

- D-1 勃海・東シナ海における河川経由の環境負荷が海洋生態系に与える影響評価手法に関する研究
- (2) 汚濁物質が海洋生態系・物質循環に与える潜在的影響の評価手法に関する研究
- ② 海洋生態系における微生物多様性解析手法の開発に関する研究

研究代表者 国立環境研究所生物圏環境部長 渡辺 信

環境庁 国立環境研究所

| | | |
|--------|----------|-----------|
| 生物圏環境部 | 部長 | 渡辺 信 |
| | 環境微生物研究室 | 広木幹也・河地正伸 |
| 水圏環境部 | 水環境質研究室 | 内山裕夫 |

平成8～10年度合計予算額 17,412 千円
(平成10年度予算額 5,682 千円)

[要旨]

中国の長江では、流域開発を目的として中流域に世界最大級の三峡ダムが建設されており、河口域の東シナ海では、将来的に長江からの流入水の量的、質的变化が予想され、生態系への影響が危惧されている。本研究では、海洋生態系で重要な位置を占める微生物相の多様性を解明することを目的とし、細菌については培養を伴う従前法および分子生物学的手法を用いて、微細藻類については予備培養法と組み合わせた顕微鏡による形態観察とフローサイトメトリー (FCM) 法により解析を行った。

東シナ海における調査サイトごとの塩分濃度の鉛直分布より、長江流入水の影響は河口から約200 km 沖合のC3 サイトまで及んでいることが明らかとなった。全細菌数と SiO₂、NO₃、DIP 各濃度の相関性から、沿岸域では従属栄養細菌、沖合域低栄養性の細菌が多く存在していることが示唆され、生息する細菌の性質が異なるものと考えられた。

真正細菌の16S rDNA を標的としたPCR-RFLPにより、C1 (長江河口から100 km 沖)、C3 (200 km 沖)、C5 (300 km 沖) サイトそれぞれの表層、中層、底層の細菌相を比較したところ、各サイトごとに細菌相が異なり、C1 サイトは長江からの流入水の影響で異質の細菌相を示し、さらに表層の細菌相は中層、底層とは異なることが示唆された。

C1 サイト表層試料を、Marine Agar 2216 を用いて培養した結果、Large colony group (コロニー径4-6 mm) と Tiny colony group (1 mm 以下) の細菌が観察され、後者は表層で多く認められた。Biolog および16S rDNA 配列による解析の結果、Large colony group では、*Alteromonas macleodii*、*Roseobacter gallaeciensis* が優占種であり、Tiny colony group のほとんどは光合成能を有する *Roseobacter litoralis* であったことから、表層に多く存在したものと考えられた。

C1 サイト表層試料のうち、培養で得られたコロニーは全菌数の約7%であったため、次いで、真正細菌16S rDNA のPCRによるライブラリー化および塩基配列解析を行った結果、 α -、 γ -proteobacteria、C/F/B group を中心とした多様な構成が見いだされ、特に *Alteromonas macleodii* と *Roseobacter gallaeciensis* の近縁種は培養法でも多く見いだされたことから、本海域の優占種である

可能性が示唆された。また、本手法では、培養法では得られなかった新奇な細菌群や、培養困難な細菌群の存在も認められた。今後、本研究で得られた塩基配列を基に各菌群に特異的なプローブを作り、現存量、存在比等の微生物多様性変遷を定量的に解析する事が可能となった。

FCM 法による解析では、前方散乱光 (FSC) および側方散乱光 (SSC) が小さくオレンジ蛍光 (FL2) が相対的に高い粒子群と、前方散乱光 (FSC) および側方散乱光 (SSC) が比較的大きく、赤色蛍光 (FL3) が相対的に高い粒子群の 2 つのことなる粒子群が認められ、これらの粒子は各々、フィコピリン色素を持つ原核のシアノバクテリアとクロロフィルしか持たない真核の微細藻類であると思われた。シアノバクテリアは河口より離れたサイトで多く B3 あるいは B5 では 10,000 cells/ml 認められたが、河口に近い A1 および B1 サイトでは真核藻類が優占するなど、長江沿岸域から外海にかけて、棲息する微生物の相が異なることが示された。予備培養法では少なくとも 4 網に所属する 4 種類のピコ植物プランクトンを検出できた。これらの種は広範囲に生息するのが認められ、調査海域における基礎生産者としての重要性が示唆された。

[キーワード] フローサイトメトリー、ピコプランクトン、PCR、16S RNA、系統樹、予備培養、電子顕微鏡

1. 序

海洋における物質循環の 99% は、細菌類、ピコ植物プランクトン、ナノ植物プランクトン、原生動物、動物プランクトンの微生物過程 (以下微生物生態系と記述) に依存しており、微生物多様性の変動は海洋生態系機能に著しい影響を及ぼすことが予想される。しかし、そのメカニズムについては殆ど知られていない。その理由として、1) 微生物生態系は予想よりもかなり複雑な構造からなっていること、2) 大陸棚での分解と生産の殆どをになっっている細菌類やピコ植物プランクトンについて、種レベルでの多様性を計測する手法は確立されていないこと、があげられる。

従来、微生物多様性の解析に当たっては、海水中に棲息する微生物を純粋分離・培養し、形態的および培養上の諸性質を基に同定をおこなってきた。しかしながら、これらの方法で認識される微生物は実験室内で培養可能な微生物に限られ、実際に海水中に存在する微生物の 10% 以下を認識しているにすぎないと言われている。培養ができない微生物の多くは貧栄養な環境下で物質循環に大きな役割をはたしていると想像されることから、環境負荷が生物多様性へ及ぼす影響を評価するには培養法が確立されていないこれらの細菌類への影響をも評価していくことが重要であると考えられる。培養に依らずに微生物の存在を認識するには、2 つの主要な方法がある。一つは、顕微鏡などで直接的に観察する方法であり、一つは微生物の構成成分を化学的に分析、定量する方法である。

微生物菌体の構成成分のうち、DNA は同一種の細胞中に定量的に存在し、また、微生物種によりその塩基配列が異なる。そのため、これを直接抽出し測定することは、その微生物の培養的性質に依存することなく定量的に多様性を解析するための有効な手段の一つであり、ある微生物に特異的な塩基配列に注目することにより、その種構成を解析することも可能である。特に近年では PCR 法と呼ばれる DNA の増幅法により、自然界の試量から直接抽出した少量の DNA から、その塩基配列を求めることが可能となった。

一方、微生物細胞を顕微鏡下で直接観察することは微生物を認識する上で最も確実な方法の一

つであり、動物・植物プランクトンの分類や同定などはこれらの光学および電子顕微鏡による形態観察に基づいて行われている。しかし、細菌類は形態が互いに似通っていることから、顕微鏡による形態観察から得られる質的情報は限られていた。しかし、近年、各種の染色法と蛍光顕微鏡により、特定の種類の微生物を特異的に認識することも可能となった。また、顕微鏡の一視野に計数される細胞数は限りがあり、微生物群集を扱う場合に不可欠な、多数の細胞についての統計的な解析に対しては多大の労力を要していた。この点に関しては、細い流束中の微小な粒子にレーザー光を当て、個々の粒子から発する蛍光や散乱光を電氣的に計測するフローサイトメトリー (FCM) 法では、数千から数万以上の粒子について蛍光顕微鏡で得られる様な情報を短時間で得ることが可能となった。この FCM 法と従来から活用されているフィールドサンプルの予備培養法による多様性解析を併用することで、自然界の微生物群集の多様性への理解がいつそう進むことが期待される。

本研究においては、これらの手法を組合せることにより微生物多様性を計測する手法を開発することを目的とし、中国東シナ海における日中共同調査の試料について、顕微鏡による形態観察を動植物プランクトンの多様性の解析に、FCM 法を海水中のピコ植物プランクトンの多様性の解析に、また、PCR 法を細菌類の多様性解析に適用することを試みた。

2. 研究方法

東シナ海での調査およびサンプリングは、1997 年 10 月及び 1998 年 5 月に行った。調査海域、およびサンプリング海域は図 1 に示した。細菌の直接計数には A1、A3、A5、B1、B3、B5、C1、C3、C5 各サイトの表層(S)、中層(M)、底層(B)の海水試料を用いた。各サイトの水深は異なるが、表層試料は海面より約 2 m 下部、底層試料は海底より約 2 m 上部、および、中層試料はその中間において採取した。

各海域における各種栄養塩濃度(DIP、NH₄、SiO₂、NO₂、NO₃)の測定には栄養塩オートアナライザを用い、全菌数は海水試料を DAPI (4',6-Diamino Phenylidole Dehydrochloride) で染色した後、落射型蛍光顕微鏡を用いて計数した。

海水試料からの全 DNA 抽出には、物理的に菌体を破碎して試料中の全ての細菌から均等に DNA を抽出・精製できる Fast DNA Kit (BIO 101)を用い、全 DNA 溶液を調製した。

真正細菌の 16S rRNA 遺伝子は全 DNA を鋳型として PCR (polymerase chain reaction)で増幅した。

PCR-RFLP(restriction fragment polymorphism pattern) で細菌相を比較する場合には、PCR 産物を制限酵素 *Hae* III で消化し、得られた電気泳動フラグメントパターンを解析システムにより解析した。

培養可能な細菌の系統解析には C1 サイトの表層海水を用い、Marine Agar 2216 平板培地に生育したコロニーを Biolog GN plate(Biolog) に供して、発色パターンをマイクロプレートリーダーで測定し、Microlog ML clust プログラムでクラスター解析を行った。

得られた PCR 産物のシーケンスには ALF II DNA シーケンサーを用い、シーケンス反応はダイデオキシ法で行った。泳動終了後、得られたピークデータをシーケンス解析ソフトにより解析し、塩基配列を解読した。

得られた塩基配列を基に Clustal W を用いて、NJ 法による分子系統樹を構築した。なお、得られた塩基配列については CHECK-CHIMERA によりキメラ DNA の有無を確認した。

FCM 測定に用いた試料は、1997 年は最終濃度が 2% となるようにグルタルアルデヒドを添加、固定した後、5℃で保存し、測定の直前に 10 ミクロンのヌクレオポアフィルターでろ過した。1998 年は採取した試料を現場で 100 ミクロンのナイロンネットでろ過したものを凍結・保管し、測定の直前に解凍し、ベクトンデキンソン社 FACSCalibur により測定した。測定に当っては、流束中の試料に含まれる各粒子を青色レーザー (488 nm) で励起し、前方散乱光 (FSC)、側方散乱光 (SSC)、緑色蛍光 (FL1; 515 - 545 nm)、オレンジ蛍光 (FL2; 564 - 606 nm)、および赤色蛍光 (FL3; 650nm<) の強度を測定した。1998 年の測定においては、FCM 装置にシリンジポンプを取り付け、試料を一定速度 (0.02 ml/sec) で注入することにより、単位体積中の粒子数を計数した。

予備培養法によるピコ植物プランクトンの検出は、ポリカーボネートフィルターによる細胞サイズ分画試料の作成、培地への植え込み、現場環境での培養、固定処理を現場で行った後、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた微細形態観察に基づき分類、同定を行った。

3. 結果と考察

(1) 全菌数と各種栄養塩濃度の関係

各種栄養塩濃度(DIP、NH₄、SiO₂、NO₂、NO₃)と全菌数との関係を図 2 に示した。NH₄濃度は、いずれのサイトにおいても 0.3 μM から 0.6 μM の間で安定し、全菌数との相関性は認められなかった。NO₂と全菌数では負の相関が弱いながらも認められた。一方、DIP、SiO₂、NO₃の各濃度と全菌数についてはいずれにおいても正の相関性が認められ、特に NO₃との関係においては、沖合の栄養塩濃度に細菌数が依存しないグループ(B)と沿岸域の栄養塩濃度に細菌数が依存するグループの直線関係を示す大きな 2 つのグループ(A)に分けることができた。この結果より、沖合域には栄養塩濃度に依存しない低栄養性の細菌が多く存在し、一方、沿岸域では栄養塩濃度に依存する従属栄養細菌が多く存在し、それぞれの海域に生息する細菌の性質が異なっていることが示唆された。測定した栄養塩濃度が細菌数を決定する限定要因であると断定できないものの、長江の河川流は沿岸域の細菌にとって重要な栄養供給源であると考えられた。

(2) PCR-RFLP 法による各サイトの細菌相の比較

東シナ海の沿岸域と沖合域では細菌群が異なることが示唆された為、全ての細菌に存在する 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-RFLP を行い、細菌相の差異を立証した。

9 測点の全ての海水試料より目的とする約 1.5 kb の DNA を増幅し、制限酵素で完全に消化して得られた DNA フラグメントパターンを図 3 に示した。サイトごとのフラグメントパターンは異なっており、各サイトの細菌相が異なることが示された。さらに、得られたフラグメントパターンを解析し、得られた系統樹を図 4 に示した。その結果、各サイトごとにクラスターを形成し、且つそれぞれが独立している事より、サイトによって細菌相は固有のものであることが示された。また、C3 および C5 サイトの各クラスターは隣接し、C1 サイトは C3、C5 クラスターとは異なる分枝を示していた。さらに、全てのサイトで中層と底層は隣接し、表層はその外側に位置していた。

塩分濃度の鉛直分布から、C1 サイトと C2 サイトは長江からの淡水の流入の影響を受け、一方、C3 サイトから C5 サイトまではほとんど影響が見られなかった事から、C1 サイトは長江からの流入の影響を強く受けて C3、C5 サイトとは異質の環境となり、このことが細菌相の違いに

起因していると考えられた。また、全てのサイトにおいて、表層が中層・底層より離れたところに位置していたが、塩分濃度は C3 サイトから C5 サイトにかけてほぼ均一であることから、表層の細菌相が異なる原因としては考えられなかった。表層には光合成能を有する細菌群の存在が在り、中層・底層とは異なった細菌相を示したのではないかと推測された。

以上より、C1 サイトの細菌相は長江からの流入の影響を受ける特徴的な海域となっており、今後、長江流域の開発に従って予想されている流入水の質および量的な変化に伴う細菌相の変化を追跡するに適切な海域であると考えられた。

(3) 培養可能な細菌多様性の解析

以上より、C1 サイトは、長江からの流入水の影響を受けて河口域特有の細菌相を有していることが示された。東シナ海では、将来的に、三峡ダム建設に伴う流域開発による長江からの流入水の質および量的な変化が予想されている。従って C1 サイトは、この影響を検討するために最も有効な測点であると考えられた。そこで、C1 サイトの細菌多様性を解析することを目的とし、まず、培養可能な細菌について、各種炭素源に対する酸化パターンに基づく解析を行った。

表 1 に各深さにおける全菌数と、Marine Agar 2216 上に生育した細菌数を比較した結果を示した。培養可能な細菌数は 2.3×10^4 cells/ml から 3.4×10^4 cells/ml であったが、全菌数は 3.0×10^5 cells/ml から 4.2×10^5 cells/ml であり、培養可能な細菌数は全菌数の約 7% から 11% 程度に過ぎなかった。通常、海洋環境において培養できる菌は、外洋域で全菌数より 2 桁から 5 桁、沿岸域で全菌数より 1 桁から 2 桁低いと言われており、本海域においても同様の結果が得られた。また、各層の平板培地にはコロニーの直径が約 4-6 mm の比較的大きなコロニーを形成する菌(Large colony group)と、コロニーの直径が 1 mm 以下の微少なコロニーを形成する菌(Tiny colony group)が観察され、Tiny colony group の占める割合は表層ほど多く、全コロニー数の 75% を占めていたが、中層、底層になるにつれその割合は 25% まで減少した (図 5)。このことは、上記の PCR-RFLP 法を用いた細菌相の比較により示された結果と一致しており、表層が中層・底層とは異なる細菌相を有することの要因の一つとして、Tiny colony group の存在が関与していることが示唆された。

(4) Large colony group の解析

分離した Large colony group の約 70 株から得られた発色パターンに基づき系統樹を構築し、図 6 に示した。その結果、Large colony group は 3 つのクラスター(A、B、C)より構成されていた。A-クラスターは *Alteromonas macleodii* の近縁種を中心に構成されており、B-クラスターには *Vibrio*、*Alteromonas*、*Roseobacter* の近縁種が混在し、C-クラスターは *Roseobacter gallaeciensis* の近縁種を中心として構成されていた。本システムは、各種炭素源に対する酸化能の有無によって菌株を同定する目的で開発されたが、細菌群集のグループ化にも有効な手段であることが示された。

Alteromonas macleodii は沿岸海域に広く分布し、多くの基質を幅広く利用する事が可能で、菌体外にアミラーゼや、アルギナーゼ等の炭素化合物分解酵素を分泌する菌として知られており、沿岸域での炭素循環に寄与している可能性を示唆した。また、*Roseobacter gallaeciensis* は、貝の養殖場の漁具より分離された菌であることから、富栄養な環境に生息する菌と考えられている。以上のことは、菌の分離源である C1 サイトの特徴、すなわち、栄養塩濃度が高い沿岸の海域であることを反映していると考えられた。

約 70 株の Large colony group の菌を Biolog GN plate に供した結果、菌ごとに異なるパターンを示し、多様な菌により構成されていると考えられた。しかし、発色パターンに基づいて構築した系統樹は 3 つのクラスターより構成されており、発色パターンの多様さに反して少なかった。このことは、発色パターンに基づく解析（表現型解析）と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による解析（遺伝子型解析）結果には関連性がないことを示している。従って、両手法より得られる結果は異なり、目的に応じて使い分ける必要がある事が明らかとなった。

（5）Tiny colony group の解析

Tiny colony group の菌は Biolog GN plate の炭素源を全く酸化しないため、16S rRNA 遺伝子塩基配列を部分的に決定し、相同性検索を行った。Tiny colony group を構成するほとんどの菌は既存のデータベースとは一致しなかったが、 α -Proteobacteria の *Roseobacter litoralis* に非常に近縁な細菌群であることが明らかとなった。Roseobacter 属は、海洋の代表的な光合成細菌である Erythrobacter 属より派生した比較的新しい分類属であり、バクテリオクロフィルを有する菌として報告されている。以上のことは、本菌群が光合成に関与している可能性を示すものであり、Tiny colony group の菌数が、光量の多い表層ほど多く存在していたことと関係があるのではないかと推察された。

培養により得られた菌は全菌数の 1 割以下と少なかったことから、海洋微生物の多様性解析に関しては不十分と考えられたが、1 細胞当たりの活性が高いと推察されることから、環境中での役割、機能の解析をする際には無視し得ない存在と非考えられる。

（6）16S rRNA 遺伝子配列に基づく細菌多様性解析

東シナ海の海水試料より得られた真性細菌の 16S rRNA 遺伝子ライブラリーを作成し、約 360 株の形質転換体が得られた。このうち 74 株のクローンよりプラスミドを抽出精製し、挿入断片の両端からシーケンスを行った。また、得られた全ての塩基配列についてソフト CHECK-CHIMERA によりキメラ DNA の有無を確かめたが、キメラ DNA と思われる配列はなかった。

シーケンスの結果得られた 5'側および 3'側からの配列について、それぞれでアライメントを行ったところ、5'側のアライメントではギャップが目立ち、3'側ではギャップが少なかった。このことから 5'側は変化に富む Variable region を多く含み、3'側は保存性の高い Conserved region が多いことが示唆された。系統解析を行う際、どの領域が適しているかを示した報告はないことから 3'側、5'側の両領域について解析したが、特定の属種に注目して詳細に系統解析を行う場合には種間での差異が大きい 5'側が適しており、本研究のように細菌群集構造の概容を解析するためには、3'側が適していることが明らかとなった。

次いで、得られた 5'側および 3'側それぞれのアライメントデータを基に NJ 法による分子系統樹を構築した(図 7)。系統樹は、既存のデータベース上の各種細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を含めて構築した。その結果、3'側の系統樹では各細菌群が明確に区別されていたのに対し、5'側の系統樹では C/F/B group が proteobacteria のクラスターに含まれる、 α -proteobacteria が 2 つのクラスターを形成するなど 2 つの系統樹は大きく異なっていた。

3'側の配列に基づいて構築した系統樹および相同性検索の結果から、C1 サイトの表層は海洋に普遍的な α -、 γ -proteobacteria、Cytophaga を中心に、Low GC gram posi、High GC gram posi の各グループより構成されていることが明らかとなった(図 8)。クローン数としては *Alteromonas*

macleodii の近縁種を筆頭に、次いで *Roseobacter gallaeciensis* が多く見いだされた。 α -proteobacteria や C/F/B group には近縁種が見いだせないグループ(Unidentified)が認められた。また、 α -proteobacteria には、バミューダ諸島の近海の Sargasso 海で得られた、これまでに単離されていない SAR-11 クラスタに近縁のグループ(SAR)が認められた。SAR-11 クラスタの菌はこれまで多くの海域で 16S rRNA 遺伝子による解析で得られており、世界中の海域に存在していることが示唆されているが分離されたという報告はまだなく、海洋における役割については不明のままである。更に、 α -proteobacteria には、海藻に付着する共生細菌として報告されている細菌に高い相同性を示すグループ(Symbiont)が認められた。共生細菌は一般に培養が困難なことが知られている。

クローン数として最も多く見いだされた *Alteromonas macleodii* の近縁種は、培養可能な菌としても最も多く見いだされており、既に述べた沿岸域における炭素循環に寄与していることをさらに強く示唆した。次いで多く見いだされた *Roseobacter gallaeciensis* も、培養可能な菌として比較的多く見いだされていることから、これらの菌は本海域の優占種として存在していることが考えられた。

以上のことから、本手法によりこれまで培養可能な菌として知られている細菌以外にも、新奇の細菌群や、培養困難な細菌群の存在が示唆され、培養を伴った手法では不可能な部分も含めて解析できたことが示された。

16S rRNA 遺伝子に基づく解析により、長江河口域の細菌群集構造を詳細に解析することができ、多様な菌の存在が示唆されたが、これらの手法は現場における現存量や機能等を定量的に正確に反映するものではない。従って今後は、得られた塩基配列を基に各菌群に特異的なプローブを作り、FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) 法やフローサイトメーターを用いた計数を行い、現存量、存在比の変遷を明らかにし、優占種の現場での機能を明らかにしていくことが東シナ海の微生物生態系をより理解して行く上で重要だと考えられた。

(7) フローサイトメトリによる微細藻類相の解析

FCM による分析例を図 9 示した。各粒子を FL3 と FL2 の蛍光強度でプロットすると、FL3 が相対的に高いもの (R1) と、FL2 が相対的に高いもの (R2)、FL3、FL2 とともに低いもの (R3) の 3 群に分けられた。R1 に属する粒子は FSC、SSC とともに大きく、また、R2 に属する粒子は SSC の小さい粒子が大部分を占めていた。

原核生物のシアノバクテリアはクロロフィルとともにフィコピリン色素を持ち、青色励起でオレンジの蛍光を発するのに対し、真核生物の緑藻類はクロロフィルのみを持つため、赤色蛍光を発する。また、原核生物のシアノバクテリアは細胞内構造が真核生物の緑藻類より単純なため、細胞内の構造の複雑さを反映する SSC は低いと考えられる。図 9 における R1 は主としてクロロフィルを持つ真核の植物プランクトン、R2 は主としてフィコピリン色素を持つ原核のシアノバクテリアであり、R3 はこれらの色素を持たない細菌等の細胞あるいは有機および無機の懸濁物質であると思われる (Li and Wood 1988)。

1997 年に調査を行った 9 地点の表層水の FCM による解析結果を図 10 に示す。一部の地点においては図 9 の R1、R2 に相当する粒子群が認められたが、地点間で差があった。即ち、外海の A5、B5、C3 および C5 においては FL2 が比較的高く、SSC の低い粒子群 (R2) が明確に認められたが、これらの地点より沿岸に近い A1、B1、C1、A3 および B3 の各地点では R2 に属する粒子群

は明瞭には認められなかった。

1997年のC1、C3およびC5の層位別採取試量のFSC、SSC、FL2およびFL3を図11に示した。各地点とも、表層から底層に向けて大型の粒子（FSCおよびSSCの大きい粒子）の比率が増加する傾向にあったが、C3およびC5ではいずれの層位も、R2に属する粒子群が明瞭に認められ、特にC3の表層ではこれらの比率が高かった。しかし、C1では表層でSSCの小さな粒子群が若干認められたものの、中層および底層ではこれらの粒子群は明瞭には認められなかった。

1998年の調査においては海水中の植物プランクトンを定量的に計数するために、FCMにより検出された粒子のうち、FSCに対してFL3が相対的に低い粒子を、狭雑物として解析から除いた上、FL1に比較してFL2が強い粒子（A群）とFL2に比較してFL3が強い粒子（B群）に判別し、単位体積中の各群の粒子数を求めた。A群はB群に比較して、前方散乱光及び側法散乱光が小さい傾向にあった。A群は青色励起光に対してオレンジの蛍光を発生し、比較的小型で単純な細胞構造を持つシアノバクテリア類（1997年調査におけるR2群）、B群は赤色の蛍光を発生し、A群より相対的に大型で複雑な細胞構造を持つ真核の藻類（1997年調査におけるR1群）と思われた。

各地点、各層位の計数結果を図12に示した。A群が比較的優占なサイトはB3、B5およびC5の各々表層から下層まで、およびA3の表層であった。B群が比較的優占なサイトはB1の表層およびA3の中層であった。

また、A群が最も多かったのは、B3表層で17000/ml、次いでB5表層で10000/ml、B群が最も多かったのはB1表層で4000/mlであった。

FCMによる解析結果から、地点により植物プランクトンの構成群が異なり、沿岸域に比較して、外海ではR2あるいはA群に属するシアノバクテリア類の比率が相対的に高くなることが示された。また、これらの傾向は従来の知見とも一致するものであり、FCM法が海洋生態系の微生物多様性解析に有効であることを示唆している。

（8）予備培養法によるピコ植物プランクトンの検出

1998年の調査ではサイズ分画した試料を予備培養することで、全ての調査地点の表層水から、*Micromonas pussila*（ブラシノ藻綱）、*Nannochloris-like species*（緑藻綱）、*Imantonia rotunda*（ハプト藻綱）そして*Synechococcus* spp.（シアノバクテリア）といった種を検出できた。これらの種は細胞サイズが1-5 μm の極微小サイズのピコ植物プランクトンであり、通常の観察法では検出が困難である。今回の調査からこれらの種が広範囲に分布することが示された。調査海域における基礎生産者としての重要性が示唆される。細胞分画試料の予備培養法はピコ植物プランクトンの検出および種レベルの多様性調査に有用な手段といえる。また並行して培養株の確立を効率的に行うことが可能で、更に詳細な多様性解析手法の開発に繋がることになる。今後、これらの生物に特異的なDNAプローブを作成することで、微生物群集の種レベルでの解析がFCMにより可能になることが期待される。

4. 参考文献

Li, W.K.W. and Wood, A.M. (1988): Vertical distribution of North Atlantic ultraphytoplankton: analysis by flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Deep-Sea Res.* 35, 1615-1638

〔国際共同研究等の状況〕 環境庁と中華人民共和国国家海洋局との間で「東海特定海区河川経路環境負荷及びその海洋生態系に及ぼす影響プロジェクトに関する共同調査研究実施取り決め」が締結され、これに基づき、共同調査船を用いて研究推進を行っている。

〔研究成果の発表状況〕

(1) 口頭発表

- ① 関口博之、神戸佐和、内山裕夫、中原忠篤、広木幹也、渡辺信、朱明遠：第14回日本微生物生態学会（1998）「16S rRNA 遺伝子情報に基づく長江河口域の細菌群集多様性解析」
- ② 関口博之、中原忠篤、内山裕夫、神戸佐和、広木幹也、渡辺信、朱明遠：第33回日本水環境学会年会（1999）「東シナ海における海洋微生物の表現型および遺伝子型に基づく多様性解析」
- ③ 関口博之、内山裕夫、神戸佐和、広木幹也、中原忠篤、渡辺正孝、朱明遠：日本農芸化学会1999年度大会（1999）「東シナ海における細菌群集構造の解析」
- ④ H.Sekiguchi, H.Uchiyama, S.Kambe, M.Hiroki, M.M.Watanabe, T.Nakahara, M.Watanabe, and M.Y.Zhu: 99th American Society for Microbiology General Meeting, Chicago USA, 1999 "Bacterial Community Structure in the East China Sea"

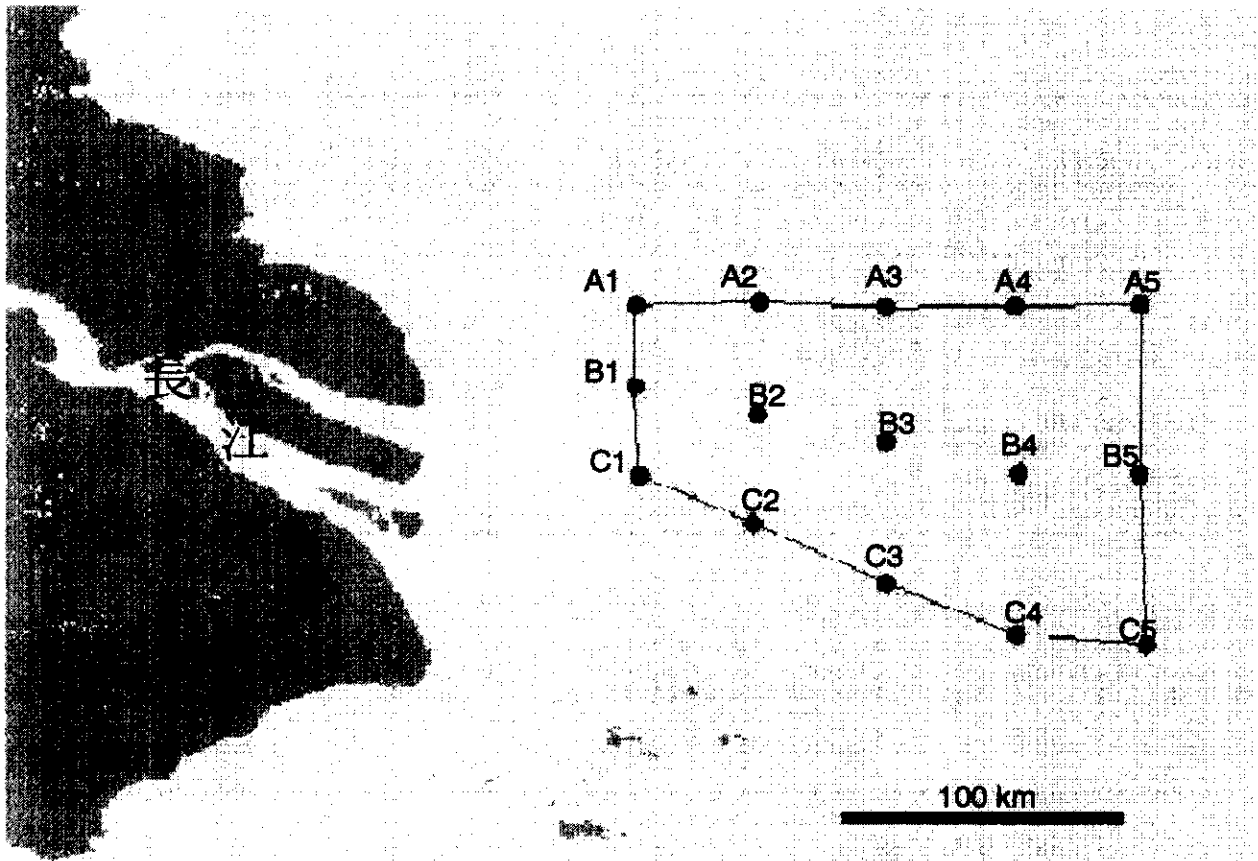


図1 東シナ海における調査海域とサンプリングサイト

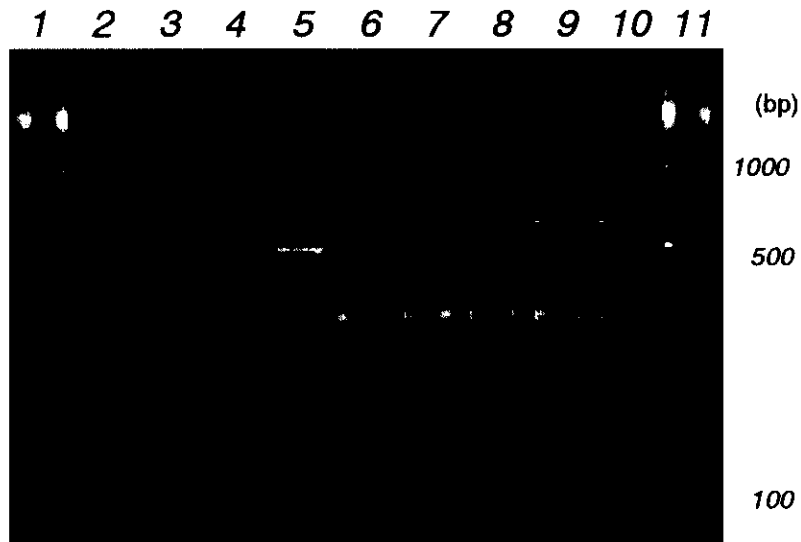


図3 各サイトごとに増幅した16S rRNA遺伝子の*Hae* IIIによるPCR-RFLPパターン

レーン2、3、4はC1サイトのそれぞれ表層、中層、底層試料、
 レーン5、6、7はC3サイトのそれぞれ表層、中層、底層試料、
 レーン8、9、10はC5サイトのそれぞれ表層、中層、底層試料、
 レーン1、11は ϕ X-174 *Hae* III Marker。

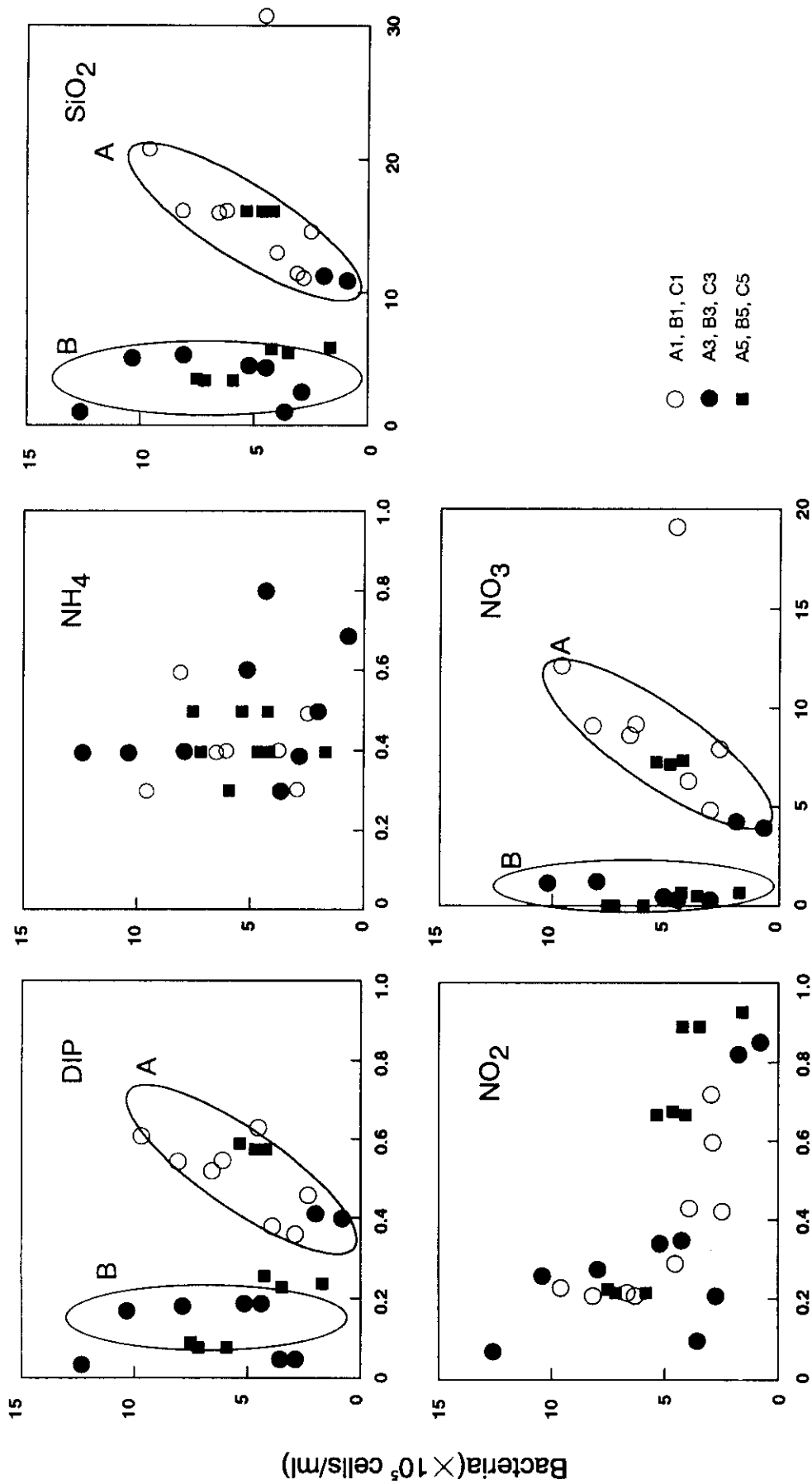


図2 各種栄養塩濃度と全菌数との関係

○はA1, B1, C1サイト、●はA3, B3, C3サイト、■はA5, B5, C5サイトを示す。楕円は各栄養塩濃度と細菌数の関係の中でグループとして分けられたものを示した。Aは細菌数が栄養塩濃度に依存するグループ。Bは細菌数が栄養塩濃度とは無関係のグループ。

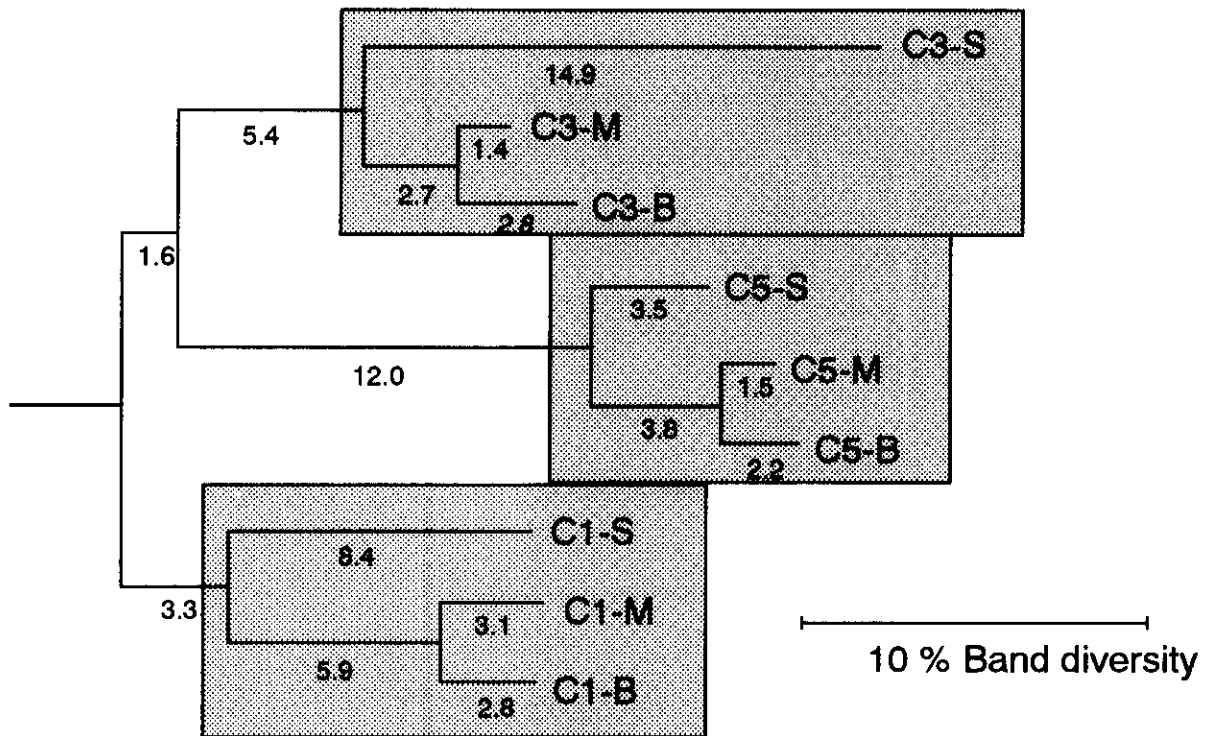


図4 *Hae* III PCR-RFLPのフラグメントパターンに基づく系統樹
 枝の横の数字はバンドパターンの相違度を示す。S、M、Bは各サイトの表層(S)、中層(M)、底層(B)。網掛け部はサイトごとに区別した。

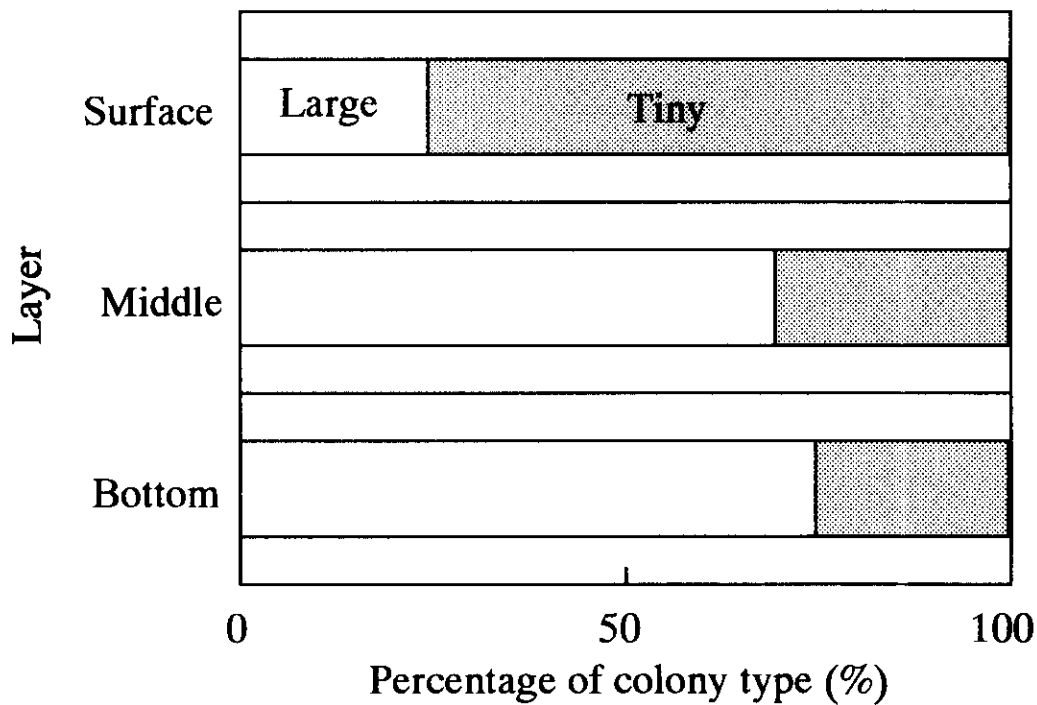


図5 C1サイトにおけるLarge colony group とTiny colony group の割合
 C1サイトの表層、中層、底層より採取した海水試料を平板培地に塗布し、25°Cで2週間培養した。

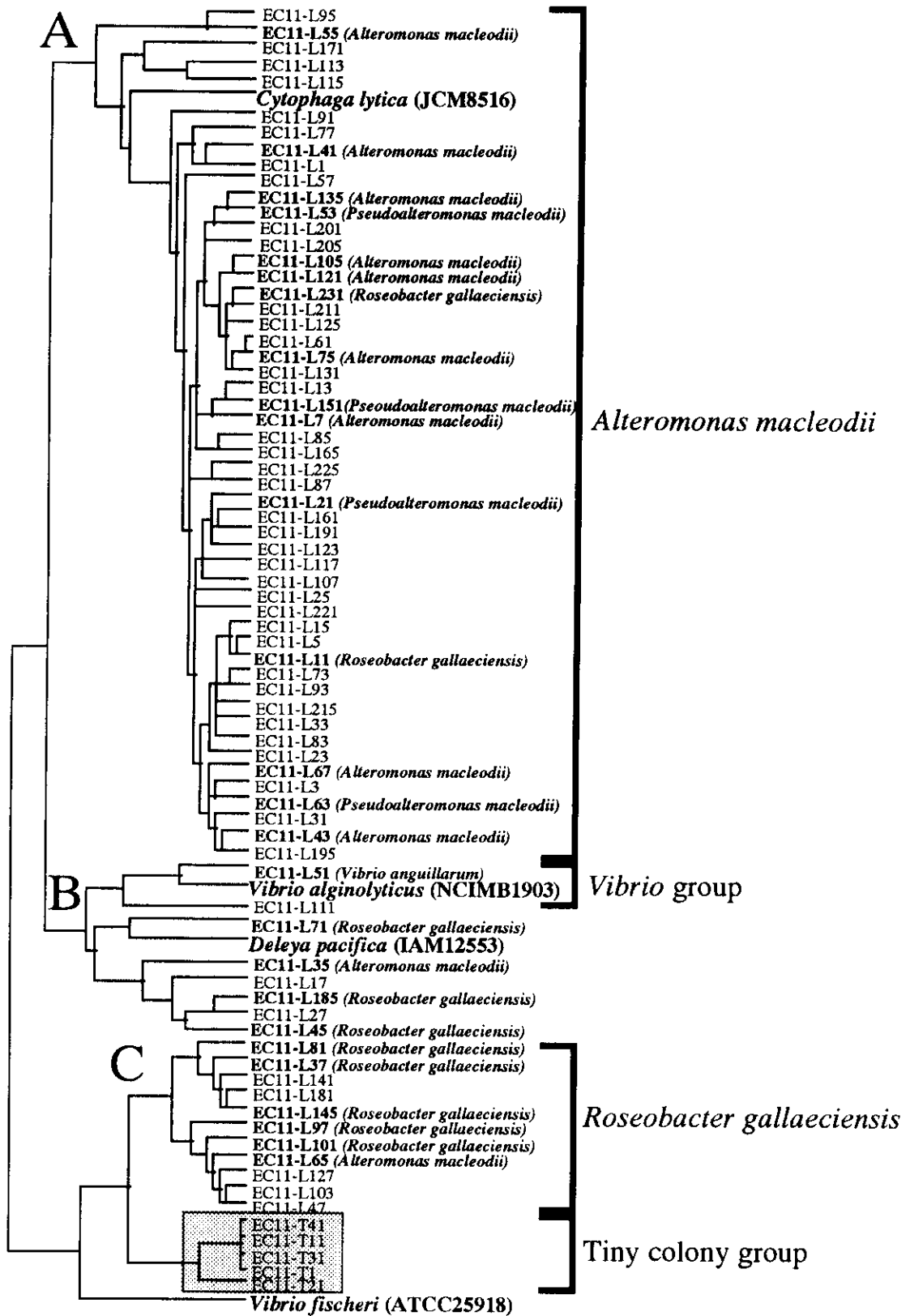


図6 Biolog GN plateの発色パターンに基づく東シナ海の細菌のクラスター解析

太字菌株は同時に解析した基準株を示す。

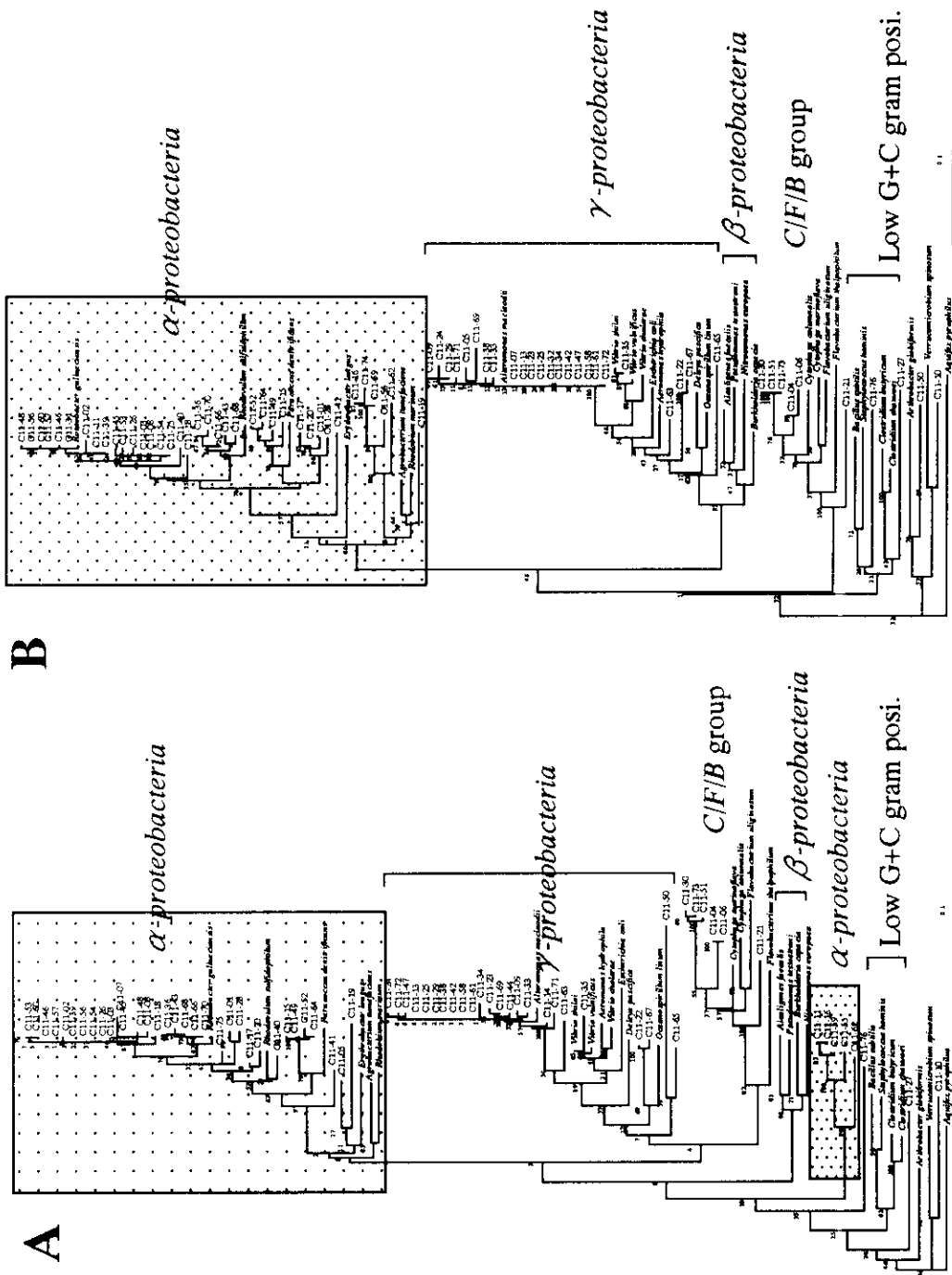


図7 異なる領域に基づく系統樹

A; 5' 領域より、 B; 3' 領域より

表1 C1サイトにおける全菌数とMarine Agar 2216上に生育した細菌数の比較

| | Surface | Middle | Bottom |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 全菌数 (cells/ml) | 4.2×10^5 | 3.1×10^4 | 3.0×10^5 |
| 培養可能な細菌数 (cells/ml) | 2.8×10^4 | 3.4×10^4 | 2.3×10^4 |
| 培養可能な細菌の割合 (%) | 6.6 | 10.9 | 7.6 |

全菌数はDAPI染色による蛍光顕微鏡での計数値、培養可能な細菌数はMarine Agar 2216上に生育したコロニーの計数値を示した。Surface、Middle、BottomはそれぞれC1サイトの各層。

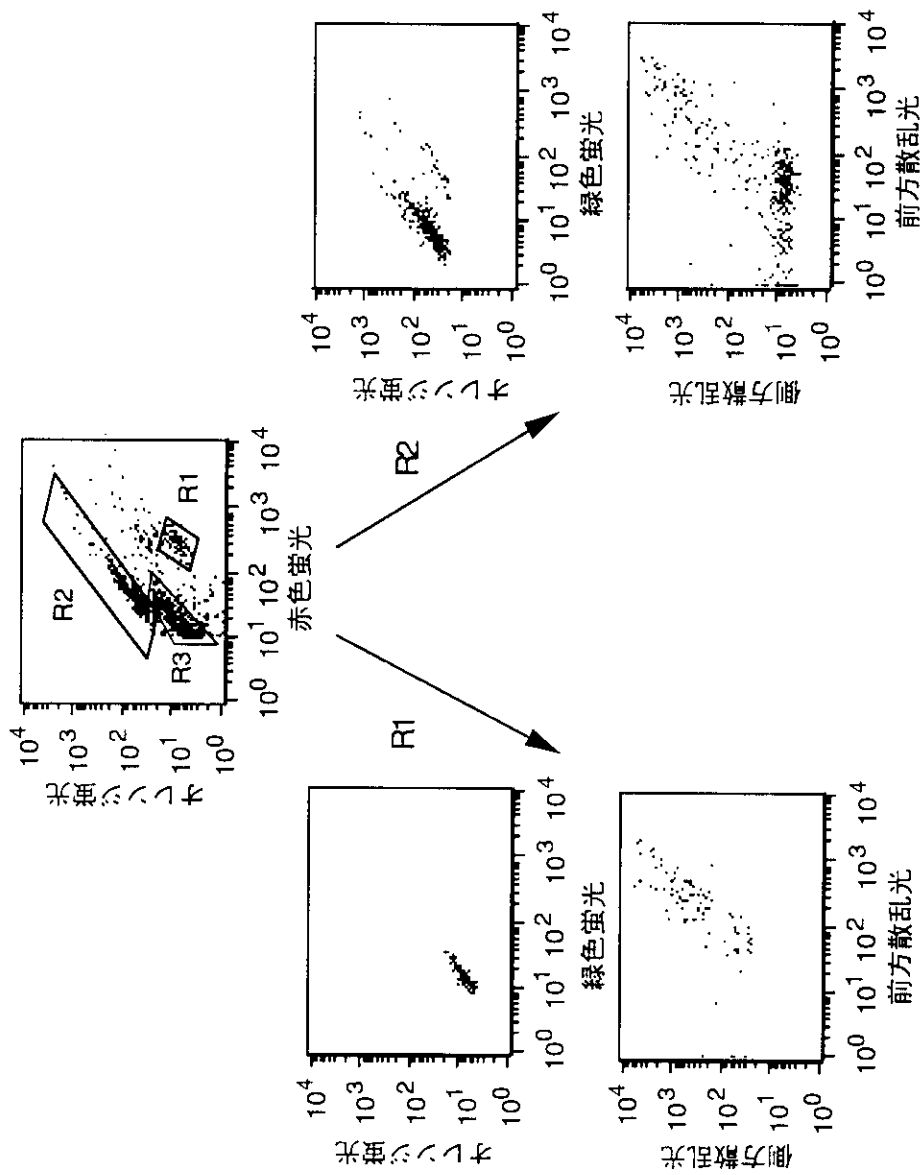


図9 フローサイトメトリーによる海水試料の解析：蛍光による分画と散乱光強度

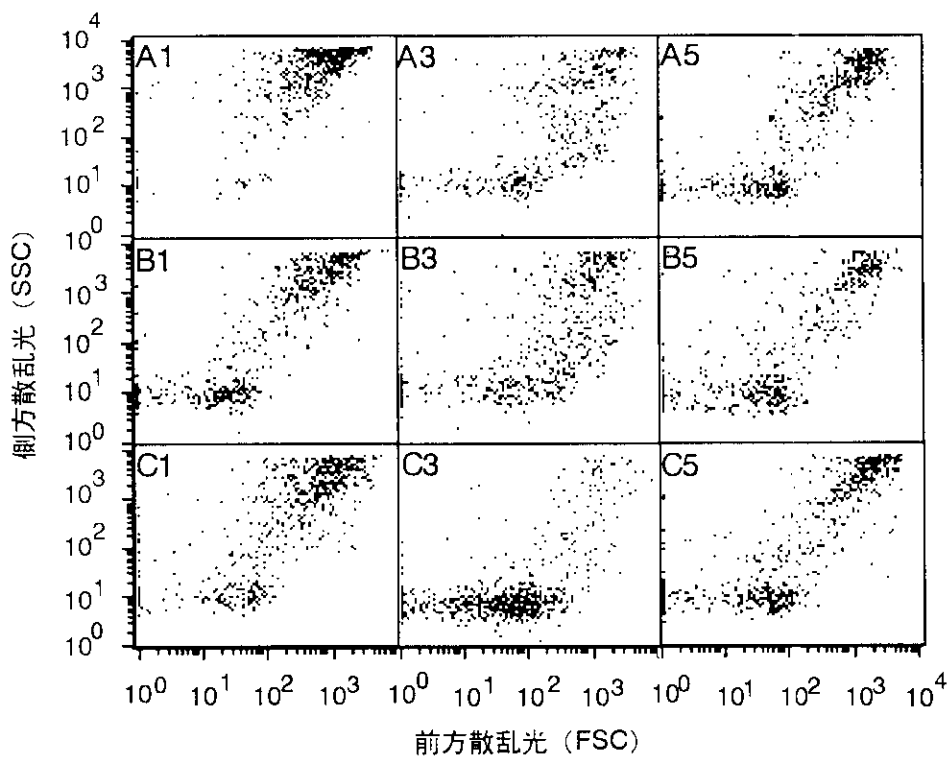
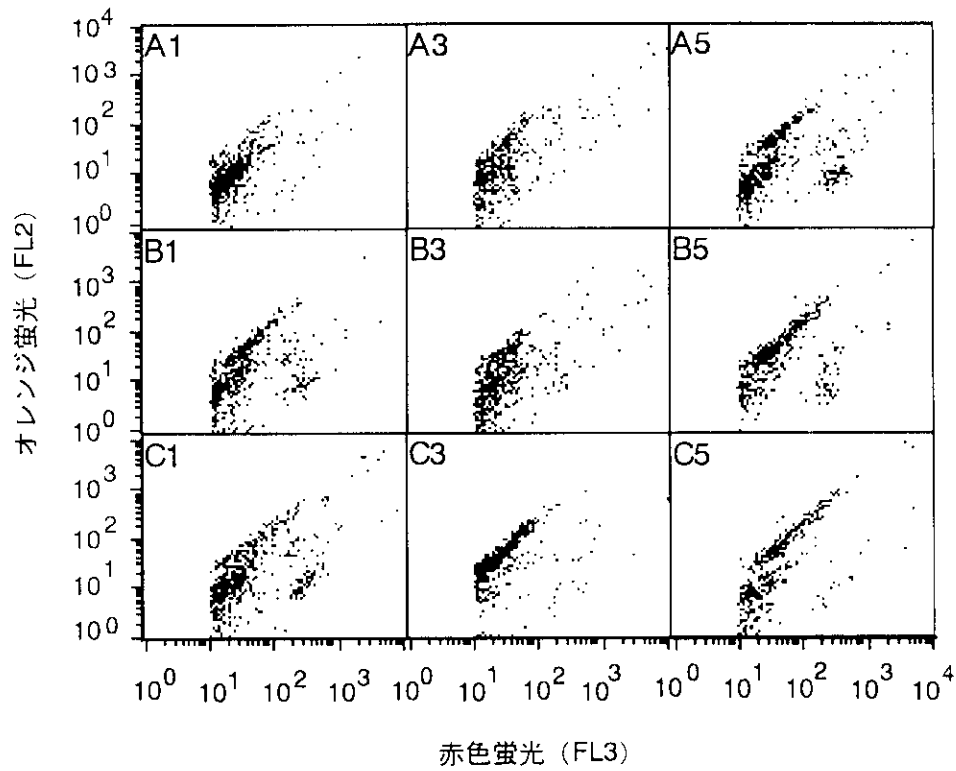


図10 フローサイトメトリーによる海水中の植物プランクトン多様性の解析 (I)

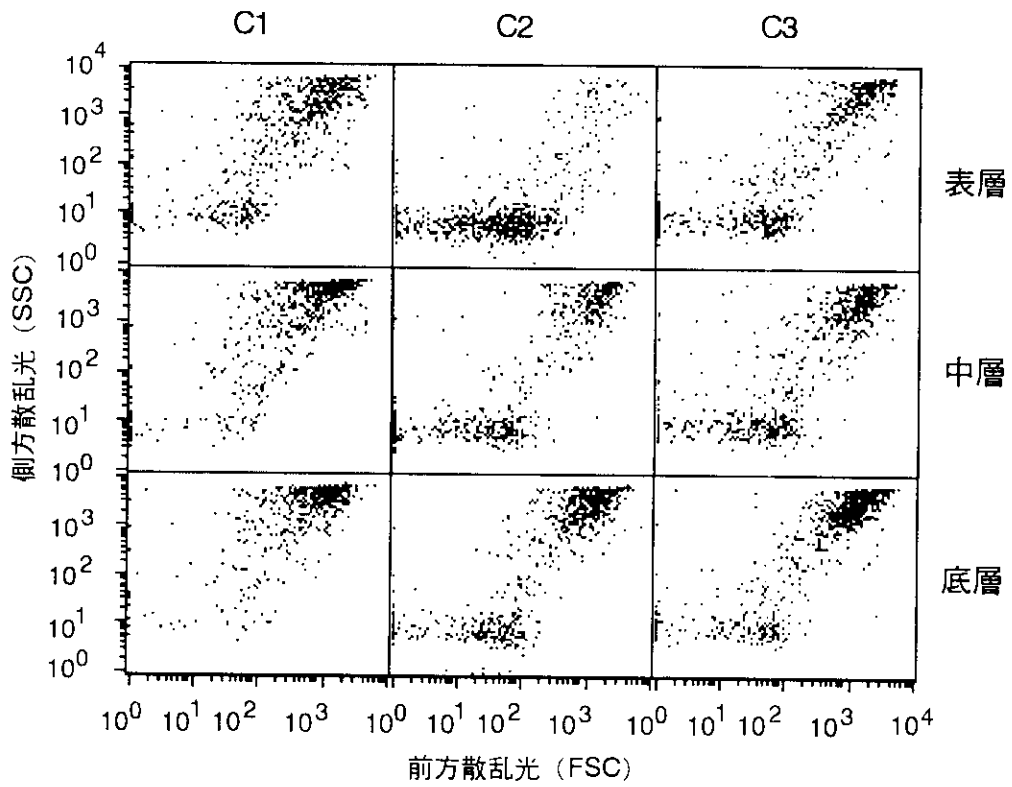
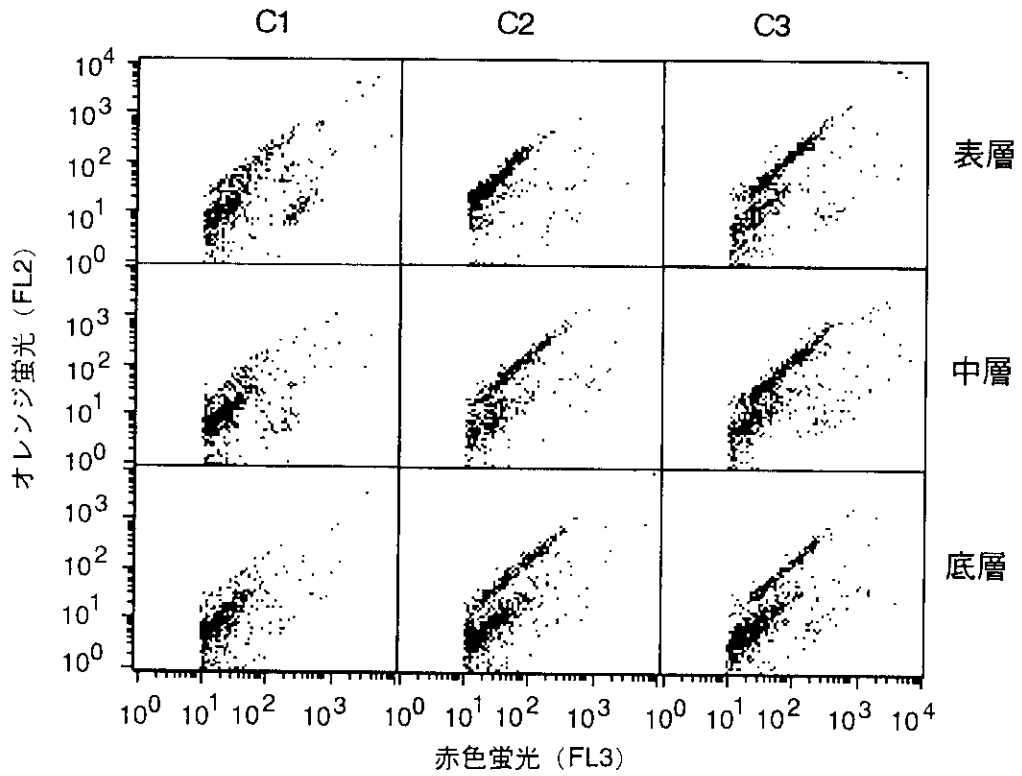


図11 フローサイトメトリーによる海水中の植物プランクトン多様性の解析 (II)

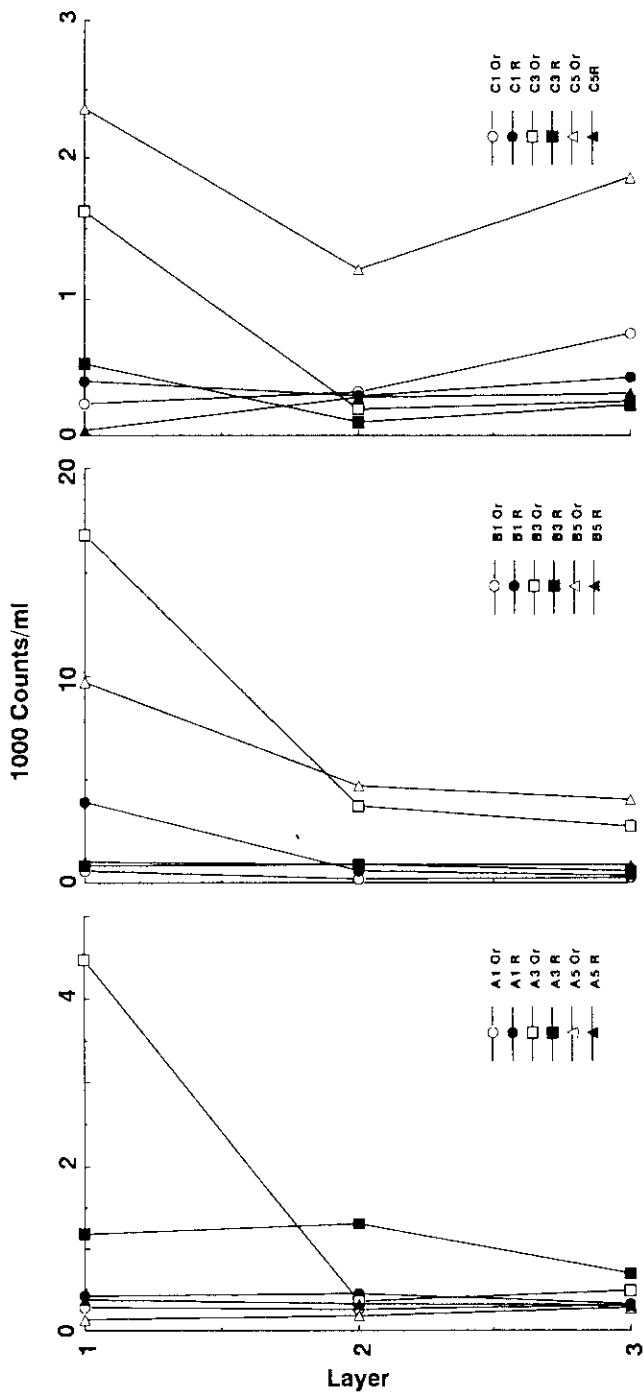


図12 ピコ植物プランクトンの分布。Or, シアノバクテリア; R, 真核細菌藻類