

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510004
 研究課題名（和文） 河口域生態系における有機物起源解析法の高度化：化合物別安定同位体比の応用
 研究課題名（英文） Provenance analyses of natural organic matter in estuaries using isotope compositions of individual chemical compounds
 研究代表者
 宮島 利宏 (Toshihiro Miyajima)
 東京大学・海洋研究所・助教
 研究者番号 20311631

研究成果の概要：生物地球化学的物質循環上重要な各種の有機・無機化合物の炭素・窒素・酸素安定同位体比を手掛かりとして、河口域における物質の起源と変換プロセスを明らかにする研究手法を開発検証した。またこうした手法により得られるデータを効果的に利用して陸域から海域への物質輸送の在り方を評価するためのモデルによる解析手法を開発・提案した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：汽水域・安定同位体比・炭素循環・窒素循環・モデル

1. 研究開始当初の背景

河口域は陸域に起源を有する物質が海洋に流出する出口に相当する通過点であるが、陸域由来の栄養塩による植物プランクトンの一次生産によって生産される有機物や、マングローブ・塩性湿地のような潮汐湿地において生産される有機物を含め、多様かつ豊富な有機物が混在し、豊かな水産資源を支えている。河口域の水質・環境を良好に保ち、水産資源の持続的利用を図るためには、こうした多様な有機物の調和の取れた供給状況を維持促進することが不可欠であるが、従来から行われている懸濁物量 (SS)、全窒素・全リンなどのバルク成分のモニタリングのみでは多様な物質供給の状況を的確に把握す

ることはできず、新しい方法論が必要とされている。その中でも軽元素の安定同位体比を応用する研究手法は既に 30 年近くの利用実績があり、多くの成果を上げている。安定同位体比は単一の起源においても変動幅があるほか、同位体分別の影響を受けるなどの問題もあり、この手法だけで有機物の起源に関して確定的な結論を得ることは必ずしも容易ではない。しかしながら他の調査手法に比べてサンプリングや試料処理が比較的容易であり、一度の調査で数多くのデータが得られること、データを解釈する上で必要となる諸情報の蓄積が広がって解釈の信頼性が高まっていることから、予備調査やモニタリング的な用途も含めて、幅広く利用されるよう

になっている。

近年、ガスクロマトグラフ等を利用して化合物別に同位体比を測定する技術が急速に普及した。従来の有機物全体の同位体比を利用する方法と比較して、化合物別安定同位体比ではそれに影響する環境要因やプロセスを絞り込めることから、物質の起源や関与するプロセスの状況に関して、よりシャープな情報を獲得できる可能性がある。また特定の生物にしか含まれない成分（バイオマーカー）の同位体比に着目する手法、化合物間の同位体比の分布パターンを指標とする方法など、環境解析への新しい応用が次々に切り開かれつつある。

しかしながら、こうした手法の中には、分析技術としては既に確立して実用的なレベルに達しているにもかかわらず、実際の生態系への応用が進んでいない場合が多く見られる。その理由として、第一には応用例が少ないこと自体が、こうした手法の有用性に対して疑問を持たれる一因になっていることが挙げられる。また、より大きな問題として、こうした手法により得られるデータを適切に解釈して有用な結論を導くモデルの研究が立ち遅れているという要因がある。これまでに普及している解釈モデルは、同位体マスバランスを用いて混合物の起源解析を行うモデルか、もしくはレイリーの同位体分別モデルを応用してプロセス評価を行うモデルのいずれかである。実際の自然現象においては、同位体マスバランスに基づく混合プロセスと同位体分別を伴う反応プロセスとが常に並行的に作用している。したがって自然現象を正しく解釈するためには、同位体マスバランスと同位体分別の両方を適切に考慮したモデルが用意される必要があるが、そのようなモデルの研究が現状では立ち遅れているのである。

2008年度には、他の同位体環境科学の研究者と共同で、その時点でのこの分野における内外の研究成果を横断的に紹介した『流域環境評価と安定同位体』という書籍を刊行した（「図書」の項参照）。ここに紹介されている数多くの研究例は、いわば上記の混合モデルかレイリーモデルかいずれか一方だけで概ねきれいに説明できるような、比較的単純な事例だけを集めたものと見ることも可能である。本研究の趣旨は、このような二極分化の限界をささやかなりとも超え出ることにはかならない。

2. 研究の目的

本研究では、河口域における生物地球化学的に重要な有機・無機物質の起源と動態を解明するために、化合物別安定同位体比分析の手法の適用を試み、また化合物別安定同位体比データを有効に活用するためのモデルを

提案することを目的とした。化合物別同位体比分析の手法には、大別して、水やメタン、二酸化炭素、硝酸イオンなど、単一の化学物質を分離してその同位体比を個別に分析する方法と、キャピラリー・ガスクロマトグラフィを応用して、脂肪酸や炭化水素、アミノ酸等のように、同一の方法で分離できる類似した一連の化合物の同位体比を同一試料から分析する方法とがある。本研究では、前者の中から二酸化炭素（溶存全炭酸）の炭素安定同位体比と硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比を、後者の中からはアミノ酸の窒素同位体比分析を代表として採り上げた。

3. 研究の方法

(1) 分析方法

溶存全炭酸の炭素安定同位体比測定には、研究代表者が以前に開発したヘッドスペース法とGC/C/IRMSを組み合わせた方法を用いた（Miyajima et al. 1995）。硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比分析には、硝酸イオンを脱窒菌によって亜酸化窒素に還元したのち、亜酸化窒素の窒素・酸素同位体比を測定する方法を用いた（Casciotti et al. 2002）。ただしこの方法が使えない場合には、アンモニウムに還元して回収したのちにその窒素同位体比だけを測定する方法を用いた（Sigman et al. 1997）。アンモニウム・イオンの窒素安定同位体比の分析にはフィルターに濃縮捕集したのちに元素分析計経由の同位体比分析を行う方法によった（Holmes et al. 1998）。アミノ酸の窒素同位体比分析には、生体試料を酸加水分解したのちにアミノ酸をN-イソプロピル・ピバロイルエステル化し、GC/C/IRMSにて分析する方法を用いた（Chikaraishi et al. 2008）。

硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比分析にあたっては京都大学生態学研究センターの由水千景、陀安一郎、永田俊の各氏にご協力頂いた。またアミノ酸の窒素安定同位体比分析にあたっては海洋科学技術センターの力石嘉人、柏山祐一郎、小川奈々子、大河内直彦の各氏からご指導を頂いた。ここに深甚の謝意を表す。

化学物質の物質質量、濃度、元素組成などの分析には、栄養塩オートアナライザー、CHNコーダー、NDIR式TOCメーターなど、標準的な機器分析法を使用した。

(2) 現地観測とサンプリング

現地調査は2007年9月、2008年6月、12月の3回、八重山諸島の河口域、マングローブ域において実施した。

本研究の補助金によるのではない、他の共同研究プロジェクトの現地調査の機会に採集された試料の一部をも、本研究の目的のために使用させて頂いた。特に基盤研究B（海外学術）「熱帯海草藻場における堆積物攪乱

の影響評価：津波と局所的環境変動の複合効果」(研究代表者：仲岡雅裕)においてアンダマン海沿岸の海草藻場・マングローブを調査した際に得た試料による分析結果は、本研究成果の中心的内容の一部となっている。また新学術領域研究「複合ストレスの包括的評価・予測とサンゴ礁生態系応答モデル解析」(研究代表者：灘岡和夫)において石垣島サンゴ礁域において採集された試料を一部利用している。研究代表者並びに他の分担者の方々のご協力とご理解に謝意を表したい。

また現地調査とは別に、東京大学海洋研究所の設備によって、同位体分別を評価するための培養実験を実施している。

4. 研究成果

(1) 溶存全炭酸の炭素安定同位体比

研究代表者は、2005～06年度に受領した科研費(基盤C)による研究の中で、熱帯河川の河口域の溶存全炭酸は海水起源・陸水起源の溶存無機炭素の他、河岸のマングローブに由来する無機炭酸、石灰岩の風化に由来し地下水によって供給される無機炭酸などから構成された非保存的な挙動を示すことを例証した。これらは起源ごとに異なる濃度と同位体組成を示すことから、同位体マスバランスに基づく混合モデルを工夫することによって各成分の混合比を定量化できることを示した。

本研究ではさらにこの手法を推し進め、同位体マスバランスに、二酸化炭素のガス交換に伴う同位体分別効果を加味した新たな混合モデルを提案した(雑誌論文)。このモデルを用いて、流域のマングローブから河口域に放出される二酸化炭素の量を評価した結果、従来の同位体マスバランス・モデルによる推定は真の放出量の数分の1程度しか見積もれない過小評価になっていたことが明らかになった。また従来のマングローブの炭素循環研究において最大のミッシングシンクであった、海水の潮汐流を媒体としての溶存無機炭素フラックスについて、それを定量的に評価する一つの有力な方法を与えることに成功した。

この手法を応用して、亜熱帯マングローブにおける炭素循環の季節変化を解明するための現地調査を実施した。得られたデータは現在解析中で、未公表となっている。

(2) アミノ酸の窒素安定同位体比

アミノ酸の同位体比分析は、研究代表者の所属機関ではこの研究課題以前には実施例がなく、研究のインフラが未整備であったことから、研究期間の前半は分析自体を実行可能にする準備作業に充てられた。その結果、一部なお不備が残っているものの、現在ではひとまず信頼に足る測定結果が出せるようになっている。

アミノ酸の窒素同位体比分析は特に食物網研究における有用性が従来から指摘されており、食物段階を構成する個々の生物の試料が得られなくても、目的の動物だけのアミノ酸同位体比分析によって、その動物の食物段階と基礎生産者が推定できるというメリットが強調されている。それに対して河口域生態系の物質循環の見地からは、むしろバクテリアなどの分解者によるアミノ酸同位体比分布のシャッフリング効果が重要である。この点に着目することによって、分解者が窒素源として何を利用しているのか、また分解者を介してのデトライタス食物網の流れを解明できる可能性が開かれる。

本研究の枠内では、アミノ酸の窒素同位体比のパターンがバクテリアの介在によってどのような影響を受けるのかを明らかにするための実験的研究を行った。材料としては東京湾の海水から分離されたバクテリア、及びATCCから購入された菌株を用い、制御された栄養条件下で培養を行ったのち、細胞を回収してそのアミノ酸窒素同位体比分布を観測した。その結果、有機態窒素(グルタミン酸)を基質として培養した場合に起こりうる同位体分別の規模、無機態窒素(アンモニウム)を窒素源とした場合のアミノ酸窒素同位体比分布の特徴、基質の炭素：窒素比が同位体分別係数に及ぼす影響などについて有意義な結果が得られた。

現在のところ、実験の反復数や設定条件の範囲が不足しているため、まとまった成果としては公表を差し控えているが、今後の研究において採るべき道筋は明らかになっており、平成21年度以降も別の科研費のサポートのもとに研究を進展させている。これらの成果は、生態系内におけるデトライタスによる物質・エネルギーの移動を解明するうえで、新しい有力な手法を提供することになると期待されている。

(3) 硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比

水中硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比は、硝酸の起源によって特徴的な値を示すと共に、水域内での脱窒や同化による消費過程に置ける同位体分別効果をも鋭敏に反映することから、起源と除去過程の双方を同時に評価することができる指標として期待されている。その反面、前述のように起源の違いによる混合過程と内部プロセスによる同位体分別とを同時に評価するための信頼できるモデルの開発が立ち遅れていた。

本研究では、河川流程における硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比の変化を栄養螺旋モデルに当てはめ、硝酸の起源と内部消費によって変化を記述する式を窒素・酸素両同位体比についてそれぞれ立てたうえで、実測データに同時回帰してパラメータを決定するというアプローチを新規に開発した。この方

法を、アンダマン海に流入する2河川に適用した結果、人為負荷の小さい河川では硝酸イオンの動態は河川内での硝化・脱窒によって制御されているのに対して、富栄養化の進んだ河川では、それは外部からの人為起源硝酸イオンの負荷と内部プロセスによるその除去とによって支配されているという、期待されるとおりの結論が得られた。このことはまた、河川内プロセスが人為起源窒素負荷の除去と海域への負荷の低減という重要な役割を果たしていることを例証している。この研究成果は既に論文にまとめ、国際的に有力な学術誌に投稿した(審査中;学会発表1も同様の趣向による)。

河口域においても、硝酸イオンの窒素同位体比を利用して河口域内での硝化・脱窒の量的寄与や時空間分布を推定する試みを行った(雑誌論文、学会発表)さらにこの成果を、同位体比を加味した生態系流動場モデルに適用することにより、系外との物質交換に比較したときの内部循環プロセスの重要性を定量的に評価することに成功した(学会発表)。

一方、熱帯・亜熱帯の河口域においては、硝酸イオンはその酸素安定同位体比のみが塩分勾配に沿って顕著に上昇するという特徴的な現象が、アンダマン海でも八重山沿岸でも一貫して観測された。これは上記のような、外部との水媒体による物質交換と系内での脱窒・再生プロセスだけを考慮したモデルでは説明が困難であった。

この現象の原因を説明する有力な仮説の一つとして、大気汚染物質に由来する窒素含有沈着物の寄与が挙げられる。大気汚染物質に由来する沈着物の硝酸の酸素同位体比は極端に高いことが知られている。このような硝酸が河口域のマングローブに付着して次第に蓄積し、最終的にはその落葉(リター)が潮汐と共に海水に浸されることによって、沈着物が海水に溶解して河口域に流出することが予想される。

実際、マングローブの葉から抽出された硝酸イオンは+61‰以上の高い酸素同位体比を示した。また八重山地方で採集された降雨には、季節によっては50 μM以上の高濃度の硝酸イオンが含まれ、その酸素同位体比は+66‰以上と極めて高かった。この事実を利用すると、硝酸イオンの酸素同位体比の塩分勾配を精密に調査することによって、河口域への大気降下物由来の窒素フラックス(越境汚染)を評価できる可能性がある。しかしながら硝酸イオンの酸素同位体比を上昇させるプロセスは大気汚染物質以外にも考えられることから、今後なお慎重な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Miyajima T, Tsuboi Y, Tanaka Y, Koike I (2009) Export of inorganic carbon from two Southeast Asian mangrove forests to adjacent estuaries as estimated by the stable isotope composition of dissolved inorganic carbon. *Journal of Geophysical Research - Biogeosciences* **114**, G01024, doi:10.1029/2008JG000861 査読有

Sugimoto R, Kasai A, Miyajima T, Fujita K (2009) Nitrogen isotope ratios of nitrate as a clue to the origin of nitrogen on the Pacific coast of Japan. *Continental Shelf Research* **29**: 1303-1309 査読有

Umezawa Y, Miyajima T, Koike I (2008) Stable nitrogen isotope composition in sedimentary organic matter as a potential proxy of nitrogen sources for primary producers at a fringing coral reef. *Journal of Oceanography* **64**: 899-909 査読有

[学会発表](計 6件)

宮島利宏, 由水千景, 大手信人, 眞壁明子, 木庭啓介, 陀安一郎, 永田俊: 硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比から見た琵琶湖の窒素循環. 日本陸水学会. 2007.09.11 茨城大学

笠井亮秀, 杉本亮, 宮島利宏, 藤田弘一: 伊勢湾における無機態窒素の安定同位体比特性. 日本水産海洋学会. 2007.11.23. 東海大学海洋学部

杉本亮, 笠井亮秀, 宮島利宏, 藤田弘一: 窒素安定同位体比に基づく伊勢湾における低次生産機構の解明. 日本水産海洋学会. 2007.11.23. 東海大学海洋学部

小関祥子, 山中寿郎, 宮島利宏, 小島茂明: 安定同位体比を用いた多摩川河口干潟に生息するヤマトシジミの食性解析. 日本ベントス学会. 2008.9.6. 熊本県立大学

梅澤有, 宮島利宏, 田中泰章, 大葉英雄, 林原毅, 由水千景, 陀安一郎, 永田俊: 大型藻類の硝酸塩取り込みに伴う同位体分別効果の定量. 日本海洋学会. 2007.9.28. 広島国際大学

Sugimoto R, Kasai A, Miyajima T, Fujita K.: Modeling of Phytoplankton Production in Ise Bay, Japan: Application of Nitrogen Isotopes to Identification of DIN Sources. EMECS, 2008.10.27. 上海

[図書](計 5件)

宮島利宏「なぜ安定同位体比なのか 同位体比の基礎知識とその読み方」『流域環

境評価と安定同位体』(永田・宮島編)京都大学学術出版会. 2009.2. p.13-32

宮島利宏・高津文人「化学風化と河川内炭素循環プロセス 溶存無機炭素安定同位体比の利用」『流域環境評価と安定同位体』(永田・宮島編)京都大学学術出版会. 2009.2. p.111-132

金詰九・宮島利宏・永田俊「有機物の生産と分解(1)」『流域環境評価と安定同位体』(永田・宮島編)京都大学学術出版会. 2009.2. p.133-152

宮島利宏「河口域における懸濁態有機炭素負荷の起源推定」『流域環境評価と安定同位体』(永田・宮島編)京都大学学術出版会. 2009.2. p.163-186

宮島利宏「淡水性堆積物における嫌氣的微生物生態系の解析」『流域環境評価と安定同位体』(永田・宮島編)京都大学学術出版会. 2009.2. p.217-239

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮島 利宏

東京大学・海洋研究所・助教

研究者番号： 20311631

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

なし。