

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550019

研究課題名(和文)放射性同位体を全く使用しない細菌生産速度測定法の開発と確立

研究課題名(英文) Development of nonradioactive method for measuring bacterial production rate in aquatic environments

研究代表者

今井 章雄 (IMAI, AKIO)

独立行政法人国立環境研究所・地域環境研究センター・研究センター長

研究者番号：40203286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、安定同位体である質量数15の窒素でラベルしたデオキシアデノシン(15N-dA)を、水圏環境中の自然細菌群集に取り込ませ、その取り込み量を液体クロマトグラフィ質量分析計により測定することで、放射性同位体を全く使用しない細菌生産速度測定方法を開発・確立することに、国内外で初めて成功した。15N-dA法による細菌生産速度は、放射性同位体を使う従来法であるチミン法と顕著な正の相関を示した。

研究成果の概要(英文)：We developed a nonradioactive quantitative measurement of bacterial production using stable isotope nitrogen-15-labeled deoxyadenosine (15N-dA) by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). The procedures of the 15N-dA method were the incubation of seawater with 15N-dA, the filtration onto a membrane filter, the DNA extraction, the enzymatic hydrolysis of DNA to nucleosides and the quantification of 15N-dA by LC-MS. Incorporation rate of 15N-dA was significantly positively correlated to that of tritium labeled thymidine (3H-TdR) in samples of coastal seawaters. Average 15N-dA : 3H-TdR incorporation ratio was 0.55 with 2.5% and 97.5% confidence intervals of 0.51 and 0.58, respectively. The results indicated that 15N-dA could accurately predict TdR incorporations over a wide range of bacterial production.

研究分野：水環境工学

キーワード：細菌生産速度測定法 非放射性同位体

1. 研究開始当初の背景

バクテリアには、有機物の分解者である従属栄養バクテリアと光合成を行う独立栄養バクテリアが存在し、水系食物網や物質循環に非常に重要な役割を担っている。加えて、水系食物網には微生物ループと呼ばれる従属栄養バクテリアが溶存有機物を基質とした増殖を起点とし、従来の食物連鎖以外に高次の栄養段階にエネルギーや物質を提供する物質輸送に大きな役割を果たしている (Azam et al. 1983)。それゆえ従属栄養バクテリアによる生産は水系炭素循環を理解する上で大変重要である。

従属栄養バクテリアの生産は、一般的に放射性同位体で標識されたチミジン (Fuhrman & Azam 1982) もしくはロイシン (Kirchman et al. 1985) の取込み速度を測定し、それを炭素量に換算することで求められる。チミジンとロイシンは、バクテリアがそれぞれ DNA もしくはタンパク質を合成するときに一定量取込まれるため、それぞれの合成速度からバクテリアの生産を求めることができる。バクテリア細胞内にはチミジンとロイシンが元々存在するため、取込まれるチミジンとロイシンを区別するために放射性同位体を使用しなければならない。しかし、野外での放射性同位体の使用が厳しく制限されている我が国では、バクテリア生産の測定は重要であると認識されつつも、ほとんど測定されていないのが現状である。

Steward & Azam (1999) はチミジンやロイシンの放射性同位体を使わないバクテリア生産速度の測定法を開発した。プロモデオキシウリジン (BrdU) はチミジンの類似物質であり、増殖しているバクテリアは DNA の合成物質としてチミジンの代わりに BrdU を取り込むことが知られている。BrdU は生物起源でないためバクテリアに取り込まれた BrdU は DNA の合成量、すなわちバクテリアの生産量の指標とみなせる。取込まれた BrdU は特異的に結合する蛍光物質と抗体を作るため、その蛍光抗体を蛍光顕微鏡や化学発光検出器によって測定することができる。しかしながら、現在の BrdU 法では、BrdU に特異的に結合した抗体の蛍光強度を BrdU 濃度に変換する際に、放射性同位体で標識した BrdU を使用しなければならず、完全に放射性同位体を使用しない測定法の確立には至っていない。

放射性同位体を使用しないバクテリア生産速度測定法が確立されたなら、水系における炭素循環や難分解性溶存有機物 (DOM) の生成メカニズム等の科学的知見が飛躍的に増大することが期待される。放射性同位体の野外使用の規制が緩く、かつ放射性同位体を取り扱う施設・整備を有する欧米に限定されていたバクテリア生産に関する研究が、放射性同位体使用という枷が外れ、世界中で広く精力的に実施されると予想される。関係学術研究が大いに進展するだろう。

2. 研究の目的

本研究は、安定同位体である質量数 15 の窒素でラベルしたデオキシアデノシン (^{15}N -dA) を、水圏環境中の自然細菌群集に取り込ませ、その取り込み量を測定することで細菌生産速度を見積もる、放射性同位体を全く使用しない細菌生産速度測定方法を開発・確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1)培養、(2)濾過、(3)DNA 抽出、(4)ヌクレオシドまでの DNA 酵素加水分解、(5)液体クロマトグラフィー・質量分析

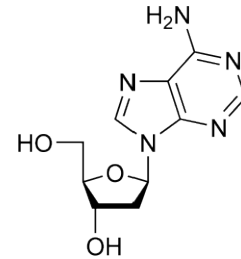


図1 デオキシアデノシンの構造式
(5つのNを ^{15}N に置換可能)

計 (LC-MS) による ^{15}N -dA 取り込み量の定量、という測定手順の検討を実施した。

(1)培養: ^{15}N -dA の添加濃度と培養時間を検討した。その結果、 ^{15}N -dA 濃度 50 nM で培養 12 時間以内が望ましいことが示唆された。

(2)濾過: 培養終了後に試水 5 ~ 20 mL を孔径 0.2 μm フィルター (オムニポア, Millipore) に濾過し、-80 で保存した。

(3)DNA 抽出: DNA 抽出法の検討を行った。DNA 抽出は抽出効率が高いビーズビーティング法を選択し、市販の2つのDNA抽出キットを用いた。MP Biomedicals社「Fast DNA[®] SPIN Kit」を用いたところ、その後の酵素加水分解反応がうまくいかず、LC-MSによる ^{15}N -dAの定量が行えなかった。これは、抽出に伴い、酵素反応阻害物質や多量の夾雑物がサンプル中に蓄積することで起こったと考えられた。次に、日鉄環境エンジニアリング社「土壌DNA抽出キット Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2」を使用したところ、その後の酵素加水分解も正常に行え、LC-MSによる ^{15}N -dAの検出・定量ができた。

Fast DNA SPIN kit の抽出効率は 28.3%と報告されている。一方、土壌DNA抽出キット Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 の抽出効率の定量的な報告はない。そこで、両抽出キットによって抽出された *Microcystis* のゲノムDNAをリアルタイムPCRで定量し、その量を比較したところ、土壌DNA抽出キット Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 によって抽出されたDNA量は、Fast DNA SPIN kit によって抽出されたものの 93.4%であることが明らかとなった。そのため、土壌DNA抽出キット

Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2の抽出効率は26.4% (=28.3%×0.934)と考えられる。

(4)ヌクレオシドまでのDNA酵素加水分解：Nuclease P1、Phosphodiesterase I、Alkaline Phosphataseを使い、Nohara et al. (2011)に従って加水分解を行った。土壌DNA抽出キット Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2を用いて抽出したDNAサンプルを使用することにより、加水分解が正常に進行した。加水分解前後での二本鎖DNA量を測定したところ、加水分解後では検出限界以下の値を示したことから、ほとんどのDNAはヌクレオシドまで分解されていると考えられる。

(5)液体クロマトグラフィー・質量分析計(LC-MS)による¹⁵N-dA取り込み量の定量：LCにおいて各ヌクレオシドを分離し、MSにおいてm/z=257で¹⁵N-dA量の定量を行った。

4. 研究成果

研究方法に記述した各ステップの検討を行い、放射性同位体を全く使用しない細菌生産速度測定法を確立することができた。

既存の細菌生産測定法である放射性同位体を用いた、DNA合成速度を見積もるチミン法(³H-TdR)及び、タンパク質合成速度を見積もるロイシン法(³H-Leu)との比較を、相模湾沿岸域の海水を用いて実施した。実験は、採取した海水に、¹⁵N-dA、³H-TdR、³H-Leuをそれぞれ最終濃度50 nMになるように添加し、10、15、20、25、30に設定したインキュベータ内において数時間培養を行った。その結果、¹⁵N-dAは0.62 - 1.8 × 10² pmol L⁻¹ h⁻¹、³H-TdRは0.31 - 3.2 × 10² pmol L⁻¹ h⁻¹、³H-Leuは4.2 - 8.4 × 10² pmol L⁻¹ h⁻¹の取り込み速度を示した。また、¹⁵N-dAと³H-TdRまたは³H-Leuの取り込み速度は、それぞれ有意な正の相関を示し([¹⁵N-dA] = 0.55 × [³H-TdR] - 4.1; n = 20, r = 0.99, p < 0.001, [¹⁵N-dA] = 0.051 × [³H-Leu] - 0.35; n = 18, r = 0.99, p < 0.001)。¹⁵N-dA法において、既存の放射性同位体で測定されるDNA合成速度(³H-TdR)及びタンパク質合成速度(³H-Leu)を正確に見積もることが可能であることが示唆された(図2)。

¹⁵N-dA法は、³H-TdR法と同じくDNA合成速度を見積もる方法であるが、それらの取り込み速度の線形回帰による直線の傾きは1を下回った(0.55)。これには3つの要因が考えられる。1つ目は、DNA抽出プロセスによるロスが考えられる。土壌DNA抽出キット Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2の抽出効率は26.4%であると考えられるため、この抽出効率を考慮すると実際の¹⁵N-dA取り込み量は現在のデータの3.79倍となる。このデータによると線形回帰による直線の傾きが2.1となる。2つ目は、非特異標識が考えられる。細菌に取り込まれた³H-TdRや¹⁵N-dAは、DNAの他にタンパク質やRNAも非特異的に標識す

ることが指摘されている。さらに³H-TdR法では冷トリクロ酢酸による不溶性画分中に、DNA以外の高分子化合物が混入することにより、DNA合成速度が過大評価される可能性もある。一方、本研究で開発した¹⁵N-dA法ではDNAに取り込まれた¹⁵N-dA量を直接LC-MSで定量するため、純粋なDNA合成速度を見積もることが可能である。そのため、両者の取り込み速度の直線回帰式の傾きは1より小さい値を示したと考えられる。3つ目は、細胞外のTdRやdAをDNA合成するための酵素の有無である。この酵素の有無は細菌種によって異なるため(Tinta et al. 2012)、dAとTdRの取り込み速度の違いを生じさせたと考えられる。

今後、¹⁵N-TdRもしくは³H-dAを用いた比較実験を行うことで、これらの原因を明らかにする必要がある。

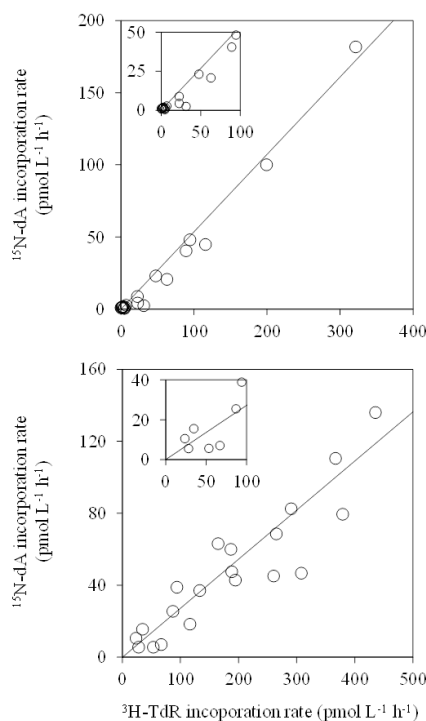


図2 本法(¹⁵N-dA法)と従来法(³H-TdR法および³H-Leu法)との取込速度の相関関係。

<引用文献>

- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyerreil and F. Thingstad (1983). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, 275-263.
- Fuhrman, J. A. and F. Azam (1982). *Mar. Biol.*, **66**, 09-120.
- Kirchman, D., E. K' Nees and R. Hodson (1985). *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 599-607.
- Steward, C. F. and F. Azam (1999). *Aquat.*

Microb. Ecol., **19**, 57-66.

Nohara, K., T. Baba, H. Murai, Y. Kobayashi, T. Suzuki, Y. Tateishi, M. Matsumoto, N. Nishimura and T. Sano (2011). *Arch. Toxicol.*, **85**, 653-661.

Tinta, T., L. S. Christiansen, A. Konrad, D. A. Liberles, V. Turk, B. Munch-Petersen, J. Piskur and A. R. Clausen (2012). *FEMS Microbiol. Lett.*, **331**, 120-127.

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 5件)

土屋健司、川崎伸之、佐野友春、富岡典子、福田秀樹、浜崎恒二、多田雄哉、下出信次・戸田龍樹、今井章雄(2015):「放射性同位体を全く使用しないバクテリア生産量測定法の開発」、第49回日本水環境学会年会、金沢大学(金沢)、2015年3月16-18日 講演要旨集:317

土屋健司、川崎伸之、佐野友春、富岡典子、福田秀樹、浜崎恒二、多田雄哉、下出信次、戸田龍樹、今井章雄(2015):「安定同位体・LC-MSを用いた細菌生産測定法」、2015年度日本海洋学会春季大会、東京海洋大学(東京)、2015年3月21-25日、講演要旨集:217

菅井洋太、土屋健司、今井章雄、浜崎恒二、菊池和彦、戸田龍樹(2014):「相模湾沿岸域における細菌へのボトムアップおよびトップダウン制御の季節変化」、2014年日本海洋学会春季大会、東京海洋大学(東京)、2014年3月26-30日

Tsuchiya K., Kawahara V.S., Hamasaki Y., Tada A., Imai A., Kikuchi T., Toda T. (2013): Typhoon-induced primary production and microbial processes below the euphotic layer in temperate coastal waters, Japan., ECSA53 and Ocean & Coastal Management, Shanghai, China 13-17 October.

Tsuchiya K., Kawahara V.S., Hamasaki Y., Tada A., Imai A., Ichikawa T., Kikuchi T., Toda T. (2013): Typhoon-driven variations of phytoplankton and bacterial production in the coastal waters of Sagami Bay, Japan., Japan Geoscience Union Meeting, Chiba, Japan, 19-24 May.

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 章雄 (IMAI, Akio)

(独)国立環境研究所・センター長

研究者番号: 40203286

(2)研究分担者

佐野 友春 (SANO, Tomoharu)

(独)国立環境研究所・主任研究員

研究者番号: 10178808

(3)連携研究者

小松 一弘 (KOMATSU, Kazuhiro)

(独)国立環境研究所・主任研究員

研究者番号: 20391104

富岡 典子 (TOMIOKA, Noriko)

(独)国立環境研究所・主任研究員

研究者番号: 40168399