

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82405

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16122

研究課題名(和文) 河川から高頻度に検出される浮遊細菌による新規リン循環プロセスの解明

研究課題名(英文) A new phosphorus cycle in river water by a polyphosphate-accumulating bacterioplankton group

研究代表者

渡邊 圭司 (Watanabe, Keiji)

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・主任

研究者番号：50575230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：河川から高頻度に検出され、細胞内にポリリン酸を蓄積する能力を有する浮遊細菌が、河川のリン循環においてどのような役割を担っているのかを解明するため、定期観測及び実験的解析からその寄与を推計した。

高感度検出法及び次世代シーケンサーを用いた菌叢解析では、ほぼ全ての河川水試料から一定の割合で検出されたことから、優占種であることが明らかとなった。蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた検出法による現存量推定、および純粋分離株を用いた培養実験による単位細胞当たりのリン酸態リンの取り込み量の測定から、この浮遊細菌が河川水中のリン酸態リンのおよそ0.6%の動態に寄与していると推計された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have analyzed a new phosphorus cycle in river water by a polyphosphate-accumulating bacterioplankton (IRD18C08 bacteria) which is belonged to a new taxon. This study has the following aims: (1) to estimate biomass of IRD18C08 bacteria by catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH), (2) to monitor phosphate-phosphorus concentration in river water, and (3) to estimate phosphate-phosphorus uptake per unit cell of IRD18C08 bacteria. These results reveal that the IRD18C08 bacteria may contribute to about 0.6% dynamics of phosphate-phosphorus cycle in river water.

研究分野：微生物生態

キーワード：リン循環 ポリリン酸蓄積細菌 浮遊細菌 河川

1. 研究開始当初の背景

浮遊細菌は、水の中で浮遊もしくは漂流し、固形物に付着しないで自由生活している細菌の総称である。また、水圏環境中において溶存有機物(汚濁物質)の主な分解者である。これら浮遊細菌(微生物)を介して行われる水圏の物質循環(微生物ループといわれる)は、近年その重要性が広く認識され、注目を集めている。しかしながら、河川の浮遊細菌群は、湖沼や海洋と比較すると、細菌の構成種に関する情報が極めて少なく、河川にどのような種が優占しているのか、またどのような種が普遍的に存在するかなど、未だ明らかになっていない。

研究代表者は、予備調査で埼玉県内の9つの河川を対象として、先行研究で開発した簡便かつ高感度な手法により浮遊細菌の検出を試みた。その結果、全ての河川からIRD18C08 クラスタに属する浮遊細菌(以下IRD18C08 細菌と略す)が検出され、得られた菌株の実に半数以上がIRD18C08 細菌の河川も見られた。IRD18C08 クラスタは、*Rhodocyclaceae* 科に属する未培養系統(分離・培養に成功していない)であり、アメリカの河川において細菌の遺伝子配列を基にした細菌叢解析で、その存在が初めて報告された。最近では、中国の太湖などからもIRD18C08 細菌に由来する遺伝子が検出されている。これらの既報および研究代表者の予備調査は、IRD18C08 細菌が河川における優占種の1つであり、河川の物質循環の中で何らかの重要な役割を担っている可能性が高いことを示唆するものであった。

一方で、IRD18C08 細菌は、16S rRNA 遺伝子配列を基にした分子系統分類によると、排水処理現場(高度処理)の活性汚泥中で生物学的リン除去を主に担っているグループであり、未培養系統群に属する“*Candidatus Accumulibacter phosphatis*”に近縁であった。そこで、予備調査で得られたIRD18C08 細菌の純粋分離株を用いて、リンの取り込み実験を行ったところ、蛍光顕微鏡観察において、細胞内にポリリン酸顆粒の蓄積が確認された。これまで、河川の浮遊細菌の細胞内でリンが高濃度で蓄積される現象は報告が無い。これらの現象は、IRD18C08 細菌を介したこれまで存在が全く知られていないリンの循環経路が、河川水中に存在していることを示唆していた。

2. 研究の目的

リンは、停滞性河川や湖沼の富栄養化(水質汚濁)を引き起こす重要な原因物質であり、その水圏環境中での動態の解明は重要な課題である。研究代表者は、IRD18C08 細菌が河川から高頻度に検出されること、また、それらは細胞内に高濃度にリンを蓄積する能力を有することを明らかにしている。本研究では、河川において、この浮遊細菌が、普遍的に存在しているのか、またその現存量は

どのくらいか、どのような生理学および遺伝学的特性を有しているのか、高濃度にリンを蓄積する能力はどのような機構で制御されているのか、それらは河川のリンの循環にどのように寄与しているのか、について明らかにし、浮遊細菌を介した新規リン循環プロセスを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

埼玉県内の10河川、15地点で、表層水をバケツ採水し、高感度培養法による培養可能な浮遊細菌の種組成解析及び培養を介さない細菌の16S rDNAを対象とした次世代シーケンス・アンプリコン解析を実施する。各試料について、溶存有機炭素濃度、硝酸濃度、亜硝酸濃度、アンモニア濃度、リン酸濃度、クロロフィル *a* 濃度及び、採水地点の水温、流量、流速、pH、電気伝導度、溶存酸素濃度などの環境パラメーターの測定もあわせて行う。

高感度培養法で得られたIRD18C08 細菌株の16S rRNA 遺伝子配列データを基に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計する。プローブ濃度、ホルムアミド濃度等の最適検出条件を検討し、IRD18C08 細菌の蛍光検出(CARD-FISH 法)を試みる。埼玉県内河川の5地点で、1年間毎月表層水の採水を行い、最適化を行ったCARD-FISH 法でIRD18C08 細菌の現存量解析を行う。

IRD18C08 細菌の培養実験を行い、DAPI 染色法による培養液中の細菌数の計測及びイオンクロマトグラフによる培地中のリン酸態リン濃度の減少(取り込み量)を調べ、単位細胞当たりのリン酸態リンの取り込み量を求める。

河川水中のIRD18C08 細菌の現存量、リン酸態リン濃度及び単位細胞当たりのリン酸態リンの取り込み量から、IRD18C08 細菌が河川リン循環への程度寄与しているのかを推計する。

IRD18C08 細菌の純粋分離株について、新属・新種提案を行うため、遺伝子系統分類、ゲノム解析、生理性状分析、キノン分析、脂肪酸分析、炭素源資化性試験等を行う。

4. 研究成果

(1) 培養を基にした高感度検出法で検出される河川浮遊細菌の種組成解析

埼玉県内の10河川、15地点、23サンプルから、合計413株の浮遊細菌を分離した。その83.5%は、Betaproteobacteria 綱に属していた(図1)。そのうちIRD18C08 細菌は164株得られ、培養法で検出された浮遊細菌の39.7%を占めており、最も多く得られた系統群であった。2番目に多く検出された系統群は、Betaproteobacteria 綱に属するPnecC 細菌であり、116株が得られた。培養法により得られたその他の浮遊細菌は、同じくBetaproteobacteria 綱に属するPnecD 細菌、GKS98 細菌、*Limnohabitans* 属細菌及びLiUU-5-340 細菌、

Actinobacteria 門に属する Luna-1 細菌及び Luna-2 細菌、Bacteroidetes 門に属する *Flavobacterium* 属細菌及び *Sediminibacterium* 属細菌などであった。IRD18C08 細菌以外の浮遊細菌については、湖沼などでも遺伝子を対象とした菌叢解析で高頻度に検出されるものであった。

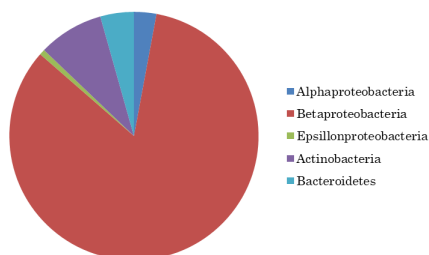


図1. 培養法で得られた浮遊細菌 413 株の門及び綱レベルの分類。Betaproteobacteria 綱に属する細菌が大部分を占めていた。

(2) 次世代シーケンシングによる細菌叢解析

埼玉県内の 8 河川、11 地点の表層水 15 サンプルについて過を行き、ポリカードネットフィルター上に捕集した細菌から市販のキットを用いて DNA を抽出し、次世代シーケンシングによる細菌叢解析を行った。Proteobacteria 門及び Bacteroidetes 門に属する細菌が全リード数の 80%以上を占めていた。97%以上の 16S rRNA 遺伝子配列 (V1 領域) の相同性を基に、OTU 解析と呼ばれる便宜上の系統分類を実施したところ、リード数の多かった上位 10 の OTU の中に IRD18C08 細菌と相同性を示す OUT が含まれていた。最もリード数の多かった OUT は、*Flavobacterium* 属細菌に近縁であり、IRD18C08 細菌に近縁な OUT は 2 番目に多いリード数であった。その他の上位 10 の OUT の中には、PncC 細菌、*Limnohabitans* 属細菌及び Luna-1 細菌に近縁な OUT が含まれた。これらの細菌については、高感度培養法でも検出された共通の細菌群であった。

以上の高感度培養法による解析及び次世代シーケンス・アンプリコン解析の結果は、IRD18C08 細菌が河川にける優占種の 1 つであり、普遍的に存在していることを強く支持するものであった。

(3)CARD-FISH 法による河川水中の IRD18C08 細菌の現存量解析

IRD18C08 細菌に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いた CARD-FISH 法で、埼玉県内の 5 河川、5 地点で IRD18C08 細菌の菌数モニタリングを 1 年間行った (図 2)。その結果、IRD18C08 細菌が平均で 5.4×10^5 cells/mL の数で河川水中に存在していることが明らかとなった。また、春季には、IRD18C08 細菌の菌数が高くなる傾向が示された。しかしながら、IRD18C08 細菌の菌数の増減を支

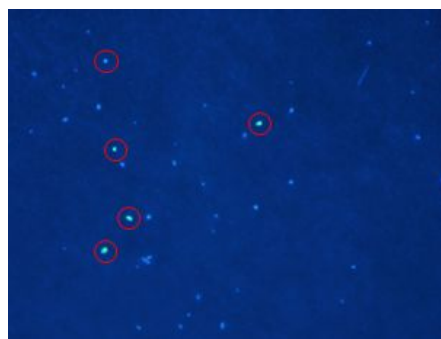


図2. CARD-FISH 法による河川水中からの IRD18C08 細菌の検出。赤丸の緑色粒子が IRD18C08 細菌で薄青色粒子がその他の浮遊細菌を示している。

配する環境因子については、本研究の中では明確にならなかった。

(4) IRD18C08 細菌の単位細胞当たりのリンの取り込み量の測定

IRD18C08 細菌の純粹分離株を培養し、培養液中の細菌数測定及び培地中のリン酸態リンの濃度減少から、単位細胞当たりのリンの取り込み量を計算した。その結果、IRD18C08 細菌は、平均で 1 細胞当たり約 1.8fg のリン酸態リンを取り込むことが示された。

(5) IRD18C08 細菌の河川リン循環への寄与

河川水中の IRD18C08 細菌の現存量、リン酸態リンの平均濃度及び 1 細胞当たりのリン酸態リンの取り込み量を求めた結果より、埼玉県内河川では、IRD18C08 細菌が河川水中のリン酸態リンのおよそ 0.6%の動態に寄与していると推計された。

これまで、河川において浮遊細菌を介したリンの循環プロセスは全く知られておらず、本研究により、ポリリン酸蓄積細菌である IRD18C08 細菌を介した河川のリンの循環の一端を初めて明らかにすることが出来た。

(6) IRD18C08 細菌の遺伝子系統分類、ゲノム解析、生理・生化学性状分析、化学分類

本研究では、IRD18C08 細菌の新属・新種提案を行うため、菌の諸特性について解析を行った。16S rRNA 遺伝子を基にした系統分類では、IRD18C08 細菌が既存の属とは異なり独立した位置にグループを形成することが示された。PacBio RS II (Pacific Bioscience 社) によるゲノム解析の結果、ゲノムサイズは 2.29Mbp であり、そのゲノム上にポリリン酸の合成に関わる酵素タンパク質をコードする遺伝子である *ppk* (polyphosphate kinase) を有することが明らかとなった。グラム陰性桿菌で、生育可能温度は 15 ~ 30、生育可能 pH は 6.0 ~ 10.0、耐塩性は示さず、細胞長は 0.8 ~ 1.0µm、幅は 0.6 ~ 0.8µm と小型の細菌であった (図 3)。主なキノン成分は Q8 であり、主な脂肪酸は、16:1 w7c/16:1 w6c 及び 16:0 であった。炭素源資化性試験の結果、IRD18C08

細菌は主に有機酸を炭素源として利用することが明らかとなった。窒素源としては、硝酸塩を利用することができた。有機酸及び硝酸塩は、河川水中から検出される物質であることから、IRD18C08 細菌は河川環境に適した細菌であることが示唆された。現在、近縁種のゲノム解析も進めており、これらのデータを基にIRD18C08 細菌の新属・新種提案を行う予定である。

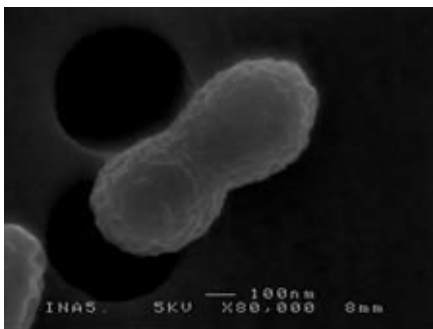


図3 . IRD18C08 細菌の走査型電子顕微鏡写真。白色のバーは 100nm を示し、細胞のサイズは非常に小さい。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Watanabe K, Ishii Y, Komatsu N, Kitamura T, Watanabe M, Yamamura S, Imai A, Hayashi S: Growth rates and tolerance to low water temperatures of freshwater bacterioplankton strains: ecological insights from shallow hypereutrophic lakes in Japan, *Hydrobiologia*, Vol. 792, pp. 67-81 (2017) doi: 10.1007/s10750-016-3045-7 (査読有)

[学会発表](計3件)

渡邊 圭司、池田 和弘、柿本 貴志、見島伊織、高橋 基之 埼玉県内河川を対象とした培養法で検出される浮遊細菌の特徴、2015年10月18日、土浦亀城プラザ(茨城県・土浦市)

渡邊 圭司、池田 和弘、柿本 貴志、見島伊織、高橋 基之 培養株から見えてくる淡水圏の浮遊細菌の特徴とその生態、2016年10月23日、横須賀市文化会館(神奈川県・横須賀市)

渡邊 圭司、須田 互、池田 和弘、柿本 貴志、河川から高頻度に検出されるポリリン酸蓄積細菌の特徴、2017年8月30日、東北大学(宮城県・仙台市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 圭司 (WATANABE, Keiji)

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当
研究者番号：50575230

(2)研究協力者

須田 互 (SUDA, Wataru)