

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710011

研究課題名（和文） 海洋細菌群集の共同作業？—水圏の有機物代謝過程での“社会主義”的働き—

研究課題名（英文） Roles and their interaction of each marine bacterial group in organic matter dynamics and aquatic ecosystem

研究代表者

大林 由美子 (OBAYASHI YUMIKO)

横浜国立大学・工学研究院・研究教員

研究者番号：60380284

研究成果の概要(和文)：海洋での有機物代謝過程における従属栄養細菌群集の働きについて、細菌群集全体としてだけでなく、群集を構成するメンバーそれぞれの持つ能力の多様性とその相互作用に注目して解析を行った。その結果、異なる有機物分解能を持つ多様な細菌が共存することが海洋生態系における高分子有機物利用の鍵となっていること、また、細菌によって得意とする有機物が異なり微生物群集内に役割分担があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： To contribute to a better understanding of the roles of heterotrophic bacteria in organic matter dynamics in marine environments, not only the ability of whole bacterial community but also diversity of the ability of each bacteria in the community and their interaction were addressed. It was suggested that high variety of bacterial ability for organic matter degradation and their combined action might be a base of mechanisms to transform and utilize various organic matters efficiently in aquatic ecosystem.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物地球化学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：物質循環・微生物ループ・有機物・海洋細菌群集・細胞外酵素・海洋生態系・微生物活性・タンパク質分解酵素

## 1. 研究開始当初の背景

海洋において、植物プランクトンに生産された有機物のうちのかなりの部分が溶存態有機物となり、それを利用する微生物（ここでは主に従属栄養性細菌）を通して再び生態系に取り込まれる経路（微生物ループ）の存在が知られ、物質循環において微生物の果た

す役割の重要性が認識されるようになった。また一方で、分子生物学的手法の導入に伴い海洋微生物群集の多様性が遺伝子レベルで示されるようになった。しかし、物質循環という観点では、微生物群集全体をひとくくりに捉え、微生物群集全体としての生物量や活性が評価されるに留まる場合が多く、物質循

環において微生物（従属栄養性細菌）の果たす機能の多様性についての知見は少ない。

## 2. 研究の目的

海洋では、多種多様な微生物がそれぞれ多様な機能を持ち、それが相互に関係しあって、群集全体の機能として見えていると考え、海洋微生物群集の構成メンバーそれぞれの持つ能力とその相互作用に注目することで、海洋生態系における微生物群集による有機物代謝過程の機能や仕組みに対する理解を深めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 海水から分離した細菌単離株を用いたアプローチ： 個々の微生物の有機物分解特性に関する情報を得るために、海水から分離したそれぞれの細菌株について、タンパク質分解特性を分析した。タンパク質分解特性は、19種類のプロテアーゼ基質（アミノペプチダーゼ用5種、トリプシン用10種、キモトリプシン用2種、エラスターゼ用2種）を用いて、各細菌株の菌体外プロテアーゼによる基質分解プロファイルから評価した。各細菌株の系統分類情報は16S rRNA 遺伝子配列より得た。

(2) マイクロコズムを用いた実験的アプローチ： 系内に有機物が付加されたときの微生物群集の反応、および、付加される有機物の種類によるその違いを知るために、マイクロコズム実験を行った。各種有機物を添加した系および添加していない系（対照区）を作成し、それぞれのマイクロコズムから経時的にサンプリングして、系内における細菌数、細菌群集構造、有機物分解酵素活性・特性の変化を追跡した。細菌数はDAPI染色による直接計数法、細菌群集構造は16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたPCR-DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）法を用いて解析し、有機物分解活性は複数種類のプロテアーゼ活性・特性分析により追跡した。

(3) 天然環境の調査による観測的アプローチ： 季節・場所・深度の異なる天然海水試料について、採取後直ちに海水中の有機物分解酵素（主にプロテアーゼ）活性・特性の分析を行った。可能な場合には同試料の環境パラメーター、細菌数、細菌群集構造についての情報もあわせて得た。

## 4. 研究成果

(1) 海水から分離した細菌株のプロテアーゼ特性

何も添加しない海水を室温で保持し、そこから経時的（days 0, 56, 84, 112）に分離した細菌株72株について、16S rRNA 遺伝子配列による系統分類と各株のプロテアーゼ特性の解析を行った。保持海水中では経過日数

に伴い系内の有機物環境が変化していると考えられ、分離日の異なる株は異なる栄養環境から分離したとみなすことができる。そこで、各株のプロテアーゼ特性が系統分類グループによって特徴づけられるのか、あるいは生息していた栄養環境によって特徴づけられるのかに注目した解析を行った。それぞれのグループの特徴づけの解析には主成分分析を用いた。その結果、この保持海水マイクロコズムから分離した細菌株のプロテアーゼ特性は分離日（すなわち生息環境）によるグループでは特徴づけられないこと、系統分類グループでは、Bacteroidetes、Gammaproteobacteria、Alphaproteobacteriaの分類グループ間でやや異なる傾向があるものの、各株のプロテアーゼ特性は実に多様であることがわかった（図1）。これらの結果から、いずれの栄養環境においても異なる有機物分解能を持つ多様な細菌が共存することが、海水中における有機物利用の鍵となっている可能性が示唆された。

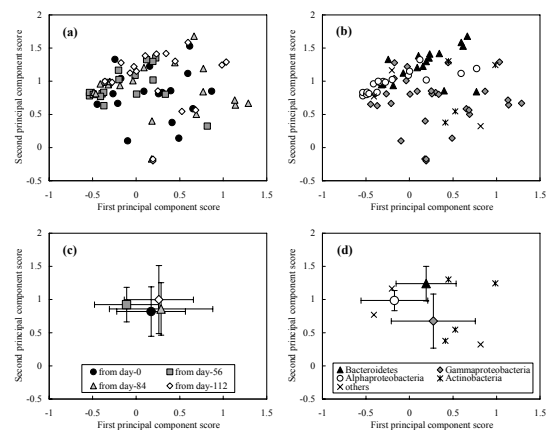


図1 保持海水マイクロコズムから分離した細菌株72株のプロテアーゼ特性（19種類の基質の分解速度で評価）について主成分分析を行った結果の第1主成分スコア・第2主成分スコア散布図。(a)と(b)は、72株をそれぞれ分離日ごとのシンボルで表示した場合と系統分類グループごとのシンボルで示した場合。シンボルの凡例は(c)(d)内にそれぞれ示した。(c)には分離日ごとのグループ内で平均した主成分スコアを、(d)には系統分類グループごとに平均した主成分スコアをプロットした。ただし、(d)において株数の少ないグループについては(b)と同じく元の株のスコアで表示している。エラーバーは各グループ内でのスコアのばらつきのため、 $\pm 1\sigma$ を表示している。(Bong et al. 投稿中)

(2) タンパク質または遊離アミノ酸が付加された系における微生物群集の反応

天然微生物群集を含む天然海水にタンパク質（ポリマー態有機物）を添加した系、遊離アミノ酸（モノマー態有機物）を添加した系、何も添加しない系（対照区）を作成し、海水中の細菌群集の反応を追跡・比較するマイクロゾム実験を行った。海洋地球研究船みらい（海洋研究開発機構）MR10-01 航海において北太平洋亜熱帯域で実験を行ったところ、遊離アミノ酸を添加した系では添加後1日以内に系内の微生物活性が上昇し、細菌数が増加した。このとき増殖した細菌の大部分は Gammaproteobacteria に属する *Vibrio* 属であった。タンパク質を添加した系では、添加1日後には微生物活性・細菌数・微生物群集組成ともに大きな変化が見られなかったが、添加2日後から系内のタンパク質分解酵素活性が上昇し、細菌数が増加した。このとき微生物群集は Bacteroidetes グループを中心とした群集に変化し、さらにその数日後

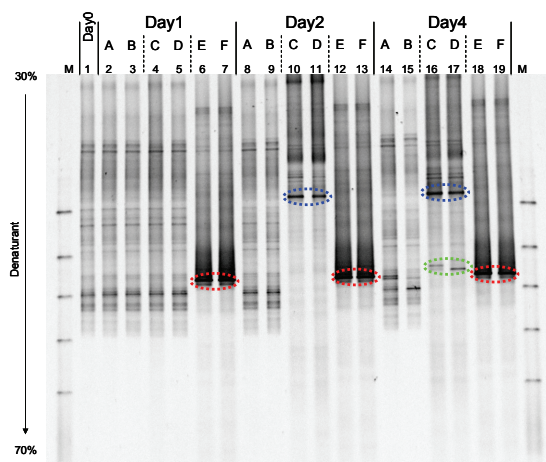


図2 北太平洋亜熱帯域で実施したマイクロゾム実験における細菌群集構造変化を示すPCR-DGGE画像。A、Bは何も添加していない対照区、C、Dはタンパク質添加区、E、Fは遊離アミノ酸添加区。レーンMはマーカー、レーン1は実験開始時の元海水における微生物群集、レーン2からレーン7、レーン8からレーン13、レーン14からレーン19は、それぞれ各実験区におけるDay1、Day2、Day4の微生物群集。得られたバンドを切り出してシーケンス解析を行った結果、赤で囲った位置のバンドは *Vibrio* 属 (Gammaproteobacteria)、青で囲った位置のバンドは Bacteroidetes グループの細菌、黄緑で囲った位置のバンドは Alphaproteobacteria グループの細菌であることがわかった。(Obayashi et al. 投稿準備中)

には Bacteroidetes に加えて Alphaproteobacteria に属する細菌も主要な構成員となった (図2)。これらの結果は、海水中にポリマー態の有機物 (タンパク質) が加わった場合はモノマー態 (アミノ酸) が加わった場合に比べて微生物群集に変化が現れるまでに時間がかかること、および、添加された有機物によって反応する微生物種が異なることを示している。すなわち、海洋微生物群集の中でもそれぞれの微生物の得意分野が異なり、役割分担があることが示唆された。

一方、同様の実験を北太平洋亜寒帯域で行ったところ、いずれの添加区でも対照区との差が見られなかった。すなわち、亜寒帯域の測点では、えさとなる有機物以外の要因が海水中の細菌群集全体の活性を律速していたと考えられる。

(3) 海洋におけるタンパク質分解酵素活性・特性

沿岸域および外洋域の様々な環境において、海水中のプロテアーゼ活性/特性の分析を行った。分析には、アミノペプチダーゼ用基質、トリプシン用基質、キモトリプシン用基質を用いた。(アミノペプチダーゼはペプチド鎖の末端からアミノ酸を一つ切り離すエキソ型酵素であるのに対し、トリプシン、キモトリプシンはペプチド鎖の内部にある結合を切ることのできるエンド型酵素である。) 結果をまとめると、沿岸域および外洋表層ではアミノペプチダーゼ活性に比べて

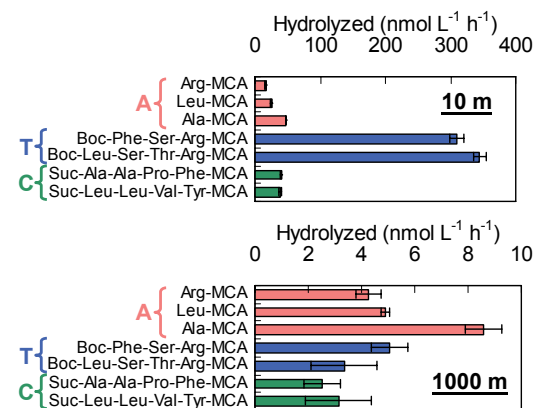


図3 外洋域 (北太平洋) の水深 10 m と 1000 m におけるプロテアーゼ活性分析結果の一例。A はアミノペプチダーゼ用基質、T はトリプシン用基質、C はトリプシン用基質。それぞれの基質が海水中的の酵素により分解される速度 (すなわち海水中的のアミノペプチダーゼ、トリプシン型酵素、キモトリプシン型酵素のポテンシャル活性) を示している。

高いトリプシン活性が検出される場合が多かったが、外洋深層ではトリプシン、キモトリプシンなどのエンド型酵素活性は低い場合が多かった（図3）。外洋では、いずれのプロテアーゼ活性も深度と共に低下するが、低下の勾配はエキソ型酵素に比べてエンド型酵素のほうが急であることがわかった。すなわち、トリプシンなどのエンド型ペプチダーゼ活性は、全体の生物活性が高い環境の場合に特に重要である可能性が示唆された。

これらの分布および上記(1)(2)の結果等も総合して海洋における有機物分解酵素活性について考えると、その由来には従属栄養細菌の細胞外酵素としてだけでは説明できない部分があり、今後、海洋における有機物代謝機構と微生物生態系の関係について、原生生物等の影響も含めてさらに研究する必要がある。

## 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4件）

- ① Obayashi, Y., Ueoka, N., Suzuki, S. (2010) Degradation and utilization of protein derived from *Pseudomonas aeruginosa* by marine microbial community. Journal of Oceanography, 66, 513-521. 査読有
- ② Bong, C.W., Obayashi, Y., Suzuki, S. (2009) Changes in proteolytic activities in stored seawater and bacterial isolates. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, Vol. 2, Environmental Research in Asia for Establishing a Scientist's Network, TERRAPUB, Tokyo, 287-291. 査読無

〔学会発表〕（計6件）

- ① 大林由美子、Bong Chui Wei、鈴木聡：「海中の有機物分解酵素活性測定における低吸着性マイクロプレートの利用」、2012年日本海洋学会春季大会、2012年3月27日、筑波大学（茨城県つくば市）
- ② 大林由美子、鈴木聡：「0.2 μm 濾過海水中でみられる微生物数の増加と高い代謝活性：（2）増殖したのは何者か」、2010年日本海洋学会秋季大会、2010年9月8日、東京農工大学オホーツクキャンパス（北海道網走市）
- ③ 大林由美子：「海洋の有機物研究と微生物生態学」、第25回日本微生物生態学会大会、2009年11月23日、広島大学（広島県東広島市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大林 由美子 (OBAYASHI Yumiko)  
横浜国立大学・工学研究院・研究教員  
研究者番号：60380284

### (2) 研究協力者

BONG Chui Wei  
愛媛大学・大学院理工学研究科・大学院生