

平成 25 年度 研究経過報告書

研究者名

永田 恵里奈

研究課題名

琵琶湖の小型定置網（エリ網）上にバイオフィルムを形成する細菌群集構造の解析

研究目的・内容

琵琶湖のエリ網漁は約 1500 年前から行われている小型定置網漁である。しかし、平成 9 年頃からエリ網に大量の付着物（珪藻類など）が発生し始め、歴史的な漁法が存続の危機に瀕している。本研究では、対策を立てるための第一歩として、付着プロセスの解明を目的とした。具体的には、複数地点に設置した試験エリ網上の付着生物叢（特に初期に付着する細菌群）を解明し、各地点の環境条件と付着生物叢を比較することで粘質性珪藻類の付着を阻害する生物を探す。

研究の経過

<材料と方法>

エリ網汚損が発生している北湖の八坂と南湖の若宮の 2 地点を試験区とし、汚損が発生していない南湖の志那を対照区として試験用エリ網を設置した。試験用エリ網は水深 0.5 m に設置し、定期的に計 6 回、網を回収し、サンプルとして使用した。付着物の付いた網を 2 mL の 1×TE buffer が入った 15 mL 遠沈管に入れ、二つの方法（ボルテックス 1 分間または超音波 5 分間）により、網と付着物を分離した。その後、4℃、500×g、5 分で遠心して二層にし、上層を上清サンプル、底の沈殿物を付着物サンプルとした。DTAB・CTAB 法のみ、またはジルコニアビーズ法と DTAB・CTAB 法を組み合わせた方法で DNA を抽出し、その収量 (ng/μL) と純度 (260/280) をナノドロップにより測定した。その後、1 回目から 6 回目の網から抽出した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った。PCR 産物を電気泳動して DNA の増幅を確認した後、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) により各サンプルの細菌群集構造を可視化した。DGGE ゲルの写真からバンドパターンデータを抽出し、統計ソフト R を用いてクラスター解析を行った。

<結果>

実験 1. エリ網付着生物叢を把握するための分子生物学的手法の開発と改良

網と付着物を分離する方法として超音波法よりもボルテックス法の方が、DNA 収量が多く純度も高いという結果になった。超音波法ではサンプル処理にかかる時間がボルテックス法よりも長く、その間に DNA が分解されてサンプルを劣化させたのではないかと考えた。DNA 抽出法を検討した結果、網サンプルと付着物サンプルの場合、ジルコニアビーズ法と DTAB・CTAB 法を組み合わせた方法が DTAB・CTAB 法のみよりも DNA 収量が多く、純度が高かった。上清サンプルについては、どちらの方法を用いても収量は同じだったが、DTAB・CTAB 法のみの方がジルコニアビーズ法と DTAB・CTAB 法を組み合わせた方法よりも純度が高かった。これらの結果から、網と付着物を分離する最適な方法はボルテックス

法であり、網サンプルと付着物サンプルから DNA を抽出する場合は、ジルコニアビーズ法と DTAB・CTAB 法を組み合わせた方法が良く、上清サンプルからの場合は DTAB・CTAB 法のみが最適な方法であるという結論に至った。なお、予備試験として、試料の破碎にビーズビーターの使用を検討したが、抽出された DNA の純度や収量は充分であったが、ほとんどのサンプルが PCR で増幅されなかった。

実験 2. エリ網に付着している細菌群集の遷移過程および季節変化の解明

DGGE およびクラスター解析を行った結果、対照区である志那の細菌群集構造に対して、試験区である若宮と八坂の細菌群集構造は異なることが明らかになった。地理的に離れているにもかかわらず、北湖の八坂と南湖の若宮の細菌群集構造は類似しており、特にエリ網の汚損が顕著になる 5 週目以降の細菌群集構造が類似していた。つまり、北湖の八坂と南湖の若宮で発生しているエリ網汚損に関与している細菌種は同じであることが示された。本研究では、八坂と若宮に共通して存在し、志那には存在しない細菌種が複数見つかっており、これらの細菌種とエリ網汚損の因果関係を調べる必要がある。

本研究と関連した今後の研究計画

エリ網汚損（粘質性付着珪藻類の繁茂）が発生する場合と発生しない場合の生物叢およびその季節変化が実験 2. により明らかになれば、両者を比較し、それぞれの環境の指標となる生物、つまりどちらか一方の環境にしか存在しない生物をそれぞれ選び出す事が可能になる。今後は、粘質性珪藻類の付着を阻害する生物を探すために、PCR-DGGE 法で分画された DNA バンドをゲルから切り出し、解読した塩基配列から生物種を推定する。

（平成 26 年 3 月 31 日現在）