

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03361

研究課題名(和文) 微量金属元素による海洋亜表層窒素循環の複合的制御メカニズム

研究課題名(英文) Complex regulation of nitrogen cycle by trace metals in the subsurface ocean

研究代表者

武田 重信 (TAKEDA, Shigenobu)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：20334328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：東部インド洋の亜表層において、窒素循環に関わる環境パラメーターの高分解能観測と、現場プランクトン群集を用いた培養実験を行った結果、窒素循環の制御要因として微量金属のうち鉄が最も重要であり、さらに光量の過不足が微生物硝化や植物プランクトンの窒素代謝に複合的に作用していることが明らかになった。特に、北部のベンガル湾では光あるいは鉄の不足、赤道域では光の不足により植物プランクトンから亜硝酸塩の放出が生じている可能性が示された。また、赤道域での光によるアンモニア酸化の制御と、鉄による亜硝酸酸化の制御が起きていることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになった東部インド洋の亜硝酸塩極大層付近における微生物の硝化作用および植物プランクトンによる窒素代謝と鉄などの微量金属ならびに光環境との関係性は、海洋における新生産の再評価に結びつく成果であり、海洋生物生産や物質循環の理解を大きく前進させるものである。今後、それらのプロセスを表現する数式を海洋生態系モデルに組み込んでいくことにより、将来の地球環境変動に対する海洋生態系応答の予測精度の向上に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the sub-surface layer of the eastern Indian Ocean, high-resolution vertical observations of environmental parameters related to nitrogen cycling and on board incubation experiments using in-situ plankton communities were conducted. The results showed that iron was the most important trace metals regulating nitrogen cycling around the primary nitrite maximum layer, and that light availability also had additional effects on microbial nitrification and phytoplankton nitrogen metabolism. In particular, light or iron deficiency in the Bay of Bengal, and light deficiency in the equatorial region were inferred to promote the release of nitrite from phytoplankton. It was also suggested that the regulation of ammonia oxidation by light intensity and nitrite oxidation by dissolved iron concentration in the equatorial region.

研究分野：海洋生物地球化学

キーワード：海洋生態 窒素循環 微量金属 植物プランクトン 硝化微生物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋における炭素や窒素など生元素の物質循環を理解する上で、海洋の亜表層(50~150m)にみられる亜硝酸塩の極大層の形成要因の解明は、重要な課題の一つである。外洋の亜熱帯域において窒素循環の主要な中間生成物である亜硝酸塩の極大層が生じる要因としては、微生物によるアンモニアの硝化作用と、植物プランクトンからの亜硝酸塩放出の二つの機構が考えられる(Lomas and Lipschultz, 2006)。硝化を担うアンモニア酸化酵素は銅、鉄、あるいは亜鉛を補因子として含んでおり、微生物硝化にはこれらの元素が不可欠である。一方、植物プランクトンからの亜硝酸塩放出には、弱光下での亜硝酸還元阻害に加えて、鉄欠乏により亜硝酸還元と硝酸還元のバランスが乱された結果、余剰の亜硝酸塩が細胞外に放出されることも関係している可能性が室内培養実験から示唆されている(Milligan and Harrison, 2000)。

(2) このような海洋亜表層における窒素循環と微量金属の関わりについて、我々のこれまでの観測結果から、北太平洋亜熱帯の溶存鉄がほぼ枯渇した環境下では、硝酸塩躍層付近の溶存亜鉛濃度が急激に減少することが確認されている。このため海洋亜表層では、微生物群と植物プランクトン間で鉄、銅、亜鉛といった微量栄養素に関する競合が起こり、その過不足が上記の過程を含む窒素循環を支配している可能性は高いと考えられた。本研究の観測フィールドに設定したインド洋では、これらの相互関係を直接調べた研究はこれまで報告されていないが、北部のベンガル湾において有光層(表面混合層)の下層に貧酸素層が存在しており、貧酸素水に高濃度で含まれる鉄などの微量金属の上層への供給フラックスが南北の緯度方向で大きく変化すると予想された。このことから、窒素循環への微量金属の寄与の相対的な変化を現場データから解析することが可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、微量栄養素である鉄、銅、亜鉛の動態が、植物プランクトンからの亜硝酸塩の細胞外放出や、微生物群集による硝化作用に影響を及ぼし、亜硝酸塩極大層の形成を始めとする亜表層の窒素循環を複合的に制御しているとの仮説を検証することを目的とした。

(2) そのため、東部インド洋において南北方向の観測線を設定し、海洋亜表層における微量金属および栄養塩分布の高分解能測定と、プランクトン群集の窒素代謝に関する船上培養実験に取り組んだ。微量金属の供給フラックスが異なるベンガル湾、赤道域、南インド洋亜熱帯域の各海域間の結果を対比させることで、現場の窒素循環に果たす微量栄養素の役割を明らかにし、海洋新生産の再評価に寄与するとともに、地球環境変動に対する海洋生態系と物質循環の応答予測の高度化に資することを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 2018年11月の学術研究船白鳳丸KH-18-6次航海に乗船し、東部インド洋の88°Eに沿った南北方向の測線上(16.5°N~20°S)で観測を実施した。このうち、15°Nのベンガル湾(BB)、0°の赤道海域(ER)、10°Sの南インド洋(SI)では、亜硝酸塩極大層付近の高分解能採水と現場プランクトン群集の微量金属添加培養実験を行った。

(2) 【高分解能採水】船体などからの微量金属による汚染を受けないクリーンCTD採水システムを用いた。まず、亜硝酸塩極大層を中心に深度間隔2~11mの10層から高分解能の採水を行い、栄養塩、クロロフィル $a$ 、微量金属、硝化活性、アンモニア酸化微生物遺伝子を測定するための試料を得た。亜硝酸等については、船上で直ちに分析し、亜硝酸極大の深さを決定した。硝化活性(アンモニア酸化速度)は、 $15\text{NH}_4^+$ トレーサー法を用いて暗条件下24時間で測定した(Shiozaki et al. 2016)。クロロフィル $a$ は船上にて酸無添加蛍光法により測定し、その実測値を用いてCTDに搭載されたクロロフィル蛍光センサーデータを補正した。栄養塩分析用のサンプルは-20°Cで保存し、陸上にてオートアナライザーを用いて標準の比色法により分析した。溶存鉄濃度は、酸性条件下で保存したろ過海水試料を用いて、カソーディックストリッピングボルタンメトリー法(Obata and van den Berg, 2001)により測定した。硝化微生物の遺伝子解析は、2Lの海水試料から孔径0.2  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過捕集した微生物サンプルを用いて、アンモニアモノオキシゲナーゼサブユニットA(amoxA)のDNAおよびRNAの定量PCRアッセイにより行った(Shiozaki et al., 2016)。アンモニア酸化古細菌(AOA)は、amoxA遺伝子の塩基配列に基づいて、shallow clade(water column cluster A)およびNitrosopumilus maritimus-like cluster)とdeep clade(water column cluster B)に分類した。アンモニア酸化細菌(AOB)については、Betaproteobacteriaを対象に調べた。

(3) 【微量金属添加培養実験】上記採水システムにより、亜硝酸塩極大層付近(BB, 62 m; ER, 110 m; SI, 98 m)から現場プランクトン群集を含む海水試料を採取して船上培養実験を行った。9Lタンクで海水をホモジナイズした後、クリーンルーム内で300mlポリカーボネート製ボトルに分注し、2 nMの鉄、銅、亜鉛を添加した実験区と無添加の対照区をそれぞれ3連で設けた。培養は、各測定の採水層の水温(BB: 27°C, ER: 27°C, SI: 26°C)に設定したインキュベーター内で2日間行い、25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (強光区、白色LED光)または10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (弱光区、青色フィル

ターで減光)の2段階の光量で12L:12Dの明暗サイクルにより照射した。培養期間中は、栄養塩濃度の変化を毎日測定するとともに、0日と2日目にはクロロフィルa濃度も測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 亜硝酸塩極大層付近における海洋環境特性

亜硝酸塩極大層の位置については、インド洋北部のベンガル湾(BB)では有光層の指標となる1%光量深度よりも6mほど浅く、亜表層クロロフィル極大層下部付近に出現したのに対して(図1)赤道域(ER)では1%光量深度よりも32mほど深い位置に見られ、亜表層クロロフィル極大と硝酸塩躍層上部との間に形成されていた。南インド洋(SI)では、亜硝酸塩極大層が有光層よりも12mほど深い位置に見られ、硝酸塩濃度が増え始める深度と対応していたが、亜表層クロロフィル極大層とは離れていたことから、植物プランクトンよりも硝化微生物が亜硝酸塩の蓄積に強く関与していることが推察された。これらの特徴は南インド洋と赤道域との間で類似していたが、ベンガル湾とは異なっていた。

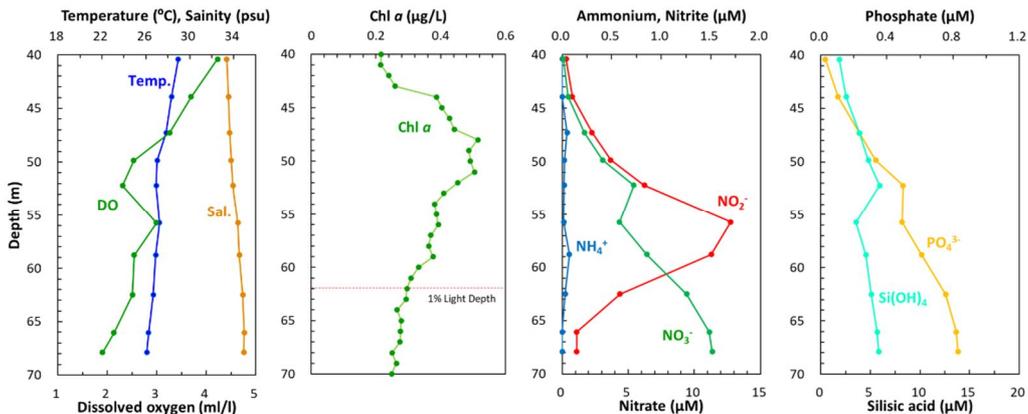


図1 ベンガル湾における亜硝酸塩極大層付近の水温、塩分、溶存酸素、クロロフィルa、硝酸塩、亜硝酸塩、アンモニウム塩、リン酸塩、溶存ケイ酸の鉛直分布。赤の破線は1%光量深度を示す。

亜硝酸塩の最大濃度はベンガル湾で1.7 μMと最も高く、他の観測点に比べて4~8倍高かった。赤道域では、東向き強い表層流(Wyrtki Jet)によって鉛直混合と拡散が強まっていたため、亜硝酸塩極大の発達が悪められて濃度が低かった可能性がある。

亜硝酸塩極大層付近の溶存鉄濃度については、いずれの測点においても0.5 nM前後の値が観測され、南インド洋では深度が深くなるにつれて増加する傾向が認められたものの、ベンガル湾や赤道域における鉛直的な濃度変化は小さかった。これは、貧酸素水に由来する1 nM以上の高濃度の溶存鉄濃度が認められたのが、ベンガル湾では約100m、赤道域では150mとなり(図2)、亜硝酸塩極大層とは約40m離れていたことによると考えられる。

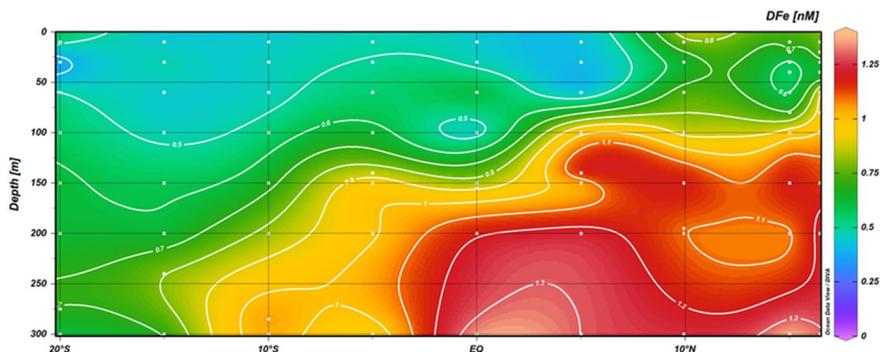


図2 東部インド洋の東経88度線における表層300m以浅の溶存鉄濃度(DFe)の鉛直断面分布

##### (2) 亜硝酸塩極大層付近におけるアンモニア酸化微生物群集と硝化活性

硝化微生物のうち、アンモニア酸化古細菌(AOA)のShallow cladeは、調査した亜表層の全層に出現し、深くなるにつれて存在量が多くなる傾向を示した(図3)。一方、Deep cladeは、ベンガル湾と赤道域において1%光量深度付近よりも深い層でのみ見られた。ベンガル湾と赤道域の亜硝酸塩極大層付近では、検出されたアンモニア酸化古細菌群集の95%以上をShallow cladeが占めており、亜表層における亜硝酸塩の生産者としての重要性が示唆された。南インド洋においても亜硝酸塩極大層付近のアンモニア酸化古細菌群集は主にShallow cladeで占められていたが、Deep cladeの存在量も深度とともに増加し、120m以深ではShallow cladeと同等のレベルにまで達した。また、アンモニア酸化古細菌の現存量には、海水中の硝酸塩濃度と正の相関が認められた。アンモニア酸化細菌(AOB)は、いずれの測点においても検出されなかった。

アンモニア酸化速度は、ベンガル湾では有光層内で深度とともに増加したが、赤道域と南インド洋では、有光層内においてアンモニア酸化が検出されず、1%光量深度よりも10~20m深い層からアンモニア酸化速度の増加が認められた(図3)。観測されたアンモニア酸化速度は、アラ

ビア海や太平洋での既報値よりも高くなる傾向にあった (Newell et al., 2011; Shiozaki et al., 2016)。一方、南インド洋における水柱のアンモニウム塩濃度は極めて低く、硝化微生物によるアンモニア酸化速度は、ベンガル湾や赤道域と比べて小さい値となっていた。南インド洋の 20°S で行った実験では、銅または亜鉛の添加によりアンモニア酸化速度がやや低下する結果も得られた。

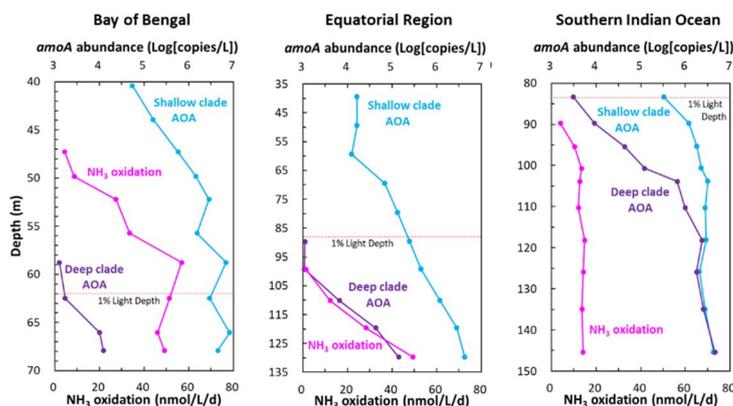


図3 ベンガル湾、赤道域、南インド洋における亜硝酸塩極大層付近のアンモニア酸化古細菌 (AOA) DNA 量 (Shallow clade および Deep clade) とアンモニア酸化速度の鉛直分布。赤の破線は 1% 光量深度を示す。

### (3) 微量金属添加に対する亜硝酸塩極大層付近のプランクトン群集の応答

亜硝酸極大層付近の植物プランクトン群集の応答に関しては、ベンガル湾において、鉄の添加により、弱光区、強光区ともにクロロフィル *a* が有意に増加したことから、鉄の制限を受けていることが明らかになった (図4)。また、無添加の対照区では、弱光区に比べて強光区においてクロロフィル *a* が有意に増加したため、光量の不足によるやや弱い制限も受けていたと考えられる。一方、赤道域と南インド洋では、鉄の添加によるクロロフィル *a* の増加が強光区においてのみ見られたことから、植物プランクトン群集は鉄と光の共制限を受けていたことが示された。但し、赤道域の対照区では、弱光区よりも強光区のクロロフィル *a* が高くなっており、現場には利用可能な溶存鉄がある程度存在していたことが示唆される。銅や亜鉛の添加に対しては、対照区と比べて有意なクロロフィル *a* の変化が見られなかった。

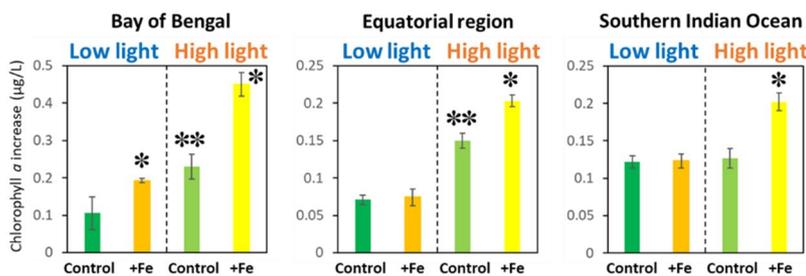


図4 弱光と強光の2段階の光条件における、対照区 (無添加) と 2 nM 鉄添加区の 2 日間培養期間中のクロロフィル *a* 変化量。  
\* 対照区と鉄添加区間に有意差あり。  
\*\* 対照区において弱光と強光の間に有意差あり。

培養期間中における亜硝酸塩濃度の変化については、ベンガル湾では亜硝酸が消費され、その消費量は高光量条件の鉄添加ボトルで有意に増加した (図5)。無添加の対照区では、弱光区と強光区に明瞭な差はなかった。赤道域では、亜硝酸塩は蓄積する傾向を示したが、鉄添加によって蓄積量が減少したほか、強光区では蓄積量の減少が見られた。南インド洋では、ベンガル湾と同様に亜硝酸塩が消費されたものの、鉄添加の有無や、光量の強弱による有意な差は認められなかった。亜鉛添加の影響については、ベンガル湾の強光区において亜硝酸塩消費量の減少が生じたのに対して、赤道域の弱光区では亜硝酸塩蓄積量が減少した。銅添加は、赤道域の強光区で亜硝酸塩蓄積量を減少させたが、その他の測点・光条件では対照区と比べて有意な変化が見られなかった。

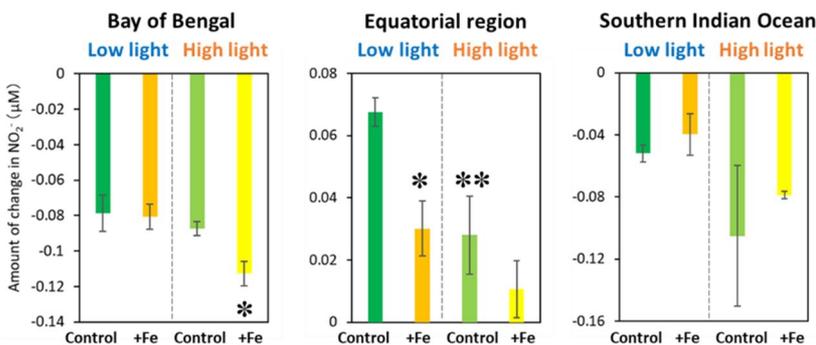


図5 弱光と強光の2段階の光条件における、対照区 (無添加) と 2 nM 鉄添加区の 2 日間培養期間中の亜硝酸塩の変化量。  
\* 対照区と鉄添加区間に有意差あり。  
\*\* 対照区において弱光と強光の間に有意差あり。

### (4) 微量栄養素による亜表層の窒素循環の制御仮説の検証

微量金属の上層への供給フラックスが南北で変化する東部インド洋の亜表層において、窒素循環に関わる環境パラメーターの高分解能観測と、現場のプランクトン群集を用いた培養実験

を行った結果、微量金属としては鉄が最も重要な制御要因になっており、そこに光量の過不足が複合的に作用していることが明らかになった。特に、ベンガル湾では光あるいは鉄の不足、赤道域では光の不足により植物プランクトンから亜硝酸塩の放出が生じている可能性が示された。また、培養実験における亜硝酸塩濃度の変化から、赤道域での光によるアンモニア酸化の制御と、鉄による亜硝酸酸化の制御が起きていることも示唆された。一方、銅や亜鉛の影響については、変動パターンが様々で、生物活動との関連付けが困難であった。以上のように、東部インド洋の亜硝酸塩極大層付近における微生物の硝化作用および植物プランクトンによる窒素代謝は、鉄供給フラックスや光環境による影響を強く受けており、その関係性は、海域によって複雑に変化することが明らかになった。

今後は、東部インド洋で解明された海洋亜表層における窒素循環と微量金属の関わりが、太平洋など他の主要な海域においても生じていることを確認し、海洋における新生産の再評価に結び付けていく必要がある。また、並行して行った予備的な実験結果からは、海水のpH低下に伴う硝化活性の減少や、有機態窒素の一つである尿素の生物利用についての基礎的な知見なども得られており、将来的には、それらのプロセスを海洋生態系モデルにおいても適切に表現するための数式を組み込んでいくことにより、将来の地球環境変動に対する海洋生態系応答の予測精度の向上に大きく貢献することが期待できる。

#### < 引用文献 >

- Milligan, A.J., Harrison, P.J. (2000): Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (BACILLARIOPHYCEAE) *J. Phycol.* 36, 78–86.
- Lomas, M.W., Lipschultz, F. (2006): Forming the primary nitrite maximum: Nitrifiers or phytoplankton? *Limnol. Oceanogr.*, 51, 2453–2467.
- Newell, S.E., Babbitt, A.R., Jayakumar, A., Ward, B.B. (2011): Ammonia oxidation rates and nitrification in the Arabian Sea. *Global Biogeochem. Cycles*, 25, GB4016, doi:10.1029/2010GB003940.
- Obata, H., van den Berg, C.M. (2001) Determination of picomolar levels of iron in seawater using catalytic cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.*, 73, 2522-2528.
- Shiozaki, T., Ijichi, M., Isobe, K., Hashihama, F., Nakamura, K., Ehama, M., Hayashizaki, K., Takahashi, K., Hamasaki, K., Furuya, K. (2016): Nitrification and its influence on biogeochemical cycles from the equatorial Pacific to the Arctic Ocean. *The ISME Journal*, 10, 2184–2197.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Mitsuhide, Ogata Natsuki, Wong Kuo Hong, Obata Hajime, Takeda Shigenobu	4. 巻 230
2. 論文標題 Photodecomposition of natural organic metal-binding ligands from deep seawater	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Chemistry	6. 最初と最後の頁 103939 ~ 103939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marchem.2021.103939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiozaki Takuhei, Ijichi Minoru, Fujiwara Amane, Makabe Akiko, Nishino Shigeto, Yoshikawa Chisato, Harada Naomi	4. 巻 33
2. 論文標題 Factors Regulating Nitrification in the Arctic Ocean: Potential Impact of Sea Ice Reduction and Ocean Acidification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Global Biogeochemical Cycles	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1029/2018GB006068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shigenobu Takeda, Kunioki Hirata, Takuhei Shiozaki
2. 発表標題 Nitrogen cycling in the primary nitrite maximum of the Indian Ocean
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田重信
2. 発表標題 微量金属による海洋一次生産の制御機構に関する生物地球化学研究
3. 学会等名 日本海洋学会2020年度秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Takeda
2. 発表標題 Sunlight-induced changes in fluorophores of dissolved organic matter in the eastern Indian Ocean
3. 学会等名 Ocean Sciences Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤光秀, 武田重信, 齊藤宏明, Hongbin Liu
2. 発表標題 秋季-初冬季のインド洋東部海域におけるピコ・ナノ植物プランクトンの鉛直分布構造
3. 学会等名 2019年度日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda. S, Y. Fujita
2. 発表標題 Effects of iron enrichment on nitrogen cycle near the subsurface chlorophyll maximum in the subtropical North Pacific
3. 学会等名 Xiamen Symposium on Marine Environmental Sciences (XMAS-IV) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	塩崎 拓平  (SHIOZAKI Takuhei)  (90569849)	東京大学・大気海洋研究所・准教授    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 光秀  (SATO Mitsuhide)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関