あるいは細胞内中の銅濃度に依存していることが考えられる。実際、南極のマクマードドライバレーにあるボニー湖から分離された好冷性脱窒細菌の未同定種 WLB20 は、銅欠乏下において培養液中に亜硝酸が蓄積し、それ以降の還元が進行しなかったこと報告されている (Ward and Priscu 1997 ; Julie and Ward 2002). 従って、銅濃度が *nirK* を有する脱窒細菌にとって生育の制限要因となる可能性があるため、現場での *nirK* の発現を調べると同時に、銅濃度を測定することも今後の課題である。

表13 ニケ坊主から得られた銅含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子 (nirK) のPCRクローンの分布とONKUの系統

ONKU ID.	Closest amino acid sequence		Exterior section										Interior section									
	Accession No.	Identity (%)	Closest amino acid organism	Accession No.	Identity (%)	Accession No.	Identity (%)	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	
<i>Alphaproteobacteria</i>																						
ONKU1	arable soil clone C90-61	97	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248	86			26	57	55	36	42	1	14	11	31	21				10	21
ONKU2	agricultural soil clone T7R1_0-7cm_098	99	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	YP_001203370	73						11	15	1	1	25	1	41				12	27
ONKU3	water column and sediment clone Psedi_nirK-12	90	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 2.10	ZP_02149867	77			39	15	7				4	12	4						
ONKU4	agricultural soil clone T1R2_13-20cm_035	97	<i>Silticibacter</i> sp. TrichCH4B	ZP_05742967	84						1	36	48									
ONKU5	water column and sediment clone Bsedl_nirK-29	95	<i>Silticibacter</i> sp. TrichCH4B	ZP_05742967	84			6	4	4	5	3	4	2	1	10	2	13			13	11
ONKU6	soil clone Swe7	91	<i>Bradyrhizobium</i> sp. GSM-471	CBI70247	78			3	1	10				9	6	4	2	25			2	2
ONKU7	water column and sediment clone P1m_nirK-03	93	<i>Silticibacter</i> sp. TrichCH4B	ZP_05742967	84			2	2	12	5	1		11	1	12	6				5	5
ONKU8	arable soil Ag12-72	98	<i>Sinorhizobium</i> sp. R-32769	CAO85937	77			5	3	10	4	1	12	3	3	1					1	1
ONKU9	estuary sediments clone SF04-BG30-A03	99	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	BAH56660	71									5	6						2	8
ONKU10	arable soil Ag100-3	85	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-484	CBI70249	80			1				1		7	11						4	13
ONKU11	pristine forest soil clone 55	86	<i>Bradyrhizobium</i> sp. GSM-471	CBI70247	75			2	2		2	1		8	4							
ONKU12	arable soil clone C1-9	77	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	BAI67024	73			2	8					1							11	4
ONKU13	agricultural soil clone T7R3_0-7cm_009	86	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	BAI67024	81			3				1	2	4							3	11
ONKU14	soil clone Swe7	98	<i>Bradyrhizobium</i> sp. GSM-406	CBI70246	82			1	2	2	4			9	3	1	2				2	2
ONKU15	rice field soil clone TBK197	91	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248	82			5	2	1	5			3	1	2	1				2	2
ONKU16	water column and sediment clone Bsedl_nirK-28	91	<i>Rhodopsedomonas palustris</i> DX-1	YP_004110634	79									6	4	7						
ONKU17	arable soil clone C90-92	86	<i>Sinorhizobium</i> sp. LBH25-4	CBG92373	78						3		1	2							3	3
ONKU18	arable soil clone Ag08-82	97	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA38	BAI67022	77						1			1	1						1	4
ONKU19	agricultural soil clone T7R3_0-7cm_009	88	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248	83			1				1	2								1	2
ONKU20	soil clone Fin14	84	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA38	BAI67022	77				2	2	2	1										
ONKU21	arable soil clone Ag08-82	88	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA38	BAI67022	75									1	1						1	3
ONKU22	activated sludge clone KEP3	91	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248	86			1	3			1									1	3
ONKU23	soil clone Fin14	82	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	BAI67024	75				1												1	3
<i>Betaproteobacteria</i>																						
ONKU24	estuary sediments clone SF04-BG20-G12	90	<i>Nitrosomonas</i> sp. URW	AAK53360	68			89	93	92	87	90	82	76	79	87	94	88	86		88	91
Total																						

5.3.4 シトクロム含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirS*)の系統と多様性

亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirS*)に帰属する 19 ONSUs は、2 Alphaproteobacteria, 14 Betaproteobacteria, 2 Gammaproteobacteria, 1 Firmicutes の four phylogenetic groups に系統分類された(表 14)。この 19 ONSUs の中では、ONSU1(696/1122 クローン)が最優占しており、コケ坊主の全画分から検出された。この ONSU1 は、ドイツの Plußsee 湖の湖水と堆積物の境界から得られた *nirS*(ABD36737)(Kim et al. 2011)に相同性 93%_{ND} および 98%_{AA} で最近縁であった。この Plußsee 湖では、湖水中では *nirK* に近縁なクローンが、一方、湖水と堆積物の境界には *nirS* に近縁なものが優占することが報告されている(Kim et al. 2011)。既知の分離株の *nirS* とのデータベース検索では、ヌクレオチド配列で *Azoarcus aromaticum* EbN1 の *nirS* (CR555306)に相同性 74%_{ND}, アミノ酸配列では *Sulfuricella denitrificans* の *nirS* (BAI66431)に相同性 72%_{AA} とそれぞれ最近縁であった。

前述した *nirK* と同様に、*nirS* に帰属するクローンもまたコケ坊主内でパッチ状に分布していたが、1 つの例外として、コケ坊主内層に特異的に検出される 1 の ONSU が得られた。この ONSU7 は *Sulfuricella denitrificans* の *nirS* (AB506461)に相同性 87%_{ND} および 98%_{AA} と比較的高い相同性を示した。*Sulfuricella denitrificans* は、日本の湖の貧酸素水塊から分離された通性嫌気性の硫黄酸化細菌であり、微好気環境下では硝酸を電子受容体として脱窒を行うことができる(Kojima and Fukui 2010)。既報の 16S rRNA 遺伝子や RuBisCO 遺伝子の多様性解析においても、硫黄酸化細菌に近縁なクローンが得られており(Nakai et al. 2011; 第 4 章参照)、コケ坊主内に存在する硫黄酸化細菌は脱窒能も有する可能性が示された。

表14 コケ坊主から得られたシトクロム含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子 (nirS) のPCRクローンの分布とONSUの系統

ONSU ID.	Closest amino acid sequence	Accession No	Identity (%)	Closest amino acid organism	Accession No	Identity (%)	Exterior section							Interior section						
							O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
Alphaproteobacteria																				
ONSU6	rice field soil clone 602S119	BAH96200	97	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TSA1	BAI67028.1	87	9	10	13	17	16	4	6	3	2	6	5	1	1	4
ONSU14	water column and sediment clone Psedi_nirS-21	ABD36737.1	91	<i>Dechlorospirillum</i> sp. I-Bh37-22	CBG92407	68														
Betaproteobacteria																				
ONSU1	water column and sediment clone Psedi_nirS-21	ABD36737	98	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	BAI66431.1	72	52	61	42	38	38	59	54	43	61	47	63	33	44	61
ONSU2	soil clone CC2	ACV33310	86	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO46-2	BAJ11556.1	80			2	5	3		5	5	4	4		2	5	3
ONSU3	wetland soil clone eT9	ADB85759.1	86	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	82														
ONSU5	activated sludge DGGE gel band s6-2	ADI17981	90	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO46-2	BAJ11556.1	74	2		2	2	1	1	1	9	2	3	1	7	4	5
ONSU7	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	BAI66431	98											3	3	2	3	4	3	2
ONSU8	activated sludge DGGE gel band s6-2	ADI17981	87	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSA20w	BAI67033.1	73								1	1					1
ONSU9	potato field clone PF06OTU173	ADB25024	94	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451	CAJ76755.1	85					1			1						
ONSU10	water column and sediment clone P1m_nirS-01	ABD36710	91	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451	CAJ76755.1	87														
ONSU12	Activated sludge clone NR1-87S42	BAD37185	94	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451	CAJ76755.1	90	3	1	4	8	2	1	2	10	4	18	12	30	22	8
ONSU15	activated sludge DGGE gel band s6-2	ADI17981	83	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	74														1
ONSU16	water column and sediment P7m_nirS-05	ABD36718	92	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28400	CAJ76752.1	91			1	2		1	3							
ONSU17	landfill refuse clone 63-42	AEK31205	87	<i>Cupriavidus necator</i>	AAD26539.1	80					1									
ONSU18	wetland soil clone eT9	ADB85759.1	86	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	81														
ONSU19	wetland soil clone aT13	ADB85738	87	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	82														
Gammaaproteobacteria																				
ONSU13	sediment-water interface clone Ssedi_nirS-35	ABR29452	82	<i>Pseudomonas lini</i>	ABF65971.1	76	1		1	1	4	1	2	1	1	1	1	4	2	3
ONSU4	denitrifying estuarine sediments clone HNIS-3	ABR29445	96	<i>Marinobacter</i> sp. CG157051	ABG36514.1	79	3	6	6	5	3	2	3	4	6	1	2	1	2	1
Firmicutes																				
ONSU11	water column and sediment clone S12m_nirS-30	ABD36778	89	<i>Bacillus cereus</i>	AEO89629.1	85	1		1	1	14	2	3	74	83	79	82	81	84	83
Total							62	68	57	63	67	69	73							

5.3.5 キノール型の一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*qnorB*) の系統と多様性

一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*qnorB*) に帰属する 94 OQBUs は, 82 Acidobacteria, 3 Alphaproteobacteria, 4 Bacteroidetes, 5 Firmicutes の four phylogenetic groups に系統分類された (表 15). 本研究で検出された *nifH*, *nirK*, *nirS* と比べると, 最も多くの operational unit が検出され, 潜在的な多様性も高いことが示唆された. なお, 南極における *qnorB* の報告は本研究が初めてである. この 94 OQBUs の中では, OQBU2 (491/1265 クローン) が最優占しており, コケ坊主の全画分から検出された. この OQBU2 は, 中国の水田土壌から得られた *qnorB* (HQ615352) (Chen et al. 2011) に相同性 79%_{ND} および 90%_{AA} で最近縁であった. 既知の分離株の *qnorB* とのデータベース検索では, *Candidatus Solibacter usitatus* Ellin6076 の putative *qnorB* (CP000473) に相同性 73%_{ND} および 76%_{AA} で最近縁であった. Chen et al. (2011) の先行研究においても, 前述した水田土壌由来の *qnorB* (HQ615352) は, 系統樹内で *Candidatus S. usitatus* Ellin6076 のクラスターに最も近接していた.

Acidobacteria は, 土壌や堆積物中で優占する微生物系統であり, 時に 16S rRNA 遺伝子の PCR クローン・ライブラリーの約半数を占めることもある (Janssen 2006). また, 約 3000 件の Acidobacteria の 16S rRNA 遺伝子の系統解析によると, この門は少なくとも 26 の subdivisions に分かれ, 真正細菌の中でも大型の門になると推定されている (Barns et al. 2007). Ward et al. (2009) による Acidobacteria の 3 菌種のゲノム解析結果より, この系統は硝酸や亜硝酸の還元に関わる酵素遺伝子が存在することと, その一方, 亜酸化窒素還元に関わる酵素遺伝子は存在せず, 完全脱窒の能力はないことが示唆されている. 本研究では, *Candidatus S. usitatus* Ellin6076 の putative *qnorB* に最近縁となる, 82 の OQBU が検出された. その一方, 本研究では, *qnor* を有する脱窒細菌としてよく知られる *Alcaligenes* 属や *Ralstonia* 属, また, *cnor* を有する脱窒細菌である *Azoarcus* 属, *Paracoccus* 属, および *Pseudomonas* 属も検出されなかった. 既報のコケ坊主内の 16S rRNA 遺伝子の多様性解析では, Acidobacteria に近縁なクローン (phylotype) は全体の 3.5% と少数派であった (Nakai et al. 2011). 本研究の結果と併せると, コケ坊主内で Acidobacteria は少数派ではあるものの, 一酸化窒素の還元においては重要な役割を果たしている可能性が示された.

表15 コケ坊主から得られたキヌノール型の一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*gNorB*) のPCRプロローンの分布とOQBUの系統

OQBU ID.	Closest amino acid sequence	Accession No		Identity (%)	Closest amino acid organism	Accession No	Identity (%)	Exterior section							Interior section											
		Accession No	Identity (%)					O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7					
Acidobacteria																										
OQBU1	paddy soil clone CK87	AEH49911	96	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	78																			
OQBU2	marine sediment clone	CAD45402	90	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76	16	37	12	26	16	25	31	33	48	41	59	54	47	46					
OQBU3	paddy soil clone NPK5	AEH49982	92	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76	7	7	7					15	7	9	10	3	7	1					
OQBU4	paddy soil clone M18	AEH50026	94	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76	2	6	5	6				6	9	3	9	11	5	9	9				
OQBU5	paddy soil clone M18	AEH50026	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								1	1	1	2	1	3	1	1				
OQBU6	paddy soil clone N2	AEH49944	90	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	74	6	3	1					3	3										
OQBU7	paddy soil clone CK87	AEH49911	97	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77	4							3											
OQBU8	paddy soil clone M86	AEH50064	96	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77	3	2		1				2	3	2	4								
OQBU9	paddy soil clone NPK5	AEH49982	90	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	74	6	5	2					1	1	2	1	1							
OQBU11	paddy soil clone NPK38	AEH50003	88	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	83	22	8	13	8	3	9		1	5	2	5	2							
OQBU12	freshwater sediment clone	CAD45392	95	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76	2	4	2					3	1										
OQBU13	paddy soil clone NPK5	AEH49982	98	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	79								1											
OQBU14	paddy soil clone M86	AEH50064	96	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76	1	1		1				4	2	1	1	1							
OQBU15	paddy soil clone CK87	AEH49911	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								1											
OQBU16	paddy soil clone M66	AEH50055	92	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	75								1											
OQBU17	paddy soil clone NPK51	AEH50007	87	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								2	2	2	1								
OQBU18	paddy soil clone CK87	AEH49911	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76								1	2										
OQBU19	paddy soil clone CK50	AEH49888	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	78	1		5	3	15	1	11		1	1	1	1	1	2					
OQBU20	paddy soil clone M86	AEH50064	95	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76	1	1	1	3	1			2	1	1	1	1	1	4					
OQBU21	marine sediment clone	CAD45402	96	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	78	8			2	5	5		1	1	6									
OQBU22	paddy soil clone CK87	AEH49911	97	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								1											
OQBU23	paddy soil clone NPK5	AEH49982	98	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								3	1	1	1								
OQBU24	paddy soil clone M86	AEH50064	95	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								1	1										
OQBU25	paddy soil clone M66	AEH50055	98	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	78								1											
OQBU26	paddy soil clone CK87	AEH49911	92	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76								2	3	2									
OQBU27	paddy soil clone M18	AEH50026	93	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76	1	1	4					2	2	2	1								
OQBU28	paddy soil clone N41	AEH49966	83	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	79								1	1	1	1	1							
OQBU29	paddy soil clone NPK5	AEH49982	90	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76								3											
OQBU31	paddy soil clone M18	AEH50026	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								3											
OQBU32	marine sediment clone	CAD45397	92	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								1											
OQBU35	paddy soil clone M44	AEH50041	94	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76								1											
OQBU36	freshwater sediment clone	CAD45392	97	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	76								1											
OQBU37	paddy soil clone M44	AEH50041	93	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								1											
OQBU38	paddy soil clone N41	AEH49966	83	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	80								1											
OQBU39	paddy soil clone CK87	AEH49911	96	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77	3	3	3	2	2	2		2	2	1	4	2	1						
OQBU40	paddy soil clone M18	AEH50026	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								3											
OQBU41	paddy soil clone CK90	AEH49914	86	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	82								1											
OQBU44	paddy soil clone CK87	AEH49911	95	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								1											
OQBU45	paddy soil clone CK50	AEH50026	92	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	78								1											
OQBU46	paddy soil clone CK50	AEH50026	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	78								2											
OQBU47	paddy soil clone CK50	AEH50026	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	77								8	2	2	1	1							
OQBU48	paddy soil clone CK87	AEH49911	97	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	75								1											
OQBU49	paddy soil clone M56	AEH50047	84	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	75								2											
OQBU50	paddy soil clone M18	AEH50026	92	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i>	Elim6076	YP_824206	78								1											

5.3.6 窒素安定同位体比分析の結果

窒素同位体比分析の結果、コケ坊主第 1 標本の外層の $\delta^{15}\text{N}$ 値は 1.18~2.13, 内層では-0.03~0.86 の範囲であり、外層よりも内層の方が $\delta^{15}\text{N}$ の値が低かった(表 16)。第 2 標本においても、外層の $\delta^{15}\text{N}$ 値は 0.90~1.86, 内層は 0.25~1.01 の範囲となり、第 1 標本と同じ傾向がみられた(表 16)。一般的に、細菌による窒素固定では、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が-3~+1 ‰の範囲の 0 ‰より小さな有機物が生成されることが知られている(Hoefs 2004)。また、脱窒細菌を用いた培養実験の結果によると(Mariotti et al. 1981; Barford et al. 1999)、細菌による脱窒反応では軽い窒素から先に N_2 になって放出されるので、残渣の窒素は相対的に重くなり、その有機物の $\delta^{15}\text{N}$ 値も高くなる。つまり、窒素固定が優勢であれば $\delta^{15}\text{N}$ 値が相対的に低くなる傾向、脱窒が優勢であれば $\delta^{15}\text{N}$ 値が相対的に高くなる傾向があるといえる。実際、脱窒が進行している湖沼堆積物中の有機物の $\delta^{15}\text{N}$ 値は 7.8‰と比較的高い値が得られている(Yamada et al. 1996)。

培養実験や環境データから測定された同位体分別効果の値と、本研究の結果から判断すると、コケ坊主生態系では脱窒に比べて窒素固定が優勢であることが示唆された。この窒素固定には、本研究の *nifH* の多様性解析で優占的に検出された Gammaproteobacteria の寄与が大きいと考えられる。コケ坊主の主構成種 *Leptobryum* sp. の植物遺体で構成される還元的な内層では、内層と外層の分解産物としての低い $\delta^{15}\text{N}$ 値を持つ硝酸、亜硝酸、アンモニア、尿素などが再び利用されるため、外層に比べて $\delta^{15}\text{N}$ 値が低くなることと、一方、外層では、内層に行った分解産物は内層に再利用され、周囲の湖水に行ったものは拡散してしまうので、外層が再利用できる部分が少ないことが考えられる。このことがコケ坊主の内層と外層における $\delta^{15}\text{N}$ 値の差に反映されている可能性がある。

表16 コケ坊主の外層と内層における窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$)

Sample	Exterior section							Interior section						
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
specimen A	1.18	1.52	1.52	1.32	2.13	1.87	2.09	0.82	0.80	0.86	0.83	0.57	0.05	-0.03
specimen B	1.86	1.43	1.12	0.90	1.08	1.11	1.30	0.81	0.62	0.90	0.53	0.25	0.91	1.01

5.4 結論

本研究では、1つの完全なコケ坊主標本を用いて、窒素固定酵素遺伝子(*nifH*)、アンモニア酸化酵素遺伝子(*amoA*)、および脱窒関連酵素遺伝子群(*narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *qnorB*, *cnorB*, *nosZ*)を標的とした多様性解析を試みた。その結果、コケ坊主全体では Gammaproteobacteria の紅色光合成細菌の *nifH*, Alphaproteobacteria のリゾビウム科の *nirK*, Betaproteobacteria の脱窒性硫黄酸化細菌の *nirS*, および, Acidobacteria の putative *qnorB* に最近縁なクローン(operational unit)がそれぞれ優占的に検出された。また、外層に特異的な Cyanobacteria に帰属する *nifH*, 内層に準優占的な Deltaproteobacteria の硫酸還元菌に帰属する *nifH* など、コケ坊主の外層や内層の層特異的に分布するクローン(operational unit)も得られた。これは、コケ坊主内に存在する酸化的な外層と還元的な内層の二層構造が反映されていると考えられる。また、窒素安定同位体比分析の結果は、コケ坊主生態系においては、脱窒に比べて窒素固定の方が優勢であり、その窒素固定には前述したような Cyanobacteria, Deltaproteobacteria, および Gammaproteobacteria が主として関与し、生態系を維持する窒素源として重要な役割を果たしていると考えられる。以上の結果より、コケ坊主生態系において、窒素固定や脱窒の各プロセスには複数の異なる微生物系統が関与することが明らかとなった。また、コケ坊主内外の部位によってもそれぞれ異なる微生物コミュニティが窒素循環に寄与する可能性が示され、その相乗効果(synergy)が生態系の存立と維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。これを確かめるためには、メタトランスクリプトームやメタプロテオーム解析を行い、現場で発現している酵素遺伝子の種類や量を網羅的に調べるのが考えられる。

第 6 章

総論

本研究では、南極湖沼に特有な水生コケ植物の大群落「コケ坊主」の共生生物相における種の多様性および生物地球化学的機能に関する分子系統学的解析を行い、その生態系や共生系の構造について考察を行った。種の多様性については、生物の系統分類に汎用される 16S/18S rRNA 遺伝子を標的とし（第 2 章、第 3 章）、また、生物地球化学的機能に関しては、CO₂ 固定に与る酵素 RuBisCO の遺伝子（第 4 章）、窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*)（第 5 章）、アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*)（第 5 章）および脱窒関連酵素遺伝子群 (*narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *qnorB*, *cnorB*, *nosZ*)（第 5 章）を対象として、計 11,844 クローン、約 12,450,000 塩基の系統解析を行った。その結果、コケ坊主の外層と内層、さらにはその上下縦方向に広く分布するバクテリアや真核微生物の rRNA 遺伝子が検出された一方、外層や内層の層特異的に存在するものもみられた。これらの傾向は、酵素遺伝子の多様性解析においてもみられた。

例えば、16S rRNA 遺伝子でコケ坊主全画分から検出された *Bradyrhizobium* 属は、RuBisCO 遺伝子、窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*)、および亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*) の多様性解析においても優占的に検出された。これは、*Bradyrhizobium* 属の細菌が、酸素存在下で従属栄養的に生育できること、微好気条件下では水素を電子供与体として二酸化炭素を固定し生育できること (Hanus et al. 1979; Lepo et al. 1980)、更に、酸素の無い嫌気条件下では硝酸呼吸を行って生育でき (van Berkum and Keyser 1985; Delgado et al. 2003)、幅広い環境条件に適応しうることが理由として挙げられる。本研究で検出された *Bradyrhizobium* 属細菌もまた好気、微好気そして嫌気条件下で生育ができるため、コケ坊主全体に広く分布していると考えられる。また、本研究では、一般的に好气的環境から嫌气的環境に移り変わる辺りの酸化還元境界層に生息することが知られている、クロマチウム目の細菌に帰属する *nifH* がコケ坊主全体から検出された。その一方、16S rRNA 遺伝子、RuBisCO 遺伝子、および *nifH* の多様性解析において、光合成細菌 Cyanobacteria に帰属する幾つかの配列がコケ坊主の外層に特異的に検出された。また、Deltaproteobacteria の硫酸還元菌に帰属する配列は、16S rRNA 遺伝子と *nifH* の両方において、内層に特徴的に得られた。

また、本研究による窒素循環に関与する各酵素遺伝子の分子系統解析の結果は、Gammaproteobacteria の紅色光合成細菌の *nifH*、Alphaproteobacteria のリゾビウム科の *nirK*、Betaproteobacteria の脱窒性硫黄酸化細菌の *nirS*、および、Acidobacteria の putative *qnorB* に最近縁なクローン (operational unit) がコケ坊主内でそれぞれ優占的であることを示しており、窒素固定や

脱室の各プロセスに複数の異なる微生物系統が関与する可能性を明らかにした。

第1章にて、微生物の分布に関する重要な仮説の1つ、Baas-Beckingの仮説「everything is everywhere, but environment selects. (あらゆる微生物は至るところに存在するが、環境が選ぶ.)」にふれた。南極コケ坊主は塔状の異常な構造物であるが、その外層は酸化的、内層は還元的であり、ミニ生物圏（あるいはミニ地球）と捉えることができる。本研究では、前述したように、このミニ生物圏に幅広く分布するコスモポリタンが検出される一方、その外層や内層の層特異的、あるいは部位特異的に分布する固有種と思われるような遺伝子も得られた。これは、ミニ生物圏内に存在する酸化的な外層と還元的な内層という二層構造の「環境」が反映されていると考えられる。勿論、これらの結果は、南極大陸の僅か2%程度を占める露岩域の湖沼という、非常に狭い舞台から得られたものである。しかしながら、本研究では、コケ坊主の共生生物相から海底熱水プルームや、深海に生息する二枚貝の内部共生菌のRuBisCO遺伝子に非常に高い相同性を示すものが得られた。このように、深海底と南極湖沼という、環境条件の大きく異なる二つの環境に生息する、地球という舞台にコスモポリタンのように分布する微生物の存在も示唆された。

以上のように、コケ坊主1個体の中では、部位によってそれぞれに異なる微生物コミュニティが存在し、その微生物コミュニティが種々の生化学的プロセスを担うことにより、その生態系の存立と維持に寄与していることが考えられる。2010年、ヨーロッパ人124名の糞便から取り出した微生物ゲノムが網羅的に調べられ、そこには1000種以上の細菌が存在しており、各個人では少なくとも160種の腸内微生物を持つことがNature誌に報告された(Qin et al. 2010)。ヒトの細胞は 10^{13} というオーダーであるのに対し、微生物の細胞数は 10^{14} というオーダーでヒトに共生していることから、ヒトが1個の生物体としてどのように機能しているかを理解するには、ヒトとその共生生物相を全体として超個体(superorganism)と捉える必要がある(Eberl et al. 2010)。なお、遺伝子の数については、ヒトが 10^4 のオーダーであるのに対し、その腸内微生物の遺伝子は少なくとも 10^6 のオーダーで存在すると考えられている(reviewed by Eberl et al. 2010)。南極コケ坊主に関しても、本研究により、その1個体には少なくとも300種の細菌、50種の真核生物が共生していることが明らかとなり、コケ坊主の存立と維持に関わる生物地球化学的機能に複数の微生物系統が複雑に関与する、自立度の高い一つの生態系である可能性が示された。このように、コケ坊主内にはヒトの腸内微生物をはるかに超える微生物の多様性がみられる。つまり、コケ坊主は、マメ科植物と根粒菌、サンゴと褐虫藻のような1対1の単純な共生関係ではなく、前述したヒトと腸内微生物のように、

コケ類とそれに付随する複数の微生物が全体として 1 個の生物体, 超個体 (superorganism) として機能していることが考えられる.

本研究は, 極限環境に成り立つこの特異な生物群集が, 主構成種であるコケ類 (主に *Leptobryum* 属) とそれに付随する共生生物相が極限環境で協調的に物質生産および物質循環を行うミニ生態系であり, 生物の相乗効果 (synergy) によって成り立っていることを提案する.

Molecular phylogenetic study on species diversity and biogeochemical cycling of biota associated with aquatic Bryophyta endemic to Antarctic lakes

This study assessed the molecular phylogenetics of species diversity and biogeochemical cycling of biota associated with large pillar communities, or “moss pillars,” of aquatic mosses peculiar to Antarctic freshwater lakes. Species diversity was investigated using phylogenetic analysis based on the 16S/18S rRNA genes widely used in phylogenetic identification (Chapters 2 and 3). Biogeochemical processes were analyzed by targeting functional genes encoding the CO₂-fixing enzyme RuBisCO (Chapter 4); nitrogenase (*nifH*) (Chapter 5); and ammonia monooxygenase (*amoA*) (Chapter 5); as well as a group of enzymes associated with denitrification (*narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *qnorB*, *cnorB*, and *nosZ*) (Chapter 5). A total of 11,844 clones (approximately 12.45 million bases) were sequenced and analyzed. I found that many bacterial and eukaryotic rRNA genotypes, or phylotypes, were vertically distributed in the exterior and interior layers of moss pillars; certain phylotypes unique to each layer were also detected. These trends were also observed in functional genetic diversity analyses.

For example, *Bradyrhizobium*, which were detected in all moss pillar sections, were also dominant in RuBisCO, nitrogenase (*nifH*), and nitrite reductase (*nirK*) genetic diversity analyses. This finding indicates that *Bradyrhizobium* are able to adapt to a broad range of environmental conditions, including growing heterotrophically in oxygen-rich conditions, fixing carbon dioxide under microaerobic conditions with hydrogen as an electron donor (Hanus et al. 1979; Lepo et al. 1980), and anaerobically (by nitrate respiration) under deoxygenated conditions (van Berkum and Keyser 1985; Delgado et al. 2003). *Bradyrhizobium* detected in this study are considered to be widely distributed across all moss pillar sections, because they can grow under aerobic, microaerobic, and anaerobic conditions. In addition, the *nifH* gene, belonging to the order Chromatiales (generally known to inhabit the oxidation-reduction boundary where aerobic conditions change to anaerobic conditions), was detected throughout the moss pillar. In contrast, 16S rRNA, RuBisCO, and *nifH* genetic diversity analysis showed that some sequences related to Cyanobacteria were only detected in the exterior layers of the pillar. In addition, sequences related to sulfur-reducing Deltaproteobacteria were specific

to the interior layer in both the 16S rRNA and the *nifH* genetic analysis. These findings suggest that microorganisms of different phylogenetic groups inhabit different sections of a single moss pillar and form a microbial community.

Molecular phylogenetic analysis of the functional genes associated with the nitrogen cycle showed the following gene sequences to be dominant in the moss pillar: *nifH* of purple photosynthetic bacteria (Gammaproteobacteria); *nirK* of Rhizobiaceae (Alphaproteobacteria); *nirS* of denitrifying sulfur-oxidizing bacteria (Betaproteobacteria), and putative *qnorB* of Acidobacteria. These results suggest that microorganisms of different phylogenetic groups participate in nitrogen fixation and denitrification processes.

The Baas-Becking hypothesis that “everything is everywhere, but the environment selects” is a key hypothesis pertaining to the distribution of microorganisms (Chapter 1). Antarctic moss pillars are strange tower-like structures with an oxidative exterior and reductive interior layer. These moss pillars can be regarded as a mini-biosphere, or bryosphere. As mentioned above, I found sequences that are widely distributed throughout the mini-biosphere, as well as sequences that are site-specific, namely, “endemic species,” distributed exclusively in either the interior or exterior layer. This finding may reflect the double-layered structure of the oxidative exterior and reductive interior environment inside the mini-biosphere. Although these results were obtained from samples collected from lakes in ice-free areas, which account for a mere 2% of Antarctica (an extremely limited sample), the RuBisCO gene found in the moss pillar demonstrated extreme relatedness to the RuBisCO gene sequence of a chemoautotrophic endosymbiont of deep-sea mussels. The presence of this gene in habitats as significantly different as deep-sea floors and Antarctic lakes suggests that the microorganism containing RuBisCO is widely distributed in various habitats around the planet.

I believe that different microbial communities exist in different parts of an individual moss pillar and that, through various biochemical processes, these biota contribute to the development and maintenance of the ecosystem. In a previous study (Qin et al. 2010), an exhaustive analysis of microbial genomes extracted from the feces of 124 Europeans demonstrated the existence of over 1000 species of bacteria. Moreover, each individual had at least 160 species of intestinal microbes. The number of cells in the human body is of the order of 10^{13} , whereas the number of microbial cells is 10^{14} . Because microbes coexist with humans, we must consider humans and their coexisting biota as one “superorganism” (Eberl et al. 2010) in order to understand how humans function. Furthermore, the

number of human genes is of the order of 10^4 , whereas it is thought that there are at least 10^6 intestinal microbe genes (Eberl et al. 2010). Similarly, this study has shown that each individual Antarctic moss pillar can contain at least 300 species of bacteria and 50 species of eukaryotes and that there is a high probability that microorganisms of several different phylogenetic groups contribute to the complex biogeochemical processes that give rise to and maintain these highly independent ecosystems. Thus, the microbial diversity seen in moss pillars is much greater than that observed in human intestines.

In summary, this study shows that the relationship observed between mosses and their associated biota in moss pillars is more closely related to that observed in the human intestine, compared with the simple one-on-one symbiotic relationship seen between gram-negative bacteria of the family Rhizobiaceae and the roots of legume plants (family Fabaceae). This study also suggests that these unique communities comprise mini-ecosystems in which cooperative material production and recycling occurs in the form of biologic synergy. Therefore, moss pillars can be regarded as “superorganisms” that function as a single individual.

謝辞

本研究を遂行するにあたって終始御指導頂きました，広島大学大学院生物圏科学研究科 長沼毅准教授に深甚たる謝意を表します．厚く御礼申し上げます．

南極湖沼の生物試料を御提供頂きました国立極地研究所 神田啓史教授，伊村智准教授に厚く御礼申し上げます．PCR クローン・ライブラリー構築と塩基配列解読の基礎を御教授頂きました国立遺伝学研究所 小原雄治教授，仁木宏典教授，鹿児島浩博士，新領域融合研センター 馬場知哉博士，柳原克彦博士，日本大学 成田貴則助教，そして，分子系統解析の基礎を御教授頂きました新潟大学 阿部貴志准教授，国立極地研究所 瀬川高弘博士に厚く御礼申し上げます．また，論文に対して有益な御助言を頂きました広島大学生物圏科学研究科 上真一教授，櫻井直樹教授，中坪孝之教授，和崎淳准教授に厚く御礼申し上げます．研究の遂行において多大なる御協力を頂きました海洋生態系評価論研究室の皆様はこの上ない感謝の意を表します．

最後に，長年にわたり大学院における研究生活を全ての面で支えていただきました家族に謝意を表します．

引用文献

- Alfreider A, Vogt C, Geiger-Kaiser M, Psenner R (2009) Distribution and diversity of autotrophic bacteria in groundwater systems based on the analysis of RuBisCO genotypes. *Syst Appl Microbiol* 32: 140-150
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919-1925
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169
- Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman, AJ (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol* 71:7724–7736
- Baas-Becking LGM (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. W.P. van Stockum and Zoon, The Hague, The Netherlands
- Badger MR, Bek EJ (2008) Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *J Exp Bot* 59: 1525-1541
- Barford CC, Montoya JP, Altabet MA, Mitchell R (1999) Steady-state nitrogen isotope effects of N₂ and N₂O production in *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 65: 989-994
- Barns SM, Cain EC, Sommerville L, Kuske CR (2007) Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl Environ Microbiol* 73: 3113-3116
- Beyer L, Bölter M (2002) *Geoecology of Antarctic Ice-free Coastal Landscapes*. Springer-Verlag, Berlin, pp 51–68
- Bowman JP, McCammon SA, Skerratt JH (1997) *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. *Microbiology* 143: 1451-1459

- Bowman JP (2002) Psychrophilic bacteria: isolation and characterization. In: Bitton G (ed.) Encyclopedia of Environmental Microbiology, John Wiley & Sons, pp 2639-2646
- Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64: 3769-3775
- Braker G, Tiedje JM (2003) Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 69: 3476-3483
- Breeze J, Cady N, Staley JT (2004) Subfreezing growth of the sea ice bacterium "Psychromonas ingrahamii". *Microbial Ecol* 47: 300—304.
- Bryantseva IA, Gorlenko VM, Kompantseva EI, Imhoff JF (2000) *Thioalkalicoccus limnaeus* gen. nov., sp nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll *b*. *IJSEM* 50: 2157-2163
- Carpenter EJ, Lin S, Capone DG (2000) Bacterial activity in South Pole snow. *Appl Environ Microbiol* 66: 4514-4517
- Chase MW (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Missouri Bot Gard* 80: 528-580
- Chen Y, Wu LQ, Boden R, Hillebrand A, Kumaresan D, et al. (2009) Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME J* 3: 1093-1104
- Chen Z, Liu J, Wu M, Xie X, Wu J, et al. (2011) Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil. *Microb Ecol in press*
- Christie P (1987). Nitrogen in two contrasting Antarctic bryophyte communities. *J Ecol* 75: 73–94
- Christie WW (1982) Lipid analysis, isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Pergamon Press, Oxford
- Christner BC, Royston-Bishop G, Foreman CM, Arnold BR, Tranter M, et al. (2006) Limnological conditions in Subglacial Lake Vostok, Antarctica. *Limnol Oceanogr* 51: 2485-2501
- Christner BC, Skidmore ML, Priscu JC, Tranter M, Foreman CM (2008) Bacteria in subglacial environments. In Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C (eds.) Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology, Springer, pp 51-71
- Convey P (2006) Antarctic climate change and its influences on terrestrial ecosystems. In: Bergstrom

- DM, Convey P, Huiskes AHL (eds) Trends in Antarctic terrestrial and limnetic ecosystems: Antarctica as a global indicator. Springer, pp 253–272
- Convey P, McInnes SJ (2005) Exceptional tardigrade-dominated ecosystems in Ellsworth Land, Antarctica. *Ecology* 86: 519-527
- Convey P (2011) Antarctic terrestrial biodiversity in a changing world. *Polar Biol* 34:1629–1641
- DeChaine EG, Cavanaugh CM (2006) Symbioses of methanotrophs and deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae). *Prog Mol Subcell Biol* 41: 227-249
- DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5685–5689
- Delgado MJ, Bonnard N, Tresierra-Ayala A, Bedmar EJ, Muller P (2003) The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology* 149: 3395-3403
- Delwiche CF, Palmer JD (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco genes in eubacteria and plastids. *Mol Biol Evol* 13: 873-882
- Dewel RA, Joines JD, Bond JJ (1985) A new chytridiomycete parasitizing the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Can J Bot* 63: 1525-1534
- Dewit R, Vangemerden H (1987) Chemolithotrophic growth of the phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 117-126
- Eady RR (1992) The dinitrogen-fixing bacteria. In *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York, pp. 534-553
- Eberl G (2010) A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol* 3: 450-460
- Ellis-Evans JC (1996) Microbial diversity and function in Antarctic freshwater ecosystems. *Biodiver and Cons* 5: 1395-1431
- Elsaied H, Naganuma T (2001) Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 67: 1751-1765
- Elsaied H, Kimura H, Naganuma T (2002) Molecular characterization and endosymbiotic localization of the gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (RuBisCO) form II in the deep-sea vestimentiferan trophosome. *Microbiology* 148: 1947-1957
- Elsaied HE, Kaneko R, Naganuma T (2006) Molecular characterization of a deep-sea methanotrophic

- mussel symbiont that carries a RuBisCO gene. *Mar Biotech* 8: 511-520
- Elsaied HE, Kimura H, Naganuma T (2007) Composition of archaeal, bacterial, and eukaryal RuBisCO genotypes in three Western Pacific arc hydrothermal vent systems. *Extremophiles* 11: 191-202
- Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, et al. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464: 543-548
- Fenchel T, Finlay BJ (1995) *Ecology and evolution in Anoxic Worlds*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom
- Findlay RH, Trexler MB, Guckert JB, White DC (1990) Laboratory study of disturbance in marine-sediments - response of a microbial community. *Mar Ecol Prog Ser* 62:121-133
- Finlay BJ (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061-1063
- Flanagan DA, Gregory LG, Carter JP, Karakas-Sen A, Richardson DJ, et al. (1999) Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol Lett* 177: 263-270
- Freeman KR, Martin AP, Karki D, Lynch RC, Mitter, MS, Meyer AF, Longcore JE, Simmons DR, Schmidt SK (2009) Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18315-18320
- Fricker HA, Scambos T, Bindschadler R, Padman L (2007) An active subglacial water system in West Antarctica mapped from space. *Science* 315: 1544-1548
- Gibson JAE, Wilmotte A, Taton A, van de Vijver B, Beyens L, Dartnall HJG (2006) Biogeography of Antarctic lakes. In: Bergstrom DM, Convey P, Huiskes AHL (Eds), *Trends in Antarctic terrestrial and limnetic ecosystems: Antarctica as a global indicator*, Springer-Verlag, Dordrecht, pp 71-98
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63
- Giri BJ, Bano N, Hollibaugh JT (2004) Distribution of RuBisCO genotypes along a redox gradient in Mono Lake, California. *Appl Environ Microbiol* 70: 3443-3448
- Gleason FH, Kagam M, Lefèvre E, Sime-Ngando T (2008) The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biol Rev* 22: 17-25
- Granger J, Ward BB (2003) Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying

- bacteria. *Limnol Oceanogr* 48: 313-318
- Green J, Bohannon BJM (2006) Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends Ecol Evol* 21: 501-507
- Hallin S, Lindgren PE (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65: 1652-1657
- Hanus FJ, Maier RJ, Evans HJ (1979) Autotrophic growth of H₂-uptake-positive strains of *Rhizobium japonicum* in an atmosphere supplied with hydrogen gas. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1788-1792
- Harris JK, Kelley ST, Pace NR (2004) New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* 70:845–849
- Hazen TC, Jimenez L, Devictoria GL, Fliermans CB (1991) Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microbial Ecol*, 22: 293-304
- Hodgson DA, Vyverman W, Verleyen E, Sabbe K, Leavitt PR, et al. (2004) Environmental factors influencing the pigment composition of in situ benthic microbial communities in east Antarctic lakes. *Aquat Microb Ecol* 37: 247-263
- Hoefs J (2004) *Stable Isotope Geochemistry*, 5th edn. Springer-Verlag, Berlin, pp. 244
- Huang Y, Niu BF, Gao Y, Fu LM, Li WZ (2010) CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26: 680-682
- Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20: 2317-2319
- Hugenholtz P, Pitulla C, Hershberger KL, Pace NR (1998) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180:366–376
- Humayoun SB, Bano N, Hollibaugh JT (2003) Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Appl Environ Microbiol* 69: 1030-1042
- Imura S, Bando T, Saito S, Seto K, Kanda H (1999) Benthic moss pillars in Antarctic lakes. *Polar Biol* 22:137–140
- Imura S, Takahashi H, Nakamura T (2000) Benthic moss pillars (Koke Bouzu) in Antarctic lakes - Analysis of colonization and growth by ¹⁴C dating. *Sum Res using AMS, Nagoya Univ* XI:176–183 (in Japanese with English Abstract)
- Imura S, Kanda H (2002) Aquatic moss vegetation at the bottom of Antarctic lakes. *Bryol Res* 8:69–73

(in Japanese)

- Imura S, Bando S, Seto K, Ohtani S, Kudoh S, Kanda H (2003) Distribution of aquatic mosses in the Syowa Coast region, East Antarctica. *Polar Biosci* 16:1–10
- Imura S (2006) Ecosystem and geohistory of Antarctic lakes. Abstracts for XIII Int Symp Polar Sciences, Incheon, Korea, 108–111
- Ino Y, Nakatsubo T (1986) Distribution of carbon, nitrogen and phosphorus in a moss community – soil system developed on a cold desert in Antarctica. *Ecol Res* 1: 59–69
- Iwasa T, Bando T, Nakamura T, Imura S (2000) The environmental changes presumed by AMS ¹⁴C ages of algal sediments in Antarctic lakes, near the Syowa Station. *Sum Res using AMS, Nagoya Univ* XI:74–80 (in Japanese with English Abstract)
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72: 1719-1728
- Jones K, Wilson RE (1978) The fate of nitrogen fixed by a free-living blue-green alga. *Ecol Bull* 26: 158–163.
- Jorgensen BB, Desmarais DJ (1986) Competition for sulfide among colorless and purple sulfur bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 179-186
- Jung J, Yeom J, Kim J, Han J, Lim HS, et al. (2011) Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Res Microbiol in press*
- Kanda H (2009) The Environmental and Genetic Approach for Life on Earth (EAGLE) project. *Polar Sci* 3:189–196
- Kanekiyo A, Takasugi H, Ogawa M, Naganuma T (2005) Sediment fatty acids associated with seafloor methane seepage in the Nankai and Sagami Troughs, off central Japan. *Aqua Ecosys Health Manage* 8:73–80
- Kaneko R, Hayashi T, Tanahashi M, Naganuma T (2007) Phylogenetic diversity and distribution of dissimilatory sulfite reductase genes from deep-sea sediment cores. *Mar Biotech* 9:429–436
- Kapitsa AP, Ridley JK, Robin G. de Q, Siegert MJ, Zotikov IA (1996) A large deep freshwater lake beneath the ice of central East Antarctica. *Nature* 381: 684-686
- Karner MB, DeLong EF, Karl DM (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507-510

- Kelly DP, Wood AP (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov and *Thermithiobacillus* gen. nov. IJSEM 50: 511-516
- Kim OS, Imhoff JF, Witzel KP, Junier P (2011) Distribution of denitrifying bacterial communities in the stratified water column and sediment-water interface in two freshwater lakes and the Baltic Sea. *Aqua Ecol* 45: 99-112
- Kimura H, Naganuma T (2001) Thraustochytrids: a forgotten agent of the marine microbial food chain. *Aquat Ecosyst Health & Management* 4: 13-18
- Kimura S, Ban S, Imura S, Kudoh S, Matsuzaki M (2010) Limnological characteristics of vertical structure in the lakes of Syowa oasis, East Antarctica. *Polar Sci* 3:262–271
- Klein M, Friedrich M, Roger AJ, Hugenholtz P, Fishbain S, et al. (2001) Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J Bacteriol* 183: 6028-6035
- Kojima H, Fukui M (2010) *Sulfuricella denitrificans* gen. nov., sp nov., a sulfur-oxidizing autotroph isolated from a freshwater lake. IJSEM 60: 2862-2866
- Kohshima S (1984) Novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. *Nature* 310: 225-227
- Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2567–2572
- Kovaleva OL, Tourova TP, Muyzer G, Kolganova TV, Sorokin DY (2011) Diversity of RuBisCO and ATP citrate lyase genes in soda lake sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 75: 37-47
- Kowalchuk GA, Stephen JR (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55: 485-529
- Kudoh S, Tuchiya Y, Ayukawa E, Imura S, Kanda H (2003a) Ecological studies of aquatic moss pillars in Antarctic lakes. 1: Macro structure and carbon, nitrogen and chlorophyll *a* contents. *Polar Biosci* 16:11–22
- Kudoh S, Watanabe K, Imura S (2003b) Ecological studies of aquatic moss pillars in Antarctic lakes. 2: Temperature and light environment at the moss habitat. *Polar Biosci* 16:23–32
- Kudoh S, Kashino Y, Imura S (2003c) Ecological studies of aquatic moss pillars in Antarctic lakes. 3: Light response and chilling and heat sensitivity of photosynthesis. *Polar Biosci* 16:33–42
- Kudoh S, Tanabe Y, Matsuzaki M, Imura S (2009) In situ photochemical activity of the phytobenthic

- communities in two Antarctic lakes. *Polar Biol* 32:1617–1627
- Kurosawa N, Sato S, Kawarabayasi Y, Imura S, Naganuma T (2010) Archaeal and bacterial community structures in the anoxic sediment of Antarctic meromictic lake Nurume-Ike. *Polar Sci* 4: 421-429
- Kuske CR, Barns SM, Busch JD (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol* 63:3614–3621
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948
- Laybourn-Parry J (2009) No Place Too Cold. *Science* 324: 1521-1522
- Lefèvre E, Bardot C, Noel C, Carrias JF, Viscogliosi E, Amblard C, Sime-Ngando T (2007) Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environ Microbiol* 9: 61-71
- Lepo JE, Hanus FJ, Evans HJ (1980) Chemoautotrophic growth of hydrogen-uptake-positive strains of *Rhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 141: 664-670
- Li L, Kato C, Horikoshi K (1999) Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers. Conserv* 8:659–677
- Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659
- Liu CL, Huang XH, Wang XL, Zhang XC, Li GY (2006) Phylogenetic studies on two strains of Antarctic ice algae based on morphological and molecular characteristics. *Phycologia* 45: 190-198
- Lizotte MP (2008) Phytoplankton and primary production. In: Vincent WF, Laybourn-Parry J (eds) *Polar lakes and rivers*. Oxford University Press, Oxford, pp 157–178
- Lloyd KG, MacGregor BJ, Teske A (2010) Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiol Ecol* 72: 143-151
- Lovley DR (2001) Bioremediation. *Anaerobes to the rescue*. *Science* 293: 1444-1446
- Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Jr., Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, Tiedje JM (2001) The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29:173–174

- Mariotti A, Landreau A, Simon B (1988) ^{15}N isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater - Application to the Chalk aquifer of northern France. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 52: 1869-1878
- Matsumoto GI, Komori K, Enomoto A, Imura S, Takemura T, Ohyama Y, Kanda H (2006) Environmental changes in Syowa Station area of Antarctica during the last 2,300 years inferred from organic components in lake sediment cores. *Polar Biosci* 19:51–62
- Matsuyama M (1987) A large phototrophic bacterium densely populating the $\text{O}_2\text{-H}_2\text{S}$ interface of Lake Kaiike on Kamikoshiki Island, Southwest Japan. *Acta Academiae Aboensis* 47: 29-43
- Matsuzaki M, Kubota K, Ban S, Imura S, Kunugi M, Satoh T (2006) Dimethyl sulfoxide-respiring bacteria in Suribati Ike, a hypersaline lake, in Antarctica and the marine environment. *Polar Biosci* 20: 73-81
- McFadden BA (1973) Autotrophic CO_2 assimilation and the evolution of ribulose diphosphate carboxylase. *Bacteriol Rev* 37: 289-319
- McKiness ZP, Cavanaugh CM (2005) The ubiquitous mussel: *Bathymodiolus* aff. *brevior* symbiosis at the Central Indian Ridge hydrothermal vents. *Mar Ecol Prog Ser* 295: 183-190
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491-499
- Michotey V, Mejean V, Bonin P (2000) Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd*₁-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl Environ Microbiol* 66: 1564-1571
- Mikucki J, Kong W, Priscu JC, Morgan-Kiss R (2010) Chemoautotrophic Bacterial Production in the Redoxcline of an Ice-Covered Antarctic Lake. AGU Fall Meeting 2010, abstract #B21F-06
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 65:4715–4724
- 三浦英樹 (2002) 第四紀の南極氷床変動と古海洋・古気候変動, 月刊地球, 24: 82
- Miyoshi T, Iwatsuki T, Naganuma T (2005) Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl Environ Microbiol* 71:1084–1088
- Mohamed NM, Colman AS, Tal Y, Hill RT (2008) Diversity and expression of nitrogen fixation genes

- in bacterial symbionts of marine sponges. *Environ Microbiol* 10: 2910-2921
- Morris RM, Rappe MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, et al. (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*: 420, 806-810
- Mosier AC, Francis CA (2010) Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary. *Environ Microbiol* 2: 667-676
- Murase J, Noll M, Frenzel P (2006) Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. *Appl Environ Microbiol* 72: 5436-5444
- 長沼 毅 (2000) 地球生物圏フロンティア (深海・地底・南極) の微生物. *宇宙生物科学*, 14: 323-331
- Naganuma T, Miyoshi T, Kimura H (2007) Phylotype diversity of deep-sea hydrothermal vent prokaryotes trapped by 0.2- and 0.1- μm -pore-size filters. *Extremophiles* 11:637-646
- Naganuma T, Hua PN, Okamoto T, Ban S, Imura S, et al. (2005) Depth distribution of euryhaline halophilic bacteria in Suribati Ike, a meromictic lake in East Antarctica. *Polar Biol.* 28: 964-970
- Naganuma T, Miyoshi T, Kimura H (2007) Phylotype diversity of deep-sea hydrothermal vent prokaryotes trapped by 0.2- and 0.1- μm -pore-size filters. *Extremophiles* 11: 637-646
- Nakai R, Abe T, Baba T, Imura S, Kagoshima H, Kanda H, Kanekiyo A, Kohara Y, Koi A, Nakamura K, Narita T, Niki H, Yanagihara K, Naganuma T (2011) Microflorae of aquatic moss pillars in a freshwater lake, East Antarctica, based on fatty acid and 16S rRNA gene analyses. *Polar Biol Online First*: DOI:10.1007/s00300-011-1090-2
- 中井亮佑, 長沼 毅 (2011) 第6章 境界の微生物, 『微生物の生態学』(日本生態学会編), 共立出版, p 85-97
- Nakanishi S (1977) Ecological studies of the moss and lichen communities in the ice-free areas near Syowa station, Antarctica. *Antarct Rec* 59: 68-96
- Nealson KH (1997) Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? *Annu Rev Earth Planet Sci* 25: 403-434
- Newman J, Gutteridge S (1993) The X-ray structure of *Synechococcus* ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase-activated quaternary complex at 2.2 Å resolution. *J Biol Chem* 268: 25876-25886
- Nisbet EG, Fowler CMR (1996) Early life - Some liked it hot. *Nature* 382: 404-405

- Ohtani S, Kudoh S, Tsuchiya Y, Suyama K, Imura S (2001) Species composition of freshwater algae in benthic moss pillars in lakes, Skarvsnes, Antarctica. Abstracts for XXIV Symp Polar Biol Tokyo, Natl Inst Polar Res 77
- Ohtsuka T, Kudoh S, Imura S, Ohtani S (2006) Diatoms composing benthic microbial mats in freshwater lakes of Skarvsnes ice-free area, East Antarctica. *Polar Biosci* 20: 113–130
- Olson JB, Stepe TF, Litaker RW, Paerl HW (1998) N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecol* 36: 231-238
- Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740
- Padisák J (2004) Phytoplankton. In: Sullivan PE and Reynolds CS (eds) *The Lakes handbook*, Vol. 1: Limnology and limnetic ecology. Blackwell Publishing, Oxford, pp 251-308
- Parkes RJ, Cragg BA, Bale SJ, Getliff JM, Goodman K, et al. (1994) Deep Bacterial Biosphere in Pacific-Ocean Sediments. *Nature* 371: 410-413
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183:3770–3783
- Paterson WSB (1994) *The Physics of Glaciers* (3rd ed.), Oxford, Elsevier
- Pearce DA, Cockell CS, Lindstrom ES, Tranvik LJ (2007) First evidence for a bipolar distribution of dominant freshwater lake bacterioplankton. *Antarctic Sci* 19: 245-252
- Pedersen K, Arlinger J, Hallbeck L, Pettersson C (1996) Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S rRNA gene sequencing. *Mol Ecol*, 5: 427-436
- Petersen JM, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, et al. (2011) Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* 476: 176-180
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, Chappellaz J, Davis J, Delaygue G, et al. (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429-436
- Philippot L, Hallin S, Schloter M (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy* 96: 249-305
- Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, Hallet S, Germon JC (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ Microbiol* 68: 6121-6128

- Priscu JC eds. (1998) *Ecosystem Dynamics in a Polar Desert*, American Geophysical Union
- Priscu JC, Adams EE, Lyons WB, Voytek MA, Mogk DW, et al. (1999) Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica. *Science* 286: 2141-2144
- Priscu JC, Tulaczyk S, Studinger M, Kennicutt MC, Christner BC, Foreman CM (2008) Antarctic subglacial water: origin, evolution and ecology. In: Vincent WF, Laybourn-Parry J (eds) *Polar lakes and rivers*. Oxford University Press, Oxford, pp 179–196
- Purdy KJ (2005) Nucleic acid recovery from complex environmental samples. In: Leadbetter JR (ed) *Methods in Enzymology*, Vol. 397. Academic Press, New York, pp 271-292
- Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, et al. (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol* 66: 5368-5382
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65
- Quesada A, Vincent WF, Lean DRS (1999) Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *FEMS Microbiol Ecol* 28: 315-323
- Quesada A, Fernandez-Valiente E, Hawes I, Howard-Williams C (2008) Benthic primary production in polar lakes and rivers. In: Vincent WF, Laybourn-Parry J (eds) *Polar lakes and rivers*. Oxford University Press, Oxford, pp 179–196
- Raghukumar S (2002) Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Eur J Protistol* 38: 127-145
- Rajendran N, Matsuda O, Imamura N, Urushigawa Y (1992) Variation in microbial biomass and community structure in sediments of eutrophic bays as determined by phospholipid ester-linked Fatty acids. *Appl Environ Microbiol* 58:562–571
- Rosch C, Mergel A, Bothe H (2002) Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol* 68: 3818-3829
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63: 4704-4712

- Sabbe K, Hodgson DA, Verleyen E, Taton A, Wilmotte A, Vanhoutte K, Vyverman W (2004) Salinity, depth and the structure and composition of microbial mats in continental Antarctic lakes. *Freshw Biol* 49: 296–319
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425
- Sameshima-Saito R, Chiba K, Minamisawa K (2004) New method of denitrification analysis of *Bradyrhizobium* field isolates by gas chromatographic determination of ¹⁵N-labeled N₂. *Appl Environ Microbiol* 70: 2886-2891.
- Santoro AE, Boehm AB, Francis CA (2006) Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Appl Environ Microbiol* 72: 2102-2109
- Scala DJ, Kerkhof LJ (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *FEMS Microbiol Lett* 162: 61-68
- Schneider G, Lindqvist Y, Lundqvist T (1990) Crystallographic refinement and structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospirillum Rubrum* at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 211: 989-1008
- Schutte UM, Abdo Z, Foster J, Ravel J, Bunge J, et al. (2010) Bacterial diversity in a glacier foreland of the high Arctic. *Mol Ecol* 19: 54-66
- Schwarz MVJ, Frenzel P (2003) Population dynamics and ecology of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an anoxic rice field soil. *Biology and Fertility of Soils* 38: 245-252
- Seto K, Imura S, (2002) Subbottom environments and benthic flora in the lake on the soya coast, Antarctica. Abstracts for XXIV Symp Polar Biol Tokyo, Natl Inst Polar Res, 86
- Shinozaki K, Yamada C, Takahata N, Sugiura M (1983) Molecular cloning and sequence analysis of the cyanobacterial gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4050-4054
- Shukla M, Chaturvedi R, Tamhane D, Vyas P, Archana G, et al. (2007) Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: Correlation between stresses. *Current Microbiol*, 54: 142-148
- Siegert MJ, Carter S, Tabacco I, Popov S, Blankenship DD (2005) A revised inventory of Antarctic subglacial lakes. *Antarctic Sci* 17: 453-460
- Simonsson I, Jonsson BH, Lindskog S (1979) A ¹³C nuclear-magnetic-resonance study of CO₂-HCO₃⁻

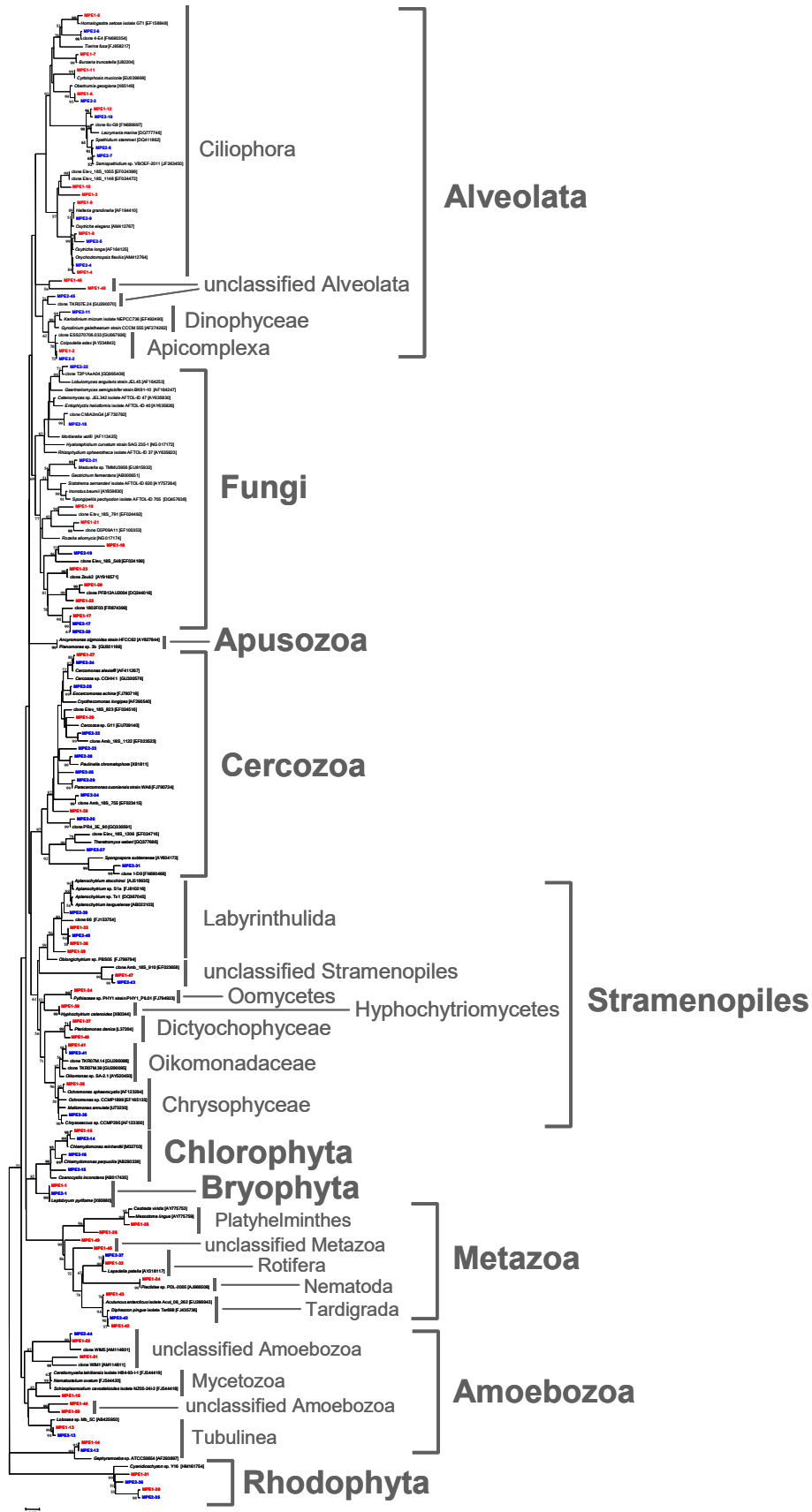
- exchange catalyzed by human carbonic anhydrase C at chemical equilibrium. *Eur J Biochem* 93: 409-417
- Spiridonova EM, Kuznetsov BB, Pimenov NV, Turova TP (2006) Phylogenetic characterization of endosymbionts of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* by analysis of the 16S rRNA, *cbbL*, and *pmoA* genes. *Mikrobiologiya* 75: 798-806
- Stal LJ, Vangemerden H, Krumbein WE (1985) Structure and development of a benthic marine microbial mat. *FEMS Microbiol Ecol* 31: 111-125
- Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, et al. (2008) Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10949-10954
- Takeshi N, Annick W (2009) Microbiological and ecological responses to global environmental changes in polar regions (MERGE): an IPY core coordinating project. *Polar Science* 3: 139-146
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739
- Tanabe Y, Kudoh S, Imura S, Fukuchi M (2008) Phytoplankton blooms under dim and cold conditions in freshwater lakes of East Antarctica. *Polar Biol* 31:199-208
- Tang EPY, Tremblay R, Vincent WF (1997) Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? *J Phycol* 33: 171-181
- Taton A, Grubisic S, Balthasart P, Hodgson DA, Laybourn-Parry J, Wilmotte A (2006a) Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Ecol* 57:272–89.
- Taton A, Grubisic S, Ertz D, Hodgson DA, Piccardi R, Biondi N, Tredici M, Mainini M, Losi D, Marinelli F, Wilmotte A (2006b) Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. *J Phycol* 42:1257–1270
- Tewari SD, Pant G (1996) Some moss collections from Dakshin Gangotri, Antarctica. *Bryol Times* 91: 7
- Tindall BJ, Rossello-Mora R, Busse HJ, Ludwig W, Kampfer P (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 249-266

- Tong S, Vors N, Patterson DJ (1997) Heterotrophic flagellates, centrohelid heliozoa and filose amoebae from marine and freshwater sites in the Antarctic. *Polar Biol* 18: 91-106
- Tsubota H, Nakao N, Arikawa T, Yamaguchi T, Higuchi M, Deguchi H, Seki T (1999) A preliminary phylogeny of Hypnales (Musci) as inferred from chloroplast *rbcL* sequence data. *Bryol Res* 7: 233-248
- Vincent WF (1988) *Microbial ecosystems of Antarctica*. Cambridge University Press, Cambridge
- Vincent WF, Downes MT, Castenholz RW, Howardwilliams C (1993) Community structure and pigment organization of cyanobacteria-dominated microbial mats in Antarctica. *Eur J Phycol* 28: 213-221
- Vincent WF, Rae R, Laurion I, Howard-Williams C, Priscu JC (1998) Transparency of Antarctic ice-covered lakes to solar UV radiation. *Limnol Oceanogr* 43: 618-624
- Vincent WF (2000) Cyanobacterial dominance in the polar regions. In: Whitton BA, Potts M (eds) *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 321–340
- Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J Bacteriol* 180: 2975-2982
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267
- Ward BB (2005) Molecular approaches to marine microbial ecology and the marine nitrogen cycle. *Ann Rev Earth Planet Sci* 33: 301-333
- Ward BB, Priscu JC (1997) Detection and characterization of denitrifying bacteria from a permanently ice-covered Antarctic lake. *Hydrobiologia* 347: 57-68
- Ward BB, O'Mullan GD (2002) Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceani*, a marine ammonia-oxidizing gamma-proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. *Appl Environ Microbiol* 68: 4153-4157
- Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, Henrissat B, Coutinho PM, et al. (2009) Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol* 75: 2046-2056
- Watanabe K, Kodama Y, Hamamura N, Kaku N (2002) Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground

- crude oil storage cavity. *Appl Environ Microbiol* 68:3899–3907
- Watson GM, Yu JP, Tabita FR (1999) Unusual ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of anoxic Archaea. *J Bacteriol* 181: 1569-1575
- Wellsbury P, Goodman K, Barth T, Cragg BA, Barnes SP, et al. (1997) Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature* 388: 573-576
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301: 976-978
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6578-6583
- Wing KT, Priscu JC (1993) Microbial communities in the permanent ice cap of Lake Bonney, Antarctica: Relationships among chlorophyll-*a*, gravel and nutrients. *Antarctic J USA* 28: 246-249
- Wise MG, McArthur JV, Shimkets LJ (1997) Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl Environ Microbiol* 63:1505–1514
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271
- Wright A, Siegert MJ (2011) The identification and physiographical setting of Antarctic subglacial lakes: an update based on recent geophysical data. In: Siegert MJ, Kennicutt C, Bindschadler B (eds) *Subglacial Antarctic Aquatic Environments*, AGU Monograph, pp 9–26
- Yamada Y, Ueda T, Wada E (1996) Distribution of Carbon and Nitrogen Isotope Ratios in the Yodo River Watershed. *Jpn J Limnol* 57: 467-477
- Ye RW, Averill BA, Tiedje JM (1994) Denitrification - production and consumption of nitric-oxide. *Appl Environ Microbiol* 60: 1053-1058
- Yergeau E, Kang S, He Z, Zhou J, Kowalchuk GA (2007) Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect. *ISMEJ* 1: 163-179
- Zablotowicz RM, Eskew DL, Focht DD (1978) Denitrification in *Rhizobium*. *Canadian J Microbiol* 24: 757-760
- Zwirgmaier K, Fichtl K, Ludwig W (2005) In situ functional gene analysis: recognition of individual genes by fluorescence in situ hybridization. In: Leadbetter J (ed) *Methods in Enzymology*, Vol. 397, Academic Press, New York, pp 338-351
- Zehr JP, Ward BB (2002) Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms.

- Appl Environ Microbiol 68: 1015-1024
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environ Microbiol 5: 539-554
- Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol 62: 316-322
- de Wit R, Bouvier T (2006) '*Everything is everywhere, but, the environment selects*'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? Environ Microbiol, 8: 755-758
- van Berkum P, Keyser HH (1985) Anaerobic growth and denitrification among different serogroups of soybean rhizobia. Appl Environ Microbiol 49: 772-777
- van der Wielen PWJJ (2006) Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes in the MgCl₂-dominated deep hypersaline anoxic basin discovery. FEMS Microbiol Lett 259: 326-331

補足図表



補足図 1 コケ坊主由来の 18S rDNA 遺伝子の PCR クローン・ライブラリーから得られた phylotype の近隣結合法による分子系統樹

補足表1 (続き)

Phylo type	No. of clones	Closest sequence/organism	Accession No.	Identity	Alignment lengths	Closest organism	Accession No.	Identity	Alignment lengths	Distribution of clones																						
										Exterior section							Interior section															
										O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7									
Unclassified bacteria																																
MPBI-282	3	Uncultured bacterium clone SLB626	DQ787720	88.9	1471	<i>Halochromatium</i> sp. AR2202	AJ401219	78.9	1407																							
MPBI-283	1	Uncultured soil bacterium clone CWT SM03_G11	DQ129127	93.8	1426	delta proteobacterium S2550	AF148141	78.2	1498																							
MPBI-284	2	Uncultured bacterium clone 54	DQ413113	90.7	1467	endosymbiont of <i>Astomonema</i> sp.	DQ408757	78.6	1410																							
MPBI-285	3	Uncultured bacterium clone MD2896-B89	EU385703	88.0	1470	<i>Rhodanobacter</i> sp. BPC1	AF494542	78.1	1445																							
MPBI-286	2	Uncultured bacterium clone 3000-B02	AY661981	92.8	1465	<i>Halochromatium</i> sp. AR2202	AJ401219	78.8	1410																							
MPBI-287	1	Uncultured bacterium clone R2030	EF219035	96.2	1416	<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3	Y17698	76.9	1503																							
MPBI-288	1	Uncultured eubacterium WCHB1-02	AF050593	98.6	1462	<i>Ferribacter thermoautotrophicus</i>	AF282253	75.1	1431																							
MPBI-289	2	Uncultured bacterium clone Sed1	EF064159	96.4	1462	endosymbiont of <i>Astomonema</i> sp.	DQ408757	78.0	1411																							
MPBI-290	1	Uncultured soil bacterium clone S1198	AF507714	93.5	1461	<i>Thalassiosira</i> sp.	EF999974	77.3	1430																							
MPBI-291	1	Uncultured bacterium clone CV80	EF530679	95.7	1459	<i>Halochromatium</i> sp. AR2201	AJ401218	79.0	1393																							
MPBI-292	8	Uncultured bacterium clone Kas175B	EF203206	99.2	1456	unidentified eubacterium clone BSV40	AJ229196	91.7	1438																							
MPBI-293	10	Uncultured bacterium clone Pia-s-69	EF632929	98.2	1439	unidentified eubacterium clone BSV40	AJ229196	84.2	1411																							
MPBI-294	11	Uncultured soil bacterium clone S1220	AF507716	94.4	1421	unidentified eubacterium clone BSV40	AJ229196	81.4	1416																							
Total										82	80	74	74	80	78	80	75	80	84	78	75	76	85									

補足表2 (続き)

Phylo type	No. of clones	Closest sequence/organism	Accession No.	Identity	Alignment length	Closest organism	Accession No.	Identity	Alignment lengths	Distribution of clones																
										Exterior section							Interior section									
										O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7			
Caldiseptica																										
MPB2-241	1	Uncultured eubacterium WCHB1-02	AF050593	98.4	1462	<i>Ferribacter thermoautotrophicus</i>	AF282253	78.2	1195																	
Gemmatimonadetes																										
MPB2-242	1	Uncultured bacterium clone ANTLV1_E09	DQ521491	97.4	1447	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	AB072735	90.3	1448																	
MPB2-243	1	Uncultured bacterium clone ANTLV1_E09	DQ521491	96.9	1447	bacterium Ellin5220	AY234571	89.2	1453																	
MPB2-244	1	Uncultured <i>Gemmatimonas</i> sp. clone A1816	EU283564	95.0	1330	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	AB072735	83.9	1450																	
Candidate division																										
OPI0																										
MPB2-245	1	Uncultured bacterium clone TP3	EF205560	91.1	1453	<i>Halobacterium modesticaldam</i> Ice1	CP000930	80.0	1443																	
MPB2-246	1	uncultured bacterium clone SJA-171	AJ009501	94.9	1450	<i>Pelotomaculum</i> sp. JT	AB091323	81.0	1460																	
MPB2-247	1	Uncultured bacterium clone 44P1	EU676408	96.2	1438	<i>Actinomycetales</i> bacterium Gsoil 1632	AB245397	80.6	1450																	
MPB2-248	5	Uncultured candidate division OPI0 bacterium clone D15_25	EU266864	94.9	1455	<i>Thermicola carboxydiphila</i>	AY603000	80.2	1468																	
MPB2-249	1	Uncultured bacterium clone TP3	EF205560	91.8	1454	<i>Clostridium straminisolvens</i>	AB125279	80.8	1449																	
OPI1																										
MPB2-250	9	Uncultured bacterium clone FFCH11767	EU134950	90.1	1306	<i>Corynebacterium callunae</i>	X84251	75.0	1200																	
ODI																										
MPB2-251	1	Uncultured bacterium clone 1013-1-CG39	AY532553	92.5	1379	<i>Acidobacteria</i> bacterium Ellin345	CP000360	72.92	1296																	
TM7																										
MPB2-252	2	Uncultured bacterium clone 655076	DQ404736	96.6	1398	unidentified eubacterium clone BSV24	AJ229187	77.9	1405																	
MPB2-253	1	Uncultured bacterium clone 656073	DQ404628	96.8	1328	unidentified eubacterium clone BSV24	AJ229187	78.1	1330																	
Unclassified bacteria																										
MPB2-254	1	Unidentified eubacterium clone vadinBA07	U81641	89.1	1462	psychrophilic sulfate-reducing bacterium LSV23	AF099059	77.9	1475																	
MPB2-255	1	Uncultured bacterium clone WM1006	DQ415748	92.3	1474	<i>Cellulomonas fini</i>	X83803	72.6	1184																	
MPB2-256	1	Uncultured bacterium clone ab55 Ig09	DQ815224	95.6	1466	<i>Desulfobacterium anilini</i>	EU020016	78.9	1473																	
MPB2-257	4	Uncultured soil bacterium clone S1220	AF507716	94.2	1421	unidentified eubacterium clone BSV40	AJ229196	81.5	1416																	
MPB2-258	2	Uncultured bacterium clone SLB626	DQ787720	88.9	1471	<i>Halochromatium</i> sp. AR2202	AJ401219	79.0	1407																	
MPB2-259	2	Uncultured bacterium clone P1a-s-69	EF632929	99.2	1456	unidentified eubacterium clone BSV40	AJ229196	84.1	1411																	
MPB2-260	2	Uncultured bacterium clone Kas175B	EF203206	99.2	1456	unidentified eubacterium clone BSV40	AJ229196	91.7	1438																	
MPB2-261	1	Uncultured candidate division OPI0 bacterium clone HAVOmat07	EF032776	90.3	1452	candidate division OPI0 bacterium T49	AM749780	91.0	1239																	
MPB2-262	2	Uncultured bacterium clone R2O30	EF219035	95.8	1417	<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3	Y17698	76.6	1504																	
MPB2-263	12	Uncultured candidate division OPI0 bacterium clone HAVOmat07	EF032776	87.9	1454	candidate division OPI0 bacterium T49	AM749780	86.0	1417																	
MPB2-264	7	Uncultured candidate division OPI1 bacterium clone 02D2Z37	DQ329862	87.4	1302	<i>Jonquetella anthropi</i>	EF46502	74.6	1316																	
MPB2-265	1	Uncultured organism clone MIAT-CR-M4-C03	EU245655	87.8	1350	mixed culture isolate kollf	EF46502	74.6	1316																	
MPB2-266	3	Uncultured bacterium clone TANB22	AY667254	86.6	1415	<i>Prochloron</i> sp.	AJ224539	86.3	1419																	
MPB2-267	1	Uncultured bacterium clone DS020	DQ234104	85.8	1409	<i>Anabaena</i> cf. <i>cylindrica</i> PMC9705	AJ293119	74.1	1393																	
MPB2-268	1	Uncultured bacterium clone FCP5707	EF515985	88.5	1380	<i>Citronictobium bathyomarinum</i>	Y16267	73.6	1279																	
MPB2-269	1	Uncultured bacterium clone:TSBX31	AB186808	98.6	1455	unidentified eubacterium clone BSV40	AJ229196	91.2	1439																	
MPB2-270	1	Uncultured bacterium clone HAVOmat13	EF032771	86.4	1456	<i>Dehalococcoides</i> sp. BH80-52	AJ431247	75.9	1186																	
Total										80	79	79	80	85	76	79	77	83	76	74	80	76				

補足表3 コケ坊主(第1標本)由来の18S rRNA遺伝子のPCRクローン・ライブラリーから得られたphylogenyの系統、構成クローン数、BLAST検索結果および検出されたコケ坊主内の部位

Phylotype	No. of clones	Closest sequence/organism	Accession No.	Identity (%)	Alignment lengths	Closest organism	Identity (%)	Accession No.	Alignment lengths	Distribution of clones																
										Alignment lengths	Identity (%)	Accession No.	Alignment lengths	Identity (%)	Accession No.	Exterior section				Interior section						
										O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7			
Bryophyta																										
MPE1-1	235	<i>Leptobryum pyriforme</i>	X80980	99.94	1774																					
MPE1-2	8	clone ESS270706.033	GU067926	99.31	1748	<i>Colpodella edax</i>		AY234843	1745																	
Ciliophora (Alveolata)																										
MPE1-4	49	<i>Onychodromopsis flexilis</i>	AM412764	97.24	1737																					
MPE1-5	7	<i>Homalogastra setosa</i> isolate GT1	EF158848	97.74	1722																					
MPE1-6	5	<i>Obertruntia georgiana</i>	X65149	97.56	1721																					
MPE1-7	4	<i>Bursaria truncatella</i>	U82204	99.13	1720																					
MPE1-8	4	<i>Halteria grandinella</i>	AF194410	99.25	1730																					
MPE1-9	3	<i>Oxytricha longa</i>	AF164125	97.33	1724																					
MPE1-10	3	clone Elev.18S_1148	EF024472	94.72	1741	<i>Onychodromopsis flexilis</i>		AM412764	1739																	
MPE1-11	2	<i>Cyrtolophosis niticola</i>	EU039899	99.35	1691																					
MPE1-12	2	clone 6c-G9	FN689997	96.30	1488	<i>Semispahidium</i> sp. VBOEF-2011		JF263450	1516																	
MPE1-3	2	clone Elev.18S_1055	EF024399	93.85	1754	<i>Oxytricha elegans</i>		AM412767	1756																	
unclassified Alveolata																										
MPE1-46	2	<i>Colpodella edax</i>	AY234843	92.80	1765																					
MPE1-48	1	<i>Ochromonas</i> sp. CCMP1899	EF165133	91.93	1648																					
Mycetozoa (Amoebozoa)																										
MPE1-15	1	<i>Schizoplasmodium cavosteloides</i> isolate NZ05-241-2	FJ544418	88.84	1882																					
Tubulinea (Amoebozoa)																										
MPE1-13	6	<i>Lobosoa</i> sp. Mb_5C	AB425950	95.58	1923																					
MPE1-14	1	<i>Gephyramoeba</i> sp. ATCC50654	AF293897	93.18	1817																					
unclassified Amoebozoa																										
MPE1-44	18	<i>Ceratiomyxella tahitiensis</i> isolate HI04-93-clone 66	FJ544419	83.32	1912																					
MPE1-50	1	clone WIM1	FJ153754	83.46	1814	<i>Aplanochytrium</i> sp. Sia		FJ810216	1812																	
MPE1-51	1	clone WIM1	AM114811	84.94	1866	<i>Nemaostelium ovatum</i>		FJ544420	1905																	
MPE1-52	1	clone WIM5	AM114801	98.80	1835	<i>Ancyromonas sigmoides</i> strain HFCC6;		AY827844	1341																	
Chlorophyta																										
MPE1-16	3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	M32703	97.99	1745																					
Fungi																										
MPE1-17	574	clone 1802F03	FR874399	92.44	1732	<i>Enophlyctis heliiformis</i> isolate AFTOL-ID 40		AY635826	1770																	
MPE1-18	16	clone Elev.18S_548	EF024199	83.70	1736	<i>Geotrichum fermentans</i>		AB000651	1747																	
MPE1-19	12	clone Elev.18S_791	EF024492	89.37	1759	<i>Gaermetomyces semiglobijfer</i> strain BK91-10		AF164247	1753																	
MPE1-20	9	clone PFB12AU2004	DQ244016	96.66	1706	<i>Rozella allomyces</i>		NG_017174	1757																	
MPE1-21	5	clone D5P09A11	EF100353	95.26	1203	<i>Spongipellis pachyodon</i> isolate AFTOL-ID 705		DQ457638	1775																	
MPE1-22	3	clone PFB12AU2004	DQ244016	94.05	1715	<i>Sisotrrema sernanderi</i> isolate AFTOL-ID 620		AY757264	1775																	
MPE1-23	3	clone Zeuk2	AY916571	98.99	1676	<i>Hyaloraphidium curvatum</i> strain SAG 235-1		NG_017172	1755																	
Nematoda (Metazoa)																										
MPE1-24	3	<i>Plectidiae</i> sp. PDL-2005	AJ966508	98.59	1775																					

補足表3 (続き)

Phylotype	No. of clones	Closest sequence/organism	Accession No.	Identity (%)	Alignment lengths	Closest organism	Accession No.	Identity (%)	Alignment lengths	Distribution of clones																
										Exterior section					Interior section											
										O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7			
Platyhelminthes (Metazoa)																										
MPE1-25	3	<i>Mesostoma lingua</i>	AY775759	93.26	1794					2																
MPE1-26	1	<i>Castrada viridis</i>	AY775753	86.66	1806																			1		
Rotifera (Metazoa)																										
MPE1-32	1	<i>Lepadella patella</i>	AY218117	97.73	1761						1															
Tardigrada (Metazoa)																										
MPE1-42	49	<i>Diphoscon pingue</i> isolate Tar698	FJ435736	98.79	1742						8	4	2	1	16	6	5	2	3	2						
MPE1-43	22	<i>Acutuncus antarcticus</i> isolate	EU266943	99.76	1673						4	3		1	7		7									
unclassified Metazoa																										
MPE1-45	5	<i>Diphoscon pingue</i> isolate Tar698	FJ435736	92.66	1745						4				1											
MPE1-49	1	<i>Acutuncus antarcticus</i> isolate	EU266943	94.82	1621						1															
Cercozoa (Rhizaria)																										
MPE1-27	5	<i>Cercomonas alexteffi</i>	AF411267	98.43	1770																		1	4		
MPE1-28	3	<i>Cercozoa</i> sp. G11	EU709140	94.74	1768																	2		1		
MPE1-29	2	clone Elev_18S_823	EF024516	94.56	1784	<i>Cryothecomonas longipes</i>	AF290540	93.02	1776																	
Rhodophyta																										
MPE1-30	6	<i>Cyanidioschyzon</i> sp. Y16	HM161754	85.74	1851																					
MPE1-31	3	<i>Cyanidioschyzon</i> sp. Y16	HM161754	90.29	1864																				1	
Chrysophyceae (Stramenopiles)																										
MPE1-35	3	<i>Ochromonas sphaerocystis</i>	AF123294	98.45	1739																				3	
Dictyochytriales (stramenopiles)																										
MPE1-37	2	<i>Pteridomonas danica</i>	L37204	98.47	1765																				2	
MPE1-40	1	<i>Pteridomonas danica</i>	L37204	97.58	1654																				1	
Hyphochytriales (Stramenopiles)																										
MPE1-39	1	<i>Hyphochytrium catenoides</i>	X80344	99.72	1767																				1	
Labyrinthulida (Stramenopiles)																										
MPE1-33	7	clone 66	FJ153754	96.15	1764	<i>Aplanochytrium stochinoi</i>	AJ519935	95.45	1758																1	
MPE1-36	3	<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	AB022103	91.98	1771																				1	
MPE1-38	2	clone 66	FJ153754	92.25	1781	<i>Aplanochytrium</i> sp. Ts1	DQ367045	92.91	1678																2	
Okomonadaceae (Stramenopiles)																										
MPE1-41	1	clone TKR07M.39	GU290095	96.22	1747	<i>Mallomonas annulata</i>	U73230	93.76	1748																1	
Oomyces (stramenopiles)																										
MPE1-34	5	<i>Pythiaceae</i> sp. PHY1 strain PHY1_PIL01	FJ794923	99.15	1773																				1	
unclassified Stramenopiles																										
MPE1-47	2	clone Amb_18S_910	EF023658	91.00	1778	<i>Oblongochytrium</i> sp. PBS05	FJ799794	77.31	1794																2	
Total	1112										81	87	82	81	82	78	79	77	72	78	74	77	79	85		

補足表4 コケ坊主(第2標本)由来の18S rRNA 遺伝子のPCRクローニング・ライブラリーから得られたphylogenyの系統、構成クローン数、BLAST検索結果および検出されたコケ坊主内の部位

Phylotype	No. of clones	Closest sequences/organism	Accession No.	Identity (%)	Alignment lengths	Closest organism	Accession No.	Identity (%)	Alignment lengths	Distribution of clones																			
										Exterior section							Interior section												
										O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7						
Bryophyta																													
MPE2-1	176	<i>Leptobryum pyriforme</i>	X80980	99.94	1774						10	6	5	18	15	18	15	18	15	7	10	18	6	16	20	12			
Alpicomplexa (Alveolata)																													
MPE2-2	1	clone ESS270706.033	GU067926	99.14	1748	<i>Coppodella edax</i>	AY234843	98.45	1742																				1
Ciliophora (Alveolata)																													
MPE2-3	27	<i>Obertrammia georgiana</i>	X65149	96.93	1724						4	1	3			5	3	11											
MPE2-4	21	<i>Oxytrichomopsis flexilis</i>	AM412764	99.83	1721						8	10	1			1	1	1											
MPE2-5	12	<i>Oxytricha longa</i>	AF164125	94.64	1735						1	6	3			1	1	1											
MPE2-6	7	clone 4-E4	FN690354	99.22	1661	<i>Tiarina fusa</i>	FJ858217	90.84	1725		4					2	2	1											
MPE2-7	6	<i>Semispathidium</i> sp. VBOEF-2011	JF263450	99.06	1595								3			3	3	1											
MPE2-8	1	<i>Spathidium stammeri</i>	DQ411862	97.43	1597													1											
MPE2-9	1	<i>Halteria grandinella</i>	AF194410	99.31	1730													1											
MPE2-10	1	<i>Lacynaria maritima</i>	DQ777746	94.72	1609													1											
Dinophyceae (Alveolata)																													
MPE2-11	5	<i>Karlodinium micrum</i> isolate NEPC736	EF492490	96.69	1754						1	2	1			1													
unclassified Alveolata																													
MPE2-45	1	clone TKR07E.24	GU290070	92.02	1766	<i>Gyrodinium galatheanum</i> strain CCCM 555	AF274262	89.96	1763																				
Tubulinea (Amoebozoa)																													
MPE2-12	2	<i>Gephyramoeba</i> sp. ATCC50654	AF293897	93.18	1817																								
MPE2-13	1	<i>Lobosea</i> sp. Mb_5C	AB425950	95.58	1923						2		1																
unclassified Amoebozoa																													
MPE2-44	1	clone WIM5	AM114801	98.91	1835	<i>Planomonas</i> sp. 3b	GU001166	82.62	1341																				
Chlorophyta																													
MPE2-14	5	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	M32703	97.71	1745																								
MPE2-15	3	<i>Coenocystis inconspicua</i>	AB017435	92.95	1759																								
MPE2-16	2	<i>Chlamydomonas perpusilla</i> var. <i>perpusilla</i>	AB290339	99.02	1741																								
Fungi																													
MPE2-17	606	clone 1802F03	FR874399	92.73	1733	<i>Entophycis helioformis</i> isolate AFTOL-ID 40	AY635826	86.17	1771		39	52	22			18	12	16						33					
MPE2-18	16	clone CH8A2mG4	JF730792	98.34	1691	<i>Catenomyces</i> sp. JEL342 isolate AFTOL-ID47	AY635830	93.81	1744				3		1	6	6												
MPE2-19	10	clone Elev_18S_548	EF024199	87.66	1743	<i>Inonotus baumii</i>	AY839830	86.22	1771							5	2												
MPE2-20	1	clone 1802F03	FR874399	91.62	1730	<i>Mortierella wolfii</i>	AF113425	87.00	1658																				
MPE2-21	1	<i>Mutinus</i> sp. TMMU13956	EU815932	98.97	1744																								
MPE2-22	1	clone T2P1AeA04	GQ995409	97.26	1755	<i>Lobulomyces angularis</i> strain JEL45	AF164253	94.93	1754																				
Rotifera (Metazoa)																													
MPE2-37	5	<i>Lepadella patella</i>	AY218117	99.20	1758																								
Tardigrada (Metazoa)																													
MPE2-42	138	<i>Diphlascon pingue</i> isolate Tar698	FJ435736	98.97	1743						1	1	21			31	23	27						21					

補足表5 ヌケ坊主由来のRuBisCO遺伝子のPCRクローン・ライブラリーから得られたORUの系統

ORU	Closest nucleotide sequence	Accession No.	Identity (%)	Closest nucleotide organism	Accession No.	Identity (%)
RuBisCO Form IA						
ORU1	tar oil contaminated aquifer clone D10gl104	EU926498	82	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix	CP001905	79
ORU2	hypersaline soda lake sediment clone 05-3-2f1-otu1	HM440006	87	<i>Thiohalophilus thiocyanatooxydans</i> strain HRhD2	GQ888587	82
ORU3	tropical deltaic mobile mud sediment clone ng3L492	AY773062	83	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	L42940	83
ORU4	tar oil contaminated aquifer clone D10gl104	EU926498	81	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix	CP001905	81
RuBisCO Form IB						
ORU5	water columns of Lake Bonney (Antarctica) clone T2EB13-IAB-DNA-048	GU132920	95	<i>Leptolyngbya laminosa</i> ETS-08	FM955229	90
ORU6	red soil clone JX-CK23	HQ259256	86	<i>Arthrospira platensis</i> FACHB341	AY136285	84
ORU7	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	CP001037	92	--		
ORU8	<i>Leptolyngbya laminosa</i> ETS-08	FM955229	83	--		
ORU9	<i>Fischerella muscicola</i> SAG 1427-1	AB075911	81	--		
ORU10	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7906	AB075918	84	--		
ORU11	water columns of Lake Bonney (Antarctica) clone T2EB13-IAB-DNA-048	GU132920	93	<i>Leptolyngbya laminosa</i> ETS-08	FM955229	87
ORU12	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	CP000117	82	--		
ORU13	water columns of Lake Bonney (Antarctica) clone T2EB13-IAB-DNA-032	GU132922	99	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 73110	AB075914	84
Form IB in bryophytes						
ORU14	<i>Leptobryum</i> sp.		100	--		
RuBisCO Form II						
ORU15	cave water clone MCRuBiII_C	FJ604806	92	<i>Halothiobacillus</i> sp. RA13	AY099399	90
ORU16	tar oil contaminated aquifer clone D27M55	EU926557	89	<i>Thiobacillus thioparus</i> strain DSM 505	EU746412	87

補足表6 コケ坊主由来の窒素固定酵素遺伝子(*nifH*)のPCRクローン・ライブラリーから得られたONHUの系統

ONHU ID.	Closest nucleotide sequence	Accession No.	Identity (%)	Closest nucleotide organism	Accession No.	Identity (%)
Cyanobacteria						
ONHU1	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	CP001037	91			
Alphaproteobacteria						
ONHU2	intertidal salt marsh clone Sp5-3	AY091872	80	<i>Desulfohalobus propionicus</i> DSM 2032	CP002364	80
ONHU3	rhizosphere clone A4	AF216939	86	<i>Sinorhizobium</i> sp. T1170	AJ505315	84
ONHU4	glacier foreland soil clone Antarctic-15 from Anvers Island	HQ013262	96	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	GQ289573	88
ONHU5	rhizosphere clone JPR8-7	HM750312	82	<i>Desulfotribrio magneticus</i> RS-1 DNA	AP010904	80
ONHU6	glacier foreland soil clone Antarctic-15 from Anvers Island	HQ013262	89	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	GQ289573	86
ONHU7	glacier foreland soil clone Antarctic-15 from Anvers Island	HQ013262	93	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	GQ289573	89
ONHU8	soil clone Yushu-12	AY601048	88	<i>Desulfohalobus propionicus</i> DSM 2032	CP002364	82
ONHU9	peat soil clone SB-25	EU090279	85	<i>Desulfohalobus propionicus</i> DSM 2032	CP002364	81
ONHU10	intertidal salt marsh clone Sp5-3	AY091872	80	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	GQ289582	79
Betaproteobacteria						
ONHU11	Antarctic clone OraP17 from the McMurdo Ice Shelf	EU915060	96	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	CP000529	87
Gammaproteobacteria						
ONHU12	Antarctic clone OraP07 from the McMurdo Ice Shelf	EU915051	98	<i>Allochroamtium vinosum</i> DSM 180	CP001896	86
ONHU13	Antarctic clone Ice aggregate 2.6 from Lake Bonney	AF049040	86	<i>Methylobacter tundripaludum</i> strain SV96	AY937260	86
ONHU14	Antarctic clone OraP07 from the McMurdo Ice Shelf	EU915051	94	<i>Allochroamtium vinosum</i> DSM 180	CP001896	86
ONHU15	soil clone Langqian-7	AY601064	86	<i>Methylococcus capsulatus</i>	AE017282.2	85
ONHU16	marine microbial mats clone GBII-144	GQ441626	93	<i>Ectothiorhodospira</i> sp. B7-7	HM149325	86
ONHU17	rhizosphere clone 9002-4	FJ394944	88	<i>Teredinibacter turnerae</i> T7901	CP001614.2	83
ONHU18	sediment clone sed_ox_rung_N17	EF133803	91	<i>Ectothiorhodospira</i> sp. B7-7	HM149325	89
ONHU19	Antarctic clone OraP07 from the McMurdo Ice Shelf	EU915051	89	<i>Allochroamtium vinosum</i> DSM 180	CP001896	83
ONHU20	sediment clone sed_ox_rung_N17	EF133803	94	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i> strain DSM 237	EF199954	89
ONHU21	Antarctic clone OraP07 from the McMurdo Ice Shelf	EU915051	94	<i>Ectothiorhodospira</i> sp. B7-7	HM149325	85
Deltaproteobacteria						
ONHU22	Antarctic clone OraP11 from the McMurdo Ice Shelf	EU915067	99	<i>Desulfotribrio aespoeensis</i> Aspo-2	CP002431	82
ONHU23	<i>Desulfohalobus propionicus</i> DSM 2032	CP002364	83			
ONHU24	bioremediated soil clone BRmi22	HQ190158	91	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01	CP001322	81
ONHU25	<i>Desulfohalobus propionicus</i> DSM 2032	CP002364	83			
ONHU26	<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	CP001089	84			
Chlorobi						
ONHU27	Antarctic clone OraP14 from the McMurdo Ice Shelf	EU915063	99	<i>Desulfotribrio aespoeensis</i> Aspo-2	CP002431	84
Spirochaeta						
ONHU28	marine microbial mats clone 08-I.54	GU193750	87	<i>Paludibacter propionigenes</i> WB4	CP002345	75
Verrucomicrobia						
ONHU29	soil clone Yushu-12	AY601048	86	<i>Desulfohalobus propionicus</i> DSM 2032	CP002364	83

補足表7 コケ坊主由来の銅含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirK*)のPCRクローン・ライブラリーから得られたONKUの系統

ONKU ID.	Closest nucleotide sequence	Accession No.	Identity (%)	Closest nucleotide organism	Accession No.
<i>Alphaproteobacteria</i>					
ONKU1	arable soil clone C90-61	ABC02529	96	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248
ONKU2	agricultural soil clone T7R1_0-7cm_098	ABI19506	89	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	YP_001203370
ONKU3	water column and sediment clone Psedi_nirK-12	ABD36652	85	<i>Phaenobacter gallaeciensis</i> 2.10	ZP_02149867
ONKU4	agricultural soil clone T1R2_13-20cm_035	ABI19478	90	<i>Silicibacter</i> sp. TrichCH4B	ZP_05742967
ONKU5	water column and sediment clone Bsedi_nirK-29	ABD36616	90	<i>Silicibacter</i> sp. TrichCH4B	ZP_05742967
ONKU6	soil clone Swe7	CAL92305	90	<i>Bradyrhizobium</i> sp. GSM-471	CBI70247
ONKU7	water column and sediment clone P1m_nirK-03	ABD36621	91	<i>Silicibacter</i> sp. TrichCH4B	ZP_05742967
ONKU8	arable soil Ag12-72	ABC02673	90	<i>Sinorhizobium</i> sp. R-32769	CAO85937
ONKU9	estuary sediments clone SF04-BG30-A03	ADM94044	90	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	BAH56660
ONKU10	arable soil Ag100-3	ABC02744	80	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-484	CBI70249
ONKU11	pristine forest soil clone 55	ACH91721	86	<i>Bradyrhizobium</i> sp. GSM-471	CBI70247
ONKU12	arable soil clone C1-9	ABC02480	77	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	BAI67024
ONKU13	agricultural soil clone T7R3_0-7cm_009	ABI19655	86	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	BAI67024
ONKU14	soil clone Swe7	CAL92305	98	<i>Bradyrhizobium</i> sp. GSM-406	CBI70246
ONKU15	rice field soil clone TBK197	BAH96282	91	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248
ONKU16	water column and sediment clone Bsedi_nirK-28	ABD36615	91	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1	YP_004110634
ONKU17	arable soil clone C90-92	ABC02502	86	<i>Sinorhizobium</i> sp. I-Bh25-4	CBG92373
ONKU18	arable soil clone Ag08-82	ABC02590	97	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA38	BAI67022
ONKU19	agricultural soil clone T7R3_0-7cm_009	ABI19655	88	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248
ONKU20	soil clone Fin14	CAL92254	84	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA38	BAI67022
ONKU21	arable soil clone Ag08-82	ABC02590	88	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA38	BAI67022
ONKU22	activated sludge clone KEP3	ABA54036	91	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-373	CBI70248
ONKU23	soil clone Fin14	CAL92254	82	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	BAI67024
<i>Betaproteobacteria</i>					
ONKU24	estuary sediments clone SF04-BG20-G12	ADM94037	84	<i>Nitrosomonas</i> sp. URW	AAK53360

補足表8 コケ坊主由来のシトクロム含有型の亜硝酸還元酵素遺伝子(nirS)のPCRクローン・ライブラリーから得られたONSUの系統

ONSU ID.	Closest nucleotide sequence	Accession No	Identity (%)	Closest nucleotide organism	Accession No	Identity (%)
Alphaproteobacteria						
ONSU6	rice field soil clone 602S119	BAH96200	97	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TSA1	BAI67028.1	87
ONSU14	water column and sediment clone Psedi_nirS-21	ABD36737.1	91	<i>Dechlorospirillum</i> sp. I-Bh37-22	CBG92407	68
Betaproteobacteria						
ONSU1	water column and sediment clone Psedi_nirS-21	ABD36737	93	<i>Azorucus aromaticum</i> EbN1	CR555306	74
ONSU2	soil clone CC2	ACV33310	86	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO46-2	BAJ11556.1	80
ONSU3	wetland soil clone eT9	ADB85759.1	86	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	82
ONSU5	activated sludge DGGE gel band s6-2	ADJ17981	90	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO46-2	BAJ11556.1	74
ONSU7	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	BAI66431	87			
ONSU8	activated sludge DGGE gel band s6-2	ADJ17981	87	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSA20w	BAI67033.1	73
ONSU9	potato field clone PF06OTU173	ADB25024	84	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451	CAJ76755.1	85
ONSU10	water column and sediment clone P1m_nirS-01	ABD36710	91	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451	CAJ76755.1	87
ONSU12	Activated sludge clone NR1-87S42	BAD37185	90	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451	CAJ76755.1	90
ONSU15	activated sludge DGGE gel band s6-2	ADJ17981	83	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	74
ONSU16	water column and sediment P7m_nirS-05	ABD36718	92	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28400	CAJ76752.1	91
ONSU17	landfill refuse clone 63-42	AEK31205	85	<i>Cupriavidus necator</i>	AAD26539.1	78
ONSU18	wetland soil clone eT9	ADB85759.1	86	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	81
ONSU19	wetland soil clone aT13	ADB85738	87	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	YP_313835.1	82
Gammaproteobacteria						
ONSU13	sediment-water interface clone Ssedi_nirS-35	ABR29452	82	<i>Pseudomonas lini</i>	ABF65971.1	76
ONSU4	denitrifying estuarine sediments clone HNIS-3	ABR29445	96	<i>Marinobacter</i> sp. CG157051	ABG36514.1	79
Firmicutes						
ONSU11	water column and sediment clone S12m_nirS-30	ABD36778	89	<i>Bacillus cereus</i>	AEO89629.1	85

補足表9 ヌケ坊主由来の一酸化窒素還元酵素遺伝子(*qnorB*)のPCRクローン・ライブラリーから得られたOQBUの系統

OQBU ID.	Closest nucleotide sequence	Accession No	Identity (%)	Closest nucleotide organism	Accession No	Identity (%)
Acidobacteria						
OQBU1	paddy soil clone CK87	AEH49911	76	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	78
OQBU2	marine sediment clone	CAD45402	79	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	73
OQBU3	paddy soil clone NPK5	AEH49982	82	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	76
OQBU4	paddy soil clone M18	AEH50026	84	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	74
OQBU5	paddy soil clone M18	AEH50026	91	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU6	paddy soil clone N2	AEH49944	90	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	72
OQBU7	paddy soil clone CK87	AEH49911	97	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU8	paddy soil clone M86	AEH50064	96	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU9	paddy soil cone NPK5	AEH49982	90	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	72
OQBU11	paddy soil clone NPK38	AEH50003	78	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	81
OQBU12	freshwater sediment clone	CAD45392	85	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	74
OQBU13	paddy soil clone NPK5	AEH49982	88	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU14	paddy soil clone M86	AEH50064	86	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	74
OQBU15	paddy soil clone CK87	AEH49911	81	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU16	paddy soil clone M66	AEH50055	82	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	73
OQBU17	paddy soil clone NPK51	AEH50007	77	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU18	paddy soil clone CK87	AEH49911	81	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	74
OQBU19	paddy soil clone CK50	AEH49888	81	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	76
OQBU20	paddy soil clone M86	AEH50064	85	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	74
OQBU21	marine sediment clone	CAD45402	86	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	76
OQBU22	paddy soil clone CK87	AEH49911	87	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU23	paddy soil clone NPK5	AEH49982	88	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU24	paddy soil clone M86	AEH50064	85	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU25	paddy soil clone M66	AEH50055	88	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	76
OQBU26	paddy soil clone CK87	AEH49911	82	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	74
OQBU27	paddy soil clone M18	AEH50026	83	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	74
OQBU28	paddy soil clone N41	AEH49966	73	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	79
OQBU29	paddy soil clone NPK5	AEH49982	80	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	76
OQBU31	paddy soil clone M18	AEH50026	81	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU32	marine sediment clone	CAD45397	82	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU35	paddy soil clone M44	AEH50041	84	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	76
OQBU36	freshwater sediment clone	CAD45392	87	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	76
OQBU37	paddy soil clone M44	AEH50041	83	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU38	paddy soil clone N41	AEH49966	73	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	80
OQBU39	paddy soil clone CK87	AEH49911	86	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU40	paddy soil clone M18	AEH50026	81	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU41	paddy soil clone CK90	AEH49914	76	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	82
OQBU44	paddy soil clone CK87	AEH49911	85	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU45	paddy soil clone CK50	AEH50026	82	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	78
OQBU46	paddy soil clone CK50	AEH50026	81	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	78
OQBU47	paddy soil clone CK50	AEH50026	81	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU48	paddy soil clone CK87	AEH49911	87	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	77
OQBU49	paddy soil clone M56	AEH50047	74	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	75
OQBU50	paddy soil clone M18	AEH50026	82	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellim6076	YP_824206	78

補足表9 (続き)

QQBU ID.	Closest amino acid sequence	Accession No	Identity (%)	Closest amino acid organism	Accession No	Identity (%)
OQBU51	paddy soil clone CK87	AEH49911	97	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	78
OQBU53	paddy soil clone M18	AEH50026	83	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU54	freshwater sediment clone	CAD45393	76	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	64
OQBU55	freshwater sediment clone	CAD45393	76	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	66
OQBU56	paddy soil clone CK87	AEH49911	85	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU57	paddy soil clone N41	AEH49966	71	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	80
OQBU58	paddy soil clone CK87	AEH49911	80	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU59	paddy soil clone CK87	AEH49911	87	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	78
OQBU60	paddy soil clone M18	AEH50026	82	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU61	paddy soil clone CK76	AEH49903	80	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	86
OQBU62	paddy soil clone CK87	AEH49911	80	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU63	paddy soil clone M86	AEH50064	82	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU64	paddy soil clone CK87	AEH49911	79	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	74
OQBU65	paddy soil clone CK87	AEH49911	82	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU66	freshwater sediment	CAD45393	74	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	65
OQBU69	paddy soil clone M18	AEH50026	83	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	78
OQBU70	paddy soil clone M66	AEH50055	81	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU71	paddy soil clone NPK5	AEH49982	85	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU72	paddy soil clone CK87	AEH49911	80	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU73	freshwater sediment qPCR29	CAD45392	85	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU74	paddy soil clone M18	AEH50026	84	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	79
OQBU75	paddy soil clone N19	AEH49952	77	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	74
OQBU76	paddy soil clone M18	AEH50026	82	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	79
OQBU77	paddy soil clone N19	AEH49952	81	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	76
OQBU78	paddy soil clone CK87	AEH49911	83	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU79	paddy soil clone CK87	AEH49911	80	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU81	paddy soil clone NPK5	AEH49982	81	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	76
OQBU82	paddy soil clone CK87	AEH49911	80	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	76
OQBU84	freshwater sediment qPCR30	CAD45393	75	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	64
OQBU85	paddy soil clone M18	AEH50026	81	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU86	paddy soil clone CK87	AEH49911	85	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU87	paddy soil clone M86	AEH50064	83	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	75
OQBU88	freshwater sediment qPCR29	CAD45392	93	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU89	paddy soil clone NPK5	AEH49982	95	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU91	paddy soil clone	AEH49911	94	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	78
OQBU92	paddy soil clone M5	AEH50020	82	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	71
OQBU93	paddy soil clone NPK51	AEH50007	91	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
OQBU94	paddy soil clone NPK5	AEH49982	97	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> Elim6076	YP_824206	77
Alphaproteobacteria						
OQBU67	freshwater sediment qRCR14	CAD45389	84	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	YP_001417931	67
OQBU80	marine sediment qWM21	CAD45398	79	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	YP_001417931	71
OQBU83	marine sediment qWM21	CAD45398	79	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	YP_001417931	71
Bacteroidetes						
OQBU42	<i>Haliscomonobacter hydrossis</i> DSM 1100	YP_004446992	85	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	YP_001194759	77
OQBU43	paddy soil clone M28	AEH50031	85	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	YP_001194759	73
OQBU52	paddy soil clone M28	AEH50031	84	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	YP_001194759	76
OQBU33	paddy soil clone M28	AEH50031	89	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	YP_001194759	76
Firmicutes						
OQBU10	paddy soil clone NPK53	AEH49990	89	<i>Bacillus</i> sp. R-32656	CAO85946	70
OQBU90	paddy soil clone M33	AEH50033	83	<i>Bacillus</i> sp. R-32709	CAO85940	73
OQBU68	paddy soil clone M33	AEH50033	92	<i>Bacillus</i> sp. R-32709	CAO85940	77
OQBU30	paddy soil clone NPK66	AEH50018	70	<i>Bacillus</i> sp. R-32709	CAO85940	65
OQBU34	paddy soil clone M33	AEH50033	84	<i>Bacillus</i> sp. R-32656	CAO85946	74