

令和元年度農学部特別研究費研究経過報告書

1. 研究者名 谷口 亮人
2. 研究課題名 養殖場海域における細菌群のマイクロスケールでの群集構造解析
3. 研究目的・内容

養殖場海域における海洋細菌群のマイクロスケールでの群集構造を初めて明らかにすることを目的とした。具体的には、(1) マイクロスケールでの細菌群集構造の手法を確立すること、(2) 和歌山県田辺湾養殖場において環境条件が異なる季節で採取した試料に応用すること、を実施した。養殖場海域における細菌群のマイクロスケール分布を明らかにした。

4. 研究の経過

(1) マイクロスケール分析手法の確立

安定的にデータを得ることや所要時間を短くすること、などから総合的に判断した。まず、DNA抽出を検討した。海水ダイレクト PCR の場合、グラム陽性菌などから効率よくゲノム DNA を分離できないことが予想される。そこで、DNAzol Direct (Molecular Research Center) を用いて、海水ドロップで DNA 抽出を行い (処理時間 15 分間)、それをそのまま PCR テンプレートにできるかを試した。しかし、DNAzol 処理を行うと得ることができなかった。他社のダイレクト PCR 用 DNA 抽出試薬は、処理後に上清を分取する必要がある、多検体処理には向かない。安定的にデータを得るためには、DNA 抽出なしの海水ダイレクト PCR が最善であると判断した。次に、安定的な PCR 産物の取得が本研究の鍵を握るため、最も効率よく産物が得られる PCR 酵素の検討を行った。検討した PCR 酵素は 7 種で、KAPA HiFi HS、KAPA2G Robust (KAPABIOSYSTEMS)、DreamTaq DNA polymerase、Platinum SuperFi DNA polymerase (ThermoFisher Scientific)、KOD Fx Neo (TOYOBO)、MightyAmp DNA polymerase (TAKARA)、Taq DNA polymerase with Robust buffer (BioAcademia) である。植物プランクトンを増殖させた自然海水 1 μL を用いた。その結果、安定的に PCR 産物が得られたのは KAPA HiFi HS であった。本酵素は、プライマーとテンプレート以外がプレミックスされており、所要時間の節約にもなる。

(2) 養殖場海域での応用

養殖場海域に隣接する地点 (St. E) において、7 月 (St.E-Jul)、9 月 (St.E-Sep) および 1 月 (St.E-Jan) にマイクロスケール分析を行った。環境要因として、St.E-Jul、St.E-Sep そして St.E-Jan の水温がそれぞれ 27.41 $^{\circ}\text{C}$ 、26.55 $^{\circ}\text{C}$ そして 16.76 $^{\circ}\text{C}$ であり、クロロフィル濃度がそれぞれ 1.20 $\mu\text{g/L}$ 、2.41 $\mu\text{g/L}$ そして 0.40 $\mu\text{g/L}$ であった。このような環境条件の違いがある中で、細菌群のマイクロスケール分布を調べた。多様性解析手法の一種であるフラグメント解析 (細菌種をピークとして検出) に供したところ、St.E-Jul で 9~18 ピーク (13.22 \pm 1.73 ピーク)、St.E-Sep で 9~17 ピーク (12.98 \pm 1.67 ピーク)、そして St.E-Jan で 6~17 ピーク (12.67 \pm 1.84 ピーク) であった。マイクロスケールに関する既報研究 (ただし、200 μL スケール) では、細菌数に関してのみ報告がある。本研究では、1 μL スケールでもピーク数 (細菌種数) に 2 倍以上もの差があることを初めて明らかにした。その細菌種数は、St.E-Jul と St.E-Jan 間で差がある傾向がみられたが ($p = 0.0756$, Tukey's HSD test)、St.E-Jul と St.E-Sep 間 ($p = 0.610$) ならびに St.E-Sep と St.E-Jan 間 ($p = 0.433$) には差はなかった。この結果は、水温差 (約 10 $^{\circ}\text{C}$) あるいは/およびクロロフィル濃度差 (約 1/6) によるものであることが示唆される。しかし、環境要因もマイクロスケールで異なることが推測されるため、マイクロスケールでの環境要因は今後解決すべき課題である。

5. 本研究と関連した今後の研究計画

今後、本研究を展開するにあたり最も問題となるのが、得られた細菌群のマイクロスケール分布を生態学的にどのように解釈するのかである。本研究の強みであるわずか 1 μL の分析は、生態学的解釈で重要な環境要因の取得とトレードオフの関係にある。細菌群のマイクロスケール分布のデータが得られても、その結果を解釈することが難しい。現在は、海水 1 μL でも分析することができる解析手法の探索を進めている。将来的には、水塊が全く異なる海域におけるブルーム形成期と崩壊期におけるマイクロスケールの変遷を追跡する。

一方で、DNA 抽出問題も解決すべき課題である。Lyse-N-Go (生産中止) のような秀逸な試薬の情報を逃さないようにするとともに、得られる実験データの解釈時に過小評価している可能性を考慮すべきである。