

平成30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

平成31年3月22日(金)
大阪・ドーンセンター

研究分野: 流域水環境管理のための水質指標に関する調査研究

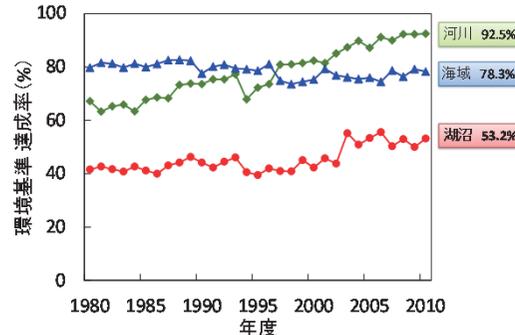
琵琶湖における微生物群集の増殖解析

京都大学大学院 工学研究科
日下部 武敏



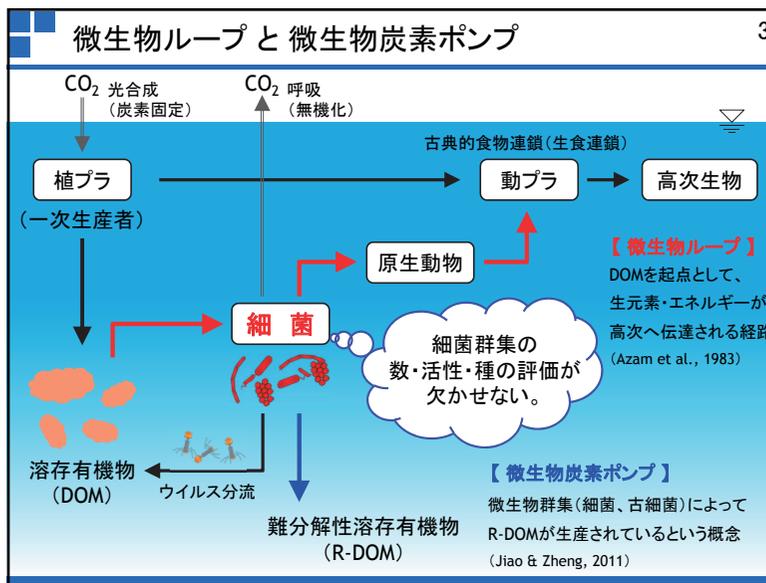
研究背景 ～湖沼の水質問題の特性～

2



環境省(2011)

- ◆ 湖沼は閉鎖性が高いため滞留時間が長く、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。



細菌群集の計数と増殖活性評価

4

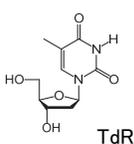
- 細菌細胞数・濃度の計数/定量法
 - ・ 核酸染色法 (AO, DAPI, SYBR Green II/SYBR Gold 等) w/ EfM, CLSM, FCM
 - ・ 濁度法、乾燥菌体重量法、平板培養法、MPN法、RT-PCR、NAD測定 等々
- 細胞増殖活性の評価法
 - ・ 上記方法による菌体量/濃度の時間変化から比増殖速度 μ (d⁻¹) を求める。
 - 必要細胞量が多い。
 - 培養時間を要する。
 - 菌体の洗浄、乾燥などの操作が煩雑である。
 - そもそも培養できない微生物(VBNC)は評価が難しい。

水環境中における細菌群集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 5

■ $[^3\text{H}]$ -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。



TdR

■ BrdU法 (Porstmann et al., 1985)

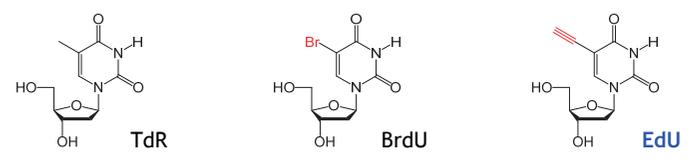
- TdRの代替として非放射性BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)を使用する。
- 抗BrdU抗体で検出する(→透過処理)。
- チミジン法と高い相関がある。(Steward & Azam, 1999)
- 細胞(single cell)レベルでの検出が可能である。(Perthaler et al., 2002)
- 抗体での反応には加熱、塩酸などによるDNA変性処理が必要である。
- 多重染色には適さない(他のターゲットとの組合せに不適)。

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(他の手法との組合せ)できることが望ましい。

研究目的 6

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

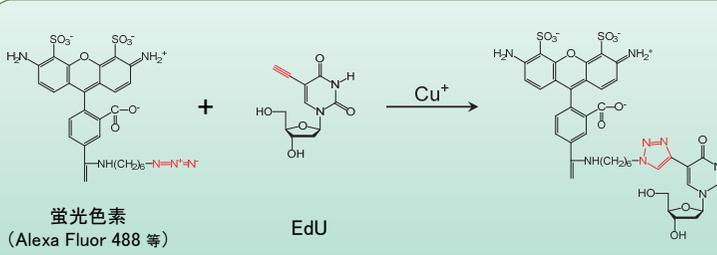
- BrdU同様、チミジン・アナログとして、DNA合成時に取り込まれる。
- Click chemistry(蛍光色素の特異標識)による検出が可能である。
- シンプルなプロトコルで高解像度のデータを取得することが期待できる。
- 透過処理が穏やかで、DNA変性処理が不要なため、多重染色が可能である。



TdR BrdU EdU

Click反応を利用した新規DNA合成の検出 7

■ 銅(Cu^+)触媒存在下におけるアジド-アルキン環付加反応(CuAAC)



蛍光色素 (Alexa Fluor 488 等) EdU

- 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 8

BrdU法

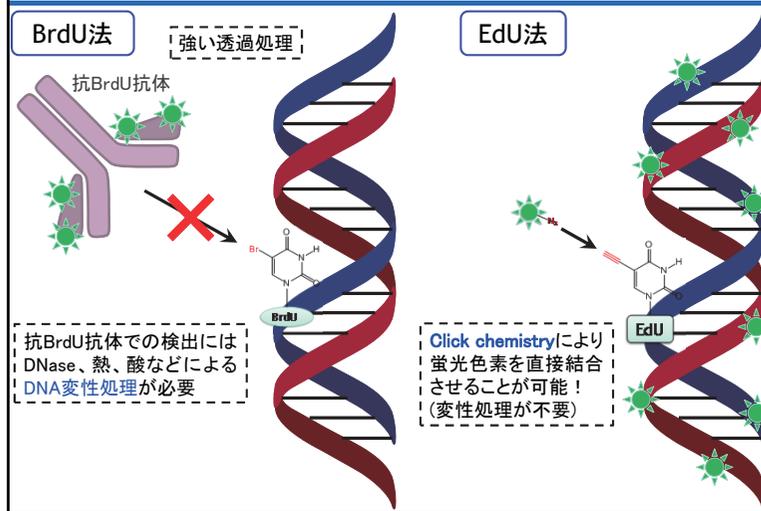
抗BrdU抗体

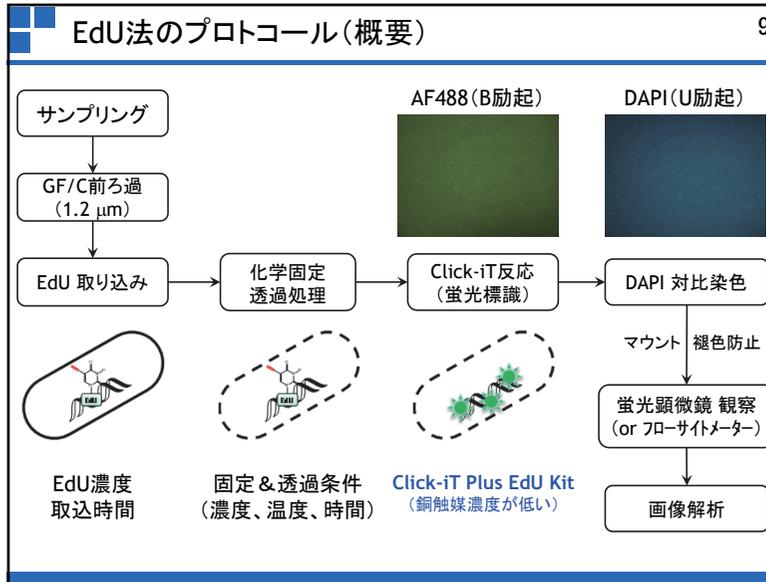
強い透過処理

抗BrdU抗体での検出には DNase、熱、酸などによる DNA変性処理が必要

EdU法

Click chemistryにより 蛍光色素を直接結合させることが可能! (変性処理が不要)





琵琶湖細菌群集の増殖解析における仮定 10

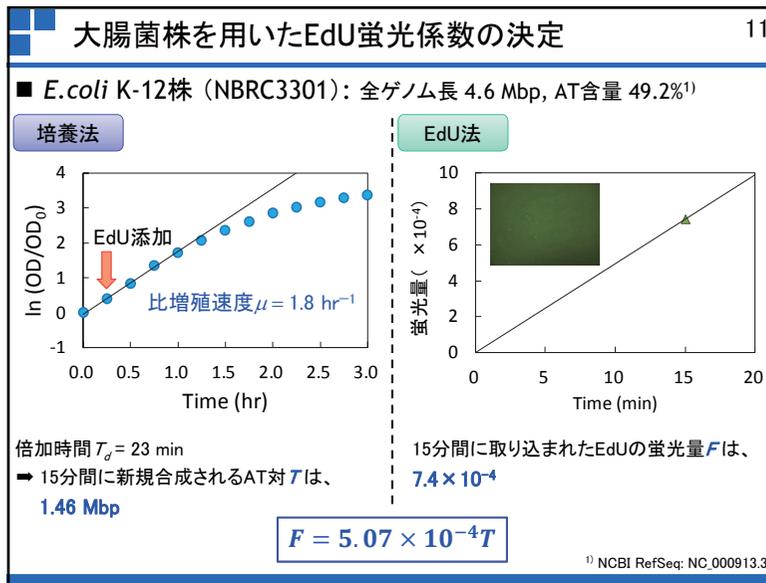
- 琵琶湖の細菌群集は**対数増殖**をしている。

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad N(t) = N_0 \times e^{\mu t} \quad (\mu = \text{一定})$$
- DNA合成速度は一定で、**全ゲノム長が2倍**になったときに細胞分裂する。

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$
- 増殖速度の温度依存性は、 **Q_{10}** 値を用いて説明できる。

$$Q_{10} = \left(\frac{T_2}{T_1}\right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$
- 琵琶湖細菌のゲノム長を**4.1 Mbp**、GC含量を**50.5%**とする¹⁾。

¹⁾ National Center for Biotechnology Information, US



EdU法による琵琶湖細菌群集の増殖解析 12

- 採水
2018年1月(冬季)・8月(夏季)、琵琶湖今津沖中央(17B)、水深 0.5 m
- EdU取り込み条件
 - 現場水温(冬季 8.6°C, 夏季 27.1°C)
 - 取り込み培養6時間

DAPI(核酸対比染色)

AF488 (EdU取り込み活性)

琵琶湖細菌群集の増殖活性の評価

13

- ImageJを用いてAF488画像を16-bitグレースケールに変換した後、蛍光量 F を数値化
- 換算式 $F = 5.07 \times 10^{-4}T$ を用いて、新規AT対合成量 T に変換

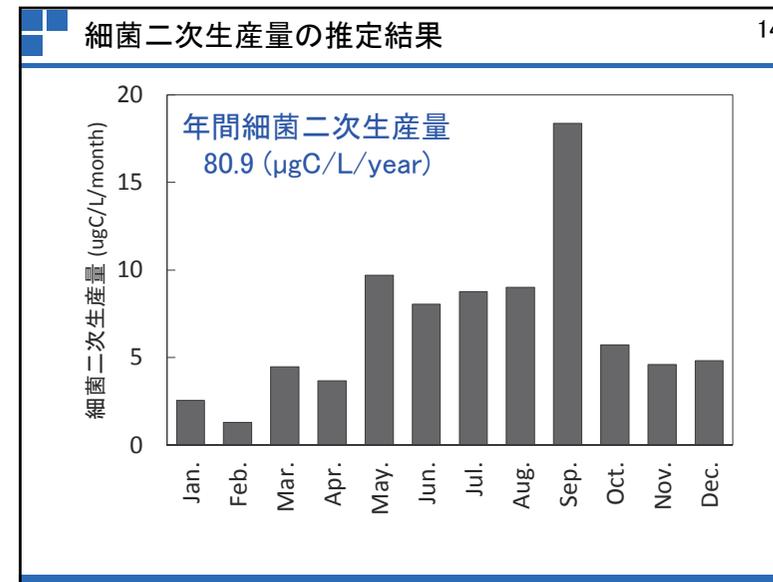
(琵琶湖細菌群集:ゲノム長 4.1 Mbp、GC含量 50.5%)

$$\mu \text{ (hr}^{-1}\text{)} = \begin{cases} 3.2 \times 10^{-2} & \text{(夏季)} \\ 2.5 \times 10^{-2} & \text{(冬季)} \end{cases}$$

$Q_{10} = 1.14$

- ・全菌数 (DAPI法)
- ・細胞容積 (TEM法)
- ・細菌炭素密度 (Nagata, 1986)
- ・水温データ (滋賀県)

細菌二次生産量の推定

まとめ

15

- BrdU代替としてEdUを用いた増殖解析手法の開発
 - ✓ チミジンアナログとしてEdUを用いることで、DNA変性処理が不要
 - ✓ 琵琶湖北湖における細菌群集の増殖活性(μ)を評価
 - ✓ 年間細菌二次生産量を 80.9 $\mu\text{gC/L/year}$ と推定
- 今後の計画
 - ✓ TSA増感法などによる感度向上
 - ✓ EdU増殖解析法に、セルソーティングおよび菌叢解析を組み合わせることで、増殖活性の高い細菌種の探索・同定

謝辞

16

- 平成30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B4・吉野魁人君、D2・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。

ご清聴ありがとうございました。

