

平成 28 年度学生による地域フィールドワーク研究助成事業
研 究 成 果 報 告 書

- ・機関及び学部、学科等名：富山大学大学院理工学教育部生物圏環境科学専攻
- ・所属ゼミ：生物圏機能第 3 講座
- ・指導教員：酒徳 昭宏
- ・代表学生：青山 拓生
- ・参加学生

【研究題目】富山湾沿岸海水中の海藻分解菌の分布調査

—廃棄海藻の減容化とマリンバイオマスとしてとらえた

有効利用を目指した海藻分解菌のデータベースの構築—

1. 課題解決策の要約

近年、食品だけでなく、化粧品や医薬品など様々な産業で利用される過程で廃棄される海藻残渣が多量に発生している。その量は富山県内のコンブだけでも年間 10 t にものぼる。その一方で、沿岸域の富栄養化や海藻養殖域の拡大によって沿岸域に集積する漂着海藻も増加し、それらが腐敗し、悪臭の原因となる問題も増加しつつある。そのため、これら廃棄海藻の減容化とそれに伴って産生される副産物の有効活用を目指して、海藻分解菌やその分解酵素の特性についての研究が精力的に行われている。しかし、海水中におけるそのような海藻藻体自身や海藻に含まれる多糖類を分解できる菌の種類や分布、季節変動といった動態を詳細に調べた研究はこれまでに無く、海洋におけるそれらの役割は不明なままである。そこで本研究では、培養法と分子生物学的手法である変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いて、富山湾沿岸域に設けた 6 定点における表層海水中的海藻分解菌を検出することで、それらの種類や分布、季節変動を調べた。その結果、培養法では、富山湾の表層海水中より 7 属 (*Saccharophagus* sp.、*Microbulbifer* sp.、*Gilvimarinus* sp.、*Pseudoalteromonas* sp.、*Vibrio* sp.、*Tenacibaculum* sp.、*Photobacterium* sp.) の海藻分解菌が単離された。そしてこれらの分解菌が隣接する 2~3 か月で出現しては消失する季節的な変動をしていることが推察された。また、DGGE 法においては、*Zobellia* sp. や *Winogradskyella* sp.、*Cellulophaga* sp. など培養法では検出されなかった海藻分解菌もいくつか検出することができた。さらに、DGGE 法によって得られた海藻分解菌を統計学的手法であるクラスター解析と MDS 解析を用いて季節変動や地点ごとの類似性を解析した結果、富山湾沿岸の表層海水中に生息する海藻分解菌は緩やかに季節変動を行っており、地点による類似性が高いことが明らかになった。これらの結果から、富山湾の表層海水中に生息する海藻分解菌は、湾全体で均一であり、同調しながら緩やかに季節変動している可能性が示唆された。

本研究で得られたこれらの結果から、富山湾の表層海水中的海藻分解菌の生態系に関するデータは、廃棄海藻をマリンバイオマスとしてとらえた有効利用に関する研究だけでなく、海水中での海藻分解菌の役割を考察するうえで貴重な知見となると考えられた。

2. 調査研究の目的

現在、海藻は世界中で多量に収穫され（約 2,500 万 t）、食品や化粧品、医薬品などの様々な分野で広く利用されている。しかし、その一方で、それらの利用に伴って廃棄される海藻残渣や漂着海藻が大量に発生し問題となっている。また、集められた廃棄海藻は、そのほとんどが焼却処分されているのが現状である。そこで、それら廃棄海藻をマリンバイオマスとしてとらえた有効活用が期待が寄せられている。そのため、これら廃棄海藻の分解菌による減容化や、その分解産物であるオリゴ糖や単糖、単細胞体の有効活用を目指して、世界中で海藻分解菌が単離され、その特徴が調べられてきた。しかし、海水中に生息する海藻分解菌の種類や分布、群集構造の季節変動など、それらの動態を詳細に調査した研究はこれまでにない。そこで本研究では富山湾沿岸に 6 つの定点（氷見、新湊、四方、滑川、魚津、黒部）を設け、表層海水中に生息する海藻分解菌の分布を培養法と分子生物学的手法である DGGE 法を用いて調べることで、海藻分解菌のデータベースを構築することを目的とした。

3. 調査研究の内容

2016 年 1 月から 2016 年 12 月にかけて、富山湾沿岸の 6 地点（氷見、新湊、四方、滑川、魚津、黒部）の漁港で表層海水を採取し、ワカメ藻体を含んだ人工海水（ASW）培地を用いて培養することで海藻分解菌の単離を行った。単離した分解菌は、16S rDNA の部分塩基配列を決定し、BLAST 検索することでその種を同定した。また、培養法では検出できない細菌も網羅的に解析するために、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法を用いた、海藻分解菌の群集構造の調査も行った。DGGE によって得られた結果を、統計学的手法であるクラスター解析と MDS 解析を用いて解析することで、その季節変動や地点ごとの類似性を推定した。

4. 調査研究の成果

ASW 培地を用いた培養法により、富山湾の表層海水中から全 42 株の海藻分解菌を単離した。それらの菌種の同定を行った結果、富山湾の表層海水中には、*Saccharophagus* sp.、*Microbulbifer* sp.、*Gilvmarinus* sp.、*Pseudoalteromonas* sp.、*Vibrio* sp.、*Tenacibaculum* sp.、*Photobacterium* sp. の少なくとも 7 属の培養可能な海藻分解菌が生息していることがわかった（図 1）。そして、これらの分解菌が隣接する 2~3 か月で出現しては消失するといった季節的な変動をしていることが推察された。

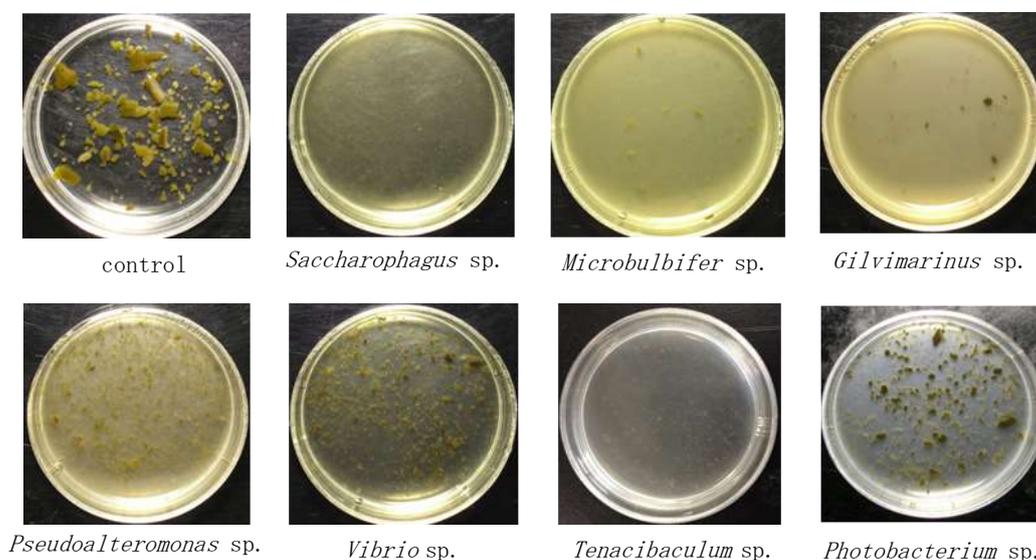


図 1. 富山湾より単離した海藻分解菌によるワカメの分解の様子。

菌を植菌していない control と比較し、菌を植菌した培地ではワカメの細粒化が確認された。

一方で、DGGE 法により、海水中に生息する全細菌の遺伝子を分離・検出することで培養不可能な海藻分解菌についても網羅的に検出した。まず、潮の満ち引きによる影響を調べるために、四方漁港において、同一日の 10 時、13 時、17 時にそれぞれ採水し、海藻分解菌を検出した。その結果、潮の満ち引きに関係なく、すべての試料中の海藻分解菌の群集構造は非常に類似していたことから、1 日の間では、それらはほとんど変化しないことが考えられた (図 2)。次に、群集構造に対する降雨の影響を調べるために、5 日間連続して海水を採水し、海藻分解菌を検出した。その結果、海藻分解菌の群集構造は降雨の影響もほとんど受けず、非常に類似していたことから、1 週間程度でもそれらはほとんど変化しないことが考えられた (図 3)。

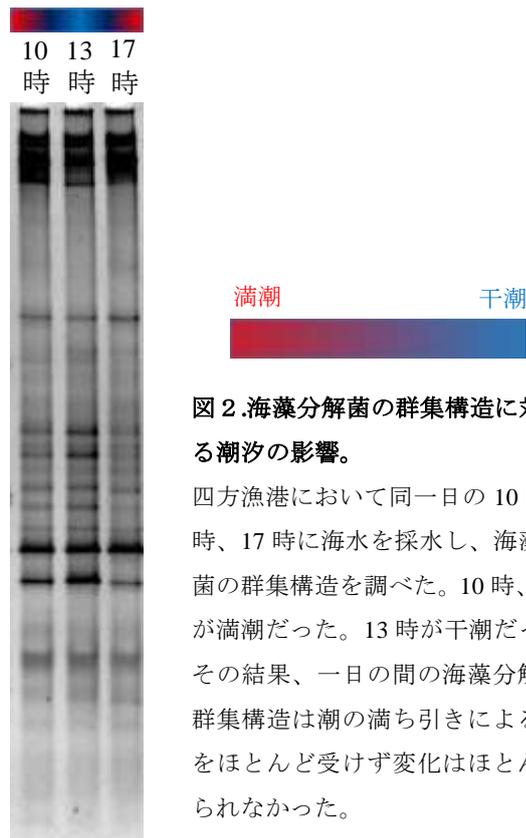


図 2.海藻分解菌の群集構造に対する潮汐の影響。

四方漁港において同一日の 10 時、13 時、17 時に海水を採水し、海藻分解菌の群集構造を調べた。10 時、17 時が満潮だった。13 時が干潮だった。その結果、一日の間の海藻分解菌の群集構造は潮の満ち引きによる影響をほとんど受けず変化はほとんど見られなかった。



図 3.海藻分解菌の群集構造に対する降雨の影響。

四方漁港で 5 日間連続して海水を採水し、海藻分解菌の群集構造を調べた。調査期間中の 2 日目と 3 日目に降雨がみられた。その結果、海藻分解菌の群集構造は降雨による影響はほとんど受けず、1 週間程度ではほとんど変化は見られなかった。

次に、季節変動を推定するために毎月海水を採水し、海藻分解菌の検出を試みた。その結果、隣接する 2~8 か月で共通する種 (赤四角) や、各月で特徴的に見られる種 (矢じり) が検出された (図 4)。また、いくつかの菌種を同定した結果、培養法では検出することができなかった *Zobellia* sp. や *Winogradskyella* sp.、*Cellulophaga* sp. など、これまでに海藻藻体や多糖類の分解菌として報告のある種が検出された。この DGGE をクラスター解析した結果、隣接した月でクラスターを形成したことから、富山湾表層海水中の海藻分解菌の群集構造は、緩やかに季節変動している可能性が示唆された (図 5)。さらに、富山湾に設けた 6 地点の 2016 年 4 月~12 月までの DGGE を MDS 解析した結果、各試料中の海藻分解菌は海水を採取した月ごとにまとまって分布する傾向を示したことから、富山湾の表層海水中の海藻分解菌の群集構造は、湾全体で均一で、同調しながら季節変動していることが示された (図 6)。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 月 月 月 月 月 月 月 月 月 月 月 月

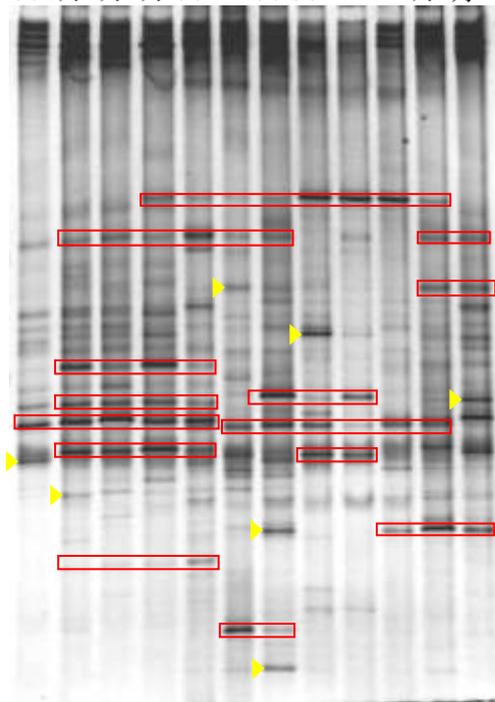


図 4. 2016 年 1 月～12 月の四方漁港の海藻分解菌の群集構造の DGGE。

隣接した月で共通してみられる種を四角で、各月に特徴的にみられるバンドを矢じりで示した。

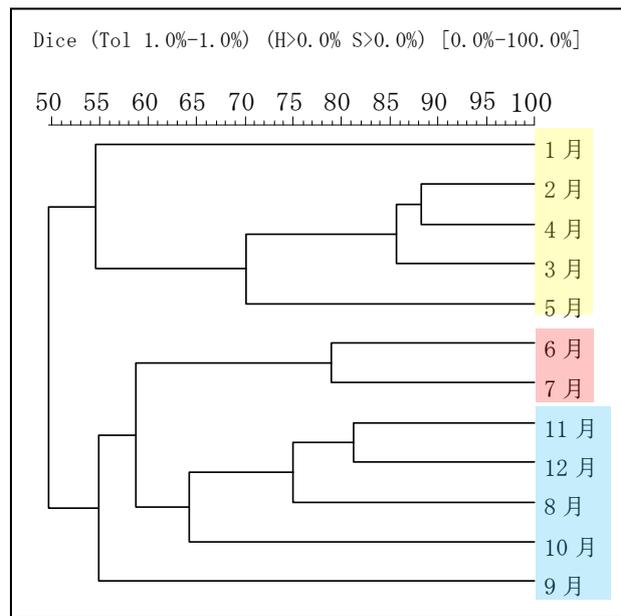


図 5. 2016 年 1 月～12 月の四方漁港の海藻分解菌の群集構造のクラスター解析。

その結果、隣接する月でクラスターを形成したことから季節変動が推察された。

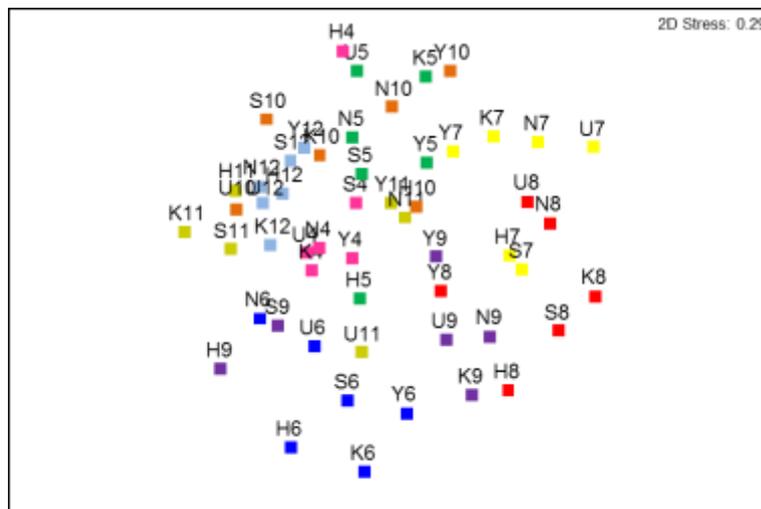


図 6. 2016 年 4 月～12 月の富山湾表層海水中の海藻分解菌の群集構造の MDS 解析。

採取した月別に色分けした。各アルファベットは採取地点、数字は採取月を示した。（H：氷見、S：新湊、Y：四方、N：滑川、U：魚津、K：黒部、数字：月）。その結果、富山湾の海藻分解菌の群集構造は湾全体で均一で、季節による影響を強く受けていると推察された。

5. 調査研究に基づく提言

本研究で、培養法と分子生物学的手法を用いて、海水中の海藻分解菌の分布について世界で初めて解析した。その結果、富山湾沿岸の表層海水中の海藻分解菌は、湾全体で均一で、同調しながら緩やかに季節変動していることが推察された。今回得られたデータは、廃棄海藻をマリンバイオマスとしてとらえた有効活用に関する研究だけでなく、海水中における海藻分解菌の役割を推定するうえでも貴重な基礎的知見となると考えられた。今後は、日本海固有水の海洋深層水や富山湾外の地点の海藻分解菌の群集構造などと比較を行い、より一層データベースの充実を目指していきたい。

6. 課題解決策の自己評価

今回の研究で、世界で初めて海藻分解菌の分布やその季節変動などについて知見が得ることができ、非常に評価できるものと考えられた。その一方で、海藻分解菌が季節変動をする要因や、それらの周年性などはいまだ明らかにできていない。今後、季節変動に伴う水温や塩分濃度などの変化と群集構造を統計学的処理を用いて解析することで、海藻分解菌の群集構造の変化の要因を明らかにできると考えている。また、海洋深層水や富山湾内と湾外の海藻分解菌の群集構造の比較や、次世代シーケンサーを用いて解析することで、より詳細な群集構造を把握することができ、海水中におけるそれらの役割を推定できると考えられた。