

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月27日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20370013

研究課題名（和文） 環境微生物群集における光エネルギー利用と細菌の飢餓適応戦略

研究課題名（英文） Utilization of light energy and adaptation strategy for starvation of bacteria in natural microbial communities

研究代表者

松浦 克美 (MATSUURA KATSUMI)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：30181689

研究成果の概要（和文）：紅色光合成細菌は、用いた4種すべてで栄養条件の悪い条件でも光エネルギーを利用して生きのびることができた。温泉の微生物群集では外部から供給された少量の電子が光合成細菌の関与で群集内に循環的に保持されて、バイオマスが成長していくことが分かった。その際、水素による電子の授受が重要な役割を果たしていた。貧栄養傾向のある湖沼中の脱窒素反応が部分脱窒をする光合成細菌と非光合成細菌が協働して進行することが分かった。

研究成果の概要（英文）：Purple photosynthetic bacteria were able to survive under the conditions of very low organic nutrients by using light energy in examined 4 species. In the microbial community of hot springs, in which low concentrations of electrons are provided from the water, the biomass grows with continuous cycling of the electrons in the community with the help of photosynthetic bacteria. In the cycling, hydrogen production and consumption play important roles. In the oligotrophic lakes and ponds, partially denitrifying photosynthetic bacteria were involved in the denitrification with non-photosynthetic bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学

キーワード：微生物群集・物質循環・水素発生・紅色光合成細菌・緑色光合成細菌

1. 研究開始当初の背景

土壌や水界中での微生物の生態は、長年にわたり、全体像を把握するのがほとんど不可能であった。これは、ごく一部の微生物のみしか検出同定できないことが要因であった。近年、微生物を単離せずにゲノムの一部の配列決定から、微生物の種類と量、およびその変動を解析できるようになり、微生物の生態

の全体像にせまることができるようになった。光合成細菌の広範な分布も明らかになってきた。

シアノバクテリアや緑藻・ケイ藻等の微生物が、海洋や陸水環境で生産者として重要な役割を担っていることはよく知られているが、酸素を発生しない光合成細菌が環境中に広く存在することが海洋を中心に最近明ら

かになってきている。これらの光合成細菌は貧栄養環境および飢餓環境における物質循環に重要な役割をはたしていることが考えられる。しかし、イオウ、窒素、および炭素の物質循環に具体的に注目し、温泉、土壌、陸水等の環境微生物群集中に、光エネルギー利用可能な微生物がどのように存在し、どのような物質循環機能を持っているかを明らかにした研究はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究の全体的な目的は、申請者が30年以上にわたり取り組んできた、光合成細菌の生化学・生物物理学、分子生物学、進化生物学の成果と経験を、微生物生態学の分野に適用することにより、環境中での光合成細菌の動態と役割を解明していくことである。特に、「広範に光合成細菌が分布している理由は、分解者としての細菌が飢餓環境で生残（サバイバル）していくために光エネルギー利用が重要であるためである」という仮説を検証する。

本研究の具体的な目的は以下の4点である。

- (1) 自然環境中での光合成細菌の存在を、種解析的・定量的に明らかにする手法を確立する。
- (2) 微生物マット、土壌、および水界底泥中に細菌の光合成遺伝子がどの程度存在し、どのように機能しているかを明らかにする。
- (3) 光合成細菌の存在が明確になった環境において光合成細菌がそこでのイオウ、窒素、および炭素の物質循環機能にどのような役割を果たしているかを明らかにする。
- (4) 光合成機能を持つことが飢餓環境での生残に効果的であるという仮説を野外実験および室内実験で明らかにする。

3. 研究の方法

研究対象の野外環境微生物として、長野県中房温泉中の微生物マット、多摩川の各流域の礫上の微生物マット、津久井湖および大学キャンパス内の池を取り上げた。注目する光合成細菌として、緑色非イオウ細菌および紅色非イオウ細菌を主に取り上げた。それらの細菌の多くは光エネルギーを利用できても光従属栄養細菌であり、中には酸素呼吸によってのみ生育する細菌（好気性光合成細菌）も多い。用いる手法は、環境サンプル中からの定量的 DNA 抽出と塩基配列決定・系統解析、イオウ・窒素・水素・炭素の物質代謝活性測定、細菌の単離とそれを用いた実験室内モデル実験が主なものである。これらのフィールド、材料、手法により、光合成細菌を含む微生物群集における、種構成を定量的に明らかにし、物質循環における役割を解明し、光エネルギーがそこに存在する光合成細菌および微生物群集にどのような役割を果たしているかを実証する。

温泉微生物マット中の光合成細菌遺伝子とイオウ・窒素・炭素・水素の循環機能の解析した。長野県、中房温泉において、65°C、55°C、45°Cの典型的なマットを採取し、様々な条件で、イオウ化合物、水素の増減活性を測定した。採取した微生物マットから、DNAおよびRNAを抽出し、PCRで増幅した後、リボソーム遺伝子、光合成反応中心遺伝子、クロロフィル合成酵素遺伝子の塩基配列を決定した。それらを用いて群集構造解析とそれぞれの細菌の空間分布および活性測定を進めた。これにより、マット中での主要な物質循環と電子循環の全体像を明らかにした。そこに関与する細菌をできるだけ単離し、部分反応を実験室内で再現した。特に、光合成細菌の独立栄養増殖を詳しく調べた。

多摩川の川底礫上の微生物マットおよび津久井湖の光合成細菌群集と窒素を解析した。多摩川上流域、青梅付近の川底から礫を採取し、微生物マット中の光合成細菌の検出を行った。川底礫微生物マット中の光合成遺伝子解析を進め、系統解析を行った。津久井湖の底泥中から、脱窒光合成細菌の集積培養を行った。集積培養中の光合成細菌の単離と、脱窒の各反応の測定を行った。別に単離した非光合成細菌との協働による脱窒反応を詳しく解析した。

以上の研究をとりまとめ、設定した仮説「自然界に光合成細菌が広範に分布している理由は、分解者としての細菌が飢餓環境で生残（サバイバル）していくために光エネルギー利用が重要であるためである」を検証した。

4. 研究成果

(1) 貧栄養温泉微生物マット中での物質循環とエネルギーの流れ

中房温泉の 65°C域に発達している微生物マット直接 DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅して、クローライブラリーを構築した。解析したクローンのうち 30%が、緑色糸状性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* と考えられた。緑色糸状性光合成細菌が主要構成種であることはこれまでの顕微鏡観察や色素分析と一致する結果である。次いで硫黄酸化細菌 (*Sulfurihydrogenibium azorense* に近縁) と発酵性細菌 (*Fervidobacterium ripariumi* に近縁) がともに約 20%であった。本結果より、発酵条件で分離した *Fervidobacterium* 属細菌は本微生物マットの主要構成種のひとつであることが分かった。*Fervidobacterium* 属細菌は、発酵代謝によって水素を生成することを確認しており、この微生物マットの電子フローに大きく貢献していると考えられた。その他の構成種として、2~5%ずつの割合で 10 種の従属栄養細菌が検出されており、中には既知細菌と

の相同性が低く、新規性の高い細菌も含まれていた。群集構造の季節・年変動をみるため、2年にまたがり異なる季節に採取した14サンプルについて、16S rRNA 遺伝子断片を対象にした T-RFLP 解析をしたところ、主要構成種に違いは見られなかった。

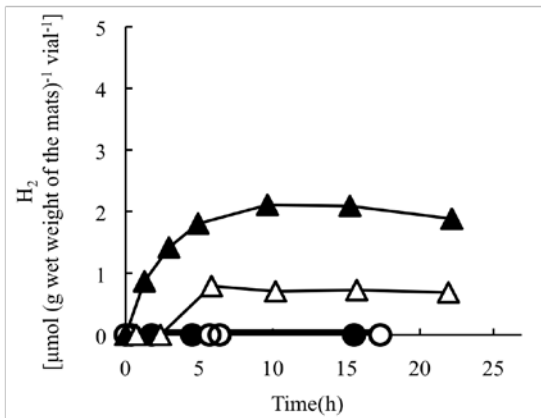


図1 温泉微生物マットでの水素発生

同じ中房温泉の70~80°C域には、無色~灰色~白色の微生物集塊が発達していた。その主要な構成種は硫黄酸化細菌 (*Sulfurihydrogenibium* 属) で、また同時に *Thermodesulfobacterium* sp. や *Caldimicrobium* sp. に近縁な細菌が共存していた。これらはすべて硫黄化合物の代謝を通してエネルギーを獲得する細菌である。温泉地から採取した微生物集塊を実験室内で安定に培養・維持することを試みた。

微生物集塊を人工温泉水で嫌氣的に培養すると、硫化水素の生成が確認できた。次に、蓋に細孔を開けた培養瓶を用いて、培養瓶の気相が大気とゆっくり交換できるようにしたところ、培養開始後すぐに培養液中の硫化水素濃度および硫酸イオン濃度の上昇が観察された。これは白色集塊で観察されたものの、灰色集塊では硫化水素濃度の上昇は観察されなかった。白色集塊では集塊内に硫黄粒を保持しており、その硫黄の酸化と同時に、このような微好気条件でも嫌氣的な硫黄還元が進行したと考えられた。ただし、白色集塊でも微好気条件で培養を続けると硫酸イオン濃度は上昇を続けるものの硫化水素濃度は低下していった。以上のことから温泉環境で観察される硫黄化合物の循環を担う微生物集塊は、酸素および電子供与体としての硫黄の適度な供給によって、形成・維持されていると考えられた。

微生物マットの硫黄還元能を調べるために、採取した微生物マットに人工温泉水と元素硫黄を加えて65°Cで嫌氣的に維持した。一定時間後に硫化水素濃度を測定すると、硫化水素の生成が観察された。また水素気相下で同様の試験をすると、生成する硫化水素濃度は高くなった。水素を電子源とした硫黄の還

元が考えられる。また光照射条件では硫化水素の生成が抑制されたことから、光合成細菌による硫化水素の消費が考えられる。さらに光合成細菌は電子源として硫化水素だけでなく、水素も利用できることが示されている。以上から発酵性細菌によって生産された水素は、これまでに報告されている硫酸塩還元細菌だけでなく、光合成細菌および硫黄還元菌によっても消費されていると考えられた。

微生物マットを用いたこれらの研究と合わせると、この群集内では水素、硫黄化合物を介して電子が循環していると考えられた。また、微生物マットが硫化水素または水素を電子源とした光独立栄養条件下で生育することが観察されたので、炭素化合物も電子循環に関与している事が示唆された。以上のように、本研究では、温泉微生物群集内における水素生産者と消費者を特定し、電子循環の概念を示すことができた。

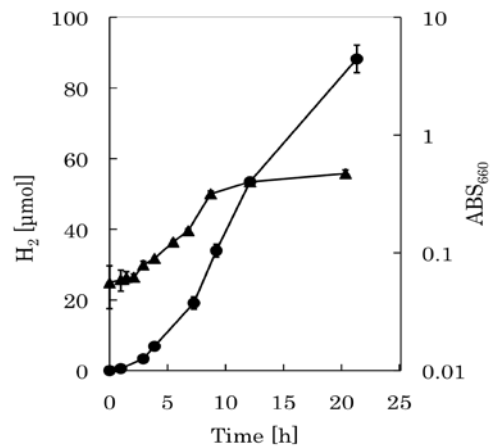


図2 単離発酵細菌での水素発生

上記の研究により、緑色系状性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* は光照射条件で独立栄養生育することが示唆されたが、未だに純粋分離株を用いた独立栄養生育は示されていない。そこで、*C. aggregans* が独立栄養での生育条件を明らかにし、またその生育に与える他菌の影響の検証を進めた。

C. aggregans が優占化している温泉微生物マットを採取し、有機炭素源を含まない培地で集積培養を繰り返した。電子受容体として水素または硫化水素を添加したとき、*C. aggregans* の生育が確認された。この集積培養系は *C. aggregans* が優占種であり、継続的に安定に継代培養できることから、*C. aggregans* は水素、硫化水素を電子受容体として、独立栄養で生育できると考えられた。

硫化水素を添加した培養系を顕微鏡観察したところ、*C. aggregans* の増殖に伴い *C. aggregans* の細胞内外に単体硫黄と考えられる顆粒の蓄積が観察された。環境中で *C. aggregans* が優占化している微生物マットに

は、発酵細菌 *Ferriobacterium riparium* が共存しており、すでに分離株も得られている。*F. riparium* を硫黄を添加した培地で培養したところ、増殖に伴い硫化水素が発生したことから、*F. riparium* が発酵条件で硫黄還元能を有することが示された。*C. aggregans* の集積培養系に *F. riparium* を添加し、硫化水素を電子供与体とした光独立栄養条件で培養したところ、*F. riparium* を添加しない系に比べ、*C. aggregans* の増殖が促進された。このことから、*F. riparium* による単体硫黄の除去および硫化水素の供給が進行していると考えられ、それによって *C. aggregans* の独立栄養生育を補助できる可能性が示された。

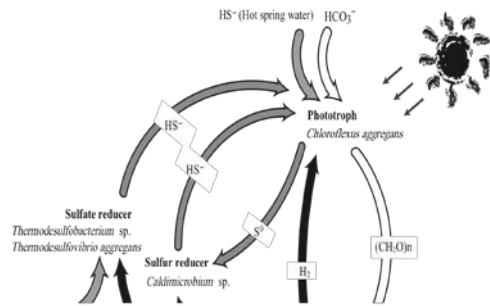


図3 温泉微生物マット中の電子循環模式図

(2) 紅色光合成細菌における飢餓生残性の種による違い

紅色光合成細菌は水圏や土壤に広く分布しているが、これには栄養塩飢餓生残戦略が寄与していると考えられる。これまでの研究で、*Rhodospseudomonas palustris* CGA009 と *Rhodospirillum rubrum* S1 が飢餓条件下でも光条件では長期間高い生残率を維持することがわかっていた。しかし暗条件下では *R. rubrum* が2日で生残率が1/1,000に低下するのに対し、*R. palustris* では20~25日を要した。*R. palustris* の飢餓・暗条件下での生残性の高さが本菌に特徴的なものなのかを明らかにするために、上記2種とは系統的に異なる紅色光合成細菌を用いて比較した。

紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, *Rubrivivax gelatinosus* IL144 の2種について、それぞれ光従属栄養的に培養し、飢餓条件に移行させて生残性をコロニー形成能(CFU)で評価した。結果、両株とも他の紅色光合成細菌と同様に飢餓・光条件では長くCFUを維持できた。一方、暗条件下ではCFUが初期値の1/1,000に低下するまでの時間は *R. gelatinosus* では3日以内に、*R. sphaeroides* では9~15日であった。また *R. palustris* と *R. rubrum* の飢餓光条件・2.5M

NaCl ストレス下での生残性を観察すると、*R. palustris* は生残率を2時間経過後も約50%維持したのに対し、*R. rubrum* では約1/1000,000まで低下し、*R. palustris* の細胞膜は浸透圧にも強いことが示唆された。*R. palustris* は飢餓・暗条件下で他の3種よりも長く生残したことから、この性質は紅色光合成細菌の中でも *R. palustris* に特徴的であると考えられ、これは自然界で栄養源量が少ない条件や様々な環境ストレスに曝されることが多かったためだと予想される。

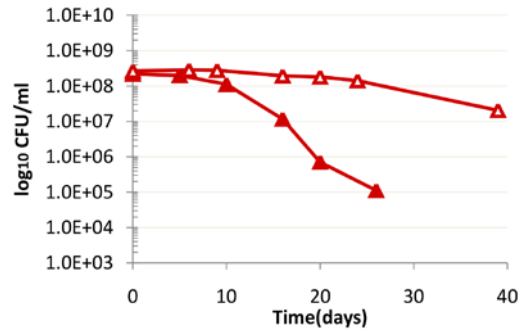


図4 生残性の高い光合成細菌の生残曲線

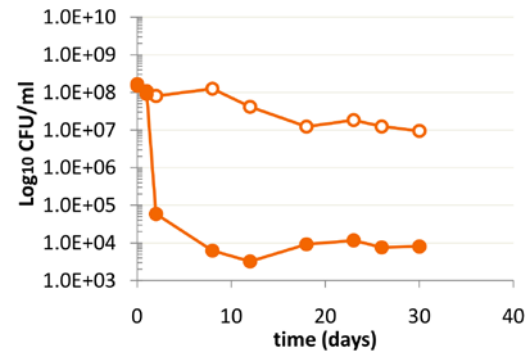


図5 生残性の低い光合成細菌の生残曲線

(3) 貧栄養条件からの亜硝酸還元を行う光合成細菌の単離と他菌との混合系での硝酸からの脱窒

脱窒能を有する紅色光合成細菌は、これまで富栄養の廃水処理施設等を中心に見つかっているが、貧栄養の自然環境からの分離例は少ない。本研究では、都市周辺の水圏から硝酸塩または亜硝酸塩呼吸もできる光合成細菌の探索を行った。首都大学東京南大沢キャンパス内の池と神奈川県津久井湖から底泥を採取し、それらを接種源として光合成細菌を集積培養した。得られた集積系から硝酸または亜硝酸の還元能で選別することで、4種6株の紅色光合成細菌の分離に成功した。これらの光合成細菌はすべて、硝酸は還元せず、亜硝酸を窒素ガスまで還元する嫌気呼吸能を有していた。このような亜硝酸還元光合成細菌はこれまでに一例しか報告がない。本研究でわずか2箇所の調査地から複数の系統群にわたる株を分離できたことから、その環境中での分布は広いことを示唆している。

これらの光合成細菌に加えて、同一環境から硝酸から亜硝酸にまで還元する非光合成細菌を分離した。この硝酸から亜硝酸に還元する細菌と上記の亜硝酸還元光合成細菌を混合培養することによって、光合成細菌が安定に亜硝酸を受け取り、二種の共同作用により硝酸から窒素ガスまで変換することが明らかになった。高濃度では生物に対する毒性を示す亜硝酸も生態系では適度な供給によって効率的に利用されていることを意味する。これは環境中における窒素循環に関与する微生物の役割がこれまで考えられていた以上に大きいことを示唆するものである。

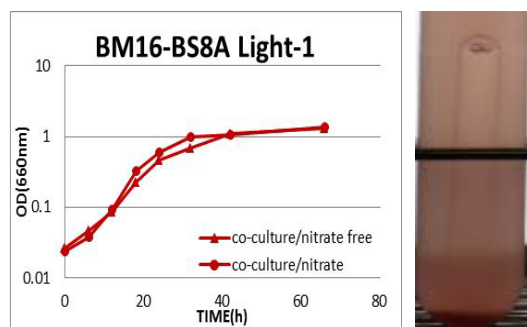


図 6 光合成細菌の増殖と脱窒

(4) 貧栄養河床礫における紅色光合成細菌の多様性

有機物流入の限定された上流河川における紅色光合成細菌の生態は知られていない。本研究では非培養法および培養法を用いて河床の礫表面の紅色光合成細菌の多様性を調べた。東京都青梅市を流れる多摩川上流より河床の礫を採取した。礫表面に発達するバイオフィームから光従属栄養・嫌気条件（光照射、 $>700\text{nm}$ ）で分離培養を行ったところ、*Rhodospirillum rubrum* および *Rhodospirillum rubrum* に高い相同性を示す株が得られた。一方、バイオフィームから直接 DNA を抽出し、紅色光合成細菌の光合成反応中心タンパク質遺伝子 *pufM* の一部を PCR で増幅しクローンライブラリーを構築したところ、解析した 37 クローンは 18 の OTU に分類され、特定種が優占化することなく、多様性に富んでいると考えられた。アルファプロテオバクテリアおよびベータプロテオバクテリア由来と考えられる配列が検出されたが、得られた多くのクローンは既知配列との相同性が低く、多種類の新種または新属の存在が示唆された。上流河川の礫表面には他の水圏とは異なる紅色光合成細菌が分布していると考えられた。

(5) 貧栄養河川におけるシアノバクテリアと緑藻の窒素を介した相互作用

緑藻などの真核微細藻類は河川の礫等にバイオフィームを発達させている。これら微細藻類は窒素固定できず、硝酸態窒素などの形で窒素元素を取り込まなければならない。

可溶性窒素濃度が低い環境における微細藻類の生存戦略に興味をもたれる。本研究では、窒素源を単独では獲得できない環境における微細藻類の生存性およびその機構を明らかにすることを目的とした。

窒素化合物を含まない培地を用いて、河床礫より採取した微生物群を継代培養し、窒素欠乏下でも微生物混合系内で緑藻が増殖することを見いだした。この微生物混合系には緑藻のほかにシアノバクテリアが共存していた。それぞれを純粋分離し、窒素化合物非添加培地で混合培養したところ、シアノバクテリアの増殖に遅れて、緑藻が増殖を開始し、シアノバクテリア依存的な緑藻の増殖が確認できた。一方、シアノバクテリアの増殖は緑藻の有無による影響を受けなかった。しかし、窒素固定活性をニトロゲナーゼのアセチレン還元活性を用いて測定したところ、緑藻との共培養によってシアノバクテリアあたりのニトロゲナーゼ活性は上昇していたことから、緑藻の増殖はシアノバクテリアの窒素固定活性を促進すると考えられた。

緑藻が窒素固定細菌との共存によって窒素化合物欠乏環境で生育できることを示した初めての報告である。このような種間関係は、緑藻の自然界での分布や生態だけでなく、植物と窒素固定細菌の共生関係の進化を考えるうえでも意義深い。

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 4 件）

- ① Hirose, S., K. V. P. Nagashima, K. Matsuura, and S. Haruta. Diversity of purple phototrophic bacteria, inferred from *pufM* gene, within epilithic biofilm in Tama River, Japan. *Microbes and Environments* (2012) in press.
- ② Otaki, H., C. R. Everroad, K. Matsuura, and S. Haruta. Production and consumption of hydrogen in hot spring microbial mats dominated by a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium. *Microbes and Environments* (2012) in press.
- ③ Everroad, C. R., H. Otaki, K. Matsuura, and S. Haruta. Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. *Microbes and Environments* (2012) in press.
- ④ Kubo, K., K. Knittel, R. Amann, M. Fukui, and K. Matsuura. Sulfur-metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa hot spring, Japan.

Syst. Appl. Microbiol., 34:293-302 (2011)

〔学会発表〕(計30件)

- ① 春田伸、大滝宏代、諸星聖、松浦克美「微生物生態系の成立様式を電子の流れで理解する」日本農芸化学会 2012 年度大会(京都) (2012)
- ② 諸星聖、松浦克美、春田伸「温泉微生物マット中の細菌の種間相互作用：プロテアーゼ産生菌による溶菌と運動性促進」日本生態学会第 59 回大会(大津) (2012)
- ③ Haruta, S., H. Otaki, S. Morohoshi, and K. Matsuura. Elaborate microbial ecosystems evolved in hot springs. 3rd Korea-Japan Symposium on Microbial Ecology (Gwangju) (2011)
- ④ Otaki, H., S. Iwata, S. Haruta, and K. Matsuura. Hydrogen transfer and electron cycling in the anoxygenic photosynthetic microbial mats. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo), (2011)
- ⑤ Kanno, N., S. Haruta, and K. Matsuura. Species-dependent difference of survivability under carbon starvation conditions in purple photosynthetic bacteria. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) (2011)
- ⑥ 大滝宏代、岩田聡実、春田伸、松浦克美「温泉バイオマット中における糸状性光合成細菌の光独立栄養的な生育を促進する元素硫黄の酸化と還元」第 27 回日本微生物生態学会(京都) (2011)
- ⑦ 菅野菜々子、春田伸、松浦克美「紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* は飢餓・暗条件でも生残性が高い」第 27 回日本微生物生態学会(京都) (2011)
- ⑧ 岩田聡実、大滝宏代、花田智、松浦克美、春田伸「緑色糸状性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* の独立栄養条件下での生育」第 27 回日本微生物生態学会(京都) (2011)
- ⑨ 菅野菜々子、春田伸、松浦克美「光合成細菌の貧栄養環境下での生残：種による違い」日本生態学会第 58 回大会(札幌) (2011)
- ⑩ 春田伸、松浦克美「陸上温泉に分布する好熱性シアノバクテリアの遺伝学的多様性」日本農芸化学会 2011 年度大会(京都) (2011)
- ⑪ Kanno, N., S. Haruta, and K. Matsuura. *Rhodospseudomonas palustris* survives longer than other purple phototrophic bacteria under carbon starvation. 13th

International Symposium on Microbial Ecology, (Seattle) Poster List, p. 58 (2010)

- ⑫ 広瀬節子、永島賢治、松浦克美、春田伸「多摩川上流河川礫上バイオフィルムの紅色光合成細菌の多様性」第 26 回日本微生物生態学会(つくば)、講演要旨集 p. 95 (2010)
- ⑬ 松川健宏、松浦克美、春田伸「脱窒能を有する光合成細菌の水圏からの探索」第 26 回日本微生物生態学会(つくば) (2010)
- ⑭ Hara, N., S. Haruta, and K. Matsuura. Laboratory cultivation of hot spring microbial mat containing sulfur-oxidizing bacteria and sulfate-reducing bacteria. 第 26 回日本微生物生態学会(つくば) (2010)
- ⑮ 菅野菜々子、春田伸、松浦克美「紅色光合成細菌の種により異なる飢餓生残と細胞内 ATP との関係」第 26 回日本微生物生態学会(つくば) (2010)
- ⑯ Gotoh, Y., K. Matsuura, and S. Haruta. Growth of green algae under nitrogen-deficient conditions was supported by coexisting nitrogen-fixing cyanobacteria. 第 26 回日本微生物生態学会(つくば) (2010)
- ⑰ 大滝宏代、春田伸、花田智、松浦克美「貧栄養嫌気条件の微生物群集における電子の循環と再利用」日本生態学会第 57 回大会(東京) (2010)
- ⑱ Otaki, H., R.E. Craig, S. Hanada, S. Haruta, K. Matsuura. Electron cycling in ecosystems: An analysis in microbial community. Institute of Low Temperature Science, International symposium "Frontier of Low Temperature Science", Sapporo, (2009)
- ⑲ 菅野菜々子、春田伸、松浦克美「紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* の飢餓生残に与える増殖相及び光の影響」第 25 回日本微生物生態学会(東広島) (2009)
- ⑳ 大滝宏代、久保響子、春田伸、花田智、可知直毅、松浦克美「生態系における酸化還元力循環：温泉微生物 マット群集をモデルにした解析」日本生態学会第 56 回大会(盛岡) (2009)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=envmic>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 克美 (MATSUURA KATSUMI)

首都大学東京・理工学研究科・教授
研究者番号：30181689