

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281044

研究課題名(和文)生物間相互作用を利用した湖沼生態系保全

研究課題名(英文)Conservation of lake ecosystems by biological interactions

研究代表者

伊藤 公紀(Itoh, Kiminori)

横浜国立大学・環境情報研究科(研究院)・教授

研究者番号：40114376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：湖沼生態系保全を目的に数理モデル研究と室内実験を行った。始めにウキクサの根圏細菌群集が藍藻類を捕食する効果を数理モデルに導入したところ、栄養塩負荷の低減を行うことなく藍藻類の増殖を抑制できることが示された。また、ウキクサ根圏細菌が細胞密度依存的なシグナル伝達によって殺藻性を示すことが示唆されていることから、そのメカニズムについて酵母細胞を用いて検討したところ、高密度化した酵母細胞は高い同期性を示すことが明らかとなった。さらに、ウキクサと共生している細菌群集構造をPCR-DGGE法により調べたところ、藍藻類の増殖抑制に関わると思われる特徴的な挙動を示す細菌群集の存在が見られた。

研究成果の概要(英文)：Ecosystem modeling study and laboratory experiments were carried out for lake-ecosystem conservation. Analysis of the developed mathematical model showed that cyanobacteria can be reduced by bacteria living in the rhizosphere of duckweed without reducing loading of nutrient. Algicidal effects of the bacteria called quorum sensing was investigated by using yeast cells as a model organism. It was shown that yeast cells of high density exhibited high degree of synchronization of metabolism probably due to quorum sensing. Experiments using the PCR-DGGE methods revealed that at least one community of bacteria played a significant role in reducing cyanobacteria.

研究分野：環境計測科学

キーワード：湖沼生態系 生物間相互作用 ウキクサ 根圏細菌群集 クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

富栄養化によって異常増殖する藍藻類（アオコ）の発生メカニズムや除去手法等について、申請者らは、数理生態モデル、マイクロコズム実験、フィールド調査（相模湖・津久井湖）によって研究を行ってきた。その結果、水生植物の根圏に生息する細菌群集を利用すると効果的にアオコの増殖を抑制できること、および、水生植物から根圏細菌へのフラボノイド化合物の供与によって細菌群集のアオコ増殖抑制能が活性化される可能性を示し、特許出願に至った（2009年-105196）。

具体的な研究の背景は大きく以下の2つである。

(I)-(i) 生態系の双安定理論

湖沼生態系の理論的研究および事例研究によれば（G-Kato & Carpenter, *Ecology*, 2005; Sheffer et al., *Nature*, 2001; 2009）栄養塩が過剰負荷された環境条件下では、藍藻類が異常増殖した「汚濁」状態のみが安定であるが、栄養塩負荷を軽減して行くと、「汚濁」状態の他に、増殖が抑制された「清澄」状態も存在が可能となる。この双安定状態に、栄養段階カスケード理論（Carpenterら, *BioScience*, 1985）を適用すると、動物プランクトンの藍藻類への捕食圧を上げる生物操作人為的に行なうことで、湖沼生態系を「汚濁」状態から「清澄」状態へと、大きく変化（レジームシフト）させる可能性が生まれる。申請者らは、湖沼の数理生態モデルの解析、および、マイクロコズム（微小生態系）実験により、湖沼生態系の双安定性について詳細に検討を行ってきた（Amemiya et al., *Ecology and Society*, 2005; *Ecological Modelling*, 2006；基盤研究（C）H17-H18）。そこで本研究課題では、栄養段階において藍藻類と競争関係にあり、かつ、水生植物からのフラボノイド化合物等の供与により活性化された細菌群集の効果を新たに数理モデル化することにより、湖沼生態系の双安定理論を展開し、生物間相互作用を利用した湖沼生態系の回復手法の可能性について数理的に明らかにする。

(I)-(ii) 根圏細菌を利用した藍藻類の除去手法

水生植物に生息する根圏細菌群集を利用することで、効果的にアオコの増殖を抑制できること、および、水生植物と根圏細菌の間でフラボノイド化合物を介したシグナル伝達が行われていることを水生植物の遺伝子発現から確認し、これらの結果を基にして特許出願を行った（雨宮・伊藤ら 特許出願 2009年-105196）。そこで、水生植物と根圏細菌間のシグナル伝達機構を、化学物質の分析や遺伝子発現の解析などから明らかにし、生物間の共生的相互作用が藍藻類の除去に有効であることを明らかにする。

(II) 細菌群集の多様性解析

申請者らは、有効な解析手法として、高分離能二次元電気泳動に基づいた、総観的DNA二次元マップ法を開発した（伊藤・雨宮ら *Soil Science and Plant Nutrition*, 2006; *J. Bioscience and Bioengineering*, 2008）。本研究においては、根圏細菌群の動態をPCR-DGGE法を用いて、群集構造の解析を行う。

2. 研究の目的

本研究では、上記の基礎的知見を発展させ、数理生態モデル解析、水生植物と根圏細菌間のシグナル伝達機構の解析、根圏細菌群集の構造解析を行い、水生植物と根圏細菌群集の共生的相互作用を利用したアオコの効果的な除去手法を提示することを目的とした。

3. 研究の方法

生物間相互作用を利用した富栄養化湖沼生態系の回復手法を提示することを目的として、(i)新しい数理生態モデルの構成と解析、(ii)ウキクサの根圏細菌群集の細胞密度依存シグナル伝達に関するモデル生物実験、および、(iii)ウキクサの根圏細菌群集のPCR-DGGE解析を行った。上記の3つの研究課題は相互に関連している。すなわち、申請者らが開発・解析を行ってきた数理生態モデルに、当研究室にて発見されたウキクサの根圏細菌群集の藍藻類除去効果を組み込んだ数理生態モデルの構成と解析を行い、湖沼生態系の双安定理論に基づく湖沼生態系の効果的な回復手法を提示する。また、ウキクサと根圏細菌群集間のシグナル伝達が藍藻類の除去効果に大きく関与している可能性を明らかにする。

4. 研究成果

(i) 数理モデルの構成と解析：

湖沼生態系の5変数モデル（Amemiya et al., *Ecology & Society* 2005）に、「ウキクサ - 根圏細菌共生系が藍藻類の増殖を抑制する効果」を考慮した数理モデルを構成した。この効果は、元となった5変数数理モデルにおいて、藍藻類の個体数密度の時間変化を表す式に、Holling Type-III型の捕食項として導入した。

上記モデルの線形安定性解析を行うと、根圏細菌群集が藍藻類の増殖を抑制する効果として、藻類の密度を表す安定性曲線が、府栄養側にシフトすることが明らかとなった。すなわち、富栄養化が進んだ状態においても、「ウキクサ - 根圏細菌群集」を導入することで藍藻類の増殖が抑制された単安定状態が実現される可能性が示された。この結果は、湖沼集水域からの栄養塩類の負荷を削減することが困難な地域においても、部分的な生物間相互作用を利用することで、藍藻類の増殖が抑制された湖沼生態系を回復できる可

能性を示している。

(ii) 細菌群集の細胞密度依存性に応じたシグナル伝達機構の解析

ウキクサ根圏の微生物群集は細胞密度が高くなると藍藻類を殺藻する2次代謝物などを産生していると思われる。そこで、微生物間の情報伝達メカニズムとして知られている細胞密度依存的シグナル伝達(クオラムセンシング)について、モデル生物として酵母細胞を用いて検討した。

遠心器を用い高重力下において、酵母細胞を懸濁させたアルギン酸ナトリウム水溶液を塩化カルシウム水溶液が満たされたマイクロチューブの底に微細管から放出することで、酵母細胞が封入された数百マイクロメートルの大きさのアルギン酸マイクロカプセルを作成した。酵母細胞を封入したマイクロカプセルをガラススライド上のチャンバーに入れ、チャンバーを倒立顕微鏡のステージに静置した。チャンバーにグルコースとシアンを入れ、個々の細胞の解糖系振動反応を観測した。観測には、NADHの自家蛍光を用いた。観測データを画像解析ソフト(Image J)を用いて処理を行い、ノイズを除去した個々の細胞の時系列振動データを得た。

時系列データにヒルベルト変換を施し、複素数の時系列解析信号データを得た。解析信号の位相情報を抽出し、複素平面状の単位円周上にデータをプロットした。それぞれの細胞の振動の位相情報を表す単位ベクトルを各時間毎に加え、蔵本が提唱したオーダーパラメータ(K)を算出した。 K の値が1であれば全ての細胞が完全な位相同期をしており、ゼロであればランダムな位相関係にあることを示す。

異なる細胞密度でマイクロカプセル内に封入された個々の酵母細胞の時系列振動データと対応するオーダーパラメータを比較すると、細胞密度が高いほどオーダーパラメータの値は1に近く、各細胞が位相を同期させて解糖系振動反応を起こしていることが分った。溶液に懸濁させた系においては、酵母細胞はクオラムセンシングのメカニズムによって、ある細胞密度以下では振動を示さないとされてきた。

しかし、本システムは、微生物群集がウキクサ根圏に集まっている状態により近いような条件、すなわち、スライドガラス上に分散させた系における研究である。その結果、細胞密度が低い場合でも、個々の細胞は振動を起こすこと、また、その位相同期の割合は低いものの、シグナル伝達により細胞間同期が起こることが明らかとなった。

本実験では、細胞密度のみならず細胞の集合状態を制御することが可能となる。従って、本結果は、根圏に生息する細菌の細胞間情報伝達の空間的集合状態依存性を研究する上でも有用な知見であると考えられる。

(iii) ウキクサの根圏微生物群集の構造解析

大学構内の池、相模湖、相模川から採取した水を、それぞれ150 mlにアオコ(*Microcystis aeruginosa* NIES298)が 5×10^6 個/mlになるよう調整し、N濃度を0.5 ppm、P濃度を0.5 ppmに調節した(閉鎖系(シャーレ法))。加えたウキクサは50葉(frond)とし、各サンプルにおいて5日間アオコの個体数変動を観察した。その後、水中およびウキクサ微生物から常法に基づきDNA抽出し、プライマー341F-GC/907RでPCRを行い、DGGEにて微生物群集比較を行った。なお、本法ではウキクサ及びアオコのDNAは抽出されないことを確認している。DGGEは、ポリアクリルアミド8%ゲルを用い、変性剤(尿素+ホルムアミド)濃度20%~60%の濃度勾配で行った。

上記各サンプルのPCR産物についてDGGEを行い、その電気泳動画像を図1に示す。これをもとに、サンプル中の水中微生物及びウキクサ根圏微生物の微生物群集構造を比較した。さらに特徴的なバンドを矢印で示した(A1~A5)。その結果、1)相模湖と相模川とは水中微生物群集構造が異なるが(1と3列)、アオコは増殖した、2)アオコが増殖とともに、バンドA4微生物は水中で著しく増加する(相模湖、相模川でも共通)、3)しかし、ウキクサの添加により、バンドA4微生物は低下する(相模湖、相模川でも共通)、4)バンドA4微生物はウキクサ根圏微生物群集の中にも存在する、5)バンドA1,A2,A5微生物はウキクサ根圏微生物であり、アオコの有無に影響を受けない、6)バンドA3微生物もウキクサ根圏微生物であるが、アオコの存在により、低下傾向が見られる、7)バンドA4微生物はより汚染が進んでいる相模川にも存在する、8)バンドA4は、本抽出法はアオコのDNAを抽出できないこと及びアオコがすでに消滅した検体にも強くみられることから、アオコ由来とは考え

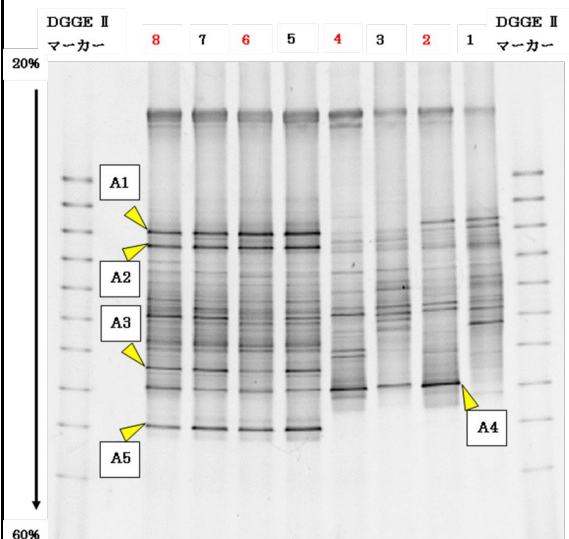


図1. 各PCR産物のDGGE画像

にくい。

以上より、ウキクサ根圏微生物には少なくとも5種類(A1,A2,A3,A4,A5)微生物が存在し、そのうち、A4はアオコ増殖に伴い水中で増殖し、ウキクサの添加でその増殖が抑制されることが明らかになった。従って、A4はウキクサによるアオコ増殖抑制機構に何らかのかたちで関与する可能性が考えられる。

一般に、共生菌とその植物宿主とは、互いに助け合う関係にある。実際に、ある植物では、従属生物である共生微生物に、酸素、アミノ酸、糖類、補酵素、ポリフェノール等の有機物を供給し、一方、共生菌は、鉄運搬体シデロホア等を産生することにより植物宿主に必須な微量元素(Fe, Cu, Zn, Co, Cr, V, Se etc)等を供給することが知られている。なお、鉄イオン等は細胞膜を通過できず、鉄運搬体等を介して初めて細胞内に移行する。従って、葉緑素を持つ独立栄養生物である水中単子葉植物のウキクサとその根に共生する従属生物の根圏微生物A4とが、上述と同様なメカニズムで共生関係にあると考えてもおかしくない。実際、水中の鉄イオン濃度は非常に低く、例え、窒素、リン、カリウムが豊富でも、その微量金属を利用できない限り水中植物は生育できない。

さて、同じく、葉緑素を持つ独立栄養生物であるシアノバクテリアのアオコの場合はどうだろうか。アオコも当然、鉄等の微量金属を必要とする。従って、もしA4微生物が鉄運搬体シデロホアを産生すると仮定すると、A4微生物が水中で十分に増殖していれば、それが産生する鉄運搬体等をアオコが利用し増殖することが十分に考えられる。また、従属栄養生物であるA4微生物もアオコが生産する有機物質を利用しているかも知れない。しかし、ともに浮遊系微生物であるため、例え、互いに有益な物質を利用するにしても、物理的に効率が悪いと思われる。一方、ウキクサの場合は、水中の根という必要物質の供給に物理的に都合の良い場所をA4微生物に提供できる。

従って、A4が共生菌であることを考慮すると、共生菌A4は、葉緑素をもつ独立栄養生物であるウキクサとアオコに鉄運搬体等を供給し、その増殖を促進させるが、ウキクサは水中のA4微生物をその根に補足・集中させることにより、結果的にアオコへの成長物質の供給を断つのではなからうか。A4微生物にしても、ウキクサの根の方が遙かに居心地が良いと思われる。以上のことを想定すると、ウキクサのアオコの増殖抑制作用を説明することが可能である。勿論、他の共生菌が特異的なアオコの増殖抑制物質を産生する可能性もある。

相模川は上流の上野原市、大月市、都留市等の生活排水の影響を受けて富栄養化しており、しばしばアオコの大発生が見られる。一方、相模湖の場合は陣馬山水系からの清流

が流れ込むことから、水質は比較的きれいであり、アオコの発生は少ない。図1.に示すように、A4と思われる微生物は相模湖の水では殆どみられないが、富栄養化している相模川の水には明瞭に観察される。このことは、相模川ではすでにA4微生物が増殖しアオコにとって好都合の状態になっており、その後のアオコ大発生を示唆しているのかも知れない。今後、A1 - A5のDNA配列を決定すれば、A4を含む根圏微生物が特定され、ウキクサによるアオコ増殖抑制のメカニズム解明に役立つであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1) Amemiya, T., Obase, K., Hiramatsu, N., Itoh, K., Shibata, K., Takinoue, M., Yamamoto, T., Yamaguchi Y. Collective and individual glycolytic oscillations in yeast cells encapsulated in alginate microparticles. *Chaos*, 25, 0646061-06466067, 2015. (査読有)

2) Nakajima, H., Hara, K., Yamamoto, Y., Itoh, K. Effects of Cu on the content of chlorophylls and secondary metabolites in the Cu-hyper accumulator lichen *Stereocaulon Japonicum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 477-482, 2015. (査読有)

3) Shibata, K., Amemiya, T., Itoh, K. Effects of oxytetracycline on populations and community metabolism of a aquatic microcosm. *Ecological Research*, 29, 401-410, 2014. (査読有)

4) Tsuboi, S., Amemiya, T., Seto, K., Itoh, K., Rajendran, N. The ecological roles of bacterial populations in the surface sediments of coastal lagoon environment in Japan as revealed by quantification of 16S rDNA. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 759-774, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計12件)

1) 小長谷耕平、平松直樹、柴田賢一、伊藤公紀、雨宮隆、細胞の階層性ダイナミクスを用いた毒性評価概念の創出、第25回非線形反応と協同現象研究会、2015.10.3、旭川医科大学。

2) 柴田賢一、雨宮隆、伊藤公紀、相対群集代謝による群集レベル代謝活性の解析、第62回日本生態学会、2015.3.18-3.22、鹿児島大学。

3) 柴田賢一、雨宮隆、伊藤公紀、抗生物質オキシテトラサイクリンのマイクロコズムへの影響、第20回日本環境毒性学会研究発表会、2014.9.10-9.11、富山国際会議場。

4) Amemiya, T. Glycolytic synchronization in yeast cells via ATP. *Bio-inspired Nonlinear Dynamical Systems*, 2014.2.20,

Tsukuba.

5) Amemiya, T. Cell-to-cell communication in yeasts via ATP. 23rd Annual Meeting of MRS-Japan, 2013.12.9-12.11, Yokohama.

6) 柴田賢一、雨宮隆、伊藤公紀、微小二一パターン形成と環境影響評価、第23回非線形反応と協同現象研究会、2013.12.07、北海道大学。

7) Amemiya, T. Molecular processes and nonlinear dynamics in glycolytic oscillations in yeast cells. The 2nd German-Japanese Workshop on Nonlinear Sciences and KANSEI-Informatics, 2013.8.29-8.30, Yamaguchi.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 公紀 (ITOH KIMINORI)

横浜国立大学・環境情報研究院・教授

研究者番号 : 40114376

(2) 研究分担者

雨宮 隆 (AMEMIYA TAKASHI)

横浜国立大学・環境情報研究院・教授

研究者番号 : 60344149