

季節変動による宍道湖の微生物変遷とネットワーク解析による共生関係の解明

松江工業高等専門学校	非会員	○村上 穂香
松江工業高等専門学校	非会員	水田 裕貴
松江工業高等専門学校	非会員	吉田 珠笑
松江工業高等専門学校	正会員	山口 剛士

1. 目的

汽水湖である宍道湖は、斐伊川から流れ込む淡水と日本海から境水道、中海、大橋川を通して逆流してくる海水が複雑に混合し、特異な水質環境の変動特性を有している。従って、汽水域には固有な種に加え、海あるいは淡水環境に生息する種や変化に富んだ生物叢がみられ、生態学的に極めて特色ある場となっている<sup>1)</sup>。しかしながら、汽水湖における微生物叢の調査は、湖沼などの淡水環境や海洋に関する研究と比較すると少ないのが現状である。故に、宍道湖に生息する微生物群集は未だブラックボックスであり、多くの未培養微生物が生息している可能性がある。また、宍道湖に生息していると考えられる未培養微生物の生態解明には分離・培養が有効であるが、環境中には分離・培養が困難な微生物が圧倒的に多いということが指摘されている<sup>2)</sup>。しかし、近年、微生物間の相互作用に関する研究が行われ、難培養性微生物の中には多種の微生物と様々な化学物質を介して情報のやり取りをしていることが明らかとなってきている<sup>3)</sup>。そこで、本研究では、宍道湖に生息する微生物で共生関係にある未培養微生物が生息しているのか明らかにすることを目的として、宍道湖に生息する微生物の同定及び多様性解析、スピアマンの順位相関係数を用いて環境変動による微生物叢の変化の相関関係を調査した。

2. 実験方法

(1) サンプリング

本研究では、宍道湖の湖心 (S-3) や塩分濃度が高い大橋川 (S-5)、淡水の河川である斐伊川側 (S-6) など様々な場所から湖水を採取した (図 1)。サンプリングを行った微生物は、3µm のメンブレンフィルターで真核生物などを除去した後、0.2 µm のメンブレンフィルターで集菌した。

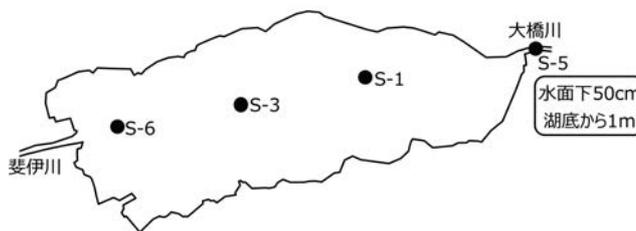


図 1 本研究におけるサンプリング場所

(2) 微生物群集構造解析

集菌したフィルターは、TE に浸した後、凍結融解による細胞壁の破壊を行った。その後、ボルテックスを行い集菌した微生物を乖離させ、乖離させた微生物を PCR に供した。PCR は、微生物を網羅的に解析できる 16S rRNA の V4 領域を標的として行った。微生物群集構造解析には、MiSeq 及び QIIME2<sup>4)</sup> を用いて、各地点における年間変動に関する微生物の同定を行った。

(3) 多様性解析及びネットワーク解析

宍道湖における微生物叢の共生関係の解明は、多様性解析、スピアマンの順位相関係数を用いて微生物の増減関係により判断した。スピアマンの順位相関係数を用いた解析では、QIIME2 で作成した OTU を整理し、統計ソフトである Past3 を用いて相関係数を求めた。さらに、強い相関 (rs>0.5, rs<-0.5) かつ、優位水準 (p=0.01) に満たないデータを省いた後、ネットワーク図作成ソフトである Cytoscape\_3.7.2 software を用いて分子間相互作用のネットワークを可視化した。

キーワード 宍道湖, 微生物群集構造解析, スピアマンの順位相関係数, NS11-12 marine group

連絡先 〒690-8518 島根県松江市西生馬町 14-4 松江工業高等専門学校 環境・建設工学科

T E L 0852-36-5261

### 3. 実験結果及び考察

#### (1) 微生物群集構造解析

宍道湖に生息する微生物を明らかにした結果、門レベルにおける微生物叢では、海側の採水地点から離れるほど *Bacteroidetes* 門に近縁な微生物の存在割合が増加傾向にあった (データ非表示). 次に、宍道湖に生息する主要微生物を解析した結果、全地点において *Actinobacteria* 門に属する hgcI clade が優占していた. さらに、2016年の6月及び12月のS1, S3において *Bacteroidetes* 門に属する NS11-12 marine group の未培養微生物が優占しており、どちらも海洋で検出されるグループであった<sup>5)</sup>. 一方で、塩化物イオン濃度が上昇しやすいS5の底泥近くでは、塩化物イオン濃度が10 mg/l 以上になると上述した微生物の存在割合が低下し、異なる海洋性細菌が優占していた (図2). Peeter らの報告によると、フィンランド湾での微生物群集構造解析の結果から、NS11-12 marine group I の上位グループ *Sphingobacteria* 目は、多様性に富む環境下で増殖しにくいことが示唆されている<sup>6)</sup>. 本研究においても  $\alpha$  多様性解析を行い、NS11-12 marine group I の存在率と比較したところ、NS11-12 marine group I の存在率は、多様性が他の時期よりも低い時期で高くなっていた (図3). この結果から、本研究においても未培養微生物である NS11-12 marine group I が他の微生物群との競合で劣勢であったことが示唆された. 従って、多様性が低い時期から培養を行うことで未培養微生物である NS11-12 marine group I を分離培養できる可能性が高いと考えられる. 次に、未培養微生物の相関性を把握するために、湖心における微生物叢の変遷からスピアマンの順位相関係数による計算を行った. その結果、未培養微生物が *Arenimonas* 属に属する微生物と *Oocystis solitaria* に近縁な微生物と強い正の相関があることが明らかとなった (図4). これらの情報を用いることで未培養微生物を分離培養できる環境にすることができるのではないかと考える.

#### 4. まとめ

本研究により、宍道湖に生息する微生物の多くが海洋性細菌であり、また宍道湖の微生物叢は、密度成層による影響を受け水面と湖底において優占種が変化することが確認された. さらに、スピアマンの順位相関係数による計算を用いることで、未培養微生物と共生関係にある微生物を把握できる可能性があることが示唆された.

#### 参考文献

- 1) 環境省 日本の汽水湖 (第2章).
- 2) Amann, R.I. *et al.*, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*, 59, 143-169, 1995.
- 3) 鎌形洋一. 極限環境微生物学会誌 6.1,74-80. 2007.
- 4) Bolyen, E. *et al.*, Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852-857, 2019.
- 5) Liu, J. *et al.*, Phylogenetic shifts of bacterioplankton community composition along the Pearl Estuary: the potential impact of hypoxia and nutrients, *Frontiers in microbiology*, 6, 64, 2015.
- 6) Laas, P. *et al.*, Spatial variability of winter bacterioplankton community composition in the Gulf of Finland (the Baltic Sea). *Journal of Marine Systems*, 129, 127-134, 2014.

謝辞：本研究の一部は、豊橋技術科学大学 高専連携教育研究プロジェクト及び島根半島・宍道湖中海ジオパーク 学術奨励事業の助成を受け、実施いたしました.

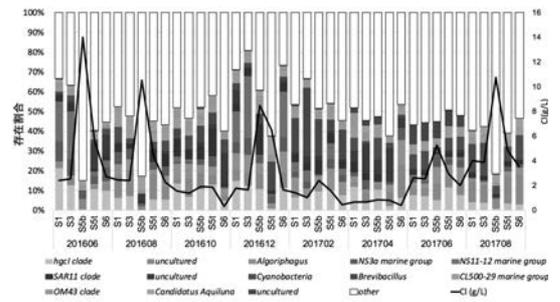


図2 全期間及び全箇所における

微生物群集構造解析及び塩化物濃度との比較

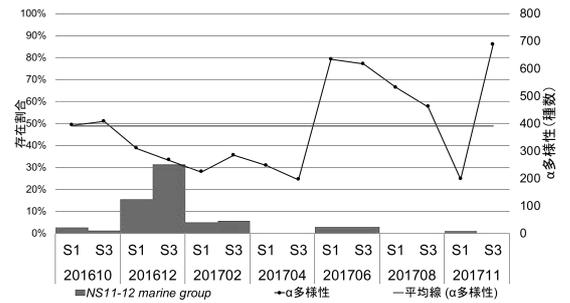


図3 NS11-12 marine group の存在率と

$\alpha$  多様性の関係

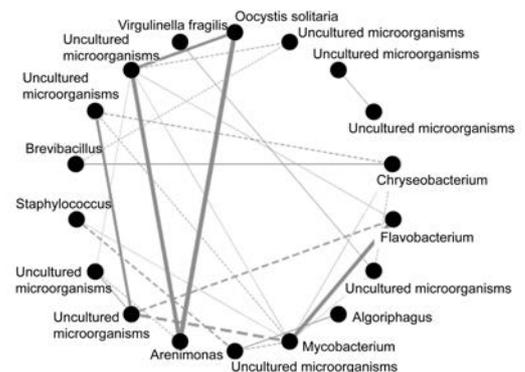


図4 宍道湖における微生物間相互作用ネットワーク