

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450108

研究課題名(和文)メタゲノム法によるアオコの消長に關与する細菌とファージの同定と季節変動解析

研究課題名(英文) Analysis of seasonal change and identification of the bacteria and phages responsible for the algal blooming by metagenomics method.

研究代表者

福島 淳 (Fukushima, Jun)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00181256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：3年間通じて秋田県八郎湖のアオコ発生環境でほぼ月に1回、微生物の調査を行った。その結果、八郎湖においてアオコはMicrocystis属の細菌が、水温が高くなる7月後半から9月にかけて大量に増殖し、全細菌数の90%以上を占めることで発生することが確認された。一方、9月に水温が低下するとともに、Microcystis属菌は10%以下まで急激に減少する。この減少にはMicrocystis属菌に感染するファージが關与することを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have been studied of the microbiome and virome in the Hachiroko-lake every month for these three years without freezing period. The algal blooming in the Hachiroko-lake was emerged by the rapid growth of Microcystis cells more than 90% of total bacteria in the middle of July to September in which the water temperature was above 25 . After the middle of September, the water temperature fell down and the ratio of Microcystis rapidly decreased bellow 10% of total bacteria. Our result represents the possibility of the participation of Microcystis phage for this reduction.

研究分野：環境微生物学

キーワード：アオコ ファージ メタゲノム 次世代シーケンサ 次世代シークエンサ Microcystis microbiome virome

1. 研究開始当初の背景

アオコは世界的に淡水環境で問題となっている。特に、動物に対する毒素を産生するランソウの異常発生の対策は大きな課題である。我が国でも多くの湖沼でアオコの発生が見られ、一部では毒素の産生も観察されているが、今のところヒトや動物に危険なほどの濃度には至っていない。しかし、今後地球の温暖化が進んだ場合には対策が必要になる可能性が高いため、現時点でその方策を考えておく事は重要である。

このアオコの発生様式については研究が幾つかある¹⁾。それらの中でアオコ発生の主要なランソウである *Anabaena* と *Microcystis* などの季節変化に関する記述がある。しかし短期間でこれらの細菌が入れ替わって、ある種が多数をしめるメカニズムについては幾つかの仮説があるが、いまだ確証が得られていない。一方、海水や淡水などの水環境中には様々な微生物が生息していることが知られている。その中でも主要な生物である細菌以上にウイルス様粒子が大量に存在していることも分かってきた²⁾。しかし、水環境中の細菌の多くは培養が困難なためその存在様式は完全には理解できていないと同時に、それらの細菌を宿主とするウイルスであるファージについてもほとんど理解されていない。さらにどの様なファージが生息して、細菌と共に変動しているかという研究もごく少数しかなく³⁾、アオコに感染するファージの研究も試験管内での解析⁴⁾を除いて非常に少ない。

一方、環境の微生物、特に環境細菌の研究に次世代シーケンサを利用したメタゲノム解析⁵⁾がここ数年盛んに行われるようになってきている。この研究は、環境から直接 DNA 等の核酸を抽出し、その配列を網羅的に決めてコンピュータ上で結合させ、最終的には存在する細菌等のゲノムをコンピュータ上で再構築するものである。現在のところ、比較的単純な微生物叢での解析⁶⁾が主で、土壌のような存在菌種が数万種以上の環境では解析方法が確立されていない。このような中で、淡水環境でアオコが発生する状況では、特定の細菌の優先種化が起こり、微生物叢は比較的単純であることが想定される。2007年に湖沼水質保全特別措置法の指定湖沼となった秋田県八郎湖ではアオコの発生状況が詳細に調査されている⁷⁾。その結果、水温が上がり始める初夏では *Anabaena* 属菌が増殖するが一旦減少し、その後数種類の *Microcystis* 属菌が増加し、秋期になると急速に減少する事が分かっている。このランソウ類の急速減少のメカニズムは分かっていないが、ファージが関与している可能性が示唆されている。我々は、昨年度9月と11月に湖水を200L採取し、そのウイルス画分について、DNAを抽出してメタゲノム解析を行った。その結果、9月には *Anabaena* や *Nostoc* 等の繊維状ラン

ソウを宿主とするファージが観察されたが、11月には観察されなかった。このことから、細菌とファージのメタゲノム解析を同時に行う事により、アオコの消長メカニズムの詳細が解明できると考えられた。またそのファージを利用できれば、アオコの発生を制御できる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

淡水環境のアオコ中ではアオコの主要構成細菌であるランソウ細菌種が季節変動している事が知られているが、アオコ発生のメカニズムは完全には理解されていない。近年、水環境中の細菌数の制御にファージ(細菌ウイルス)が重要な役割を担っている可能性が指摘されている。一方、我々の研究でもアオコ発生環境で、ランソウを宿主とするファージ種が菌の消長とともに変化する結果を得ている。このことから、アオコ発生に影響を与えるファージが存在している可能性が考えられた。そこで本研究では、まずアオコが定期的に発生する秋田県八郎湖をフィールドにして、その菌とファージの季節変動を次世代シーケンサとメタゲノムにより解析し、アオコ発生におけるファージ関与様式を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

アオコ発生環境中の淡水細菌とウイルスを、結氷期(1月-3月)を除いて月に1回サンプリングして、次世代シーケンサを使用して網羅的に調査した。一方、アオコ中のランソウ類細菌の培養と同時にファージの分離についても試みた。実際には細菌群集は16SリボソームRNA遺伝子を次世代シーケンサで解析するとともに全遺伝子の同定のためにイルミナ社MiSeqとHiSeqを使ってショットガンメタゲノム解析も同時に行った。また、ファージDNA画分に関してもメタゲノム解析を行った。この際まず、16SリボソームRNA遺伝子解析用プライマーの選択およびメタゲノム解析に必要なデータ量の検討等、基礎的な検討を行ってから解析を始めた。この調査を3年間継続した。

4. 研究成果

2015年度は2013、14年度に比べてアオコの発生が顕著であった。これは、2015年度は7月に降雨が少なく、水温も高い傾向にあったことが原因であると考えられる。そこで、ここでは主に2015年度の結果を示す。

(1) 2015年度の細菌叢の解析においては、水温が24℃を超えた7月からシアノバクテリア門の菌の割合が増加し、30%程度になった(図1)。

(2) その後シアノバクテリア門菌の割合はアオコが発生した8月は最も多く95%で

9月は85%以上であったが、アオコが見られなくなった10月には10%程度と急激に減少した(図1)。

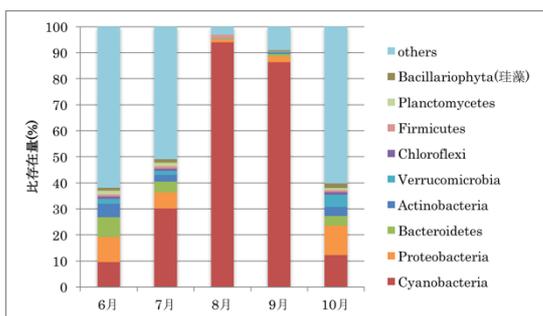


図1 主要な門の割合

(3) シアノバクテリアの門内の割合では *Microcystis* 属菌の割合が8月と9月とも90%以上であった。一方7月と10月は5%以下であった(図2)。以上からアオコの発生は *Microcystis* 属菌の大量増殖が原因であることが再確認された。この結果は前年度までの結果とほぼ同じであったが、*Microcystis* 属菌の大量増殖とアオコの関係がよりはっきりした。

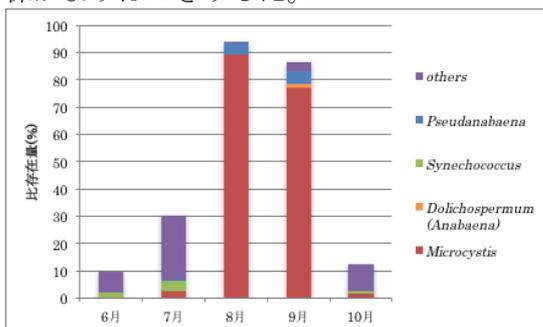


図2 シアノバクテリアの属割合

(4) ウイルス画分のDNA配列研究では、全配列の97%以上はデータベースとの相違がない unknown であった。

(5) BLAST 解析で相違性が認められた配列では、*Microcystis* 属菌を宿主とするファージは *Microcystis* 属菌とはやや遅れて9月に最も多く検出され(図3、4)、菌の消長との関係が強く示唆された。

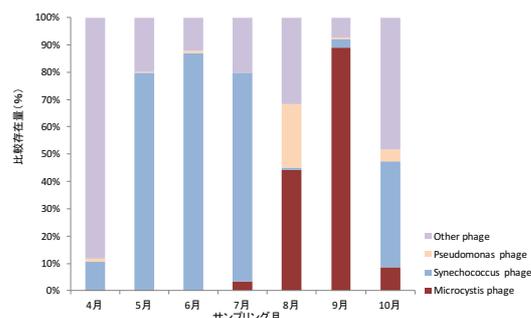


図3 ファージの割合

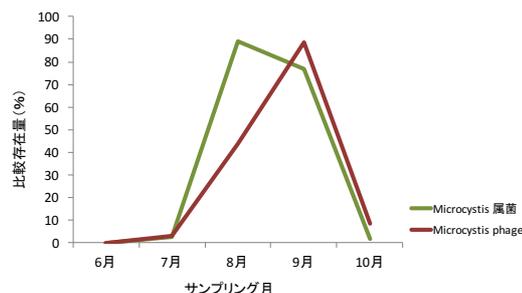


図4 *Microcystis* 属菌とファージの変化

(6) unknown 配列をアッセンブルしてゲノムを再構成したところ、100 kb 以上の再構成ゲノム配列が複数得られた。7) 9月のウイルス濃縮液を、培養した *Microcystis* 属菌に感染させたところ、ファージを回収することができた。

<引用文献>

- 1) K. E. Havens, 2008, *Advance Exp. Med. and Biol.* 619:733-747
- 2) O. Bergh et al., 1989, *Nature* 340: 467-468
- 3) T. Yoshida et al., 2007, *Nippon Suisan Gakkaishi* 73: 302-305
- 4) T. Yoshida et al., 2006, *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1239-1247
- 5) C. Luo, et al., 2011, *ISME J.* 6:898-901
- 6) O.E. Havelrud, et al., 2011, *BMC Microbiol.* 11: 221
- 7) 岡野邦宏、2008年、*科学研究費補助金報告書*

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1件)

- (1) Fukushima J, Tojo F, Asano R, Kobayashi Y, Shimura Y, Okano K & Miyata N (2015) Complete Genome Sequence of the Unclassified Iron-Oxidizing, Chemolithoautotrophic Burkholderiales Bacterium GJ-E10, Isolated from an Acidic River. *Genome Announc* 3: 01455-01414.

[学会発表] (計5件)

- (1) 浅野亮樹, 岡野邦宏, 小林弥生, 志村洋一郎, 福島淳 (2015.3.6). 八郎瀨における微生物群集構造の周年解析. 日本ゲノム微生物学会, 神戸市.
- (2) 福島淳, 東條ふゆみ, 小林弥生, 浅野亮樹, 志村洋一郎, 岡野邦宏, 宮田直幸 (2014.5.10). 新規鉄酸化細菌のゲノム構造と代謝様式. 日本生化学会東北支部例会. 秋田市.

- (3) 福島淳, 東條ふゆみ, 小林弥生, 浅野亮樹, 志村洋一郎, 岡野邦宏, 宮田直幸 (2014. 3. 30). 酸性河川より分離された未分類の鉄酸化細菌 GJ-E10 株のゲノム構造. 日本農芸化学会 2014 年度大会. 東京.
- (4) 岡野邦宏, 浅野亮樹, 福島淳, 鈴木英治, 宮田直幸, 尾崎保夫 (2014. 3. 17). 次世代シーケンサーを用いた秋田県八郎湖の遺伝子多様性解析. 日本水環境学会. 東北大学.
- (5) 福島淳, 浅野亮樹, 宮田直幸, 小林弥生, 岡野邦宏, 志村洋一郎, 稲元民夫 (2013. 11. 29). 県立大学における次世代 DNA シーケンサによる微生物ゲノムおよびメタゲノム解析の現状. 秋田応用生命科学研究会. 秋田市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 淳 (FUKUSHIMA, Jun)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：00181256

(2) 研究分担者

浅野 亮樹 (ASANO, Ryoki)
秋田県立大学・生物資源科学部・研究員
研究者番号：20646137

(3) 研究分担者

岡野 邦広 (OKANO, Kunihiro)
秋田県立大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：30455927