

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12145

研究課題名（和文）海洋細菌による膜小胞を介した微生物炭素ポンプの炭素フローの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Carbon Flow in Microbial Carbon Pump through Membrane Vesicles of Marine Bacteria

研究代表者

大森 裕子（Omori, Yuko）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：80613497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然海洋細菌をもちいた<sup>13</sup>Cトレーサー培養実験により、海洋細菌が生成する細胞外膜小胞（MV）の挙動を炭素レベルで評価した。海洋細菌は主に増殖期後にMVを生成し、MVは細菌に分解されずに残存することが示された。細菌由来の有機物は、大半が溶存態として、一部がMVとして、海水中に放出されることが示唆された。一方で、沿岸表層における観測により、MVが保有する有機炭素は非常にわずかであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋細菌が難分解性DOMを生成することで長期間海洋に有機炭素を貯留するプロセスは、地球表層の炭素循環ならびに気候変動に影響を及ぼすが、その有機炭素プールの形成過程はブラックボックスである。本研究は、海洋細菌が生成するMVに着目し、細菌が生成する有機物の一部はMVとして残存することから、細菌を由来する微小な粒子形成が海洋有機炭素プールの形成プロセスのひとつであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The behavior of extracellular membrane vesicles (MV) produced by marine bacteria was evaluated at the carbon level through <sup>13</sup>C tracer incubation experiments using natural marine bacteria. It was shown that marine bacteria primarily produced MV after the growth phase, and these MVs remained without being degraded by bacteria. More than half of the bacterial-derived organic matter was suggested to be released into the seawater as dissolved form, with <10% present as MV. The observations in the coastal surface waters revealed that the organic carbon content of MV was very low.

研究分野：生物地球化学

キーワード：海洋炭素循環 微生物炭素ポンプ 細胞外膜小胞 海洋細菌

## 1. 研究開始当初の背景

海水中には様々なサイズの有機物が存在し、孔径 0.2~0.7  $\mu\text{m}$  のろ紙を通過する有機物は溶解態有機物 (Dissolved Organic Matter: DOM) と定義される。海洋に存在する DOM は、約 700 PgC もの炭素量を有する地球表層における最大級の有機炭素プールの一つである。海洋 DOM の 90% 以上は生物分解に対して安定な難分解性 DOM で構成され、数百~千年もの寿命をもつ。近年、海洋細菌が代謝等により難分解性 DOM を生成することで海洋に炭素を長期間固定するプロセスとして、「微生物炭素ポンプ」という概念が提唱された (Jiao et al., 2010)。微生物炭素ポンプは、その概念と重要性が認識されているが、海洋細菌による難分解性 DOM の生成プロセスとその量的な寄与については、海洋への炭素隔離能を正確に理解するための本質的な問いであるにも関わらず、未だ解明されていない。

本研究は、海洋細菌が生成する細胞外膜小胞 (Membrane Vesicle: MV) が生物分解に対して安定である可能性に着目し、海洋細菌由来の MV を介した微生物炭素ポンプのプロセスと炭素フローの解明を目指す。MV とは、大半の細菌が放出する細胞膜で構成される小胞を指す。MV は、含有する DNA やシグナル化合物、タンパク質などの「運び屋」として、細菌間の情報伝達や遺伝子のやり取りといった細胞間相互作用に寄与する。これまで、微小な MV は DOM 画分の一部として扱われ、その存在が認識されていなかった。しかし Biller et al. (2014) により、海洋細菌が生成した MV は表層から深層まで広く分布し、生物分解に安定である可能性が発見され、海洋炭素循環にも寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

海洋細菌が生成する MV を介した微生物炭素ポンプのプロセスと炭素フローの解明のため、

- (1) 自然細菌群集を用いて、 $^{13}\text{C}$  トレーサー法による 2 か月間の培養実験を実施し、海洋細菌が生成する MV 量と分解性を評価する。
- (2) 沿岸表層水中に分布する MV がもつ炭素量を明らかにし、海洋中の有機炭素プールにおける MV の寄与を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 自然細菌群集を用いた培養実験

自然細菌群集は、静岡県下田市鍋田湾における表面海水から採取した。人工海水に自然細菌群集と  $^{13}\text{C}$  で標識されたグルコースを添加し、培養開始 0 日目から 60 日目まで計 6 回試料を分取した。分取した試料を、ろ過および超遠心分離により、細菌画分とコロイド画分、DOM 画分に分画した。さらに密度勾配遠心法により、コロイド画分から MV 画分を精製した。各画分中に含まれる  $^{13}\text{C}$ -有機炭素濃度は、元素分析計 質量分析計により測定した。コロイドおよび MV 画分中に含まれる粒子の濃度とサイズは、Nano Sight を用いて明らかにした。

### (2) 沿岸海洋表水中に分布する MV 炭素量の評価

鍋田湾から採取した表面海水 300 L を、GF/F フィルター (孔径 0.7  $\mu\text{m}$ ) でろ過し、ろ液を回収した。限外ろ過により、ろ液から分子量 10 kDa 以上の画分を濃縮した。超遠心および密度勾配遠心法を用いて MV 画分を精製し、有機炭素量を元素分析計により測定し、粒子数濃度とサイズは Nano Sight を用いて明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 海洋細菌による MV の生成

培養開始 0 日目から 3 日目までに、 $^{13}\text{C}$ -グルコースを取り込んだ海洋細菌が指数関数的に増殖し、それ以降細菌細胞数は緩やかに減少した (図 1)。コロイド画分と MV 画分の粒子数濃度は、

海洋細菌の減少後から増加した。この結果から、海洋細菌の死滅に伴って、MV や細胞断片等を含むコロイドが形成されたことが示唆された。培養 20 日目以降、MV の粒子数濃度がほぼ一定であったことから、MV は海洋細菌に速やかに分解されず、微生物分解に対して安定であることが示唆された。

### (2) 海洋細菌由来有機物の行方

海洋細菌は唯一の炭素源である  $^{13}\text{C}$ -グルコースを利用して増殖し、海洋細菌がもつ  $^{13}\text{C}$  濃度は 3 日目に最大値を示し、30 日までに大きく減少した(図 2)。海洋細菌に由来する有機物の行方を評価するため、3 日目から培養最終日までに減少した海洋細菌の  $^{13}\text{C}$  濃度を 100%としたとき、MV、コロイドおよび DOM 画分の  $^{13}\text{C}$  濃度の増加量が占める割合を求めた。その結果、細菌由来有機物の 53%が DOM 画分へと移行し、7%および 4%がそれぞれ MV とコロイド画分の形成に寄与したと見積もられた。残りは、無機化されたと考えられる。海洋細菌は水中に難分解性 DOM を放出するとともに(Omori et al., 2020) MV やコロイドといった微細な粒子を形成し放出していることが示唆された。

### (3) 沿岸表層における MV が保有する炭素濃度

鍋田湾の表面海水中から回収した MV の直径サイズは <math>170\text{ nm}</math> であり、DOM 画分のサイズに該当した。この結果は、粒子である MV がこれまで DOM として扱われてきたことを示唆する。MV が保有する有機炭素濃度は 2 - 6 nMC であり、MV が DOM 画分に占める割合はわずか  $5 \times 10^{-3}\%$  であった。従来の報告から、MV の粒子数濃度は海洋表層で最も高く、深度とともに減少することが示されている (Biller et al., 2014)。したがって、最も MV の炭素濃度が高い表層においても、有機炭素プールへの MV の寄与がわずかであることが示唆された。培養実験および観測結果から、実海洋における MV のシンクとして、細菌による分解以外に動物プランクトンによる摂食などが考えられる。

#### < 引用文献 >

- Biller, S. J., F. Schubotz, S. E. Roggensack, A. W. Thompson, R. E. Summons, and S. W. Chisholm (2014) Bacterial vesicles in marine ecosystems, *Science*, 343, 183 - 186.
- Jiao N., G. J. Herndl, D. A. Hansell, R. Benner, G. Kattner, S. W. Wilhelm, D. L. Kirchman, M. G. Weinbauer, T. Luo, F. Chen, and F. Azam (2010) Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 593 - 599.
- Omori, Y., A. Saeki, S. Wada, Y. Inagaki, and T. Hama (2020) Experimental analysis of diurnal variations in humic-like fluorescent dissolved organic matters in surface seawater. *Frontiers in Marine Science*, 7, 589064.

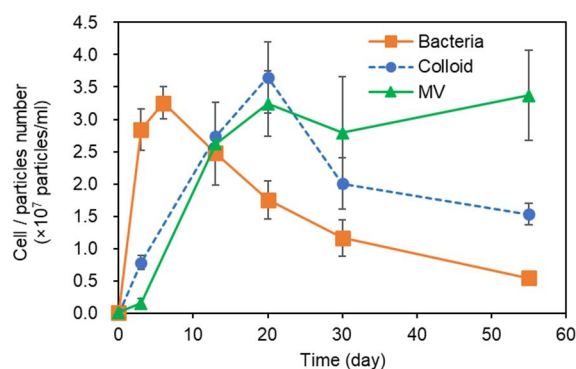


図 1 培養期間中の海洋細菌の細胞数とコロイドおよび MV 画分の粒子数濃度の変化

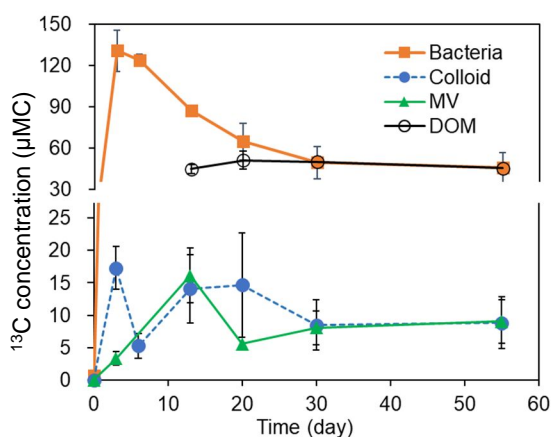


図 2 培養期間中の海洋細菌、コロイド、MV 画分および DOM 画分中の  $^{13}\text{C}$  濃度の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Omori Yuko, Saeki Akira, Wada Shigeki, Inagaki Yuji, Hama Takeo	4. 巻 7
2. 論文標題 Experimental Analysis of Diurnal Variations in Humic-Like Fluorescent Dissolved Organic Matter in Surface Seawater	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2020.589064	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 大森裕子, 高橋俊輝, 濱健夫, 猪俣敏, 谷本浩志
2. 発表標題 海洋細菌による揮発性有機化合物の生成に関する実験的解析
3. 学会等名 日本惑星科学連合2022年大会
4. 発表年 2022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	濱 健夫 (Hama Takeo) (30156385)	筑波大学・生命環境系・名誉教授  (12102)	
研究分担者	豊福 雅典 (Toyofuku Masanori) (30644827)	筑波大学・生命環境系・准教授  (12102)	

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
---------	---------