

学位論文題名

Studies on Microorganisms Preserved
within Permafrost Ice Wedge in Alaska

(アラスカ永久凍土氷楔中の微生物に関する研究)

学位論文内容の要旨

氷楔(ひょうせつ)はシベリア、アラスカの永久凍土層に一般的に見られる楔形の氷である。氷楔は地表の裂け目に雪解け水が土砂と混ざって入り込み凍結するという一連の現象の繰り返しによって成長し形成される。アラスカ、フェアバンクス市近郊の Fox permafrost tunnel 内部は氷楔が部分的に露出しており、これらの氷を含む凍土層を零度以下に保つことによって人為的に保存している。このトンネル内部に露出している氷楔は楔の形を示しているだけでなく、その形成過程で生じるとされる縦の葉脈構造や凍った際に閉じ込められたガスの気泡が認められることから、形成されてから一度も融解していないことが示唆された。氷楔が形成される過程において、微生物も土砂などと共に氷中に閉じ込められた可能性が考えられる。永久凍土を含む凍った環境からの微生物の分離はすでに報告されているが、氷楔についてはこれまでに行われておらず、何万年もの間氷の中という過酷な環境で形成時に閉じ込められた微生物が生き続けているのかどうか、どのような微生物が生存しているのかを知ることは地球微生物学として非常に興味深い。

従って、本研究は、Fox permafrost tunnel 内の氷楔の年代測定を行い形成された年代を明らかにすると共に、その氷楔内から生きた微生物を平板培養法を用いて分離すること、氷楔中の DNA を単離株と共に 16S リボゾーム RNA 遺伝子に基づいて系統的な解析を行うこと、単離株の温度感受性を調べること、系統的に新規な単離株についての分類学的研究を行うこと、また、トンネル内部に露出する他の氷楔や違うタイプの氷の細菌群集構造を DGGE 法を用いて調べることを目的とした。

氷楔試料の年代測定の結果、この氷楔は約 25,000 年前に形成され現在まで凍り続けているものであった。好氣的平板培養の結果、溶かした氷 1 ml 当たり約 10^3 から 10^6 個のコロニーが増殖し、これらが 25,000 年間氷の中で生き続けていたことが証明された。270 株の細菌を単離し、系統解析を行ったところ、それらは、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Gammaproteobacteria* の 3 つの綱に属する好気あるいは通性嫌気性細菌であった。またそれらのほとんどは孢子形成能をもたない放線菌目の細菌であった。氷から抽出した DNA を用いて作製した 16S のクローン 273 個を解析した結果、それらは単離株と同じ *Actinobacteria* 綱、*Bacilli* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱に属するものであった。全クローン中 90% 以上は *Pseudomonas* 属に近いものであった。種の豊富さを示す Rarefaction 解析の結果、氷楔中微生物の多様性は非常に少ないことが示唆された。単離された真菌類は *Geomyces* sp.、*Phaeococcomyces* sp.、*Leucosporidium* sp. に属するカビ、酵母で

あった。単離株は 4°C および 15°C で増殖し、27°C 以上では増殖しない低温性の細菌および真菌であった。いくつかの単離株は零度以下でも増殖を示し、群集構造解析の結果と併せて、何万年もの間氷の中で適応した微生物が生き残ってきたことが考えられた。16S リボゾーム RNA 遺伝子の全長配列に基づく系統解析の結果、系統樹において基準株から独立したクラスターを形成した単離株群がいくつか見出され、属あるいは種レベルで新規な細菌である可能性が示唆された。単離株 AHU1791^T 他 1 株は *Microbacteriaceae* 科において、AHU1821^T 他 6 株は *Corynebacterineae* 亜目において、それぞれ独立したクラスターを形成し、新属である可能性が示唆され、多相分類法 (polyphasic analysis) に基づいて表現型の性質を中心に調べた。AHU1791^T は好気性、無芽胞、極鞭毛を有するグラム陽性桿菌で、-5°C から 25°C で増殖する低温菌であった。細胞壁は B2_Y 型、ジアミノ酪酸を有し、主要メナキノン MK-12 と 13 あるいは 11 であった。これら表現型は最も近縁な *Subtercola* 属と異なっていたことから、AHU1791^T を新属新種 *Glaciibacter superstes* として提案した。AHU1821^T も好気性、無芽胞のグラム陽性桿菌で、-5°C から 27°C で増殖する低温菌であった。細胞壁は化学型 IV, A1_Y 型で、MK-9(H₂) を有していた。DNA gyrase subunit B に基づいた系統樹においても他の属と独立していることを支持し、表現型と併せて AHU1821^T が新属であると判断した。氷楔中の微生物の存在が明らかとなったが、土砂などと共に閉じ込められた微生物は主に周辺環境に由来するであろうということから、地層の違いや形成過程の違いが影響する可能性が考えられた。そこで、DGGE 法を用いて地層の違う氷楔や氷楔とは構造的に明確に異なる氷塊の細菌群集を比較した。その結果、氷楔中の細菌群集構造と地層との関連性は見出されなかったが、氷楔と氷塊の細菌群集は有為な違いが認められた。このことから、氷楔中の細菌群集構造は地層の違いすなわちそれらの由来する周辺環境よりも形成過程により影響されることが考えられる。

このように、何万年も凍った環境から生きた微生物を分離したが、それらがどのようにして生き残ったかは未解明である。自然環境、特に過酷な環境には“生きてはいるが培養できない”状態の微生物が多く存在するといわれている。実際に、実験室で環境ストレスを与えるとあたかも一端休眠しているかのような状態に陥り、再び増殖しなくなる孢子形成能を持たない細菌種の例がある。氷楔中には水がほとんど存在しないと考えられることから、閉じ込められた細菌もこのような休眠状態に入る可能性が考えられる。近年、増殖能を失った細胞を覚醒させ再び増殖に導くタンパク質 (覚醒因子) が発見された。休眠状態であったであろう氷楔中の細菌が寒天培地上で増殖したことから、氷楔単離株が覚醒因子を発現する能力がある可能性が考えられる。氷楔単離株における覚醒因子についての研究は、氷楔中で生き残ってきた戦略の解明につながるだけでなく、一方で未解明な覚醒因子による覚醒メカニズムの解明にもつながることが期待される。そこで、氷楔単離株に覚醒因子をコードする遺伝子があるかどうかを調べ、その遺伝子の配列的特徴を調べた。その結果、いくつかの氷楔単離株において PCR による覚醒因子遺伝子部分配列の増幅が確認された。覚醒因子遺伝子の存在が認められた単離株のうち、2 株の Open Reading Frame を調べた。その結果、単離株の推定アミノ酸配列は既存の覚醒因子と高い相同性を示し (35% および 45%)、活性中心のアミノ酸も保存されていた。このことから、単離株の覚醒因子が、増殖不可の状態から覚醒させる働きを持つ可能性が考えられたが、それが発現するかどうかは未明である。しかし、氷楔のような特殊な環境からの単離株においての覚醒因子の存在の可能性が示唆されたことにより、得られた配列情報や、単離株のカルチャーコレクションが覚醒因子の覚醒メカニズムの解明などの研究に寄与することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 客員教授 福 田 正 巳 (国際北極圏研究センター
アラスカ大学)

副 査 准教授 湯 本 勲

副 査 准教授 曾 根 輝 雄

副 査 准 教 田 中 みち子

学 位 論 文 題 名

Studies on Microorganisms Preserved within Permafrost Ice Wedge in Alaska

(アラスカ永久凍土氷楔中の微生物に関する研究)

本論文は、英文 158 頁、図 38、表 25、7 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

氷楔はアラスカなどの永久凍土層に見られる楔形の氷である。地表の裂け目に雪解け水が土砂と混ざって入り込み凍結する現象の繰り返しによって成長し形成される。アラスカ中央部にある Fox permafrost tunnel 内部に露出する氷楔は楔の形を保ち、その形成過程で生じる縦の葉脈構造や形成時に閉じ込められた気泡が見られることから、一度も融解していないことが示唆された。形成時に微生物も土砂と共に氷中に閉じ込められた可能性が考えられる。永久凍土を含む凍結環境から微生物が分離されているが、凍土層に無数にあるにもかかわらず氷楔については行われていない。数万年間氷の中という過酷な環境で微生物が生き続けているのかどうか、どのようなものなのか、を知ることは地球微生物学的視点からも非常に興味深く、また微生物リソースの収集という点において重要である。

本研究は、Fox tunnel 内氷楔の放射性炭素年代測定を行い、その氷楔内の微生物を平板培養法、分子生物学的手法により分離・解析すること、分離株の温度感受性を調べることで、系統的に新規な単離株についての分類学的研究を行うことを目的とした。

年代測定の結果、氷楔試料は 25,000 年前に形成され、一度も融解されていなかった。好氣的平板培養の結果、 10^3 - 10^6 CFU/(ml of melted ice)が増殖した。270 株の単離した細菌は、グラム陽性または陰性の好気あるいは通性嫌気性、従属栄養性の真正細菌で、ほとんどは無芽胞の放線菌目に属する細菌であった。氷から抽出した DNA の 16S のクローンは単離株と同じ綱に属するもので、ほとんどは *Pseudomonas* 属に近いものであった。分離された真菌類は、担子菌門あるいは子実菌門に属する無性世代のカビ、酵母であった。単離株は -5°C または 4°C から 20°C で増殖する低温性の細菌、真菌類であった。単離株の比増殖速度と温度の関係を Arrhenius plot で示したところ、それらは零度以下を含む低温に適応していると考えられ、群集構造解析の結果と併せ、何万年もの間氷の中で適応した微生物が生き残ったことが考えられた。単離株を Agriculture Hokkaido University Culture Collection に登録、保存した。

様々な培地を用いて分離を行った結果、系統的に新規な細菌が数多く得られた。分類上有効な表現型

の特徴づけを行ったところ、単離株 AHU1791^T 他 1 株は *Microbacteriaceae* 科において、AHU1821^T 他 6 株は *Corynebacterineae* 亜目においてそれぞれが新属新種であることが示唆され、AHU1791^T 他 1 株を新属新種 *Glaciibacter superstes* として提案した。現在、AHU1821^T 株についても新属新種提案を行っている。

氷楔単離株カルチャーコレクションの利用と応用の観点から、Resuscitation-promoting factor(Rpf)に着目した。Rpf は生きてはいるが培養できない状態の細胞を再び覚醒させる働きを持つタンパク質で、無芽胞放線菌目細菌 *Micrococcus luteus* において初めて見つかった。この菌の生産する Rpf は自身の細胞だけでなく他の細菌種にも覚醒因子として働くことからその応用が期待されているが、どのような種に効くのかまた、覚醒メカニズムそのものも分かっていない。氷楔中に水はほとんどなく、今回得られた単離株は休眠状態で生き残ったと考えられたこと、一度コロニーとして得られたものが、保存可能な形で培養不可能になってしまったこと、氷楔単離株のほとんどは Rpf 及び *rpf* 遺伝子が見つかる無芽胞放線菌であったこと、以上のことから、単離株が *rpf* 遺伝子を持つ可能性が考えられ、その探索を行った。PCR による増幅と配列確認の結果、様々な種類の単離株から *rpf* 遺伝子と相同性を持つ配列が得られ、単離株が *rpf* 遺伝子を持つことが明らかとなった。その中から 2 株の *rpf* 遺伝子 Open Reading Frame(ORF)を決定したところ、Rpf と高い相同性を示し酵素活性に関与するアミノ酸残基も保存され、Rpf と同じ機能を持つ可能性が示唆された。ORF を決定したことによって組換え Rpf の作製が可能になった。組換え Rpf がどのような種の単離株に働くのか、氷楔中の細菌群集に与える影響などを調べることによって Rpf の応用、カルチャーコレクションの利用だけでなく、Rpf メカニズムの解明に寄与することが期待された。

地質学的に特徴的な構造を持つ氷楔に着目し、初めてその中の生きた微生物、微生物群集を明らかにしただけでなく、年代測定を行うことで地質学と結びつけて研究を行った点は独創的である。多角的な微生物の解析を行い氷楔という特殊凍結環境を特徴づけ、そこから得た単離株のユニークなカルチャーコレクションを作製したこと、実際に、その中から新属新種提案を行い、分類学的にも意義のある研究に結びつけた点においても評価できる。また、カルチャーコレクションの作製だけに留まらず、その利用を環境微生物学的あるいは疫学的に重要な Rpf の研究と結びつけ、新たな研究の展開を提示したことにおいても十分に評価しうる。

これらの研究結果のうち、原著論文二報が学術雑誌である ASM News、Applied and Environmental Microbiology に受理された（それぞれ 2006 年 56 巻 10-15 頁、2007 年 73 巻 2360-2363 頁）。また、原著論文一報が学術雑誌である International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology に受理され、出版予定である。

よって、審査員一同は、片山泰樹が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。