

## 鍋田湾沿岸表層における膜小胞の炭素量の評価

野口 瑞穂 (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】

海洋の溶存態有機物 (Dissolved Organic Matter; DOM) は、地球表層における最大級の有機炭素リザーバーであり、DOM の構成成分やその動態の解明は地球上の炭素循環の理解に重要である。DOM は孔径 200~400 nm のろ紙を通過する画分と作業上定義され、様々なサイズの有機物で構成される。

膜小胞 (Membrane Vesicle; MV) は、バクテリアが放出する直径 20-400 nm の脂質二重膜で構成される小胞である。MV はサイズが小さいため、DOM の構成成分、あるいは 1~1,000 nm のコロイド画分に含まれる粒子として扱われてきた。MV は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ため (Biller et al., 2014; 竹内, 2020)、炭素を長期間隔離する画分として微生物炭素ポンプに関与する可能性がある。また、炭素源が MV のみの培地でもバクテリアが生育できたことから (Biller et al., 2014)、海洋細菌の基質としての役割をもつ可能性がある。このように、MV は海洋炭素循環に影響するにもかかわらず、海洋 MV が低濃度であるため分析が難しく、炭素量といった基礎的な情報が無い。

本研究では、沿岸海水中の MV がもつ炭素量の評価を目的とした。自然海洋中の MV の炭素量を測定するためには、大量の海水から MV を含むコロイド画分を濃縮する必要がある。そこで、まず鍋田湾表層水を用いてコロイド画分の濃縮手法のひとつである限外ろ過法によるコロイド画分の回収率を検証し、得られたコロイド画分中の MV の炭素量を測定した。

## 【方法】

## 1) 限外ろ過によるコロイド画分の回収率評価

11月6日に静岡県下田市鍋田湾において深度 3-5 m の自然海水を 15 L 採水した。自然海水を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のカプセルフィルターでろ過した。ろ液を 10 kDa のフィルターを用いて、限外ろ過し濃縮した試料と、限外ろ過を行わず自然海水のままの試料をそれぞれ超遠心し、ペレットを回収した。本研究では、このペレットをコロイド画分と定義し、コロイド画分の粒子数と粒子サイズを測定した。

## 2) 鍋田湾沿岸表層における MV の炭素量の評価

2021年9月9日、11月6日に1)と同じ場所で自然海水をそれぞれ 160 L、400 L 採水した。9月の海水試料を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  カプセルフィルター、11月のサンプルを孔径 0.7  $\mu\text{m}$  の GF/F でろ過し、ろ液を限外ろ過にておよそ 100 倍に濃縮した。1)と同様の操作でコロイド画分を回収した。コロイド画分から MV 画分を抽出するため密度勾配遠心を行った (Tashiro et al., 2009)。9月の試料では密度勾配遠心後の画分を上から 1 mL ずつ分取し、画分 I~III とした。コロイド画分と密度勾配遠心で得られた各画分中の炭素量および粒子数を測定した。また、海水試料中のバクテリアの細胞数の計測および群集組成の解析を行った。

11月の海水試料では、密度勾配遠心後の試料を上から 0.375  $\mu\text{L}$  ずつ分取し、8つの画分 (画分1~8) に分画した。分画した試料中の脂質二重膜を染色し、蛍光強度を測定した。膜成分が多く含まれる画分を MV 画分とし、コロイド画分と MV 画分の炭素量と粒子数を測定した。

## 【結果と考察】

## 1) 限外ろ過によるコロイド画分回収率評価

限外ろ過を行わずに回収したコロイド画分の粒子数濃度は、 $6.10 \times 10^5$  particle/mL、限外ろ過を行って回収したコロイド画分の粒子数濃度は、 $4.30 \times 10^5$  particle/mL であった。コロイド画分に含まれる粒子数から、限外ろ過による粒子の回収率は 70% であると考えられる。

## 2) 鍋田湾沿岸表層における膜小胞の炭素量の評価

9月の試料のコロイド画分と密度勾配遠心後の画分 I~III に含まれる粒子数濃度はそれぞれ  $2.49 \times 10^5$ 、 $5.80 \times 10^4$ 、 $1.74 \times 10^4$ 、 $3.69 \times 10^4$  particle/mL であった。コロイド画分と画分 I~III の粒子数濃度の合計の比率から、密度勾配遠心による粒子の回収率は 46% であると見積もられた。

11月の試料を用いた脂質測定の結果、画分 3~5 はその他の画分と比較して蛍光強度が 2 倍以上高かった (図 1)。したがって、主に画分 3~5 に MV が分離されたことが示唆される。この画分の密度範囲は、1.11~1.19 g/mL であった。

9月の試料においては、同じ密度範囲に当たる画分 II が MV 画分であると定義した。この MV 画分に含まれる粒子の直径は 100~400 nm であった。また、鍋田湾表層水における粒子濃度は  $5.07 \times 10^4$  particle/mL と推定された。これは、Biller et al. (2014) で報告されたマサチューセッツ州沿岸、サルガッソ海の表層における MV 濃度より低かった。原因としては、コロイド画分を回収するための超遠心において粒子が損失した可能性がある。

9月の試料における MV 画分の炭素濃度は 1.98 nmol/L であった。よって、粒子数と粒子が含有する炭素量から、MV 1 個あたりの炭素含有量は 0.136 fgC であると推定された。これは、Biller et al. (2014) で推定された値と一致した。11月の試料のデータは今後解析を進める。

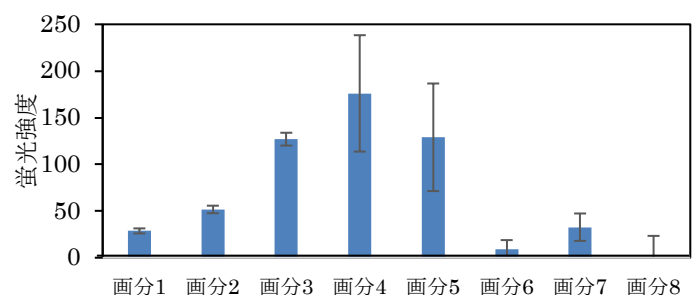


図 1. 11月の試料における膜成分の蛍光強度  
エラーバーは標準誤差を示す (n=3)