

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850129

研究課題名(和文) 海洋における混合栄養生物が物質循環に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Roles of mixotrophs in material cycling of the ocean

研究代表者

佐藤 光秀 (Sato, Mitsuhide)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：60466810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：光合成と粒子食の両方を同一生物がおこなう混合栄養は海洋プランクトンにおいては極めて普遍的な現象である。本研究は、種々の手法を用いて研究例の少なかった外洋における混合栄養性プランクトンを定量した。古典的な蛍光標識細菌添加法、および食胞の染色とフローサイトメトリーの組み合わせによる結果は互いによく相関しており、後者の有用性が明らかになった。また、混合栄養生物は貧栄養な亜熱帯海域で相対的な重要性が高まっており、栄養獲得戦略として粒子食が有効にはたらいける可能性がある。また、同位体標識した餌生物を取り込ませ、超高解像度二次イオン質量分析で観察することにより混合栄養生物を定量する条件を検討した。

研究成果の概要(英文)：Mixotrophy, which is a combination of photosynthesis and phagotrophy, is a universal trait among marine phytoplankton. In the present study, mixotrophs in the open ocean were quantified using the two different methods, traditional fluorescently labelled bacteria method and a combination of flow cytometry and an acidotropic fluorescent probe. The results using the two methods were well correlated with each other, showing that the latter method is robust in quantifying mixotrophs in natural environments. The relative importance of mixotrophs was higher in the subtropical waters, which contain scarce bioavailable nutrients. This suggests that phagotrophy is an effective strategy for nutrient acquisition. I also examined the optimum conditions for secondary ion mass spectrometry of the samples from the experiments where natural plankton communities were fed with isotope-labelled prey, in order to quantify mixotroph abundance and grazing.

研究分野：生物海洋学

キーワード：混合栄養生物 フローサイトメトリー 栄養塩 質量分析 物質循環

1. 研究開始当初の背景

近年、微生物食物網をめぐる物質循環において特に注目されるのが混合栄養生物、すなわち光合成によるエネルギー獲得と摂餌の両方を行う能力がある生物の役割である。海洋における混合栄養生物自体は 1980 年代よりその存在が認識され、観察や分類の研究は脈々と行われてきた。

近年着目が増している理由の一つが、外洋における混合栄養生物研究の進展である。混合栄養生物の研究は黎明以来陸水や内湾域に集中していたが、少ないながらも外洋におけるデータが蓄積するにつれ、興味深いことがわかってきた。それは、環境中の栄養塩濃度と、混合栄養生物による摂餌速度や全摂食に占める混合栄養生物の割合との間に負の相関がみられるというものである (Stukel *et al.*, 2011; Hartman *et al.*, 2012)。これは、貧栄養な環境において光合成と摂餌という二つのエネルギー獲得形態をもつ混合栄養生物の優位性を示唆している。

しかし、この観測事実だけでは、たとえ貧栄養環境で主要な摂餌者が混合栄養生物に変わろうとも、系全体の物質やエネルギーの循環には影響がなく、従来認識のままでも大きくは変わらない。ここでもう一つ、混合栄養生物は従属栄養生物と比べて体元素組成、およびそれともなう再生効率が異なる (Rothhaupt *et al.*, 1997) という点が重要となる。これは光合成装置の維持などに起因するものと推察される。すなわち、**栄養塩環境の変化にともなう混合栄養者と従属栄養者の相対的な寄与の変化は、各種栄養塩の相対的な循環動態を変化させ、系全体の生産効率や一次生産者の存在量や組成に影響を与え**ると考えられる。

これまでの混合栄養生物の研究は、蛍光標識した模擬餌粒子と蛍光顕微鏡観察を組み合わせた計数による研究が圧倒的主流であった。一定期間の培養後に蛍光餌粒子を取り込んだ自家蛍光生物を計数することによって混合栄養生物の密度や生物量、摂餌速度を推定する手法である。観察に熟達が必要で個人差は出やすいものの、実験自体は単純で内湾から外洋まで幅広く適用できるという長所から、20 年以上にわたり適用されてきた (Bird *et al.*, 1987)。しかし、蛍光擬餌粒子がどれだけ実際の餌粒子と区別されず取り込まれるかは常に付きまとう問題であり、炭素や窒素が実際混合栄養生物を介してどの程度転送されているかの定量にまでは至らなかった。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、**混合栄養者をめぐる物質の流れを明らかにする手法を構築・検**

討することである。これは旧来の蛍光擬餌粒子法を補完するものであり、具体的には現場の群集から窒素同位体で標識した餌を作製し、同位体標識した重炭酸塩とともに培養する。このサンプルを超高解像度二次イオン質量分析装置 (nanoSIMS) を用いて観察し、窒素標識粒子と炭酸塩の両方を取り込んだ生物を定量することによって混合栄養者とその摂餌量の定量化を図る。つづいて、この手法と旧来の手法を併用することによって、**各海域での混合栄養者の密度や摂餌速度のマッピングを行う**。内湾や外洋、特に栄養塩類の勾配に着目しながらさまざま海域で測定を行うことにより、混合栄養者に影響を与える環境因子の解明を行う。時に応じて添加培養実験を行い、実験的検証を行うとともに、環境変化に対する混合栄養者の応答を明らかにする。これらをもとに、**混合栄養者をめぐる生元素の循環を明らかにする**。従属栄養者との比較や海域ごとの比較を通じて、従属栄養者が海洋の物質循環において占める地位を解明する。

3. 研究の方法

中部太平洋南北測線を観測する白鳳丸 KH-13-7 次航海及び KH-14-3 次航海を利用し、蛍光標識細菌 (FLB) 法、食胞を染色する蛍光プローブ LysoTracker Green とフローサイトメトリーの併用による計数 (LT 法) および同位体標識による摂餌実験の 3 通りの実験を行い、相互比較を試みた。すべての採水は水深 10 m より行った。

(1) FLB 法

KH-13-7 次航海においては神奈川県荒崎沖にて採取した現場細菌を培養し、染色して餌として用いた。KH-14-3 次航海においては東京大学大気海洋研究所微生物分野より供与された *Sphingomonas alaskensis* 株を染色して用いた。

(2) LT 法

フローサイトメーターは Partec 社製 CyFlow space を使い、濃度や染色時間は研究室にて維持培養している亜寒帯外洋性クリプト藻に対して最適化した。サンプルはすべて船上で処理・測定した。実験は KH-14-3 次航海のみで行った。

(3) 同位体添加実験

各航海 3 測点で実験を行った。表層海水に $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を添加し、同位体標識したピコ植物プランクトンを作製した。これをフィルター上に濃縮し、洗浄したのち $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ とともに同じ深度から得た水に添加した。12 時間の培養中数回サンプルを採取し、フィルター上に集めて nanoSIMS 観察用サンプルとした。

4. 研究成果

FLB 法および LT 法

KH-13-7 次航海においては、西経 170 度線上を南緯 0 から 10 度まで観測することがで

きた。全ナノ植物プランクトンに占める混合栄養生物の割合は 6~8%であり、同様の手法を用いて測定された貧栄養海域での結果と比べてやや小さいが同程度であった。この割合がやや小さかったのには沿岸域の細菌から FLB を作製したためにサイズが比較的大きく、サイズ選別が起こった可能性が考えられた。

そこで、KH-14-3 次航海では手に入るうち最も小さい細胞であるもののひとつである *Sphingomonas alaskensis* を用いて FLB を作製し、西経 170 度線上の北緯 0 から 64.25 度を観測した。その結果、全ナノ植物プランクトンのうち、2~12%に FLB 取込みが見られた。また、その割合は亜熱帯循環内（北緯 5~35 度）で他の海域より明らかに高く（図 1）、高度に成層化した環境内では絶対独立栄養生物と比して混合栄養生物が栄養獲得において優位性が高い可能性がある。

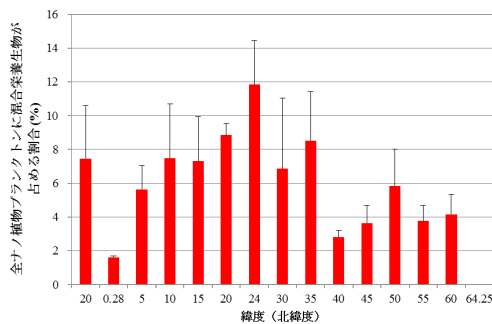


図 1. FLB 法により診断された、KH-14-3 次航海南北測線における全ナノ植物プランクトンに占める混合栄養生物の割合。

しかし、混合栄養生物と絶対従属栄養植物の比較においては、両者の比に明確な地理的変動は見られず、両者の相対的な生態的優位性を決定する因子は今回の研究からは明らかにならなかった。また、全 FLB 取込み量においても、混合栄養生物による全取込み量や混合栄養生物と絶対従属栄養生物の比率に関して、明瞭な地理的変動はなかった。本手法の解像度や精度の問題も含め、今後さらに検討が必要となる。

LT 法は直接的に摂餌行動を測定するものではないが、食胞の有無を判定基準とすることによって潜在的な摂餌能を判断することができる。LysoTracker Green の取り込みの有無は緑蛍光の強度から判別するため、その閾値の設定により混合栄養生物の比率が変化する。本研究においては諸検討の結果、自家蛍光の 10 倍の強度を閾値とした。

その結果、LT 法により診断された混合栄養生物の比率は FLB 法の結果と有意な正の相関を示したが、LT 法のほうが圧倒的に高かった。これは LT 法が潜在的な摂餌能を診断する方法であるためと考えられる。しかし、LT 法は短時間で多量のサンプルを扱うことができるため、繰り返し精度もよく、観察者の技能に左右されないなど利点も多い。最も大

きな利点は餌生物のサイズなどに対する選択性を考慮する必要がないため、海水内の全群集に対して 1 回の実験で同じ条件で摂餌能を診断できることにある。このことにより、FLB 法では診断の難しいピコ植物プランクトンの潜在的な摂餌能も判別することができた（図 2）。ナノ植物プランクトンほど高い割合ではないものの、亜熱帯循環内を中心に摂餌能をもつピコ植物プランクトンは極めて普遍的な存在であることが明らかになった。亜寒帯域に出現するクリプト藻は他のナノ植物プランクトンと比べて密度が低いため FLB 法では有意な計数を得ることが難しかったが、LT 法によりその摂餌能を評価することが可能になった。クリプト藻の摂餌能は北極海や陸水において知られているが、外洋域での報告は初めてである。クリプト藻は他のナノ植物プランクトンと比べて鉄等の資源が乏しい海域においても優占することが知られており、混合栄養という栄養形態が過酷な環境下での生存に寄与している可能性がある。また、LT 法においては、前述の地理的変動も FLB 法よりも明瞭に見られた。

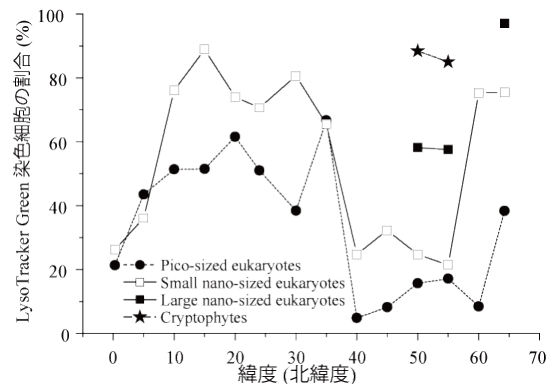


図 2. LT 法により診断された、KH-14-3 次航海南北測線におけるピコ植物プランクトン、ナノ植物プランクトン（サイズにより大小に区分）、クリプト藻に占める潜在的な混合栄養生物の割合。

以上の成果は論文としてまとめられており、近日投稿される予定である。

同位体標識と超高解像度二次イオン質量分析を組み合わせた混合栄養生物をめぐる物質循環の直接測定実験は、KH-13-7 次航海及び KH-14-3 次航海の 2 航海において、南北太平洋で数回実施することができた。現在、サンプルを処理し、測定条件の検討を行っている。年度中に成果を報告することはできなかったが、測定を継続し、全成果と併せて混合栄養生物をめぐる物質循環とそれを制御する要因の一端が解明されるものと期待する。

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 2件)

1. Sato, M., T. Kodama, F. Hashihama and K. Furuya (2015): The effects of diel cycles and temperature on size distributions of pico- and nanophytoplankton in the subtropical and tropical Pacific Ocean. *Plankton and Benthos Research*, 10: 26-33. 査読有
2. Tanita, I., S. Takeda, M. Sato and K. Furuya (2015): Surface and middle layer enrichment of dissolved copper in the western subarctic North Pacific. *La mer*, 53: 75-90. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

1. 佐藤光秀 (2015): 北太平洋南北測線における混合栄養性プランクトンの分布. 日本海洋学会春季大会. 東京海洋大学. 2015年3月22日.
2. 谷田 巖・塩崎拓平・児玉武稔・佐藤光秀・古谷 研 (2015): 太平洋熱帯亜熱帯域における窒素固定生物の分布と環境要因. 日本海洋学会春季大会. 東京海洋大学. 2015年3月22日.

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