

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 16 年度博士課程進学
氏名 井上 雄介
指導教員名 木暮 一啓

論文題目

Ecological implication of marine bacterial buoyant density

(海洋細菌の菌体密度とその生態学的意義)

地球上における様々な元素循環の中で、炭素は生物地球化学的に最も重要である。水圏における食物連鎖を考慮すると、その流れは大きく二つに分けられる。即ち、(1) 生食食物網 (grazing food web) と (2) 微生物ループ (microbial loop) である。前者は植物プランクトンや藻類による一次生産を起点とし、後者は、従属栄養性の原核生物による溶存態有機物の取込みを起点とする。一次生産された有機物の 30–50% は微生物ループを経由して流れると見積もられており、この有機物の取込みメカニズムの理解は水圏の炭素循環を理解する上で重要である。

全海洋中の有機物は炭素量として約 700 Pg と推定されているが、この値は大気中の二酸化炭素の炭素量 (約 755 Pg) に匹敵する。これらの有機物は一般的に孔径 0.7 μm のガラス繊維フィルターを通過するかどうかによって溶存態と懸濁態の二つに分けられてきた。溶存態はその炭素量で有機物全体の約 95% 以上を占め、その殆どは従属栄養性原核生物のみによって利用される。溶存態と称されるものの、このフラクションには数 nm から約 700 nm 前後に及ぶ連続的なサイズ分布を持つ粒子が存在し、その中には、原核生物それ自身やウイルスも含まれる。原核生物による溶存態有機物の利用とは、これらの微小粒子の利用が多大の割合を占めており、その利用メカニズムの解明には、菌体粒子と微小粒子との相互作用という視点が不可欠である。これまでいわゆるマリンスノー、マリンジェルなどの懸濁態有機物の微生物分解過程については多くの知見が蓄積しているが、溶存態の微小粒子の分解メカニズムについては殆ど研究例がない。

原核生物を粒子として見れば、大きさ、質量、形、表面構造、親水性、荷電状態など、様々な特性を持つ。微小粒子との相互作用は、これらの特性の総合的な反映と見なすことができる。これまで、天然の原核生物の大きさや形については多くの知見が得られてきた。海洋細菌の大部分は半径 0.3–0.5 μm 程度の球菌状と見なせる。また、表面構造、親水性、荷電状態などについては、付着過程の研究を通じて多くの情報が蓄積してい

る。一方、質量は最も基本的な物理量でありながら、個々の細胞が小さいため、直接測定は技術的困難を伴う。そこで、単位体積当たりの質量、即ち菌体密度を質量の代わりにする方法がある。特に、植物プランクトンの研究では、沈降速度を考えるとときにその密度が利用されてきた。また、培養菌体に対して、密度勾配分画 (Density-dependent cell sorting, DDCS) 法を応用し、対数増殖期と定常期、または、飢餓状態など、異なる生理状態の菌を分離する事が可能となった。しかし、この方法が天然の海洋細菌群集に直接的に応用され、菌体密度を測定した例はない。

本論文の目的は、(1) DDCS 法を天然の海洋細菌に適用するための方法論的検討を行うこと、(2) 海洋細菌の菌体密度が時空間的にどのように変動しているかを明らかにすること、(3) 菌体密度が菌体の挙動にどのような影響を与えるか、さらに菌体密度の違いが海洋中の微小粒子やウイルスとの遭遇頻度、その結果としての増殖あるいは死滅、さらにそれが細菌群集の多様性維持にどのような意味を持つかを、モデル計算を通じて明らかにすることである。

1. 菌体密度測定法の検討

DDCS 法はこれまでほぼ例外なく培養菌体をその対象としており、天然海洋細菌群集に直接適用された例はない。このため、DDCS 法及びそれに必要な菌体の濃縮についての方法論的開発が必要であった。前者については、DDCS の際の塩分及び担体である Percoll の濃度設定、遠心条件の設定を行った。この結果、塩分 400 mmol dm^{-3} 、Percoll 濃度 62–63 % 若しくは 45 % 及び 70 % を併用、 4°C にて $50\,000 \times g$ 、20 min の遠心という条件でマーカーの併用により、3 若しくは 6 画分の天然細菌群集を得ることが可能になった。また、DDCS を天然細菌群集に適用する場合、当初必要な細菌数は画分の数と個々の画分についてその後の解析に必要な菌数に依存する。本研究では個々の画分について FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いた群集構造解析を行うために必要な菌数の確保を条件と考えてきた。その結果、分画後のサンプル 1 cm^3 あたり、 10^4 – 10^5 程度の菌数が必要と考えた。

DDCS は一回につき 1 cm^3 のサンプルしか処理することが出来ない。天然の海洋細菌数は表層域で概ね 10^6 cm^{-3} なので、細菌を濃縮することが必要になる。本研究では、限外濾過法を用いた濃縮を行うことにより、90 % 程度の濃縮効率で細菌を 100 から 500 倍に濃縮することに成功した。これにより、濃縮試料 1 cm^3 中の細菌量は 10^8 のオーダーになり、DDCS 法を天然海洋細菌群集に適用することが出来た。

2. 海洋細菌の菌体密度と時空間的分布との関係

細菌の粒子としての挙動を明らかにすることを目的にして、第 1 章で確立した DDCS 法を天然細菌群集へ適用し、その時空間変動を解析した。また、FISH を組み合わせることにより、系統群と菌体密度との関係を調べた。

油壺湾の表層水を、2005 年 2 月から 2006 年 2 月まで毎月 1 回採水し、濃縮後 DDCS 法により 3 画分 (< 1.064 , $1.064 - 1.074$, $1.074 < \text{g cm}^{-3}$) に分画し、全菌数を求めるとともに、FISH 法を適用した。その結果、季節を問わず、*Bacteroidetes* に属する細菌の菌体密度は小さいものが多い傾向にあり、また、*Archaea* の菌体密度は大きいものが多い傾向にあることが分かった。

研究船淡青丸, KT-05-16 次航海において, 相模湾沖, 黒潮南側, 黒潮流軸, 黒潮北側の外洋域 4 測点で鉛直的に 6 から 7 深度で採水し, DDCS 法を用いて 5 画分 (< 1.036 , $1.036-1.051$, $1.051-1.064$, $1.064-1.074$, $1.074-1.087$, $> 1.087 \text{ g cm}^{-3}$) に分画し, 各画分に含まれる全菌数を計数した。その結果, < 1.036 , $1.036-1.051$, $1.051-1.064 \text{ g cm}^{-3}$ の 3 画分に含まれる菌数の全菌数に対する割合は棲息深度と負の順位相関関係にあり, $1.064-1.074 \text{ g cm}^{-3}$ の画分に含まれる菌数の全菌数に対する割合と棲息深度との間には有意な順位相関関係は認められず, $1.074-1.087$, $> 1.087 \text{ g cm}^{-3}$ の 2 画分に含まれる菌数の全菌数に対する割合は棲息深度と正の順位相関関係にあることが分かった (いずれも Kendall 及び Spearman の順位相関係数, 有意水準 5%)。即ち, 深海は表層よりも全菌数に占める密度の大きな細菌数の割合が大きいということが明らかになった。

3. 粒子としての細菌像

海洋の大部分の細菌は, 直径 $1 \mu\text{m}$ 以下の球菌状で, しかも鞭毛を持たない。第 2 章で天然海水中の細菌群集の菌体密度が得られたことにより, 細菌の粒子としての挙動を解析することが可能になった。本章では, その沈降速度, 他の大型あるいはウイルスを含む微小粒子との遭遇率とそれによる増殖, 死滅, さらに多様性の維持効果についてのモデル解析を試みた。

細菌を剛体球と仮定し, その密度及び半径をそれぞれ大, 中, 小の 3 種, 合計 9 種のモデル細菌を考えた。これらのモデル細菌には, 密度の概念が入っているため, 沈降速度を持つことが特徴である。これらのモデル細菌の沈降速度を, 表層 ($< 200 \text{ m}$), 中層 ($500-1000 \text{ m}$), 深層 ($> 3000 \text{ m}$) を模した海洋のモデルにおいてそれぞれ求めた。

さらに, 細菌の沈降を考慮して, 海洋モデルにおいて, (1) マリンスノー, (2) マリンジェル, (3) サブミクロン粒子 (SMP), (4) コロイド粒子と細菌との衝突頻度を見積もった。そして, 各粒子の持つ易分解性の炭素量と細菌の同化効率とを仮定し, 細菌の増殖速度を見積もった。その結果, 易分解性の有機物の多い表層では, 細菌の沈降速度の差が増殖速度に及ぼす影響は余り大きくないが, 易分解性の有機物の少ない深層では, 沈降速度の大きな細菌ほどより増殖速度が大きくなることが分かった。これは, 細菌と微粒子, 特にマリンジェルとの衝突頻度が増大することに起因するという結果になった。また, 細菌及びウイルスを共に粒子として捉え, 両者が共存するモデルを用いて, 細菌の沈降が両者の多様性を維持していることを明らかにした。

まとめ

本研究は, 海洋細菌群集の菌体密度の時空間分布を調べ, 菌体の沈降速度を求めた最初の研究である。この研究を通じて, 少なくとも *Archaea*, *Bacteroides* のグループは特徴的な菌体密度を持つこと, 菌体密度の大きな菌数の全菌数に対する割合が棲息深度に応じて増加することを明らかにした。さらにモデル計算により, 菌体の沈降速度とウイルスを含む粒子との遭遇頻度, その遭遇が細菌群集の増殖, 死滅, 多様性維持にもたらす影響を明らかにした。このように細菌を粒子として捉え, その生態について解析したのは初めてのことである。今後そのモデルの実証を目指すとともに, 粒子としての挙動という視点から原核生物の新たな生命像を作り上げて行く予定である。