

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：64303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17879

研究課題名（和文）微生物核酸の同位体比測定による新たな生態系構造解析手法の確立

研究課題名（英文）A new method to analyze for ecological structure by measuring stable isotope ratios of microbial nucleic acids

研究代表者

大西 雄二 (Onishi, Yuji)

総合地球環境学研究所・基盤研究部・特任助教

研究者番号：10847677

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）：淡水湖沼生態系における底生動物群集を支える栄養源について、堆積物中の微生物活動の重要性を正確に評価するための新たな手法を確立することを目的として、微生物の核酸の回収・精製・同位体比測定方法の検討を行った。その結果、従来の精製法に問題があり、うまく同位体比を測定することができないことが明らかとなった。しかしながら、淡水湖沼生態系において硫黄同位体比を用いた、微生物活動に関する新たな評価手法を確立し、底生動物群集の栄養源として、堆積物中での硫黄循環とそれに伴う微生物活動が重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

淡水湖沼生態系において、堆積物中での硫黄酸化細菌や硫酸還元細菌の活動が、底生動物群集の栄養源として重要であることが初めて明らかとなった。これは、淡水湖沼生態系内にこれまで知られていない新たな栄養経路が存在していることを示唆している。この現象について、他の湖沼での調査を進めることによって、地球温暖化などの環境変動に対する淡水湖沼生態系の応答を理解する上で重要な知見が得られると期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated methods for recovery, purification, and isotope ratio measurements of microbial nucleic acids to establish a new method for accurately assessing the importance of microbial activity for nutrient resources supporting benthic animal communities in freshwater ecosystems. As a result, it became clear that the purification was problematic and that isotope ratios could not be successfully measured by the conventional methods. However, we established a new evaluation method for microbial activity using sulfur isotope ratios in freshwater ecosystems, and found that sulfur cycling in sediments and associated microbial activities are important as a nutrient resource for benthic animal communities.

研究分野：安定同位体生態学

キーワード：安定同位体 核酸 琵琶湖

1. 研究開始当初の背景

水圏生態系において、底生性の生活形を持つ動物は、ほとんど全ての動物門に存在し、非常にありふれた生活形であると同時にその種や形態は多様である。淡水湖沼生態系において底生動物は、堆積物中に蓄積した有機物を摂食することで有機物蓄積量を減少、摂食した有機物を消化することにより植物プランクトンなどの生物が利用可能な栄養塩を水中に放出、魚類など高次の栄養段階の動物の餌資源となることで食物連鎖を維持する。これらの働きによって生態系のバランスや健康、生物多様性を維持するのに貢献している (Covich et al. 1999 *BioScience*)。従って、底生動物がどのような栄養源に依存しているのかを定量的に評価することは、対象とする生態系における物質循環や食物網構造の理解、さらには水産資源管理や生態系保全においても重要である。

底生動物は移動能力に乏しいため、その場の堆積物中に蓄積したデトリタスとしての有機物を摂食している。デトリタスは主に湖沼表層の植物プランクトンなどの死骸が沈降して堆積したものからなる。また、デトリタスには堆積物中で活動する微生物に由来する有機物も含まれる。例えば、嫌気的な堆積物中では有機物分解に伴って発生するメタン (CH_4) を利用するメタン酸化細菌によって生産された有機物が、ユスリカなどの栄養源となっていることはよく知られている (Jones & Grey 2011 *Freshw. Biol.*)。一方で、淡水湖沼の底生動物群集における栄養源について、堆積物中の微生物に関してはメタン酸化細菌以外の寄与は全く知られていない。

生物の栄養源の特定や生態系構造の解析には、炭素・窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) が非常に有効である (Minagawa & Wada et al. 1984 *Geochim. Cosmochim. Ac.*)。本手法は対象とする生物の生物体とその餌の炭素・窒素安定同位体比を測定することで、各生物の栄養源や栄養段階を明らかにし、群集の食物網構造を解析する。しかし本手法は、例えば微生物のような採取・分離が困難な生物についての評価は不可能である。

核酸の同位体比測定の考え自体は古くから存在しており、環境中の核酸の炭素同位体比測定は 1990 年代に行われている (Coffin et al. 1990 *Appl. Environ. Microbiol.*)。しかし、環境中に微量にしか存在しない核酸の炭素同位体比を測定するには 100 L もの大量の試料が必要であった。さらに、窒素同位体比も測定するためにはさらに膨大な量の試料が必要となるため、測定された例はない。このような理由から環境中の核酸同位体比測定はあまり現実的ではなく、核酸同位体比の利用に向けた、基本的な培養実験もほとんど行われていない (Blair et al. 1985 *Appl. Environ. Microbiol.*)。

近年の同位体比測定技術の向上により、極微量での同位体比分析が可能となってきている。そのため、数十年前では実現できなかった環境中核酸の同位体比測定も可能となりつつある。従って、本研究において培養下における微生物核酸の同位体比がどのような代謝によって決定されているかという基本的な情報を明らかにしておくことで、環境中核酸の同位体比という新たな環境評価ツールを利用できるようになる。さらに将来的には核酸から、微生物群集構造解析と安定同位体比分析を合わせて行うことで生態系構造の理解が進展すると期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では核酸 (DNA, RNA) に着目した。核酸は全ての生物が持ち、異なる塩基配列を持つ理想的なバイオマーカーとみなすことができる。従って、微生物の核酸の同位体比から、菌体の同位体比を推定することができれば、生態系における微生物の役割の理解も劇的に進展することが期待できる。しかし、そもそも生物の核酸同位体比が測定された例はほとんどなく、「核酸同位体比」から「菌体の同位体比」を推定できるかという最も基礎的な情報も存在しない。そこで本研究では、培養下にある微生物について、安定同位体比測定に適した核酸の抽出、精製法を確立することを目的とした。

(2) 生物体中のリン含量は核酸代謝を介してその生物の成長速度と関連している。つまり、成長速度が大きい生物は、体組織を構成するタンパク質を合成するために、RNA の合成が活発になる。RNA は生物体中リンの主要なプールであるので、生物のリン含量と成長速度に相関が見られると考えられている。従って、生物の核酸代謝とリン含量は密接に関連しているが、生物体リン含量の定量には多くの試料を要するために小さい試料では測定が難しい。そこで、将来的に核酸代謝の指標としてリン含量を使用可能とするために、少量の試料量での生物体リン含量測定法を開発することを目的とした。

(3) 琵琶湖では、表層の植物プランクトンなどの沈降粒子に加えて、メタン酸化細菌に由来する有機物が底生動物の栄養源となっていることが既に知られている。従って、琵琶湖深層の底生動物群集を対象として、その栄養源におけるメタン酸化細菌以外の微生物に由来する有機物の寄与を定量的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 代表者が所属している研究室で培養されている脱窒菌 (*Pseudomonas aureofaciens*) を用いて核酸の抽出をおこなった。十分に増殖した菌体を遠心分離で回収後、市販の核酸抽出キット (ニッポンジーン社の ISOPLANT と ISOPLANT II) を用いて核酸の抽出をおこなった。抽出した核酸は洗浄と精製を繰り返し行い、微量試料測定用に改良された元素分析計連結型同位体比質量分析計 (木庭ほか 2021 *Radioisotopes*) にて炭素と窒素安定同位体比を測定した。得られた値を菌体の値と比較した。

(2) 生物体や水圏の懸濁物などのリン含量の測定に用いられる湿式酸化法を微量試料用に改良した。濃度や pH, 試料との混合割合を変化させた複数の反応試薬を調整し、あらかじめリン含量が既知である標準試料 (イカ粉末 NMIJ CRM 7406-a, 茶葉粉末 NMIJ CRM 7505-a) を用いた。湿式酸化された溶液中のリン酸イオン濃度をモリブデンブルー法で測定し、試料からのリン分解率を計算した。それぞれの条件から最も適した条件を検討した。

(3) 琵琶湖深層の底生動物群集から動物や堆積物、湖水などを採取した。試料採取は琵琶湖の湖水が成層化して深層に貧酸素水塊が形成される夏季に行われた。試料は琵琶湖最深部から採取された。採取された底生動物試料には、メタン酸化細菌を摂食していると考えられているユスリカ幼虫や、嫌気環境に強く堆積物中有機物を摂食する貧毛類などが採取された。採取した試料の安定同位体比を測定し、琵琶湖の底生動物の栄養源における微生物の寄与を評価した。

4. 研究成果

(1) 各抽出キットからの抽出物について、ISOPLANT 抽出物ではタンパク質がほぼ完全に除去できていたのに対して、ISOPLANT II 抽出物ではタンパク質が検出され狭雑物の除去が不十分であった。ISOPLANT 抽出物では、試薬からの炭素のコンタミネーションを防ぐことができず炭素安定同位体比測定に不適であることがわかった。ISOPLANT で抽出された核酸と菌体の窒素安定同位体比測定を比較したところ、それぞれの値は培養条件によって変動したが、その差は約 8% で常に一定であり、核酸と菌体の同位体比に関係がある可能性が明らかとなった。

(2) リン含量既知の標準物質を用いて、さまざまな条件でリン濃度を測定したところ、0.15M 水酸化ナトリウム溶液にペルオキシ二硫酸カリウム濃度が 4% になるように調整した溶液で動物、植物標準試料ともに約 100% のリン回収率を得た。また、試料量と反応溶液量の比率は、試料の 4 倍量以上の溶液を加えて反応させることで十分に生物体中リンが分解されることがわかった (図 1)。本手法を用いることで、0.1 mg 程度の生物試料でリンを測定することが可能となった (Onishi 2021 *Analytical Sciences* 37, 1771-1774)。

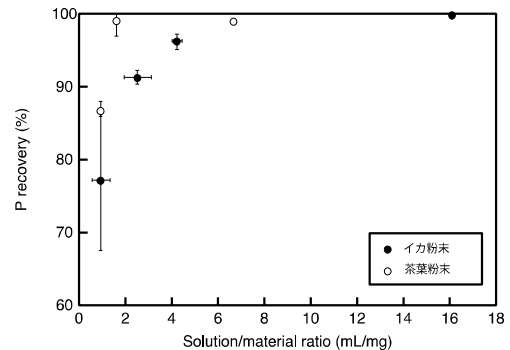


図 1. 反応溶液量とリン回収率の関係

(3) 琵琶湖深層の底生動物群集における堆積物中の微生物の寄与について、研究開始当初の計画を一部変更して、硫黄安定同位体比を用いた手法を考案した。本手法は代表者が深海生態系の調査で用いていた手法であり、それを淡水湖沼生態系へと適用させた。その結果、堆積物中の硫化物の硫黄同位体比は湖水中硫酸イオンの同位体比よりも明瞭に低く、堆積物中の硫酸還元細菌による硫酸還元が生じていることが示唆された。また、底生動物の硫黄同位体比は、イトミミズ (図 2 の黒丸) は硫化物と硫酸イオンの中間的な値、エラミミズ (図 2 の赤丸) では硫化物とほぼ等しい値であった。このことから、堆積物中の硫酸酸化細菌に由来する有機物から栄養を得ていることが示された。さらに、群集全体における堆積物中の硫酸酸化細菌の寄与率を計算すると 58% となり、硫酸酸化細菌が主要な硫黄源であることが明らかとなった (Onishi et al. 2023 *Geobiology* 21(5), 671-685)。

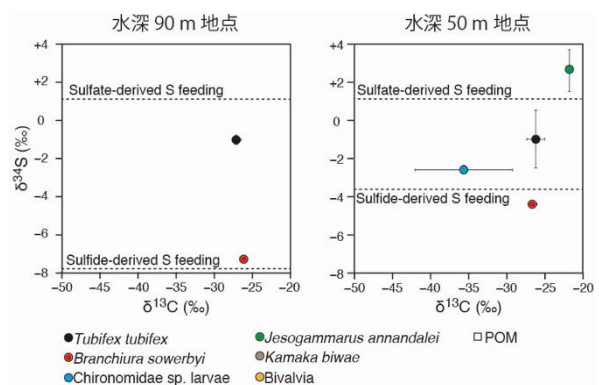


図 2. 琵琶湖の底生動物の炭素・硫黄安定同位体比

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大西雄二	4. 巻 8
2. 論文標題 淡水湖沼における底生動物群集を支える堆積物中の微生物活動	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 42-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Onishi Yuji, Yamanaka Toshiro, Koba Keisuke	4. 巻 21
2. 論文標題 Major contribution of sulfide derived sulfur to the benthic food web in a large freshwater lake	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Geobiology	6. 最初と最後の頁 671-685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gbi.12569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kurasawa Akira, Onishi Yuji, Koba Keisuke, Fukushima Keitaro, Uno Hiromi	4. 巻 68
2. 論文標題 Multipath ecological influence of an iteroparous fish migration from Lake Biwa to an alluvial stream	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Freshwater Biology	6. 最初と最後の頁 1400-1412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/fwb.14112	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 大西雄二	4. 巻 92
2. 論文標題 琵琶湖の底生動物の炭素・窒素・硫黄安定同位体比	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 92-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 ONISHI Yuji	4. 巻 37
2. 論文標題 Digestion Efficiency during Alkaline Persulfate Oxidation for Determination of Total Phosphorus Content of Biological Samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1771-1774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21p116	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 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大西雄二, 山中寿朗, 木庭啓介
2. 発表標題 淡水湖沼における底生動物群集を支える化学合成一次生産
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2024 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大西雄二, 宇野裕美, 倉澤央, 福島慶太郎, 木庭啓介
2. 発表標題 魚類遡上期の琵琶湖流入河川におけるアンモニウムの起源推定
3. 学会等名 日本生態学会第71回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大西雄二, 木庭啓介
2. 発表標題 循環期の琵琶湖における硫化物と底生動物の硫黄同位体比
3. 学会等名 第13回同位体環境学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大西雄二, 山中寿朗, 木庭啓介
2. 発表標題 成層期の琵琶湖における堆積物中硫黄循環と底生動物への影響
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大西雄二, 倉澤央, 宇野裕美, 福島慶太郎, 木庭啓介
2. 発表標題 遡上魚が排泄するアンモニウムと河川生物の窒素同位体比
3. 学会等名 日本生態学会第70回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Onishi Yuji, Yamanaka Toshiro, Koba Keisuke
2. 発表標題 Biogeochemical sulfur cycle and contribution of the sulfide to benthic animals in freshwater lake
3. 学会等名 12th International Conference on the Applications of Stable Isotope Techniques to Ecological Studies (IsoEcol 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西雄二, 山中寿朗, 木庭啓介
2. 発表標題 成層期における琵琶湖堆積物中硫化物の濃度と同位体比の鉛直分布
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Onishi Yuji, Uno Hiromi, Kurasawa Akira, Fukushima Keitaro, Koba Keisuke
2. 発表標題 Stable nitrogen isotopic signatures of ammonium in fish excretion and stream waters
3. 学会等名 日本生態学会第69回年会
4. 発表年 2022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
---------	---------