

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04323

研究課題名(和文) 湖沼中の難分解性有機物の産生はウイルスによって加速されるか？

研究課題名(英文) Do viruses accelerate the production of refractory dissolved organic matter in freshwater lakes

研究代表者

清水 芳久 (Shimizu, Yoshihisa)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：20226260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、湖沼における細菌のウイルス感染、およびそれに伴う溶菌が湖内有機物循環にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。1年を通じた琵琶湖調査から、数少ない細菌種が細菌生産の多くに寄与しており、それらの存在量がウイルス感染によって抑制されていることが示唆された。つまりこれらの細菌-ウイルス感染系が溶菌に関わっている可能性がある。またモデル細菌およびファージを用いた室内実験から、溶菌有機物が比較的早く細菌に利用され、難分解性有機物に変換されてい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

難分解性有機物は海洋において重要な炭素貯蔵庫としての役割を担っているが、湖沼ではその蓄積が生態系や我々人間の水利用へ悪影響を及ぼすと懸念されている。湖沼において難分解性有機物の起源の解明は重要なテーマであり、現在も活発に研究がなされているが、依然として明確な答えを出せずにいる。本研究の成果は、今後、温暖化が湖沼の難分解性有機物にどのような影響を与えるのかを考える際に、ウイルス感染の重要性を明らかにする点で重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine how viral infection of bacteria in freshwater lakes and associated lysates affects the organic matter cycling in the lake. A survey at Lake Biwa suggested that a few bacterial species contribute to much of the bacterial production and that their abundance is suppressed by viral infection. This means that these bacteria-virus infection pairs may be involved in the flux of lysates. Laboratory experiments using model bacteria and phage suggested that the lysates are utilized by the bacteria relatively quickly.

研究分野：土木環境システム

キーワード：湖沼 細菌 ウイルス 溶菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水圏の細菌は、植物プランクトンが光合成で産出した溶存有機物を利用し、その一部を難分解性有機物に変換して水中に長期間貯留させる。日本各地の湖沼で、この難分解性有機物が蓄積していると報告されており、生態系や水利用への悪影響が懸念されている。近年、研究代表者のグループは、琵琶湖での細菌およびそれに感染するウイルスが難分解性有機物の産生に大きく関わっている可能性があることを見いだした。特に注目すべきは、大量の細菌がウイルスによって感染死し、その結果、細菌内の有機物が細胞破壊を伴って水中に放出されていること(溶菌)そして細菌がわずか数日で易分解性の基質を難分解性有機物に変換していることの発見である。申請者らのグループは琵琶湖において、細菌の最大7割が毎日ウイルスによって感染死し、それに伴う溶菌によって細菌細胞が溶存有機物(以下、溶菌由来有機物)として水中に回帰されていること(ウイルス分流)を報告した。特に餌資源も少なく、細菌の活性が低い深水層でも表水層を上回るほど感染現象が起きていることを明らかにした。溶菌によって放出される有機物は、もともと細菌の細胞を構成していた有機物であり、窒素やリンが豊富である(タンパクやDNA)と考えられるため、分解性が高いと考えられる。そこで申請者らはウイルス感染による分解性有機物の再生産は細菌にとっての重要な餌資源であり、難分解性有機物の生産を加速させている可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス分流が湖内の有機物循環にも影響を与えることから、ウイルスによる細菌感染、溶菌由来有機物の調製とその生分解特性について検討し、ウイルス分流の動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 琵琶湖水中における細菌とそれに感染するウイルスの動態

溶菌は感染によって引き起こされるため、細菌生産の高い時期(夏季)にどのウイルスがどの細菌に感染しているかを明らかにすべく、1年間の琵琶湖調査(月に一度採水)を実施した。細菌生産は¹⁵N-dAの取り込み活性法により評価した。細菌群集は16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を対象としたアンプリコンシーケンスで評価した。ウイルス群集は細菌のような共通遺伝子がないため、ショットガンシーケンシングによってウイルスゲノムを構築し、その組成によって評価した。得られたウイルスゲノムの塩基配列情報から宿主細菌(門レベル)で推定し、さらに共解析をすることによって、感染関係の抽出をこころみた。

(2) 細菌およびファージの単離

細菌についてはLB培地(1000分の1程度に希釈)を用いて現場水温で培養した。最大で1ヶ月ほど培養した後、コロニーを得た。コロニー中の細菌細胞を純化させるため、同条件でさらに2回培養し、単離株とした。合計で126の細菌株を得ることが出来た。これらについては、全て16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンス(V3、V4領域、MiSeq、Illumina)を実施し、種を同定した。これら126ほどの菌株から同種のものを取り除いた100種程度を対象として、ウイルスの単離を実施した。前培養した宿主を含む寒天プレート状に、琵琶湖水(採水後、30kDaの限外ろ過フィルターを用いて50倍程度濃縮したもの)を塗布し、最大1ヶ月ほど現場水温で培養した。一つの寒天プレートに対して複数のプラークが出来た場合には、最大10個のプラークを採取した。得られたプラークはさらに宿主株および寒天培地を用いて、純化した。その後、寒天培地と同成分の液体培地および宿主株を用いてウイルスを複製した。複製後、孔径0.2 μmのフィルターでろ過し、塩化セシウム密度勾配超遠心法を用いて精製し、ウイルス株とした。得られたウイルス株からDNAを抽出し、ショットガンシーケンス(MiSeq、Illumina)に供した。得られたraw readsのうちハイクオリティのものを対象にアッセンブルし、ウイルスコンティグを得た。

(3) 溶菌由来有機物の調製と生分解性

はじめに*E. coli*を37℃で40 mLのLB液体培地により振盪培養を行った。同時に同条件で*E. coli*を4時間程度振盪培養した後、T4ファージを添加し、そのウイルス量を増殖させた。その後*E. coli*、T4ファージともに遠心機を用いた限外ろ過(アミコンウルトラ)での培地の洗浄を試みた。また、希釈する際には浸透圧変化による活性低下を防ぐため無機塩培地(M9)を用いた。限外ろ過による希釈操作を行った後、それぞれの炭素濃度の減少を確認するため溶存有機炭素(DOC)濃度を計測した。なお*E. coli*培地については超純水で十分に通水した0.22 μmのポリカーボネートフィルターを用いて細菌を除去した後にDOC濃度を測定した。また、希釈操作後のT4ファージの活性を確認するため希釈された培地に含まれる*E. coli*とT4ファージを用いたプラークアッセイを行った。この際には*E. coli*のみを含んだプレート培地と、*E. coli*とT4ファージをともに含んだプレート培地の2系を用意した。

洗浄を行った *E. coli* の培地に、量を 40 mL とするまで無機塩培地(M9)を追加した。同様の系をさらに 2 つ用意し、計 3 種類の系を用意した。その 1 つには同量の無機塩培地(M9)を添加し(T4 非添加系) 1 つには 2.1 により培地洗浄した T4 ファージを 40 μ L(0.1v/v%)と M9 を 360 μ L 添加し、また 1 つには同様の T4 ファージを 400 μ L(1.0v/v%)添加した。ただし、T4 ファージによる溶菌が発生するには *E. coli* が増殖過程である必要があるため、系への T4 ファージや M9 の添加は実験開始からその増殖過程となる 360 min(6 h)が経過した時点でを行った。また、同様に *E. coli* を増殖させる目的で 4.0 gC/L のグルコースを各系へ添加した。

各系を用意した時点から、測定のため各サンプルより一定量の採水を開始し、これを一定培養時間ごとに行った。各時間でサンプルから回収する量は、OD600 による濁度測定のため 1.0 mL、三次元蛍光光度計による測定を行うための 1.5 mL とし、計 2.5 mL を回収した。続いて OD600 の測定を行い、超純水で十分に通水した 0.22 μ m のポリカーボネートフィルターを用いて細菌を除去した後三次元蛍光光度計の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 琵琶湖水中における細菌とそれに感染するウイルスの動態

表層では 19 種の細菌が全細菌数の約 40% を占め、夏場に最も多く、ウイルスによって抑制される細菌数の大部分に寄与する可能性があることが明らかとなった。つまり琵琶湖の細菌生産量のピーク時には、ごく一部の細菌種とファージが重要な感染ペアであり、溶菌フラックスに寄与すると考えられる。また、深層で優占する細菌とウイルス種の約 50% が、調査期間を通じて存在していたことも明らかとなった。このことは、「Kill the winner」モデルによって、表層の細菌に対するウイルスの影響を説明できるかもしれないが、深層では他の力学が作用している可能性を示唆している。さらに、年に一度の鉛直混合により、表層と深層で群集の変化速度が同程度になる可能性があることもわかった。これらの知見は、将来、淡水湖の成層が地球温暖化の影響を受けたときに、群集や群集間の相互作用がどのように変化するかを理解する上で貴重であると思われる。

(2) 細菌およびファージの単離

単離した細菌株について、これは *Sphingomonadaceae* 属の *Sphingopyxis* であることが Identity 98.507% で同定された。この *Sphingomonadaceae* 属は琵琶湖水中(2018 年 9 月から 2019 年 12 月までのデータ)にて存在が確認されている。単離した *Sphingomonadaceae* 属に感染するファージ(VSN-002)のゲノムは 41,771 bp から成り、その GC 含有率は 61.7% であった。75 の予測された ORF のうち、41 は左向きであり、65 は ATG から始まり、2 は TTG から始まった。合計で 50 個のタンパク質がファージゲノム内にコードされ、その長さは 138 から 3,186 bp に及んだ。推定された 50 個のタンパク質のうち、19 個は機能未知のタンパク質に分類され、31 個は推定可能な機能を持つことが示された。ファージゲノムには、ファージの複製に関連するタンパク質(ターミナーゼ、DNA ヘリカーゼ、カプシド、テールなど)がコードされていることがわかった。また、感染時に発現し、宿主の代謝を促進することでウイルスの生産量を増加させると考えられる補助代謝遺伝子(AMG)もファージゲノムで観られた。ファージゲノムには、ラジカル S-アデノシルメチオニン(SAM)上科が存在し、細菌の多数の生合成経路において重要な役割(タンパク質補酵素の合成など)を担っている可能性があることがわかった。BLASTn 解析の結果、我々の *Sphingomonadaceae* 属ファージはこれまでに報告されているバクテリオファージと相同性(類似度 95%以上)が無く、このファージの宿主はゲノム分類データベースの既存のどの種にも割り当てられていないことが判明した。図 2 に得られたファージの全ゲノムを表記する。また、このファージに関しては GenBank に全ゲノムを寄託(accession number MZ127829)、全ゲノムシーケンスの raw reads が DDBJ に登録されており(accession number DRR361504)、データ入手が可能となっている。

(3) 溶菌由来有機物の調製と生分解性

遠心式限外ろ過フィルタユニットでは、培地成分が十分に除去できないことが明らかとなった。塩化セシウムを用いた超遠心密度勾配法で先にウイルスを精製し、培地成分を十分に取り除いた後に、塩化セシウムを無機塩培地に置換することで、有機炭素濃度を超純水と同等の濃度に抑えることができた。

T4 添加 1.0v/v%系のタンパク質様ピークが 2880 min(48 h)の時点で他の系と比べて高い傾向にあり、同時刻で T4 添加 1.0v/v%系のフミン質ピークが高い傾向にある。このタンパク質様ピークの小さな差は *E. coli* 細胞内物質が溶菌によって放出されたものであると考えられる。また、フミン様ピークはその溶菌由来有機物から *E. coli* が難分解性有機物に変換したものであると考えられるため、T4 添加 1.0v/v%系では T4 ファージによる溶菌が他と比べ盛んに発生していると解釈できる。その後 3 つの系でフミン様ピークの差が観られなくなっているのは、*E. coli* が添加したグルコースからも生成できることが理由であると考えられる。また、4320 min(72 h)から大きく濁度が下がっているが、タンパク質様ピークはいずれの系でも上昇し続けていた。これはこの時刻から *E. coli* が衰退期に入り、分解された細菌体の構成物質が放出されていることが理由であると考えられる。

以上をまとめると、*E. coli*が増殖を開始してから 360 min(6 h)経過した時点で、T4 ファージを 1.0v/v%添加した系では、培養開始から 2880 min(48h)経過した付近で溶菌が活発となっており、同時に細菌がその溶菌由来有機物を難分解性有機物に変換していると考えられる。つまり、溶菌の発生によって放出された有機物が難分解性有機物に変換された可能性があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shang Shen, Yoshihisa Shimizu	4. 巻 12:624980
2. 論文標題 Seasonal Variation in Viral Infection Rates and Cell Sizes of Infected Prokaryotes in a Large and Deep Freshwater Lake (Lake Biwa, Japan)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.624980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shang Shen, Yoshihisa Shimizu	4. 巻 12:624980
2. 論文標題 Seasonal Variation in Viral Infection Rates and Cell Sizes of Infected Prokaryotes in a Large and Deep Freshwater Lake (Lake Biwa, Japan)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.624980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shen Shang, Anazawa Tetsunobu, Matsuda Tomonari, Shimizu Yoshihisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Sphingomonadaceae Strains Isolated from a Freshwater Lake	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00070-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shen Shang, Anazawa Tetsunobu, Matsuda Tomonari, Shimizu Yoshihisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Phage Infecting Sphingomonadaceae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00366-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 丹後元秀, 本間亮介, 竹内悠, 沈尚, 朴耿洙, 中田典秀, 田中宏明, 鮫島正一
2. 発表標題 疑似太陽光照射下における可視光応答光触媒ケーキ層/膜処理システムによる大腸菌ファージ MS2 の不活化効果の評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹後元秀, 本間亮介, 竹内悠, 沈尚, 朴耿洙, 中田典秀, 田中宏明, 鮫島正一
2. 発表標題 疑似太陽光照射下における光触媒ケーキ層/セラミック膜処理システムによる下水処理中ウイルス 粒子の消失と不活化に関する基礎検討
3. 学会等名 第43回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shang Shen, Ryosuke Homma, Yusuke Okazaki, Kento Tominaga, Takashi Yoshida and Yoshihisa Shimizu
2. 発表標題 Viral losses by sunlight exposure in euphotic and aphotic layers of a freshwater lake
3. 学会等名 10th Aquatic Virus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shang Shen
2. 発表標題 Do viruses accelerate the production of refractory dissolved organic matter in Lake Biwa, Japan?
3. 学会等名 35th Congress of the International Society of Limnology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沈尚, 富永賢人, 土屋健司, 松田知成, 吉田天士, 清水芳久
2. 発表標題 琵琶湖水中における細菌感染性ウイルスの動態
3. 学会等名 日本腐食物質学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沈尚, 富永賢人, 土屋健司, 松田知成, 吉田天士, 清水芳久
2. 発表標題 メタゲノム解析を用いたアクティブな細菌 - ウイルス感染関係の推定
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂田空, 沈尚, 松田知成, 清水芳久
2. 発表標題 メタゲノム解析で明らかにする下水ウイルスの存在実態
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丹後元秀, 本間亮介, 竹内悠, 沈尚, 朴耿洙, 中田典秀, 田中宏明, 鯨島正一
2. 発表標題 疑似太陽光照射下における可視光応答光触媒ケーキ層/膜処理システムによる大腸菌ファージ MS2 の不活化効果の評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹後元秀, 本間亮介, 竹内悠, 沈尚, 朴耿洙, 中田典秀, 田中宏明, 鮫島正一
2. 発表標題 疑似太陽光照射下における光触媒ケーキ層/セラミック膜処理システムによる下水処理中ウイルス 粒子の消失と不活化に関する基礎検討
3. 学会等名 第43回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shang Shen, Ryosuke Homma, Yusuke Okazaki, Kento Tominaga, Takashi Yoshida and Yoshihisa Shimizu
2. 発表標題 Viral losses by sunlight exposure in euphotic and aphotic layers of a freshwater lake
3. 学会等名 10th Aquatic Virus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shang Shen
2. 発表標題 Do viruses accelerate the production of refractory dissolved organic matter in Lake Biwa, Japan?
3. 学会等名 35th Congress of the International Society of Limnology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沈尚, 富永賢人, 土屋健司, 松田知成, 吉田天士, 清水芳久
2. 発表標題 琵琶湖水中における細菌感染性ウイルスの動態
3. 学会等名 日本腐食物質学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沈尚, 富永賢人, 土屋健司, 松田知成, 吉田天士, 清水芳久
2. 発表標題 メタゲノム解析を用いたアクティブな細菌-ウイルス感染関係の推定
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂田空, 沈尚, 松田知成, 清水芳久
2. 発表標題 メタゲノム解析で明らかにする下水ウイルスの存在実態
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022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	松田 知成 (Matsuda Tomonari) (50273488)	京都大学・工学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	沈 尚 (Shen Shang) (20882426)	国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境保全領域・JSPS 特別研究員 (82101)	

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