

20周年記念号

清浄性の高い海洋深層水中の細菌群集に光を当てる

Highlighting Bacterial Communities in Strikingly Clean Deep Seawater

寺原 猛¹・山田勝久²・池上康之³・五十嵐康弘⁴・今田千秋¹

Takeshi TERAHARA¹, Katsuhisa YAMADA², Yasuyuki IKEGAMI³, Yasuhiro IGARASHI⁴ and Chiaki IMADA¹

1. 緒 言

海洋深層水（以下、DSWと記述）の特徴のひとつに微生物が少ない清浄性があげられる。実際、伊豆赤沢海洋深層水取水施設のDSW中の生菌数はその直上の表層海水（以下、SSWと記述）と比べ、約千分の一程度であると報告されている（今田，2012）。一方、富山湾深層水からの乳酸菌の分離と諸性状（林ら，2007）や伊豆赤沢海洋深層水取水施設のDSW中の懸濁物の除去に用いるバッグ状フィルターから分離した微生物が生産する細胞賦活物質の研究（柴田ら，2016）の報告など、特異的な環境であるDSW中には特異的な生理・生化学的諸性状を有する有用微生物あるいは新規微生物の存在が期待される。

微生物の新たな探索源として、海洋環境が注目されるようになってきたが、その対象は海底堆積物や海洋生物であることが多く、海水を分離源とする微生物、特にDSW中に存在する微生物に関する基礎的知見は十分ではない（今田，2009）。そこで、筆者らはDSWを微生物の分離源として活用するに先立ち、日本各地のDSW中の微生物群集組成を調べた。微生物（特に海洋微生物）は寒天培地を用いた通常の方法では培養できないことが多い（Amann *et al.*, 1995）、DSWから抽出した微生物DNAを用い、微生物群集組成解析に汎用されている分子生物学的手法の一つである「変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法」（以下、DGGE法と記述）（Muyzer *et al.*,

1993）や次世代シーケンサーを用いて解析した。日本各地のDSW中の細菌群集組成解析の結果を報告するとともに、今後の展望についても述べる。

2. 方 法

日本各地の海洋深層水取水施設からDSWとSSWを入手した。入手したサンプルは孔径3.0 μm のヌクレポアフィルターを用いて懸濁物などを濾過した後、さらに孔径0.2 μm のヌクレポアフィルターで濾過し、微生物をフィルター上に捕捉した。このフィルターから微生物DNAを定法によって抽出し、真正細菌の16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマーを用いてPCRを行った。DGGE法ではGC-clampを付与したプライマーを用いて細菌群集組成を解析した。次世代シーケンス解析では、454 Genome Sequencer FLX systemにより得られたデータはRAST (MG-RAST) server (<http://metagenomics.anl.gov/>) によって解析し、Miseqにより得られたデータはMiSeq SOP (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP) を用いてOTUを作成し、QIIME1.8.0 (<http://qiime.org/>) によって解析することで、各サンプルの細菌群集組成を調べた。

3. 結果および考察

日本各地の取水施設から2010年から2011年にかけて春夏秋冬に1回ずつ入手したDSWとSSWを

¹ 東京海洋大学（〒108-8477 東京都港区港南4-5-7）

² DHC（〒106-8571 東京都港区南麻布2-7-1）

³ 佐賀大学（〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町1）

⁴ 富山県立大学（〒939-0398 富山県射水市黒河5180）

Table 1. Summary of the pyrosequencing data of the five seawater samples

	Tokyo Bay		Izu-Akazawa		Toyama	
	SSW	DSW	SSW	DSW	SSW	DSW
Total Size of sequences (bp)	13,984,630	9,239,717	9,880,725	1,025,693	2,425,709	
No. of reads	42,554	27,949	30,114	3,111	7,387	
Total Size of sequences that passed quality control (bp)	13,706,020	9,205,942	9,748,634	1,010,162	2,339,936	
No. of reads that passed quality control	41,737	27,849	29,720	3,068	7,131	
Mean sequence length (bp)	328	330	328	329	328	
Number of taxonomic hits (known phyla)	21	27	22	17	14	

DGGE法にて解析した結果、DSWとSSW中の細菌群集組成は異なることがわかった。さらに、DSW中の細菌群集組成は取水施設や採水時期によって多様であり、取水施設との地理的関連は確認できなかった (Terahara *et al.*, 2016)。

また、別途入手したDSWとSSW (伊豆赤沢・2012年、富山(滑川)・2013年)の細菌群集組成を454 Genome Sequencer FLX systemを用いて解析した結果 (Table 1)、DSW中の細菌種数はSSW中よりも多く、DSWのほうが多様性は高いことが示唆された (Terahara *et al.*, 2016)。

さらに、日本各地の7か所から2013年11月と2014年2月に入手したDSWとSSWをMiseqにより解析した結果、細菌群集の95%以上が4つの門 (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*) と未同定の門で占められることがわかった。また、DSW中の細菌種数 (7か所の平均) はSSW中よりも多く、DSWのほうが多様性は高いことが示唆された (海洋深層水利用学会2016滑川大会にて発表)。

4. 展 望

DGGE法と次世代シーケンス解析の結果、日本各地のDSW中の細菌群集は多様であることが示唆された。ただし、基礎的情報として用いるためには定期的なサンプリングや解析数を増やす (数日間続けて採水してデータを平均化する) など、データの更なる蓄積が必要であろう。DNA情報では生菌・死菌の区別はつかないため、DSW中の細菌の多くは死菌であることも考えられるが、特異的な生理・生化学的諸性状を有する微生物の新たな分離源の一助となる

ことを期待したい。

謝 辞

SSWおよびDSWを提供して頂きました海洋深層水取水施設の関係者の皆様、次世代シーケンス解析でお世話になりました中山先生 (九大) を始めとする共同研究者の皆様に心より御礼申し上げます。

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. Mol. Biol. Rev.*, 59, 143-169.
- 林 篤志・嶋田貴志・尾仲宏康・古米 保 (2007) 富山湾深層水からの *Enterococcus* 属乳酸菌の分離と諸性状の検討. *日本乳酸菌学会誌*, 18, 58-64.
- 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. *海洋深層水研究*, 10, 33-40.
- 今田千秋 (2012) 海洋における新有用微生物. *海洋深層水研究*, 13, 33-40.
- 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.
- 柴田雄次・齋藤美恵・山田勝久・寺原 猛・小林武志, 今田千秋 (2016) 伊豆赤沢海洋深層水から分離した微生物が生産する細胞賦活物質の研究. *海洋深層水研究*, 17, 9-16.
- Terahara, T., K. Yamada, J. Nakayama, Y. Igarashi, T. Kobayashi, and C. Imada (2016) Bacterial community structures of deep-sea water investigated by molecular biological techniques. *Gene*, 576, 696-700.