

令和元年6月20日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12576

研究課題名(和文) 暗黒海である海洋中・深層水中の微生物群集の増殖および代謝活性現場測定法の開発

研究課題名(英文) Development of in situ measurement system for growth and metabolic activity of microbial community in deep ocean

研究代表者

内海 真生 (UTSUMI, MOTOO)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60323250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、申請者が開発した海洋中・深層で使用可能な現場微生物培養機を用い、低温、高圧環境の暗黒海である水深200 m以深水中の微生物群集の生物生産活性について現場培養から定量評価する手法を開発する目的で行った。

研究期間中の調査航海に乗船し、現場培養機を用いた海洋中・深層での現場培養実験とニスキン採水器で同水深から採取した現場水の船上培養を実施した。その結果、船上培養と現場培養では水深が増加するにつれて微生物群集の生物生産活性が異なっており、船上培養から得られる結果は実水深の微生物生産活性よりも大きな値となっていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現場培養機を用いた実水深での微生物群集の生物生産活性測定から、従来の中・深層海水を採取後船上培養することで得ていた微生物の生物生産活性は炭素代謝を過大評価している可能性が極めて高いと言える。圧力の減少は中・深層の微生物群集の生物活性を刺激するとも言え、大気圧下で行われた結果をもとに推定されている炭素需要について、特に深層で見直す必要があることを支持するものである。

研究成果の概要(英文)：Prokaryotic heterotrophic production is a key process in the ocean's biological carbon cycle. About 50% of this production takes place in the dark ocean characterized by low temperature and high hydrostatic pressure. However, activity measurements of prokaryotic heterotrophic production are usually performed under atmospheric pressure conditions. The main aim of this study is to understand prokaryotic activity and metabolism under in situ hydrostatic pressure in the dark ocean. The main aim includes that determining the difference of deep-sea prokaryotic activity under in situ hydrostatic pressure and atmospheric pressure conditions to understand the effect of hydrostatic pressure on prokaryotic heterotrophic production. As a result, prokaryotic heterotrophic production under in situ pressure was generally lower than under atmospheric pressure condition, suggesting that incubation under atmospheric pressure on board stimulates activity of dark ocean prokaryotes.

研究分野：水圏環境工学

キーワード：生物海洋 微生物群集生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子情報による微生物群集構造解析や加速器質量分析計を用いた微生物膜脂質組成研究から、古細菌群集が海洋に普遍的に存在すること、特に、有光層以深の中・深層で微生物群集の中で占める割合が増加すること、その多くが独立栄養性を有し活性も高い可能性があること、ある種の溶存態有機炭素の回転時間が海洋中層で非常に短いこと、が示され、有光層下の微生物活性の定量化は世界的に関心の高いテーマとなっている。

これまでの海洋微生物群集の増殖および代謝活性測定研究で用いられてきた手法は、大気圧下の地上とは大きく環境条件の異なる水深で採取した海水サンプルを一度研究調査船上まで持ち帰り、その後船上の実験室において各種の培養・分析に使用し解析するものであった(図1)。これらの研究方法には、(1) 特定水深の海水を採取してから、船上での分注・培養実験に用いるまでに輸送や船上処理に長い時間が必要で、採取してからの時間経過と共に現場環境との乖離やサンプルボトル内での二次的な環境形成が生じる、(2) 採取した現場環境とかけ離れた環境下(水圧、水温、各種ガス圧、他)での培養や実験となる、(3) 現場環境と大きく異なる大気圧環境での培養では増殖できる微生物個体群の割合は本来のものと比較して低い可能性が高い、等の問題点が存在し、現場環境での微生物群集の様々な活動を定量的に評価出来ていると考えることは難しい。

海洋中・深層で直接微生物の増殖や活性測定を行うことは、変化に乏しく海洋炭素循環にもあまり寄与していないと考えられてきた暗黒海の物質循環を再考する大きな契機となる重要な課題である。なぜなら、海洋の平均水深はおよそ3,800 mであり、有光層(水深200 m程度)下の中層や深層がその大部分の容積を占めるからである。この膨大な容積を持つ光の届かない海水層、暗黒海を対象とした研究の積極的な推進と知見の蓄積が現在、社会的にも強く求められている。

暗黒海とされる海洋中・深層の微生物研究に関して、これまで現場での微生物群集の増殖や各種生物活性を直接測定する目的で行われたものは世界的に見てほとんど例がない。暗黒海で直接微生物の増殖や生物活性の測定を行うことは、変化に乏しく海洋炭素循環にもあまり寄与していないと考えられてきた海洋中・深層の物質循環を再考する糸口になる。また、こうした現場培養や測定手法の構築は、海洋遺伝子資源探索と遺伝子資源の確保・保全にも寄与することに繋がる。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が作成した耐圧性を持つ海水採水機 ROCS (Rotary Clean SeaWater Sampler) の時系列自動採水機能を活用した海洋中・深層で使用可能な現場微生物培養装置を用い、暗黒海 (dark sea) である海洋有光層下(水深200 m以深)水中の微生物群集の増殖速度や増殖特性について直接現場培養から定量評価することを目的に行った。また、独創的は ROCS 現場培養機を用い海洋の大部分を占める暗黒海の各種微生物群集の増殖速度や物質代謝速度の測定を試みるため、低温、高圧下で使用可能な本培養機の改良も同時並行的に実施し、暗黒海洋水中の微生物群集の増殖および代謝特性を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) ROCS 現場培養機の改良

研究期間中の現場実験状況をもとに ROCS 現場培養機に対して適宜改良を行った(図2)。具体的には、現場水深海水を培養槽へ採水導入するのに要する時間短縮のための採水ラインの最適化、

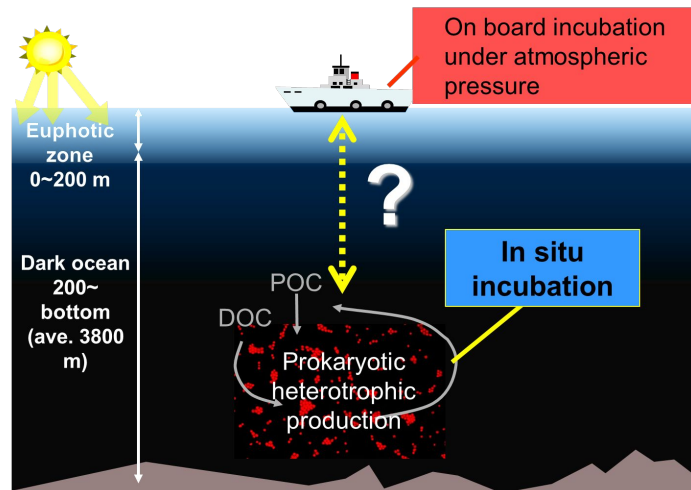


図1. 大気圧下で行う船上培養による微生物群集の生物生産活性測定は高圧環境にある現場水深で実際に行っていることを正確に反映しているのか。



図2. ロゼッタ採水装置上に設置された ROCS 現場培養機。

培養用基質添加ならびに培養開始までに要する時間短縮のための配水ラインの最適化、調査船を利用した実験の際要求される半日での実験完了に対応する短時間現場培養を可能とする培養槽および採水筒の小型化、
 である。また、世界的なりチウム電池の供給難、ならびに空輸等の制限に対応するため、アルカリ電池型のバッテリーユニット、および
 一回の調査航海で複数回実験を行う場合に必要になる再充電可能な小型リチウムイオン電池バッテリーおよびマルチの電圧に対応する充電装置、
 を作成した。さらに現場培養実験を実施した際に判明した、
 培養槽である採水ボトル内の添加基質の不均質混合を解消するための改良、
 培養試料採取時に懸念された採水ラインリーク防止に関する改良、
 も行った。

(2) 現場培養実験

ROCS 現場培養機を用いた海洋中・深層（水深 10 - 3,800 m）での現場培養実験、および比較対象のためのニスキン採水器で同水深から採取した現場水の船上培養実験を、H28 年度は北大西洋および太平洋にて、H29 年度はカリブ海および南大洋にて、H30 年度は北大西洋および南・中大西洋にて実施した。

4. 研究成果

(1) ROCS 現場培養機の改良

低温、高圧環境となる暗黒海である中・深層（深海）環境での現場培養機の運転は、表層環境での機器運転とは異なり、様々なささいな事項でも正常運転の障害となり得ることが 3 年の研究期間で改めて判明した。特に低温環境下での電気系統の保守には細心の注意が必要で、船上や表層水中での運転では問題が生じない場合でも、中・深層での運転では不具合が発生することを複数回確認し、電源系統のコネクタ類やケーブル類の日常的な保守点検、早めの交換、などが中・深層での装置運転に必要不可欠である。

現場培養を行う際に最も重要な構成要素となる培養槽とその周辺構造に関しては 3 年間の研究から、培養槽についてはビニールバッグ、ポリカーボネート製採水筒をそれぞれ目的に応じて使用することで得られる結果が安定すること、採水ラインなどの設計を最短化することで現場培養後の試料採取を安定的に行えることが確認された。

さらに、様々な海域で現場培養機を稼働させるために、3 年の研究期間で複数の電源（電池）に対応する改良を行ったことで、調査船を用いた現場培養実験を速やかに行うことが可能なノウハウを蓄積することが出来た。

(2) 現場培養実験

暗黒海である海洋中・深層中の微生物群集構造に関しては、近年分子生物学的研究手法が発展したこともあり様々な新規知見が集積しつつある。しかしながら、中・深層に生息する微生物群集の増殖や代謝活性に特に水深が深くなるにつれ増加する圧力がどのように影響を与えるかについては依然としてほとんど明らかになっていない。

3 年間にわたり複数回の船上培養実験と現場培養実験で ROCS 現場培養機を用いた現場水深での微生物群集の生物生産活性を測定し、それを通常の大気圧条件下での生物生産活性と比較した結果、水深が増加するにつれて微生物（細菌）群集の生物生産活性の違いが拡大しており、船上培養から得られる活性は現場の微生物群集生物生産活性よりも大きな値になることがほぼ間違いのないことが判明した（図 3）。この結果は、現場の高圧環境から大気圧となる船上環境への減圧が深海微生物群集の生物生産活性を刺激することを示すものと言える。従って、これまで深海から採取した水試料を大気圧下にある船上培養を行って測定された伝統的な微生物群集生物生産活性は、特に海洋深層における炭素需要について過大評価していることを示唆している。

さらに、予察的に実施した分子生物学的手法を用いた微生物群集解析から、中・深層から採取し船上培養を行った培養海水中には、大気圧環境下で微生物群集生物生産の増加に大きく寄

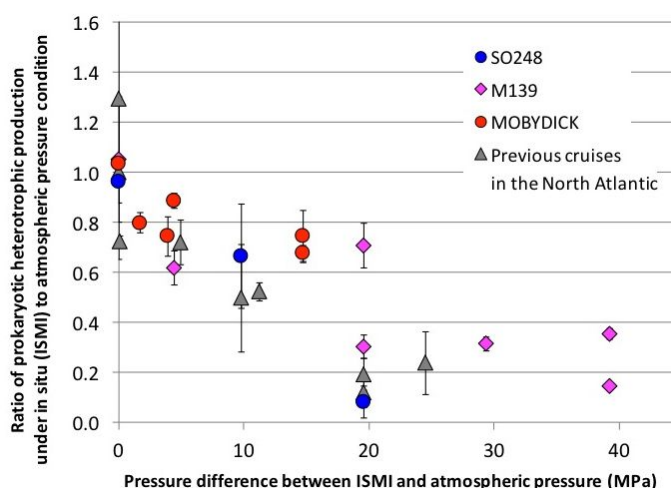


図 3. 現場水深での従属栄養微生物群集の生物生産と同一水深海水の船上培養での生物生産の比較。SO248：太平洋調査、M139：カリブ海大西洋調査、MOBYDICK：南大洋調査、での結果を示す。

与しているような高活性微生物はほとんど存在しないことが明らかとなった。表層海水試料を人工的な加圧環境下で培養した結果から、圧力環境下では表層海水中の微生物群集の生物生産活性が著しく減少させることも明らかとなった。また、中・深層で活性の高い微生物群に関する情報も得ることに成功した。

以上3年間の研究から、ROCS 現場培養機を世界の様々な海域や調査船を用いた暗黒海である中深層の微生物群集の生物生産や代謝活性測定に用いるための基本的な手法構築、ならびに調査船を用いた現場培養実験を速やかに行えるノウハウを蓄積することが出来た。海洋中・深層の微生物群集による生物生産活性の定量的評価は、地球規模での炭素循環の定量化に必要不可欠な項目であり、本研究で開発されつつある現場培養による実水深での活性の定量的測定手法は、炭素循環の不正確性の縮減と定量性の信頼度を上げるために大きな貢献をする可能性を秘めたものであると言える。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

Amano-Sato Chie, Sintés Eva, Reinthaler Thomas, Utsumi Motoo, Gerhard J. Hernd.
Reduced prokaryotic heterotrophic production at in situ pressure conditions in the dark ocean. European Geosciences Union (EGU) General Assembly, 2017.

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：天野（佐藤）千恵

ローマ字氏名：(AMANO-SATO, chie)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。