

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450261

研究課題名(和文) 嫌気環境の微生物ループ：嫌気性従属栄養性鞭毛虫の生理・生態

研究課題名(英文) Microbial loop in anoxic environments: Ecology and physiology of anaerobic heterotrophic nanoflagellates

研究代表者

近藤 竜二 (KONDO, Ryuji)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：30244528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：水月湖の酸化還元境界層から通性嫌気性の従属栄養性微小鞭毛虫を分離し、分子系統解析と微細構造観察による同定を行った。その結果、分離株を新属新種 *Suigetsumonas clinomigrationis* gen. et sp. nov. として記載することを提案した。

この株の増殖速度と細菌捕食活性の速度論的解析を行ったところ、分離株の増殖や細菌捕食活性はエサ密度の影響を受けていると示唆された。

この分離株を特異的に検出する遺伝子プローブを作成し、CARD-FISH法によって水月湖水柱の分布を調べたところ、酸化・還元境界層に最も多く存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：A facultative anaerobic bacterivorous nanoflagellate was isolated from the oxic-anoxic interface of the meromictic Lake Suigetsu, Japan. We characterized the isolate using light and transmission electron microscopy and molecular phylogenetic analyses. The isolate displayed some characteristic features different from the known species in class Placididea. The 18S rDNA sequence was also phylogenetically distant from the clades of the known Placididae. Thus, we described the newly isolate as *Suigetsumonas clinomigrationis* gen. et sp. nov. Growth and grazing kinetics were studied in the strain using co-culture experiments with a single bacterium. The growth and bacterivorous characteristics showed that the isolate can grow at full depth of Lake Suigetsu throughout year, but may be limited by prey bacterial densities in natural environments. High abundance of *S. clinomigrationis* was detected from the interface of Lake Suigetsu by means of CARD-FISH with the species-specific probe.

研究分野：微生物生態学

キーワード：従属栄養性微小鞭毛虫 嫌気 密度成層湖 微生物食物網 細菌摂食

1. 研究開始当初の背景

湖沼や海洋のプランクトン食物網において、微生物ループは重要な物質循環系である。微生物ループとは、植物プランクトンが光合成中間代謝物や自己分解物として排出する溶存態有機物を細菌が栄養基質として利用し、細菌を原生生物が捕食し、さらに原生生物が動物プランクトンに捕食されることによって従来の生食連鎖につながる系である。海洋では植物プランクトンによる一次生産の最大で 50% がこの微生物ループに流れており、これまで“捨てられた”と考えられてきたエネルギーが再び生食食物連鎖に戻る系であり、水圏における重要な物質循環系として認識されるようになった。

水圏環境では、原生生物の中でも従属栄養性微小鞭毛虫 (Heterotrophic nanoflagellate: HNF) が主要な細菌捕食者である。細菌生産のほぼ全てが HNF によって捕食される場合もあり、HNF による細菌捕食が主要な細菌の減耗要因となっている。また、HNF は植物プランクトンよりも窒素・リンの含有率が高く、動物プランクトンにとってより高価値な餌資源である。実験的にも動物プランクトンは植物プランクトンよりも HNF を選択的に捕食する事が知られている。さらに、HNF が栄養塩の再生にも大きく寄与している。これらのことから、HNF は細菌捕食者、動物プランクトンの餌資源、さらには栄養塩の回帰者として生態学的に重要な役割を担っている。

ところで、養殖漁場の底泥、成層期の沿岸海域や湖沼の底層など、嫌気的な環境は我々の身近に普遍的に存在する。嫌気環境での細菌の生態や機能については、硫酸還元細菌による硫化水素の生成や有機物の最終分解、光合成・化学合成細菌による還元型硫黄化合物の酸化などが、我々の研究によって明らかにされてきた。一方、嫌気環境の微生物ループに関しては、顕微鏡観察によって嫌気性と考えられる HNF の存在は古くから知られているものの、その生態に関する知見は殆どない。この理由は、生物活性が高く、生物生産にとって重要な好気環境だけを対象に研究が進められてきたからである。我々は、嫌気的に細菌捕食速度を測定するために、嫌気培養瓶を用いた *in situ* 蛍光ビーズレーザー法を開発した。この方法を用いて、底層に硫化水素が多量に蓄積する水月湖を対象に、HNF の現存量と細菌捕食活性を測定したところ、嫌気的な環境でも細菌捕食性の HNF が存在し、好気環境に生息する HNF と同等の細菌捕食活性を潜在的に有することを世界で初めて明らかにした。さらに、嫌気性細菌を培養する技術を応用して、嫌気性 HNF の培養を試みたところ、形態の異なる数種類の嫌気性 HNF が混在する培養系を確立することが出来た。

2. 研究の目的

本研究では、嫌気環境における微生物食物

網の解明に資するため、嫌気性の細菌捕食性 HNF の生理・生態を明らかにすることを目的とする。主に水月湖をフィールドとし、その嫌気層から HNF を分離・培養し、その増殖におよぼす水温や塩分、溶存酸素の影響を調べるとともに、細菌捕食活性と各種酵素活性の動力学的解析によって嫌気性 HNF の生理・生化学的特性を解明する。また、18S rRNA 遺伝子を標的としたプローブを作成し、現場環境における HNF の動態解析を行う。培養株の生理・生化学的研究と現場の動態解析から嫌気環境における微生物食物網の構造と機能を解明する。

3. 研究の方法

3-1 嫌気性微小鞭毛虫の分離培養と同定

水月湖境界層よりサンプリングを行い、嫌気的な条件を維持したまま、鞭毛虫の集積培養を行った。ガラスキャピラリーを用いて集積培養から鞭毛虫を単離し、新しい培地に接種することで単細胞からのクローン株 (LScTR-1) を獲得した (図 1)。獲得した株の微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。また、18S rRNA 遺伝子配列を決定し、これを用いて近隣結合法・最節約法・最尤法による系統樹を作成した。

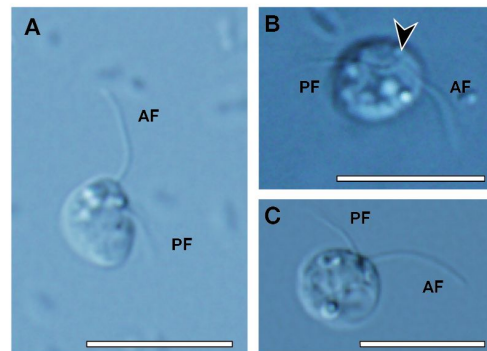


図 1 *Suigetsumonas clinomigrationis* LScTR-1 の光学顕微鏡写真。AF: 前鞭毛、PF: 後鞭毛。矢じりは鞭毛基部を示す。Bar = 10 μ m

3-2 LScTR-1 株の増殖と細菌摂食の速度論的特性

細菌の群集構造の変化による影響を除去するために、*S. clinomigrationis* とその培養液から単離された *Arcobacter* sp. co01 との二者培養系を確立した。培養温度と塩濃度の条件を変えて *S. clinomigrationis* を培養し、その増殖可能範囲と至適条件を検討した。

S. clinomigrationis を、そのエサとなる *Arcobacter* sp. co01 の密度を変えて好氣的・嫌氣的に培養し、その比増殖速度を求めた。また、*S. clinomigrationis* を、*Arcobacter* sp. co01 の密度を変えて好氣的・嫌氣的に培養し、各

細菌密度の細菌捕食速度を測定し、増殖速度と同様に最大細菌捕食速度を求めた。

3-3 LScsTR-1 株の特異的検出と計数

CARD-FISH 法により、*S. clinomigrationis* の検出と計数を行うために、ARB ソフトを用いて、本種に特異的なプローブ PLA1241 (5'-GGATTGCTCGTTGACCGCAC-3') を設計・作成した。2014 年 10 月と 2015 年 9 月に水月湖湖心で採水し、ホルマリン固定した試料を、CARD-FISH 法によって細胞数を計数した。

4. 研究成果

4-1 嫌気性微小鞭毛虫の分離培養と同定

LScsTR-1 の分離培養に成功した。これを好気的な条件で培養したところ、増殖が認められたことから通性嫌気性であることが明らかとなった。

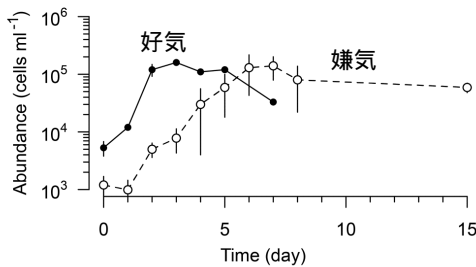


図 2 好気条件と嫌気条件での *Suigetsumonas clinomigrationis* の増殖。

光学顕微鏡観察の結果、細胞長が 3.5 - 6.7 μm 、細胞幅が 2.2 - 4.7 μm であり (図 1)、基質に付着して震えるような振る舞い (wobbling motion) が観察できた。18S rRNA 遺伝子配列をもちいた分子系統解析の結果、LScsTR-1 は Stramenopiles 生物群、Placididea 綱に属することが高いブートストラップ値で支持された (図 3)。

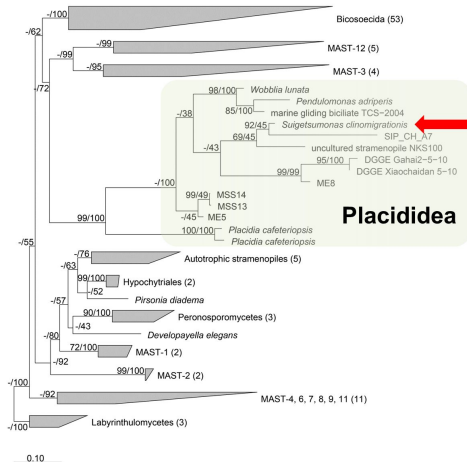


図 3 18S rDNA を用いた最尤系統樹。

電子顕微鏡を用いた微細構造観察の結果、LScsTR-1 の鞭毛小毛、ミトコンドリアクリステ、鞭毛装置の構造が Stramenopiles 生物群、Placididea 綱と共通していることが明らかとなった。これらの結果と分子系統解析の結果と合わせ、LScsTR-1 が Placididea に属することが強く支持された。一方で、paranuclear body の有無や、微小管の本数など、LScsTR-1 の微細構造は既知の Placididea である *Wobblia lunata* と *Placidia cafeteriopsis* とは異なっていた (図 4、表 1)。transitional helix の構造は一般に保守的であるため、重要な分類形質である。この構造は *W. lunata* と *P. cafeteriopsis* で属を超えて共通していたが、LScsTR-1 は異なっていたため、本株は属レベルで異なると考えた。LScsTR-1 は塩濃度が 4-12 psu の水月湖境界層から単離されたが、*W. lunata* と *P. cafeteriopsis* は沿岸域から単離されている。また、近縁の環境クローンはいずれも塩湖や塩泉など高塩濃度の環境から得られたものである。このことから、現段階では LScsTR-1 のみが低塩濃度から発見された Placididea であり、既存の Placididea とは異なる性質であることが明らかとなった。以上の結果から、LScsTR-1 は新属新種であるのが妥当であると考え、*Suigetsumonas clinomigrationis* gen. nov. sp. nov. として提案した。

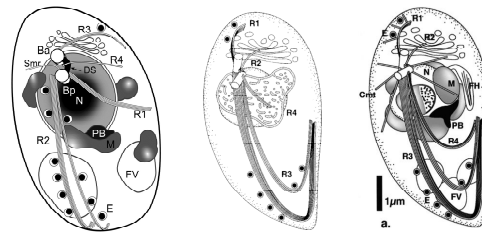


図 4 Placididea 綱の 2 属との比較。
左: *Suigetsumonas clinomigrationis*
中: *Wobblia lunata*
右: *Placidia cafeteriopsis*

表 1 Placididea 綱の微細構造比較

	基底小体の配向	らせん構造	鞭毛根				Mt.	para. body	Wob. mot.	文献
			R1 (R4)	R2 (R3)	R3 (R1)	R4 (R2)				
<i>Placidia cafeteriopsis</i>	直角	4-5 回二重	3	10	2-3	1	7-10	+	-	Moriya et al. 2002
<i>Wobblia lunata</i>	鈍角	3-4 回二重	2	10	5	1	1	-	+	Moriya et al. 2000, 2002
<i>Suigetsumonas clinomigrationis</i>	平行	4 重	4	8	3	1	4	+	+	Okamura et Kondo 2015

4-2 LScsTR-1 株の増殖と細菌捕食の速度論的特性

培養温度と塩濃度の条件を変えて *S. clinomigrationis* を培養し、その増殖可能範囲と至適条件を検討したところ、*S. clinomigrationis* は 10 - 30 °C で増殖がみられ、至適温度は 25 °C であった。また、塩濃度は 3.9 - 36.9 psu の間で増殖が認められ、至適塩

濃度は 7.8 psu であった (図 5)。この *S. clinomigrationis* が増殖可能な水温・塩濃度は水月湖の鉛直的な変化と季節変動をカバーしていることから、*S. clinomigrationis* は水月湖の幅広い水深で生息が可能な鞭毛虫であることが明らかとなった。

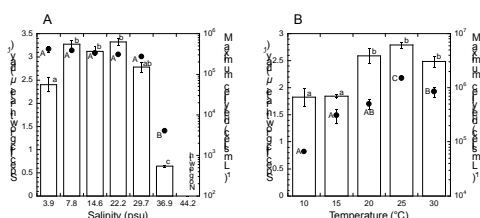


図 5 *Suigetsumonas clinomigratinis* の増殖におよぼす塩分 (A) と水温 (B) の影響。棒グラフは増殖速度 (左軸)、黒丸は最大細胞収量 (右軸) を示す。

S. clinomigrationis の比増殖速度と *Arcobacter* sp. co01 の密度は双曲線の関係を示した (図 6A)。両者の関係を Monod の式に当てはめて最大比増殖速度を推定した結果、好気条件のそれよりも嫌気条件の最大比増殖は低かった。一般に嫌気的な条件ではエネルギー代謝効率が悪く、嫌気条件で最大比増殖速度がより遅くなっていると考えられる。

好気条件・嫌気条件の細菌捕食速度は Michaelis-Menten タイプの式で記述できた (図 6B)。最大細菌捕食速度は水月湖水柱で得られた現場の細菌捕食速度の範囲内であった。また、増殖速度および細菌捕食速度の半飽和定数は、水月湖の好気層の全菌数と嫌

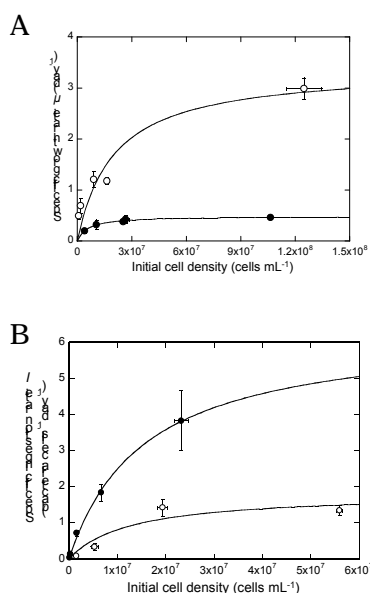


図 6 *Suigetsumonas clinomigratinis* の比増殖速度 (A)、細菌捕食速度 (B) と細菌密度の関係

気層の全菌数と同じかそれよりも高いことから、*S. clinomigrationis* の増殖・細菌捕食は水月湖において細菌密度による制限を受けていると考えられる。*S. clinomigrationis* は水月湖の幅広い水深で細菌捕食を行い、増殖することが可能であるユニークな鞭毛虫であることが明らかとなった。

4-3 LScTR-1 株の特異的検出と計数

CARD-FISH 法により水月湖水柱の *S. clinomigrationis* の検出と計数を行ったところ、好気層、嫌気層ともプローブ陽性細胞が検出されたが、酸化・還元境界層に最も多く存在し、その数は約 500~800 cells/ml であった。しかし、その細胞数は全鞭毛虫数の 1.2~2.4%にしかすぎず、水月湖では主要な鞭毛虫ではないと考えられた。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

Y. Mori, T. Kataoka, T. Okamura and R. Kondo (2013) Dominance of green sulfur bacteria in the chemocline of the meromictic Lake Suigetsu, Japan as revealed by dissimilatory sulfite reductase gene analysis. *Archives of Microbiology*, **195**, 303-312. DOI: 10.1007/s00203-013-0879-5

R. Kondo, M. Kodera, Y. Mori, T. Okamura, S. Yoshikawa and K. Ohki (2014) Spatiotemporal distribution of bacteriochlorophylls in the meromictic Lake Suigetsu, Japan. *Limnology*, **15**, 77-83. DOI: 10.1007/s10201-013-0415-y

Y. Mori, T. Kataoka and R. Kondo (2015) Use of stable isotope probing to identify bacterial species involved in CO₂ fixation in the water just below the oxycline of the meromictic Lake Suigetsu, Japan. *Plankton and Benthos Research*, **10**, 111-120.

T. Okamura and R. Kondo (2015) *Suigetsumonas clinomigrationis* gen. et sp. nov., a novel facultative anaerobic nanoflagellate isolated from the meromictic Lake Suigetsu, Japan. *Protist*, **166**, 409-421. DOI: 10.1016/j.protis.2015.06.003

森 郁晃、近藤竜二、梅澤 有、松岡 敦充、須崎寛和、中田英昭、和田 実(2015) 西九州・大村湾の貧酸素水塊形成期における堆積物微生物群集呼吸の動態。沿岸海洋研究、**53**, 87 - 95。

S. Masuda, Z. Bao, T. Okubo, K. Sasaki, S. Ikeda, R. Shinoda, M. Anda, R. Kondo, Y. Mori and K. Minamisawa (2016) Sulfur fertilization changes the community structure of rice root-, and soil-associated bacteria. *Microbes and Environments*, **31**,

〔学会発表〕(計 15 件)

森 裕美、近藤竜二．水月湖の酸化還元境界層における緑色硫黄細菌の生態学的役割．日本地球惑星科学連合 2013 年大会 (2013 年 5 月 19 日) 千葉市

T. Okamura and R. Kondo. Ecological properties of newly isolated anaerobic heterotrophic nanoflagellate strains. First EMBO Conference on Aquatic Microbial Ecology: SAME13 (12 September 2013) Stresa, Italy.

R. Kondo and T. Okamura. Isolation and cultivation of anaerobic heterotrophic nanoflagellate from the meromictic Lake Suigetsu, Japan. First EMBO Conference on Aquatic Microbial Ecology: S SAME13 (12 September 2013) Stresa, Italy.

岡村高彦、近藤竜二．嫌気性微小鞭毛虫の分離と性状．平成 25 年度日本水産学会秋季大会 (2013 年 9 月 21 日) 津市

T. Okamura and R. Kondo. Isolation and characterization of anaerobic heterotrophic nanoflagellates from the meromictic Lake Suigetsu, Japan. Big Microbes: CER International workshop on ecology for young scientists (18 November 2013), Otsu, Shiga.

森 裕美、近藤竜二．水月湖酸化還元境界層における一次生産者の群集構造解析．第 29 回日本微生物生態学会大会 (2013 年 11 月 24 日) 鹿児島市

岡村高彦、近藤竜二．嫌気性微小鞭毛虫の分離培養とその性状．第 29 回日本微生物生態学会大会 (2013 年 11 月 24 日) 鹿児島市

池田拓哉、近藤竜二、森 裕美、勝山千恵、山岸昂夫、上田眞吾、吉永郁生、諏訪祐一．富栄養化淡水湖沼、北浦の anammox 活性が高い地点での anammox 活性垂直分布と微生物群集構造．第 29 回日本微生物生態学会大会 (2013 年 11 月 24 日) 鹿児島市

岡村高彦、近藤竜二．水月湖から分離した新規嫌気性微小鞭毛虫：生理学的特徴．平成 26 年度日本水産学会秋季大会 (2014 年 9 月 20 日) 福岡市

岡村高彦、近藤竜二．水月湖から分離した新規嫌気性微小鞭毛虫：微細構造と系統解析．平成 26 年度日本水産学会秋季大会 (2014 年 9 月 20 日) 福岡市

四本木彰良、近藤竜二、野牧秀隆、柏山祐一郎．北西太平洋表層水における微細藻類の捕食に伴うクロロフィル代謝．藻類学会第 39 回大会 (2015 年 3 月 22 日) 福岡市

近藤竜二、岡村高彦．通性嫌気性鞭毛虫 *Suigetsumonas clinomigrationis* の微細構造と増殖生理．日本微生物生態学会第 30

回大会 (2015 年 10 月 18 ~ 19 日) 土浦市
松田勝明、西澤 学、布浦拓郎、矢吹彬憲、野牧秀隆、近藤竜二．深海から分離した従属栄養性微小鞭毛虫の増殖温度．日本微生物生態学会第 30 回大会 (2015 年 10 月 18 ~ 19 日) 土浦市

I. Mukherjee, T. Okamura, S. Nakno, R. Kondo. High abundance of heterotrophic nanoflagellates in the oxic-anoxic interface of meromictic Lake Suigetsu, Japan. 日本微生物生態学会第 30 回大会 (2015 年 10 月 18 ~ 19 日) 土浦市

四本木彰良、柏山祐一郎、近藤竜二、野牧秀隆、石川 輝、木下雄介、民秋 均．外洋表層水から分離されたピコ藻類を捕食する無色プロティストとそれらのクロロフィル代謝．日本藻類学会第 40 回大会 (2016 年 3 月 19 日) 東京

〔図書〕(計 1 件)

近藤竜二．青潮、海洋の硫黄循環と微生物「環境と微生物の事典」日本微生物生態学会編集、朝倉書店、東京、2014 年

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1) 研究代表者

近藤 竜二 (KONDO, Ryuji)

福岡県立大学・海洋生物資源学部・教授
研究者番号：30244528

(2) 研究分担者

中野 伸一 (NAKANO, Shin-ichi)

京都大学・生態学研究センター・教授
研究者番号：50270723