

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870936

研究課題名(和文)クロマグロ養殖場海域の物質循環を統べる細菌鍵種の特定

研究課題名(英文) Bacterial key species as a regulator of organic matter flux in a bluefin tuna farming environment

研究代表者

谷口 亮人 (TANIGUCHI, Akito)

近畿大学・農学部・助教

研究者番号：10548837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、造礁サンゴが群棲するクロマグロ養殖場海域における細菌群の変動を調べ、その物質循環を統べる細菌鍵種を特定した。季節に係わらず、造礁サンゴの放出する粘液によって、細菌生産が増加することを明らかにした。活発に増殖している細菌群の次世代シーケンス解析を行った結果、ごく一部の細菌種がその細菌生産を担っていることを明らかにした。これらの細菌種が、本養殖場海域における細菌鍵種である可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, bacterial key species which would regulate organic matter flux in a bluefin tuna farming environment have been identified. Bacterial production in seawater was enhanced by released coral mucus regardless of the season. It was found that only a few bacterial species were dominant in the community of active growing bacteria from the analysis of next generation sequencing, suggesting they play a key role in the enhanced production. These bacteria should be "key species" as regulators of organic matter flux in the bluefin tuna farming environment where corals inhabit.

研究分野：微生物海洋学

キーワード：クロマグロ養殖 サンゴ サンゴ粘液 プロモデオキシウリジン 次世代シーケンス 細菌鍵種 物質循環

### 1. 研究開始当初の背景

近畿大学では、クロマグロ養殖を鹿児島県奄美大島の花天湾で行っている。このクロマグロ養殖場海域には、興味深い光景が広がっている。きれいな海の象徴であるサンゴが、クロマグロ養殖生簀籠上に群棲している光景である。サンゴの周辺には多種多様な天然魚類が群がっており、本養殖場の生態系サービスの充実ぶりがうかがえる。この驚くべき光景は、適正な養殖活動がなされていることを示している。我々の知見・理解を超えた至妙なバランスの物質循環が成立していることが示唆される。この物質循環を駆動している生物が、細菌群となる。

サンゴは周辺環境に粘液を放出する。サンゴが環境ストレスに抵抗するために、常時放出している。その量は、グレートバリアリーフのサンゴ *Acropora* において、一日当たり  $4.8 \text{ L/m}^2$  である (Wild et al., 2004, Nature 428: 66-70)。サンゴ粘液には、抗菌物質のほかに、海水の 100 倍以上もの密度あるいは濃度の細菌や栄養塩および有機物を含むことも示されている。このようなサンゴ粘液が周辺海水に放出されると、細菌群が駆動する物質循環にも影響を与えるのではないだろうか。サンゴが存在し、その粘液で特定の細菌群が活発化し、至妙なバランスの物質循環が成り立つ。その結果、サンゴがさらに生育するという「サンゴスパイラル」が存在するのではないだろうか。

これまでに、研究代表者は、DNA トレーサー法を駆使して、沿岸域から外洋域に亘り、時空間的に増殖する細菌種について解析してきた。研究代表者は、活発に増殖する際域種を、海洋の物質循環の鍵を握る細菌種 = 細菌鍵種として特定してきた。活発に増殖する細菌種 = 細菌鍵種は、その増殖に有機物を多く必要とし、さらにウイルスの溶菌や原生生物の捕食を受けやすい (Fuhrman, 1999, Nature 399: 541-548; Pernthaler, 2005, Nature Rev Microbiol 3: 537-546)。そのため、他の細菌よりも物質循環に貢献する。一方、研究代表者は、サンゴ粘液が海水に放出されると細菌生産が著しく増加することも見出している。この結果は、サンゴ粘液が果たしている細菌群を介した物質循環に対する多大な影響の一端を示す。しかしながら、どのような細菌種がその影響を受けているのか、という疑問には未だ答えられていない。果たして、サンゴ粘液は一体どのような細菌種の増殖を促し、どれくらい活発に増殖させ、細菌生産を促進しているのだろうか。

### 2. 研究の目的

本研究では、サンゴ粘液が海水に放出されることで活発に増殖し、高い生物量・生産量をもつ細菌種、つまり、クロマグロ養殖場海域の物質循環を統べる細菌鍵種を特定する。「海を汚す養殖」と「きれいな海で生きるサンゴ」の共存は、至妙場バランスで物質

循環が成立していることを示している。物質循環を駆動するのは細菌群である。とりわけ、活発に増殖している細菌種は細菌鍵種として物質循環を統べる。その細菌鍵候補種を絞り込み、各細菌鍵候補種の生物量および生産量を調べ、全細菌生産への寄与率が特に高い細菌鍵種をつきとめる。

### 3. 研究の方法

クロマグロ養殖生簀籠上で優占しているサンゴ *Acropora* sp. を対象サンゴとした。同じサンゴ群体からの粘液による影響を見るために、サンゴの極近傍からシリンジを用いてサンゴ粘液を採取した。シリンジで採取した試料を 100% 粘液試料 (以下、Mucus) とし、これを周辺海水で希釈した 50% 粘液試料 (以下、MuSW) と、海水のみの試料 (以下、SW) の 3 種類を 2 本立てで準備した。既得試料とあわせて、平成 25 年に新規試料を採取した：春季 (平成 23 年 5 月、平成 24 年 5 月、平成 25 年 5 月) および秋季 (平成 22 年 10 月、平成 23 年 11 月、平成 24 年 10 月)。現場にて、各試料にプロモデオキシウリジン (BrdU; 終濃度  $1 \mu\text{M}$ ) を添加し、現場水温付近で ~10 時間培養した。培養後に、(1) 細菌生産測定用にチミジン (終濃度  $1 \text{ mM}$ ) を加えて、(2) 細菌計数用に、パラホルムアルデヒド (終濃度 2%) で固定し、(3) 群集構造解析用に、孔径  $0.22 \mu\text{m}$  ステリベクスフィルターでろ過し、それぞれ分析まで冷凍保存した。非養殖場海域として、和歌山県串本町のサンゴ *Acropora* sp. を対象として、同様の方法で群集構造解析を行った。クロマグロ養殖場海域と非養殖場海域における活発に増殖する細菌群を比較した。

#### (1) 細菌生産

試料をナイロンメンブレンにろ過し、DNA を変性後、抗 BrdU 抗体と BrdU で標識された DNA を反応させた。BrdU 取り込み量を発光で検出した。

#### (2) 細菌数

固定試料を孔径  $0.22 \mu\text{m}$  ポリカーボネイトフィルターにろ過した後、BIC-FISH 法に供した。対象とした主要細菌系統群は、Eubacteria、Alphaproteobacteria (*Roseobacter/Rhodobacter*, *Roseobacter*, SAR11, *Sphingomonas*)、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria (*Vibrio*, *Oceanospirillum*, *Alteromonas*)、Bacteroidetes である。

#### (3) 群集構造

ステリベクスから細菌 DNA を抽出後、抗 BrdU 抗体を用いて BrdU で標識された DNA のみを分取した。この DNA を用いて、群集構造解析の手法である変性剤濃度勾配ゲル電気泳動解析 (DGGE) あるいはリボソーム遺伝子間スペーサー領域自動解析 (ARISA) に供した。SW および Mucus の 2 本立てのうち、1 本を次世代シーケンズ解析 (Illumina 社 MiSeq) に供した。解析については、北海道システム・サイエンス株式会社に委託した。

得られたデータを解析パイプライン「QIIME」にて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細菌生産

海水試料(SW)のみの細菌生産は6.63~266 pmol BrdU/L/hでの範囲であった。一方、海水に粘液が入った場合には、海水よりも有意に細菌生産が増加していた( $p < 0.01$ )。サンゴの極近傍からシリンジで採取した粘液試料(Mucus)における細菌生産は118~352 pmol BrdU/L/hの範囲で、SWとMucusの混合試料(MuSW)においては78.4~447 pmol BrdU/L/hの範囲であった。SWとMucusとの差は最大で17.8倍となった。さらに、この細菌生産の増加は、培養1時間後でも確認できた。また、この細菌生産の増加は、粘液にもともと存在していた細菌ではなく、海水柱に存在していた細菌によるものであることも示唆している(雑誌論文1: Taniguchi *et al.* 2014)。これらの結果は、潮汐の影響をあまり受けることなく、サンゴ粘液がクロマグロ養殖場海域における細菌生産を支えていることを示唆する。

##### (2) 細菌数

平成23年11月の試料を代表試料として用いた。培養前と培養後の細菌数は、SWにおいては、 $4.4 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>から $2.9 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>へと有意に減少していた( $p < 0.01$ )。一方で、サンゴ粘液が含まれたMucusおよびMuSW試料においては、それぞれ細菌数が $2.4 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>から $9.1 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>および $2.5 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>から $7.1 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>へと有意に増加していた( $p < 0.01$ )。このとき、活発に増殖している細菌の割合は、SW、MucusおよびMuSWにおいて、それぞれ25.3%、79.4%および64.2%となっていた。このことから、サンゴ粘液は、海水に放出されると、活発に増殖する細菌群の割合を増加させることが考えられる。

サンゴ粘液の影響を受けたMucusおよびMuSW試料における菌群集構造をBIC-FISH法で調べたところ、AlphaproteobacteriaとBacteroidetes属する細菌系統群が優占していることが分かった(Fig. 1)。活発に増殖している細菌群のうち、MucusにおいてはAlphaproteobacteriaが36.4%、そしてBacteroidetesが29.9%を占めていた。MuSWにおいては、Alphaproteobacteriaが23.3%、そしてBacteroidetesが30.8%を占めていた。

、全細菌のうち占める割合が38.0%であり、そのうちの72.3%が活発に増殖していた。これらの細菌系統群に、サンゴ粘液が放出された海水において、物質循環の鍵を握る細菌種が含まれていることが示唆される。しかしながら、同じAlphaproteobacteriaに属していても、その粘液によって活発に増殖する系統群とそうでない系統群が存在していた。

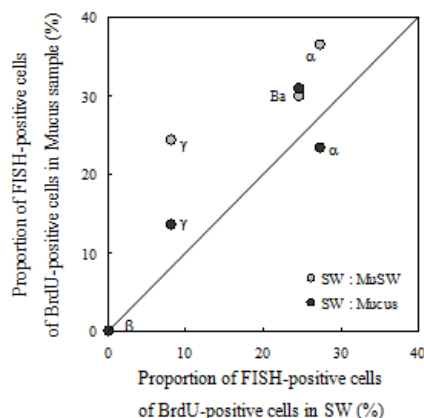


Fig. 1 活発に増殖している細菌群に占める各系統群の割合  
 $\alpha$ : Alphaproteobacteria,  $\beta$ : Betaproteobacteria,  $\gamma$ : Gammaproteobacteria, Ba: Bacteroidetes. 直線は、 $y=x$ の直線を示している。

##### (3) 群集構造解析

ARISAによる群集構造解析の結果、大きく2つのクラスターに分けることが出来た。つまり、活発に増殖する細菌群のうち、海水試料(SW)の細菌群集構造と粘液を含んだ試料(MucusとMuSW)とは異なるクラスターを形成していた。一方で、2本立てで行った試料間において、群集構造に大きな違いはなかった。

上記の(2)で得られた結果において、同じ綱あるいは目レベルにおいてもサンゴ粘液によって活発に増殖する細菌種としない細菌種の存在が示唆されている。そこで、当初の研究計画を変更し、BIC-FISHによる細菌鍵種の絞り込みではなく、次世代シーケンスによる細菌鍵種の絞り込みを試みた。BIC-FISHでは、大きな分類群において、絶対定量が出来るという利点はあるが、細かな細菌種レベルでの定量には難しい部分がある。一方で、次世代シーケンスは、大量の塩基配列で結果を得ることが出来るため、絶対定量はできないが、細かな細菌種レベルでその相対現存量を知ることが出来る強みがある。

SWにおいて活発に増殖している細菌群として、Alphaproteobacteriaに属するRhodobacteraceae、Gammaproteobacteriaに属するHalomonadaceaeおよびBacteroidetesに属するCryomorphaceaeが全試料において優占していた(Fig. 2)。Alphaproteobacteriaに属するRhodobacteraceaeおよびBacteroidetesに属するCryomorphaceaeは、粘液の影響を受けたMucusおよびMuSWにおいても活発に増殖している細菌として優占していた。一方で、Gammaproteobacteriaに属するHalomonadaceaeは、粘液の影響を受けたMucusおよびMuSWではほとんど増殖していなかった。このHalomonadaceaeに属する細菌種は、粘液に含まれる抗菌物質の影響を受けやすいか、あるいは粘液に含まれる有機物を効率よく利用できないのかもしれない。

興味深いことに、平成23年5月、平成24年5月、平成22年10月および平成23年11月と平成24年10月および平成25年5月とのMucusおよびMuSW試料間において活発

に増殖している細菌群が異なっていた (Fig. 2)。これは、サンゴ種による違いが考えられる。平成 24 年 5 月までのサンゴ種と平成 24 年 10 月までのサンゴ種は、同じ *Acropora* 属に属するサンゴであるが異なる種であることが、形態的に推察される。これは、平成 24 年 10 月までに対象としていたサンゴが、台風によって脱落したため、やむなく別群体のサンゴを対象とすることとなったためである。しかしながら、非常に興味深いデータを得ることが出来た。異なるサンゴ属由来の粘液であっても、細菌生産を増加させるという効果は変わらないが、その生産を促されている細菌種が異なることが分かった。今後は、サンゴ属によってサンゴ粘液の組成が異なるのか、あるいは抗菌物質が異なるのかなどのメカニズムの解明に取り組む必要がある。

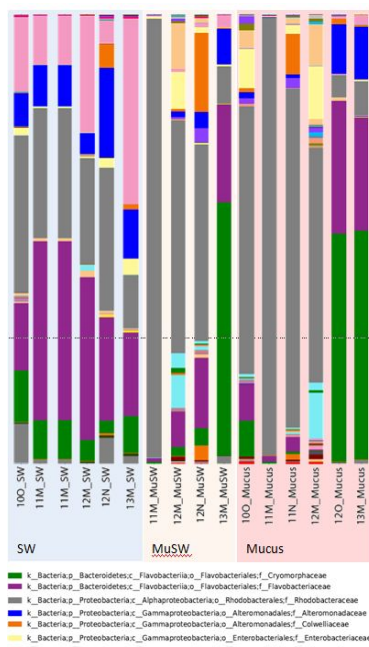


Fig. 2 次世代シーケンス解析による活発に増殖している細菌群の科レベルにおける割合。全 OTU を 100% としたときの相対現存量であらわしている。とりわけ、注目すべき細菌科をグラフ下に示している。

サンゴ粘液によって活発に増殖している細菌種として、Alphaproteobacteria の Rhodobacteraceae に属する OTU 10 および Bacteroidetes の Cryomorphaceae に属する OTU 0 が海水のそれよりも有意に割合を増加させていた。一方で、Alphaproteobacteria の Rhodobacteraceae に属する OTU 8、Gammaproteobacteria の Halomonadaceae に属する OTUs 14, 21 そして 27 はサンゴ粘液があると海水よりも割合を減少させていた。

非養殖場海域においても、同様の傾向がみられるのかを DGGE で調べたところ、Alphaproteobacteria の Rhodobacterales および Bacteroidetes の Flavobacteriales に近縁な細菌が活発に増殖している細菌種数のうち半数以上を占めていた (雑誌論文 2: Taniguchi *et al.*, 2015)。クロマグロ養殖場域において活発に増殖していた Rhodobacteraceae および Cryo-

morphaceae は、それぞれ Rhodobacterales および Flavobacteriales に属している。すなわち、この結果は、養殖場海域あるいは非養殖場海域にかかわらず、これらの細菌種が、サンゴ礁生態系における物質循環を担っている鍵となる細菌種であることを示唆している。

観測期間中 (平成 22 年 ~ 平成 26 年) クロマグロ養殖場海域の造礁サンゴは、台風などの不慮のイベントによって脱落するサンゴ群体もあったが、健康に成長していた。その間の濁度あるいはクロコフィル濃度には劇的な変化が見られなかった。これは、本養殖場海域の水質が健全に保たれていることを示唆する。そのような海域において、サンゴ粘液が海水中に放出されると、海水由来の細菌生産が有意に増加されることが分かった。さらに、その増加は、季節に係わらず、あるいはサンゴ種に係わらず、起こることも示唆した。細菌数および群集構造解析によって、その細菌生産は、とりわけ Alphaproteobacteria の Rhodobacteraceae および Bacteroidetes の Cryomorphaceae が主に担っていることを示唆した。増加した細菌生産の半分以上をも、これらの細菌群によって担われていた。すなわち、これらの細菌群が、クロマグロ養殖場海域あるいはサンゴ礁域における物質循環を統べていることが強く示唆される。とりわけ、本研究課題で特定した Rhodobacteraceae の OTU 10 および Cryomorphaceae の OTU 0 が、本養殖場海域における細菌鍵種であろう。今後、これらの細菌種の絶対定量、季節的変動、有機物分解能 (質および量) などを、寒天培養法および分子生態学的手法を用いて詳細に解析する必要がある。

## 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 2 件)

1. Taniguchi, A., Yoshida, T., Hibino, K., Eguchi, M. (2015) Community structures of actively growing bacteria stimulated by coral mucus. *Journal of Marine Biology and Ecology*, in press, 査読有, doi: 10.1016/j.jembe.2015.04.020
2. Taniguchi, A., Yoshida, T., Eguchi, M. (2014) Bacterial production is enhanced by coral mucus in reef systems. *Journal of Marine Biology and Ecology*, 461: 331-336, 査読有, doi: 10.1016/j.jembe.2014.09.004

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 畔柳裕樹、西村翔太、西田雄人、滝野雄斗、谷口亮人、江口 充「サンゴ粘液によって活発に増殖する細菌群の群集構造解析」平成 26 年度日本水産学会近畿支部例会、2014 年 11 月 22 日、京都大学

- (京都府京都市)
2. 吉田隆志、青木隆一郎、西村翔太、畔柳裕樹、谷口亮人、江口 充「クロマグロ養殖場のサンゴが細菌群の生産と組成に与える影響」第 29 回日本微生物生態学会大会、2013 年 11 月 23~24 日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kindai-suizoku.daa.jp/About%20us/Detail/Coral.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

谷口 亮人 ( TANIGUCHI, Akito )

近畿大学・農学部・助教

研究者番号：10548837