

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06196

研究課題名（和文）有機態リン再生過程とリン酸-酸素安定同位体解析に基づくリン循環の解明

研究課題名（英文）Study on DOP hydrolysis processes of lake water phosphorus cycling based on the enzyme-mediated DOP regeneration rates and the oxygen isotopic composition of phosphate.

研究代表者

池谷 透 (Ikeya, Tohru)

京都大学・生態学研究センター・研究員

研究者番号：70361590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：湖水をリン酸（モノ- & ジ-）エステラーゼで加水分解して生成するオルトリン酸の増加量をイオンクロマトグラフィーで測定し、有機態リン濃度を定量する方法を開発し、モリブデン青法では、従来、見落とされていた酸易分解性成分の有機態リンをリン酸エステル結合の種類やサイズ分画ごとに定量した。さらに、蛍光生成基質の分解速度キネティクスと組み合わせることによって、酵素反応速度論に基づく有機態リンの回転時間を求めた。湖水のリン酸-酸素安定同位体比分析との同時調査を実施することにより、分解基質濃度と同位体比の対応関係を明らかにし、両者の季節変動や流入負荷の変動による半閉鎖性水域のリン循環への影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機態リンがリン酸エステラーゼで分解される際、同位体交換平衡によって生じるリン酸-酸素安定同位体比の変化は、野外に適用可能なリン循環の指標として用いられるようになった。一方、有機態リンの測定は、従来、化学的分解や分子量に基づく分析操作上の定義に基づく把握に留まっていた。本研究では、湖水の酵素加水分解によって生成したオルトリン酸をイオンクロマトグラフィーで定量することによって分解酵素種ごとに有機態リン濃度を測定する方法を確立し、現場の有機態リン基質の回転時間を酵素反応速度論から求めることにより、有機態リン基質動態とリン酸-酸素安定同位体比変化の対応関係について議論することが可能になった。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel method to determine organic phosphorus concentration's of lake water by determination of orthophosphate with ion chromatography, after through decomposition with a phospho-mono-esterase or combination of a phospho-mono-esterase and de-esterase ('s). It allowed to determine acid-labile organic phosphorus concentration's based on the (mono-, and di-)-esterase-species for digestion and the size fraction of lake water. A turnover time for each esterase-species was also determined from the esterase-species concentration's and the decomposition kinetics determined experimentally with fluorescent substrates. The investigations combined with phosphate oxygen isotope analysis have elucidated the relationship of these values, and the seasonal changes and the effects of phosphorus-loading on the phosphorus cycling in a semi-enclosed water.

研究分野：水圏生態学

キーワード：有機態リン オルトリン酸 イオンクロマトグラフィー リン酸酸素安定同位体 リン酸エステラーゼ  
エクストンゼイム 微生物メタゲノム 次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

微生物群に取り込まれる無機態のオルトリン酸が栄養制限状態で枯渇した後も、有機態リンは利用可能なリンのプールとして存在することから、リン循環の理解には有機態リンのプールサイズとオルトリン酸の再生速度の把握が重要である。しかしながら、有機態リンの把握は懸濁態・溶存態、酸分解性(有機態)リン、あるいは、溶存態リンの分子量サイズという分析操作上の定義にとどまり、循環過程に対応する有機態リンの分子種同定や生物による利用は理解の途上にある。微生物が細胞外のリンを利用する際に細胞膜のリン吸収システムを介して無機態リン(DIP)のオルトリン酸( $P_i$ )が取り込まれるが、モリブデン青法(JIS K 0102 46.1.1)で定量する溶存反応性リン(SRP)は、反応試薬として加える硫酸によって易分解性の有機態リンがオルトリン酸に分解されるために無機態リンが過大評価の傾向にある。そのため、SRP測定に基づく有機態リンの分解量見積もりでは、有機態リン分解の寄与が過小評価される可能性がある。湖水の $P_i$ 濃度はMaruo *et al.* (2016)によるイオンクロマトグラフィー(IC)の導入によってnmol/Lオーダーの高感度な直接定量が可能になった。Yi *et al.* (2021)は水深が浅く富栄養湖な琵琶湖周辺内湖の湖水および流入水について $P_i$ とSRPを同時測定した。その結果、 $P_i$ とSRPの量比には0.1~1の変動があり、微生物活動に由来する有機物が原因であることを見いだした(Yi *et al.* 2020)。溶存態全リン(TDP)とSRPとの差分(SUP: Soluble Unreactive Phosphate)だけではなく、SRP成分内にも有機態リンが含まれている可能性がある。

一方、リンには複数の安定同位体が存在せず、リン自体をトレーサーとして利用できない。このため生物地球化学的リン循環の解明は、炭素や窒素に比べてリン循環の解明は遅れをとった。放射性同位体をリンのトレーサーとして容器内で評価する試みもあるが、実験スケールが限定的かつ実施の困難さのために限界がある。近年、生態系のリン循環速度や栄養負荷起源を定量化するために、リン酸に含まれる酸素の安定同位体(リン酸-酸素安定同位体)比をトレーサーとする試みが提唱され、その理論背景の検証と野外への適用が試みられるようになった。この手法を用いると野外の開放系でのリンの挙動の定量化が可能になる。すなわち、起源鉱石由来のリン酸が微生物に取り込まれたり、有機態リンがリン酸エステラーゼによって加水分解を受けたりするときにリン酸に含まれる酸素原子の安定同位体比が同位体交換平衡で変化することがリン循環の様子を知る手がかりになる。これは、湖内に負荷されるリンのリン酸-酸素安定同位体比が湖水の値と異なる場合に、湖内への流入負荷と同位体交換平衡の影響が湖水の溶存態リンのリン酸-酸素安定同位体比の変化にフットプリントとして残されるため、リン酸-酸素安定同位体比がリン循環指標になることに基づいている。安定同位体のリン循環速度の見積もりは、有機態リンの分子種の同定を回避したリン循環速度推定のブレイクスルーにもつながると考えられる。しかしながら、野外のリン酸-酸素安定同位体比から推定されるリンの循環速度がどの程度妥当であるか野外で検証した研究は無く、対応関係を裏付ける検証が課題とされている。

## 2. 研究の目的

微生物群の細胞外酵素であるリン酸エステラーゼの特異性に基づく有機態リン分子種の分解過程と生物の利用履歴情報を含むリン酸-酸素安定同位体の二つの側面からリン循環速度を見積もることにより、リン酸-酸素安定同位体の交換平衡反応の野外での変動過程-有機態リンの分解によるリンの再生過程-リン循環に寄与する微生物群動態の関係を解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 有機態リンの定量

$P_i$ 濃度の過大評価を避けるため、本研究では陰イオン分析カラム(AS23, Dionex)を用い、

イオンサプレッサーをエクスターナルモードで連結した IC 分析法で  $P_i$  濃度を測定した (Maruo *et al.* 2016)。アルカリホスファターゼ (AP)、ホスホジエステラーゼ I (PD-I)、無機ピロホスファターゼ (PPase) の加水分解反応で生じる  $P_i$  濃度から有機態リン濃度を測定した。

## (2) 分解キネティクス測定

現場の分解速度を求めるため、4-MUP、MUPyrP、BisMUP (Bis(4-methylumbelliferyl)phosphate) の添加後、リン酸エステラーゼによって生成するウンベリフェロンの蛍光強度からリン酸モノエステルとピロリン酸ジエステルの分解反応キネティクスを求めた。

## 4. 研究成果

### (1) 溶存態有機態リンの酵素特異的分解成分とサイズ画分ごとの挙動

流入水・上流側の柳平湖・下流側の平湖の3箇所で採水を行い、GF/F フィルターと  $0.2 \mu\text{m}$  以下のろ液の有機態リン濃度を定量した (池谷・丸尾 2021)。溶存態画分の  $0.2 \mu\text{m}$  以下画分に加え、 $0.2 \mu\text{m}$  以上の粒子状画分にも有機態リン成分が存在し、分解可能なリン循環を構成していると考えられた (図 1)。こうした粒子状画分は浮遊微生物の排出物や遺骸の分解産物由来と考えられた。こうした粒子状画分が細分化し、 $0.2 \mu\text{m}$  以下の溶存態へと移行すると考えられる。GF/F ろ過画分と  $0.2 \mu\text{m}$  以下画分、共に、平湖では AP 分解成分の濃度が高かった。反対に、流入水では AP 分解成分の濃度が低く、測定対象の全有機態リンのなかの存在割合も低かった。 $0.2 \mu\text{m}$  以下の画分は PPase と PD-I の分解成分濃度が流下方向に向かってみかけ上減少し、AP 分解成分の濃度が増加した。

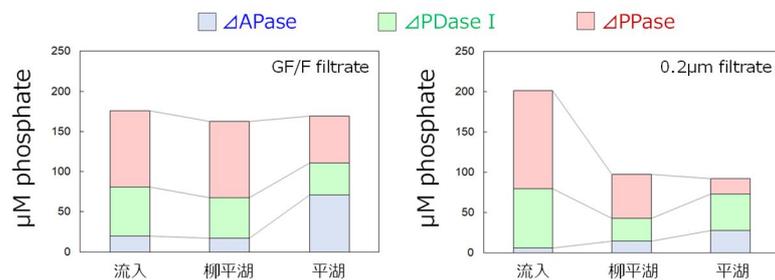


図1. リン酸エステラーゼを用いた有機態リン濃度の定量結果 (左: GF/Fフィルターろ液; 右:  $0.2 \mu\text{m}$  フィルターろ液)。 $\Delta$ APase: アルカリホスファターゼ分解成分;  $\Delta$ PDase I: ホスホジエステラーゼ I 分解成分;  $\Delta$ PPase: 無機ピロホスファターゼ分解成分

### (2) サイズ画分ごとの溶存態有機態リンの分解速度

現場湖水の分解活性は、フィルター濾別でサイズ別画分ごとに測定を行ったところ、リン酸モノエステラーゼ、リン酸ジエステラーゼ、共に、 $2 \mu\text{m}$  以上の藻類画分に全画分の 59~87% 程度の最も高い分解活性が認められ、リン酸モノエステラーゼは、 $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$  以上の細菌画分にも 22~33% 程度の分解活性が認められた (図 2)。一方、リン酸ジエステラーゼについては  $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$  以上の細菌画分に分解活性が認められなかった。 $0.2 \mu\text{m}$  以下の溶存態画分にはリン酸モノエステラーゼ、リン酸ジエステラーゼの活性が、各々、全画分の 4~19%、13~18% 程度と 2 割以下の寄与に留まることが分かった。したがって、残りの 80% 以上は、細菌や藻類など、浮遊微生物群の細胞表層にあるエクトエンザイムの分解活性に由来すると考えられた。リン酸エステラーゼを用いた溶存態有機態リンの定量を行ううえで酵素分解反応には  $0.2 \mu\text{m}$  以下のろ液画分を供することにより、現場湖水中に存在する有機態リンの分解活性による酵素分解活性を抑制できると考えられた。

### (3) 溶存態有機態リンのエステラーゼ分解成分と操作的定義による溶存態リン画分の関係

2017 年 4 月、7 月、10 月の現場湖水と流入水について、リン酸 - 酸素安定同位体と溶存態リン画分を含む各種湖水成分、浮遊微生物組成について調査を実施し、総合的な解析を行った。従

来、無機態・有機態リンは、比色定量の際に強酸を用いるモリブデン青法と、ペルオキシ二硫酸カリウム添加と加熱処理（120℃, 45 min）を組み合わせた分解法が、各々の安定した定量結果を得る方法として常用されることが多かった。AP、PD-I、PPase の3種のリン酸エステラーゼで加水分解を受ける易分解性の有機態リン濃度を操作的定義による溶存態リン画分の関係を確認したところ、SRP画分からPiを差し引いた濃度との間に最も高い相関関係が認められ、有意な相関関係が得られた（ $P < 0.001$ ）。このことから、これまで無機態リンの簡便な測定法として用いられてきたSRP画分には、実際には有機態リンが含まれていることが示唆される。すなわち、リン酸エステル結合の加水分解を前提とするオルトリン酸の再生過程について議論をする場合に、TDPとSRPの差分を有機態リン（DOP）の定義としてきた従来の認識とは全く異なり、微生物群の作用による機能的な面から有機態リンの実態を捉え直す必要があることが本研究から示唆された。

0.2 μm以上の粒子状画分も、浮遊微生物の排出物や遺骸の分解産物に由来する有機態リン成分が存在することも示された。こうした粒子状画分の有機態リンは、従来のリンの分別定量では、全リン（TP）と溶存態全リン（TDP）の差分、すなわち、粒子状リン（PP）として測定されてきた画分に相当する。こうした粒子状有機態リンが、溶存態有機態リンとは連続的なサイズ組成スペクトラムとなって水中の有機態リンプールを構成していると考えられる。

Worsfold *et al.* (2008) によるDOPの構成要素のスキームでは、リン酸エステル結合を有するAP、PD-I、PPaseの分解成分は、いずれもDissolved Molybdate Unreactive P (MUP)の画分の構成要素とされているが、現場湖水を用いて得られた本研究の定量結果では、むしろDissolved Reactive P (DRP)、すなわち、SRPの構成要素と考えられた。

#### （4）溶存態有機態リンの分解活性の季節変化

2017年4～10月の柳平湖と平湖の現場湖水の溶存態有機態リンの分解活性は、リン酸モノエステラーゼ、リン酸ジエステラーゼのいずれも7月以降に最大速度が増加するような季節変化が確認された。7～9月は、下流側の平湖のほうが柳平湖より最大速度と半飽和定数の両方ともに大きかった。9月初旬には、集水域の水田への灌漑水の供給が停止するため、柳平湖と平湖の滞留時間は灌漑期の約3倍に増加する（池谷・伴, 2020; 池谷ほか, 2024a）。このため、柳平湖と平湖は9月以降、リン制限が厳しくなる傾向にあるが、有機態リンの分解活性の増加は、そうしたリン制限の強化と同期していた。さらに、9～10月は平湖では、引き続き、リン酸モノエステラーゼ、リン酸ジエステラーゼのいずれも最大速度が増加し、半飽和定数は小さくなった。平湖は柳平湖より容積が大きく滞留時間が柳平湖より長いために、リン制限がさらに厳しくなる傾向があるためと考えられた。9～10月の平湖の酵素キネティクスの変化は、リン制限が厳しくなることによって両エステラーゼ、共に、基質に対して親和性が高くなるような質的な変化が生じ、低濃度での分解活性が飛躍的に増加したことを示唆する。一方、柳平湖では、10月の調査直前の降雨によって高濃度のリンが流入し、リン制限が緩和された。リン酸モノエステラーゼとリン酸ジエステラーゼの最大速度は7月のレベルに低下し、半飽和定数も小さくなった。こうした変化はリン制限の緩和の影響と考えられ、10月は集水域からのリンの流入の影響が柳平湖のみに及ぶような短期的な変動によって柳平湖と平湖では対照的な状況が生じていた。

10月の平湖と平湖藻類の種数とメタ16S解析による細菌類のOTU richnessは、9月に比べて、各々、6～22%減少し、柳平湖の藻類の総細胞密度とメタ16S解析の細菌類のRead numberは、各々、57%、24%減少した。一方、10月の平湖の藻類の総細胞密度は9月に比べて17%減少したのに対して細菌類のRead numberは1.7倍に増加し、藻類総細胞密度と細菌類のRead numberの

変化は異なっていた。こうした変化とリン酸モノ・ジエステラーゼ活性の変化には、特定の種の出現などの微生物群動態や形質の誘導が関係している可能性が考えられた。

#### (5) 溶存態有機態リンのエステラーゼ分解成分の回転時間見積り

内湖の 0.2  $\mu\text{m}$  以下のろ液画分についてリン酸エステラーゼ分解成分ごとに有機態リン濃度を測定し、酵素キネティクス測定に基づいて各成分の回転時間を見積もった。4 月は動物プランクトンによる藻類捕食が卓越するために 1m 程度にまで透明度の上昇が例年観察される。リン酸モノエステラーゼ活性は細菌類の密度に比例して柳平湖より平湖が高く、AP 分解成分の回転時間は短かった。一方、PD-I、PPase 分解成分は平湖の濃度が高く分解活性も低く、回転時間は 1.5~1.7 倍長かった。リン酸ジエステラーゼ活性の 80% 以上が 2 $\mu\text{m}$  以上の藻類画分にあり ( 図 2 )、4 月はプラン

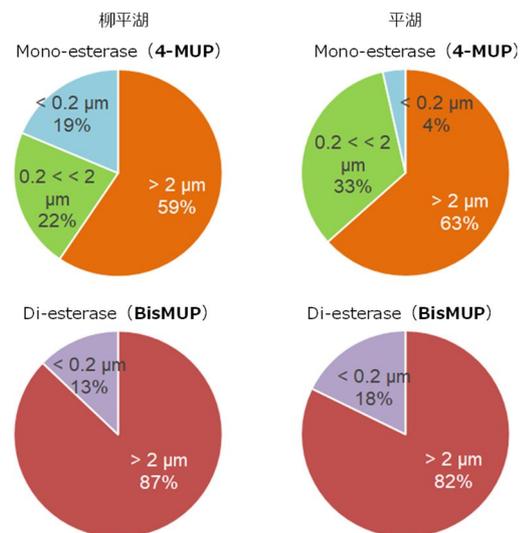


図2. MUPとBisMUPを分解基質としてサイズ画分ごとに測定したリン酸モノエステラーゼとリン酸ジエステラーゼによる現場湖水分解活性の最大速度。

クトン藻類密度が低いことが関係していると考えられた。7月の調査では、湖水の滞留時間は20日で流入量は安定し、リン制限で平湖のAP分解成分が減少するなかにあって平湖の各有機態リン成分の回転時間は柳平湖より短くなり、再循環への寄与が示唆された。10月の柳平湖は直前の降雨でリンが流入し、リン制限から緩和された直後と考えられた(柳平湖のAP分解成分は未検出)。リン制限が最も厳しい10月の平湖は溶存態有機態リン濃度が極めて低く、分解速度が高いために回転時間が最も短かった(平湖のPD-I・PPase分解成分は未検出)。反対に、10月の柳平湖はPD-I・PPaseの分解活性が低下し、回転時間が最も長かった。

#### (6) 溶存態有機態リン成分動態とリン酸 - 酸素安定同位体から推定されるリン循環

有機態リン動態調査と並行して同水域の流下方向に沿ってリン酸 - 酸素安定同位体比の変化を求め、生物学的過程によるリン循環やエクトエンザイムによる有機態リンの加水分解の影響を検討した (Yi *et al.* 2024)。この解析では閉鎖性水域内の変化に対して定常状態を仮定するとリン酸 - 酸素安定同位体比が再循環プロセスに起因する同位体平衡値に向かって流下方向に減少し、7月のリンの再生率は最も高く10月は7月に次いでリンの再生率が最も高い結果となった。7月と10月のリン酸 - 酸素安定同位体比の変化には、有機態リンの分解過程で生じる同位体分別効果も考えられるため、両解析アプローチの時間的・空間的スケールを揃えた検討を予定している。4月のリン酸 - 酸素安定同位体比の変化についてはリン酸モノ・ジエステラーゼ活性のバランス変化と関連する浮遊微生物群動態の影響が示唆された。

#### (7) まとめ

有機態リンの分解量と酵素キネティクスから浮遊藻類と細菌類の存在比とリン酸モノ・ジエステラーゼの相対活性の関係について検討した。本研究の発展として9~10月に見られた質的な酵素キネティクスの変化と対応する浮遊細菌群のRNA-seq解析も予定している。こうした機能解析によってリン酸酸素同位体比の同位体分別効果等の影響因子と有機態リン動態解明のさらなる発展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishida Takuya, Uehara Yoshitoshi, Iwata Tomoya, Cid-Andres Abigail P., Asano Satoshi, Ikeya Tohru, Osaka Ken'ichi, Ide Jun'ichiro, Privaldos Osbert Leo A., Jesus Irisse Bianca B. De, Peralta Elfritzson M., Tri?o Ellis Mika C., Ko Chia-Ying, Paytan Adina, Tayasu Ichiro, Okuda Noboru	4. 巻 53
2. 論文標題 Identification of Phosphorus Sources in a Watershed Using a Phosphate Oxygen Isoscape Approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 4707 ~ 4716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.8b05837	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 該当する

1. 著者名 Yi Rong, Ishida Takuya, Song Peixue, Ikeya Tohru, Okuda Noboru, Paytan Adina, Ban Syuhei	4. 巻 69
2. 論文標題 Using oxygen isotopes in phosphate to assess biological phosphorus cycling in a small and shallow freshwater lake system	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography	6. 最初と最後の頁 1285 ~ 1298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lno.12571	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 該当する

1. 著者名 池谷透, 石田卓也, 易容, 伴修平, 大久保卓也, 奥田昇	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 平湖・柳平湖の水質改善と滞留時間調整の検討.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 自然環境復元研究	6. 最初と最後の頁 17-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 池谷透, 上原佳敏, 伴修平, 脇田健一, 奥田昇	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 琵琶湖周辺内湖の再生と保全(第2報): 平湖・柳平湖の水質維持と在来魚遡上の両立をめぐる地域住民活動との協働.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 自然環境復元研究	6. 最初と最後の頁 31-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池谷透
2. 発表標題 「内湖再生」を経て「在来魚のにぎわい」へ - 平湖・柳平湖保全の取り組み - .
3. 学会等名 滋賀自然環境研究会第30回研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池谷透・易容・伴修平・丸尾雅啓・石田卓也・奥田昇
2. 発表標題 琵琶湖周辺内湖における可分解性溶存有機態リン動態と現場分解活性.
3. 学会等名 日本陸水学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池谷透, 丸尾雅啓
2. 発表標題 イオンクロマトグラフィーを用いた有機態リンの酵素加水分解定量
3. 学会等名 日本陸水学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ikeya Tohru, Ishida Takuya, Uehara Yoshitoshi, Asano Satoshi, Tayasu Ichiro, Okuda Noboru, Ushio Masayuki, Fujinaga Shohei, Ko Chia-Ying, Peralta Elfritzson M., Ishikawa Naoto F., Iwata Tomoya
2. 発表標題 The analysis of the community composition of riverine bacteria and microalgae in relation to nutrient status and diversity: the case in irrigation season in the Yasu River, Japan
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池谷透
2. 発表標題 地域住民と結ぶ身近な自然との関わり - 流域内をつなぐ地域保全の視点
3. 学会等名 自然環境研究会第29回研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池谷透・石田卓也・上原佳敏・伴修平・大久保卓也・脇田健一・谷内茂雄・奥田昇
2. 発表標題 住民と共に考える内湖の身近な水辺環境再生
3. 学会等名 自然環境復元学会第20回全国大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 脇田 健一、谷内 茂雄、奥田 昇	4. 発行年 2020年
2. 出版社 京都大学学術出版会	5. 総ページ数 470
3. 書名 流域ガバナンス	

〔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
研究 分担者	奥田 昇  (Okuda Noboru)  (30380281)	神戸大学・内海域環境教育研究センター・教授   (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	伴 修平  (Ban Syuhei)  (50238234)	滋賀県立大学・環境科学部・教授    (24201)	
研究分担者	石田 卓也  (Ishida Takuya)  (70759571)	広島大学・先進理工系科学研究科（総）・助教    (15401)	
研究分担者	丸尾 雅啓  (Maruo Masahiro)  (80275156)	滋賀県立大学・環境科学部・教授    (24201)	

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