

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月30日現在

機関番号：82706
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22740340
 研究課題名（和文） 酸化還元環境に応じた底生有孔虫のエネルギー獲得様式のスィッチ
 研究課題名（英文） Variable energy utilization of benthic foraminifera in relation to redox conditions
 研究代表者
 野牧 秀隆 (NOMAKI HIDETAKA)
 独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・研究員
 研究者番号：90435834

研究成果の概要（和文）：底生有孔虫が海底の現場で実際に活性を持っているかどうかを判別する方法を開発した。また、細胞内で硝酸塩呼吸を行っている個体を、殻内有機物と細胞内の有機物のアミノ酸窒素同位体比を比較することで、活性の高低も含めて見積もることができることを見出した。この手法は、これまで実験室内で活性の測定などを行って推定するしかなかった有孔虫の硝酸塩呼吸の実態をより正確に導くことができると期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a method to identify foraminiferal metabolic activities in situ. Also, we found a novel tool to estimate the degree of denitrification in foraminiferal cells by comparing nitrogen isotopic compositions of amino acids in foraminiferal cell and in organic matter of foraminiferal test. This will be useful proxy to estimate foraminiferal respiration from shallow water to deep-sea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：深海生態学、生物地球化学サイクル
 科研費の分科・細目：地球惑星科学・層位・古生物学
 キーワード：底生有孔虫、呼吸、堆積物—水境界、酸化還元環境、同位体標識実験、アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

底生有孔虫は、海底に普遍的に生息する原生生物であり、特に深海底では生物量、多様性ともに高く、生態学的観点、物質循環の観点から非常に重要な分類群である。また、その石灰質、砂質の殻が堆積物中によく保存され、種組成や殻の形態、化学組成が生息環境

とよく対応することから、優れた古環境指標として用いられている。

底生有孔虫は、堆積物中において、沈降有機物フラックスと堆積物間隙水中の溶存酸素量とに応じた鉛直分布を示すとされてきた。有孔虫をはじめとする従属栄養生物にとって、餌と、呼吸に用いる酸素は不可欠な要

素であるからである。近年、特定の有孔虫種による硝酸塩呼吸（脱窒）の可能性が報告された。溶存酸素だけでなく、硝酸塩、もしかしたら鉄、硫酸塩なども、嫌気呼吸の最終電子受容体として底生有孔虫に利用されている可能性を示唆する。また、嫌気的な環境に生息する有孔虫では、細菌を細胞内に共生させてエネルギーを得ている種も報告されており、有孔虫のエネルギー獲得形式は、実は非常に多様なのかもしれない。

代表者はこれまで、相模湾中央部深海底の底生有孔虫について、実験室内での酸素呼吸量の測定や、船上でのミトコンドリアの活性の推定などを行ってきた。また、堆積物中の生息位置での底生有孔虫の活性を知るために、ミトコンドリアの電子伝達系の働きで還元され沈殿を発生させる還元系発色試薬を、ミトコンドリア活性、すなわち呼吸活性の指標として評価し、堆積物中で使用することを試みた。

船上での培養実験の結果、ミトコンドリア活性（≒呼吸活性）を示す個体は、種によって特定の化学条件の深度に限られているように見られた。たとえば、堆積物表層を中心に生息する *Uvigerina akitaensis* は、表層から 2-3cm の深部にも「細胞質が詰まった個体」が見られるが、そのうちミトコンドリア活性を示した個体は、溶存酸素の検出される表層部分に限られる。一方、堆積物の深部に主に生息する *Globobulimina affinis* のうち、ミトコンドリア活性を示した個体は、硝酸塩の枯渇する深度以深と、溶存酸素の検出される深度以浅の、両極的な分布を示した。*Globobulimina* は、室内での飼育実験の結果、堆積物表層から深部まで数日をかけて移動することが観察されている。堆積物表層付近では酸素呼吸を、深部では細胞内の硝酸塩プールを用いて硝酸塩呼吸を行うといったよ

うに、*Globobulimina* はダイナミックに堆積物の間隙水の化学環境に適応、利用してエネルギーを得ているのかもしれない。

このように、異なる有孔虫種が、堆積物中の酸素や硝酸塩などの濃度に応じてエネルギーの獲得様式を変化させ、それぞれ環境に適応している可能性がある。好気・嫌気環境下での呼吸様式の違いは、海底面での物質循環にも大きく影響を与えると同時に、地球史における酸素量の増加や海洋無酸素事象などにおける生存・適応戦略を理解する上でも重要な知見を提供する。

2. 研究の目的

底生有孔虫が堆積物中の化学環境に応じてエネルギーの獲得形式をスイッチすることで、有孔虫のような小型底生生物がダイナミックに堆積物中を移動、適応しながら物質を代謝し、物質循環に貢献しているという仮説を、実験的手法により確かめることである。

3. 研究の方法

(1) 貧酸素から還元的な環境に移行する堆積物中において、有孔虫の代謝がどのように変化するかを明らかにするために、2011年1月に相模湾深海底における現場培養実験を行った。この実験では、還元系発色試薬であるMTTを用い、酸素濃度や硝酸塩濃度に応じた底生有孔虫のすみ分けに、有孔虫の呼吸活性がどの程度影響しているのかを明らかにすることを目的とした。異なる有孔虫種の比較を行うこと、また、同一種でも異なる溶存酸素濃度、硝酸塩濃度の環境に生息する個体の比較を行うことで、化学環境に応じて有孔虫がどのようにその呼吸活性を変化させ、エネルギーを得ているのかを明らかにできる。実

験では、3日間の培養を行い、その際には、培養期間中に環境の変化を最小限に抑えるために新たに開発した現場培養装置を使用した。無人探査機を用いて現場培養装置を海底に設置し、MTTを海底に噴霧、拡散させた後、1日後に培養装置の上部を開放させ、周囲の環境と同様に保つようにした。設置から3日後に堆積物を回収し、深度ごとに切り分け、冷凍保存した。また、堆積物中の栄養塩濃度を調べるために、通常の実験室で分析を行った。

堆積物は、解凍後に63 μ mの篩を用いて洗浄し、実態顕微鏡を用いて底生有孔虫の拾い出しを行った。

(2) 季節的に、また堆積物中の深度方向で好気、嫌気環境が変化する浅海域に生息する底生有孔虫を用いた飼育実験を行い、一部の底生有孔虫（または共在する微生物）が行っているとされる硝酸塩呼吸の実態解明を行った。横浜市野島の干潟で採取した底生有孔虫 *Ammonia beccarii* を含む堆積物を、好気的環境および嫌気的環境下で1ヶ月間飼育した。好気的環境の堆積物、嫌気的環境の堆積物はそれぞれ7本ずつの培養系を準備し、1本はコントロールとして硝酸塩を添加せず、6本には、ほぼ3日に1回、同位体比の異なる硝酸塩（+73‰を2本へ、0‰を2本へ、-73‰を2本へ）を添加した。培養系内の環境が均一に好气的または嫌气的になるよう、系内を1日に1回攪拌した。実験終了後、堆積物の直上水を採取、濾過し、硝酸塩濃度とその同位体比測定用に冷凍保存した。堆積物は、300 μ mのメッシュでろ過し、細胞質の詰まった生きている有孔虫を拾い出した。拾い出した有孔虫は、分析までの間、風乾の後冷凍保存した。

底生有孔虫のアミノ酸の窒素同位体比の測定前に、一部の底生有孔虫個体には過酸化水素水を用いて細胞の有機物除去処理を行い、殻内に含まれる有機物のみの状態にし、有機物除去処理を行わない、細胞質を含む個体との比較を行った。

(3) 堆積物の表層は酸化的な一方深部は嫌气的であり、さまざまな有孔虫種がすみ分けている相模湾の底生有孔虫についても分析を行った。②の結果から得られた、硝酸塩呼吸のシグナルを指標として、自然環境の試料を用いて、どの種が、どの深度で硝酸塩呼吸を行っているかを検討した。相模湾中央部水深1430mで採取した底生有孔虫3種類

(*Globobulimina affinis*, *Chilostomella ovoidea*, *Uvigerina akitaensis*) について、堆積物の深度ごとに拾い出しを行った。

Ammonia beccarii の分析と同様に、同一深度から拾い出した有孔虫個体に対して、一部はそのままアミノ酸の窒素同位体比を測定し、一部は過酸化水素水で細胞質の有機物除去を行ってから測定を行った。

4. 研究成果

(1) 相模湾における現場培養実験の結果、堆積物の表層でのみ細胞の代謝活性を示す種と、堆積物表層から深部にかけて代謝活性を示す種が見られた。これは、船上での培養実験での結果と同様であり、底生有孔虫が、実際の深海底においても堆積物中の環境に応じて異なる活性をもつことを示唆する。これまで細胞質の有無や、堆積物試料採取後の分析に頼られてきた有孔虫の活性の判定を、現場で評価できるようになった点は重要な進展である。

(2) *Ammonia beccarii* を用いた室内培養実験の結果では、酸化的な環境では、添加した硝酸塩の影響は有孔虫細胞内、殻内有機物双方のアミノ酸窒素同位体比にはまったく影響が見られなかった。一方、嫌気的な環境下では、添加した硝酸塩の同位体比に応じ、有孔虫細胞内のアミノ酸窒素同位体比に明確な変動がみられた。有孔虫細胞内のアミノ酸窒素同位体比と、添加した硝酸塩の窒素同位体比には1:1の直線的な関係が見られた上、添加した硝酸塩同位体比からさらに一定値重い同位体比となっていた。これは、周囲の硝酸塩を積極的に取り込み、アミノ酸合成以外の用途に積極的に利用した後、残ったプールを利用してアミノ酸合成を行っていることを示唆する。一方で、このような関係は殻内有機物では非常にわずかにしか見られなかった。これが、成長量が少ないために、実験前の情報が殻に多く残っていたためなのか、それとも殻内の有機物には実際にほとんど残らないのかは今後の調査が必要である。

また、実験で見られた、「殻内有機物のアミノ酸窒素同位体比は軽い」一方で「細胞内のアミノ酸窒素同位体比は重い」という関係は、自然環境に生息する *Ammonia beccarii* にも見られた。同位体比の重くなり方から推察すると生活史の半分程度は嫌気的な環境で生活している（硝酸塩呼吸に依存している）ことを示唆する。この、殻内有機物と細胞内有機物のアミノ酸窒素同位体比の差は、有孔虫細胞内での硝酸塩利用に対する有用な指標となる可能性が高い。

(3) *Chilostomella ovoidea* では殻内有機物と細胞内有機物のアミノ酸窒素同位体比の差はほとんどなかったが、おもに堆積物の深部に生息する *Globobulimina affinis* と、堆積物浅部に生息する *Uvigerina akitaensis* で、

硝酸塩呼吸に依存した窒素同位体比の証拠が見られた。一方で、深度方向で硝酸塩呼吸の程度に明確な変化は見られず、1個体がさまざまな環境を行き来し、その環境に応じた呼吸を行っていることが示唆される。

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6件)

- ① Akoumianaki I, Nomaki H, Pachiadaki M, Kormas KA, Kitazato H, Tokuyama H (in press)
Low bacterial diversity and high labile organic matter concentrations in the sediments of the Medee deep-sea hypersaline anoxic basin
Microbes and Environments, 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/advpub/0/advpub_ME12045/_article
- ② Seike K, Jenkins RG, Watanabe H, Nomaki H, Sato K
Novel use of burrow casting as a research tool in deep-sea ecology
Biology Letters, 査読有, (2012)
DOI:10.1098/rsbl.2011.1111
- ③ Nomaki H, Ogawa NO, Takano Y, Suga H, Ohkouchi N, and Kitazato H.
Differing utilization of glucose and algal particulate organic matter by deep-sea benthic organisms of Sagami Bay, Japan
Marine Ecology Progress Series, 査読有, 431, (2011), 11–24
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0967063709000909>
- ④ Enge AJ, Nomaki H, Ogawa NO, Witte U, Moeseneder MM, Lavik G, Ohkouchi N,

Kitazato H, Kučera M, Heinz P

Response of the benthic foraminiferal community to a simulated short-term phytodetritus pulse in the abyssal North Pacific

Marine Ecology Progress Series, 査読有, 438, (2011), 129–142

<http://www.int-res.com/abstracts/meps/v438/p129-142/>

⑤ Nomaki H, Ogawa NO, Ohkouchi N,

Toyofuku T, Kitazato H

The role of meiofauna in deep-sea benthic food webs revealed by carbon and nitrogen stable isotope analyses

In Earth, Life, and Isotopes (Eds: Ohkouchi N, Tayasu I, and Koba K), 査読有, (2010), p119-138.

<http://www.kyoto-up.or.jp/book.php?id=1687>

⑥ Takano Y, Chikaraishi Y, Ogawa NO,

Nomaki H, Morono Y, Inagaki F, Kitazato H, Hinrichs K, Ohkouchi N

Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea

Nature Geoscience, 査読有, 3, (2010), 858–861

<http://www.nature.com/ngeo/journal/v3/n12/abs/ngeo983.html>

[学会発表] (計 28 件)

① 野牧秀隆, 井上健太郎, 菅寿美・

豊福高志・土屋正史・北里洋

深海底での炭素固定量の現場測定実験

Blue Earth 2012 (2012年2月22日、品川・東京海洋大学)

② 野牧秀隆, 小川奈々子, 大河内直彦、

北里洋

底生有孔虫の細胞質に由来する有機物の微

好気/嫌気的環境下での長期保存

日本地球惑星科学連合 2011 年大会 (2011 年 5 月 26 日、幕張メッセ、幕張)

③ Nomaki H, Inoue K, Suga H, and Kitazato H

Algal carbon processing by benthic foraminifera and microbes across the Arabian Sea Oxygen Minimum Zone

EGU2011 (2011 年 4 月 7 日、ウィーン・オーストリア)

④ 野牧秀隆、豊福高志、北里洋、

Dick van Oevelen

Linear inverse model と現場実験、観測値を統合した相模湾深海底の炭素循環モデル

2010 年度古海洋シンポジウム (2011 年 1 月 6 日、東京大学大気海洋研究所、柏)

⑤ Nomaki H, van Oevelen D, Toyofuku T,

Kitazato H

Deep-sea benthic food-web structure at the bathyal Sagami Bay revealed by *in situ* experiments and linear inverse model

Trench Connection: International Symposium on the Deepest Environment on Earth (2010 年 11 月 10 日、柏・日本)

⑥ Nomaki H, Toyofuku T, de Nooijer LJ,

Suga H, and Kitazato H

Onboard and *in situ* incubation experiments for understanding deep-sea benthic foraminiferal ecologies

FORAMS2010 (2010 年 9 月 6 日、ボン・ドイツ)

⑦ Nomaki H, Ogawa NO, Takano Y,

Suga H, Ohkouchi N, Toyofuku T, and Kitazato H

Utilization of dissolved organic matter by the deep-sea benthic community at the Sagami Bay, Japan

12th Deep-Sea Biology Symposium (2010年6月10日、レイキャビク・アイスランド)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/seika/pub-j/res/ress/nomakih/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

野牧 秀隆 (NOMAKI HIDETAKA)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・研究員

研究者番号：90435834