

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01898

研究課題名(和文) 湖沼底層部の低酸素化が誘導するメタロゲニウム粒子生成の分子機構と駆動システム解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism and driving system for formation of Metallogenium-like particles that are induced by oxygen depletion in hypolimnion of lakes

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖北湖の底層部では低酸素化に伴ってメタロゲニウム粒子と呼ばれるマンガン酸化物微粒子が発生している。本研究では、植物プランクトンの細胞外ポリマー物質(EPS)が底層部に沈降し、メタロゲニウム粒子の生成を誘導していることを示す結果が得られた。底層部での粒子生成を担うと考えられる Bosea属マンガン酸化細菌は、植物プランクトンと同様に表層部で増殖した後湖底に沈降すること、さらに粒子生成には特定のマルチ銅オキシダーゼ及びペルオキシダーゼが関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

湖沼底層部の低酸素化が国内外で顕在化し、底層部の生態系や物質循環に影響を及ぼすことが危惧されている。本研究は、低酸素化によって引き起こされるメタロゲニウム粒子の生成機構を詳細に検討し、表層で発生する植物プランクトンが大きく関与する可能性を提示した。メタロゲニウム粒子生成における植物プランクトンの寄与は本研究で初めて明らかになった成果で、湖沼底層部のマンガン循環を理解する上で重要な知見である。同時に湖沼底層部の最近の質的環境の変化をとらえており、底層部環境の保全対策を進めるための一助になり得る成果である。

研究成果の概要(英文)：Filamentous manganese oxide particles, which are called Metallogenium-like particles, occur in the near-bottom layer of northern basin of Lake Biwa. In this study, we showed that extracellular polymeric substances (EPS) of phytoplankton sink to the bottom layer and can induce the particle formation. The manganese-oxidizing bacteria belonging to the genus Bosea are considered a potent candidate for the causative agent of Metallogenium-like particles. The results suggested that similarly to phytoplankton, these bacteria grow in the surface layer and sink to the bottom and then participate in the particle formation in the presence of EPS. Our data supported that the bacterial manganese oxidation is catalyzed by certain multicopper oxidase and peroxidase proteins expressed specifically under the environmental conditions.

研究分野：環境生物学

キーワード：マンガン酸化細菌 マンガン循環 湖沼低酸素化 植物プランクトン 細胞外ポリマー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

琵琶湖北湖の水深約 90 m の湖底付近では、2002 年以降毎年夏季から春季にかけて、メタロゲニウム粒子と呼ばれるフィラメント状マンガン酸化物微粒子が発生している。低酸素化により底質から溶出したマンガン(Mn^{2+})イオンが直上の有酸素層でマンガン酸化細菌により酸化されて生成すると考えられている。

メタロゲニウム粒子の生成機構に関して、湖沼底層部の低酸素化がメタロゲニウム粒子の発生を誘導していることは確かである。しかし琵琶湖北湖における過去の水質データからは、溶存酸素濃度の低下だけでは粒子の発生は説明できない。例えば、2009 年以降は底層部の溶存酸素が 3 mg/L 以上存在しても発生し、湖水中の粒子数は年々増加傾向にある。即ち、メタロゲニウム粒子生成を誘導する因子が他にも存在すると考えられた。一方、メタロゲニウム粒子の生成を担うマンガン酸化細菌に関して、これまでに *Bosea* 属細菌 BIWAKO-01 株が酸素制限及びゲル状多糖添加条件において、メタロゲニウム粒子を生成することを明らかにした。この結果は実験室内の培養試験で得られたもので、*Bosea* 属細菌が琵琶湖北湖の底層部で実際に機能しているかは不明である。*Bosea* 属の琵琶湖北湖での鉛直分布を調査するとともに、底層部環境においてゲル状多糖がメタロゲニウム粒子生成の誘導因子として働いているか、実態の解明が急がれる。

メタロゲニウム粒子の発生は世界各地の成層湖沼や海域で報告されているが、その生成機構は未解明である。メタロゲニウム粒子は底層部で鉄、亜鉛、ヒ素等の金属イオンやリン酸を取り込み、底層部の物質循環の鍵となるため、粒子生成のしくみを解明することは極めて重要な課題である。さらに、メタロゲニウム粒子発生を誘導する環境因子を特定することで、琵琶湖北湖の底層部環境が近年、低酸素化とともにどのように変貌してきたのか質的に評価できるようになるため、底層部環境の保全対策に貢献できることが期待される。

2. 研究の目的

琵琶湖北湖でのメタロゲニウム粒子生成機構を解明することを目的として、以下の項目について研究を実施した。

- (1) 琵琶湖北湖での植物プランクトンによる多糖生成と底層部への移行
- (2) 植物プランクトン発生とメタロゲニウム粒子発生との関係性
- (3) *Bosea* 属マンガン酸化細菌の琵琶湖北湖での鉛直分布
- (4) *Bosea* 属マンガン酸化細菌によるメタロゲニウム粒子生成の分子機構

3. 研究の方法

(1) 琵琶湖北湖今津沖中央地点 (35°23'41" N、136°07'57" E) を調査地とした。滋賀県琵琶湖環境科学研究センター (LBERI) による毎月の定点調査において、0.5 ~ 90 m の水深から採取された湖水試料を分与いただき、多糖濃度及びメタロゲニウム粒子数を計測した。水深 90 m の試料は底質直上の試料として用いた。またメタロゲニウム粒子の生成要因を解析するため、LBERI で取得された同地点における pH、溶存酸素等の一般水質項目、及び植物プランクトン細胞体積のデータを使用した。

全糖は湖水試料 250 ~ 300 mL を凍結乾燥して濃縮した後、アンスロン試薬を用いた比色法で定量した。懸濁態多糖は湖水試料を 0.4 μ m フィルターを用いて低速で濾過して捕集した後、アルシアンブルー試薬で染色してから比色定量した。また、湖水試料の凍結乾燥で得られた粉末試料をトリフルオロ酢酸試薬で加水分解した後、生成した単糖類をアルジトールアセテート法で誘導体化し、ガスクロマトグラフ-質量分析装置で同定・定量を行った。

これらの水質項目のうち、懸濁態多糖以外は本研究の実施以前からデータが継続的に取得されている。メタロゲニウム粒子生成の実態解明のためにはできるだけ長期のデータを解析する必要があると考え、本研究期間以前のデータも併せて扱うこととした。

(2) 上記(1)のデータを元に各水質項目の年平均値を算出し、主成分分析及び単相関分析によってメタロゲニウム粒子発生量と相関する水質項目を調査した。

(3) *Bosea* 属マンガン酸化細菌の北湖での鉛直分布を定量 PCR 法で調査した。(1) で記載した湖水 500 ~ 1000 mL を 0.2 μ m フィルターで濾過して -80°C で保存した。フィルターを細断し、アスコルビン酸試薬を加えてマンガン酸化物を溶解した後、全 DNA を抽出した。

Bosea 属 BIWAKO-01 株近縁種の定量は、785F (5'-GGTGCATGCACCTCAGT-3') と -プロテオバクテリアに特異的な 908 R (5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT-3') をプライマーとした定量 PCR により行った。なお、BIWAKO-01 株の 16S rRNA 遺伝子を別途クローニングし、絶対検量線法で測定した。

(4) *Bosea* 属マンガン酸化細菌によるメタロゲニウム粒子生成の分子機構を明らかにするため、BIWAKO-01 株を培養し、マンガン酸化に關与する酵素遺伝子の特定を試みた。BIWAKO-01 株を 100 mg/L 麦芽エキス、20 mg/L 酵母エキス、20 mg/L アルギニン塩酸塩、42 mg/L 重炭酸ナトリウム、1 mM 硫酸マンガン及び 500 mg/L 寒天を含む培地に植種し、20℃ で静置培養した。黒褐色のマンガン酸化物が生成し始めた 5 日目及び 6 日目の培養液を回収し、市販の RNA 保護剤を添加した後、RNA 抽出まで -80℃ で保存した。全 RNA を抽出後、rRNA を除去してから市販のキット (TruSeq Standard mRNA Sample Prep Kit, Illumina) を用いてライブラリーを構築し、次世代シーケンサーで解析した。

培養 5 日目及び 6 日目の試料から各々得られた 4.49 Gb 及び 4.45 Gb のシーケンスデータについて、アダプター配列と低クオリティデータの除去を行った後、rRNA 配列の除去を行った。これらのデータ及び BIWAKO-01 株の全ゲノムデータを用いて RNA 配列のマッピングを行い、マンガン酸化酵素であるマルチ銅オキシダーゼ及びペルオキシダーゼの遺伝子発現量を解析した。

培養液で形成されたマンガン酸化物の濃度は、10 mM ヒドロキシルアミン溶液で溶解した後、ICP 発光分光分析装置で定量した。

BIWAKO-01 株によるメタロゲニウム粒子の生成過程の解析では、炭素安定同位体で標識したアルギニン塩酸塩を添加した上記の培地で培養した。メタロゲニウム粒子を回収後、十分に脱イオン水で洗浄してから二次元高分解能二次イオン質量分析装置で ¹³C のマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) 琵琶湖北湖での植物プランクトンによる多糖生成と底層部への移行

琵琶湖今津沖中央地点におけるクロロフィル *a* (Chl.*a*)、全糖及びメタロゲニウム粒子の鉛直濃度分布を図 1 に示す。なお、2014 年度～2016 年度の測定データは本研究以前に取得された。表層部で Chl.*a* 濃度が高いのは植物プランクトンの増殖に起因する。この結果より、糖成分が表層で生産された後、底層部に移行していることが示された。水深 0.5 m における全糖濃度と Chl.*a* 濃度には有意の相関関係が認められた ($r = 0.377, P = 0.002$)。水深 0.5 m の植物プランクトンバイオマスとの相関を調べた結果、緑藻細胞体積と高い相関関係が認められた ($r = 0.723, P < 0.001$)。さらに 2017 年度に多糖を構成する単糖類の分析を行った結果、水深 0.5 m と 90 m の両試料において、ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース及びグルコースが検出され、組成比も両試料で概ね一致していた (図 2)。

以上の調査結果から、表層部で植物プランクトン (主として緑藻類) によって生産された多糖類が底層部に供給されている実態が示された。

(2) 植物プランクトン発生とメタロゲニウム粒子発生との関係性

過去 18 年間の水質データ (年平均値) を収集して統計解析し、底層部のメタロゲニウム粒子発生数と相関する水質パラメータの特定を試みた。主成分分析の結果、水深 90 m での粒子発生数と表層 0.5 m での植物プランクトン総細胞体積間で相関関係が見られた (図 3)。一方で、粒子発生数と水深 90 m の他の水質項目 (溶存酸素、pH 等) では関係性は見られなかった。植物プランクトン種では、特に緑藻類と高い相関関係にあることが示された。単相関分析の結果、メタロゲニウム粒子数と植物プランクトン総細胞体積、及び緑藻細胞体積で各々、 $r = 0.725 (P = 0.003)$ 、 $r = 0.744 (P = 0.002)$ と高い相関係数が得られた。

(1) の成果と併せて、表層部で緑藻類によって生成された多糖類が底層部に沈降し、メタロゲニウム粒子生成を誘導するとの仮説を支持する結果が得られた。

(3) *Bosea* 属マンガン酸化細菌の琵琶湖北湖での鉛直分布

琵琶湖北湖における *Bosea* 属 BIWAKO-01 株近縁種の鉛直分布をモニタリングした結果について、懸濁態多糖濃度及びメタロゲニウム粒子数の計測結果とともに図 4 に示す。約 2 年の調査期間において、2018 年 7 月～8 月と 10 月～11 月、2019 年 1 月と 7 月の表層部で高い DNA コピー数が検出され、表層で増殖していることが示された。表層の Chl.*a* 濃度 (図 1) 及び懸濁態多糖濃度 (図 4) が高い時期と一致していたことから、植物プランクトンの生産性が高まった時期に従属栄養性の *Bosea* 属細菌が増殖していると推察された。*Bosea* 属細菌の底層部の分布では、2019 年度は総じて検出コピー数が低かったが、2018 年度は 8 月と 12 月～1 月に高いコピー数で検出された。これらの時期と底層部でのメタロゲニウム粒子発生時期とは概ね一致していた (図 4)。

これらの結果から、*Bosea* 属 BIWAKO-01 株近縁種は植物プランクトンの生産が高まった時期に表層で増殖した後、底層に沈降し、酸素制限・多糖存在下でメタロゲニウム粒子を形成する可能性が示された。

(4) *Bosea* 属マンガン酸化細菌によるメタロゲニウム粒子生成の分子機構

Bosea 属 BIWAKO-01 株を培養し、マンガン酸化物の形成が始まるタイミングで菌体を回収し、マンガン酸化酵素 (マルチ銅オキシダーゼ及びペルオキシダーゼ) の遺伝子発現量を解析した。酸化態マンガン濃度は培養 5 日目で 0.24 mg/L、6 日目で 2.3 mg/L に増加していた。BIWAKO-01

株のゲノム上には、マルチ銅オキシダーゼとペルオキシダーゼの遺伝子が各々5つずつ見い出されていたが、マンガン酸化物が生成し始めた5日から6日にかけて、2つのマルチ銅オキシダーゼ遺伝子と1つのペルオキシダーゼ遺伝子が高発現していた(図5)。これらの酵素遺伝子が特定の環境条件で発現し、メタロゲニウム粒子の形成を担っていると推察された。

BIWAKO-01株を¹³C標識アルギニン添加培地で培養し、菌体及びメタロゲニウム粒子のフィラメント構造に含まれる炭素を分析した。その結果、菌体は¹³C標識されていたが、少なくともフィラメント構造からは¹³Cが検出されなかった。フィラメント構造に含まれる炭素は菌体が分泌したのではなく、添加した多糖を由来とする可能性が考えられた。

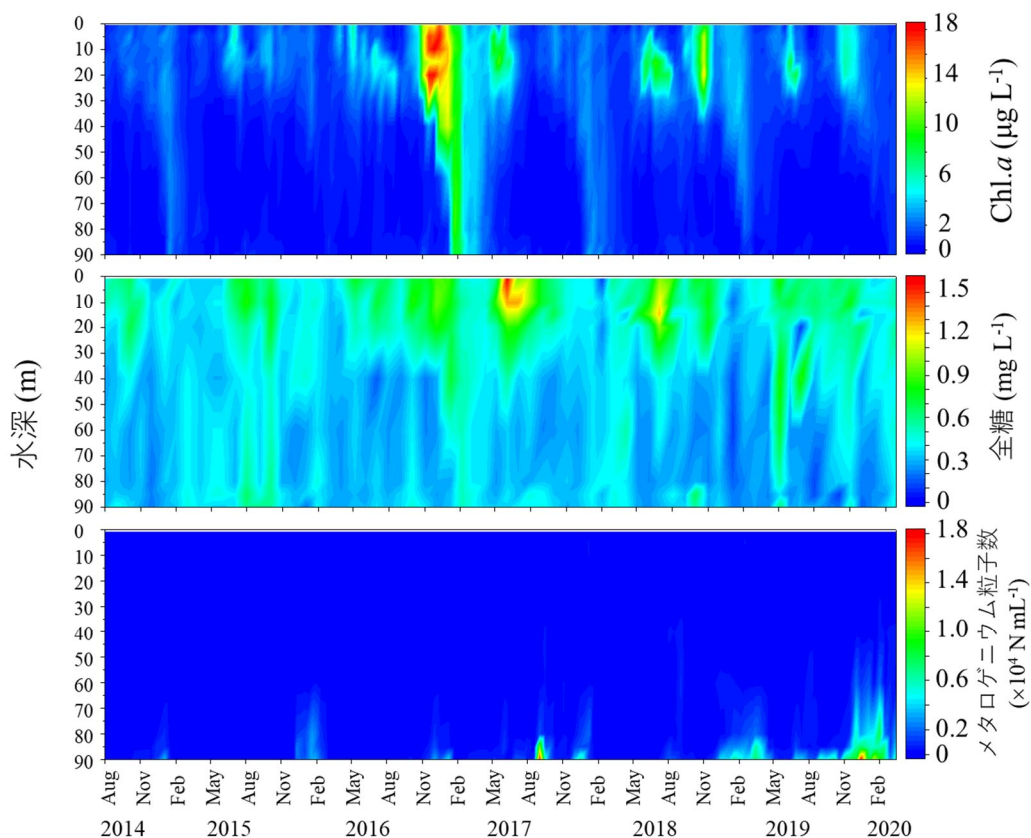


図1. 琵琶湖今津沖中央地点のChl.a、全糖及びメタロゲニウム粒子の鉛直濃度分布

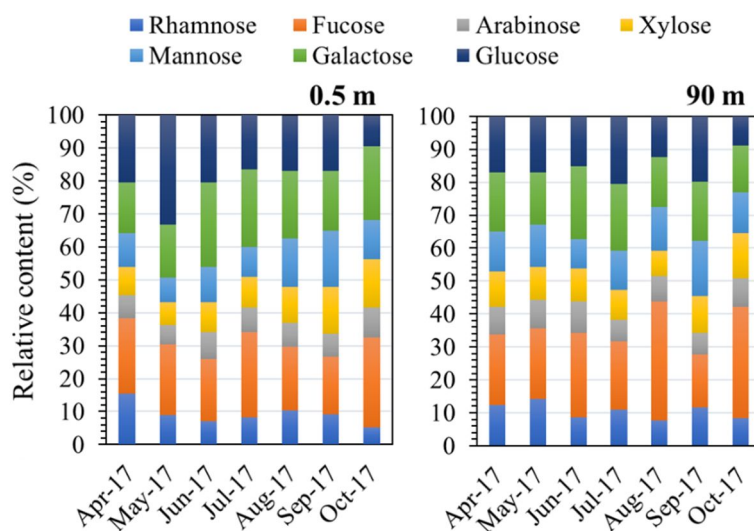


図2. 琵琶湖今津沖中央地点の水深0.5 m及び90 mにおける単糖類の組成(2017年)

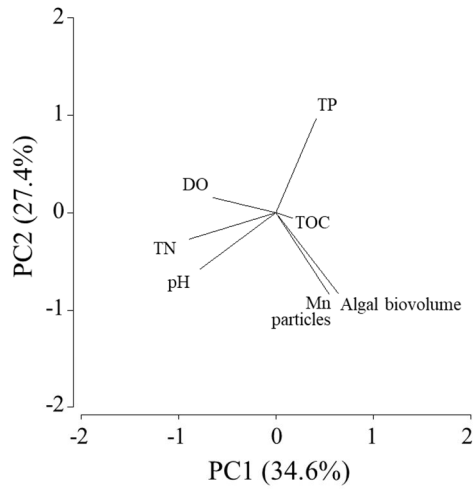


図 3. 琵琶湖今津沖中央地点のメタロゲニウム粒子数 (90 m、年平均値) 及び他の水質項目の主成分分析結果

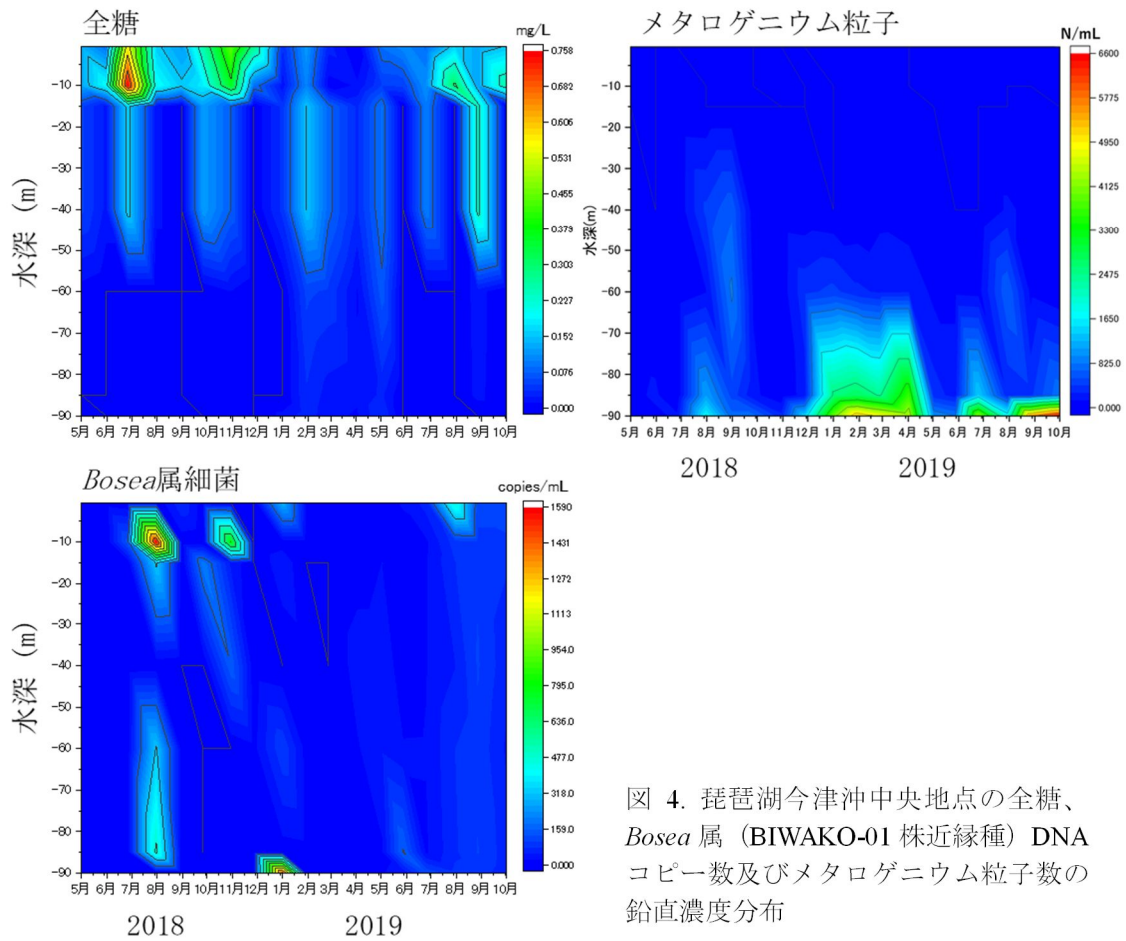


図 4. 琵琶湖今津沖中央地点の全糖、*Bosea* 属 (BIWAKO-01 株近縁種) DNA コピー数及びメタロゲニウム粒子数の鉛直濃度分布

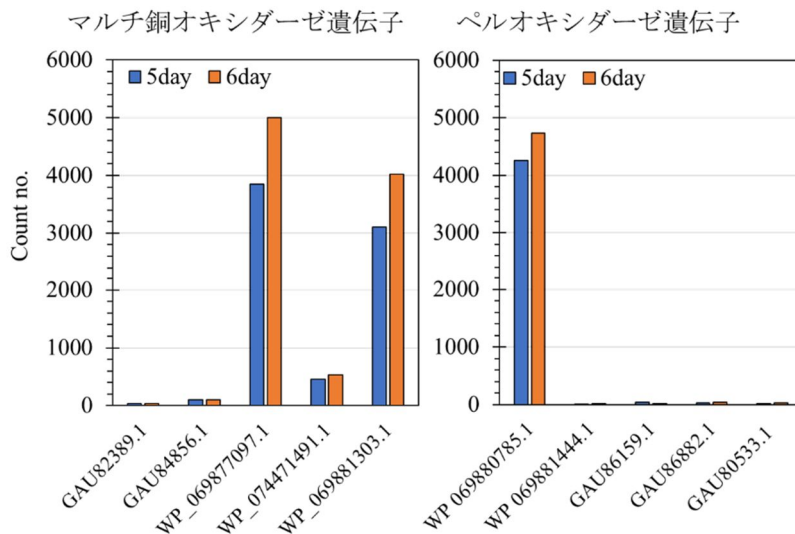


図 5. *Bosea* 属 BIWAKO-01 株の培養菌体におけるマンガン酸化酵素遺伝子の発現 (RNA-Seq 解析)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古田世子, 萩原裕規, 大柳まどか, 池田将平, 宮田直幸
2. 発表標題 琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子数の鉛直分布について
3. 学会等名 日本陸水学会第84回大会（金沢市）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡野邦宏, 松崎彩実, 古田世子, 鈴木徹, 池谷仁里, 藤林恵, 宮田直幸
2. 発表標題 メタロゲニウム粒子生成細菌BIWAKO-01株の琵琶湖水柱での分布と季節変動
3. 学会等名 日本水処理生物学会第56回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田世子, 池田将平, 一瀬諭, 池谷仁里, 宮田直幸
2. 発表標題 メタロゲニウム粒子生成にかかる大型緑藻の関与について
3. 学会等名 日本陸水学会第83回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡野邦宏, 松崎彩実, 古田世子, 鈴木徹, 池谷仁里, 藤林恵, 宮田直幸
2. 発表標題 メタロゲニウム粒子生成細菌BIWAKO-01株の特異的検出と琵琶湖水柱での分布
3. 学会等名 日本水処理生物学会第55回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田直幸, 古田世子, 岡野邦宏, 藤林恵, 池谷仁里, 一瀬諭
2. 発表標題 琵琶湖底層部のマンガン循環に関するマンガン酸化細菌の生態と植物プランクトン多糖の役割
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古田世子, 中村光穂, 池田将平, 山本春樹, 一瀬諭, 宮田直幸
2. 発表標題 メタロゲニウム粒子生成と植物プランクトンの関係性, 日本陸水学会第82回大会
3. 学会等名 日本陸水学会第82回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古田世子, 中村光穂, 池田将平, 一瀬諭, 池谷仁里, 宮田直幸
2. 発表標題 琵琶湖におけるメタロゲニウム粒子生成と多糖類の関係性について
3. 学会等名 日本水処理生物学会第54回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古田世子, 山本春樹, 池田将平, 中村光穂, 一瀬諭, 池谷仁里, 宮田直幸
2. 発表標題 琵琶湖で発生した大型緑藻とメタロゲニウム粒子との関係性について
3. 学会等名 日本水環境学会第52回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Furuta, S., Ishikawa, K., Miyata, N.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 966
3. 書名 Lake Biwa: Interactions between Nature and People, 2nd ed (eds. Kawanabe, H., Nishino, M., Maehata, M.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	古田 世子 (Furuta Seiko) (00508476)	滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・環境監視部門・主任専門員 (84201)	
研究分担者	鈴木 徹 (Suzuki Toru) (20235972)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	
研究分担者	岡野 邦宏 (Okano Kunihiro) (30455927)	秋田県立大学・生物資源科学部・助教 (21401)	
研究分担者	池谷 仁里 (Ikegaya Hisato) (30531579)	兵庫県立大学・生命理学研究科・客員研究員(研究員) (24506)	
研究分担者	藤林 恵 (Fujibayashi Megumu) (70552397)	九州大学・工学研究院・助教 (17102)	

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