

長野県大町白馬小谷地域の温泉環境における微生物群集構造解析

○太田和希¹、胡桃澤歩未¹、西澤凧沙¹、西山未咲希¹、本堂遥也¹、佐藤友彦²、澤木祐輔²
吉田圭佑²、山本希²、森宙史³、黒川顕³、田中俊博¹

1. 長野県大町岳陽高校、2. 東京工業大学、3. 国立遺伝学研究所

Introduction

長野県北西部は、巨大な地溝帯であるフォッサマグナの西縁にあたり、地質学的に構造が複雑な地域です。私たちの高校は、糸魚川-静岡構造線上に位置し、東のフォッサマグナ側には主に新第三紀の堆積岩が、西の北アルプス側には主に白亜紀後期～古第三紀の花崗岩が分布しています。一方、白馬岳地域には飛騨外縁帯に属する蛇紋岩化した古生代の超塩基性岩体が分布しています。

本地域には、これら地質の違いに基づき熱源や成分が大きく異なる多数の温泉があります。私たちは、環境が異なるこれらの温泉に、どのような微生物が生息しているのか、それら微生物群集は温泉の違いでどのように異なるのか、微生物群集構造の違いを生じさせる原因は何なのか、を調べようと研究を開始しました。



本研究では、それら温泉と微生物群集との関係性を調査するために、温泉をサンプリングした後、温泉水中の微生物から丸ごと抽出したゲノムを対象として、系統マーカー遺伝子である16S rRNA遺伝子をターゲットとして群集構造を解析する、メタ16S解析手法により、温泉水中の微生物群集構造を明らかにすることを試みました。

Result 1

右写真が各温泉水サンプルの写真、下表が、各サンプルのメタデータになります。



	採取時間	源泉の様子	源泉の匂い	温度(°C)	pH
①蓮華温泉 黄金の湯	11時23分	木箱の中底に赤茶色の土	特になし	42.1	6.33
②蓮華温泉 仙気の湯	11時56分	硫黄が付着。緑色の付着物あり。	腐卵臭	82	2.7
③葛温泉 高瀬の湯	15時38分	コンクリートの隙間に、石灰のような付着物あり。	腐卵臭	78.9	8.17

	DO(溶存酸素量)	EC(電気伝導度)	ORP(酸化還元電位)	MiSeqのリード数(pairs) 1リードは300 bpの長さ
①蓮華温泉 黄金の湯	22	81	-15	2,562,462
②蓮華温泉 仙気の湯	N.D.	34.3	38	2,048,015
③葛温泉 高瀬の湯	0.13	103.8	-205	N.D. (DNAがうまく抽出できなかった)

Materials & Methods

①サンプル採取

- 3地点の温泉水をそれぞれ採取
- メタデータとして、温度、pH、溶存酸素濃度、酸化還元電位、電気伝導度を測定



3サンプルの温泉水

②DNA抽出

- 温泉水を濾過し微生物をフィルタリング
- 細胞破碎しDNAを取り出した
- PCR阻害物質を沈殿させ除去
- タンパク質・塩除去のためにアルコールバッファーで洗浄



2サンプルのDNA溶液

③PCR(16S rRNA遺伝子増幅)

- 反応液調整
DNA溶液, 342F-806Rプライマー, PCR用プレミックス試薬を混合
- PCR
(98°C 2分-98°C 10秒-55°C 30秒-72°C 1分)×30
- 電気泳動を行い不純物除去



精製16S rRNA遺伝子溶液

④シーケンシング

精製16S rRNA遺伝子溶液



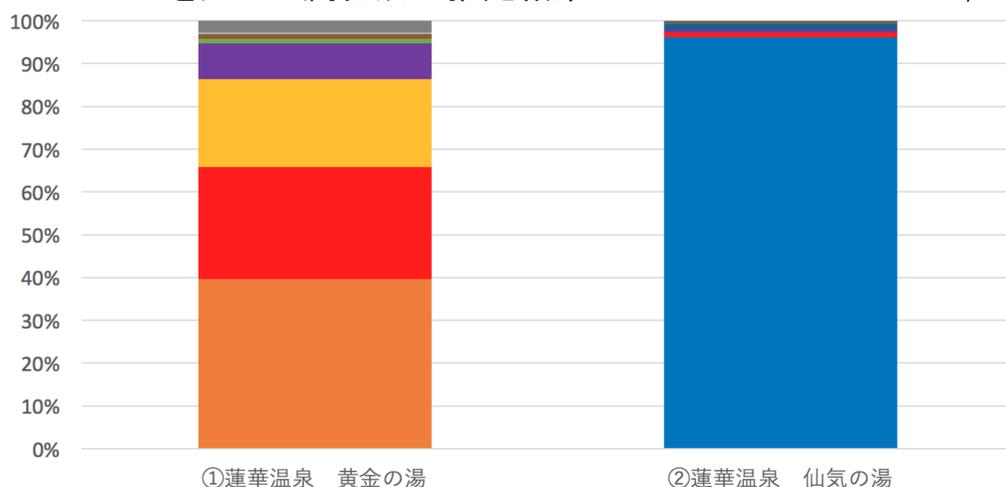
シーケンシング
(MiSeq 300 bp paired-end)



16S rRNA遺伝子配列

Result 2

VITCOMIC2を用いた属組成の推定結果 (VITCOMIC2の詳細については2P-53へ)



- Hydrogenobaculum (青)
- Propionivibrio (橙)
- Ralstonia (赤)
- Uliginosibacterium (黄)
- Sphingomonas (紫)
- Azoarcus (緑)
- Thermogymnomonas (黒)
- Methylococcus (茶)
- Caldisphaera (灰)
- Azovibrio (黄緑)
- Nitrospira (黒)
- Vulcanisaeta (黒)
- Bellilinea (青)
- Methylobacterium (茶)
- Derxia (黒)
- Others (黒)

MicrobeDB.jpのメタ16Sデータを用いた優占属の生息環境の推定

(公共データベース中のメタ16Sのデータを用いて、その属が優占しているサンプルを探した。詳しくは附設展示会の微生物統合データベースプロジェクトのブースへ)

- Hydrogenobaculum(青) 温泉・温泉堆積物等 (イエローストーン国立公園・万座温泉・箱根温泉など)
- Propionivibrio(橙) 地下水バイオフィーム・活性汚泥・シロアリ腸内等
- Ralstonia(赤) 土壌等
- Uliginosibacterium(黄) 土壌・湖水等
- Sphingomonas(紫) 土壌・河川水等

Discussion

- サンプル②は、イエローストーン国立公園・万座温泉・箱根温泉などの温泉に属組成が類似していることがわかりました。これらの地域は、安山岩・流紋岩・玄武岩等の火山岩から形成されており、蓮華温泉と同様に噴火などの火山活動によって形成されたという点で、共通しています。
- サンプル①は、優占している属が、一般的には土壌や淡水等、温泉とは異なる環境で多い属であることがわかりました。サンプル①は、水温が低くpHも中性に近いことから、周りの環境から微生物が混ざり込んでもある程度は生きていけるのではと考えられます。そのため、一般的な温泉水とは異なる属組成になった可能性があります。