

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651021

研究課題名（和文）微生物細胞膜脂質¹⁴C分析に基づく海洋DOC炭素循環と微生物ループとの関連性解明

研究課題名（英文）Relationships between continental Ice sheet retreat events recorded in the Arctic Ocean floor and their global climate changes

研究代表者

内田 昌男（UCHIDA MASAO）

独立行政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

研究成果の概要（和文）：

海洋古細菌（マリンクレナーキオータ）の代謝に関する情報（従属栄養・化学計独立栄養の割合）、炭素循環におけるその役割（規模）について知見を得るため、海洋深層水取水施設でのサンプリングの実施し、古細菌（大きさ平均0.5-0.2μm）細胞膜由来テトラエーテル脂質（GDGTs）の放射性炭素の測定を行った。¹⁴Cの結果と併せて、現場培養、文献値などを総合した海洋古細菌マリンクレナーキオータによる海洋における炭素固定量の試算を行った。駿河湾では、48-54%のクレナーキオータが炭素固定をしているとしているとした場合の計算結果は、1.29Gt C/yr から 6.29Gt C/yr と試算された。

研究成果の概要（英文）：

Metabolism of marine archaea is well unknown, such as relative abundance of archaea with heterotrophic and autotrophic metabolisms. To elucidate the role in the carbon cycle, the GDGTs derived from membrane lipids of marine archaea were studied using natural level radiocarbon tracer, which samples was collected from a commercial deep water collection facility in Suruga bay. The carbon fixation rate was estimated by using in-situ incubation experiment and published values. The 48-54% of Crenarchaeota are estimated with autotrophic metabolism and their carbon amount accumulation rate was from 1.29Gt C/y to 6.29Gt C/y.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境動態解析

キーワード：海洋古細菌・代謝・放射性炭素・溶存有機炭素・海洋微生物ループ

1. 研究開始当初の背景

海洋DOC炭素の¹⁴C年代は、全海洋においておよそ6000年と非常に古いことは先に述べた。これは、DOCの海洋での回転時間が著しく長く、短期的な物質循環とは独立した系に属していて、短期時間軸での生物学的、物理化学的な物質交換においては、ほぼ不活性な存在と解釈されている。また海洋中では、実際に従属栄養微生物が利用できる炭素に

は制限があるとの報告がある。しかしながら本来DOC炭素は、炭素源として微生物が最も利用可能なサイズであり、海水中に豊富に存在している。加えて、海洋DOCリザーバーが大気CO₂のリザーバーに匹敵する規模であることを考慮すると、semireactiveなDOC炭素（fresh carbon）と微生物活動との関連性に理解はグローバルな炭素循環の実像を知る上で重要である。

2. 研究の目的

本研究では、海洋古細菌の代謝特性について地球化学的手法を用いて定量的に明らかにすることを目的とする。本研究で得られる知見は、微生物による海洋炭素循環の定量的解明に資する手法開発であることから、海洋DOC プールを中心とした炭素循環と海洋微生物ループとの関連性解明をめざす。

3. 研究の方法

海洋DOCフラクションの微生物バイオマス(細胞膜脂質分子)、DOC、DICの ^{14}C 測定を行い、表層海水に生息する微生物の炭素源(fresh carbon か old carbon)とその代謝(従属栄養か独立栄養)について明らかにする。

さらに上記の結果を踏まえて、 ^{14}C によるマスバランスモデルとボックスモデルを用いて、微生物が用いるDOC炭素のターンオーバー時間を求め、海洋表層の一次生産量と従属栄養・独立栄養として微生物バイオマスが果たす役割について定量的に解明する。

1) 深層水中微生物バイオマスの大量

(A) 試料採取

外洋における大量海水ろ過を行う前の準備期間の一環として、国内の深層水くみ上げ施設並びに現場大量濾過装置を利用して海水を大量ろ過による微生物バイオマスの採取実験を行う。深層水くみ上げは、静岡県清水市の静岡県駿河湾深層取水施設(採水深度397m、687m)で行った。

分析に必要な海水ろ過量は、10万リットルと見積もっている。大量ろ過装置は、以下のシステムから構成される(図1参照)。

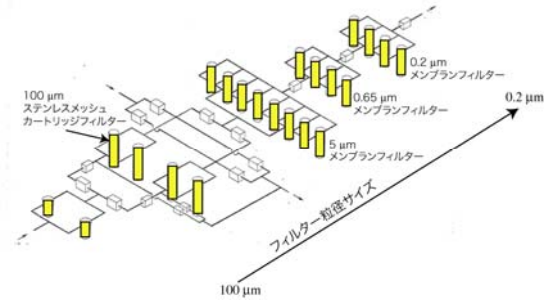
この大量ろ過装置は、電磁弁8個、電磁流量計4個、各種ろ過フィルターステンレス製ハウジング(各サイズメンブランフィルターハウジング: 100 μm 用4個、5 μm 用8個、0.65 μm 用4個、0.2 μm 用4個)、バックフラッシュ機能付きステンレスフィルター、制御用パソコンから構成され、毎分10 L/min、圧力1.1気圧の条件で、制御可能に設計されている。

(B) 分析方法の検討・確立

1) 微生物rRNA・DNAの抽出・精製・濃縮・純度チェック

各種サイズのフィルターから全古細菌群集ならびに真正細菌群集のRNAならびにDNA抽出を物理破砕法(Bio 101 for soil)を用いて行い、化学抽出法で破砕されないタイプの細菌DNAについて採取する。

図1. 0.2mmサイズ捕集用大量海水ろ過装置



2) 海水中DOC、DICの ^{14}C 分析

DIC、海水にリン酸を加え、炭酸を分離した後、 CO_2 ガスの単離・精製を行い、DOCは、海水試料約1Lに1200WのUVを照射し、液体窒素で酸化生成された CO_2 ガスを回収する。さらに専用真空ラインにてグラファイト試料を作成してからAMS測定を行う。得られた結果は、 $\Delta^{14}\text{C}$ 値に換算し、最終的に(E)マスバランスモデルに用いる。

(C) 微生物細胞膜脂質分子(GDGTs, PLFA)の大量抽出・精製・濃縮・純度チェック

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GDGTs(分子量ca. 1300)(古細菌起源)、リン脂質脂肪酸(細菌起源))の抽出と同定を行う。フィルターは、大容量ソックスレー抽出機により、溶媒可溶性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ルキルグリセロールテトラエーテル(GDGTs: glycerol dialkyl glycerol tetraethers)を分画する。GDGTsは、LC/MSにより定量・同定を行う。さらに分子レベル ^{14}C 測定に先立ち、炭素安定・放射性炭素同位体分析を行う。

(D) 微生物膜脂質分子の極微量AMS ^{14}C 分析

1) エーテル脂質(GDGTs)の前処理

GDGTsについては、LC/MSを用いて定量後、HPLCを用いて順相・逆相カラムを用いて植物色素などの化合物を取り除き、分離精製と濃縮を行う。最終的にLC/MSを用いて純度の確認を行う。

4. 研究成果

海洋古細菌(マリンクレンアーキオータ)の代謝に関する情報(従属栄養・化学合計独立栄養の割合)、炭素循環におけるその役割(規模)について知見を得るため、海洋深層水取水施設でのサンプリングの実施し、古細菌(大きさ平均0.5-0.2 μm)細胞膜由来テトラエーテル脂質(GTGTs)の放射性炭素の測定を行った。 ^{14}C の結果と併せて、現場培養、文献値などを総合した海洋古細菌マリンクレンアーキオータによる海洋における炭素

固定量の試算を行った。海洋古細菌の炭素固定（代謝情報）に関する情報を得るため、

1) 駿河湾深層水取水施設で深層水（水深 397 m）を 0.2 μm サイズで約 20 万リットルろ過するための、大量ろ過装置を製作することができた。

2) 最終的に多段式メンブレンフィルター（10, 5, 1, 0.5, 0.2 μm まで）を用いて約 10 万リットルの大量ろ過に成功した。

3) ろ過フィルター試料について古細菌由来の有機分子（以下、GDGTs）を抽出するための条件検討を行い、抽出条件を確立した。GDGTs 濃度は、0.02ng/L~1ng/L と極微量であった。

4) 抽出した GDGTs を、HPLC を用いて数段階の精製条件の検討を行い、順相・逆相カラムを組み合わせた GDGTs 分子の高純度分離精製条件を検討し、確立に成功した。最終的に炭素量にして約 5 μg 相当の GDGTs 分子の分離に成功した。

5) 極微量炭素量での放射性炭素濃度測定のための同位体希釈法による試料前処理法について検討を行った。サンプル 5mg を燃焼し生成した CO₂ に対し、¹⁴C 既知の CO₂ を加えた後、¹⁴C 測定を行った。最終的にマスバランスによる補正を行い、サンプルの ¹⁴C 値を決定した。

6) 古細菌の炭素源（代謝情報）を特定した。GDGTs、DOC、DIC の ¹⁴C 測定結果を用いたマスバランスモデル計算を行った結果、古細菌の炭素源の約半分が、DIC を用いた化学合成独立栄養であった。さらに、駿河湾で求められた 48-54% のクレンアーキオータが炭素固定をしているとしているとした場合の計算結果は、1.29Gt C/yr から 6.29Gt C/yr と試算される。またこの規模は、海洋一次生産量 50 Gt C/yr と比較すると約 2.5% から 13% になる。これは、海洋全層における DIC 量 38000GtC と比べてみると、約数万年規模で交換する規模と計算される。このことは、現在、海洋 DOC の放射性炭素年代が 6000 年以上と古いことを考慮すると海洋 DIC 物理的プロセスによる交換無しに微生物ループを通じた交換だけで生じて板場合、少なからず極端な計算結果を与えていないことを示唆するものであった。

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）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① Sato C. A., Akiyama S., Uchida M., Shimada K., Utsumi M., Archaeal

distribution and abundance in water masses of the Arctic Ocean, Pacific sector, *Aquatic Microbial Ecology*, 査読有, 69, 2013, 101-112

DOI: 10.3354/ame01624

- ② Iwata H., Ueyama M., Harazono Y., Tsuyuzaki S., Kondo M., Uchida M. Quick Recovery of Carbon Dioxide Exchanges in a Burned Black Spruce Forest in Interior Alaska. *SOLA*, 査読有, 7, 2011, 105-108

DOI: 10.2151/sola.2011-027

- ③ Kim S., Khim B.K., Uchida M., Itaki T., Tada R., Millennial-scale paleoceanographic events and implication for the intermediate-water ventilation in the northern slope area of the Bering Sea during the last 71 kyr. *Global and Planetary Change*, 査読有 79 (1-2), 2011, 89-98

DOI: 10.1016/j.gloplacha.2011.08.004

- ④ Rella S., Uchida M., Sedimentary organic matter and carbonate variations in the Chukchi Borderland in association with ice sheet and ocean-atmosphere dynamics over the last 155 kyr. *Biogeosciences*, 査読有 8 (12), 2011, 1-9

DOI: 10.5194/bg-8-3545-2011

- ⑤ Nagao S., Kodama H., Aramaki T., Fujitake N., Uchida M., Shibata Y. Carbon isotope composition of dissolved humic and fulvic acids in the Tokachi River system. *Radiation Protection Dosimetry*, 査読有, 146 (1-3), 2011, 322-325

DOI: 10.1016/j.nimb.2009.10.108

- ⑥ Fushimi A., Wagai R., Uchida M., Hasegawa S., Takahashi K., Kondo M., Hirabayashi M., Morino Y., Shibata Y., Ohara T., Kobayashi S., Tanabe K. Radiocarbon (¹⁴C) diurnal variations in fine particles at sites downwind from Tokyo. Japan in summer. *Environmental Science and Technology*, 査読有, 45 (16), 2011, 6784-6792

DOI: 10.1021/es201400p

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① Amano S. C., Utsumi M., Uchida M., Kondo M., Adachi M., Yamamoto T., CO₂, CH₄ fluxes and bacterial diversities at terrestrial ecosystem along the trans-Alaska pipeline in tundra and boreal forest, Alaska. AGU fall meeting 2012, 3-7 December 2012, San

- Francisco, UAS.
- ② Akiyama S., Amano S. C., Uchida M., Utsumi M. Vertical profile and components of marine planktonic archaea in the Pacific sector of the Arctic Ocean. AGU Fall Meeting 2011, 5-9 December 2011, San Francisco, UAS.
 - ③ Amano S. C., Akiyama S., Uchida M., Utsumi M. Distribution and structure of planktonic Archaea in the Arctic Ocean using 2008 – 2010 R/V Mirai cruise samples. AGU Fall Meeting 2011, 5-9 December 2011, San Francisco, UAS.
 - ④ 佐藤千恵, 秋山昇平, 鈴木祐喜, 内田昌男, 内海真生, 北極海海洋炭素循環に関する海洋古細菌群集の評価. Blue earth' 11, 2011年3月7-8日, 東京
 - ⑤ Kumata H., Uchida M., Saha M., Kondo M., Shibata Y., Takada H., Source diagnosis of PAHs from Kolkata canal sediments by using compound class specific radiocarbon analysis (CCSRA). 16-18 December 2011, Tokyo.
 - ⑥ Saha M., Kumata H., Uchida M., Takada H., Compound Class Specific Radiocarbon Analysis (CCRSA) of PAHs from Highly Contaminated Kolkata Canal Sediments. Accelerator Mass Spectrometry Conference 2011, 20-25 March 2011, Wellington, New Zealand.
 - ⑦ 秋山昇平, 佐藤千恵, 山本智子, 内海真生, 近藤美由紀, 安立美奈子, 内田昌男. アラスカ北極圏の湿原土壌環境特性の解析II-土壌微生物群集構造について -. 第45回日本水環境学会年会, 2011年3月18日~20日, 札幌
 - ⑧ 佐藤千恵, 秋山昇平, 鈴木祐喜, 内田昌男, 内海真生, 北極海海洋炭素循環に関する海洋古細菌群集の評価. Blue earth' 11, 2011年3月7-8日, 東京
 - ⑨ Uchida M., Kondo M., Matsuda A., Minoura Y., Shibata Y. Recent advances of radiocarbon measurements at NIES TERRA. Accelerator Mass Spectrometry Conference 2011, 20-25 March 2011, Wellington, New Zealand.
 - ⑩ Uchida M., Kumamoto Y., Polyakov I, Utsumi M., Kim Y., Rozman P., Murata M., Shibata Y., The trans-Arctic water 14C sections from Mirai and NABOS cruises: reconstruction of surface-mid-deepwater ventilation ages and their comparison of past 14C inventory data. The 4th East Asia AMS Symposium, 16-18, December, 2011, Tokyo.

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 昌男 (UCHIDA MASAO)

独立行政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