

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550003

研究課題名(和文)細菌群の増殖応答と遺伝子発現特性に着目した湖沼二次生産機構の解明

研究課題名(英文) Study on secondary production mechanism in lake focusing on bacterial growth responses and gene expression signatures

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：湖沼生態系では、溶存有機物に基づく細菌生産(二次生産)を経由する微生物ループが重要な役割を果たしている。本研究では、千葉県印旛沼に於いて微生物ループに流入する溶存有機物の起源と、それらを利用する細菌群について評価した。その結果、印旛沼では、異なる季節においてもBurkholderialesが細菌生産を担っていること、流入河川由来の溶存有機物はその生産を支えている可能性などが示された。

研究成果の概要(英文)：Microbial loop which is driven by bacterial (secondary) production based on dissolved organic matter plays an important role in lake ecosystems. This study evaluated the sources of dissolved organic matter flowing into microbial loop and bacterial community utilizing the dissolved organic matter in Lake Inba, Chiba prefecture. The results suggest that Burkholderiales are likely to contribute to microbial loop in Lake Inba in different seasons. One of the possible sources of dissolved organic matter supporting bacterial production in Inba lake is inflowing river.

研究分野：環境微生物

キーワード：微生物ループ 湖沼 細菌生産 溶存有機物

1. 研究開始当初の背景

湖沼生態系は食物連鎖では、通常の「植物プランクトン 動物プランクトン」という捕食連鎖による炭素フローに加え、「溶存有機物 細菌 細菌捕食性の微小原生物 動物プランクトン」という「微生物ループ」を経由する炭素フローの寄与も大きい。微生物ループは、溶存有機物 (Dissolved Organic Matter: DOM) が細菌に利用されてバイオマスに変換される二次生産 (細菌生産) が起点であるが、どのような DOM が、どのような細菌群に利用されているのかという点についてはほとんど明らかになっていない。従って、現状の微生物ループモデルでは、「DOM」も「細菌」も要素としてはそれぞれ1つのボックスとして包括的に捉えられており、両者をつなぐリンケージも一本の線で示されているにすぎない。しかし、実際には流入河川、藻類、底泥、下水処理水など異なる起源の DOM に対して、湖沼の多様な細菌群が対応している可能性は高く、二次生産の構造を示すリンケージは非常に複雑であると考えられる。湖沼における微生物ループの構造と機能を明らかにするためには、二次生産における DOM と細菌群との複雑な対応関係を結びつける研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、湖沼の二次生産における DOM と細菌群との対応関係を明らかにし、微生物ループモデルを精緻に構築するための基礎情報を蓄積することを目的とする。具体的には、千葉県印旛沼を対象として、以下の3点を目的に研究を実施する。

- (1) 湖沼において活発に増殖し、微生物ループに寄与する細菌群を特定するための手法を開発する。実際の湖沼微生物ループでは、活発に増殖する細菌群ほど原生生物に捕食される可能性が高い。従って、湖水中の存在比率が高い細菌群が必ずしも微生物ループに関与しているとは言えない。また、微生物ループに流入する DOM 量が少ない場合には、細菌の増殖量がストックとして存在している細菌量に埋没してしまうことも懸念される。従って、微生物ループにおける細菌生産を可視化するためには、湖水中の細菌数と DOM とのバランスも調整する必要がある。
- (2) 異なる起源の DOM (流入河川、底泥溶出水、藍藻産生有機物) に対する湖沼細菌群の応答を明らかにし、実際の湖水中での湖沼細菌群の増殖特性と比較することにより、湖沼微生物ループを支える DOM の起源を推定する。
- (3) 湖沼微生物ループにおける二次生産の季節変化と流入河川由来の DOM の寄与を評価する。

3. 研究の方法

- (1) 湖沼微生物ループに寄与する細菌群の特

定方法の確立

2010年10月に千葉県印旛沼 (西印旛沼) 表層水を採水し、孔径 10 μm のフィルターで大型生物を除外した (L_{10})。次いで、細菌捕食性の原生生物を除外して細菌のみを含む画分を調製するために、するために、孔径 0.8 μm のフィルターでろ過を行った ($L_{0.8}$)。更に、 $L_{0.8}$ を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過し、75 で1時間低温滅菌を施すことで、細菌も除外した無菌湖水を調製した ($L_{0.2}$)。これらを表1に示すように混合した。Run A は、細菌捕食性の原生生物による捕食圧が存在する系であり、初期全菌数も未調整の条件であるため、実際の湖水の条件に最も近い。Run B は、捕食圧は存在するものの、初期全菌数を無菌湖水で希釈して 1/10 にした系である。Run C は、捕食圧のみを除外し、初期全菌数は未調整の系である。Run D は、捕食圧を除外し、初期全菌数を無菌湖水で希釈して 1/10 にした系である。

これらの系を、暗所、19.0 (採水時水温) で培養し、定期的に採水を行い、全菌数の変化をフローサイトメーターでモニタリングした。また、実験開始時、全菌数増加後、全菌数減少後の試料については、16S rRNA 遺伝子を標的とした次世代シーケンシングを行い、細菌群集構造を解析した。

表1 回分培養条件

系	試料の混合条件	捕食圧	初期全菌数
Run A	L_{10} 500 mL	あり	$\times 1$
Run B	L_{10} 50 mL + $L_{0.2}$ 450 mL	あり	$\times 1/10$
Run C	$L_{0.8}$ 500 mL	なし	$\times 1$
Run D	$L_{0.8}$ 50 mL + $L_{0.2}$ 450 mL	なし	$\times 1/10$

- (2) 湖沼微生物ループを支える DOM の起源推定

2014年12月に印旛沼表層水を採水し、表1に示した Run B と同様の系を調製した。起源の異なる DOM としては、流入河川水、底泥溶出水、藍藻産生有機物を準備した。流入河川水由来の DOM については、2014年12月に鹿島川 (鹿島橋) から採水した河川水を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過し、75 で1時間低温滅菌を施して、無菌河川水を調製した。底泥由来の DOM については、2014年10月に採泥した印旛沼底泥から底泥溶出水を調製し、これを同様に処理して無菌底泥溶出水を準備した。藻類産生有機物については、藍藻 *Microcystis aeruginosa* NIES-843 株を改変 CSi 培地で培養した培養液を、同様に処理し、無菌藍藻産生有機物を調製した。これらの無菌 DOM 試料に、 L_{10} を初期全菌数が 1/10 になるように添加し、湖水試料 (Run B) と共に 19 で暗所培養し、全菌数と細菌群集構造を解析した。

- (3) 湖沼微生物ループにおける二次生産の季節変化の評価

2014年10月に加えて、2015年6月、10月、2016年1月に印旛沼表層水を採水した。湖水の水温は、2014年10月が19.0、2015年6月が26.0、2016年10月が17.0、2016年1月が5.4であった。同時に、印旛沼の外部負荷の主要な起源となっている鹿島川（鹿島橋）から河川水を採水した。湖水については、表1に示したRun B、Run Dと同様の系を調製した。すなわち、いずれの系も初期全菌数は無菌湖水で1/10に希釈しているが、Run Bでは原生生物による捕食圧が残存しているのに対して、Run Dでは捕食圧を除外している。また、河川水については、孔径0.2μmのフィルターでろ過し、75℃で1時間低温滅菌を施すことで、無菌河川水を調製し、そこに初期全菌数が1/10となるように L_{10} （捕食圧あり）か $L_{0.8}$ （捕食圧なし）を添加して、採水時の水温で培養した。定期的に試料を採水し、全菌数と細菌群集構造を解析した。

4. 研究成果

(1) 湖沼微生物ループに寄与する細菌群の特定方法の確立

図1にRun A～Run Dの全菌数の変化を示す。初期全菌数を希釈していないRun AとRun Cでは全菌数の増加傾向が顕著ではないが、初期全菌数を希釈したRun BとRun Dでは全菌数の明瞭な増加を可視化することができた。また、捕食圧が残存するRun AとRun Bでは、培養後半に全菌数が減少傾向に転じている。Run CやRun Dでの全菌数が減少傾向を示さないことから、Run AやRun Bで観察された全菌数の減少は溶菌などではなく、捕食によるものと推察された。

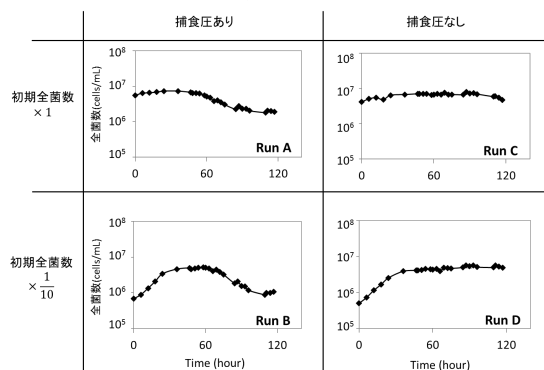


図1 Run A～Run Dの全菌数の変化

Run BとRun Dについて、培養前後の細菌群集構造を解析した結果を図2に示す。元の湖水ではActinomycetalesの存在比率が高かったのに対して、増殖後の試料ではFlavobacterialesやBurkholderialesの比率が増加することが確認され、これらの細菌群の増殖活性が高かったことが推察された。また、捕食圧が残存しているRun Bでは、全菌数が減少した117時間後において、FlavobacterialesやBurkholderialesの比率は再び低下しており、これらが優先的に捕食

されていることも示唆された。微生物ループにおいて活発に増殖する細菌群は、同時に捕食されやすいため、湖水中の見掛けの存在比率は低く抑えられていると考えられる。

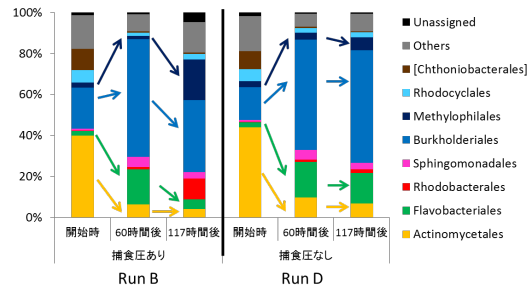


図2 Run B及びRun Dの細菌群集構造の推移

(2) 湖沼微生物ループを支えるDOMの起源推定

印旛沼における細菌生産を支えるDOMの起源を推定するために、印旛沼の流入河川水(鹿島川)底泥溶出水、藍藻産生有機物を用いて、印旛沼湖水中の細菌群を培養した。図3に全菌数の変化を示す。いずれの系も、全菌数の増加と減少という変化が観察された。

図4に、細菌群集構造の変化を示す。湖水中では、全菌数増加時にBurkholderialesの割合が増加し、全菌数減少時にその割合も低減した。河川DOM、底泥DOMに対しても、Burkholderialesは同様の傾向を示した。ま

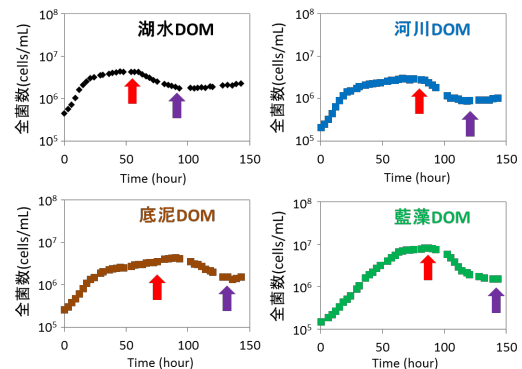


図3 湖水中及び異なる起源のDOM添加に対する全菌数の変化(矢印: 遺伝子解析試料の採取)

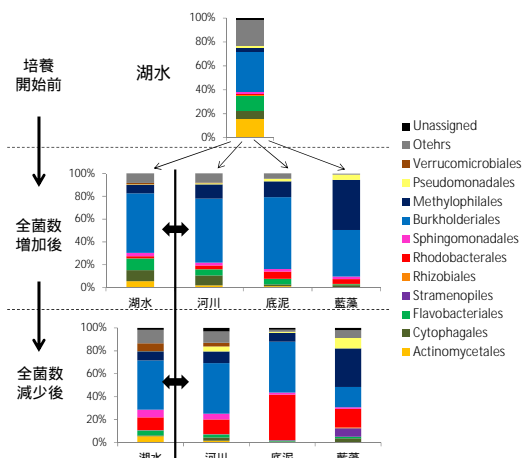


図4 湖水中及び異なる起源のDOM添加に対する細菌群集構造の変化

た、藍藻 DOM を添加した系では、全菌数増加時に、Burkholderiales に加えてMethylophilales の割合も増加していた。全菌数減少時には、いずれの系においてもRhodobacterales の存在割合が増加しており、他の細菌群と比較してRhodobacterales は相対的に捕食されにくい傾向があることが推察された。細菌群集構造の類似性をクラスター解析で比較した結果を図5に示す。この結果、湖水中での細菌群集の変化の傾向は、流入河川である鹿島川のDOMを有機物源として評価した場合の傾向と類似していることが示された。採水時の印旛沼の微生物ループを支えていたDOMは、鹿島川に由来していることが推察された。

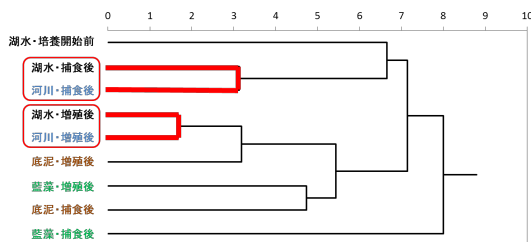


図5 細菌群集構造のクラスター解析

(3) 湖沼微生物ループにおける二次生産の季節変化の評価

(2)の結果より、2014年12月の印旛沼微生物ループを支えるDOMの主要な起源として鹿島川が推定された。そこで、印旛沼における細菌増殖特性の季節変化と鹿島川の寄与を評価するために、2015年6月、10月、2016年1月に調査を実施した。湖水、河川水ともに、捕食圧なしの系における全菌数増加時のデータから、最大比増加速度を算出すると共に、最大増加数を求めた。また、捕食圧ありの系における全菌数の減少時のデータから、最大比減少速度を算出した。図6に全菌数の最大増加量の結果を示す。湖水中の最大増加数は、2015年10月>2014年10月>2015年6月>2016年1月の順であり、必ずしも水温の傾向とは完全には一致しなかった。河川水についても、最大増加数の傾向は湖水の結果とほぼ一致していた。また、常に河川水中での最大増加数の方が、湖水中での最大増加数よりも大きいことも明らかになり、湖沼での滞留時間中における生分解の影響が推察された。

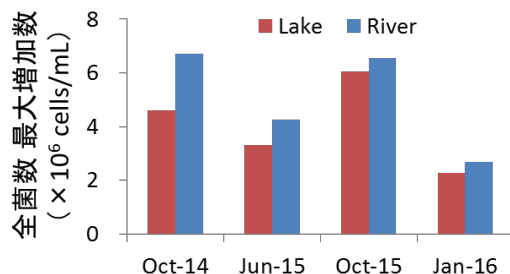


図6 湖水中、河川水中での全菌数の最大増加数

図7、図8に、湖水中と河川水中における湖沼細菌群の最大比増加速度と最大比減少速度の結果をそれぞれ示す。2015年6月と2016年1月の湖水と河川の最大比増加速度と最大比減少速度は一致しており、細菌の動力学的な点からは、湖水中と河川中における湖沼細菌群の動態は類似していた。一方、2015年10月では、河川と湖沼との間で最大比増加速度と最大比減少速度の値に乖離が見られた。

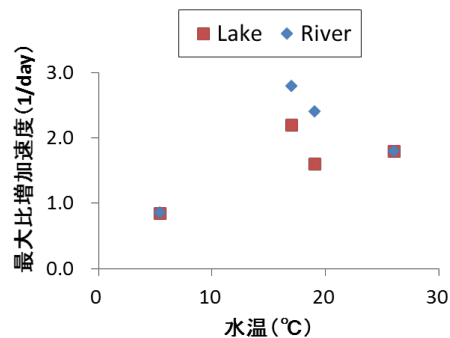


図7 湖水中、河川水中での全菌数の最大比増加速度

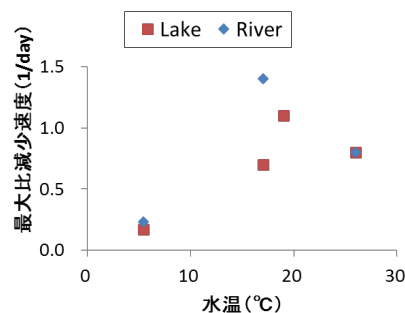


図8 湖水中、河川水中での全菌数の最大比減少速度

次世代シーケンサーを用いて、全菌数が最大値に達した付近の細菌群集構造を解析した結果を図9に示す。いずれの月においても、全菌数増加時にはBurkholderialesの割合が増加し、全菌数減少時にはBurkholderialesの割合が減少した。鹿島川河川水中の溶存有機物に反応したグループも、湖水同様にBurkholderialesであることが示された。これらのことから、印旛沼においては、季節にかかわらず、Burkholderialesが二次生産を担っていることが示された。Burkholderialesは、様々な起源のDOMに対しても応答することが(2)の結果から示されており、この結果だけでは鹿島川由来のDOMが微生物ループを駆動していたかどうかは断定できない。今後は、湖沼微生物ループのKey playerとして明らかになったBurkholderialesに着目し、研究当初に予定していた遺伝子発現特性などについても解析を実施し、この細菌群の微生物ループにおける役割について知見を深めていきたい。

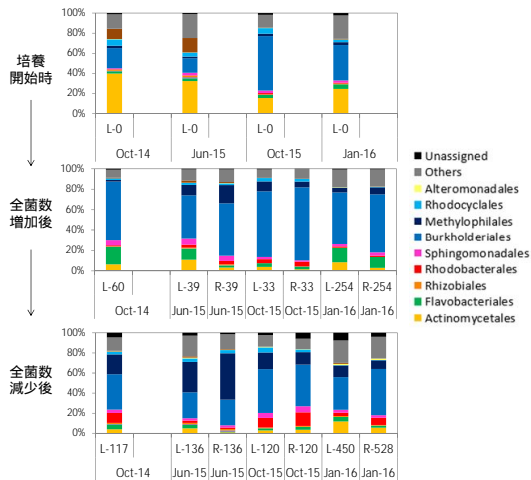


図9 湖水中(L)、河川水中(R)での湖沼細菌群集構造の変化

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 4件)

三角恭平、春日郁朗、栗栖太、古米弘明、
印旛沼における湖沼微生物ループを構成する細菌および原生生物の推定、日本微生物生態学会第30回大会、2015年10月17日～10月20日、土浦亀城プラザ(茨城県・土浦市)

三角恭平、春日郁朗、栗栖太、古米弘明、
湖沼微生物ループを駆動する溶存有機物の起源推定の試み、日本陸水学会第80回大会、2015年9月28日～9月29日、北海道大学(北海道・函館市)

春日郁朗、静中に動あり 微生物群集構造に対峙する視点、第18回日本水環境学会シンポジウム ポピュレーションダイナミクス研究委員会企画 “ポピュレーションダイナミクス研究のフィロソフィー”、2015年9月14日～9月16日、信州大学(長野県・長野市)

三角恭平、春日郁朗、栗栖太、古米弘明、
印旛沼微生物ループを構成する細菌群の増殖ポテンシャルと群集組成の評価、第49回日本水環境学会年会、2015年3月16日～3月18日、金沢大学(石川県・金沢市)(ライオン賞受賞)

[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