

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19510007
 研究課題名（和文） 海洋と南極湖沼における硫黄循環に対するジメチルスルフォキシド呼吸の役割の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the role of dimethyl sulfoxide respiration for the sulfur circulation in the ocean and Antarctic lakes
 研究代表者
 松崎 雅広 (MATSUZAKI MASAHIRO)
 広島大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：50294517

研究成果の概要（和文）：

本研究では南極湖沼の硫黄循環モデルとしての可能性を探るために様々な南極湖沼の細菌群集構造解析とジメチルスルフォキシド(DMSO)呼吸細菌の分離を行った。高濃度塩湖のすりばち池と舟底池の上層は出現菌属が少なく単純な細菌相であったが、嫌氣的であるすりばち池の下層は多様性に富んでいた。低濃度3塩湖の細菌群集構造は池ごとに異なり多様性に富んでいたが、すりばち池と舟底池の結果と異なるものであった。一方、淡水湖は *Thiomicrospira* sp. が優占する単純な細菌相であった。これら細菌群集構造の違いは塩分濃度によるものと推定された。同時に DMSO 依存的に嫌気培養し2菌属を分離した。しかしこれらは両池から出現するが池全体の優占属ではなかった。

研究成果の概要（英文）：

16S rRNA clone library analysis was used to examine the biodiversity and community structure in Antarctic salt and freshwater lakes. The bacterial community structures of salt lakes in which haloclines exist differed between these three salt lakes, indicating that there were many unidentified bacteria, and that they were rich in biodiversity. The bacterial communities of eight freshwater lakes formed a simple structure, such as *Thiomicrospira* sp., which inhabits the ocean in polar regions and fall water around McMurdo Dry Valleys, becomes the predominant genus. Phylogenetic analysis revealed that these bacteria growing in salt and freshwater lakes were closely related genera. These results suggested that these bacterial communities differed based on the salinity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：嫌気呼吸・硫黄循環・南極湖沼・気候変動

1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素やメタンガスによる地球温暖化が問題となっている。ジメチルスルフィド(DMS)は、逆に地球の寒冷化に関与するガスとして注目されている。DMSは海洋性植物プランクトンに含まれる浸透圧調節物質と考えられているジメチルスルフォニオプロピオナート(DMSP)が動物プランクトンに捕食され、環境中に放出されたDMSPが細菌により分解されて生ずる。生成したDMSは速やかに酸素と反応し、ジメチルスルフォキシド(DMSO)に変換される。一部のDMSは大気中に拡散し光酸化によりメタンサルホン酸(MSA)を生成し、それが雲の核となって雲の形成を促進し、気候変動に影響(地球冷却化)を与えと言われる(Stiefel, Science, 1996)。北太平洋上の見積もりによると、MSAが核となって雲を形成する割合は80%にも達するといわれており(Andreae and Raemdonck, Science, 1983)、物DMSO、さらには硫酸塩となって再び海に戻る。大気での循環としてはDMSに比べて硫化水素は極めて少なく、DMSが地球規模の硫黄循環の多くを占めている。特に南極の氷の分析から過去16万年間に硫酸塩が氷河期に増加し、間氷期に減少していることが示され(Legrand et al., Atmospheric Environment, 1967)、海洋の生物起源の揮発性DMSの増大が地球の寒冷化に重要な役割を担っているのではないかと考えられている。DMSOはあらゆる水環境に存在し、特に海洋には220 nM、湖、河川、雨水中にも1~70 nM存在していることが報告されている(Griebler, J. Microbiological Methods, 1997)。DMSから変換されたDMSOは細菌の嫌気呼吸系の一つであるDMSO呼吸によりDMSに還元される。最近、古細菌の*Halobacterium*もDMSO呼吸を行うことが報告され(Müller and DasSarma, J. Bacteriol., 2005)、DMSO呼吸細菌は地球上のいたるところに生息しているDMSの酸化することが示唆された。しかしながら、海洋環境中のDMSO呼吸可能な細菌についての報告はない。

我々は地球規模での硫黄循環におけるDMSO呼吸の寄与を*dmsA*遺伝子(DMSO呼吸遺伝子)の定量的解析によって明らかにしようとした。しかしながら、DMSO呼吸を行うことがしめされている報告されている大腸菌と光合成細菌のDMSO呼吸遺伝子(*dmsA*)をプローブとして用いた場合、海水中から精製した細菌DNAとはほとんど反応しなかった。この結果は、海洋中に存在する*dmsA*遺伝子の検出には海洋細菌由来の種々の*dmsA*遺伝子が必要であることが推定された(unpublished data)。一方、南極の湖沼は流入入がほとんどなく、動物による環境かく乱や人間活動による汚染もほとんどない。南極

塩湖は地球規模の自然界での硫黄循環(サイクル)の過程を理解するモデルとなる「閉鎖生態系」として考えることができる。そこで、南極塩湖での硫黄循環におけるDMSO呼吸の寄与をDMSO呼吸遺伝子の定量的解析から明らかにできるかどうかを調べるために、まず南極湖沼に存在するDMSO呼吸細菌を分離しようと考え、これまでに南極昭和基地周辺の高濃度塩湖すりばち池と舟底池から*Marinobacter* sp. (Matsuzaki et al, Polar Bioscience, 2006)と*Halomonas* sp.を分離した。

2. 研究の目的

本研究はまず分離したDMSO呼吸細菌の*dmsA*遺伝子の分離およびその構造を解析する。それと平行してさらに網羅的に南極湖沼からDMSO呼吸細菌を分離し、属の特定および、*dmsA*遺伝子の構造解析を行う。さらに*dmsA*遺伝子を用いて全DMSO呼吸細菌密度を定量し、南極湖沼および海洋での硫黄循環におけるDMSO呼吸の寄与を*dmsA*遺伝子の解析から定量的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

DMSO呼吸遺伝子である*dmsA*遺伝子はデータベース上に約15種類が登録されているのみである。これらのうちの大半がサルモネラ菌やペスト菌などの全ゲノム情報が明らかになった病原性の腸内細菌に属するものである。われわれはこれまでに南極昭和基地周辺にある高濃度塩湖すりばち池と舟底池からDMSO呼吸細菌として*Marinobacter* sp.と古細菌の*Halomonas* sp.を分離している。

(1) 分離したDMSO呼吸菌のDMSO呼吸遺伝子構造の解析

現在までに南極湖沼からDMSO呼吸細菌として2属を分離し、*Marinobacter* sp.と*Halomonas* sp.と同定した。一方、外洋(太平洋)および瀬戸内海からDMSO呼吸細菌として*Vibrio* sp.を分離、同定した。これら3属の細菌の16S rRNA遺伝子による系統解析から*dmsA*遺伝子は腸内細菌のものに相同性が高いことが予想された。そこで、データベース上に登録されている*dmsA*遺伝子のアミノ酸配列の相同性をもとにして、PCR法およびサザンハイブリダイゼーションによって各細菌の*dmsA*遺伝子の分離を行っている。現在までのところ、PCR法による*dmsA*遺伝子の増幅は成功していない。一方、大腸菌の*dmsA*遺伝子の3'側をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより*Halomonas* sp.には1本の、*Marinobacter* sp.には数本のバンドが検出された。これらが*dmsA*遺伝子である

のかどうかの確認をミニゲノミックライブラリーを構築し行っている。確認後、全長の塩基配列を決定し、*dmsA* 遺伝子と16S rRNA 遺伝子による系統樹を比較、分子進化について考察を行う。

(2) 南極昭和基地周辺に点在する湖沼と南極海の DMSO 呼吸細菌の分離

2003年11月から2004年3月にかけて、昭和基地周辺の淡水から高塩(21%)までの27湖沼と、同時に南極海の10点から海水も採水した。また、2007年4月に国立極地研究所の工藤先生から、および2008年4月には同じく極地研究所の伊村先生から重複する約15湖沼の試料を分与していただく予定である。

現在私が現地で採水したそれぞれの水試料に含まれる培養可能なDMSO呼吸細菌の分離を行っている。上記2属以外のDMSO呼吸細菌の分離を継続中であり、分離培養で次第順次16S rRNA 遺伝子を決定、属の同定を行う。各湖沼から少なくとも10種類の細菌が分離できた段階で、各湖沼および海洋の特徴(水温、塩分濃度等)とDMSO呼吸細菌の種類分布について考察を行う。

一方、各々の水試料の全菌数および培養可能な生菌数を測定する。酸素呼吸で生育した細菌については16S rRNA 遺伝子を決定、属の同定を行い、各採水地点の培養可能な細菌相を推定する。

さらに、培養によらずPCR法でのみ16S rRNA 遺伝子を増幅させ、各湖沼の16S rRNA 遺伝子ライブラリーを構築する。これらの塩基配列を決定し培養によらない細菌相を推定する。

これらの結果から、生菌数および全菌数における培養可能なDMSO呼吸細菌の割合が決定でき、DMSO呼吸の各湖沼における硫黄循環に対する重要性が検討できる。

4. 研究成果

本研究ではまず南極昭和基地周辺の露岩域に数多く点在する湖沼の網羅的な細菌群集構造解析を行った。

1) 塩湖の細菌群集構造解析

スカルプスネスの子鉢池、ありさ池、ねずみ池の水試料からDNAを抽出し、PCR法により16S rRNA 遺伝子を増幅しそれぞれの池のクローンライブラリーを構築した。水試料は塩分濃度の薄い上層と塩分濃度の濃い下層を用いた。約1.4 kbの正しいサイズをもつクローンをランダムに分離し、各サンプルについて少なくとも20クローン以上の配列を決定した。各池の上層は塩分濃度が0.25-0.79%の低塩分であり、*Roseobacter* sp. と *Marinobacter* sp. の共通する菌属が確認された。*Roseobacter* sp. は海洋性の光合成細菌であり、*Marinobacter* sp. は海洋性の細菌である。しかしながら特定の菌属が優占せず、多様性に富んでいた(図1)。特にねずみ池においては、未知のクローンが48%を占めていた。

一方高塩分濃度の下層は塩分濃度が1.65-5.1%で幅がある。下層の細菌群集構造は上層に比べてより未知の菌属の割合が多かった。特に子鉢池とねずみ池においては約60%が未知の菌属で占められていた。さらに同定された菌属も数多く出現し、多様性に富んでいることが明らかとなった。

Depth	Closest identified relative	Similarity (%)	Number of clones
Kobai	Uncultured bacterium clone ARKDMS-38	97.8-98.8	9
	<i>Roseobacter</i> sp. SL25	98.7-99.1	6
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	98.0-99.2	3
	Bacterium DG948	99.4	2
	Uncultured bacterium clone SH_52	98.6-98.7	2
	Others	97.6-98.5	3
	Unidentified		9
	Others	97.3-99.9	8
	Unidentified		18
	Arisa	<i>Roseobacter</i> sp. SL25	94.3-99.2
<i>Psychroflexus torquus</i>		96.7-97.7	2
<i>Marinobacter iguayensis</i>		96.1-99.0	2
<i>Marinospirillum</i> sp.		96.8-97	2
Others		95.3-99.9	10
Unidentified			3
<i>Leptolyngbya antarctica</i> AMT FIRELIGHT 1		99.6-100	6
Uncultured <i>Arcoobacter</i> sp. clone DS172		98.0-98.7	5
<i>Flavobacterium micromat</i> strain LMG 21919		98.2-99.5	4
<i>Roseobacter</i> sp. SL25		96.7-99.0	6
Others	94.5-100	6	
Unidentified		4	
Nezumi	<i>Marinobacter</i> sp.	96.2-99.1	6
	<i>Roseobacter</i> sp. SL25	96.3-99.0	2
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	97.9-98.1	2
	<i>Marinospirillum</i> sp. vlc_3n-red	97.1	2
	others	95.7-97.1	9
	Unidentified		19
	Uncultured bacterium clone LAgut-16S-P13	96.1-97.3	3
	Others	95.1-97.9	12
	Unidentified		22

2) 淡水湖の細菌群集構造解析

ラングホブデのぬるめ池、スカルプスネスの地蔵池、菩薩池、如来池、仏池、親子池、孫池の細菌群集構造解析を行った。データベース解析からはすべての淡水湖において *Thiomicrospira* sp. が優占属となり全クローンは北極や南極の海

Depth	Closest identified relative	Similarity (%)	Number of clones
Jizon	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	99.1-99.6	18
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	98.2	1
	<i>Heliosarobium</i> sp. M2	97.4	1
	Uncultured organism clone cty_CGOAR20	97.7	1
Bosatsu	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	98.3-99.6	27
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	97.9	1
	<i>Marinospirillum</i> sp. vlc_3n-red	97.2	1
	Uncultured epsilon proteobacterium clone 33-PARB00	96.5	1
	Unidentified		1
Nyurai	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	99.1-99.6	25
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	97.8-99.2	4
	Uncultured bacterium clone TIP26L09	98.8	1
	<i>Marinospirillum</i> sp. vlc_3n-red	96.9	1
	Uncultured alpha proteobacterium clone LC1-25	96.4	1
Hotoke	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	98.3-99.6	24
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	97.9-99.2	4
	<i>Roseobacter</i> sp. SL25	99.0	1
	Unidentified		2
Oyako	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	98.3-99.6	20
	<i>Marinospirillum</i> sp. vlc_3n-red	96.9-97.3	6
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	97.5-99.2	5
	Uncultured bacterium clone Cc106	98.9	1
	Unidentified		1
Mago	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	98.9-99.6	26
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	98.1-99.2	2
	<i>Roseobacter</i> sp. SL25	99	1
	Uncultured bacterium clone Cc106	99	1
	<i>Marinobacter</i> sp. Aphiame.L1727a	98.5	1
Namazu	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	97.9-99.6	17
	<i>Marinospirillum</i> sp. vlc_3n-red	96.2-97.2	5
	<i>Halomonas</i> sp. SYO J71	95.8-96.8	2
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LA1-B21N	98.1	1
	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	98.6-99.6	16
Nurume	Others	97.1-99.4	6
	Unidentified		2
	<i>Thiomicrospira</i> sp. AD03	99.3-99.7	12
	<i>Marinobacter</i> sp.	99.0-99.7	3
	<i>Roseobacter</i> sp. SL25	98.9-99.0	2
Others	97.7-99.0	3	
Unidentified		5	

洋とアメリカのマクナード基の48-86%を占めていた。*Thiomicrospira* sp. 地周辺の滝に生息する。一方、塩湖にも出現した uncultured Flavobacteriaceae、*Roseobacter* sp.、*Marinospirillum* sp. などの菌属も数は少ないながら共通に出現した。この結果は海水由来の細菌属が淡水に変化した後でも生息し続けていることが示唆された。しかしながら、その出現頻度は低く、*Thiomicrospira* sp. が優占する単純な細菌群集構造を形成していた。淡水湖と塩湖には過剰に酸素が存在することから、これらの細菌群集構造の違いは塩分濃度の違いが原因であ

ることが考えられた。

3) 塩湖と淡水湖に出現する細菌属の系統解析

淡水湖と塩湖に出現する細菌属の塩基配列を用いて両湖に出現する細菌の系統の違いを調べた。淡水湖のみに出現した *Thiomicrospira* sp. は塩湖と淡水湖に共通に出現する *Marinospirillum* sp. や *Marinobacter* sp. に近縁であった。また、塩湖にのみ出現した細菌属はそれ自身を含む単独のクレードに分類され、しかも未培養クローンとして登録されているものが大半であった。このことはこれらの細菌が現在までに培養分離されていない細菌種であるか、もしくは氷河期後に大陸が上昇し取り残された細菌がそのまま南極湖沼において生き続けてきた古い細菌種である可能性も考えられる。

以上の結果は夏の時期の細菌群集構造を解析したものである。今後は氷で湖沼表面が覆われる時期から開水までの期間の細菌群集構造の変化を調べることにより、細菌群集の変化と物質循環に関する研究の端緒となることが期待できる。

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2件)

① Kimura, S., Ban, S., Imura, S., Kudoh, S. and Matsuzaki, M.; Limnological characteristics of vertical structure in the lakes around Syowa Oasis, East Antarctica. (2010) *Polar Science*, Vol., 3, p262-p271. 査読有

② Kudoh, S., Tanabe, Y., Matsuzaki, M. and Imura, S.; In situ photochemical activity of the phyto-benthic communities in two Antarctic lakes. (2009) *Polar Biol.*, Vol., 32, No.11, p1617-p1627. 査読有

[学会発表] (計6件)

① Matsuzaki, M., Wakitani, M., Takahashi, Y., Kasamatsu, N., and Kudoh, S.

Analysis of bacterial diversity and dimethyl sulfoxide respiring bacteria of Antarctic salt lakes.

Xth SCAR International Biology Symposium, Hokkaido University, Sapporo, July 30, 2009.

② 松崎雅広、脇谷昌俊、高橋陽介、星野保、笠松 伸江、工藤栄

南極塩湖における微生物群集とDMSO呼吸細菌の解析

第66回日本植物学会中国四国支部大会、2009年5月16日、高知大学

③ 松崎雅広、脇谷昌俊、高橋陽介、星野保、

工藤栄

南極塩湖における微生物群集とDMSO呼吸細菌の解析

第31回極域生物シンポジウム、P192、2008年12月4日、国立極地研究所

④ 脇谷昌俊、松崎雅広、高橋陽介、工藤栄
南極昭和基地周辺の塩湖すりばち池と舟底池の細菌群集構造

第65回日本植物学会中国四国支部大会、2008年5月17日、広島大学

⑤ 松崎雅広、伊藤岳、高橋陽介
光合成細菌のDMSO呼吸系のセンサーヒスチジンキナーゼ DmsS のセンシング機能のトポロジー解析

日本植物生理学会2008年度年会、2008年3月21日、北海道大学

⑥ 脇谷昌俊、松崎雅広、高橋陽介、星野保、工藤栄

南極すりばち池および舟底池における微生物群集とDMSO呼吸細菌の解析

第30回極域生物シンポジウム、2007年11月15日、国立極地研究所

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/bio/PMOLP/HYS/antarctic.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 雅広 (MATSUZAKI MASAHIRO)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：50294517

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

伊村 智 (IMURA SATOSHI)
国立極地研究所・研究教育系・准教授
研究者番号：90221788 (H20-21)

工藤 栄 (KUDOH SAKAE)
国立極地研究所・研究教育系・准教授
研究者番号：40221931 (H20-21)