

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450245

研究課題名(和文) 海洋生態系での主要な有機物分解者は従属栄養細菌だけだろうか？

研究課題名(英文) Is organic matter degradation in aquatic ecosystem attributed only to heterotrophic bacteria?

研究代表者

大林 由美子 (OBAYASHI, Yumiko)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・助教

研究者番号：60380284

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)：海洋生態系における生物地球化学的物質循環プロセスのなかで、水圏での有機物の分解・分子変換プロセスはブラックボックスとして扱われがちである。従来、海水中での非生物態有機物(溶存有機物、非生物態粒状有機物)の分解・分子変換については従属栄養細菌の働きのみが強調されてきた。本研究は、細菌だけでなく、真核微生物(主に原生生物)のなかにも海水中の非生物態有機物の分解・分子変換に関与しているものがあるのではないかと考えて研究に着手した。その結果、従属栄養細菌のほかに原生生物のなかにも、水中で細胞外有機物を分解する能力を持つものがあることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Among biogeochemical processes in aquatic environment, degradation and/or transformation of natural organic matter in aquatic ecosystem is one of the most undescribed processes so far. Degradation of organic matter in aquatic ecosystem is generally thought to be attributed to heterotrophic bacteria, however, we hypothesized that not only heterotrophic bacteria but also eukaryotic microbes, especially protists, contribute to organic matter degradation processes in aquatic environment. In this study, we found that some kinds of protists showed high potential activities of extracellular proteases and parts of their enzymes were seemed to be secreted to the surrounding water. Further researches for the contribution of the protists to organic matter degradation in aquatic environment are expected.

研究分野：生物地球化学

キーワード：海洋生態系 生物ループ 有機物分子変換 物質循環 海洋微生物群集 従属栄養性細菌 原生生物 細胞外加水分解酵素 微生物

1. 研究開始当初の背景

海洋に存在する有機物は、炭素量にしてその9割以上が非生物態有機物 (non-living organic matter) である。非生物態有機物には、非生物態粒状有機物 (生物の糞や死骸、それらのかけらや凝集物など) と、溶存有有機物が含まれる。海洋における有機物の移動・変換経路として、いわゆる食う・食われるの関係である捕食食物連鎖のほかに、溶存有有機物が従属栄養性細菌に取り込まれたのちに捕食の経路へと繋がっていく「微生物ループ」があることは広く認識されている。

海洋での有機物動態に関する研究として、捕食食物連鎖や微生物ループ (微生物捕食食物連鎖) における生態学的構成員間での捕食による有機物の移動を親生物元素フラックスとして解析する研究は比較的行われているのに対し、有機物の分子変換・変質プロセスに関する情報は少ない。従来、海水中での非生物態有機物の分解 (分子変換) は、従属栄養性細菌が担っていると考えられているが、実際に関与する微生物群やそれらの有機物分解能についての詳細は、必ずしも明らかになっておらず、海洋での有機物分解プロセスの実態はブラックボックスとなっている。

2. 研究の目的

本研究は、海洋生態系での生物地球化学的物質循環プロセスの中でブラックボックスとして扱われがちな、水圏での非生物態有機物の分解・変質・変換過程の実態に関する情報を得ることを目的とした。従来、海水中での有機物分解 (分子変換) については、従属栄養性細菌の働きのみが強調されてきたが、本研究では、従属栄養性細菌のほかに、真核微生物 (主として原生動物) のなかにも海水中での非生物態有機物の分解・分子変換に関与するものがあるのではないかと仮説をたて、その実態を捉えることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、水圏において、微生物が自身の体 (細胞) の外に対して作用させる細胞外プロテアーゼの活性を、細胞外有機物分解能の指標とした。各種の人工基質を試水に添加し、基質の分解速度を測定することで、その基質を分解する酵素の活性を測定することができる。本研究では、複数のタイプのプロテアーゼ (アミノペプチダーゼ、トリプシン型、キモトリプシン型) 活性を、それぞれ複数のアミノペプチダーゼ用、トリプシン用、キモトリプシン用の基質を用いて測定し、試水のプロテアーゼ活性プロファイルとした。

天然海水では、様々な種類の細胞外プロテアーゼ活性が検出されるが、測定される活性・プロファイルは、様々な微生物を含む群集全体の細胞外プロテアーゼ活性・プロファイルの総和であり、微生物群集を構成する各々の微生物群の細胞外プロテアーゼ活性・プロファイルはわからない。本研究では、

真核微生物 (原生動物) の細胞外有機物分解能を検討するために、まず、原生動物の分離株を用いた。ここでは、繊毛虫株とラビリンチュラ株で得られた結果について報告する。

4. 研究成果

(1) 繊毛虫の細胞外有機物分解能

繊毛虫は、水圏における代表的な原生動物の一つである。水圏微生物生態系においては微生物ループの主役である従属栄養細菌などを捕食する捕食者として位置づけられることが多い。また自らが捕食されることにより、より高次の栄養段階へと有機物を転送する役目も担う。しかし、繊毛虫自身が細胞外の有機物の分解に直接関与する有機物分解酵素を放出するとは、考えられていない。

本研究では天然海水に含まれる多様な有機物分解酵素の起源を考えるにあたり、従属栄養細菌以外の細胞外有機物分解酵素源の可能性として原生動物を想定し、その一つとして、海水から分離した繊毛虫株について、細胞外の有機物を分解する能力があるかどうかを調べる実験を行った。

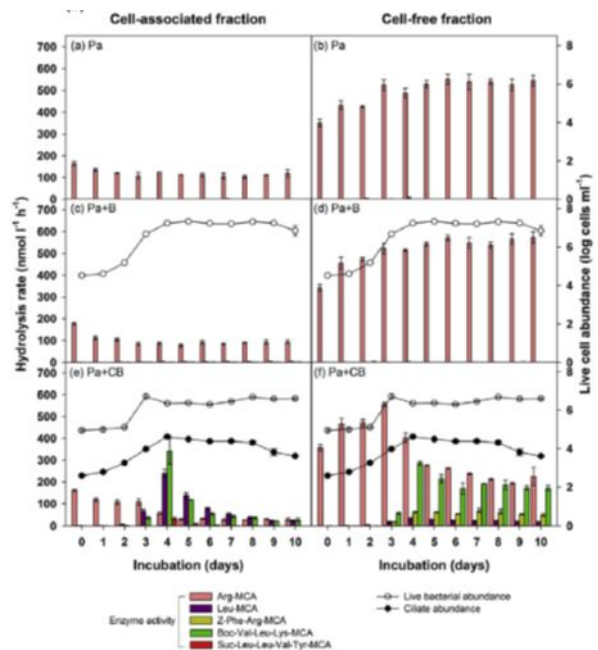


図 1. 繊毛虫株を用いたマイクロゾム実験の系内の細菌数・繊毛虫数と細胞外プロテアーゼ活性の変化。折れ線グラフは細菌数 (○) と繊毛虫数 (●)、バーグラフは細胞外プロテアーゼ活性 (色分けで示した 5 種類の基質を使用: Arg-MCA と Leu-MCA はアミノペプチダーゼ用、Z-Phe-Arg-MCA と Boc-Val-Leu-Lys-MCA はトリプシン用、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA はキモトリプシン用の基質。これらの基質は、予備実験においてこの繊毛虫株の培養液中で分解が見られたものを用いた)、上段(a, b)は繊毛虫のエサとした死細菌のみの系 (ブランク区)、中段は(c, d)はブランクに細菌のみが加わった系 (対照区)、下段(e, f)はブランクに細菌と繊毛虫が加わった系 (実験区)、左列(a, c, e)は細胞画分、右列(b, d, f)は細胞外画分。(Thao et al. (2015) Marine Environmental Research, 109, 95-102.)

まず、この繊毛虫株培養液において、細胞外画分および細胞内画分のプロテアーゼプロファイル調べた。その結果、いずれの画分においても一部のトリプシン用基質が分解されることがわかった。

次に、この繊毛虫株を用いたマイクロコスム実験を行った。ただし、この繊毛虫株は無菌ではなく培養液中に付随細菌が存在する。そのため、実験区（繊毛虫と細菌を含む）のほかに、培養液から繊毛虫細胞を取り除いた濾液（細菌を含むが繊毛虫は含まない）を対照区として用いた。実験の結果、10日間の実験期間中に、細菌のみを含む系ではトリプシン型活性の上昇は見られなかったが、細菌と繊毛虫を両方含む系では水中のトリプシン型活性の上昇が見られ、そのタイミングは繊毛虫細胞数の増加とよく一致していた（図1）。

これらの結果から、繊毛虫も海水中の有機物分解酵素源として考えうることが示唆された。

(2) ラビリンチュラ類の細胞外有機物分解能

ラビリンチュラ類は単細胞真核微生物（原生生物）で、水辺の落葉などに付着してその有機物を分解することで知られており、その分解に、セルラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼなどの有機物分解酵素を用いることが報告されている。しかし、水圏、特に水柱における溶存有機物や懸濁粒子態有機物の分解に対するラビリンチュラ類の寄与については、ほとんど情報がない。一方で、近年のメタゲノム解析などでは、落葉などないような外洋を含む幅広い海域からラビリンチュラ類の存在が報告されており、水圏での有機物動態におけるラビリンチュラ類の働きに興味を持たれる。本研究では、ラビリンチュラ類の水圏での有機物分解者としてのポテンシャルを探るための第一歩として、液体培地中のラビリンチュラ類分離株の細胞外プロテアーゼ活性プロファイル調べた。

連携研究者の保有するラビリンチュラ類ヤブレッツボカビ科の10属18株を用い、対数増殖期と定常期のそれぞれで、培養液（細胞を含む）および培養上清（培養液から細胞を除去）の両方について細胞外プロテアーゼ活性プロファイル分析した。プロテアーゼ活性プロファイルの分析には、アミノペプチダーゼ用基質5種類、トリプシン用基質10種類、キモトリプシン用基質2種類の系17種類の基質を使用した。

その結果、全株で、アミノペプチダーゼ型およびトリプシン型の細胞外プロテアーゼ活性が確認された。キモトリプシン型活性は*Botryochytrium*属でのみ顕著だった。同じ属の株同士では似たプロファイルが見られ、属間では異なっていたことから、属により分解の得意な有機物が異なる可能性が示唆された。

対数増殖期には、アミノペプチダーゼ活性

は、いずれの株でもほとんどが細胞を含む画分に検出されたが、トリプシン型活性は、20-90%程度（株によって異なる）が上清画分に検出された。すなわち、対数増殖期のラビリンチュラ類は、アミノペプチダーゼを細胞表面に保持した状態で持つ一方、トリプシン型酵素の一部を水中に放出していると考えられる。

定常期には、対数増殖期に比べて細胞あたりの活性が低下する株が多いが、顕著に高くなる株も確認された。また、上清画分の活性の割合が対数期に比べてやや高くなる傾向がみられた。これが、細胞破壊による細胞内酵素の漏出によるものか、生細胞からの放出によるものかは明らかではないが、いずれも水中の有機物の分解に貢献するものと考えられる。

以上より、ラビリンチュラ類は水柱でも有機物分解に貢献しうるポテンシャルがあることが明らかとなった。

(3) まとめ

従来、水圏での有機物分解は従属栄養細菌による作用のみが強調されてきたが、原生生物のなかにも細胞外の有機物を分解する力を持つものがあることが明らかになった。今後、実際の海洋での非生物態有機物の分解・分子変換における様々な微生物の寄与について、量的な見積りも含めてさらに詳細な研究を実施したい。

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2件）

Ngo Vy Thao, Yumiko Obayashi, Taichi Yokokawa, Satoru Suzuki (2014):
Coexisting protist-bacterial community accelerates protein transformation in microcosm experiments. *Frontiers in Marine Science*, 1:69. 査読有
doi:10.3389/fmars.2014.00069

Ngo Vy Thao, Akino Nozawa, Yumiko Obayashi, Shin-Ichi Kitamura, Taichi Yokokawa, Satoru Suzuki (2015):
Extracellular proteases are released by ciliates in defined seawater microcosms. *Marine Environmental Research*, 109, 95-102. 査読有
doi: 10.1016/j.marenvres.2015.06.011

〔学会発表〕（計6件）

大林由美子・高尾祥文：真核微生物ラビリンチュラ類の細胞外プロテアーゼプロファイル～水圏での有機物分解者としてのポテンシャルを探るために～，日本微生物生態学会 第31回大会，横須賀市文化会館（神奈川県横須賀市），2016年10月23, 24日

Yumiko Obayashi, Satoru Suzuki:
Proteolytic enzymes in seawater:
contribution of prokaryotes and protists.
2016 Ocean Sciences Meeting, ニューオー
リンズ (アメリカ合衆国), 2016 年 2 月 25
日 (Invited)

高尾祥丈・松岡順平・大林由美子: ラビ
リンチュラ類のタンパク質分解酵素活性, ラ
ビリンチュラ・シンポジウム, 日本科学未来
館 (東京都江東区), 2015 年 7 月 4 日

大林由美子・Ngo Vy Thao・北村真一・横
川太一・鈴木 聡: 細菌だけではないみたい
海水中の有機物分解酵素の源, 日本海洋
学会 2015 年度春季大会, 東京海洋大学 (東
京都港区), 2015 年 3 月 23 日

Ngo Vy Thao, Akino Nozawa, Yumiko
Obayashi, Shin-Ichi Kitamura, Taichi
Yokokawa, Satoru Suzuki: Bacterial
proteins are rapidly processed in the
presence of both bacteria and ciliates. 環
境微生物系学会合同大会 2014, アクトシテ
ィ浜松 (静岡県浜松市), 2014 年 10 月 24 日

大林由美子・横川太一・鈴木 聡: 生物活
性阻害剤を用いて海水中のタンパク質分解
酵素活性の起源を探る, 環境微生物系学会合
同大会 2014, アクトシティ浜松 (静岡県浜
松市), 2014 年 10 月 23 日

〔図書〕(計 1 件)

大林由美子: 菌体外酵素. 『環境と微生物
の事典』(分担執筆), 日本微生物生態学会
編, 朝倉書店, 2014 年, p.125-126

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林 由美子 (OBAYASHI, Yumiko)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・助
教

研究者番号: 60380284

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

高尾 祥丈 (TAKAO, Yoshitake)
福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授
研究者番号: 00511304

(4) 研究協力者

()