

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22908

研究課題名(和文)極微量酸素同位体をトレーサーに用いた水試料中の呼吸速度定量法開発

研究課題名(英文)High-sensitivity tracer assay for oxygen consumption rate in ocean and lakes using ^{17}O as a tracer

研究代表者

角皆 潤(Tsunogai, Urumu)

名古屋大学・環境学研究科・教授

研究者番号：50313367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸素の微量安定同位体である ^{17}O を濃縮した酸素分子を密閉容器中の水試料に添加し、一定の培養期間中に進行する呼吸(酸素消費)反応で変動する水の同位体比を高精度に定量化することで、呼吸速度を高感度、高精度かつ簡便に定量出来る新手法を開発した。この新手法で定量化される呼吸速度の精度・確度を検証するとともに、これを用いて、海水および湖沼水試料の呼吸速度を実測した。すると一次生産が活発な表層で速く、新鮮な有機物の少ない深層水中で遅くなった。また、光を当てて培養すると、遮光して培養した場合と比べて呼吸速度が上昇することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各水環境における水中の酸素消費速度(=呼吸速度)の大きさや、その季節変動や長期変化の実態を把握すること、さらにその大小を規定する環境因子を明らかにすることは、人類にとってきわめて優先度の高い課題であるが、暗瓶法等の従来の呼吸速度定量法は検出感度が低く、また確度にも問題があった。本研究で開発した新手法は高感度、高精度かつ簡便に水中の呼吸速度定量を実現する画期的な手法であり、水中呼吸速度の観測を一般化・普遍化出来る。貧酸素水塊発生時期予測の高精度化が実現し、貧酸素水塊発生原因の解明も、容易になる。

研究成果の概要(英文)：A new method to quantify the respiration rates in water columns by using the trace stable oxygen isotope (^{17}O) as a tracer is developed. In this method, the oxygen molecules of which oxygen atoms have been replaced by ^{17}O are added to water samples sealed in glass bottles. Because the added oxygen molecules were converted to water molecules in the bottles through respiration, the respiration rates can be estimated by measuring temporal variations in the triple oxygen isotopic compositions of water. By using the new method, vertical distributions of respiration rates were measured in the water columns of a coastal ocean area and a mesotrophic lake where hypoxic water mass can be found at the bottom. We concluded that the water column respiration is as important as the respiration in the water-sediment interface during the formation of the hypoxia in each water column. The new method can be applicable to determine the respiration rates in the open ocean water columns as well.

研究分野：同位体地球化学

キーワード：溶存酸素 呼吸速度 光合成速度 安定同位体 トレーサー 海洋 湖沼 伊勢湾

1. 研究開始当初の背景

大気の約20%を占める酸素 (O₂) は強力な酸化力を持ち、地球表層圏内の個々の環境を特徴づける上で、最も重要な物質の一つである。海洋・湖沼・地下水といった水環境の大部分は、O₂の供給が制限される一方で、系内に共存する (あるいは系外から流入してくる) 有機物を用いた、O₂消費反応 (=呼吸反応) が進行する (Fig. 1)。その結果、O₂が枯渇した貧酸素水が生じることがあり、その中では、水質劣化や悪臭、生物の大量死、青潮等の環境問題が発生する。さらに貧酸素水中では、NやPなどの栄養塩 (光合成を律速し、生態系構造を左右する) の挙動も大きく変わるので、その影響は、貧酸素水の外にも、また貧酸素水が存在しない時期にも波及する。各水環境におけるO₂消費速度 (=呼吸速度) の大きさや、その季節変動や長期変化の実態を把握すること、さらにその大きさを規定する環境因子を明らかにすることは、人類にとってきわめて優先度の高い課題である (Lachkar et al., 2019)。

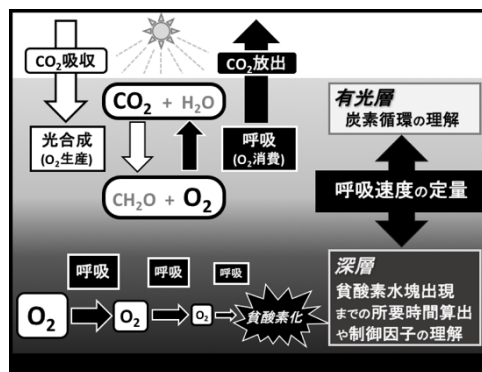


Fig. 1 水環境中の酸素循環と呼吸速度測定の意義。

しかし水環境中の呼吸速度の実測例は少なく、呼吸速度の大きさを支配する環境因子が明らかになることも滅多に無い。例えば日本海では、深層水中のO₂濃度が経年的に減少していることが知られている。これは温暖化の進行で冬季鉛直混合が不活化化したことが原因とされ、約100年後には無酸素化するとされている。しかし、これは、深層水中の呼吸速度が毎年一定であることを仮定した上で導かれた結論であり、この仮定に学術的な裏付けは無い。これは、海洋深層水中の呼吸速度は極めて遅く、従来法である暗瓶法 (暗所培養時のO₂濃度変化から算出) では定量出来ないからである。また暗瓶法は光呼吸を算入出来ないのも、定量値の確度にも問題があった。

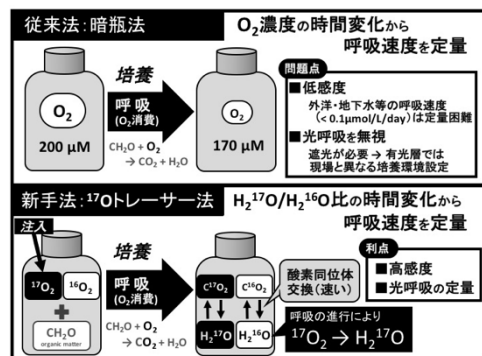


Fig. 2 従来法と新手法の比較。

呼吸速度は、閉鎖・無光環境下で水試料を培養し、培養に伴う溶存O₂濃度の減少速度から定量化する、いわゆる暗瓶法で求めるのが最も一般的である (Fig. 2; Williams et al., 2004)。これは有光環境下で採取された試料でも同じで、呼吸速度は光環境と独立であると仮定して、無光環境下で培養して求める。しかし現在では、光環境が変化すると呼吸速度も変化することが知られており (Luz et al., 2002)、暗瓶法で求めた呼吸速度の確度は、著しく低い。また培養前後の試料の溶存O₂濃度を、誤差0.5%以下の高い精度で定量化する必要があるため、これを実現するのに数100 mL程度の試料量と、優れた分析技術が必要となる (Williams et al., 2004)。さらにこれだけの高精度で測定しても、一般の海洋深層水における水柱の呼吸速度を定量化することは難しかった。

一方、複数の反応が共存する系で、特定の反応を区別するのに利用されるのが、同位体標識 (トレーサー) である。例えば光合成の基質であるH₂OのO原子 (大部分は¹⁶O) を¹⁸Oに置換して培養すると、¹⁸O₂の増加速度から光合成速度が定量化出来る。ところが光合成の逆反応である呼吸反応の場合、O₂を¹⁸Oに置換して培養しても、生成するC¹⁸O₂の大部分は、H₂¹⁶OとO原子交換してH₂¹⁸Oとなる。O₂やCO₂が水1Lあたり10⁻⁴ molから10⁻³ mol程度しか存在しないのに対して、H₂¹⁸Oは0.1 mol以上存在するので、呼吸に伴うH₂¹⁸O量の変化は検出限界を下回り、呼吸速度は定量出来なかった。一方、H₂¹⁷Oは水1Lあたり2 × 10⁻² mol程度と少ない。しかも近年の同位体分析技術の発展のおかげで、H₂Oの¹⁷O/¹⁶O比が1 × 10⁻⁵以下 (0.001%以下) の高い精度で定量出来るようになった。これは水1Lあたり、2 × 10⁻⁷ mol程度呼吸が進行すると検出出来ることを意味する。

2. 研究の目的

本研究は、酸素の極微量安定同位体である¹⁷Oを標識 (トレーサー) に用いた、高感度かつ高確度、そして簡便な水試料中の呼吸速度定量法を開発することを目的として実施した (Fig. 2)。具体的には、¹⁷Oを濃縮したO₂ (¹⁷O₂) を密閉容器中の水試料に添加し、一定の培養期間中に進行する呼吸で増大するH₂¹⁷O量を高精度に定量化することで、呼吸速度を求める。

3. 研究の方法

本申請研究で提案する新手法の具体的な手順をFig. 3に示す。研究は以下の7項目について行った。

①¹⁷O₂準備

H₂¹⁷O (¹⁷O純度50%以上) を購入するとともに、内容積1 mL程度の小型の電解分解セルを自作し、この中でH₂¹⁷Oを電気分解することで¹⁷O₂を作成した。また作成した¹⁷O₂を脱ガス済みの超純水とともに市販のガラスバイアル容器に密封し、長期保存出来るようにした。

②¹⁷O₂添加法開発

市販のガスタイトシリンジと分注器を組み合わせることで高い再現性で同一体積のガスを分注出来る分注器を製作し、各試料に対して同一量(10 μL程度)の¹⁷O₂を添加出来るようにした。なお¹⁷O₂添加量の絶対値は、以下の方法で正確に見積もった。(1) 自然同位体組成の純O₂ガスを内容積既知(500 mL程度)の容器中に用意した、(2) ここに各試料に対して添加する場合と同様に¹⁷O₂を添加した、(3) 添加前後の純O₂ガスの¹⁷O/¹⁶O比および¹⁸O/¹⁶O比の微小変化を自然同位体比専用の気体質量分析計を用いて高精度定量し、これを元に¹⁷O₂および¹⁸O/¹⁷O添加量を算出した。

③培養容器の選定とブランク量等の評価

超純水を試料として、多種の容器やゴム栓の組み合わせの中から、ブランクH₂¹⁷O量を最も低く抑えることの出来る容器を選定した。また、ブランクH₂¹⁷O量の絶対値や、その再現性から、本手法の定量下限や測定精度を見積もった。

④培養環境の準備

有光環境下の試料を培養する場合、温度以外に光量も現場と等しくなるように調整する必要があるため、これを再現出来る培養水槽を整備した。

⑤従来法による検証

酸化速度が速く、従来法(暗瓶法)で呼吸速度が定量化出来る大学構内のため池水を使って、従来法との比較実験を行い、新手法の精度や確度を検証した。

⑥観測

夏季に貧酸素水塊が湖底もしくは海底直上に発生することが知られている琵琶湖と伊勢湾で、開発した¹⁷Oトレーサー法を活用した観測を実施した。前者の観測には京都大学生態学研究センターの「はす」、後者の観測には三重大学の練習船「勢水丸」を用いた。具体的には、貧酸素水塊上の観測点で貧酸素水を含めた各層水を採水し、ただちに¹⁷Oトレーサー法を用いて水柱呼吸速度の定量を行った。琵琶湖の有光層内で採取した試料については、現場と同じ有光環境下の培養以外に、無光環境下でも同時に培養して得られた呼吸速度を比較し、光環境の影響を無視する暗瓶法に問題が無いか検証した。また伊勢湾では、同じ観測点で堆積物の表層コアも同時に採取し、水柱中以外に堆積物表面で進行する呼吸速度を定量して、これが水柱中の酸素消費速度に与える影響を定量化するとともに、貧酸素水塊発生の主たる原因が、水柱(現場)呼吸にあるのか、それとも堆積物表面で進行する呼吸にあるのか考察した。それぞれの大きさを規定する環境因子を考察した。

4. 研究成果

はじめに、大気平衡の超純水を用いて新手法(¹⁷Oトレーサー法)のブランク評価を行った結果、0.01 μmol O₂ L⁻¹ day⁻¹未滿となった。次に遮光環境下で培養した水試料について、従来の溶存O₂濃度変化に基づく呼吸速度定量法(暗瓶法)との比較を通じて確度の検証を行った(Fig. 4)。その結果、新手法で求めた呼吸速度は、従来法と誤差内で一致することが確認出来た。なおFig. 4(a)にも確認出来るように、多くの水試料において培養とともに、単位時間あたりに生成するH₂¹⁷O量が鈍化する傾向が見られた。これは

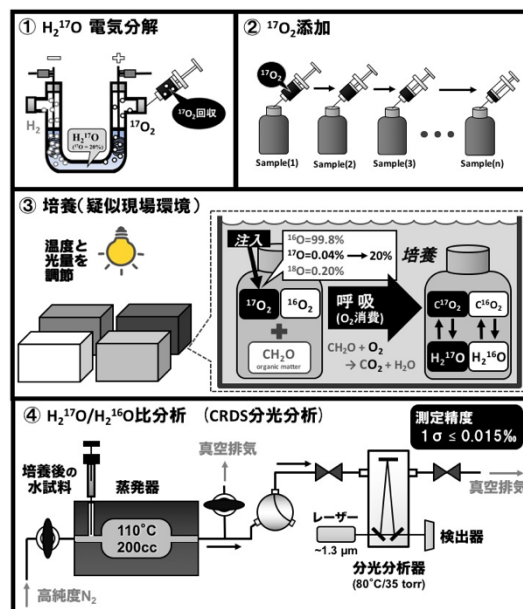


Fig. 3 本研究で開発した呼吸速度定量法の操作手順。

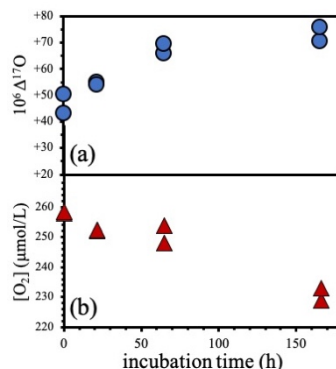


Fig. 4 (a) 名古屋大学構内で採取したため池水に対して無光下で¹⁷Oトレーサー法を適応した際に観測された、H₂Oの $\Delta^{17}\text{O} (= \ln(\delta^{17}\text{O} + 1) - 0.528 \times \ln(\delta^{18}\text{O} + 1))$ 値時間変化、(b) 同じ試料を同じ条件下で密閉容器中に放置した際に観測された溶存酸素濃度の時間変化。溶存酸素濃度はウィンクラー法で定量した。

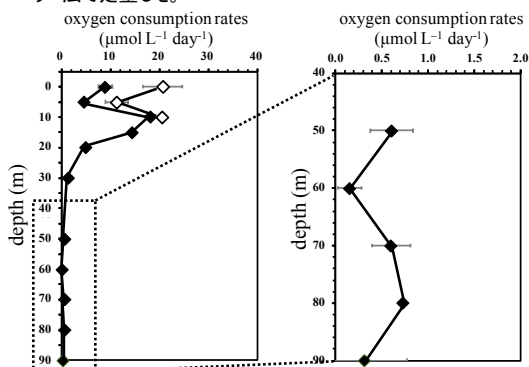


Fig. 5 琵琶湖における呼吸速度の鉛直分布。◆印は無光下、◇印は現場を模擬した有光下での呼吸速度を表す。

培養に伴って、呼吸で消費される有機物分子が次第に欠乏していることを反映したと思われる。そこで全試料について、 $t=0$ における $H_2^{17}O$ 生成速度を外挿し、ここから各試料の呼吸速度を見積もることとした。

次にこの新手法を用いて、琵琶湖の湖心部（水深約 90 m）で 5-10 m 毎に各層採水を行い、水柱中の酸素消費速度の鉛直分布を実測した（Fig. 5）。その結果、各層の酸素消費速度は $0.1\text{--}20 \mu\text{molO}_2 \text{L}^{-1} \text{day}^{-1}$ の範囲で変動し、一次生産が活発な表層（＝有光層）内で速く、深水層で遅くなることになった。この鉛直分布は、有光層内で進行する一次生産によって生成した新鮮な有機物量の大小が酸素消費速度を決めていることを示唆する。また、有光層内で採取した試料に現場の光環境を模擬した光を当てて有光下で培養すると、同じ試料を遮光して培養した場合と比べて、呼吸速度が有意に上昇することが明らかになった。これは従来の暗瓶法で求めた呼吸速度は、過小見積りとなっていた可能性を示唆する（Luz et al., 2002）。

最後に貧酸素水塊が海底付近に出現する夏季の伊勢湾で、呼吸速度を実測した。観測は有光層内で光合成の活発な水深 5 m、貧酸素水塊外の水深 10 m、海底直上に現れた貧酸素水塊内（水深 18 m および 22 m）で採水を行い、水柱呼吸速度を実測した。また表層堆積物も同時に採取し、海底面（＝海底堆積物）の直接酸素消費速度も実測した。

その結果、各層の水柱呼吸速度の絶対値は $2.2\text{--}13 \mu\text{molO}_2 \text{L}^{-1} \text{day}^{-1}$ の範囲で変動し、琵琶湖と同様に有光層内が最も速く、無光層では遅くなる鉛直分布が見られた（Fig. 6(a)）。また無光層内で比較すると、貧酸素水塊の内外で大きな差は見られなかった（Fig. 6(a)）。ただし湖底直上の溶存 O_2 濃度は他と比べて極めて低く、得られた現場の呼吸速度で相互の呼吸速度を比較するのは適当では無い。そこで水柱呼吸速度は溶存 O_2 濃度に比例すると仮定して反応速度定数を求めると、貧酸素水塊内外で大きな差が見られた。Fig. 6(b)には得られた反応速度定数を元に、大気平衡状態（ $[O_2] = 220 \mu\text{mol L}^{-1}$ ）に換算した水柱呼吸速度を示したが、貧酸素水塊内の水柱呼吸速度は貧酸素水塊外の 5 倍近くに達しており、また水深とともに増大する傾向が明らかになった。つまり、貧酸素水塊内の水柱呼吸速度の絶対値は、溶存 O_2 濃度が減少したことで小さくなったものと思われる。また、得られた水柱呼吸速度の鉛直分布から、各水深で深の水柱における平均酸素消費速度を求めると、水深 18 m 以深であれば、現場の酸素消費速度は海底堆積物による水柱酸素消費速度と比べて遥かに小さいものの、水深 10 m 以深であれば、海底堆積物による水柱の平均酸素消費速度を上回ることが明らかになった（Fig. 7）。伊勢湾の貧酸素水塊発生には、堆積物だけでなく、水柱の酸素消費（呼吸）が大きく寄与しているものと結論した。

本研究で開発した ^{17}O トレーサ法は世界に前例が無い、新手法である。本手法を暗瓶法と比較すると、現場と同じ光環境下で培養出来る点と、分析に必要な試料量を1/100以下に抑えられる点で、圧倒的に優れている。一方、感度（＝検出下限の呼吸速度）は、同じ培養時間や分析回数で比較すると1桁程度向上したに過ぎない。ただし、必要試料量を1/100以下に抑えられるおかげで培養時間を容易に延長することができ、分析回数も増やせるので、実用的な感度は2桁以上向上した。

地球温暖化の進行は海洋の成層化を促進し、全球規模で貧酸素水の形成を促進すると考えられているが（Lachkar et al., 2019）、明確な根拠があるわけではない。本研究が提案する呼吸速度定量法が確立することで、定量値の精度・確度は飛躍的に向上し、しかも定量操作が従来よりもはるかに簡便になるので、観測が広く一般化・普遍化し、データの蓄積速度が飛躍的に向上することが期待される。各水環境における呼吸速度の変動や長期変化が検出出来るようになり、呼吸速度を規定する環境因子の把握も進む。温暖化が引き起こす水環境や物質循環の擾乱も、より明確に評価・予測出来るようになる。環境科学分野はもちろん、海洋学・湖沼学・陸水学・土木工学・水産学など幅広い分野に大きな発展をもたらすことが期待出来る。

〈引用文献〉

- Lachkar, Z., M. Lévy, and K. S. Smith (2019) Strong Intensification of the Arabian Sea Oxygen Minimum Zone in Response to Arabian Gulf Warming. *Geophys. Res. Lett.* 46, doi:10.1029/2018GL081631.
- Luz, B., E. Barkan, Y. Sagi, and Y. Z. Yacobi (2002) Evaluation of community respiration mechanisms with

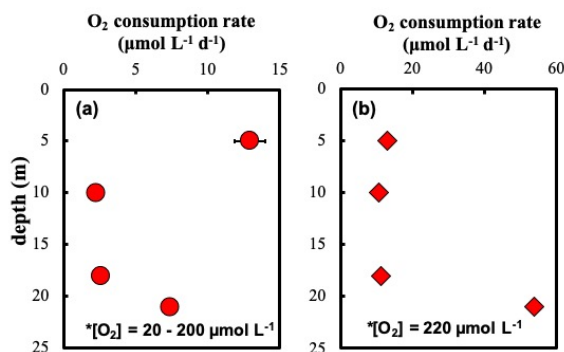


Fig. 6 伊勢湾湾奥部の貧酸素水塊出現地点における呼吸速度の鉛直分布。(a) 現場における呼吸速度鉛直分布、(b) 呼吸速度は溶存 O_2 濃度に比例すると仮定して大気平衡時 ($[O_2] = 220 \mu\text{mol L}^{-1}$) に換算した呼吸速度鉛直分布。

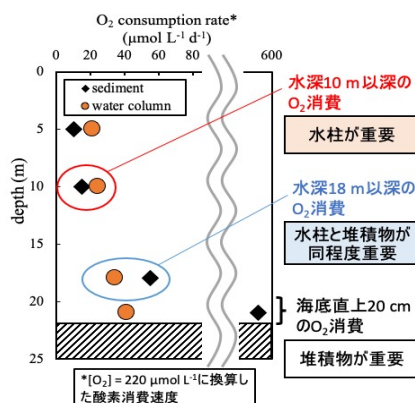


Fig. 7 大気平衡時 ($[O_2] = 220 \mu\text{mol L}^{-1}$) に換算した伊勢湾湾奥部貧酸素水塊出現地点における水柱中の現場酸素消費（＝呼吸）速度および堆積物による水柱酸素消費速度の鉛直分布。それぞれ各水深で深の水柱における平均酸素消費速度を示す。

oxygen isotopes: A case study in Lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.* 47, 33-42.

Williams, P. J. L. B., Morris, P. J., & Karl, D. M. (2004). Net community production and metabolic balance at the oligotrophic ocean site, station ALOHA. *Deep-Sea Research Part I*, 51(11), 1563-1578, doi.org/10.1016/j.dsr.2004.07.001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hao Xu, Urumu Tsunogai, Fumiko Nakagawa, Yijun Li, Masanori Ito, Keiichi Sato, and Hiroshi Tanimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Determination of the triple oxygen isotopic composition of tropospheric ozone in terminal positions using a multistep nitrite coated filter pack system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rcm.9124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Takahiro, Nakagawa Fumiko, Shibata Hideaki, Tsunogai Urumu	4. 巻 126
2. 論文標題 Vertical Changes in the Flux of Atmospheric Nitrate From a Forest Canopy to the Surface Soil Based on 170 Values	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Geophysical Research: Biogeosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1029/2020JG005876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsunogai Urumu, Miyoshi Yuko, Matsushita Toshiyuki, Komatsu Daisuke D., Ito Masanori, Sukigara Chiho, Nakagawa Fumiko, Maruo Masahiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Dual stable isotope characterization of excess methane in oxic waters of a mesotrophic lake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography	6. 最初と最後の頁 2937 ~ 2952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lno.11566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川 書子, 鈴木 謙介, 伊藤 昌稚, 角皆 潤
2. 発表標題 現場環境下における都市河川中の脱窒・同化・硝化速度定量法開発
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2020, Virtual
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蘭 慧, 角皆 潤, 中川 書子, 伊藤 昌稚, 三好 友子, 原 修一
2. 発表標題 安定同位体組成を指標に用いた伊勢湾における過飽和メタンの起源および挙動解明
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2020, Virtual
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野一哉, 角皆 潤, 中川書子, 伊藤昌稚
2. 発表標題 対流圏一酸化窒素の窒素及び三酸素同位体組成の定量
3. 学会等名 第25回大気化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 頼 鵬, 中川書子, 角皆 潤, 丁 とう, 野口 泉, 山口高志
2. 発表標題 多段フィルターパック法を用いたガス状亜硝酸および二酸化窒素の三酸素同位体異常定量
3. 学会等名 2020年度日本地球化学会第67回オンライン年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角皆 潤, 柏木章吾, 伊藤昌稚, 中川書子, 鋤柄千穂
2. 発表標題 微量安定同位体トレーサーを利用した水圏環境下における酸素消費速度定量
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2019年大会, 幕張メッセ国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角皆 潤, 柏木章吾, 伊藤昌稚, 中川書子, 鋤柄千穂, 水野宏香
2. 発表標題 微量安定同位体トレーサーを利用した海洋における水柱酸素消費速度定量
3. 学会等名 日本海洋学会2019年度秋季大会, 富山国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野宏香, 角皆潤, 中川書子, 伊藤昌稚
2. 発表標題 15Nアンモニア添加培養に基づく水柱硝化速度の鉛直分布定量
3. 学会等名 日本海洋学会2019年度秋季大会, 富山国際会議場
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------