

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06294

研究課題名(和文)高プロリン含有成分に着目した新しい海洋有機物動態論の開拓

研究課題名(英文) Exploring a novel perspective in the research of marine organic matter dynamics with a focus on constituents with a high level of proline

研究代表者

永田 俊(Nagata, Toshi)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：40183892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸は重要な生体構成成分であり、海洋物質循環において重要な役割を果たしている。これまで海洋環境中のアミノ酸動態については多くの研究がなされてきたが、たんぱく質を構成する20種類のアミノ酸のうち唯一の環状2級アミンであるプロリンは、分析方法上の制約から、その分布や変動についての知見が限られてきた。本研究では、この方法的な制約を克服し、海洋試料のアミノ酸組成を、プロリンを含めて高感度に分析する手法を確立した。この手法を用い、海洋有機物のプロリン含有量の変動を明らかにするとともに、これまで未知であった、高プロリン含有成分の動態の影響要因の解明を大きく前進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来用いられてきた誘導化法とは異なる原理に基づく分析手法を確立し、これを海洋試料に適用することで、これまで見逃されてきたプロリン動態を解析する為の技術的基盤を提供した。この方法が確立したことで、今後、海洋試料のアミノ酸動態の研究が高度化することが期待される。また、この手法を用い、これまで情報の乏しかったサブミクロンサイズ画分の海洋有機物のプロリン含有量とその変動を明らかにするなど、海洋物質循環の理解の深化に結び付く、重要な新知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Amino acids are important biological constituents and play an important role in marine biogeochemical cycles. Much research has been done on the dynamics of amino acids in the marine environment, but proline, which is the only cyclic secondary amine among the 20 amino acids that make up proteins, has largely been overlooked due to analytical method restrictions. We have overcome this methodological limitation and established a method for highly sensitive analysis of the amino acid composition of marine samples, including proline. Using this method, we clarified the fluctuations in the proline content of marine organic matter and contributed to elucidating the previously unknown factors that influence the dynamics of high-proline-containing components in marine organic matter.

研究分野：海洋生物地球化学

キーワード：海洋物質循環 プロリン コロイド粒子 アミノ酸 海洋微生物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

結合型アミノ酸は、海洋微生物バイオマスの半分以上を占める最重要の生体高分子であり、海洋炭素・窒素循環の中で重要な役割を果たしている。そのため海洋有機物動態論の中で、アミノ酸の研究は中心的な位置を占めてきた。しかし、これまでタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のうち唯一の環状 2 級アミンであり、独特の化学構造を持つ L-プロリンは、方法上の制約などもあり大きく見逃されてきた。研究代表者らは、近年、西部北太平洋の亜寒帯および亜熱帯海域において、サブミクロンサイズ画分の有機物(サブミクロン粒子)の中に、L-プロリンが蓄積しているという現象を発見した(Takasu and Nagata, 2015)。これは高プロリン含有性のサブミクロン粒子が海洋環境中に大量に存在することを示した初めての結果であり、海洋における有機物動態支配の新規メカニズムの存在を強く示唆するものである。実際、海洋の外洋水中には、1 mL あたり約 1000 万個のサブミクロン粒子が存在することが電気抵抗型粒子計測装置を用いた測定により明らかにされているが、これらの有機微粒子は、衝突・凝集を介した沈降性大型凝集物の形成を通して、海洋における大規模な炭素鉛直輸送を直接的に支配するばかりでなく、地球化学反応を制御する固体表面反応場の提供や、従属栄養生物の生産を支える餌資源の供給、さらには海水中での可視光後方散乱の支配要因、といったさまざまな側面で重要な役割を果たすと考えられている。そのためサブミクロン微粒子の動態機構解明は、海洋地球化学のみならず、生態学、微生物学、海洋光学、衛星海洋学といった広範な分野に大きな波及効果をもたらす。先行研究によれば、サブミクロン粒子の主要構成要素は、海洋微生物の残渣に由来するポリマーからなるゲル状の微粒子であるとされているが、その起源、生成機構、蓄積・除去過程については未解明の点が多い。本研究では、研究代表者らの発見を土台として、海洋環境中の高プロリン含有微粒子の動態機構解析を推進する。それを通じて、海洋有機物の生成、蓄積、輸送、分解に関わる未解明機構の解明にむけて、学術潮流の転換を図る。

### 2. 研究の目的

本研究では、海洋環境中のプロリン含有成分の動態解析を推進する。具体的には、特にコロイド画分に着目してプロリン含有成分の海域や深度による変動を明らかにし、その支配要因や、海洋における有機物の蓄積、輸送過程の制御においてそれらがどのような役割を果たしているのかについての考察を深める。また、地球化学と微生物学の専門家の学際的な結集により、プロリンの動態制御と密接にかかわる微生物過程や、高分子有機物や粒子の変動についての解明も進める。これらを通して、海洋有機物動態の理解の深化に貢献することを目的とする。

(1) 現場観測：先行研究で得られた結果は、観測地点が限られていることから、本研究では、より多様な海洋環境での現象の再現性を確認することを目的として現場観測を行う。また、プロリン動態と海洋環境との関係を解析し、プロリン含有成分の起源、動態、制御要因について考察する。

(2) 分析手法の確立：現在最も広く用いられている海水中アミノ酸分析法であるオルトフタルアルデヒド誘導化・高速液体クロマトグラフ法では、二級アミンの定量ができない。そのため既往の海洋有機物動態論においては、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸の中で唯一の二級アミンである L-プロリンは大きく見逃されてきた。一方、Takasu and Nagata (2015)では、ガスクロマトグラフ・質量分析法を用いてプロリンの分析を行ったが、この方法では、大量の海水を限外濾過法により濃縮する必要がある。そのため多大な時間と経費を要し、このことが研究の進展を大きく阻んできた。そこで、本研究では、質量分析法にかわる高感度な分析法としてオリトフタルアルデヒド法によらない高速液体クロマトグラフ法に着目し、低濃度試料でのプロリン分析を確立する。なお、高プロリン含有成分のアミノ酸配列の解明を模索したが、検討の結果、海水中から分析に必要な十分量の試料を得るのは困難であることが明らかになったため、本研究では、高感度で精度の高い分析システムの開発に注力した。

(3) 培養実験：海洋有機物の分解に伴うプロリン含有量の変化と微生物群集の変動を追跡し、高プロリン含有成分の動態や制御要因について考察する。

### 3. 研究の方法

(1) 北海道沖および三陸沖で実施された研究船新青丸の航海において、コロイド画分の有機物を採取した。観測地点と採水時の海域特性を表す水温、塩分、溶存酸素濃度の鉛直分布を図 1 に示す。ニスキン採水器を用いて採水した海水を、まず燃焼処理をした GF/F ガラスろ紙でろ過し、懸濁態粒子画分(以下、POM)とした。次に、ろ液を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のオムニポアフィルターでろ過し、サブミクロン粒子を捕集した(以下、コロイド画分)。なお、採水は、表層(水深 10 m)と、中層(水深 500 m、ただし、定点 OT4 では海底から 10 m 上の層である水深 280 m)で行った。

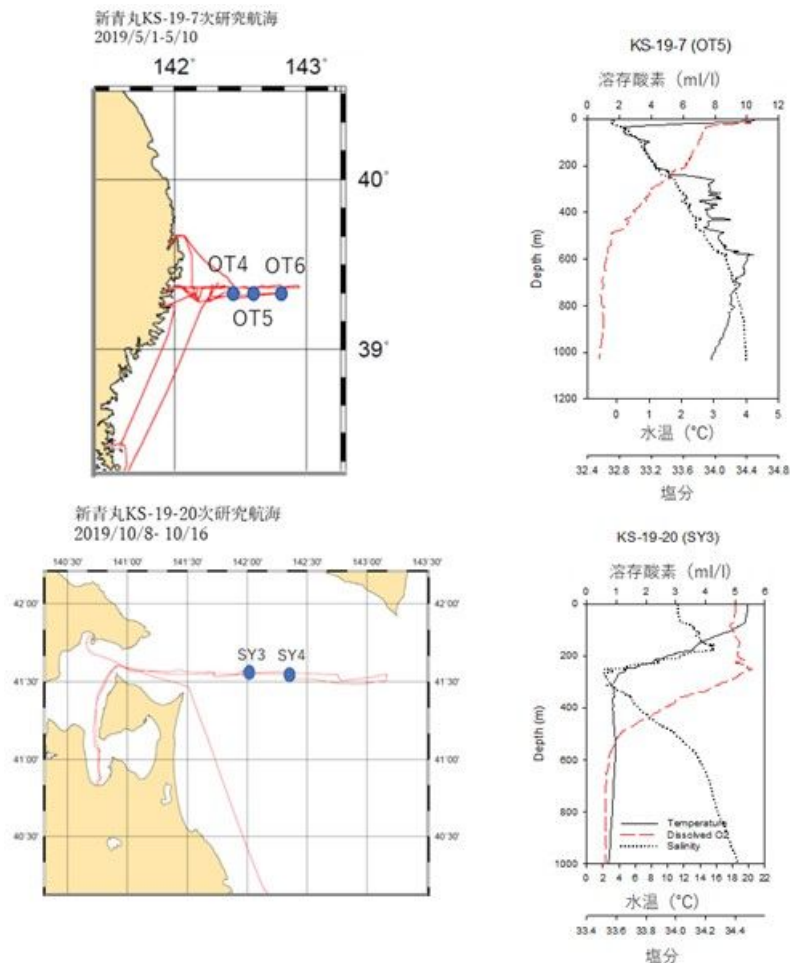


図1 観測地点と海洋学的特性（代表点として各海域の1地点のプロファイルを示す）実線は水温、破線は溶存酸素、点線は塩分。

酸を添加し、アミノ酸をカチオン化させた。その後、Takano et al. (2010) の方法に従い、AG50 (AG 50W-X8 200-400mesh Resin, BioRad) イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画・脱塩を行った。分画・脱塩後のサンプルは、Waters製のAccQ-Fluor Reagent Kitを用いて、カルバミン酸6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジル (AQC) によるアミノ酸の蛍光誘導体化を行った。蛍光誘導体化したアミノ酸は、蛍光検出器 (2475 Fluorescence Detector, Waters) 付き高速液体クロマトグラフィー (Alliance e2695, Waters) により測定を行った。なお、アミノ酸の分離にはC18カラム (AccQ-Tag Column, 4  $\mu$ m, 3.9  $\times$  150 mm, Waters) を用い、AccQ-Tag Eluent A (Waters)、アセトニトリル (富士フィルム和光)、超純水 (Milli-Q, Direct-Q UV3, Merck Millipore) の混合割合を変化させながらそれぞれのアミノ酸を溶出させた。標準物質には、アミノ酸混合標準液H型 (富士フィルム和光) を用いた。

(3) 大気海洋研究所国際沿岸海洋研究センターの施設を利用し、海洋における有機物生産において重要な役割を果たす、珪藻を主体とした植物プランクトン群集のブルームを100Lスケールの容器内で発生させた。得られた懸濁態有機物を暗条件下で培養し、有機物分解に伴う、アミノ酸組成の変化を調べた。懸濁態有機物からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた16SrRNA遺伝子アンプリコンシーケンシングを行うことで、分解に関わる微生物群集組成の変化を調べた。

#### 4. 研究成果

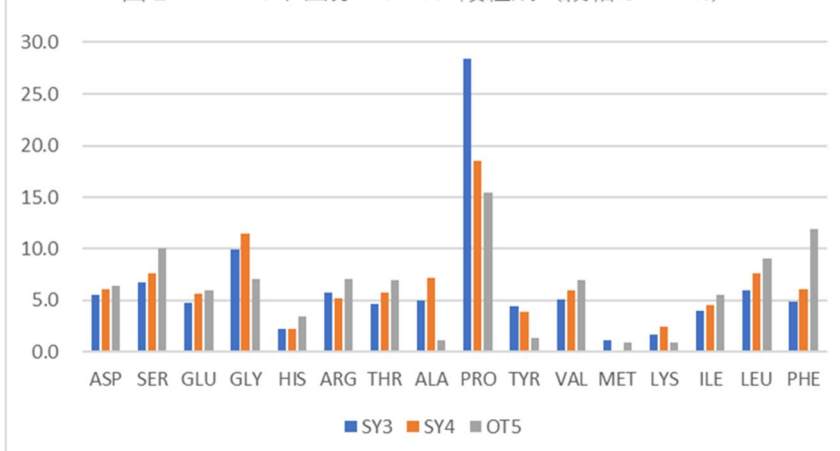
(1) AQC誘導体化HPLC法によりアミノ酸分析法を検討した結果、試料を脱塩することにより良好な分析結果が得られることが明らかになった。海洋のコロイド有機物のアミノ酸分析に本法を適用したのは本研究が初めてであり、今後、海洋におけるプロリンを含むアミノ酸動態の理解の深化に大きく貢献することが期待される。方法の詳細については論文にまとめ発表する予定である。

(2) 新たに確立したAQC誘導体化HPLC法を用いて、北海道沖および三陸沖の海域において表層と中層のPOMとコロイド画分のアミノ酸組成を明らかにすることに成功した。その結果、OT5, SY4, SY3の3定点の水深500mにおいて、コロイド画分における全アミノ酸濃度に対するプロ

試料を捕集したろ紙は凍結して実験室に持ち帰り、分析に供した。

(2) POMを捕集したGF/Fフィルターまたはコロイド画分の有機物を捕集したオムニポフィルターは、ガラスアンプルに入れ、1 mLの濃塩酸と10  $\mu$ Lの55  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>のアスコルビン酸を添加し、窒素ガスを1分間吹き付けた後にガラスアンプルを封じた。ガラスアンプルに封入したサンプルは、110  $^{\circ}$ Cで24時間加水分解を行った。加水分解したサンプルは、石英ウールを詰めたパスツールピペットに通して濾過を行い、濾液は窒素ガスで乾燥固化させた。ここで乾燥固化させたサンプルを希塩酸あるいは超純水に再溶解させ、アミノ酸の蛍光誘導体化を行うことが一般的であるが、析出物が多く、クロマトグラムにも多くの夾雑ピークが見られることから、蛍光誘導化前にサンプルの脱塩・精製を行った。まず、乾燥固化したサンプルに、2 mLの0.1N塩

図2 コロイド画分のアミノ酸組成（縦軸はモル%）



リンの割合(モル%)が、それぞれ 15.5, 18.5, 28.4%と顕著に高いことが明らかになった(図2)。この結果は、海洋中層において、プロリンを多く含むコロイド成分が一般的に存在することを示しており、重要な意義がある。

(3) 以上の結果を、先行研究のデータとあわせて解析したところ、コロイド画分にお

けるプロリン含有量が、総アミノ酸濃度の低下とともに上昇する傾向が明らかになった。また、プロリン含有量は、海水中の溶存酸素濃度が低いほど高くなる傾向を示した。この結果は、有機物の分解の進行とともに、難分解性のプロリン含有成分が海水中に蓄積した可能性を示唆する。ただし、近年、海洋細菌が浸透圧調節のためにプロリンを細胞内に蓄積しており、そのことが、コロイド画分にプロリンが多く含まれる理由であるという仮説が米国の研究グループにより提案されていることから (Johnson et al. 2020)、プロリン蓄積機構については今後のさらなる検討が必要である。以上の成果は論文にまとめて発表する予定である。

(4) 培養実験の結果から、有機物分解の進行とともに、アミノ酸濃度が顕著に減少し、それに伴い、細菌群集組成やアミノ酸組成が変動することが明らかになった。しかし、プロリン含有量は、分解の後期においても顕著な上昇を示さず、比較的一定であった。本研究で用いた実験系では、分解に伴う高プロリン含有成分の蓄積は示されなかった。

(5) 海洋におけるコロイド粒子の起源や動態についてゲル状物質という観点から総説をまとめて公表するとともに、海洋粒子の粒径分布に関する知見を原著論文にまとめて公表した。

#### <引用文献>

Takasu and Nagata (2015) High proline content of bacteria-sized particles in the Western North Pacific and its potential as a new biogeochemical indicator of organic matter diagenesis *Frontiers in Marine Science*, 2:110. doi: 10.3389/fmars.2015.00110

Takano, Y., Kashiya, Y., Ogawa, O.N., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N. (2010) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2317-2323.

Johnson, W.M., Longnecker, K., Kido Soule, M.C., Arnold, W.A., Bhatia, M.P., Hallam, S.J., Van Mooy, B.A.S. and Kujawinski, E.B. (2020), Metabolite composition of sinking particles differs from surface suspended particles across a latitudinal transect in the South Atlantic. *Limnology and Oceanography*, 65: 111-127. <https://doi.org/10.1002/lno.11255>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagata, T., Yamada, Y., Fukuda, H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Transparent exopolymer particles in deep oceans: Synthesis and future challenges	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/gels7030075	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 -

1. 著者名 Yamada, Y., Fukuda, H., Umezawa, Y., Nagata, T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Geographic Variation of Particle Size Distribution in the Kuroshio Region: Possible Causes in the Upper Water Column	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2021.768766	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海老原諒子, 福田秀樹, 横川太一, 永田俊
2. 発表標題 沈降性凝集体に発達する細菌群集の動態：メソコスムを用いた実験的解析
3. 学会等名 日本海洋学会2020年度秋季大会
4. 発表年 2020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	横川 太一  (Yokokawa Taichi)  (00402751)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究員    (82706)	

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 分 担 者	高巢 裕之  (Takasu Hiroyuki)  (00774803)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科（環境）・助教    (17301)	

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