

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19071

研究課題名（和文）全球的鉄循環における磁性細菌と真核微生物との生物間相互作用の役割

研究課題名（英文）Role of predator-prey interactions between magnetotactic bacteria and eukaryotic microorganisms on global iron cycle

研究代表者

田岡 東（Taoka, Azuma）

金沢大学・生命理工学系・教授

研究者番号：20401888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：水環境に広く偏在する磁性細菌は、細胞内に一般的な細菌の百～千倍程度の鉄を含む。本研究では磁性細菌の微生物生態系における鉄の供給者として役割を検証した。まず、磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1 が原生生物に捕食された際に細胞内外の Fe²⁺ 濃度が上昇することがわかった。また、淡水池において磁性細菌を捕食する原生生物を同定したところ *Coleps* 属の繊毛虫が磁性細菌捕食者であった。さらに、磁性細菌捕食の淡水池の微生物組成への影響を調べたところ、磁性細菌捕食に特異的に増加する細菌種を確認した。本研究では、磁性細菌と真核微生物の生物間相互作用が環境中の鉄の存在状態や微生物群集への影響を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究から、海洋や湖沼などの水環境には多くの磁性細菌が生育しており、環境中の鉄を細胞内に濃集し生態系での鉄循環に重要な役割が期待されるが、磁性細菌が生態系で果たす意義は検討されてこなかった。本研究では、環境中での磁性細菌と真核微生物との被食捕食関係が、環境中の鉄の存在状態や同じニッチで生息する生物群集に及ぼす影響を初めて評価した。本研究の成果は、鉄供給者としての磁性細菌が貢献することを実証したもので、生態系の物質循環における細菌の新たな役割を提案した。本研究は、生態系の保全や制御方法を検討するための基礎知識として学術的社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：Magnetotactic bacteria (MTB) are ubiquitous in aquatic environments and contain 100 to 1000 times more iron than normal bacteria. In this study, we examined the role of MTB as iron providers in microbial ecosystems. We found that MTB predation by protist cells increased Fe²⁺ concentrations in the intra- and extracellular milieu. Moreover, we identified ciliates belonging to the genus *Coleps* as naturally occurring MTB grazers in a freshwater pond. Furthermore, we investigated the effects of MTB predation on the microbial compositions of a freshwater pond environment. In this study, we evaluated the effects of the interspecies interactions between MTB and eukaryotic microorganisms on environmental iron states and on microbial communities.

研究分野：分子微生物学

キーワード：磁性細菌 鉄循環 微生物生態 生物間相互作用 磁気感知 細菌 原生生物 磁鉄鉱

1. 研究開始当初の背景

鉄は、地球を構成する元素のうち4番目に豊富な元素であるが、酸素の存在する環境では、鉄は不溶性の Fe^{3+} (その溶解度はpH 7で 10^{-18} M) の状態で存在し、多くの真核生物はこれを直接利用できない。一方、細菌は、シデロフォア (キレート物質) を細胞外へ分泌し、 Fe^{3+} を取り込み利用できる。細菌に取り込まれた鉄は、食物網により微生物から高次消費者へ移行すると考えられている^{文献1}。しかし、その生産者たる細菌の実環境における実態はよく分かっていない。磁性細菌は、マグネトソームとよばれる膜小胞内で、磁鉄鉱 (Fe_3O_4) またはグレイジャイト (Fe_3S_4) の結晶を合成し、磁気を感じることができる細菌の総称である (図1) ^{文献2}。磁気鉱物のバイオミネラルゼーションのため、磁性細菌は一般的な細菌の100~1000倍の鉄を含んでいる。興味深いことに、2020年にAmorらが報告した試算では、海洋中に生息する磁性細菌の総数から海洋中に流れ込む年間鉄量の最大50%が、磁性細菌に取り込まれると見積もった^{文献3}。則ち、磁性細菌が、淡水及び海水環境で生物

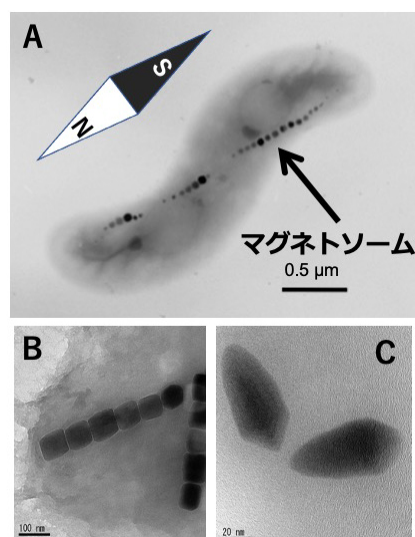


図1 (A) 磁性細菌の透過型電子顕微鏡写真。細胞中央の直鎖状の構造が磁気センサーとして働くマグネトソーム。(B,C) 磁性細菌が形成した磁鉄鉱結晶。

が利用可能な鉄の供給者として重大な役割を担うことが期待される。しかし、環境中で磁性細菌がどのような生物によって摂餌され、磁性細菌由来の鉄が食物網や環境にどのような影響をもたらすのか、磁性細菌を生産者とする生態系に関する研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、水圏生態系の鉄循環における磁性細菌の役割を評価し、磁性細菌の全球的生態系への未知の貢献を検証することを目的とする。鉄は、生命活動に必須の元素であるが、食物網において鉄循環を支えている微生物の実態は意外にもよく分かっていない^{文献1}。本研究では、磁性細菌が、生態系において生物利用可能な鉄の供給に貢献しているかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 原生生物による磁性細菌捕食が細胞内外の鉄濃度に及ぼす影響

原生生物 *Tetrahymena pyriformis* 培養液に磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (AMB-1) 細胞を添加し、AMB-1細胞を捕食させた。磁性細菌を捕食した *T. pyriformis* 細胞の磁気応答性は、光学顕微鏡下で磁石を設置して観察した。*T. pyriformis* 食胞内のマグネトソームは、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。*T. pyriformis* 細胞内 Fe^{2+} イオンの局在は、鉄特異のプロンプ *FerroOrange* を用いた蛍光顕微鏡観察により可視化した。培養液中の鉄イオン濃度の変化はフェロジン法を用いて測定した。

(2) 淡水環境中で磁性細菌を捕食する原生生物の同定

試料とした環境サンプルの採集は金沢大学角間キャンパス内にある淡水池で行った。同池には約3~5cmの堆積物が堆積しており、池の水を堆積物ごと採集した。AMB-1細胞懸濁液を12mg(湿重量)/mlとなるように池から採集した試料に添加し、1日から数日間室温で暗所に静置することでAMB-1を試料中の原生生物に捕食させた。その後、試料をガーゼでろ過し、濾液から磁石を用いて磁性を有する微生物を濃縮し、位相差顕微鏡で観察した。得られた磁性を示す原生

生物を含む試料からゲノム DNA を抽出した。ユニバーサルプライマーを用いて真核生物 18s rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、変性濃度勾配ゲル電気泳動法を用いて PCR 産物を分離した。得られた主要なバンドをゲルから切り出し、シーケンスすることで、種同定を行った。

(3) 原生生物による磁性細菌の捕食が微生物群集に与える影響

試料は、(2)で磁性細菌を捕食する原生生物が確認された淡水池から採集した。小型の水槽を実験区として、AMB-1 (1 g/L) 添加区、大腸菌 (1 g/L) 添加区、無添加区をそれぞれ作製した。細菌を添加後、0、2、4、6、9、14、18、22、26、30 日後にサンプリングを行った。サンプルは、ポアサイズ 0.45 μm のフィルターで濾過することで微生物を濃縮し、Dneasy Power Water Kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。得られた DNA 試料を鋳型として、原核細胞 16s rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーを用いて 16s rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、変性濃度勾配ゲル電気泳動法を用いて各実験区の細菌相の時系列変化を調べた。また、14、22、30 日目のサンプルについて、16s rRNA 遺伝 (V3/V4 領域) を用いたアンプリコンシーケンス解析 (生物技研) を行い、詳細な細菌種構成を解析した。

4. 研究成果

(1) 原生生物による磁性細菌捕食が細胞内外の鉄濃度に及ぼす影響

磁性細菌は水環境中の鉄循環に寄与することが期待されるが、磁性細菌と原生生物との捕食被食関係が細胞外環境の鉄分布に及ぼす影響はこれまで評価されていない。そこで、本研究では、原生生物のモデル生物である *T. pyriformis* と磁性細菌のモデル生物である *M. magneticum* AMB-1 を用いて、磁性細菌が原生生物に捕食された際に、細胞内外の鉄濃度にどのような影響があるかを調べた。磁性細菌を摂食した *T. pyriformis* は磁気応答を示し、その食胞内に多数のマグネタイト結晶を含んでいた。鉄特異的プローブを用いた蛍光イメージングの結果から、磁性細菌を捕食した *T. pyriformis* は、通常の細菌を捕食した細胞に比べて細胞内の鉄イオン含有量が 5 倍高くなった。マグネトソームを緑色蛍光蛋白質 (GFP) で標識した AMB-1 を捕食させたところ、鉄プローブと GFP のシグナルが顆粒状の構造 (食胞と思われる) に共在したことから、AMB-1 由来の鉄イオンが *T. pyriformis* 細胞内に供給されることがわかった。興味深いことに、磁性細菌の捕食がおこった培養液では、細胞外の Fe^{2+} イオン濃度が上昇した。このことから、磁性細菌が原生生物に捕食されることで、磁性細菌由来の鉄が、生物が利用しやすい Fe^{2+} イオンの状態で環境中に放出されることが初めて示唆され、鉄循環における磁性細菌の重要性を実験的に示すことができた。この結果は、原生生物による磁性細菌捕食が、他の微生物に鉄資源を供給するという仮説を支持しており、論文発表した (Environ Microbiol Rep.15(3):181-187 (2023))。

(2) 淡水環境中で磁性細菌を捕食する原生生物の同定

(1)では、モデル生物を用いて実験室内で磁性細菌の捕食と鉄イオン濃度への影響を調べた。それでは実際の環境中で磁性細菌を捕食する原生生物は存在するのだろうか。本研究では、淡水環境における「磁性細菌食者」の種同定を目的に以下の実験を行った。まず、*Magnetospirillum* 属と見られる磁性細菌が実際に生育する淡水池から微生物群集を含む底泥試料を採集した。そこに AMB-1 の細胞懸濁液を加え、一定期間恒温し環境微生物による磁性細菌の捕食を促した。その後、試料から磁石に濃集する微生物を単離したところ、繊毛虫と思われる原生生物が多数採集できた。得られた細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR によって増幅された 18s リボソーム遺伝子をコードする DNA を増幅し、塩基配列を決定したところ繊毛虫 *Coleps amphacanthus* の塩基配列と 98% 相同な配列が得られた。磁石に濃縮される微生物は、尾部の棘状突起や板状構造に覆われるなど *C. amphacanthus* の形態的特徴を示したことから、当該環境では *Coleps* 属の微生物が「磁性細菌食者」であることがわかった。

(3) 原生生物による磁性細菌の捕食が微生物群集に与える影響

本研究では、微生物生態系において磁性細菌が食物連鎖を介して鉄を供給する可能性を検証するため原生生物による磁性細菌の捕食が微生物群集に及ぼす影響を調べた。(2)の結果から、調査区である淡水池において、*Coleps* 属の繊毛虫が AMB-1 を捕食することがわかった。次に、この淡水池を再現した水槽に AMB-1 または大腸菌を添加し、2 日おきに定期的にサンプリングを行った。それぞれの試料中に含まれる DNA を精製し、得られた試料を鋳型として細菌 16s rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により細菌種構成の経時変化を調べた。その結果、AMB-1 および大腸菌のバンドは、細菌添加後 7 日程で消失することから、添加した細菌が捕食・消化されたことが示唆された。興味深いことに、磁性細菌を添加した区画と大腸菌を添加した区画では微生物群集を構成する種組成が異なることがわかった。次に、16s rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析を行い細菌種構成の違いを詳細に調べた。その結果、*Rhodobacteraceae* 属や *Polynucleobacter* 属細菌が AMB-1 添加区で特異的に確認できることや、いくつかの細菌種が AMB-1 の添加区で増加することが明らかになった。現在は、これらの細菌種構成の変化が、鉄イオンに依存的であるかを確認するための実験を実施中である。この結果は、磁性細菌が原生生物に捕食されることが微生物群集の多様性に影響することを示唆している。

(4) まとめ

水環境に存在する磁性細菌の細胞数の見積もりから磁性細菌が保持する鉄量を概算すると、年間に海洋環境に流入する鉄量の 0.1~50%を保持することが示唆され^{文献3}、磁性細菌は、生命活動に必須元素である鉄の循環において、未知の重要性を持つことが期待された。そこで、本研究では、磁性細菌が微生物生態系における鉄資源を供給しうるかを検証した(図2)。まず、磁性細菌が原生生物に捕食されるのか、そして磁性細菌が捕食された際に細胞外の鉄濃度が上昇するかを、モデル原生生物 *T. pyriformis* を用いて調べたところ、*T. pyriformis* は捕食した磁性細菌の磁鉄鉱結晶で磁性を示すほど多くの磁性細菌を捕食すること、その際に細胞内外の Fe^{2+} 濃度が上昇することを明らかにした。さらに、淡水環境中で磁性細菌 AMB-1 を捕食する原生生物を同定したところ、*Coleps* 属の繊毛虫が AMB-1 を捕食することがわかった。淡水池中の微生物群集の多様性に、磁性細菌の原生生物による捕食が影響を与えるかを調べるため、淡水池由来の微生物群集に AMB-1 と大腸菌を加えて比較したところ、AMB-1 を加えた際に特異的な細菌群集の変化が確認された。今後の課題として、検出された微生物群集の変化が磁性細菌由来の鉄イオン供給の影響によるものかどうかを検証する必要がある。本研究では、これまで注目されてこなかった磁性細菌と真核微生物の生物間相互作用が環境中の鉄の存在状態や、同じ環境に生息する微生物群集への影響を初めて評価した。

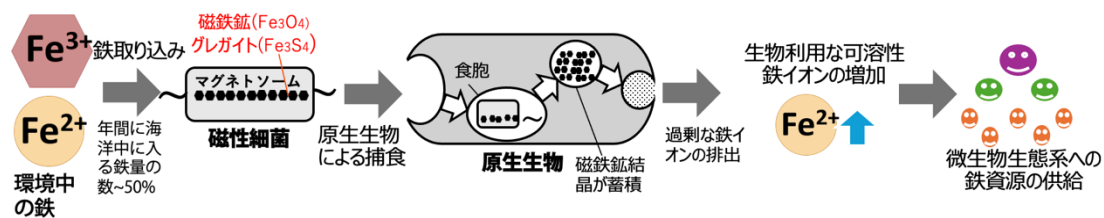


図2 磁性細菌の捕食による微生物生態系への鉄イオンの供給の概念図

- 文献： 1) 水環境学会誌 39:197-210 (2016).
 2) *Nat Rev Microbiol.* 14(10):621-637 (2016).
 3) *Environ Microbiol* 22(3):823-831 (2020).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Seki Yusuke, Eguchi Yukako, Taoka Azuma	4. 巻 15
2. 論文標題 Influence of protozoan grazing on magnetotactic bacteria on intracellular and extracellular iron content	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 181 ~ 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1758-2229.13140	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 Taoka Azuma, Eguchi Yukako, Shimoshige Rino, Fukumori Yoshihiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Recent advances in studies on magnetosome associated proteins composing the bacterial geomagnetic sensor organelle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 228 ~ 238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13062	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 Wan Juan, Monteil Caroline L., Taoka Azuma, Ernie Gabriel, Park Kieop, Amor Matthieu, Taylor-Cornejo Elias, Lefevre Christopher T., Komeili Arash	4. 巻 13
2. 論文標題 McaA and McaB control the dynamic positioning of a bacterial magnetic organelle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-32914-9	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 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 福井深月, 池田慶信, 田岡東
2. 発表標題 原生生物による磁性細菌の捕食が微生物群集に与える影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会 アジア微生物生態シンポジウム第13回浜松大会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関 雄介, 江口 友佳子, 田岡 東
2. 発表標題 原生生物による磁性細菌捕食が細胞内外の鉄濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会 アジア微生物生態シンポジウム第13回浜松大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井深月, 田岡東
2. 発表標題 原生生物による磁性細菌捕食が微生物群集に与える影響
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuanyuan Pan, Takumi Saito, Yousuke Kikuchi, Azuma Taoka
2. 発表標題 マグネトソームを固定する動的MamK細胞骨格繊維を維持するMamJ機構解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下茂 梨乃, 江口 友佳子, 田岡 東
2. 発表標題 Qind株を用いた細胞内で新規合成されたマグネトソーム配置機構解析
3. 学会等名 第18回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Azuma Taoka, Yousuke Kikuchi, Takumi Saito, Yoshihiro Fukumori
2. 発表標題 Dynamic in vitro assembly of MamK cytoskeleton for magnetosome positioning.
3. 学会等名 The 7th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukako Eguchi, Yusuke Seki, Yoshinobu Ikeda, Yoshihiro Fukumori, Azuma Taoka
2. 発表標題 Identification of protozoan predators that feed on magnetotactic bacteria from freshwater environment.
3. 学会等名 The 7th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田 瑞希、江口 友佳子、田岡 東
2. 発表標題 細菌オルガネラ「マグネトソーム」の形成初期に起こるタンパク質間相互作用の同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下茂 梨乃、田岡 東
2. 発表標題 磁性細菌Magnetospirillum magneticum AMB-1細胞内で新規に合成されたマグネトソームの配置機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古田瑞希、江口友佳子、田岡東、
2. 発表標題 細菌オルガネラ「マグネトソーム」の形成初期に起こるタンパク質間相互作用の同定
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学生体分子生理学研究室ホームページ http://pronet.w3.kanazawa-u.ac.jp/J/index.html

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