

博士論文

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
水圏生物科学専攻

谷田 巖

2015 年 7 月

目次

第一章 序論

1-1 熱帯亜熱帯域における窒素固定	1
1-2 窒素固定の制限要因	11
1-3 窒素固定の阻害要因	23
1-4 本研究の目的	32

第二章 太平洋における窒素固定のリン鉄共制限の海域的変動

2-1 背景	35
2-2 方法	
2-2-1 サンプルリング	37
2-2-2 クロロフィル <i>a</i>	38
2-2-3 栄養塩	39
2-2-4 溶存鉄	40
2-2-5 顕微鏡観察	41
2-2-6 <i>nifH</i> 現存量	41
2-2-7 エアロゾル沈着量見積り	43
2-2-8 ピコ・ナノ植物プランクトン現存量	43
2-2-9 基礎生産	44
2-2-10 セブタムキャップからの鉄溶出の評価	45
2-2-11 リンおよび鉄の添加実験	46
2-2-12 スチューデントの <i>t</i> -検定	48
2-2-13 主成分分析	48
2-2-14 クラスタ分析	50
2-3 結果	
2-3-1 水塊の特徴およびクロロフィル <i>a</i> 、基礎生産の分布	50
2-3-2 栄養塩および溶存鉄濃度、エアロゾル沈着量	53
2-3-3 窒素固定生物および植物プランクトン群集の組成	55
2-3-4 窒素固定活性の分布	58
2-3-5 各パラメータ間の関係	59
2-3-6 主成分分析およびクラスタ分析	61
2-3-7 リンおよび鉄の添加に対する窒素固定の応答	65
2-4 考察	
2-4-1 西部北太平洋熱帯亜熱帯域および東シナ海	67
2-4-2 東部太平洋熱帯域および赤道湧昇域	81
2-5 まとめ	82

第三章 銅が窒素固定および植物プランクトン群集に及ぼす影響

3-1 溶存銅サンプルの前処理としての紫外線照射の検討	
3-1-1 背景	134
3-1-2 方法	
3-1-2-1 紫外線照射時間検討実験	134
3-1-2-2 SAlFe reference sample 中の溶存銅濃度測定	135
3-1-3 結果	
3-1-3-1 紫外線照射時間と溶存銅の検出濃度の関係	135
3-1-3-2 SAlFe reference sample の測定	136
3-1-4 考察	136
3-2 溶存銅の鉛直分布	
3-2-1 背景	137
3-2-2 方法	
3-2-2-1 サンプルリング	139
3-2-2-2 水塊、クロロフィル、栄養塩	140
3-2-2-3 溶存銅測定用試薬	140
3-2-2-4 溶存銅濃度測定	141
3-2-2-5 植物プランクトン色素組成	143
3-2-3 結果	
3-2-3-1 水塊の特徴およびクロロフィル <i>a</i> 、植物プランクトン色素組成、栄養塩	144
3-2-3-2 溶存銅	147
3-2-4 考察	
3-2-4-1 溶存銅の鉛直分布の特徴	149
3-2-4-2 表面付近の高い溶存銅濃度	151
3-2-4-3 北太平洋における溶存銅の鉛直分布の比較	152
3-2-4-4 有光層内の溶存銅のソースとシンク	153
3-2-4-5 有光層以深の溶存銅のソースとシンク	155
3-2-4-6 ニッケルとの比較	157
3-3 窒素固定に対する銅の毒性の評価	
3-3-1 背景	158
3-3-2 方法	
3-3-2-1 サンプルリング	160
3-3-2-2 銅添加培養	161
3-3-2-3 窒素固定	161
3-3-2-4 ピコ・ナノ植物プランクトン群集	161

3-3-2-5 溶存銅濃度	162
3-3-2-6 競合配位子平衡カソーディックストリッピングボルタンメトリーによる銅有機配位子の測定の原理	162
3-3-2-7 銅滴定	166
3-3-2-8 pCu の計算	167
3-3-2-9 統計解析	167
3-3-3 結果	
3-3-3-1 栄養塩および溶存銅濃度、銅有機配位子	167
3-3-3-2 現場のピコ・ナノ植物プランクトン群集組成	169
3-3-3-3 鉄添加の影響	169
3-3-4 考察	171
3-4 まとめ	177
第四章 総合考察	197
摘要	210
謝辞	213
参考文献	216
付録	243

略語表

α_{Cu^+}	銅の無機副反応係数	EDTA	エチレンジアミン四酢酸
$\alpha_{\text{Cu}^{2+}+\text{L}}$	銅と銅有機配位子の副反応係数	ENSO	エルニーニョ・南方振動
$\alpha_{\text{Cu}^{2+}+(\text{SA})^{\times}}$	銅とサリチルアルドキシムの副反応係数	EPPS	3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]- プロパンスルホン酸
Allo	アロキサンチン	FLPE	フッ素加工ポリエチレン
ANOVA	分散分析	Fuco	フコキサンチン
AOU	見かけの酸素消費量	Hex	19'-ヘキサノイルフコキサンチン
But	19'-ブタノイルフコキサンチン	HNLC	高硝酸低クロロフィル
Chl <i>a</i>	クロロフィル <i>a</i>	HPLC	高速液体クロマトグラフィー
Chl <i>c</i> 3	クロロフィル <i>c</i> 3	<i>i</i>	銅滴定における検出ピークの高さ
Chld <i>a</i>	クロロフィリド <i>a</i>	K'_{CuL} または $K'_{\text{Cu}^{2+}+\text{L}}$	有機錯体銅の条件安定定数
CSV	カゾーデイックストリッピングボルタメトリー	L	銅有機配位子
CLE-CSV	競合配位子平衡カゾーデイックストリッピングボルタ メトリー	L'	銅と錯形成していない銅有機配位子
Cu^{2+}	遊離銅イオン(II)	MLD	混合層深度
Cu^+	有機配位子と錯形成していない銅	MV Chl. <i>a</i>	モノビニルクロロフィル <i>a</i>
CuL	有機錯体銅	MV Chl. <i>b</i>	モノビニルクロロフィル <i>b</i>
DCu	溶存銅	N+N	硝酸塩＋亜硝酸塩
Diad	デアアデイノキサンチン	Neo	ネオキサンチン
DMF	<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	PAR	光合成有効放射
DO	溶存酸素	PC	ポリカーボネート
DV Chl. <i>a</i>	ジビニルクロロフィル <i>a</i>	pCO ₂	二酸化炭素分圧

PCR	ポリメラゼ連鎖反応	SCM	亜表面クロフィル極大
pCu	遊離銅イオン濃度の常用対数の絶対値	SOD	スーパーオキシドジスムターゼ
PEEK	ポリエーテルエーテルケトン	SPRINTARS	Spectral Radiation-Transport Model for Aerosol Species
Peri	ペリデイン	SRP	溶存反応性リン
PFA	ペルフルオロアルコキシ	TE	トリス-エチレンジアミン四酢酸
POPSO	ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)	TPE	熱可塑性エラストマー
Pras	プラシノキサンチン	UV	紫外線
PTFE	ポリ四フッ化エチレン	Zea	ゼアキサンチン
S	銅滴定曲線の直線部分の傾き		

第一章 序論

1-1 熱帯亜熱帯域における窒素固定

海洋の亜熱帯循環は地球の表面積の約 4 割を占める最大の海洋循環である (Sverdrup et al. 1942)。亜熱帯循環においては北半球では時計回り、南半球では反時計回りの循環により、境界域で海流による水の交換が少ないため、水温や塩分、栄養塩の水平的勾配が小さい (Hayward 1987)。また、混合層深度の季節的変動が小さく年間を通して強く成層しているため (Bingham and Lukas 1996)、栄養塩の豊富な下層から植物プランクトンが生育可能な有光層への栄養塩供給が制限されている。このような理由から、亜熱帯の多くの海域では栄養塩濃度が低く、特に窒素が基礎生産を制限する主要な栄養素となっている。こうした亜熱帯外洋域における栄養塩濃度は極めて低く、従来法による測定では検出限界以下であること、クロロフィル *a* 濃度および基礎生産がともに低いことから、陸の砂漠になぞらえて「海の砂漠」と呼ばれている (Hayward et al. 1983)。しかし、1988 年に US Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) プログラムの一環で Hawaii Ocean Time-series (HOT) プログラムが開始され (Karl and Lukas 1996)、高感度分析法による栄養塩測定 (Garside 1982; Karl and Tien 1992) を用いて、Station ALOHA (A Long-Term Oligotrophic Habitat Assessment: 22° 45' N、158° 00' W) における栄養塩のナノモルレベルでの時系列変動が明らかにされた (Karl et al. 2001)。具体的には、溶存反応性リン (SRP) が長期的に減少し、それに伴って溶存態有機リン (DOP) (文献中では溶存非反応性リン: SNP) が増加する傾向が観測された。彼らはこの無機リン酸塩の消費について、*Trichodesmium* 現存量および窒素固定活性のデー

タ、懸濁粒子および沈降粒子中の N:P 比が Redfield 比より高かったこと、全溶存態窒素 (TDN) : 全溶存態リン (TDP) 比が表層で高かったこと、および沈降粒子中の $\delta^{15}\text{N}$ から年間の窒素源の 48% は窒素固定に由来するという見積りから、窒素固定が原因であると結論付けている (Karl et al. 1997)。また、この海域における沈降粒子フラックス中の粒子態窒素のうち、平均で 5 割程度が窒素固定由来のものであることも明らかになった (Dore et al. 2002)。こうして、亜熱帯循環において窒素固定が栄養塩動態と深く関わっていることが認識されるようになるにつれて、太平洋のハワイ周辺海域以外の西部北太平洋亜熱帯域でも窒素固定の新生産への寄与が見積もられた (Shiozaki et al. 2009)。これらの観測から、亜熱帯のうち比較的生物生産の高い ALOHA では新生産の半分、生物生産の低い西部北太平洋では最大 4 割に窒素固定が寄与していたと見積もられている。さらに、東部南太平洋および西部北太平洋においても SRP 濃度の空間的変動が調べられ、いずれの海域においても窒素固定の寄与によるものと思われる SRP 濃度の低下が報告されている (Moutin et al. 2008; Hashihama et al. 2009)。このように、窒素固定は貧栄養海域表層の新生産に対する重要な窒素供給源であるとともにリン消費とも関わる重要な過程である。

海洋の窒素固定を担う窒素固定生物の多様性についても、近年の研究から多くの知見が得られている。海洋の亜熱帯域における窒素固定は主にシアノバクテリアにより担われていると考えられており (Sohm et al. 2011)、様々な窒素固定性シアノバクテリアが知られている。初期の研究は光学顕微鏡で観察できる大型のシアノバクテリアである *Trichodesmium* 属および *Richelia intracellularis* を中心に行われた。*Trichodesmium* 属の特徴については Bergman et al. (2013) による

総説が詳しい。*Trichodesmium* 属はユレモ (*Oscillatoriaceae*) 科に属し、形態分類から以下の 2 系統群 6 種に分類される (Janson et al. 1995): (i) *T. tenue* (Wille 1904) および *Trichodesmium* sp., *T. erythraeum* (Ehrenberg 1830)、 (ii) *T. thiebautii* および *T. hildebrandtii* (Gomont 1893)、*T. contortum* (Wille 1904)。上記 2 系統群を分ける分類形質は、グリコーゲン繊維の塊の有無およびガス泡 (gas vacuole) の分布であり、これらをさらに種まで分類する際の形質として、ガス泡を構成する小胞 (gas vesicle) の直径、および円錐状体 (cylindrical body) および渦巻き状体 (scroll body)、“eccentric body”の有無が挙げられている (Janson et al. 1995)。*Trichodesmium* 属は幅 4–40 μm の細胞が連結した糸状体 (trichome) として存在し、黄褐色から暗褐色、あるいは赤みがかかった色をしており、また、しばしば複数の糸状体が集合したコロニーを形成する。また、分子系統学的にも *T. erythraeum* とそれ以外の種の 2 系統群に分類され、さらに、*Katagnymene* 属の海産種である *K. pelagica* および *K. spiralis* もこのうち後者と近縁であり、遺伝的には同属であることが指摘されている (Orcutt et al. 2002; Lundgren et al. 2005)。*Trichodesmium* 属では、唯一 *T. erythraeum* IMS101 株 (Prufert-Bebout et al. 1993) でゲノムが解読されている。本属は昼間に光合成を行うが、窒素固定の反応を触媒するニトロゲナーゼ酵素は酸素により不活性化されるため、光合成により発生する酸素からどのようなメカニズムでニトロゲナーゼを保護しているかについて、様々な議論が行われてきた。以前は、コロニー中心部で酸素濃度を低く維持することで窒素固定に好適な環境を維持しているという仮説も提唱されたが (Paerl and Bebout 1988)、トリコーム単体でも窒素固定能力を持つことから他のメカニズムが関連していると考えられており、現在では、酸素を発生

する光合成とニトロゲナーゼを用いる窒素固定を空間的あるいは時間的に隔離しているという仮説が有力である。まず、空間的隔離のメカニズムとしては、ジアゾサイトと呼ばれる細胞の存在が挙げられる。ジアゾサイトは通常の栄養細胞と比較してガス胞およびシアノフィチン粒子の含有が少なく (Sandh et al. 2012)、ルゴール液で染色した際に色彩が明るい細胞として確認できる (Fredriksson and Bergman 1997)。ジアゾサイトは *Trichodesmium* のトリコーム中に、2-30 細胞程度連結し、これが通常 1-2 箇所程度存在する。*Trichodesmium* は窒素固定時にのみジアゾサイトを形成し、ジアゾサイト内でのみニトロゲナーゼを発現する (Sandh et al. 2012)。ただし、全ての細胞に均等にニトロゲナーゼが存在するという報告もあり (Paerl et al. 1989; Ohki 2008; Orcutt et al. 2009)、ニトロゲナーゼの発現する細胞は条件によって変動するのかもしれない。また、ジアゾサイトは後述するヘテロシストと異なり、細胞分裂の能力を維持しており (Fredriksson and Bergman 1995)、ヘテロシストのように完全には栄養細胞から分化していない。つぎに、ニトロゲナーゼと酸素の時間的隔離のメカニズムとして、ニトロゲナーゼの発現と光合成の日周リズムのずれが挙げられる。*Trichodesmium* spp. のニトロゲナーゼの発現は正午頃に最大となるが、このタイミングで酸素除去過程である呼吸およびメーラー反応が活発化し、酸素を消費することで窒素固定に好適な環境を作り出していると考えられている (Berman-Frank et al. 2001)。*Trichodesmium* 属の天然における分布は検鏡と *nifH* 遺伝子を対象とした定量 PCR により大西洋で多く報告され、太平洋およびインド洋でも複数の報告例がある。このうち、特に大西洋

熱帯域および西部南太平洋、ハワイ沖、南シナ海、東シナ海で現存量が高い (Bombar et al. 2011; Luo et al. 2012)。

Richelia intracellularis および *Calothrix rhizosoleniae* は珪藻に共生するネンジュモ科 (Nostocaceae) の窒素固定性シアノバクテリアである (Ostenfeld and Schmidt 1901; Lemmerman 1905)。*Richelia* 属は *R. intracellularis* 1 種のみから構成され、栄養細胞の連鎖した藻糸の片端に窒素固定を行う細胞であるヘテロシスト 1 個を持つ。*R. intracellularis* の宿主として、珪藻 *Rhizosolenia acuminata*、*R. bergonii*、*R. clevei*、*R. cylindrus*、*R. firma*、*R. hebetata*、*R. imbricate*、*R. styliiformis*、*Hemiaulus indicus*、*H. hauckii*、*H. membranaceus*、*H. sinensis*、*Guinardia* 属、*Chaetoceros compressum*、*Bacteriastrum* 属が報告されている (Karsten 1907; Sournia 1970)。ただし、*Rhizosolenia* 属については、古い知見が誤同定を含むことが指摘されている (Sundström 1984)。これらのうち、*Rhizosolenia* 属、*Hemiaulus* 属、*Guinardia* 属については *R. intracellularis* は珪藻殻内部のペリプラズム間隙に、*Chaetoceros* 属および *Bacteriastrum* 属には珪藻殻外部に共生する。これらのうち、*Chaetoceros* 属の珪藻殻外部に共生するものを現在は *C. rhizosoleniae* と分類することが多いが、いずれも *R. intracellularis* に含める場合もある (Janson et al. 1999; Gomez et al. 2005)。*R. intracellularis* と *C. rhizosoleniae* の違いとして、宿主の違いに加えて、形態的な違いとして、*C. rhizosoleniae* はヘテロシスト径が *R. intracellularis* よりも小さく、藻糸長も短いこと、および *R. intracellularis* の藻糸を構成する栄養細胞の幅が細胞ごとに揃っているのに対し、*C. rhizosoleniae* の栄養細胞はヘテロシスト寄りの細胞から反対側の細胞にかけて細胞の幅が若干狭くなってい

くことが挙げられる。しかしながら、こうした違いにもかかわらず、分子系統学的には *C.*

rhizosoleniae は *R. intracellularis* に含まれるとされている; ヘテロシストの形成に関わる *hetR* 遺

伝子の配列から、*R. intracellularis* は異なる宿主を持つグループごとに遺伝的に大きな違いがあ

り、*C. rhizosoleniae* と *R. intracellularis* の違いははそうした変異の幅に含まれるためである

(Janson et al. 1999)。したがって、慣習的には 2 種を形態により区別しているものの、*R.*

intracellularis という種は遺伝的には宿主ごとに異なる複数の種あるいは分類群を含むものであ

り、*C. rhizosoleniae* もそのうちの 1 つであると捉えられる (Sven Jansson 准教授、私信)。また、

そもそも *Chaetoceros* 属を宿主とするものを *C. rhizosoleniae* と同定することが間違いであって、

R. intracellularis と同定すべきであるとする意見もあり (Fernando Gómez 博士、私信)、上記の形

態による分類については研究者間で必ずしも統一されたものではないようである。したがって、

本研究ではこれ以降、*C. rhizosoleniae* も *R. intracellularis* にまとめて記載する。ただし、*Calothrix*

属には *C. rhizosoleniae* 以外にも、天然において単体で生息していた種である *Calothrix* sp.

PCC7507 株が存在するほか (Janson et al. 1999)、最近、ハワイ近海において *Trichodesmium* spp. の

パフ型コロニーに外部共生する *Calothrix* sp. が発見されている (Momper et al. 2014)。*R.*

intracellularis の分布は、検鏡あるいは *nifH* 遺伝子の定量 PCR による観測が太平洋と大西洋の熱

帯亜熱帯域を中心に報告されており、インド洋ではマダガスカル沖でも報告例がある (Luo et al.

2012)。このうち、大西洋西部のアマゾン川ブルーム、西部南太平洋、南シナ海で現存量が高い

(Foster et al. 2007; Moisander et al. 2008; Bombar et al. 2011)。

これらの顕微鏡で観察可能なサイズの窒素固定生物に加え、分子生物学的手法の発達により単細胞シアノバクテリアの窒素固定生物の存在が認識されるようになった; ニトロゲナーゼサブユニットをコードする遺伝子である *nifH* のサイズ別の発現および窒素固定活性から、小型の窒素固定生物が窒素固定に大きく寄与していることが明らかにされた (Zehr et al. 2001; Montoya et al. 2004)。これらの単細胞シアノバクテリアのうち、外洋域で代表的なものとして *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* (UCYN-A) や *Crocospaera watsonii* (UCYN-B)、*Cyanothesa* sp. および *Gloeocapsa* sp. と近縁な UCYN-C が挙げられる (Zehr et al. 2001; Falcón et al. 2002, 2004; Langlois et al., 2005; Foster et al., 2007)。UCYN-A は円石藻 *Braarudosphaera bigelowii* のプレートの外側に共生し (Thompson et al. 2012, 2014; Hagino et al. 2013)、細胞サイズは 1 μm 以下である (Goebel et al. 2008)。培養株は確立されていないが、*nifH* は昼間と夜間両方で発現し、特に昼間に高いことが確認されている (Church et al. 2005; Needoba et al. 2007)。UCYN-A は光化学系 II、RuBisCo、TCA サイクルの遺伝子を欠いているため、外部からの有機炭素をエネルギー源とする従属栄養性であると考えられているが (Tripp et al. 2010)。実際に、安定同位体でラベルした窒素と炭素を用いた NanoSIMS による研究から、UCYN-A は窒素固定により固定した窒素を宿主に供給し、宿主は UCYN-A に光合成により固定した有機炭素を供給することが明らかにされている (Thompson et al. 2012)。*C. watsonii* は種として記載される以前から既に *Synechocystis* sp. WH8501 株として単離されていたものも含めて、現在では複数の培養株が確立され、それらの間のゲノム情報の比較から、ゲノムサイズと細胞サイズの大きいグループと小さいグループが存在

することが明らかにされている (Bench et al. 2013)。細胞サイズは 2.5–7 μm で (Falcón et al. 2005)、独立栄養性であり、窒素固定は夜間に行う (Church et al. 2005; Goebel et al. 2007)。 *Cyanothece* sp. は培養株 (TW3 株) が近年確立され、細胞の形態は棒状で幅 2.5–3.0 μm 、長さ 4.0–6.0 μm である (Taniuchi et al. 2012)。

UCYN-A および *C. watsonii* の *nifH* 遺伝子の天然での分布に関する報告は、大西洋では比較的多いが、太平洋では少なく、インド洋ではごくわずかである (Luo et al. 2012)。UCYN-A は大西洋熱帯域および東部北大西洋亜熱帯域、西部南太平洋、東部北太平洋で現存量が高く、東部南太平洋にはほとんど分布しない (Luo et al. 2012; Turk-Kubo et al. 2014)。また、*C. watsonii* は西部南太平洋で *nifH* 現存量が高いことに加え (Luo et al. 2012)、西部北太平洋亜熱帯循環の北緯 15–20 °N でも *C. watsonii* を含むナノサイズシアノバクテリアの高い細胞密度が報告されている (Sato et al. 2010)。一方、西部太平洋と比較すると大西洋では *C. watsonii* の現存量は低く、また、東部南太平洋にはほとんど分布しない (Luo et al. 2012; Turk-Kubo et al. 2014)。UCYN-C の観測例はほとんど大西洋であり、他は東部太平洋でわずかに報告されているのみであるが、このうち多く分布するのは大西洋熱帯域であり、その他の海域にはほとんど分布しない (Luo et al. 2012; Turk-Kubo et al. 2014)。

さらに、シアノバクテリア以外の *nifH* 遺伝子を持つ従属栄養性バクテリアも近年は盛んに研究されている。今までは、非シアノバクテリア窒素固定生物が存在し、その *nifH* 遺伝子が発現していることまでは知られていたが、それらによる窒素固定活性がどの程度海域の窒素固定活性

に寄与しているかは未だ明らかになっていない。しかしながら、窒素固定性シアノバクテリアが生息せず、これらの非シアノバクテリアが主要な窒素固定生物である海域が近年報告されており (Rieman et al. 2010)、例えば、南太平洋の東部チリ沖の沿岸湧昇域 (Fernandez et al. 2011) および同じく南太平洋の亜熱帯循環域 (Halm et al. 2012) が挙げられる。このうち、南太平洋東部チリ沖は湧昇による下層からの硝酸塩供給により表層の硝酸塩濃度が高かったが、従来窒素固定は硝酸塩の枯渇した海域に限定されるものであると考えられていたのに対し (e.g. Monteiro et al. 2011)、こうした環境における窒素固定は従来の概念にあてはまらないものであった (Fernandez et al. 2011)。この海域における窒素固定生物は、*nifH* 遺伝子の配列からほとんどは α 、 β 、 γ -プロテオバクテリアを含むクラスターIに属するグループであると考えられた (Fernandez et al. 2011)。また、*Trichodesmium* spp.についてはアンモニアや硝酸塩の添加により窒素固定が阻害されるという報告があるものの (Capone et al. 1990; Holl and Montoya 2005)、バルト海および塩沼から単離された従属栄養性窒素固定性バクテリアも硝酸塩の添加によって窒素固定が抑制されないことや (Boström et al. 2007; Tibbles and Rawlings 1994)、大西洋熱帯域および塩沼の天然群集に対するアンモニアの添加により窒素固定が阻害されないことから (Voss et al. 2004; Hanson 1977)、一部の窒素固定生物は環境中の硝酸塩・亜硝酸塩・アンモニウム塩といった窒素固定生物以外の生物にも利用可能な形態の窒素の濃度に関係なく、窒素固定を行っている可能性がある。東部南太平洋では沿岸湧昇域に加え、亜熱帯貧栄養海域の表層においても従属栄養性バクテリアが主要な窒素固定生物であると考えられている。東部南太平洋亜熱帯循環および赤道湧昇域において、*nifH*

遺伝子の塩基配列のシーケンスおよびそのうちのいくつかについての定量 PCR の結果から、亜熱帯循環西部では UCYN-A および γ -プロテオバクテリアが主要な窒素固定生物であると考えられている (Halm et al. 2012)。一方、亜熱帯循環東部および赤道湧昇域では窒素固定性シアノバクテリアは検出されず、 γ -プロテオバクテリアが多く検出されたが、このうちシーケンスで配列が検出された 3 種類 (γ -ETSP1-3) について *nifH* 現存量を定量 PCR で測定したが、現存量はいずれも低く、南太平洋亜熱帯循環東部の窒素固定がどのような窒素固定生物により担われているのかについてはよくわかっていない (Turk-Kubo et al. 2014)。また、東部南太平洋では、有光層以深の特に酸素極小層において、従属栄養性の窒素固定生物により活発に窒素固定が行われており、有光層以深の窒素固定の鉛直積算が有光層内の窒素固定の鉛直積算に匹敵することが報告されている (Bonnet et al. 2013)。現在のところ *nifH* 遺伝子を保有する非シアノバクテリアのうち、どのようなグループが実際に窒素固定に寄与しているのかはほとんど分かっておらず、それらの *nifH* 遺伝子の現存量や発現の分布についてもごく一部のグループについて報告されているのみであるが、分子生物学的手法から、海洋の *nifH* 遺伝子の多様性のうち大部分は非シアノバクテリアによって構成され、シアノバクテリアはそれらのごく一部に過ぎないことが明らかにされている (Riemann et al. 2010; Farnelid et al. 2011)。

近年の研究で、極域の海水中あるいはブラインからも *Trichodesmium* に類似したグループ、*Oscillatoria* 属、*Cyanothece* に類似したグループの窒素固定生物が発見され、亜熱帯域に分布する窒素固定生物と近縁と考えられる窒素固定生物が極域にも分布することが明らかとなった

(Díez et al. 2012)。しかしながら、極域における窒素固定生物の分布は特に海産のグループについてはほとんど分かっておらず、亜熱帯に生息する窒素固定生物とどのような関係にあるのかもよく分かっていない。

1-2 窒素固定の制御要因

窒素固定の制御要因として、水温のほか、光合成を行うシアノバクテリアに対しては光、また、栄養素としては鉄およびリン、ニッケル、モリブデンに加え、従属栄養性窒素固定生物については有機炭素も重要であると考えられている。一方、窒素固定を阻害する要因としては酸素がニトロゲナーゼを不活化するほか、アンモニウム塩や硝酸塩による阻害、銅による生物毒性が挙げられる。また、長期的な $p\text{CO}_2$ の変動も窒素固定生物の活性に影響を与える可能性が指摘されている。

まず、水温はそれぞれの窒素固定生物の増殖あるいは窒素固定活性に影響を与える要因であり、その最適な水温幅は亜熱帯域に生息する窒素固定生物同士でも異なる。亜熱帯域に生息する窒素固定生物のうち、培養株が単離されている *Trichodesmium* および *C. watsonii*、UCYN-C について増殖の水温依存性が報告されており、*T. erythraeum* IMS101 株は 20–34 °C で増殖が可能であり、特に 24–30 °C で増殖および窒素固定活性が最大となる (Breitbarth et al. 2007)。そして、天然における *Trichodesmium* spp. の分布域も 20–30 °C の範囲であることから、天然での分布は生理的な水温依存性を反映していると考えられる (Breitbarth et al. 2007)。*C. watsonii* については、大

西洋の 1 株と太平洋の 2 株で増殖の水温依存性が報告されている (Falcón et al. 2005)。培養株によって増殖可能な水温幅は異なり、狭いものでは 28–29 °C、広いものでは 26–30 °C において増殖が可能であり、28–29 °C あるいは 28–30 °C で最大増殖が得られた。天然においては、南太平洋において水温 29 °C を中心に現存量が高い傾向が報告されている (Moisander et al. 2010)。

UCYN-C については、培養株 TW3 が 28–34 °C で活発に増殖することが報告されている (Taniuchi et al. 2012)。*R. intracellularis* および γ -プロテオバクテリア 24774A11 は培養株が確立されていないが、これらの窒素固定生物の水温に対する現存量の分布傾向は *C. watsonii* と似ており、22–30 °C に多く分布し、この水温域では高水温域ほど現存量が高く、特に 29 °C に現存量のピークが見られた (Moisander et al. 2014)。UCYN-A についても培養株が確立されていないが、天然における現存量が水温 24 °C を中心として高くなることから、*C. watsonii*、*R. intracellularis* および γ -プロテオバクテリア 24774A11 と比較して低水温域を中心に分布するグループであると考えられる (Moisander et al. 2010)。

窒素固定はエネルギーを多量に必要とするため、光が窒素固定を制御する要因となりうる (Karl et al. 2008)。光合成を行う窒素固定生物のニトロゲナーゼ活性は光合成と密接に関係していることが報告されている (Carr and Whitton 1982; Gallon 2001; Karl et al. 2008)。特に、窒素固定生物の鉛直的な分布に光利用能が大きく影響している可能性があるが、実際にどのような影響を及ぼしているのかはあまり分かっていない。また、現場の混合層深度はその海域の光利用能を決める重要な要因であり、窒素固定生物の水平分布を決める要因となる可能性がある。しかし、モデ

ルによる見積りでは、海洋の窒素固定生物の分布は主に鉄やリンにより制限されているため、光による影響は小さいとされている (Monteiro et al. 2011)。

窒素固定を制限する栄養素としては、まず、鉄が挙げられる。窒素固定において、窒素分子と水分子からアンモニアを生成する反応を触媒するニトロゲナーゼ酵素は、1 分子につき鉄 19 原子を含む (Rubio and Ludden 2008)。そのため、他の植物プランクトンと比較して、窒素固定生物は生理的に多量の鉄を必要とする。特に、*Trichodesmium* は細胞内鉄含量が高いことが報告されており (Kustka et al. 2003)、これは、*Trichodesmium* が鉄の余剰状態において鉄を贅沢取り込みし (Kustka et al. 2003)、これをフェリチン (鉄貯蔵タンパク) の一種である Dps タンパクにより貯蔵するためであると考えられている (Castruita and Saito 2006)。また、*Trichodesmium* については、鉄の化学形態による利用能の違いが報告されている。通常、植物プランクトンは溶存態の鉄を取り込み、粒子態の鉄は直接利用することはできないが、*Trichodesmium* のコロニーはダスト粒子をトラップし、コロニー中心部に包み込んで鉄を溶かして取込むことが報告されている (Rubin et al. 2011)。また、溶存態の鉄についても化学形態の違いにより、*Trichodesmium* による取込み速度は異なる。天然で採集した *Trichodesmium* のコロニーは無機鉄およびシデロフォア鉄の取込み速度が高く、ポルフィリン鉄の取込み速度が低い (Achilles et al. 2003)。ただし、*T. erythraeum* IMS101 株については、シデロフォア鉄の取込み速度が無機態の鉄と比較して低いことが報告されており (Roe et al. 2012)、株間あるいは天然に生息するものと培養株で有機錯体鉄の鉄取り込み能力が異なる可能性がある。一方、*C. watsonii* は細胞内の鉄要求量を低く抑えるメ

リズムを持つ。*Trichodesmium* は光合成と窒素固定のいずれをも昼間に行うのに対し (Capone et al. 1997)、*C. watsonii* は夜間に窒素固定を行うことが知られている (Tuit et al. 2004)。そのため、*C. watsonii* においては、多量の鉄を必要とする光合成と窒素固定が時間的に区別されており、昼と夜でそれぞれの鉄酵素の生成と分解のリズムが交互になることで一度に必要な鉄の量を最大40%節約していると見積もられている (Saito et al. 2011)。さらに、*C. watsonii* は鉄欠乏環境下では細胞自体が小さくなることで細胞あたりの鉄の必要量を抑え、また、表面積/体積比を大きくすることで細胞体積あたりの鉄の取込み能力を高めることで、鉄濃度の低い環境に順応すると考えられている (Jacq et al. 2014)。このように、窒素固定生物のグループ間で鉄の利用可能な化学形態や細胞内貯蔵、鉄欠乏への適応が異なるため、鉄の供給量の違いが現場の窒素固定生物群集組成を変化させる可能性がある。ただし、*Trichodesmium* spp.および *C. watsonii* 以外の窒素固定生物については、鉄の利用能についてほとんど報告されていない。

一方、リンも鉄と並んで窒素固定の制御要因となりうる栄養素である。窒素固定生物は窒素分子を窒素源とするため硝酸塩・亜硝酸塩・アンモニウム塩および有機態の窒素を必要としない。したがって、窒素固定とともに有機物生産を維持した場合、環境中のリンの消費が進み (Karl et al. 1997)、リン欠乏となる場合がある (Grabowski et al. 2008)。リンの生物学的利用能については *Trichodesmium* spp.および *C. watsonii* の培養株を用いた知見がある。まず、無機リン酸塩の利用能について、*C. watsonii* (Falcón et al. 2005) の方が *Trichodesmium* spp. (Fu et al. 2005) よりも低い半飽和定数を持つ。また、*T. erythraeum* と *C. watsonii* では生成可能な有機リン分解酵素の種類も

異なる。*T. erythraeum* はアルカリフォスファターゼおよび C-P リアーゼの遺伝子をともに持ち、エステル結合を持つリン酸エステルおよび C-P 結合を持つホスホン酸のいずれも利用可能である (Dyhrman et al. 2006; Orchard et al. 2009)。また、*T. erythraeum* は自らホスホン酸を生成することも知られており (Dyhrman et al. 2009)、ホスホン酸の利用により他のホスホン酸を利用できない種に対してリン獲得の点で有利である可能性がある。一方で、*C. watsonii* はアルカリフォスファターゼ遺伝子を持つものの、C-P リアーゼ遺伝子は持たず、ホスホン酸を単一のリン源とした培地では生育できない (Dyhrman and Haley 2006)。したがって、リンが窒素固定に及ぼす影響は、リンの化学的組成や濃度と窒素固定生物の組成によって変動すると考えられる。

ニッケルは、有害な酸素種を無害化するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の補因子として様々な生物の細胞内で利用されている。*T. erythraeum* IMS101 株でゲノム情報が解読されたことにより、この生物はそれぞれニッケルおよびマンガンを含むスーパーオキシドジスムターゼをコードする遺伝子である *sodN* および *sodA* (Palenik et al. 2003; Dupont et al. 2008) を持つことが明らかにされた。また、外洋域において鉄とリンが十分に存在する環境中ではニッケルが *Trichodesmium* spp. の制限要因となる可能性が指摘されている。Ho (2013) は、ニッケルの添加により *T. erythraeum* IMS101 株の SOD の活性が上昇し、窒素固定活性も上昇したことから、SOD が窒素固定の阻害要因であるスーパーオキシドからニトロゲナーゼを防御していた可能性を指摘している。ニッケル欠乏条件では、特に強光下において、*T. erythraeum* 培養株の増殖 (Ho et al. 2013) および窒素固定活性 (Rodriguez and Ho 2014) が低下することが報告されている。

モリブデンは鉄とともにニトロゲナーゼタンパクに利用されている (Rubio and Ludden 2005)。

全ての窒素固定生物はモリブデンと鉄を含むニトロゲナーゼを持つ。ただし、代替ニトロゲナーゼと呼ばれるバナジウムと鉄を含むタイプ、および鉄のみを含むタイプ、モリブデンを持つ窒素固定生物がわずかに知られており、これらのタイプはモリブデンを含まない (Rubio and Ludden 2005)。窒素固定生物のモリブデン要求はほとんどニトロゲナーゼによるモリブデン要求で説明でき、*C. watsonii* WH8501 株では細胞内モリブデン含量のすべてが、*T. erythraeum* IMS101 株では7割がニトロゲナーゼによる利用と見積もられている (Tuit et al. 2004)。モリブデンは海水中に MoO_4 として微量に存在するが、海水中に多量に存在する硫酸分子と構造が似ているため、硫酸塩が窒素固定生物によるモリブデン取り込みを阻害する可能性が指摘されている (Howarth and Coale 1985)。しかし、カナダのアルバータ州の塩水湖においては湖間の $\text{SO}_4^{2-}:\text{Mo}$ 比の変動と *Aphanizomenon flos-aquae* と *Anabaena* spp. を中心とする窒素固定生物の現存量の間に関係があることが報告されているものの (Marino et al. 1990)、天然の海洋においては、実際にモリブデンが窒素固定を制限していることを示す証拠は得られておらず、既存のデータはいずれも窒素固定がモリブデン制限でないことを示している (Paerl et al. 1987; Paulsen et al. 1991; Paerl and Zehr 2000)。

窒素固定に従属栄養性窒素固定生物が寄与している可能性が認識されるようになり、有機物の供給が窒素固定の制御に重要であると考えられるようになった。天然において有機物の供給が窒素固定をどのように制御しているのかについてはまだあまり分かっていないものの、南太平洋

の島嶼域周辺においては鉄および有機炭素（グルコースおよびマンニトール）の添加により窒素固定生物の現存量が増加したほか（Moisander et al. 2012）、東部南太平洋の赤道湧昇域においては有機炭素（グルコース）の添加による窒素固定活性の上昇が報告されている（Dekaezemacker et al. 2013）。したがって、有機物の供給が窒素固定活性あるいは従属栄養性窒素固定生物の現存量を制御する要因であることは確かである。しかし、有機物によるこれらの制御が海域間あるいは季節的にどのように変動するのかについては不明である。

海水中の二酸化炭素濃度が窒素固定生物に与える影響は窒素固定生物のグループによって異なる。*T. erythraeum* IMS101 株および *C. watsonii* WH8501 株は二酸化炭素濃度の上昇により増殖および窒素固定活性が増加することが報告されているのに対し（Barcelos e Ramos et al. 2007; Hutchins et al. 2007; Levitan et al. 2007; Fu et al. 2008; Gradoville et al. 2014b）、汽水域に生息する窒素固定性シアノバクテリア *Nodularia spumegina* は二酸化炭素濃度の上昇により増殖および窒素固定活性が大幅に低下することが報告されている（Czerny et al. 2009）。二酸化炭素濃度の上昇が窒素固定の増加をもたらすのは、二酸化炭素濃縮に必要なエネルギーが低下し、窒素固定に使えるエネルギーが多くなるためであると考えられている（Barcelos e Ramos et al. 2007; Hutchins et al. 2007; Levitan et al. 2007; Kranz et al. 2010）。ただし、今までいくつかの天然海水に対する二酸化炭素の添加実験が行われているものの、天然では二酸化炭素濃度の上昇による窒素固定活性の増加は確認されていない（Bottjer et al. 2014; Gradoville et al. 2014a; Law et al. 2012）。

このように、窒素固定の制限要因となりうる栄養素は複数報告されているが、これらのうち、食物連鎖を支える基礎生産者である窒素固定性シアノバクテリアにとって重要な栄養素であるという点で鉄とリンが重要視されており、これらの栄養素と窒素固定の関係についてフィールド研究が盛んに行われている (Zehr and Kudela 2011)。天然において、窒素固定生物の増殖および窒素固定活性のリンおよび鉄に対する依存については、比較的大型で現存量も高い *Trichodesmium* spp. に関して知見が多く、大西洋では細胞内リン含量と窒素固定活性の関係 (Sanudo-Wilhelmy et al. 2001) やアルカリフォスファターゼ活性 (Webb et al. 2007; Hynes et al. 2009) から、リンが *Trichodesmium* spp. の窒素固定活性を制限する栄養素であることが示されている一方、ダストによる鉄供給と *Trichodesmium* spp. の現存量の関係から、本属の現存量は鉄が制限となっているという報告もある (Moore et al. 2009)。窒素固定あるいは窒素固定生物の現存量に対する制御要因を直接的に調べる手法として、天然海水に対する栄養添加培養実験が広範な海域で行われており、海域間の窒素固定あるいは窒素固定生物の現存量に対する制限栄養素の違いについても明らかになりつつある。栄養添加実験をおこなった研究は、熱帯亜熱帯外洋域については東部および西部大西洋、カリブ海、ハワイ近海から東部北太平洋亜熱帯域および移行域にかけて、さらに、南太平洋では西部の島嶼域から東部の高硝酸塩低クロロフィル *a* (HNLC) 海域および亜熱帯循環にかけて報告されている (Fig. 1.1、Table 1.1、Paerl et al. 1994; Mills et al. 2004; Needoba et al. 2007; Bonnet et al. 2008; Grabowski et al. 2008; Watkins-Brandt et al. 2011; Langlois et al. 2012; Moisander et al. 2012; Turk-Kubo et al. 2012; DeKaetzmacker et al. 2013)。一方、インド洋およ

び西部北太平洋では研究例がない。窒素固定の鉄による制限が報告されているのは、海水中の窒素固定生物全体を対象とした実験と *Trichodesmium* のみをピックアップした実験を含めて、東部および西部大西洋、カリブ海、ハワイ近海、西部南太平洋島嶼域、東部南太平洋 HNLC 海域であり、リン制限であった海域は東部および西部大西洋、ハワイ近海、東部北太平洋である。

これらの知見から、研究の行われている大西洋と太平洋について、窒素固定の制限栄養素の海域間の変動について以下のような特徴が挙げられる。まず、窒素固定性シアノバクテリアによる窒素固定において最も重要な栄養素である鉄とリンについて、大西洋では、窒素固定の鉄制限は大西洋全域で見られ、リン制限は東部でのみ見られた。太平洋では、ハワイ近海と西部南太平洋では鉄制限とリン制限のいずれも観測されている。また、東部南太平洋の赤道湧昇の影響のある海域では鉄制限が報告されている。東部北太平洋移行域と東部南太平洋亜熱帯循環では添加実験は行われたものの、鉄とリンのいずれの制限も見られなかった。このように、大西洋と太平洋の内部で、鉄制限あるいはリン制限が見られる海域と見られない海域が存在することが明らかになっている。このように海域間で窒素固定の鉄制限あるいはリン制限の有無が異なる原因として、少なくとも窒素固定生物の分布が重要であることは指摘されている。すなわち、東部南太平洋亜熱帯循環では窒素源が枯渇しているにもかかわらず、窒素固定が低く、鉄あるいはリン酸塩を添加しても窒素固定が見られなかったことが Bonnet et al. (2008) により報告されており、この原因は窒素固定性シアノバクテリアがほとんど分布していなかったことが原因と考えられている。ただし、同じ航海の別の報告 (Raimbault and Garcia 2008) および別の航海での報告 (Dekaezemacker

et al. 2013) では東部南太平洋亜熱帯循環でも窒素固定自体は検出されており、Bonnet et al.

(2008) で窒素固定が検出されなかったのは測定条件の違いによるものである可能性がある。いずれにせよ、この海域で鉄およびリン酸塩の添加に対して窒素固定の増加が見られなかったのは、応答する窒素固定生物がほとんど存在しなかったことが原因と考えられている。しかしながら、東部南太平洋以外の窒素固定性シアノバクテリアが窒素固定を担っていると考えられる海域での、窒素固定活性の制限栄養素の海域間変動がどのような環境要因や窒素固定生物組成の変動と関係しているのかは分かっていない。

このような、海域ごとの大きなスケールで窒素固定活性の制限栄養素が変動することは知られているものの、より小さなスケールでの空間的変動についてはあまり分かっていない。しかし、窒素固定生物の分布や窒素固定活性についてはより小さなスケールでの環境変動の影響を受けることが知られている。例えば、ダスト沈着の空間的勾配が *Trichodesmium* spp. や *R. intracellularis*、UCYN-A、B、C の分布あるいは窒素固定活性を決める要因であることが複数の報告で指摘されている (Kitajima et al. 2009; Moore et al. 2009; Ratten et al. 2015)。また、中規模渦も窒素固定生物の分布や窒素固定活性に影響を与える要因として挙げられる。Fong et al. (2008) は、ALOHA 付近で中規模の高気圧性渦内部でクロロフィル *a* が高くなっているほか、*Trichodesmium* spp.、*C. watsonii*、*R. intracellularis* の現存量が高かったと報告している。さらに、Watkins-Brandt et al. (2011) も、ハワイ近海の観測海域 (OPEREX) において、中規模渦周辺で現場の窒素固定が海域間で変動し、高気圧性渦の境界域で最も窒素固定活性が高かったことを報告している。これらの報告で

は、中規模渦に伴う水平移流または湧昇による下層からの栄養供給、あるいは窒素固定生物の物理的輸送が現場の窒素固定活性を制御する要因であったと考えられている。このように、エアロゾル沈着の勾配やメソスケールの物理環境の変動が窒素固定生物の分布や窒素固定活性の空間的変動の要因となっているため、窒素固定の制限栄養素についてもこのような環境要因に伴って変動する可能性がある。

空間的な環境変動のほか、時間的な環境変動によっても窒素固定の制限栄養素は変動する可能性があるが、ほとんど報告例はない。ただし、窒素固定活性自体の時間的変動は報告されており、年間の季節変動と、エルニーニョ・南方振動 (ENSO) に伴う変動が知られている。季節的変動については、Stn. ALOHA および西部北太平洋において、冬季に窒素固定活性が高くなる傾向があり、冬季鉛直混合による下層からのリン酸塩供給の増加が窒素固定活性を促進している可能性が指摘されている (Dore et al. 2002; Grabowski et al. 2007; Kitajima et al. 2009)。ENSO については、東部南太平洋熱帯域の HNLC 海域で、ラニーニャの時期よりもエルニーニョの時期に窒素固定が高く、湧昇の強さ、栄養塩供給、貧酸素水の供給の変動が関係していた可能性が指摘されているが (Dekazemacker et al. 2013)、そのメカニズムについてはよく分かっていない。また、ハワイ近海でも鉄およびリン酸塩の添加に対する窒素固定活性の応答が2月と3月の実験で異なっていたことが報告されているが、その変動がどのような要因と関係しているのかは不明である (Grabowski et al. 2008)。

以上のように、今までの研究によって、窒素固定の制限栄養素の空間的変動については大西洋の東西で明らかにされている一方、太平洋では西部北太平洋を中心に研究が不足しているため (Table 1.1)、窒素固定の制限栄養素の海域的変動については十分に理解されていない。また、栄養供給が窒素固定に対して及ぼす影響が太平洋と大西洋でどのように異なるかも不明である。本研究における研究海域である太平洋は大西洋と比較して、窒素固定に関係する環境要因に、以下のような違いが挙げられる。すなわち、大西洋はサハラ砂漠由来のダストが大量に飛来することで溶存鉄濃度も東部大西洋熱帯域で高い (Sarhou et al. 2003; Measures et al. 2008)。また、太平洋よりも赤道湧昇が弱いいため、下層から供給されたリン酸塩が窒素固定に伴う消費により枯渇している (Wu et al. 2000)。こうした海域にはダスト粒子からの鉄利用能を持つ *Trichodesmium* spp. や、*R. intracellularis* などの大型の窒素固定生物が多く分布する (Luo et al. 2012)。それに対し、太平洋も西部海域では、東アジア由来のエアロゾルが飛来するものの、大西洋と比較すると沈着量は低く、鉄供給も少ないため、より小型で栄養素の欠乏した環境に強い *C. watsonii* などの単細胞性窒素固定シアノバクテリアが多い。西部北太平洋亜熱帯循環においては先行研究からダストによる鉄供給と冬季鉛直混合による下層からのリン酸塩供給が窒素固定を維持していると指摘されているが (Hashihama et al. 2009; Kitajima et al. 2009; Shiozaki et al. 2009)、添加実験による窒素固定の制限栄養素の診断は行われておらず (Fig. 1.1)、実際にこれらの栄養素の供給に対して窒素固定活性が応答するかどうかは調べられていない。太平洋において *Trichodesmium* spp. が多く分布するのはハワイや南太平洋の島嶼付近、あるいは東シナ海および黒潮域といった一部の海域

のみである (Bonnet et al. 2008; Shiozaki et al. 2010)。黒潮域では、大陸棚周辺で湧昇による栄養塩供給が生じているほか (Chen 1996)、黒潮が南西諸島付近から西部北太平洋亜熱帯循環への *Trichodesmium* の輸送経路となっている (Marumo and Asaoka 1974)。また、太平洋は大西洋と比較して東西に長いこと、陸域由来あるいは大気由来の鉄供給のある西部北太平洋、ハワイ諸島周辺、南太平洋西部島嶼域では窒素固定性シアノバクテリアが比較的多く分布する一方 (Campbell et al. 2005; Kitajima et al. 2009; Calil et al. 2011)、供給源から地理的に離れている東部では鉄供給が非常に低く (Moore and Braucher 2008)、極めて生物生産の低い海域となっており、そこでは、鉄要求量の低いと考えられている *C. watsonii* も含めて窒素固定性シアノバクテリアは鉄制限によりほとんど生息しない (Bonnet et al. 2008)。その結果、リンが消費されないため、無機リン酸塩が数百 nM 残存している (Raimbault et al. 2008)。このように、太平洋では大西洋と栄養供給や窒素固定生物の組成が大きく異なり、また、これらの太平洋内での地理的変動も大きい。したがって、栄養添加に対する窒素固定の応答も太平洋と大西洋では大きく異なることが予想され、また、太平洋の内部でも栄養供給あるいは窒素固定生物の組成の海域間の違いを反映し、異なった応答が見られる可能性がある。

1-3 窒素固定の阻害要因

窒素固定の阻害要因としては、まず、酸素が挙げられる。光合成と窒素固定を同時に行う *T. erythraeum* IMS101 株においてもニトロゲナーゼタンパクの構造は基本的に嫌気性窒素固定生物

のものと同様であることから、好氣的生物も含め、基本的にニトロゲナーゼは酸素により失活すると考えられている (Zehr et al. 1997)。海水中の酸素分圧の増加が *Trichodesmium* spp. の窒素固定活性の低下をもたらすという報告もあるが (Staal et al. 2007)、*Trichodesmium* spp. は前述のようにニトロゲナーゼを酸素から隔離するメカニズムを持つため、好氣的環境においても高い窒素固定活性を維持することが可能である (Ohki and Fujita 1988)。こうした好氣的環境に生息する窒素固定生物が存在する一方、嫌氣的環境に生息するものも存在し、東部南太平洋においては酸素極小層で窒素固定が比較的活発に行われており、水柱積算で表層の窒素固定と同程度であることが報告されている (Fernández et al. 2013; Bonnet et al. 2013)。こうしたことから、嫌氣的環境に生息する窒素固定生物にとっては酸素が窒素固定の重要な制御要因と考えられている。

酸素以外に、窒素固定を阻害する要因としてアンモニア態や硝酸態の窒素が挙げられる。アンモニア態窒素の mM レベルの添加が多く窒素固定生物の株で窒素固定を阻害する一方 (Ramos et al. 1985)、硝酸態窒素の mM レベルの添加は窒素固定生物の株により窒素固定の阻害をする場合としない場合がある (Martin-Nieto et al. 1991; Sanz-Alferez and Del Campo 1994)。また、天然の *Trichodesmium* spp. サンプルに対するアンモニア添加でニトロゲナーゼ活性が抑制されると報告されているものの (Capone et al. 1990)、短期的には固定された窒素の添加は窒素固定を低下させないという報告もある (Fu and Bell. 2003; Mulholland et al. 2001)。ただし、これとは逆に窒素固定を低下させるという報告もある (Holl and Montoya 2005)。しかし、こうした議論はあるものの、近年東部太平洋のチリ沖湧昇域や赤道湧昇域の硝酸態窒素が十分に存在する環境において

も窒素固定活性があることが報告され (Raimbault and Garcia 2008; Fernandez et al. 2011; Dekaezemacker et al. 2013)、こうした環境に生息する窒素固定生物の寄与も含め群集全体の窒素固定を考えた場合、硝酸態窒素は窒素固定の阻害要因としてはあまり重要ではないと考えられる。

その他の阻害要因としては銅が考えられる。銅は植物プランクトンにとって栄養であると同時に毒性を持つ金属である。銅は栄養素として、植物プランクトン細胞内でプラストシアニン、シトクロムオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、スーパーオキシドジムスターゼ、およびマルチカッパーオキシダーゼなどの様々なタンパクの補因子として利用されている (Twining and Baines 2013)。珪藻の培養株において、マルチカッパーオキシダーゼにより二価鉄を酸化する過程で取込むことが知られており、特に鉄制限条件で細胞内 Cu:C 比が上昇することが報告されている (Peers and Price 2005; Maldonado et al. 2006; Annet et al. 2008)。また、鉄欠乏状態で鉄タンパクであるシトクロム b6f が銅タンパクであるプラストシアニンに代替されることから、鉄供給の低い海域において銅が植物プランクトンの生態において重要であると考えられている (Peers and Price 2006)。天然海水中において銅は植物プランクトンの増殖を制限しうる程度に不足しているとされるものの (Moffett and Dupont 2007)、実際に天然において銅が植物プランクトンの生理的な制限となっているという報告はない。銅の利用能は一般に遊離銅イオンおよび無機錯体銅で高く、有機錯体銅で低いが、外洋域においては有機錯体銅以外の銅の濃度が極めて低いため、植物プランクトンは主に有機錯体銅を利用すると考えられている。したがって、銅濃度の低い環

境における銅の取り込み速度は遊離銅イオン濃度でなく、有機錯体銅を構成する有機配位子の種類により支配される (Semeniuk et al. 2009)。

一方、過剰の銅は植物プランクトンに有毒となる (Coale 1991)。そして、一部の海域では、実際に銅の毒性が植物プランクトン群集の組成および増殖に影響を与えていると考えられている (Moffett et al. 1997; Mann et al. 2002; Paytan et al. 2009)。銅の毒性は植物プランクトンの光合成や増殖、酸素発生、ATP 生成など様々な過程を阻害し、クロロフィル *a* 含量の低下あるいはクロロフィル *a* アロマーへの置換、細胞の変形あるいは破裂をもたらす (Stauber and Florence 1987; Rijstenbil et al. 1994; Cid et al. 1995)。光合成については、光化学系 II を阻害し、光化学系 I は阻害しないと考えられている (Cid et al. 1995; Lombardi and Maldonado 2011; Deng et al. 2014)。また、銅毒性によりカタラーゼ活性が低下することから (Stauber and Florence 1987)、酸化ストレスと関連している可能性がある。さらに、急性毒性と慢性毒性があり、低レベルの銅濃度上昇に対しては、長時間さらされることで銅耐性が上昇する (Visviki and Rachlin 1991)。

銅の毒性はスペシエーションによって異なる。錯体銅は無毒である一方、最も反応性の高い形態である遊離銅イオンは毒性を持ち、銅の毒性は遊離銅イオン濃度で決まる (Sunda 1975)。海水中の銅は平衡状態を仮定すると 99.8%以上が有機錯体として存在し、0.15%が CuCO_3 をはじめとした無機錯体、0.01%が遊離銅イオン (Cu^{2+}) として存在すると見積もられている (Coale and Bruland 1990)。したがって、海水中の銅有機配位子は銅のスペシエーションを支配する重要な要因である。銅は栄養および毒の 2 つの側面を持つが、銅の不足あるいは過剰は数 nmol l^{-1} から数

十 nmol l^{-1} の範囲での変動でもたらされる。さらに、海水中の銅有機配位子の濃度および条件安定度定数によって銅の利用能は変化する。したがって、銅が植物プランクトンに及ぼす影響を評価する際には、このような極微量の銅濃度の変動とともに、銅有機配位子の濃度および条件安定度定数を評価する必要がある。

銅有機配位子の化学的組成は明らかになっていないが、いくつかの候補が挙げられており、沿岸域においては腐植物質の寄与が大きいと考えられている (Kogut and Voelker 2001; Whitby and van den Berg 2014)。また、植物プランクトンおよびバクテリアは遊離銅イオン濃度の高い環境で毒性緩和のために細胞外に銅有機配位子を放出する (Leal et al. 1999; Moffett et al. 1990; Moffett and Brand 1996; Croot et al. 2000)。こうして細胞外に放出される配位子は、もともと細胞内に貯蓄されているのではなく、銅濃度の上昇に応答して生成され、放出されと考えられている (Schreiber et al. 1990; Harwood-Sears and Gordon 1990)。このように放出される配位子は海産バクテリア *Vibrio parahaemolyticus*、*V. alginolyticus* および *Pseudomonas aeruginosa* では低分子タンパクであると考えられており (Schreiber et al. 1990; Harwood-Sears and Gordon 1990; Gordon et al. 1996)、円石藻 *Emiliania huxleyi* ではチオールであると考えられている (Leal et al. 1999)。また、海水中に直接放出される場合の他、細胞膜外高分子物質の膜として細胞周辺に保持される場合もある (Bitton and Freihof 1977; Bhaskar and Bhosle 2006)。

生物がこのような細胞外に放出する配位子のうち、特に、*Synechococcus* spp. が生成する銅有機配位子の条件安定度定数は $10^{11.5}-10^{13.4} \text{ M}^{-1}$ と天然において最も強力な銅有機配位子のものと

近いこと (Moffett et al. 1990; Moffett and Brand 1996; Croot et al. 2000)、海水中の配位子の重要なソースであると考えられている。それに対し、珪藻、円石藻、緑藻、渦鞭毛藻などの真核植物プランクトンが生成する銅有機配位子は条件安定度定数が $10^{10.6-12.3} \text{ M}^{-1}$ と、*Synechococcus* spp. が生成するものと比較してやや弱いものであることが報告されている (Croot et al. 2000)。したがって、植物プランクトンの群集組成が異なる海域同士では銅のスペシエーションにも違いが生じる可能性がある。銅と配位結合をする官能基に着目すると、-SH 基を持つチオールは銅と条件安定度定数の高い安定な錯体を形成するため、沿岸域・外洋域ともに重要な配位子として考えられている。フィールドでのチオールの分布に関する知見は少ないものの、HPLC で分離した複数のチオール、あるいはカソーディックストリッピングボルタンメトリーで検出したチオールの分布が調べられており、その濃度から沿岸域および外洋域表層で銅のスペシエーションの一部に寄与している可能性が指摘されている (Christine et al. 1998; Tang et al. 2000; Dupont et al. 2006)。

従来、エアロゾル沈着は、海洋表面において枯渇している鉄の重要な供給源としての側面のみが強調されてきたが、同時に供給される銅が植物プランクトン群集に対して毒性を与える可能性が近年指摘されている (Paytan et al. 2009)。窒素固定に対する銅毒性についてはまだほとんど注目されていないが、窒素固定生物がエアロゾル供給に大きく依存した分布を示すこと (Moore et al. 2009)、また、シアノバクテリアが一般的に銅毒性への耐性が低いことを考慮すると (Brand et al. 1986)、銅の窒素固定に対する影響を評価することは重要な課題である。

銅の供給による植物プランクトンへの毒性の影響はエアロゾルが非常に多く供給されるごく一部の沿岸域に限定されると考えられており、研究も沿岸域のものに限られている (Paytan et al. 2009; Guo et al. 2011; Jordi et al. 2012)。しかし、窒素固定に着目する場合、外洋域が主な評価の対象となる。なぜなら、結合態窒素が豊富に残存する沿岸域では窒素固定生物は珪藻などの他の植物プランクトンとの競争に勝てないため、窒素固定を行うシアノバクテリアの主要な生息域は結合態窒素の枯渇した外洋域であるためである。特に、高ダスト域や島周辺など、外洋海水に散発的に陸域由来の供給がある海域で窒素固定は活発であることが報告されている (Shiozaki et al. 2009, 2014b)。本研究の対象海域である西部北太平洋熱帯亜熱帯域もダスト供給の高い海域を中心に窒素固定が行われており (Kitajima et al. 2009; Shiozaki et al. 2009)、銅の窒素固定への影響を考える上で重要な海域である。

しかし、銅の影響の評価は始まったばかりであり、いまだ多くの課題が残されている。まず、海洋における銅自体に関する理解の不足が挙げられる。第一に、銅の分布とその変動についての知見が乏しいことである。外洋域における銅の代表的な鉛直分布も 1970 年代後半から 1980 年代には信頼性の高いものが得られるようになり、大洋間での濃度の違いも明らかにされている (e.g. Town and Filella 2000)。典型的な銅の鉛直分布は栄養塩型と吸着除去型の複合型である。表層では生物起源粒子によるスキャベンジング (Kinugasa et al. 2005) により濃度は 0.24 nmol l^{-1} まで低下し (Bruland 1980; Miller and Bruland 1994; Ezoe et al. 2004)、中層から深層にかけて有機物分解に伴う再生により濃度が上昇する (Boyle et al. 1977)。そして、全水柱を通して海底堆積物か

らの供給と沈降粒子による吸着除去の影響を受ける (Boyle et al. 1977; Bruland 1980; Westerlund and Öhman 1991)。また、これら以外の供給源としてエアロゾル沈着 (Paytan et al. 2009)、河川水の流入 (Martin and Whitfield 1983)、沿岸域あるいは大陸棚域の海底堆積物 (Westerlund and Öhman 1991)、熱水噴出孔 (Sander and Koschinsky 2011) が知られている。また、銅濃度の水平的な変動として、沿岸域と外洋域の濃度勾配 (Bruland 1980, Boyle et al. 1981)、亜寒帯と亜熱帯表層水における濃度の違い、および表面付近での季節的濃度変動 (Coale and Bruland 1990) が報告されている。しかしながら、海盆内における銅濃度の海域間変動の要因についての理解は未だ限られている。各海域における銅の分布を制御する要因を明らかにする際には、これらの供給および除去過程や水平移流 (Yeats and Campbell 1983) の影響を考慮しつつ、銅の鉛直分布を調べることが重要である。

第二に、スペシエーションのデータの不足が挙げられる。現在、フィールドにおけるスペシエーションのデータ数は銅濃度よりもさらに少なく、また、検出できる配位子の範囲 (検出窓) も研究によりまちまちであるため、海域的に比較可能なデータはさらに少ない。それに加えて、単一の検出窓による測定が主流であり、複数の検出窓を用いて複数の条件安定度定数・濃度の組み合わせを求めた配位子測定は現在ごくわずかしか存在しない (e.g. Buck and Bruland 2005)。このことは、銅の供給により溶存銅濃度の上昇が期待される場合の銅毒性について議論することを困難にしている。なぜなら、銅は濃度が低い状態では強い配位子と優先的に結合し、銅濃度が上昇して強い配位子が銅により飽和するにつれて、弱い配位子とも結合するようになるため、銅濃

度の上昇前と上昇後では銅有機錯体を形成する配位子の組成は異なると考えられるからである。

したがって、銅の供給による毒性の影響について議論するためには、複数の検出窓の設定を用いた測定による配位子の把握が不可欠である。

このような銅自体の知見の不足に加えて、窒素固定生物に対する銅毒性の影響についても極めて知見が限られている。*Trichodesmium* の培養株についてわずかに銅毒性の影響が調べられており、遊離銅イオン濃度が 10^{-12} M 程度で増殖が抑制されることが報告されているものの (Rueter et al. 1979)、窒素固定生物種ごとの銅耐性の違いも分かっていない。ただし、既存知見から、シアノバクテリアでは 10^{-12} M、真核藻類では 10^{-11} M 以上の遊離銅イオン濃度により増殖が低下することが知られており、シアノバクテリアは真核植物プランクトンと比較して銅毒性の影響を受けやすい傾向がある (Brand et al. 1986)。したがって、窒素固定を行うシアノバクテリアも真核藻類と比較して銅毒性への耐性が低いと考えられる。また、*Synechococcus* の場合は沿岸性の株か外洋性の株かによっても耐性は異なる (Stuart et al. 2009)。したがって、窒素固定生物の現場群集内でも種や分類群により銅に対する応答は異なることが期待される。

以上のように、海域間の銅のスペシエーションの変動、および窒素固定生物の銅への耐性についての知見は極めて乏しい。したがって、フィールドにおいて銅が窒素固定活性に及ぼす影響を予測することは現状では困難であり、実際に現場での添加実験により銅の添加効果を評価し、どのような要因が銅の窒素固定活性に対する影響をコントロールしているのかを明らかにすることが不可欠である。

1-4 本研究の目的

本研究は、海域により栄養環境と窒素固定生物の分布が大きく変動する太平洋において、特にリンおよび鉄、銅に着目しつつ窒素固定活性がこれらの供給に対してどのように応答するのかを明らかにし、それらの応答の海域間での変動がどのような環境要因や生物組成と関係しているのかを明らかにすることを目的とした。本論文の構成は以下のとおりである。

第二章では、太平洋における鉄およびリン酸塩と窒素固定生物の分布を比較するとともに、添加培養実験により、鉄およびリン酸塩の添加に対して現場の窒素固定活性がどのように応答するのかを明らかにした。第三章では、西部北太平洋の熱帯域と亜寒帯域の溶存銅の鉛直分布を比較した。また、亜熱帯域表層において銅添加実験により銅の添加が窒素固定活性に与える影響を明らかにした。さらに、現場の溶存銅濃度および銅有機配位子の濃度・条件安定度定数から、毒性の指標である遊離銅イオン濃度の銅添加に伴う変動を見積もることで、どの程度の銅濃度上昇まで遊離銅イオン濃度を無毒なレベルに抑えられるかを明らかにし、大気由来の銅供給の窒素固定活性に対する影響について議論した。第四章の総合考察では、第二章および第三章の結果を踏まえて、鉄およびリン酸塩、銅の供給に対する窒素固定活性の応答について太平洋と大西洋を比較し、鉄とリン酸塩の供給様態が海洋の窒素固定に及ぼす影響について、両大洋における違いに着目しつつ議論した。また、栄養添加に対する窒素固定活性の応答の違いを決める生理的メカニズムについても議論した。

Table 1.1 栄養添加培養実験による窒素固定の制限栄養素の診断についての先行研究。

海域	パラメータ	制限栄養素	参考文献
カリブ海および ノースカロライナ沖湾流	<i>Trichodesmium</i> spp.の窒素固定	Fe	Paerl et al. (1994)
東部大西洋熱帯域	窒素固定 <i>nifH</i> 現存量	P, Fe	Mills et al. (2004)
東部大西洋熱帯域	(Total, Filamentous, UCYN-A, B, C, Gamma-A) <i>nifH</i> 発現	N, P, Fe	Langlois et al. (2012)
北大西洋熱帯域	(<i>C. watsonii</i> , <i>Trichodesmium</i> , <i>R. intracellularis</i> , UCYN-A)	P, Fe	Turk-Kubo et al. (2012)
東部北太平洋移行域	窒素固定	P, Fe のいずれでもない	Needoba et al. (2007)
ハワイ沖 (Station ALOHA)	窒素固定	P, Fe	Grabowski et al. (2008)
北太平洋	窒素固定	P (リン酸塩、ホスホン酸)	Watkins-Brandt et al. (2011)
西部南太平洋	<i>nifH</i> 現存量 (<i>C. watsonii</i> , γ-24774A11)	グルコース+マンニトール, Fe+EDTA	Moisander et al. (2012)
東部南太平洋	窒素固定	P, Fe のいずれでもない	Bonnet et al. (2008)
東部南太平洋熱帯域	窒素固定	Fe, グルコース	Dekaezemacker et al. (2013)

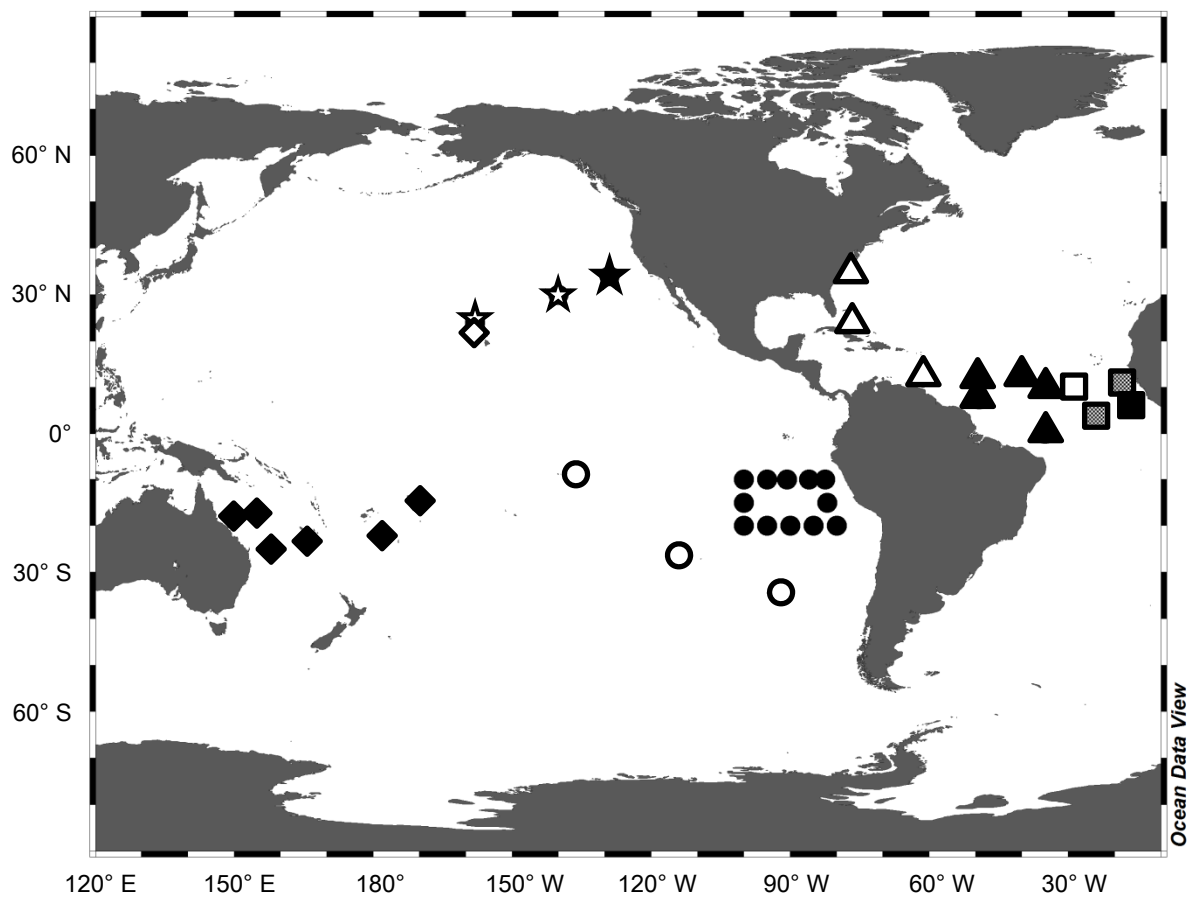


Fig1.1 栄養添加に対する窒素固定活性あるいは *nifH* 遺伝子の現存量、発現の応答を調べた既存知見の分布 (△: Paerl 1994; □および▣: Mills et al. 2004; ★: Needoba et al. 2007; ○: Bonnet et al. 2008; ◇: Grabowski et al. 2008; ☆: Watkins-Brandt et al. 2011; ■および▣: Langlois et al. 2012; ◆: Moisander et al. 2012; ▲: Turk-Kubo et al. 2012; ●: Dekaezemacker et al. 2013)。

第二章 太平洋における窒素固定のリン鉄共制限の海域的変動

2-1 背景

太平洋は海域により栄養供給が大きく異なり、分布する窒素固定生物の組成も海域間で異なることが報告されている。西部北太平洋においては東アジア由来のエアロゾルの沈着が多く、こうした海域において窒素固定活性も高いことから、鉄の供給が窒素固定活性の分布に重要である可能性が指摘されている (Kitajima et al. 2009; Shiozaki et al. 2009)。また、この海域では *C. watsonii* を含むナノシアノバクテリアが多く分布し (Sato et al. 2010)、窒素固定活性の分布と関係があることから (Kitajima et al. 2009)、*C. watsonii* が重要な窒素固定生物であると考えられている。また、この海域においては *Trichodesmium* spp.のほか、*R. intracellularis* の分布も報告されている (Gómez et al. 2005; Kitajima et al. 2009)。さらに、これらの窒素固定の高い海域において栄養塩の高感度分析から SRP がナノモルレベルで枯渇していることが報告されている (Hashihama et al. 2009)。しかし、窒素固定の制御に重要と考えられている鉄の分布と窒素固定生物の分布あるいは窒素固定活性の関係は分かっておらず、また、これらの栄養素の添加に対して窒素固定がどのように応答するのかも不明である。西部北太平洋では、西側で東アジアからのエアロゾル沈着が高く SRP が枯渇する傾向が見られるものの、東の海域にいくにつれてその傾向は弱くなる。ただし、ハワイ周辺海域はおそらく陸域由来の栄養供給により窒素固定生物が多く分布し、窒素固定活性の高い海域となっている。さらに、季節によって東アジア由来のエアロゾルの供給と下層からの栄養塩の供給は変動し、特に冬季のリン酸塩の表層への供給量増加にともない窒素固定活性が上昇することが報告されている (Kitajima et al. 2009)。このように、西部北太平洋は海域や季節によっ

て栄養環境と窒素固定活性が大きく変動するため、栄養供給に対する窒素固定活性の応答もこれらの要因に伴い変動することが期待される。

南太平洋西部では、*nifH* 遺伝子の組成は Cluster I に分類される γ -プロテオバクテリア、UCYN-A が主要な構成者であり、わずかながら Cluster III に属する配列も見つかっている (Zehr et al. 2003)。また、いくつかの γ -プロテオバクテリア (Gamma1-4) の *nifH* 発現も確認されている (Halm et al. 2012)。また、島周辺では *Trichodesmium* spp.、*C. watsonii* が多く分布するほか、UCYN-A などの窒素固定性シアノバクテリアや従属栄養性の γ -プロテオバクテリア 24774A11 が多く分布することが報告されている (Moisander et al. 2014)。南太平洋は湧昇域を除いて東西を通して硝酸塩および亜硝酸塩の濃度は低いものの、リン酸塩は数百 nM のレベルで存在しており、西部北太平洋と比較すると高い濃度である (Raimbault et al. 2008; Hashihama et al. 2009)。この海域における栄養添加実験から、UCYN-A、*C. watsonii* および γ -24774A11 の *nifH* 現存量が有機炭素および鉄によって制限されていたことが分かっている (Moisander et al. 2012)。一方、東部亜熱帯循環は生物量、基礎生産ともに極めて低い海域として知られており、おそらく大気由来の鉄供給の不足が原因であると考えられている (Bonnet et al. 2008)。東部亜熱帯循環には窒素固定性シアノバクテリアはいずれもほとんど分布しないことが複数の既存知見で報告されており (Bonnet et al. 2008; Dekaezemacker et al. 2013)、シアノバクテリア以外の従属栄養性窒素固定生物が主要な窒素固定生物であると考えられている。この海域における *nifH* 遺伝子のシーケンシングとそれらのうち代表的な 3 つの配列 (γ -ETSP1-3) について定量が試みられたものの、いず

れも現存量が低かったため、未だ主要な窒素固定生物のグループは特定されていない (Turk-Kubo et al. 2014)。東部亜熱帯循環内部および赤道湧昇域において添加実験が報告されており、亜熱帯循環内部では窒素固定の制限が認められなかったものの、赤道湧昇域においては鉄による窒素固定の制限が認められた (Bonnet et al. 2008; Dekaezemacker et al. 2013)。

太平洋の西部の縁辺海である東シナ海では、陸域付近や黒潮域においてしばしば *Trichodesmium* spp.が多く分布することが知られており、こうした環境では窒素固定活性も高い (Marumo and Asaoka et al. 1974; Shiozaki et al. 2010)。しかしながら、この海域における窒素固定の制御要因についてはあまりよく分かっていない。

このように、太平洋においては陸域あるいは大気由来の栄養供給が高い海域と低い海域が存在し、海域間で窒素固定生物の組成も異なる。したがって、窒素固定の制限となる要因も海域間で異なることが予想されるものの、太平洋における窒素固定の制限要因の把握は一部の海域に限られている。したがって、本研究では太平洋の各海域を横断的に観測することで、これらの海域における窒素固定の制限要因がどのような環境要因と関係しているのかを明らかにすることを目的とした。

2-2 方法

2-2-1 サンプルング

サンプルングおよび培養実験は白鳳丸 KH-11-10 次航海 (2011 年 12 月から 2012 年 1 月) およ

び KH-12-3 次航海 (2012 年 7 月から 8 月) (Fig. 2.1a および b、c)、淡青丸 KT-11-23 次航海 (2011 年 9 月) および KT-12-24 次航海 (2012 年 9 月) (Fig. 2.2a-c) で行った。本研究では便宜上、以下、測点 108 (158.1° W) 以西の測点を西部太平洋、測点 109 (149° W) 以東をの測点を東部太平洋と区分した。各測点において、ニスキン採水前に KH-11-10 および KH-12-3 次航海では Hyperprofiler (Satlantic)、KT-11-23 次航海では INF-300 (Biospherical Instruments)、KT-12-24 次航海では AEM10W-USB (JFE Advantech) により光合成有効放射 (PAR) の鉛直分布を測定した。サンプリングは海表面からバケツにより、あるいは表面に対して PAR が 50%となる光深度から酸洗浄したニスキン-X 採水器により採水した。50%光量層から採水した理由は、表面バケツ採水では鉄のコンタミネーションを防げないことと、50%の減光下で後述の培養実験を行ったため、この光条件と一致した深度から採水するためである。白鳳丸 KH-11-10 および KH-12-3 次航海では微量金属のコンタミネーションを防ぐため、ニスキン-X 採水器のスπιゴットをテフロン製のものに交換し、キャローセルの吊り下げはチタンアーマードケーブルにより行った。淡青丸航海では通常のニスキン-X 型採水器および鉄製のケーブルを用いた。ニスキン採水時における圧力および水温、塩分、溶存酸素はキャローセルに取り付けた SBE9plus、SBE3、SBE4、SBE43 (Sea-Bird Electronics) により測定した。混合層深度 (MLD) は σ_t が 10 m における値から 0.125 上昇する深度と定義した (Suga et al. 2004)。

2-2-2 クロロフィル *a*

KT-11-23 および KT-12-24 次航海では表面より、KH-11-10 および KH-12-3 次航海では 50%光量層よりサンプリングした。海水を直径 25 mm のガラス繊維濾紙 (GF/F、Whatman) に濾過し、6 ml (KH-11-10、KH-12-3、KT-11-23) あるいは 4 ml (KT-12-24) の *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) (特級、和光純薬工業) に濾紙を浸漬して-20 °C で一日以上クロロフィル *a* を抽出した (Suzuki and Ishimaru 1990)。クロロフィル *a* の濃度は酸非添加法により 10-AU fluorometer (Turner Designs) を用いて測定した (Welschmeyer 1994)。校正に用いスタンダードは、クロロフィル *a* の標準物質 (和光純薬工業) を DMF に溶かしたものを吸光光度計により濃度決定し、これを順次 DMF で希釈して作成した。

2-2-3 栄養塩

各航海において KT-11-23 および KT-12-24 次航海では表面から、KH-11-10 および KH-12-3 次航海では 50%光量層からサンプリングした。硝酸塩+亜硝酸塩 (N+N) および SRP の測定は、KT-11-23 および KT-12-24 次航海ではオートアナライザーによる通常のマイクロモルレベルでの分析法で、KH-11-10 および KH-12-3 次航海ではナノモルレベルでの高感度分析法により行った。通常測定用の海水サンプルは、スピッツ管に採取後、-20 °C で凍結し、陸上研究室で解凍後、オートアナライザーにより栄養塩濃度を測定した。高感度分析法での測定用のサンプルは酸洗浄した高密度ポリエチレン製ボトルに採取後、-20 °C で凍結保存して陸上研究室で測定あるいは採取後ただちに測定した。高感度分析法は長光路キャピラリーセル (World Precision

Instruments) および FO-6000 (World Precision Instruments) を用いて、Hashihama et al. (2009) の方法にしたがった。高感度分析法による検出限界はブランク値の繰り返し測定による標準偏差の 3 倍と定義し、KH-11-10 次航海では N+N および SRP についてそれぞれ 1.6 nmol l^{-1} および 1.3 nmol l^{-1} であり、KH-12-3 次航海ではそれぞれ 2 nmol l^{-1} および 1 nmol l^{-1} であった。

2-2-4 溶存鉄

溶存鉄サンプルは KH-11-10 および KH-12-3 次航海の 50%光量層よりサンプリングした。ニースキン採水器のテフロンスピゴットにシリコンチューブで接続した孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のアクロパック 200 カプセルスーポアメンブレンフィルター (Pall) を用いて、重力濾過により粒子を除去し、濾液を酸洗浄した低密度ポリエチレンボトルにボトルの首の付け根部分まで採取した。低密度ポリエチレンボトルの洗浄は Kondo et al. (2012) の方法と同様に行った。採取した海水サンプルは白鳳丸船内のクリーンルームで高純度の 20%塩酸 (Tamapure-AA 100、多摩化学) を 0.5 ml 添加し、pH を 1.7 に調整して室温で保存した。溶存鉄濃度は 757VA Computrace (Metrohm) を用いて Obata and van den Berg (2001) の方法により測定した。ただし、Sato et al. (2007) に従い、pH 緩衝液は 3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸 (EPPS) の代わりにピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸) (POPSO) (Dojin Chemicals) を用いた。ブランクは、海水サンプルと同容量の Milli-Q 水に 20%塩酸を 0.5 ml 添加したものを用いた。検出限界はブランク測定の標準偏差の 3 倍として測定日ごとに決定し、 $0.020\text{--}0.12 \text{ nmol l}^{-1}$ の範囲であったが、

本研究で用いたデータは全て検出限界以上であった。

2-2-5 顕微鏡観察

KH-11-10 および KH-12-3 次航海の 50%光量層よりサンプリングした。海水を 500 ml のボトルに採取し、酸性ルゴール液を 3 ml 加えて固定した。陸上研究室で固定サンプルを濃縮後、倒立顕微鏡 (Nikon) を用いて Utermöhl 法により *R. intracellularis* のフィラメント数を計測した。また、同時に *Trichodesmium* spp.についても形態を観察した。ただし、*Trichodesmium* 属を種のレベルにまで同定するには、光学顕微鏡で観察できる分類形質以外にも、ガス胞をはじめとする細胞内の微小な器官を電子顕微鏡で観察する必要がある (Janson et al. 1995)。したがって、本研究では *Trichodesmium* 属の種同定はせずに、まとめて *Trichodesmium* spp.として記載した。

2-2-6 *nifH* 現存量

KH-11-10 および KT-11-23、KT-12-24 次航海では表面より、KH-12-3 次航海では 50%光量層よりサンプリングした。KH-11-10 次航海以外は添加培養実験と同じ深度から採水したが、KH-11-10 次航海では培養海水は 50%光量層から、*nifH* 現存量のサンプルは表面から採水したので、それぞれ採水深度が異なる。ただし、いずれも混合層内のサンプルであったため、本論文ではこれらの違いを特に区別せずに扱った。海水 1 l を吸引濾過し、直径 47 mm、孔径 0.2 μ m のニュークリポアメンブレンフィルター (Whatman) 上に粒子を濾集した。フィルターは液体窒素で瞬間凍結

させた後、-80 °C で保存した。航海後に陸上研究室で、ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit (Invitrogen) を用いてメーカーのプロトコルに従い DNA を抽出・精製し、分析まで-20 °C で凍結保存した。

Trichodesmium spp.および UCYN-A、*C. watsonii*、 γ -プロテオバクテリア 24774A11 (γ -24774A11) の *nifH* 現存量を定量 PCR により測定した。測定に用いたフォワードおよびリバースプライマー、プローブ、スタンダードテンプレートは、*Trichodesmium* spp.、UCYN-A、*C. watsonii* (UCYN-B) については古屋 (2009) が作成し、Shiozaki et al. (2014a) により記載されたものを用いた。 γ -24774A11 のプライマー、プローブ、スタンダードテンプレートについては Moisander et al. (2008、2010) に記載されたものを若干改変したものを用いた (Shiozaki et al. 2014b) (Table 2.1)。標準液はトリス-エチレンジアミン四酢酸 (TE) 緩衝液によりストック液を順次希釈して 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 および 10^1 copies μl^{-1} の濃度段階を作成した。ブランクはテンプレートを含まない TE 緩衝液を用いた。測定直前にサンプルおよび標準液の希釈系列、ブランクのテンプレート 1 μl を 2 \times Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time、TAKARA) 10 μl およびオートクレーブした Milli-Q 水 7.4 μl 、フォワードおよびリバースプライマーそれぞれ 0.60 μl 、プローブ 0.40 μl と混合し、MJ Mini personal thermal cycler (BioRad) が組み込まれた MiniOpricon real-time PCR system (BioRad) によりサンプル中の *nifH* 現存量を測定した。PCR プログラムは以下のとおりである; 95 °C で 10 秒間変成させたのち、95 °C を 4 秒間および 60 °C を 11 秒間のサイクルを 50 回繰り返し、25 °C に冷却した。測定は同一サンプルに対して 4 回繰り返し、その平均値を用いた。PCR 増幅効率は

Trichodesmium spp.、UCYN-A、*C. watsonii* および γ -24774A11 についてそれぞれ 93.6–100.0%、90.8–107.1%、91.8–105.9% および 91.8–110.0% であった。回帰の決定係数は >0.988 であった。サンプリング後の濾過容量および測定前の抽出過程における濃縮率を考慮すると、現場の *nifH* 現存量に換算して 1×10^2 copies l^{-1} が定量可能な最小の値であるため、これを検出限界とした。

2-2-7 エアロゾル沈着量の見積り

KH-11-10、KH-12-3 次航海におけるエアロゾル沈着量は Spectral Radiation-Transport Model for Aerosol Species (SPRINTARS) (Takemura et al. 2000、2002、2005) によって見積もった。各測点における 1 日当たりのエアロゾル沈着量はサンプリング前 2 週間の値を平均したものをを用いた (Hashihama et al. 2009)。

2-2-8 ピコ・ナノ植物プランクトン細胞密度

KT-11-23 および KT-12-24 次航海では海表面より、KH-11-10 および KH-12-3 次航海では 50% 光量層より採水後、バケツあるいはニスキン採水器から海水サンプルを 4.5 ml 凍結保存チューブ (Nunc) に採取した。サンプルは終濃度 1% となるようにグルタルアルデヒド (電子顕微鏡用、和光純薬) を添加して固定し、液体窒素で瞬間凍結した後に -80°C で保存後、陸上研究室で測定、あるいは採取後に未固定のまま船上で直ちに測定に供した。測定は PAS-III フローサイトメーター (Partec) を用い、前方散乱光、側方散乱光、オレンジ色蛍光、赤色蛍光により真核植物プラ

ンクトン、*Synechococcus*、*Prochlorococcus*、ナノシアノバクテリアにクラスターを分け、それぞれの細胞密度を計測した。

2-2-9 基礎生産

KT-11-23 および KT-12-24 次航海では海表面より、KH-11-10 および KH-12-3 次航海では 50% 光量層より採水後、バケツあるいはニスキン採水器から海水サンプルを 4.5 l ポリカーボネートボトル (Nalgene) に採取した。基礎生産の培養および測定法は Hama et al. (1983) に従った。培養前のサンプル中の粒子の $\delta^{13}\text{C}$ を決定するために、海水サンプル 4.5 l は採水後ただちに燃焼させたガラス繊維フィルター (GF/F、Whatman) に濾過し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。培養用の海水には、 $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ (Cambridge Isotope Laboratories) を終濃度 $200\text{ }\mu\text{M}$ となるように添加後、熱可塑性エラストマー (TPE) 製セプタムキャップ (Nalgene) でふたをし、ボトルを黒色オーガンジーの布地で作ったカバーで包んで 50% 光量に調節し、甲板に設置した表面海水掛け流し水槽で 24 時間培養した。培養後、ボトル内の海水 4.5 l を燃焼させた GF/F フィルターにより濾過し、フィルターを $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。培養は 2 連のボトルで行った。

航海後、フィルターサンプルを $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 6 時間乾燥させ、塩酸で 2 時間燻蒸させたのち、再度 2 時間乾燥させた。乾燥させたフィルターを錫カプセル (ルディスイス) に包んだのち、元素量・同位体比測定に供した。測定は、元素量分析計 (Flash EA、Thermo Electron) および質量分析計 (Delta^{plus} XP、Thermo Electron) により炭素の元素量および同位体比を測定した。基礎生産

速度は Hama et al. (1983) にしたがって計算した。

2-2-10 セプタムキャップからの鉄溶出の評価

鉄添加による窒素固定への影響を評価する際に、培養液への鉄のコンタミネーションは結果に影響を与える。したがって、培養器具からの鉄の溶出や採水・実験作業時の鉄の混入は最小限に抑える必要がある。このうち、培養器具からの鉄の溶出に関して、本研究で用いたポリカーボネート製ボトルについては、酸洗浄により鉄クリーンな実験に使用可能であることが Takeda and Obata (1995) により報告されている。しかし、本研究で窒素固定の見積りに用いた $^{15}\text{N}_2$ 法 (Montoya et al. 1996) では、培養瓶の蓋にセプタムキャップを用いるが、このセプタムキャップについては適切な素材および洗浄方法および、その結果、鉄がどの程度溶出するのかについて報告されていない。したがって、航海前にこれらについて以下の方法で検討を行った。

器具は 125 ml のポリカーボネート製ボトル (Nalgene) および、TPE 製セプタムスクリーキャップ、およびこれのセプタム部をシリコンゴムシート (厚さ 5 mm、アズワン) に交換したものを用いた。それぞれ、水道水により 5%に希釈した Extran MA03 洗剤 (Merck-Millipore) に 1 日以上、 1 mol l^{-1} 塩酸 (特級、和光純薬工業) に一晩以上室温で浸漬し、その後、 0.3 mol l^{-1} 塩酸 (有害金属測定用、和光純薬工業) に浸漬して $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 6 時間以上、Milli-Q 水に浸漬して $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 6 時間以上加熱した。

実験に用いた海水は、人工海水を用いた。人工海水は YBCII 培地 (Chen et al. 1996) とほぼ同

様であるが、微量金属、EDTA およびリン酸塩を加えていないものを作成し、さらに、培地中に微量に混入した鉄を除去するために、これを Chelex 100 (Bio-Rad) で 2 回精製したものを用いた。

鉄溶出実験は以下のように行った。125 ml ポリカーボネート製ボトルを TPE 処理区およびシリコンゴム処理区、コントロールについて各 3 本ずつ用意し、それぞれに培地 50 ml ずつを加えた。TPE 処理区およびシリコンゴム処理区、コントロールはそれぞれ TPE 製セプタムおよびシリコンゴム製セプタム、セプタムでない通常のキャップでふたをし、TPE 処理区およびシリコンゴム処理区はボトルを上下逆にして培地がセプタムに接するようにして 24 時間そのまま置いた。コントロールは上下逆にせずにそのまま置いた。24 時間後に元に戻し、ただちに培地中の鉄濃度を前述の方法で測定した。

各ボトルの培地中の鉄濃度は TPE 処理区の 1 本が 63 pmol l^{-1} であったのを除いて全て検出限界である 47 pmol l^{-1} 以下であった。したがって、いずれのセプタム処理による鉄溶出も検出できないレベルであった。

セプタムキャップからの鉄溶出の検討の結果、いずれのセプタムキャップも鉄の溶出に関しては問題なく使用可能であると考えられた。したがって、本研究では、先行研究 (Shiozaki et al. 2009) で用いられている TPE 製セプタムキャップを使用した。

2-2-11 リンおよび鉄の添加実験

海水は KT-11-23 および KT-12-24 次航海では海表面より、KH-11-10 および KH-12-3 次航海で

は 50% 光量層より採水後、バケツあるいはニスキン採水器より海水サンプルを 4.5 l ポリカーボネートボトル (Nalgene) に採取した。培養前サンプル中の粒子の $\delta^{15}\text{N}$ を決定するため、サンプル 4.5 l を採水後ただちに燃焼させたガラス繊維フィルター (GF/F, Whatman) に濾過し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。添加系列として、白鳳丸航海ではリンのみ、鉄のみ、およびリン鉄両方の添加区を設け、淡青丸航海ではリンの添加区を設けた。無添加区をコントロールとした。リン添加はリン酸二水素カリウム (特級、和光純薬)、鉄添加は塩化鉄 (III) (特級、和光純薬) をそれぞれ終濃度 200 nmol l^{-1} および 2 nmol l^{-1} となるように添加した。添加後、ボトルは内部に気泡が入らないように TPE 製セプタムキャップ (Nalgene) でふたをし、ガスタイトシリンジで $^{15}\text{N}_2$ ガス (SI サイエンス) を注入した。白鳳丸航海では注射針からのコンタミネーションを防ぐため、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 製チューブ (仁礼工業) により注射針をカバーしてガスを注入した (Needoba et al. 2007)。ボトルは黒色オーガンジーの布地で作ったカバーにより現場光量に調節し、甲板に設置した表面海水かけ流し水槽で 48 時間培養した。培養後、ボトル内の海水 4.5 l を燃焼させた GF/F フィルターにより濾過し、フィルターを $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

航海後、フィルターサンプルを $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 6 時間乾燥させ、錫カプセルに包んだのち、測定に供した。測定は、元素量分析計 (Flash EA, Thermo Electron) および質量分析計 ($\text{Delta}^{\text{plus}}$ XP, Thermo Electron) により窒素の元素量および同位体比を測定した。窒素固定速度は Montoya et al. (1996) にしたがって計算した。

本研究で用いた $^{15}\text{N}_2$ のバブルを直接添加する方法では、気相と液相の $^{15}\text{N}_2$ ガスと $^{14}\text{N}_2$ ガスが

平衡に達するのに時間がかかるため、窒素固定が過小評価となることが指摘されており (Mohr et al. 2010)、本研究の値も過小の見積りとして考えなければならない。しかしながら、Mohr et al. (2010) の $^{15}\text{N}_2$ 飽和水を添加する方法では、 $^{15}\text{N}_2$ 飽和水を作る過程で脱気水を作成する必要がある、脱気水の作成時に鉄が混入する可能性が高い。したがって、本研究では旧来の $^{15}\text{N}_2$ バブル添加法を用いて実験を行った。

同じ系列内のボトル間で他のボトルと比べて 1 本だけ窒素固定の値が大きくずれることがあった。これはおそらく窒素同位体比の測定時のエラーと考えられたため、このような場合は $p < 0.05$ を基準とするスミルノフの棄却検定により外れ値を判定して除外した。

2-2-12 スチューデントの t -検定

窒素固定に対する添加の効果はスチューデントの t -検定により添加区とコントロールを比較し、有意水準 0.05 として評価した。また、冬季の KH-11-10 次航海の測点 102-108 とそのほかの夏季の測点の窒素固定生物の現存量の比較も同様に t -検定で行った。また、各パラメータ間の関係は単回帰分析により有意水準 0.05 で評価した。

2-2-13 主成分分析

測点におけるデータの変動を特徴づけるパラメータを明らかにするため、各パラメータを主成分分析に供した。本研究で全航海を通して得られたデータとして窒素固定活性および、*nifH*

現存量 (*Trichodesmium*、UCYN-A、*C. watsonii*、 γ -24774A11)、ピコ・ナノ植物プランクトン細胞密度 (真核植物プランクトン、*Synechococcus*、*Prochlorococcus*、ナノシアノバクテリア)、栄養塩濃度 (N+N および SRP)、MLD、基礎生産、クロロフィル *a* 濃度、水温、塩分があり、白鳳丸航海 (KH-11-10 および KH-12-3 次航海) ではそれらに加えて *R. intracellularis* フィラメント密度および溶存銅濃度、エアロゾル沈着量見積り (黒色炭素およびダスト、有機物、海塩粒子、硫酸塩) のデータも取得した。そのため、主成分分析も全航海データを用いた解析と白鳳丸航海を用いた解析の 2 通りで行った。欠損データのある測点のデータを除いたのち、データを標準化し、相関行列から主成分を求めた。計算は R (R Core Team 2005) を用いて行った。後述のクラスター解析に用いる主成分として標準偏差が 1 以上のものを選択したところ、全航海データでは主成分 1-5 が、白鳳丸航海のみのデータでは主成分 1-7 が選ばれ、これらの累積寄与率はそれぞれ 84% および 74%であった。

これらに加えて、環境パラメータのみを用いた分析も行った。パラメータは SRP 濃度、溶存鉄濃度、混合層深度、水温、塩分を選択した。エアロゾル沈着量見積り、N+N はそれぞれ溶存鉄濃度および SRP 濃度と関連の強いパラメータであったため、この分析では除外した。データセットは白鳳丸航海の全データあるいは西部北太平洋のみのデータの 2 通りを用いて分析を行った。いずれも主成分 1-3 を後述のクラスター分析に用い、主成分の標準偏差は 0.94 以上であった。主成分 1-3 までの累積寄与率はそれぞれ 78%および 84%であった。

2-2-14 クラスタ分析

各測点を主成分に基づいていくつかのパターンに分類するため、全航海データおよび白鳳丸航海のみのデータについて R を用いて K-means 法によるクラスタ分析を行った。クラスタ間の距離はユークリッド距離を用いた。データは上記の主成分分析により求めた各主成分（全航海データ：主成分 1-5、白鳳丸航海のみのデータ：主成分 1-7）に対する測点ごとの主成分得点を用いた。クラスタ数は全航海データおよび白鳳丸航海のみのデータで 4-8 個の間で変動させて分析し、クラスタが明瞭に分離したものを採用した。その結果、それぞれクラスタ数を 4 個および 7 個として分割した。

上述の環境パラメータのみを用いてもとめた主成分についても同様にして、白鳳丸航海全データおよび西部北太平洋データをそれぞれ 4 クラスタおよび 3 クラスタに分割した。

2-3 結果

2-3-1 水塊の特徴およびクロロフィル *a*、基礎生産の分布

白鳳丸 KH-11-10 次航海では、海面クロロフィル *a* の分布から、測点 102-109 が北太平洋亜熱帯循環、測点 110-114 および測点 122 が赤道湧昇域、測点 115-121 が南太平洋亜熱帯に位置していた (Fig. 2.1a、c)。23° N の観測ラインでは培養サンプルの採水深度 (3-10 m) における水温は 24.2-27.4 °C であり、西から東にかけて低くなった (Fig. 2.1a)。それに伴い、MLD は 27 m から 105 m へと深くなった。また、MLD の変動はより小さなスケールでも見られ、2 つの低気圧

性渦 (Fig. 2.1a) の内部に位置していた測点 102 および 104A で隣接の渦外部の測点よりも浅くなっており、それぞれ 27 m および 45 m であった。赤道湧昇域の測点のうち赤道上の測点 111 で水温が 24.1°C と最も低く、その他の測点では 24.4–27.4 °C であった。測点 111 を除くこれらの測点における MLD は 17–54 m であった。赤道湧昇域よりも南の亜熱帯循環内の測点では水温は低下し、最も低かった測点 119 では 22.1 °C であった。亜熱帯循環内の測点における MLD は 18–38 m であり、KH-11-10 次航海の他の海域と比べて最も浅かった。KH-11-10 次航海におけるクロロフィル *a* 濃度は赤道湧昇域の測点 110–114 および測点 122、および北太平洋の測点 106–108 および測点 109 で高く、それぞれ 0.100–0.162 $\mu\text{g l}^{-1}$ および 0.086–0.162 $\mu\text{g l}^{-1}$ であった。海面クロロフィル画像から、測点 109 は赤道湧昇域よりは北に位置していたが、カリフォルニア海流の影響でクロロフィル *a* が高かったと考えられた (Fig. 2.1c)。北太平洋亜熱帯循環西部の測点 102–105 および南太平洋亜熱帯循環内の測点 115–121 ではクロロフィル *a* 濃度は低く、それぞれ 0.048–0.074 $\mu\text{g l}^{-1}$ および 0.022–0.050 $\mu\text{g l}^{-1}$ であった。基礎生産は、北太平洋亜熱帯循環の測点 102 および測点 108 (Stn. ALOHA)、測点 109 で 0.42–0.68 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ 、赤道湧昇域の測点 110 および測点 112–114、測点 122 で 0.50–0.64 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ と高かった。一方、西部北太平洋亜熱帯循環のその他の測点および東部南太平洋亜熱帯循環の測点では基礎生産は低く、それぞれ 0.11–0.31 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ 、および検出限界以下から 0.27 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ であった。

西部北太平洋において夏季に行った KH-12-3 次航海では、表面水温が 29 °C 以上の暖水域が 170° E 以西の 20° N まで分布していた (Fig. 2.1b)。本航海中、黒潮は測点 216 よりも沿岸側に位

置しており、本論文に示した測点はすべて黒潮よりも外洋側に位置していた。暖水域内部の測点 208-211 では外部の測点 205、207 および測点 212-216 と比較して MLD が深くなる傾向が見られ、それぞれ 40-51 m および 15-36 m であった (Table 1)。冬季の KH-11-10 次航海と異なり、KH-12-3 次航海では MLD と低気圧性渦の間に関係は見られなかった (Fig. 2.3b および c、Table 2.2)。採水深度における水温は高緯度域ほど低く、特に測点 205 では 24.4 °C であり、他の測点の 27.5-29.2 °C と比べて低かった (Fig. 2.1b、Table 2.2)。クロロフィル *a* 濃度は測点 205 および 212、214 で高く、それぞれ 0.103 および 0.099、0.081 $\mu\text{g l}^{-1}$ であった (Fig. 2.1b)。その他の測点におけるクロロフィル *a* 濃度は 0.039-0.069 $\mu\text{g l}^{-1}$ であった。基礎生産は南の測点 210-212 で 0.18-0.19 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ と低く、その他の測点では 0.19-0.55 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ であった (Table 2.4)。

夏季に行われた KT-11-23 次航海における東シナ海の測点 301-312 では、表面水温が 28.2-28.8 °C、表面塩分が 34.5-34.7 であり、また、各測点の 90-140 m 付近の深度に見られた塩分 34.8-34.9 の極大が黒潮域の特徴 (Gong et al. 1995) を示していた (Fig. 2.4)。また、西部北太平洋西縁の黒潮域およびその周辺海域で行われた KT-12-24 次航海の測点 401-407 では、表面水温が 27.9-29.2 °C、表面塩分が 33.2-34.5 であった (Table 2.2)。また、CTD 観測を行った測点 401 および 402、407 では、115-150 m 深度で見られた塩分極大が 34.8-34.9 であり、黒潮域の特徴を示していた (Fig. 2.5)。KT-11-23 次航海では、海面高度の衛星画像から計算された地衡流と船の流速計から、観測後半の測点は黒潮の影響を受けていたと考えられた (Fig. 2.2b)。KT-11-23 次航海の東シナ海における観測点では、混合層深度は 38-80 m であった (Table 2.2)。また、KT-12-24

次航海の測点 401 および 402 では、混合層深度は 25–26 m であった (Table 2.2)。表面クロロフィ
ル *a* 濃度は高知および鹿児島沖 (KT-11-23) > 東シナ海 (KT-11-23) > 黒潮およびその周辺海域
(KT-12-24) の順に高く、それぞれ $0.38\text{--}1.45\ \mu\text{g l}^{-1}$ 、 $0.11\text{--}0.18\ \mu\text{g l}^{-1}$ 、 $0.046\text{--}3.04\ \mu\text{g l}^{-1}$ であった
(Table 2.2)。また、これらの海域における基礎生産はそれぞれ $3.1\ \mu\text{mol C l}^{-1}\text{ d}^{-1}$ 、 $0.23\text{--}0.69\ \mu\text{mol C}$
 $\text{l}^{-1}\text{ d}^{-1}$ 、 $0.40\text{--}2.1\ \mu\text{mol C l}^{-1}\text{ d}^{-1}$ であった (Table 2.4)。

2-3-2 栄養塩および溶存鉄濃度、エアロゾル沈着量

西部北太平洋亜熱帯域では KH-11-10 の測点 102–108 および KH-12-3 次航海の測点 202–216
のいずれにおいても N+N 濃度は極めて低かったのに対し ($<5\ \text{nmol l}^{-1}$)、SRP 濃度はいずれの航
海でも海域間で大きく変動した。KH-11-10 次航海の測点 102–108 の 23°N 観測ライン上では SRP
濃度は西部から東部にかけて検出限界以下 ($<1.3\ \text{nmol l}^{-1}$) から $52\ \text{nmol l}^{-1}$ まで増加し (Fig. 2.6a)、
この海域で SRP 濃度は MLD と有意な正の相関を示した ($p<0.05$) (Fig. 2.7a)。このうち、測点 102
および 104A において低気圧性渦が見られたが、これらの測点では MLD の浅化に伴い SRP 濃度
がそれぞれ <1.3 および $5\ \text{nmol l}^{-1}$ と他の測点よりも低くなっていた (Fig. 2.3a および 2.6a)。また、
KH-12-3 次航海では 20°N 以北で SRP が検出限界以下 ($<1\ \text{nmol l}^{-1}$) に枯渇しており、 15°N 以南
では MLD が深くなるのに伴い $80\text{--}98\ \text{nmol l}^{-1}$ と大幅に高くなっていた (Fig. 2.6b)。ただし、この
航海では MLD と SRP 濃度の間に有意な相関は認められなかった ($p>0.05$)。

西部北太平洋では、海塩粒子を除いた黒色炭素、ダスト、有機物、硫酸塩の沈着量は、夏季

の KH-12-3 次航海では冬季の KH-11-10 次航海と比べて 1 桁から 2 桁程度高かった (Table 2.3)。

夏季の KH-12-3 次航海ではこれらのエアロゾルの沈着量はいずれも研究海域北部および西部で沈着が多く、南部で低かった。また、沈着量の変動幅はエアロゾルの種類により異なるものの、夏季の KH-12-3 次航海では比較的変動の幅が大きいのに対し、冬季の KH-11-10 次航海では変動幅は小さく、海域的な変動も乏しかった。現場の溶存鉄濃度は夏季の KH-12-3 次航海では $0.064\text{--}0.90\text{ nmol l}^{-1}$ であった (Table 2.2)。高い溶存鉄濃度はエアロゾル沈着量見積りの高かった 148°E 以西の測点 212 および 214、215、216 で観測され、 $0.31\text{--}0.90\text{ nmol l}^{-1}$ であった (Fig. 2.6 b)。

KH-12-3 次航海では溶存鉄濃度は黒色炭素およびダスト、有機物沈着量見積りと有意な正の相関を示した ($p<0.05$) (例としてダスト沈着量、Fig. 2.9b)。一方、溶存鉄濃度と MLD の間には有意な相関は見られなかった ($p>0.05$)。冬季の KH-11-10 次航海における溶存鉄濃度は $0.082\text{--}0.73\text{ nmol l}^{-1}$ (Table 2.2) であり、ハワイ近海の測点 108 で 0.73 nmol l^{-1} と最も高かったが (Fig. 2.6a)、いずれのエアロゾル沈着量、MLD とも有意な相関は見られなかった ($p>0.05$)。

KH-11-10 次航海の赤道湧昇域の測点 110–114、122 および東部北太平洋のカリフォルニア海流の影響を受けクロロフィル *a* 濃度の高かった測点 109 のうち、測点 112–114 では N+N および SRP 濃度がともに高く、それぞれ $229\text{ nmol l}^{-1}\text{--}8.12\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ および $278\text{--}709\text{ nmol l}^{-1}$ であった。測点 109 および 110、115 では N+N 濃度は $3\text{--}5\text{ nmol l}^{-1}$ と亜熱帯循環内と同様に低かったが、SRP 濃度は $141\text{--}232\text{ nmol l}^{-1}$ と比較的高かった。より東の海域の測点 122 では N+N および SRP 濃度はそれぞれ 17 nmol l^{-1} および 361 nmol l^{-1} と若干高い値であった。これらの測点において溶存鉄

濃度は $0.099\text{--}0.36\text{ nmol l}^{-1}$ と常に低かった。

KH-11-10 次航海の東部南太平洋亜熱帯循環の測点 116–121 では N+N 濃度は $<5\text{ nmol l}^{-1}$ 、溶存鉄濃度は $0.056\text{--}0.452\text{ nmol l}^{-1}$ とともに低かったのに対し、SRP 濃度は $98\text{--}299\text{ nmol l}^{-1}$ であり西部北太平洋と比較して高かった (Table 2.2)。

KT-11-23 次航海において東シナ海の測点 302–312 では、N+N 濃度は $0.14\text{--}1.4\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ と比較的高かったのに対し、SRP 濃度は検出限界以下から 16 nmol l^{-1} であり夏季の西部北太平洋亜熱帯域 20° N 以北で $<7\text{ nmol l}^{-1}$ であったのと同程度であった (Table 2.2)。しかし、測点 30B1 では、N+N が $0.34\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ 、SRP が 12 nmol l^{-1} とわずかに高い値が観測された。KT-12-24 次航海における西部北太平洋の黒潮およびその周辺海域では、N+N および SRP 濃度はともに通常のオートアナライザーによる分析で検出限界以下 (それぞれ 0.1 および $0.05\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$) であった (Table 2.2)。

2-3-3 窒素固定生物および植物プランクトン群集の組成

西部北太平洋において冬季の KH-11-10 次航海の測点 102–108 および夏季の KH-12-3 次航海を通じて、*Trichodesmium* spp. はコロニーでなく藻糸単体で存在し、その分布は散発的であった (Table 2.3)。藻糸の太さは $5\text{--}11\text{ }\mu\text{m}$ であり、細胞の長さは幅よりも短いものから 2 倍程度の長さのものまでが存在した。また、藻糸は直線的あるいは一部が滑らかに屈曲した形状であった (Fig. 2.10)。これらの特徴から、本研究で採取したものの多くは、*T. erythraeum* であると考えられた。ただし、Janson et al. (1995) は、*T. erythraeum* は藻糸の太さは $7\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ で、細胞の長さは幅より

も短いと記述しており、本研究で観察した *Trichodesmium* のうちこれらの記述に当てはまらないものも見られたことから、*T. tenue*、*T. thiebautii*、*Trichodesmium* sp.などの別種が含まれていた可能性がある。しかし、同じ藻糸の中に細胞の長さが幅よりも短いものと長いものが両方存在するものも見られ、光学顕微鏡で観察できる分類形質のみでは完全な種同定は困難であった。

Trichodesmium spp.の現存量は冬季の KH-11-10 次航海と夏季の KH-12-3 次航海で違いは見られなかった ($p>0.05$)。冬季の KH-11-10 次航海の *Trichodesmium* spp.の *nifH* 現存量は、溶存鉄濃度が 0.36 nmol l^{-1} と高かった測点 105 において現存量が $2 \times 10^4 \text{ copies l}^{-1}$ と最も高かった (Table 2.4)。夏季の KH-12-3 次航海の *Trichodesmium* spp.の *nifH* 現存量は $0-7 \times 10^3 \text{ copies l}^{-1}$ であり、 $20-28^\circ \text{ N}$ の海域に多く分布した (Table 2.4)。また、溶存鉄濃度がこの航海中 0.90 nmol l^{-1} と最も高かった測点 214 で現存量が最も高く、 $7 \times 10^3 \text{ copies l}^{-1}$ であった。

R. intracellularis は珪藻 *Hemiaulus* spp.および *Rhizosolenia* spp.を宿主とするものが主体であったが、*Chaetoceros* spp.を宿主とするものもわずかに観察された (Fig. 2.11)。現存量は冬季の KH-11-10 次航海と夏季の KH-12-3 次航海でそれぞれ $0-15$ および $0-16 \text{ filaments l}^{-1}$ であり、冬季と夏季に差はなく ($p>0.05$)、分布は散発的であった (Table 2.4)。

C. watsonii の *nifH* 現存量は冬季の KH-11-10 次航海では、低気圧性渦の内部の測点 102 および 104A で比較的高く、それぞれ $1 \times 10^3 \text{ copies l}^{-1}$ および $8 \times 10^2 \text{ copies l}^{-1}$ であった (Table 2.4)。夏季の KH-12-3 次航海では、 160° E 観測ライン上の $10-25^\circ \text{ N}$ で明瞭な現存量のピークが見られ、*Trichodesmium* spp.の *nifH* 現存量のピークと海域的に一致していた (Table 2.4)。また、全航海を

通して *C. watsonii* の *nifH* 現存量とナノシアノバクテリア細胞密度は有意な正の相関があった ($p<0.05$)。

γ -24774A11 は広域に分布し、冬季の KH-11-10 次航海および夏季の KH-12-3 次航海を通してすべての測点で *nifH* が検出された。冬季の KH-11-10 次航海における *nifH* 現存量は 1×10^2 – 2×10^3 copies Γ^{-1} であり、低気圧性渦内側の測点 102 および 104A で比較的高くそれぞれ 7×10^2 copies Γ^{-1} および 2×10^3 copies Γ^{-1} であった (Table 2.4)。夏季の KH-12-3 次航海における現存量は 1×10^2 – 1×10^4 copies Γ^{-1} であり、最も高い現存量は *C. watsonii* および *Trichodesmium* spp. の分布よりもやや北側の 28–30° N で観測された (Table 2.4)。

冬季の KH-11-10 次航海における UCYN-A の *nifH* 遺伝子の分布は 2 つの低気圧性渦の内部と 170° W 以東の海域に限られていた。*C. watsonii* および γ -24774A11 と同様に、測点 102 および 104A で比較的高い *nifH* 現存量が観察され、それぞれ 7×10^2 copies Γ^{-1} および 2×10^3 copies Γ^{-1} であった (Table 2.4)。夏季の KH-12-3 次航海では、水温が 24.4 °C と低かった測点 205 で高い現存量が観察され、 1×10^4 copies Γ^{-1} であった (Table 2.4)。

ピコ・ナノ植物プランクトンについては、夏季の KH-12-3 次航海と冬季の KH-11-10 次航海の間で、現存量の違いなどは特に認められなかった (Table 2.3)。

東部太平洋の KH-11-10 次航海の測点 109–122 では、北半球と南半球ともに、本研究で調べた窒素固定生物はほとんど存在せず、*Trichodesmium* spp. および UCYN-A が一部の測点でわずかに観察されたのみであった (Table 2.4)。真核植物プランクトン、*Synechococcus* および

Prochlorococcus は赤道湧昇域では多く分布したが、亜熱帯循環内では少なかった (Table 2.3)。

KT-11-23 および KT-12-24 次航海で観測を行った東シナ海および黒潮とその周辺海域においては、本研究で *nifH* 遺伝子の現存量を定量した 4 種の窒素固定生物のうち、*Trichodesmium* spp. および γ -24774A11 の現存量が高く、KT-11-23 次航海では東シナ海の測点 302-312 でそれぞれ $1 \times 10^2 - 3 \times 10^3$ copies l^{-1} および $3 \times 10^2 - 2 \times 10^4$ copies l^{-1} 、黒潮域および鹿児島沖でそれぞれ $4 \times 10^3 - 1 \times 10^5$ copies l^{-1} および $6 \times 10^2 - 3 \times 10^3$ copies l^{-1} であった (Table 2.4)。また、黒潮およびその周辺海域で観測した KT-12-24 次航海における *Trichodesmium* spp. および γ -24774A11 の *nifH* 現存量はそれぞれ $0 - 1 \times 10^5$ copies l^{-1} および $4 \times 10^3 - 3 \times 10^4$ copies l^{-1} であった。これらに対して UCYN-A および *C. watsonii* の *nifH* 現存量は低く、KT-11-23 次航海において UCYN-A は全測点で全く検出されず、*C. watsonii* は $0 - 5 \times 10^2$ copies l^{-1} であった。KT-12-24 次航海では KT-11-23 次航海よりは UCYN-A と *C. watsonii* のいずれも現存量が高かったものの、それぞれ $0 - 7 \times 10^3$ copies l^{-1} および $0 - 1 \times 10^3$ copies l^{-1} であり、*Trichodesmium* spp. および γ -24774A11 の *nifH* 現存量よりは低かった (Table 2.4)。また、*Synechococcus* および *Prochlorococcus* の現存量が本研究海域中では比較的多く分布していた (Table 2.3)。

2-3-4 窒素固定活性の分布

本研究で窒素固定活性の測定をおこなった測点ではいずれも活性が検出された。窒素固定活性を海域間で比較すると、東シナ海と黒潮域で特に高い活性が見られ、太平洋では、高い方から

夏季西部北太平洋、冬季西部北太平洋、東部太平洋となった (Table 2.4)。

西部北太平洋冬季の KH-11-10 次航海では海域間の窒素固定の変動は比較的小さく 0.32–0.85 nmol N l⁻¹ d⁻¹ の範囲であった (Fig. 2.6c)。一方で、夏季 KH-12-3 次航海では窒素固定が 0.18–2.2 nmol N l⁻¹ d⁻¹ の範囲で、海域間で大きく変動し、特に 160° E 観測ライン上の測点 207 を除く 15–35° N の海域で 0.58–2.2 nmol N l⁻¹ d⁻¹ と高かった (Fig. 2.6d)。

東部北太平洋の測点 209 では窒素固定活性は 0.44 nmol N l⁻¹ d⁻¹ であった。赤道湧昇域の測点 210–214 および 222 では窒素固定活性は 0.25–0.83 nmol N l⁻¹ d⁻¹ であった。このうち、南半球側の測点 212–214 では窒素固定活性は 0.61–0.83 nmol N l⁻¹ d⁻¹ と比較的高かった。東部南太平洋亜熱帯循環内の測点 215–221 における窒素固定活性は 0.16–0.51 nmol N l⁻¹ d⁻¹ であり、赤道湧昇域よりもわずかに低かった (Fig. 2.6e)。

KT-11-23 次航海の東シナ海の測点 302–312 における窒素固定は 0.42–4.4 nmol N l⁻¹ d⁻¹ であり (Table 2.4)、特に測点 302–308 で 1.3–4.4 nmol N l⁻¹ d⁻¹ と高かった。また、高知沖の黒潮域測点 30B1 でも 3.5 nmol N l⁻¹ d⁻¹ と高い窒素固定が見られた。黒潮およびその周辺海域で行われた KT-12-24 次航海でも高い窒素固定が見られ、*Trichodesmium* spp. の現存量が 1×10⁵ *nifH* copies l⁻¹ と高かった測点 403 で 16 nmol N l⁻¹ d⁻¹ と非常に高い窒素固定活性が観測され、その他の測点でも 0.56–1.3 nmol N l⁻¹ d⁻¹ であった。

2-3-5 各パラメータ間の関係

本研究における現場窒素固定活性は *Trichodesmium* spp. の *nifH* 現存量および基礎生産、クロロフィル *a* 濃度と有意な正の相関が、塩分と有意な負の相関があった ($p<0.05$)。また、窒素固定生物に関しては、*C. watsonii* の *nifH* 現存量がナノシアノバクテリア細胞密度と有意な正の相関 ($p<0.05$) を持ったほか、 γ -24774A11 が黒色炭素およびダスト沈着量見積り (いずれも KH-11-10 および KH-12-3 次航海のみ) と有意な正の相関 ($p<0.05$) を、塩分と有意な負の相関を持った ($p<0.05$)。その一方で、*R. intracellularis* (KH-11-10 および KH-12-3 次航海のみ) および UCYN-A は他のパラメータとの相関は見られなかった ($p>0.05$)。基礎生産およびクロロフィル *a* はピコ・ナノ真核植物プランクトンおよび *Synechococcus*、*Prochlorococcus* の細胞密度と有意な正の相関 ($p<0.05$) があったほか、基礎生産とクロロフィル *a* 同士も有意な正の相関 ($p<0.05$) を示した。その一方で、塩分に対しては有意な負の相関 ($p<0.05$) を示した。さらに、ピコ・ナノ真核植物プランクトンと *Synechococcus*、および *Synechococcus* と *Prochlorococcus* の細胞密度の間にも有意な正の相関があった ($p<0.05$)。 *Prochlorococcus* の細胞密度はこれらの他、混合層深度および水温と有意な正の相関 ($p<0.05$) が、塩分と有意な負の相関 ($p<0.05$) があった。

また、有意な相関は見られなかったパラメータ間にも、関係性が深いと考えられるものも存在した。*C. watsonii* の *nifH* 現存量はナノシアノバクテリア細胞密度を除く他のいずれのパラメータとも有意な相関は見られなかった ($p>0.05$)。しかし、冬季は夏季と比較して *C. watsonii* の *nifH* 現存量が大幅に低く、水温の季節間の違いと対応しており (Fig. 2.12a)、また、水温ほど明瞭ではないが、エアロゾル沈着量も夏季に高く冬季に低いため (Fig. 2.12b)、水温やエアロゾル

供給が *C. watsonii* の *nifH* 現存量の季節的な変動の要因となっている可能性がある。また、*C. watsonii* の *nifH* 現存量は MLD と負の関係にあり (Fig. 2.12c)、*C. watsonii* が成層の発達した環境に多く分布したことを示している。

γ -24774A11 の *nifH* 現存量も黒色炭素、ダストおよび塩分以外のパラメータと、有意な相関はなかったが ($p>0.05$)、季節ごとに見るとある程度の傾向が認められた。まず、高い現存量が見られた測点の水温幅は 27.3–29.2 °C であり、冬季の低水温環境ではこれよりも現存量が低い傾向が認められた (Fig. 2.13a)。この他、*C. watsonii* と同様に、 γ -24774A11 の *nifH* 現存量も MLD および SRP とは負の関係にあり (Fig. 2.13b および c)、 γ -24774A11 が、成層が発達し SRP の供給の低い貧栄養環境を中心に分布していたことを示している。

Trichodesmium の *nifH* 現存量は水温 27–28 °C 付近で現存量が最も高く、それより高いあるいは低い水温域では現存量が低くなる傾向があった (Fig. 2.14a)。また、SRP 濃度と現存量の変動はほとんど関係が見られなかったが (Fig. 2.14b)、エアロゾル沈着 (Fig. 2.14c) あるいは溶存鉄濃度 (Fig. 2.18) の高かったいくつかの測点では現存量が高かった。ただし、エアロゾル沈着量が低いにも関わらず高い現存量が認められる測点も多かった。

2-3-6 主成分分析およびクラスター分析

白鳳丸 KH-11-10 および KH-12-3 次航海の全測点の環境パラメータを用いた分析から、主成分 1 は塩分およびリン酸塩濃度と正の関係、水温と負の関係を、主成分 2 は MLD と正の関係を、

主成分 3 は溶存鉄濃度と正の関係を示した (Table 2.5)。主成分分析で求めた各測点の主成分得点 (Table 2.9) から、太平洋は 4 クラスターに分割された (Fig. 2.19c)。東部南太平洋の測点 112–122 は 1 つのクラスターとなり、高塩分と高 SRP 濃度で特徴付けられた。残りの西部北太平洋および東部太平洋測点 109、110 は 3 つのクラスターとなった；冬季の KH-11-10 次航海の残りの測点と夏季 KH-12-3 次航海測点 205 が 1 つのクラスターになり、これらの測点間の相違は MLD で特徴付けられた。夏季航海の測点 205 以外の測点は高緯度域の測点 208–211 のクラスターと測点 207 および測点 212–216 のクラスターに分割され、PC1–PC2 平面では水温および溶存鉄濃度、SRP 濃度あるいは塩分で違いが表されるように見えるが、実際のデータとは対応していなかった。

そのため、さらに西部北太平洋のデータを抽出して分析をおこなった。主成分 1 は塩分および MLD と正の、主成分 2 はリン酸塩濃度と負の、主成分 3 は溶存鉄濃度と正の関係を表していた (Table 2.6)。もとめた主成分得点 (Table 2.10) から以下の 3 クラスターに分割した (Fig. 2.19d)。冬季航海測点 104A–108 はその他の測点よりも MLD が深く、独立したクラスターを形成した。夏季航海および冬季航海測点 102 は 2 つのクラスターになり、低緯度域の測点 210 および 211 からなるクラスターは高水温と高 SRP 濃度で特徴付けられた。残りのクラスター内の測点は溶存鉄濃度の違いで特徴付けられた。

白鳳丸航海データを用いた分析では、固有ベクトルの値から各主成分に対する影響の大きい変数は以下のように考えられた。主成分 1 は基礎生産およびクロロフィル *a* 濃度、主成分 2 は

C. watsonii の *nifH* 現存量およびナノシアノバクテリア細胞密度といずれも負の関係、主成分 3 は N+N および SRP 濃度といずれも負の関係を示した。主成分 4 は UCYN-A の *nifH* 現存量と正の関係、主成分 5 は MLD と正の関係を示した (Table 2.7)。白鳳丸航海のみのデータによる分析結果についても同様にして、主成分 1 は海塩粒子を除くエアロゾル沈着量見積り (黒色炭素、ダスト、有機物、硫酸塩)、主成分 2 は基礎生産およびクロロフィル *a* 濃度、主成分 3 は窒素固定および *C. watsonii* の *nifH* 現存量、ナノシアノバクテリア細胞密度といずれも負の関係であり、主成分 4 は N+N および SRP 濃度、主成分 5 は MLD、主成分 6 は海塩粒子沈着量見積りと負の関係、主成分 7 は *R. intracellularis* フィラメント密度と負の関係を示した (Table 2.8)。

また、主成分 1 および 2 に対する各変数のベクトルの位置は以下ようになった。まず、全航海データの結果では、各変数の分布はいくつかのグループに分かれた (Fig. 2.19a)。すなわち、クロロフィル *a* および基礎生産、*Synechococcus* が特に近いグループとなり、これに加えて真核植物プランクトンおよび *Prochlorococcus*、UCYN-A が N+N および MLD の間に位置していた。また、*Trichodesmium* および γ -24774A11、窒素固定活性は水温と MLD の間に位置した。*C. watsonii* とナノシアノバクテリアはほとんど同一のベクトルとなり、水温と近く、N+N や SRP とは反対方向のベクトルとなった。

一方、白鳳丸航海のみのデータではエアロゾル沈着量のデータが加わり、これが主成分 1、2 に対して大きな寄与があった (Fig. 2.19b)。各エアロゾルパラメータは互いに近いベクトルとなり、さらに溶存鉄濃度と γ -24774A11 も近いベクトルとなった。これらのパラメータは水温とク

クロフィル *a* の間に位置していた。*Trichodesmium* spp. の *nifH* 現存量および *R. intracellularis* のフィラメント密度、窒素固定活性は、ベクトルの長さが短く、主成分 1、2 の平面上でうまく表されなかったが、これらのエアロゾルパラメータと近い方向性を持っていた。その他のパラメータについては全航海データの結果と同様の傾向を示した。

各測点のデータの主成分得点は Table 2.11 (全航海データ) および Table 2.12 (白鳳丸データ) に示す。各測点のデータの主成分 1 および 2 に対する主成分得点を用いて、各変数の固有ベクトルのプロットと同じ図に測点番号でプロットした (Fig. 2.19a および b)。これらの特徴については以下のものであった。

全航海のデータを用いたクラスター解析の結果、東部南太平洋が 1 つのクラスター I に、北太平洋および東シナ海が 3 つのクラスター II および III、IV になった (Fig. 2.19a)。主成分 1 および 2 に対するプロットから、東部南太平洋のクラスター I は高 SRP と高塩分で特徴づけられた。北太平洋クラスターのうち、測点 209 および 210 を含むクラスター II は高水温と高い *C. watsonii* の *nifH* 現存量で特徴づけられた。残り 2 つの北太平洋クラスターはプロット上で近接していたが、主にクロロフィル *a* 濃度の違いで区別された。高クロロフィルクラスター III は冬季の経度 180°より東の測点と東シナ海の測点を多く含み、低クロロフィルクラスター IV は主に夏季の測点と冬季の 175°E 以西の測点を含んでいた。

白鳳丸航海のみのデータを用いたクラスター分析では全航海データのものよりも細かくクラスターを分けたが、全航海データでの分析と結果は一貫しており、全航海データ分析の 4 個のク

クラスターをさらに細分化した結果となった (Fig. 2.19b)。すなわち、東部南太平洋のクラスターI は赤道湧昇域 I-A と亜熱帯循環 I-B に分けられた。北太平洋クラスターのうち、測点 209 と 210 で形成されたクラスターII はそのまま残った。北太平洋高クロロフィル *a* クラスターIII からは測点 205 のみが分離し (III-A、残った測点のクラスターを III-B とする)、低クロロフィル *a* クラスターIV からは測点 214 および 215、216 が分離した (IV-A、残った測点のクラスターを IV-B とする)。これらの分離した測点はエアロゾル沈着量の高い海域に相当したため、エアロゾルパラメータを含んだ白鳳丸航海データの解析では元のクラスターから分離したと考えられた。

2-3-7 リンおよび鉄の添加に対する窒素固定の応答

西部北太平洋におけるリン鉄添加培養実験における2日間の窒素固定活性は冬季の KH-11-10 次航海の測点 102–108 については Fig. 2.15 に、測点 109–122 については Fig. 2.16 に、夏季の KH-12-3 次航海については Fig. 2.17 に示す。これらの結果から、コントロールと比較して有意 ($p < 0.05$) に窒素固定が増加した系列を Table 2.4 にまとめた。そして、添加効果のあった系列の組合せから各測点における窒素固定の制限栄養素を判断した。例えば、夏季航海の 160° E 線上の測点 205 では、鉄のみおよび鉄+リン酸塩の添加で窒素固定が増加したため、窒素固定活性は鉄制限であると診断した (Fig. 2.17a)。測点 208 では、すべての添加区で窒素固定の増加が見られたため、窒素固定活性はリン鉄共制限であると判断した (Fig. 2.17c)。測点 209 では、リン酸塩のみおよびリン酸塩+鉄の添加で窒素固定が増加し、窒素固定はリン制限であったと判断した

(Fig. 2.17d)。窒素固定に何らかの栄養制限が認められた測点は SRP が $<10 \text{ nmol l}^{-1}$ に枯渇した海域の内部に位置しており、それよりも $80\text{--}98 \text{ nmol l}^{-1}$ と SRP 濃度が高かった夏季 KH-12-3 次航海南部の測点 210 および 211 ではいずれもリンあるいは鉄制限は認められなかった。(Fig. 2.17、Table 2.4)。夏季の KH-12-3 次航海の 148° E 以西の観測ラインでは、測点 215 および 216 で窒素固定はそれぞれリン鉄共制限および鉄制限であった (Fig. 2.17g-j、Table 2.4)。冬季の KH-11-10 次航海では、リンが $<10 \text{ nmol l}^{-1}$ と枯渇した低気圧性渦内部の測点 102 および 104A で窒素固定はそれぞれリン制限およびリン鉄共制限であった (Fig. 2.15、Table 2.4)。

KH-11-10 次航海の東部太平洋の測点 109-122 のうち、赤道湧昇域の南半球側の N+N およびリン酸塩が高濃度で存在した測点 112-114 で窒素固定活性は鉄制限あるいは鉄とリンの共制限であった。すなわち、測点 112 では鉄添加区およびリン+鉄添加区で、測点 113 ではリン+鉄添加区で、測点 114 では鉄添加区でコントロールに対して有意な窒素固定の上昇が見られた ($p<0.05$) (Table 2.4)。

KT-11-23 および KT-12-24 次航海で行ったリン添加実験では、どの測点においてもリン添加による窒素固定の有意な上昇は見られなかった ($p<0.05$) (Table 2.4)。また、系列のボトル数が 2 連以下で統計的な解析を行わなかった測点についても、リン添加による窒素固定の上昇を示す結果は得られなかった。

2-4 考察

2-4-1 西部北太平洋熱帯亜熱帯域および東シナ海

西部北太平洋熱帯亜熱帯域では、測点の位置は異なるものの、夏季と冬季の2つの時期に観測を行った。これらの海域における窒素固定はいずれも先行研究の値の範囲内であった（およそ $<11 \text{ nmol l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、Church et al. 2009; Shiozaki et al. 2009）。本海域の夏季の KH-12-3 次航海における窒素固定生物の分布はグループ間で異なり、それらの分布は主に水温およびエアロゾル沈着、溶存鉄濃度、クロロフィル *a* により特徴付けられた。まず、研究海域最北の亜熱帯循環北部にあたる測点 205 はこの航海中で最も水温が低く、クロロフィル *a* 濃度およびエアロゾル沈着量の見積りが高かった (Fig. 2.19b: III-A)。この測点では UCYN-A の現存量が本研究中で最も高かった。このグループは東部北太平洋の移行域においても *nifH* 遺伝子の組成から主要な窒素固定生物であると考えられており (Grabowski et al. 2008)、このような環境に適した生態を持つと考えられる。また、この測点における水温 (24.4 °C) は UCYN-A が既存知見による最も分布の多い水温と一致したため (Moisander et al. 2010)、この測点の水温は UCYN-A の生育に適していたと考えられた。一方、同航海で測点 205 よりもエアロゾル沈着および溶存鉄濃度の高かった 148° E 以西の測点では UCYN-A の現存量は低かったため、本海域の夏季における本グループの分布には鉄よりも水温の影響が大きかったと考えられた。また、測点 205 において現存量の高かった UCYN-A は従属栄養性であるため、生育に有機物供給を必要とする。この測点ではクロロフィル *a* および基礎生産が同じ夏季航海の他の測点と比べて高かったことから、有機物の供給も高かった可能性があり、そのことが UCYN-A の生育に有利となったのかもしれない。あるいは、天然の UCYN-A

の9割が円石藻 *B. bigelowii* に共生し (Krupke et al. 2014)、UCYN-A と *B. bigelowii* の共進化の可能性も指摘されているため (Thompson et al. 2014)、宿主の生態が UCYN-A の分布を決めていた可能性もある。したがって、水温および有機物供給のみでなく、無機栄養塩供給も UCYN-A の分布に重要である可能性がある。本研究では UCYN-A は黒潮域にも分布したものの現存量は低く、亜熱帯域北縁の測点 205 が主要な生息域と考えられた。しかし、測点 205 は外洋域であるため、UCYN-A の宿主である *B. bigelowii* が沿岸性種である (Konno et al. 2007) ことと矛盾する。近年、*B. bigelowii* には複数のタイプが存在し (Hagino et al. 2005; Takano et al. 2006)、生息域によりタイプが異なることが明らかにされたため (Hagino et al. 2009)、*B. bigelowii* についても外洋性のタイプが存在するのかもしれない。また、UCYN-A 自体も沿岸性と外洋性でゲノムが異なることが報告されており (Bombar et al. 2014)、黒潮域で検出されたものと測点 205 に分布したものは異なる生態を持つ可能性もある。したがって、今後は UCYN-A の生息環境を明らかにする上で、宿主の生態やタイプの違いを考慮することも重要になるだろう。

Trichodesmium spp.、*C. watsonii*、 γ -24774A11 は、UCYN-A よりも高水温域に分布することが報告されており (Moisander et al. 2010、2014)、夏季の本海域でも測点 205 よりも南の水温 28–29 °C の海域に多かった。これらの分布水温は既存知見の分布水温と一致した (Moisander et al. 2010、2014)。特に、本研究では *C. watsonii* は他の窒素固定生物よりも南の 20° N 以南に多く分布したが、これらの測点での水温は 27.5–29.2 °C であり、既存知見による現存量が極大となる水温と一致するため (Moisander et al. 2010)、本種の分布北限は水温により制限されていた可能性

がある。この海域は高水温のほか、西部北太平洋亜熱帯域の他の海域と比べてエアロゾル沈着量の見積りが低く、鉄供給が低いと考えられた。こうした海域において *C. watsonii* が主要な窒素固定生物であったという事実は、*C. watsonii* の鉄要求量が低く (Saito et al. 2011)、鉄濃度に対する増殖の半飽和定数が低い (Kustka et al. 2003; Jacq et al. 2014) という生理的特徴を反映していた可能性がある。一方、SRP 濃度は 15° N 以北では枯渇していたのに対し、5–10° N では高くなっており、*C. watsonii* の分布域が SRP 枯渇域と余剰域の両方にまたがっていたことから、現場の SRP 濃度は *C. watsonii* の分布を決める直接の要因ではないと考えられた。したがって、西部北太平洋の夏季における *C. watsonii* の分布は水温により制御され、また、*C. watsonii* の鉄供給の低い環境への適応が、この海域で他の窒素固定生物に対して優占する要因となっていたと考えられた。

これに対し、*Trichodesmium* spp. および γ -24774A11 は 148° E 以西に多く分布した。この海域はエアロゾル沈着量の見積り、溶存鉄濃度がともに高かった。KH-12-3 次航海では溶存鉄濃度とエアロゾル沈着量見積り (黒色炭素、ダスト、有機物) の間に有意な正の相関が見られたことから ($p < 0.05$)、大気由来の鉄供給が現場の溶存鉄濃度を定める要因であったと考えられる。このうち、 γ -24774A11 の *nifH* 現存量がダストおよび黒色炭素の沈着量見積りと有意な正の相関を示したのに対し ($p < 0.05$)、*Trichodesmium* spp. を含む他の窒素固定生物とエアロゾル沈着量との有意な関係は認められなかった ($p > 0.05$)。この原因として、 γ -24774A11 が大気由来の鉄あるいは有機物供給に対し強く依存していた可能性の他、*Trichodesmium* spp.、*R. intracellularis*、UCYN-A

はパッチ状に分布し、検出されない測点も多かったのに対し、 γ -24774A11 はこの海域では全ての測点で検出されたため、統計的に有意になりやすかった可能性が考えられる。 γ -24774A11 が普遍的に分布するという特性は南太平洋島嶼域においても報告されている (Moisander et al. 2014)。いずれにせよ、今まで γ -24774A11 は亜熱帯の貧栄養環境に生息することは報告されていたが (Moisander et al. 2014)、本研究の観測から、本研究西部北太平洋において他の窒素固定性シアノバクテリア以上にエアロゾルに依存した分布をすることが明らかになった。 γ -24774A11 がエアロゾルからの鉄供給に依存するのか有機炭素の供給に依存するのかは本研究の結果からは分からなかった。

東シナ海における KT-11-23 次航海では、*Trichodesmium* spp. および γ -24774A11 の現存量が本研究海域中最も高く、窒素固定生物群集で優占していた一方、UCYN-A および *C. watsonii* はほとんど検出されなかった (Table 2.3)。また、KT-11-23 次航海の東シナ海および KT-12-24 次航海の黒潮域では本研究の他海域と比べて特に高い窒素固定活性が測定された。本研究の全航海のデータをを用いた解析では、窒素固定活性は *Trichodesmium* spp. の *nifH* 現存量および基礎生産、クロロフィル *a* 濃度と有意な正の相関が見られたが ($p < 0.05$)、これは東シナ海や黒潮域のように沿岸に近く生物生産の高い海域で窒素固定が高かったためである。また、*Trichodesmium* spp. は島効果などにより陸域からの栄養供給に応答してしばしばブルームを形成することが報告されており (Campbell et al. 2005; Shiozaki et al. 2014b)、このような環境に多く分布する生態を持つ可能性がある。過去の知見でも同様に東シナ海や黒潮域において高い現存量が複数報告されており

(Marumo and Asaoka 1974; Shiozaki et al. 2010)、おそらくこれらの海域では陸域からの栄養供給と大気由来の鉄供給により *Trichodesmium* spp.の増殖に有利な環境が形成されているのだと考えられる。東シナ海における SRP 濃度は夏季の西部北太平洋と同様に低かったが、この KT-11-23 次航海ではエアロゾル沈着量見積りおよび溶存鉄濃度のデータは取得していないため、この海域で *Trichodesmium* spp.と γ -24774A11 が優占した原因は不明である。したがって、この海域においても栄養塩、鉄供給あるいは有機炭素の供給と窒素固定生物の分布の関係を今後明らかにする必要があると考えられる。

夏季の西部北太平洋亜熱帯域では水温とエアロゾルによる鉄供給の勾配が窒素固定生物の組成の明瞭な変化を生じていた一方、冬季の KH-11-10 次航海の 23° N の観測線上では経度方向に明瞭な窒素固定生物の組成の変化は観測されなかった。この原因として、本航海では研究海域全体で夏季の KH-12-3 次航海と比較して鉄の供給源として重要なエアロゾル沈着量が 1-2 桁低く、いずれのエアロゾル沈着量も表層の溶存鉄濃度に対する有意な影響は見られず ($p>0.05$ 、図はダスト沈着量と溶存鉄濃度のプロット、Fig. 2.9a)、したがって、鉄の供給が窒素固定生物の組成の変化を生じさせるほど多くなかった可能性が挙げられる。一方、冬季は混合層が夏季と比較して深く、SRP 濃度が全体的に高い傾向が見られた。SRP 濃度と MLD の間に正の相関が見られたことから ($p<0.05$ 、Fig. 2.7a)、混合による下層からの供給が表層の SRP 濃度を決める要因であったと考えられた。夏季には見られなかった MLD と SRP 濃度の相関が冬季には見られたのは、冬季鉛直混合により SRP の下層からの供給がより大きかったことと、それに対して窒素固定による

リン酸塩消費が小さかったことから、東西方向の MLD の勾配に伴う SRP の供給の違いが現場 SRP 濃度に反映されたためであると考えられた。観測線西部の測点 102 および 104A は低気圧性渦内部に位置し、混合層の浅化と SRP 濃度の枯渇が見られた。これらの測点において UCYN-A および *C. watsonii*、 γ -24774A11 の現存量がやや高かったが、そのメカニズムは本研究からは分からなかった。渦内でのこれらの窒素固定生物の現存量が高かった以外は、本航海で環境要因と窒素固定生物の分布の間に明瞭な関係は認められなかった。

夏季と冬季の航海では測点の位置が異なるため、季節変動が窒素固定生物の分布に与える影響を厳密に議論することはできないものの、地理的に近い冬季の KH-11-10 次航海の測点 102、103 と夏季の KH-12-3 次航海の 208、209 を比較すると、 γ -24774A11 および *C. watsonii* の現存量は夏季に高く冬季に低かった。一方、*Trichodesmium* spp.、*R. intracellularis*、UCYN-A では季節による現存量の違いは見られなかった。このうち、 γ -24774A11 の現存量の季節的変動に関しては、現存量がダストおよび黒色炭素の沈着量見積りと相関があったことから ($p<0.05$)、エアロゾル沈着の季節的変動が重要な要因である可能性がある。また、増殖の水温依存性は不明であるものの、現存量が既存知見と同様に 29 °C を中心に高い傾向が見られたことから (Moisander et al. 2014)、水温が影響していた可能性もある。*C. watsonii* の現存量の季節的変動を制御する環境要因としては、まず水温が挙げられる。*C. watsonii* の *nifH* 現存量は回帰分析では有意な関係は見られなかったものの ($p>0.05$)、水温 25–29 °C にかけて高水温域で高くなる傾向が認められた。この関係は Moisander et al. (2010) が報告しているものと同様であり、*C. watsonii* の分布に対する

水温の重要性を示唆するものである。培養株の知見から、*C. watsonii* の増殖の至適水温は 28–29 °C であり、25–27 °C では増殖が低下あるいはまったく増殖できないことが指摘されている (Falcón et al. 2005)。これらの水温はそれぞれ本研究の夏季および冬季の観測における *C. watsonii* 分布域の現場水温と一致し (それぞれ 27.5–29.2 °C および 25.0–27.5 °C)、さらに、*C. watsonii* の *nifH* 現存量は冬季の西部北太平洋 (KH-11-10 次航海の測点 102–108) で低く、夏季に高かったが、これらを水温に対してプロットすると水温で明瞭に分かれていることが分かる。このことから、水温が *C. watsonii* の *nifH* 現存量の季節変動の主要因であった可能性がある。また、夏季 KH-12-3 次航海において *C. watsonii* の分布が南の海域に限定され、より西や北のエアロゾル沈着が高く鉄濃度も高い海域にあまり分布しなかったことも、水温が制限となっていた可能性が考えられる。ただし、夏季のエアロゾル沈着量の高い環境でエアロゾル沈着量の低い冬季よりも *nifH* 現存量が高くなることが観察されたため、*C. watsonii* についても水温に加えて鉄供給の影響があった可能性も否定できない。一方、低水温環境に生息する UCYN-A の現存量は、冬季には水温が 24.2–27.4 °C と低かったにもかかわらず、夏季の測点 205 よりも低かった。したがって、水温以外の要因、たとえば冬季の大気由来の鉄供給や、UCYN-A は従属栄養性であるため有機物供給の不足などにより生育できなかった可能性がある。

夏季航海において、窒素固定の制限となっていた栄養素は 25° N 以北では鉄、それ以南ではリンとなっており、その境界の測点 208 および 215 でリン鉄共制限が観測された。このように明瞭に鉄制限とリン制限の地理的パターンが分かれていたことから、窒素固定の栄養制限は短時間

でランダムに変動するものではなく、時空間的変動スケールの大きい環境パラメータにより制御されていたと考えられる。160° E の観測線上の 20–35° N では SRP と MLD のいずれも緯度方向に変動していない。一方、溶存鉄濃度は変動していないものの、エアロゾル沈着量見積もりは緯度方向に変動しており（例としてダスト沈着量、Fig. 2.8b）、鉄が亜熱帯域南部よりも北部で多く供給されていた可能性がある。すなわち、窒素固定はエアロゾル沈着の多い海域で鉄制限であり、少ない海域では鉄制限でなかった。これらのいずれの測点でも SRP 濃度は低く、混合層も南のリン制限の測点の方が北の鉄制限の測点よりも深く、南の測点ではエアロゾルはより希釈され、下層からのリン酸塩供給は多いと考えられる。したがって、このようなエアロゾル沈着と窒素固定の鉄制限の地理的関係が見られた原因として、まず、この緯度方向の観測ライン上で、窒素固定生物群集の栄養要求性が変動していたことが考えられる。このような窒素固定生物群集の栄養要求性の変動を生じる要因として、水温およびエアロゾル供給による窒素固定生物群集の組成の変化が重要であると考えられる。その理由として、窒素固定生物の種によりリンや鉄の要求性および獲得メカニズムが異なることと (Dyhrman et al. 2006; Dyhrman and Haley 2006; Saito et al. 2011)、実際にこの観測ライン上で緯度方向に窒素固定生物群集の組成が大きく変化し、それが制限栄養素の鉄からリンへの変化と地理的に一致したことが挙げられる。すなわち、*C. watsonii* が優占する測点で窒素固定がリン制限で、UCYN-A あるいは *Trichodesmium* spp.、γ-24774A11 が優占する測点では鉄制限の傾向が見られた。これは、*C. watsonii* が他の窒素固定生物よりも鉄要求量が低いという報告 (Saito et al. 2011) により支持され、窒素固定生物の種間の栄養生態の違

いはその分布域の違いを生じるのみならず、それらが優占する海域での窒素固定の栄養制限にも関わっている可能性が高い。

UCYN-A は従属栄養性シアノバクテリアであるが、これらが優占した測点 205 において窒素固定が鉄制限であったことは、この海域においてこのグループの生存に鉄供給が重要であることを示唆している。東部北太平洋移行域の UCYN-A 優占群集への鉄およびリン酸塩添加実験では添加による窒素固定の増加は見られなかったものの (Needoba et al. 2007)、東部北大西洋で行われた添加実験では、ダスト供給の高い海域にもかかわらず、ダストの添加により UCYN-A の *nifH* 現存量が増加した (Langlois et al. 2012)。このことは UCYN-A が鉄を多量に要求する種であることを示唆している。したがって、本研究で測点 205 における UCYN-A の生存に、水温や有機物供給に加えて、鉄の供給も重要であった可能性がある。

東シナ海において行ったリン添加培養実験では窒素固定のリン添加に対する応答は見られなかった (Table 2.4)。現場の SRP 濃度は $1\text{--}16\text{ nmol l}^{-1}$ と比較的低い濃度であったのに対し、N+N 濃度は $0.14\text{--}1.4\text{ }\mu\text{M}$ と比較的高い濃度で存在した。したがって、レッドフィールド比から考えると、現場海水中の N+N:SRP 比は 25–348 であり、SRP は N+N に対して欠乏していたことがわかる。また、比のみでなく、濃度自体も本研究西部北太平洋および ALOHA (Grabowski et al. 2008) において現場窒素固定の制限が見られたレベルと同程度であった。それにもかかわらずリン添加に対して窒素固定の増加が見られなかった原因は本研究では分からなかった。現場に生息していた主要な窒素固定生物は *nifH* 現存量から *Trichodesmium* spp. および γ -24774A11 であった (Table 2.3)。

今後、これらの窒素固定生物の生理活性を明らかにすることで、これらの窒素固定生物の生理的なリン欠乏の有無について明らかにできると考えられる。また、本研究では KT-11-23 および KT-12-24 次航海では現場鉄濃度の観測を行わなかったが、この海域で鉄が窒素固定に及ぼす影響についても今後明らかにする必要がある。

冬季航海では、測点 102 および 104A でそれぞれ窒素固定がリン制限およびリン鉄共制限であった (Table 2.4)。前述のようにこれらの測点は低気圧性渦内部に位置し (Fig. 2.3a)、MLD は浅く SRP 濃度が低かった (Table 2.2)。したがって、窒素固定活性のリン制限の分布は表層の SRP の枯渇と地理的に一致した。また、これらの SRP が枯渇した測点以外では窒素固定はリン制限でなかったことを考慮すると、Kitajima et al. (2009) が指摘するように、冬季の西部北太平洋亜熱帯循環は全体としては冬季鉛直混合により下層から十分なリン酸塩供給があるために、リン利用能に関しては窒素固定にとって好適な環境であったと考えられる。また、夏季航海と同様に、リンが制限であった測点に *C. watsonii* の現存量が集中していたことから、*C. watsonii* は現場でリン制限を受けやすい可能性があるが、*Trichodesmium* spp.や UCYN-A、 γ -24774A11 の現存量もこれらの測点で高かったことから、これらの窒素固定生物が寄与していた可能性もある。したがって、今後は窒素固定生物種ごとの *nifH* の発現を調べ、窒素固定生物のグループごとの窒素固定について栄養制限を明らかにすることで、鉄やリンによる窒素固定の制御様態をより詳細に明らかにできると考えられる。

一方、冬季航海を通して全測点でエアロゾル沈着量見積りは極めて低かったが、測点 104A

を除いて窒素固定の明瞭な鉄制限は見られなかった。エアロゾル供給の高い夏季に窒素固定が鉄制限であり、低い冬季に鉄制限でなかったという傾向は、夏季の西部北太平洋におけるエアロゾル供給量と窒素固定の鉄制限の関係と同様であった。ただし、海域によって優占する窒素固定生物種が明瞭に変動した夏季航海とは異なり、冬季航海では観測した 4 種の窒素固定生物はいずれも現存量が低く、特定のグループによる優占が見られなかった。したがって、夏季における制限栄養素の空間的変動とは異なり、窒素固定の栄養添加への応答を季節的な窒素固定生物群集の組成の変動によって説明することは難しく、おそらく窒素固定生物の生理状態の違いが季節間の鉄添加に対する窒素固定の応答の違いの原因であったと考えられる。特に、冬季は窒素固定生物の現存量が低く、窒素固定活性も低かったことから、鉄を添加しても現場群集に窒素固定を大幅に増加させる能力がそもそもなかった可能性がある。このように窒素固定生物が少なく窒素固定活性も低かった原因としては、低水温と大気由来の鉄供給が低かった可能性が考えられる。西部北太平洋亜熱帯循環では、冬季鉛直混合による下層からのリン酸塩の供給の増加により、夏季よりも冬季に窒素固定活性が高くなることが報告されているものの (Kitajima et al. 2009)、本研究では逆に冬季に窒素固定活性が低かった。これについては、Kitajima et al. (2009) は亜熱帯循環を南北に横断する観測を行ったのに対し、本研究の観測ラインは亜熱帯循環の北縁部の水温が 24.2–27.4 °C とやや低い海域を東西に観測したため、本研究では窒素固定活性の低い海域のみを捉えていたのかもしれない。

窒素固定生物群集の栄養要求性の他に、鉄あるいはリンの利用能が海域間で異なっていた可

能性もある。溶存鉄濃度あるいはその供給過程であるエアロゾル沈着量、SRP 濃度あるいはその供給過程と関係する混合層深度からは本研究の窒素固定の制限栄養素の海域間の変動は説明できなかった。しかしながら、鉄あるいはリンの利用能を左右する要因として、これら以外にも、鉄の化学形態や窒素固定生物と非窒素固定生物間でのこれらの栄養素の競合などの要因により海域間で鉄あるいはリンの利用能が変動し、それが本研究の窒素固定の制限栄養素の海域間変動の要因となった可能性が考えられる。

まず、窒素固定生物と非窒素固定生物が共存する場合の競合について、海水中の栄養素の存在比および窒素固定生物と非窒素固定生物が取り込む栄養素の比を用いたモデル計算から、海洋全体で窒素固定生物は第一に鉄、第二にリン、非窒素固定生物は窒素が生物量を制限する栄養素であると考えられている (Ward et al. 2013)。したがって、第一に制限となる栄養素は窒素固定生物と非窒素固定生物でそれぞれ異なるため、リービッヒの最小律により最も欠乏する栄養素のみが現存量の制限となると仮定すると、窒素固定生物と非窒素固定生物の間に栄養素をめぐる競合は起こらない。そして、窒素固定生物と非窒素固定生物の現存量は供給される栄養素の比によって決まる。非窒素固定生物にとって、海水中の栄養素の存在比と非窒素固定生物による取込みの比から、通常窒素が最も欠乏する栄養素である。したがって、窒素が一度枯渇すると、非窒素固定生物による鉄あるいはリンの取込みはそれ以上起こらないため、鉄およびリンの枯渇の主要因は窒素による制限を受けない窒素固定生物による取込みである。ただし、鉄あるいはリンがすでに枯渇した状況において、非窒素固定生物による取込みが一時的あるいは局所的に変動するこ

とで、窒素固定生物が利用可能な鉄あるいはリンの濃度が変化することはあるかもしれない。本研究では、窒素固定生物と非窒素固定生物の鉄あるいはリンの取込み速度や細胞内含量を調べていないため、これらの間の栄養素をめぐる競合の有無については分からない。ただし、植物プランクトンの生物量あるいは生産の大きさや、窒素固定生物と非窒素固定生物がどの程度の割合で共存するか等の要因はこうした競合に影響を与える可能性があるので、以下の点について検討した。夏季の KH-12-3 次航海および冬季の KH-11-10 次航海いずれにおいても、窒素固定の制限が見られた測点において、他の測点と比較して、必ずしも基礎生産あるいはクロロフィル *a* 濃度は高くなっていなかった (Table 2.2 および 2.4)。また、窒素固定生物と非窒素固定生物の存在比の指標として、窒素固定生物の生物量/クロロフィル *a* 濃度比を示す (Table 2.4)。ただし、窒素固定生物の生物量については、*Trichodesmium* spp.、UCYN-A および *C. watsonii* については既存知見による *nifH* コピーあたり、*R. intracellularis* についてはフィラメントあたりの炭素含有量 (Luo et al. 2012) を用い、細胞サイズの報告されていない γ -24774A11 については計算に含めなかった。これと窒素固定の制限栄養素の分布と比較した結果、特に関係は見られなかったため、植物プランクトン群集における窒素固定生物の生物量の割合は窒素固定活性の制限栄養素を決める要因ではなかったと考えられた。

これ以外に窒素固定生物と非窒素固定生物の栄養獲得における競合と関係する要因として、鉄の化学形態ごとの鉄利用能の違いが挙げられる。溶存鉄について、化学形態は大別して有機配位子と結合した有機錯体鉄、無機イオンと結合した無機錯体鉄、および遊離鉄イオンに分けられ

る。このうち、天然海水中の鉄有機配位子の有力な候補としてシデロフォア、ポルフィリン、および腐植物質が挙げられる。このうち、真核植物プランクトンはシデロフォア鉄の取込み速度が低く、ポルフィリン鉄の取込み速度が高いのに対し、原核生物であるシアノバクテリアはシデロフォア鉄の取込み速度が高く、ポルフィリン鉄の取込み速度が低いと考えられている (Hutchins et al. 1999)。窒素固定生物については *Trichodesmium* spp. について報告されており、無機錯体鉄(III) およびシデロフォア鉄(III) の取込み速度は高く、ポルフィリン鉄(III) で取込み速度が低いというように (Achilles et al. 2003)、上記の特徴と一致した鉄取込み特性を持っている。ただし、*T. erythraeum* IMS101 株については配位子を desferrioxamine B あるいは aerobactin とするシデロフォア鉄の取込み速度は塩化鉄(III) およびクエン酸鉄と比較して低いことが報告されている (Roe et al. 2012)。その他の窒素固定生物の鉄取込み特性は不明であるが、現場の鉄有機配位子の組成がシデロフォアかポルフィリンかによって、原核生物である窒素固定生物と真核植物プランクトンとの間の鉄をめぐる競合の関係は変化することが予想される。しかし、溶存鉄の化学形態については、大西洋でシデロフォア E および G が溶存鉄の<4.6%と有機錯体を形成していることが報告されているものの (Mawji et al. 2008)、まだほとんどの部分については不明である。したがって、鉄有機配位子の組成が窒素固定生物と非窒素固定生物の鉄とリンをめぐる競合に関してどのような影響を与えているのかを明らかにすることは今後の課題である。

窒素固定のリン制限海域の分布を説明する上で、無機リン酸塩だけでなく、有機リンの利用能も考慮する必要がある。夏季 KH-12-3 次航海におけるリン酸モノエステルおよびリン酸ジエ

ステル濃度は Sato et al. (2013)により報告されているが、いずれも窒素固定のリン制限が見られた測点 209 で他の測点よりも低い傾向は見られなかった。したがって、少なくともこの 2 種類の有機リンの濃度に関しては、窒素固定がリン制限であったことの主要因ではないと考えられる。

2-4-2 東部太平洋亜熱帯域および赤道湧昇域

東部太平洋赤道湧昇域および東部南太平洋亜熱帯循環ではいずれも本研究で調べた窒素固定生物はほとんど存在しなかったが (Table 2.3)、窒素固定は実験を行った全ての測点で検出された。本研究で調査した *Trichodesmium* spp.および *R. intracellularis*、*C. watsonii*、UCYN-A は亜熱帯外洋性の主要な窒素固定シアノバクテリアであるため、この海域では Raimbault and Garcia (2008) および Bonnet et al. (2008) が指摘したように、従属栄養性非シアノバクテリアの窒素固定生物によって窒素固定が行われていたと考えられる。本研究ではさらに、従属栄養性の γ -24774A11 もこれらの海域には存在しないことが明らかになった。そもそも γ -24774A11 は亜熱帯貧栄養域に生息するグループと考えられているため (Moisander et al. 2014)、富栄養な赤道湧昇域に生息しなかったことは想定内であったが、より南の亜熱帯循環内でも全く検出されなかった。このことは、 γ -24774A11 も鉄あるいは有機物供給の不足により東部南太平洋では生育できなかったことを示唆する。西部北太平洋におけるこのグループの分布がエアロゾル供給に依存していたことと合わせると、 γ -24774A11 の生息には鉄あるいは有機物の供給が必須であると考えられる。

東部南太平洋では、大気由来の鉄供給の低い環境に適応した窒素固定生物が窒素固定を担っ

ていたと考えられるが、赤道湧昇域と亜熱帯循環では栄養環境、窒素固定および鉄添加に対する窒素固定の応答が異なっていた。まず、赤道湧昇域では $N+N$ およびリン酸塩濃度が亜熱帯循環に対して高く、亜熱帯循環で検出限界以下から $0.27 \mu\text{mol C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ であったのと比較して $0.50\text{--}0.68 \mu\text{mol C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ と高い基礎生産が見られた (Table 2.4)。さらに、窒素固定も赤道湧昇域で亜熱帯循環よりも高かった。この原因として、赤道湧昇域では高い基礎生産により、従属栄養性窒素固定生物がエネルギー源として必要とする有機物が豊富に供給されたことで、窒素固定が活性化された可能性が考えられる。

また、添加実験から、赤道湧昇域では窒素固定が鉄制限であったのに対し、亜熱帯循環では鉄制限でなかった。このことは Dekaezemacker et al. (2013) が最初に報告しており、本研究でも同様の結果が得られたことから、比較的定常的な現象である可能性がある。窒素固定の鉄添加に対する応答が赤道湧昇域と亜熱帯循環で異なっていた理由は本研究では明らかにならなかったが、栄養塩濃度および生物生産がこれらの海域間では大きく異なることから、そもそも生息している窒素固定生物の種類が異なる可能性があり、これらの海域間で窒素固定生物群集の鉄要求量が異なっていたのかもしれない。また、亜熱帯循環では赤道湧昇域よりも窒素固定活性が低かったため、もし同一の窒素固定生物が分布していたとしても群集全体としての鉄要求量は低かった可能性が考えられる。

2-5 まとめ

太平洋において、本研究で調査した *Trichodesmium* spp.および *R. intracellualris*、*C. watsonii*、UCYN-A、 γ -24774A11 はいずれも東部南太平洋には分布せず、Bonnet et al. (2008)が大気由来の鉄供給の欠乏によりこの海域に窒素固定性シアノバクテリアが生息できないと報告しているのと同様の傾向が本研究でも認められた。また、窒素固定性シアノバクテリアに加え、 γ -24774A11 も同様に東部南太平洋には分布しないことが明らかになったが、それが窒素固定性シアノバクテリアの場合と同様に鉄供給の不足が原因であるのか、あるいは有機炭素の供給などの他の要因によるものかは分からなかった。さらに、本研究の結果から、西部北太平洋と東部南太平洋の間だけでなく、西部北太平洋内部においてもエアロゾルの沈着による鉄供給が窒素固定生物の各グループの分布に影響を与えていたと考えられた。すなわち、*Trichodesmium* spp.および γ -24774A11 はエアロゾル沈着の高い海域に分布する一方、*C. watsonii* は比較的低い海域に分布し、これらの分布が窒素固定生物のグループ間の鉄要求性の違いを反映していた可能性がある。このうち γ -24774A11 については、従属栄養性であるため、大気由来の有機物供給もこのグループがエアロゾル沈着の高い海域に多く分布した原因であった可能性がある。また、エアロゾル供給の他、水温も窒素固定生物の分布を決める重要な要因であったと考えられた。特に、*C. watsonii* の増殖の至適水温および UCYN-A の分布水温域の既存知見と本研究で実際に分布した測点の水温が一致しており、これらのグループの分布に水温が影響していたと考えられた。

また、栄養添加実験から、西部北太平洋亜熱帯域においては、窒素固定活性の制限栄養素と窒素固定生物群集組成の間に以下のような関係が見られた。まず、リンについては、現場のリン

酸塩濃度が低い場合に窒素固定を制限し、高い場合は制限しなかったことから、リン酸塩の枯渇が窒素固定活性のリン制限が起こるための必要条件であると考えられた。一方、鉄については、エアロゾル沈着の高い環境で鉄添加に対して窒素固定活性が増加し、沈着の低い環境では鉄添加に対する窒素固定活性の応答は見られなかった。この原因として、窒素固定生物の組成が測点間で異なることで、窒素固定生物群集全体の鉄要求量も測点間で異なっていた可能性と、添加された鉄に応答して窒素固定活性を増加させる能力に違いがあった可能性が考えられた。

このような鉄添加への窒素固定活性の複雑な応答に関しては、共制限の概念から捉えることができる。まず、異なる窒素固定生物ごとに栄養要求性が異なり、それぞれ異なる栄養素によって制限を受けていた可能性が考えられる。すなわち、夏季の西部北太平洋では *C. watsonii* の分布域を中心に窒素固定活性のリン制限が見られ、その他の窒素固定生物が多く分布する測点では窒素固定活性は鉄制限の傾向であった。このことは、異なる窒素固定生物が同じ環境において共存する可能性を示している。すなわち、同じ環境中に 2 種の植物プランクトンが共存する際に、リービッヒの最小律に基づいて最も欠乏する栄養素がそれぞれの種で同じ場合は、競争により一方のみが生き残り、もう一方は生き残れないが、それぞれの種で欠乏栄養素が異なる場合は共存可能であることが、Tilman (1977) および Sommer (1983) の培養実験において示されている。このことから考えると、本研究の夏季の西部北太平洋熱帯亜熱帯域ではリン制限であると考えられた *C. watsonii* と大気由来の鉄供給に依存していると考えられた *Trichodesmium* spp. および γ -24774A11 が測点 212 で共存し、群集全体の窒素固定がリン鉄共制限であったことは、このよ

うなメカニズムによるものである可能性がある。

一方で、1 つの生物が同時に異なる 2 つの栄養素により制限を受けていた可能性も考えられる (Saito et al. 2008)。本研究でも KH-12-3 次航海の測点 215 において窒素固定がリン鉄共制限であった。この測点では少なくとも窒素固定シアノバクテリア群集は *Trichodesmium* spp. 主体であり、前述のように栄養要求性の異なる種の共存によって説明することは難しい。そのため、1 つの生物が同時に 2 つの栄養素による制限を受けていた可能性が考えられる。また、西部北太平洋の夏季および冬季を通じ、窒素固定のリン制限は SRP 濃度の枯渇と地理的に対応していた。したがって、鉄制限の場合と異なり、現場窒素固定生物群集のリン要求性よりも現場 SRP 濃度の方がより窒素固定の制限に関わっていたといえる。このことは、鉄と比較してリン酸塩に対する窒素固定生物のグループ間での要求性の差は小さく、前者のグループ間での栄養要求性の違いによる共存を生じにくい可能性がある。しかし、本研究では群集全体の窒素固定活性しか測定しておらず、これら 2 つの共制限の違いを明瞭に区別することは難しい。そのため、今後、より明確に共制限のメカニズムを明らかにするためには、*nifH* の発現を測定することで、それぞれの窒素固定生物ごとの応答を明らかにする必要がある。

いくつかの測点では、SRP および溶存鉄濃度が低いにもかかわらず窒素固定はリンと鉄のどちらの添加にも応答しなかった。これらについては 2 つの原因が考えられる。まず、冬季航海の測点 103 においては窒素固定生物の現存量および窒素固定活性がともに低かった。そのために、現場の窒素固定生物は鉄の添加に応答する能力がなかった可能性が考えられる。このような現象

は、東部南太平洋亜熱帯循環における Bonnet et al. (2008) の研究でも報告されており、この海域ではそもそも鉄供給が定常的に低いために窒素固定生物がほとんど生育できず、鉄が枯渇してリンが余剰であるにも関わらず、鉄添加を行っても窒素固定の上昇が見られなかった。これらのことから、現場の窒素固定生物の現存量や生理活性が低いために栄養が欠乏しているにも関わらず、欠乏栄養素の添加に対する窒素固定活性の応答能力が欠如していたと可能性が考えられる。次に、現場の窒素固定生物が実際に生理的に栄養欠乏状態でなかった可能性も考えられる。例えば、夏季航海測点 214 では、溶存鉄濃度が 0.90 nmol l^{-1} と高かったのに対し、SRP は枯渇していた (Fig. 2 b)。また、現場では *Trichodesmium* spp. が比較的現存量が高かったにも関わらず (Table 2)、リンの添加に対し窒素固定は上昇しなかった。これについては細胞内に十分な栄養を貯蔵していたため制限とならなかった可能性が考えられる。*Trichodesmium* spp. はリンおよび鉄の細胞内貯蔵 (Castruita and Saito 2006; Orchard et al. 2010) と鉄の贅沢消費 (Kustka et al. 2003) が知られている。また、*Trichodesmium* spp. の鉛直移動による栄養塩獲得 (Villareal and Carpenter 2003) も表面の栄養の濃度と *Trichodesmium* spp. の生理状態の乖離を生じる可能性がある。したがって、今後の研究では窒素固定の栄養制限とともにこれらの栄養素の細胞内含量を測定することで、栄養制限と細胞内貯留の関係を明らかにすることが重要であると考えられる。

Table 2.1 *γ*-proteobacteria 24774A11 の *nifH* 定量 PCR に用いたフォワードおよびリバースプライマー、プローブの配列。Moisander et al. (2008, 2010) に記載されているものを Shiozaki et al. (2014b) に従って若干改変したもの。

フォワードプライマー	プローブ	リバースプライマー	参考文献
CGGTAGAGGATCTTGAGCTTGAA	AAGTGCTTAAGGTTGGCTTTGGCGACA	CACCTGACTCCACGCACTTA	Moisander et al. (2008)

Table 2.2 KH-11-10 および KH-12-3, KT-11-23, KT-12-24 次航海の各測点におけるサンプルリング日時、位置、添加培養用海水の採水深度 (50%光量層)、水温、塩分、混合層深度、栄養塩濃度 (N+N、SRP)、溶存鉄濃度、およびクロロフィル *a* 濃度を記した。データ欠損は「-」で記した。

測点	日付 [日/月/年]	緯度 [° N]	経度 [° E]	採水深度 [m]	水温 [°C]	混合層深度 [m]	N+N [nmol l ⁻¹]	リン酸塩 [nmol l ⁻¹]	溶存鉄 [nmol l ⁻¹]	クロロフィル <i>a</i> [µg l ⁻¹]
102	7-Dec-11	23.0	160.0	11	26.8	27	<1.6	<1.3	0.17	0.062
103	8-Dec-11	23.0	165.0	3	27.4	77	<1.6	28	0.14	0.067
104A	10-Dec-11	23.0	170.0	8	26.2	45	3	5	0.082	0.048
104B	11-Dec-11	23.0	175.0	5	26.3	71	3	10	0.14	0.074
105	13-Dec-11	23.0	180.0	5	26.4	74	2	11	0.36	0.069
106	15-Dec-11	23.0	190.0	5	25.4	90	5	35	0.13	0.102
107	17-Dec-11	23.0	195.0	10	25.1	105	4	24	0.22	0.086
108	19-Dec-11	22.8	201.9	5	24.2	91	3	52	0.73	0.162
109	28-Dec-11	14.0	211.0	9	25.2	54	5	232	0.36	0.135
110	30-Dec-11	7.0	218.0	10	27.4	54	3	141	0.27	0.100
112	3-Jan-12	-7.5	232.5	4	25.2	52	8.12×10 ³	709	0.24	0.162
113	5-Jan-12	-15.0	240.0	3	25.5	24	3.61×10 ³	460	0.10	0.122
114	6-Jan-12	-20.0	240.0	7	25.9	17	229	278	0.21	0.117
115	8-Jan-12	-23.0	240.0	5	25.4	19	3	232	0.28	0.050
116	10-Dec-12	-26.5	240.0	13	24.4	38	-	-	0.060	0.022
117	11-Jan-12	-30.0	240.0	9	22.4	31	0	98	0.14	0.023
118	14-Jan-12	-30.0	253.0	5	22.7	33	2	126	0.073	0.024

Table 2.2 続き。

測点	日付 [日/月/年]	緯度 [° N]	経度 [° E]	採水深度 [m]	水温 [°C]	混合層深度 [m]	N+N [nmol l ⁻¹]	リン酸塩 [nmol l ⁻¹]	溶存鉄 [nmol l ⁻¹]	クロロフィル <i>a</i> [µg l ⁻¹]
119	16-Jan-12	-30.0	260.0	6	22.1	18	5	153	0.45	0.035
120	16-Jan-12	-26.5	260.0	5	23.6	35	5	180	0.15	-
121	18-Jan-12	-23.0	260.0	6	24.9	29	5	299	0.063	0.029
122	20-Jan-12	-20.0	260.0	7	24.4	22	17	361	0.13	0.103
205	14-Jul-12	35.0	160.0	5	24.4	20	<2	6	0.11	0.103
207	17-Jul-12	30.0	160.0	4	27.4	15	<2	4	0.28	0.047
208	18-Jul-12	25.0	160.0	6	29.0	40	<2	7	0.40	0.044
209	19-Jul-12	20.0	160.0	4	29.2	45	<2	6	0.11	0.069
210	22-Jul-12	15.0	160.0	5	29.2	50	<2	80	0.24	0.047
211	23-Jul-12	10.0	160.0	5	29.2	51	<2	98	0.064	0.039
212	1-Aug-12	20.0	148.0	10	28.9	28	<2	<1	0.49	0.099
214	5-Aug-12	24.0	143.2	11	27.5	36	<2	<1	0.90	0.081
215	8-Aug-12	28.0	138.0	7	27.8	23	<2	2	0.31	0.061
216	9-Aug-12	31.0	134.0	9	27.9	29	<2	<1	0.36	0.048
30B1	22-Sep-11	32.5	132.9	0	26.2	-	336	12	-	1.45
30B2	23-Sep-11	31.4	132.0	0	27.5	-	165	16	-	0.38
30B3	23-Sep-11	31.1	131.1	0	27.8	-	213	14	-	0.33
301	25-Sep-11	24.6	125.6	0	28.4	45	330	-	-	0.18

Table 2.2 続き。

測点	日付 [日/月/年]	緯度 [° N]	経度 [° E]	採水深度 [m]	水温 [°C]	混合層深度 [m]	N+N [nmol l ⁻¹]	リン酸塩 [nmol l ⁻¹]	溶存鉄 [nmol l ⁻¹]	クロロフィル <i>a</i> [µg l ⁻¹]
302	25-Sep-11	24.6	125.0	0	28.6	80	213	6	-	0.15
303	25-Sep-11	25.0	124.8	0	28.5	50	221	8	-	0.15
304	26-Sep-11	25.0	125.0	0	28.3	44	140	6	-	0.15
305	26-Sep-11	25.0	125.2	0	28.2	47	136	4	-	0.18
306	26-Sep-11	25.2	125.2	0	28.5	74	313	4	-	0.12
307	26-Sep-11	25.2	125.0	0	28.8	76	469	2	-	0.16
308	26-Sep-11	25.4	125.0	0	28.6	38	1.39×10 ³	11	-	0.13
309	27-Sep-11	25.4	125.2	0	28.4	41	1.35×10 ³	<1	-	0.11
310	27-Sep-11	25.6	125.2	0	28.2	57	715	2	-	0.15
311	27-Sep-11	25.6	125.4	0	28.7	58	295	2	-	0.12
312	27-Sep-11	25.8	125.4	0	28.6	61	486	4	-	0.11
401	12-Sep-12	33.4	138.0	0	28.5	25	<100	<50	-	0.046
402	14-Sep-12	31.0	138.0	12	29.2**	26	<100**	<50**	-	0.054**
403	18-Sep-12	33.1	134.6	0	27.9	-	<100	<50	-	0.304
404	19-Sep-12	31.1	133.6	0	28.3	-	<100	<50	-	0.091
405	19-Sep-12	30.5	133.3	0	28.2	-	<100	<50	-	0.05
406	19-Sep-12	29.2	132.7	0	28	-	<100	77	-	0.06
407	20-Sep-12	27.7	132.0	0	27.9	38	<100	<50	-	0.051

* リン酸塩添加により窒素固定の有意な減少が見られた ($p<0.05$)。 ** 50%光量層ではなく、表面より採水した。

Table 2.3 各測点におけるエアロゾル沈着量見積りおよびピコ・ナノ植物プランクトン細胞密度。データ欠損は「-」で示した。

測点	黒色炭素 [fg m ⁻² d ⁻¹]	ダスト [pg m ⁻² d ⁻¹]	有機物 [pg m ⁻² d ⁻¹]	海塩粒子 [pg m ⁻² d ⁻¹]	硫酸塩 [pg m ⁻² d ⁻¹]	真核植物プランクトン [10 ³ cells ml ⁻¹]	<i>Synechococcus</i> [10 ³ cells ml ⁻¹]	<i>Prochlorococcus</i> [10 ³ cells ml ⁻¹]	ナノシアノバクテリア [cells ml ⁻¹]
102	36.5	0.242	0.0989	123	3.37	-	-	-	-
103	38.3	0.479	0.119	140	2.80	0.696	0.855	27.4	18
104A	46.8	0.567	0.147	136	3.73	0.807	0.490	13.3	28
104B	57.0	0.762	0.177	198	5.03	0.726	0.980	25.2	7
105	65.1	0.976	0.227	216	5.45	0.803	1.08	123	n.d.
106	46.9	0.478	0.188	120	4.92	1.27	3.14	179	n.d.
107	98.4	0.499	0.571	127	10.4	0.839	1.50	41.0	n.d.
108	102	0.637	0.61	146	7.42	2.25	9.30	165	n.d.
109	437	1.26	1.95	277	12.3	2.63	4.49	68.5	n.d.
110	274	0.776	1.61	43.5	10.4	1.38	1.86	127	n.d.
112	58.0	2.33	0.489	134	5.24	0.249	0.083	22.9	n.d.
113	9.05	1.53	0.0672	40.6	3.26	-	-	-	-
114	7.31	0.854	0.0465	24.8	6.18	0.777	0.383	23.0	n.d.
115	9.99	0.62	0.0896	64.0	5.66	0.099	n.d.	5.83	n.d.
116	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	3.16	0.711	0.0174	123	2.84	0.893	0.102	n.d.	n.d.
118	2.31	0.583	0.0232	96.6	3.35	0.434	n.d.	n.d.	n.d.
119	1.75	0.429	0.0107	72.3	2.75	0.366	0.111	4.91	n.d.

Table 2.3 続き。

測点	黒色炭素 [fg m ⁻² d ⁻¹]	ダスト [pg m ⁻² d ⁻¹]	有機物 [pg m ⁻² d ⁻¹]	海塩粒子 [pg m ⁻² d ⁻¹]	硫酸塩 [pg m ⁻² d ⁻¹]	真核植物プランクトン [10 ³ cells ml ⁻¹]	<i>Synechococcus</i> [10 ³ cells ml ⁻¹]	<i>Prochlorococcus</i> [10 ³ cells ml ⁻¹]	ナノシアノバクテリア [cells ml ⁻¹]
120	1.16	0.357	0.00835	72.1	3.40	1.14	n.d.	n.d.	n.d.
121	1.17	0.302	0.0105	73.2	2.92	0.473	0.130	4.81	n.d.
122	1.17	0.657	0.00829	49.8	2.90	4.56	1.58	7.30	n.d.
205	435	10.7	1.33	142	142	2.52	16.3	57.5	n.d.
207	256	11.1	0.44	45.8	45.8	0.813	1.99	32.2	n.d.
208	101	4.58	0.335	59.4	59.4	0.466	0.529	24.8	108
209	99.3	2.06	0.833	94.6	94.6	0.488	0.488	46.4	542
210	133	3.35	0.762	115	115	0.712	0.465	27.5	252
211	88.9	1.64	0.491	43.3	43.3	0.723	0.628	18.2	31
212	232	14.8	1.64	46.3	46.3	0.553	0.474	52.0	17
214	613	30.6	5.37	84.3	84.3	0.734	0.651	45.6	n.d.
215	520	26.5	3.56	185	185	0.940	1.56	31.4	n.d.
216	500	22.1	3.06	322	322	0.822	1.41	25.1	n.d.
30B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
301	-	-	-	-	-	0.912	8.75	69.5	0
302	-	-	-	-	-	1.02	4.46	50.4	2

Table 2.3 続き。

測点	黒色炭素 [fg m ⁻² d ⁻¹]	ダスト [pg m ⁻² d ⁻¹]	有機物 [pg m ⁻² d ⁻¹]	海塩粒子 [pg m ⁻² d ⁻¹]	硫酸塩 [pg m ⁻² d ⁻¹]	真核植物プランクトン [10 ³ cells ml ⁻¹]	<i>Synechococcus</i> [10 ³ cells ml ⁻¹]	<i>Prochlorococcus</i> [10 ³ cells ml ⁻¹]	ナノシアノバクテリア [cells ml ⁻¹]
303	-	-	-	-	-	0.634	0.846	65.4	0
304	-	-	-	-	-	0.778	4.29	81.2	0
305	-	-	-	-	-	1.53	20.8	80.2	0
306	-	-	-	-	-	0.788	0.909	73.0	0
307	-	-	-	-	-	0.863	2.95	83.1	0
308	-	-	-	-	-	0.719	1.17	59.9	2
309	-	-	-	-	-	0.921	1.35	25.6	0
310	-	-	-	-	-	0.940	2.14	78.0	0
311	-	-	-	-	-	1.41	1.67	57.2	0
312	-	-	-	-	-	0.756	2.41	74.0	0
401	-	-	-	-	-	1.03	6.08	135	0
402	-	-	-	-	-	0.802	1.60	109	0
403	-	-	-	-	-	3.09	39.1	102	0
404	-	-	-	-	-	0.997	1.30	119	0
405	-	-	-	-	-	0.925	1.12	103	0
406	-	-	-	-	-	0.933	1.60	106	0
407	-	-	-	-	-	1.01	1.25	119	0

Table 2.4 各測点における窒素固定生物の *nifH* あるいはフィラメント密度および基礎生産、窒素固定、および海水中の窒素固定生物シアノバクテリア *Abai-Omas/クロロフィル a* (Diaz/Chl. *a*) 比を示す。データ欠損は「-」で示した。 *nifH* 現存量が検出限界以下 (1×10^2 copies l^{-1}) の場合は ‘n.d. (not detected)’ と記した。また、添加培養実験においてコントロールと比較して有意な添加効果のあった添加系列についても示した ($p < 0.05$)。空欄は添加効果が見られなかったことを示す。

測点	<i>Trichodesmium</i> spp. [<i>nifH</i> copies l^{-1}]	UCYNA [<i>nifH</i> copies l^{-1}]	<i>C. watsonii</i> [<i>nifH</i> copies l^{-1}]	γ -24774A11 [<i>nifH</i> copies l^{-1}]	<i>R. intracellularis</i> [filament l^{-1}]	基礎生産 [μ mol C l^{-1} d $^{-1}$]	窒素固定 [nmol N l^{-1} d $^{-1}$]	添加効果	Diaz/Chl. <i>a</i> [μ g C/ μ g Chl. <i>a</i>]
102	1 $\times 10^3$	7 $\times 10^2$	1 $\times 10^3$	7 $\times 10^2$	5	0.42	0.85	P, PFe	5.85
103	n.d.	n.d.	n.d.	1 $\times 10^2$	0	0.14	0.42		0
104A	2 $\times 10^3$	2 $\times 10^3$	8 $\times 10^2$	2 $\times 10^3$	15	0.11	0.63	PFe	10.7
104B	n.d.	n.d.	2 $\times 10^2$	3 $\times 10^2$	7	0.32	0.65		0.0562
105	2 $\times 10^4$	n.d.	n.d.	2 $\times 10^2$	4	0.29	0.32		78.3
106	2 $\times 10^3$	n.d.	2 $\times 10^2$	2 $\times 10^2$	10	0.31	0.58		6.18
107	8 $\times 10^2$	6 $\times 10^2$	5 $\times 10^2$	8 $\times 10^2$	0	0.26	0.49		2.92
108	1 $\times 10^3$	n.d.	n.d.	2 $\times 10^2$	0	0.57	0.53		2.22
109	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.68	0.44		0
110	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.50	0.25		0
112	200	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.60	0.83	Fe, PFe	0.334
113	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.54	0.61	PFe	0
114	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.56	0.64	Fe	0
115	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.19	0.33		0
116	n.d.	900	n.d.	n.d.	-	0.075	-		0.00879

Table 2.4 続き。

測点	<i>Trichodesmium</i> spp. [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	UCYNA [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	<i>C. watsonii</i> [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	γ-24774A11 [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	<i>R. intracellularis</i> [filament l ⁻¹]	基礎生産 [μmol C l ⁻¹ d ⁻¹]	窒素固定 [nmol N l ⁻¹ d ⁻¹]	添加効果	Diaz/Chl. <i>a</i> [μg C/μg Chl. <i>a</i>]
117	n.d.	200	n.d.	n.d.	0	0.092	0.29		0.00201
118	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.12	0.16		0
119	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.27	0.23		0
120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	0.51		-
121	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.086	0.30		0
122	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0.64	0.65		0
205	n.d.	1×10 ⁴	n.d.	4×10 ²	14	0.55	1.2	Fe, PFe	0.0242
207	n.d.	2×10 ²	n.d.	1×10 ⁴	2	0.44	0.22	P*	1.42×10 ⁻³
208	4×10 ²	n.d.	2×10 ⁴	2×10 ³	16	0.19	0.58	P, Fe, PFe	10.7
209	1×10 ³	n.d.	1×10 ⁵	1×10 ³	0	0.41	2.2	P, PFe	35.4
210	n.d.	n.d.	5×10 ⁴	3×10 ²	5	0.19	1.0		19.9
211	n.d.	n.d.	3×10 ³	1×10 ²	2	0.19	0.29		1.49
212	n.d.	1×10 ²	1×10 ⁴	3×10 ³	2	0.18	0.50		2.67
214	7×10 ³	4×10 ²	2×10 ³	8×10 ³	5	0.41	0.64		25.3
215	2×10 ³	2×10 ²	n.d.	1×10 ⁴	7	0.31	0.40	PFe	9.33
216	n.d.	n.d.	n.d.	3×10 ³	0	0.37	0.18	Fe	0
30B1	3×10 ⁴	n.d.	n.d.	8×10 ²	4	3.1	3.5		6.85
30B2	1×10 ⁵	n.d.	1×10 ²	3×10 ³	0	-	-	-	92.2
30B3	4×10 ³	n.d.	n.d.	6×10 ²	2	-	-	-	4.11

Table 2.4 続き。

測点	<i>Trichodesmium</i> spp. [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	UCYNA [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	<i>C. watsonii</i> [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	γ-24774A11 [<i>nifH</i> copies l ⁻¹]	<i>R. intracellularis</i> [filament l ⁻¹]	基礎生産 [μmol C l ⁻¹ d ⁻¹]	窒素固定 [nmol N l ⁻¹ d ⁻¹]	添加効果	Diaz/Chl. <i>a</i> [μg C/μg Chl. <i>a</i>]
301	1×10 ²	n.d.	n.d.	3×10 ²	2	-	-	-	0.247
302	3×10 ³	n.d.	5×10 ²	1×10 ⁴	0	0.56	2.3		7.17
303	2×10 ²	n.d.	n.d.	4×10 ³	0	0.59	4.4		0.345
304	1×10 ²	n.d.	3×10 ²	4×10 ³	0	-	-	-	0.304
305	2×10 ²	n.d.	n.d.	2×10 ³	2	0.48	2.6		0.391
306	-	-	-	-	0	0.23	1.3		0.000162
307	6×10 ²	n.d.	n.d.	1×10 ⁴	0	0.54	2.1		1.07
308	5×10 ²	n.d.	n.d.	5×10 ³	0	0.69	2.4		1.07
309	1×10 ³	n.d.	n.d.	1×10 ⁴	2	0.42	0.53		2.70
310	2×10 ³	n.d.	n.d.	2×10 ⁴	6	0.30	0.42		3.63
311	1×10 ³	n.d.	n.d.	1×10 ⁴	0	0.59	0.60		3.40
312	3×10 ³	n.d.	n.d.	2×10 ⁴	4	0.68	0.75		8.45
401	-	-	-	-	-	-	-	-	-
402	1×10 ³	n.d.	2×10 ²	8×10 ³	-	0.40	0.90		6.76
403	1×10 ⁵	2×10 ²	n.d.	4×10 ³	-	2.1	16		104
404	n.d.	4×10 ²	2×10 ²	9×10 ³	-	0.64	0.60		0.0443
405	1×10 ³	n.d.	5×10 ²	1×10 ⁴	-	0.57	1.3		7.30
406	6×10 ²	7×10 ³	1×10 ³	9×10 ³	-	-	-	-	3.72
407	9×10 ²	5×10 ³	4×10 ²	3×10 ⁴	-	-	-	-	5.35

*リン酸塩添加区でコントロールよりも有意に窒素固定が低かった ($p<0.05$)。

Table 2.5 白鳳丸航海データ (KH-11-10、KH-12-3) 全測点の環境パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各変数の分散、および各主成分の標準偏差、寄与率および累積寄与率。

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
SRP	0.507	-0.133	0.166	0.835	-0.017
DFe	-0.364	-0.041	0.882	0.033	-0.296
MLD	-0.224	0.921	-0.086	0.298	-0.077
水温	-0.495	-0.316	-0.433	0.324	-0.602
塩分	0.562	0.182	0.005	-0.328	-0.737
標準偏差	1.42	0.99	0.94	0.79	0.69
寄与率	0.40	0.20	0.18	0.13	0.10
累積寄与率	0.40	0.60	0.78	0.90	1.00

Table 2.6 白鳳丸航海データ (KH-11-10、KH-12-3) 西部北太平洋測点の環境パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各変数の分散、および各主成分の標準偏差、寄与率および累積寄与率。

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
SRP	0.218	-0.716	0.470	0.236	-0.403
DFe	-0.149	0.486	0.808	-0.256	-0.150
MLD	0.640	-0.060	0.263	-0.077	0.715
水温	-0.437	-0.488	0.037	-0.708	0.261
塩分	0.573	0.093	-0.233	-0.610	-0.486
標準偏差	1.43	1.11	0.97	0.78	0.42
寄与率	0.41	0.25	0.19	0.12	0.04
累積寄与率	0.41	0.65	0.84	0.97	1.00

Table 2.7 全航海データ (KH-11-10、KH-12-3、KT-11-23、KT-12-24) の全パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各変数の分散、および各主成分の標準偏差、寄与率および累積寄与率。

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16
窒素固定	0.293	-0.146	-0.284	0.126	-0.032	0.023	-0.454	0.507	-0.202	0.240	-0.127	-0.083	-0.402	0.212	0.054	0.017
<i>Trichodesmium</i> spp.	0.067	-0.076	0.270	-0.189	0.371	-0.516	0.360	0.502	-0.112	0.065	0.241	-0.120	0.010	-0.031	-0.072	-0.005
真核植物プランクトン	0.181	0.300	0.034	0.339	0.068	0.369	0.486	0.016	0.060	0.241	0.300	0.097	-0.388	-0.029	0.267	0.007
<i>Synechococcus</i>	0.301	0.177	0.077	0.404	-0.005	-0.155	-0.231	-0.071	0.009	-0.508	0.423	-0.277	0.165	0.283	0.066	0.018
<i>Prochlorococcus</i>	0.350	-0.003	0.175	-0.037	0.402	-0.009	0.097	-0.188	-0.207	-0.427	-0.515	0.268	-0.254	0.070	0.088	-0.013
ナシアンノバクテリア	-0.069	-0.431	-0.326	0.289	0.192	-0.039	0.187	-0.068	0.152	-0.054	-0.025	-0.108	0.009	0.010	-0.009	-0.709
UCYN-A	0.072	0.164	0.114	0.477	-0.177	-0.564	-0.045	-0.092	0.257	0.287	-0.221	0.375	-0.015	-0.010	-0.170	0.001
<i>C. watsonii</i>	-0.065	-0.433	-0.327	0.285	0.186	-0.039	0.198	-0.064	0.139	-0.091	-0.035	-0.100	-0.009	-0.091	-0.057	0.700
γ -24774A11	0.245	-0.158	0.120	-0.310	-0.384	-0.003	0.196	0.083	0.636	-0.181	-0.087	-0.150	-0.283	0.242	-0.079	0.008
N+N	0.029	0.201	-0.478	-0.314	-0.002	-0.448	-0.018	-0.230	0.064	0.000	0.079	-0.023	-0.132	-0.096	0.583	0.012
SRP	-0.179	0.358	-0.445	-0.131	0.085	-0.050	0.180	-0.061	-0.120	-0.097	0.089	0.103	-0.182	0.416	-0.574	0.004
MLD	0.220	-0.052	0.093	-0.181	0.546	0.092	-0.269	-0.329	0.325	0.444	0.145	-0.031	0.110	0.279	-0.066	0.039
基礎生産	0.383	0.171	-0.264	-0.006	-0.080	0.115	0.303	0.211	-0.013	0.134	-0.317	-0.038	0.653	0.200	0.107	0.023
クロロフィル <i>a</i>	0.433	0.165	-0.230	-0.088	0.089	0.078	-0.134	0.074	0.176	-0.116	0.123	0.040	0.010	-0.694	-0.374	-0.063
水温	0.244	-0.414	-0.068	-0.149	-0.211	0.009	0.032	-0.043	-0.176	-0.040	0.427	0.671	0.118	0.125	0.019	0.005
塩分	-0.339	0.164	-0.072	0.036	0.284	0.145	-0.187	0.458	0.449	-0.271	0.004	0.413	0.114	0.056	0.209	0.010
標準偏差	1.92	1.65	1.41	1.37	1.22	0.94	0.93	0.83	0.71	0.62	0.58	0.50	0.39	0.30	0.28	0.06
寄与率	0.23	0.17	0.12	0.12	0.09	0.05	0.05	0.04	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00
累積寄与率	0.23	0.40	0.52	0.64	0.74	0.79	0.84	0.89	0.92	0.94	0.96	0.98	0.99	0.99	1.00	1.00

Table 2.8 白鳳丸航海データ (KH-11-10、KH-12-3) の全パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各変数の分散、および各主成分の標準偏差、寄与率および累積寄与率。

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
窒素固定	0.050	-0.039	-0.526	0.096	-0.092	0.031	-0.133	0.166	-0.070	0.091	-0.192	0.001
<i>Trichodesmium</i> spp.	0.073	0.026	0.044	-0.145	0.367	-0.033	-0.295	0.644	0.345	-0.368	0.043	0.013
<i>R. intracellularis</i>	0.121	-0.039	-0.105	-0.358	-0.128	-0.075	-0.524	-0.142	0.262	0.406	-0.061	0.306
真核植物プランクトン	0.050	0.340	-0.091	-0.077	-0.164	0.245	0.339	0.065	0.493	0.162	-0.141	0.206
<i>Synechococcus</i>	0.149	0.328	-0.169	-0.273	-0.223	0.039	-0.017	-0.007	-0.260	-0.088	0.136	-0.173
<i>Prochlorococcus</i>	0.093	0.272	-0.136	-0.179	0.395	0.139	-0.052	-0.115	-0.041	-0.137	0.252	-0.305
ナノシアノバクテリア	0.013	-0.248	-0.474	0.116	0.052	0.047	0.093	0.125	-0.053	-0.003	-0.096	-0.007
UCYN-A	0.121	0.163	-0.149	-0.295	-0.416	-0.090	-0.237	0.073	-0.177	-0.281	0.013	0.017
<i>C. watsonii</i>	0.024	-0.247	-0.468	0.130	0.057	0.072	0.089	0.132	-0.080	-0.006	-0.063	0.006
γ -24774A11	0.291	-0.152	0.175	0.094	-0.029	0.201	-0.180	-0.050	0.174	0.158	-0.388	-0.603
N+N	-0.075	0.158	-0.023	0.426	-0.024	-0.385	-0.432	-0.057	-0.059	-0.026	-0.067	-0.099
SRP	-0.204	0.199	0.047	0.444	-0.143	-0.136	-0.111	0.052	0.125	-0.087	0.086	0.162
D-Fe	0.225	0.087	0.138	0.131	0.259	0.345	-0.117	0.188	-0.428	0.247	0.120	0.364
黒色炭素	0.405	0.051	0.061	0.061	-0.064	-0.035	0.067	-0.035	-0.018	-0.132	-0.095	0.096
ダスト	0.373	-0.098	0.156	0.116	-0.073	0.043	-0.106	0.079	-0.045	0.108	0.014	-0.088
有機物	0.381	-0.012	0.095	0.156	0.043	0.028	0.021	0.042	-0.097	-0.044	-0.147	0.281
海塩粒子	0.169	0.122	0.014	-0.087	0.133	-0.618	0.284	0.275	0.043	0.321	-0.072	-0.014
硫酸塩	0.320	-0.130	-0.044	0.039	-0.158	-0.275	0.186	0.086	-0.018	0.162	0.508	-0.180

Table 2.8 続き。

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
MLD	-0.054	0.160	-0.136	-0.176	0.482	-0.217	0.015	-0.255	-0.111	0.165	-0.265	-0.028
基礎生産	0.118	0.377	-0.141	0.264	-0.065	0.153	0.091	0.075	0.220	0.027	0.027	-0.158
クロロフィル <i>a</i>	0.050	0.424	-0.153	0.213	0.119	0.073	-0.118	-0.136	-0.031	0.176	0.099	-0.025
水温	0.196	-0.247	-0.181	0.098	0.173	0.008	-0.108	-0.379	0.381	-0.064	0.454	0.108
塩分	-0.330	-0.041	0.048	-0.036	-0.073	0.182	-0.138	0.336	-0.031	0.493	0.290	-0.203
標準偏差	2.36	1.93	1.75	1.53	1.49	1.12	1.08	0.93	0.81	0.68	0.62	0.60
寄与率	0.24	0.16	0.13	0.10	0.10	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02	0.02	0.02
累積寄与率	0.24	0.40	0.54	0.64	0.74	0.79	0.84	0.88	0.91	0.93	0.95	0.96

Table 2.8 続き。

	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18	PC19	PC20	PC21	PC22	PC23
窒素固定	-0.205	0.071	-0.167	0.006	-0.144	0.333	-0.175	0.371	-0.063	0.294	-0.373
<i>Trichodesmium</i> spp.	-0.115	-0.058	0.078	-0.047	-0.007	0.004	0.199	-0.069	0.007	0.041	-0.078
<i>R. intracellularis</i>	0.361	0.099	-0.088	-0.119	0.063	0.023	0.155	-0.068	-0.037	-0.016	0.014
真核植物プランクトン	-0.114	0.218	0.438	0.149	-0.107	-0.113	-0.165	-0.026	0.051	0.014	-0.026
<i>Synechococcus</i>	-0.009	-0.157	0.236	0.247	0.324	0.439	0.202	-0.312	0.066	0.096	-0.029
<i>Prochlorococcus</i>	0.359	0.466	-0.132	0.149	-0.020	-0.036	-0.292	0.150	-0.001	-0.035	0.042
ナノシアノバクテリア	0.153	0.014	0.081	0.031	0.121	-0.068	0.071	-0.115	0.299	-0.688	-0.167
UCYN-A	-0.240	-0.101	-0.001	-0.050	-0.024	-0.401	-0.209	0.300	0.033	-0.199	0.300
<i>C. watsonii</i>	0.144	0.046	0.091	0.102	0.052	-0.259	0.119	-0.222	-0.323	0.367	0.495
γ -24774A11	0.038	-0.133	0.134	0.151	0.181	-0.127	0.094	0.243	0.148	0.075	0.046
N+N	0.072	0.062	0.373	-0.008	-0.178	-0.058	-0.329	-0.327	0.153	0.083	-0.052
SRP	0.070	0.228	0.016	0.189	0.517	0.059	0.214	0.380	-0.191	-0.109	0.076
D-Fe	0.162	-0.269	0.322	-0.009	0.031	-0.063	-0.123	0.237	-0.018	0.000	-0.027
黒色炭素	0.008	-0.006	-0.235	0.070	0.314	-0.385	-0.165	-0.287	-0.321	0.053	-0.506
ダスト	-0.239	0.263	0.036	0.062	-0.264	0.316	-0.009	-0.122	-0.499	-0.408	0.190
有機物	-0.197	0.348	-0.270	-0.040	0.161	0.115	-0.018	-0.125	0.556	0.150	0.288
海塩粒子	0.142	-0.248	-0.160	0.321	-0.012	0.053	-0.167	0.114	0.015	-0.057	0.159
硫酸塩	0.001	0.232	0.248	-0.352	-0.030	-0.153	0.262	0.161	0.105	0.146	-0.167
MLD	-0.427	0.087	0.207	-0.326	0.301	-0.051	0.062	0.040	-0.150	-0.071	0.036

Table 2.8 続き。

	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18	PC19	PC20	PC21	PC22	PC23
基礎生産	0.171	-0.305	-0.228	-0.602	0.085	0.148	-0.134	-0.082	-0.066	-0.077	0.193
クロロフィル <i>a</i>	-0.203	-0.109	-0.264	0.238	-0.359	-0.282	0.503	-0.052	0.079	-0.045	-0.049
水温	-0.267	-0.325	0.033	0.201	0.122	0.092	-0.228	0.041	0.050	0.000	0.088
塩分	-0.305	0.098	-0.188	0.053	0.265	-0.149	-0.247	-0.222	0.055	-0.009	0.007
標準偏差	0.52	0.47	0.42	0.31	0.27	0.14	0.13	0.10	0.08	0.03	0.02
寄与率	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
累積寄与率	0.97	0.98	0.99	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table 2.9 白鳳丸航海データ (KH-11-10、KH-12-3) 全測点の環境パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各測点の主成分得点。

測点	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
102	-0.42	-0.68	-0.61	-0.59	0.28
103	-0.72	1.15	-1.01	0.14	-0.27
104A	0.05	0.21	-0.94	-0.65	0.06
104B	-0.28	1.17	-0.78	-0.30	-0.15
105	-0.74	1.21	0.17	-0.20	-0.53
106	-0.19	1.99	-0.68	-0.05	0.18
107	-0.40	2.61	-0.27	0.01	-0.01
108	-0.96	2.07	2.32	-0.05	-0.48
205	-0.02	-0.69	-0.34	-0.83	1.53
207	-0.72	-1.27	-0.18	-0.57	0.05
208	-1.08	-0.45	-0.05	-0.26	-1.34
209	-1.01	-0.35	-1.42	0.00	-0.45
210	-1.12	-0.27	-0.80	0.49	-0.63
211	-1.18	-0.35	-1.58	0.81	0.24
212	-1.64	-1.07	0.38	-0.13	-0.69
214	-2.62	-0.79	2.53	0.09	-0.34
215	-1.42	-1.19	-0.17	-0.14	0.45
216	-1.65	-1.01	0.01	-0.02	0.36
109	-0.78	0.09	0.72	1.17	1.43
110	-1.28	-0.12	-0.23	0.96	0.73
112	1.96	-0.01	0.65	2.92	0.23
113	2.28	-0.68	-0.18	0.97	-0.40
114	1.82	-0.77	0.07	-0.13	-1.05
115	1.85	-0.53	0.47	-0.53	-1.30
117	1.57	0.28	0.29	-1.12	0.80
118	1.65	0.29	-0.06	-0.90	0.83
119	1.07	-0.36	1.86	-0.84	0.77
120	1.75	0.26	0.12	-0.62	0.01
121	1.96	-0.26	-0.39	0.12	-0.16
122	2.28	-0.48	0.11	0.24	-0.15

Table 2.10 白鳳丸航海データ (KH-11-10、KH-12-3) 西部北太平洋測点の環境パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各測点の主成分得点。

測点	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
102	-0.54	0.38	-0.99	0.20	-0.33
103	0.98	-0.59	-0.27	-0.28	0.47
104A	0.66	0.31	-1.30	-0.07	-0.40
104B	1.28	0.24	-0.77	-0.23	0.16
105	1.18	0.63	0.05	-0.53	0.10
106	2.07	-0.19	-0.20	0.47	0.26
107	2.45	0.35	0.04	0.25	0.61
108	2.19	1.02	2.18	0.33	-0.59
205	-0.57	0.76	-1.01	1.93	-0.43
207	-1.13	0.38	-0.61	-0.02	-0.57
208	-0.26	0.15	-0.16	-1.74	-0.44
209	-0.62	-0.60	-0.90	-0.84	0.44
210	-0.11	-2.21	0.83	-0.34	-0.48
211	-0.54	-3.14	0.81	0.80	0.01
212	-1.46	0.40	0.26	-0.89	-0.02
214	-1.91	1.57	2.08	0.01	0.32
215	-1.84	0.23	-0.14	0.51	0.34
216	-1.83	0.30	0.11	0.43	0.55

Table 2.11 全航海データ (KH-11-10、KH-12-3、KT-11-23、KT-12-24) の全パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各測点の主成分得点。

測点	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16
103	-1.11	-0.48	0.76	-0.32	0.61	0.36	-1.04	-0.87	0.13	0.66	0.69	0.32	0.08	0.01	0.03	-0.09
104A	-1.69	-0.26	1.02	0.52	-0.21	-0.68	-0.56	0.08	0.38	0.62	0.22	0.33	-0.37	-0.19	0.14	-0.16
104B	-0.85	-0.03	0.47	-0.17	0.54	0.53	-0.92	-0.24	0.29	0.68	0.15	0.03	0.56	-0.02	0.24	0.00
105	0.17	-0.44	2.64	-1.40	3.66	-2.49	1.51	2.00	-0.76	0.09	0.57	0.01	0.09	-0.02	0.04	0.00
106	0.98	0.53	1.27	-0.15	2.77	0.43	-0.43	-0.96	-0.08	-0.55	-1.05	0.51	-0.51	0.10	0.28	0.01
107	-0.49	0.30	0.89	-0.24	1.65	0.34	-1.21	-0.82	0.99	1.15	0.15	-0.19	0.36	0.13	-0.08	0.09
108	2.41	1.91	0.62	0.83	2.79	1.06	-0.08	-0.72	0.46	-0.85	-0.48	-0.12	0.20	-0.20	0.27	-0.01
205	2.00	2.74	0.99	5.32	-1.57	-2.82	-0.10	-0.35	0.65	0.49	-0.48	0.56	0.05	0.04	-0.11	0.02
207	-0.54	-0.34	0.70	-0.24	-1.85	0.15	0.71	0.11	0.17	-0.59	-0.33	-0.12	0.33	0.26	0.43	0.01
208	-1.60	-1.79	-0.02	0.27	-0.13	0.06	-0.26	-0.09	0.07	-0.25	0.46	0.71	0.18	0.04	0.36	0.01
209	-0.50	-5.72	-3.68	2.91	1.66	-0.23	1.06	0.12	0.56	-0.22	-0.48	-0.50	0.08	-0.07	-0.02	-0.06
210	-1.34	-3.08	-1.38	1.25	0.60	0.02	0.28	-0.66	-0.06	0.10	0.51	0.23	-0.21	0.18	-0.11	0.13
211	-1.14	-0.96	0.45	-0.24	-0.58	0.05	-0.11	-1.16	-0.98	0.59	0.87	0.37	0.07	0.34	-0.19	-0.07
212	-0.52	-1.06	0.38	-0.20	-0.72	0.07	-0.25	-0.40	-0.50	-0.53	0.22	0.67	-0.23	-0.93	-0.15	0.17
214	0.44	-0.76	1.11	-0.81	-0.57	-0.97	1.01	0.57	-0.42	0.30	0.08	-0.50	0.07	-0.23	-0.26	0.05
215	-0.15	-0.70	0.99	-0.46	-1.66	-0.22	0.76	-0.12	-0.17	-0.16	0.18	-0.36	-0.28	-0.03	0.05	-0.02
216	-0.58	-0.53	0.72	-0.12	-1.37	0.11	0.41	-0.69	-0.89	0.20	0.15	-0.18	0.49	-0.06	0.26	0.00
109	1.60	1.88	-0.50	0.67	0.27	1.10	1.47	-0.92	-0.90	0.63	0.08	-0.80	0.23	-0.15	-0.63	-0.03

Table 2.11 続き。

測点	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16
110	1.10	0.42	0.32	-0.16	0.52	0.52	0.77	-1.41	-1.34	-0.14	-0.68	0.36	0.10	-0.01	-0.34	-0.04
112	-0.47	3.50	-5.49	-2.94	0.53	-2.42	-0.03	-1.15	-0.02	-0.02	0.22	-0.06	-0.15	0.05	0.20	0.01
114	-1.42	1.53	-1.30	-0.10	-0.12	0.63	0.04	1.44	0.16	-0.76	-0.38	0.83	0.93	-0.31	-0.48	-0.05
115	-3.35	0.75	-0.23	-0.18	-0.11	0.15	-0.79	1.03	0.30	-0.95	-0.11	0.69	0.28	0.13	-0.25	-0.01
117	-3.26	0.89	0.76	0.47	-0.03	0.20	-0.48	0.16	0.21	0.12	-0.31	-0.91	-0.50	-0.12	0.31	0.02
118	-3.31	0.74	0.63	0.12	-0.04	0.08	-0.60	0.06	0.14	-0.03	-0.39	-0.89	-0.13	0.00	0.05	0.02
119	-2.94	1.03	0.26	0.20	-0.45	0.02	-0.18	0.27	-0.26	-0.18	-0.90	-1.23	0.18	-0.13	-0.12	-0.01
121	-3.40	0.80	-0.03	-0.11	-0.05	0.08	-0.52	0.25	-0.06	-0.45	0.17	0.18	-0.42	0.55	-0.53	0.02
122	-0.66	3.38	-1.30	1.65	0.17	2.31	2.48	1.36	0.34	0.67	0.89	0.43	-0.67	0.11	0.36	0.02
302	2.65	-0.53	-0.14	-0.73	0.06	0.20	-0.74	0.76	0.57	0.69	0.46	-0.25	0.08	0.27	-0.30	0.04
303	2.62	-0.82	-1.34	-0.22	-0.54	0.52	-1.92	1.87	-1.10	1.07	-0.87	0.06	-0.68	0.01	-0.10	0.00
305	3.65	0.73	-0.32	1.89	-0.09	0.15	-1.83	0.42	-0.80	-1.79	1.73	-0.86	0.08	0.16	0.12	-0.01
307	2.70	-0.53	-0.29	-0.92	0.01	0.45	-0.90	0.22	0.51	0.30	-0.17	0.21	-0.15	-0.03	-0.21	0.00
308	1.92	-0.27	-1.19	-0.65	-0.90	0.05	-0.48	0.88	-0.70	0.42	-0.67	0.15	0.34	-0.22	0.54	-0.02
309	0.60	-0.34	-0.02	-1.04	-1.27	-0.16	0.30	-0.24	0.48	0.06	0.41	-0.07	0.11	-0.48	0.37	-0.02
310	1.76	-0.67	0.80	-1.69	-0.86	-0.08	0.41	-0.43	1.76	-0.76	0.17	-0.08	-0.94	-0.44	-0.41	-0.07
311	1.62	-0.22	0.25	-0.76	-0.63	0.58	0.68	-0.20	0.53	0.30	0.10	0.22	0.45	-0.08	0.11	0.00
312	2.30	-0.70	0.50	-1.68	-1.00	-0.06	0.92	0.25	1.49	-0.25	-0.47	-0.23	0.42	0.75	-0.04	0.04
402	0.80	-0.91	0.70	-0.58	-1.07	-0.09	0.64	-0.43	-1.13	-0.68	-0.70	0.46	-0.51	0.58	0.18	0.00

Table 2.12 白鳳丸航海データ (KH-11-10、KH-12-3) の全パラメータを用いた主成分分析により算出された各主成分に対する各測点の主成分得点。

測点	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
103	-1.35	-0.61	0.19	-0.74	0.93	-0.76	0.57	-0.95	-0.17	-0.09	-0.16	-0.01
104A	-0.83	-1.17	-0.08	-2.06	-0.71	-0.75	-1.41	-0.27	0.78	0.65	-0.70	0.49
104B	-0.96	-0.06	-0.20	-1.01	0.50	-1.06	0.09	-0.44	0.23	1.01	-0.49	0.09
105	-0.21	0.74	0.41	-1.94	3.63	-0.76	-1.11	2.74	1.32	-1.09	0.51	-0.18
106	-0.77	1.63	-0.88	-2.01	1.83	-0.06	-0.66	-1.03	0.26	0.49	0.06	-0.69
107	-1.07	0.54	0.08	-0.85	1.28	-0.51	0.45	-0.57	-0.74	0.28	-0.80	-0.32
108	0.35	4.23	-0.84	-0.67	2.14	1.50	0.56	-0.04	-1.52	1.00	0.47	-0.43
205	3.30	3.32	-2.46	-3.08	-4.63	-0.49	-1.09	0.38	-0.66	-0.82	0.27	-0.03
207	1.35	-1.12	1.46	0.40	-0.83	1.49	-0.32	-0.71	0.69	-0.33	-0.48	-1.85
208	0.10	-2.17	-0.63	-0.92	-0.02	0.52	-1.61	-0.73	0.42	1.19	0.57	0.93
209	0.36	-3.24	-6.61	1.66	0.50	0.47	0.78	1.00	-0.33	-0.27	-0.49	-0.52
210	0.27	-2.48	-2.59	0.32	0.27	-0.40	0.37	-0.18	0.00	0.14	0.40	0.55
211	-0.70	-1.46	0.22	-0.26	0.04	-0.32	0.34	-1.68	0.65	-1.33	0.35	0.45
212	1.41	-1.11	0.54	0.61	0.46	1.21	-0.52	-0.91	-0.51	-0.22	0.61	0.32
214	5.72	-0.57	1.78	1.40	1.10	1.71	-1.34	0.90	-0.64	-0.11	-0.84	0.99
215	4.89	-1.37	1.65	0.53	-0.59	-0.41	-0.17	-0.07	0.74	0.50	-0.48	-0.86
216	4.56	-0.99	1.50	0.69	-0.35	-2.48	2.15	0.47	-0.12	0.62	1.40	-0.21
109	1.65	3.40	-0.19	0.84	0.45	-0.71	2.06	-0.13	0.49	-0.11	-0.83	0.90
110	0.51	1.44	0.01	0.39	1.07	0.87	0.63	-1.68	0.24	-1.56	0.32	0.28
112	-2.03	2.91	-0.36	4.96	-0.24	-2.47	-2.49	-0.26	-0.20	-0.07	-0.16	-0.17
114	-2.19	0.67	0.10	1.43	-0.90	1.33	-0.34	0.31	0.28	0.26	1.04	-0.36
115	-2.57	-1.10	1.28	0.37	-0.72	0.59	-0.27	0.67	-0.66	0.29	0.92	0.00
117	-2.38	-0.95	1.43	-0.74	-0.86	-0.35	0.79	0.80	-0.68	-0.08	-0.70	-0.01
118	-2.55	-1.11	1.54	-0.57	-0.80	-0.39	0.61	0.46	-0.63	-0.38	-0.53	-0.19
119	-1.98	-0.53	1.66	0.14	-0.68	0.65	0.35	0.89	-1.34	-0.27	-0.30	0.41
121	-2.77	-1.23	1.24	0.01	-0.92	-0.21	0.16	0.23	-0.14	-0.42	0.20	-0.01
122	-2.11	2.40	-0.24	1.12	-1.95	1.83	1.39	0.81	2.26	0.69	-0.15	0.41

Table 2.12 続き。

測点	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18	PC19	PC20	PC21	PC22	PC23
103	-0.95	-0.44	0.18	0.26	-0.11	0.08	-0.12	0.04	0.04	-0.07	-0.01
104A	0.25	-0.15	-0.24	0.14	-0.22	-0.17	0.02	0.17	0.22	-0.01	0.01
104B	-0.22	-0.63	-0.56	-0.21	-0.17	0.32	-0.16	-0.03	-0.07	0.05	0.04
105	-0.02	-0.35	0.17	0.04	-0.05	-0.03	0.03	-0.02	-0.02	0.00	0.00
106	0.55	1.36	-0.42	-0.05	-0.09	0.07	-0.07	0.06	-0.13	-0.02	-0.02
107	-1.30	-0.06	0.12	-0.56	0.23	-0.34	0.13	0.02	-0.07	0.01	-0.01
108	0.16	-0.19	0.67	0.25	0.11	0.13	0.10	-0.01	0.14	0.01	0.01
205	-0.30	-0.10	0.03	-0.02	0.02	0.01	-0.02	-0.02	-0.04	0.00	0.00
207	0.54	-0.93	0.38	-0.02	0.15	-0.07	-0.16	0.03	-0.07	0.00	0.00
208	0.76	-0.30	0.37	-0.23	0.26	-0.05	0.02	-0.19	-0.06	-0.02	-0.03
209	0.08	0.06	-0.25	-0.02	-0.09	0.06	-0.04	-0.01	0.04	-0.02	-0.01
210	0.12	0.12	0.51	0.12	0.28	-0.14	0.07	0.08	-0.07	0.05	0.03
211	-0.33	-0.17	0.49	-0.21	0.04	0.32	0.14	-0.01	0.06	0.02	-0.02
212	-0.42	-0.09	-0.03	0.70	-0.81	-0.14	0.04	-0.02	-0.13	0.01	0.01
214	-0.58	0.36	-0.15	-0.25	0.17	0.13	-0.13	0.01	0.00	-0.01	0.00
215	0.01	0.49	-0.13	0.28	0.09	0.05	0.28	-0.02	0.08	0.02	0.00
216	0.10	0.15	0.11	-0.34	-0.17	-0.04	-0.12	0.04	0.02	-0.02	0.00
109	0.70	-0.70	-0.62	0.46	0.25	-0.07	0.07	-0.03	-0.08	-0.01	-0.02
110	0.52	0.42	-0.38	-0.31	0.05	-0.17	-0.14	-0.03	0.12	0.01	0.02
112	0.11	0.08	0.36	0.01	-0.06	-0.01	-0.03	-0.02	0.00	0.00	0.00
114	-0.37	-0.38	-1.12	-0.38	-0.13	0.02	0.23	0.00	0.02	0.00	-0.02
115	-0.24	-0.11	-0.47	0.31	0.46	-0.09	-0.23	-0.03	0.08	0.01	0.00
117	0.22	0.39	0.20	0.18	-0.29	-0.03	-0.13	-0.12	0.05	0.05	-0.06
118	0.23	0.39	-0.04	-0.07	-0.08	0.00	0.13	-0.29	0.00	-0.04	0.05
119	1.06	-0.25	0.25	-0.47	-0.28	0.05	0.11	0.23	-0.06	-0.01	0.00
121	-0.19	0.52	-0.09	0.50	0.59	0.13	0.06	0.15	-0.09	-0.01	0.00
122	-0.52	0.51	0.64	-0.11	-0.17	-0.01	-0.07	0.01	-0.01	-0.01	0.01

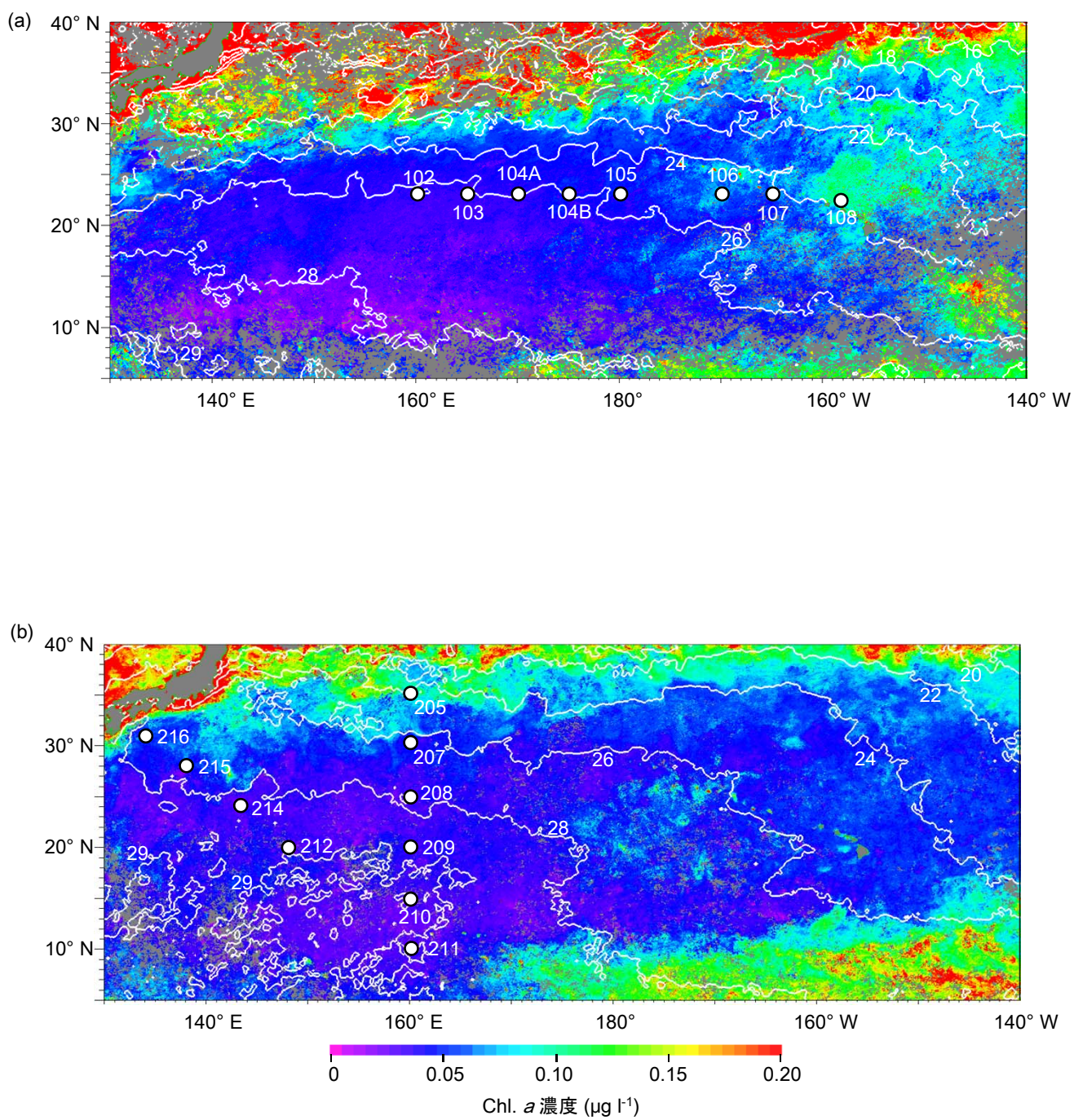


Fig 2.1 (a) KH-11-10次航海レグ1および(b) KH-12-3次航海、(c) KH-11-10次航海レグ2におけるMODIS-Aquaによる表面クロロフィル*a*濃度 ($\mu\text{g l}^{-1}$) および水温 ($^{\circ}\text{C}$) の衛星画像。背景の色がクロロフィル*a* 濃度を、コンターが水温を表す。カラーバーのスケールは (a) および (b) のものと (c) のもので異なる。

(c)

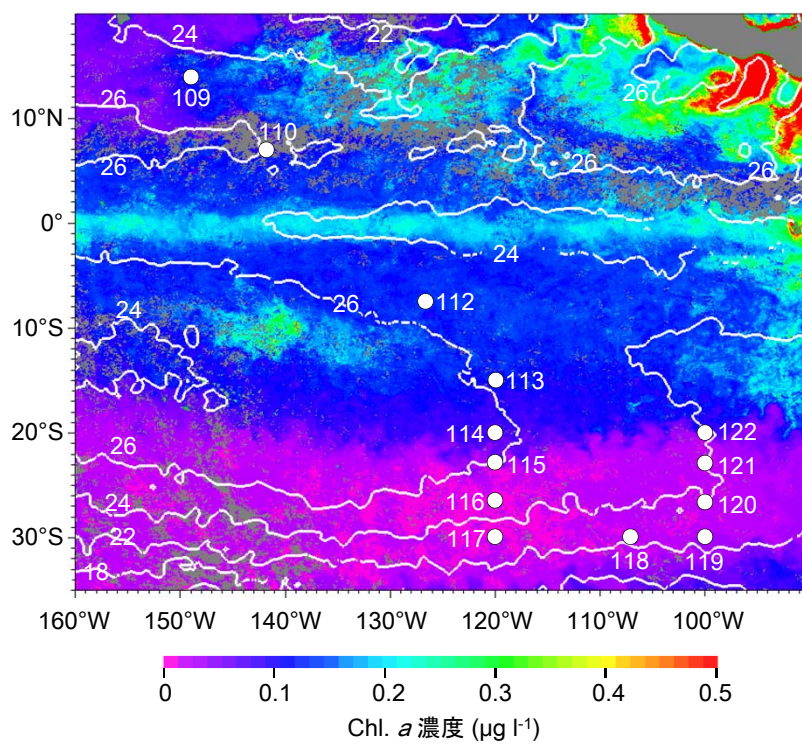
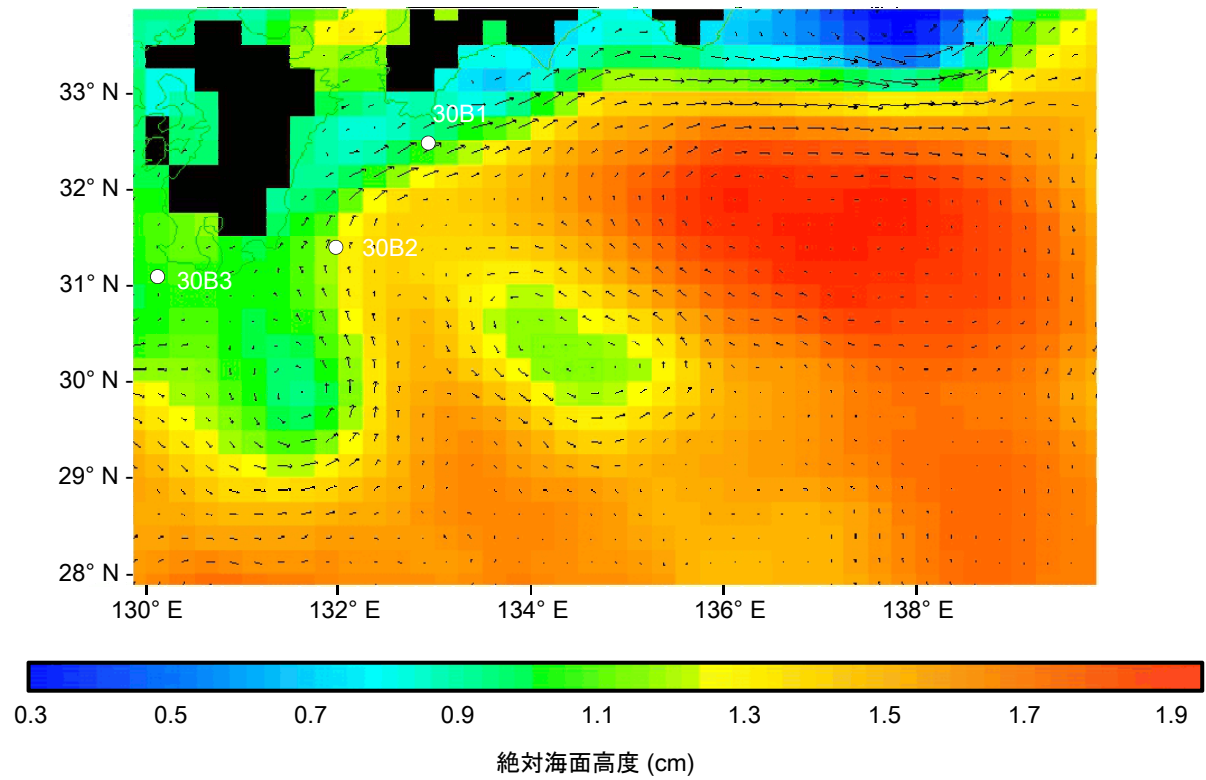


Fig 2.1 続き。

(a)



(b)

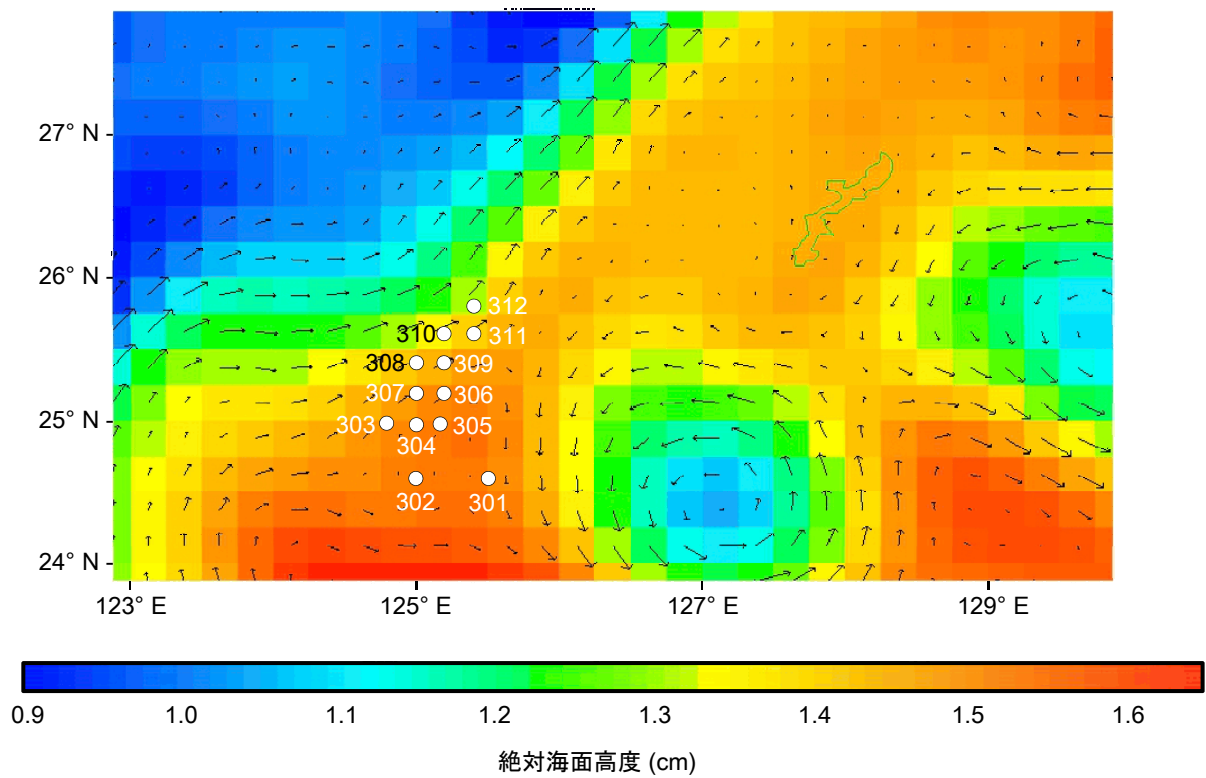


Fig 2.2 KT-11-23次航海の (a) 太平洋測点および (b) 東シナ海測点、(c) KT-11-23次航海の衛星海面高度 (背景カラー) および地衡流 (ベクトル)。

(c)

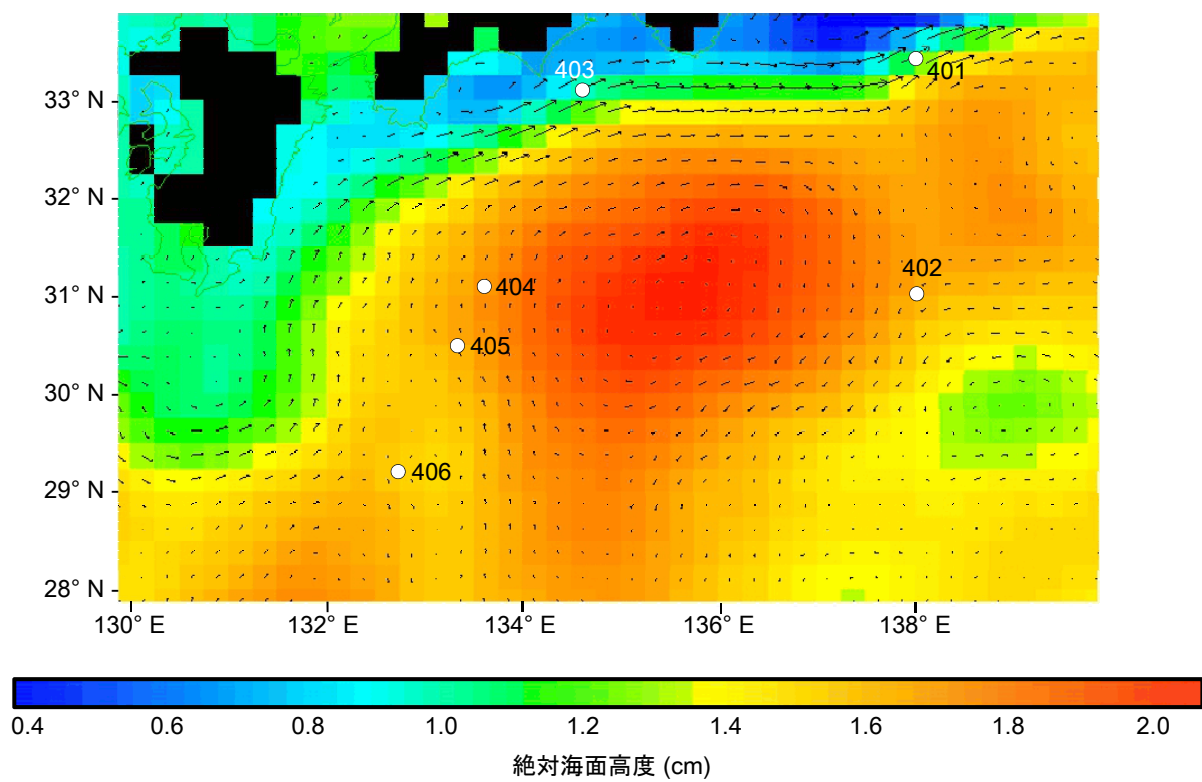


Fig 2.2 続き。

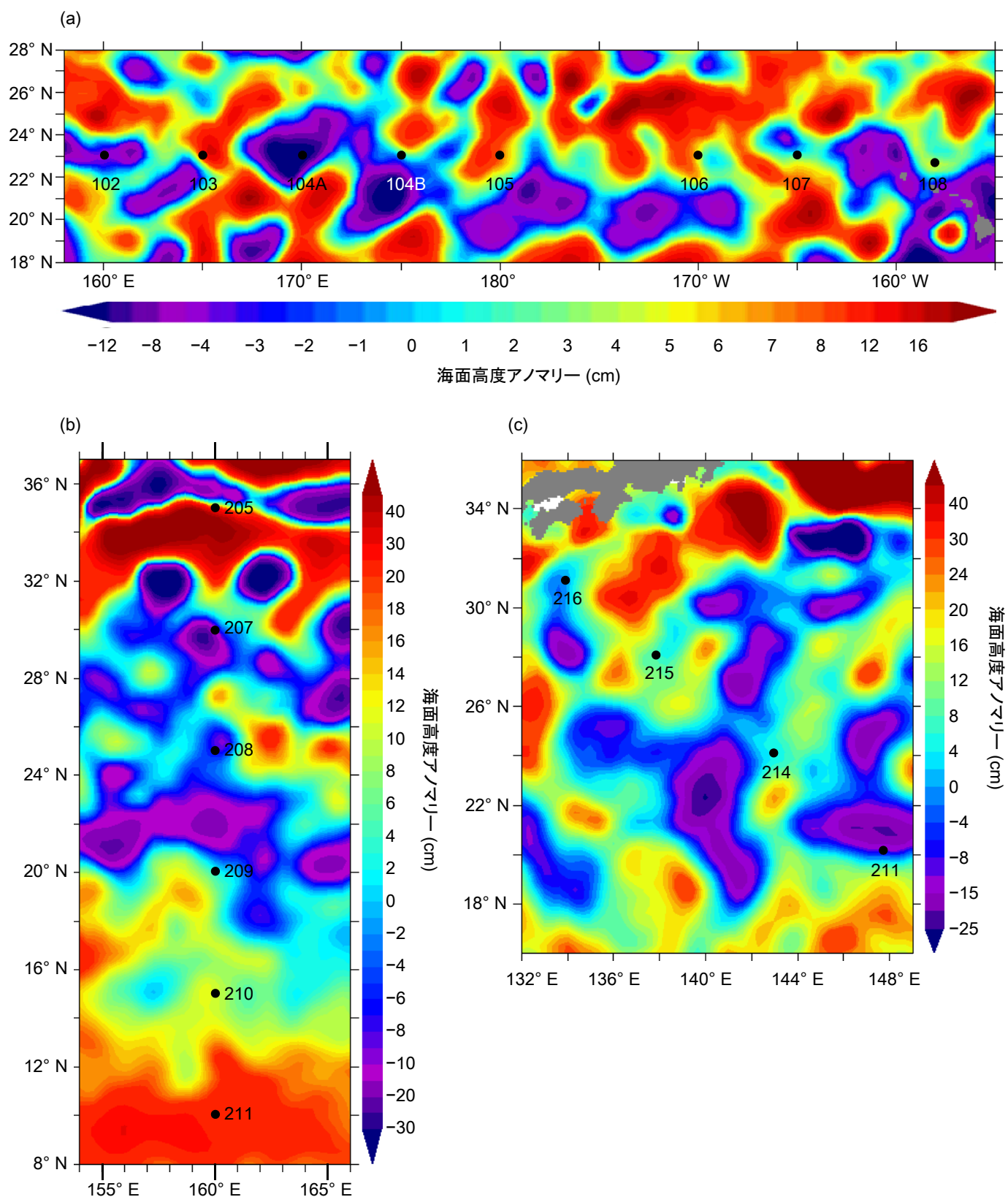


Fig 2.3 (a) KH-11-10次航海レグ1およびKH-12-3次航海 (b) レグ1および (c) レグ2における Ssalto/Duacsによる20年間の平均 (1993-2012年)に対する海面高度偏差 マップ ($1/4^\circ \times 1/4^\circ$ 、メルカトル図法)。データは”merged data”を用い、AVISO ウェブサイト (<http://www.aviso.oceanobs.com>) のLive Access Serverにより描画した。

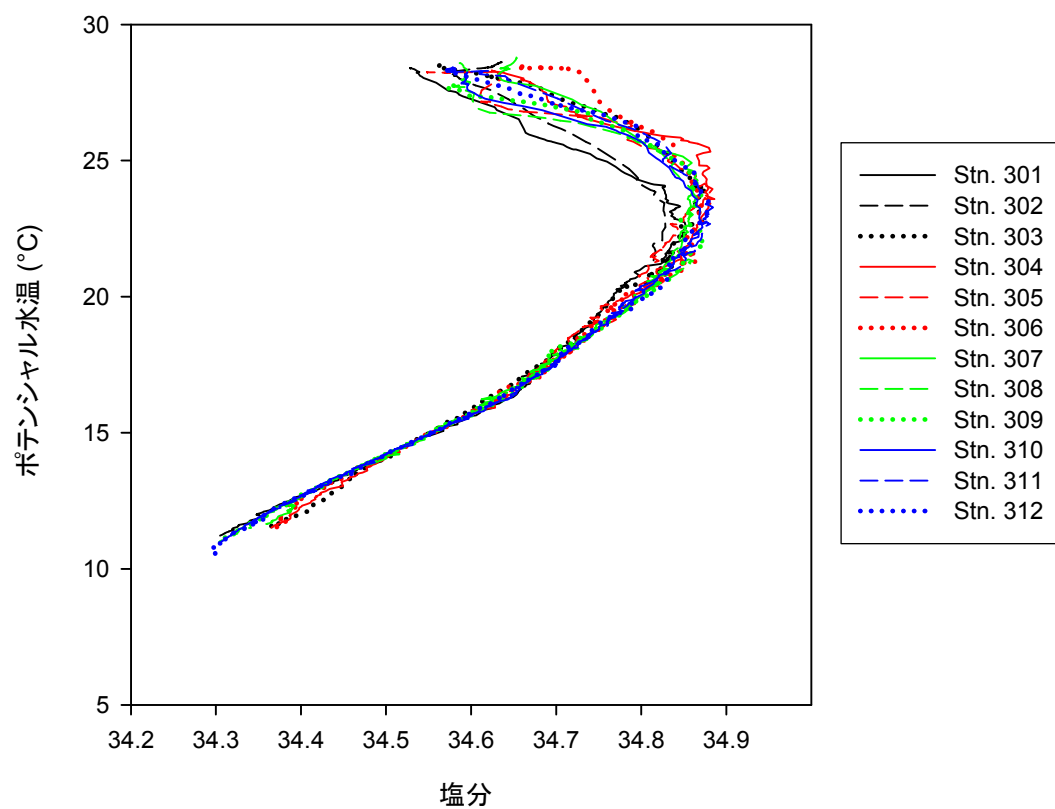


Fig. 2.4 淡青丸KT-11-23次航海の各測点におけるT-Sダイアグラム。

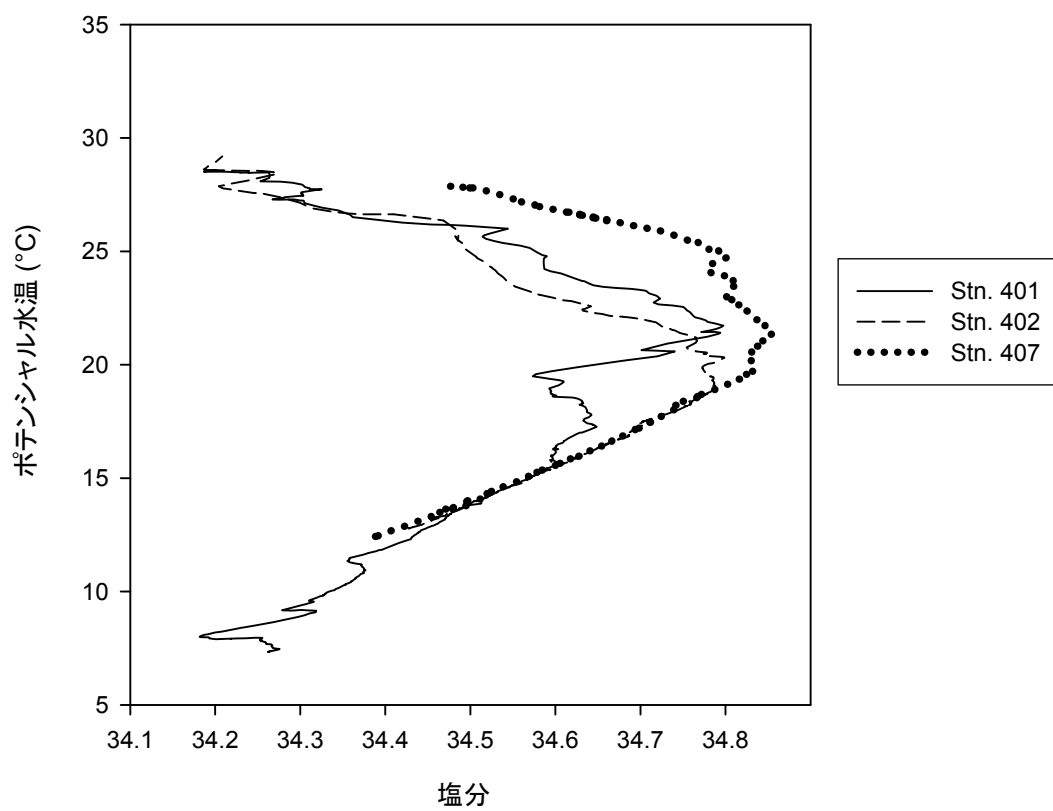


Fig. 2.5 淡青丸KT-12-24次航海の各測点におけるT-Sダイアグラム。

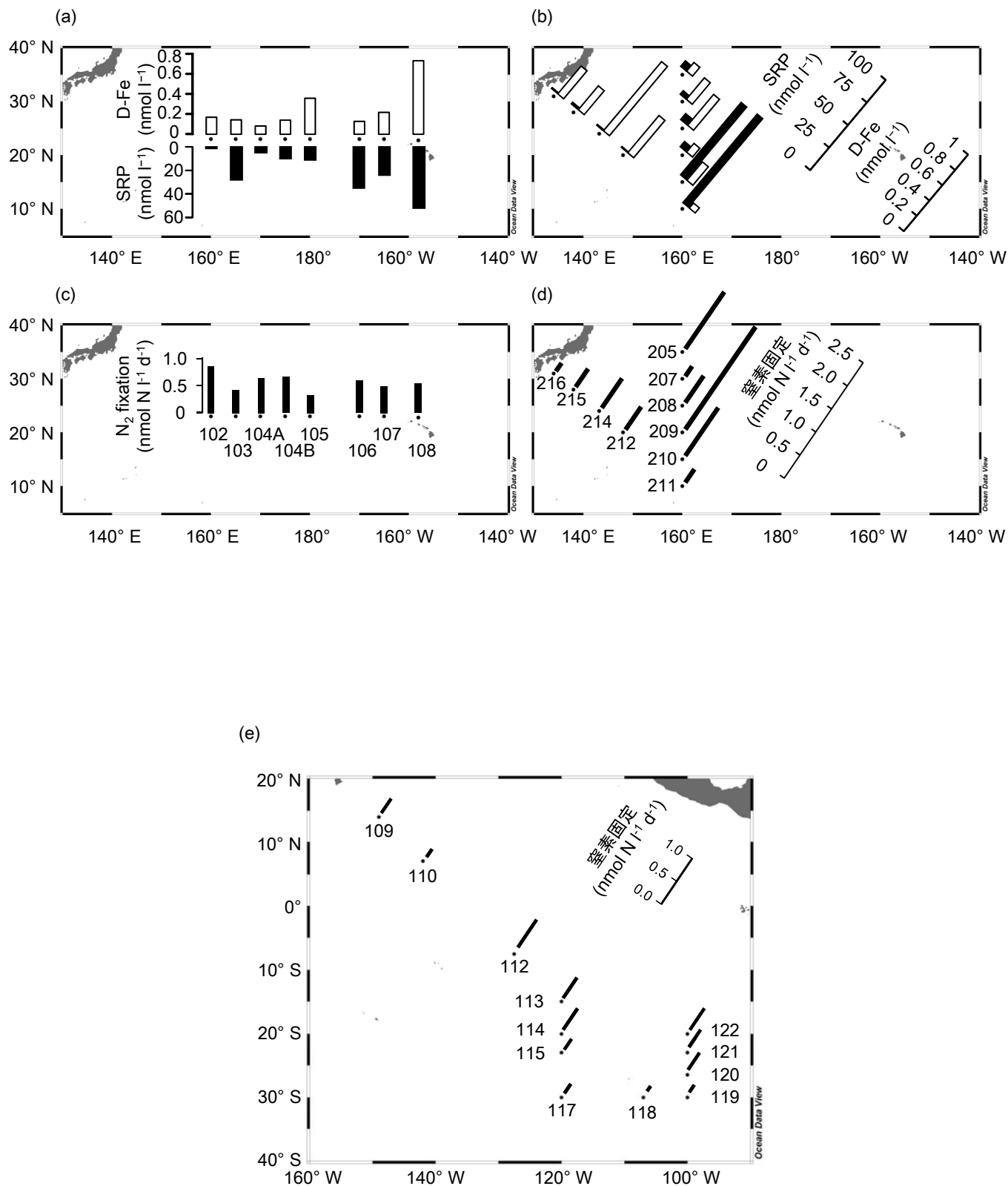


Fig 2.6 (a) KH-11-10次航海レグ1および (b) KH-12-3次航海のSRP (黒) および溶存鉄濃度 (白)、および、 (c) KH-11-10次航海レグ1、 (d) KH-12-3次航海および (e) KH-11-10次航海レグ2の1日当たりの窒素固定活性。

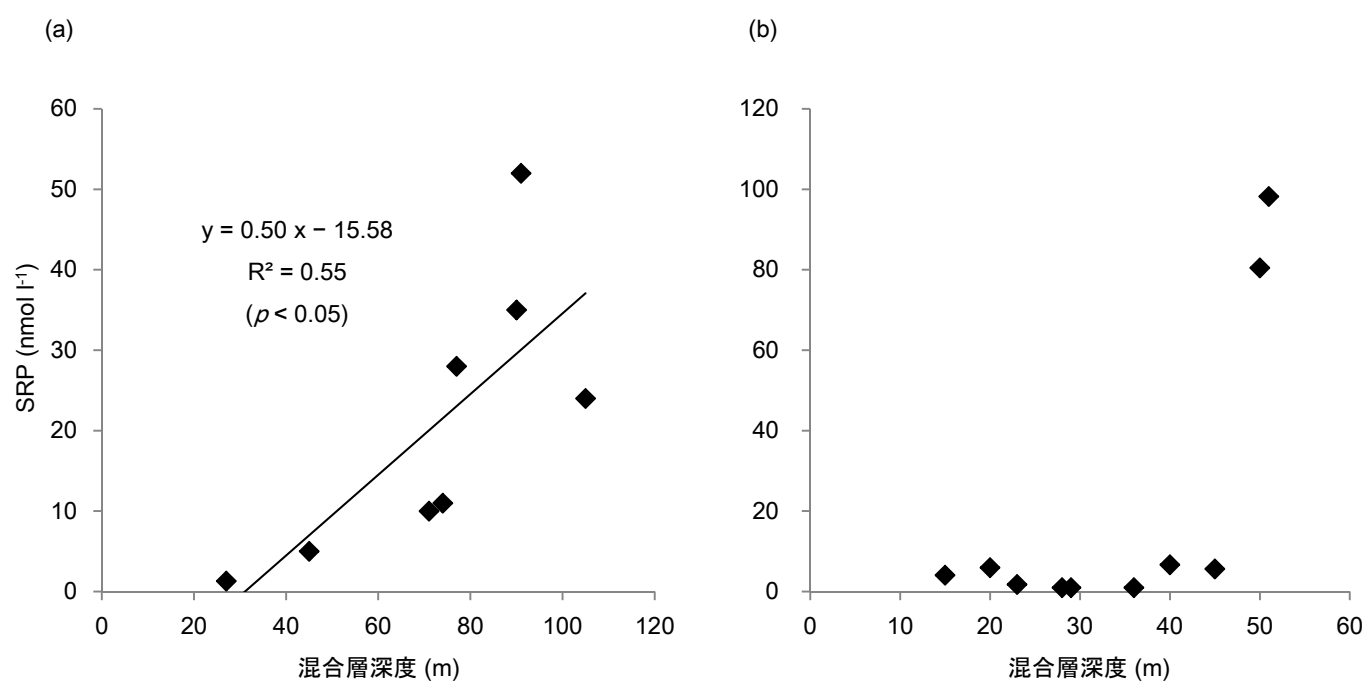


Fig 2.7 (a) KH-11-10次航海レグ1および (b) KH-12-3次航海における50%光量層におけるSRP濃度とMLDの関係。KH-11-10次航海においては有意な正の相関が見られた ($p < 0.05$)。

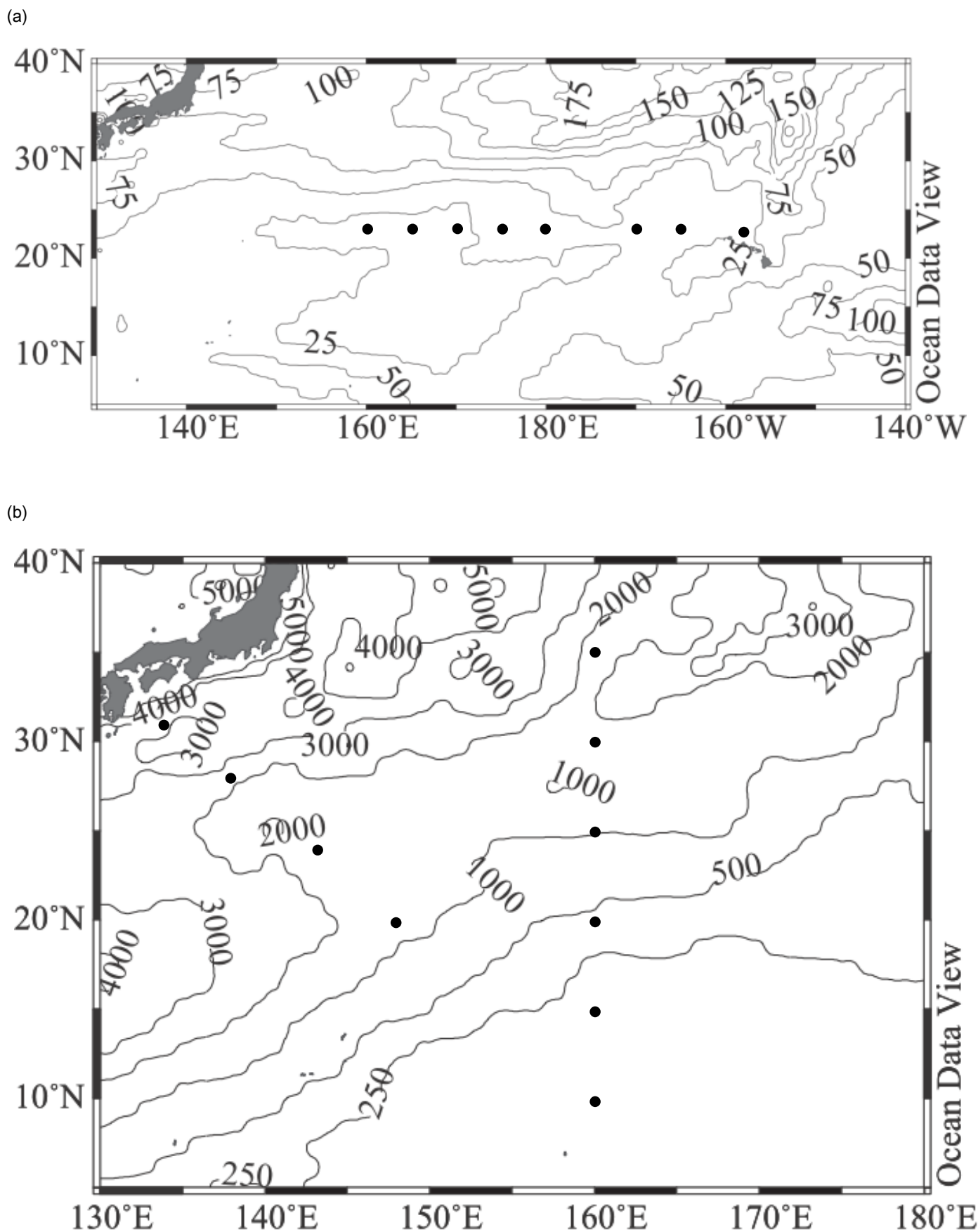


Fig 2.8 (a) 2011年12月および(b) 2012年7-8月の西部北太平洋におけるSPRINTARSによるダスト沈着量見積りの分布。

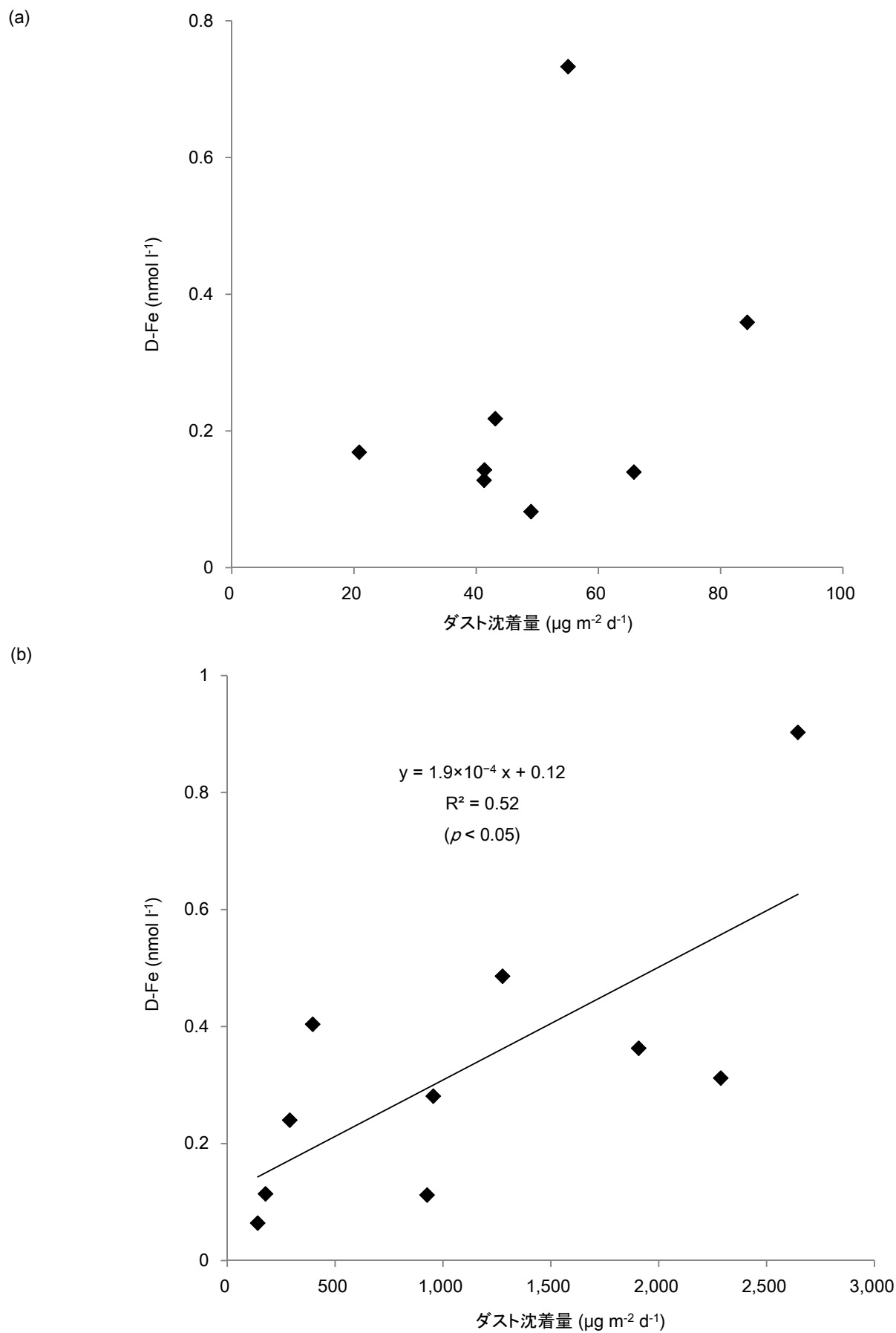


Fig 2.9 (a) KH-11-10 および (b) KH-12-3次航海におけるサンプル前2週間のダスト沈着量見積りの平均と50%光量層における溶存鉄濃度の関係。KH-12-3次航海においては有意な正の相関 ($p < 0.05$) が見られた。

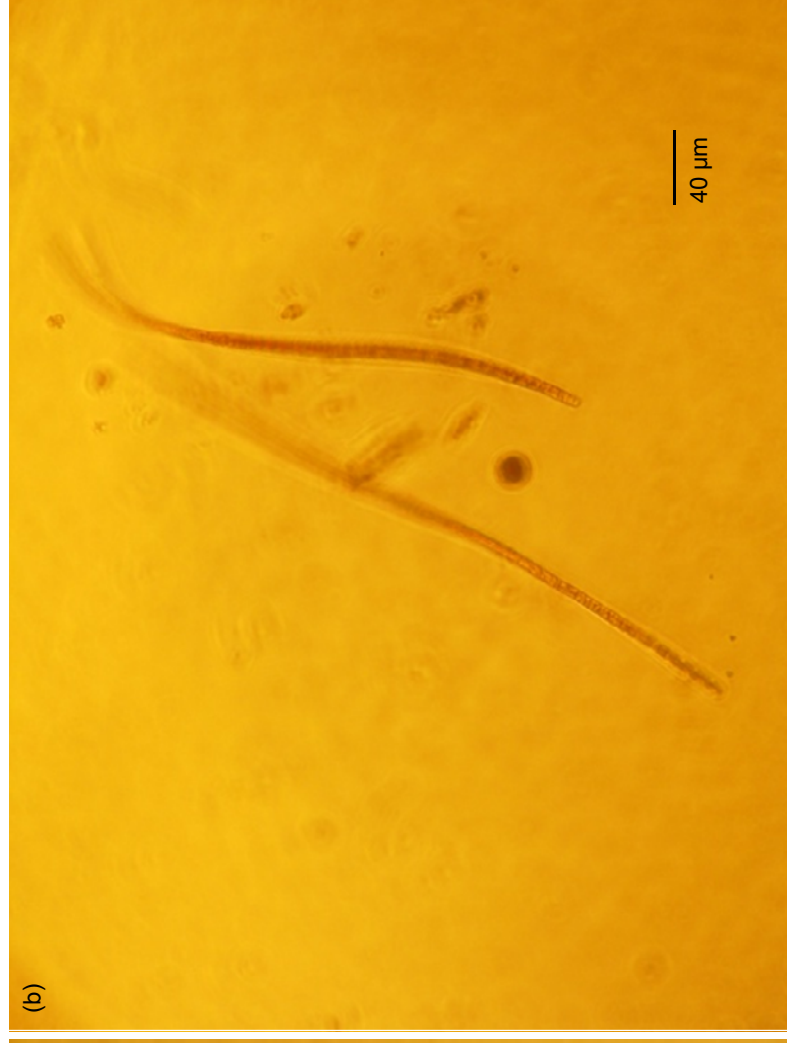
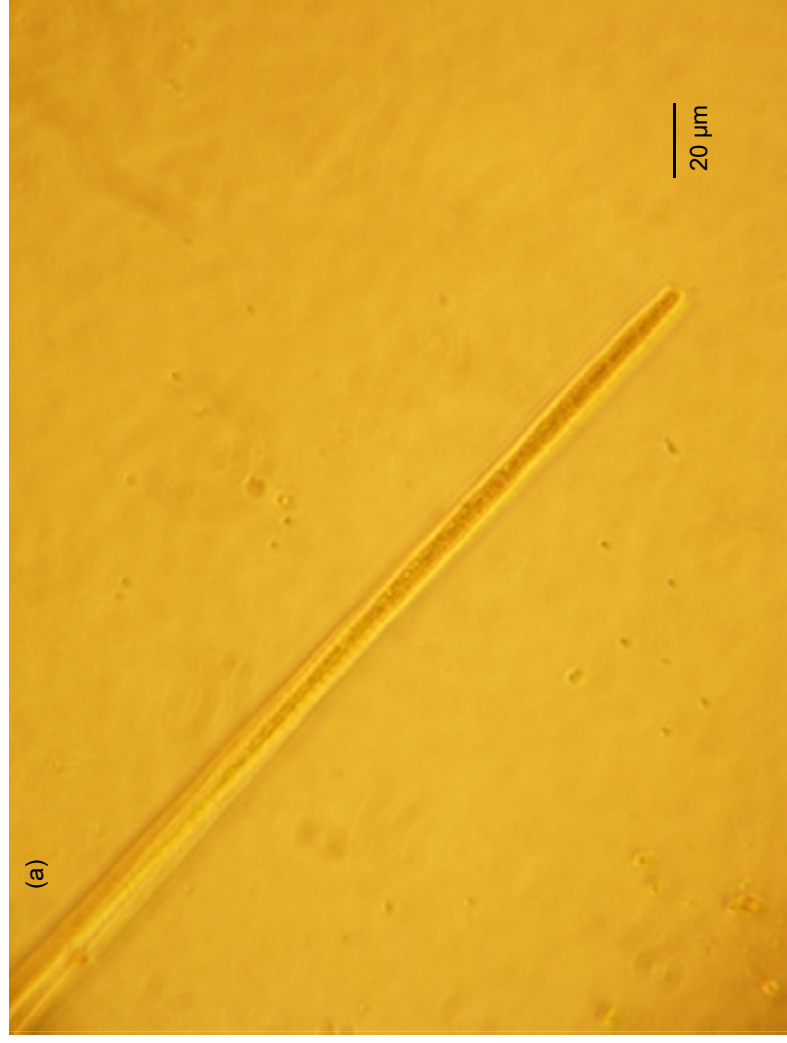
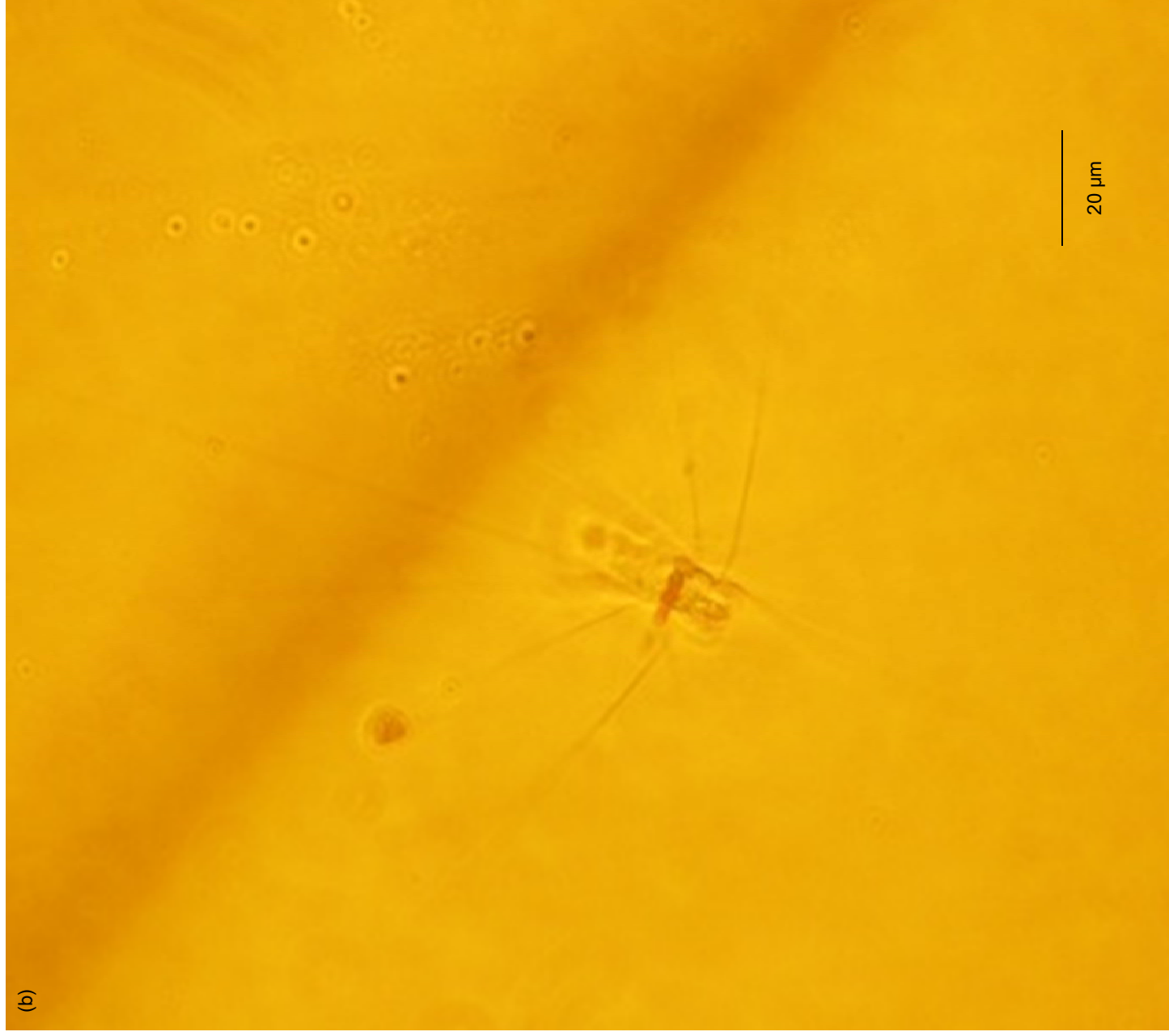
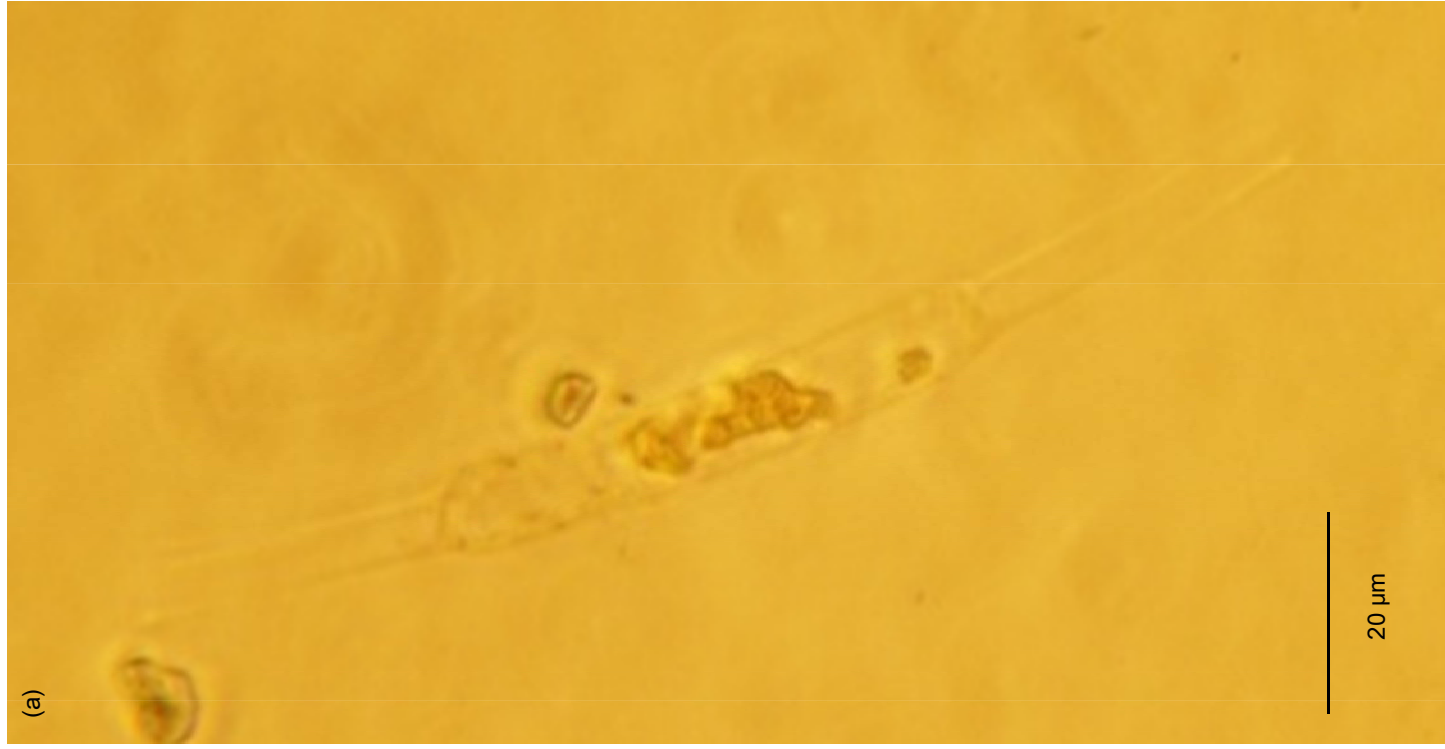


Fig. 2.10 光学顕微鏡により観察した*Trichodesmium* spp. (a-c) の写真。



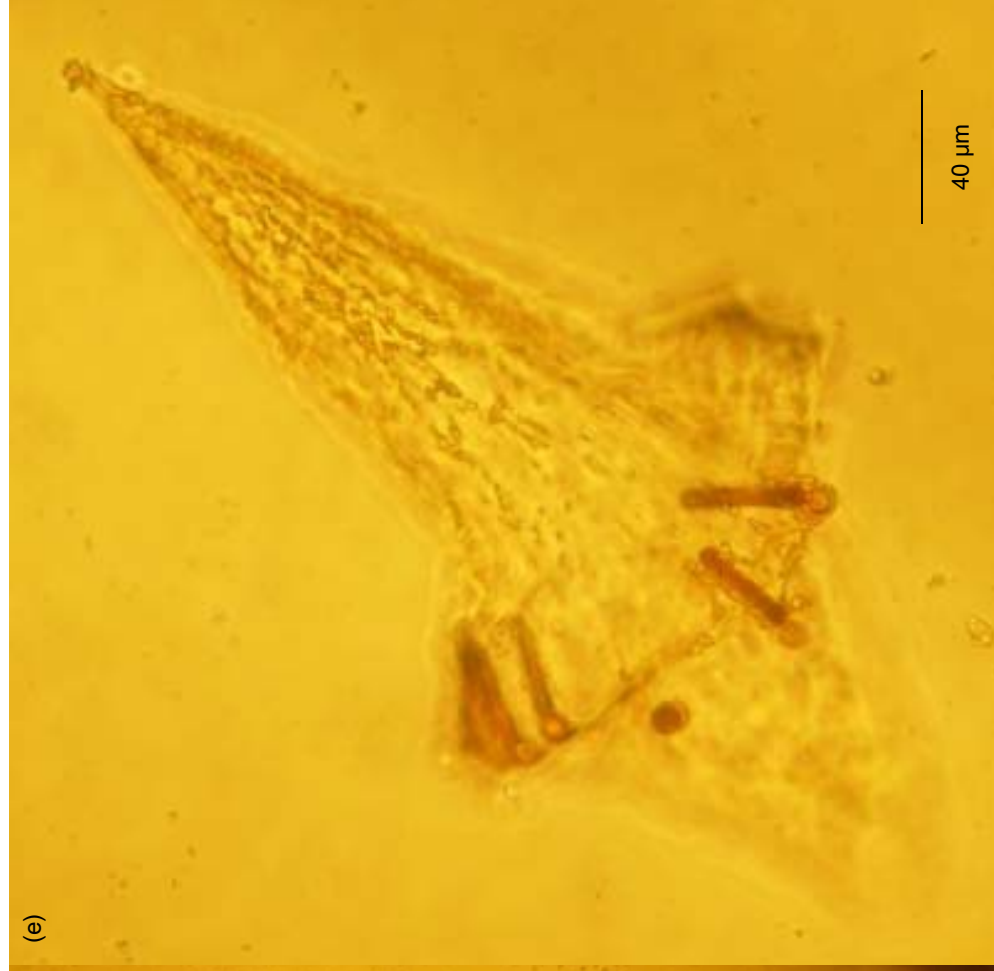
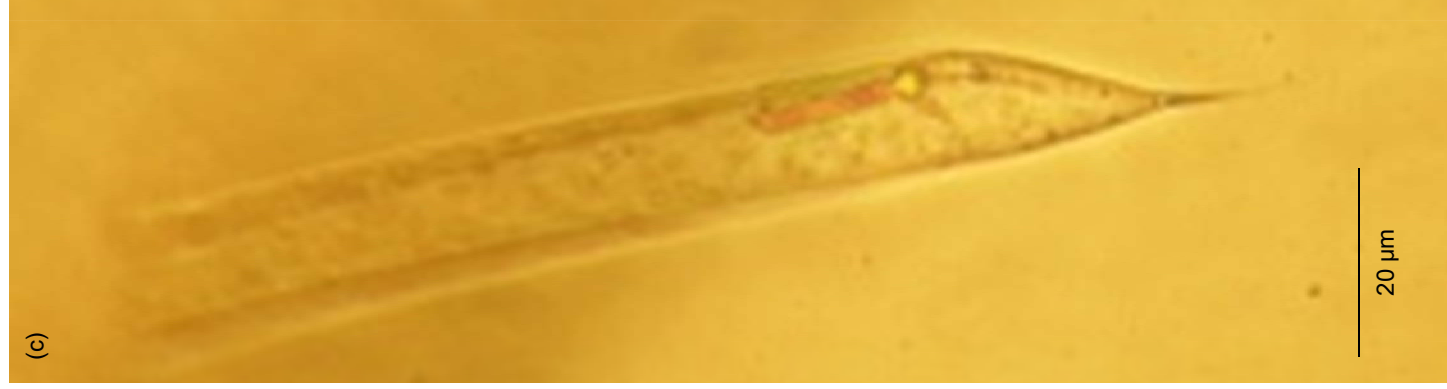


Fig. 2.11 (前ページから) 光学顕微鏡により観察した*R. intracellularis* の写真。宿主は*Hemiaulus* sp. (a)、*Chaetoceros* sp. (b)、*Rhizosolenia* spp. (c、d)、および同定できなかったもの (e)。

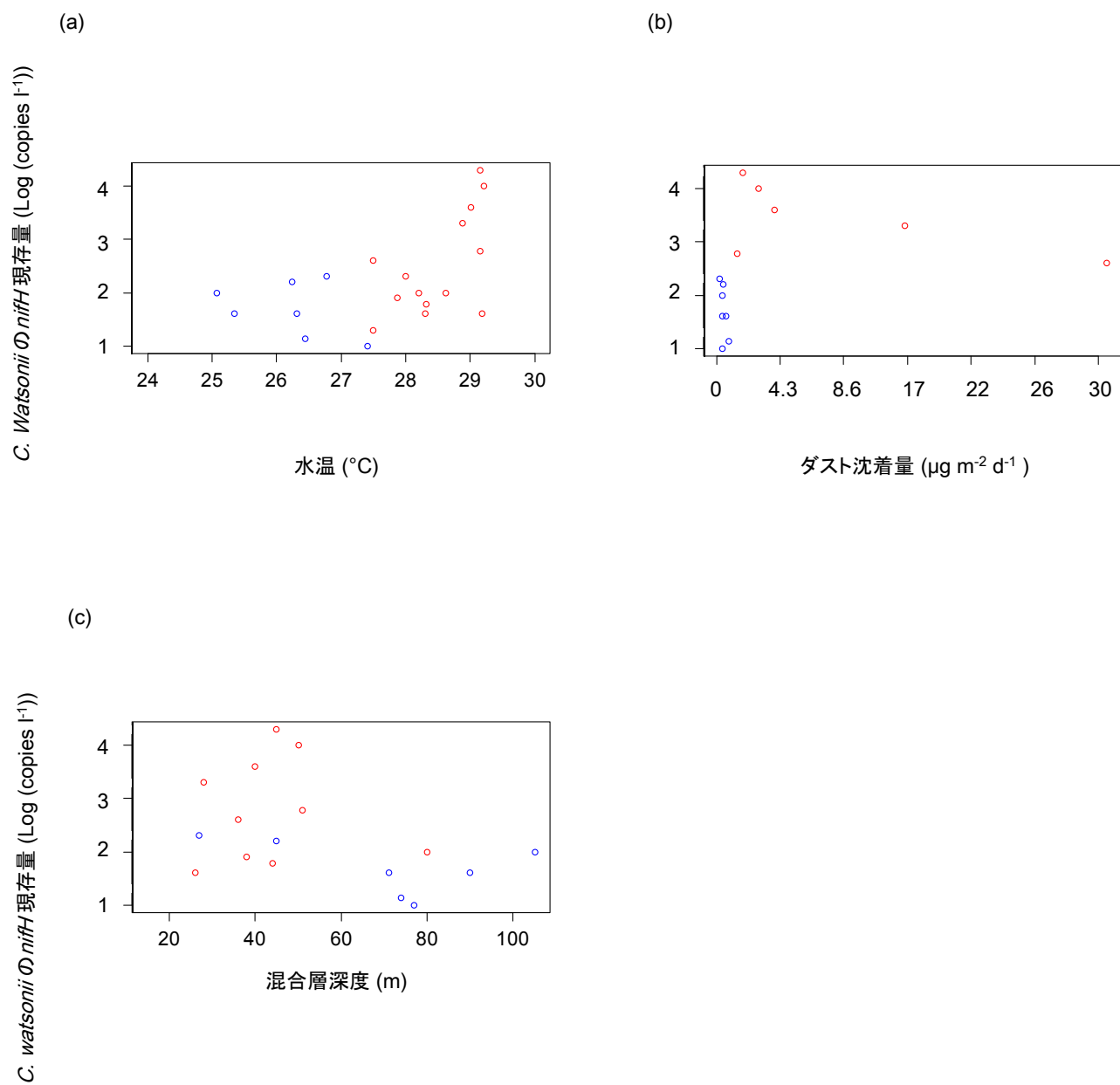


Fig. 2.12 冬季 (青丸、KH-11-10次航海レグ1) および夏季 (赤丸、その他) の *C. watsonii* の *nifH* 現存量と (a) 水温、(b) ダスト沈着量および (c) MLDの関係。

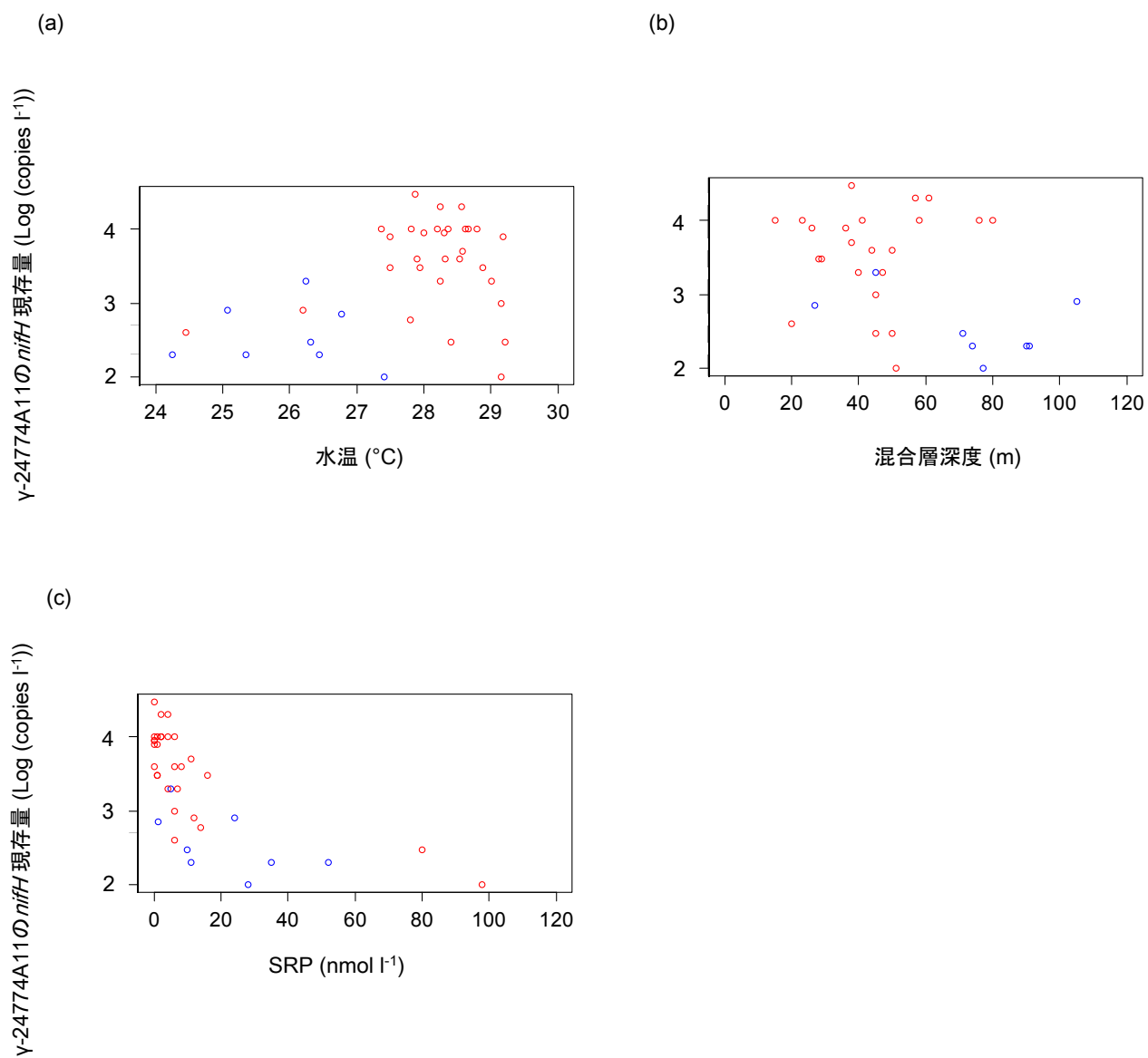


Fig. 2.13 冬季 (青丸、KH-11-10次航海レグ1) および夏季 (赤丸、その他) の γ -24774A11 の *nifH* 現存量と (a) 水温、 (b) MLDおよび (c) SRP濃度との関係。

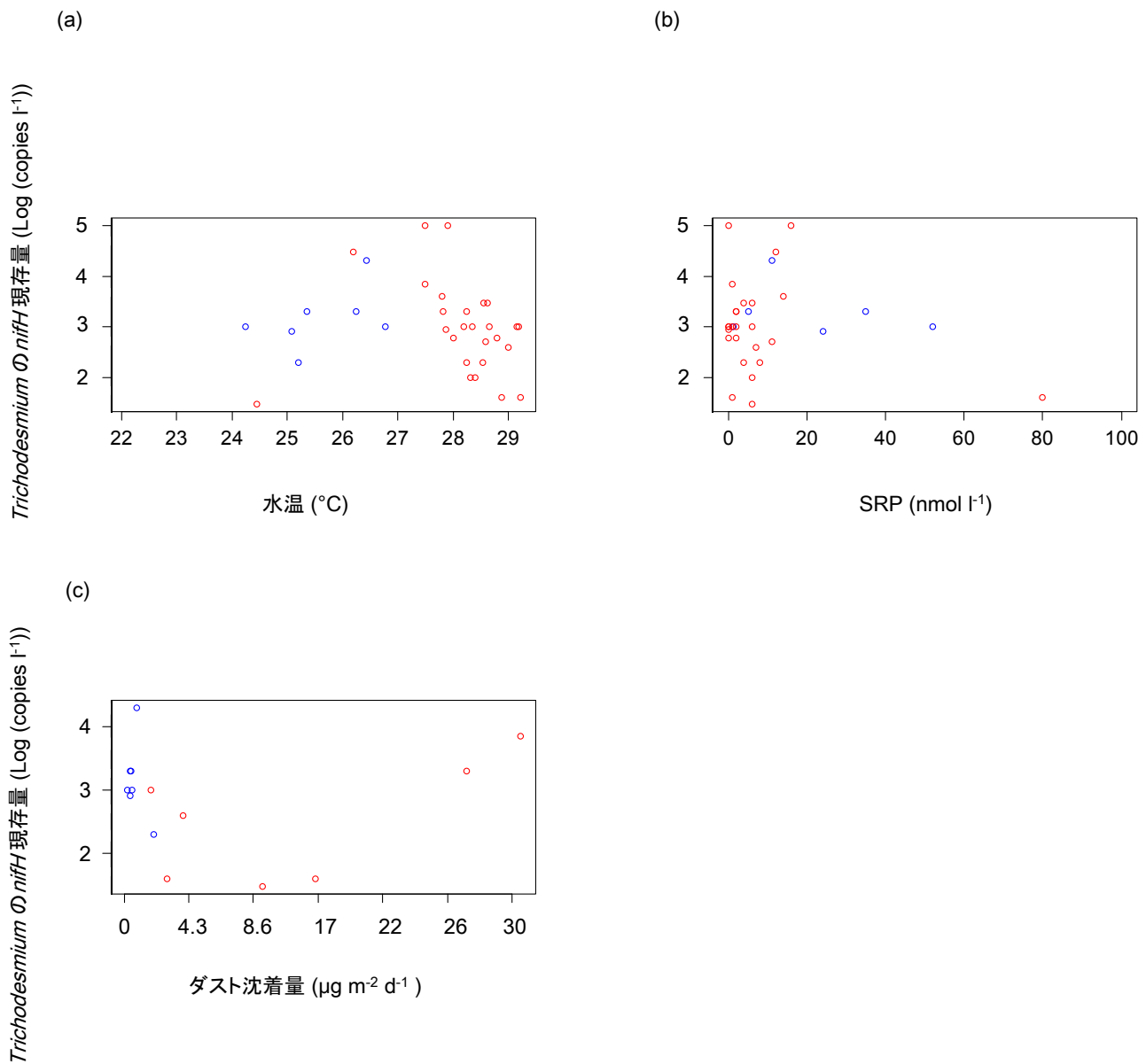


Fig. 2.14 冬季 (青丸、KH-11-10次航海レグ1) および夏季 (赤丸、その他) の*Trichodesmium* の *nifH* 現存量と (a) 水温、(b) SRP濃度、および(c) ダスト沈着量との関係。

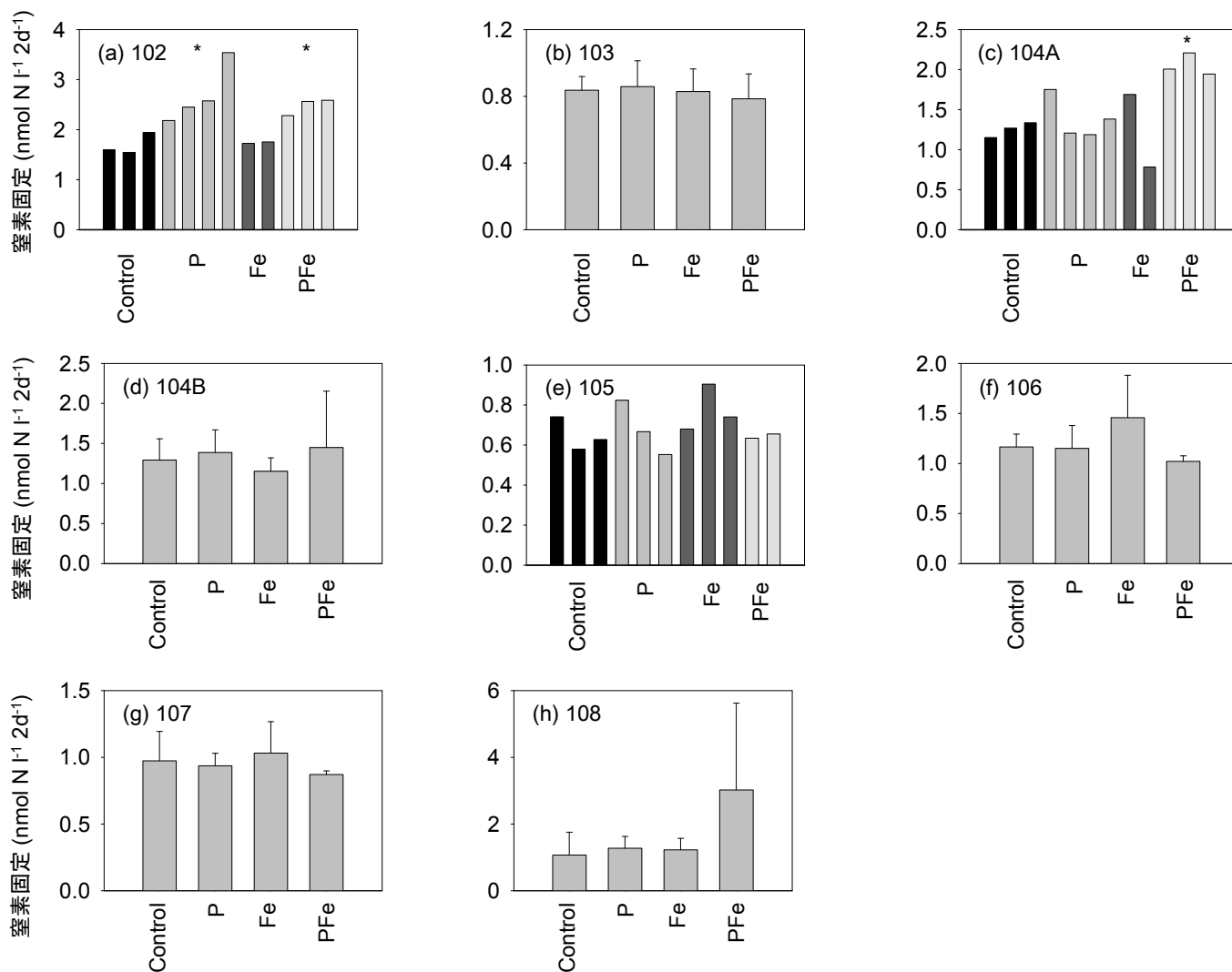


Fig 2.15 KH-11-10次航海レグ1各測点における各添加区の2日間の窒素固定活性。エラーバーは標準偏差を示す。測点 102、104A および 105では、データが3連でそろわなかったためボトルごとの活性を示した。また、アスタリスク (*) はコントロールに対して有意に活性が異なったことを示す (*t*-検定、*p*<0.05)。

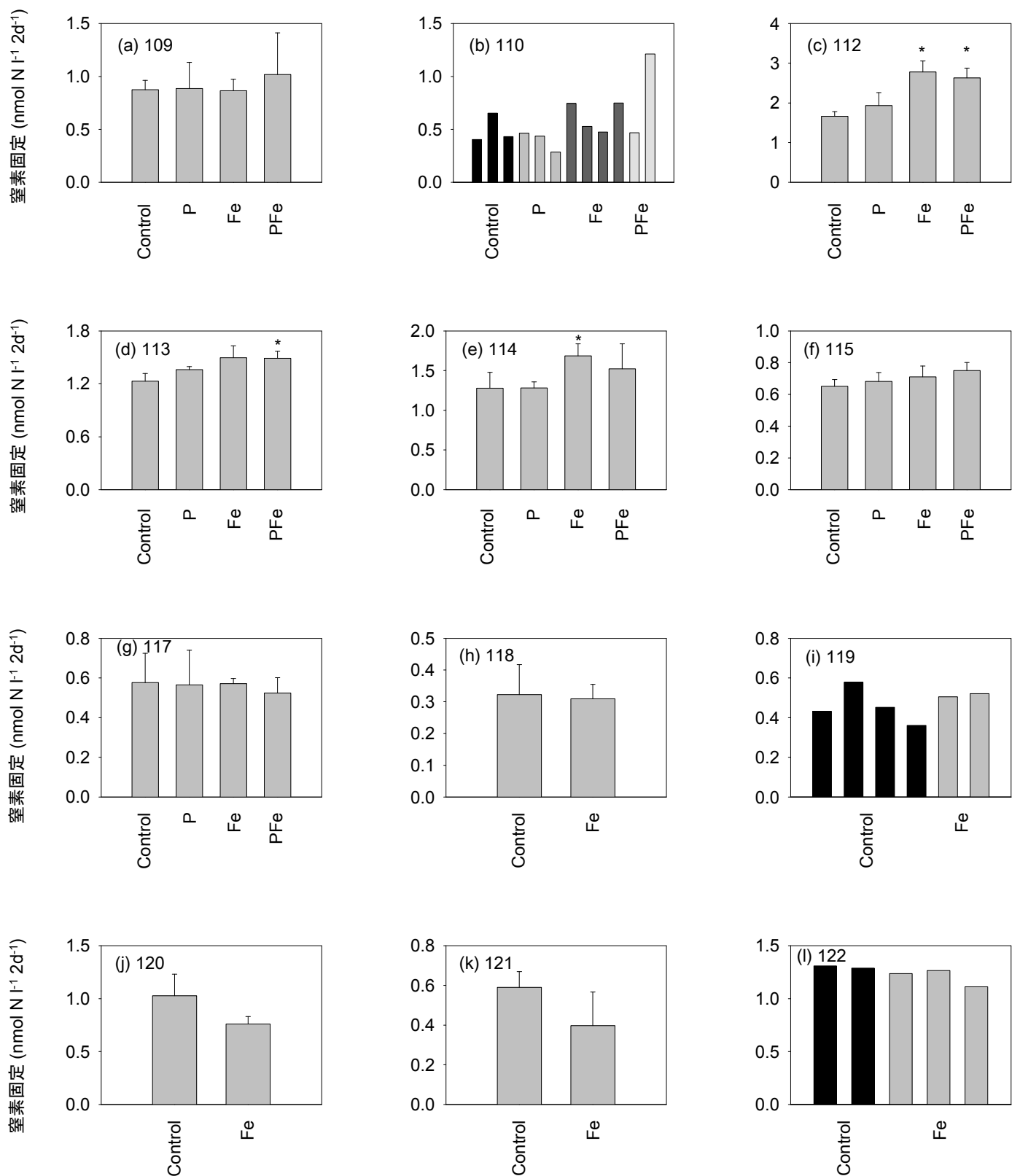


Fig 2.16 KH-11-10次航海レグ2各測点における各添加区の2日間の窒素固定活性。エラーバーは標準偏差を示す。測点 102、104A および 105では、データが3連でそろわなかったためボトルごとの活性を示した。また、アスタリスク (*) はコントロールに対して有意に活性が異なったことを示す (*t*-test, *p* < 0.05)。測点118から122では鉄添加区とコントロールの2系列のみで実験を行った。

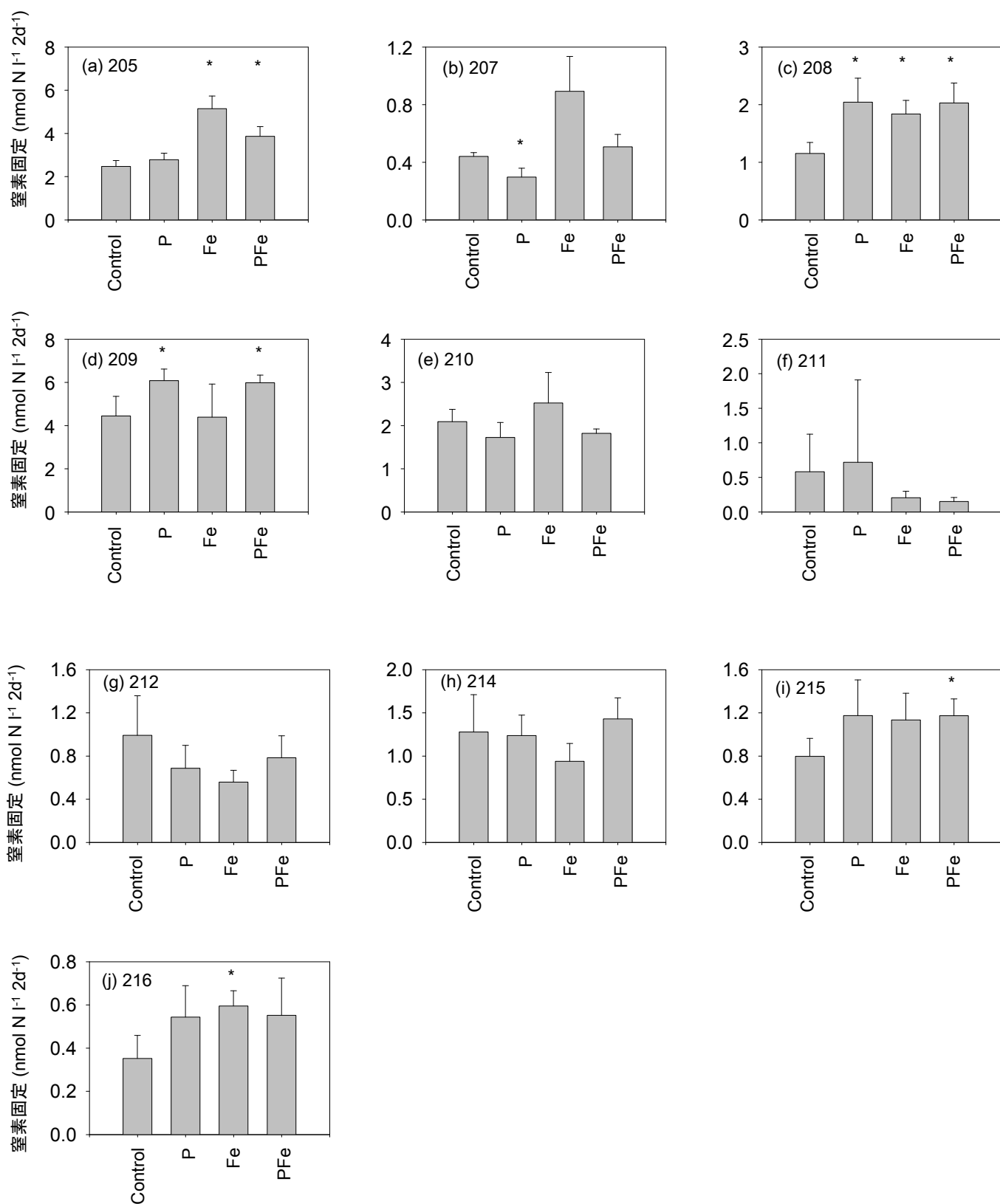


Fig 2.17 KH-12-3次航海各測点における各添加区の2日間の窒素固定活性。エラーバーは標準偏差を示す。また、アスタリスク (*) はコントロールに対して有意に活性が異なったことを示す (*t*-test, *p*<0.05)。

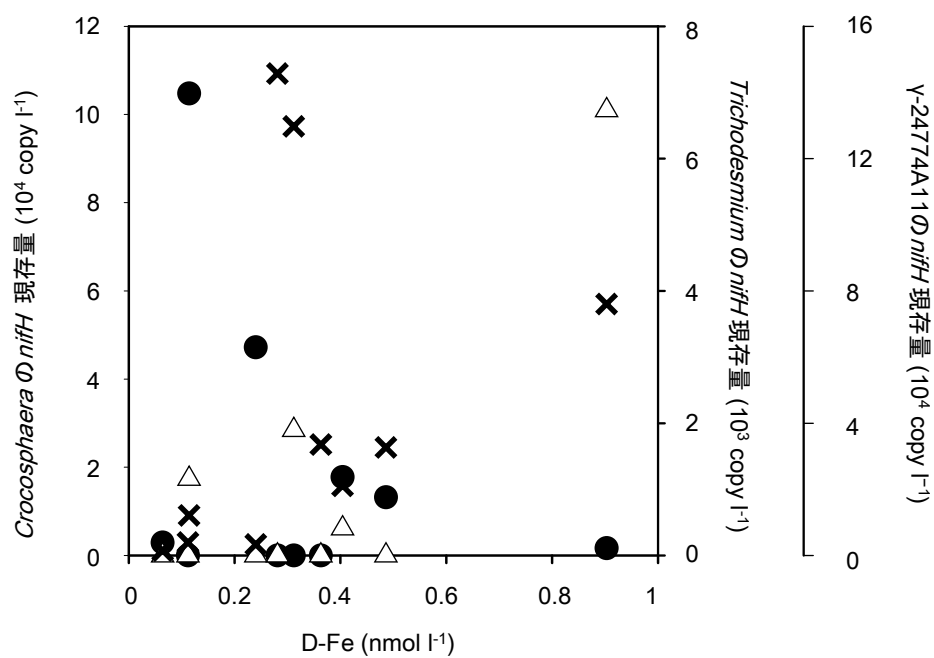


Fig 2.18 KH-12-3次航海における*C. watsonii* (●)、*Trichodesmium* spp. (△) および γ-24774A11 (×) の*nifH* 現存量を溶存鉄濃度に対してプロットした。

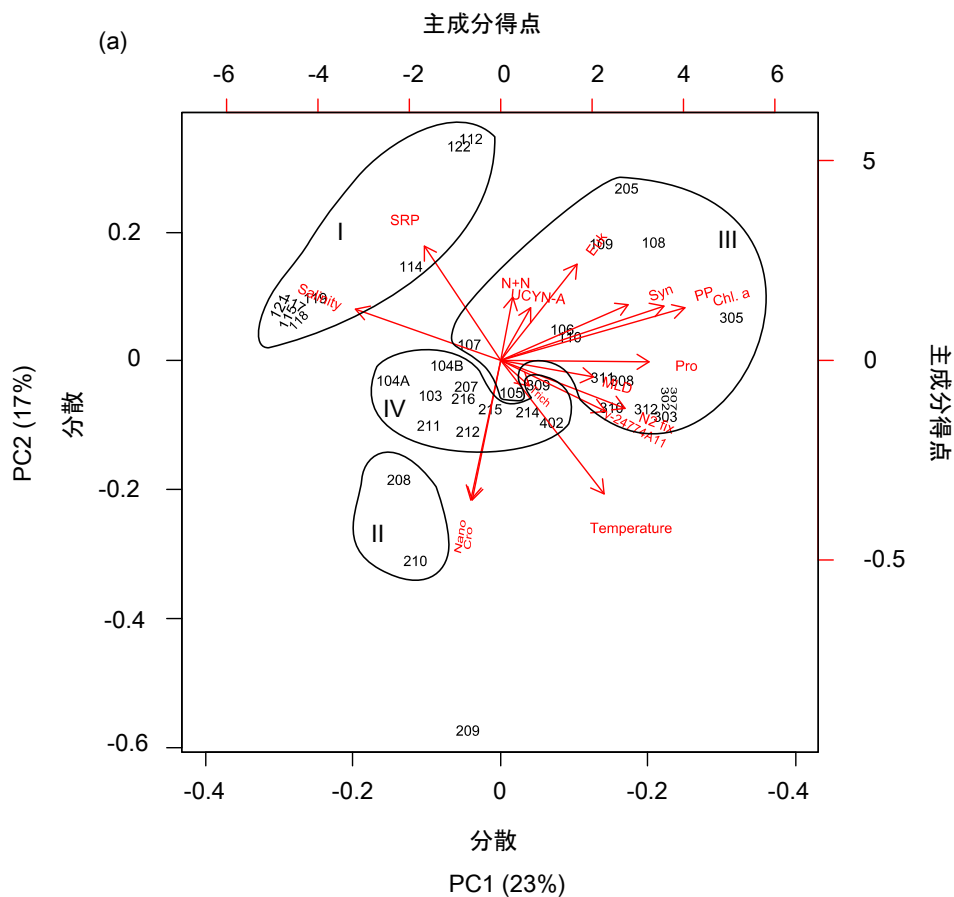


Fig. 2.19 (a)全航海データ (KH-11-10、KH-12-3、KT-11-23、KT-12-24) および (b) 白鳳丸航海データ (KH-11-10、KH-12-3) の全パラメータを用いた主成分分析の結果。および、白鳳丸航海の (c) 全測点および (d) 西部北太平洋測点のデータの環境パラメータ (水温、塩分MLD、SRP濃度および溶存鉄濃度) を用いた分析結果。主成分1 (X軸) および2 (Y軸) に対して各変数の分散 (赤字、変数名および矢印)および各測点データの主成分得点 (黒字、測点番号)をプロットしたもの。なお、本文中で定義していない略称として以下のものを用いた。N2 fix: 窒素固定、Trich: *Trichodesmium nifH*、Euk: 真核植物プランクトン、Syn: *Synechococcus*、Pro: *Prochlorococcus*、Nano: ナノシアノバクテリア、Cro: *C. watsonii*、BC: 黒色炭素、OC: 有機物、PP: 基礎生産。各測点における主成分得点を用いたクラスター解析 (K-means法) の結果に基づき、測点群を線で囲った。(a) および (b) の各クラスターには便宜上、記号を割り振った (全航海データではIおよびII、III、IV; 白鳳丸航海データではI-AおよびI-B、II、III-A、III-B、IV-A、IV-B)。

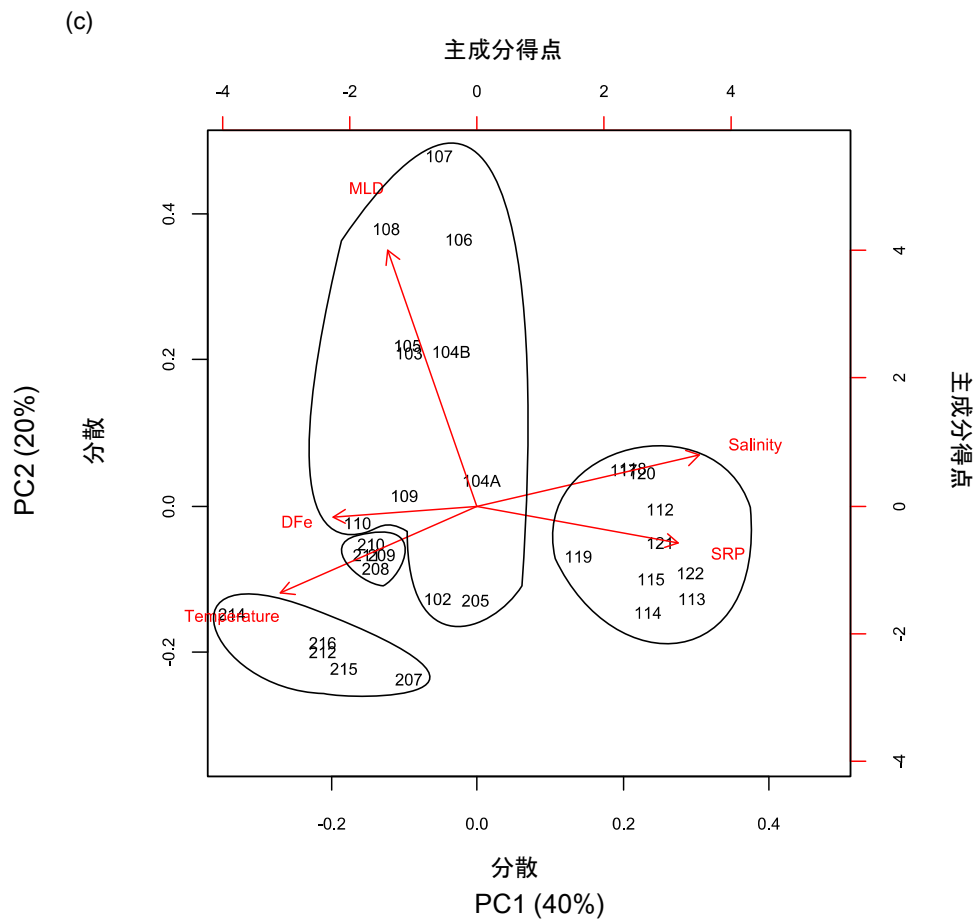
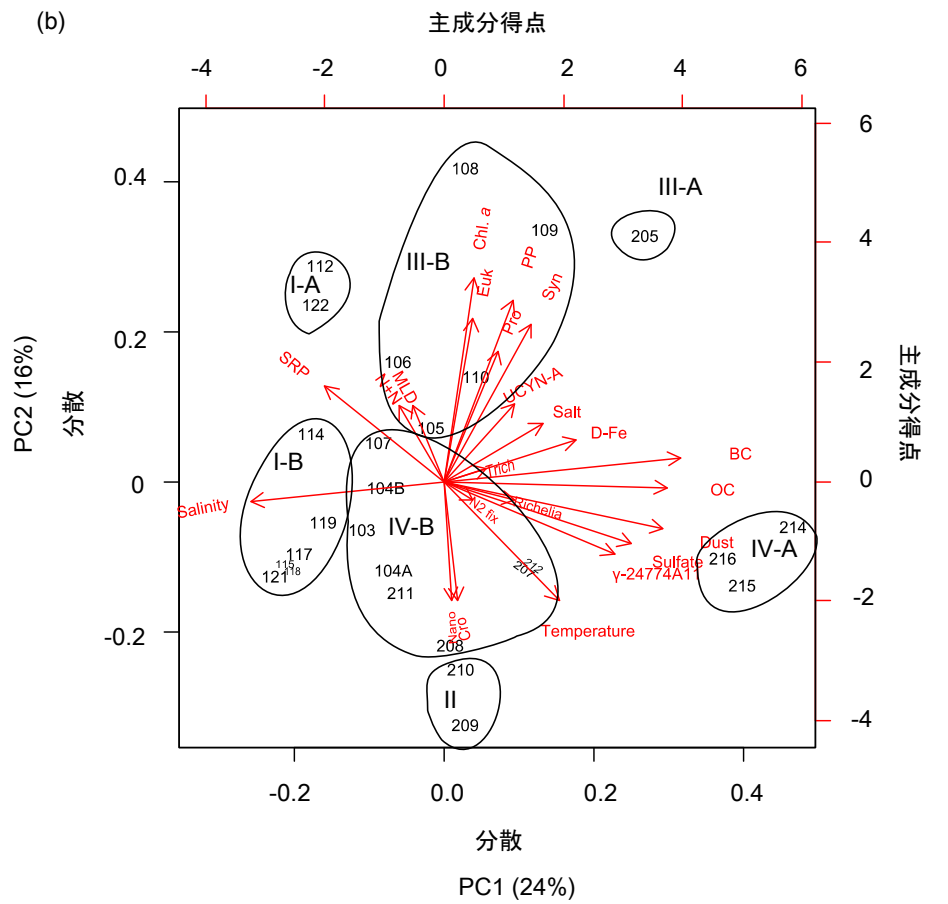


Fig. 2.19 続き。

(d)

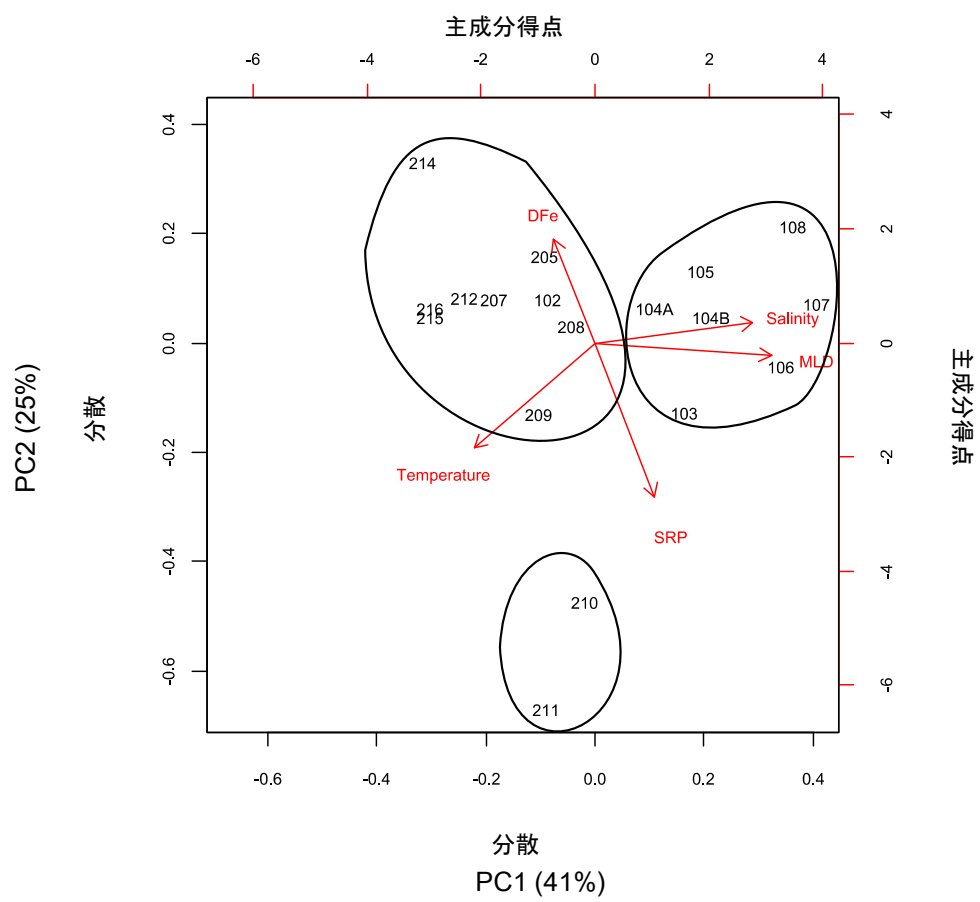


Fig. 2.19 続き。

第三章 銅が窒素固定および植物プランクトン群集に及ぼす影響

3-1 溶存銅サンプルの前処理としての紫外線照射の検討

3-1-1 背景

本研究では Campos and van den Berg (1994) のカソーディックストリッピングボルタメトリー (CSV) 法による銅濃度測定を行ったが、彼らはサンプル海水中の有機物が測定を阻害する可能性を指摘している。これには 2 つのメカニズムが考えられ、まず、有機物が高濃度の場合には水銀電極表面に付着し、測定に用いるキレート剤サリチルアルドキシム (SA) とサンプル中の銅による錯体の電極への吸着を阻害する可能性がある。第二に、強力な銅有機配位子が高濃度で含まれる場合はサンプル中の銅がこれらの配位子と錯形成し、試薬として添加した SA と十分に錯形成しない可能性が考えられる。しかしながら、この測定法において必要なサンプルの紫外線処理の条件についてはデータが報告されておらず、サンプルの採取場所によっても条件が変わると考えられるため、これらについて検討を行った。

3-1-2 方法

3-1-2-1 紫外線照射時間検討実験

サンプリングおよびサンプル処理は微量金属のコンタミネーションを最小限に抑えるために微量金属クリーン技術を用いた。海水は淡青丸航海 KT-08-8 次航海の測点 10 (31° 33' N、133° 13' E、2008 年 5 月 15 日) において表面ポンプ採水により採取し、採水口に接続した孔径 0.2 μm

の Millipak-100 フィルター (Merk-Millipore) により濾過し、500 ml フッ素加工ポリエチレン (FLPE) ボトル (Nalgene) に採取した。サンプルは測定まで -20°C で凍結保存した。

陸上研究室にて 4°C で暗所にて 2 日間置いて完全に解凍後、塩酸 (Tamapure-AA 100, 多摩化学) を添加して pH を 1.8 以下に調整した。サンプルをテフロンカップに入れて石英ガラス皿で蓋をして氷冷しながら紫外線を 0.5、1、1.5、2、3、4 時間照射した (UM-452, 450 W, Ushio)。また、イニシャルとして未照射のサンプルも用意した。紫外線照射後、サンプル中の溶存銅濃度を CSV 法 (Campos and van den Berg, 1994) で測定した。パラメータ設定は Campos and van den Berg (1994) と同じものを用いた。測定結果から、各照射時間のサンプルに対して、標準添加法による検量線の傾きおよび溶存銅濃度を ANOVA ($p<0.05$) による検定で比較した。

3-1-2-2 SAFe reference sample 中の溶存銅濃度測定

SAFe reference sample (S および D2) をカリフォルニア大学サンタクルズ校 K. Bruland 教授および G. J. Smith 氏より提供していただいた。これらのサンプルは紫外線照射を行わずに、CSV 法 (Campos and van den Berg, 1994) による溶存銅濃度測定に供した。3 回繰り返し測定を行い、平均値および標準偏差を求めた。

3-1-3 結果

3-1-3-1 紫外線照射時間と溶存銅の検出濃度の関係

標準添加の傾きおよび溶存銅の検出濃度はともに紫外線照射時間によらず変化しなかった ($p>0.05$) (Fig. 3.1a および b)。最初、銅濃度はイニシャルの電流値および標準添加による検量線の傾きから算出したが、両パラメータのばらつきが加わるため、銅濃度のばらつきは比較的大きくなった。これが原因で有意な変化が検出できなかった可能性があるため、各紫外線照射時間における標準添加の傾きを一定であると考えて、イニシャルの電流値でも検定を行ったが、やはり有意差は見られなかった ($p>0.05$)。

3-1-3-2 SAFe reference sample の測定

本研究による測定結果を平均値 \pm 絶対標準偏差 (相対標準偏差) として示すと、S が 0.50 ± 0.03 nmol l⁻¹ (5.98%)、D2 が 2.35 ± 0.15 nmol l⁻¹ (6.27%) であった (n=3)。海水密度を 1.025 kg l⁻¹ とすると、S および D2 の測定値はそれぞれ、 0.51 ± 0.03 、 2.41 ± 0.15 nmol kg⁻¹ となる。SAFe reference sample のコンセンサス値は S が 0.52 ± 0.05 nmol kg⁻¹、D2 が 2.28 ± 0.15 nmol kg⁻¹ であり (2013 年 5 月報告値; www.geotraces.org)、本研究の測定結果はコンセンサス値の範囲内であった。

3-1-4 考察

紫外線照射実験において、標準添加の傾きがイニシャルから照射 4 時間まで変化しなかった (Fig. 3.1a)。このことは、測定感度を低下させる原因である天然の銅有機配位子や水銀滴表面への有機物吸着の測定への影響が、イニシャルから極めて低かったことを示している。照射時間に

よる検出溶存銅濃度の変化が見られなかったことも同様に解釈できる (Fig. 3.1b)。

SA を人工配位子として用いた CSV 法では、本サンプルの測定において、紫外線照射を行わなくても溶存銅濃度の過小評価にはならなかった。Campos and van den Berg (1994) は沿岸サンプルの一部で紫外線照射が必要であることを指摘しているが、外洋サンプルについては触れられていない。他の測定法とは対照的に、本結果で CSV 法による外洋サンプルが紫外線照射なしでも溶存銅濃度を正確に定量できたことの理由として以下が考えられる。CSV 法では強力な人工配位子を高濃度で添加し、銅と配位子の錯体を測定する。サンプル中では、添加した人工配位子および元々存在する天然配位子と銅との間の平衡により各化学種の濃度が決まると考えられるが、添加した SA は条件安定度定数が比較的高い上、添加濃度も $25 \mu\text{mol l}^{-1}$ と非常に高いため、ほぼ全ての銅が SA と錯形成し、天然配位子の測定への影響が無視できるほどに小さかったと考えられる。

また、西部北太平洋熱帯域および亜熱帯域のいくつかのサンプルでも紫外線を 4 時間照射したサンプルと未照射のサンプルとで一致した値が得られたことから (Table 3.1)、本海域のサンプルについて本測定方法では前処理としての紫外線照射は必要ないと判断された。ただし、第三章二節のデータは一部紫外線照射をおこなったサンプルのデータも含む。

3-2 溶存銅の鉛直分布

3-2-1 背景

銅は植物プランクトンにとって栄養素と毒のいずれとしても作用するが、こうした銅の植物プランクトンに対する作用は銅濃度のナノモルレベルでの時空間的変動により制御されている。したがって、銅が環境中において植物プランクトンの増殖を促進しているのか阻害しているのかを理解するためには、銅濃度の空間的変動を解明することが重要である。銅の空間的変動を理解するうえで、その供給と除去の過程を明らかにすることが重要である。銅の供給過程として、エアロゾルの沈着 (Paytan et al. 2009)、河川流入 (Martin and Whitfield 1983)、沿岸域および陸棚域の海底堆積物 (Westerlund and Öhman 1991)、熱水噴出孔 (Sander and Koschinsky 2005) が挙げられ、除去仮定として、生物による取込み (Kinugasa et al. 2005) および沈降粒子による吸着除去 (Boyle et al. 1977; Bruland 1980) が挙げられる。しかしながら、外洋域における銅濃度の空間的変動についての知見は限られている。

海域ごとの銅の供給過程と除去過程を解明する上で、銅の鉛直分布を調べる必要がある。溶存銅の典型的な鉛直分布は 1970 年代後半から報告されており、栄養塩型と吸着除去型のハイブリッド型であるとされている。銅は栄養塩型の性質を持つため、銅濃度は表層では生物による取り込みにより 0.24 nmol l^{-1} まで低くなり (Bruland 1980; Miller and Bruland 1994; Ezoe et al. 2004)、中深層にかけて有機物分解に伴い再生される (Boyle et al. 1977)。また、海底堆積物からの供給および水柱を通しての粒子による吸着除去も銅の鉛直分布に影響を与える (Boyle et al. 1977)。さらに、エアロゾルの沈着や (Paytan et al. 2009)、表層および中層における水平移流 (Yeats and Campbell 1983) による銅の供給についても報告されている。

西部北太平洋は東アジア由来のエアロゾルの沈着 (Moore and Braucher 2008) およびオホーツク海から西部北太平洋亜寒帯循環の中層水の水平移流 (Nishioka et al. 2007) により多量の鉄が供給される海域である。これらの過程により鉄と同時に銅も供給される可能性があるが、この海域における銅濃度の海域的変動についての知見は限られている (Fujishima et al. 2001; Ezoe et al. 2004; Takano et al. 2014)。いくつかの珪藻類においては、鉄欠乏条件で鉄の代替として銅が利用されることから (Peers and Price 2006)、こうした鉄制限の HNLC 海域において銅が植物プランクトンにとって重要な元素であることが示唆される。本研究では、西部北太平洋の亜寒帯域と熱帯域で溶存銅濃度が異なることを観測したため、これについて報告するとともに、銅の供給および除去過程について議論した。

3-2-2 方法

3-2-2-1 サンプルリング

サンプルリングは白鳳丸 KH-08-2 次航海において西部北太平洋の亜寒帯域の測点 5 (47° 00' N、160° 07' E、5248 m、2008 年 8 月) および熱帯域の測点 22 (11° 30' N、155° 00' E、5795 m、2008 年 9 月) において行った。事前に酸洗浄したテフロンコートニスキン-X 型採水器により 5–5000 m より海水を採取した。溶存銅濃度測定用の海水サンプルは採水器のテフロンスピゴットに接続した孔径 0.22 μm の Millipak 100 フィルター (Merck-Millipore) により重力濾過し、125 ml 低密度ポリエチレン (LDPE) ボトル (Nalgene) に採取した。溶存銅サンプル用のボトルは Kondo et al.

(2012) の方法で事前に酸洗浄したものを用いた。サンプリング後、海水サンプルは高純度塩酸 (Tamapure-AA 100、多摩化学) を添加して pH を 1.7 に調整した。

3-2-2-2 水塊、クロロフィル、栄養塩

水温および塩分、溶存酸素 (DO)、蛍光はロゼットに取り付けたセンサー (Sea-bird Electronics) により測定した。MLD は σ_t が 10 m における値から 0.125 上昇した深度と定義した (Suga et al. 2004)。Brunt-Väisälä 振動数の鉛直分布は水温および塩分から Millard et al. (1990) にしたがって計算した。見かけの酸素消費量 (AOU) は飽和酸素濃度からセンサーで測定した現場の溶存酸素濃度を差し引いて計算した (Weiss 1970)。クロロフィル *a* 濃度測定用のサンプルは、海水 113–300 ml を 25 mm のガラス繊維濾紙 (GF/F、Whatman) に濾過し、5 ml の *N'*、*N'* ジメチルホルムアミドで一晩以上抽出後、10-AU 蛍光光度計 (Turner Designs) により船上で測定した。栄養塩用の海水サンプルは−20 °C で凍結保存して持ち帰り、陸上研究室にてオートアナライザー (AACS III、Bran+Luebbe) で硝酸塩およびリン酸塩、ケイ酸濃度を測定した。航走中の表面塩分は船底 (5 m) よりポンプでくみ上げた海水をモニター (ACT-20、Alec Electronics) した。航走中の表面塩分値はこの航海のレグ 1 の各測点で海表面からバケツ採水で採取したサンプルの塩分測定値を用いて校正した。

3-2-2-3 溶存銅測定用試薬

サリチルアルドキシム (SA) (Sigma) を 0.1 mol l^{-1} 塩酸 (Tamapure-AA 100、多摩化学) に終濃度 10 mmol l^{-1} で加え、 $4-6^{\circ}\text{C}$ で数日間放置して完全に溶解させたものをストック溶液とした。

後述の追加測定時には SA を Milli-Q 水に終濃度 100 mmol l^{-1} で溶解させたものをストック溶液とし、保存中に SA が析出した場合は電子レンジで温めて完全に溶解させた後、Milli-Q 水で終濃度 10 mmol l^{-1} に希釈してから使用した。ホウ酸 (suprapure、Merck-Millipore) を 0.35 mol l^{-1} アンモニア水 (Tamapure-AA 100、多摩化学) に終濃度 1 mol l^{-1} で溶解させ、pH 緩衝液とした。後述の紫外線照射処理を行わなかった追加測定時には MnO_2 法 (Grasshoff et al. 1999) により 2 回精製したホウ酸バッファーを使用した。3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]-プロパンスルホン酸 (EPPS) (Sigma-Aldrich) を 1 mol l^{-1} アンモニア水 (Tamapure-AA 100、多摩化学) に終濃度 1.2 mol l^{-1} で溶解させた pH 緩衝液も作成した。銅標準液は銅標準液 (Cu: 1000 mg l^{-1} 、JCSS、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ in $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ 、和光純薬工業) を $0.05-0.1 \text{ mol l}^{-1}$ の塩酸 (Tamapure-AA 100、多摩化学) で順次希釈して作成した。

3-2-2-4 溶存銅濃度測定

溶存銅濃度は SA を用いて CSV 法により測定した (Campos and van den Berg 1994)。溶存銅濃度はサンプル採取から 16 ヶ月保存したものをを用いた。1 回目の測定では紫外線照射を行ったが、追加測定時には行わなかった。1 回目の測定時の手順は以下のとおりである。測定を妨害する可能性のあるサンプル中の有機物を分解するため、12 ml のサンプルを石英管に入れて、705 UV

digester (150 W、Metrohm) を用いて 80–90 °C で 4 時間紫外線照射を行った。紫外線照射後、サンプル 10 ml をホウ酸緩衝液 100 μ l およびアンモニア水 (Tamapure-AA 100、多摩化学) により pH を 8.3–8.4 に調整し、SA を終濃度 25 μ mol l⁻¹ となるように加えた。サンプルを入れたペルフルオロアルコキシ (PFA) 製測定セル (Metrohm) を 757 あるいは 797 VA Computrace (Metrohm) にセットし、Campos and van den Berg (1994) の方法で測定した。ただし、測定条件は以下のように微調整した。析出電位は -1.06 V、走査範囲は -0.11 V から -0.56 V とした。溶存銅濃度は標準添加法によって決定し、Milli-Q 水中の銅濃度の繰り返し測定値の標準偏差の 3 倍で定義した検出限界は 0.05 nmol l⁻¹ であった。また、標準海水 (NASS-5、National Research Council Canada) の測定も行った。このときは測定前の紫外線照射は行わず、また、pH 緩衝液として EPPS 緩衝液 (終濃度 6.0 nmol l⁻¹ で加えて pH を 8.3–8.4 に調整) を用いた。測定値は 5.16 ± 0.19 nmol l⁻¹ (n = 3) であり、2 種類以上の測定法により決定された保証値 (4.67 ± 0.72 nmol l⁻¹) の範囲内であった。当初は EPPS 緩衝液を用いていたが、EPPS は銅とわずかながら錯形成能があるため (Soares and Barros 2001)、フィールドサンプル測定時にはホウ酸緩衝液に切り替えた。ただし、Cu-EPPS 錯体の条件安定度定数は Cu-SA 錯体のものよりはるかに低いため、測定への影響は無視できる。したがって、いずれの緩衝液を用いた測定についても同様に扱った。

紫外線照射を行わなかった追加測定時のパラメータ設定は Campos and van den Berg (1994) と同じものを用いた。紫外線照射を行わなかったサンプルは測点 5 の 3500 m および 4500 m のサンプルと、測点 22 の 5 m および 50 m のサンプルである。これらの値は直上あるいは直下の深

度から採取した紫外線照射を行ったサンプルの値と比較してかけ離れた値ではなかったため、測定法の違いによる影響はなかったと考えられた。いくつかの値は最初の測定による値と追加測定の値の平均値を用いた。これらは測点 5 の 5 m および 50 m、150 m、1500 m および測点 22 の 10 m の値であるが、最初の測定値と追加測定時の測定値の間に明瞭な差は認められなかった (Table 3.1)。

ブランクは Milli-Q 水中の銅濃度を”0”として用いた。測定間で pH 緩衝液の種類 (EPPS およびホウ酸、精製の有無) が異なるため、これらの測定ごとにブランク測定を行って値を補正した。ただし測定間で pH は同じ値に調整した。したがって、本研究における報告値は pH 緩衝液の種類に関わらず互いに比較可能である。

3-2-2-5 植物プランクトン色素組成

植物プランクトンの色素組成を明らかにするため、測点 5 の 5 および 10、20、30、50 m および測点 22 の 5 および 10、30、50、100、140、150、200 m にて 0.7–5.2 l の海水を採取した。海水はガラス繊維濾紙 (GF/F、Whatman) に濾過し、濾紙は液体窒素中で瞬間凍結あるいはディープフリーザー中で凍結後、陸上研究室における測定まで -80 °C で保存した。濾紙上の色素は 3.6 ml の 95%メタノール (液体クロマトグラフィー用、和光純薬工業) 中で植物プランクトン細胞を超音波破碎 (Sonifier 150、Branson) した後、5 °C で 1 時間以上抽出した。サンプル中のガラス繊維濾紙の残骸は孔径 0.2 μm のポリ四フッ化エチレン (PTFE) 製 syringe driven filter unit

(Millex®-FG、Merck-Millipore) で濾過して取り除いた。測定直前に、1.6 ml の抽出液に 0.4 ml の Milli-Q 水を加えて希釈した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムに注入した。

サンプル中の色素濃度は Zapata et al. (2000) の方法を若干修正した方法 (Miki et al. 2008) で測定した。測定した色素は保持時間と吸光スペクトルをスタンダードのものと比較して決定した。スタンダードのデータは Furuya et al. (2003) および Miki et al. (2008) と同じものを用いた。測定した色素はモノビニルクロロフィル *a* (MV Chl. *a*) およびモノビニルクロロフィル *b* (MV Chl. *b*)、ジビニルクロロフィル *a* (DV Chl. *a*)、ゼアキサンチン (Zea)、アロキサンチン (Allo)、ディアデイノキサンチン (Diad)、19'-ヘキサノイルフコキサンチン (Hex)、プラシノキサンチン (Pras)、フコキサンチン (Fuco)、19'-ブタノイルフコキサンチン (But)、ペリディニン (Peri)、クロロフィル *c*₃ (Chl. *c*₃)、ネオキサンチン (Neo)、クロロフィリド *a* (Chld. *a*) である。

3-2-3 結果

3-2-3-1 水塊の特徴およびクロロフィル *a*、植物プランクトン色素組成、栄養塩

測点 5 における塩分は表面の 32.6 から 5000 m の 34.7 まで深度に伴って上昇した (Fig. 3.2 a)。ポテンシャル水温は表面で 13.2 °C と最も高く、深度とともに急激に下降して 93 m において 1.14 °C で極小となった後、上昇して 256 m で 3.67 °C となり、再び深度とともに下降して 5009 m で 1.08 °C となった (Fig. 3.2a)。測点 22 では、塩分は表面付近 43 m まで 34.6 で一定であり、深度とともに増加して 158 m において 35.1 で極大となった (Fig. 3.2b)。塩分極大は北太平洋熱帯

水に特徴的であり、表面における蒸発とそれに伴う密度の高い海水の沈み込みによって形成されるとされている (Suga et al. 2000)。塩分極大以深では 292 m で塩分 34.4 の極小が存在し、それ以深で再び上昇して 5702 m で 34.7 となった。測点 22 におけるポテンシャル水温は表面で最も高く 29.3 °C であり、深度とともに単調に下降して 5702 m で 1.01 °C となった (Fig. 3.2b)。

測点 5 における水塊は、水温および塩分から亜寒帯表層水 (Subarctic Upper Water、0–2000 m) および太平洋深層水 (Pacific Deep Water、2000–5000 m) の 2 つに分けられた (Fig. 3.2 c) (Tomczak and Godfrey 2005)。測点 22 における水塊は西部北太平洋中央水 (Western North Pacific Central Water) および北太平洋中層水 (North Pacific Intermediate Water)、太平洋深層水 (Pacific Deep Water) の 3 つが確認され (Tomczak and Godfrey 2005)、それぞれ 175–250 m および 250–2000 m、2000–5700 m に確認された (Fig. 1d)。175 m 以浅の低塩分の水塊の名称は不明であるが、おそらく 175 m に観察された高塩分の北太平洋熱帯水の形成の結果として生じたものと考えられる (Suga et al. 2000)。すなわち、海表面で蒸発により高塩分高密度の水塊が生成され、これが沈み込み水平輸送されることで、表層よりも高塩分の亜表層水塊が形成される。MLD は測点 5 および 22 でそれぞれ 12 m および 45 m であった。測点 5 における Brunt-Väisälä 振動数は混合層下部の 11 から 12 m にかけて 0.0509 から 0.204 s^{-1} に急激に上昇し、200 m にかけて 0.0552 s^{-1} まで低下した (Fig. 3.3a)。測点 5 の 12 m 以浅の表層水は低塩分で特徴付けられ、T-S ダイアグラムでそれ以深の水塊と区別できる (Fig. 3.2c)。海表面 (5 m) の低塩分水はこの航海中、北方の広い海域で観測された (Fig. 3.4)。測点 22 では、Brunt-Väisälä 振動数は 10 から 43 m にかけて 0.01 – 0.03

s^{-1} と比較的安定しており、それ以深で急激に上昇し、46 m で $0.0553 s^{-1}$ となった。この変化は混合層深度と一致した。46 m 以深では Brunt-Väisälä 振動数は徐々に増加し、200 m で $0.0834 s^{-1}$ に達した (Fig. 3.3b)。

測点 5 におけるクロロフィル *a* 濃度は表面で $0.67 \mu g l^{-1}$ と最も高く、50 から 100 m にかけて急激に減少した (Fig. 3.5a)。40 m でクロロフィル *a* 濃度が $0.23 \mu g l^{-1}$ と低い値を示したが、この深度における *in vivo* 蛍光および水温、塩分の急激な変化は見られなかったため、実際にクロロフィル *a* 濃度が低かったのかあるいは測定時の操作ミスによるものか不明であった。測点 22 において、クロロフィル *a* は表面から 75 m まで低く $0.04\text{--}0.08 \mu g l^{-1}$ であり、140 m に $0.28 \mu g l^{-1}$ の亜表層クロロフィル極大 (SCM) が観察された (Fig. 3.5 b)。

本研究で測定した植物プランクトン色素のうち、測点 5 では MV Chl. *a* および But, Hex, Fuco, Chl. *b*, Chl. *c*₃, Diad が大部分を占めており (Table 3.2)、珪藻およびプリムネシウム藻、渦鞭毛藻が主要な植物プランクトングループであったことが示唆された。一方、測点 22 では、表面から 100 m までは MV および DV Chl. *a* および Zea が主要な色素であり、140 m の SCM から 150 m まではそれらに加えて Chl. *b* も多く存在した (Table 3.2)。これらの結果から、測点 22 では主要な植物プランクトングループは *Prochlorococcus* を含むシアノバクテリアであると考えられた。

測点 5 および 22 において、酸素極小層はそれぞれ 700 m ($7.18 ml l^{-1}$) および 1160 m ($5.86 ml l^{-1}$) で見られた (Fig. 3.6a-d)。酸素極小層は測点 5 では亜寒帯表層水中に、測点 22 では北太平洋中層水中に位置した。

測点 5 において、硝酸塩およびリン酸塩、ケイ酸濃度はいずれも表面で最も低くそれぞれ 7.52、0.932、8.76 $\mu\text{mol l}^{-1}$ であり、硝酸塩およびリン酸塩は 300–600 m で最も高くそれぞれ 45.7–46.2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 、3.17–3.19 $\mu\text{mol l}^{-1}$ であった。ケイ酸はそれよりも深い 1500 m において 163 $\mu\text{mol l}^{-1}$ と最大となった。これらの栄養塩の濃度極大は全て亜寒帯表層水中で見られた。

測点 22 において、硝酸塩およびリン酸塩、ケイ酸濃度は SCM 以浅で最も低く、極大はそれぞれ 1000 m (40.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$) および 1500 m (2.90 $\mu\text{mol l}^{-1}$)、3000 m (155 $\mu\text{mol l}^{-1}$) で観察された。硝酸塩およびリン酸塩の極大は西部北太平洋中央水および北太平洋中層水中に位置した。ケイ酸の極大はさらに深い太平洋深層水まで達していた。

3-2-3-2 溶存銅

溶存銅の鉛直分布は亜寒帯域および熱帯域測点のいずれにおいても栄養塩型の特徴を持っていた (Fig. 3.6b および d)。亜寒帯域の測点 5 では、表面付近の 5 m で低塩分 (32.6–32.9) の水塊とともに 3.2 nmol l^{-1} と比較的高い濃度が見られた。混合層 (12 m) 以深では、Chl. *a* が依然として高い濃度で存在していた 20–30 m に 2.24–2.26 nmol l^{-1} の溶存銅極小が存在した (Fig. 3.5a)。溶存銅濃度は 5–1000 m では 2.2–3.2 nmol l^{-1} の範囲にあり、1000–1500 m および 3000–4000 m で上昇し、4000–5000 m では 5.0 nmol l^{-1} に達した (Fig. 3.6b)。このように、溶存銅濃度の上昇は AOU あるいは硝酸塩、リン酸塩、ケイ酸の極大が存在する深度よりも深い層でも続いていた (Fig. 3.6a および b)。また、400–3000 m では溶存銅濃度とケイ酸濃度の間に有意な正の相関が見られた

($p < 0.05$) (Fig. 3.7a)。一方で、溶存銅濃度と硝酸塩およびリン酸塩濃度、AOUの間には有意な相関は見られなかった ($p > 0.05$) (not shown)。

熱帯域の測点 22 では、表層 200 m での溶存銅濃度は比較的変動は小さかったものの、溶存銅濃度極小 (0.84 nmol l^{-1}) が SCM (140 m) で見られた (Fig. 3.5b)。この測点の 5 m のデータは 10.1 nmol l^{-1} と、外洋域表層の濃度としては異常に高く、コンタミネーションが疑われたためデータから除外した。溶存銅濃度の上昇は 400 m 以深の北太平洋中層水中で見られ、太平洋深層水中の 3000–5000 m で $4.0\text{--}4.5 \text{ nmol l}^{-1}$ に達した (Fig. 3.6d)。これよりも深い深度でも溶存銅濃度はさらに上昇し、海底からおおよそ 200 m の 5587 m では 5.5 nmol l^{-1} であった。測点 22 でも測点 5 と同様に、溶存銅濃度は AOU、硝酸塩、リン酸塩、ケイ酸極大よりもずっと深い深度まで上昇を続けた。300–2000 m に限り、溶存銅濃度はケイ酸濃度と有意な正の相関を示した ($p < 0.05$) (Fig. 3.7b)。2000 m 以深では、ケイ酸濃度はほとんど一定であるのに対して溶存銅濃度は深度に伴って上昇を続けるので、結果としてこの深度での溶存銅とケイ酸の間に有意な相関はなかった ($p > 0.05$)。

亜寒帯域の測点 5 および熱帯域の測点 22 の両測点における溶存銅濃度の鉛直分布を比較すると、表層から 1500 m までは測点 5 における溶存銅濃度が測点 22 における濃度よりも高かった。これらの深度は測点 5 では亜寒帯表層水に、測点 22 では西部北太平洋中央水および北太平洋中層水に相当した。一方、両測点で太平洋深層水に相当する 2000 m 以深では、溶存銅濃度は両測点間で同じレベルであった。

3-2-4 考察

3-2-4-1 溶存銅の鉛直分布の特徴

溶存銅の鉛直分布が栄養塩型の特徴をもつことは大西洋 (Moore 1978; Yeats and Campbell 1983; Danielsson et al. 1985)、太平洋 (Boyle et al. 1977; Bruland 1980) およびインド洋 (Danielsson 1980; Saager et al. 1992) に共通して報告されている。両測点ともに、溶存銅極小はクロロフィル *a* 濃度の高い深度に位置しており、植物プランクトンによる溶存銅の消費を示していた。溶存銅濃度の上昇は測点 5 および 22 でそれぞれ 1000 m および 600 m 以深で見られ、有機物の分解に伴った再生および深層循環による年齢の高い水塊の水平輸送の複合的作用によるものと考えられる。

本研究では、測点 5 および 22 のいずれにおいても、深度の幅はそれぞれ異なるものの、溶存銅とケイ酸の間に有意な正の相関が見られた (Fig. 3.7)。溶存銅とケイ酸の相関は珪藻による銅の消費と生物ポンプによる下層への輸送によって引き起こされると報告されている (Westerlund and Öhman 1991; Nolting et al. 1991; Löscher 1999; Boye et al. 2012)。回帰直線の傾きは本研究測点 22 において 0.016 であり、この値は東部北太平洋亜熱帯域および亜寒帯域で報告されている値の範囲内であった (0.006–0.029) (Nolting et al. 1991)。亜寒帯域では、珪藻の現存量が一般的に低いにもかかわらず、銅とケイ酸の間にしばしば相関が報告されている (Nolting et al. 1991; Boye et al. 2012)。それに加え、亜熱帯域に位置する測点 22 においても、Fuco/Chl. *a* 比が 0.02–0.07 と亜寒

帯域の測点 5 の 0.22–0.32 と比べて一桁低いことから珪藻の現存量は低かったと考えられる。さらに、全沈降粒子フラックス中のオパールの寄与は西部北太平洋亜熱帯域では亜寒帯域よりも低いことが知られている (Kawahata 2002)。これらのことから、測点 22 の 300–2000 m の溶存銅は主に、珪藻の優占する生物生産の高い海域から水平輸送により供給されたものであることを示唆する。一方、測点 5 では、2–300 m の範囲では銅とケイ酸の相関は見られなかった。しかし、400 m 以深で溶存銅濃度が上昇したのに対し、ケイ酸濃度の上昇は小さかったことから、結果として測点 5 における溶存銅とケイ酸の回帰直線の傾きは 0.042 (Fig. 3.7a) と、測点 22 における傾き 0.016 (Fig. 3.7b) と比べて高くなった。両測点において溶存銅がケイ酸極大よりも深い深度でも濃度上昇し続けたという事実を説明するためには、たとえ水平輸送による銅供給があったとしても、鉍物粒子などの珪藻以外の沈降粒子による下層への輸送か、あるいは海底堆積物からの供給が (Boyle et al. 1977; Bruland 1980) がなければ説明できない。測点 22 における溶存銅濃度の勾配は、5000 m でやや低い値となったものの、海底から 2000 m にかけて見られた。したがって、この測点における溶存銅濃度の 2000–5587 m にかけての上昇は海底からの供給によるものと考えられる。一方で、測点 5 では溶存銅濃度の勾配が 3000 m と 4000 m の間で途切れているように見えるため、水平輸送による供給を考えなければ、海底からの銅の供給は 4000–5000 m に限定され、2000–3000 m での銅供給源は表層からの鉍物の沈降粒子によるものかもしれない。鉍物粒子からはケイ酸も銅と同時に供給される可能性があるが、海水中のケイ酸濃度は元々高いため、ケイ酸濃度への影響は相対的に小さいと考えられる。それに対して溶存銅濃度は元々海水中に含

まれる濃度が低いため、比較的このような供給による現場濃度への影響は比較的高いと考えられる。また、鉱物粒子の沈降による供給以外にも、深層循環による銅を多く含む海水の北方向への水平輸送による供給がこの測点の 3000–4000 m の溶存銅濃度勾配の不連続性の原因であった可能性も考えられる。したがって、将来的には緯度方向の高密度の観測により銅の鉛直分布を明らかにする必要がある。

3-2-4-2 表面付近の高い溶存銅濃度

本研究では、測点 5 の 5 m および 10 m、測点 22 の 5 m で高い溶存銅濃度が観測された。これらの海表面における高い溶存銅濃度の原因として、エアロゾル沈着による供給かあるいは船体からのコンタミネーションが挙げられている (Boyle et al. 1977; Coale and Bruland 1990; Ezoe et al. 2004)。少なくとも、測点 22 の 5 m における溶存銅濃度は 10.1 nmol l^{-1} と、外洋域で見られる値よりも 1 桁高い濃度であり、海表面への銅供給源であるエアロゾルの密度も低かったため (Fig. 3.8)、コンタミネーションによるものであると考えられた。本研究では採水中に船の排気ガスからのコンタミネーションを防ぐために船のサンプリングを行う側を風上に向けていたが、ロゼットサンプラーでの表面付近の採水では船体からのコンタミネーションを完全に防ぐのは難しいのかもしれない (Bruland 1980)。それとは対照的に、測点 5 の表面付近での高い溶存銅濃度はエアロゾル沈着あるいは水平輸送により説明できるレベルであった (Boyle et al. 1977, 1981)。また、測点 5 の表面から 12 m の間に塩分 32.9–33.1 の亜寒帯表層水よりもさらに低塩分 (32.6–32.9) の

水塊が見られた。この低塩分の表層水はこの航海中、160–180° E の 44.5° N 以上の広い海域で見られたことから (Fig. 3.4)、東カムチャツカ海流 (Favorite et al. 1976) により沿岸から供給された銅を多く含む水塊が輸送されてきていたと考えられた。測点 5 の表面付近における溶存銅濃度の上昇が見られた深度はこの低塩分の水塊が見られた 12 m 以浅に位置したことから、このような水平輸送による銅の供給が銅濃度上昇の主な要因である可能性が高いと考えられた。ただし、沿岸からの銅供給だけでなく、この表層水塊の水平輸送の過程におけるエアロゾルの沈着による銅の供給も寄与している可能性がある。

3-2-4-3 北太平洋における溶存銅の鉛直分布の比較

北太平洋における既存知見および本研究の溶存銅の鉛直プロファイルを統合したものを Fig. 3.9 に示す (Bruland 1980; Buck et al. 2012; Coale and Bruland 1990; Ezoe et al. 2004; Fujishima et al. 2001; Hirose et al. 1982; Midorikawa et al. 1990; Miller and Bruland 1994; Moffett and Dupont 2007; Semeniuk et al. 2009; Takano et al. 2014)。ここで、Moffett and Dupont (2007) の値は、グラフからの読取り値を用いた。溶存銅濃度は 1500 m 以浅において測点 5 と Moffett and Dupont (2007) を除くそれ以外の測点でそれぞれ 2.23–4.52 nmol l⁻¹ および 0.46–2.94 nmol l⁻¹ であり、測点 5 以外の平均値と比較すると 0.94–2.56 nmol l⁻¹ ほど高かった。一方、2000 m 以深ではこれらの間に差は見られなかった (Fig. 3.9)。Moffett and Dupont (2007) も 500–1500 m で測点 5 と同様に高い溶存銅濃度を報告している。しかし、測点 5 および Moffett and Dupont (2007) における溶存銅濃度の

このような高い値は決して非現実的なものではないと考えられる。なぜなら、北太平洋亜寒帯域における銅有機配位子の錯形成容量はおよそ 3–4 nmol l⁻¹ 程度 (Coale and Bruland 1990; Moffett and Dupont 2007) であり、本研究の現場溶存銅濃度はこれと同程度あるいはこれよりも低いため、十分海水中に保持されうる濃度と考えられるためである。このような高い溶存銅濃度がどのように生じたかを考える上で、銅の供給および除去過程を考えることは不可欠である。

3-2-4-4 有光層内の溶存銅のソースとシンク

有光層内 (西部北太平洋亜寒帯循環においておよそ 45–60 m: Mochizuki et al. 2002; Tsuda et al. 2005) における重要な銅のソースとしてエアロゾルの沈着が挙げられる (Paytan et al. 2009)。Paytan et al. (2009) は、大気由来の銅の沈着が西部北太平洋の特に 35–45° N 付近で高いと見積もっており、他の研究によるダスト沈着量見積りと似た分布をしている (Uematsu et al. 2003; Measures et al. 2005)。Ezoe et al. (2004) の測点 BO01 (39° 59' N, 160° 00' E; 2000 年 6 月 23–24 日) は本研究の測点 5 よりもエアロゾル由来の銅供給量の高い海域の中心部に位置しているにもかかわらず、1500 m 以浅における溶存銅濃度は測点 5 よりも低かった。また、MODIS-Terra (2000 年 7 月) あるいは MODIS-Aqua (2008 年 8 月) により観測した 550 nm における月平均エアロゾル光学深度 (Goddard Earth Sciences Data and Information Services Center (GES DISC) のウェブサイト上の Giovanni online data system により作成) はサンプリング時に測点 BO01 (2000 年 7 月) で 0.157 と、測点 5 (2008 年 8 月) の 0.143 よりも高かった。さらに、大西洋では表層の溶存銅の分

布 (Boyle et al. 1981) はダスト沈着量とともに緯度方向に変動する溶存鉄の分布とは全く異なっており、本研究測点 5 で見られた高い溶存銅濃度は大気由来の供給が主な原因ではなかったと考えられる。

もう 1 つの溶存銅の有光層への供給源の可能性として、沿岸水の水平移流による輸送が挙げられる (Yeats and Campbell 1983)。測点 5 において水平移流により溶存銅が供給されたことを示す証拠は 2 つある。第一に、前述のとおり、海表面の低塩分水が測点 5 を含む海域に広く分布しており、沿岸水の水平移流が示唆されること、第二に、SeaWiFS (9 km) による 2008 年 8 月の月平均表面クロロフィルの衛星画像 (Giovanni により作成) が、高クロロフィル水が沿岸域から測点 5 を含む外洋域の広大な海域に伸びていたことを示したことが挙げられる (Fig. 3.10)。したがって、エアロゾルよりも沿岸水の水平的な輸送が測点 5 における高い溶存銅濃度を引き起こした主要な原因であると考えられる。ただし、エアロゾルの沈着による銅供給もある程度溶存銅濃度の上昇に寄与した可能性も否定できない。測点 5 の表層への銅の供給は Cu-Si の関係からも示唆される。測点 5 と測点 22 の溶存銅濃度を同じケイ酸濃度 ($15\text{--}80\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ の範囲) に対して比較すると、測点 5 では測点 22 に対して $0.6\text{--}1.8\text{ nmol l}^{-1}$ ほど高いことがわかる (Figs. 4.6a および b)。したがって、海表面付近で溶存銅濃度を上昇させた要因として、下層からの供給ではなく、大気由来あるいは沿岸由来の銅の供給が考えられる。

溶存銅の有光層からの除去過程は、鉛直分布が栄養塩型であることから、主に生物起源粒子によるスキベンジングであると考えられる。西部北太平洋亜寒帯域における基礎生産は熱帯域

と比べて高いことが報告されており (Noriki et al. 1995; Yamada et al. 2012)、また、測点 5 における表面クロロフィル *a* 濃度も西部北太平洋亜熱帯域の中で比較的高い。測点 5 では、沿岸水の水平輸送により鉄もある程度供給されていた可能性があるが、硝酸塩が高濃度で残存していることから、鉄欠乏により基礎生産が制限されている HNLC 海域に位置していたと考えられる (Fig. 3.6)。このような環境下で鉄酵素を銅酵素で代替する珪藻や (Peers and Price 2006)、有機錯体鉄の取り込みにマルチ銅オキシダーゼを利用する珪藻が知られており (Annett et al. 2008; Maldonado et al. 2006)、植物プランクトンによる銅利用が活発になる可能性が考えられる。このように、有光層内での溶存銅の除去は亜寒帯域で熱帯域よりも大きいと考えられる。したがって、測点 5 で溶存銅濃度が高かった原因はおそらく供給過程にあると考えられる。

3-2-4-5 有光層以深の溶存銅のソースとシンク

有光層以深の溶存銅の供給源として、有光層から生物ポンプのはたらきで輸送されてきた沈降有機物が挙げられる。上述のとおり、測点 5 における生物による銅の利用は比較的高いと考えられる。しかし、2000 m 以深では測点 5 とその他の測点の間に溶存銅濃度の違いは認められなかった (Fig. 3.9)。これはおそらく、2000 m までで有機物のほとんどが分解してしまったためであると考えられる。

深層循環に伴う溶存銅の供給も測点 5 の 1500 m 以浅の溶存銅濃度上昇に寄与した可能性がある。北太平洋亜寒帯域は深層循環の終点であり、溶存銅を多く含む海水が湧昇していると考えら

れる。前述のように、Moffett and Dupont (2007) も北太平洋亜寒帯域で 500–1500 m において高い溶存銅濃度を報告している。したがって、このような過程による溶存銅供給が存在した可能性が考えられる。しかし、Takano et al. (2014) が西部北太平洋亜寒帯域で報告している溶存銅濃度の値は本研究測点 5 の値のように高くなく、この海域での溶存銅濃度は時空間的にばらつきがあるのかもしれない。

有光層以深におけるもう 1 つの銅の供給源として水平移流による輸送が考えられる。珪藻による生物ポンプ以外の銅の供給を明らかにするため、測点 5 および 22 における溶存銅濃度：ケイ酸濃度 (Cu:Si , $\text{nmol } \mu\text{mol}^{-1}$) 比をプロットした (Fig. 3.11)。測点 5 における Cu:Si 比は表面で 2.1 と最も高く、1000 m で 0.019 と最も低くなり、そして再び海底にかけてわずかに上昇し 0.035 となった。表面付近での高い Cu:Si 比は生物によるケイ酸の消費と比較的高濃度で残存する銅によるものであると考えられる。一方、海底付近での高い Cu:Si 比は海底からの銅の供給とケイ酸極大以深でのケイ酸濃度の減少によるものであると考えられる。両測点における Cu:Si 比の鉛直分布は 400–2000 m の範囲では 0.02–0.03 と同程度であり、これらの深度範囲では銅およびケイ酸濃度は水塊の移流の経路に沿った、珪藻による生物ポンプによりコントロールされていたと考えられる。しかし、測点 5 の 1500 m ではわずかに高い比が観察され、これはこの深度における高い溶存銅濃度 (4.52 nmol l^{-1}) のためであった。この海域には、オホーツク海から高い溶存鉄濃度の水塊の水平移流によって鉄が供給されることが報告されており、この水塊は σ_θ が 26.6–27.5 であるとされている (Nishioka et al. 2007)。これは測点 5 では 116–1110 m に相当することから、

1500 m での高い溶存銅濃度の原因ではないと考えられた。しかし、116–1110 m においては溶存銅の供給源となっていた可能性は考えられる。ただし、測点 5 の溶存銅プロファイルおよび Cu:Si 比のプロットからは、特徴的なシグナルは観察されなかった。

西部北太平洋亜寒帯域における沈降粒子フラックスが大きいことから (Noriki et al. 1995; Kawahata 2002)、吸着除去による銅の除去も大きかったと考えられる。したがって、高い溶存銅濃度を維持するためには、有光層における生物による取込みおよび有光層以深における吸着除去による除去を上回る供給があったと考えられる。

3-2-4-6 ニッケルとの比較

本研究の銅の分布を他の微量元素元素と比較すると、溶存ニッケルの分布が溶存銅の分布と似た特徴を持っていた。すなわち、溶存ニッケルの濃度は 1500 m の濃度極大以浅で北太平洋亜寒帯域において亜熱帯域よりも濃度が高く、極大以深では海域間の差は見られなかった (Ezoe et al. 2004)。ニッケルも銅と同様に、栄養塩型の鉛直分布をし、リン酸塩およびケイ酸としばしば相関を持つことが知られており (Bruland 1980; Boyle et al. 1981)、銅とニッケルいずれにとっても珪藻と関連した生物ポンプによるコントロールが重要であることを示唆している。

3-3 窒素固定に対する銅の毒性の評価

3-3-1 背景

窒素固定生物は生理的に鉄要求が高いため、外洋域表層における鉄の主要な供給源である大気由来のエアロゾルの沈着は窒素固定を促進する要因として着目されてきた。しかし、近年、Paytan et al. (2009) によりエアロゾル沈着により鉄と同時に供給される銅が植物プランクトンの増殖を阻害すると報告され、いくつかの沿岸域においても同様の報告がなされている。窒素固定に対する銅の影響について、今まで現場ではほとんど研究が行われていない。しかし、窒素固定生物はエアロゾル沈着に依存する生態を持つため、鉄と同時に供給される銅が窒素固定生物に対してどのような影響を与えるのかを明らかにすることは、窒素固定の制御を明らかにする上で重要である。

海水中の溶存銅の毒性は銅の濃度だけでなく、銅有機配位子に大きく左右される。天然の銅有機配位子は、その化学的組成については不明であるが、競合配位子を用いた測定結果から、様々な条件安定度定数の配位子が混合したものであると捉えられている (e.g. Buck and Bruland 2005)。そして、基本的に強い配位子は低濃度で、弱い配位子は高濃度で存在する傾向が海水域、汽水域、淡水域いずれにおいても認められる (Town and Filella 2000)。有機錯体銅は毒性を持たないため、有機配位子は銅の毒性の緩和に重要な役割を果たしているが、海水中の銅濃度が低い場合は強い配位子のみと結合し、銅濃度が高くなるにつれてより弱い配位子とも結合する。したがって、銅濃度が高くなる状況においては弱い配位子が銅毒性緩和に中心的な役割を果たすと考えられて

いる (Hirose 2007)。しかしながら、西部北太平洋における配位子の測定例は少なく、単一検出窓を用いたものが多いため、相互比較が困難であり、条件安定度定数と濃度の組み合わせで表される銅有機配位子の組成がよく分かっていない。したがって、銅濃度の上昇に伴う遊離銅イオン濃度の変動を明らかにするためには、現場において複数の検出窓を用いて測定を行う必要がある。

また、銅毒性に対する耐性はプランクトンのグループにより異なることが知られており、一般に、シアノバクテリアは真核植物プランクトンよりも銅に対する耐性が低い (Brand et al. 1986)。また、繊毛虫も銅の毒性に対する耐性が低いことが知られており (Stoecker et al. 1986)、銅は捕食者を通して植物プランクトンに影響を与える可能性がある。このようにプランクトングループ間の銅耐性の違いにより、銅の毒性はプランクトンの群集構造の変化をもたらすと考えられ (Coale 1991)、窒素固定と生物生産の関係にも影響を及ぼす可能性がある。また、窒素固定生物のグループによっても銅耐性が異なる可能性も考えられる。しかし、現在は *T. thiebautii* の遊離銅イオン濃度と炭酸固定の関係については報告されているが (Rueter et al. 1979)、他の窒素固定生物に対する銅の影響は報告されていない。したがって、西部北太平洋内の窒素固定生物の組成の異なる測点間で、銅の窒素固定活性に対する影響に違いが生じる可能性も考えられる。

本研究ではエアロゾル沈着の多い西部北太平洋亜熱帯循環の夏季において、銅の添加が窒素固定活性に与える影響について添加実験により明らかにすることを目的とした。また、現場の溶存銅濃度と銅有機配位子の濃度および条件安定度定数を用いて溶存銅濃度の変化に対する遊離銅イオン濃度の変化を評価し、大気由来の銅供給の見積りと併せて、大気由来の銅供給が窒素固

定活性に及ぼす影響についても議論した。

3-3-2 方法

3-3-2-1 サンプルリング

2012 年 7 月 6 日から 8 月 14 日にかけて行われた白鳳丸 KH-12-3 次航海において、測点 205、209、および 212 で 50%光量層から酸洗浄したテフロンコートされたニスキン X 型採水器を用いて採水を行った。スピゴットおよびエアベントはあらかじめ酸洗浄したテフロン製の製品に交換した。イニシャルの溶存銅および銅有機配位子のサンプルはニスキンボトルのスピゴットにシリコンチューブを用いて孔径 0.2 μm のアクロパック 200 カプセルスーパーポアメンブレン (Pall) を接続し、重力濾過によってそれぞれ酸洗浄した 125 ml LDPE 製細口ボトル (Nalgene) および 500 ml FLPE 製細口ボトル (Nalgene) に採水した。溶存銅サンプルは船内クリーンルームにて 20% 塩酸 (Tamapure-AA-100、多摩化学) を 500 μl 添加し、pH を 1.7 以下に調整し、常温で保存した。銅有機配位子サンプルは $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。銅添加培養実験用の海水はスピゴットにシリコンチューブを接続し、4.5 l ポリカーボネート製 (PC) 細口丸型ボトル (Nalgene) に採水した。また、窒素固定を推定する際に必要なイニシャルの $\delta^{15}\text{N}$ 用のサンプルは 4.5 l の遮光ポリエチレン製ボトルに採水し、あらかじめ $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 6 時間燃焼させた GF/F フィルターに濾過し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。ピコ・ナノ植物プランクトン計数用サンプルはニスキンボトルより PC ボトルに採水後、4.5 ml クライオチューブ (Nunc) に採取し、終濃度 1%となるようにグルタルアルデ

ヒド溶液 (和光純薬工業) を添加後、液体窒素で瞬間凍結し、 -80°C で凍結保存した。

3-3-2-2 銅添加培養

採水した 4.5 l ポリカーボネートボトルに船内クリーンルームにて硫酸銅 (II) の添加 (特級、和光純薬工業) を行った。添加区は終濃度 1 および 10 nmol l^{-1} で、無添加のものをコントロールとした。第二章の添加培養実験と同様に窒素固定活性の見積りは Montoya et al. (1996) の方法により行った。 $^{15}\text{N}_2$ ガスを添加し、50%減光下で、甲板に設置した表面海水掛け流し水槽で 2 日間培養を行った。培養後は、4.5 ml チューブにピコ・ナノ植物プランクトン計数用サンプルを採取し上述と同様に保存した後、残りの海水を引圧 0.02 MPa 以下で、あらかじめ燃焼させた GF/F フィルター (Whatman) に濾過した。濾紙は -20°C にて凍結保存した。

3-3-2-3 窒素固定

第二章の方法と同様に窒素の同位体比の測定から窒素固定活性を算出した (Montoya et al. 1996)。基本的に各系列 4 連のボトルで培養したが、1 本だけ大きく窒素固定の値がずれた場合があった。他の系列のボトルと比較しても異常なほど値が異なる場合は、測定のエラーの可能性が高いため、そのような場合は $p<0.05$ を基準としてスミルノフの棄却検定で外れ値を判断した。

3-3-2-4 ピコ・ナノ植物プランクトン群集

第二章において記述したのと同様に、フローサイトメーターを用いて培養前後のピコ・ナノ植物プランクトンのグループ別細胞数を計数した。

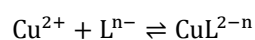
3-3-2-5 溶存銅濃度

溶存銅濃度の測定は採水後 20 か月以上保存後に行った。測定は前述の紫外線照射を行わない方法で行った。検出限界はブランク測定の標準偏差の 3 倍として計算し、 $0.018 \text{ nmol l}^{-1}$ であった。

3-3-2-6 競合配位子平衡カソーディックストリッピングボルタンメトリー (CLE-CSV) による銅有機配位子の測定の原理

本研究における測定原理は Campos and van den Berg (1994) と同様である。サンプルに一定濃度の SA および銅標準液を複数の濃度段階で添加し、一定時間以上放置することでサンプル内の銅と天然の有機配位子および SA を平衡状態にさせる。この際、天然の有機配位子と SA の間で銅の奪い合いが起こる。その後、CSV により CuSA_2 の還元電流を測定する。この結果から、以下の原理によって銅有機配位子の濃度および条件安定度定数、遊離銅イオン濃度を求める。

天然の銅有機配位子はその組成が明らかでないので銅原子とどのような比率で錯形成するか不明である。そのため、慣習として 1 : 1 で錯形成すると仮定して配位子濃度および条件安定度定数を求める。銅および銅有機配位子の間には以下の平衡が成り立つ。



限りなく希薄な溶液において、この熱力学的平衡定数 (または安定度定数) は以下のように表される。

$$K = \frac{[\text{CuL}^{2-n}]}{[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{L}^{n-}]}$$

ここで、[] 記号はモル濃度を表す。しかし、海水などのイオン強度の高い溶液の場合は溶液化学種の活量を考える必要がある。また、 Cu^{2+} と溶液中の陰イオン、および L^n と溶液中の陽イオンとの錯形成反応も考慮する必要がある。そのため、実際にはそれらを考慮した条件安定度定数 (K') を用いる。条件安定度定数には論文により以下の2種類が用いられている。

$$K'_{\text{Cu'L}} = \frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}'] \cdot [\text{L}']}$$

および

$$K'_{\text{Cu}^{2+}\text{L}} = \frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{L}']}$$

ここで Cu' は有機配位子と錯形成していない無機銅を表す。本研究では特に記載しない限りは条件安定度定数として $K'_{\text{Cu}^{2+}\text{L}}$ を用いたが、 $[\text{Cu}']$ および $[\text{Cu}^{2+}]$ の間には以下のような関係があり、 $K'_{\text{Cu'L}}$ および $K'_{\text{Cu}^{2+}\text{L}}$ は相互に換算することが可能である。無機銅は遊離銅イオンおよび海水中の陰イオンとの無機錯体の合計であるから

$$[\text{Cu}'] = [\text{Cu}^{2+}] + [\text{CuX}_1] + [\text{CuX}_2] + [\text{CuX}_3] + \cdots$$

と表せる。ここで、 X_i は CO_3^{2-} 、 OH^- や Cl^- などの銅と錯形成する陰イオンを表す。 CuX_i の条件安定度定数を β'_i とすると

$$\beta'_i = \frac{[\text{CuX}_i]}{[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{X}_i]^k}$$

であるから (但し、k は定数とする)、

$$[\text{Cu}'] = [\text{Cu}^{2+}] + [\text{Cu}^{2+}] \cdot \sum (\beta'_i \cdot [\text{X}_i]^k)$$

と表せる。ここで、

$$\alpha_{\text{Cu}'} = 1 + \sum (\beta'_i \cdot [\text{X}_i]^k)$$

とおくと

$$[\text{Cu}'] = \alpha_{\text{Cu}'} \cdot [\text{Cu}^{2+}]$$

と表せる。 $\alpha_{\text{Cu}'}$ は無機副反応係数と呼ばれる。 $\alpha_{\text{Cu}'}$ は水温と塩分により変化するが (Coale and

Bruland 1990)、本研究は淡水の影響のほとんどない海域で行っており、これらの結果に及ぼす影

響は極めて小さいため、 $\alpha_{\text{Cu}'}$ の値はサンプルに関わらず常に 30 (Coale and Bruland 1990) を用いた。

ピークの高さを i、感度を S とすると、各滴定点における CuSA および CuSA_2 の濃度の和 $[\text{CuSA}_x]$ は以下の式で表される。

$$i = S \cdot [\text{CuSA}_x] \quad (1)$$

銅有機配位子測定では、S は銅の高濃度添加により得られる直線部分の傾きから求める。銅有機

配位子濃度および条件安定度定数の計算には、以下の式を用いる。

$$\frac{[\text{Cu}']}{[\text{CuL}]} = \frac{[\text{Cu}']}{[\text{L}]} + \frac{1}{K'_{\text{Cu'L}} \cdot [\text{L}]} \quad (2)$$

ここで、[L] は天然の銅有機配位子の総濃度、[CuL] は天然銅有機配位子と銅との錯体の濃度を

あらわす。また、 $K'_{\text{Cu'L}}$ は銅と天然銅有機配位子との条件安定度定数をあらわす。上記の式は以

下の 2 つの式から求められる。

$$[L] = [L'] + [CuL]$$

$$K'_{Cu'L} = \frac{[CuL]}{[Cu'] \cdot [L']}$$

ここで、 $[L']$ は銅と錯形成していない天然銅有機配位子濃度をあらわす。(1) 式から $[CuSA_x]$

が求まるので、各滴定点における $[Cu']$ は以下の式より求められる。

$$[Cu'] = \frac{\alpha_{Cu'}}{\alpha_{Cu^{2+}(SA)_x}} \cdot [CuSA_x]$$

ここで、 $\alpha_{Cu^{2+}(SA)_x}$ は銅と SA の錯体の副反応係数を表し、

$$\alpha_{Cu^{2+}(SA)_x} = \frac{[Cu^{2+}]}{[Cu(SA)_x]}$$

と定義される。また、 $[CuL]$ については、

$$[CuL] = [DCu] - [Cu(SA)_x] - [Cu']$$

となる。ただし、 $[DCu]$ は各滴定サンプル液中の溶存銅濃度を表す。これらから、各滴定点に

ついて $[Cu']$ を独立変数、 $\frac{[Cu']}{[CuL]}$ を従属変数としてプロットし、最小 2 乗法により直線近似する

と、(2) 式より直線の傾きが $\frac{1}{[L]}$ 、y 切片が $\frac{1}{K'_{Cu'L} \cdot [L]}$ となり、これから $[L]$ および $K'_{Cu'L}$ を計算

した。 $K'_{Cu^{2+}L}$ については

$$K'_{Cu^{2+}L} = \alpha_{Cu'} \cdot K'_{Cu'L}$$

から計算した。また、サンプル中の無機イオン濃度 $[Cu']$ については

$$[DCu] = [Cu'] + [CuL]$$

$$[L] = [L'] + [CuL]$$

$$K'_{Cu'L} = \frac{[CuL]}{[Cu'] \cdot [L']}$$

の3式から求められる。そして、フリーの銅イオン濃度 $[\text{Cu}^{2+}]$ は

$$[\text{Cu}^{2+}] = \frac{[\text{Cu}']}{\alpha_{\text{Cu}'}}$$

により求められる。最後に、銅有機配位子の副反応係数は、

$$\alpha_{\text{Cu}^{2+}\text{L}} = \frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}^{2+}]}$$

から求められる。

3-3-2-7 銅滴定

銅有機配位子の測定は CLE-CSV 法 (Campos and van den Berg 1994) により行った。凍結サンプルは 4-6°C の冷蔵庫内で 2 日間程度置いて解凍し、酸洗浄した 20 ml PFA 製ボトル (サンブラテック) に 11 ml ずつ移した。これに、ホウ酸緩衝液 110 μl を加え、銅標準溶液を終濃度 0、0.25、0.5、1、1.5、2.5、3.5、5、7.5、10、15、25、35、50、75、100、150 nmol l^{-1} となるように添加した。室温にて 2 時間放置後、SA を終濃度 0.1、0.5、2、100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ となるよう添加し、15 分以上置いてから測定を行った (Buck and Bruland 2005)。いくつかのサンプルでは SA 濃度 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ での測定も行った。測定は銅添加濃度の低いサンプルから高いサンプルの順番で行った。PFA 製ボトルから 10 ml のサンプルを PFA 製測定セルに移し、3 分間パージング後、-0.15 V で 1 分間デポジションを行った。その後の電位走査のパラメータ設定は溶存銅測定と同様である。まず、SA を終濃度 0.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ で添加した一連の銅添加濃度系列についてピークを測定し終わったら、測定後、測定時にサンプル中に廃棄される水銀滴を除いて元のボトルに回収しておいたサンプル

に SA を追加して終濃度 $0.5 \mu\text{mol l}^{-1}$ にして再度一連の測定を行うというようにして、全 SA 濃度について測定を行った。

3-3-2-8 pCu の計算

Van den Berg-Ruzic の直線近似の結果から、検出窓ごとに銅有機配位子濃度および条件安定度定数、pCu (遊離銅イオン濃度 (M) の常用対数 $\times (-1)$ で表される) を算出した。また、銅添加時の毒性の指標として、銅 1 nmol l^{-1} および 10 nmol l^{-1} 添加区のイニシャルの pCu も検出窓ごとに求めた。

3-3-2-9 統計解析

培養後の各系列間のピコ・ナノ植物プランクトン各グループの細胞数、および窒素固定活性の比較は、まず ANOVA によりいずれかの系列間に有意差があるかどうかを検定した後 ($p < 0.05$)、Tukey-Kramer の方法で個別の系列ごとの比較を行った。これらの計算は R を用いて行った。

3-3-3 結果

3-3-3-1 栄養塩および溶存銅濃度、銅有機配位子

これらの測点における栄養塩環境は第二章で記述したとおり、N+N 濃度は検出限界以下 ($< 2 \text{ nmol l}^{-1}$) であり、SRP 濃度は $< 6 \text{ nmol l}^{-1}$ と低かった (Table 2.2)。イニシャルの溶存銅濃度は測点

205、209、212 の順で低くなり、それぞれ 3.11 ± 0.11 、 2.49 ± 0.18 、 0.57 ± 0.01 nmol l⁻¹ であった。各測点における銅有機配位子を濃度および条件安定度定数の常用対数で表す。測点 205 では検出窓 0.1 μmol l⁻¹ SA で 11.4 nmol l⁻¹、11.2、0.5 μmol l⁻¹ SA で 7.88 nmol l⁻¹、12.4、2 μmol l⁻¹ SA で 5.24 nmol l⁻¹、13.1 であった。測点 209 では検出窓 0.1 μmol l⁻¹ SA で 8.87 nmol l⁻¹、11.5、0.5 μmol l⁻¹ SA で 8.66 nmol l⁻¹、12.2、2 μmol l⁻¹ SA で 2.04 nmol l⁻¹、14.9 であった。測点 212 では検出窓 0.1 μmol l⁻¹ SA で 6.66 nmol l⁻¹、11.4、0.5 μmol l⁻¹ SA で 9.46 nmol l⁻¹、11.7、2 μmol l⁻¹ SA で 0.66 nmol l⁻¹、13.6、5 μmol l⁻¹ SA で 0.23 nmol l⁻¹、14.8 であった。検出窓が高くなるにつれて、銅有機配位子の濃度は低く、条件安定度定数は高くなる傾向が認められたが（測点 212 の検出窓 0.1 μmol l⁻¹ SA から 0.5 μmol l⁻¹ SA にかけては例外的に配位子濃度が低下した）、同じ検出窓の設定でも測点間で検出される配位子濃度・条件安定度定数の組合せは一定でなかった。これらの結果から計算される pCu は測点 205 では検出窓 0.1、0.5、2 μmol l⁻¹ SA に対してそれぞれ 11.7、12.6、12.9、測点 209 では検出窓 0.1、0.5、2 μmol l⁻¹ SA に対してそれぞれ 11.9、12.6、10.8、測点 212 では検出窓 0.1、0.5、2、5 μmol l⁻¹ SA に対してそれぞれ 12.4、12.9、12.9、10.9 であった。同一サンプルの同一添加区でも検出窓ごとに pCu のばらつきが見られたが、これは検出窓の設定によって、検出された銅有機配位子濃度がサンプル中の溶存銅濃度よりも低い場合に pCu が大きく低下したことが原因であると考えられる。pCu が最も高くなるような適切な検出窓を選定することにより配位子濃度がサンプル中溶存銅濃度よりも高くなるように測定した場合、イニシャル無添加区の pCu は測点 205 および 209、212 でそれぞれ 11.7-12.9、11.9-12.6、12.4-12.9 と同程度の値となった。

3-3-3-2 現場のピコ・ナノプランクトン群集組成

実験開始時、真核植物プランクトンと *Synechococcus* の細胞密度は測点 205 で他の測点よりも高く、それぞれ 2516、16280 cells ml⁻¹ であった。測点 209 と 212 ではこれら 2 グループの細胞密度は同程度に低く、測点 209 ではそれぞれ 488、488 cells ml⁻¹、測点 212 ではそれぞれ 553、474 cells ml⁻¹ であった。*Prochlorococcus* はどの測点でも現存量はあまり変わらず、測点 205、209、212 でそれぞれ 57466、46366、52018 cells ml⁻¹ であった。ナノシアノバクテリアは測点 209 で高い細胞密度を示し、542 cells ml⁻¹ であった。測点 212 ではわずかに 17 cells ml⁻¹ であり、測点 205 では全くシグナルが検出されなかった。

3-3-3-3 銅添加の影響

測点 205 および 209、212 におけるイニシャルの無添加区、1 nmol l⁻¹ および 10 nmol l⁻¹ 銅添加区の pCu は検出窓ごとに Table 3.3 にまとめた。これらの計算に用いた銅滴定の結果と各滴定データから計算された銅化学形態のパラメータ、および直線近似の結果については Table S1-S10 および Fig. S1-S10 に示した。銅 1 nmol l⁻¹ 添加区では pCu はこれよりもわずかに低くなりそれぞれの測点で 11.5–12.5、11.7–12.4、11.9–12.4 となった。銅無添加区および 1 nmol l⁻¹ 添加区において pCu 濃度が最も高く計算されたのは検出窓 0.5 および 2 μmol l⁻¹ SA を用いた時で、この時検出された条件安定度定数が常用対数で 11.7–13.1 の配位子が低濃度の銅濃度上昇に対する毒性の緩

和に重要な役割を果たしていると思われた。銅 10 nmol l^{-1} 添加区ではどの検出窓でもサンプル中溶存銅濃度が検出配位子濃度を上回り、pCu はそれぞれの測点で 9.57–10.1、9.46–9.89、9.46–10.3 と大きく低下した。

銅の添加によるピコ・ナノ植物プランクトンの減少および窒素固定の低下は各測点銅 1 nmol l^{-1} 添加区では見られず、銅 10 nmol l^{-1} 添加区で顕著であった (Fig. 3.12 および 3.13)。これら植物プランクトンおよび窒素固定生物に対する毒性の発揮は pCu の低下と一致した。銅の添加による細胞密度の減少は *Synechococcus* で最も顕著であり、全測点で 10 nmol l^{-1} の銅添加により大幅にかつ有意に減少した ($p < 0.05$)。 *Prochlorococcus* も全測点で 10 nmol l^{-1} の銅添加により大幅な細胞密度の減少を示したが、有意な減少は測点 209 のみで見られた ($p < 0.05$)。逆に、銅毒性に対して最も耐性を示したのは真核ピコ・ナノ植物プランクトンであり、特に測点 205 および 212 では 10 nmol l^{-1} の銅添加に対して細胞密度の減少幅はわずかであった。真核ピコ・ナノ植物プランクトンの減少は測点 209 のみでコントロールに対して有意であった ($p < 0.05$)。ナノシアノバクテリアは測点 209 と 212 でともに 10 nmol l^{-1} の銅添加により有意に減少したが ($p < 0.05$)、測点 209 では 10 nmol l^{-1} の銅添加で大きく減少したが、測点 212 では減少幅は比較的小さかった。窒素固定は 1 nmol l^{-1} の銅添加ではコントロールと比較して有意な変化は認められなかったが ($p > 0.05$)、 10 nmol l^{-1} の銅添加によりすべての測点で大幅な減少が認められた ($p < 0.05$)。特に、測点 209 と 212 では 10 nmol l^{-1} の銅添加により窒素固定が検出されないまでに抑制されたが、一方、測点 205 では添加後も窒素固定は検出された。

3-3-4 考察

本章の各測点における窒素固定生物の分布は前章で記述したとおり、銅添加培養実験を行った3測点では窒素固定生物の組成が異なった。まず、測点205ではUCYN-Aの現存量が 1×10^4 *nifH* copies Γ^{-1} と高く窒素固定生物群集内で優占し、*R. intracellularis*の現存量も14 filaments Γ^{-1} と他の測点と比較して高かった。しかし、*C. watsonii*の*nifH*は全く検出されなかった。それに対し、測点209および212ではいずれも*C. watsonii*が主要な窒素固定生物であり、現存量はそれぞれ 1×10^5 および 1×10^4 *nifH* copies Γ^{-1} であった。*C. watsonii*の細胞径は3–7 μm であり、ナノシアノバクテリアに分類される。また、本航海においてナノシアノバクテリア細胞数と*C. watsonii*の*nifH*現存量は1:1の対応ではないものの、ほぼ直線関係にあった (Fig. 3.14)。したがって、本研究では培養後の*nifH*現存量を測定していないが、培養後に採取したナノシアノバクテリア細胞数のデータは*C. watsonii*現存量の指標とすることが可能である。このことから、各測点で銅の10 nmol Γ^{-1} 添加により培養後のナノシアノバクテリア細胞密度が激減したことは*C. watsonii*の減少をも示していると考えられた。植物プランクトン群集では、測点205で*Synechococcus*および真核ピコ・ナノ植物プランクトンの細胞密度が他の2測点よりも高かったが、*Prochlorococcus*の細胞密度は3測点で大きな差はなく、クロロフィル*a*濃度もあまり大きな違いは見られなかった。

溶存銅濃度は測点205、209、212の順に低下し、特に測点212では他の測点よりも1桁低かった (Table 3.3)。配位子濃度も溶存銅濃度と同様に、測点212では他の2測点における近い条件

安定度定数を持つ配位子と比べて濃度が低い傾向が見られた（条件安定度定数は常用対数で 11.4-14.8 の範囲のものを検出したが、いずれの条件安定度定数のものについても同様の傾向が見られた）。溶存銅濃度も銅有機配位子の濃度も測点間で異なっていたものの、それぞれが連動して増減したため、生物に対する毒性の指標である pCu は測点間でほぼ一定に維持されており、天然の銅は全ての測点で現場群集に対して無毒とされるレベルに維持されていた。

本研究では、イニシャルの銅有機配位子については測定を行ったが、培養後については行われなかった。したがって、培養期間中の銅有機配位子の組成の変化については考慮していない。しかし、銅の急性毒性は 1 時間程度と比較的短期間で植物プランクトンに影響を及ぼすことを考慮すると (Paytan et al. 2009)、イニシャルの銅有機配位子のデータを用いた銅毒性の評価は有効であると考えられる。イニシャルの銅有機配位子組成から予測される、銅濃度が上昇した際の pCu の変化も測点間で非常に類似しており、銅の供給に対する短期的な銅毒性の変化についても測点間の違いはほとんどないと考えられた。実際に、銅添加培養実験においても、全ての測点で窒素固定およびピコ・ナノ植物プランクトン群集への銅の毒性は銅添加量 1 nmol l^{-1} では見られず、 10 nmol l^{-1} の添加によってのみ見られた。このときの各測点の pCu も銅 1 nmol l^{-1} および 10 nmol l^{-1} 添加時にそれぞれ 12.4 および 9.89–10.3 とほとんど測点間で差がなかった。これは、天然の海水中で銅濃度に合わせて植物プランクトンが配位子の生成を調節していたか (Moffett and Brand 1996)、あるいは銅と錯形成することで配位子の安定性が高まった結果、銅と配位子の濃度が同様の変動を示した可能性が考えられる。

しかしながら、銅毒性の影響は植物プランクトン間でばらつきが見られた。もっとも明瞭な違いは、ピコ・ナノ植物プランクトングループ間での違いであり、*Synechococcus* が最も大きく減少し、真核植物プランクトンが最も強い耐性を示した。これは、培養株による植物プランクトン間の銅耐性の違いに関する知見と一致する傾向であった。Brand et al. (1986) によれば、植物プランクトンの種類により銅耐性は様々であるが、ほとんどのグループでは pCu が 11 から 9 の間で増殖が大きく抑制されるのに対し、*Synechococcus* では pCu が 12 から 11 の間でも増殖が低下するとされている。本研究における真核ピコ・ナノ植物プランクトンとシアノバクテリアの銅 10 nmol l^{-1} 添加に対する細胞密度の減少幅の違いも、このような生理的な銅耐性の違いに起因するものと考えられる。イニシャルの海水中に含まれていた銅有機配位子の組成から、銅毒性を発揮する pCu=11 あるいは pCu=12 に達するにはそれぞれおよそ $5\text{--}8 \text{ nmol l}^{-1}$ (合計 $8.11\text{--}8.57 \text{ nmol l}^{-1}$ 程度) あるいは 3 nmol l^{-1} 程度の溶存銅濃度上昇 (合計 $3.57\text{--}6.11 \text{ nmol l}^{-1}$ 程度) が必要であると見積もられた。陸域から離れた外洋域においてはこれほどの銅濃度の上昇は考えにくい、沿岸域においては普通にみられる濃度であるため (Town and Filella 2000)、このような海域においては銅毒性が発揮される可能性がある (Moffett et al. 1997)。

窒素固定活性に対する銅毒性の影響も測点間でのばらつきが見られた。窒素固定は測点 209 および 212 では 10 nmol l^{-1} の銅添加により完全に抑制されたが、測点 205 では減少したもののわずかに維持された。これらの違いを生んだ原因の 1 つとして、窒素固定生物の組成が異なっていたことが挙げられるが、窒素固定生物の銅耐性はほとんど知見がなく、Rueter (1979) が *T.*

thiebautii の銅耐性について報告している程度である。測点 205 では *R. intracellularis* や UCYN-A が窒素固定生物群集における優占群であったが、これらの窒素固定生物は真核藻類に共生しているものの、UCYN-A は円石藻 *B. bigelowii* に細胞外共生することが知られており (Hagino et al. 2013)、*R. intracellularis* の場合は珪藻 (本研究では *Rhizosolenia* spp. および *Hemiaulus* spp.) の細胞膜と珪酸殻の間の細胞間隙に共生するため Gomez et al. 2005)、銅の毒性の影響を直接受ける可能性がある。一方で、測点 209 および 212 では *C. watsonii* が最も *nifH* コピー数が多く、また、本研究および先行研究 (Kitajima et al. 2009) の結果から、これらの海域では *C. watsonii* の窒素固定への寄与が大きいと考えられる。*C. watsonii* は銅毒性に弱い *Synechococcus* や *Prochlorococcus* と同様に単細胞のシアノバクテリアであるため、銅による毒性の影響を大きく受け、結果として窒素固定がほぼ完全に抑制された可能性が考えられた。

平衡状態を仮定すると、銅濃度が高くなるにつれ、銅が錯形成する配位子は条件安定度定数が高いけれども低濃度のものから、条件安定度定数が低く濃度の高い配位子へと移行すると考えられる。したがって、Hirose (2007) が指摘しているように、銅毒性の緩和に寄与する配位子は、比較的 condition stability constant の低いものであると考えられる。銅有機配位子の生成能は多くの海産植物プランクトンおよびバクテリアにおいて確認されているが (e.g. Croot et al. 2000; Gordon et al. 2000)、*Synechococcus* が condition stability constant の高い配位子を生成するのに対し、真核植物プランクトンでは、これよりも condition stability constant の低い配位子の生成は知られているものの、*Synechococcus* が生成する配位子のように condition stability constant の高い配位子の生成能は報告されていない (Croot et al. 2000)。

したがって、銅濃度の低い環境では、真核植物プランクトンが生成する銅有機配位子は銅のスペシエーションへの寄与は小さいが、沿岸域などの溶存銅濃度の高い環境では銅の毒性緩和に重要な役割を果たしている可能性がある。

本研究の現場観測の結果とエアロゾル沈着量の見積りを用いて、大気由来の銅が窒素固定に与える影響を評価した。白鳳丸 KH-11-10 および KH-12-3 次航海における銅沈着量を以下の二通りの方法で大まかに見積もった。各測点におけるサンプリング前 2 週間の総エアロゾル沈着量 (黒色炭素+有機物+ダスト+海塩粒子+硫酸塩) 積算値から、済州島および佐渡島における銅/エアロゾル質量比の平均値 (0.217 ng/μg) (Cohen et al. 2004) を用いて銅沈着量を求め、各測点における混合層深度 (15–105 m) で割った結果、最大 95 pmol l⁻¹ (測点 216) となった。もう 1 つの方法は、同じ航海の各測点におけるサンプリング前 2 週間のダスト沈着量積算値から、ダスト中のアルミニウム含有率 5.3% (Mahowald et al. 2005) および太平洋におけるエアロゾルの Cu/Al 比 (Chen 2004) を用いて銅沈着量を求め、各測点における混合層深度で割った結果、最大 232 pmol l⁻¹ (測点 215) となった。エアロゾル中の銅の溶解度は pH などの条件によって大きく変動するが (Takeda et al. 2014)、ここでは溶存銅濃度が最大でどの程度上昇する可能性があるかを見積もるため、溶解度は考慮しなかった。いずれの見積りでも、エアロゾル供給による銅濃度の上昇は西部北太平洋において高いときでも 1 nmol l⁻¹ に満たない程度であると考えられた。また、本研究で観測した表層の溶存銅濃度はエアロゾル沈着量の分布との関係は KH-08-2 および KH-12-3 次航海のいずれでも見られなかった。本研究で複数の検出窓を用いて測定した銅有機配位子の濃度お

よび条件安定度定数から、銅が毒性を発揮するには溶存銅濃度の 3–5 nM 程度の上昇が必要であると見積もられた。表層におけるダストの滞留時間が数日から数十日と考えられているが (Jickells 1999)、人為起源粒子の滞留時間は不明である。したがって、滞留時間を 2 週間として計算した本研究の見積りには比較的大きな誤差が含まれると考えられる。しかし、大気由来の銅供給は毒性を発揮する 3–5 nM に比べて大幅に低いため、滞留時間の誤差を考慮しても、大気由来の銅供給のみでは植物プランクトンに対して毒性を発揮するような銅濃度の上昇は考えにくい。

一方で、沿岸由来の銅供給は外洋域においてもナノモルレベルの銅濃度上昇を引き起こす可能性が示されたが、沿岸からの水平移流のある海域では窒素供給により窒素固定生物以外の植物プランクトンの現存量も高くなることが期待される。このような環境では銅有機配位子の生成能を持つ *Synechococcus* をはじめとした植物プランクトンが多い可能性があるため、単純にこうした環境で銅の毒性が現れやすいとはいえない。沿岸由来の銅供給にともなう銅の毒性の可能性について明らかにするには、こうした環境において空間的により詳細な観測を行い、銅の供給と窒素固定生物に対する毒性の影響を評価する必要があると考えられる。

3-4 まとめ

本研究では、溶存銅の鉛直分布を西部北太平洋亜寒帯域および亜熱帯域において明らかにし、水塊および生物パラメータと比較した。西部北太平洋亜寒帯域では高い溶存銅濃度が観測されたが、これは、表層では水平移流が主要な供給源と考えられ、エアロゾル由来の供給も多少は寄与していた可能性が考えられた。そして、表層の銅が生物ポンプの働きによって下層へと輸送されて 1500 m までの溶存銅濃度上昇をもたらしたと考えられる。これに加えて、1500 m への水平移流による直接の銅供給の可能性も示唆されたが、供給源となった水塊や、どのような経路で輸送されてきたかについては明らかにならなかったため、今後、より詳細な観測により明らかにしていく必要がある。本研究では、西部北太平洋亜寒帯域において、生物ポンプが水平移流および深層循環による湧昇とあわせて中層から深層にかけての銅の重要な供給源であることが示唆された。したがって、生物により銅がどの程度利用されるのか、また、鉄欠乏海域において基礎生産を支えるのに銅がどの程度寄与しているのかを明らかにすることで、さらに銅の輸送過程への理解が進むものと考えられる。さらに、大気由来の鉄供給量の変化は海洋表層における植物プランクトンの鉄欠乏状態に影響し、その結果植物プランクトンの銅要求量を変化させ、生物ポンプによる下層への銅フラックスに影響を与えと考えられるため、将来の気候変動に伴うエアロゾル沈着量の変化が天然の環境中の銅濃度にどのような影響を与えるのかを明らかにすることは重要である。

また、夏季の西部北太平洋熱帯亜熱帯域表層において、メカニズムまでは分からなかったも

の、溶存銅濃度および銅有機配位子の濃度の違いが観測された。しかし、溶存銅濃度と配位子濃度が似たような変動をし、結果として pCu が測点間でほぼ一定に保たれており、銅の添加による pCu の変化も測点間であまり違いはないことが明らかになった。しかしながら、銅毒性の窒素固定に対する影響は測点間で異なり、窒素固定生物間の銅耐性の違いが重要であると考えられた。夏季の西部北太平洋における大気由来の銅の供給量を見積もった結果、大気由来の銅供給による混合層における溶存銅濃度の上昇はわずかであり、銅有機配位子が溶存銅に対して十分量存在するため、毒性の指標である遊離銅イオン濃度の大きな上昇にはつながらないと考えられた。したがって、西部北太平洋において銅は窒素固定の阻害要因にはならないと考えられた。

Table 3.1 KH-08-2 次航海の溶存銅サンプルのうち、紫外線照射処理を行ったもの (+UV) と行っていないもの (-UV) の測定値の比較。

測点	深度 (m)	溶存銅濃度 (nM)	
		+UV	-UV
5	5	3.30	3.46
		3.07	3.14
	50	2.93	2.01
			1.87
	150	2.21	2.59
		3.14	3.04
	1500	4.78	5.07
		3.73	
22	10	1.20	1.24
		0.95	0.83

Table 3.2 深度ごとの各色素の濃度。単位は $\mu\text{g l}^{-1}$ 。

測点	深度	Chl c_3	Chld a	Peri	But	Fuco	Neo	Pras	Hex	Diad	Allo	Zea	Chl b	DV Chl a	MV Chl a
5	5	0.063	0.025	0.021	0.046	0.123	0.008	0.007	0.171	0.052	0.017	0.018	0.049	0.000	0.556
	10	0.061	0.017	0.016	0.045	0.114	0.008	0.008	0.172	0.044	0.011	0.013	0.053	0.000	0.472
	20	0.082	0.014	0.013	0.063	0.117	0.010	0.005	0.191	0.035	0.007	0.006	0.034	0.000	0.425
	30	0.091	0.010	0.010	0.074	0.151	0.012	0.017	0.147	0.024	0.008	0.009	0.054	0.000	0.480
	50	0.061	0.000	0.000	0.040	0.140	0.016	0.032	0.038	0.011	0.014	0.006	0.119	0.000	0.474
22	5	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.000	0.000	0.006	0.003	0.000	0.032	0.004	0.017	0.027
	10	0.001	0.000	0.002	0.002	0.003	0.000	0.000	0.009	0.004	0.000	0.032	0.005	0.017	0.051
	30	0.001	0.000	0.002	0.002	0.004	0.000	0.000	0.009	0.003	0.000	0.031	0.006	0.016	0.036
	50	0.003	0.000	0.003	0.003	0.005	0.000	0.000	0.012	0.004	0.000	0.044	0.007	0.028	0.044
	100	0.006	0.000	0.004	0.008	0.003	0.001	0.000	0.026	0.004	0.000	0.050	0.024	0.075	0.073
	140	0.024	0.000	0.002	0.037	0.004	0.002	0.001	0.005	0.003	0.001	0.034	0.150	0.136	0.106
	150	0.022	0.000	0.001	0.033	0.003	0.002	0.001	0.043	0.003	0.001	0.021	0.120	0.095	0.097
	200	0.008	0.000	0.000	0.010	0.001	0.000	0.000	0.014	0.001	0.000	0.002	0.029	0.013	0.030

Chl c_3 : クロロフィル c_3 , Chld a : クロロフィリド a , Peri: ペリディニン, But: 19'-ブタノイルフコキサンチン, Fuco: フコキサンチン, Neo: ネオキサンチン, Pras: プラシノキサンチン, Hex: 19'-ヘキサノイルオキシフコキサンチン, Diad: ディアディノキサンチン, Allo: アロキサンチン, Zea: ゼアキサンチン, Chl. b : クロロフィル b , DV Chl a : ジビニルクロロフィル a , MV Chl a : モノビニルクロロフィル a

Table 3.3 測点 205 および 209、212 における溶存銅濃度と、各 SA 濃度で測定した銅有機配位子濃度とその条件安定度定数。これらの結果から計算されるイニシャルおよび銅を添加 (1 nM および 10 nM) 添加した時の pCu。±で標準偏差を示した。

測点	DCu			SA	銅有機配位子			Log K' Cu2+	pCu		
	(nmol l ⁻¹)			(μmol l ⁻¹)	(nmol l ⁻¹)				添加前	+1 nM	+10 nM
205	3.11	±	0.11	0.1	11.4	±	1.2	11.2	11.7	11.5	10.1
				0.5	7.88	±	0.30	12.4	12.6	12.4	9.76
				2	5.04	±	0.30	13.1	12.9	12.5	9.57
209	2.49	±	0.18	0.1	8.87	±	0.92	11.5	11.9	11.7	9.89
				0.5	8.66	±	0.42	12.2	12.6	12.4	9.89
				2	2.04	±	0.11	14.9	10.8	10.3	9.46
212	0.57	±	0.01	0.1	6.66	±	0.65	11.4	12.4	11.9	9.86
				0.5	9.46	±	0.31	11.7	12.9	12.4	10.3
				2	0.66	±	0.05	13.6	12.9	10.5	9.48
				5	0.23	±	0.04	14.8	10.9	10.3	9.46

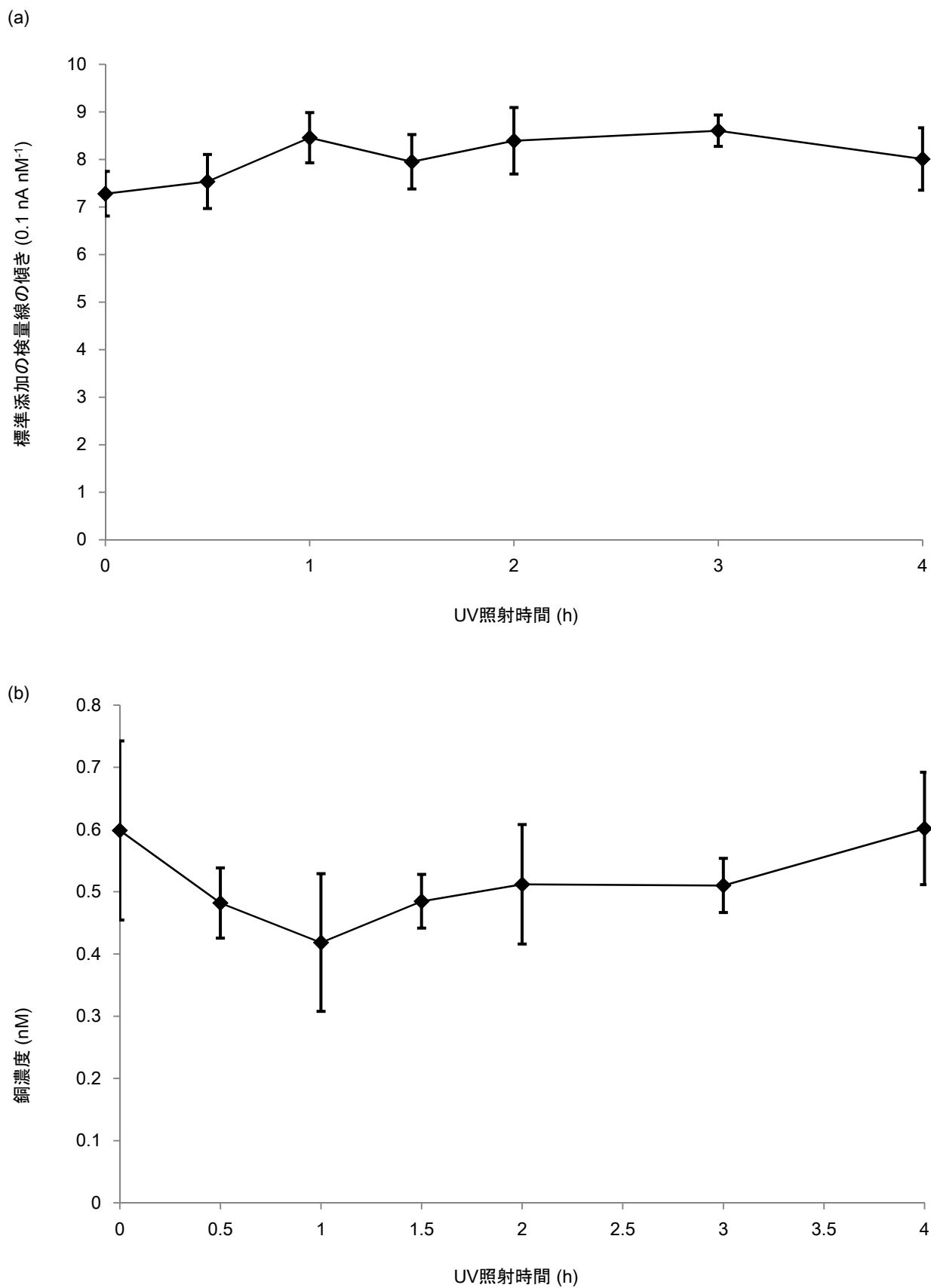


Fig. 3.1 紫外線照射時間に対する (a) 標準添加の傾きおよび (b) 銅濃度の変化。

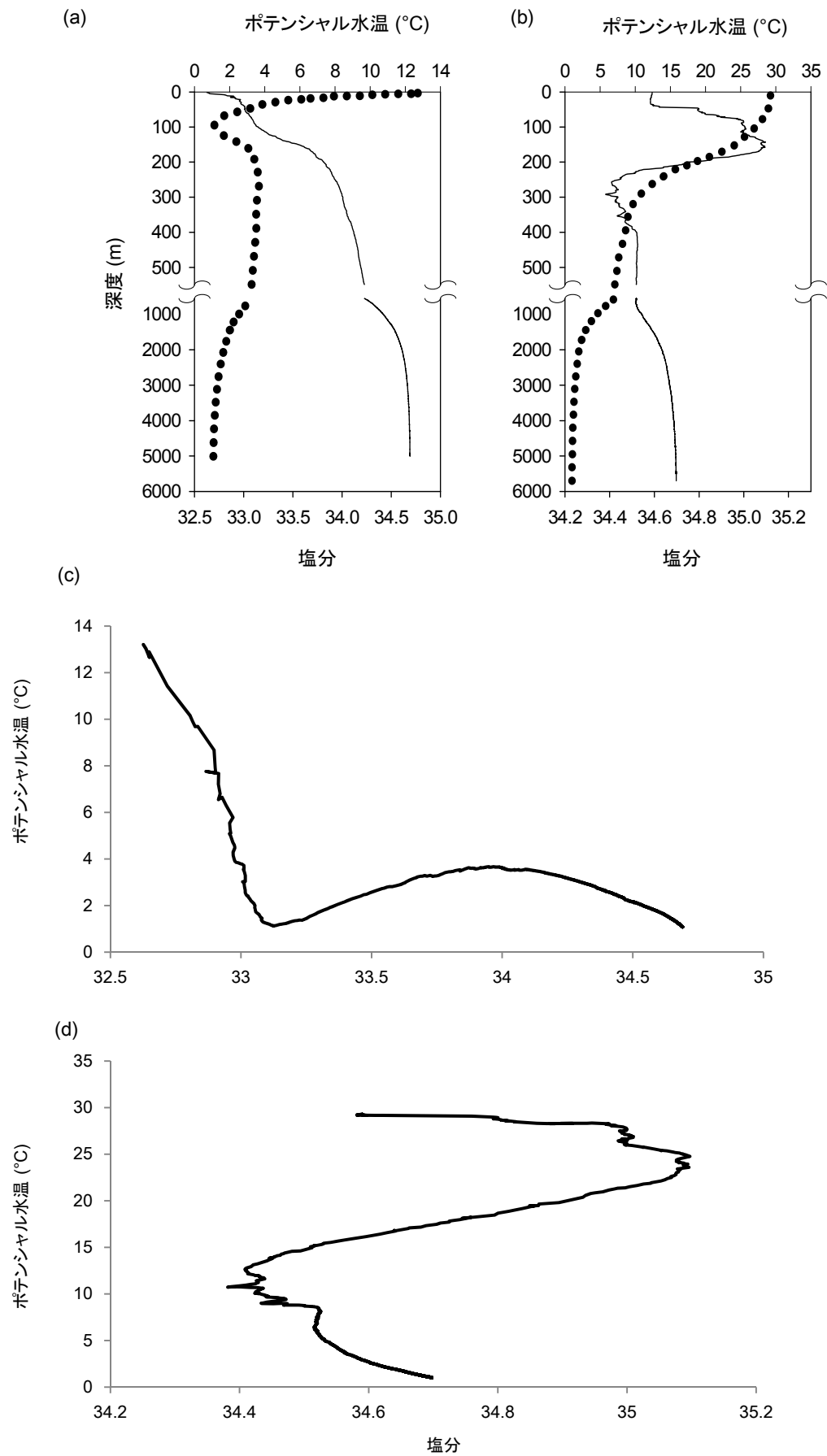


Fig. 3.2 塩分 (実線) およびポテンシャル水温 (点線) の鉛直分布 (a: 測点5、b: 測点22)、およびT-Sダイアグラム (c: 測点5、d: 測点22)。

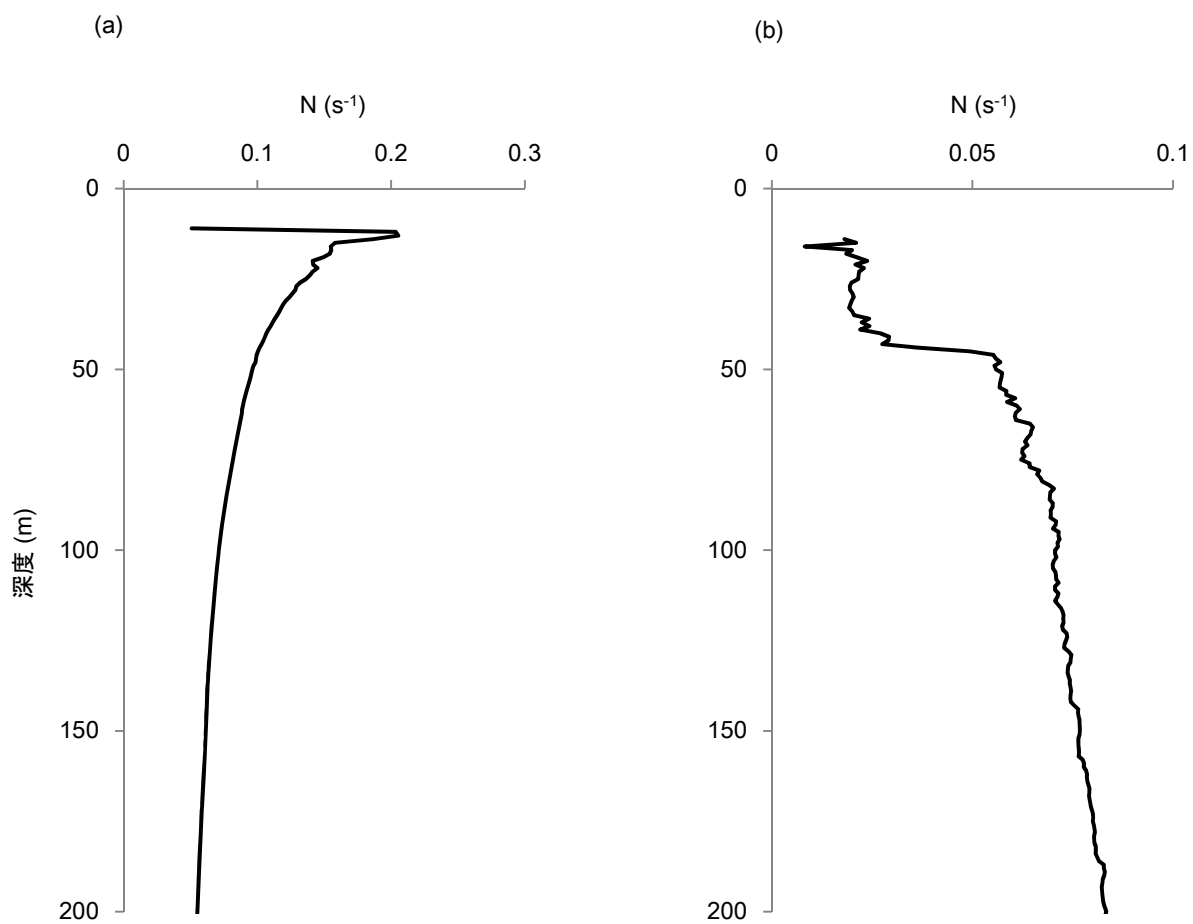


Fig. 3.3 測点5 (a) および22 (b) において水温と塩分から計算した Brunt-Väisälä 振動数 (N) の鉛直分布。

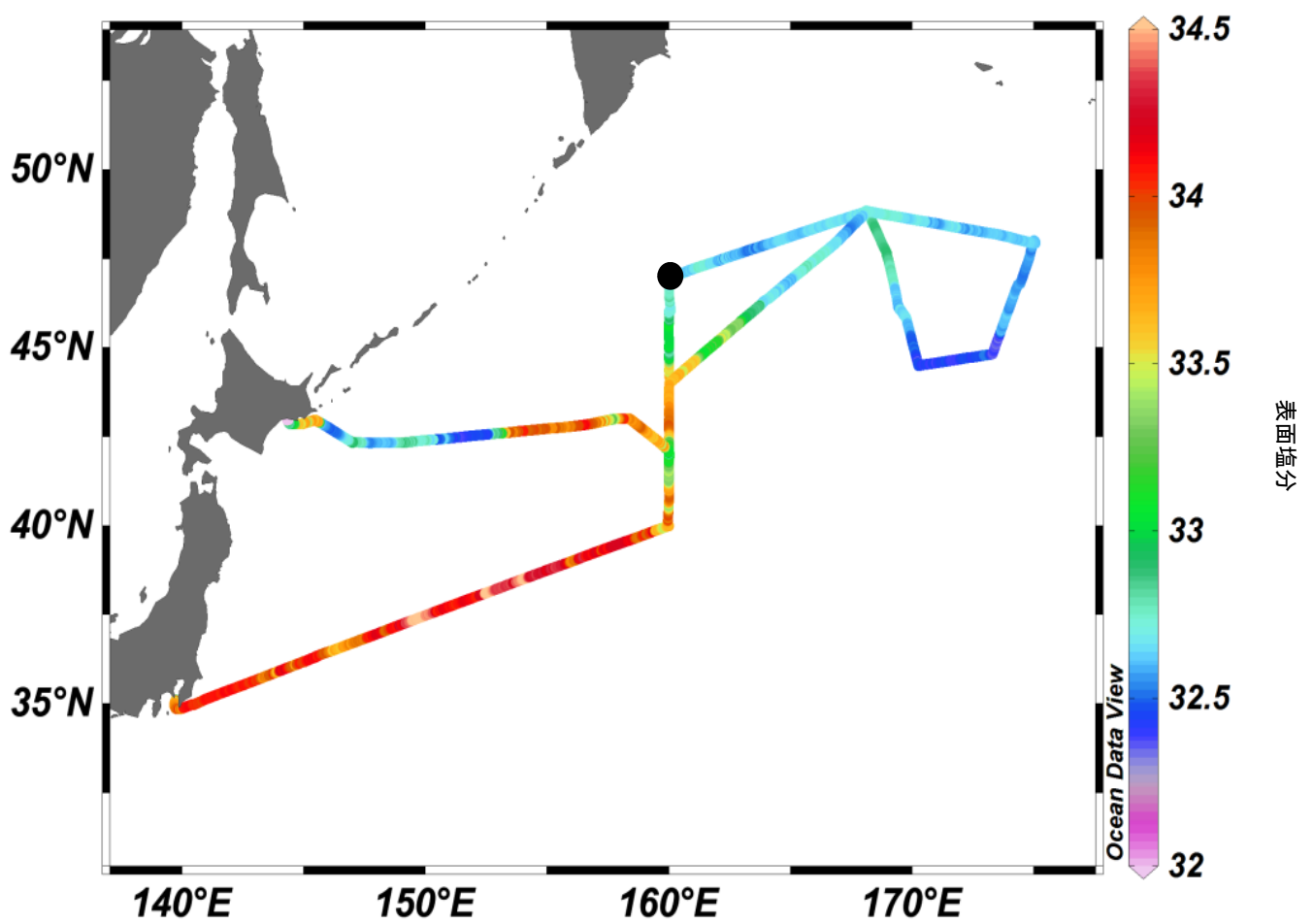


Fig. 3.4 KH-08-2次航海のレグ1 (2008年7月29日-8月19日) における航走中の表面塩分の分布。測点5の位置を●で示している。

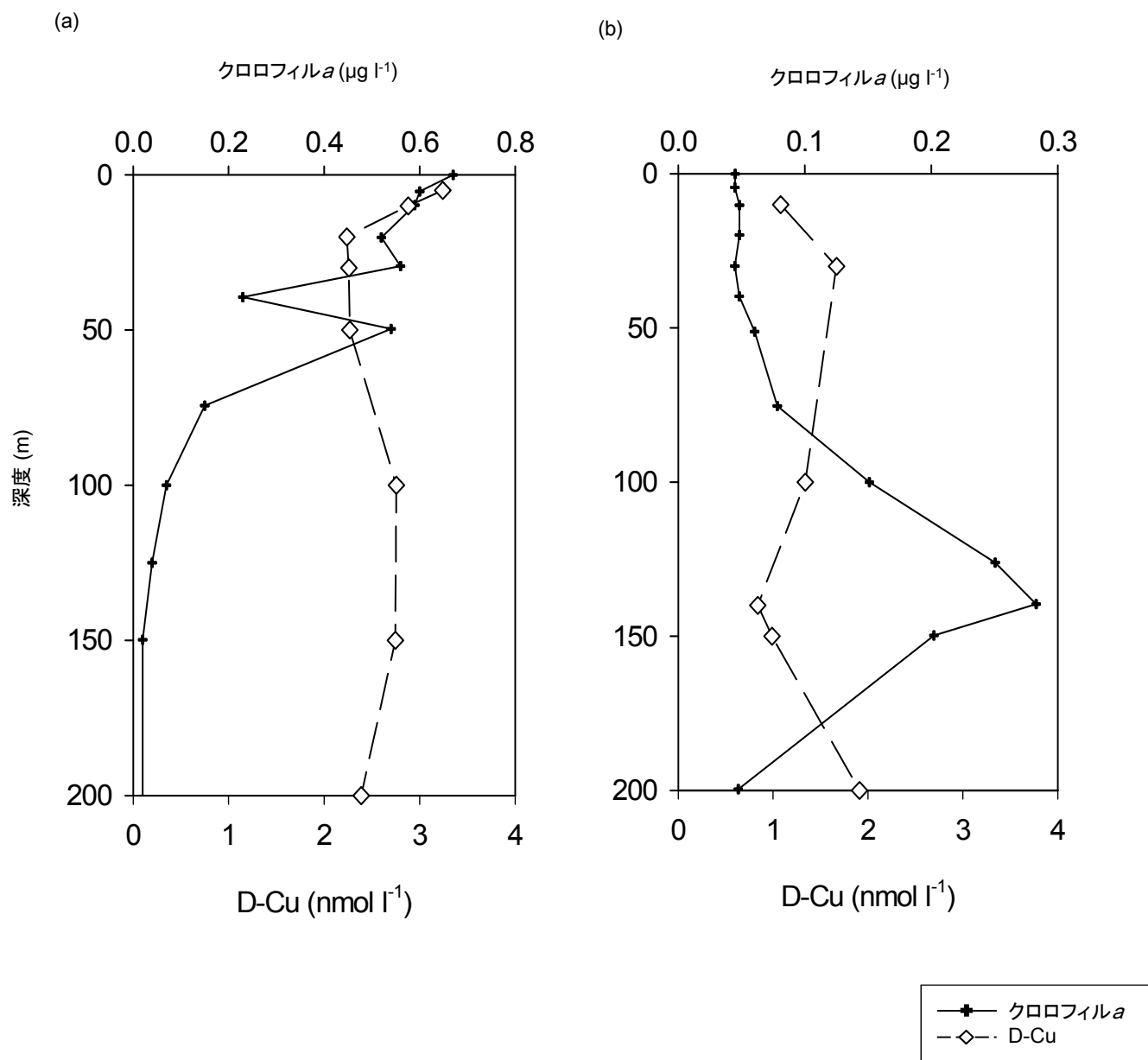


Fig. 3.5 (a) 測点5および (b) 22におけるクロロフィル a (+、実線) および溶存銅 (\diamond 、破線) の鉛直分布。

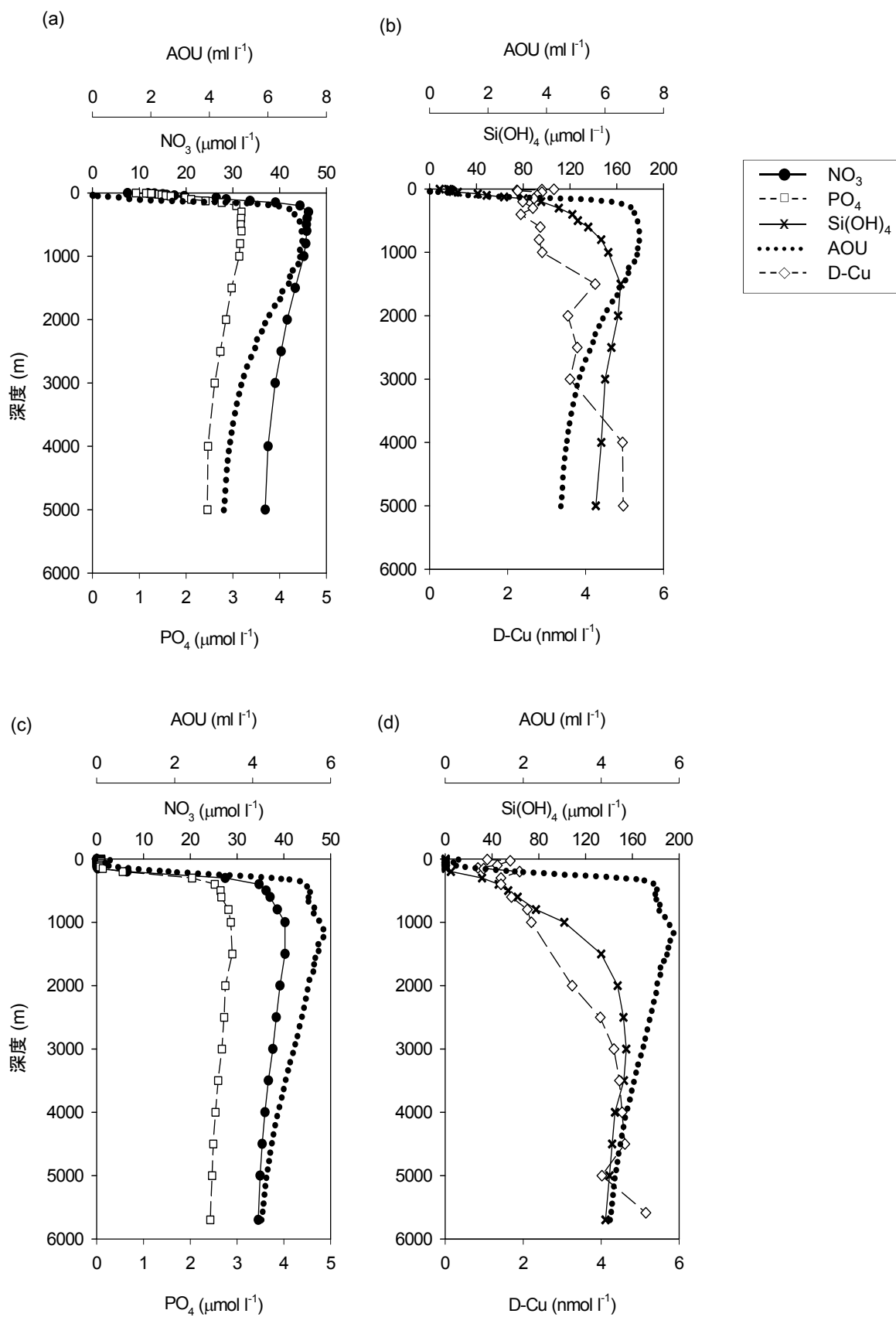


Fig. 3.6 測点5 (a, b) および22 (c, d) における硝酸塩 (a, c) およびリン酸塩 (a, c)、ケイ酸 (b, d)、溶存銅 (b, d)、AOU (a, b, c, d) の鉛直分布。

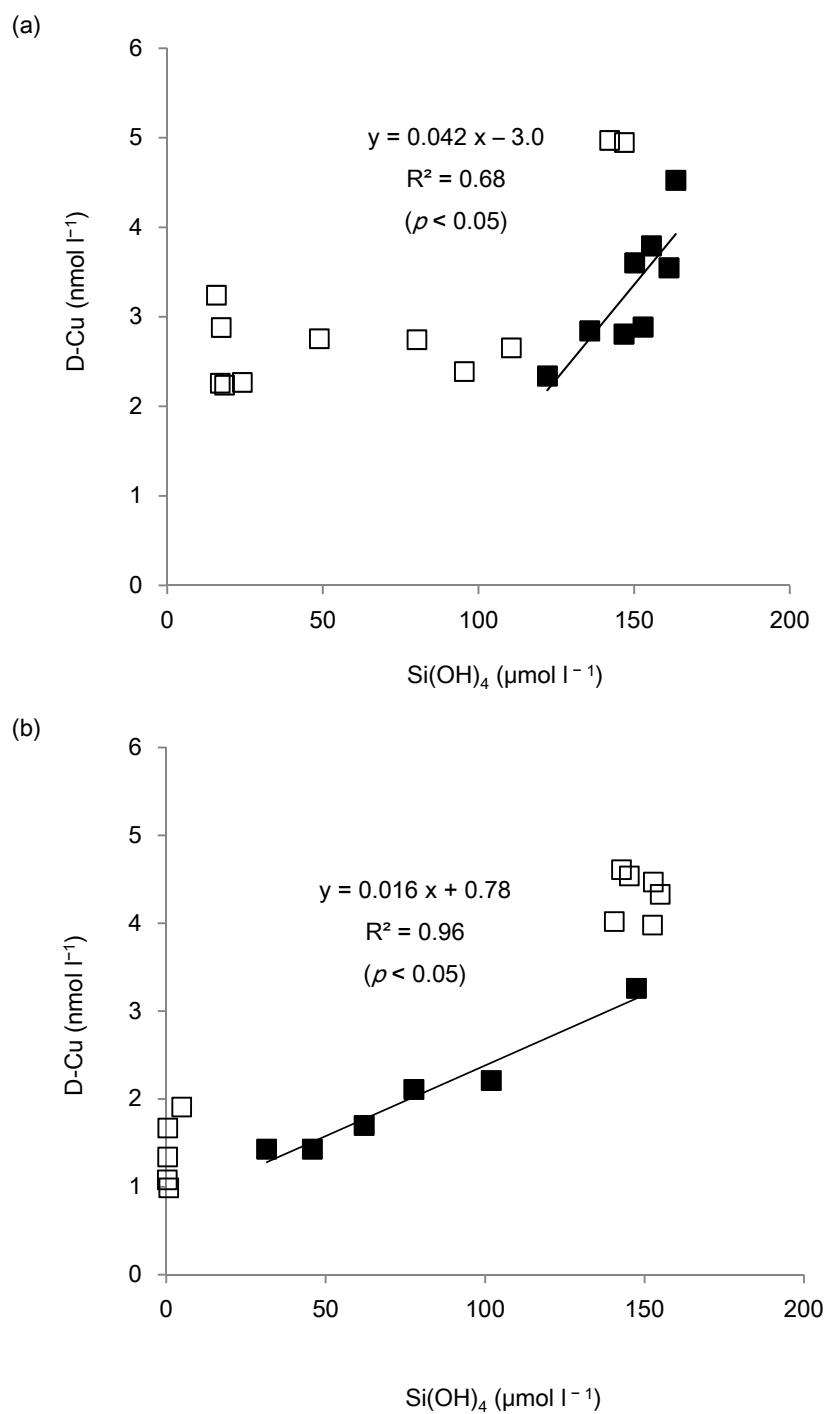


Fig. 3.7 測点5 (a) および22 (b) の全水柱における溶存銅濃度とケイ酸濃度の関係 (□および■)。測点5および22のそれぞれ300–2000 mおよび400–3000 mでは有意な正の相関が見られた ($p < 0.05$ 、図中の■で示したデータ)。

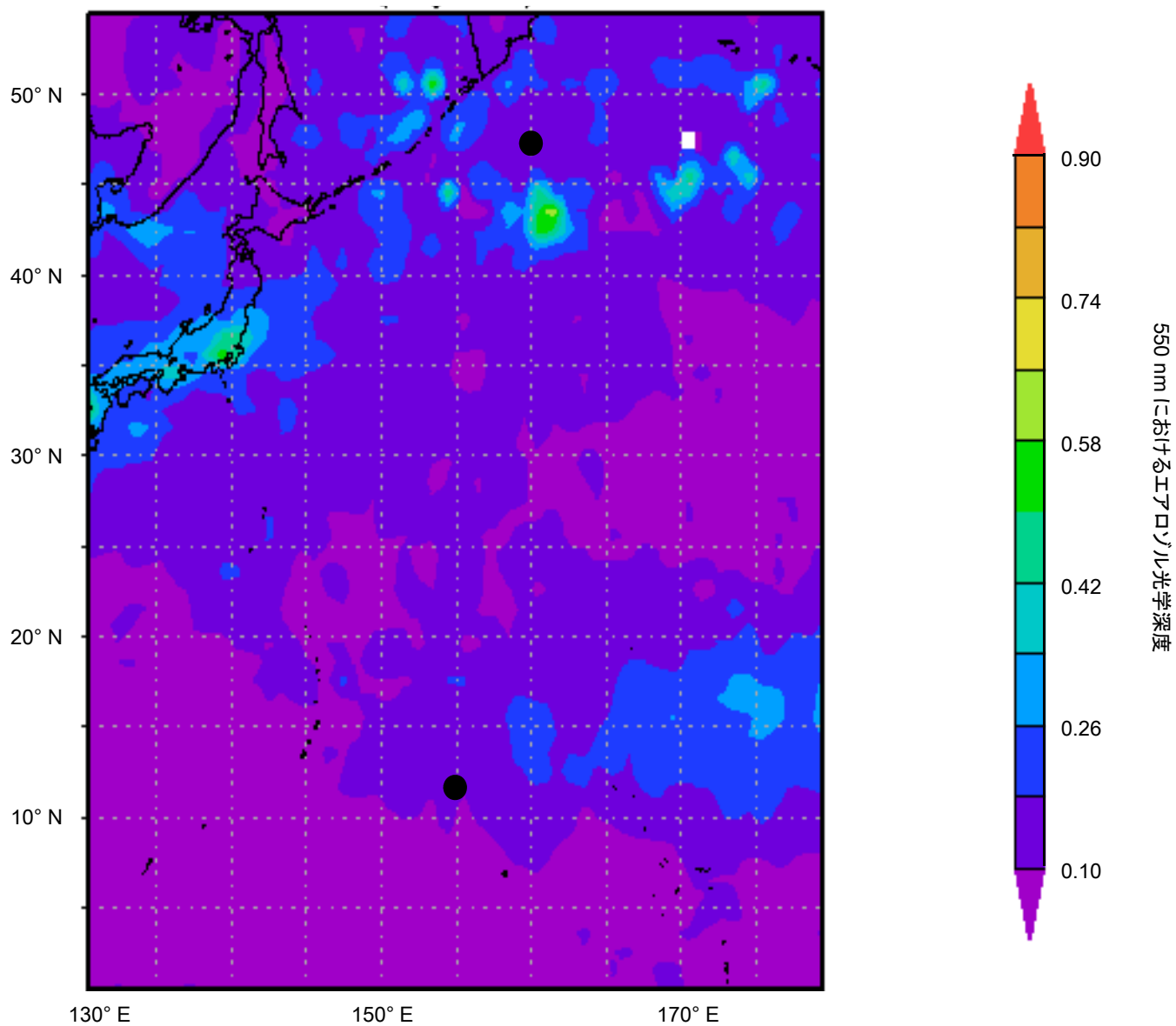


Fig. 3.8 MODIS-Aquaによる2008年8月の月平均の550 nmにおけるエアロゾル光学深度 (unitless)。Giovanniのウェブサイト (<http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/giovanni>) にて描画し、測点5および22の位置を黒点で示した。

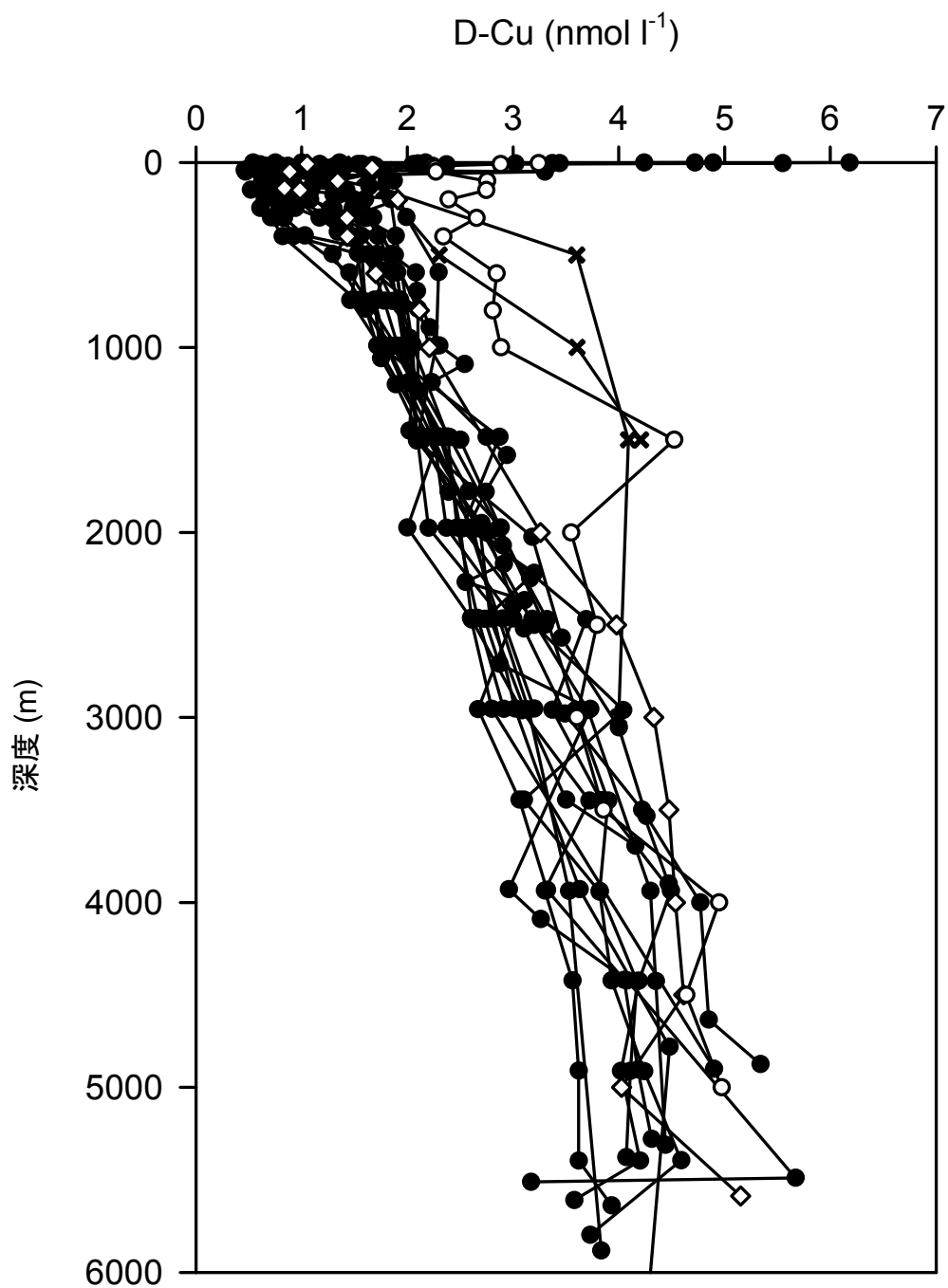


Fig. 3.9 太平洋における溶存銅の鉛直分布の既存知見 (●、Bruland 1980; Buck et al. 2012; Coale and Bruland 1990; Ezoe et al. 2004; Fujishima et al. 2001; Hirose et al. 1982; Midorikawa et al. 1990; Miller and Bruland 1994; Semeniuk et al. 2009; Takano et al. 2014; ×、Moffett and Dupont 2007) および本研究 (測点5: ○、測点22: ◇) のデータをまとめて一つの図にプロットした。

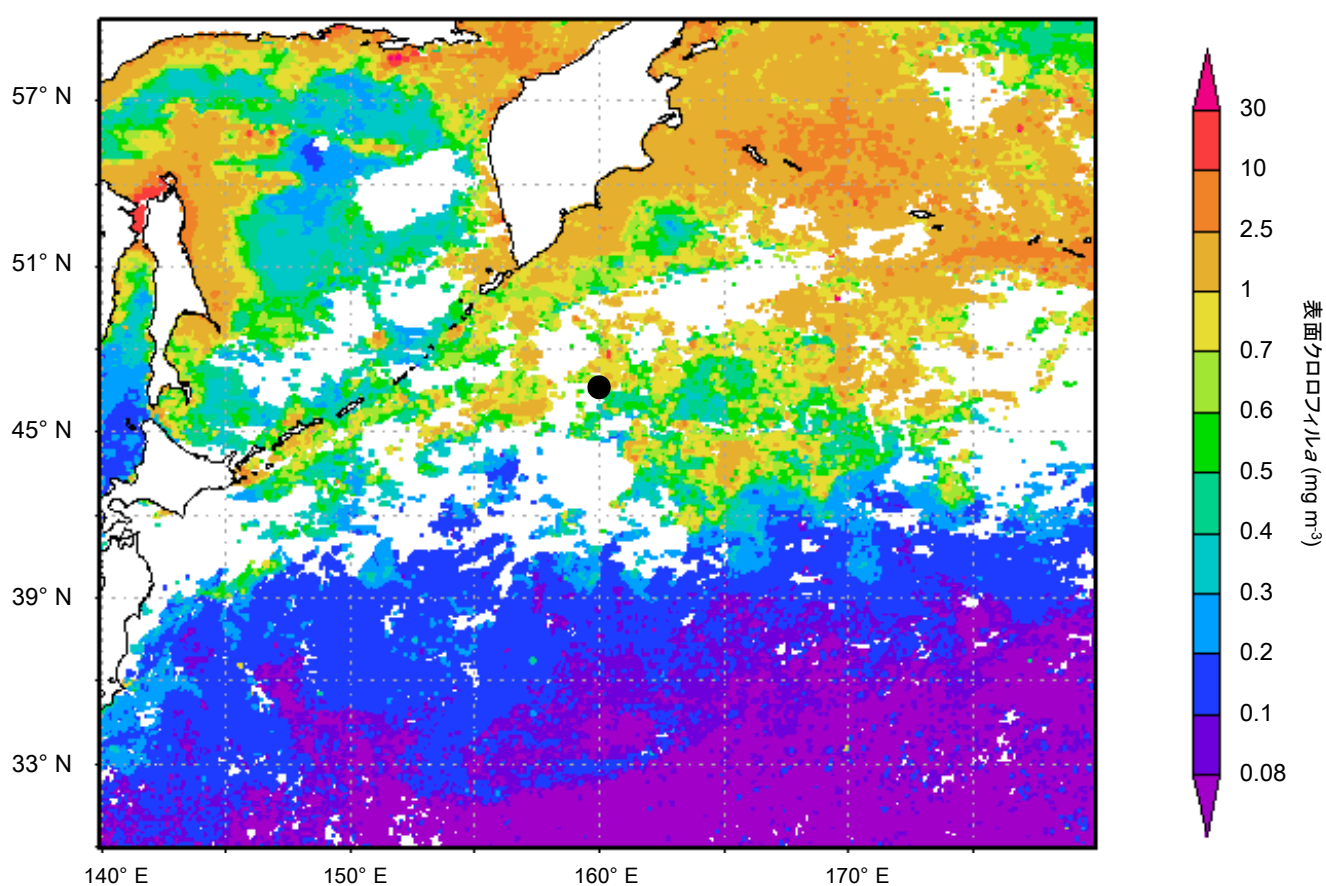


Fig. 3.10 2008年8月の海表面クロロフィル*a* 濃度の衛星画像。SeaWiFS 9 kmの月平均データを用い、Giovanni online data system (<http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/giovanni>) により描画した。測点5の位置は●で示した。

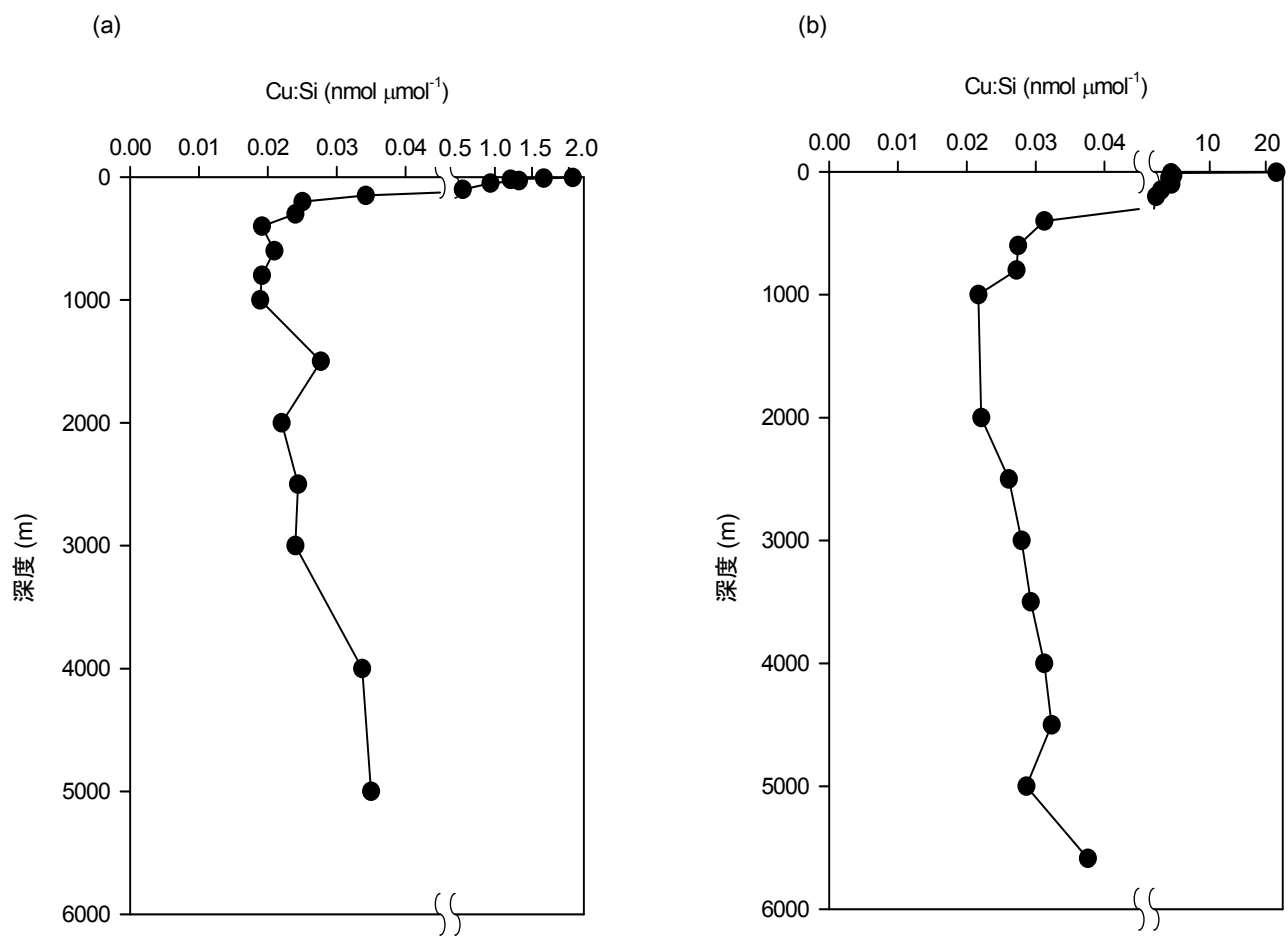


Fig. 3.11 測点5 (a) および22 (b) における Cu:Si 比 (溶存鉄濃度:ケイ酸濃度) の鉛直分布。

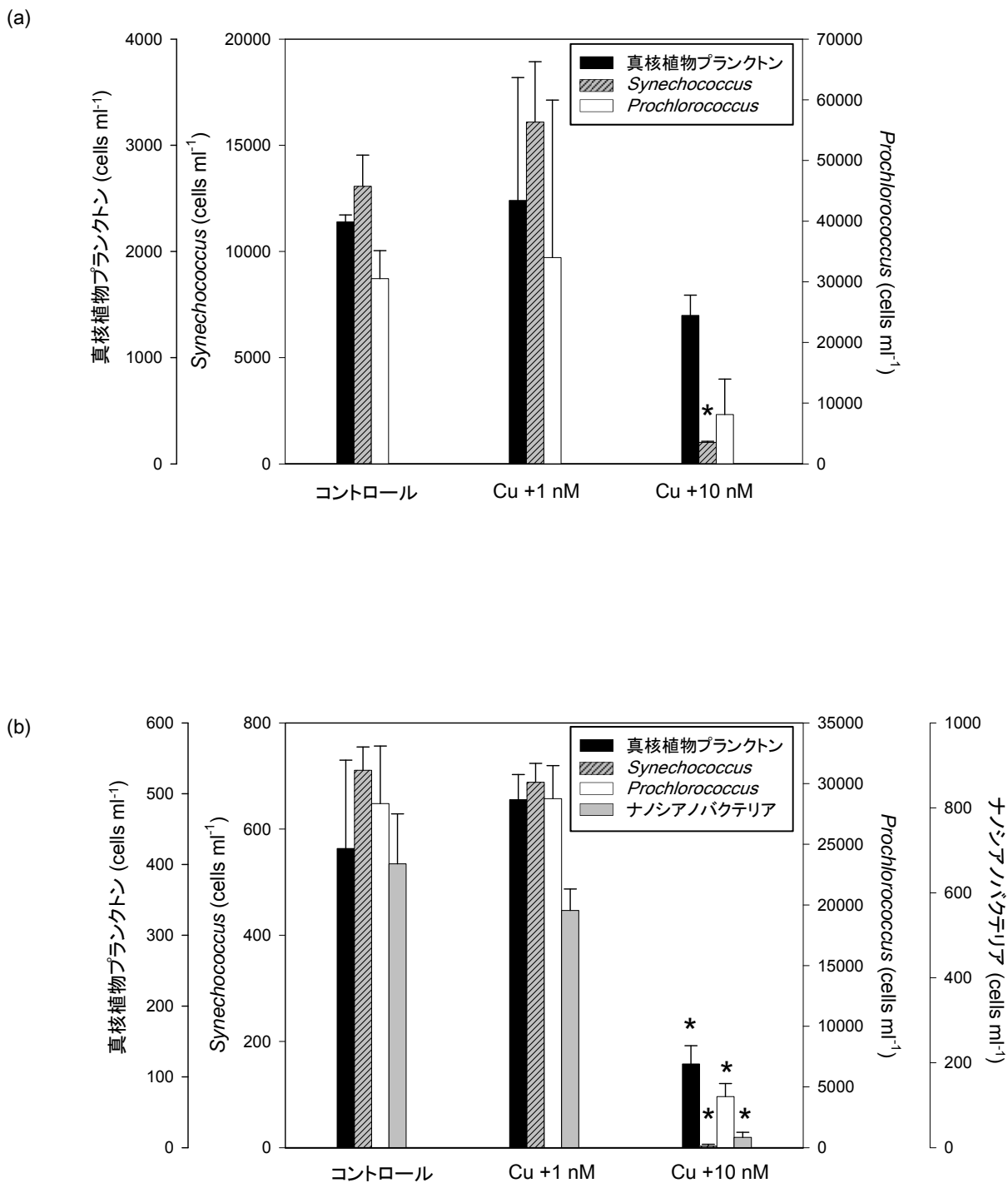


Fig. 3.12 KH-12-3次航海測点205 (a) および209 (b)、212 (c) における各添加系列の培養後のピコ・ナノ植物プランクトン細胞密度 (真核植物プランクトン、および *Synechococcus*、*Prochlorococcus*、ナノシアノバクテリア)。エラーバーはボトル間の標準偏差を示す。アスタリスク (*) はコントロールに対する有意差があったことを示す ($p < 0.05$)。

(c)

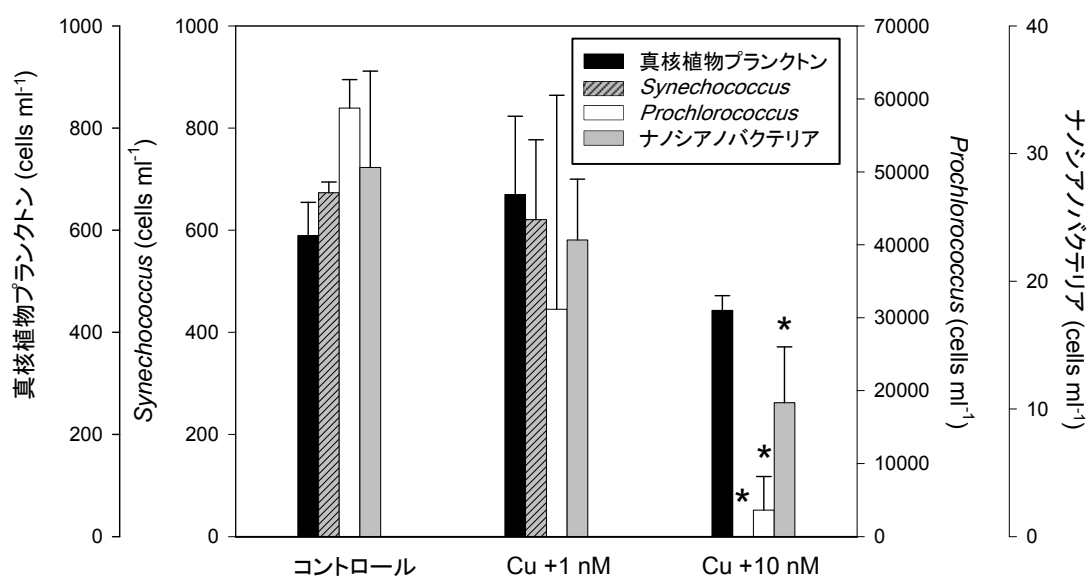


Fig. 3.12 続き。

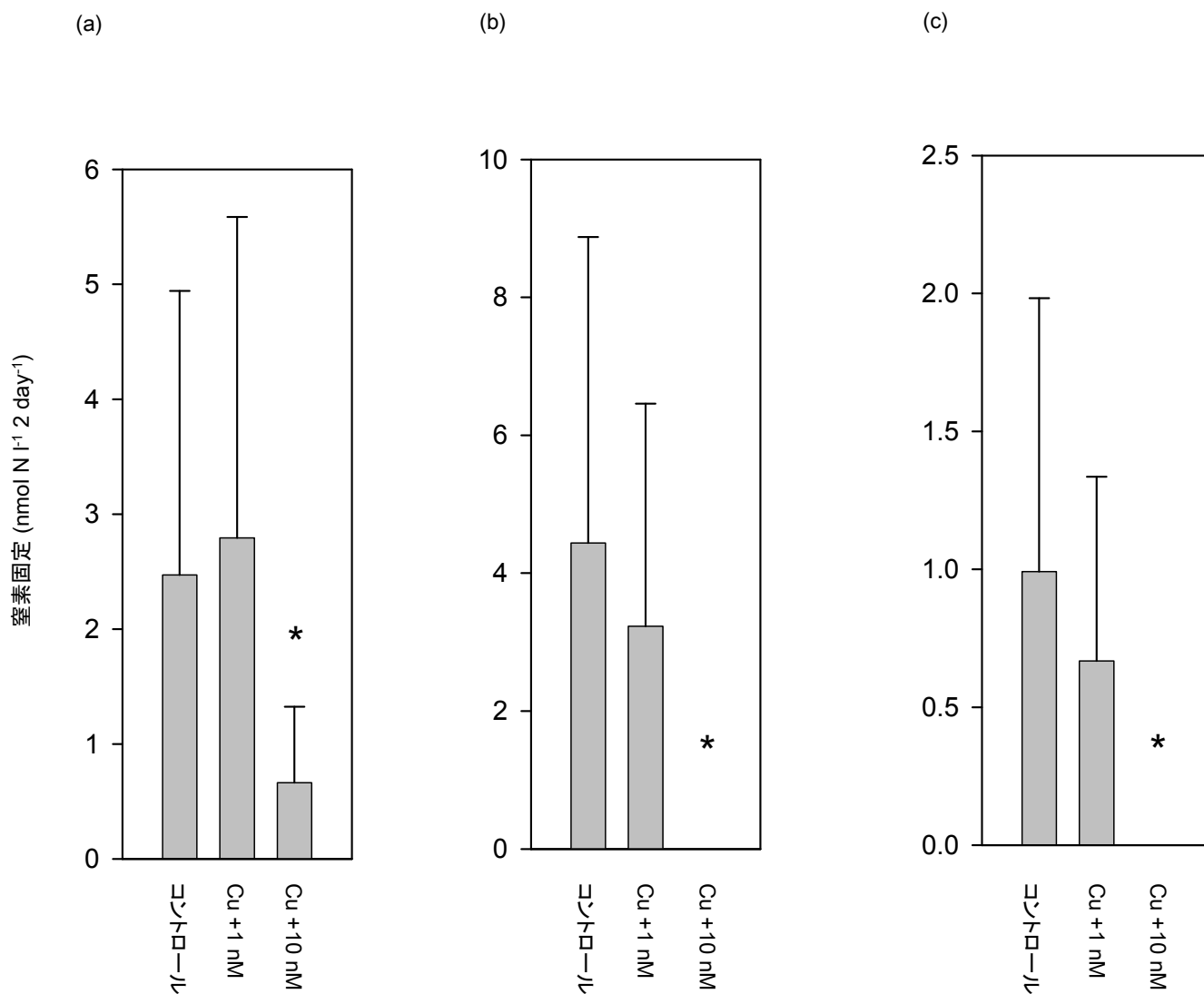


Fig. 3.13 KH-12-3次航海測点205 (a) および209 (b)、212 (c) における各添加系列の培養期間中 (2日間) の窒素固定活性。エラーバーはボトル間の標準偏差を示す。測点209および210の銅10 nM添加区では窒素固定が検出されなかった。アスタリスクはコントロールに対する有意差があったことを示す ($p < 0.05$)。

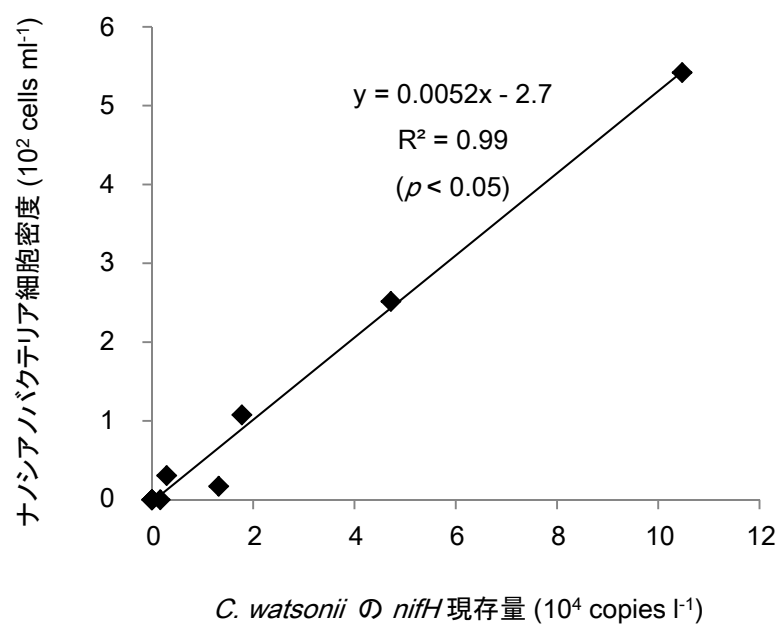


Fig. 3.14 KH-12-3次航海におけるナノシアノバクテリア細胞密度と *C. watsonii* の *nifH* 現存量の関係。

第四章 総合考察

本研究により、太平洋の窒素固定の鉄およびリンによる制限の地理的分布が明らかになった。

西部北太平洋の夏季にエアロゾル供給の特に高かった亜熱帯循環西部および北部において鉄制限を受けており、それよりも南のエアロゾル供給のやや低かった *C. watsonii* が優占した海域においてリン制限を受けていたことが明らかになった。西部北太平洋の冬季には、混合層が深くなり表層にリン酸塩が多く供給されることで、夏季と比較して SRP 濃度が高くなったと考えられた。したがって、ほとんどの測点では窒素固定のリン制限は見られなかったものの、30°N の東西観測ライン西部の 2 測点において低気圧性渦内部で混合層深度が浅くなっており、表層で SRP が枯渇していた。これらの測点で窒素固定のリン制限が見られたことから、渦により混合層が浅くなったことで表層へのリン酸塩供給が低下し、結果として窒素固定生物のリン制限につながったと考えられた。また、冬季航海の各測点のエアロゾル沈着は夏季航海と比較して極めて低かったにも関わらず、冬季航海において窒素固定の明瞭な鉄制限は観測されなかった。唯一、測点 104A においてリンと鉄の共制限が見られたが、この測点の添加実験ではリン酸塩と鉄を両方添加した系列でのみコントロールと比較して有意な窒素固定の増加が見られ ($p<0.05$)、鉄のみあるいはリン酸塩のみの添加区ではコントロールとの有意差は見られなかったため ($p>0.05$)、少なくとも窒素固定に対して鉄単独では制限となっていなかった。東シナ海ではリン酸塩の添加効果のみを診断したが、窒素固定のリン制限は見られなかった。一方、東部南太平洋においては、赤道湧昇域において窒素固定の鉄制限が見られたが、亜熱帯循環内部では鉄制限でなかった。本研究

では 80–100° W で観測を行った先行研究 (Dekaezemacker et al. 2013) よりも西の 100–127.5° W で観測を行ったが、窒素固定が赤道湧昇域で鉄制限であり、亜熱帯循環内で鉄制限でなかったという傾向は先行研究と同様であった。銅の窒素固定に対する影響はエアロゾル沈着の高かった夏季の西部北太平洋のみで評価したが、大気由来の銅供給は窒素固定を阻害しないと考えられた。また、既存知見から、東部北太平洋、東部南太平洋、中部太平洋赤道域においても溶存銅に対して 1 nM 以上の過剰の銅有機配位子が存在することが報告されているため (Coale and Bruland 1990; Miller and Bruland 1994; Jacquot et al. 2013)、西部北太平洋のみならず太平洋の外洋域全体で銅による窒素固定に対する影響は小さいと考えられた。

これらの結果から、窒素固定のリン制限は表層の SRP が枯渇した環境でのみ見られたことから、現場のリン酸塩濃度の低下が、窒素固定のリン制限が起こるための必要条件であると考えられた。一方、西部北太平洋で見られた窒素固定の鉄制限は現場の窒素固定生物の組成と関係していた可能性があり、特にエアロゾル供給の高い海域に生息する窒素固定生物群集が鉄添加に応答し、窒素固定が増加した。また、東部南太平洋でも鉄制限が見られたものの、このメカニズムは本研究からは明瞭には分からなかった。現場の窒素固定をどのような生物が担っているか、また、鉄添加が直接窒素固定を活性化するかあるいは生物生産を介した有機物供給により活性化されるのか、といった点について、より詳細な観測をする必要があるだろう。

栄養添加により窒素固定が増加した測点があった一方、添加効果の見られない測点も多かった。鉄やリン酸塩の添加による窒素固定の応答が見られた測点は無添加区の窒素固定活性が高か

った測点であった。これについては2つの要因が考えられる。まず、窒素固定生物がもともと少なかったために栄養添加に応答がなかった可能性がある。例えば、夏季の南部の測点211ではより北の添加効果の見られた測点208や209と比べて窒素固定生物が少なかった。次に、窒素固定生物の生理活性も重要であったと考えられる。現存量自体には大きな差がないにもかかわらず添加効果のあった測点となかった測点があったことから、おそらく現場の窒素固定生物の生理活性が低いために栄養添加に対して短期間に応答できなかったのではないかと考えられた。ただし、この場合の応答は窒素固定生物が増殖する場合と個体ごとの窒素固定活性が増加する場合が考えられるが、本研究では培養終了時の窒素固定生物の現存量を定量していないため、これらを区別することはできなかった。

栄養供給、窒素固定生物の分布、窒素固定の栄養による制限について、太平洋と大西洋を比較すると、いくつかの異なる特徴が挙げられる。まず、太平洋は相対的にエアロゾル供給が低く、また、東西に広いため、供給源に近い西部から東部にかけて大きな勾配が存在する (Moore and Braucher 2008)。一方、大西洋におけるエアロゾル供給は東で高く西で低いものの、季節によって西部まで比較的多くエアロゾルが輸送されることもある (Kaufman et al. 2005)。また、大西洋西部ではアマゾン川プルームにより栄養塩および鉄が供給されることで、窒素固定生物のホットスポットが形成されている (Foster et al. 2007)。こうした要因により、大西洋では大型の *Trichodesmium* spp. や *R. intracellularis* が太平洋と比べて広範な海域で多く分布するのに対し、太平洋で *Trichodesmium* spp. が多く分布するのはハワイや黒潮域、南太平洋の島嶼域といった海域

に限定され (Luo et al. 2012)、西部太平洋の亜熱帯循環内では小型の単細胞シアノバクテリアである *C. watsonii* が多く分布し、重要な窒素固定者となっていることが示唆されている (Kitajima et al. 2009; Sato et al. 2010)。また、東部南太平洋では鉄欠乏で窒素固定性シアノバクテリアが生息できず、おそらく従属栄養性窒素固定生物が主要な窒素固定者であると考えられており (Bonnet et al. 2008; Dekaezemacker et al. 2013)、実際にいくつかの *nifH* 遺伝子の配列が定量されたものの、いまだ主要な窒素固定者の種類やその分布についての知見は限られている (Halm et al. 2012; Turk-Kubo et al. 2014)。

本研究と既存知見の添加実験の結果を比較すると、このような窒素固定生物の組成の海域的変動とそれに伴う窒素固定活性の変動が、窒素固定の鉄あるいはリン酸塩の添加に対する応答の違いにつながっていることが示唆される。まず、大西洋では鉄添加による窒素固定の増加は東西全域で見られ、リン添加による窒素固定の増加はエアロゾル供給が大きくリン酸塩の消費の大きい東部で報告されている。一方で、太平洋では添加に応答する海域もあったものの、先述のように、半分以上の測点では鉄あるいはリン酸塩の添加に対する応答が見られなかった点が特徴的であった。これについては、前述のように大西洋では大気あるいは河川由来の鉄供給が多いために、窒素固定に好適な環境が形成されているのに対し、太平洋では鉄の供給が低いため、窒素固定生物の活性が低かった、あるいは冬季西部北太平洋の航海のように窒素固定生物の現存量がそもそも低かったために栄養添加に対して応答する能力がなかったことが要因であった可能性がある。

次に、鉄制限とリン制限について個別にその地理的分布を見てみる。鉄制限は鉄供給の多い大西

洋では東部から西部まで全域的に報告されている (Table 1.1)。これに対し、太平洋では鉄制限は西部北太平洋、ハワイ近海、西部南太平洋といった鉄が比較的多く供給されと考えられる海域と、東部南太平洋の赤道湧昇域に限られる。このことから、鉄供給のもとと多い海域に分布する窒素固定生物群集において鉄添加による窒素固定の上昇が見られる傾向がある。一方、リン酸塩の添加に対する窒素固定の応答は太平洋でも大西洋でも現場リン酸塩の枯渇した環境に限定される。ただし、鉄添加の場合と同様に、太平洋では現場の窒素固定生物の組成あるいは活性が低い場合は現場リン酸塩濃度が低くてもリン酸塩添加による窒素固定活性の上昇は起こらない場合があった。

大西洋と太平洋の間の、あるいは太平洋内部でのこのような窒素固定の栄養供給に対する短期的な応答の違いは、窒素固定の栄養の利用効率に影響すると予想される。大気由来の鉄供給を時空間的に均一であると仮定したモデルでの窒素固定への影響の見積りが、観測に対して過小評価であることが近年指摘されており、そのような非定常的供給に対する短期的な応答が窒素固定や基礎生産に対して長期的に大きな寄与となることが指摘されている (Guieu et al. 2014)。したがって、大西洋や太平洋の栄養添加による窒素固定の増加が見られた海域では、窒素固定が増加しなかった海域に比べ、非定常的な栄養供給がより効率的に窒素固定を促進し、新生産に寄与する可能性がある。したがって、今後、こうした海域間の違いを考慮しつつ非定常的栄養供給が窒素固定に与える影響を評価することが重要であると考えられる。

このような非定常的な栄養供給過程として、エアロゾルの供給のほかには島効果 (Furuya et

al. 1986; Takeda et al. 2007; Hasegawa et al. 2009; Shiozaki et al. 2014b) や台風に伴う湧昇 (Chung et al. 2012) が知られている。しかし、これらの過程の間では、プランクトン群集に与える影響が互いに異なる。ダストストームでは *Prochlorococcus* が減少し、*Synechococcus* が増加するという傾向が一貫しており (Chung et al. 2012; Herut et al. 2005)、非窒素固定性シアノバクテリア同士の遷移が起こる一方、台風による湧昇では窒素リンが表層にマイクロモルレベルで供給されるため、鎖状中心目珪藻が優占し、*Trichodesmium* spp. と渦鞭毛藻は減少することが報告されている (Chung et al. 2012)。また、亜熱帯海域の島周辺での湧昇も同様に珪藻の優占を引き起こすことが知られている。ただし、その後の栄養消費による還元態窒素の枯渇とともに珪藻がいなくなることで、窒素固定生物のホットスポットとなることが報告されている (Shiozaki et al. 2014b)。このように、供給過程により栄養塩と鉄の供給比あるいは供給レベルを反映して、植物プランクトンの群集組成の遷移の過程が異なるため、結果として、これらの過程が窒素固定生物に及ぼす影響もそれぞれ異なると考えられる。エアロゾルの供給過程における窒素固定生物の動態については比較的研究されているものの、島効果をはじめとする他の栄養供給過程については窒素固定生物の動態はまだあまり調べられていない。したがって、今後はこれらの異なった栄養供給様態によって、非窒素固定生物および窒素固定生物の応答がどのように異なるかを明らかにすることも重要であると考えられる。

また、本研究では大気由来の銅供給は植物プランクトンに毒性を及ぼすほどではないと考えられたものの、本研究および先行研究 (Bruland 1980; Boyle et al. 1981) で陸域由来の供給により

溶存銅濃度が平均的な値から数 nmol l^{-1} 上昇する様子が観測されたことから、島周辺の窒素固定には銅供給が影響を及ぼす可能性はある。これを評価する際に、銅の供給量に加えて銅有機配位子がどの程度供給されるかも重要であるが、亜熱帯域の島では銅との配位能をもつ腐植物質がそれほど存在しないと考えられる。したがって、鉱物が多量に海洋に流入すれば、その近辺で一時的に銅毒性が発揮されることはあるかもしれない。ただし、亜熱帯域には強力な銅有機配位子を生成する能力を持つ *Synechococcus* が多く分布するため (Moffett et al. 1990)、実際にこうした海域において銅の毒性が発揮されるのかどうかは、現場の銅の濃度と化学形態を観測することにより明らかにする必要がある。また、銅毒性はピコ・ナノ植物プランクトンについて、真核植物プランクトンよりもシアノバクテリアに強く作用することが本研究の銅添加実験の結果や Croot et al. (2000) の室内培養実験から示唆されるため、島から多量に供給された硝酸塩の消費および希釈に伴って珪藻中心の群集から窒素固定生物群集へと遷移する過程に阻害的に働く可能性がある。また、銅毒性は重度の場合は細胞自体を死滅させるが (Rijstenbil et al. 1994)、光化学系 II を阻害することや (Cid et al. 1995; Lombardi and Maldonado 2011; Deng et al. 2014)、光合成系を酸化ストレスから守るカタラーゼ活性を阻害することも知られており (Stauber and Florence 1987)、光合成系による炭化水素生産の阻害を通じて窒素固定能力を低下させる可能性も考えられる。

本研究では太平洋の窒素固定の鉄制限およびリン制限の分布を明らかにしたが、これらの制限が起こるメカニズムについては本研究の結果からは明確には分らない。しかし、鉄制限の起こるメカニズムについては第 2 章で以下の 2 つの可能性を挙げた。

まず、第一の可能性として、高エアロゾル域で鉄要求の高い窒素固定生物が分布することで窒素固定が鉄制限となり、低エアロゾル域で鉄要求の低い窒素固定生物が分布することで鉄制限にならなかったという可能性が考えられる。これについては、需要と供給を明らかにする必要がある。需要に関しては、西部北太平洋の夏季リン制限海域で優占した窒素固定シアノバクテリア *C. watsonii* は、光合成と窒素固定を時間的に隔離することにより約 40%の鉄を節約していると見積もられている (Saito et al. 2011)。これにより、エアロゾル供給の比較的低い海域に生息できた可能性がある。しかしながら、本研究では分布については調べたが、実際に *C. watsonii* が他の窒素固定生物と比べて鉄欠乏の影響を受けていなかったのかどうかについてはよく分からない。したがって、細胞内の鉄および炭素の貯蔵、あるいはそれらと関連した遺伝子またはタンパク発現を現場観測することにより、現場窒素固定生物群集の鉄の需要について明らかにすることが必要だろう。また、窒素固定生物が利用可能な鉄がどの程度供給されているのかも重要である。夏季 KH-12-3 次航海ではエアロゾル沈着が研究海域の南で低く、西および北で高いと見積もられたが、Buck et al. (2006) の5月のエアロゾル中鉄濃度の実測値でも同様の分布が報告されている。しかし、それがどの程度溶解するのかについては、知見が限られている (Buck et al. 2006; Takeda et al. 2014)。特に、エアロゾルは輸送中に粒子径や組成が変化するのに伴い、鉄の溶解度も変化することが大西洋で報告されている (Baker and Jickells 2006; Chen and Siefert 2004)。東アジア由来の黄砂とサハラダストでは組成や溶解度も異なるため、太平洋においても輸送過程におけるダスト粒子の溶解度の変化を明らかにすることが重要である。また、現場の窒素固定生物がどの程

度、溶解した鉄を利用できるのかについて鉄の化学形態とともに明らかにすることも必要である。

次に、第二の可能性として、鉄供給に対して窒素固定を短期間で増加させる生理的活性を窒素固定生物が持っていたかどうかに関係していた可能性が考えられる。鉄供給に対して短期間で窒素固定を回復させる能力がどのように制御されているのかははっきりとは分からないものの、光合成が関わっている可能性がある。光合成は窒素固定に必要なエネルギーを生成しているほか (Mitsui et al. 1986)、有機物合成に伴う窒素要求が生じることで窒素固定の必要性が増すと考えられる。実際に、 $p\text{CO}_2$ 上昇による光合成の上昇に伴って窒素固定が促進された例が *C. watsonii* 培養株を用いた実験で報告されている (Fu et al. 2008)。また、*T. erythraeum* IMS101 株は鉄欠乏条件下でまず窒素固定を優先的に抑制して、光化学系 I およびフィコビリナンパク、電子伝達タンパクの発現は維持し (Shi et al. 2007; Küpper et al. 2008)、その後 16–20 日間鉄欠乏が続くと、色素組成の変化とともに窒素固定がほぼ完全に回復することが報告されている (Küpper et al. 2008)。これに加えて、鉄を含む電子伝達タンパクであるフェレドキシンの代替として鉄を含まないフラボドキシンを鉄欠乏状態で発現することが知られている (Lin et al. 2009)。このような調節機構により窒素固定に必要なエネルギーを生産する光合成系が維持されることで、鉄が供給された際に 1 日 (Shi et al. 2007) と比較的短期間で窒素固定が応答を始めることが可能なのかもしれない。このことから、*T. erythraeum* IMS101 株は光合成系を維持している限りは、鉄欠乏状態から窒素固定を回復させるメカニズムを持っていることがうかがえる。本研究の夏季西部北太平洋 20° N 以南においては、鉄添加に対して窒素固定の増加は見られなかったが、この海域では窒素固定生

物群集内で *C. watsonii* が優占していた。*C. watsonii* は夜間に窒素固定、昼間に光合成を行うことで、一度に必要とする鉄タンパクの量を減らし、細胞鉄含量を節約していることが知られている (Saito et al. 2011)。この戦略は、より鉄供給の低い海域でも生息できるという点でメリットとなるが (Saito et al. 2011)、一方で、*Trichodesmium* spp. の持つ光合成系を維持しながらの窒素固定回復メカニズムは持てない可能性がある。すなわち、*C. watsonii* においては、光合成系とニトロゲナーゼが同一の画分の鉄を共有しているため、鉄が不足した場合はそのいずれもが維持できなくなる可能性があるためである。ただし、*C. watsonii* の鉄欠乏時の生理的応答はまだよく分かっていないので、これらの点については今後明らかにする必要がある。また、*Trichodesmium* spp. も実際にはシアノサイトと栄養細胞で窒素固定と光合成を別の細胞で行っているため、*C. watsonii* と比較して 2 倍程度あると指摘されている (Saito et al. 2011) 細胞内鉄含量は贅沢取り込み (Kustka et al. 2003) による細胞内貯蔵に由来する可能性もある。いずれにせよ、*Trichodesmium* spp. は鉄要求量が高いというデメリットを持つと同時に、細胞内に多くの鉄を貯蔵することで一時的な鉄欠乏が緩和された際に窒素固定を速やかに回復させる能力を持ち、それによって、非定常的な鉄供給を有効に利用できるというメリットを持っている可能性がある。このような窒素固定生物間の戦略の違いが、本研究の夏季西部北太平洋における窒素固定の鉄制限海域とリン制限海域の地理的境界の原因であった可能性も考えられる。したがって、これらの窒素固定生物の栄養供給時における窒素固定の制御がどのような生理パラメータと関係しているのかを明らかにすることが重要であると考えられる。

一方、リン酸塩添加効果の有無がどのような要因に影響されたのかについては本研究のデータからは説明できなかった。SRP 濃度とリン酸エステル (Sato et al. 2013) はいずれも低濃度であり、リン制限の測点と鉄制限の測点の間に違いは認められなかったことから、これらはリン制限の有無を決める要因とは考えられなかった。ただし、有機リンのうちホスホン酸の濃度については分かっていない。本研究の夏季の西部北太平洋では *C. watsonii* の分布域を中心に窒素固定活性のリン制限が見られたこと、*C. watsonii* はホスホン酸を分解できないという既存知見を考慮すると、ホスホン酸の利用能が窒素固定活性のリン制限と関係していた可能性は否定できない。したがって、今後はホスホン酸の分布についても明らかにするとともに、*Trichodesmium* spp. や *C. watsonii* 以外の窒素固定生物の有機リン利用能についても明らかにする必要があるだろう。

結論

本研究により、西部北太平洋亜熱帯域の窒素固定が鉄制限およびリン制限の地理的分布が初めて明らかになった。鉄制限とリン制限の海域は異なり、亜熱帯循環内でエアロゾル沈着の高い夏季の西部および北部で鉄制限、エアロゾル沈着の低い南部でリン制限であり、その境界域でリンと鉄の共制限であった。こうした制限栄養素の海域間の変動は現場窒素固定生物の組成の変化に伴う窒素固定生物群集全体の栄養要求性あるいは栄養添加に対する窒素固定活性の応答の違いを反映したものであると考えられた。冬季には鉛直混合により表層のリン酸塩濃度が上昇したことで、局所的にリン酸塩の枯渇した中規模渦内を除いて窒素固定のリン制限は解除された。東

シナ海においてはリン酸塩添加の効果についてのみ診断し、窒素固定はリン制限でないことが明らかとなった。東部南太平洋の赤道湧昇域では窒素固定は鉄制限であったが、一方、亜熱帯循環域内部においては鉄制限でなく、先行研究の報告と一致した。また、鉄とリン酸塩の他に、銅が窒素固定に及ぼす影響についても評価したが、大気由来の銅供給は窒素固定の阻害要因とはならないと考えられた。

太平洋の窒素固定の鉄添加への応答を決める要因として、現場の窒素固定生物の組成が重要であると考えられたが、窒素固定生物の組成自体はおそらく大気由来の鉄の供給を反映し、西部北太平洋のエアロゾル沈着の多い海域とやや少ない海域、エアロゾル沈着の非常に少ない東部南太平洋でそれぞれ窒素固定生物の組成に違いが見られた。ただし、水温や有機物供給などのその他の環境要因も窒素固定生物の組成に影響を及ぼしている可能性も考えられた。リン酸塩の添加に対する窒素固定の応答はリン酸塩枯渇域に限定されたことから、太平洋の外洋域ではリン酸塩が数十 nmol l^{-1} 以上存在する環境ではリンは窒素固定の制限要因ではないと考えられた。

サハラダストの供給とアマゾン川プルームにより東西に広く鉄が供給されている大西洋と比較すると、太平洋は大気由来の鉄供給の海域間の差が大きいため、それに伴う窒素固定生物の組成の海域的変動も大きかった。これに伴って、栄養添加に対する窒素固定の短期的応答の有無にも海域的な違いが見られた。この原因として、鉄供給量の地理的変動により現場群集の鉄要求量が増加した可能性と、窒素固定生物間の鉄欠乏状態から窒素固定を回復させる能力の違いによる可能性が考えられる。天然における栄養供給様態は、特にエアロゾル供給に見られるように、時

空間的に不均一なものであるため、これに対する窒素固定の応答の有無は、供給された栄養素が窒素固定を通して生物生産にどの程度寄与するかを左右する可能性がある。今後、現場において窒素固定生物の窒素固定活性に加えて光合成系等の生理活性を同時に評価することで、これらのメカニズムを明らかにできると期待される。

摘要

1. 本研究では、太平洋において窒素固定を制御する要因について、特に鉄、栄養塩、水温および銅に着目しつつ明らかにし、それらの制御要因の海域間での違いがどのような環境要因と関連しているのかを明らかにすることを目的とした。
2. 窒素固定生物の分布を制御する要因として鉄および水温が重要であると考えられ、特に夏季西部北太平洋ではエアロゾル沈着により溶存鉄濃度が上昇したと考えられる海域で *Trichodesmium* spp. および γ -プロテオバクテリア 24774A11 の *nifH* 現存量が高く、エアロゾル供給の低いと考えられる海域で *C. watsonii* の *nifH* 現存量が高かった。また、UCYN-A や *C. watsonii* の分布を決める要因として水温も重要であると考えられた。
3. 窒素固定の鉄制限の地理的パターンは海水中の溶存鉄濃度や鉄の供給源として重要なエアロゾルの沈着が少ない海域とは必ずしも一致せず、むしろエアロゾルの沈着が多く、窒素固定活性の高かった測点で観測された。
4. 窒素固定のリン制限の地理的パターンは現場リン酸塩濃度の枯渇と比較的一致したことから、太平洋で無機リン酸塩が数十 nmol l^{-1} 以上存在する環境では、リンは窒素固定を制限しないと考えられた。

5. 鉄あるいはリン酸塩の添加に対する窒素固定活性の上昇が見られた測点では、無添加区の窒素固定活性がそもそも高く、窒素固定の活発な海域はそうでない海域と比較して、非定常的な栄養供給がより効率的に窒素固定に寄与する可能性がある。
6. カソーディックストリップングボルタンメトリーによる溶存銅濃度の測定において、本研究で用いた測定条件では、西部北太平洋の外洋サンプルについて前処理としてサンプルに対する紫外線照射の必要はないことが分かった。
7. 西部北太平洋亜寒帯域において表面から 1500 m にかけて高い溶存銅濃度が観察され、海表面における沿岸水の水平移流および、生物ポンプによる銅の下層への輸送、水平移流による有光層以深への輸送が主要な銅供給プロセスとして考えられた。
8. 西部北太平洋亜熱帯循環において、銅有機配位子の濃度および条件安定度定数から、大気由来の銅供給は窒素固定を阻害するレベルではないと考えられた。また、銅濃度が大幅に上昇した場合は、銅の毒性は真核ピコ・ナノ植物プランクトンよりもシアノバクテリアに大きく作用し、いずれの測点においても窒素固定活性も大幅に減少させることが明らかになった。特に、*C. watsonii* の優占する海域において、窒素固定活性に対する銅の阻害効果が大きかつ

た。

9. 本研究から、鉄供給に対して窒素固定が上昇するのは夏季のエアロゾル供給の高い西部北太平洋の亜熱帯域西縁部および北縁部、東部南太平洋赤道湧昇域であり、リン酸塩の添加により窒素固定が上昇するのは夏季西部北太平洋亜熱帯循環のややエアロゾル供給の低い南部の海域および冬季の中規模渦により表層のリン酸塩の枯渇した環境であることが明らかになった。
10. 鉄やリン酸塩の添加培養実験において窒素固定の上昇が見られた海域が大西洋と比較して太平洋では限られており、非定常的な栄養供給が窒素固定に及ぼす影響が海域間で異なる可能性が示された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切な指導を賜り、論文の完成に導いていただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻水圏生物環境学研究室の古谷 研教授に深く感謝するとともに、厚くお礼申し上げます。また、同研究室の高橋一生准教授、佐藤光秀助教、福代康夫特任教授、東京大学アジア生物資源環境研究センターの岩滝光儀准教授には、本研究について様々な指導および助言をいただきましたことを、この場を借りてお礼申し上げます。

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科の武田重信教授および東京大学大気海洋研究所の小畑元准教授には微量金属に関する実験手法および論文執筆に関して多くの助言をいただきましたことを感謝申し上げます。

東京大学大気海洋研究所の植松光夫教授および津田敦教授、小川浩史准教授には海洋研究開発機構学術研究船「白鳳丸」KH-08-2 および KH-11-10、KH-12-3 次航海において、便宜を図っていただくとともに、CTD および栄養塩、クロロフィル *a* のデータを提供していただいたことに深く感謝申し上げます。

また、同大気海洋研究所の津田敦教授および齊藤宏明准教授には、「白鳳丸」KH-11-10 および KH-12-3 次航海で行った光観測について多大なご助力をいただいたことについて厚くお礼申し上げます。

北里大学海洋生命科学科の林崎健一准教授および角田崇氏には、炭素および窒素の元素量・同位体比分析について、機器を使用させていただき、丁寧なご指導をいただきましたこと

を深く感謝申し上げます。

九州大学応用力学研究所竹村俊彦教授には SPRINTARS のデータをご提供いただいたことに厚くお礼申し上げます。

カリフォルニア大学サンタクルス校の Kenneth W. Bruland 教授および同リサーチスペシャリストの Geoffrey J. Smith 氏には微量金属の標準海水をご提供いただいたことを深く感謝申し上げます。

東京大学大気海洋研究所の塩崎拓平博士には窒素固定および *nifH* 遺伝子に関する実験および解析に関して指導していただき、論文執筆においても有益な助言をいただきました。また、本論文で使用した基礎生産および栄養塩データの一部を提供いただきましたことを心よりお礼申し上げます。

水産総合研究センター日本海区水産研究所の児玉武稔研究員には高感度分析法による栄養塩データの提供と、測定法についてご指導いただきましたことを深く感謝申し上げます。

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科の近藤能子助教には微量金属の測定および解析についてご指導いただきましたことを深く感謝申し上げます。

石油天然ガス・金属鉱物資源機構の三木周博士には、植物プランクトン色素組成の測定および解析について様々なご助言をいただきましたことを深く感謝しております。

海洋研究開発機構学術研究船「白鳳丸」KH-08-2、KH-11-10、KH-12-3 次航海および「淡青丸」KT-11-23、KT-12-24 次航海の船長ならびに乗組員の皆様、乗船研究者およびマリナー

クジャパンの観測技術員の皆様には観測作業にご協力いただいたうえ、船内生活においても大変お世話になりました。心よりお礼申し上げます。

最後に、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様には航海や実験、研究生活のあらゆる面においてお世話になりました。心よりお礼申し上げます。

参考文献

- Achilles, K. M., T. M. Church, S. W. Wilhelm, G. W. Luther III, and D. A. Hutchins. 2003. Bioavailability of iron to *Trichodesmium* colonies in the western subtropical Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 2250–2255.
- Annett, A. L., S. Lapi, T. J. Ruth, and M. T. Maldonado. 2008. The effects of Cu and Fe availability on the growth and Cu : C ratios of marine diatoms. *Limnol. Oceanogr.* **53**: 2451–2461.
- Baker, A. R., and T. D. Jickells. 2006. Mineral particle size as a control on aerosol iron solubility. *Geophys. Res. Lett.* **33**: 1–4.
- Barcelos e Ramos, J., H. Biswas, K. G. Schulz, J. LaRoche, and U. Riebesell. 2007. Effect of rising atmospheric carbon dioxide on the marine nitrogen fixer *Trichodesmium*. *Global Biogeochem. Cycles* **21**: 1–6.
- Bench, S. R., P. Heller, I. Frank, M. Arciniega, I. N. Shilova, and J. P. Zehr. 2013. Whole genome comparison of six *Crocospaera watsonii* strains with differing phenotypes. *J. Phycol.* **49**: 786–801.
- Bergman, B., G. Sandh, S. Lin, J. Larsson, and E. J. Carpenter. 2013. *Trichodesmium* - a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 286–302.
- Berman-Frank, I., P. Lundgren, Y. Chen, H. Küpper, Z. Kolber, B. Bergman, and P. Falkowski. 2001. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science* **294**: 1534–7.
- Bhaskar, P. V, and N. B. Bhosle. 2006. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environ. Int.* **32**: 191–8.
- Bingham, F. M., and R. Lukas. 1996. Seasonal cycles of temperature, salinity and dissolved oxygen observed in the Hawaii Ocean Time-series. *Deep-Sea Res. Part II* **43**: 199–213.
- Bitton, G., and V. Freiihofer. 1978. Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microb. Ecol.* **25**: 119–125.

- Bombar, D., P. H. Moisander, J. W. Dippner, R. A. Foster, M. Voss, B. Karfeld, and J. P. Zehr. 2011. Distribution of diazotrophic microorganisms and *nifH* gene expression in the Mekong River plume during intermonsoon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **424**: 39–52.
- Bombar, D., P. Heller, P. Sanchez-Baracaldo, B. J. Carter, and J. P. Zehr. 2014. Comparative genomics reveals surprising divergence of two closely related strains of uncultivated UCYN-A cyanobacteria. *ISME J.* **8**: 2530–2542.
- Bonnet, S., C. Guieu, F. Bruyant, O. Prášil, F. Van Wambeke, P. Raimbault, T. Moutin, C. Grob, M. Y. Gorbunov, J. P. Zehr, S. M. Masquelier, L. Garczarek, and H. Claustre. 2008. Nutrient limitation of primary productivity in the Southeast Pacific (BIOSOPE cruise). *Biogeosciences* **5**: 215–225.
- Bonnet, S., J. Dekaezemacker, K. A. Turk-Kubo, T. Moutin, R. M. Hamersley, O. Grosso, J. P. Zehr, and D. G. Capone. 2013. Aphotic N₂ fixation in the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *PLoS One* **8**: e81265.
- Boström, K. H., L. Riemann, M. Kühl, and Å. Hagström. 2007. Isolation and gene quantification of heterotrophic N₂-fixing bacterioplankton in the Baltic Sea. *Environ. Microbiol.* **9**: 152–164.
- Böttjer, D., D. M. Karl, R. M. Letelier, D. A. Viviani, and M. J. Church. 2014. Experimental assessment of diazotroph responses to elevated seawater *p*CO₂ in the North Pacific Subtropical Gyre. *Global Biogeochem. Cycles* **28**: 601–616.
- Boye, M., B. D. Wake, P. Lopez Garcia, J. Bown, A. R. Baker, and E. P. Achterberg. 2012. Distributions of dissolved trace metals (Cd, Cu, Mn, Pb, Ag) in the southeastern Atlantic and the Southern Ocean. *Biogeosciences* **9**: 3231–3246.
- Boyle, E. A., F. R. Sclater, and J. M. Edmond. 1977. The distribution of dissolved copper in the Pacific. *Earth Planet. Sci. Lett.* **37**: 38–54.
- Boyle, E. A., S. S. Husted, and S. P. Jones. 1981. On the distribution of copper, nickel, and cadmium in the surface waters of the North Atlantic and North Pacific Ocean. *J. Geophys. Res.* **86**: 8048–8066.
- Brand, L. E., W. G. Sunda, and R. R. L. Guillard. 1986. Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **96**: 225–250.
- Breitbarth, E., A. Oschlies, and J. LaRoche. 2007. Physiological constraints on the global distribution of *Trichodesmium* - effect of temperature on diazotrophy. *Biogeosciences* **4**: 53–61.

- Bruland, K. W. 1980. Oceanographic distributions of cadmium, zinc, nickel, and copper in the North Pacific. *Earth Planet. Sci. Lett.* **47**: 176–198.
- Buck, C. S., W. M. Landing, J. A. Resing, and G. T. Lebon. 2006. Aerosol iron and aluminum solubility in the northwest Pacific Ocean: Results from the 2002 IOC cruise. *Geochemistry Geophys. Geosystems* **7**: Q04M07
- Buck, K. N., and K. W. Bruland. 2005. Copper speciation in San Francisco Bay: A novel approach using multiple analytical windows. *Mar. Chem.* **96**: 185–198.
- Buck, K. N., J. Moffett, K. A. Barbeau, R. M. Bundy, Y. Kondo, and J. Wu. 2012. The organic complexation of iron and copper: an intercomparison of competitive ligand exchange-adsorptive cathodic stripping voltammetry (CLE-ACSV) techniques. *Limnol. Oceanogr.* **10**: 496–515.
- Calil, P. H. R., S. C. Doney, K. Yumimoto, K. Eguchi, and T. Takemura. 2011. Episodic upwelling and dust deposition as bloom triggers in low-nutrient, low-chlorophyll regions. *J. Geophys. Res.* **116**: C06030.
- Campbell, L., E. J. Carpenter, J. P. Montoya, A. B. Kustka, and D. G. Capone. 2005. Picoplankton community structure within and outside a *Trichodesmium* bloom in the southwestern Pacific Ocean. *Vie Milieu*. **55**: 185–195.
- Campos, M. L. A. M., and C. M. G. van den Berg. 1994. Determination of copper complexation in sea water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicylaldoxime. *Anal. Chim. Acta* **284**: 481–496.
- Capone, D. G., J. P. Zehr, H. W. Paerl, B. Bergman, and E. J. Carpenter. 1997. *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science* **276**: 1221–1229.
- Capone, D. G., J. M. O’Neil, J. Zehr, and E. J. Carpenter. 1990. Basis for diel variation in nitrogenase activity in the marine planktonic cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3532–3536.
- Carr, N. G. and B. A. Whitton. 1982: The biology of cyanobacteria. University of California Press, 688 pp.

- Castruita, M., M. Saito, P. C. Schottel, L. A. Elimegreen, S. Myneni, E. I. Stiefel, and F. M. M. Morel. 2006. Overexpression and characterization of an iron storage and DNA-binding Dps protein from *Trichodesmium erythraeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2918–2924.
- Chen, C. T. A. 1995. The Kuroshio intermediate water is the major source of nutrients on the East China Sea continental shelf. *Oceanol. Acta* **19**: 523–527.
- Chen, Y.-B., J. P. Zehr, and M. Mellon. 1996. Growth and nitrogen fixation of the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. IMS 101 in defined media: Evidence for a circadian rhythm. *J. Phycol.* **32**: 916–923.
- Chen, Y. 2004. Sources and fate of atmospheric nutrients over the remote oceans and their role on controlling marine diazotrophic microorganisms. Graduate School of the University of Maryland. Ph. D. thesis.
- Chen, Y., and R. L. Siefert. 2004. Seasonal and spatial distributions and dry deposition fluxes of atmospheric total and labile iron over the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *J. Geophys. Res.* **109**: D09305.
- Christine, A., L. Gall, and C. M. G. van den Berg. 1998. Folic acid and glutathione in the water column of the North East Atlantic. *Deep-Sea Res. Part I* **45**: 1903–1918.
- Chung, C.-C., G.-C. Gong, and C.-C. Hung. 2012. Effect of Typhoon Morakot on microphytoplankton population dynamics in the subtropical Northwest Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **448**: 39–49.
- Church, M. J., C. M. Short, B. D. Jenkins, D. M. Karl, and J. P. Zehr. 2005. Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5362–5370.
- Church, M. J., C. Mahaffey, R. M. Letelier, R. Lukas, J. P. Zehr, and D. M. Karl. 2009. Physical forcing of nitrogen fixation and diazotroph community structure in the North Pacific subtropical gyre. *Global Biogeochem. Cycles* **23**: GB2020.
- Cid, A., C. Herrero, E. Torres, and J. Abalde. 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* **31**: 165–174.

- Coale, K. H., and K. W. Bruland. 1990. Spatial and temporal variability in copper complexation in the North Pacific. *Deep-Sea. Res.* **37**: 317–336.
- Coale, K. H. 1991. Effects of iron, manganese, copper, and zinc enrichments on productivity and biomass in the subarctic Pacific. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1851–1864.
- Cohen, D. D., D. Garton, E. Stelcer, O. Hawas, T. Wang, S. Poon, J. Kim, B. C. Choi, S. N. Oh, H.-J. Shin, M. Y. Ko, and M. Uematsu. 2004. Multielemental analysis and characterization of fine aerosols at several key ACE-Asia sites. *J. Geophys. Res.* **109**: D19S12.
- Croot, P. L., J. W. Moffett, and L. E. Brand. 2000. Production of extracellular Cu complexing ligands by eucaryotic phytoplankton in response to Cu stress. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 619–627.
- Czerny, J., J. Barcelos e Ramos, and U. Riebesell. 2009. Influence of elevated CO₂ concentrations on cell division and nitrogen fixation rates in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Biogeosciences* **6**: 1865–1875.
- Danielsson, L. 1980. Cadmium, cobalt, copper, iron, lead, nickel and zinc in Indian Ocean water. *Mar. Chem.* **8**: 199–215.
- Danielsson, L. G., B. Magnusson, and S. Westerlund. 1985. Cadmium, copper, iron, nickel and zinc in the north-east Atlantic Ocean. *Mar. Chem.* **17**: 23–41.
- Dekaezemacker, J., S. Bonnet, O. Grosso, T. Moutin, M. Bressac, and D. G. Capone. 2013. Evidence of active dinitrogen fixation in surface waters of the eastern tropical South Pacific during El Niño and La Niña events and evaluation of its potential nutrient controls. *Global Biogeochem. Cycles* **27**: 768–779.
- Deng, C., X. Pan, S. Wang, and D. Zhang. 2014. Cu²⁺ inhibits photosystem II activities but enhances photosystem I quantum yield of *Microcystis aeruginosa*. *Biol. Trace Elem. Res.* **160**: 268–275.
- Díez, B., B. Bergman, C. Pedrós-Alió, M. Antó, and P. Snoeijs. 2012. High cyanobacterial *nifH* gene diversity in Arctic seawater and sea ice brine. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**: 360–366.
- Dore, J. E., J. R. Brum, L. M. Tupas, and D. M. Karl. 2002. Seasonal and interannual variability in sources of nitrogen supporting export in the oligotrophic subtropical North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 1595–1607.

- Dupont, C. L., J. W. Moffett, R. R. Bidigare, and B. A. Ahner. 2006. Distributions of dissolved and particulate biogenic thiols in the subarctic Pacific Ocean. *Deep-Sea Res. Part I* **53**: 1961–1974.
- Dupont, C. L., K. Barbeau, and B. Palenik. 2008. Ni uptake and limitation in marine *Synechococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 23–31.
- Dyhrman, S. T., P. D. Chappell, S. T. Haley, J. W. Moffett, E. D. Orchard, J. B. Waterbury, and E. A. Webb. 2006. Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature* **439**: 68–71.
- Dyhrman, S. T., and S. T. Haley. 2006. Phosphorus scavenging in the unicellular marine diazotroph *Crocosphaera watsonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1452–1458.
- Dyhrman, S. T., C. R. Benitez-Nelson, E. D. Orchard, S. T. Haley, and P. J. Pellechia. 2009. A microbial source of phosphonates in oligotrophic marine systems. *Nat. Geosci.* **2**: 696–699.
- Ehrenberg, C. G. 1830. Neue Beobachtungen über blutartige Erscheinungen in Aegypten, Arabien und Sibirien, nebst einer Uebersicht und Kritik der früher bekannten. *Ann. der Phys. und Chemie* **94**: 477–514.
- Ezoe, M., T. Ishita, M. Kinugasa, X. Lai, K. Norisuye, and Y. Sohrin. 2004. Distributions of dissolved and acid-dissolvable bioactive trace metals in the North Pacific Ocean. *Geochem. J.* **38**: 535–550.
- Falcón, L. I., F. Cipriano, A. Y. Chistoserdov, and E. J. Carpenter. 2002. Diversity of diazotrophic unicellular cyanobacteria in the tropical North Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5760–5764.
- Falcón, L. I., E. J. Carpenter, F. Cipriano, B. Bergman, and D. G. Capone. 2004. N₂ fixation by unicellular bacterioplankton from the Atlantic and Pacific oceans: Phylogeny and in situ rates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 765–770.
- Falcón, L. I., S. Pluvinau, and E. J. Carpenter. 2005. Growth kinetics of marine unicellular N₂-fixing cyanobacterial isolates in continuous culture in relation to phosphorus and temperature. *Mar. Ecol. Ser.* **285**: 3–9.
- Farnelid, H., A. F. Andersson, S. Bertilsson, W. A. Al-Soud, L. H. Hansen, S. Sørensen, G. F. Steward, Å. Hagström, and L. Riemann. 2011. Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. *PLoS One* **6**: e19223.

- Favorite, F., A. J. Dodimead, and K. Nasu 1976: Oceanography of the subarctic Pacific region, 1960-71. Bull. Int. North Pac. Fish. Comm. **33**:1-187.
- Fernandez, C., L. Fariás, and O. Ulloa. 2011. Nitrogen fixation in denitrified marine waters. PLoS One **6**: E20539.
- Fernández, A., R. Graña, B. Mouriño-Carballido, A. Bode, M. Varela, J. F. Domínguez-Yanes, J. Escánez, D. de Armas, and E. Marañón. 2013. Community N₂ fixation and *Trichodesmium* spp. abundance along longitudinal gradients in the eastern subtropical North Atlantic. ICES J. Mar. Sci. **70**: 223–231.
- Fong, A. A., D. M. Karl, R. Lukas, R. M. Letelier, J. P. Zehr, and M. J. Church. 2008. Nitrogen fixation in an anticyclonic eddy in the oligotrophic North Pacific Ocean. ISME J. **2**: 663–676.
- Foster, R. A., A. Subramaniam, C. Mahaffey, E. J. Carpenter, D. G. Capone, and J. P. Zehr. 2007. Influence of the Amazon River plume on distributions of free-living and symbiotic cyanobacteria in the western tropical north Atlantic Ocean. Limnol. Oceanogr. **52**: 517–532.
- Fredriksson, C., and B. Bergman. 1995. Nitrogenase quantity varies diurnally in a subset of cells within colonies of the non-heterocystous cyanobacteria *Trichodesmium* spp. Microbiology **141**: 2471–2478.
- Fredriksson, C., and B. Bergman. 1997. Ultrastructural characterisation of cells specialised for nitrogen fixation in a non-heterocystous cyanobacterium, *Trichodesmium* spp. Protoplasma **197**: 76–85.
- Fu, F. X., and P. R. F. Bell. 2003. Factors affecting N₂ fixation by the cyanobacterium *Trichodesmium* sp. GBRTLI101. FEMS Microbiol. Ecol. **45**: 203–209.
- Fu, F.-X., Y. Zhang, P. R. F. Bell, and D. A. Hutchins. 2005. 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.
- Fu, F.-X., M. R. Mulholland, N. S. Garcia, A. Beck, P. W. Bernhardt, M. E. Warner, S. A. Sanudo-Wilhelmy, and D. A. Hutchins. 2008. Interactions between changing pCO₂, N₂ fixation, and Fe limitation in the marine unicellular cyanobacterium *Crocosphaera*. Limnol. Oceanogr. **53**: 2472–2484.

- Fujishima, Y., K. Ueda, M. Maruo, E. Nakayama, C. Tokutome, H. Hasegawa, M. Matsui, and Y. Sohrin. 2001. Distribution of trace bioelements in the subarctic North Pacific Ocean and the Bering Sea (the R/V Hakuho Maru cruise KH-97-2). *J. Oceanogr.* **57**: 261–273.
- Furuya, K., M. Takahashi, and T. Nemoto. 1986. Summer phytoplankton community structure and growth in a regional upwelling area off Hachijo Island, Japan. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **96**: 43–55.
- Furuya, K., M. Hayashi, Y. Yabushita, and A. Ishikawa. 2003. Phytoplankton dynamics in the East China Sea in spring and summer as revealed by HPLC-derived pigment signatures. *Deep-Sea Res. Part II* **50**: 367–387.
- 古屋 弘信. 2008. 貧栄養海域における窒素固定性シアノバクテリアの群集動態. 東京大学大学院農学生命科学研究科 修士論文.
- Gallon, J. R. 2001. N₂ fixation in phototrophs: adaptation to a specialized way of life. *Plant Soil* **230**: 39–48.
- Garside, C. 1982. A chemiluminescent technique for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater. *Mar. Chem.* **11**: 159–167.
- Goebel, N. L., C. A. Edwards, B. J. Carter, K. M. Achilles, and J. P. Zehr. 2008. Growth and carbon content of three different-sized diazotrophic cyanobacteria observed in the subtropical North Pacific. *J. Phycol.* **44**: 1212–1220.
- Gomez, F., K. Furuya, and S. Takeda. 2005. Distribution of the cyanobacterium *Richelia intracellularis* as an epiphyte of the diatom *Chaetoceros compressus* in the western Pacific Ocean. *J. Plankton Res.* **27**: 323–330.
- Gomont, M. 1982. Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées). *Ann. des Sci. Nat. Bot. Série 7.* **16**: 91–264.
- Gong, G.-C., K.-K. Liu, and S.-C. Pai. 1995. Prediction of nitrate concentration from two end member mixing in the southern East China Sea. *Cont. Shelf Res.* **15**: 827–842.
- Gordon, A. S., B. J. Dyer, R. A. Kango, and J. R. Donat. 1996. Copper ligands isolated from estuarine water by immobilized metal affinity chromatography: temporal variability and partial characterization. *Mar. Chem.* **53**: 163–172.

- Gordon, A. S., J. R. Donat, R. A. Kango, B. J. Dyer, and L. M. Stuart. 2000. Dissolved copper-complexing ligands in cultures of marine bacteria and estuarine water. *Mar. Chem.* **70**: 149–160.
- 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.
- Gradoville, M. R., A. E. White, D. Böttjer, M. J. Church, and R. M. Letelier. 2014a. Diversity trumps acidification: Lack of evidence for carbon dioxide enhancement of *Trichodesmium* community nitrogen or carbon fixation at Station ALOHA. *Limnol. Oceanogr.* **59**: 645–659.
- Gradoville, M. R., A. E. White, and R. M. Letelier. 2014b. Physiological response of *Crocospaera watsonii* to enhanced and fluctuating carbon dioxide conditions. *PLoS One* **9**: e110660.
- Grasshoff, K., K. Kremling, and M. Ehrhardt 1999: Methods of seawater analysis. Willey-VCH, 3rd edition, 632 pp..
- Guieu, C., O. Aumont, A. Paytan, L. Bopp, C. S. Law, N. Mahowald, E. P. Achterberg, E. Marañón, B. Salihoglu, A. Crise, T. Wagener, B. Herut, K. Desboeufs, M. Kanakidou, N. Olgun, F. Peters, E. Pulido-Villena, A. Tovar-Sanchez, and C. Völker. 2014. The significance of the episodic nature of atmospheric deposition to Low Nutrient Low Chlorophyll regions. *Global Biogeochem. Cycles* **28**: 1179–1198.
- Guo, C., J. Yu, T.-Y. Ho, L. Wang, S. Song, L. Kong, and H. Liu. 2012. Dynamics of phytoplankton community structure in the South China Sea in response to the East Asian aerosol input. *Biogeosciences* **9**: 1519–1536.
- Hagino, K., H. Okada, and H. Matsuoka. 2005. Coccolithophore assemblages and morphotypes of *Emiliania huxleyi* in the boundary zone between the cold Oyashio and warm Kuroshio currents off the coast of Japan. *Mar. Micropaleontol.* **55**: 19–47.
- Hagino, K., Y. Takano, and T. Horiguchi. 2009. Pseudo-cryptic speciation in *Braarudosphaera bigelowii* (Gran and Braarud) Deflandre. *Mar. Micropaleontol.* **72**: 210–221.
- Hagino, K., R. Onuma, M. Kawachi, and T. Horiguchi. 2013. Discovery of an endosymbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (prymnesiophyceae). *PLoS One* **8**: e81749.

- Halm, H., P. Lam, T. G. Ferdelman, G. Lavik, T. Dittmar, J. LaRoche, S. D'Hondt, and M. M. M. Kuypers. 2012. Heterotrophic organisms dominate nitrogen fixation in the South Pacific Gyre. *ISME J.* **6**: 1238–49.
- Hama, T., T. Miyazaki, Y. Ogawa, T. Iwakuma, M. Takahashi, A. Otsuki, and S. Ichimura. 1983. Measurement of photosynthetic production of a marine phytoplankton population using a stable ^{13}C isotope. *Mar. Biol.* **73**: 31–36.
- Hanson, R. B. 1977. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in a salt marsh amended with sewage sludge and organic carbon and nitrogen compounds. *Appl. Environmental Microbiol.* **33**: 846–852.
- Harwood-Sears, V., and A. S. Gordon. 1990. Copper-induced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1327–1332.
- Hasegawa, D., M. R. Lewis, and A. Gangopadhyay. 2009. How islands cause phytoplankton to bloom in their wakes. *Geophys. Res. Lett.* **36**: L20605.
- 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**: L03610.
- Hayward, T. L., E. L. Venrick, and J. A. McGowan. 1983. Environmental heterogeneity and plankton community structure in the central North Pacific. *J. Mar. Res.* **41**: 711–729.
- Hayward, T. L. 1987. The nutrient distribution and primary production in the central North Pacific. *Deep-Sea Res.* **34**: 1593–1687.
- Herut, B., T. Zohary, M. D. Krom, R. F. C. Mantoura, P. Pitta, S. Psarra, F. Rassoulzadegan, T. Tanaka, and T. F. Thingstad. 2005. Response of East Mediterranean surface water to Saharan dust: On-board microcosm experiment and field observations. *Deep-Sea Res. Part II* **52**: 3024–3040.
- Hirose, K., Y. Dokiya, and Y. Sugimura. 1982. Determination of conditional stability constants of organic copper and zinc complexes dissolved in seawater using ligand exchange method with EDTA. *Mar. Chem.* **11**: 343–354.
- Hirose, K. 2007. Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Appl. Geochemistry* **22**: 1636–1645.

- Ho, T.-Y. 2013. Nickel limitation of nitrogen fixation in *Trichodesmium*. *Limnol. Oceanogr.* **58**: 112–120.
- Ho, T.-Y., T.-H. Chu, and C.-L. Hu. 2013. Interrelated influence of light and Ni on *Trichodesmium* growth. *Front. Microbiol.* **4**: 1–6.
- Holl, C. M., and J. P. Montoya. 2005. Interactions between nitrate uptake and nitrogen fixation in continuous cultures of the marine diazotroph *Trichodesmium* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **41**: 1178–1183.
- Howarth, R. W., and J. J. Cole. 1985. Molybdenum availability, nitrogen limitation, and phytoplankton growth in natural waters. *Science* **229**: 653–655.
- Hutchins, D. A., F.-X. Fu, Y. Zhang, M. E. Warner, Y. Feng, K. Portune, P. W. Bernhardt, and M. R. Mulholland. 2007. CO₂ control of *Trichodesmium* N₂ fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. **52**: 1293–1304.
- Hynes, A. M., P. D. Chappell, S. T. Dyhrman, S. C. Doney, and E. A. Webb. 2009. Cross-basin comparison of phosphorus stress and nitrogen fixation in *Trichodesmium*. *Limnol. Oceanogr.* **54**: 1438–1448.
- Jacq, V., C. Ridame, S. L’Helguen, F. Kaczmar, and A. Saliot. 2014. Response of the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Crocospheera watsonii* to iron limitation. *PLoS One* **9**: e86749.
- Jacquot, J. E., Y. Kondo, A. N. Knapp, and J. W. Moffett. 2013. The speciation of copper across active gradients in nitrogen-cycle processes in the eastern tropical South Pacific. *Limnol. Oceanogr.* **58**: 1387–1394.
- Janson, S., P. J. A. Siddiqui, A. E. Walsby, K. M. Romans, E. J. Carpenter, and B. Bergman. 1995. Cytomorphological characterization of the planktonic diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. from the Indian Ocean and Caribbean and Sargasso Seas. *J. Phycol.* **31**: 463–477.
- Janson, S., J. Wouters, B. Bergman, and E. J. Carpenter. 1999. Host specificity in the *Richelia*-diatom symbiosis revealed by *hetR* gene sequence analysis. *Environ. Microbiol.* **1**: 431–438.
- Jickells, T. D. 1999. The inputs of dust derived elements to the Sargasso Sea; a synthesis. *Mar. Chem.* **68**: 5–14.

- Jordi, A., G. Basterretxea, A. Tovar-Sánchez, A. Alastuey, and X. Querol. 2012. Copper aerosols inhibit phytoplankton growth in the Mediterranean Sea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 21246–21249.
- Karl, D. M., and G. Tien. 1992. MAGIC: A sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 105–116.
- Karl, D. M., and R. Lukas. 1996. The Hawaii Ocean Time-series (HOT) program: Background, rationale and field implementation. *Deep-Sea Res. Part II* **43**: 129–156.
- Karl, D., R. Letelier, L. Tupas, J. Dore, J. Christian, and D. Hebel. 1997. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* **388**: 533–538.
- Karl, D. M., K. M. Bjorkman, J. E. Dore, L. Fujieki, D. V. Hebel, T. Houlihan, R. M. Letelier, and L. M. Tupas. 2001. Ecological nitrogen-to-phosphorus stoichiometry at station ALOHA. *Deep-Sea Res. Part II* **48**: 1529–1566.
- Karl, D. M., R. R. Bidigare, M. J. Church, J. E. Dore, R. M. Letelier, C. Mahaffey, and J. P. Zehr. 2008. The nitrogen cycle in the North Pacific trades biome: an evolving paradigm. *In* D. G. Capone, D. A. Bronk, M. R. Mulholland, and E. J. Carpenter [eds.], *Nitrogen in the marine environment*, 2nd edition. Elsevier.
- Karsten, G. 1907. Das Indische Phytoplankton nach dem Material der Deutschen Tiefsee-Expedition 1898–1899. *Dtsch. Tiefsee-Exped. 1898–1899*, **2**: 423–548.
- Kaufman, Y. J., I. Koren, L. A. Remer, D. Tanré, P. Ginoux, and S. Fan. 2005. Dust transport and deposition observed from the Terra-Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) spacecraft over the Atlantic Ocean. *J. Geophys. Res.* **110**: D10S12.
- Kawahata, H. 2002. Suspended and settling particles in the Pacific. *Deep-Sea Res.* **49**: 5647–5664.
- Kinugasa, M., T. Ishita, Y. Sohrin, K. Okamura, S. Takeda, J. Nishioka, and A. Tsuda. 2005. Dynamics of trace metals during the subarctic Pacific iron experiment for ecosystem dynamics study (SEEDS2001). *Prog. Oceanogr.* **64**: 129–147.
- Kitajima, S., and K. Furuya. 2009. Latitudinal distribution of diazotrophs and their nitrogen fixation in the tropical and subtropical western North Pacific. *Limnol. Oceanogr.* **54**: 537–547.
- Kogut, M. B., and B. M. Voelker. 2001. Strong copper-binding behavior of terrestrial humic substances in seawater. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 1149–1156.

- Kondo, Y., S. Takeda, and K. Furuya. 2012. Distinct trends in dissolved Fe speciation between shallow and deep waters in the Pacific Ocean. *Mar. Chem.* **134-135**: 18–28.
- Konno, S., N. Harada, H. Narita, and R. W. Jordan. 2007. Living *Braarudosphaera bigelowii* (Gran & Braarud) Deflandre in the Bering Sea. *J. Nannoplankt. Res.* **29**: 78–87.
- Kranz, S. A., O. Levitan, K.-U. Richter, O. Prášil, I. Berman-Frank, and B. Rost. 2010. Combined effects of CO₂ and light on the N₂-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* IMS101: physiological responses. *Plant Physiol.* **154**: 334–345.
- Krupke, A., G. Lavik, H. Halm, B. M. Fuchs, R. I. Amann, and M. M. M. Kuypers. 2014. Distribution of a consortium between unicellular algae and the N₂ fixing cyanobacterium UCYN-A in the North Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* **16**: 3153–67.
- Küpper, H., I. Šetlík, S. Seibert, O. Prášil, E. Šetlikova, M. Strittmatter, O. Levitan, J. Lohscheider, I. Adamska, I. Berman-Frank, H. Küpper, I. Šetlík, O. Prášil, and H. Kuepper. 2008. Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. *New Phytol.* **179**: 784–798.
- Kustka, A. B., S. A. Sañudo-Wilhelmy, E. J. Carpenter, D. Capone, J. Burns, and W. G. Sunda. 2003. Iron requirements for dinitrogen- and ammonium-supported growth in cultures of *Trichodesmium* (IMS 101): Comparison with nitrogen fixation rates and iron: carbon ratios of field populations. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1869–1884.
- Langlois, R. J., J. LaRoche, and P. A. Raab. 2005. Diazotrophic diversity and distribution in the tropical and subtropical Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7910–7919.
- Langlois, R. J., M. M. Mills, C. Ridame, P. Croot, and J. LaRoche. 2012. Diazotrophic bacteria respond to Saharan dust additions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **470**: 1–14.
- Law, C. S., E. Breitbarth, L. J. Hoffmann, C. M. McGraw, R. J. Langlois, J. LaRoche, A. Marriner, and K. A. Safi. 2012. No stimulation of nitrogen fixation by non-filamentous diazotrophs under elevated CO₂ in the South Pacific. *Glob. Chang. Biol.* **18**: 3004–3014.
- Leal, M. F. C., M. T. S. D. Vasconcelos, and C. M. G. van den Berg. 1999. Copper-induced release of complexing ligands similar to thiols by *Emiliania huxleyi* in seawater cultures. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1750–1762.

- Lemmermann, E. 1905. Die Algenflora der Sandwich-Inseln. Ergebnisse einer Reise nach dem Pacific, H. Schauinsland 1896/97. Engler's Bot. Jahrbücher Syst, Pflanzengeschichte Pflanzengeographie, **34**: 607–663.
- Levitan, O., G. Rosenberg, I. Setlik, E. Setlikova, J. Grigel, J. Klepetar, O. Prasil, and I. Berman-Frank. 2007. Elevated CO₂ enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. Glob. Chang. Biol. **13**: 531–538.
- Lin, S., G. Sandh, H. Zhang, J. Cheng, K. Perkins, E. J. Carpenter, and B. Bergman. 2009. Two flavodoxin genes in *Trichodesmium* (Oscillatoriales, Cyanophyceae): Remarkable sequence divergence and possible functional diversification. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. **371**: 93–101.
- Lombardi, A. T., and M. T. Maldonado. 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. Photosynth. Res. **108**: 77–87.
- Löscher, B. M. 1999. Relationships among Ni, Cu, Zn, and major nutrients in the Southern Ocean. Mar. Chem. **67**: 67–102.
- Lundgren P., S. Janson, S. Jonasson, A. Singer, and B. Bergman. 2005. Unveiling of novel radiations within *Trichodesmium* cluster by *hetR* gene sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 190–196.
- Luo, Y.-W., S. C. Doney, L. A. Anderson, M. Benavides, I. Berman-Frank, A. Bode, S. Bonnet, K. H. Boström, D. Böttjer, D. G. Capone, E. J. Carpenter, Y. L. Chen, M. J. Church, J. E. Dore, L. I. Falcón, A. Fernández, R. A. Foster, K. Furuya, F. Gómez, K. Gundersen, A. M. Hynes, D. M. Karl, S. Kitajima, R. J. Langlois, J. LaRoche, R. M. Letelier, E. Marañón, D. J. McGillicuddy, P. H. Moisander, C. M. Moore, B. Mouriño-Carballido, M. R. Mulholland, J. A. Needoba, K. M. Orcutt, A. J. Poulton, E. Rahav, P. Raimbault, A. P. Rees, L. Riemann, T. Shiozaki, A. Subramaniam, T. Tyrrell, K. A. Turk-Kubo, M. Varela, T. A. Villareal, E. A. Webb, A. E. White, J. Wu, and J. P. Zehr. 2012. Database of diazotrophs in global ocean: abundance, biomass and nitrogen fixation rates. Earth Syst. Sci. Data **4**: 47–73.
- Mahowald, N. M., A. R. Baker, G. Bergametti, N. Brooks, R. A. Duce, T. D. Jickells, N. Kubilay, J. M. Prospero, and I. Tegen. 2005. Atmospheric global dust cycle and iron inputs to the ocean. Glob. Biogeochem. **19**: 1–76.

- Maldonado, M. T., A. E. Allen, J. S. Chong, K. Lin, D. Leus, N. Karpenko, and S. L. Harris. 2006. Copper-dependent iron transport in coastal and oceanic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 1729–1743.
- Mann, E. L., N. Ahlgren, J. W. Moffett, and S. W. Chisholm. 2002. Copper toxicity and cyanobacteria ecology in the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 976–988.
- Marino, R., R. W. Howarth, J. Shamess, and E. Prepas. 1990. Molybdenum and sulfate as controls on the abundance of nitrogen-fixing cyanobacteria in saline lakes in Alberta. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 245–259.
- Martin, J. M., and M. Whitfield 1983: The significance of the river input of chemical elements to the ocean, p. 265-296. *In* Wong, C. S., E. Boyle, K. W. Bruland, J. D. Burton and E. D. Goldberg [eds.], Trace metals in sea water. Plenum Press, New York and London.
- Martín-Nieto, J., A. Herrero, and E. Flores. 1991. Control of Nitrogenase mRNA Levels by Products of Nitrate Assimilation in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Plant Physiol.* **97**: 825–828.
- Marumo, R., and O. Asaoka. 1974. *Trichodesmium* in the East China Sea 1. Distribution of *Trichodesmium thiebautii* Gomont during 1961–1967. *J. Oceanogr.* **30**: 298–303.
- Mawji, E., M. Gledhill, J. A. Milton, G. A. Tarran, S. Ussher, A. Thompson, G. A. Wolff, P. J. Worsfold, and E. P. Achterberg. 2008. Hydroxamate siderophores: Occurrence and importance in the Atlantic Ocean. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 8675–8680.
- Measures, C. I., M. T. Brown, and S. Vink. 2005. Dust deposition to the surface waters of the western and central North Pacific inferred from surface water dissolved aluminum concentrations. *Geochemistry, Geophys. Geosystems* **6**: Q09M03
- Measures, C. I., W. M. Landing, M. T. Brown, and C. S. Buck. 2008. High-resolution Al and Fe data from the Atlantic Ocean CLIVAR-CO₂ Repeat Hydrography A16N transect: Extensive linkages between atmospheric dust and upper ocean geochemistry. *Global Biogeochem. Cycles* **22**: GB1005
- Midorikawa, T., E. Tanoue, and Y. Sugimura. 1990. Determination of complexing ability of natural ligands in seawater for various metal ions using ion selective electrodes. *Anal. Chem.* **62**: 1737–1746.

- Miki, M., N. Ramaiah, S. Takeda, and K. Furuya. 2008. Phytoplankton dynamics associated with the monsoon in the Sulu Sea as revealed by pigment signature. *J. Oceanogr.* **64**: 663–673.
- Millard, R., W. Owens, and N. Fofonoff. 1990. On the calculation of the Brunt-Väisälä frequency. *Deep-Sea Res.* **17**: 167–181.
- Miller, L. A., and K. W. Bruland. 1994. Determination of copper speciation in marine waters by competitive ligand equilibration/liquid-liquid extraction: an evaluation of the technique. *Anal. Chim. Acta* **284**: 573–586.
- Mills, M. M., C. Ridame, M. Davey, J. La Roche, and R. J. Geider. 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* **429**: 292–294.
- Mitsui, A., S. Kumazawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao, and T. Arai. 1986. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* **323**: 720–722.
- Mochizuki, M., N. Shiga, M. Saito, K. Imai, and Y. Nojiri. 2002. Seasonal changes in nutrients, chlorophyll *a* and the phytoplankton assemblage of the western subarctic gyre in the Pacific Ocean. *Deep-Sea Res. Part II* **49**: 5421–5439.
- Moffett, J. W., and L. E. Brand. 1996. Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 388–395.
- Moffett, J. W., L. E. Brand, P. L. Croot, and K. A. Barbeau. 1997. Cu speciation and cyanobacterial distribution in harbors subject to anthropogenic Cu inputs. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 789–799.
- Moffett, J. W., and C. Dupont. 2007. Cu complexation by organic ligands in the sub-arctic NW Pacific and Bering Sea. *Deep-Sea Res. Part I* **54**: 586–595.
- Moffett, J. W., R. G. Zika, and L. E. Brand. 1990. Distribution and potential sources and sinks of copper chelators in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Res.* **37**: 27–36.
- Mohr, W., T. Großkopf, D. W. R. Wallace, and J. LaRoche. 2010. Methodological underestimation of oceanic nitrogen fixation rates. *PLoS One* **5**: e12583.
- Moisander, P. H., R. a Beinart, I. Hewson, A. E. White, K. S. Johnson, C. A. Carlson, J. P. Montoya, and J. P. Zehr. 2010. Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N₂ fixation domain. *Science* **327**: 1512–4.

- Moisander, P. H., R. A. Beinart, M. Voss, and J. P. Zehr. 2008. Diversity and abundance of diazotrophic microorganisms in the South China Sea during intermonsoon. *ISME J.* **2**: 954–967.
- Moisander, P. H., R. Zhang, E. A. Boyle, I. Hewson, J. P. Montoya, and J. P. Zehr. 2012. Analogous nutrient limitations in unicellular diazotrophs and *Prochlorococcus* in the South Pacific Ocean. *ISME J.* **6**: 733–44.
- Moisander, P. H., T. Serros, R. W. Paerl, R. a Beinart, and J. P. Zehr. 2014. Gammaproteobacterial diazotrophs and *nifH* gene expression in surface waters of the South Pacific Ocean. *ISME J.* **8**: 1962–1973.
- Momper, L. M., B. K. Reese, G. Carvalho, P. Lee, and E. A. Webb. 2014. A novel cohabitation between two diazotrophic cyanobacteria in the oligotrophic ocean. *ISME J.* **9**: 882–893.
- Monteiro, F. M., S. Dutkiewicz, and M. J. Follows. 2011. Biogeographical controls on the marine nitrogen fixers. *Global Biogeochem. Cycles* **25**: 1–8.
- Montoya, J. P., M. Voss, P. Kahler, and D. G. Capone. 1996. A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 986–993.
- Montoya, J. P., C. M. Holl, J. P. Zehr, A. Hansen, T. A. Villareal, and D. G. Capone. 2004. High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* **430**: 1027–1031.
- Moore, C. M., M. M. Mills, E. P. Achterberg, R. J. Geider, J. LaRoche, M. I. Lucas, E. L. McDonagh, X. Pan, A. J. Poulton, M. J. A. Rijkenberg, D. J. Suggett, S. J. Ussher, and E. M. S. Woodward. 2009. Large-scale distribution of Atlantic nitrogen fixation controlled by iron availability. *Nat. Geosci.* **2**: 867–871.
- Moore, J. K., and O. Braucher. 2008. Sedimentary and mineral dust sources of dissolved iron to the world ocean. *Biogeosciences* **5**: 631–656.
- Moore, R. M. 1978. The distribution of dissolved copper in the eastern Atlantic Ocean. *Earth Planet. Sci. Lett.* **41**: 461–468.
- Moutin, T., D. M. Karl, S. Duhamel, P. Rimmelin, P. Raimbault, B. A. S. Van Mooy, and H. Claustre. 2008. Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences* **5**: 95–109.

- Mulholland, M. R., K. Ohki, and D. G. Capone. 2001. Nutrient controls on nitrogen uptake and metabolism by natural populations and cultures of *Trichodesmium* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **37**: 1001–1009.
- Needoba, J. A., R. A. Foster, C. Sakamoto, J. P. Zehr, and K. S. Johnson. 2007. Nitrogen fixation by unicellular diazotrophic cyanobacteria in the temperate oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 1317–1327.
- Nishioka, J., T. Ono, H. Saito, T. Nakatsuka, S. Takeda, T. Yoshimura, K. Suzuki, K. Kuma, S. Nakabayashi, D. Tsumune, H. Mitsudera, W. K. Johnson, and A. Tsuda. 2007. Iron supply to the western subarctic Pacific : Importance of iron export from the Sea of Okhotsk. *J. Geophys. Res.* **112**: C10012.
- Nolting, R. F., H. J. W. De Baar, A. J. Van Bennekom, and A. Masson. 1991. Cadmium, copper and iron in the Scotia Sea, Weddell Sea and Weddell/Scotia Confluence (Antarctica) . *Mar. Chem.* **35**: 219–243.
- Noriki, S., T. Iwai, A. Shimamoto, S. Tsunogai, and K. Harada. 1995. Spatial variation of Al flux in the North Pacific observed with sediment trap, p. 345–354. *In* H. Sakai, and Y. Nozaki [eds.], *Biogeochemical Processes and Ocean Flux in the Western Pacific*. Terra Scientific publishing Company.
- Obata, H., and C. M. G. van den Berg. 2001. Determination of picomolar levels of iron in seawater using catalytic cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.* **73**: 2522–8.
- Ohki, K., and Y. Fujita. 1988. Aerobic nitrogenase activity measured as acetylene reduction in the marine non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* spp. grown under artificial conditions. *Mar. Biol.* **98**: 111–114.
- Ohki, K. 2008. Intercellular localization of nitrogenase in a non-heterocystous cyanobacterium (cyanophyte), *Trichodesmium* sp. NIBB1067. *J. Oceanogr.* **64**: 211–216.
- Orchard, E. D., E. A. Webb, and S. T. Dyhrman. 2009. Molecular analysis of the phosphorus starvation response in *Trichodesmium* spp. *Environ. Microbiol.* **11**: 2400–2411.
- Orchard, E. D., C. R. Benitez-Nelson, P. J. Pellechia, M. W. Lomas, and S. T. Dyhrman. 2010. Polyphosphate in *Trichodesmium* from the low-phosphorus Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* **55**: 2161–2169.

- Orcutt K. M., U. Rasmussen, E. A. Webb, J. B. Waterbury, K. Gundersen, and B. Bergman. 2002. Characterization of *Trichodesmium* spp. by genetic techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2236–2245.
- Orcutt, K. M., S. Ren, and K. Gundersen. 2009. Detecting proteins in highly autofluorescent cells using quantum dot antibody conjugates. *Sensors* **9**: 7540–7549.
- Ostenfeld, C., and J. Schmidt. 1901. Plankton fra det Rode Hav og Adenbugten (Plankton from the Red Sea and the Gulf of Aden.). *Vidensk. Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Foren.* **3**: 141–182.
- Paerl, H. W., K. M. Crocker, and L. E. Prufert. 1987. Limitation of N₂ fixation in coastal marine waters: Relative importance of molybdenum, iron, phosphorus, and organic matter availability. *Limnol. Oceanogr.* **32**: 525–536.
- Paerl, H. W., and B. M. Bebout. 1988. Direct measurement of O₂-depleted microzones in marine *Oscillatoria*: Relation to N₂ fixation. *Sci. Wash* **241**: 442–445.
- Paerl, H. W., J. C. Priscu, and D. L. Brawner. 1989. Immunochemical localization of nitrogenase in marine *Trichodesmium* aggregates: Relationship to N₂ fixation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2965–2975.
- Paerl, H. W., L. E. Prufertbebout, and C. Z. Guo. 1994. Iron-stimulated N₂ fixation and growth in natural and cultured populations of the planktonic marine cyanobacteria *Trichodesmium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1044–1047.
- Paerl, H., J. Zehr. 2000. Marine nitrogen fixation, p. 387–426. *In* D. Kirchman [ed.], *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss.
- Palenik, B., B. Brahamsha, F. W. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain, J. Lamerdin, W. Regala, E. E. Allen, J. McCarren, I. Paulsen, A. Dufresne, F. Partensky, E. A. Webb, and J. Waterbury. 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **424**: 1037–1042.
- Paulsen, D. M., H. W. Paerl, and P. E. Bishop. 1991. Evidence that molybdenum-dependent nitrogen fixation is not limited by high sulfate concentrations in marine environments. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1325–1334.

- Paytan, A., K. R. M. Mackey, Y. Chen, I. D. Lima, S. C. Doney, N. Mahowald, R. Labiosa, and A. F. Post. 2009. Toxicity of atmospheric aerosols on marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 4601–4605.
- Peers, G., and N. M. Price. 2006. Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom. *Nature* **441**: 341–344.
- Prufert-Bebout, L., H. W. Paerl, and C. Lassen. 1993. Growth, nitrogen fixation, and spectral attenuation in cultivated *Trichodesmium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1367–1375.
- R Core Team 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Raimbault, P., and N. Garcia. 2008. Evidence for efficient regenerated production and dinitrogen fixation in nitrogen-deficient waters of the South Pacific Ocean: impact on new and export production estimates. *Biogeosciences* **5**: 323–338.
- Raimbault, P., N. Garcia, and F. Cerutti. 2008. Distribution of inorganic and organic nutrients in the South Pacific Ocean – evidence for long-term accumulation of organic matter in nitrogen-depleted waters. *Biogeosciences* **5**: 281–298.
- Ramos, J. L., F. Madueño, and M. G. Guerrero. 1985. Regulation of nitrogenase levels in *Anabaena* sp. ATCC 33047 and other filamentous cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **141**: 105–111.
- Ratten, J.-M., J. LaRoche, D. Desai, R. U. Shelley, W. M. Landing, E. Boyle, G. A. Cutter, and R. J. Langlois. 2015. Sources of iron and phosphate affect the distribution of diazotrophs in the North Atlantic. *Deep-Sea Res. Part II.* **116**: 332–341.
- Riemann, L., H. Farnelid, and G. Steward. 2010. Nitrogenase genes in non-cyanobacterial plankton: prevalence, diversity and regulation in marine waters. *Aquat. Microb. Ecol.* **61**: 235–247.
- Rijstenbil, J. W., J. W. M. Derksen, L. J. A. Gerringa, T. C. W. Poortvliet, A. Sandee, M. van den Berg, J. van Drie, and J. A. Wijnholds. 1994. Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Mar. Biol.* **119**: 583–590.
- Rodriguez, I. B., and T.-Y. Ho. 2014. Diel nitrogen fixation pattern of *Trichodesmium*: the interactive control of light and Ni. *Sci. Rep.* **4**: 4445.

- Roe, K. L., K. Barbeau, E. L. Mann, and M. G. Haygood. 2012. Acquisition of iron by *Trichodesmium* and associated bacteria in culture. *Environ. Microbiol.* **14**: 1681–1695.
- Rubin, M., I. Berman-Frank, and Y. Shaked. 2011. Dust-and mineral-iron utilization by the marine dinitrogen-fixer *Trichodesmium*. *Nat. Geosci.* **4**: 529–534.
- Rubio, L. M., and P. W. Ludden. 2005. Maturation of nitrogenase: A biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **187**: 405–414.
- Rubio, L. M., and P. W. Ludden. 2008. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**: 93–111.
- Rueter, J. G., J. J. McCarthy, and E. J. Carpenter. 1979. The toxic effect of copper on *Oscillatoria* (*Trichodesmium*) *theibautii*. *Limnol. Oceanogr.* **24**: 558–562.
- Saager, P. M., H. J. W. De Baar, and R. J. Howland. 1992. Cd , Zn , Ni and Cu in the Indian Ocean. *Deep-Sea Res.* **39**: 9–35.
- Saito, M. A., T. J. Goepfert, and J. T. Ritt. 2008. Some thoughts on the concept of colimitation: Three definitions and the importance of bioavailability. *Limnol. Oceanogr.* **53**: 276–290.
- Saito, M., and E. Bertrand. 2011. Iron conservation by reduction of metalloenzyme inventories in the marine diazotroph *Crocosphaera watsonii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 1–6.
- Sander, S. G., and A. Koschinsky. 2011. Metal flux from hydrothermal vents increased by organic complexation. *Nat. Geosci.* **4**: 145–150.
- Sandh, G., L. Xu, and B. Bergman. 2012. Diazocyte development in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium*. *Microbiology* **158**: 345–352.
- Sanz-Alf  rez, S., and F. F. del Campo. 1994. Relationship between nitrogen fixation and nitrate metabolism in the *Nodularia* strains M1 and M2. *Planta* **194**: 339–345.
- S  nudo-Wilhelmy, S. A., A. B. Kustka, C. J. Gobler, D. A. Hutchins, M. Yang, K. Lwiza, J. Burns, D. G. Capone, J. A. Raven, and E. J. Carpenter. 2001. Phosphorus limitation of nitrogen fixation by *Trichodesmium* in the central Atlantic Ocean. *Nature* **411**: 66–9.

- Sarthou, G., A. R. Baker, S. Blain, E. P. Achterberg, M. Boye, A. R. Bowie, P. Croot, P. Laan, H. J. W. De Baar, T. D. Jickells, and P. J. Worsfold. 2003. Atmospheric iron deposition and sea-surface dissolved iron concentrations in the eastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res. Part I* **50**: 1339–1352.
- Sato, M., S. Takeda, and K. Furuya. 2007. Iron regeneration and organic iron(III)-binding ligand production during *in situ* zooplankton grazing experiment. *Mar. Chem.* **106**: 471–488.
- 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., R. Sakuraba, and F. Hashihama. 2013. Phosphate monoesterase and diesterase activities in the North and South Pacific Ocean. *Biogeosciences* **10**: 7677–7688.
- Schreiber, D. R., F. J. Millero, and A. S. Gordon. 1990. Production of an extracellular copper-binding compound by the heterotrophic marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Chem.* **28**: 275–284.
- Semeniuk, D. M., J. T. Cullen, W. K. Johnson, K. Gagnon, T. J. Ruth, and M. T. Maldonado. 2009. Plankton copper requirements and uptake in the subarctic Northeast Pacific Ocean. *Deep-Sea Res. Part I* **56**: 1130–1142.
- Shi, T., Y. Sun, and P. G. Falkowski. 2007. Effects of iron limitation on the expression of metabolic genes in the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *Environ. Microbiol.* **9**: 2945–2956.
- Shiozaki, T., K. Furuya, T. Kodama, and S. Takeda. 2009. Contribution of N₂ fixation to new production in the western North Pacific Ocean along 155°E. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **377**: 19–32.
- Shiozaki, T., K. Furuya, T. Kodama, S. Kitajima, S. Takeda, T. Takemura, and J. Kanda. 2010. New estimation of N₂ fixation in the western and central Pacific Ocean and its marginal seas. *Global Biogeochem. Cycles* **24**,
- Shiozaki, T., Y. L. Chen, Y.-H. Lin, Y. Taniuchi, D.-S. Sheu, K. Furuya, and H.-Y. Chen. 2014a. Seasonal variations of unicellular diazotroph groups A and B, and *Trichodesmium* in the northern South China Sea and neighboring upstream Kuroshio Current. *Cont. Shelf Res.* **80**: 20–31.
- Shiozaki, T., T. Kodama, and K. Furuya. 2014b. Large-scale impact of the island mass effect through nitrogen fixation in the western South Pacific Ocean. *Geophys. Res. Lett.* **41**:2907-2913.

- Soares, H. M. V. M., and M. G. R. T. Barros. 2001. Electrochemical processes of cadmium, copper, lead, and zinc in the presence of *N*- (2-Hydroxyethyl) piperazine-*N'*-3-Propanesulfonic Acid (HEPPS) : Possible implications in speciation studies. *Electroanalysis* **13**: 325–331.
- Sohm, J. A., E. A. Webb, and D. G. Capone. 2011. Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 499–508.
- Sommer, U. 1983. Nutrient competition between phytoplankton species in multispecies chemostat experiments. *Arch. für Hydrobiol.* **96**: 399–416.
- Sournia, A. 1970. Les Cyanophycées dans le plancton marin. *Ann. Biol. Ser.* **9**: 63-76.
- Staal, M., S. te Lintel Hekkert, G. J. Brummer, M. Veldhuis, C. Sikkens, S. Persijn, and L. J. Stal. 2007. Nitrogen fixation along a north–south transect in the eastern Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 1305–1316.
- Stauber, J. L., and T. M. Florence. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar. Biol.* **519**: 511–519.
- Stoecker, D. K., W. G. Sunda, and L. H. Davis. 1986. Effects of copper and zinc on two planktonic ciliates. *Mar. Biol.* **92**: 21–29.
- Stuart, R. K., C. L. Dupont, D. A. Johnson, I. T. Paulsen, and B. Palenik. 2009. Coastal strains of marine *Synechococcus* species exhibit increased tolerance to copper shock and a distinctive transcriptional response relative to those of open-ocean strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5047–5057.
- Suga, T., A. Kato, and K. Hanawa. 2000. North Pacific Tropical Water: its climatology and temporal changes associated with the climate regime shift in the 1970s. *Prog. Oceanogr.* **47**: 223–256.
- Suga, T., K. Motoki, Y. Aoki, and A. M. Macdonald. 2004. The North Pacific climatology of winter mixed layer and mode waters. *J. Phys. Oceanogr.* **34**: 3–22.
- Sunda, W. G.. 1975. The relationship between cupric ion activity and toxicity of copper to phytoplankton. The Massachusetts Institute of Technology and the Woods Hole Oceanographic Institution. Ph. D. thesis.
- Sundström, B. G. 1984. Observations on *Rhizosolenia clevei* Ostensfeld (Bacillariophyceae) and *Richelia intracellularis* Schmidt (Cyanophyceae). *Bot. Mar.* **27**: 345–355.

- Suzuki, R., and T. Ishimaru. 1990. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. *J. Oceanogr.* **46**: 190–194.
- Sverdrup H.U., Johnson M.W. and Fleming R.H. 1942. The oceans: Their physics, chemistry, and general biology. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York, pp. 1087
- Takano, Y., K. Hagino, Y. Tanaka, T. Horiguchi, and H. Okada. 2006. Phylogenetic affinities of an enigmatic nannoplankton, *Braarudosphaera bigelowii* based on the SSU rDNA sequences. *Mar. Micropaleontol.* **60**: 145–156.
- Takano, S., M. Tanimizu, T. Hirata, and Y. Sohrin. 2014. Isotopic constraints on biogeochemical cycling of copper in the ocean. *Nat. Commun.* **5**: 5663.
- Takeda, S., and H. Obata. 1995. Response of equatorial Pacific phytoplankton to subnanomolar Fe enrichment. *Mar. Chem.* **50**: 219–227.
- Takeda, S., N. Ramaiah, M. Miki, Y. Kondo, Y. Yamaguchi, Y. Arie, F. Gómez, K. Furuya, and W. Takahashi. 2007. Biological and chemical characteristics of high-chlorophyll, low-temperature water observed near the Sulu Archipelago. *Deep-Sea Res. Part II* **54**: 81–102.
- Takeda, S., H. Obata, A. Okubo, M. Sato, and Y. Kondo. 2014. Bioavailability and biogeochemical processes of trace metals in the surface ocean, pp. 163–176. *In* M. Uematsu, Y. Yokouchi, Y. Watanabe, S. Takeda, and Y. Yamanaka [eds.], Western Pacific Air-Sea interaction Study. Terra Scientific publishing Company.
- Takemura, T., H. Okamoto, Y. Maruyama, A. Numaguti, A. Higurashi, and T. Nakajima, 2000. Global three-dimensional simulation of aerosol optical thickness distribution of various origins. *J. Geophys. Res.* **105**: 17853-17873.
- Takemura, T., T. Nakajima, O. Dubovik, B. N. Holben, and S. Kinne, 2002. Single-scattering albedo and radiative forcing of various aerosol species with a global three-dimensional model. *J. Climate.* **15**: 333-352.
- Takemura, T., T. Nozawa, S. Emori, T. Y. Nakajima, and T. Nakajima, 2005. Simulation of climate response to aerosol direct and indirect effects with aerosol transport-radiation model. *J. Geophys. Res.* **110**: D02202.

- Tang, D., C.-C. Hung, K. W. Warnken, and P. H. Santschi. 2000. The distribution of biogenic thiols in surface waters of Galveston Bay. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1289–1297.
- Taniuchi, Y., Y. L. Chen, H.-Y. Chen, M.-L. Tsai, and K. Ohki. 2012. Isolation and characterization of the unicellular diazotrophic cyanobacterium Group C TW3 from the tropical western Pacific Ocean. *Environ. Microbiol.* **14**: 641–654.
- Thompson, A. W., R. A. Foster, A. Krupke, B. J. Carter, N. Musat, D. Vaultot, M. M. M. Kuypers, and J. P. Zehr. 2012. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* **337**: 1546–1550.
- Thompson, A., B. J. Carter, K. Turk-Kubo, F. Malfatti, F. Azam, and J. P. Zehr. 2014. Genetic diversity of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria UCYN-A and its prymnesiophyte host. *Environ. Microbiol.* **16**: 3238–49.
- Tibbles, B. J., and D. E. Rawlings. 1994. Characterization of nitrogen-fixing bacteria from a temperate saltmarsh lagoon, including isolates that produce ethane from acetylene. *Microb. Ecol.* **27**: 65–80.
- Tilman, D. 1977. Resource competition between plankton algae: An experimental and theoretical approach. *Ecology* **58**: 338–348.
- Tomczak, M., and J. S. Godfrey 2005: Regional oceanography: An introduction, pdf version 1.1, Butler and Tanner Ltd, London, 391pp.
- Town, R. M., and M. Filella. 2000. A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. *Aquat. Sci.* **62**: 252–295.
- Tripp, H. J., S. R. Bench, K. A. Turk, R. A. Foster, B. A. Desany, F. Niazi, J. P. Affourtit, and J. P. Zehr. 2010. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature* **464**: 90–94.
- Tsuda, A., H. Kiyosawa, A. Kuwata, M. Mochizuki, N. Shiga, H. Saito, S. Chiba, K. Imai, J. Nishioka, and T. Ono. 2005. Responses of diatoms to iron-enrichment (SEEDS) in the western subarctic Pacific, temporal and spatial comparisons. *Prog. Oceanogr.* **64**: 189–205.
- Tuit, C., J. Waterbury, and G. Ravizzaz. 2004. Diel variation of molybdenum and iron in marine diazotrophic cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 978–990.

- Turk-Kubo, K. A., K. M. Achilles, T. R. C. Serros, M. Ochiai, J. P. Montoya, and J. P. Zehr. 2012. Nitrogenase (*nifH*) gene expression in diazotrophic cyanobacteria in the Tropical North Atlantic in response to nutrient amendments. *Front. Microbiol.* **3**: 386.
- Turk-Kubo, K. A., M. Karamchandani, D. G. Capone, and J. P. Zehr. 2014. The paradox of marine heterotrophic nitrogen fixation: abundances of heterotrophic diazotrophs do not account for nitrogen fixation rates in the Eastern Tropical South Pacific. *Environ. Microbiol.* **16**: 3095–3114.
- Twining, B. S., and S. B. Baines. 2013. The trace metal composition of marine phytoplankton. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **5**: 191–215.
- Uematsu, M., Z. Wang, and I. Uno. 2003. Atmospheric input of mineral dust to the western North Pacific region based on direct measurements and a regional chemical transport model. *Geophys. Res. Lett.* **30**,
- Villareal, T. A., and E. J. Carpenter. 2003. Buoyancy regulation and the potential for vertical migration in the oceanic cyanobacterium *Trichodesmium*. *Microb. Ecol.* **45**: 1–10.
- Visviki, I., and J. W. Rachlin. 1991. The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella-minuta*, in both acute and chronic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**: 271–275.
- Voss, M., P. Croot, K. Lochte, M. Mills, and I. Peeken. 2004. Patterns of nitrogen fixation along 10° N in the tropical Atlantic. *Geophys. Res. Lett.* **31**: 1–4.
- Ward, B. A., S. Dutkiewicz, C. M. Moore, and M. J. Follows. 2013. Iron, phosphorus, and nitrogen supply ratios define the biogeography of nitrogen fixation. *Limnol. Oceanogr.* **58**: 2059–2075.
- Watkins-Brandt, K. S., R. M. Letelier, Y. H. Spitz, M. J. Church, D. Böttjer, and A. E. White. 2011. Addition of inorganic or organic phosphorus enhances nitrogen and carbon fixation in the oligotrophic North Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **432**: 17–29.
- Webb, E. A., R. W. Jakuba, J. W. Moffett, and S. T. Dyhrman. 2007. Molecular assessment of phosphorus and iron physiology in *Trichodesmium* populations from the western Central and western South Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 2221–2232.
- Weiss, R. F. 1970. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Res.* **17**: 721–735.

- Welschmeyer, N. A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 1985–1992.
- Westerlund, S., and P. Öhman. 1991. Cadmium, copper, cobalt, nickel, lead, and zinc in the water column of the Weddell Sea, Antarctica. *Geochim. Cosmochim. Acta* **55**: 2127–2146.
- Wille N. 1904. Die Schizophyceen der plankton-expedition. *In* Hensen V. [ed.], *Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humbol-Stiftung*. 88 pp..
- Whitby, H., and C. M. G. van den Berg. 2015. Evidence for copper-binding humic substances in seawater. *Mar. Chem.* **173**: 282–290.
- Wu, J., W. Sunda, E. A. Boyle, and D. M. Karl. 2000. Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science* **289**: 759–762.
- Yamada, N., H. Fukuda, H. Ogawa, H. Saito, and M. Suzumura. 2012. Heterotrophic bacterial production and extracellular enzymatic activity in sinking particulate matter in the western North Pacific Ocean. *Front. Microbiol.* **3**: 379.
- Yeats, P. A., and J. A. Campbell. 1983. Nickel, copper, cadmium and zinc in the northwest Atlantic Ocean. *Mar. Chem.* **12**: 43–58.
- Zapata, M., F. Rodríguez, and J. L. Garrido. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **195**: 29–45.
- Zehr, J. P., D. Harris, B. Dominic, and J. Salerno. 1997. Structural analysis of the *Trichodesmium* nitrogenase iron protein: implications for aerobic nitrogen fixation activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 303–309.
- Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* **5**: 539–554.
- 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.
- Zehr, J. P., and R. M. Kudela. 2011. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **3**: 197–225.

付録

Table S1 測点 205 における SA 添加濃度 0.1 μM での銅滴定の結果。各銅添加濃度におけるサンプル液中の総銅濃度および銅-SA 錯体の還元電流のピーク高、銅-SA 錯体濃度 ($[\text{CuSA}_x]$)、有機配位子と錯形成していない銅濃度 ($[\text{Cu}']$)、有機錯体銅濃度 ($[\text{CuL}]$)、 $[\text{Cu}']/[\text{CuL}]$ 比を示す。「n.d.」は還元電流のピークが検出されなかったことを示す。銅添加系列のうち、無添加のものについては、2-4 連のサンプルを測定した結果を平均した。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	$[\text{CuSA}_x]$ (nM)	$[\text{Cu}']$ (pM)	$[\text{CuL}]$ (nM)	$[\text{Cu}']/[\text{CuL}]$
0	3.11	n.d.	0	0	3.11	0
0.25	3.36	n.d.	0	0	3.36	0
0.5	3.61	n.d.	0	0	3.61	0
1	4.11	n.d.	0	0	4.11	0
1.5	4.61	n.d.	0	0	4.61	0
2.5	5.61	n.d.	0	0	5.61	0
3.5	6.61	0.194	1.31	108	5.19	2.09×10^{-2}
5	8.11	0.335	2.26	187	5.66	3.30×10^{-2}
7.5	10.6	0.519	3.50	289	6.82	4.24×10^{-2}
10	13.1	0.768	5.19	428	7.50	5.72×10^{-2}
15	18.1	1.19	8.03	664	9.41	7.05×10^{-2}
25	28.1	3.36	22.7	1874	3.55	0.528
35	38.1	4.27	28.8	2382	6.90	0.345
50	53.1	6.58	44.4	3671	5.01	0.732
100	103	11.0	74.2	6131	22.8	0.269
150	153	14.9	100	8290	44.5	0.186

Table S2 測点 205 における SA 添加濃度 0.5 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	3.11	n.d.	0	0	3.11	0
0.25	3.36	0.126	0.308	4.64	3.05	1.52×10^{-3}
0.5	3.61	0.175	0.428	6.44	3.18	2.03×10^{-3}
1	4.11	0.298	0.728	11.0	3.37	3.25×10^{-3}
1.5	4.61	0.312	0.763	11.5	3.84	2.99×10^{-3}
2.5	5.61	0.482	1.18	17.7	4.41	4.01×10^{-3}
3.5	6.61	0.724	1.77	26.6	4.81	5.53×10^{-3}
5	8.11	0.869	2.13	32.0	5.95	5.37×10^{-3}
7.5	10.6	1.62	3.96	59.6	6.59	9.04×10^{-3}
10	13.1	2.45	5.99	90.1	7.03	1.28×10^{-2}
15	18.1	3.26	7.97	120	10.0	1.20×10^{-2}
25	28.1	7.38	18.0	271	9.79	2.77×10^{-2}
35	38.1	10.4	25.5	383	12.3	3.12×10^{-2}
50	53.1	17.8	43.5	654	8.96	7.30×10^{-2}

Table S3 測点 205 における SA 添加濃度 2 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	3.11	0.276	0.492	1.37	2.62	5.25×10^{-4}
0.25	3.36	0.311	0.553	1.54	2.81	5.51×10^{-4}
0.5	3.61	0.492	0.876	2.45	2.73	8.96×10^{-4}
1	4.11	0.684	1.22	3.40	2.89	1.18×10^{-3}
1.5	4.61	0.924	1.64	4.60	2.96	1.55×10^{-3}
2.5	5.61	1.23	2.19	6.12	3.41	1.79×10^{-3}
3.5	6.61	1.65	2.94	8.21	3.67	2.24×10^{-3}
5	8.11	2.23	3.97	11.1	4.13	2.69×10^{-3}
7.5	10.6	3.32	5.91	16.5	4.68	3.52×10^{-3}
10	13.1	3.78	6.73	18.8	6.36	2.95×10^{-3}
15	18.1	6.55	11.7	32.6	6.42	5.07×10^{-3}
25	28.1	12.2	21.7	60.7	6.34	9.58×10^{-3}
35	38.1	13.7	24.4	68.2	13.6	5.00×10^{-3}
50	53.1	20.2	35.9	100	17.1	5.86×10^{-3}

Table S4 測点 209 における SA 添加濃度 0.1 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	2.49	n.d.	0	0	2.49	0
0.25	2.74	n.d.	0	0	2.74	0
0.5	2.99	n.d.	0	0	2.99	0
1	3.49	n.d.	0	0	3.49	0
1.5	3.99	n.d.	0	0	3.99	0
2.5	4.99	n.d.	0	0	4.99	0
3.5	5.99	n.d.	0	0	5.99	0
5	7.49	0.235	1.89	157	5.44	2.88×10^{-2}
7.5	9.99	0.365	2.95	244	6.80	3.58×10^{-2}
10	12.5	0.606	4.89	404	7.19	5.62×10^{-2}
15	17.5	1.35	10.9	900	5.69	0.158
25	27.5	2.50	20.2	1667	5.64	0.295
35	37.5	3.91	31.6	2608	3.32	0.785
50	52.5	5.64	45.5	3762	3.20	1.17
75	77.5	7.65	61.7	5102	10.6	0.480
100	102	9.17	74.0	6116	22.4	0.274
150	152	14.0	113	9357	29.9	0.313

Table S5 測点 209 における SA 添加濃度 0.5 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	2.49	n.d.	0	0	2.49	0
0.25	2.74	n.d.	0	0	2.74	0
0.5	2.99	n.d.	0	0	2.99	0
1	3.49	n.d.	0	0	3.49	0
1.5	3.99	0.280	0.702	10.6	3.28	3.22×10^{-3}
2.5	4.99	0.420	1.05	15.8	3.92	4.03×10^{-3}
3.5	5.99	0.617	1.54	23.2	4.42	5.25×10^{-3}
5	7.49	0.886	2.22	33.3	5.24	6.37×10^{-3}
7.5	9.99	1.33	3.33	50.1	6.61	7.58×10^{-3}
10	12.5	2.18	5.46	82.1	6.95	1.18×10^{-2}
15	17.5	4.00	10.0	151	7.32	2.06×10^{-2}
25	27.5	7.51	18.8	283	8.40	3.37×10^{-2}
35	37.5	12.1	30.2	454	6.83	6.65×10^{-2}
50	52.5	17.8	44.6	670	7.24	9.25×10^{-2}
75	77.5	23.9	59.8	899	16.8	5.35×10^{-2}

Table S6 測点 209 における SA 添加濃度 2 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	2.49	0.331	0.779	2.18	1.71	1.28×10^{-3}
0.25	2.74	0.316	0.744	2.08	1.99	1.05×10^{-3}
0.5	2.99	0.439	1.03	2.89	1.95	1.48×10^{-3}
1	3.49	0.672	1.58	4.43	1.90	2.33×10^{-3}
1.5	3.99	0.588	1.38	3.88	2.60	1.49×10^{-3}
2.5	4.99	1.26	2.96	8.30	2.02	4.12×10^{-3}
3.5	5.99	1.68	3.95	11.1	2.03	5.46×10^{-3}
5	7.49	2.01	4.73	13.2	2.75	4.82×10^{-3}
7.5	9.99	2.61	6.14	17.2	3.83	4.49×10^{-3}
10	12.5	4.02	9.46	26.5	3.00	8.82×10^{-3}
15	17.5	6.33	14.9	41.7	2.55	1.63×10^{-2}
25	27.5	10.6	24.8	69.6	2.57	2.70×10^{-2}
35	37.5	15.2	35.8	100	1.58	6.36×10^{-2}
50	52.5	20.9	49.2	138	3.10	4.44×10^{-2}

Table S7 測点 212 における SA 添加濃度 0.1 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	0.570	n.d.	0	0	0.570	0
0.25	0.820	n.d.	0	0	0.820	0
0.5	1.07	n.d.	0	0	1.07	0
1	1.57	n.d.	0	0	1.57	0
1.5	2.07	n.d.	0	0	2.07	0
2.5	3.07	n.d.	0	0	3.07	0
3.5	4.07	n.d.	0	0	4.07	0
5	5.57	0.275	2.04	168	3.37	5.00×10^{-2}
7.5	8.07	0.410	3.03	251	4.79	5.23×10^{-2}
10	10.6	0.639	4.73	391	5.45	7.17×10^{-2}
15	15.6	1.24	9.18	759	5.63	0.135
25	25.6	2.82	20.9	1725	2.97	0.581
35	35.6	3.71	27.5	2270	5.83	0.389
50	50.6	6.09	45.1	3725	1.76	2.12
75	75.6	8.39	62.1	5132	8.32	0.617
100	101	8.73	64.6	5340	30.6	0.175
150	151	12.9	95.1	7861	47.6	0.165

Table S8 測点 212 における SA 添加濃度 0.5 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	0.570	n.d.	0	0	0.570	0
1	1.57	n.d.	0	0	1.57	0
1.5	2.07	0.204	0.549	8.25	1.51	5.45×10^{-3}
2.5	3.07	0.386	1.04	15.7	2.01	7.77×10^{-3}
3.5	4.07	0.565	1.52	22.9	2.52	9.08×10^{-3}
5	5.57	0.783	2.11	31.7	3.43	9.25×10^{-3}
7.5	8.07	1.36	3.67	55.1	4.35	1.27×10^{-2}
10	10.6	1.95	5.26	79.0	5.23	1.51×10^{-2}
15	15.6	3.24	8.73	131	6.71	1.96×10^{-2}
25	25.6	6.49	17.5	263	7.81	3.37×10^{-2}
35	35.6	10.2	27.6	415	7.55	5.49×10^{-2}
50	50.6	15.8	42.5	639	7.42	8.61×10^{-2}

Table S9 測点 212 における SA 添加濃度 2 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	0.570	n.d.	0	0	0.570	0
0.25	0.820	0.196	0.447	1.25	0.372	3.37×10^{-3}
0.5	1.07	0.252	0.574	1.61	0.494	3.25×10^{-3}
1	1.57	0.429	0.978	2.74	0.589	4.65×10^{-3}
1.5	2.07	0.670	1.53	4.28	0.538	7.94×10^{-3}
2.5	3.07	1.08	2.46	6.90	0.600	1.15×10^{-2}
3.5	4.07	1.35	3.08	8.62	0.983	8.77×10^{-3}
5	5.57	2.11	4.81	13.5	0.745	1.81×10^{-2}
7.5	8.07	3.14	7.16	20.0	0.890	2.25×10^{-2}
10	10.6	4.11	9.37	26.2	1.17	2.24×10^{-2}
15	15.6	5.97	13.6	38.1	1.92	1.99×10^{-2}
25	25.6	10.8	24.5	68.6	0.988	6.94×10^{-2}
35	35.6	15.2	34.7	97.2	0.744	0.131
50	50.6	19.9	45.3	127	5.11	2.48×10^{-2}

Table S10 測点 212 における SA 添加濃度 5 μM での銅滴定の結果。記述形式は Table S1 と同様。
[CuL]および[Cu']/[CuL]に負の値が見られたデータについては直線近似の際に除いた。

銅添加濃度 (nM)	総銅濃度 (nM)	ピークの高さ (nA)	[CuSA _x] (nM)	[Cu'] (pM)	[CuL] (nM)	[Cu']/[CuL]
0	0.570	0.195	0.422	0.311	0.147	2.11×10^{-3}
0.25	0.820	0.314	0.679	0.500	0.141	3.56×10^{-3}
0.5	1.07	0.377	0.814	0.600	0.255	2.35×10^{-3}
1	1.57	0.541	1.17	0.862	0.399	2.16×10^{-3}
1.5	2.07	0.865	1.87	1.38	0.200	6.89×10^{-3}
2.5	3.07	1.32	2.85	2.10	0.216	9.73×10^{-3}
3.5	4.07	1.81	3.91	2.88	0.156	1.84×10^{-2}
5	5.57	2.54	5.49	4.04	7.79×10^{-2}	5.19×10^{-2}
7.5	8.07	3.82	8.25	6.08	-0.190	-3.20×10^{-2}
10	10.6	4.68	10.1	7.45	0.451	1.65×10^{-2}
15	15.6	7.34	15.9	11.7	-0.301	-3.88×10^{-2}
25	25.6	12.0	25.9	19.1	-0.334	-5.71×10^{-2}
35	35.6	16.0	34.6	25.5	0.974	2.61×10^{-2}
50	50.6	23.6	50.9	37.5	-0.351	-0.107

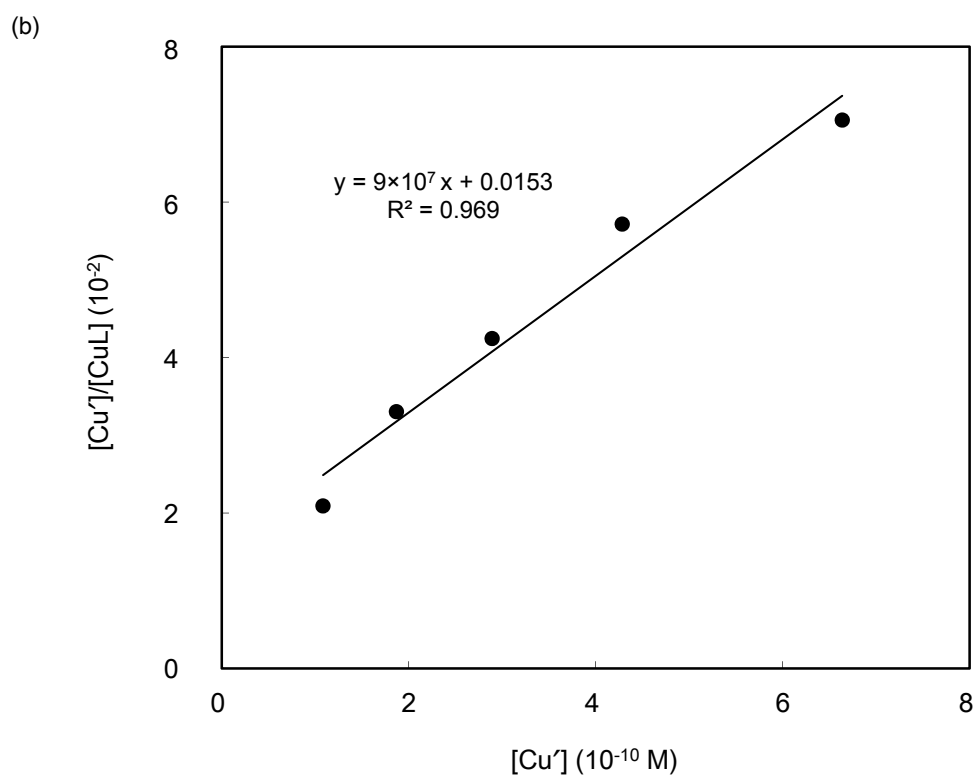
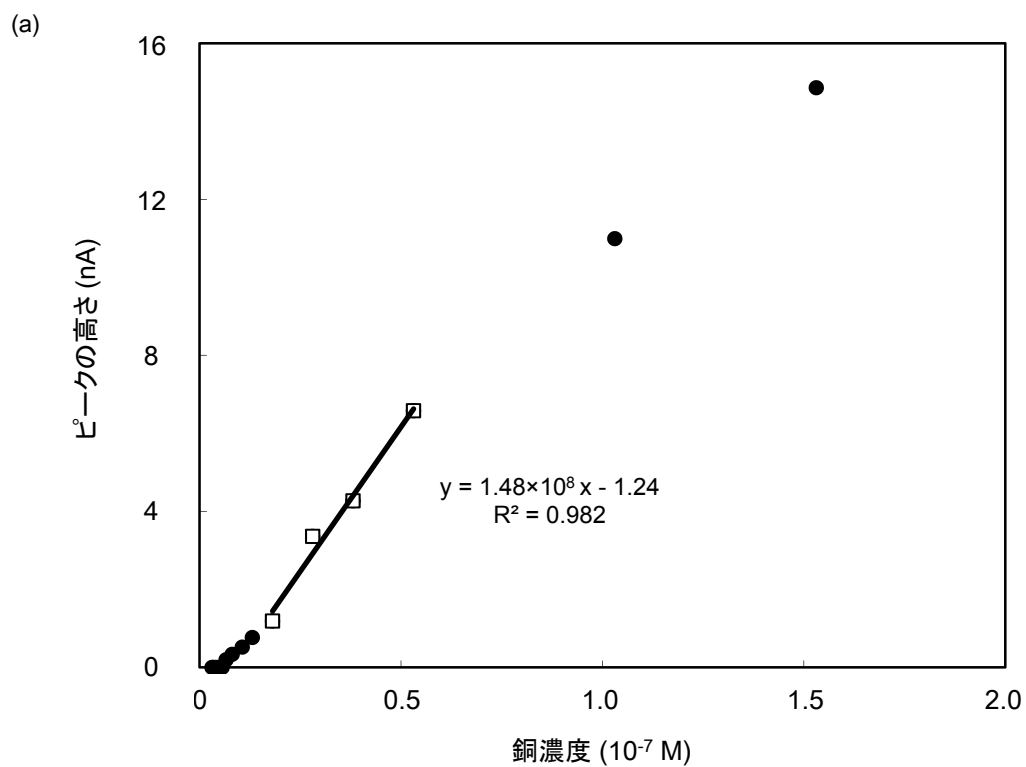


Fig. S1 KH-12-3次航海測点205におけるSA添加濃度0.1 μ Mでの銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。銅滴定曲線 (a) において、横軸は銅添加後のサンプル中の総銅濃度を、縦軸は銅-SA錯体の還元電流のピークの高さを表す。

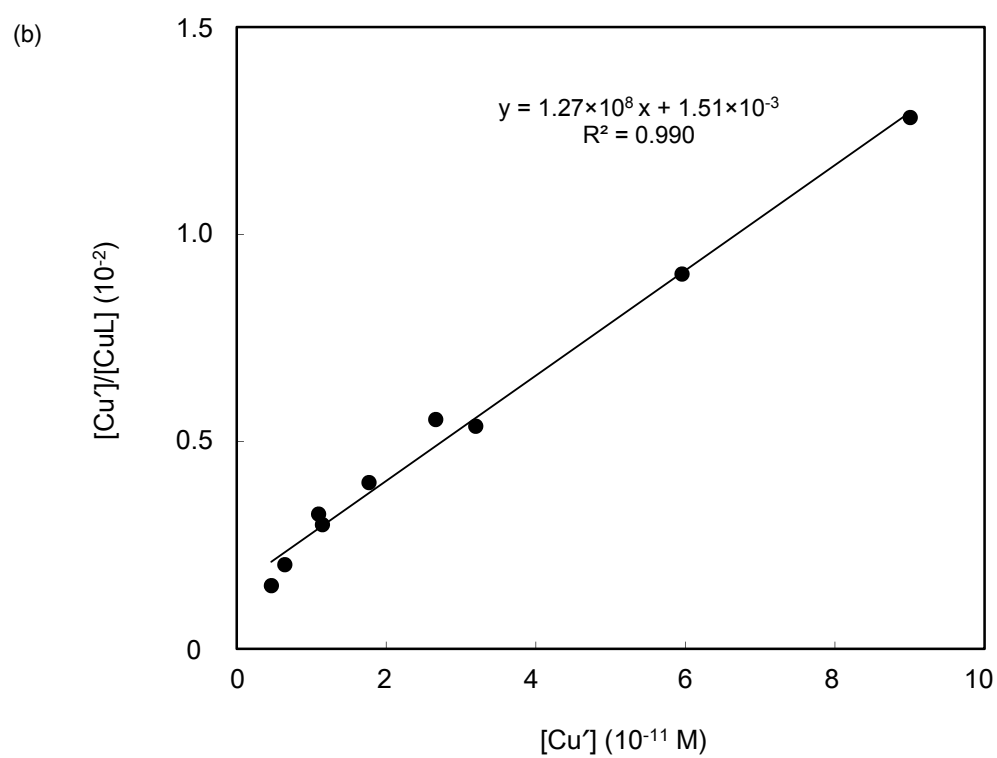
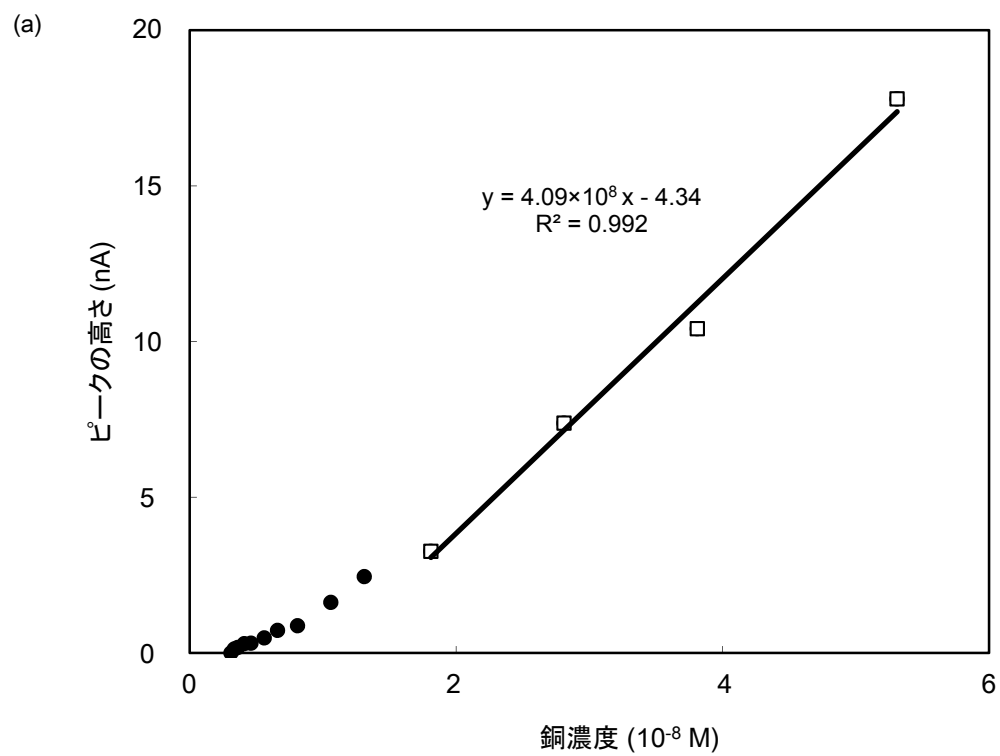


Fig. S2 KH-12-3次航海測点205におけるSA添加濃度0.5 μM での銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

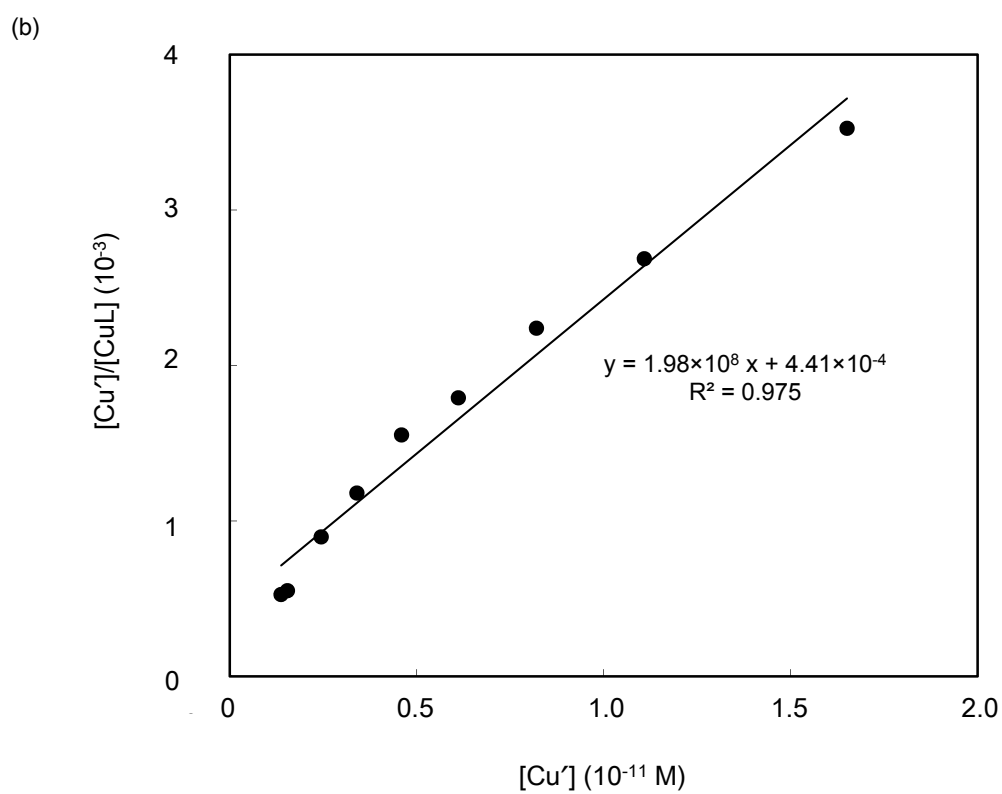
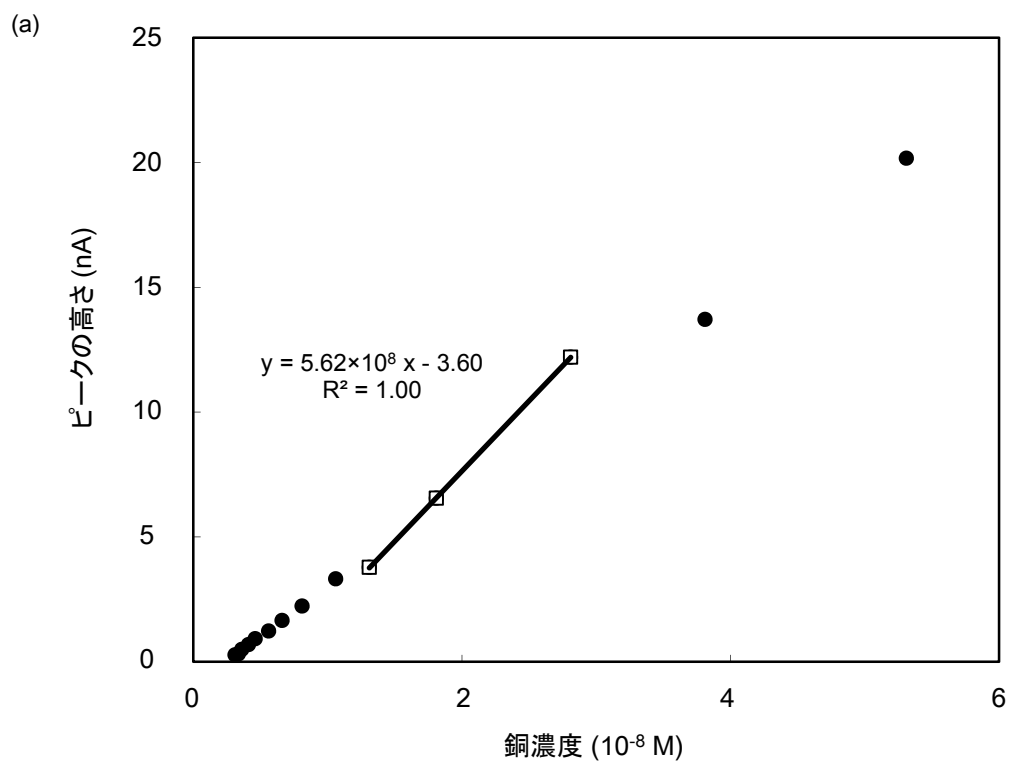


Fig. S3 KH-12-3次航海測点205におけるSA添加濃度2 μ Mでの銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

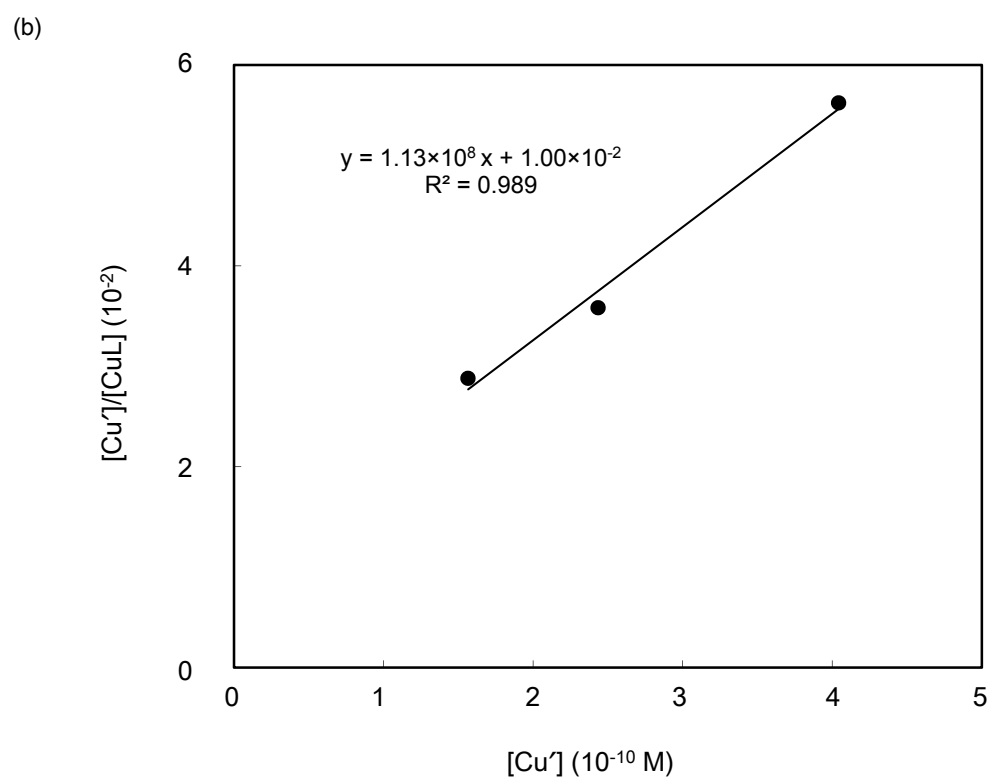
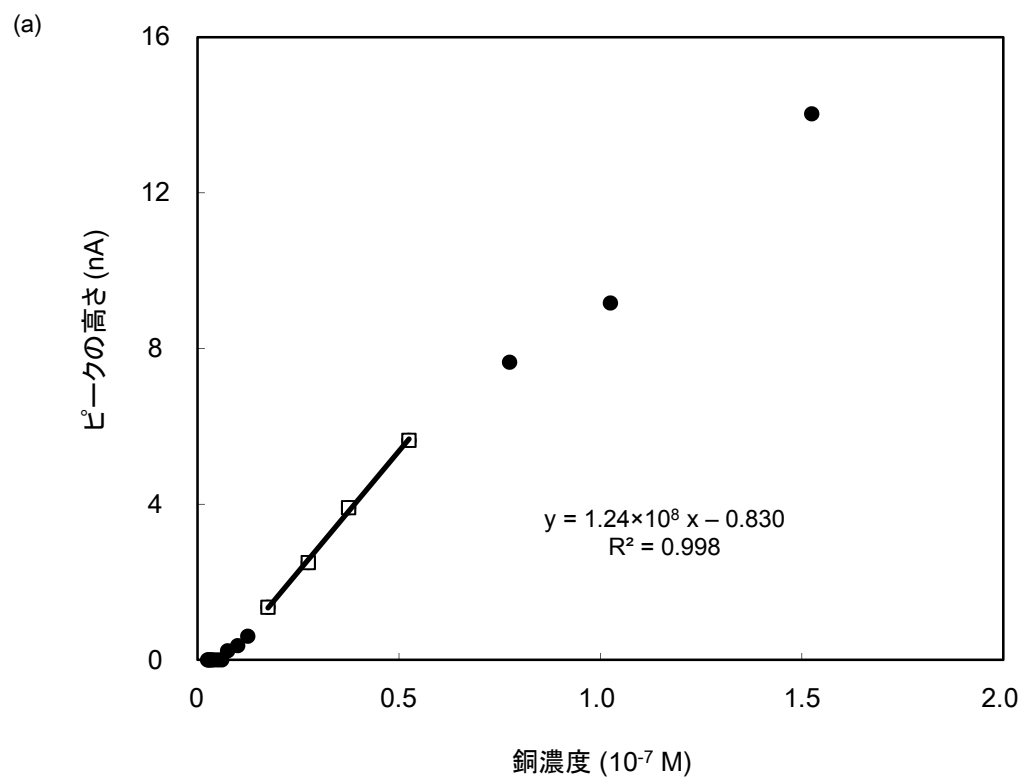


Fig. S4 KH-12-3次航海測点209におけるSA添加濃度0.1 μ Mでの銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

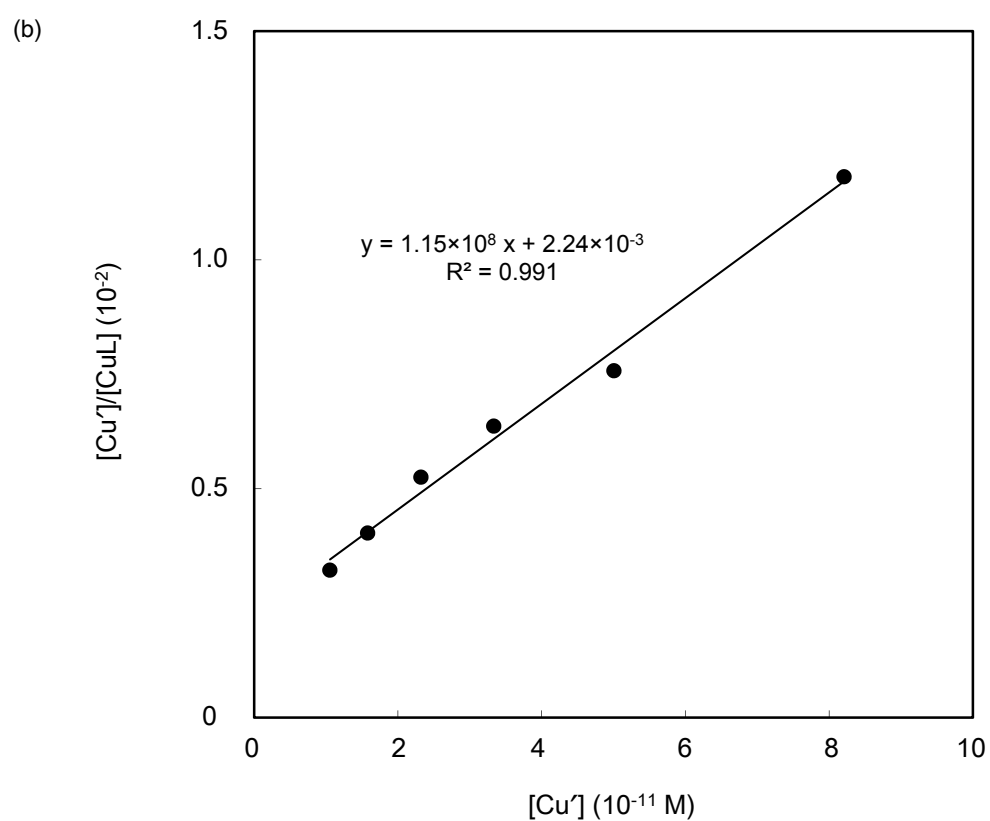
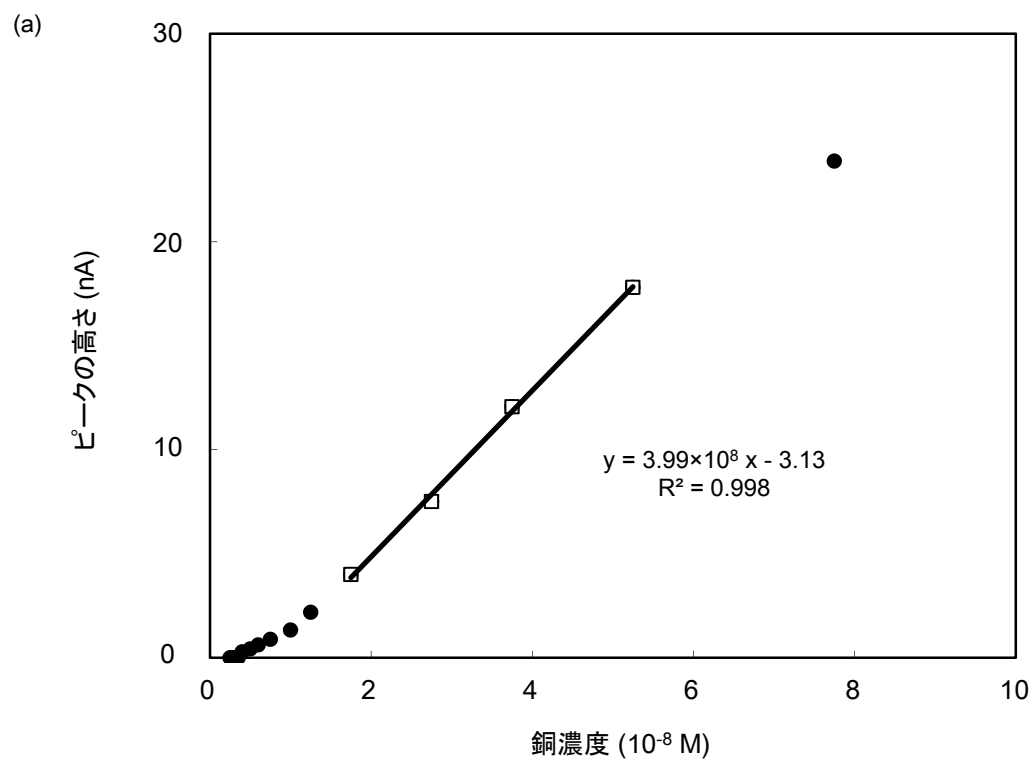


Fig. S5 KH-12-3次航海測点209におけるSA添加濃度0.5 μM での銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

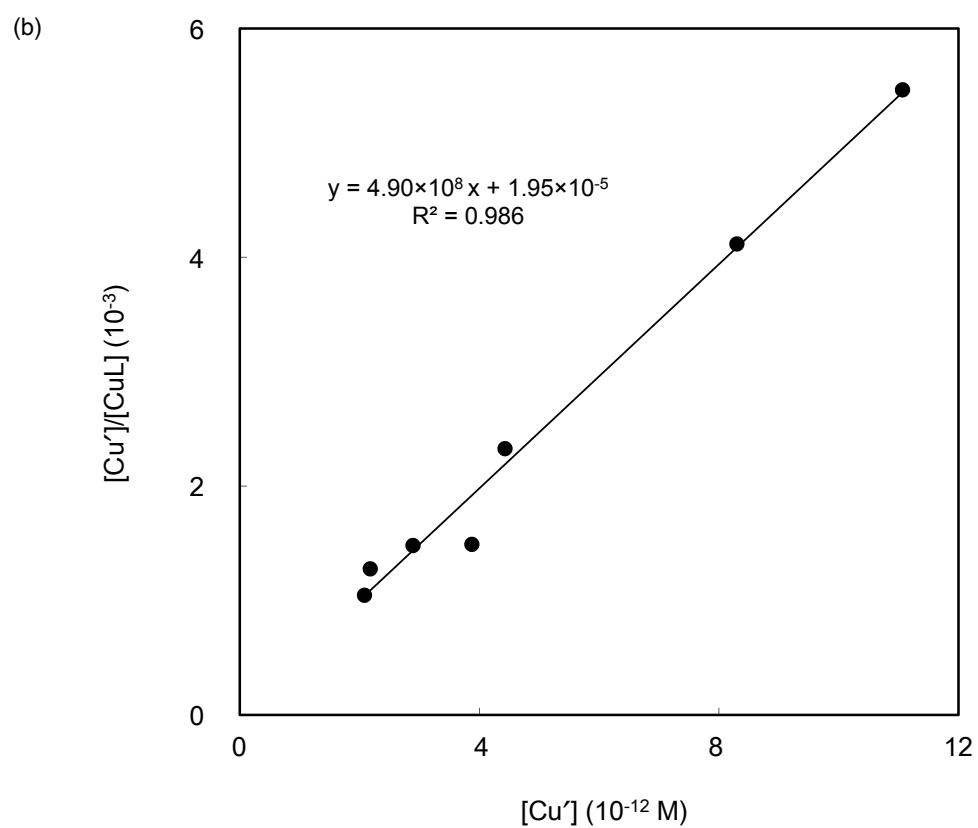
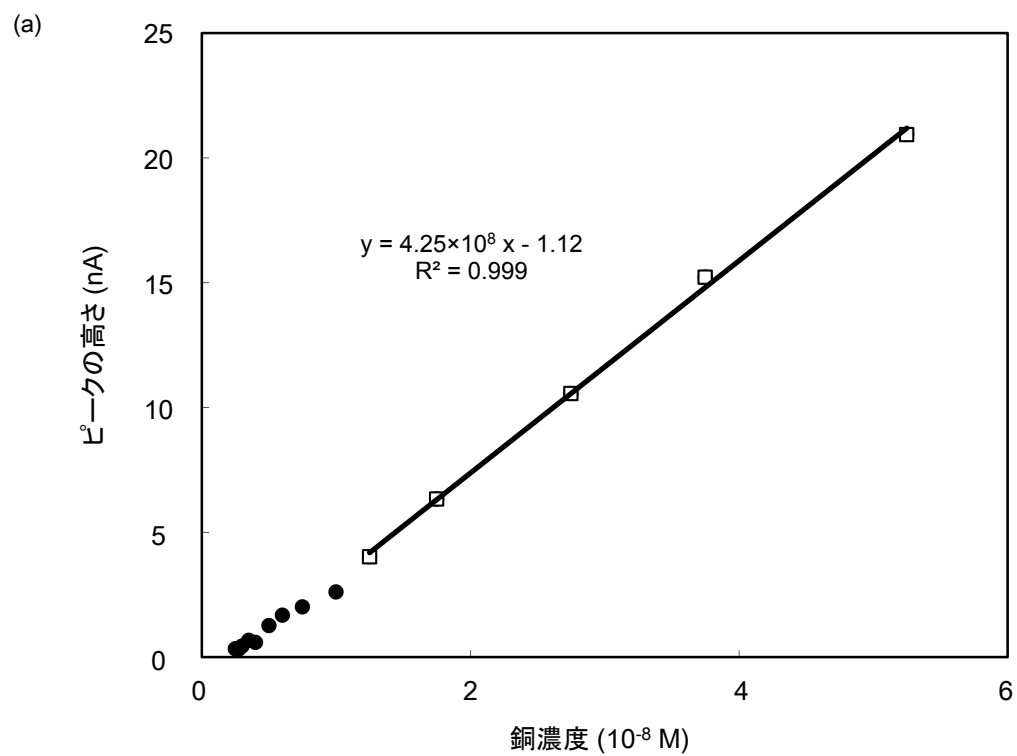


Fig. S6 KH-12-3次航海測点209におけるSA添加濃度2 μ Mでの銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

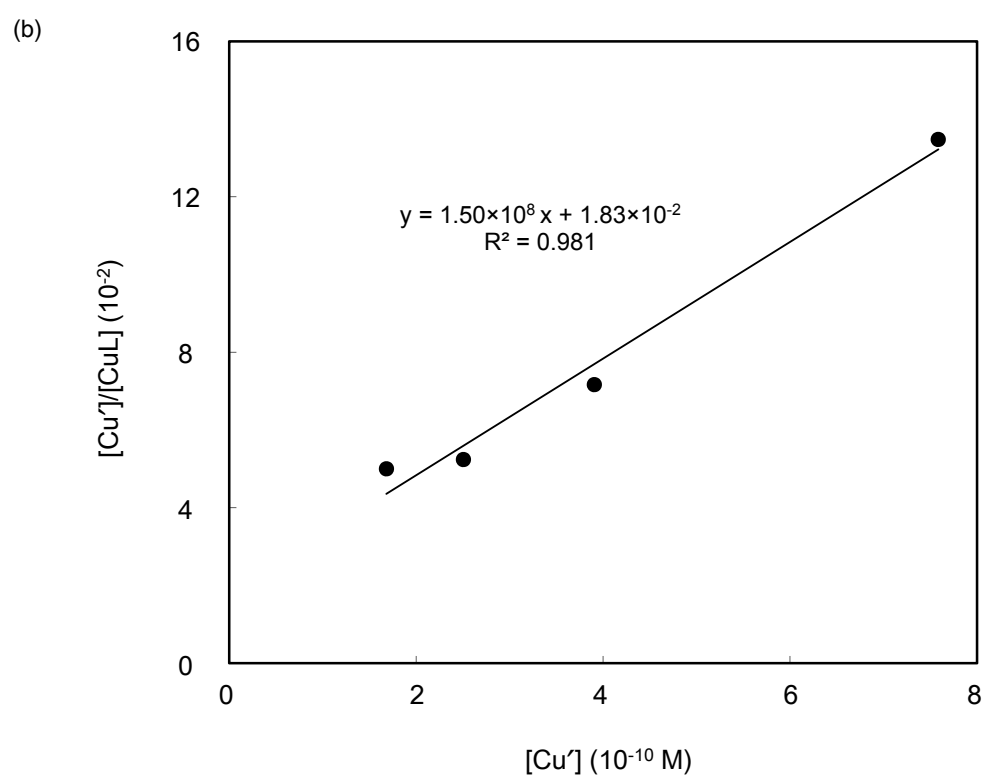
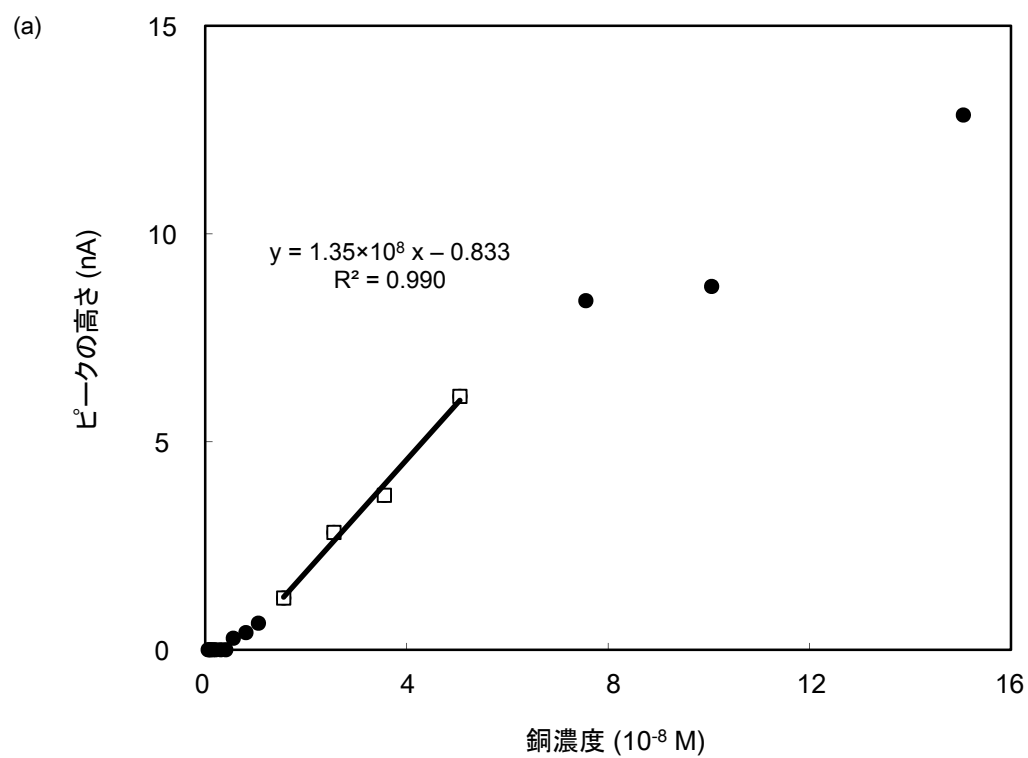


Fig. S7 KH-12-3次航海測点212におけるSA添加濃度0.1 μM での銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

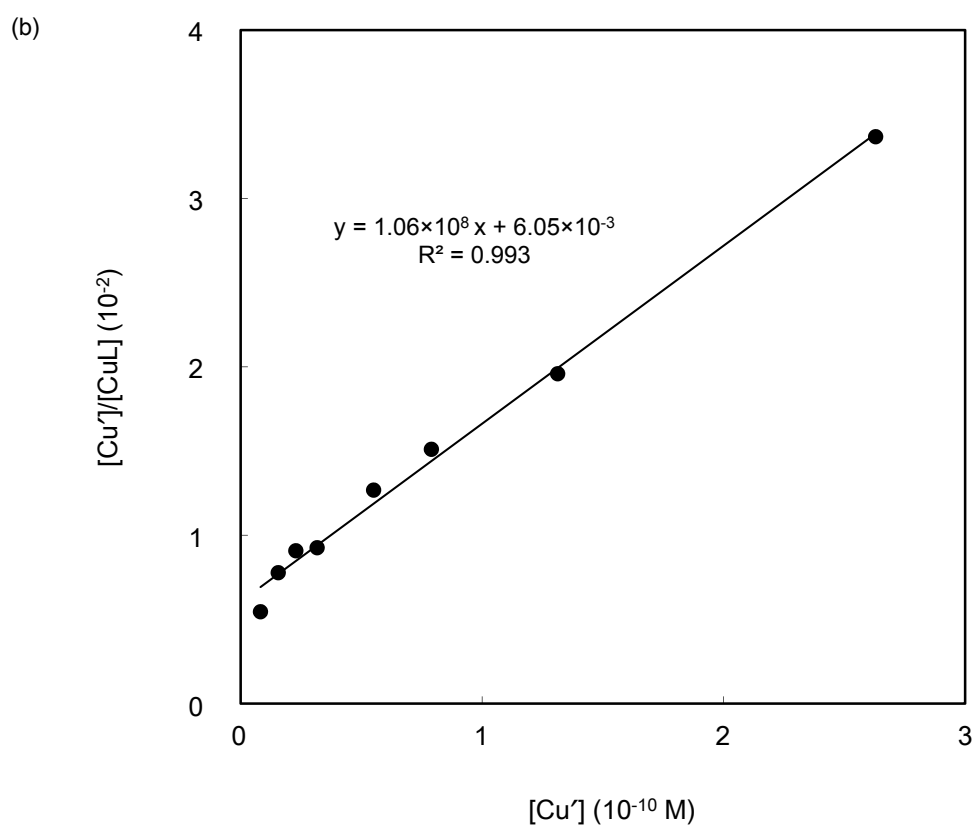
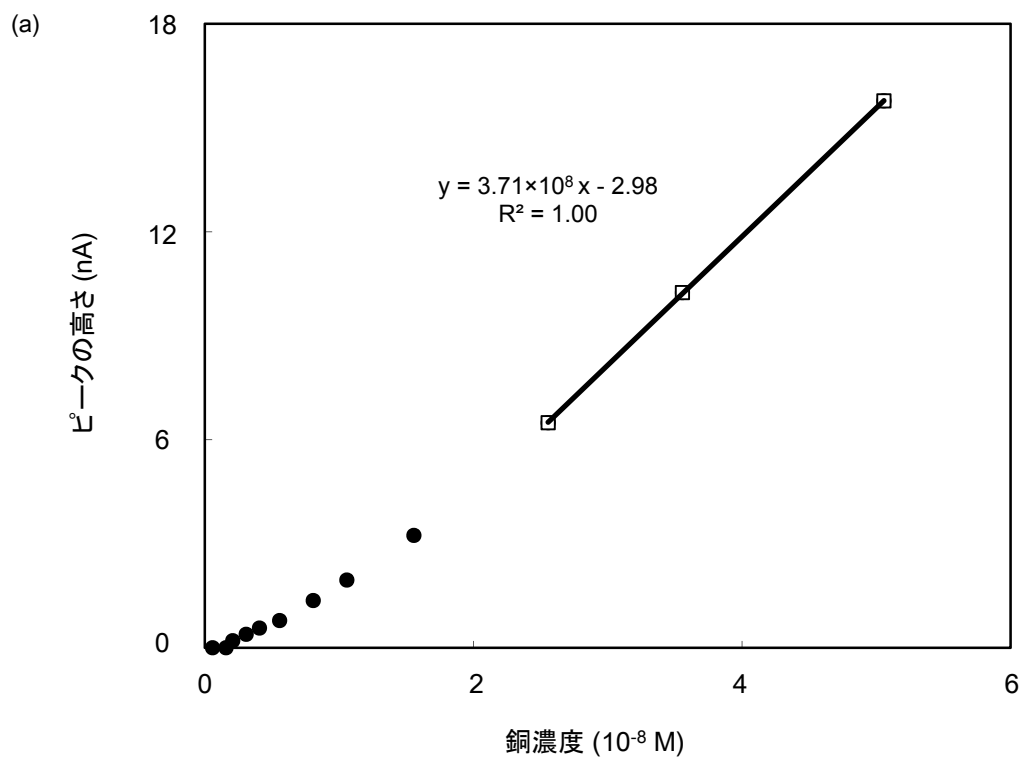


Fig. S8 KH-12-3次航海測点212におけるSA添加濃度0.5 μM での銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

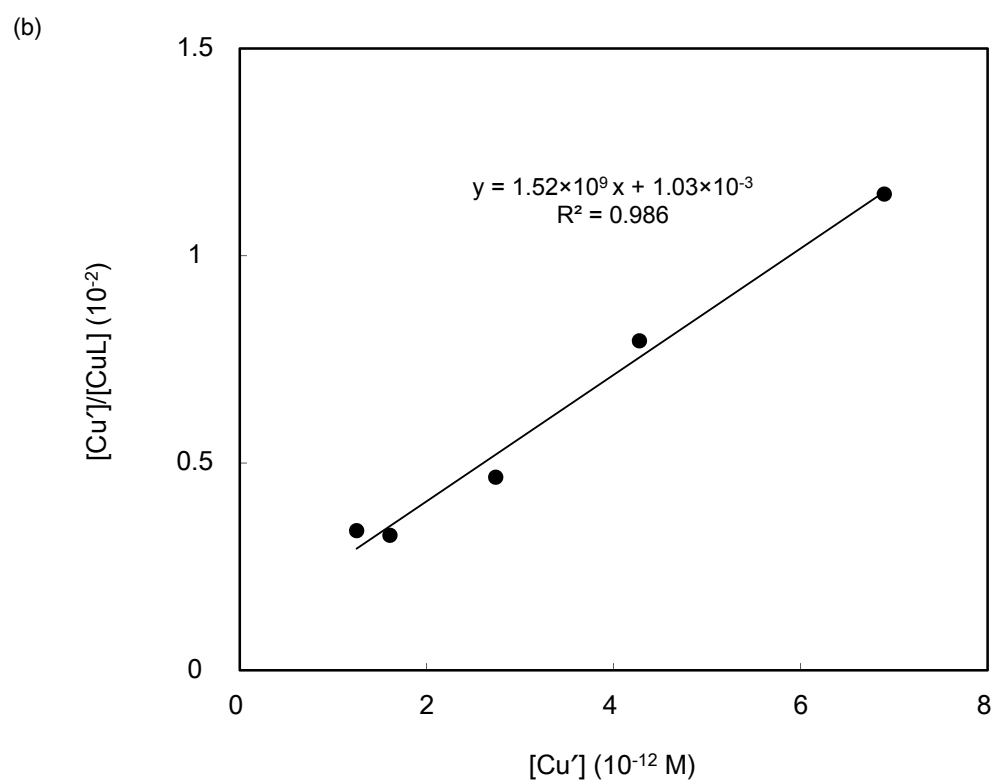
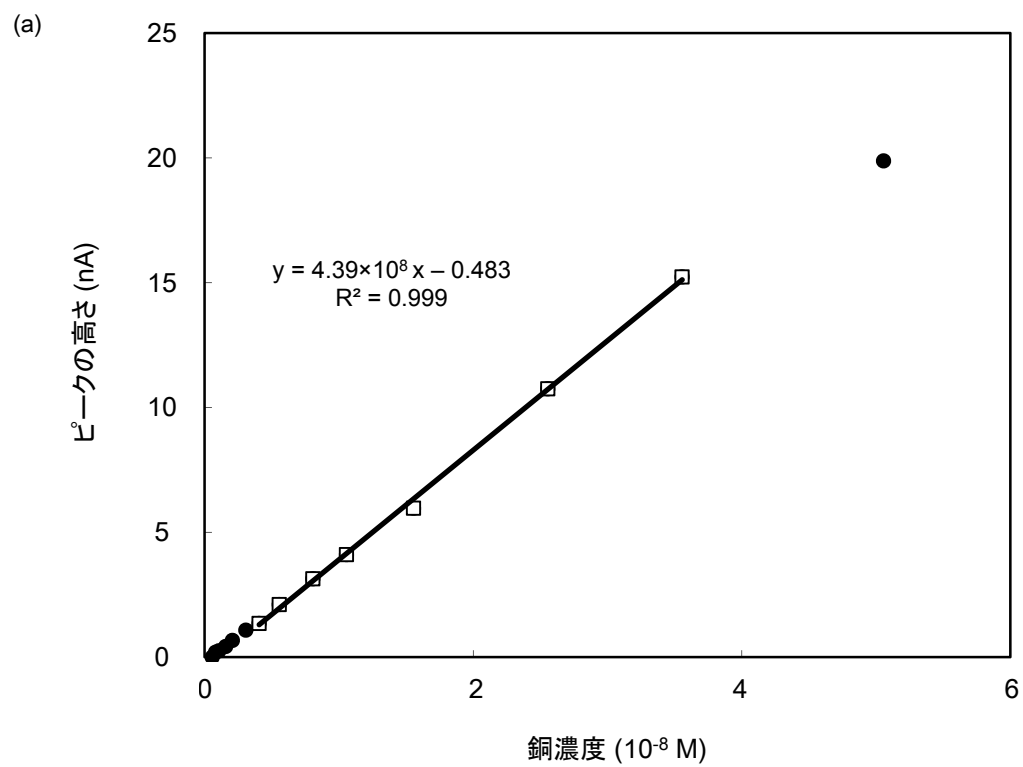


Fig. S9 KH-12-3次航海測点212におけるSA添加濃度2 μ Mでの銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。

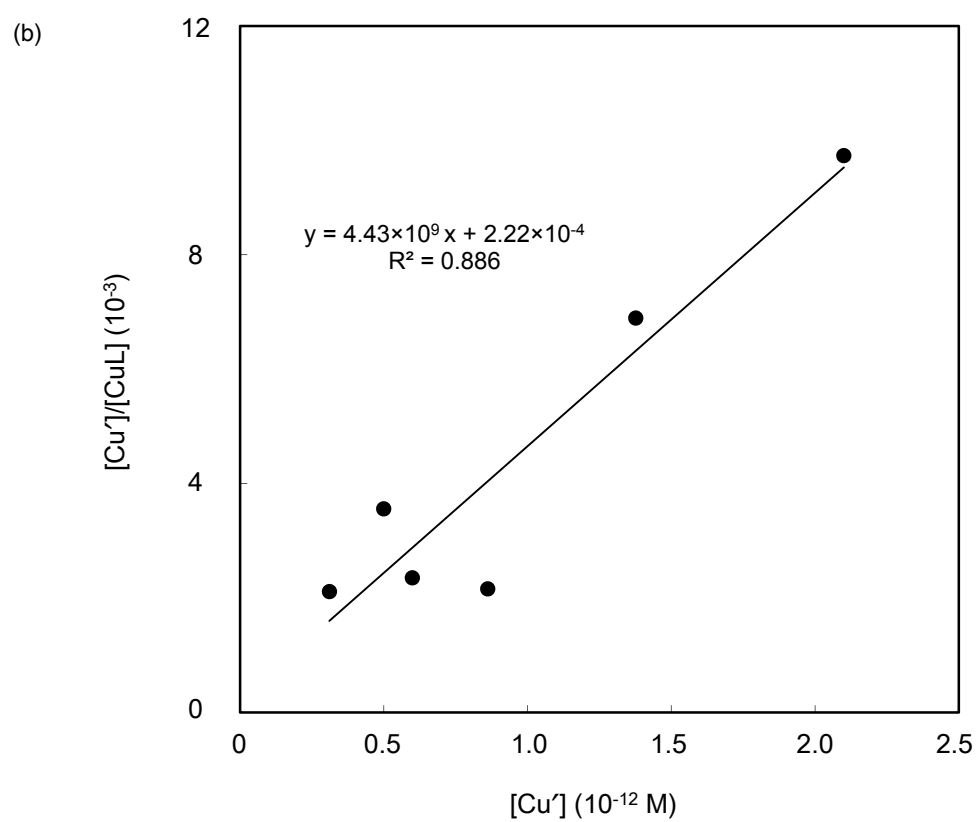
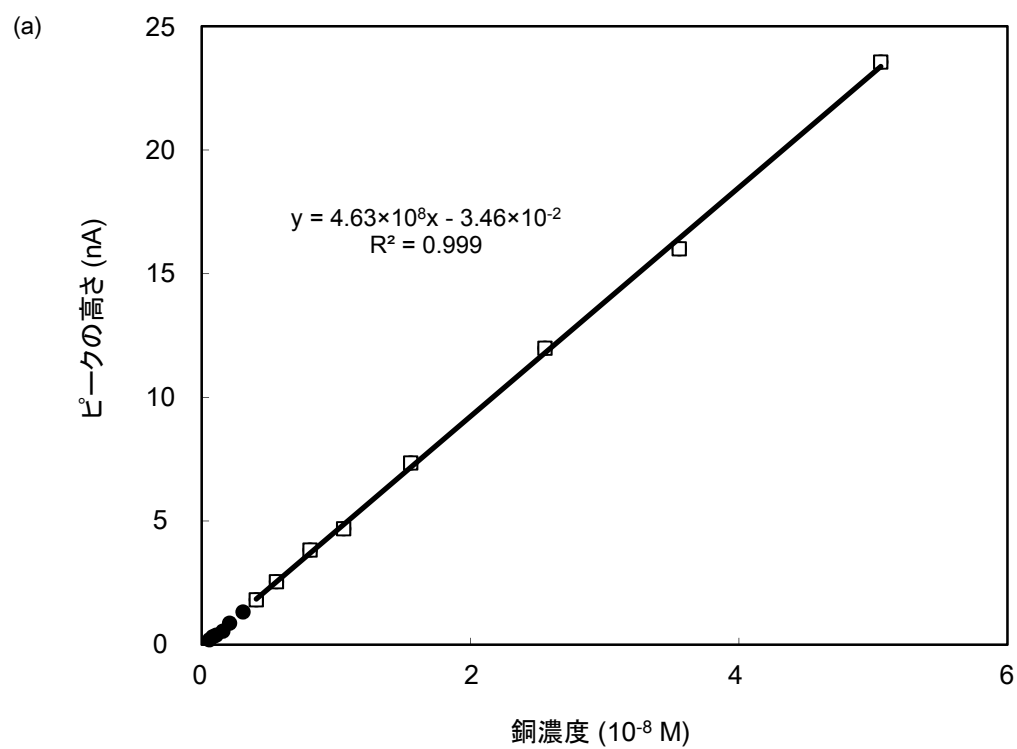


Fig. S10 KH-12-3次航海測点212におけるSA添加濃度5 μ Mでの銅滴定曲線 (a) およびvan den Berg-Ruzicプロットによる直線近似 (b)。