

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 30 日現在

機関番号：45405

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510013

研究課題名（和文） 海洋と南極湖沼における硫黄循環と窒素循環に対する嫌気呼吸の役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the role of anaerobic respiration for the sulfur and nitrogen circulation in the ocean and Antarctic lakes

研究代表者 松崎 雅広（MATSUZAKI MASAHIRO）

鈴峯女子短期大学・保育学科・教授

研究者番号：50294517

研究成果の概要（和文）：本研究では南極湖沼の硫黄循環モデルとしての可能性を探るために様々な南極湖沼の細菌群集構造解析を行った。高濃度塩湖のすりばち池と舟底池の上層は出現菌属が少なく単純な細菌相であったが、嫌気的であるすりばち池の下層は多様性に富んでいた。これらの細菌は系統的に近縁属であり、高塩分が細菌相を左右する要因であることが考えられた。DMSO の前駆物質であるジメチルスルフォニオプロピオネートの存在量が少ない水層では DMSO 呼吸細菌が優占属であり負の相関関係が認められた。一方、淡水湖は *Thiomicrospira* sp. が優占する単純な細菌相であった。

研究成果の概要（英文）：The bacterial community structures of salt lakes in which haloclines exist differed between these three salt lakes, indicating that there were many unidentified bacteria, and that they were rich in biodiversity. The bacterial communities of eight freshwater lakes formed a simple structure, such as *Thiomicrospira* sp., which inhabits the ocean in polar regions and fall water around McMurdo Dry Valleys, becomes the predominant genus. Phylogenetic analysis revealed that these bacteria growing in salt and freshwater lakes were closely related genera. DMSP concentrations from phytoplankton and DMS and dissolved DMSP concentrations in the water samples are shown. There is a negative correlation between the abundance of DMSO-respiring bacteria and DMSP, there are many *Marinobacter* in the surface water.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：硫黄循環・窒素循環・南極湖沼・気候変動

1. 研究開始当初の背景

酸化炭素やメタンガスによる地球温暖化が問

題となっており、地球温暖化ガスとして数多くのガスが報告されている。亜酸化窒素(N_2O)はメタンよりも温暖化係数が高いガスとして、ジメチルスルフィド(DMS)は逆に地球の寒冷化に関与するガスとして注目されている。DMSは海洋性植物プランクトンに含まれる浸透圧調節物質と考えられているジメチルスルフォニオプロピオナート(DMSP)が動物プランクトンに捕食され、環境中に放出されたDMSPが細菌により分解されて生ずる(図1)。生成したDMSは速やかに酸素と反応し、ジメチルスルフォキシド(DMSO)に変換される。一部のDMSは大気中に拡散し光酸化によりメタンスルホン酸(MSA)を生成し、それが雲の核となって雲の形成を促進し、気候変動に影響(地球冷却化)を与えと言われる(Stiefel, Science, 1996)。DMSOはあらゆる水環境に存在し、特に海洋には220 nM、湖、河川、雨水中にも1~70 nM存在していることが報告されている(Griebler, J. Microbiological Methods, 1997)。DMSから変換されたDMSOは細菌の嫌気呼吸系の一つであるDMSO呼吸によりDMSに還元される。古細菌の*Halobacterium*もDMSO呼吸を行うことが報告され(Müller and DasSarma, J. Bacteriol., 2005)、DMSO呼吸細菌は地球上のいたるところに生息していることが示唆された。しかしながら、海洋環境中のDMSO呼吸可能な細菌についての報告はない。

一方、 N_2O は大気中に約300 ppbの濃度で含まれ、燃料の使用や有機物の微生物分解によって発生する。 N_2O は細菌の嫌気呼吸の一つである脱窒によっても発生し、細胞内においては有機物を酸化するのに使われる。窒素の循環に関しても海洋の貧酸素水域における脱窒の強弱が、氷期・間氷期の気候変動を引き起こす要因として挙げられており、対流圏の N_2O 濃度も連動して増減することが明らかになってきた(Richardson et al., Trends Biotechnol., 2009)。

南極の湖沼は流入がほとんどなく、動物による環境かく乱や人間活動による汚染もほとんどない。南極湖沼は地球規模の自然界での硫黄循環(サイクル)の過程を理解するモデルとなる「閉鎖生態系」として考えることができる。そこで、南極湖沼での硫黄循環におけるDMSO呼吸の寄与をDMSO呼吸遺伝子の定量的解析から明らかにできるかどうかを調べるため、まず南極湖沼に存在するDMSO呼吸細菌を分離しようと考え、これまでに南極昭和基地周辺の高濃度塩湖すりばち池と舟底池から*Marinobacter* sp. (Matsuzaki et al, Polar Bioscience, 2006)と*Halomonas* sp.を分離した。しかしながら、DMSO呼吸遺伝子(*dmsA*)の分離には至っていない。*dmsA* 遺伝子はデータベース上に約15種類が登録されているのみである。これらのうちの大半がサルモネラ菌やペスト菌などの全ゲノム情報が明らかになった病原性の腸内細菌に属するものである。分離した*Marinobacter* sp.と*Halomonas* sp.との相同性が低いためにPCRに

よる増幅やサザンハイブリダイゼーションによる分離が不可能であったと考えられた。湖沼中のDMSP量と細菌群集構造の関係を調べるためにまず4塩湖と7淡水湖を解析した。淡水湖は*Thiomicrospira* sp.が優占属であり細菌量全体の60%以上を占めていた。一方、塩湖は海水由来にもかかわらず海中の細菌群集構造とは異なり、さらに存在する細菌属が池ごとに異なっていた。これら細菌属は培養できない種が大多数を占めていた。これらの細菌属の系統解析からは、塩湖に生育する細菌属は系統的に近縁であり塩分が限定要因となっていることが明らかとなった。さらに淡水湖と塩湖の両方に共通する細菌属が存在することから、海起源は同じであるが流入出量の違いにより塩分濃度に変化し、細菌群集構造が変化したものと考えられた。2塩湖のDMSとDMSPの垂直分布量を定量したところDMSO呼吸細菌である*Marinobacter* sp.と*Halomonas* sp.が存在する水深ではDMSP量が少なく負の相関関係を示した。以上の結果から南極塩湖における硫黄循環においてDMSO呼吸が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では嫌気呼吸であるDMSO呼吸と脱窒が硫黄と窒素の循環に重要であると考え、まず南極湖沼における硫黄循環と窒素循環のモデルを構築する。そのためにまず第51次南極地域観測隊が2010年4月に持ち帰る南極湖沼の水サンプルの細菌群集構造をDGGEシステムにより網羅的に解析する。さらに次年度以降、DMS/DMSP量と窒素量の定量およびDMSO還元酵素遺伝子・タンパク質・mRNA量の定量を行い、南極湖沼および海洋での硫黄および窒素循環における嫌気呼吸の寄与を定量的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

自然界に生息する細菌のうち細菌の生理活性や分離培地等の影響で培養可能なものは1%以下といわれている。一方、DMSO呼吸遺伝子である*dmsA*遺伝子はデータベース上に15種類が登録されているのみであるが、これらのうちのほとんどが病原性の腸内細菌に属するものであり、環境中の細菌は存在しない。脱窒細菌についてもデータベース上に約10種類が登録されているのみである。そこで、最初に網羅的にDMSO呼吸細菌と脱窒細菌を分離し、その属を決定すること、その後の定量解析に用いる*dmsA*遺伝子と脱窒関連酵素遺伝子を分離する。

平成22年度

2009年11月に出発する第51次南極地域観測隊の夏のオペレーションにおいて、南極昭和基地周辺の塩湖を含む湖沼と南極海の水試料のサンプリングを依頼している。2010年4月中旬

にそれらサンプルを受け取る。培養可能な細菌は全体の1%以下とされているが、データベースに登録されている配列では嫌気呼吸系遺伝子の PCR による増幅やプローブの調製が確実に行える可能性が低いと考えられる。そこで、すみやかに湖沼と南極海の試料に含まれる培養可能な DMSO 呼吸細菌と脱窒細菌の分離を行う。分離培養でき次第順次 16S rRNA 遺伝子を決定、属の同定を行う。少なくとも 10 種類の細菌が分離できた段階で、海洋の特徴(水温、塩分濃度、窒素量等)と DMSO 呼吸細菌と脱窒細菌の種類分布について考察を行う。一方、各々の水試料の全菌数および培養可能な生菌数を測定する。酸素呼吸で生育した細菌については 16S rRNA 遺伝子を決定、属の同定を行い、各採水地点の培養可能な細菌相を推定する。さらに、培養によらず PCR 法でのみ 16S rRNA 遺伝子を増幅させ、培養によらない細菌相を推定する。これまでほぼ全長である 1.4 kbp の 16S rRNA 遺伝子を増幅させていたが、より簡便に行うことができる Dcode システム(DGGE 法)によって解析を行う。

これらの結果から、細菌相における培養可能な DMSO 呼吸細菌の割合及び脱窒細菌が決定でき、硫黄循環と窒素循環における嫌気呼吸の必要性が検討できる。

平成23年度以降

第 51 次観測隊の冬のオペレーションにおいて冬～初夏にかけての湖沼と南極海の水試料のサンプリングも依頼している。平成 22 年度と同様の解析を行うことにより季節的な細菌群集構造の変動を明らかにすることができ、硫黄循環と窒素循環における嫌気呼吸の重要性について 1 年の周期変動的に検討できる。解析はサンプルが届く平成 23 年度 4 月以降となる。

さらに平成 23 年 11 月に出発する第 52 次観測隊の夏のオペレーションにおいて、DMS/DMSP を定量する予定である。この解析は国内共同研究者に依頼する予定であるが、私自身が観測隊に参加し測定する可能性もある。

同時に嫌気呼吸系遺伝子・酵素・mRNA の定性・定量解析を行うために遺伝子プライマー・プローブを作製し、次の解析を行う。

(1) 嫌気呼吸系遺伝子を用いた蛍光抗体法(FISH 法)と定量的 PCR 法による定量方法の確立

これまで海洋微生物を材料として物質の代謝・循環を研究、理解するべく、海洋中の細菌の菌数を、抗体法あるいは培養計数法により測定しようとする試みが報告されているが、特異的な抗体が得にくいこと、また海洋性細菌は一般に増殖が極めて遅いため培養計数法の適用が難しいことなど問題が多かった。そこで、細菌内に含有される 16S rRNA をターゲットとして、蛍光標識オリゴ DNA プローブを直接菌体内 16S rRNA 分子にハイブリダイズさせ、蛍光顕微鏡下でその蛍光を観察し、特定微生物の検出・定量を行

う FISH 法の確立を行う。16S rRNA と嫌気呼吸系 mRNA をターゲットとして、蛍光顕微鏡で観察、DMSO 呼吸細菌および脱窒細菌を特異的に認識し、水試料中の DMSO 呼吸能と脱窒細菌を有する細菌の定量を行う。研究室に自由に利用できる蛍光顕微鏡が設置されている。蛍光フィルターのみの交換で解析できる。

一方 FISH 法はリボソーム RNA をターゲットにした場合によく用いられる。特定の機能遺伝子を用いる場合、このような機能遺伝子は通常ゲノム上に 1~数コピーしか存在しないことが多いことから、蛍光検出において十分な感度が得られない可能性が考えられる。そこで、核酸染色蛍光色素 SYBR Green を用いたリアルタイム定量的 PCR 法による嫌気呼吸系遺伝子の定量法の確立も同時に行う。定量的 PCR を行うサーマルサイクラーは現在までのところ自由に使える機器は設置されていないが、一時的に利用するのは可能である。

(2) 嫌気呼吸系酵素の現場測定法の開発

植物プランクトンが放出する寒冷化ガス DMS を酸化して DMSO を生成する細菌や藻類が存在するが、空気中の酸素により酸化されるものが大半であることが予想される。海水中の DMSO を還元し DMS として再放出するのが DMSO 呼吸であり、脱窒活性と合わせて現場測定法を開発する。これらの実地試験は広島大が所有する豊潮丸の航海中に行う。N₂O、DMS、DMSO を定量するためにガスクロマトグラフィーが必要であるが、分析は国内の共同研究者に依頼する。

4. 研究成果

南極の湖沼は流出入がほとんどなく、動物による環境かく乱や人間活動による汚染もほとんどない。南極湖沼は地球規模の自然界での硫黄循環(サイクル)の過程を理解するモデルとなる「閉鎖生態系」として考えることができる。これまでに南極湖沼での硫黄循環における DMSO 呼吸の寄与を DMSO 呼吸遺伝子の定量的解析から明らかにできるかどうかを調べるために、南極湖沼に存在する DMSO 呼吸細菌を分離しようと考え、これまでに南極昭和基地周辺の高濃度塩湖すりばち池と舟底池から *Marinobacter* sp. (参考文献1)と *Halomonas* sp. を分離した。しかしながら、DMSO 呼吸遺伝子(*dmsA*)の分離には至っていない。閉鎖生態系における物質循環を考える上でそれぞれの湖沼における細菌群集構造の違いを知ることは重要である。これまでに南極昭和基地周辺の露岩域に数多く点在する湖沼の網羅的な細菌群集構造解析を行い、塩湖では塩分濃度の薄い上層は *Roseobacter* sp. と *Marinobacter* sp. の共通する菌属が確認されるが、*Roseobacter* sp. と *Marinobacter* sp. の海洋性の菌属も存在していた。一方、高塩分濃度の下層細菌群集構造は上層に比べてより未知の菌属の割合が多かった。一方、淡水湖は *Thiomicrospira* sp. が優占する。そこで、本研究では淡水湖と塩湖に出現する細菌属の塩基配

列を用いて両池に出現する細菌の系統の違いを調べた。

1) 塩湖と淡水湖に出現する細菌属の系統解析

淡水湖のみに出現した *Thiomicrospira* sp. は塩湖と淡水湖に共通に出現する *Marinospirillum* sp. や *Marinobacter* sp. に近縁であった。また、塩湖にのみ出現した細菌属はそれ自身を含む単独のクレードに分類され、しかも未培養クローンとして登録されているものが大半であった。このことはこれらの細菌が現在までに培養分離されていない細菌種であるか、もしくは氷河期後に大陸が上昇し取り残された細菌がそのまま南極湖沼において生き続けてきた古い細菌種である可能性も考えられる。

2) 塩湖すりばち池と舟底池の DMSP 量と DMSO 呼吸細菌の相関関係

植物プランクトン由来の DMSP (ジメチルスルフォニオプロピオネート) が細胞破壊などにより海水中に放出され、DMSP リアーゼなどの酵素反応によって DMS (ジメチルスルフィド) に変換されると考えられている。揮発性物質である DMS は環境中に放出されると酸化され、DMSO に変化する。塩湖すりばち池と舟底池の DMSP 量と DMSO 呼吸細菌の相関関係について調べた。*Marinobacter* sp. が比較的多い水層は、すりばち池の表層、2m、5m、舟底池の 0m であり、この水層では DMSP の存在量が少なくなっており、負の相関関係があると考えられた。

以上の結果は夏の時期の細菌群集構造を解析したものである。今後は氷で湖沼表面が覆われる時期から開氷までの期間の細菌群集構造の変化を調べることにより、細菌群集の変化と物質循環に関する研究の端緒となることが期待できる。

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 0 件)

[学会発表] (計件)

松崎雅広、高橋陽介、工藤栄

南極昭和基地周辺の湖沼における細菌群集構造解析

第 67 回日本植物学会中国四国支部大会、2010 年 5 月 15 日、山口大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 雅広 (MATSUZAKI MASASHIRO)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：50294517

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

伊村 智 (IMURA SATOSHI)
国立極地研究所・研究教育系・准教授
研究者番号：90221788

工藤 栄 (KUDOH SAKAE)
国立極地研究所・研究教育系・准教授
研究者番号：40221931