



海洋科学掘削によるマントル到達への挑戦
—地球最大のフロンティアに挑む—

海洋地殻微生物研究の 到達点とマントル掘削 での挑戦

鈴木庸平

Exploring the oceanic crust biosphere:
milestones and future frontiers

Suzuki Yohey

すずき ようへい：東京大学大学院理学系研究科
地球惑星科学専攻

地下深部の掘削、微生物ゲノム解析、ナノスケールでの固体分析等の科学技術の近年の発展により、これまで不毛と考えられていた地下深部の岩石が、微生物の生息に適していると判明した。本稿は、海洋地殻を中心に、これまでの研究成果をまとめ、今後の研究について展望する。

1. はじめに

深海熱水噴出孔の発見は、我々の生命観を大きく変えた (Corliss et al., 1979)。ブラックスモーカーの周辺にチューブワームや巨大な二枚貝などの特異な生物が密生しているが、光合成由来ではなく、ブラックスモーカーから供給される化学物質に栄養を依存している (Felbeck, 1981)。光合成との対比で使われる化学合成は、熱水から放出される H_2 、 CH_4 、 HS^- 、 $Fe(II)$ などの様々な還元物質をエネルギー源にして炭素を固定する代謝である (Amen and Teske, 2005)。還元物質は岩石と水の相互作用やマグマの脱ガスによって生成されるが、還元物質からエネルギーを取り出す上で必要な酸化剤は、深海底の場合は光合成に基づく生物地球化学的プロセスから供給される。深海生物は海水に含まれる O_2 や NO_3^- で還元物質を酸化して、エネルギーを獲得しているが、光合成とは無関係に生成される酸化剤に依存する生命活動は、光合成生物が出現する前の原始地球の微生物活動に類似している。したがって、深海熱水噴出孔から下の岩石圏には、光合成産物が無視できる程少ない、熱水孔下生物圏が存在し、ブラックスモーカーはその窓と考えられてきた (Deming and Baross, 1993)。海洋地殻内生命探査は、高速拡大軸付近の深海熱水噴出孔から、熱対流や地形効果により駆動される流体循環を伴う海嶺翼へと拡張されており (Edwards et al., 2011)、海洋地殻が 1000 万年の時間をかけて冷却された後は、微生物生態系は海底下 6 km でも存在すると予想される (Heberling et al., 2010 ; Heuer et al., 2020)。

深海底熱水孔や海底下の環境と同様に、陸上の温泉や地下深部の微生物生態に関して研究が活発に行われている。光栄養生物に依存しない地下微

生物生態系(subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem ; SLiME)は、白亜系の洪水玄武岩の深部帯水層で初めて発見された(Stevens and McKinley, 1995)。この微生物生態系では、地下水とカンラン石や輝石族鉱物との反応によってH₂が生成され、その水素がエネルギー源となる。地下深部の中性から弱アルカリ性のpH条件下では、カンラン石や輝石族鉱物の溶解速度は低温で遅いため、生態系が成立するには不十分なエネルギー源であるとの批判がある。一方、陸上温泉水に、水素酸化でエネルギー獲得するメタン生成古細菌が優占するため、温度上昇で鉱物と水の反応速度が加速される熱水活動域の方が、SLiMEの成立には好ましいとする考えもある(Chapelle et al., 2002)。SLiMEsは、光栄養生物が出現する以前の原始的な微生物生態系を理解する上で重要なだけでなく、光栄養生物が不在と考えられている火星の生命体を探索する上でも重要である(Onstott et al., 2019)。光合成産物なしで岩石内部に生息するためには、マグマの脱ガス、岩石-水相互作用、放射線分解によるエネルギー源の供給が不可欠である。

2. 岩石内生命の解析技術

自然界に存在する微生物の約98%は培養不可能であることが知られており(Wardら, 1990; Wade, 2002)。自然界の微生物の性状を調べるには、培養に依存しない技術が必要である。小サブユニット rRNA 遺伝子の配列決定により、古細菌と呼ばれるドメインレベルの新規の原核生物が認識され(Woese, 1987)、陸上温泉からは門レベルで新規の多様な古細菌や細菌が認識された(Barns et al., 1994; Hugenholtz et al., 1998)。rRNA配列に基づく普遍系統樹では好熱性から超好熱性の分類群が、共通祖先に近い根本で分岐しており、原始地球はマグマオーシャンが冷却した後しばらくは高温環境であったと考えられるため、好熱性から超好熱性の原核生物が、共通祖先に見られた原始的特徴が保存されていると考えられてきた(Pace, 1991; Russel, 2021)。分子生物学的な手法による微生物生態系の調査は、温泉水から地下深部へと

拡大していく過程で、掘削による微生物汚染を識別することの重要性が認識された。そのため、汚染源として重要な掘削流体にトレーサーを添加する方法が開発された(Griffin et al., 2018年)。特に、微生物大の蛍光ビーズを用いる手法や溶存物質であるが温度を上げると気化するPerfluorocarbonを用いる手法が適用されている(Smith et al., 2000)。深部まで埋没した海洋堆積物(Heuer et al., 2020; Inagaki et al., 2015; Orsi, 2018)や陸上の堆積岩(Bagnoud et al., 2016; Daly et al., 2016; Hermsdorf et al., 2017; Magnabosco et al., 2018; Probst et al., 2018)を対象とした微生物調査が行われているが、火成岩からなる基盤はまだ十分に調査されていない。これは主に岩盤を掘削する技術的な難しさと共に(Michibayashi et al., 2019)、岩石の割れ目や空隙がコア外部から直接つながっており、掘削流体による汚染を避ける困難さに起因する。一方、未固結堆積物や堆積岩は、汚染されたコア外部を除去することで容易に汚染を回避することができる。特に陸上では、鉱山の地下施設から掘削されたボーリング孔から、自噴する地下水を用いて微生物が研究されている。南アフリカ共和国の金鉱山で行われた研究では、放射線分解反応によって生成された化学物質を用いて、深さ3 kmの地下水中に化学無機独立栄養細菌の*Candidatus Desulforudis audaxviator*を単一種とする生態系が発見された(Lin et al., 2010)。この細菌種は、水素酸化・硫酸還元や窒素・炭素固定を行うことができ、その代謝能は、地下水サンプルのメタゲノム解析により、全ゲノムが再構築されたことで裏付けられた(Chivian et al., 2008)

単一種生態系で実証されたように、回収できるバイオマスが高く、多様性の低い自然界の微生物群集は、メタゲノムからのゲノムの再構築が容易である。培養なしで、自然界の微生物からほぼ完全なゲノムが初めて再構築された、酸性鉱山廃液の微生物群集を皮切りに(Tyson et al., 2004)、DNAシーケンシングとパイオインフォマティクスの進歩により、多様な微生物集団のメタゲノム解析が可能になった(Rinke et al., 2013)。短い配

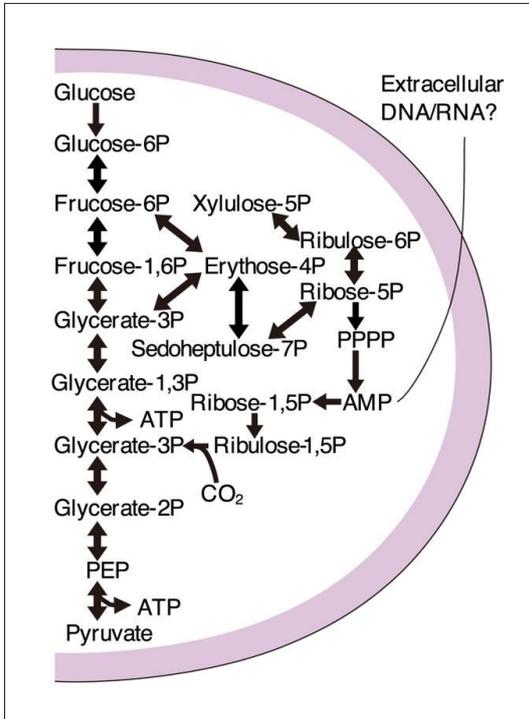


図1 CPRとDPANNに見られる炭素代謝経路. 細胞外の核酸を取り込む解糖系,ヌクレオチド救済経路,非酸化性ペントースリン酸経路を示す. Takamiya et al. (2021) から抜粋.

列のアセンブルにより,培養できない微生物から高品質のゲノム配列が得られるようになった(Wrighton et al., 2012). そのような微生物の中には,小サブユニットのrRNA遺伝子の配列からのみ,その存在が知られていた微生物が多く含まれていた(Hugenholtz et al., 1998). Candidate Phyla Radiation (CPR)と呼ばれる細菌の専門が認識され(Hug et al., 2016),ゲノム解析の結果,ゲノムと細胞のサイズが小さいことが明らかになった.多くのゲノム中には,脂質,アミノ酸,ヌクレオチドを合成する遺伝子が欠損することも判明した(Brown et al., 2015). CPRと同様に,古細菌にも新たな専門としてDPANN(Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota)が認識された.小さな細胞とゲノムを持ち,ヌクレオチド,アミノ酸,脂質を合成する

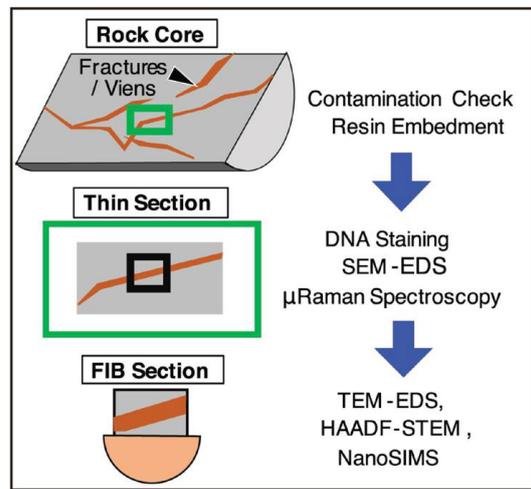


図2 岩石コア解析のフローチャート. SEM, 走査型電子顕微鏡; EDS, エネルギー分散型X線分光法; FIB, 集束イオンビーム; TEM, 透過電子顕微鏡; NanoSIMS, ナノスケール二次イオン質量分析法; HAADF-STEM, 高角度環状暗視野走査型透過電子顕微鏡. Takamiya et al. (2021) から抜粋.

遺伝子を欠損する点で, CPRと共通する(Castelle and Banfield, 2018; Castelle et al., 2018; Castelle et al., 2015). CPRとDPANNは,初期の地球で普遍的であった嫌気性条件に生息し,早期に他の細菌や古細菌から分岐した可能性や(Castelle and Banfield, 2018; Méheust et al., 2019; Schönheit et al., 2016),解糖,ヌクレオチドサルベージ経路,非酸化性ペントースリン酸経路が古くから保存されている可能性が考えられる(Jaffe et al., 2020)(図1).

ゲノム解析の進展と並行して,堆積物中の微生物細胞の可視化技術は,堆積物マトリックスから分離した細胞を,SYBR-Green IでDNA染色し,フローサイトメトリーで検出する(Morono et al., 2013).さらに,基盤岩である火成岩中の微生物の新しい可視化手法が開発された(Sueoka et al., 2019)(図2).新手法では,亀裂のある岩石コアを樹脂に埋め込んだ後,薄くスライスして岩石内部を可視化する.LR Whiteという樹脂は,固化した樹脂の中にSYBR-Green Iが浸透するため,岩石内

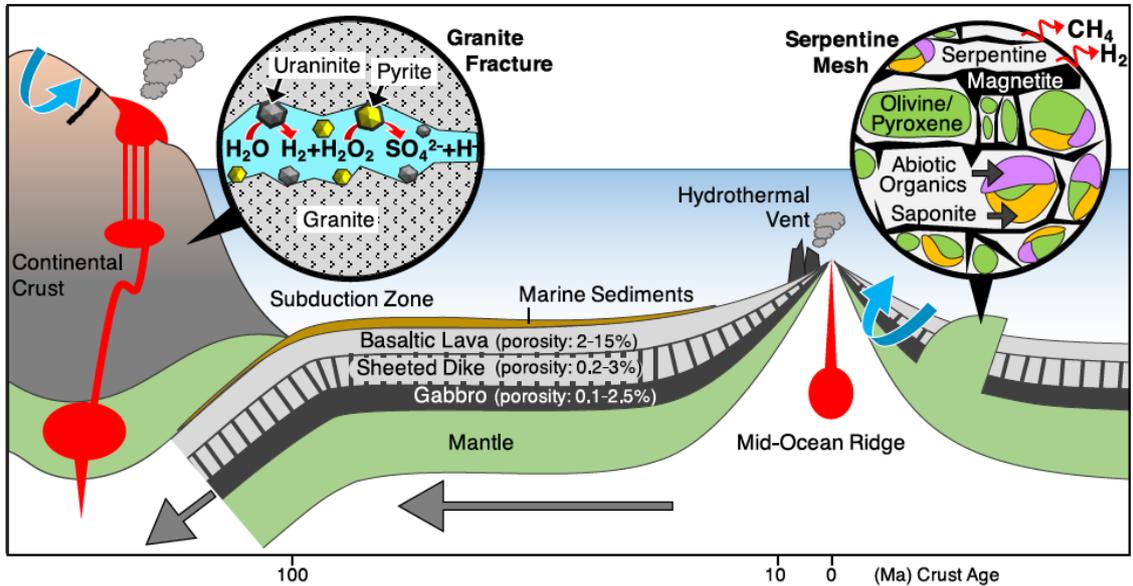


図3 岩石生命圏の地質学的・テクトニックな特徴。円形の枠内には、岩石内で生命が生息する場所の鉱物学的・地球化学的な特徴を示す。青矢印は熱水循環を示す。Takamiya et al. (2021) から抜粋。

部の微生物細胞を蛍光顕微鏡で可視化することができる。サブミロンスケールの元素マッピングとナノスケールの鉱物同定を組み合わせると、岩石割れ目に微生物細胞が、粘土鉱物に包まれているのが観察された (Suzuki et al., 2020 ; Yamashita et al., 2019)。

3. 岩石内生命圏の典型例

Onstott ら (2019) は、岩石生命圏は岩石内の物理化学的プロセスに依存する生態系の存在領域と定義している。光合成による豊富なエネルギー源を伴う地表生態系と比較すると、岩石内部の環境はエネルギー的に、水とカンラン石や輝石などの鉱物との相互作用や、放射線による水分解反応に依存する (図3)。後者は、南アフリカの金鉱山の地下水において実証されたプロセスである。金やウランに富む堆積岩中では、水の放射線分解により H_2 と H_2O_2 などの活性酸素が生成される (Lin et al., 2005) (図2)。 H_2O_2 と黄鉄鉱 (FeS_2) などの硫化鉱物が反応することで硫酸が生成し、電子受容体として利用される (Lefticariu et al., 2006)。

苦鉄質や超苦鉄質の岩石中に多く含まれるカンラン石や輝石族鉱物が水と反応して、 H_2 だけでなく炭化水素も生成する (Charlou et al., 2002 ; Proskurowski et al., 2008) (図3)。これは蛇紋岩化反応として知られ、蛇紋石鉱物の形成を伴う。大西洋中央海嶺の低速拡大軸近傍で、アルカリ性の熱水噴出を伴う Lost City フィールドが知られる (Kelley et al., 2001)。蛇紋岩化反応で生じた熱水は、海底面で炭酸塩鉱物を主成分とする白いチムニー構造を形成する。チムニー内部は Methanosarcinales 目に属する単系統のメタン生成古細菌が優占しており (Schrenk et al., 2004)、チムニー外部では嫌氣的メタン酸化古細菌が発見されている (Brazelton et al., 2006)。Methanosarcinales 目のメタン生成古細菌は、酢酸やメチルアミン、メチル硫酸などのメチル化合物を使用し、これらの基質は蛇紋岩化反応の産物と考えられる。

4. 海洋地殻の岩石内生命圏

海洋地殻は、玄武岩質のマグマが冷却されて中央海嶺で形成される (図3)。海洋地殻上部は玄武

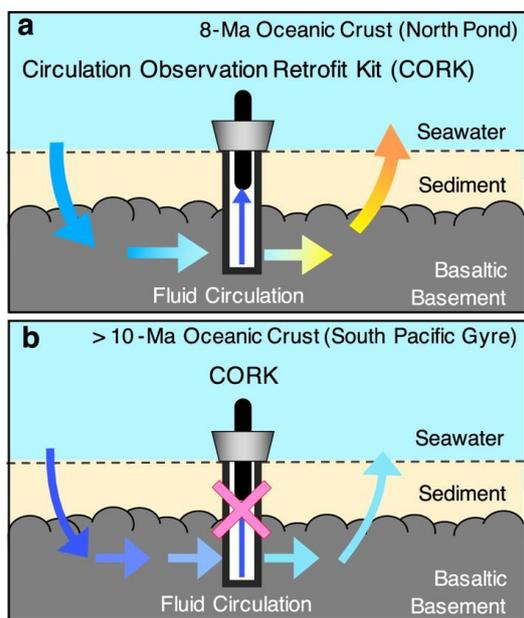


図4 海洋地殻の玄武岩基盤の地殻流体循環と流体サンプリングの模式図. North Pondサイトにおける地殻流体サンプリング (a). 南太平洋環流域におけるサンプリング可能な地殻流体の欠如 (b). Takamiya et al. (2021) から抜粋.

岩質溶岩で構成され、急冷により空隙率が高い (2% ~ 15%)。その下部は、平行岩脈群で 0.2 ~ 3%、斑レイ岩で 0.1 ~ 2.5% と上部海洋地殻に比べはるかに空隙率が小さい (Heberling et al., 2010)。生命最高生育温度の 120°C 等温線未満の海洋地殻の空隙率 (~ 109 km³) を考慮して、Heberling et al. (2010) は海洋地殻のバイオマスは海洋全体の原核生物バイオマス (~ 10²⁹ 細胞, Bar-On et al., 2018) と同等と推定している。

中央海嶺では、高温の玄武岩-海水反応により、生命活動のためのエネルギーが過剰に供給される (Bach and Edwards, 2003)。海嶺翼で地殻流体の循環は、熱対流または水文学的すなわち地形の効果により駆動される (Sclater et al., 1980) (図 3, 4)。堆積物に覆われた玄武岩質溶岩の部分は玄武岩基盤と呼ばれる。350 万年前と 800 万年前の海嶺翼での先行研究では、基盤内の帯水層にはそれぞれ

嫌気性好熱菌と好気性好中温菌が生息し、炭素と硫黄の循環に寄与していることが示された (Cowen et al., 2003; Leveret et al., 2013; Orcutt et al., 2013; Zhang et al., 2016)。

海洋地殻の地殻流体を用いて、メタゲノム解析 (Jungbluth et al., 2016; Tully et al., 2018)、メタトランスクリプトームとメタゲノムを組み合わせた解析 (Seyler et al., 2021) が行われている。大西洋中央海嶺の North Pond と呼ばれる 800 万年前の海嶺翼では、メタゲノムの時系列解析とメタトランスクリプトーム解析、パルクおよび単細胞代謝率測定データを統合して、岩石内の代謝の詳細について議論している (Trembath-Reichert et al., 2021)。その議論によると、有機・無機両方の炭素が同化しており、これはエネルギー欠乏に適應のためと考えている。

形成年代が 1000 万年より古くなると、岩石亀裂が二次鉱物で満たされ、流体循環と玄武岩-海水反応は著しく減衰する (Jarrard, 2003) (図 4)。微生物研究は地殻流体を用いて行われてきたが、地殻流体が採取困難な古い海洋地殻は研究が進んでいなかった。海洋地殻の 90% 以上は形成年代が 1000 万年前以上であるため (Müller et al., 2008)、空間的に広大な地殻環境における微生物生態系の存在は、ほとんど不明である (Santelli et al., 2010)。南太平洋環流域 (SPG) の海底下生命圏を対象とした統合海洋掘削計画 (IODP) 第 329 次航海において、1300 万年前、3300 万年前、1 億 400 万年前の玄武岩質溶岩が掘削されている (図 3)。SPG は、表層の光合成活動が極めて低い海域で (D'Hondt et al., 2015)、この超貧栄養の特徴は、玄武岩基盤に、光合成由来の有機物から独立して生きる微生物生態系が存在することが期待された。玄武岩の割れ目は、サポナイトやノントロナイトに組成と結晶構造が類似した Fe、Mg スメクタイト粘土の形成が明らかになり (Sueoka et al., 2019; Yamasita et al., 2019)、両スメクタイト粘土の形成は、低温での玄武岩-海水相互作用によると考えられる。スメクタイト粘土の分布と微生物細胞の密集が直接観察され、細胞密度が 1 cm³ 当たり

10¹⁰ 細胞を超えていることも明らかになった (Suzuki et al., 2020). 小サブユニット rRNA 遺伝子解析と脂質分析から、これらの岩石コアに生息するのは従属栄養細菌であることも判明した (Suzuki et al., 2020).

また、地球の下部地殻が海底に露出しているインド洋の Atlantis Bank の海底下 750 m から掘削した岩石コアに対して、メタトランスクリプトーム解析が行われた (Li et al., 2020). コアリングされた海底下の斑れい岩でも従属栄養微生物が優占していることが明らかにされており (Li et al., 2020), Atlantis Massif でコアリングされた斑れい岩の結果と一致している (Mason et al., 2010). これらの結果は、3300 万年前と 1 億 400 万年前の玄武岩基盤で従属栄養細菌が優占する SPG の結果と一致する (Suzuki et al., 2020).

5. 海洋地殻微生物研究の今後の展望

Atlantis Massif の 173 m から掘削した斑れい岩コアのサポナイトに、アミノ酸の 1 種であるトリプトファンが異常濃集していることが報告された (Ménez et al., 2018). 蛇紋岩化反応により非生物学的に生成したと主張されているが、岩石内の微生物活動により形成された可能性も指摘される。その根拠として、1 億 400 万年前の SPG の玄武岩コアのサポナイトに密集して生息する微生物細胞が報告されており (Sueoka et al., 2019), サポナイトは表面積が大きく、溶存有機物を吸着する能力も高いことから (Cuadros, 2017), サポナイトをはじめとする岩石内部の鉱物が微生物生態系の形成に果たす役割を検討する必要がある。海洋地殻の平均形成年代は 1 億年であり、沈み込み帯からマントルへトリサイクルする。玄武岩基盤は岩石の形成史を通じて生命を育むことが明らかになりつつあるが、中央海嶺での形成後にテクトニックの影響を受けていない形成年代の古い海洋地殻下部も広大な空間であるため、生命の生息が可能かどうかを今後、海洋掘削を通じて明らかにする必要がある (Umino et al., 2021).

参考文献

- [1] Amend, J.P., Teske A. (2005). Expanding frontiers in deep subsurface microbiology. *Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives*: 131-155.
- [2] Bach, W., Edwards, K. J. (2003). Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust: implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67(20): 3871-3887.
- [3] Bagnoud, A., Chourey, K., Hettich, R. L., De Bruijn, I., Andersson, A., Leupin, O. X., Schwyn, B., Bernier-Latmani, R. (2016). Reconstructing a hydrogen-driven microbial metabolic network in Opalinus Clay rock. *Nature communications* 7(1): 1-10.
- [4] Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(5): 1609-1613.
- [5] Bar-On, Y. M., Phillips, R., and Milo, R. (2018). The biomass distribution on earth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* E0115, 6506-6511. doi: 10.1073/pnas.1711842115
- [6] Brazelton, W. J., Schrenk, M. O., Kelley, D. S., Baross, J. A. (2006). Methane-and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City hydrothermal field ecosystem. *Applied and environmental microbiology* 72(9): 6257-6270.
- [7] Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., Wilkins, M. J., Wrighton, K. C., Williams, K. H., Banfield, J. F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523(7559): 208-211.
- [8] Castelle, C. J., Banfield, J. F. (2018). Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. *Cell* 172(6): 1181-1197.
- [9] Castelle, C. J., Brown, C. T., Anantharaman, K., Probst, A. J., Huang, R. H., Banfield, J. F. (2018). Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature Reviews Microbiology* 16(10): 629.
- [10] Castelle, C. J., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Hug, L. A., Brown, C. T., Wilkins, M. J., Frischkorn, K. R., Tringe, S. G., Singh, A., Markillie, L. M. (2015). Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Current biology* 25(6): 690-701.
- [11] Chapelle, F. H., O'Neill, K., Bradley, P. M., Methé, B. A., Ciufo, S. A., Knobel, L. L., Lovley, D. R. (2002) A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature* 415(6869): 312-315.
- [12] Charlou, J., Donval, J., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P., Holm, N. (2002). Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent

- fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chemical geology* 191(4): 345-359.
- [13] Chivian, D., Brodie, E. L., Alm, E. J., Culley, D. E., Dehal, P. S., DeSantis, T. Z., Gihring, T. M., Lapidus, A., Lin, L.-H., Lowry, S. R. (2008). Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Science* 322(5899): 275-278.
- [14] Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, von Herzen RP, Ballard RD, Green K, Williams D, Bainbridge A, Crane K (1979) Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science* 203(4385): 1073-1083.
- [15] Cowen, J. P., Giovannoni, S. J., Kenig, F., Johnson, H. P., Butterfield, D., Rappé, M. S., Hutnak, M., Lam, P. (2003). Fluids from aging ocean crust that support microbial life. *Science* 299(5603): 120-123.
- [16] Cuadros, J. (2017). Clay minerals interaction with microorganisms: a review. *Clay Minerals* 52(2): 235-261.
- [17] Deming, J. W., Baross, J. A. (1993). Deep-sea smokers: windows to a subsurface biosphere *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57(14): 3219-3230.
- [18] Daly, R. A., Borton, M. A., Wilkins, M. J., Hoyt, D. W., Koutz, D. J., Wolfe, R. A., Welch, S. A., Marcus, D. N., Trexler, R. V., MacRae, J. D. (2016). Microbial metabolisms in a 2.5-km-deep ecosystem created by hydraulic fracturing in shales. *Nature microbiology* 1(10): 1-9.
- [19] D'Hondt, S., Inagaki, F., Zarikian, C. A., Abrams, L. J., Dubois, N., Engelhardt, T., Evans, H., Ferdelman, T., Gribsholt, B., Harris, R. N. (2015). Presence of oxygen and aerobic communities from sea floor to basement in deep-sea sediments. *Nature Geoscience* 8(4): 299-304.
- [20] Edwards, K. J., Wheat, C. G., and Sylvan, J. B. (2011). Under the sea: microbial life in volcanic oceanic crust. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 703-712. doi: 10.1038/nrmicro2647
- [21] Felbeck, H. (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213(4505): 336-338.
- [22] Griffin, W., Phelps, T., Colwell, F., Fredrickson, J. (2018). Methods for obtaining deep subsurface microbiological samples by drilling The microbiology of the terrestrial deep subsurface. CRC Press, pp 23-44
- [23] Heberling, C., Lowell, R. P., Liu, L., Fisk, M. R. (2010). Extent of the microbial biosphere in the oceanic crust. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 11(8).
- [24] Hersedorf, A. W., Amano, Y., Miyakawa, K., Ise, K., Suzuki, Y., Anantharaman, K., Probst, A., Burstein, D., Thomas, B. C., Banfield, J. F. (2017). Potential for microbial H₂ and metal transformations associated with novel bacteria and archaea in deep terrestrial subsurface sediments. *The ISME journal* 11(8): 1915-1929.
- [25] Heuer, V. B., Inagaki, F., Morono, Y., Kubo, Y., Spivack, A. J., Viehweger, B., Treude, T., Beulig, F., Schubotz, F., Tonai, S. (2020). Temperature limits to deep subseafloor life in the Nankai Trough subduction zone. *Science* 370(6521): 1230-1234.
- [26] Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., Hersedorf, A. W., Amano, Y., Ise, K. (2016). A new view of the tree of life. *Nature microbiology* 1(5): 1-6.
- [27] Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180(18): 4765-4774.
- [28] Inagaki, F., Hinrichs, K.-U., Kubo, Y., Bowles, M. W., Heuer, V. B., Hong, W.-L., Hoshino, T., Ijiri, A., Imachi, H., Ito, M. (2015). Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~ 2.5 km below the ocean floor. *Science* 349(6246): 420-424.
- [29] Jaffe, A. L., Castelle, C. J., Carnevali, P. B. M., Gribaldo, S., Banfield, J. F. (2020). The rise of diversity in metabolic platforms across the Candidate Phyla Radiation. *BMC biology* 18(1): 1-15.
- [30] Jarrard, R. D. (2003). Subduction fluxes of water, carbon dioxide, chlorine, and potassium. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 4(5).
- [31] Jungbluth, S. P., Bowers, R. M., Lin, H.-T., Cowen, J. P., Rappé, M. S. (2016). Novel microbial assemblages inhabiting crustal fluids within mid-ocean ridge flank subsurface basalt. *The ISME journal* 10(8): 2033-2047.
- [32] Kelley, D. S., Karson, J. A., Blackman, D. K., Fruh-Green, G. L., Butterfield, D. A., Lilley, M. D., Olson, E. J., Schrenk, M. O., Roe, K. K., Lebon, G. T. (2001). An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30°N. *Nature* 412(6843): 145-149.
- [33] Leticariu, L., Pratt, L. M., and Ripley, E. M. (2006). Mineralogic and sulfur isotopic effects accompanying oxidation of pyrite in millimolar solutions of hydrogen peroxide at temperatures from 4 to 150 °C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 4889-4905. doi: 10.1016/j.gca.2006.07.026
- [34] Lever, M. A., Rouxel, O., Alt, J. C., Shimizu, N., Ono, S., Coggon, R. M., Shanks, W. C., Lapham, L., Elvert, M., Prieto-Mollar, X. (2013). Evidence for microbial carbon and sulfur cycling in deeply buried ridge flank basalt. *Science* 339(6125): 1305-1308.
- [35] Li, J., Mara, P., Schubotz, F., Sylvan, J. B., Burgaud, G., Klein, F., Beaudoin, D., Wee, S. Y., Dick, H. J., Lott, S. (2020). Recycling and metabolic flexibility dictate life in the lower oceanic crust. *Nature* 579(7798): 250-255
- [36] Lin, L.-H., Slater, G. F., Lollar, B. S., Lacrampe-Couloume, G., and Onstott, T. C. (2005). The yield and

- isotopic composition of radiolytic H₂, a potential energy source for the deep subsurface biosphere. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 893-903. doi: 10.1016/j.gca.2004.07.032
- [37] Magnabosco, C., Lin, L.-H., Dong, H., Bomberg, M., Ghiorse, W., Stan-Lotter, H., Pedersen, K., Kieft, T., Van Heerden, E., Onstott, T. C. (2018). The biomass and biodiversity of the continental subsurface. *Nature Geoscience* 11(10): 707-717.
- [38] Mason, O. U., Nakagawa, T., Rosner, M., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Maruyama, A., et al. (2010). First investigation of the microbiology of the deepest layer of ocean crust. *PLoS One* 5(5): e15399. doi: 10.1371/journal.pone.0015399
- [39] Méheust, R., Burstein, D., Castelle, C. J., Banfield, J. F. (2019). The distinction of CPR bacteria from other bacteria based on protein family content. *Nature communications* 10(1): 1-12.
- [40] Ménez, B., Pisapia, C., Andreani, M., Jamme, F., Vanbellingen, Q. P., Brunelle, A., Richard, L., Dumas, P., Réfrégiers, M. (2018). Abiotic synthesis of amino acids in the recesses of the oceanic lithosphere. *Nature* 564(7734): 59-63.
- [41] Michibayashi, K., Tominaga, M., Ildefonse, B., and Teagle, D. A. (2019). What lies Beneath: the formation and evolution of oceanic lithosphere. *Oceanography* 6(12), 138-149. doi: 10.5670/oceanog.2019.136
- [42] Morono, Y., Terada, T., Kallmeyer, J., Inagaki, F. (2013). An improved cell separation technique for marine subsurface sediments: applications for high-throughput analysis using flow cytometry and cell sorting. *Environmental microbiology* 15(10): 2841-2849.
- [43] Müller, R. D., Sdrolias, M., Gaina, C., Steinberger, B., Heine, C. (2008). Long-term sea-level fluctuations driven by ocean basin dynamics. *Science* 319(5868): 1357-1362.
- [44] Onstott, T., Ehlmann, B., Sapers, H., Coleman, M., Ivarsson, M., Marlow, J., Neubeck, A., Niles, P. (2019). Paleo-rock-hosted life on Earth and the search on Mars: a review and strategy for exploration. *Astrobiology* 19(10): 1230-1262.
- [45] Orcutt, B. N., Wheat, C. G., Rouxel, O., Hulme, S., Edwards, K. J., Bach, W. (2013). Oxygen consumption rates in subsurface basaltic crust derived from a reaction transport model. *Nature Communications* 4(1): 1-8.
- [46] Orsi, W. D. (2018). Ecology and evolution of seafloor and subsurface microbial communities. *Nature Reviews Microbiology* 16(11): 671-683.
- [47] Pace, N. R. (1991). Origin of life-facing up to the physical setting. *Cell* 65(4): 531-533.
- [48] Russell, M. J. (2021). The "water problem", the illusory pond and life's submarine emergence—A review. *Life* 11(11): 429. doi: 10.3390/life11050429
- [49] Proskurowski, G., Lilley, M. D., Seewald, J. S., Früh-Green, G. L., Olson, E. J., Lupton, J. E., Sylva, S. P., Kelley, D. S. (2008). Abiogenic hydrocarbon production at Lost City hydrothermal field. *Science* 319(5863): 604-607.
- [50] Probst, A. J., Ladd, B., Jarett, J. K., Geller-McGrath, D. E., Sieber, C. M., Emerson, J. B., Anantharaman, K., Thomas, B. C., Malmstrom, R. R., Stieglmeier, M. (2018). Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nature microbiology* 3(3): 328-336.
- [51] Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499(7459): 431-437.
- [52] Sclater, J., Jaupart, C., Galson, D. (1980). The heat flow through oceanic and continental crust and the heat loss of the Earth. *Reviews of Geophysics* 18(1): 269-311.
- [53] Schönheit, P., Buckel, W., Martin, W. F. (2016). On the origin of heterotrophy. *Trends in microbiology* 24(1): 12-25.
- [54] Schrenk, M. O., Kelley, D. S., Bolton, S. A., and Baross, J. A. (2004). Low archaeal diversity linked to subsurface geochemical processes at the Lost City Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* 6(10), 1086-1095. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00650.x
- [55] Seyler, L. M., Trembath-Reichert, E., Tully, B. J., Huber, J. A. (2021). Time-series transcriptomics from cold, oxic subsurface crustal fluids reveals a motile, mixotrophic microbial community. *The ISME Journal* 15(4): 1192-1206.
- [56] Smith, D. C., Spivack, A. J., Fisk, M. R., Haveman, S. A., Staudigel, H. (2000). Tracer-based estimates of drilling-induced microbial contamination of deep sea crust. *Geomicrobiology Journal* 17(3): 207-219.
- [57] Santelli, C. M., Banerjee, N., Bach, W., Edwards, K. J. (2010). Tapping the subsurface ocean crust biosphere: low biomass and drilling-related contamination calls for improved quality controls. *Geomicrobiology Journal* 27(2): 158-169.
- [58] Stevens, T. O., McKinley, J. P. (1995). Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* 270(5235): 450-455.
- [59] Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428(6978): 37-43
- [60] Sueoka, Y., Yamashita, S., Kouduka, M., Suzuki, Y. (2019). Deep microbial colonization in saponite-bearing

fractures in aged basaltic crust: Implications for subsurface life on Mars. *Frontiers in microbiology* 10: 2793.

[61] Suzuki, Y., Yamashita, S., Kouduka, M., Ao, Y., Mukai, H., Mitsunobu, S., Kagi, H., D'Hondt, S., Inagaki, F., Morono, Y. (2020). Deep microbial proliferation at the basalt interface in 33.5-104-million-year-old oceanic crust. *Communications biology* 3(1): 1-9.

[62] Takamiya, H., Kouduka, M., Suzuki, Y. (2021) The Deep Rocky Biosphere: New Geomicrobiological Insights and Prospects. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2021.785743.

[63] Trembath-Reichert, E., Walter, S. R. S., Ortiz, M. A. F., Carter, P. D., Girguis, P. R., Huber, J. A. (2021). Multiple carbon incorporation strategies support microbial survival in cold seafloor crustal fluids. *Science Advances* 7(18): eabg0153.

[64] Tully, B. J., Wheat, C. G., Glazer, B. T., Huber, J. A. (2018). A dynamic microbial community with high functional redundancy inhabits the cold, oxic seafloor aquifer. *The ISME Journal* 12(1): 1-16.

[65] Umino, S., Moore, G. F., Boston, B., Coggon, R., Crispini, L., D'Hondt, S., Garcia, M. O., Hanyu, T., Klein, F., Seama, N., Teagle, D. A. H., Tominaga, M., Yamashita, M., Harris, M., Ildefonse, B., Katayama, I., Kusano, Y., Suzuki, Y., Trembath-Reichert, E., Yamada, Y., Abe, N., Xiao, N., Inagaki, F. (2021) Workshop report: Exploring deep oceanic crust off Hawai'i, *Scientific Drilling*, 29, 69-82, <https://doi.org/10.5194/sd-29-69-2021>.

[66] Wade, W. (2002). Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J. R. Soc. Med.* 95, 81-83. doi: 10.1258/jrsm.95.2.81

[67] Ward, D. M., Weller, R., Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345(6270): 63-65.

[68] Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews* 51(2): 221.

[69] Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Sharon, I., Miller, C. S., Castelle, C. J., VerBerkmoes, N. C., Wilkins, M. J., Hettich, R. L., Lipton, M. S., Williams, K. H. (2012). Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science* 337(6102): 1661-1665.

[70] Yamashita, S., Mukai, H., Tomioka, N., Kagi, H., Suzuki, Y. (2019). iron-rich Smectite formation in Subseafloor Basaltic Lava in Aged oceanic crust. *Scientific Reports* 9(1): 1-8.

[71] Zhang, X., Feng, X., and Wang, F. (2016). Diversity and metabolic potentials of subsurface crustal microorganisms from the western flank of the Mid- Atlantic Ridge. *Front. Microbiol.* 7: 363. doi: 10.3389/fmicb.2016.00363.

