



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	氷河やアイスコア中のバクテリアに関する研究
Author(s)	瀬川, 高弘
Citation	低温科学, 70, 173-180
Issue Date	2012-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49068
Type	departmental bulletin paper
File Information	LTS70_024.pdf



氷河やアイスコア中のバクテリアに関する研究

瀬川 高弘^{1),2)}

2012 年 1 月 13 日受付, 2012 年 1 月 18 日受理

氷河生態系は非常にシンプルな構造を持つため、他の生態系では困難な、総合的な生態系研究の理想的な対象となるばかりでなく、雪氷微生物はアイスコア解析における古環境復元の新たな環境指標となることが報告されている。氷河上には雪氷環境に適応したごく少数の種類のバクテリアが増殖し、それぞれ氷河上の異なる環境に適応している。また、雪氷微生物は他の寒冷な環境からも検出されるが、雪氷環境のみに特殊化した微生物ではなく、土壌や淡水環境などにも多く生息していることが明らかになってきた。さらにここでは、氷床アイスコア中の微生物解析についても議論する。

Bacterial communities in snow and ice environments

Takahiro Segawa^{1,2}

Bacteria growing in the snow and ice of the glacier are important as decomposers of glacier ecosystems and bacteria in ice cores could be used as new environmental markers for past environmental studies. To clarify altitudinal changes in the bacterial community on the glacier, we analyzed bacterial 16S rRNA gene by PCR amplification. Analysis revealed the presence of 100 bacterial OTUs; however, 17 major OTUs accounted for 57-87% of the clone library at each site, suggesting that they formed the major part of the bacteria on the glacier. Based on the dominant phylotypes, the bacterial community on the glacier could be divided into three types, corresponding to the snow-covered, snow- and ice- covered, and bare-ice areas of the glacier. Our results suggest that a relatively limited number of bacteria predominate and that each phylotype is adapted to a distinct set of conditions on the glacier. Estimates by BLAST search of the source environments of relatives to the 16S rRNA gene sequences on the glacier suggest almost all were from soils and fresh waters, and very few from snow and ice environments. Based on geographical records in the database, all bacteria were matched to those recorded from the Polar Regions. The results suggest that the bacterial communities on the glacier are common in cold regions of the world and are likely to not be specialized members of the snow and ice biota but also inhabitants of soil and freshwater environments.

1. 氷河上で生息するバクテリア

近年、氷河や雪渓などの寒冷な雪氷環境にも、昆虫や甲殻類、ミミズ類、藻類などの多様な生物が存在し、特殊な生態系を形成していることがわかってきた (Kohshima, 1984, Takeuchi et al., 2001b, Yoshimura et al., 1997)。しかしながら氷河生態系のバクテリア、およびシアノバクテリアの生態に関しては、まだほとんど報告が無く、どのような種類が氷河の雪氷環境で増殖してい

るのかさえ明らかにされていなかった。

そこで、従来あまり生態的知見が得られていなかった氷河生態系のバクテリアの生態を明らかにする事を目的に、アラスカの Gulkana 氷河を対象に遺伝子解析による微生物分析を行った (図 1)。Gulkana 氷河上の高度の異なる 5 地点で採取された雪氷試料から DNA を抽出し、試料中の DNA 量比が保存される低サイクル PCR にて 16S rRNA 遺伝子の増幅をおこなった。増幅産物をクローニング、シーケンシングし、塩基配列を相同性検索によりバクテリア種を推定した。その結果、全部で 100 OTU (Operational taxonomic unit) のバクテリアが検出された (Segawa et al., 2010a)。氷河上で増殖している種は、量的に多く含まれると考えられるが、クローンライブラリー中で 1% 以上を占めたのは 17 OTU であった (表 1)。興味深いことにこの上位 17 OTU

1) 情報・システム研究機構 新領域融合研究センター

2) 国立極地研究所

¹ Transdisciplinary Research Integration Center, Tokyo, Japan

E-mail: segawa@nipr.ac.jp

² National Institute of Polar Research, Tokyo, Japan

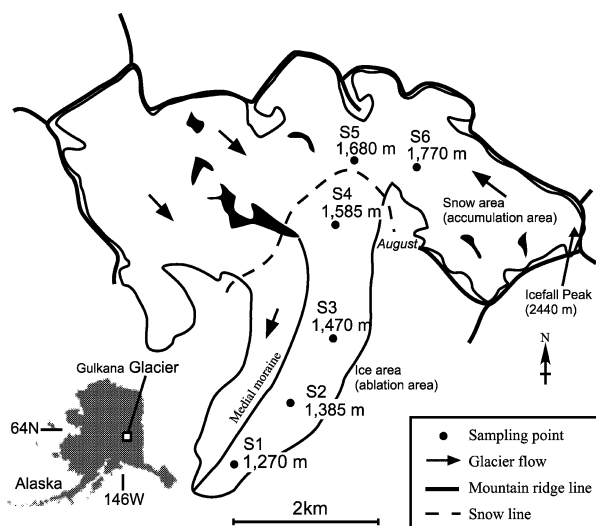


図1：アラスカ Gulkana の地図とサンプリング地点

は、各ライブラリーの57%から87%を占めることや、約半数が *Bacteroidetes* に分類されることがわかった。またこの17 OTU には、南極の土壌から単離された好冷菌など、寒冷環境からの記載があるものが7つ含まれていた。以上の事実から、これらのバクテリアが氷河の雪氷中で生息している寒冷環境に適応したバクテリア種であることが示唆された。

次に、氷河で増殖しているバクテリアを特定することを目的に、氷河の環境に近い、低温・貧栄養条件下で培養実験を行った。雪を融かして滅菌後アガロースで固めた融雪水培地や BBM 培地などの貧栄養培地に現場でサンプルを接種し、低温下（4℃）で2週間培養し、16S rRNA 遺伝子解析をおこなったところ、21の系統群のバクテリアが培養された。この中にはクローン比率上位17 OTU のうちの5つと、好冷菌や耐冷菌であるとの記載があるものが5つ含まれていた。したがって、これらの種は氷河の雪氷中でも増殖している可能性が高いと考えられる。

しかし、雪培地には量的限りがあることや、植え継ぎ

過程で問題が生じたため、同氷河にて低栄養培地（R2A, 希釈 R2A, LB, 希釈 LB, キシロース培地）を用いて、4, 15, および25℃下で培養実験をおこなった。その結果、50倍希釈 R2A 培地を用いて、4℃で培養したときに最大コロニー数（ 10^4 – 10^5 CFU mL⁻¹）を示し、低温・貧栄養環境に適応したバクテリアが多く生息していると考えられた（Segawa et al., 2011）。この培養によって得られた234株について、16S rRNA 遺伝子による系統解析を行った結果、 β -および γ -*Proteobacteria* に属する株が優占していることが分かった。また、培養株全体では34の系統群を示し、このうち26群（77%）は寒冷環境からの報告例があることから、寒冷な環境に共通した種が Gulkana 氷河にも存在することが示唆された。しかし、クローンライブラリーの結果と一致した培養株は5群であり、さらに上位17 OTU とは1群しか一致しなかった。このことから、氷河上の優占種を培養するには、氷河の環境に近い融雪水培地がより適していることが分かった。

氷河上の高度変化によって、それぞれのバクテリアのクローン比率（その種が全バクテリア量に占める割合、優占度）を調べたところ、17 OTU の高度分布様式は、下流ほど多い下流タイプ、中流部で多くなる中流タイプ、上流ほど多い上流タイプの3タイプに分類できた（図2）。このことから、氷河上のバクテリアは種によって優占する高度が異なり、それぞれの種が氷河上の異なった環境に適応していることが示唆された。このような氷河上のバクテリア群集の高度分布は、DGGE 解析によるバンドパターンの分析や、そのクラスター解析の結果からも支持された。

各高度のバクテリア群集に含まれる種数や多様性指数の解析により、氷河上のバクテリア群集の多様性は、上流部の雪環境で最も低く、雪環境と氷環境の移行地帯に相当する中流部の雪線付近で最大となることが明らかになった。以上のような、バクテリア種による高度分布様

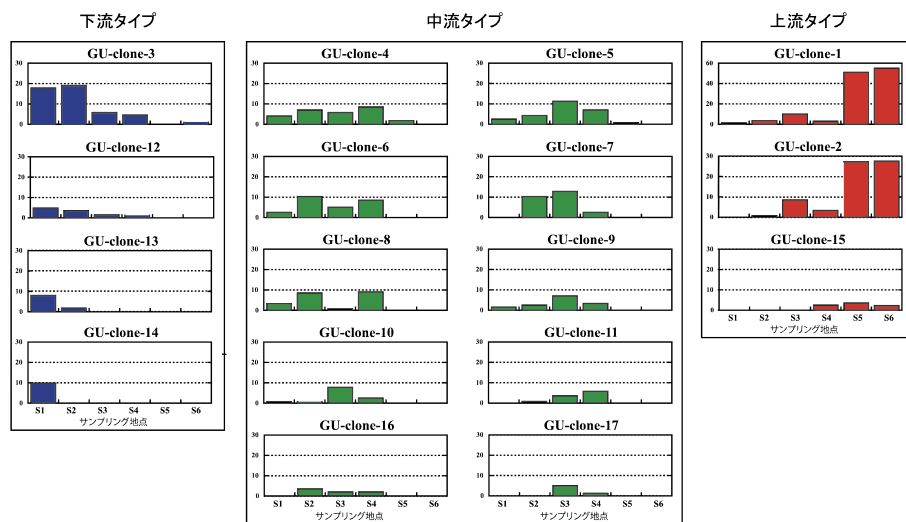


図2：Gulkana 氷河における、上位17 OTU のクローン比率

表 1: Gulkana 氷河から検出された上位 17 OTUs のバクテリア

Clone No.	Closest GenBank relative Closest GenBank cultured relative	一致率%	割合%	Accession Number	Bacterial group
GU-clone-1	— <i>Hymenobacter soli</i> PB17	— 96.0	20.7	— AB251884	<i>Bacterioidetes</i>
GU-clone-2	— <i>Pedobacter</i> sp. N7	— 90.0–90.1	11.2	— EU109726	<i>Bacterioidetes</i>
GU-clone-3	— <i>Flexibacteraceae</i> bacterium VUG-A42aa	— 96.8	8.0	— EU155012	<i>Bacterioidetes</i>
GU-clone-4	— Arctic sea ice bacterium ARK10173	— 99.7–99.8	4.5	— AF468440	<i>Actinobacteria</i>
GU-clone-5	— <i>Pedobacter terrae</i> strain DS-57	— 93.1	4.3	— DQ889723	<i>Bacterioidetes</i>
GU-clone-6	— <i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	— 92.0–92.3	4.4	— CP000697	<i>Alphaproteobacteria</i>
GU-clone-7	— <i>Bacteroidetes</i> bacterium P3	— 94.9–95.0	4.3	— DQ351728	<i>Bacterioidetes</i>
GU-clone-8	Uncultured bacterium clone 1959-5 <i>Hellobacterium modesticaldum</i> Ice1	96.6–96.7 78.5	3.6	AY425789 CP000930	<i>Firmicutes</i>
GU-clone-9	— <i>Granulibacter bethesdensis</i> CGDNIH1	— 91.6–91.1	2.4	— AY788950	<i>Alphaproteobacteria</i>
GU-clone-10	— <i>Acidobacteria</i> bacterium TPB6011	— 97.5	2.0	— AM887757	<i>Acidobacteria</i>
GU-clone-11	— <i>Acidobacteriaceae</i> bacterium Gsoil 969	— 97.3	1.7	— AB245337	<i>Acidobacteria</i>
GU-clone-12	— <i>Flexibacteraceae</i> bacterium VUG-A33	— 98.7	1.8	— EU155010	<i>Bacterioidetes</i>
GU-clone-13	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> clone CB_07 <i>Sphingobacteriales</i> bacterium HU1-GD23	95.7 94.1	1.6	EF562550 FJ177530	<i>Bacterioidetes</i>
GU-clone-14	Uncultured bacterium clone MIZ16 Betaproteobacterium BP-5	98.5 95.8	1.6	AB179507 AY145571	<i>Betaproteobacteria</i>
GU-clone-15	— <i>Pedobacter terrae</i> strain DS-57	— 93.3	1.4	— DQ889723	<i>Bacteroidetes</i>
GU-clone-16	— <i>Hellobacterium chlorum</i>	— 79.4	1.3	— M11212	<i>Firmicutes</i>
GU-clone-17	— <i>Novosphingobium acidiphilum</i> FSW06-204d	— 99.3	1.0	— EU336977	<i>Alphaproteobacteria</i>

式の違いや、高度による群集構造や種の多様性の変化は、この氷河上の一次生産者である雪氷藻類の高度分布様式や、高度による群集構造や種の多様性の変化と非常によく似ていることが明らかになった (Takeuchi, 2001)。これは両者が、氷河上で高度によって変化する同じ環境要因、おそらく氷河表面の状態の変化に対応しているためであると考えられる。

これらの結果は、アイスコア解析や氷河生態系モデルの構築にも貢献できると考えられる。たとえば、本研究によって氷河上で増殖するバクテリアが特定され、その高度分布などの生態も明らかになったため、今後は、アイスコアに含まれるこれらの微生物を古環境復元に利用

することが可能になると考えられる。また、将来の環境変動に対して雪氷生態系がどのように応答するかを予測するための生態系モデルの構築にも貢献できると考えられる。

2. 氷河上のシアノバクテリアや微生物分散

雪氷中で増殖する藍藻類 (シアノバクテリア) は、氷河生態系の一次生産者として、世界各地の氷河に生息していることが分かっていた (Porazinska et al., 2004, Takeuchi and Li, 2008, Uetake et al., 2010)。またシアノバクテリアは、氷河表面のアルベドを低下させている

生物由来の有機物形成にも、バクテリアとともに重要な働きをしていると考えられている (Kohshima et al., 1993, Thomas and Duval, 1995, Hoham and Duval, 2001, Takeuchi et al., 2001a). しかし従来の雪氷微生物研究では、細胞の直接観察による分類、同定、定量しかおこなわれてこなかったため、藍藻類に関しては、まだほとんど種レベルでの研究はなされておらず、雪氷中にはどのような種類のシアノバクテリアが、どの程度の密度で存在しているのか、またそれぞれの種の地理的分布などが分かっていないのが現状である。そこで、氷河上で増殖するシアノバクテリアや地理的分布様式を明らかにすることを目的に、分子生物学的手法を用いて、中国 Qiyi 氷河に生息するシアノバクテリアの解析をおこなった (Segawa and Takeuchi, 2010)。

顕微鏡観察の結果より 3 種類のシアノバクテリアが観察されたが、16S rRNA 遺伝子解析からは 8 OTU のシアノバクテリアが検出され、遺伝子情報を用いた解析の方がより多くの種類を検出できることが示された (図 3)。16S rRNA 遺伝子の系統解析より、*Oscillatoriales*, *Chroococcales*, および未分類藍藻に分けられ、大部分は *Oscillatoriales* 目の藍藻であった。氷河上のシアノバクテリアと他環境との類似性を相同性検索・Blast により分析したところ (>97%一致), 土壤環境からの記載と一致したものは 40%, 淡水環境からの記載との一致が 38%, 雪氷環境からの記載との一致が 2%であった (表 2)。また、すべてのシアノバクテリ

アが南極や北極からの記載種と高い一致率を示した。以上の結果から、氷河生態系のシアノバクテリアは他の寒冷な地域からも検出されるが、雪氷環境のみに特殊化した微生物ではなく、土壤や淡水環境などにも多く生息していることが明らかになった。

近年、北極と南極などの極域環境の微生物相解析により、微生物の全地球的な分布を示す研究成果が報告されてきている。例えば、南北極の両極の湖から共通の細菌が検出されたという結果 (Pearce et al, 2007) や、低温環境に適応しているシアノバクテリアは、地球上のあらゆる陸上寒冷生物圏に広く分布しているという報告などがある (Jungblut et al., 2010)。しかしながらこれらの報告では、16S rRNA 遺伝子という単一遺伝子の比較

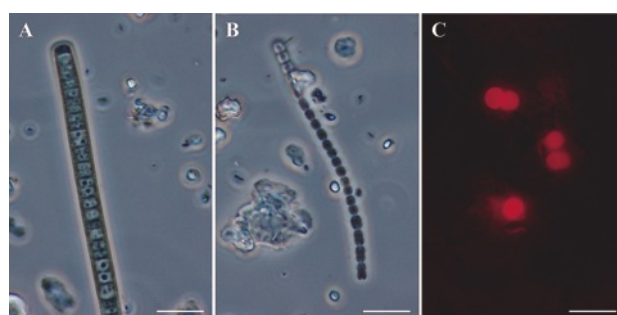


図 3：中国 Qiyi 氷河から観察されたシアノバクテリア (A) *Oscillatoriaceae* cyanobacterium L; (B) *Oscillatoriaceae* cyanobacterium S; (C) *Chroococcales* cyanobacterium. A と B は位相差顕微鏡, C は蛍光顕微鏡による撮影。スケールは 10 μm

表 2：16S rRNA 遺伝子による Qiyi 氷河のシアノバクテリアと他環境との類似性

OTU 番号	環 境 情 報						
	クローン数	雪氷	土壌	淡水	湿原	その他	記載なし
OTU0	136	1(0.7)	73(53.7)	37(27.2)	1(0.7)	3(2.2)	21(15.4)
OTU1	19	1(5.3)	7(36.8)	6(31.6)	5(26.3)	0(0)	0(0)
OTU2	14	0(0)	0(0)	11(78.6)	0(0)	0(0)	3(21.4)
OTU3	51	2(3.9)	29(56.9)	20(39.2)	0(0)	0(0)	0(0)
OTU4	12	0(0)	6(50.0)	6(50.0)	0(0)	0(0)	0(0)
OTU5	43	0(0)	23(53.5)	1(2.3)	0(0)	19(44.2)	0(0)
OTU6	21	2(9.5)	3(14.3)	14(66.7)	0(0)	1(4.8)	1(4.8)
OTU7	57	0(0)	0(0)	40(70.2)	13(22.8)	1(1.8)	3(5.3)
全数	353	6(1.7)	141(39.9)	135(38.2)	19(5.4)	24(6.8)	28(7.9)

OTU 番号	地 域							
	南極	北極	アジア	北米	南米	欧州	その他	記載なし
OTU0	12(8.8)	2(1.5)	3(2.2)	52(38.2)	10(7.4)	25(18.4)	6(4.4)	26(19.1)
OTU1	5(26.3)	0(0)	0(0)	0(0)	7(36.8)	7(36.8)	0(0)	0(0)
OTU2	5(35.7)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	6(42.9)	0(0)	3(21.4)
OTU3	1(2.0)	14(27.5)	0(0)	2(3.9)	29(56.9)	4(7.8)	0(0)	1(2.0)
OTU4	1(8.3)	1(8.3)	0(0)	1(8.3)	7(58.3)	2(16.7)	0(0)	0(0)
OTU5	1(2.3)	0(0)	0(0)	14(32.6)	21(48.8)	2(4.7)	0(0)	5(11.6)
OTU6	11(52.4)	0(0)	0(0)	2(9.5)	2(9.5)	5(23.8)	0(0)	1(4.8)
OTU7	4(7.0)	1(1.8)	0(0)	2(3.5)	0(0)	40(70.2)	1(1.8)	9(15.8)
全数	40(11.3)	180(5.1)	3(0.8)	73(20.7)	76(21.5)	91(25.8)	7(2.0)	45(12.7)

ヒットした件数と、全ヒット件数中の割合を括弧で表す

しか実施していない。また、微生物の塩基配列情報が DNA データベース上に完全に網羅されているわけではないため、検出された微生物種が広域分布種のコスモポリタンであるのか、それとも地域的な分布種のエンデミックな種であるのかを判断するのは難しいと考えられる。なお、Bahl et al. 2011 による最近の報告によると、世界各地から採取されたシアノバクテリア *Chroococcidiopsis* の 16S rDNA や ITS 領域の解析結果により、*Chroococcidiopsis* の分布様式は、近年に分布を広範囲に拡大したのではなく、現代の大陸の形成以前に形成されたことを示唆しており、今後の微生物分布研究の参考になるであろう。

3. アイスコア中の微生物解析

氷河や氷床に長年にわたって堆積した雪や氷は、過去の環境情報を封印した、降水と大気化石のようなものである。アイスコアを取り出して分析すれば、過去の環境変動について多くの情報を得ることができる。将来の環境変動を予測するためには、過去の環境変動に関する理解が大きな手がかりとなるため、最近では、古環境復元を目的に、多くの地域で氷河ボーリングが行われ、アイスコア解析が行われるようになった。しかし、従来のアイスコア解析では、物理・化学的分析しか行われてこなかったが、中低緯度地域のアイスコアにおいて、雪氷環境で増殖する雪氷微生物を環境指標として利用することで、従来得られなかった環境情報が復元できることが報告されている (Uetake et al., 2006, Yoshimura et al., 2000)。本研究では、南極氷床アイスコア中バクテリアを古環境指標としての可能性の検討をおこなった。

3.1 南極沿岸域のアイスコア解析

南極アイスコア（氷期のヤマト山脈の氷試料と間氷期のミズホの氷試料）に含まれる微生物解析をおこなった（図4）。DNA 分析などによる雪氷微生物分析法を確立するために、ごく少量の雪氷試料からの DNA 抽出や、各種ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールを用いて基礎的な実験をおこなった。約 1000 cm³ の氷試料を用いて、氷周囲に付着しているコンタミネーションを滅菌済みのセラミックナイフにて除去した後、氷試料を融解させ、滅菌済みの 0.22 μm フィルター上に微生物を濾過させた。フィルターから DNA 抽出をおこない、原核生物の 16S rRNA 遺伝子プライマーを用いた PCR 増幅をおこない、塩基配列の解読をおこなった。遺伝子解析の結果、全部で 45 OTU のバクテリアが検出され、約半数 (21 OTU) が単離株と 98% 以上の一致率であったが、残りは未記載種であった (Segawa et al., 2010b)。間氷期のミズホのアイスコアからは 33 OTU、氷期のヤマトのアイスコアからは 20 OTU のバクテリアが検出され、また 8 OTU が両アイ

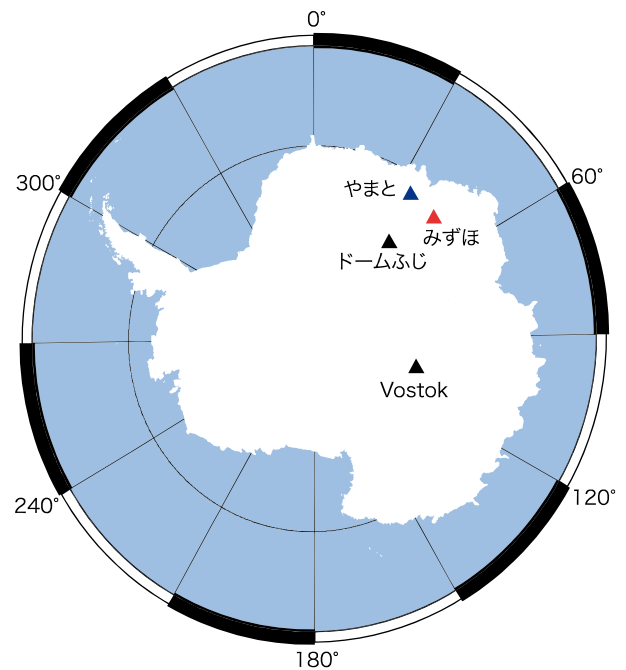


図4：南極氷床のアイスコア試料の掘削地点（ヤマト山脈とミズホ基地）

スコアから検出された。シンプソン指数 (1/D) はミズホ試料では 24.1、ヤマト試料では 5.7 となり、OTU 数とシンプソン指数はミズホ試料の方が高い結果となった。ミズホ試料では *Bacteroidetes* が優占種であったが、氷期のヤマト試料では *γ-proteobacteria* が優占種であった（図5）。

得られた遺伝子情報を DNA データベースと照合させ、アイスコア中にはどのような種類の微生物が含まれているかの推定をおこなった。36 OTU が 98% 以上の一致率で、データベースから近縁種が検出された。ヒットしたバクテリアの生息環境を調べたところ、土壌、海水、淡水、雪氷、腸内などの様々な環境からの記載があった（図6）。氷期のヤマトの試料は間氷期のミズホの試料にくらべ、淡水、海水、高熱、氷河、植物からの記載種の割合が高くなったが、動物から記載された割合が低くなった。間氷期のミズホ試料ではバクテリアの密度と種数が多くなったことや、動物起源のバクテリアが多く検出されたこと、鳥の腸内細菌は間氷期試料からのみ検出されたことは、間氷期には海水の張り出しが少なくなり、動物の生息域が近かったことが原因であると考えられる。その他の環境、特に遠方の環境（淡水、海水、植物など）からのバクテリア種は氷期のヤマト試料の方が多かったことは、氷期では遠方からの輸送が大きかったことを示唆している。ミズホ試料に動物起源のバクテリアが多く、ヤマト試料に遠距離輸送されたと考えられるバクテリアが多いことは、2つの試料中のバクテリア種のグループの違いにも反映されたと考えられる。本研究から間氷期と氷期で検出されるバクテリアの種類や起源に大きな違いがあることがわかり、南極氷床

ミズホアイスコア(間氷期)

ヤマトアイスコア(氷期)

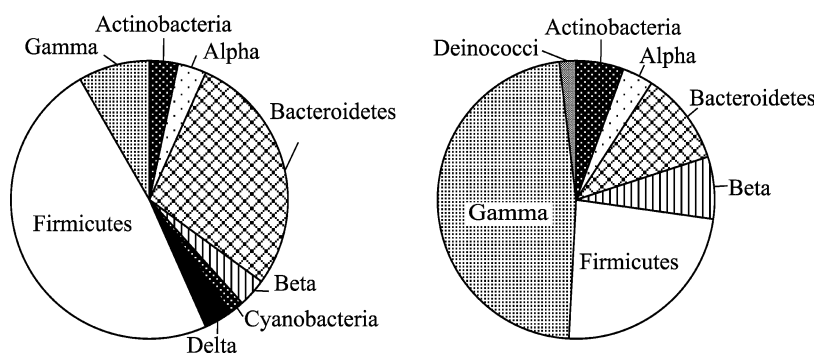


図5：ミズホ基地およびヤマト山脈から掘削されたアイスコア中のバクテリアグループの割合

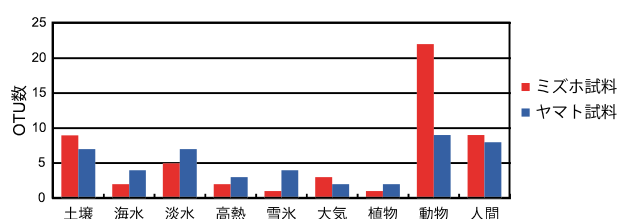


図6：16S rRNA 遺伝子によるミズホおよびヤマト試料中のバクテリアと他環境との類似性

アイスコア中のバクテリアの古環境指標としての可能性が示された。

3.2 古代DNAの先行研究や南極ドームふじコアの微生物解析にむけて

現在、南極氷床下の水層と岩盤は、人類に残された最後のフロンティアのひとつとされ (Pearce, 2009), その生態系の解明に世界的な期待が集まっている。南極氷床の下には150以上の氷床下湖が存在し、その中でも最大であるのがボストーク湖である (琵琶湖の約20倍の面積) (Priscu et al., 2003, Siebert et al., 2005)。かなり長い間外界と隔離されていると推測されており (一説には300-1500万年), その生命探査に期待が集まっている。南極ボストーク基地での氷床アイスコア (accretion ice) に含まれる微生物の生命探査をおこなった研究では微生物細胞が観察され, 原核生物の16S rRNA遺伝子解析の結果, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* などのバクテリアが検出された。また, LIVE/DEAD BacLight Kit による生死判別分析の結果, 一部の細菌は生息していることが示唆された (Christner et al., 2006, Priscu et al., 1999)。しかし, 氷床掘削過程, 実験過程にともなうコンタミネーションの可能性も議論されている段階である。

1980年代以降, 古代試料からのDNA研究がおこなわれ, 多くの論文が発表されてきた (Willerslev and Cooper, 2005)。その中には数千万年から数億年という非常に古い時代の試料からも微生物が培養されたという報告もあるが, 追認はされていない。Willerslev et al.,

2007は, グリーンランド氷床の底付近の氷から取り出した樹木や昆虫のDNAから, グリーンランドが数十万年前には本当に森に覆われていたことを示した。さらにアミノ酸分析や, COI 遺伝子を用いて relatively rate test をおこない, コンタミネーションではないことも示している。科学的な信憑性やコンタミネーションへのディフェンスなどの観点からも, 非常に興味深い。

ドームふじ基地は南極の中央に位置するため, ヤマト試料やミズホ試料などの沿岸域の試料よりも細胞数が少ないことが予想される。近年のボストーク基地における氷試料の解析によると, 表面付近の試料のバクテリア細胞は0-0.02細胞/mlであり, アイスコア中には0-24細胞/mlと非常に少ないことが報告されている (Bulat et al., 2011)。このように, 細胞数の極めて少なく, またそのほとんどが難培養微生物である氷床アイスコア解析では, コンタミネーションの問題がクローズアップされてくる。アイスコア試料からコンタミネーションを回避しながら無菌環境下で微生物を採取するための技術開発は, 氷床コアの微生物を研究するうえで最も重要なステップである。アイスコア融解の過程でコンタミネーションの可能性が否定できなければ, その後の解析結果は信頼性が得られなく, 価値のないものになってしまうためである。

これまでアイスコアから氷試料内部を採取するための融解装置は主に欧米の研究機関によって開発され, 様々なアイスコアを対象に用いられてきた (Cole-Dai et al., 2006, Osterberg et al., 2006)。しかしこれらの研究は主に化学分析や微粒子分析であったため, 生物学的分析におけるコンタミネーションの問題については考慮された装置ではなかった。そこで低温科学研究所の新堀邦夫氏と共同で, これまで開発されてこなかった無菌的に氷試料内部を採取する融解装置の開発をおこなった (図7)。この融解装置を用いることで, 氷試料のクリーンな中心部分と, コンタミネーションされている周辺部の (外部氷試料) とを別々に採取することができる。バクテリア

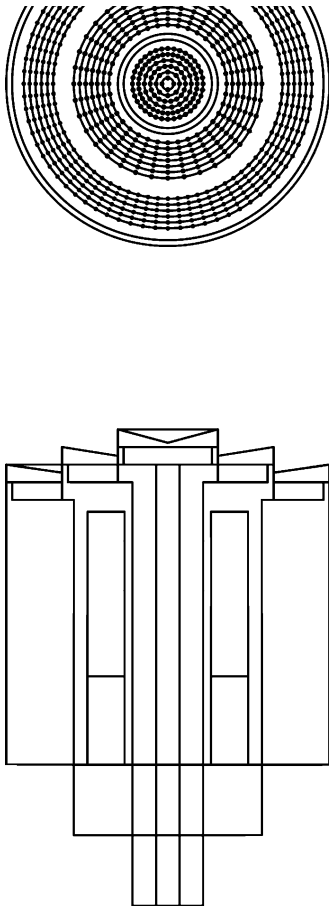


図7：開発したアイスコア融解装置

と同程度の大きさの蛍光ビーズを氷表面に高濃度に塗布した実験氷を作成し、検証実験をおこなった結果、外部氷試料からのみ蛍光ビーズが検出された。また、人工的に合成したDNA溶液を上記と同様に塗布した検証実験においても、外部氷試料からのみ合成DNAが検出された。これより、開発した融解装置は氷表面のコンタミネーション部分を除去し、正確に氷内部のみを採取できることがわかった。

細胞数の極めて少ない南極氷床アイスコア研究においては、融解させたサンプルから、いかにして微生物細胞を分離・回収するかも、非常に重大な課題である。メンブレンフィルター上に試料の濃縮をおこない、そこからDNA抽出をおこなう一般的な手法では、非常に高いバイアスがかかり正確な微生物群集を解明できなかったり、DNA抽出時のロスなどにより微生物が検出されなかったりする問題がある。近年、マイクロマンニピュレーションや、セルソーター、レーザーマイクロダイゼクションなどにより微量細胞を単離させて遺伝子解析をおこなう研究も報告されており（Heywood et al., 2010, Hongoh et al., 2008, Yanagihara et al., 2011）、氷床コア微生物解析においてもこのような最先端の技術が必要になってくるであろう。

ドームふじ基地での第二期深層掘削計画の最終年と

なった2007年に、約3035 m深の氷床最下部から氷試料が掘削された。3034 m深の約72万年以上前の氷試料から融解装置を用いて無菌的に試料を抽出し、電子顕微鏡による観察により、桿状バクテリアが検出された。また、3035 m深から得られた水層から、各種バクテリアの遺伝子配列の検出に成功した。岩盤が氷床に封じ込められる前の古代の環境に由来する微生物である可能性があり、現在、全遺伝子情報データーによる解析がおこなわれている。

引用文献

- Bahl J, Lau MCY, Smith GJD, Vijaykrishna D, Cary SC, Lacap DC, Lee CK, Papke RT, Warren-Rhodes KA, Wong FKY, McKay CP, Pointing SB (2011) Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria. *Nature Commun* 2: 163. doi:10.1038/ncomms1167
- Bulat SA, Alekhina IA, Marie D, Martins J, Petit JR (2011) Searching for life in extreme environments relevant to Jovian, Åds Europa: Lessons from subglacial ice studies at Lake Vostok (East Antarctica). *Advances in Space Research*, 48, 697-701.
- Christner BC, Royston-Bishop G, Foreman CM *et al.* (2006) Limnological conditions in Subglacial Lake Vostok, Antarctica. *Limnology and Oceanography*, 51, 2485-2501.
- Cole-Dai J, Budner DM, Ferris DG (2006) High speed, high resolution, and continuous chemical analysis of ice cores using a melter and ion chromatography. *Environmental Science and Technology*, 40, 6764-6769.
- Heywood JL, Sieracki ME, Bellows W, Poulton NJ, Stepanauskas R (2010) Capturing diversity of marine heterotrophic protists: one cell at a time. *ISME J*, 5, 674-684.
- Hoham RW, Duval B (2001) Microbial ecology of snow and freshwater ice with emphasis on snow algae. In: *Snow ecology: an interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems*. (eds Jones HG, Pomeroy JW, Walker DA, Hoham RW) pp Page., Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T *et al.* (2008) Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*, 322, 1108-1109.
- Jungblut AD, Lovejoy C, Vincent WF (2010) Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. *ISME J*, 4, 191-202.
- Kohshima S (1984) Novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. *Nature*, 310, 225-227.
- Kohshima S, Seko K, Yoshimura Y (1993) Biotic acceleration of glacier melting in Yala glacier Langtang region, Nepal Himalaya. *Snow and Glacier Hydrology*, 218, 309-316.
- Osterberg EC, Handley MJ, Sneed SB, Mayewski PA, Kreutz KJ (2006) Continuous ice core melter system with discrete sampling for major ion, trace element, and

- stable isotope analyses. *Environmental Science and Technology*, **40**, 3355-3361.
- Pearce DA (2009) Antarctic subglacial lake exploration: a new frontier in microbial ecology. *ISME J*, **3**, 877-880.
- Pearce, D. A., Cockell, C. S., Lindstrom, E. S., Tranvik, L. J. (2007) First evidence for a bipolar distribution of dominant freshwater lake bacterioplankton. *Antarctic Science*, **19**, 245-252.
- Porazinska DL, Fountain AG, Nylen TH, Tranter M, Virginia RA, Wall DH (2004) The Biodiversity and Biogeochemistry of Cryoconite Holes from McMurdo Dry Valley Glaciers, Antarctica. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **36**, 84-91.
- Priscu JC, Adams EE, Lyons WB *et al.* (1999) Geomicrobiology of Subglacial Ice Above Lake Vostok, Antarctica. *Science*, **286**, 2141-2144.
- Priscu JC, Bell RE, Bulat SA *et al.* (2003) An International Plan for Antarctic Subglacial Lake Exploration. *Polar Geography*, **27**, 69-83.
- Segawa T, Takeuchi N (2010) Cyanobacterial communities on Qiyi glacier, Qilian Shan China. *Annals of Glaciology*, **51**, 135-144.
- Segawa T, Takeuchi N, Ushida K, Kanda H, Kohshima S (2010a) Altitudinal changes in a bacterial community on Gulkana Glacier in Alaska. *Microbes Environ*, **25**, 171-182.
- Segawa T, Ushida K, Narita H, Kanda H, Kohshima S (2010b) Bacterial communities in two Antarctic ice cores analyzed by 16S rRNA gene sequencing analysis. *Polar Science*, **4**, 214-227.
- Segawa T, Yoshimura Y, Watanabe K, Kanda H, Kohshima S (2011) Community structure of culturable bacteria on surface of Gulkana Glacier, Alaska. *Polar Science*, **5**, 41-51.
- Siegert, M. J., Carter, S., Tabacco, I., Popov, S. and Blankenship (2005) A revised inventory of Antarctic subglacial lakes. *Antarct. Sci.* **17**: 453-460.
- Takeuchi N (2001) The altitudinal distribution of snow algae on an Alaska glacier (Gulkana Glacier in the Alaska range). *Hydrological Processes*, **15**, 3447-3459.
- Takeuchi N, Kohshima S, Goto-Azuma K, Korner RM (2001a) Biological characteristics of dark colored material (cryoconite) on Canadian Arctic glaciers (Devon and Penny ice cap). *Proceeding of the Memoirs of National Institute of Polar Research, Special Issue*, **54**, 495-505.
- Takeuchi N, Kohshima S, Seko K (2001b) Structure, formation, darkening process of albedo reducing material (cryoconite) on a Himalayan glacier: a granular algal mat growing on the glacier. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **33**, 115-122.
- Takeuchi N, Li Z (2008) Characteristics of Surface Dust on Ürümqi Glacier No. 1 in the Tien Shan Mountains, China. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **40**, 744-750.
- Thomas WH, Duval B (1995) Sierra Nevada, California, U. S.A., Snow algae: Snow albedo changes, algal-bacterial interrelationships, and ultraviolet radiation effects. *Arctic and Alpine Research*, **27**, 389-399.
- Uetake J, Kohshima S, Nakazawa F *et al.* (2006) Biological ice-core analysis of Sofiyskiy glacier in the Russian Altai. *Annals of Glaciology*, **43**, 70-78.
- Uetake J, Naganuma T, Hebsgaard MB, Kanda H, Kohshima S (2010) Communities of algae and cyanobacteria on glaciers in west Greenland. *Polar Science*, **4**, 71-80.
- Willerslev E, Cappellini E, Boomsma W *et al.* (2007) Ancient Biomolecules from Deep Ice Cores Reveal a Forested Southern Greenland. *Science*, **317**, 111-114.
- Willerslev E, Cooper A (2005) Review Paper. Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 3-16.
- Yanagihara K, Niki H, Baba T (2011) Direct PCR amplification of the 16S rRNA gene from single microbial cells isolated from an Antarctic iceberg using laser microdissection microscopy. *Polar Science*, **5**, 375-382.
- Yoshimura Y, Kohshima S, Ohtani SA (1997) Community of snow algae on a Himalayan glacier. *Arctic and Alpine Research*, **29**, 126-137.
- Yoshimura Y, Kohshima S, Takeuchi N, Seko K, Fujita K (2000) Himalayan ice core dating with snow algae. *Journal of Glaciology*, **46**, 335-340.