

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26740001

研究課題名(和文) 海洋における粒子態有機物を起源とする微生物炭素ポンプ機能の解明

研究課題名(英文) Dynamics of microbial carbon pump; analysis of refractory dissolved organic matter production from particulate organic matter

研究代表者

多田 雄哉 (Tada, Yuya)

北海道大学・地球環境科学研究科(研究院)・日本学術振興会特別研究員-PD

研究者番号：40582276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物炭素ポンプ過程において重要な過程と考えられる、粒子態有機物から溶出する難分解性溶存有機物(具体的には腐植様蛍光物質)を定性的および定量的に解析するため、半透膜を用いた実験系の確立および実際の海水中に存在する粒子態有機物から溶出する腐植様蛍光物質の定量を行った。また、粒子態有機物から溶出してくると考えられる還元糖類およびアミノ酸各種をモデル物質として、海水中に添加する培養実験を実施し、これらの添加に増殖応答する細菌系統群および、これらの変化に伴う蛍光性溶存有機物の変化を解析した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on the microbial carbon pump, which is the one of the most important carbon sequestration systems as well as the biological carbon pump in the ocean. I tried to develop the method using semi permeable membrane to assess the production of refractory dissolved organic matter (DOM), especially humic-like fluorescence DOM (FDOM), from particulate organic matter (POM). Then I assessed the production of protein-like and humic-like FDOM from the POM using incubation experiment. In addition, I evaluated the interaction among the labile organic matter (used several amino acids and monosaccharides as a model DOM), bacterial community, and the humic-like FDOM production.

研究分野：海洋微生物生態学

キーワード：難分解性溶存有機物 海洋細菌 微生物炭素ポンプ 粒子態有機物

1. 研究開始当初の背景

近年、海洋細菌の代謝過程で、化学・生物学的な分解を受けにくい難分解性溶存有機物 (Dissolved organic matter (DOM)) が生成され、長期間蓄積される「微生物炭素ポンプ」という新たな炭素貯蔵システムが提唱された (Ogawa et al., Science, 2001; Jiao et al. Nature Rev. Microbiol., 2010)。この難分解性 DOM は海洋炭素プールの約 9 割を占めることが明らかとなってきた (620 Gt; Hansell et al., Oceanogr., 2009)。したがって、微生物炭素ポンプ機能による難分解性 DOM 生成量の正確な見積もりは、海洋における炭素貯蔵能力の評価および海洋炭素循環モデルを高精度化する上での重要な課題であると考えられる。

海洋細菌による難分解性 DOM の生成過程は微生物炭素ポンプ効率を見積もる上で鍵となる過程である。研究代表者はこれまでに、西部北太平洋亜寒帯域における現場観測と培養実験の解析結果から、海洋細菌群集の増殖が、藻類由来の DOM の減少と共変動し、その後、難分解性 DOM が大量に生成され、海水中に残存する現象を発見した (Tada et al., Appl. Environ. Microbiol., 2011; Tada et al., J. Oceanogr., 2012)。さらに、これらの先行研究で得られた画像データを詳細に解析した結果、ブルームによって生成された粒子態有機物の周囲に大量の細菌群が付着している現象が観察された。海洋において、有機物の転換・分解に関わる従属栄養細菌は、粒子態有機物に付着した状態で生息する「付着性細菌」と、水中に浮遊して溶存有機物を利用する「自由遊泳性細菌」の二つの存在形態がある。これまでの研究で、付着性細菌は粒子態有機物の分解・溶存化に大きく貢献していることが示されている (Delong et al., Limnol. & Oceanogr., 1993; Nagata et al., Deep-Sea Res., 2008) ことから、これら付着性細菌による粒子態有機物の溶存化は難分解性 DOM の生成、ひいては微生物炭素ポンプ過程に大きく影響していると予想される。しかしながら、粒子態有機物からの難分解性 DOM 溶出量を見積もった研究例は非常に希少であるのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、難分解性 DOM の一つと考えられる腐植様蛍光物質に着目し、粒子態有機物から溶出される腐植様蛍光物質を定量すると同時に、腐植様蛍光物質生成に寄与する細菌群を特定することで、粒子態有機物を起源とした微生物炭素ポンプ機能の制御要因を明らかにすることを目的とした。具体的には (1) 付着性細菌および粒子態有機物起源の溶出 DOM のみを分離・解析するため、「半透膜培養法」を確立する。

(2) 「半透膜培養法」と「三次元・励起蛍光スペクトル法」の併用により、粒子態有機物からの難分解性 DOM (特に腐植様蛍光物質) 溶出量の定量化と分子量情報の特定を行う。

(3) 粒子態有機物から溶出されると予想される、アミノ酸や還元糖類の分解過程における腐植様蛍光物質への変換過程、およびその変動に寄与する細菌群集の特定を行うことで、難分解性 DOM の微生物学的生成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 半透膜培養法に使用する半透膜として、系外からの細菌細胞のコンタミネーションが最も軽減できると考えられた、Spectrumlabs 社製の Float-A-Lyzer (分子量 8,000~10,000) を用いて予備実験を行った。予備実験として、1. 半透膜洗浄法の再検討、および半透膜からの DOC 溶出量の定量、2. 半透膜からの蛍光溶存有機物溶出量の定量、3. 半透膜内からの細菌細胞の透過 (コンタミネーション) の有無の検討を行った。また、洗浄後の半透膜からの蛍光溶存有機物の溶出量を、三次元励起蛍光スペクトル法によって確認した。

(2) 2015 年 12 月に忍路臨海実験所付近で採取した海水 (24 L) 中の粒子態有機物を孔径 3 μm のポリカーボネートフィルターを用いて捕集し、フィルター上の粒子態有機物を人工海水に再懸濁した。これらの粒子態有機物が含まれた溶液をよく攪拌し、分子量の異なる半透膜 (分子量 100-500 および 8,000-10,000) 中に充填し、現場海水温で 10 日間培養した (11°C)。培養開始後、5 日目にサブサンプルを取得し、培養前及び培養後の試料に対して、三次元励起蛍光スペクトル法を用いて、溶出してくるタンパク質様および腐植様蛍光物質を定量した。

(3) 2015 年 7 月に、北海道大学忍路臨海実験所から採取した沿岸海水を用いて、粒子態有機物から溶出されると考えられる単体のアミノ酸および還元糖をモデル有機物とし、有機物添加実験を実施した。培養期間中、全菌数を蛍光顕微鏡を用いた直接計数法によりモニタリングし、培養前と培養後においては、三次元励起蛍光スペクトル法を用いて、これらの易分解性溶存有機物からどのような蛍光性有機物が生成されるのかを解析した。また、16S rRNA 遺伝子を標的とした Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法および次世代シーケンサー (Ion PGM, Life Technologies) を用いて、これら蛍光性溶存有機物の生成に伴って、どのような細菌系統群が増加するのかを詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 半透膜洗浄法として、超純水に長期間浸す方法、また、希塩酸 (0.5 M) に浸漬後、超純水に長期浸漬する洗浄する方法を試みた。具体的には、炭素フリーのガラスボトル (450°C、4 時間燃焼) に超純水または 0.5 M 塩酸を満たし、半透膜を浸漬して洗浄した後、全有機体炭素計 (TOC-V, Shimadzu) を用いて、有機炭素の溶出を経時的にモニタリングした。この結果から、酸洗浄 (1 day) 後に超純水に 1 ヶ月程度 (20 days) 浸漬することで、半透膜からの DOC 溶出量がほぼゼロになることが明らかとなった (図 1A)。また、洗浄後の半透膜からの蛍光溶存態有機物の溶出量を、三次元励起蛍光スペクトル法によって定量した。その結果、半透膜から、若干のタンパク質様蛍光物質が溶出してくることが明らかとなった。しかしながら、腐植様物質の溶出は見られないことが明らかとなった (図 1B)。

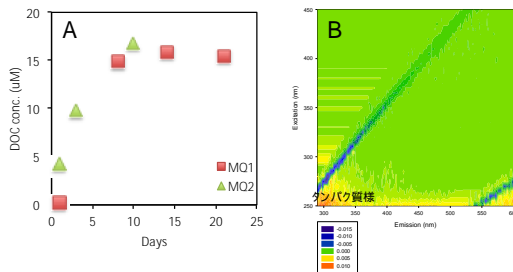


図1. 半透膜から溶出してくるDOC量 (A)およびFDOM (B)

また、北海道石狩湾に面した北海道大学附属忍路臨海実験所において採取した海水を半透膜の内部に充填し、膜内から膜外への細菌細胞のコンタミネーションの有無をフローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡を用いた直接計数法を用いて解析した。その結果、半透膜外への細菌細胞のコンタミネーションは無いことが明らかとなった。これらの結果から、Float-A-Lyzer 半透膜を用いることで、粒子態有機物および付着性細菌から溶出される腐植様蛍光物質の分析が可能であることが示唆された。

(2) 三次元励起蛍光スペクトル法によって、タンパク質様 (チロシン様) 蛍光物質および腐植様蛍光物質 M の蛍光強度を解析した結果、分子量 100~500 の半透膜から溶出した蛍光物質はチロシン様および腐植様 M 蛍光物質ともに、コントロールとの差が見られなかった (培養時間による差も見られなかった)。一方で、分子量 8,000~10,000 の半透膜からは、腐植様 M 蛍光物質の溶出が見られたことから、付着性細菌群集が粒子態有機物を利用し

て腐植様 M 蛍光物質を溶出する可能性があること。また、その蛍光物質は分子量 8,000~10,000 の範囲にある可能性が示唆された (図 2)。

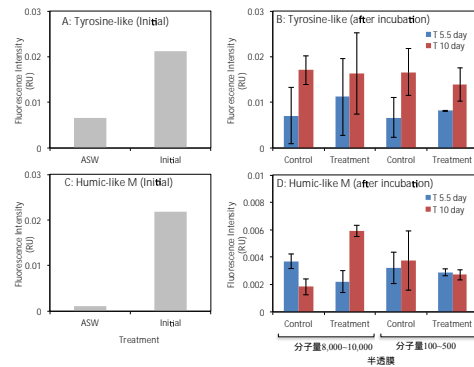


図2. 現場海水におけるFDOM中のトリプシン様FDOM量 (A) および腐植様-M FDOM量 (C)、培養後、半透膜から溶出したトリプシン様FDOM量 (B) および腐植様-M FDOM量 (D)

(3) 2015 年 7 月に行った培養実験において、三次元励起蛍光スペクトル法を用いて蛍光性有機物の増減を解析した結果、アミノ酸および還元糖添加に対する細菌数の増加に伴って、腐植様蛍光物質が増加することが明らかとなった (図 3, 4)。

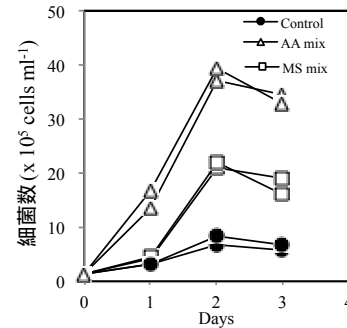


図3. 培養実験中の細菌数の変化

さらに、アミノ酸添加区と還元糖添加区を比較すると、アミノ酸添加区で腐植様蛍光物質 C の増加が顕著であることが明らかとなった (図 4) ことから、海洋細菌への溶存有機物の供給形態 (化学的特性) が変化することで、腐植様蛍光物質の生産量も変化することが明らかとなった。

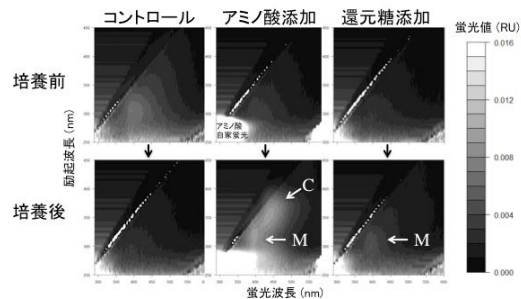


図4. 培養実験前および後におけるFDOM蛍光量の変化

また、培養前、培養後試料に対して、次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造解析を行った結果、還元糖添加区で *Bacteroidetes* 門 *Flavobacteriia* 綱に属する塩基配列の割合が増加することが明らかとなった。また、プロテオバクテリア門に属する塩基配列中では、アミノ酸および還元糖の両添加区でコントロール区と比較して、*Gammaproteobacteria* 綱 *Oceanospirillales* 目および *Vibrionales* 目に属する塩基配列の割合が増加することが明らかとなった(図5)。これらの結果から、細菌系統群の群集組成の変動によって腐植様蛍光物質の質および量が変動することが示唆された。

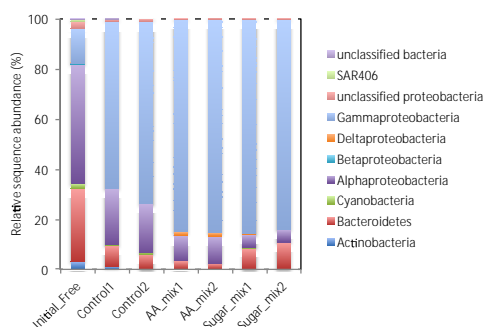


図5. 現場海水中、培養実験前および後における細菌群集構造の変化(次世代シーケンサーを用いた得られた塩基配列を解析した結果)

これらの成果は、日本海洋学会および日本微生物生態学会において発表した。

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0件)

[学会発表](計3件)

多田雄哉・中谷里愛・後藤周史・山下洋平・鈴木光次、「珪藻および渦鞭毛藻由来の溶存態有機物が沿岸性海洋細菌群集組成に及ぼす影響」、日本海洋学会春季大会、2016/3/17、東京大学、東京都文京区

多田雄哉・鈴木光次、「微細藻類由来の溶存態有機物に対する海洋細菌群集の動態解析」、日本微生物生態学会、2015/10/19、土浦コンベンションセンター、茨城県土浦市

多田雄哉・鈴木光次、「南太平洋における海洋細菌主要系統群の空間的変動」、日本海洋学会秋季大会、2015/9/15、愛媛大学、愛媛県松山市

[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
<http://geos.ees.hokudai.ac.jp/kojis/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 雄哉 (TADA YUYA)

北海道大学地球環境科学研究所・日本学術振興会特別研究員-PD
研究者番号：40582276

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し