

多摩川流域の生態系を育む河床藻類を支える
窒素固定細菌の多様性と役割

2017年

春田 伸
首都大学東京・理工学研究科

【研究成果の要旨】

河床礫に付着する微生物被膜（バイオフィーム）について、環境 DNA 解析法を用いて、窒素固定細菌の多様性および分布を調べた。さらに、河床礫バイオフィームから窒素固定細菌を分離培養して、真核藻類の生育に与える影響を評価した。

調査した試料において、河床礫バイオフィームを構成する細菌叢に大きな違いはなく、地域や季節に寄らず、安定していると考えられた。細菌叢のなかでは、酸素非発生型の光合成能を有する一群の細菌が多く観察された。窒素固定細菌の分布についてみると、下流域ではシアノバクテリアが主たる窒素固定者と考えられた。一方、上流域には、シアノバクテリアだけでなく、好気従属栄養細菌および嫌気性細菌による窒素固定もあると考えられた。分離培養した窒素固定細菌には、真核藻類に対して生育促進作用を示すものが確認できた。以上から、河床礫には、多様な窒素固定細菌が分布していることが分かり、河床礫バイオフィームの一次生産に影響を及ぼすと考えられた。

【研究の背景・目的】

窒素固定は、大気中の窒素ガスを、多くの生物が利用可能なアンモニアに変換する反応で、原核生物（細菌、アーキア）の一部にしか見られず、これまで窒素固定する真核生物は知られていない。窒素固定細菌は、土壌をはじめとして、広く水圏（海洋、湖沼）にも分布しており、生態系の窒素循環に重要な役割を担っていると考えられる。また、古くから植物に共生する根粒菌や茎粒菌による植物生長促進作用が広く研究されている。さらに、近年では、昆虫をはじめとする多様な動物の内在菌として、その機能性に関する研究が盛んになっており、ヒト腸内細菌叢に占める役割も調べられるようになってきている。多様な生物との共生、また、温泉や海底などの極限環境からの発見から、窒素固定細菌に関する研究は、進化の観点からも注目が集まっている。しかし、河川環境における窒素固定細菌の分布や多様性に関する研究は限られており、さらに窒素固定細菌による藻類の生育促進作用はまだほとんどわかっていない。

河川の生態系は、河床の藻類を中心とする微生物群によって支えられている。陸上生態系における森、湾岸生態系における藻場、と同様に、河床の微生物群は河川生態系を育む主要な一次生産の場である。河床藻類の分布や重要性は古くから調べられており、多摩川における過去の調査・試験研究課題「多摩川の川床に分布する付着藻類の生態と意義に関する研究」（渡辺博士・都立大）でも、藻類の有用性が報告されている。

本研究では、多摩川を対象に、河床礫における窒素固定細菌の分布と多様性を明らかにするとともに、共存する藻類に与える影響を理解することを目的とした。

【材料と方法】

河床礫バイオフィルム試料の採取

河床より石を採取し、石表面のバイオフィルム（ひとつの石から約 10 cm 四方分）を、滅菌した歯ブラシを用いて掻きとった。滅菌水に懸濁し、氷冷して研究室まで持ち帰り、その後の解析に使用した。採取地は、最終頁の流域図に示した。

窒素固定活性の測定

アセチレン還元法により、窒素固定活性を評価した。試料をガラスバイアル瓶に入れた後、その気層にアセチレンガスを入れた。適当な条件で反応後、バイアル瓶の気層に含まれるエチレン量をガスクロマトグラフィーによって定量した。

河床礫バイオフィルムの 16S rRNA 遺伝子を対象にした細菌叢解析

採取した河床礫バイオフィルムから常法に従い、全 DNA を抽出した。この DNA を鋳型として、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を対象に PCR 増幅し (Caporaso et al. 2011)、その増幅産物の塩基配列を次世代 DNA シーケンサー MiSeq (イルミナ社、米国) で解析して、ペアエンドリードを得た。得た配列は、sickle ツールで品質を整えた。その後、Qiime ver. 1.9.0.を用いて、キメラ配列を除去し、97%以上一致する配列を一つの OTU (Operational taxonomy unit) としてまとめた。各 OTU について、green genes 提供のデータベースをもとに系統推定した。以上の解析は、ファスマック社 (厚木、神奈川) で行った。

河床礫バイオフィルムの窒素固定酵素遺伝子の塩基配列多様性解析

河床礫バイオフィルムから抽出した全 DNA を鋳型として、窒素固定を担うタンパク質をコードする遺伝子 *nifH* を PCR 増幅し、その遺伝子塩基配列を上記と同様に MiSeq を用いて解析した。使用したプライマーセットは、以下の通り。

nifH の増幅に用いたプライマーセットとその配列

名称	PCR ステップ	5' - 3'	出典
<i>nifH1</i>	1st PCR	TGYGAYCCNAARGCNGA	1)
<i>nifH2</i>	1st PCR	ADNGCCATCATYTCNCC	1)
<i>nifH3</i>	2nd PCR	ATRTTRTTNGCNGCRTA	2)
<i>nifH4</i>	2nd PCR	TTYTAYGGNAARGGNGG	2)

1); Zehr, J.P., and L.A. McReynolds. 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55:2522-

2); Zani, S., et al. 2000. Appl. Environ. Microbiol. 66:3119-

バイオフィルムから抽出した DNA を鋳型に、*nifH1* & *nifH2* の組合せで PCR (1st PCR) を行ったのち、その増幅産物を鋳型にして、*nifH3* & *nifH4* の組合せで 2nd PCR を行った。

窒素固定細菌の分離・培養

可溶性窒素化合物を含まない培地を用いて、採取したバイオフィルム試料を暗所好気従属栄養条件、25°Cで培養した。同様の条件で継代培養後、寒天平板培地（1% w/v Bactoagar）でコロニー形成を繰り返し、分離株を取得した。培地には下に示す Modified AF6ΔN 培地に、有機物としてリンゴ酸ナトリウム（0.5 g/L）とピルビン酸ナトリウム（0.5 g/L）を添加して使用した。

Modified AF6ΔN medium (1L)

MES buffer	400 mg
Fe-citrate	2.00 μg
citric acid	2.00 μg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.03 g
K ₂ HPO ₄	5.00 mg
KH ₂ PO ₄	0.01 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.01 g
Pyridoxine · HCl (Vitamin B ₆)	0.10 μg
Cyanocobalamine (Vitamin B ₁₂)	0.10 μg
Thiamine · HCl (Vitamin B ₁)	1.00 μg
Biotin (vitamin H)	0.20 μg
Trace metals solution	5.00 mL

Trace metals solution (1L)

Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5.00 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.98 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.11 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	12.5 mg

真核藻類の分離・培養

真核藻類の培養には、上記 Modified AF6ΔN 培地に、窒素源として、NaNO₃（0.14 mg/L）と NH₄NO₃（22.0 μg/L）を添加した培地を使用した。25°C、光照射条件（LED λ=470 nm & 660 nm）で培養し、分離には、寒天平板培地（1% w/v Bactoagar）を使用した。

分離株の分子系統解析









常法に従い、細胞から DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子、または真核藻類の 18S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、その塩基配列を決定した。塩基配列決定には、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) および Applied Biosystems 3130xl capillary sequencer を用いた。得られた配列の近縁配列は、BLAST を用いてデータベース検索した。Clustal W を用いた配列アラインメントおよび系統樹作成には、MEGA または ARB ソフトウェアを利用した。

窒素固定細菌が真核藻類の生育に与える影響の評価


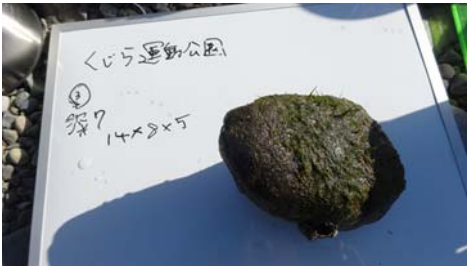


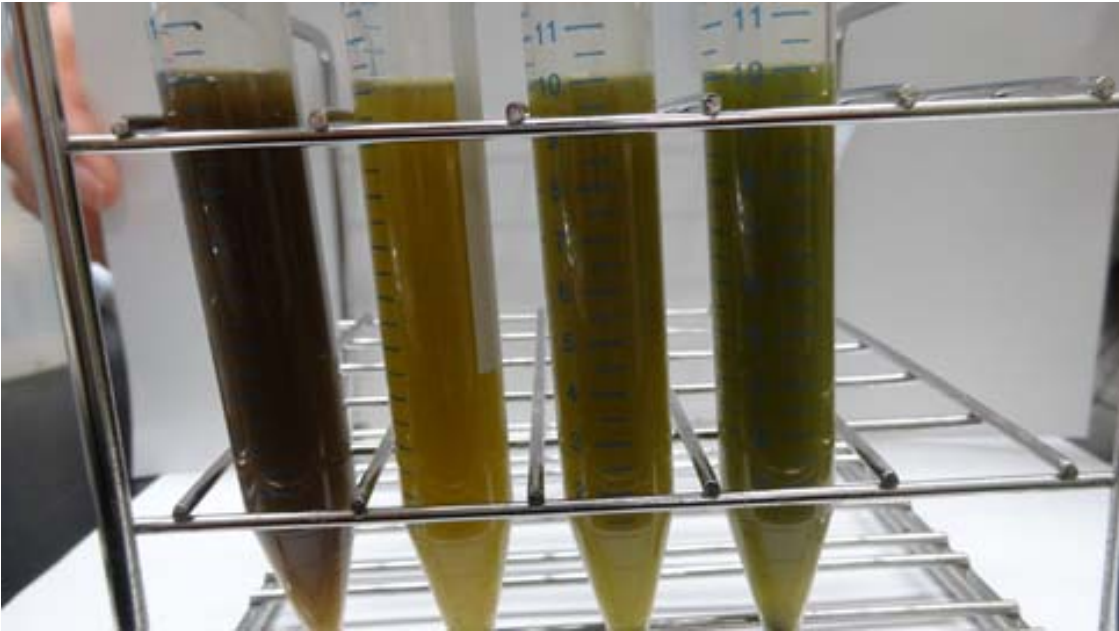
窒素固定細菌および真核藻類を液体培養し、それぞれの培養液 5 μl を混合し、Modified AF6ΔN 寒天培地に滴下した。25°C、光照射条件で培養し、寒天上から藻類細胞を回収して、そのクロロフィル a 量を定量し、藻類の生育を評価した。

【結果・考察】

多摩川の上流域から下流域にかけて、複数の調査地を選択した。主な調査地とその河床礫バイオフィームの様子を以下に示す。

調布橋 (CF)	拝島橋 (HJ)
	
	
羽村堰 (HM)	関戸橋 (SD)
	
	

河床より採取した石とそこから回収したバイオフィルム試料

調布橋 (CF)	拝島橋 (HJ)
	
羽村堰 (HM)	関戸橋 (SD)
	
<p>左から、調布橋、羽村堰、拝島橋、関戸橋の試料（上流から下流に向かう順）</p>	
	

上図に示すように、上流二カ所（調布橋、羽村堰）のバイオフィルムは、年間を通じて、赤茶から褐色であるのに対し、下流の拝島橋、関戸橋の試料では緑色であった。前者は、珪藻類、後者は、緑藻類が優占化していた。

1. 河床礫バイオフィルムの細菌叢

細菌の系統分類指標遺伝子（16S rRNA 遺伝子）を対象に、バイオフィルムに含まれる細菌の塩基配列多様性を解析した。解析に用いた試料は、次の表 1 に示した。

表 1 採取した試料と試料 ID

採取場所 (ID)	流速*	2016 年 6 月	2016 年 11 月	2017 年 2 月
調布橋 (CF)	速い	n.a.	CF_N	CF_F
羽村堰 (HM)	速い	n.a.	HM_N	HM_F
拝島橋 (HJ)	速い	n.a.	n.a.	n.a.
関戸橋 (SD)	速い	SD_Jf	SD_N	SD_F
	遅い	SD_Js	n.a.	n.a.

流速: 速い、約 0.3 m/sec; 遅い、約 0.01 m/sec

n.a., data not available

解析によって取得した配列データの概要を表 2 にまとめた。それぞれに試料について、30,000 以上の配列が取得できた。OTU 数を比較すると、いずれも 2,000 以上で、多様な細菌が存在していることが示された。

表 2 取得した 16S rRNA 遺伝子塩基配列データの概要

試料 ID	試料番号*	総リード (配列) 数	OTU 数
CF_N	1	30,381	2,156
CF_F	1	38,095	2,313
HM_N	1	83,021	6,345
HM_F	1	51,907	3,619
SD_Jf	1	82,083	4,681
SD_Jf	2	72,472	3,572
SD_Jf	3	57,488	3,859
SD_Js	1	76,138	4,903
SD_Js	2	70,142	4,459
SD_Js	3	97,644	4,766
SD_N	1	42,947	3,359
SD_F	1	64,009	4,129

*同一時期・場所であるが、採取した石が異なる場合、1、2、3 と分けた。SD_Js については、以降の解析で SD_Js2 のみを使用した。

次ページからの図1～4および表3には、得られた塩基配列をデータベース検索し系統を推定し、試料ごとに分布を調べた結果を示した。まず、門レベルで見ると、解析したいずれの試料でも、プロテオバクテリア門の細菌が多いことが分かる(図1)。次いで、バクテロイデテス門、シアノバクテリア門がみられ、これらの優占性は、季節や場所に依存しないと考えられた。綱レベルに分けてみると(図2)、プロテオバクテリア門でもアルファサブクラスが多く、同時に、ガンマおよびベータサブクラスが見られるという結果であった。

これらプロテオバクテリア門の各サブクラスについて、さらに目レベルでの構成比をみたのが、図3である。アルファサブクラスでは、光合成細菌も多く含まれる *Rhodobacterales* 目および好気従属栄養性の窒素固定細菌も知られる *Sphingomonadales* 目の比率が多いことが分かった。さらに、根粒菌などの植物と共生し窒素固定産物を供給する細菌が見つかる *Rhizobiales* 目も少なからず検出された。

ベータサブクラスでは、いずれの試料でも *Burkholderiales* 目が優占していた。*Burkholderiales* 目には多様な有機物分解菌が知られており、河川環境における物質循環への寄与も予想される。ガンマサブクラスでは、植物との相互作用について古くから研究されているグループのひとつである *Xanthomonadales* 目が多いという特徴があった。

下位の階層まで見ても、上述したように、試料間の違いは小さく、上流域では珪藻が多く、下流域では緑藻が多いという特徴があったにもかかわらず、河床礫バイオフィルムの細菌叢は、比較的安定していると考えられた。ただし、CF_N や CF_F のように、一部の試料では、水生生物の腸内細菌由来とも想像される細菌種が見つかり、河床礫バイオフィルムの細菌叢は、河川生態系からの影響も受けていると考えられた。

続いて、主要な一次生産者であり、窒素固定能も広く知られるシアノバクテリアについてみる。図1でみたように全細菌に占める割合も高く、珪藻や緑藻とともに河床礫バイオフィルムにおける重要な一次生産者と考えられる。目レベルでの内訳をみると、他のグループの細菌と異なり、試料間で違いが大きいことが分かった(図4)。シアノバクテリアの構成比には、河川水の栄養塩濃度が大きく影響しているのではないだろうか。最上流部の調布橋(CF)では、特に *Oscillatoriales* 目が主要種であり、他には、*Synechococcales* 目や *Pseudoanabaenales* 目、さらには *Chroococcales* 目も検出された。多く検出された配列について、近縁種を検索し、その分布とともに表3にまとめた。分布域が広く存在量も多い OTU7 は、既知種 *Tychonema bourrellyi* と100%の相同性を示した。しかし、その他の多くの OTU は、既知種との相同性が90%前後と低く、このことは、河床礫バイオフィルムには、まだ培養されていない多くの未知種が分布していることを示している。これらの系統進化および河川生態系の役割解明に興味もたれる。

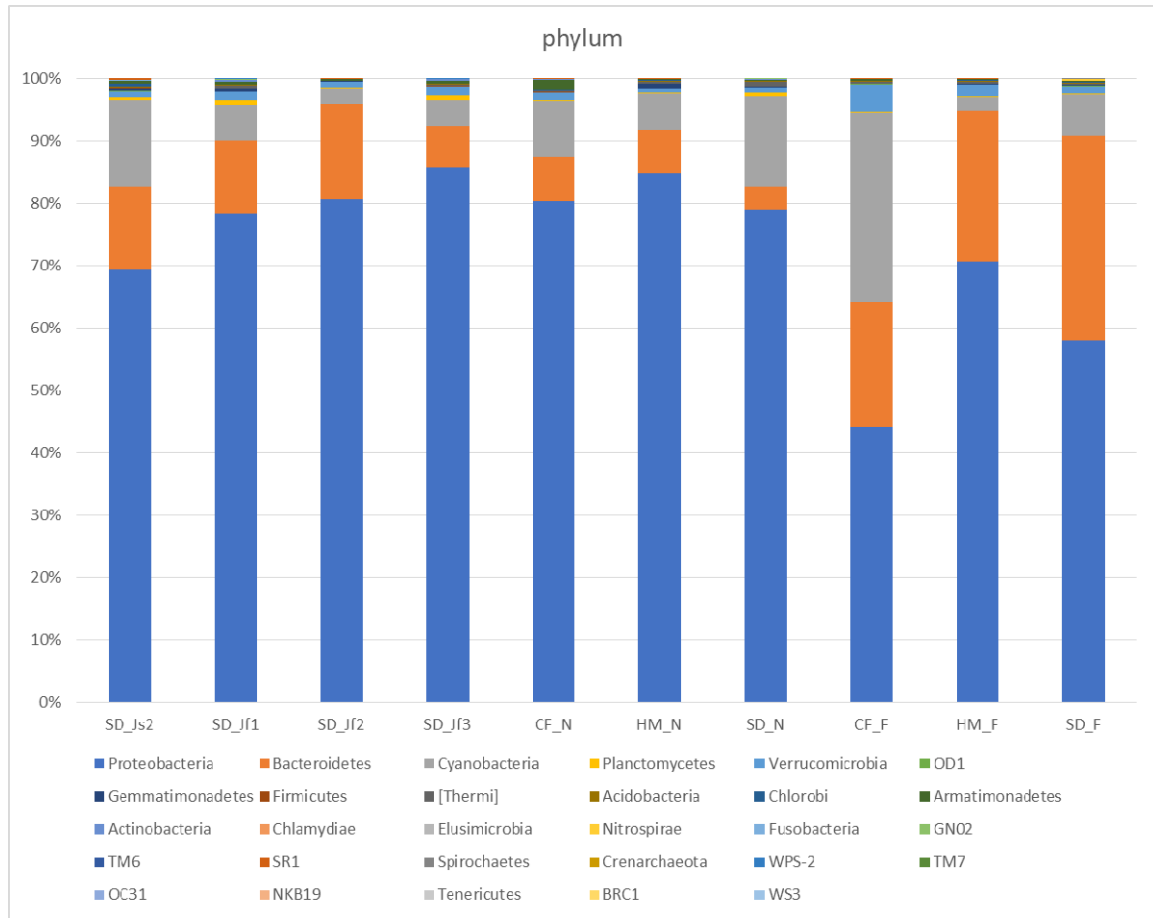


図1 門 (phylum) レベルで分類した河床礫バイオフィルムの細菌叢比較
16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性検索による分類

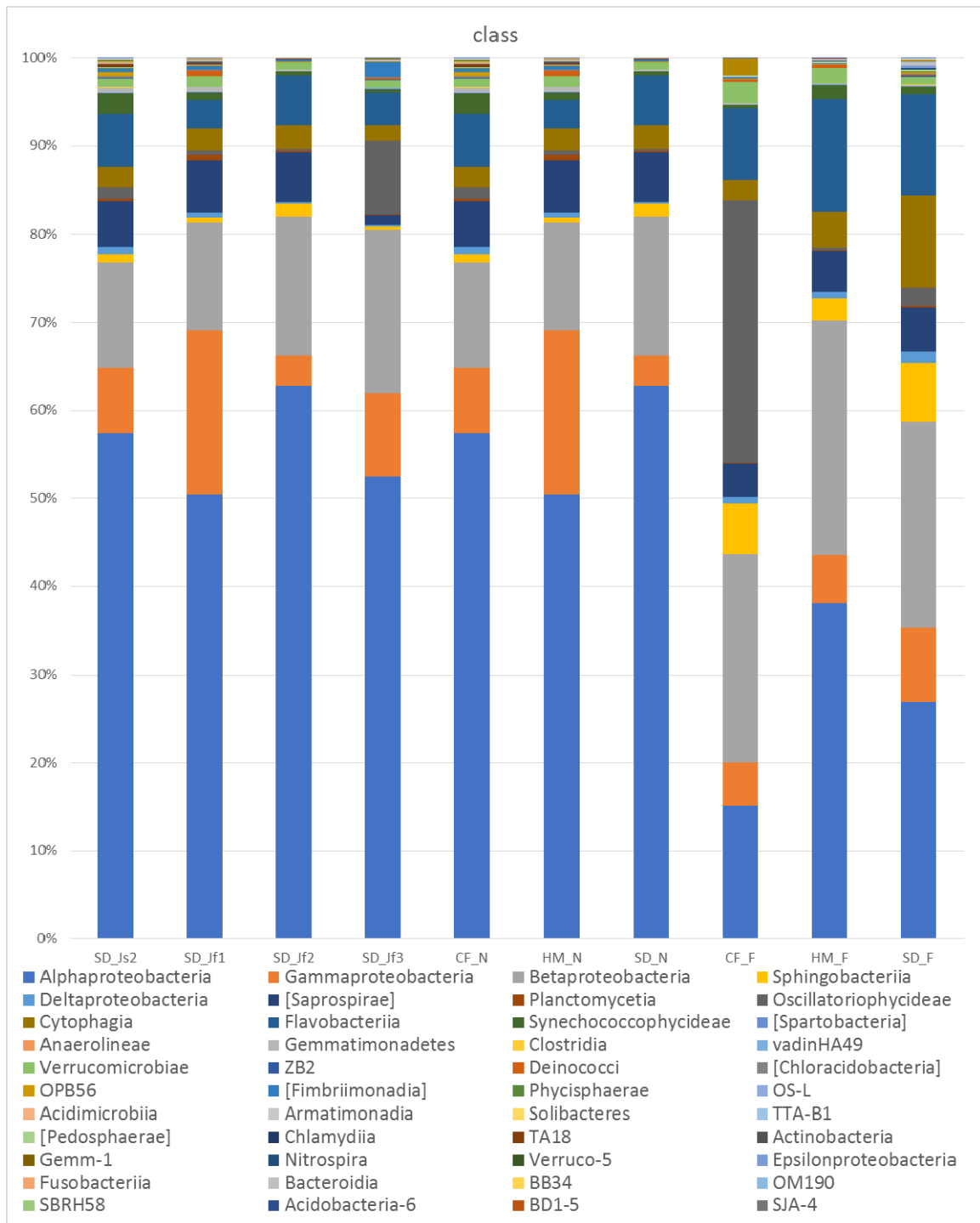


図2 網 (class) レベルで分類した河床礫バイオフィルムの細菌叢比較
16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性検索による分類

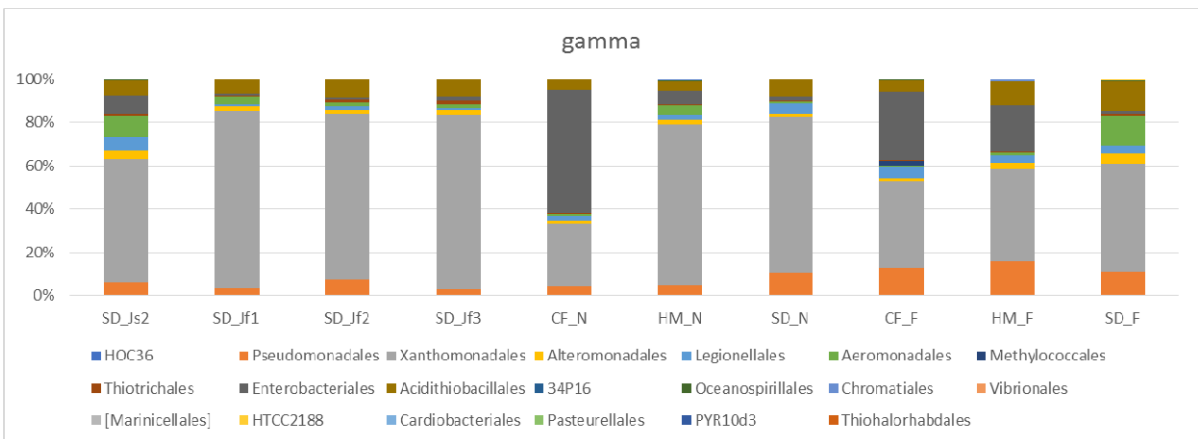
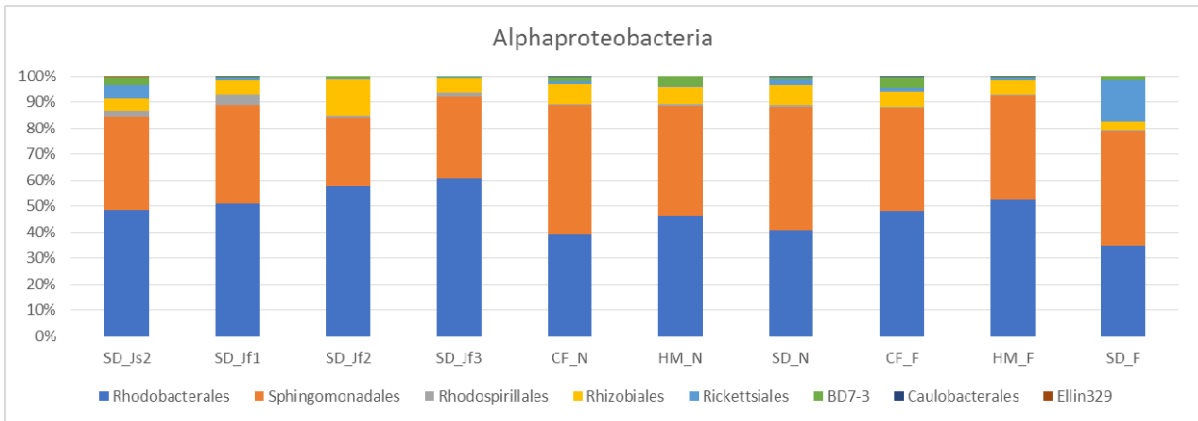
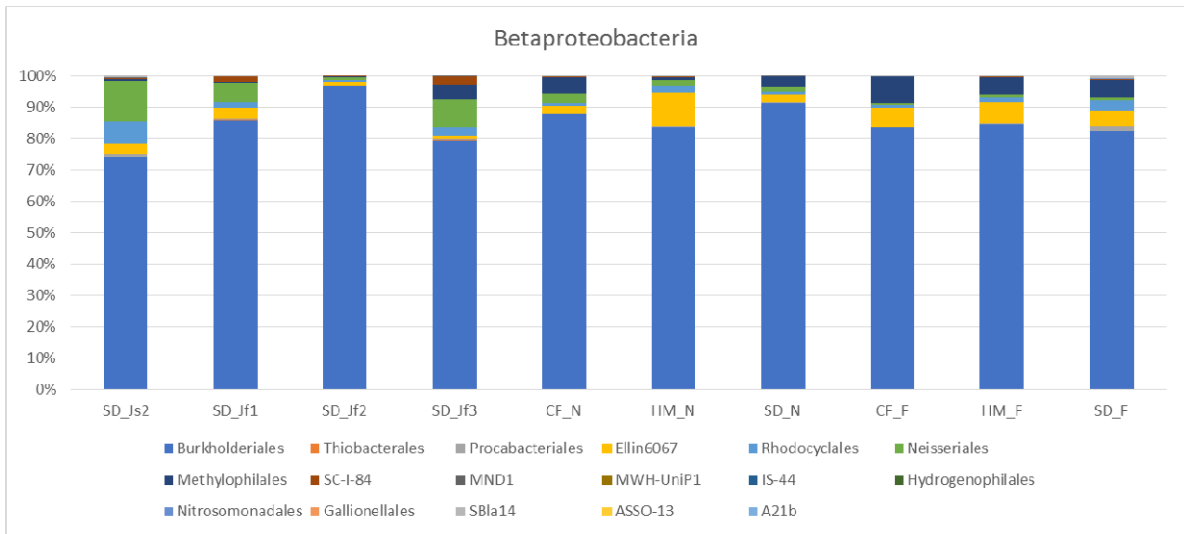


図3 河床礫バイオフィームから検出されたプロテオバクテリア門 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性検索による分類を目レベルで示した。サブクラスごとに別のグラフに示し、上から順に、ベータプロテオバクテリア、アルファプロテオバクテリア、ガンマプロテオバクテリアの構成内訳を示した。

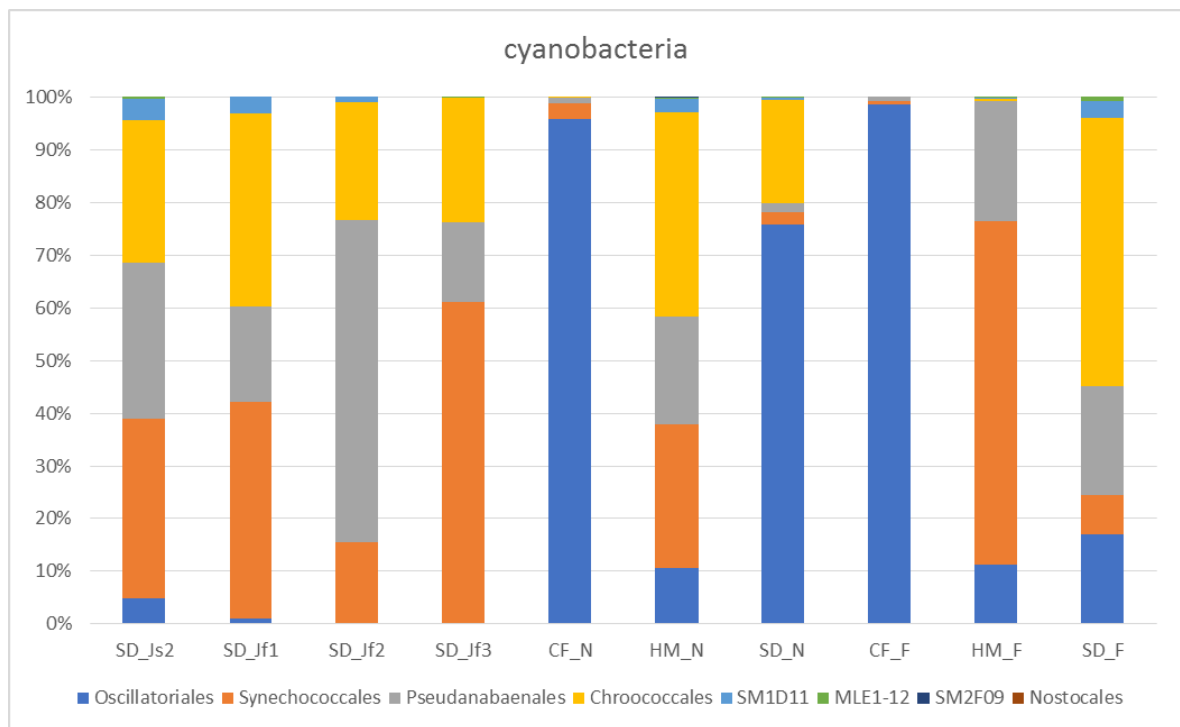


図4 河床礫バイオフィルムから検出されたシアノバクテリア
16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性検索による分類を目レベルで示した。

表 3 検出されたシアノバクテリアの既報種との相同性と分布

OTU	最近縁種	相同性	SD_JF2	CF_N	HM_N	SD_N	CF_F	HM_F	SD_F
1	<i>Kovackia muscicola</i>	90%	+	+	-	-	+	+	+
2	<i>Acaryochloris marina</i>	92%	+	+	++	+	+	-	++
3	<i>Synechococcus elongatus</i>	84%	-	-	+	+	-	-	+
4	<i>Xenococcaceae cyanobacterium</i>	94%	+	+	++	++	+	+	++
5	<i>Trichocoleus desertorum</i>	94%	+	+	+	+	-	+	+
6	<i>Pinocchia polymorpha</i>	90%	-	-	+	+	+	+	+
7	<i>Tychonema bourrellyi</i>	100%	-	+++	++	+++	+++	++	++
8	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	91%	+	+	+	+	+	-	+
9	<i>Chamaesiphon minutus</i>	91%	-	+	-	+	+	++	+
10	<i>Cyanobacterium aponinum</i>	96%	+	-	++	+	-	+	++
11	<i>Chamaesiphon subglobosus</i>	98%	++	+	++	+	+	++	+
12	<i>Xenococcaceae cyanobacterium</i>	94%	+	-	+	+	-	+	+
13	<i>Xenococcaceae cyanobacterium</i>	95%	+	-	+	++	+	-	+
14	<i>Cyanobium gracile</i>	100%	+	-	+	+	-	-	+
15	<i>Xenococcaceae cyanobacterium</i>	94%	+	-	+	+	-	-	+
16	<i>Symplacastrum californicum</i>	95%	-	+	+	-	+	+	-
17	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i>	95%	+	-	+	-	-	-	-
18	<i>Loriellopsis cavernicola</i>	87%	-	+	+	+	+	++	+
19	<i>Tapinothrix clintonii</i>	88%	+	-	+	-	+	+	+
20	<i>Acaryochloris marina</i>	89%	-	-	+	-	+	+	-
21	<i>Pantanalinema rosanaeae</i>	92%	-	-	+	++	-	-	+
22	<i>Tapinothrix clintonii</i>	91%	+	+	+	-	+	+	++
23	<i>Alkalinema pantanalense</i>	90%	-	-	++	+	-	+	+
24	<i>Neosynechococcus sphagnicola</i>	92%	+	+	++	+	+	+	++

+++ , 1.00%以上 ; ++ , 0.10%以上 ; + , 0.00001%以上 ; - , 未検出

2. 河床礫バイオフィルムの窒素固定酵素遺伝子の多様性と分布

窒素固定に関わる酵素遺伝子の一つである *nifH* の塩基配列多様性を解析した (表 4)。

表 4 採取した試料と試料 ID

採取場所 (ID)	流速*	2016 年 6 月	2016 年 11 月	2017 年 2 月
調布橋 (CF)	速い	n.a.	CF_N	CF_F
羽村堰 (HM)	速い	n.a.	HM_N	HM_F
拝島橋 (HJ)	速い	n.a.	HJ_N	HJ_F
関戸橋 (SD)	速い	SD_Jf	SD_N	n.a.
	遅い	SD_Js	n.a.	n.a.

流速: 速い、約 0.3 m/sec; 遅い、約 0.01 m/sec

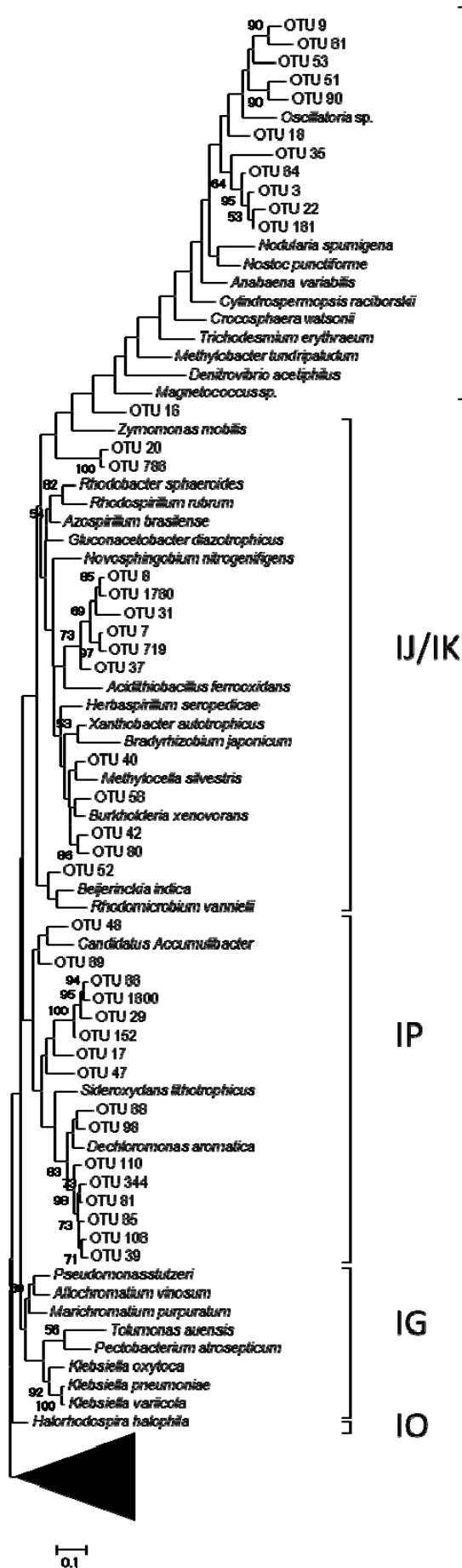
n.a., data not available

解析によって取得した配列データの概要を表 5 にまとめた。それぞれに試料について、約 5,000 から 25,000 の配列が取得できた。OTU 数は、100 から 250 であった。全体の 1%以上を占める OTU を対象に解析した系統樹を図 5、6 に示した。

表 5 取得した *nifH* 塩基配列データの概要

試料 ID	総リード (配列) 数	OTU 数
CF_N	4,795	105
CF_F	14,297	163
HM_N	6,975	124
HM_F	19,793	255
HJ_N	14,201	182
HJ_F	16,310	184
SD_Jf	25,839	214
SD_Js	25,679	263
SD_N	9,088	148

河床礫バイオフィルムから多様な系統にわたる *nifH* 塩基配列が検出された (図 5、6)。図 5 に示す IB はシアノバクテリアを含むグループであり、前述の 16S rRNA 遺伝子による細菌叢解析でも高頻度に検出されたように窒素固定シアノバクテリアが繁茂している様子がうかがえる。その他にも、好気呼吸細菌および嫌気呼吸細菌による窒素固定があることが示唆され、その呼吸様式も多様であると考えられた。さらに既報配列と相同性が低い配列も多数見つかかり、未知新規窒素固定細菌の存在を強く示唆している。



IB

IJ/IK

IP

IG

IO

図5 *nifH* 遺伝子塩基配列の系統樹—その1
 IB, IJ, IK, IP, IG, IO の系統について示し、その他については、▲として、その詳細は次ページに示した。

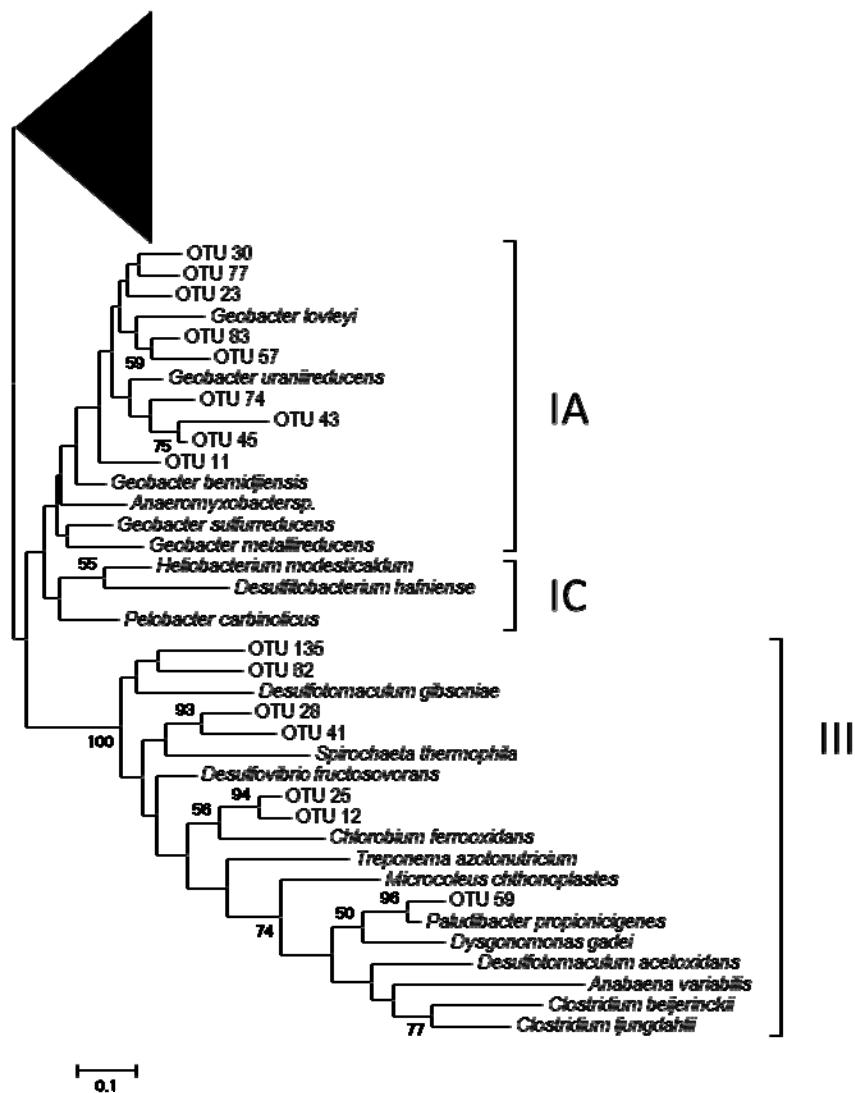


図6 *nifH* 遺伝子塩基配列の系統樹—その2

IA, IC, III の系統について示し、その他については、▲として、その詳細は前ページに示した。

続く図7には、*nifH* 遺伝子塩基配列の分布をまとめた。下流域の HJ、SD の試料では IB グループの配列が多く、窒素固定へのシアノバクテリアの寄与が大きいことを示唆している。一方、CF、HM の上流域では、IJ/IK、IP や IA の配列が見られ、これらは、好気従属栄養細菌や嫌気性細菌由来と考えられる。共存する真核藻類の種類や河川水中の栄養塩濃度などの影響が予想される。ただし、採取時期や流速による違いは小さいようであった。

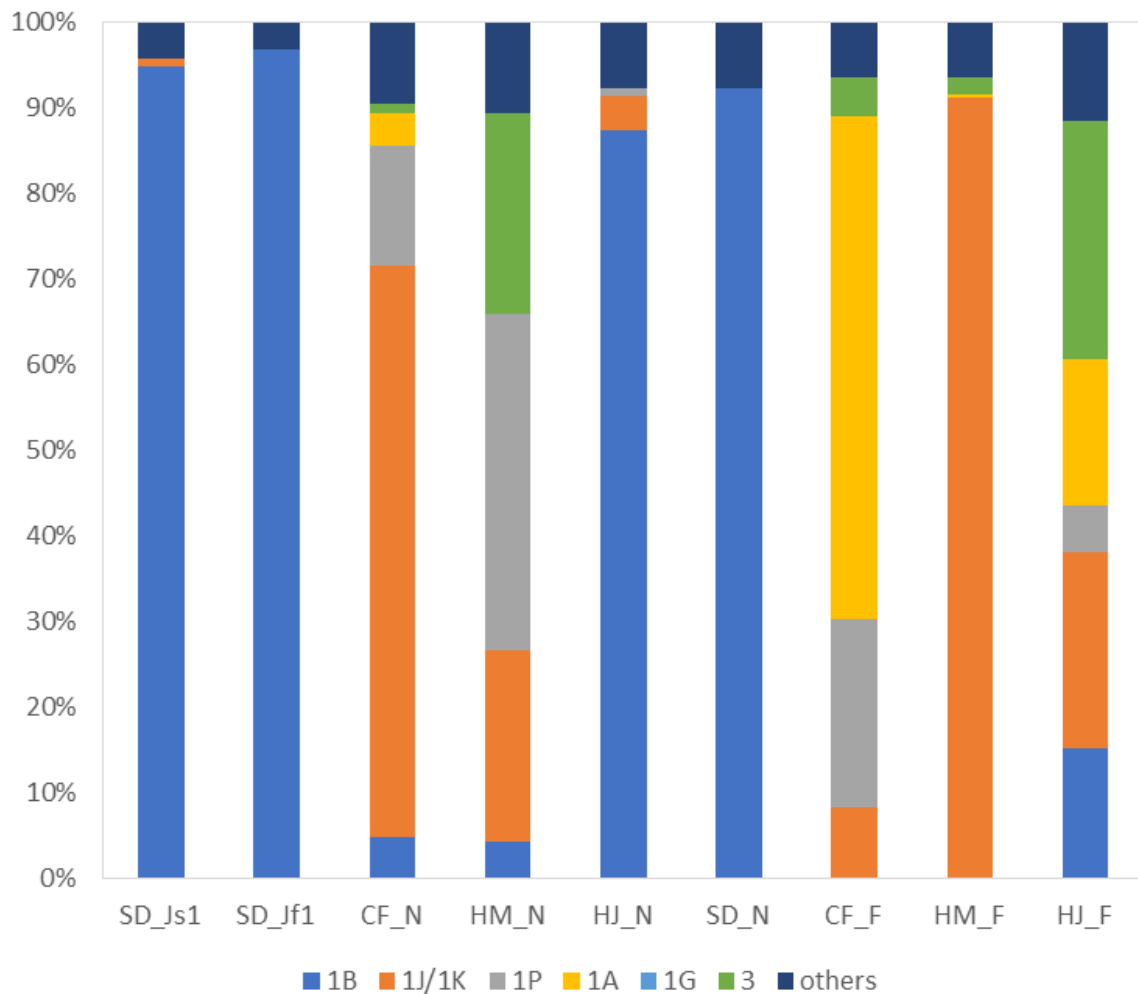


図7 検出された *nifH* 遺伝子塩基配列の試料毎の分布

1B, 1J/1K, 1P, 1A, 1G, 3 は、図5、6の系統樹の IB, IJ/IK, IP, IA, IG, III にそれぞれ対応する。

3. 窒素固定細菌の分離培養

多摩川から採取した河床礫バイオフィームについて、可溶性窒素化合物を含まない培地を用いて、好気従属栄養条件、25℃で培養して、細菌を分離した。また、河床礫バイオフィームから緑藻を培養した際、その緑藻培養系に共存していた細菌も同様に分離した。その結果、13株の細菌が分離できた。16S rRNA 遺伝子にもとづく系統解析の結果、それらは 8 属に分けられると考えられた (表 6)。これらのなかには、*Arcicella* 属細菌など、これまで河川環境から見つかっていなかったものも含まれる。

分離した細菌の、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統を示す分子系統樹を図 8 に示した。系統樹から、TU02 株や TU08 株は新種の可能性が考えられた。さらに、TU01 株や TU03 株は、これまで窒素固定能が知られていなかった分類群からの初めての窒素固定細菌の発見であると考えられる。

表 6 好気従属栄養性分離株の一覧

分離株	属	類縁菌の河川からの発見例
TU01	<i>Arcicella</i> *	なし
TU02	<i>Arthrobacter</i>	あり
TU03	<i>Novosphingobium</i> *	あり
TU04	<i>Sphingomonas</i>	なし
TU05	<i>Herbaspirillum</i>	なし
TU06, TU07, TU08	<i>Pseudomonas</i>	あり
TU09	<i>Raoultella</i>	あり
TU10, TU11, TU12, TU13	<i>Klebsiella</i>	あり

*これまでに窒素固定能の報告がない

これらの情報も踏まえ、多摩川の河床礫バイオフィームの窒素固定活性をアセチレン還元法で評価した。窒素固定酵素は、窒素ガスのアンモニアへの変換だけでなく、アセチレンのエチレンへの変換も触媒することが知られている。酸素の有無、光照射の有無、と条件を分けてエチレンの生成量を測定したところ、酸素あり条件で、光照射の有無にかかわらず、活性を検出することができた。

細菌叢解析では、河床礫バイオフィームでは、シアノバクテリアだけでなく、上記のような好気従属栄養性の窒素固定細菌も、河床礫微生物生態系への窒素供給に重要な役割を担っていると考えられた。

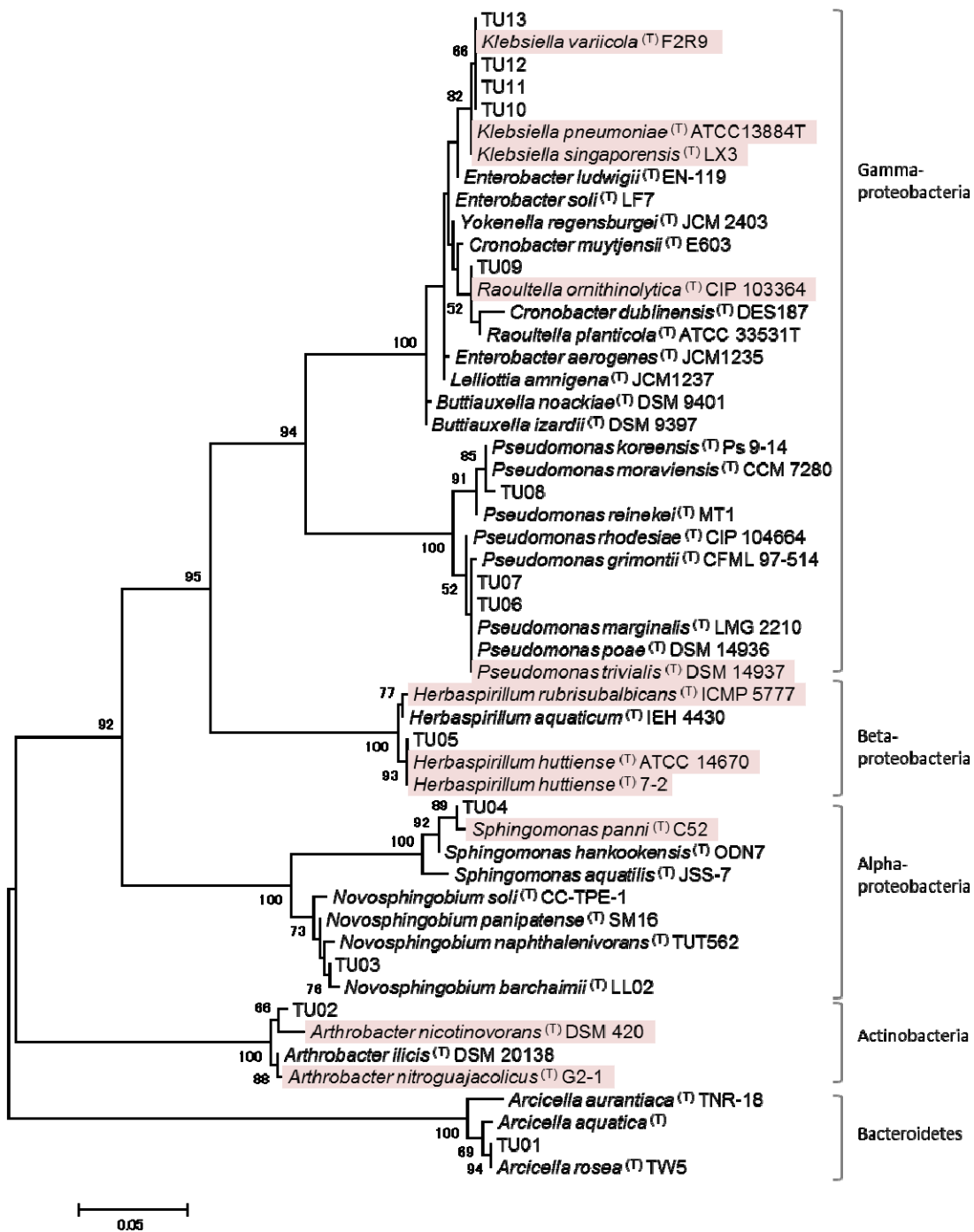


図8 分離した細菌とその近縁種の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹網掛けした細菌は、これまでに窒素固定能が報告されている細菌を示す。

4. 藻類の生育への細菌の作用

河床から被験菌としての緑藻を取得した。ここでは、まず、多摩川から採取した河床礫バイオフィルムを、可溶性窒素化合物を含まない培地で、光独立栄養条件、25℃で培養した。緑藻の生育が見られる培養系が得られ、そこには単細胞性緑藻の他に、多種類の細菌が共存していた（図9）。細菌が窒素固定し、緑藻に窒素源を供給している共生系と考えられた。ここから、緑藻 GA 株を純粋分離した。18S rRNA 遺伝子にもとづく系統解析の結果、GA 株は、*Desmodesmus komarekii* に近縁と考えられた（図10）。

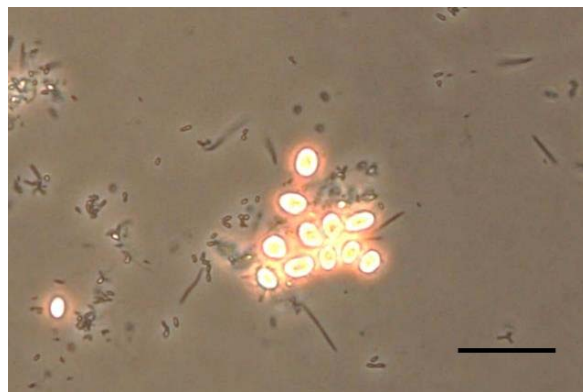


図9 緑藻を含む培養系の位相差顕微鏡像
スケールバーは、20 μm を示す。

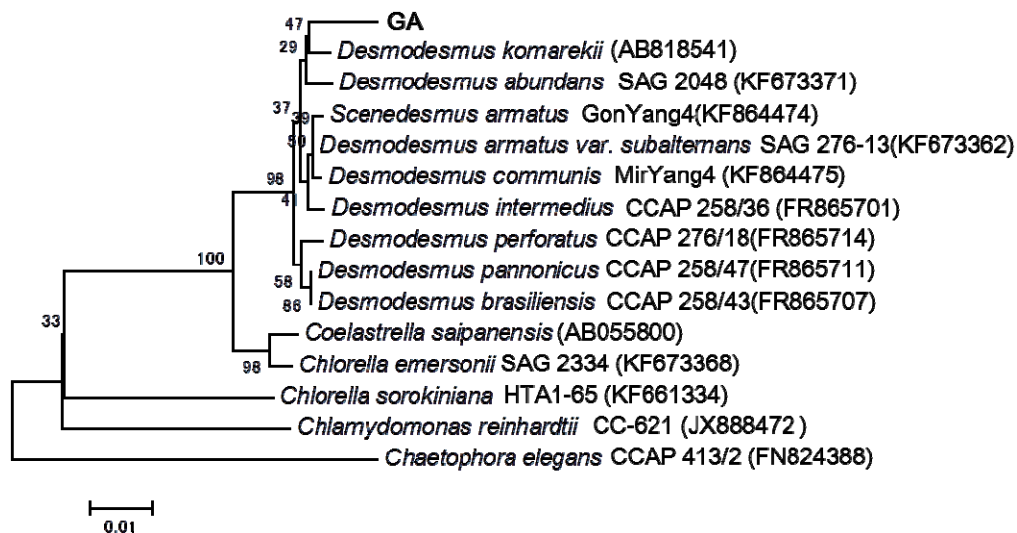


図10 分離した緑藻（GA株）の18S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

藻類と細菌を共培養する寒天平板培養・評価系を構築し、二者の相互作用を解析した。河床礫バイオフィルムより分離した緑藻 *Desmodesmus* GA 株と被験細菌を混合し、寒天培地で培養後、緑藻の生育量を測定した。その結果、多くの分離株は、GA 株の生育を抑制した(表7)。中でも、*Sphingomonas* 属の TU04 株による阻害活性は高く(図 1 1 a)、他の緑藻、*Chlorella vulgaris* NIES 2170 株を用いた実験でも確認された(data not shown)。

一方、*Arcicella* 属の TU01 株は窒素固定条件で緑藻 *Desmodesmus* GA 株の生育を支持した(図 1 1)。図 1 1 a に示すように窒素化合物添加条件では、TU01 株の有無による緑藻の生育の違いは見られないが、図 1 1 b のように、窒素化合物「非」添加条件では、緑藻単独では生育できないものの、TU01 株の共存により、生育できるようになっていることが分かる。TU01 株が窒素固定し、その産物を緑藻に供給していると同時に、TU01 株は緑藻から光合成による炭酸固定産物を受け取る、という共生系であると考えられる。このような種間による窒素固定産物の授受は、これまで、河床礫から分離した *Nostoc* 属の窒素固定シアノバクテリアと緑藻の間でも観察されていたが(Goto et al. 2009)、好気従属栄養性窒素固定細菌では初めての例である。

緑藻に対して、生育促進効果の見られた *Arcicella* 属細菌の分布について、前述の細菌叢のデータから解析した。表 8 に示すように、どの試料からも 0.1%以上の割合で検出され、多いときには、4.5%も占めていた。これは、表 3 に示したシアノバクテリアの検出頻度に匹敵する。

表 7 細菌の緑藻への作用

分離株	<i>Desmodesmus</i> GA 株への作用
TU01	positive
TU02	negative
TU03	negative
TU04	negative
TU05	n.t.
TU06, TU07, TU08	negative
TU09	n.t.
TU10, TU11, TU12, TU13	negative
n.t., not tested yet	

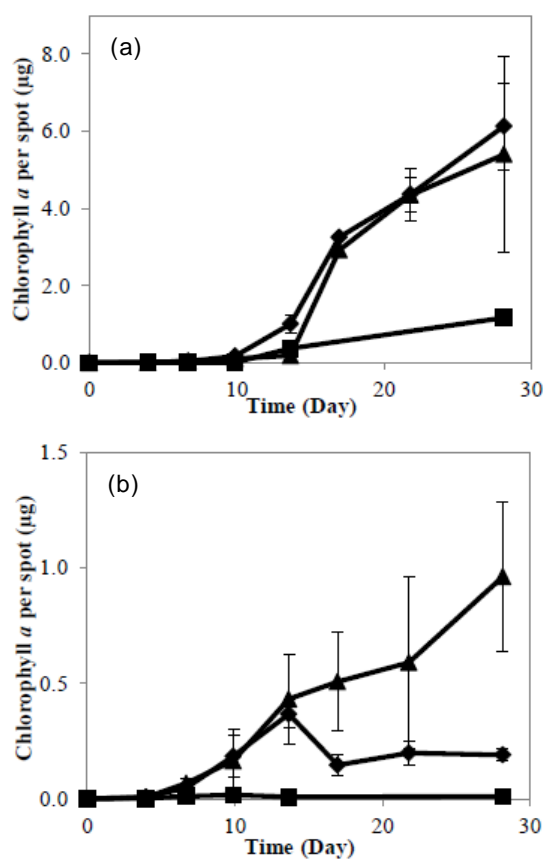


図 1 1 窒素固定細菌との共培養による緑藻 (*Desmodesmus*) の生育
 (a), 窒素 (7.5 mM 塩化アンモニウム) 添加条件、(b), 窒素非添加条件。
 寒天平板培地上での緑藻の生育は、一つのスポットの細胞から抽出したクロロフィル *a* 量で評価した。◆緑藻単独培養、▲TU01 株との共培養、■TU04 株との共培養。

表 8 *Arcicella* sp. (*A. aurantiaca*) の検出頻度

試料 ID	試料番号*	総リード (配列) 数	<i>A. aurantiaca</i> の配列数	全体に 占める割合 (%)
CF_N	1	30,381	44	0.1
CF_F	1	38,095	197	0.5
HM_N	1	83,021	258	0.3
HM_F	1	51,907	1,174	2.3
SD_Jf	1	82,083	419	0.5
SD_Jf	2	72,472	1,008	1.4
SD_Jf	3	57,488	260	0.5
SD_Js	1	76,138	707	0.9
SD_Js	2	70,142	342	0.5
SD_Js	3	97,644	186	0.2
SD_N	1	42,947	241	0.6
SD_F	1	64,009	2,878	4.5

*同一時期・場所であるが、採取した石が異なる場合、1、2、3 と分けた。

【結語】

本研究で、河床には、これまで考えられていた以上に多様な窒素固定細菌が分布していることが明らかになった。系統的多様性だけでなく、酸素や光への応答などの生理学的性質にも多様性が見られた。さらに、それら窒素固定細菌のなかから、緑藻に対する生育促進作用を見出すことができた。河床藻類は河川生態系を支える重要な一次生産者（炭酸固定者）と考えられている。これまでの研究では藻類の生長に直接影響を及ぼす栄養塩濃度や日照などの環境因子に注目されてきたが、本研究によって、共存する窒素固定者の重要性が指摘された。加えて、水生動物の腸内に由来すると考えられる細菌も検出されていることから、河床礫バイオフィルムの細菌叢は河川生態系の状態を映し出す生物指標にもなりうるのではないだろうか。以上から、河川生態系の管理・保全方策の提案およびその実行において、河床礫バイオフィルムの細菌叢解析・モニタリングは、有効な手法になってくると強く期待される。

本研究により、河床礫バイオフィルムには、多くの新種細菌が分布していることが示唆された。窒素固定細菌だけでなく、シアノバクテリアにも未記載の新種と予想されるものが複数検出された。本研究が、多摩川を対象とした、細菌の新種発見から生物多様性保全にわたる幅広い研究を、さらに飛躍的に推進する契機になれば幸いである。

【謝辞】

本研究に際し、2年間の助成をいただいた公益財団法人とうきゅう環境財団に心より感謝申し上げます。また、本研究にご指導、ご助言を賜った守屋繁春博士（理化学研究所）、南澤究博士（東北大学）、松浦克美博士（首都大学東京）に厚くお礼申し上げます。最後に、試料採取にご協力いただいた皆様に深く感謝いたします。

本研究成果の一部は、次の学会で発表した。

第2回国際シンポジウム・マトリョーシカ型原理 筑波大学、つくば（2015）

Effect of symbiotic relationship with eukaryotic algae on nitrogen-fixing bacteria.
Nishihara, A., N. Kanno, K. Matsuura and S. Haruta.

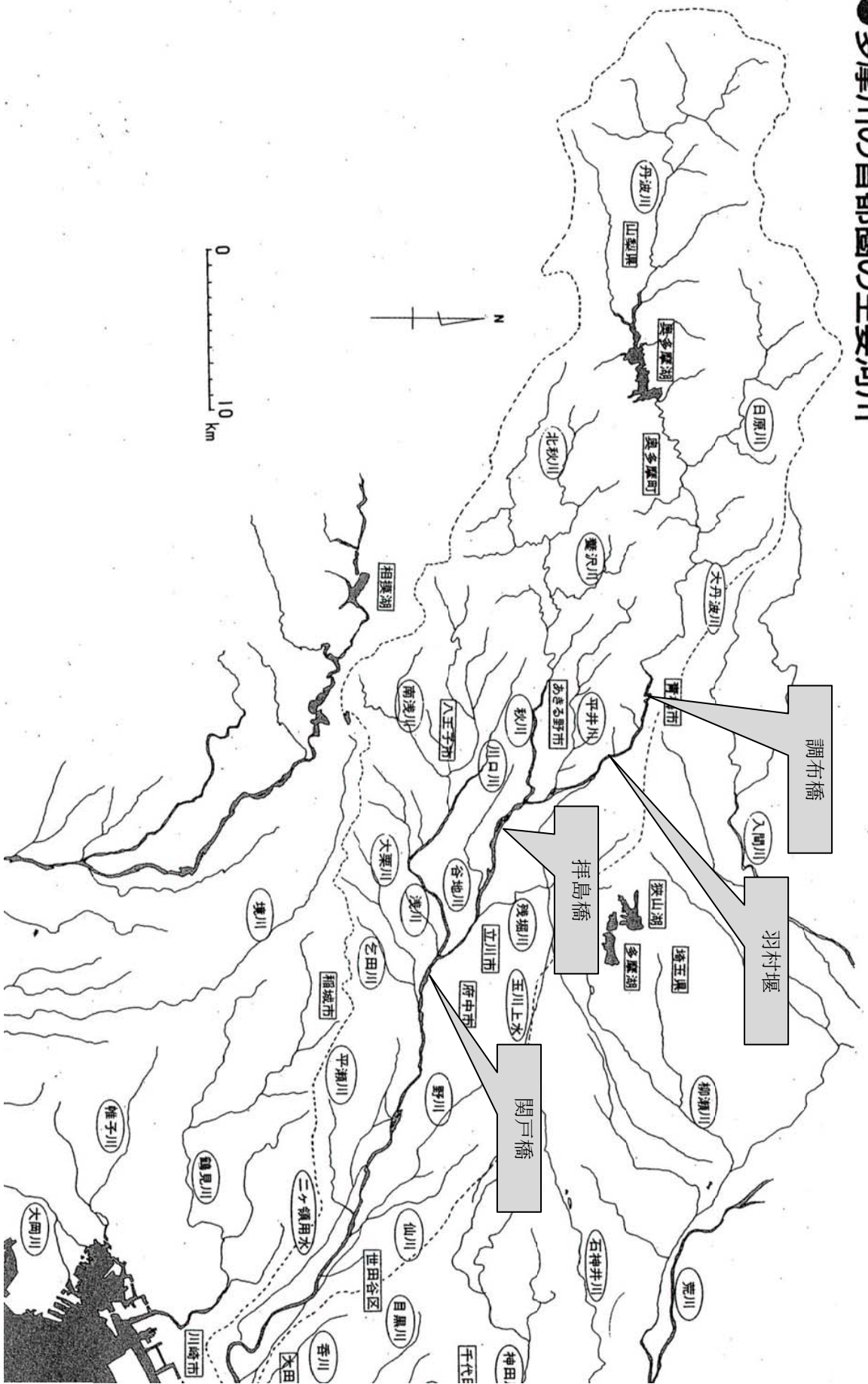
光合成若手&植物脂質若手ジョイントセミナー2015 階層領域越境突破～転写制御から生態系まで～ 東京大学、東京（2015）

環境で生きる細菌たち—Two heads are better than one?— 春田伸

【引用文献】

- Caporaso, J.G., C.L. Lauber, W.A. Walters, D. Berg-Lyons, C.A. Lozupone, P.J. Turnbaugh, N. Fierer, and R. Knight. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 15:108 Suppl 1:4516-22.
- Gotoh, Y., K. Matsuura, and S. Haruta. Cyanobacteria enable eukaryotic microalgal growth under nitrogen-limiting conditions. MSK's 50th Anniversary International Symposium on Microbiology (2009), South Korea, Proceedings p. 216.
- Zani, S., M.T. Mellon, J.L. Collier, and J.P. Zehr Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* (2000) 66:3119-3124.
- Zehr, J.P., and L.A. McReynolds. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1989) 55:2522-2526.

●多摩川の首都圏の主要河川



多摩川流域の生態系を育む河床藻類を支える窒素固定細菌の
多様性と役割

(研究助成・学術研究VOL. 46—NO. 331)

著 者 春田 伸

発行日 2017年11月

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenv.or.jp/>