

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32690

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21449

研究課題名(和文) バクテリア生産速度を測定する際に最も良い基質は何か～DNA合成速度の観点から～

研究課題名(英文) Appropriate deoxyribonucleosides for measuring bacterial production from the viewpoint of DNA synthesis rate

研究代表者

土屋 健司 (Tsuchiya, Kenji)

創価大学・理工学部・助教

研究者番号：70739276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA合成速度に基づくバクテリア生産速度測定に適したデオキシリボヌクレオシドを明らかにするため、自然バクテリア群集においてDNAを構成する4つのデオキシリボヌクレオシド(チミジン、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジン)の取り込み特性を評価した。その結果、デオキシグアノシンの取り込み速度が最も高いことが明らかとなった。そのため、バクテリア生産速度測定において、デオキシグアノシンを使用することにより、より多くのバクテリア種の生産を反映できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Incorporation characteristics of four deoxyribonucleosides (thymidine, deoxyadenosine, deoxyguanosine and deoxycytidine) composing DNA in natural bacterial communities were examined to evaluate appropriate deoxyribonucleosides for measuring bacterial production from the viewpoint of DNA synthesis rate. The highest incorporation rate among the four deoxyribonucleosides was deoxyguanosine. The present study suggests that measurement of bacterial production by using deoxyguanosine possibly reflects larger numbers of bacterial species productions.

研究分野：生物海洋学

キーワード：バクテリア生産 安定同位体 LC-MS DNA合成 デオキシリボヌクレオシド

1. 研究開始当初の背景

水圏生態系におけるバクテリアは、溶存態有機物を基質とした微生物ループを駆動させる主体者として、従来の生食食物連鎖以外に高次の栄養段階にエネルギーや物質を提供する物質輸送に重要な役割を果たしている (e.g. Fenchel 2008). バクテリア生産はしばしば一次生産を大幅に上回り (Cole et al. 1988), バクテリア生産速度の測定は水圏炭素循環を理解する上で大変重要である. 従来のバクテリア生産速度測定法では、放射性同位体 (^3H) でラベルされたチミジン (^3H -dT 法; Furhman and Azam 1980, 1982) の DNA への取り込み速度を測定し、それを細胞増殖量及び炭素量に変換することでバクテリア生産量を求めてきた.

自然バクテリア群集において、dT を取り込み、DNA に組み込むバクテリアは全体の何割かに限られており、特に陸水で優占するバクテリア種は殆どチミジンから DNA 合成をしない (e.g. Douglas et al. 1987, Perez et al. 2010). その大きな要因の一つに、チミジンキナーゼ (dT にリン酸を付加し、チミジル酸を作る酵素) を持つ種が限られていることが挙げられる. そのため、dT で測定したバクテリア生産は、水柱のバクテリア群集全体の生産ではなく、一部のポピュレーションの生産を測定していることとなる. これまで、自然群集におけるバクテリア生産速度 (DNA 合成速度) 測定のために使用されてきたデオキシリボヌクレオシドは dT のみであった. それは、取り込まれた dT が、RNA へ行くことが無いと考えられたためである (DNA : dT に対応するのは RNA : ウラシル). 一方、DNA を構成するデオキシリボヌクレオシドには dT の他に、デオキシアデノシン (dA), デオキシグアノシン (dG), デオキシシチジン (dC) がある. dT 以外のデオキシリボヌクレオシドの DNA への取り込み速度が相対的に速いということがわかれば、それはそれらのデオキシリボヌクレオシドから DNA 合成できるバクテリア種が多いということを示しており、バクテリア群集全体の生産性評価の正確度がより高くなることが期待される.

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究は DNA の材料となる 4 つ全てのデオキシリボヌクレオシド (dT, dA, dG, dC) の取り込み特性を海及び湖沼において評価し、バクテリア群集全体の生産性評価に適したデオキシリボヌクレオシドを明らかにする. デオキシリボヌクレオシドの取り込み速度の定量には、研究代表者らが新規に開発した放射性同位体フリーの測定法 (Tsuchiya et al. 2015) を用いた.

3. 研究の方法

調査は海洋生態系として相模湾および湖沼生態系として霞ヶ浦において実施した. 相

模湾では真鶴港 (St. A; $35^{\circ}08.9' \text{N}$, $139^{\circ}09.1' \text{E}$) および沖合定点 (St. M; $35^{\circ}09.0' \text{N}$, $139^{\circ}10.5' \text{E}$) において、霞ヶ浦では高浜入り (St. 1; $36^{\circ}08.952' \text{N}$, $140^{\circ}19.492' \text{E}$), 土浦入り (St. 7; $36^{\circ}03.902' \text{N}$, $140^{\circ}13.993' \text{E}$), 湖心 (St. 9; $36^{\circ}02.142' \text{N}$, $140^{\circ}24.222' \text{E}$), 湖尻 (St. 12; $35^{\circ}58.593' \text{N}$, $140^{\circ}28.332' \text{E}$) において採水した. 採水した海水および湖水に対して、質量数 15 の窒素安定同位体で標識した ^{15}N -dT (NLM-3901-25), ^{15}N -dA (NLM-3895-25), ^{15}N -dG (NLM-3899-CA-25), ^{15}N -dC (NLM-3897-25; いずれも Cambridge Isotope Laboratories 社製) をそれぞれ最終濃度 50 nM になるように添加し、現場水温、暗所下で 5 ~ 24 時間培養した. 培養終了後、Tsuchiya et al. (2015) の方法に従い、濾過、DNA 抽出、DNA 酵素加水分解、LC-MS/MS による分析を実施した. 濾過においては、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (Ominopore, Millipore) を用い、フィルターは DNA 抽出まで -80°C で冷凍保存した. DNA 抽出においては、日鉄環境エンジニアリング社「土壌 DNA 抽出キット Extrapol Soil DNA Kit Plus ver.2」を用いた. DNA 酵素加水分解においては、Nohara et al. (2011) に従い、抽出した DNA サンプルに Nuclease P1, Phosphodiesterase I, Alkaline Phosphatase の酵素を順に添加し、ヌクレオシドまで加水分解した. 最後に LC-MS/MS 分析においては、10 mM 酢酸アンモニウムとメタノールの混合溶液を移動相として使用し、 ^{15}N -dT, ^{15}N -dA, ^{15}N -dG, ^{15}N -dC はそれぞれ m/z 245 > 129, 257 > 141, 273 > 157, 231 > 115 で直接定量した.

4. 研究成果

相模湾および霞ヶ浦両方のほとんどの測点において、デオキシグアノシンが最も高い取り込み速度を示した (図 1, 2). このことは、他のデオキシリボヌクレオシドと比較して、細胞外デオキシグアノシンを DNA 合成に使用できるバクテリア種が多いことを示唆しており、デオキシグアノシンを使用したバクテリア生産測定はより多くの種のバクテリア増殖を反映するものと考えられる.

一方、デオキシシチジンは全ての測点において最も低い取り込み速度を示したことから、デオキシシチジンは他のデオキシリボヌクレオシドと比較して、細胞外に存在するデオキシシチジンを DNA 合成に再利用する経路より、細胞内で新たに合成したデオキシシチジンを DNA 合成に使用する経路の方が卓越していたことが示唆された. また、デオキシシチジンを添加した系においては、多くのサンプルでチミジンとして検出された. 特に霞ヶ浦においては、チミジンを添加した系 (dT dT 取り込み速度) と比較して、デオキシシチジンを添加した系でのチミジン取り込み量の方が多かった (dC dT 取り込み速度; 図 3). 湖沼生態系に優占するバクテリア種は、細胞外チミジンから DNA 合成するための酵素を持つものが少ないと言われ

ており、そのような種は細胞外デオキシシチジンをチミジンの代わりに再利用する経路が発達していたことが示唆された。

本研究は新規に開発したデオキシリボヌクレオシドを直接定量する手法を用いることにより、海洋生態系および湖沼生態系における群集レベルでのデオキシリボヌクレオシドの取り込み特性を明らかにし、バクテリア生産測定の正確性向上、水圏炭素循環の解明の一助となるものである。

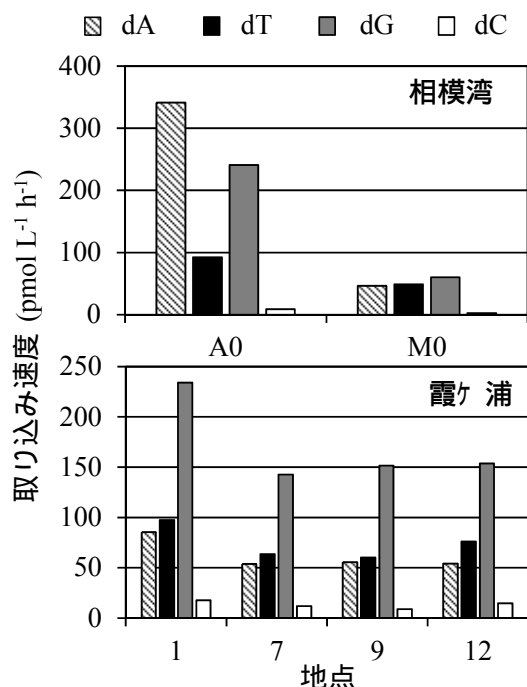


図1 夏季における各デオキシリボヌクレオシドの取り込み速度(上:相模湾,下:霞ヶ浦)

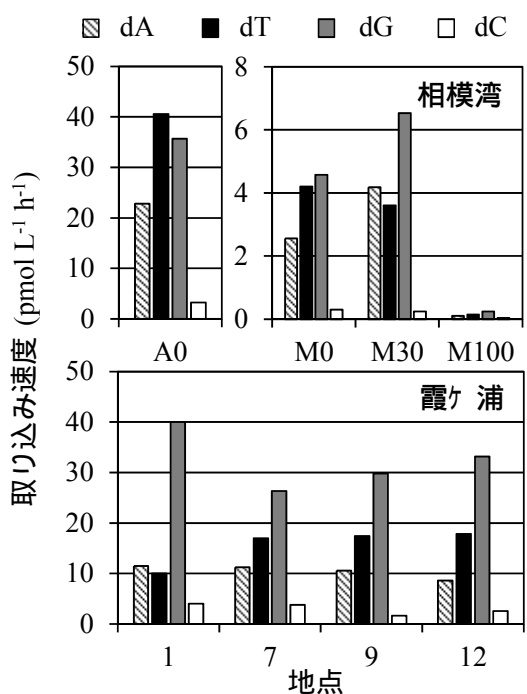


図2 冬季における各デオキシリボヌクレオシドの取り込み速度(上:相模湾,下:霞ヶ浦)

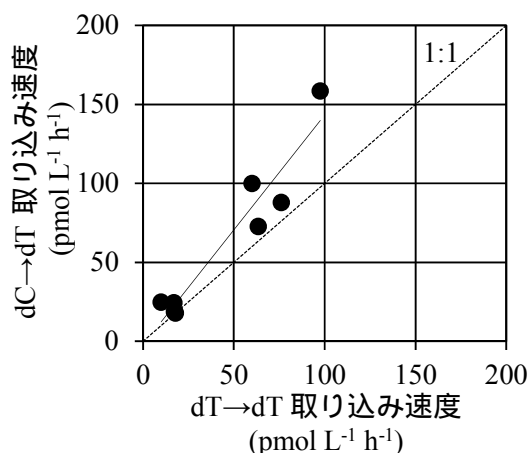


図3 霞ヶ浦における dT および dC を添加した系での dT 取り込み速度の関係(それぞれ dT dT 取り込み速度, dC dC 取り込み速度; $[dC \rightarrow dT] = 1.46 \times [dT \rightarrow dT] - 2.38$; $n = 8$, $r = 0.957$, $p < 0.001$)

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4件)

Tsuchiya, K., V. S. Kuwahara, T. Yoshiki, R. Nakajima, S. Shimode, T. Kikuchi and T. Toda, 2017. (査読有)

Response of phytoplankton and enhanced biogeochemical activity to an episodic typhoon event in the coastal waters of Japan. *-Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 194: 30-39.
doi:10.1016/j.ecss.2017.05.019

Sugai, Y., K. Tsuchiya, V. S. Kuwahara, S. Shimode, K. Komatsu, A. Imai and T. Toda, 2016. (査読有)

Bacterial Growth Rate and Grazing Pressure on Bacteria in the Euphotic and Disphotic Layers in Temperate Coastal Waters of Sagami Bay, Japan.
-Journal of Oceanography. 72: 577-587.
doi:10.1007/s10872-016-0352-6

Tsuchiya, K., T. Sano, N. Kawasaki, H. Fukuda, N. Tomioka, K. Hamasaki, Y. Tada, S. Shimode, T. Toda and A. Imai, 2015. (査読有)

New isotope-free method for measuring bacterial production using $[^{15}N_5]$ -2'-deoxyadenosine and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) in aquatic environments.
-Journal of Oceanography. 71: 675-683.
doi:10.1007/s10872-015-0310-8

Tsuchiya, K., V. S. Kuwahara, K. Hamasaki, Y. Tada, T. Ichikawa, T. Yoshiki, R. Nakajima,

A. Imai, S. Shimode and T. Toda, 2015.(査読有)
Typhoon-induced response of phytoplankton and bacteria in temperate coastal waters.
-*Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 167: 458-465.
doi:10.1016/j.ecss.2015.10.026

[学会発表](計10件)

土屋健司・戸田龍樹・佐野友春・富岡典子・小松一弘・高津文人・今井章雄・早川和秀・Indranil Mukherjee・中野伸一, 2017.
琵琶湖北湖におけるバクテリア生産量.
- 第1回海洋生物学シンポジウム(東京海洋大学), 2017年3月, 講演要旨集: 11.

土屋健司・戸田龍樹・佐野友春・富岡典子・高村典子・中川恵・高津文人・小松一弘・今井章雄, 2017.
霞ヶ浦湖心におけるバクテリア生産速度の季節変動.
- 第51回日本水環境学会年会(熊本大学), 2017年3月, 講演要旨集: 388.

土屋健司・戸田龍樹・佐野友春・富岡典子・今井章雄・下出信次, 2016.
DNA合成速度に基づいたバクテリア生産測定に適した基質は何か.
-2016年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会(熊本県立大学), 2016年9月, 講演要旨集:40.

土屋健司, 2016.
放射性同位体を使用しないバクテリア生産速度測定法の開発.
-「第三回プランクトン学会若手の会」2016年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会(熊本県立大学), 2016年9月, 講演要旨集:151.

Tsuchiya, K., T. Toda, T. Sano, N. Tomioka, A. Imai, N. Kawasaki, H. Fukuda, K. Hamasaki, Y. Tada and S. Shimode, 2016.
Measuring bacterial production without radioisotopes in aquatic environments.
-3rd International Postgraduate Conference on Biotechnology (IPCB2016), Surabaya, Indonesia, 24-26 August 2016, Abstracts: 112.

Tsuchiya, K., T. Toda, T. Sano, N. Tomioka, A. Imai, N. Kawasaki, H. Fukuda, K. Hamasaki, Y. Tada and S. Shimode, 2016.
Comparison between [¹⁵N]-deoxyadenosine method and [³H]-thymidine method for measuring bacterial production in aquatic environments.
-33rd SIL Congress, Turin, Italy, 31 July – 5 Augut 2016, Book of Abstracts: 110.

土屋健司・戸田龍樹・佐野友春・富岡典子・今井章雄・下出信次, 2016.
バクテリア生産測定における各デオキシ

ヌクレオシドのDNAへの取り込み特性.
-2016年度日本海洋学会春季大会(東京大学), 2016年3月, 講演要旨集:283.

小出昌美・土屋健司・今井章雄・佐野友春・富岡典子・下出信次・戸田龍樹, 2016.
カイアシ類 *Acartia steueri* に付着するバクテリア現存量および生産量の季節変動.
-2016年度日本海洋学会春季大会(東京大学), 2016年3月, 講演要旨集:282.

土屋健司・川崎伸之・佐野友春・富岡典子・福田秀樹・浜崎恒二・多田雄哉・下出信次・戸田龍樹・今井章雄, 2015.
バクテリア生産測定における¹⁵N-デオキシアデノシン法と従来法の比較.
-2015年度日本海洋学会秋季大会(愛媛大学), 2015年9月, 講演要旨集:189. (ポスター)
[ベストポスター賞]

Tsuchiya, K., T. Toda, N. Kawasaki, T. Sano, N. Tomioka, A. Imai, H. Fukuda, K. Hamasaki, Y. Tada and S. Shimode, 2015.
New radioisotope-free method for measuring bacterial production using ¹⁵N₅-2'-deoxyadenosine and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) in aquatic environments.
-ECSA55 Unbounded boundaries and shifting baselines, London, UK, 6-9 September 2015, Abstract: O1.35.

6. 研究組織

(1)研究代表者

土屋 健司 (TSUCHIYA, Kenji)
創価大学理工学部・助教
研究者番号: 70739276

(4)研究協力者

佐野 友春 (SANO, Tomoharu)
国立環境研究所環境計測研究センター
・主任研究員
研究者番号: 10178808

富岡 典子 (TOMIOKA, Noriko)
国立環境研究所地域環境研究センター
・主任研究員
研究者番号: 40168399

下出 信次 (SHIMODE, Shinji)
横浜国立大学環境情報研究院・准教授
研究者番号: 70397090