

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：82405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12313

研究課題名(和文) 河川の浮遊細菌を介した新たなリン循環プロセスとその地球化学的意義の解明

研究課題名(英文) A new process in the phosphorus cycle by riverine bacterioplankton and its geochemical impact

研究代表者

渡邊 圭司 (Keiji, Watanabe)

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・専門研究員

研究者番号：50575230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：淡水圏に生息する浮遊細菌21株(4系統群)についてゲノム解析を行ったところ、その全てに細胞内リン蓄積遺伝子(ppk)様の配列をゲノム上に確認できた。浮遊細菌(6系統群)の細胞内リン蓄積量を、培養実験後のリン酸態リンの減少量から推定したところ、11.2～52.6 mg-P/g dry cell weightであった。CARD-FISH法により、河川水中のIRD18C08に属する細菌の現存量は、全浮遊細菌の2.2～6.6%であることを明らかにした。IRD18C08に属する細菌の分離株は、高次分類階級レベルで系統的な新規性が認められ、新科(Fluviibacteraceae)を提案し受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラネタリー・バウンダリー(地球の限界)の考え方の中で、リンは深刻な環境汚染を引き起こしているとともに、一方で、枯渇資源として将来的に食料供給を脅かすリスクが高いことが示唆されている。循環型社会を目指す上で、自然環境中でのリンの動態解明は重要な研究課題の1つである。本研究では、淡水圏における浮遊細菌を介したリンの動態及びそのメカニズムの一端を初めて明らかにすることができた。特に、浮遊細菌の全ゲノム解析の結果は、それらほぼ全てがゲノム上に細胞内リン蓄積遺伝子(ppk)様の配列を保持していることを示し、リン循環プロセスにおける粒子状リンとしての浮遊細菌の重要性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The complete genome analysis was conducted about 21 strains (4 phylogenetic groups) of freshwater bacterioplankton isolates. These results revealed that the polyphosphate kinase-like genes (ppk) were existing in the genome sequences of all strains. The phosphorus accumulation amounts of several bacterioplankton isolates (6 phylogenetic groups) were 11.2 to 52.6 mg-P/g dry cell weight that were calculated from decreased level of phosphorus in the cultivation experiment. The biomass of IRD18C08 cluster bacteria was estimated 2.2 to 6.6 % of total bacterioplankton cells at riverine environments using CARD-FISH analysis. The phylogeny of IRD18C08 cluster isolate revealed a novelty at higher category, and it was proposed a new family, Fluviibacteraceae fam. nov. of the order Rhodocyclales.

研究分野：微生物生態学

キーワード：リン 淡水圏 浮遊細菌 ゲノム ポリリン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンを取り巻く地球環境問題は大きく分けて2つある。1つは「富栄養化」に関するものであり、もう1つは「枯渇資源」としての問題である。富栄養化の問題は、主に人間活動(農業活動など)により過剰に排出されたリンや窒素の流入に起因しており、適正な栄養塩管理が強く求められる。そのためには、自然環境中に放出されたリンがどのような過程を経て循環しているのか詳細に理解する必要がある。河川から海洋沿岸域の生態系に供給されるリンは、大きく分けて粒子状リンと溶存態リンの2つの形態に大別される。河川水中の粒子状リンは、溶存態リンの20倍以上の量で存在しているため、河川から河口・沿岸域にかけたリン循環における粒子状リンの挙動の重要性が指摘されている。しかしながら、粒子状リンは、そもそもどのようなものから構成されているのかなどそのほとんどが不明であり、地球規模のリン循環を解明する上で残された大きな研究課題の1つである。浮遊細菌(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)が細胞内にポリリン酸として蓄積し運ぶリンは、粒子状リンと見なせるため、河川から河口・沿岸域にリンを運ぶ、未知のリン循環プロセスの1つである。

### 2. 研究の目的

本研究では、浮遊細菌を介したリンの循環プロセスとその地球化学的な意義を解明するため、初めに河川から海洋沿岸域における菌叢解析及びその中でどの細菌が細胞内にリンを蓄積する能力を有するのか明らかにする。次に、分離株を用いた培養実験により、細菌の細胞内にどのくらいの量のリンが蓄積されるのかを調べる。あわせて細菌の全ゲノム解析を行い、どのようなメカニズムでリンが取り込まれ細胞内に蓄積されるのかを明らかにする。最後に、河川水中におけるリン蓄積能を有する細菌の現存量を調べ、浮遊細菌を介してどのくらいの量のリンが輸送されるのか推計する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料採取と細菌叢解析

荒川上流から東京湾沿岸までの9地点で表層水を採水し、ろ過によりメンブレンフィルター上に菌体を捕集し、市販のキットにより細菌のDNAを抽出した。得られたDNAについて、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析を行った。

#### (2) 全ゲノム解析

21菌株の浮遊細菌の分離株について全ゲノム解析を行い、どの浮遊細菌のゲノム上に細胞内にリンをポリリン酸の形で高濃度に蓄積するための酵素タンパク質コードする遺伝子(*ppk*)様の配列があるのかを調べた。あわせて、ゲノム上のリンに関わる機能遺伝子の配列の有無から、細胞外からのリンの取込み及び細胞内蓄積のメカニズムを推定した。

#### (3) 細胞内リン蓄積量

浮遊細菌6菌株の培養実験により、培養後の菌体量(DAPI染色による菌体数と乾燥菌体重量)及び改変R2A培地中のリン酸態リンの減少量をイオンクロマトグラフで測定し、各浮遊細菌の細胞内リン蓄積量を算出した。

#### (4) IRD18C08 クラスター細菌の現存量

埼玉県内河川に多く検出されるIRD18C08クラスター細菌について、特異的に検出できる酵素標識プローブを設計及び作成した。荒川上流から東京湾沿岸までの9地点の試料について、ろ過によりポリカーボネートフィルター上に細菌を捕集し、パラホルムアルデヒドで細菌の細胞を固定化した。固定化菌体について、DAPI染色による全菌数及びCARD-FISH法によるIRD18C08クラスター細菌数の計測を行った。

#### (5) IRD18C08 クラスター細菌によるリン輸送量の推計

IRD18C08 クラスター細菌の細胞内リン蓄積量、河川における現存量及び河川流量から、IRD18C08 クラスター細菌を介したリンの輸送量を推計した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細菌叢解析

次世代シーケンサーにより荒川上流から東京湾沿岸までの9地点の細菌叢解析を行い、Tribe、Clade、Lineage及びClusterの系統群でまとめた(図1) 門(Phylum)レベルで見ると、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 及び *Actinobacteria* の3門で、全リードの80%以上を占めていた。河川上流域および河川下流から海洋沿岸域では、*Proteobacteria* が全リードの50%以上を占めていたが、河川中流域では、*Bacteroidetes* が40~50%を占めており、河口から海洋沿岸域では *Actinobacteria* が20~30%を占めており、*Bacteroidetes* の割合は相対的に低く10%以下となっていた。全体的に bacIII-A (PRD01a001B)の Clade が卓越しており、Tribeで見ると、Lhab-A1、Phila、acI-A3 及び bacI-

A1 のリード数が相対的に高い割合を示し、以前に行った埼玉県内河川 15 試料の解析結果と大きく異なっていた（データ未記載）。

(2) 全ゲノム解析

これまで淡水圏から分離した浮遊細菌 21 菌株 (IRD18C08、GKS98、LiUU-5-340、Flavo-A3 の系統群) について、全ゲノム解析を行った。その結果、全ての菌株のゲノム上に、細胞内にリンをポリリン酸の形で高濃度に蓄積するための酵素タンパク質コードする遺伝子 (*ppk*) 様の配列が見られた。荒川上流から東京湾沿岸までの試料では相対割合が高くなかったが、埼玉県内の他の河川で高頻度かつ高い割合で検出される IRD18C08 クラスターに属する SHINM1 株について、全ゲノム解析結果からリンの取込み及び細胞内への蓄積に関わる遺伝子の探索を行った。この株は、有機リン酸エステル及びホスホン酸の取込みに関する遺伝子群は類似の配列が無く、*pit* 及び *pstCSAB* 様の配列が見られたことから、有機態リンは利用できず無機態リン (リン酸態リン) を細胞外から取込んでいると推定された。また、*ppk1* 及び *ppk2* 様の配列が見られたことから、細胞内のポリリン酸の蓄積及び利用に ATP 及び GTP の双方が利用できると推定された (図 2)。

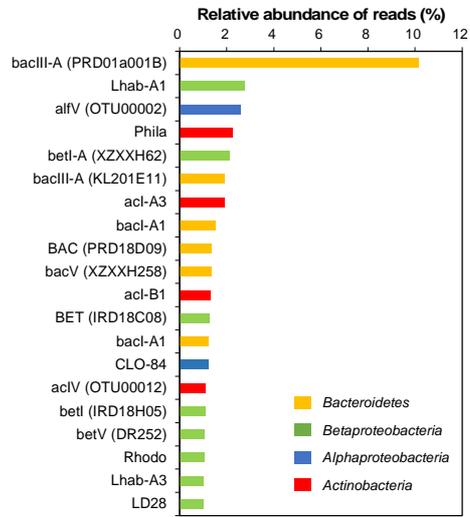


図 1 . 細菌叢解析結果 (上位 20 系統群)

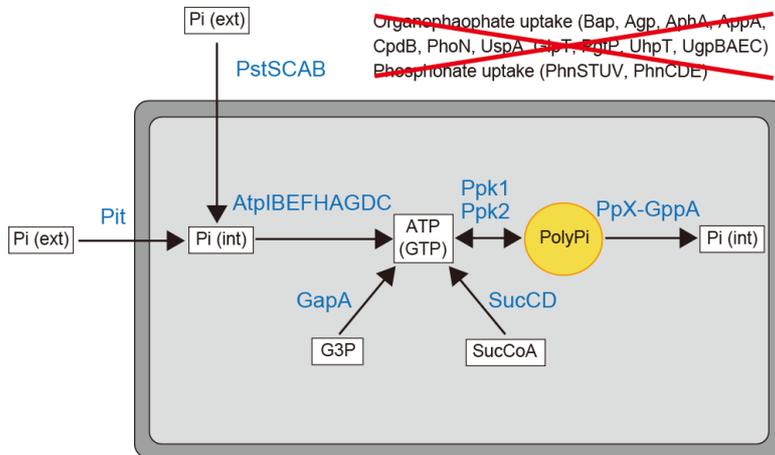


図 2 . IRD18C08 クラスター細菌 (SHINM1 株) の推定されるリン代謝

(3) 細胞内リン蓄積量

淡水圏に高頻度で検出される Flavo-A3、Luna1-A2、PnecC、PnecD、Lhab-A3 及び IRD18C08 に属する浮遊細菌 6 菌株について、改変 R2A 培地を用いた培養実験により、培養後の菌数、乾燥菌体重量及びリン酸態リンの減少量をイオンクロマトグラフで調べ、それぞれ細胞内リン蓄積量を算出した。その結果、細胞内のリン蓄積量は、Flavo-A3 が 11.2、Luna1-A2 が 43.3、PnecC が 20.7、PnecD が 21.7、Lhab-A3 が 52.6 及び IRD18C08 が 32.5 mg-P/g dry cell weight であることが明らかとなった。

(4) IRD18C08 クラスター細菌の現存量

CARD-FISH 法で荒川上流から東京湾沿岸までの 9 地点の IRD18C08 クラスター細菌の現存量を調べた (図 3)。IRD18C08 クラスター細菌の現存量は、荒川上流域で  $1.5 \times 10^4$  cells/mL、最も多かった中流域で  $2.5 \times 10^5$  cells/mL、9 地点の平均は  $1.3 \times 10^5$  cells/mL であった。全細菌に占める割合は、2.2 ~ 6.6% (平均 4.7%) であった。先行研究で行った、他の埼玉県内河川 5 地点では、現存量が  $3.1 \times 10^5 \sim 9.8 \times 10^5$  cells/mL (平均

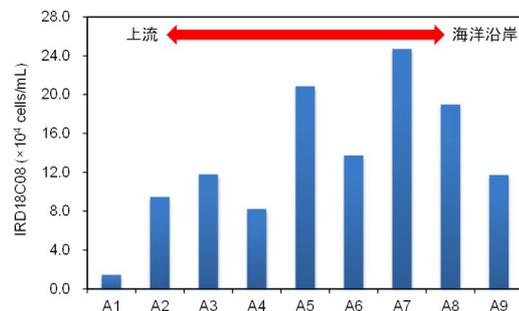


図 3 . 荒川の IRD18C08 細菌の現存量

5.7×10<sup>5</sup> cells/mL) 全細菌に占める割合は、8.5～14.9% (平均 11.3%)であった。以上のことから、荒川は埼玉県内の他の河川と比較して、IRD18C08 クラスター細菌の現存量が少ない河川であることが明らかとなった。

#### ( 5 ) IRD18C08 クラスター細菌によるリン輸送量の推計

IRD18C08 クラスター細菌のリンの細胞内取込み量、現存量及び河川流量より、IRD18C08 クラスター細菌が細胞内にリンを蓄積し、それ自体は粒子状のリンとして輸送する量は、荒川では 1.2～6.0 t-P/year、他の埼玉県内河川 ( 5 河川 ) では 0.01～0.3 t-P/year と推計された。荒川では、IRD18C08 クラスター細菌の現存量は少なかったが、河川流量が多いため IRD18C08 クラスター細菌が運ぶリンの量は、他の河川と比較して多いという結果となった。ただし、本研究で算出した浮遊細菌のリンの細胞内蓄積量は、最も生育の良い培養条件下 ( 高栄養下 ) で算出したものであることから、実際の河川環境下 ( 低栄養下 ) における IRD18C08 クラスター細菌によるリンの輸送量は ( 蓄積量 ) 上記値よりも低い可能性がある。

#### ( 6 ) 浮遊細菌の新属・新種提案

IRD18C08 クラスター細菌 1 菌株及び Flavo-A3 に属する細菌 2 菌株については、生理学的、生化学的及び遺伝学的な検討を経て、それぞれ *Fluviibacter phosphoaccumulans* ( 新科・新属・新種 )、*Flavobacterium ammonificans* 及び *Flavobacterium ammoniigenese* ( それぞれ新種 ) を提案し、原核生物に関する国際委員会 ( ICSP: International Committee on Systematics of Prokaryotes ) に受理された。

## 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 Keiji Watanabe, Sho Morohoshi, Tadao Kunihiro, Yuichi Ishii, Lena Takayasu, Yusuke Ogata, Chie Shindo, Wataru Suda	4. 巻 70
2. 論文標題 Fluviibacter phosphoraccumulans gen. nov., sp. nov., a polyphosphate accumulating bacterium of Fluviibacteraceae fam. nov., isolated from surface river water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 5551-5560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.004446	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 Wataru Suda, Yusuke Ogata, Lena Takayasu, Chie Shindo, Keiji Watanabe	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete genome and plasmid sequences of three Fluviibacter phosphoraccumulans polyphosphate-accumulating bacterioplankton strains isolated from surface river water	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01474-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01474-20	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 Watanabe Keiji, Kitamura Tatsumi, Ogata Yusuke, Shindo Chie, Suda Wataru	4. 巻 72
2. 論文標題 Flavobacterium ammonificans sp. nov. and Flavobacterium ammoniigenes sp. nov., ammonifying bacteria isolated from surface river water	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005307	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 Wataru Suda, Yusuke Ogata, Chie Shindo, Keiji Watanabe	4. 巻 -
2. 論文標題 Complete genome sequences of two Flavobacterium ammonificans strains and a Flavobacterium ammoniigenes strain of ammonifying bacterioplankton isolated from surface river water	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00176-22	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0件

〔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
研究分担者	須田 互  (Suda Wataru)  (20590847)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医学研究センター・副チームリーダー   (82401)	
研究分担者	石井 裕一  (Ishii Yuichi)  (80551027)	公益財団法人東京都環境公社(東京都環境科学研究所)・環境資源研究科・主任研究員   (82816)	

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
---------	---------