

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12199

研究課題名(和文)クロロフィル窒素同位体比手法の亜熱帯域窒素循環解析への応用

研究課題名(英文) Development and application of the compound specific isotope analysis of chlorophylls to elucidate nitrogen cycle in the ocean

研究代表者

小川 奈々子 (OGAWA, Nanako O.)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・主任技術研究員

研究者番号：80359174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：物質循環モデル等を用いた海洋の窒素循環研究の精度向上を念頭に、必須情報である「純粋な一次生産者情報」として海洋表層水から採取された光合成クロロフィルの分子レベル窒素安定同位体比の利用を提唱、必要とされる海洋での試料採取・前処理・分析・結果の解析について手法の開発と最適化を行った。

試料は海洋研究開発機構の海洋地球研究船「みらい」と東北海洋生態系調査研究船「新青丸」の各研究航海(平成27年度MR15-05、平成28年度KS-16-08)において採取された200m以浅の海洋表層水が用いられ、研究代表者が開発した超微量元素分析計安定同位体比測定システムによりクロロフィル色素の窒素同位体比が測定された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate the nitrogen cycle in the modern surface ocean, nitrogen isotopic compositions of chloropigments (chlorophyll and its derivatives) and nitrate in the natural ocean were determined. Chloropigments are a group of nitrogenous compounds produced only by the phototrophic primary producers. As directly involved to the photosynthetic process, and known to be preserved in the sediments for long time, nitrogen isotope information of chlorophyll is regarded to be one of the most useful tool to reconstruct and assess the biogeochemical nitrogen cycle in the surface ocean, both in present and in the past. Suspended particles and water samples were collected from photic zone of Indian Ocean and subtropical sites in the western Pacific Ocean. The observed were applied to the isotopic nitrogen model simulation to elucidate contribution balance of nutrient nitrogen as substrate to the phytoplankton photosynthesis and the nitrogen cycle in the surface ocean.

研究分野：生物地球化学

キーワード：クロロフィル 光合成 化合物レベル同位体比 海洋表層域 窒素循環 同位体物質循環モデル 植物  
プランクトン

## 1. 研究開始当初の背景

人間活動を通して人為的に行われる窒素固定は、膨大な無機態窒素の水界への再供給を通して、地球全体の窒素循環に大きな影響を与え続けてきた。窒素は海洋における光合成生物の成長をコントロールする主要な因子で、多くの海域において窒素の分布や循環は生物生産量や生態系構造を決める重要な情報である。海洋の光合成一次生産者(植物プランクトン)は、生物化学的な物質循環変動を記録するため、海洋有光層における一次生産者と海洋物質循環の解析は、現在の地球物質循環だけでなく、堆積物に残された記録を解読する古環境解析の基盤的知見としてもその重要性が高い。実際に多くの海域において窒素の分布や循環は生物生産量や生態系構造を決める重要なパラメーターとみなされ、数理モデルを用いた物質循環解析の研究においても海洋窒素の動態、すなわち一次生産者による窒素利用動態に関する正確な定量的知見は大きな意味を持つ。しかし実際の海洋環境下では一次生産者である植物プランクトンと、その他の生物やその分解残渣などと分離して採取解析することは困難なため、海洋物質循環の解析研究では、多くの場合で微量な動植物をすべて一緒にした混合物情報が「一次生産者の代替データ」として用いられてきた(図1)。このような一次生産者情報の不正確さは、データ解析の曖昧さにつながり、海洋表層における窒素循環研究、ひいては海洋表層の物質循環研究の進展を妨げる一つの側面となってきた。

一方、海洋を含む生物圏における窒素循環の解析においては「物質動態の解析」にその有効性を強く発揮する「安定同位体比」を用いた研究手法が知られている。研究代表者は安定同位体比手法を天然の環境試料に含まれる極微量の有機物に応用し、自ら開発した「超微量安定同位体比測定システム」をもとに、特定の生物に由来する有機物シグナルの化合物レベル安定同位体比情報に基づく環境変動解析研究に従事し、過去の湖沼環境・海洋環境の復元解析研究に関して成果と知見を蓄積してきた。これに対して、連携研究者は海洋観測で得られる安定同位体比情報を軸とする定量性の高い海洋物質循環モデルとして「同位体物質循環モデル」を構築し、これを用いて海洋窒素循環とその地球規模での物質循環の影響に関する解析を実施してきた。本研究では、これらの背景のもと「純粋な海洋一次生産者(植物プランクトン)情報」による物質循環解析を実施することを主たる目的とし、そのための手法開発を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、物質循環モデル等を用いた海洋の窒素循環研究の精度向上を念頭に、そのための必須情報である「純粋な一次生産者情報」を獲得する手法としての、海洋表層水から採取された光合成クロロフィルの分子レ

ベル窒素安定同位体比測定手法の利用を提唱する。具体的には研究代表者・連携研究者のこれまでの研究知見をもとに、海洋での試料採取、試料分析とその前処理、結果解析のそれぞれについて、手法の開発・最適化と改良を行う。

窒素安定同位体比手法は、物質動態解析に優れた威力を発揮する手法である。しかし既に述べたように海洋における一次生産者である植物プランクトンは微小な生物であり、実際の海洋試料から分離採取することは極めて難しい。このため既存の試料採取手法・分析手法のままでは「海洋一次生産者の純粋な安定同位体知見」は得ることが出来ない。本研究では、これまで海洋窒素循環研究の深化を妨げてきた「植物プランクトン情報の欠如」の問題を看過するための研究手法として、光合成色素である「クロロフィル」を海洋表層で採取された懸濁粒子から抽出し、その化合物レベルの安定同位体比を測定し、植物プランクトンに直結した純粋な一次生産者由来の窒素同位体比情報を獲得する。クロロフィル窒素同位体比分析は、堆積物試料を用いた古環境解析の研究分野では既に多くの実績があるが、実際に一次生産者による光合成が行われている現在の海洋表層域での測定例は世界でもごくわずかに留まる。とくに窒素固定の活発な亜熱帯～熱帯海域では未だ例がなく、本研究の結果これらの知見が得られれば世界に先駆けた研究成果となることが期待される。

異なる海洋環境条件下における光合成窒素循環知見の蓄積は、古環境解析研究においても重要な情報であり、海洋学・地球環境変動など複数の研究分野への貢献も期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、ターゲットとして東部インド洋海域および西部北太平洋の亜熱帯海域の各試料を用いた。生物生産量のより少ない海域が対象となることから、効率よく純粋な一次生産者の情報を得ための手法開発が、研究遂行の上で重要な位置を占める。これを踏まえて、本研究では(1)試料採取手法の検討、(2)分析手法の検討、(3)分析と結果解析の3つに分類し、各項目ごとに研究を進めた。

### (1) 試料採取手法の検討

研究代表者と連携研究者は栄養塩濃度とプランクトン現存量の豊富な西西北太平洋の高緯度海域において、既に懸濁態試料から抽出精製したクロロフィル色素の化合物レベル窒素同位体比測定の実績がある。一方、本研究でターゲットとする北部インド洋海域および西部北太平洋の亜熱帯海域はいずれも生物生産量が少ないこと、より小さな種類の植物プランクトンが卓越することが予測され、過去の手法がそのまま適応できない可能性が考えられた。

このため本研究では、大型の現場濾過装置を用い大容量（200 L 以上）濾過手法を軸に従来の懸濁物試料、異孔径フィルターによりサイズ分画された懸濁物試料、限外濾過膜による濃縮後にセルソーターを用いて種類ごとに分画した試料の3手法で試料を採取し、それぞれの手法の開発と結果の比較を行う

試料は海洋研究開発機構の海洋地球研究船「みらい」における平成 27 年度 MR15-05 航海および、東北海洋生態系調査研究船「新青丸」の平成 28 年度 KS-16-08 航海でそれぞれ採取し、船上で追加の処理を施した後、冷凍または冷蔵にて持ち帰り、その後実験室での分析前処理に供した。サイトフローメーターを用いる試料調整手法については、平成 27 年度中に沿岸海域試料や培養試料を用いた予備試料による検討を実行し、最適な試料採取手法を設定した。

## (2) 分析および前処理手法の検討

懸濁態試料から抽出精製したクロロフィル色素の化合物レベル窒素同位体比測定では、試料は有機溶媒を用いて抽出後、一段階もしくは二段階の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって、各クロロフィル化合物種ごとの純度の高い試料に分離したうえで、それぞれを超微量型安定同位体比測定システムに導入して同位体比分析を行う。天然環境から採取された試料ではクロロフィル以外の夾雑物の存在が HPLC での分離精製過

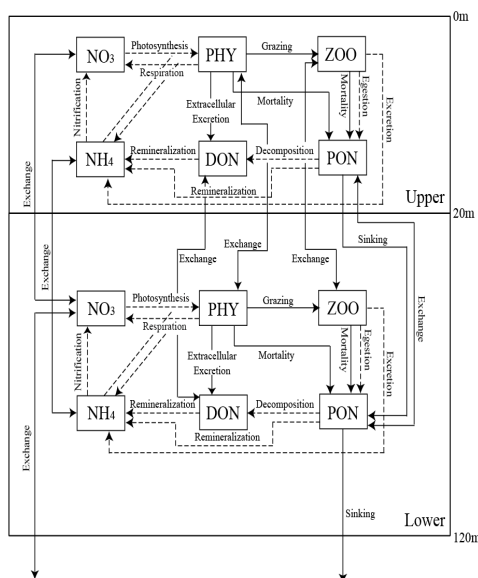


図1 海洋における窒素循環のモデル

(Yoshikawa et al. 2005)

植物プランクトン(PHY)、動物プランクトン(ZOO)、懸濁態有機物(PON)、溶存態有機物(DON)、硝酸(NO<sub>3</sub>)、アンモニア(NH<sub>4</sub>)。実線の矢印は同位体分別のないプロセス、破線の矢印は同位体分別のあるプロセスをそれぞれ示す。

程に大きく影響するため、対象海域の特性に応じた注意深い吟味と手法の微調整が必要とされる。これを踏まえ、本研究においても各試料の性質にあわせて前処理手法に適宜変更を加え、これと並行して、試料の測定を進めることとなる。

平成 27 年度にはインド洋試料を、平成 28 年度には北太平洋の亜熱帯海域試料をそれぞれ対象として各試料のクロロフィルの抽出精製手法の最適化を行い、試料の単離精製を実施した。

## (3) 分析と結果解析

上記で単離精製された各クロロフィル試料については、準備が出来次第速やかに安定同位体比を測定する。得られた結果はクロロフィル試料と同時に採取し分析を予定している海水中の硝酸態窒素濃度とその同位体比の測定結果と共に、連携研究者が開発した、同位体海洋窒素循環モデル(図 1)を用いた解析における「現場データ」として供する。解析内容は実際の航海内容に応じて適宜最適化する。

クロロフィル化合物等の超微量同位体比測定手法の最適化と分析・解析は代表者、硝酸同位体比測定は連携研究者がそれぞれ担当し、試料採取手法の検討、結果の解析は研究代表者と連携研究者とで行った。

## 4. 研究成果

海洋表層試料は、海洋研究開発機構の海洋地球研究船「みらい」と東北海洋生態系調査研究船「新青丸」の各研究航海(平成 27 年度 MR15-05、平成 28 年度 KS-16-08)において、200m 以浅の海洋表層水にて採取された。

懸濁態粒子はグラスファイバーフィルター上にろ過捕集され、クロロフィルは得られた懸濁態粒子より有機溶媒等を用いて抽出後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて単離精製したのち、代表者が開発した超微量元素分析計安定同位体比測定システムにより、同位体比測定を行った。硝酸態窒素はクロロフィルと同水深の海水について濃度とその窒素同位体比が測定された。

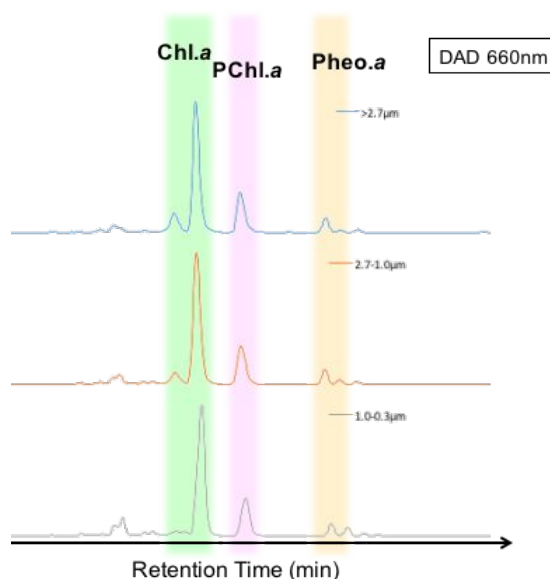
## (1) 分画試料によるサイズ間比較

本研究では海洋表層水試料に関する『ごく微量の成分を対象とした研究』であることを念頭に、従来型の船上で手動濾過を行う手法（船上ろ過法）にかわり、より多くの試料を採取できる手法として、直径 135mm のフィルターを設置した大型ろ過装置を現場海水中に投下し、海水を直接ろ過をする手法（現場ろ過法）による採取手法を軸に展開した。

現場濾過手法では前者の 10 倍以上のろ過を実現することが可能となる。西部北太平洋亜寒帯域での検討により、大型の現場濾過による生物試料の破壊の影響、およびその抽出されるクロロフィル色素への影響は小さい

ことが明らかとなっている。

本研究では、従来通りの単一サイズの懸濁態試料のほか、2.7 $\mu\text{m}$  以上、1.0-2.7 $\mu\text{m}$ 、0.3-1.0 $\mu\text{m}$  の3つのサイズフラクションで分画した試料が採取され、これらのクロロフィル分布と安定同位体比の測定を実施し結果の比較を行った。図2に西部北太平洋の北緯30度東経157度の地点で採取された試料、第一段階の高速液体クロマトグラフィーにおける、波長660nmでの検出シグナルの比較を示す。この結果からは、懸濁粒子のサイズ分画試料同士では、試料内の各クロロフィル種とその分布バランスには顕著な差が無いことが明らかとなった。しかし各試料内の懸濁粒子量とクロロフィル存在量は、共に2.7 $\mu\text{m}$ 以上の画分では少なく、1.0-2.7 $\mu\text{m}$  および0.3-1.0 $\mu\text{m}$  のサイズ画分により多くの粒子（植物プランクトン）が存在し、クロロフィル量も多くなることが示された。一方、各ク



**図2 西部北太平洋亜熱帯域の懸濁物から抽出されたクロロフィル色素**

懸濁物試料は現場濾過装置を用いて2016年7月に北緯30度東経157度地点の水深102mでサイズ別に採取された。クロロフィルはアセトンで抽出後、Milli-Q水・ヘキサンとの液液洗浄により夾雑物のおおまかな除去を経て乾固したのちジメチルホルムアミドに溶解して高速液体クロマトグラフィーに導入した。図は上から順に、2.7 $\mu\text{m}$ 以上、1-2.7 $\mu\text{m}$ 、1-0.3 $\mu\text{m}$ の各粒子サイズの試料について、ダイオードアレイ検出器にて検出された波長660nmのシグナルを示す。

いずれの試料にもクロロフィル a (Chl. a) が卓越して存在し、その1割以下のパイロクロロフィル a (PChl. a)、2割前後のフェオフィチン a (Pheo. a) が存在することが示唆された。また特定のサイズの試料のみに存在するクロロフィル種は確認できなかった。これにより当該サイトの試料では、各サイズ間でクロロフィル色素の存在内容に顕著な差異が無いことが確認された。

クロロフィル色素の窒素安定同位体比の測定結果はサイズ間で最大3‰の差が、クロロフィル色素間で最大4‰の差が認められた。海洋表層域で、クロロフィル色素の窒素同位体比が、窒素源である無機態窒素の量と同位体比に相関して、時々刻々と変化することが、既に明らかになりつつある。本研究ではそこに、サイズの異なる粒子の比較という要素も加わっているため、現在、プランクトン種の解析結果、無機態窒素の同位体比変動等の情報等とあわせての解析をすすめている。

### (2) 分析手法の最適化と前処理手法の検討

先に示したように、クロロフィル色素の分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、各クロロフィル色素を分離し個別の試料として収集する精製プロセスが必要となる。本研究では大容量で採取された懸濁態試料について、一段階 HPLC での精製と二段階 HPLC による精製手法とを同時に使い、両者の結果を比較した。

この結果、海洋表層試料においても二種類の HPLC 手法を用いる二段階精製手法の方で、より純粋なクロロフィル化合物が得られることが明らかとなり、二段階 HPLC 手法がここでも有効であることが明らかとなった。

### (3) セルソーターを用いた植物プランクトンの単離手法の有効性検討

本研究ではセルソーターで海洋試料中の植物プランクトンを種類（特定のサイズ範囲にあり、特定の蛍光シグナルに反応する種）ごとに粒子レベルで単離し、その同位体比測定を実施する手法についても検討を行った。

両海域において20万~60万セル程度のシアノバクテリア・ピコシアノバクテリア等の試料を単離することに成功し、いくつかの試料については窒素同位体比の測定結果を得ることが出来た。本手法は長年多くのラボで試みられているものの、未だ数例しか成功報告がない。クロロフィル化合物の同位体比データと共に、貴重な知見となることから、成果として発表を念頭に複製試料を用いた追実験とその分析作業を現在進めている。

本研究で得られたクロロフィル色素の分子レベル窒素同位体測定結果と、栄養塩濃度、硝酸態窒素同位体比のデータの一部は、既に連携研究者が開発している「安定同位体を用いた海洋物質循環モデル」において、植物プランクトンの窒素利用に関する「より正確なパラメーター」として摘要され、大気海洋域での窒素循環に関するモデル解析の結果が、成果として発表された。

クロロフィル色素は、特定の生物活動（光合成）のみに由来する窒素を含む有機化合物である上に、沈降粒子や堆積物中で長期にわたって保存されるという特性から、有機化合物を用いた環境解析研究の分野で「環境中の一次生産者活動を記録する指標化合物」とし



て注目されている。一方で HPLC による単離精製を必要とする分析手法の煩雑さや、微量測定技術の難しさから、研究の主体は、より高濃度で試料を得られ、湖沼・海底堆積物と陸上・沿岸域の富栄養環境中の試料を用いた環境解析(古環境解析)研究の分野に偏ってきた(図3)。このような古環境解析研究においても、基礎知見として、海洋表層域での観測データは必要であり、こうした基礎知見を増やす努力は、研究分野の深化に向けて行ふべき努力の一つであると考えている。本研究で得られたような、化合物レベル同位体比を用いた現在の環境動態に関する知見が、将来の環境解析研究の議論を支える礎となっていくことを期待している。

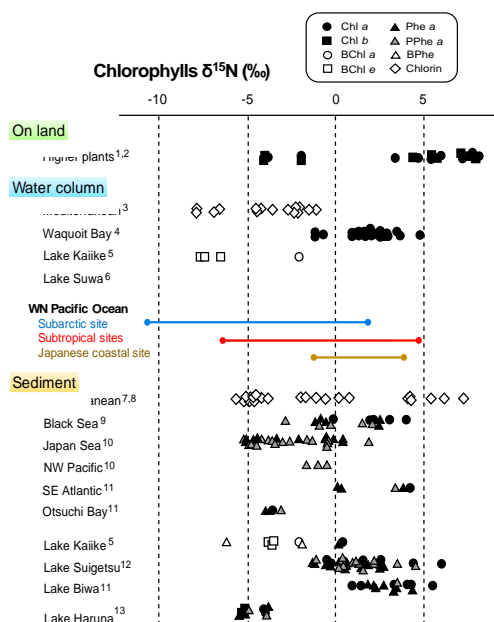


図3 環境クロロフィル色素の窒素同位体比の分布

陸上植物、湖沼および海洋の懸濁粒子試料、湖沼および海底の堆積物から抽出されたクロロフィル色素の窒素同位体比分布。Ohkouchi & Takano (2013) Treatise on Geochemistry から改変。

黒い記号が文献値。赤・青・茶色の直線は、本研究とその関連研究において、西部北太平洋での表層域海水から得られた各クロロフィル色素の窒素同位体比の範囲を示す。

堆積物コアや陸上・沿岸域の富栄養環境中の試料における研究が先行しており、外洋環境における表層域のデータは限られている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Yoshikawa C, Abe H, Aita MN, Breider F, Kuzunuki K, Toyoda S, Ogawa NO, Suga H, Ohkouchi N, Danielache SO, Wakita M, Honda, MC, Yoshida N (2016) Insight into nitrous oxide production processes in

the western North Pacific based on a marine ecosystem isotopomer model. Journal of Oceanography (査読有), 72(3), 491-508.

doi:10.1007/s10872-015-0308-2

吉川 知里, 阿部 瞳, 相田 真希, 小川 奈々子, 菅 寿美, 大河内 直彦, 脇田 昌英, 本多 牧生, 豊田 栄, 吉田 尚弘 (2016) 海洋 N<sub>2</sub>O 排出量の推定を目的とした海洋低次生態系- 同位体分子種モデルの開発. 月刊海洋 (査読無), 48(7), 302-308.

[学会発表](計9件)

Ogawa NO, Yoshikawa C, Suga H, Makabe A, Matsui Y, Kawagucci S, Fujiki T, Harada N, Ohkouchi N, Molecular chlorophyll isotope to elucidate nitrogen cycle in the Western Pacific Ocean, ASLO 2017 Aquatic Sciences Meeting, 2017/03/01, Honolulu Hawaii (USA) 口頭

Yoshikawa C, Ogawa NO, Chisaraishi Y, Makabe A, Matsui Y, Kawagucci S, Sasai Y, Aita M. N, Wakita M, Honda M. C, Fujiki T, Harada N, Ohkouchi N, Nitrogen isotope ratios of sinking particles record autumn progress of nitrification, ASLO 2017 Aquatic Sciences Meeting, 2017/03/01, Honolulu Hawaii (USA) Poster

Ogawa NO, Yoshikawa C, Suga H, Makabe A, Matsui Y, Yoshida O, Kawagucci S, Fujiki T, Harada N, Ohkouchi N, Nitrogen Isotope of Chloropigments in the Nitrogen Cycle in the Ocean, Goldschmidt Conference 2016, 2016/6/29, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)ポスター

Ogawa NO, Yoshikawa C, Suga H, Makabe A, Matsui Y, Yoshida O, Kawagucci S, Fujiki T, Harada N, Ohkouchi N, Compound-specific nitrogen isotopic composition of chloropigments as a tool to access the N-cycle in the surface ocean, The 10th International Conference on the Applications of Stable Isotope Techniques to Ecological Studies (IsoEcol 2016), 2016/4/4, 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)口頭

Yoshikawa C, H Yamaguchi, NO Ogawa, H Suga, A Makabe, S Kawagucci, T Fujiki, N Harada, Na Ohkouchi, Nitrogen isotope ratios of phytoplankton in the northwestern North Pacific, The 10th International Conference on the Applications of Stable Isotope Techniques to Ecological Studies (IsoEcol 2016), 2016/4/4, 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)ポスター

吉川 知里, 笹井義一, 脇田昌英, 本多牧生, 眞壁明子, 布浦拓郎, 松嶋修一郎, 豊田栄, 吉田尚弘, 小川奈々子, 菅寿美, 大河内直彦, 分子内同位体比を用いた海洋 N20 モデルの開発, 日本海洋学会 2016 年度春季大会 2016/3/17, 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区) 口頭

Yoshikawa C, Y Sasai, M Wakita, Makio CH, T Fujiki, N Harada, A Makabe, S Matsushima, S Toyoda, N Yoshida, NO Ogawa, H Suga, N Ohkouchi, Insight into nitrous oxide production processes in the western North Pacific based on a marine ecosystem isotopomer model, 2016 Ocean Science Meeting, 2016/2/24, New Orleans, Louisiana (USA)ポスター

小川奈々子, 吉川知里, 藤木徹一, 原田尚美, 大河内直彦, 北太平洋亜寒帯域 (K2 サイト)におけるクロロフィルの窒素同位体比, 2015 年度日本地球化学会第 62 回年会, 2015/9/17, 横浜国立大学常盤台キャンパス (神奈川県横浜市) 口頭

吉川知里, 笹井義一, 脇田昌英, 本多牧生, 松嶋修一郎, 豊田栄, 吉田尚弘, 小川奈々子, 菅寿美, 大河内直彦, 海洋生態系 同位体分子種モデルを用いた西部北太平洋における N20 生成プロセスの解明, 2015 年度日本地球化学会第 62 回年会, 2015/9/16, 横浜国立大学常盤台キャンパス (神奈川県横浜市) 口頭

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 奈々子 (OGAWA, Nanako O.)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・主任技術研究員

研究者番号: 80359174

### (2) 連携研究者

吉川 知里 (YOSHIKAWA, Chisato)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・技術研究員

研究者番号: 40435839

### (3) 研究協力者

菅原 春菜 (SUGAHARA, Haruna)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・ポストドクトラル研究員

研究者番号: 50735909