

# RNA を用いた海洋細菌群集の構造解析

2009 年 3 月 自然環境学専攻 海洋物質循環学分野 76749 和田英里

指導教員 木暮一啓 教授

キーワード：16S rDNA、16S rRNA、群集構造、多様度指数、高機能群

## I. はじめに

海水 1mL 中にはおよそ 100 万の細菌が存在し、海洋における物質循環に深く関与していると考えられている。しかし、環境中の細菌のうち培養可能なものは 1%以下に過ぎず、細菌生態に関する研究は培養に依存しない分子生物学的な手法によって行われている。細菌の系統は、サンプルから抽出した 16S rDNA の塩基配列に基づいて決定されているが、海水中には、生菌だけでなく死菌や休眠の様々な生理状態の細胞が含まれ、そのうち代謝活性をもつものはごく一部だと考えられる。Gentile *et al.* (2006) では、南極海において 16S rDNA と 16S rRNA それぞれからクローンライブラリーを作成し、その塩基配列より群集構造の比較を行った。その結果、得られたすべての系統型のうち 93.6%が 16S rRNA ライブラリーから見つかったが、16S rDNA ライブラリーには 70.5%の系統型しか含まれておらず、16S rDNA のみの解析では不十分であり 16S rRNA 解析の必要性が示唆された。

本研究の目的は、16S rDNA と 16S rRNA の両方を用いて海洋における細菌群集解析及び多様性解析を行い、海洋環境中における細菌群集の全体像の把握と高い代謝活性をもつ高代謝活性群集について明らかにすることである。本研究では、群集構造解析の手法として t-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用い、16S rRNA で検出することができる細菌群を“高機能群”と定義し、高機能群が海洋における鉛直的分布とそれを規定する要因を探る。

## II. サンプルと実験方法

海洋細菌群集の鉛直分布解析用サンプルは、2007 年 7 月 9 日から 17 日に、学術研究船淡青丸 KT-07-16 次航海にて採取した。採水は相模湾 (St. P) 2 測点、東京湾 (St. T5, St. T6) 2 測点及び駿河湾沖 (St. S) の計 4 測点において鉛直的に行った (Fig. 1)。ペリスタポンプを用いて海水を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の Sterivex-GP filter に 5L ずつ濾過した。DNA/RNA 抽出は、Frias-Lopez *et al.* (2008) の抽出法を一部変更して行った。粗精製した核酸は、AllPrep™ DNA/RNA Mini kit (Qiagen) を用いて DNA と RNA に分離・精製した。16S rRNA の逆転写反応には、ユニバーサルプライマー 1492R を用いた (Lane, 1991)。

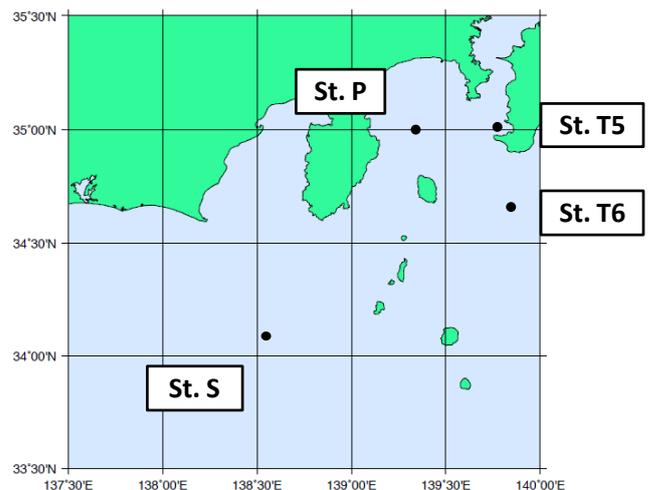


Fig. 1 サンプルングサイト

cDNA 及び DNA をテンプレートとして真正細菌に特異的なプライマーセット (27F-1492R)を用いての PCR を行い、t-RFLP 法を用いて群集構造解析及び多様性解析を行った。

### III. 結果及び考察

t-RFLP ピークプロファイルは、深度だけでなく 16S rDNA と 16S rRNA で大きく異なり、16S rDNA と 16S rRNA の両方で出現するものと、どちらか一方でのみ出現するものがあった。16S rRNA で検出できるような高機能群には、表層から深層まで深度に関係なく普遍的に分布するものと、特定の場面にのみ分布するものがあることが分かった。

また、16S rRNA の OTU(operational taxonomic units)数は、16S rDNA よりも大きく有意な差があった( $p < 0.01$ )。さらに、OTU 数だけでなく多様度指数(Shannon-Wiener index 及び Simpson's index)も 16S rRNA において大きい値を示した(それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ )。これは、Gentile *et al.*(2006)や West *et al.* (2008)で報告されたように、16S rRNA からは 16S rDNA よりも多くの分類群が見つかったという報告一致し、さらに分類群数だけでなく、多様度指数についても 16S rRNA の方が高いことが分かった。

t-RFLP のピークパターンからデンドログラムを作成すると、クラスターは表層サンプル(0-100 m)と中深層( $\geq 200$  m)に大きく分かれた(Fig. 2)。また、中深層において 16S rDNA と 16S rRNA は比較的高い位置で分岐し、中深層に比べて表層では高機能群と全細菌群の群集構造が類似することが示唆された。

そこで、細菌群集と環境パラメータにおけるスピアマンの順位相関係数を海洋表層と中深層に分けてそれぞれ算出した。その結果、海洋表層における 16S rDNA の OTU 数は、深度に正の相関を示し( $r=0.62$ ,  $p < 0.01$ )、全菌数に負の相関を示したが( $r=-0.72$ ,  $p < 0.01$ )、16S rRNA では有意な相関は見られなかった。これらのことから、海洋細菌の群集構造は水深 200 m を境にして大きくことなり、高機能群は表層、中深層で類似した群集構造を持つことが示唆された。

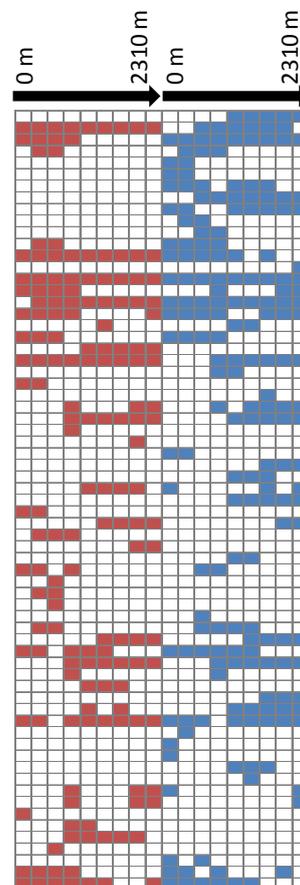


Fig. 2 St. T6における t-RFLPプロファイルの模式図  
■ : 16S rDNA, ■ : 16S rRNA

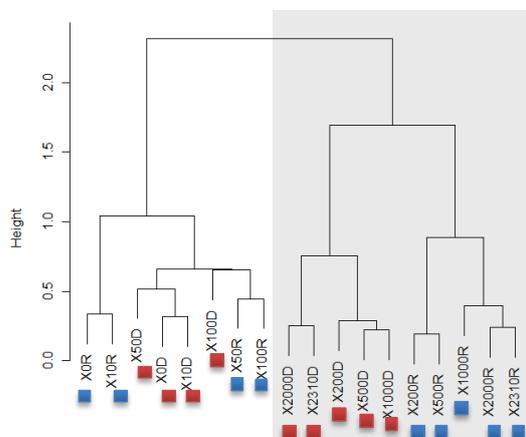


Fig. 3 St.T6における細菌群集のクラスター解析

# Study of marine bacterial community structure using 16S rDNA and 16S rRNA

March 2009, Department of Natural Environmental Studies, 76749 Eri Wada

Supervisor; Professor Kazuhiro Kogure

Keywords: 16S rDNA, 16S rRNA, community structure, diversity, active bacteria

## I. Introduction

Marine bacteria play an important role in the ocean material flux. Recent technical developments make it possible to clarify bacterial distribution and diversity by culture-independent methods using 16S rDNA sequences. However, DNA pool extracted from sea water would be consisted of cells in various physiological states; living, dormant and dead cells.

Although it may possible to prepare the list of microbes present in that environment, a specific bacterial population, which is functionally active *in situ*, could not be determined, whereas, cellular rRNA amount in a cell is correlated with metabolic activity, which represents cellular function. Therefore, the analysis of 16S rRNA diversity can be used to reveal the active microbial community by the sequencing of its clone library (Gentile *et al.*, 2006). Comparison the result of population structure using 16S rDNA and 16S rRNA libraries has demonstrated that 93.4% of the whole phylotypes was detected in RNA library; while only 31 phylotype (70.5%) was achieved from DNA library.

The purpose of this study was to investigate for total and physiologically active bacterial phylotype in the ocean. I analyzed bacterial community structure and diversity from both 16S rDNA and rRNA at four stations by the terminal restriction fragmental polymorphism (t-RFLP) methods.

## II. Materials and Methods

Samples were taken from four stations during the KT-07-16 in July 2007 of R/V Tansei-maru (Fig.1). Bacterial samples in the seawater were collected on 0.2 $\mu$ m pore size Sterivex-GP filter units (5 L). The method from collected bacteria nucleic acids (DNA and RNA) extraction was based on as described (Frias-Lopez *et al.*, 2008). Extracted DNA and RNA was separately obtained by using RNA/DNA mini kit (Qiagen).

Total RNA was subjected to reverse

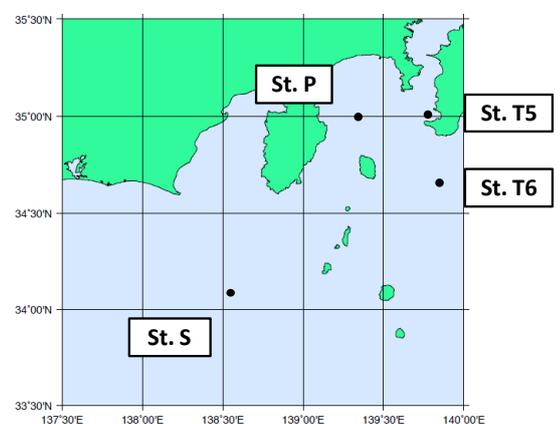


Fig. 1 Sampling station

transcription with the universal primer, 1492R, to prepare cDNA. DNA and cDNA were amplified with primers specific for the domain Bacteria (27F-1492R, Lane, 1991). Community structure based upon DNA and cDNA was constructed by using the t-RFLP method.

### III. Results and Discussions

Every t-RFLP profiles showed characteristic feature, especially, the t-RFLP profiles of 16S rRNA were also greatly different from those of 16S rDNA. Some OTUs appeared from both 16S rDNA and 16S rRNA, whereas some OTUs appeared either 16S rDNA or 16S rRNA. In addition, some OTUs were found throughout the water column, while, certain OTUs were found in the specific depth. The number of 16S rRNA OTUs was significantly higher than that of 16S rDNA ( $p < 0.01$ ). The diversity index (Shannon-Weiner index and Simpson's index) showed comparable trend from that was exhibited upon OTU number comparison. Namely, 16S rRNA were higher than those of the 16S rDNA ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ , respectively). Those results were agreed with the findings that the number of phylotypes acquired from 16S rRNA was exceeded to that from 16S rDNA. (Gentile *et al.*, 2006; West *et al.*, 2008).

Cluster analysis demonstrated based on the presence or absence of t-RFLP profiles (Fig.3). The bacterial communities in the surface (0-100 m) were different from the communities in the deep layer ( $\geq 200$  m). In the deep layer, the bacterial communities on the 16S rDNA resulted in a clustering distinctively different from that based on the 16S rRNA. This indicated that active bacterial communities in the surface were similar to total bacterial communities.

Spearman rank correlation coefficients were calculated to examine the relationships between OTU richness and environmental parameters. The number of the 16S rDNA OTUs in the surface is correlated with both depth and bacterial abundance (respectively,  $r = 0.62$ ,  $p < 0.01$ ;  $r = -0.72$ ,  $p < 0.01$ ). However, the number of the 16S rRNA OTUs did not show significant correlations with environmental parameters. The community structure of marine bacteria exhibited different constitution, whose boarder was shown to exist at 200 m in depth. Bacterial community, with high functional activity showed a similar community structure at the surface and the deep.

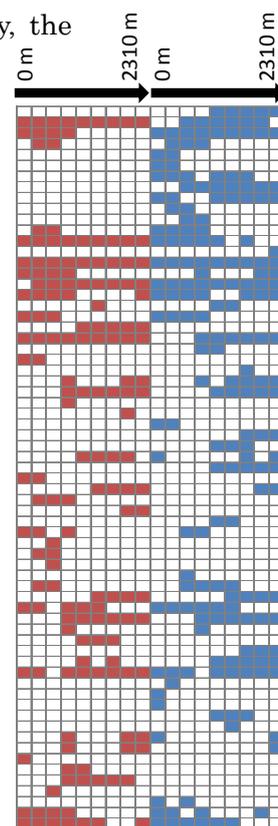


Fig. 2 Schematic representation of the t-RFLP peak patterns at St. T6  
 ■ : 16S rDNA, ■ : 16S rRNA

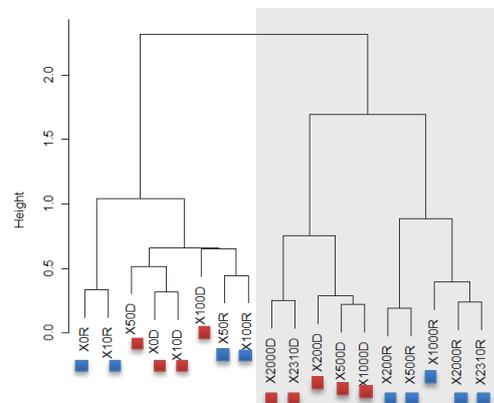


Fig. 3 Cluster analysis of bacterioplankton communities at St. T6