

博士論文（要約）

北太平洋におけるリン酸塩および易分解性溶存態リンの  
動態に関する研究

山口 珠葉

# 目次

## 第1章 序論

### 1-1. 背景

1-1-1. 海洋におけるリン	1
1-1-2. 溶存有機態リンの構成成分	2
1-1-3. 溶存有機態リンの起源とアクティブフラックス	3
1-1-4. 易分解性溶存態リン	4
1-1-5. アルカリフォスファターゼ	5
1-1-6. 窒素固定生物のリン要求	6

1-2. 目的および本論文の構成	7
------------------	---

## 第2章 リン酸および易分解性溶存態リンの空間分布と生物可用性

2-1. 背景	9
---------	---

### 2-2. リン酸ジエステルの高感度測定手法

2-2-1. 背景および方法	10
2-2-2. 結果および考察	11

### 2-3. 北太平洋におけるリン酸および易分解性溶存態リンの空間分布と生物可用性

2-3-1. 方法	
2-3-1-1. 観測概要	12
2-3-1-2. 栄養塩分析	12
2-3-1-3. アルカリフォスファターゼ活性	13
2-3-1-4. クロロフィル <i>a</i> およびバクテリア細胞密度	15

### 2-3-2. 結果

2-3-2-1. 中部北太平洋南北ライン	
2-3-2-1-1. 環境要因	16
2-3-2-1-2. 溶存有機態リン	16
2-3-2-1-3. アルカリフォスファターゼ活性	17
2-3-2-2. 北太平洋亜熱帯域東西ライン	
2-3-2-2-1. 環境要因	20
2-3-2-2-2. 溶存有機態リン	20
2-3-2-2-3. アルカリフォスファターゼ活性	21
2-3-2-3. 冬季黒潮域および冬季西部北太平洋	
2-3-2-3-1. 環境要因	24
2-3-2-3-2. 溶存有機態リン	25
2-3-2-3-3. アルカリフォスファターゼ活性	26

### 2-3-3. 考察

2-3-3-1. リン酸モノエステルの空間分布	28
2-3-3-2. リン酸ジエステルの空間分布	30
2-3-3-3. リン酸モノエステルおよびジエステル分布の季節変化	31
2-3-3-4. リン酸モノエステルの生物利用	32
2-3-3-5. 準易分解性ジエステルの生物利用	34

第3章 リン酸塩および易分解性溶存態リンの時系列変動	
3-1. 背景	37
3-2. 方法	37
3-3. 結果	
3-3-1. 環境要因	38
3-3-2. 溶存有機態リン	38
3-3-3. アルカリフォスファターゼ活性	40
3-4. 考察	
3-4-1. 当該海域の特徴	42
3-4-2. リン酸塩*およびリン酸モノエステルの時系列変動	43
3-4-3. 表層上部におけるリンの再生機構	44
3-4-4. アルカリフォスファターゼ活性の時系列変動	45
第4章 窒素固定生物のリン酸エステル利用	
4-1. 背景	47
4-2. 北太平洋外洋域における現場観測	
4-2-1. 方法	47
4-2-2. 結果	48
4-2-3. 考察	49
4-3. 室内培養実験	
4-3-1. <i>T. erythraeum</i> ECS0305 株におけるモノエステラーゼ活性	
4-3-1-1. 方法	50
4-3-1-2. 結果	52
4-3-1-3. 考察	52
4-3-2. 窒素固定性シアノバクテリアのリン酸ジエステル利用能	
4-3-2-1. 方法	53
4-3-2-2. 結果	54
4-3-2-3. 考察	55
4-4. 窒素固定生物とリン酸エステル	55
第5章 リン利用における微量金属要求性	
5-1. 背景	57
5-2. 方法	
5-2-1. 北緯 23 度線冬季	57
5-2-2. 北緯 23 度線夏季	58
5-3. 結果	
5-3-1. DOP 濃度の手法別比較	60
5-3-2. 北緯 23 度線冬季	
5-3-2-1. 各種リン化合物	60
5-3-2-2. 微生物群集組成	61
5-3-2-3. アルカリフォスファターゼ活性	61

5-3-3. 北緯 23 度線夏季	
5-3-3-1. 各種リン化合物	62
5-3-3-2. 微生物群集組成と Chl <i>a</i>	63
5-3-3-3. アルカリフォスファターゼ活性	64
5-3-4. 現場金属濃度の見積もり	65
5-4. 考察	
5-4-1. DOP <sub>mesh</sub> の構成成分	66
5-4-2. 北太平洋亜熱帯域におけるリンー微量金属共制限	67
5-4-3. 現場のリン酸モノエステル生成速度	70
第 6 章 動物プランクトンのリン排泄	
6-1. 背景	71
6-2. 短期飼育	
6-2-1. 方法	72
6-2-2. 結果	
6-2-2-1. DOP 濃度の手法別比較	73
6-2-2-1. リン酸塩排泄速度	74
6-2-2-2. DOP*排泄速度	75
6-2-3. 考察	
6-2-3-1. リン酸塩および DOP*排泄速度	76
6-2-3-2. 排泄速度の昼夜変動とアクティブフラックス	77
6-3. 継続飼育	
6-3-1. 方法	79
6-3-2. 結果	
6-3-2-1. 初期現場環境	79
6-3-2-2. カイアシ類	80
6-3-2-3. オキアミ類	81
6-3-2-4. バクテリア細胞密度	81
6-3-3. 考察	
6-3-3-1. リン排泄速度の経時変化	82
6-3-3-2. 現場リン酸モノエステル貯留への寄与	84
6-3-3-3. バクテリア群集の影響	85
第 7 章 総合考察	
7-1. リン酸モノエステルの動態	86
7-2. リン酸ジエステルの動態	89
7-3. 北太平洋における溶存有機態リンの動態	91
摘要	94
謝辞	95
引用文献	97
図表	109

## 略語表

AP; alkaline phosphatase

APA; alkaline phosphatase activity

bisMUP; bis-(4-methylumbelliferyl) phosphate

bisNPP; bis-(*p*-nitrophenyl) phosphate

Chl *a*; chlorophyll *a*

C<sub>microbe</sub>; 炭素換算した植物プランクトンおよびバクテリア現存量の和

DE; phosphoric diester

DEA; diesterase activity

DEA<sub>CHL</sub>; Chl *a* で標準化した DEA

DEA<sub>high</sub>; 基質濃度 4  $\mu$ M 時における DEA

DEA<sub>low</sub>; 基質濃度 100 nM 時における DEA

DIP; dissolved inorganic phosphorus

DOP; dissolved organic phosphorus

DOP\*; 滅菌ろ過した海水における DOP

DOP<sub>mesh</sub>; 100  $\mu$ m メッシュでろ過した海水における DOP

DW; dry weight

LDOP; labile dissolved organic phosphorus

ME; phosphoric monoester

MEA; monoesterase activity

MEA<sub>CHL</sub>; Chl *a* で標準化した MEA

MEA<sub>high</sub>; 基質濃度 2  $\mu$ M 時における MEA

MEA<sub>low</sub>; 基質濃度 100 nM 時における MEA

MUF; 4-methylumbelliferone

MUP; 4-methylumbelliferyl phosphate

N+N; nitrate+nitrite

(+P) ; リン酸塩添加培地の意味

(-P) ; リン酸塩無添加培地の意味

PAR; photosynthetic active radiation

*p*NP; *p*-nitrophenol

*p*NPP; *p*-nitrophenyl phosphate

SCM; surface chlorophyll maximum

TDP; total dissolved phosphorus

リン酸塩\*; アザイド溶液を添加し、培養を行ったあとのリン酸塩濃度

## 第1章 序論

### 1-1. 背景

#### 1-1-1. 海洋におけるリン

リンは生体にとって必要不可欠な元素であり、DNA や生体膜を構成する他、高エネルギーリン酸結合を有する ATP などとして生体活動の維持を担う。その生物学的な重要性から、リンは海洋における主要な栄養素の 1 つであるが、海洋表層では植物プランクトンや従属栄養性バクテリアなどの微生物による利用に対してその供給が不足しやすい状態にある。その要因として、リン同様に重要な生元素である窒素とは異なり、大気からの流入がほとんどないこと (Froelich et al. 1982; Paytan & McLaughlin 2007)、ならびに物理的に安定した水塊構造により深層からの供給が乏しいことが挙げられる。

リンは海水中で多種多様な存在形態、すなわち鉱物粒子などと結合した粒状無機態リン、生体やデトリタスなどを含む粒状有機態リン、リン酸塩に代表される溶存無機態リン (DIP: dissolved inorganic phosphorus)、そしてリン酸エステルなどを含む溶存有機態リン (DOP: dissolved organic phosphorus) の形態をとることが知られている。海水中の粒子サイズは本来連続的なスペクトラム上にあるが、ここでの溶存あるいは粒子態の定義については、便宜的に操作上用いる各種フィルターの孔径が採用される。本研究では、孔径およそ  $0.7\ \mu\text{m}$  のガラス繊維ろ紙 GF/F フィルター (Whatman, GE Healthcare, USA) を基準とした。

一般に、これらの存在形態の中で微生物群集にとって最も利用しやすいのは DIP に含まれるリン酸塩である。リン酸塩はその生物可用性の高さに加えて、海水中の濃度測定手法が比較的簡便であることから、これまでに多くの知見が集積されている。リン酸塩は一般に沿岸域や深層などで約  $1\text{--}3\ \mu\text{M}$  と高い一方 (Meybeck 1982; Paytan & McLaughlin 2007)、サルガッソー海などの表層ではしばしば分析法の検出限界以下となる ( $< 50\ \text{nM}$ , Michaels & Knap 1996)。通年にわたり成層が発達する亜熱帯海域では深層からの栄養塩供給が乏しいために表層での栄養塩濃度が極めて低く、貧栄養海域と呼ばれる。貧栄養海域は栄養塩環境が一樣で変化に乏しい「海の砂漠」としてこれまで認識されてきた。しかし、近年の高感度栄養塩測定技術の向上により、貧栄養海域の中でも栄養塩がナノモルレベルで変動することが明らかとなった (Wu et al. 2000; Cavendar-Bares et al. 2001; Hashihama et al. 2009)。リン酸塩が枯渇した貧栄養海域では、微生物は自身のリン要求を満たすため DIP 以外のリン化合物、とりわけ DOP を利用することでリン酸を得ることが知られており (Yentsch et al. 1972; Hoppe 2003)、したがってこれらの海域ではリン酸塩のみならず DOP もまた生物生産を支える重要なリン源である。

### 1-1-2. 溶存有機態リンの構成成分

リン酸塩の枯渇した海域において代替のリン供給源となりうる DOP は、その化学構造の違いから以下の 3 つの化合物に大別される。

(1)リン酸エステル: リン酸とアルコールが縮合した化合物であり、リン酸モノエステル (ME: phosphoric monoester)、リン酸ジエステル (DE: phosphoric diester)、リン酸トリエステルが含まれる。リン酸エステルはヌクレオチド、ホスホアミノ酸、糖リン酸、リン脂質など生体にとって重要なはたらきを担う物質に多く含まれる。ATP などの特定のヌクレオチドに関しては、放射性同位体を用いた取り込み速度の測定から、海水中での高い反応性が明らかとなった (Paul et al. 1987)。

(2)ホスホン酸: 生体内ではホスホノ脂質などとして存在しており、C-P 結合を含むリン化合物である。その分解にはホスホナターゼもしくは C-P リアーゼを用いる 2 通りがあり (Wanner 1994)、除去付加酵素である C-P リアーゼはホスホナターゼよりも多様なホスホン酸化合物を分解できる (Kononova & Nesmeyanova 2002)。ホスホン酸は C-P 結合の活性化エネルギーの高さや、生体内と環境中の存在比の違いから、これまで生物利用されにくい物質と考えられてきたが (Clark et al. 1998)、近年窒素固定性シアノバクテリア *Trichodesmium* が C-P リアーゼを有することが明らかになるなど (Dyhrman et al. 2006)、ホスホン酸の生物利用への注目が高まっている。

(3)ポリリン酸: リン酸基が繰り返し連なったポリマー構造をしており厳密には有機物ではない。しかしながら、DOP が全溶存リン (TDP: total dissolved phosphorus) と DIP との差分として計算される都合上、ポリリン酸は便宜的に DOP に含まれる化合物群として検出される。ポリリン酸は、生体内では糖リン酸やヌクレオチドなどとして存在し、そのリン酸残基の長さは様々であるが、DOP の中でも特に低分子画分に多く含まれるとされる (Young & Ingall 2010)。

ポリリン酸は細胞内に顆粒状のリン貯蔵物質として蓄積される場合があり、そのような細胞内へのポリリン酸の蓄積には次の 3 パターンがある。一つ目は DIP が豊富な環境においてリンが過剰に取り込まれる場合 (luxury uptake: Diaz et al. 2008)、二つ目は低リン酸塩環境において一時的に DIP が供給された際にリンが取り込まれる場合 (overplus response: Bolier et al. 1992)、そして三つ目がリン酸塩枯渇環境で DOP 由来のリンが取り込まれる場合 (overplus like response: Orchard et al. 2010b) である。このように、ポリリン酸顆粒の蓄積には DOP に含まれる他の化合物群も関わるものの、その機構には未だ不明な点が残る。こうして蓄積されたポリリン酸はリン欠乏時に分解されリン源として利用される。

Young & Ingall (2010) は、高分子 DOP だけでなく低分子 DOP も含めた新しい解析手法を用いて、 $^{31}\text{P}$ -NMR 解析から上記の 3 化合物が DOP のそれぞれ約 80–85%、5–10%、8–13% を占めること、またこの比率が海域によってほとんど変わらないことを明らかにした。

### 1-1-3. 溶存有機態リンの起源とアクティブフラックス

外洋域における DOP は概ね数十から数百 nM の範囲にあり、リン酸塩とは反対に海表面付近で高く、深度とともに低下するというスキベンジング型の鉛直分布がほぼ全球的に共通する (Paytan & McLaughlin 2007; Karl & Bjorkman 2015)。また、この DOP と同様にフィルターを通過する有機物として定義される溶存有機物 (DOM: dissolved organic matter) については、DOM 中の炭素・窒素・リンの元素比からは、リンが窒素や炭素よりも海洋表層などの浅い深度で積極的に無機化される (Clark et al. 1998)。これらを併せると、上述の DOP 鉛直分布はその正味の生成が海洋表層において盛んであることを示唆する。

ここで、DOP およびこれを包含する DOM は細胞からの排出や滲出のほか、捕食やウィルス浸食に伴う細胞の損傷や崩壊による漏出などの複合要因によって水柱内に供給される (Karl & Bjorkman 2015)。特に生体から排出される DOP について、植物プランクトン群集が排出する DOM 量は海表面付近で最大になることが東部北太平洋で報告されている (Anderson & Zeutschel 1970) ほか、動物プランクトンでは一日の間にそのリン含有量のおよそ半分を DOP として排出する (Pomeroy et al. 1963) との研究もある。さらに、室内培養実験では 8 種の植物プランクトンそれぞれが排出した DOP が同種または他種間で再同化されることが確認され、その同化率は DOP を生成する種と利用する種の組み合わせによって様々であることがわかった (Kuenzler 1970)。したがって、これら生体から排出される DOP は表層におけるリンの動態に一定の役割を果たすこと、またその重要性は排出された DOP の化学組成や生物可用性などの特性に左右されることが示唆された。しかしながら、具体的にどのような DOP が生体から排出されるのかという点での知見は未だ乏しい。

また、一般に生元素動態においては系内での再生機構のみならず、系外への移出、例えば生物ポンプによる表層からの除去過程も考慮すべき重要な因子である。リンにおいては、DOM 中のリンと同様に、沈降粒子中のリンもまた浅い深度で選択的に無機化あるいは溶存化される (Paytan et al. 2003) ため、生物作用による深層へのリンの輸送過程としては相対的に動物プランクトンによる日周あるいは季節的鉛直移動に伴う能動的な物質輸送が重要になると考えられる。しかしながら、炭素 (Steinberg et al. 2000) や窒素 (Steinberg et al. 2002)



の場合と比べて、リンについてこの能動的な物質輸送、すなわちアクティブフラックスを実測した研究は未だ報告がない。また、経験式から理論上アクティブフラックスを算出した先行研究 (Hannides et al. 2009) では、特に DOP 排泄に関して動物プランクトンの群集組成や分類群別の排泄速度が考慮されておらず、この分野における知見の集積が未だ不十分である。

#### 1-1-4. 易分解性溶存態リン

$^{31}\text{P}$ -NMR 解析により、化学結合からみた DOP の組成については一定の見解が得られている (Young & Ingall 2010) 一方で、これらの解析手法では DOP の生物可用性については伺い知ることはできない。DOP の動態を考える上では、これら化学的な分類のみならず、生物にとっての利用のしやすさという観点からも DOP の組成を把握することが必要である。そこで、酵素によって加水分解される易分解性 DOP (LDOP: labile DOP) という分類基準が Strickland & Parsons (1972) によって提唱された。これを受けて、今日では LDOP の分析手法としてアルカリフォスファターゼ (AP: alkaline phosphate) を用いてリン酸エステル類を加水分解する研究が報告されている (Moutin et al. 2008; Duhamel et al. 2010; Suzumura et al. 2012; Hashihama et al. 2013)。LDOP はリン酸枯渇環境における重要な代替リン源であると考えられるため、特に貧栄養海域における LDOP の動態を明らかにすることは、その海域での一次生産者の生理生態を理解し、生物生産力を評価する上で必須である。

しかしながら、AP 活性に関しては様々な海域からの知見が多くある一方で、LDOP に関してはその分布などの基本的な知見が未だ乏しい。特に、外洋域における上述の研究例はいずれも LDOP の 1 成分である ME のみに焦点を当てており、多様な化合物から構成され则认为られる LDOP の全容を把握するには不十分といえる。また、LDOP の知見が乏しい要因の一つには測定手法の検出感度の課題があり、南太平洋亜熱帯域 (Moutin et al. 2008) や中部北太平洋亜熱帯域 (Duhamel et al. 2010) では、ME 濃度はそれぞれ検出限界である 20 あるいは 5 nM 以下である。Hashihama et al. (2013) もまた、高感度栄養塩測定法 (Hashihama et al. 2009) を用いたうえで、黒潮反流域では ME が表層でほぼ枯渇することを報告した。したがって、外洋域における LDOP 分析には感度の高い栄養塩測定技術が必要であることに加え、既存の分析手法では把握できない LDOP がリン源としての役割を果たす可能性が指摘される。

ここまで、リン酸塩の代替としての LDOP の役割について述べてきたが、微生物群集に

よる LDOP 利用はリン酸枯渇環境に限ったものではない。ハワイ沖では有光層内においてリン酸塩と LDOP が同時に生物利用されることが示唆された (Bjorkman & Karl 2003) ほか、有光層下部においても AP 活性の上昇がみられた (Duhamel et al. 2011)。また、表層以深では高い AP 活性が太平洋 (Koike & Nagata 1997) やインド洋 (Hoppe & Ullrich 1999) で報告されたことから、LDOP は貧栄養海域におけるリン酸塩の代用物としての役割にとどまらず、微生物種ごとのリン獲得に関する生存戦略とも関連することが予想される。

#### 1-1-5. アルカリフォスファターゼ

LDOP の生物利用の要となる AP は、リン酸塩枯渇環境でしばしば高い活性が検出されることに加え、その活性はリン酸塩の添加に対して速やかに減少する (Perry 1972) ことから、海洋におけるリン酸塩の枯渇の指標として古くから用いられてきた。AP は原核生物や真核生物を問わず幅広い生物種が保有しており、リン酸エステルを基質とする酵素の総称である。リン酸エステルは一般に分子量が大きいため、直接生体膜を透過することが少なく、そのため AP は外膜上やペリプラズム領域などにおいて発現する (Martinez & Azam 1993b)。加えて、AP は発現した外膜上から剥がれ落ちるなどして、完全に細胞から離れた場合にもその活性を数日から数週間単位で維持することから (Baltar et al. 2013)、海水中の溶存画分においても活性が確認される (Li et al. 1998; Baltar et al. 2010; Sato et al. 2013)。

AP 活性の解釈においては、水柱内の生物量に対して標準化することが求められることから、先行研究ではしばしば植物プランクトン現存量としてのクロロフィル (Chl) *a* や (Nausch 1998; Vidal et al. 2003)、バクテリア現存量としてその細胞数など (Williams & Jochem 2006)、あるいはこれら微生物群集全体として合算の細胞数や炭素換算量など (Cotner et al. 1997; Pinhassi et al. 2004; Duhamel et al. 2010) がパラメータとして用いられている。このような標準化に際しては AP 活性がこれらの懸濁態粒子に由来することを前提とする。しかしながら、生物生産の低い有光層下部やそれ以深においては全画分における AP 活性の 8 割以上を溶存画分活性が占める (Balter et al. 2010) ほか、有光層内においても溶存画分活性が全画分活性の 79% に達することもある (Li et al. 1998) など、溶存画分活性の寄与は無視することができない。したがって、観測時における AP 活性がどの画分に由来するのかを明らかにすることは、現場の微生物群集のリン欠乏度を把握する上で有効な手段である。

AP はリン酸エステル加水分解酵素の総称であるが、この酵素群は 3 つの主要な遺伝子ファミリータイプ (*phoA*, *phoD*, *phoX*) に分類される。いずれのタイプもモノエステラーゼ活

性 (MEA: monoesterase activity) とジエステラーゼ活性 (DEA: diesterase activity) のどちらも有するが (表 1) (O'Brien & Herschlag 2001; Wu et al. 2007; Rodriguez et al. 2014)、*phoA* タイプでは DEA が MEA よりも極めて低いのに対し、*phoX* タイプでは MEA とほぼ同等の DEA を有する (表 1) など、その特性は遺伝子タイプによって異なることが示唆された。

また、これら全てが補欠金属因子を必要とする金属酵素であり (Wang et al. 2005; Rodriguez et al. 2014; Yong et al. 2014)、その中でも鉄および亜鉛は海洋における微量元素元素である。微量元素とは生命活動に必須であるにも関わらず、海水中での溶解度が低く、加えて供給源が地理的に限られるために、しばしば生物の増殖制限要因となることが報告されている元素である (Martin & Fitzwater 1988)。このとき、1つの種が必ずしもすべてのタイプの AP を有するわけではなく、例えば珪藻類では *phoD* や *phoX* タイプの遺伝子はほとんど報告がない (Lin et al. 2013) 一方で、シアノバクテリアでは 1 または 2 タイプの AP を保有する場合が多くみられる (Lin et al. 2018)。海産バクテリアにおいては、*phoA* よりも *phoX* タイプが多く分類群で見つかったほか (Sebastian & Ammerman 2009)、現場の現存量では *phoD* が最も多いとされる (Luo et al. 2009)。鉄および亜鉛は特に亜熱帯海域表層において極めて低い濃度で存在する (Brown et al. 2005; Kim et al. 2015) ことをふまえると、補欠金属因子の不足は代替リン源となる LDOP の利用を制限することに繋がり、またこの金属制限の及ぶ範囲や程度は現場微生物群集の組成に大きく関わることが予想される。

#### 1-1-6. 窒素固定生物のリン要求

リン酸塩枯渇環境下では LDOP 利用が高まると考えられるが、貧栄養海域ではリン酸塩よりも硝酸塩などの無機態窒素塩の枯渇が深刻である場合が多く、窒素が生物の増殖における主な制限要因である (Tyrrell 1999)。このような厳しい窒素制限下において、他の生物種よりも有利な増殖能を持つのが窒素固定生物である。窒素固定生物はニトロゲナーゼ酵素を利用して、海水中の窒素ガスを直接アンモニアへ変換できることから、窒素制限を受けにくい。代表的な窒素固定性シアノバクテリアの *Trichodesmium* は亜熱帯海域でしばしばブルームを起こす (Capone et al. 1998) など、貧栄養海域における重要な一次生産者である。また、これらの窒素固定生物によって海洋全体では年間およそ 80 Tg (Capone et al. 1997)、北太平洋ではおよそ 13 Tg (Shiozaki et al. 2010) の窒素が固定されており、全球的な窒素動態に重要な影響を及ぼすことが明らかとなった。

このように、海洋生態系において重要な役割を担う窒素固定生物であるが、窒素制限を

受けにくい反面、その増殖の制限要因となりやすいのは鉄やリンである (Rueter 1988; Tyrrell 1999)。前述した群体性の *Trichodesmium* では、ホスホン酸 (Dyhrman et al. 2006) や亜リン酸 (Polyviou et al. 2015) 利用能が解明され、また窒素固定生物が還元的なリン (III) 化合物の動態に大きく関わることも示唆されている (Van Mooy et al. 2015)。また、単細胞性の窒素固定生物である *Crocospaera* では様々な ME 化合物を利用できる一方で、ホスホン酸利用能はないことが報告されている (Dyhrman & Haley 2006) ことから、窒素固定生物における DOP 利用は多様である可能性が指摘される。

## 1-2. 目的および本論文の構成

以上より、海洋における LDOP の生物利用は全球的なリンの動態のみならず、微量元素および窒素動態とも密接に関わることが示唆され、特に貧栄養海域では生物生産を支える重要な役割を担うと考えられる。しかしながら、LDOP の分布特性やその起源のみならず、その生物利用がどのような環境下や生物種によって促進されるのかなど、LDOP の動態に関する知見の集積が未だ不十分である。

このような背景をふまえ、本研究では LDOP として ME に加え、知見の乏しい DE に重点を置き、北太平洋外洋域におけるこれらの濃度分布、および生物可用性のパラメータとして AP 活性の時空間変動を明らかにすることを第一の目的とした。その上で、これらの分布特性から示唆された窒素固定生物との関連に加え、リン-微量元素共制限の有無、動物プランクトンのリン排泄が担うアクティブフラックスおよび DOP 供給源としての役割について明らかにすることを第二の目的とした。

第 2 章では、はじめに外洋域の希薄な栄養塩濃度に適した高感度 DE 測定手法の確立を行った。その上で、北太平洋外洋域における海域縦断・横断的な観測を行い ME、DE、MEA、および DEA の分布特性を明らかにし、そのような分布が形成される要因について考察を行った。

第 3 章では、父島沖定点における 9 日間にわたる時系列観測を通して、第 2 章で示された ME や DE の分布傾向、およびその生物利用の指標となる AP 活性の経時的な変動を明らかにし、そのような変動をもたらす要因について考察を行った。

第 4 章では、北太平洋外洋域における窒素固定速度と、LDOP 濃度および AP 活性との相互関係について考察を行うとともに、そこから示唆された仮説、すなわち ME のみならず DE が窒素固定生物にとって重要なリン源となりうる、について室内培養実験から検証を行

った。

第 5 章では、船上添加培養実験から AP の微量元素要求性について海域間比較を行い、北太平洋亜熱帯域におけるリンー微量元素共制限環境の地理的分布について検証することで、系外からの微量元素供給に対する微生物群集の潜在的な応答について明らかにした。

第 6 章では、動物プランクトンによるリンのアクティブフラックスを見積もるため、北太平洋亜熱帯域における船上培養実験にて、その主要な分類群におけるリン酸塩および DOP 排泄速度を測定した。併せて、種または分類群別リン酸塩、ME、DE、DOP 排泄速度の時系列変化をみることで、生理生態学的な観点からも動物プランクトンから排泄されるリンに関する知見を集積した。

最後に、第 7 章では各章から得られた結果をもとに、北太平洋外洋域における LDOP 動態がリン酸塩だけでなく、窒素固定、微量元素、動物プランクトン排泄などによってどのように制御されるのか、また各要因の相互関係について総合的な考察を行うとともに、今後の課題を整理した。

## 第2章 リン酸および易分解性溶存態リンの空間分布と生物可用性

### 2-1. 背景

貧栄養海域において枯渇したリン酸塩の代わりに重要なリン源になると考えられる LDOP について、その代表的な構成成分である ME の濃度分布を北太平洋外洋域で報告した例は、西部北太平洋で3件 (Suzumura et al. 2012; Hashihama et al. 2013; Sato et al. 2013)、ハワイ沖で1件 (Duhamel et al. 2010) および南太平洋で1件 (Moutin et al. 2008) に留まる (図 2.1)。これらの先行研究ではほとんどの場合、大腸菌由来モノエステラーゼを用いて海水中の ME を分析したが、Suzumura et al. (2012) ではウシ由来モノエステラーゼを使用しており、同航海同測点にて ME 分布を報告した Hashihama et al. (2013) と比較した際には、ME 濃度がやや高くなる傾向にあった。したがって、このような酵素添加法に基づく LDOP 研究においては、手法や用いる酵素の統一が重要である。

ここで、Suzumura et al. (2012) を除く先行研究では、ME はいずれの海域でも検出限界以下となる場合があった。しかしながら、これらの研究で用いられる測定手法の検出感度はそれぞれ異なっており、最も感度が高いものは 3 nM (Hashihama et al. 2013; Sato et al. 2013)、最も低いものでは 20 nM (Moutin et al. 2008) であった。どちらもナノモルレベルでの感度ではあるものの、後者では適切に ME 濃度を測定できていたか疑問の残るところであり、したがって外洋域における希薄な ME の分布を明らかにする上ではとりわけ感度の高い測定手法を用いるべきである。

リン酸塩枯渇海域における ME の鉛直分布は、表層上部ではほぼ枯渇しており、深度とともに増加する栄養塩型の分布を示した (Hashihama et al. 2013)。これは ME を含む DOP 全般の鉛直分布とは反対の傾向であったが、この特性が広く北太平洋亜熱帯域全域でみられるのか、またどのような環境条件においてこのような鉛直勾配が形成されるのかについては明らかではない。この意味で、ME の水平および鉛直分布に関わる要因として現場リン酸塩濃度などの化学環境だけでなく、モノエステラーゼ活性 (MEA) に代表される生物学的アプローチも必須であり、そこから算出した ME 貯留の回転時間や現場基質濃度を用いた現場の酵素活性と合わせることで ME の消費や生成にかかわるメカニズムについて明らかにすることができる。

上述のように、リン酸塩枯渇海域では ME も同様に極めて低い濃度であることから、そのような環境では代替リン源として DE もまた重要な役割を果たすことが期待される。DE は核酸や生体膜など生物にとって普遍的な物質に含まれており、そのため海洋におけるリンの動態に少なからず影響を及ぼすことが推察される。実際に、沿岸域や河口域におい

では、DE 濃度はしばしば ME 濃度に匹敵する場合もある (Monbet et al. 2009; Suzumura et al. 1998)。しかしながら、ヘビ由来ジエステラーゼを用いて測定されたこれらの DE について外洋域における報告例はなく、また現状では低栄養塩環境における高感度 DE 測定手法が確立していない。

以上より、本章でははじめに外洋域の希薄な栄養塩濃度に即した高感度 DE 測定手法を確立した上で、北太平洋外洋域の広範囲にわたって ME および DE の分布を高感度で明らかにすることを目的とした。そして、これらの分布とリン酸塩、MEA、DEA などとの関係から、海域間で共通した分布傾向を抽出するとともに、その傾向がどのような要因によってもたらされるのかについて考察を行った。

## 2-2. リン酸ジエステルの高感度測定手法

### 2-2-1. 背景および方法

外洋域における DE の高感度測定についてはこれまで報告がなかったことから、本研究では既存の測定手法を組み合わせることで高感度 DE 測定法を確立させた。具体的には、沿岸域で用いられた加水分解酵素添加による DE 測定法 (Suzumura et al. 1998) と、貧栄養海域での高感度 ME 測定法 (Hashihama et al. 2013) を組み合わせ、遊離したリン酸塩を測定することにより DE 濃度を求めるものである。酵素添加量については Hashihama et al. (2013) を参照し、加水分解のための培養時間および酵素の基質特異性については以下の検討実験を行った。

モデル DE 化合物として市販のチミジン 5'-リン酸 *p*-ニトロフェニルエステルナトリウム塩 (*p*NP-TMP: 純度約 98%, Sigma-Aldrich, USA) およびビス 4-メチルウンベリフェリルリン酸 (bisMUP: 純度約 98%, Chem-Impex Int. Inc., USA) の 2 種類を用い、西部北太平洋保存海水を溶媒としてそれぞれ 98 または 101 nM の基質溶液を作成した。基質溶液はそれぞれ 30 mL ずつポリプロピレン (PP) 管 (Sarstedt, Germany) に分注し、30  $\mu$ L の 5 M アジ化ナトリウム、0.6 mL の 0.5 M トリス緩衝液 (1.2 M 塩酸で pH 8 に調整)、0.6 mL の酵素溶液を添加した。酵素溶液には、Phosphatase, Alkaline from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) および Phosphodiesterase I (*Crotalus adamanteus* venom, Worthington, USA) が各 0.2 U mL<sup>-1</sup> となるよう調整した混合溶液を用いた。なお、序論で述べたように、AP には MEA と DEA のどちらも有するタイプが存在するが (表 1)、本研究で用いる大腸菌由来モノエステラーゼについては、ジエステラーゼ活性をほとんど有していないことがわかっている (O'brien &

Herschlag 2001; Monbet et al. 2007)。

各溶液を添加後 30°C の暗所インキュベータ内において、1 時間おきに計 6 回サブサンプルを回収し、速やかに凍結することで酵素反応を停止させた。ただし、bisMUP 系列の培養 5 時間目のサブサンプルについては作成しなかった。また、0、1 および 3 時間目の培養は n=1、その他の培養は n=3 で行った。

凍結した試水は数日以内に室温で解凍後、モリブデンブルー法に基づく高感度栄養塩測定法 (Hashihama et al. 2009) でリン酸塩を測定し、その濃度を溶液量で補正した。このとき、遊離したリン酸塩濃度の実測値と理論値の比を算出することで、Phosphodiesterase I の *p*NP-TMP または bisMUP における加水分解効率とした。同時に、添加溶液および溶媒中に含まれるリン酸塩、ME、DE のコンタミネーション濃度についても測定し、加水分解効率の補正に用いた。

#### 2-2-2. 結果および考察

本研究で用いたヘビ由来酵素である Phosphodiesterase I は、ヌクレオチドの糖鎖や塩基に対しては非特異的であり、例えば DNA をよく分解する (Suzumura et al. 1998; Turner et al. 2002)。本結果においてもチミジン基を有する *p*NP-TMP の加水分解効率は培養 6 時間後において平均  $99 \pm 1\%$  ( $\pm$ SD, n=3) と高かった (図 2.2)。その一方で、同時間における bisMUP の加水分解効率は平均  $3 \pm 2\%$  と極めて低く (図 2.2, n=3)、この酵素には明瞭な基質特異性があることが示された。ゆえにこの酵素を実際の試水に用いた場合、検出される DE は過小評価であることに留意する必要がある。

*p*NP-TMP の加水分解に関して、4 時間以上の培養であればその効率に有意な差はみられなかった (t-test,  $p > 0.05$ )。また、ここで用いた約 100 nM という基質濃度は、外洋域における ME 濃度よりも十分に高く (Hashihama et al. 2013)、ひいては DE を含む他の LDOP の想定量を上回る濃度であると考えた。したがって、 $0.2 \text{ U mL}^{-1}$  の酵素溶液濃度かつ 30°C 暗所での 5 時間の培養で、試水中の DE が十分に加水分解されると判断し、この条件をもって外洋域における DE の高感度測定手法とした。



## 2-3. 北太平洋におけるリン酸および易分解性溶存態リンの空間分布と生物可用性

### 2-3-1. 方法

#### 2-3-1-1. 観測概要

観測は海洋研究開発機構学術研究船「白鳳丸」における 4 航海にて行い、それぞれ KH-14-3 次航海は 2014 年 7 - 8 月、KH-15-4 次航海は 2015 年 12 月、KH-16-7 次航海は 2016 年 12 月、KH-17-4 次航海は 2017 年 8 - 10 月に実施された。各航海における観測点の位置は図 2.3 に示した。各測点では CTD 観測により水温、塩分、密度の鉛直分布を得たほか、Hyper Profiler (Biospherical Instruments, USA) を用いた光深度の観測を行い、表面光量の 100、25、10、1 および 0.1% となる 5 層の深度を決定した。ただし、夜間や悪天候につき光観測ができなかったときは、経験的に亜表層クロロフィル極大 (SCM: subsurface chlorophyll maximum) 層深度を光量 1% 層とみなし、この層を基準に他の光量層深度を見積もった。採水は CTD-ロゼットニスキン採水器を用いて深度 200 m 以浅の固定深度 11 層、光量層 5 層および SCM 層の最大 17 層から行った。このとき、海表面 (0 m) での採水には希塩酸で洗浄したバケツを用いた。

#### 2-3-1-2. 栄養塩分析

上述の深度より、無機栄養塩としてリン酸塩および硝酸+亜硝酸塩 (N+N) 測定のため、試水を 30 mL の PP 管に採水した。N+N およびリン酸塩については、高感度栄養塩比色分析法 (Hashihama et al. 2009) を用いて船上測定、もしくは -20°C で凍結保存の後、陸上研究室にて測定した。この手法による検出限界値はリン酸塩および硝酸塩が 3 nM、亜硝酸塩が 2 nM であった。なお、以降の結果において、検出限界以下のサンプルについては 0 nM とし、回帰分析や分布図作成などを行ったが、累乗回帰分析において従属変数として用いた場合のみ便宜的に 0.5 nM として扱った。

ME および DE については、まず各層よりブランク、ME、DE 用としてそれぞれ 30 mL ずつ PP 管に分取した。ME サンプルには Hashihama et al. (2013) に従い、30  $\mu$ L の 5 M アジ化ナトリウム、0.6 mL の 0.5 M トリス緩衝液 (1.2 M 塩酸で pH 8 に調整)、0.6 mL の酵素溶液を添加した。その後 30°C での暗所培養を 2 - 5 時間行ったあと凍結保存し、船上または陸上研究室にて高感度手法を用いてリン酸塩として測定した。ブランクにはアジ化ナトリウム溶液のみを添加後、同様に培養を行い、凍結保存後に後日リン酸塩を測定した。このブランクにおけるリン酸塩濃度は同深度の現場リン酸塩濃度と同程度であったことから

(図 2.4,  $p < 0.001$ )、現場リン酸塩濃度のデータが欠落した場合にリン酸塩濃度として補完する用途にも用いられた。以後、このリン酸塩濃度についてはリン酸塩\*濃度と表記する。DE の分析には 2-2 節に記載の添加試薬量と培養時間を適用し、同様にリン酸塩として測定した。このとき、添加試薬に含まれる夾雑リン酸塩の検討のため、試薬調整の度に MAGIC 法 (Karl & Tien 1992) により溶存リンを除去した海水を溶媒として試水と同様の試薬の添加と培養を行い、夾雑リン酸塩濃度を決定した。培養後の試水におけるリン酸塩濃度は、試薬中の夾雑リン酸塩濃度を差し引き、試薬添加に伴う液量補正を行った上で、ブランクとの差分から ME および DE 濃度を算出した。

ME および DE の検出限界は Hashihama et al. (2013)における ME 測定精度 $\pm 1.7$  nM を参照し、3.4 nM とした。また、KH-15-4 次航海における測点 BS-5 にて 3 連でのサンプリングを行った際、ME および DE 系列におけるリン酸塩濃度の変動係数は 5%以内に収まったことから、本研究で用いたこれらの測定手法の再現性は高いと判断した。なお、算出した ME および DE 濃度については前述の無機栄養塩と同様に、回帰分析や分布図作成などの際は 0 nM、累乗回帰分析の際には 0.5 nM として扱った。

全溶存リン (TDP: total dissolved phosphorus) については、450°C で 5 時間焼成した GF/F フィルターを通したろ過海水を分析に供した。30 mL PP 管に採水したろ過海水は-20°C で凍結保存の後、陸上研究室にて湿式酸化法 (Hansen & Koroleff 1999) を用いて測定を行った。このとき、試水本来のリン酸塩濃度が約 500 nM 以下であった場合にはナノモルレベルでの分析手法を適用した。試水にペルオキシ二硫酸カリウム (試薬特級, 和光純薬) 5%溶液を添加後、125°C で 2 時間オートクレーブを行い、その後遊離塩素の除去のためドラフト内で半日以上静置した。その後リン酸塩を高感度法で測定し、TDP 濃度とした。それ以外のサンプルについては、5%ペルオキシ二硫酸カリウム溶液を添加後、120°C の分解加熱槽 (D2BX-02, BLTEC, Japan) で約 40 分加熱分解を行い、TNTP 分析装置 (QuAAtro 166+B000-01, BRAN+LUEBBE, USA) でマイクロモルレベルでの分析を行った (Yasui et al. 2016)。

#### 2-3-1-3. アルカリフォスファターゼ活性

MEA および DEA の測定には、上述の光量層 5 層から得た試水を供した。ただし、KH-15-4 次航海では光観測を行わなかったため、0、20、50、100、150 m の固定深度から採水を行った。試水ははじめ 500 mL 黒ポリ瓶に採水したのち、2.5 mL ずつアクリルセルに分注し、人工蛍光基質として 4-メチルウンベリフェリルリン酸 (MUP, Thermo Fisher, USA) または

bisMUP (Chem-Impex Int. Inc.) を添加した。このとき、MUP については終濃度約 100、500 nM、1、2  $\mu$ M の 4 段階となるようそれぞれ添加した (n=3)。bisMUP については MUP と同様もしくは 100、500 nM、1.5、3  $\mu$ M の 4 段階、あるいは 100、500 nM、1.5、3、4  $\mu$ M の 5 段階となるようそれぞれ添加した (n=3)。基質添加後は暗所現場水温下で 8 - 14 時間培養し、添加直後を含め約 2 - 4 時間おきに加水分解後産物である 4-メチルウンベリフェロン (MUF) の蛍光値を測定した (励起光: 359 nm, 蛍光: 449 nm) (FP-8200; 日本分光) (Sato et al. 2013)。MUF の検量線については、焼成した GF/F フィルターを通した現場ろ過海水 (0 m) に MUF (Sigma-Aldrich) を 5 - 50 nM の 4 段階で添加し、他試水と同様に培養しながら毎測点各時間の蛍光値測定の度に作成した。各蛍光試薬のストックはオートクレーブした 3.5% NaCl 水溶液を溶媒として、MUP および bisMUP は 50  $\mu$ M、MUF は 500 nM の濃度で作成した。これらのストックは小分けにして凍結保存し、使用直前に必要分のみを解凍した。

得られた MUF 濃度から、培養時間に対する線形増加が確認された範囲において酵素反応速度 (V) を計算し、ミカエリス-メンテン型基質濃度反応式 (式 1) を仮定して両酵素活性の半飽和定数  $K_m$  および単位時間・海水当たりの最大反応速度  $V_{max}$  を算出した (Sigmaplot, HULINKS,  $p < 0.05$ )。なお、式 1 において  $S'$  とは添加した蛍光基質の濃度を意味する。このとき、DEA については曲線のあてはまりがしばしば悪く、KH-14-3 次航海データでは有意水準 7% まで、KH-16-7 次航海データでは 6% まで許容することとした。各エステルの回転時間は両パラメータの比 ( $K_m/V_{max}$ ) から算出した (Labry et al. 2005)。

$$V = \frac{V_{max} * S'}{K_m + S'} \quad (\text{式 1})$$

ここで、式 1 にあるように、本研究では特筆されない限りにおいて  $V_{max}$  や  $K_m$  は現場の基質濃度を反映しない値のことを指す。

予備実験において、MEA 分析に用いた蛍光基質 MUP は、現場の ME 測定に用いた大腸菌由来モノエステラーゼによって速やかに分解されたことから (データ省略)、実測した ME 化合物群と、現場で発現したモノエステラーゼが基質とする ME、すなわち現場海洋で生物利用される ME 化合物群は同一であるとみなすことができた。そのため、ME を測定した測点においては、現場基質濃度を  $S$  として、以下の式 2 に従い別途  $V_{max}'$  および  $K_m'$  を算出した。

$$V = \frac{V_{max}' * (S + S')}{K_m' + (S + S')} \quad (\text{式 2})$$

式 2 において、 $S'$  を 0 としたときに、算出した  $V_{\max}'$  と  $K_m'$ 、そして現場 ME 濃度 ( $S$ ) を用いて現場の MEA ( $V$ ) を導出した。この値を今後は in situ MEA と表記することとする。

その一方で DEA については、2-2.節に記載のように本研究で DE の濃度測定に用いた Phosphodiesterase I では DEA 分析で用いた蛍光基質 bisMUP を分解できなかった (図 2.2)。このことは、現場で発現したジェステラーゼが基質とする DE 化合物群は、Phosphodiesterase I によって加水分解される DE 化合物群とは異なることを意味する。したがって、上記のような方法に基づく in situ DEA の算出は行わなかった。

また、KH-17-4 次航海の測点 B02 - 16 および KH-16-7 次航海の測点 N02 ではサイズ画分別の活性測定を行った。孔径 0.2 または 0.8  $\mu\text{m}$  のディスポーザブルフィルターユニット (ADVANTEC, Japan) とプラスチック製シリンジを用いて光量層 5 層から得られた試水をろ過し、MEA では 2  $\mu\text{M}$ 、DEA では 4  $\mu\text{M}$  の基質を添加した。これらのサンプルも他同様に培養および蛍光値の測定を行い、酵素反応速度を計算した。この値を未ろ過試水における値と比較することで、全活性に対する溶存画分 (< 0.2  $\mu\text{m}$ )、小型粒子画分 (0.2 - 0.8  $\mu\text{m}$ )、大型粒子画分 (> 0.8  $\mu\text{m}$ ) の活性の割合 (%) を算出した。また、本研究では小型粒子画分と大型粒子画分の両方を指す場合には粒子画分と呼称した。

#### 2-3-1-4. クロロフィル $a$ およびバクテリア細胞密度

Chl  $a$  の分析には、栄養塩の項目と同じ層より 270 mL の褐色ボトルに採水した試水を供し、25 mm GF/F フィルター上にろ過捕集した。フィルターはザルスタットチューブ内で 6 mL のジメチルホルムアミドに浸漬し、冷暗所で 24 時間以上抽出後 (Suzuki & Ishimaru 1990)、蛍光光度計にて蛍光値を船上測定した (Welschmeyer 1994)。バクテリア細胞密度の分析には、MEA と DEA を分析した 5 層から得た試水 5 mL について、終濃度 1% のグルタルアルデヒドで固定し、液体窒素中に保管した。そして陸上研究室にて解凍後、SYBR Green I (Thermo Fisher, USA) で染色し、フローサイトメーター (Cyflow space, Partec, Japan) で細胞数の計数を行った (Marie et al. 1997)。

ここで、植物プランクトンと従属栄養性バクテリアを合わせた微生物群集全体の生物量として、それぞれ Chl  $a$  濃度および細胞密度から炭素換算した生物量の和 ( $C_{\text{microbe}}$ ) を算出した。このとき、C:Chl  $a$  比は Taylor et al. (1997) および Chang et al. (2003) を参照し、海域や深度別におおよそその値 (20 - 160) を当てはめた。また、バクテリアについては Lee & Furman (1987) に基づき、20 fg C cell<sup>-1</sup> として計算を行った。

## 2-3-2. 結果

### 2-3-2-1. 中部北太平洋南北ライン

#### 2-3-2-1-1. 環境要因

観測ラインは南北におよそ 4,000 km 伸びており、赤道域から極域までの幅広い海洋環境を含んだ。それに伴い、水温、N+N、リン酸塩は水平および鉛直的に大きく変動し、概ね測点 A09 を境界にそれ以南では高水温・低栄養塩の水塊が水柱の大半を占め、それ以北では水温躍層の顕著な浅化とともに高栄養塩の水塊が確認された (図 2.5a, b, c)。ただし、赤道上の測点 A01 では例外的に海表面付近まで比較的高い栄養塩濃度が認められたほか、ベーリング海に位置する測点 A13 および A14 の海表面付近では反対に栄養塩濃度が低かった (図 2.5b, c)。高水温・低栄養塩の水塊が分布した測点 A02 - 08 においては、リン酸塩は完全には枯渇しておらず、最も低い場合でも 15 nM (測点 A08, 0 m) と常に検出可能な範囲であった。一方、N+N は測点 A02 - 06 の 50 m 以浅ではほぼ検出限界以下 (< 5 nM) であったことから、この海域は主に窒素制限下にあったと考えられた (図 2.5b)。ただし、測点 A06 - 08 ではリン酸塩もまた 30 nM 以下にまで低下したことから、測点 A02 - 05 よりも相対的にリン酸塩が不足した環境であったことが伺えた (図 2.5c)。Chl *a* については、明瞭な SCM 層が測点 A02 - 08 において確認され、その深度は N+N 躍層とよく一致した (図 2.5d)。また、ベーリング海 (測点 A12 - 15) においては 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  以上の顕著に高い Chl *a* 濃度が検出され、生物生産の多い海域であったことが示された。

これら 4 つの環境要因と塩分、深度を合わせた 6 つのパラメータを用いて、各試料をクラスター解析 (Ward Hierarchial Clustering 法) で 3 つのクラスターに分けた (図 2.5e)。クラスター1 は低緯度域に分布し、暖水塊を代表した。反対に、クラスター3 は高緯度域の冷水塊に分布した。クラスター2 については、測点 A02、A03、A09 - 12 の有光層下部に分布し、顕著に栄養塩濃度が高い水塊として定義された。これらのクラスター分けから、同一の測点であっても深度によって異なる水塊が存在することが示された。

#### 2-3-2-1-2. 溶存有機態リン

測点 A02 - 09 で測定した ME および DE は、どちらも検出限界以下から 40 nM にあり (図 2.6a, b)、リン酸塩と比べて極めて狭くかつ低い範囲で変動することが明らかとなった。ME、DE とともに 100 m 以浅でしばしば高い濃度が検出されたことから、ME では測点 A04 と A05、DE では測点 A03、A04、A06 において深度に対する負の相関が認められ ( $p < 0.05$ )、スキ

ャベジング型の鉛直分布を示した。

これらの共通した特徴の一方で、ME は平均  $12 \pm 5$  nM (n=128) であったのに対し、DE は平均  $5 \pm 6$  nM (n=128) と ME よりも総じて低かった (Mann-Whitney U-test,  $p < 0.001$ )。加えて、DE はむらのある分布で一貫した傾向が見られなかった一方、ME では南北方向での分布傾向が認められた。ME は南側 4 測点の水柱全体で概ね 10 nM 以上と高く、反対に北側 4 測点の主に表層下部では 10 nM 以下と低かった (図 2.6a, b)。ME におけるこの南北差は、0.1% 光量層あるいは 150 m まで水柱積算した ME 量の比較においてより顕著に表れ、測点 A06 - 09 では測点 A02 - 05 より有意に低かった (Mann-Whitney U-test,  $p < 0.05$ ) (図 2.6c)。積算した DE 量については、水柱内で局所的に高い濃度を記録した測点 A04 および A09 において突出した値を示したほかは、概ね一定の量を示した (図 2.6c)。

リン酸塩との関係においては、ME はリン酸塩が 100 nM 未満の場合に、それ以上の場合よりも低くなることがわかった (Mann-Whitney U-test,  $p < 0.01$ )。また、30 nM 以下の低リン酸塩水塊がみられた測点 A06 - 08 では ME の水柱積算値も低かったことから、水柱全体でみた場合にはリン酸塩と ME は同所的に低くなることが示唆された。その一方で、DE についてはリン酸塩と明瞭な関係性を示さず、DE の分布はリン酸塩によって説明できないことがわかった。

TDP はリン酸塩と似た水平および鉛直分布を示した (図 2.6d) が、TDP は最も低い場合でも 96 nM (測点 A07, 27 m) と高く、特にリン酸塩がおおよそ 200 nM 以下の海域においてはリン酸塩よりも大幅に高かった。そのため、TDP とリン酸塩の濃度差分から定義される DOP は測点 A02 - 09 において高く、この海域では DOP は TDP の平均  $61 \pm 23\%$  (n=123) とその大半を占めた (図 2.6e)。この DOP に対し、ME および DE はそれぞれ平均で  $7 \pm 5\%$ 、 $4 \pm 13\%$  を占め (表 2.1, n=129)、両者を合算した場合でも 1 割程度と少ない割合に留まったことから、DOP の大半がこれら易分解性エステル以外で構成されることが示された。

#### 2-3-2-1-3. アルカリフォスファターゼ活性

ME を測定した測点 A02 - 09 において、現場基質濃度を考慮した MEA パラメータ  $V_{\max}'$  および  $K_m'$  は、未考慮である  $V_{\max}$  および  $K_m$  よりもそれぞれ平均で  $2 \pm 1\%$ 、 $8 \pm 3\%$  有意に増加した (図 2.7, n=38) (Wilcoxon Signed-rank Test,  $p < 0.001$ ) ことから、どちらのカイネティクスパラメータの算出に関しても現場基質濃度が影響を及ぼすことが示された。このとき、 $K_m$  の増大は理論的に矛盾がない一方、 $V_{\max}$  についても増大した要因については本研究では不

明であった。ただし、いずれの増加率も 10%以内に収まるほど小さかったことから、現場基質濃度を考慮しないことによる両パラメータの過小評価は無視できる程度であると判断した。加えて、上記解析を行った海域以南および以北では TDP に占めるリン酸塩の割合が高く、したがって ME をはじめとする DOP がカイネティクスパラメータの計算に及ぼす影響はさらに小さいと考えられたことから、海域間でのカイネティクスパラメータ算出上の公平性を鑑み、観測海域全体を通して便宜的に現場基質濃度を考慮しない活性値を以て降用いた。

MEA  $V_{\max}$  はどのサンプルにおいても DEA  $V_{\max}$  を上回り (図 2.8a)、それぞれ平均は  $0.37 \pm 0.41 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $n=72$ )、 $0.046 \pm 0.043 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $n=68$ ) と、MEA  $V_{\max}$  は DEA  $V_{\max}$  よりも 1 桁高かった。また、 $K_m$  値は MEA で  $0.095 - 1.9 \mu\text{M}$ 、DEA で  $0.054 - 7.3 \mu\text{M}$  の範囲で推移した。両パラメータより算出した ME および DE の回転時間は平均でそれぞれ  $99 \pm 74$  日 ( $n=72$ )、 $3039 \pm 1267$  日 ( $n=62$ ) であり、最短でそれぞれ 26 日、667 日であった (表 2.1, 図 2.8b)。したがって、本調査海域で発現したモノエステラーゼはジエステラーゼよりも活性や基質親和性ともに高く、それに伴い DE よりも ME の生物利用が盛んであったと考えられた。前述のように、現場ジエステラーゼが基質とする DE 化合物群は、Phosphodiesterase I によって加水分解された核酸などを含む DE 化合物群とは異なり、そのカイネティクスから算出した上述の回転時間は、一般に核酸の回転時間として報告される 1 日以下 (Brum et al. 2005) よりも顕著に長かった。したがって、本研究ではこの回転時間の長い DE 化合物群を以降は準易分解性 DE と呼称し、濃度測定を行った DE と明瞭に区別した。

一般に、AP 活性はリン制限の指標として用いられるため、リン酸塩濃度の低い海域で活性が高くなることが予想された。しかしながら、両活性ともにリン酸塩濃度の高いベーリング海およびチャクチ海において顕著に高い  $V_{\max}$  が検出されたことに加え (図 2.9a, d)、MEA  $V_{\max}$  については栄養塩躍層以深を含む有光層下部でもしばしば高かった (図 2.9a)。その一方で、DEA  $V_{\max}$  は特に測点 A04 の 25% 光量層をはじめとする有光層上部でもしばしば高い値が観察され、MEA  $V_{\max}$  とは異なる分布傾向を示した (図 2.9d)。

これら単位時間・海水当たりの活性を Chl *a* で標準化したものをこれ以降 MEA<sub>CHL</sub> および DEA<sub>CHL</sub> とする。MEA<sub>CHL</sub>、DEA<sub>CHL</sub> はどちらも測点 A02 - 08 の 50 m 以浅において高く、これはリン酸塩が 200 nM 以下の水塊の分布と概ね一致した (図 2.9b, e)。よって、環境中の比較的低いリン酸塩が生物量当たり活性の増加に寄与したことが伺えた。また、測点 A13 - 15 では水柱内全体で MEA<sub>CHL</sub> および DEA<sub>CHL</sub> が低く、前述の高い MEA  $V_{\max}$  と DEA  $V_{\max}$  はこの海域における高い Chl *a* 濃度に依存することが示された。その一方で、リン酸塩濃度が

高く、また Chl *a* 濃度が低い有光層下部、特に測点 A01 - 03 および測点 A09 - 12 において高い MEA<sub>CHL</sub> および DEA<sub>CHL</sub> が検出される場合があった。

このような各パラメータの分布傾向をふまえ、それぞれリン酸塩との関係をみると、海水当たり活性はリン酸塩がおおよそ 500 nM 以上の高リン酸塩環境下におけるばらつきが大きいために MEA  $V_{\max}$  と DEA  $V_{\max}$  のどちらも有意な相関が得られなかった(表 2.2, 図 2.10a, b)。同様に ME、準易分解性 DE の回転時間もまたリン酸塩濃度と関連を示さなかった(表 2.2)。一方、MEA<sub>CHL</sub> および DEA<sub>CHL</sub> はリン酸塩の低下とともに増加する傾向がみられ、また高リン酸塩環境下 (> ~500 nM) での突出した値はそのほとんどがクラスター2 に分類された(図 2.10c, d)。そこで、クラスター1 と 3 のみを合わせたデータセットで再解析したところ、MEA<sub>CHL</sub> と DEA<sub>CHL</sub> はリン酸塩濃度に対し有意な負の相関を示した(表 2.2, 図 2.10c, d)。したがって、中部北太平洋赤道域から極域までの大半の水塊においては、環境中のリン酸塩濃度が生物の MEA および DEA の発現をコントロールする要因であることが示された。ただし、海水当たり活性を標準化する生物量パラメータとして  $C_{\text{microbe}}$  を用いた場合は、クラスターに関わらず両活性とリン酸塩濃度との間に関係性はみられなかったことから、リン酸塩による両活性の制御は微生物群集内で画一的ではないことが推察された。

現場 ME 濃度と MEA  $V_{\max}'$ 、 $K_m'$ を用いて算出した in situ MEA は、測点 A02 - 09 において 0.002 - 0.015 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>の範囲で推移しており、その平均は 0.005±0.003 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>(n=38) と MEA  $V_{\max}$  よりも 2 桁低い値であった(図 2.9a, c)。In situ MEA の算出に用いた現場 ME 濃度は、対応する MEA の  $K_m$  値よりも大幅に低かったため ( $p < 0.01$ )、in situ MEA は  $V_{\max}/K_m$  に依存した関数となった ( $p < 0.01$ )。加えて、in situ MEA は MEA  $V_{\max}$  との間にも正の相関がみられたことから ( $p < 0.01$ )、MEA  $V_{\max}$  と同様にリン酸塩との間に関係性はみられなかった(表 2.2)。

ME を測定したサンプルはほとんどがクラスター1、すなわちリン酸塩が MEA の発現に対し負の制御要因となる環境に分類された。そこで、一部クラスター2 に分類されたサンプル結果を除いた場合、ME 濃度は MEA  $V_{\max}$  および  $C_{\text{microbe}}$  あたり MEA との間に負の相関を示した(表 2.2, 図 2.11a)。このことは低リン酸塩環境下で MEA が高まった結果、ME の生物消費が進み、その濃度が減少したことを示唆しており、ME 濃度が低いほどその回転時間が短くなったこともこれを支持した(図 2.11d)。その一方で、MEA<sub>CHL</sub> および in situ MEA は ME 濃度と正の相関を示しており(図 2.11b, c)、これは高 ME 環境下でその加水分解が促進されたことを示唆する。これらの矛盾した関係性は、調査海域においてリン酸塩が完全に枯渇しなかったために、代替リン源となる ME の利用度合いがさほど高くなかったことに



## 第4章 窒素固定生物のリン酸エステル利用

### 4-1. 背景

全球的な窒素動態に重要な役割を果たす窒素固定生物において、その増殖制限要因となりうるのは主にリンと鉄である。例えば、代表的な窒素固定生物である *Trichodesmium* では他の微生物群集よりもリン酸塩取り込み能が低い (Orchard et al. 2010a; Sohm & Capone 2006)。また、同じく代表的な窒素固定生物である *Crocospaera* では、高親和性リン酸塩トランスポーターを保有するものの (Dyhrman & Haley 2006)、鉄欠乏下では *Trichodesmium* よりもリンに関する増殖速度半飽和定数が大きいとされる (Garcia et al. 2014)。したがって、リン酸塩獲得能が乏しいこれらの窒素固定生物においては、DOP の利用が重要な生存戦略の一つであると考えられる。実際に、上述の2種においては複数のモデル DOP 化合物について、それぞれを単一リン源として与えた際に十分生育可能であることが報告されている (表 4.1)。

現場観測においても、外洋域における ME 貯留の消長が窒素固定活性の増減によって最もよく説明されたことから (第2章参照)、窒素固定生物が ME をはじめとするリン酸エステルの動態にどのような影響を及ぼし得るのかを明らかにすることを本章の目的とした。はじめに、現場海洋における窒素固定活性と ME、DE、MEA、および DEA との関連についてデータ比較および検討を行い、そこから導出された窒素固定性シアノバクテリアによる ME および準易分解性 DE 利用の仮説を検証するため、培養株を用いた室内実験を行った。

### 4-2. 北太平洋外洋域における現場観測

#### 4-2-1. 方法

観測は KH-14-3 次航海での 170°W 南北ライン、KH-16-7 次航海での冬季 23°N 東西ライン、KS-16-9 次航海での父島沖定点および KH-17-4 次航海での夏季 23°N 東西ラインにおいて行った (図 2.3, 図 3.1)。各測点における観測概要および栄養塩などの結果については第2および第3章に記載した。窒素固定活性の測定は 100、25、10、1、0.1% 光量層の5層で行い、ポリカーボネート製 4.5 L ボトル (n=2) に採水後、イニシャルについては直後に 25 mm GF/F フィルター上へろ過捕集し、フィルターを冷凍保存した。培養系列については  $\delta^{15}\text{N}$ -dissolution 法 (Mohr et al. 2010) に基づき、脱気済み現場表面海水に  $^{15}\text{N}_2$  ガスを飽和させたものを各ボトルに 100 mL ずつ添加した。培養系列は遮光布で現場光量に調整したあと、甲板のかけ流し水槽で 24 時間培養を行った。培養後はイニシャル同様にろ過ならびに冷凍

測点について窒素固定生物群集組成を比較した。主要な窒素固定生物 6 グループである  $\gamma$  プロテオバクテリア、*Rhizosolenia* あるいは *Hemiaulus* に共生する *Richelia intracellularis*、UCYN-A、UCYN-B および *Trichodesmium* におけるニトロゲナーゼ遺伝子 *nifH* の qPCR 解析の結果 (Shiozaki et al. 2017; 堀井 未発表) からは、窒素固定性シアノバクテリア、とりわけ *Trichodesmium* または UCYN-B の現存量が高くなることで水柱内の窒素固定活性が増加することが示唆された (表 4.3)。

ここで、高い窒素固定活性は高い ME、DE 濃度および高い MEA、DEA と関連したことを鑑みると、窒素固定性シアノバクテリアによる窒素固定は ME や準易分解性 DE の利用によって支えられた、あるいはこれらの窒素固定生物が主要な ME および DE 生成者となり周囲の微生物群集におけるリン酸エステル利用を促進した、もしくはその両方が推察された。そこで、本研究では *Trichodesmium* および UCYN-B の代表種として *Crocospaera* の 2 種に着目し、どのような環境条件で ME 利用が促進されるのか、また両種において先行研究の無い DE 利用能について明らかにすることを目的とし、以下の 2 つの室内培養実験を行った。

#### 4-3. 室内培養実験

##### 4-3-1. *T. erythraeum* ECS0305 株におけるモノエステラーゼ活性

###### 4-3-1-1. 方法

はじめに、本実験に供した *T. erythraeum* ECS0305 株 (混菌) は 2003 年に東シナ海より単離され (北島 2009)、1991 年に北大西洋から単離された IMS101 株 (Prefert-Bebout et al. 1993) やオーストラリア沖で単離された GBRTRLI101 株 (Fu & Bell 2003) と異なり、MEA の水温・光量依存性についての知見が乏しい。ここで、IMS101 株は GBRTRLI101 株よりも増殖速度やリン酸塩取り込み能が高く (Fu et al. 2005)、またその至適光量も高い (Bell & Fu 2005; Breitbarth et al. 2008)。このことから、本種の生理生態学的特性は株によって異なり、したがって ECS0305 株についてこれらの先行研究を当てはめることは適切ではないと考えた。

ECS0305 株における至適培養条件を決めるため、暗所で一年以上保存した北太平洋外洋域表層水を用いて TMV 培地 (Prefert-Bebout et al. 1993) を作成し、予備培養を行った。容器はポリカーボネート製の 28 mL 遠沈管 (Nalgene)、光周期は 12L:12D とし、結果、本株の比増殖速度は光合成有効放射 (PAR: photosynthetic active radiation)  $260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、または水温  $26^\circ\text{C}$  で極大を示すことが明らかとなった。

この予備培養の結果をふまえ、MEA の水温依存性の検討においては PAR を約  $260 \mu\text{mol m}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に保ちながら 5 つの水温条件 (22, 25, 26, 28,  $30^{\circ}\text{C}$ ) で、また光量依存性の検討においては水温  $26^{\circ}\text{C}$  で 4 つの PAR 条件 (40, 100, 180,  $260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で培養を行った。なお、培養容器ならびに光周期は予備培養と同じであった。各条件で 3 世代以上にわたって培養株を馴致させたが、PAR  $260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の条件のみ実験開始の数日前から同水温かつ PAR  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の対数増殖期にあった株を用いて馴致させた。

各条件で馴致した培養株はその後通常の TMV 培地 (+P) もしくはリン酸塩無添加のリン制限培地 (-P) の 2 種類に植え継ぎ ( $n=3$ )、蛍光光度計 (TD-700; Tuner Designs) にて *in vivo* Chl *a* 蛍光値を日ごと測定することで増殖曲線をそれぞれ得た。この増殖曲線と予備培養の結果に基づき、植え継ぎ後 10 日以上かつ対数増殖期終盤もしくは定常期初期にある株について Chl *a* および MEA の測定を行った。ここで、実験に供した培養株が混菌株であることを考慮し、従属栄養性バクテリアではなく *Trichodesmium* に由来する MEA を測定するため、GF/F フィルター上にろ過捕集した粒子を活性測定の対象とした。

Chl *a* については 5 mL の培養液を GF/F フィルターにろ過捕集し、抽出および測定方法は第 2 章に記載の方法と同様とした。MEA 測定には *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) を基質として用い (Fu & Bell 2003)、10 mL の培養液を 25 mm GF/F フィルター上にろ過後、6 mL の滅菌海水、0.3 mL の 10 mM *p*NPP 水溶液、0.81 mL のトリスグリシン緩衝液、0.081 mL の 1 mM 塩化マグネシウム水溶液からなる混合溶液の入った 15 mL フェルコンチューブにフィルターを浸漬した。このとき、*p*NPP の終濃度はおよそ 0.42 mM であった。フィルターを浸漬後、元の培養条件にて約 3 時間静置後、吸光光度計 (UV-2400P; 島津製作所) にて分解産物である *p*NP について波長 410 nm における吸光度を測定した。なお、*p*NP 検量線は保存海水を溶媒に 0 - 70  $\mu\text{M}$  の範囲で作成し、参照した。生成された *p*NP の量は静置時間と比例関係にあったことから、単位時間・Chl *a* 量あたりの *p*NPP 分解速度を算出し、MEA とした。ここで、通常培地で測定した比増殖速度および MEA の後には (+P)、リン制限培地で測定したこれらの項目の後には (-P) をつけることで以降区別した。

併せて、各培養条件においてトリコーム上のモノエステラーゼ発現部位を確認するため、蛍光基質である ELF97 (Molecular Probes, USA) を用いた顕微鏡観察 (Dyhrman et al. 2002) を行った。100  $\mu\text{L}$  の培養液と 5  $\mu\text{L}$  の ELF97 溶液をマイクロチューブにて混和し、元の条件下で約 45 分暗所静置後、ホールスライドガラスに移し蛍光顕微鏡 (LABOPHOT-2, Nikon) にて加水分解された ELF97 の蛍光を観察した (励起波長: 330 - 380 nm)。

#### 4-3-1-2. 結果

水温依存性の検討において、各条件の通常培地ではバックグラウンドとして低い MEA (+P) が検出された ( $0.01 - 0.018 \mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) (図 4.4a)。一方、MEA (-P) は  $0.07 - 0.34 \mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$  の範囲で推移し、各培養条件において通常培地よりも有意に高かった ( $t$ -test,  $p < 0.05$ )。このとき、比増殖速度 (+P) は  $28^\circ\text{C}$  で極大となったのに対し、MEA (-P) は水温が上昇するに従って増加し、MEA の至適水温は株自身のそれよりも高いことを示した。ここで、 $22^\circ\text{C}$  の通常培地では十分な増殖が得られなかったため、参考として予備実験 ( $n=1$ ) における比増殖速度 (+P) のみを示した。

光量依存性の検討においても、上述の水温に対する結果と同様に、MEA は各培養条件において通常培地 ( $0.006 - 0.018 \mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) よりもリン制限培地 ( $0.12 - 0.25 \mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) にて有意に高かった ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ) (図 4.4b)。また、比増殖速度 (+P) が  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  でピークに達したのに対し、MEA (-P) は光量が増えるごとに増加傾向にあり、また MEA (+P) も低い値ながらもわずかに増加した。

ELF97 を用いた顕微鏡観察では、通常培地で培養したトリコーム上には、どの条件においても蛍光粒子は確認されなかった (図 4.5a)。一方、リン制限培地で培養したトリコームの周囲または表面には顕著に ELF97 の蛍光が観察された (図 4.5b)。ここで、トリコームの表面にあると判断した理由としては、蛍光粒子がトリコームの周縁上にも確認されたためである。これらの蛍光粒子は、トリコームの形に沿って分布した (図 4.5b) ほか、トリコームの主中央部や先端部の細胞に集中する場合も観察された。また、他の部位に比べて内部組織が少なく見える細胞群に集中する場合や (図 4.5c, d)、反対にこれらの組織を避けて蛍光粒子が観察されることもあった (図 4.5e)。

#### 4-3-1-3. 考察

予備培養および培養実験の結果から、*T. erythraeum* ECS0305 株における増殖至適水温は  $26 - 28^\circ\text{C}$ 、光量は  $180 - 260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であることが示され、この結果は IMS101 株 ( $27.5^\circ\text{C}$ ,  $180 - 1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Breitbarth et al. 2007; 2008) と GBRTLI101 株 ( $25^\circ\text{C}$ ,  $45 - 75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Fu & Bell 2003) の中間的な値であることが明らかとなった。ECS0305 株における MEA の至適水温・光量条件は、どちらも本株の増殖至適条件よりも高いことが示され、今回の測定条件では飽和にまで至らなかった。したがって、4-2節で示されたように窒素固定活性の比較的高い有光層上部における高い水温・光量条件下では、増殖に関わらず MEA は高く

なることが予想された。*T. erythraeum* の他 2 株における生物量当たり窒素固定活性もまた、IMS101 株では 25 - 30°C の範囲において極大値やそれに近い値を示し (Breitbarth et al. 2007)、また GBRTLI101 株では増殖至適光量を超えても窒素固定活性が増加した (Bell & Fu 2005) ことから、*T. erythraeum* においては高い窒素固定活性と高い MEA は連動することが示唆された。この仮説は、昼間に窒素固定を行う (Saino & Hattori 1978) *Trichodesmium* が、夜間よりも昼間に高い MEA を示した先行研究 (Mulholland et al. 2002) によっても支持される。

ELF97 による蛍光染色では、モノエステラーゼの発現がトリコーム上で局在する様子がしばしば見られ、これらの部位では相対的にリン要求が高まったと考えられた。モノエステラーゼの発現が集中した部位の内、内部構造の乏しい細胞群については、ガス胞が少なく窒素固定が活発なジアゾサイトと呼ばれる細胞の特徴や外見 (El-Shehawey et al. 2003; Sandh et al. 2012) と似通っていた。このことから、トリコーム上において窒素固定と ME 利用が同所的に起きており、前述の水温・光量依存性の検討から推察された窒素固定活性と MEA の連動仮説を支持する結果となった。ただし、このジアゾサイトと推定される部位には ELF97 の蛍光粒子が集中する場合もあれば、反対にこの部位を避けるように蛍光粒子が分布する場合もあったことから、窒素固定に伴うモノエステラーゼの発現は恒常的な現象ではなく、藻体の生理状態や成長段階などに影響される可能性が示された。

#### 4-3-2. 窒素固定性シアノバクテリアのリン酸ジエステル利用能

##### 4-3-2-1. 方法

本実験には *T. erythraeum* ECS0305 株と、これと同様に東シナ海より単離した *Crocospaera watsonii* (北島 2009) の混菌株を供した。培養容器や光周期は前節と同様であったが、*C. watsonii* の培養にはマグネシウムおよびカルシウム塩が無添加の改変した TMV 培地を用いた。水温・光量条件は *T. erythraeum* が 26°C・約 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、*C. watsonii* が 28°C・約 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であり、増殖曲線および比増殖速度は *in vivo* Chl *a* 蛍光の測定によって求めた。

はじめに、通常培地にて対数増殖期にある両株をリン酸塩無添加のリン制限培地へ植え継ぎ、リン枯渇状態に移行させる前培養を行った (n=3)。この時、対照群として通常 TMV 培地へも植え継ぎを行った (n=3)。リン制限培地へ植え継いだ株の増殖がほぼ止まるまで各培養条件で培養した後、通常およびリン制限培地の両方において MEA、DEA および Chl *a* の測定を行った。Chl *a* および MEA の測定は前節と同様に行ったが、培養液のろ過量はどちらも 4 mL であり、また基質として 8 mM の *p*NPP 溶液を 0.3 mL を添加し、*p*NPP の終濃

度をおよそ 0.33 mM に変更した。このとき、培養時間は *T. erythraeum* で 4 時間、*C. watsonii* で 7 時間であった。DEA は、添加基質を bis-*p*-ニトロフェニルリン酸 (bisNPP, Sigma-Aldrich) に、培養株のろ過量を 8 mL へ変更した上で、MEA と同様の手順で測定した。

リン制限培地での前培養後、上述の MEA、DEA および Chl *a* 測定用のサブサンプルを分取した残りの培養液については、通常培地、リン制限培地、bisNPP 培地の 3 種類に植え継ぎ、継続して培養を行った。ここで、bisNPP 培地とはリン制限培地に終濃度約 50  $\mu$ M で bisNPP 溶液を添加したものである。植え継ぎ後も引き続き in vivo Chl *a* 蛍光値を測定し、各培地における両株の増殖曲線を得た。

#### 4-3-2-2. 結果

前培養後の両株における MEA および DEA は、通常およびリン制限培地のどちらにおいても認められ、両株が DE 分解能を有することがわかった (図 4.6)。リン制限培地では両株とも MEA が DEA よりも有意に高く検出された (*t*-test,  $p < 0.01$ ) ほか、これらの活性は通常培地よりも有意に上昇した (*t*-test,  $p < 0.05$ ) (ただし *T. erythraeum* の DEA を除く)。2 種の比較においては、*T. erythraeum* の酵素活性はいずれの条件でも *C. watsonii* よりも高かったが、リン制限培地における両酵素活性の比率 (DEA:MEA) をみると、*T. erythraeum* では 0.12 であったのに対し、*C. watsonii* では 0.29 と高かった。

リン制限培地からそれぞれ 3 種類の培地へ植え継いだあとの両株の増殖は、通常培地での立ち上がりが最も早く、次いで bisNPP 培地であり、リン制限培地へ植え継いだものはいずれも増殖をみせなかった (図 4.7)。bisNPP 培地での最大 Chl *a* 収量を通常培地のそれと比べたとき、*T. erythraeum* は  $137 \pm 44\%$  で通常培地と同等 (*t*-test,  $p > 0.05$ )、*C. watsonii* は  $161 \pm 54\%$  と通常培地以上 (*t*-test,  $p < 0.05$ ) であった (図 4.8)。また、比増殖速度は通常培地のものと比べて *T. erythraeum* では  $107 \pm 24\%$ 、*C. watsonii* では  $92 \pm 8\%$  であり、どちらも通常培地と同等であった (*t*-test,  $p > 0.05$ )。このことから、両株共に bisNPP のみをリン源とした培地において、通常培地と同等かそれ以上に増殖できることが示された。ただし、*T. erythraeum* については、植え継ぎ後から bisNPP 培地で増殖を再開するまでに平均 11 日程度のタイムラグがあった一方で、*C. watsonii* ではそのようなタイムラグはみられないもしくは 1 日以下であった。

#### 4-3-2-3. 考察

先行研究においては、モデル DE 化合物として bisNPP を単一リン源として与えた場合、赤潮形成種や淡水性シアノバクテリアなどの植物プランクトンのうち、通常培地と同程度の増殖を示したのは海産種では *Chaetoceros ceratosporus* 1 種に留まった (図 4.8)。このことから、bisNPP 培地においても高い増殖を示した *T. erythraeum* および *C. watsonii* の両株ともに、他の海産種にはほとんど見られないような高い DE 利用能を有することが明らかとなった。本結果は、*T. erythraeum* が *phoA* だけでなく、DEA のある *phoX* (表 1) を保有する (Orchard et al. 2009) という分子生物学的観点からも支持された。*C. watsonii* においては、現在までに単離された 10 種類の株それぞれで保有する AP 遺伝子は異なり (Bench et al. 2013)、大西洋から単離された WH0401、WH8501、WH8502 の 3 株には *phoD* は確認されず、極めて低い DEA を有する *phoA* (表 1) が確認された (Bench et al. 2013)。その一方で、大西洋または太平洋のいずれかから単離された WH0003、WH0005、WH0402 の 3 株においては *phoD* が報告された (Bench et al. 2013)。*phoD* を持つ後者の 3 株については、いずれの株も細胞外に ECM (extracellular material) と呼ばれる物質を排出し、高い粘度の培養株となる特徴がある (Webb et al. 2009)。本研究で用いた *C. watsonii* 株は太平洋から単離されたものであり、また ECM を排出して粘度の高い培養株を形成する特徴があったことから、おそらく後者の 3 株と同じく *phoD* を有することが考えられた。

ここで、PhoX 自身の DEA は PhoD よりも高いこと (表 1)、また前培養後における *C. watsonii* の DEA:MEA が高かったこと、ならびに *T. erythraeum* では bisNPP 培地へ順応するためのタイムラグが必要であったことの 3 点をふまえると、リン酸塩枯渇環境において *C. watsonii* は *T. erythraeum* よりも恒常的に *phoD* を発現させることで、積極的に DE を利用する戦略を取ることが推察された。ただし、*phoD* を有する *C. watsonii* の 3 株 WH0003、WH0005、WH0402 と非粘性の WH8502 株では *phoA*、*phoD* 以外の何らかの AP 遺伝子も見つかっている (Bench et al. 2013) ことから、未知の酵素が *C. watsonii* の DE 利用能に関わることも考えられた。

#### 4-4. 窒素固定生物とリン酸エステル

培養実験でモデル DE 化合物として用いた bisNPP は、Phosphodiesterase I による加水分解効率が 19.3% であり (Turner et al. 2002)、したがって bisMUP よりやや分解されやすい (図 2.2) もの、加水分解効率の高い *pNP-TMP* や DNA (Suzumura et al. 1998; Turner et al. 2002)

と比べた場合には比較的分解されにくい基質であるといえる。この意味で、現場観測における易分解性 DE に含まれる bisNPP 様物質の割合は低いと考えられる。したがって、本結果において培養実験に供した 2 種の窒素固定性シアノバクテリアが高い bisNPP 利用能を有したことは、これらの生物が準易分解性 DE を利用する可能性を示し、したがって準易分解性 DE を基質とする現場 DEA と現場窒素固定活性との相関関係を支持すると考えた。

ここで、窒素固定生物は固定した炭素や窒素の多くを細胞外に排出することから (Nausch 1996; Capone et al. 2005)、貧栄養海域におけるこれら元素のホットスポットとして機能し、しばしばその周囲に表在性のバクテリア (Nausch 1996) を含む多様なコンソーシアムが形成される (Hmelo et al. 2012)。特に *Trichodesmium* では表在性のバクテリアがクオラムセンシングによって MEA を制御することが報告され (Van Mooy et al. 2012)、貧栄養海域における *Trichodesmium* のリン獲得に貢献することが示唆された (Van Mooy et al. 2012)。したがって、本研究における培養実験で検出された MEA および DEA が厳密な意味ですべて窒素固定性シアノバクテリアに由来するかという判別は難しいものの、AP が細胞外酵素であることやマイクロ環境における藻体とバクテリアとの相互作用を鑑みるに、ME や準易分解性 DE は少なくとも間接的に窒素固定活性の増大に寄与すると考えられた。

ただし、本研究では現場 ME および DE 濃度と窒素固定活性との相関について、その因果関係を説明することはできなかった。これらの同所的な高まりが、環境中の高い ME や DE が窒素固定活性を促進したことを意味するのか、あるいは窒素固定生物による有機物の排出 (Nausch 1996; Capone et al. 2005) によって ME や DE が水柱内へ供給された結果であるのか、を判別するためには今後窒素固定生物のリン酸エステル取り込み速度や生成速度について明らかにすることで検証できると考える。



## 摘要

1. 生物にとって重要なリン源となりうるリン酸モノエステル (ME) およびリン酸ジエステル (DE) は、北太平洋外洋域においてナノモルレベルの低い水準にあった。ME はナノモルレベルにありながらも現場リン酸塩濃度に応じて栄養塩型やスキャベンジング型などの鉛直分布を示した一方、DE は海域に依らずほぼ枯渇し、そのどちらもが生物可用性が高いことが考えられた。

2. 西部北太平洋の表層上部では、リン酸塩および ME が互いに連動した時系列変動を示したことから、ME や粒子態リンを介してリンが速やかに再生される機構が存在する可能性が示された。このことは、貧栄養海域における無機態栄養塩の見かけ上の枯渇と、季節変動を示す生物生産との繋がりを解明する足掛かりになると考えられる。

3. アルカリフォスファターゼ (AP) 活性の解析からは、ME や準易分解性 DE が低リン酸塩環境のみならず、窒素固定性シアノバクテリアにとって好適な環境においてもその生物利用が促進されることが示唆された。すなわち、これらのリン酸エステルを活発に活用することが窒素固定生物にとって重要なリン獲得戦略であると考えられた。

4. 夏季の西部北太平洋はリン - 微量金属共制限環境下にあることが初めて明らかとなり、鉄や亜鉛の供給によって ME や準易分解性 DE の生物利用が促進されることが示唆された。AP 活性の律速要因となる微量金属は大陸側より順に鉄から亜鉛へと変化し、このことは現場微生物群集の組成や、遺伝子タイプ別 AP の金属要求性の違い、あるいはその両方に起因すると考えられた。

5. 表層以深への動物プランクトンによるリンのアクティブフラックスは、これまでの推定値や沈降粒子フラックスよりも大幅に大きいことが示唆された。また、動物プランクトンから ME や DE が排泄されることを初めて確認し、海洋のリン循環全体を考える上での動物プランクトンによるリン排泄研究の重要性を示した。

## 謝辞

本研究の遂行に当たって、終始懇切丁寧なご指導と貴重なご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 高橋一生教授に心より深く感謝申し上げます。創価大学大学院工学研究科 古谷 研教授には本論文の執筆に当たってご指導、ご鞭撻を賜りましたこと、心より深く感謝申し上げます。また、東京海洋大学 神田穰太教授、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 武田重信教授、東京大学大気海洋研究所 濱崎恒二教授、東京大学アジア生物資源環境研究センター 岩滝光儀准教授には学位審査の副査として本論文のご校閲を賜り、また審査に快くご参加いただきましたこと、深く感謝申し上げます。

海洋研究開発機構 (JAMSTEC) 学術研究船「白鳳丸」KH-14-3、KH-15-4、KH-16-7、KH-17-4 次航海、および同学術研究船「新青丸」KS-16-9 次航海に携わった船長の皆様、ならびにすべての乗組員、観測技術員、および乗船研究者の方々に心より御礼申し上げます。皆様の多大なるご尽力によるこれらの航海の成功がなければ本研究は成し遂げられませんでした。この場を借りて深く感謝申し上げます。

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 橋濱史典助教および江濱 誠氏には高感度栄養塩分析技術の習得や実際の測定にあたり、丁寧にご指導を賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。併せて、同大学院海洋環境学部門の皆様には各種栄養塩の分析に快くご協力いただきまして、御礼申し上げます。また、日本海区水産研究所 児玉武稔博士からも、高感度栄養塩測定技術についてご指導を賜りましたこと、御礼申し上げます。

微量金属添加実験の実施にあたっては、北海道大学低温科学研究所 西岡 純准教授、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 近藤能子准教授、香港科技大学 佐藤光秀研究員にクリーン技術をご教授いただき、またサンプリングにも快くご協力いただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また、佐藤光秀研究員には特に本研究の技術的な面において日頃から貴重なご助言を数多く賜りましたこと、重ねて深く感謝申し上げます。

現場の栄養塩データについては、西岡 純准教授、橋濱史典助教、JAMSTEC 塩崎拓平特任研究員、東京海洋大学大学院海洋環境学部門の加藤 遥氏ならびに杉山貴紀氏より快くご提供いただきましたこと、厚く御礼申し上げます。

窒素固定活性データおよび窒素固定群集組成については、塩崎拓平特任研究員および東京大学大学院農学生命科学研究科 堀井幸子氏より快くご提供いただきました。また観測にあたっては、古谷 研教授、堀井幸子氏、東京大学大学院農学生命科学研究科 滝野翔大氏に多大なるご協力をいただきました。これらの方々に深く感謝申し上げます。

動物プランクトンの排泄実験においては、東京大学大学院農学生命科学研究科 中村賢一氏より実験個体の採集・提供をはじめ、多大なるご助力をいただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

SPRINTARS によるダスト沈着量のデータについては、九州大学応用力学研究所 竹村俊彦教授より快くご提供いただきましたこと、厚く御礼申し上げます。

東京大学大気海洋研究所 齊藤宏明教授および橋濱史典助教には KS-16-9 次航海におけるセジメントトラップ試料のリンフラックスデータを快くご提供いただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

窒素固定生物の培養実験に供した *T. erythraeum* ECS0305 株および *C. watsonii* 株は、現西海区水産研究所 北島 聡博士によって確立された株を使用させていただきました。ここに記して感謝の意を表します。また、培養技術の習得にあたり増田貴子博士、堀井幸子氏、熊谷陽子技術補佐員にご協力ならびに貴重なご助言を賜りましたこと、御礼申し上げます。また、自身が研究航海で不在の折に、培養株の管理および培養実験の測定にご尽力いただいた権田夏月氏にこの場を借りて深く感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物環境学研究室およびアジア生物資源環境研究センターの皆さまには日常生活から研究活動にいたるまで、常日頃から大変お世話になりました。心より深く感謝申し上げます。なお、本研究は日本学術振興会特別研究員奨励費（DC1）16J08143 の助成を受けました。

## 引用文献

- Anderson, G. C. & Zeutschel, R. P. Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore areas of the northeast Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 15, 402-407 (1970).
- Baltar, F. et al. High dissolved extracellular enzymatic activity in the deep central Atlantic Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 58, 287–302 (2010).
- Baltar, F., Arístegui, J., Gasol, J. M., Yokokawa, T. & Herndl, G. J. Bacterial Versus Archaeal Origin of Extracellular Enzymatic Activity in the Northeast Atlantic Deep Waters. *Microb. Ecol.* 65, 277–288 (2013).
- Bell, P. R. F. & Fu, F. X. Effect of light on growth, pigmentation and N<sub>2</sub> fixation of cultured *Trichodesmium* sp. from the Great Barrier Reef lagoon. *Hydrobiologia* 543, 25–35 (2005).
- Bench, S. R. et al. Whole genome comparison of six *Crocospaera watsonii* strains with differing phenotypes. *J. Phycol.* 49, 786–801 (2013).
- Bennett, J. L. & Hopkins, T. L. Aspects of the ecology of the calanoid copepod genus *Pleuromamma* in the eastern Gulf of Mexico. *Contrib. Mar. Sci.* 31, 119-136 (1989).
- Bertilsson, S., Berglund, O., Karl, D. M. & Chisholm, S. W. Elemental composition of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnol. Oceanogr.* 48(5), 1721-1731 (2003).
- Bjorkman, K. M. & Karl, D. M. Bioavailability of dissolved organic phosphorus in the euphotic zone at Station ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre. *Limnol. Ocean.* 48, 1049–1057 (2003).
- Björkman, K. M., Duhamel, S., Church, M. J. & Karl, D. M. Spatial and Temporal Dynamics of Inorganic Phosphate and Adenosine-5'-Triphosphate in the North Pacific Ocean. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–14 (2018).
- Björkman, K., Thomson-Bulldis, A. L. & Karl, D. M. Phosphorus dynamics in the North Pacific subtropical gyre. *Aquat. Microb. Ecol.* 22, 185–198 (2000).
- Bolier, G., de Koningh, M. C. J., Schmale, J. C. & Donze, M. Differential luxury phosphate response of planktonic algae to phosphorus removal. *Hydrobiologia* 243: 113-118 (1992)
- Breitbarth, E. et al. Physiological constraints on the global distribution of *Trichodesmium* - effect of temperature on diazotrophy. *Biogeosciences* 4, 53–61 (2007).
- Breitbarth, E., Wohlers, J., Kläs, J., LaRoche, J. & Peeken, I. Nitrogen fixation and growth rates of *Trichodesmium* IMS-101 as a function of light intensity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 359, 25–36 (2008).
- Brown, M. T., Landing, W. M. & Measures, C. I. Dissolved and particulate Fe in the western and central North Pacific: Results from the 2002 IOC cruise. *Geochem. Geophys. Geosys.* 6, Number 10 (2005).
- Browning, T. J. et al. Iron limitation of microbial phosphorus acquisition in the tropical North Atlantic. *Nat. Commun.* 8, 1–7 (2017).

- Bruland, K. W. Oceanographic distributions of cadmium, zinc, nickel, and copper in the North Pacific. *Earth Planet. Sci. Lett.* 47, 176–198 (1980).
- Brum, J. R. Concentration, production and turnover of viruses and dissolved DNA pools at Stn ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre. *Aquat. Microb. Ecol.* 41, 103–113 (2005).
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergman, B. & Carpenter, E. J. *Trichodesmium*, a Globally Significant Marine Cyanobacterium. *Science* 276, 1221–1229 (1997).
- Capone, D. G. et al. An extensive bloom of the N<sub>2</sub>-fixing Cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the central Arabian Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172, 281–292 (1998).
- Capone, D. G. et al. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cy.* 19.2 (2005).
- Cavender-Bares, K. K., Karl, D. M. & Chisholm, S. W. Nutrient gradients in the western North Atlantic Ocean: Relationship to microbial community structure and comparison to patterns in the Pacific Ocean. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 48, 2373–2395 (2001).
- Chang, J., Shiah, F. K., Gong, G. C. & Chiang, K. P. Cross-shelf variation in carbon-to-chlorophyll *a* ratios in the East China Sea, summer 1998. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 50, 1237–1247 (2003).
- Chen, D., Qian, P. Y. & Wang, W. X. Biokinetics of cadmium and zinc in a marine bacterium: influences of metal interaction and pre-exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(8), 1794–1801 (2008).
- Clark, L. L. & Ingall, E. D. & Benner R. Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature* 1998 393–426. (1998).
- Cotner, J. B., Ammerman, J. W., Peele, E. R. & Bentzen, E. Phosphorus-limited bacterioplankton growth in the Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 13(2), 141–149 (1997).
- Debelius, B., Forja, J. M. & Lubián, L. M. Toxicity of copper, nickel and zinc to *Synechococcus* populations from the Strait of Gibraltar. *J Marine Syst.* 88(1), 113–119 (2011).
- DeFrank, J. J., Beaudry, W. T., Cheng, T. C., Harvey, S. P., Stroup, A. N. & Szafraniec, L. L. Screening of halophilic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chem.-Biol. Interact.* 87(1–3), 141–148 (1993).
- Desboeufs, K. V., Sofikitis, A., Losno, R., Colin, J. L. & Ausset, P. Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. *Chemosphere* 58, 195–203 (2005).
- Diaz, J. et al. Marine polyphosphate: a kept player in geologic phosphorus sequestration. *Science* 320, 652–655 (2008).
- Diaz, J. M., Holland, A., Sanders, J. G., Bulski, K., Mollett, D., Chou, C. W., ... & Duhamel, S. Dissolved organic phosphorus utilization by phytoplankton reveals preferential degradation of polyphosphates over phosphomonoesters. *Frontiers in Marine Science*, 5, 380 (2018).
- Duce, R. A. & Tindale, N. W. Atmospheric transport of iron and its deposition in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1715–1726 (1991).

- Duhamel, S., Dyhrman, S. T. & Karl, D. M. Alkaline phosphatase activity and regulation in the North Pacific Subtropical Gyre. *Limnol. Oceanogr.* 55, 1414–1425 (2010).
- Duhamel, S., Björkman, K. M., van Wambeke, F., Moutin, T. & Karl, D. M. Characterization of alkaline phosphatase activity in the north and south pacific subtropical gyres: Implications for phosphorus cycling. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1244–1254 (2011).
- Duhamel, S., Björkman, K. M., Repeta, D. J. & Karl, D. M. Phosphorus dynamics in biogeochemically distinct regions of the southeast subtropical Pacific Ocean. *Prog. Oceanogr.* 151, 261–274 (2017).
- Dyhrman, S. T., Webb, E. A., Anderson, D. M., Moffett, J. W. & Waterbury, J. B. Cell-specific detection of phosphorus stress in *Trichodesmium* from the Western North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1832–1836 (2002).
- Dyhrman, S. T., Chappell, P. D., Haley, S. T., Moffett, J. W., Orchard, E. D., Waterbury, J. B. & Webb, E. A. Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature* 439, 68–71 (2006).
- Dyhrman, S. T. & Haley, S. T. Phosphorus scavenging in the unicellular marine diazotroph *Crocospaera watonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1452–1458 (2006).
- Eivazi, F. & Tabatabai, M. A. (1977). Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9(3), 167–172 (1977).
- El-Shehawy, R., Lugomela, C., Ernst, A. & Bergman, B. Diurnal expression of *hetR* and diazocyte development in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*. *Microbiology* 149, 1139–1146 (2003).
- Eppley, R. W., Renger, E. H., Venrick, E. L. & Mullin, M. M. A study of plankton dynamics and nutrient cycling in the central gyre of the North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 18(4), 534–551 (1973).
- Froelich, P. N., Bender, M. L., Luedtke, N. A., Heath, G. R. & DeVries, T. The marine phosphorus cycle. *Am. J. Sci.* 282(4), 474–511 (1982).
- Fu, F. X. & Bell, P. R. F. Effect of salinity on growth, pigmentation, N<sub>2</sub> fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257, 69–76 (2003).
- Fu, F. X., Zhang, Y., Bell, P. R. F. & Hutchins, D. A. Phosphate uptake and growth kinetics of *Trichodesmium* (Cyanobacteria) isolates from the North Atlantic Ocean and the Great Barrier Reef, Australia. *J. Phycol.* 41, 62–73 (2005).
- Garcia, N. S., Fu, F., Sedwick, P. N. & Hutchins, D. A. Iron deficiency increases growth and nitrogen-fixation rates of phosphorus-deficient marine cyanobacteria. *ISME J.* 9, 238–245 (2015).
- Garde, K. & Gustavson, K. The impact of UV-B radiation on alkaline phosphatase activity in phosphorus-depleted marine ecosystems. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 238, 93–105 (1999).
- Grabowski, M. N. W., Church, M. J. & Karl, D. M. Nitrogen fixation rates and controls at Stn ALOHA. *Aquat. Microb. Ecol.* 52, 175–183 (2008).

- Gradoville, M. R. et al. Diversity and activity of nitrogen-fixing communities across ocean basins. *Limnol. Oceanogr.* 62, 1895–1909 (2017).
- Grainger, S. L. J. Filament structure and phosphatase activity in the *Rivulariaceae*. Doctoral dissertation, Durham University. (1989).
- Hannides, C. C. S. et al. Export stoichiometry and migrant-mediated flux of phosphorus in the North Pacific Subtropical Gyre. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 56, 73–88 (2009).
- Hansen, H. P. & Koroleff, F. Determination of Nutrients. *Methods of Seawater Analysis*, 3rd eds. 159-228 (1999).
- Hargrave, B. T. Feeding rates of zooplankton in a natural community. B. Sc. Thesis, Dalhousie University (1965).
- Hargrave, B. T. & Geen, G. H. Phosphorus excretion by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 13(2), 332-342 (1968).
- Hashihama, F. et al. Macro-scale exhaustion of surface phosphate by dinitrogen fixation in the western North Pacific. *Geophys. Res. Lett.* 36, 2–6 (2009).
- Hashihama, F., Kinouchi, S., Suwa, S., Suzumura, M. & Kanda, J. Sensitive determination of enzymatically labile dissolved organic phosphorus and its vertical profiles in the oligotrophic western North Pacific and East China Sea. *J. Oceanogr.* 69, 357–367 (2013).
- Hmelo, L. R., Van Mooy, B. A. S. & Mincer, T. J. Characterization of bacterial epibionts on the cyanobacterium *Trichodesmium*. *Aquat. Microb. Ecol.* 67(1), 1-14 (2012).
- Hoppe, H. Relations between bacterial extracellular enzyme activities and heterotrophic substrate uptake in a brackishwater environment. *Colloque International de Bacteriologie Marine, Brest (France)*, 1-5 (1984).
- Hoppe, H. G. & Ullrich, S. Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: Phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquat. Microb. Ecol.* 19, 139–148 (1999).
- Hoppe, H. Phosphatase activity in the sea. 187–200 (2003). doi:10.1023/A:1025453918247
- Ikeda, T. The effect of laboratory conditions on the extrapolation of experimental measurements to the ecology of marine zooplankton III Short-term changes in the respiration rates of two subtropical zooplankton species, *Acartia tonsa* and *Sagitta hispida*. *Mar. Biol.* 58, 285–293 (1980).
- Ikeda, T., Hing Fay, E., Hutchinson, S. A. & Boto, G. M. Ammonia and inorganic phosphate excretion by zooplankton from inshore waters of the Great Barrier Reef, Queensland. I. Relationship between excretion rates and body size. *Mar. Freshw. Res.* 33, 55–70 (1982).
- Ikeda, T. & Mitchell, A. W. Oxygen uptake, ammonia excretion and phosphate excretion by krill and other Antarctic zooplankton in relation to their body size and chemical composition. *Mar. Biol.* 71, 283–298 (1982).
- Ikeda, T. Distribution, growth and life cycle of the mesopelagic amphipod *Primno abyssalis* (Hyperiid: Phrosinidae) in the southern Japan Sea. *Mar. Biol.* 123, 789-798 (1995).
- Ikeda, T., Kanno, Y., Ozaki, K. & Shinada, A. Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a

- function of body mass and temperature. *Mar. Biol.* 139(3), 587-596 (2001).
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W. ... & Azam, F. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(8), 593 (2010).
- Kaeriyama, H. & Ikeda, T. Vertical distribution and population structure of the three dominant planktonic ostracods (*Discoconchoecia pseudodiscophora*, *Orthoconchoecia haddoni* and *Metaconchoecia skogsbergi*) in the Oyashio region, western North Pacific. *Plankton Biol. Ecol.* 49(2), 66-74 (2002).
- Karl, D. M. & Tien, G. MAGIC: A sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* 37, 105–116 (1992).
- Karl, D. M. & Yanagi, K. Partial characterization of the dissolved organic phosphorus pool in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1398–1405 (1997).
- Karl, D. M., Bidigare, R. R. & Letelier, R. M. Long-term changes in plankton community structure and productivity in the North Pacific Subtropical Gyre: The domain shift hypothesis. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 48, 1449–1470 (2001).
- Karl, D. M. & Björkman, K. M. Dynamics of dissolved organic phosphorus. In *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (pp. 233-334). Academic Press (2015).
- Kim, T., Obata, H., Kondo, Y., Ogawa, H. & Gamo, T. Distribution and speciation of dissolved zinc in the western North Pacific and its adjacent seas. *Mar. Chem.* 173, 330–341 (2015).
- Kitamura, M. et al. Seasonal changes in the mesozooplankton biomass and community structure in subarctic and subtropical time-series stations in the western North Pacific. *J. Oceanogr.* 72, 387–402 (2016).
- Kobari, T., Kitamura, M., Minowa, M., Isami, H., Akamatsu, H., Kawakami, H., ... & Honda, M. C. Impacts of the wintertime mesozooplankton community to downward carbon flux in the subarctic and subtropical Pacific Oceans. *Deep. Res. Part I Oceanogr.* 81, 78-88 (2013).
- Koike, I. & Nagata, T. High potential activity of extracellular alkaline phosphatase in deep waters of the central Pacific. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 44, 2283–2294 (1997).
- Kondo, Y., Takeda, S. & Furuya, K. Distinct trends in dissolved Fe speciation between shallow and deep waters in the Pacific Ocean. *Mar. Chem.* 134-135, 18–28 (2012).
- Kononova, S. V. & Nesmeyanova, M. A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 67(2), 184-195 (2002).
- Kremer, P. Respiration and excretion by the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Mar. Biol.* 44, 43–50 (1977).
- Kuenzler, E. J. (1970). Dissolved organic phosphorus excretion by marine phytoplankton. *J. Phycol.* 6(1), 7-13 (1970).
- Kumar, T. A., Singh, S. & Tiwari, D. N. Alkaline phosphatase activities of an *Anabaena* sp. From deep-water rice. *World J Microb. Biot.* 8, 585-588 (1992).
- Labry, C., Delmas, D. & Herbland, A. Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in



- relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters (Bay of Biscay). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 318, 213–225 (2005).
- Le Borgne, R. (1986). The release of soluble end products of metabolism. Corner, E. D. S. & O'Hara, S. C. M. (Eds.). *The biological chemistry of marine copepods*. Oxford University Press P109-164 (1986).
- Lee, S. & Fuhrman, J. A. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(6), 1298-1303 (1987).
- Li, H., Veldhuis, M. J. W. & Post, A. F. Alkaline phosphatase activities among planktonic communities in the northern Red Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 173, 107–115 (1998).
- Lin, H. Y. et al. Identification and characterization of an extracellular alkaline phosphatase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biotechnol.* 15, 425–436 (2013).
- Lin, W., Zhao, D. & Luo, J. Distribution of alkaline phosphatase genes in cyanobacteria and the role of alkaline phosphatase on the acquisition of phosphorus from dissolved organic phosphorus for cyanobacterial growth. *J. Appl. Phycol.* 30(2), 839-850 (2018).
- Liu, X. & Millero, F. J. The solubility of iron in seawater. *Mar. Chem.* 77, 43–54 (2002).
- Louanchi, F. & Najjar, R. G. A global monthly climatology of phosphate, nitrate, and. *Glob. Biogeochem. Cycles* 14, 957–977 (2000).
- Luo, H., Benner, R., Long, R. A. & Hu, J. Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21219–21223 (2009).
- Mahaffey, C., Reynolds, S., Davis, C. E. & Lohan, M. C. Alkaline phosphatase activity in the subtropical ocean: insights from nutrient, dust and trace metal addition experiments. *Front. Mar. Sci.* 1, 1–13 (2014).
- Mahowald, N. M. & Luo, C. A less dusty future? *Geophys. Res. Lett.* 30(17) (2003).
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S. & Vaulot, D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(1), 186-193 (1997).
- Marshall, S. M., Orr, P. & Conover, R. J. On the biology of *Calanus finmarchicus* XII. The phosphorus cycle: excretion, egg production, autolysis. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 41(2), 463-488 (1961).
- Martin, J. H. & Fitzwater, S. E. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature*, 331(6154), 341-343 (1988).
- Martinez, J. & Azam, F. Aminopeptidase activity in marine chroococcoid cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11), 3701-3707 (1993a). Martinez, J. & Azam, F. Periplasmic aminopeptidase and alkaline phosphatase activities in a marine bacterium: implications for substrate processing in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92, 89–97 (1993b).
- Meybeck, M. Carbon, nitrogen, and phosphorus transport by world rivers. *Am J Sci* 282: 401-450 (1982).
- Michaels, A. F. & Knap, A. H. Overviews of the U.S. JGOFS Bermuda Atlantic Time-series study

- and the Hydrostation S program. Deep-Sea Res. Pt II 43, 157-198 (1996).
- Millero, F. J., Woosley, R., Ditrolio, B. & Waters, J. Effect of ocean acidification on the speciation of metals in seawater. Oceanography 22, 72-85 (2009).
- Mochida, M. Seasonal variation and origins of dicarboxylic acids in the marine atmosphere over the western North Pacific. J. Geophys. Res. 108, 4193 (2003).
- Mohr, W., Großkopf, T., Wallace, D. W. R. & LaRoche, J. Methodological underestimation of oceanic nitrogen fixation rates. PLoS One 5, 1–7 (2010).
- Monbet, P., McKelvie, I. D., Saefumillah, A. & Worsfold, P. J. A protocol to assess the enzymatic release of dissolved organic phosphorus species in waters under environmentally relevant conditions. Environ. Sci. Technol. 41, 7479-7485 (2007).
- Monbet, P., McKelvie, I. D. & Worsfold, P. J. Dissolved organic phosphorus speciation in the waters of the Tamar estuary (SW England). Geochim. Cosmochim. Acta 73, 1027-1038 (2009).
- Montoya, J. P., Voss, M., Kahler, P. & Capone, D. G. A Simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N<sub>2</sub> fixation. Appl. Environ. Microbiol. 62, 986–993 (1996).
- Moore, L. R., Goericke, R. & Chisholm, S. W. Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. Mar. Ecol. Prog. Ser. 259-275 (1995).
- Moutin, T. et al. Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. Biogeosciences 5, 95–109 (2008).
- Mulholland, M. R., Floge, S., Carpenter, E. J. & Capone, D. G. Phosphorus dynamics in cultures and natural populations of *Trichodesmium* spp. Mar. Ecol. Prog. Ser. 239, 45–55 (2002).
- Nakamura, K., Takahashi, K., Shimode, S., Shimizu, Y. & Furuya, K. Effects of container size, density, and incubation period on ammonium excretion rate measurements of planktonic copepods: Validation with a highly sensitive analytical method. Plankton & Benthos Res. (2019).
- Nausch, M. Microbial activities on *Trichodesmium* colonies. Mar. Ecol. Prog. Ser. 141, 173-181 (1996).
- Nausch, M. Alkaline phosphatase activities and the relationship to inorganic phosphate in the Pomeranian Bight (southern Baltic Sea). Aquat. Microb. Ecol. 16, 87–94 (1998).
- O'Brien, P. J. & Herschlag, D. Functional interrelationships in the alkaline phosphatase superfamily: Phosphodiesterase activity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. Biochemistry 40, 5691–5699 (2001).
- Orchard, E. D., Webb, E. A. & Dyhrman, S. T. Molecular analysis of the phosphorus starvation response in *Trichodesmium* spp. Environ. Microbiol. 11, 2400–2411 (2009).
- Orchard, E. D., Ammerman, J. W., Lomas, M. W. & Dyhrman, S. T. Dissolved inorganic and organic phosphorus uptake in *Trichodesmium* and the microbial community: The importance of phosphorus ester in the Sargasso Sea. Limnol. Oceanogr. 55, 1390–1399 (2010a).
- Orchard, E. D., Benitez-Nelson, C. R., Pellechia, P. J., Lomas, M. W. & Dyhrman, S. T.

- Polyphosphate in *Trichodesmium* from the low-phosphorus Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* 55, 2161–2169 (2010b).
- Orrett, K. & Karl, D. M. Dissolved organic phosphorus production in surface seawaters. *Limnol. Oceanogr.* 32, 383–395 (1987).
- Paul, J. H., Jeffrey, W. H. & Deflaun, M. F. Dynamics of extracellular DNA. *Environ. Microbiol.* 53, 170–179 (1987).
- Paytan, A., Cade-Menun, B. J., McLaughlin, K. & Faul, K. L. Selective phosphorus regeneration of sinking marine particles: Evidence from  $^{31}\text{P}$ -NMR. *Mar. Chem.* 82, 55–70 (2003).
- Paytan, A. & McLaughlin, K. The oceanic phosphorus cycle. *Chemical reviews* 107(2), 563–576 (2007).
- Perry, M. J. Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Mar. Biol.* 15, 113–119 (1972).
- Pinhassi, J. et al. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6753–6766 (2004).
- Polyviou, D., Hitchcock, A., Baylay, A. J., Moore, C. M. & Bibby, T. S. Phosphite utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 824–830 (2015).
- Pomeroy, L. R., Mathews, H. M. & Min, H. S. Excretion of phosphate and soluble organic phosphorus compounds by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 8, 50–55 (1963).
- Poretsky, R. S. et al. Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. *Environ. Microbiol.* 11, 1358–1375 (2009).
- Prufert-Bebout, L., Paerl, H. W. & Lassen, C. Growth, nitrogen fixation, and spectral attenuation in cultivated *Trichodesmium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1367–1375 (1993).
- Richardson, B. & Corcoran, A. A. Use of dissolved inorganic and organic phosphorus by axenic and nonaxenic clones of *Karenia brevis* and *Karenia mikimotoi*. *Harmful Algae* 48, 30–36 (2015).
- Rivkin, R. B. & Swift, E. Diel and vertical patterns of alkaline phosphatase activity in the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *Limnol. Oceanogr.* 24, 107–116 (1979).
- Rivkin, R. B. & Swift, E. Characterization of alkaline phosphatase and organic phosphorous utilization in the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *Mar. Biol.* 61, 1–8 (1980).
- Rodriguez, F. et al. Crystal structure of the *Bacillus subtilis* phosphodiesterase PhoD reveals an iron and calcium-containing active site. *J. Biol. Chem.* 289, 30889–30899 (2014).
- Roy, S., Harris, R. P. & Poulet, S. A. Inefficient feeding by *Calanus helgolandicus* and *Temora longicornis* on *Coscinodiscus wailesii*: quantitative estimation using chlorophyll-type pigments and effects on dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 145–153 (1989).
- Rubio, L. M. & Ludden, P. W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 93–111 (2008).
- Rueter, J. G. Iron Stimulation of photosynthesis and nitrogen fixation in *Anabaena* 7120 and *Trichodesmium* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* 24, 249–254 (1988).

- Saino, T. & Hattori, A. Diel variation in nitrogen fixation by a marine blue-green alga, *Trichodesmium thiebautii*. Deep. Res. 25, 1259–1263 (1978).
- Sameoto, D. D. Respiration rates, energy budgets and moulting frequencies of three species of euphausiids found in the Gulf of St. Lawrence. J. Fish. Res. Bd Can. 33, 2568-2576 (1976).
- Saito, M. A., Goepfert, T. J. & Ritt, J. T. Some thoughts on the concept of colimitation: three definitions and the importance of bioavailability. Limnol. Oceanogr. 53(1), 276-290 (2008).
- Sandh, G., Xu, L. & Bergman, B. Diazocyte development in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium*. Microbiology 158, 345-352 (2012).
- Sato, M., Hashihama, F., Kitajima, S., Takeda, S. & Furuya, K. Distribution of nano-sized Cyanobacteria in the western and central Pacific Ocean. Aquat. Microb. Ecol. 59, 273–282 (2010).
- Sato, M., Sakuraba, R. & Hashihama, F. Phosphate monoesterase and diesterase activities in the North and South Pacific Ocean. Biogeosciences 10, 7677-7688 (2013).
- Satomi, M. & Pomeroy, L. R. Respiration and phosphorus excretion in some marine populations. Ecology 46(6), 877-881 (1965).
- Schroth, A. W., Crusius, J., Sholkovitz, E. R. & Bostick, B. C. Iron solubility driven by speciation in dust sources to the ocean. Nat. Geosci. 2, 337–340 (2009).
- Sebastian, M. & Ammerman, J. W. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA. ISME J. 3, 563–572 (2009).
- Shaked, Y., Xu, Y., Leblanc, K. & Morel, F. M. M. Zinc availability and alkaline phosphatase activity in *Emiliania huxleyi*: Implications for Zn-P co-limitation in the ocean. Limnol. Oceanogr. 51, 299–309 (2006).
- Shiozaki, T. et al. New estimation of N<sub>2</sub> fixation in the western and central Pacific Ocean and its marginal seas. Global Biogeochem. Cycles 24, 1–12 (2010).
- Shiozaki, T., Kodama, T., Kitajima, S., Sato, M. & Furuya, K. Advective transport of diazotrophs and importance of their nitrogen fixation on new and primary production in the western Pacific warm pool. Limnol. Oceanogr. 58, 49–60 (2013).
- Shiozaki, T. et al. Basin scale variability of active diazotrophs and nitrogen fixation in the North Pacific, from the tropics to the subarctic Bering Sea. Global Biogeochem. Cycles 31(6), 996-1009 (2017).
- Sinoir, M. et al. Zinc marine biogeochemistry in seawater: A review. Mar. Freshw. Res. 63, 644–657 (2012).
- Sohm, J. A., & Capone, D. G. Phosphorus dynamics of the tropical and subtropical north Atlantic: *Trichodesmium* spp. versus bulk plankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 317, 21-28 (2006).
- Steinberg, D. K. & Carlson, C. A. Zooplankton vertical migration and the active transport of dissolved organic and inorganic carbon in the Sargasso Sea. Deep. Res. Part I, Oceanogr. Res. Pap. 47, 137 (2000).
- Steinberg, D. K., Goldthwait, S. A. & Hansell, D. A. Zooplankton vertical migration and the active

- transport of dissolved organic and inorganic nitrogen in the Sargasso Sea. Deep. Res. Part I, Oceanogr. Res. Pap. 49(8), 1445-1461 (2002).
- Stihl, A., Sommer, U. & Post, A. F. (2001) Alkaline phosphatase activities among populations of the colony-forming diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium* spp. (cyanobacteria) in the Red Sea. J. Phycol. 37, 310-317 (2001).
- Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis, 2nd ed. Bull Fish Res Bd Can, Ottawa, p310 (1972).
- Sunda, W. G. & Huntsman, S. A. Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. Limnol. Oceanogr. 41(3), 373-387 (1996).
- Suzuki, R. & Ishimaru, T. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. J. Oceanogr. Soc. Japan 46, 190-194 (1990).
- Suzumura, M., Ishikawa, K. & Ogawa, H. Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. Limnol. Oceanogr. 43(7), 1553-1564 (1998).
- Suzumura, M. Persulfate chemical wet oxidation method for the determination of particulate phosphorus in comparison with a high-temperature dry combustion method. Limnol. Oceanogr. Methods 6, 619-629 (2008).
- Suzumura, M., Hashihama, F., Yamada, N. & Kinouchi, S. Dissolved phosphorus pools and alkaline phosphatase activity in the euphotic zone of the western North Pacific Ocean. Front. Microbiol. 3, 1-13 (2012).
- Tang, K. W., Turk, V. & Grossart, H. P. Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. Aquat. Microb. Ecol. 61, 261-277 (2010).
- Taylor, A. H., Geider, R. J. & Gilbert, F. J. Seasonal and latitudinal dependencies of phytoplankton carbon-to-chlorophyll *a* ratios: results of a modelling study. Mar. Ecol. Prog. Ser. 152, 51-66 (1997).
- Tegen, I., Werner, M., Harrison, S. P. & Kohfeld, K. E. Relative importance of climate and land use in determining present and future global soil dust emission. Geophys. Res. Lett. 31(5) (2004).
- Turner, B. L., McKelvie, I. D. & Haygarth, P. M. Characterisation of water-extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis. Soil Biol. Biochem. 34, 27-35 (2002).
- Tyrrell, T. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature 400, 525-531 (1999).
- Valdés, V. P., Fernandez, C., Molina, V., Escibano, R. & Joux, F. Dissolved compounds excreted by copepods reshape the active marine bacterioplankton community composition. Front. Mar. Sci. 4, (2017).
- Valdés, V. et al. Nitrogen and phosphorus recycling mediated by copepods in Western Tropical South Pacific. Biogeosciences 15, 6019-6032 (2018).
- Van Den Broeck, N., Moutin, T., Rodier, M. & Le Bouteiller, A. Seasonal variations of phosphate availability in the SW Pacific Ocean near New Caledonia. Mar. Ecol. Prog. Ser. 268, 1-12

- (2004).
- Van Mooy, B. A. S. et al. Quorum sensing control of phosphorus acquisition in *Trichodesmium* consortia. *The ISME journal* 6(2), 422 (2012).
- Van Mooy, B. A. S. et al. Major role of planktonic phosphate reduction in the marine Phosphorus redox cycle. *Science* 348, 783–785 (2015).
- Vidal, M., Duarte, C. M., Agustí, S., Gasol, J. M. & Vaqué, D. Alkaline phosphatase activities in the central Atlantic Ocean indicate large areas with phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 262, 43–53 (2003).
- Wang, J., Stieglitz, K. A. & Kantrowitz, E. R. Metal specificity is correlated with two crucial active site residues in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry* 44, 8378–8386 (2005).
- Wanner, B. L. Molecular genetics of carbon-phosphorus bond cleavage in bacteria. *Biodegradation* 5(3-4), 175-184 (1994).
- Webb, E. A., Ehrenreich, I. M., Brown, S. L., Valois, F. W. & Waterbury, J. B. Phenotypic and genotypic characterization of multiple strains of the diazotrophic cyanobacterium, *Crocospaera watsonii*, isolated from the open ocean. *Environ. Microbiol.* 11, 338–348 (2009).
- Welschmeyer, N. A. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1985-1992 (1994).
- White, A. E., Spitz, Y. H., Karl, D. M. & Letelier, R. M. Flexible elemental stoichiometry in *Trichodesmium* spp. and its ecological implications. *Limnol. Oceanogr.* 51(4), 1777-1790 (2006).
- White, A. E., Karl, D. M., Bjorkman K. M., Beversdorf, L. J. & Letelier, R. M. Production of organic matter by *Trichodesmium* IMS101 as a function of phosphorus source. *Limnol. Oceanogr.* 55, 1755-1767 (2010).
- Williams, C. J. & Jochem, F. J. Ectoenzyme kinetics in Florida Bay: implications for bacterial carbon source and nutrient status. *Hydrobiologia* 569(1), 113-127 (2006).
- Wu, J., Sunda, W., Boyle, E. A. & Karl, D. M. Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science* 289, 759-762 (2000).
- Wu, J. R. et al. Cloning of the gene and characterization of the enzymatic properties of the monomeric alkaline phosphatase (PhoX) from *Pasteurella multocida* strain X-73. *FEMS Microbiol. Lett.* 267, 113–120 (2007).
- Yamaguchi, H., Yamaguchi, M., Fukami, K., Adachi, M. & Nishijima, T. Utilization of phosphate diester by the marine diatom *Chaetoceros ceratosporus*. *J. Plankton Res.* 27, 603–606 (2005).
- Yamaguchi 2013
- Yamaguchi, H., Arisaka, H., Otsuka, N. & Tomaru, Y. Utilization of phosphate diesters by phosphodiesterase-producing marine diatoms. *J Plankton Res.* 36(1), 281-285 (2013).
- Yasui, S., Kanda, J., Usui, T. & Ogawa, H. Seasonal variations of dissolved organic matter and nutrients in sediment pore water in the inner part of Tokyo Bay. *J. Oceanogr.* 72, 851–866

(2016).

Yentsch, C. M., Yentsch, C. S. & Perras, J. P. Alkaline phosphatase activity in the tropical marine blue green alga, *Oscillatoria erythraea* (“*Trichodesmium*”). Limnol. Oceanogr. 17, 772-774 (1972).

Yong, S. C. et al. A complex iron-calcium cofactor catalyzing phosphotransfer chemistry. Science, 345(6201), 1170-1173 (2014).

Yoshimura, T. et al. Dissolved organic phosphorus production and decomposition during open ocean diatom blooms in the subarctic Pacific. Mar. Chem. 165, 46–54 (2014).

Young, C. L. & Ingall, E. D. Marine dissolved organic phosphorus composition: Insights from samples recovered using combined electrodialysis/reverse osmosis. Aquat. Geochemistry 16, 563–574 (2010).

北島 聡 (2009) 太平洋熱帯・亜熱帯海域における窒素固定性シアノバクテリアの生態に関する研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科 博士論文

佐藤 岳 (2017) 西部北太平洋亜熱帯定点における各種リンプールの短期変動. 東京海洋大学海洋科学部 卒業論文

谷田 巖 (2015) 太平洋における窒素固定の栄養制限に関する研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科 博士論文

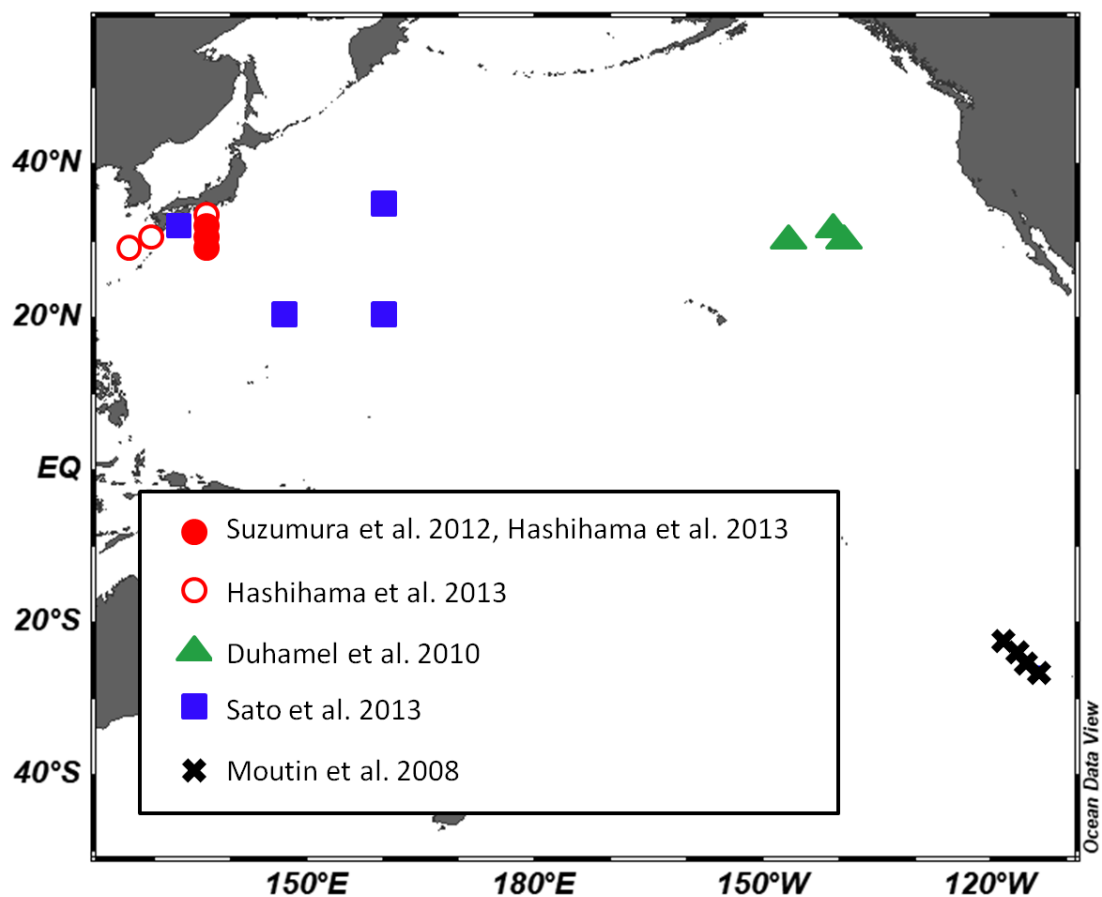


図 2.1 北太平洋におけるリン酸モノエステルを測定した先行研究とその位置.

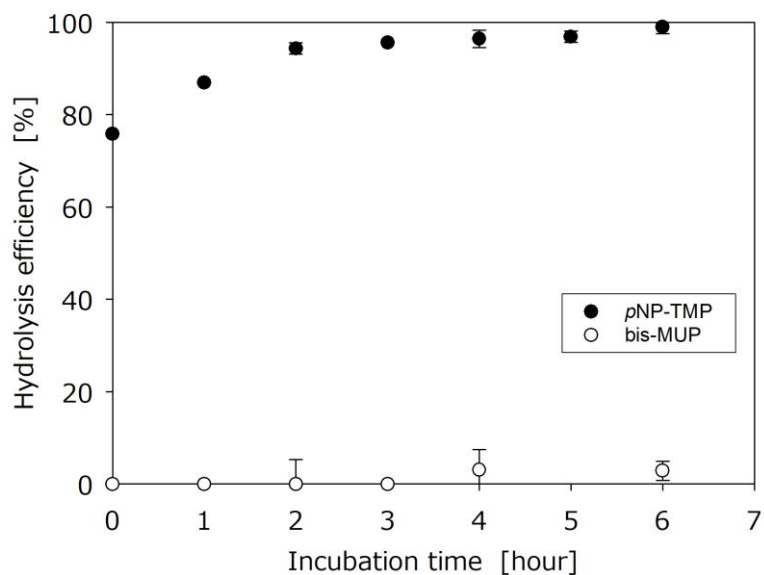


図 2.2 ヘビ由来 Phosphodiesterase I における基質別分解効率.

黒丸はチミジン 5'-リン酸 *p*-ニトロフェニルエステルナトリウム塩 (pNP-TMP)、白丸はビス 4-メチルウンベリフェリリン酸 (bis-MUP) を基質とした際の分解効率である。また、2、4、6 時間目のサンプルについてはエラーバーで標準偏差を示した。



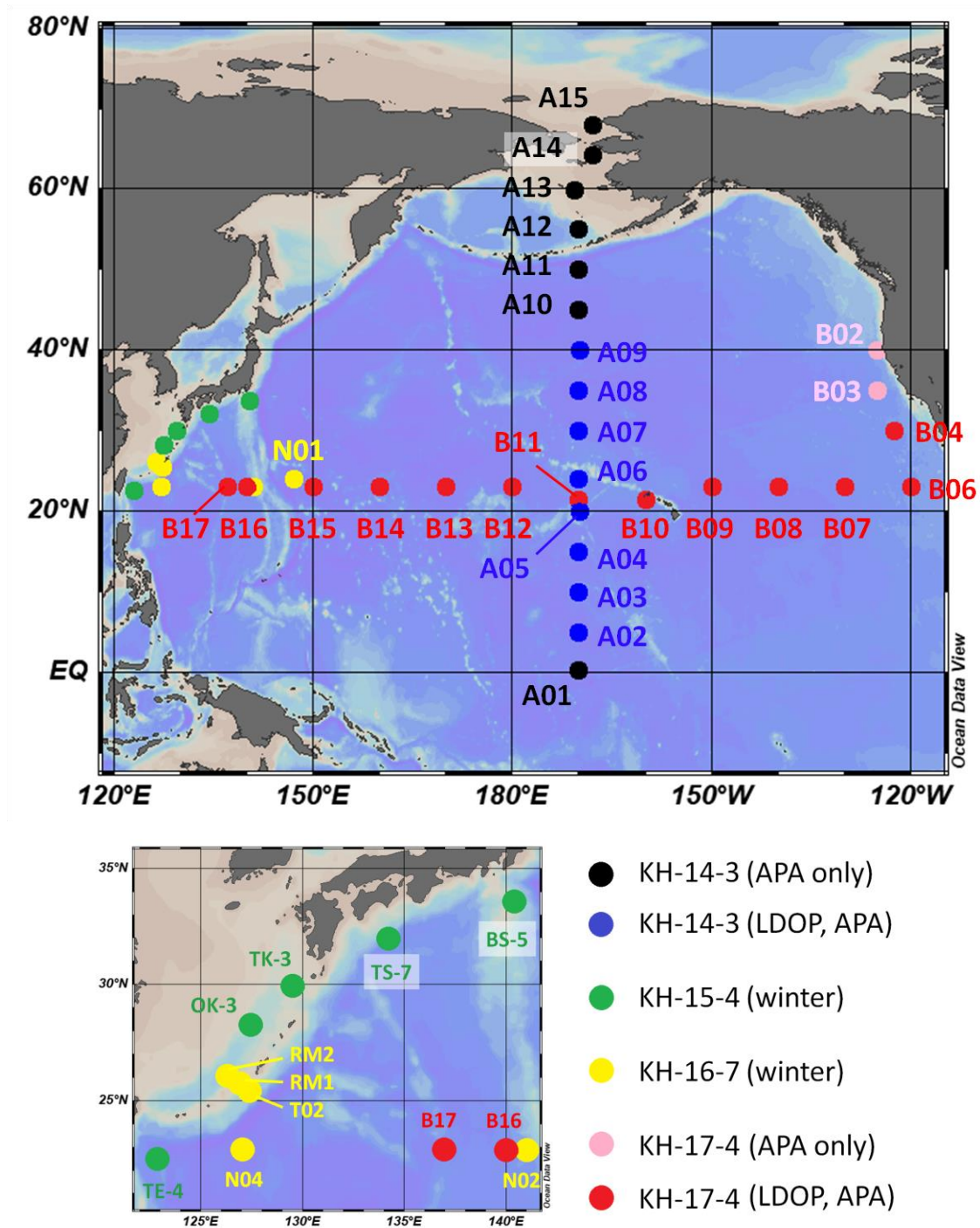


図 2.3 全 4 航海における測点図.

(APA only)とは同一航海中に、アルカリフォスファターゼ活性 (APA) の測定のみを行った測点を指し、(LDOP, APA)とは同一航海中に APA と易分解性溶存態リン (LDOP) の両方の測定を行った測点を指す。(winter)は冬季に行った測点であり、全測点において APA と LDOP の測定を行った。

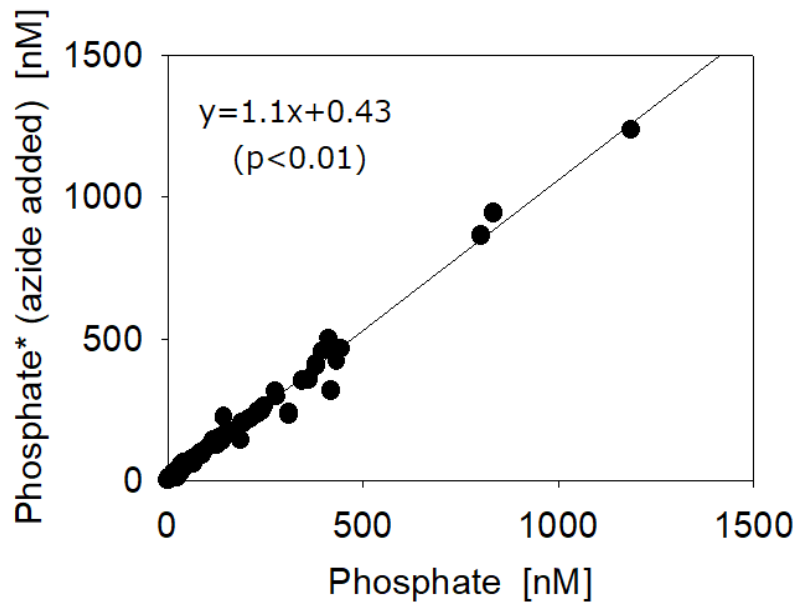


図 2.4 現場リン酸塩濃度と、アジ化ナトリウム添加培養後の試水中のリン酸塩(リン酸塩\*)濃度の関係.

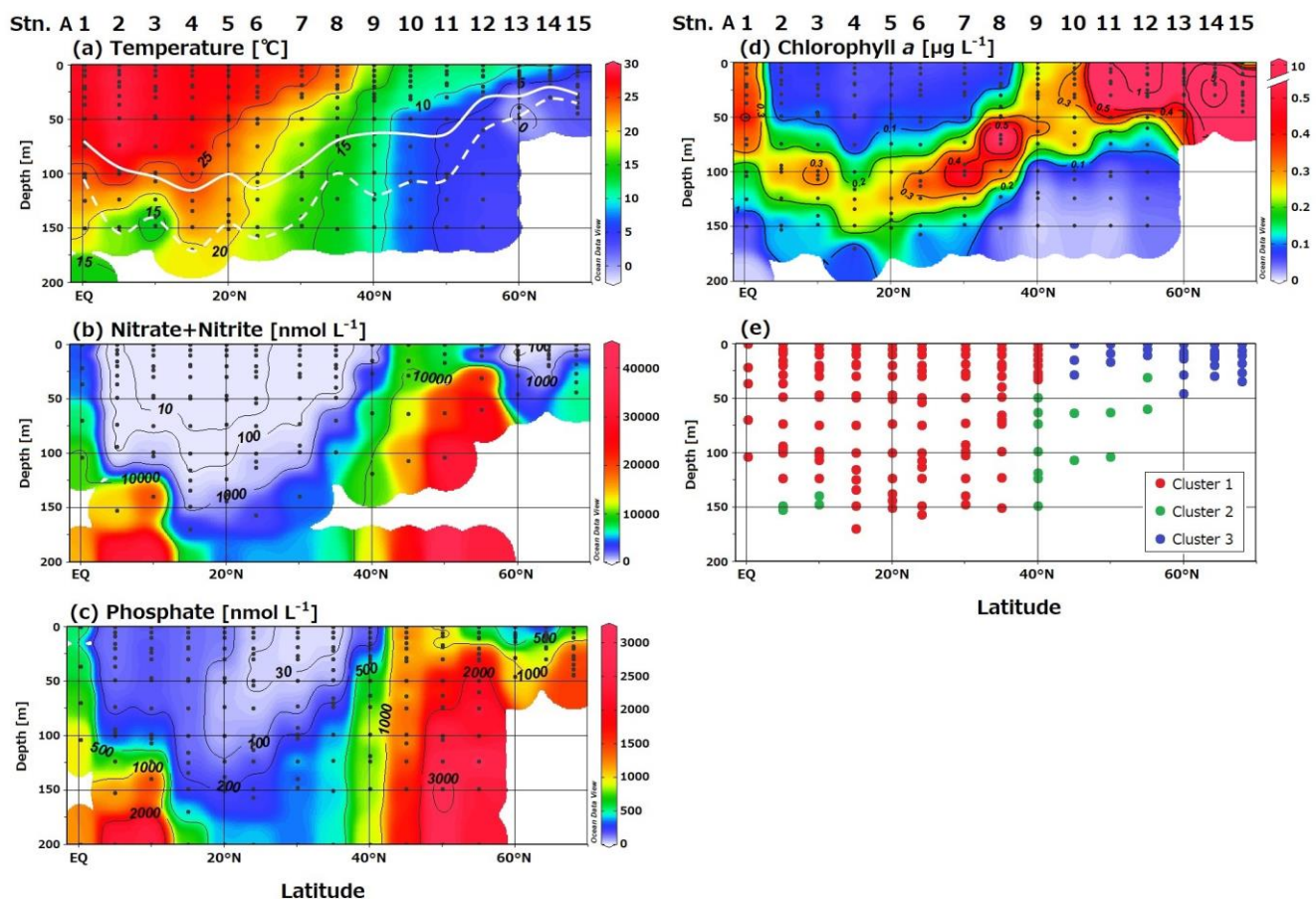


図 2.5 170°W 南北ラインにおける各環境要因の分布.

(a) 水温 (b) 硝酸塩+亜硝酸塩 (N+N) 濃度 (c) リン酸塩濃度 (d) クロロフィル (Chl)  $a$  濃度 (e) 試料別クラスター分けの結果

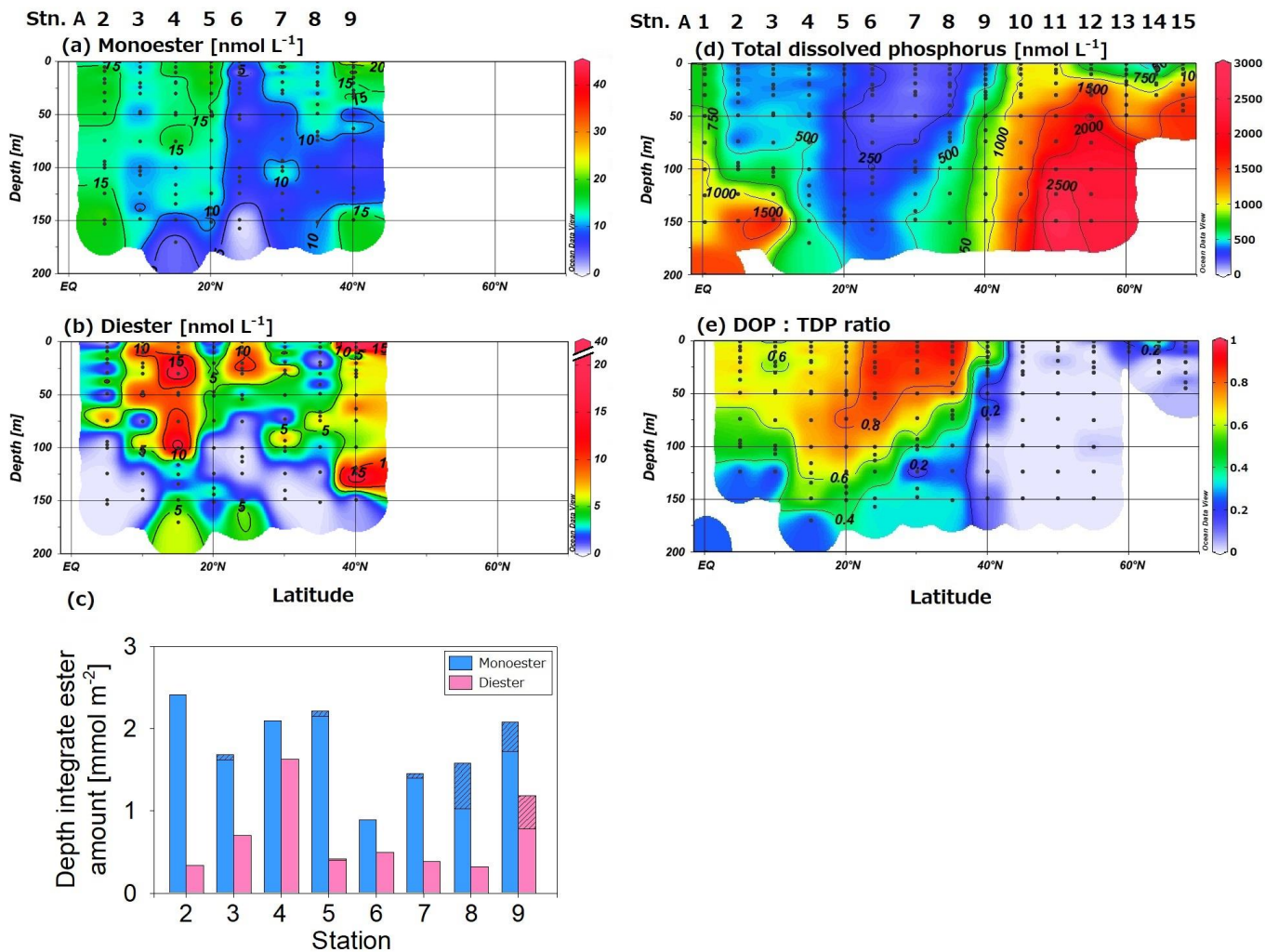


図 2.6 170°W 南北ラインにおける溶存有機態リンの分布.

(a)リン酸モノエステル (ME) 濃度 (b)リン酸ジエステル (DE) 濃度 (c) 両エステル水柱積算値 (d) 全溶存リン (TDP) 濃度 (e) 溶存有機態リン (DOP) :TDP 比  
(c) は測点 A02、04、06 では 0.1% 光量層 (> 150 m) まで、その他の測点では 150 m までの積算値を示す。また後者において、0.1% 光量層から 150 m までの積算値を斜線で表した。

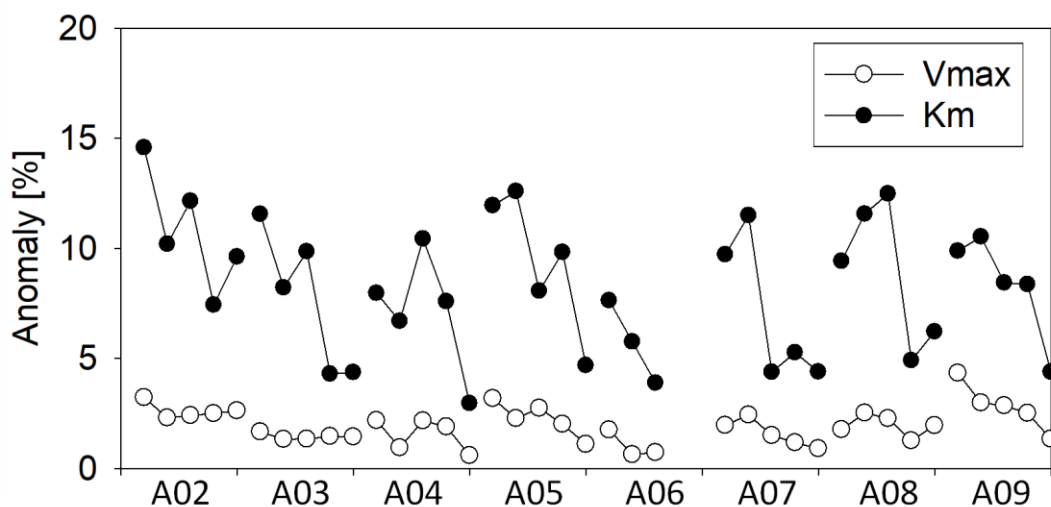


図 2.7 170°W 南北ラインにおける現場 ME 濃度を考慮した  $V_{max}'$ ,  $K_m'$  における  $V_{max}$ ,  $K_m$  に対する変化率.

各測点において、5 つの光量層のうち深度の浅い結果を左から順に示した。



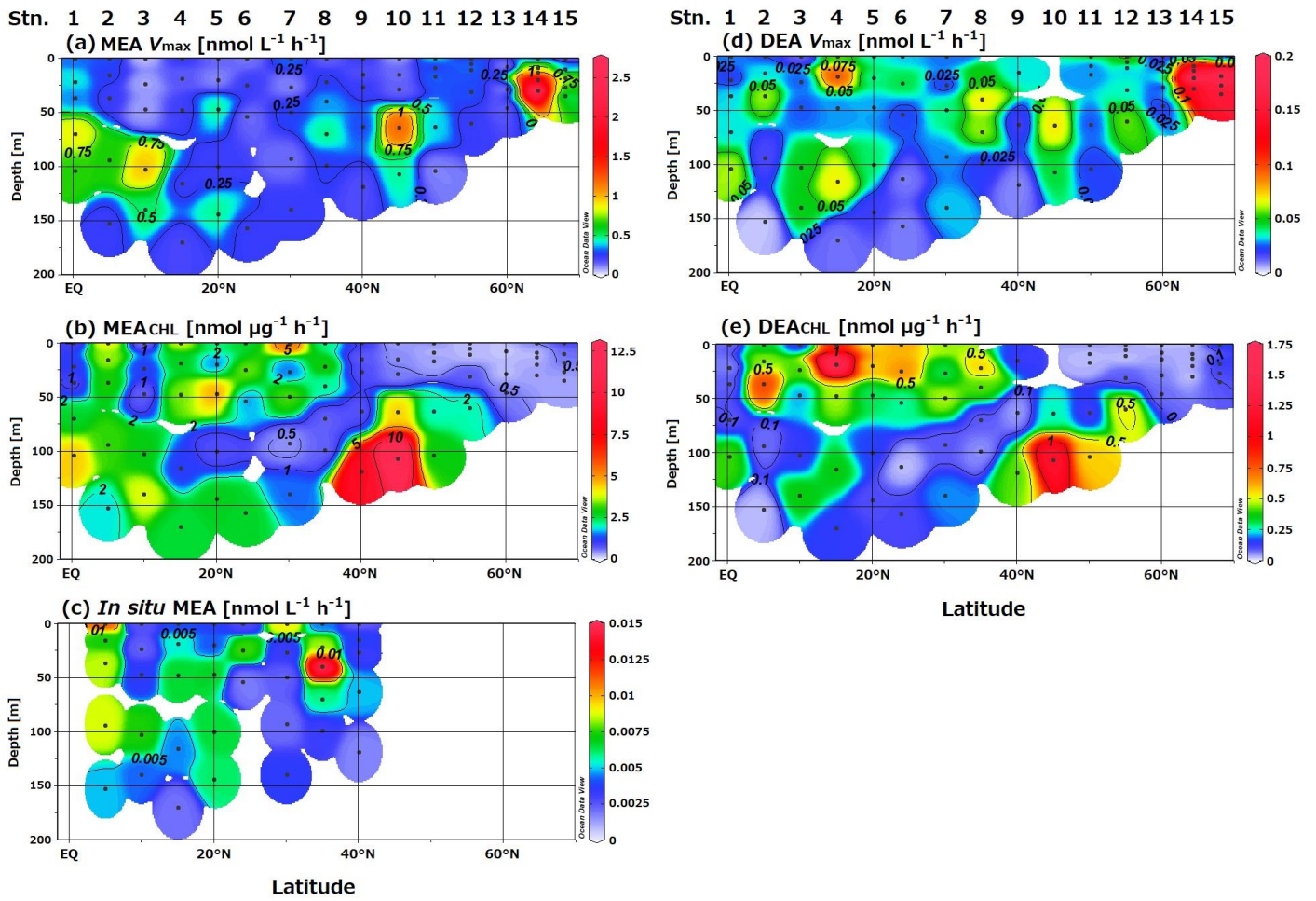


図 2.9 170°W 南北ラインにおけるアルカリフォスファターゼ活性の分布.

(a)  $MEA_{V_{max}}$  (b) Chl *a* 当たり MEA ( $MEA_{CHL}$ ) (c) in situ MEA

(d)  $DEA_{V_{max}}$  (e) Chl *a* 当たり DEA ( $DEA_{CHL}$ )

各略称は図 2.6 または図 2.8 を参照のこと。

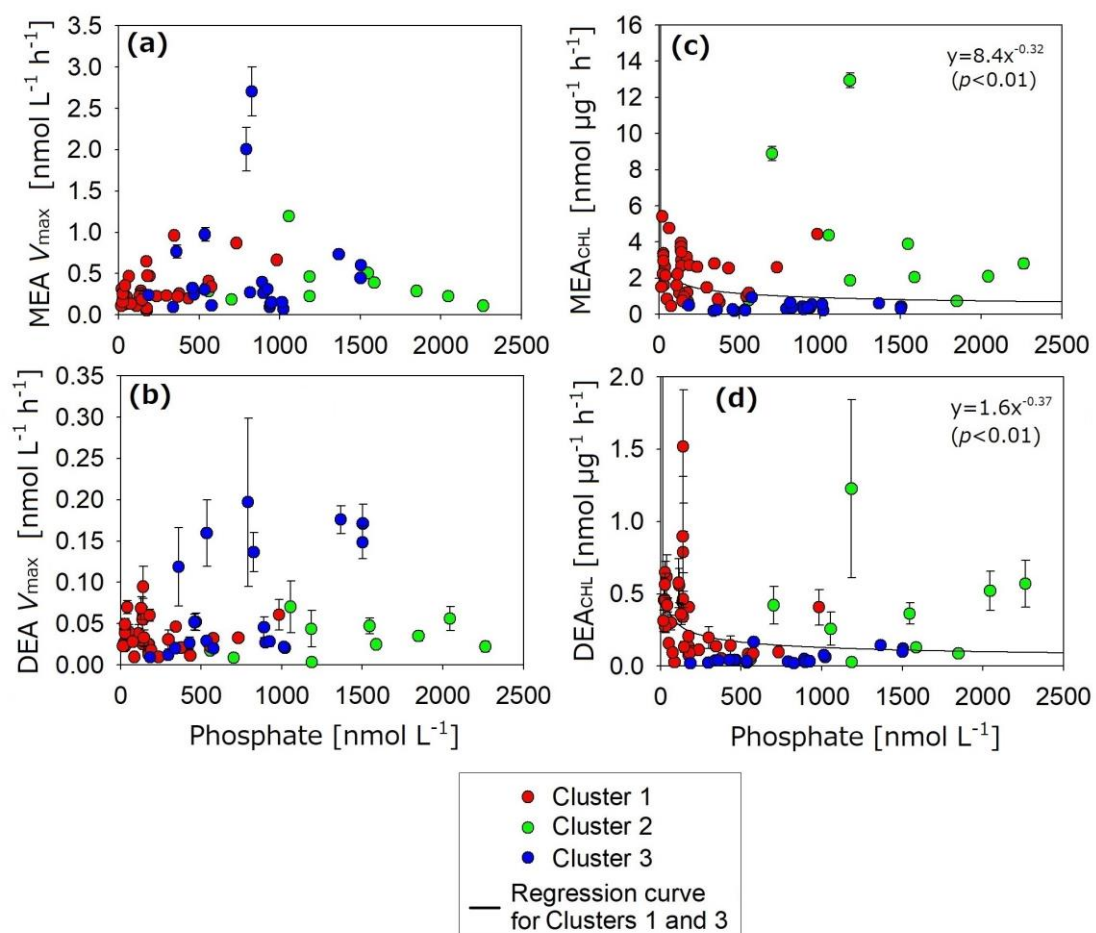


図 2.10 170°W 南北ラインにおけるリン酸塩濃度と (a) MEA  $V_{\max}$ 、(b) DEA  $V_{\max}$ 、(c) MEA<sub>chl</sub>、(d) DEA<sub>chl</sub> との関係。

各試料のクラスターをそれぞれ赤、緑、青丸で示し、クラスター1 および 3 を合わせた場合の累乗回帰曲線を黒線で示した。各略称は図 2.8 または図 2.9 を参照のこと。

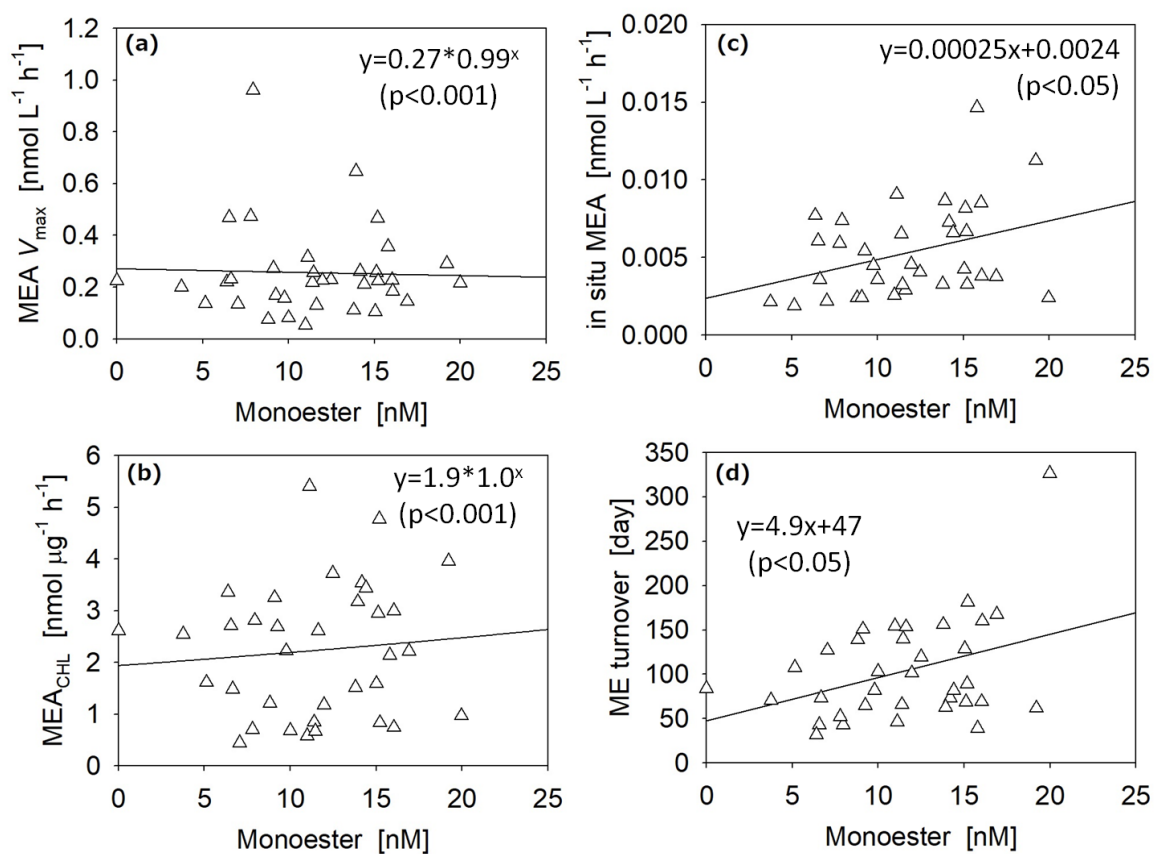


図 2.11 170°W 南北ラインにおける ME と (a) MEA  $V_{\max}$ 、(b) MEA<sub>CHL</sub>、(c) in situ MEA、(d) ME 回転時間との関係.

いずれのデータセットもクラスター1のみ使用した。各略称は図 2.6、2.8、2.9 を参照のこと。

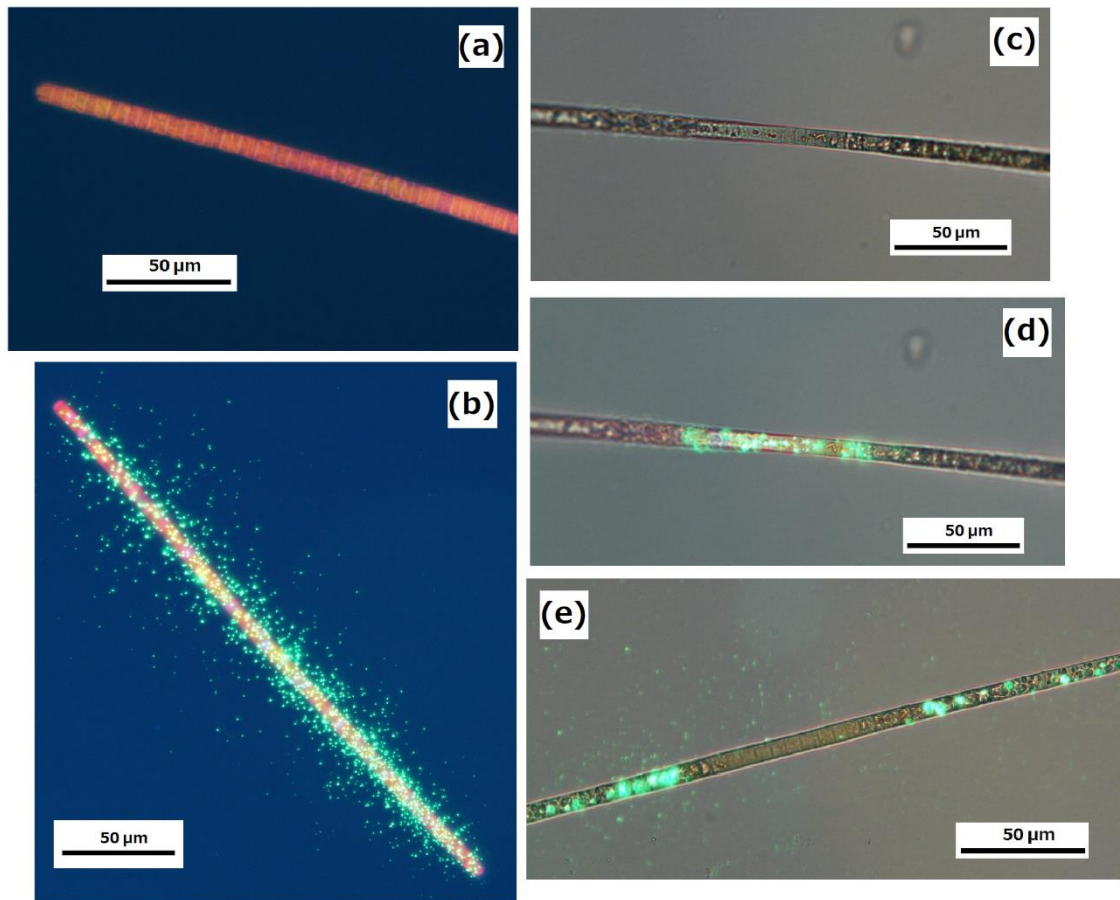


図 4.5 ELF97 で染色したトリコームの光学顕微鏡写真.

- (a) 通常培地、暗視野 UV 励起 (b) リン制限培地、暗視野 UV 励起 (c) リン制限培地、明視野 (d) リン制限培地、明視野 UV 励起 (e) リン制限培地、明視野 UV 励起。
- (c) (d) は同じトリコームを撮影したものであり、中央部分のジアゾサイトと推定される部位に蛍光粒子が集中している。
- (e) では反対に、ジアゾサイトと推定される部位を避けて蛍光粒子が観察された。