

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651006

研究課題名(和文) 湖沼における藻類産生有機物を起点とする微生物ループの構造解明の試み

研究課題名(英文) Structural analysis of microbial loop based on algal organic matter in lake

研究代表者

春日 郁朗 (KASUGA, Ikuro)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20431794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：安定同位体プローブ法により、藻類産生有機物を起点とする湖沼微生物ループの構造を評価した。藻類単藻無菌株を ^{13}C 標識重炭酸で培養し、 ^{13}C 標識された藻類産生有機物を湖沼水に添加して培養した。比重分離したDNAを解析した結果、Limnohabitans属に近縁な細菌群が藻類産生有機物に特異的に応答していること、鞭毛虫や繊毛虫などがLimnohabitans属を捕食して増殖していることなどが観察された。また、Limnohabitans属と藍藻類との間に密接な関係があることも実湖沼の調査から推察された。

研究成果の概要(英文)：The structure of microbial loop in lake was evaluated by stable isotope probing. ^{13}C -labelled algal organic matter prepared by cultivating algal pure culture with ^{13}C -bicarbonate was added to lake water. DNA analysis in different density fractions demonstrated that microorganisms related to Limnohabitans predominantly responded to algal organic matter. In addition, flagellates and ciliates also assimilated ^{13}C by preying on Limnohabitans-related bacteria. The close relationship between Limnohabitans-related bacteria and cyanobacteria was observed in the field survey.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：安定同位体プローブ法 湖沼 藻類産生有機物 微生物ループ Limnohabitans

1. 研究開始当初の背景

水圏生態系の物質循環において、溶存有機物を起点とする「微生物ループ」は重要な役割を担っている。古典的な食物連鎖は、まず藻類が草食性の動物プランクトンに捕食されることから始まる。一方、1980年代に提案された微生物ループの概念では、溶存有機物を細菌が取り込むことで細菌バイオマスが生産され、それを微小な原生生物(従属栄養ナノ鞭毛虫など)が捕食する経路の存在が提示されている。すなわち、これまで食物連鎖には入らないとされてきた溶存有機物が、細菌生産を経由することで食物連鎖を支えているということであり、水圏生態系を理解するためには、微生物ループの寄与を正確に評価することが必要になっている。しかし、微生物ループの構造はブラックボックスとして扱われているのが現状であり、どのような微生物が微生物ループのノードに位置して、微生物ループを構成しているのか十分に明らかにされていない。湖沼における一次生産者である藻類は、溶存態の「藻類産生有機物(Algal Organic Matter: AOM)」を細胞外に排出することが知られている。AOMも、微生物ループを経由して湖沼生態系を支えていると考えられているが、その実態については知見がほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、AOMを起点とする湖沼微生物ループの構造を明らかにするために、安定同位体プローブ法(Stable Isotope Probing: SIP)を活用することとした。SIP法は、安定同位体標識した基質を用いることで、その基質を同化する微生物を特定する手法として優れている。一方で、利用可能な安定同位体標識した化合物の種類が制限になるという欠点がある。AOMは複雑な化合物の集合体であり、特定のモデル物質で代替できるものではない。そこで、本研究では、単藻無菌株を¹³C-重炭酸を添加した培地で培養することで、藻類に¹³C標識されたAOMを生合成させることを試みた。炭素源はすべて¹³C-重炭酸であるため、藻類が増殖とともに排出する溶存態のAOMもすべて¹³Cで標識されていることになる。このように調製した¹³C-AOMを湖沼水に添加して培養することで、どのような微生物がAOMを利用して微生物ループを構成しているのか、¹³Cをトレースして明らかにすることを目的とした。また、AOMを特異的に利用する細菌群が、実際の湖沼においてどのような動態を示しているのかについても評価した。

3. 研究の方法

(1) 単藻無菌株の培養とAOMの調製

単藻無菌株として、藍藻 *Microcystis aeruginosa* (NIES-843)、緑藻 *Scenedesmus acuminatus* (NIES-92)を国立環境研究所より取り寄せた。これらの藻類を、有機物濃度を

低減させた改変 CSI 培地を用いて温度 20℃、光強度 3000Lux、明暗周期 12 時間:12 時間の条件で無菌的に 1 ヶ月間培養した。培地成分である重炭酸ナトリウムについては、 $\text{NaH}^{12}\text{CO}_3$ 、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ をそれぞれ用いた。培養終了後に、培養液を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過し、¹²C-AOMと¹³C-AOMを調製した。

(2) マイクロコズム培養実験

2013年6月4日に、神奈川県津久井湖三井大橋より表層水を採水した。大型生物や懸濁物質を除外するために、孔径 10 μm のフィルターでろ過して実験に供した。前処理した湖水に、調製した¹²C-AOMあるいは¹³C-AOMを最終濃度が約 1 mg C/Lとなるように添加し、温度 20℃、暗所で 2 週間培養した。

経時的に採水して、溶存有機炭素濃度(Dissolved organic carbon: DOC)を測定するとともに、全菌数の変化をフローサイトメーターによって計数した。培養 1 日後、14 日後に、¹²C-AOM 添加系、¹³C-AOM 添加系それぞれから微生物群集解析用の試料を採水した。採水した試料を 0.2 μm フィルターでろ過して微生物を回収した後、核酸抽出を行った。

(3) SIP 法による AOM 同化微生物の同定

7.163 M CsCl 水溶液、Gradient Buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 0.1 M KCl) を調製した。CsCl 水溶液に Gradient Buffer と抽出した DNA (500 ng) を添加し、Optima L-70K Ultracentrifuge (BECKMAN) を用いて超遠心分離を行った。超遠心分離の条件は、45,000 rpm (178,000 $\times g$)、68~72 時間、20℃である。遠心分離後、チューブ上端から流動パラフィンを連続的に流入させ、下端に空けた穴から試料を約 250 μl ずつ分取した。これらの画分の屈折率を測定し、浮遊密度に換算した。各画分の DNA の精製は、PEG 沈により行った。収量を向上させるため、Glycogen (20 mg/ml) を添加して精製を行った。

各画分中の全細菌を標的とした 16S rRNA 遺伝子、全真核生物を標的とした 18S rRNA 遺伝子の定量を、リアルタイム PCR を用いて行った。得られた定量値をもとに、各画分の相対存在量を算出し、¹²C-AOM 添加系と¹³C-AOM 添加系の結果を比較した。¹³C-AOM 添加系において比重分布のシフトが観察された場合には、重画分を対象として Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法、クローンライブラリー法、パイロシーケンシング法による群集構造解析を実施した。

(4) 実湖沼水における *Limnohabittans* 属細菌の動態

2013年2月から10月まで毎月1回、津久井湖三井大橋表層水を定期的に採水し、核酸抽出を行った。本研究からAOMを特異的に同化していることが推定された *Limnohabittans* 属の 16S rRNA 遺伝子を定量するために、

Limnohabitans 属の R-BT lineage に特異的な FISH プロブ R-BT065 をフォワードプライマーに、*Betaproteobacteria* に特異的なプライマー Beta682r をリバースプライマーに用いた定量 PCR 系を確立した。確立した手法を用いて、*Limnohabitans* 属の存在量の季節変化を評価した。また、神奈川県企業庁谷ヶ原浄水場の協力を得て、同地点における藻類計数値のデータを用い、*Limnohabitans* 属の動態との関係を考察した。

4. 研究成果

(1) マイクロコズムにおける DOC と全菌数の変化

図 1 に、*Microcystis*-AOM 添加系 (^{12}C -AOM) の DOC の変化を示す。DOC は添加直後から減少し、培養 4 日後には添加前のレベルにまで戻った。緑藻 *S. acuminatus* から調製した AOM についても、同様の傾向が観察された。

図 2 に、*Microcystis*-AOM を添加した系における全菌数の変化を示す。培養前の全菌数は約 2.2×10^6 cells/ml であったが、培養 1 日後には約 4 倍に増加し、最大値を示した。 ^{12}C 、 ^{13}C -AOM とともに類似した変化が観察された。*Scenedesmus*-AOM を添加した系では、約 3.6×10^6 cells/ml から培養 1 日後には約 3 倍に増加し、最大値を示した。最大比増殖速度は、*Microcystis*、*Scenedesmus*-AOM 添加系ともに、約 1.0 day^{-1} であった。最大値に達した全菌数は、その後急速に減少に転じ、*Microcystis*-AOM 添加系では培養 3 日後には培養前の約 1/2 倍となり、*Scenedesmus*-AOM 添加系では約 1/6 倍となってそれぞれ最小値を示した。AOM の添加によって増殖した細菌

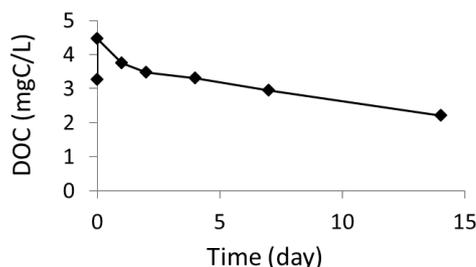


図 1 ^{12}C -AOM 添加系 (*M. aeruginosa*) における DOC の変化

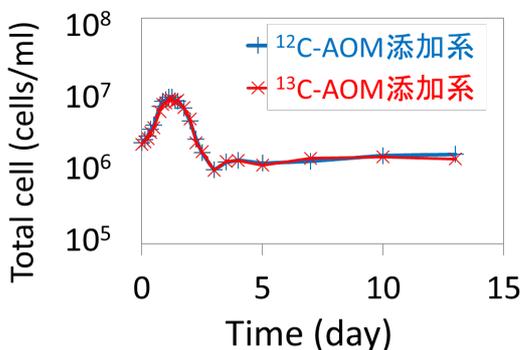


図 2 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -AOM 添加系 (*M. aeruginosa*) における全菌数の変化

が捕食や溶菌などにより死滅したことが推察された。

(2) 細菌群集構造解析

図 3 に、培養 1 日後、14 日後の試料 (*Microcystis*-AOM 添加系) から抽出した DNA を比重分離し、各画分中の 16S rRNA 遺伝子コピー数を定量した結果を示す。培養 1 日後には、 ^{13}C -AOM 添加系の比重分布が、 ^{12}C -AOM 添加系の比重分布と比較して、右にシフトしている様子が読み取れる。この結果は、湖沼水中のある細菌群が、 ^{13}C -AOM を同化して増殖したことを直接的に示している。一方、培養 14 日後には、 ^{12}C -AOM 添加系と ^{13}C -AOM 添加系の比重分布に差異は見られず、AOM を同化して増殖した細菌群そのものが系から消失したと考えられた。同様の傾向は、*Scenedesmus*-AOM 添加系においても確認された。

図 4 に、培養 1 日後の ^{13}C -AOM (*Microcystis*) 添加系の重画分を対象として、16S rRNA 遺伝子の多様性を T-RFLP 法で解析した結果を示す。解析の結果、断片長 198 bp のフラグメントが優占していることが観察された。クロニングの結果、この断片は *Betaproteobacteria* に属する *Limnohabitans* 属に近縁な細菌に由来することが明らかになった。同じ画分の 16S rRNA 遺伝子組成をパイロシーケンシング法によって解析した結果を図 5 に示す。解析の結果、細菌群集の

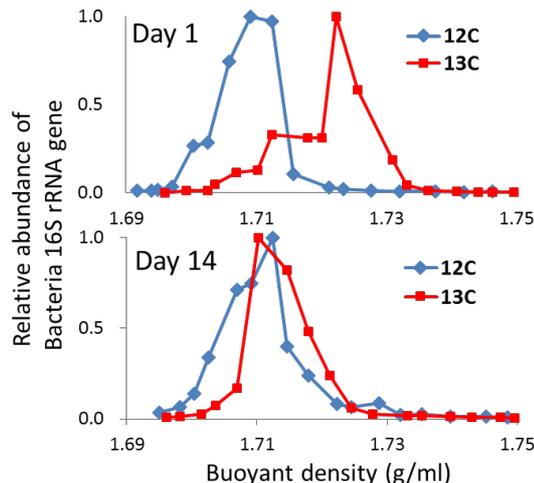


図 3 *Microcystis*-AOM 添加系における 16S rRNA 遺伝子の比重分布

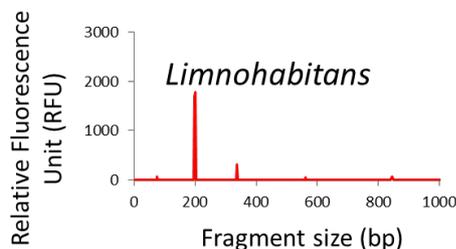


図 4 ^{13}C -AOM 添加系 (*M. aeruginosa*) における培養 1 日後の重画分の T-RFLP 法による細菌群集構造解析

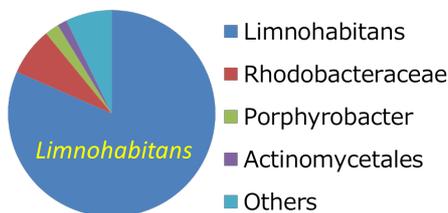


図5 ^{13}C -AOM 添加系 (*M. aeruginosa*) における培養1日後の重画分のパイロシーケンシング法による細菌群集構造解析

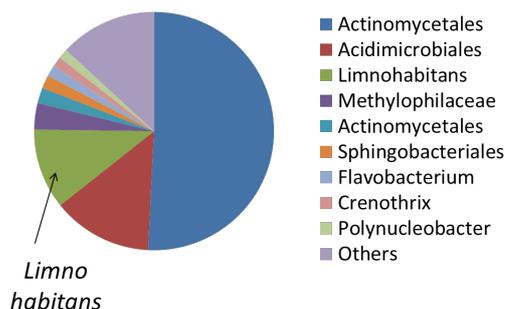


図6 パイロシーケンシング法による AOM 添加前の湖水中の細菌群集構造解析

82%を *Limnohabitans* 属に近縁な配列が占めており、T-RFLP 法による解析結果と整合していた。また、*Scenedesmus*-AOM 添加系においても、培養1日後に重画分で優占していたのは *Limnohabitans* 属に近縁な細菌群であることが確認された。このことから、藍藻 (*Microcystis*)、緑藻 (*Scenedesmus*) の種類の差異によらず、このマイクロコズムでは *Limnohabitans* 属に近縁な細菌群が AOM を選

択的に同化していたことが明らかになった。図6に、AOM 添加前の湖水の細菌群集構造をパイロシーケンシング法で解析した結果を示す。AOM 添加前の湖水中では、主に *Actinomycetales* に近縁な細菌群が大半を占めており、*Limnohabitans* 属に近縁な細菌群は全体の11%を占めているに過ぎなかった。この結果より、必ずしも優占種ではない *Limnohabitans* 属が、AOM の添加に対して特異的に応答したことが明らかになった。

(3) 真核生物群集構造解析

図7に、培養1日後、14日後の試料 (*Microcystis*-AOM 添加系) から抽出した DNA を比重分離し、各画分中の 18S rRNA 遺伝子コピー数を定量した結果を示す。培養1日後、14日後ともに、 ^{13}C -AOM 添加系の比重分布が、 ^{12}C -AOM 添加系の比重分布よりも右にシフトしていることが明らかになった。同様のパターンは、*Scenedesmus*-AOM 添加系においても確認された。全菌数の変化、16S rRNA 遺伝子の比重分布の時間変化を併せて考えると、18S rRNA 遺伝子で観察された結果は、 ^{13}C -AOM を同化した *Limnohabitans* 属に近縁な細菌群がある種の真核生物が捕食して増殖してい

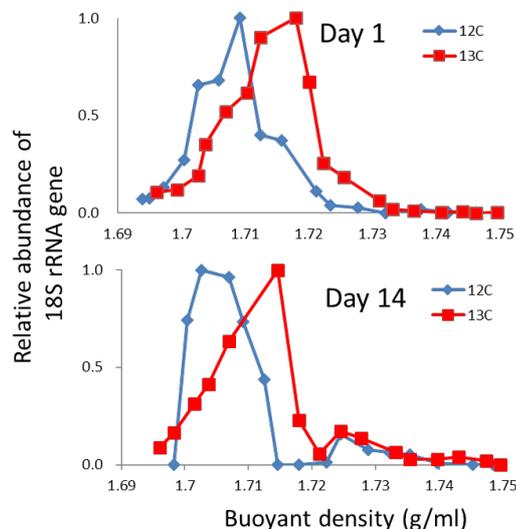


図7 *Microcystis*-AOM 添加系における 18S rRNA 遺伝子の比重分布

ることを示している。16S rRNA 遺伝子の場合には、比重分布のずれが14日後には消失していたが、18S rRNA 遺伝子の場合には引き続き観察されていることも特徴的である。重画分の 18S rRNA 遺伝子を解析した結果、*Didymoeca*, *Choanoflagellida* 等の襟鞭毛虫に近縁な 18S rRNA 遺伝子が主に検出され、AOM *Limnohabitans* 襟鞭毛虫という微生物ループを経由する炭素フローが短期間に生じたことが明らかになった。培養14日後の重画分の 18S rRNA 遺伝子を解析した結果、培養1日後とは異なり、*Incisomonas*, *Anophyroides* 等の繊毛虫に近縁な配列が検出された。このことから、培養1日後から14日後にかけて、襟鞭毛虫が繊毛虫に捕食されるなど、AOM がより高次の生物に移行していたことが確認された。

(4) 実湖沼における *Limnohabitans* 属の動態調査

本研究において、*Limnohabitans* 属に近縁な細菌群が、*Microcystis*, *Scenedesmus* の産生する AOM を特異的に利用して、AOM を起点とする微生物ループを駆動する役割を担っていることが明らかにされた。実際の湖沼において、この細菌群がどのような動態を示しているのか、2013年2月から10月にかけて津久井湖表層水を定期的に採水し、湖水中の *Limnohabitans* 属 (R-BT lineage) の 16S rRNA 遺伝子コピー数を定量した。また、同地点における藻類数を計数した結果との比較を行った。図8に、*Limnohabitans* 属の 16S rRNA 遺伝子コピー数と藍藻の顕微鏡計数値を比較した結果を示す。藍藻類は5月から6月にかけて増加傾向を示し、6月に最大値を示した後、9月にかけて漸減した。一方、*Limnohabitans* 属の 16S rRNA 遺伝子コピー数もほぼ4月~5月にかけて増加傾向を示し、藍藻類のピークに1ヶ月遅れて7月に最大値を示した。なお、7月に示した最大値は、全

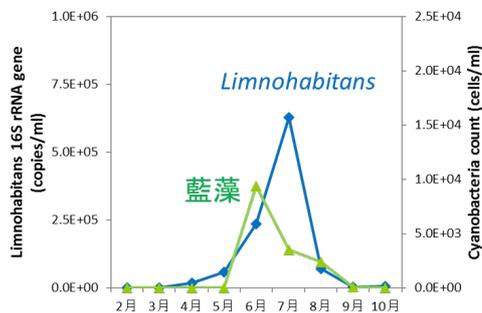


図8 津久井湖三井大橋地点表層水における藍藻類と *Limnohabitans* 属の存在量の推移

細菌の16S rRNA 遺伝子コピー数の約11%を占めていた。その後、*Limnohabitans* 属の16S rRNA 遺伝子コピー数は急減した。*Limnohabitans* 属のピークが藍藻類のピークに追隨して観察された原因としては、藍藻類が排出するAOMの排出時期のピークが藻類数のピークからずれていた可能性（藍藻が溶菌することで体外に大量のAOMが溶出したなど）が考えられる。津久井湖では、主に珪藻類と藍藻類が優占藻類であるが、珪藻数や全藻類数との間には明確な関係は認められなかった。このことから、実際の湖沼において、藍藻類と *Limnohabitans* 属の間にはAOMを介した特異的な関係性があり、藍藻由来のAOMを起点とした微生物ループにおいて、*Limnohabitans* 属が重要な役割を果たしていることが推察された。

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）

〔学会発表〕（計 2件）

木戸佑樹、春日郁朗、栗栖太、古米弘明、湖沼微生物ループにおける藻類産生有機物を利用する微生物群の構成と消長、第48回日本水環境学会講演集、p.244.（平成26年3月18日、仙台）【年会優秀発表賞（クリタ賞）受賞】

木戸佑樹、春日郁朗、栗栖太、古米弘明、*Microcystis aeruginosa* 産生有機物を同化する細菌群のDNA安定同位体プローブ法による解析、第78回日本陸水学会大会講演要旨集、p.51.（平成25年9月11日、大津）【優秀発表賞受賞】

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.recwet.t.u-tokyo.ac.jp/kasuga/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

春日 郁朗（KASUGA, Ikuro）

東京大学・大学院工学系研究科・講師

研究者番号：20431794

(2)研究分担者

栗栖太（KURISU, Futoshi）

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：30312979