

氏名	ふるた せいこ 古田 世子
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	平成27年 3月20日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科専攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学位論文題目	マンガン酸化細菌 <i>Bosea</i> sp. BIWAKO-01 株の培養特性 及び琵琶湖底層部におけるメタロゲニウム粒子生成 機構に関する研究
指導教員	宮田 直幸
論文審査委員	主査 宮田 直幸 副査 尾崎 保夫 片野 登 特別 内海 真生 (筑波大学)

論文内容要旨

琵琶湖北湖（今津沖中央地点）の水深 90 m 付近では、2002 年 10 月に溶存酸素（DO）濃度が 0.9 mg/L まで低下し、その後メタロゲニウム粒子と呼ばれるフィラメント状マンガン（Mn）酸化物粒子の発生が観測されるようになった（図 1）。メタロゲニウム粒子は世界中の成層湖や海域で発生が報告され、成層下での Mn や種々の微量元素元素等の循環に影響を及ぼす重要な因子として知られている。その生成機構として、低酸素化した底質表面から溶脱した Mn^{2+} イオンが、直上の酸化層で Mn 酸化細菌により酸化されて粒子を形成すると考えられているが、その実態は不明である。本研究では、琵琶湖北湖底層部におけるメタロゲニウム粒子の生成機構を明らかにすることを目的としている。

1. 琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子の発生状況と水質との関連性

今津沖中央地点の水深約 90 m で採取したメタロゲニウム粒子内には細胞構造は観察されず、粒子自体は微生物細胞ではないことを確認した。メタロゲニウム粒子のフィラメント部分を解析した結果（図 2）、バーネサイ (δ - MnO_2) 様 Mn 酸化物で構成されていることが示された。

2002～2013 年度における今津沖中央地点水深約 90 m のメタロゲニウム粒子数、DO 及び pH の経年変化（図 3）から、DO 及び pH が低値の時期にメタロゲニウム粒子が発生する傾向が認められた。しかし、メタロゲニウム粒子発生数と DO、または pH 値との相関係数は、各々 $r = 0.46$ ($p < 0.05$) 及び $r = 0.41$ ($p < 0.05$) であり、負の相関が認められたが、概して低いことが明らかになった。このことから、北湖底層部でのメタロゲニウム粒子の発生には、DO や pH に加えて別の環境因子が関与していると推察された。

2. Mn 酸化細菌 BIWAKO-01 株の単離と特徴付け

湖水を分離源として、メタロゲニウム粒子を生成する Mn 酸化細菌 BIWAKO-01 株を単離した。本菌株は、*Bosea* 属 (α -*Proteobacteria* 綱) に帰属されることが明らかになった（図 4）。本菌株を用いて、これまでに取得が困難であった安定なメタロゲニウム粒子生成培養系を確立することに成功した。

BIWAKO-01 株の培養液中で生成したメタロゲニウム粒子（図 5A）には、内部に菌体が存在する粒子（図 5B）と空洞の粒子が観察され、培養の経過日数とともに内部に菌体を保持する粒子は減少していた。メタロゲニウム粒子の構造に関して、フィラメント部分は酸性多糖を含むことが示され、さらにレクチンアッセイにより、 α -マンノース、 α -グルコース、ガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルグルコサミンを構成糖として含むことが示唆された（図 5C, D）。フィラメント部分の微細構造を解析し

た結果、ナノシート（図 5E）及びナノロッド構造（図 5F）が観察された。後者は、電子回折パターンから Mn(III)酸化物であるマンガナイト（ γ -MnOOH）と同定された。pH 条件と Mn^{2+} 濃度を考慮して、マンガナイトは微生物作用により生じたバーネサイト（ナノシート）が培地中に残存する高濃度 Mn^{2+} と反応して生成した二次生成物であると結論付けた [$Mn(IV) + Mn(II) \rightarrow 2 Mn(III)$]。低濃度 Mn^{2+} 存在下ではナノシート構造のみが観察され、琵琶湖底層部の粒子の構造特性とよく一致することが明らかになった。

3. BIWAKO-01 株を用いたメタロゲニウム粒子生成要因の解析

BIWAKO-01 株によるメタロゲニウム粒子生成に及ぼす pH 及び O_2 濃度の影響について試験した結果、弱酸性条件（pH 5.5~6.5）及び O_2 制限条件で Mn 酸化及びメタロゲニウム粒子生成が促進することが明らかになった（図 6 及び 7）。さらに、BIWAKO-01 株の培養には M3 半流動培地（100 mg/L 麦芽エキス、40 mg/L 酵母エキス、0.5 mM $NaHCO_3$ 、500 mg/L 寒天、2 mM $MnSO_4$ ）を用いたが、500 mg/L 寒天を添加しない培地では Mn 酸化が起こらずメタロゲニウム粒子を生成しないことが明らかになった。寒天以外では、アガロース、ペクチン、コーンスターチ等で粒子を生成したが、グルコースやガラクトース等の単糖では生成せず、メタロゲニウム粒子の生成には多糖の存在が必要であることが初めて示された。BIWAKO-01 株は菌体増殖の炭素源やエネルギー源としては多糖を利用せず、未知の機能の関与が考えられた。琵琶湖北湖底層部においてこれらの環境条件が整ったとき、Mn 酸化細菌の働きによりメタロゲニウム粒子が発生すると推察された。

4. 琵琶湖北湖でのメタロゲニウム粒子生成における植物プランクトンの関与

既往研究により、近年琵琶湖では細胞外にゲル状の粘質鞘（多糖）を持つ植物プランクトンが増加傾向にあることが示されている。本研究では、発生した植物プランクトンが湖底に沈降し、多糖の供給源としてメタロゲニウム粒子の生成に関与しているとの仮説を立てて検討を行った。実際に、底層部の懸濁物質を顕微鏡で観察すると、多くのメタロゲニウム粒子が粘質鞘様のゲル状物質に付着して存在することが示された。また、2002 年以降の北湖における植物プランクトン発生量の測定データを整理し、メタロゲニウム粒子生成との関連性を検討した結果、メタロゲニウム粒子が発生する数か月前に植物プランクトン総細胞容積が増加していること（図 8）、年度毎のメタロゲニウム粒子発生数と植物プランクトン総細胞容積には比較的高い正の相関関係があることが明らかになった（ $r = 0.69$; $p < 0.05$ ）（図 9）。発生した植物プランクトンを分類し、各年度に占める割合を求めたところ、殆どの年では緑藻類が主要な植物プランクトンであった（表 1）。2009 年度（18%）と 2013 年度（17%）は緑藻の占める割合が低かったため、この 2 年分のデータを除外して再度相関係数を求めると非常に高い相関関係が得られた（ $r = 0.90$; $p < 0.05$ ）。さらに、緑藻 *Staurastrum arctiscon* を対象とした生分解試験の結果、細胞外の粘質鞘は 2 か月を経ても一定量が残存することが明らかになった。最後に、BIWAKO-01 株の培養時に寒天に替えて粘質鞘を持つ *S. dorsidentiferum* または *S. arctiscon* の培養藻体を添加し、メタロゲニウム生成への影響を検討した結果、BIWAKO-01 株は培養藻体共存下でメタロゲニウム粒子を生成した（表 2、図 10A）。しかし、粘質鞘を洗浄除去した培養藻体を添加してもメタロゲニウム粒子は生成しないことが示された（表 2、図 10B）。これらの結果は、植物プランクトンの粘質鞘が湖底でのメタロゲニウム粒子生成に関与するとの仮説を支持するものである。

本研究では、BIWAKO-01 株の培養特性及び現地での水質調査データ等の検討により、琵琶湖北湖でメタロゲニウム粒子の生成をもたらす環境因子として、DO、pH 及び多糖（植物プランクトン）が重要であることを明らかにした。特に、琵琶湖底層部で植物プランクトンが多糖の供給源として関与していることが強く示唆され、メタロゲニウム粒子生成機構に関する新しい知見を提示することができた。本研究の成果は、他の成層湖や海域でのメタロゲニウム粒子生成を理解するための重要な手掛かりとなり得る。また、国内の湖沼において底層部環境の質的評価が非常に重要な課題である。本研究により、近年、琵琶湖底層部がどのような環境に変化してきているのか、メタロゲニウム粒子生成の側面から捉えることができ、今後、底層部環境の保全対策のための基礎データとして活用が期待される。

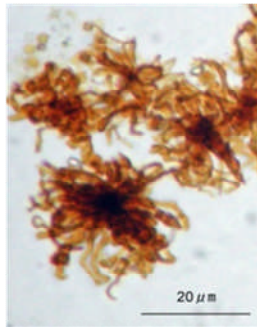


図1. 琵琶湖今津沖中央地点（水深90m）で採取したメタロゲニウム粒子（2008/10/6）
Bar=20 μm

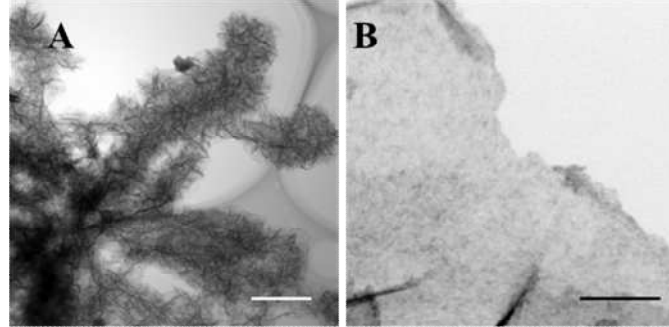


図2. 今津沖中央地点で採取したメタロゲニウム粒子のSTEM像（2013/1/7）
Bar=2 μm (A); 50 nm (B)

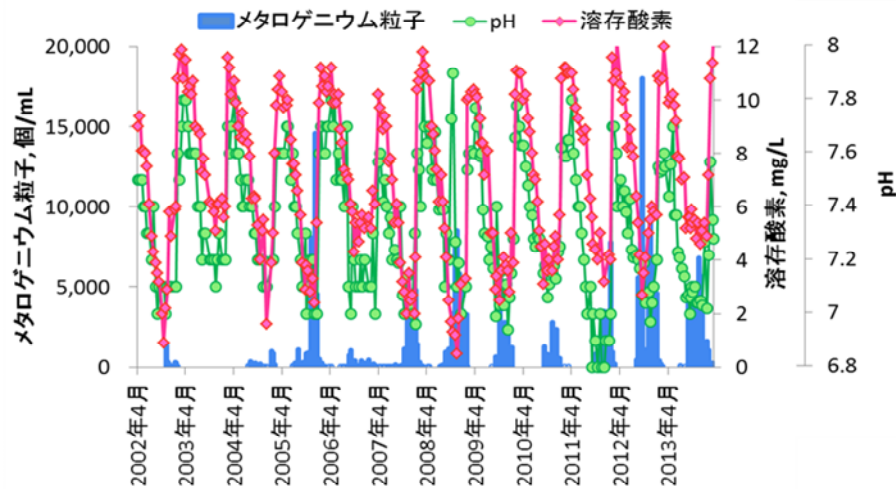


図3. 今津沖中央地点におけるメタロゲニウム粒子発生数、DO及びpHの経年変化（2002年度～2013年度）

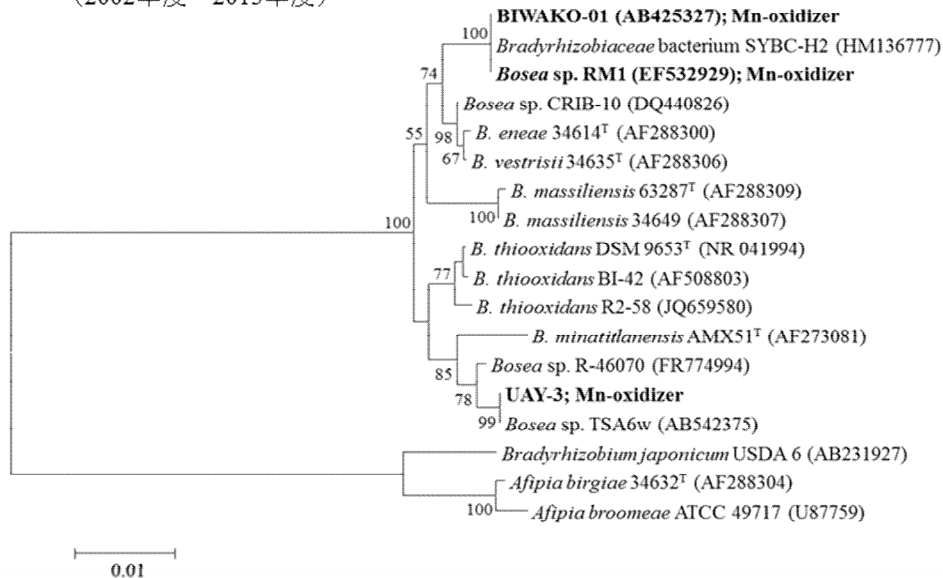


図4. 16S rDNA遺伝子配列に基づくMn酸化細菌BIWAKO-01株及び*Bosea*属近縁株の分子系統樹（近隣結合法により作成/RM1株及びUAY-3株は既知のMn酸化細菌）

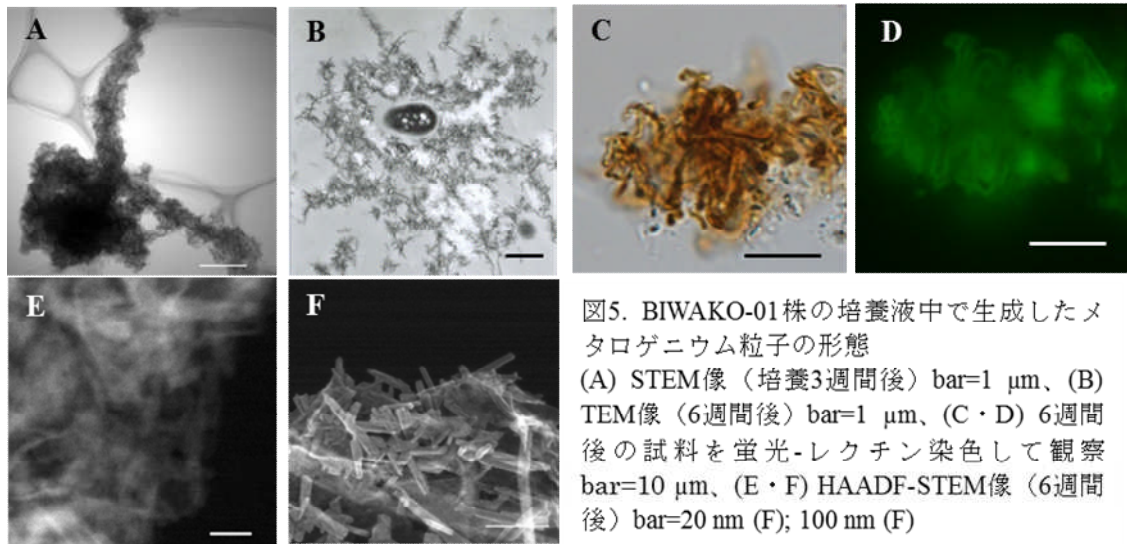


図5. BIWAKO-01株の培養液中で生成したメタロゲニウム粒子の形態
 (A) STEM像 (培養3週間後) bar=1 μm 、(B) TEM像 (6週間後) bar=1 μm 、(C・D) 6週間後の試料を蛍光-レクチン染色して観察 bar=10 μm 、(E・F) HAADF-STEM像 (6週間後) bar=20 nm (E); 100 nm (F)

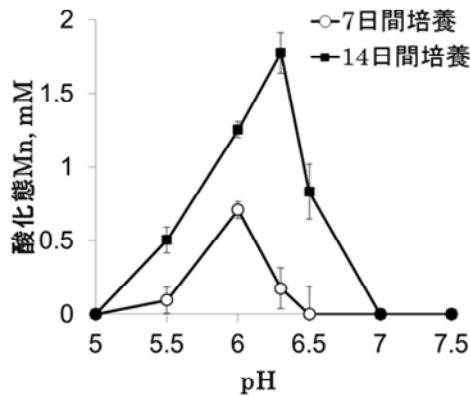


図6. BIWAKO-01株によるMn酸化物生成に及ぼすpHの影響
 気相中の O_2 濃度=10%；平均値 \pm SD (n=3)

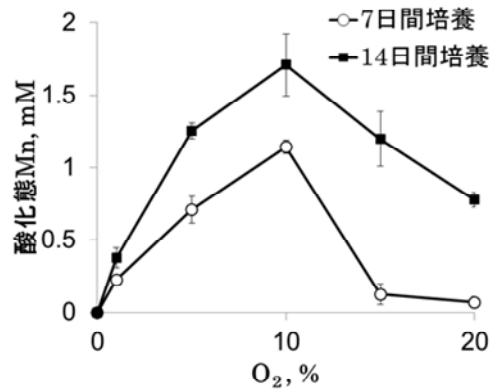


図7. BIWAKO-01株によるMn酸化物生成に及ぼす気相中 O_2 濃度の影響
 pH=6.0；平均値 \pm SD (n=3)

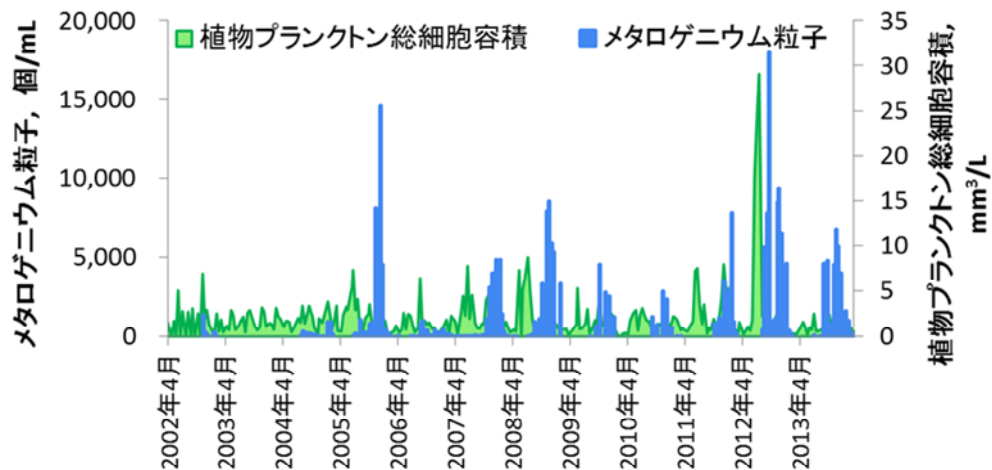


図8. 今津沖中央地点水深約90 mにおけるメタロゲニウム粒子数と表層0.5 mでの植物プランクトン総細胞容積の経年変化 (2002年度~2013年度)

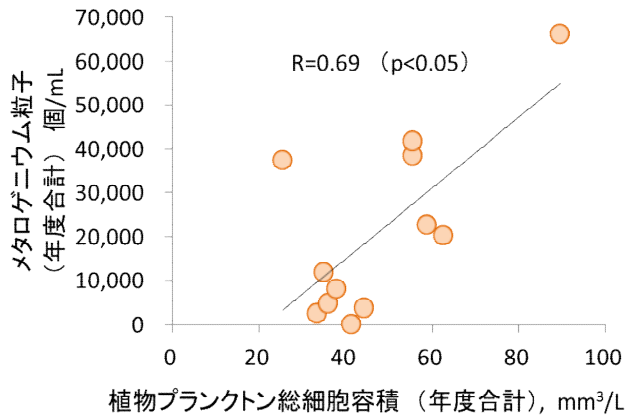


図 9. メタロゲニウム粒子数年度合計値と植物プランクトン総細胞容積の年度合計値の相関 (2002年度～2013年度)

表 1. 植物プランクトン総細胞容積に占める各藻類種の割合 (単位: %)

	緑藻	珪藻	藍藻	その他	<i>S. dorsidentiferum</i> *
2002年度	66	11	6	16	45
2003年度	34	25	5	36	22
2004年度	50	18	14	18	27
2005年度	58	15	9	17	26
2006年度	56	18	5	21	10
2007年度	73	9	7	11	30
2008年度	60	12	10	17	36
2009年度	18	33	18	32	7
2010年度	41	25	15	19	33
2011年度	63	15	11	11	51
2012年度	82	7	4	7	75
2013年度	17	48	18	16	10
2002-2013年度の全平均値	57	17	9	17	36

*: *S. dorsidentiferum* は、緑藻に含まれる

表 2. 緑藻 *S. dorsidentiferum* 藻体を添加した培地中での BIWAKO-01 株による Mn 酸化物の生成 (培養 2 週間; 平均値±SD (n=3))

粘質鞘	添加細胞数 (cell/mL)	酸化態 Mn (mM)
有り	1.6×10^4	1.2 ± 0.3
無し*	1.5×10^4	<0.1

* 細胞外粘質鞘を洗浄除去した藻体を添加

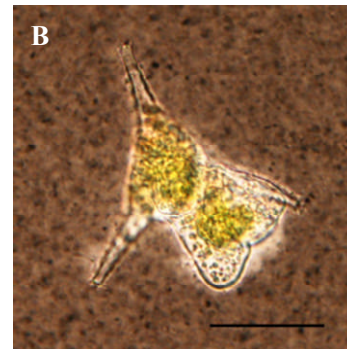
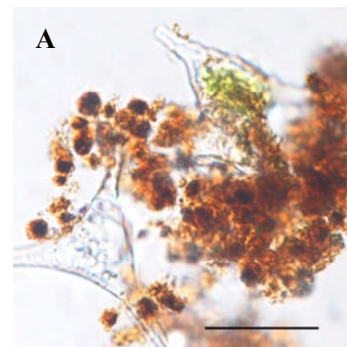


図 10. *S. dorsidentiferum* 共存下における BIWAKO-01 株によるメタロゲニウム粒子生成 (培養 2 週間後)

(A) 粘質鞘をもつ藻体を添加、
(B) 粘質鞘を洗浄除去した藻体を添加

Bar=30 μm

論文審査結果要旨

近年、湖沼底層部の低酸素化現象が全国的に問題になっている。湖沼底層部の低酸素化が栄養塩や金属元素の循環に与える影響や底生生物への生態影響を評価することが重要な課題である。湖沼底層部の低酸素化が引き起こす一つの現象として、底質からの Mn^{2+} イオンの溶出と直上の酸化層でのフィラメント状Mn酸化物粒子（メタロゲニウム粒子）の生成が挙げられる。生成したメタロゲニウム粒子はリン酸や種々の金属イオンを取り込むため、湖沼底層部での物質循環の一端を担う重要な因子である。しかしながら、その生成には微生物によるMn酸化作用が関与するとされているが実態は解明されておらず、どのような環境条件で生成するか詳細は不明である。本研究では、琵琶湖北湖底層部におけるメタロゲニウム粒子生成機構を明らかにすることを目的として検討を行い、以下の成果を得ている。

- 1) 琵琶湖水よりMn酸化細菌*Bosea* sp. BIWAKO-01株を単離し、これまでに取得が困難であったメタロゲニウム粒子を安定的に生成する微生物培養系を確立した。生成した粒子のフィラメント部分は酸性多糖を含む細胞外ポリマーにバーネサイト (δ - MnO_2) 様Mn酸化物が沈着した構造を有し、琵琶湖底層部で発生した粒子のMn酸化物の構造とよく一致することを明らかにした。
- 2) BIWAKO-01株の培養特性の解析により、メタロゲニウム粒子の生成は特定の酸素条件（溶存酸素として2~6 mg/L）及びpH条件（5.5~6.5）で促進されることを明らかにした。さらにBIWAKO-01株によるMn酸化及びメタロゲニウム生成には寒天のような多糖類の存在が必要であることを明らかにした。
- 3) 琵琶湖底層部でのメタロゲニウム粒子生成に関して、粘質鞘（細胞外多糖）を有する植物プランクトンが表層部で増殖した後底層部に沈降し、多糖の供給源として機能しているとの新しい仮説を提唱した。琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子発生量と植物プランクトンバイオマスには正の相関があること、BIWAKO-01株が粘質鞘を持つ緑藻の共存下でメタロゲニウム粒子を生成したこと等、仮説を支持する結果を示すことができた。

本研究は、湖沼底層部におけるメタロゲニウム粒子生成を室内モデル系で再現して詳細に試験するとともに、現地で取得されてきた水質データを解析することにより、これまで不明であったメタロゲニウム粒子生成をもたらす環境因子を明らかにしている。特に植物プランクトン（粘質鞘）が琵琶湖底層部において多糖の供給源として機能することを示したことは意義深く、世界中で報告されている成層湖でのMn循環の一端を解明する重要な手掛かりとなり得ることから、陸水学、生物地球化学分野での学術的価値は大きいといえる。一方で国内では、湖沼底層部環境の質的評価が重要な課題であり、本研究は、近年の琵琶湖底層部がどのような環境に変化してきているのか、メタロゲニウム粒子生成の側面から捉えている。審査委員会では、研究成果が琵琶湖や他の国内湖沼の保全対策のための基礎データとして今後活用されることを期待している。また学位論文発表会では、研究成果とその意義について明瞭かつ分かり易く説明し、質疑に対して十分な回答ができていた。これらのことから博士号学位を授与するに値すると判断した。