

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04263

研究課題名（和文）熱帯・亜熱帯域から極域までの全球海洋観測から明らかにする海洋窒素固定の統合的理解

研究課題名（英文）Integrative understanding of marine nitrogen fixation based on global observations from tropics to polar regions.

研究代表者

塩崎 拓平（Shiozaki, Takuhei）

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：90569849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では南極海沿岸において窒素固定活性を初めて検出した。窒素固定活性は北極海でも検出されており、すなわち本研究の発見によって、海洋窒素固定は全球的なプロセスであることが明らかになった。また本研究によって、北極海に生息する窒素固定生物のゲノムが初めて明らかになった。極域環境は熱帯・亜熱帯海域と比べて変化に富んでいる。極域に生息する窒素固定生物はその環境に合わせて特殊な機能を持つことがゲノム情報から示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋窒素固定は熱帯・亜熱帯海域貧栄養海域におけるローカルなプロセスであると考えられてきた。本研究によって極域を含む全球的なプロセスであることが明らかになったことはこれまでのパラダイムからの大きな変換をもたらす。窒素固定は海洋における主要な窒素源であり、基礎生産を制御している。極域を含めて海洋窒素固定を正確に見積もることは海洋基礎生産全体の理解に必要な不可欠となる。

研究成果の概要（英文）：Nitrogen fixation is the primary source of reactive nitrogen in the ocean. We found substantial nitrogen fixation near the Antarctic coast, especially around ice-covered regions. Nitrogen fixation has also been observed in the Arctic Ocean, indicating that marine nitrogen fixation is not a local process in the tropical and subtropical oligotrophic region, but is a ubiquitous process in the global ocean. We also revealed for the first time the genomes of nitrogen fixer in the Arctic Ocean. The polar environment shows heterogeneity compared to tropical and subtropical oligotrophic region. The genome information suggests that Arctic nitrogen fixers have some specialized functions adapting to their environment.

研究分野：微生物海洋学

キーワード：窒素固定 極域

1. 研究開始当初の背景

窒素固定は、生物が介在して N_2 からアンモニアを合成する窒素供給過程である。窒素固定は海洋外から供給される主要な窒素源と位置づけられており、そのため海洋全体の植物生産の増減を制御する(Gruber and Galloway, 2008)。すなわち、窒素固定は海洋生物生産を支配する重要なプロセスであることが認識されているが、窒素固定の研究が海洋において本格的に始まったのは1990年代後半からであり、未だ手探りの探索的研究が多く黎明期の域を出ておらず、未解明部分が多いのが現状である。

N_2 は化学的に非常に安定な状態である。そのため、窒素固定は他の窒素栄養塩(硝酸塩やアンモニウム塩)を利用するよりも大量にエネルギーを消費する。そのため、窒素固定生物が生息できるのは硝酸塩やアンモニウム塩など溶存態の窒素栄養塩が乏しい海域に限定されるというのが教科書的通例であった。しかし、近年、北極海においても窒素固定が行われている研究成果が示された(Blais et al., 2012; Shiozaki et al., 2018)。そして研究代表者の発見により北極海ではこれまで知られていた窒素固定生物群集とはまったく異なる群集で窒素固定が成り立っていることが明らかとなった(Shiozaki et al., 2018)。北極海における新たな窒素固定生物群集の発見は、従来の窒素固定に関する固定観念を覆す。つまり、窒素固定は世界的に行われている生産過程であり、熱帯・亜熱帯貧栄養海域とその周辺の研究だけでは海洋窒素固定の理解が十分でなく、より広範囲で包括的に捉え直す必要があることを示していた。

2. 研究の目的

これまでの熱帯・亜熱帯域に限定された知見では海洋窒素固定の理解が不十分である。本研究では、北極海から熱帯・亜熱帯、南極海に至る観測から海洋窒素固定をグローバルなプロセスと捉え直し、どこでどのような特徴を持った窒素固定生物が存在するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 環境の大きく異なる北極海、南極海を含む極域と熱帯・亜熱帯貧栄養海域での現場観測により、窒素固定活性と窒素固定生物、環境因子(水温、塩分、栄養塩濃度など)を調査し、各海域の窒素固定の特徴と共通点を明らかにする。

(2) 極域から採取されたサンプルのメタゲノム解析によって、窒素固定生物のゲノムを再構築する。その上で熱帯・亜熱帯貧栄養海域で代表的な窒素固定生物と比較ゲノム解析を行い、極域に生息する窒素固定生物の代謝の特徴と共通点を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 南極海における窒素固定の発見とその特徴

南極海は窒素栄養塩が豊富にあり、かつ窒素固定に必要な鉄が不足した海域である。そのため、これまでほとんどの海洋生態系モデルにおいても窒素固定は行われないとされてきた。本研究では世界で初めて南極海外洋域から沿岸域まで窒素固定の観測を実施した。

観測は第60次南極地域観測隊の夏隊期間(2018年12月から2019年3月)に南極観測船「しらせ」と南極大陸において行った。その結果、南極海沿岸域の定着氷域と氷縁域において窒素固定が検出され、その窒素固定は熱帯・亜熱帯域沿岸域で見られるような非常に高い値(44.4 $nmol N L^{-1} d^{-1}$)を示していた。南極海外洋域では窒素固定は検出されなかった。

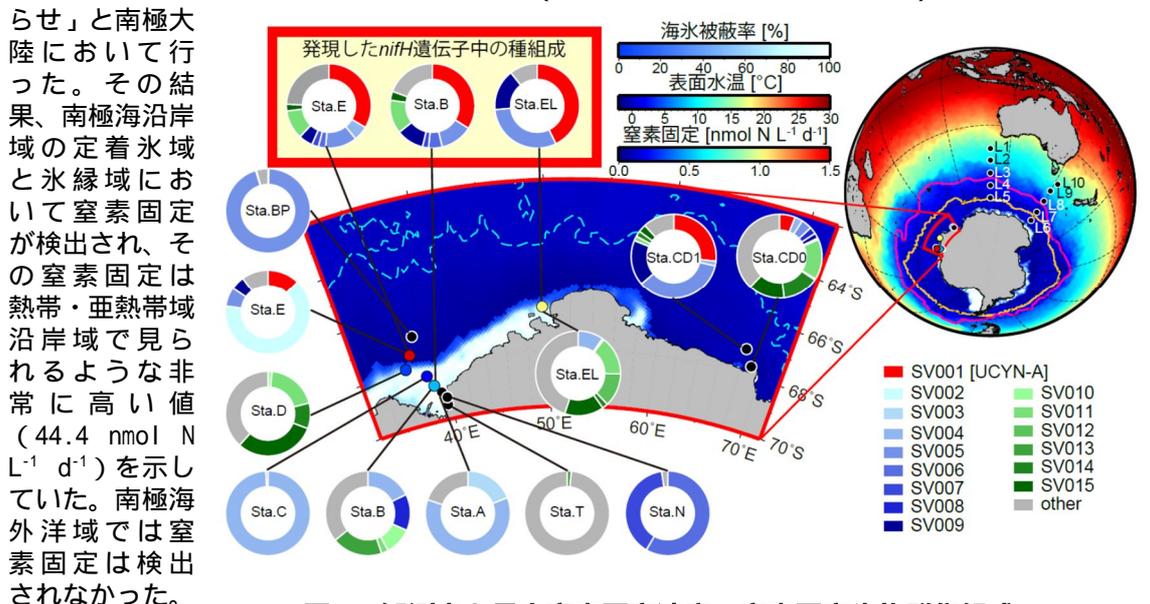


図1: 観測点と最大窒素固定速度、窒素固定生物群集組成

この窒素固定活性の分布から考えられた窒素固定の支配要因は鉄供給量の多寡である。海水には鉄が多く含まれることが知られており、南極海では海水融解時の鉄供給が要因で鉄不足が解消され、植物プランクトンのブルームがしばしば発生することが知られている(Sedwick et al., 1997)。南極海での窒素固定の検出が海水域に限られたことは、この海水からの鉄供給に起因していた可能性が高いと考えられた。

また南極海沿岸域ではすべての測点でニトロゲナーゼをコードする遺伝子である *nifH* 遺伝子が見つかった。そしてこの中で、亜熱帯の代表的な窒素固定生物の一つであるシアノバクテリアの UCYN-A の配列が見つかった。また窒素固定の活性が検出された測点で発現した *nifH* 遺伝子の組成を調べたところ、UCYN-A の *nifH* 遺伝子が最も多くなっていた。この結果は南極海の窒素固定は主に UCYN-A によって行われていたことを示唆した。

南極海での窒素固定が検出されたことで、海洋窒素固定はもはや熱帯・亜熱帯海域だけのローカルなプロセスではなく、全球規模で行われているプロセスであることが証明された。また南極海では UCYN-A が主要な窒素固定者であることが示唆された。UCYN-A は近年北極海にも存在することが明らかになっており(Shiozaki et al., 2018; Harding et al., 2018)、全球規模の窒素固定を理解する上で重要な生物であると言える。本研究成果は Nature Geoscience に掲載された(Shiozaki et al., 2020)。

(2) 北極海における窒素固定生物の特徴

海洋における窒素固定生物に関する情報のほとんどは主に *nifH* 遺伝子の配列情報に依存している。それ以外の代謝の情報はゲノム情報が明らかな数種のシアノバクテリア性窒素固定生物に限られている(例えば、Welsh et al., 2008; Tripp et al., 2010)。*nifH* 遺伝子の配列情報は窒素固定生物の群集組成の情報を提供する。北極海では *nifH* 遺伝子の情報から、UCYN-A のような亜熱帯と共通の窒素固定生物が存在する一方で、亜熱帯では報告例のない特殊な窒素固定生物が存在することが明らかになっている(Shiozaki et al., 2018)。しかし、その特殊な窒素固定生物がどのような代謝の特徴を持ち、北極海で生息しうるのはわかっていない。本研究では北極域において得られたメタゲノムデータから微生物ゲノムが再構築 (metagenome-assembled genomes、以下 MAG)されたデータベースを用い(Nishimura and Yoshizawa, in press)、そこから得られた窒素固定生物 MAG(北極海窒素固定 MAG)と熱帯・亜熱帯海域から得られた窒素固定生物 MAG(Delmont et al., 2022)、培養株も確立されているシアノバクテリア性窒素固定生物のゲノムを比較して、北極海の窒素固定生物の特徴を明らかにする試みを行った。

北極海で現在までに得られている 111 のメタゲノムデータから 6818 の原核生物の MAG を得た。そのうち *nifH* が検出されたのは 9 つの MAG であった。窒素固定を行うためには *nifH* の他に *nifDK*、*nifEBN* が必要であるが(Dos Santos et al., 2012)、*nifH* を持つ MAG のうち 2 つはこの一部もしくはすべてを持たなかった。すなわち窒素固定を行うポテンシャルをもつ MAG は全部で 7 つ得られたことになる(以下、bin.6, 10, 19, 42, 48, 55, 56)。このうち既存の *nifH* のユニバーサルプライマーで検出できるのは bin.6, 48, 55, 56 であった。それ以外の MAG の *nifH* は既存のプライマーでは検出が困難であることが示された。得られた MAG のうち窒素固定能を持つものは Cyanobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Campylobacterota, Bacterioidota に属していた。Bacterioidota 門で窒素固定生物が発見されたのは海洋では初めてである。Cyanobacteria の MAG(bin.56)は UCYN-A(Candidatus 'Atelocyanobacterium thalassa')であり、特に UCYN-A2 と呼ばれるサブグループに属する窒素固定生物であることが示された。この bin.56 以外は新種である可能性が示された。

これらの MAG の存在量を全球メタゲノムデータベースから調べた結果、北極海と深海に特異的であることが示された。一方、熱帯・亜熱帯海域から得られていた窒素固定生物 MAG のいくつかは北極海でも検出された。すなわち、既知の窒素固定生物もいくつかは必ずしも熱帯・亜熱帯海域表層においてのみ存在しているわけではないことが示された。

それぞれの MAG と熱帯・亜熱帯海域で得られた窒素固定生物ゲノムの生理・代謝機能の有無から階層的クラスタ分析を実施した結果、北極海窒素固定 MAG は熱帯・亜熱帯海域の窒素固定生物と門レベルでは大きな違いがないことが示された。ただ、より詳細に比較すると、北極海窒素固定 MAG は特有の代謝モジュールを持つことが明らかになった。例えば bin.10 は好冷菌として知られる *Psychromonas* 属に属しており、低温適応に必要な多価不飽和脂肪酸(PUFA)合成経路を持っていた。また bin.19 と 48 はそれぞれサリチル酸塩分解モジュールとカルバゾール分解モジュールを持っていた。サリチル酸塩とカルバゾールは原油に含まれる成分であり、熱帯・亜熱帯海域で得られた窒素固定生物ゲノムからはこれらの分解モジュールを持つものはなかった。また、UCYN-A2 について、これまで報告されている UCYN-A2 のすべてのゲノムと比較ゲノム解析を行った結果、北極海の UCYN-A2(bin.56)は低緯度域の UCYN-A2 が持たない *gph* 遺伝子を持つことが示された。この遺伝子は DNA 修復の際に用いられるものである(Pellicer et al., 2003)。低温環境では細胞内活性酸素濃度が増加することが知られており、低温環境に適応した微生物では活性酸素による DNA ダメージを修復するための遺伝子を多く持つ傾向があることが知られ

ている (Barria et al., 2013; Bowman, 2017)。北極海の UCYN-A2 が *gph* 遺伝子を持つことは低温環境に適応していることに由来する可能性がある。また、北極海窒素固定 MAG の特徴として、0.2 μm 以下の超微小画分において特に多くゲノム配列が検出される MAG があったことである (bin.6,10,19)。熱帯・亜熱帯海域で検出された窒素固定生物にはこのような特徴は見られなかった。

本研究によって、北極海に出現する窒素固定生物のゲノムと、そこから推測される代謝の特徴が示された。海洋性窒素固定生物は熱帯・亜熱帯海域と北極海においてそれぞれ特有の種が存在する一方、両方の海域に分布する種も存在することがわかった。北極海特有の種は特殊な代謝を持つ傾向があること、体サイズが非常に微小になる傾向があることがわかった。これらがどのような生態学的意味を持つのか今後明らかにする必要がある。

<引用文献>

- Barria, C., M. Malecki, C.M. Arraiano (2013), Bacterial adaptation to cold, *Microbiology*, 159, 2437-2443.
- Blais, M., et al. (2012), Nitrogen fixation and identification of potential diazotrophs in the Canadian Arctic, *Global Biogeochem. Cycles*, GB3022, doi:10.1029/2011GB004096.
- Bowman, J.P. (2017), Genomics of psychrophilic Bacteria and Archaea, in: *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, edited by: Margesin, R., Springer International Publishing, 345-387.
- Delmont, T.O., et al. (2022), Heterotrophic bacterial diazotrophs are more abundant than their cyanobacterial counterparts in metagenomes covering most of the sunlit ocean, *ISME J.*, 16, 927-936.
- Dos Santos, P.C., Z. Fang, S.W. Mason, J.C. Setubal, R. Dixon (2012), Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes, *BMC Genomics*, 13, 162.
- Gruber, N, J.N. Galloway (2008), An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle, *Nature*, 451, 293-296.
- Harding, K., K.A. Turk-Kubo, R.E. Sipler, M.M. Mills, D.A. Bronk, J.P. Zehr (2018), Symbiotic unicellular cyanobacteria fix nitrogen in the Arctic Ocean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115, 13371-13375.
- Nishimura, Y., S. Yoshizawa (in press), The OceanDNA MAG catalog contains over 50,000 prokaryotic genomes originated from various marine environments, *Sci. Data*.
- Pellicer, M.T., M.F. Nunez, J. Aguilar, J. Badia, L. Baldoma (2003), Role of 2-Phosphoglycolate phosphatase of *Escherichia coli* in metabolism of the 2-phosphoglycolate formed in DNA repair, *J. Bacteriology*, 185, 5815-5821.
- Sedwick, P.N., G.R. DiTullio (1997), Regulation of algal blooms in Antarctic shelf waters by the release of iron from melting sea ice, *Geophys. Res. Lett.*, 24, 2515-2518.
- Shiozaki, T., et al. (2018), Diazotroph community structure and the role of nitrogen fixation in the nitrogen cycle in the Chukchi Sea (western Arctic Ocean), *Limnol. Oceanogr.*, 63, 2191-2205.
- Shiozaki, T., A. Fujiwara, K. Inomura, Y. Hirose, F. Hashihama, N. Harada (2020), Biological nitrogen fixation detected under Antarctic sea ice, *Nat. Geos.*, 13, 729-732.
- Tripp, H.J., et al. (2010), Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium, *Nature*, 464, 90-94.
- Welsh, E.A., et al. (2008), The genome of Cyanothecce 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 15094-15099.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shiozaki Takuhei, Inomura Keisuke, Fujiwara Amane, Hirose Yuu, Hashihama Fuminori, Harada Naomi	4. 巻 15
2. 論文標題 Reply to: Questioning High Nitrogen Fixation Rate Measurements in the Southern Ocean	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Geoscience	6. 最初と最後の頁 31 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41561-021-00874-2	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 該当する
1. 著者名 Shiozaki Takuhei, Hashihama Fuminori, Endo Hisashi, Ijichi Minoru, Takeda Noriko, Makabe Akiko, Fujiwara Amane, Nishino Shigeto, Harada Naomi	4. 巻 66
2. 論文標題 Assimilation and oxidation of urea derived nitrogen in the summer Arctic Ocean	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography	6. 最初と最後の頁 4159 ~ 4170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lno.11950	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 Tanita Iwao, Shiozaki Takuhei, Kodama Taketoshi, Hashihama Fuminori, Sato Mitsuhide, Takahashi Kazutaka, Furuya Ken	4. 巻 126
2. 論文標題 Regionally Variable Responses of Nitrogen Fixation to Iron and Phosphorus Enrichment in the Pacific Ocean	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Geophysical Research: Biogeosciences	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1029/2021JG006542	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 Sato Takuya, Shiozaki Takuhei, Taniuchi Yukiko, Kasai Hiromi, Takahashi Kazutaka	4. 巻 126
2. 論文標題 Nitrogen Fixation and Diazotroph Community in the Subarctic Sea of Japan and Sea of Okhotsk	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Geophysical Research: Oceans	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1029/2020JC017071	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 Hirose Yuu, Shiozaki Takuhei, Otani Masahiro, Kudoh Sakae, Imura Satoshi, Eki Toshihiko, Harada Naomi	4. 巻 8
2. 論文標題 Investigating Algal Communities in Lacustrine and Hydro-Terrestrial Environments of East Antarctica Using Deep Amplicon Sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 497 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8040497	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 Masuda Takako, Inomura Keisuke, Takahata Naoto, Shiozaki Takuhei, Sano Yuji, Deutsch Curtis, Prasil Ondrej, Furuya Ken	4. 巻 3
2. 論文標題 Heterogeneous nitrogen fixation rates confer energetic advantage and expanded ecological niche of unicellular diazotroph populations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0894-4	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 Shiozaki Takuhei, Tada Yuya, Fukuda Hideki, Furuya Ken, Nagata Toshi	4. 巻 164
2. 論文標題 Primary production and nitrogen assimilation rates from bay to offshore waters in the oyashio-kuroshio-Tsugaru Warm Current interfrontal region of the northwestern north Pacific Ocean	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers	6. 最初と最後の頁 103304 ~ 103304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dsr.2020.103304	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 Shiozaki Takuhei, Fujiwara Amane, Inomura Keisuke, Hirose Yuu, Hashihama Fuminori, Harada Naomi	4. 巻 13
2. 論文標題 Biological nitrogen fixation detected under Antarctic sea ice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Geoscience	6. 最初と最後の頁 729 ~ 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41561-020-00651-7	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 Endo Hisashi, Blanc-Mathieu Romain, Li Yanze, Salazar Guillem, Henry Nicolas, Labadie Karine, de Vargas Colombar, Sullivan Matthew B., Bowler Chris, Wincker Patrick, Karp-Boss Lee, Sunagawa Shinichi, Ogata Hiroyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Biogeography of marine giant viruses reveals their interplay with eukaryotes and ecological functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 1639 ~ 1649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-020-01288-w	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 該当する

1. 著者名 Chen Tien-Yi, Chen Yuh-ling Lee, Sheu Der-Shyan, Chen Hong-Yung, Lin Yen-Huei, Shiozaki Takuhei	4. 巻 143
2. 論文標題 Community and abundance of heterotrophic diazotrophs in the northern South China Sea: Revealing the potential importance of a new alphaproteobacterium in N ₂ fixation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers	6. 最初と最後の頁 104 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dsr.2018.11.006	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 該当する

1. 著者名 Shiozaki Takuhei, Hirose Yuu, Hamasaki Koji, Kaneko Ryo, Ishikawa Kazuo, Harada Naomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Eukaryotic Phytoplankton Contributing to a Seasonal Bloom and Carbon Export Revealed by Tracking Sequence Variants in the Western North Pacific	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.02722	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 塩崎拓平, 藤原周, 井之村啓介, 広瀬侑, 橋濱史典, 原田尚美
2. 発表標題 南極海海水域における窒素固定の発見
3. 学会等名 日本海洋学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

南極の湖沼周辺に生息する微生物の群集構造を解明
<https://www.tut.ac.jp/docs/PR200415.pdf>
シアノバクテリアの休むという生存戦略 不活性な細胞が分布範囲の拡大に寄与する
<https://www.aori.u-tokyo.ac.jp/research/topics/2020/20200514.html>
南極海氷域における窒素固定の発見 - 窒素固定が全球プロセスであることが明らかに -
<https://www.aori.u-tokyo.ac.jp/research/news/2020/20201027-1.html>

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	浜崎 恒二 (Hamasaki Koji) (80277871)	東京大学・大気海洋研究所・教授 (12601)	
研究分担者	遠藤 寿 (Endo Hisashi) (80795055)	京都大学・化学研究所・助教 (14301)	

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
---------	---------