

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2007
 課題番号：19510028
 研究課題名 (和文) バクテリア群集の変動解析による富山湾沿岸域の海水汚染のモニタリング手法

研究課題名 (英文) A monitoring method of seawater pollution in coastal zone of Toyama bay by variability analyses of bacterial community structure

研究代表者

中村 省吾 (NAKAMURA SHOGO)
 富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・教授
 研究者番号：60134996

研究成果の概要：日本海の海水汚染をモニタリングするための手法として、バクテリア群集の変動解析の有用性が考えられた。そこで、その基礎研究として、富山湾沿岸域海水中の各種バクテリアの群集構造とその変動を調べた。その結果、季節変動を伴うものの、汽水域を除いた沿岸域の各港間で、基本的に似た群集構造を持つことが判った。さらに、海水中の油汚染、富栄養化、重金属汚染などで、優占するバクテリア種や群集構造が変化することも示唆された。

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学，環境影響評価・環境政策

キーワード：海洋環境保全，富山湾，モニタリング，バクテリア，群集構造，16S-rDNA，DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)

1. 研究開始当初の背景

近年、生物種の生死・運動・発光などの反応を指標として、環境水中の汚染物質を総合的に捉えることが可能な方法だと言われ、様々なバイオモニタリングやバイオアッセイが報告されている。そして、汚染物質の検出確度をより上げる必要があることや、生物種やその指標となる反応によって各種汚染物質に対する感受性が異なることから、複数の生物種や指標を組み合わせたバッテリーモニタリングやバッテリーアッセイに関

する研究が行われ始めている。また、ある地域の環境変化を捉えるためには、そこに生息する生物種とその特性や密度を把握しておくことが重要であると考えられている。

一方、富山湾が位置する日本海は、平均水深が約 1,350m であるのに対し、出入り口となる海峡の水深は数 m～約 130m と平均水深のほぼ 10 分の 1 となっているため、半閉鎖的な海域と考えられる。そして、日本海やその周辺では、富栄養化 (黄海，渤海)，石油汚染 (ナホトカ号など)，化学物質汚染 (吉林

省石油化学工場爆発)などが多発しており, 日本海の閉鎖的な構造から, それら汚染物質の蓄積と生態系への影響が懸念されている。

また, これまでに研究者が出会っているバクテリア種は, 実在する種の0.1~10%程度だと言われている。また, 分子生物学の発展に伴い, バクテリアの16S rDNAの塩基配列から種を同定する方法も確立されてきた。そして, 環境中の土壌や水を採取し, そこから抽出した16S rDNAをPCRによって増幅し, その産物を変性剤の濃度勾配がついたゲルで分離する方法(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE))が開発された。このPCR-DGGE法を用いれば, 培養はできないが生息しているバクテリア種だけでなく, その群集構造も検出できることが報告されている。

2. 研究の目的

上記の背景から本研究では, 富山湾沿岸域の海水汚染を中心とした環境変化をモニタリングする方法としてPCR-DGGE法を検討することを目的とした。そのために, 富山湾沿岸域の海水中のバクテリア群集の構造解析をPCR-DGGE法を用いて行い, 富山湾沿岸域の6~12の港におけるバクテリアの群集構造やその周年変化を解析することを試みた。さらに, 石油汚染, 富栄養化や重金属汚染を想定して, 海水中に重油, リンや窒素, カドミウムなどを添加し, それに伴うバクテリア群集構造の変化や, 実際に増殖するバクテリア種の検出も試みた。

3. 研究の方法

試料海水は, 滅菌した10のメディウム瓶に, 網目が0.5mmのステンレスネットで濾過しながら採取した。その後, 発泡スチロール箱の中で氷温に保ちながら, 研究室に持ち帰った。2007年度では, 富山湾沿岸域の12箇所(氷見, 伏木, 国分, 新湊, 堀岡, 四方, 岩瀬, 滑川, 水橋, 魚津, 黒部, 宮崎)の各港で, 2008年度では, その中の6箇所(堀岡, 四方, 岩瀬, 滑川, 魚津, 黒部)の各港で海水を採取した。

まず, 採取してきた海水100~500mlを, 孔径0.2 μ mのメンブレンフィルターを用いて減圧濾過し, そのフィルター上にバクテリアを捕集した。次に, フィルターごとリゾチーム, Proteinase K, RNaseなどで処理した後, TE飽和フェノール, クロロホルムで捕集したバクテリアからDNAを抽出した。そのDNAを鋳型として, 真正細菌の16S rDNAのV3領域

を増幅するため, 341F-GC (GCクランプを付加)及び518Rの各プライマーと増幅キット(KOD FX, TOYOBO)を用いてPCRにかけた。増幅したV3領域は, D-Codeシステム(Bio Rad)を用いて変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)にかけた。DGGEで検出された主要なバンドから, それが由来するバクテリア種を同定するために, まず, 切り出したバンドの抽出液と上記プライマーでPCRにかけた。そして, 増幅したDNAとBig Dye Terminator (Applied Biosystems)を用いてシークエンス反応を行った後, シークエンサー(Genetic Analyzer 3130xl, Applied Biosystems)で塩基配列を決定し, それをBLAST検索にかけて種の同定を行った。一方, 富栄養化や重金属の混入が群集構造に及ぼす影響を調べるために, C重油(0.5% (w/v))リン(0.05ppm), 窒素(0.5ppm), カドミウム(0.01ppm, 0.1ppm)を海水に加えて培養し, 上記と同様な方法でPCR-DGGE解析を行った。

なお, DGGEの検出されたバンドパターンからバクテリア群集構造の類似度を検出するため, FP Quest (Bio Rad)を用いクラスター解析も行った。

4. 研究成果

最初に, バクテリア群集を解析するために必要最少となる試料海水量を調べることにした。そこで, 採取してきた海水1ml~10をメンブレンフィルターで濾過し, そのフィルターに捕集されたバクテリアから抽出したDNAをPCR-DGGEにかけ, 検出されるバンドパターンを比較した。その結果, 試料海水量が10ml以下の場合, 同じ濾過量の間であってもDGGEのバンドパターンに大きなバラツキが見られたが, 100ml以上になるとそのバラツキが少なくなることが判った。そこで, 試料海水量を100~500mlとして以降の実験を進めた。

まず, 海水の採取時間によってバクテリア群集構造が変化するかどうかを調べた。そのために, 四方漁港の港内と港外で, 朝9時, 昼13時, 夕方17時と毎日3回の採水を5日間連続で行い, それらのPCR-DGGEで得られるバンドパターンを観察した。その結果, 同日の朝~夕方までの間だけでなく, 5日の間でもバンドパターンに大きな変化は見られなかった。この結果から, 5日間程度の短い期間では, 降雨や潮の干満などによる影響は少なく, 港内及び港外海水中のバクテリア群集構造は大幅な変化はしないものと思われ

た。

次に、年間のバクテリア群集の変化を見るため、毎月、富山湾沿岸域の6~12港で海水を採取し、そのバクテリア群集構造を DGGE で比較観察した。その結果、同じ月であれば港間での差は少なく、毎月、多くの港でほぼ同じような群集構造が見られた。この結果より、富山湾沿岸域のバクテリア群集構造は、基本的に均一なものであることが推察された。しかし、河川水の流入により汽水域となっている黒部港、水橋漁港、伏木港では、他の港とは異なる群集構造が見られる場合が多かった。また、同一港で年間を通じた群集構造の変化を調べたところ、少しずつ変化する様子が見られた。一方、07年と08年の同じ月における各港の DGGE パターンを比較したところ、似たパターンになっていることが多かったことから、毎年同じ月では同じような群集構造になること、言い換えれば周年変化があることが示唆された。そして、DGGE で検出された主要なバンドを解析して得た塩基配列から種の同定を行った結果、Proteobacteria に属する種と Cyanobacteria に属する種が多く、多くの港で共通して見られた。従って、富山湾沿岸域では、これらが共通で主要なバクテリア種になっていることが考えられた。一方、黒部港では、多くの種が淡水域に生息していると言われている Flavobacteria に属する種が、年間を通して多く検出された。

さらに、バクテリア群集構造の変化によって、石油汚染、富栄養化、重金属汚染などが捉えられるかどうかを調べた。まず、採取した海水にC重油を添加し、その後の DGGE のバンドパターンの変化を調べた。その結果、重油分解菌として報告されている *Alcanivorax* sp. と同じ移動度を示すバンドの増強が検出された。同様に、リンと窒素を添加して培養し、その DGGE のバンドパターンの変化を調べた。その結果、培養3~5日後に、リンや窒素の添加で出現するバンドが検出され、それから、*Lishizhenia caseinilytica* に近い新種と推定された。次に、海水に0.01~0.1ppmのカドミウムを添加して培養した結果、培養3日後から新たなバンドの出現が見られ、それらのバンドから0.01ppmの添加試料では *Cytophaga* sp. に近い新種のバクテリアと考えられ、さらに0.1ppmの添加試料で出現したバンドから、Marine γ -proteobacterium HTCC2188, *Serratia plymutha*, *Neptunomonas naphthovorans* に近縁な種や新種と推定された。これらの結果より、海水試料の DGGE に

おいて、このようなバクテリア種由来のバンドの出現が、石油汚染、富栄養化、カドミウム汚染などの指標として使用できる可能性が示唆された。

以上の成果より、PCR-DGGE によるバクテリアの群集構造の変動解析によって、富山湾沿岸域の海水中の環境変化をモニタリングできる可能性が高まった。また、この手法は、富山湾沿岸域だけでなく、富山湾、日本海、ひいては世界の海水環境の変化をモニタリングする手法としても有用になるものと思われた。

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2件)

Tanaka, D., Tanaka, S., Yamashiro, Y. and Nakamura, S., Distribution of oil-degrading bacteria in coastal seawater, Toyama Bay, Japan. Environ. Toxicol., 23, 563-569, (2008), 査読有り

田中大祐, 田中俊輔, 中村省吾, 富山湾沿岸域海水中のバクテリア群集構造解析, 月刊海洋, 47, 118-126, (2008), 査読無し

〔学会発表〕(計4件)

田中俊輔, バクテリア群集構造を用いた富山湾沿岸域の海洋汚染モニタリングの検討, 第43回日本水環境学会年会, (2009.3.16), 山口大学

田中俊輔, 富山湾沿岸海水中の油分解細菌の解析, 日本水処理生物学会第44回大会, 富山国際会議場, 2007年11月14日(水)~16日(金)

Tanaka, D., Distribution of oil-degrading bacteria in coastal seawater, Toyama bay, Japan, 13th International Symposium on Toxicity Assessment, August 19 to 24, 2007, Toyama.

田中俊輔, 富山湾沿岸域の海水に見られる油膜中のバクテリア群集構造解析, 第41回日本水環境学会年会, 大阪産業大学, 2007年3月15日(木)~16日(金)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

○取得状況（計 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 省吾 (NAKAMURA SHOGO)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授

研究者番号：60134996

(2) 研究分担者

田中 大祐 (TANAKA DAISUKE)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・助教

研究者番号：40360804

(3) 連携研究者