

令和元年6月12日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14962

研究課題名(和文) 海洋生物生産の支配因子リンは微生物群の還元により変動しているか

研究課題名(英文) Does an essential element "phosphorus" in oceanic waters vary with microbial reduction?

研究代表者

山口 晴生 (YAMAGUCHI, Haruo)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・准教授

研究者番号：10432816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海水中に含まれる各種リンの定量的検出系を確立し、それを用いて未だ知られていない微生物学的リン酸還元現象を明らかにすることに挑んだ。各種リンを核磁気共鳴(NMR)によって検出可能な諸条件について検討し、さらに内部標準化合物を選抜・導入することで、海水に溶存する正リン酸、亜リン酸などの酸化型・還元型リン化合物を定量的に網羅検出することが可能となった。最終的な目的としていた微生物学的リン酸還元の有意性を示し、そのプロセスを担う微生物種を分離するには至らなかったものの、多様な酸化型・還元型リンを利用可能な海洋微生物種を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋生物生産の制御因子リンの動態を解明にすることは、それと連動する生物生産の機構を考える上で極めて重要である。本研究では、新しいツールと組み合わせた核磁気共鳴解析法を確立し、それにより多様な物質とともに存在する各種リン化合物を個別に抽出することなく、網羅的かつ定量的に把握可能とした。これによりリンの酸化・還元を担う微生物の探索が可能となり、多様なリン化合物を利用可能な海洋微生物種をあらたに見出すことができた。今後、海洋におけるリンの動態についての理解を果たし、海洋生物生産の機構解明それに基づいた制御法の開発に貢献できる点で、本研究で得られた成果は学術的かつ社会的に意義深い。

研究成果の概要(英文)：This study established a quantitative method for various phosphorus compounds in seawaters, and thereby, challenged to reveal a microbial phosphate reduction in marine environments. Our method based on NMR (nuclear magnetic resonance) is capable of detecting orthophosphate, phosphite, and other phosphorus compounds in seawaters. By using an internal standard in the method, we succeeded to quantify those compounds and obtain the marine microorganisms able to utilize the oxidized/reduced phosphorus compounds for their growth. Unfortunately, no microorganism which is able to reduce orthophosphate was isolated; however, this study found a possibility that microbial phosphate reduction would potentially occur in the environments. Our results contribute to an understanding of the marine phosphorus cycle associated with microbial phosphorus redox in seawaters.

研究分野：水圏微生物生態学

キーワード：海洋 リン酸 酸化 還元 微生物

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

1. 研究開始当初の背景

海洋の生物生産を左右する主要元素の一つはリンであり、そのなかでカギ的役割を果たすのは完全酸化型の正リン酸であると言われてきた。しかし近年、正リン酸の還元型である亜リン酸化合物が海洋より見つかっている。このうち亜リン酸メチルは、強力な温室効果ガスの一つメタンの前駆体として重要視されている。また、亜リン酸化合物を利用可能な海洋微生物も見出され、ごく最近、その生物利用性が微生物種によって異なることも報告された。これらを受け、海洋生物生産・地球気候変動を理解する上で、正リン酸のみならず各種リン酸の挙動を解明することが重要となりつつある。

研究代表者のグループは、海洋において還元型リンが生成されるプロセスの一つとして、微生物学的リン酸還元の可能性を考えた。すなわち、海洋微生物のなかにはリン酸還元を行うものが存在しており、その作用により亜リン酸などの還元型リンが生成されているとする仮説を打ち立てた。

2. 研究の目的

この仮説を立証するために、本研究では、海水中の各種リン化合物を網羅的かつ定量的に検出可能な核磁気共鳴システムを開発した。それと細菌培養技術を併用することで、海洋における各種リンの変動を明らかにし、微生物学的なリン酸還元現象を見出そうとした。この目的を達成するために、以下の小課題を設定・遂行しようとした。

- (1) 海水に含まれる各種リンの検出・相対定量可能な系の新規開発
- (2) 沿岸海水・海底泥中の各種リンの分布と挙動
- (3) 微生物学的リン酸還元のポテンシャル評価、当該反応を担う微生物の分離・培養

3. 研究の方法

(1) 海水や海底泥などに含まれる各種リンをリン核磁気共鳴 (^{31}P -NMR, 以下 NMR) によって検出するには、混在する常磁性元素 (磁場を乱す鉄・コバルトなど) を効率よく除去もしくはそれらの磁場障害作用を軽減しなくてはならない。また、リン由来の NMR シグナルの検出を網羅的かつ定量的に行うためには、基準となる濃度不変の内部標準物質を検討・選定することが重要となる。本課題では、常磁性元素による磁場の乱れを効率よく軽減・除去できる手法を検討した。この軽減・除去に要する薬剤、時間、反応 pH などの諸条件を検討し、NMR 解析可能な条件を決定した。また、人工合成リン化合物に属する“塩素系リン酸トリエステル”などに着目し、これらの中でシグナルが良好なものを内部標準リンとして選定しようとした。以上の条件が整い次第、各種リン標品として、正リン酸、亜リン酸、次亜リン酸、リン酸モノエステル、リン酸ジエステルならびにホスホネートを用い、NMR で網羅同定・検出しようとした。これらの濃度を内部標準に基づいて高精度に算定可能な検量線を確立した。

(2) 高知県浦ノ内湾を中心的な調査海域とした。応募者のこれまでの調査により、浦ノ内湾底層ではしばしば酸素が欠乏し、かつリン酸塩が豊富に溶存することが判明している。この浦ノ内湾の複数定点より海底泥を採取し、先に確立した検出・定量系により、特に海底泥の間隙水試料に含まれる各種リンの分布・組成を調べようとした。

(3) 海底泥試料に電子供与体・電子受容体としてそれぞれ有機物 (グルコース) 等・正リン酸を添加し、酸素が充足・欠乏する条件下で培養した。経時的に採取した試料中の酸素濃度と正リン酸・還元態リンを定量した。正リン酸還元ポテンシャルが認められた試料を段階的に希釈し、正リン酸を含む寒天あるいは海水培地に接種した。多くの海洋細菌群が通常の寒天培地では増殖できないことを考慮し、表層に微細な凸凹画分を有する新規寒天培地も活用し、形成されたコロニーからの分離・純粋培養を試みた。これらの分離株がリン酸還元を行うかどうか、その有意性を判定し、最終的には DNA 解析に基づいて当該株の種・群を解析した。

4. 研究成果

一般的に、海水には常磁性元素が含まれており、それが NMR の磁場に“ひずみ”をもたらすことで、核磁気共鳴のシグナル検出を不可能にしてしまう。さまざまな解消法が検討されているなか、今回の研究では、ごく安価なキレーター CR11 を試料に適量添加 (試料の 40%以上) し、培養・遠心分離処理することで、リンの検出に及ぼす常磁性元素の負の影響を大幅に軽減することが可能となった。CR11 の特性を踏まえると、おそらく鉄イオンなどのカチオンが磁場をみだす主要な元素であり、それらの元素をキレーティング・除去することで、海水試料の NMR 解析が可能になったものと判断される。この手法により、ごく短時間の操作で各種リン化合物に由来する核磁気共鳴シグナルを低コストで得ることができる。多量の常磁性元素が含まれる微生物用の培地であっても、各種リンの解析が可能とみなされた。

さらに、内部標準として、天然環境に存在しない、かつ微生物の分解作用を受けにくい人工合成リン化合物を用いることで、海水に含まれる各種リン、具体的には正リン酸、亜リン酸、次亜リン酸、リン酸モノエステル、リン酸ジエステルならびにホスホネートそれぞれの検量線を得ることができた。これらキレーター・内部標準を導入した NMR 解析により、海水中に含まれる各種リン化合物を網羅的かつ定量的に検出可能な系を確立するに到った。

現状、これらのリンを個別に検出するためには、イオンクロマトグラフィーが用いられる。ただし、海水に含まれる各リン化合物を対象とする場合、混在する様々な物質の中から対象化

化合物を抽出する操作などが求められる。今回確立した方法の優れた点は、そのような抽出操作を必要とせずとも対象とする化合物を網羅的に検出・解析できることにある。唯一、感度が低いことは核磁気共鳴解析における今後解決すべき課題の一つとして残された。いずれにせよ常磁性元素を多量に含む海水培地においても各リン化合物に由来する明瞭な NMR シグナルを得ることができ、今後、微生物の培養にともなうリンの利用を解析する上で、開発した系が強力かつ有効なツールになるものと期待される。得られた成果は、順次論文として発表していく予定である。

当該系により沿岸海域におけるリンの網羅的・定量的解析を実施しようとした。いくつかの試料で正リン酸に由来する NMR シグナルを得ることができたものの、亜リン酸塩などの還元型リンの同シグナルを得ることはできなかった。これは、後者のリン化合物の濃度がきわめて低いこと、あるいは常磁性元素と結合していることで、NMR での検出が困難であったことを示唆しているのかもしれない。また、多くの試料で NMR シグナルを得ることが困難であったことを踏まえると、先の試験では検討できなかった何らかの元素・要素による磁場障害が引き起こされているものと推測された。今後、その障害解消を図ることが課題として残された。

調査海域より得られた試料を培養することで、リン酸還元の可能性について検証しようとした。ここでは、電子供与体/電子受容体を自在に変更可能な海水培地を開発し、正リン酸が推定唯一の電子受容体として存在する培地にて細菌の増殖を見出すことができた。これを受けて、リン酸還元のパテンシャルについて検討したところ、ごく一部の試料において還元型リンに由来すると思われる NMR シグナルをわずかに得ることができた。これを受けて、沿岸域においてはリン酸還元がポテンシャルとして引き起こされるのではないかと推測された。ただし、その還元が有意なものであることを示すことはできず、また化学的・生物学的な作用で引き起こされるかについても判断できなかった。そこで、該当試料より細菌の分離を試み、正リン酸を推定電子受容体とする培地で培養したところ、細菌の増殖を見出すことができた。ただし、NMR 解析では、還元型リンの明瞭なシグナルを得ることができなかった。今後、検出系の感度を高めるとともに、より多くの試料を試験対象にすることで、微生物学的リン酸還元を検討していく。

この一連の試験に関連して、さまざまなリン化合物の利用能試験を実施した結果、代表者が分離した海洋遍在細菌 (Yamaguchi et al. International Biodeterioration & Biodegradation 2016) あるいは他供試した細菌の培養株が酸化・還元型のリンを増殖に利用できることが判明した。その中には、様々な酸化型リンのみならず化学的に極めて安定とされる有機態の還元型リン化合物をも酸化利用可能な微生物種も数多く存在することが明らかとなった。本試験の結果を踏まえると、おそらく海洋ではリンの還元よりも酸化が(解析可能なレベルで)活発に行われているのではないかと考えられる。これらの知見は、リンの循環機構の全容理解を果たす上で極めて重要な位置づけにあると判断される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 在間雅輝, 山口晴生, 足立真佐雄, 浅原時泰, 西脇永敏. 栄養塩欠乏に対する海洋微生物の増殖生理応答に関する研究. 海水に含まれる正リン酸の迅速定量法の確立. 平成 29 年度日本水産学会春季大会 (東京海洋大学), 2017 年.
- (2) Masaki Zaima, Haruo Yamaguchi, Ryoko Kuramatsu, Mika Minamida, Miki Seki, Masao Adachi, Yuji Tomaru, Haruyasu Asahara and Nagatoshi Nishiwaki. Selective utilization of inorganic and organic phosphorus compounds by the bloom forming diatom *Chaetoceros tenuissimus*: new approach using a modified quantitative ³¹P-NMR. International Symposium "Fisheries Science for Future Generations" The Japanese Society of Fisheries Science (Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan), 2017.
- (3) 在間雅輝, 山口晴生, 浅原時泰, 西脇永敏, 南田美佳, 関 美樹, 足立真佐雄. 栄養塩欠乏に対する海洋微生物の増殖生理応答に関する研究. 海水培地に含まれる各種リンの網羅・定量的検出法の確立. 平成 28 年度日本水産学会秋季大会 (近畿大学), 2016 年.
- (4) 山口晴生, 倉松涼子, 在間雅輝, 浅原時泰, 西脇永敏, 足立真佐雄. 栄養塩欠乏に対する海洋微生物の増殖生理応答に関する研究. 海産珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* の選択的リン利用能. 平成 28 年度日本水産学会秋季大会 (近畿大学), 2016 年.

〔その他〕

ホームページ等

水族環境学研究室 (水質汚濁, 赤潮, 魚毒性中毒・貝毒, バイオ燃料)
<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~yharuo/laques/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西脇 永敏
ローマ字氏名：NISHIWAKI, Nagatoshi
所属研究機関名：高知工科大学
部局名：環境理工学群
職名：教授
研究者番号(8桁)：30237763

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浅原 時泰
ローマ字氏名：ASAHARA, Haruyasu
研究協力者氏名：林 芳弘
ローマ字氏名：HAYASHI, Yoshihiro
研究協力者氏名：鈴木 怜
ローマ字氏名：SUZUKI, Satoshi
研究協力者氏名：山本 博文
ローマ字氏名：YAMAMOTO, Hirofumi

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。