

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710003

研究課題名（和文）新たな植物プランクトン生理状態診断法の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of novel methods for diagnosis of phytoplankton physiological status

研究代表者

佐藤光秀（Sato Mitsuhide）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：60466810

研究成果の概要（和文）：培養株および外洋の天然植物プランクトン群集を用い、種々の生理状態診断法を検討及び適用した。また、この過程において、数種の外洋性のピコ・ナノ植物プランクトンの培養株を作成することができた。種々の検討の結果、特に、リン酸モノエステラーゼ及びリン酸ジエステラーゼ活性とこれを細胞ごとに診断する ELF-97 の組み合わせはリン酸制限を診断する上で最も簡便かつ有用な方法であることが確認された。これを南北太平洋で適用したところ、広範なリン酸制限マップを描くことができた。また、亜熱帯表層におけるリン酸ジエステルはモノエステルに比べて生物学的に安定な画分であるという地球化学的に重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Various methods to diagnose phytoplankton physiological status were applied to cultured and natural phytoplankton populations and their validity was examined. In this process, some cultures of oceanic pico- and nanophytoplankton were established. Among them, it was confirmed that measurement of phosphate monoesterase and diesterase activities using fluorogenic substrates in combination with a fluorescent probe ELF-97 were very effective in detecting phosphorus limitation of phytoplankton. By applying this method in the North and South Pacific, the map of phosphorus limitation was drawn throughout the Pacific Ocean. From kinetics studies, it was found that phosphate diesters are recycled much slower than monoesters in the surface water of the tropical Pacific, which is an important result for biogeochemical cycles of phosphorus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：生物海洋・植物プランクトン

1. 研究開始当初の背景

植物プランクトンは全球一次生産の約半分を担い、炭素をはじめとする親生物元素の循環を駆動する重要な構成要因である。リービヒの最少律によれば、生物の速度過程は相対的に最も不足する元素または光や温度などの環境要因によって制御されている。これにより、種々の栄養塩濃度や環境条件の差異が植物プランクトン種組成および現存量の差異を生み、また異なる植物プランクトン群集が異なる環境条件を作る相互依存の関係が達成されている。すなわち、海洋環境と植物プランクトンの分布という 2 者をリンクさせているものが制限要因であるといえる。また、制限要因を知ることは将来的な環境の変動に対して生物群集の応答を予測するうえでの必要条件となると考えられる。

天然における植物プランクトンの制限要因を知るために今日まで広く用いられている添加培養法は、簡便な方法であると同時に以下に挙げるような問題点を抱えている。それは、(1)培養中の群集構造の変化、(2)培養瓶に閉じ込めることによる生理活性の変化、(3)瓶内での栄養塩の再生にともなう化学環境の変化である。これらは培養という操作を行う以上避けられないものであり、定量化するのに煩雑な分析が必要となる。

そこで、これらの方法がもつ短所を克服した新たな手法の開発が進みつつある。その手法は大別すると、(1)反応後細胞内や細胞壁に残存する蛍光プローブや基質アナログを蛍光顕微鏡やフローサイトメータを用いて検出する方法、(2)ある種の環境条件下で発現が増加または減少する遺伝子またはそれにコードされたタンパク質を定量する方法、の 2 種である。このような方法はまだ主流ではないものの、現在急速に開発が進み、海洋学に採り入れられつつあるものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、海洋の植物プランクトンの栄養塩制限状態を診断する新たな手法を確立し、それを用いて現場での植物プランクトンの生理状態を種、またはグループごとに解明することである。具体的には、分子化学的手法や近年開発された分子プローブなどを用いることによって、アーティファクトから逃れることができなかった添加培養法にとって代わる手法の開発を目指す。これを適用することによって、さまざまなスケールで時空間変動を示す我が国周辺の栄養塩環境と植物プランクトン群集組成、およびそれから生じる物質の地球科学的循環の一端が解明されると期待される。

3. 研究の方法

(1) 室内培養実験による測定条件の検討

外洋で代表的な藻類株について、培地の栄養

塩濃度をコントロールして人為的に栄養塩制限状態を誘導し、種々の診断法を適用した。これによって、各手法による検出感度や制限とシグナル発現の対応を比較・検討し、好適な手法と測定条件を選出した。また、ウェブ上および論文上で公開されている各種栄養獲得に関わる遺伝子をサーベイし、それらから選ばれた候補遺伝子につき、プライマーおよびプローブを設計した。

(2) 藻類培養株の獲得と維持

水産総合研究センター「若鷹丸」に乗船し、親潮域より海水を採取し、フィルターを用いてサイズ分画を行った後、さまざまな栄養塩を添加して培養株の確立を試みた。

粗培養株はフローサイトメータを用いたソーティングを経て純培養株化を試み、増殖が安定した時点で培養条件(光、温度、栄養塩濃度)を変化させて基礎的な生理パラメータを獲得した。

(3) リン酸モノエステラーゼおよびジエステラーゼ活性

リンは太平洋外洋において極めて変動が大きく、植物プランクトンの生理状態を左右する栄養塩である可能性が考えられる。

そこで古典的な手法である蛍光基質を用いたリン酸モノエステラーゼ活性の測定に加え、これに類似した構造のジエステル蛍光基質も併用することにより、より詳細にリン制限状態を把握することを試みた。

観測は太平洋全域をカバーする航海である海洋研究開発機構研究船白鳳丸 KH-11-10 (2011年12月～2012年2月)およびKH-12-3 (2012年7～8月)において行った。海水に各基質となる 4-methylumbelliferyl phosphate および bis (4-methyl-umbelliferyl) phosphate を 1 μM 加え、酵素反応により遊離する 4-methylumbelliferone を蛍光光度計により定量した。また、いくつかの測点においては基質濃度を変化させ、反応速度パラメータの測定を行った。

(4) ピコ・ナノ植物プランクトンサイズ組成の解析

植物プランクトンの細胞サイズは栄養状態や増殖速度に左右され、特に窒素栄養塩の供給は影響を与えるとされる。そこで、前述の KH-11-10 および KH-12-3 次航海のデータに加え、過去の航海から KH-08-2 (2008年8～9月)のデータを加え、フローサイトメータを用いて測定された植物プランクトンサイズ組成のデータを、各種環境パラメータ(水温、塩分、栄養塩濃度)と併せて解析することにより、これらのデータが栄養塩制限状態の指標となりえるかを検討した。

解析はフローサイトメータ PAS-III (partec) により測定されたものを用い、十分なデータ数が確保された *Synechococcus*、ナノサイズのシアノバ

クテリア、真核ピコ・ナノ植物プランクトンの3群集に絞って解析を行った。

4. 研究成果

(1) 室内培養実験による測定条件の検討
ウェブ上で公開されている遺伝子データベース (GenBankおよびIMG) を利用して窒素固定性シアノバクテリア *Crocospaera watsonii* および非窒素固定性シアノバクテリア *Synechococcus* のリン・鉄欠乏に応答すると推定されるタンパク質をコードする遺伝子配列のプライマーを設計した。これは今後、フィールドより採取した遺伝子サンプルの測定に用いる予定である。

また、蛍光基質アナログを用いたアルカリホスファターゼ活性の測定として、旧来の蛍光分光光度計に代わり、卓上タイプのフィルター型蛍光光度計を用いた測定法を開発した。これにより、船上においても省スペースかつ簡便に群集全体のリン制限の程度が評価できるようになった。

さらに、リン欠乏状態において細胞表面に凝集する蛍光物質ELF-97の蓄積量を蛍光顕微鏡と画像解析を用いて定量する手法の検討を行った。今後はさらにこれをフローサイトメトリーによって測定する手法の検討を行う。

(2) 藻類培養株の獲得と維持

水産総合研究センター「若鷹丸」に乗船し、親潮域より複数の植物プランクトン株を得た。10種ほどが粗培養株の形で維持されており、顕微鏡観察及び色素の状態などから、珪藻類、緑藻類、クリプト藻類などが主と考えられる。基礎的な生理パラメータを測定し、その増殖特性等を把握した。また、今後はすでに設計したプライマーを適用することで、目的遺伝子の配列等を取得するなど、分子生物学的な貢献も期待される。

(3) リン酸モノエステラーゼおよびジエステラーゼ活性

過去知られているように北緯30度付近のリン酸枯渇域において極めて高いモノエステラーゼ活性が測定されたが、それに加えジエステラーゼも同じ海域でピークを示し(図1)、後者もリンストレス状態を評価する手法として有効なことが示された。しかし、その他の地点では両者の傾向は必ずしも一致せず、群集構造の違いによる酵素組成の違いを反映しているのではないかと考えた。一部の測点では反応速度パラメータの測定も加えて行い、これにより、リン酸モノエステラーゼの基質親和性及び最大反応速度はリン酸塩濃度と有意な負の相関を示すことが明らかになった。これは、現場の微生物群集が分子レベルで現場のリン酸塩濃度に応答していることを示す。また、速度パラメータから計算される基質の生物学的

回転速度はリン酸モノエステルが1~2週間であったのに対し、ジエステルは100日を大きく超え(表1)、後者が生物学的には不活性な画分であることが初めて示された。

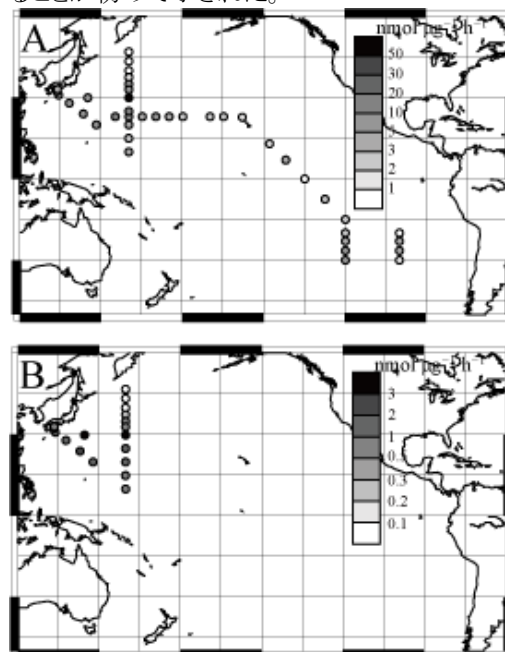


図1. 10 mにおけるクロロフィルaあたりリン酸モノエステラーゼ(A)およびジエステラーゼ活性(B)。

表1. リン酸モノエステルの10 mおよびクロロフィル極大層(SCM)における潜在回転速度(日)。測点番号が大きくなるほど低緯度の測点である。

		Monoesters	Dieters
10 m	Stn. 1	99	N.D.
	Stn. 5	13	N.D.
	Stn. 9	11	390
	Stn. 12	7	324
	Stn. 17	5	128
SCM	Stn. 1	112	652
	Stn. 5	46	N.D.
	Stn. 9	26	535
	Stn. 12	16	575
	Stn. 17	22	N.D.

(4) ピコ・ナノ植物プランクトンサイズ組成の解析
フローサイトメトリーにより測定されたピコ・ナノ植物プランクトン平均サイズはどの群集についても環境パラメータと有意な相関を示さなかった。そこで、各平均サイズを測定時の現地時刻(世界標準時+東経÷15)に対してプロットしたところ、すべての群集について顕著な日周変化を示していることが明らかになった。すなわち、太平洋全域においてピコ・ナノ植物プランクトンは同期的な分裂を行っている可能性が強く示唆された。また、その分裂はどの群集に関しても日没前後に始まることが示唆された。

この日周変化の影響を補正した平均細胞サイズを各種環境パラメータと回帰させたところ、真核植物プランクトン群集以外の2群集は有意な相関は見られなかった。それに対し、真核植物プランクトンの細胞サイズは温度およびリン酸塩濃度と有意な正の相関を示し、特に温度の影響が大きかった(図2)。これは温度が高くなるほど小型の群集の相対的寄与が減少することによるもので、群集全体のサイズがシフトするものではなかった。従来は温度の上昇とそれにとまなう成層の強化は植物プランクトンサイズの小型化をもたらすものだと定説があったが、この結果はそれに修正を迫るものである。より正確には、高温の水塊では極めて細胞サイズの小さい*Prochlorococcus*の相対的寄与も高まるので、高温下では植物プランクトンの細胞サイズは2極化するといえる。

このサイズ組成の変化が食物網構造全体や移出生産に与える影響を今後明らかにしていく必要がある。また、栄養塩獲得の上では不利な大型の真核植物プランクトンがどのようにしてより成層化した高温の環境に適応しているのか、混合栄養などのこれまで重視されてこなかった栄養獲得形態を中心に検討していく必要がある。

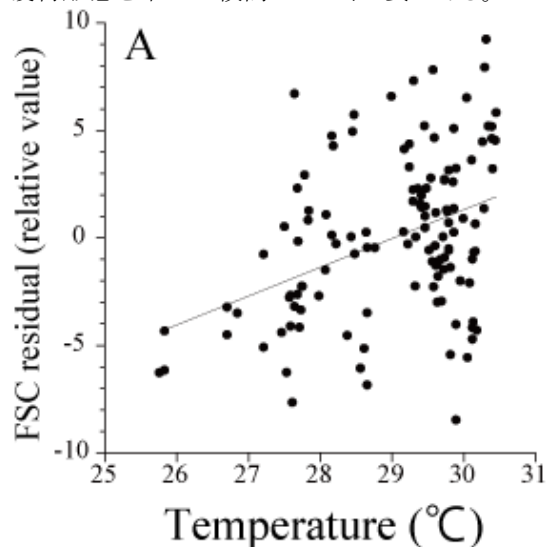


図2. 水温に対する真核ピコ・ナノ植物プランクトン細胞平均サイズ。平均サイズは相対値で、日周変化の影響を補正している。

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1件)

(1) Sato, M., R. Sakuraba, and F. Hashihama (2013): Phosphate monoesterase and diesterase activities in the North and South Pacific Ocean. *Biogeosciences Discussion Papers*, bg-2013-282, accepted. 査読有。

[学会発表](計3件)

(1) 佐藤光秀・橋濱史典・児玉武稔・古谷 研 (2013): 太平洋亜熱帯海域におけるピコ・ナノ植物プランクトンサイズ. 2013年度日本海洋学会春季大会, 東京. 2013年3月22日

(2) Sato, M., R. Sakuraba, and F. Hashihama (2013): Distributions of alkaline phosphatase and disphosphatase activities in the Pacific Ocean, with an emphasis on phosphorus cycling in subtropical gyres. ASLO 2013 Aquatic Sciences Meeting, New Orleans, USA. 2013年2月19日

(3) 佐藤光秀 (2011): 太平洋亜熱帯域における植物プランクトンの増殖と制限要因. 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 亜熱帯太平洋のプランクトン生態系および物質循環に関する比較海洋学, 東京. 2011年10月3日

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤光秀 (Sato Mitsuhide)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 60466810

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし