

分子生物学的手法を用いた多摩川河口域の細菌 群集モニタリング

2010年

今田 千秋
東京海洋大学 大学院 教授

共同研究者：小林 武志（東京海洋大学 大学院 准教授）
濱田 奈保子（東京海洋大学 大学院 教授）

分子生物学的手法を用いた多摩川河口域の細菌群集モニタリング

東京海洋大学 大学院 教授 今田千秋

1-1.目的

平成 19 年 3 月より東京湾奥部の多摩川河口域において、滑走路の新設を主目的とする羽田空港再拡張工事が進められている。しかしながら、この工事に伴う現場海洋生物の生態系に及ぼす影響はほとんど調査されていないのが現状である。この工事の影響で陸土壤に含まれる有機物等がこの海域に流入することにより現場微生物の生態系に変化が生じ、赤潮などの藻類の異常発生により、湾奥部に「富栄養化」と呼ばれる現象を引き起すことも十分考えられる。富栄養化は生態系のバランスを乱し、生物の多様性を減少させてしまうことにより、漁獲量の減少や悪臭の発生といった被害を及ぼすことにつながるものである。このようなことから、同河口域において現場微生物の継続的なモニタリングを行うことは、拡張工事の影響をより詳細に評価するために極めて重要であると考えられる。

近年、現場微生物の群集構造を解析するのに、培養を介さない分子生物学的手法として 16S または 18S rRNA 遺伝子等を用いた FISH 法 (Giovannoni *et al.*, 1988) が開発された。また、蛍光ラベルしたプライマーを用いて rDNA を増幅し、制限酵素処理を行い、処理部位の差異を DNA シーケンサーで検出し評価を行う T-RFLP 法 (Liu *et al.*, 1997) や、本研究でも採用した DGGE 法による海洋環境モニタリングも行われている (田中ら, 2008)。

このようなことから本章では、羽田空港滑走路拡張工事による現場生態系の微生物調査を行うために、多摩川河口域から東京湾奥部にかけていくつかの観測定点を設け、現場表面水および堆積物を定期的に採集し、表面水の環境データを測定するとともに DGGE 法を用いた現場微生物の群集構造解析を行うことを目的とした。また、海域の陸土壌の流出による影響を調べるために土壌中の微生物から放線菌を選択し、有機物等の汚濁を判定するために有機物の最終分解者である「硫酸還元細菌」に着目し、この微生物の東京湾内における群集構造の多様性と季節変化について調査を行った。

1-2 試料および方法

1-2-1 東京湾奥部および多摩川河口域における堆積物試料の採集

本学所属の研究練習船「ひよどり」(Fig.1)により、Fig.2 に示すように多摩川河口域から東京湾奥部にかけてほぼ等間隔(羽田空港沖～六郷土手付近)に 5 点(St.6~10)、また東京湾奥部において 5 点(St.1~5)の観測定点を設け、表面水および堆積物を採集した。表面水は滅菌済のポリエチレン製ビンを用い、堆積物はエクマンバージ式採泥器で採集を行った。なお、これらの試料は 2008 年には 3 回(5 月 28 日、8 月 27 日、11 月 18-19 日)、2009 年には 4 回(1 月 13 日、5 月 19-20 日、8 月 18-19 日、11 月 24-26 日)、St.6~10 では 2010 年 1 月においても採集を行った。試水の pH や溶存酸素などの環境データは、マルチプローブシステム YSI 556MPS(YSI/Nanotech Inc., Japan)を用いて行い、測定結果を Table 1a および Table 1b に示した。また堆積物は採集後、放線菌の群集構造解析を行うために、分析するまで -80℃ にて保

存した。

1-2-2 堆積物試料からの環境 DNA の抽出

各堆積物試料からの環境 DNA の抽出は前述の土壌 DNA 抽出キットを用いて行った。

1-2-3 環境 DNA の放線菌に特異的なプライマーによる PCR 増幅

得られた環境 DNA 試料の GC クランプ付加のユニバーサルプライマーおよび放線菌に特異的なプライマーにより、Nested PCR を行い、DGGE に供した。

1-2-4 環境 DNA の硫酸還元細菌に特異的なプライマーによる PCR 増幅

得られた環境 DNA 試料を GC クランプ付加の硫酸還元細菌の機能性遺伝子 *dsrAB* に特異的なプライマーによる PCR 増幅を Nested PCR 法で行った。本研究に用いた硫酸還元細菌に特異的なプライマー群を Table 2 に示した。

Nested PCR 法における Primary PCR では、*dsrAB* 遺伝子を対象に上流側に DSR1Fmix および下流側に DSR4Rmix プライマーを用いて増幅を行い、GoTaq® Green Master Mix(Promega Co., WI, USA)、プライマーを終濃度 $0.1 \mu\text{M}$ 、テンプレート DNA を加えたものを PCR 反応液とした。PCR 増幅反応には、Dice mini TP100(Takara Bio Inc., Japan)を使用し、 94°C で 2min 後、(94°C で 40sec、 48°C で 40sec、 72°C で 90sec) $\times 35$ cycle 行い、最後に 72°C で 10min の追加伸長反応を行

った後、PCR増幅の確認を行った。この反応により得られたPCR産物を利用したSecondary PCRでは、*dsrB*遺伝子を対象に上流側にGC-clampを付加したGC-DSR2060FおよびDSR4Rプライマーを用いた。PCR増幅反応は94℃で2min後、(94℃で40sec、55℃で40sec、72℃で1min)×18cycle行い、最後に72℃で30minの追加伸長反応を行った後、DGGEに供した。

1-2-5 DGGEによる放線菌および硫酸還元細菌の群集構造解析

放線菌の群集構造解析のDGGEに用いたゲルは8%アクリルアミド溶液中に10% Ammonium Peroxodisulfate(APS)、*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine(TEMED)をそれぞれ終濃度0.6%および0.06%となるように加え、ゲルを重合させた。これに変性剤として7M尿素と40%ホルムアミドを加えたものを80%、加えていないものを0%としてGradient作製装置を用いて、30-65%の濃度勾配ゲルを作製した。作製したゲルのDNAバンドパターンは2-2-4に準じて確認した。その後、検出された太い明瞭なDGGEバンドをゲルから切り出してマイクロチューブに入れた後、-20℃にて保存した。

また、得られたDGGEの電気泳動像から放線菌の群集構造の相違を明確にすると同時に現場放線菌と硫酸還元細菌全体の群集構造の変化を捉えるために、Lane Multi Screener 3.0(ATTO, Tokyo)によりDGGE Marker(Nippon Gene Co., Ltd.)をもとにDGGEの電気泳動像を合成し、SPSS 13.0(SPSS Japan Inc., IBM Company)によるクラスター解析および多次元尺度解析(MDS)をそれぞれ行った。

1-2-6 現場放線菌の系統解析

1-2-5 において切り出した DGGE バンドはよく洗浄した後、PCR 増幅を行い、DGGE によりバンドの単一性を確認した。その後、PCR 産物を精製した後、Operon 社(<https://www.operon.jp>)の DNA シーケンスサービス(1-29-10, Maenochō, Itabashiku, Tokyo)に外注し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定を行い、得られた塩基配列から相同性検索を NCBI Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)で、また系統解析を MEGA4(<http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/MEGA>)で行った。

1-3 結果および考察

DGGE による放線菌の群集構造解析

Fig.3 および 4 に多摩川河口域および東京湾堆積物中の放線菌の群集構造の DGGE 泳動像を示した(図の DNA バンド上の数字は切り出したバンドの番号に対応)。なお、Fig.4a および 4b 上の点線は異なるゲルであるため、その境界線として示した。この DGGE 泳動像を用いて行ったクラスター解析による多摩川河口域の放線菌の水平および季節変化を調べた結果を Fig.5 に、また MDS 解析による水平および季節変化を調べた結果を Fig.6 に示した。これらの結果からわかるように、多摩川河口域においては特定の季節でクラスターが形成されなかったことから、河口域における放線菌の群集構造の変化は生活排水や陸土

壤等による影響と考えられた。また、St.6、7 および St.8~10 が異なるクラスターを形成したことから、St.6、7 および St.8~10 は放線菌の群集構造がそれぞれ異なることがわかった。クラスター解析では St.6、MDS 解析では St.7 において採集時期による群集構造の変化が最も大きかったことから、海水の流入や羽田空港滑走路拡張工事の影響が考えられた。

そこで、東京湾に流入する他の河川である荒川河口域の St.1 と比較を行った。クラスター解析による多摩川河口域と荒川河口域の水平および季節変化を調べた結果を Fig.7 に、また MDS 解析による水平および季節変化を調べた結果を Fig.8 に示した。これらより明らかなように、St.6 および 7 が St.1 と比較して放線菌の群集構造の変化が特に大きいということにはなかった。このことから、羽田空港滑走路拡張工事は、St.6 および 7 の放線菌の群集構造にあまり影響しないことが示唆された。

また、東京湾における放線菌の群集構造を調査するために行ったクラスター解析による東京湾の水平および季節変化を調べた結果を Fig.9 に、また MDS 解析による水平および季節変化を調べた結果を Fig.10 にそれぞれ示した。これらの結果から明らかなように、東京湾においても特定の季節における放線菌のクラスター形成は確認できなかった。このことから、東京湾の堆積物中では放線菌の季節変化が顕著にみられないことが推定された。また、クラスター解析により St.1、St.2~4 および St.5 でそれぞれ独立した大きなクラスターの形成が確認されたことから、それぞれの海域の放線菌の群集構造が異なることが示唆された。最も群集構造の変化が大きかったのは、荒川河口域で

ある St.1 であった。このことより、河川の河口域は海水中よりも放線菌の群集構造の変化が大きいことがわかった。これに対して群集構造の変化が最も小さかったのは、St.5 であった。これは、St.5 が最も東京湾口に近いことから多摩川や荒川のような大きな河川からの影響を受けにくいためではないかと考えられた。

放線菌における系統解析

放線菌の群集構造解析に用いた DGGE のゲルから得られた DNA バンドをゲルから切り出し PCR 増幅した後、16S rRNA 遺伝子を指標とした分子系統解析を行った結果を Fig.11 に示した。この図からわかるように、切り出した DNA バンド合計 20 本のうち、9 本は *Actinobacteria* 門のクラスターに属さなかったため、放線菌以外の細菌群と考えられた。また、残りの 11 本は *Actinobacteria* 門に属する放線菌であり、Band1 は *Gordonia* 属、また Band3 は *Marmoricola* 属、Band7 は *Nocardioides* 属、Band18 は最も近縁な系統群は環境クロールンであったが、*Ilumatobacter fluminis* に相同性が高かった。その他のバンドは既知の細菌との相同性が低かったため、その詳細は不明であった。

Gordonia 属は一般土壌や重金属や油で汚染された土壌などから分離されている細菌である (Fo-Ting *et al.*, 2009)。この属に近縁であった Band1 は St.8~10 までのほとんどの試料から検出されたことから、これらの地点の優占種と考えられた。なお、St.1~7 に *Gordonia* 属がみられなかったのは、分離源が主に陸上であるため、塩分耐性能を保持していないためと考えられた。

Marmoricola 属は系統的に *Nocardioides* 属に近縁であり、大理石 (Urzi *et al.*, 2000)、海底堆積物 (Lee *et al.*, 2007) および陸土壤 (Dastager *et al.*, 2008) から分離されている。一方、*Nocardioides* 属は陸土壤、河川、湖水、海水中など様々な場所から分離されているが、主に陸上からの分離報告例が多い細菌である (Tóth *et al.*, 2008)。また、*Marmoricola* 属と陸土壤からの分離報告数が多い *Nocardioides* 属に近縁であった Band3 と Band7 は St.10 の 2009 年 1 月の試料からのみ検出され、この試料のバンドパターンは異なる採集時期の St.10 のパターンと大きく異なっていることから陸土壤の影響が考えられた。しかし、同採集時期の St.8 および 9 はそれぞれの異なる採集時期のバンドパターンとの変化があまりみられず、試料採集の 4 日前まで降雨が確認できなかったことから、降雨による影響はないものと考えられた。多摩川河口域の神奈川県川崎市の幸区および川崎区において堤防工事等が頻繁に行われていることから、これらの工事の影響ではないかと推定された。

Ilumatobacter fluminis は *Acidimicrobium* 亜綱に属し、2009 年に分離された新属新種の細菌である。この細菌は河川河口域で分離され、塩分要求性を示すことが報告されている (Matsumoto *et al.* 2009)。この細菌に近縁であった Band18 は St.1 から検出され、塩分濃度が約 3% である St.1~5 においても顕著にみられたことから、*I. fluminis* と同様に塩分要求性の海洋細菌であると推定された。

DGGE による硫酸還元細菌の群集構造解析

Fig.12 および 13 に多摩川河口域および東京湾堆積物中の硫酸還元

細菌の群集構造の DGGE 泳動像を示した。なお、Fig.13a および 13b 上の点線は異なるゲルであるため、その境界線として示した。この DGGE 泳動像を用いて行ったクラスター解析による多摩川河口域の硫酸還元細菌の水平および季節変化の結果を Fig.14 に、また MDS 解析による水平および季節変化の結果を Fig.15 に示した。これらの結果からわかるように、多摩川河口域においては放線菌と同様に特定の季節でクラスターの形成はみられなかった。しかし、2008 年 8 月の St.6 および 2009 年 8 月の St.7~9 は同地点の異なる時期の試料と比較して群集構造が最も変化していた。これは、夏は水温が高いため、硫酸還元細菌による有機物の分解が進行した影響と考えられた。そして、MDS 解析では、大きく St.8~10、St.6 および 7 の 2 つの異なるクラスターの形成が確認できた。これは、St.8~10 と比較して St.6 および 7 は海水の影響を強く受けるためと考えられた。また、多摩川河口域である St.6 および 7 の羽田空港滑走路拡張工事の影響を調べるために荒川河口域の St.1 と比較を行った。クラスター解析による多摩川河口域と荒川河口域の水平および季節変化の結果を Fig.16 に、また MDS 解析による水平および季節変化の結果を Fig.17 にそれぞれ示した。これらより明らかのように、St.6 および 7 は拡張工事を行っていない St.1 と比較した場合、硫酸還元細菌の群集構造の変化が大きかった。このことから、羽田空港滑走路拡張工事による有機物等の流入による影響が大きいと考えられた。また、東京湾における硫酸還元細菌の群集構造を調査するために行ったクラスター解析による東京湾の水平および季節変化を調べた結果を Fig.18 に、また MDS 解析による水平および季節変化を調べた結果を Fig.19 に

それぞれ示した。これらより明らかなように、硫酸還元細菌についても東京湾では特定の季節におけるクラスター形成が確認できなかったため、東京湾の堆積物中では硫酸還元細菌の季節変化が顕著にみられないことが考えられた。また、St.1、St.2~4 および St.5 とでそれぞれ独立した大きなクラスターの形成が確認された。このことから、それぞれの海域において硫酸還元細菌の群集構造が異なることが示唆された。一方、放線菌では河川の河口域で群集構造に大きな変化がみられたが、硫酸還元細菌の群集構造の変化が最も大きかったのは、東京湾口に最も近い St.5 であった。これは、St.1~4 では大きな河川から流入してくる栄養塩、主に硝酸塩等の影響により、硝酸還元が優先され、硫酸還元細菌による硫酸還元が抑制されているのではないかと考えられた。これに対し、St.5 の群集構造の変化が大きかったのは多摩川や荒川のような大きな河川からの影響が少ないことから、硫酸還元細菌による硫酸還元活性が最も高いためと推定された。

以上から DGGE による放線菌および硫酸還元細菌の群集構造解析によって海水、河川水および陸土壌の影響を明らかにすることができたことから、DGGE は環境のモニタリング調査に大変有効であることが示された。

1.4.参考文献

・ Dastager SG., Lee JC., Ju YJ., Park DJ., Kim CJ., *Marmoricola*

bigeumensis sp. nov., a member of the family Nocardioidaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58(5):1060-3(2008).

• Fo-Ting S., Jyun-Liang L., Chieh-Chen H., Ying-Ning H., A.B.Arun, Li-Sen Y., Chiu-Chung Y., Molecular detection and phylogenetic analysis of the catechol 1,2-dioxygenase gene from *Gordonia* spp. Syst. Appl. Microbiol. 32(5):291-300(2009).

• Geets J., Borrernans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., van der Lelie D., Vanbroekhoven K., DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. J. Microbiol., 66:194-205(2006).

• Giovannoni SJ., DeLong EF., Olsen GJ., Pace NR., Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J. Bacteriol., 170(2):720-726(1988).

• Lee SD., *Marmoricola aequoreus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57(7):1391-5(2007).

• Liu X., Alexiou M., Martin-Orozco N., Chung Y., Nurieva RI., Ma L., Tian Q., Kollias G., Lu S., Graf D., Dong C., Cutting edge: A

critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction. *J. Immunol.*, 182(8):4516-4520(1997).

• Loy, A., Kusel, K., Lehner, A., Drake, H.L., Wagner, M.,
Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:6998–7009(2004).

Matsumoto A., Kasai H., Matsuo Y., Omura S., Shizuri Y., Takahashi Y., *Ilumatobacter fluminis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 55(3):201-5(2009).

田中大祐、田中俊輔、中村省吾、富山湾沿岸域海水中的バクテリア群集構造解析. 月刊海洋 号外 47:118-126(2008).

• Tóth EM., Kéki Z., Homonnay ZG., Borsodi AK., Márialigeti K., Schumann P., *Nocardioides daphniae* sp. nov., isolated from *Daphnia cucullata* (Crustacea: Cladocera). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(1):78-83(2008).

• Urzì C., Salamone P., Schumann P., Stackebrandt E., *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family

Nocardioidaceae isolated from a marble statue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50(2):529-36(2000).

• Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., Stahl, D.A.,
Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early
origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.*, 180:2975–2982(1998).



Fig.1 試料採集に用いた研究練習船「ひよどり 19t」の写真

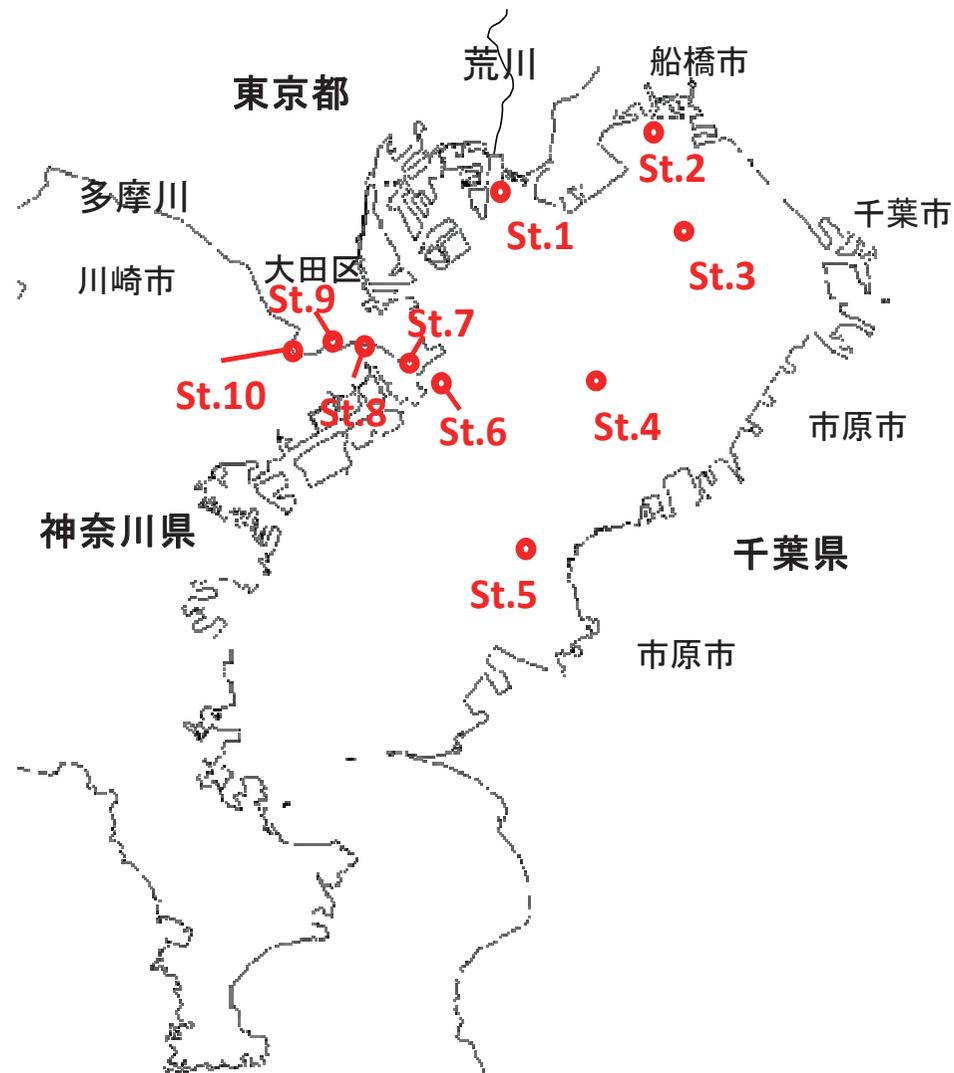


Fig.2 多摩川河口域および東京湾の堆積物の採集点

Table 1a 多摩川河口域および東京湾表面水の環境データ(2008年)

観測定点	採水日	緯度(N)	経度(E)	水深 (m)	水温 (°C)	溶存酸素濃度 (mg/L)	pH	塩分 (‰)	透明度 (m)
St.1	2008/5/28	35° 376'	139° 509'	2.5	21.6	9.25	8.68	0.57	1.5
St.2	2008/5/28	35° 392'	139° 578'	7.6	22.1	11.98	9.01	5.37	1.8
St.3	2008/5/28	35° 361'	139° 591'	11.0	21.3	13.36	9.00	5.46	1.9
St.4	2008/5/28	35° 313'	139° 551'	21.0	22.0	15.60	9.26	8.93	0.9
St.5	2008/5/28	35° 256'	139° 521'	22.0	21.0	13.50	9.00	25.52	2.0
St.6	2008/5/28	35° 307'	139° 485'	22.0	21.2	13.96	9.03	14.97	1.0
St.7	2008/5/28	35° 314'	139° 471'	1.8	23.2	9.28	8.41	25.70	0.3
St.8	2008/5/28	35° 322'	139° 451'	3.0	23.1	7.61	8.08	28.84	ND*
St.9	2008/5/28	35° 322'	139° 434'	0.3	24.1	7.38	7.82	25.80	ND*
St.10	2008/5/28	35° 321'	139° 415'	0.3	24.3	7.92	7.56	29.30	ND*
St.1	2008/8/27	35° 376'	139° 509'	2.0	23.9	4.38	8.23	0.09	0.8
St.2	2008/8/27	35° 392'	139° 578'	6.7	24.4	0.89	8.84	0.16	0.9
St.3	2008/8/27	35° 361'	139° 591'	10.0	23.9	3.46	9.08	1.19	2.8
St.4	2008/8/27	35° 313'	139° 551'	21.0	24.6	7.14	9.65	8.71	3.5
St.5	2008/8/27	35° 256'	139° 521'	22.0	24.2	7.32	9.66	18.16	5.4
St.6	2008/8/27	35° 307'	139° 485'	21.0	24.7	6.64	7.60	8.16	2.0
St.7	2008/8/27	35° 314'	139° 471'	3.0	24.5	6.51	7.24	29.88	1.7
St.8	2008/8/27	35° 322'	139° 451'	3.0	25.0	6.71	7.41	31.52	ND*
St.9	2008/8/27	35° 322'	139° 434'	0.3	23.5	6.70	7.69	27.73	ND*
St.10	2008/8/27	35° 321'	139° 415'	0.3	22.1	7.93	7.65	29.72	ND*
St.1	2008/11/18	35° 376'	139° 509'	2.8	18.7	9.27	7.89	2.51	1.1
St.2	2008/11/18	35° 392'	139° 578'	7.6	17.8	8.51	8.09	20.72	2.6
St.3	2008/11/18	35° 361'	139° 591'	11.5	17.9	8.33	8.06	21.78	2.8
St.4	2008/11/18	35° 313'	139° 551'	22.0	18.2	8.92	8.18	29.72	3.6
St.5	2008/11/18	35° 256'	139° 521'	21.5	18.4	8.59	8.17	29.73	5.0
St.6	2008/11/18	35° 307'	139° 485'	22.0	18.4	11.03	7.96	13.89	2.5
St.7	2008/11/18	35° 314'	139° 471'	3.0	18.7	7.17	7.91	32.22	2.3
St.8	2008/11/18	35° 322'	139° 451'	3.0	16.6	7.55	7.80	32.99	ND*
St.9	2008/11/18	35° 322'	139° 434'	0.3	17.6	6.77	7.43	29.65	ND*
St.10	2008/11/18	35° 321'	139° 415'	0.3	16.2	8.90	7.45	32.05	ND*

*, 未計測

Table 1b 多摩川河口域および東京湾表面水の環境データ(2009年)

観測地点	採水日	緯度(N)	経度(E)	水深 (m)	水温 (°C)	溶存酸素 (mg/L)	pH	塩分 (‰)	透明度 (m)
St.1	2009/1/13	35° 376'	139° 509'	2.5	11.7	7.82	8.12	32.00	2.0
St.2	2009/1/13	35° 392'	139° 578'	7.8	9.0	9.59	8.10	30.99	3.0
St.3	2009/1/13	35° 361'	139° 591'	11.0	10.1	9.41	8.13	31.79	4.5
St.4	2009/1/13	35° 313'	139° 551'	21.0	10.9	9.19	8.14	32.15	5.5
St.5	2009/1/13	35° 256'	139° 521'	21.5	11.5	8.82	8.14	32.51	4.2
St.6	2009/1/13	35° 307'	139° 485'	21.9	12.0	8.76	8.09	27.58	4.3
St.7	2009/1/13	35° 314'	139° 471'	3.0	11.6	8.72	7.89	4.40	2.0
St.8	2009/1/13	35° 322'	139° 451'	3.0	12.6	12.65	7.71	28.17	ND*
St.9	2009/1/13	35° 322'	139° 434'	0.3	11.5	9.78	7.33	30.47	ND*
St.10	2009/1/13	35° 321'	139° 415'	0.3	10.7	10.55	6.98	21.71	ND*
St.1	2009/5/19	35° 376'	139° 509'	2.0	20.0	7.08	7.51	27.58	1.5
St.2	2009/5/19	35° 392'	139° 578'	7.3	19.6	6.51	8.12	19.88	2.0
St.3	2009/5/20	35° 361'	139° 591'	11.0	19.2	8.38	8.47	10.78	3.6
St.4	2009/5/20	35° 313'	139° 551'	21.0	20.4	8.97	8.49	4.40	1.8
St.5	2009/5/20	35° 256'	139° 521'	22.0	19.5	9.04	8.51	30.47	2.5
St.6	2009/5/19	35° 307'	139° 485'	22.0	19.7	8.31	8.42	27.44	2.3
St.7	2009/5/19	35° 314'	139° 471'	2.0	19.8	10.54	8.39	2.26	1.5
St.8	2009/5/19	35° 322'	139° 451'	3.0	24.1	7.61	7.71	26.37	ND*
St.9	2009/5/19	35° 322'	139° 434'	0.3	23.8	6.38	7.71	27.05	ND*
St.10	2009/5/19	35° 321'	139° 415'	0.3	23.7	8.82	7.51	19.05	ND*
St.1	2009/8/18	35° 376'	139° 509'	1.5	27.0	5.22	7.59	27.44	1.1
St.2	2009/8/18	35° 392'	139° 578'	6.3	26.3	7.62	8.22	21.71	1.5
St.3	2009/8/19	35° 361'	139° 591'	10.0	26.7	11.23	8.65	11.73	1.2
St.4	2009/8/19	35° 313'	139° 551'	20.0	27.2	11.42	9.66	2.26	1.5
St.5	2009/8/19	35° 256'	139° 521'	21.0	26.5	11.34	8.64	27.05	1.5
St.6	2009/8/18	35° 307'	139° 485'	22.0	27.8	13.63	8.98	14.78	0.9
St.7	2009/8/18	35° 314'	139° 471'	3.0	28.7	11.89	8.77	3.76	1.0
St.8	2009/8/18	35° 322'	139° 451'	3.0	28.6	6.54	7.85	30.25	ND*
St.9	2009/8/18	35° 322'	139° 434'	0.3	28.9	6.58	7.52	31.67	ND*
St.10	2009/8/18	35° 321'	139° 415'	0.3	27.7	8.26	7.41	6.62	ND*
St.1	2009/11/24	35° 376'	139° 509'	2.5	14.5	8.17	7.90	14.78	1.3
St.2	2009/11/24	35° 392'	139° 578'	8.2	15.0	7.47	7.98	19.05	3.7
St.3	2009/11/26	35° 361'	139° 591'	11.0	15.4	7.88	8.09	12.63	5.2
St.4	2009/11/26	35° 313'	139° 551'	21.0	15.3	8.66	8.17	3.76	6.0
St.5	2009/11/26	35° 256'	139° 521'	21.5	16.7	7.58	8.12	31.67	5.0
St.6	2009/11/24	35° 307'	139° 485'	22.0	15.0	8.34	8.00	12.49	3.7
St.7	2009/11/24	35° 314'	139° 471'	3.4	14.8	8.75	7.80	0.84	2.5
St.8	2009/11/24	35° 322'	139° 451'	3.0	16.4	10.17	7.51	6.62	ND*
St.9	2009/11/24	35° 322'	139° 434'	0.3	16.6	11.45	7.38	2.64	ND*
St.10	2009/11/24	35° 321'	139° 415'	0.3	16.7	9.67	7.14	0.84	ND*
St.6	2010/1/19	35° 307'	139° 485'	24.0	11.5	13.48	7.94	28.96	2.0
St.7	2010/1/19	35° 314'	139° 471'	2.6	12.4	25.06	7.90	25.06	1.5
St.8	2010/1/20	35° 322'	139° 451'	3.0	9.1	9.68	9.57	13.42	ND*
St.9	2010/1/20	35° 322'	139° 434'	0.3	10.7	8.15	10.30	7.35	ND*
St.10	2010/1/20	35° 321'	139° 415'	0.3	11.1	10.92	10.68	2.65	ND*

*, 未計測

Table 2 本研究に用いた硫酸還元細菌に特異的なプライマー

プライマー名	塩基配列(5'-3')	Nested PCR amplification stage	参考文献
DSR1Fmix	DSR1F	Primary	Wagner <i>et al.</i> (1998)
	DSR1Fa		Loy <i>et al.</i> (2004)
	DSR1Fb		Loy <i>et al.</i> (2004)
DSR4Rmix	DSR4R	Primary	Wagner <i>et al.</i> (1998)
	DSR4Ra		Loy <i>et al.</i> (2004)
	DSR4Rb		Loy <i>et al.</i> (2004)
	DSR4Rc		Loy <i>et al.</i> (2004)
GC-DSR2060F	GC-clamp※-CAACATCGTYCAYACCCA	Secondary	Geets <i>et al.</i> (2006)
DSR4R	GTGTAGCAGTTACCGCA	Secondary	Wagner <i>et al.</i> (1998)

※, GC-clamp 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC-3'

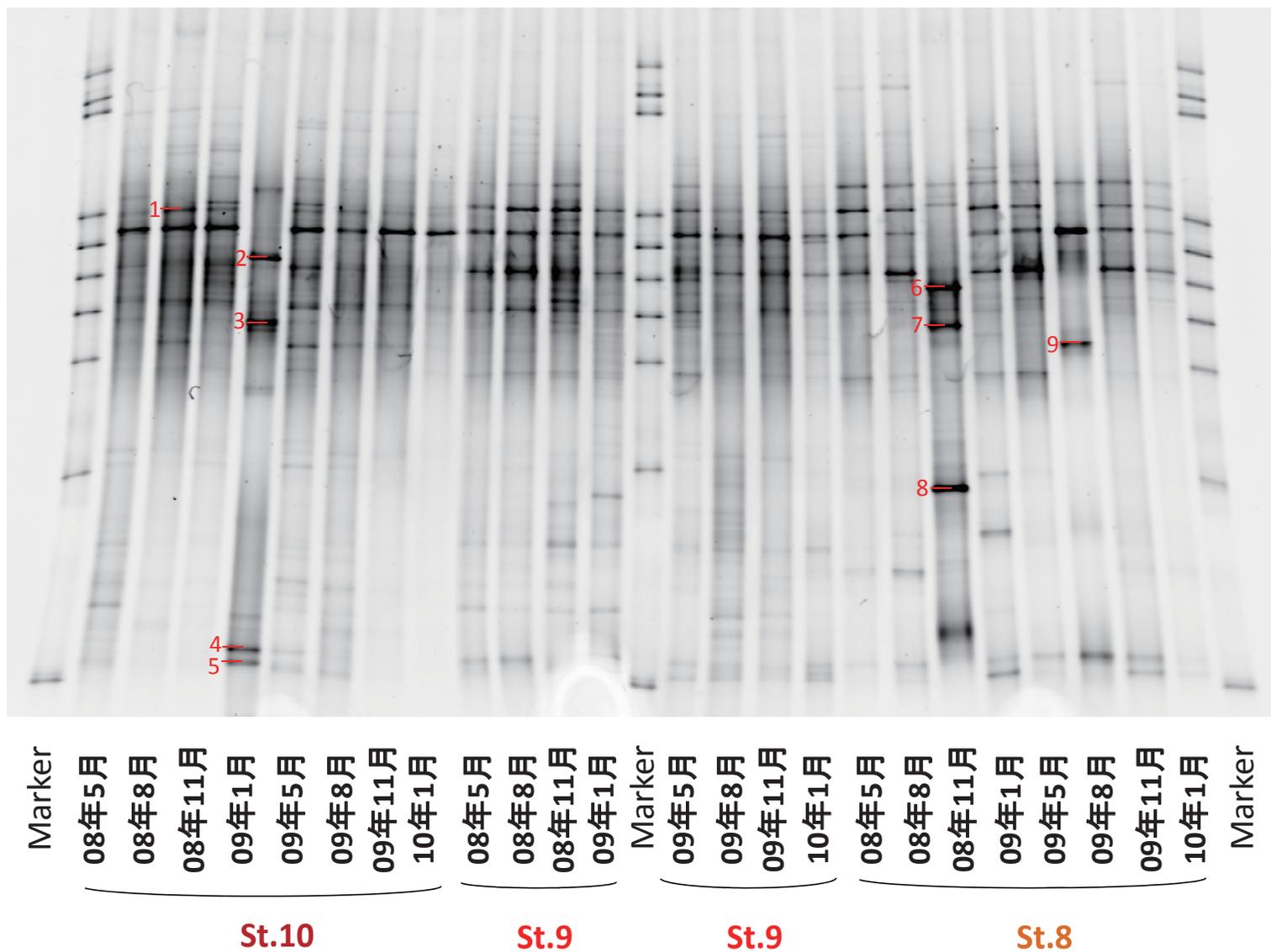


Fig.3a 多摩川河口域 St.10～8 の堆積物中の放線菌の DGGE ゲル電気泳動像

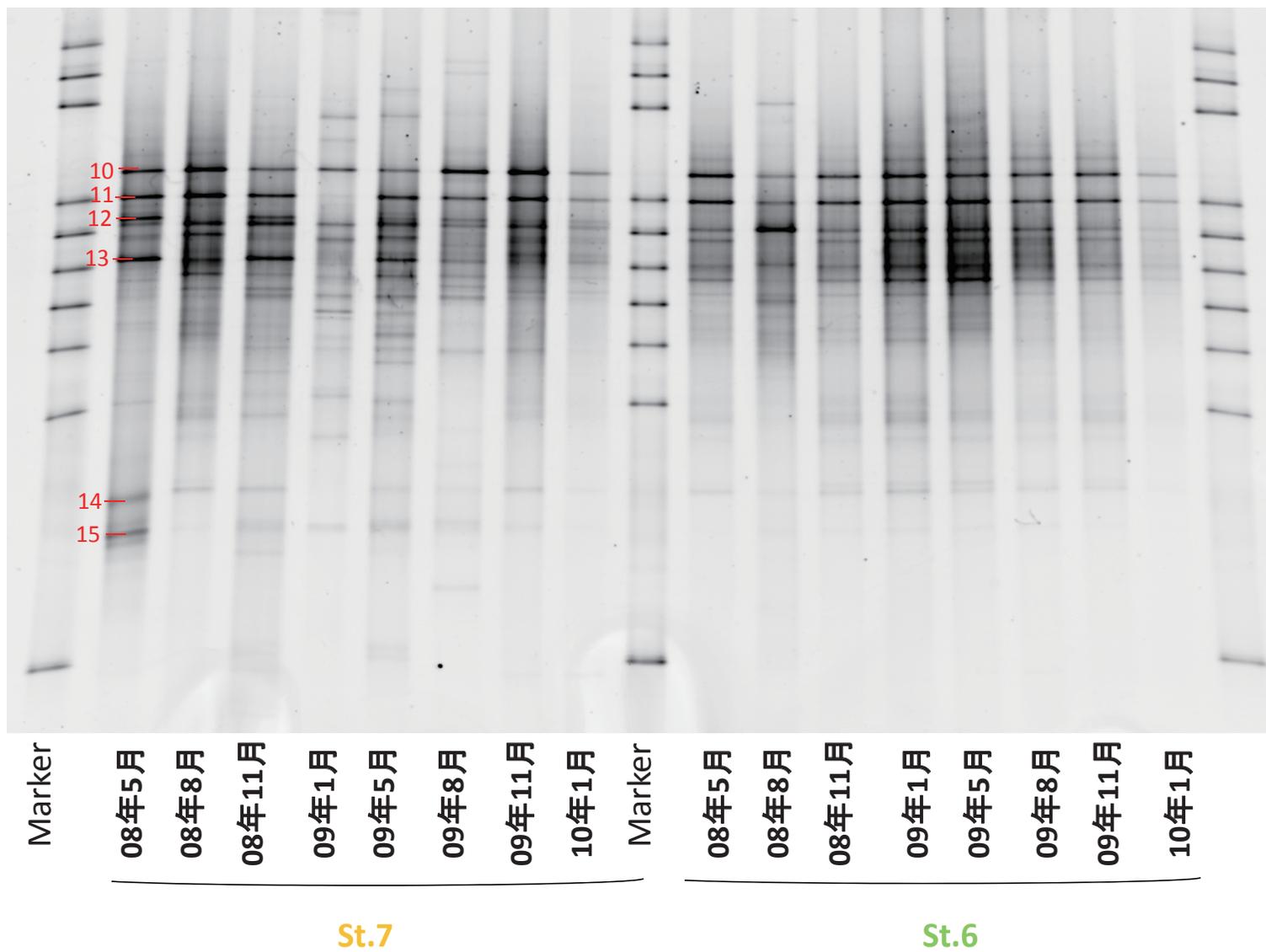


Fig.3b 多摩川河口域 St.7~6 の堆積物中の放線菌の DGGE ゲル電気泳動像

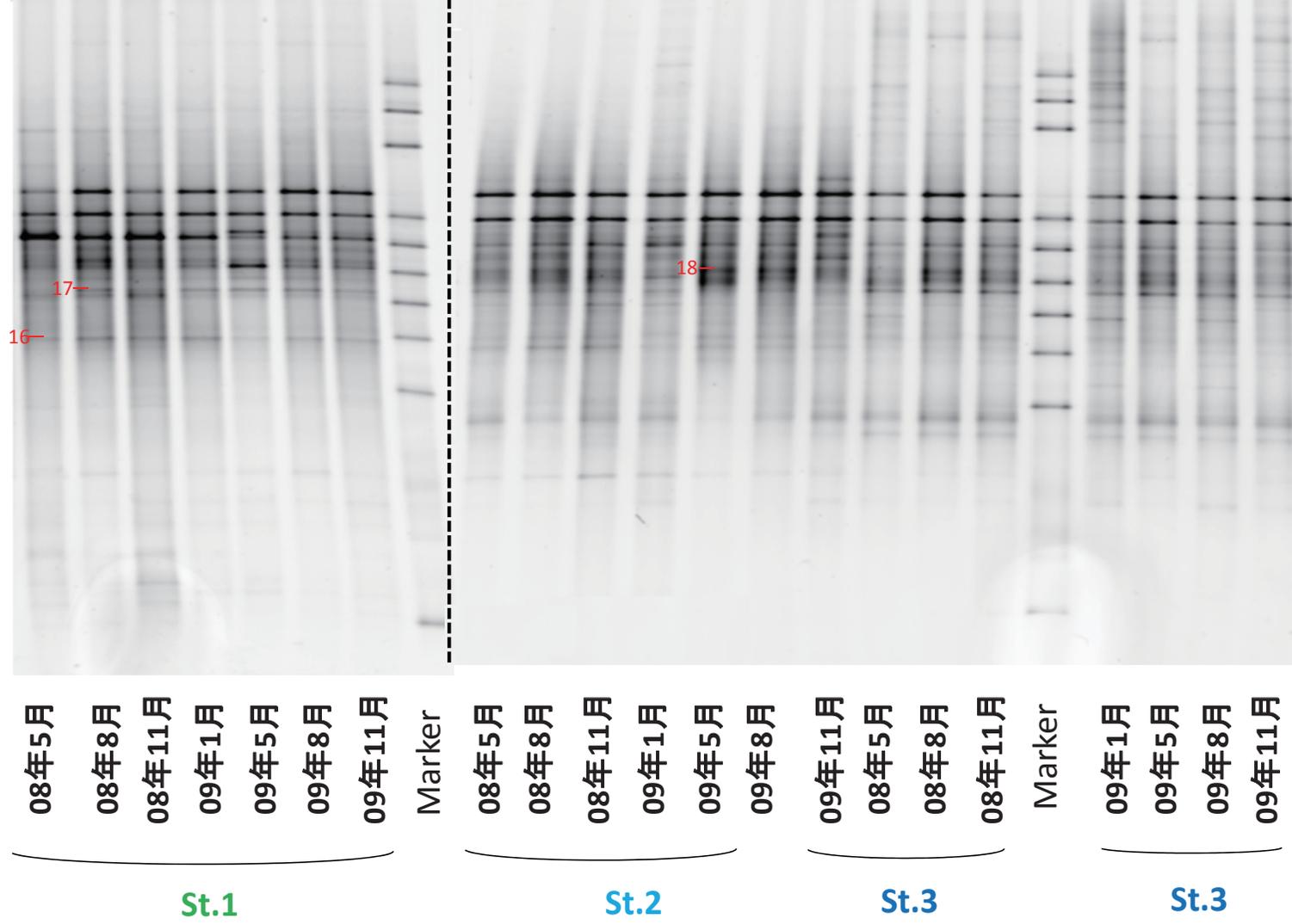


Fig.4a 東京湾 St.1～3 の堆積物中の放線菌の DGGE ゲル電気泳動像

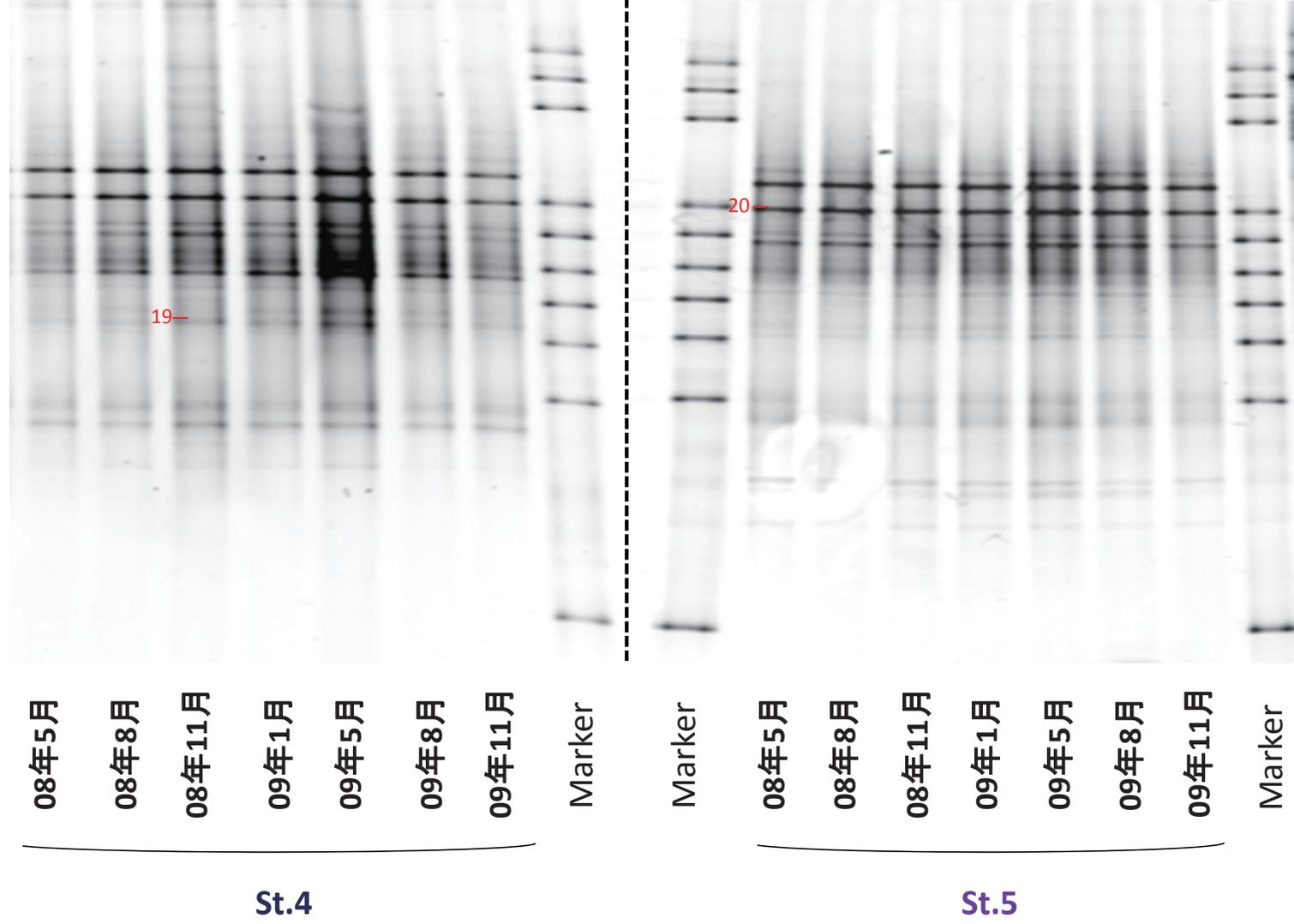


Fig.4b 東京湾 St.4~5 の堆積物中の放線菌の DGGE ゲル電気泳動像

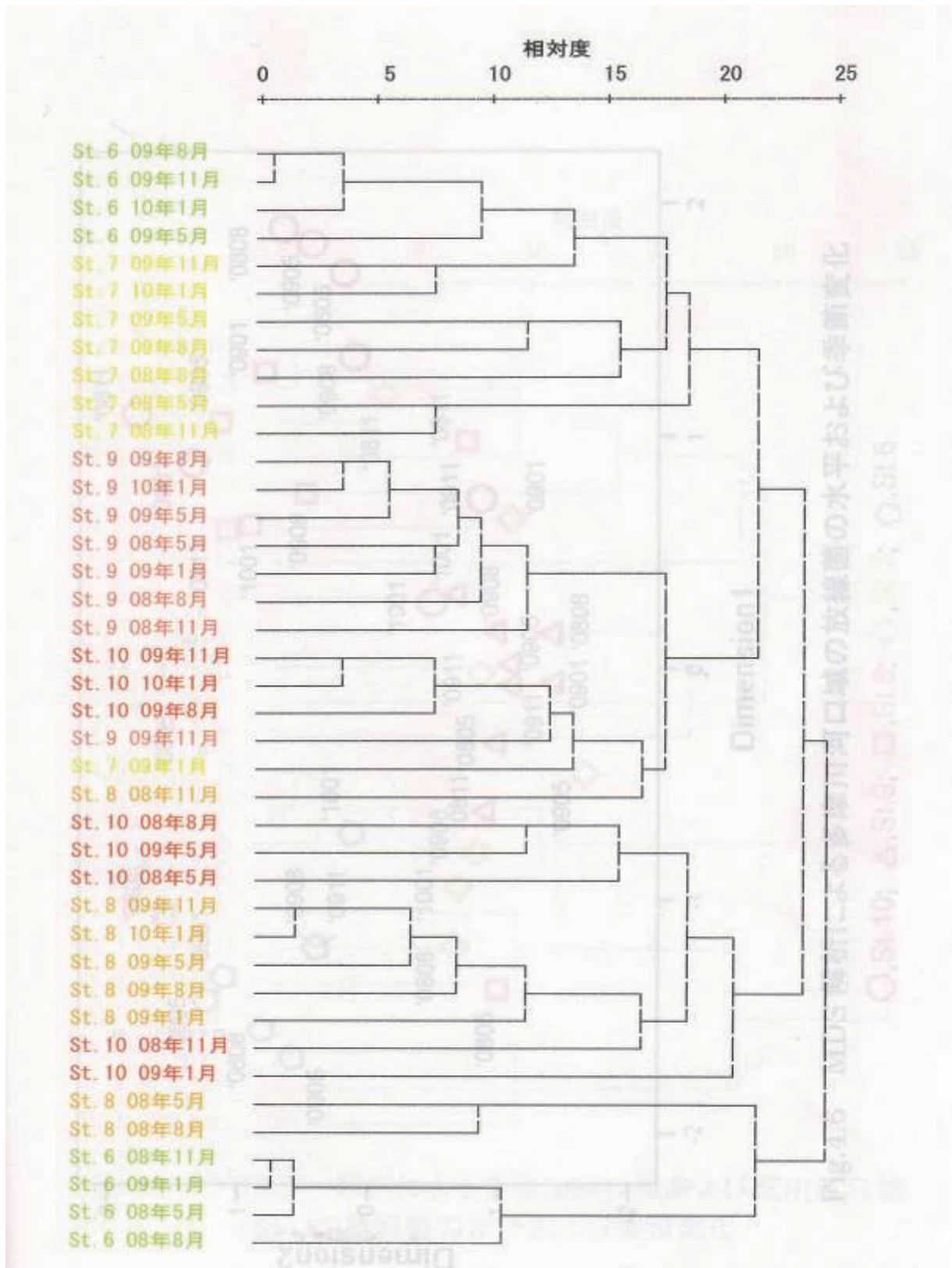


Fig.5 クラスター解析による多摩川河口域の放線菌の水平および季節変化

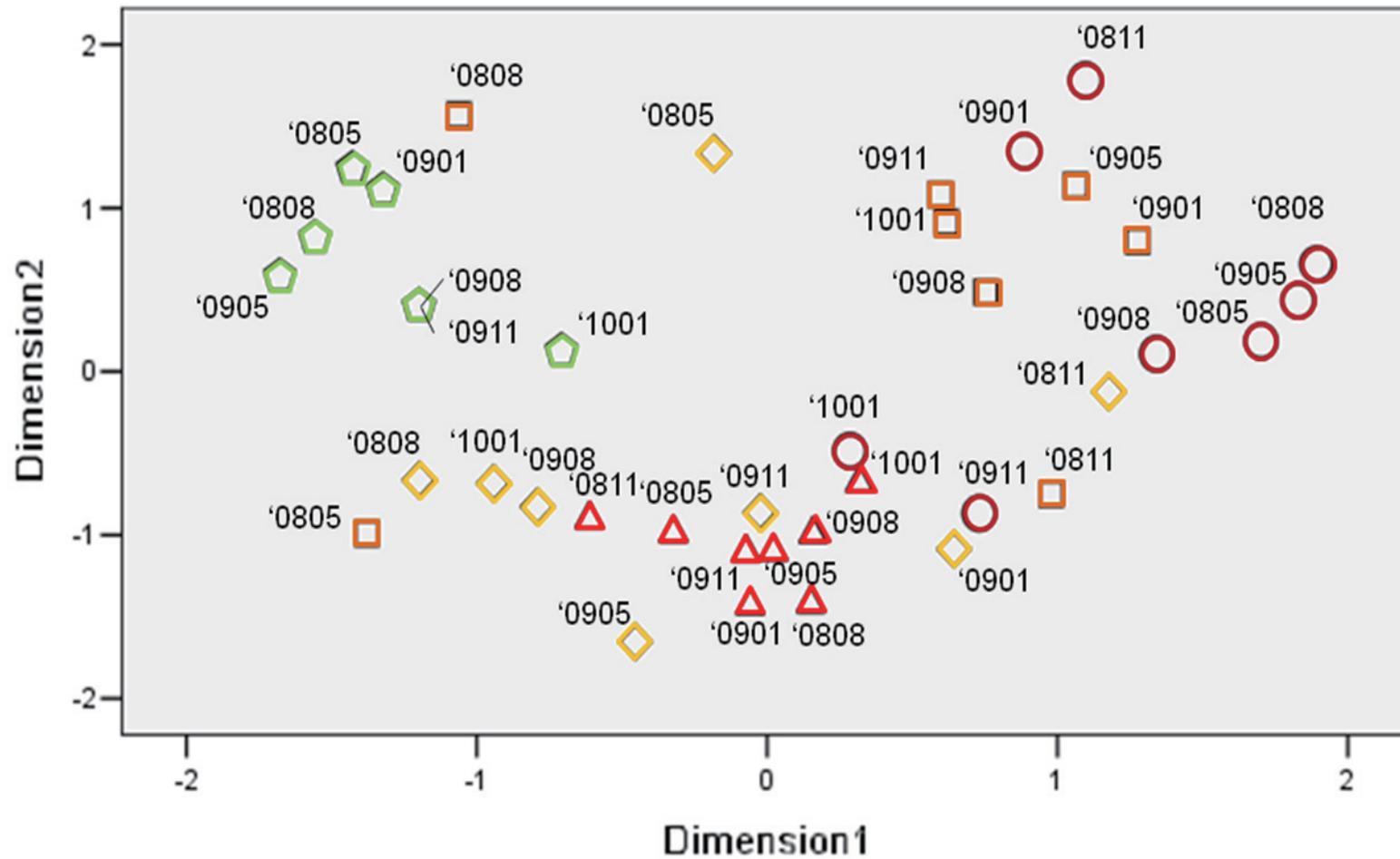


Fig.6 MDS 解析による多摩川河口域の放線菌の水平および季節変化

○, St.10; △, St.9; □, St.8; ◇, St.7; ⬠, St.6

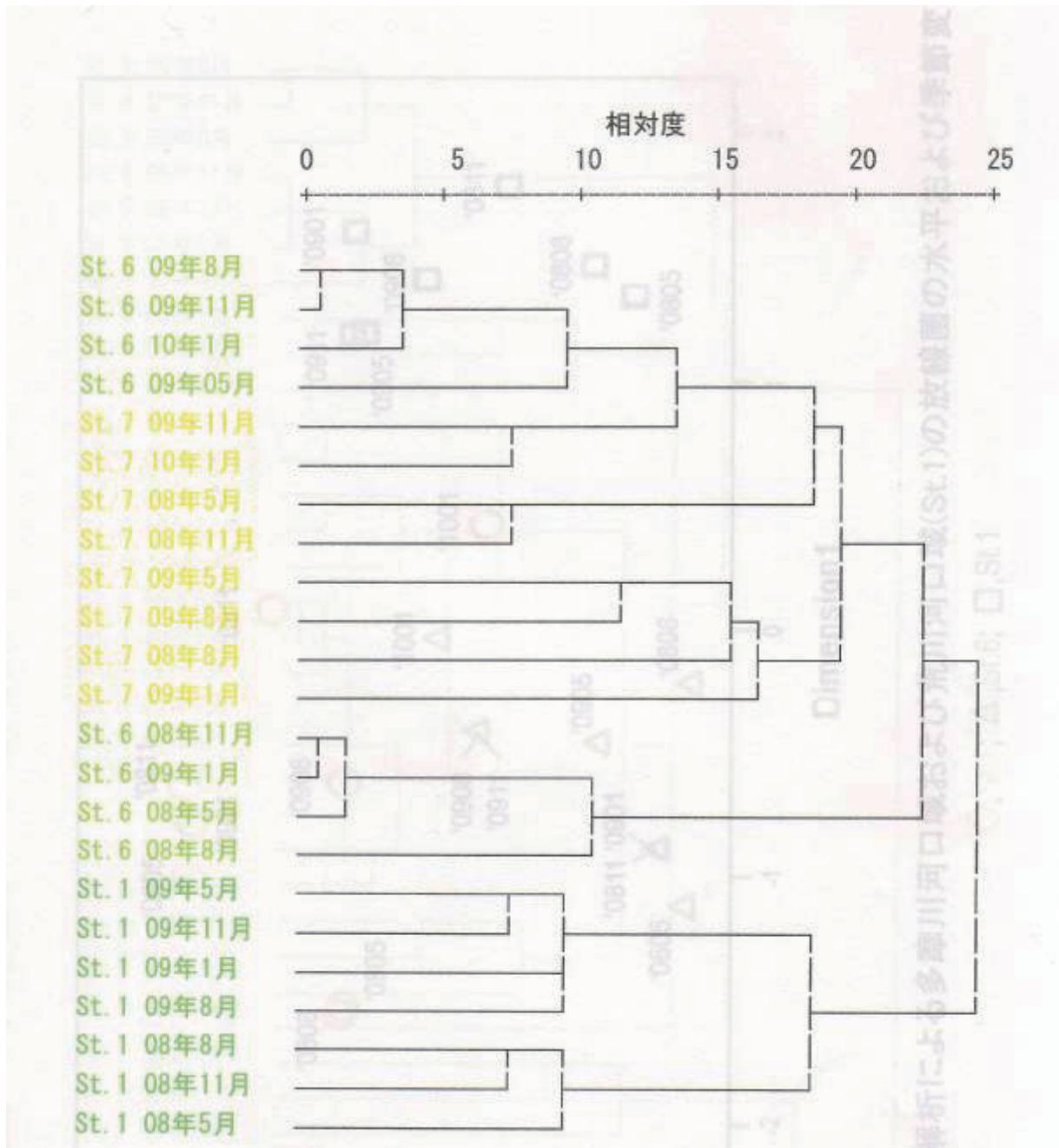


Fig.7 クラスター解析による多摩川河口域および荒川河口域(St.1)の放線菌の水平および季節変化

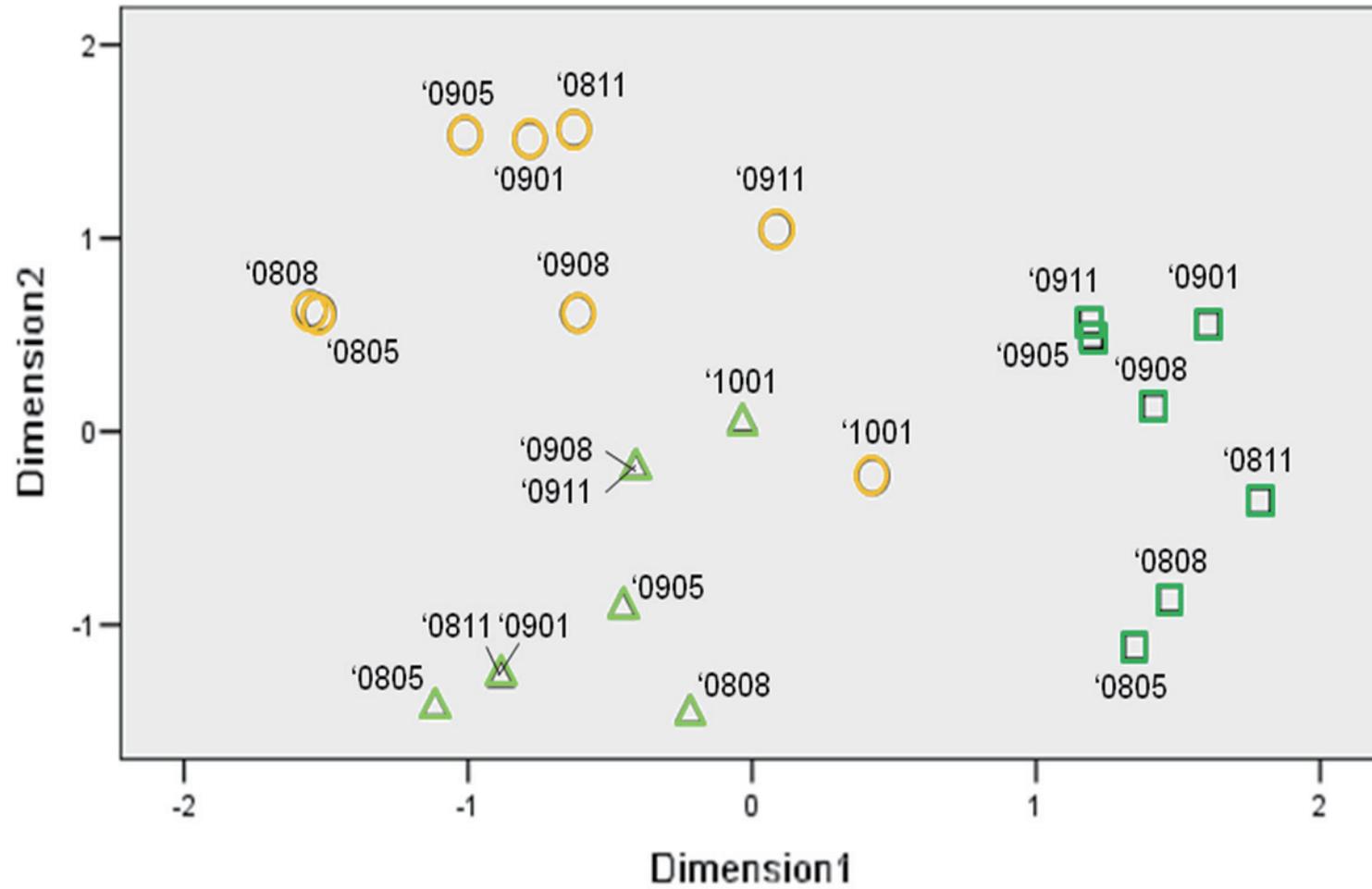


Fig.8 MDS 解析による多摩川河口域および荒川河口域(St.1)の放線菌の水平および季節変化

○, St.7; △, St.6; □, St.1

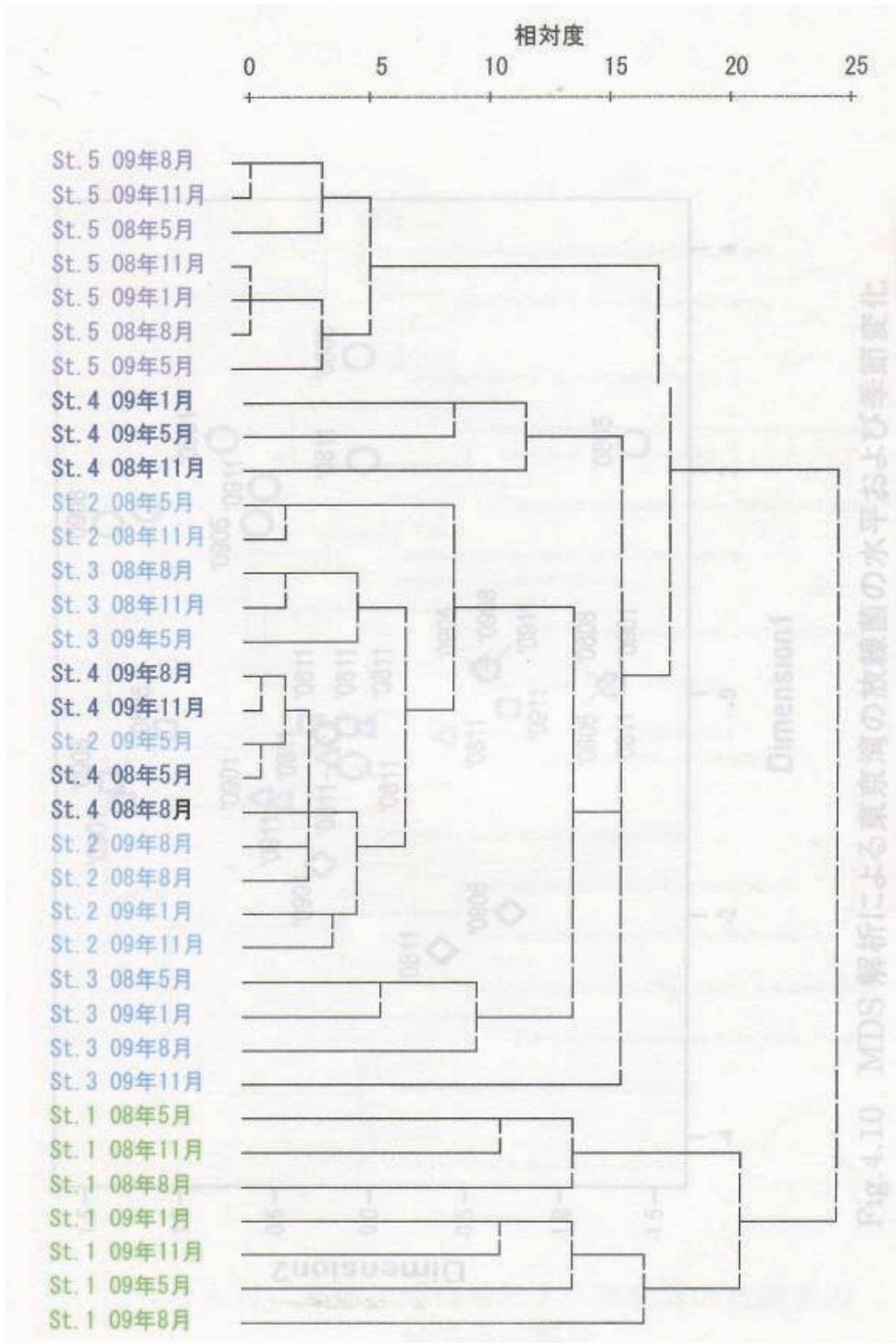


Fig.4.10 MDS 解析による東京湾の放線菌の水平および季節変化

Fig.9 クラスター解析による東京湾の放線菌の水平および季節変化

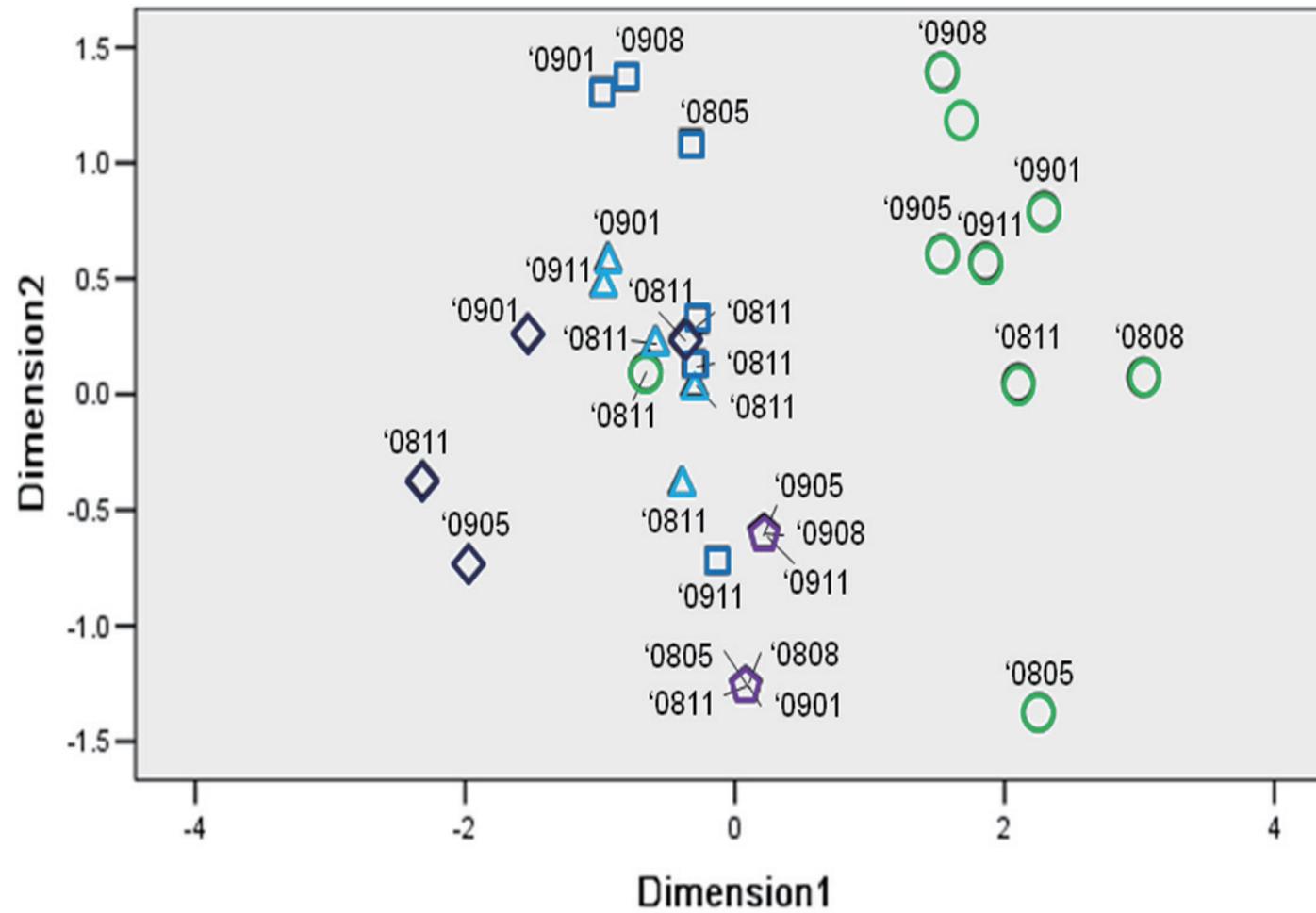


Fig.10 MDS 解析による東京湾の放線菌の水平および季節変化

○,St.1; △,St.2; □,St.3; ◇,St.4; ♡,St.5

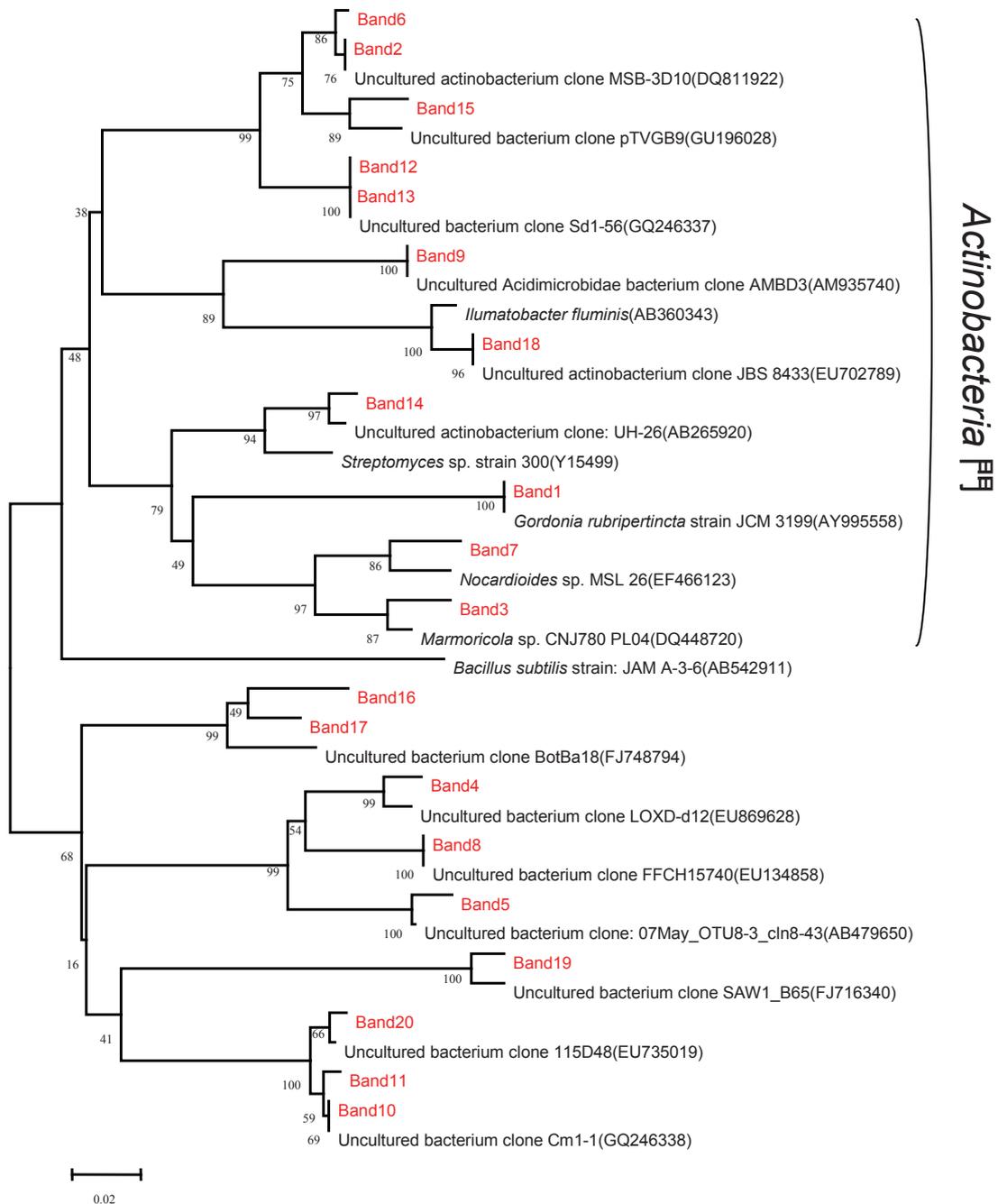


Fig.11 多摩川河口域および東京湾の放線菌の分子系統解析

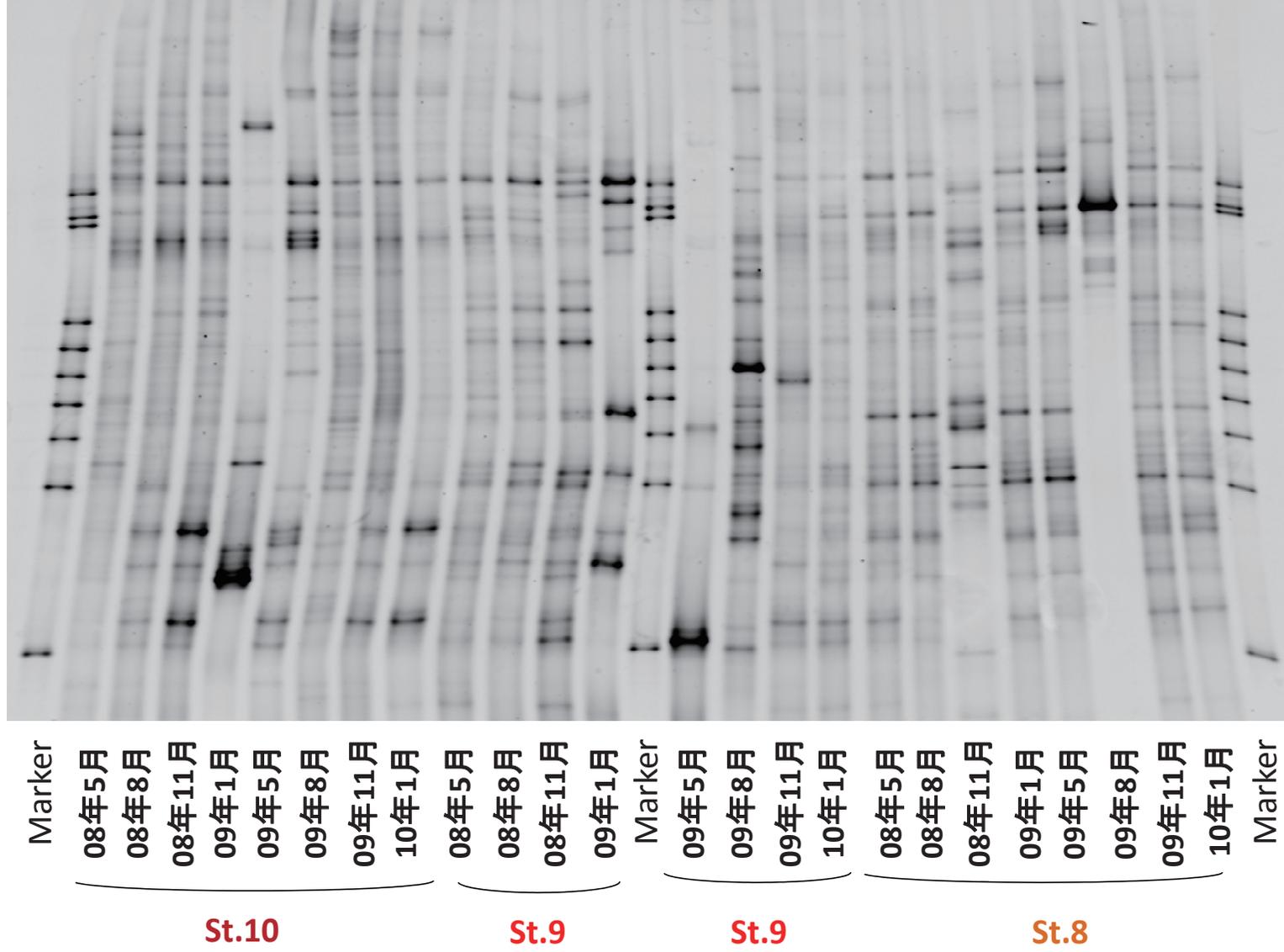


Fig.12a 多摩川河口域 St.10~8 の堆積物中の硫酸還元細菌の DGGE ゲル電気泳動像

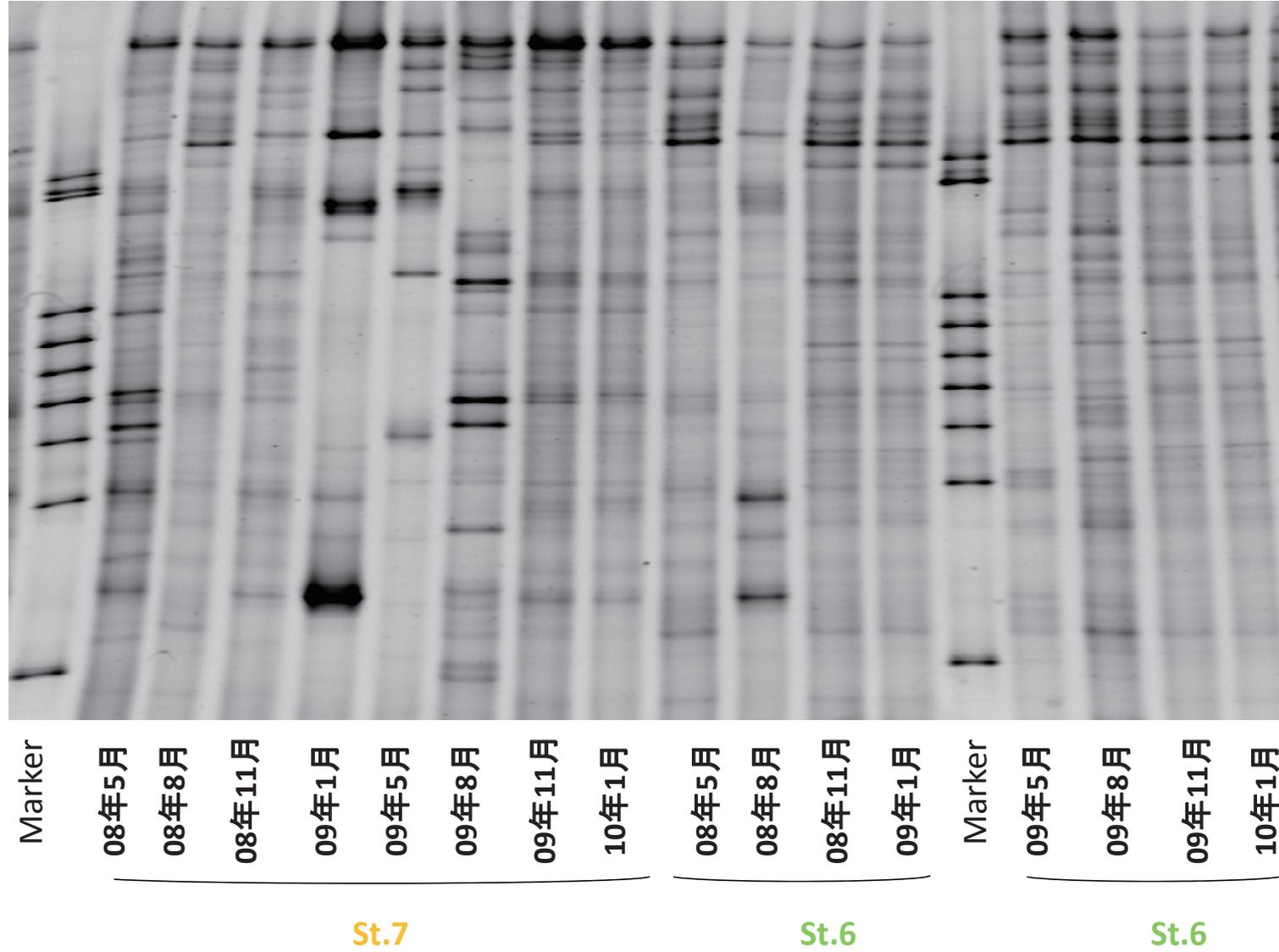


Fig.12b 多摩川河口域 St.7~6 の堆積物中の硫酸還元細菌の DGGE ゲル電気泳動像

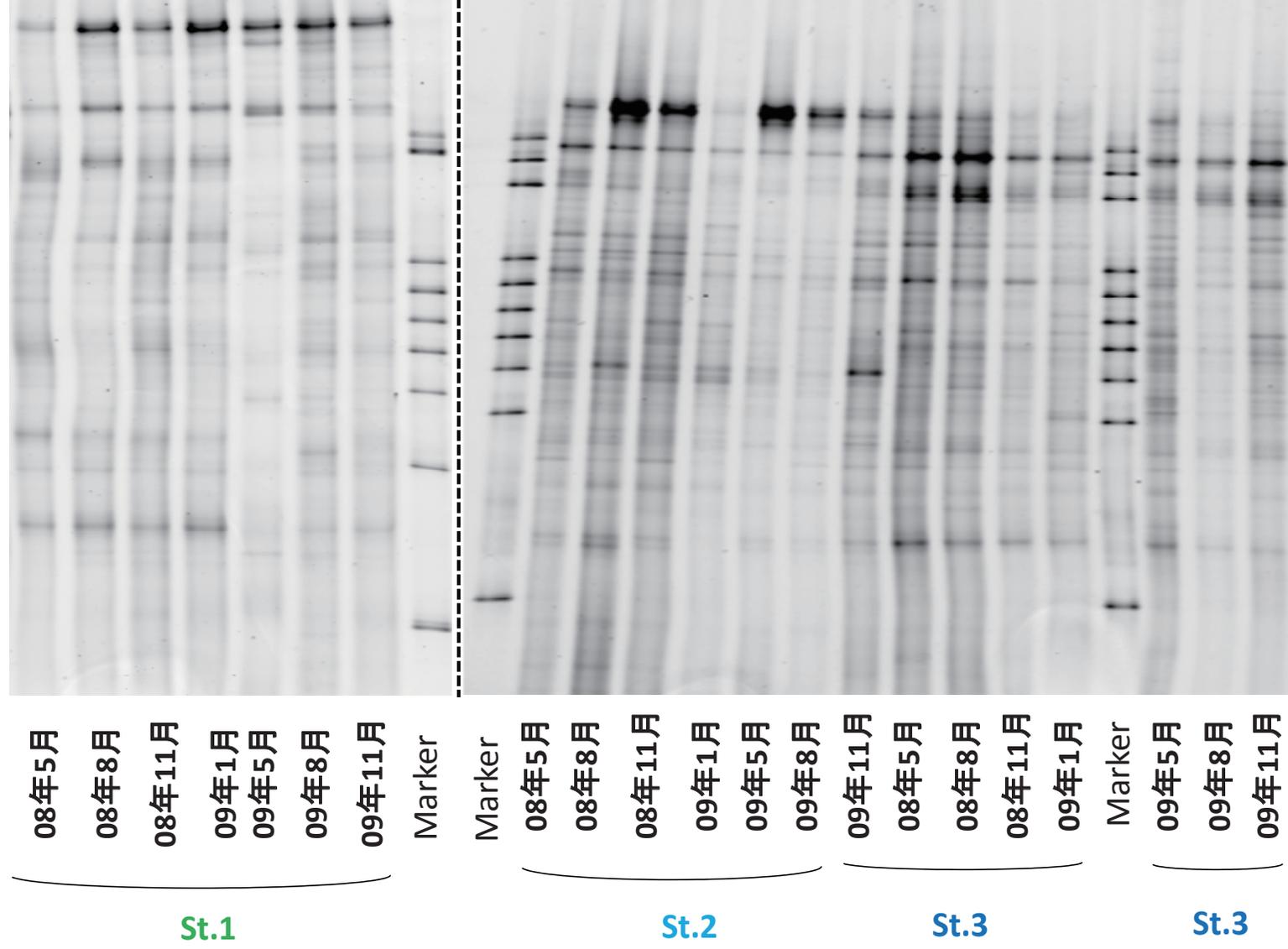


Fig.13a 東京湾 St.1~3 の堆積物中の硫酸還元細菌の DGGE ゲル電気泳動像

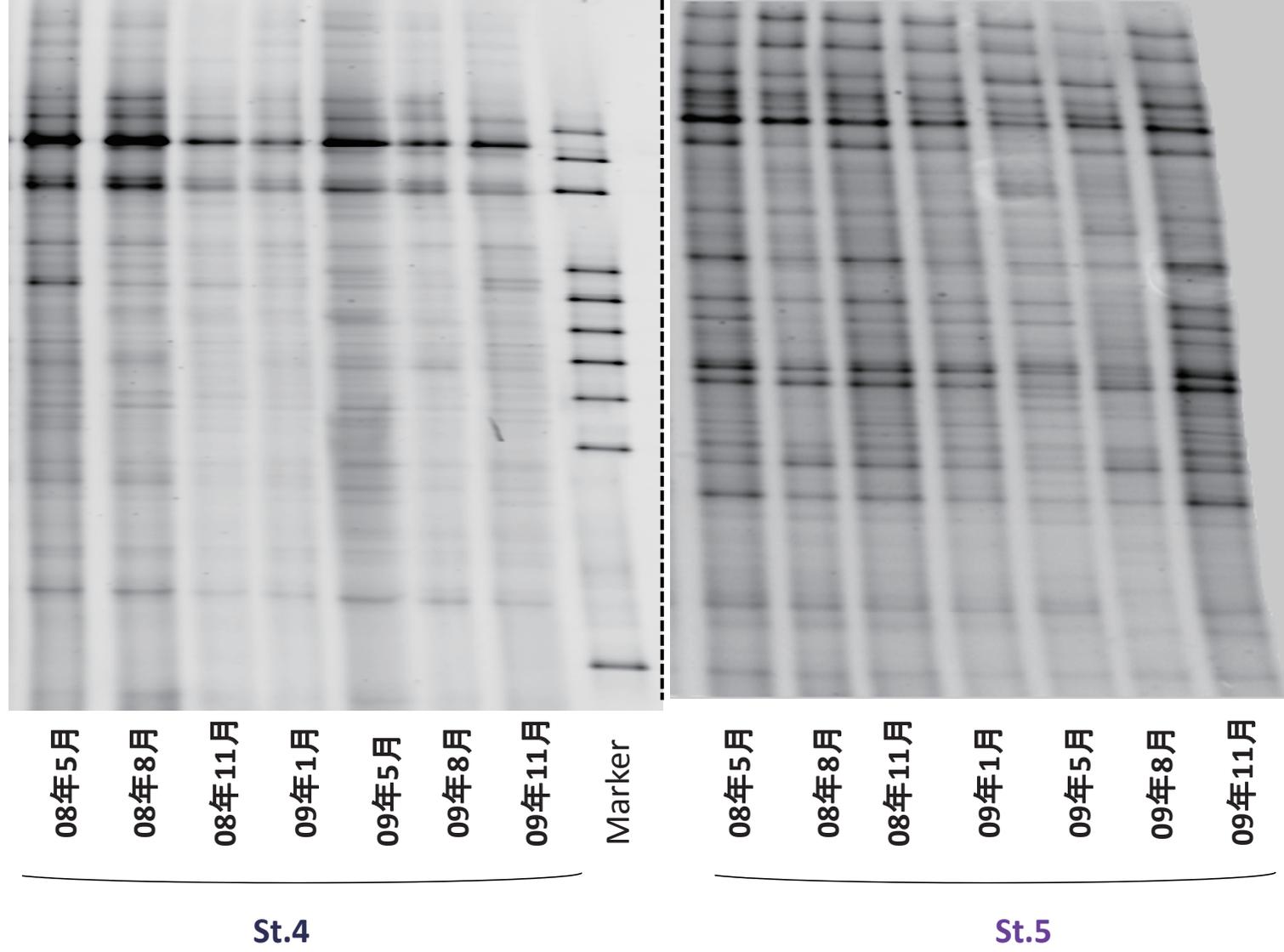


Fig. 13b 東京湾 St.4~5 の堆積物中の硫酸還元細菌の DGGE ゲル電気泳動像

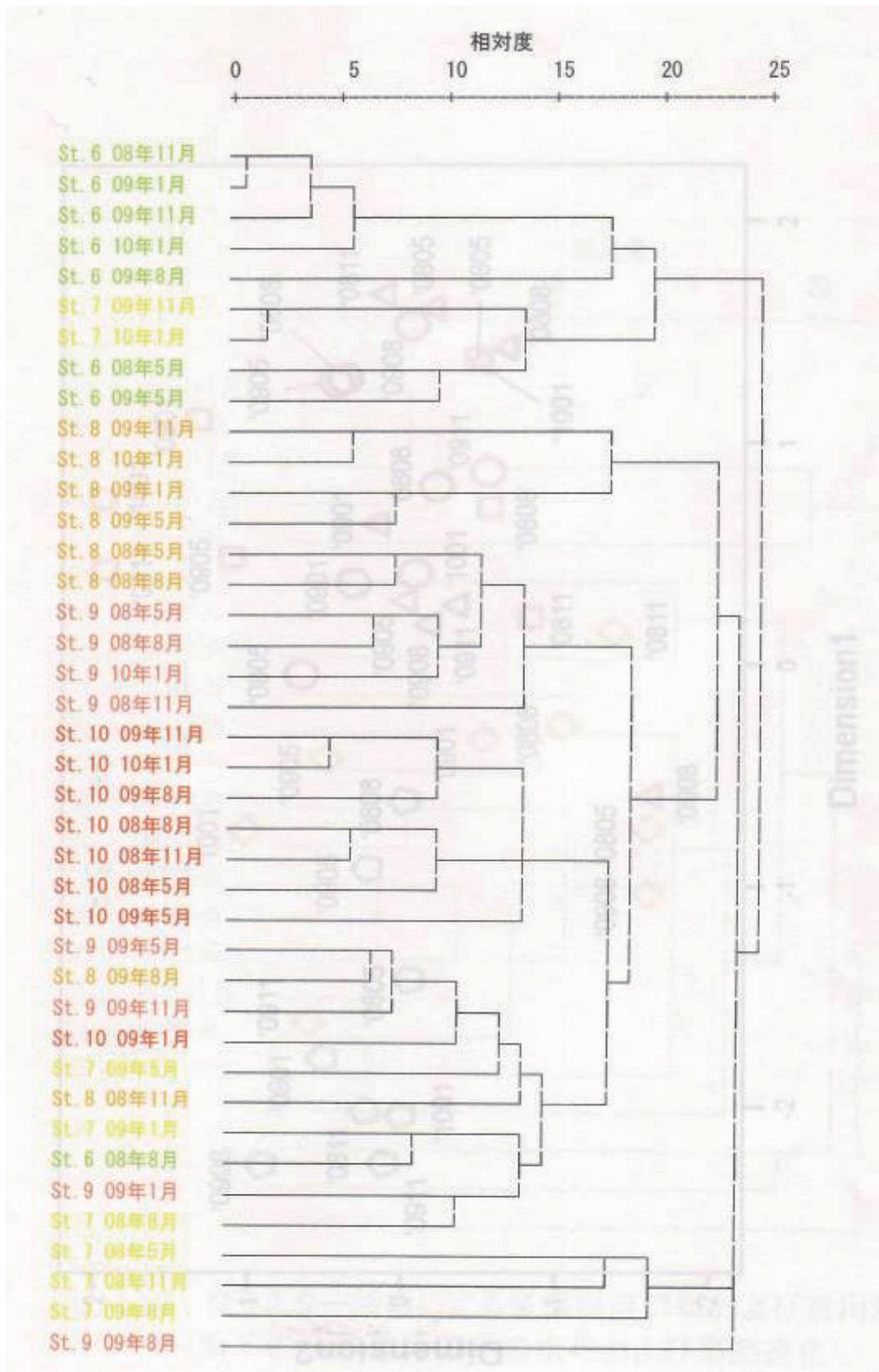


Fig. 14 クラスタ解析による多摩川河口域の硫酸還元細菌の水平および季節変化

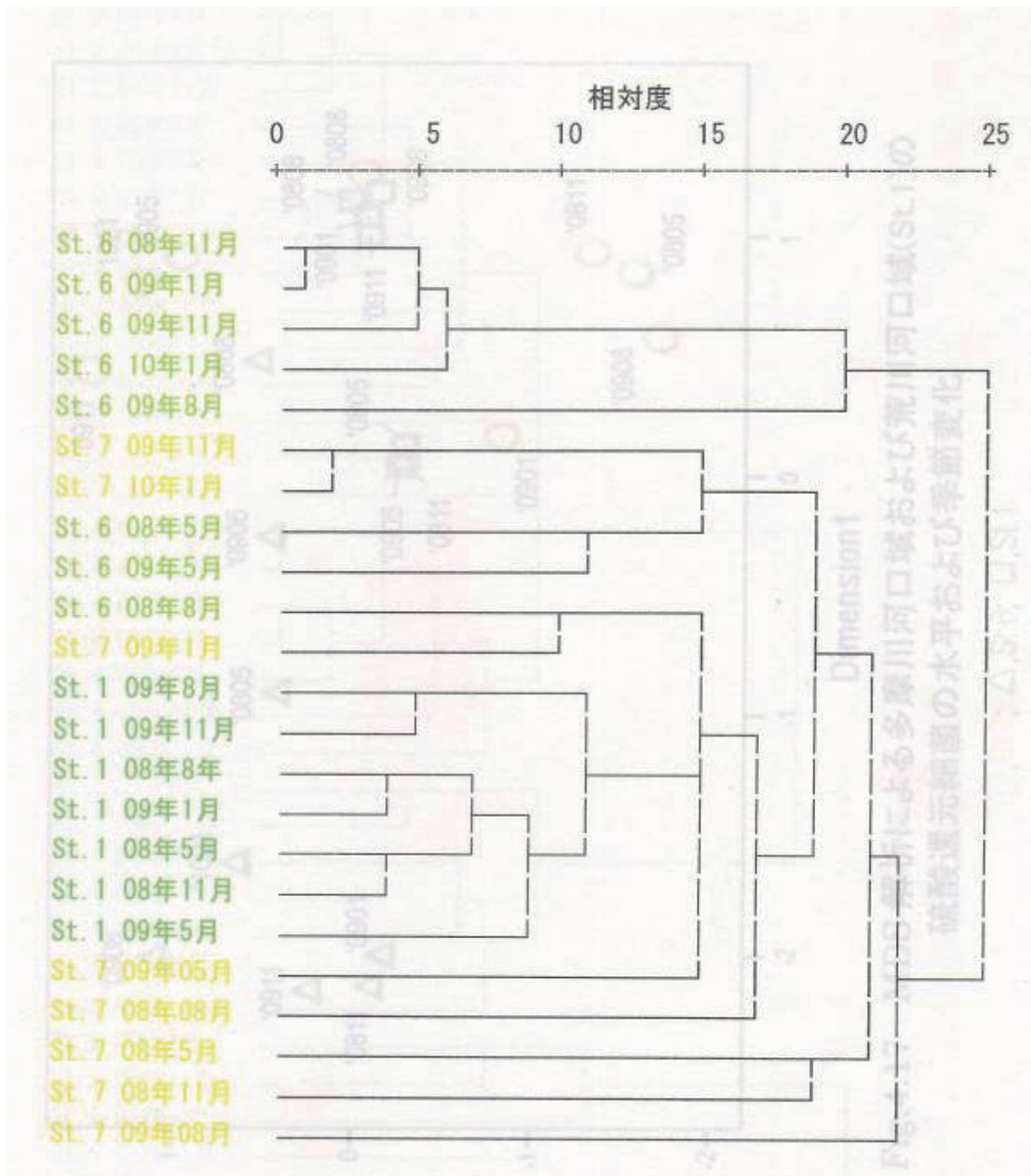


Fig. 16 クラスタ解析による多摩川河口域および荒川河口域 (St.1)の硫酸還元細菌の水平および季節変化

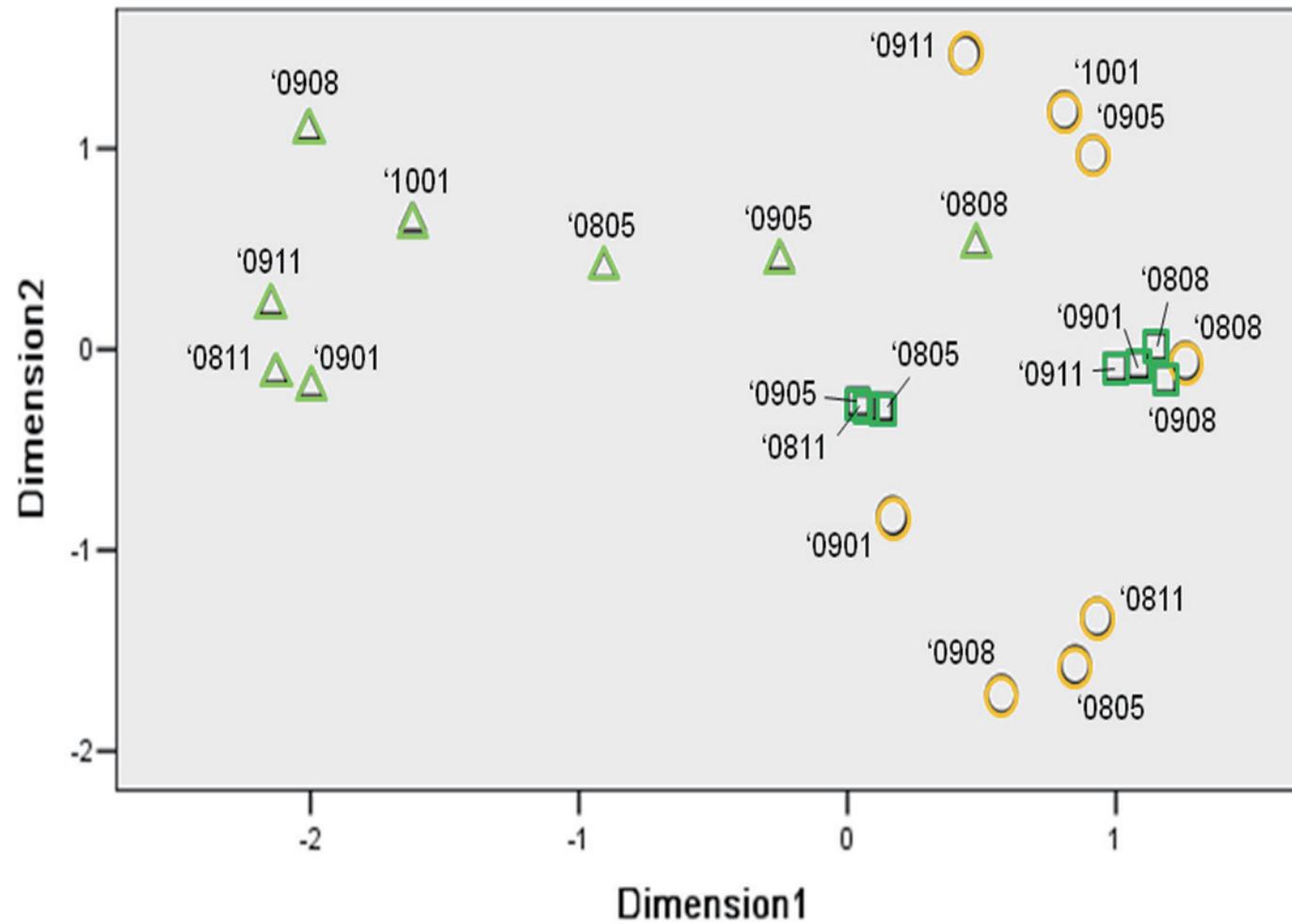


Fig. 17 MDS 解析による多摩川河口域および荒川河口域(St.1)の硫酸還元細菌の水平および季節変化

○, St.7; △, St.6; □, St.1

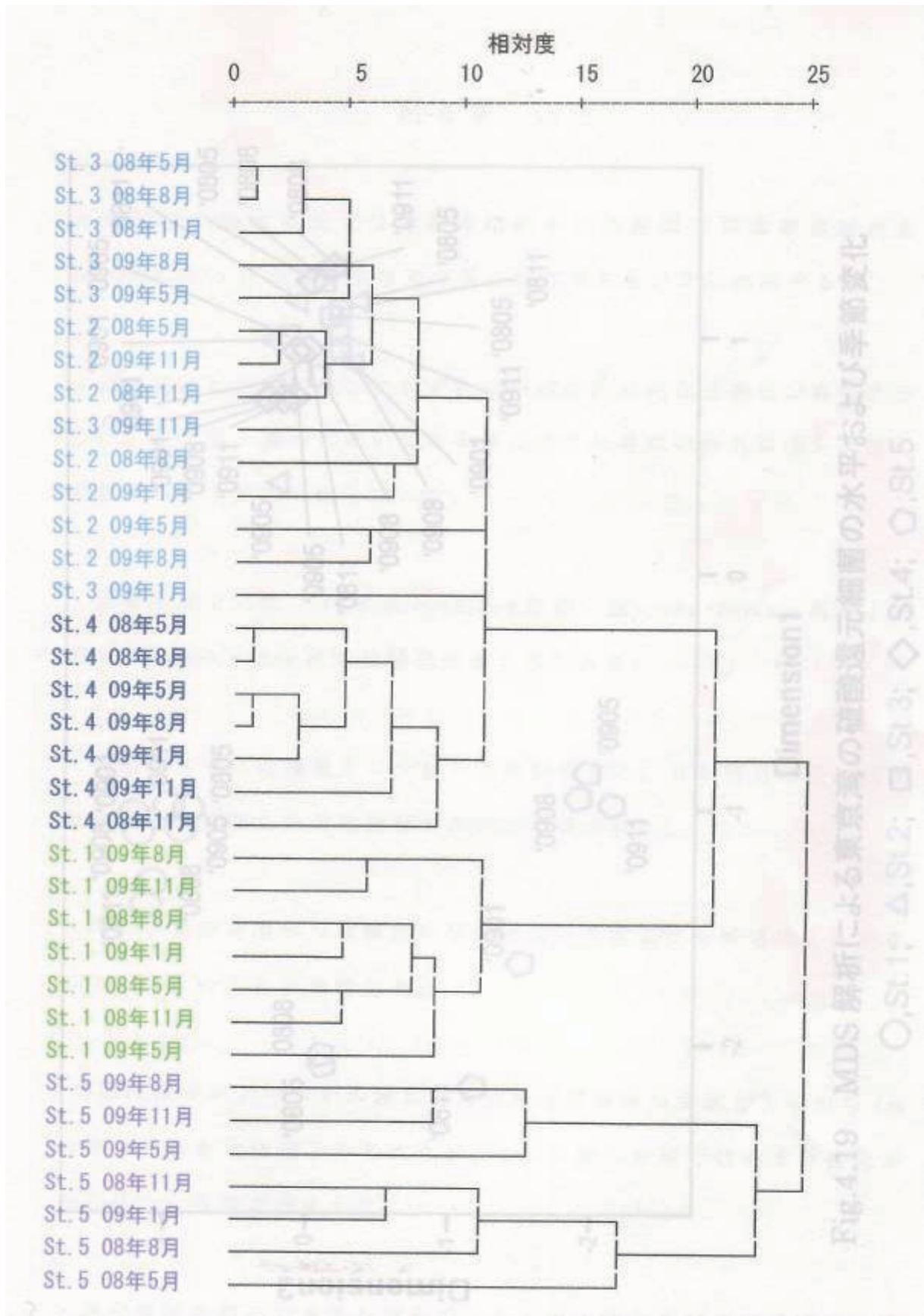


Fig. 18 クラスタ解析による東京湾の硫酸還元細菌の水平および季節変化

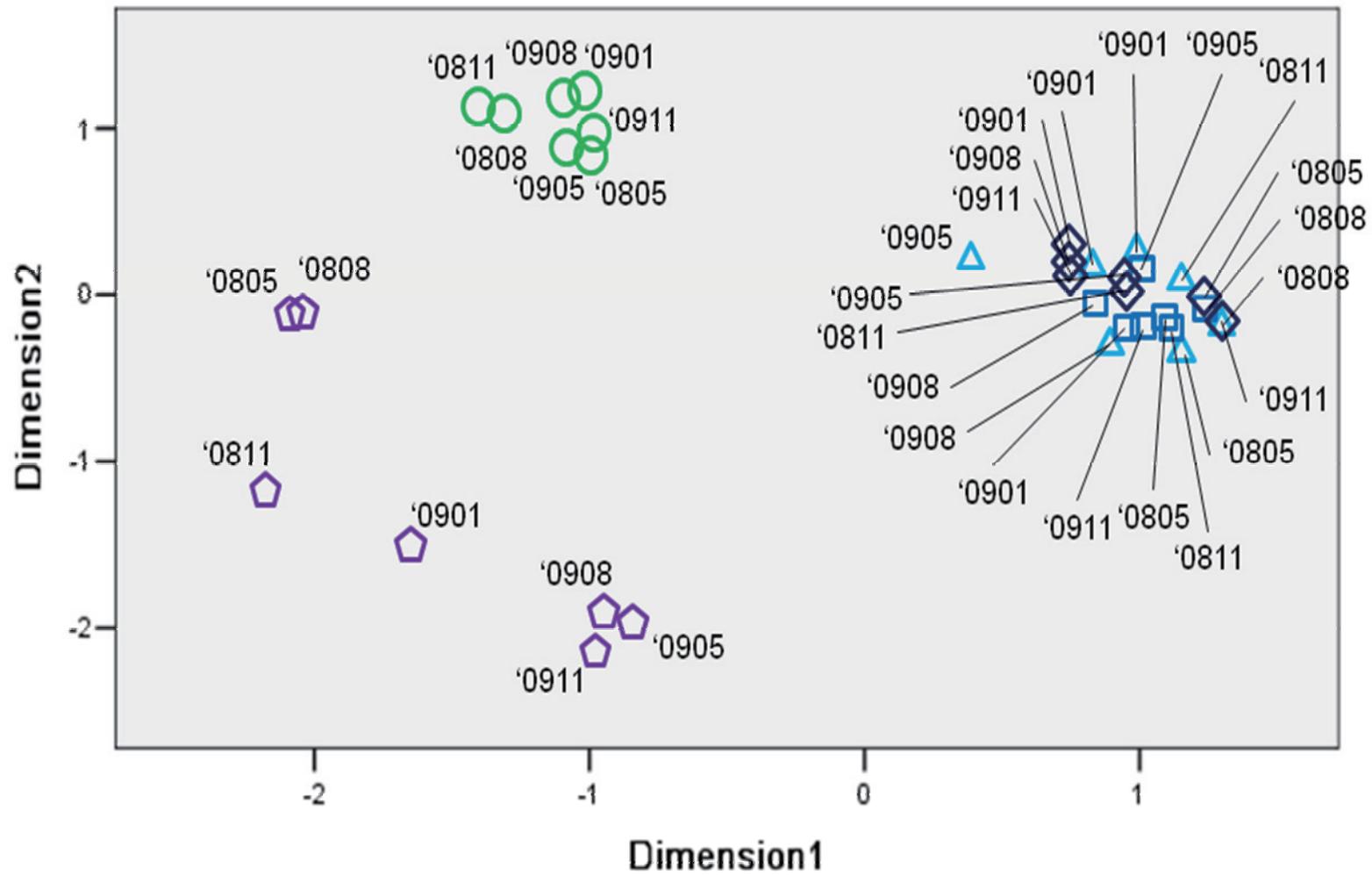


Fig. 19 MDS 解析による東京湾の硫酸還元細菌の水平および季節変化

○, St. 1; △, St. 2; □, St. 3; ◇, St. 4; ♡, St. 5

助成調査・試験研究完了報告書 [学術研究用]
(最終年度)

2010年 4月 1日

財団法人 とうきゅう環境浄化財団
会長 西本定保 様

住所 船橋市西習志野 1-45-4

調査・試験研究者

氏名 今田千秋 ㊞

2008年7月10日付第2008-08号

調査・試験研究課題

『分子生物学的手法を用いた多摩川河口域の細菌群集モニタリング』

上記、助成調査・試

験研究は2010年3月31日に完了いたしましたので、[財団法人 とうきゅう環境浄化財団 “調査・試験研究助成に関する調査・試験研究の選定基準、助成の方法、調査・試験研究の実施方法、助成金の支払い方法ならびに調査・試験研究者の個人情報の保護の方法に関する規程”]第12条に基づき、下記書類を添えて報告いたします。

記

1. 調査・試験研究の実施内容および成果に関する報告書

(1) ①調査・試験研究課題 (邦文、英文)

②代表研究者名 (日本語、英文ローマ字)・所属 (日本語、英語)

共同研究者名 (日本語、英文ローマ字)・所属 (日本語、英語)

③実施内容 要約400字程度 (邦文、英文)

④今後予想される効果 400字程度 (邦文、英文)

⑤調査・試験研究対象場所 別紙地図に対象範囲を明示

⑥本研究により作成した発表論文

ア. 著者名 (日本語、英語)

イ. 題目 (邦文、英文)

ウ. 発表場所 (学会、雑誌) 学会名、雑誌名、発行年月、発行者または出版社 (日本語、英語)

エ. 研究内容のキーワード [5以内] (日本語、英語)

オ. 要約[400字程度] (邦文、英文)

(2) 財団提出研究成果報告書 (FD又はCD-ROM添付)

2. 調査・試験研究の助成金に関する決算報告書 (最終年度1年分)

(1) 調査・試験研究総額

(2) 助成金限度額 (費用項目別)

1. 調査・試験研究の実施内容および成果に関する報告書

(1) ①調査・試験研究課題（邦文、英文）

分子生物学的手法を用いた多摩川河口域の細菌群集モニタリング

The monitoring of population analysis of microorganisms living in the estuary of Tamagawa River by the molecular biological method

②代表研究者名

氏名 今田千秋 (Chiaki Imada)

所属 (東京海洋大学・大学院, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology)

③実施内容 要約 400 字程度（邦文、英文）

本研究は羽田空港滑走路拡張計画に伴う東京湾奥部の多摩川河口域の生態系に影響を及ぼす主要な環境要因を明らかにすることを目的とし、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)および多次元尺度法(MDS)を用いて現場微生物の群集組成の水平変化および季節変化を調査するとともに環境要因を特定し、現場生態系に対する影響を検証したものである。それらのサンプル中に存在する微生物の中から、陸土壤中に多く生息していることから土壌流出の判定の指標として「放線菌」を、また水質汚染の指標として有機物の最終分解者に位置する「硫酸還元菌」をそれぞれ選択し、それらの微生物の群集構造の季節及び水平変化を解析した。2008年5月から2010年1月まで合計8回にわたり多摩川河口域において堆積物を採集した。その結果、堆積物中の放線菌も硫酸還元菌も群集構造に水平変化は見られたが、季節変化は殆ど見られなかった。このことから、河口域におけるこれらの微生物の群集構造の変化は生活排水や陸土壌流出による影響を受けると考えられた。

The present study aims to specify the major environmental factors which influence the ecosystem of the estuary of Tamagawa River of the inner part of Tokyo Bay due to the runway expansion project of Tokyo International Airport (Haneda Airport). The environmental factors were determined to examine the horizontal and seasonal variation in community structures of microorganisms in order to clarify the ecosystem *in situ* by using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and multi dimensional scaling (MDS) methods. The sediment samples were collected in the estuary of Tamagawa River of Tokyo Bay for 8 times during the period of May 2008 and January 2010. Actinomycetes and sulfate-reducing bacteria were selected as indicator microorganisms from terrestrial soil and water pollution, respectively. Seasonal and horizontal variations of their community structures were analyzed. The horizontal variation was observed in both microorganisms whereas no clear seasonal variation was observed in the sediment. This suggests that the community structure of microorganisms in the estuary is affected by the inflow of wastewater or terrestrial soil.

④今後予想される効果 400 字程度（邦文、英文）

本研究では、前述の DGGE 法を用いて羽田沖の東京湾奥部多摩川河口域の現場環境における放線菌および硫酸還元菌の群集組成解析を行い、海水、河川水および陸土壌の影響を明らかにすることができたことから、本法は環境のモニタリング調査に大変有効であることが示された。今後東京湾奥部の羽田沖のような多摩川河口域のみならず、東京湾奥部の各所から表面水および堆積物サンプルを採集して群集組成解析を行うことも東京湾全体のモニタリングに必要と考えられる。特に東京湾に流入する多摩川以外の大きな河川(江戸川、荒川など)の影響を調査することにより、羽田空港拡張工事による東京湾全海域における生態系への影響も調査する必要があると考えている。また、

東京湾奥部の表面海水中の放線菌の系統解析から、表面海水中にはまだ多くの未分離の放線菌が存在することが明らかになり、海洋は新たな放線菌の分離源となりうることが示唆された。

In the present study, the community structure of actinomycetes and sulfate-reducing bacteria in the estuary sediment of Tamagawa River, Off-shore of Haneda Airport was analyzed by using DGGE method. The method proved to be very useful for the investigation of environmental monitoring of the effect of seawater, river water and sediment. It is necessary to collect surface seawater and sediment samples from various stations in the inner part of Tokyo Bay in order to analyze the population of microorganisms in the future. It is important to investigate the effect of inflow of especially large rivers such as Edo River and Arakawa River except for Tanagawa River on the ecosystem of all the areas in Tokyo Bay by the runway expansion project of Haneda Airport. Moreover, from the result of the phylogenetic analysis of actinomycetes from inner part of Tokyo Bay, it is apparent that undiscovered strains are living in the surface seawater. This suggests that marine environment is a good source for finding the novel ones.

⑤調査・試験研究対象場所 （別紙地図に対象範囲を明示しました）

⑥本研究により作成した発表論文
特に無し

⑤調査・試験研究対象場所



ぶんせいぶつがくてきしゅほう もち たまがわかこういき さいきんぐんしゅう
分子生物学的手法を用いた多摩川河口域の細菌群集モニタリング

(研究助成・学術研究VOL. 39—NO. 287)

著者 いまだ ちあき
今田 千秋

発行日 2011年3月31日

発行者 公益財団法人 とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://home.q07.itscom.net/tokyuenv/>