

DGGE法による海洋深層水中の微生物群集組成解析

Microbial Community Analysis of Deep Seawater by
Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

寺原 猛・山口貴大・山田勝久・小林武志・今田千秋

Takeshi TERAHARA, Takahiro YAMAGUCHI, Katsuhisa YAMADA,
Takeshi KOBAYASHI and Chiaki IMADA

Abstract

Deep seawater (DSW), about which there are few microbial reports, is of interest as excellent sources of novel microorganisms or ones with unique natures; however, only a few studies have been undertaken to investigate the microbial community in DSW. In this study, we examined the community structures of bacteria and fungi in DSW samples collected from the pumping stations for DSW in Izu-Akazawa in Shizuoka Prefecture by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analyses. DGGE analyses revealed that several kinds of bacteria and fungi were present in DSW and the microbial community structures of attached microbes and free-living microbes differed. In addition, multi-dimensional scaling (MDS) analysis of the obtained DGGE profiles indicated that each community structure of bacteria and fungi changed throughout the year with the exception of a few months. Furthermore, sequence analyses of the obtained DGGE profiles to identify microorganisms indicated that bacteria belonging to new genera and novel fungi were present in DSW samples collected from the pumping stations in Izu-Akazawa.

Key Words: Bacteria, Deep seawater, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis, Fungi, Microbial community structure

要 旨

自然界でも微生物に関する研究が少ない海洋深層水 (DSW) 中には全く未知の、あるいは特異的な生理・生化学的諸性状を有する微生物の存在が期待されるが、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、一般細菌および真菌を対象にして、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE法) を用いて、微生物群集組成をそれぞれ調べた。その結果、年間を通じて様々な群集の存在が示唆された。また、溶存態有機物に付着している微生物 (A) と遊離して存在している微生物 (F) の群集組成は異なっていることがわかった。さらに、多次元尺度法 (MDS法) で解析した結果、一般細菌および真菌ともに、群集組成は変遷することが示唆された。また、DGGEのバンドをシーケンス解析し、微生物を同定した結果、DSW中には属レベルで新規と思われる細菌や新規性が高いと思われる真菌の存在が示唆された。

キーワード：一般細菌、海洋深層水、真菌、微生物群集組成、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE法)

1. 緒 言

近年、陸土壤中の微生物からの新規生理活性物質の発見頻度が減少してきたことから、新たな微生物の探索源として、海洋環境が俄かに注目されるようになり、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、微生物の分離源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、特に海洋深層水 (以下、DSWと記述) 中に存在する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).

DSWは「光合成による有機物生産よりも有機物分解が卓越し、かつ、鉛直混合や人為的汚染の影響が少ない、補償深度以深の資源性の高い海水」と定義づけられている (高橋, 2000). 一般的に水深約200 m以深の海水であり、年間を通じて水温が低く、高い清浄性を有し、無機栄養塩が豊富に存在することから、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). このように、自然界においても微生物に関する研究が少ないDSW中には新規微生物、あるいは特異的な生理・生化学的諸性状を有する微生物の存在が期待できる.

そこで、本研究ではDSWを微生物の分離源として活用するに先立ち、DSW中の微生物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), 本研究ではDSWから抽出した微生物DNAを用い、微生物群集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) を用いて、微生物群集組成を調べることにした. なお、海洋環境中にはマリンスノーのような溶存態有機物 (Dissolved Organic Matter, 以下DOMと記述) に付着している微生物 (Attached Microbes, 以下Aと記述) とDOMに付着せずに遊離して存在している微生物 (Free-Living Microbes, 以下Fと記述) が存在し、AとFの群集組成は異なることが報告されている (Caron *et al.*,

1982). そこで、孔径 $3.0\mu\text{m}$ のフィルター上に集めたDSW中の微生物をA、この濾液中の微生物をさらに孔径 $0.2\mu\text{m}$ のフィルター上に集めたものをFと呼称することにした. 本研究では、一般従属栄養細菌 (以下、一般細菌と記述) および真菌を対象にして、DSW中のA、Fの群集組成をDGGE法および多次元尺度法 (Multidimensional scaling, 以下MDSと記述) によってそれぞれ解析した結果とともに、DGGEゲルから切り出したDNAバンドのシーケンスを解析し、微生物を同定した結果を報告する.

2. 材料と方法

2.1 海洋深層水 (DSW) のサンプリング

静岡県伊東市伊豆赤沢にある(株)DHC海洋深層水研究所の取水施設において、2012年1月から12月まで1カ月ごとにDSW (水深800 m) を取水した. 各取水日は2012年1月26日、2月21日、3月27日、4月25日、5月28日、6月27日、7月26日、8月27日、9月24日、10月29日、11月26日、および12月25日である.

2.2 DNA抽出

DSW 2 Lを孔径 $3.0\mu\text{m}$ のヌクレポアフィルターでプレ濾過後、その濾液をさらに孔径 $0.2\mu\text{m}$ のヌクレポアフィルターを用いて濾過集菌した後、各フィルターをスクリュウキャップ付チューブに入れた. このチューブにTEバッファ600 μL とリゾチーム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) をそれぞれ加えて、 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 (5,000 $\times g$, 30分間, 20°C). 遠

心分離後、得られた水層650 μ Lを新しいマイクロチューブ(1.5 mL容)に移し、これにSDS溶液30 μ L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 μ Lをそれぞれ加えた後、再度遠心分離(20,000 $\times g$, 20分間, 4 $^{\circ}$ C)し、その上清を分取した。これに3 M酢酸ナトリウム60 μ Lとイソプロパノール600 μ Lを添加し、遠心分離した(20,000 $\times g$, 30分間, 20 $^{\circ}$ C)。遠心分離後、生じた沈殿からDNAをエタノールで精製し、超純水20 μ Lに溶解させた後、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

2.3 PCR

一般細菌：ユニバーサルプライマー（GCクランプを付与したGC341F: 5'-GC-clamp-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', 907R: 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'）（Muyzer *et al.*, 1993）を用いて一般細菌の16S rRNA遺伝子断片を増幅した。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 μ Lおよび滅菌水を混合し、総量25 μ Lに調製した。これを94 $^{\circ}$ C（2分間）の初期加熱後、94 $^{\circ}$ C（1分間）、60 $^{\circ}$ C（1分間）、72 $^{\circ}$ C（1.5分間）の3ステップでPCRを30回繰り返した後、72 $^{\circ}$ C（30分間）の伸長反応を行い、得られたPCR産物をDGGEに供した。

真菌：ユニバーサルプライマー（GCクランプを付与したGCNL1: 5'-GC-clamp-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3', LS2: 5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'）（Cocolin *et al.*, 2000）を用いて真菌の26S rRNA遺伝子断片を増幅した。PCR溶液は上記と同様総量25 μ Lに調製した。94 $^{\circ}$ C（5分間）の初期加熱後、94 $^{\circ}$ C（1分間）、52 $^{\circ}$ C（45秒間）、72 $^{\circ}$ C（1分間）の3ステップを30回繰り返した後、72 $^{\circ}$ C（7分間）の伸長反応を行い、得られたPCR産物をDGGEに供した。

2.4 DGGE解析

8%アクリルアミドゲル溶液に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7 M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.）を用いて、60 $^{\circ}$ C、100 V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。次に画像解析ソフト（Quantity One ver 4.3.0, Bio-Rad Co.）でバンドの解析を行った後、各サンプル間の類似度を調べるために、多次元尺度法（以下、MDS法）で統計解析した（SPSS 13.0 for Windows, SPSS Co.）。また、微生物を同定するためにDNAバンドをゲルから切り出し、滅菌水で洗浄後、マイクロピペットチップの先端でゲルを物理的に細かく破碎し、DNAを抽出した。これを各微生物種に特異的なプライマーセットで再度増幅し（PCRのサイクル数は15サイクルとした）、増幅産物を確認したのち、精製（Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega Co.）を行い、DNAシーケンスに供した。得られた塩基配列をBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）にて検索し、微生物種の同定を行った。

3. 結果

3.1 一般細菌の群集組成

2012年1月から6月の伊豆赤沢DSW中の一般細菌の群集組成をDGGE法で解析した結果をFig. 1aに、7月から12月の結果をFig. 1bに示した。その結果、取水した月が同じであっても、AとFの群集組成は異なることが確認された（Fig. 1）。さらに、Aでは15~23本、Fでは16~25本のDNAバンドが確認された（バンドの数が最も多かった1Fに印を表記した）。伊豆赤沢DSW中には年間を通じて、様々な一般細菌が存在することが示唆された（Fig. 1）。続いて、DGGEの結果からDNAバンドの有無に基づき、各サンプル間の群集組成の違い（距離）を算出し、各サンプルの群集組成を2次元平面上の座標に投影できるMDS法を用いて統計解析した。その結果、Aの群

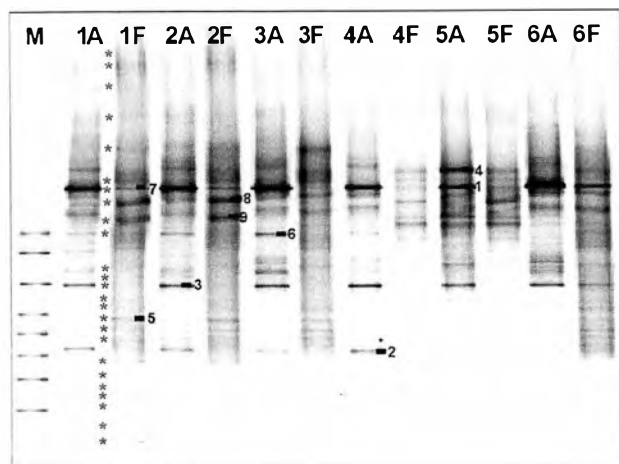


Fig. 1a

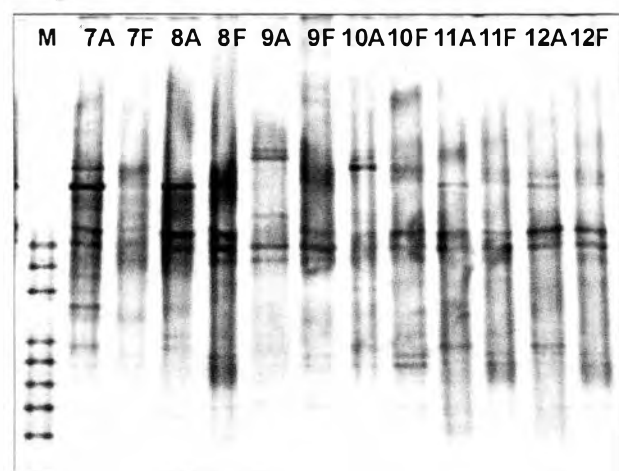


Fig. 1b

Fig. 1. DGGE profiles of bacteria in DSW collected from the pumping station for deep seawater in Izu-Akazawa. (a) The samples were collected from January to June, 2012. (b) The samples were collected from July to December, 2012. Months when DSW was collected represent at the top of each lane. For instance, 1A represents the attached bacteria collected in January and 1F represents the free-living bacteria collected in January.

集組成は1~4月ではあまり変遷しなかったが、5月以降は6~7月を除き、大きく変遷した。また、Fの群集組成は6~10月に大きく変遷していた (Fig. 2)。次にDGGEゲルから切り出したDNAバンドのシーケンスを解析し、AとFの細菌の同定を試みた結果、属レベルで新規と思われる細菌 (94%程度) や未培養クローンと高い相同性を示し、難培養性細菌の存在が示唆された (Table 1)。

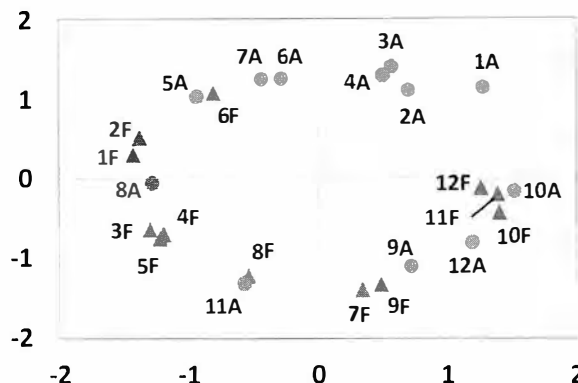


Fig. 2. MDS profiles based on the DGGE patterns in attached bacteria (A) and free-living bacteria (F) collected from the pumping station for deep seawater in Izu-Akazawa. Months when DSW was collected represent at the top of each sample.

3.2 真菌の群集組成

2012年1月から6月の伊豆赤沢DSW中の真菌の群集組成をDGGE法で解析した結果をFig. 3aに、7月から12月の結果をFig. 3bに示した。その結果、Aでは13~22本、Fでは11~24本のDNAバンドが確認され (バンドの数が最も多かった2Fに印を表記した)、さらにDGGEバンドパターンの変動も確認され、伊豆赤沢DSW中には様々な真菌群集の存在が示唆された (Fig. 3)。一般細菌と同様に、各サンプル間の真菌群集の類似度をMDS法で統計解析したところ、9~12月のFを除き、AおよびFの群集組成は月ごとで大きく変遷していた (Fig. 4)。また、DGGEゲルから切り出したDNAバンドの塩基配列を調べるために、16本のバンドをシーケンス解析したところ、7本のバンドの塩基配列は解読することができず、真菌と同定されたのは9本であった。しかしながら、同定された9本でも近縁種との相同性は85~94%に過ぎなかったことから、DSW中には新規な真菌が存在する可能性が示唆された (Table 2)。

4. 考 察

DGGE法を用いて、伊豆赤沢DSW中の一般細菌および真菌の群集組成を調べた結果、一般細菌および真菌ともに、年間を通じて様々な群集の存在が示唆された。さらに、取水した月が同じであっても、AとFの群集組成は異なることが確認された (Figs.

Table 1. Bacterial taxa detected in DSW after DGGE analysis, with their best Blast match.

Band	Accession	Description	Size (bp)	Source
1	JQ794615.1	Uncultured <i>Ralstonia</i> sp. clone OTU-19	317/320 (99%)	Homo sapiens, cystic fibrosis sinuses
2	CP003293.1	<i>Propionibacterium acnes</i> HL096PA1	317/322 (98%)	Human skin
3	KC818420.1	<i>Bacillus</i> sp. SSL08	320/321 (99%)	Lonar Lake water sample
4	GQ029833.1	Uncultured bacterium clone nbw928a12ca	266/282 (94%)	Homo sapiens, skin, occiput
5	EU491752.1	Uncultured bacterium clone EPR3968-O8a-Bc84	314/331 (95%)	Seafloor lavas from the East Pacific Rise
6	JQ400761.1	Uncultured <i>Ralstonia</i> sp. clone CNY_00651	320/320 (100%)	Soil
7	KC682321.1	Uncultured bacterium clone FLOCS_1301A-GWPpyrrhotite_H02	303/321 (94%)	Substrate mineral chips
8	JQ400758.1	Uncultured <i>Ralstonia</i> sp. clone CNY_00648	319/320 (99%)	Soil
9	JQ400758.1	Uncultured <i>Ralstonia</i> sp. clone CNY_00648	320/320 (100%)	Soil

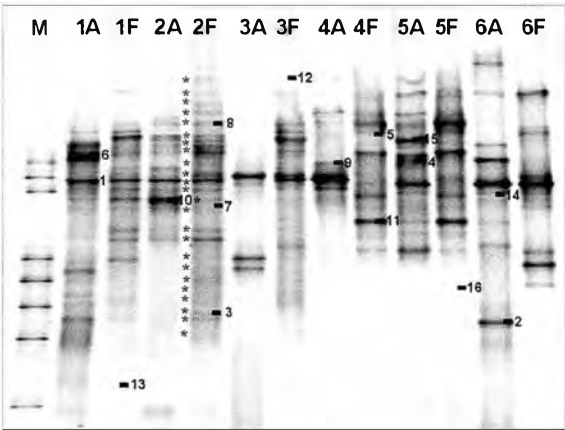


Fig. 3a

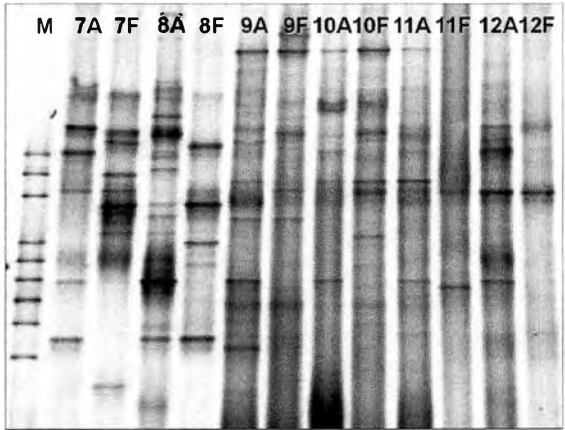


Fig. 3b

Fig. 3. DGGE profiles of fungi in DSW collected from the pumping station for deep seawater in Izu-Akazawa. (a) The samples were collected from January to June, 2012. (b) The samples were collected from July to December, 2012. Months when DSW was collected represent at the top of each lane. For instance, 1A represents the attached fungi collected in January and 1F represents the free-living fungi collected in January.

1, 3). Sarggaso Seaで実施された研究から、AとFの群集を構成する細菌や原生動物は異なっていたことが報告されている (Caron *et al.*, 1982)。さらに、

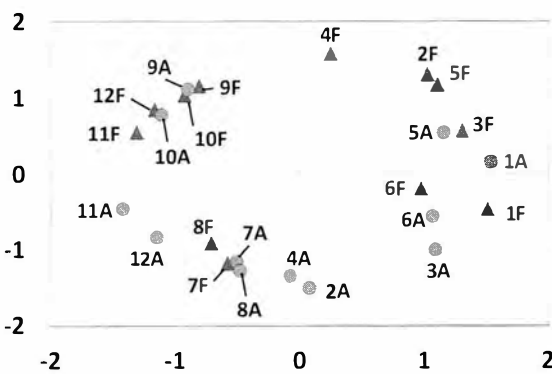


Fig. 4. MDS profiles based on the DGGE patterns in attached fungi (A) and free-living fungi (F) collected from the pumping station for deep seawater in Izu-Akazawa. Months when DSW was collected represent at the top of each sample.

一般細菌のAとFの群集組成については、浅海海水（地中海：水深5, 50, 400 m）(A cinas *et al.*, 1999) から深海海水（プエルトリコ海溝：水深6,000 m）(Eloe *et al.*, 2011) まで、AとFで異なることが数多く報告されている。本研究の伊豆赤沢DSW（水深800 m）においても、AとFの群集組成が異なることを示しており、既往の報告と良い一致を示した。また、これらの群集組成をMDS法で統計解析したところ、一般細菌および真菌ともにAおよびFの群集組成は変遷することが示唆された (Figs. 2, 4)。微生物の群集組成は、表層から沈降してくる粒状有機物の質や量に影響されることが報告されている (Yoshida *et al.*, 2007)。また、伊豆赤沢が面している相模湾では、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)。そのため、伊豆赤沢DSW中に存在する粒状有機物の質や量が変化し、それに伴い、一般細菌および真菌ともに群集組成が変遷したと考えられ

Table 2. Fungal taxa detected in DSW after DGGE analysis, with their best Blast match.

Band	Accession	Description	Size (bp)	Source
1	FR865753	<i>Planophila</i> sp. CCAP 462/1	119/127 (94%)	Antarctica: Signy Island, South Orkney Islands
3	EU327088	<i>Candida haemulonii</i> strain TJY2a	170/189 (90%)	Research on the diversity of marine yeast
6	AY026374	<i>Monosiga brevicollis</i>	105/118 (89%)	—
8	GU991571	<i>Skeletonema tropicum</i> clone 8	137/157 (87%)	Coastal water of Mangalore, India
9	HQ651782	<i>Cladococcus viminalis</i> isolate 302	144/168 (86%)	Ocean water
10	JN637172	<i>Rhodotorula dairenensis</i> strain GM-15	94/104 (90%)	Surface of wine grapes
11	HQ651782	<i>Cladococcus viminalis</i> isolate 302	133/155 (86%)	Ocean water
12	JN890532	Uncultured fungus clone PFG10GadID	88/103 (85%)	Ectomycorrhizal monodominant lowland tropical rainforest; soil 0–20 cm
15	HQ65178	isolate 302	177/197 (90%)	Ocean water

※ Band 2, 4, 5, 7, 13, 14, 16: Not read.

る。ただし、DGGE法では異種複合体 (Hetero duplex) が生じ、実際よりも多くのバンドが検出される可能性がある (石井ら, 2000)。加えて、標的としたrRNA 遺伝子は微生物によりコピー数が異なることにも注意して評価することが必要である (Farrelly *et al.*, 1995)。

DGGEバンドからDSW中の一般細菌の同定を試みた結果、DSW中の一般細菌には未培養クローンが多く、DSWには難培養性細菌が存在していることが示唆された (Table 1)。しかしながら、DGGEバンドの解析数が十分ではないため、この点についてはクローンライブラリー法を用いた解析 (Acinas *et al.*, 1999) に倣い、今後もクローンライブラリー法などの解析により、継続して多角的に調査する必要があると考えている。また、未培養クローンと同定されたDGGEバンドの約半数の分離源は土壌であり (Table 1)、DSW中に存在する細菌は土壌中の細菌とは生理・生化学的諸性状が異なることが考えられるため、DSW中の一般細菌を分離することで、新規あるいは特異的な生理・生化学的諸性状を有する一般細菌が得られると期待される。

また、真菌群集のDGGEバンドを解析したところ、真菌と同定されたのは9本であり、残りの7本は塩基配列を解読することができなかった。この点はDGGE法の解像度の問題でDGGEのバンドが単一ではなかったと考えられる。しかしながら、同定された9本でも近縁種との相同性は85～94%に過ぎなかったことから、DSWには新規な真菌が存在していることが示唆された (Table 2)。なお、真菌は通

常3.0 μm 以上の大きさであり、孔径3.0 μm のフィルター上にすべての真菌が捕捉されると考えられるが、DGGEの結果、孔径0.2 μm のフィルター上にも捕捉されていた。真菌の胞子には、大きさが3.0 μm 未満のもの (たとえば、*Aspergillus niger*の休眠胞子：2.93 $\pm$ 0.15 μm (Bizukojc and Ledakowicz, 2006), *Aspergillus fumigatus*の分生子：1.8～4.0 μm (Fuller *et al.*, 2009)) が報告されていることから、DSW中の真菌は深海という苛酷な環境でも生き延びるために胞子として存在しており、そのために孔径0.2 μm のフィルター上にも捕捉されたのではないかと考えられる。

このようにDSW中には、様々な一般細菌および真菌が存在し、新規性が高い微生物や難培養微生物も存在してい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。自然界においても微生物に関する研究が少ないDSWには未知微生物、あるいは特異的な生理・生化学的諸性状を有する微生物の存在が示唆されたことから、DSWは応用微生物学的見地からも有益な分離源となることが期待される。

参考文献

Acinas, S. G., J. Anton and F. Rodriguez-Valera (1999) Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 514–522.

Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer (1995) Phyloge-

- netic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143–169.
- Bizukojc, M. and S. Ledakowicz (2006) A kinetic model to predict biomass content for *Aspergillus niger* germinating spores in the submerged culture. *Process Biochem.*, 41(5), 1063–1071.
- Caron, D. A., P. G. Davis, L. P. Madin and J. M. Sieburth (1982) Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. *Science*, 218, 795–797.
- Cocolin L., L. F. Bisson and D. A. Mills (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol.*, 189, 81–87.
- Eloe E. A., C. N. Shulse, D. W. Fadrosh, S. J. Williamson, E. E. Allen and D. H. Bartlett (2011) Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment. *Environ. Microbiol. Reports*, 3, 449–458.
- Farrelly V., F. A. Rainey and E. Stackebrandt (1995) Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2798–2801.
- 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.
- Fuller, K. K., W. Zhao, D. S. Askew and J. C. Rhodes (2009) Deletion of the protein kinase A regulatory subunit leads to deregulation of mitochondrial activation and nuclear duplication in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell*, 8(3), 271–277.
- 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.
- 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.
- 石井浩介・中川達功・福井 学 (2000) 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用。 *Microb. Environ.*, 15, 59–73.
- 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., E. C. De Waal and A. G. Uitterlinden (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695–700.
- 高橋正征 (2000) 海にねむる資源 海洋深層水。あすなろ書房，東京，189 pp.
- Yoshida, A., M. Nishimura and K. Kogure (2007) Bacterial community structure in the Sulu Sea and adjacent areas. *Deep-Sea Res.*, 54, 103–113.

(2014年5月13日受付；2014年5月14日受理)