

②

海洋性低栄養細菌の低栄養環境 への適応機構

吉 永 郁 生

1991

目 次

第 I 章	序 論	1
第 II 章	外洋海域とサンゴ礁海域の細菌群集によるタンパク質および DNA 合成活性の比較	6
第 III 章	通性および偏性低栄養細菌分離株の生理的特性	27
III - 1	偏性低栄養細菌および通性低栄養細菌の単離、およびそれら細菌の種々の有機物濃度培地における増殖生理	28
III - 2	KE10 株の低有機物濃度培地への増殖適応	43
III - 3	飢餓状態における通性低栄養細菌 KE10 株の生理的特性	51
III - 4	高栄養環境下, 低栄養環境下および飢餓環境下の KE10 株の生理的および形態的特性	64
III - 5	高栄養環境下, 低栄養環境下および飢餓環境下における通性低栄養細菌のロイシン取り込み機構の解析	79
III - 6	概 要	94
第 IV 章	高濃度有機物培地における低栄養細菌の増殖阻害	96
IV - 1	異なる基質を用いた培地による MPN 計数値の比較	97
IV - 2	単一アミノ酸・ペプチド培地における通性低栄養細菌 KE10 株 O-CELL の増殖特性	106
IV - 3	高濃度グリシンによる他のアミノ酸の同化阻害	111
IV - 4	概 要	120
第 V 章	総 括	122
	Summary	125

謝 辞

参考文献

第 I 章 序 論

1900年初頭にはじまる海洋微生物の研究は、当初は土壤微生物学の模倣の枠を出るものではなかったが、近年、海洋志向の研究者の増加に加え、微生物研究のための機器の発達などにより海洋独自の多くの新しい発見がなされるようになってきた。その中の重要なものの一つとして、Hobbie et al. (1977) による蛍光顕微鏡を用いた直接検鏡法の開発があげられる。従来、海洋環境、とりわけ溶存態有機物 (Dissolved Organic Material, DOM) 量がきわめて希薄な外洋低栄養海域においては、有機物が比較的豊富な微粒子表面を持つ植物プランクトンやその他の懸濁物が主な細菌生産の場となり、従属栄養細菌の大部分はその懸濁物に付着した付着細菌として生存していると考えられていた (Wiebe & Pomeroy 1972)。しかしながら、蛍光顕微鏡により、水中の細菌を比較的容易に観察することが可能になり、外洋海域を含むほとんどの海域で、常に 1ml 当り 10^6 cells 程度の細菌が存在し、しかもその大部分が懸濁物に付着していない浮遊細菌である事が明らかに (Hobbie et al. 1977, Porter & Feig 1980), 海洋環境の微生物群集に対する認識の変更が迫られることになった。

水圏の食物連鎖という観点からみた場合、植物プランクトンよりも体組成中の窒素含有比が高く (Banse 1974, Fukami et al. 1981), 栄養価が高い細菌が、動物プランクトンにとって重要な食料となっているのではないかという考え方は以前からあり (Fenchel & Harrison 1976, Fenchel 1984), 懸濁粒子の分解過程において付着細菌の増殖が結果的に懸濁粒子の窒素含有比を高くし、栄養価を高めているという報告もある (Harrison & Mann 1975, Fukami et al. 1981, 1985)。その場合も生態学上重要なのは付着細菌であり、浮遊細菌の重要性は認識されてはいなかった。しかし、Fenchel (1982) は体長 $5\sim 10\mu\text{m}$ 程度の従属栄養性微細鞭毛虫 (Heterotrophic nanoflagellate, HNF) が、細菌補食者、特に浮遊細菌補食者として食物連鎖上の重要な地位を占めていることを明らかにし、「微生物食物連鎖 (microbial food chain)」における一次生産者としての浮遊細菌の重要性が改めて評価されるようになってきた (Azam et al. 19

83, Sieburth 1984)。同時にこれら HNFが海洋環境中に多数存在し、しかも高い細菌補食活性を持っていることから、餌としての浮遊細菌もかなり高い細菌生産活性を持っていないなければならないことが示唆された (MacManus & Fuhrman 1988, 今井 1990)。また、外洋環境を含むほとんどの海域で、従属栄養細菌の生産活性が、その水域の植物プランクトンの光合成活性の、実に 30%以上に及んでいることも明らかになってきた (Cole et al. 1988)。

それでもなお、大多数の浮遊細菌は死滅しているか、休眠状態あるいは飢餓状態にあって増殖はしておらず、高濃度の有機物環境 (懸濁物表面等) に偶発的に遭遇した際にのみ増殖を開始するのではないかという考え方は根強く残っており (Stevenson 1978, Morita 1985, 1986), 実際の海洋環境において従属栄養活性の主体となっているのは数量的には少数派である付着細菌であろうという説 (Marshall 1979, Kjelleberg et al. 1987) の支持者は依然として後を絶たない。一方, Hodson et al. (1981) は、ろ過法によって海水中の微小粒子を分画して、各画分について生産活性を測定し比較することによって、海洋環境の細菌生産活性のうちかなりの部分が $1.2 \mu\text{m}$ 以下の画分、つまり浮遊細菌、によることを明らかにし、海洋環境の従属栄養細菌活性の主体となっているのは付着細菌ではなく浮遊細菌であろうと主張している (Hodson et al 1981, Wangersky 1984)。

さらに, Griffith et al. (1990) は同様の方法を用いることによって、沿岸域の比較的富栄養な海域では全体の 50~80%の細菌生産が付着細菌によるものであるが、沖合い海域では浮遊細菌による細菌生産が全体の 80~99%を占めることを報告している。その他、沈降粒子上の細菌とその周囲の海水に浮遊している細菌の間で個々の細菌当りの細菌生産活性にほとんど差がみられないということが外洋海域 (Karl et al. 1988) および室内実験 (Jacobsen & Azam 1984) で観察されており、また海洋環境中の沈降粒子の分解・可溶化にも浮遊細菌が大きく関与していること (Cho & Azam 1988) などから、細菌の生存戦略として「自然環境中の浮遊細菌は飢餓状態にあり、増殖しておらず、懸濁物に付着した際にのみ増殖を開始する」という説 (Marshall 1979) は少なくとも外洋においては否定し得るものと

思われる。さらにマイクロオートラジオグラフィ (Microautoradiography) による知見は、海洋の DOMが浮遊細菌群集によって主に利用されていることを明らかにすると同時に、顕微鏡下に観察される浮遊細菌がこれら DOMを活発に利用していることも示している (Tabor & Neihof 1982, Douglas et al. 1987)。

このように、海洋環境、とりわけ外洋低栄養海域では浮遊細菌が現場細菌群集による従属栄養活性の主体者であり、一次生産者として海洋生態学上重要な役割を果たしていることは明らかである (Azam & Cho 1987)。これらのことから外洋環境の生態系の研究には、浮遊細菌群集の動態を正確に把握することは不可欠である。

前述したように外洋海水中の有機物濃度は、溶存態有機炭素 (dissolved organic carbon, DOC) 量にして $0.4\sim 0.7\text{mgC/l}$ ときわめて低く (Menzel & Ryther 1970), しかも実際に従属栄養細菌群に利用可能な有機物は、その 20~50%であると推定されている (Ishida et al. 1977, Servais et al. 1987, 1989)。それにもかかわらず、従来、海洋細菌の研究に常用されている ZoBell 2216E寒天培地 (Oppenheimer & ZoBell 1952) は、海洋環境の有機物濃度の数万倍というきわめて高濃度のペプトン含有している。このような培地で増殖している細菌群が、細菌相のうえでもまた従属栄養活性のうえでも外洋環境の細菌群のそれを再現しているかどうかは以前から疑問視されてきた (Sieburth 1984)。実際、この培地を用いて外洋環境中の細菌数を計数すると、顕微鏡下に観察し、計数され得る全細菌数の 0.1%に満たない事が多い (江口 1990)。また、ZoBell

2216E培地などの高栄養寒天平板培地によって分離された海洋細菌の 16S リボゾーム RNA から cDNA プロンプを作り、自然環境の細菌群集の識別に応用した最近の研究によると、海洋で優勢な細菌は高栄養寒天平板培地ではいまだ培養に成功していない事が示唆されている (Giovannoni et al. 1990, Ward et al. 1990)。以上のような観点から、少量の有機物を加えただけの、あるいは新たな有機物を全く添加しない低栄養寒天平板培地により海洋細菌の計数が行われ、高栄養寒天平板培地を用いた場合より比較的高い計数結果を得、分類的にも異なった細菌相を得ている (Carlucci &

Shimp 1974, Mallory et al. 1977, Yanagita et al. 1978)。Akagi et al. (1977) は寒天の代わりにグラスファイバー-フィルターを担体とした培地を調製し、様々な海域で細菌計数を行い、沿岸海域では高栄養培地による計数値が高いが外洋海域では低栄養培地 (約16mgC/l) による計数値の方が高いことを示した。

Ishida & Kadota (1979) は、低栄養な湖水中の有機物濃度に比較的近い濃度の有機物のみ含有する低栄養液体培地 (ST10⁻⁴培地, 約0.2mgC/l) を用い、これにトレーサーとして¹⁴C-有機化合物を添加し、細菌細胞内への¹⁴C-有機化合物の同化によって細菌の増殖を確認し、最確数値 (MPN値) によって細菌を計数する方法 (¹⁴C-MPN法) を考案した。湖水域 (Ishida et al. 1980) および外洋海域 (Ishida et al. 1986) においてこの方法を用いて細菌計数を試みた結果、得られた生菌数は、高栄養寒天平板培地や高栄養液体培地はもとより、低栄養寒天平板培地によって得られた値より1~2桁高く、その大部分は高栄養培地には増殖できない細菌であった。その傾向は低栄養環境に生息する細菌群に顕著であった。

この¹⁴C-MPN法では、高栄養培地と低栄養培地を併用することで全低栄養細菌を高栄養細菌 (eutroph), 通性低栄養細菌 (facultative oligotroph), 偏性低栄養細菌 (obligate oligotroph) の3群の細菌に分けて計数することが可能である。沿岸域などの富栄養海域では高栄養細菌と通性低栄養細菌が優勢であり、外洋などの低栄養海域では偏性低栄養細菌が優勢であることが明らかになっている (Ishida et al. 1986, Eguchi & Ishida 1990)。とりわけ、南極海域の海水中の付着細菌は高栄養培地で増殖可能な細菌 (高栄養細菌と通性低栄養細菌) の割合が高かったのに対し、浮遊細菌では偏性低栄養細菌が大部分であったという計数結果 (江口 1990) は、外洋海域の浮遊細菌を検出するうえで低栄養液体培地が最も有効であることを示している。特に偏性低栄養細菌は、たとえろ過海水のみの寒天平板培地を使用したとしても増殖せず、このことは寒天平板培地 (低栄養培地であっても) では外洋で優勢している偏性低栄養細菌群をとらえることはほとんど不可能であることを意味している。

これまでも寒天平板による低栄養培地を用いて分離された低栄養細菌

菌分離株に関する研究はいくつかなされており、この細菌が有機物を添加しないろ過海水中で良好な増殖を示すことなどが報告されているが、いずれも寒天あるいはフィルター上にコロニーを形成する細菌 (Akagi et al. 1980a, b, Carlucci et al. 1986, 1987) で、外洋環境では優占種と認められないもの (Ishida et al. 1986, Eguchi & Ishida 1990, 江口 1990) である。また、寒天平板培地上で増殖する低栄養細菌であっても、生理的な側面まで研究されたものはいまだみられない。分離に使われる寒天平板培地の寒天には、数十mgC/l程度のアミノ酸 (ニンヒドリン陽性物質) が含まれること、あるいは、固体表面という物理的環境が液相で生息している多く海洋細菌、特に浮遊細菌の増殖には不適當なのではないかということなどから、外洋において優勢な細菌をこの寒天培地によって計数・分離することには強い疑問が残されている。

以上の点をふまえ、本研究は外洋海水中の細菌群集の生理的特性を、海洋での現場実験、および低栄養細菌の純粹分離株を用いた室内実験によって調べ、実際に海洋環境で細菌群集 (主に浮遊細菌) が低栄養環境にどのように適応し、どのような生理的な状態を保ちながら生存しているかを考察したものである。第I章の緒言に続き、第II章では、太平洋の外洋低栄養海域と比較的富栄養な熱帯サンゴ礁域という有機物濃度環境の異なる2つの海域の細菌群集について高分子合成能を調べ、比較検討した。第III章では、低栄養液体培地 (ST10⁻⁴培地) を用いて分離した通性低栄養細菌および偏性低栄養細菌の各分離菌株を用い、その増殖特性や生理的特性を調べるとともに、いくつかの実験を通して低栄養環境での低栄養細菌の適応戦略を考察した。第IV章では、真の海洋低栄養細菌 (偏性低栄養細菌) の研究をおこなう際に技術的に最も困難であるとともに重要な問題である「偏性低栄養細菌の高有機物濃度培地での増殖能力の欠落」という現象について、新たに得られたいくつかの知見をもとに考察を試みた。

第II章 外洋海域とサンゴ礁海域の細菌群集によるタンパク質およびDNA合成活性の比較

緒言

海洋環境における従属栄養細菌群集の現存量や存在状態に関する研究が進むにつれて、現場の細菌生産活性をより正確に把握しようとする傾向が強くなり、FDC法（直接検鏡で観察される細菌の中で分裂途中の細菌を計数して、全細菌数との比率から増殖速度を計算する方法）や、 CO_2 、 SO_4 などの同化速度から生産速度を見積る方法などの種々の方法が開発されてきた（Hagström et al. 1979, Overbeck 1979, Jordan & Likens 1980, Riemann & Sondergaard 1984）。特に、細菌のDNA合成の前駆物質であるチミジントレーサーとして用いDNA合成活性や細菌生産活性を見積るチミジン法（Fuhrman & Azam 1980）はその簡便さ、理論的根拠の明確さから多くの研究者によって様々な海域で応用されてきた（Rosenberg et al. 1990, Riemann & Sondergaard 1984, Hagström et al. 1988）。しかし、このチミジン法はDNA合成速度が他の細胞構成成分および生産速度と同調していることが前提となっていることから、チミジンのDNA画分への同化速度から細菌生産活性を見積るための変換係数（Conversion factor）が、現場細菌群集の組成や、生理的な状態に左右されているのではないかとすることが問題点として指摘されている（Davis 1989）。まして、外洋低栄養海域では、大部分の従属栄養細菌が低栄養細菌であり、なかでも高有機物濃度培地で増殖することができない偏性低栄養細菌が優勢であることから（Ishida et al. 1986, Eguchi & Ishida 1990）、沿岸域の比較的富栄養な環境の細菌群集とは細菌相のうえからも個々の細菌の生理的な特性の面からも異なっていることは十分に考えられる。

ロイシントレーサーとして蛋白質合成活性を測定し、細菌生産活性を見積るロイシン法（Kirchman et al. 1985, 1986b, c）もチミジン法と同様の問題点を持っているが、チミジン法とロイシン法を併用して海洋の細菌群集の動態の解析を試みることによって低栄養海域と富栄養海域とい

う異なる海域の細菌群集間の生理的特性の差異を明確にし、さらには得られた結果をもとに低栄養環境の細菌群集の適応機構の一部を明らかにすることができるかもしれない。

本章では、ロイシン法とチミジン法を併用して低栄養海域である熱帯外洋域の細菌群集のDNA合成速度およびタンパク質合成速度を測定し、細菌細胞内の高分子合成活性を調べ、比較的富栄養な環境であるボナベ島近海サンゴ礁域および外洋水との交換が起こっているマジェロ環礁域の細菌群集のそれと比較した。

実験方法

海水採取地点および採水方法

採水は東京大学海洋研究所所属の研究調査船白鳳丸による南太平洋研究調査（KH-88-1）においておこなわれた。採水地点をFig. 2-1に示す。

Stn. 28はマジェロ環礁の湾口部から約12km離れた地点で、水深は1860mであった。Stn. MAはマジェロ環礁を構成する島に最も近いサンゴ礁域であった。採水は1988年3月5日16:00および6日11:00と15:00の3回に分けて行われ、それぞれStns. MA1, MA2およびMA3とした。MA1およびMA3は引潮時であり、MA2は満ち潮時であった。Stns. MB, MC, MDおよびMEの採水は3月7日14:40から14:50の間に行われた。ボナベ島の各採水地点は本島の周囲約5kmに広がるサンゴ礁域で3月14日（Stn. A1）と3月15日（それ以外の全採水地点）の引潮時に行われた。表層水は、滅菌した500mlないし1l容ガラスビン（SCHOTT社ないしWHATMAN社製）を用いて水深約0.5m層から採水した。外洋の各深度の採水は、ロゼットマルチサンプラー（NISKIN社製）によって行った。これらの試水は5°Cで貯蔵し、3時間以内に実験に供した。

溶存態有機炭素（DOC）量の測定

各試水のDOC量を測定するため、燃焼処理（450°C, 1.5時間）によってあらかじめ混在した有機物を除去したガラスフィルターGF/F（WHAT-

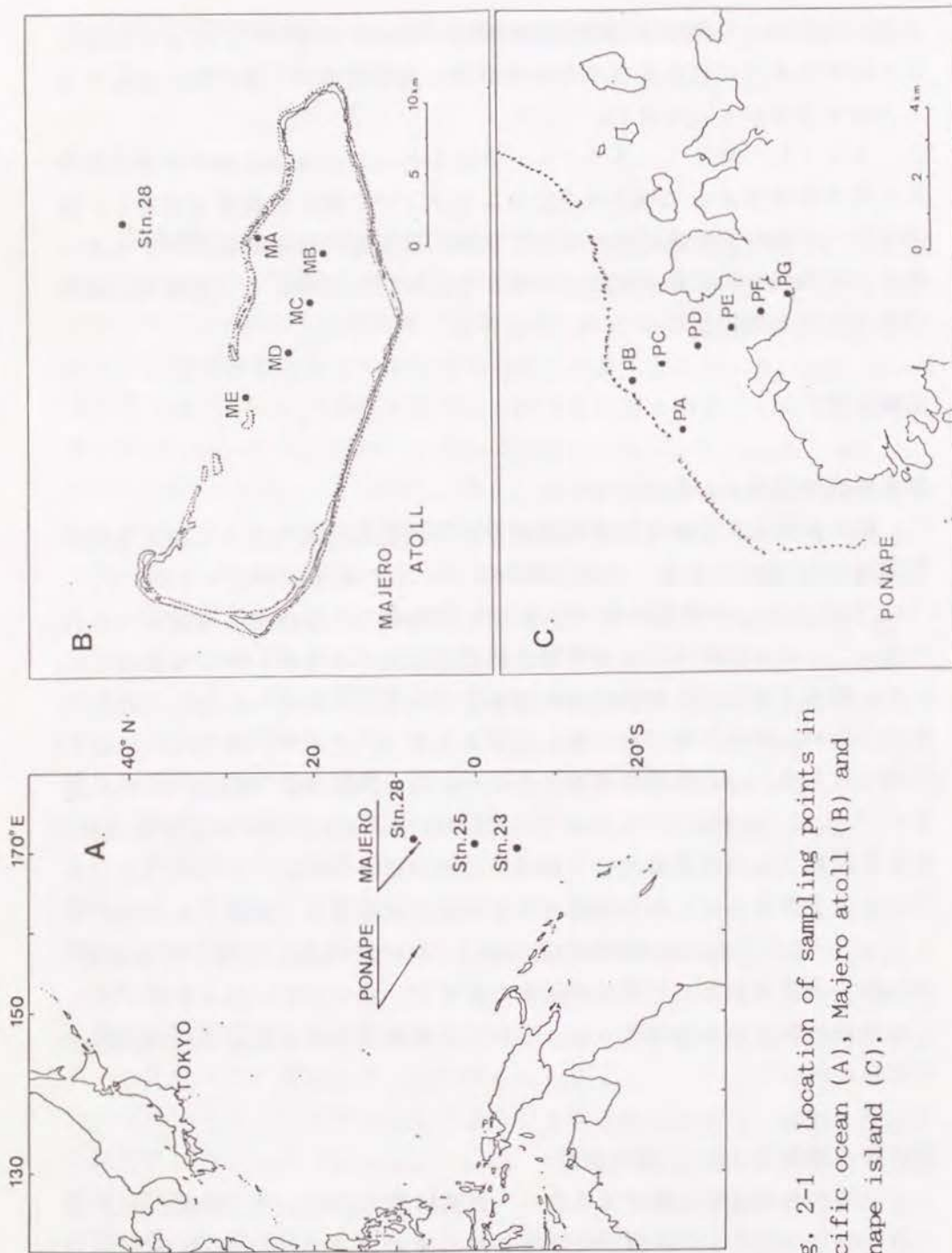


Fig. 2-1 Location of sampling points in Pacific ocean (A), Majero atoll (B) and Ponape island (C).

MAN社)で各試水をろ過し,ろ液を塩酸処理したポリエチレンボトルに入れ,-20°Cで保存した。後日,凍結試水を温水中で解凍し,試水 10mlに対して 0.1N-H₂SO₄を 1ml加えて酸性化した後,CO₂を除去した空気を通気して試水中の無機態炭素を取り除き,TOC測定器(TOC-500,SHIMADZU)で測定した。

³H-チミジンと³H-ロイシンの同化速度

各採水地点の細菌群集によるDNA合成速度とタンパク質合成速度を測定するために,冷トリクロ酢酸(trichloroacetic acid,TCA)不溶画分への³H-チミジン(methyl-³H-Thymidine,TdR,56Ci/mmol,ICN)の同化速度(TdR_{DNH})と,熱TCA不溶画分への³H-ロイシン(120Ci/mmol,Amer-sham)の同化速度(Leu_{prot})を求めた。外洋海水は20mlを,サンゴ礁海域の海水は10mlを試験管に分注し,³H-チミジンと³H-ロイシンをそれぞれ最終濃度が5nMになるように別々に加え,現場の水温で1~3時間培養した。あらかじめ氷上で冷やしておいた10%TCA水溶液を試水と同量加えて反応を停止し,³H-チミジンを加えた試水は速やかに氷上で5分間抽出した。³H-ロイシンを加えた試水はタンパク質画分以外的高分子を取り除くために80°Cの熱水中で1時間放置した。それぞれの不溶画分を0.2μmの孔径のニトロセルロースメンブレンフィルター(ADVANTECH社)上にろ過捕集し,5%の冷TCA水溶液で数回洗浄した後,ガラスバイアルにいれ,液体シンチレーター(AQUASOL II,NEN)を加え,それぞれの放射能活性を液体シンチレーションカウンター(LSC502,ALOKA)で計測した。細菌生産活性(Bacterial Production,BP)は下記の計算式を用いて求めた。

$$BP \text{ (cells/ml/h)} = [\text{チミジン同化量 (mol/ml/h)}] \times [2 \times 10^{18}]$$

(Fuhrman & Azam 1982)

このほか,細菌群集の細菌細胞内へのロイシン同化活性(Leu_{ass})を測定するために,上述の実験と並行して最終濃度5nMの³H-ロイシンとともに試水を上記の同じ時間,現場水温で培養し,TCAで処理することなしに,細菌を速やかにメンブレンフィルター上にろ過捕集して反応を止め,ろ過

海水で数回洗浄した後、同様に放射能活性を測定した。それぞれの実験について、最終濃度で4%のホルマリンを加えた試水を空試験とし、空試験2本立て、試水3本立てで行った。

全細菌および低栄養細菌の計数

全細菌の計数はDNA結合蛍光色素DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl-indole) 染色による直接検鏡法でおこなった (Porter & Feig 1980)。試水は中性ホルマリンで固定 (最終濃度4%) した後、DAPIを最終濃度0.5 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、暗所で5~10分間静置した。あらかじめスランブラックで染色し、ろ過蒸留水 (0.2 μm) でよく洗浄しておいた0.2 μm スクレーンフィルター上に、上記DAPI処理した適量の試水を1~3ml捕集し、すみやかに無蛍光イマージョンオイル (NIKON社) でスライドガラス上に封入した。調製した試料は落射蛍光顕微鏡 (OPTIPHOT-EFD, NIKON社) で検鏡し、紫外線励起で青く光る顆粒のうち細菌様の形状のものを計数した。

低栄養細菌計数用培地は以下の手順で調製した。まず熟成海水 (Aged Sea Water, ASW) 1 l にトリプティケース (BBL) 0.5g および酵母エキス (Difco) 0.05g を添加したものを高濃度有機物培地 (ST10⁻¹ 培地) とし、この培地に寒天を1.2%添加したものをST10⁻¹ 寒天培地とした。ASW (江口 1990) は、外洋海水をガラスフィルター (GF/CかGF/F, Whatman社) でろ過して動植物プランクトンを除去した後、海水で十分に洗浄したガラス製ボトルまたは濃塩酸で処理したポリタンクに入れ、暗所に3か月以上保存したものである。ASWは培地を調整する直前に、蒸留水でよく洗浄した0.2 μm ニトロセルロースメンブレンフィルター (MILLIPORE社かADVANTECH社製) でろ過して使用した。上記のST10⁻¹ 培地をろ過ASWで1000倍に希釈したものを、低濃度有機物培地 (ST10⁻⁴ 培地) とした。それぞれの培地をスクリーキャップ試験管 (13×130mm, PYREX) に4mlずつ分注し、121°C、15分間オートクレーブにより滅菌した。なお実験に用いたガラス製器具は、すべて450°Cで1.5時間燃焼し内面に付着した有機物の混入をできる限りなくし、スクリーキャップも超純水で2回煮沸して洗浄した。

最確数 (Most Probable Number, MPN) 法の手順は以下の通りである。採取した計数用試水は冷蔵保存し、3時間以内に実験に供した。オートクレーブしたろ過ASWを用いて試水を順次10倍希釈し、原液を含む5段階の各希釈液を0.1mlずつ各5本立てのST10⁻⁴ 培地に接種した (一次接種)。また各希釈段階についてホルマリン (最終濃度4%) で固定した試料を同様に接種し、これを空試験とした。4週間、現場水温、暗所で静置培養を行った後、試料の一部 (1ml) を上記のDAPI直接検鏡法によって計数し、空試験値3倍以上の計数値を得たものを「増殖あり」と判定した。また、試料の一部 (0.1ml) はST10⁻¹ 培地に二次接種し、二週間培養後、増殖の有無を肉眼で濁りの有無によって判定した。

以上の操作から、それぞれ増殖の見られた試験管の本数を希釈段階ごとに求め、Taylorの表 (Taylor 1962) からMPN計数値を求めた。ST10⁻⁴ 培地への一次接種によって得られたMPN値は、低濃度有機物培地で増殖可能な細菌群を計数したものであり、通性低栄養細菌 (Facultative oligotroph, FO) と偏性低栄養細菌 (Obligate oligotroph, OO) を合計した全低栄養細菌 (Total Oligotroph, TO) 計数値であるとした。ST10⁻¹ 培地への二次接種で、増殖が確認された細菌群は高低両培地で増殖可能な細菌群であるため通性低栄養細菌計数値とし、全低栄養細菌計数値から通性低栄養細菌計数値を差し引いた値を偏性低栄養細菌計数値とした。

結 果

各採水地点のDOC量、クロロフィルa量、全細菌数、およびMPN法による低栄養細菌計数値をTable 2-1に示した。Stn. 28を含む外洋水のDOC量はおおむね1~2mgC/lで、マジェロ環礁の各採水地点のうち湾口部のStns. MDとMEではそれぞれ0.82, 0.64mgC/lと外洋水とほぼ同程度の低い値であった。対照的にマジェロ環礁内の湾奥部 (Stns. MBとMC) およびサンゴ礁域 (Stn. MA) のDOC量は2mgC/l以上であり、ポナベ島のサンゴ礁 (据礁) 域のそれと同様に高かった。ポナベ島の採水地点は全体的にかなりDOC量が高く (>2mgC/L)、同時にクロロフィルa量も高いことから、

この水域では一次生産が盛んに行われていると推測された。マジェロ環礁やボナベ島のサンゴ礁域の全細菌数も外洋海域のそれらに比べて高い傾向があった。

Table 2-1 Bacterial profiles, chlorophyll-a contents and DOC contents in pelagic water, Majero atoll and Ponape water. TO: number of total oligotroph. FO: number of facultative oligotroph. OO/TO: $\{100-(FO/TO)\} \times 100$. DAPI-DC: total bacterial number counted by direct count with DAPI stain. Chl.a: referred to "Preliminary Report of The Hakuho Maru Cruise KH-88-1".

Station	Depth	TO (/ml)	FO (/ml)	OO/TO (%)	DAPI-DC (/ml)	DOC (mgC/l)	Chl.a (ug/l)
Pelagic water							
Stn.28	0m	2.3×10^3	2.3×10^2	90.0	8.3×10^5	0.86	0.06
	10m	1.7×10^3	1.3×10^3	23.5	1.3×10^6	1.71	0.06
	20m	3.3×10^2	2.3×10^2	93.0	8.6×10^5	1.34	0.05
	30m	1.3×10^3	2.3×10^2	82.3	6.2×10^5	1.36	0.06
Stn.23	0m	4.6×10^2	2.3×10^2	95.0	8.3×10^5	1.24	0.06
	0m	1.3×10^3	1.7×10^2	86.9	8.4×10^5	1.02	
Stn.25	0m	7.9×10^2	1.3×10^2	83.5	8.1×10^5	0.96	
Majero							
MA1	0m	4.9×10^3	2.3×10^3	53.1	9.5×10^5	2.16	
MA2	0m	1.7×10^4	1.3×10^4	23.5	1.4×10^6	2.25	
MA3	0m	2.3×10^3	2.3×10^3	0.0	9.7×10^5	2.15	
MB	0m	4.9×10^3	4.9×10^3	0.0	1.2×10^6	2.09	
MC	0m	1.7×10^4	7.0×10^3	58.8	1.1×10^6	2.08	
MD	0m	2.3×10^3	7.9×10^2	65.7	8.0×10^5	0.82	
ME	0m	7.9×10^3	1.3×10^3	83.5	1.0×10^6	0.64	
Ponape							
PA1	0m	1.2×10^4	2.2×10^3	81.7	1.1×10^6	1.66	
PA2	0m	7.9×10^3	3.3×10^3	58.2	7.8×10^5	1.95	
PB	0m	2.3×10^3	1.7×10^3	26.1	8.8×10^5	2.74	0.10
PC	0m	7.0×10^2	4.6×10^2	34.3	1.0×10^6	1.95	0.32
PD	0m	4.9×10^3	4.9×10^3	0.0	1.6×10^6	2.17	0.39
PE	0m	2.2×10^3	1.7×10^3	22.7	1.1×10^6	2.04	0.27
PF	0m	4.6×10^3	1.8×10^3	60.9	1.3×10^6	4.26	0.57
PG	0m	1.4×10^4	1.1×10^3	92.1	1.1×10^6	4.65	0.06

外洋海域では全低栄養細菌計数值もボナベ島やマジェロ環礁のそれと比較して低かった ($0.3 \sim 2.3 \times 10^3$ /ml) が, ST10⁻¹寒天培地を用いた塗抹平板培養法による計数值に比べると 1桁ほど高い値であった。外洋域では Stn. 28 の 10m層をのぞいて, 外洋の各試水の全低栄養細菌に占める偏性低栄養細菌の割合は高く, 80%以上であったのに対し, マジェロおよびボナベ島の各採水地点の低栄養細菌群集の中では通性低栄養細菌が優勢であった (Table 2-1)。

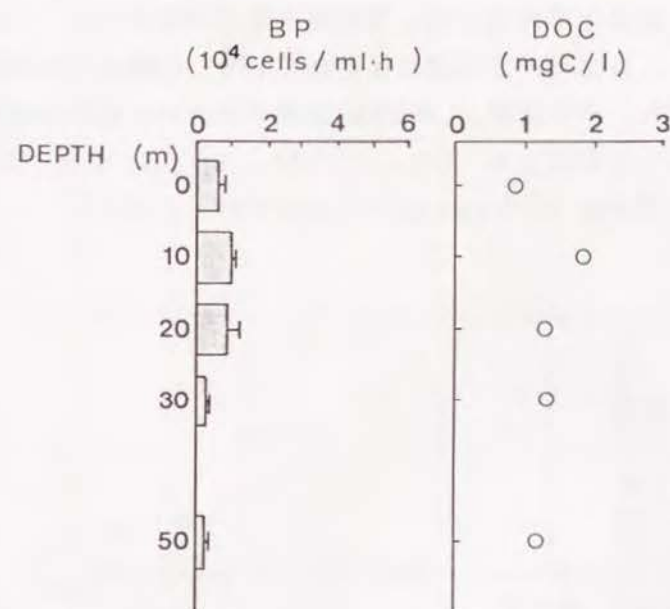
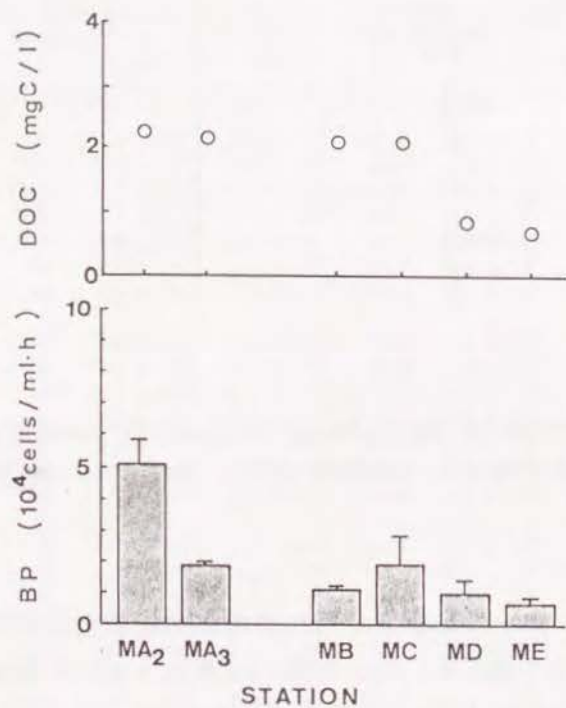


Fig. 2-2 Vertical profile of bacterial productions (BP) and dissolved organic carbon (DOC) contents at Stn.28.

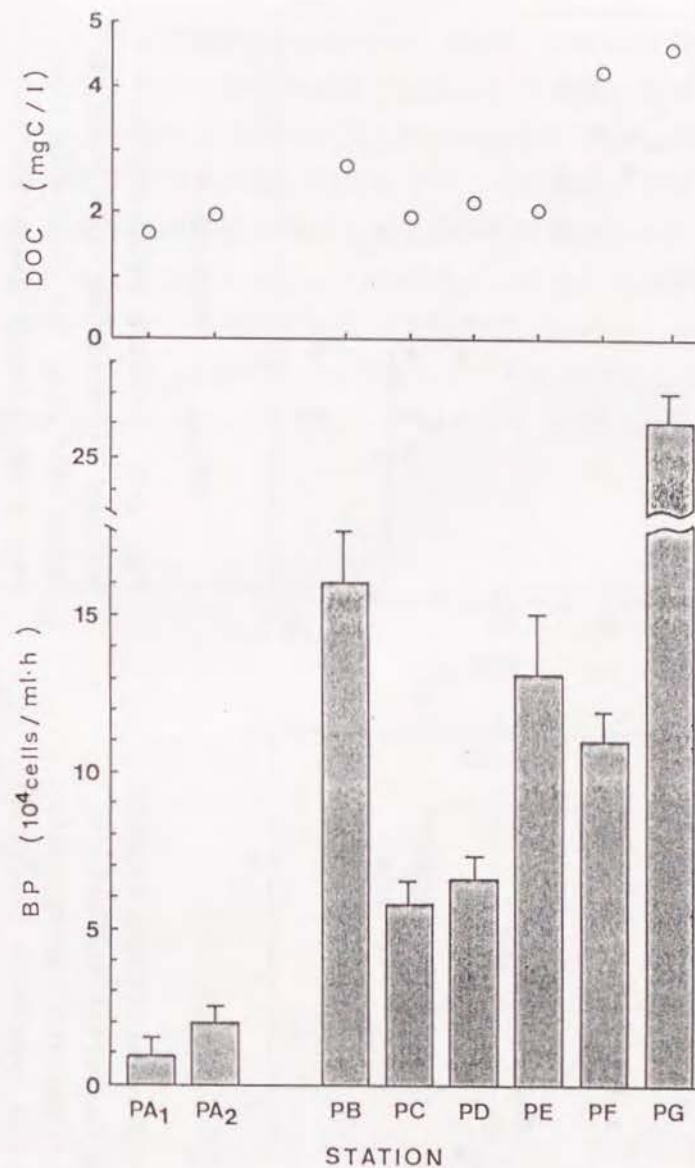
チミジン法によって見積もられた各地点の細菌生産活性および DOC量を Fig. 2-2と Fig. 2-3に示した。外洋の試水とマジェロ環礁の湾口部の試水の細菌生産活性は約 5.0×10^2 cells/ml/hであった。一方, サンゴ礁域では全体的に細菌生産活性は高く, ボナベ島の裾礁域では最も低い外縁部の Stn. PA1で 9.3×10^2 cells/ml/hであり, 島に最も近い地点 (Stn. PG) で最高であった (2.6×10^4 cells/ml/h)。全体的にみて DOC量と細菌生産活性の間には正の相関関係が見られた ($r^2=0.67$) (Fig. 2-4)。各採水地点のチミジンの DNA画分への同化速度 (Td_{DNA}) を横軸に, ロイシンのタンパク質画分への同化速度 (Leu_{Prot}) を縦軸にプロットしたところ (Fig. 2-5), ボナベ島の試水のような比較的 DOC量が高く, 細菌生産活性が高いところでは, Td_{DNA} と Leu_{Prot} の値の間に正の相関がみられたが,

TdRNAが低く細菌生産活性が低い外洋海水などの試水では、TdRNAが減少しても Leuprotはほぼ一定の値に保たれており、明確な正の相関関係は認められなかった。その結果、DNA合成速度とタンパク質合成速度の間に正の相関がみられる範囲では、Leuprot : TdRNAが 1.4~8.5 : 1であるのに対して、外洋海域では 10.5~55.6 : 1となっていた。



A. MAJERO

Fig. 2-3a Profiles of bacterial productions (BP) and dissolved organic carbon (DOC) contents in Majero atoll. The location of each sampling points was shown on Fig.1. MA₂ and MA₃ samples were collected at 11:40 (ebbing) and 15:00 (flowing) respectively on March 5, 1988 at Stn.MA.



B. PONAPE

Fig. 2-3b Profiles of bacterial productions (BP) and dissolved organic carbon (DOC) contents in Ponape. The location of each sampling points was shown on Fig.1. PA₁ and PA₂ samples were collected on March 14 and 15, 1988 at Stn.PA respectively.

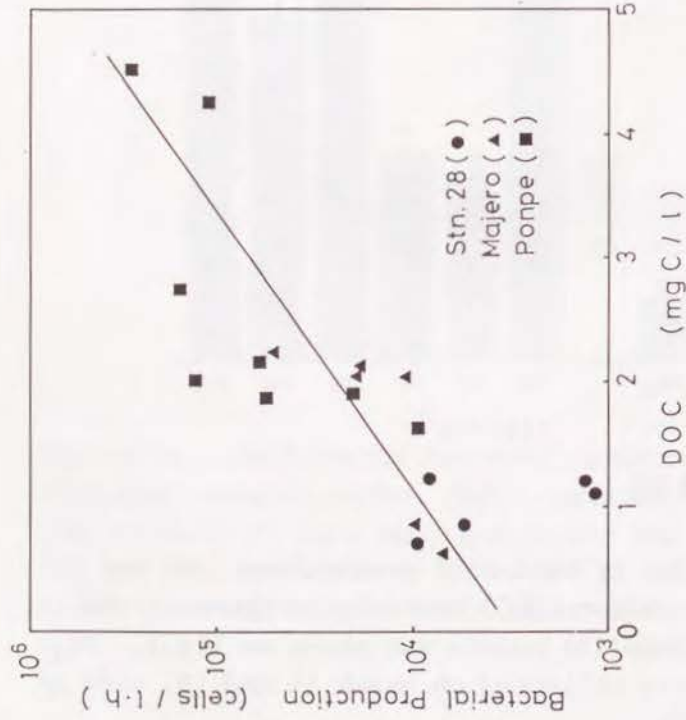


Fig. 2-4 Overall relationship between DOC contents and bacterial production estimated by ^3H -thymidine incorporation rates into cold TCA insoluble fraction (TdR_{DNA}).

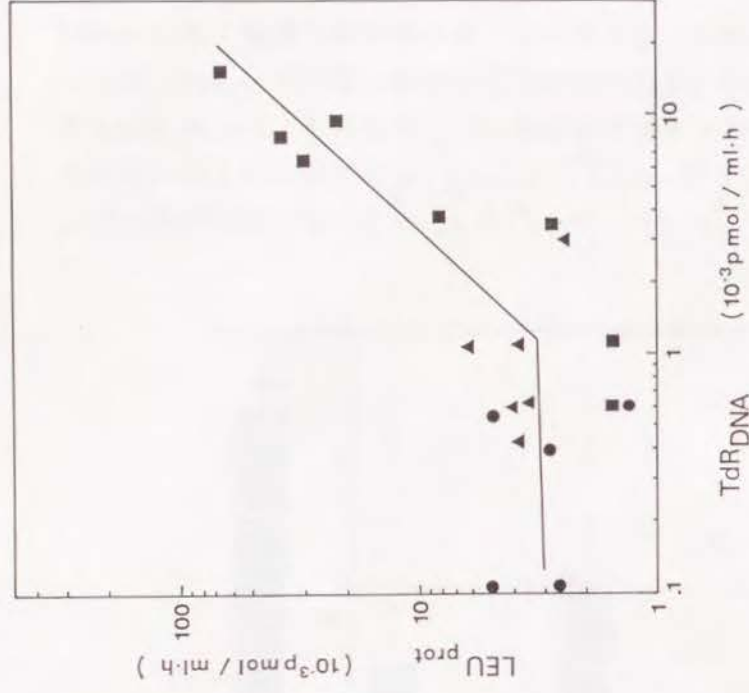


Fig. 2-5 Overall relationship between ^3H -thymidine incorporation rates into cold TCA insoluble fraction (TdR_{DNA}) and ^3H -leucine incorporation rates into hot TCA insoluble fraction (Leu_{prot}). Refer to Fig. 2-4 for (●, ▲, ■).

Stn. 28とマジェロ環礁内の各試水について、 TdR_{DNA} と細菌細胞内（全細胞成分）へのロイシンの同化速度（ Leu_{ass} ）の関係、および Leu_{ass} に対する Leu_{prot} の割合を Fig. 2-6 に示した。stn. 28 の 20m, 30m と 50m 層とマジェロ環礁の湾口部（Stn. ME）の試水では、DOC 量およびチミジンの同化速度がマジェロ環礁の内部海域のそれと比較して低かったにも関わらず、 Leu_{ass} が高かった（Fig. 2-6A）。この結果、このような水域の細菌群集が、速やかにタンパク質に同化したロイシンの割合（ $\text{Leu}_{\text{prot}}/\text{Leu}_{\text{ass}}$ ）は、取り込んだロイシンの 42.5~68.6% であった（Fig. 2-6b）。その他の外洋海域の採水地点でも $\text{Leu}_{\text{prot}}/\text{Leu}_{\text{ass}}$ が 34.3% から 59.4% と低かった（Fig. 2-7）。

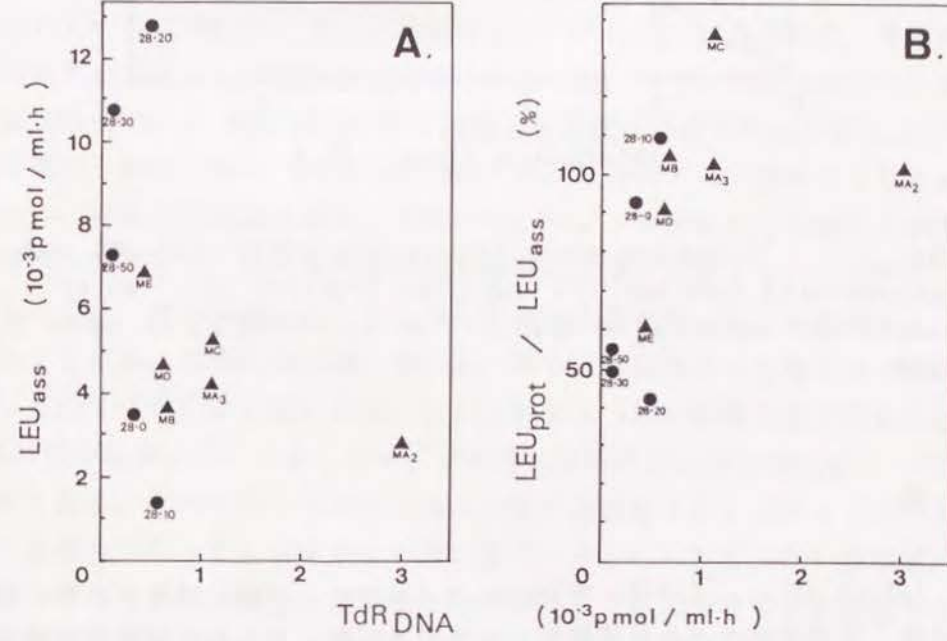


Fig. 2-6 Relationship between TdR_{DNA} and ^3H -leucine assimilation rates (Leu_{ass}) (A) or ratios of Leu_{prot} to Leu_{ass} (B).

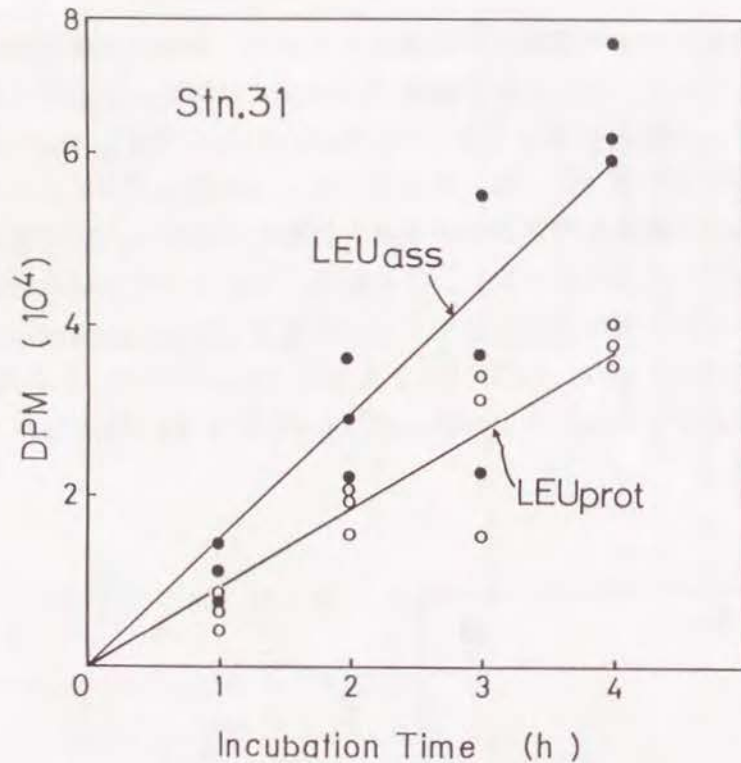


Fig. 2-7 ^3H -leucine assimilation into whole cell (●) and incorporated into hot TCA insoluble fraction (○). Water sample was collected at Stn.31(5° 46'N, 165° 01'E) on March 9, 1988.

考察

Ishida et al. (1986) や Eguchi & Ishida (1990) は東シナ海, 西太平洋, 黒潮海域などの外洋海域では低栄養細菌, とりわけ偏性低栄養細菌が優勢であるが, 沿岸および内湾の富栄養海域では高栄養細菌や通性低栄養細菌が優勢であることを報告している。本研究においても, 外洋海水中の DOC量は平均 1.1mgC/l , 全細菌数 (DAPI-DC) は $8.7 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ であり, 植物プランクトン由来のクロロフィル a 量も低く, Stn.28の

10m層をのぞく外洋の試水ではほとんど (>82.3%) が偏性低栄養細菌であった。一方, マジェロ環礁内部海域およびボナベ島沿岸裾礁域では, DOC量や全細菌計数値は外洋海域のそれと較べて高く, 低栄養細菌の中の通性低栄養細菌の占める割合が高かった。これらの結果は, ボナベ島およびマジェロ島のサンゴ礁海域が富栄養海域であり, 外洋域が典型的な低栄養海域であることを示している。

このような対照的な海域において, 細菌群集の DNA画分へのチミジン同化速度を求め, Fuhrman & Azam (1982) によって, 理論的に導き出された, 変換式から細菌生産速度を算出したところ, 外洋海域の試水では $1.4 \times 10^3 \text{ cells/ml/h}$ (Stn.28の 50m層) から $9.4 \times 10^3 \text{ cells/ml/h}$ (Stn.28の 10m層) で, その平均値は $5.2 \times 10^3 \text{ cells/ml/h}$ であった。一方, ボナベ島の裾礁域では, $9.3 \times 10^3 \text{ cells/ml/h}$ (Stn.PA1) から $2.6 \times 10^5 \text{ cells/ml/h}$ (Stn.PG) で, 平均値は $1.0 \times 10^5 \text{ cells/ml/h}$ であり, 外洋海域のそれと比較して 1桁から 2桁ほど高かった。マジェロ環礁域では, 湾口部 (Stns.MD と ME) の DOC量と細菌生産速度は外洋のその値に近く, 湾口部から内側の地点 (Stns.MA, MBと MC) にかけて DOC量が高くなるに従って, 細菌生産速度も増加していった。マジェロ環礁の内部海域の水深は平均 30mであり, かなり大型の船が最深部の港に入港する。その特殊な地形により, 潮の干満にともなって外洋海水が環礁内のかなり最奥部まで進入するため, 環礁内部水域, 特に湾口部では外洋海水の影響を強く受けているのではないと思われる。この海域でみられた細菌生産速度および DOC量の結果は, このようなマジェロ環礁独特の地形的な要因によって説明され得る。それに対してボナベ島は, 島の周囲数キロメートルのところまで満潮時であっても水深がせいぜい数メートルにしかならない裾礁域が広がっており, 外洋海水が裾礁域の内部深くまで進入することは困難であると思われる。さらに島の海岸に近い地点では島からの陸水の流入による影響が大きく, その結果ボナベ島の裾礁域の試水はマジェロ環礁内水域のそれと比較してより富栄養な環境であると考えられる。

様々な海域の細菌生産速度がチミジン法やその他の方法を用いて求められ, その時の植物プランクトンによる一次生産量との関係について論じ

られており、Cole et al. (1988) は過去に各地で行われた実験のデータを解析し、細菌の生産活性と一次生産活性との間に正の相関があることを見出した。また、Kirchman et al. (1986a) は現場の溶存態有機物 (DOM) 量の変動がより直接的に細菌生産活性を制御していると述べている。今回の実験でも DOC 量と DNA 合成活性との間には正の相関が見られた ($r^2 = 0.67$, $p < 0.01$)。しかし、DOC 量が沿岸域よりも低い外洋海域 (Stn. 28) では、細菌群集による DNA 合成活性が低いにも関わらず、熱 TCA 不溶画分へのロイシンの同化活性、つまりタンパク質の合成活性が比較的高い値で維持されていた。このことは、Kirchman が沿岸域の細菌群集で観察しているような DNA 合成とタンパク質合成の間の同調性 (Kirchman et al. 1986c, Chin-Leo & Kirchman 1988, Kirchman et al. 1989) が、外洋の低栄養海域の細菌群集 (偏性低栄養細菌が優勢である) については見られないということの意味している。この DNA 合成活性とタンパク質合成活性の間の非同調性の原因としては、以下に述べるいくつかの理由が考えられる。

① 実験中にトレーサーとして加えた微量の有機物 (チミジンやロイシン) によって外洋海水の細菌群集の増殖速度が変わり、一時的に「unbalanced growth」の状態になった。② 外洋海水ではほとんどの細菌が飢餓状態にあり、増殖能力は失っているものの、有機物を代謝する能力は保持している。③ 外洋海水では、実際は DNA 合成を行っているものの環境中のチミジンを取り込めないために見かけ上 DNA 合成が起こっていないように見える一群の細菌が優占している。④ 外洋の細菌群集は活発に代謝し、増殖しているものの、低栄養環境に適応した結果として、沿岸域の細菌群集とは高分子生合成機構や有機物の取り込み機構などの面で異なった生理学的特性を持っている。

まず①の可能性について考える。一般に細菌がバランスの取れた増殖を行っているときには、細菌細胞を構成する種々の高分子化合物は細菌の増殖速度に同調した速度で生合成されている。しかし、細菌を取り巻く周囲の環境要因の変化にともない、細菌がその増殖速度を変化させる時、一時的に細胞内の高分子合成活性の間の同調性が失われることがある。この時の細菌細胞の状態を「unbalanced growth」という (Kirchman et al.

1986^a, Chin-Leo & Kirchman 1988)。しかし、細菌がこのような状態にいたるためには、細菌の増殖速度の変化を引き起こすような環境変化、例えば有機物濃度の変化、が生じなければならない。今回の実験の場合、高分子合成活性を調べるためにトレーサーとして、 ^3H -ロイシンを最終濃度 5nM の濃度になるように添加した。一般に外洋海水中には数 nM から数十 nM の溶存態のロイシンが存在していると報告されており (Lee & Bada 1975, Eguchi & Ishida 1990), 5nM 程度のロイシンの添加は細菌をとりまく有機物環境にそれほど大きな変化を与えたとはいえない。その他にも、30mmφ の試験管を反応容器として実験に用いたことによるボトル効果 (Van Es & Meyer-Reil 1982) 等の影響も考えられるが、サンゴ礁域の富栄養海域の試水についても同じ方法で行われたにも関わらず、DNA 合成とタンパク質合成との間には同調性が見られたことから、このような実験系の問題が細菌群集に増殖速度の変化を引き起こすだけの要因になっているとは考えにくい。

②と③の可能性を検討する際には、実際に現場環境の細菌の中で、どの程度の割合の細菌が、チミジンあるいはロイシンを取り込み、同化することができるかを考える必要がある。マイクロオートラジオグラフィの手法は、「放射性同位元素の比活性が基質によって異なる」「細菌の従属栄養活性の強弱によってはある細菌群については域値以下になる可能性がある。」等いくつかの問題点を内在しているが、現場環境に存在している個々の細菌の従属栄養活性を直接観察できる点で非常に有効である。この手法を用いた実験例によると、沿岸海域では顕微鏡下に観察されうる細菌のうち 10~50% の細菌にチミジンの同化活性が見られ、アミノ酸を利用する細菌もほぼ同じ割合で検出された (Fuhrman & Azam 1982, Tabor & Neihof 1982)。それに対して、Nova Scotia 沖合い海域での実験では (Douglas et al. 1987), チミジン同化活性を持つ細菌数に比べてグルタミン同化活性を持つ細菌数が数倍高い傾向がみられている。この報告は外洋の低栄養海域では、沿岸の富栄養海域と異なり、グルタミン酸を同化するがチミジンの同化活性を示さない、または示せない状態の細菌群が多数存在している可能性を示唆するものである。

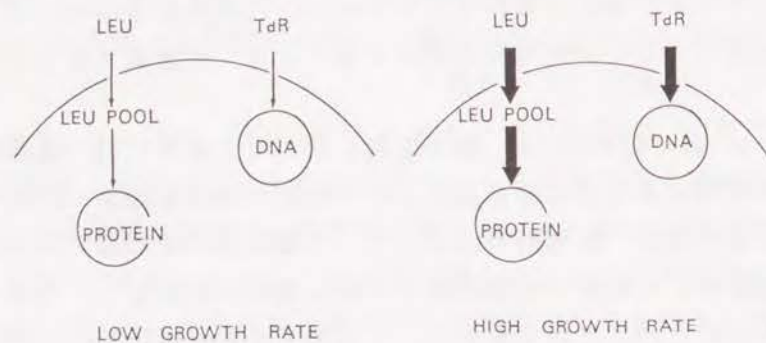
さらに、培養実験において、純粋分離した海洋細菌を長期間まったく有機基質を添加しない無機培地中で飢餓状態においた場合、寒天平板上で増殖し得る細菌数（生菌数）の減少が著しいのに比べて、呼吸活性を持つ細菌数の減少はそれほどでもないという報告がある（Amy et al. 1983, Kurath & Morita 1983, 吉永 III-3 参照）。これらは、自然環境中でも多くの細菌が、飢餓にさらされることによって細胞内での代謝活性を保持するものの増殖能力を消失した状態になっている可能性（②の可能性）を示唆するものである。しかし、これまで行われてきた飢餓実験は用いられてきた細菌分離株が通常の寒天培地で分離可能な富栄養細菌が主体であり、このような富栄養細菌は外洋低栄養海域ではきわめて少数であること（Ishida et al. 1986, Eguchi & Ishida 1990）、飢餓条件が実際には考えられないほど高い細菌密度であることなどの理由により、そのまま現場環境の現象の解析に応用することは危険であると思われる。そのうえ、最近、自然環境中で多くの細菌がまったく増殖しない飢餓状態にあるとは考えられないという意見（Azam & Cho 1987）や、外洋環境中でも予想以上に活発な細菌生産活性が行われているのではないかという報告もある（Hagstrom et al. 1988）。これらの点を考慮すると ② の可能性はきわめて低いものと判断できよう。

③ の可能性について考えてみると、これまでにチミジンを DNA 合成の基質として利用しないいくつかの細菌分離株が報告されている（Ramsey 1974, Johnstone & James 1989, Jeffrey & Paul 1990）。また、Novitsky (1983) はマイクロオートラジオグラフィによる顕微鏡観察に際して、現場環境の試水で形態観察では分裂途中であると思われるにもかかわらず細胞外の³H-チミジンを同化していない細菌を観察したと報告している。Davis (1989) は湧昇域 (upwelling) と下降域 (downwelling) という異なった環境から分離したいくつかの細菌株について、同じように増殖しているにもかかわらずチミジンの利用能に差異が存在することを報告している。つまり、外洋低栄養海域と沿岸海域とでは細菌群集組成が異なり、前者では環境中のチミジンを取り込めないために（おそらく thymidine kinase を欠いているため）、DNA 合成に利用することのできない細菌が優

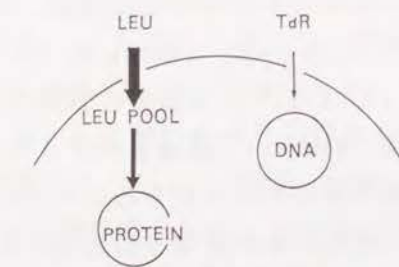
勢である可能性が高く、③の可能性をまったく消去することはできないであろう。これをより確かなものにするために、外洋低栄養海域で優勢な偏性低栄養細菌のチミジン利用能を検討することは、有意義であると思われる。

Hirsh et al. (1979) は、彼の総説において、非常に低い濃度域で有機物濃度が変動する環境に最も適応した「理想の低栄養細菌」が持っていると思われる生理的、形態的特性として、「基質親和性の高い取り込み系は低栄養細菌がごく微量の有機基質の存在を速やかに察知し、効率よく細胞内に取り込むために有効である」、「利用できる有機物が限られた環境下では獲得したエネルギーを細胞分裂に費やすよりも細胞の維持、基質取り込み系の維持や貯蔵物質の合成などに用いる方が長期生残するためには有利である。」などをあげている。その後、多くの研究者が海水から分離した細菌を用いて、低栄養環境の細菌は基質親和性の高い取り込み系を持ち、低栄養環境下でこの取り込み系を有効に機能させることを実証した（Akagi 1980a, Davis & Robb 1985, Ishida et al. 1982, Albertson et al. 1990a, Marden et al. 1987）。本研究においても「細菌生産活性が低い外洋海域の細菌群集は、5nM という低濃度のロイシンの取り込み活性に関してはサンゴ礁域の細菌群集のそれよりもむしろ高い」という結果が得られており、低栄養海域の細菌群集が環境中の希薄な有機基質を効果的に利用していることは明らかである。さらに、細菌生産活性が盛んなサンゴ礁域の細菌群集は取り込んだロイシンを速やかにタンパク質画分に同化するため、取り込まれたロイシンはほぼ 100% タンパク質画分に同化されているのに対し、外洋海域の細菌群集では、ロイシン取り込み活性がタンパク質合成活性よりも高いため、場合によっては取り込まれたロイシンの 50% がタンパク質画分へ同化されずに、細胞内に「ロイシンプール」として存在していることがわかった。

以上の結果から、Hirsh et al. (1979) の仮説を参考にして ④ の可能性と関連した次のモデルを考えた (Fig. 2-8)。沿岸域など富栄養海域の細菌群集では、基質の取り込み速度、細胞内の種々の高分子化合物（タンパク質、DNA など）合成速度、および増殖（分裂）速度の 3 者が同調して



EUTROPHIC AREA



OLIGOTROPHIC AREA

Fig. 2-8 Schematic model of substrates incorporation into cell components (protein and DNA) of bacterial assemblages in eutrophic and oligotrophic area.

おり、それぞれの活性は環境条件によって同調的に変動していると思われる。一方、外洋低栄養海域の低栄養細菌群集は、沿岸域よりも低濃度域で変動する環境中の有機基質に対応するため、つねに基質親和性の高い取り込み系を保持し続ける必要がある。それゆえ低栄養細菌群集は獲得したエネルギーを、増殖よりも取り込み系の維持及びタンパク質合成に優先的に消費しており、DNA合成活性（細菌細胞外のチミジンがDNA合成に利用されていた場合）が低いにもかかわらず、潜在的に高いタンパク質合成活性および高い基質取り込み能を保っている。それゆえ、DNA合成活性および増殖（分裂）活性は、個々の細菌細胞を維持するのに必要なタンパク質合成とは同調せずに変動しているのではないと思われる。

Simon et al. (1989) は、外洋海域で多くみられる小さな細菌は、沿岸域や実験室内の高濃度有機物培地で増殖している大きな細菌細胞と比べて、1個当りのタンパク質含量が高いことを報告しており、また深水域（500m以下）の細菌群集では取り込まれたアデニンの大部分がDNAではなくタンパク質画分へ同化されるという報告（Hanson & Lowery 1983）もある。つまり1個の細菌細胞内の種々の高分子合成活性が環境の変化によって変わることは十分予想される。

本実験でみられたように、DNA合成活性が低く抑えられている外洋低栄養海域の細菌群集が、高いタンパク質合成活性を保っている理由としては、低栄養環境に適応した個々の低栄養細菌が富栄養環境で増殖している細菌群集とは異なる生理的特性を獲得しているためではないかと考えられる。それに加えて、前述の一部の低栄養細菌がチミジンを取り込むことができないために、DNA合成活性が過小評価されていることも上記の傾向をきわだたせている可能性がある。

そこで次章では、ここに示したモデルを確認するため、有機物濃度の低い 10^{-4} 培地を用いて外洋低栄養海域で優先している低栄養細菌の分離し、得られた細菌分離株の低栄養環境下での生理的特性の解析を試み、低栄養環境への適応戦略について考察する。

概要

(1) 南太平洋外洋海域の低栄養海域では偏性低栄養細菌が優占しているのに対し、比較的一次生産が高く溶存態有機物(DOC)量が高いサンゴ礁水域では通性低栄養細菌が優占していた。

(2) DNA合成活性(チミジンのDNA画分への同化活性)と環境中のDOC量の間には正の相関($r^2=0.67$)がみられた。

(3) DOC量が高いサンゴ礁域の試水ではタンパク質合成活性(ロイシンのタンパク質画分への同化活性)とDNA合成活性(チミジンのDNA画分への同化活性)の間に正の相関がみられたが、DOC量が比較的低い外洋域やマジェロ環礁の湾口部の試水ではDNA合成活性が低い試水であっても、タンパク質合成活性が比較的高い値で保たれている傾向があった。

(4) DNA合成活性に較べてタンパク質合成活性が比較的高く保たれている試水では、そのほかの水域の試水では取り込まれたロイシンの大部分がタンパク質画分へ同化されるのに対して、取り込まれたロイシンの約50%はタンパク質画分へ同化されずに、細胞内アミノ酸プールとして存在した。

(5) 以上の結果から、低栄養環境への個々の細菌の適応戦略としてのモデルを考えた。低栄養環境下の細菌群集は限られたエネルギーを分裂(DNA合成)よりも、基質取り込み系などの細胞活性の維持に優先的に利用するために、富栄養環境の細菌群集と較べて、潜在的にタンパク質合成活性がDNA合成活性よりも高く維持されていると推定した。

第Ⅲ章 通性および偏性低栄養細菌分離株の生理的特性

緒言

第Ⅱ章の熱帯海域における調査の結果から、外洋の細菌群集が有機基質の取り込み機構や細胞内高分子の合成能などの面で、富栄養なサンゴ礁海域の細菌群集とは異なる生理的特性を持ち、低栄養環境に適応している可能性が示された。そこで、外洋低栄養海域の細菌群集の現場での動向をより正確に把握するために、低栄養細菌の低栄養環境下での生理的特性を明らかにする必要がある。

細菌群集の低栄養環境への適応機構を解析するために、従来、実験室レベルで取り扱われてきた細菌分離株は、たとえ外洋海域から分離された細菌であるとはいえ、高濃度の有機物を含む寒天培地から分離された、いわゆる富栄養細菌である。また、このような細菌を用いて得られた知見は、その多くが高濃度有機物培地で栄養増殖している細菌分離株を、まったく有機物を添加しない人工海水中に懸濁し、その結果引き起こされる細菌細胞の生理的变化を追跡するという、いわゆる飢餓生残についての研究で得られたものである(Novitsky & Morita 1976, Jones & Rhodes-Roberts 1981, Amy et al. 1983, Humphery et al. 1983, Kjelleberg & Hermansson 1984)。ところが、外洋海域の細菌群集のもう一つの生存形態であると思われる低栄養環境下での増殖状態の細菌細胞に関する知見はその実験上の困難さも手伝ってきわめて少ないのが現状である。

本章では、外洋低栄養細菌の計数にきわめて有効な低濃度有機物液体培地を用いて外洋低栄養海域で優勢である低栄養細菌(通性低栄養細菌および偏性低栄養細菌)を分離し、その分離菌株の低栄養環境下、高栄養環境下、および飢餓環境下における特性を増殖の程度、基質取り込み速度、高分子合成能などの面から調べた。さらに、従来の実験結果および第Ⅱ章の結果をまじえて外洋低栄養海域の細菌群集の低栄養環境への適応機構について考察を試みた。

III-1 偏性低栄養細菌および通性低栄養細菌の単離，およびそれら細菌の種々の有機物濃度培地における増殖生理

本節では，低濃度有機物培地（ $ST10^{-4}$ 培地）で増殖可能な偏性および通性低栄養細菌を，画線分離法あるいは $ST10^{-4}$ 培地をもちいた希釈法によって分離した。得られたそれぞれの細菌分離株の，種々の濃度のペプトン培地（ $ST10^{-1}$ 培地）における増殖特性を調べた。

実験方法

偏性低栄養細菌および通性低栄養細菌の単離

偏性低栄養細菌は寒天平板上でコロニーを形成せず，単離に常用されている寒天平板上での画線による方法は利用できない。従って低濃度有機物培地である $ST10^{-4}$ 培地を用いた希釈法を繰り返す事によって単一菌株（クローン株）の分離を試みた。試料の採取は，1985年 5月11日および 1989年 6月20日の両日に京都大学農学部附属水産実験所の観測船「白浪丸」によって，若狭湾冠島近海の Stn.1 (Fig. 3-1) の 50m層で行った。採水は前もって十分洗浄した 6 l バンドン採水器を用いた。全菌数計数用の試料は船上で速やかに固定し（4%ホルマリン），MPN法による低栄養細菌計数用の試水はあらかじめ 450°C ，1.5時間の燃焼処理を施して有機物を取り除いた滅菌ガラスボトル（WHATMAN社）にいれ，どちらも 5°C に冷却した状態で実験室まで持ち帰った。採水から実験室に持ち帰るまでに経過した時間は，約10時間であった。全菌数は DAPI染色後，落射蛍光顕微鏡による直接検鏡法によって計数し（第II章参照），低栄養細菌数は第II章で述べた MPN法の手順に従って計数を行った。クロロフィル a (Chl-a) 測定用に採水後，5~10 l の試水を GF/F（あらかじめ 450°C ，1.5時間の燃焼処理を行っている。）でろ過し，フィルターを分析するまで -20°C で凍結保存した。Chl-a測定は SCOR/UNESCO (1966) の方法で行った。一方，ろ液は，濃塩酸で処理し，よく洗浄したポリビンにいれ，DOC測定に供した（第II章参照）。

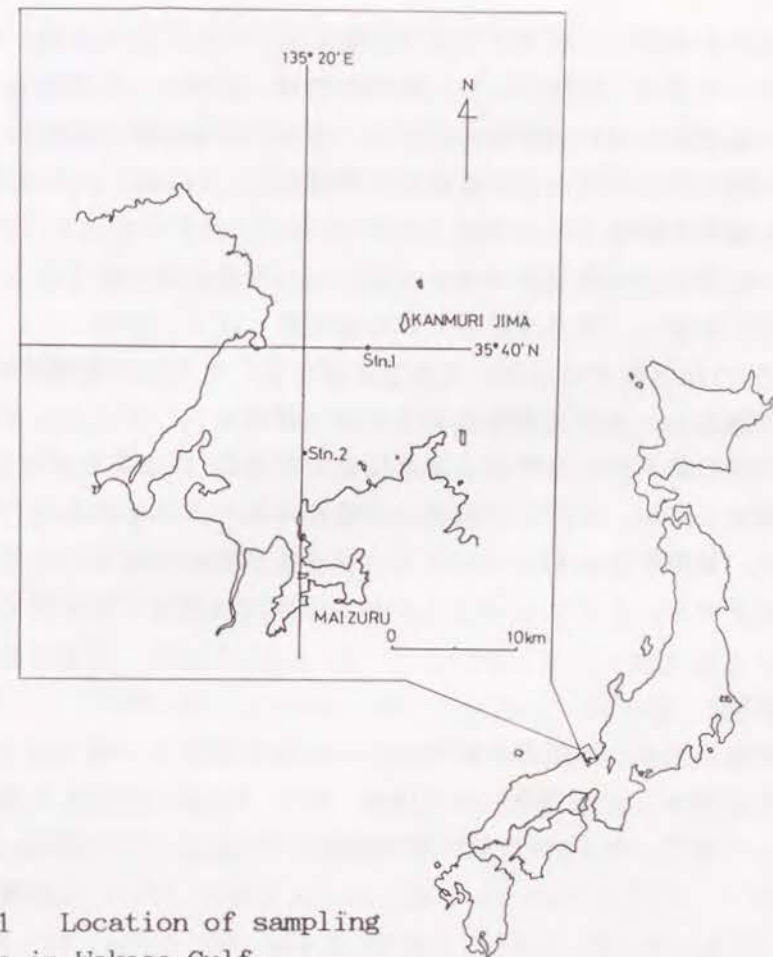


Fig. 3-1 Location of sampling stations in Wakasa Gulf.

偏性低栄養細菌を分離するために，MPN法で低栄養細菌の計数をした際に $ST10^{-4}$ 培地では増殖が確認されたにもかかわらず $ST10^{-1}$ 培地では白濁するまでの増殖が確認されなかった試験管を選び，それを最大希釈した試験管には計算上約 1~50cells/mlの細菌が含まれているように滅菌 ASW（熟成海水，第II章参照）で $1/10^2$ ， $1/10^3$ ， $1/10^4$ ， $1/10^5$ に希釈した。各希釈段階の試料を 5本立ての $ST10^{-4}$ 培地（2ml）にそれぞれ 0.1mlずつ接種した。 15°C で 4週間培養した後，直接検鏡法で 5×10^5 cells/ml以上の増殖が認められた試験管の中でのなるべく希釈段階が高い試験管について，もう一度同じ手順で希釈後，1本の $ST10^{-1}$ 培地と 5本の $ST10^{-4}$ 培地に接種し

た。同様に培養し、 $ST10^{-1}$ 培地で白濁を生じないことを確認した試験管から接種した $ST10^{-4}$ 培地のうち、細菌の増殖が認められた試験管の中でなるべく希釈段階の高い試験管を保存し、偏性低栄養細菌分離菌株とした。

実験に用いた通性低栄養細菌分離菌株は、1985年5月23日に熊野灘で低栄養細菌の計数を行った際（江口 1990）、 $ST10^{-4}$ 培地と $ST10^{-1}$ 培地の高・低両濃度有機物培地で増殖が認められた試験管の培養を $ST10^{-1}$ 寒天平板培地に画線し、数回同培地での画線を繰り返して分離した。分離した細菌株は $ST10^{-4}$ 培地で4回以上培養を繰り返して低濃度有機物培地での増殖能力を確認し、それを通性低栄養細菌分離菌株とした。以後の実験では水深50m層の試水から分離された通性低栄養細菌KE10株を通性低栄養細菌代表菌株として用いた。この菌株は運動性があり、単極毛を持つグラム陰性細菌で、糖発酵能がありオキシダーゼ活性が陽性であること、および増殖に塩を要求することから *Vibrio* sp. と同定された。

基礎培地

本実験では、天然海水を熟成させた熟成海水 (Aged Sea Water, ASW) と、人工海水 (Nine Salt Solution, NSS, Marden et al. 1985) を基礎培地として使用した。ASWは第II章の方法で作成し、そのDOC量は1.3~1.7mgC/l (平均1.6mgC/l) であった。人工海水 (NSS) の無機塩類組成は、NaCl 17.6g; Na_2SO_4 1.47g; $NaHCO_3$ 0.08g; KCl 0.25g; KBr 0.04g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.87g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.41g; $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01g; H_3BO_3 0.01g; である。以上9種類の塩類を超純水 (Nano pure II; Barnstead社) 1 l に溶解した。調製時のpHは約7.4であり、オートクレーブ後もさほど変化はなかった。NSSのDOC量は0.73mgC/lであった。なお使用したガラス器具およびNaClは洗浄後、450°C、1.5時間燃焼し、付着している有機物をできる限り除いた。

種々の有機物濃度の $ST10^{-n}$ 培地での増殖特性

種々の濃度の $ST10^{-n}$ 培地における各偏性低栄養細菌分離菌株および通性低栄養細菌KE10株の増殖を調べるため、まずASW 1 l にトリプティケ

ース (BBL) 5g と、酵母エキス (Difco) 0.5gを添加し $ST10^0$ 培地を調製し、これをASWで10倍、100倍、1,000倍および10,000倍に希釈して、それぞれを $ST10^{-1}$ 培地、 $ST10^{-2}$ 培地、 $ST10^{-3}$ 培地および $ST10^{-4}$ 培地とした。 $ST10^0$ 培地に相当するNS $ST10^0$ 培地は、NSS 1 l に $ST10^0$ 培地と同量のトリプティケース (BBL) と酵母エキス (Difco) を添加し、滅菌後、あらかじめ滅菌してあった Na_2HPO_4 を無菌的に添加 (最終濃度: 10mg/l) して調製した。

偏性低栄養細菌は $ST10^{-3}$ 液体培地に継代・保存しているが、実験に際しては、 $ST10^{-4}$ 培地で2回前培養した後、対数増殖期後期の細菌細胞 (約 10^6 cells/ml) を各濃度の $ST10^{-n}$ 培地またはNS $ST10^{-n}$ 培地に初期細菌密度が約 10^4 cells/mlになるように接種した。培養は15°Cあるいは20°C、暗所で静置培養し、24~48時間間隔で各々の培地から数mlを採取し、DAPI染色による直接検鏡法によって細菌の計数を行った。

通性低栄養細菌KE10株には $ST10^{-1}$ 半流動寒天培地 (寒天濃度0.3%) に継代・保存し、実験に際して $ST10^{-4}$ 培地に接種し、同培地で数回前培養を繰り返した後、種々の濃度の $ST10^{-n}$ 培地に初期細菌密度が約 10^4 ~ 10^5 cells/mlになるように接種し、20°C、暗条件下で静置培養した。12~24時間間隔で数mlの試水を採取し、DAPI法で細菌計数を行った。

結果

各採水日のChl-a量、DOC量、全細菌数 (Total count, DAPI-DC) およびMPN法から得られた全低栄養細菌数 (Total oligotroph, TO) と、通性低栄養細菌 (Facultative oligotroph, FO) 数をTable 3-1に示した。いずれの採水日でも低濃度有機物液体培地を用いたMPN法によって全細菌数の約10%の計数値が得られ、しかもその大部分 (>85%) は偏性低栄養細菌 (Obligate Oligotroph, OO) であった。

偏性低栄養細菌は上記希釈法により11菌株の分離に成功した (Fig. 3-2)。KI-6, KI-11, KI-12, KI-13, KI-14およびKI-15の6菌株は1985年5月の採水時に、KI89A, KI89B, KI89C, KI89DおよびKI89Eの5菌株は

Table 3-1 Bacterial number, DOC and Chl.a contents of sea water samples of Stn.1 (50m) in Wakasa Gulf. Chl.a: chlorophyll a, DOC: dissolved organic carbon, DAPI-DC: number of total bacteria counted by direct counting method with DAPI stain, TO: number of total oligotroph, FO: number of facultative oligotroph, OO: obligate oligotroph, OO/TO: 1-(FO/TO)

	1985.5.11	1989.6.22
Chl. a (ug/l)	0.14	0.22
DOC (mgC/l)	1.05	1.26
Bacterial number (/ml)		
DAPI-DC	4.7×10^5	5.6×10^5
TO	4.7×10^4	6.2×10^4
TO/DAPI-DC	0.10	0.11
FO	7.0×10^3	4.9×10^3
OO/TO	0.85	0.92



Fig. 3-2 Epifluorescence microscopic photograph of obligate oligotroph, KI-15, with DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) stained.

1989年 6月の採水時に分離された。いずれも非常に小さな短桿菌であり、そのうちKI-6, KI-11, KI-12, KI-15および KI89Cの 5菌株はグラム染色陰性, オキシダーゼ活性陽性であった。そのうちの KI89C株の SEM (走査型電子顕微鏡写真) による写真を Fig. 3-3に示した。

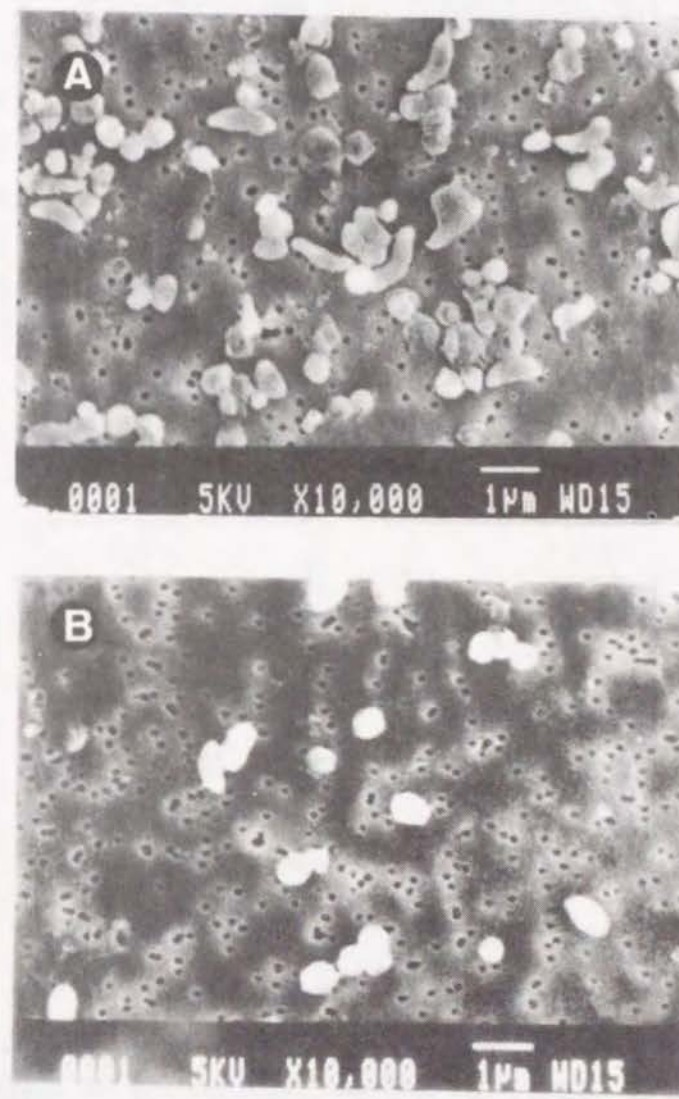


Fig. 3-3 SEM photographs of obligate oligotroph (KI89C) preincubated in $ST10^{-3}$ (A) and $ST10^{-1}$ (B) media.

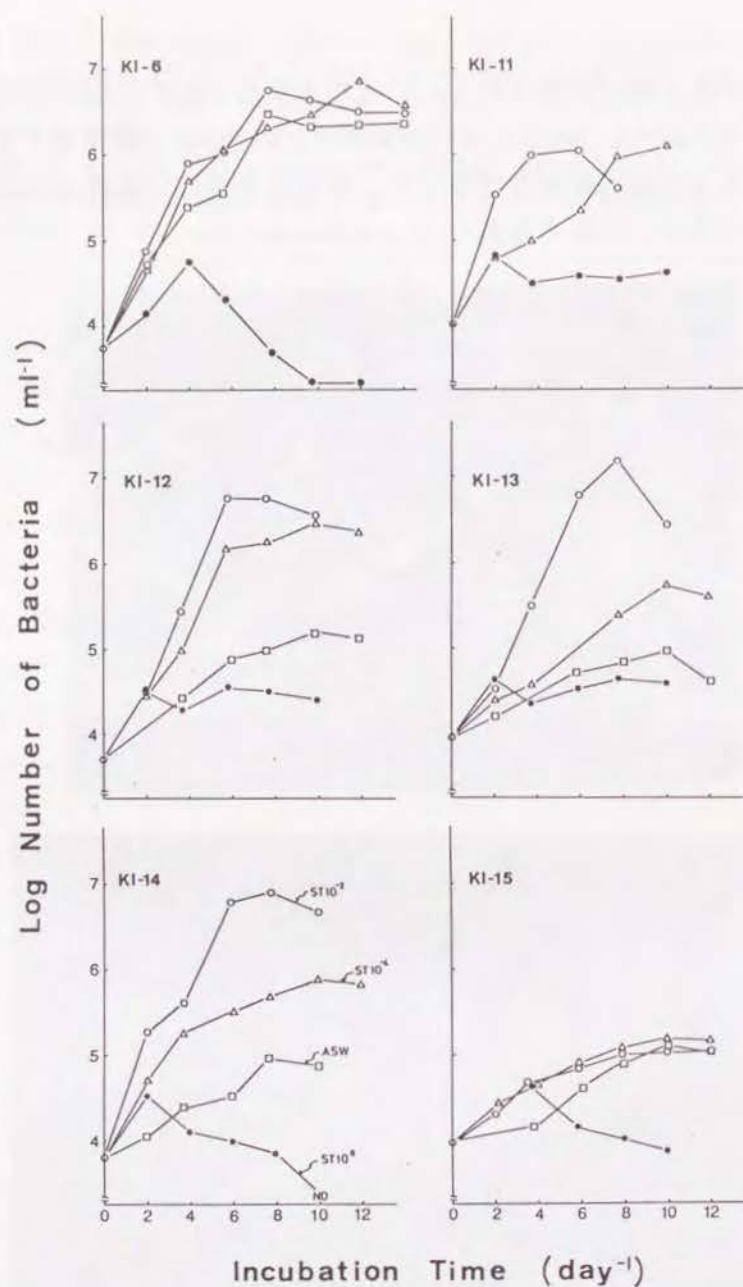


Fig. 3-4 Growth curves of six obligate oligotrophs in $ST10^{-n}$ media. $ST10^0$ (●) medium contained 5g of trypticase peptone and 0.5g of yeast extract in 1l of aged sea water (ASW). $ST10^{-2}$ (○) and $ST10^{-4}$ (△) were prepared with 100 and 10,000 times dilution of the $ST10^0$ medium. ASW medium (□) was the autoclaved ASW without any nutrient added.

偏性低栄養細菌 7 菌株について種々の濃度の $ST10^{-n}$ 培地における増殖曲線を Fig. 3-4 と Fig. 3-5 に示した。いずれの偏性低栄養細菌株も低濃度有機物培地である $ST10^{-4}$ 培地で良好な増殖を示したが、ZoBell 2216E 培地とはほぼ同等の有機物を含んでいる $ST10^0$ 培地では全く増殖することができなかった。それぞれの偏性低栄養細菌の最終細胞収量 (final cell yield) を Fig. 3-6 に、比増殖率 (growth rate, μ) を Table 3-2 に示した。通性低栄養細菌は、 $ST10^{-1}$ 培地と $ST10^{-2}$ 培地では肉眼で濁りが確認できるほどの細菌密度 (およそ $10^7 \sim 10^8$ cells/ml) にまで増殖するが (Fig. 3-8), 偏性低栄養細菌はいずれも 10^7 cells/ml の細菌密度までしか増殖できなかった。通性低栄養細菌や富栄養細菌の場合は 10^7 cells/ml の細菌密度であっても、白濁が確認できることがあるが、偏性低栄養細菌の場合、細菌細胞の大きさが非常に小さいため、もっとも細胞収量がよい場合 (約 2×10^7 cells/ml) であっても白濁が確認することはなかった。比増殖率 (μ) は通性低栄養細菌と較べて一般に非常に低かった。

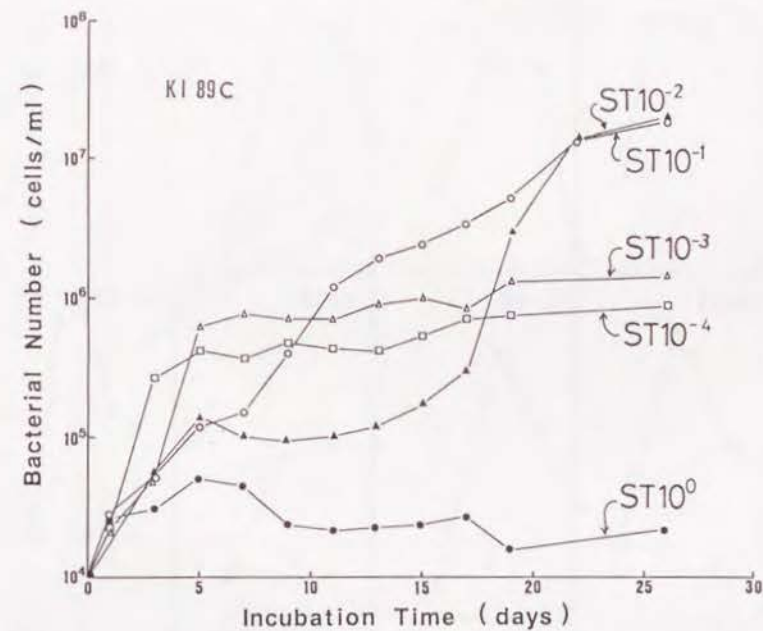


Fig. 3-5 Growth curves of obligate oligotroph (KI89C) in various $ST10^{-n}$ media. $ST10^{-1}$, $ST10^{-2}$, $ST10^{-3}$, $ST10^{-4}$ were prepared with 10, 100, 1000, 10000 times dilution of the $ST10^0$ medium.

Table 3-2 Growth rates (μ , day^{-1}) of obligate oligotroph in various peptone concentration media. NG: no growth. ND: no data

Isolates	Trypticase peptone added (mg/l aged sea water)					
	0	0.5	5	50	500	5000
KI-6	0.654	0.732	ND	0.755	ND	NG
KI-11	NG	0.556	ND	1.221	ND	NG
KI-12	0.363	0.937	ND	1.153	ND	NG
KI-13	0.221	0.412	ND	1.356	ND	NG
KI-14	0.327	1.085	ND	1.198	ND	NG
KI-15	0.256	0.334	ND	0.331	ND	NG
KI89C	ND	0.483	0.340	0.156	0.323 [#]	NG

#: The growth rate of KI89C in high nutrient medium (500mg peptone/l) was calculated after 17days incubation.

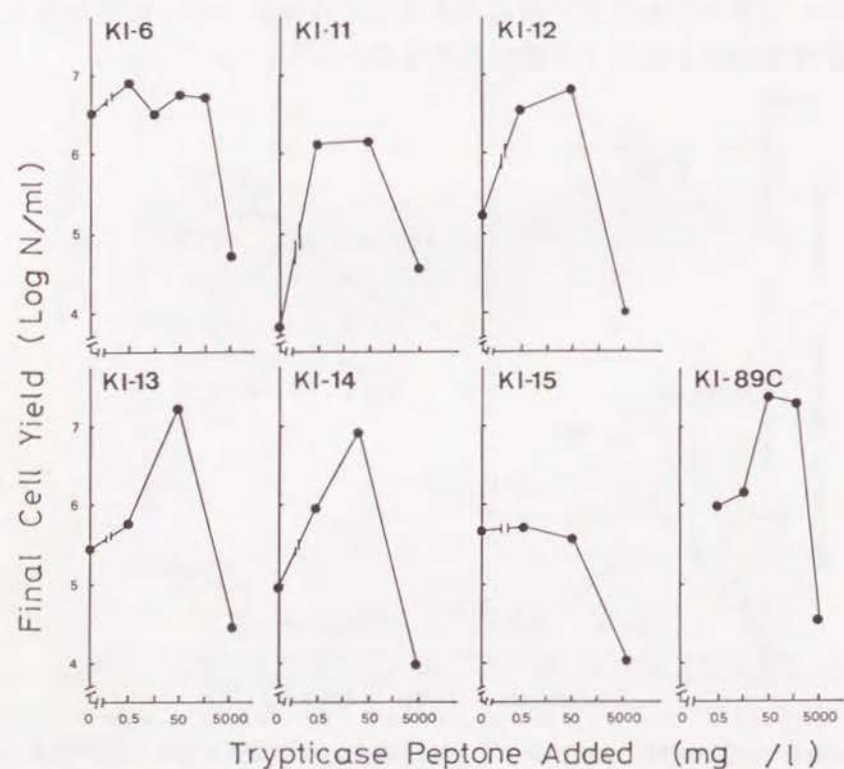


Fig. 3-6 Final cell yields of seven obligate oligotrophs in various trypticase peptone concentrations.

KI89C株は、 $\text{ST}10^{-4}$ ~ $\text{ST}10^{-2}$ 培地では誘導期がほとんどみられなかったが、 $\text{ST}10^{-1}$ 培地では増殖曲線が2段階増殖を示した。他の2菌株の偏性低栄養細菌分離株 (KI89Aと KI89D) においても同様の2段階増殖がみられたため、 $\text{ST}10^{-1}$ 培地で増殖を終えた細菌細胞を再び $\text{ST}10^{-1}$ 培地に接種した。その結果、Fig. 3-7に示すように、 $\text{ST}10^{-4}$ 培地で前培養したときとは異なり、

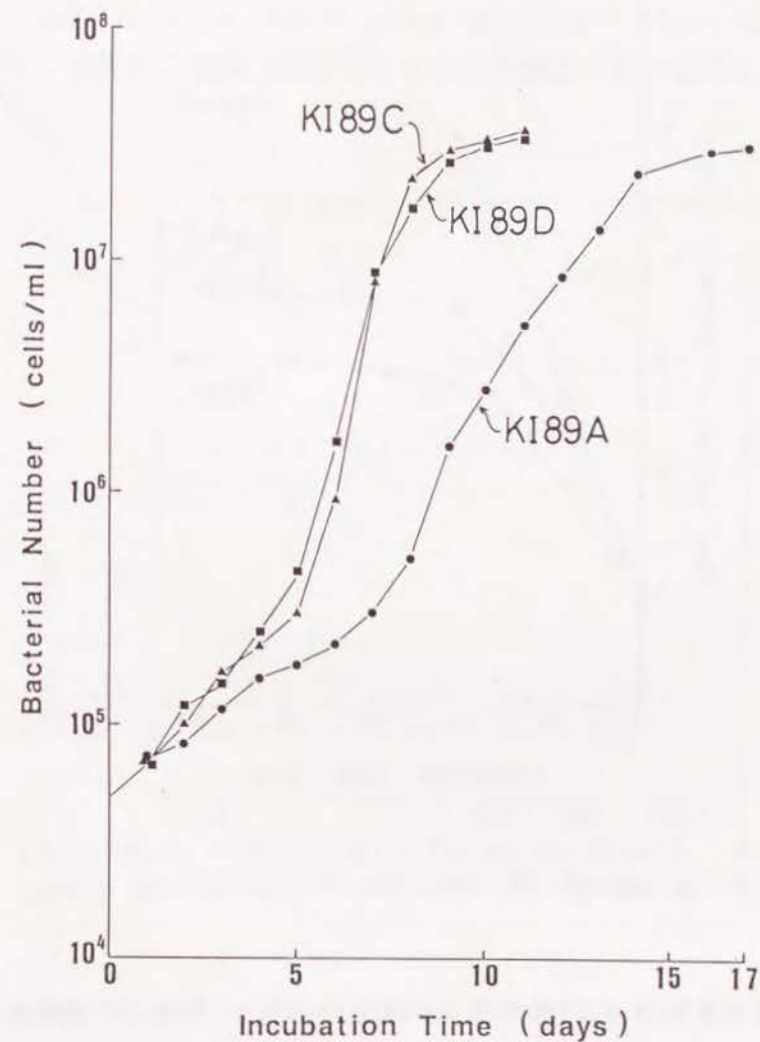


Fig. 3-7 Growth curves of three obligate oligotrophs (KI89B, KI89C, KI89D) in the $\text{ST}10^{-1}$ medium. Each bacterial inoculum was preincubated in $\text{ST}10^{-1}$ medium.

通常の増殖曲線を示し、約 5×10^7 cells/mlの細菌密度に達するまで増殖した。しかし、この時の細菌細胞もきわめて小さな単桿菌 (Fig. 3-3) であったため、肉眼で白濁を確認できるまでにはいたらず、また、この細菌細胞を $ST10^0$ 培地に接種しても増殖しなかった。

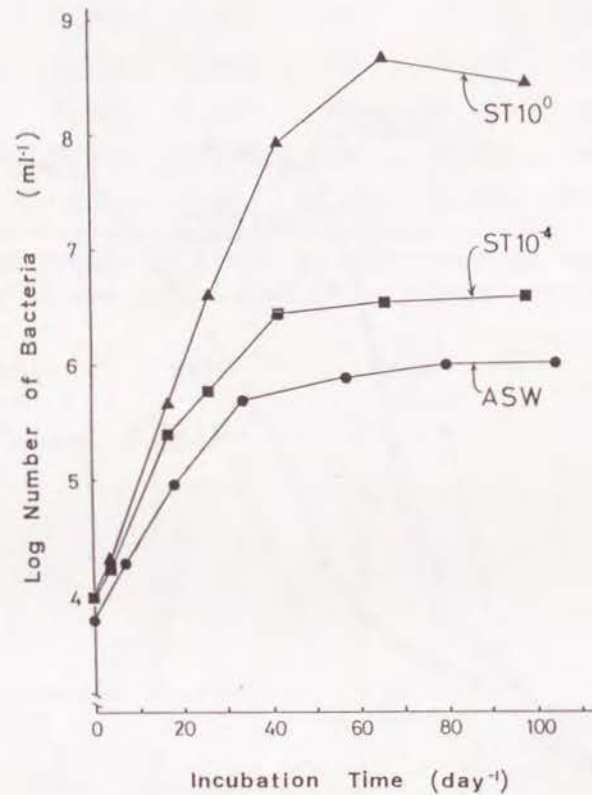


Fig. 3-8 Growth curves of a facultative oligotroph, *vibrio* sp. KE10, in the $ST10^0$, the $ST10^{-4}$ and the ASW media.

通性低栄養細菌 KE10株の種々の濃度の $ST10^{-n}$ 培地での増殖曲線を Fig. 3-8に示した。本実験では低濃度有機物培地で数回前培養を繰り返した細菌細胞を接種したが、低濃度有機物培地でも、それより 10,000倍有機物濃度が高い高濃度有機物培地でも、誘導期もなく通常の増殖パターンを示

した。各濃度のもとでの本菌の比増殖率 (μ) を Fig. 3-9に示した。ペプトン濃度が 1mg/l以下の時、 μ は 0.12/hでほぼ一定であり、それ以上の濃度では徐々に増加し、1,000mg/l以上の濃度では 0.22/hと再び一定になった。最終細胞収量は Fig. 3-10に示したように、0.5mg/l以下の濃度ではペプトン 1mg当り 3.3×10^6 cells, 0.5~100mg/lのペプトン濃度範囲では 1mg当り 1.6×10^6 cells, および 100mg/l以上ではペプトン 1mg当り 3.4×10^5 cellsと培地中の濃度の増加とともに最終細胞収量が低下し、効率が悪くなった。

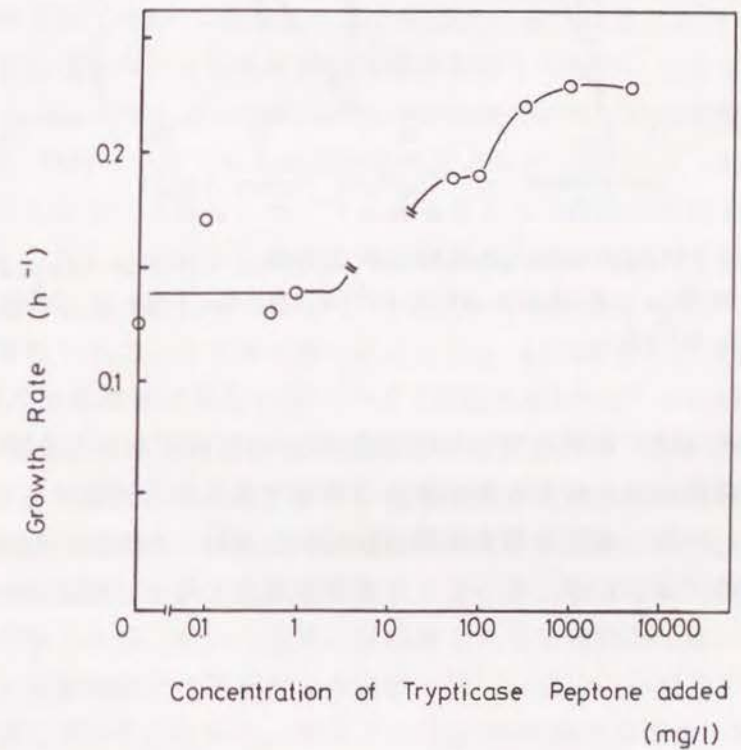


Fig. 3-9 Specific growth rates (μ) of KE10 in various trypticase peptone media.

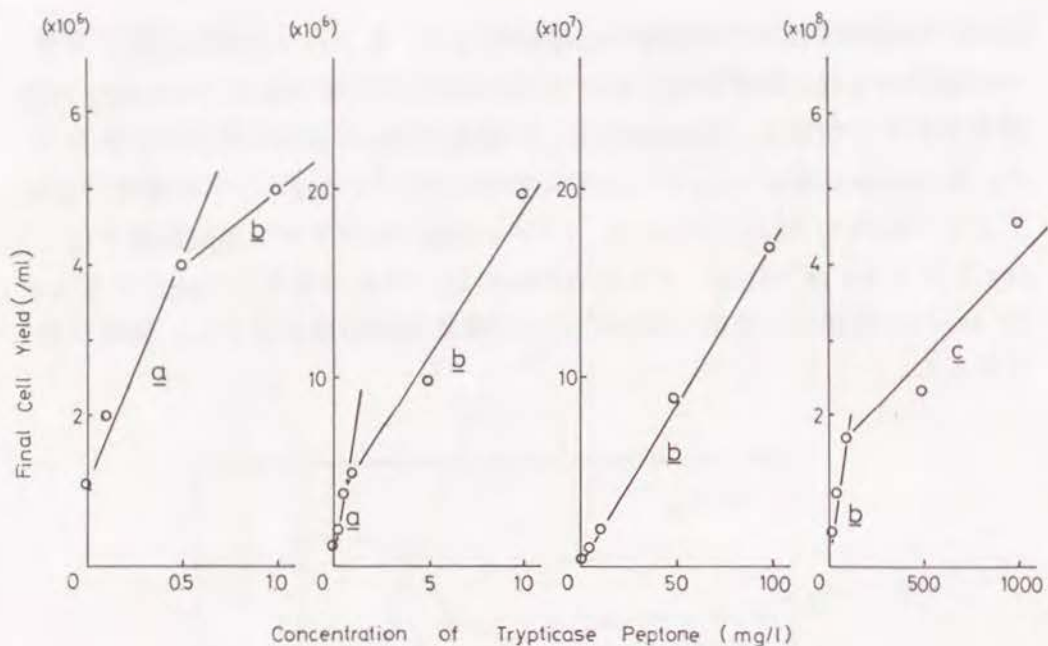


Fig. 3-10 Final cell yields of KE10 in various trypticase peptone media. a: $Y=(3.27 \times 10^6)X$, b: $Y=(1.63 \times 10^6)X$, c: $Y=(3.43 \times 10^5)X$

人工海水 NSSを基礎培地として調製した NSST10⁻¹培地中を用いた場合、偏性低栄養細菌はいかなる有機物濃度の培地であっても増殖することができなかった。一方、通性低栄養細菌 KE10株は、ST10⁻¹培地と同様の増殖をNSST10⁻¹培地で示したが、まったく有機物を添加しない、NSSのみでは増殖はできなかった。

考察

偏性低栄養細菌を分離するために採水した地点では、1985年と1989年のいずれの採水日も全低栄養細菌の大部分が偏性低栄養細菌であった。希釈法によってそれぞれの採水日から合計 11菌株の偏性低栄養細菌を得ることができた。そのうちの 5菌株についていくつかの分類学的性状を調べた

ところ全ての細菌がグラム染色陰性で、オキシダーゼ活性陽性であった。江口(1990)は、外洋水から分離した 29菌株の偏性低栄養細菌のうち 20菌株が低濃度有機物培地で培養を繰り返している間に高濃度有機物培地で白濁するほどの増殖が可能になり、それらの 76.4%がグラム染色陰性、オキシダーゼ活性陽性の *Pseudomonas-Alteromonas*属であることを報告している。今回はそのような現象はみられなかったが、単離された偏性低栄養細菌 5菌株もこの属の細菌であるかもしれない。

7菌株の偏性低栄養細菌は各濃度のペプトン培地における細菌細胞収量から二つのグループに分けることができた。一つはペプトンの添加によっても基礎培地 (ASW) で培養した際と同程度の細胞収量しか得られず、基質として添加したペプトンをあまり有効に利用していないと思われるグループであり (KI-6株と KI-15株)、残りの菌株はペプトンを添加した場合に基礎培地 (ASW) で得られる細菌細胞収量よりも 10倍から 100倍高い細胞収量が得られることから、ペプトンを基質として有効に利用していると思われる。しかし、いずれの偏性低栄養細菌も白濁が確認できるまでの細胞収量は得られず、また ZoBell 2216E培地の有機物濃度に相当する ST10⁰培地では増殖することができなかった。しかし KI-6株および KI189C株は、ST10⁰培地では増殖できないが、ST10⁻¹培地では $6 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^7$ cells/mlまで増殖した。我々は、高濃度有機物培地 (ST10⁻¹培地) で肉眼で増殖を確認できない (白濁を生じない) 細菌を偏性低栄養細菌と定義していたが、これらの結果は、偏性低栄養細菌であっても ST10⁻¹培地 (500mg ペプトン/l) で増殖が可能であることを示している。1985年に MPN法で低栄養細菌を計数した際、ST10⁻¹培地では白濁がみられないが、多くの場合その培養液を直接検鏡法で観察すると $10^6 \sim 10^7$ cells/mlの細菌密度までは細菌が増殖していた。しかし、ペプトン 5g/lの高濃度有機物培地 (ST10⁰培地) では全ての偏性低栄養細菌分離株が増殖ができず、また、ST10⁻¹培地に用いたトリプティケース (BBL) 以外の市販のペプトン (フィトンペプトン: Difco, ポリペプトン: 大五, プロテオースペプトン: Difco) やカゼインの完全加水分解物であるカザミノ酸 (Difco) を培地基質として使用した場合にも、やはり 5g/lの高濃度では増殖できないという結果も得られて

おり、一般に偏性低栄養細菌が増殖可能なペプトン濃度の上限は 0.5g/l から 5g/lの間にあるのではないと思われる。以上の結果から、偏性低栄養細菌を「ZoBell 2216E培地と同等のペプトン (5g/l) を含む高濃度有機物培地では増殖が不可能な細菌」と定義することができよう。Akagi et al. (1980b) はガラスファイバーフィルターまたは寒天平板低濃度有機物培地上に形成されたコロニーから分離したいくつかの低栄養細菌 (通性低栄養細菌) が、培地に含まれる有機物濃度が高くなるにしたがって細胞収量が低下した事例を報告している。彼らの分離した低栄養細菌は数十から数百 mgC/lの有機物濃度の培地では白濁が確認できるほど増殖が可能であり、今回分離した偏性低栄養細菌とは増殖特性が異なっているが、高濃度有機物培地での増殖阻害が見られる点で興味を持たれる。

通性低栄養細菌 KE10株は全く有機基質を添加しない熟成海水 (ASW) 中であっても、それより 10,000倍も有機物濃度が高い ST10⁰培地と同様に増殖が可能であった。KE10株以外にも同じく熊野灘から分離された 3株の通性低栄養細菌もやはり高低両培地および熟成海水中で同様に良好な増殖を示した。Carlucci et al. (1986) は、基質無添加の寒天平板培地によって太平洋から分離した低栄養細菌 (通性低栄養細菌と思われる) が表面海水から得られた熟成海水のみの培地で 8.0×10^5 cells/mlまで増殖し、人工海水中であっても 6.0×10^6 cells/mlまで増殖することを報告している。今回分離された KE10株を含む通性低栄養細菌は、低栄養環境への適応という点でこれらの細菌に匹敵し、数百 μ g ~ 数gC/lのきわめて広範囲の有機物濃度環境に対して即座に対応して増殖しうる非常に適応能力に富んだ細菌であることが明らかになった。このような細菌は湖水からも報告されている (Ishida et al. 1982)。沿岸域では夏期に一時的に 300mgC/lの DOC量の増加が見られることが報告されている (Banoub & Williams 1972) ほか、微細藻類のブルーム発生時などには環境水の DOC量が爆発的に増加することが多い (Jorgensen 1986)。一方、外洋域では 50 μ gC/l程度の DOC量の日周変動が見られることが報告されている (Johnson et al. 1981) が全体として有機物濃度の変動は小さいと思われる。しかし、非常に小さい空間的規模 (microenvironment, 例えば粒状有機物, 植物プランクトンの表面

及び近傍)、あるいは非常に短い時間的規模では比較的大きな有機物濃度の変動が存在する可能性がある (Kjelleberg et al. 1987)。通性低栄養細菌の持っている有機物環境に対するこのような能力はそのような変動に十分対応し得るものであろう。

通性低栄養細菌 KE10株は高栄養・低栄養両培地において偏性低栄養細菌分離菌株よりも高い比増殖率および細菌細胞収量を示した。このような室内実験の結果は実際の現場環境においても、通性低栄養細菌は偏性低栄養細菌よりも有機物環境に対する適応戦略の面で圧倒的に有利であることを示唆する。しかし、外洋環境での¹⁴C-MPN計数の結果 (Ishida et al. 1986, Eguchi & Ishida 1990) によると、低栄養海域では偏性低栄養細菌は通性低栄養細菌よりも優勢である事が示されている。この矛盾の原因として、① 通性低栄養細菌と偏性低栄養細菌の生存競争には有機物濃度以外の要因、例えば利用可能な有機物の種類等、が作用している、② 偏性低栄養細菌は自然環境では高い増殖活性を持っているが、分離の過程で本来の活性を失ってしまった、などの理由が考えられる。これらの問題はⅢ-2 からⅢ-5 において検討する。

Ⅲ-2 KE10株の低有機物濃度培地への増殖適応

通性低栄養細菌である KE10株は、外洋低栄養海域から低濃度有機物液体培地で分離・培養され、高濃度有機物培地にも低濃度有機物培地にも増殖する。本節では、本菌株を用いて、高濃度有機物培地 (ST10⁻¹培地) および低濃度有機物培地としての有機基質無添加の熟成海水 (ASW培地) で培養し、それぞれの培地に適応させることによってその増殖特性がどのように変化するか調べた。

実験方法

実験に用いた KE10株の細菌細胞の調製方法を Fig. 3-11に示した。本菌を ST10⁻¹培地で 48時間培養し、遠心分離 (8000G×10min) によって無

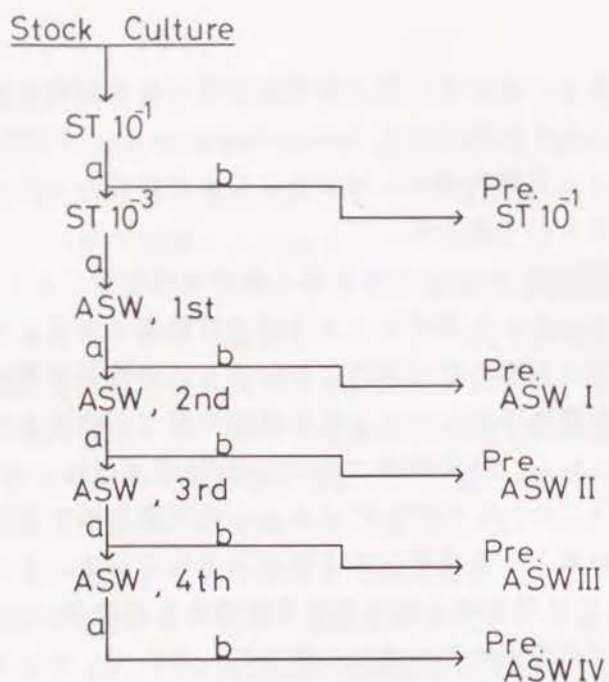


Fig. 3-11 The methodological scheme of preincubation. a: incubation for 2 days at 20°C. b: preparation of bacterial inoculum.

菌的に集菌し、滅菌ろ過 ASWで 2回洗浄し、これを「Pre. ST10⁻¹」とした。この細菌細胞を ST10⁻³培地で 48時間培養した後、初期細菌密度が 10⁴ cells/mlになるように ASW培地 (III-1 参照) に接種し、48時間培養した細菌細胞をヌクレオポアフィルター (孔径 0.2 μm) 上に無菌的に集菌し、滅菌ろ過 ASWで 2回洗浄したものを「Pre. ASW I」とした。さらに、ASW培地による培養を 2回、3回および 4回と繰り返し、同様の操作で集菌した細菌細胞を、それぞれ「Pre. ASW II」、「Pre. ASW III」および「Pre. ASW IV」とした。このようにして集めた各々の細菌細胞を、初期細菌密度が約 4 × 10⁴ cells/mlになるように ST10⁰培地と Gly2000培地 (下記) に接種し、それぞれの培地での増殖を、経時的に直接検鏡 (DAPI染色法、II章参照) による全菌計数 (direct count, DC) と ST10⁻¹寒天平板培地 (III-1 参照) を用いた塗沫平板培養法による生菌計数 (plate count, PC) によって調べた。
Gly2000培地は、グリシン (Gly; 半井) 6.2gと酵母エキス (Difco)

0.05gを ASW 1 l に溶解して調製した培地であり、ST10⁰培地とほぼ同じ量の有機物 (2gC/l) を含有している。さらに Gly2000培地を ASWによって 10, 100および 1,000倍に希釈した培地をそれぞれ Gly200, Gly20および Gly2培地とし、「pre. ST10⁻¹」と「Pre. ASW IV」の細菌細胞の各培地での増殖曲線を調べた。

結果

熟成海水 (ASW) 培地に繰り返し培養した際の細菌数 (直接検鏡) の変化を Fig. 3-12に示した。前節で述べたように KE10株は ASW培地でも良好な増殖を示し、ASW培地での継代培養を通じても比増殖率および細菌細胞収量に著しい変化はなかった。

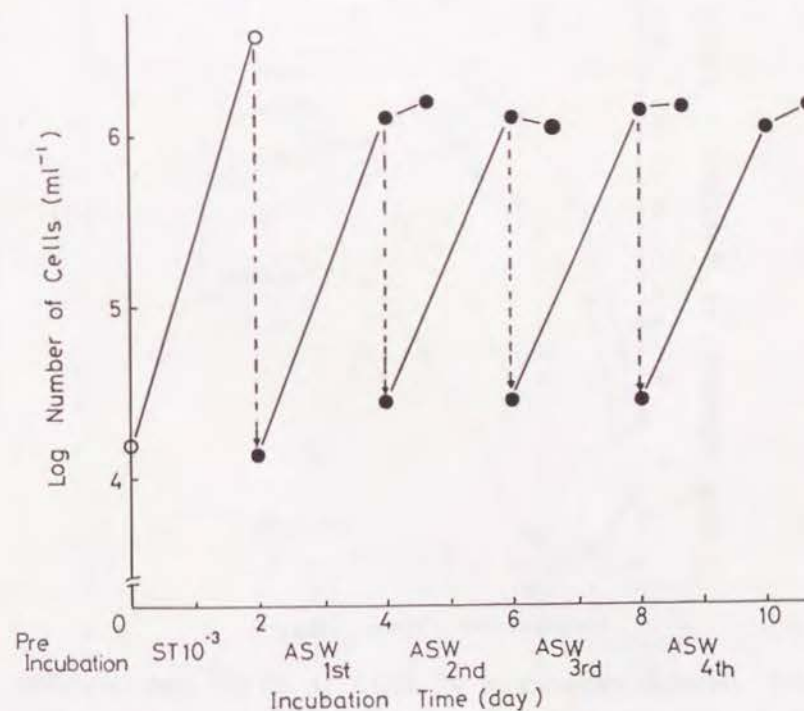


Fig. 3-12 Changes of bacterial cell number in preincubations of low nutrient media.

「Pre. ST10⁻¹」から「Pre. ASWIV」までの細菌細胞をそれぞれ ST10⁰培地および Gly2000培地に接種し、その増殖曲線を Fig. 3-13に示した。それぞれの細菌細胞の ST10⁰培地での増殖パターンに全菌数 (DC) と生菌数 (PC) とともに明瞭な差異は認められなかった。一方、「Pre. ST10⁻¹」から「Pre. ASWII」までの細菌細胞を Gly2000培地に接種し増殖を調べたところ、DCでも PCでも 2日間の誘導期を経た後、増殖を開始し、最終的には約 10⁸ cells/mlの細菌細胞収量を得ることができたのに対し、「Pre. ASWIII」の細菌細胞を Gly2000培地に接種した場合 3日間の誘導期を経て増殖を開始したが、「Pre. ASWIV」の細菌細胞では少なくとも 7日間の培養期間内には DCと PCいずれの場合も対数増殖を開始しなかった。この「Pre. ASWIV」の細菌細胞は高濃度ペプトン培地 (ST10⁻¹培地かST10⁰培地) で培養するこ

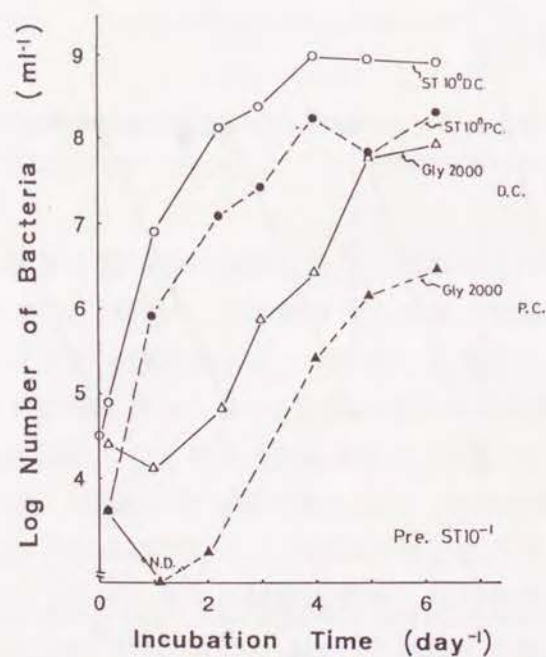
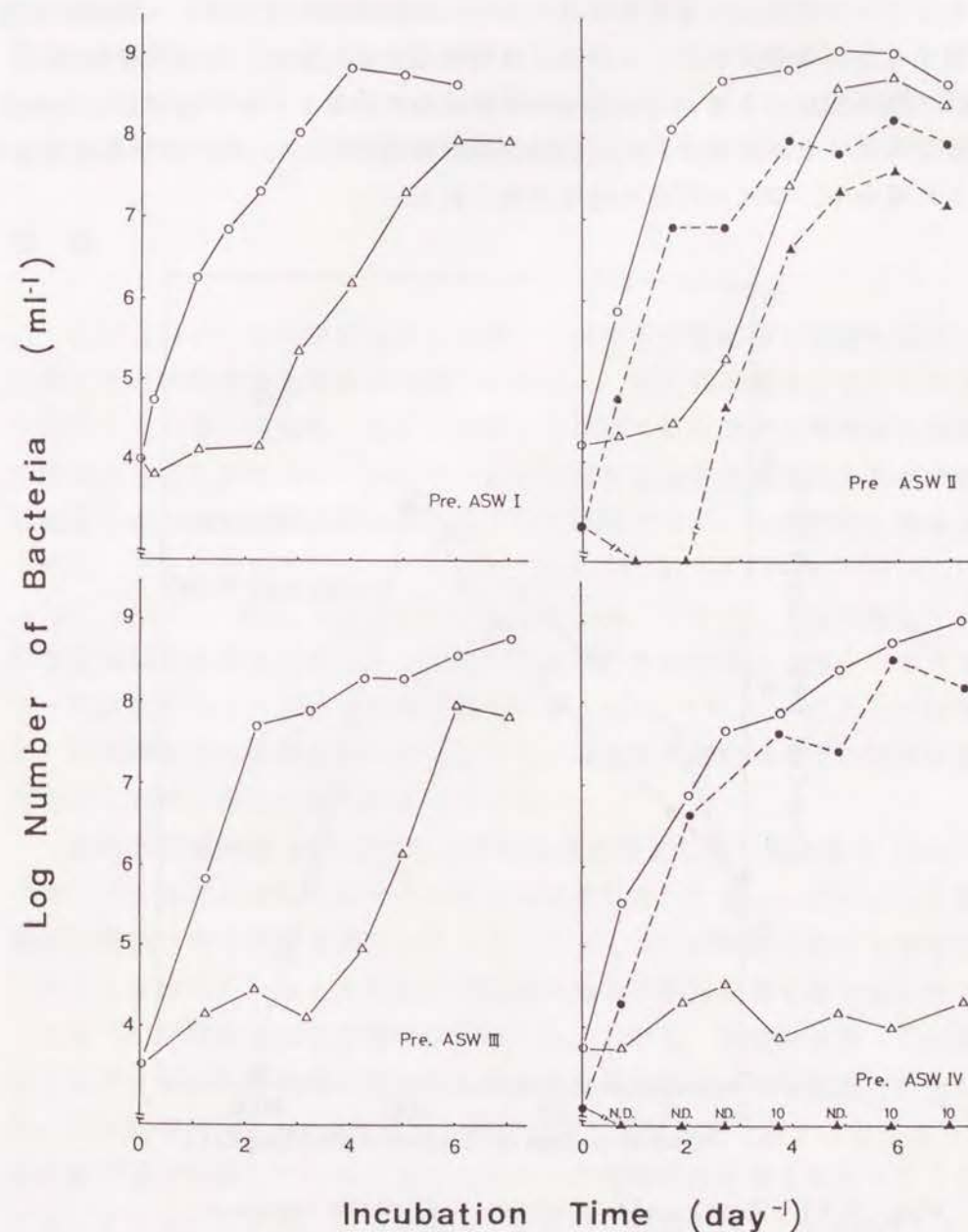


Fig. 3-13 Growth responses of KE10 in ST10⁰ and Gly2000 media (6.2g glycine and 0.5g yeast extract added to ASW). D.C.: direct counting with DAPI stain (○ △), P.C.: viable counting on ST10⁻¹ agar plate (● ▲). See to Fig. 3-11 for Bacterial inoculum.



とにより、再び Gly2000培地での増殖能を回復した。さらに数回の追試をおこなった結果、「低栄養環境に適応した細菌細胞はペプトン培地には増殖するが、高濃度グリシン培地では増殖能を喪失する」という現象は、KE10株を少なくとも4回以上ASW培地で継代培養した時に必ず見られる現象であることが確認された。低濃度有機物培地としてNSST10⁻⁴培地を使用した場合も、やはり同様の結果が得られた。

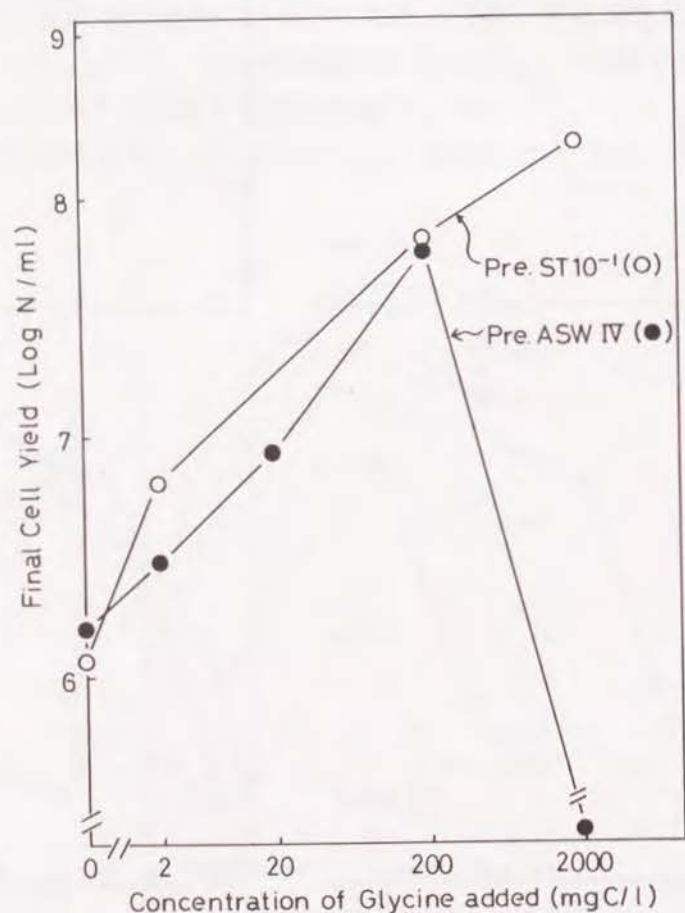


Fig. 3-14 Final cell yields of KE10 in various concentrations of glycine media. Bacterial inoculum were preincubated in ST10⁻¹ (Pre.ST10⁻¹) and ASW for 4 times (Pre.ASW IV).

「Pre.ST10⁻¹」と「Pre.ASWIV」の細菌細胞を種々の濃度のグリシン培地に接種し、得られた最終細胞収量を Fig. 3-14に示した。Gly200培地より低濃度の培地における細胞収量は「Pre.ST10⁻¹」と「Pre.ASWIV」の間ではほとんど差はみられず、Gly2000培地での増殖能を失った「Pre.ASWIV」であっても低濃度グリシン培地での増殖能は保持していた。

考察

江口(1990)は外洋環境から分離した偏性低栄養細菌が分離の過程で、高濃度有機物培地でも増殖する能力を獲得し、通性低栄養細菌化した事例を報告している。同様に、最初に分離した段階では高濃度有機物寒天培地で増殖することができなかった従属栄養細菌が低濃度有機物寒天培地で植え継ぎを繰り返す過程で高濃度有機物寒天培地でコロニーを形成し得るようになったという報告もいくつかある(Shimidu et al. 1986, Carlucci et al. 1986)。逆に、*Cytophaga johnsonae*が、グルコースを制限した状態で長期間連続培養を行うことによって高濃度有機物寒天培地上でのコロニー形成能を失った事例も報告されている(Höfle 1983)。これらの報告は、低栄養細菌が環境条件の変化により、高濃度有機物培地での増殖能を可逆的に変化し得る可能性を示している。

通性低栄養細菌 KE10株は全く有機基質を添加しない熟成海水(ASW)であっても良好な増殖を示すことはすでに示した。しかし、このような低濃度有機物培地で培養を繰り返すことによって ST10⁰培地における増殖能を失うことはなく、たとえ低濃度有機物培地で十数回培養を繰り返したとしても ST10⁰培地で即座に増殖を開始した。しかし、特定の基質(この場合はグリシン)を有機基質とする高濃度有機物培地での増殖能は消失した。この結果は KE10株が低濃度有機物培地で増殖を繰り返すことにより、高栄養環境で生存しているときとは異なった増殖特性を得るに至ったことを示している。この際、低栄養環境に適応した細菌細胞「Pre.ASWIV」であっても高濃度ではなく低濃度のグリシンを基質として添加した培地では十分に増殖することができ(Fig. 3-14)、「Pre.ST10⁻¹」とほぼ同様の最終

細胞収量を得ることができた。つまり、通性低栄養細菌 KE10株は低濃度有機物培地で数回培養を繰り返すことにより、グリシンを基質とした場合には「低濃度有機物培地では増殖が可能だが高濃度有機物培地では増殖することができない」という偏性低栄養細菌の特徴を示すようになることが明らかになった。低栄養環境に適応し、Gly2000培地での増殖能を失った細菌細胞「Pre. ASWIV」であっても、再び高濃度有機物培地 (ST10⁻¹培地) で増殖させると Gly2000培地での増殖能を回復し、細菌細胞の形状も「Pre. ST10⁻¹」のそれに戻ることから、このような増殖特性は可逆的に変化し、KE10株がおかれる有機物環境によって引き起こされることが明らかになった。以後の実験では ASWあるいは NSST10⁻⁴培地などの低濃度有機物培地で増殖を繰り返し、低栄養環境に適応していると思われる細菌細胞を「Oligotrophic phase cell, O-CELL」とし、高濃度有機物培地で増殖を繰り返している細菌細胞「Eutrophic phase cell, E-CELL」とは区別する。

III-3 飢餓状態における通性低栄養細菌 KE10株の生理的特性

外洋域などの低栄養環境における従属栄養細菌の適応戦略の一つとして、飢餓状態での生存が挙げられる。海洋細菌の飢餓生存に関する生理的研究は Morita (1984, 1985) や Kjelleberg et al. (1987) らによって行われているが、大腸菌等による基礎的な研究は数多くなされている (Koch 1971, 1979, Matin 1979)。本節では、通性低栄養細菌 KE10株の飢餓生残能力を基質取り込みや高分子合成および細菌細胞の形態などの面から調べ、従来の研究と比較し、検討した。

実験方法

飢餓実験

KE10株を NSST10⁻¹培地あるいは ST10⁻¹培地 (II-1 実験方法 参照) で細菌密度が 10⁸ cells/ml (OD₆₆₀値 0.08) になるまで培養した細菌細胞を遠心分離 (8000G × 10min) によって集菌し、滅菌ろ過 NSSで 2回洗浄した後、10⁸ cells/mlの細菌密度になるように滅菌ろ過 NSSに再懸濁した。培養はすべて 20°C, 暗所, 静置で行った。適当な時間間隔で試料を採取し、以下の実験に供した。なお、すべてのガラス器具はあらかじめ 450°C, 1.5時間の燃焼処理を施した。

細菌計数

採取した試料に最終濃度が 4% になるように中性ホルマリンを添加し、固定した。この固定試料を DAPI染色した後、直接検鏡によって計数した値を全菌数 (total cell count, T.C.) とした。生菌数 (viable cell count, V.C.) は ST10⁻¹寒天培地による塗沫平板上のコロニー数で示した。

呼吸細菌数 (respired cell count, R.C.) は以下の方法 (Zimmermann et al. 1978) で計数した。採取した試料に最終濃度が 0.02% になるように INT (2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride) を添加し、暗所に 20分間放置した後、中性ホルマリン (最終濃

度 2%) を添加して反応を停止した。その後直接検鏡と同じ要領で、スダンプラックであらかじめ染色した 0.2 μ mヌクレオポアフィルター上にろ過捕集し、落射蛍光顕微鏡によって計数した。なお、INTは細菌の電子伝達系の活性により還元され、紫外線の照射によって蛍光を発生する赤色沈澱、INT-formazan, を生成する。

走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察および体積の測定

走査型電子顕微鏡観察用の試料は以下のようにして調製した。採取した細菌試料に最終濃度で 1% になるように電子顕微鏡用グルタルアルデヒド (半井) を添加し、5 $^{\circ}$ C で 12~24 時間放置して前固定し、さらに最終濃度が 2% になるようにグルタルアルデヒドを添加して後固定 (2 時間) を行った。それぞれ 10⁶ cells/ml になるようにろ過 NSS で希釈した後、1 ml を孔径 0.2 μ m のヌクレオポアフィルター上にろ過捕集した。細菌試料ののったフィルターを 50% から 100% のエタノール溶液で順次脱水し、酢酸イソアミルに置換した後、臨界点凍結乾燥を行った (JCPD-5, 日本電子)。乾燥した試料はイオンスパッタリング装置 (FC1100, 日本電子) で金蒸着し、走査型電子顕微鏡 (JEM-840A, 日本電子) で観察した。

さらに SEM のモニター上の 40 個の細胞を任意に選び、長軸 (L) および短軸 (W) の長さを計測し、以下の計算式を用いて細菌細胞の体積を計算した。

$$V = (\pi / 4) \times W^2 \times (L - W / 3) \quad (\text{Bratbak 1985})$$

タンパク質および DNA の合成活性

飢餓開始後経時的に採取した試料を、遠心分離 (8000G \times 10min) で集菌し、滅菌ろ過 NSS で 2 回洗浄した後、全菌数値で 10⁷ cells/ml になるように滅菌ろ過 NSS に再懸濁した。この細菌懸濁液を 2 つの三角フラスコに 20 ml ずつ分注した後、それぞれに L-³H-ロイシン (4.44 TBq, 120 Ci / mmol, Amersham) 0.5 MBq と ³H-チミジン (methyl-³H-thymidine: ³H-TdR, 2.44 TBq, 65.9 Ci / mmol, ICN) 0.3 MBq を別々に添加して反応を開始した。添加した ³H-ロイシンおよび ³H-チミジンはいずれも 5 nM の濃度である。2,

4 と 6 分後にそれぞれのフラスコから試料を 1 ml ずつ採取し、これらを、あらかじめ冷 10% TCA 水溶液 1 ml の入った試験管に添加して、水中で 5 分間抽出を行った。抽出終了後、孔径 0.2 μ m ニトロセルロースメンブレンフィルター (ADVANTECH 社) 上に速やかにろ過捕集し、5 ml の冷 5% TCA 水溶液で 2 回洗浄後、ガラスバイアルに移した。この試料に液体シンチレーター (AQUASOL II, NEN) を加え、液体シンチレーションカウンター (PACARD model 2425, あるいは ALOKA LSC3050) で放射活性を測定した。非生物的な放射活性の吸着を測定するため、空試験として最終濃度 4% のホルマリンで処理した細菌懸濁液を用意し、試料 3 本、空試験 1 本立てで実験を行った。測定値は直線部分について最小二乗法による直線回帰を行い、細菌内高分子画分への同化速度を求めた。なお、予備実験としてロイシンのタンパク質画分への同化活性測定のためのタンパク質抽出法として、80 $^{\circ}$ C \cdot 1 時間の加熱処理も検討したが、水中で 5 分間処理して得られた値と統計的に差がみられず、取り込まれた後、タンパク質以外の高分子画分へ同化されるロイシンは無視できると判断した。

アミノ酸混液 (protein hydrolysate, Prot. hy.) およびグルコースの同化活性

飢餓開始後経時的に採取し、上記と同様の操作で調製した、細菌懸濁液 20 ml に ¹⁴C-アミノ酸混液 (¹⁴C-protein hydrolysate, ¹⁴C-Prot. hy., 57 mCi / miliatom carbon, Amersham), あるいは D-¹⁴C-グルコース (295 mCi / mmol, ICN) をそれぞれ 1 μ Ci 添加した。培養は 20 $^{\circ}$ C で行い、2, 4, 6 および 8 分後にそれぞれ 1 ml ずつ採取し、速やかに 0.2 μ m ニトロセルロースメンブレンフィルター上にろ過捕集し、滅菌 NSS で 2 回以上洗浄後、ガラスバイアルに移し、上記と同様に放射活性を測定した。それぞれの基質の細菌内への同化速度は得られた測定値の直線部分を直線回帰して求めた。

結 果

飢餓状態における細菌数の変動

KE10株を飢餓状態に3週間おき、その間の全菌数(T.C.)呼吸細菌数(R.C.)および生菌数(V.C.)をFig. 3-15に示した。T.C.は飢餓期間を通じて徐々に減少する傾向はあるが、著しい変化はみられなかった。それに対しV.C.は飢餓開始後直ちに減少し始め、6日後には飢餓開始時の22%に低下したが、その後は減少せずほぼ一定であった。飢餓開始直後のT.C.に対するV.C.の割合は38%であったが、6日後には7%となっていた。一方、R.C.は飢餓開始直後にはT.C.の91%であり、飢餓の進行にしたがって漸減する傾向はあるがV.C.のような著しい低下はなく、6日目以降T.C.の50%程度の値で推移した。長期間(20週間)飢餓環境に放置してもT.C.は飢餓直後の値とほとんど変わらず、またV.C.は飢餓直後の17%(T.C.に対しては10%)が維持されていた。

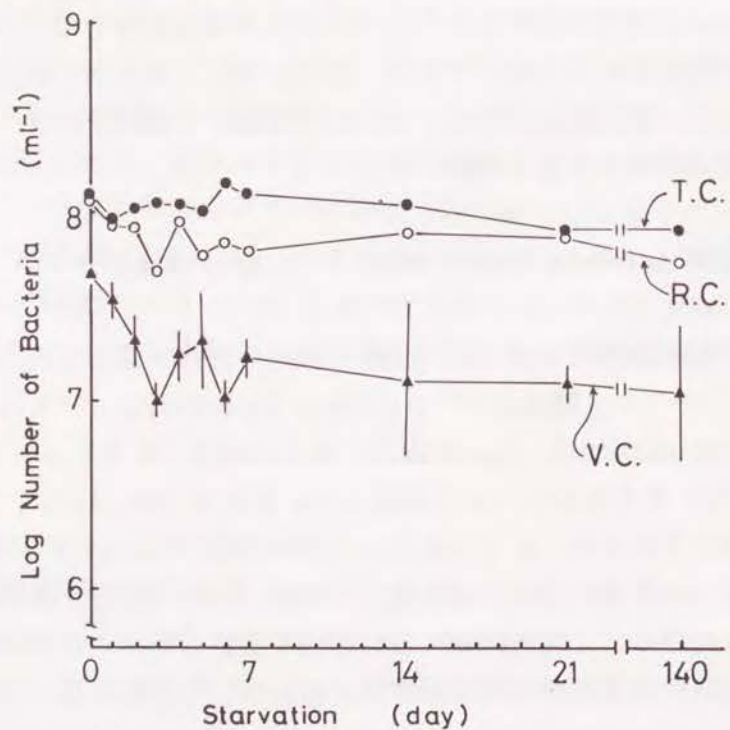


Fig. 3-15 Change of bacterial cell number of KE10 during a starvation experiment. T.C.: total cell count with DAPI stain, R.C.: respiring cell count with INT methods, V.C.: viable cell count with $ST10^{-1}$ agar plate.

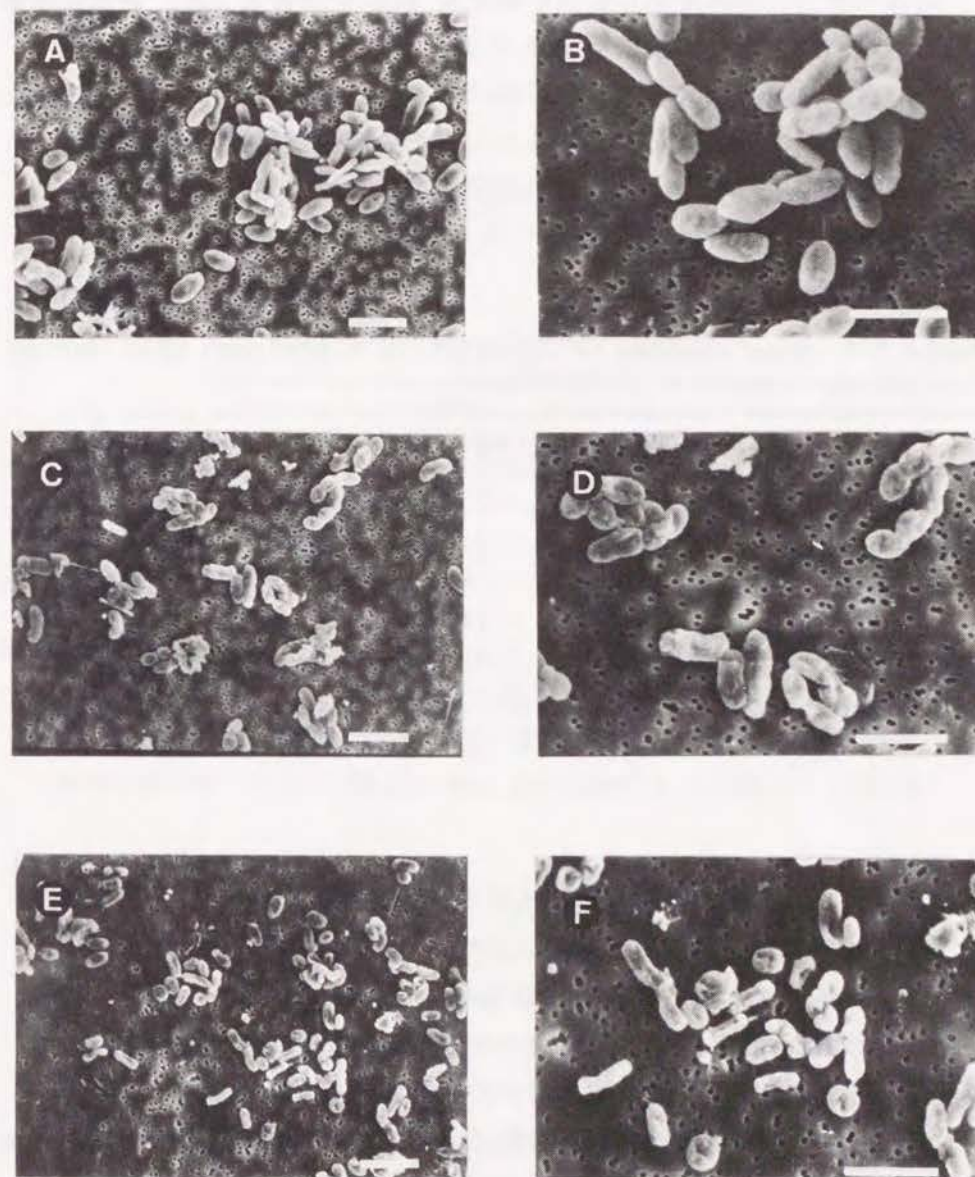


Fig. 3-16 SEM photographs of KE10 at 0 (A, B), 3(C, D), 21(E, F)days starvation. bar: $3\mu\text{m}$ (A, C, E), $1\mu\text{m}$ (B, D, F).

飢餓期間中の細菌細胞の形態の変化を Fig. 3-16に示した。高濃度有機物培地中の細菌細胞の体積は平均で $0.60 \mu\text{m}^3$ であった。飢餓開始直後(1日~3日)の細菌は大きさにはそれほど変化はみられなかったが、細菌表面にくぼみがあるものが多くみられた。その後、飢餓が進行するにしたがって細菌細胞は徐々に小型化し 2週間後には長軸で 61.5%，短軸で 68.4%に減少し、体積は飢餓直後の 23.3%になった (Table 3-3)。

Table 3-3 Size changes of facultative oligotroph KE10 during starvation. Means \pm SE (n>20).

	Length(μm)	Width(μm)	Volume(μm^3)
0day	1.74 ± 0.42	0.72 ± 0.06	0.60 ± 0.17
1day	1.58 ± 0.26	0.70 ± 0.05	0.52 ± 0.12
3days	1.53 ± 0.26	0.68 ± 0.05	0.47 ± 0.13
7days	1.19 ± 0.53	0.48 ± 0.04	0.19 ± 0.11
14days	1.02 ± 0.37	0.49 ± 0.09	0.16 ± 0.08
21days	1.00 ± 0.25	0.48 ± 0.08	0.15 ± 0.07

DNAおよびタンパク質の合成活性

飢餓期間中の潜在的な DNAおよびタンパク質の合成活性の変化を、それぞれ ^3H -チミジン (^3H -TdR) および ^3H -ロイシン (^3H -Leu) の細胞内高分子画分への同化活性を指標として調べた (Fig. 3-17)。飢餓開始時の ^3H -TdRの DNA画分への同化速度は $22.4 \times 10^{-22} \text{mol/cell/min}$ であり、 ^3H -Leuのタンパク質画分への同化速度は $198.2 \times 10^{-22} \text{mol/cell/min}$ であった。DNA合成活性は飢餓開始直後に急激に減少し、1日後には開始時の 10%になり、その後一定になった。それに対してタンパク質合成活性は飢餓 1日後も開始時とほぼ同等の活性を維持していた。その後、タンパク質合成活性は徐々に減少するものの、2週間後も開始時の 41%の活性を維持していた。

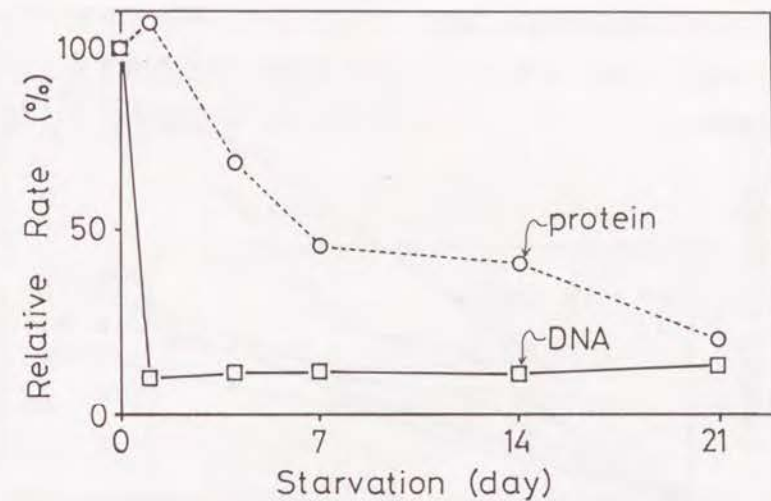


Fig. 3-17 Changes of relative rates of DNA and protein synthesis activities by KE10 during starvation. DNA and protein synthesis rates were expressed as methyl- ^3H -thymidine and L- ^3H -leucine incorporation rates into TCA insoluble fraction. The values were related to the incorporation rate that was obtained at the onset of starvation (0 h) which was assigned a value of 100 (%).

アミノ酸混液およびグルコースの同化活性

KE10株は飢餓進行中であっても、有機基質の添加に即座に対応して、速やかにアミノ酸とグルコースの取り込みを開始することができた (Fig. 3-18)。 ^{14}C -アミノ酸混液 (^{14}C -prot. hy.) および ^{14}C -グルコース (^{14}C -Glucose) の同化活性の飢餓期間中の変化を Fig. 3-19に示した。飢餓開始時にはアミノ酸混液およびグルコースの同化活性は、それぞれ $8.11 \times 10^{-19} \text{atom carbon/cell/min}$ と $0.78 \times 10^{-19} \text{mol/cell/min}$ であった。飢餓開始 1日後、T.C. 当りの同化活性はそれぞれ増加し、アミノ酸混液に関しては開始時の 1.3倍に、グルコースに関しては 1.2倍になった。その後、飢餓経過にしたがってそれぞれの値は減少し、アミノ酸混液の場合は 1週間後に開始時の 61.9%，飢餓 2週間経過以降は開始時の 50%前後の値で

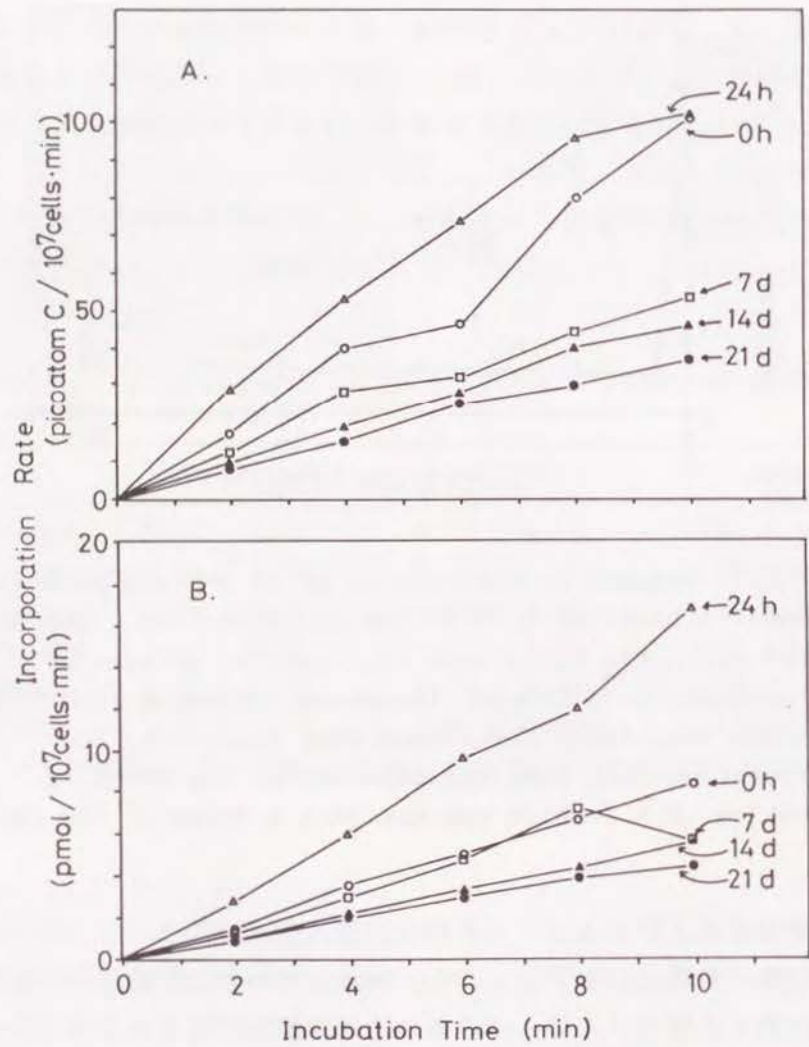


Fig. 3-18 Incorporation rates of ^{14}C -protein hydrolysate (A) and ^{14}C -glucose (B) by KE10 at 0, 1, 7, 14, 21 days of starvation.

推移した。グルコースの場合 1週間後に開始時とほぼ同じ同化活性に戻り、2週間経過以降は開始時の 60%前後の値で推移した。飢餓期間中の同化活性を R.C. 当りで換算すると、それぞれの基質の値は飢餓開始 1日後は開始時の値の 1.2倍および 1.7倍に増加し、この高い同化活性は飢餓 1週間後

もほとんど減少しなかった。しかし、飢餓 2週間後以降にはこの高い活性も失われ、全菌数当りでの推移と同じようにそれぞれ開始時の 50ないし 60%前後の値で一定になった。

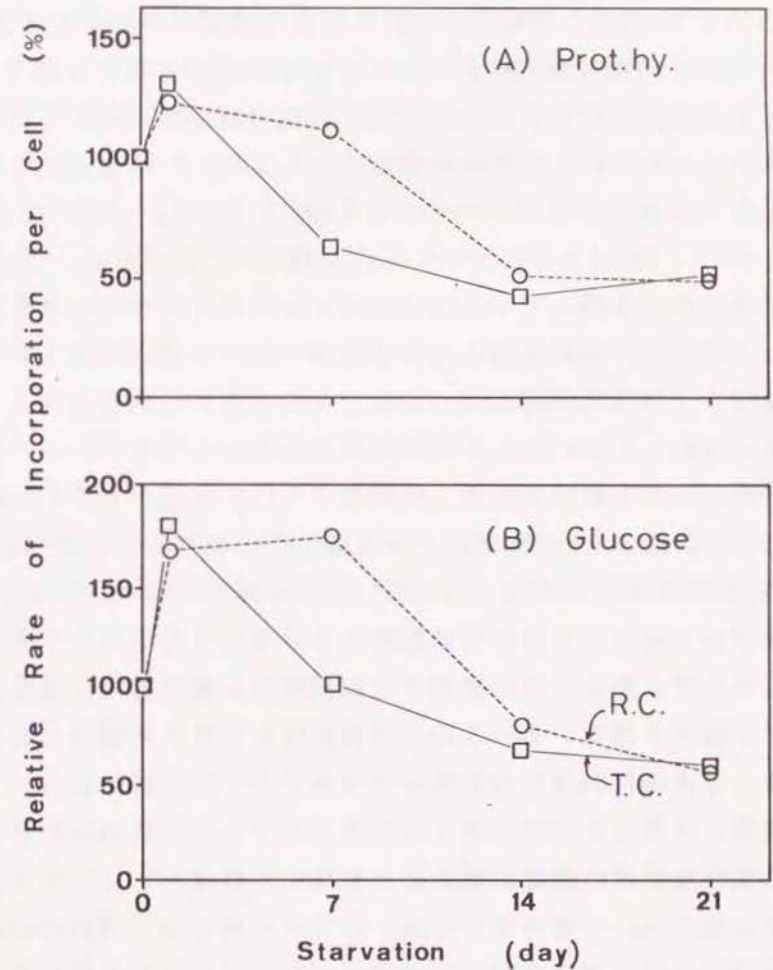


Fig. 3-19 Changes of relative rates of ^{14}C -protein hydrolysate (A) and ^{14}C -glucose (B) incorporation by KE10 during starvation. Relative rates per respiring cell count (O) and total cell count (\square). See Fig. 3-17 for the values obtained.

考 察

外洋環境に生存している従属栄養細菌、特に浮遊細菌にとって、利用可能な有機物がまったく存在しない状態（飢餓状態）が長期間続くのは通常の状態であると考えている研究者は多い(Morita 1986, Roszak & Colwell 1987)。このような考え方に従うと海洋細菌が外洋低栄養海域で生存していくうえで必要な能力はこのような飢餓状態で生残する能力（飢餓生残能力）であり、実際にいくつかの海洋細菌分離菌株については有機物を添加しない人工海水中で長期の飢餓状態でも生残し、増殖能力を維持していることが実験室内で確認されている(Amy & Morita 1983, Kurath & Morita 1983, Jones & Rhodes-Roberts 1981)。そのため、このような長期間の飢餓状態で生残している細菌細胞がどのような生理的特性を持っているかという問題は、海洋細菌の低栄養環境に対する適応機構という面からだけでなく、外洋低栄養海域の細菌群集の生理的な状態を考える上でも重要であり(Davis 1989)、多くの研究が行われている。

KE10株の場合も飢餓開始後、生菌数(V.C.)は減少し、6日後には開始時の23%になったがその後はほとんど減ることはなく、飢餓140日後も開始時の17%の細菌が増殖能(Viability)を保持しており、飢餓に対していままでに報告されている他の海洋細菌にひけを取らない高い生残能力を示した。これまでに多くの海洋細菌では飢餓直後に細菌数(生菌数)が増加する現象が観察されている。この現象は飢餓生残時に特異的に起こる現象で、通常こびと化(dwaling)あるいは断片化(fragmentation)と呼ばれ、一般の増殖とは異なりDNA合成とは無関係に起こり、細菌細胞数の増加と並行して個々の細菌の体積の減少をとめない、結果として小型の細菌細胞を多数生じるため、「増殖無き分裂」と考えられている(Novitsky & Morita 1976, 1977, Kjelleberg 1982, 1984)。しかし、KE10株の場合、飢餓直後に細菌数の増加およびそれともなう細菌細胞の体積の減少はみられなかった。Amy & Morita (1983)は17株の海洋細菌の飢餓生残中の生菌数の変化に3つの型があることを報告している。第1は飢餓直後に生菌数が増加し、その値で一定になるもの、第2に飢餓直後の増加に続いて減

少し、ある値で一定になるもの、第3は飢餓直後に減少し、ある値で一定になる場合である。KE10株は第3の型にはいると思われる。KE10株の場合も飢餓1週間経過後から細菌体積の減少がみられた。

KE10株の場合、飢餓開始6日間のあいだにV.C.は減少したが、その間T.C.はほとんど減少せず、大部分(90%以上)の細菌細胞は呼吸活性を維持していた。飢餓140日後にもR.C.はT.C.の約70%であったのに対し、V.C.はT.C.の約7%であった。これらの結果は、飢餓が経過するにしたがって「呼吸活性はあるものの増殖能力を持たない(respiring but not viable)細菌」が増えることを意味する。同様の現象はいくつかの細菌株についても報告されており(Amy & Morita 1983, Kurath and Morita 1983)、飢餓によって、本当は増殖能力(viability)を失ってはいないものの寒天培地上でコロニーを形成できない細菌(viable but nonreplicating cell)が生残しているのではないかと考えられている(Rozzak & Colwell 1987)。本節においても、V.C.は高濃度有機物寒天培地(ST 10^{-1} 培地)上でのコロニー形成能から判断した値であり、実際の増殖能をどれくらい反映しているかはわからない。飢餓が進行するにしたがって、「呼吸活性はあるものの増殖能力はない一群の細菌」の割合が増加するが、このような細菌が他の適当な生菌計数法を工夫することで増殖能を確認できる可能性は残されている。外洋海域においては、顕微鏡下に観察される細菌はきわめて小型であること、またその数が寒天平板を用いた細菌計数値と比べて圧倒的に多いことなどから、以上のような飢餓によって誘発される諸々の現象は外洋低栄養海域の細菌群集が飢餓状態にあるという説の有力な証拠となっている。

飢餓期間中のDNAおよびタンパク質の合成活性、アミノ酸混液とグルコースの同化活性の変化について調べたところ、DNA合成活性以外はいずれもよく似た推移を示した。DNA合成活性は飢餓直後に激減したのに対し、タンパク質合成活性は飢餓1日目にも飢餓開始前とほぼ同じ高い活性を維持していた。アミノ酸混液とグルコースの同化活性は、いずれも飢餓開始直後に増加し、飢餓1日目にはそれぞれ開始時の130%、181%(T.C.当り)になりその後減少した。飢餓3週間後の細菌細胞であっても有機基

質の添加に即座に対応し、まったく誘導期なしに取り込みを開始することができた。長期間飢餓環境にさらされた後でも、海洋細菌がアミノ酸、あるいは糖などの取り込み系を保持していることは今までにもいくつか報告されている (Davis & Robb 1985, Faquin & Oliver 1984 他)。アミノ酸混液およびグルコースの同化活性を V.C. 当りでそれぞれ計算するとこの傾向はやや変わり、飢餓 1 日後には前者は開始時の 1.7 倍に、後者は 2.4 倍になり、1 週間後にはそれぞれ 3.7 倍と 6.0 倍に達し、その後も飢餓開始時と較べて高い値を推移した。一方、R.C. 当りで計算をした場合、活性の高い期間が飢餓 1 週間目まで延びたことをのぞいて、T.C. 当りの活性の推移とさほど大きな差異はみられなかった。細菌計数法の違いによって飢餓過程における細菌当りの活性の推移についての解釈が変わってくるという問題は以前から指摘されてきた (Kurath & Morita 1983, Moyer & Morita 1989b)。飢餓過程にある細菌の中の個々の細菌細胞の性質が一樣ではない事は明らかであるが、今回の実験のような基質の利用能に関する実験の場合、固体表面の物理的特性等の基質利用能以外の要因が絡んでくる V.C. よりも R.C. かあるいは T.C. 当りの計算値がもっとも細菌全体の特性の変化を忠実に表しているのではないかと思われる (Kurath & Morita 1983)。

KE10 株の飢餓過程における生理的な変化は、タンパク質合成活性、基質利用能、V.C.、細菌形状等から飢餓 1~2 週間を境界として二つの段階に分けられることが明らかになった。多くの海洋細菌の場合、飢餓期間中の細菌の生理的な変化が、飢餓直後に細菌細胞内の代謝機構が劇的に変化する時期 (transient phase) と、その後続く長期間の飢餓の間、細胞内の代謝活性を低いながらも一定の状態を維持する時期の二つの段階に分けられることが指摘されている (Kjelleberg et al. 1987, Moyer & Morita 1989a)。飢餓期間中に生じる細胞数、形状、タンパク質、脂質、核酸物質などの細胞構成成分の変化は、この第一の段階でみられるのが普通である (Amy et al. 1983, Moyer & Morita 1989a, b, Mårdén et al. 1985)。海洋細菌 S14 株の場合、この第一段階 (飢餓開始後数時間) に、細胞内の脂質、PHB (poly- β -hydroxybutyrate, 代表的な細菌の貯蔵物質) および DNA 合成活性が劇的に減少するのに対し、タンパク質の分解、合成速度

(すなわちタンパク質の turnover)、呼吸活性および有機基質の同化活性はむしろ一時的に高くなる (Mårdén et al. 1985, Malmcróna-Friberg et al. 1986, Nystrome et al. 1986, 1987)。他の細菌 (ANT-300 株) ではこの時期に細菌細胞当りのタンパク質含量が増加するという報告もある (Moyer & Morita 1989b)。これらの現象はいずれも飢餓直後のこの時期に細菌細胞が飢餓に対して耐性のある細胞につくりかえられていることを示唆している。この仮説は、飢餓によって誘導されるいくつかのタンパク質 (starvation induced protein) が大腸菌と同じように海洋細菌にも存在することからも支持される (Amy and Morita 1983, Groat and Matin 1986, Jouper-Jaan et al. 1986, Nyström et al. 1989)。これらの新しく合成されるタンパク質のいくつかは、熱などの他の刺激によっても誘導されるタンパク質 (shock induced protein) であることが知られているが、いくつかのタンパク質に関しては飢餓特異的であった。飢餓細胞のタンパク質に特異的に反応する抗体も得られており、同時に飢餓特異的に合成されるタンパク質の多くが細菌の基質取り込み機構に関係が深いと考えられているペリプラズム空間に存在することも報告されている (Albertson et al. 1987, Nyström et al. 1988)。飢餓直後に抗生物質でタンパク質の合成を阻害した場合、即座に増殖能を失うということはないものの、長期間の飢餓に対する耐性が低下することから、この時期に合成されるタンパク質合成が長期の飢餓生残に大きく関係している可能性も示唆されている (Humphrey et al. 1983)。KE10 株に関しても DNA 合成活性は飢餓直後に急激に減少したにも関わらず、タンパク質合成活性は飢餓開始以前の高い活性をしばらくの間維持していたが、この間にタンパク質の分解および再合成 (reconformation) が行われているのかもしれない。

しかし、KE10 株がこの飢餓初期の段階でより積極的に低栄養環境に適応している可能性も無視できない。第 II 章で指摘したように外洋の細菌群集は限られたエネルギーを増殖 (DNA 合成) よりも細菌細胞の取り込み系の維持に優先的に用いることで低栄養環境に適応している可能性を示した。飢餓 1 週間目まで (transient phase) の細菌は DNA 合成と活性は低く抑えられているものの、環境中の有機基質 (アミノ酸、グルコース) を利用す

る能力は飢餓開始時の細菌よりむしろ高くなっている。つまり、この時期の細菌が限られたエネルギーを増殖よりも細菌細胞の維持、あるいは有効に環境中の有機基質を取り込み、利用する活性の維持に優先的に利用している可能性が示唆される。海洋細菌 S9株と S14株は飢餓開始 4~24時間後までに多量のプロテアーゼを合成し、細胞外に放出していることが報告されており、著者らは飢餓状態の細菌が新たなタンパク質やペプチドの供給に積極的に備えていると推定している (Albertson et al. 1990b)。

第II章で外洋の細菌群集のタンパク質合成活性が、沿岸域の細菌群集と比べて DNA合成活性は低いにもかかわらず、高く保たれていることを示した。本節の通性低栄養細菌分離株 KE10株を用いた飢餓実験でも、飢餓開始直後の段階で、DNA合成活性が低く、タンパク質合成活性が高い状態がみられた。外洋環境に存在する細菌の大部分が長期の飢餓状態におかれているという説は、本研究を含めた近年の外洋海域における実験の結果からは否定的であるが、外洋低栄養海域の細菌群集が比較的短い時間スケールの飢餓 (short term starvation) にさらされており、一時的に飢餓直後の段階 (transient phase) にある可能性 (Kjelleberg et al. 1987) は否定できない。

III-4 高栄養環境下、低栄養環境下および飢餓環境下のKE10株の生理的および形態的特性

III-2とIII-3において、通性低栄養細菌 KE10株を低濃度有機物培地 (ASW培地か NSST10⁻⁴培地) で繰り返し培養した場合、KE10株は ST10⁰培地や低濃度グリシン培地では増殖するが、高濃度グリシン培地では増殖できなくなる。および KE10株は高濃度有機物培地で増殖している細菌細胞よりも同化活性などは低い。長期生存し得ることを明らかにした。本節では、通性低栄養細菌 KE10株から、高濃度有機物培地で増殖した細菌細胞 (Eutrophic phase cell, E-CELL), E-CELLを Novistky & Morita (1977) の方法に従って全く有機物を加えない人工海水 (NSS) 中で一定期間 (2週間) 飢餓状態にした飢餓細胞 (Starved phase cell, S-CELL), およ

び外洋海水とほぼ同じ有機物濃度の低濃度有機物培地 (ASW培地か NSST10⁻⁴培地) で 4回以上培養を繰り返し、十分に低栄養環境に適応させた細菌細胞 (Oligotrophic phase cell, O-CELL) の 3種の細菌細胞を調製し、それぞれの細菌細胞について DNA合成活性、タンパク質合成活性、基質の利用能等の生理的な側面および透過型電子顕微鏡をもちいた形態的な側面から比較をおこなった。さらに、偏性低栄養細菌 KI89C株についても同様の実験をし、通性低栄養細菌から調製した 3種の細菌細胞と比較した。

実験方法

E-CELL, S-CELLおよび O-CELLの調製法

E-CELL, S-CELLと O-CELLの調製法を Fig. 3-20に示す。KE10株の保存培地から高濃度有機物培地 ST10⁻¹培地あるいは NSST10⁻¹液体培地に接種し、培養後再び同じ培地に接種し対数増殖期後期まで培養した細菌細胞を遠心分離 (8000G x 10min) によって集菌し、約 200mlの滅菌ろ過 NSSで洗浄した後、ふたたび滅菌ろ過 NSSに再懸濁した細菌細胞を E-CELL (高濃度有機物培地に適応した細菌細胞) とした。E-CELLを、まったく有機基質を添加しない NSSに 10⁸cells/mlの細菌密度で懸濁し、2週間飢餓状態にした後、上述の方法で集菌・洗浄を行った細菌細胞を S-CELL (飢餓細胞) とした。O-CELLを調製するために、まず E-CELLを低濃度有機物培地 (NSST 10⁻⁴培地あるいは ASW培地) に約 10⁴cells/mlの濃度で接種し、対数増殖期後期まで培養した細菌細胞 (約 10⁶cells/ml) を再び低濃度有機物培地に接種し培養した。この操作を 4回以上繰り返した培養を、できるだけおだやかに孔径 0.2μmのヌクレオポアフィルター上に集菌し、滅菌ろ過 NSSで数回洗浄した後、滅菌ろ過 NSSに再懸濁した細菌細胞を O-CELL (低濃度有機物培地に適応した細菌細胞) とした。培養は 20°C, 暗条件, 静置で行った。それぞれの細菌懸濁液は DAPI法で計数した後、10⁷cells/mlの濃度になるように NSSで希釈した。

偏性低栄養細菌 KI89C株については、それぞれ ST10⁻³培地および ST 10⁻¹培地で 20°C, 暗条件, 静置で培養し、対数増殖期後期にヌクレオポア

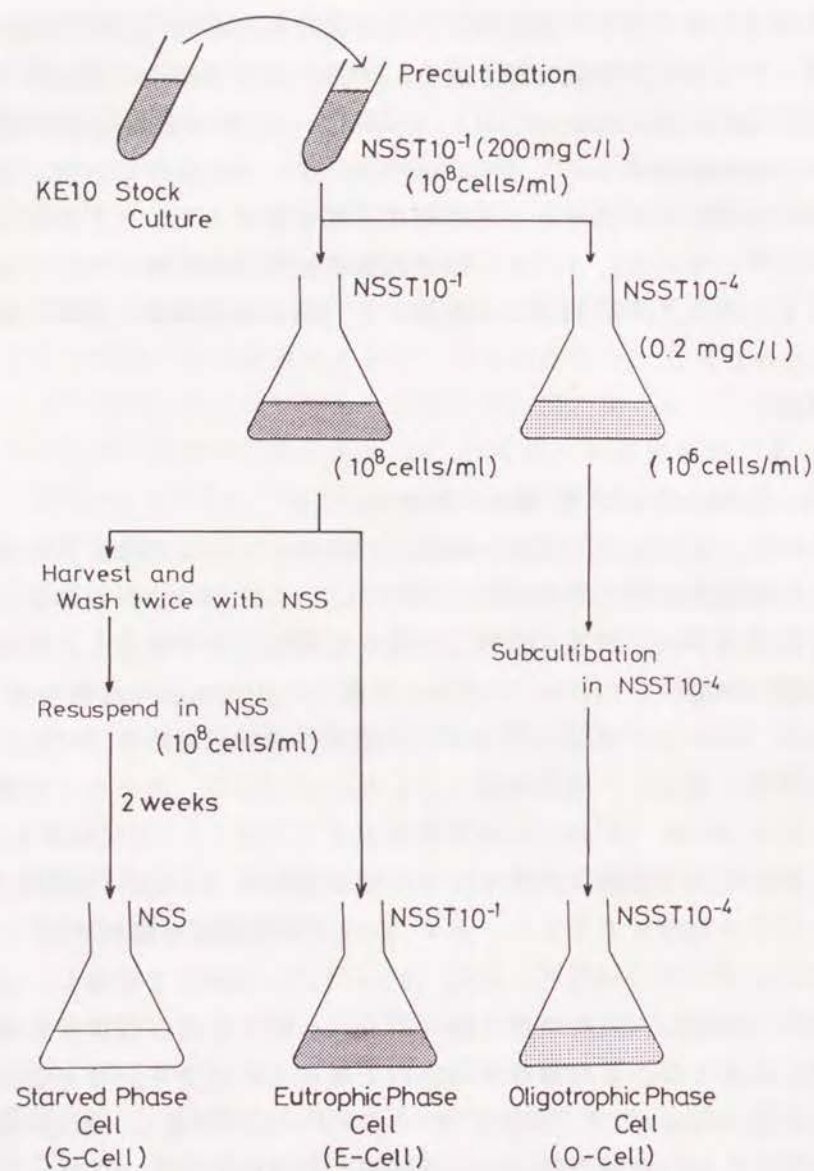


Fig. 3-20 Preparation procedure of eutrophic phase cell (E-CELL), starved phase cell (S-CELL) and oligotrophic phase cell (O-CELL). See to "material and methods" for details.

フィルター上にできるだけ穏やかにろ過捕集し、滅菌NSSで数回洗浄した後、およそ 10^7 cells/ml になるようにNSSに再懸濁したものを実験に供した。

透過型顕微鏡 (TEM) 試料の調製法

透過型電子顕微鏡観察用試料は以下の手順で調製した。各細菌懸濁液に最終濃度が1%になるように電子顕微鏡用グルタルアルデヒド(半井)を滴下し、そのまま12~24時間5°Cで放置して前固定した。さらに最終濃度2%のグルタルアルデヒドで後固定(2時間)した後、E-CELLとS-CELLは遠心分離(8,000G x 10min)で集菌し、1%(最終濃度)オスミウム酸(半井)で10分間処理した。O-CELLは細菌密度が少ないため、10 lの大量培養を行い、0.2 μmヌクレオポアフィルターでろ過捕集した後、滅菌ろ過NSSに再懸濁し、ふたたび遠心分離によって集菌した後、E-CELLやS-CELLと同様にオスミウム酸処理を行った。このようにして固定した各細菌細胞ペレットを遠心分離によって十分洗浄してオスミウム酸をのぞいた後、2%寒天に包埋し、約1mm³の細片に切り取った。この包埋試料を50~100%エタノール系列で段階的に脱水を行い、プロピレンオキシドで置換後、エポキシ系樹脂(Epon 812: 46.6ml, DDSA: 25.0ml, MNA: 28.3ml, DMP: 1.7%, ルベアック)に包埋した。ダイヤモンドナイフで、試料の超薄切片を作成し、0.5%酢酸ウランとReynoldsのクエン酸鉛法で電子染色を行い、透過型電子顕微鏡(BIOSYSTEM JEM-1200EX II, 日本電子)で観察、写真撮影を行った。

DNAおよびタンパク質の合成活性

詳細はIII-3の手順にしたがった。今回は5nMの³H-ロイシンを添加する系だけではなく、L-¹⁴C-ロイシン(312mCi/mmol, Amersham)を1 μCi添加することによってロイシンの最終濃度が500nMになるようにしてタンパク質画分への同化速度を測定した。

グルコースおよびアミノ酸混液 (Prot. hy.) の利用活性

KE10株から調製したE-CELL, S-CELLと O-CELL, および偏性低栄養細菌 K189C株それぞれについて, ^{14}C -グルコースおよび ^{14}C -アミノ酸混液を基質とした時の細菌細胞内への同化速度および呼吸速度を測定した。まず, それぞれの細菌懸濁液を PP試験管に 3.0mlづつ分注した。 ^{14}C -グルコース (295mCi/mmol, ICN) および ^{14}C -アミノ酸混液 (^{14}C -Prot. hy., 57mCi/miliatom carbon, Amersham) をそれぞれに 0.15 μCi づつ添加して反応を開始した。細菌内に取り込まれた基質のうち呼吸基質として利用された画分は以下のようにして定量した。上記の反応液に 2, 4および 6分後に直ちに 4N $\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液を 0.3mlづつ添加して反応を止めた後, ソーダライムを通して CO_2 を除去した空気を 1分間反応液に通気して, CO_2 捕集用液体シンチレーター 10mlを入れたガラスバイアルに CO_2 を捕集し, 液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。 CO_2 捕集用液体シンチレーターの組成は AQUASOL II (NEN) : 8ml, Monoethanolamine: 1mlおよび Ethyl Cell osolve: 1.5ml (液体シンチレーション用特製試薬, 半井) である。

一方, 反応液を 2, 4, 6分後にそのままニトロセルロースメンブレンフィルター (ADVANTECH社) 上にろ過捕集し, フィルターを液体シンチレーター (AQUASOL II) に入れ, 同様に放射活性を測定したものを, 細菌細胞内への基質の同化量とした。実験は 3本立で行い, 空実験として試料にホルマリン (最終濃度 4%) を添加した試験管を用意した。

結果

透過型電子顕微鏡による観察

TEMによる細菌切片像 (Fig. 3-21) によると, KE10株の O-CELLには E-CELLにはみられない電子密度の低い粒子状の物質が多量に分布していた。E-CELLに較べて S-CELLと O-CELLでは電子密度の高い構成成分の減少がみられた。E-CELLでは細菌の表面から粘質物らしい物質が分泌されているようであった。

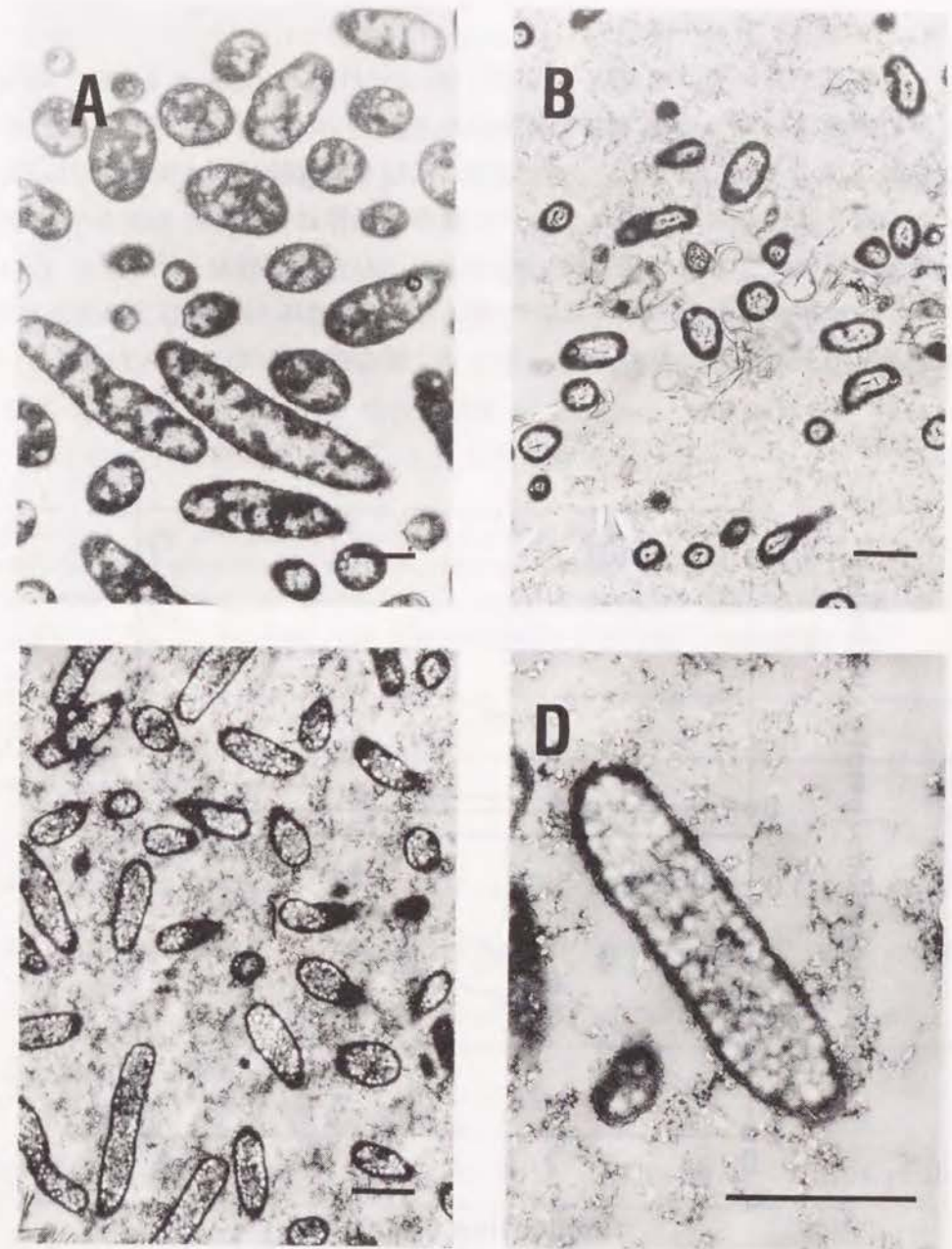


Fig. 3-21 TEM photographs of E-CELL (A), S-CELL (B) and O-CELL (C, D) prepared from KE10. bar: 1 μm .

DNAとタンパク質の合成活性

通性低栄養細菌 KE10株から調製した E-CELL, S-CELLと O-CELL の 3種類の細菌細胞について DNA合成活性およびタンパク質合成活性を調べた結果を Fig. 3-22と Table 3-4に示した。DNA合成活性はチミジンの DNA画分への同化活性として, またタンパク質合成活性はロイシンのタンパク質画分への同化活性として表した。E-CELLの DNA合成活性は $22.4 (\pm 1.56) \times 10^{-22} \text{ mol/cell/min}$ であった。O-CELLは E-CELLにくらべて DNA合成活性は 1/8であったにもかかわらず, タンパク質合成活性は $269.9 (\pm 10.1)$

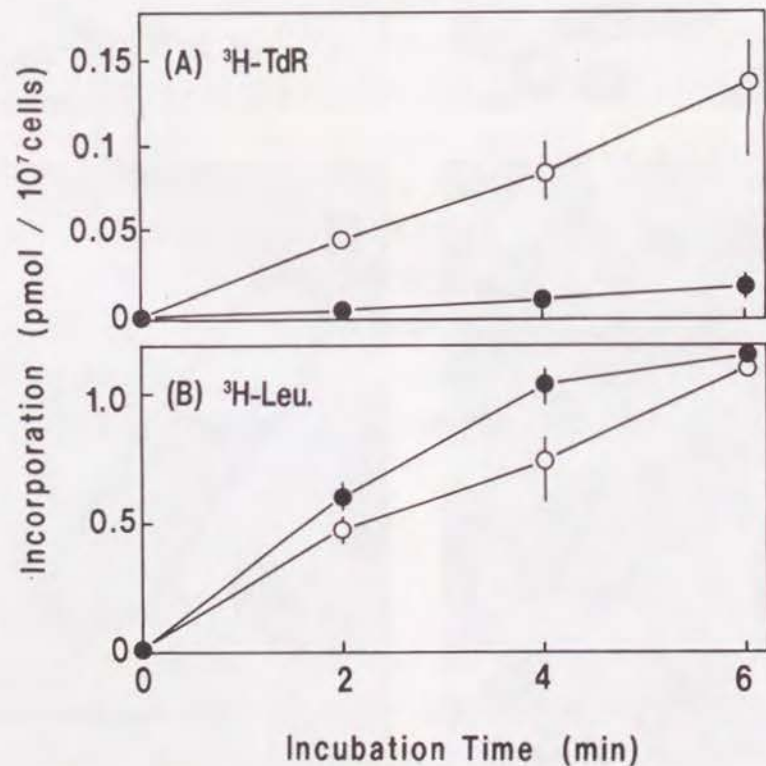


Fig. 3-22 Methyl-³H-thymidine (³H-TdR) and ³H-leucine (³H-Leu.) incorporation by E-CELL(O) and O-CELL(●). Error bars were shown.

$\times 10^{-22} \text{ mol/cell/min}$ であり, E-CELLの $189.8 (\pm 8.80) \times 10^{-22} \text{ mol/cell/min}$ よりも高かった。この際, タンパク質合成活性を測定するために加えたロイシンの濃度が E-CELLが利用するには希薄すぎる可能性があるため(次節参照), 500nMのロイシン存在下でのロイシンのタンパク質画分への同化活性を調べたところ, E-CELLと O-CELLの同化活性はそれぞれ $4.79 (\pm 0.11) \times 10^{-19} \text{ mol/cell/min}$ と $5.04 (\pm 0.31) \times 10^{-19} \text{ mol/cell/min}$ でほとんど変わらなかった。一方, S-CELLは DNA合成活性が $2.66 (\pm 0.32) \times 10^{-22} \text{ mol/cell/min}$ であり O-CELLとはほぼ同様の低い活性に抑えられており, タンパク質合成活性も $67.8 (\pm 2.08) \times 10^{-22} \text{ mol/cell/min}$ と E-CELLや O-CELLよりもかなり低かった。

Table 3-4 DNA and protein synthesis activities of three cell phases prepared from facultative oligotroph, KE10. DNA and protein synthesis activities were expressed by assimilation rates of methyl-³H-thymidine and L-³H-leucine (or L-¹⁴C-leucine) into TCA insoluble fraction, respectively.

	E-Cell	O-Cell	S-Cell
Assimilation rate into TCA-insoluble fraction ($10^{-22} \text{ mol/cell/min}$)			
(A) methyl- ³ H-thymidine	22.4 \pm 1.56	2.60 \pm 0.41	2.66 \pm 0.32
(B) ³ H-leucine (5nM)	189.8 \pm 8.80	269.9 \pm 10.1	67.8 \pm 2.08
(B)/(A)	8.47	103.8	25.5
Assimilation rate into TCA-insoluble fraction ($10^{-19} \text{ mol/cell/min}$)			
(C) ¹⁴ C-leucine (500nM)	4.79 \pm 0.11	5.04 \pm 0.31	1.98 \pm 0.15

ST10⁻¹培地および ST10⁻³培地で培養した偏性低栄養細菌 K189C株の DNAとタンパク質の合成活性を Table 3-5に示した。通性低栄養細菌と比較すると偏性低栄養細菌の高分子合成活性は低く, ST10⁻³培地で培養した細

Table 3-5 DNA and protein synthesis rates, and substrate uptake rates of obligate oligotroph (KI89C) growing in ST10⁻³ and ST10⁻¹ media.

	KI89C	
	ST10 ⁻³	ST10 ⁻¹
Assimilation rate into TCA-insoluble fraction (10 ⁻²² mol/cell/min)		
(A) methyl ³ H-thymidine	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.03
(B) ³ H-leucine (5nM)	6.97 ± 0.47	7.45 ± 0.55
(C) ¹⁴ C-leucine (500nM)	34.1 ± 5.50	33.5 ± 1.59
(B)/(A)	41.0	46.6
Substrates uptake rate [#] (10 ⁻²² mol/cell/min)		
¹⁴ C-protein hydrolysate ^{##}		
Assimilation	132.0 ± 3.88	180.0 ± 5.69
Respiration	18.9 ± 4.43	
¹⁴ C-glucose		
Assimilation	6.9 ± 0.72	4.9 ± 0.55
Respiration	0.0 ± 0.27	

The concentration of substrates added is 1 nanoatom carbon /ml (ca.200pmol amino acids /ml) of ¹⁴C-protein hydrolysate and 160pmol /ml of ¹⁴C-glucose.

10⁻²²atom carbon /cell/min.

菌細胞の DNA合成活性は $0.17 (\pm 0.03) \times 10^{-22}$ mol/cell/minで, タンパク質合成活性は 5nMのロイシン存在下で $6.97 (\pm 0.47) \times 10^{-22}$ mol/cell/min, 500nMのロイシン存在下で $34.1 (\pm 5.50) \times 10^{-22}$ mol/cell/minであった。偏性低栄養細菌の場合, 通性低栄養細菌 KE10株とは異なり, 高濃度有機物培地である ST10⁻¹培地で培養した細菌細胞であっても (ST10⁰培地では増殖できない), 細菌の形状や比増殖速度には大きな変化はみられなかった (III-1 参照) が, DNAとタンパク質の合成活性の面でもやはり大きな違いは認められなかった。

Table 3-6 ¹⁴C-protein hydrolysate (amino acids mixture) and ¹⁴C-glucose uptake rates of three cell phases prepared from KE10. The concentrations of substrates added is 1 nanoatom carbon /ml (ca. 500pmol amino acids /ml) of ¹⁴C-protein hydrolysate and 0.16nmol /ml of ¹⁴C-glucose.

	E-CELL	O-CELL	S-CELL
Substrate uptake rate (10 ⁻¹⁹ mol/cell/min)			
¹⁴ C-Protein hydrolysate [#]			
Assimilation	9.06 ± 0.93	6.74 ± 0.23	3.79 ± 0.20
Respiration	0.52 ± 0.09	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.03
¹⁴ C-Glucose			
Assimilation	0.82 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.49 ± 0.02
Respiration	0.19 ± 0.01	0.00 ± 0.002	0.05 ± 0.004

: 10⁻¹⁹atom carbon /cell/min

基質利用活性

通性低栄養細菌から調製した E-CELLはアミノ酸混液とグルコースの両基質について利用活性が高く, それぞれの同化活性は $9.06 (\pm 0.93) \times 10^{-19}$ atom carbon, $0.82 (\pm 0.01) \times 10^{-19}$ mol/cell/minであり, 呼吸

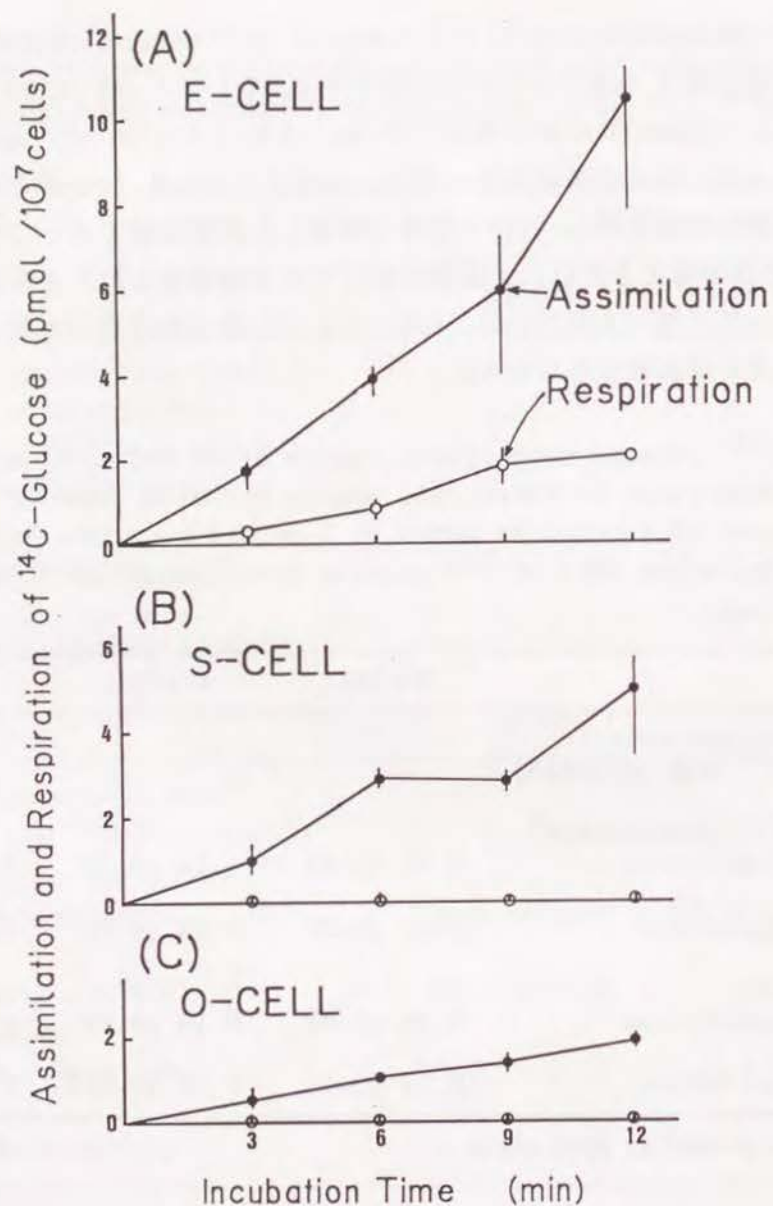


Fig. 3-23 Assimilation and respiration of ^{14}C -glucose by E-CELL, S-CELL and O-cell prepared from KE10. Error bars were shown.

活性は $0.52 (\pm 0.09) \times 10^{-19}$ atom carbon, $0.19 (\pm 0.01) \times 10^{-19}$ mol/cell/minであった (Table 3-6, Fig. 3-23)。E-CELLを2週間飢餓状態にさらした細菌細胞 S-CELLではアミノ酸の同化活性および呼吸活性は $3.79 (\pm 0.20)$ と $0.20 (\pm 0.03) \times 10^{-19}$ atom carbon/ 10^7 cells/minであり、それぞれE-CELLの41.8%および38.5%に減少していた。一方、低濃度有機物培地で培養を繰り返した細菌細胞 O-CELLでは、アミノ酸の同化活性は $6.74 (\pm 0.23) \times 10^{-19}$ atom carbon/cell/minとS-CELLの2倍の高い活性を維持していたが、呼吸基質としての利用活性はS-CELLとほぼ同じ $0.24 (\pm 0.01) \times 10^{-19}$ atom carbon/cell/minであり、E-CELLの活性の41.2%に減少していた。しかし、グルコースの利用活性に関しては、O-CELLはE-CELLと比べてきわめて低く、同化活性で $0.14 (\pm 0.03) \times 10^{-19}$ mol/cell/min、呼吸活性はほとんど0であったのに対し、S-CELLでは呼吸基質としての利用活性 $0.05 (\pm 0.004) \times 10^{-19}$ mol/cell/minと低いものの同化活性は $0.49 (\pm 0.02) \times 10^{-19}$ mol/cell/minとE-CELLの59.8%に相当する比較的高い活性が維持された。

偏性低栄養細菌 KI89C株の基質利用活性は通性低栄養細菌 KE10株と比べて全体的に低かったが、アミノ酸混液の同化活性および呼吸活性はそれぞれ $132.0 (\pm 3.88)$ と $18.9 (\pm 4.43) \times 10^{-22}$ atom carbon/cell/minであり、グルコースの利用活性 (同化活性が $6.9 (\pm 0.72) \times 10^{-22}$ mol/cell/min、呼吸活性が $0.0 (\pm 0.27) \times 10^{-22}$ mol/cell/min) より比較的高く、KE10株のO-CELLと似た傾向がみられた。高濃度有機物培地である $\text{ST}10^{-1}$ 培地で増殖を繰り返したKI89C株でもこの傾向は変わらなかった (Table 3-5)。

考察

外洋環境中で浮遊性従属栄養細菌は、① 飢餓状態での生残 (starvation survival, nongrowing) か ② 低栄養環境での増殖 (oligotrophic growing) のいずれかの存在形態を取っていると考えられる。一般に、外洋性従属栄養細菌の生理的特性を考察する際の基礎的な知見としては、前者

の状態の海洋細菌分離株を用いた室内実験で得られたものが多く（Ⅲ-3参照）、後者の状態の細菌細胞を扱った室内実験はきわめて少ない。そこで本節では、従来多くの研究がなされている飢餓状態の細菌細胞だけではなく、外洋の有機物濃度と同程度の有機物を含む低濃度有機物培地で繰り返し培養し、低栄養状態に完全に適応した細菌細胞を用いて得られた高分子合成活性等の生理的な知見を、高濃度有機物培地で増殖をしている細菌細胞のそれらと比較し、外洋環境の細菌群集の生理的な状態について新たな考察を加えた。

O-CELLを調製する際には低濃度有機物培地で4回以上繰り返し培養した細菌細胞をO-CELLとした。Ⅲ-2で述べたように4回以上低濃度有機物培地で繰り返し培養して得た細菌細胞は、「高濃度グリシン培地では増殖しない」という高濃度有機物培地で増殖させた細菌細胞とは異なる増殖特性を示したことから、このような培養条件の細菌細胞O-CELLを低栄養環境に充分適応したモデル細菌細胞とした。

3種の細菌細胞の体積は、E-CELL、S-CELLおよびO-CELLはそれぞれ $0.60\mu\text{m}^3$ 、 $0.16\mu\text{m}^3$ と $0.31\mu\text{m}^3$ であり、O-CELLはS-CELLよりいくぶん細長い形態であった。TEMによる3種の細菌細胞の内部形態的の観察では、O-CELLにはE-CELLにはみられない電子密度の低い粒子状の物質が多量に分布していた。またE-CELLに較べてS-CELLとO-CELLでは電子密度の高い構成成分の減少がみられた。E-CELLでは細菌の表面から粘質物らしい物質が分泌されているようであった。KE10株は強い付着性を持つ細菌ではないが、高濃度有機物培地で培養したときには対数増殖期後期になるとやや凝集する傾向があるのにたいしO-CELLやS-CELLではそのような凝集する傾向はあまりみられないことに関係があるかもしれない。

O-CELLはE-CELLの1/8のDNA合成(TdR_{DNA})活性しかみられないにもかかわらず、タンパク質合成(Leu_{prot})活性に関してはE-CELLと同等か、低濃度のロイシンを添加した場合にはむしろE-CELLより高い活性を示し、Leu_{prot}/TdR_{DNA}比は103.8ときわめて高かった。一方、S-CELLでもLeu_{prot}/TdR_{DNA}比が25.5でE-CELLの値(8.47)よりも高かった。富栄養海域であるサンゴ礁域の細菌群集の場合、Leu_{prot}/TdR_{DNA}比は1.4~8.5

であったが、外洋域の細菌群集の場合その比は10.5~55.6であった(第Ⅱ章)。本節で得たE-CELLのLeu_{prot}/TdR_{DNA}比はサンゴ礁域の細菌群集のそれと似ていたのに対し、S-CELLやO-CELLのそれは外洋域の細菌群集と比較的類似していた。第Ⅱ章では、外洋の細菌群集ではチミジンのDNA画分への同化活性は低いが、ロイシンのタンパク質画分への同化活性は高く維持されていたことから、これら外洋海域の細菌群集は低栄養環境に適応によりDNA合成よりもタンパク質合成を優先しているものと推定した。本節で得たO-CELLとS-CELLのLeu_{prot}やTdR_{DNA}の活性の結果は上記の考察を裏付けるものであろう。

外洋域の細菌群集の生理的な状態が飢餓状態の細胞S-CELLと低栄養増殖をしている細胞O-CELLのいずれの細菌細胞のそれと似ているかを明らかにすることは本研究の主な目的の一つであるので、この点について考察を加えてみた。S-CELLとO-CELLの間にはグルコースの利用活性に関して違いが見られた。O-CELLではアミノ酸混液の利用活性(同化活性+呼吸活性)はE-CELLの72%の活性を維持しているにもかかわらずグルコースの利用活性はきわめて低かった。一方、S-CELLはアミノ酸混液の利用活性がO-CELLのそれより低くE-CELLの41.6%であるものの、グルコースの利用活性はO-CELLの3.9倍でE-CELLの53.5%の活性を持っていた。このようにどちらも低栄養環境に適応していると思われるO-CELLとS-CELLの2種類の細菌細胞の間にも微妙な相違が存在することが明らかになった。E-CELLとO-CELLはともに培地の基質としてはペプトンを添加しており、そのほとんどがアミノ酸であると考えてよいだろう。O-CELLの場合、低有機物濃度のペプトン培地で増殖を繰り返している間に基質として加えられていないグルコースの取り込み系を失ってしまったのではないかとと思われる。それに対して、S-CELLではE-CELLが持っていたグルコースの取り込み系を飢餓環境下であっても、ある程度維持し続けているのではないかと考えられる。

これまでも、外洋海域の細菌群集がアミノ酸に比べてグルコースや酢酸を利用しにくいことが報告されている(江口1990, Gocke et al. 1981)。ニューヘブリデス海溝の細菌群集によるアミノ酸混液とグルコースの同化活性をTable 3-7に示した。アミノ酸混液にくらべてグルコースの

Table 3-7 Incorporation rates (h^{-1}) of ^{14}C -protein hydrolysate (^{14}C -Prot.hy.) and ^{14}C -glucose (^{14}C -Glc.) by bacterial assemblages in south pacific ocean ($23^{\circ}08.5'S$, $171^{\circ}02.0'E$). 20ml water samples were incubated with radiolabelled substrates (0.1 μ ci added) for 1 h at *in situ* temperature.

Depth	^{14}C -Prot.hy. (picoatom carbon)	^{14}C -Glc. (pmol)
0 m	16.0	0.05
90 m	26.8	0.04
2000 m	1.6	0.00

同化活性は低く、外洋海域の細菌群集がアミノ酸とグルコースに関しては特異性が高いことは明らかである。このことからグルコースの利用能という側面から考えた場合、通性低栄養細菌であっても O-CELL のような低濃度有機物培地で繰り返し培養した細菌細胞 (O-CELL) の方が飢餓状態に長期間さらされた細菌細胞 (S-CELL) よりも外洋細菌群集の特徴を再現しているものと考えられる。このことは偏性低栄養細菌 K189C 株のアミノ酸混液とグルコースの利用活性の結果からも支持されよう。

偏性低栄養細菌 K189C 株の場合、全体的に活性が低かったものの、通性低栄養細菌 KE10 株の O-CELL と同様に、DNA 合成活性にくらべてタンパク質合成活性が高く維持されており ($Leu_{prot}/TdRNA = 41$)、またグルコースの利用活性がアミノ酸混液のそれと較べてかなり低い傾向が見られた。しかし、KE10 株の場合では高濃度有機物培地 (ST あるいは $NSST10^{-1}$ 培地) で培養した細菌細胞 E-CELL と低濃度有機物培地で培養した細菌細胞 O-CELL の間に高分子合成活性や基質利用活性に大きな差異がみられたのに対して、K189C 株の場合、低濃度有機物培地で培養した細菌細胞 (O-CELL に相当) と、K189C 株が増殖できるもっとも有機物濃度の高い培地 ($ST10^{-1}$ 培地)

で繰り返し培養行った細菌細胞 (E-CELL に相当) の間にほとんど違いがみられなかった。これらの結果から、同じ低栄養細菌であっても通性低栄養細菌と偏性低栄養細菌との間に生理的に大きな違いがあることがわかった。

偏性低栄養細菌 K189C 株の場合、1細胞当りの Leu_{prot} は 418.2×10^{-22} mol/h である。外洋環境でタンパク質合成を行っている全ての偏性低栄養細菌が K189C 株と同等のタンパク質合成活性を持つと仮定した場合、第 II 章で示した結果から、Stn. 28 の 30m 層では 1ml の海水中で約 1.26×10^5 の細菌がタンパク質合成を行っているという結果が得られる。この値は直接検鏡法で得た同じ試水中の全菌数 (6.15×10^5 cells/ml) の 20% にあたる。そのほかの外洋試水の細菌群集においても全菌数の 9~20% の細菌がタンパク質合成を行っているという計算結果が得られた。マイクロオートラジオグラフィーの手法を外洋環境の細菌群集に応用した実験により、添加した有機基質を利用することが可能な細菌数は全菌数の約 10~50% 程度であるということが今までに報告されている (Douglas et al. 1987)。

以上の考察は、外洋環境に存在する細菌のなかで数 10% がタンパク質合成能を持っており、その活性は低栄養液体培地を用いて分離された偏性低栄養細菌の純粋分離株によって実験室内でもっとも忠実に再現し得ること、および偏性低栄養細菌が外洋低栄養海域で優勢であり、そこでの従属栄養活性の主体となっていることを示唆している。

III-5 高栄養環境下、低栄養環境下および飢餓環境下における通性低栄養細菌のロイシン取り込み機構の解析

外洋低栄養環境に生存している細菌が、そこに存在する微量の有機基質を効果的に取り込み、利用するために、基質親和性の高い (つまり Michaelis 定数, K_m 値が低い) 取り込み系を持っているに違いないということは多くの研究者によって考えられている (Hirsh 1979, Poindexter 1981)。実際に外洋環境の細菌群集の有機基質に対する親和性はきわめて高い (Wright & Burnison 1979, Ferguson & Sunda 1984)。

通性低栄養細菌 KE10 株は、III-4 で述べたように、培地中の有機物濃

度が通常の培地濃度から外洋海水程度の希薄な濃度へと変わることによって形態的にも生理的にも変わることが明らかになった。そこで、本節では KE10株がロイシンの取り込みに関して親和性の高い取り込み系を持っていることを確認するとともに、III-4で示した E-CELL, S-CELLおよび O-CELLのロイシン取り込み系を、 10^{-10} M~ 10^{-5} Mの濃度域において詳細な解析を試みた。

実験方法

ロイシン取り込みカイネティクスの測定

あらかじめ 0.2nM から 100nM までの濃度の $L\text{-}^3\text{H}$ -ロイシン、あるいは 0.04 μ M から 10 μ M までの濃度の $L\text{-}^{14}\text{C}$ -ロイシンを添加した試験管に、それぞれ 10^7 cells/ml の濃度になるように調製した E-CELL, S-CELL および O-CELL の細菌懸濁液を、1ml ずつ加えて反応を開始した。20°C で 2 分間培養後、速やかに 0.2 μ m ニトロセルロースメンブレンフィルター (ADVANTECH 社) 上にろ過捕集し、約 10ml の滅菌ろ過 NSS で 2 回洗浄した後、ガラスバイアルに入れ、液体シンチレーター (AQUASOL II, NEN) を添加して放射活性を測定した。実験は 4 本立てで行った。最終濃度 4% になるようにホルマリンを加えて同様の実験を行ったものを空試験値とした。

通常、細菌による特定の基質の取り込みは、Michaelis-Menten 機構 (①) に従って進行すると考えられており、その解析には酵素反応速度論が準用され、添加した基質濃度 (S) とその時の取り込み速度 (V) から Lineweaver-Burk 逆数プロット法 (②) によって、E-CELL, S-CELL と O-CELL の細菌細胞の最大取り込み速度 (V_{\max}) と基質に対する親和性を示す Michaelis 定数 (K_m) を求めた。

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{--- ①} \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m}{S} \times \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{--- ②}$$

ロイシン取り込み系に対する種々のアミノ酸の添加による効果

非放射性のアミノ酸の添加による放射性ロイシンの取り込み速度の変

化を調べるために、5pmol の $L\text{-}^3\text{H}$ -ロイシンあるいは 100pmol の $L\text{-}^{14}\text{C}$ -ロイシンを添加した滅菌試験管に、種々の非放射性のアミノ酸を、添加した放射性ロイシンの 50 倍の濃度 (前者には 250pmol, 後者には 5nmol) になるように添加した。1ml の細菌懸濁液 (10^7 cells/ml) を添加して反応を開始し、20°C で 2 分間培養した後、同様に放射活性を測定した。

ペリプラズム空間に存在するロイシン結合タンパク質の解析

E-CELL と S-CELL のロイシン取り込み系に関与すると推定されるペリプラズム空間タンパク質の解析を行った。通常、海洋性グラム陰性細菌のペリプラズム空間タンパク質の抽出には、低張液による浸透圧処理が用いられる。KE10 株は完全な純水中では破裂するので、本実験では NSS を純水で希釈して得た 10% NSS 液を低張液として用いて 10 分間の浸透圧処理をほどこした。SEM 観察によると、この処理では細菌細胞の完全な破壊はみられず、処理後も処理前の 82~94% の増殖能を維持していた。この処理によって湿重量 1g の細菌細胞当り E-CELL では 2250 μ g, S-CELL では 3400 μ g のタンパク質が上澄中に得られ、これらのタンパク質をペリプラズムタンパク質 (Periplasmic Protein, P.P.) とした。

10% 浸透圧処理によって P.P. をのぞいた細菌細胞について、ロイシン取り込み活性を前述の方法で測定した。反応時間は 3, 6 および 9 分間とした。

一方、上澄中に得られた P.P. は限外ろ過 (ウルトラフリー C3LGC) によって脱塩・濃縮し、7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。泳動終了後、 ^{14}C -ロイシン (328mCi/mmol, Amersham) を 17 μ Ci 添加した 0.05M トリス塩酸緩衝液 (50ml) 中にゲルを入れ、10 分間振とうした。その後、緩衝液を取り除き、放射性基質を含まない 0.05M トリス塩酸緩衝液 (50ml) を加えて 5 分間振とうし、ゲルを洗浄した。この操作を 2 回おこなった後ゲルを乾燥し、ラジオクロマナイザー (JTC501, Aloka) によってゲルの中の放射活性を走査し、ラジオクロマナイザー用データ処理装置 (ACM500, Aloka) によって解析した。同時に銀染色法 (銀染色キット, 半井) によってタンパク質バンドの位置を確認した。

結果

KE10株は2週間の飢餓状態を経た後であっても、他のアミノ酸やグルコースの取り込みに関してみられたのと同様に、ロイシン添加後直ちに取り込みを開始した (Fig. 3-24)。種々の濃度のロイシンを添加した際の E-CELL, S-CELL および O-CELL の取り込み速度を Fig. 3-25 に示した。また、得られた結果を Lineweaver-Burk 逆数プロット法によって解析した (Fig. 3-26)。この逆数プロットの直線部分を最小二乗法によって直線回帰し、得られた一次関数から最大取り込み速度 (V_{max}) と基質に対する親和性を示す Michaelis-Menten 定数 (K_m) を求めた。それぞれの回帰直線の相関係数 (r^2) はいずれも 0.8 以上であり、 t 検定による危険率は 1% 以下であった。その結果、E-CELL は K_m 値が $1.1 \mu M$ の低親和性の取り込み系と $0.028 \mu M$ の高親和性の取り込み系の 2 種類の取り込み系を持っていることが明らかになった。しかし、S-CELL および O-CELL の 2 種類の細菌細胞では

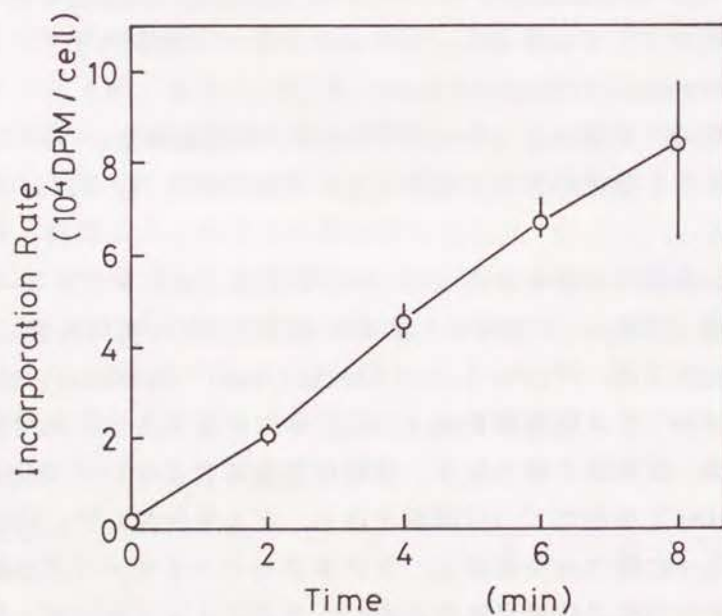


Fig. 3-24 Incorporation of leucine by S-CELL prepared from KE10. Error bars were shown.

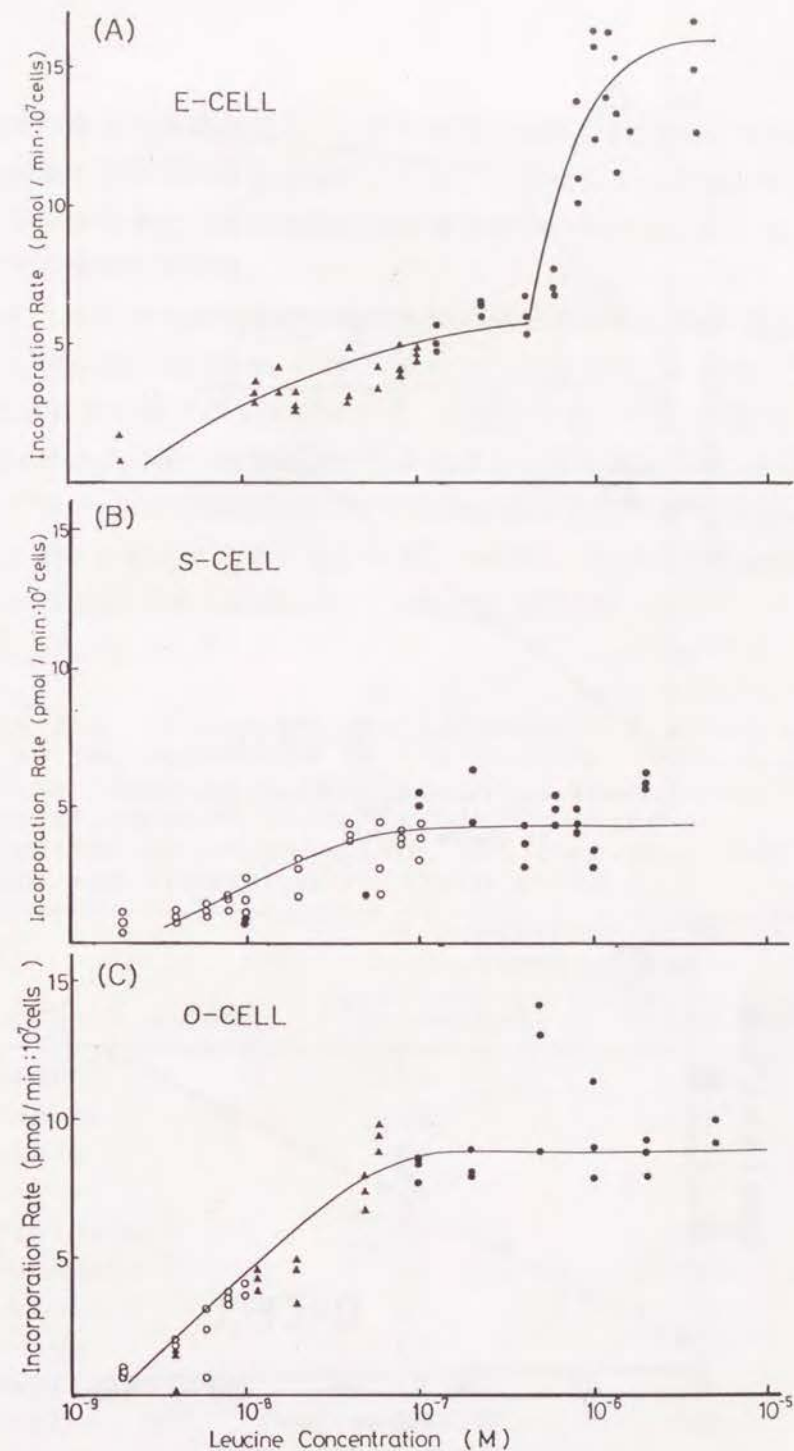


Fig. 3-25 Incorporation rates of leucine by E-CELL (A), S-CELL (B) and O-CELL (C) in various leucine concentrations.

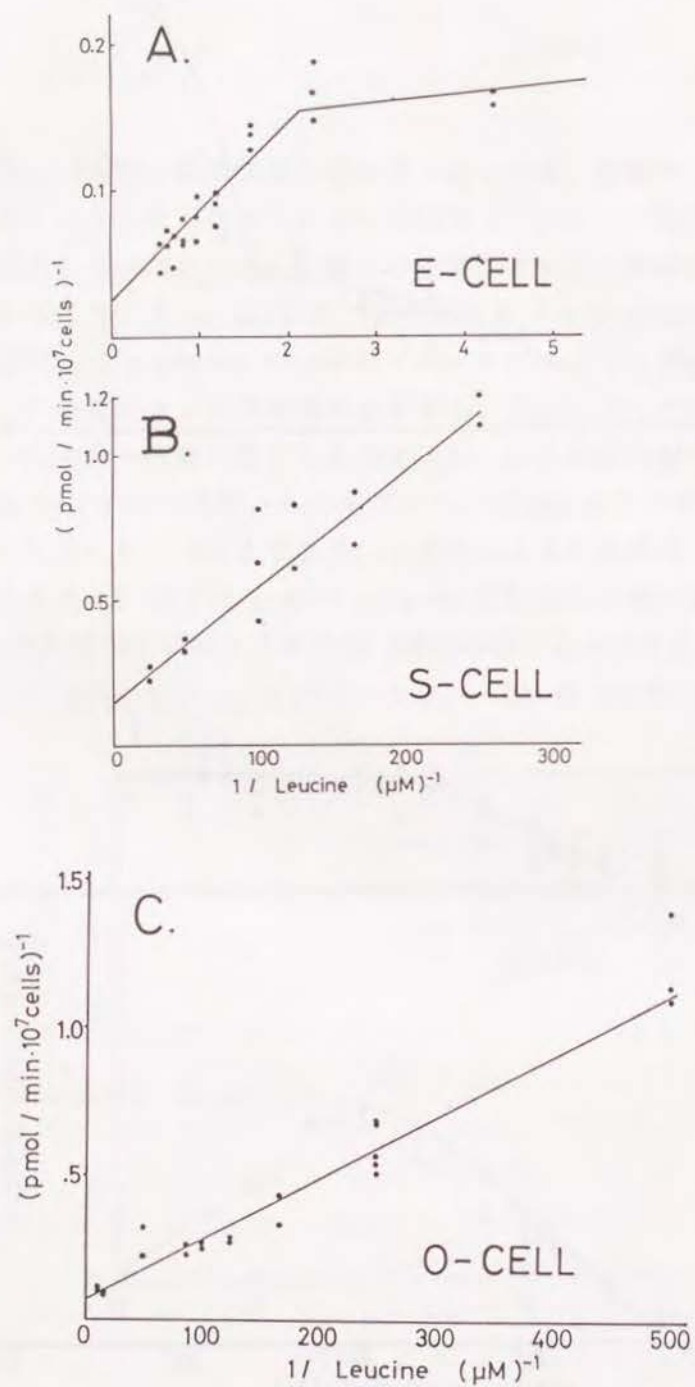


Fig. 3-26 Lineweaver-Burk plots of leucine incorporation by E-CELL (A), S-CELL (B) and O-CELL (C).

低親和性の取り込み系が消失し、それぞれ K_m 値 $0.017 \mu\text{M}$ と $0.027 \mu\text{M}$ の高親和性の取り込み系のみを保持していた。t 検定により評価したところ、1%以下の危険率で3種の細菌細胞の高親和性の取り込み系の K_m 値は同一の物である事がわかった。

次に、それぞれ細菌細胞の高親和性の取り込み系の V_{max} 値を比べると、E-CELLと S-CELLでは $7.04 \times 10^{-19} \text{mol/cell/min}$ と $6.70 \times 10^{-19} \text{mol/cell/min}$ ほぼ同じ値であるのに対して、O-CELLではこの値が $13.9 \times 10^{-19} \text{mol/cell/min}$ と3種の細菌細胞のなかではもっとも高かった。E-CELL、S-CELLおよび O-CELLの細菌細胞の平均の表面積はそれぞれ $3.29 \mu\text{m}^2$ 、 $1.54 \mu\text{m}^2$ および $2.94 \mu\text{m}^2$ であることから、O-CELLと S-CELLの表面積当りの V_{max} 値は E-CELLのそれのおよそ 2.0倍と 2.2倍であった。

Table 3-8 Effect of nonradiolabelled amino acids on the incorporation of ^{14}C -leucine (1 μM) and ^3H -leucine (5nM) by E-CELL prepared from KE10. Competitors were added at 50 times the concentration of radiolabelled leucine. Every sample was incubated for 2min at 20°C.

Amino acid added	% inhibition of incorporation	
	^{14}C -Leu(1 μM)	^3H -Leu(5nM)
Glycine	38	13
L-Alanine	55	21
L-Valine	84	89
L-Lysine	76	30
L-Tryptophan	54	52
L-Glutamate	32	9
L-Glutamine	17	2
L-Serine	13	0
L-Phenylalanine	73	93
L-Methionine	69	90

E-CELLのロイシン取り込み系に対するロイシン以外のいくつかの有機基質による阻害効果を、高親和性・低親和性のそれぞれの取り込み系について調べた結果、バリン、フェニルアラニンとメチオニンはどちらの取り込み系に対しても強い阻害活性を示し、グルタミン酸とグルタミンは阻害活性を示さなかった。しかし、グリシン、アラニンとリジンに関しては、低親和性の取り込み系の方が高親和性の取り込み系に較べて強く阻害された (Table 3-8)。

E-CELLと S-CELLに関してロイシン取り込み系に対するペリプラズム空間タンパク質 (P.P.) の関与を調べるために、浸透圧処理をほどこしてペリプラズム空間タンパク質を取り除いた細菌細胞のロイシン取り込み活性を調べた。低濃度ロイシン (5nM) 存在下の取り込み活性に関しては、浸透圧処理した細菌細胞は、E-CELLと S-CELLいずれの場合も無処理の細菌細胞の取り込み活性の 12~35%に低下した (Table 3-9)。高濃度のロイシン存在下では、低濃度ロイシン存在時よりは浸透圧処理の影響が少なかったが、それでも若干のロイシン取り込み活性の低下がみられた。

Table 3-9 Effect of osmotic shock treatment (10% NSS) on the incorporation of radio-labeled leucine (1 μ M, 5nM) by E-CELL and S-CELL. Ratio of incorporation rates to those by E-CELL and S-CELL without osmotic shock treatment were shown.

	Ratio (%)	
	¹⁴ C-leucine (1 μ M)	³ H-leucine (5nM)
E-CELL	24.9	49.5
S-CELL	52.2	18.2

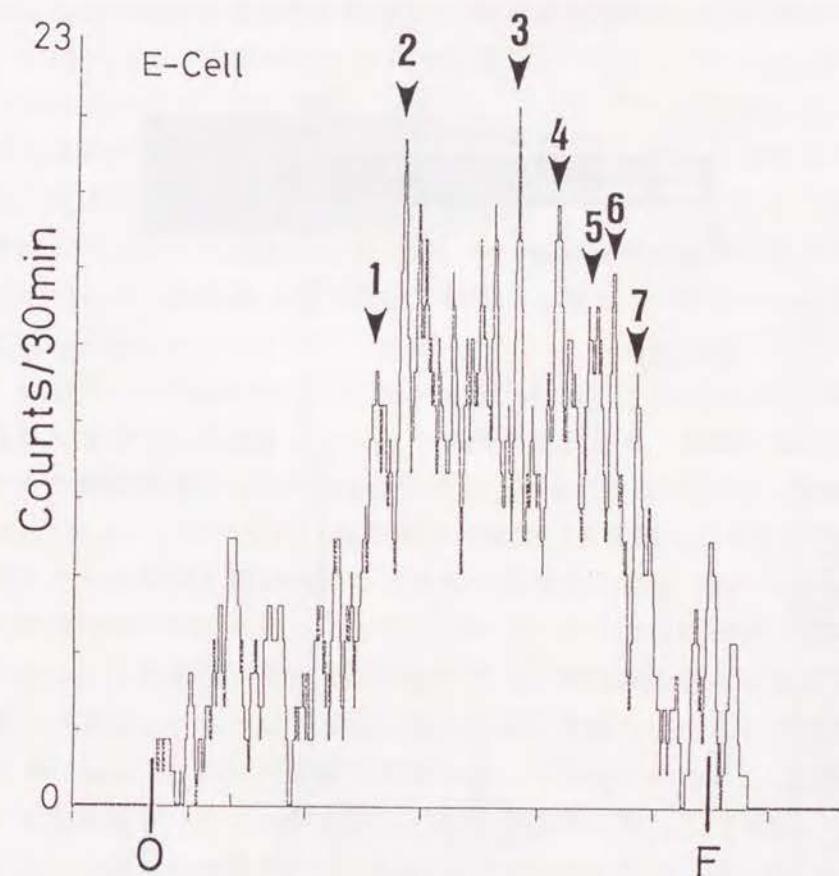
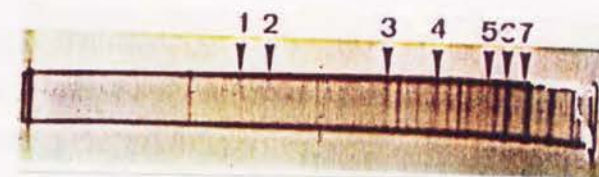
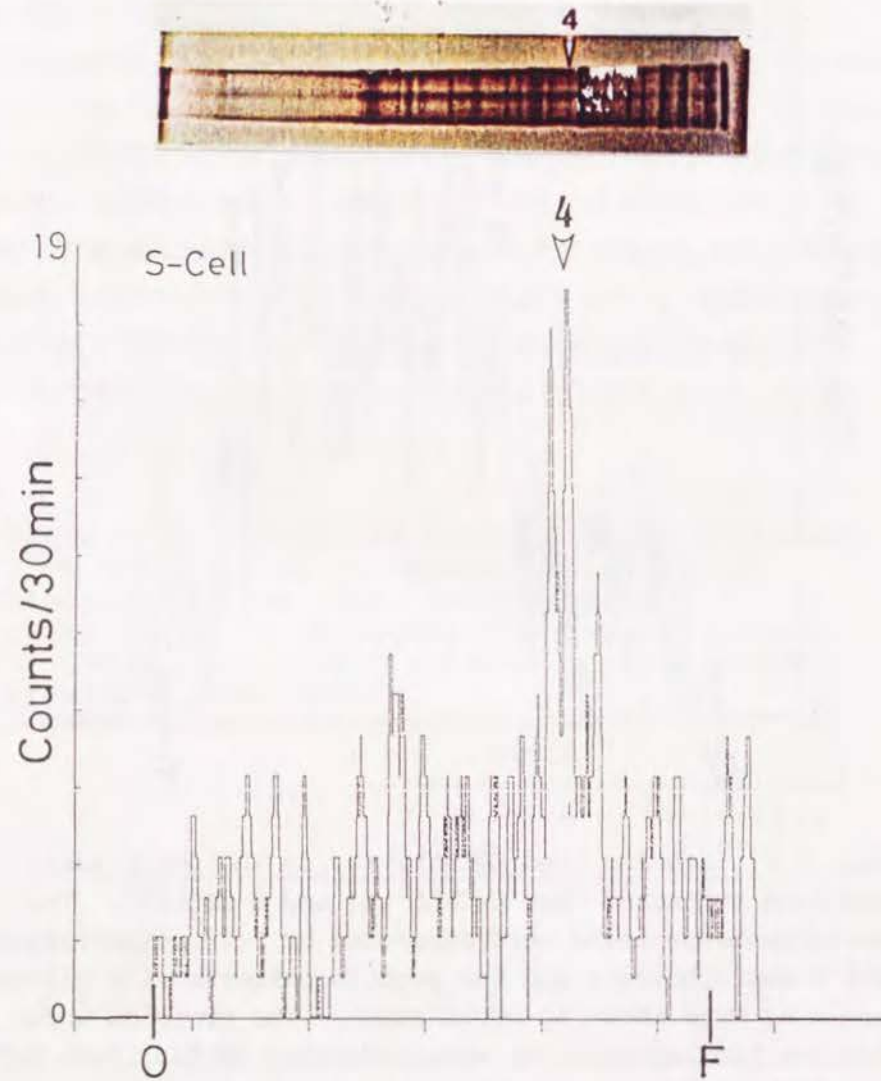


Fig. 3-27 Leucine binding activity in the periplasmic proteins extracted from E-CELL (A) and S-CELL(B). The periplasmic proteins were separated by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis and the protein patterns with silver staining were shown at upper sides. The proteins which had leucine binding activity were indicated (∇, ∇). Both E-CELL and S-CELL showed same protein active to leucine binding (∇ 4).

ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって P.P. を分画後、ロイシンの結合活性を調べた結果を Fig. 3-27 に示した。E-CELL ではロイシン結合活性を示すタンパク質が複数確認されたのに対して、S-CELL では 1つしか確認されなかった。S-CELL で確認されたこのロイシン結合タンパク質は、E-CELL でも確認され、E-CELL と S-CELL が共有する P.P. であった。



考察

種々の濃度のロイシン存在下でのロイシン取り込み速度から Lineweaver-Burk 逆数プロット法によって解析を行ったところ、高栄養条件下で培養した KE10 株の細菌細胞 E-CELL は K_m 値がそれぞれ 2.8×10^{-8} M と 1.1×10^{-6} M の 2 段階の取り込み系を持っていた。この E-CELL を長期間飢餓状態にさらした S-CELL では、高栄養増殖時に見られた複数のロイシン取り込み系のうち、親和性の低い (K_m 値の大きい) 取り込み系が消失した。また、低濃度有機物培地で数回繰り返し培養した O-CELL でも、同様に低親和性の取り込み系が消失していたが、S-CELL と同様に親和性の高い (K_m 値の小さい) 取り込み系は保持されており、しかも S-CELL よりも 1 細胞当りの活性が高かった。

Azam & Hodson (1981) と Hagström et al. (1984) は外洋海域の細菌群集の基質取り込みカインेटクスを現場試水および連続培養系で調べ、これらの細菌群集が複数の K_m 値を持っていることを示した。その後、Nissen et al. (1984) は、海水のみの培地でも増殖可能な海洋細菌分離株がグルコースの取り込みに関して多相の取り込み機構 (Multiphasic Uptake Mechanism) を持っており、グルコースの濃度に依存して K_m 値の異なる取り込み系を使い分けていると推定し、外洋の個々の細菌が低栄養環境への適応の一つとして多相の取り込み系を持っているのではないかという Williams (1973) の考察を支持した。そのほかにもいくつかの海洋細菌や淡水細菌で、アミノ酸、糖などの有機基質に関して 2 つ以上の多相の取り込み系が報告されている (Geesey & Morita 1979, Marden et al. 1987, Ishida et al. 1982)。本研究で、通性低栄養細菌 KE10 株にも高濃度有機物培地で増殖している際には同様の多相の取り込み系が確認されたことから、低栄養細菌のうち高栄養寒天培地で分離可能な通性低栄養細菌にはこのような多相の取り込み系が普遍的に存在し、低栄養環境に適応していることが示唆された。

飢餓生残と基質取り込み機構の関係についてもいくつかの知見がある。海洋性の *Vibrio* sp. S14 株は飢餓状態にさらされると高親和性のロイシン

取り込み系の活性を強化し V_{max} 値を増大させる一方、低親和性の取り込み系の V_{max} 値を低下させることが報告されており (Marden et al. 1987), 飢餓生残における重要な適応機構であると考えられている。南極海から分離された Ant-300 株は $0.25 \mu\text{M}$ 以上のアルギニン存在下で有効に機能している低親和性の取り込み系とそれ以下の濃度で有効に機能する高親和性の取り込み系を持っているが (Geesey & Morita 1979), 飢餓状態にはいると低親和性の取り込み系の機能は低下するのに対して、高親和性の取り込み系は維持されていると報告されている (Geesey & Morita 1979, Faquin & Oliver 1984)。

KE10 株の O-CELL あるいは S-CELL は、低栄養環境下では低親和性の基質取り込み系は消失している。他の海洋細菌同様に、KE10 株も低栄養環境に対する適応機構の 1 つとして、低栄養環境下ではあまり役に立たない低親和性の取り込み機構の機能を低下させる一方、高親和性の取り込み機構の機能を維持・強化することで環境中の希薄な有機物の利用を図っているものと思われる。

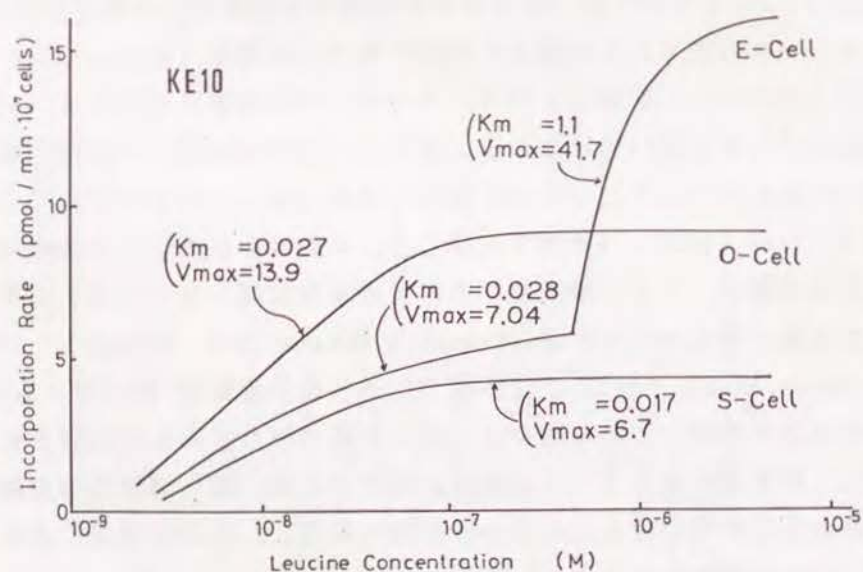


Fig. 3-28 Leucine uptake kinetics of three cell phases, E-CELL, S-CELL and O-CELL. K_m : Michaelis constant, μM , V_{max} : maximum velocity, 10^{-19} mol/cell/min.

さて、KE10 株の 3 種の状態の細菌細胞に共通してみられるの高親和性の取り込み系について V_{max} 値を較べたところ、O-CELL は他の 2 種の細菌細胞と較べて約 2 倍の V_{max} 値を持っていた。その結果として、約 $1 \mu\text{M}$ 以下の濃度のロイシン存在下では、O-CELL は E-CELL よりも高い取り込み活性を示した (Fig. 3-28)。S-CELL も表面積当りのロイシン取り込み活性では、低濃度のロイシン存在下で E-CELL よりもかなり高い活性を示した。

低栄養環境への個々の細菌の適応戦略として、これまでは「飢餓状態での生存説」(Morita 1986) が主なものでありであり、低栄養環境における細菌のもう一つの存在形態として考えられる低栄養増殖状態を仮定した知見はきわめて少ない。Ishida et al. (1982) は、淡水性の通性低栄養細菌 (*Aeromonas* sp.) がグルタミン酸の取り込みに関してやはり低親和性の取り込み系と同時に、低濃度のグルタミン酸を効率よく利用し得る高親和性の取り込み系も備えており、この細菌の低栄養環境下での増殖能力を支えていることを報告しているが、この細菌の場合、高濃度グルタミン酸培地 (2.7mM) で培養した細菌細胞 (H-cell) と、低濃度グルタミン酸培地で培養した細菌細胞 (L-cell) の間には、取り込み系に関しては劇的な変化は見られなかった。しかし、本研究で用いた海洋性通性低栄養細菌 KE10 株の場合、ロイシンの取り込み機構に関しては、E-CELL と O-CELL の間には明らかに変化がみられ、しかも、高濃度ロイシン存在下では前者が、低濃度ロイシン存在下では後者が、より効果的にロイシンを取り込む能力を示し、それぞれの有機物濃度環境に適応した取り込み機構が存在することを確認することができた。一方、従来の飢餓実験を踏襲した S-CELL の場合、細菌表面積当りの取り込み活性では E-CELL と較べて、低濃度域のロイシン取り込み能力に有効性を見いだすことができたが、細菌細胞数当りでは明瞭な差を見いだすことができなかった。この結果から、低栄養増殖を行っている細菌細胞 O-CELL は、飢餓生残している細菌細胞 S-CELL と比べ、低栄養環境へのよりすすんだ適応能力を保持していることが示唆された。このことは、低栄養細菌の低栄養環境に対する生理的な適応戦略に関して新たな知見を提供するとともに、従来の飢餓実験から得た知見をもとに低栄養

環境の細菌群集の生理的な特性を考えることに対して警鐘を加えるものである。

KE10株の E-CELLが示した 2種類のロイシン取り込み機構を他のアミノ酸との拮抗阻害の面から検討すると、低濃度域 (5nM) の取り込みではバリン、フェニルアラニンやメチオニンによる顕著な拮抗阻害が見られたが、高濃度域 (1 μ M) のロイシン取り込みと比べて、拮抗阻害のパターンに特に顕著な違いは見られなかった。Hirsh et al. (1979)の低栄養細菌における机上の仮説では、基質に対する特異性の低い取り込み系が細菌の低栄養環境での生存に有効であるとされていたが、KE10株の高親和性の取り込み系にはそのような傾向はみられなかった。

10%NSSによる浸透圧ショックをほどこした KE10株の E-CELLと S-CELLは、いずれもロイシン取り込み活性を低下させた。このことから浸透圧ショックによって細菌細胞から除かれるペリプラズム空間タンパク質 (P.P.) が、KE10株のロイシン取り込み機構に大きく関与している可能性が示唆された。グラム陰性細菌では、P.P.の中の結合タンパク質 (Binding Protein, B.P.) が環境中の有機基質、特にアミノ酸の取り込みに重要な役割を果たしていると考えられている (Anraku 1982)。また、海洋環境中の細菌群集にみられる高い基質親和性に結合タンパク質が関与しているという意見もある (Griffiths et al. 1974)。そこで、E-CELLと S-CELLのロイシン取り込み機構の違いがペリプラズム空間に存在する B.P.の違いによって生じる可能性、いいかえると、KE10株の低栄養環境への適応戦略の 1つとしてのロイシン取り込み系の切り替えが、B.P.を作り替えることによって起こっているという仮説のもとに、E-CELLと S-CELLから P.P.を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分画し、それぞれの各 P.P.のロイシン結合活性を調べた。泳動後の E-CELLと S-CELLの P.P.の泳動パターンはかなり異なっており、しかも E-CELLにはみられたロイシン結合活性を持つ複数のタンパク質バンドが、S-CELLでは 1本しかみられないことから、E-CELLと S-CELLの間のロイシン取り込み機構の差は、ペリプラズム空間のロイシン結合タンパク質の差による可能性が示唆された。海洋性の *Vibrio* sp. S14株も飢餓開始直後からあらたなタンパク質

(Starvation induced protein) を合成し、その中にはいくつかのペリプラズム空間タンパク質があることが次元電気泳動法および免疫学的方法から明らかになっている (Albertson et al. 1987, Nyström et al. 1988)。また、高栄養増殖時の S14株では、P.P.中の 37kDaおよび 44kDaのタンパク質にロイシン結合活性がみられるが飢餓生残時には 37kDaのタンパク質の減少がみられ、これが飢餓生残時にロイシン取り込み機構の変化に関係があるのではないかと考えられており、同様のタンパク質レベルでの低栄養環境への適応機構がグルコースの取り込み機構に関しても報告されている (Mårdén et al. 1987, Albertson et al. 1990a)。KE10株の場合も、飢餓開始直後にタンパク質合成活性の増加がみられ、飢餓生残に必要なタンパク質が合成されている可能性が示されており (III-3)、ロイシン取り込み機構に密接に関与している B.P.を作り替えることで、希薄な有機基質を利用できる取り込み系を維持し、飢餓環境に耐え得るように適応しているのではないかと考えられる。また、S-CELLの P.P.中で唯一ロイシン結合活性を持っているタンパク質が、これが E-CELL、S-CELLと O-CELLに共通してみられる高親和性の取り込み系に関与する B.P.である可能性は強い。

ロイシン取り込みカイネティクスの解析から、O-CELLは S-CELLよりもより高度に低栄養環境に適応していると判断されることから、O-CELLの P.P.を解析することは大いに興味のもたれるところであったが、E-CELLと S-CELLで P.P.抽出に用いた浸透圧ショックの条件では、O-CELLから P.P.を抽出することが不可能であった。これは O-CELLが E-CELLや S-CELLよりも強い浸透圧耐性を示し、E-CELLと S-CELLでは大部分の細菌が破壊されてしまう条件 (D.W.による浸透圧ショック) であっても、増殖能や外部形状 (SEM観察) はほとんど影響を受けなかった。O-CELLの持っている高親和性の取り込み系は、E-CELLや S-CELLの高親和性の取り込み系と Km値がほぼ同じであったが、Vmax値は後二者よりもかなり高かった。このことから O-CELLも E-CELLや S-CELLに共通してみられる B.P.を持っており、この B.P.の数か、または B.P.が結合する細胞内膜上の部位が、E-CELLや S-CELLよりも多いことが予想される。

III-6 概要

(1) 低濃度有機物培地をもちいた希釈法によって分離に成功した偏性低栄養細菌 11株は、いずれも低濃度有機物培地である $ST10^{-4}$ 培地では比較的良好な増殖を示すものの、高濃度有機物培地である ZoBell 2216E培地と同程度の有機物を含む $ST10^0$ 培地ではまったく増殖することができなかった。

(2) 通性低栄養細菌 KE10株は、高低両培地およびまったく有機物を添加しない熟成海水 (ASW) 中であっても良好な増殖をした。

(3) 高濃度有機物培地で培養した KE10株はグリシン高濃度培地 (2gC/l) で増殖可能であるが、この細菌を低濃度有機物培地 ($NSST10^{-4}$ 培地かASW) で数回繰り返し培養した細菌細胞 O-CELLは、 $ST10^0$ 培地やグリシン低濃度培地では良好な増殖を示すものの、グリシン高濃度培地では増殖能力を失っていた。

(4) KE10株はまったく有機物を添加しない人工海水中であっても長期間 (140日間) 生残が可能であった。KE10株は飢餓開始直後に DNA合成活性が低下するが、タンパク質合成活性およびアミノ酸、グルコース等の有機基質の利用能は一時的に増加した後、減少し、飢餓 2週間経過以降一定になった。

(5) 高濃度有機物培地で増殖している細菌細胞 E-CELL、E-CELLを 2週間飢餓状態にさらした細菌細胞 S-CELLおよび低濃度有機物培地で増殖している細菌細胞 O-CELLを KE10株から調製し、これら 3種の細菌細胞の間で DNA合成活性 (TdR_{DNA}) およびタンパク質合成活性 (Leu_{prot}) を調べたところ、O-CELLと S-CELLはいずれも E-CELLにくらべて DNA合成活性が $1/8$ と低かったが、タンパク質合成活性では O-CELLは E-CELLと同等かそれ以上の活性を持っていた。このような特徴は、第 II 章で示したように、外洋環境の細菌群に特徴的に観察されたものであった。

(6) O-CELLと S-CELLはいずれも低栄養環境に適応した細菌細胞であると思われるが、形態的にも生理的にも差がみられ、タンパク質合成活性、アミノ酸の利用活性は O-CELLがかなり高かったのに対して、グルコースの利用能は S-CELLの方が高かった。

(7) E-CELLは、ロイシンの取り込み系に関して K_m 値が $1.1 \times 10^{-6}M$ の低親和性の取り込み系と $2.7 \times 10^{-9}M$ の高親和性の取り込み系を持っているが、O-CELLと S-CELLでは低親和性の取り込み系が消失し、高親和性の取り込み系のみが保持されていた。O-CELLの高親和性のロイシン取り込み系は E-CELLや S-CELLのそれと比較して V_{max} 値が高く、その結果、低濃度のロイシン存在下では O-CELLがもっとも効果的な取り込み活性を示した。

(8) KE10株の高低両親和性のロイシン取り込み機構にはいずれもペリプラズム空間に存在するタンパク質 (おそらく結合タンパク質, B.P.) が関与していると推定された。また、E-CELLと S-CELLの間には抽出したペリプラズム空間タンパク質に違いがみられ、E-CELLではその中に複数のロイシン結合活性があるタンパク質がみられたが、S-CELLでは 1つのタンパク質のみにロイシン結合活性が確認された。

第IV章 高濃度有機物培地における低栄養細菌の増殖阻害

緒言

海水中の細菌の生菌計数用培地として、当初 ZoBell 2216E培地 (Oppenheimer & ZoBell 1952) が開発されたが、Sieburth (1967) らによってこの培地中の有機物濃度が海洋細菌の増殖には高すぎるのではないかと指摘され、多くの海洋微生物の研究者がこの問題を検討した (Fonden 1968, Ishida & Kadota 1974, 1975, Ishida et al. 1986, Eguchi & Ishida 1990, Akagi et al. 1977, Carlucci & Shimp 1974, Mallory et al. 1977, Yanagita et al. 1978)。そうした研究の過程で、培地に含まれる有機物濃度の問題の他に、寒天培地のような固体培地でのコロニー計数法にも問題があることが判明し、 $ST10^{-4}$ 培地などの低濃度有機物液体培地を用いた MPN法が海洋細菌計数に非常に有効であることが明らかにされた (Ishida & Kadota 1979, Ishida et al. 1986, Eguchi & Ishida, 1990)。この方法によって、従来の方法に比べて細菌の計数値が 10~100倍以上も増加するとともに、これまでは存在がわからなかった一群の細菌「偏性低栄養細菌」(Ishida & Kadota 1981) が低栄養海域で優占していることが明らかになった。

一方、培地基質の種類が細菌計数値に及ぼす影響について検討した研究はあまりなされていないが、純粋分離菌株の増殖能に関しては、Martin & MacLeod (1984) の研究がある。それは低栄養細菌および富栄養細菌として分与された細菌株 (Akagi 1980b) を用いて、いくつかのアミノ酸、有機酸などの単一有機物を基質とした培地での増殖を調べたもので、これらの細菌がある種の有機基質培地では低栄養細菌が富栄養細菌に、富栄養細菌が低栄養細菌に変わり得ることを示している。このことは、MPN法に用いる培地の基質を変えることによって $ST10^{-4}$ 培地を用いた場合とは異なる細菌を捉えることができる可能性を示唆している。また、III-2において、高濃度ペプトン培地でも低濃度ペプトン培地でも増殖可能な通性低栄養細菌 KE10株は、低栄養環境に適応することによって「低濃度グリシン培地に

は増殖するが、高濃度グリシン培地には増殖できない」という偏性低栄養細菌の増殖特性に類似した性質を示すことを明らかにした。

本章では、まずIV-1において、いくつかのペプトン、アミノ酸、糖および有機酸をそれぞれ単一基質として培地を調製し、外洋海域における細菌数を MPN法で計数し、得られた結果を比較した。IV-2とIV-3では、KE10株を用いて高濃度グリシンによる増殖阻害の原因を調べ、得られた知見を参考にして偏性低栄養細菌の高濃度有機物培地での増殖阻害に関して考察した。

IV-1 異なる基質を用いた培地による MPN計数値の比較

これまでの MPN計数では培地の基質としてトリプティケースペプトンを常用してきた。本節では、この培地 ($ST10^{-4}$ 培地) をコントロールとして、市販の各種ペプトン、および単一のアミノ酸、糖と有機酸を単一基質として添加した培地を用い、基質によって MPN計数値にどのような相違が生じるかを、若狭湾沖合い低栄養海域の細菌群集について調べた。

実験方法

試料の採取

採水は、1986年 4月23日と5月22日、1987年 5月29日および1989年 6月22日の計 4回、観測船「白浪丸」により前述 (III-1 参照) の若狭湾冠島近海で行った。1986年 5月のみ Stn. 2で、それ以外は Stn. 1で採水した (Fig. 3-1)。表層水 (0m層) は滅菌ガラスボトル (WHATMAN) で直接採水し、深層水 (40mまたは 50m層) はよく洗浄したバンドン採水器を用いて採水した。全菌数計数用の試料は船上で速やかに固定し (最終濃度 4%ホルマリン)、MPN法による低栄養細菌計数用の試料は氷蔵した状態で研究室まで持ち帰った。採水から実際に生菌数計数用液体培地に接種するまでに要した時間は約 10時間であった。用いたガラス器具はすべて $450^{\circ}\text{C} \cdot 1.5$ 時間の燃焼処理をほどこした。

MPN計数用培地の調製

MPN計数に用いた各種の培地の組成を Table 4-1に示した。トリプティックケースペプトン (Trypticase peptone, Try, BBL), ポリペプトン (Polypeptone, Pol, 大五), プロテオースペプトン (Proteose peptone, Pro, Difco) の3種はカゼインの部分加水分解物, カザミノ酸 (Cas-amino acids, Cas, Difco) はカゼインの完全加水分解物, フィトンペプトン (Phyton peptone, Phy, Difco) は大豆タンパク質の部分加水分解物である。トリプティックケースペプトンを基質とした通常の ST10⁻⁴培地も対照として使用した (Try培地)。それぞれの基質の高濃度培地は ST10⁻¹培地と同じ有機炭素濃度 (約 200mgC/l) になるようにろ過熱成海水 (ASW) で調製し, それぞれに酵母エキス (Difco) を 0.05g/lの濃度で添加した。グル

Table 4-1 Variation of high nutrient liquid media for MPN count.

	composition				abbreviation
	substrate	Y.E.	ASW	NaNO ₃	
trypticase					
peptone	0.5g	0.05g	1 l		Try(ST)
proteose peptone	0.5g	0.05g	1 l		Pro
polypeptone	0.5g	0.05g	1 l		Pol
phyton peptone	0.5g	0.05g	1 l		Phy
casamino acids	0.5g	0.05g	1 l		Cas
glycine	0.62g	0.05g	1 l		Gly
alanine		0.05g	1 l		Ala
leucine	0.36g	0.05g	1 l		Leu
phenylalanine		0.05g	1 l		Phe
glutamate	0.49g	0.05g	1 l		Glu
aspartate	0.55g	0.05g	1 l		Asp
arginine	0.48g	0.05g	1 l		Arg
histidine		0.05g	1 l		His
glucose	0.50g	0.05g	1 l	0.05g	Glc
glycolate	0.67g	0.05g	1 l	0.05g	Glycol

コースおよびグリコール酸を基質とした培地には, 窒素源としてさらに NaNO₃ を 0.05g/lの濃度で加えた。低濃度培地は ST10⁻³培地と同様, それぞれの高濃度培地を ASWで 100倍に希釈して調製した。

今回の実験では低栄養培地として ST10⁻³培地を用いた。この理由は 1985年 5月の観測の際に, ST10⁻⁴培地では 10⁵cells/ml程度にしか増殖せず, 「増殖無し」と判定された試験管でも, ST10⁻³培地に再接種するとその多くが 10⁶cells/ml以上の増殖を示した経験によるものである。また 1986年 4月の観測の際に, 低濃度有機物培地として基質を添加しない熱成海水のみの培地 (ASW培地), ST10⁻⁴培地および ST10⁻³培地の3種を用意し, 得られた MPN値を比較したところ, この海域では ST10⁻⁴培地や ASW培地よりも ST10⁻³培地の方が高い計数値が得られ, この濃度の培地が最も低栄養細菌の増殖に適していることが示唆されたためである。

MPN法の手順

MPN計数法は第II章の手順に従った。低濃度培地では4週間, 高濃度培地では2週間, それぞれ 15°C・暗所・静置条件で培養を行った。

結果

市販されているいくつかのペプトンおよびカザミノ酸を基質として調製した低濃度培地を用いて, 1986年 4月の採水時に通性低栄養細菌および偏性低栄養細菌の MPN計数を行い, 培地による計数値の違いを比較した (Fig. 4-1)。トリプティックケースペプトンを基質とする Try低濃度培地 (ST10⁻³培地と同じ) による全低栄養細菌計数値は, 0m層で 7.0×10⁴ cells/ml, 50m層で 2.2×10⁴ cells/mlであり, そのうち偏性低栄養細菌の割合はそれぞれ 42%と 93%であった。その他の市販のペプトン (Pol, Proと Phy) を基質とした低濃度培地を用いて得られた低栄養細菌の MPN値は, 0m層と 50m層をとわず, 全体的に Try培地で得られた値よりも低く, 特に Phy培地で得られた計数値は Try培地のその約 1/8 (0m層)と 1/20 (50m層)であった。また, Pro培地では得られた低栄養細菌はすべて通性

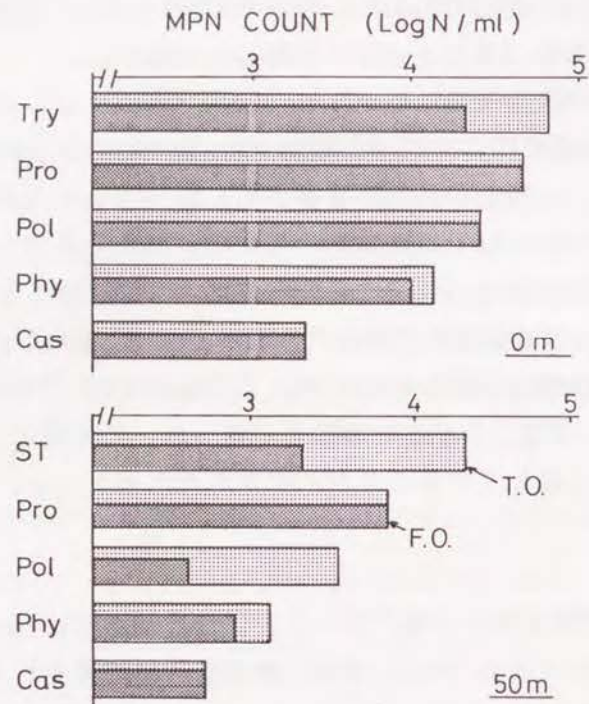


Fig. 4-1 Number of total oligotroph (TO) and facultative oligotroph (FO) counted by MPN method with various peptone media at 0m and 50m depth of Stn.1 in Wakasa Gulf (see Fig. 3-1) on April 23, 1986. See Table 4-1 for each abbreviation.

低栄養細菌であったが、全低栄養細菌計数値は Try培地のそれより低かった。Cas培地で得られた計数値はこの 1986年 4月の採水時には他のペプトン培地のそれと比べて著しく低かったが、他の採水時にはそのような傾向はみられなかった (Figs.4-1~4-4)。

1986年 5月, 1987年 5月および 1989年 6月には, アミノ酸, 糖および有機酸を単一基質として調製した培地 (単一基質培地) によって全低栄養細菌と通性低栄養細菌の MPN計数を行った (Figs.4-2~4-4)。低濃度培地での全低栄養細菌数 (一次接種) は, 単一基質培地の方がペプトン培地よりも一桁ほど少ない傾向が見られた。しかし, 単一基質培地の中での差異

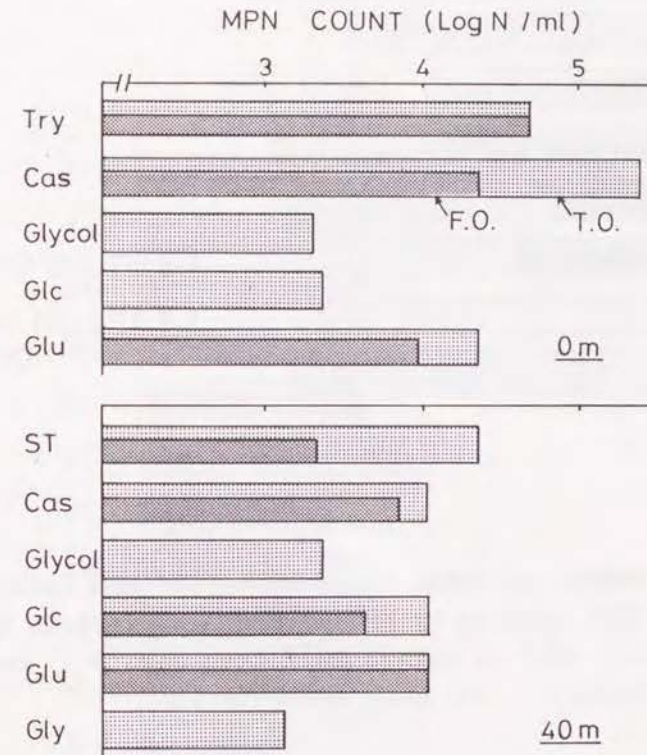


Fig. 4-2 Number of total oligotroph (TO) and facultative oligotroph counted (FO) by MPN method with various substrate media at 0m and 40m depth of Stn.2 in Wakasa Gulf (see Fig. 3-1) on May 23, 1986. See Table 4-1 for each abbreviation.

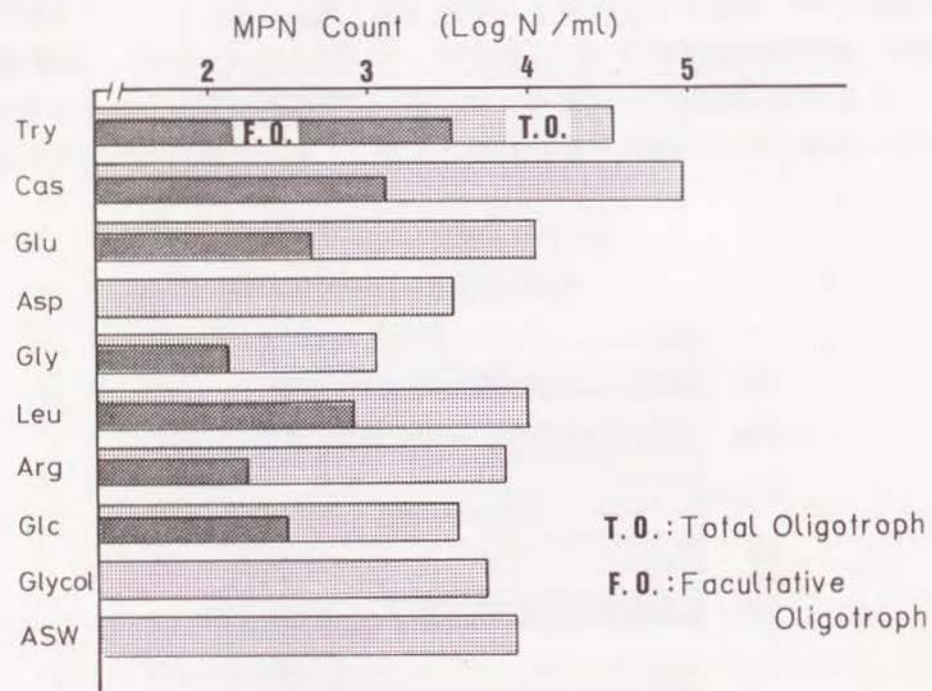


Fig. 4-3 Number of total oligotroph (TO) and facultative oligotroph (FO) counted by MPN method with various substrate media at Stn.1 (0m) in Wakasa Gulf (see Fig. 3-1) on May 29, 1987. See Table 4-1 for each abbreviation.

はペプトン培地との間の差異と比べて大きくはなかった。1987年と1989年の採水時には低濃度培地の一つとして有機基質無添加のASWのみの培地（ASW培地）を用いてMPN計数を行ったが、ASWを基礎培地として調製した単一基質培地の方がASW培地よりもMPN値がしばしば低くなった。また、

単一基質高濃度培地に二次接種して得られた通性低栄養細菌のMPN値も 10^{-1} 培地で得られた値よりもさらに低く、特にグリコール酸、グリシン、アスパラギン酸などを基質とした場合、高濃度培地でまったく増殖が確認されず、結果として得られた低栄養細菌がすべて偏性低栄養細菌となってしまうことがあった。

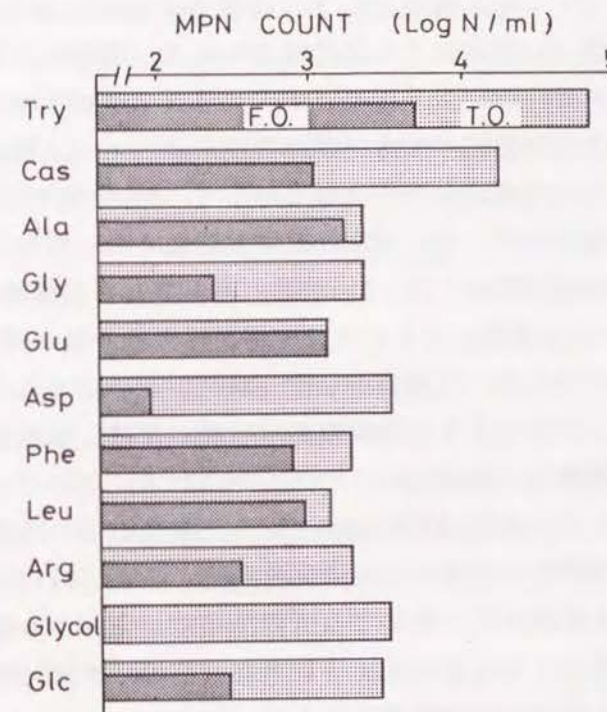


Fig. 4-4 Number of total oligotroph (TO) and facultative oligotroph (FO) counted by MPN method with various peptone media at Stn.1 (0m) in Wakasa Gulf (see Fig. 3-1) on June 22, 1989. See Table 4-1 for each abbreviation.

考察

本節では、まずいくつかの市販のペプトンとカザミノ酸を用いた低濃度液体培地を調製して外洋環境の低栄養細菌の MPN 計数を行い、得られた計数値を比較した。フィトンペプトン以外の 3 種のペプトンとカザミノ酸は、いずれもその原料となるタンパク質がカゼインであり、アミノ酸組成はほぼ同一であると考えられるにもかかわらず、各ペプトン間で全低栄養細菌計数値に大きな差が生じた。大豆タンパク質の部分加水分解物であるフィトンペプトンを基質とした Phy 培地で得られた MPN 値は最も低く、特に 50m 層では Phy 培地による計数値よりも Try 培地によるそれは 20 倍も高い値が得られた。このような違いは、おそらくペプトンの原料であるタンパク質のアミノ酸組成や加水分解の程度によるアミノ酸の存在形態（遊離型か結合型か）の差に由来するのであろう。Pro 培地では偏性低栄養細菌がまったく検出されず、すべて通性低栄養細菌であったが、全低栄養細菌数は Try 培地の方が高かった。Cas 培地で時々高い計数値を得ることがあるものの全体的に Try 培地、つまり今まで海洋細菌の計数に用いてきた ST10⁻¹ 培地、において高い計数値が得られた。このような Try 培地に対する他のペプトン培地による低栄養細菌計数値の差は、偏性低栄養細菌計数値、通性低栄養細菌計数値のいずれにもみられる。このことは Try 培地（ST10⁻¹ 培地）では通性低栄養細菌とされた細菌が他の培地では偏性低栄養細菌的な増殖特性を示すことも考えられる。また、Try 培地では偏性低栄養細菌とされた細菌が他の培地では低濃度培地であっても増殖できない可能性もある。Ⅲ-1 でも述べたように ST10⁰ 培地で増殖できず、偏性低栄養細菌として分離された細菌がその他のペプトンやカザミノ酸を基質とした高濃度培地でも増殖できなかった事からも、Try 培地（ST10⁻¹ 培地）で偏性低栄養細菌とされた細菌は培地の基質の種類によって通性低栄養細菌となることはきわめて稀であると思われる。

アミノ酸、糖、有機酸などを単一の有機基質として調製した培地によって MPN 計数を行うと、ほとんどの場合、全低栄養細菌計数値は低濃度 Try 培地（ST10⁻³ 培地）による計数値より明らかに低く、ASW のみの培地に

よる MPN 計数値より低くなる場合も多かった。この結果は、わずか 2mgC/l の基質の添加によって、低栄養細菌の増殖が阻害されたことを示唆する。また、各基質の高濃度培地への二次接種によって得られる通性低栄養細菌数も単一基質培地で得られる値は低かった。特にグリコール酸を基質とした場合、高濃度培地での増殖はまったく見られず、結果的にグリコール酸を基質として計数した場合には、計数された低栄養細菌はすべて偏性低栄養細菌となった。しかし、低濃度グリコール酸培地で増殖が確認された細菌のほとんどが ST10⁻¹ 培地では白濁を生ずるほど増殖したことから、従来の MPN 計数法では通性低栄養細菌とされた細菌であっても、高濃度グリコール酸培地では白濁するほど増殖し得ないことが明らかになった。グリコール酸は多くの植物プランクトンの光合成の余剰生産物として細胞外に排出される有機酸であると報告されており（Hellebust 1974）、海水中に生存している従属栄養細菌にとっては主要な利用有機基質の 1 つであると考えられる。江口（1990）は、グリコール酸が海洋の低栄養細菌によって同化されやすい基質であることを報告している。しかしながら、本実験結果から、グリコール酸を単一の基質として用いた場合には低栄養細菌はおおよそ 10⁷ cells/ml（肉眼で白濁が判定できる濃度）以上の細菌密度には増殖できないということが明らかになった。Wright（1975）は、グリコール酸が主にエネルギー源として呼吸基質として利用されることを報告しており、今回の実験結果も考えあわせて、低栄養細菌にとってグリコール酸がエネルギー源としては利用されても細菌細胞構成物質として同化されにくいのではないかという可能性が示唆された。

本実験の結果からは、Try 培地（ST10⁻¹ 培地）が海洋細菌の生菌数計数に最も適していることが示された。しかし、琵琶湖北湖の細菌を計数する際、トリプティックペプトンを基質とした LT10⁻³ 培地（ST10⁻³ 培地に相当）よりも、現場の湖水をそのままろ過滅菌して低濃度培地として使用した方が高い計数値が得られるという報告もあり（Fukami et al. 1988, 1990）、海洋細菌を計数する際にも現場海水をそのまま培地とした場合に ST10⁻¹ 培地より高い計数値が得られる可能性は残されている。

以上の室外実験の結果から、培地の基質の種類によって、特に単一基

質培地を用いた場合、ST10⁰培地では通性低栄養細菌とされる細菌が低濃度培地では増殖できるものの高濃度培地では増殖できないという偏性低栄養細菌の増殖特性を示すことが示唆された。

通性低栄養細菌 KE10株も低濃度有機物培地で繰り返し培養した細菌細胞 (O-CELL) は、グリシンを基質とした場合に低濃度培地では増殖できるものの 2000mgC/l以上の高濃度培地では増殖することができなかった。このことと本節の結果から通性低栄養細菌であっても低栄養環境に適応させることによって、ある特定の基質の培地では偏性低栄養細菌と類似した増殖特性を示すようになることが示唆された。そこで、IV-2とIV-3では KE10株から調製した O-CELLを用いて、高濃度グリシン培地による増殖阻害機作について詳細に検討し、得られた知見を参考にして偏性低栄養細菌の高濃度培地での増殖阻害機構を考察する。

IV-2 単一アミノ酸・ペプチド培地における通性低栄養細菌 KE10株 O-CELLの増殖特性

IV-1では外洋環境で通常通性低栄養細菌として検出される細菌が、いくつかの単一基質培地で偏性低栄養細菌としての性質を示すことがあると述べた。また、III-2では実際に通性低栄養細菌として分離された KE10株が低栄養環境に適応した状態 (O-CELL) では、グリシン培地で偏性低栄養細菌に類似した増殖特性を示すことを明らかにした。本節ではいくつかの単一アミノ酸培地を調製し、それらの培地での KE10株の増殖特性、特に最終細胞収量について調べた。

実験方法

実験に用いた培地基質はアミノ酸 19種とグリシンのジペプチドであるグリシルグリシンである。培地の基質濃度は全て炭素量が同一になるように調製した。例えば、ST10⁰培地の有機物濃度に相当する 2000mgC/l培地はそれぞれ 2000mgCに相当する基質と 0.5gの酵母エキス (Difco) を 1 l の

ろ過 ASWに溶解して調製し、これをろ過 ASWで 10倍、100倍、1,000倍に希釈した培地をそれぞれ 20mgC/l培地、2mgC/l培地および 0.2mgC/l培地とした。KE10株を ASWで 4回以上繰り返し培養した細菌細胞 O-CELLを初期細菌密度が約 1.0×10^4 cells/mlになるようにそれぞれの培地 (50ml) に接種し、15°C、暗条件下で静置培養を行った。約 1日間隔で採取した試料を DAPI染色後、蛍光顕微鏡による直接検鏡で計数して増殖曲線を得、最終細胞収量を測定した。

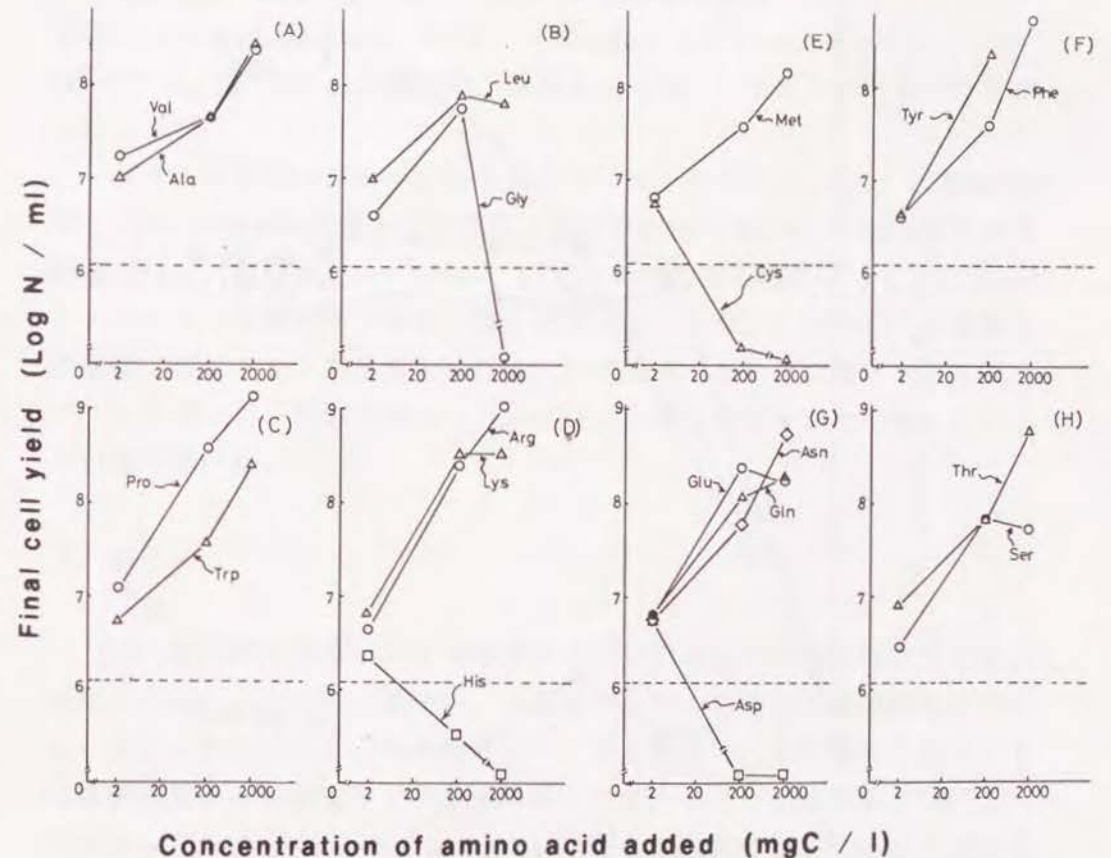


Fig. 4-5 Final cell yields of O-CELL prepared from KE10 in various concentrations of single amino acid media. Dot line show the final cell yield of O-CELL in ASW (aged sea water) without any nutrient addition.

結果

ST10⁻培地の場合(Ⅲ-1参照)と同様に, KE10株 0-CELLは低濃度有機物培地で繰り返し培養したにも関わらず, ほとんどのアミノ酸高濃度培地(2,000mgC/l)で即座に対数増殖を開始し, 70~120時間後には定常期に

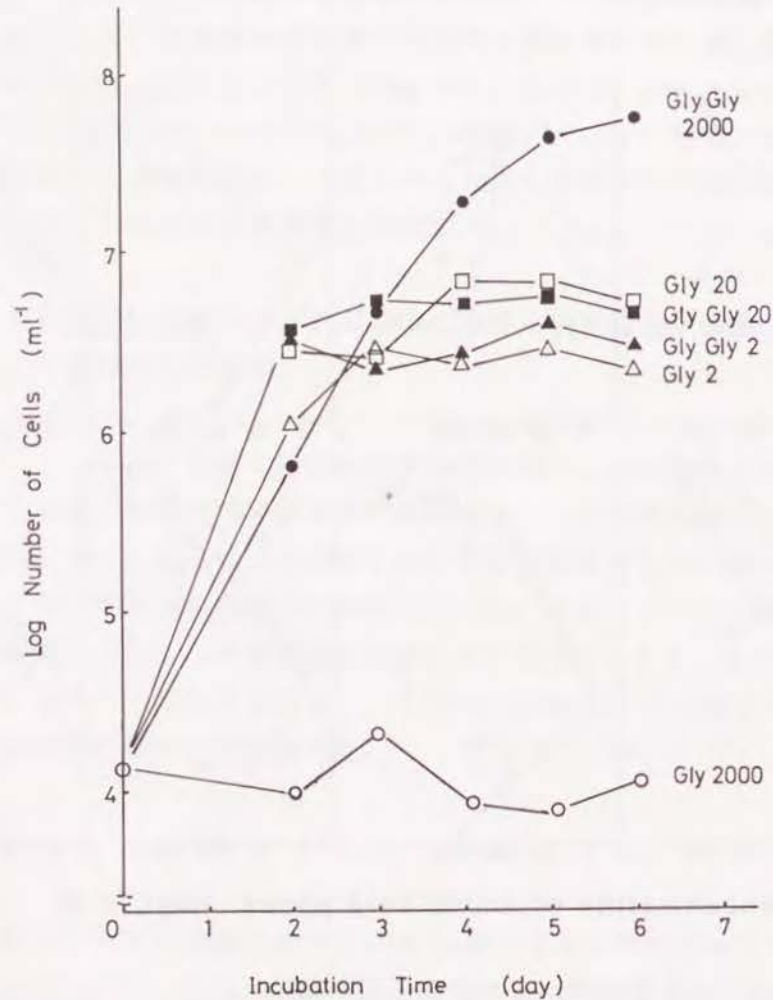


Fig. 4-6 Growth curves of KE10 in various concentration of glycine (Gly, ○, □, △) and glycyglycine (GlyGly, ●, ■, ▲). The concentration of substrate were 2000mgC/l (○, ●), 20mgC/l (□, ■) and 2mgC/l (△, ▲). 0-CELL was used for each inoculums.

達した。種々の濃度の単一アミノ酸培地(19種)で得られる 0-CELLの最終細胞収量を Fig. 4-5(A)~(H)に示した。用いた 19種のアミノ酸の中で, ロイシン (Leu, Fig. 4-5(B)) やセリン (Ser, Fig. 4-5(H)) では, 200mgC/l 培地で約 7.0×10^7 cells/mlの細胞濃度まで増殖が見られたが, 2,000mgC/l培地では細胞収量が低下 (6.5×10^7 と 5.5×10^7 cells/ml)した。アスパラギン酸 (Asp, Fig. 4-5(B)), シスチン (Cys, Fig. 4-5(E)), ヒスチジン (His, Fig. 4-5(D)), とグリシン (Gly, Fig. 4-5(B))の4種を基質とした場合, 2mgC/lの濃度の培地は通常増殖を示したが, グリシンでは少なくとも 2,000mgC/l, アスパラギン酸, シスチンとヒスチジンの3種のアミノ酸では 200mgC/l以上の濃度の培地で, ほとんど増殖できなかった。

グリシンのジペプチドであるグリシルグリシン (Gly-Gly) と遊離型のグリシン (Gly) を基質とした種々の濃度の培地における 0-CELLの増殖曲線を Fig. 4-6に示した。0-CELLは 2mgC/lの低濃度の培地ではグリシンとグリシルグリシン両培地ではほぼ同様の増殖を示したが, 2,000mgC/lの高濃度の培地ではグリシンを基質とした際には増殖しなかったにもかかわらず, グリシルグリシン培地では 6×10^7 cells/mlの細菌密度まで増殖することが可能であった。

考察

KE10株は外洋環境中の有機物濃度に近い低濃度有機物培地で繰り返し培養した場合(0-CELLに相当), 高濃度グリシン培地での増殖能力を失うことはⅢ-2で述べた。その他の単一アミノ酸培地でも高濃度培地での増殖阻害効果がみられるかどうか調べたところ, アスパラギン酸 (Asp), シスチン (Cys) とヒスチジン (His) をそれぞれ基質とした時に高濃度培地での増殖阻害がみられた。2mgC/lの濃度のヒスチジン培地で得られた 0-CELLの最終細胞収量は 1.6×10^6 cells/mlで, 0-CELLの基質無添加のろ過 ASWでの最終細胞収量 (1.2×10^6 cells/ml, Fig. 4-5に破線で表示) とそれほど変わらなかったことから, 0-CELLが実際にはヒスチジンを利用せ

ず ASW中に存在する微量の有機基質を利用して増殖した可能性がある。しかし、0-CELLは 2mgC/lの濃度のアスパラギン酸、システインおよびグリシン培地では、ろ過 ASWでの最終細胞収量の約 5倍の細胞収量に達していることから、明らかにこれら 3種のアミノ酸を利用したと考えられる。それゆえ、高濃度のこれらのアミノ酸は 0-CELLの増殖を阻害している推定される。このことから、0-CELLが アスパラギン酸、システインおよびグリシンといった基質では「低濃度で存在している時は利用して増殖できるが、高濃度に存在している時は増殖することができない」という偏性低栄養細菌の性質を示したことになる、通性低栄養細菌でも条件によっては偏性低栄養細菌の性質を持つということが示唆された。

Kihara & Snell (1952) は、*Lactobacillus casei* が高濃度のグリシンの存在下でその増殖が阻害されることを発見し、その理由を、グリシンがこの細菌の必須アミノ酸であるアラニンの取り込みを競合的に阻害しているからではないかと考えた。彼らはまたアラニンを含むペプチドを添加することによって、グリシンによる増殖阻害が緩和されることを示し、グリシンがアラニンを含むペプチドの取り込みは阻害しないからではないかと考察した。

KE10株の 0-CELLも、グリシンのジペプチドであるグリシルグリシン高濃度培地では増殖を阻害されなかった。一般に、細菌を含む微生物では、2~3個のアミノ酸が結合したオリゴペプチドは遊離型アミノ酸とは異なる取り込み系によって細胞内に取り込まれ、取り込まれた後に加水分解を受けることがわかっている (Payne & Bell 1978, Nisbet & Payne 1982)。KE10株 0-CELLの場合も、グリシルグリシンは細菌細胞内に取り込まれた後、即座に 2分子のグリシンに加水分解されると考えられることから Fig. 4-6 で得られたグリシンとグリシルグリシン培地における増殖パターンの違いは細胞内での生合成系の違いと考えるよりは、基質が細胞内へ取り込まれる段階での違いによるのではないかと推察される。以上の結果から高濃度グリシンによる KE-10株 0-CELLの増殖阻害のメカニズムについて以下のような仮説をたてた。「もともと基礎培地として用いたろ過 ASWには微量のアミノ酸が存在していると考えられる。0-CELLは添加した基質以外にこれ

ら ASW中の微量のアミノ酸も利用して増殖するが、高濃度のグリシンは他の必須アミノ酸の取り込みを阻害し、その結果増殖阻害が起こるのではないか」。この仮説を確かめるために IV-3 では グリシンによる他のアミノ酸の取り込み阻害の有無を検討した。

IV-3 高濃度グリシンによる他のアミノ酸の同化阻害

IV-2 の実験結果より、高濃度グリシンの添加によって他の必須アミノ酸の取り込みが阻害され、その結果、KE-10株 0-CELLの高濃度グリシン培地での増殖が阻害されるのではないかとこの仮説を立てた。本節では高濃度のグリシン存在下でのいくつかのアミノ酸の取り込みの様子を放射性同位元素で標識したアミノ酸を用いて調べ、上記の仮説を検討するとともに、得られた結果をもとにして、海洋細菌の多くが有機物濃度が高い培地で増殖できない理由について考察した。

実験方法

KE10株から調製した 0-CELLの培養 1 l を遠心分離 (8,000G×10min) によって集菌し、滅菌ろ過 ASWで二回洗浄した後、滅菌ろ過 ASWに再懸濁し、約 50mlの細菌懸濁液を得た。この懸濁液の細菌濃度は約 $3\sim 5 \times 10^6$ cells/mlであった。あらかじめ 2mlのろ過 ASWを入れた試験管に最終濃度が 2, 200および 2000mgC/lになるように非放射性のグリシンおよびグリシルグリシンを加え、それに調製した細菌懸濁液を 0.5mlずつ加えて反応液とし、 ^{14}C で標識したいくつかのアミノ酸およびグルコースを $0.2\mu\text{Ci}$ ずつ添加して反応を開始した。用いた基質は $\text{L-}^{14}\text{C}$ -アミノ酸混液 (57 mCi/milliatom carbon, Amersham), $\text{D-}^{14}\text{C}$ -グルコース (292mCi/mmol, Amersham), ^{14}C -グリシン (118mCi/mmol, Amersham), $\text{L-}^{14}\text{C}$ -ロイシン (342mCi/mmol, Amersham), $\text{L-}^{14}\text{C}$ -アラニン (75mCi/mmol, Amersham), $\text{L-}^{14}\text{C}$ -ヒスチジン (150mCi/mmol, Amersham), $\text{L-}^{14}\text{C}$ -セリン (157mCi/mmol, Amersham) である。培養は 15°C のウォーターバスで行い 15, 30,

60, 90および120分後に菌体を0.2 μ mニトロセルロースメンブレンフィルター(ADVANTECH社)上にろ過捕集し,ろ過ASWで数回洗浄した後ガラスバイアルに入れ,液体シンチレーター(AQUASOL II, NEN)を加え,液体シンチレーションカウンター(PAKARD model 2425)で放射活性を測定した。中性ホルマリンで固定した(最終濃度4%)後,同様の操作を行ったものを空試験とし,全ての測定は2本立てで行った。

外洋低栄養海域の細菌群集の 14 C-アミノ酸混液の同化活性に対するグリシンやグリシルグリシンの影響を調べた。海水試料は第II章で述べたKH88-1航海に際して,1988年3月11日にStn.33(6°33'0"N,159°59'9"E)の0m層から滅菌ガラスビン(SCHOTT社)で直接採水した。滅菌試験管(30mm ϕ)に20mlづつ分注した後,非放射性的グリシンおよびグリシルグリシンを最終濃度が0.25,0.5,1.0,2.5および5.0 μ M(約0.006~0.12mgC/l)になるように添加し, 14 C-アミノ酸混液を0.3 μ Ci(263 nanoatom carbon/l,アミノ酸組成から計算すると約50nMのアミノ酸を含む)加えて反応を開始した。現場水温(28°C)で1時間培養し,速やかに孔径0.2 μ mメンブレンフィルター(ADVANTECH社)上に捕集して,ろ過ASWで数回洗浄した後,液体シンチレーターで放射活性を測定した(第II章参照)。

結果

非放射性的グリシンやグリシルグリシンを加えない時の 14 C-グリシン, 14 C-セリン, 14 C-ロイシン, 14 C-グルタミン酸, 14 C-ヒスチジン, 14 C-アラニンの同化量を経時的变化をFig.4-7に示した。同化量はヒスチジンでは30分後,ロイシンでは60分後,それ以外のアミノ酸では90分後まで直線的に増加した。この結果から,以後の同化阻害実験の培養時間をヒスチジンのみ20分,それ以外は30分とした。非放射性的グリシンを全く加えない場合の 14 C-アミノ酸混液と 14 C-グルコースの同化速度を1として,2,200および2000mgC/lの濃度のグリシン存在下での同化速度の相対値をFig.4-8に示した。2mgC/lのグリシン存在下では非存在下の80%の,2000

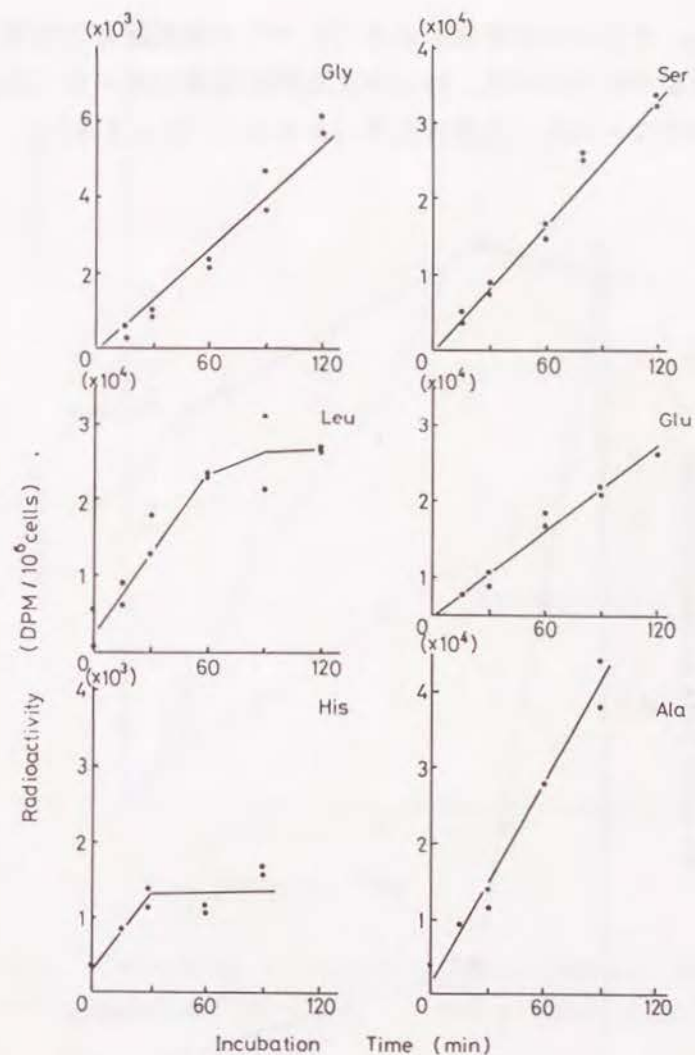


Fig. 4-7 Amino acids incorporation of O-CELL (KE10). Gly:glycine, Ser:serine, Leu:leucine, Glu:glutamate, His:histidine, Ala:alanine.

mgC/l(約84mM)のグリシン存在下では94%の 14 C-アミノ酸混液の同化阻害が見られたのに対し, 14 C-グルコース同化活性は2mgC/lのグリシン存在下ではほぼ0%,2000mgC/lのグリシン存在下でも27%の同化阻害しか表

れなかった。グリシンの添加による ^{14}C -アミノ酸混液の同化阻害効果は、反応開始後すぐにはあられ、90分の反応時間を通じて一定(1mgC/lのグリシン添加時で30~40%)の阻害活性がみられた(Fig. 4-9)。

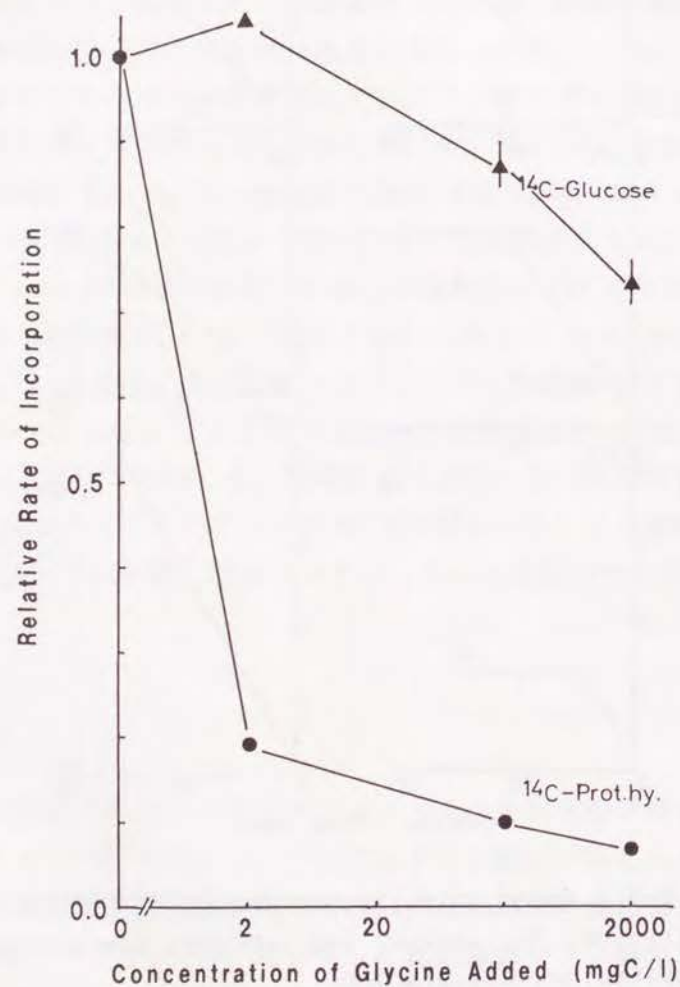


Fig. 4-8 Relative rates of ^{14}C -protein hydrolysate (Prot. hy.) and ^{14}C -glucose incorporation by O-CELL (KE10) at various concentration of glycine added. The values were related to the incorporation rates without glycine.

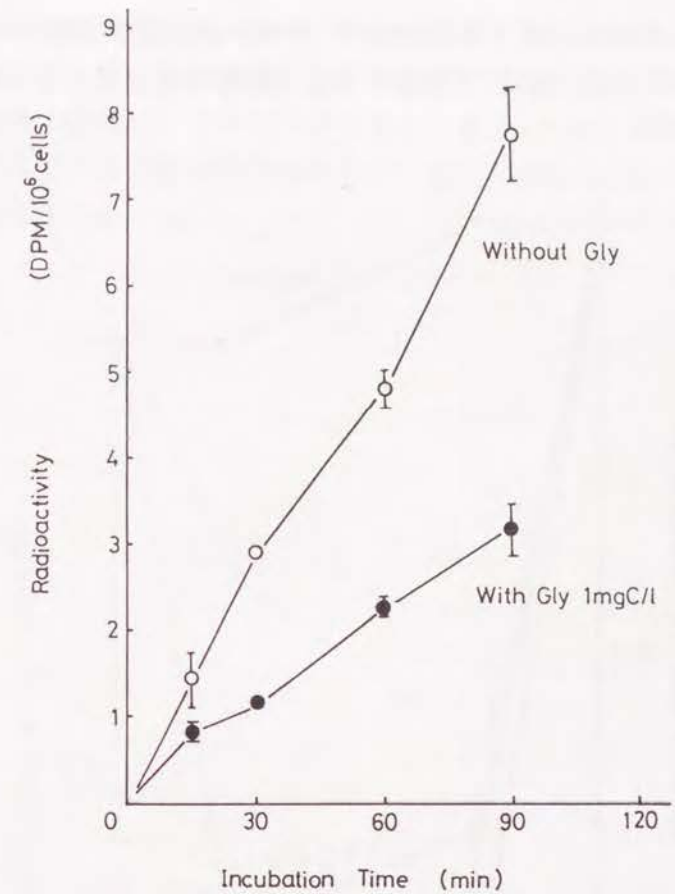


Fig. 4-9 ^{14}C -protein hydrolysate incorporation of O-CELL (KE10) with 1mgC/l of glycine and without glycine.

^{14}C -ロイシン, ^{14}C -アラニン, ^{14}C -グルタミン酸, ^{14}C -セリンおよび ^{14}C -ヒスチジンがグリシンの添加によってどのような同化阻害を受けるかを調べたところ(Fig. 4-10), 2mgC/lの非放射性グリシンの添加によって ^{14}C -ヒスチジンを除く各アミノ酸は72% (^{14}C -アラニン) から97% (^{14}C -グルタミン酸および ^{14}C -セリン)の同化阻害がみられ, 2000mgC/lのグリシンを添加した条件では ^{14}C -ロイシン, ^{14}C -アラニン, ^{14}C -グルタミン酸および ^{14}C -セリンの4種のアミノ酸はほぼ100%の同化阻害を受けた。

一方、 ^{14}C -ヒスチジンは 2,000mgC/l のグリシン存在下であっても 15% の同化阻害しか示さず、最もグリシン添加の影響を受けにくかった。

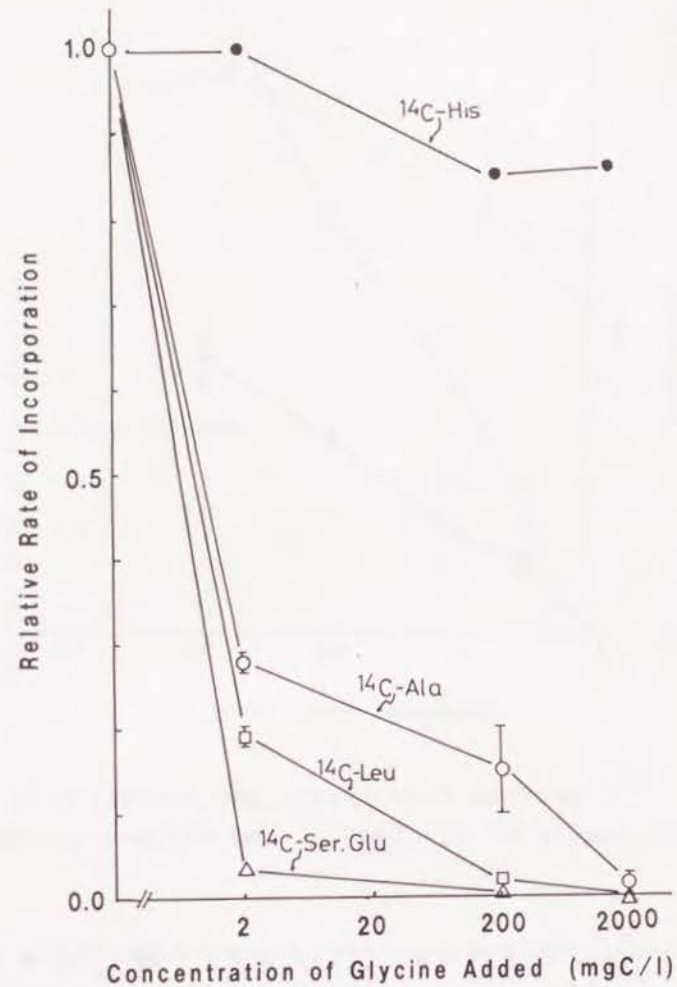


Fig. 4-10 Relative rates of ^{14}C -histidine(His), ^{14}C -alanine(Ala), ^{14}C -leucine(Leu), ^{14}C -serine(Ser) and ^{14}C -glutamate(Glu) incorporation by O-CELL (KE10) at various concentration of glycine added. The values were related to the incorporation rates without glycine.

次に、非放射性グリシンおよびそのジペプチドであるグリシルグリシン存在下での ^{14}C -アミノ酸混液の同化速度を比較した (Fig. 4-11)。 ^{14}C -アミノ酸混液の同化は、グリシルグリシンでは 2mgC/l で 30% の、2000 mgC/l で 60% の阻害活性があらわれたが、グリシンの添加に比べてその同化阻害効果は小さかった。

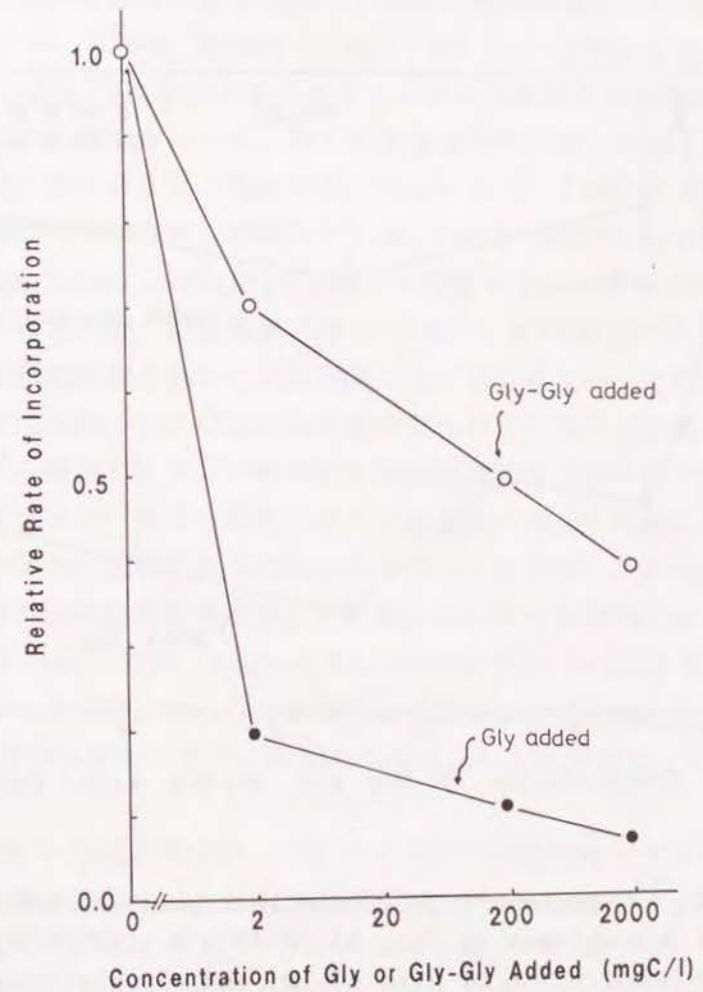


Fig. 4-11 Relative rates of ^{14}C -protein hydrolysate incorporation by O-CELL (KE10) at various concentration of glycine (●) and glycylglycine (○) added. The values were related to the incorporation rates without glycine.

さらに、外洋海域の細菌群集について行った同様の実験の結果をFig. 4-12に示した。 ^{14}C -アミノ酸混液の同化活性は、 $0.5\mu\text{M}$ (0.012mgC/l) のグリシンの添加によって、添加しなかった時の42%に低下したのに対し、グリシルグリシンの添加では $0.5\mu\text{M}$ で同化阻害効果はほとんどみられず、 $5\mu\text{M}$ でもほぼ100%の同化活性を保持していた。

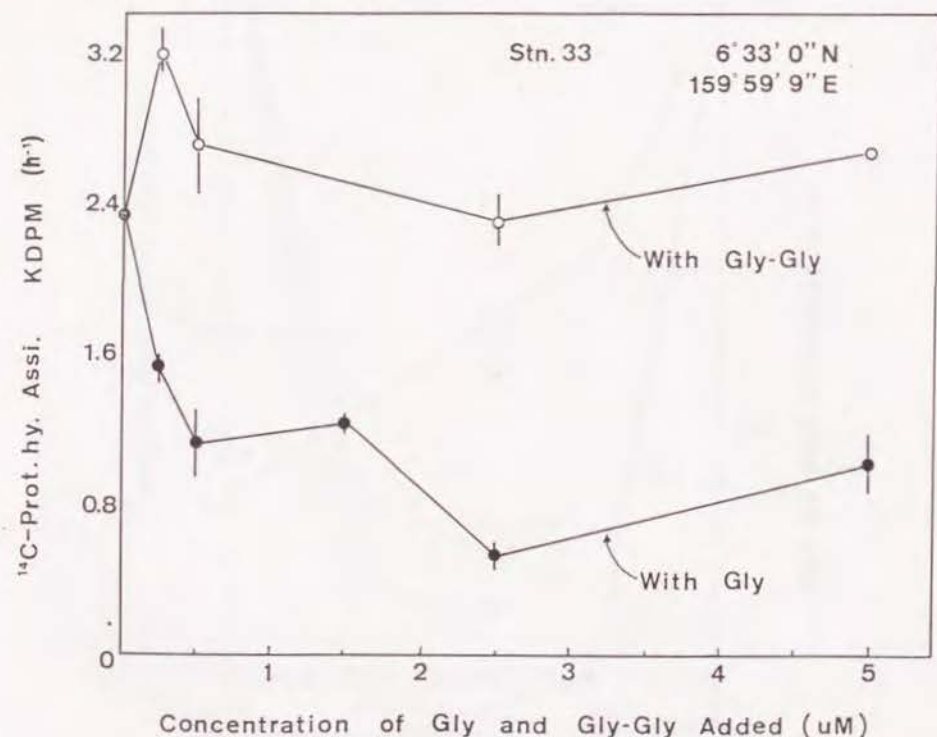


Fig. 4-12 ^{14}C -protein hydrolysate incorporation rate of bacterial assemblages at Stn. 33 ($6^{\circ}33'0''\text{N}$, $159^{\circ}59'9''\text{E}$) with various concentration of glycine (●) and glycylglycine (○).

考 察

「基質親和性が高く基質特異性が低い取り込み系の獲得」が低栄養細菌の低栄養環境への適応機構の一つとして重要であるとする研究者は多く (Hirsh et al. 1979, Poindexter 1981), 実際に基質に対する親和性の高い取り込み系は海洋細菌分離株や外洋の細菌群集から確認されている (Akagi et al. 1980a, Nissen et al. 1984.)。通性低栄養細菌 KE10株の場合も 0-CELLで親和性の高いロイシン取り込み系の存在が明らかになっている (III-5 参照)。一方、多くの基質を同時に取り込むことができる特異性の低い取り込み系に関しては、Akagi et al. (1980a) が海洋性低栄養細菌 486株でその存在を報告している。Tam & Pate (1985) は低栄養細菌である *Asteccacaulis biprosthecum* から分離された付属柄 (細胞壁と細胞膜に囲まれた突起物、能動輸送を行う, Proter & Pate 1975) が18種ものアミノ酸を同時に取り込むことが可能な取り込み系を持っていることを報告した。同時に彼らはこのような基質特異性が低い取り込み系では、その取り込み系に関与するアミノ酸の間で拮抗阻害的な干渉作用が引き起こされる可能性があり、ある種類のアミノ酸濃度が増加した際には他のアミノ酸の取り込みが阻害される危険性があることを示唆した。同様のアミノ酸相互の取り込み拮抗阻害に関しては他にもいくつか報告されている (Kihara & Snell 1952, Johnson & Vishniac 1970, Ferber & Ely 1982)。Ferber & Ely (1982) はいくつかのアミノ酸による *Caulobacter crescentus* の増殖阻害効果が、アミノ酸相互の取り込み拮抗阻害によることを示唆した。

KE-10株 0-CELLの場合も、 ^{14}C -グルコースの同化はグリシンによってほとんど阻害されなかったにもかかわらず、 ^{14}C -ヒスチジンをのぞく4種のアミノ酸 (^{14}C -ロイシン, ^{14}C -グルタミン酸, ^{14}C -セリン, ^{14}C -アラニン) および ^{14}C -アミノ酸混液の同化はグリシンによって強く阻害されたことから、アミノ酸相互の拮抗的な取り込み・同化阻害関係があることが示され、これが高濃度グリシン培地における増殖阻害の機構に関与している可能性が示唆された。一方、グリシルグリシンはグリシンと比較してア

ミノ酸の同化に対する阻害効果はあまりみられなかった。アミノ酸が2~3個結合したオリゴペプチドが、そのペプチドを構成しているアミノ酸とは異なる系で取り込まれるという報告は多く (Payne 1978, De Felice et al. 1973, Hulen & Le Goffic, 1987), 0-CELLの場合もグリシルグリシンの取り込み系をグリシンのそれとは別に持っており、グリシルグリシンは他のアミノ酸の同化を拮抗的に阻害しなかったのではないかとと思われる。

以上の結果は、KE10株 0-CELLも低栄養環境への適応機構として親和性が高く、特異性の低い取り込み系を持っており、高濃度のグリシンが他のアミノ酸の取り込み・同化を拮抗的に阻害することによって高濃度のグリシン培地での増殖阻害が引き起こされる可能性を示唆するものである。

III-1では現場環境に存在する通性低栄養細菌も培地の基質の種類によっては偏性低栄養細菌として検出される可能性を示唆した。特にグリシン、アスパラギン酸、グリコール酸などの単一基質の添加が、たとえ低い濃度 (2mgC/l) であっても、海洋環境の細菌の増殖には阻害的に働くことも明らかになった。実際に外洋海域の細菌群集においても、グリシンが他のアミノ酸の同化を阻害するかどうか調べたところ、グリシルグリシンは¹⁴C-アミノ酸混液の同化を阻害しないにもかかわらずグリシンは 0.5 μM (0.012mgC/l) の濃度の添加で¹⁴C-アミノ酸混液の同化を約 60%阻害した。このことは自然環境中の細菌群集も、低栄養環境への適応の結果として特異性の低いアミノ酸取り込み系を獲得し、その結果、単一アミノ酸培地では一種類のアミノ酸が高い濃度で供給されたことによって他のアミノ酸の同化が拮抗的に阻害され、増殖阻害が生じることを示唆している。偏性低栄養細菌が高濃度ペプトン培地で増殖できない理由も、あるいはペプトン中のあるアミノ酸が他のアミノ酸の取り込み・同化を阻害することによるかも知れない。

IV-4 概要

(1) いくつかのペプトン、アミノ酸、糖や有機酸を単一基質として高・低両濃度の液体培地を調製し、現場の細菌計数を行ったところ、ST10⁻培

地の基質であるトリプティケースペプトンが低栄養細菌の増殖に適していることがわかった。また、単一有機基質培地を用いた MPN法では、全低栄養細菌数および通性低栄養細菌数が低く、また ST10⁻培地では通性低栄養細菌とされる細菌でも時には単一有機基質の培地では高濃度培地での増殖能がみられない偏性低栄養細菌の特質を示すことが明らかになった。

(2) 通性低栄養細菌 KE10株は低濃度培地で繰り返し培養した 0-CELLでは、グリシン、アスパラギン酸、ヒスチジンやシステインの高濃度培地では増殖阻害をうけるが、グリシンのジペプチドであるグリシルグリシンでは増殖を阻害されなかった。

(3) グリシンは KE10株 0-CELLによる他のアミノ酸の同化を強く阻害したのに対し、グリシルグリシンはそれほど強く阻害しなかった。同様の結果は外洋海域の細菌群集でもみられた。このことから (2) でみられた高濃度グリシンによる 0-CELLの増殖阻害や、(1) でみられた単一アミノ酸培地での低栄養細菌の増殖阻害が、アミノ酸相互の拮抗的な取り込み・同化阻害によって引き起こされるのではないかと推定した。

第V章 総括

外洋低栄養海域では低栄養細菌、とりわけ偏性低栄養細菌、が優占しており、このような細菌は低栄養環境に適応した結果、富栄養海域の細菌群集とは異なる生理的特性を持っていると思われる。本研究では、外洋低栄養海域の細菌群集と単離した偏性低栄養細菌および通性低栄養細菌株について、高分子合成や基質利用などの面から生理的な特性を調べ、富栄養海域の細菌群集や高濃度有機物培地で増殖している細菌のそれと比較し、外洋環境での低栄養細菌の生態や低栄養環境への適応機構について考察した。

得られた結果をまとめると以下の通りである。

(1) DOC量が低く偏性低栄養細菌が優占している外洋低栄養海域と、DOC量が高く通性低栄養細菌が優占しているサンゴ礁域において、 ^3H -チミンと ^3H -ロイシンのTCA不溶画分への取り込み速度から、細菌群集のDNAおよびタンパク質合成速度を測定した。その結果、外洋低栄養海域の細菌群集に比べてサンゴ礁域の細菌群集の方がDNA合成活性が高く、DOC量とDNA合成活性の間には正の相関がみられた。しかし、サンゴ礁域の細菌群集ではタンパク質合成活性とDNA合成活性の間に同調性がみられたが、外洋低栄養海域の細菌群集では両者の間に明瞭な同調性がみられず、DNA合成活性が低い海水であってもタンパク質合成活性が比較的高く保たれている傾向があった。このような低栄養海域の細菌群集はDNA合成活性が低いにも関わらず、低濃度の ^3H -ロイシンの取り込み活性は高く、取り込まれた ^3H -ロイシンの約50%がタンパク質画分へ速やかに同化されずに細胞内アミノ酸プールとして存在していたことから、低栄養海域の細菌群集が低栄養環境への適応として「限られたエネルギーを分裂（DNA合成）よりも、基質取り込み系などの細胞活性の維持に優先的に利用するため、潜在的にDNA合成活性よりもタンパク質合成活性が高く保たれている」と推定した。

(2) 高低両濃度有機物培地で増殖可能な通性低栄養細菌 KE10株は人工海水中での飢餓に長期間（140日間）生残し、有機物の供給に対応してそれ

を速やかに利用することができた。この KE10株から高濃度有機物培地で増殖している細菌細胞 E-CELL、低濃度有機物培地で低栄養増殖し、低栄養環境に適応している細菌細胞 O-CELL、E-CELLを2週間飢餓状態においた細菌細胞 S-CELLの3種の細菌細胞を調製し、DNA合成活性およびタンパク質合成活性を調べたところ、O-CELLとS-CELLはDNA合成活性がE-CELLの1/8程度と低かったが、タンパク質合成活性はO-CELLではE-CELLと同等かそれ以上の活性を持っていた。このようなO-CELLの特徴は、(1)で述べた低栄養細菌の適応機構を支持するものであった。いずれも低栄養環境に適応した細菌細胞であると思われるS-CELLとO-CELLの間には基質利用能などに差がみられ、S-CELLはアミノ酸とグルコースをどちらも利用するのに対して、O-CELLではアミノ酸の利用活性はS-CELLよりも高いがグルコースはほとんど利用せず、基質利用の際の特異性が高いという特徴が見いだされた。このような特徴は外洋低栄養海域の細菌群集にもみられることから、O-CELLの方がS-CELLより低栄養海域の細菌の特徴を再現していると考えられる。

KE10株はE-CELLに相当する高濃度有機物培地での増殖時には低親和性（ K_m 値： $1.1 \times 10^{-6}\text{M}$ ）と高親和性（ K_m 値： $2.7 \times 10^{-8}\text{M}$ ）の2つのロイシン取り込み系を持っているが、O-CELLとS-CELLでは低親和性の取り込み系が消失し、高親和性の取り込み系のみが保持されていた。O-CELLの高親和性の取り込み系はE-CELLやS-CELLのそれと比べて V_{\max} 値が高く、その結果 $1\mu\text{M}$ 以下の低濃度のロイシン存在下ではO-CELLが最も効果的な取り込み活性を示した。このことから、KE10株は低栄養環境下では、必要のない低親和性の取り込み系を消失させ、高親和性の取り込み系の効率を高くして低濃度の基質を有効に利用できるように適応していると推定された。また、そのような適応機構にペリプラズム空間タンパク質（おそらく結合タンパク質）が関与している可能性が示唆された。

若狭湾から単離した偏性低栄養細菌11菌株は、いずれも有機物濃度が 200mgC/l 以下の低濃度有機物培地では増殖するものの、ZoBell 2216E培地と同等の有機物濃度（ $2,000\text{mgC/l}$ ）の高濃度有機物培地では増殖することができなかった。これら偏性低栄養細菌のうちのKI89C株のDNAとタン

パク質の合成活性は、それぞれ 0.17×10^{-22} mol/cell/minと 6.97×10^{-22} mol/minであった。外洋海域でタンパク質の合成を行っている全ての従属栄養細菌が K189C株と同じ活性を持っていると仮定したならば、熱帯外洋海域の調査結果では、タンパク質合成活性のある細菌数は $0.36 \sim 1.3 \times 10^5$ cells/mlとなる。この値はその時の全細菌数の 9~20%となり、Douglas et al. (1989) が報告している外洋海域で有機基質（グルタミン酸）を利用している細菌数とはほぼ一致した。この結果は、外洋海域の細菌群集のタンパク質の合成活性が偏性低栄養細菌の単離菌株によって忠実に再現され得ることを意味する。

(3) ST10⁻¹培地の基質であるトリプティケースペプトンを単一のアミノ酸、糖や有機酸に置き替えて調製した培地を用い、低栄養海域において低栄養細菌の計数を行ったところ、ST10⁻¹培地に比べて単一基質培地では計数値が一桁以上低く、また、見かけ上偏性低栄養細菌と判定される細菌群が優勢となるが、これらの多くは ST10⁻¹培地では通性低栄養細菌になる一群の細菌であることがわかった。一方、純粋培養株である KE10株も低濃度有機物培地で繰り返し培養した O-CELLでは、グリシン、アスパラギン酸、ヒスチジンやシステインを単一基質としたそれぞれの高濃度培地では増殖阻害をうけた。しかし、グリシンのジペプチドであるグリシルグリシンでは増殖阻害を受けなかったことから、「高濃度のグリシンによる増殖阻害は、取り込み段階でのアミノ酸相互の拮抗阻害によって引き起こされるのではないか」という仮説をたて、実際にグリシルグリシンに比べて、グリシンが他のアミノ酸の取り込み・同化活性を強く阻害することを確認した。グリシンによる他のアミノ酸の取り込み阻害・同化阻害という現象は外洋海域の細菌群集でもみられることから偏性低栄養細菌が高濃度有機物培地で増殖できない理由が、培地中のアミノ酸相互の拮抗的な取り込み・同化阻害によるのではないかと推定した。

Summary

In pelagic waters oligotrophic bacteria, especially obligate oligotrophs, were predominated, and it is expected that these bacteria may have unique physiological properties to adapt to low nutrient environments, different from those of bacteria in eutrophic coastal waters. In this paper, in order to make clear such physiological and ecological significances of oligotrophs in oligotrophic pelagic water, adaptation mechanisms of oligotrophs in pelagic waters were studied.

The results obtained are summarized below:

(1) In vivo DNA and protein synthesis rates of bacterial assemblages in oligotrophic pelagic waters where obligate oligotrophs were predominated, and in eutrophic coral reef waters where facultative oligotrophs were predominated, were estimated by measuring incorporation rates of ³H-thymidine and ³H-leucine into TCA insoluble fraction. The bacterial assemblages in coral reef waters had higher DNA synthesis activities than those in pelagic waters, and there was a positive correlation between DNA synthesis rates and DOC (dissolved

organic carbon) amounts. In the coral reef waters, protein synthesis rates of bacterial assemblages were positively correlated to DNA synthesis rates. On the other hand, in oligotrophic pelagic waters there were no such correlation between protein and DNA syntheses, because protein synthesis activities were kept at relatively high levels although DNA synthesis rates were extremely low. Such bacterial assemblages in oligotrophic pelagic waters had high ability of ^3H -leucine uptake at a low concentration, and about 50% of ^3H -leucine taken up into cells was not quickly incorporated into protein fraction, and remained in amino acids pool of bacterial cells. These results suggest that bacterial assemblages in oligotrophic waters mainly have high uptake activity of substrates and utilize substrates as energy sources to achieve substrate uptake and protein synthesis rather than DNA synthesis and reproduction.

(2) A facultative oligotroph KE10 which can grow in both high (2gC/l) and low (0.2mgC/l) nutrient media survived for long term starvation (140 days) in artificial sea water(NSS), and immediately responded to

suddenly nutrient supply.

E-CELL (adaptively grown in a high nutrient medium), O-CELL (adaptively grown in a low nutrient medium) and S-CELL (starved for 2 weeks in NSS) were prepared from KE10, and their activities of DNA and protein syntheses were investigated. DNA synthesis activities of S-CELL and O-CELL were 1/8 of that of E-CELL, but protein synthesis activity of O-CELL was higher than that of E-CELL. These properties of O-CELL supported the adaptation mechanism of oligotrophic bacteria mentioned in (1). O-CELL and obligate oligotroph KI89C took up amino acids mixture with high velocity but not glucose, although S-CELL utilized both amino acids mixture and glucose. In view of the fact that bacterial assemblages in pelagic waters showed high uptake activity to amino acids mixture but not to glucose, it is assumed that O-CELL or oligotrophs, but not S-CELL are the living form of bacteria in pelagic waters, .

E-CELL prepared from KE10 had two uptake systems of leucine, which affinities were low (Km value: $1.1 \times 10^{-6}\text{M}$) and high (Km value: 2.7×10^{-8}), but O-CELL and

S-CELL lost the low affinity system and had only the high affinity system. The high affinity uptake system of O-CELL had higher Vmax value than those of E-CELL and S-CELL. These result suggested that KE10 grown in a low nutrient medium adapted to take up substrates at a low concentration effectively, with the high affinity uptake system. Periplasmic proteins, perhaps binding proteins, might regulate these adaptation mechanism of substrates uptake.

All eleven isolates of obligate oligotrophs grew in a low nutrient medium (< 200mgC/l), but didn't grow in high nutrient medium (2000mgC/l) as such ZoBell 2216E medium. Incorporation rates of ³H-thymidine and ³H-leucine into TCA insoluble fraction (for estimation of DNA and protein synthesis activities) of an obligate oligotroph (KI89C), grown in a low nutrient medium (2mgC/l) were 0.17×10^{-22} and 6.97×10^{-22} moll/cell/min, respectively. On the assumption that all living bacteria in pelagic waters would have the same activity of protein synthesis as KI89C, the number of bacteria synthesizing protein would be $0.36-1.3 \times 10^5$ cells/ml, calculated from the in situ incorporation rates of ³H-

leucine in pelagic water. This number will correspond with 9-20% of total bacterial number measured from direct counting method. This percentage was the same as that of bacterial assemblage which assimilated glutamate in pelagic water (Douglas et al. 1989). These result suggests that DNA and protein syntheses activities of individual bacteria in pelagic waters derived from obligate oligotrophs.

(3) By using low nutrient liquid media which individually contained various amino acids, glucose and glycolate as a single substrate in place of trypticase peptone (ST10⁻ⁿ medium), most probable numbers (MPN) of oligotrophic bacteria were measured in pelagic waters. Numbers of oligotroph with such low concentration single substrate media (2mgC/l) were generally one order lower than that with ST10⁻³ medium. A part of facultative oligotrophs which grew in ST10⁻¹ medium could not grow in high concentration single substrate media (200mgC/l). KE10 adaptively grown in a low nutrient medium (O-CELL) could not grow in several single substrate (glycine, aspartate, histidine or cystein) media in a high concentration. Addition of glycine in

a high concentration to such single substrate medium showed inhibitory effect on incorporation of other amino acids by O-CELL, but glycylglycine (dipeptide of glycine) did not have such inhibitory effect. O-CELL grew in a medium with high concentration of glycylglycine. From these result, it is assumed that inhibition of other amino acids incorporation by addition of glycine in a high concentration induced growth inhibition of O-CELL in a high concentration glycine medium. The inhibitory effect of glycine was also observed in bacterial assemblages in pelagic waters at a low concentration. It is presumed that growth limitation of obligate oligotrophs by a high nutrient medium might be resulted from those competitive inhibition of substrate uptake.

謝 辞

本研究を終わるにあたり、終始ご懇篤なるご指導ならびご鞭撻を賜りました、京都大学農学部教授 石田祐三郎先生に深く感謝の意を表します。

また、常に熱心な御指導をしていただきました高知大学助教授 深見公雄先生に心からお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力をいただきました、東京大学海洋研究所教授 清水潮先生、三重大学教授 菅原庸先生、京都大学助教授 内田有恆先生、京都大学助手 左子芳彦先生、近畿大学助手 江口充先生、南西海区水産研究所研究室長 今井一郎博士、舞鶴水産実験所技官 上野正博博士、京都大学水産微生物学研究室の諸先輩の方々、ならびに小原賢氏、坂見知子氏、中野伸一氏、前田俊道氏、栗林秀生氏、蝶野英人氏に深く感謝いたします。

最後に野外調査の際にお世話になった研究船白鳳丸（東京大学海洋研究所所属）、練習船勢水丸（三重大学所属）の船長、士官、船員の皆様および緑洋丸（舞鶴水産実験所所属）の船長に心からお礼申し上げます。

LITERATURE CITED

- Akagi, Y., Taga, N., Simidu, U. (1977) *Can. J. Microbiol.* 23: 981-987.
- Akagi, Y., Taga, N. (1980a) *Can. J. Microbiol.* 26:454-459.
- Akagi, Y., Simidu, U., Taga, N. (1980b) *Can. J. Microbiol.* 26:800-806.
- Albertson, N. H., Jones, G. W., Kjelleberg, S. (1987) *J.Gen.Microbiol.* 133:2225-2231.
- Albertson, N. H., Nystrom, T., Kjelleberg, S. (1990a) *FEMS Microbiol. Lett.* 70:205-210.
- Albertson, N. H., Nystrom, T., Kjelleberg, S. (1990b) *Appl. Environ. Microbiol.* 56:218-223.
- Amy, P. S., Pauling, C., Morita, R. Y. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1041-1048.
- Amy, P. S., Morita, R. Y. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1109-1115.
- Anraku, Y. (1982) p. 87-110. In "Transport and bioenergetics in biomembranes", Sato, R. (ed.), Plenum press, New york.
- Azam, F., Hodson, E. (1981) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6:213-222.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L.-A. Thingstad, F. (1983) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Azam, F., Cho, B. (1987) p.261-281 In "Ecology of microbial communities" 41th symposium of the society for general microbiology, Fletcher, M., Gray, T. R. G., Jones, J. G. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Banoub, M., Williams, P. J. leB. (1972) *Deep-Sea Res.* 19:433-443.
- Banse, K. (1974) *Limnol. Oceanogr.* 19:695-699.
- Bratbak, G. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1488-1493.
- Carlucci, A.F., Shimp, S.L. (1974) p. 363-367. In "Effect of the ocean on microbial activities", Colwell, R. R., Morita, R. Y. (eds.), University Park Press, Baltimore.
- Carlucci, A.F., Shimp, S.L., Craven, D. B. (1986) *FEMS Microbiol. Ecol.* 38:1-10.
- Carlucci, A.F., Shimp, S.L., Craven, D. B. (1987) *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:211-220.
- Chin-Leo, G., Kirchman, D.L. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1934-1939.
- Cho, B.C., Azam, F. (1988a) *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 31: 153-162.
- Cho, B. C., Azam, F. (1988b) *Nature* 332:441-443.
- Cole, J.J., Findlay, S., Pace, M.L. (1988) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43:1-10.
- Davis, C. L., Robb, F. T. (1985) *Appl. Environ.*

Microbiol. 50: 551-563.

Davis, C. L. (1989) Appl. Environ. Microbiol. 55:1267-1272.

De Felice, M., Guardiola, J., Lamberti, A., Iaccarino, M. (1973) J. Bacteriol. 116:751-756.

Douglas, D.J., Novitsky, J.A., Fournier, R.O. (1987) Mar. Ecol. Prog. Ser. 36:91-99.

Eguchi, M., Ishida, Y. (1990) FEMS Microbiol. Ecol. 73:23-30.

Faquin, W. C., Oliver, J. D. (1984) J. Gen. Microbiol. 130:1331-1335.

Fenchel, T., Harrison, P. (1976) p. 285-299. In "The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes", Anderson, J. M. (ed.), Blackwell Scientific, Oxford.

Fenchel, T. (1982) Mar. Ecol. Prog. Ser. 9:35-42.

Fenchel, T. (1984) p.301-315. In "Flows and energy and materials in marine ecosystem", Fasham, M. J. R. (ed.), Plenum Press, New York.

Ferber, D. M., Ely, B. (1982) Mol. Gen. Genet. 187:446-452.

Ferguson, R. L., Sunda, W. (1984) Limnol. Oceanogr. 29:258-274.

Fonden, R. (1968) Vatten. 2:161-166.

Fuhrman, J.A., Azam, F. (1980) Appl. Environ.

Microbiol. 39:1085-1095.

Fuhrman, J.A., Azam, F. (1982) Mar. Biol. 66:109-120.

Fukami, K., Simidu, U., Taga, N. (1981) J. exp. mar. Biol. Ecol. 55:171-184.

Fukami, K., Simidu, U., Taga, N. (1985) Mar. Ecol. Prog. Ser. 21:1-5.

Fukami, K., Ohara, S., Ishida, Y., Mariazzi, A. A. (1988) Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 54:1659-1663.

Fukami, K., Ohara, S., Ishida, Y. (1990) Arch. Hydrobiol. Beih. 34:43-47.

Geesey, G. G., Morita, R. Y. (1979) Appl. Environ. Microbiol. 38:1092-1097.

Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., Field, K. G. (1990) Nature 345:60-63.

Gocke, K., Dawson, R., Liebezeit, G. (1981) Mar. Biol. 62:209-216.

Griffith, P. C., Douglas, D. J., Wainright, S. C. (1990) Mar. Ecol. Prog. Ser. 59:263-270.

Griffiths, R. P., Baross, J. A., Hanus, F. J., Morita, R. Y. (1974) Zeit. Alleg. Mikrobiol. 14:359-369.

Groat, R. G., Matin, A. (1986) J. Ind. Microbiol. 1:69-73.

Hagström, A., Larsson, U., Horstedt, P., Normark, S. (1979) Appl. Microbiol. 37:805-812.

Hagströme, A., Ammerman, J. W., Henrichs, S., Azam, F.
(1984) Mar. Ecol. Prog. Ser. 18:41-48.

Hagström, A., Azam, F., Andeersson, A., Wikner, J.,
Rassoulzadegan, F. (1988) Mar. Ecol. Prog. Ser.
49:171-178.

Harrison, P. G., Mann, K. H. (1975) Limnol. Oceanogr.
20:924-934.

Hellebust, J. A. (1974) p. 838-863. In "Algal
physiology and biochemistry.", Bacterial monographs
vol.10, Stewart, W. D. P. (ed.)

Hirsh, P. (1979) p. 357-372. In "Strategies of
Microbial Life in Extreme Environments", Shilo M.
(ed.), Dahlem Konferenzen Life Science Reserch
Report 13, Verlag Chemie, Weinheim.

Hobbie, J. E., Daley, R., Jasper, S. (1977) Appl.
Environ. Microbiol. 33:1225-1228.

Hodson, R. E., Maccubbin, A. E., Pomeroy, L. R. (1981)
Mar. Biol. 64:43-61.

Höfle, M. G. (1983) Appl. Environ. Ecol. 46: 1045-
1053.

Humphrey, B., Kjelleberg, S., Marshall, K. C. (1983)
Appl. Environ. Microbiol. 45:43-47.

Hülen, C., Goffic, F. L. (1987) FEMS Microbiol. Lett.
40:103-109.

Ishida, Y., Kadota, H. (1974) Bull. Jap. Soc. Sci.
Fish. 41:957-960

Ishida, Y., Kadota, H. (1975) Bull. Jap. Soc. Sci.
Fish. 40:999-1005.

Ishida, Y., Uchida, A., Kadota, H. (1977) Bull. Jap.
Soc. Sci. Fish. 43:885-892.

Ishida, Y., Kadota, H. (1979) Arch. Hydrobiol. Beih.
12:77-85.

Ishida, Y., Shibahara, K., Uchida, H., Kadota, H.
(1980) Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46:1151-1158.

Isida, Y., Kadota, H. (1981) Microbiol. Ecol. 7:123-
130.

Ishida, Y., Imai, I., Miyagaki, T., Kadota, H. (1982)
Microb. Ecol. 8: 23-32.

Ishida, Y., Eguchi, M., Kadota, H. (1986) Mar. Ecol.
Prog. Ser. 30:197-203.

Jouper-Jaan, Å., Dahllöf, B., Kjelleberg, S. (1986)
Appl. Environ. Microbiol. 52:1419-1421.

Jacobsen, T. R., Azam, F. (1984) Bull. Mar. Sci.
35:495-502.

Jeffrey, W.H., Paul, J.H. (1990)
Appl. Environ. Microbiol. 56:1367-1372.

Johnson, C. L., Vishniac, W. (1970) J. Bacteriol.
104:1145-1150.

Johnson, K. M., Burney, C. M., Sieburth, J. M. (1981)
Mar. Biol. 65:49-60.

Johnstone, B. H., Jones, R. D. (1989) Microb. Ecol.

- 18: 73-77.
- Jones, K. L., Rhodes-Roberts, M. E. (1981) *J. Appl. Bacteriol.* 50:247-258.
- Jordan, M. J., Likens, G. E. (1980) *Limnol. Oceanogr.* 25:719-732.
- Jorgensen, N. O. G. (1986) p. 5-19. In "Carbon dynamics in eutrophic, temperate lakes", Riemann, B., Sondergaard, M. (eds.), Elsevier Science Publishers.
- Karl, D. M., Knauer, G. A., Martin, J. H. (1988) *Nature* 332:438-441.
- Kihara, H., Snell, E. E. (1952) *J. Biol. Chem.* 197:791-800.
- Kirchman, D., K'nees, E., Hodson, R. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 599-607.
- Kirchman, D., Murray, R.E., Hodson R.E. (1986a) p. 631-637. In: *Proc. Fourth International Symposium of Microbial Ecology*, Megysar F., Ganter M. (eds), Sbvne Society for microbiology, Ljubljana, Yugoslavia,
- Kirchman, D. L., Hodson, R. E. (1986b) *Limnol. Oceanogr.* 31:339-350.
- Kirchman, D. L., Newell, S. Y., Hodson, R. E. (1986c) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 32:47-59.
- Kirchman, D. L., Soto, Y., Wambeck, F.V., Bianchi M. (1989) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 53:267-275.

- Kjelleberg, S., Humphrey, B. A., Marshall, K. C. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1166-1172.
- Kjelleberg, S., Hermansson, M. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 48:497-503.
- Kjelleberg, S., Hermansson, M., Mårdèn, P., Jones, G. W. (1987) *Ann. Rev. Microbiol.* 41:25-49.
- Koch, A. L. (1971) *Adv. Microbial. Physiol.* 6: 147-217.
- Koch, A. L. (1979) p. 261-279. In "Strategies of Microbial Life in Extreme Environments" Shilo M. (ed.), Dahlem Konferenzen Life Science Reserch Report 13, Verlag Chemie, Weinhein.
- Kurath, G., Morita, R. Y. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1206-1211.
- Lee, C., Bada, J. L. (1975) *Earth Planet Sci. Lett.* 26:61-68.
- Mallory, L. M., Austin, B., Colwell, R. R. (1977) *Can. J. Microbiol.* 23:733-750.
- Malmcrona-Friberg, K., Tunlid, A., Mårdèn, P., Kjelleberg, S., Odham, G. (1986) *Arch. Microbiol.* 144:340-345.
- Matin, A. (1979) p. 484. In "Strategies of Microbial Life in Extreme Environments", Shilo M. (ed.), Dahlem Konferenzen Life Science Reserch Report 13, Verlag Chemie, Weinhein.
- Mårdèn, P., Tunlid, A., Malmcrona-Friberg, K., Odham, G., Kjelleberg, S. (1985) *Arch. Microbiol.* 142:326-

- Mårdèn, P., Nyström, T., Kjelleberg, S. (1987) FEMS Microb. Ecol. 45:233-241.
- Marshall, K. C. (1979) p.281-290. In "Strategies of Microbial Life in Extreme Environments", Shilo M. (ed.), Dahlem Konferenzen Life Science Reserch Report 13, Verlag Chemie, Weinheim.
- Martin, P., MacLeod, R. A. (1984) Appl. Environ. Microbiol. 47:1017-1022.
- McManus, G. B., Fuhrman, J. A. (1988) Hydrobiologia 159:51-62.
- Menzel, D. W., Ryther, J. H. (1979) P. 31-54. In "Organic matter in natural waters", Hood, D. W. (ed.), Institute of Marine Science Occasional Publication No.1. University of Alaska, College.
- Morita, R. Y. (1984) p.83-100. In "Heterotrophic activity in the sea", Hobbie, J. E., Williams, P. J. L. (eds.), Plenum Press, New York.
- Morita, R.Y. (1985) p. 111 -130. In: "Bacteria in their natural environments" Fletcher, M., Floodgate, G. D. (eds.), Academic Press.
- Morita, R. Y. (1986) p. 242-248. In Proc. fourth international symposium of microbial ecology. Sbvne Society for Microbiology, Megysar, F., Gantar, M. (eds.), Ljubljana, Yugoslavia.
- Moyer, C. L., Morita, R. Y. (1989a) Appl. Environ. Microbiol. 55:1122-1127.

- Moyer, C. L., Morita, R. Y. (1989b) Appl. Environ. Microbiol. 55:2710-2716.
- Nissen, H., Nissen, P., Azam, F. (1984) Mar. Ecol. Prog. Ser. 16:155-160.
- Nisbet, T. M., Payne, J. W. (1982) J. Gen. Microbiol. 128:1357-1364.
- Novitsky, J. A., Morita, R. Y. (1976) Appl. Environ. Microbiol. 32:617-622.
- Novitsky, J. A., Morita, R. Y. (1977) Appl. Environ. Microbiol. 33:635-641.
- Novitsky, J.A. (1983) Appl.Environ.Microbiol. 45:1753-1760.
- Nyström, T., Mårdèn, P., Kjelleberg, S. (1986) FEMS Microbiol. Ecol. 38:285-292.
- Nyström, T., Mårdèn, P., Kjelleberg, S. (1987) FEMS Microbiol. Ecol. 45:143-153.
- Nyströme, T., Albertson, N.,Kjelleberg, S. (1988) J. Gen. Microbiol. 134:1645-1651.
- Nyströme, T., Albertson, N.,Kjelleberg, S. (1989) p. 80-84. In "Recent Advances in Microbial Ecology" (Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R., Uchida, A. eds.), Japan Scientific Societies Press, Japan.
- Oppenheimer, C. H., ZoBell, C. E. (1952) J. Mar. Res. 11: 10-18.
- Overbeck, J. (1979) Ergeb. Limnol. 12:38-47.

Payne, J. W. (1978) p.257-298. In "Microorganisms and nitrogen sources.", Rosen, B. P. (ed.), John Wiley and Sons, inc., New York.

Payne, J. W., Bell, G. (1979) *J. Bacteriol.* 137:447-455.

Poindexter, J. S. (1981) p. 63-89. In *Advances in Microbial ecology*, vol. 5, Alexander, M. (ed.), Plenum Publishing Corporation, New York.

Porter, K.G., Feig, Y.S. (1980) *Limnol. Oceanogr.* 25:943-948.

Proter, J. S., Pate, J. L. (1975) *J. Bacteriol.* 122:976-986.

Ramsay, A.J. (1974) *J. Gen. Microbiol.* 80:363-373.

Riemann, B., Sondergaard, M. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 47:632-638.

Rosenberg, R., Dahl, E., Edler, L., Fyrberg, L., Graneli, E., Graneri, W., Hagstrom, A., Lindahl, O., Matos, M. O., Pettersson, K., Sahlsten, E., Tiselius, P., Turk, V., Wikner, J. (1990) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61: 215-231.

Roszak, D. B., Corwell, R. R. (1987) *Microbiol. Rev.* 51:365-379.

SCOR/UNESCO (1966) *Determination of photosynthetic pigments in seawater*, p.69 *Methodology 1*, Unesco Publications Center, New York.

Servais, P., Billen, G., Hascoet, M. C. (1987) *Wat. Res.* 21:445-450.

Servais, P., Anzil, A., Ventresque, C. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2732-2734.

Sieburth, J. M. (1984) p. 405-444. In "Heterotrophic activity in the sea" Hobbie, J. E., Williams, P. J. L. (eds.), Plenum Press, New York.

Simidu, U., Kogure, K., Fukami, K., Imada, C. (1986) *Mem. Natl. Inst. Pollar., Spec. Issue* 40:405-412.

Simon, M., Azam, F. (1989) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51: 201-213.

Stevenson, L. H. (1978) *Microb. Ecol.* 4:121-133.

Tam, E., Pate, J. L. (1985) *J. Gen. Microbiol.* 131:2687-2699.

Tabor, P.S., Neihof, R.A. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 44:945-953.

Taylor, J. (1962) *J. Appl. Bacteriol.* 25: 54-61.

Vaccaro, R. F., Jannasch, H. W. (1967) *Limnol. Oceanogr.* 12:540-542.

Van Es, F. B., Meyer-Reil, L.-A. (1982) p.111-170. In: *Advanced in Microbial Ecology*, vol.6, Marshall, K. C. (ed.), Plenum Press, New York.

Wangersky, P. J. (1984) P. 263-288. In "Heterotrophic activity in the sea", Hobbie, J. E., Williams, P. J. L. (eds.), Plenum Press, New York.

Ward, D. M., Roland, W., Bateson, M. M. (1990) *Nature* 345: 63-65.

Wiebe, W. J., Pomeroy, L. R. (1972) Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 29:325-352.

Williams, P. J. LEB. (1973) Limnol. Oceanogr. 18:159-165.

Wright, R. T. (1974) Limnol. Oceanogr. 20:626-633.

Wright, R. T., Burnison, B. K. (1979) p.140-155. In "Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology", Colwell, J. W. (ed.), ASTMSTP695, Am. Soc. for Testing Materials, Philadelphia.

Yanagita, T., Ichikawa, T., Tsuji, T., Kamata, Y., Ito, K., Sasaki, M. (1978) J. Gen. Appl. Microbiol. 24:59-88.

Zimmerman, R., Iturriaga, R., Becker-Birck, J. (1978) Appl. Environ. Microbiol. 36:926-935.

今井一郎 (1990) 海洋における従属栄養性微小鞭毛虫の細菌捕食者としての役割. 月刊 海洋, 22 : 60-66.

江口充 (1990) 外洋海域における低栄養細菌の存在とその生存戦略. 京都大学農学部 博士論文.