

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14783

研究課題名(和文)琵琶湖湖底ベント孔近傍に集群するミジンコと共生する微生物群集のメタゲノム解析

研究課題名(英文) Metagenetic analysis on symbiotic bacterial community with Daphnia colonizing near a vent on the lake floor of Lake Biwa

研究代表者

伴 修平 (Ban, Syuhei)

滋賀県立大学・環境科学部・教授

研究者番号：50238234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖北湖の定点(水深90m)において、0-30mと60-90mからDaphniaを採取し、体躯、腸管、排泄物に分けてその細菌組成を調べた。全ての試料から全DNAを抽出し、古細菌および真正細菌の16S rDNA V4領域を標的として2-step PCRによりライブラリーを作成した。全ての試料からGenusレベルで150以上のOTUが検出され、Daphnia体内外の細菌群集組成は極めて高い多様性を示すことが分かった。古細菌は検出されず、メタン酸化細菌との関連は示せなかった。Orderレベルでクラスター解析した結果、体躯、腸管、排泄物に関連した細菌組成はそれぞれ特徴的な組成を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Daphnia spp. were collected from 0-30 m and 60-90 m at a station (90 m deep) in North basin of Lake Biwa. Archaeal and bacterial communities associated with whole bodies, guts and feces were separately analyzed with a molecular technique. Whole DNAs were extracted from each of the all samples with a Soil DNA Isolation Kit. Then, library of each sample was made with two-step PCR targeted to V4 region of 16S rDNA in archaea and bacteria. More than 150 OTUs in genus level were detected from all samples, suggesting extremely high diversity of bacterial communities related with Daphnia bodies, guts and feces. No archaea were found, and therefore no methane-oxidizing bacteria related food-web was shown in this study. According to cluster analysis in order level, bacterial compositions in whole bodies, guts and feces were separated to different clusters, showing specific bacterial communities in each of the three compartments tested.

研究分野：水圏生態学

キーワード：環境微生物 ミジンコ 共生微生物 琵琶湖 ベント孔

1. 研究開始当初の背景

極最近、琵琶湖北湖の水深 **90 m** の湖底において低温噴出水の存在が確認された⁽¹⁾。さらに、その近傍において、ミジンコの仲間の動物プランクトンが集群して遊泳する様子が観察された⁽²⁾。通常、ミジンコ類は湖沼表層に生息して植物プランクトンを摂食することでエネルギーを得ている。90 m の湖底では植物プランクトンはほとんど生息しないため、採餌のために表層へ上昇しなければならない。しかし、近年、炭素安定同位体分析によって、湖底嫌気層から放出されるメタンが、メタン酸化細菌 (MOB) を介して動物プランクトン、そしてより高次栄養段階の生物に利用されている可能性が示唆されるようになってきている⁽³⁾。飼育実験によって、MOB をサプリメントとして与えるとミジンコ (*Daphnia magna*) の成長が促進されることも確かめられた⁽⁴⁾。また、現場湖沼環境では、MOB はミジンコが効率よく摂食するには小さすぎるため、原生動物を介した食物網の存在が示唆されている⁽⁵⁾。これらのことは、琵琶湖湖底でも、光合成以外に MOB に依存した食物網が存在する可能性を暗示させる。琵琶湖湖底で発見されたベント孔から噴出する物質についてはまだ不明な部分が多い。しかし、その形態は深海底の冷水噴出帯に類似しており、 H_2S やメタンなどが噴出している可能性が高い。一方、深海底では H_2S やメタンを含んだ海水が噴出する熱水噴出孔近傍において、イオウ酸化細菌のような化学合成細菌が共生することによって、光合成に依存しない特異な生態系の形成されていることが知られている。この深海底のアナロジーで考えると、琵琶湖湖底付近に集群するミジンコは、むしろ **MOB** あるいはイオウ酸化細菌と共生することによって、湖底付近に特異的に分布しているのかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、琵琶湖湖底ベント孔付近に集群するミジンコ類の体腔、消化管内そして排泄物中の微生物群集構造をメタゲノム解析することによって明らかにし、ミジンコ類が MOB やイオウ酸化細菌を摂食しているのか、あるいはそれら細菌群集と共生しているのか評価することを試みる。

3. 研究の方法

琵琶湖北湖沖 (35° 21,837' N、136° 06,127' E、水深 92.2 m) において、閉鎖式プランクトンネット (網目 450 μ m、口径 45 cm) の鉛直曳きにて、6月は0~30 m と 60~90 m、8月は60~90 m から動物プランクトンサンプルを採集した。得られたプランクトンサンプルから *Daphnia* のみをピックアップし、濾過湖水中で1時間放置し、排泄物を採取した。このうち半数の個体に関しては排泄物を十分に排出させるために、スターチを添加した場合を用意した。また、それらの処理をした個体の一部については実体顕微鏡下にて解剖し、腸管のみを分離した。即ち、スターチ処理と未処理について、*Daphnia* 個体全体、*Daphnia* 腸管、*Daphnia* 排泄物のサンプルを得た。これに加えて、湖水を 0.2 μ m メンブレンフィルターで濾過して懸濁物を集めた。これら全てのサンプルから、Soil DNA Isolation Kit (NORGEN Biotek Corp) を用いて全 DNA を抽出した。古細菌および真正細菌の 16S rDNA V4 領域を標的とした 2-step PCR によりライブラリーを作成した。Miseq Illumina を用いて、2 x 300 bp の条件でシーケンシングを行った。得られた配列に対して、Fastx toolkit の fastq_barcode_splitter を用いて対象配列のみ抽出後、ペアエンドマージスクリプト FLASH を用いて、クオリティーフィルタリングを通った配列をマージした。マージ後の配列のうち 246-260 塩基長

のみの配列を解析に用いた。これらに対して、usearch の uchime アルゴリズムを用いて決めた配列のチェックを行った。データベースは菌叢解析用パイプライン Qiime に付属する Greengene の 97% OTU とした。

4. 研究成果

から のすべてのサンプルから、Genus レベルで 150 以上の OTU が検出され、*Daphnia* 体内外の細菌群集組成は高い多様性を示すことが明らかになった。すべての OTU が細菌もしくはシアノバクテリアと高い相同性を示し、古細菌は全く見られなかった。また、OTU が最も多かったのは、湖水であった。Order レベルでクラスター解析した結果、 および は、それぞれ別のクラスターに分かれた(図 1)。このことから、細菌群集は体躯、腸管内、排泄物それぞれに特徴的な組成であることが明らかとなった。また、 の排泄物中においては、 および と極めて異なる細菌組成を示しており、季節や深度を問わず約 50-85%を Bacillales が占めた(図 2)。

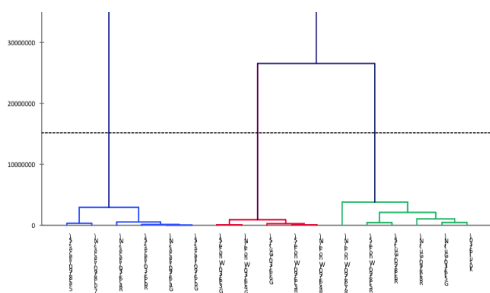


図 1 Order の OTU 数を用いたクラスター分析の結果

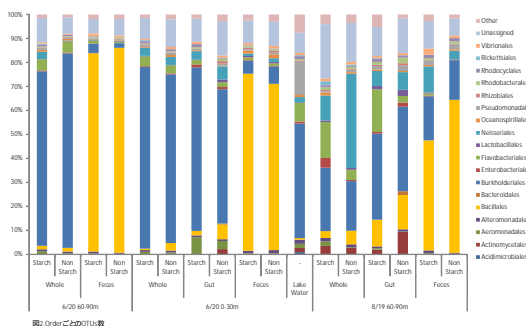


図 2 Order の OTU を用いた細菌組成

Bacillales は生存能力が高く、ある限られた環境下で優位に増殖し優占すると考えられている。これまでも、節足動物や魚類の腸内および排泄物において、Bacillales が優占した例が報告されている^{(6), (7)}。これらのことは、琵琶湖における *Daphnia* の腸内環境が節足動物や魚類と同様であった可能性、あるいは魚類の腸内における Bacillales がその餌生物である *Daphnia* 由来である可能性を示唆した。一方、 および において、Bacillales は数%程度の組成にとどまり、Burkholderiales が最も優占していた。

今回の実験結果から、ミジンコ類に共生する MOB やイオウ酸化細菌の存在、およびミジンコ類による MOB やイオウ酸化細菌の摂食の可能性は示唆されなかった。このことから、60~90 m に分布するミジンコとこれらの細菌との関連性は低いものと推測された。しかし、本研究では、当初計画していた潜水ロボットを用いた、琵琶湖深湖底に発見された低温水噴出口付近に特異的に分布する *Daphnia* を採集することはできなかった。もしかすると、MOB に依存した食物網はこの低温噴出口近傍に極めて特異的に成立しているのかもしれない。今後の課題は、これらを採集し、その細菌組成を解析することで 90 m までの水柱に棲息する *Daphnia* のそれと比較する事である。

< 引用文献 >

- (1) 琵琶湖湖底に見つかった低温噴出水孔, <http://www.biwako-trust.com/labo/kotei-chosa/pdf/dx09kotei.pdf>(2014 年 10 月 26 日確認)
- (2) 琵琶湖湖底のベント孔付近に集群するミジンコ類, <https://www.youtube.com/watch?v=agjeO6YR8WQ> (2014 年 10 月 26 日確認)
- (3) Bastviken, D. et al., 2003. *Ecology*, **84**: 969-981.

- (4) Deines, P. & P. Find, 2011. *Aquat. Micro. Ecol.*, **65**: 197-206.
- (5) Agsild, H. et al., 2014. *Freshwat. Biol.*, **59**: 272-285.
- (6) Wang, M. et al. 2015. *Eur. J. Entomol.* **112**: 619-624.
- (7) Sun, YG et al. 2010. *Fish Shellfish Immunol.* **29**: 803-809.

5 . 主な発表論文等
特に記載なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伴 修平 (BAN, Syuhei)
滋賀県立大学・環境科学部・教授
研究者番号：5 0 2 3 8 2 3 4

(2)研究分担者

熊谷 道夫 (KUMAGAI, Michio)
立命館大学・総合科学技術研究機構・教授
研究者番号：4 0 2 3 4 5 1 2

細井(田辺)祥子 (Hosoi-Tanabe, Shoko)
滋賀県立大学・環境科学部・准教授
研究者番号：8 0 4 2 3 2 2 6