

DGGE 法による伊豆赤沢海洋深層水中の微生物群集構造解析

○山田勝久¹, 寺原 猛², 山口貴大², 小林武志², 今田千秋²(1 株式会社DHC、2 東京海洋大学)

【目的】

海洋は新規有用微生物の宝庫の可能性を秘めているにもかかわらず、これまで微生物の探索源としては海底堆積物や海洋生物が中心であった。従って海水中から分離された微生物、さらには海洋深層水(以下、DSWと記述)中に存在する微生物に関する基礎的知見は乏しいのが現状である。

そこで本研究では、太陽光が殆ど届かない補償深度(水深約 200 m)以深の海水であり、年間を通じて水温が低く、高い清浄性を有し、無機栄養塩が豊富に存在するなどユニークな特徴を有する DSW から、新規微生物、あるいは特異的な生理・生化学的諸性状を有する微生物を分離することに先立ち、まず DSW 中の微生物群集組成を調べることを目的とした。

【方法】

DSW の取水

静岡県伊東市伊豆赤沢にある株式会社DHC 海洋深層水研究所の取水施設において、2012年1月から12月まで1ヶ月ごとにDSW(水深800 m)を取水した。

微生物 DNA の抽出・精製

取水後、DSW 2 Lを孔径 3.0 μm のヌクレオポアフィルターでプレ濾過後、得られた濾液をさらに孔径 0.2 μm のヌクレオポアフィルターを用いて濾過集菌した。それぞれのフィルターから CTAB 法を用いてDNAを抽出・回収した。これに3 M酢酸ナトリウム、イソプロピルアルコールを順に加えて精製し、更に70%エタノールを加えてDNAを精製した後、純水に溶解して-20°Cで保存した。なお比較対照としてDSWを取水した直上の表面海水を用いて同様の操作を行い、得られたDNA精製物を-20°Cで保存した。

PCR および DGGE 解析

一般細菌は、ユニバーサルプライマー(GC クランプを付与した GC341F, 907R)を用いて一般細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅した。乳酸菌は、特異的プライマーを使用し、Nested-PCR を行った。1st PCR では WLAB1 と 1492R を用い、2nd PCR ではテンプレートに 100 倍希釈した 1st PCR 産物、WLAB1 と GC クランプを付与した GCWLAB2 を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。また、真菌については、ユニバーサルプライマー(GC クランプを付与した GCNL1, LS2)を用いて、26S rRNA 遺伝子を増幅した。こうして得られた各微生物の PCR 産物を DGGE に供した。

【結果および考察】

一般細菌、乳酸菌および真菌の群集組成を DGGE法で解析した結果、DSW中にも多様な群集組成が存在することが示唆された。そこで、これらの群集組成をMDS解析したところ、各菌種により群集組成が異なることがわかった。次にDGGEゲルから切り出したDNAバンドより微生物の同定を試みたが、一般細菌においては未培養クローンが多く、多数の難培養クローンの存在が示唆された。乳酸菌としては4種が同定されたが、未培養クローンも多かった。一方、真菌と同定されたDNAバンドは9本あったが、近縁種との相同性は85-94%に過ぎないことから、新規菌種の可能性が示唆された。

このようにDSW中の一般細菌、乳酸菌、および真菌の群集組成は多様であり、難培養微生物も多く存在していることが示唆されたが、この点については再現性を含め、今後も継続して調査する必要があると考えている。自然界においても稀有な環境であるDSW中には未知微生物、あるいは特異的な生理・生化学的諸性状を有する微生物の存在が期待できることから、DSWは応用微生物学的見地からも有益な分離源であると考えられる。