

海洋細菌に由来する膜小胞の炭素隔離機構における動態の定量的評価

高瀬 仁美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 大森 裕子 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

海洋には地球表層における最大級の有機炭素貯蔵庫として、溶解態有機物 (Dissolved Organic Matter; DOM) が存在する (Hansell et al., 2009)。DOM の 95% は、微生物による分解に耐性のある難分解性 DOM (Refractory DOM; RDOM) であり、数百年から数千年の間海洋中に残存する。RDOM は「微生物炭素ポンプ (Microbial Carbon Pump; MCP)」を介して作られるとされ (Jiao et al., 2010)、ペプチドグリカンや外膜タンパク質等、細菌由来の膜成分を含むことから、細菌は RDOM の主要な生産者であると考えられている (Tanoue et al., 1995; Ogawa et al., 2001; Kitayama et al., 2001)。

海洋細菌は、膜小胞 (Membrane Vesicle; MV) と呼ばれる、細菌外膜で構成される直径 20-400 nm の粒子を生産する (Toyofuku et al., 2019)。MV はペプチドグリカンや外膜タンパク質を含み、海洋細菌の培養実験において数週間から数か月間の分解耐性を示したことから (Billler et al., 2014; 竹内, 2020)、RDOM の構成成分の一つである可能性が示唆されている。先行研究では、海洋細菌の培養によって得られる「微細粒子画分 (MV や膜断片、ファージを含む画分)」の安定性について解析し、MV が RDOM として有機炭素を隔離する可能性が示された (竹内, 2020)。しかし、MV の機能を正確に評価するためには、微細粒子画分から MV を分離する必要がある。その方法として、従来から「密度勾配遠心法」が用いられているが、溶媒に有機物である Iodixanol を使用しており、MV が保持する有機炭素量を測定する際に障害となることが懸念された。

本研究では、密度勾配遠心法を用いた MV の有機炭素量測定方法を検討し、海洋細菌の培養によって得られる微細粒子画分から MV を分離することで、海洋細菌由来の MV が隔離する有機炭素量を定量的に評価することを目的とした。

【方法】

実験 1. 密度勾配遠心法による MV 分離と有機炭素測定法の検討

材料として、菌体を除去した緑膿菌培養液を使用した。超遠心により微細粒子画分のペレットを形成し、45% Iodixanol で懸濁した。その上に 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10% Iodixanol を重層し、遠心により MV 様画分のバンドを得た。超遠心によりペレット (MV ペレット) を回収し、Iodixanol を除去するために、NaCl 水溶液で 0 から 5 回洗浄したあと、元素分析計を用いてそれぞれの有機炭素量を測定した。

実験 2. ^{13}C -グルコースを基質とした海洋細菌による分解実験

2020 年 10 月 14 日に静岡県下田市鍋田湾で採水された表層水から海洋細菌を分取した。20 L ポリカーボネート容器 3 本に、海洋細菌 2 L と人工海水 18 L を充填した。海洋細菌の代謝に由来する有機物の行方を追跡するため、基質として ^{13}C -グルコースを添加し、暗条件下 20°C で培養した。培養開始日 (0 日目) と 3、6、13、20、30、55 日目に培養海水を分取し、試料の一部について、

孔径 0.4 μm ガラス繊維ろ紙でのろ過により細菌を捕集した。実験 1 と同様の作業により、ろ液から微細粒子画分と MV 様画分を回収した。①細菌数、②微細粒子数と MV 様粒子数、③ ^{13}C でラベルされた有機炭素濃度 (細菌画分・微細粒子画分・MV 様画分)、④培養液のグルコース濃度、⑤細菌群集組成を測定・解析した。

【結果と考察】

実験 1. 密度勾配遠心法による MV 分離と有機炭素測定法の検討

緑膿菌の MV ペレットの有機炭素量は洗浄 0 回目で 4.09 mmolC/L だったが、2 回目で 3.03 mmolC/L まで減少し、4 回目まで 3.04 mmolC/L とほぼ一定の値が得られた。このことから、MV ペレットを 2 回洗浄することで、Iodixanol を除去し、MV が保持する有機炭素量を正確に測定できることが示唆された。

実験 2. ^{13}C -グルコースを基質とした海洋細菌による分解実験

細菌数は培養開始から 6 日目までに 3.3×10^7 cells/ml に増加し、55 日目まで緩やかに減少した (図 1)。一方、微細粒子数は、培養開始から 20 日目までに 6.9×10^7 particles/ml に達すると、30 日目までにやや減少したが、55 日目までほぼ一定であった (図 1)。これらのことから、細菌が増殖してから死滅する過程で、膜断片や MV、ファージ等が放出され、微細粒子数が増加したと考えられる。密度勾配遠心法では、容器間や培養日数によって複数の異なる密度の MV 様粒子を得られ、その数は $(1.4 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^7)$ particles/ml であった。MV 様粒子が微細粒子画分に占める割合は培養開始後から増加し、55 日目には 50%~113% を占めていた。したがって、細菌から放出された微細粒子は分解されずに残存し、そのうちの 50% 以上は MV 様粒子であることが示唆された。

細菌画分の ^{13}C 濃度は、培養開始から 6 日目までに 139.7 $\mu\text{molC/L}$ まで増加したあと、55 日目まで減少し続けた。微細粒子画分の ^{13}C 濃度は、培養開始以降 6 日目で一度大きく減少したものの、再び増加し 13 日目でピーク (25.3 $\mu\text{molC/L}$) に達した。その後、30 日目まで緩やかに減少し、55 日目までほぼ一定の値を示した。これらのことから、細菌に取り込まれた ^{13}C のうち、18.1% が微細粒子の形成に寄与し、形成された微細粒子の 86.9% が分解されずに残存することが確かめられた。なお、MV 様粒子の ^{13}C 濃度については、今後解析を進める。

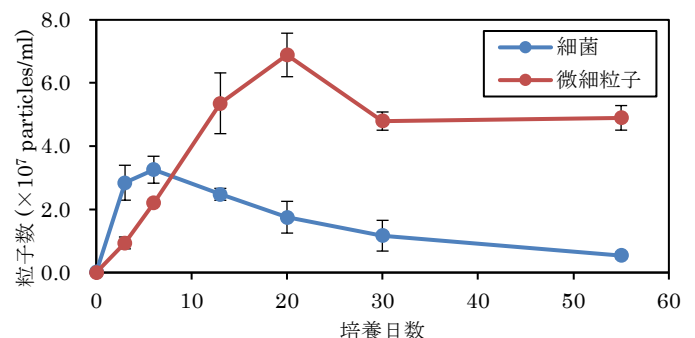


図 1 細菌数と微細粒子数の経時変化
n = 3、エラーバーは標準偏差を示す。