

— 2016年度日本海洋学会岡田賞受賞記念論文 —

貧栄養海域におけるピコ・ナノプランクトン 栄養動態に関する研究*

佐藤 光秀[†]

要 旨

ピコ・ナノ植物プランクトンは外洋における主要な一次生産者であり、食物網の起点である。本論文ではピコ・ナノ植物プランクトンの組成と分布、栄養獲得、被食過程について著者らが行ってきた研究の内容と成果を概説する。はじめに、フローサイトメトリーにより代表的なピコ・ナノ植物プランクトングループの分布やサイズ組成を明らかにし、その生理的な特徴や環境因子と分布を関連づけた。つづいて、ピコ・ナノ植物プランクトンが多様な群集組成を呈する要因の一つとしてリンや鉄の利用に着目し、特に、外洋域で重要となる有機態リンと有機配位子に結合した鉄の利用について現場での実験をもとに新知見を得た。また、植物プランクトン群集を形作る要因としての被食過程に着目し、サイズ分画から植物プランクトンの被食速度を見積もる手法を開発した。これらの結果から、外洋、特に貧栄養海域におけるピコ・ナノ植物プランクトンの特徴的な栄養獲得戦略を明らかにした。

キーワード：ピコ・ナノ植物プランクトン、フローサイトメトリー、栄養塩、鉄、混合栄養

1. ピコ・ナノプランクトン

外洋表層におけるほぼ唯一の一次生産者である植物プランクトンの体サイズ範囲は直径にして10000倍以上に及ぶ。世界最小の光合成生物である *Prochlorococcus* の細胞径は0.6 μm程度である (Morel *et al.*, 1993) のに対し、珪藻 *Ethmodiscus* 属の珪藻は直径2–3 mm, *Thalassiothrix* 属の珪藻の細胞長は4 mmに達する (Round *et*

al., 1990)。また、シアノバクテリア *Trichodesmium* やブルムネシウム藻 *Phaeocystis* は直径1 cmにもおよぶ細胞群体を形成する (Walsby, 1978; Wang *et al.*, 2011)。漂流生態系の生物は摂餌の際に体の位置を固定できないため、餌をまるごと取り込む摂餌方式が主流である。この方式では自身の摂餌器官よりも大きい餌を食べることができないため、生産者のサイズはさらに上位の消費者のサイズ組成を規定する要因になる。すなわち、海洋の一次生産がどのようなサイズの生物によって行われているかは漁業生産や生物ポンプの効率を決定する根源的な要因となっている。プランクトンをサイズにより区分することは以上の点から有用であり、便宜的に相当径で0.2から2 μmのものをピコプランクトン、2から20 μmのものをナノプランクトン、20から200 μmのものをマイクロ

* 2016年9月1日受領; 2016年11月1日受理

著作権：日本海洋学会, 2017

[†] 東京大学大学院農学生命科学研究科

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

TEL: 03-5841-5292 FAX: 03-5841-5308

e-mail: asatom@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

プランクトンと呼ぶ。

以上は植物プランクトンを食べる側から見たサイズの重要性であるが、植物プランクトン自身にとってサイズの影響が現れるのは栄養塩の取り込みである。小さい細胞ほど表面積：体積比が大きくなるため、相対的な栄養塩取り込みにおいて有利であり、低濃度の栄養塩環境でも増殖を維持することができる。反面、大きい細胞はより多様な小器官をもつことができる。たとえば、珪藻類の液胞は溶存物質を貯蔵することができるため、栄養塩の供給が大きく変化するような環境で有利である。そのため、貧栄養海域では一次生産者は圧倒的にピコ・ナノ植物プランクトンによって占められており (Odate and Maita, 1988), それらから始まる微生物食物網がエネルギー・物質の主要な転送過程になっている。

外洋におけるピコ・ナノ植物プランクトンの研究は、1980年代に端を発し、分類・生理・生態の各分野で現在にいたるまで精力的に進められてきた。しかし、体サイズが小さく光学顕微鏡下での観察が難しいこと、頻繁なアクセスの難しい外洋に分布が集中していること、培養株の単離や維持が難しいこと、など大型の植物プランクトンと比べ研究障壁が多く、いまだに不明な点が多く残されている。筆者らは太平洋におけるピコ・ナノ植物プランクトンの生態に着目し、これまで研究を行ってきた。はじめに、ピコ・ナノ植物プランクトン細胞を光学的な特性の違いから分けられたグループについて、それぞれの分布特性と、その生理的な特徴との関連を明らかにした。また、その細胞サイズを規定する環境要因を調べ、将来的に予測される海水温の上昇が外洋の生態系に及ぼす影響について考察した。つづいて、外洋において多様なピコ・ナノ植物プランクトンが共存し、海域ごとに特徴的な群集組成を呈する要因について、栄養塩、特にリンや鉄の利用と被食過程に着目して研究を進めた。リンや鉄の利用に着目したのは、栄養塩の中で単純な構造で生理学的にも利用しやすい無機イオンは極めて低い濃度になるまで利用しつくされていることにより、有機態リンや有機配位子に配位した鉄の利用の重要性が高まると考えたためである。被食過程については、サイズ分画から植物プランクトンの被食速度を見積もる手法を開発した。これらの研究により明らかになったピコ・ナノ植物プランクトンの生態の一端を以下に紹介する。

2. ピコ・ナノプランクトンの組成と分布

ピコ・ナノ植物プランクトンは大別すると原核生物と真核生物に二分される。原核生物の中では、シアノバクテリア (ラン藻) が酸素発生型光合成を行う。ピコ・ナノサイズのシアノバクテリアとしては、先述の世界最小の光合成生物である *Prochlorococcus* およびそれに次いで小さい *Synechococcus* (直径 $0.8 \mu\text{m}$ ~) のほか、水中に溶存する窒素分子を同化すること (窒素固定) ができるナノプランクトン *Crocospaera* (Zehr *et al.*, 2001) などが挙げられる。真核生物、特に原生生物は現在も分類系統の整理が進行中であり、その中でも光合成生物は様々な系統に分散して存在している。ピコ・ナノ植物プランクトンはクリプト藻綱、ハプト藻綱 (プリムネシウム藻綱)、緑藻綱、プラシノ藻綱、ペラゴ藻綱などに主に存在する。また、珪藻綱や渦鞭毛藻綱の中にもこのサイズ範囲に入るものがある。元来、これらの種の同定は、天然サンプル、もしくはそこから確立した培養株を電子顕微鏡などで観察することによっていた。しかし、特に外洋種については、培養株の確立が困難なこと、形態的特徴がマイクロ植物プランクトンに比べて乏しいことなどから、網レベルの判別でも多大な労力を要した。1990年代には、各藻類綱群が特徴的な色素組成を有していることを利用し、高速液体クロマトグラフィにより測定した群集全体の色素組成から藻類綱群の組成を推定する手法が確立され (Mackey *et al.*, 1996), 世界中の海域でのピコ・ナノ植物プランクトンの組成の理解が飛躍的に進んだ。さらに近年は次世代シーケンサーなど分子生物学的手法の進化により、海洋ピコ・ナノ植物プランクトンのより詳細な組成や新たな分類群 (Not *et al.*, 2007) が次々と明らかになっている。

これらとは別に、1980年代からピコ・ナノ植物プランクトンの群集解析に用いられている手法にフローサイトメトリーがある (Olson *et al.*, 1985)。これは細胞の懸濁液にレーザーを当て、細胞の径や色素量などの情報を細胞ごとに得る手法である。HPLC ほどの色素分解能はないが、色素の含量をクロロフィルとフィコエリスリンに分けて測定することができる。また、蛍光プローブを利用して、生理活性を測定したり、特定の分類群だけを免

疫化学的に検出したりすることも可能である。フローサイトメトリーの利点は、何よりも少量のサンプルから現場で、ピコ・ナノ植物プランクトンのサイズ組成やおおまかな分類群の組成を測定できる点にある。なお、研究船上に装置を持ち込めない場合にはサンプルを固定・保存し、陸上で分析することも可能である (Vaulot *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 2006)。

著者は2003年より研究船にフローサイトメーターを搭載し、太平洋の全域にわたってピコ・ナノ植物プランクトンの群集構造の解析を行ってきた (Fig. 1)。この結果、すべてのピコ・ナノ植物プランクトン群が明瞭な緯度方向の区分を示すということが明らかになった。*Prochlorococcus* の分布は南北とも40度以下の低緯度海域に限られていた (Fig. 1の(a))。*Synechococcus* はほぼ全海域に出現したが、赤道湧昇域や亜寒帯循環域で特に密度が高かった (Fig. 1の(b))。真核植物プランクトンは亜寒帯域で密度が高く (Fig. 1の(c))、栄養塩供給による制御が強く示唆された。また、これらの傾向は概ね大西洋などの他の海域の結果と一致していた。ここで着目されるのはフローサイトメトリーにより特に識別可能な2群、ナノサイズのシアノバクテリア (以下、ナノシアノバクテリア) とクリプト藻である。

ナノシアノバクテリアは前述の窒素固定性単細胞シアノバクテリア *Crocospaera* を含む群である。ナノシアノバクテリアの一部が窒素固定を行う (Zehr *et al.*, 2001) ことが明らかになるまで、外洋におけるナノシアノバクテリアに対する関心は低く、生態学的・海洋学的な研究は極めて少なかった (Ishizaka *et al.*, 1994; Neveux *et al.*, 1999)。著者は太平洋の広域にわたって取得したフローサイトメトリーのデータからナノシアノバクテリアの密度を測定し、マッピングした (Sato *et al.*, 2010)。ナノシアノバクテリアは南北とも緯度10~20度の海域に集中して分布しており、特に太平洋西部や島嶼の近傍で高い密度が見られた (Fig. 1の(d))。特に西部北太平洋における高密度出現海域の北限は表層のリン酸塩が検出されはじめる海域 (Hashihama *et al.*, 2009) とほぼ一致しており、無機リン酸や陸起源物質に依存した生存戦略を示唆する。

クリプト藻は真核生物でありながらフィコビルン蛋白を有することで特徴づけられ、特にフィコエリスリンを

含むタイプのもはフローサイトメトリーにより容易に検出される。クリプト藻は亜寒帯のごく限られた海域でのみ高密度で出現した (Fig. 1の(e))。また、西部北太平洋亜寒帯域で2004年に行われた現場鉄散布実験において、クリプト藻は鉄添加に応答して密度を増加させた。その後、溶存鉄濃度が低下して、他の植物プランクトン群の生物量が低下していく中でも、クリプト藻は比較的高い細胞密度を維持していた (Sato *et al.*, 2009)。クリプト藻は比較的低鉄濃度の低いペルー海流域において高い生物量を示すことが報告されており (DiTullio *et al.*, 2005)、鉄欠乏に耐性があるのかもしれない。

天然群集サンプルにおいて、クリプト藻以外の真核植物プランクトンは蛍光の情報からそれ以上の細かい分類群に区分することが難しいため、便宜的にサイズ情報からいくつかクラスターに分けるのが通例である。とはいえ、生態系を通じたエネルギー・物質転送の起点のサイズ構成を知ることは極めて重要であり (前章参照)、そのサイズ構成を決定する因子を知ることは、気候変動や人為的な環境変化が海洋生態系に与える影響を予測する上で必須である。全球的な植物プランクトンのサイズ構成からの予想では、温暖化にともなう成層の強化、および栄養塩供給の減少が植物プランクトンの平均サイズを小さくすると考えられている (Marañón *et al.*, 2001; Morán *et al.*, 2010)。しかし、これは極域から亜熱帯までの温度範囲の観測データから推定された結果であり、今世紀末までに予想される表層海水温の上昇幅 (< 3°C, Marinov *et al.*, 2010) に対しても成立するかどうかは疑問である。また、すでに圧倒的にピコ・ナノ植物プランクトンが優占している亜熱帯海域で今後どのような変化が起こるかについては予想の埒外である。そこで、亜熱帯海域のピコ・ナノ植物プランクトンのみに着目し、その平均細胞サイズに影響を与える環境因子を明らかにするために、亜熱帯に特徴的で散乱光強度から細胞サイズを推定できる3群 (*Synechococcus*, ナノシアノバクテリア、および真核植物プランクトン) を対象に、太平洋亜熱帯域表層における散乱光強度 (細胞サイズの指標) データを解析した (Sato *et al.*, 2015)。その結果、細胞サイズに最も影響を与えていたのは測定時刻であり、どの群においても夕方を頂点とする日周サイクルで変動することが見出された。この現象は培養株 (DuRand *et al.*, 2002; Dron *et*

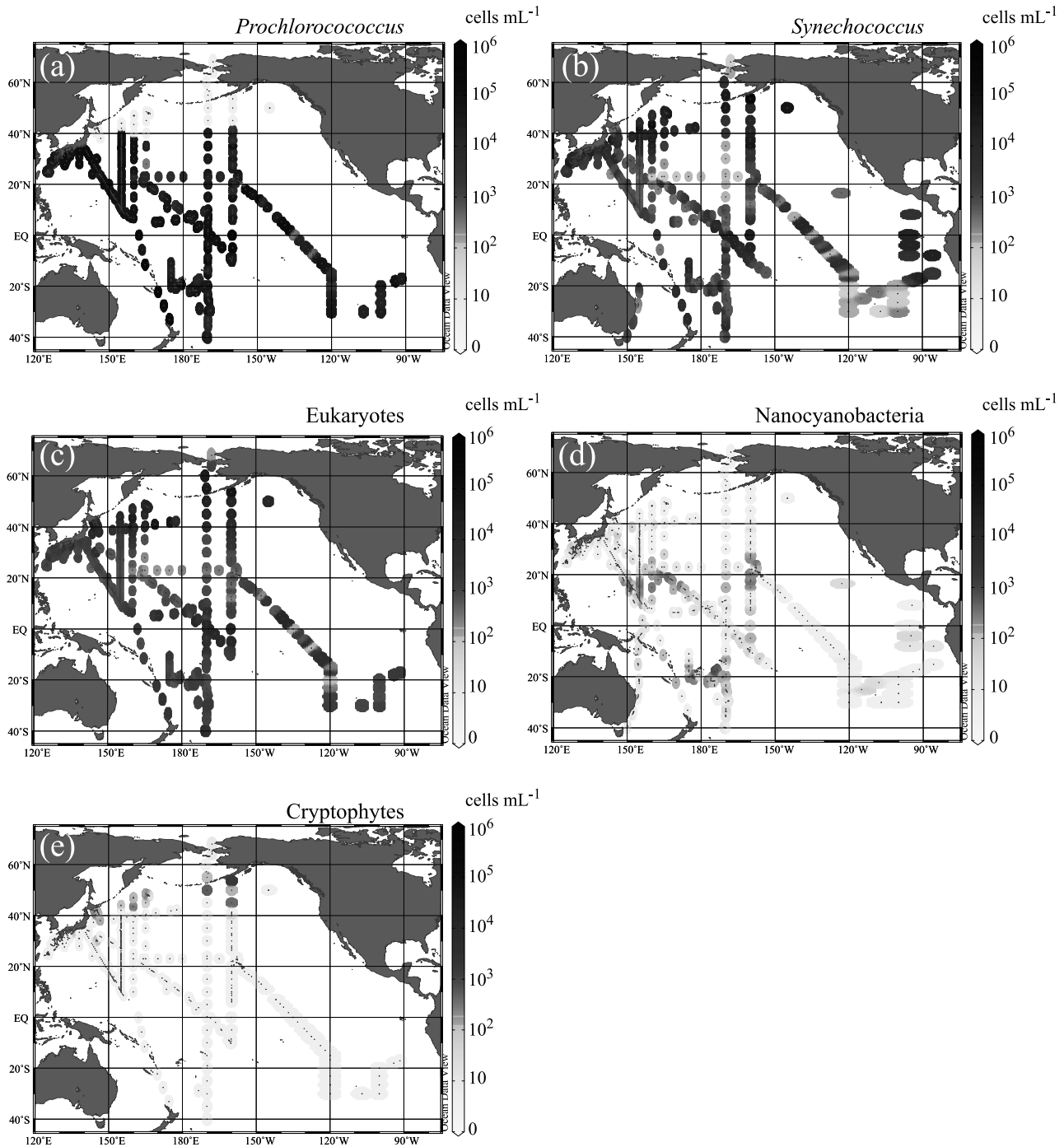


Fig. 1. Cell concentration (cells mL⁻¹) of (a) *Prochlorococcus*, (b) *Synechococcus*, (c) eukaryotic pico- and nanophytoplankton (excluding cryptophytes), (d) nanocyanobacteria, and (e) cryptophytes at the surface of the Pacific Ocean, as measured by flow cytometry. Data are derived from the research cruises onboard R/V Hakuho-maru, Tansei-maru, Mirai, and Umitaka-maru from 2003 to 2014. Some of the data in this figure are reported by Sato *et al.* (2009, 2010).

Table 1. Level of significance for the regression of temperature and soluble reactive phosphorus (SRP) concentration against forward light scatter (FSC, index of cell size) of pico- and nanophytoplankton after correcting for diel variations. This table is derived from Sato *et al.* (2015).

Population	Cruise	Single regression		Multiple regression	
		Temp.	SRP	Temp.	SRP
<i>Synechococcus</i>	KH-08-2	>0.1	>0.1	N/A	
Nano-sized cyanobacteria	KH-08-2	>0.1	>0.1	N/A	
Pico- and nano-sized eukaryotes	KH-08-2	<0.001	>0.1	<0.001	>0.1
	KH-11-10 & KH-12-3	<0.001	<0.05	<0.005	>0.05

al., 2012) や定点観測 (Vaulot and Marie, 1999; Olson *et al.*, 2003) でも確認されており、昼間に光合成により細胞内に物質を貯蔵し、夜間にかけて、その物質を利用して同期的に細胞分裂する現象をとらえたものと考えられる。この日周サイクルの影響を除去した散乱光強度について、水温、緯度、塩分、栄養塩濃度などの環境パラメータとの相関を調べたところ、真核植物プランクトンの散乱光強度と水温との間または真核植物プランクトンの散乱光強度とリン酸塩濃度との間のみで有意な相関がみられた (Table 1)。ここで、特に真核植物プランクトンの散乱光強度と水温とは強い正の相関 (温度が高いほどサイズが大きくなる) がみられたことが注目される。これは過去のデータから推定される関係とは逆の結果であった。将来的な海水温の上昇やそれにとまなう成層の強化が、亜熱帯海域に限って言えば、植物プランクトン群集全体の小型化をもたらさない可能性がある。この現象を植物プランクトンの栄養戦略から説明する試みについては第5章で詳述する。

3. ピコ・ナノプランクトンによるリンの利用

前章でも触れたように、亜熱帯外洋内において、無機リン酸塩濃度は時空間的に大きく変動していることから、プランクトンの分布を制御する要因の一つとなっている

と考えられる。特に、北太平洋西部においてリン酸塩濃度は高感度分析法の検出限界付近にまで低下している (Hashihama *et al.*, 2009)。このような環境において生物は再生により生じるリン酸塩のほか、有機態のリンに依存していると考えられる。海水中の有機態リンはリン原子周りの分子構造によって分類され、リン酸エステルが最も主要な形態であり、強固なリン-炭素結合をもつホスホン酸がこれに次ぐと考えられている (Young and Ingall, 2010)。しかし、その全容については不明な点が多い。

海洋におけるリン酸エステルの利用については1980年代から研究があり、その多くはアルカリホスファターゼというリン酸エステル加水分解酵素の活性に着目したものであった。アルカリホスファターゼはほとんどの植物プランクトンが有しており、リン酸塩欠乏下で発現することによりリン欠乏に対抗する手段となる。そのため、アルカリホスファターゼ活性はリン酸塩欠乏の指標として広く用いられており (Hoppe, 2003)、亜熱帯外洋においてはしばしばアルカリホスファターゼの活性の高まりが見られる (Duhamel *et al.*, 2010)。これらの研究では、モデル基質としてリン酸モノエステルが用いられているが、実際には海水中には核酸などの生体分子に由来するジエステル類も存在していると考えられている。植物プランクトンの中でもリン酸ジエステルを唯一のリン源として増殖できるかどうかは種間で異なる (Yamaguchi,

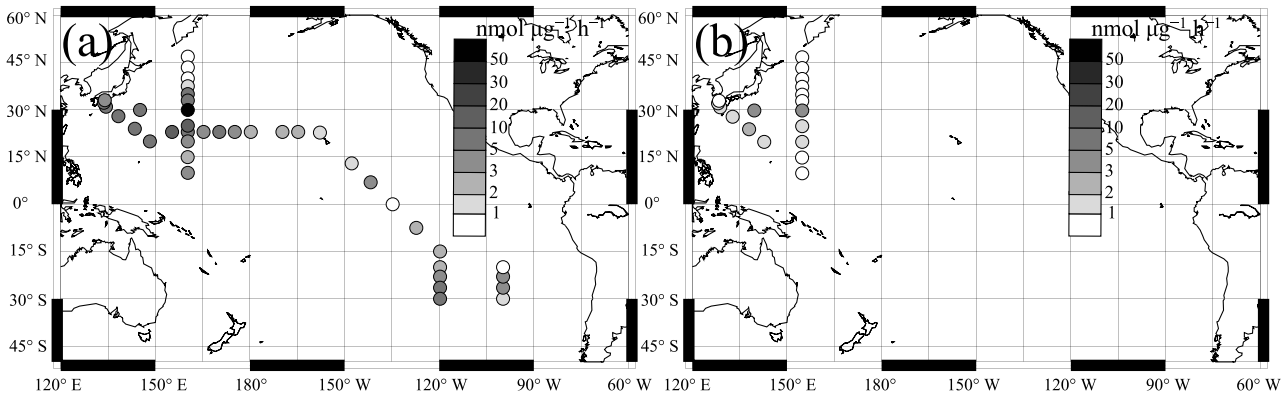


Fig. 2. Activities of phosphate (a) monoesterase and (b) diesterase ($\text{nmol l}^{-1} \text{h}^{-1}$) at 10 m of the Pacific Ocean, as normalized by chlorophyll *a* concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$), an index of phytoplankton biomass. Original figure is in Sato *et al.* (2013).

2005)。このため、ジエステルの利用は貧栄養海域における植物プランクトンの群集構造形成に影響を与えていると考えられるが、その加水分解活性を現場で測定した例はなかった。そこで、著者らは、蛍光基質ピス (4-メチルウンベリフェリル) リン酸を用いて西部北太平洋においてリン酸ジエステルの加水分解を測定した (Sato *et al.*, 2013)。リン酸ジエステルの加水分解速度はリン酸塩が枯渇した海域で高く、リン酸の欠乏に伴うジエステルの利用が強く示唆された。しかし、その速度はモノエステルのそれよりも1桁以上低かった (Fig. 2) ため、外洋表層におけるリン源としての相対的な重要性は高くないと考えられる。複数の基質濃度における活性測定の結果から求めた潜在的な回転速度は100日を超え、リン酸ジエステルが外洋表層において生物地球化学的に不活性な画分であることが確認された。溶存DNAの回転速度が1日を下回る (Paul *et al.*, 1987; Brum, 2005) ことを考慮すると、ジエステルの中には極めて高速で循環している画分と不活性な画分が混在していると考えられる。

次に解明を進めるべき有機態リンはホスホン酸であるが、適切な蛍光基質が市販されていないこと、分解過程が多段階の反応であり極めて多様な遺伝子が関与していることなど克服すべき障壁は多く、研究は未だ初期段階にある (鈴村ら, 2015)。ホスホン酸を唯一のリン源として増殖できる植物プランクトンは限定的である。その中で、窒素固定能を有するシアノバクテリア *Trichodesmi-*

um に関しては、単純な分子構造のホスホン酸の分解速度の測定が試みられている (Karl *et al.*, 2008)。

4. ピコ・ナノプランクトンによる鉄の利用と再生

植物プランクトンの体を構成する金属元素のうち、鉄は光合成系や窒素代謝などの生命活動に必須の酵素の中心金属であり、突出して要求量が高い。しかし、高い要求量に比して海洋表層における鉄イオンの溶解度は低いために、供給源である陸地から離れた外洋では鉄は不足しやすい。特に、太平洋東部赤道域、北太平洋亜寒帯域、そして南大洋の3海域は、表層に多量の硝酸塩が残存しているにもかかわらず植物プランクトン生物量が比較的低位に維持されているため、HNLC (High Nitrate, Low Chlorophyll の略) 海域と呼ばれている。これらの海域における一次生産の制限要因の一つが鉄不足であることが知られている (Martin *et al.*, 1994; Boyd *et al.*, 2000; Tsuda *et al.*, 2003)。HNLC 海域においては、亜熱帯循環域ほどではないがピコ・ナノ植物プランクトンの割合は高い。また、これらの海域で行われた鉄散布実験の結果は、鉄不足による増殖の制限や生理的なストレスがピコ・ナノ植物プランクトンにまで及んでいることを示している (Suzuki *et al.*, 2005; Lance *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2009)。亜熱帯循環域の一部では窒素固定が鉄による制限を受けている (Grabowski *et al.*, 2008)。したがっ

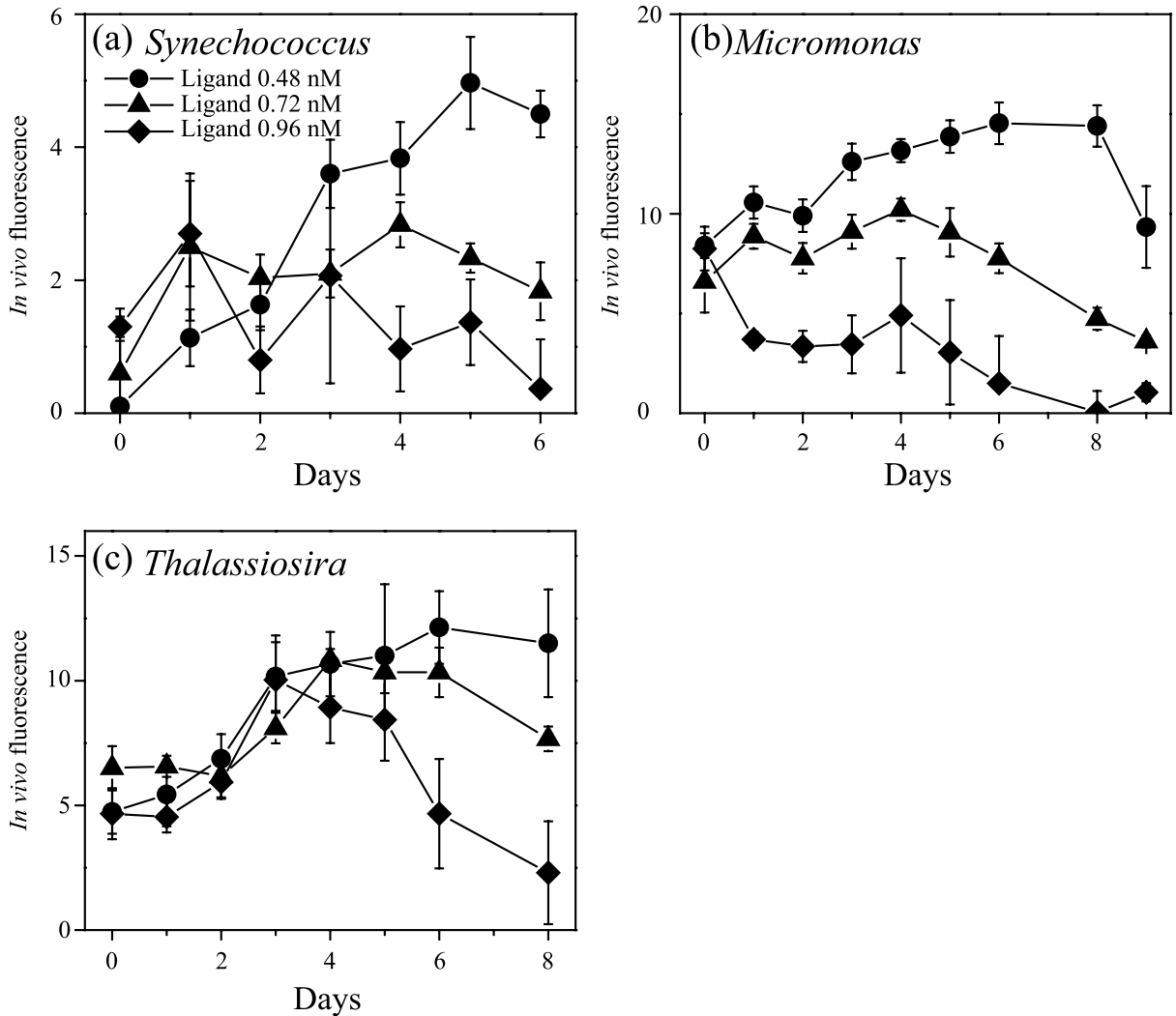


Fig. 3. Temporal changes of in vivo chlorophyll fluorescence showing growth of algal cultures in different seawater media. (a) : *Synechococcus* sp. (cyanobacterium), (b) *Micromonas pusilla* (prasinophytes) and (c) : *Thalassiosira weissflogii* (diatoms). Circles, triangles, and diamonds indicate respectively the values in seawater media before the grazing experiment, those after six days of dark incubation, and those after six days of dark incubation after addition of phytoplankton concentrate. Original figure is in Sato *et al.* (2007a).

て、窒素やリンが不足しているような海域においても、鉄が植物プランクトン活動の制限要因の一つと考えられる。

外洋表層において、溶存鉄イオンの濃度は一般的に 1 nM を下回るが、水温・塩分・酸素分圧から計算される溶解度よりは高いことが多い。これは海水中に存在する有機物と錯体を形成することにより安定化していることによると考えられている (van den Berg, 1995)。鉄と錯

形成する有機配位子の起源は完全にはわかっていないが、微生物が鉄欠乏下で放出するシデロフォアと、植物プランクトンなどの体内に含まれ、被食やウィルス感染の際に海水中に放出されるポルフィリン化合物が候補としてあげられている (Rue and Bruland, 1995)。また、これらの有機配位子は鉄の利用能を変化させることが確認されている。培養株を用いた実験によると、原核植物プランクトン (シアノバクテリア) はシデロフォア錯体を

効率よく利用し、真核植物プランクトンはポルフィリン錯体を相対的によく利用する (Hutchins *et al.*, 1999)。この観察結果を考慮すると、鉄制限海域において植物プランクトンの再生にともない海水中に放出された鉄は、同時に放出されるポルフィリン化合物の影響により真核植物プランクトンに優先的に利用され、植物プランクトン群集構造の形成に影響をおよぼす、という仮説が成立する。この仮説は以下の様な小仮説に分解することができる。

- (1) 植物プランクトンの摂餌にともない海水中に鉄イオンが放出される。
- (2) それと同時に鉄の化学形態に影響を及ぼすレベルの親和力を有する、十分な化学当量の有機配位子も放出される。
- (3) その配位子と錯形成した鉄イオンは、植物プランクトン種間で利用能の差が見られる。

これら3つの小仮説の各々を検証するため、北太平洋亜寒帯域の表層海水を用いて、3段階の培養実験を行った (Sato *et al.*, 2007a)。まず、現場海水を濾過した後に栄養塩類を加え、ピコ・ナノ植物プランクトンの濃密な群集を得た。これを、再び同所より採取した現場海水に加え、現場の動物プランクトンによる摂餌を増強させたときの溶存鉄濃度や有機鉄配位子濃度を測定し、コントロール実験の結果と比較した。ついで、培養終了後の海水を濾過し、藻類培養株を添加して増殖をモニタリングし、海水中の鉄の利用能を調べた。その結果、植物プランクトンの密度を増した系においては植物プランクトンの消費も増えており、それに応じて溶存鉄および有機鉄配位子の濃度もより大きく増加していた。また、より多くの配位子が蓄積した海水ほど植物プランクトンの増殖は抑制され (Fig. 3)、再生された鉄は生物利用能が高くないことが示唆された。増殖抑制効果は珪藻に対してはシアノバクテリアや緑藻よりも低かったことから、鉄制限海域における摂餌にともない鉄再生は植物プランクトン群集構造を変化させるトリガーになる可能性がある。

5. ピコ・ナノプランクトンの摂餌と被食

ピコ・ナノ植物プランクトンはナノサイズの鞭毛虫やそれよりやや大きい繊毛虫などの動物プランクトンによ

る摂餌を受けている。その摂餌速度は摂餌者と餌粒子の遭遇確率に依存しているため、生物を含まない濾過海水で天然群集を希釈すると、餌生物の内的増殖速度は変化しない一方で、被食速度は減少していく。よって、希釈率に対して餌生物のみかけの増殖速度 (= 内的増殖速度と被食速度の差) をプロットすると希釈していない海水における被食速度が推定可能である。この技術は希釈培養法 (Landry and Hassett, 1982) と呼ばれ、ピコ・ナノ植物プランクトンの内的増殖速度と被食速度を簡便に求める方法として広く用いられている。希釈培養法は「どの生物が食べられているか」を測定するには極めて優れた方法であるが、原理上「どの生物が食べているか」の情報を得ることができない。これを補完するのが、異なる孔径のフィルターで濾過して作製した摂餌者の組成の異なる海水を培養し、餌生物の増殖を比較することによってそれぞれの摂餌者の寄与を見積る分画培養法である。

しかし、分画培養法は用いるフィルターの孔径と生物学的な分類のサイズの境界が必ずしも一致しないことや、フィルターの孔径よりも大きい生物もすり抜けることがあること (Stockner *et al.*, 1990) などにより、厳密なサイズ分画が不可能であり、結果の解釈は定性的なものになりがちである。そこで、筆者はむしろ分画が不完全なことを利用し、摂餌者の組成が異なる各海水について重回帰分析をすることにより、摂餌者の各群による摂餌への寄与を見積る手法を開発した (Sato *et al.*, 2007b)。海水を2から200 μm の異なる目合のフィルターで濾過し、動物プランクトンの組成の異なる複数の海水を作製した。理想的にはある目合を境にある種のプランクトンがまったくいないか元の海水と同じだけ存在するかなるが、実際には分画が不完全なことから、画分ごとになだらかに動物プランクトン密度の異なる海水が作製される。従属栄養性ナノ鞭毛虫と繊毛虫ではその平均細胞サイズが異なるため、画分ごとにこれら2種の動物プランクトンの比も異なる海水ができる。これらの海水をそれぞれ培養し、各画分における植物プランクトンの見目の増殖速度および動物プランクトン密度を測定した。見かけの増殖速度は内的増殖速度と各動物プランクトンから受ける摂餌速度の線型結合であるとの仮定のもと重回帰分析を行うことで、それぞれのパラメータを推定し

た。その結果は過去培養株などを用いて得られた濾水速度の範囲内にあり、手法の妥当性が裏付けられた。しかし一方で、回帰が有意でない場合も見られた。これは、この二者のみを植物プランクトンの摂餌者として考慮するだけでは不完全である可能性を示唆している。たとえば、顕微鏡下での観察では植物プランクトンとして計数されてしまう混合栄養生物の影響が考えられる。

混合栄養生物とは、無機炭素から有機炭素を同化する独立栄養と、外部から有機物そのものを同化する従属栄養を一つの生物体の中で両立する生物のことである。ほとんどの生物、特に植物プランクトンは何らかの溶存有機物を細胞外から取り込むことができる広義の混合栄養生物であるが、ここでは混合栄養における従属栄養を粒子態物質の取り込みに限るという狭い意味での定義を用いる (Flynn *et al.*, 2013)。植物プランクトンにおける粒子食は、内湾における渦鞭毛藻類の大量発生の機構として古くから知られている (Burkholder *et al.*, 2008)。しかし、外洋の比較的小型のナノプランクトン、時にピコプランクトンにおいても広くみられる現象であることが明らかになったのは比較的近年のことである (Zubkov and Tarran, 2008; Sanders and Gast, 2012)。

混合栄養生物は炭素のほか、窒素やリン、鉄といった栄養塩をより小さい生物が取り込んだものを利用することでサイズによる不利を克服することができる一方、細胞内に光合成器官と摂餌器官を同時にもたなければならず、資源の投資が大きくなるという不利な点も負っている。しかし、このような機構は栄養塩が枯渇する外洋表層において比較的大型の植物プランクトンが増殖を維持する上で有利であると考えられており、数値モデルによって水柱の安定が混合栄養生物の優位をもたらすことが示されている (Mitra *et al.*, 2014)。フィールドにおける観測や測定においても、外洋表層における植物プランクトンによる摂餌は数多く観察されている (Zubkov and Tarran, 2008; Hartmann *et al.*, 2012)。また、筆者らの中部太平洋における観測では、粒子食を行うナノ植物プランクトンの比率は亜熱帯循環域で他の海域より高く、リン酸塩濃度と負の相関を示した (Sato *et al.*, in press)。これらの結果は、混合栄養という戦略が貧栄養海域での生存に有効である可能性を示唆するものである。また、第2章で紹介したように、ピコ・ナノ植物プランクトン

の平均細胞サイズが熱帯・亜熱帯においてリン酸塩濃度と負の相関を示す (Sato *et al.*, 2015) ことも、比較的細胞サイズの大きい混合栄養生物の寄与の変化という観点から説明することも可能である。混合栄養生物は摂餌器官を細胞内にもたなければならぬため、完全独立栄養生物と比較して細胞サイズが大きくなるためである。

6. おわりに

本論文においては、ピコ・ナノプランクトン、特に外洋におけるピコ・ナノ植物プランクトンについて、組成と現存量、栄養塩の利用と増殖、被食という3つの観点から、その生態系における重要性の一端を明らかにするために筆者らが行ってきた研究を関連研究とともに紹介した。

太平洋の広汎な海域において、フローサイトメトリーを用いて得られたピコ・ナノ植物プランクトンの群集構造を示した。既往研究で報告されていたグループに加え、比較的限られた地域に出現するナノシアノバクテリアやクリプト藻といったグループの水平分布からは、2つのグループの特徴的な生存戦略が強く示唆された。より分類群を詳細に解析するためには、今後は分子生物学的手法の導入がますます主流になっていくであろう。しかし、船上で即時に高時空間分解能でピコ・ナノ植物プランクトンの群集構造を知ることのできるフローサイトメトリーは今後も重宝されるであろう。

リン酸塩の枯渇は微生物によるモノエステルの加水分解酵素の活性を高めることは広く知られていたが、ジエステルの加水分解酵素の活性も同時に高まることも明らかになった。しかし、ジエステル加水分解速度はモノエステルのそれと比べると1桁以上低く、核酸のような特殊な構造のものを除いて、ジエステルは外洋表層においては生物的に不活性な画分であることが示唆された。

鉄の不足が生物生産を制限するような海域では、再生により海水中に供給される鉄が重要な役割を担っている。ピコ・ナノ植物プランクトンの被食にともなって海水中に放出される鉄は同時に海水中に放出される配位能をもつ有機物の影響を受け、植物プランクトンによるその利用能は無機溶存鉄と比べて低いことが明らかになった。しかも、その有機物による利用能の低下は、珪藻よりも

シアノバクテリアや緑藻において顕著に現れ、再生鉄の利用能が植物プランクトン群集構造に影響をおよぼす可能性が示唆された。

プランクトン食物網構造を定性的に理解する手法として用いられてきた分画培養法に重回帰分析を組み合わせることで、生物量が比較的多い沿岸域においては、動物プランクトングループ別に摂餌速度を定量的に見積もることができることがわかった。実際に現場に適用した場合、回帰が有意でない場合があり、これを説明する要因として混合栄養生物の存在が示唆された。混合栄養生物は外洋においても重要なコンポーネントであり、栄養塩の欠乏が強くなるほどその重要性を増す可能性がある。混合栄養生物は栄養塩濃度が極めて低い海域で比較的大型のナノ植物プランクトンが生物量を維持している機構を説明するかもしれない。今後、この仮説を検証するために、外洋プランクトン生態系における混合栄養生物の役割を定量的に評価していく必要がある。

謝 辞

このたび、名誉と伝統ある日本海洋学会岡田賞に選出いただき、誠に光栄に存じます。推薦ならびに選考に携わられたすべての先生方および委員の皆様には厚く御礼申し上げます。今回このような栄誉をいただくに値する研究成果は当然独力では成し遂げることはかなわず、多数の皆様の有形無形のお力添えによるものです。東京大学の古谷研教授には学生時代においては指導教員として、研究者・海洋学者としての基礎の基礎からご指導いただき、現職においては上司そして共同研究者としてこれまで目の覚めるような議論と啓発をいただきました。特に研究活動における健全な批判的精神は今でも、そしてこれからも私にとっては座右のものとなりました。深く感謝申し上げます。長崎大学の武田重信教授には微量金属測定に必須の洗浄・サンプリング・測定の技術から論文の添削にいたるまで、研究者としての土台を授けていただきました。心より御礼申し上げます。

東京海洋大学の橋濱史典博士、海洋研究開発機構の塩崎拓平博士とはこれまで数多くの共同研究とデータの交換を通じて時には闊達に、時には精緻に、議論を重ねることができました。お二方に加え、長崎大学の近藤能子

博士、水産研究・教育機構の北島聡博士、児玉武稔博士をはじめとする東京大学水圏生物環境学研究室のメンバーとの日々は私の研究者としての欠くことのできない一部分となっております。

私の研究活動の多くは研究船の上で行われたものです。海洋研究開発機構白鳳丸、淡青丸、みらい、東京海洋大学海鷹丸、長崎大学長崎丸、ワシントン大学 Thomas G. Thompson 号、水産研究・教育機構若鷹丸の士官・船員の皆様には観測・研究の円滑な進行のため多大なご協力をいただきました。また、500 日を超える乗船生活をともに過ごした乗船研究者の皆様のご協力も忘れることはできません。東京大学大気海洋研究所観測研究推進室および株式会社マリン・ワーク・ジャパンの皆様による観測支援には心より感謝申し上げます。

研究とは離れた環境でくつろぎの時間をくれるすべての友人たちは、研究に新たな気持ちで向き合うための癒しとインスピレーションを与えてくれることに感謝しております。そして私を大学院博士課程まで進学させていただいた両親と家族には、この年齢になってあらためて感謝と尊敬の念が増す次第です。

References

- Boyd, P. W., A. J. Watson, C. S. Law, E. R. Abraham, T. Trull, R. Murdoch, D. C. E. Bakker, A. R. Bowie, K. O. Buesseler, H. Chang, M. Charette, P. Croot, K. Downing, R. Frew, M. Gall, M. Hadfield, J. Hall, M. Harvey, G. Jameson, J. LaRoche, M. Liddicoat, R. Ling, M. T. Maldonado, R. M. McKay, S. Nodder, S. Pickmere, R. Pridmore, S. Rintoul, K. Safi, P. Sutton, R. Strzepek, K. Tanneberger, S. Turner, A. Waite, and J. Zeldis (2000): A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. *Nature*, **407**, 695–702.
- Brum, J. R. (2005): Concentration, production and turnover of viruses and dissolved DNA pools at Stn ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre. *Aquat. Microb. Ecol.*, **41**, 103–113.
- Burkholder, J. M., P. M. Glibert, and H. M. Skelton (2008): Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, **8**, 77–93.
- DiTullio, G. R., M. E. Geesey, J. M. Maucher, M. B. Alm, S. F. Riseman, and K. W. Bruland (2005): Influence of iron on algal community composition and physiological status in the Peru upwelling system. *Limnol. Oceanogr.*, **50**, 1887–1907.
- Dron, A., S. Rabouille, P. Clauquin, B. Le Roy, A. Talec, and A. Sciandra (2012): Light-dark (12:12) cycle of carbon and nitrogen metabolism in *Crocospaera watsonii* WH8501: relation to the cell cycle. *Environ. Microbiol.*, **14**, 967–981.
- Duhamel, S., S. T. Dyrman, and D. M. Karl (2010): Alkaline phosphatase

- activity and regulation in the North Pacific Subtropical Gyre. *Limnol. Oceanogr.*, **55**, 1414–1425.
- DuRand, M. D., R. E. Green, H. M. Sosik, and R. J. Olson (2002): Diel variations in optical properties of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae). *J. Phycol.*, **38**, 1132–1142.
- Flynn, K. J., D. K. Stoecker, A. Mitra, J. A. Raven, P. M. Glibert, P. J. Hansen, E. Granéli, and J. M. Burkholder (2013): Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *J. Plankt. Res.*, **35**, 3–11.
- Grabowski, M. N. W., M. J. Church, and D. M. Karl (2008): Nitrogen fixation rates and controls at Stn ALOHA. *Aquat. Microb. Ecol.*, **52**, 175–183.
- Hartmann, M., C. Grob, G. A. Tarran, A. P. Martin, P. H. Burkhill, D. J. Scanlan, and M. V. Zubkov (2012): Mixotrophic basis of Atlantic oligotrophic ecosystems. *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **109**, 5756–5760.
- Hashihama, F., K. Furuya, S. Kitajima, S. Takeda, T. Takemura, and J. Kanda (2009): Macro-scale exhaustion of surface phosphate by dinitrogen fixation in the western North Pacific. *Geophys. Res. Lett.*, **36**, doi: 10.1029/2008gl036866.
- Hoppe, H. G. (2003): Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia*, **493**, 187–200.
- Hutchins, D. A., A. E. Witter, A. Butler, and G. W. Luther III (1999): Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature*, **400**, 858–861.
- Ishizaka, J., H. Kiyosawa, K. Ishida, K. Ishikawa, and M. Takahashi (1994): Meridional distribution and carbon biomass of autotrophic picoplankton in the central north Pacific Ocean during late northern summer 1990. *Deep-Sea Res. I*, **41**, 1745–1766.
- Karl, D. M., L. Beversdorf, K. M. Björkman, M. J. Church, A. Martinez, and E. F. DeLong (2008): Aerobic production of methane in the sea. *Nature Geoscience*, **1**, 473–478.
- Lance, V. P., M. R. Hiscock, A. K. Hiltig, D. A. Stuebe, R. R. Bidigare, W. O. Smith, and R. T. Barber (2007): Primary productivity, differential size fraction and pigment composition responses in two Southern Ocean in situ iron enrichments. *Deep-Sea Res. I*, **54**, 747–773.
- Landry, M. R., and R. P. Hassett (1982): Estimating the grazing impact of marine micro-zooplankton. *Mar. Biol.*, **67**, 283–288.
- Mackey, M. D., D. J. Mackey, H. W. Higgins, and S. W. Wright (1996): CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **144**, 265–283.
- Marañón, E., P. M. Holligan, R. Barciela, N. González, B. Mouriño, M. J. Pazó, and M. Varela (2001): Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **216**, 43–56.
- Marinov I., S. C. Doney, and I. D. Lima (2010): Response of ocean phytoplankton community structure to climate change over 21st century: partitioning the effects of nutrients, temperature and light. *Biogeosciences*, **7**, 3941–3959.
- Martin, J. H., K. H. Coale, K. S. Johnson, S. E. Fitzwater, R. M. Gordon, S. J. Tanner, C. N. Hunter, V. A. Elrod, J. L. Nowicki, T. L. Coley, R. T. Barber, S. Lindley, A. J. Watson, K. Van Scoy, C. S. Law, M. I. Liddicoat, R. Ling, T. Stanton, J. Stockel, C. Collins, A. Anderson, R. Bidigare, M. Ondrusek, M. Latasa, F. J. Millero, K. Lee, W. Yao, J. Z. Zhang, G. Friederich, C. Sakamoto, F. Chavez, K. Buck, Z. Kolber, R. Greene, P. Falkowski, S. W. Chisholm, F. Hoge, R. Swift, J. Yungel, S. Turner, P. Nightingale, A. Hatton, P. Liss, and N. W. Tindale. (1994): Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, **371**, 123–129.
- Mitra, A., K. J. Flynn, J. M. Burkholder, T. Berge, A. Calbet, J. A. Raven, E. Graneli, P. M. Glibert, P. J. Hansen, D. K. Stoecker, F. Thingstad, U. Tillmann, S. Vage, S. Wilken, and M. V. Zubkov (2014): The role of mixotrophic protists in the biological carbon pump. *Biogeosciences*, **11**, 995–1005.
- Morán, X. A. G., Á. López-Urrutia, A. Calvo-Díaz, and W. K.W. Li (2010): Increasing importance of small phytoplankton in a warmer ocean. *Glob. Change. Biol.*, **16**, 1137–1144.
- Morel, A., Y.-W. Ahn, F. Partensky, D. Vaulot, and H. Claustre (1993): *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: a comparative study of their size, pigmentation and related optical properties. *J. Mar. Res.*, **51**, 617–649.
- Neveux, J., F. Lantoiné, D. Vaulot, D. Marie, and J. Blanchot (1999): Phycoerythrins in the southern tropical and equatorial Pacific Ocean: Evidence for new cyanobacterial types. *J. Geophys. Res.*, **104**, 3311–3321.
- Not, F., K. Valentin, K. Romari, C. Lovejoy, R. Massana, K. Tobe, D. Vaulot, and L. K. Medlin (2007): Picobiliphytes: a marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. *Science*, **315**, 253–255.
- Odate, T., and Y. Maita (1988): Regional variation in the size composition of phytoplankton communities in the western North Pacific Ocean spring 1985. *Biol. Oceanogr.*, **6**, 65–78.
- Olson, R. J., A. Shalapyonok, and H. M. Sosik (2003): An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep-Sea Res. I*, **50**, 301–315.
- Olson, R. J., D. Vaulot, and S. W. Chisholm (1985): Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res.*, **32**, 1273–1280.
- Paul, J. H., W. H. Jeffrey, and M. F. Deflaun (1987): Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 170–179.
- Round, F. E., R. M. Crawford, and D. G. Mann (1990): *The Diatoms: Morphology and Biology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rue, E. L., and K. W. Bruland (1995): Complexation of iron (III) by natural organic-ligands in the central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Mar. Chem.*, **50**, 117–138.
- Sanders, R. W., and R. J. Gast (2012): Bacterivory by phototrophic picoplankton and nanoplankton in Arctic waters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **82**, 242–253.
- Sato, M., F. Hashihama, S. Kitajima, S. Takeda, and K. Furuya (2010): Distribution of nano-sized *Cyanobacteria* in the western and central Pacific Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.*, **59**, 273–282.
- Sato, M., T. Kodama, F. Hashihama, and K. Furuya (2015): The effects of diel cycles and temperature on size distributions of pico- and nanophytoplankton in the subtropical and tropical Pacific Ocean. *Plankton Benthos Res.*, **10**, 26–33.
- Sato, M., R. Sakuraba, and F. Hashihama (2013): Phosphate monoesterase and diesterase activities in the North and South Pacific Ocean. *Biogeosciences*, **10**, 7677–7688.
- Sato, M., T. Shiozaki, and F. Hashihama (in press): Distribution of mix-

- otrophic nanoflagellates along the latitudinal transect of the central North Pacific. *J. Oceanogr.*, doi: 10.1007/s10872-016-0393-x.
- Sato, M., S. Takeda, and K. Furuya (2006): Effects of long-term sample preservation on flow cytometric analysis of natural populations of pico- and nanophytoplankton. *J. Oceanogr.*, **62**, 903–908.
- Sato, M., S. Takeda, and K. Furuya (2007a): Iron regeneration and organic iron (III)-binding ligand production during in situ zooplankton grazing experiment. *Mar. Chem.*, **106**, 471–488.
- Sato, M., S. Takeda, and K. Furuya (2009): Responses of pico- and nanophytoplankton to artificial iron infusions observed during the second iron enrichment experiment in the western subarctic Pacific (SEEDS II). *Deep-Sea Res. II*, **56**, 2745–2754.
- Sato, M., T. Yoshikawa, S. Takeda, and K. Furuya (2007b): Application of the size-fractionation method to simultaneous estimation of clearance rates by heterotrophic flagellates and ciliates of pico- and nanophytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **349**, 334–343.
- Stockner, J. G., M. E. Klut, and W. P. Cochlan (1990): Leaky filters: A warning to aquatic ecologists. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**, 16–23.
- Suzuki, K., A. Hinuma, H. Saito, H. Kiyosawa, H. Liu, T. Saino, and A. Tsuda (2005): Responses of phytoplankton and heterotrophic bacteria in the northwest subarctic Pacific to in situ iron fertilization as estimated by HPLC pigment analysis and flow cytometry. *Prog. Oceanogr.*, **64**, 167–187.
- 鈴木昌弘, 塚崎あゆみ, 橋濱史典, 佐藤光秀, 梅澤有 (2015): 貧栄養海域のリンの循環過程と解析手法. *地球環境*, **20**, 77–88.
- Tsuda, A., S. Takeda, H. Saito, J. Nishioka, Y. Nojiri, I. Kudo, H. Kiyosawa, A. Shiimoto, K. Imai, T. Ono, A. Shimamoto, D. Tsumune, T. Yoshimura, T. Aono, A. Hinuma, M. Kinugasa, K. Suzuki, Y. Sohrin, Y. Noiri, H. Tani, Y. Deguchi, N. Tsurushima, H. Ogawa, K. Fukami, K. Kuma, and T. Saino (2003): A mesoscale iron enrichment in the western Subarctic Pacific induces a large centric diatom bloom. *Science*, **300**, 958–961.
- van den Berg, C. M. G. (1995): Evidence for organic complexation of iron in seawater. *Mar. Chem.*, **50**, 139–157.
- Vaulot, D., C. Courties, and F. Partensky (1989): A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry*, **10**, 629–635.
- Vaulot, D., and D. Marie (1999): Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *J. Geophys. Res.*, **104**, 3297.
- Walsby, A. E. (1978): The properties and buoyancy-providing role of gas vacuoles in *Trichodesmium* Ehrenberg. *British. Phycol. J.*, **13**, 103–116.
- Wang, X. D., Y. Wang, and W. O. Smith (2011): The role of nitrogen on the growth and colony development of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae). *Eur. J. Phycol.*, **46**, 305–314.
- Yamaguchi, H. (2005): Utilization of phosphate diester by the marine diatom *Chaetoceros ceratosporus*. *J. Plankt. Res.*, **27**, 603–606.
- Young, C., and E. Ingall (2010): Marine dissolved organic phosphorus composition: Insights from samples recovered using combined electro dialysis/reverse osmosis. *Aquat. Geochem.*, **16**, 563–574.
- Zehr, J. P., J. B. Waterbury, P. J. Turner, J. P. Montoya, E. Omoregie, G. F. Steward, A. Hansen, and D. M. Karl (2001): Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*, **412**, 635–638.
- Zubkov, M. V., and G. A. Tarran (2008): High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature*, **455**, 224–226.

Studies on the dynamics of pico- and nanophytoplankton in oligotrophic oceans in relation to nutrient availability

Mitsuhide Sato*

Abstract

Pico- and nanophytoplankton are important primary producers in the open ocean and form the foundations of food webs. The author has studied the composition and spatial distribution, nutrient acquisition and grazing loss of pico- and nanophytoplankton. First, the spatial distribution and size composition of pico- and nanophytoplankton have been revealed by flow cytometry and related with their physiological characteristics and environmental factors. Second, the author focused on the utilization of phosphorus and iron, as a driving factor of pico- and nanophytoplankton community formation, with special emphasis on organic phosphorus compounds and organic iron complexes, and obtained some novel insights from field experiments. Third, a new methodology was investigated to estimate the grazing rates of different microzooplankton groups on pico- and nanophytoplankton based on the size-fractionation method. These results were used to study the characteristic nutrient acquisition strategies of pico- and nanophytoplankton in the open oligotrophic ocean.

Key words : Pico- and nanophytoplankton, flow cytometry, nutrients, iron, mixotrophy

(Corresponding author's e-mail address : asatom@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

(Received 1 September 2016 ; accepted 1 November 2016)

(Copyright by the Oceanographic Society of Japan, 2017)

* Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo
Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan
TEL: +81358415292 FAX: +81358415308
e-mail: asatom@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp