

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510013

研究課題名(和文)オリゴ糖に着目した海水中の低分子溶存有機物の動態の解明

研究課題名(英文) Biogeochemical characteristics of oligosaccharides in seawater as model compounds of low-molecular weight dissolved organic matter

研究代表者

宗林 留美(福田留美)(Sohrin, Rumi)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：00343195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：海水中の低分子溶存有機物の動態を解明することを目的として、二糖に着目して研究を行った。海水中の二糖の定量法として、グラファイトカーボンカラムを用いた固相抽出により海水試料の脱塩を行い、脱塩した試料を蒸発乾固して二糖を濃縮し、高性能イオン交換クロマトグラフィーとパルスドアンペロメトリで分析することで、駿河湾の表層海水でスクロース、マルトース、トレハロース、ラクツロースを検出・定量し、未同定のオリゴ糖を6種検出した。スクロース、マルトース、トレハロースは二糖を利用して増殖可能な原核生物のうち、駿河湾で特に現存量が高かった二糖であり、二糖によるボトムアップコントロールが示された。

研究成果の概要(英文)：For better understanding of the dynamics of low-molecular weight dissolved organic matter in marine environments, we developed a novel technique to determine oligosaccharides concentrations in seawater. Seawater samples were desalted by solid phase extraction using with a graphite carbon column and evaporated to concentrate oligosaccharides, then analyzed by high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection. We determined the concentrations of sucrose, maltose, trehalose and lactulose in the epipelagic layer of the Suruga Bay, and detected other six unknown-oligosaccharides. MPN survey indicated high abundance of prokaryotes in the Suruga Bay that were grown on sucrose, maltose and trehalose. Our findings demonstrated, for the first time, bottom-up controls of prokaryotes by dissolved organic matter on a molecular level in seawater.

研究分野：生物海洋化学

キーワード：オリゴ糖 海洋生態系 生元素循環

1. 研究開始当初の背景

(1) 海水中の低分子溶存有機物を調べることの必要性

海水中に存在する有機物の約 95% は孔径約 1 $\mu$ m のフィルターを通過する溶存有機物であり、その構成元素である炭素(溶存有機炭素)の総量は大気中の二酸化炭素の総量に匹敵し、その 60~80% は分子量 1,000 以下の低分子の画分に属する。従って、海水中の低分子溶存有機物は生物圏屈指の巨大炭素リザーバーであり、その動態の解明は地球規模の炭素循環の理解に必須である。しかし、海水中の低分子溶存有機物は、生物利用による回転時間が数秒から数千年と幅広いことが指摘されているものも、その差異を決定するメカニズムは全くわかっていない。

(2) なぜオリゴ糖に着目するのか

海水中の溶存有機物の 90% 以上は未同定であるが、同定された化合物の内、量が最も多いのが糖である。また、糖は海水中で原核生物により利用されやすく、糖利用に関する遺伝子の情報が近年急速に蓄積されつつある(Swalbach et al., 2010, *Environmental Microbiology*, 12, 490-500)。しかし、海水中の糖の分析は、遊離態(単糖)を直接定量するか、結合態(多糖)の加水分解後にその構成要素を遊離態として定量する手法が常法であり、多糖の種類を体系的に調査した例はない。低分子画分に該当する多糖は、単糖が 2~6 個程度結合したオリゴ糖である。オリゴ糖の検出と同定は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフ質量分析法(GC-MS)、液体クロマトグラフ質量分析法(LC-MS)の発展により近年飛躍的に向上しており、現在は外洋域で nmol L<sup>-1</sup> オーダーの二糖の人工甘味料(スクラロース)を定量できるレベルにある(Mead et al., 2009, *Marine Chemistry*, 116, 13-17)。また、オリゴ糖では、構成要素や結合の違いにより生物利用能が異なる可能性がある。実際、湖水や湖底堆積物を用いた糖の添加実験では、六員環と五員環から成る二糖が、六員環から成る二糖より生物利用能が低いことが報告されている(Armosti and Repeta, 1994, *Limnology and Oceanography*, 39, 1865-1877; Meon and Jüttner, 1999, *Aquatic Microbial Ecology*, 16, 281-293.)。海水での報告はないが、申請者の研究室で分子量が等しい 5 種類の二糖(図 1)を駿河湾の表層海水に添加して行った 2 回の予備実験では、スクロース(六員環+五員環)は原核生物に迅速に取り込まれるものもバイオマスに変換されにくく、ラクツロース(六員環+五員環)は取り込みに時間がかかるが溶存有機物として残存しにくいことがわかった。また、増殖した原核生物はマルトース(六員環+六員環)とスクロースで種構成が類似していたにも関わらず、バイオマスへの変換効率は両糖で顕著に異なった。これらの結果は、二糖異性体間での生物利用能の差異、すなわち取り

込み易さや取り込みの利用の違いの解明が、低分子溶存有機物の動態の理解への糸口となる可能性を示している。しかし、天然のオリゴ糖を海水で検出した例はなく、その存在も供給過程も不明である。

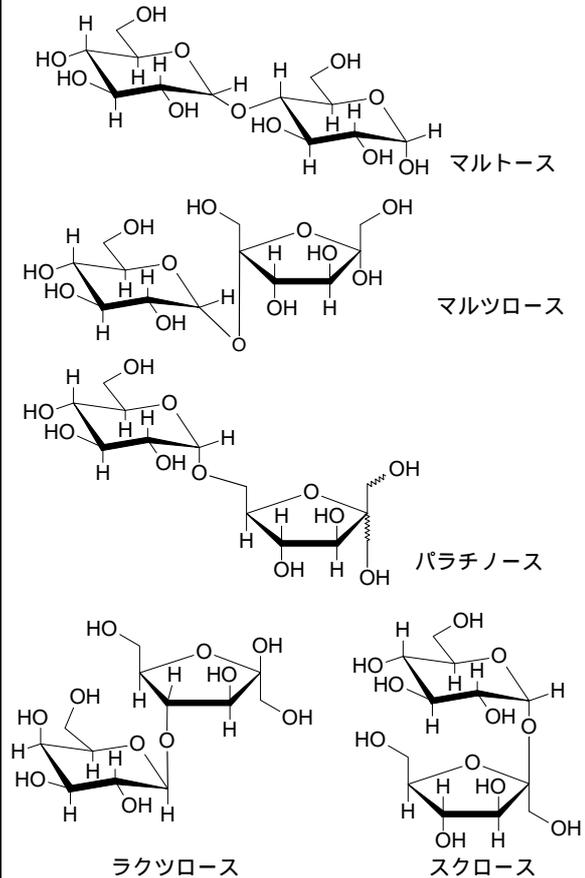


図 1. 二糖の例(何れも分子式は C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> で、分子量 342.3)。

2. 研究の目的

本研究課題では、海水中で比較的量が多く、メタゲノミクスにより海洋での生物利用に関する情報が急速に蓄積されつつある糖の中でも、海水試料ではこれまで体系的な分析が行われていない天然のオリゴ糖に着目し、その中でも原核生物が直接細胞内に取り込むことができる分子量 600 程度以下(Weiss et al., 1991, *Science*, 254, 1627-1630)の条件を満たし、最も構造が単純な二糖を研究対象とし、海水中でのその生物利用能と分布を明らかにすることを目的とする。これにより、生物圏屈指の巨大炭素リザーバーであるにもかかわらず、ごく一部の遊離態化合物を除いて、その種類や生物利用能が明らかになっていない海水中の低分子溶存有機物について、その動態解明への基礎を築くことを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 海水中での二糖の定量法の開発

低濃度の糖試料の定量では、高性能イオン交換クロマトグラフィー(HPAE)とパルスドアンペロメトリ(PAD)検出を組み合わせた分析法(HPAE-PAD)が糖の高感度分析の定法

とされており、海水試料でも多くの先行研究で適用されている (Mopper et al., 1992, Environmental Science & Technology, 26, 138-144 など)。により行った。ただし、海水試料に HPAE-PAD を適用する場合、海水に大量に含まれる塩類が PAD による糖の検出を妨害するため、前処理として脱塩を行う必要がある。海水中の低分子の糖の分析における前処理としてこれまでに行われた脱塩方法では、固相抽出が一般的であり、イオン交換樹脂カラム、銀カラム (何れも Mopper et al., 1992, Environmental Science & Technology, 26, 138-144 など)、活性炭 (Sakugawa and Handa, 1983, Journal of the Oceanographical Society of Japan, 39, 279-288) がその例として挙げられるが、単糖の結果を比較すると、糖の種類によって回収率にばらつきがあるのが現状である。また、これらの方法は塩類をカラムに補足するため、そのままでは糖は濃縮されない。そこで、本研究では、二糖以上の結合態糖を捕捉し、且つ、溶離液の容量を小さくすることで糖の濃縮が可能な手法として、グラファイトカーボンカラムによる固相抽出を行った。前処理から定量までの手順を図 2 に示す。固相抽出の通液は手動またはシリンジポンプ (Legato 210 KD Scientific) を用い、固相抽出後に糖を含む溶離液から分析に不適な溶媒を短時間で蒸発させるために、加熱しながら試料に対して竜巻状に空気を当てる装置 (Rapid システム, バイオクロマト) を用いた。これにより蒸発乾固した試料を超純水で再溶解し、CarboPac PA200 (カラムサイズ 3×250mm, Thermo) と CarboPac PA200 BioLCTM Guard (カラムサイズ 3×50mm, Thermo) を装着した HPAE-PAD (ICS-5000, Thermo) により糖を定量した。分析の際の HPAE-PAD の条件は、カラム温度を 30、定量中の溶離液を溶離液 A (超純水) : 溶離液 B (0.2M NaOH) = 87.5% : 12.5% で流量 400  $\mu\text{l min}^{-1}$ 、PAD を表 1 の通りに設定した。

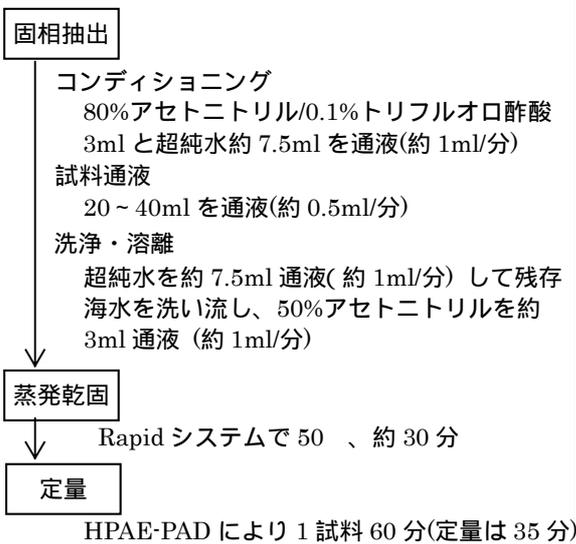


図 2 . 二糖の分析方法 .

表 2. HPAEC-PAD における PAD の設定条件 .

時間(秒)	電位(V)
0.00~0.41	0.1000
0.41~0.43	-2.0000
0.43~0.44	0.6000
0.44~0.50	-0.1000

(2) 原核生物群集による二糖の利用能評価  
二糖を利用して増殖可能な原核生物が海水中にどの程度存在するのかを明らかにするために、駿河湾表層海水で most probable numbers (MPN)法による培養実験を行った。培地には、遮光状態で長期間室温保存して微生物が利用可能な有機物を減らした亜熱帯の表面海水(以降、ヴィンテージ海水)に、二糖と窒素源とリン源を加えたものを用意し、これにろ過により捕食者を除いた海水試料を添加して、希釈系列を作成し、21 日間、暗条件、22 ~ 26 で培養した。原核生物の増殖の有無は、先行研究 (Martens-Habena and Sass, 2006, Applied and Environmental Microbiology, 72, 87-95) に従い、増殖に伴う DNA 総量の増加を、SYBR Green-I の蛍光強度の上昇として蛍光マイクロプレートリーダー (Infinite 200 PRO, Tecan) により検出する方法を用いた。MPN 値の計算には Jarvis et al. (2010, Applied Microbiology, 109, 1660-1667) のアルゴリズムを用いた。

### (3) 生物群集の評価

本研究課題に先行して行った予備調査から、二糖を利用して増殖する原核生物の細胞サイズが二糖の種類により異なることが明らかになった。原核生物は、鞭毛虫や繊毛虫などの原生生物により捕食されるが、捕食者の種により捕食に適した餌生物の細胞サイズが異なることから、二糖の種類によって微生物食物連鎖に多様性が生じる可能性が考えられる。この多様性を明らかにするための基礎的知見として、駿河湾における繊毛虫の時空間分布を調査した。調査は 2014 年 6 月から毎月、駿河湾湾奥部の測点 SR1 (35° 03' 20" N, 138° 41' 00" E) と湾奥部の SR3 (34° 53' 00" N, 138° 38' 30" E) でニスキン採水器により海水試料を採取し、酸性ルゴール溶液で固定後、静置とシフォンによる上澄み除去を繰り返して繊毛虫を濃縮し、ウタモールチャンバーを用いて倒立顕微鏡で観察した。また、繊毛虫を捕食する中型動物プランクトンや、一次生産に関する調査も共同研究の形式で行った。

## 4 . 研究成果

### (1) 二糖の分布

ヴィンテージ海水に既知濃度の二糖を添加し、前処理を行い、二糖の回収率を求めた。容量 500 mg のグラファイトカーボンカラムに二糖添加海水 (終濃度各 0.01 mg/L) を 20 ml 通液し、カラムからの溶離後に蒸発乾固を

行い、0.5 ml の超純水に再溶解することにより、塩分を検出限界以下まで除去しながら、図 1 に示した 6 種の二糖を 92.4 ~ 99.2% の回収率で 40 倍に濃縮することに成功した。そこで、駿河湾の海水に図 2 に示した分析方法を適用し、以下の結果を得た。2016 年 9 月の駿河湾湾奥部の測点 SR1 では、深度 0m、10m、100m でスクロースが検出され、その濃度は 0.36 ~ 1.30nmol/L であった。また、中央部の測点 SR3 でも深度 100m でスクロースが 0.22nmol/L 検出された。スクロース以外の二糖では、マルトース(SR1、10m、0.76nmol/L)、トレハロース(SR1、100m、1.77nmol/L)、ラクツロース(SR3、10m、0.90nmol/L)が検出され、パラチノースとマルツロースは検出されなかった。スクロースは先行研究においても沿岸海水で検出されている (Sakugawa and Handa, 1983, Journal of the Oceanographical Society of Japan, 39, 279-288 ほか)。ラクツロースは人工化合物であるが、本研究課題に先行して行った予備調査において、駿河湾海水中原核生物が増殖に利用できることを確認しており、今回、ラクツロースが駿河湾海水中で検出されたことからラクツロースが沿岸生態系に寄与している可能性が示された。また、分析対象とした 6 種の二糖以外にも未同定のオリゴ糖が検出され、その種類は陸寄りの測点 SR1 で 4 ~ 6 種と、沖寄りの測点 SR3 の 3 ~ 5 種よりわずかながら多く、二糖の多様性に陸域からの影響があることを示唆した。

#### (2) 原核生物群集による二糖の利用能評価

駿河湾清水港内の表面海水に含まれる原核生物群集の中で二糖を利用して増殖できるものの細胞数(MPN 値)をトレハロース、スクロース、ラクツロース、マルツロース、パラチノース、マルトースの 6 種の二糖について求めた結果、何れの二糖でも MPN 値は 4 月に顕著に高く、中でもトレハロース、スクロース、マルトースで高かった。トレハロース、スクロース、マルトースは 4 月以外の時期でも他の二糖に比べて高い MPN 値を示した。トレハロース、スクロース、マルトースは植物プランクトンやシアノバクテリアにより生産されることが知られることから、本研究で得られた結果は、春季の植物プランクトンブルーム時にトレハロース、スクロース、マルトースが海水中に特に多く供給され、これらを利用して増殖する原核生物の現存量を高めたことを示唆した。また、二糖により MPN 値が異なり、駿河湾海水中で濃度の高かったトレハロース、スクロース、マルトースで MPN 値も高かったことから、原核生物の種によって利用できる二糖の種類が異なり、海水中で原核生物群集に対する二糖によるボトムアップコントロールが働いていることが示唆された。これらの成果は、二糖を起点とした食物連鎖の存在を意味しており、海洋生態系および生元素循環の理解に有用であると考えられる。

#### (3) 生物群集の評価

駿河湾における繊毛虫の分布は、中層の 3 層 (深度 200m、塩分極小層、500m) で採水できた場合に、塩分極小層で極大を取るといった特徴的な分布を示した。同様の傾向は、本研究課題の前に観測した御前崎沖太平洋でも見られた。北太平洋の塩分極小層は、北太平洋中層水(NPIW)の影響を強く受けていることが知られており、駿河湾中層の塩分極小層も NPIW の影響を受けているとされる (Sohrin et al., 2011, Aquatic Microbial Ecology, 64, 1-14)。本研究課題の関連研究として行なった NPIW に関する研究から、NPIW の起源水がオホーツク海で生成される過程で、ブッソル海峡やクリル海盆の表層海水や海底付近に蓄積した有機物を取り込むことが示され、生物が利用しやすい有機物に比較的富むことが考えられることから (Sohrin et al., 2014, Progress in Oceanography, 126, 168-179)、駿河湾の塩分極小層で繊毛虫が比較的多い要因として、NPIW に含まれる炭素源や餌生物の影響が示唆された。この炭素源とオリゴ糖との関連性については、今後の調査課題である。

#### 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 1 件)

(1) Sohrin, R., Imanishi, K. and Suzuki, Y., Kuma, K., Yasuda, I., Suzuki, K. and Nakatsuka, T., Distributions of dissolved organic carbon and nitrogen in the western Okhotsk Sea and their effluxes to the North Pacific, Progress in Oceanography, 査読有, 126, 2014 年, 168-179 頁

[学会発表](計 10 件)

- (1) 宗林留美、鬼頭信幸、吉川 尚、西川 淳、松浦弘行、駿河湾における繊毛虫の分布、2016 年度日本海洋学会春季大会、2016 年 3 月 14 日 ~ 18 日、東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)
- (2) 吉川 尚、上原武志、佐藤元貴、山川 賢人、宗林留美、松浦弘行、西川 淳、駿河湾における植物プランクトン群集の光合成光利用特性、2015 年度日本海洋学会秋季大会、2015 年 9 月 26 日 ~ 30 日、愛媛大学(愛媛県松山市)
- (3) 剣持瑛行、西川 淳、松浦弘行、吉川 尚、宗林留美、春期から冬期にかけての駿河湾におけるメソ動物プランクトンの個体群動態と群集構造、2015 年度日本プランクトン学会・日本ベントス大会合同大会、2015 年 9 月 2 日 ~ 5 日、北海道大学(北海道札幌市)
- (4) 松浦弘行、宮本資博、吉川 尚、宗林留美、西川 淳、夏~秋期の駿河湾におけるヒドロクラゲ類の季節変化、2015

年度日本プランクトン学会・日本ベントス大会合同大会、2015年9月2日～5日、北海道大学(北海道札幌市)

- (5) Sohrin, R., Imanishi, K. and Suzuki, Y., Effluxes of Dissolved Organic Carbon and Nitrogen from the Okhotsk Sea to the North Pacific, Asia Oceania Geosciences Society 11th Annual Meeting, 2014年7月28日～8月1日, 札幌市
- (6) 宗林留美、今西國松、鈴木 款、オホーツク海から北太平洋中層への溶存有機炭素・窒素フラックス、2015年度日本海洋学会春季大会、2014年3月26日～30日、東京海洋大学(東京都港区)
- (7) Notsu, K., Sohrin, R., Wada H., Tsuboi, T., Sumino, H., Mori, T., Tsunogai, U., Hernandez, P. A., Suzuki, Y., Ikuta R., Oorui K., Koyama, M., Masuda, T., Fujii, N., Volatile leakage from the crater bottom of Teishi Knoll, Japan, formed by a submarine eruption in 1989, Makavol 2012 El Hierro Conference, 2012年10月10～15日、スペイン・カナリー諸島
- (8) 宗林留美、永翁一代、加藤憲二、森 愛理、鈴木 款、海水中での二糖の分解特性、2012年度日本海洋学会秋季大会、2012年9月13日～17日、東海大学清水校舎(静岡県静岡市)
- (9) 坪井辰哉、和田秀樹、宗林留美、松崎浩之、駿河湾における溶存無機炭素の<sup>14</sup>C濃度と栄養塩濃度、2012年度日本地球化学会第59回年会、2012年9月11～13日、九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市)
- (10) Sohrin, R., Mori, A., Nagaosa, K., Kato, K., Suzuki, Y., Microbial degradation of disaccharides in seawater, ASLO Aquatic Sciences Meeting, 2012年7月8日～13日、滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール(滋賀県大津市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

アウトリーチ活動3件

- (1) SAKURAサイエンスプログラム、2016年2月、静岡大学
- (2) 文部科学省科学技術人材育成費補助事業「女性研究者研究活動支援事業(拠点型)」共同研究ラボコールイベント2015、2015年9月、静岡市静岡科学館る・く・る
- (3) 駿河湾をもっと知ろう、2015年7月、静岡市南部生涯学習センター

シンポジウム発表6件

- (1) 水田恵大、小関佑太、佐々木将大、吉川 尚、松浦弘行、西川 淳、宗林留美、駿河湾における植物プランクトン群集の光合成光利用特性、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア2014、2014年11月28日、富士市ふじさんめっせ(ポスター発表優秀賞)
- (2) 宗林留美、鬼頭信幸、駿河湾における微小動物プランクトン、特に繊毛虫類の生態特性、駿河湾プロジェクト研究発表会、2015年2月23日、東海大学清水校舎
- (3) 加藤春佳、河井祐也、後藤直堯、中庭旭、西川 淳、松浦弘行、吉川 尚、宗林留美、大林由美子、駿河湾におけるメソ動物プランクトンの群集構造と個体群変動、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア、2015年12月11日、沼津市キラメッセぬまづ
- (4) 佐藤元貴、上原武志、吉川 尚、松浦弘行、西川 淳、宗林留美、大林由美子、駿河湾における植物プランクトン群集の光合成光利用特性の季節変動、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア、2015年12月11日、沼津市キラメッセぬまづ
- (5) 上原武志、佐藤元貴、吉川 尚、松浦弘行、西川 淳、宗林留美、大林由美子、駿河湾における植物プランクトン群集の一次生産の季節変動、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア、2015年12月11日、沼津市キラメッセぬまづ
- (6) 西川 淳、松浦弘行、吉川 尚、宗林留美、大林由美子、駿河湾の漂流生態系SURUMEプロジェクトの成果より、水産海洋学会地域研究集会、2016年3月10日、静岡市清水テルサ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗林 留美 ( 福田 留美 )

( SOHRIN, Rumi )  
静岡大学・理学部・准教授  
研究者番号： 0 0 3 4 3 1 9 5

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

( )

研究者番号：