

# 放射性同位体を用いないバクテリア生産速度測定法の開発と応用

Development and application of methods for  
measuring bacterial production as an alternative to radioisotopes

土屋 健司\*  
Kenji TSUCHIYA\*

国立環境研究所 地域環境研究センター  
Center for Regional Environmental Research, National Institute for Environmental Studies

## 摘 要

バクテリア生産速度 (BP) の定量には放射性同位体を用いたチミジン法やロイシン法が一般的に用いられており、放射性同位体の使用が厳しい国・地域においては実測例に限られ、生産動態を知る上で障壁となっていた。そこで我々は放射性同位体を用いない BP 測定法を開発した。本手法では  $^{15}\text{N}$  で標識したデオキシアデノシン ( $^{15}\text{N}$ -dA) をバクテリアに取り込ませ、DNA 抽出、酵素加水分解後に液体クロマトグラフィー質量分析計によって  $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み速度を定量し、BP を見積もる。 $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み速度は湖沼及び海洋において既存の  $^3\text{H}$ -チミジン取り込み速度と有意な正の相関を示し、本手法の妥当性が示された。この  $^{15}\text{N}$ -デオキシアデノシン法は化合物レベルで定量を行うため、既存の手法では成し得なかった純粋な DNA 合成速度の定量を可能とした。本稿では  $^{15}\text{N}$ -dA 法の開発過程とともに、琵琶湖における応用例を紹介し、最後に今後の課題や展開について議論する。

キーワード：安定同位体、液体クロマトグラフィー質量分析計、長期変動、  
デオキシアデノシン、琵琶湖、ロイシン

Key words : stable isotope, liquid chromatography mass spectrometry,  
long-term variation, Deoxyadenosine, Lake Biwa, Leucine

## 1. はじめに

水圏生態系におけるバクテリアは物質やエネルギー循環において重要な役割を果たしている (Azam, 1998)。バクテリアは多くの生物が直接利用できない溶存態有機炭素 (孔径が概ね  $0.1\sim 1\ \mu\text{m}$  のフィルターを通過するもの) を主に利用して増殖し、微生物食物連鎖や生食食物連鎖へと物質循環を駆動させる役割を担っている (Wylie and Currie, 1991)。特に溶存態有機炭素は地球上における主要な炭素リザーバーであり (海洋では  $662\ \text{PgC}$ , Hansell *et al.*, 2009), その量は陸域の植生 ( $550\sim 650\ \text{PgC}$ ) や大気中の二酸化炭素量 ( $700\ \text{PgC}$ ) とほぼ同等である。また、ほとんどの有機炭素は溶存態の形態で存在し、海洋バイオマスの 200 倍以上の量を示す (Hansell *et al.*, 2009)。そのため、溶存態有機炭素を利用するバクテリアの生産動態を把握することは生物地球化学循環を理解する上で重要であり、水圏生態学における主要なテーマの 1 つである。

バクテリア生産速度 (Bacterial production; BP) と

は、単位時間、単位体積 (面積) 当たりのバクテリアバイオマスの増加量を表すものである。これまで BP は、主にチミジン (TdR) 法 (Fuhrman and Azam, 1980; Fuhrman and Azam, 1982) やロイシン (Leu) 法 (Kirchman *et al.*, 1985) によって測定されてきた。TdR 法ではデオキシリボ核酸 (DNA) を構成するヌクレオシドの一種である TdR をバクテリアに取り込ませ、DNA 合成速度から BP を見積もる (図 1)。TdR の塩基 (チミン) は他のヌクレオシドの塩基 (アデニン, グアニン, シトシン) と異なり、直接的にリボ核酸 (RNA) 合成に利用されないため、DNA 合成速度測定のトレーサーとして用いられている。TdR 取り込み量から細胞増殖への変換係数、1 細胞当たりの炭素量を乗ずることによって BP が求められる。前者の変換係数は、外洋では一般に  $2\pm 2\times 10^{18}\ \text{cells mol-TdR}^{-1}$  (Ducklow and Carlson, 1992) が用いられ、後者は一般に  $20\ \text{fgC cell}^{-1}$  (Lee and Fuhrman, 1987) が用いられる。Leu 法ではタンパク質を構成するアミノ酸の一種である Leu をバクテリアに取り込ませ、タンパク質合成速度から BP を見積もる。Leu

受付：2020 年 8 月 31 日、受理：2020 年 10 月 26 日

\* 〒 305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2, E-mail : tsuchiya.kenji@nies.go.jp, ktsuchiya@soka.gr.jp

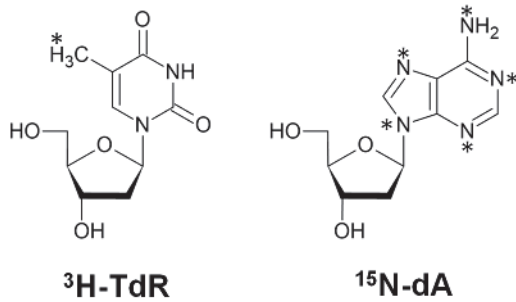


図1  $^3\text{H}$ -チミジン法で使用される[メチル- $^3\text{H}$ ]-チミジン( $^3\text{H-TdR}$ , 左)と,  $^{15}\text{N}$ -デオキシアデノシン法で使用される[ $^{15}\text{N}_5$ ]-デオキシアデノシン( $^{15}\text{N-dA}$ , 右). \*印で示した箇所がそれぞれ $^3\text{H}$ または $^{15}\text{N}$ で標識されている。

はバクテリアに取り込まれた後に他のアミノ酸に形を変えることはなく、バクテリアのタンパク質の中で極めて安定な割合で存在することから(Kirchman *et al.*, 1985; Simon and Azam, 1989), タンパク質合成速度測定のトレーサーとして用いられている。Leu 取り込み速度に、Leu の式量、細胞炭素量とタンパク質の比、同位体希釈率を乗じ、タンパク質中の Leu の割合で除して BP は求められる。Leu の式量を 131.2、細胞炭素量とタンパク質の比を 0.86、同位体希釈率を 2、タンパク質中の Leu の割合を 0.073 とした、 $3.1 \text{ kgC mol-Leu}^{-1}$  という換算係数がよく用いられる(Kirchman, 1993)。

TdR や Leu は、もともと細胞内に存在するため、取り込まれた TdR や Leu を区別するために、放射性同位体で標識される( $^3\text{H}$  や  $^{14}\text{C}$  がよく用いられる)。これらのアプローチは方法論的にシンプルで感度が高いことから、水圏生態学の研究分野でスタンダードな測定法として広く用いられてきた。しかし、これらの手法は放射性同位体を使用するため、現地調査での使用には重大な、時には乗り越えられないような物流上の困難や制約があり(Steward and Azam, 1999), 任意の場所での測定を難しくしている。特に我が国においては放射性同位体の使用に関して強い制限がある。海洋の大型調査船などでは放射性同位体専用の実験室を積み込むことにより、船上での BP 測定が可能だが、陸水環境においてはそのような設備を搭載する(できる)船はほとんど存在しない。このような事情から、我が国の陸水環境における BP 実測例は極めて限られているのが現状であり、湖沼においては諏訪湖(Watanabe, 1996)、琵琶湖(e.g. Nagata 1987; Ram *et al.* 2010)、霞ヶ浦(Kawasaki *et al.* 2013)などに限られる。

DNA 合成速度に基づいた放射性同位体を用いない BP 測定方法として、1999 年にプロモデオキシウリジン(BrdU)法が開発された(Steward and Azam, 1999)。この手法は TdR のアナログである BrdU をバクテリアに取り込ませ、抗原抗体反応によって取り込まれた BrdU を定量するというものである。BrdU

は抗体検出ができるため、細胞レベルでの検出(e.g. Tada *et al.* 2010)や、免疫分取によるシーケンスによる増殖細胞の判別や特定(e.g. Tada and Grossart 2014; Hamasaki *et al.*, 2016; Malayil *et al.*, 2020)などが可能といった利点がある。しかし、抗原抗体反応によって得られた化学発光強度と BrdU 量との変換係数を得るためには、放射性同位体で標識した物質(例えば  $^3\text{H-TdR}$  や  $^3\text{H-BrdU}$  など)を使用する必要があり、真に放射性同位体フリーの手法はこれまで開発されてこなかった。

そこで我々は、任意の場所で測定可能な、放射性同位体を全く用いない BP 測定手法の開発を行い、水圏環境におけるバクテリアの生産動態を明らかにしてきた。本稿では、新手法の開発過程と、琵琶湖における実測例、そして最後に今後の課題や展開について紹介したい。

## 2. 放射性同位体を用いないバクテリア生産速度測定法の開発： $^{15}\text{N}$ -デオキシアデノシン法

$^{15}\text{N}$ -デオキシアデノシン( $^{15}\text{N-dA}$ )法では、TdR と塩基対をなすデオキシアデノシンに着目し、アデニンの 5 つの窒素原子をすべて安定同位体  $^{15}\text{N}$  で標識したものをトレーサーとして用いた( $^{15}\text{N-dA}$ , NLM-3895-PK, Cambridge Isotope Laboratories, 図 1)。 $^{15}\text{N-dA}$  取り込み量は以下の(1)~(5)の工程で定量する：(1)  $^{15}\text{N-dA}$  を添加・培養し(最終濃度~50 nM)、バクテリアに取り込ませる。(2)培養終了後に孔径 0.2- $\mu\text{m}$  ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)メンブレンフィルター(Omnipore, Millipore)に試水を濾過し、冷凍保存する。(3)フィルター試料に捕集されたバクテリア群集から DNA を抽出する。(4)抽出した DNA を 3 つの酵素(Nuclease P1, Phosphodiesterase I, Alkaline Phosphatase)を用いてヌクレオシドまで加水分解する。(5)液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS/MS)を用いて  $^{15}\text{N-dA}$  取り込み量を定量する。デオキシアデノシンの塩基(アデニン)は RNA にも用いられるが、LC-MS/MS によって RNA 構成要素であるアデノシンと DNA 構成要素であるデオキシアデノシンは分けて測定することが可能であるため、RNA やアデノシン三リン酸(ATP)などに用いられたとしても定量結果は影響を受けない。

本手法の開発において、DNA 抽出方法や回収率、 $^{15}\text{N-dA}$  添加濃度など、各工程の課題に関して検討した。まず、DNA 抽出方法として、DNA の吸着・精製過程が異なる、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP-Biomedicals)と Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (Nippon Steel & Sumikin Eco-Tech Corporation)の 2 つのキットを検討した。前者はガラスビーズに DNA を吸着させ、塩濃度の変化により溶出させるが、後者は磁性ビーズに DNA を吸着させ、加熱により溶出させる方法を採用している。その結果、前

者の DNA 抽出方法では後段の酵素加水分解反応が進まず、 $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み量の定量ができなかった (Tsuchiya *et al.*, 2015)。前者の DNA 抽出キットには、本研究で用いた酵素による加水分解反応を阻害する物質が含まれていた可能性が考えられる。一方、後者の DNA 抽出キットを用いたところ、酵素加水分解反応に阻害は見られず、 $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み量の定量が可能であったため、DNA 抽出法としてこの方法を採用した。

次に Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 による DNA 回収率を調べるため、霞ヶ浦の高浜入り、土浦入り、湖心の3地点より採水し、それぞれ1または5 mL ずつ孔径 0.2- $\mu\text{m}$  PTFE メンブレンフィルターに濾過した。同時に湖水を濾過しないコントロールも作成した。DNA 抽出時にフィルター試料とともに既知量の *nec1* 遺伝子 (PCR 増副産物,  $1.0 \times 10^6$  copies/tube) を添加し、抽出後の同遺伝子数をリアルタイム PCR 法により定量した。その結果、*nec1* 遺伝子の回収率は  $102 \pm 9\%$  ( $n=7$ ) を示し、DNA 抽出・精製過程におけるロスはほとんど見られないことが確認された。一方で本抽出キットによるバクテリアの溶菌効率は明らかではなく、DNA 抽出効率は不明である。しかし、2016年1月に霞ヶ浦2地点(高浜入り、湖心)、相模湾1地点(真鶴沖定点)における  $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み速度を3回反復で測定したところ、それぞれ  $11.59 \pm 0.37$ ,  $11.65 \pm 0.95$ ,  $2.53 \pm 0.09$  pmol  $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  を示した。それぞれの変動係数 (CV) は 3.2%, 8.2%, 3.4% と比較的小さく、高い精度で測定されていた。もし DNA 抽出効率 (細胞破碎効率) が低いのであれば、測定結果はよりばらつくと考えられるが、このような高い精度での測定結果は、間接的ではあるが比較的高い DNA 抽出効率を得られていた可能性を示唆するものであると考えられる。

$^{15}\text{N}$ -dA 添加濃度と取り込み量の関係を調べた。試水は相模湾真鶴港より採水し、 $^{15}\text{N}$ -dA を最終濃度 5, 20, 50, 100 nM となるように添加後、6, 12, 24, 48 時間、暗所、現場水温 (21 $^{\circ}\text{C}$ ) 下で培養した。その結果、添加濃度が低く、培養時間が長くなるほど取り込み量は低下する傾向を示したが、最終濃度 50, 100 nM, 培養時間 6, 12 時間のサンプルにおいては統計的な有意差は見られなかったことから (Bonferroni's test,  $p > 0.05$ )、 $^{15}\text{N}$ -dA 添加濃度は 50 nM, 培養時間は 12 時間以内が望ましいと考えられた。

$^{15}\text{N}$ -dA 法の妥当性を確認するため、海洋 (相模湾) 及び湖沼 (霞ヶ浦、琵琶湖) において、従来法である  $^3\text{H}$ -TdR 法と比較を行った。その結果、 $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み速度は、いずれの水圏においても有意な正の相関を示し、本手法の妥当性が示された (図 2)。

一方、それぞれの水圏における取り込み速度の直線回帰の傾きは 1 を下回り (相模湾 0.55, 霞ヶ浦 0.28, 琵琶湖 0.61)、 $^3\text{H}$ -TdR 取り込み速度が  $^{15}\text{N}$ -dA

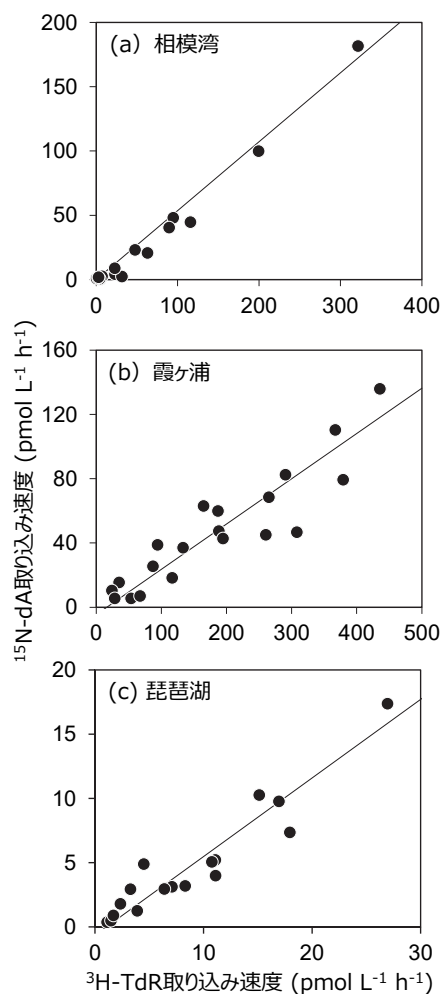


図 2  $^{15}\text{N}$ -デオキシアデノシン ( $^{15}\text{N}$ -dA) 及び  $^3\text{H}$ -チミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) 取り込み速度の比較結果。

図中の直線は Standard Major Axis (SMA) II 型直線回帰モデルを示す。(a) 相模湾 [ $^{15}\text{N}$ -dA] =  $0.55 \times [^3\text{H}$ -TdR] - 4.1 ( $n=20$ ,  $r=0.99$ ,  $p < 0.001$ ), (b) 霞ヶ浦 [ $^{15}\text{N}$ -dA] =  $0.28 \times [^3\text{H}$ -TdR] - 4.6 ( $n=20$ ,  $r=0.91$ ,  $p < 0.001$ ), (c) 琵琶湖 [ $^{15}\text{N}$ -dA] =  $0.61 \times [^3\text{H}$ -TdR] - 0.64 ( $n=17$ ,  $r=0.94$ ,  $p < 0.001$ ). (Tsuchiya *et al.* 2015; Tsuchiya *et al.* 2020a より引用)

取り込み速度と比較して高い結果となった。この理由として、(1)DNA 抽出効率、(2)細胞外ヌクレオシド (dA と TdR) の DNA 合成に用いる能力の違い、(3)放射性同位元素の非特異標識が考えられる。 $^{15}\text{N}$ -dA 法では DNA 抽出過程を経るため、抽出効率が低いと過小評価につながる。また、 $^{15}\text{N}$ -dA 法と  $^3\text{H}$ -TdR 法の取り込み速度比が霞ヶ浦、相模湾で異なる理由として、バクテリア種組成の違いによる溶菌効率 (抽出効率) が異なる可能性も考えられる。しかし、本抽出キットの DNA 抽出効率は上述したように定量はされていないが、高い測定精度が得られたことから、比較的高い抽出効率を得られている可能性は高く、傾きを大きく下げる主要な要因とは考えにくい。細胞外ヌクレオシド (dA と TdR) を DNA 合成に用いる能力の違いに関しては、dA や TdR が DNA に取り込まれる際に、ヌクレオシドにリン酸を付加するためのデオキシアデノシンキナーゼ、チミジンキ

ナーゼといった酵素が必要であるとされ、これらの酵素の有無はバクテリア分類群によって異なる(e.g. Tinta *et al.*, 2012)。実際に dA と TdR の DNA への取り込み速度がどの程度異なるのかを明らかにするため、 $^{15}\text{N}$ -dA と、 $^{15}\text{N}$  で標識した TdR( $^{15}\text{N}$ -TdR, NLM-3901-25, Cambridge Isotope Laboratories)を用いて相模湾、霞ヶ浦において取り込み速度を比較した。その結果、 $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み速度は、 $^{15}\text{N}$ -TdR 取り込み速度のおよそ 87% であることがわかり(Tsuchiya *et al.*, 2020b, 図 3)、細胞外ヌクレオシドの DNA への取り込み能の違いだけでは、 $^{15}\text{N}$ -dA 及び  $^3\text{H}$ -TdR 取り込み速度の違いを説明するには不十分であった。また、両水域における  $^{15}\text{N}$ -dA と  $^{15}\text{N}$ -TdR 取り込み速度比はおおむね同程度であり、傾きの違い(0.55 vs 0.28)は他の理由によって説明されうるものであると推察された。一方、 $^3\text{H}$ -TdR は細胞内に取り込まれたのち、DNA だけでなく、RNA やタンパク質も  $^3\text{H}$  が標識してしまう非特異標識の問題が指摘されている(e.g. Brittain and Karl, 1990; Chin-Leo and Kirchman, 1990)。 $^3\text{H}$ -TdR 法では冷トリクロロ酢酸によって得られた不溶性画分中の放射線強度を測定するが、不溶性画分中には RNA やタンパク質も含まれており、非特異標識によって取り込み量の過大評価が引き起こされる。実際に、不溶性画分中における DNA 画分の  $^3\text{H}$  標識率は 0%~103% と大きく変動することが知られている(reviewed in Brittain and Karl, 1990)。一方、 $^{15}\text{N}$ -dA 法では化合物レベルで  $^{15}\text{N}$ -dA 取り込み量を定量するため、非特異標識による取り込み量のバイアスは発生しないと考えられる。こういったことから、取り込み速度の傾きが 1 を下回る原因として、 $^3\text{H}$ -TdR 法における非特異標識に起因する取り込み速度の過大評価が大きく影響していたと考えられる。以上のことから、 $^{15}\text{N}$ -dA 法は化合物レベルで定量を行うため、既存の手法では成し得なかった純粋な DNA 合成速度の定量を可能とし、水

圏生態系における BP のより正確な見積もりを可能とすることが示された。

### 3. 湖沼生態系におけるバクテリア生産速度の実測：琵琶湖

琵琶湖は日本最大の湖であり(面積 670 km<sup>2</sup>, 貯水量 275 億 m<sup>3</sup>)、京阪神の約 1,400 万人の飲料水等として利用されている。琵琶湖では高度成長に伴い富栄養化が進行し、淡水赤潮が頻発したが、負荷削減努力により 1980 年代以降栄養塩濃度は減少した(Hsieh *et al.*, 2010)。その結果、クロロフィル濃度は低下し、植物プランクトン種組成の遷移が見られるなど(Kishimoto *et al.* 2013)、生態系の変化が顕在化している。系外からの栄養塩・有機物負荷量や水質、植物プランクトンなどに関する長期変動はこれまでよく記述されてきたが(e.g. 佐藤ら, 2016)、BP の長期変動は明らかとなっていない。水圏生態系においてバクテリアは溶存態有機物を懸濁態化させ、微生物食物連鎖を駆動させる役割を担っている。そのため BP の測定は系外から流入する溶存態有機物が水圏食物網に取り込まれているかどうかを考慮する際に重要であり、これらの長期変動を把握することは湖沼生態系における物質収支を把握する上で重要である。

琵琶湖における BP 測定に関しては、1986 年 4 月から 10 月、琵琶湖北湖の南比良沖の定点(Ie-1, 図 4)において、 $^3\text{H}$ -TdR 法を用いて最初の BP が測定された(Nagata, 1987)。その後、1997 年から 1998 年には捕食者を除いた環境下でバクテリアを培養し、現存量の変化から見積もる方法(Gurung *et al.* 2000)、2005 年から 2006 年には  $^3\text{H}$ -Leu 法(Ram *et al.*, 2010)を用いて、同定点において BP が測定された。2016 年から 2017 年にかけて、筆者らも琵琶湖北湖にお

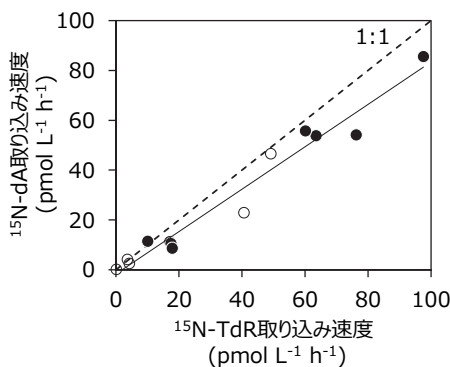


図 3  $^{15}\text{N}$ -デオキシアデノシン( $^{15}\text{N}$ -dA)及び  $^{15}\text{N}$ -チミジン( $^{15}\text{N}$ -TdR) 取り込み速度の比較結果。図中の直線は Standard Major Axis(SMA)II 型直線回帰モデルを示す( $[^{15}\text{N}\text{-dA}] = 0.87 \times [^{15}\text{N}\text{-TdR}] - 2.3$ ,  $r = 0.98$ ,  $n = 13$ ,  $p < 0.001$ )。白丸と黒丸はそれぞれ相模湾、霞ヶ浦を示す。破線は取り込み速度が 1:1 の直線を示す。(Tsuchiya *et al.* 2020b より引用)

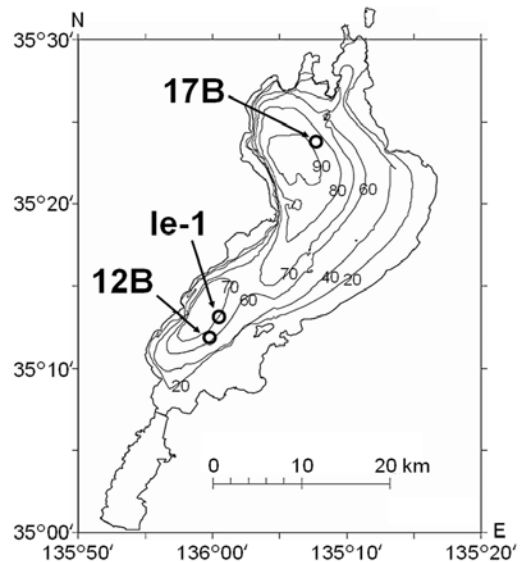




図 4 琵琶湖北湖における調査定点。


いて<sup>15</sup>N-dA法を用いてBPを測定した(Tsuchiya *et al.* 2020a)。これらの測定手法のうち、<sup>3</sup>H-TdR法と<sup>15</sup>N-dA法はDNA合成速度に基づくものであり、細胞数の増加と強く関連している。また、捕食者を除いた状態での培養法(Gurung *et al.*, 2000)も同様に細胞数の変化に着目している。そのため、これらの手法の理論的背景は同じであり、直接比較可能である。一方、<sup>3</sup>H-Leu法はタンパク質合成速度を測定するものであり、DNA合成速度とタンパク質合成速度はバクテリアの生理状態や環境条件によって変化することが知られている(Kirchman, 1992)。そのため、<sup>15</sup>N-dA法と<sup>3</sup>H-Leu法は同じサンプルで測定しない限り、直接の比較は難しい。そこで、本研究では2016~2017年にかけて、<sup>15</sup>N-dA法を用いてBPの季節変動を明らかにするとともに、1986年(Nagata, 1987)、1997~1998年(Gurung *et al.*, 2000)のBPと比較することにより、琵琶湖北湖における30年間のBPの変化を明らかにすることを目的とした。

2016~2017年の調査は、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの調査船「びわかぜ」と京都大学生態学研究センターの調査船「はす」を用いて、北湖南部に位置する調査定点南比良沖中央(12B、水深約60m、4)で実施した。この地点はこれまでBP測定がされてきた調査定点Ie-1の近くに位置している。水深0、5、10、15、20、40、60mより採水し、BP・バクテリア現存量を測定した。<sup>3</sup>H-TdR法で測定されたBP(1986年)と比較を行うため、<sup>15</sup>N-dA取り込み速度から<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度への変換係数を実験的に求めた( $[^3\text{H-TdR}] = 1.64 \times [^{15}\text{N-dA}]$ , 2c)。Nagata(1987)では、<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度はフィルターを用いてバクテリアを捕集し、酢酸エチルで溶解させる手法(Fuhrman and Azam, 1982)を用いて測定していた。本研究における比較実験においても、2018年6月にフィルター法によって<sup>3</sup>H-TdR速度を測定したところ、取り込み速度が低いためにコントロールのブランクが相対的に高くなり、定量できなかった(Tsuchiya *et al.*, 2020a)。そのため、2018年7月にブランクが低く抑えられるフィルターを用いない遠心法(Smith and Azam, 1992)によって<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度を測定した。既知濃度の<sup>3</sup>H-TdRを使用して、フィルター法と遠心法間での計数効率の違いを比較したところ、フィルター法の毎分崩壊数(DPM)は遠心法の92.9%であった。そのため、Nagata *et al.* (1987)で使用したフィルター法に合わせるため、遠心法で得られたDPMに0.929を乗じて補正した。以上から、<sup>15</sup>N-dA取り込み速度から<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度への変換は、上述した2つの係数を乗じて行った( $1.64 \times 0.929 \times [^{15}\text{N-dA}]$ )。Nagata(1987)では、<sup>3</sup>H-TdR添加濃度(5~6nM)が低く、取り込み速度は飽和していなかったため、<sup>15</sup>N-dA法と同じ添加濃度(50nM)で<sup>3</sup>H-TdRを添加したと仮定し、<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度の補正を行っ

た。すなわち、1986年4月から7月は1.56、8月から9月は1.88、10月は2.00を乗じ、補正済み<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度とした。1997~1998年のBP(Gurung *et al.*, 2000)と比較するため、<sup>15</sup>N-dA取り込み速度とバクテリア細胞数増殖の関係を求めた( $1.83 \times 10^6 \text{ cells pmol}^{-1} \text{ } ^{15}\text{N-dA}^{-1}$ , Tsuchiya *et al.*, 2020a)。この変換係数を用いてバクテリアの比増殖速度( $\mu$ )を算出し、水温と $\mu$ の関係を比較した。

2016~2017年の<sup>15</sup>N-dA取り込み速度は0.13 pmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>(2016年8月、水深40m)から30.7 pmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>(2016年7月、水深5m)の範囲で変動した。1986年4月から10月における水深0~10mの補正済み<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度は27.7~145 pmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>(87.2 ± 36.7)を示した。2016~2017年における同月(4~10月)、同深度(0~10m)における<sup>15</sup>N-dA取り込み速度から見積もられた<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度は6.93~41.4 pmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>(18.9 ± 11.5)であり、1986年の取り込み速度と比較して有意に低かった(Student's t-test,  $p < 0.001$ )。1986年の<sup>3</sup>H-TdR取り込み速度は、2016~2017年と比較して4.6倍高く、BPはこの30年間で22%にまで低下したことが示唆された。

2016~2017年の $\mu$ は0.0086~0.70 d<sup>-1</sup>を示し、1997~1998年の $\mu$ と比較して(0.072~1.0 d<sup>-1</sup>)有意に低かった(Student's t-test,  $p < 0.001$ )。2016~2017年及び1997~1998年の両期間において、 $\mu$ は水温と有意な関係を示し、その直線回帰式はそれぞれ $[\mu] = 0.017 \times [\text{水温}] - 0.092$  ( $n = 56, r^2 = 0.59, p < 0.001$ )、 $[\mu] = 0.035 \times [\text{水温}] - 0.044$  ( $n = 17, r^2 = 0.68, p < 0.001$ )であった。1997~1998年の直線回帰式の傾きは2016~2017年と比較して2.1倍の値を示し、BPはこの20年間でおよそ半分まで低下したことが示唆された。

BPの経年変化をもたらした原因として、外部要因(有機物・栄養塩負荷)と内部要因(水質)が考えられる。系外からの負荷量と水質の相対変化量を5に示した。上述したように、BPは2016~2017年の値と比較して、1986年は4.6倍、1997~1998年は2.1倍の値を示した。滋賀県における下水道普及率は、1986年当時は非常に低く20%以下であったが、その後急速に拡大し、2015年には89%に達している。その結果、有機炭素(TOC)、易分解性TOCや全リン(TP)負荷量は、1985年と比較してそれぞれ56%、42%、51%にまで低下した。このことから、人為的な流入負荷削減に伴いBPは低下したと考えられる。しかし、これらTOCやTP負荷量の低下率はBP低下率より小さく、他の直接的な要因も考慮する必要がある。

水質に関しては、1986年の生物化学的酸素要求量(BOD)は2016~2017年と比較して1.3倍と、BPの変動率より大幅に低く、BP変動を説明できないと考えられた。BODは易分解性有機物の指標の1つであり(Jonas, 1997)、季節によってはBODとBPに

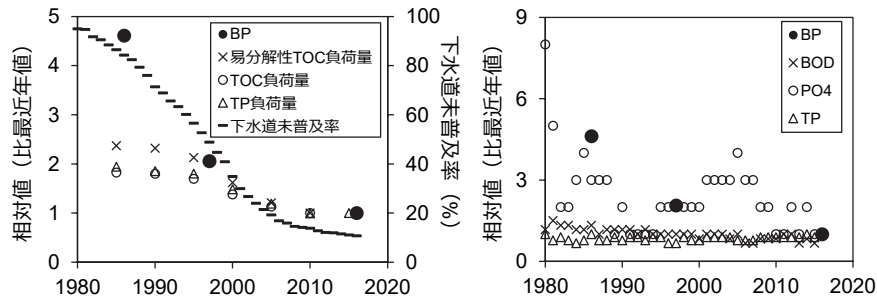


図5 琵琶湖北湖調査地点 12B(南比良沖中央)におけるバクテリア生産速度(BP), 有機物・栄養塩負荷量及び下水道未普及率(左), 水質(右)の経年変化。

図中の下水道未普及率以外は、最近年値との相対値で示している。全有機炭素(TOC)と易分解性 TOC 負荷量は佐藤ら (2016), 全リン(TP) 負荷量は滋賀県・京都府(2017), 下水道未普及率は滋賀県(2020), 生物化学的酸素要求量(BOD), PO<sub>4</sub>, TP は滋賀県(2017)より得た。

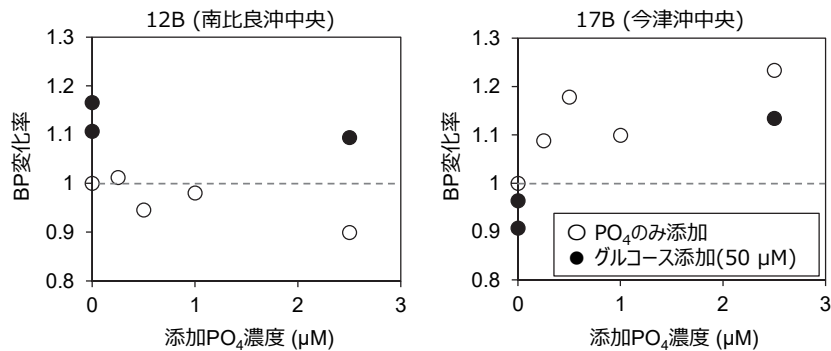


図6 琵琶湖北湖調査地点 12B(南比良沖中央, 左図), 17B(今津沖中央, 右図)における PO<sub>4</sub> 及びグルコース添加に伴うバクテリア生産速度(BP)変化率(何も添加しないコントロールを1とした)。

2018年11月に水深5mより採水し、孔径1.0-μmポリカーボネートメンブレンフィルター(Nuclepore, Whatman)で濾過後、PO<sub>4</sub>(0~2.5 μM)及びグルコース(50 μM)を添加し、現場水温、暗所下で数時間培養した。

は有意な関係があると報告されているが(Jonas and Tuttle, 1990), 本研究では有意な関係は認められなかった。

TPに減少傾向は認められなかったが、PO<sub>4</sub>濃度は明確な減少傾向が認められ、BPの減少傾向と類似した(図5)。琵琶湖ではバクテリアは強いPO<sub>4</sub>律速であることが指摘されており(Gurung and Urabe, 1999; Kishimoto and Ueno, 2011), 特に1996~1997年の栄養塩添加実験では、表層湖水のバクテリア群集はPO<sub>4</sub>添加に対して全ての実験において有意に増殖速度が増加したが、グルコースやアンモニウム添加に対する応答は全く見られなかった(Gurung and Urabe, 1999)。そこで、筆者らも2018年11月にPO<sub>4</sub>とグルコース添加に対するBPの応答を調べた(図6)。その結果、北湖北部に位置する調査地点今津沖中央(17B)ではPO<sub>4</sub>添加によってBP増加が見られたのに対し、12BではPO<sub>4</sub>添加ではBPは増加せず、グルコース添加によって増加した。このことから、12Bではリン律速ではなく炭素律速が起こっていたことが示唆された。ここで、北湖における一次生産量の長期変動を見てみると、1996~1997年の一次生産量(1.2±0.6 gC m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>; Urabe *et al.*, 2005)は、1985~1987年(0.67±0.37 gC m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>; Takahashi, *et al.* 1995), 2016~2018年(0.48±0.37 gC m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>;

今井ら, 2019)と比較して有意に高かった(Steel-Dwass's test,  $p < 0.01$ )。以上のことから、1986年は高い有機物や栄養塩の流入負荷によってBPが維持されていたが、1997~1998年には一次生産は高く保たれていたものの、流入負荷削減によってBPは強いリン制限になっていたと考えられる。2016~2017年にかけて更に生態系に変化が起こり、これまでのリン制限に加え、一次生産量の低下による炭素制限も示唆された(図6)。このように琵琶湖の生態系は年々変化を続けており、これまでの流入負荷削減などによる影響とともに、これからは気候変動による変化も予想されるため、今後も継続して琵琶湖内外の変化を捉え、注視していく必要があるだろう。

#### 4. 今後の課題・展望

我々が開発した<sup>15</sup>N-dA法はDNA抽出や酵素加水分解、LC-MS/MSによる分析などの工程が必要であり、測定にかかるバイアスは非常に低く抑えられているものの、従来法と比較して簡便かつハイスループットな分析法ではないことが普及の課題となっている。DNA抽出の工程では、FastDNA SPIN Kit for Soilなどの簡便な抽出法を用いた際には後段の酵素

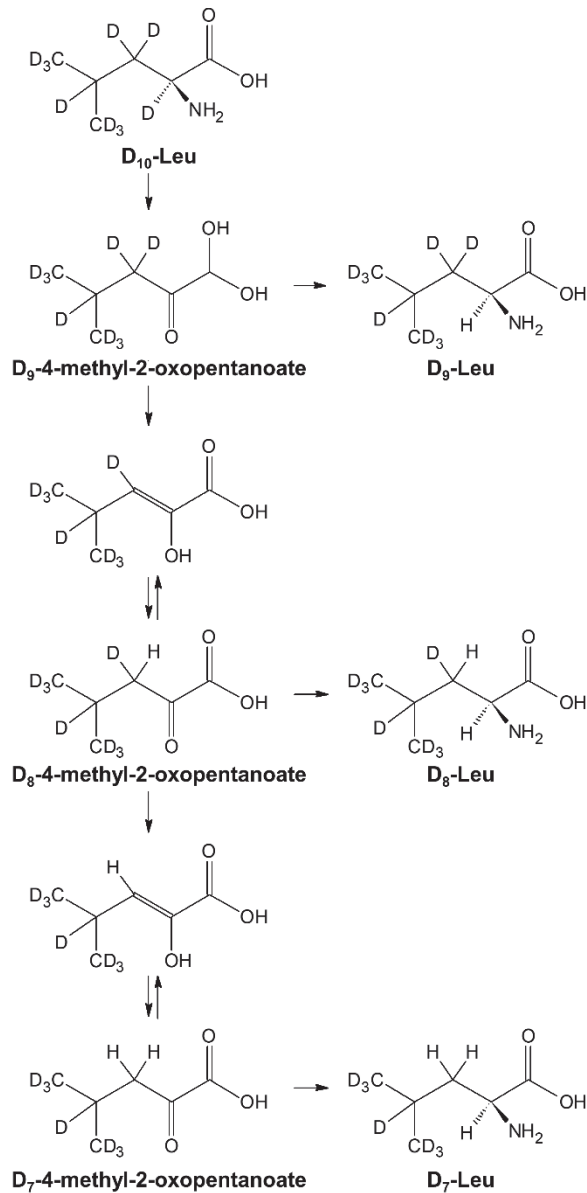


図7 D<sub>10</sub>-Leu 取り込み後の推定反応経路 (Tsuchiya *et al.* 2020c より引用)。

加水分解が阻害される可能性もあり、簡略化を行う際は慎重に手法の選定を行う必要がある。また、酵素加水分解に関しては、現在は3つの酵素を順番に添加する手法を実施しているが (Nohara *et al.* 2011)、一種類の酵素の添加だけでDNAからヌクレオシドまで分解する方法も報告されている (Quinlivan and Gregory, 2008)。我々はそのうちの1つである Benzonase について実際に湖のサンプルを用いて加水分解を試みた。しかし、Benzonase を用いたサンプルでは酵素加水分解が進まず、<sup>15</sup>N-dA は定量できなかった (土屋, 未発表)。今後、このような工程の簡略化が進めば、よりハイスループットな測定法として用いることができると考えられる。

現在筆者らはタンパク質合成速度測定法の安定同位体法を開発中である (Tsuchiya *et al.* 2020c)。この手法では、ロイシン (Leu) のアミノ基とカルボ

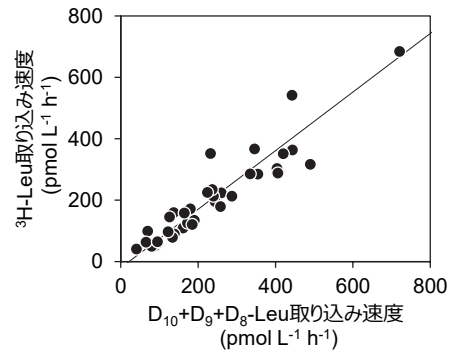


図8 D<sub>10</sub>+D<sub>9</sub>+D<sub>8</sub>-ロイシン (Leu) と <sup>3</sup>H-Leu 取り込み速度の関係。

図中の直線は Standard Major Axis (SMA) II 型直線回帰モデルを示す ( $[^3\text{H-Leu}] = 0.95 \times [\text{D}_{10} + \text{D}_9 + \text{D}_8\text{-Leu}] - 20$ ,  $n = 36$ ,  $r = 0.93$ ,  $p < 0.001$ )。 (Tsuchiya *et al.* 2020c より引用)。

キシル基を除く10個のHを安定同位体である重水素Dで標識したものをを用いる (D<sub>10</sub>-Leu, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CD CD<sub>2</sub>CD(NH<sub>2</sub>)COOH, DLM-567, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., 図7)。D<sub>10</sub>-Leu をバクテリアに取り込ませた後、6 mol L<sup>-1</sup> 塩酸 (110 °C, 20 時間) でタンパク質をアミノ酸まで分解する。その後、塩酸をロータリーエバポレーターで飛ばし、内部標準 (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-L-Leu, CLM-2262-H, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を加えた 0.3 mol L<sup>-1</sup> 塩酸に再溶解させ、最後に LC-MS/MS によって定量するという手順を経る。実際に霞ヶ浦や琵琶湖のサンプルを用いて D<sub>10</sub>-Leu 取り込み速度を測定したところ、興味深いことに D<sub>10</sub>-Leu ( $m/z$  142.10) のみならず、D<sub>9</sub>-Leu ( $m/z$  141.10) や D<sub>8</sub>-Leu ( $m/z$  140.10) も検出された。Leu は細胞内に取り込まれた後、アミノ基転移反応などにより 4-methyl-2-oxopentanoate となるが (Rudman and Meister 1953; Sanwal and Zink 1961)、その際に2位のDが外れ、D<sub>9</sub>-4-methyl-2-oxopentanoate となる (図7)。その後、アミノ基付加反応が起こり Leu に戻るときには、2位にDではなくHが付加されることにより、D<sub>9</sub>-Leu として検出されたと考えられる。また、D<sub>9</sub>-4-methyl-2-oxopentanoate の3位のDがHに置換されることにより、D<sub>8</sub>-4-methyl-2-oxopentanoate となる。これにアミノ基が付加され、再び Leu に戻ったものが D<sub>8</sub>-Leu として検出されたと考えられる。一方、D<sub>7</sub>-Leu は検出されなかった。このことから、タンパク質合成へ使用された細胞外 Leu の量は、D<sub>10</sub>、D<sub>9</sub>、D<sub>8</sub>-Leu を測定することにより、過不足なく定量できると考えられる。実際に、琵琶湖、霞ヶ浦において <sup>3</sup>H-Leu 法と D<sub>10</sub>-Leu 法の取り込み速度を比較したところ、両者間で有意な正の相関を示すとともに、傾きもほぼ1を示した ( $[^3\text{H-Leu}] = 0.95 \times [\text{D}_{10} + \text{D}_9 + \text{D}_8\text{-Leu}] - 20$ ,  $n = 36$ ,  $r = 0.93$ ,  $p < 0.001$ ; 図8)。このことから、D<sub>10</sub>-Leu 法は <sup>3</sup>H-Leu 法の放射性同位体フリーな代替法として用いることが可能であるこ

とが示された。

一方、 $D_9$ -Leu と  $D_8$ -Leu の合計取り込み速度は、 $D_{10}$ -Leu 取り込み速度の3~19倍もの値を示した (Tsuchiya *et al.*, 2020c)。このことは、細胞外 Leu はバクテリアによって取り込まれた後、直接タンパク質合成へ利用される画分は比較的小さく ( $D_{10}$ -Leu として検出)、速やかにアミノ基転移反応が起こり、一度 4-methyl-2-oxopentanoate になった画分がタンパク質合成へ使われる割合が大きいことが本研究によって初めて明らかとなった ( $D_9$ + $D_8$ -Leu として検出)。すなわち、Leu→4-methyl-2-oxopentanoate→Leu→タンパク質という代謝回転は、単なる受動的な化学平衡反応というよりも何らかの生理学的意義があるものと考えられる。Leu は細胞内でさまざまな代謝系の基質や制御因子としても重要な役割を果たしているため、その細胞内濃度は適正に制御されている必要がある。そのため、上述した反応は細胞外から取り込んだ過剰な Leu を 4-methyl-2-oxopentanoate の形でプールし、必要に応じて Leu に再生して利用していた可能性が考えられる。このような代謝反応が生理学的、生態学的にどのような意味をもつのか、今後の研究が待たれる。

## 謝 辞

本研究は JSPS 科研(2550019, 15K21449, JP17K12814, JP17J11577)、環境省及び(独)環境再生保全機構環境研究総合推進費(5-1607)、地方創生交付金共同研究「健全な水環境保全のための水質・湖底環境に関する研究」、笹川研究科学助成(25-716)の助成を受けたものである。琵琶湖における調査では京都大学生態学研究センターの研究船「はす」、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの研究船「びわかぜ」を利用した。ここに記して謝意を表する。

## 引用文献

Azam, F. (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science*, 280, 694–696. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.694>

Brittain, A. M. and Karl, D. M. (1990) Catabolism of tritiated-thymidine by aquatic microbial communities and incorporation of tritium into rna and protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1245–1254. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.5>

Chin-Leo, G. and Kirchman, D. L. (1990) Unbalanced growth in natural assemblages of marine bacterioplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 63, 1–8. <https://doi.org/10.3354/meps063001>

Ducklow, H. W. and Carlson, C. A. (1992) Oceanic bacterial production. *Advances in Microbial Ecology*, 12, 113–181. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7609-5_3)

7609-5\_3

Fuhrman, J. A. and Azam, F. (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of british columbia, antarctica, and california. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 1085–1095. <https://doi.org/10.1128/AEM.39.6.1085-1095.1980>

Fuhrman, J. A. and Azam, F. (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Marine Biology*, 66, 109–120. <https://doi.org/10.1007/Bf00397184>

Gurung, T. B., Nakanishi, M. and Urabe, J. (2000) Seasonal and vertical difference in negative and positive effects of grazers on heterotrophic bacteria in Lake Biwa. *Limnology and Oceanography*, 45, 1689–1696. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1689>

Gurung, T. B. and Urabe, J. (1999) Temporal and vertical difference in factors limiting growth rate of heterotrophic bacteria in Lake Biwa. *Microbial Ecology*, 38, 136–145. <https://doi.org/10.1007/s002489900167>

Hamasaki, K., Taniguchi, A., Tada, Y., Kaneko, R. and Miki, T. (2016) Active populations of rare microbes in oceanic environments as revealed by bromodeoxyuridine incorporation and 454 tag sequencing. *Gene*, 576, 650–656. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.016>

Hansell, D. A., Carlson, C. A., Repeta, D. J. and Schlitzer, R. (2009) Dissolved organic matter in the ocean: A controversy stimulates new insights. *Oceanography*, 22, 202–211.

Hsieh, C. H., Ishikawa, K., Sakai, Y., Ishikawa, T., Ichise, S., Yamamoto, Y., Kuo, T. C., Park, H. D., Yamamura, N. and Kumagai, M. (2010) Phytoplankton community reorganization driven by eutrophication and warming in Lake Biwa. *Aquatic Sciences*, 72, 467–483. <https://doi.org/10.1007/s00027-010-0149-4>

今井章雄・富岡典子・小松一弘・佐野友春・土屋健司・廣瀬佳則・尾原禎幸(2019)細菌生産の定量的解析, 55–75. 早川和秀(編), 琵琶湖における有機物収支の把握に関する研究.

Jonas, R. B. (1997) Bacteria, dissolved organics and oxygen consumption in salinity stratified chesapeake bay, an Anoxia Paradigm1. *American Zoologist*, 37, 612–620. <https://doi.org/10.1093/icb/37.6.612>

Jonas, R. B. and Tuttle, J. H. (1990) Bacterioplankton and organic carbon dynamics in the lower mesohaline chesapeake bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 747–757. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.4.747-757.1990>



- doi.org/10.1128/AEM.56.3.747-757.1990
- Kawasaki, N., Komatsu, K., Kohzu, A., Tomioka, N., Shinohara, R., Satou, T., Watanabe, F. N., Tada, Y., Hamasaki, K., Kushairi, M. R. and Imai, A. (2013) Bacterial contribution to dissolved organic matter in eutrophic Lake Kasumigaura, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 7160–7168. <https://doi.org/10.1128/AEM.01504-13>
- Kirchman, D., Knees, E. and Hodson, R. (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein-synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 599–607. <https://doi.org/10.1128/Aem.49.3.599-607.1985>
- Kirchman, D. L. (1992) Incorporation of thymidine and leucine in the subarctic Pacific: application to estimating bacterial production. *Marine Ecology Progress Series*, 82, 301–309. <https://doi.org/10.3354/meps082301>
- Kirchman, D. L. (1993) Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria, 509–512. In: P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr and J. J. Cole (eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. <https://doi.org/10.1201/9780203752746-59>
- Kishimoto, N. and Ueno, K. (2011) Influence of phosphorus concentration on the biodegradation of dissolved organic matter in Lake Biwa, Japan. *Journal of Water and Environment Technology*, 9, 215–223. <https://doi.org/10.2965/jwet.2011.215>
- Kishimoto, N., Ichise, S., Suzuki, K. and Yamamoto, C. (2013) Analysis of long-term variation in phytoplankton biovolume in the northern basin of Lake Biwa, *Limnology*, 14, 117–128. <https://doi.org/10.1007/s10201-012-0390-8>
- Lee, S. and Fuhrman, J. A. (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1298–1303. <https://doi.org/10.1128/Aem.53.6.1298-1303.1987>
- Malayil, L., Ramachandran, P., Chattopadhyay, S., Cagle, R., Hittle, L., Ottesen, A., Mongodin, E. F. and Sapkota, A. R. (2020) Metabolically-active bacteria in reclaimed water and ponds revealed using bromodeoxyuridine DNA labeling coupled with 16S rRNA and shotgun sequencing. *Water Research*, 184, 116185. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116185>
- Nagata, T. (1987) Production rate of planktonic bacteria in the north basin of lake biwa, Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2872–2882. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.12.2872-2882>
- 1987
- Nohara, K., Baba, T., Murai, H., Kobayashi, Y., Suzuki, T., Tateishi, Y., Matsumoto, M., Nishimura, N. and Sano, T. (2011) Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner, *Archives of Toxicology*, 85, 653–661. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0611-z>
- Quinlivan, E. P. and Gregory, J. F., 3rd. (2008) DNA digestion to deoxyribonucleoside: a simplified one-step procedure. *Analytical Biochemistry*, 373, 383–385. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.031>
- Ram, A. S. P., Nishimura, Y., Tomaru, Y., Nagasaki, K. and Nagata, T. (2010) Seasonal variation in viral-induced mortality of bacterioplankton in the water column of a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquatic Microbial Ecology*, 58, 249–259. <https://doi.org/10.3354/ame01381>
- Rudman, D. and Meister, A. (1953) Transamination in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 200, 591–604.
- Sanwal, B. D. and Zink, M. W. (1961) L-Leucine dehydrogenase of *Bacillus cereus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 94, 430–435. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90070-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90070-4)
- 佐藤祐一・岡本高弘・早川和秀・大久保卓也・小松英司(2016)琵琶湖における難分解性有機物の起源：発生源における生分解試験とボックスモデルによる推計。水環境学会誌, 39, 17–28. <https://doi.org/10.2965/jswe.39.17>
- 滋賀県(2017)琵琶湖環境白書, p.11–78. <https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/4016451.pdf>(2019年2月1日確認)
- 滋賀県・京都府(2017)第7期琵琶湖に係る湖沼水質保全計画, p.1–36. <https://www.env.go.jp/water/Biwa-7.pdf>(2018年6月1日確認)
- Simon, M. and Azam, F. (1989) Protein-content and protein-synthesis rates of planktonic marine-bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 51, 201–213. <https://doi.org/10.3354/meps051201>
- Smith, D. C. and Azam, F. (1992) A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Marine Microbial Food Webs*, 6, 107–114. <http://www.gso.uri.edu/dcsmith/page3/page19/assets/smithazam92.PDF>
- Steward, G. F. and Azam, F. (1999) Bromodeoxyuridine as an alternative to 3H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 57–66. <https://doi.org/10.3354/ame019057>
- Tada, Y., Taniguchi, A. and Hamasaki, K. (2010) Phylotype-specific growth rates of marine

- bacteria measured by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Aquatic Microbial Ecology*, 59, 229–238. <https://doi.org/10.3354/ame01412>
- Tada, Y. and Grossart, H.-P. (2014) Community shifts of actively growing lake bacteria after N-acetylglucosamine addition: improving the BrdU-FACS method. *The ISME Journal*, 8, 441. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013>
- Takahashi, M., Hama, T., Matsunaga, K. and Handa, N. (1995) Photosynthetic Organic-Carbon Production and Respiratory Organic-Carbon Consumption in the Trophogenic Layer of Lake Biwa. *Journal of Plankton Research*, 17, 1017–1025. <https://doi.org/10.1093/plankt/17.5.1017>
- Tinta, T., Christiansen, L. S., Konrad, A., Liberles, D. A., Turk, V., Munch-Petersen, B., Piskur, J. and Clausen, A. R. (2012) Deoxyribonucleoside kinases in two aquatic bacteria with high specificity for thymidine and deoxyadenosine. *FEMS Microbiology Letters*, 331, 120–127. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02565.x>
- Tsuchiya, K., Sano, T., Kawasaki, N., Fukuda, H., Tomioka, N., Hamasaki, K., Tada, Y., Shimode, S., Toda, T. and Imai, A. (2015) New radioisotope-free method for measuring bacterial production using [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-2'-deoxyadenosine and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) in aquatic environments. *Journal of Oceanography*, 71, 675–683. <https://doi.org/10.1007/s10872-015-0310-8>
- Tsuchiya, K., Tomioka, N., Sano, T., Kohzu, A., Komatsu, K., Imai, A., Hayakawa, K., Nagata, T., Okamoto, T. and Hirose, Y. (2020a) Decrease in bacterial production over the past three decades in the north basin of Lake Biwa, Japan. *Limnology*, 21, 87–96. <https://doi.org/10.1007/s10201-019-00582-2>
- Tsuchiya, K., Sano, T., Tomioka, N., Kohzu, A., Komatsu, K., Shinohara, R., Shimode, S., Toda, T. and Imai, A. (2020b) Incorporation characteristics of exogenous <sup>15</sup>N-labeled thymidine, deoxyadenosine, deoxyguanosine and deoxycytidine into bacterial DNA. *PloS One*, 15, e0229740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229740>
- Tsuchiya, K., Sano, T., Tomioka, N., Komatsu, K., Imai, A., Hayakawa, K., Nagata, T., Okamoto, T. Kuwahara, V. S. and Kohzu, A. (2020c) Novel method for measuring aquatic bacterial productivity using D10-leucine based on protein synthesis rate. *Aquatic Microbial Ecology*, 85, 121–129. <https://doi.org/10.3354/ame01945>
- Urabe, J., Yoshida, T., Gurung, T. B., Sekino, T., Tsugeki, N., Nozaki, K., Maruo, M., Nakayama, E. and Nakanishi, M. (2005) The production-to-respiration ratio and its implication in Lake Biwa, Japan. *Ecological Research*, 20, 367–375. <https://doi.org/10.1007/s11284-005-0052-y>
- Watanabe, Y. (1996) Limiting factors for bacterioplankton production in mesotrophic and hypereutrophic lakes: estimation by (3H) thymidine incorporation. *Japanese Journal of Limnology (Rikusuigaku Zasshi)*, 57, 107–117. <https://doi.org/10.3739/rikusui.57.107>
- Wylie, J. L. and Currie, D. J. (1991) The relative importance of bacteria and algae as food sources for Crustacean Zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 36, 708–728. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.4.0708>



土屋 健司 / Kenji TSUCHIYA

1986年広島県生まれ。2014年創価大学大学院工学研究科環境共生工学専攻博士後期課程修了。博士(工学)。専門は水圏生態学, 生物地球化学。創価大学助教, JSPS特別研究員PDを経て, 2020年4月より国立環境研究所特別研究員。相模湾や霞ヶ浦, 琵琶湖などのフィールドにおいて植物プランクトンやバクテリアなどの低次栄養段階生物群集の生産生態に関する研究を実施してきた。また, 湖沼の底生動物や河床のバイオフィームなど, 陸水の底生環境を通じた物質循環に着目した研究も進めている。