

学 位 論 文 題 名

海洋における酸素非発生型好気性光合成細菌の生理生態学的研究

(An ecophysiological study of marine aerobic anoxygenic phototrophic bacteria)

学位論文内容の要旨

酸素非発生型好気性光合成細菌 (Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria; 以下 AAnPB と称す) は、光合成色素としてバクテリオクロフィル (BChl) *a* を有し、光栄養と従属栄養の両方の栄養様式を用いて増殖する光従属栄養細菌である。AAnPB は、基本的に炭素源およびエネルギー源としては有機物を必要とするが、BChl *a* を活性中心に持つ光化学系を用いた光合成により、さらに生命活動に必須な ATP を産生する。この光エネルギーの利用は AAnPB の代謝における補完的な役割を持ち、他の従属栄養細菌と比べて、有機物の同化効率の上昇ひいては増殖の促進に寄与すると考えられている。一方、近年の先行研究により、AAnPB が海洋表層に普遍的に存在し、その現存量は時空間的に大きく変化する事が明らかとなった。この事は、微生物ループを介した海洋炭素循環における AAnPB の重要性は時空間的に変化する事を示している。しかしながら、未だに AAnPB の生理生態学的な知見が少なく、その生物像が不明瞭なために、その海洋炭素循環における駆動力の定量的および定性的な正確な評価には至っていない。そこで、本研究では海洋性 AAnPB に関する生態学的および生理学的研究を並行して行い、海洋性 AAnPB に関する基礎的な知見を蓄積するとともに、海洋生態系におけるその生物像を明らかにすることを目指した。

生態学的な研究として、岩手県大槌湾において 2007 年 5 月から 2008 年 8 月にかけて 11 回の AAnPB の現場観測を行い、さらに擬似現場実験系において AAnPB の増殖応答解析を行った。AAnPB 現存量の定量法には、BChl *a* の自家蛍光を指標とした赤外蛍光顕微鏡直接計数法を用いた。結果として、2008 年 5 月の本湾における AAnPB の鉛直分布パターンにおいて、植物プランクトンの生物量が最大の層であるクロロフィル極大層と AAnPB 現存量のピークが一致した。このことは、AAnPB が植物プランクトンの動態に密接に関連した生態学的特性を有することが示唆している。そこで、その生態学的特性をより詳細に検証するために、擬似現場実験系において植物プランクトンブルームを再現し、そこでの AAnPB の増殖応答を解析した。その結果、AAnPB は、植物プランクトン由来の有機物供給に対して、全菌よりも早いタイミングで増加することが確認された。さらにブルーム期間中の海水試料について、光合成関連遺伝子 *pufM* をターゲットとしたクローニング法を適用し、AAnPB の群集解析を行った。結果として、植物プランクトンブルーム期間中に出現した AAnPB ファイロタイプとしては、*Roseobacter* 属に近縁な種が高い占有率を示し

た(全 AAnPB の内、最大で 96%)。以上の生態学的研究から、沿岸海洋性 AAnPB の生態学的特性として、従属栄養細菌と比較して、植物プランクトンの生産する有機物をより効率的に自身の増殖に結び付けることが出来る特性が明らかとなった。また特に、*Roseobacter* 属の AAnPB が、他属と比較して、有機物利用に優れていることが明らかとなった。この生態学的研究を踏まえて、大槌湾海水から単離培養した沿岸海洋性 AAnPB 株 *Roseobacter* sp. OBYS 0001 (GenBank Accession no. AB586070)を用いて、他属の AAnPB である *Erythrobacter* のタイプストレイン *Erythrobacter longus* NBRC 14126 との光合成特性の比較を行った。各培養株を ZoBell 2216E 培地で培養し、その増殖期ごとの細胞密度、光合成色素定量および同定、光学特性、光合成活性を、それぞれ、蛍光顕微鏡直接計数法、高速液体クロマトグラフィー、分光蛍光光度法、BChl 可変蛍光光度法を用いて測定した。細胞増殖は、両株ともに同様のパターンを示した。細胞内 BChl *a* 量は、両株ともに定常期に最大となった。BChl 蛍光励起スペクトル/吸収スペクトルについて、*Roseobacter* は 470 ~ 600 nm の波長域において *Erythrobacter* よりも高かった。光合成活性パラメタについては、 540 ± 60 nm の励起光下での光化学系の有効光吸収断面積が、*Roseobacter* は *Erythrobacter* よりも大きかった。これらの結果は、*Roseobacter* は *Erythrobacter* と比較して光合成のために緑色域の光線を有効に捕集する能力を有しており、効率的な光合成潜在能力を有していることを示唆している。また、*Roseobacter* sp. OBYS 0001 を用いて、有機物制限下における AAnPB の生理特性の解明を行った。*Roseobacter* sp. OBYS 0001 を、ZoBell 2216E 培地と、その 100 倍希釈系である 1/100ZoBell 培地で培養し、両者の増殖期ごとの光合成生理特性を調べた。測定項目と手法は上記の他属間比較実験と同様である。結果として、細胞増殖は ZoBell 培地の系では典型的な増殖曲線を描いたが、1/100ZoBell ではその増殖が制限された。細胞内 BChl *a* 量も両者で異なるパターンを示し、1/100ZoBell での BChl *a* 量は ZoBell 培地より常に低かった。また光合成活性パラメタについては、有機物制限環境下では細胞内光合成色素量も光化学系の有効光吸収断面積も変えることなく、光化学系の光化学反応の最大量子収率 (F_v/F_m) を上げることが明らかになった。これらの結果は、AAnPB は有機物制限環境下で光合成活性を高める生理機構を有していることを示している。それは有機物制限環境下という従属栄養的増殖が制限される中で、光エネルギー利用能が生命維持における補完的な役割を担っていることを示唆している可能性がある。最後に、近年、先行研究によってその存在が示唆されている光によって駆動するクエン酸回路を利用した AAnPB の無機炭素固定能を評価した。その方法として、光合成装置が十分に形成された定常期の沿岸海洋性 AAnPB 株 *Roseobacter* sp. OBYS 0001 の培養液に ^{14}C ラベルされた重炭酸ナトリウムを一定量添加し、光強度と炭素固定速度の関係を調査した。その結果、光強度が上昇するに従って炭素固定速度も増加するという傾向は確認出来なかった。本実験に関しては今後、培養条件を検討する必要がある。

本研究により、沿岸海洋性 AAnPB の *Roseobacter* 株は、効率的な従属栄養的増殖機構と共に、光エネルギー利用による光栄養的生残機構を有していたことが明らかになった。これらの結果は、海洋性 AAnPB の一部は、その光従属栄養様式を生かし、細胞の増殖と生残の両方において従属栄養細菌よりも大きな生理生態学的利益を享受していることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	鈴木	光次
副査	教授	吉川	久幸
	教授	福井	学
	准教授	山下	洋平
	准教授	浜崎	恒二

(東京大学大気海洋研究所)

学位論文題名

海洋における酸素非発生型好気性光合成細菌の生理生態学的研究

(An ecophysiological study of marine aerobic anoxygenic phototrophic bacteria)

酸素非発生型好気性光合成細菌（以下、AAnPB）は、海洋表層に普遍的に存在し、光独立栄養と従属栄養の両方の栄養様式を用いて増殖することが出来る真正細菌である。また、AAnPBは、光合成色素として、バクテリオクロロフィル a を細胞内に含み、多様な細菌系統群にわたって存在することが知られている。近年、沿岸海洋域ならびに外洋域において、AAnPBが細菌群集中の主要細菌グループの1つであったことが報告されたが、その現存量の時空間変化は大きく、その変化要因について、未だ理解が進んでいない。これは、AAnPBの生理生態学的知見の不足によることが大きく、AAnPBの海洋生態系並びに生物地球化学過程における役割の多くは未だ不明瞭である。このため、申請者は、海洋に生息するAAnPBに関する生態学的研究ならびに生理学的研究をそれぞれ実施し、それらの基礎的な知見を蓄積するとともに、海洋生態系におけるAAnPBの生物像を解明することを試みた。

生態学的研究として、申請者は、2007年5月から2008年8月にかけて、岩手県大槌湾において、現場観測を行った。その際、AAnPB現存量の評価手法として、バクテリオクロロフィル a の自家蛍光をAAnPB指標として、赤外蛍光顕微鏡による直接計数法を実施した。さらに、AAnPBの光合成反応中心をコードする*pufM*遺伝子断片を標的とした定量PCRを実施することにより、AAnPBの現存量変化を追跡することを試みた。その結果、植物プランクトンブルーム期の垂表層クロロフィル極大層において、AAnPB細胞数が高くなっていたことを発見した。また、この結果から、植物プランクトンが生産する有機物を利用して、AAnPBの増殖が刺激されていたことが示唆された。この観測結果を検証するため、大槌湾海水を用いた中規模閉鎖系（メソコスム）実験を2008年5月に実施した。この実験において、栄養塩をメソコスムに添加し、植物プランクトンの大増殖（ブルーム）を人為的に発生させ、AAnPBの細胞数と*pufM*遺伝子コピー数の時間変化を評価した。その結果、AAnPBは、植物プランクトンブルーム後、顕著に増殖し、全細菌群集よりも早い見かけの増殖速度を示したことから、AAnPBは植物プランクトン由来の有機物をより効率的に獲得し、迅

速に増殖できる能力を持つことが明らかとなった。さらに、*pufM* 遺伝子を標的とした遺伝子クローニングを実施した結果、増殖した AAnPB は *Roseobacter* に属するファイロタイプで占められていたことが判明した。また、申請者は、FISH 法や分光光度法などを駆使して、大槌湾の海水からバクテリオクロロフィル *a* を含有する AAnPB 4 株を単離することに成功した。さらに、その内の 1 株である *Roseobacter* sp. OBYS 0001 について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列全長を解読し (GenBank Accession no. AB586070)、その分子系統を明らかにした。

申請者は、上記の生態学的研究の成果を踏まえ、AAnPB の生理学的研究として、本研究で単離培養に成功した *Roseobacter* sp. OBYS 0001 株と他属の AAnPB である *Erythrobacter* タイプストレイン *Erythrobacter longus* NBRC 14126 との光合成特性の違いを評価した。その主要成果として、*Roseobacter* sp. OBYS 0001 株は、*Erythrobacter longus* NBRC 14126 株に比べ、緑色域における光化学系の有効光吸収断面積が高いことを発見し、*Roseobacter* は *Erythrobacter* に比べて緑色光を有効的に光合成に利用できる能力を持つことを明らかにした。さらに、申請者は、*Roseobacter* sp. OBYS 0001 株を ZoBell 2216 培地とその 100 倍希釈系である 1/100 ZoBell 培地でバッチ培養を行い、その増殖特性と光合成生理特性を評価した。その結果、1/100 ZoBell 培地で培養した株は、増殖速度が相対的に低下したが、細胞内光合成色素量や光化学系の有効光吸収断面積を変化させることなく、光化学系の光化学反応の最大量子収率 (F_v/F_m) を高める生理機構を有していたことを世界で初めて発見した。すなわち、有機物制限環境下において、AAnPB は、従属栄養性が抑圧される一方で、光独立栄養能力を増加させるという生残戦略を有することを明示した。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士 (環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。