

DGGE 法による海洋深層水中の放線菌の群集組成解析

Community Analysis of Actinomycetes in Deep Seawater
using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

寺原 猛・加藤 朋・山田勝久・小林武志・今田千秋

Takeshi TERAHARA, Tomo KATO, Katsuhisa YAMADA, Takeshi KOBAYASHI and Chiaki IMADA

Abstract

Deep seawater (DSW) pumped up from unique environments such as those with low temperature and high pressure is of interest as excellent sources of beneficial microorganisms; however, only a few studies have been undertaken to investigate microbial community in DSW. In this study, we examined community structures of actinomycetes in DSW and surface seawater (SSW) samples collected from three DSW pumping stations in Japan (Izu-Akazawa and Yaizu in Shizuoka Prefecture and Muroto in Kochi Prefecture). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analyses revealed that the actinomycete community structures were markedly different between DSW and SSW samples. In addition, multi-dimensional scaling (MDS) analysis of the obtained DGGE profiles in Izu-Akazawa indicated that the actinomycete community structures in SSW varied seasonally and tended to be uniquely different structures in each season, whereas those in DSW were stable throughout the year compared with the structures in SSW.

Key Words: Deep Seawater, Actinomycetes, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) Analysis, Community Structure, Seasonal Change

要 旨

低温、高水圧の特異環境下から汲み上げられた海洋深層水（DSW）は、応用微生物学的見地からも様々な利用が期待されるが、微生物に関する基礎的知見は乏しいのが現状である。そこで、本研究では DSW 中に存在する微生物の中から、諸産業において重要視されている放線菌に着目し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE 法）を用いて、伊豆赤沢・焼津沖（駿河湾）・室戸沖の DSW と表面海水（SSW）の放線菌の群集組成を調べた。その結果、DSW と SSW では、放線菌の群集組成に大きな相違が確認された。また、伊豆赤沢の群集組成を多次元尺度法（MDS）で解析したところ、SSW では放線菌の群集組成は大きく変化し、季節ごと（3月～5月、6月～8月、9月～11月、12月～1月）に異なった群集を形成している傾向があつたが、DSW では群集組成は SSW と比較して変化が少なく、年間を通じて安定していることが示唆された。

キーワード：海洋深層水、放線菌、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE 法）、群集組成、季節変化

1. 緒 言

産業利用上の海洋深層水（以下、DSWと記述）は、一般的に水深約200m以深の海水であり、低温・清浄性・富栄養性などの性質を示すことから、温度差発電、海洋生物の増養殖、食品飲料水など様々な分野で利用されている（藤田・高橋、2006）。現在、全国各地で約15施設の海洋深層水取水施設が稼働し、それぞれ安定したDSWの取水が行われている。DSWは、応用微生物学的見地からも様々な利用が期待されるが、微生物に関する基礎的知見は乏しいのが現状である（今田、2009）。

放線菌は高GC（グアニン+シトシン）含量のグラム陽性菌に分類される細菌であるが、一般細菌とは形態が大きく異なる。これまで微生物由来の生理活性物質の半数以上が放線菌由来であることから、放線菌は現在でも各種有用生理活性物質の貴重な探索源となっている（Lazzarini *et al.*, 2000）。放線菌の主な生育環境は陸土壤であるが（Hayakawa *et al.*, 2000），近年、陸土壤中の放線菌からの新規生理活性物質の発見頻度は著しく減少している。このことから、新たな放線菌の探索源として、海洋環境が俄かに注目され、沿岸海域の海底堆積物中から多くの放線菌が分離されるようになってきた（Mincer *et al.*, 2002）。しかしながら、海洋における放線菌の生態や分布については未解明の点が多いのが現状である。

そこで、本研究ではDSW中の放線菌の群集組成を調べることを目的とした。一般に、海洋微生物の多くは、寒天培地を用いた通常の方法では培養できないため（Amann *et al.*, 1995），その多様性解析には、培養に依存しない「変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法」（以下DGGE法と記述）（Muyzer *et al.*, 1998）のような分子生物学的手法が用いられている。このDGGE法を用いて、静岡県伊東市の伊豆赤沢の海洋深層水取水施設で採水されたDSWと表面海水（以下、SSWと記述）について、放線菌の群集組成を調べた結果、DSWの放線菌の群集組成はほとんど季節変化が見られないのに対し、SSWでは大きく変化していた（今田、2010）。そこで、著者らは

伊豆赤沢のDSWとSSWの放線菌の群集組成の変化を多次元尺度法（Multidimensional scaling, 以下MDSと記述）で解析するとともに、比較のために焼津沖（駿河湾）、室戸沖のDSWとSSWについても、放線菌の群集組成を解析した結果を報告する。

2. 材料と方法

2.1 表層水と深層水のサンプリング

SSW（水深0m）とDSWの採水場所をFig. 1に示す。伊豆赤沢海洋深層水取水施設では、SSWとDSW（水深800m）を2009年3月から2010年1月まで1ヶ月ごとに採水した。各採水日は2009年3月30日（SSWを3S, DSWを3Dと表す）、4月21日（4S, 4D）、6月1日（6S, 6D）、6月24日（6S-2, 6D-2）、7月27日（7S, 7D）、8月25日（8S, 8D）、9月28日（9S, 9D）、10月28日（10S, 10D）、11月26日（11S, 11D）、12月15日（12S, 12D）、および2010年1月27日（1S, 1D）である。また、焼津沖（駿河湾）の海洋深層水取水施設では、SSWとDSW（水深397m）を2009年12月（12YS, 12YD）に採水した。高知県室戸市の海洋深層水取水施設では、SSWとDSW（水深374m）を2009年10月（10MS, 10MD）と2010年1月（1MD）に採水した。

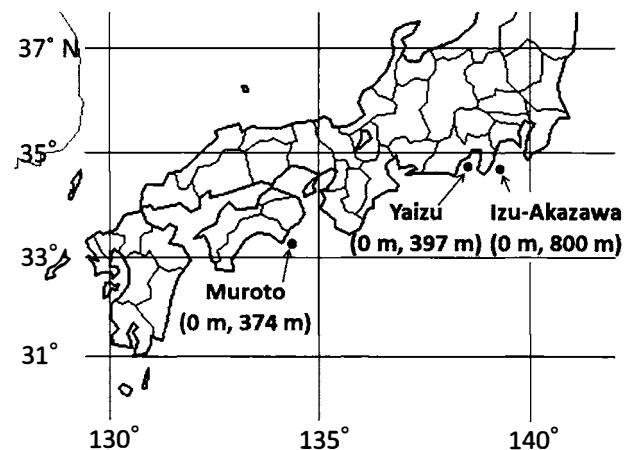


Fig. 1. Map of the study area, showing the location of the DSW pumping stations. Numbers under each station name indicate the depth for SSW and DSW sources, respectively.

2.2 DNA 抽出

各採水地点の1 L のSSW と2 L のDSW を孔径3.0 μm のスクリューフィルターでプレ濾過後、孔径0.2 μm のスクリューフィルターを用いて濾過集菌した。このフィルターをスクリューキャップ付チューブに入れ、TE バッファー-600 μL とリゾチム 20 μL (Wako, 5 mg/mL) を加えた後、37°Cで1時間インキュベーションした。次に、プロテイナーゼK 溶液3 μL (Invitrogen, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と10 % ドデシル硫酸ナトリウム 30 μL (以下、SDS) をそれぞれ加え、37°Cで1時間インキュベーションした後、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール混液（混合比=25:24:1）600 μL を添加し、ビーズホモジナイザー (MS-100R, Tomy Co.) を用いて、菌体を磨碎処理した(2,000 rpm, 15秒間)。処理後、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 溶液100 μL を加えて十分に攪拌した後、65°Cで10分間インキュベーションし、遠心分離した(20,000 $\times g$, 15分間, 20°C)。上清を除去後、SDS 溶液30 μL とクロロホルム-イソアミルアルコール混液（混合比=24:1）600 μL を加えた後、再度遠心分離(20,000 $\times g$, 20分間, 4°C)し、上清を分取した。この上清にイソプロパノール 600 μL を添加し、生じた沈殿からDNAを精製後、超純水 20 μL に溶解させ、-20°Cで保存した。

2.3 PCR

一般細菌のユニバーサルプライマー (341F, 1401R) と Stach *et al.* (2003) が設計した放線菌に特異的なプライマー (SC235F, SC878R) を用いて放線菌の16S rRNA 遺伝子を增幅した。PCR 溶液は、2 \times GoTaq[®]Green Master Mix (Promega Co.), 5 pmol のプライマーセット、抽出DNA 0.5 μL および滅菌水を混合し、総量 25 μL に調製した。1st PCR ではSC235F (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTG-3') と 1401R を用い、94°C (2分間) の初期加熱後、94°C (30秒間), 57°C (30秒間), 72°C (1.5分間) の3ステップを35回繰り返した後、72°C (7分間) で伸長反応を行った。2nd PCR ではテンプレートに100倍希釈した1st PCR 産物を用いた他は上記

と同様に調製し、GC クランプを付与したGC341F と SC878R (5'-CCGTACTCCCCAGGCCGGG-3') を用いて、94°C (2分間) の初期加熱後、94°C (1分間), 62°C (1分間), 72°C (1.5分間) の3ステップを15回繰り返した後、72°C (30分間) の伸長反応を行い、得られた2nd PCR 産物をDGGEに供した。

2.4 DGGE 解析

DGGE 法は電気泳動法の一種であり、バンドの数は微生物種の数を表し、バンドの濃さは各微生物種の菌数の多さを表している。そのため、DGGE 法はサンプル間の微生物群集組成を簡便に比較して調べることが可能である。ただし、PCR にはバイアスがあるので半定量的であり、電気泳動法のために解像度には限界もありうる。ゲルの作製方法、泳動条件、解析条件を以下に示す。8 % アクリアミドゲル溶液に10%過硫酸アンモニウムとテトラメチルエチレンジアミンをそれぞれ終濃度0.6%と0.06%になるように加えて、ゲルを重合させた後、Gradient Delivery System (Bio-Rad Co.) を用いて、変性剤の濃度勾配を30-65% (100%変性剤は7Mの尿素と40%のホルムアミドを加えたもの) に調製したゲルを作製した。電気泳動は微生物群集解析システム (Dcode System, Bio-Rad Co.) を用い、60°C, 100Vで18時間泳動した後、SYBR Gold (Invitrogen Co.) でゲルを30分間染色した。染色後、画像解析用イメージング装置 (Molecular Imager FX, Bio-Rad Co.) でゲルを写真撮影し、泳動結果を確認した。画像検出ソフト (Lane Multi Screener ver. 3.0, ATTO Co.) で各サンプルのバンドを検出した後、画像解析ソフト (Quantity One ver. 4.3.0, Bio-Rad Co.) でバンドの解析を行い、サンプル間の相同性を調べるために一般的にクラスター解析に用いられている非加重結合法 (以下、UPGMA 法) および多次元尺度法 (以下、MDS 法) で統計解析した (SPSS 13.0 for Windows, SPSS Co.)。

3. 結 果

3.1 伊豆赤沢の DSW と SSW の放線菌の群集組成

伊豆赤沢の DSW と SSW の放線菌の群集組成を DGGE 法で解析した結果、両者とも 2 ~ 10 本程度のバンドが確認されたが、群集組成には大きな相違がみられた (Fig. 2)。バンド 1~5 は複数の DSW サンプルで検出されたが、SSW では未検出もしくは一部のサンプルからの検出に留まった。そこで、各サンプル間の相同意を UPGMA 法および MDS

法で統計解析した。その結果、距離行列から系統樹を作成する UPGMA 法で DSW と SSW でクラスターが明確に二つに分かれたことから、DSW と SSW の放線菌の群集組成が大きく異なることが示唆された (Fig. 3)。また、SSW のクラスターは枝分かれが早く、DSW に比べて SSW の放線菌の群集組成は多様性が高いことがわかった。さらに Fig. 4 に示すように、各サンプル間の相同意を 2 次元平面上に投影できる MDS 法からもその傾向がみられ、DSW では比較的まとまった分布を示し、DSW の放線菌の群集組成は年間を通じてあまり変化が見られない

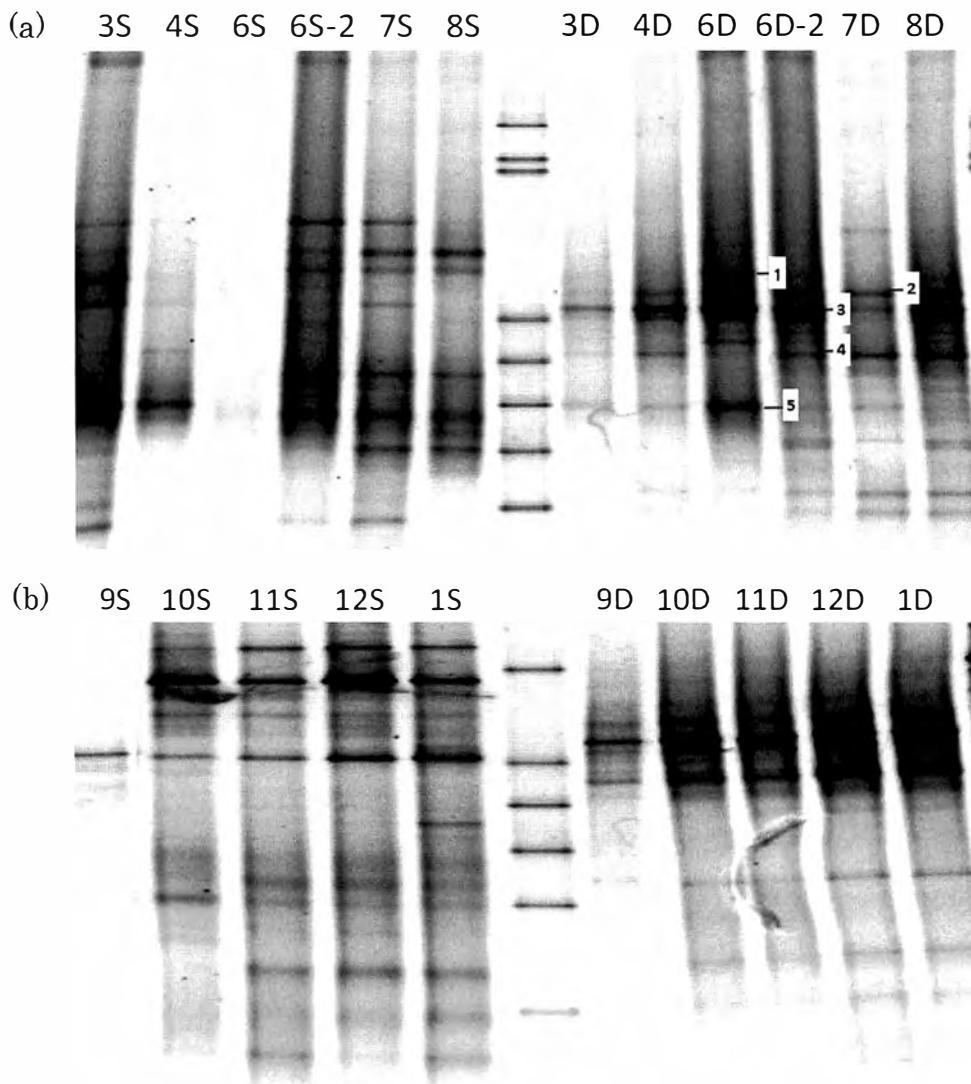


Fig. 2. DGGE profiles of actinomycetes in DSW (D) and SSW (S) collected from the pumping station for deep seawater in Izu-Akazawa. (a) The samples were collected from March to August, 2009. (b) The samples were collected from September 2009 to January 2010. Months when DSW and SSW were collected represent at the top of each lane. For instance, 3S represents the surface seawater collected in March and 3D represents the deep seawater collected in March.

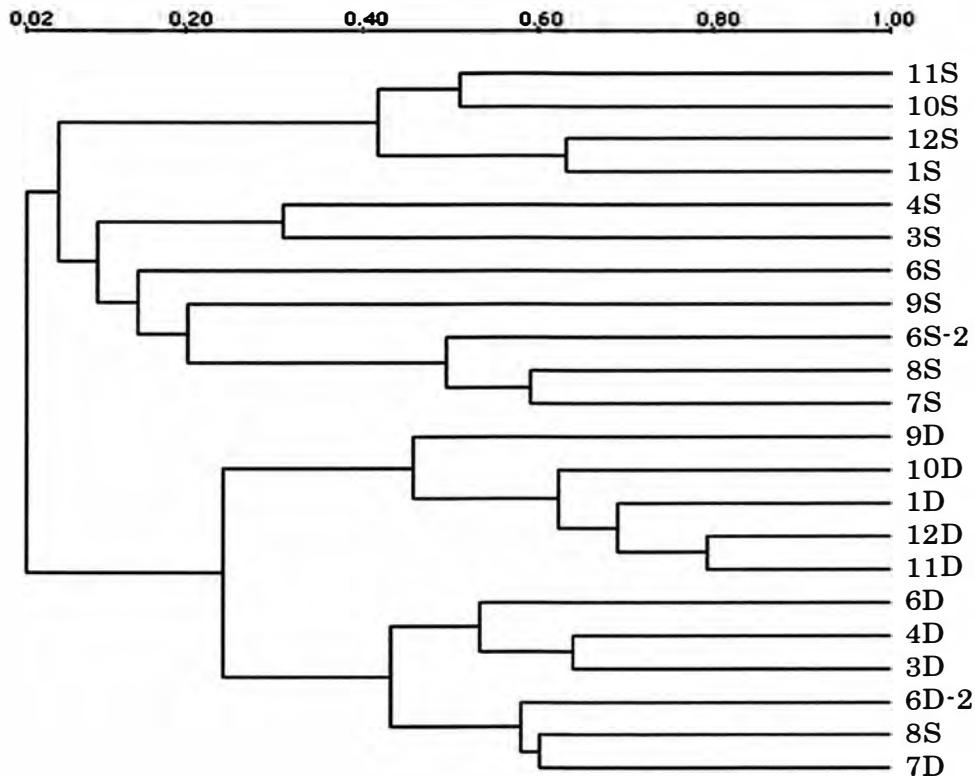


Fig. 3. Dendrogram derived from DGGE analysis of the actinomycetal community structures in DSW and SSW collected from the pumping station for deep seawater in Izu-Akazawa. Months when DSW and SSW were collected represent at the top of each lane.

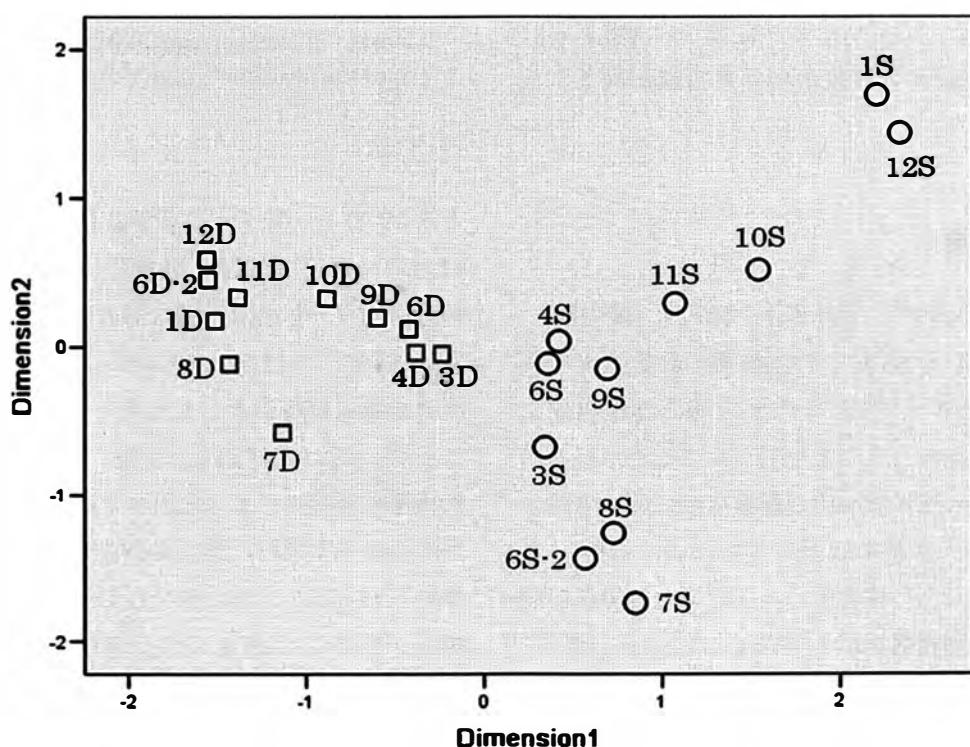


Fig. 4. MDS profiles based on the DGGE patterns in DSW and SSW collected from the pumping station for deep seawater in Izu-Akazawa, showing the actinomycetal community structures in DSW were stable throughout the year, whereas those in SSW represented seasonal change. Months when DSW and SSW were collected represent at the top of each lane.

ことがわかった。一方、SSW では放線菌の群集組成には季節変化が示唆され、季節ごと（3月～5月、6月～8月、9月～11月、12月～1月）にまとまった分布傾向がみられた。Fig. 2 に示した泳動図では、たとえば 10S から 1S の群集組成が同一であるように見えるが、SSW のバンドは幅広く、多くの放線菌種から構成されている。統計解析によって、その群集組成が異なっており、放線菌の多様性が DSW に比べて大きいことが示された。

3.2 焼津沖（駿河湾）、室戸沖、伊豆赤沢の DSW と SSW の放線菌の群集組成

焼津沖（駿河湾）と室戸沖の DSW と SSW における放線菌の群集組成を 3.1 と同様に解析した結果、どのサンプルからも 10 本程度のバンドが確認されたが、伊豆赤沢と同様に DSW と SSW で群集組成には大きな相違がみられた (Fig. 5)。そこで、伊豆赤沢の DGGE データ（2009 年 10 月～2010 年 1 月）も加えて UPGMA 法で群集組成を統計解析した。その結果、Fig. 6 に見られるように焼津沖（駿河湾）の SSW を除き、DSW と SSW のクラスターに分かれた。このことから、種々の海域においても DSW と SSW の放線菌の群集組成が異なることが示唆された。

4. 考 察

DGGE 法を用いて、伊豆赤沢・焼津沖（駿河湾）・室戸沖の DSW と SSW 中の放線菌の群集組成を調べた結果、DSW と SSW での放線菌の群集組成に大きな相違が見られることを明らかにした。日本沿岸海域における海洋放線菌の群集組成に関する報告例は少ないが、本結果は Yoshida *et al.* (2008) と良い一致を示した。放線菌のみならず一般細菌の群集組成も深度別相違を示し (Yoshida *et al.*, 2007), 水温や溶存酸素の低下よりも表層から沈降してくる粒状有機物の質や量が微生物の群集組成に強い影響を与えることが報告されている (Yoshida *et al.*, 2007, 2008)。また、DGGE 法の結果を統計解析したところ、焼津沖（駿河湾）の SSW を除き、DSW

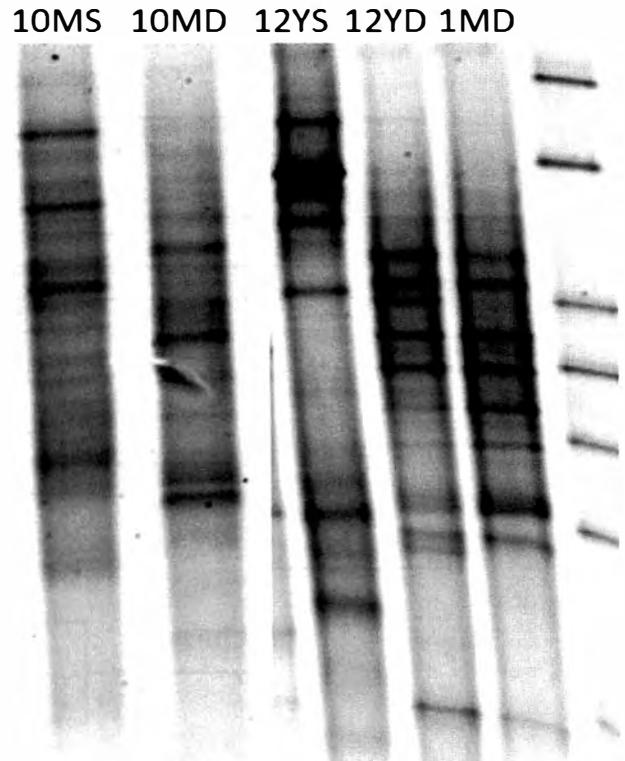


Fig. 5. DGGE profiles of actinomycetes in DSW (D) and SSW (S) in the pumping stations for deep seawater in Izu-Akazawa and Yaizu (Y) in Shizuoka Prefecture and Muroto (M) in Kochi Prefecture. Months when DSW and SSW were collected represent at the top of each lane. For instance, 10MS represents the surface seawater collected from Muroto in October and 10MD represents the deep seawater collected from Muroto in October.

と SSW のクラスターに分かれた (Fig. 6)。駿河湾は沿岸付近まで深海底が接近している急深の海底地形であり、冬の海水温は海表面から水深約 300 m まで 13-15°C でほぼ一定であることから、湧昇流が生じて深海生物が水面まで浮上してくることが報告されている (久保田ら, 2008)。駿河湾の DSW の放線菌も湧昇流により水面まで浮上することにより、さらには冬季冷却に伴う鉛直混合の影響により、焼津沖（駿河湾）では SSW と DSW の放線菌の群集組成が類似し、DSW のクラスターに含まれたのではないかと考えられる。

また、伊豆赤沢の DGGE 結果を MDS 解析したところ、DSW では年間を通じて群集組成にあまり変化が見られなかったのに対し、SSW では季節変化が示唆され、季節ごとにまとまった分布傾向がみ

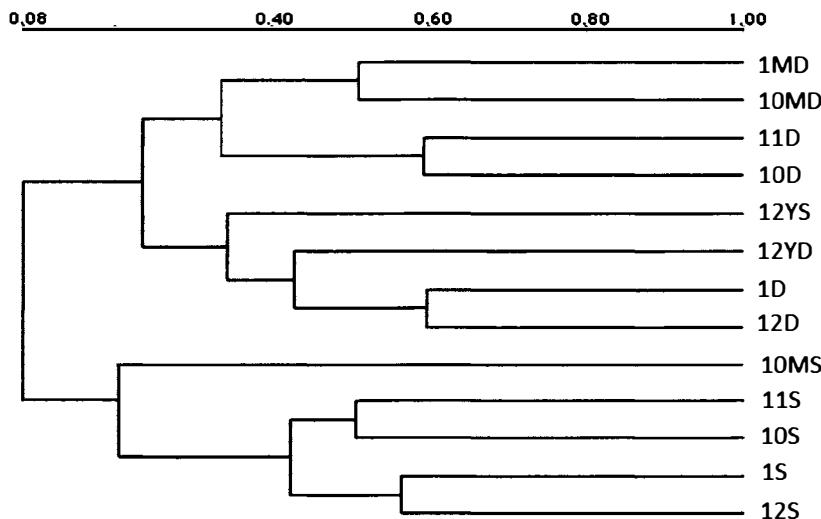


Fig. 6. Dendrogram derived from DGGE analysis of the actinomycetal community structures in DSW and SSW collected from the pumping stations for deep seawater in Izu-Akazawa, and Yaizu (Y) in Shizuoka Prefecture and Muroto (M) in Kochi Prefecture. Months when DSW and SSW were collected represent at the top of each lane.

られた (Fig. 4). 伊豆赤沢は相模湾に面しているが、相模湾のSSWは、黒潮、東京湾水、河川水およびこれらの混合水の影響を受けるため、時空間変動が大きいと考えられる。また、相模湾のSSWでは植物プランクトン（クロロフィルa）が春季と秋季に増大することが報告されている (Hashihama *et al.*, 2008)。これに伴い、動物プランクトンの大増殖も見られるが、その後これらの死滅によってSSW中の有機物量が変化するために、放線菌の群集組成に季節変化が生じたのではないかと推察される。

このように DSW 中の放線菌の群集組成は SSW と大きく異なることが示唆されたが、この点については再現性を含め、今後も継続して調査する必要があると考えている。年間を通じて比較的一定であり、採水の時期に大きく影響されることなく、DSW 中の特異な微生物の分離が可能であるということから、DSW は応用微生物学的見地からも有益な分離源であると思われる。

謝 辞

表層水および深層水の採水に御協力いただいた焼津沖（駿河湾）の海洋深層水取水施設、室戸市の海洋深層水取水施設に感謝の意を表する。

参考文献

- Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.
- 藤田大介・高橋正征 (2006) 海洋深層水利用学：基礎から応用・実践まで. 成山堂書店、東京, 209 pp.
- Hashihama, F., N. Horimoto, J. Kanda, K. Fukuya, T. Ishimaru and T. Saino (2008) Temporal variation in phytoplankton composition related to water mass properties in the central part of Sagami Bay. *J. Oceanogr.*, 64, 23-37.
- Hayakawa, M., M. Otoguro, T. Takeuchi, T. Yamazaki and Y. Iimura (2000) Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 171-185.
- 今田千秋 (2009) 応用微生物学的見地から見た海洋深層水と海底堆積物の有効利用. *海深研*, 10, 33-40.
- 今田千秋 (2010) 海洋深層水の利用－微生物の宝探し. *日水誌*, 76, 727.
- 久保田正・佐藤武 (2008) 三保海岸（駿河湾）に生存状態で打ち上がったミズウオの記録. 東海大学紀要海洋科学部, 6, 11-17.
- Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 399-405.
- Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman and W.

- Fenical (2002) Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5005–5011.
- Muyzer, G. and K. Smalla (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127–141.
- Parsons, T. R., M. Takahashi and B. Hargrave (1995) Biological oceanographic process. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, pp. 24–36.
- Stach, J. E., L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow and A. T. Bull (2003) New primers for the class actinobacteria: Application to marine and terrestrial environments. *Environ. Microbiol.*, 5, 828–841.
- Yoshida, A., M. Nishimura and K. Kogure (2007) Bacterial community structure in the Sulu Sea and adjacent areas. *Deep-Sea Res.*, 54, 103–113.
- Yoshida, A., Y. Seo, S. Suzuki, T. Nishino, T. Kobayashi, N. Hamada-Sato, K. Kogure and C. Imada (2008) Actinomycetal community structures in seawater and freshwater examined by DGGE analysis of 16S rRNA gene fragments. *Mar. Biotechnol.*, 10, 554–563.

(2012年6月29日受付；12月10日受理)