

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K18000

研究課題名(和文)環境中の細菌捕食性原生生物群集の増殖特性定量法の開発と実証

研究課題名(英文)Development and demonstration of quantification method for bacterivorous character of in situ protistan community

研究代表者

片岡 剛文(Kataoka, Takafumi)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：10533482

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):細菌から原生生物への有機物輸送過程を見積もるために、細菌捕食性原生生物を単離し、増殖速度および最適増殖温度、疑似餌としての蛍光ビーズの捕食速度を比較した。3種の原生生物のビーズ捕食速度は2.4～13.5 beads/cell/hの幅で6倍程度異なった。また、細胞分裂に伴い合成されるDNAをBrdUで標識して計測したところ、チミンの7～15%(核酸のうち2～3%)がBrdUに置き換わっていた。一方で、BrdUを取り込まない細菌株もあった。BrdUで核酸を標識した細菌を餌として原生生物へ転化したBrdUを検出する場合、BrdU含有率と取り込みの有無が種によって異なることを考慮する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な細菌捕食性原生生物と10種類の異なる種類の従属栄養細菌の単離株が得られたことは、環境中の有機物輸送過程を見積もるための室内実験を行うための最適な材料であり貴重な成果である。また、生物種によって最適な餌粒子サイズが異なる発見は、原生生物による細菌捕食が粒子サイズに関係していることを示しており、環境中での有機物輸送の効率を見積もる上で貴重な成果が得られたと言える。新たに合成される核酸をBrdUにより標識する技術を応用し、それらを定量することで、細菌の種類により2倍程度も標識効率が異なることを示した。細菌の種類によってBrdUの利用可能性が異なることを示すことができた。

研究成果の概要(英文):In order to estimate the transport process of organic material from heterotrophic bacteria to bacterivorous protists (BVP), three BVPs were obtained from natural seawater and parameters for bacterivory were determined. The incorporation rates of fluorescent beads were ranged from 2.4 to 13.5 beads/cell/h among three different taxa. On the other hand, incorporation of thymidine analog, BrdU, was compared among three bacterial isolates and showed that 7～15% of thymine was replaced by BrdU although one bacterium isolate could not incorporate BrdU. Thus, it is necessary to consider the inability of BrdU incorporation in some bacteria taxa when estimating bacterial growth using BrdU.

研究分野：水圏微生物生態学

キーワード：水圏微生物生態学 BrdU 核酸標識 細菌捕食性原生生物 従属栄養原核生物 微生物ループ

## 1. 研究開始当初の背景

水圏生態系において、現存量が高い微生物（原核生物および原生生物）の増殖に関する情報は水圏物質循環を考える上で極めて重要である。これまでに、原核生物の増殖速度は、DOM を微生物ループに取り込む過程として重要視され、特に DNA を構成するチミン塩基の前駆体であるチミジンの放射性同位体（トリチウム-チミジン： $^3\text{H-TdR}$ ）の取り込み速度は、分裂速度を計測する高感度な手法として広く用いられてきた。一方、原生生物は多様である上に生活史が複雑なため、増殖過程の把握が難しく、環境中の原生生物の増殖に関する知見は殆どない。これまでの研究では、培養可能な一部の原生生物を用いて細菌粒子に見立てた蛍光ビーズや蛍光標識した細菌の捕食速度を算出することで推定されてきた。しかし、これらの値は、細菌の減少過程を計測しており、原生生物の増殖が考慮されていないため原核生物から原生生物への有機物輸送を表す値とは異なる。捕食により細菌から原生生物へ輸送される物質を定量することができれば、有機物輸送を定量化する新しい手法となると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

チミジンの臭素置換体である BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) は、細胞分裂に伴い新たに合成された DNA を標識する分子として細胞生理学分野で広く使用されており、 $^3\text{H-TdR}$  の非放射性代替物質として、環境中で増殖する細菌の DNA 標識に応用されている。本研究では、(1)培養法に依存せずに細菌捕食性原生生物の種組成を網羅的に検出する手法を開発するとともに、(2)培養実験により捕食した細菌数と原生生物の増殖速度の関係を定式化することで、(3)環境中の細菌捕食性原生生物の増殖速度を推定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 細菌捕食性原生生物および従属栄養細菌の単離株の取得

海水試料に有機物源となる酵母抽出液を添加し、現場水温に近い温度下で1週間培養した。培養期間中に増殖が認められた原生生物を毛細管により選抜して新たな培地へ移し替えた。この作業を繰り返すことで、原生生物の単離株を得た。また、海水試料を、含酵母抽出液の人工海水寒天培地に塗布し、得られた細菌のコロニーを選抜することで細菌の単離株を得た。

### 単離株の分子同定および形態計測

単離株のゲノム DNA を FastDNA spin kit により抽出し、PCR 法で原生生物は 18S rRNA 遺伝子、原核生物は 16S rRNA 遺伝子の全長を増幅した。PCR 産物はサンガー法により塩基配列を決定し、データベース (Genbank) に登録されている塩基配列と比較することで同定した。原核生物の培養をグルタルアルデヒドで固定し(最終濃度 2%)、SYBR-gold で染色(最終希釈 1/10000)した後に蛍光顕微鏡下で観察した。細胞サイズはソフトウェア

ア ImageJ を使用して計測した。

### 原生生物による蛍光ビーズ捕食速度

プラスチックフラスコ（50 mL 容量）で培養し、対数増殖期となった原生生物を遠心分離により約 10 倍の濃度になるように濃縮した。共培養されている細菌の細胞密度の約 10 倍の濃度になるように、蛍光ビーズ（ビーズ直径は、0.1  $\mu\text{m}$ , 0.5  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$ ）を添加して一定時間培養した後、培養液と等量の、緩衝液（Tris-HCl pH=7.2）を含むグルタルアルデヒド（4%）の混合液を加えることで、穏やかに固定した。蛍光顕微鏡下で観察し、蛍光ビーズを細胞内に含む原生生物を計数することで蛍光ビーズ捕食速度を算出した。

### 原核生物のゲノム DNA に取り込まれる BrdU 量の定量

単離した原核生物株 3 種を選定し、酵母抽出液（1000 ppm）を含む人工海水中で培養した。対数増殖期中期に BrdU を添加し（最終濃度 20  $\mu\text{M}$ ）、定常期初期の細胞を遠心分離により回収した。Lyszyme と Protainase K を併用した酵素法によりゲノム DNA を溶出し、RNase A を添加して RNA を除去した。さらに、フェノールクロロフォルム/クロロフォルムイソアミルアルコール法によりタンパク質を取り除き、イソプロピルアルコールを用いたアルコール沈殿法により gDNA を凝縮しペレットとした。gDNA のペレットを DNA 分解緩衝液（40 mM Na-acetate, 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub>）に溶解し、100°C で 5 分間静置後に急冷して変性した。Nuclease P1（ヤマサ醤油株式会社）により 5'-mononucleotides (dNMP)へ分解した。続いて、Bacteria Alkaline Phosphatase (Takara)により、リン酸基を除去してヌクレオシド (dN) 溶液を作成した。

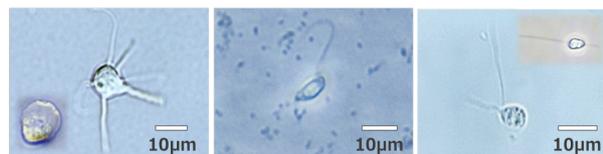
リン酸緩衝液（10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>）を溶離液として HPLC によりヌクレオシドを分離した。濃度が既知の各ヌクレオシド溶液で検量線を作成して定量した。

## 4. 研究成果

### 細菌捕食性原生生物および従属栄養細菌の単離株の取得

海水湖である日向湖の水深 10m および 34m から 2 種類、水月湖の水深 34.5m から 1 種類の原生生物単離株を得た (Fig. 1)。それぞれの 18S rRNA 遺伝子配列は、Becosoecida 科、*Vannella* 属、*Neobodo* 属に近縁であった。若狭湾から従属栄養細菌 10 種類の単離株を得た (Table 1)。全てが Proteobacteria に属する Alphaproteobacteria と Gammaproteobacteria であった。

細胞サイズと世代時間は、 $2.8 \pm 0.1 - 17.5 \pm 3.1$  (h)の範囲であった (Table 2)。広い分類群の細菌捕食性原生生物と増殖速度が異なる複数の従属栄養細菌の単離株が得られたことは、室内培養実験において細菌捕食に関する検証実験を行う材料が得られたという点で貴重な成果である。



SG	Amoebozoa	Stramenopile	Stramenopile
Genus	<i>Vannella</i>	<i>Neobodo</i>	<i>Becosoecida</i>
由来	日向湖(34m)	水月湖(34.5m)	日向湖(10m)
長径( $\mu\text{m}$ )	$12.5 \pm 2.5$	$5.0 \pm 1.0$	$6.0 \pm 1.0$
短径( $\mu\text{m}$ )	$10.0 \pm 2.0$	$4.0 \pm 1.0$	$4.0 \pm 1.0$

Fig. 1 細菌捕食性原生生物の光学顕微鏡像と 18S rRNA 遺伝子配列による近縁配列の分類および細胞サイズ。

Table 2. 細菌単離株の細胞サイズと世代時間。細胞サイズは 100 細胞以上を計測した。世代時間は 20°C 下で 50mL 容量の好気培養中の吸光値 (OD600) を計測することで導出した (n=3)。

株名	Cell size		Growth index
	Average ± SD	Minor	Average ± SD
	Major (μm)	(μm)	Generation time (h)
WB01	1.59 ± 0.29	1.08 ± 0.14	3.3 ± 0.6
WB02	1.76 ± 0.28	0.85 ± 0.15	17.8 ± 1.1
WB03	1.82 ± 0.45	0.49 ± 0.08	17.5 ± 3.1
WB04	3.1 ± 0.65	1.03 ± 0.16	7.8 ± 0.6
WB05	1.59 ± 0.31	0.52 ± 0.09	7.3 ± 1.4
WB06	2.43 ± 0.67	0.94 ± 0.17	10.2 ± 0.6
WB07	2.1 ± 0.24	0.76 ± 0.16	2.8 ± 0.1
WB08	2.29 ± 0.54	0.81 ± 0.13	3.5 ± 0.3
WB09	1.98 ± 0.5	0.75 ± 0.12	3.4 ± 0.6
WB10	3.02 ± 0.51	0.99 ± 0.14	10.2 ± 0.5
WB11	2.22 ± 0.4	0.99 ± 0.12	7.5 ± 0.8

Table 1 若狭湾から単離培養した細菌の 16S rRAN 遺伝子配列とデータベース (nr) 中の配列との相同性。γ, α は Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria を示す。

ID2	Closest relatives' information			Identity (%)
	Subclass	strain		
WB01	γ	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain Nsub1		98.5
WB02	γ	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain EH49		97.7
WB03	α	<i>Stakelama</i> sp. strain P-2		96.5
WB04	α	<i>Tistrella mobilis</i> strain 2PR56-11		99.9
WB05	α	<i>Erythrobacter</i> sp. JL893		100
WB06	γ	<i>Alteromonas</i> sp. A-1		100
WB07	α	<i>Sulfitobacter</i> sp. KS8-4		99.2
WB08	γ	<i>Vibrio splendidus</i> strain 1		99.6
WB09	γ	<i>Vibrio splendidus</i> strain 6-2		99.1
WB10	α	<i>Leisingera aquimarina</i> strain DC13		100
WB11	α	<i>Pseudophaeobacter leonis</i> strain 306		99.6

### 原生生物による蛍光ビーズ捕食速度

3 種類の原生生物に対して、粒子直径が異なる 3 種類の蛍光ビーズを添加して、その捕食速度を計測したところ、いずれの原生生物も 0.1 μm の蛍光ビーズは捕食しなかった (Fig. 2)。また、1.0 μm の蛍光ビーズに対して 0.5 μm の蛍光ビーズの捕食速度が高く、広い分類群において餌のサイズは餌選択における重要な要素であることが確認された。

また、0.5 μm の蛍光ビーズの捕食速度は *Vannella* sp., *Neobodo* sp., *Becosoecida* sp. の順に速く、種類によって捕食速度が異なることが示唆された。

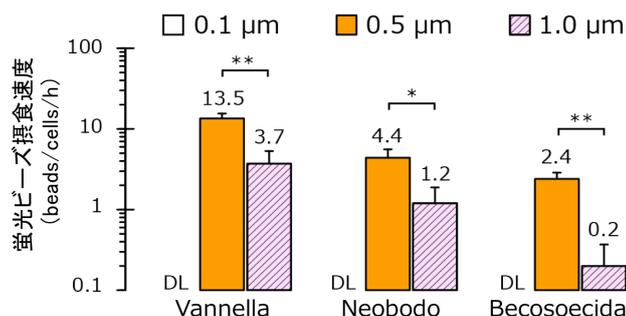


Fig. 2 原生生物単離株による蛍光ビーズ捕食速度 (n=3)。蛍光ビーズの直径は 0.1, 0.5, 1.0 μm を使用した。\*と\*\*は有意水準 p<0.5 と p<0.01 をそれぞれ示す。DL は検出限界以下を示す。

### 細菌の BrdU 取り込み量の計測

原核生物株の内、増殖速度が速い 3 株 (WB6: *Alteromonas* sp., WB9: *Vibrio* sp., TKB3: *Nautella* sp.) について、BrdU (最終濃度 20 μM) を添加して培養し、gDNA に取り込まれた BrdU 量を計測した (Fig. 3)。BrdU 添加区では、gDNA 含有量が高く、非添加対象区では見られないクロマトグラムピークが多数検出されたことから、細胞応答に起因する核酸類似物質の混入が考えられた。各株のヌクレオシド総量に対する BrdU の割合を算出したところ、*Alteromonas* sp. と *Nautella* sp. では全塩基のうち、2% と 3% の gDNA が BrdU と置き換わっていた。一方で、*Vibrio* sp. は 0.28% とほとんど取り込まれず、培養液中の BrdU も検出されなかった。つまり、*Vibrio* sp. は BrdU を分解し DNA 合成以外の基質と

して利用した可能性があると考えられた。培養株の種類により取り込み量が異なることと、BrdU を核酸の前駆体として利用しない原核生物が存在することが示された。

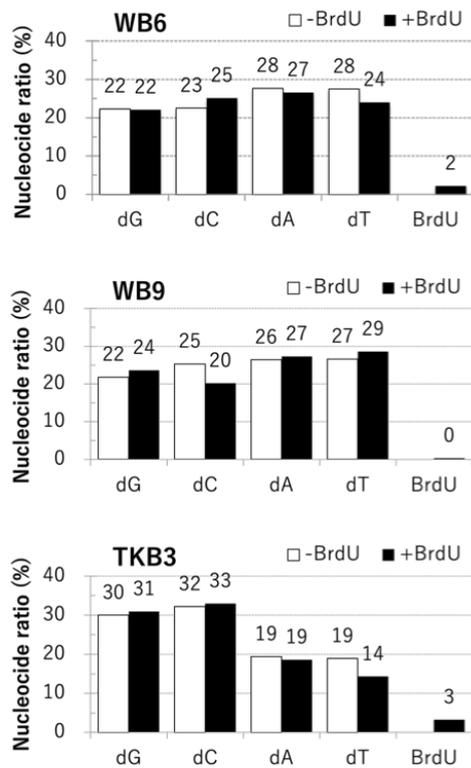


Fig. 3 従属栄養細菌中の各ヌクレオシド (dG, dC, dA と dT) の割合 (%). 黒は BrdU 添加区を白は BrdU 非添加区を表す。BrdU は BrdU の割合を表す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kataoka Takafumi, Kondo Ryuji	4. 巻 25
2. 論文標題 Data on taxonomic annotation and diversity of 18S rRNA gene amplicon libraries derived from high throughput sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 104213 ~ 104213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka Takafumi, Mitsunobu Satoshi, Hamamura Natsuko	4. 巻 33
2. 論文標題 Influence of the Chemical Form of Antimony on Soil Microbial Community Structure and Arsenite Oxidation Activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 214 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME17182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka Takafumi, Ooki Atsushi, Nomura Daiki	4. 巻 34
2. 論文標題 Production of Dibromomethane and Changes in the Bacterial Community in Bromoform-Enriched Seawater	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 1-1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME18027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka Takafumi, Kondo Ryuji	4. 巻 224
2. 論文標題 Protistan community composition in anoxic sediments from three salinity-disparate Japanese lakes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Estuarine, Coastal and Shelf Science	6. 最初と最後の頁 34 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecss.2019.04.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤竜二・片岡剛文
2. 発表標題 水圏の嫌気環境における従属栄養性原生生物 現存量、多様性、生理・生態
3. 学会等名 第33回日本微生物生態学会山梨大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸上 達哉・山田 和正・石田 香澄・吉川 伸哉・片岡剛文
2. 発表標題 透過型電子顕微鏡による海産原生生物(Stramenopiles)の細胞内微細構造観察における化学固定法と急速凍結置換法の比較
3. 学会等名 第12回北陸合同バイオシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田香澄・片岡剛文
2. 発表標題 ポリスチレンビーズを用いた海産原生生物の餌粒子サイズによる捕食選好性
3. 学会等名 日本微生物生態学会大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡剛文・大木淳之・野村大樹
2. 発表標題 Bacterial production of organic gas in cold seawater
3. 学会等名 5th International Symposium on Arctic Research（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤竜二・片岡剛文
2. 発表標題 Abundance, diversity and cultivation of anaerobic protists in anoxic lacustrine sediments
3. 学会等名 日本微生物生態学会大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡剛文・大木淳之・野村大樹
2. 発表標題 Enrichment of marine bacteria with adding a halocarbon, Bromoform (CHBr3)
3. 学会等名 日本微生物生態学会大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡剛文・田仲あいら・前川鈴香・中野伸一・近藤竜二
2. 発表標題 嫌気的な湖底堆積物中の原生生物の群集組成
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片岡剛文・近藤竜二
2. 発表標題 大量塩基配列を用いた湖沼堆積物における真核微生物群集の解析
3. 学会等名 日本珪藻学会第37回研究集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------