

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660112

研究課題名(和文) 森林植物中の天然同位体トレーサーを用いた窒素同化過程の新解析法の開発

研究課題名(英文) triple oxygen isotope

研究代表者

中川 書子(Nakagawa, Fumiko)

名古屋大学・環境学研究科・准教授

研究者番号：70360899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、硝酸の天然同位体トレーサーを用いて森林生態系の窒素循環像を解明することを試みた。自然環境下の植物の個体内に含まれる硝酸の窒素・三酸素同位体組成の定量法を開発し、植物に同化される硝酸の供給源同定を試みた。植物試料は、マツ、ナラ、セコイア、スギといった木本類、ササといった草本類、コケ・地衣類など様々な植物種について分析を行ったところ、ササやコケ類中の硝酸は高い三酸素同位体組成を持ち、半分近くが大気由来の硝酸であることが分かった。木本類についても、大気由来の硝酸が含まれていることが確認された。また、同じトレーサーを使って、森林生態系全体の大気硝酸利用効率の評価にも応用した。

研究成果の概要(英文)：In this study, stable nitrogen and triple oxygen isotopic compositions of nitrate (NO_3^-) in plant, soil, rainwater and stream water samples were measured to gain more insight into nitrogen cycle in natural forest ecosystems. We have developed a new method to measure stable nitrogen and triple oxygen isotopic compositions of NO_3^- in plant materials. Plant species, which were used in our experiment, are arboreal plants (pine, oak, sequoia and Japanese cedar), herbaceous plants (e.g. sasa), mosses and lichens. Large triple oxygen anomalies are found in NO_3^- in sasa species and mosses indicating that almost half of the NO_3^- in leaves originate from atmospheric NO_3^- . Triple oxygen anomalies are also found in leaves of arboreal plants leading to our conclusion that leaves contains atmospheric NO_3^- to some extent. We also extend application of the NO_3^- isotopes as tracers to quantify the fate of atmospheric NO_3^- in the entire forest ecosystems.

研究分野：環境化学

キーワード：硝酸 三酸素同位体組成 植物 窒素同化 降水 土壌水

1. 研究開始当初の背景

窒素 (N) はタンパク質を作っているアミノ酸の構成元素であり、森林生態系を構成する植物にとっては一次生産 (光合成) を行うために必要不可欠な元素である。植物が利用する窒素の主要な形態は、微生物による有機物質の無機化反応によって生成されたアンモニウム態窒素 (NH_4^+) や硝酸態窒素 (NO_3^-) である。現在の酸化的な地球表層環境では、 NO_3^- を一次生産に利用するケースは多く、森林生態系における窒素循環像を把握する上で、森林生態系内の硝酸の起源や挙動を解析することは重要である。

森林生態系の窒素循環解析には、森林生態系内に存在する NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 、有機態 N といった様々な形態の N を定量したり、 ^{15}N 濃縮トレーサーを用いた培養法などによって植物の同化過程や微生物による化学反応などを定量したりすることで解析されてきた。しかし、前者の現存量の定量だけでは、N の起源や循環速度を見積もることは難しく、また、それらを見積もる一般的な手法である後者の培養法は、培養に時間と手間がかかり、また培養操作が、植物の周辺環境を天然系と異なるものに変えてしまうという欠陥があった。

2. 研究の目的

硝酸 (NO_3^-) には2つの窒素同位体 (^{14}N 、 ^{15}N) と3つの酸素同位体 (^{16}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O) が存在し、その相対組成は硝酸の起源を反映して特徴的に変動することが明らかになりつつある。特に、大気由来の NO_3^- は3種の酸素同位体の相対組成 ($\Delta^{17}\text{O}$ 値 = $\delta^{17}\text{O} - 0.52 \times \delta^{18}\text{O}$) が +26 ‰程度と他の NO_3^- ($\Delta^{17}\text{O} = 0$ ‰) とは大きく異なる特徴的な値を持っており、これが森林生態系内に入ることによって、非常に良い天然トレーサーと成り得る (図1)。

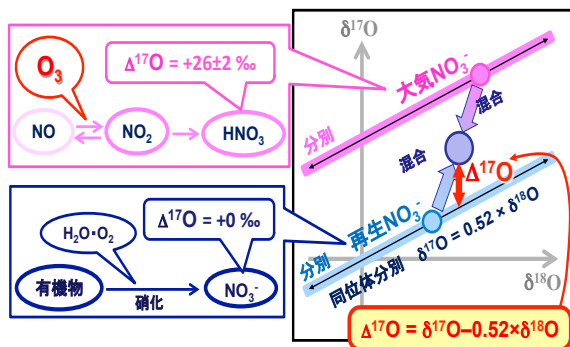


図1 NO_3^- の三酸素同位体トレーサー

本申請研究では、申請者らが開発した「硝酸 (NO_3^-) の高感度窒素・三酸素同位体定量法」を使って、森林生態系における NO_3^- を中心とした窒素循環解析を行った。また、森林植物中から NO_3^- を抽出して、その同位体組成を定量する方法を確立し、植物に同化される NO_3^- の起源推定を行った。

3. 研究の方法

(1) 森林生態系における窒素循環解析

NO_3^- の天然同位体トレーサーを用いた森林生態系全体の窒素循環を評価するための対象フィールドとして、森林伐採による渓流水中の NO_3^- 濃度の増大が確認された北海道天塩研究林ヤツメ沢を選択した。ヤツメ沢の渓流水、土壌水、地下水などの試料を2週間おきに採取し、 NO_3^- 濃度およびその窒素・三酸素同位体組成の定量を行った。また、陸上生態系における平均的な大気 NO_3^- の利用効率を調べるために、広域的な地下水試料の代用として世界各国のミネラルウォーター中に含まれる NO_3^- 濃度およびその窒素・三酸素同位体組成の定量を行った。

(2) 森林植物の窒素同化過程の解析

森林植物試料中の個体内における NO_3^- の同化過程を明らかにするため、本研究では、

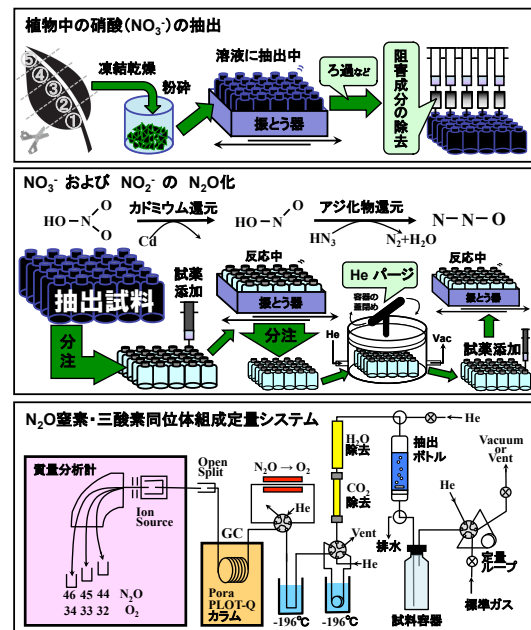


図2 植物試料中の NO_3^- の窒素・三酸素同位体組成定量方法

植物体内から NO_3^- の抽出を行い、 N_2O に化学的に変換した上で、同位体組成を定量し、変換前の NO_3^- の同位体組成を算出する方法を利用する。そこで、まずは樹木から NO_3^- を水溶液として抽出する方法とそれを N_2O 化する方法を確立するための基礎実験を行った。前者は Husted et al. (2000) 等で推奨されている濃度測定用の方法を用い、後者は環境水試料用に確立した手法を用いた。

採取した植物試料は、純水を用いて外表面部を洗浄後、凍結乾燥・粉砕した上で、純水で植物中の NO_3^- の抽出を行った。抽出時間は2時間とし、抽出後 $0.2 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過した。抽出試料毎に同位体組成既知の試薬を内標準として添加した(図2)。

森林植物試料は、大気窒素沈着量の異なる2地点(北海道と愛知県)で採取した。樹木の葉・根試料および周辺の土壌試料を採取し、直ちに NO_3^- を抽出した。また、土壌環境に関する各種パラメータ(pH, 水分量等)も現地で定量した。

(3) 分析

各水試料および植物試料抽出液中の NO_3^- 濃度はイオンクロマトグラフを使って定量した。 NO_3^- および NO_2^- の N_2O 化と、各同位体組成 ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\Delta^{17}\text{O}$) の定量には、申請者らが開発した手法 (Komatsu et al, 2008; Tsunogai et al. 2008) を利用した。

4. 研究成果

(1) 森林生態系における窒素循環解析 1

樹木の間伐や下草である笹の伐採が森林生態系の窒素循環に与える影響を評価するために、実際に森林伐採が行われた北海道天塩研究林ヤツメ沢において、渓流水中の NO_3^- 濃度およびその窒素・三酸素同位体組成の時間変動を調べた。調査期間は、森林や笹の伐採1年前から伐採3年後までの4年間に渡って行った。

渓流水中の NO_3^- 濃度は、笹伐採前は平均 $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ 、最大 $3.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ と降水中の硝酸濃度(およそ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) に比べて低いことから、森林生態系が大気から沈着してきた NO_3^- を効率的に利用していることが分かった。この傾向は森林伐採後も続いたが、下草である笹を伐採した後は、渓流水中の NO_3^- 濃度が増大し、最大 $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ の NO_3^- 濃度が観測された。このことから、森林伐採後も笹が大気沈着窒素を効率的に利用していることが考えられた(図3)。

そこで、大気沈着窒素が本当に笹伐採後の森林生態系で利用されずに系外に出ていっているのか、それとも森林生態系で利用された後で渓流水に入ってきた窒素なのかを確認するために、渓流水中の NO_3^- の三酸素同位

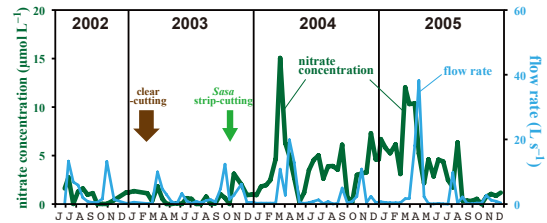


図3 渓流水の流速および NO_3^- 濃度の時間変化

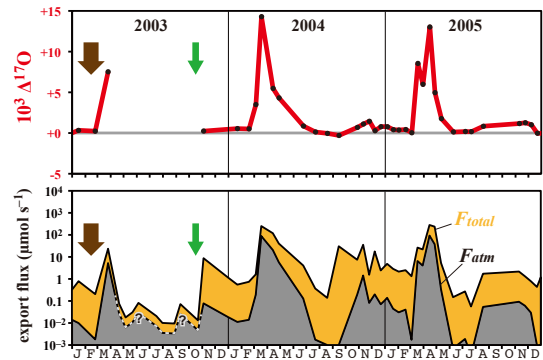


図4 渓流中に溶存している NO_3^- の三酸素同位体組成の時間変化(上)・大気 NO_3^- および再生 NO_3^- の渓流水への流出フラックス(下)

体組成を定量した。その結果、春先の雪解けの季節では、渓流水中の NO_3^- の三酸素同位体組成は 14%程度であり、渓流水中の硝酸の50%以上が大気由来の NO_3^- であることが分かった。これに対し、それ以外の季節では、渓流水中の NO_3^- の三酸素同位体組成は 1.5%程度と低い値を示し、渓流水中に流れ込んだ大部分の NO_3^- は有機物が分解してできた再生 NO_3^- であることが分かった。笹伐採後の大気 NO_3^- と再生 NO_3^- の渓流水への流出量は、それぞれ笹伐採前の16倍程度と5倍程度であることが分かった(図4)。このことから笹は大気 NO_3^- を吸収する能力が高いことが示唆された。

(2) 森林生態系における窒素循環解析 2

森林などの陸上生態系は、大気から沈着する大気 NO_3^- の除去源として機能していることが、多様な先行研究からも明らかになっている (Grennfelt and Hultberg, 1986; Williams et al., 1996; Tietema et al., 1998)。しかし、陸上生態系は不均質性が大きく、その除去量を定量化したり、地域毎の除去量や除去過程の特徴を評価したりすることは難しい。そこで本研究では、陸上生態系を経由して溶出した地下水に含まれる NO_3^- の $\Delta^{17}\text{O}$ 組成を定量化することで、大気 NO_3^- の利用効率の定量化を行った。

この研究を実現するためには、複数の陸上生態系にわたって、集水域をそれぞれ別とす

る地下水試料が必要となる。しかしながら、広域的な試料採取はコスト的にも時間的にも困難である。そこで本研究では、市販のミネラルウォーターを地下水試料の代用として、国内外の各地域でボトリングされたミネラルウォーターに含まれる NO_3^- の $\Delta^{17}\text{O}$ 組成を定量化することで、各ミネラルウォーター涵養域における大気 NO_3^- の浄化効率を広域的に定量化した。

その結果、地下水中の全溶存 NO_3^- に占める、大気から沈着した NO_3^- は平均で3パーセント程度しか無く、残りの97パーセントは有機態窒素から再生した NO_3^- に置換されていることが明らかになった(図5)。また大気沈着由来の NO_3^- 濃度は、森林域で涵養される地下水中には低く、乾燥域や高山域のような森林が乏しい場所で涵養される地下水中には高くなることも明らかにした(図6)。

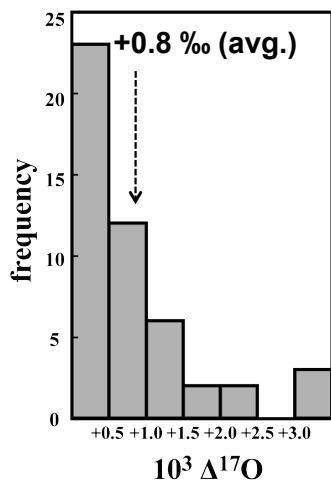


図5 ミネラルウォーターに含まれる NO_3^- の三酸素同位体組成

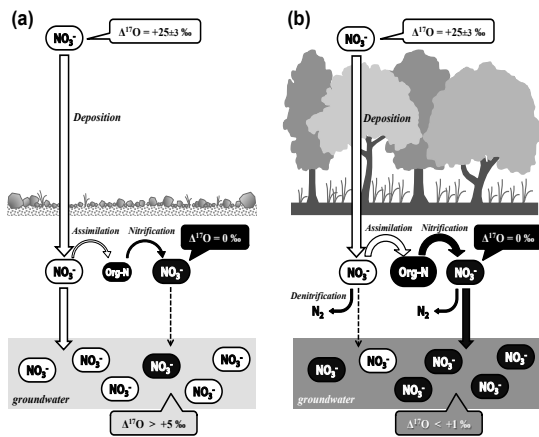


図6 森林生態系における植生の違いによる大気 NO_3^- の利用効率の違いを示した模式図

(3) 森林植物の窒素同化過程の解析

大気由来の窒素負荷量が異なる2つの森林(窒素負荷の小さい北海道の森林と窒素負荷の大きい愛知県の森林)を対象に植物試料の採取および NO_3^- の窒素・三酸素同位体分析を行い、植物の窒素同化過程の解析や同化される NO_3^- の供給源同定を試みた。植物試料は、マツ、ナラ、セコイア、スギといった木本類、ササといった草本類、コケ・地衣類など様々な植物種の葉、枝、幹、根、といった部位に分けて分析を行った。また、植物中の NO_3^- の起源と考えられる大気沈着由来の NO_3^- や土壤中の NO_3^- の窒素・三酸素同位体組成を調べるために、降水(林外雨と林内雨)および土壌試料の採取も行った。

降水試料中の NO_3^- の三酸素同位体組成は、林外雨、林内雨共に、大きな同位体異常(+26‰程度)を持つことが確認された。また、土壌試料中の NO_3^- の三酸素同位体組成については、0‰では無かったことから、根から吸収する NO_3^- に大気由来の NO_3^- が最大数%入っている可能性があることが考えられた。降水由来の NO_3^- と土壌由来の NO_3^- の三酸素同位体組成は大きく異なることが確認でき、 NO_3^- の三酸素同位体組成は、植物中の NO_3^- の起源を推定するのに有効な指標であることが分かった。

植物中の NO_3^- の三酸素同位体組成は、最大+12‰もの大きな三酸素同位体異常が観測された。このことから、植物中には葉から直接 NO_3^- を体内に取り込むプロセスが存在する可能性が示唆された。植物体内の NO_3^- の三酸素同位体組成は、植物の種類によって大きく異なることが分かった。ササやコケ類中の NO_3^- は高い三酸素同位体組成を持ち、半分近くが大気由来の NO_3^- であることが分かった。木本類についてもササ等と比べると少ないが、大気由来の NO_3^- が含まれていることが確認された(図7)。

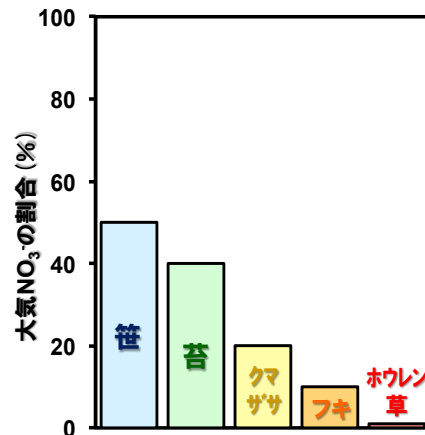


図7 大気 NO_3^- が各固体中の全 NO_3^- に占める混合比

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Nakagawa, F., A. Suzuki, S. Daita, T. Ohyama, D.D. Komatsu and U. Tsunogai (2013) Tracing atmospheric nitrate in groundwater using triple oxygen isotopes: Evaluation based on bottled drinking water. *Biogeosciences* 10, 3547-3558. [IF: 3.859]
- (2) Tsunogai, U., D.D. Komatsu, T. Ohyama, A. Suzuki, F. Nakagawa, I. Noguchi, K. Takagi, M. Nomura, K. Fukuzawa, and H. Shibata (2014) Quantifying the effects of clear-cutting and strip-cutting on nitrate dynamics in a forested watershed using triple oxygen isotopes as tracers. *Biogeosciences*, 11, 5411-5424.
- (3) 角皆潤, 中川書子 (2014) 同位体環境科学第3講: 安定同位体比によるプロセス解析. 大気環境学会誌, 第49巻, 第5号, A63-A72.
- (4) Shibata H., Hasegawa, Y., Watanabe T., Fukuzawa K. (2013) Impact of snowpack decrease on net nitrogen mineralization and nitrification in forest soil of northern Japan. *Biogeochemistry*, 116, 69-82.
- (5) Watanabe T., Fukuzawa K., Shibata H. (2013) Temporal changes in litterfall, litter decomposition and their chemical composition in Sasa dwarf bamboo in a natural forest ecosystem of northern Japan. *Journal of Forest Research*, 18(2), 129-138.
- (6) Hishi T., Urakawa R., Tashiro N., Maeda Y., Shibata H. (2014) Seasonality of factors controlling N mineralization rates among slope positions and aspects in cool-temperate deciduous natural forests and larch plantations. *Biology and Fertility of Soils*, 50, 343-356.
- (7) Shibata H., Cattaneo LR, Leach AM, Galloway JN (2014) First approach to the Japanese nitrogen footprint model to predict the loss of nitrogen to the environment. *Environmental Research Letters* 9:115013 doi:10.1088/1748-9326/9/11/115013
- (8) Fukuzawa K, Shibata H, Takagi K, Satoh F, Koike T, Sasa K (2015) Roles of

dominant understory Sasa bamboo in carbon and nitrogen dynamics following canopy tree removal in a cool-temperate forest in northern Japan. *Plant Species Biology* 30: 104-115 doi: 10.1111/1442-1984.12086

[学会発表] (計 14 件)

- (1) 角皆潤, 南翔, 佐久間博基, 大山拓也, 小松大祐, 中川書子, 加藤憲二 (2013) 「湧水系の溶存酸素の三酸素同位体組成: なぜ富士山湧水系は酸素に富んでいるのか?」 (AHW26-02) 日本地球惑星科学連合 2013 年大会、幕張メッセ国際会議場 203、2013 年 5 月 23 日。(招待講演)
- (2) 大山拓也, 角皆潤, 小松大祐, 中川書子, 野口泉 (2013) 「都市域における乾性沈着 HN03 の起源について」 (1C08) 2013 年度日本地球化学会第 60 回年会、筑波大学第一エリア、2013 年 9 月 11 日。
- (3) 小松大祐, 角皆潤, 佐藤晋太郎, 中川書子, 田中敦 (2013) 「水圏環境におけるメタン酸化の新指標: 炭素と水素の複合同位体分別」 (3C19)、2013 年度日本地球化学会第 60 回年会、筑波大学第一エリア、2013 年 9 月 13 日。
- (4) 角皆潤, 宮内貴規, 大山拓也, 小松大祐, 蓼沼雪衣, 中川書子, 梅田信, 田中敦 (2013) 「貧栄養・中栄養湖沼における大気沈着由来の硝酸の混合比」 (A-2-1)、第 19 回大気化学討論会、石川県七尾市和倉温泉のと楽、2013 年 11 月 7 日。
- (5) 角皆潤, 中川書子, 小松大祐 (2013) 「10 年後の IRMS」 2013 年質量分析学会同位体比部会プレゼミ「大胆予測: 10 年後の質量分析計はこうなる」、広島湯坂温泉郷賀茂川荘、2013 年 12 月 4-6 日。(招待講演)
- (6) 角皆潤, 南翔, 佐久間博基, 小松大祐, 中川書子 (2014) 溶存酸素の三酸素同位体組成を利用した貧栄養・中栄養水圏環境下の総一次生産量定量, MIS21-14, 日本地球惑星科学連合 2014 年大会, パシフィコ横浜, 2014 年 4 月 28 日-5 月 2 日。
- (7) 宮内貴規, 大山拓也, 角皆潤, 中川書子, 小松大祐 (2014) 硝酸の三酸素同位体組成を指標に用いた中栄養湖沼における窒素循環解析, 1B07, 2014 年度日本地球化学会第 61 回年会, 富山大学, 2014 年 9 月 16-18 日。

(8) 松下 俊之, 角皆 潤, 中川 書子, 小松大祐 (2014) 炭素および水素安定同位体比を用いた天然環境下におけるメタン酸化過程解析, 1B08, 2014 年度日本地球化学会第 61 回年会, 富山大学, 2014 年 9 月 16-18 日.

(9) 中川 書子, 大山 拓也, 角皆 潤, 小松大祐, 梅田 信 (2014) 富栄養化湖沼における窒素循環速度の定量: 硝酸の天然同位体トレーサーを用いた解析, 1P36, 2014 年度日本地球化学会第 61 回年会, 富山大学, 2014 年 9 月 16-18 日.

(10) 中根 令以, 大山 拓也, 中川 書子, 角皆 潤, 野口 泉, 山口 高志 (2014) 硝酸の三酸素同位体組成を指標に用いた NO_x の光化学反応過程の解析. 第 20 回大気化学討論会, 府中グリーンプラザ本館, 2014 年 10 月 27-29 日

(11) 角皆 潤, 中川 書子 (2014) 軽元素安定同位体比指標の弱点とその克服に向けて, 2014 年度質量分析学会同位体比部会プレゼミ, 筑波山温泉旅館一望, 2014 年 11 月 26-28 日. (招待講演)

(12) 中川 書子, 岡田駿, 鈴木敦之, 小松大祐, 角皆 潤, 柴田英昭, 福澤加里部 (2014) 植物中の天然同位体トレーサーを用いた窒素同化過程の解析, 2014 年度質量分析学会同位体比部会, 筑波山温泉旅館一望, 2014 年 11 月 26-28 日.

(13) 中川 書子, 角皆 潤 (2014) 水の三酸素同位体比測定, 2014 年度質量分析学会同位体比部会, 筑波山温泉旅館一望, 2014 年 11 月 26-28 日.

(14) 井上貴央, 角皆潤, 中川書子, 山下洋平, 吉田俊也, 福澤加里部, 柴田英昭 (2015 年) 植生の違いが表層土壌浸透水の溶存窒素動態に及ぼす影響, 日本森林学会, 北海道大学, 2015 年 3 月 26-29 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://biogeochem.has.env.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 書子 (NAKAGAWA FUMIKO)
名古屋大学・環境学研究科・准教授 (2014)
北海道大学・理学研究院・助教 (2013)
研究者番号: 70360899

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

柴田 英昭 (SHIBATA HIDEAKI)
北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター
教授
研究者番号: 70281798

蔵治 光一郎 (KURAJI KOHICHIRO)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 90282566

小松 大祐 (KOMATSU DAISUKE)
東海大学・海洋学部・講師 (2014)
名古屋大学・環境学研究科
・研究員 (2013)
研究者番号: 70422011