

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12308

研究課題名(和文) シングルセル解析を駆使した水圏における細菌増殖特性の精密解析

研究課題名(英文) Single cell analysis of bacterial growth in aquatic environment

研究代表者

日下部 武敏 (Kusakabe, Taketoshi)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：40462585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：国内の湖沼において、微生物に分解されにくい難分解性有機物の増加が懸念される。本研究では、微生物食物網で重要な位置を占める細菌群集が、琵琶湖において難分解性溶存有機物を産生しているのではないかと考えた。本研究ではDNA変性処理不要で、他の手法との組み合わせ可能なEdU増殖解析法を確立し、細菌細胞ごとに細菌増殖特性の解析を行った。その結果、琵琶湖における年間の細菌二次生産量は81 ug/L/yearと推定された。細菌二次生産へ流れる炭素量は、夏季、冬季ともに一次生産量の1%程度と見積もることができ、平均的に見ると琵琶湖における炭素循環において微生物ループは主要な経路ではないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

琵琶湖では、微生物に分解されにくい難分解性有機物の増加が指摘されてきた。本研究では、微生物食物網で重要な位置を占める細菌群集が、難分解性有機物を産生していると考え、琵琶湖の物質循環に果たす細菌群集の役割を調べた。その結果、細菌二次生産へ流れる炭素量は一次生産量の1%程度と見積もられ、平均的に見ると琵琶湖における炭素循環において微生物ループは主要な経路ではないことが明らかとなった。しかしながら、細菌二次生産が活発に行われているホットスポットの存在や、細菌二次生産が炭素制限を受けていることを示唆する結果は学術的に意義があり、将来における湖沼の有機物管理にも資する研究成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：The recalcitrant dissolved organic matter that is difficult for bacterioplankton to decompose in lakes is increasing in Japan since mid 1980's. We hypothesized that a bacterial community, which occupies an important position in the microbial food web, produces recalcitrant dissolved organic matter in Lake Biwa. In this research, We developed single-cell analysis method of bacterial growth that does not require DNA denaturation treatment and can be combined with other methods, and analyzed the bacterial growth characteristics of each bacterial cell using EdU. As a result, the annual bacterial production in Lake Biwa was estimated to be 81 ug/L/year. The amount of carbon flowing to bacterial production can be estimated to be less than 1% of the primary production in both summer and winter, and it is clear that, on annual average, the microbial loop in Lake Biwa is not the major path in the carbon cycle.

研究分野：水環境、廃棄物・資源循環

キーワード：琵琶湖 細菌群集 増殖解析 シングルセル解析 難分解性有機物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国内の湖沼において、微生物に分解されにくい難分解性有機物が増加・蓄積しており、生態系や水利用への悪影響が懸念されている。琵琶湖流域では、流入負荷と湖内 BOD<sub>5</sub> 濃度は低減傾向にあるが、一方で、湖内 COD<sub>Mn</sub> 濃度は 1980 年代半ばを境に漸増傾向に転じ、難分解性有機物の増加が懸念される。将来における湖沼の有機物管理を考える上で、難分解性溶存有機物の起源や生成機構、化学的特性、時空間的変動を理解することは極めて重要である。

海洋における炭素吸収固定プロセスの新たな概念、すなわち、微生物炭素ポンプ (Microbial Carbon Pump, MCP) が提唱された (Jiao et al., 2010)。これは、海洋の一次生産によって供給された有機物を細菌群集が利用する過程で、その一部が難分解性溶存有機物に変換され、海洋内部に長期間安定に固定されるというプロセスである。同様の概念は以前からもあったが、比較的シンプルに概念化されたと言える。本研究では、微生物食物網で重要な位置を占めると考えられる細菌群集が、琵琶湖において微生物炭素ポンプを駆動することで難分解性溶存有機物を産生しているのではないかと考えた。

細菌群集による難分解性溶存有機物の生成機構を深く理解するためには、細菌生産量 (総量) だけでは不十分であり、活発に増殖 (細菌二次生産) している細菌種の探索とその寄与、季節的・空間的変動等を明らかにしなければならない。また、増殖活性のみならず、環境条件 (水温や水塊構造、栄養塩類濃度等) が異なると、たとえ同じ細菌種であっても細胞のサイズや形状、元素組成が異なることが知られており、これらの情報も併せて取得しなければならない。

### 2. 研究の目的

研究背景を踏まえて、本研究では DNA 変性処理不要で、他の手法との組み合わせ可能な EdU 増殖解析法を確立し、細菌細胞ごとに細菌増殖特性の解析を行うことである。細菌群集の増殖活性 (生産量) は、放射性同位元素で標識した DNA 合成前駆物質チミジン (<sup>3</sup>H-TdR) の取り込み量を測定するチミジン法が広く利用されてきたが、放射性同位元素の野外使用に関する法規制が厳しい我が国では適用は難しい。Steward & Azam (1999) によって非放射性代替法としてチミジンアナログであるプロモデオキシウリジン (BrdU) を利用する方法が提案された。しかし、BrdU 法は、Anti-BrdU 抗体で検出するために DNA 変性処理が必要であり、二本鎖 DNA の完全性の損失だけでなく、細胞形態を破壊する等の欠点を抱えており、他の手法と組み合わせることが難しい。この課題を解決するために、本研究ではチミジンアナログである 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU、図 1) を利用する新たな増殖解析法の確立を目指すものである。

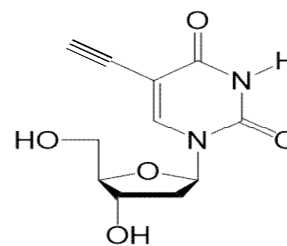


図 1 EdU の化学構造式

### 3. 研究の方法

本研究では、琵琶湖北湖・今津沖中央 (17B) にてステンレスバケツを用いて表層水を、バンドーン採水器を用いて深層 (水深 60 m) の湖水を月 1 回の頻度で採取した。採取した琵琶湖水は滅菌済み PS ボトルに入れて遮光し、氷冷しながら実験室に持ち帰った。まず、琵琶湖水から SS と微細藻類、原生動物を除去することを目的に、ガラス繊維ろ紙 GF/C (1.2 μm) で琵琶湖水をろ過した。これにより、細菌画分 (< 1.2 μm) 中の Chl. *a* 濃度 (微細藻類) を低減しつつ、89 ~ 95% の細菌細胞を回収できることを確認した。この GF/C ろ液 (細菌画分) に EdU を所定濃度で添加して EdU 取り込みを開始し、6 時間後に 0.01% ポリ-L-リシン (PLL) 溶液でコーティング処理した 0.22 μm メンブレンフィルター上に細菌細胞を捕集した。自然乾燥の後、メンブレンフィルター上でパラホルムアルデヒド (PFA) 固定 (4 °C、暗所、24 時間) し、PBS 洗浄 (3 回)、エタノール (50%、80%、99.5%) による脱水処理を行った。次に、10 mg/mL リゾチーム溶液 (pH 8.0) による透過処理 (37 °C、30 分) を行った後、Click-iT Plus キット (Thermo Fischer Scientific) を用いて、細菌細胞内に取り込まれた EdU を Alexa Fluor 488 (AF488) 色素で蛍光染色した。この工程は、銅 (Cu<sup>+</sup>) 触媒存在下におけるアジド-アルキン環付加反応 (CuAAC) を利用したものであり、室温においても水中で反応が進行し、細胞内でもほとんど阻害を受けないとされる。加えて、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による対比染色 (0.1 μg/mL) の後に、落射蛍光顕微鏡 BX-53 で観察した。なお、増殖解析実験方法の予備検討では、大腸菌株 (*E. coli* K-12、NBRC 3301) を用いた。顕微鏡観察では、U 肋起によって DAPI の蛍光を観察し、同一視野で B 肋起によって AF488 の蛍光を観察し撮影した。これを 10 視野について行った。16-bit モノクロ画像で、閾値を超える蛍光値を示す粒子 (細菌細胞) から画像の持つ蛍光量を数値化し EdU の新規取り込み量の解析を行った。

細菌細胞の有機元素分析のため、GF/C ろ液をガラス繊維ろ紙 GF-75 (0.3 μm) でろ過することで細菌細胞を捕集した。これらの GF-75 をあらかじめ 250 °C で 4 時間熱しておいた乾燥機 (NDO-400、EYELA) に、60 °C で 6 時間入れておくことで乾燥させた。その後、CHN コーダー (MT-5、Yanaco) を用いて元素分析を行い、細菌群集の細胞炭素密度 (fgC/μm<sup>3</sup>) を求めた。

#### 4. 研究成果

微生物株を用いた予備検討結果を用いて、琵琶湖細菌群集によって取り込まれた EdU の蛍光量から世代(倍加)時間を計算すると、夏季、冬季ともに 0.5 日程度と求まった。蛍光量を新規合成された DNA 量に換算して夏季および冬季における平均的な比増殖速度を求めると、それぞれ  $3.2 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$  および  $2.5 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$  であった。したがって、増殖活性の高い細菌については季節に関わらず半日程度で増殖しており、琵琶湖細菌群集の平均的な増殖速度の 40~60 倍程度であることが明らかとなった。とりわけ、夏季においては上位 4.9% の細菌細胞が二次生産量(総 EdU 取り込み量)の 50% を占めていることが明らかとなった(図 2)。このことは、鍵となる細菌群によって細菌二次生産が活発に行われているホットスポットが局所的に存在していることを示唆する結果であるが、本研究では細菌二次生産量の詳細な時間的、空間的な分布の把握はできておらず今後の課題である。

有機元素分析の結果より、琵琶湖北湖における細菌炭素密度は、表層(0.5 m)および深層(60 m)でそれぞれ 225~504  $\text{fgC}/\mu\text{m}^3$  および 198~537  $\text{fgC}/\mu\text{m}^3$  と推定された。既報値 39~188  $\text{fgC}/\mu\text{m}^3$  (Nagata et al., 1996) と比べて高かった。これは細菌細胞体積の評価方法の違いによる可能性がある。全菌数データから、夏季および冬季における細菌群集の現存量は、それぞれ 9.0  $\mu\text{gC}/\text{L}$  および 6.3  $\mu\text{gC}/\text{L}$  と求まった。次に、夏季および冬季における 1 日あたりの細菌二次生産量は、それぞれ  $2.9 \times 10^{-1} \mu\text{gC}/\text{L}/\text{day}$  および  $1.6 \times 10^{-1} \mu\text{gC}/\text{L}/\text{day}$  と推定された。また、琵琶湖細菌群集の増殖速度に関する温度係数 ( $Q_{10}$ ) は 1.14 と求まり、やや低い値であった。このことは琵琶湖細菌群集の増殖速度の温度依存性が低いからではなく、増殖の律速となっている因子が他に存在していることを示唆するものである。琵琶湖水にグルコースを添加して同様の増殖活性を調べた実験では EdU 取り込み量が増えたことから、琵琶湖においては有機物(炭素)が細菌増殖活性を制限している因子の一つである可能性が示唆される。琵琶湖・17B 地点における水温データで補正して毎月の細菌二次生産量を求め、合計することで、最終的に年間の細菌二次生産量は 81  $\mu\text{gC}/\text{L}/\text{year}$  と推定された(図 3)。定性的には、水温が高く、一次生産量が多いと考えられる春先から秋にかけて細菌二次生産量が多い傾向が認められた。本研究では、月 1 回の調査で、2 水深で細菌二次生産量を推定したが、局所的に発生していると想定される活発な細菌増殖活性を捉えられていない可能性があり、過小評価している可能性があることに留意が必要である。最後に、増殖効率を 0.26 (Del Giorgio & Cole, 1998) とすると、琵琶湖において細菌群集が 1 年間に取り込んでいる炭素量は  $3.0 \times 10^2 \mu\text{gC}/\text{L}/\text{year}$  となる。琵琶湖における一次生産速度 160~760  $\text{mgC}/\text{m}^3/\text{day}$  (Nagata et al., 1996) と比較すると、細菌二次生産へ流れる炭素量は夏季、冬季ともに 1% 程度と見積もることができ、平均的に見ると琵琶湖における炭素循環において微生物ループは主要な経路ではないことが明らかとなった。

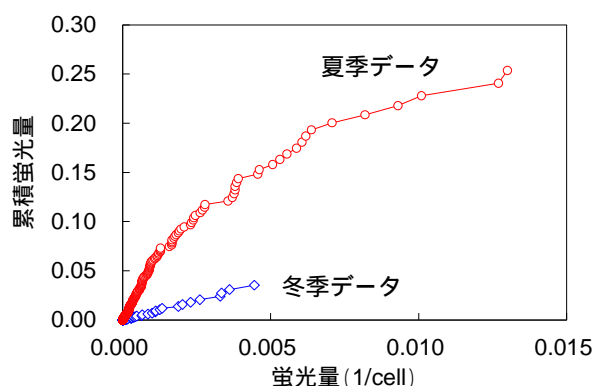


図 2 細菌細胞ごとの(累積)蛍光量

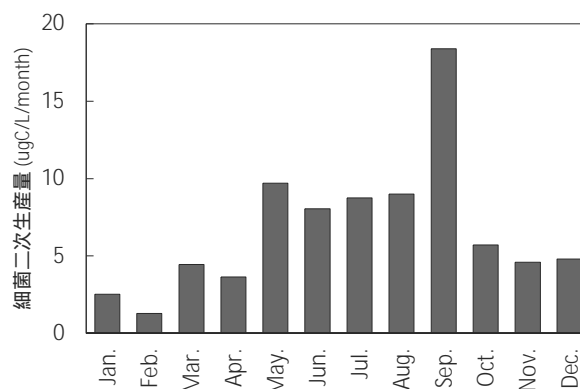


図 3 月ごとの細菌二次生産量(推定値)

#### 参考文献

- Del Giorgio, Paul A., and Jonathan J. Cole. "Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems." *Annual Review of Ecology and Systematics* 29.1 (1998): 503-541.
- Jiao, Nianzhi, et al. "Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean." *Nature Reviews Microbiology* 8.8 (2010): 593-599.
- Nagata, Toshi, et al. "Uncoupled responses of bacterial and algal production to storm-induced mixing in Lake Biwa." *Japanese Journal of Limnology (Rikusuigaku Zasshi)* 57.4-2 (1996): 533-543.
- Steward, Grieg F., and Farooq Azam. "Bromodeoxyuridine as an alternative to 3H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples." *Aquatic Microbial Ecology* 19.1 (1999): 57-66.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉野魁人, 日下部武敏, 清水芳久
2. 発表標題 シングルセル解析に向けた細菌細胞回収方法の検討
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	清水 芳久  (Shimizu Yoshihisa)  (20226260)	京都大学・工学研究科・教授    (14301)	調査、解析

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