

学位審査報告書

（ふりがな） 氏名	たかす ひろゆき 高 巢 裕 之
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学位記番号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 25 年 月 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科 生物科学 専攻
（学位論文題目） Growth and mortality of bacterial subgroups with different types of respiratory quinone in Lake Biwa （琵琶湖における異なる呼吸鎖キノンを保持する細菌亜集団の増殖と死滅）	
論文調査委員	（主査） 中野伸一 教授 奥田昇 准教授 足田努 教授

京都大学	博士 (理学)	氏名	高巢裕之
論文題目	Growth and mortality of bacterial subgroups with different types of respiratory quinone in Lake Biwa (琵琶湖における異なる呼吸鎖キノンを保持する細菌亜集団の増殖と死滅)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>湖沼や海洋の沖合生態系の生物地球化学的物質循環過程において、浮遊細菌群集は重要な役割を果たしている。光学的手法の発展や分子生物学的手法の導入により、細菌群集は系統、呼吸活性、有機物の利用特性といった点で様々な形質を持った亜集団から構成されていることが明らかとなった。しかし、方法的制限により、亜集団の物質循環過程における役割の違いは明確に分かっておらず、細菌群集の変化と物質動態との関連は明らかではない。本研究は、大型淡水湖の琵琶湖において、細菌群集構造と微生物ループにおける炭素循環との関係を解明する目的で行った。本研究では、細菌のエネルギー代謝様式に違いをもたらすと考えられる呼吸鎖キノン(以下、RQ)の種類によって細菌群集を亜集団に分割し、亜集団の炭素バイオマス量、増殖・死滅速度を求めることで、亜集団ごとに炭素循環への寄与を評価した。</p> <p>第二章では、浮遊細菌の炭素バイオマス量評価手法としての、RQ分析の有用性を評価するため、湖水中のRQ濃度と細菌バイオマスとの関係を調査した。RQ濃度と、従来法である画像解析をもとに推定した細菌バイオマス量との間に高い正の相関関係が見られたことから、RQ濃度が浮遊細菌バイオマス量を反映する指標となることが示唆された。細菌群集の細胞RQ含量あたりの炭素含量は $0.67 \text{ mg C nmol RQ}^{-1}$ であった。この値を換算係数として用い、現場のRQ濃度から浮遊細菌の炭素バイオマス量を求めた結果、表水層において $0.008 \sim 0.054 \text{ mg C L}^{-1}$、深水層において $0.010 \sim 0.024 \text{ mg C L}^{-1}$ と推定された。また、細菌群集構造の変化が湖水の環境条件の変化の指標と成り得る可能性を示唆した。これらの結果より、RQ分析は、浮遊細菌群集の炭素バイオマス量と群集構造を同時にかつ高精度で評価できる点において有用な手法であると結論付けた。</p> <p>第三章では、細菌の増殖速度および原生生物による捕食速度とウイルス溶菌速度を同時に見積もることのできる改良希釈培養法とRQ分析を組み合わせることで、亜集団の増殖および死滅速度を見積もることに成功した。実験の結果、細菌群集の増殖速度は、原生生物による捕食およびウイルス溶菌によって死滅する速度とほぼ釣り合うことが示された。自然細菌群集の死滅要因としては、様々な環境要因が考えられるが、琵琶湖の細菌群集は物理化学的な環境要因の変化によって死滅する前に、捕食と溶菌によって速やかに死滅していることが推察された。琵琶湖の細菌：鞭毛虫現存量比は低く、鞭毛虫は餌制限状態であると考えられる。また、鞭毛虫1匹あたりに消費される細菌バイオマス量は、ほぼ一定の値であったことから、餌制限状態である鞭毛虫は、細菌密度に関わらず、可能場限りの細菌捕食を行っていることが考えられた。一方で、ウイルスによる死滅速度は、細菌の増殖速度依存的に増減していた。現場で優占する亜集団(ユビキノン(UQ)-8および10保持亜集団)は、高い増殖速度を示し、その後速やかに死滅することから、微生物ループにおける細菌群集を介する炭素流の大部分(約6割)を駆動していることが明らかとなった。一般に、淡水湖沼や河川では <i>Betaproteobacteria</i> に属する細菌が優占するとされているが、この細菌群の多くはUQ-8を保持していると報告されている。このことから、UQ-8保持亜集団は、淡水環境の微生物ループの炭素循環過程において重要な役割を担っていると考えられる。本研究は、RQ種によって細菌群集を亜集団に分割することで、優占細菌亜集団と微生物ループにおける炭素循環との関係を明らかにした。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

湖沼や海洋の浮遊性細菌は、単細胞で生息しており、細胞サイズは $1\mu\text{m}$ 以下と、極めて小さい。このため、浮遊性細菌の細胞サイズの測定や形態的特徴の検討は困難を極める。申請者は、細菌のエネルギー代謝様式に違いをもたらすと考えられる呼吸鎖キノン(以下、RQ)を定量することにより、細菌バイオマスを見積もる方法を開発した。この方法により、細菌バイオマスは、従来よりも比較的安定して良い結果が得られるようになった。

細菌は、保持する RQ のタイプによって亜集団に分類することができる。RQ は、エネルギー代謝様式の違いをある程度反映するので、RQ による細菌群集の分類は各亜集団の生理学的特性も反映する。自然界の細菌群集の分類には、従来、16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析が用いられてきたが、遺伝子配列に基づいた分類群はさまざまな生理学的特性の細菌を包含している。申請者は、琵琶湖北湖沖帯の浮遊細菌群集について RQ による細菌バイオマスの定量と細菌群集の亜集団への分類を行った。その結果、琵琶湖北湖の沖帯では、表水層・深水層共に一年を通じてユビキノン 8 (UQ8) を持つ細菌が優占した。従来、世界各地の湖沼では β プロテオバクテリアが優占することが知られていたが、この細菌亜集団には UQ8 を持つ細菌が多く含まれている。申請者の結果は、従来 of 遺伝子解析による細菌亜集団への分類が、ある程度生理学的な特性を反映していることを示唆する重要な発見である。

申請者は、RQ 定量による細菌バイオマス測定方法を、細菌の増殖と死滅の測定に適用した。細菌の生物学的要因による死滅には、原生生物による摂食とウイルスによる感染が考えられる。細菌の増殖と死滅の測定には、希釈法が用いられる。しかし、従来 of 希釈法では、ウイルスを考慮していないため、細菌の増殖速度はウイルス感染による死滅速度を減じた見かけ上の値でしかなかった。申請者は、湖水サンプル中からウイルスを除去した濾過水を希釈法に適用することによりこの問題を克服し(改良希釈法)、改良希釈法と RQ 定量の併用により琵琶湖北湖沖帯の細菌亜集団ごとの増殖・死滅速度を評価した。UQ8、および UQ8 とともに多く見られるユビキノン 10 (UQ10) を有する優占細菌亜集団の増殖速度は、他の細菌亜集団と比べて高いことが分かった。UQ8、UQ10 共に、ウイルス感染による死滅速度は細菌の増殖速度に依存した。一方、細菌亜集団によらず、琵琶湖の原生生物にとって細菌バイオマスは全体としてもなお低く、原生生物は餌制限に陥っているとの結果が得られた。これらの結果は、先行研究が細菌群集全体を対象としていたのに対し、申請者の研究は特定の細菌亜集団についての結果であるため、先行研究に比べて解像度の高い貴重な情報である。

申請者は、琵琶湖北湖沖帯で優占的であった UQ8 と UQ10 を合わせると、増殖した細菌バイオマスの 60% が摂食と感染により死滅するとの結果を得た。すなわち、少なくとも琵琶湖北湖沖帯においては、微生物を介した食物連鎖における物質循環の大部分は優占細菌の生産と死滅によって駆動していると言える。

以上のように、申請者の研究は、自然水域の浮遊細菌のバイオマスの定量だけでなく、細菌群集構造解析も同時に行える画期的な手法を開発した。さらに、優占する細菌亜集団のみで水圏の微生物食物連鎖の物質循環における駆動力となることを初めて示した。これらは、水圏生態系の物質循環と微生物の群集動態との関係を解明する、重要な成果と言える。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 25 年 3 月 11 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。