

助成番号 0628

## 海洋に分布する微生物の多様性に関する研究

西田 洋巳

東京大学大学院農学生命科学研究科

**概要** 海洋には河川などを通じて多くの微生物が流入しており、塩濃度 3.5%が増殖に不適である微生物も多く存在していると考えられる。また、急激な高塩環境への変化により“培養できない状態”へ移行した細菌も存在している可能性も高い。そこで、塩濃度のみが異なる培地を用意し、それらに海水サンプルを一定量加え、培養できた細菌を 16S rDNA 領域を増幅する PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)により検出・比較した。さらに、サンプリングした海水を 4°Cで 5 ヶ月間保存した後、再度同じ実験を行い培養できた細菌を検出した。PCR-DGGE における各バンドを切り出し、その塩基配列を決定することにより、そのバンドの DNA 配列を持つ細菌の種類を推定した。その結果、海水保存前における培養サンプルには培養条件によらず検出した *Vibrio* 属細菌を保存後における培養サンプル中にはいずれの条件においても検出せず、代わって初島海水においては保存後における培養サンプル中に保存前には検出しなかった *Sulfitobactor* 属細菌をすべての塩濃度条件で検出し、熱海海水においては保存後 3.5% 塩濃度の培養条件下で *Cobetia* 属および *Pseudoalteromonas* 属細菌を検出した。保存前後のいずれにおいても検出した細菌は *Shewanella* 属細菌だけであった。本細菌は塩濃度 3.5%条件下の培養液中ではなく、低塩濃度条件下においてのみ検出した。よって、本細菌は塩濃度 3.5%が増殖に不適であるにもかかわらず、4°Cで 5 ヶ月間の保存海水中で死滅しなかったことを示す。また、4°Cで 5 ヶ月間の保存後において *Vibrio* 属細菌は増殖せず、*Cobetia* 属および *Pseudoalteromonas* 属細菌は増殖したことを、培養サンプルから直接抽出した複合ゲノムサンプルに対するオリゴ DNA マイクロアレイ解析により確認した。すなわち、保存期間中に *Vibrio* 属細菌は“培養できる状態”から“培養できない状態”へ移行し、*Cobetia* 属および *Pseudoalteromonas* 属細菌は塩濃度 3.5%条件下において“培養できない状態”から“培養できる状態”へ移行したと考えられる。

### 1. 目的

海水中には多くの微生物が存在している。また、種レベルにおいて、微生物の 9 割以上が未知種であると報告されている。多くの種が未知である原因の一つとして、環境中において多くの微生物が培養できない状態にある可能性が指摘されている<sup>1,2)</sup>。現在、実験室においてこのような状態の細菌を生じさせる際には、培地中の栄養分を枯渇させ、その状態を長く続ける方法が主として用いられている。さて、雨などが原因で陸(土壌)から河川に流れ込み、最終的に海に存在する微生物が存在しているはずであり、その中に環境中の急激な塩濃度の変化により増殖を中止(休止)した微生物が含まれている可能性がある。すなわち、海水中には「塩により培養できない状態へ誘導された」微生物が存在している可能性がある。ここでは海洋由来の培養細菌複合体と培養中の塩濃度の関係について研究した。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 海水サンプルと培地

2006年5月4日・5日、熱海海岸および初島において海水をサンプリングした。また、次の2種類の培地を用意した。一つは1% ペプトンと0.5% 酵母エキスの溶液、もう一つはそれに3.5% NaClを加えたものである。海水サンプル1 mlに上記二つの培地のいずれかを9 ml混ぜたものおよび海水サンプル2 mlに上記の二つの培地いずれかを8 ml混ぜたものを作り、それらを室温(15-20°C)で2日間静置培養した。サンプリングした海水を4°Cで5ヶ月保存したのものに対してもサンプリング直後と同条件で実験を行った。また、東京大学本郷キャンパスの三四郎池から採取した淡水サンプルに対しても同様の実験を行った。

#### 2.2 PCR-DGGE による検出

細菌の16S rRNAの500塩基位置と900塩基位置で挟まれた領域を増幅できるPCRプライマーを用いてPCRを行い<sup>3)</sup>、その増幅産物に対し変性剤濃度勾配ゲル電気泳

動(DGGE; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)を行った。その際の変性剤濃度勾配は100%を7M尿素・40%ホルムアミドとして30%~60%とした。電気泳動後、ゲルからバンドを切り出し、その塩基配列を決定した。塩基配列決定後、BLAST検索を行い、類似配列を有する細菌の種を検索した。類似細菌における配列を抽出し、それらの配列を基に整列配列を作成した。*Vibrio* 属細菌間の系統関係はその整列配列より挿入・欠失サイトを除いた350塩基、*Shewanella* 属細菌間の系統関係はその整列配列より挿入・欠失サイトを除いた400塩基に基づき1,000回のブーツストラップをとまう近隣結合法により系統樹を作成した。

### 2.3 オリゴ DNA マイクロアレイによる検出

データベースに登録されている細菌16S rDNAの比較より、高度に保存されている14塩基と極めて多様性に富む9塩基が接している23塩基配列を基にプローブ設計したオリゴ DNA マイクロアレイを用いて、培養細菌由来ゲノムDNAをHybridizationさせ、そのシグナル強度を得た。その際のPositiveコントロールDNAとして*Pseudomonas putida* KT2440のゲノムDNAを使用した。その際、Hybridizationサンプル中におけるコントロールゲノムDNAの割合は10%(0.1 mg/ml)とした。

## 3. 結果と考察

### 3.1 サンプル直後の海水サンプルにおける細菌の検出

図1にPCR-DGGEの結果を示した。熱海および初島の海水サンプルともに塩濃度が3.5%, 0.7%, 0.35%と低くなるほどバンドの数が増加した。

バンド1~8の塩基配列を決定し、それらの配列に対してBLAST相同性検索した結果、塩基配列を決定した領域においてバンド8は*Bacillus psychrodurans*と完全に一致した。本細菌は熱海サンプルを塩濃度0.7%で培養した際にのみ検出した。

その他の七つのバンドについては完全に一致する配列が既知塩基配列データベースには存在していなかった。配列の類似性により、バンド1については*Shewanella*属細菌、バンド2, 4, 5, 7については*Vibrio*属細菌、バンド3, 6については*Marinomonas*属細菌由来であることがわかった。なお、塩基配列を決定した領域において、バンド4, 5, 7は完全に一致し、バンド3, 6も完全に一致した。

バンド2, 4, 5, 7と*Vibrio*属の既知種間の系統関係を図

2に示した。系統樹よりバンド2とバンド4, 5, 7の細菌は種レベルで違っていることがわかった。PCR-DGGEにおけるバンドの位置だけでは区別できない場合があることは指摘され、その解析限界について報告されている<sup>4)</sup>。



図1 採取後間もなくの海水由来の培養細菌のPCR-DGGEパターン

### 3.2 4°Cで5ヶ月保存後の海水サンプルにおける細菌の検出

図3にPCR-DGGEの結果を示した。サンプリング直後の海水サンプルからの結果と異なり、初島サンプルと熱海サンプルにおいてバンドのパターンが大きく異なった。

バンド9~12の塩基配列を決定し、それらの配列に対してBLAST相同性検索を行った結果、バンド9は*Sulfitobacter*属細菌、バンド10は図2におけるバンド1と同一配列であり、*Shewanella*属細菌、バンド11は*Cobetia*属細菌、バンド12は*Pseudoalteromonas*属細菌由来であることがわかった。よって、海水サンプリング直後および保存後の海水から共通に検出できた細菌は*Shewanella*属細菌(バンド1および10)だけであり、その検出は塩濃度が3.5%の培養条件では検出できず、サンプリング直後では0.35%においてのみ、保存後では0.35%および0.7%(電気泳動におけるバンド位置からの推定)において検出できた。

*Shewanella* 種間の系統関係(図4)を見たところ、本*Shewanella*属細菌は*S. frigidimarina*と*S. livingstonensis*と単系統群を作った。これらの種はいずれも培養においてNaClを必要としないと報告されている<sup>5)</sup>。他方、これら三つの配列で構成された系統群(ブーツストラップで54%の支持)に最も近縁種である*S. gaetbuli*は生育にNaClを

要求すると報告されている<sup>6)</sup>。ゆえに、本研究で検出した *Shewanella* 属細菌は塩要求の境界に存在しているといえる。この結果は 3.5%よりも低い塩濃度においてのみ検出されたことに矛盾しない

*Vibrio* 属細菌は海水サンプルの保存前にはすべての培養細菌複合体中に確認できたにもかかわらず、保存後においてはどの培養サンプル中にも検出されなかった。こ

れは本細菌が 4°Cで 5 ヶ月間保存したことにより培養できない状態になったことを強く示唆する。3.5%塩濃度だけでなく 0.7%、0.35%においても検出できなかったことより、本細菌を本培養条件で培養できない状態から培養できる状態へ再度移行させるためには塩濃度以外の要因が必要であることを示唆している。

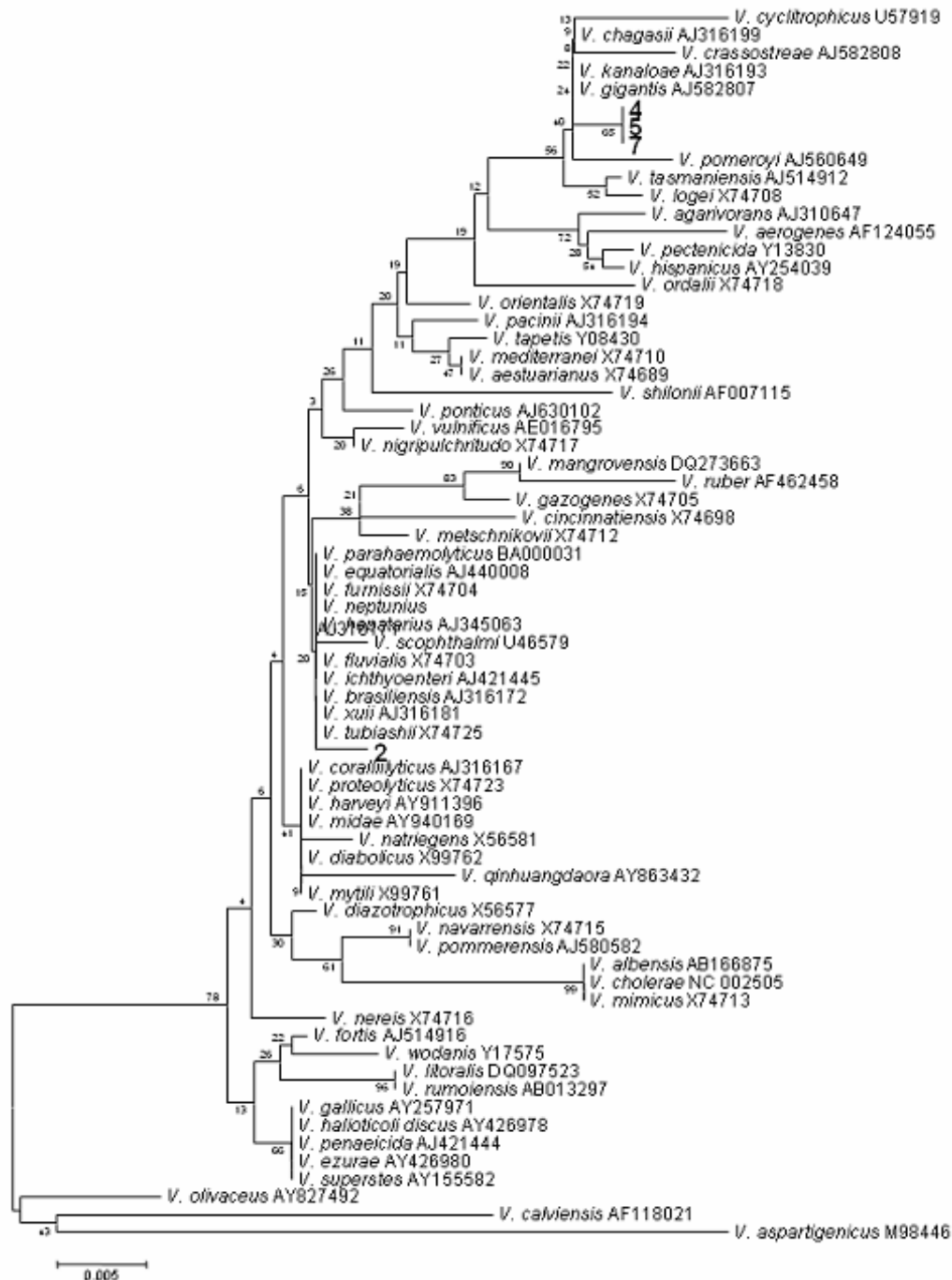


図2 *Vibrio* 既知種とバンド 2, 4, 5, 7 の系統関係

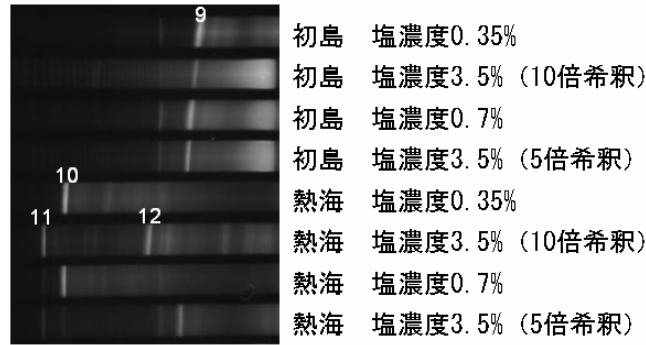


図3 4°Cで5ヶ月間後の海水由来の培養細菌のPCR-DGGEパターン

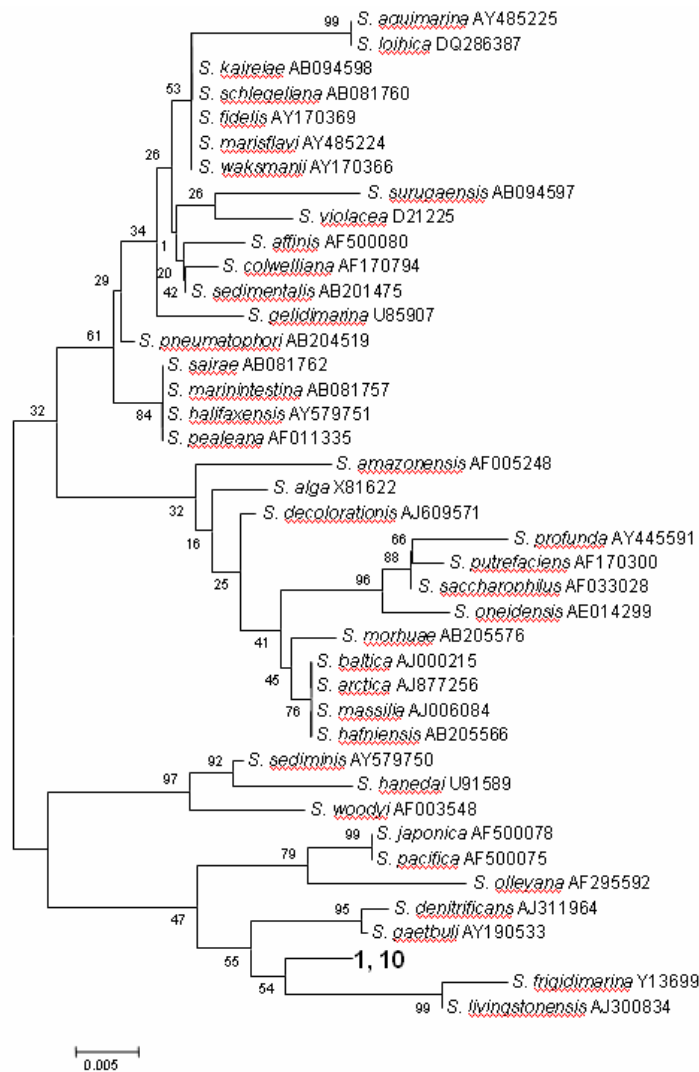


図4 *Shewanella* 既知種とバンド1, 10の系統関係

### 3.3 淡水サンプルにおける細菌の検出

図5にPCR-DGGEの結果を示した。保存前の海水サンプルからの結果(図1)と比較すると、バンドの多様性が

低く、いずれの塩濃度条件においても同様のパターンを示した。

バンド13と14の塩基配列を決定し、それらの配列に対

してBLAST 相同性検索を行った結果、これらの配列は同一であり、*Lactococcus lactis* と塩基配列を決定した領域において完全に一致した。

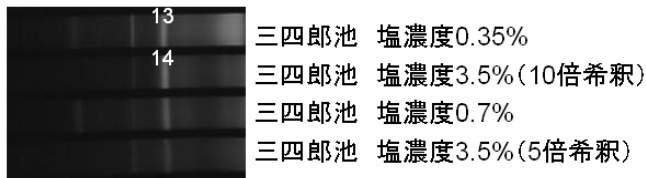


図5 三四郎池由来の培養細菌の PCR-DGGE パターン

### 3. 4 マイクロアレイによる *Cobetia*、

#### *Pseudoalteromonas*、および *Vibrio* の検出

PCR による増幅バイアスを考慮すると、より直接に DNA を検出できるマイクロアレイで確認することは意味がある。ここでは、保存海水(熱海)由来塩濃度 3.5% で培養した細菌群からの全ゲノム DNA を Hybridization サンプルとしてマイクロアレイ解析を行った。図 2 において比較した既知 *Vibrio* 種の中で *V. gallicus* 以外すべてがマイクロアレイのプロンプ領域において共通配列 5'-AACGAGCGC AACCCTTATCCTTG-3' を有していた。他方 DGGE におけるバンドを有する細菌と近縁の既知 *Cobetia* および *Pseudoalteromonas* 種は共通の配列 5'-AACGAGC GCAACCCCTATCCTTA-3' であった。これらのシグナル強度を Positive および Negative コントロールと比較した(表 1)。

表 1 マイクロアレイにおけるシグナル強度

プローブ配列	シグナル強度
<b>Positive control (<i>Pseudomonas putida</i>)</b>	
5'-AACGAGCGCAACCCTTGTCTTA-3' (forward)	8576
5'-TAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTT-3' (reverse)	5050
<b><i>Cobetia</i>, <i>Pseudoalteromonas</i></b>	
5'-AACGAGCGCAACCCCTATCCTTA-3' (forward)	1650
5'-TAAGGATAGGGTTGCGCTCGTT-3' (reverse)	1738
<b><i>Vibrio</i></b>	
5'-AACGAGCGCAACCCTTATCCTTG-3' (forward)	1120
5'-CAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTT-3' (reverse)	1460
<b>Negative controls</b>	
5'-AACGAGCGCAACCCTTTTTTTTTT-3' (forward)	1532
5'-AACGAGCGCAACCCAAAAAAA-3' (forward)	1528

*Cobetia* および *Pseudoalteromonas* のシグナル強度はいずれのタイプにおいても *Vibrio* のシグナル強度よりも高い

値であった。また、*Vibrio* のシグナル値は Negative コントロールより低かったことより、本培養細菌中に *Vibrio* は存在していないことを強く示唆した。これらの結果は PCR-DGGE の結果とよく一致している。

### 4. 今後の課題

海水を 4°C で 5 ヶ月間保存したことにより、*Vibrio* 属細菌は培養可能な状態から培養できない状態に移行したと考えられた。培養できない状態への移行メカニズムに関する研究は純粋培養された *Vibrio* 属細菌を用いて行われることが多い。しかし、本研究においては微生物複合体の状態で解析したことにより、*Vibrio* 属細菌が培養できない状態になったこととほかの細菌が培養できない状態から培養できる状態へ移行したことが海水保存期間中に生じたことを示すデータを得ることができた。また、海水サンプルが異なっている場合に保存後培養できる状態になる細菌の種が異なっていることも示した。この現象にどれほど普遍性があるかについては今後の研究対象である。また、海水と淡水における微生物多様性の比較解析も今後の課題である。海洋に一般的に存在していると考えられる *Shewanella* 属細菌の中には低塩濃度の方が一般海水塩濃度よりも増殖に適している細菌が存在していることを示した。本細菌の多様性と塩濃度との関連についても今後の研究課題の一つである。

### 引用文献

- 1) Oliver, J.D., Hite, F., McDougald, D., Andon, N.L., and Simpson, L.M., Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2624-2630 (1995).
- 2) Oliver, J.D., The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, **43**, 93-100 (2005).
- 3) Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700 (1993).
- 4) Kisand, V., and Wikner, J., Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J. Microbiol. Meth.*, **54**, 183-191

- (2003).
- 5) Bozal, N., Montesm, M.J., Tudela, E., Jiménez, F., and Guinea, J., *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 195-205 (2002).
- 6) Yoon, J.-H., Kang, K.H., Oh, T.-K., and Park, Y.-H., *Shewanella gaetbuli* sp. nov., a slight halophile isolated from a tidal flat in Korea. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 487-491 (2004).

No. 0628

## Studies on the Diversity of Microorganisms Distributed in the Ocean

Hiromi Nishida

Agricultural Bioinformatics Research Unit, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,  
The University of Tokyo

### Summary

I detected bacteria cultured at different NaCl concentrations from seawater. In the PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) analyses, three bacteria belonging to the genera *Marinomonas*, *Shewanella*, and *Vibrio* respectively were detected in the culture at 0.35% NaCl concentration from seawater soon after sampling in Atami-seashore, but only one bacterium belonging to the genus *Vibrio* was detected at 3.5% NaCl concentration. On the other hand, only one bacterium belonging to the genus *Shewanella* was detected in the culture at 0.35% NaCl concentration from the preserved seawater at 4°C for 5 months, but two bacteria belonging to the genera *Cobetia* and *Pseudoalteromonas* respectively were detected at 3.5% NaCl concentration. Thus, only one bacterium belonging to the genus *Shewanella* was detected in the cultures from both Atami-seashore-seawaters before and after the preservation. In addition, this bacterium was not detected in the culture at 3.5% NaCl concentration but at 0.35% NaCl. Phylogenetic analysis showed that this bacterium was closely related to the species that do not require NaCl for growth in the genus *Shewanella*. Bacteria belonging to the genus *Vibrio* were detected before the preservation but were not detected after the preservation in the PCR-DGGE analyses. In the oligonucleotide microarray analyses, *Vibrio* was not detected in the culture at 3.5% NaCl from the preserved seawater, which suggests that the bacteria belonging to *Vibrio* entered into nonculturable state during the preservation. On the other hand, the bacteria belonging to the genera *Cobetia* and *Pseudoalteromonas* were not detected before the preservation but were detected after it, which suggests that those bacteria shifted from the nonculturable state to the culturable state.