

# 琵琶湖における微生物群集の増殖解析

京都大学 日下部武敏

## 1. はじめに

湖沼の水質問題の特性として、閉鎖性が高いために滞留時間が長く、富栄養化や汚濁・汚染がいったん進行してしまえば、その影響が長期間にわたって継続すること、湖沼の水質改善・浄化には多大な時間とコストが必要となることが挙げられる。環境基準の達成率も、河川や海域に比べ依然として湖沼では低い状況にある（図 1）。特に、琵琶湖のような大きくて深い湖の水質形成メカニズムは複雑で不明な点が多い。琵琶湖では流入負荷と湖内 BOD 濃度は低減傾向にあるが、一方で、湖内 COD 濃度は 1980 年代半ばを境に漸増傾向に転じた。このことは、微生物に分解されにくい難分解性溶存有機物 (R-DOM) の増加を示唆しており、生態系や水利用への悪影響が懸念されている。しかし、同定できる有機成分（アミノ酸等）は有機物全体の 10%程度とされ（Thurman, 1985）、湖沼有機物に関する基盤情報が欠如していると言える。

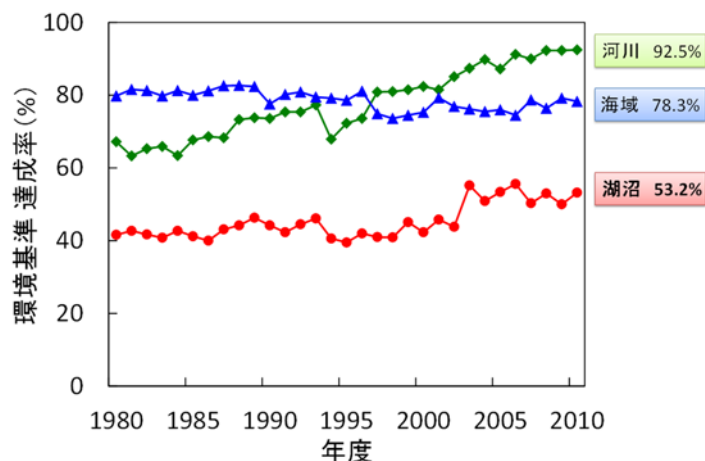


図 1 河川、海域及び湖沼の環境基準達成率の経年変化（環境省, 2011）

有機物の物質循環過程は、有機物量だけでなく、化学組成や複合体の形成といった変質過程、また、生態系の多様な構成員（植・動プランクトン、細菌、原生動物、ウイルス等）の活性や構成員間の相互作用の影響を強く受ける。古典的な生食連鎖（藻類→動物プランクトン→魚）のほか、微生物ループ（溶存有機物→細菌→原生動物）や、ウイルス感染による細菌の溶菌も物質循環の一部を担っている。さらに、温度や光、D<sub>0</sub>、pH 等の環境要因も考慮すべき非常に複雑な系である。湖沼の R-DOM に関する様々な報告があるものの、その生成機構や化学構造が十分に理解されたとはいえないのが現状である。

本研究では、微生物群集が介在する「微生物炭素ポンプ (microbial carbon pump)」が長期的な炭素貯留プロセス（難分解性有機物の生産プロセス）として駆動していることに鑑みて、微生物食物網 (microbial food web) の結節点 (node) として細菌が重要な鍵になると考えた（図 2）。有機物や動植物の遺骸の微生物分解や、微生物ループに流れる有機物フラックスは、微生物群集の組成と活性の大きさに強く依存し、季節

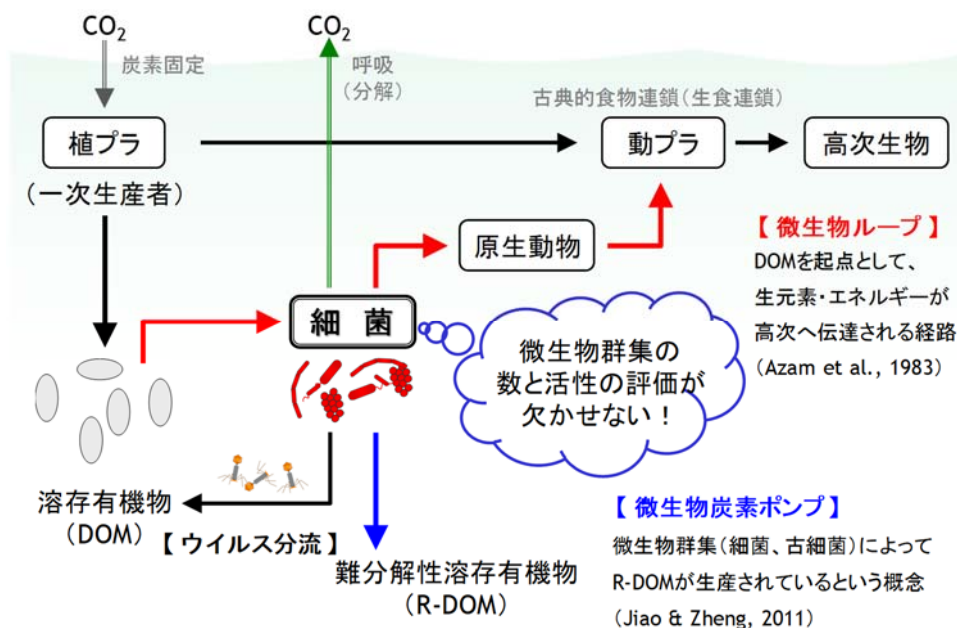


図2 湖内物質循環の鍵を握る微生物群集

的、空間的に大きく変動していることが予想される。微生物群集の組成については、次世代シーケンサー (NGS) の登場により、これまでにない勢いで膨大なデータの取得が可能となった。

細菌の増殖 (量および速度) を評価するためには、細菌細胞数や濃度を計数、定量する必要がある。そのためには、DAPI や SYBR 系の蛍光色素で核酸を染色した後に、蛍光顕微鏡 (Efm) や共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)、フローサイトメーター (FCM) で計数したり、RT-PCR 法、NAD 測定、濁度法、乾燥菌体重量法、平板培養法、MPN 法などによって定量される。細胞増殖活性を評価するためにはこれらの方法による菌体量 (細胞数) や濃度の時間変化から比増殖速度  $\mu$  ( $d^{-1}$ ) を求める必要がある。しかし、必要細胞量が多いこと、培養時間を要すること、菌体の洗浄や乾燥などの操作が煩雑であること、培養できない微生物 (VBNC) はそもそも評価が難しいことなどの課題がある。

そこで、実際の水環境中の条件における微生物の増殖活性を評価する手法の開発が行われてきた。微生物群集の増殖活性 (secondary or bacterial production) については、放射性同位元素で標識した DNA 合成前駆物質チミジン ( $^3H$ -チミジン) やロイシン ( $^3H$ -ロイシン) の取込み量を測定する方法が広く利用されてきた (Fuhrman & Azam, 1982; Kirchman et al., 1985)。チミジン法は、DNA 合成前駆物質を増殖時に DNA に取り込ませるが、新規 DNA 合成量の検出のために放射性同位元素で標識した  $^3H$ -TdR を使用し、シンチレーションカウンターなどの装置が必要となり、毒性のあるシンチレーションカクテルを取り扱う。国内では、放射性同位元素の取扱いに関する法規制が厳しいことなどから実施の困難性を有しており、微生物の生産性に関するデータが限られているのが現状である。その後、Steward & Azam (1999) によって非放射性代替法としてブロモデオキシウリジン (BrdU) を利用する方法が提案され、汎用的な手法となっていった。BrdU 法は、チミジン法と高い相関があり、細胞 (single cell) レベルでの検出が可能である (Pernthaler et al., 2002) ことが強みである。しかし、BrdU 法は、

抗 BrdU 抗体で検出するために強い透過処理や、加熱、塩酸などによる DNA 変性工程が必要であり、二本鎖 DNA の完全性の損失だけでなく、細胞形態を破壊する等の欠点を抱えている。そのため、他のターゲットと組み合わせた多重染色には適しているとは言い難い。

本研究では、さらなる代替法として 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) を用いて、微生物の群集レベルおよび個々の細胞レベルでの増殖活性を評価できる手法の開発を目指す。EdU は、BrdU 同様、チミジン・アナログとして、DNA 合成時 (S 期) に取り込まれる (図 3)。

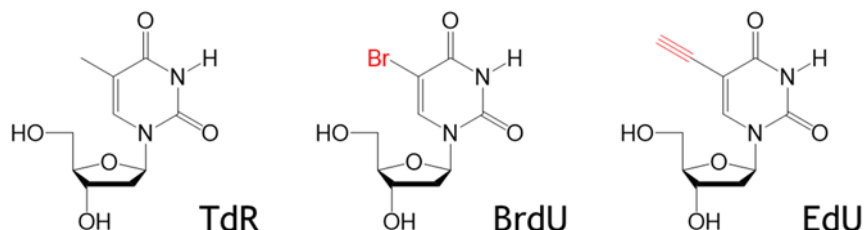


図 3 TdR、BrdU、EdU の化学構造

EdU 法では、DNA に取り込まれた EdU に、サイズの小さいアジド化蛍光色素 (Alexa Fluor など) を直接結合させて蛍光検出する (Salic & Mitchison, 2008)。この反応はアジドとアルキンが銅触媒存在下の比較的温和な条件で進行する環化付加反応 (CuAAC) を利用したものである (図 4)。アジドやアルキンは生体内には存在しない (bioorthogonal) 官能基とされ、生体内でもほとんど阻害を受けない特徴を有しており、シンプルなプロトコールで高解像度のデータを取得することが期待できる。さらに、EdU 法では、透過処理の条件が穏やかで、DNA の変性工程が不要で、BrdU 法と比べて温和な条件で効率的に検出が期待でき、多重染色も期待できる (図 5)。

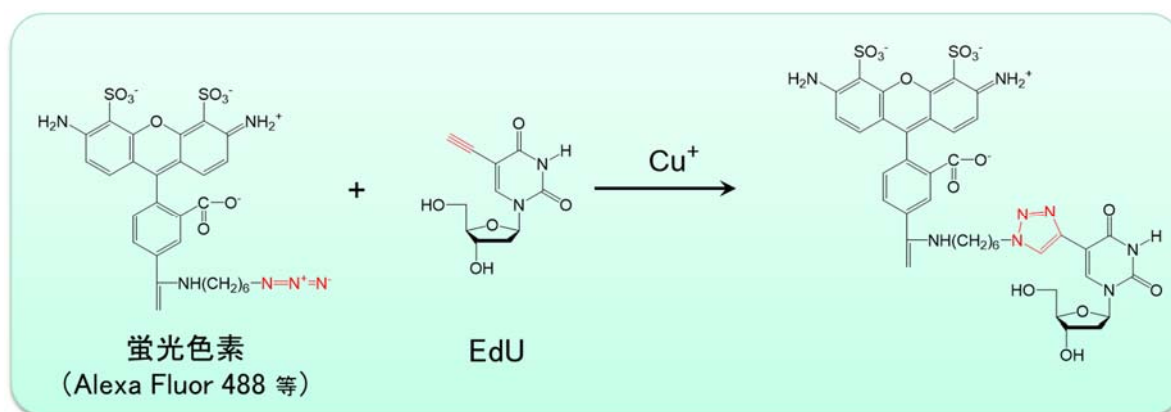


図 4 CuAAC 反応を利用した EdU の蛍光標識化

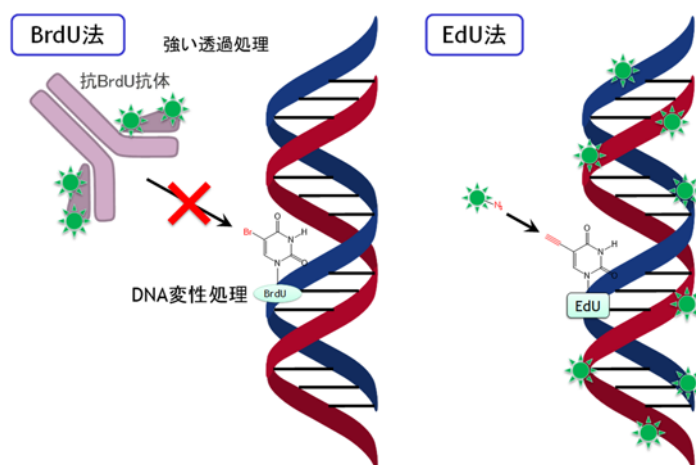


図5 BrdU法とEdU法の違い

## 2. 研究の目的

本研究のねらいは、EdUを利用して、蛍光顕微鏡観察により群集レベルだけでなく、個々の細胞レベルで増殖活性を評価することにある。平成29年度は、EdUを利用した微生物群集の増殖解析法の新規開発を目的とした。

## 3. 実験方法

### 3.1 採水調査

平成29年度は、琵琶湖北湖・今津沖中央17B（全水深90m）において採取調査を実施した。琵琶湖での採水調査は、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター所有の調査船「びわかぜ」により実施し、表層水（水深0.5m）の採水にはステンレス製バケツを、深層水（水深60m）の採水にはバンドーン採水器をそれぞれ用いた。採取した水サンプルは実験室に持ち帰り、速やかに実験に供した。さらに、各種実験条件の検討には唐橋付近（瀬田川）の表流水も用いた（図6）。



図6 サンプルング地点

### 3.2 EdU 法

本研究では、Zwirgmaier (2010)、Tada et al. (2010) ならびに試薬キットの取扱説明書を参考にして、EdU を用いた微生物群集の増殖解析を行った。実験フローの概要を図 7 に示した。

採取した水サンプルは、滅菌済み PS ボトルに入れて、遮光して実験室に持ち帰った (A)。持ち帰った水サンプル中の原生動物や大型藻類が細菌と共存する場合、EdU 取り込みの競合や捕食の影響により細菌の増殖活性を正確に把握することが困難になるため、前ろ過処理によってそれらを取り除く必要があった。本研究では、原生動物のほとんどが約 2  $\mu\text{m}$ ～約 100  $\mu\text{m}$  であること (盛下, 2004) を考慮して、前ろ過に用いるメンブレンフィルターの孔径を検討した (B)。前ろ過後の水サンプルに EdU 溶液を添加した後、所定の温度条件で培養することで EdU を細菌に取り込ませた (C)。本研究では細菌の増殖解析に Click-iT EdU Plus Imaging Kit (Invitrogen) を用いた。EdU の最終濃度は 1  $\mu\text{M}$  であった。EdU を所定の時間が経過したところで、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako) を用いて遮光しながら化学固定を行った (D)。化学固定の条件は、4°C で 24 時間とした。透過処理は、10 mg/mL Lysozyme (in 0.05 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl) を用いて、37°C で 30 分間行った (E)。化学固定および透過処理の後、Kit に同封の試薬を用い、室温で 30 分間 Click-iT 反応させることで細菌に取り込まれた EdU を Alexa Fluor 488 で蛍光標識した (F)。Click-iT 反応に続けて、Kepner & Pratt (1994) の方法に従って、DAPI (最終濃度 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7 分間) を用いて核酸の対比染色を行った (G)。褪色防止剤を含んだマウント剤 ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo) を用いて、24 時間硬化させた (H)。Alexa Fluor 488 により緑色に標識された EdU を含む細菌細胞を観察する場合は B 励起で、DAPI により青色に標識された核酸を有する細菌細胞を観察する場合は U 励起でそれぞれ観察した (I)。(D)～(H) では、それぞれの操作の間に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) による洗浄と、50%、80% および 100% エタノール (Wako) に順にそれぞれ 3 分間浸漬させて行う脱水、そして

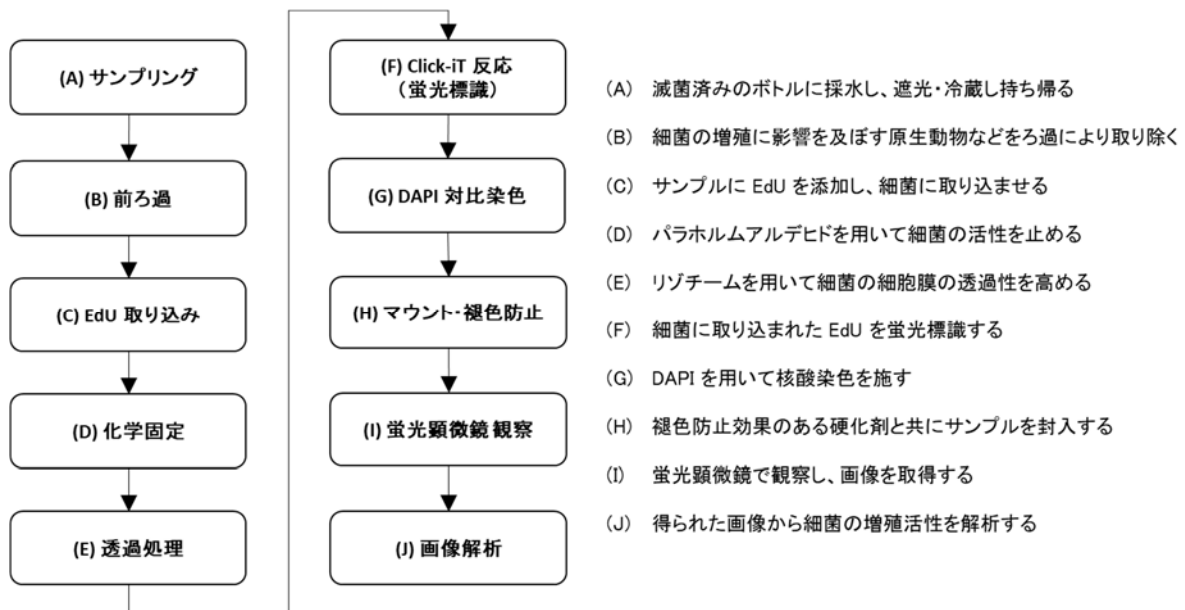


図 7 EdU 法の実験フロー



脱水後の自然乾燥を行った。また、(E)～(G)では、それぞれ上述の洗浄前に 3% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS を用いてブロッキング処理を施した。

その他、細菌を捕集する方法として、EdU 取り込み後の細菌を含む試水をろ過することでメンブレンフィルター上に細菌を捕集するフィルター法と、菌体濃縮液をスライドガラス上に滴下し、乾燥させることで細菌をスライドガラスの表面に直接接着させて捕集するスライドガラス法があり、実験的な検討を加えた。

## 4. 結果および考察

### 4.1 前ろ過に用いるメンブレンフィルターの孔径

EdU 取り込み時に原生動物や大型藻類が細菌と共存する場合、競合や捕食の影響により細菌の活性を正確に把握することが困難になる。したがって、前ろ過によってそれらを取り除く必要がある。唐橋付近で採水した水サンプルを用いて検討実験を行った。検討を行ったメンブレンフィルターの孔径は、2.0  $\mu\text{m}$ 、3.0  $\mu\text{m}$ 、5.0  $\mu\text{m}$ 、8.0  $\mu\text{m}$  であった。最終的には、研究対象の細菌サイズや原生動物のサイズを考慮し、孔径 2.0  $\mu\text{m}$  のアイソポアメンブレンフィルター (Merck-Millipore) を採用することとした。前ろ過後に、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のアイソポアメンブレンフィルター (Merck-Millipore) 上に細菌を捕集した後、DAPI による核酸染色を施し、蛍光顕微鏡観察により細菌細胞数を計数した (写真 1、図 8)。写真 1 より、細菌サイズよりも大型の細胞が除去できていることが分かる。図 8 より、前ろ過前後で細菌数に大幅な減少は見られず、細菌細胞の定量的な捕集が可能と判断した。なお、写真 1 で赤く光っている細胞は、光合成色素の自家蛍光を検出しているものと考えられる。光合成細菌 (シアノバクテリアなど) の可能性もあるが、微細な植物プランクトン (真核細胞) が前ろ過後の水サンプルに存在している可能性がある。したがって、多重染色する際には注意が必要であり、今後解決すべき課題であった。

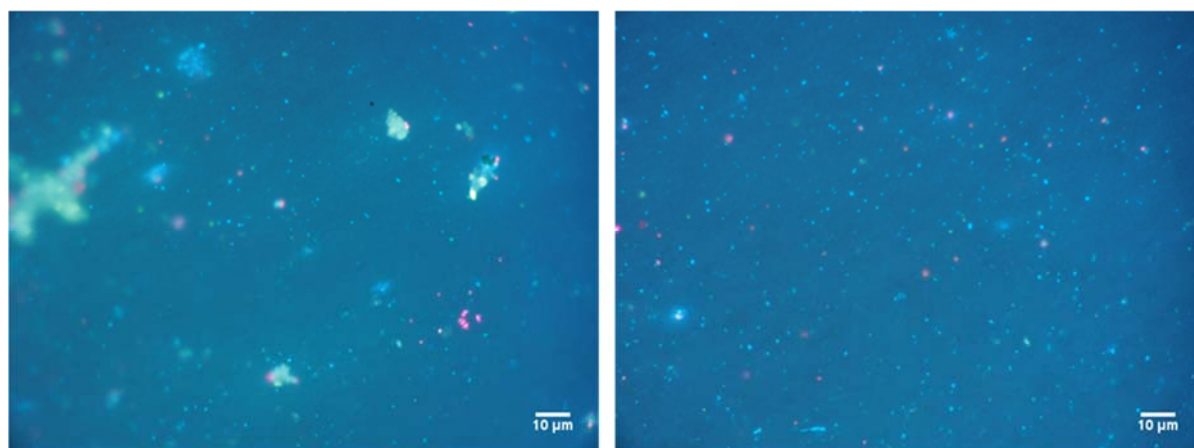


写真 1 前ろ過前後の蛍光顕微鏡写真の比較 (DAPI、U 励起)

左：前ろ過前、右：前ろ過後、Scale bar : 10  $\mu\text{m}$

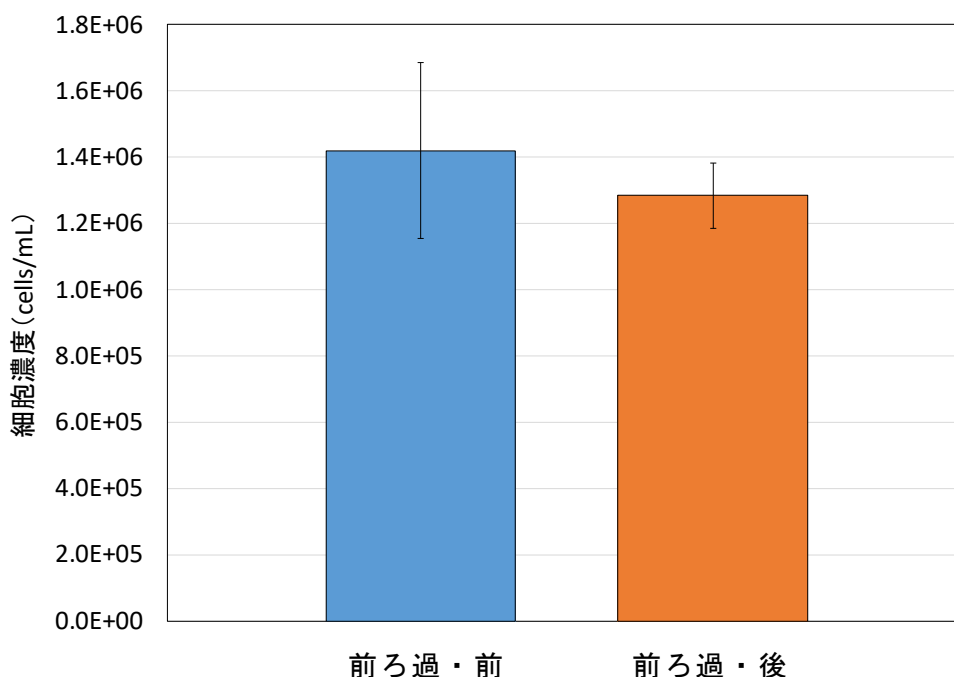


図 8 前ろ過前後の細菌濃度の変化

#### 4.2 細菌細胞の捕集方法の検討

前述 (4.1) の通り、細菌を捕集する方法は細菌を含む試水をろ過することでフィルター上に細菌を捕集するフィルター法と、細菌の濃縮液をスライドグラス上に滴下し乾燥させることで細菌をスライドグラスの表面に直接接着させて捕集するスライドグラス法があり、両者を実験的に検討する必要がある。

フィルター法では、アイソポアメンブレンフィルターの孔径  $0.2 \mu\text{m}$  よりも小さい細菌細胞が通過して損失している可能性がある。アイソポアメンブレンフィルターはポリカーボネート製トラックエッチドメンブレンフィルターで滑らかなガラスのような表面を有しており顕微鏡観察に適しているとされる。反面、細胞が剥離しやすいというデメリットがある。本研究では、細菌細胞のフィルターへの接着性を高め、各種工程での細胞の剥離を防ぐため、メンブレンフィルターの前処理を実施した。フィルターは使用する前に 0.01% Poly-L-lysine に浸漬させた後、自然乾燥させたものを使用した (Tada et al., 2010)。唐橋付近で採取した水サンプル 10 mL をフィルターに通水させた後、フィルターを十分に乾燥させて DAPI 染色を行った。蛍光顕微鏡で U 励起により観察した結果を写真 2 に示す。一方で、スライドグラス法では、多検体を効率的に扱える点などのメリットがある。サンプルの作製に使用したスライドグラスは、高撥水性印刷が施された 10 穴スライドグラスで、細胞の接着力向上と共染防止のために親水性化コーティング処理されたものであった。スライドグラス法では、フィルター法と同じ水サンプルを用い、2 mL の水サンプルを遠心濃縮やパラホルムアルデヒド (PFA) による化学固定とその洗浄過程を含む一連の過程を経て細菌細胞を濃縮して、各ウェルに滴下した。最後に、スライドウォーマーを用いて風乾させることでスライドグラスに細菌細胞を接着させた。その後、同様に DPAI 染色を行い、蛍光顕微鏡で U 励起により観察した (写真 2)。

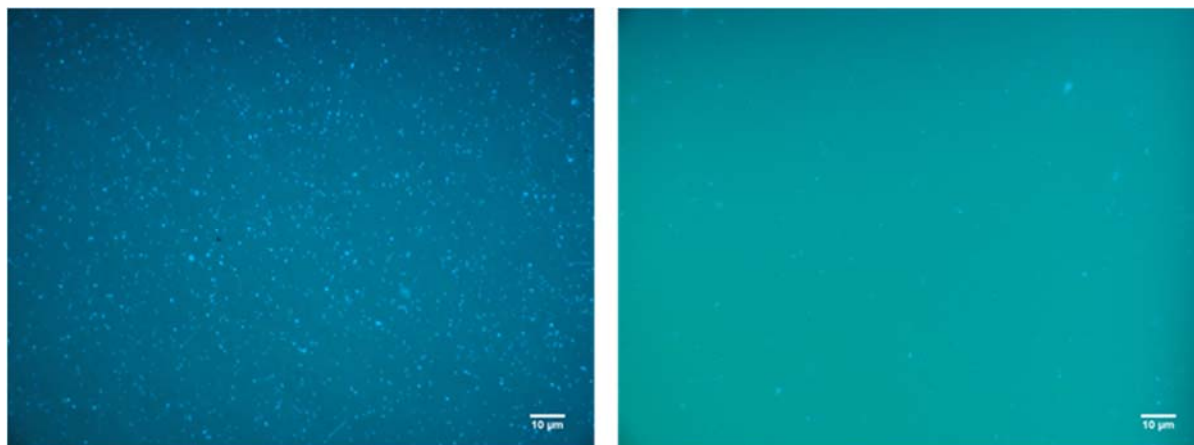


写真2 フィルター法およびスライドガラス法の比較（DAPI、U 励起）  
左：フィルター法、右：スライドガラス法、Scale bar：10 μm

写真2より、スライドガラス法では細菌細胞の多くが剥離しており、バックグラウンドが高いことが明らかとなった。一方、フィルター法では細菌細胞が十分に捕集されていたと判断した。したがって、本研究ではメンブレンフィルターを用いた EdU 法により微生物群集の増殖解析を行うこととした。

#### 4.3 EdU 取込時間の検討と温度依存性の評価

細菌の増殖活性は、現場の水温で評価を行う必要がある。琵琶湖での微生物群集の温度環境を考えると、5~30℃の範囲で温度依存的に EdU 取込み活性が増加することを確認する必要がある。また、低水温環境（冬季や深水層）において、低いと想定される増殖活性を検出できることも重要である。低水温下での低い増殖活性を検出するためには、基本的には EdU 取り込み時間を長くするしかないが、取り込み時間が長くなるほど実際の水環境の状況から乖離することになる。特に、EdU 法では EdU 取り込み後に化学固定処理を行うため、時間経過とともに進行する細菌細胞の自己融解 (autolysis) を避けることは難しく、取り込み時間をただ長くすればよいという訳でもない。

本研究では、どれくらいの培養時間が必要なのか、温度を3段階に設定して増殖活性の温度依存性を評価した。琵琶湖北湖沖帯において、表層水（現場水温 7.8 °C）を採取した。その後、遠沈チューブに 10 mL ずつ分注し EdU（最終濃度 1 μM）添加し、7°C、15°C、25°Cで遮光しながら培養した。EdU 添加後 1、3、6 時間後にサンプルをインキュベーターから取り出し、フィルター法で増殖活性を評価した。DAPI と Alexa Fluor 488 で染色されている細菌細胞を計数し、DAPI（U 励起）で検出された細胞数に対する、EdU を取り込んだ細胞数の比を求めた。15°C および 25°C で EdU を 6 時間取り込ませた際の蛍光顕微鏡写真を写真3に、温度依存性の結果を図9に示した。図9より、6時間あれば温度依存的に EdU 取り込み量が増加していることが確認できた。さらに、サンプル 10 mL で実験を開始した場合、最終的な細胞密度は 1 視野（10,000 μm<sup>2</sup>）に約 200 細胞存在しており、6 時間後であれば低温（7°C）においても、1 割程度の細胞が EdU 取り込み活性を示す結果となった。このことから、琵琶湖で想定される低水温環境下においても、EdU 取り込み活性を検出可能であることが明らかとなった。



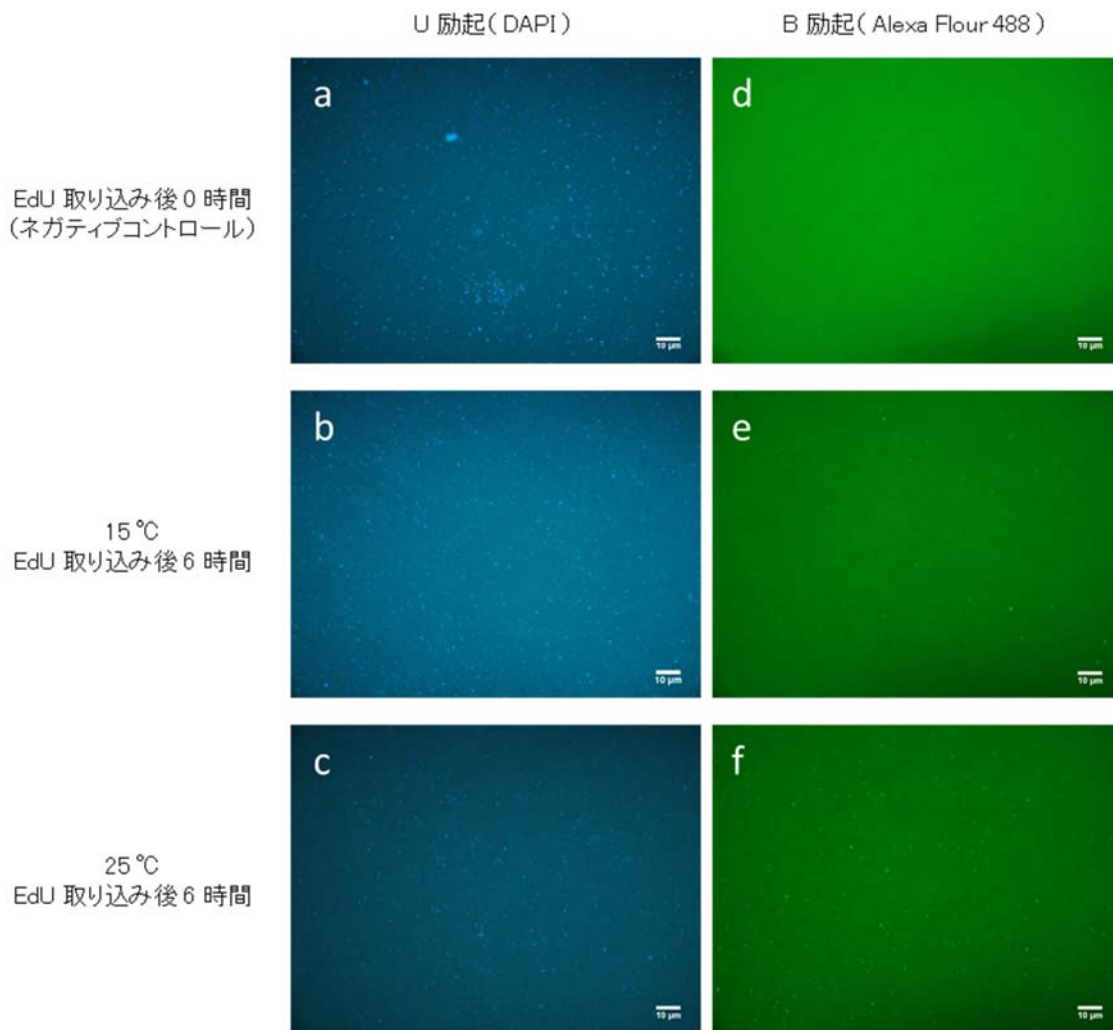


写真 3 EdU 取り込み温度の影響  
Scale bar : 10 µm

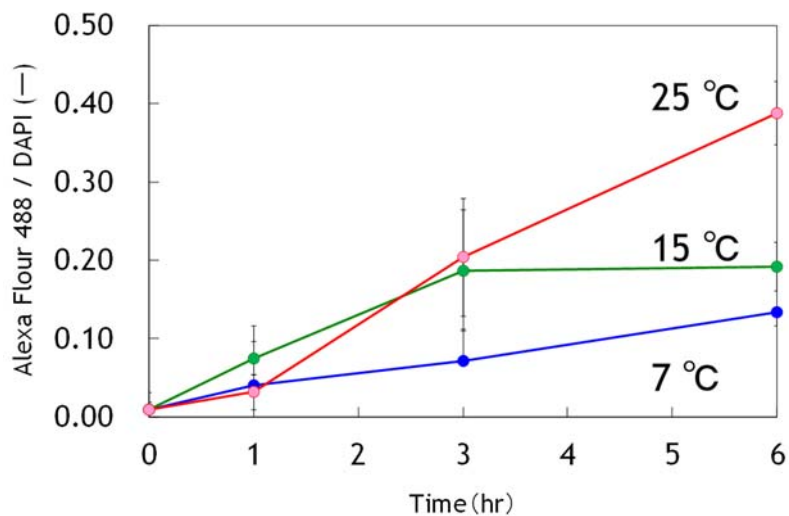


図 9 温度の違いによる EdU を取り込んだ細胞数の変化

## 5. まとめ

本研究では、微生物群集が介在する微生物炭素ポンプが長期的な炭素貯留プロセス（難分解性有機物の生産プロセス）として駆動していることに鑑みて、微生物食物網の結節点（node）として細菌が重要な鍵になると考えた。本研究のねらいは、EdUを利用して、蛍光顕微鏡観察により群集レベルだけでなく、個々の細胞レベルで増殖活性を評価することにある。平成29年度は、EdUを利用した微生物群集の増殖解析法の新規開発を目的とした。各種条件検討の結果、琵琶湖で想定される温度環境下におけるEdU取り込み活性（増殖活性）を評価可能な手法を開発できた。

今後は、細菌細胞内のrRNAを標的とした蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)と本研究で開発したEdU法を組み合わせることによって、細菌をクラス（網）レベルで増殖活性を評価できる方法に高度化していく計画である。

## 参考文献

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, 257-263.
- Fuhrman, J. A., & Azam, F. (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology*, 66(2), 109-120.
- Jiao, N., & Zheng, Q. (2011). The microbial carbon pump: from genes to ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7439-7444.
- Kepner, R. L., & Pratt, J. R. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews*, 58(4), 603-615.
- Kirchman, D., K'nees, E., & Hodson, R. (1985). Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3), 599-607.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 3094-3101.
- Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2415-2420.
- Steward, G. F., & Azam, F. (1999). Bromodeoxyuridine as an alternative to <sup>3</sup>H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples. *Aquatic Microbial Ecology*, 19(1), 57-66.
- Tada, Y., Taniguchi, A., & Hamasaki, K. (2010). Phylotype-specific growth rates of marine bacteria measured by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and fluorescence *in situ* hybridization. *Aquatic Microbial Ecology*, 59(3), 229-238.
- Thurman, E. M. (1985). Organic geochemistry of natural waters.
- Zwirgmaier, K. (2010). Detection of prokaryotic cells with fluorescence *in situ* hybridization. In *Fluorescence in situ Hybridization (FISH)* (pp. 349-

362). Humana Press, Totowa, NJ.

環境省水・大気環境局 (2011). 平成 22 年度公共用水域水質測定結果.

盛下勇 (2004). 応用原生動物学. 山海堂.

## 謝辞

本研究は、平成 29 年度公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構・水質保全研究助成のご支援を賜りました。琵琶湖での採水調査を遂行するにあたり、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの皆様のご協力を賜りました。本研究の実施に際し、京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センターの大学院生、山内渚君、沈尚君のご協力を賜りました。ここに記して、関係各位に深く感謝の意を表します。