

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340050

研究課題名(和文) フミン物質及び藻類由来有機物の環境動態と難分解性有機物としての環境影響の解明

研究課題名(英文) Analysis of Dynamics and Effects of Humic Substances and Algal Organic Matter as Refractory Organic Matter in Environmental Waters

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：三次元蛍光光度法とDOC測定を用いる環境水中フミン物質の迅速分析法についてカラム分画法と比較検討し、琵琶湖及び流域河川水のフミン物質の動態解析に適用した。琵琶湖北湖水から濃縮分離したタンパク質様蛍光物質は、SDS-PAGE及び二次元電気泳動によるpI/MWの結果から藻類由来タンパク質様蛍光物質と類似しており、藻類の寄与が大きいと示唆された。リアルタイムPCRを用いる藻類モニタリングを開発して琵琶湖水に適用し、琵琶湖の溶存有機物質及び蛍光物質の季節変化に及ぼす藻類の影響を評価した。

研究成果の概要(英文)：A rapid analysis of humic substances in waters using three dimensional excitation emission matrix and DOC was investigated comparing with fractionation analysis, and applied to the dynamics of humic substances in Lake Biwa and its surrounding rivers. In order to elucidate the characteristics and origin of protein-like fluorophores in Lake Biwa, concentrated protein-like fluorophores were analyzed using SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis. Analytical results of pI/MW of concentrated protein-like fluorophores in Lake Biwa were similar to those of algal DOM. These results suggest that protein-like fluorophores in Lake Biwa may be attributed to algal DOM. The monitoring methods of phytoplankton in lakes using real-time PCR were developed and applied to the monitoring of phytoplankton in Lake Biwa. The effects of phytoplankton on the seasonal changes in the characteristics of DOM and fluorophores from Lake Biwa were estimated.

研究分野：複合新領域

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 琵琶湖 三次元蛍光光度法 SDS-PAGE リアルタイムPCR 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質(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) 培養した藻類由来有機物の内、タンパク質様蛍光物質を濃縮・分離して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)法などによる分子レベルでの解析結果をもとに、琵琶湖北湖水中のタンパク質様蛍光物質についても解析する方法を開発し、湖水中での動態や起源について解析する。

(3) 琵琶湖での内部生産の藻類由来有機物の影響を明らかにするため、リアルタイム PCR を用いる藻類の分子認識モニタリング法を検討し、琵琶湖水や培養系などに適用すると共に藻類由来有機物との関係を評価する。

## 3. 研究の方法

(1) 琵琶湖試料は北湖今津沖中央(St. 17B)など4地点で採水した。河川水試料は姉川、安曇川など琵琶湖流入4河川16地点と淀川水

系4河川6地点で採水した。採水した試料はろ過後、蛍光強度とDOC値をそれぞれ3-DEEM法とTOC計を用いて測定した。一部を除き河川水のピークA(蛍光強度)はDOC値と正の相関を示すことから、河川水のピークAはほぼ土壌フルボ酸(FA)の寄与と仮定し、Dando FA(褐色森林土)を標準試料としてFA濃度を求めた。カラム分画法は疎水性樹脂(DAX-8)を用いた疎水性酸(HoA)の濃度を求め、本法のFA濃度と比較した。琵琶湖水のFA濃度は、日本腐植物質学会提供のBiwako FAを標準試料として求めた。

(2) 3種の藻類、*Microcystis aeruginosa*、*Staurastrum dorsidentiferum*、*Cryptomonas ovata*を培養し、これらの藻類由来有機物を濃縮・分離し、三次元蛍光光度法(3-DEEM)、SDS-PAGE及び二次元電気泳動などで分析し、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クロスフロー限外ろ過、凍結乾燥、限外ろ過で濃縮し、SDS-PAGE、二次元電気泳動及び蛍光検出ゲルクロマトグラフ法で測定し、藻類由来有機物の結果と比較解析した。

(3) 3種の藻類を培養し、それぞれの藻類の細胞濃度系列を作成した。これらの試料をビーズ破砕後、DNeasy Plant Mini Kitを用いてDNA抽出し、それぞれの藻類の種特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRを行い、得られたThreshold cycle(Ct)値と細胞濃度から検量線を作成した。琵琶湖水及び培養系などにも適用し、藻類由来有機物の特性との関係を評価した。ろ紙法によるDNA抽出についても検討した。

## 4. 研究成果

(1) 環境水におけるフミン物質の迅速分析法の開発と琵琶湖・流域河川水の動態解析

琵琶湖・流域河川水試料をろ過後、蛍光強度とDOC値をそれぞれ3-DEEM法とTOC計を用いて測定した。一部を除き河川水のピークA

(蛍光強度)は DOC 値と正の相関を示すことから、河川水のピーク A はほぼ土壌フルボ酸(FA)の寄与と仮定し、Dando FA(褐色森林土)を標準試料として FA 濃度を求めた。カラム分画法は疎水性樹脂(DAX-8)を用い疎水性酸(HoA)の濃度を求め、本法の FA 濃度と比較した。琵琶湖水の FA 濃度は、日本腐植物質学会提供の Biwako FA を標準試料として求めた。本法及びカラム分画法を用いて求めた淀川水系 4 河川における FA 濃度と HoA 濃度の分析値は、宇治川を除く 3 河川では比較的良い一致を示した。宇治川では本法の値がカラム分画法より低い値を示し、琵琶湖水の影響と考えられる。琵琶湖流入河川の安曇川と姉川では DOC 値がそれぞれ 0.11-0.57mgC/L, 0.23-0.74mgC/L と低く、カラム分画法は適用できないため、本法で FA 濃度を求めるとそれぞれ 0.05-0.18mgC/L 及び 0.09-0.29mgC/L で、FA の存在割合は上流の方が下流より高かった。

琵琶湖水における両法による分析値は、水深 10~20m では比較的良い一致を示したが、表層水では夏季に本法の値がカラム分画法より低く、これは夏季に表層水の FA の蛍光強度は太陽光により消光して低下するためと推測される。底層水では逆に本法の値の方が高くなり、これは底質からの FA の溶出の影響と考えられる。

## (2) 琵琶湖・流域河川水中溶存有機物質の特性に及ぼす光照射と波長領域の影響

琵琶湖北湖水(St. 17B)を 3-DEEM で測定すると、土壌フルボ酸と同様の励起蛍光波長に 2 つのフルボ酸様蛍光ピーク、ピーク A(Ex/Em=310-330/420-450nm) と ピーク B(Ex/Em=250-260/425-450nm)、及び 1 つのタンパク質様蛍光ピーク、ピーク C(Ex/Em=270-280/320-350nm)が検出された。同地点の水深 0.5m における 2015 年 8-10 月及び 2016 年 6-8 月のピーク A の蛍光強度は、他の月や水深 80m の値と比較すると特に低く、太陽光照射しても蛍光強度はほとんど変化せず、他の月は太陽光照射すると 30~45%減少した。底層水のピーク A の蛍光強度はすべての月で 30~50%減少し

た。これらの結果から、夏季の琵琶湖北湖表層水では既に太陽光によりフルボ酸様蛍光物質の消光(蛍光強度の減少)が生じていると考えられる。流域河川水では、ピーク A の蛍光強度の減少率は、太陽光の方が Xe ランプ照射より大きく、ピーク C の減少率は逆に太陽光より Xe ランプ照射の方が大きいことが確認された。一方、琵琶湖・流域河川水において DOC 値は光照射しても変化は小さく、分子量分布は高分子物質が減少し低分子物質が増加したことから、光照射により蛍光物質の消光だけでなく、低分子化が推測される。

波長カットフィルターを用いた Xe ランプ照射では、Xe ランプ(UV-29 セット)照射すると、土壌フルボ酸及び藻類由来と環境水 DOM のピーク A, B の蛍光強度の減少率はセットしない場合とほぼ同程度なのに対し、藻類由来と環境水 DOM のピーク C の蛍光強度の減少率はセットすると大きく低下したことから、ピーク C には 290nm 以下の光の影響が大きいといえる。Xe ランプ(W-Y495 セット)照射では、ピーク A, B の蛍光強度の減少率はセットしない場合より低下した。土壌フルボ酸と藻類由来有機物に太陽光及び Xe ランプ照射すると、土壌フルボ酸と藻類由来フルボ酸様蛍光物質の蛍光強度の減少は太陽光の方が大きく、藻類由来タンパク質様蛍光物質の蛍光強度の減少は Xe ランプ照射の方が大きいという傾向を示した。これらの結果から、環境水中のタンパク質様蛍光物質は紫外線領域の波長が、フルボ酸とフルボ酸様蛍光物質には可視領域の波長の影響が大きいことが示唆された。

## (3) 電気泳動などを用いる琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質の特性解析

琵琶湖水(2-3 L)から濃縮・分離したタンパク質様蛍光物質(2013 年 11 月~2015 年 2 月)を蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法で測定すると、保持時間 17-19 分のピークは測定したすべての試料で検出され、2013 年と 2014 年 11 月は保持時間 23-24 分に、他の月はそれより高分子量側の 21-22 分にピークが検出された。同じ試料を SDS-PAGE(銀染色)で分析すると、

すべての試料で 50-75 kDa の範囲に二つのバンドが検出され、2013 年 11 月は 37 kDa 付近に濃いバンドが検出され、2014 年 6, 9, 10 月は 45 kDa 付近にバンドが検出された。両法の結果より、保持時間 21-22 分、23-24 分のピークは、それぞれ分子量 45 kDa、37 kDa 付近のバンドに対応し、採水月に依存することがわかった。分子量 37, 45, 50-75 kDa のバンドは、培養した藻類由来タンパク質様蛍光物質でも検出されており、今回同定できた琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質には藻類の寄与が大きいと考えられる。

加圧式限外ろ過法、クロスフロー限外ろ過法を用い琵琶湖水(3-10 L)から濃縮・分離した試料では、既に琵琶湖水で検出されていた 50~75 kDa の 2 つのバンドと約 45 kDa のバンドに加え、37~100 kDa の範囲に多数のバンドが検出された。これらの試料の二次元電気泳動を行うと、スポットは分子量 20~180 kDa の範囲に広く分布し、ほとんど酸性側に検出された。2016 年 5 月の琵琶湖試料の二次元電気泳動結果では、50~75 kDa の 2 つのバンドは等電点(pI)が pI=3.4,5 及び 4-4.75、約 45 kDa のバンドは pI=4.5-5 と見積もられた。これらの結果を藻類由来タンパク質様蛍光物質の二次元電気泳動の結果と比較した。琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質には藻類由来タンパク質様蛍光物質と同様の MW/pI をもつタンパク質のスポットが検出され、二次元電気泳動の結果からも藻類の寄与が大きいと推測される。

(4) 藻類の分子認識モニタリング法を用いる琵琶湖水中溶存有機物質に及ぼす藻類由来有機物の影響解析

琵琶湖の難分解性有機物は、フミン物質に加えて内部生産の藻類由来有機物 (AOM) であることを報告しているが、その特性は藻類の種類により異なるため、水環境での AOM の影響を明らかにするためには、藻類のモニタリングが重要である、しかし、現行の顕微鏡による直接計数では、類似する種の識別が難しく、長年の経験と技術、時間と労力を要する

などの欠点がある。そこで本研究では、リアルタイム PCR を用いる藻類の分子認識モニタリング法を検討し、琵琶湖水や培養系などに適用すると共に AOM の特性を評価した。

3 種の藻類、*Microcystis aeruginosa*、*Staurastrum dorsidentiferum*、*Cryptomonas ovata* を培養し、それぞれの藻類の細胞濃度系列を作成した。これらの試料をビーズ破碎後、DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA 抽出し、それぞれの藻類の種特異的プライマーを用いリアルタイム PCR を行い、得られた Threshold cycle(Ct) 値と細胞濃度から検量線を作成した。琵琶湖水及び培養系などにも適用し、培養系では 3-DEEM 測定などにより AOM の特性を評価した。

細胞濃度とリアルタイム PCR の Ct 値との間には、*Microcystis* では  $10^2 \sim 10^7$  cells/ml、*Staurastrum* と *Cryptomonas* では  $10^1 \sim 10^4$  cells/ml の濃度範囲で直線関係が見られた。純水、琵琶湖水及び藻類混合系と 3 種の異なる系での融解曲線とアガロースゲル電気泳動により、他の藻類の影響なしに目的の PCR 産物の種特異的増幅ができていることを確認した。培養系にも適用し、増殖曲線を比較すると共に DOC 及び蛍光物質測定により AOM の特性を評価した。

(5) ろ紙法による DNA 抽出とリアルタイム PCR を用いる環境水の藻類モニタリング

琵琶湖北湖など閉鎖性水域では微生物に分解されにくい難分解性の溶存有機物質 (DOM) が増加し、問題となっている。難分解性有機物には、フミン物質に加えて藻類由来 DOM の寄与が大きいことを明らかにしており、環境水での藻類モニタリングが重要である。しかし、現行の顕微鏡を用いる細胞数の直接計数では長年の経験、時間と労力を要するなどの欠点がある。そこで、ろ紙上に捕集した藻類から DNA 抽出してリアルタイム PCR を行う方法を検討し、*Microcystis aeruginosa* などの藻類モニタリングに適用した。

*M. aeruginosa* を培養し、細胞数を顕微鏡により計数し、原液を純水で  $10^{-1} \sim 10^{-4}$  に希釈し

て、細胞の濃度系列を作成した。これらをそれぞれろ紙(孔径0.45 μm)上に滴下し、そのろ紙を凍結した後に室温で解凍し、遠沈管に入れ、TE バッファーを5mL 加えて1時間加熱して DNA を抽出した。抽出液についてリアルタイム PCR を行い、試料の Threshold cycle (Ct 値) と細胞数から検量線を作成した。*Staurastrum dorsidentiferum* についても同様の方法で検量線を作成した。また、琵琶湖北湖(St.17B)で水深別に採水した湖水1Lをろ過し、ろ紙上から DNA 抽出した試料についてもリアルタイム PCR を行い、環境試料への本法の適用について検討した。

ろ紙上に捕集した *M. aeruginosa* 及び *Staurastrum dorsidentiferum* の細胞数と Ct 値の間には、それぞれ  $6.8 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^6$  cells、 $90 \sim 9.0 \times 10^4$  cells の細胞数範囲で直線関係がみられた。琵琶湖北湖試料(St.17B)の湖水試料について、*Staurastrum dorsidentiferum* プライマーを用いて PCR を行うと、単一の PCR 産物を得ることができた。このことから他の藻類が混在する系でも本法を用いることで特異的に検出できることがわかった。また琵琶湖北湖試料(St.17B)で水深別に *Staurastrum dorsidentiferum* の計数を行った結果、細胞密度は水深10mで最大となり、水深が深くなるに従い減少する傾向を示した。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計8件)

Y. Fuse, T. Okamoto, K. Hayakawa, H. Karatani, E. Yamada, Py-GC/MS analysis of sediments from Lake Biwa, Japan: characterization and sources of humic acids, *Limnology*, 査読有, Vol.17, 2016, pp. 207-221  
DOI: 10.1007/s10201-015-0470-7

布施泰朗, 柄谷 肇, 山田 悦, 熱分解 GCMS を用いる琵琶湖底質の分析: フミン物質の特性と起源, 京都工芸繊維大学環境科学センター報「環境」, 査読無, Vol. 28, 2016, pp. 32-39

Tomomi Kinoshita, Kenichi Tonokura, Ikuya Shibata, Etsu Yamada et al., Management of Chemicals for Safety and Education, *J. Environment and Safety*, 査読有, Vol. 6, 2015, pp.81-84

DOI: 10.11162/daikankyo.16S0801

山田 悦, 検知管法などを用いる大学の実験室における揮発性有機物質(VOCs)濃度の動態と経年変化の解析(2005-2014年), *環境と安全*, 査読有, Vol. 6, 2015, pp. 141-149

DOI: 10.11162/daikankyo.15G0901

山田 悦, 発光バクテリアを用いたバイオアッセイによる環境汚染物質のモニタリングに関する新展開, *ぶんせき*, 査読有, 2014, pp. 689-690

### [学会発表](計25件)

水口裕尊, 笹井啓佑, 藤井 颯, 比嘉良太, 藤井しおり, 布施泰朗, 岡本高弘, 早川和秀, 柄谷 肇, 山田 悦, 電気泳動などを用いる藻類由来及び琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質の特性解析, 第77回日本分析化学討論会, 2017年5月27日, 龍谷大学(京都市)

藤井 颯, 水口裕尊, 笹井啓佑, 布施泰朗, 石川可奈子, 岡本高弘, 早川和秀, 柄谷 肇, 山田 悦, ろ紙法による DNA 抽出とリアルタイム PCR を用いる環境水の藻類モニタリング, 第77回日本分析化学討論会, 2017年5月27日, 龍谷大学(京都市)

島居克希, 上田智也, 寺井大地, 布施泰朗, 岡本高弘, 早川和秀, 山田 悦, 環境水におけるフミン物質の迅速分析法の開発と琵琶湖・流域河川水での動態解析, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月16日, 北海道大学(北海道札幌市)

上田智也, 島居克希, 寺井大地, 布施泰朗, 岡本高弘, 早川和秀, 山田 悦, 琵琶湖・流域河川水中溶存有機物質の特性に及ぼす照射と波長領域の影響, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月14日, 北海道大学(北海道札幌市)

笹井啓佑、水口裕尊、藤井 颯、布施泰朗、  
岡本高弘、早川和秀、柄谷 肇、山田 悦、  
電気泳動などを用いる琵琶湖水中タンパ  
ク質様蛍光物質の特性解析、日本分析化学  
会第 65 年会、2016 年 9 月 14 日、北海道  
大学(北海道札幌市)

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、第 74 回日本分析学討論  
会(招待講演)、2014 年 5 月 24 日、日本  
大学工学部(福島県郡山市)

[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・分子化学系・教授  
研究者番号：1016659