

研究助成 平成20年度 報告書

財団法人 黒潮生物研究財団
理事長 深田 純子 殿

作成日のみ記入して下さい
作成日 平成21年 2月 18日
受領日 平成21年 2月 18日

貴財団の研究助成により、下記の成果を上げましたので報告いたします

助成者対象者氏名(ふりがな)	ケシャムルティ・シャジャンク
----------------	----------------

学生の方はこちらに記入してください

学校名		学部 学科 講座 等	
学 年		区 分	卒研・修研・博研・その他 ()
指導教官 氏 名	深見公雄	指導教官の所属・職	高知大学

一般の研究者の方はこちらに記入してください

所属	生物多様性研究中心中央研究院台湾	職名	博士後研究員
最終学歴	高知大学大学院黒潮圏海洋科学研究科	学位等	博士(学術)

研究課題名	粘液を介したサンゴと周辺海水中の細菌群集の相互作用
助成を受けた研究内容について、学会等での発表、学術誌等への公表を行った場合には、下欄にその内容(講演の場合:学会名、期日、タイトル、発表者名等、著作の場合:著者、発行年月、タイトル、雑誌名等)を記入して下さい	
第11回 日本サンゴ礁学会 ポスター発表 2008年11月23日~25日	

研究の内容(研究成果)報告書の作成要領

- ・研究成果をA4の用紙1枚にまとめて下さい。
- ・言語は日本語とします
- ・1行目に研究課題名、2行目に研究の実施者名(助成対象者名に○印をつける)を記入してください
- ・以下は図表、テキスト等、自由にレイアウトして結構です
- ・報告書は、一太郎2007、花子2007、MS-Word 2007、MS-Excel 2007、MS-PowerPoint 2007、Adobe-Photoshop CS2、Adobe-Illustrator CS2、Adobe-Acrobat 8.0で表示可能なファイル形式で作成してください
- ・特殊なフォントを使用される場合は、埋め込んで下さい
- ・成果報告書は当財団のホームページ等に公表しますので、著作権やデータの取り扱い等には十分ご注意下さい
- ・報告書(この紙と成果報告書の2枚)は、出力したものを郵送した上で、ファイルを電子メールまたはCD等の媒体に納めてお送り下さい
- ・電子メールでお送りの場合、添付ファイルのサイズは数100KB程度までにしてください

・提出期限は平成20年2月17日とする

粘液を介したサンゴと周辺海水中の細菌群集の相互作用

○ ケシャムルティ シャシャンク¹, 深見公雄¹, 向本康祐²

(1.高知大学大学院黒潮総合人間科学専攻, 2.高知大学農学部)

「本研究の目的」サンゴの周辺海中には高密度の細菌が分布しており、サンゴの主要な分泌物である粘液はこれら細菌類の重要な増殖基質となっていることが知られている。その一方で、ある種の細菌群に対しては抗菌作用を持ち、増殖抑制因子として機能していることが分かってきた。近年、細菌類によるサンゴの病気や白化が大きな問題となっており、サンゴとサンゴ礁の衰退原因の一つであると考えられている。しかしながらこれらの細菌類がどのように関与し、サンゴに病気をもたらすのか、またサンゴは細菌類に対して、どのような防御機構を働かせているのかについてはほとんど明らかになっていない。本研究ではサンゴの粘液に注目し、サンゴの健康状態によって粘液の化学組成がどのように変化するのか、またその変化が周辺海水中の一般細菌や白化や病気の原因となる細菌群に対してどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

「実験方法」高知県大月町西泊の黒潮生物研究所地先に生息する6種類のサンゴ; *Acropora muricata*, *A. hyacinthus*, *A. japonica*, *Pavona decussata*, *Goniastrea sp.* 及び *Favia sp.* を採集し、それぞれサンゴ組織と粘液から寒天培地を使って細菌を単利し、遺伝学的手法 (DNA, PCR) を用いて細菌群集組成を調べた。DNA キット NucleoSpin (日本ジェネティクス社製) を用い、プロトコールに従い DNA 抽出を行った。抽出物は速やかに -25°C で冷凍保存し、DNA 領域を増幅するために PCR 反応を行った。プライマーは細菌にユニバーサルな 341F-GC clamp および 534R を用いた。精製した PCR 産物の DNA 断片の塩基配列を決定するため、本研究ではダイターミネーター法を用いた。抽出した脱プライマー済みの PCR 産物を DNA テンプレートとしてサイクルシーケンシング PCR を行った。反応後、カラムをセットしたコレクションチューブに Sephadex G-50 Mix well 750µl 加えて、4600rpm で2分間遠心分離した。カラムをオートクレーブ滅菌した 1.5ml エッペンドルチューブに移し、上記に示した反応液 10µl を添加した。これを、4600rpm で2分間遠心分離し、1.5ml エッペンドルチューブに反応液を精製した。これを、DNA シーケンサー (ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer) を用いて分析した。決定した塩基配列について、遺伝子解析ソフト FinchTV を用いて塩基配列の編集を行った。BLAST を用いてデータベース中の他生物の塩基配列と比較することにより、近縁種の検討を行った。

「結果と今後の予定」今回の調査では、約 150 ほどの細菌コロニーが寒天培地上に検出されたが、その多くで、塩基配列を決定することができなかった。しかしながら、塩基配列を確認できたサンゴ粘液中の細菌類では、多くが *Vibrio sp.* *Pseudomonas sp.* 及び *Pseudoalteromonas sp.* であることが分かった。昨年行った同様の実験では、サンゴ粘液は細菌阻害物質や細菌増殖基質として働いているという結果を得ている (Table 1)。今後は、温度等のストレスの有無がサンゴの生理状態とサンゴ粘液の化学組成に与える影響、及び、サンゴ粘液が細菌類の増殖や群集組成に与える影響を引き続き調べていきたいと考えている。

Table 1. Coral mucus as suppressor or promoter of bacterial growth

	増殖が確認された細菌種	抑制が確認された細菌種
1	Uncultured proteobacterium isolate, S17	Uncultured bacterium clone RS.Muc.11
2	Uncultured alphaproteobacterium clone CD2A7	Uncultured alphaproteobacterium clone MPCa6_B05
3	Uncultured bacterium clone PDW-OTU8	Uncultured alphaproteobacterium clone HAL-SW-2
4	Uncultured alphabacterium clone pltb-RF-41	