

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成14年度博士課程 入学

氏名 吉田明弘
指導教官名 木暮一啓

論文題目

Studies on marine bacterial community structure using denaturing gradient gel electrophoresis and multidimensional scaling.

(変性剤勾配ゲル電気泳動法と多次元尺度法を用いた海洋細菌群集組成に関する研究)

微生物は通常、共通の遺伝子を持つ他の細胞と共存し、個体群を形成している。個体群もまた他の個体群と相互作用を行いながら群集を形成している。

生物の維持と増加には物質とエネルギー源の供給が必要であり、それぞれの化学的環境はそれを利用する微生物の種類を規定する。また、供給された物質とエネルギー源は細胞内の一連の化学反応により使われ、最終産物が細胞外に排出される。こうした排出はその場の化学的環境を変えると同時に、群集構造自体をも変化させる。化学反応の速度は温度などの物理的条件に依存するので、細胞の増殖も物理的な条件に左右される。

このように、海洋の細菌群集構造はその化学的、物理的環境によって規定されると同時に、生物間の相互作用を反映している。微生物の群集構造の解明はこうした生物と環境との統合的理解に必須の基本情報と言える。

群集構造の解明の条件は、第一に全ての個体群を把握できること。第二に定量的であること、第三に個々の種変動ではなく全体の変動を何らかの形で数値化し、把握できることである。こうした条件を考慮すると、培養に依存する方法は全体のごく一部しか把握できないので、適当でない。従って培養によらないいわゆる分子生物的方法の利用は必須である。分子生物的方法にも様々あり、主要には三つがあげられる。まず、クローンライブラリー等を用いた網羅的解析で、近年報告されたメタゲノム解析もこれにあたる。これらの方法は第一、二番目の条件を満たすことができるが、解析にかかる時間、費用、手間が多大であり、第三の目的に対しては現実的でない。2つ目は蛍光 *in situ* ハイブリダイゼ - シ

ヨン法等の遺伝子ハイブリダイゼーション法を用いた微生物群集の現存数解析であり、個々の細胞を顕微鏡下で直接識別、計数するために、第二、三番目の条件を満たす。しかし、これで把握できる群集の範囲はプローブに依存しており、現実には例えば γ -Proteobacteria のように、極めて大きな範囲、または特定の個体群のみの検出のように極めて狭い範囲での把握しかできない。一方、変性剤勾配ゲル電気泳動法(DGGE)や末端制限断片長多系法(T-RFLP)等のフィンガープリンティング法は微生物群集の遺伝的多様性を見ることができ、群集組成の空間的多様性や時間的変動を見るのに適している。中でも DGGE は得られた結果から直接遺伝情報を解析できるため、上記の三つの条件をかなり満足させる。しかしそれぞれの条件については体系的な検討が必要であると判断される。

第三番目の条件を満たす解析手段としてバンドパターンを解析する手法は最も適していると考えられる。中でも多次元尺度法(Multi Dimensional Scaling、MDS)は群集組成の変化を二次元座標上の点の位置で視覚的に捉えることができ、微生物群集組成の動態解析にとって有用な解析手法であると考えられる。

本研究では、代表的ないくつかの環境要因による微生物群集組成の動態をDGGE-MDSによって解析し、群集組成の変化のプロセスを知ることを目的とした。この目的を達成するにあたり、まずDGGE法の検討を行い、上記の条件を満たすような解析法を体系的に確立した。第二に、この方法を化学的条件の異なるメソコズム中の細菌群集に適用して群集構造の変化を連続的に追跡し、どのような要因がその変化に寄与するかを明らかにした。第三に、海洋の鉛直的な群集構造の変化に着目し、それがどのような条件に応じて変化するかを真正細菌、古細菌のそれぞれについて解析を行った。

1. DGGE の標準化

DGGE-MDS における標準化を細胞濃縮、DNA の抽出、PCR、DGGE の項目において行った。細胞の濃縮は濾過装置を作成し、濃縮にかかる手間と時間を大幅に削減することができた。DNA の抽出は複数の手法の検討を行い回収率、群集ごとの抽出効率を比較して Somerville ら(1989)の方法を採用した。PCR は増幅ミス回避するためホットスタート法、タッチダウン PCR 法を行い、PCR のバイアスを回避するため PCR のサイクル数を調整して行った。信頼性のある群集組成解析を行うにあたり、DGGE の定量性の検討もを行い、PCR 産物 200ng を DGGE ゲルにアプライし、SYBR Green I で染色、レーザーキャナを用いて検出することで感度・解像度の向上を図った。

2. 化学的要因による細菌群集組成の変化：石油と分散剤の細菌群集に与える影響

上記の検討によって確立した DGGE-MDS 法を用い、メソコズムにおける細菌群集構造の時系列的な変動を解析し、その変動を招く主要因について検討した。このメソコズムは石

油汚染およびその際に添加される分散剤が微生物食物連鎖構造にどのような影響を与えるかを調べる目的で設置されたものである。

メソコズム実験は、直径 1.5m、水深 3m、容量 5000L のメソコズムに浜名湖沿岸海水を満たし、何も添加しないもの(天然海水区)、A 重油水溶性画分を添加したもの(石油区)、A 重油水溶性画分と分散剤を添加したもの(石油分散剤区)を用いて行った。マイクロコズム実験は容量 5L の滅菌したボトルに横浜港海水を満たして行った。この際、メソコズム実験に加え分散在のみを添加したもの(分散剤区)を追加して行った。それぞれの実験で 1 日毎に 5 日間サンプリングを行った。得られたサンプルから DNA を抽出し、PCR を行い、得られた PCR 反応物を用いて DGGE を行い、MDS により、類似度を視覚化した。

メソコズム実験では石油区では細菌数が一旦増加した後に減少したが、石油分散剤区では石油と分散剤の添加直後に石油区の 3 倍程度の増殖が見られ、その後も細菌数は高い値で維持された。一方それぞれの群集組成の変化は石油区では細菌数の減少と同時に起こっているのに対し、石油分散剤区では細菌の増殖と同時に起こっていた。また、石油分散剤区の群集組成の変化は石油区のものとは大きく異なっていた。石油分散剤区で見られた以上の変化はマイクロコズム実験の分散剤区でも確認された。以上の結果から、分散剤の添加が細菌群集の数と群集組成に大きく影響することが明らかになった。また、この解析には DGGE-MDS の方法が有効であり、従来の DGGE 法のみでは群集全体の変化を適切に表わすことができないことが確認された。

3. 物理的要因による微生物群集組成の変化：スーラー海とその周辺海域における微生物群集組成解析

上記のメソコズム実験は、特定の環境条件を人為的に作りだし、どのような条件が微生物群集の遷移に大きな役割を果たすかを実験的に検証することができる。しかし天然海水中の細菌群集の解析にはそのようなアプローチはできない。どのような物理化学的要因が微生物群集構造を規定しているのかを知るには、相互に条件の異なる場から海水試料を採取し、比較する必要がある。そこで、海洋での鉛直方向の群集組成の変化に着目し、水深 1000m 以深においても比較的高い水温(約 10℃)を保つ特殊性の高い海域であるスーラー海とその周辺海域で解析を行った。また、この解析は真正細菌および古細菌のそれぞれについて行い、2 つのドメイン間の違いを調べた。

採水した測点はスーラー海 4 点と北太平洋、セレベス海、南シナ海各 1 点であった。すべての測点で水深 10、100、1000m、北太平洋、セレベス海、南シナ海で水深 4000m、スーラー海の測点のうち 2 点では水深 3000m でそれぞれ採水を行った。採水はニスキン採水器にて行った。

得られたサンプルから微生物細胞を濃縮し DNA を抽出後、細菌と古細菌にそれぞれ特異的なプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 反応物を用いて DGGE を行い、MDS

により、類似度を視覚化した。

細菌群集組成は水平方向よりも、むしろ鉛直方向に大きく異なっていた。1000m 以深ではスルー海と周辺海域では温度・溶存酸素が大きく異なるにもかかわらず群集組成は類似していた。一方温度がスルー海の 1000m と 3000m では温度・溶存酸素が等しいにもかかわらず群集組成が異なっていた。以上より深海の細菌群集を決定する要因として温度・溶存酸素は重要でないことが示唆された。溶存有機態炭素の現存量と種類、または水圧が深海での細菌群集組成を決定する大きな要因であると考えられた。

古細菌群集組成もまた鉛直方向に大きく異なっていたが、深海では細菌群集と異なり深度による群集組成の成層構造が弱かった。また、古細菌の種の多様性は細菌の多様性に比べて高かった。以上より細菌と古細菌の群集組成を決定する要因は異なっていることが示唆された。

本研究では、DGGE-MDS を確立後、化学的環境条件を変えたメソコズム、およびスルー海とその周辺海域において微生物群集構造の変化を時空間的に解析した。その結果、この方法が群集全体の変化を把握するのに有効であること、メソコズムでは分散剤という化学物質がその組成変化を規定していること、外洋では海域によらず鉛直的な方向に群集組成が変動する傾向を示すが、その応答は真正細菌と古細菌の間に違いがあることが明らかになった。