

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510032

研究課題名(和文) 宍道湖・中海の水質保全を目的としたピコシアノバクテリア培養株の確立と応用研究

研究課題名(英文) The establishment of picocyanobacteria strains for the purpose of the water quality maintenance of Lakes Shinji and Nakaumi and applied study

研究代表者

大谷 修司(OHTANI, Shuji)

島根大学・教育学部・教授

研究者番号：50185295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：汽水湖、宍道湖・中海では、ピコシアノバクテリア(径約1 $\mu$ m)がしばしば優占するが、これまで種名も生態系における役割も明らかにされていなかった。宍道湖産ピコシアノバクテリア培養株ESS-1-2株とS3-1株は形態観察と分子系統解析からCyanobium属の一種であることが明らかとなった。ESS-1-2株や宍道湖産植物プランクトン培養株を、摂餌実験に応用するための培養条件を確立し、ESS-1-2株をヤマトシジミに与え、排泄物と消化管の観察からその消化の過程を観察した。餌としての有効性をESS-1-2株と珪藻1種、緑藻1種と比較したところ、餌としては3種のなかでは珪藻が最も有効であった。

研究成果の概要(英文)：In the brackish Lakes Shinji and Nakaumi, picocyanobacteria (cells ca. 1  $\mu$ m in diameter) have been frequently dominant, but species were not confirmed and the roles in the ecosystem were not known. Pycocyanobacteria strains (ESS-1-2 and S3-1) were identified as Cyanobium sp. by the observation of cell morphology and the molecular analysis. Culture conditions of ESS-1-2 and several phytoplankton of Lake Shinji were established for the feeding experiment of Corbicula japonica. We observed a process of the digestion from feces and gastrointestinal observations of Corbicula japonica with ESS-1-2. After checking the effectiveness as the bait of Corbicula japonica with ESS-1-2, a diatom and a green alga, a diatom was the most effective as bait.

研究分野：微細藻類の分類学

キーワード：汽水湖 宍道湖・中海 植物プランクトン ピコシアノバクテリア 培養株 大量培養 ヤマトシジミ  
の餌 水質保全

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、1994 年以降島根県保健環境科学研究所と共同して宍道湖・中海において、植物プランクトンの種組成と現存量のモニタリングを実施してきた。ピコシアノバクテリア（径約 1 $\mu$ m）は、6 月～11 月に優占する傾向があり、過去の出現傾向を調査した結果、2003 年以降その出現頻度が高くなっている傾向が認められた。しかし、ピコシアノバクテリアは未だに種名は明らかではなく、これらが本水系で果たす生態的役割や代表的な水産資源のヤマトシジミの餌となっているか否かも未だに不明のままであった。本水系のピコシアノバクテリアの種レベルの同定、培養株を確立することや大量培養方法の確立は、ピコシアノバクテリアの生態的役割の解明にも極めて重要である。

## 2. 研究の目的

本研究ではピコシアノバクテリアの培養株を分離培養し、形態的特徴と分子系統解析から分類学的研究を行い種名を明らかにすること、また、ヤマトシジミへの摂餌実験等の大量培養の方法を確立すること、培養を行ったピコシアノバクテリアや宍道湖で優占する植物プランクトンをヤマトシジミに摂餌させて、その餌としての有効性について検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)ピコシアノバクテリアのクローン化

クローン化は、まず 96well プレーートの各ウェルに 250  $\mu$ l IMK+Si 培地（1/10 海水）を分注した。続いてセルソーター（Beckman Coulter EPICS ALTRA）を用いて宍道湖湖水分から離された ESS-1-2 株の細胞を 1 細胞ずつ 96well プレートに分取した。20、12 時間：12 時間の明暗周期で培養を行い、細胞が増殖した well から

培養液の一部を 10 ml IMK+Si 培地（1/10 海水）入り試験管に移し、クローン株とした。

### (2)ピコシアノバクテリアの種の同定

ESS-1-2 株と同様に宍道湖湖水分から離された S3-1 株について、光学顕微鏡（OLYMPUS BX60）による形態観察と 16S rDNA 配列の分子系統解析から種の同定を試みた。上記クローン化と分子系統解析は国立環境研究所、志村氏、河地氏に依頼した。

### (3)宍道湖産植物プランクトン増殖実験

200 ml 容器：ピコシアノバクテリア *Cyanobium* sp.(ESS-1-2)、藍藻 *Microcystis ichthyoblabe*(GS-1)、藍藻 *Coelosphaerium kuetsingianum* (G2)、珪藻 *Thalassiosira pseudonana*(SC-1)、珪藻 *Cyclotella atomus* (SC-6)、緑藻 *Pseudodictyosphaerium minusculum*(HK-17)、緑藻 *Monoraphidium circinale*(SO4-2)について、20、12 時間：12 時間明暗周期の条件で IMK+Si 培地（1/10 海水）200 ml を含む三角フラスコで、静置培養を行い、十分な増殖を確認した。なお、*C. kuetsingianum* のみ淡水藻類用 CA 培地を用いた。括弧内は培養株番号を示す。

5L 容器：*Cyanobium* sp. (ESS-1-2) 及び *P. minusculum* (HK-17) について IMK+Si 培地（1/10 海水）を用い、25、約 2000 lux、14 時間明期：10 時間暗期の条件で培養を行った。なお、曝気は細菌が除去できるフィルターを通して行った。両培養株ともに培地 10 ml を含む試験管で培養を開始し、次に培地 30 ml を含む試験管、最後に 5L のプラスチック容器で培養を行った ESS-1-2 株は 4 月 20 日開始、HK-17 は 4 月 27 日に開始し、いずれも 9 月 20 日に終了した。最終細胞密度の計測にはトーマ血球計数板を用いて 400 倍で検鏡を行い、3 回計測しその細胞密度を計測し

た。本実験は島根県保健環境科学研究所，野尻氏，佐藤氏，神谷氏と共同に行った。

10L 容器： *M. ichthyoblabe* (GS-1) について CA 培地を用い，25℃，約 1500 lux，12 時間明期，12 時間暗期の条件で培養を行った。2L と 10L の培養系は細菌が除去できるフィルターを通し常時曝気した。試験期間は平成 24 年 5 月 17 日～平成 24 年 9 月 2 日とした。

本実験では，一定以上の細胞密度に調整しつつ 10 mL 試験管で培養を開始し，500 mL 三角フラスコ，3L 三角フラスコ，10L 培養容器と順次大きい容器で培養を行った。最終細胞密度を落射型蛍光顕微鏡にて G 励起を用い計測した。細胞計測にはトーマ血球計数板を用いて 200 倍で検鏡を行い，細胞密度を計測した。なお，本培養株の増殖実験は島根大学生物資源科学研究科の高橋氏，佐藤氏との共同で行った。

#### (4) ヤマトシジミへの摂餌実験

宍道湖西岸において，2014 年 5 月，7 月，8 月に殻長約 20 mm のヤマトシジミを採集し，実験室に持ち帰った。宍道湖水を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し，湖水から植物プランクトンを除去し，その水を用いて絶食状態でヤマトシジミに糞を排出させた。約 3 時間おきに排出物を採集し，排出物の形態，植物プランクトンの有無，バクテリアの有無，消化の程度などについて顕微鏡観察を行い，排出物の区分を試みた。*Cyanobium* sp.(ESS-1-2)を IMK+Si 培地 (1/10 海水) を用い，20℃，約 1000 lux，12 時間明期：12 時間暗期の条件で培養を行った。十分に色づくまで増殖させて，本種のみをヤマトシジミに与える摂餌実験を行った。本実験は島根大学教育学部の石橋氏との共同で行った

## 4. 研究成果

### (1) ピコシアノバクテリアのクローン化

大谷研究室には 2008 年 11 月の宍道湖湖水

から分離されたピコシアノバクテリア ESS-1-2 株があり，本培養株は細胞径約 1 μm で，楕円体と球体が混在していることから複数種が混ざっている可能性があった。そこで複数のクローン株を作成し，これらのクローン株について 16S rDNA 配列を調べた結果，すべての遺伝子配列が同じであった。この結果は，ESS-1-2 株は一種類からなる単藻培養株であり，球形と楕円体が混在することは同種の分裂時期による違いと考えられた。クローン化できたことで，今後の生理学的実験やヤマトシジミへの摂餌実験等への応用研究に利用が広がることを期待できる。

### (2) ピコシアノバクテリアの種の同定

*Cyanobium* 属は Rippka & Cohen-Bazire (1983) によって提案された属であるが，形態的な記載が少なく，同じ培養株を用いて Komarek *et al.* (1999) によって属の形態的特徴の記載が詳しく行われた。その結果と他の文献の結果をまとめて Komarek & Anagnostidis (1999) で記載文，スケッチ，検索表が出版され，本属の特徴と種の同定が可能となった。

Komarek & Anagnostidis (1999) の *Cyanobium* 属の記載文は，「細胞は単独で，2 分裂によって増殖し，コロニーは形成しない。細胞は小さく，細胞の長さは 1-4 μm，幅は 1-3 μm で粘質は形成しない。卵形，楕円体から短い棒状で通常はクロマトプラズマが見える。」であるが，宍道湖産 ESS-1-2 株，S3-1 株ともに，上記の記載に形態は良く一致する。二つの株の形態的特徴を以下に示す。

ESS-1-2 株：細胞は単独で 2 分裂で増殖，球形，卵形，楕円体，棒状，長さ 1.0-3.1 μm 幅 0.8-1.1 μm。

S3-1 株：細胞は単独で 2 分裂で増殖，球形，卵形，楕円体，棒状，長さ 1.2-2.8 μm 幅

### 1.1-1.2 $\mu\text{m}$ .

また、16S rDNA 配列の分子系統解析でも、すでに報告されている *Cyanobium* 属の培養株と同じクラスターに入っていることから、宍道湖産のこれら 2 株は形態的特徴からも分子系統解析の結果からも *Cyanobium* sp. として扱うことが妥当であると考えた。種の同定に関しては、本属の種との詳細な比較研究が必要であり、今後の課題とした。なお、ESS-1-2 株は淡水藻類用の CA 培地では育たないが、S3-1 株は CA 培地で育つことができ、その増殖特性は互いに異なっており興味深い。

### (3)宍道湖産植物プランクトン増殖実験

クロロフィル a 含量の測定のように数百 ml 容器での増殖量で十分の場合やヤマトシジミの摂餌実験に用いる 5~10L 容器の量が必要な場合があり、3 つの容器サイズでの培養を行ったのでその結果を示す。

・200 ml 容器:珪藻 *Cyclotella atomus* (SC-6) のみ十分な増殖が得られなかったが、他の植物プランクトンは GF フィルターで濾過したところ、十分に濃い試料が得られ、カロチノイドの組成と細胞あたりのクロロフィル a 測定 (静岡県立大学 谷氏共同) や炭素と窒素同位体比測定 (京都大学 笠井氏共同) 等に用いることができた。以下にその最終細胞密度を示す。*Cyanobium* sp.(ESS-1-2)  $44.1 \times 10^6$  cells/ml, *M. ichthyoblabe* (GS-1)  $13.9 \times 10^6$  cells/ml, *C. kuetzingianum* (G2)  $9.1 \times 10^6$  cells/ml, *T. pseudonana* (SC-1)  $1.5 \times 10^6$  cells/ml, *C. atomus* (SC-6)  $0.27 \times 10^6$  cells/ml, *P. minusculum* (HK-17)  $10.1 \times 10^6$  cells/ml, *M. circinale* (SO4-2)  $4.2 \times 10^6$  cells/ml

・5L 容器: *Cyanobium* sp. (ESS-1-2) 及び *P. minusculum* (HK-17) について増殖実験を今回の方法で細胞密度が ESS-1-2 株は  $4.7$

$\times 10^7$ /ml, HK-17 株は  $1 \times 10^7$ /ml までの大量培養系が確立できた。

・10L 容器: *M. ichthyoblabe* (GS-1) について最終細胞密度は  $2 \times 10^6$  cells/mL であった。10L 培養系以外の培養系 (2L の培養系等) でも最終細胞密度は  $10^6$  cells/mL 程度であったため、大量培養による増殖能力の低下は見られなかった。また、移植の際、移植直後の細胞密度が  $10^4 \sim 10^5$  cells/mL 以上であれば増殖が可能であることが示された。

### (4)ヤマトシジミへの摂餌実験

ヤマトシジミの宍道湖での資源量は平成 22 年から 24 年にかけて連続して減少傾向にあり、その原因解明を様々な角度から行う必要があった。宍道湖におけるヤマトシジミの摂餌とその排出、消化過程に関して、特に微細藻類に焦点をあてて調査を行った。

神西湖人工池での結果 (大谷他 2004) と同様に、今回の宍道湖西岸から採集したヤマトシジミの排出物は入水管から排出される擬糞と、出水管から排出される未消化糞、消化糞の 3 種類に区分された。擬糞には微細な鉍物片と未消化の藻類が多く含まれていた。未消化糞には未消化の植物プランクトンや底生性の藻類が多数観察され、バクテリアはほとんど観察されなかった。消化糞は微細な茶色の粒子からなり、バクテリアを多く含み、未消化の藻類が時々観察された。

*Cyanobium* sp.(ESS-1-2) を増殖させて、本種のみを与える摂餌実験を行った。ヤマトシジミを解剖したところ未消化糞を含む消化管は青緑色になり、クロロフィル自家蛍光が残っていた。一方、消化糞では自家蛍光がなくなり、形状も顆粒状に変化していることから中腸腺で消化されていることが示唆された。

## (5) 宍道湖産植物プランクトンを用いた応用研究例

### 応用研究 1

藍藻の *Cyanobium* sp.(ESS-1-2)と珪藻の *T. pseudonana* (SC-1), 緑藻の *P. minusculum* (HK-17)の三種類を島根県水産技術センター福井氏, 勢村氏に分譲し, シジミの餌として大量培養の方法を共同で確立した。京都大学笠井氏と水産技術センターが餌としての有効性を窒素と炭素の安定同位体を用いて調べる実験を行った結果, 3 種の中では珪藻 *T. pseudonana* が餌として最も有効であった。

### 応用研究 2

島根県水産技術センターに *Cyanobium* sp.(ESS-1-2)と珪藻の *T. pseudonana* (SC-1), 緑藻の *P. minusculum* (HK-17)を分譲し, 南里氏, 土江氏, 勢村氏によってこれらの種類のヤマトシジミ幼生にとっての飼料価値が検討された。摂餌実験から珪藻と緑藻に比べ ESS-1-2 株は, 成長が悪く, 着底までの時間が長いこと, 加えて, 着底後の成長と生残率が割ることが示唆された。今後, 稚貝ヤマトシジミにとっての餌料価値が総合的に判断される。

## <引用文献>

Komarek, J., Kopecky, J. and Cepak, V. (1999) Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. *Crypogamie Algol.* 20: 209-222.

Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1999) Cyanoprokaryota 1.Teil Chroococcales. In *Susswasserflora von Mitteleuropa* 19/1 : 1-548 .

大谷修司・辻井要介・江原亮・草田和美・板倉俊一・山口啓子・品川明・秦明德・中村

幹雄 (2004) 神西湖人工池におけるヤマトシジミの摂餌, 排出と消化過程. *LAGUNA* 11 : 109 - 124 .

Rippka, R. and Cohen-Bazire, G. (1983) The Cyanobacteriales: A legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134 B: 21-36.

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ](計 3 件)

野尻由香里, 崎 幸子, 大谷修司 (2013) 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2011 年度) 島根保環研所報 53: 53-61. 査読無.

野尻由香里, 佐藤紗知子, 大谷修司 (2014 年) 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2012 年度) 島根県保健環境科学研究所報概要 54: 66-68. 査読無.

中島結衣・大谷修司 (2014) 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2013 年度) 概要. 島根県保健環境科学研究所報 55: 77-79. 査読無.

[ 学会発表 ](計 1 件)

大谷修司, 神門利之, 野尻由香里, 佐藤紗知子, 嵯峨友樹, 辻谷睦巳, 丸山将輝, 菅井隆吉. 宍道湖産植物プランクトンの培養株保存とその応用研究. 第 17 回河川生態学術研究発表会, 2014 年 11 月 12 日, 発明会館 (東京)

[ 図書 ](計 0 件)

[ 産業財産権 ](計 0 件)

[ その他 ](計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大谷修司 ( OHTANI Shuji )

島根大学・教育学部教授：50185295

### (2)研究分担者

該当無し

### (3)連係研究者

該当無し

### (4)研究協力者

国立環境研究所：志村遥平 ( SHIMURA

Yohei ) ,河地正伸( KAWACHI Masanobu )

京都大学フィールド科学教育研究センター：

笠井亮秀 ( KASAI Akihide )

島根県保健環境科学研究所：野尻由香里

( NOJIRI Yukari ) ,佐藤紗知子( SATO

Sachiko ) ,神谷 宏( KAMIYA Hiroshi )

島根県水産技術センター：土江麻代

( TSUCHIE Mayo ) , 福井克也

( FUKUI Katsuya ) , 勢村 均

( SEMURA Hitoshi )

島根大学教育学部：石橋圭子 ( ISHIBASHI

Keiko )

島根大学生物資源科学研究科：高橋慶行

( TAKAHASHI Yoshiyuki ) , 佐藤利夫

( SATO Toshio )

静岡県立大学環境科学研究所：谷 幸則

( TANI Yukinori )

東京大学大学院新領域創成科学研究科：南里

敬弘 ( NANRI Takahiro )