

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12586

研究課題名(和文) 微量金属元素による海洋亜表層の窒素循環制御メカニズム

研究課題名(英文) Regulation mechanism 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、北太平洋亜熱帯域の亜表層クロロフィル極大層(SCM)付近における亜硝酸塩極大の形成状況を把握するとともに、現場のプランクトン群集を用いた船上培養実験を行い、亜硝酸塩の蓄積に関わる窒素循環に及ぼす鉄の影響を明らかにすることを目的とした。亜硝酸塩極大とSCMが近接していた測点では、鉄および光制限を受けていた植物プランクトンからの亜硝酸塩放出が、亜硝酸塩極大の主な形成要因となっていた可能性が示された。一方、亜硝酸塩極大とSCMが離れていた測点では、硝酸塩および亜硝酸塩の消費傾向が強く表れていたことから、植物プランクトンの窒素代謝への鉄制限の影響が弱いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tested a hypothesis that iron limitation stimulates nitrite release from phytoplankton cells to the surrounding water near the subsurface chlorophyll maximum (SCM) due to inhibition of nitrite metabolic pathway. The incubation experiments confirmed that the phytoplankton assemblage in the SCM were under iron-limitation. At a station where the primary nitrite maximum (PNM) was observed near the SCM, the iron enrichment resulted in an increase in nitrate consumption and a decrease in nitrite accumulation in the incubation bottles. The bottles incubated under a stronger light intensity also showed similar trend in the nutrient dynamics. These results suggest that the excretion of nitrite by phytoplankton under both iron and light limitation is playing a role for PNM formation. At a station where the SCM was shallower than the PNM, the observed nitrite excretion by phytoplankton assemblage in the bottles was not significant probably due to the severe nitrogen limitation at the SCM.

研究分野：海洋生物地球化学

キーワード：海洋生態 物質循環 微量金属 窒素 植物プランクトン

### 1. 研究開始当初の背景

海洋における炭素など生元素の物質循環を把握するには、有光層外から供給される硝酸塩などを用いた一次生産、すなわち新生産を正しく評価することが必須となる。近年の遺伝子解析を用いた海洋微生物の機能研究の進展に伴い、有光層内で微生物硝化による硝酸塩の生成が起きていることが示され、硝酸塩取り込みを指標として従来見積もられてきた新生産の見直しが求められている。この微生物硝化の寄与を評価する上で、海洋の亜表層でみられる亜硝酸塩の極大層の形成要因の解明が、重要な鍵になり得る。

海洋の亜表層で亜硝酸塩が生成する過程としては、硝化微生物によるアンモニアの亜硝酸への酸化作用と、硝酸塩を取り込んだ植物プランクトンからの亜硝酸塩の細胞外放出の二つが考えられる。

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、電子伝達系においても硝化細菌は鉄、硝化古細菌は銅に依存していることが分かっている。

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の影響に加えて、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余剰の亜硝酸塩が細胞外に放出されることが、珪藻培養株を使った室内実験結果から示唆されている (Milligan & Harrison, 2000)。

鉄は、硝酸還元酵素など多様な細胞内酵素類に補因子として含まれており、植物プランクトンの栄養生理に複雑な影響を及ぼす (Takeda 1998)。このため、硝酸塩取り込みや窒素固定のような海洋窒素循環の主過程を対象に、鉄制限の影響が精力的に調べられてきたが、鉄欠乏に伴う植物プランクトンからの亜硝酸塩の細胞外放出が海洋生態系内でどのような意義をもつのかについてはあまり考察されてこなかった。

一方、海水中に溶存する鉄の大部分は有機錯体鉄として存在しており、植物プランクトンによる有機錯体鉄の取り込みには、銅を含む酸化酵素反応系が関与している。また、植物プランクトンが光合成を行う際に必要な炭酸脱水素酵素にも亜鉛が含まれている。さらに我々は、西部北太平洋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を見出している。

このように海洋亜表層における植物プランクトンや硝化微生物による窒素代謝に際しては、両者の間で鉄などの微量元素に関する競合が起こり、その過不足が窒素循環を制御している可能性は高いと考えられる。しかし、これらの相互作用を結び付けて解釈することを意識した現場観測や実験はこれまで行われてこなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、海洋の亜表層における栄養塩

等の窒素循環に関わる環境パラメーターの高分解能観測を試みるとともに、鉄などの微量栄養金属の動態が、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制御する要因になっているとの新たな仮説を、現場観測によるプロセス研究を通して検証することを目的とする。

これにより、外洋域における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の応答予測の高度化に貢献することが期待される。

### 3. 研究の方法

2017年9~10月の北太平洋亜熱帯域での白鳳丸航海において、23°N線に沿った170°Wから137°Eまでの7測点(170°Wの測点のみ21°N)で、亜表層クロロフィル極大層(SCM)を含む計11層で5m間隔の高分解能鉛直採水を行い、栄養塩およびクロロフィル等を測定した。

また、SCM、SCM 10 m、SCM+10 mから採取した海水試料を0.22 μmのフィルターで濾過後、フィルター上に捕集された微生物群集の細胞からDNAを抽出し、細菌および古細菌に共通な16S rRNA遺伝子のV4領域を対象としてMiSeqを用いたアンプリコンシーケンシングによって解析した。

東部(170°W)と西部(160°E)の2測点では、金属による汚染に配慮したクリーン採水によりSCMから採取した海水を用いて、植物プランクトン窒素代謝への鉄と光の影響を調べるため鉄添加培養実験と、微生物硝化を調べるための窒素添加培養実験を実施した。

鉄添加培養実験では、容積1Lの酸洗浄したポリカーボネート製培養瓶に分注した後、基質となる栄養塩を加えて現場のプランクトン群集を安定させるため、最終濃度1 μMの硝酸塩と0.0625 μMのリン酸塩を加えて、光量22.7 μmol/m<sup>2</sup>/s、明暗周期14L:10D、温度21 °Cの条件下で、小型インキュベーターを用いて2日間予備培養した。その後、鉄無添加+弱光区、鉄無添加+強光区、鉄添加+弱光区、鉄添加+強光区の4つの実験区を設定し、2日間の植物プランクトンの増殖応答をクロロフィル濃度の変化量から、硝酸塩の取り込みおよび亜硝酸塩の蓄積については栄養塩濃度の高感度比色分析により調べた。鉄は塩化鉄(III)を最終濃度1 nM(現場濃度の10倍以上)で添加し、弱光区は15.8 μmol/m<sup>2</sup>/s、強光区は36.8 μmol/m<sup>2</sup>/sの光量に調節した。

窒素添加培養実験では、酸洗浄したガラスファイバーフィルター(GF/F, 孔径約0.8 μm)で植物プランクトンを除去した後、アンモニウム塩もしくは亜硝酸塩を1 μM添加して鉄添加培養実験と同じインキュベーター内で培養し、アンモニウム塩、亜硝酸塩、硝酸塩の濃度変化を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 北太平洋亜熱帯域における亜表層クロロフィル極大 (SCM) と栄養塩および水中光量の鉛直分布構造

23°N の観測線に沿った 7 測点における SCM、亜硝酸塩極大、硝酸塩躍層開始深度、1% 光量層、0.1% 光量層の鉛直的な位置関係を図 1 に示す。SCM は一般的な有光層深度の目安となる 1% 光量層よりやや深い 0.3~0.7% 光量層に認められ、SCM と硝酸塩躍層開始深度は多くの測点でほぼ一致していた。亜硝酸塩極大は 113~155 m に出現し、137°E の測点を除いて SCM の 5~25 m 下層に位置しており、それらの深度における光量としては 0.1~0.6% の範囲内であった。

これらの結果から、亜硝酸塩極大の出現深度について、SCM から 5~11 m と近い場合 (137, 140, 170°E, 170°W) と SCM から鉛直的に 15~20 m と離れている場合 (150, 160°E, 180°) の 2 パターンがあることが分かった。これまでに、ハワイ沖では SCM と亜硝酸塩極大が近いパターンが (Dore and Karl et al., 1996)、カリフォルニア中央海流では離れたパターンが報告されており (Santoro et al., 2013)、水柱の鉛直的な安定性の違いによって SCM と亜硝酸塩極大の位置関係が大きく変化する可能性が考えられる。本研究では、150°E と 180° の測点における鉛直振動を表す Brunt-Vaisälä 振動数の値が、他の測点と比べて大きくなる傾向にあったが、物理環境との対応については今後詳しく調べる必要がある。

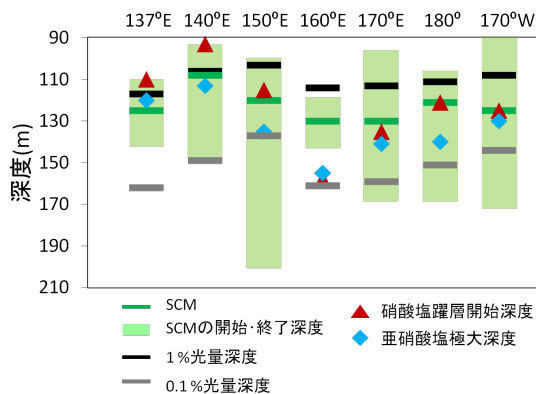


図 1. 北太平洋亜熱帯域 (23°N) の東西観測線上における亜表層クロロフィル極大層 (SCM)、亜硝酸塩極大、硝酸塩躍層開始深度、1% 光量層、0.1% 光量層の鉛直的な位置関係

(2) 北太平洋亜熱帯域の亜表層クロロフィル極大 (SCM) 付近における微生物群集組成

23°N の観測線に沿った 7 測点における SCM とその上下 10 m 層から採取した海水試料中には、アンモニア古細菌 (Ammonia Oxidizing Archaea, AOA) の系統群である Thaumarchaeota 門と、亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB) の系統群である Nitrospinae 門が見出され、いずれの試料においても

Thaumarchaeota 門 AOA の方が Nitrospinae 門 NOB よりも高い割合をしめていた (図 2)。AOA は解読された全塩基配列数の 0.5~8.5% を占め、NOB は 0~1.1% を占めていた。23°N 観測線の東から西に向かって AOA、NOB の存在割合は増加傾向を示し、いずれの測点においても、AOA と NOB の割合は SCM 下 10m 層で最大、SCM 上 10m 層で最小となった。

Thaumarchaeota 門 AOA と Nitrospinae 門 NOB が同所的に存在し、相対的に AOA の存在割合が高いことは、他の海域の結果 (Bristow et al., 2015; Tolar et al., 2013) と一致しており、今回の調査海域におけるアンモニア酸化過程においても、両細菌群が関与していることが示唆される。

Thaumarchaeota 門 AOA と Nitrospinae 門 NOB の存在比 (NOB/AOA) は 0~0.21 の範囲にあり、各細菌群の変化パターンと同じく 23°N の観測線の東から西に向かって増加する傾向が見られた。メキシコ湾の海水におけるアンプリコンシーケンシングで NOB/AOA 比が平均 0.05 だったこと (Tolar et al., 2013) と比較して、137°E および 140°E の値は顕著に高く、これらの測点において NOB による亜硝酸酸化が相対的に強化されていたと考えられる。

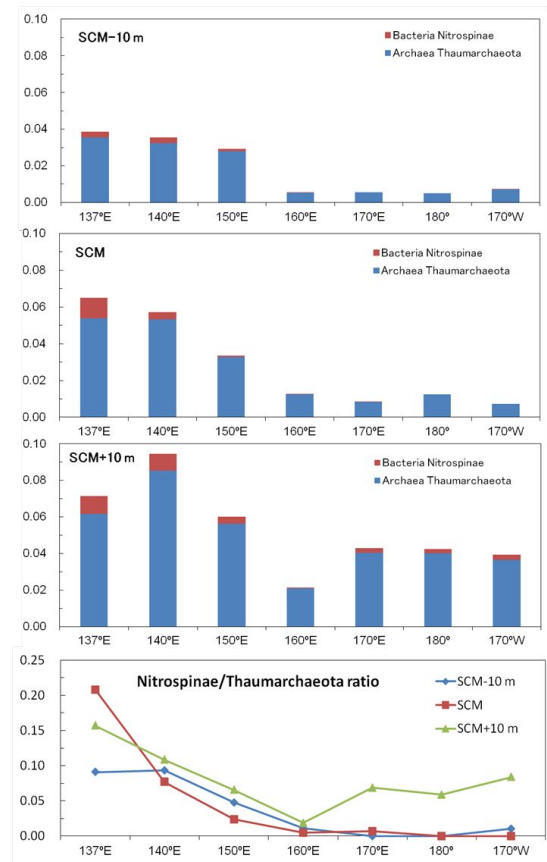


図 2. 北太平洋亜熱帯域 (23°N) の東西観測線上における亜表層クロロフィル極大層 (SCM) とその 10m 上層 (SCM-10m) および 10m 下層 (SCM+10m) での Nitrospinae 門 (亜硝酸酸化細菌系統群) と Thaumarchaeota 門 (アンモニア古細菌系統群) の遺伝子存在量ならびに両者の遺伝子の存在比

### (3) プランクトン群集の窒素代謝に及ぼす鉄と光の影響

北太平洋亜熱帯域の東部 (21°N; 170°W) と西部 (23°N; 160°E) における亜表層クロロフィル極大層プランクトン群集を用いた鉄添加培養実験では、両測点ともに鉄添加区のクロロフィル濃度が鉄無添加区と比べて高くなったことから、現場の植物プランクトン群集は鉄制限状態にあったと判断された。但し、鉄無添加区においてもある程度のクロロフィル濃度の増加が確認されたため、現場の鉄濃度環境は植物プランクトンの増殖を完全に抑制するほど強い欠乏状態になっていなかったと思われる。

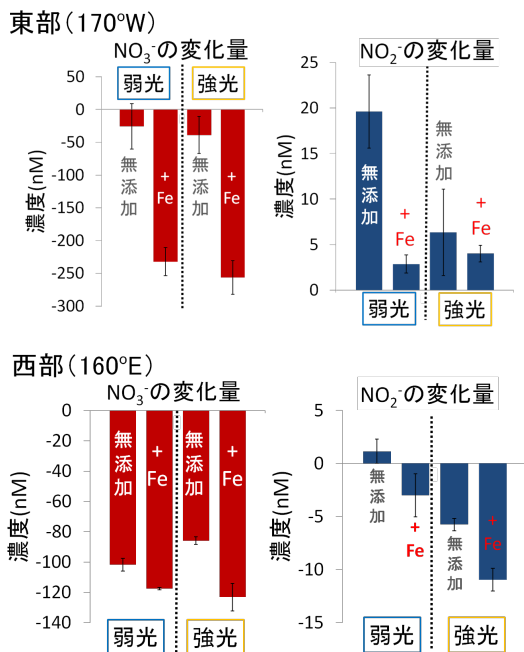


図 3. 北太平洋亜熱帯域の東部 (21°N; 170°W) と西部 (23°N; 160°E) での亜表層クロロフィル極大層プランクトン群集を用いた鉄添加培養実験における培養 2 日間の硝酸塩と亜硝酸塩濃度の変化量

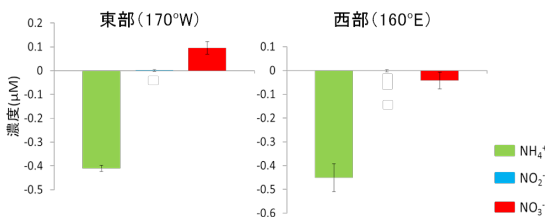


図 4. 北太平洋亜熱帯域の東部 (21°N; 170°W) と西部 (23°N; 160°E) での亜表層クロロフィル極大層の微生物群集に対するアンモニウム塩添加実験における 2 日間の無機窒素濃度の変化量

亜硝酸塩極大と SCM が近接していた東の測点では、鉄添加による硝酸塩の消費量の増加が弱光区と強光区の両方で生じており、鉄供給によって硝酸塩還元酵素の機能が回復したことを示唆している (図 3 左上)。亜硝酸塩の動態については、鉄無添加+弱光区では消費された硝酸塩とほぼ同量の亜硝酸塩が海水中に蓄積していたのに対して、鉄添加によって亜硝酸塩の蓄積量が 1/4 程度にまで大

きく減少し、光量を強めることによって蓄積量は半分以下に減少した (図 3 右上)。これらの結果は、鉄供給による亜硝酸塩還元酵素の機能回復と、その反応系への光エネルギー供給改善を意味する。また、微生物硝化を調べるための窒素添加培養実験においては、アンモニウム塩の添加による硝酸塩の増加から微生物群集によるアンモニウム塩から硝酸塩への酸化が起きていたことを確認したが、亜硝酸塩の蓄積は見られなかった (図 4 左)。従って、鉄および光制限を受けていた植物プランクトンからの亜硝酸塩放出が、亜硝酸塩極大の主な形成要因となっていた可能性が示された。

一方、亜硝酸塩極大と SCM が離れていた西の測点では、鉄無添加+弱光区で亜硝酸塩濃度が僅かに増加したものの、いずれの実験区においても硝酸塩および亜硝酸塩の消費傾向が強く表れていた (図 3 下)。また、窒素添加培養実験では、亜硝酸塩だけでなく硝酸塩の蓄積も見られなかった (図 4 右)。これらの結果は、SCM 付近の植物プランクトン群集が強い窒素制限状態にあり、東部海域と比べて窒素代謝への鉄制限の影響が弱く不明瞭になっていたことを示唆する。

### (4) 亜硝酸塩極大層の形成機構に関する仮説の検証

本研究で得られた結果から、北太平洋の亜熱帯海域における亜硝酸塩極大層の形成機構について、亜硝酸塩極大と SCM の位置関係を 2 パターン (図 5) に分けて整理した。

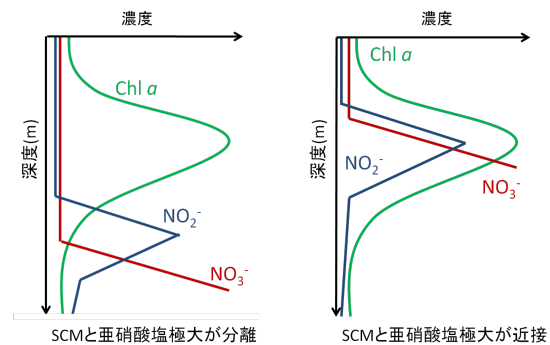


図 5. 亜熱帯海域における亜表層クロロフィル極大 (SCM) と亜硝酸塩極大の位置関係を表す模式図

亜硝酸塩極大と SCM が近接していた東部の測点のような海域では、鉄供給により硝酸塩の消費が増大するとともに、鉄供給および光量の増加に伴い亜硝酸塩の蓄積が減少を示したことなどから、鉄および光制限を受けていた植物プランクトンからの亜硝酸塩放出が、亜硝酸塩極大の主な形成要因となっていたことが示され、鉄制限の影響が弱光よりも大きいと判断された。従って、鉄欠乏に伴う植物プランクトンの硝酸塩代謝の障害が亜硝酸塩の細胞外放出を促し、亜硝酸塩極大の形成に寄与しているとの仮説が検証された。

一方、亜硝酸塩極大と SCM が離れていた西

部の測点のような海域では、SCM 付近の植物プランクトン群集は強い窒素制限状態にあり、亜硝酸塩の蓄積は非常に少なくなっていると同時に、植物プランクトンの窒素代謝への鉄制限の影響が弱く不明瞭になると考えられる。SCM と離れた下層に亜硝酸塩極大が形成される要因としては、内部波で SCM の位置が一時的に浅層に移動した可能性が高いと推察されるが、微生物群の亜硝酸塩酸化活性がアンモニア酸化活性と比べて弱くなっているかどうかについて銅や亜鉛など鉄以外の微量元素の複合影響も含めて今後確かめる必要がある。

#### <引用文献>

- Bristow, L.A., N. Sarode, J. Cartee, A. Caro-Quintero, B. Thamdrup, F.J. Stewart, 2015, Biogeochemical and metagenomic analysis of nitrite accumulation in the Gulf of Mexico hypoxic zone. *Limnology and Oceanography*, 60, 1733-1750.
- Lomas, M.W., F. Lipschultz, 2006, Forming the primary nitrite maximum: Nitrifiers or phytoplankton? *Limnology and Oceanography*, 51, 2453-2467.
- Milligan, A.J., P.J. Harrison, 2000, Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (BACILLARIOPHYCEAE), *Journal of Phycology*, 36, 78-86.
- Santoro, A.E., C.M. Sakamoto, J.M. Smith, J.N. Plant, A.L. Gehman, A.Z. Worden, K.S. Johnson, C.A. Francis, K.L. Casciotti, 2013, Measurements of nitrite production in and around the primary nitrite maximum in the central California Current. *Biogeosciences*, 10, 7395-7410.
- Tolar, B.B., G.M. King, J.T. Hollibaugh, 2013, An analysis of Thaumarchaeota populations from the Northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 4, 72.

#### 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 3件)

- Shiozaki, T., D. Bombar, L. Riemann, F. Hashihama, S. Takeda, T. Yamaguchi, M. Ehama, K. Hamasaki, K. Furuya, 2017, Basin scale variability of active diazotrophs and nitrogen fixation in the North Pacific, from the tropics to the subarctic Bering Sea. *Global Biogeochemical Cycles*, 31, 996-1009.

- 査読有, DOI: 10.1002/2017GB005681  
Lee, K., T. Matsuno, T. Endoh, J. Ishizaka, Y. Zhu, S. Takeda, C. Sukigara, 2017, A role of vertical mixing on nutrient supply into the subsurface chlorophyll maximum in the shelf region of the East China Sea. *Continental Shelf Research*, 143, 139-150. 査読有, DOI: 10.1016/j.csr.2016.11.001  
Obata, H., J. Nishioka, T. Kim, K. Norisuye, S. Takeda, Y. Wakuta, T. Gamo, 2017, Dissolved iron and zinc in Sagami Bay and the Izu-Ogasawara Trench. *Journal of Oceanography*, 73, 333-344. 査読有, DOI: 10.1007/s10872-016-0407-8

#### [学会発表](計 4件)

- 武田重信・藤田裕也, 北太平洋亜熱帯域における亜表層クロロフィル極大付近の窒素循環に及ぼす鉄の影響. 日本地球惑星科学連合 2018 年大会, 2018 年  
平田国興・武田重信, 混合栄養性ハプト藻の栄養獲得様式の違いによる細胞内 CNP 元素組成比の変化. 2017 年度日本海洋学会秋季大会, 2017 年  
Takeda, S., Distributions of dissolved trace metals along a 170°W section in the Pacific Ocean. 2017 Aquatic Sciences Meeting, 2017 年  
藤田裕也・石田朗人・近藤能子・武田重信, 白鳳丸 KH-15-3 次航海における硝酸塩センサー観測. 九州大学応用力学研究所共同利用研究集会, 2016 年

#### 6. 研究組織

##### (1)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

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

和田 実 (WADA, Minoru)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号: 70292860