

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850117

研究課題名(和文) プラクトン・パラドックスに挑む：珪藻類の協働的な有機態窒素・リン利用機構の解明

研究課題名(英文) Challenging studies on a plankton paradox theory: species-collaborative utilization of organic nitrogen and phosphorus compounds by marine diatoms

研究代表者

山口 晴生 (Yamaguchi, Haruo)

高知大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10432816

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)：海洋の主要基礎生産者である珪藻類は、必須栄養塩(窒素・リン)を巡り、種間で熾烈な競争を展開しているように見えながらも、実際には共存共栄を果たしている。この生態学の一般法則に矛盾する「プラクトン・パラドックス」の合理的説明を果たすため、本課題では、珪藻による種協働的な栄養塩利用について明らかにしようとした。その結果、いくつかの珪藻は有機態窒素/リンの一つ核酸を協働的に分解し、その結果、群集としての共存繁栄を図るのではないかと示唆された。これにより、「プラクトン・パラドックス」を合理的に説明可能な一つの新規現象が提唱された。

研究成果の概要(英文)：According to a competitive exclusion principle in ecology, a diatom that acquired a large amount of nutrients would be foreclose the other species for the environment and then could be a winner in the competition process. However, it is fact that many diatom species coexist in oceanic waters. This study evaluated the utilization of nucleotides, nucleosides and purines (component parts of nucleic acids) by field populations and cultures of marine diatoms by using a newly developed method with a spectro-fluorometric plate reader. Several diatoms were able to utilize these component parts as phosphorus sources and some diatoms utilized those as nitrogen sources. The results obtained from this research suggest that several species of marine planktonic diatoms degrade organic nitrogen/phosphorus complex compounds in cooperation with the other species and then live and let live as a community.

研究分野：海洋環境微生物学

キーワード：珪藻 有機態窒素 有機態リン 種協働

1. 研究開始当初の背景

珪藻類は、地球上の一次生産の約 20% を担う基礎生産者として、地球化学的・生態学的に重要な位置を占めている。環境中で珪藻が増殖する過程では、その生育に不可欠な栄養塩(窒素・リン等)を巡って、種間で熾烈な競合が展開されているものと考えられる。生態学の競争排他則に従えば、こうした競合の過程では、栄養塩の利用能に勝る少数あるいは単一の種が勝ち残り、その他の種は排除されると考えられる。ところが実際には、わずか 1 リットルの沿岸海中には数十種以上に及ぶ多種珪藻が共存を果たしている。

なぜ特定少数の珪藻種が優占しないのか?なぜ上記の生態学法則が守られないのか?この現象は「プランクトン・パラドックス」と呼ばれ、海洋生態学上の大きな謎とされてきた。これを説明する様々な仮説が提唱されているものの、未だ決定的・合理的な説明は果たされていない。

先にも述べたように、海産珪藻は窒素・リンを巡る獲得競争を展開していると考えられ、その競争過程では無機形態の窒素(=硝酸塩やアンモニウム)・リン(=リン酸塩)の獲得が鍵となると言われている。一方で、沿岸海中の窒素原子・リン原子の多くは、様々な有機物と結合した有機態の窒素/リン化合物として存在している。これら有機態窒素・リンは、多種多様な生物から海水中に常時供給されており、その濃度は無機態窒素・リンの数倍から数百倍になることが近年明らかにされつつある。これら有機態窒素・リンのうち、アミノ酸や糖リン酸のような、単純かつ低分子な化合物については、いくつかの珪藻種に分解可能なことが報告されている。しかし一方で、有機態窒素・リンに占めるその割合は、概ね数%~20%程度と低いことがわかってきた。これらの化合物に対し、多様な有機物と複雑に結合した、核酸やリン脂質といった複雑な有機態の窒素/リン化合物は、より大きな割合(25%~90%)を占め、沿岸域に広く分布していることが報告されている。これら複雑な有機態窒素/リンは細菌群により分解されるものと認識されており、珪藻による分解・利用の可能性は全く検討されていなかった。この可能性を探るべく、応募者は、科研費若手研究 B (平成 22~24 年度)等の助成を得ながら、以下の注目すべき知見を世界に先駆けて蓄積してきた。

1)珪藻(A種)は、核酸・リン脂質のような複雑な化学構造をとる有機物を、独自の酵素フォスファターゼにより強力に分解する(リンを切り出す)。

2)珪藻(B種)は、ヌクレオシドなどの有機態窒素を酵素アミダーゼにより分解する(窒素を切り出す)。

3)珪藻の有機態窒素・リン分解能は、細菌群のそれに概ね匹敵し、珪藻種や化合物の種類によって大きく異なる。

以上の成果より応募者は、珪藻多種による

有機態窒素・リンの利用仮説を構築した。仮説:異なる有機態窒素/リン分解能を持った複数の珪藻種は、窒素・リンを相互補完することで種協働的な栄養塩獲得戦略を展開する。すなわち、限られた種類の無機態窒素・リンばかりではなく、珪藻種別に異なる有機態窒素・リンを分解・利用することで、多種の珪藻が同時に存在することが可能となる。これは珪藻共存の「プランクトン・パラドックス」を合理的に説明できるものである。

2. 研究の目的

この仮説を検証すべく、本研究では、珪藻多種による有機態窒素/リン利用を明らかにし、珪藻の共存機構を提示する。具体的には、沿岸海域の海産珪藻群集の中で、有機態窒素・リン分解能を有する種およびその動態について明らかにする。さらに、当該種を含めた珪藻培養株を多数確立し、それらの有機態窒素・リン分解能と利用能ならびにそれらの種間における差異を厳密な培養実験により解明する。最終的には、多様な有機態窒素・リンを含むフラスコ内で珪藻複数種を培養し、それらの協働過程を栄養塩利用という観点から精査する。

3. 研究の方法

(1)有機態の窒素/リン化合物を分解可能な海産珪藻の探索

本邦沿岸域より採水を行い、各種珪藻を分離した。これらの分離株がどのような種類の有機態窒素・リンを分解・利用できるのかを既存の培養株とあわせて調べた。また、当該分解・利用能が判明した種については、その現存量の変動をモニタリングし、多種の共存性を調べた。

(2)海産珪藻の有機態窒素・リン分解・利用能の解明(室内培養試験)

前項の試験で見出した珪藻種を対象に、それらの有機態窒素・リン利用能を厳密な室内培養試験により精査した。これにより、当該能力の珪藻種間における差異を明らかにしようとした。

(3)有機態窒素・リンの種協働的な分解・利用による珪藻複数種の共存機構解明(室内培養試験)

珪藻各種の協働性を明らかにするため、有機態窒素・リン利用能が異なる珪藻種を一つのフラスコ培養液に混合接種し、それらの増殖を調べようとした。

4. 研究成果

(1)本邦沿岸水中の植物プランクトン群集は、核酸(DNA・RNA)・リン脂質の分解に不可欠な種々のフォスファターゼを産生することがわかった。とりわけ、環境水中のリン酸塩が制限因子になる場合、植物プランクトン群集の酵素活性が有意に増大したのに対し、窒素制限下での増大は認められなかった。後述するプレートリーダーを用いた核酸構

成要素，すなわちヌクレオチド，ヌクレオシド，塩基の定量により，沿岸試料のプランクトンの当該要素利用活性を検出することができた。このことは，現場プランクトン群集による核酸の分解とそれによって生じた産物の利用を示唆するものである。ただし，現場調査結果のみでは，種の共存要因を特定することは困難であり，培養試験による解析が必要と判断された。

(2) そこで，プランクトン群集の中でも，とりわけ優占した珪藻種に焦点をあて，それらの培養株の有機態リン/窒素の利用能を調べたところ，いくつかの珪藻が，糖リン酸，核酸ならびにリン脂質をはじめとする有機態窒素・リン化合物を利用可能なことが判明した。これらの利用能は，一般的なリン源として知られる正リン酸の利用能に匹敵するものであった。

窒素・リン原子が複雑に結合した有機窒素・リン化合物のうち「核酸」「コリン型リン脂質」に焦点をあて，珪藻種によるそれらの利用能の詳細を明らかにしようとした。これにより，珪藻群集による核酸の協働利用を考察しようとした。

そのためにまず，核酸構成要素の利用活性評価系を新たに確立しようとした。ここでは，分光プレートリーダーを用いることで，核酸構成要素を高速・簡易に検出・定量可能な系を確立した。

精密な培養試験の結果，いくつかの珪藻種は，核酸は分解できないが，核酸構成要素ヌクレオチドをリン源としてのみならず窒素源としても利用できることがわかった。一方で，他のいくつかの珪藻は，核酸を分解でき，それによって生ずる当該要素をリン源としては利用できることが判明した。ところが一方で，珪藻のいくつかは，その分解産物を窒素源としては利用できないこともわかった。

また一方で，窒素原子を含むコリン型リン脂質については，いくつかの珪藻がリンを遊離・利用した後に有機窒素化合物コリンを遊離させることが判明した。しかし，試験した条件において，コリンを利用可能な珪藻種は見いだせなかった。

これらをあわせると，珪藻種間において有機態リン/窒素の利用能は大きく異なると思われる。これらの珪藻種が，有機物と複雑に結合した窒素・リン原子を利用するには，複数の珪藻種が協働的に窒素・リンの分解を行う必要があるのではないかと示唆される。

(3) 有機態窒素・リン利用能が異なる珪藻種を一つのフラスコ培養液に混合接種したところ，細胞形態の酷似により，明瞭な協働性を確認することができなかった。そこで，珪藻複数種の共存機構を実証するため，細胞形態の明らかに異なる珪藻培養株を確立することができた。予備的にはあるが，核酸を窒素/リン源とする条件においてこれらの共

存を確認することができた。珪藻種共存の力ギを握るのは，それらの増殖を制限する栄養塩の種類であり，また制限の度合いによって共存関係は大きく変動すると考えられた。

(4) 総括：

高水温期に成層が発達する本邦沿岸域では，底層水の豊富な窒素・リンが表層に供給されにくくなり，それらが珪藻類を中心とした植物プランクトン群集の増殖を制限する要因となる。ここで，リンによる制限が窒素よりも先行する場合，いくつかの珪藻種はフォスファターゼを産生し，有機態の窒素/リン化合物からリン原子を切り出すことが可能となる。この切り出したリンを獲得することで，珪藻種のいくつかは，リンによる制限から解放される。続いて，残存する有機態窒素にアクセスすることで，窒素を獲得できるのではないかと考えられる。特に，核酸のような窒素/リン化合物は，異なる分解能・利用能を持つ複数の珪藻種によって，窒素・リンの相互補完，すなわち種協働的な栄養塩獲得戦略を展開している可能性が立証された。

少なくとも沿岸域のような生物量が豊富な海域では，それら由来の核酸が豊富に溶存することが知られている。従来，植物プランクトンのリン源・窒素源として考慮されてこなかった核酸は，おそらく多種珪藻の協働分解を介して，それら藻類の有効な窒素・リン源になると考えられる。このようなプロセスが起これば，複数の珪藻種が同時に存在することが可能となり，「プランクトン・パラドックス」を合理的に説明することができると結論付けられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

山口晴生，小林崇晃，倉松涼子，足立真佐雄．沿岸海域におけるフォスファターゼ活性の消長～高感度定量系を用いた解析～．平成 28 年度日本水産学会春季大会，東京海洋大学 (3 月 26 日～30 日・平成 27 年)

山口晴生．真核微細藻類による有機物からのリン切り出し．微細藻類研究集会．自然科学研究機構 基礎生物学研究所 岡崎コンファレンスセンター(12 月 22 日～23 日・平成 26 年)

〔図書〕(計 1 件)

山口晴生．有機態窒素・リンと増殖『有害有毒プランクトンの科学』今井一郎，山口峰生，松岡数充(編) 58-72, 2016, 恒星社厚生閣．

〔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
水族環境学研究室
<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~yharuo/laques/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 晴生 (YAMAGUCHI HARUO)
高知大学・教育研究部自然科学系・准教授
研究者番号：10432816

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

外丸 裕司 (TOMARU YUJI)
水産総合研究センター・主任研究員
研究者番号：10416042

鈴木 怜 (SUZUKI SATOSHI)
高知県水産試験場・主任研究員
研究者番号：なし

片野俊也 (KATANO TOSHIYA)
東京海洋大学・准教授
研究者番号：00509820

岡村慶 (OKAMURA KEI)
高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号：70324697