

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281015

研究課題名(和文)古細菌細胞膜脂質の分子レベル放射性炭素分析に基づく海洋DOC炭素循環の実態解明

研究課題名(英文)Research on carbon cycling of seawater DOC using CSRA of Archaea lipids

研究代表者

内田 昌男(uchida, masao)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境計測研究センター・主任研究員

研究者番号：50344289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：海洋古細菌による化学合成独立栄養代謝の実態を定量的に把握するため、太平洋駿河湾の水塊を対象に、現場培養装置による古細菌の増殖速度の実測ならび同水塊から採取した古細菌脂質バイオマーカーの同位体分析を行った。現場培養による増殖速度の計測値から、化学独立栄養古細菌群集による有機炭素生産量を試算したところ、1.5-4.6Gt C/yrの有機炭素生産量と見積もられた。また自然レベルの<sup>14</sup>C同位体をトレーサーとして、古細菌脂質の<sup>14</sup>C同位体分析を行った。<sup>14</sup>C同位体の結果と現場のバイオマス量の試算から、水深400mにおける古細菌の約半分が、化学独立栄養古細菌群集であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We measured leucine incorporation rates using in situ incubation apparatus in Suruga Bay. Compound specific radiocarbon analysis of archaeal lipids to elucidate relative contribution of chemoautotrophic archaea in open ocean. As a results, the organic carbon production rate by the chemoautotrophic archaea in Suruga Bay was 1.5-4.6 Gt C/yr, which was 3.0-9.2% of 0.36 Gt C/yr of primary production of reported values of Pacific Ocean. In 400 m water column in Suruga Bay, it was estimated that half of percent of archaea could be chemoautotrophy from measured values of incorporation rate and radiocarbon data.

研究分野：生物地球化学

キーワード：古細菌 太平洋 駿河湾 バイオマーカー 放射性炭素 現場培養 増殖速度 DOC

## 1. 研究開始当初の背景

海洋の細菌群集の中で、古細菌群集が海洋の至る所に存在し、且つ高い割合が独立栄養性である可能性が報告されて以来、炭酸固定を行う古細菌が地球規模の物質循環の中で極めて重要な役割を担っている可能性があることが認識されている。2005年には、1細胞レベルで取り込みを確認できる MICRO-CARD-FISH 法を利用した研究から古細菌炭酸固定速度が北大西洋深層水中の古細菌 1細胞あたり平均 0.014 fmol C day<sup>-1</sup> と見積もられ、また、北太平洋深層水の一部では炭酸固定速度が大きい水塊も存在することが報告された (Herndl et al. AEM, 71(5): 2303-2309)。この研究は海洋物質循環の中での独立栄養性古細菌の寄与を明らかにした極めてインパクトのある研究であるが、前述の通り、船上培養を伴っていることから、圧力差や輸送時の温度変化によるバイアスが含まれている可能性がある。海洋原核生物(細菌)を介した物質循環解明には、細菌群集生物量(バイオマス)を知り、増殖速度や特定の物質に対する代謝活性を把握することが必要となる。バイオマスに関しては、高感度の CARD-FISH 法(蛍光顕微鏡観察により特定の属や種の細菌個体群を可視化する)の進歩によってドメインや属レベルで定量的な存在量把握が可能となってきた。しかしながら、増殖速度や代謝活性評価といった、「生きた」生物の評価には未だ課題が多く残る。これまでの海洋細菌群集の増殖速度測定は、任意の水深の海水試料をニスキン採水器などで採取後船上まで引き上げ、船上においてニスキン採水器から海水試料を大気圧下で取り出した後、温度管理を行った培養槽内で培養し、培養開始からの細菌細胞数の変化を経時的に観察することで算出されてきた。近年では放射性同位体ラベル基質を添加することで基質取り込みを 1細胞レベルで確認することが可能となったことから、得られた値を速度論的に計算して増殖速度定数が求められるようになった (Teira et al. AEM, 70(7): 4411-4414, Herndl et al. AEM, 71(5): 2303-2309)。例えば、2005年には、1細胞レベルで取り込みを確認できる MICRO-CARD-FISH 法を利用した研究から、古細菌炭酸固定速度が北大西洋深層水中の古細菌 1細胞あたり平均 0.014 fmol C day<sup>-1</sup> と見積もられ、また、北太平洋深層水の一部では炭酸固定速度が大きい水塊も存在することが報告された (Herndl et al. AEM, 71(5): 2303-2309)。この研究は海洋物質循環の中での独立栄養性古細菌の寄与を明らかにした極めてインパクトのある研究であるが、前述の通り、船上培養を伴っていることから、圧力差や輸送時の温度変化によるバイアスが含まれている可能性が高い。

一方、海洋 DOC の炭素量は、680 GtC と試算されており、大気 CO<sub>2</sub> の 750 GtC に匹敵する規模を持っている。海洋 DOC 濃度は、海洋表層(有光層から温度躍層)においてわずかに変化しているが、それ以深においては、ほぼ一定の値を示す。海洋 DOC の <sup>14</sup>C(DO<sup>14</sup>C)に関する研究報告は、1980年代後半より開始され、海洋 DOC 放射性炭素同位体比の鉛直、水平方向分布の詳細が明らかにされてきた。DO<sup>14</sup>C は、海域に関係なく -390~-525‰(年代に換算すると、4000年~6000年)と表層海水中の溶存態無機炭素(DIC)の <sup>14</sup>C 同位体比(20-120‰; 現在の大气 <sup>14</sup>C 同位対比に相当)に比べて著しく古い。こうした古い年代の報告から、海洋の DOC 主要成分は微生物群集に分解されない化学的に不活性な炭素リザーバーであるが、近年、微生物による炭素利用の可能性が指摘されるようになり、炭素循環における役割が注目されるようになったが、それらに関する知見はいまだ乏しい状況にある。

## 2. 研究の目的

上述の通り、これまでに船上培養から得られてきた細菌増殖速度は、特に深い深度の試料の場合、試料採取時と培養時の圧力差、ならびに海面までの試料水輸送時の温度変化によって、現場水深で実際に行われている細菌群集の増殖過程を反映していない可能性が生じていることは否めない。このような課題に対して本研究では、水深 4,000m までの任意の水深において試料水の培養槽への採取から基質の添加、その後の現場水深・水圧での培養、ならびに現場水深での継続的な培養槽培養水の採取と細菌固定、まで行うことを可能とした新型の細菌現場培養装置を用い、海洋有光層以深水中の in situ 細菌増殖速度の測定を行い、現場古細菌のバイオマスの実測値を求め、さらに古細菌脂質の <sup>14</sup>C のトレーサーデータを組み合わせることにより、古細菌の代謝に関する試算を行うものである。

## 3. 研究の方法

### (1)細菌現場培養装置の概要

細菌現場培養装置は、船上であらかじめ採水・培養に伴う培養槽からの試料採取スケジュールを入力することで、培養装置の各パーツをスケジュールに従って自動で稼働可能な設計となっている。電源としてバッテリーを培養装置に装着しているため、スケジュール入力後は培養装置のすべての動作を自動で行える。装置は培養槽部分(培養用ボトル)、培養試料固定ボトル部分、通信制御部分、ポンプ部分、バッテリー部分、に大きく分けられる(図1)。

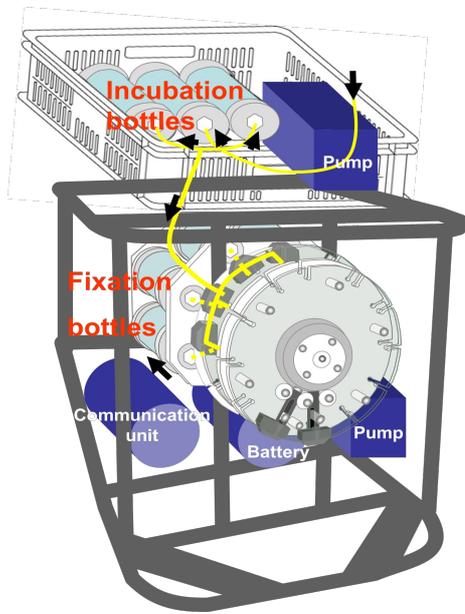


図 1. 細菌現場培養装置の概略

#### (2)細菌現場培養

この細菌現場培養装置を用い、2014年8月、2015年8月ならびに2016年5,6月に海洋細菌群集の現場培養実験を実施した（水深 10m から 3,200m）。この際、従来の細菌増殖速度測定法である船上培養についても、細菌現場培養装置を定位させる水深の海水試料を別途ニスキン採水器で採取の後、現場培養装置と同型の培養槽と現場水深水温に設定した培養器を用い船上において実施した。細菌群集の増殖を測定するための基質としてロイシン（leucine）を使用し、培養槽へ一定濃度のロイシンを添加した後、細菌細胞へのロイシン取り込み量を継時的に測定することで細菌生産量を算出した。

#### (3)試料

駿河湾の水深 397m から採取された大量濾過試料（メンブレンフィルター）を用いて行った。試料採取は、オリジナルの大量濾過装置を用いた。濾過装置は、各種ろ過フィルターステンレス製ハウジング（各サイズメンブレンフィルターハウジング：100  $\mu\text{m}$  用 4 個、5  $\mu\text{m}$  用 8 個、0.65  $\mu\text{m}$  用 4 個、0.2  $\mu\text{m}$  用 4 個）から構成される。

#### (4)微生物脂質の抽出

各種サイズのフィルターに補足された微生物膜脂質分子（エーテル脂質（古細菌）、脂肪酸（細菌））の抽出と同定を行った。フィ

ルターは、大容量ソックスレー抽出機により、溶媒可溶脂質成分の全抽出を行い、その後、アルカリけん化処理を行う。さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる、中性成分から、古細菌膜脂質由来グリセロールジアシルグリセロールテトラエーテル（GDGTs: glycerol dialkyl glycerol tetraethers）を、酸性成分より細菌膜脂質由来脂肪酸を分画した。GDGTs は、LC/MS により定量・同定を行う。脂肪酸は、GC-FID での定量、GC/MS での同定に先立って、メチルエステル化を行う。さらに分子レベル  $^{14}\text{C}$  測定に先立ち、炭素安定同位体分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)細菌増殖速度

各水深での現場培養と船上培養での細菌増殖速度（細菌生産速度）を図 2 に示す。

現場細菌培養により得られた細菌生産速度は、同水深の海水試料を船上培養して得られた細菌生産速度よりも一般的に低いことが判明した。このことは、船上培養（すなわち大気圧下での培養）は、水深のある層に生息する海洋細菌群集の細菌生産を活性化する可能性を示している。また、海域によらず、水深が増加するに従い、船上培養と現場培養で得られた細菌生産速度の差が大きくなる傾向が認められた。

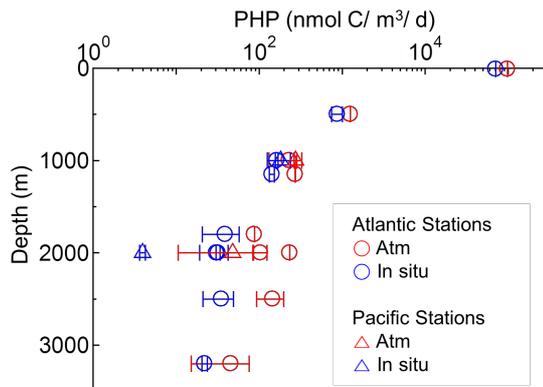


図 2. 船上および現場培養から得られた各水深の細菌生産速度。エラーバーは平均値  $\pm$  SD

##### (2)微生物の代謝に関する計算結果

駿河湾水深 400-700m で採取された試料から DIC, DOC, GDGTs を抽出し、それらの  $^{14}\text{C}$  分析、現場培養による増殖速度の計測結果に基づき、古細菌群集の代謝割合を計算したところ、約半分 40-50%が、化学合成独立栄養代謝であることが示された。

#### 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）

〔学会発表〕(計4件)

(1)Chie Amano-Sato, Eva Sintes, Motoo Utsumi, Gerhard J. Hernd. 2016. Effect of hydrostatic pressure on bacterial heterotrophic activity in the dark ocean.2016 Ocean Sciences Meeting (21-26 February, New Orleans, Louisiana, USA)

(2)Qintong Li, Chie Amano-Sato, Seiya Takahashi, Takuro Nunoura, Motoo UTSUMI. 2016. Abundance and transcriptional activity of Taumarchaeal amoA and ureC genes in North Pacific Ocean. 2016 Ocean Sciences Meeting (21-26 February, New Orleans, Louisiana, USA)

(3)Chie Amano-Sato, Eva Sintes, Thomas Reinthaler, Marta M. Varela, Motoo Utsumi, Gerhard J. Herndl. 2015. Lower prokaryotic leucine incorporation rates under in situ pressure than under decompressed conditions in the deep North Atlantic. Aquatic Sciences Meeting (22-27 February 2015, Granada, Spain)

(4)尾村 宏美, 青木 元秀, 内田 達也, 梅村 知也, 熊田 英峰, 2015 堆積物試料中のバクテリア細胞膜由来ホパノイドの抽出方法の検討, 第 22 回クロマトグラフィーションポジウム, 近畿大学(東大阪),2015/5/28-30

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 昌男 (MASAO UCHIDA)

国立研究開発法人 国立環境研究所・環境計測研究センター

・主任研究員

研究者番号：50344289

(2)研究分担者

内海真生 (MOTOO UTSUMI)

国立大学法人 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：60323250

(2)研究分担者

熊田 英峰 (KUMATA HIDETOSHI)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：60318194