

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710022

研究課題名（和文） 生理特性から捉える細菌群集の海洋物質循環過程における役割

研究課題名（英文） The role of prokaryotes in the marine carbon cycle which observed from their physiological properties

研究代表者

山田 奈海葉 (YAMADA NAMIHA)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・研究員

研究者番号：90435769

研究成果の概要（和文）：生理特性として無機炭酸固定を行う海洋原核生物に着目し、その有機物生成過程に関して、海洋炭素循環過程における役割を明らかにした。本研究により、原核生物は無機炭酸固定により、細胞体炭素の生成を超える、多量の溶存態タンパク質を生成していることが明らかになった。すなわち、原核生物の無機炭酸固定はこれまで考えられてきたよりも海洋炭素循環において非常に重要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The CO<sub>2</sub> fixation is one of the properties of marine prokaryotes. It was demonstrated that their role in the marine carbon cycle. The results suggest that prokaryotic CO<sub>2</sub> fixation produces large amounts of dissolved protein, which exceed the cellular carbon fraction. Thus, total prokaryotic dark CO<sub>2</sub> fixation appears to be more important in the marine carbon cycle than previously thought.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物地球化学、微生物生態学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：海洋物質循環、原核生物

## 1. 研究開始当初の背景

海水中には、炭素量換算すると、大気中の二酸化炭素と同程度の非生物態有機物が存在する。非生物態有機物の大半は、サイズが小さく、濾紙を通過可能な溶存態有機物として存在する。海洋細菌の多くは、溶存態有機物の一部を分解・利用し、物質循環過程を駆動させている。海洋細菌が利用できない溶存態有機物は海水中に残存・蓄積し巨大な炭素プールを構成していると考えられてきたが、「何故利用されずに残存するのか」という疑問に答えを与えることのできる溶存態

有機物の生成プロセスや残存メカニズムについてはほとんど分かっていない。

1995年、海域・深度を問わず、溶存態有機物として非常に少数のタンパク質分子が残存・蓄積していることが明らかとなった (Tanoue, 1995, Mar. Chem. 51, 239-252)。そして、これらのタンパク質は、ある特定の化学的性質を持つために残存・蓄積しているのだと考えられてきた。本研究の研究代表者は、分離された個々の溶存態タンパク質分子の化学的性質を調べ、それらが様々ではないこと、それらのタンパク質がある特定の細菌

グループ (*Pseudomonas* グループ) に由来することを明らかにした。そして、溶存態タンパク質の残存には、その化学的性質よりも、これらを元々作り出した細菌グループに特有の生理特性や機能が深く関わっていることを見出し、世界で初めて「溶存態有機物の生成プロセスや残存メカニズム」について言及することを可能にした (Yamada & Tanoue, 2006, *Prog. Oceanogr.* 69, 1-18)。すなわち、細菌の種類や生理特性に着目することが、細菌群集が海洋の物質循環を駆動するプロセスやメカニズムを真に理解することにつながると言える。

細菌は、培養条件によって培養が可能になったり不可能になったりすることが知られている。Gauthier (2000) は、様々な種類の単離株について、培養不能になる条件を調べた研究をまとめており、これによると、用いた基質によっても培養の可否は変化していた (*Nonculturable Microorganisms in the Environment*, (eds.) Colwell & Grimes, ASM Press, 87-112)。細菌が自然海水中で利用する溶存態有機物は、様々な化学的性質を持った有機物の集合体である。すなわち、細菌の生理特性の違いによって「食の好み」も異なってくるはずであり、基質の化学的性質が違えば、溶存態有機物へと移行する速度も異なることが予想される。

## 2. 研究の目的

研究開始当初は、上記理由により、海洋細菌の利用する基質として、化学的性質の異なる様々なモデル有機物を用いた研究を進めることを想定していた。しかしながら、分析手法上、海洋細菌として分画されるサイズ画分 (0.2~1.0  $\mu\text{m}$  程度) の中には、多くの古細菌が存在することが近年明らかになってきたことから (e.g., Herndl et al., 2005, *Appl. Environ. Microb.* 71, 2303-2309; Varela et al., 2008, *Environ. Microbiol.*, 10, 110-124)、細菌だけではなく、古細菌も含めた原核生物全体を考慮した研究を行う必要があると考えた。

海洋原核生物は、有機物の分解や無機化といった従属栄養的な活動を通じて、海洋物質循環の重要な駆動者としての役割を持っている一方で、暗所で無機炭酸固定 (独立栄養) を行うものが存在する。海洋の中深層や深層では、通常、従属栄養で利用可能な有機物は限られている。しかし、海水中には炭素換算すると有機物の 60 倍にも相当する大量の無機炭酸が存在する。無機炭酸固定は、これらの無機炭酸を炭素源として用いており、そのような生理特性を持つ原核生物の多くが古細菌であることが知られている (e.g., Herndl et al., 2005)。さらに、海洋中深層

における原核生物による無機炭酸固定速度は、有機物取り込み速度に匹敵することも報告されている (Reinthal et al., 2010, *Deep-Sea Res. II*, 57, 1572-1580)。そこで、本研究では、無機炭酸固定に関する生理特性を持つ原核生物を対象とし、 $^{14}\text{C}$  標識をした重炭酸塩を基質兼トレーサーとして用いることで、無機炭酸固定能を持つ原核生物を經由した炭素のフローを明らかにすることにより、これらの海洋物質循環 (炭素循環) における役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 測定手法の確立

無機炭酸固定能を持つ原核生物の有機物生成に関して、細胞体への無機炭酸固定に加え、これを經由した溶存態有機物生成の有無について、原核生物の主要成分であるタンパク質に着目して検討した。

海水試料は、学術研究船淡青丸により、黒潮沖の観測点において水深 2000 m から採取し、陸上実験室へ輸送した。海水試料は、実験に供するまで 4  $^{\circ}\text{C}$  で保存し、無機炭酸固定速度と溶存無機炭酸濃度 (DIC) を測定した。無機炭酸固定速度は、①原核生物、②原核生物のトリクロロ酢酸 (TCA) 不溶画分および③全 TCA 不溶画分の 3 種類について測定した。本研究では、TCA 不溶画分を便宜上、「タンパク質画分」とみなし、③から②を差し引いて溶存態有機物のタンパク質画分を計算した。

全ての実験に関して、海水試料に最終濃度が 2.5  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  になるように  $^{14}\text{C}$ -重炭酸塩ナトリウムを添加し、暗所において 4  $^{\circ}\text{C}$  で 72 時間培養を行った。培養は、中性ホルマリン (最終濃度 2% (v/v)) の添加によって終了した。また、培養開始時に中性ホルマリンを添加した試料をネガティブコントロールとして用いた。

①原核生物: Herndl et al. (2005) の方法に従い、培養後の試料 40 mL を直径 25 mm、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のニトロセルロースフィルターで濾過した。フィルターは、7 mL 液体シンチレーションバイアルへ入れ、炭酸塩を除去するために、0.5 M 塩酸を 100  $\mu\text{L}$  添加した後、デシケーター内で減圧乾固した。ここへ酢酸エチル 0.5 mL を添加してフィルターを溶解させた後、液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold, Perkin Elmer) 6 mL を添加して液体シンチレーションカウンターで  $^{14}\text{C}$  (dpm) を測定した。

②原核生物のタンパク質画分: ①と同様に、ニトロセルロースフィルターで濾過した。5% (w/v) TCA 溶液 6 mL でフィルターを洗浄し、TCA 可溶画分を除去した後、さらに 80% (v/v) エタノール溶液 5 mL で洗浄した。フィルターは、A) と同様に処理し、 $^{14}\text{C}$  (dpm) を測

定した。

③全タンパク質画分：培養後の試料 1.5 mL に TCA を 5% (w/v) になるように添加し、20,800×g、4℃で、10 分間遠心分離した。沈殿物に 5% (w/v) TCA 溶液 1 mL を加えて同様に遠心分離した後、沈殿物に 80% (v/v) エタノール溶液 1 mL を加えて同様の遠心分離を行った。最終的に得られた沈殿物は、0.5 M 塩酸を 50 μL 添加した後、デシケーター内で減圧乾固した。ここに液体シンチレーションカクテル 1 mL を添加して液体シンチレーションカウンターで <sup>14</sup>C (dpm) を測定した。試料海水中の DIC 濃度を測定し、得られた <sup>14</sup>C の取込速度から無機炭素固定速度を算出した。

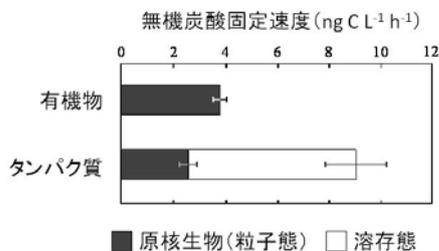
#### (2) 様々な海域における調査

上記手法を用い、海洋環境の異なる様々な海水中における無機炭酸固定能を有する原核生物を経由した炭素フローの測定を行った。海水試料は、学術研究船淡青丸により、相模湾、相模湾沖、駿河湾沖、黒潮沖の 4 つの観測点における水深 200~1500m から採水して実験に供した。

### 4. 研究成果

#### (1) 測定手法の確立

①原核生物と②原核生物のタンパク質画分の無機炭酸固定速度は、それぞれ 3.81 ng C L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> および 2.58 ng C L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> であり、細胞全体へ取り込んだ無機炭酸由来炭素の約 68% がタンパク質画分であったことがわかった。さらに、③から②を差し引いた溶存態タンパク質は、6.44 ng C L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> となった。このことから、原核生物が、無機炭酸固定を経由した溶存態有機物の生成を行うこと、細胞体タンパク質へ固定した炭素の約 2.5 倍もの溶存態タンパク質を無機炭酸から生産することが明らかになり、原核生物の無機炭素固定は、海洋物質循環を考える上で無視できないものであることが示唆された。



#### (2) 様々な海域における調査

現在 DIC の測定が終了していないため、炭素換算ができていないが、<sup>14</sup>C (dpm) の値を基に計算した結果ではあるが、実験を行った全ての試料において無機炭酸利用能を持つ

原核生物が、細胞体へ取り込んだ無機炭酸の 0.7~13 倍の無機炭酸由来の炭素を溶存態タンパク質として多量に放出していることを確認することができた。このことから、無機炭酸利用能を持つ原核生物の物質循環過程への寄与が非常に大きいこと、その現象が様々な海域で普遍的に起こっていることが明らかになった。

#### 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 5 件)

- ① Yamada, Namiha, Masahiro Suzumura, Methods for determining rates of protein synthesis via dark CO<sub>2</sub> fixation by marine prokaryote, *Analytical Letters*, 査読有, 2011, 印刷中.
- ② Yamada, Namiha, Nobuo Tsurushima, Masahiro Suzumura, Effects of seawater acidification from ocean CO<sub>2</sub> sequestration on bathypelagic prokaryote activities, *Journal of Oceanography*, 査読有, 66, 2010, 571-580.
- ③ Nagata, Toshi, Christian Tamburini, Javier Arístegui, Federico Baltar, Alexander Bochdansky, Serena Fonda-Unami, Hideki Fukuda, Alexandra Gogou, Dennis A. Hansell, Roberta L. Hansman, Gerhard Herndl, Christos Panagiotopoulos, Thomas Reinthaler, Rumi Sohrin, Pedro Verdugo, Namiha Yamada, Youhei Yamashita, Taichi Yokokawa, Douglas H. Bartlett, Emerging concepts on microbial processes in the bathypelagic ocean – ecology, biogeochemistry and genomics, *Deep-Sea Research II*, 査読有, 57, 2010, 1519-1536.
- ④ Yamada, Namiha, Suzumura Masahiro, Effects of Seawater Acidification on Hydrolytic Enzyme Activities, *Journal of Oceanography*, 査読有, 66, 2010, 233-241.
- ⑤ Yamada, Namiha, Eiichiro Tanoue, Similarity of electrophoretic dissolved protein spectra from coastal to pelagic seawaters, *Journal of Oceanography*, 査読有, 65, 2009, 223-233.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 山田奈海葉, 無機炭酸固定能を持つ原核生物による溶存態有機物の生成, 2010 年

- 度日本海洋学会秋季大会，2010年9月8日，網走，北海道。
- ② 山田奈海葉，二酸化炭素の海洋隔離技術に対する環境影響評価，平成22年度産総研環境・エネルギーシンポジウムシリーズ1「温室効果気体の動態解明とその管理のための技術をめざして」，2010年8月31日，東京。
  - ③ 山田奈海葉，海水中の溶存態タンパク質の起源およびその化学的性質，平成21年度共通基盤試験研究推進会議 土壤肥料部会、第1分科会「土壤の有機態窒素の分子実体」，2010年2月23日，つくば，茨城。
  - ④ 山田奈海葉，二酸化炭素の海洋隔離技術に対する環境影響評価に関する研究，第7回環境研究機関連絡会成果発表会－自然と共生する社会をつくる－，2009年11月11日，東京。
  - ⑤ 山田奈海葉，二酸化炭素の海洋中深層隔離が細菌活性へ与える影響，第4回E&Eフォーラム，2009年6月17日，つくば，茨城。
  - ⑥ Yamada, Namiha，The potential impacts on biogeochemical cycles of ocean CO<sub>2</sub> sequestration, JPGU (Japan Geoscience Union) 2009, 2009年5月20日，幕張，千葉。

[その他]

ホームページ等

産総研リポジトリ

[http://www.aist.go.jp/aist\\_j/aist\\_repository/index.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/aist_repository/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 奈海葉 (YAMADA NAMIHA)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・研究員

研究者番号：90435769

### (2) 連携研究者

鶴島 修夫 (NOBUO TSURUSHIMA)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・研究員

研究者番号：40357538

鈴村 昌弘 (SUZUMURA MASAHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：90357301