

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510091

研究課題名（和文） 白川・緑川河口干潟における微生物叢に関する研究

研究課題名（英文） Study on microbial community in tidal flat sediment sampled from Shirakawa- and Midorikawa-river.

## 研究代表者

森村 茂 (MORIMURA SHIGERU)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20230146

## 研究成果の概要（和文）：

経時的あるいは深さ方向に好気環境と嫌気環境が入り混じる干潟においては、微生物が重要な役割を果たす窒素および硫黄化合物の物質循環、すなわち酸化還元反応がバランスした元素循環が重要である。例えば、底質の貧酸素化が起こり、硫黄循環が還元方向に傾いて硫化水素濃度が上昇すると、底生生物の死滅を招き、悪循環を起こして環境がさらに悪化する。最初に、16S rRNA 遺伝子を標的とした菌叢解析を行った結果、自然環境が保全されている白川（砂質干潟）・緑川（泥質干潟）の両河口干潟ともに好気性細菌の方が嫌気性細菌よりも多く検出されたが、それでも *Alphaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱、*Deltaproteobacteria* 綱、*Chloroflexi* 門、*Bacteroidetes* 門、*Actinobacteria* 門を優占種として、好気性・通性嫌気性・嫌気性細菌が混在する多様な微生物叢を示した。一方で、*aprA* や *nirS* などの窒素および硫黄循環に関与する機能性遺伝子を標的とした解析を行った結果、窒素循環においても硫黄循環においても同属の微生物が多く割合を占め、16S rRNA 遺伝子を標的とした解析結果と異なり、物質循環には非常に限定された微生物種が重要なはたらきを担っていることが推測された。

## 研究成果の概要（英文）：

Redox-balanced circulation of nitrogen and sulfur will occur in a tidal flat where both aerobic and anaerobic conditions are shown by changing tide level. Bacteria should take important role in the elemental circulation and unbalanced circulation changes environmental condition worse. We analyzed microbial community in tidal flat sampled from Shirakawa- and Midorikawa-river. From the results in clone analysis targeted to 16S rRNA gene, both aerobic and anaerobic bacteria were detected in all samples and *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* were dominant. However, *Thiobacillus* group was dominant by the analysis targeted to functional genes such as *aprA* and *nirS*.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：生態環境 干潟環境

## 1. 研究開始当初の背景

九州西部に位置する有明海は、日本の干潟総面積の約40%に及ぶ広大な干潟が発達した大型閉鎖性内湾である。その干潟には多種多様な生物が生息し、食物連鎖を通じた物質循環がバランス良く効率的に行なわれており、干潟は高い浄化機能を有している。なかでも、微生物は自然環境における重要な分解者であり、特に干潟においては、好気性と嫌気性の微生物が複雑な環境条件の下、互いに関連しながら有機物を分解することで、干潟の浄化機能に寄与していると考えられる。また、好気性および嫌気性微生物の共存は、窒素や硫黄などの元素循環に対しても重要な働きをしていると考えられる。しかしながら、干潟に生息する微生物叢に関する知見はほとんど得られていない。そこでわれわれは、干潟底質の生態系における一つの指標として微生物叢の変化に着目し、人工巣穴による底質改善技術の現地実証試験を実施して、嫌気性細菌である硫酸還元菌の減少が人工巣穴設置場所の好気的環境への変化を示唆することを明らかにした。

近年、干潟環境の悪化が問題となる中で、干潟環境を改善するための様々なアプローチが試みられている。微生物はこれらの改善策の効果をj知るうえで指標として利用できると考えた。しかし、研究開始時点では有明海干潟環境の微生物叢を解析した報告例はなく、自然環境が保全されている干潟本来の生態系を有している場所で、どのような微生物生態系が形成されているかが不明であった。

自然界において培養可能な細菌は0.1~1%程度と言われており、海洋細菌においては海水中で0.001~0.1%、底泥中で0.25%程度しか培養できないと言われており、培養法による解析では環境細菌群集が十分に反映されない。このことは干潟の細菌解析においても同様であると予想された。したがって、細菌を直接単離・培養するのではなく、細菌のDNAを抽出し、それをテンプレートとした分子生物学的手法を用いて細菌群集の解析を行うことにした。ある環境に生息する細菌群集を解析する際には、16S rRNA遺伝子領域を標的として細菌群集の全体像を解析する場合が一般的である。これは、16S rRNA遺伝子領域が様々な細菌が共通して持つ保存性の高い指紋領域であるため、異なる種同士を比較しやすい点やデータベース上に多くの細菌の16S rRNAが登録されているというメリットがあるためである。また、窒素や硫黄循環に関与する微生物叢を解析する場合は、機能性遺伝子を標的とした解析手法が一般的である。

## 2. 研究の目的

多くの底生生物が生息していて巣穴が存在しているような自然が残っている干潟と

して、砂質干潟である白川河口干潟と泥質干潟である緑川河口干潟を選択し、16S rRNA 遺伝子および硫黄代謝や窒素代謝に関与する機能性遺伝子である *aprA*、*amoA*、*nirS* を標的とした分子生物学的な解析を行うことにより細菌叢の基礎的なデータを得て、干潟の細菌叢の特徴を示すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 調査対象干潟の概要

粒度組成が異なる自然河口干潟として、白川河口（砂質干潟）および緑川河口（泥質干潟）を選択した。図-1 に示す白川河口干潟（砂質）および緑川河口干潟（泥質）において、潮上帯付近（上部）と潮間帯下部（下部）のそれぞれ2箇所（図-2）、2008年5月と9月および2009年1月にサンプリングを行った。

調査時に目視で大型底生生物を確認した結果、白川河口の上部はハクセンシオマネキ、下部はハマグリ等が生息していた。一方、緑川河口の上部はチゴガニ、下部はヤマトオサガニやムツゴロウ等が生息していた。

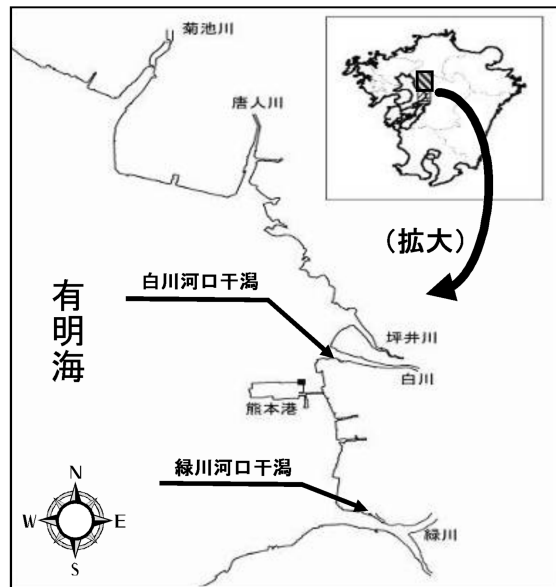


図-1 調査干潟の位置図

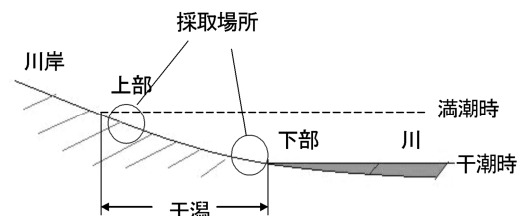


図-2 標高の異なるサンプリング箇所の模式図

### (2) 調査内容および底質環境特性

調査内容は微生物、地盤高、底質（粒度組成、強熱減量、酸化還元電位）、水温、pH、

塩分濃度とした。微生物と強熱減量は表層 5 cm の底泥を採取し、クーラーボックスで氷冷したものを実験室に持ち帰った後、分析を行った。酸化還元電位 (ORP)、水温、pH、塩分濃度は東亜 DKK 社製ポータブル型測定装置を用いて現地で測定した。有機物量は強熱減量から求め、粒径分布は HORIBA 社製レーザー回折／散乱式粒度分布測定装置を用いて測定した。

### (3) 微生物叢の解析

粒度組成、標高、サンプリング時期の違いによる微生物叢の特徴を調べるために、図-3 に示した手順で、クローン解析を行った。

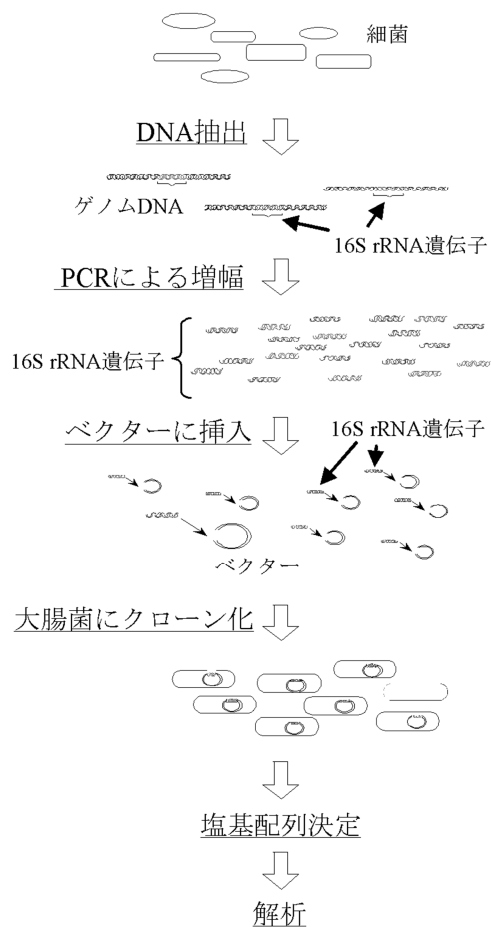


図-3 クローン解析方法の概

最初に、河口干潟底泥サンプル中に存在する細菌などの微生物から全 DNA を抽出した。DNA 抽出は、Fast DNA SPIN Kit for Soil (Q-BIO gene 社) を用いて行なった。次に、抽出した DNA を鋳型とし、すべての種類の真正細菌における 16S rRNA 遺伝子を対象とするプライマーセット (Eu27F / Eu518R) を用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) による 16S rRNA 遺伝子断片の増幅を行った。得られた 16S rRNA 遺伝子断片を、ライゲーション反応により pT7Blue ベクターに挿入した後、大腸

菌に形質転換を行ってクローン化することで遺伝子ライブラリーを構築した。16S rRNA 遺伝子ライブラリーの中からクローンを任意に選択し塩基配列を決定した。得られた塩基配列をデータベースに照合し、ホモロジー検索を行うことで生息する微生物の種類を推定した。また、系統樹を作成することにより、粒度組成、標高、サンプリング時期の違いと微生物叢の特徴について比較検討を行った。機能性遺伝子を標的とした場合も、同様の手順で解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 底質環境特性

表-1 に示したように、測定時の ORP から判断して白川は緑川と比較して好気的な環境にあり、底泥中の有機物濃度は低いことが確認できた。また、粒径分布については、白川の方が緑川よりも中央粒径が大きく、それぞれ砂質および泥質干潟であることが確認された。

表-1 各サンプリングサイトの特性

時期	場所	位置	ORP (mV)	有機物量 (mg/g-dry soil)	中央粒径 (μm)
5月	白川	上部	210	6.34	143.4
		下部	180	23.7	99.4
	緑川	上部	-72	69.6	20.3
		下部	-40	98.1	11.6
9月	白川	上部	110	21.8	151.0
		下部	93	20.7	12.7
	緑川	上部	-50	57.8	36.9
		下部	-20	109	14.1
1月	白川	上部	231	12.4	76.1
		下部	227	14.7	40.9
	緑川	上部	-113	47.2	42.9
		下部	-21	76.5	17.9

### (2) 微生物叢

#### ① 16S rRNA 遺伝子を標的とした全バクテリアの解析

各サンプルについて、5月と1月は約 50 クローンの、9月は約 20 クローンの解析を行った。詳細な数値は省略するが、各サンプルで好気性細菌に近縁なクローンの方が嫌気性細菌に近縁なものより多く検出された。5月サンプルでは緑川の方が白川に比べて嫌気性細菌の数が多いが、1月サンプルでは両者の間で大きな違いを見ることができなかった。門・綱のレベルでは *Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、

*Chloroflexi*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria* の割合が多かったが、全体としては様々な種類のバクテリアが存在していることがわかった。数値では示していないので、各サンプルで分類されたクローン数を比率に直してグラフ化したものを図-4 に示した。

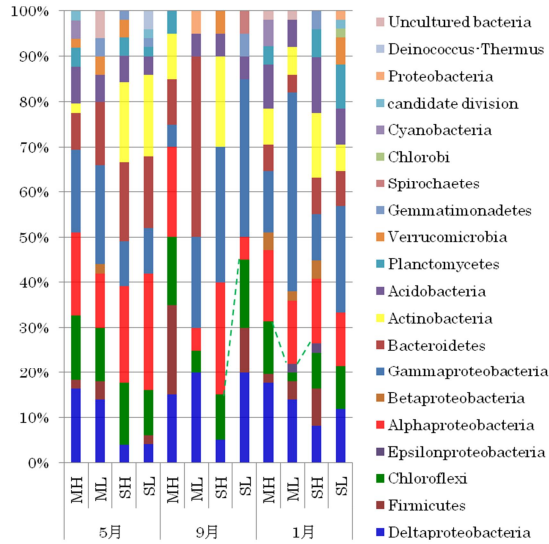


図-4 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析結果

図中の波線は好気性細菌と嫌気性細菌の境界を示しており（下側が嫌気性／上側が好気性細菌）、比率としても好気性細菌の方が嫌気性細菌より多いことがわかる。5月サンプルでは緑川と白川のクローンの存在比に違いが見られるが、上部と下部には違いが見られなかった。9月では全サンプルでクローンの存在比に違いが見られた。1月サンプルでは好氣的・嫌氣的な細菌では大きな違いが現れなかったが、白川と緑川において上部と下部で *Gammaproteobacteria* のクローンの割合が異なった。

さらに詳細な検討を行うため、優先種となった門・綱について系統樹解析を行った。最初に、ホモロジー検索で *Deltaproteobacteria* に分類されたクローンで系統樹を作製し図-5 に示した。*Deltaproteobacteria* に近縁なクローンは緑川が多く、硫酸還元菌とそれ以外のグループに分かれた。特に、硫酸還元菌に近縁なクローンは緑川の方に多く存在していた。白川のクローンは粘性菌に近縁なグループに多くの割合が存在しており、同じ綱でも、近縁種には違いが見られることがわかった。*Alphaproteobacteria* に分類されたクローンで系統樹を作製したところ、主に好気性細菌が占めていることがわかった。また、その中に好気性化学合成有機栄養細菌と光合成細菌

菌のグループが認められ、光合成細菌は上部に多く分布していた。*Gammaproteobacteria* に分類されたクローンで系統樹を作製した結果では、*Chromatium minutissimum* のように絶対嫌気性細菌や *Aeromonas veronii* のように通性嫌気性の化学合成有機栄養細菌の種類も近縁であったが、大部分は好気性の有機物分解菌や *Uncultured bacteria* に近縁であった。好気性有機物分解菌に近縁な種類は緑川と白川の間で偏りが見られなかったが、*Uncultured bacteria* のグループでは緑川の方が多かった。紅色硫黄細菌に近縁な細菌は緑川のみで検出された。

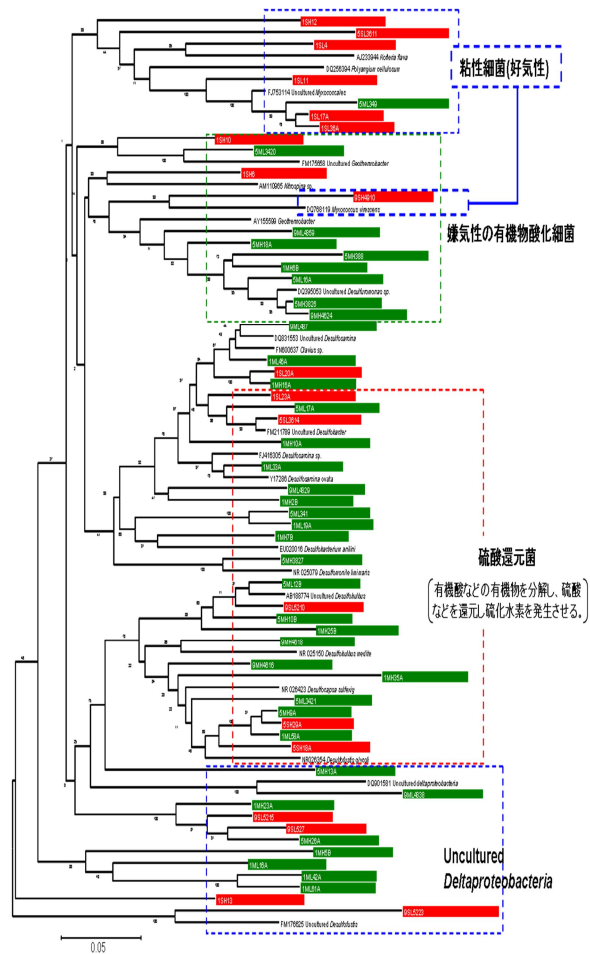


図-5 *Deltaproteobacteria* に注目した系統樹

*Proteobacteria* 門以外の門については、*Chloroflexi* は大きく分けて絶対嫌気性、*Uncultured bacteria* のグループと好気性、通性嫌気性の細菌のグループに分かれた。それぞれのグループで、緑川と白川のクローン間で偏りは見られなかったが、絶対嫌気性、*Uncultured* 細菌のグループの中では緑川と白川で分かれていた。好気、通性嫌気性の細菌グループは全部で 11 クローンであり、そのうち 5 月サンプルのクローンが 9 クローン

と多数を占めた。*Actinobacteria* に分類されたクローンは好気性細菌が多いために、ホモロジー検索で示したように白川で多く検出された。5月、9月、1月で顕著に分かれる傾向は見られず、この門の季節による変動はないものと思われた。また、近縁種には *Marmoricola* のような硝酸を還元する細菌や、*Ilumatobacter*、*Blastococcus* のように塩耐性の細菌が含まれていた。*Bacteroidetes* に分類されたクローンについては、塩耐性を持つ好気性細菌に近縁なものが多く検出された。至適塩分濃度が海水の3%より低い細菌に近縁なクローンは白川、緑川河口干潟の上部で検出された。このことは、上部が水につかっている時間(塩に触れる時間)が少ないためと考えられた。また、カロテノイドを生産する細菌である *Robiginitalea*、*Muricola* に近縁なクローンは緑川に多く存在していた。

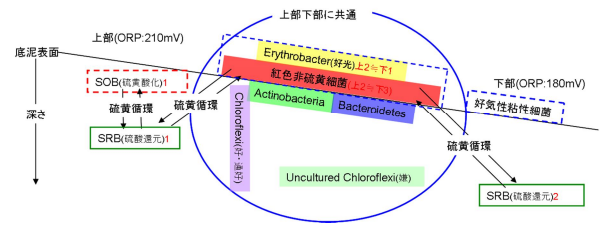
泥中の ORP 値より、白川の方が好气的であり緑川は嫌气的であった。砂質・泥質、潮間帯の上下、季節変化という3つの環境要因の違いに対する細菌叢の変化を比較したところ、一番の違いがあった要因は砂質・泥質に起因する好気/嫌気要因であった。季節に関しては違いが見られたが、サンプルの粒径が変化してしまっていたための変化かもしれないと思われた。標高に関しては大きな違いは見られなかったが、光合成細菌および近縁細菌の至適塩濃度で違いが表れた。

ホモロジー検索結果および系統樹解析の結果をもとにして、50クローン解析している5月サンプルと1月サンプルについて一部の菌叢に関する分布予想図を作製し、図-6に示した。

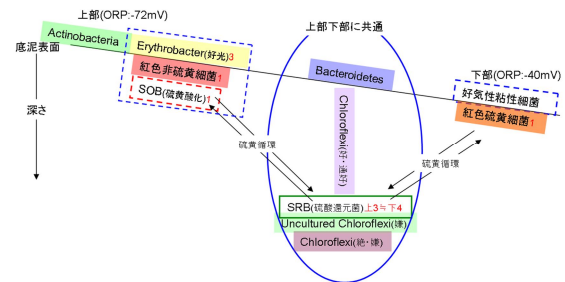
好気性細菌、光合成細菌は底泥表層付近に存在すると考えられ、嫌気性細菌は底泥中に存在すると考えられた。通性好気性細菌は底泥表面、底泥中の両方に存在すると考えられた。嫌気性細菌の中で、硫酸化において非酸素発生型の光合成細菌が関係していると考えられた。また、紅色硫黄細菌や紅色非硫黄細菌のような嫌気条件では光合成、好気条件では化学合成を行う菌は上部に分布し、満潮時に光合成を行い、干潮時に化学合成を行うと考えられた。5月は1月に比べ、上部と下部の両方で硫酸循環が活発であると考えられた。

## ②機能性遺伝子を標的とした窒素代謝および硫酸代謝の解析

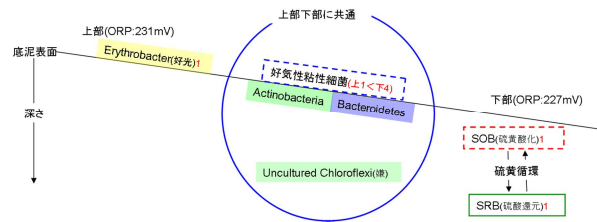
最初に、硫酸代謝に関与する *aprA* 遺伝子を標的としたクローン解析を行った。硫酸塩還元細菌も硫酸化細菌も *aprA* 遺伝子を有することが知られており、硫酸に関する酸化還元バランスを知ることを目的とした。得られた結果を系統樹にまとめ、図-7に示した。16S rRNA 遺伝子を標的とした解析では、硫酸



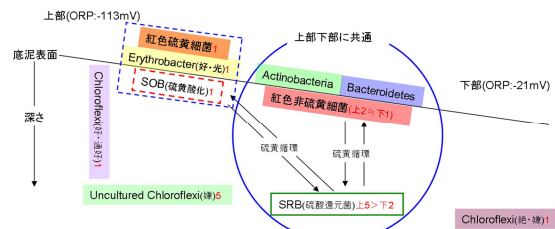
A. 5月白川サンプル中の菌叢分布予想図



B. 5月緑川サンプル中の菌叢分布予想図



C. 1月白川サンプル中の菌叢分布予想図



D. 1月緑川サンプル中の菌叢分布予想図

※図中の赤字は得られたクローン数を示している。SOBは硫酸化細菌、SRBは硫酸還元菌を示している。分布は深さ方向と記載している位置は対応している。嫌は嫌気性、好は好気性、通好は通性嫌気性、光は光合成細菌を示している。

図-6 菌叢分布予想図

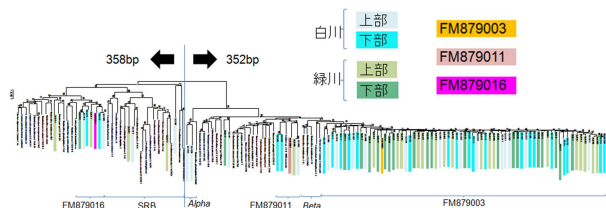


図-7 *aprA* 遺伝子を標的としたクローンの系統樹解析結果



還元菌が分類される *Deltaproteobacteria* に近縁な微生物が多く検出されたが、*aprA* を標的とした解析では硫黄酸化に関与する微生物が多く検出された。その中でも、データベースでは *Gammaproteobacteria* に近縁であると示された FM879003 に近縁なクローンが多数を占め、16S rRNA 遺伝子を標的とした解析結果とは異なった。

次に、窒素代謝に関与する *amoA* および *nirS* 遺伝子を標的としたクローン解析を行った。*amoA* 遺伝子を標的として PCR 増幅した断片の塩基配列をデータベースで照合し、ホモロジー検索を行った結果、EU925233.1|Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone を最近縁種とするクローンが、緑川および白川河口の上部・下部すべてにおいて確認された。同時に、それぞれの場所に特徴的なアンモニア酸化細菌も存在していることが系統樹解析により明らかとなった。一方、脱窒に関与する *nir* 遺伝子を標的とした PCR を行った結果、*nirK* 遺伝子は増幅されなかったのに対し、*nirS* 遺伝子は増幅されることがわかった。*nirS* 遺伝子を標的としたクローン解析を行った結果、従属栄養型の脱窒菌は非常に少なく、硫黄脱窒を行う *Thiobacillus denitrificans* に近縁なクローンが多数を占めた。以上の機能性遺伝子を標的とした解析の結果では、*T. denitrificans* に近縁なクローンが物質循環において重要なはたらきを担っていることが推測された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 野光暁、湯 岳琴、森村 茂、木田建次、増田龍哉、滝川 清：微生物叢解析による干潟底泥中の微生物機能と底質環境特性. 土木学会論文集 B2(海岸工学), B2-65, 1091-1095 (2009). 査読あり

[学会発表] (計3件)

- ① 中野光暁、湯 岳琴、森村 茂、太田広人、木田建次、増田龍哉、滝川 清：微生物叢解析による干潟底泥中の微生物機能と底質環境特性. 第 62 回日本生物工学会大会, 2010 年 10 月 28 日, 宮崎シーガイア.
- ② 渡邊千夏、森村 茂、中野光暁、太田広人、木田建次、増田龍哉、嶋永元裕、逸見泰久、滝川 清：八代海の環境改善に向けた底質部の微生物群集解析. 第 62 回日本生物工学会大会, 2010 年 10 月 28 日, 宮崎シーガイア.
- ③ 中野光暁、湯 岳琴、森村 茂、太田広人、木田建次：白川および緑川河口干潟底泥における微生物叢の解析. 第 15 回日本生物工

学会九州支部大会, 2008 年 12 月 6 日, 崇城大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森村 茂 (MORIMURA SHIGERU)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20230146

### (2) 研究分担者

(なし)