

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19861

研究課題名（和文） $^{14}\text{C}$ 同位体を用いた海洋古細菌による化学合成代謝による炭素固定量算出手法の開発

研究課題名（英文）Estimating carbon assimilation rates of marine archaea using natural-level radiocarbon.

研究代表者

内田 昌男（Masao, Uchida）

国立研究開発法人国立環境研究所・地球システム領域・主幹研究員

研究者番号：50344289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、化学合成独立栄養海洋古細菌（クレンアーキオータ）の $\text{CO}_2$ 固定量を算出するための手法開発を行った。新規に開発したベイジアン統計によるマルコフ連鎖モンテカルロ法(MCMC)マスマルコフ連鎖モデルにGDGTs, DOC, PIC, DICの同位体データを入力値として計算を行い、駿河湾(400m水深)採取のクレンアーキオータの約4割が、化学合成独立栄養代謝である結果を得た。さらにクレンアーキオータの細胞密度18-63 (fgC/cell)の現場観測値と化学合成独立栄養代謝の比率から、炭素固定量の年間フラックスは、 $2.9\text{E}+06$  (gC/km<sup>3</sup>/yr)を算出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、海洋古細菌による炭素利用の定量化に関連し、炭素に関する微生物の代謝比率（化学合成独立栄養、従属栄養）試算のため、地球化学、微生物生態学学的アプローチによる実験的な検討を行った。本研究により開発された技術は、様々な環境未培養微生物の代謝情報推定研究へ応用が可能であり、微生物生態学、炭素循環研究などの研究分野において、強力なツールとなるであろう。特に炭素循環における微生物ループの役割に関する定量的な理解を大いに進展させるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method to calculate the metabolic rate of chemotrophic autotroph metabolism ( $\text{CO}_2$  assimilation) by marine microorganisms, especially marine archaea, using natural-level radiocarbon isotopes of cell membrane lipids as tracers. In this study, we performed calculations using GDGTs, DOC, POC, and DIC isotope data as input values in a newly developed Markov chain Monte Carlo (MCMC) mass balance model with Bayesian statistics, and obtained a result that the proportion of chemosynthetic nutrient metabolism ( $\text{CO}_2$ ) of marine archaea in Suruga Bay is approximately 40%. The results showed that the proportion of chemotrophic autotroph metabolism ( $\text{CO}_2$ ) in marine archaea in Suruga Bay is approximately 40%. Furthermore, the annual flux of carbon fixation was calculated to be  $2.9\text{E}+06$  (gC/km<sup>3</sup>/yr) based on the cell density of Crenarchaeota (18-63 fgC/cell) at the depth of 400-700 m in Suruga Bay and the ratio of carbon assimilation by chemotrophic autotroph of Crenarchaeota.

研究分野：地球化学

キーワード：放射性炭素 古細菌 GDGTs 化学合成独立栄養代謝 駿河湾 炭素循環 ベイズ統計マルコフ連鎖モンテカルロ法 セルソーター

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学的手法を用いた海洋微生物学的研究の進歩から、非熱水性の海洋古細菌が海洋全層に分布しており、それらの古細菌が光合成非依存の化学合成 独立栄養を高い活性で行っていることが遺伝子的 (定性的) に示唆されるようになった (Karner et al. 2001)。また、これまで文献値を用いた試算からは、化学合成に關与する海洋古細菌の年間収支は、有光層における光合成量に匹敵する計算がなされているが (Hansman et al. 2009)、未だその実態は未解明である。本研究では、これら海洋古細菌の代謝 特性を地球化学的手法と微生物生態学的手法を用いて定量的に明らかにすることを目標とする。本研究により得られる知見は、微生物による海洋炭素循環の定量的解明に資する手法開発であり、海洋微生物ループおよび海洋炭素循環に関する定量的知見を提供することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、海洋微生物、特に海洋古細菌の細胞膜脂質の自然レベル放射性炭素同位体をトレーサーに用いた、海洋微生物による化学合成代謝の代謝量 (CO<sub>2</sub> 固定量) を算出するための手法開発を行う。本研究では、海水実試料から様々な方法を検討して、微生物試料を大量濃縮する。海洋古細菌のバイオマスから抽出した細胞膜脂質分子 (GDGTs) の炭素安定同位体比 (<sup>13</sup>C) と放射性炭素 (<sup>14</sup>C) 同位体の実測値を基に、同位体マスバランスを用いた動態実測値の測定と計算を行うことで、海洋古細菌による炭素固定の算出手法を開発する。

## 3. 研究の方法

微生物の細胞膜脂質の化合物レベル同位体計測と現場培養による微生物代謝活性データおよび微生物の化学合成代謝の代謝量 (CO<sub>2</sub> 固定量) を算出するため、以下の 1) - 4) の項目について検討を行った。

1) セルソーターを用いた海洋微生物細胞膜脂質 (脂肪酸) の回収方法の検討、2) 微生物現場微生物培養データからなる微生物バイオマス量インベントリーの作成、3) 同位体データを用いたベイジアン統計によるマルコフ連鎖モンテカルロ法を用いた代謝比率の試算 (従属栄養代謝と化学合成栄養代謝)、4) 微生物バイオマス量データと同位体モデルに基づく代謝比率を統合した炭素固定量 (フラックス) の試算

## 4. 研究成果

### 1) セルソーターを用いた海洋微生物細胞膜脂質の回収方法の検討

海中の主要なバクテリア、古細菌は、0.5-0.2 μm のサイズからなる。微生物脂質の細胞膜脂質の同位体計測のためには、炭素量にしてマイクログラムオーダーが必要である。これらの量のバイオマスを得る方法として、多段階式のフィルターろ過による方法があるが、その場合、10-20 万 L レベルの海水ろ過が必要となる。しかし、これらの方法では、回収しようとするバクテリアのサイズ (0.2 μm) よりも前段の目の粗い (保持孔径の大きい) フィルターに、粗大粒子と共にバクテリアが捕集され、極小のフィルタにおける回収率が極めて低くなることから、大量の海水が必要となる。本研究では、フローサイトメトリ

ーの技術を用いて、ろ過フィルターを使用なしで、海水からダイレクトに微生物サイズ(0.2  $\mu\text{m}$ )の菌体のみを捕集・濃縮(セルソーターと遠心分離)することを想定した実験を行った。試料は、駿河湾の深層水(水深 397 m、駿河湾深層水取水供給施設)を使用した。海水試料を PP チューブに入れ、セルソーター(Sony SH800)で計測した。照射光は 488 nm レーザー、細胞染色あり、なしにより実験を行った。PI 染色、7AAD 染色いずれの試料サイズ( $\geq 0.5 \mu\text{m}$ ) (A グループ)、それよりも大きいサイズの B グループ(FSC-A  $10^4$ - $10^5$ ) 共に染色なしのカウント数よりも染色後の試料において高いカウント数が得た。以上から、微生物細胞サイズの A グループにおいてより高い収率で、微生物脂質の選択的回収と濃縮が可能であることが確認された。さらに、セルソーターによるバイオマスから脂質量を把握するため、ろ過海水について Bligh & Dyer 法による脂肪酸メチルエステルの定量を行った。その結果、C15:0, C16:1(n7), C17:0, C18:2(n9, 12), C18:1(n9), C2:3, C20:1, C22:6(n3)の脂肪酸が検出された。このうちパルミトレイン酸(C16:1n9)が数百 ng/L と最も高い濃度で回収された。以上の結果から、セルソーターを用いることにより、数十 L オーダーの海水から、マイクロオーダーの脂質の回収が可能であることが確認された。また、古細菌の細胞膜脂質(GDGTs)の存在量は、脂肪酸に比べて低いが、10 万 L オーダーの海水からの直接ろ過の場合と比べ大幅に必要海水量を減らすことが可能であることが確認された。

## 2) 微生物現場微生物培養データからなる微生物バイオマスインベントリーの作成

本研究では、駿河湾焼津沖(海底水深 800-1000 m)の中層水について、catalyzed reporter deposition fluorescent in situ hybridization (CARD-FISH) 法により海洋性古細菌(クレンアーキオータ、ユーリアーキオータ)の細胞密度細胞密度と体積の平均値、および体積当たり炭素量の文献値を用いて、駿河湾中層における古細菌バイオマスを試算すると、体積当たり古細菌炭素量(本報告ではクレンアーキオータをもって全古細菌とする)は約 0.6-2.0 gC/L と試算した。

現在、全海洋における古細菌炭素量の妥当な値として 0.3 GtC が報告されている(Bar-on et al. 2018)。これに使用されたデータセット(Lloyd et al. 2013)を用いて、海洋中層の古細菌細胞密度の幾何平均を算出し( $2.07 \times 10^4$  cells/mL) 細胞当たり炭素量の幾何平均 11 fgC/cell (Bar-on et al. 2018) を乗じて、全海域の中層における古細菌炭素量、0.23  $\mu\text{gC/L}$  を得た。一方、駿河湾中層では、全海洋中層の平均に比べて、約 5 倍(最小 2.5~最大 9 倍)大きいことがわかった。これは、古細菌細胞密度が駿河湾( $3.2 \pm 1.6 \times 10^4$  cells/mL, mean  $\pm$  sd) と全海洋( $2 \times 10^4$  cells/mL) でほぼ同じであるのに対して、古細菌細胞サイズが駿河湾で大きく、細胞当たり炭素量が大きくなるに起因していることが推測された(駿河湾, 18-63 fgC/cell; 全海洋, 11 fgC/cell)。加えて、沿岸域での原核生物細胞サイズは遠洋に比べて大きいことが知られており(Fukuda et al. 1998)、古細菌(クレンアーキオータ)に対しても同様の傾向があることが認められた。

## 3) 同位体データ( $^{14}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ )を用いたベイジアン統計によるマルコフ連鎖モンテカルロ法(MCMC)を用いた代謝比率の試算

本研究では、GDGTs、DOC、DIC、POC の 4 パラメーターに関する dual 同位体比( $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ )の計測値を用いて、古細菌の化学合成栄養代謝(DIC を利用)と従属栄養代謝(DOC、POC を利用)の相対比率を求めるため、ベイジアン統計によるマルコフ連鎖モンテカルロ法(MCMC 法)による解析方法について検討を行った。MCMC による計算は、(1)-(4)式に従った。MCMC

法は、ベイズ推定において、事後分布を求めるのが計算上困難な場合に、事前分布と尤度分布を材料として乱数を無作為抽出することにより事後分布を概算する方法であり、近年、同位体を用いたソースアポーションング研究において利用されている (Uchida et al., 2023)。本研究では、GDGTs、DOC、DIC、POC の  $^{14}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$  値を入力値とし、乱数生成の繰り返し回数を 100 回に設定し、GDGTs のソース毎の比率を計算した。その結果、DIC、DOC、PIC のフラクションは、43%、57%、0%と計算された。以上の結果より GDGTs の 43% が、化学合成栄養 ( $\text{CO}_2$ )、57% が従属栄養代謝 (DOC) を行っており、POC は、計算上は代謝に利用されていないことがわかった。以上の計算により、dual isotope ( $^{14}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ ) の計測値からの代謝比率推定における統計的な推定精度の向上が確認された。

$$\begin{pmatrix} \Delta^{14}\text{C}_{GDGTs} \\ \delta^{13}\text{C}_{GDGTs} \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \Delta^{14}\text{C}_{DOC} & \Delta^{14}\text{C}_{POC} & \Delta^{14}\text{C}_{DIC} \\ \delta^{13}\text{C}_{DOC} & \delta^{13}\text{C}_{POC} & \delta^{13}\text{C}_{DIC} \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$$

(1)

$$\Delta^{14}\text{C}_i = \Delta^{14}\text{C}_i^{DOC} \times f_i^{DOC} + \Delta^{14}\text{C}_i^{POC} \times f_i^{POC} + \Delta^{14}\text{C}_i^{DIC} \times f_i^{DIC}$$

(2)

$$\delta^{13}\text{C}_i = \delta^{13}\text{C}_i^{DOC} \times f_i^{DOC} + \delta^{13}\text{C}_i^{POC} \times f_i^{POC} + \delta^{13}\text{C}_i^{DIC} \times f_i^{DIC} \quad (3)$$

$$1 = f_i^{DOC} + f_i^{POC} + f_i^{DIC}$$

(4)

#### 4) 微生物バイオマス量と同位体モデルに基づく炭素固定量の試算 (フラックス) の試算

本研究では、新規に開発したベイジアン統計によるマルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC) マスバランスモデルシミュレーションモデルに GDGTs、DOC、PIC、DIC の同位体データを入力値として計算を行い、駿河湾の海洋古細菌の化学合成栄養代謝 ( $\text{CO}_2$ ) の割合が約 4 割である結果を得た。さらに駿河湾水深 400-700m におけるクレンアーキオータの細胞密度と炭素量と化学合成による代謝比率の結果から炭素固定量の年間フラックスは、 $2.9\text{E}+06$  ( $\text{gC}/\text{km}^3/\text{yr}$ ) と算出した。以上から、本研究により開発された技術は、様々な環境中の未培養微生物の代謝情報推定における強力なツールとなることが期待される。特に極域、極限環境を含む様々な環境における未知微生物の代謝に関する知見の取得が可能となり、炭素循環研究における微生物ループの役割の理解を大いに進展させるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uchida Masao, Mantoku Kanako, Kobayashi Toshiyuki, Kawamura Kimitaka, Shibata Yasuyuki	4. 巻 536
2. 論文標題 Ultra small mass AMS 14C sample preparation and analyses at NIES-TERRA AMS facility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms	6. 最初と最後の頁 144 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nimb.2022.12.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uchida Masao, Mantoku Kanako, Kumata Hidetoshi, Kaneyasu Naoki, Handa Daishi, Arakaki Takemitsu, Kobayashi Toshiyuki, Hatakeyama Shiro, Shibata Yasuyuki, Kawamura Kimitaka	4. 巻 538
2. 論文標題 Source apportionment of black carbon aerosols by isotopes (14C and 13C) and Bayesian modeling from two remote islands in east Asian outflow region	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms	6. 最初と最後の頁 64 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nimb.2023.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Amano Chie, Reinthaler Thomas, Sintes Eva, Varela Marta M., Stefanschitz Julia, Kaneko Sho, Nakano Yoshiyuki, Borchert Wolfgang, Herndl Gerhard J., Utsumi Motoo	4. 巻 21
2. 論文標題 A device for assessing microbial activity under ambient hydrostatic pressure: The in situ microbial incubator (ISMI)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography: Methods	6. 最初と最後の頁 69 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lom3.10528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 M. Uchida, K. Mantoku, T. Kobayashi, K. Kawamura, Y. Shibata	4. 巻 536
2. 論文標題 Ultra small mass AMS 14C sample preparation and analyses at NIES-TERRA AMS facility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B	6. 最初と最後の頁 144-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nimb.2022.12.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bao Rui、Uchida Masao、Zhao Meixun、Haghipour Negar、Montlucon Daniel、McNichol Ann、Wacker Lukas、Hayes John M.、Eglinton Timothy I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Organic Carbon Aging During Across-Shelf Transport	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Geophysical Research Letters	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1029/2018GL078904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Uchida Masao、Mantoku Kanako、Kobayashi Toshiyuki
2. 発表標題 Improvements for ultra-microscale radiocarbon measurements at NIES-TERRA
3. 学会等名 The 15th International Conference on Accelerator Mass Spectrometry. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Uchida Masao、Kumata Hidetoshi、Mantoku Kanako、Uchida Masaki、Utsumi Motoo、Kaneko Ryo、Nakai Ryosuke、Iwahana Go、Shibata Yasuyuki、Kawamura Kimitaka
2. 発表標題 Black carbon and their isotopic signatures in permafrost soil: Implication of sources and fate under changing Arctic climate
3. 学会等名 Seventh International Symposium on Arctic Research (ISAR-7) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Uchida Masao、Eglinton Timothy I.、Mollenhauer Gesine、Montlucon Daniel、Hayes John M.、Coppola Laurent、Gustafsson Orjan、Mantoku Kanako、Ahagon Naokazu、Harada Naomi
2. 発表標題 Age offsets between marine-derived lipid biomarkers, TOC, and foraminifera during cross shelf-slope lateral transport revealed by compound-specific radiocarbon dating
3. 学会等名 24th Radiocarbon Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Amano Chie、 Zhao Zihao、 Sintes Eva、 Reinthaler Thomas、 Stefanschitz Julia、 Kisadur Murat、 Utsumi Motoo、 Herndl Gerhard J.
2. 発表標題 Heterotrophic activity of the deep-sea microbial community under in situ hydrostatic pressure conditions
3. 学会等名 ASLO 2021 Aquatic Sciences Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	熊田 英峰  (Kumata Hidetoshi)  (60318194)	東京薬科大学・生命科学部・講師   (32659)	
研究分担者	内海 真生  (Utsumi Motoo)  (60323250)	筑波大学・生命環境系・教授   (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------