

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281042

研究課題名(和文)琵琶湖底層部におけるメタロゲニウム生成機構の解明と底層部環境の質的評価

研究課題名(英文) Study on the mechanism of Metallogenium-particle formation at bottom layer of Lake Biwa and qualitative evaluation of the bottom environment

研究代表者

宮田 直幸 (MIYATA, Naoyuki)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20285191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖北湖今津沖の湖底では2002年以降、メタロゲニウム粒子と呼ばれるマンガン酸化粒子の発生が観測されている。本研究では、マンガン酸化細菌によるメタロゲニウム粒子の生成機構を解析するとともに、北湖底層部でメタロゲニウム粒子生成をもたらす環境因子を特定し、現在の底層部環境がどのような状態にあるのか質的に評価することを目的とした。本研究の結果、メタロゲニウム粒子生成をもたらす底層部の環境条件として、貧酸素化に加えて多糖濃度が増大している可能性が挙げられた。さらに、上層部で発生した植物プランクトンが沈降し、底層部で多糖の供給源としてメタロゲニウム粒子生成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the northern basin of Lake Biwa, the occurrence of filamentous Mn particles (Metallogenium-particles) at the bottom layer has been recorded since 2002. The aim of this study was to analyze the mechanism of Metallogenium particle formation in Mn(II)-oxidizing bacteria and to specify the conditions of bottom environment that bring about the particles formation. The results suggest that Mn(II)-oxidizing bacteria produce the Metallogenium particles under oxygen-limited, weakly acidic, and gelatinous polysaccharide-rich conditions. In the northern basin, polysaccharide-encapsulated phytoplankton cells grown in the upper layer go down and serve as resource of polysaccharides in the bottom layer.

研究分野：環境生物学

キーワード：マンガン酸化細菌 メタロゲニウム粒子 貧酸素化 底層部物質循環

## 1. 研究開始当初の背景

琵琶湖北湖今津沖の湖底では、2002年以降、メタロゲニウム (*Metallogenium*) 粒子と呼ばれるフィラメント状のマンガン酸化物粒子の発生が観測されるようになった (図1)。このことは近年、北湖底層部環境が質的に変化していることを示唆している。メタロゲニウム粒子は、底層部が貧酸素化する成層湖や海域で出現する。溶存酸素の低下で底質から溶出したマンガニオンが直上の酸化層で生物酸化されて生成すると考えられている。しかし、どのようなマンガン酸化菌がどのような環境条件で生産するのか、微生物生態や生成機構は未だ明らかにされていない<sup>1,2</sup>。

一方で、先般底生生物への生態影響の観点から環境基準 (生活環境項目) に底層溶存酸素量が追加されるなど、底層部環境の保全対策がクローズアップされている。メタロゲニウム粒子は貧酸素化とともに底層部の物質循環に直接影響を与える重要な因子であるため、底生生態系の保全、健全な物質循環機能の維持の観点から実態解明が重要な課題である。

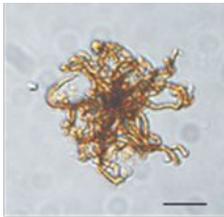


図1. 琵琶湖北湖水深約90mで採取されたメタロゲニウム粒子 (フィラメント状マンガン酸化物)。Bar = 10  $\mu$ m

## 2. 研究の目的

(1)本研究では、微生物 (マンガン酸化細菌) によるメタロゲニウム粒子の生成機構を解析することを一つの目的としている。湖水より単離したマンガン酸化細菌をモデル生物として扱い、培養特性を解析してメタロゲニウム粒子生成条件を特定しようとした。また本菌の全ゲノムの解読を試みた。さらに培養液中で生成したメタロゲニウム粒子と琵琶湖底層部で生成したメタロゲニウム粒子の構造特性をナノスケールで比較した。

(2)さらに本研究では、北湖底層部でメタロゲニウム粒子生成をもたらす環境因子を特定し、現在の底層部環境がどのような状態にあるのか質的に評価することをもう一つの目的とした。(1)のモデル生物の解析で得られた知見をもとに、湖沼底層部でのメタロゲニウム粒子生成における多糖 (植物プランクトン由来) の関与を検討した。また湖沼底層部の細菌群集を解析し、マンガン酸化に関与する細菌の挙動を調査した。

## 3. 研究の方法

(1)モデル微生物と培養法: 琵琶湖湖水から単離されたマンガン酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01株を使用した。M3半流動培地 (100 mg/L 麦芽エキス、40 mg/L 酵母エキス、0.5 mM  $\text{NaHCO}_3$ 、500 mg/L 寒天、0.1~2 mM  $\text{MnSO}_4$ ) を

用いて20、暗所で静置培養した。

ゲノム解析は PacBio RS II (Pacific Biosciences) で、得られたシーケンスの *de novo* アッセンブルは FALCON ver. 0.4.0 で行った。

(2)メタロゲニウム粒子の構造解析: 採取したメタロゲニウム粒子を風乾後、高分解能走査透過型電子顕微鏡 (STEM, JEM-2100F, JEOL) を用いて 200 kV にて観察を行った。装置付属の電子線回折装置で Mn 酸化物の結晶構造を解析するとともに、高角度散乱暗視野法 (HAADF-STEM) と電子エネルギー損失分光法 (EELS) の併用により、粒子の構成元素を分析した。

メタロゲニウム粒子に含まれる多糖は特定の蛍光標識レクチンで染色し、蛍光顕微鏡装置 BX60 (Olympus) を用いて励起波長 470~490 nm で観察した。

(3)現地水質調査: 2014年度~2016年度に北湖今津沖中央地点 (水深約90m) で表層から5~20mごとにバンドーン採水器を用いて採水した。多糖濃度は毎月1回、アンスロンを用いた比色法で測定した。植物プランクトンおよびメタロゲニウム粒子の計数はプランクトン計数板を用いて行った。植物プランクトンバイオマスは細胞体積を求めて評価した。

(4)細菌群集構造の解析: 2016年7月から2017年2月の期間、水深90mの水試料及びその直下の底質 (懸濁液) を採取した。各試料から懸濁物をメンブランフィルター (0.2  $\mu$ m) で回収しDNAを抽出後、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により真正細菌叢を調査した。16S rRNA 遺伝子のPCR増幅にはプライマー-515F及び806Rを用い、PCR産物の塩基配列は MiSeq システム (illumina) を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1)BIWAKO-01株の粒子生成条件: これまでにメタロゲニウム粒子を生成するマンガン酸化細菌の単離・培養が試みられてきたが、未だ培養系は確立されていない。本研究では *Bosea* 属マンガン酸化細菌である BIWAKO-01株が特定の静置培養条件でメタロゲニウム粒子を生成することを明らかにした (図2,3)。即ち、BIWAKO-01株は容易に継代培養できる「易培養性」であるが、次の3条件が揃うとはじめてマンガン酸化が進み、メタロゲニウム粒子の生成が促進した。

弱酸性条件 (pH 5.5~6.5)

酸素制限条件

寒天等のゲル状多糖存在下

通常、好気性であるマンガン酸化細菌の培養ではこれらの条件が考慮されることはない。これまでメタロゲニウム生成細菌の実態は未解明であったが、その一因として適した

培養条件が適用されなかったことが挙げられる。

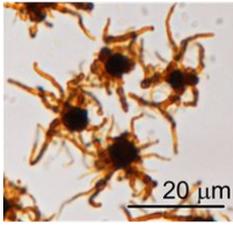


図2. BIWAKO-01株の培養液中で生成したメタロゲンニウム粒子. Bar = 10 μm

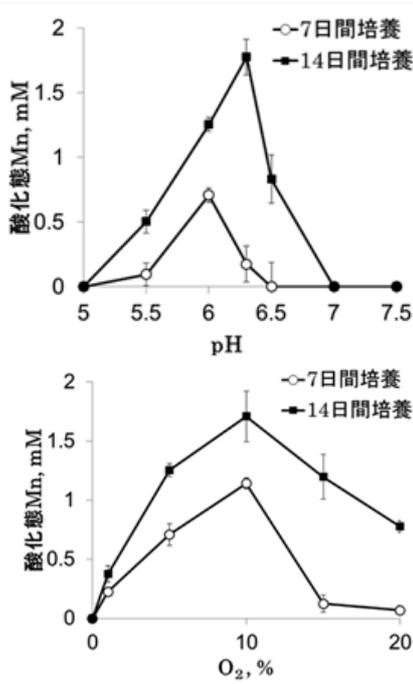


図3. BIWAKO-01株によるメタロゲンニウム粒子生成に及ぼすpH及び気相酸素濃度の影響

(2)BIWAKO-01株のマンガン酸化酵素系：本株のゲノム解析の結果、以下の知見が得られた。ゲノムサイズ：7,326,961 bp、GC含量：64.80%、タンパク質コーディング遺伝子数：6,988、RNAコーディング遺伝子数：67。タンパク質コーディング遺伝子のうち4,938については機能が推定できた。BIWAKO-01株のマンガン酸化酵素の候補遺伝子として、マルチ銅オキシダーゼをコードする *moxA* 様の配列が見出された(図4)。また、別のタイプのマンガン酸化酵素として知られるヘム含有ペルオキシダーゼの *mopA* 様遺伝子も検出され、これらのマンガン酸化酵素系がメタロゲンニウム粒子生成に関与していると考えられた。

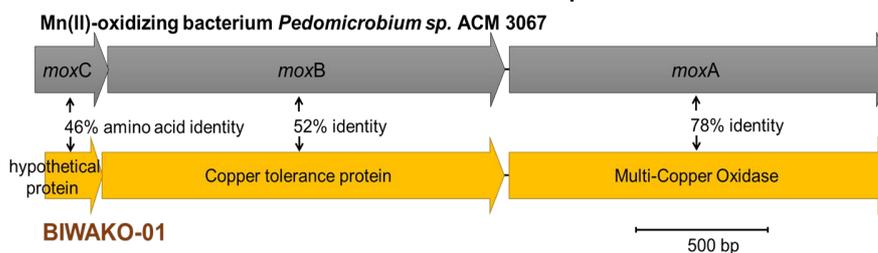


図4. BIWAKO-01株のゲノム配列中に見出された *mox* 遺伝子

(3)メタロゲンニウム粒子の構造特性：BIWAKO-01株の培養液中で生成したメタロゲンニウム粒子(図2)のフィラメント部分の微細構造を解析した結果、ナノシート及びナノロッド構造(図5)が観察された。後者は、電子回折パターンから Mn(III)酸化物であるマンガナイト( $\gamma$ -MnOOH)と同定された。pH条件と  $Mn^{2+}$ 濃度を考慮して、マンガナイトは微生物作用により生じたバーネサイト(ナノシート)が培地中に残存する高濃度  $Mn^{2+}$ と反応して生成した二次生成物であると結論付けた[ $Mn(IV) + Mn(II) \rightarrow 2 Mn(III)$ ]。低濃度  $Mn^{2+}$ 存在下ではナノシート構造のみが観察され、琵琶湖北湖底層部のメタロゲンニウム粒子の構造特性とよく一致することが明らかになった(図5)。

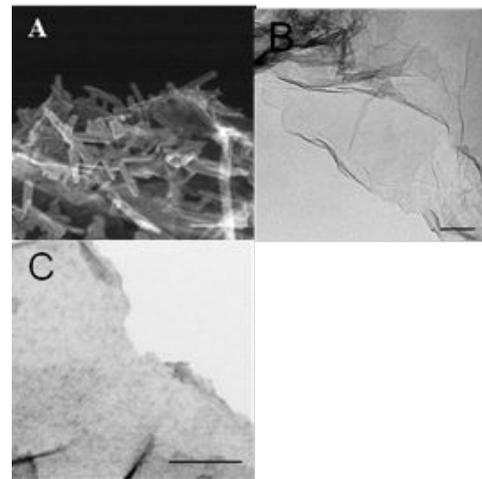
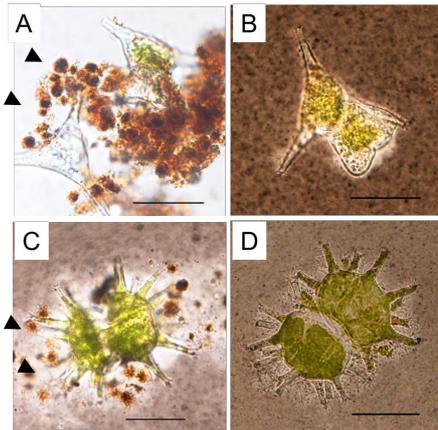


図5. (A)BIWAKO-01株が形成したメタロゲンニウム粒子フィラメントのナノロッド構造(HAADF-STEM像). Bar=100 nm (B)同フィラメントのナノシート構造(TEM像). Bar=50 nm (C)琵琶湖北湖底層部で出現したメタロゲンニウム粒子のフィラメントのナノシート構造(STEM像). Bar=50 nm

(4)植物プランクトン由来多糖の役割：培養試験において、BIWAKO-01株によるメタロゲンニウム粒子生成には寒天等ゲル状多糖の添加が必要であった。そこで、琵琶湖北湖でもメタロゲンニウム粒子生成に多糖が関与すると仮定し、「表層で増殖した植物プランクトンが湖底に沈降して多糖を供給している」との仮説を立てた。この仮説を支持する結果として、以下の知見が得られた。

細胞外多糖（粘質鞘）をもつ緑藻、珪藻、藍藻を添加した培地で BIWAKO-01 株を培養するとメタロゲニウム粒子が生成する。粘質鞘を洗浄除去した藻体を添加しても粒子は生成しない（図 6）。

琵琶湖環境科学研究センターで保有する過去の水質データの解析結果から、2002 年以降のメタロゲニウム粒子発生数（年平均）は底層部の DO、pH 値と負の相関（ $P < 0.01$ ）が、表層部での植物プランクトンバイオマス量（年平均）とは正の相関（ $P < 0.05$ ）を示す（図 7）。



Panel	緑藻細胞の添加条件; 藻体密度 (no./mL)	酸化Mn; mM MnO <sub>2</sub> / 2週間
A	<i>S. dorsidentiferum</i> (未洗浄) 790 ± 40	1.2 ± 0.3
B	<i>S. dorsidentiferum</i> (洗浄) 750 ± 25	< 0.1
C	<i>S. arctiscon</i> (未洗浄) 810 ± 15	0.7 ± 0.3
D	<i>S. arctiscon</i> (洗浄) 750 ± 15	< 0.1

図 6. BIWAKO-01 株によるメタロゲニウム粒子の形成：緑藻 *Staurostrum dorsidentiferum* 及び *S. arctiscon* 藻体の添加効果。Bar=30 μm。矢印はメタロゲニウム粒子を示す。

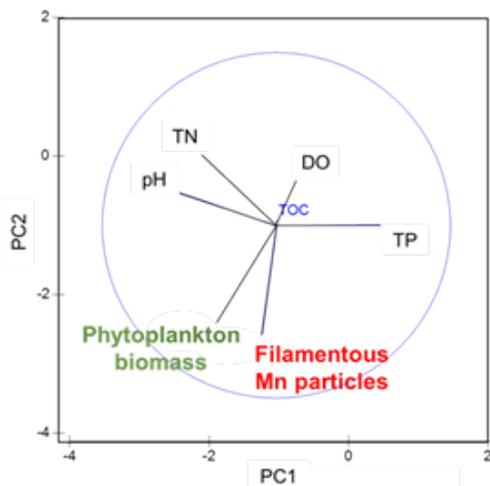


図 7. 琵琶湖北湖（今津沖中央）における底層部でのメタロゲニウム粒子発生数と水質項目の主成分分析

(5) 琵琶湖北湖における多糖の実態調査：底層部でのメタロゲニウム粒子生成において、植物プランクトンが産生する多糖の関与が示唆されたため、2014 年度から 2016 年度に湖水中の多糖濃度を水深ごとに測定した。この実態調査により、以下の知見を得た。

表層（水深 0.5 m）における植物プランクトンバイオマス（細胞体積）と全糖濃度には正の相関がある（ $p < 0.01$ ）（図 8）。

多糖は水深 90 m でも検出される（上層部の 30 ~ 100%）。上層部で産生された多糖が沈降している様子が観察。沈降過程において、クロロフィル a 濃度の減衰と比較して多糖濃度の減衰は緩慢である（図 9）。底層部のメタロゲニウム粒子はゲル状有機物に付着して存在する。ゲル状物質はレクチン染色陽性で、多糖からなる（図 10）。

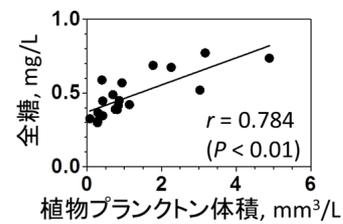


図 8. 琵琶湖北湖上層部（今津沖中央）における植物プランクトンバイオマスと全糖濃度の関係

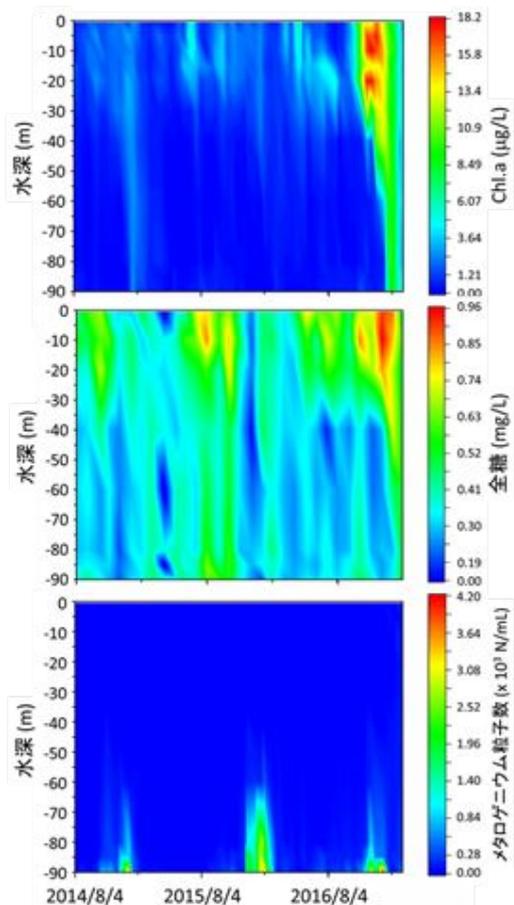


図 9. 琵琶湖北湖（今津沖中央）における Chl.a 濃度、全糖濃度、メタロゲニウム粒子数の推移（調査期間：2014.8 ~ 2017.2）

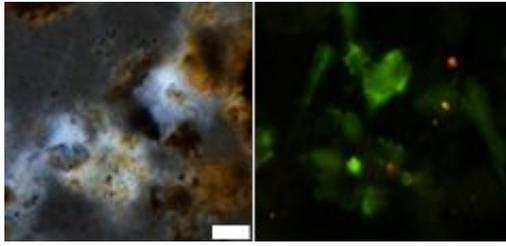


図 10. 琵琶湖北湖底層部（今津沖中央）で採取されたメタロゲニウム粒子の顕微鏡写真。ゲル状多糖マトリクスに付着して存在。（右）レクチン染色（蛍光） Bar=20 μm

(6)底層部の細菌叢： 水深 90 m の水試料及びその直下の底質の真正細菌叢を解析した結果、両試料とも調査期間を通じて大きな変動はなく、また両試料の細菌叢はよく一致していた（図 11）。*Thermomarinilinea* 属、*Desulfobacteraceae* 科、*Anaeromyxobacter* 属などに近縁の嫌気性細菌が主要な細菌群として検出されたが、一方で *Bosea* 属細菌はほとんど検出されなかった（シーケンス検出率 0.01%以下）。嫌気性細菌が優占する水深 90 m 付近では好気性の *Bosea* 属は生息していないと推察された。*Bosea* 属が湖底でのメタロゲニウム粒子生成に関与するならばその生息域はどこか、今後詳細に検討する必要がある。

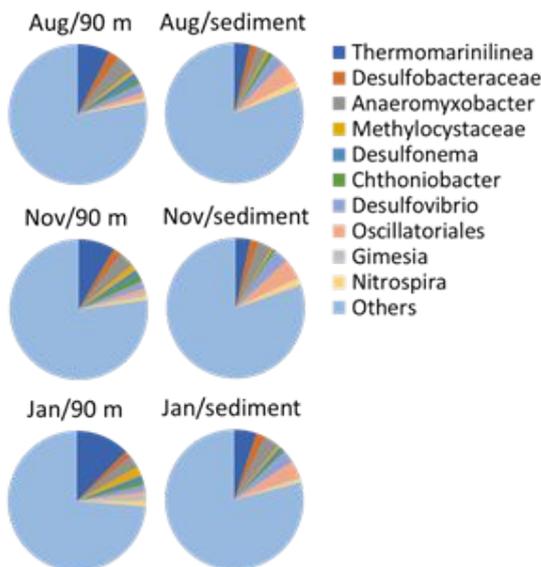


図 11. 琵琶湖北湖（今津沖中央）底層部の細菌叢（2016年8月、11月、2017年1月の調査結果）。水深 90m 及びその直下の底質（懸濁液）を解析。

(7)北湖底層部の質的評価 - 研究総括： 湖沼底層部の貧酸素化要因の一つとして、表層部での植物プランクトン発生量の増加が挙げられるが、一瀬ら<sup>3</sup>は、琵琶湖で観察される藍藻、緑藻の多くが細胞容積の2倍以上の細胞外多糖を保持すること、北湖では近年、単位湖水量当たりの植物プランクトン総細胞体積が増加していることを報告した。これ

らの植物プランクトンが底層部に沈降し、微生物分解を受けることにより、溶存酸素消費およびCO<sub>2</sub>生成(=pH低下)が進行する。一方で、沈降した植物プランクトンによる細胞外多糖の供給量は増加している。近年北湖底層部ではこれらの環境条件が揃い易くなっていると推察される。BIWAKO-01株の培養実験の結果を踏まえると、これらの環境条件が底層部でのメタロゲニウム粒子生成を駆動している可能性がある。本研究では、底層部の細菌叢解析でBIWAKO-01株の近縁種を検出できなかったため、底層部でメタロゲニウム粒子生成を担う微生物の特定には至らなかった。今後微生物を特定し、メタロゲニウム粒子生成と底層部の環境条件との関係性についてさらに解析を進める必要がある。

#### <引用文献>

- T. Miyajima: *Arch. Hydrobiol.*, 124, 317-335 (1992)  
 H. Ehrlich *et al.*: *Geomicrobiology*, 5th ed., pp 347-420, CRC Press, New York (2009)  
 一瀬論ら: 日本水処理生物学会誌, 49, 65-74 (2013)

#### 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2件)

- Okano, K., Furuta, S., Ichise, S., Miyata, N.: Whole genome sequences of two manganese(II)-oxidizing bacteria, *Bosea* sp. strain BIWAKO-01 and Alphaproteobacterium strain U9-1i, *Genome Announcements*, 4 (6), e01309-16 (2016). DOI: 10.1128/genomeA.01309-16. 査読有  
Furuta, S., Ikegaya, H., Hashimoto, H., Ichise, S., Kohno, T., Miyata, N., Takada, J.: Formation of filamentous Mn oxide particles by the alphaproteobacterium *Bosea* sp. strain BIWAKO-01. *Geomicrobiology Journal*, 32, 666-676 (2015). DOI: 10.1080/01490451.2014.982837. 査読有

#### [学会発表](計11件)

- 古田世子, 池田将平, 一瀬論, 池谷仁里, 宮田直幸: 琵琶湖におけるメタロゲニウム粒子発生要因について, 日本水処理生物学会第53回大会(習志野市), 2016.11.11.  
宮田直幸, 古田世子: 湖沼底層部環境の質的变化: マンガン酸化菌の培養を通して見えてきたこと, 第19回日本水環境学会シンポジウム(秋田市), 2016.9.14.  
Miyata, N., Furuta, S., Ikegaya, H., Hashimoto, H., Fujibayashi, M., Okano,

K., Takada, J., Ichise, S.: Possible role of extracellular polysaccharides from phytoplankton as an inducer for formation of filamentous manganese oxide particles in Lake Biwa, SIL2016 (International Society of Limnology) (Torino, Italy), 2016.8.1.

古田世子, 岡本高弘, 藤原直樹, 一瀬諭, 宮田直幸: 琵琶湖における植物プランクトンバイオマスとメタロゲニウム粒子発生との関係, 日本陸水学会第80回大会(函館市), 2015.9.28.

Miyata, N., Furuta, S., Ikegaya, H., Hashimoto, H., Ichise, S., Kohno, T., Takada, J.: Formation of filamentous Mn(III, IV) oxide particles in cultures of an alphaproteobacterium isolate. 15th International Society for Microbial Ecology (Seoul, Korea), 2014.8.26.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 直幸 (MIYATA, Naoyuki)  
秋田県立大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 20285191

### (2) 研究分担者

古田 世子 (FURUTA, Seiko)  
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・  
環境監視部門・専門員  
研究者番号: 00508476

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

高田 潤 (TAKADA, Jun)  
岡山大学大学院・自然科学研究科・  
特任教授  
研究者番号: 60093259

桐山 徳也 (KIRIYAMA, Totsuya)  
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・  
環境監視部門・専門員  
研究者番号: 40723862  
(H26年度~H27年度)

### (3) 連携研究者

一瀬 諭 (ICHISE, Satoshi)  
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・  
環境監視部門・専門員  
研究者番号: 10508443

### (4) 研究協力者

池谷 仁里 (IKEGAYA, Hisato)  
兵庫県立大学・生命科学研究科・研究員  
研究者番号: 30531579

藤林 恵 (FUJIBAYASHI, Megumu)  
秋田県立大学・生物資源科学部・助教  
研究者番号: 70552397