

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 成果報告会（大阪）

平成30年3月8日

琵琶湖における微生物群集の増殖解析

京都大学大学院 工学研究科

日下部 武敏 ○ 沈 尚

謝 辞

2

- 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ご協力を賜りました。
- 本研究の実施に際して、京都大学・流域圏総合環境質研究センターの大学院生、特に、M1 山内渚 君、D1 沈尚 君のご協力を賜りました。

ここに記して、深く感謝の意を表します。

湖沼の水質問題の特性

3

環境基準達成率(%)

年度

河川 92.5%

海域 78.3%

湖沼 53.2%

環境省(2011)

- ◆ 湖沼は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うと、その影響が長期間にわたって継続する。**
- ◆ 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。
- ◆ 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。**

微生物ループと微生物炭素ポンプとウイルス分流

4

CO₂ 炭素固定

CO₂ 呼吸(分解)

古典的食物連鎖(生食連鎖)

植プラ (一次生産者)

動物プラ

高次生物

原生動物

細菌

溶存有機物 (DOM)

難分解性溶存有機物 (R-DOM)

【微生物ループ】
DOMを起点として、生元素・エネルギーが高次へ伝達される経路 (Azam et al., 1983)

【微生物炭素ポンプ】
微生物群集(細菌、古細菌)によってR-DOMが生産されているという概念 (Jiao & Zheng, 2011)

微生物群集の数と活性の評価が欠かせない!

微生物群集の計数と増殖活性評価

5

- 細菌細胞数・濃度の計数／定量法
 - ・ 核酸染色法 (AO、DAPI、SYBR Green、SYBR Gold 等) w/ EfM、CLSM、FCM
 - ・ RT-PCR、NAD測定、濁度法、乾燥菌体重量法、平板培養法、MPN法 等々
- 細胞増殖活性の評価法
 - ・ 上記方法による菌体量／濃度の時間変化から**比増殖速度** $\mu(d^{-1})$ を求める。
 - 必要細胞量が多い。
 - 培養時間を要する。
 - 菌体の洗浄、乾燥などの操作が煩雑である。
 - 培養できない微生物 (VBNC) はそもそも評価が難しい。 等々

そこで、

水環境中での増殖活性を評価する手法

が必要である。

新規DNA合成を指標とする増殖活性評価

6

- [³H]-チミジン (TdR) 取り込み法 (チミジン法) (Fuhrman & Azam, 1982)
 - ・ DNA合成前駆物質 TdR を増殖時にDNAに取り込ませる。
 - ・ 検出のために放射性同位元素で標識した³H-TdRを使用する。
 - ・ シンチレーションカウンターなどの設備が必要となる。
 - ・ 毒性のあるシンチレーションカクテルを取り扱う。
- BrdU法 (Porstmann et al., 1985)
 - ・ TdRの代替として**非放射性BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)**を使用する。
 - ・ 抗BrdU抗体で検出する(→強い透過処理)。
 - ・ チミジン法と高い相関がある。(Steward & Azam, 1999)
 - ・ 細胞 (single cell) レベルでの検出が可能である。(Pernthaler et al., 2002)
 - ・ 抗体での反応には加熱、塩酸などによる**DNA変性処理**が必要である。
 - ・ 多重染色には適さない(他のターゲットとの組合せに不適)。

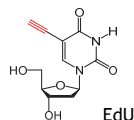
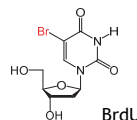
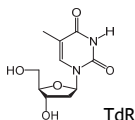
増殖活性を有する細菌の群集構造の解析には、DNA変性処理が不要で、多重染色できることが望ましい。

研究目的

7

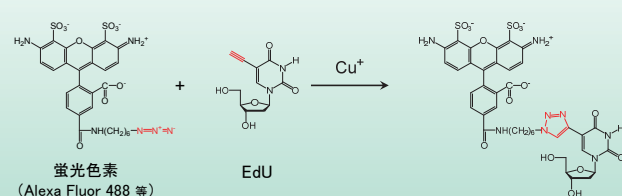
BrdU代替としてEdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine)を用いた微生物の群集レベルおよび細胞レベルでの増殖解析手法の開発

- BrdU同様、チミジン・アナログとして、DNA合成時に取り込まれる。
- Click chemistry(蛍光色素の特異標識化)による検出が可能である。
- 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。
- 透過処理が穏やかで、DNA変性処理が不要なため、多重染色が可能である。



Click-iT反応を利用した新規DNA合成の検出

8

■ 銅(Cu⁺)触媒存在下におけるアジド-アルキン環付加反応(CuAAC)

- アジドやアルキンが生体内には存在しない(bioorthogonal)官能基である。
- 室温においても水中で反応が進行し、生体内でもほとんど阻害を受けない。
- Cu⁺触媒存在下で不安定な成分を含む反応との互換性がない。
- 触媒のCu⁺が細胞に毒性を示すことがある。

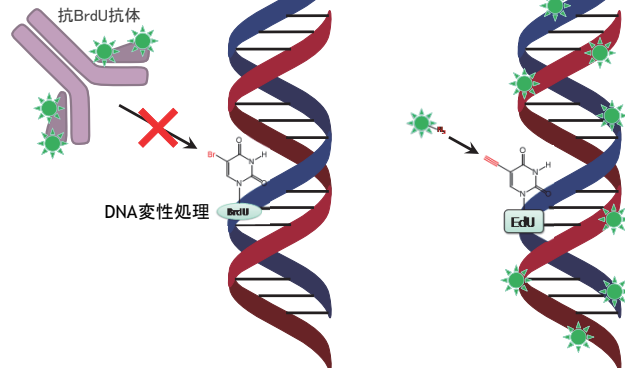
BrdU法 と EdU法の違い

9

BrdU法

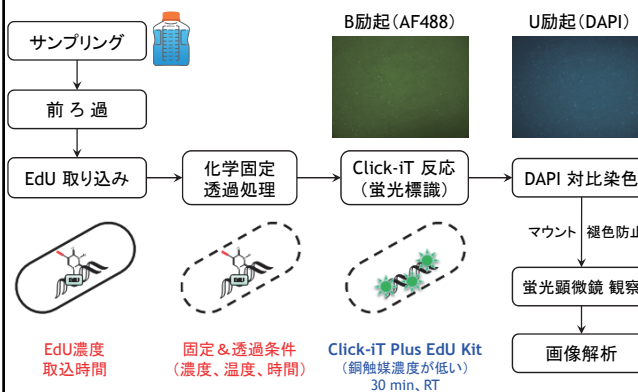
透過処理

EdU法



EdU法のプロトコール(概要)

10



採水調査

11

■ 琵琶湖北湖 沖帯

- 調査船「びわかぜ」(滋賀県)
- 表層水(0.5 m)、深層水(60 m)
- SUSバケツ、バンドーン採水器

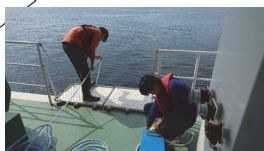
今津沖中央(17B)

N、P環境基準点
全水深 約90 m

■ 唐橋

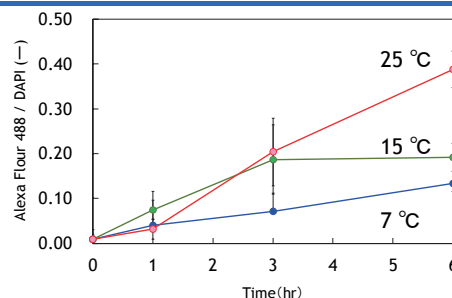
- 表流水
- 各種検討実験に使用

唐橋(河川水)



EdU 取り込み条件の検討

12



- EdU濃度を 1 μ M で、培養を 6 時間することで、琵琶湖の微生物群集の増殖活性を計測できた。
- Poly L-lysine (PLL) でコーティングしたポリカーボネート製メンブレン(Isopore)を用いることで定量的に細菌細胞を捕集できた。

細菌生産量 (bacterial production) の推定

13

■ 手順

① EdU取り込み曲線から比増殖速度 $\mu(\text{d}^{-1})$ を算出

② 湖水サンプルの細菌細胞濃度 (cells/mL) をDAPI核酸染色により計数

③ TEM法により細菌細胞体積分布を計測し、平均細胞体積 ($\mu\text{m}^3/\text{cell}$) を算出

④ 換算計数 ($\text{fgC}/\mu\text{m}^3$) により、細菌炭素生産速度 ($\mu\text{gC}/\text{L}/\text{d}$) を推定 (Nagata, 1986)

	7 °C	15 °C	25 °C
細菌炭素生産速度 ($\mu\text{gC}/\text{L}/\text{d}$)	2.7×10^{-1}	5.9×10^{-1}	7.5×10^{-1}
一次炭素生産速度 ※ ($\mu\text{gC}/\text{L}/\text{d}$)	1.1×10		

※ 岡本ら (2012) の一次生産量 (107.337 tonC/y) から算出

まとめ

14

BrdU代替としてEdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) を用いた微生物の群集レベルおよび細胞レベルでの増殖解析手法の開発

✓ EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) 取り込み法における条件検討を行い、新規DNA合成量を指標とする細菌増殖活性を検出、定量できるようになった。

✓ 粗い推定ながらも、琵琶湖北湖の細菌炭素生産速度を算出した。

【今後の計画】

□ 琵琶湖における微生物群集の増殖解析により、その時空間分布を把握する。

□ 増殖活性の高い微生物群集の系統解析 (FISH 等) を組合せた評価により、詳細な微生物増殖構造を明らかにしていく。

4-3