

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580215
 研究課題名（和文） 遺伝子マーカーを利用した海洋堆積物における硫酸還元細菌の分布生態と多様性解析
 研究課題名（英文） Distribution and diversity of sulphate-reducing bacteria in marine sediments as determined using molecular marker
 研究代表者
 近藤 竜二（KONDO RYUJI）
 福井県立大学・生物資源学部・准教授
 研究者番号：30244528

研究成果の概要：本研究では、機能遺伝子をマーカーとして利用し、日本ならびに韓国の沿岸海域の底泥中における硫酸還元細菌の分布生態と多様性を解析した。まず、亜硫酸還元酵素遺伝子を標的とした定量 PCR 法による硫酸還元細菌の計数方法を開発した。この方法によって底泥中の硫酸還元細菌を計数したところ、有機物汚濁の進行に伴って硫酸還元細菌が増加することが明らかとなった。PCR-DGGE によってその群集組成を調べた結果、主要な硫酸還元細菌が *Desulfobacteraceae* 科および *Desulfobulbaceae* 科であったが、水域によって硫酸還元細菌の組成が異なることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：微生物生態学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：硫酸還元細菌、亜硫酸還元酵素遺伝子、養殖漁場堆積物、有機汚濁、リアルタイム PCR、PCR-DGGE

1. 研究開始当初の背景

硫酸還元細菌は硫酸塩を異化的に還元する偏性嫌気性細菌で、酸素のない環境に普遍的に存在し、有機汚濁の進行した水域の底泥における硫化物生成の主な原因微生物である。その活動によって生産された硫化物は直接的には底泥中や底層中のベントス・魚介類に対して毒性を有するだけでなく、水中の溶解酸素の消費による貧酸素水塊の生成、還元状態の発達、赤潮や青潮の発生要因など間接

的にも魚介類の生産に悪影響をおよぼすなど地球環境にとって重要な微生物群である。この硫酸還元細菌はグラム陽性菌、古細菌、 δ プロテオバクテリアに属するグラム陰性菌と広い範囲の種類にわたって存在しており、異化的に硫酸塩を還元する微生物の一群である。硫酸還元細菌は嫌気条件下で硫酸塩を還元する際に電子供与体として H_2 や酢酸、乳酸、プロピオン酸などの有機酸を利用し、最終的に有機物を二酸化炭素にまで完全に

酸化することが出来るため、嫌気環境下における有機物の最終分解者として重要な役割も担っている。特に海洋堆積物中では有機物分解の 50%がこの硫酸還元細菌に依存していることが明らかとなっている。この硫酸還元細菌の分布や活性を明らかにすることは、海洋における硫黄循環過程の解明のみならず、沿岸海域、河口水域ならびに養殖漁場などの有機物汚染や漁場老化の進行程度とその過程を知る上で極めて重要であり、現場における硫酸還元細菌の詳細な生態解明が強く求められている。

硫酸還元細菌の生態解明には、現場における細菌数やその群集組成、活性を正確に見積もる必要がある。しかしながら、従来の従来の計数法では培養を伴うとともに、特定の細菌種しか計数できない限られた培地を用いることから、これまで培養法で得られた計数値は過小評価されていると考えられ、現場における活性を必ずしも反映しないことを明らかにしてきた。従来の培養計数法に代わる方法として、硫酸還元細菌に特異的な PCR プライマーを開発し、定量(競合)PCR 法による硫酸還元細菌の迅速で正確な計数方法を確立した(Kondo et al. 2004)。また、この PCR で得られる PCR 産物の塩基配列から、硫酸還元細菌群集の構造解析にも利用できることが示された。

硫酸還元細菌などの有機物分解や硫黄代謝に関わる微生物の現場における生態解明は、将来にわたって海洋環境を利用・保全する上で極めて重要である。海洋環境、特に沿岸域における硫化水素生成の原因微生物である硫酸還元細菌の分布と生態ならびにその多様性を明らかにすることにより、海洋環境の有機物汚濁や漁場老化の進行程度とその過程を知ることが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景のもとに、本研究では、底泥に多量の有機物が蓄積し、夏季に硫化水素の発生が見られる沿岸海域および陸からの影響が殆どない外洋の堆積物を対象水域として、硫酸還元活性を反映する機能遺伝子(亜硫酸還元酵素)を標的に、その遺伝子マーカーを利用した沿岸海域底泥中での詳細な分布生態を明らかにし、環境条件の異なる現場水域における硫酸還元細菌群集の動態と環境要因との関係から、海洋底泥における硫化水素生成のメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Real-time PCR

亜硫酸還元酵素遺伝子(*dsrAB*)の一部を特異的に増幅する PCR プライマー(DSR1F+, DSR-R)を用いて、SYBR Green I による

real-time PCR の最適条件を検討した。この条件検討には、*Desulfovibrio desulfuricans* DSM642^T、*Desulfobacter autotrophicum* DSM3382^T、*Desulfobulbus propionicus* DSM2032^T、*Desulfobacter latus* ATCC34918^T、*Desulfococcus multivorans* DSM2059^T の細菌株の DNA を用いた。

(2) DNA の抽出方法の検討

市販の DNA 抽出キット(FastDNA Spin kit および FastDNA Spin kit for Soil)と HTP スピンカラム法の比較を行った。既知量の硫酸還元細菌細胞をフィルター上に捕集、あるいは泥試料に添加して DNA を抽出し、real-time PCR で硫酸還元細菌を計数した。

(3) 沿岸域底泥の採取

水温成層の発達する夏季(7月~10月)に日本および韓国沿岸域の 50 地点において採泥を行った。エクマンバージ型採泥器あるいはコア採泥器で底泥を採取し、先端を切り落とした 50 ml 容シリンジを用いて 0-4 cm 層を採取した。一部の試料については 0-1 cm 層を採取した。

(4) 化学分析

酸揮発性硫化物(AVS-S)は、酸性条件下で水蒸気蒸留した後、メチレンブルー法で測定した。COD はアルカリ性過マンガン酸カリウム滴定法で測定した。強熱減量(IL)、有機炭素・窒素量は定法に従って分析した。

(5) 硫酸還元細菌の計数

(1)で決定した最適条件で、real-time PCR によって硫酸還元細菌を計数した。*Desulfovibrio desulfuricans* DSM642^T 株の *dsrAB* 遺伝子を組み込んだ pCR ベクターを段階的に希釈して作成した検量線を基に試料中の *dsrA* コピー数を計数し、硫酸還元細菌数を算出した。

(6) PCR-DGGE

亜硫酸還元酵素遺伝子(*dsrAB*)の一部を増幅する PCR プライマー(GC-DSRp2060F、DSR-4R)を用いて、Geets et al. (2006)の方法に従って PCR 増幅した。

変性剤濃度 35-70%のポリアクリルアミドゲルで 200V、60 で 4 時間電気泳動を行った後、SYBR Gold で染色し、UV 照射下でゲルを撮影した。ゲルからバンドを切り出し、1.5 ml 容エッペンドルフチューブに入れて -25 で保存した。

切り出したバンドから DNA を抽出し、再度 PCR を行って DGGE に供し、単一のバンドであることを確認した。その後、GC クランプのない PCR プライマーを用いて PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

単一のバンドが得られない DGGE バンドについては TA Cloning kit を用いて PCR 産物をクローニングし、塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) Real-time PCR

亜硫酸還元酵素遺伝子を標的とした硫酸還元細菌に特異的な DSR1F+ と DSR-R のプライマーを用いた PCR では、 Mg^{2+} の濃度を 3.5 mM とし、Q-Solution を用いている。本研究では、SYBR Green I 法による real-time PCR を用いた同遺伝子の定量方法の最適な条件について、 Mg^{2+} の濃度と Q-solution の添加の影響を調べた。図 1 に示すように、Q-Solution を添加しない場合の PCR 効率、 Mg^{2+} の濃度が 2.5 mM の場合より (90.1%) も 3.5 mM のほう (93.5%) が若干高かった。Q-Solution を添加すると PCR 効率は 65.5% と極端に低下した。これらの結果から、亜硫酸還元酵素遺伝子を定量するための real-time PCR の反応液には Q-Solution を添加せず、 Mg^{2+} 濃度を 3.5 mM とした。この方法を用いて数種の硫酸還元細菌の亜硫酸還元酵素遺伝子を定量したところ、 $<10^3 \sim 10^{10}$ コピーの亜硫酸還元酵素遺伝子を定量することが可能となった(図 2)。

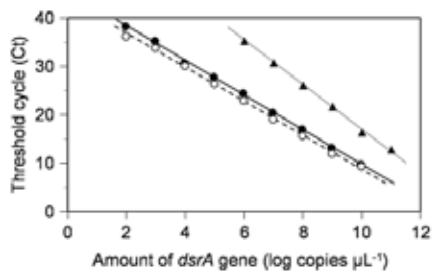


図 1 *Desulfovibrio desulfuricans* DSM642^T の *dsrA* 遺伝子の real-time PCR による検量線。
○ : 3.5 mM MgCl₂, □ : 2.5 mM MgCl₂, △ : 3.5 mM MgCl₂ + Q-Solution。

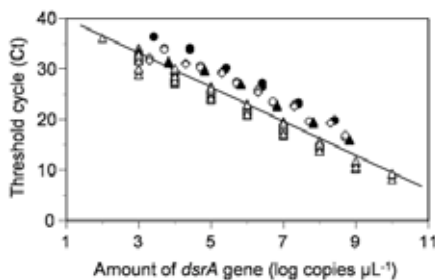


図 2 Real-time PCR による種々の硫酸還元細菌株の *dsrA* 遺伝子の計数。○ : *Desulfovibrio desulfuricans* DSM642^T, □ : *Desulfobacterium autotrophicum* DMS3382^T, △ : *Desulfobulbus propionicus* DSM2032^T, ◇ : *Desulfobacter latus* ATCC43918^T, ☆ : *Desulfococcus multivorans* DSM2059^T。

(2) DNA の抽出方法の検討

多検体の泥あるいは水試料から効率よく DNA を抽出するため、既存の方法 (HTP スピнкаラム法) と市販のキット (FastDNA Spin Kit および FastDNA Spin Kit for Soil) を用いる方法について検討した。

D. desulfuricans DSM642^T を培養し、DAPI 計数法によって細胞数を数えた後、段階的に希釈した。この細菌細胞を、水試料を想定した場合には孔径 0.2 μm のポリカーボネートフィルターに捕集した。上記 3 種の方法でフィルターごと DNA を抽出し、real-time PCR によって亜硫酸還元酵素遺伝子を定量し、硫酸還元細菌数に換算した。HTP スピнкаラム法ならびに FastDNA Spin Kit を用いた場合には、フィルター上に捕集した硫酸還元細菌数と real-time PCR によって計数された細菌数には直線関係 ($r > 0.99$) が認められた (図 3)。両者の関係の直線式の傾きは、HTP スピнкаラム法では 1.02、FastDNA Spin Kit では 1.09 で、フィルター上に捕集した細菌をほぼ正確に計数できていることが示された。

一方、FastDNA Spin Kit for Soil を用いた場合には、DNA の抽出効率が悪く、フィルター上に捕集する方法ではこのキットが使用できない。

泥試料の場合には、HTP スピнкаラム法と FastDNA Spin Kit for Soil について検討した。既知量の硫酸還元細菌を泥試料に添加して DNA を抽出し、水試料と同様に real-time PCR によって硫酸還元細菌を計数した。何れの方法でも、添加した細胞数と検出された細胞数には直線関係が認められた。(図 4)。

水試料、泥試料とも HTP スピнкаラム法と市販のキットでは DNA の回収率に差は認められないものの、市販のキットを用いるほうが、実験操作が簡便で、時間も大幅に短縮できた。

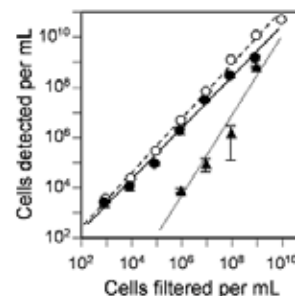


図 3 フィルター上に捕集した硫酸還元細菌の real-time PCR による計数。DNA 抽出には HTP スピнкаラム法 (○) FastDNA SPIN Kit (□) および FastDNA SPIN Kit for Soil を用いた。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

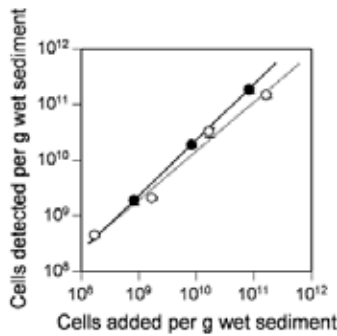


図4 底泥試料に添加した硫酸還元細菌の回収。既知量の *Desulfovibrio desulfuricans* DSM642^T 細胞を底泥試料に添加し、HTP スピнкаラム法 (○) あるいは FastDNA SPIN Kit for Soil (●) を用いて DNA を抽出し、real-time PCR によって細胞数を計数した。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

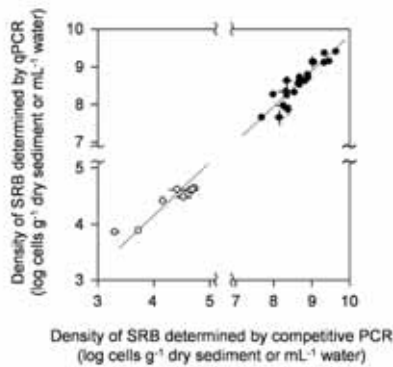


図5 Real-time PCR と競合 PCR で計数した養殖漁場底泥中 (○) および密度成層湖水中 (●) の硫酸還元細菌数の関係。点線は最小二乗法で求めた両者の直線を示す。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

本研究で開発した real-time PCR 法と競合 PCR 法の比較を、泥試料については養殖漁場の底泥、水試料については密度成層湖である水月湖の試料を用いて比較した。その結果、両者には有意な相関関係 ($r=0.995$) が認められ (図5) real-time PCR によって硫酸還元細菌が正確に計数されていることが示された。

(3) 沿岸域底泥中の硫酸還元細菌の分布と多様性

東京湾以西および韓国麗水の沿岸域から合計 50 の底泥表層試料を採取した。COD、AVS-S、IL および泥分含有率を測定し、これらの値から水産用水基準に従って合成指標を算出したところ、汚染泥と正常泥が含まれていた。これらの泥試料から DNA を抽出し、

real-time PCR によって硫酸還元細菌を計数したところ、 $1.6 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^9$ cells/g 乾泥で、底泥の化学的性質に関係なく 10^7 cells/g 乾泥以上の硫酸還元細菌が存在することが明らかとなった。この硫酸還元細菌数は底泥中の有機炭素量の増加に伴って増加し、有意な ($p<0.01$) 正の相関関係が認められた (図6)。一方、COD や AVS-S との間には明瞭な関係は認められなかった。これらの結果から、底泥中の硫酸還元細菌数が底泥の有機物汚染の指標となりうることが示唆される。

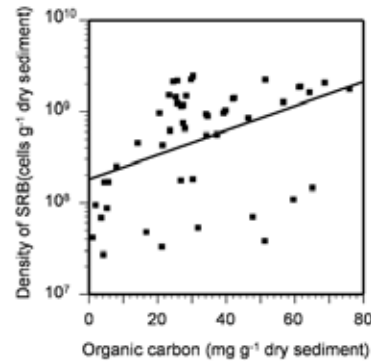


図6 有機炭素量と硫酸還元細菌数との関係。 ($r=0.43, p<0.01$)

亜硫酸還元酵素のサブユニットをコードしている *dsrB* 遺伝子の一部を標的とした PCR-DGGE によって底泥中の硫酸還元細菌の多様性について調べた。図7に示したように、底泥試料によって検出される DGGE バンドの数は異なり、その数は4~23本であった。水域ごとに DGGE のバンドパターンを比較すると、愛媛県の下波湾や高知県の浦ノ内湾で見られるように同じ水域内では類似したバンドパターンを示したが、五ヶ所湾や東京湾のように同じ水域内でも地点が異なると DGGE のバンドパターンは大きく異なっていた。東京湾の底泥や五ヶ所湾の底泥に比べて、下波湾の COD、AVS-S 値の変動幅は地点間の差が小さく、底泥の化学的性質が硫酸還元細菌の群集組成を決定する要因の一つと考えられる。

DGGE ゲルから約 100 本のバンドを切り出し、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列と相同性の高い配列を Blast によって検索したところ、殆どの配列は分離培養されている硫酸還元細菌の配列ではなく、環境から得られた未培養のクローンと相同性が高かった。これらの塩基配列をアミノ酸に翻訳し、近隣結合法によって作成した系統樹を図8に示す。沿岸域底泥から得られた DGGE バンドの多くは *Desulfobacteraceae* 科あるいは

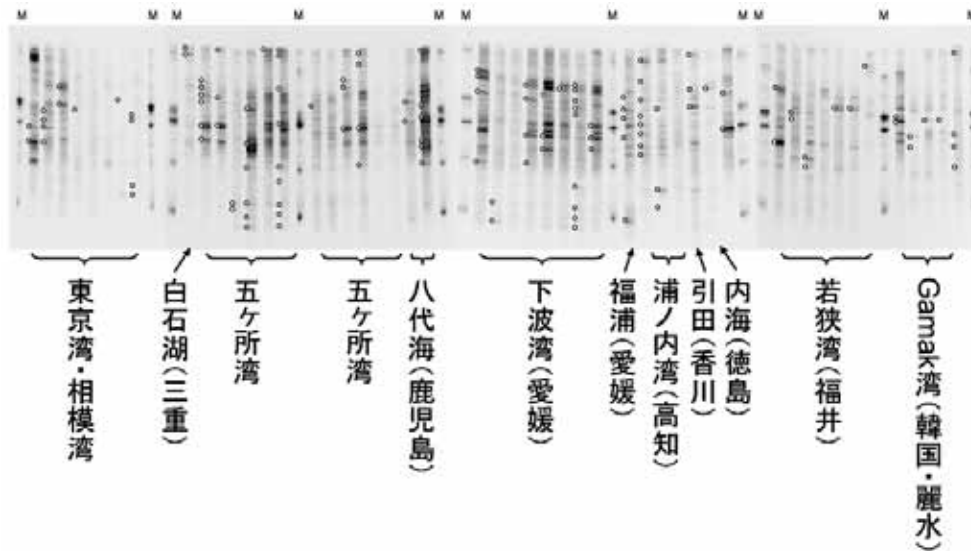


図7 沿岸域底泥中の硫酸還元細菌群集のPCR-DGGE プロファイル。M はマーカーを示す。は切出して塩基配列を決定した DGGE バンドを示す。

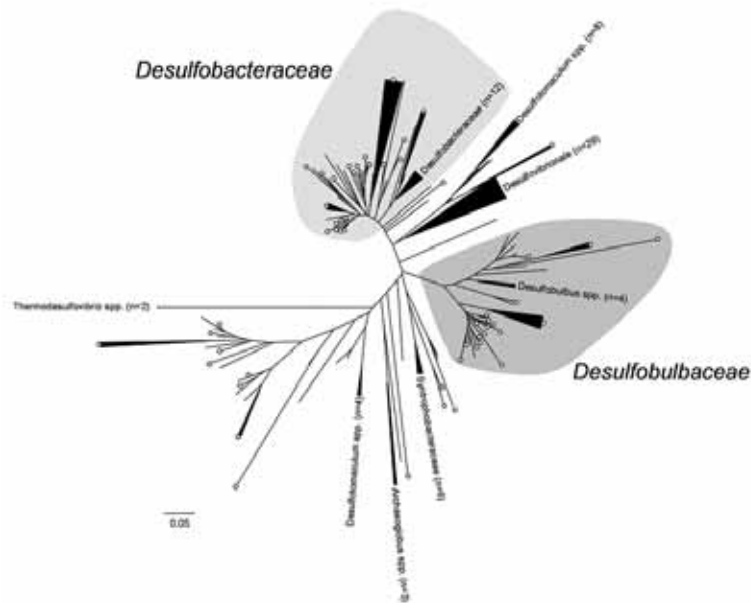


図8 DGGE バンドから切出した DsrB のアミノ酸配列に基づく NJ 系統樹。は切出して塩基配列を決定した DGGE バンドを示す。

Desulfobulbaceae 科のクラスターに近縁な配列で、これらの配列と同じ泳動度を示す DGGE バンドは全ての底泥試料から得られたことから、これらの科に属する硫酸還元細菌が底泥中の主要な群集であることが明らかとなった。この他、何れの硫酸還元細菌ともクラスターを形成しない DGGE バンドも得られ、これらの硫酸還元細菌も底泥中の主要な群集の一つであることが示唆された。

市販のキットによる DNA 抽出の後、

real-time PCR によって底泥中の硫酸還元細菌を簡便かつ正確に計数することが可能となった。この方法を用いて東京湾以西の沿岸域ならびに韓国・麗水の底泥中の硫酸還元細菌の計数を行うとともに、PCR-DGGE による硫酸還元細菌の群集組成を調べた。その結果、底泥中の硫酸還元細菌数は有機物の蓄積に伴って増加することが示された。その群集組成は、細胞数と同様に底泥中の有機物量のほか、AVS-S など他の底質要因によっても変化することが示唆された。底泥中の硫酸還元細

菌群集は *Desulfobacteraceae* 科ならびに *Desulfobulbaceae* 科を主とする多様な硫酸還元細菌によって構成されていることが明らかとなった。

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 6件)

R. Kondo, A. Nakagawa, L. Mochizuki, K. Osawa, Y. Fujioka and J. Butani. Dominant bacterioplankton populations in the meromictic Lake Suigetsu as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. *Limnology*, **10** (1), 63-69 (2009).

N. Kawahara, K. Shigematsu, T. Miyadai and R. Kondo. Comparison of bacterial communities in fish farm sediments along an organic enrichment gradient. *Aquaculture*, **287** (1-2), 107-113 (2009).

R. Kondo, K. Shigematsu and J. Butani. Rapid enumeration of sulphate-reducing bacteria from aquatic environments using real-time PCR. *Plankton & Benthos Research*, **3** (3), 180-183 (2008).

N. Kawahara, K. Shigematsu, S. Miura, T. Miyadai and R. Kondo. Distribution of sulfate-reducing bacteria in fish farm sediments. *Plankton & Benthos Research*, **3** (1), 42-45 (2008).

R. Kondo and J. Butani. Comparison of the diversity of sulfate-reducing bacterial communities in the water column and surface sediments of a Japanese meromictic lake. *Limnology*, **8** (2), 131-141 (2007).

R. Kondo, K. J. Purdy, S. Q. Silva and D. B. Nedwell. Spatial dynamics of sulphate-reducing bacterial compositions in sediments along a salinity gradient in a UK estuary. *Microbes and Environments*, **22** (1), 11-19 (2007).

[学会発表](計 10件)

坂見知子、奥村 裕、村岡大祐、横山 寿、重松孝太郎、近藤竜二 . T-RFLP 法による魚類養殖漁場底泥中の細菌群集組成の比較 . 平成 21 年度日本水産学会春季大会、2009 年 3 月 30 日、東京

重松孝太郎、近藤竜二、坂見知子、横山 寿、小泉喜嗣、尹 良湖 . 日本および韓国沿岸域底泥中の硫酸還元細菌の分布と群集組成 . 平成 21 年度日本水産学会春季大会、2009 年 3 月 28 日、東京

森 裕美、近藤竜二 . 光合成硫黄細菌に

おける亜硫酸還元酵素遺伝子の塩基配列の解析 . 第 24 回日本微生物生態学会、2008 年 11 月 26 ~ 27 日、札幌市

重松孝太郎、尹 良湖、近藤竜二 . 沿岸域底泥中の硫酸還元細菌の分布と群集組成 . 第 24 回日本微生物生態学会、2008 年 11 月 26 ~ 27 日、札幌市

森 裕美、近藤竜二 . 紅色硫黄酸化細菌に特異的な PCR プライマーの開発 . 2008 年日本プランクトン学会・日本ペントス学会合同大会、2008 年 9 月 6 日、熊本市

R. Kondo, N. Kawahara, K. Shigematsu and T. Miyadai. Comparison of bacterial communities in fish farm sediments along an organic enrichment gradient. 12th International Symposium on Microbial Ecology, Cairns, Australia, 19 August 2008

Y. Mori and R. Kondo. Specific detection of purple sulfur bacteria using PCR primers that target dissimilatory sulfite reductase gene. 12th International Symposium on Microbial Ecology, Cairns, Australia, 21 August 2008

近藤竜二、重松孝太郎、部谷巡貴 . リアルタイム PCR 法による硫酸還元細菌の迅速定量 . 平成 20 年度日本水産学会春季大会、2008 年 3 月 28 日、静岡市

重松孝太郎、川原直城、近藤竜二 . PCR 法による海面養殖場底泥中の硫酸還元細菌の分布と多様性解析 . 平成 19 年度日本水産学会秋季大会、2007 年 9 月 26 日、函館市

N. Kawahara, K. Shigematsu, T. Miyadai and R. Kondo. Comparison of bacterial communities in fish farm sediments with different pollution levels . 第 23 回日本微生物生態学会、2007 年 9 月 16 日、松山市

[その他]

近藤竜二 . 養殖場堆積物の微生物群集 . 平成 20 年度日本水産学会水産増殖懇話会第 2 回講演会 (招待講演) . 2009 年 2 月 7 日、藤沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 竜二 (KONDO RYUJI)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号 : 30244528