

水循環における微生物 DNA インディケーター

静岡大学理学部 地球科学科 加藤憲二・永翁一代

水のあるところに生命活動は営まれる。そして地球表層から地下深部に至るあらゆる水のある環境にバクテリアとアーキアに大別される原核生物（一般には細菌と呼ばれる）が存在する。地球上に最初に登場した生命体に最も近い原核生物は、高温で酸素のない地球環境が冷却されていく中、シアノバクテリアと呼ばれる一群が光合成をおこなって酸素を作り出す自らの働きで地球表層を酸素のある環境へと大きく変化させた。その変化とともに、エネルギーを作り出すというとても大きく大きな進化を経ながら原核生物は分布域を拡大し、今日の生命圏を作り出していった。それは、私たちが極限環境と考える熱くて酸素のない世界からいま地球上で目にする〈環境世界〉への生物圏の拡大でもあった。

空飛ぶ鳥類や昆虫ばかりでなく、植物の種子や孢子、動物の小さな卵など多くの生物にとっては〈移動空間〉にすぎない対流圏においても、ある種の原核生物はそこで生命活動を展開している。そして原核生物の生命活動は地下に向かっては1000メートルを遥かに超えるだろうと考えられている。この稿では、2012年（River Front Vol.74）で地下圏の微生物を紹介した『水循環と地下生命圏』に最新の知見を加えながら研究の展開をよりくわしく紹介し、そして微生物 DNA を水循環における有効なインディケーターとして位置づける世界初の試みを提案したい。

1. 数は少ないが多様、なぜか？

原核生物の数（全菌数）は富士山麓の湧水では1mlあたり 10^3 と海水（ 10^5 ）や河川や湖水（富栄養化していれば 10^6 ）に比べて驚くほど少ないことは先に報告したが（加藤ほか, 2012）、このことは活火山である阿蘇山での観測結果によっても保証された（Furuta, 2014）。地下圏を数年から数十年の年月を経て再び地表へと現れた水の中に含まれる細菌数は、雨水や降雪の中の細菌数に比べてもおおよそ百分の一に密度を減少させているということはどうやら間違いなさそうである（小坂, 2008, 野津田, 2015, Sugiyama, 2015）。地球上の生命圏において、あらゆる環境の中に原核生物は存在しているが、密度から考えると最も小さな値を湧水は示していると考えても良さそうである。富士山

や阿蘇山のような地表表面近くに溶岩流が分布する地質環境では、間隙率の大きな溶岩流が原核生物粒子を濾過するように取り除くことが考えられるが（光谷, 2012）、その上の土壌1g中には $10^8 \sim 10^9$ の原核生物が存在することを考えると、やはり数の少なさはきわめて印象的である。ヨーロッパに広く分布するカルスト地形などを対象とした地下水中の原核生物数と比べても、富士山や阿蘇山に見られる値の低さは特徴的である（Griebler and Lueders, 2009）。では富士山の地下水に含まれる原核生物には多様性は認められないのだろうか？

そうではない。富士山麓の地下水から私たちが遺伝子解析によって得た原核生物の多様性は、今までに世界の地下圏から報告された（Farnleitner et al., 2005; Fukuda et al., 2010; Kato et al., 2009）すべての綱（原核生物の分類群としての比較はしばしばこのレベルで行われる）の原核生物を含んでいた（表1）。あらゆる生態系で主要な構成員となるプロテオバクテリア綱をはじめ、土壌細菌を代表し、酸素のない環境に生息する絶対嫌気性菌を含むファーミキューテス綱、放線菌を含むアクチノバクテリア綱などバクテリア（真正細菌）に8つの綱が含まれる。さらに、高温や高塩濃度などの極限的な環境に広く分布するアーキアの大きな二つの綱も検出されているのである（Segawa et al., 2015）。このことは何を示唆しているのだろうか？ 水循環、とりわけ有効な淡水の供給源としての地下水について考えるとき、最大の未知数である「いったい、ある地質環境の地下圏にどれだけの地下水が蓄えられているのか」、「それはどのように地表へと流れてくるのか」、という大きな問題に繋がって行く情報を提供しようと考えられる。

2. 降雨がどのように地下水に取り込まれていくかが微生物でわかるだろうか？

そもそも地下で涵養される湧水は、雨水や降雪に起源を発する。ではその水の動きの中で微生物粒子はどのような挙動をするのだろうか？ 富士山麓の標高800m地点、朝霧高原で採水した雨水と、同じ場所で採取した土壌を使って野津田君が実験を行い興味深い結果を得ている（野津田, 2015）。野津田君は、30cmの薄い土壌層と60cmの厚い土壌層をカラムで再現し、それぞれのカラムに通

表 1. リボソームデータベースプロジェクト (RDP II) が公開するクラシファイヤーを用いて決定した富士山麓湧水の原核生物の門レベルでの分類と検出されたクローン数.

(a) バクテリア		東麓	東南麓	南麓	西麓
門	特徴				
プロテオバクテリア	グラム陰性細菌。酸素を発生しないタイプの光合成細菌や硫酸化細菌、鉄酸化細菌などの化学合成細菌から脱窒細菌、硫酸還元菌、腸内細菌などの従属栄養細菌など幅広く多様なグループが属する。	30	21	22	33
バクテロイデテス	グラム陰性桿菌。偏性嫌気性で動物の腸内細菌であるバクテロイデス属、好気性または通性嫌気性で色素を生産するサイトファーガ属、土壌、水中などに分布し、セルロースなどを分解するフラボバクテリウム属を含む。	8	7	15	3
ファーミキューテス	ほとんどがグラム陽性菌。好気性および通性嫌気性の納豆菌や通性嫌気性、嫌気性の乳酸菌などを含むバチ綱と絶対嫌気性、芽胞を形成するクロストリジウム綱を含む。	2	2	1	1
プランクトマイセーテス	グラム陰性菌。出芽で増殖し、特徴的な生活環を示す。	1	3	1	1
アシドバクテリア	グラム陰性菌。土壌や堆積物、海水など幅広く環境から遺伝子は検出されるが、培養不能の菌が多い。単離培養されているアシドバクテリア綱は有機栄養性細菌で好酸性である。	1	2	1	1
シアノバクテリア	酸素を発生するタイプの光合成細菌。藍藻とも呼ばれる。	1	5		3
アクチノバクテリア	グラム陽性細菌。多くは分岐した菌糸を形成するなど糸状菌様の形態をとる放線菌が占める。土壌に生息し、抗生物質を生産するものを含む。	1		1	2
ニトロスピラ	大部分が化学合成細菌の硝化細菌。			1	
OD1	イエローストーン国立公園 Obsidian Pool より検出された遺伝子配列をもとに作られた門。まだ培養不能で、嫌気的な水界などから検出されている。	3			2
TM7	ドイツ湿原の泥炭、中央の層 (Torf, Mittlere Schicht) より検出された遺伝子配列をもとに作られた門。まだ培養不能で、活性汚泥、水処理プラント、熱帯雨林の土壌、口腔などさまざまな場所から検出されている。	2			
未分類		5	7	7	12
		54	47	49	58
(b) アーキア		東麓	東南麓	南麓	西麓
門	特徴				
ユーリアーキオータ	メタン生成菌、超好熱性菌、高度好塩性菌、好熱高度好酸性菌など多様なグループを含む古細菌。	5	7	1	13
クレーンアーキオータ	超好熱性菌、好熱好酸性菌を含む古細菌。		3	1	5
未分類		4	2	4	6
		9	12	6	24

(データは Segawa et al., 2015 に基づく。)

常のやや強い降雨 (100mm/day) と非常に強い豪雨 (300mm/day) を想定して雨水を供給し、硝酸イオン濃度 (雨水にも含まれるが土壌水中に多量に含まれる) と原核生物数 (雨水には約 10^5 cell/ml、土壌中には 10^{8-9} cells/g 含まれる) が土壌カラムを通じた水 (つまり地下水) の中のどのようように現れるかを調べた。その結果、(1) 硝酸イオンは降雨強度にかかわらず厚い土壌層から多く溶出し、降雨強度ではなく間隙水中に溶存するイオンの総量が溶出量を支配したと考えられた。(2) 一方、原核生物については降雨強度が強い場合に、より多数の原核生物が溶出水中に認められることが実験的に示された。土壌粒子に付着していたり、土壌粒子が作る間隙に凝集していたりする原核生物が強い雨でたたき出され水中に流入することが考えられた。

大学院生の杉山歩さんは実際に、これを現場での集中的な観測で明らかにした。富士山麓中腹か

ら低地における地下水の平均涵養標高はおおよそ 1700m 付近と考えられるが、標高 726m 地点に湧出する湧水中に、300mm に及ぶ豪雨の後原核生物数が顕著に増加する現象を発見した (Sugiyama, 2015)。2012 年から 2014 年にかけて 4 回の顕著な降雨イベントを対象に 20 回近い現場観測を繰り返して得られた貴重な現場でのデータである。

私たちがこのような観測に取り組んだことには背景がある。2011 年はわが国の災害史上大変な年であったが、富士山麓でも震度 5 を超える地震があったばかりでなく台風による地下水の異常出水が標高 200 m 付近の富士宮市街地を見舞った。降雨量が 300mm を超える豪雨の後、標高 128m に位置する湧水が涵養する“よしま池”の pH が、通常の 7.29 から 7.02 へとわずか 2, 3 週間の間に大きく減少していたのである (Segawa, 2012)。富士山麓に降る雨の pH は 5 前後であることから、これは明らかに上流部で降った雨が地表近くを下流へと流

れ、湧水となって「よしま池」に流れ込んだことを示唆していると推察された。

杉山さんはまず、水そのものの動きを水分子を構成する酸素の安定同位体で調べた。酸素には中心となる ^{16}O のほかに重い ^{18}O がある（詳しくは檜山他 2008などを参照されたい）。このときの雨は重い ^{18}O をより多く含んでいた。降った雨が速い速度で湧出してくれば湧水の酸素安定同位体は重い方へと傾く。このことが降水量 300mm の豪雨後に標高 726 m の地点での湧水に認められたのである。

杉山さんは、さらに高度な遺伝子解析を駆使して原核生物の構成を解析し、土壌由来の細菌が豪雨後間もない下流地点での湧水に混入していることを確認した（未発表）。激しい雨は土壌に付着した原核生物粒子を土壌粒子からはがしとり、地下水にそれは混入する。地下水が湧水となって流出するまでには溶岩流の間隙など様々な粒子を補足する仕組みが存在すると考えられるが、激しい雨に押し出された地下水中にはしっかりと土壌から混入した原核生物粒子が認められたのである。

3. 阿蘇山での好熱性原核生物 DNA の追跡

Riverfront vol.74 (2012) で紹介したように富士山麓の様々な場所で採取した湧水中に至適生育温度が 40°C を超える好熱性原核生物の DNA が検出された（原著論文は Segawa et al. 2015）。それは大量の水を蓄える厚さ 150m ほどの溶岩流から流れ出る地下水だけで湧水が構成されていると考えては説明がつかないことを示している。地温勾配を考えるとおよそ地下 600m 以深で生育していた原核生物が水の動きによって地表へと運ばれたと考えられる。

休火山の富士山と違い、活火山の阿蘇山ではどうであろうか。大学院生の古田さんが熱い湧水（温泉）と冷たい湧水を対象に微生物の遺伝子解析に取り組んだ。阿蘇の内輪山の南山麓、標高 683m に熱水が直接湧き出る垂玉温泉ではもちろんであるが、そこから南東に約 6.2km 離れた標高 518m の竹崎でわき出る冷湧水中にも垂玉温泉とは異なる多様な好熱性原核生物の DNA が検出された。さらに垂玉温泉とは山頂を挟んで反対の北側に自噴する役犬原（やくいんばる）の湧水からも多様な好熱性原核生物の DNA が検出された。湧き出てくる水が熱いか熱くないかにかかわらず、私達が調べた阿蘇の内輪山の湧水からはすべて好熱性原核生物の DNA が複数検出された。調べられたいずれの湧水も高熱環境を通過、もしくはそこに由来する原核生物を含んでいたことになる。湧出する地下

水が熱いか熱くないかは、地下水が最後に高温の熱源に接触してから地表に湧出するまでの時間の問題であって、それがどこからやってきた水かということを説明することにならないのである。では低温の湧水に含まれる好熱性原核生物は、それが活性を發揮し増殖していた高温環境から、湧出時の 15°C 付近へ地下水温の低下という環境変化の中でどれくらいの間生存あるいは DNA を消失することなく存在し続けるのであろうか。この問題に取り組んだのは勝又君である。

4. 好熱性原核生物は温度低下の中でどれくらいの期間生存するだろうか

実験では、水中に溶存する有機物で増殖する従属栄養型の好熱性細菌 *Meiothermus ruber* をモデル生物とした。上述した“よしま池”に湧出する湧水を培地とし、温度を 45°C 、 30°C 、 15°C の三段階に設定して原核生物の状態を観察した。結果の一部を図 2 に示す。 45°C では 12 週を経ても原核生物数に変化は無いが、 30°C では培養開始 5 週目あたりから、さらに 15°C の培養では培養開始 2 週目から細胞は分解を始め消失していくことが示された。およそ 12 週で当初の 100 分の一ほどに生残する原核生物数が減少した。高温環境で生育していた原核生物は地下水の流れに乗って地表へと運ばれる間に低下する温度環境の中で数を減少させるが、数ヶ月なら温度の低下という大きな環境変化にも対応しうることを示したと言えよう。

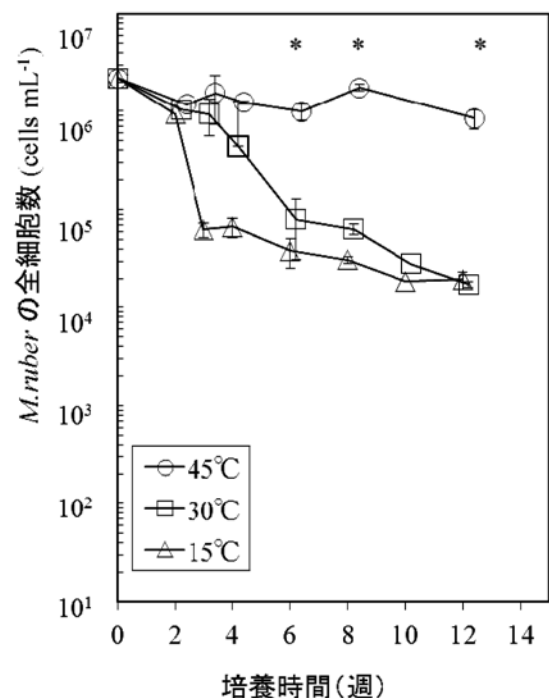


図 1. 現場湧水中における *Meiothermus ruber* の細胞数の経時変化。

一つ新しいことが分かると、新たに次の疑問が現れるのが科学である。そのようにして科学は私達に自然の姿を見せてきた。フロンや同位体を使った富士山地下水の地下圏での滞留時間は20年から35年と推定されている。地下水が降水から湧出までたどるプロセスを地下浸透の過程と、地下からの湧出の過程の二成分に分けて考えることができるとしても、例えば地下600mの高温環境から地下水が地表へと運ばれるのに要する時間は“年”のオーダーではないかと考えるのが常識であろう。数ヶ月では足りない。私達は大きな問題にまた直面した。地下圏での水の動きは一体どのようになっているのだろうか。

5. 再び富士山地下圏へ

富士山麓の湧水から検出された好熱性原核生物のDNAを一つの分子系統樹の中に書き込んでみた

(図2)。アーキアに属するのはイエローストーンから検出されていることが分かり、バクテリアでは温泉のバイオマットや深部地下圏あるいは動物に共生するものにさらに類縁性が高いものなどさまざまな高温環境から見つかった原核生物の仲間が地下圏で活動していることが示唆され、その一部が地下水の流れによって地表へと運び出されているという微生物の大きな旅路が見えてくる。原核生物という生き物がもたらしてくれる情報は、それはどのような環境で生育するのか、つまりどこからやって来たのか、という情報だけではなく、どれくらいの時間の間にやって来たのか、ということをも示唆する貴重な情報をも備えているように思われる。“遠くからやってくる者”が、必ずしも“遅く到着する”とはかぎらないのではないだろうか。地下圏での水の動きはきわめて複雑だと思われる。

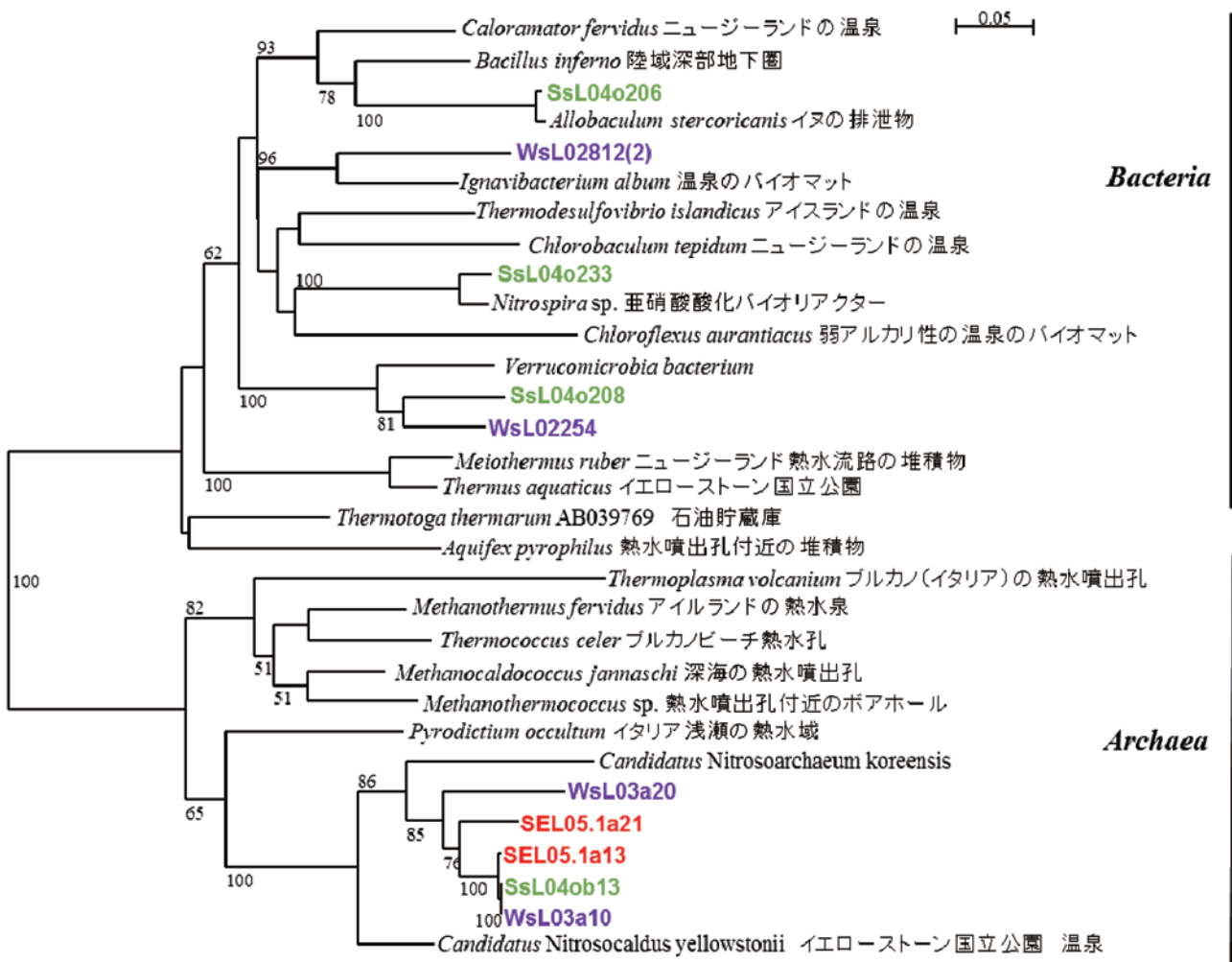


図2. 主な好熱性原核生物の系統樹. 緑文字は富士山南麓、赤文字は富士山東南麓、紫文字は富士山西麓から検出されたクローンを示す。

湧水は地下圏のさまざまな場所を流れる地下水がブレンドされて地表へと湧出したものであり、湧出水の化学成分の分析結果は、ブレンド後の値を示している。これに対して、水の中の微生物DNAはブレンド前のモルトともいべき水の由来を表すメッセージを携えているといえるのではないだろうか。

文献

- Farnleitner A.H., Wilhartitz I., Ryzinska G., Kirschner A.K.T., Stadler H., Burtscher M.M., Hornek R., Szewzyk U., Herndl G., Mach R.L., 2005, Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environmental Microbiology*, 7, 1248-1259.
- Fukuda A., Hagiwara H., Ishimura T., Kouduka M., Ioka S., Amano Y., Tsunogai U., Suzuki Y., Mizuno T., 2010, Geomicrobiological properties of ultra-deep granitic groundwater from the Mizunami Underground Research Laboratory (MIU), central Japan. *Microbial Ecology*, 60, 214-225.
- Furuta, T., 2014, A comparative study on prokaryotic community constituents in springwater of volcanic mountains, Mt. Aso and Mt. Fuji. 静岡大学大学院理学研究科地球科学専攻 修士論文, pp. 42.
- Griebler, C. and Lueders, T., 2009, Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater biology*, 54, 649-677.
- 檜山哲哉, 阿部理, 栗田直幸, 藤田耕史, 池田健一, 橋本重将, 辻村真貴, 山中勤, 2008, 水の酸素・水素安定同位体を用いた地球水循環研究と今後の展望. *水文・水資源学会誌*, 21, 158-176.
- 加藤憲二, 瀬川卓也, 永翁一代, 2012, 水循環と地下生命圏—富士山地下圏を例に. *Riverfront*, 74, 12-16.
- Kato K., Nagaosa K., Kimura H., Katsuyama C., Hama K., Kunimaru T., Tsunogai U., Aoki K., 2009, Unique distribution of deep groundwater bacteria constrained by geological setting. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 569-574.
- 勝又弘貴, 2015, 富士山麓湧水における異なった温度条件下での好熱性細菌の生残性, 静岡大学理学部地球科学科 卒業論文, pp. 33.
- 小坂正道, 2008, 富士山地下圏における地下水と岩石の相互作用と細菌の分布. 静岡大学理学部地球科学科 卒業論文, pp.45.
- 光谷大樹, 2012, 溶岩の地下水と原核生物への影響 - バッチ培養による解析. 静岡大学理学部地球科学科 卒業論文, pp. 38.
- 野津田健, 2015, 降雨強度の違いが土壌層を通過後の地下水へどのように影響するか. 静岡大学理学部地球科学科 卒業論文, pp. 55.
- Segawa, T., 2012, Chemical properties of springs and distribution and diversity of its prokaryotes at the foot of Mt. Fuji. 静岡大学大学院理学研究科地球科学専攻 修士論文, pp. 53.
- Segawa, T., Sugiyama, A., Kinoshita, T., Sohrin, R., Nakano, T., Nagaosa, K., Greenidge, D. and Kato, K., 2015, Microbes in groundwater of a volcanic mountain, Mt. Fuji; 16S rDNA phylogenetic analysis as a possible indicator for the transport routes of groundwater. *Geomicrobiology Journal*, DOI:10.1080/01490451.2014.991811.
- Sugiyama, A., 2015, Multiple analyses to chase the signature of direct impact of rainfall into groundwater in Mt. Fuji. 静岡大学大学院理学研究科地球科学専攻 修士論文, pp. 60.