



分子生物学手法を用いた 海洋生物地球化学循環の研究

遠藤 寿*

1. はじめに

海は豊かな海産資源を育み、酸素を作り出し、また気候を安定に保つ役割を担うことから地球の生命維持装置にも例えられる。海洋における主要な基礎生産者としてこの装置の中核を担うのが植物プランクトンである。彼らは光合成によって陸域生態系に匹敵する量の二酸化炭素を固定しており、その一部は高次栄養生物や海洋深層へ輸送される。よって、彼らは現在の地球システムを理解し、今後生じる気候変動の規模と性質を予測する上でも鍵となる生物群と言える。注目すべきは、海洋植物プランクトンの生物量が炭素換算で陸域植物の1/200に満たないことである¹⁾。これは、彼らが活発に増殖と死滅を繰り返しながら、陸域高等植物の数百倍の速度で資源を循環させていることを意味する。そのため、海洋植物プランクトンの群集構造（種の組み合わせ）や生理活性は生存環境に合わせて時空間的にダイナミックに再構築されており、その性質を理解するための多次元な生物情報解析が近年盛んとなっている。この群集組成を高解像度に見積もる上で欠かせない技術が、環境中の核酸配列を標的とした分子生物学手法である。1990年代に登場した定量PCRによる遺伝子定量化の普及に加え、2000年代半ばに登場したハイスループットシーケンサー（HTS）により、海水中の遺伝子塩基配列を大量かつ客観的に取得し、植物プランクトンの群集組成を網羅的に追跡できるようになった。本稿では、受賞対象となった「分子生物学手法を用いた海洋生物地

球化学循環の研究」に関連する著者らの研究成果を紹介する。研究手法や結果解釈については最小限の記載に留める一方で、その研究に至る個人的な興味や各研究の繋がりに焦点を当てている。随所に、論文に相応しくない主観的な記述が入ることをご容赦いただきたい。

2. 植物プランクトンの現存量・機能指標としての遺伝情報

海洋生物を標的とした遺伝情報解析の応用範囲は極めて多岐に及ぶ。配列取得技術の革新と共に急速に発展してきた、コンピュータによる生物学的配列解析（バイオインフォマティクス）技術により、生物の潜在的機能の総和ともいえる全ゲノム情報や、進化や多様性創出に関する情報が、環境中の遺伝配列から徐々に明かされつつある。このような激変する情勢の中、著者は遺伝情報を海洋物質循環の指標として活用する道を模索してきた。すなわち、これまで分析化学的手法で評価してきた生物量や基礎生産速度のプロキシとして、より高速かつ簡便に分析可能な遺伝子配列や濃度の情報を用いる試みである。このような研究は海洋遺伝情報の応用範囲の一つとしては注目度が低く、環境ゲノミクスの華々しい潮流と比べると潮溜まりのように進展が緩やかな分野と言えるかもしれない。これは環境分析化学と分子生物学の両手法に精通する研究者が少ないことが一因でもあるが、そのさらなる背景には、どこまで精密に計測しても物質循環の間接的指標にしかならな

*京都大学化学研究所附属／バイオインフォマティクスセンター准教授

い分子生物学手法に多くの研究者が価値を見いだせないという事情があるように思う。幸か不幸か、著者は遺伝情報の持つ多面性（群集構造、現存量、機能発現の全指標となり得る）と可分析性（核酸は海水中から最も高感度に測定可能な生体分子である）に魅了され研究を続けてきた。従来指標の簡易的なプロキシとしての役割を超え、環境と微生物の相互作用の定量化を推進する可能性が遺伝情報にはあると考えている。全ての生物が遺伝情報や機能情報の媒体として核酸を用いていることを考えれば、指標となる遺伝子の濃度や転写量はそこに生息する植物プランクトン種の現存量や機能発現に直結しているはずである（図1）。しかし、定量分析を鍵とする生物地球化学の研究に遺伝情報を用いるためには、既存の分析化学手法による実測値と比較してその妥当性を検証する必要がある。

著者らは、海洋で最も重要な基礎生産者であり、形態的特徴や光合成補助色素による分類比較が容易な珪藻類に着目し、光学的・分析化学的に取得可能な現存量・群集組成・機能の各情報を遺伝子解析から再現できるか否かを検討した。まず、植物プランクトンにおいて光合成炭素固定を担う酵素 RubisCO の大サブユニットをコードする *rbcL* 遺伝子に着目し、珪藻を中心とする不等毛藻類を標的とした定量 PCR 分析によって得た *rbcL* 遺

伝子現存量を、HPLC 分析で定量した珪藻類の現存量指標色素であるフコキサンチン濃度と比較した。その結果、ベーリング海の植物プランクトン群集に対して、両指標の間に高い正の相関 ($r^2 = 0.68$) が見られた²⁾。その後、西部北太平洋親潮域や南大洋でも同様の解析を行い、指標色素と遺伝子現存量の間には全球的に高い正の相関 (Pearson correlation, $r^2 = 0.82$, $p < 0.01$) が示された（図2）。

次に、珪藻群集における *rbcL* 遺伝子の転写活性と炭素固定速度との関係性を評価した研究を紹介する。先行研究より、海水中の *rbcL* 遺伝子は炭

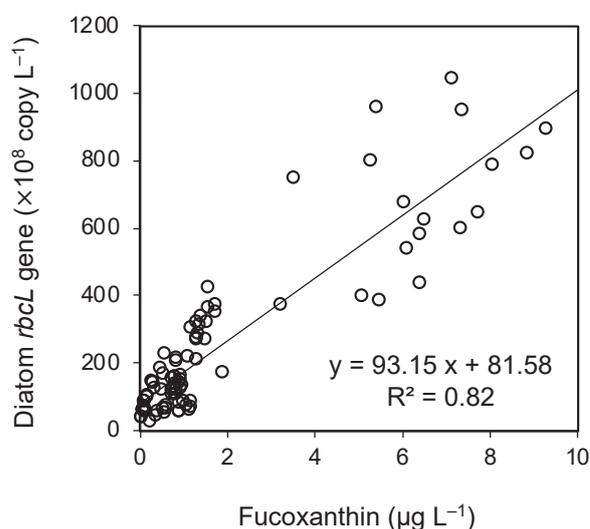


図2. 珪藻類の指標色素であるフコキサンチンと *rbcL* 遺伝子現存量との関係 (Endo et al., 2015 を改変)

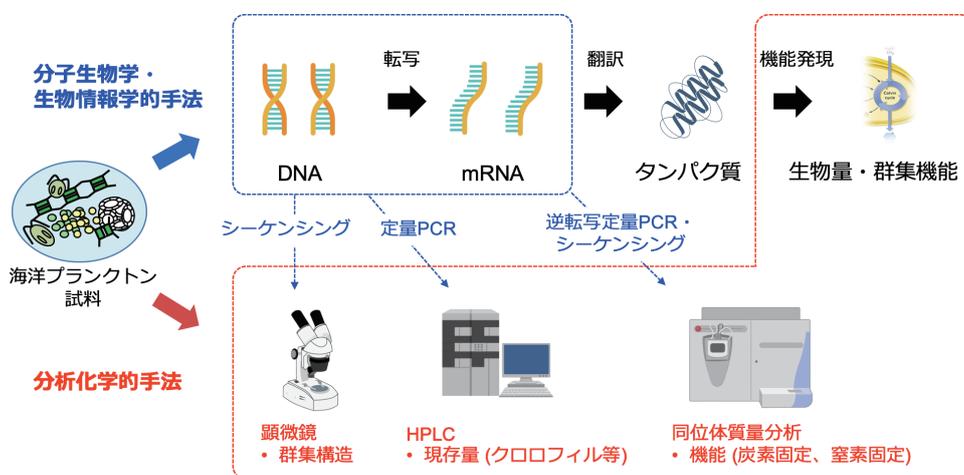


図1. 分子生物学手法を用いた海洋プランクトンの現存量・機能パラメータ推定の概略図。一部のイラスト素材は研究ネット (<https://www.wdb.com/kenq>) から引用。

養塩や光環境に応じて活発に転写調節されることが知られている³⁾。また、RubisCOによるCO₂付加反応がしばしば光合成の律速段階になることから、その発現量と基礎生産力との間に正の相関があることが、沿岸域や河川プルーム域で観測されている^{4,5)}。著者らは、南大洋の計5つの海域において定量PCRおよび¹³C添加培養実験を行うことで珪藻類の*rbcL* 遺伝子転写量および光飽和時における最大炭素固定速度 (P_{\max}) を定量し、両指標間における強い正の相関 ($r^2 = 0.93-0.98$, $p < 0.01$) を報告した⁶⁾ (図3)。これは先行研究の結果を他海域で再現したに過ぎないが、生物地球化学における重要なパラメータである基礎生産力が、煩雑な実験と分析を介さない遺伝子発現定量から再現できたことに驚き、著者が分子生物学手法を海洋調査の主軸とするきっかけとなった。

分子生物手法が藻類の生物量や生理活性の指標となることは前述の通りだが、環境中のDNAを用いた植物プランクトン研究で突出して実用例が多いのは、指標遺伝子による群集構造の推定である。中でも、全真核生物に保存されている18S rRNA 遺伝子を指標としたDNAメタバーコーディングによって、棲息するプランクトンの系統群や相対組成が見積もった研究例が多く報告され

ている。一方、この手法の有用性を巡っては研究者の間でも意見が分かれ、ゲノム内の遺伝子重複数が系統によって大きく異なるため遺伝子数の割合が生物組成を正しく反映していないという主張をよく耳にする。特に、ゲノムサイズやその系統内変動が概して大きい渦鞭毛藻類については現存量の過大評価や、種間比較における他指標との不一致を招く危険性が指摘されている⁷⁾。一方、有用性を支持する根拠としては、ゲノム内の遺伝子コピー数と細胞サイズとの間に正の相関があり、全体的な傾向としては遺伝子組成比が生物量を反映しているというものである^{8,9)}。実際のところ、この議論は有用・無用の単純な二項対立ではなく、どのデータに注視するかによって結論が分かれる類のものである。そもそも、群集組成と一口に言っても、細胞数や炭素量、光合成色素含量など多彩な評価基準がすでに存在し、分析の目的に応じて使い分けられているのが実情である。指標遺伝子もその尺度の一つと見るのが妥当であろう。すなわち、18S rRNA 遺伝子は個々の系統型の変動解析において極めて優秀な指標である一方、細胞数や炭素フラックスなどの文脈で使用するには他の定量的指標と照らし合わせながら議論する必要がある。

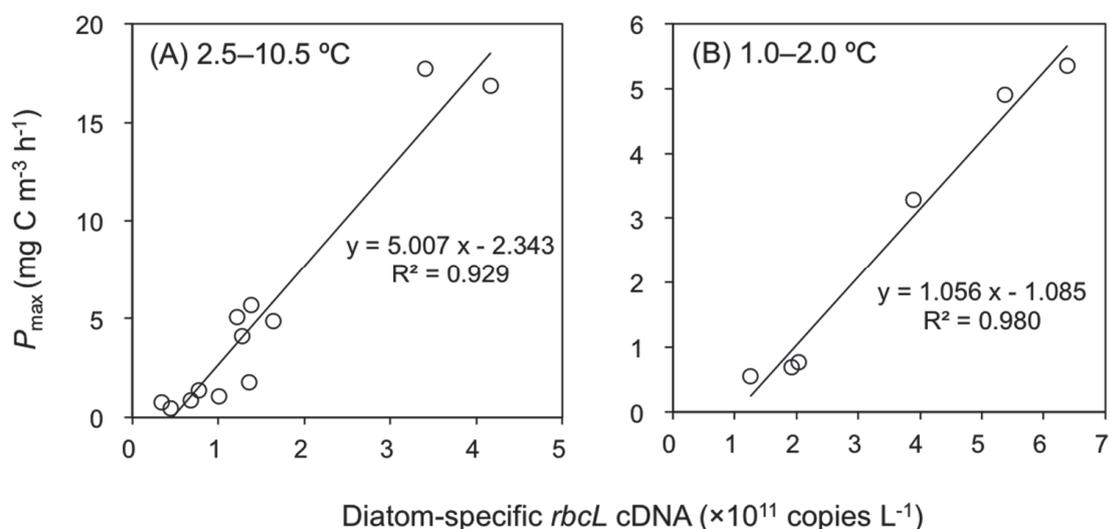


図3. 珪藻類の*rbcL* 遺伝子転写量と最大炭素固定速度 P_{\max} との関係。左は水温が2.5–10.5℃、右は水温1.0–2.0℃の海域における回帰結果を示す。両指標間に強い相関が見られるが、RubisCOの水温依存性等を反映して海域ごとに傾きは異なる (Endo et al., 2017 を改変)。

著者もこの問題に興味を持ち、藻類同定の専門家と共同で顕微鏡計数と 18S rRNA 遺伝子解析との比較を行った。その結果、西部北太平洋の南北 12 測点における珪藻類の 18S rRNA 遺伝子濃度は細胞数や指標色素現存量と有意な正の相関 (Pearson correlation, $p < 0.01$) を示した一方で、細胞体積から算出した炭素含有量との相関は小さかった ($p > 0.01$)。個々の系統群の寄与率に着目すると、同海域で優占した珪藻 Bacillariaceae 科と Mastogloioaceae 科に対して、遺伝子組成が細胞数組成¹⁰⁾を極めて良く再現した (図 4)。一方で、相対寄与率が平均 10% を下回るようなマイナーな系統群については再現性が低く、これは双方の分析法における検出感度の違いや、配列データベースに収録されていない系統群は分類できないことなどに起因すると考えられる。残念なことに、植物プランクトン系統群の多くは形態的特徴が乏しいことから同様の比較データを作ることは容易ではなく、未だ広域な生物群で検証に至っていないのが現状である。

3. 植物プランクトンの環境影響評価への活用

植物プランクトンの動態解析における分子生物学手法の有用性について、網羅的とは言えないまでも様々な観点からの検証例を紹介した。次に、同

手法の応用例として、著者の研究の中で特に強い特色を持つ植物プランクトン群集の環境影響評価について紹介する。特に注目したのは、人間活動によって増加した二酸化炭素 (CO₂) に起因する海洋表層の CO₂ 分圧の上昇である。二酸化炭素は水和して重碳酸イオンに解離する際にプロトンを排出するため、この現象は海洋酸性化として環境科学の分野で広く知られている。海水の酸性化 (実際には弱アルカリ性から中性に近づくこと) にともなう炭酸系平衡により炭酸塩飽和度が低下することから、カルサイトやアラゴナイトなど炭酸カルシウムの殻を作る石灰化生物に対してその影響が懸念されている¹¹⁾。植物プランクトンの中にも円石藻など石灰化生物が一部存在するが、植物が行う光合成という機能を考えた場合、同現象がもたらす環境変化の主題は pH の低下ではなく CO₂ 分圧の増加である。なぜなら、炭素固定酵素である RubisCO の CO₂ 半飽和定数は 20–70 μmol L⁻¹ であり、典型的な海水中の溶存 CO₂ 濃度 (約 10–20 μmol L⁻¹) は光合成の律速要因に成り得るからである^{12,13)}。藻類はこの CO₂ 制限を解消するため細胞内の CO₂ を能動的に高める炭素濃縮機構 (Carbon Concentrating Mechanism, CCM) と呼ばれる生理機能を有し、この機能に費やされるエネルギーは炭素固定に関わる全 ATP の 20%

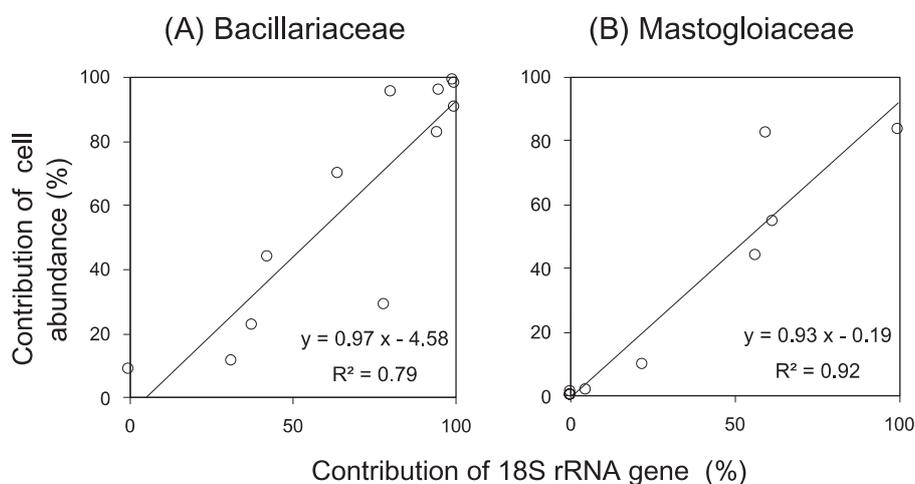


図 4. 西部北太平洋の表層 5 m 水における珪藻類の寄与率の細胞計数および 18S rRNA 遺伝子メタバーコーディングとの比較。細胞計数結果は杉江恒二博士 (JAMSTEC) から提供いただいたデータ (Sugie and Suzuki, 2016) を使用している。

とも見積もられている¹⁴⁾。したがって、現在進行している CO₂ 分圧の増加は CCM のコストを減らすことで藻類の光合成や増殖に有利に働く可能性がある。

著者らは、ベーリング海において現場プランクトン群集を用いた培養実験を行い、植物プランクトンの現存量指標であるクロロフィル *a* 濃度が将来的な環境下で減少することを報告した²⁾。中でも特に顕著な減少を示した系統群が、同海域の優占種である珪藻類であった。同実験で用いた CO₂ 条件は、当時の海水中 CO₂ 分圧である 380 μatm に加え、西暦 2100~2150 年に予測される 600 μatm および 1,000 μatm であり、藻類培養に用いる条件としてはさして過酷とは言えない（藻類の生理応答を測る実験では 10,000 μatm を超える値を用いることも珍しくない）。しかし、このような穏やかな環境変化に対し珪藻群集の増殖が有意に低下するという結果は、予期していた光合成における CO₂ 律速の緩和と相反するものであった。同結果の解釈として、同海域は鉄律速海域として知られることから、海水中の酸性度増加にともなう微量元素の生物利用可能性の低下が関与した可能性が議論されている¹⁵⁾。これに加え、申請者は珪藻類の *rbcL* 遺伝子の転写率が高 CO₂ 条件下で低下したことを報告した²⁾。また、他のグループがカリフォルニア沿岸で実施した実験でも、藻類群集の RubisCO のタンパク質合成が高 CO₂ 条件下で増殖速度の低下をともなって減少することが報告されている¹⁶⁾。このような RubisCO 発現の下方調節を説明しうる因子として、紅藻を用いた先行研究より、転写因子 Ycf30 (*rbcR*) の存在下で、*rbcL* 遺伝子の転写が CO₂ 受容体分子であるリブローズ 1,5-ビスリン酸 (RuBP) 濃度に応じて調整されることが示されている¹⁷⁾。すなわち、RubisCO 合成量の低下は、CO₂ 利用可能性の増加によって減少した細胞内 RuBP によって、*rbcL* 遺伝子の転写が下方調節されたことに起因した可能性が考えられる。RubisCO の発現調節と珪藻類の増殖動態との因果関係は明らかでない

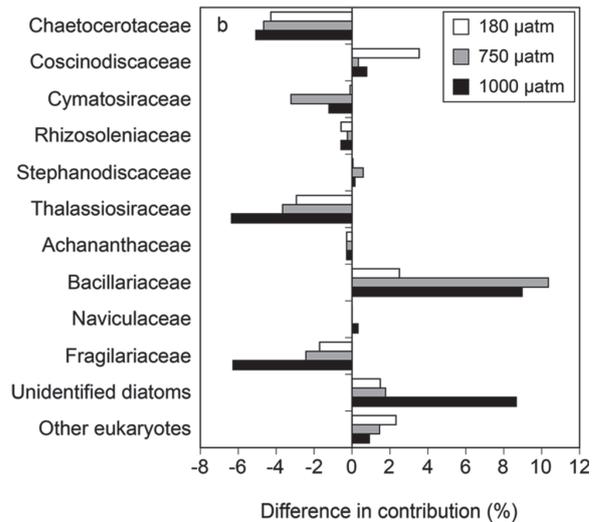


図5. 春季親潮域の珪藻に対する CO₂ 濃度が *rbcL* 転写活性に与える影響。実験当時の条件 (350 μatm CO₂) と比較して転写物に占める寄与率が増加・減少した系統群 (科) をそれぞれ正・負の値で示した (Endo et al., 2016 を改変)

が、著者らが南大洋で行った観測では *rbcL* 転写率が鉄濃度の増加に応答して強く上方調節され、やはり増殖速度の増加を伴っていた⁶⁾。これらの結果は、海洋植物プランクトンの環境応答を正しく評価する上で、増殖資源の多可だけでなく生物の複雑な生理応答を理解する必要があることを示す好例と言えるかもしれない。

さらに、どのような系統が CO₂ に対して応答を示したのかを精査するため、春季の西部北太平洋親潮域における培養実験で HTS を用いた *rbcL* 遺伝子の配列解析を行った¹⁸⁾。同海域は春季に発達する大規模な珪藻ブルームで知られ、世界的にも生物生産が特に高い海域である。同解析の結果、ベーリング海の結果と同調的に、高 CO₂ 分圧下で *rbcL* 転写量の低下が観察され、中でも春季ブルームを象徴する系統群である Chaetocerotaceae 科および Thalassiosiraceae 科の寄与率が減少し、Bacillariaceae 科がそれにとって代わるように増加していた (図5)。前2系統は細胞サイズが大きく生物炭素ポンプへの寄与が大きい一方で、後者は生物炭素ポンプへの寄与が相対的に小さいとされる。また、春季ブルーム期における大型珪藻から小型珪藻への群集変化は 1970 年代から観測

されている同海域の群集遷移傾向とも同調的であった¹⁹⁾。したがって、同海域における植物プランクトンの群集組成や生物生産は環境変化の進行とともにさらに改変される可能性が懸念される。

4. 生物地理分布と多様性評価への活用

海洋観測における HTS 技術の普及がもたらした最たる恩恵は、微生物群集構造解析の高速化と客観化である。DNA メタバーコーディングあるいはメタゲノムの遺伝子カタログ化を用いた群集解析は、ひとたび解析手法を確立してしまえば、専門的な分類知識や労力を有する顕微鏡計測と比べ遥かに簡便かつ高速に行うことができる。また、ウイルスなど現在の光学的技術では分類が困難な系統群に対しても網羅的な群集組成を把握することが可能である²⁰⁾。このような処理能力の向上を原動力として、海洋微生物の生物地理分布に関する研究の広域化が急速に進展してきた^{21,22)}。一方で、指標遺伝子に基づく群集データは絶対量ではなく相対頻度として与えられるという欠点がある。これにより、異なる系統群の頻度が互いの頻度に影響を及ぼすいわゆる「定数和制約」の問題が生じ、定量性を鍵とする物質循環パラメータとの比較や、全系統間の関係性を推定する相関ネット

ワーク解析等において重大な誤解釈をもたらす危険性がある²³⁾。これを解決する手段として、リアルタイム PCR やデジタル PCR による定量的データの取得、あるいは濃度既知の DNA 配列を内部標準として用いる手法が挙げられるが、このような手法が確立された現在においても絶対頻度情報を扱った研究は極めて少ないのが実情である。

著者らは、黒潮流軸の南北 2,000 km に渡る 46 地点から採取した DNA 試料を用いて、同海域の主要な基礎生産者であるハプト藻類の分布と多様性を定量的メタバーコーディング手法により評価した。その結果、東シナ海陸棚との境界域において同藻類の密度が極めて高い海域が存在し、陸棚域からの多量のハプト藻類が流入している可能性が示された。また、遺伝子の絶対頻度を用いた共起ネットワーク解析によりハプト藻類の系統型は、南方（上流）海域由来と陸棚由来に二分され、両群集が交わる海域より下流では、東シナ海由来の群集が優占することが示された²⁴⁾（図 6）。これは、黒潮生態系の植物プランクトン組成が西南諸島沖で劇的に変化していることを示しており、遺伝子指標による定量的な群集解析で初めて観測可能となった現象である。従来、黒潮本流に占める陸棚由来水のフラックスは 1% 程度と見積もられ、流

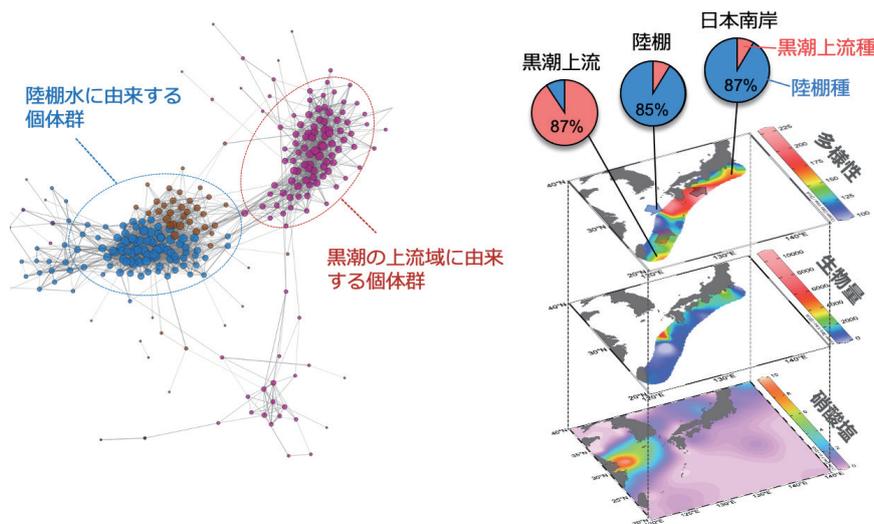


図 6. 定量的メタバーコーディングデータに基づく黒潮海域ハプト藻群集の相関ネットワーク（左）。調査海域におけるハプト藻の多様性、生物量（指標遺伝子濃度）および、硝酸塩濃度（右）。各海域の群集に占める種の起源水を円グラフで示している（Endo et al., 2023 を改変）

量の観点では特に重要視されていなかった²⁵⁾。一方で、陸棚水は長江希釈水等の影響によりプランクトンの現存量や増殖資源が豊富であり、その黒潮への影響が水温や塩分などの保存量と同等に低いとは限らない。本研究は、日本の南岸域を流れる黒潮の生態系において東シナ海陸棚域、さらに言えば長江がもたらす肥沃な栄養塩が重要であることを強く示唆しており、HTSによる高解像度な群集情報が物質循環に新たな視野をもたらすことを実証した例と言える。

5. おわりに

本稿では、海洋の植物プランクトンに光を当て、主に配列情報の定量化や群集構造解析の成果を紹介した。大規模配列解析が海洋調査に普及してすでに10年以上が経過し、真に膨大な配列情報が環境中から採掘された現在においても、生物の進化や生態に関する目を見張る研究成果が毎年のように発掘されている。この流れは、配列取得技術のさらなる発展を伴って止む気配を見せず、その可能性は未知数である。

このような潮流を踏まえて振り返ってみると、私の海洋プランクトンに関する研究は生物情報科学と分析化学の領域にまたがってはいるが、その手法は双方の専門家が目もくれないような古典的な技術が主体である。これは、私が研究対象とする真核プランクトンが概して長大かつ複雑なゲノムを持つためにゲノムレベルの解析が未だ困難という事情もあるが、何より全種・全ゲノムのような途方もない変数を物質循環のピースに組み込むためのアイデアが無かったというのが本音である。今後、日進月歩のシーケンス技術や1細胞解析技術の恩恵を受け、微生物群集解析は分子～個体レベルへとますます多面化・複雑化することは明らかである。このような生物学的情報を物質循環の理解へと繋げる手段として、遺伝情報の定量化も重要性を増すことが予測される。物量的尺度に目をつぶる生物情報科学と、生物学的複雑性を見まいとする海洋分析化学の両者の弱点を相補的に補

い、双方の関連性を紐解きながら相乗効果を生み出す強みが、私の研究に秘められているかもしれない。

一方で、個人的な見解としては、海水を掬ってその中の微生物を調べるという作業に限界を感じ始めているのも事実である。例えるなら、膨大な数の写真（スナップ・ショット）を眺めながら事件を推理している感覚であり、私の貧相なイメージ力ではそこで起こっている生物のふるまいを正確に理解し得ない。大量の配列情報を扱う一方で、非常に多くの大切な情報を見落としている感覚に常に苛まれている。私を海洋学の虜にしたのは、培養容器の中で日々その様相を変化させるプランクトン群集や化学的環境因子であり、またその変化を正確に捉える分析技術である。40代に差し掛かり中堅研究者としてテーマを再設計すべきこの時期に、本稿執筆の機会を頂けたことに感謝したい。生物による海洋物質循環駆動の解明が目的であるならば、それに迫る最良の手段は何なのか、自身の研究を回顧し、日進月歩の技術と向き合い、時には古典的手法に倣って研究を展開していきたい。

6. 謝辞

この度、栄誉ある海洋化学奨励賞を授与いただき誠に光栄に思います。本賞の選考に際してお世話になりました実行委員ならびに選考委員の皆様には厚く御礼申し上げます。指導教官の鈴木光次教授はじめ北海道大学化学物質循環学分野の諸先生には、海洋物質循環の基本概念から実測手法に至るまで幅広いご指導を賜りました。もう一人の恩師であり、同賞の推薦者でもある京都大学の緒方博之教授には、生物情報科学の奥深さと教育者としての姿勢を学びました。共に研究・教育の第一線で活躍される両教授にご指導頂けたことは望外の幸運であり、余命分の運がもう残っていないのではないかと心配になるほどです。最後になりますが、研究生生活や研究航海でお世話になりました多くの方々に、謹んで感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Bar-On, Y. M. & Milo, R. The Biomass Composition of the Oceans: A Blueprint of Our Blue Planet. *Cell* **179**, 1451–1454, doi:10.1016/j.cell.2019.11.018 (2019).
- 2) Endo, H., Sugie, K., Yoshimura, T. & Suzuki, K. Effects of CO₂ and iron availability on *rbcL* gene expression in Bering Sea diatoms. *Biogeosciences* **12**, 2247–2259, doi:10.5194/bg-12-2247-2015 (2015).
- 3) John, D. E. *et al.* Phytoplankton carbon fixation gene (RuBisCO) transcripts and air-sea CO₂ flux in the Mississippi River plume. *ISME J* **1**, 517–531, doi:10.1038/ismej.2007.70 (2007).
- 4) Corredor, J. E. *et al.* Geochemical rate-RNA integration study: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene transcription and photosynthetic capacity of planktonic photoautotrophs. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5459–5468, doi:10.1128/AEM.70.9.5459-5468.2004 (2004).
- 5) John, D. E. *et al.* A day in the life in the dynamic marine environment: how nutrients shape diel patterns of phytoplankton photosynthesis and carbon fixation gene expression in the Mississippi and Orinoco River plumes. *Hydrobiologia* **679**, 155–173, doi:10.1007/s10750-011-0862-6 (2011).
- 6) Endo, H. *et al.* Phytoplankton community responses to iron and CO₂ enrichment in different biogeochemical regions of the Southern Ocean. *Polar Biology* **40**, 2143–2159, doi:10.1007/s00300-017-2130-3 (2017).
- 7) Ruvindy, R. *et al.* Genomic copy number variability at the genus, species and population levels impacts in situ ecological analyses of dinoflagellates and harmful algal blooms. *ISME Commun* **3**, 70, doi:10.1038/s43705-023-00274-0 (2023).
- 8) Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D. & Vaultot, D. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiol Ecol* **52**, 79–92, doi:10.1016/j.femsec.2004.10.006 (2005).
- 9) Godhe, A. *et al.* Quantification of diatom and dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7174–7182, doi:10.1128/AEM.01298-08 (2008).
- 10) Sugie, K. & Suzuki, K. Characterization of the synoptic-scale diversity, biogeography, and size distribution of diatoms in the North Pacific. *Limnology and Oceanography* **62**, 884–897, doi:10.1002/lno.10473 (2016).
- 11) Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A. & Kleypas, J. A. Ocean acidification: the other CO₂ problem. *Ann Rev Mar Sci* **1**, 169–192, doi:10.1146/annurev.marine.010908.163834 (2009).
- 12) Trimborn, S., Wolf-Gladrow, D., Richter, K.-U. & Rost, B. The effect of pCO₂ on carbon acquisition and intracellular assimilation in four marine diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **376**, 26–36, doi:10.1016/j.jembe.2009.05.017 (2009).
- 13) Badger, M. R. *et al.* The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **76**, 1052–1071, doi:DOI 10.1139/b98-074 (1998).
- 14) Raven, J. A. Physiology of Inorganic C Acquisition and Implications for Resource Use Efficiency by Marine-Phytoplankton - Relation to Increased CO₂ and Temperature.

- Plant Cell and Environment* **14**, 779–794, doi:DOI 10.1111/j.1365-3040.1991.tb01442.x (1991).
- 15) Sugie, K. *et al.* Synergistic effects of $p\text{CO}_2$ and iron availability on nutrient consumption ratio of the Bering Sea phytoplankton community. *Biogeosciences* **10**, 6309–6321, doi:10.5194/bg-10-6309-2013 (2013).
 - 16) Losh, J. L., Young, J. N. & Morel, F. M. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton. *New Phytol* **198**, 52–58, doi:10.1111/nph.12143 (2013).
 - 17) Minoda, A., Weber, A. P., Tanaka, K. & Miyagishima, S. Y. Nucleus-independent control of the rubisco operon by the plastid-encoded transcription factor Ycf30 in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol* **154**, 1532–1540, doi:10.1104/pp.110.163188 (2010).
 - 18) Endo, H., Sugie, K., Yoshimura, T. & Suzuki, K. Response of Spring Diatoms to CO_2 Availability in the Western North Pacific as Determined by Next-Generation Sequencing. *Plos One* **11**, e0154291, doi:10.1371/journal.pone.0154291 (2016).
 - 19) Chiba, S., Ono, T., Tadokoro, K., Midorikawa, T. & Saino, T. Increased stratification and decreased lower trophic level productivity in the Oyashio region of the North Pacific: A 30-year retrospective study. *Journal of Oceanography* **60**, 149–162, doi:DOI 10.1023/B:JOCE.0000038324.14054.cf (2004).
 - 20) Endo, H. *et al.* Biogeography of marine giant viruses reveals their interplay with eukaryotes and ecological functions. *Nat Ecol Evol* **4**, 1639–1649, doi:10.1038/s41559-020-01288-w (2020).
 - 21) de Vargas, C. *et al.* Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* **348**, 1261605, doi:10.1126/science.1261605 (2015).
 - 22) Villarino, E. *et al.* Global beta diversity patterns of microbial communities in the surface and deep ocean. *Global Ecology and Biogeography* **31**, 2323–2336, doi:10.1111/geb.13572 (2022).
 - 23) Hirano, H. & Takemoto, K. Difficulty in inferring microbial community structure based on co-occurrence network approaches. *BMC Bioinformatics* **20**, 329, doi:10.1186/s12859-019-2915-1 (2019).
 - 24) Endo, H., Umezawa, Y., Takeda, S. & Suzuki, K. Haptophyte communities along the Kuroshio current reveal their geographical sources and ecological traits. *Mol Ecol* **32**, 110–123, doi:10.1111/mec.16734 (2023).
 - 25) Gallagher, S. J. *et al.* The Pliocene to recent history of the Kuroshio and Tsushima Currents: a multi-proxy approach. *Progress in Earth and Planetary Science* **2**, doi:10.1186/s40645-015-0045-6 (2015).