

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510006

研究課題名(和文) 環境水におけるフミン物質など難分解性有機物の迅速計測法の開発と動態解析

研究課題名(英文) Development of Rapid Monitoring and Analysis on the Dynamics of Refractory Organic Matter such as Humic Substances in Environmental Water

研究代表者

山田 悦 (Yamada, Etsu)

京都工芸繊維大学・環境科学センター・教授

研究者番号：30159214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖水の溶存有機物質(DOM)と蛍光物質を解析し、土壌フルボ酸及びタンパク質のトリプトファンと同じ蛍光特性を持つフルボ酸様蛍光物質とタンパク質様蛍光物質が存在し、フルボ酸様蛍光物質は分子量3kDa以下の割合が高く、タンパク質様蛍光物質は分子量30kDa以上と3kDa以下の割合が高かった。土壌フルボ酸とタンパク質様蛍光物質は高分子量、藻類由来フルボ酸様蛍光物質は低分子量が多いことから、琵琶湖水DOMは土壌フルボ酸と藻類由来DOMの両方の寄与があると考えられる。琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質には藻類由来DOM中と同様のタンパク質が検出され、藻類の寄与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The dynamics and characteristics of dissolved organic matter (DOM) and fluorophores in Lake Biwa were evaluated. As the molecular weights of fulvic-like and protein-like fluorescence DOM may be mainly less than 3 kDa and except for 3-30 kDa, respectively, DOM in Lake Biwa might be attributed to both of soil fulvic acid and algal DOM. The protein-like fluorophores in Lake Biwa may be attributed to proteins in algal DOM.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：フミン物質 藻類由来有機物 タンパク質様蛍光物質 フルボ酸様蛍光物質 琵琶湖 三次元蛍光光度法 SDS-PAGE 難分解性有機物

1. 研究開始当初の背景

(1) 琵琶湖は日本で最大の湖であるが、1985年以降、生物化学的酸素要求量(BOD)はほとんど一定であるのに対し、化学的酸素要求量(COD)の値は年々増加しており、微生物に分解されない難分解性有機物の増加が懸念される。湖沼など閉鎖的な水域では、このように難分解性の溶存有機物(DOM)が増加しており、その原因解明が求められている。

(2) 難分解性有機物の原因は、外来性の土壌フミン物質に加え、植物プランクトンなど内部生産によるものも大きいことを見いだしたが、内部生産有機物については不明な点が多いため、その特性と動態、難分解性有機物への寄与の解明は非常に重要である。

2. 研究の目的

(1) 環境水中での難分解性有機物、土壌フルボ酸及び藻類由来のフルボ酸様蛍光物質とタンパク質様蛍光物質などの迅速で簡易な計測法を開発し、琵琶湖と流入・流出河川をモデルとして、これら難分解性有機物の動態を解明し、湖水で蓄積する原因を明らかにする。

(2) 藻類由来有機物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)法などにより分子レベルで解析し、プランクトン種の変遷を湖水のDOMの特性変化やCOD増加と関連づけて解析する。

(3) 底質フミン物質を抽出・単離し、その化学特性を解析し、底質からの溶出など動態解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 琵琶湖の水深別水質を解析し、琵琶湖水及底泥中のフミン物質や藻類由来有機物の動態及び特性について解析した。3種類の湖水産の植物プランクトン、*Microcystis aeruginosa*、*Staurastrum dorsidentiferum*、*Cryptomonas ovata* を培養し、これらの藻類由来有機物と琵琶湖水中蛍光物質の比較解析から、内部生産

の有機物指標について検討した。

(2) 藻類由来有機物を濃縮・分離し、三次元蛍光光度法(3-DEEM)及び SDS-PAGE など分析し、藻類由来 DOM、特にタンパク質様蛍光物質の特性について解析した。琵琶湖水のタンパク質様蛍光物質を凍結乾燥、限外ろ過で濃縮し、SDS-PAGE 及び蛍光検出ゲルクロマトグラフ法で解析した。さらに、琵琶湖底質からフミン酸(HA)とFAを堆積層別に抽出・分離し、元素分析、NMR分析などで特性評価した。

4. 研究成果

(1) 琵琶湖におけるフルボ酸様及びタンパク質様蛍光物質の相対蛍光強度の月変化

琵琶湖北湖の南比良沖中央(St. 12B)など3地点と南湖1地点の計4地点で2008年7月から採水し、水深別水質を解析した。琵琶湖北湖のSt. 12Bにおけるフルボ酸様蛍光物質(ピークA)の相対蛍光強度(RFI)は、表層水、水深60m共に6~9月までは変化が小さく、9~12月にかけて増加し、循環期においては水深60mでは表層水とほぼ同じ値を示した。*Uroglena americana*による淡水赤潮が発生した2009年5月においては、ピークAのRFI値は表層水、水深10mでそれぞれ5.87 QSU、5.71 QSUと、4月の約2倍の高い値を示したが、水深60mでは2.58 QSUと4月とほぼ同じ値で、値が上昇したのは表層水のみであった。琵琶湖北湖のSt. 12Bにおいて、ピークAのRFI値は、琵琶湖が循環期の1~4月において表層水と底層水の値に水深による違いは見られなかったが、6月以降は底層水の値が表層水よりも高かった。フルボ酸様蛍光物質は、水深60mの方が表層水の値よりも高いことから、湖底からのフミン物質の溶出など底質の寄与が推測できる。また藻類培養時の3-DEEMプロットの結果や淡水赤潮発生時の蛍光強度の変化などから、藻類の寄与もあると考えられる。

タンパク質様蛍光物質(ピークC)のRFI値は、フルボ酸様蛍光物質とは逆に表層水のRFI値が底層水よりも高く、月による変動が大きいという傾向を示した。St. 12Bで淡水赤潮の発

生した 2009 年 5 月には、タンパク質様蛍光物質は表層水及び水深 10m で高い値を示した。成層期にタンパク質様蛍光物質は、底層水よりも表層水の値が高いという傾向を示し、クロロフィル a 濃度が高くなると増加することから、藻類の寄与が大きいと考えられる。

(2) 藻類由来のタンパク質様蛍光物質の濃縮分離と SDS-PAGE

培養液中の藻類由来 DOM、タンパク質様蛍光物質の濃度は低く、共存物質が多いため、そのままでは SDS-PAGE に適用できなかった。そこで、SDS-PAGE 分析の前に限外ろ過で濃縮し、エコノパック 10-DG カラム(排除限界 6 kDa)を用いて VT 培地を Tris-HCl バッファーと交換することにより共存物質の除去を行った。*Microcystis*、*Staurastrum* 及び *Cryptomonas* の三種類の藻類由来 DOM からタンパク質様蛍光物質をそれぞれ 350 倍に濃縮・分離し、CBB 染色による SDS-PAGE 分析を行った(Table 1)。*Microcystis*、*Staurastrum* 及び *Cryptomonas* の培養日数は、それぞれ 42 日、77 日及び 67 日である。*Microcystis* 由来のタンパク質様蛍光 DOM の SDS-PAGE は、17、37、50、75、150 kDa にバンドが検出され、特に 37 と 150 kDa のバンドはクリアであった。またレーンのトップにはっきりとしたバンドが検出されたことから 250 kDa より高分子量の物質の存在が考えられる。この結果は、*Microcystis* 由来のタンパク質様蛍光物質は主に 200 kDa 以上の高分子物質であるという蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法の結果と一致する。この高分子物質はタンパク質や糖類などが結合した複合物質で、*Microcystis aeruginosa* の細胞壁を構成するペプチドグリカン(peptidoglycan)ではないかと推測される。*Staurastrum* 由来のタンパク質様蛍光 DOM の SDS-PAGE では 50 kDa にはっきりしたバンドが検出され、37 kDa にもバンドが検出された。*Cryptomonas* 由来のタンパク質様蛍光 DOM では、50~150 kDa の間でいくつかのバンドが検出されたが、他の藻類と比較すると弱いバンドだった。これは、*Cryptomonas* 由来のタンパク質様蛍光物質が

分解しやすいだけでなく、*Microcystis* と *Staurastrum* 由来のタンパク質様蛍光物質が難分解性であるためと推測される。

Table 1 SDS-PAGE による 3 種類の藻類由来タンパク質様蛍光物質の分子量解析

phytoplankton	Molecular weight of protein (kDa)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	17, 37, 40, 50, 75, 150, >250
<i>Staurastrum dorsidentiferum</i>	20, 37, 50
<i>Cryptomonas ovata</i>	10, 15, 37, 75, 150

Microcystis、*Staurastrum* 及び *Cryptomonas* の藻類由来有機物(AOMs)と細胞外有機物(EOMs)、それぞれの寄与を明らかにするために、その特性を明らかにした。培養 19 日、28 日及び 42 日目における *Microcystis* の EOMs と AOMs からタンパク質を濃縮分離し、SDS-PAGE で分析した。培養 19 日目における EOMs でのタンパク質様蛍光物質では、50、75 kDa に弱いバンドが検出され、28 日目では 50、75 kDa に加え、25 kDa にもバンドが検出された。AOMs のタンパク質様蛍光物質では、どちらの培養日数でも、10~15、37、50、75 kDa のバンドと 250 kDa 以上の分子量バンドが検出された。培養 42 日目における EOMs のタンパク質様蛍光物質では、10~20、50、150 kDa にクリアなバンドが検出され、250 kDa 以上の分子量バンドも検出された。分子量 250 kDa 以上のバンドは、培養 19 日と 28 日目の EOMs 試料では検出されず、超音波処理を行った AOMs 試料のみ検出された。タンパク質様蛍光物質は、培養日数が増加すると分子量分布が多様化し、特に 250 kDa 以上の高分子物質は増殖期の EOMs では検出されないことから、増殖期以降における細胞内有機物あるいは細胞壁成分の放出によるものと考えられる。

(3) 琵琶湖水中 DOM の濃縮と SDS-PAGE

琵琶湖水中の DOM およびタンパク質様蛍光物質は希薄なため、まず凍結乾燥により琵琶

湖北湖(St. 17B)の表層水試料(2013年11月5日, 12月6日採水)、2~4Lを約10~30倍に濃縮し、さらに藻類培養液と同様の操作で濃縮後、SDS-PAGEを行った。11月採水の琵琶湖北湖水の濃縮試料には2200倍, 3700倍共に37kDaにクリアなバンドが検出された。一方、12月6日採水の琵琶湖水試料2.2Lも同様の濃縮・分離操作を行い1mLまで濃縮した試料を用いたが、CBB染色ではクリアなバンドは検出されなかった。

蛍光検出 ゲルクロマトグラフ法を用いて、SDS-PAGEと同じ試料を40倍希釈し、タンパク質様蛍光ピークの励起蛍光波長である $Ex/Em = 280/320$ nmで測定すると、11月採水試料では保持時間23~24分付近に大きなピークとその高分子側($RT = 18 \sim 19$ 分)に小さなピークが検出された。一方、12月採水試料では保持時間18~19分に大きなピークとその低分子側($RT = 22 \sim 23$ 分)に小さなピークが検出され、11月と異なるゲルクロマトグラムであった。SDS-PAGEの結果に加え、蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法においても琵琶湖水中のタンパク質様蛍光物質には藻類由来DOMと同様の保持時間にピークが検出されていることから、琵琶湖水中のタンパク質様蛍光物質は*Microcystis*及び*Staurastrum*などの藻類由来DOMであることが示唆されたが、今後さらに検討が必要である。

(4) 琵琶湖底質フミン物質の堆積層別化学特性の解析

琵琶湖底質からのフミン物質溶出が琵琶湖水難分解性DOMの原因の一つではないかと考えられるため、その化学特性を明らかにするために、琵琶湖北湖今津沖中央(St. 17B)の底質を2010年から毎年11月に採取し、抽出・単離した底質フミン酸と底質試料の化学特性について解析を行った。琵琶湖北湖(St. 17B)における底質のTOC量は、1層の2~5%に対し5層では1~2%と、上層で高く、下層で低いという傾向を示した。琵琶湖底質のTOC量は、下層ほど堆積年数が長いこと、堆積していくにつれ底質中の有機炭素成分が分解・縮

合を繰り返し、TOC量は1%近くに収束すると考えられる。

琵琶湖底質から、国際腐植物質学会(IHSS)法に従い抽出したフミン酸の量は、2012年は層に関係なく3~4 mg/gで、2013年は1, 2層で10 mg/gと高い値を示し、下層では低下した。底質のフミン酸量の年による違いについては不明な点も多く、今後さらに検討する。

抽出・単離した底質フミン酸の化学特性について検討した。元素分析の結果から、2013年採取の底質フミン酸では、C、H及びN含量は1層の48.65%、5.85%、5.33%に対し、第5層はそれぞれ44.38%、4.58%、4.39%と1層よりも低く、O含量は1層の40.17%に対し、5層は46.65%と高い値を示した。底質フミン酸のC、H及びN含量は上層よりも下層の方が低く、O含量は逆に上層よりも下層の方が高いという傾向を示した。底質フミン酸のC含量は40~49%と土壌フミン酸の53~54%と比較すると低く、O含量は40~52%と土壌フミン酸の37%と比較して高い値を示した。また、琵琶湖底質フミン酸のH/C比は1.2~1.46と土壌フミン酸の1.18, 0.93よりやや高く、N/C比も0.082~0.095と土壌フミン酸の0.073, 0.063より高い。琵琶湖底質フミン酸のH/C比が高いのは、材料物質が脂肪族性の構造に富むためであり、N/C比が高いのは、フミン酸の前駆物質として主として植物プランクトンのタンパク質が寄与しているためと考えられる。¹H-NMRの結果から、底質フミン酸の脂肪族性プロトンは52~54%と、土壌フミン酸の30~41%と比較すると高く、芳香族性プロトンが4.5~5.5%と、土壌フミン酸の9.0~18.9%と比較すると低いことがわかった。琵琶湖底質フミン酸は、土壌フミン酸と比較して、脂肪族性に富む構造であると考えられる。赤外分光分析の結果から、琵琶湖底質フミン酸と土壌フミン酸の赤外吸収スペクトルを比較した。琵琶湖フミン酸はペプチド結合の存在に特徴的なC=OとN-H、C=Nの振動に基づく1640 cm^{-1} と1540 cm^{-1} 付近、カルボキシル基のC-O伸縮振動とC-H変角運動による1220 cm^{-1} 付近にも吸収がある。また、多糖類のOH伸縮振動

に帰属される 1040 cm⁻¹付近にも非常に強いピークが見られた。これらの結果より、ペプチド結合、多糖類、セルロースの存在が明らかである。琵琶湖底質の TOC 量に対する底質 HA の炭素量の比(C_{HA}/C_{sed})は、2011 年、2012 年は、1 層の 3 %に対し 5 層では 7 %と、下層の方が高く、2013 年は 1 層の 10 %に対し 5 層は 4 %と 2011 年 2012 年とは異なる結果が得られた。琵琶湖底質では、底質フミン酸が主要な有機炭素源と考えているが、年によってフミン酸量や C_{HA}/C_{sed} 比が異なることについては不明な点も多く、今後さらに検討していく必要がある。

琵琶湖底質フミン酸は、土壌フミン酸と比較すると C 含量が高く、O, N 含量は低く、脂肪族性に富み、ペプチド結合、多糖類、セルロースが存在することから、植物プランクトンなどによる内部生産由来の寄与が大きいと推測できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

山田 悦、布施泰朗、柄谷 肇、湖沼など閉鎖性水域における難分解性有機物増加の原因解明に関する研究 湖水産植物プランクトン由来のタンパク質様蛍光物質の特性評価、京都工芸繊維大学環境科学センター報「環境」、査読無、Vol. 25、2013、pp. 35-44

E. Yamada, T. Hirota, N. Hatori, Yuki Kitao, Y. Fuse, S. Aoki, H. Karatani, T. Matsunaga, Characterization of Protein-like Fluorophores Released from Lake Phytoplankton on the Basis of Fractionation and Electrophoresis, Analytical Sciences, 査読有, Vol. 28, No. 6, 2012, pp. 595-600

DOI: 10.2116/analsci.28.595

E. Yamada, S. Ohara, T. Uehara, T. Hirota, N. Hatori, Y. Fuse, S. Aoki, Biodegradation of Dissolved Organic Matter (DOM) Released from Phyto-

plankton in Lake Biwa, Analytical Sciences, 査読有, Vol. 28, No. 7, 2012, pp. 675-681

DOI: 10.2116/analsci.28.675

山田 悦、総合論文「琵琶湖など閉鎖性水域における難分解性有機物増加に関する研究 - フミン物質と藻類由来有機物の動態と特性 - 」, 海洋化学研究, 査読無, Vol. 25, No. 1, 2012, pp. 3-13

山田 悦、布施泰朗、柄谷 肇、湖沼など閉鎖性水域における難分解性有機物増加の原因解明に関する研究 琵琶湖におけるトリハロメタン前駆物質としてのフミン物質と藻類由来有機物の動態解析、京都工芸繊維大学環境科学センター報「環境」、査読無、Vol. 24、2012、pp. 39-48

[学会発表](計 8 件)

山田 悦、閉鎖性水域で増加する難分解性有機物に及ぼすフミン物質と藻類由来有機物の影響解明、日本分析学会(招待講演)、2014 年 5 月 24 日、日本大学工学部(福島県郡山市)

山田 悦、布施泰朗、柄谷 肇、SDS-PAGE などによる藻類由来タンパク質様蛍光物質の特性評価と琵琶湖水への適用、日本分析学会、2013 年 9 月 12 日、近畿大学(大阪府東大阪市)

布施泰朗、山田 悦、琵琶湖底質中フミン物質の蛍光特性の堆積層別解析、日本分析学会、2013 年 9 月 12 日、近畿大学(大阪府東大阪市)

[図書](計 1 件)

○ 山田 悦、布施泰朗他、電気書院、地球環境論 緑の地球と共に生きる一、2014、227

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 悦(YAMADA, Etsu)

京都工芸繊維大学・環境科学センター・教授
研究者番号: 30159214

(2)研究分担者

布施 泰朗(FUSE, Yasuro)

京都工芸繊維大学・環境科学センター・助教

研究者番号：90303932

(3)連携研究者

柄谷 肇(KARATANI, Hajime)

京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究科・

教授

研究者番号：1016659