

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710005

研究課題名(和文) 海洋「微生物ループ」への有機物供給メカニズム：名脇役はだれ？

研究課題名(英文) Who contribute to supply microbial available organic matter in marine "microbial loop"?

研究代表者

大林 由美子 (Obayashi, Yumiko)

横浜国立大学・工学研究院・研究教員

研究者番号：60380284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：海洋物質循環における「微生物ループ」の重要性は認識されているが、細菌が利用できる形の有機物を微生物ループに供給するメカニズムに関する情報は少ない。本研究の成果では、天然海水中でみられる有機物分解特性は従属栄養細菌群集による作用だけでは説明できないこと、「微生物ループ」のなかで従来は細菌の捕食者としてのみ位置づけられてきた原生動物が細菌群集への有機物供給を手助けしている可能性があることなどが示唆された。しかし、海洋微生物生態系において、海水中の有機物動態に対して、誰が、どのように、どの部分に関わっているかについての全体像はまだ掴めておらず、今後もさらに発展させた研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Supplying mechanisms of microbial available organic matter to marine "microbial loop" is not well described. In this study, activities and its profiles of extracellular enzymes which degrade bioorganic molecules in seawater were investigated in various situations (observations and experiments). As results, it was revealed that organic matter degradation enzymes detected in seawater were surely but not all derived from heterotrophic bacteria. Part of organic matter hydrolytic enzymes in seawater might be derived from microbes other than bacteria such as protozoa. Further investigation is needed to understand whole mechanism of organic matter degradation and utilization in marine "microbial loop".

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：物質循環 微生物ループ 海洋 有機物 微生物生態系 海洋細菌群集 細胞外酵素 原生生物

1. 研究開始当初の背景

地球表層の一次生産の約半分は海洋で行われている。生産された有機物は、生態系の中で形を変えながら移動する。30年ほど前までは、海洋でのその主たる移動・変換経路は「植物プランクトン 動物プランクトン 魚などの高次栄養生物」という捕食食物連鎖であると考えられ、細菌などの微生物は、その経路から外れたところで魚の糞や死んだ生物を分解して再び一次生産の材料にする役目を担うものと認識されていた。しかし、1980年代以降の研究により、海洋で生産された有機物のうちのかなりの部分がなんらかの過程を経て海水中の“溶存態有機物”となることがわかった。さらに、海水中の微生物（主に従属栄養性細菌）はこの溶存態有機物も“えさ”として利用し、その微生物が他の生物に捕食されることにより高次栄養生物へと物質が伝わっていく経路があることが示され、「微生物ループ」と呼ばれている。近年では、海洋表層で一次生産された有機物の約半分が微生物ループの側に流れるとも見積られており、海洋における物質やエネルギーの移動・変換（物質循環）における微生物ループの重要性が広く認識されるようになった。しかしながら、このような見積りは、細菌の現存量とその炭素要求量からの推定であり、「どのようにして有機物が微生物ループへ供給されているのか」については、説明されていないことが多い。

2. 研究の目的

海洋の「微生物ループ」は、地球表層の物質循環経路の一つとしてその重要性が認識されているにもかかわらず、物質循環の視点からも生態系解析の視点からも、最もその実態が把握されていない部分である。地球環境変動に対する物質循環系や海洋生態系の応答とそのフィードバックの予測においても、海洋「微生物ループ」の理解は必須の命題である。本研究では、微生物ループへの有機物供給メカニズムに焦点をあててその実態に迫り、「微生物ループ」に対する基本的理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、従来は従属栄養細菌群集の活性の指標と捉えられてきた海水中の高分子有機物分解酵素活性・特性を“微生物ループへの有機物供給メカニズムを知るための道標”と捉え、それを用いた調査・実験を行った。主に複数種類のタンパク質分解酵素の活性を測定してその特性を明らかにし、また、実験によってはタンパク質そのものの分解についても同時に分析した。

4. 研究成果

(1) 細胞外加水分解酵素活性測定法の再考

他の実験の実施に先立ち、海水中の細胞外加水分解酵素活性測定法の見直しを行った。その結果、マイクロウェルプレートを用いて測定する場合、低吸着性のマイクロプレートを使用しなければ、酵素の種類によっては活性が大幅に過小評価されることがわかった。これは主にプレート器壁への酵素および基質の吸着による失活と思われる。以降の実験では、いずれも低吸着性マイクロプレートを使用した。

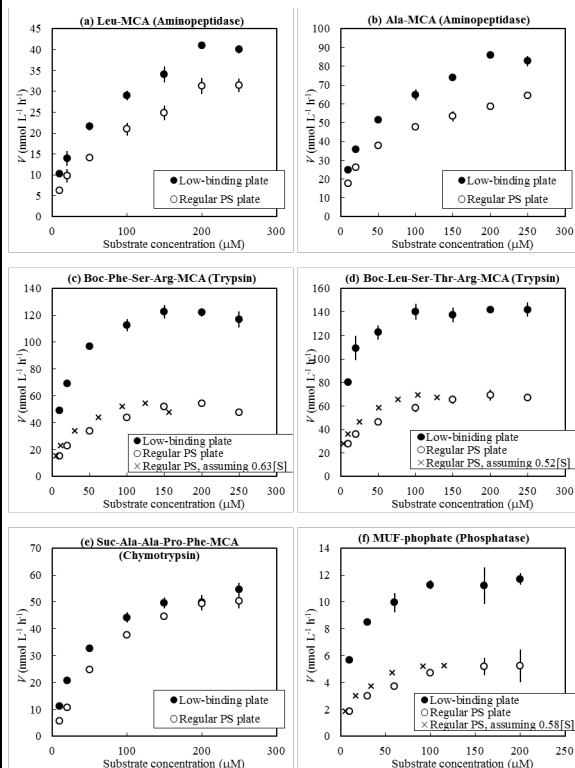


図1. 低吸着性マイクロプレートを用いた場合（白丸）と一般的なポリスチレン製マイクロプレートを用いた場合（黒丸）のミカエリスプロットの比較。活性測定のための基質として(a)アミノペプチダーゼ用基質 Leu-MCA、(b)アミノペプチダーゼ用基質 Ala-MCA、(c)トリプシン用基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、(d)トリプシン用基質 Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA、(e)キモトリプシン用基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA、(f)ホスファターゼ用基質 MUF-phosphate を用いている。特にトリプシン型酵素活性とホスファターゼ活性の測定において、使用するプレートによる差が大きいことがわかる。(Obayashi et al. 投稿中)

(2) 生物活性の部分阻害剤を用いて天然海水中のタンパク質分解酵素の起源を探る実験

天然海水（沿岸の表層海水）に、原核生物に対する抗生物質としてエリスロマイシンを添加した系（E）、真核生物およびアーキア

に対する阻害剤となるジフテリアトキシンを添加した系 (D)、その両方を添加した系 (ED)、どちらも添加していない系 (C) を作成し、各系内のプロテアーゼ活性・特性の変化を追跡する実験を行った。また、採水した海水の一部は直ちに濾過して、孔径 0.6 μm のフィルターを通過した海水 (細菌群集を含むが原生動物などはほとんど含まない)、孔径 0.2 μm のフィルターを通過した海水 (溶解態画分。細菌群集もごく少量しか含まれない) を作成し、これらについても、同様の実験を行った。いずれの実験区も二連で行い、エリスロマイシンとジフテリアトキシンはそれぞれ最終濃度 10 mg/mL になるように添加した。各ボトルから、継時的にサブサンプルを採取し、各種プロテアーゼ活性を測定した。測定には、アミノペプチダーゼ用基質として Leu-MCA と Ala-MCA、トリプシン用基質として Boc-Phe-Ser-Arg-MCA と Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA、キモトリプシン用基質として Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA を用いた。

採水後すぐの海水では、これまでの沿岸表層海水での調査と同様に、トリプシン型活性が最も高く、そのうちのかなりの割合が溶解態画分に含まれていた。阻害剤を添加していない系 (C) では、Day1 までにトリプシン型活性とキモトリプシン型活性は低下し、アミノペプチダーゼ活性が増大した。同様の変化は 0.6 μm および 0.2 μm の濾過海水を用いた系でも観測された。エリスロマイシンを添加した系 (E) では、この Day1 でのアミノペプチダーゼ活性の上昇は見られず、いずれの酵素活性もやや低下した。これらの結果から C でのアミノペプチダーゼ活性上昇は細菌の増殖または活性化によるものであり、E ではエリスロマイシンの静菌作用によりこれが抑えられたものと考えられる。

ジフテリアトキシンを添加した場合 (D) のプロテアーゼ活性は予想と大きく異なる変化を示した。アミノペプチダーゼ活性は非常に大きく上昇し、トリプシン型、キモトリプシン型活性も、アミノペプチダーゼほどの増加幅ではないがいずれも上昇した。原生動物などの真核微生物をほとんど含まない 0.6 μm 濾過海水にジフテリアトキシンを添加した場合も同様に Day1 までに大きく上昇し、それ以降は未濾過海水の D よりもさらに大きく上昇した。ジフテリアトキシンとエリスロマイシンを両方添加した ED では、Day1 までの上昇は見られず Day2 より上昇した。これらの結果より、ジフテリアトキシンがある場合のプロテアーゼ活性の上昇は細菌の増殖または活性化によるものであり、真核生物およびアーキアにとっての阻害剤であるジフテリアトキシンが細菌にとってはエサとなったものと思われる。ジフテリアトキシンはタンパク質であるので、プロテアーゼ活性が特に増大した可能性がある。ED ではエリスロマイシンの静菌作用により細菌群集の活性

化が 1 日は抑えられていたがその後は静菌作用よりもタンパク質添加による施肥効果のほうが上回ったと考えることができる。

以上の結果から、天然海水中で検出されるプロテアーゼ活性のうち、アミノペプチダーゼ活性については細菌群集に直接由来するものが多いと思われるが、トリプシン型・キモトリプシン型酵素については、その起源の少なくとも一部は細菌群集であるがそれ以外の起源も含まれること、細菌群集によるトリプシン型・キモトリプシン型酵素の産生はタンパク質が添加された場合には増大すること、などが示唆された。

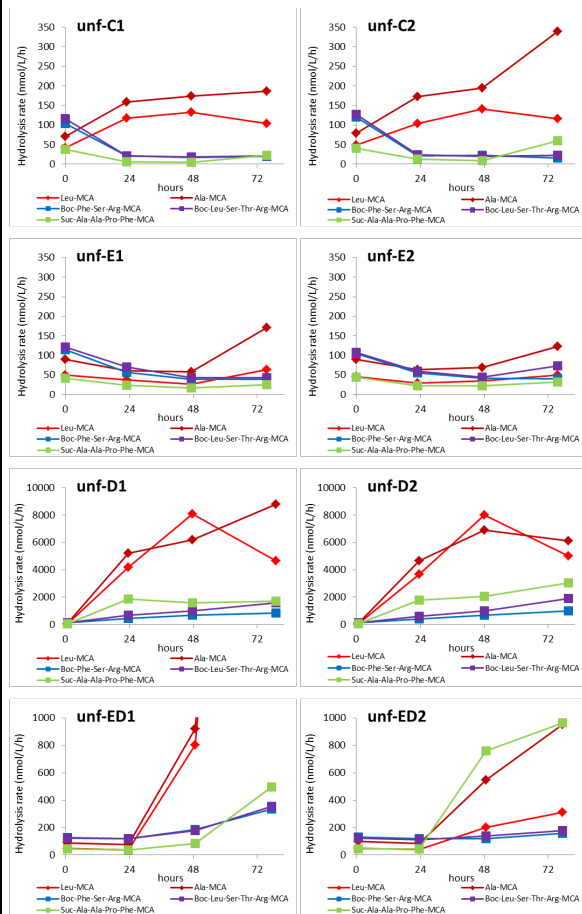


図 2. 未濾過天然海水に、何も加えていない場合 (unf-C1, unf-C2)、エリスロマイシンを加えた場合 (unf-E1, unf-E2)、ジフテリアトキシンを加えた場合 (unf-D1, unf-D2)、エリスロマイシンとジフテリアトキシンを両方加えた場合 (unf-ED1, unf-ED2) の系内のタンパク質分解酵素活性の変化。いずれの実験区も二連で行っている。タンパク質分解酵素活性・特性の測定には、アミノペプチダーゼ用基質 (Leu-MCA (赤)、Ala-MCA (茶))、トリプシン用基質 (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (青)、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (紫))、キモトリプシン用基質 (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (緑)) を用いた。0.6 μm 濾過海水、0.2 μm 濾過海水でも同様の実験を行っているが紙面の都合上、図は割愛する。実験には沿岸表層海水を用いた。(Obayashi et al. 投稿準備中)

(3) 生物遺骸由来タンパク質分解マイクロコズム実験

海水中の微生物群集によるタンパク質分解を追跡する実験を行った。採水時に大型粒子を除去したのみの未濾過海水および濾過により細菌以外の生物(原生生物など)を取り除いた海水に、有機物の固まりである微生物遺骸を分解基質として添加したマイクロコズムを作成して暗所に置き、添加した微生物遺骸由来のタンパク質が分解される様子を経時的に追跡した。その結果、原生生物も細菌群集も含む未濾過海水の系では、10日目以降、検出されるタンパク質が激減したのに対し、原生生物を取り除いた海水(細菌群集を含む)を用いた系では、検出されるタンパク質は減少するものの30日目においてもかなりのタンパク質が残存していた。このことは、一般に有機物分解者と考えられている細菌群集だけでなく、原生生物なども海水中のタンパク質分解に多分に貢献をしている可能性を示唆している。

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)

Chui Wei Bong, Yumiko Obayashi, Satoru Suzuki (2013): Succession of protease activity in seawater and bacterial isolates during starvation in a mesocosm experiment. *Aquatic Microbial Ecology*, 69, 33-46. 査読有
doi: 10.3354/ame01618

[学会発表](計 6 件)

Ngo Vy Thao, Akino Nozawa, Yumiko Obayashi, Shin-Ichi Kitamura, Taichi Yokokawa, Satoru Suzuki: Ciliates exhibited prominent protease activity against bacteria in microcosm experiments. *Ocean Sciences Meeting 2014*, ホノルル, 2014年2月25日

大林由美子・Bong Chui Wei・鈴木 聡: 海水中の有機物分解酵素活性測定: 方法論再考, 第29回日本微生物生態学会大会, 鹿児島, 2013年11月23日

Y. Obayashi, S. Suzuki, K. Hamasaki: Microbial responses to addition of dissolved protein and free amino acids: case studies in the subtropical and subarctic North Pacific. 第28回日本微生物生態学会大会 / The 4th Japan-Korea International Symposium on Microbial Ecology, 豊橋, 2012年9月20-21日

Y. Obayashi, S. Suzuki, K. Hamasaki: Different response of marine bacterial community to addition of dissolved protein and free amino acids. ASLO 2012 Aquatic Sciences Meeting, 大津, 2012年7月10日

N. V. Thao, Y. Obayashi, T. Yokokawa, S. Suzuki: Bacterial proteases are not sufficient to degrade proteins in seawater. ASLO 2012 Aquatic Sciences Meeting, 大津, 2012年7月10日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林由美子(OBAYASHI, Yumiko)
横浜国立大学・大学院工学研究院・研究教員
研究者番号: 60380284

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: