

# 内湾底質環境を反映する微生物群集とその平面分布の把握

Study on Socio-Cultural and Socio-Physical Environments

学籍番号 56815  
氏名 新井 俊介 (Arai, Shunsuke)  
指導教員 佐藤 弘泰 助教授

## 1. 研究背景と目的

近年、分子生物学的手法の発展に伴い、微生物を対象とした研究は飛躍的にその領域を広げた。その結果、培養困難な環境微生物についての研究も可能となり、以前に比べ簡便かつ迅速に微生物群集の様子を知ることができるようになった。

内湾の底質は様々な機能を有していることが知られている。富栄養化に伴う海底付近での貧酸素化は底質中の微生物による酸素消費がその一因である。その一方で、底質中に生息している硝化細菌・脱窒細菌は窒素循環を担うことから水質浄化に貢献していることが知られている。

このように内湾環境において底質とそこに生息する微生物の機能は極めて重要な要素である。しかしながら、底質と微生物の関係が明らかになっていないばかりか、底質がどのように形成し、また輸送されるのか未だに十分な知見が得られていないのが実情である。

底質中の微生物は酸素の有無、栄養塩類濃度の違いなど、生息環境の影響を受け群集構造を変動させると共に、その底質が持つ硝化・脱窒などの機能や性質を反映していると予測される。また、底質中の微生物は、底質とともに、『巻き上げ→輸送→堆積』

を繰り返していると考えられる。つまり、微生物群集構造の経時的变化やその平面分布を明らかにすることで、底質の挙動に迫れると期待される。

そこで本研究では、底質と微生物群集の関連性に着目して、微生物群集を通じて環境を把握することを目指した。

具体的には東京湾および有明海の底質において、

- 微生物群集構造を分子生物学的手法を用いて明らかにする
- それぞれの環境を反映した特徴的な微生物群集を把握する
- それらの微生物群集の経時的变化および平面分布を明らかにする

を行うことで、底質と微生物群集の関連性について新たな知見を得ることを目的とした。

## 2. 実験方法

### (1) 底泥サンプリング

本研究では2005年5月～12月にかけて東京湾で3地点×3回、および有明海では4地点×4回、底質のサンプリングを行った。また、2006年9月と12月に、有明海24地点および周辺河川等7地点から底質のサンプリングを行った。さらに2006年有明海サンプリングでは底質表層1cmと3cmで鉛直方向にとりわけた。

(a)は2005年東京湾サンプリング地点。湾中央部 (St. 8)、東京都側沿岸部 (St. 98)、千葉県側沿岸部 (St. 99) の3地点。(b)は2005年有明海サンプリング地点。諫早湾沖 (S1)、筑後川河口付近 (S3)、干潟沿岸部 (S4)、干潟 (T1) の4地点。(c)は2006年有明海サンプリング地点。サンプリングは船上から行い、解析に供するまで $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

(2) PCR-Cloning-Sequencing法  
 凍結保存しておいた底泥試料から IS0IL for Beads Beating (ニッポンジーン) を用いてDNAを抽出した。抽出方法は同社のプロトコルに従った。抽出したDNAは分光光度計 (Nano Drop ND-1000) で濃度を測定し、 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ になるように滅菌した超純水で希釈した。この抽出DNAを鋳型として、アンモニア酸化細菌をターゲットとしたPCR反応を行った。アンモニア酸化細菌を対象としたPCRは、CT0189 f<sup>2)</sup> (5' -GGA GR(G)A AAG C(T)AG GGG ATC G-3' ) とCT0654r<sup>2)</sup> (5' -CTA GCY TTG TAG TTT CAA ACG C-3' ) をプライマーセットを用い、 $95^{\circ}\text{C}$ 5分、 $92^{\circ}\text{C}$ 1分の熱変性の後、 $92^{\circ}\text{C}$ 30秒、 $62-0.5n^{\circ}\text{C}$ 30秒 ( $n+1$ はサイクル数)、 $72^{\circ}\text{C}$ 45秒のサイクルを11回繰り返し、その後 $92^{\circ}\text{C}$ 30秒、 $57^{\circ}\text{C}$ 30秒、 $72^{\circ}\text{C}$ 45秒のサイクルを24回繰り返し、最後に $72^{\circ}\text{C}$ で5分の伸長を行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動により確認した。  
 このPCR産物を対象とし、QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN)を用い、同社のプロトコルに従ってクローニングを行い、その後のSequencingに供し得られたクローンの塩基配列を決定した。

### (3) PCR-T-RFLP法

(2)の解析から得られた結果より、各地点における特徴的な微生物群集を反映させるような制限酵素を選択し、T-RFLP解析をおこなった。用いた制限酵素は東京湾で BsaJ I、有明海で Hpy99 I、Hpy188 III、HpyCH4 IVであり、これらをPCR産物と反応させるこ

とで、各地点における群集のプロファイル可視化させた。また得られたT-RFLPのデータから各細菌物群集の占める割合を算出し、各地点における細菌群集の構成比を求めた。

## 3. 実験結果

### (1) PCR-Cloning-Sequencing解析結果

東京湾および有明海のそれぞれ3地点サンプルを用いてアンモニア酸化細菌を対象としたPCR-Cloning-Sequencing解析を行った。解析したサンプルは東京湾の St. 8, St. 98, St. 99 と有明海の S1, S3, T1 である。得られた塩基配列情報をもとに作成した系統樹を示す。

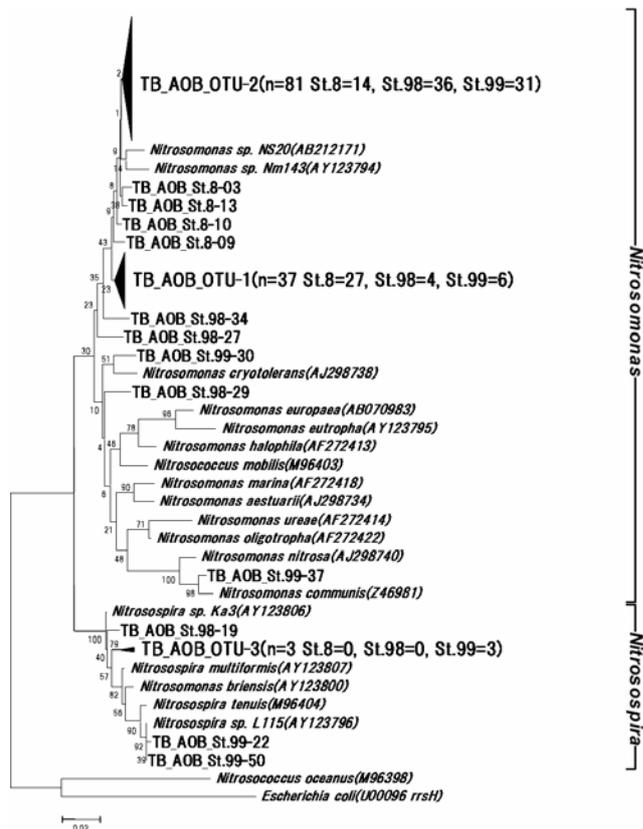


Fig.2 東京湾における AOB の系統樹

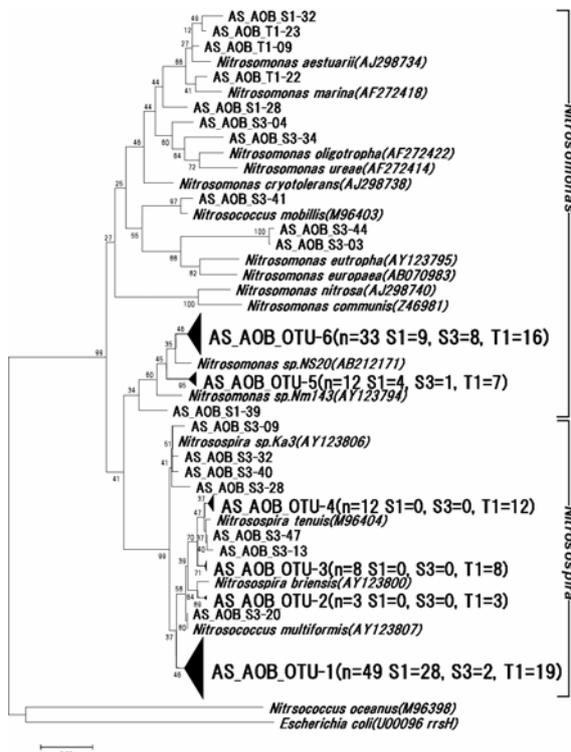


Fig. 3 有明海における AOB の系統樹

系統樹上で近縁な塩基配列をまとめて OTU を作成した。

東京湾からは主要な OTU が 2 つ検出された。また有明海からは主要な OTU が 6 つ検出された。

この解析結果より、以下の知見が得られた。

- 東京湾は極めて多様性が低く、そのほとんどが *Nitrosomonas* 属に属していた。
- 有明海は地点ごとにアンモニア酸化細菌群集の構成が異なっており、特に筑後川河口付近で特徴的な構成が得られた。

この結果を受けて、T-RFLP 解析を行った。

## (2)PCR-T-RFLP 解析

東京湾および有明海 2005 年サンプルを用いて T-RFLP 法による解析を行った。

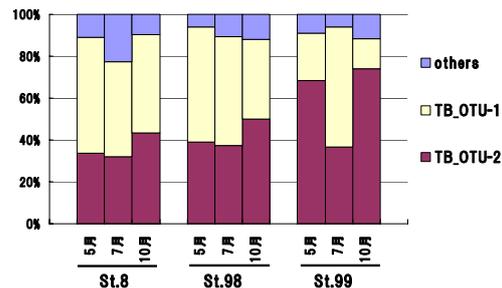


Fig. 4 東京湾 AOB の経時変化

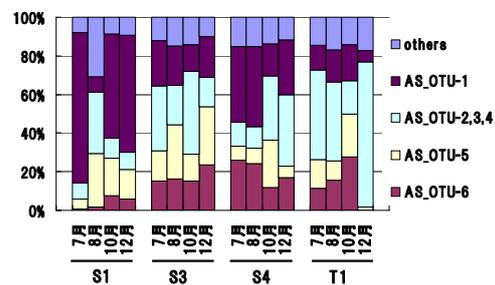


Fig.5 有明海 AOB の経時変化

2005 年サンプルより東京湾および有明海の各地点における経時変化を把握することが出来た。水質の変化など季節変動を細菌群集が反映していることがわかった。

2006 年有明海の解析結果より、各地点に特徴的なアンモニア酸化細菌群集が明らかになり、それぞれがどのように分布しているか把握することが出来た。

## 4. まとめ.

本研究より、微生物群集がその場の環境を反映していることがわかった。また、細菌群集の平面分布を明らかにすることで、底質の挙動を推測できることが示唆された。

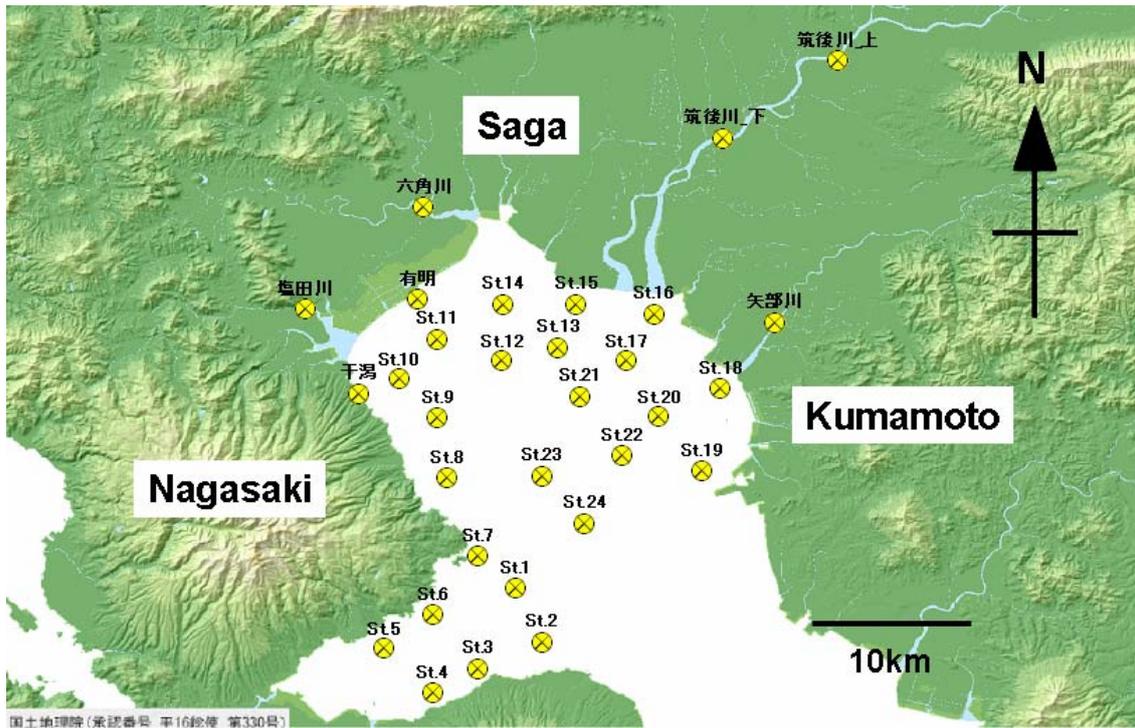


Fig.6 2006年有明海サンプリング地点

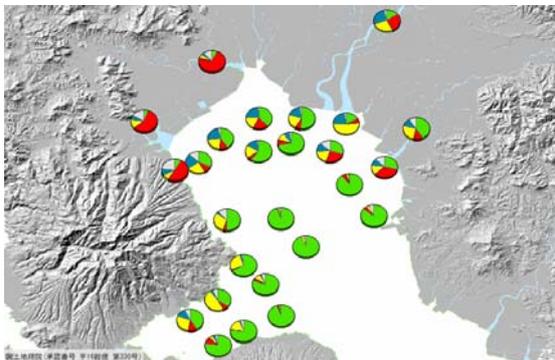


Fig.7 2006年9月 1cm

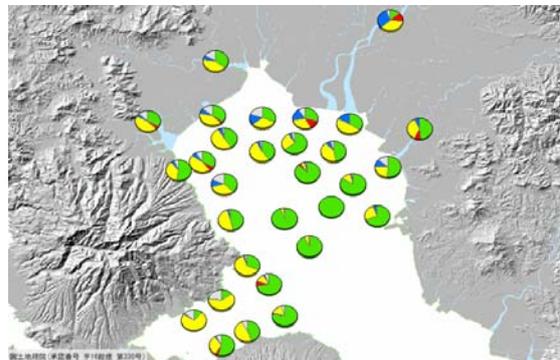


Fig.9 2006年12月 1cm

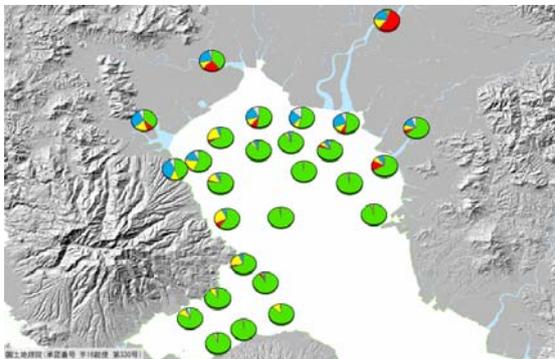


Fig.8 2006年9月 3cm

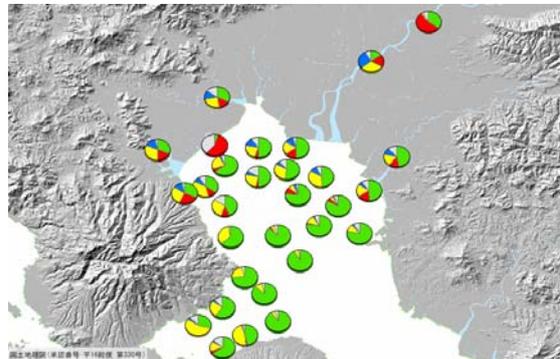


Fig.10 2006年12月 3cm