

口頭発表 OA

水圏生態系

OA-001

淡水湖沼の硫酸化細菌群集における
主要構成種の特定とゲノム解析○渡邊 友浩¹、小島 久弥¹、福井 学¹
¹北大・低温研

硫酸化細菌 (SOB) は、硫黄、窒素、および炭素の循環をリンクさせる微生物である。海洋環境では、その豊富な存在量と元素循環への影響から主要なSOBについて詳細な研究がなされている。一方で、陸域の元素循環に寄与する淡水湖沼のSOBに関しては主要な系統すら不明であった。本研究の目的は、淡水湖沼のSOB群集における主要構成種を特定し、そのゲノム構成の特徴を解明することである。6つの淡水湖沼から採取した堆積物と水試料を対象に、遺伝子配列に基づきSOBの群集構造解析を行った。この結果、淡水湖沼環境のSOB群集は海洋環境とは系統的に大きく異なり、ベータプロテオバクテリアが優占することが示された。大半の配列は特定の属に分類できなかったが、堆積物と水試料から高頻度で検出された配列グループは、それぞれ *Sulfuricella denitrificans*、*Sulfuritalea hydrogenivorans* と同属であると推定された。これらは他の淡水環境からも見出されているため、淡水湖沼に分布する典型的なSOBであると推察される。我々は、淡水環境の主要なSOBのモデルとして、両種の基準株の完全ゲノムを決定することに成功した。両ゲノムから硫黄、窒素、炭素循環に関与する遺伝子が同定された。硫酸化関連遺伝子の構成は2菌株間で共通しており、予測された硫酸化経路は他のベータプロテオバクテリア綱のSOB、*Thiobacillus denitrificans* と同じだった。

Key words: sulfur oxidizing bacteria, freshwater lake, genome
E-mail: watanabe1986@pop.lowtem.hokudai.ac.jp

OA-003

珪藻DNA/RNAウイルスの増殖と
水温の関係○外丸 裕司¹、木村 圭^{1,2}
¹水研七瀬戸水研、²学振特別研究員PD

【目的】小型浮遊性珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* は、初夏から秋にかけて沿岸域でブルームを形成する、重要な一次生産者である。これまでの研究により、本藻を宿主とするウイルスとして2種類の異なる核酸タイプのウイルス、CtenDNAV (DNAウイルス) ならびにCtenRNAV (RNAウイルス) の存在が明らかとなっている。本研究では現場に出現するウイルスとその要因を明らかにするため、両ウイルスの増殖と水温の関係を調査した。【方法】宿主株 (2-10, 2-6株) に対するウイルス接種試験を15℃、20℃ならびに25℃で行った。宿主密度、ウイルスタイターを測定するとともに、宿主細胞内におけるウイルス複製の有無をゾナン・サザン解析により評価した。【結果と考察】宿主2-10株は、いずれの水温条件でもDNA/RNA両核酸タイプのウイルスによって死滅した。また、RNAウイルスは水温が低いほど宿主殺藻までの期間が短く、逆にDNAウイルスは高水温で宿主を早く殺藻した。一方、本種2-6株は、いずれの水温条件でも細胞内におけるRNAウイルスの複製を許さなかった。現場では比較的水温が低い20-25℃の条件でRNAウイルスが優占するが、水温が25℃を超える時期以降はDNAウイルスが優占することが観察されている。RNAウイルスはDNAウイルスよりも低温で有利になるという今回の室内実験結果は、現場でのウイルスの優占に水温が関係していることを部分的に支持するものと推察された。珪藻宿主とウイルスの関係は複雑であるため、塩分や光条件など、今後も様々な条件下における両者の関係を精査することが、現場における宿主挙動の理解に必要である。

Key words: Diatom, Virus, DNA, RNA
E-mail: tomaruy@affrc.go.jp

OA-002

富栄養化汽水湖におけるアンモニア酸化の
特異性~アーキアによるアンモニア酸化~○工藤 勇人¹、倉橋 正典¹、田代 陽介¹、二又 裕之¹
¹静岡大・院工

静岡県浜松市に位置する佐鳴湖は、上流から2つの都市河川が流入し下流では浜名湖と連結している富栄養化汽水湖である。水質浄化の一つの手法として窒素循環の強化が考えられる。そこで、本研究では窒素循環における律速段階である硝化特性について動力学的および微生物生態学的に把握することを目的とした。上流部と下流部における底泥および湖水を採取し、実サンプルを用いた硝化活性の動力学的解析を行った。その結果、アンモニア酸化および亜硝酸酸化とともに上流部の方が下流部に比べ、 V_{max} 値および K_s 値は約2~10倍高い値を示し、現場におけるアンモニア酸化活性は数mM程度で阻害されることが示唆された。この結果は、良好な窒素循環を図るためには排水中のアンモニア濃度を極力抑える必要があることを示唆している。アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*) を標的としたクローンライブラリー解析の結果、中流部および下流部においてはアーキア由来 *amoA* のみが検出され、特に Group I.1b に属する *amoA* が優占化しており Nitrososphaera 由来の *AmoA* と約80%の相同性を示した。下流部におけるアーキア由来 *amoA* を対象とした real-time PCR および DGGE の結果、3年間を通して $1.0 \pm 0.2 \times 10^8$ copies g^{-1} sediment であり群集構造もほぼ安定していた。一方で、塩素濃度が下流部に比べ約30倍低い上流部においてはバクテリア由来の *amoA* も検出された。以上の結果から、佐鳴湖底泥においては主に新規のアーキアが硝化を担っており、その能力は安定している事が示唆された。現在、アンモニア酸化アーキアの集積・分離および塩濃度がアンモニア酸化アーキアおよび細菌の動態に及ぼす影響について解析を進めている。

Key words: nitrification, archaea, sediment, eutrophication, brackish lake

OA-004

有害渦鞭毛藻感染性ウイルスHcRNAVに対する
マルチプレックスリアルタイムRT-PCR法の開発○中山 奈津子¹、長崎 慶三²、浜口 昌巳¹
¹水研七瀬水研、²水研セ本部

有害渦鞭毛藻ヘテロカプサによる赤潮の終息には、1本鎖RNAウイルス (HcRNAV) の感染が重要な影響を与えている可能性が示唆されており、演者は、ウイルスの高い複製能や宿主特異性を利用した生物学的赤潮防除法として「HcRNAVを含む天然海底泥の利用」を検討中である。同法の最適化には、高精度かつ迅速なウイルス定量技術が不可欠であるが、従来法では、測定対象が一部の株特異的なHcRNAV数に限定されること、測定に1週間以上を要するなどの問題があった。そこで、本ウイルスに特異的な測定系を開発し、散布したHcRNAVの効果の検証や現場環境での持続的測定への適用を目指すこととした。HcRNAVは感染タイプによって3タイプに分けられるため、各タイプの代表株 (HcRNAV34, 109, 659) の特異的塩基配列に基づき、複製酵素遺伝子およびカプシドタンパク質遺伝子の2領域に対してそれぞれ特異的なプライマーとプローブセットを設計した。その結果、マルチプレックスリアルタイムRT-PCR法によるHcRNAV特異的な測定系の開発に成功した。また、各代表株について、マルチプレックスリアルタイムPCR法、透過型電子顕微鏡を用いた直接計数法、およびMPN法による測定結果を比較した結果、前二者は高い相同性を示したが、MPN法で得られた結果はウイルス株によって異なった。開発したリアルタイムPCR法は、1時間以内に3タイプの検出が可能であること、測定精度が高いこと、さらに2領域を同時に検出するため特異性が高いことから、現場環境中における全HcRNAVの定量に適用可能であることが示された。

Key words: Multiplex real-time RT-PCR, HcRNAV virus, *Heterocapsa circularisquama* blooming, high-specificity
E-mail: nnakayama@affrc.go.jp