

機関番号：12102  
 研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20310004  
 研究課題名 (和文) 微生物 rRNA・膜脂質の放射性炭素分析に基づく海洋 DOC 炭素循環プロセスの解明  
 研究課題名 (英文) Study of marine DOC carbon cycle based on the radioactive carbon analyses of bacterial rRNA and membrane lipids  
 研究代表者  
 内海 真生 (UTSUMI MOTOO)  
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授  
 研究者番号：60323250

研究成果の概要 (和文)：微生物の rRNA、細胞膜脂質分子の放射性炭素 ( $^{14}\text{C}$ ) 同位対比を測定するため、数万 L レベルの海水ろ過装置を作成し、北極海の表層海水および静岡県駿河湾深層水くみ上げ施設で試料を採取し測定と解析を行った。その結果、太平洋側北極海の化学独立栄養古細菌群集による有機炭素生産は、植物プランクトンの一次生産量の試算 0.36 Gt C/year の 0.4%にあたる 0.0013Gt C/year と見積もられた。また、駿河湾 397 m 水深の古細菌群集の約 48-52%が独立栄養性である可能性が DOC 炭素および DIC 炭素の  $^{14}\text{C}$  測定値から示された。

研究成果の概要 (英文)： We made up a seawater filtration device which can filter several ten thousand liter to measure radiocarbon ( $^{14}\text{C}$ ) ratio of bacterial rRNA and cell membrane lipid molecules, and the filter samples were collected at the Pacific sector of the Arctic Ocean and the Suruga bay deep seawater drawing up facilities (397 m depth). As the results, the organic carbon production rate by the chemoautotrophic archaea in the Pacific sector of the Arctic Ocean was 0.0013Gt C/year, which is about 0.4% of the primary production rate (0.36 Gt C/year). From the measured value of  $\text{D}_0^{14}\text{C}$  and  $\text{D}_1^{14}\text{C}$ , it was estimated that about 48-52% of archaea could be chemoautotrophy at 397 m depth of the Suruga Bay.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：環境動態解析

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：物質循環、海洋、化学合成独立栄養、古細菌

## 1. 研究開始当初の背景

放射性炭素 (以下  $^{14}\text{C}$ ) は、成層圏上部で宇宙線によって生成される約 5730 年の半減期をもつ核種であり、環境中には極微量存在

している。加速器質量分析計 (AMS) による  $^{14}\text{C}$  測定技術は近年飛躍的に進歩しており、環境中に存在する極微量の有機分子や炭素粒子の自然レベル  $^{14}\text{C}$  測定が可能となりつ

つある。

海洋 DOC の炭素量は、680 GtC と試算されており、大気 CO<sub>2</sub> の 750 GtC に匹敵する規模である。その濃度は、海洋表層（有光層から温度躍層）においてわずかに変化しているが、それ以深においては、ほぼ一定の値を示す。海洋 DOC の 14C (D014C) に関する研究は 1980 年代後半より開始され、海洋 DOC 放射性炭素同位対比の鉛直、水平方向分布の詳細が明らかにされてきた。D014C は海域に関係なく -390～-525‰（年代に換算すると、4000 年～6000 年）と表層海水中の溶存態無機炭素 (DIC) の 14C 同位体比 (20-120‰；現在の大気 14C 同位対比に相当) に比べて著しく古い。こうした古い年代の報告から、海洋の DOC 主要成分は微生物群集に分解されない化学的に不活性な炭素リザーバーであり、その構成成分も難分解性の高分子種からなると考えられてきた。また海洋中で実際に従属栄養微生物が利用できる炭素には制限があるとの報告もある。

ところが、短期的炭素循環炭素リザーバーとしては不活性と考えられてきた DOC の一部が、微生物により活発に代謝されていることが、近年、海洋水中の中性糖の 14C 分析から明らかになった。上述の通り、海洋 DOC の 14C 年代は水深 1000 m で 4000 年～6000 年と非常に古い値である。これは、DOC の海洋での回転時間が著しく長く、短期的な物質循環とは独立した系に属して、短期時間軸での生物学的、物理化学的な物質交換においては、ほぼ不活性な存在とされている解釈されている。しかしながら本来 DOC に相当する粒径にある炭素源としての有機物は、海水中に豊富に存在し、微生物が利用可能なサイズである。こうした DOC 組成解析は近年飛躍的に進歩し、分子レベルでの解析から DOC の 20-35% が高分子で、コロイド状で存在しており (HMW-DOC)、semireactive な DOC であること、HMW-DOC の構成は、炭水化物 (50-70%)、たんぱく質 (3-5%)、脂質 (1%) からなると報告されている。また、海洋 DOC フラクシオンから抽出された糖の 14C 測定から得られる炭素同位体比が、表層のバルク DOC よりも、表層 DIC の同位体比に近い値を有していたことから、上記の semireactive な DOC の存在を示唆している、との結果も発表されている。semireactive な DOC 炭素が存在するならば、海洋の DOC 炭素回転時間はこれまで考えられていたよりも短くなり、海洋 DOC リザーバーの規模が大気 CO<sub>2</sub> のリザーバーに匹敵することになることから考えてもグローバルな炭素循環の再考もあり得る。

この semireactive な DOC 炭素の循環を研究するには、これら DOC を分解する原核生物 (古細菌ならびに真正細菌群集) の RNA, DNA, 細胞膜脂質などの炭素系化学物質の 14C

(DI14C ならびに D014C) を測定する必要がある。測定結果をマスバランスモデルに組込むことで、微生物の炭素源、すなわち DOC-炭素利用 (独立栄養) しているのか、DIC-炭素利用 (従属栄養) なのか、炭素源について相対的な寄与率を求める事が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、海洋 DOC 炭素の短期的な炭素循環に果たす微生物の役割を定量的に明らかにすることである。そのために、海水大量ろ過装置の開発と作成、微生物群集構造の定量評価および生産量試算、rRNA、細胞膜脂質分子の極微量 AMS 分子レベル放射性炭素分析手法の構築を行う。新たに作成した装置や手法を用い、北極海および北太平洋での DOC フラクシオンの微生物バイオマス、DOC、DIC の 14C の測定を行い、海水中に生息する微生物の炭素源 (fresh carbon か old carbon) とその代謝 (従属・独立栄養) について明らかにする。さらに上記の結果を踏まえて、放射性炭素によるマスバランスモデルとボックスモデルを用いて、微生物が利用する DOC 炭素のターンオーバー時間を求め、海洋表層の一次生産量と従属栄養・独立栄養として微生物バイオマスが果たす役割について定量的に解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 海洋細菌群集試料の大量採取手法の確立

研究に必要な微生物試料を超大量に採取するため、自動海水中溶存有機炭素フラクシオン大量ろ過装置を設計作成した (図 1)。本装置は、電磁弁 8 個、電磁流量計 4 個、各種ろ過フィルターステンレス製ハウジング (各サイズメンブランフィルターハウジング: 100 μm 用 4 個、5 μm 用 8 個、0.65 μm 用 4 個、0.2 μm 用 4 個)、バックフラッシュ機能付きステンレスフィルター、制御用パソコンから構成され、毎分 10 L/min、圧力 1.1 気圧の条件で制御可能である。本装置を用い、静岡県駿河湾深層取水施設 (採水深度、397 m) で海水ろ過試料を孔径 0.2 μm のフィルター上に採取した。同様に海洋地球観測船「みらい」による北極海 (MR08-04, MR09-03, MR10-05) および北太平洋航海 (MR08-05) 航海に乗船し、上記装置を用いた表層海水の連続大量ろ過を実施した。また各海域・各水深海水を CTD 採水装置を用いて採取し、研究に必要な微生物、有機物試料を採取した。

### (2) 海洋微生物群集の定量評価

海洋水柱の真正細菌群集および古細菌群集の分布を定量的に明らかにするために、細菌細胞の直接計数法である FISH

(Fluorescence in situ hybridization) 法を改良した CARD-FISH 法を用い、各海域の細菌群集密度を計数した。また、得られた現場密度を元に、太平洋側北極海をモデルに化学合成独立栄養古細菌群集による有機炭素生産速度を計算により求めた。

(3) 微生物 rRNA・DNA、膜脂質の抽出・精製・濃縮および 14C 測定のための処理手法の検討

採取した海水試料の DOC および DIC 炭素の 14C 分析は、まず試料海水にリン酸を添加し炭酸を分離させて CO<sub>2</sub> ガスの単離・精製を行った後、グラファイト試料を作成してから AMS により測定を行った。

各種サイズのフィルターから細菌群集の RNA ならびに DNA 抽出、ならびに膜脂質成分の回収を行った。回収した全 DNA を用い、古細菌群集ならびに真正細菌群集にそれぞれ特異的なプライマーセットを用い、選択的に 16S rRNA 遺伝子領域を増幅し、シーケンス解析を行いサンプル中の細菌群集構造を解析した。

各種サイズのフィルターに補足された微生物膜脂質分子（エーテル脂質（古細菌）、脂肪酸（細菌））を回収するため、大容量ソックスレー抽出機を用いて溶媒可溶脂質成分の全抽出を行い、その後、アルカリけん化処理、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーで、中性成分から古細菌膜脂質由来グリセロールジアルキルグリセロールテトラエーテル (GDGTs: glycerol dialkyl glycerol tetraethers) を、酸性成分より細菌膜脂質由来脂肪酸を分画した。GDGTs は、LC/MS により定量・同定した。脂肪酸については、GC-FID での定量、GC/MS での同定に先立って、メチルエステル化を行った。また、分子レベル 14C 測定に先立ち、炭素安定・放射性炭素同位体分析を行った。rRNA、GDGTs の高精度 14C 測定を行うにあたり、rRNA、GDGTs のガス化が最大の課題となることから、低バックグラウンドでの rRNA、GDGTs の燃焼を行うため、ガス化を行う真空ラインの前処理システムを新規開発・製作した。

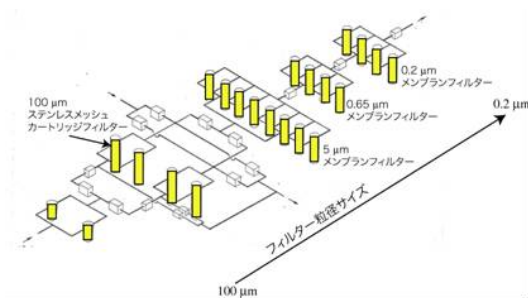


図1 自動海水中溶存有機炭素フラクション大量ろ過装置の設計図

4. 研究成果

(1) 海洋細菌群集試料の大量採取手法の確立

作成した自動海水中溶存有機炭素フラクション大量ろ過装置により、静岡県駿河湾深層取水施設（採水深度、397 m）で約 15 万 L の海水ろ過に成功し、ろ過試料を孔径 0.2 μm のフィルター上に採取した。海洋地球観測船「みらい」による北極海（MR08-04, MR09-03, MR10-05）および北太平洋航海（MR08-05）航海では、定点観測による停船時を挟んで表層海水ろ過を実施し、1 試料採取に要求される海域範囲を 100-200 km 以内限定した上で最大 5 万 L の表層海水ろ過に成功した（図 2）。こうした船上での DOC フラクションサイズを考慮した大規模海水ろ過システムは、本装置が世界初の試みである。



図2 みらい船内に設置した自動海水中溶存有機炭素フラクション大量ろ過装置

(2) 北極海海洋微生物群集の定量評価

東シベリア海を除く多くの北極海域の 50 m 以深において、全菌・真正細菌・古細胞密度は深度が増すごとに減少する傾向があった。また深度 50 m より浅層では、クレンアーキオータよりもユーリアーキオータの細胞密度が高い特徴が確認された。クレンアーキオータは表層で  $10^2 \sim 10^3$  cells/mL、50 m 以深では  $1.4 \times 10^3 \sim 3.5 \times 10^4$  cells/mL 存在した。カナダ海盆深層および東シベリア海海底近傍では、クレンアーキオータの割合が高い傾向があった（図 3）。この原因として、Crenarchaeota にとって易分解性の有機物もしくは栄養塩が東シベリア海に供給されている可能性が考えられた。加えて、16S rDNA を用いた系統解析より、同じクレンアーキオータ門に属しても、海域や水深の違いにより群集構造が異なることが判明した（図 4）。

炭素固定量を試算すると、0.0013 Gt C/year となった。これは北極海における植物

プランクトンの一次生産量の約2%に値し、これまでに全海域で試算されている0.4% (植物プランクトン一次生産量40~60 Gt C/year) に対して古細菌の炭素固定量0.6~0.7 Gt C/year (Ingalls et al. 2006) より若干高い値である。

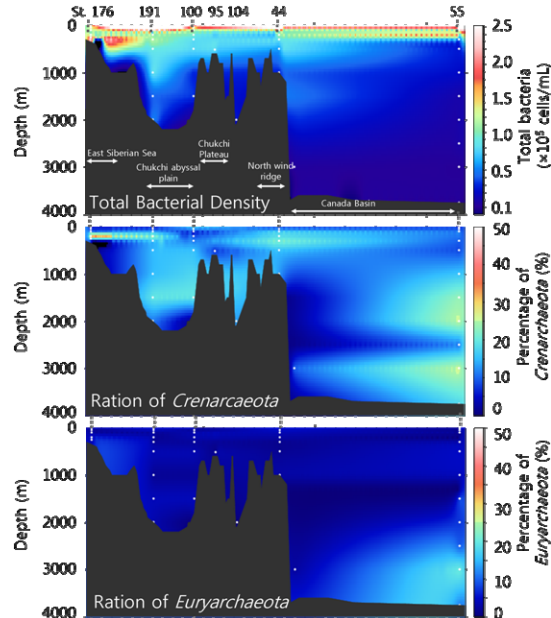


図3 東シベリア海からカナダ海盆の東西ライトランセクトにおける微生物群集の空間分布

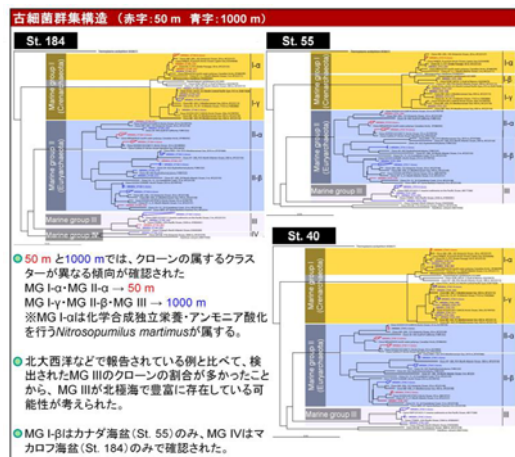


図4 太平洋側北極海の高古細菌群集構造解析結果 (水深50 m および1000 m)。St. 40: ノースウインドリッジ、St. 55: カナダ海盆、St. 184: マカロフ海盆 (東シベリア海)

(3) 14C 同位対比をもとにした化学合成独立栄養古細菌群集の定量評価

膜脂質 14C 分析に関して、数万 L の海水試料からの抽出が完了したが、解析に有効な値を得るためには試料量の更なる上積みが必要となることが明らかとなった。10 万 L 超の試料回収が可能だった駿河湾 397 m 水深試料について GDGTs、DOC、DIC の 14C 同位対比を求めた (図5)。この数値をもとに 14C 同位体マスバランスモデルを用い Crenarchaeota 群集の独立栄養性・従属栄養性の割合を計算した結果、全体の約半分 (48-52%) の Crenarchaeota 群集が化学合成独立栄養性である可能性が示された。

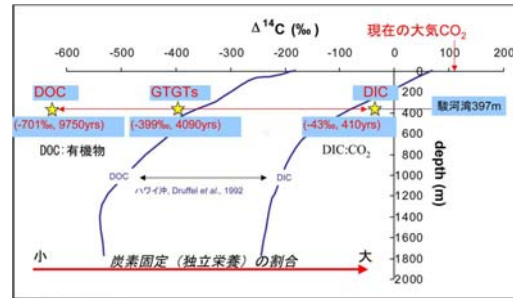


図5 駿河湾 397 m 水深の GDGTs、DOC、DIC の 14C 同位対比測定結果

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Rella, S. F. and Uchida, M. Sedimentary organic matter variations in the Chukchi Borderland over the last 155 kyr, Biogeosciences Discuss. (査読有)、8:2259-2280, 2011.
- ② 佐藤千恵、ROCS 培養機を用いた海洋細菌群集の現場代謝評価、日本微生物生態学会誌、(査読無)、in press, 2011.
- ③ Chen, G., Y. Zhou, J-M Li and Utsumi, M. Development and application of quantitative PCR for monitoring of microbial population dynamics during methane fermentation process. Jpn. J. Water Treatment Biology, (査読有)、46: 47-57, 2010.

[学会発表] (計19件)

- ① Uchida, M., Kumamoto, Y., Polyakov, I., Ivanov, V., Kim, Y., Rozman, P., Utsumi, M., Shimada, K., Murata, M., Shibata, Y. The trans-Arctic water 14C sections from MIRAI and NABOS cruises: Reconstruction of surface mid-deep water ventilation ages and

their comparison of past 14C inventory data. Second International Symposium on the Arctic Research, 2010.12.8, TOKYO, JAPAN.

- ② Akiyama, S., Sato, C., Gang, C., Uchida, M., Utsumi M. Community structure of marine planktonic archaea in the Pacific sector of the Arctic Ocean. Second International Symposium on the Arctic Research, 2010.12.8, TOKYO, JAPAN.
- ③ Sato, C., Kuroki, Y., Chen, G., Uchida, M. and Utsumi, M. Characteristic distribution and structure of planktonic archaea in the Arctic Ocean. 2009 AGU Fall Meeting, 2009.12.16, San Francisco (USA)
- ④ 佐藤千恵, 黒木由貴子, 陳剛, 内田昌男, 内海真生. 太平洋側北極海における古細菌群集の空間分布、第25回日本微生物生態学会、2009.11.22、広島県東広島市
- ⑤ Uchida, M., M. Utsumi, K. Kato, Shibahara, A. and Y. Shibata. Novel radiocarbon chronology tool using archaeal tetraether lipids in the western Arctic. 日本地球惑星科学連合2009年大会、2009.5.19、千葉県幕張市
- ⑥ Sato, C., Utsumi, M., Kuroki, Y., Uchida, M. Pilot study of marine planktonic archaeal distribution in the Arctic Ocean. The 10th Arctic Science Summit Week, 2009.03.25, Bergen, Norway
- ⑦ 佐藤千恵, 内海真生, 黒木由貴子, 陳剛, 内田昌男、MR07-04, 05, 06 航海採取試料による海洋DOC炭素循環と微生物の関連性解明に関する研究の予察的結果：海洋性古細菌の分布と多様性、第12回みらいシンポジウム、2009.03.13、東京都池袋

[図書] (計2件)

- ① ウォレス・S・ブロッカー、ロバート・クンジグ 著、内田昌男一監訳、東郷えりか一訳、河出書房新社、CO2 と温暖化の正体 FIXING CLIMATE、2009年、350ページ
- ② 内田昌男 編、海洋出版株式会社、月刊地球 総特集—北半球高緯度海域における気候変動研究—近未来温暖化影響予測に向けた最新の知見、2008年、250ページ

[その他]

ホームページ等

[http://researchmap.jp/Motoo\\_UTSUMI/](http://researchmap.jp/Motoo_UTSUMI/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内海 真生 (UTSUMI MOTOO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：60323250

### (2) 研究分担者

内田 昌男 (UCHIDA MASAO)

独立行政法人国立環境研究所・化学環境研究領域・研究員

研究者番号：50344289

熊本 雄一郎 (KUMAMOTO YUICHIRO)

独立行政法人海洋研究開発機構・地球環境観測研究センター・技術研究主任

研究者番号：70359157