

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871086

研究課題名(和文)「植物プランクトンの枯死に伴うリン化合物溶出モデル」の構築とインパクト予測

研究課題名(英文) Establish a new model of P compounds and analysis of P cycle when phytoplankton is decomposed in lake water.

研究代表者

篠原 隆一郎 (Shinohara, Ryuichiro)

独立行政法人国立環境研究所・地域環境研究センター・研究員

研究者番号：00610817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は日本で最も富栄養化した湖沼である霞ヶ浦において、植物プランクトンの枯死に伴うリンの動態について研究を行ったものである。本研究における主な研究成果を以下に示す：

(1) *M. aeruginosa*中に含まれる主要な有機態リン化合物はRNA-Pであったが、DNA-Pはほとんど含まれていなかった。(2) 懸濁物中に含まれる主要な有機態リン化合物はRNA-Pであり、その変動が重要であると考えられた。一方で、*M. aeruginosa*中のリン化合物組成と異なり、DNA-Pも少量ながら含まれていた。*M. aeruginosa*が優占している場合にはDNA-P濃度が低く、(1)で得られた結果とも整合していた。

研究成果の概要(英文)：In the current study we analyzed phosphorus (P) compound composition in phytoplankton and established a model with the decay. I did the following experiments: (1) I analyzed P compound composition in *Microcystis aeruginosa* to analyze the compounds included. (2) I monitored P compounds composition in suspended particles and compared it with the biomass of *M. aeruginosa*. I attained the following results:

(1) RNA-P accounted for the largest proportion in organic P compounds, but DNA-P was not included in *M. aeruginosa*. (2) P compounds composition in suspended particles shows that RNA-P exhibited largest P compound in suspended particles. When *M. aeruginosa* was the predominant phytoplankton species, DNA-P did not show large proportion. This fluctuation was consistent with the results of (1). Because RNA-P exhibited the largest P compound, changes in abundance of RNA-P are the most important component for P cycle in the water column.

研究分野：応用生態工学

キーワード：核磁気共鳴装置 リン化合物 核酸 RNA-P DNA-P

1. 研究開始当初の背景

全国の湖沼、ダム貯水池等では植物プランクトンの大発生が問題視されている。特に、*Microcystis aeruginosa* に代表されるラン藻類の大発生は以前からアオコ発生として問題視されてきた。このアオコ発生に極めて重要な要因の一つは豊富なリンの存在であると考えられている。藻類にとってリンは生長のために必須の元素のひとつであり、一般にリンが豊富に存在すると、藻類が増殖しやすくなることが知られている。

一方で、リンには様々な形態が存在していることが知られている(図1)。最も一般的な形態分類は、溶存態(0.7µmのフィルターでろ過されたときに通過する画分)および、懸濁態(同様のフィルターで通過しない画分)であり、一般に懸濁態が全リンの7~8割を占めている。一方で、溶存態は2割程度であるが、その2割の中でも無機態リン(溶存性無機態リン)が存在し、それが藻類には使用されやすい形態(生物利用可能性)であるとされている。溶存性無機態リンは、懸濁態リン、溶存性有機態リンなどから生分解・化学反応を経て供給されると考えられているため、そのソースとなる各種画分に含まれるリン化合物の動態解明が極めて重要である。つまり、溶存態リンへと変化するリスクを評価することは、懸濁物等に含まれるリン化合物を明らかにすることに帰着されるといえる。

近年、自然界における有機態リンの化合物分析法が開発され、湖沼における懸濁態リンが分析可能になってきた(図2)。例えば霞ヶ浦においては、Shinohara et al. (2012)によれば、懸濁物、底泥に含まれるリンを分析したところ、懸濁物中に対して、底泥中のDNAに含まれるリン(DNA-P)が大きく上昇していた。一方で、底泥中においても、様々なリンの化合物形態が存在しており、鉛直的にDNA-Pが分解していることが明らかになってきた(Reitzel et al. 2007)。これらの報告は、湖沼におけるリンの動態の中で、DNA-Pが極めて重要であるという可能性を示している。

DNA-Pに代表される有機態リン化合物の供給は、おそらく湖内の生物生産によって担われていると推察される。霞ヶ浦に代表される富栄養湖では、植物プランクトンが主要な生物生産である。しかし、植物プランクトンのバイオマスの変化に伴う、リン化合物の変化については明らかになっていないのが現状である。つまり、リンの物質循環の解明に

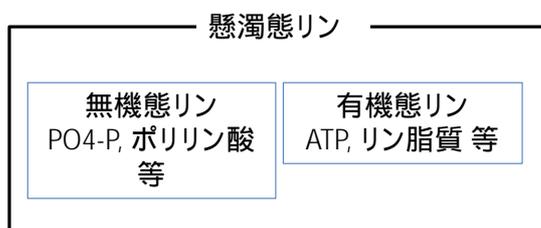


図1: 懸濁態リンの種類・化合物

とって、植物プランクトンが生産する、懸濁態リン化合物・植物プランクトン枯死の際に変動するリン化合物を明らかにすることが重要であり、以上が本プロジェクトの背景である。

2. 研究の目的

以上の背景を元に、本研究では以下の目的に応じてサブテーマを設定し、プロジェクトを遂行する(図3)。

- (1) ^{31}P NMR を用いて植物プランクトンに含まれるリンの化合物形態を明らかにする。
- (2) *Microcystis aeruginosa* や微生物のバイオマスと、懸濁物中のリンの化合物形態との関係を明らかにする。
- (3) 以上のサブテーマを統合し、プランクトン枯死時における有機態リン化合物の動態を明らかにする。

以上の目的を達成することで、霞ヶ浦における微生物由来の有機態リンがリン循環に重要であるという仮説を検証することが本プロジェクトの最終的なゴールである。

3. 研究の方法

本研究では、上に示した目的を達成するため、以下のような方法で研究を進めた。

- (1) *M.aeruginosa* および懸濁粒子の採取
M.aeruginosa が大発生した時期において、プランクトンネット(85µm)を用いて *M.aeruginosa* を大量に採取した。懸濁粒子については、酸洗浄した20Lの容量のタンクに採取し、5分以内に国立環境研究所、臨湖実験施設に持ち帰り、濾過を行った。濾過は10L程度のサンプルに対して、GF/F ガラス繊維ろ紙を用いて行った。

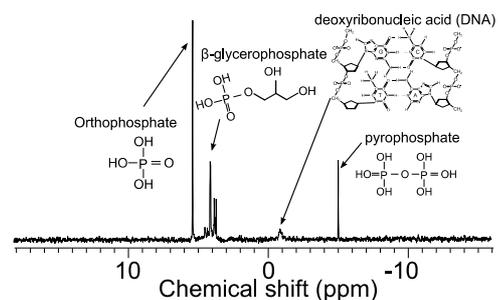


図2: ^{31}P NMR を用いて得られるスペクトルの例と化合物。

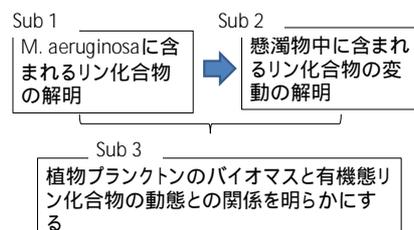


図3: 本研究におけるサブテーマのフロー図

(2) サンプル抽出および、分析条件。
 サンプルの抽出方法については、Cade-Menun (1996)に準じて行った。具体的には、まず、サンプルに対して 0.25mol L⁻¹ の NaOH, 0.05mol L⁻¹ の EDTA を含む溶液を用いて 4 時間抽出を行った。その溶液を GF/F フィルターで濾過後、凍結乾燥を行った。パウダー状になったサンプルを再度 1M NaOH, 0.1M EDTA, D₂O を含む溶液 1.5mL に溶解させた。それを NMR にかけることでスペクトルを得た。

(3) *Microcystis aeruginosa* のバイオマスおよび、粒子性有機炭素量の測定

M. aeruginosa のバイオマスは、定量 PCR 法を用いて行った。詳細については、Tomioaka et al. (2011)を参照されたい。粒子性有機炭素量については、1mol L⁻¹ の塩酸雰囲気化で脱炭酸した後、Yanaco CHN analyzer を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) *M. aeruginosa* に含まれるリン化合物と、その量について。

M. aeruginosa が大発生した際にプランクトンネットを用いて捕集したサンプルについて、³¹P NMR を用いて分析、定量を行った。その結果を図 4 に示す。*M. aeruginosa* に含まれるリン化合物は、オルトリン酸、RNA-P (Mononucleotides)、Glucose-6 phosphate, α-glycerophosphate, β-glycerophosphate, pyrophosphate であった。そのうち、最も多いのは、Mononucleotides として検出される RNA-P であった。一方で、DNA-P はほとんど含まれていないことが明らかになった。

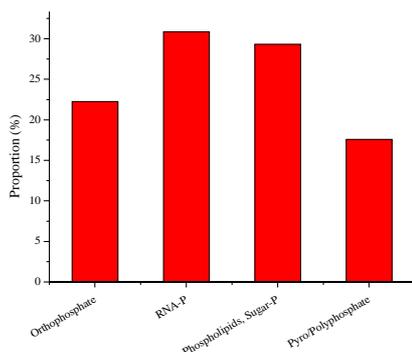


図 4: *Microcystis aeruginosa* に含まれるリン化合物割合。

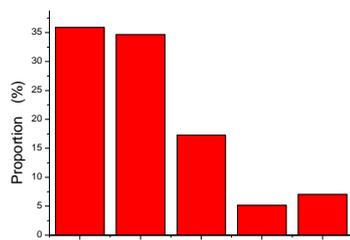


図 5: 霞ヶ浦の懸濁物に含まれているリン化合物割合。

4.2. 霞ヶ浦の懸濁粒子に含まれているリン化合物とその動態

一方で、霞ヶ浦における懸濁粒子に含まれるリン化合物の分析および、その動態に関して解析を行った。近年では特に核酸に含まれるリンが重要であると考えられているため、特に RNA-P(mononucleotides)と、DNA-P に注目し、解析を行った。

(2) 懸濁粒子に含まれるリン化合物について 図 5 に示す。懸濁粒子には、オルトリン酸、RNA-P、リン脂質、DNA-P、ピロリン酸が含まれていた。特に、RNA-P が有機態リンの中では最も多く、有機態リンのうち、59%を占めていた。核酸に含まれるリン (RNA-P+DNA-P) は、有機態リンのうち、69%を占めており、これらのリン化合物が重要であると裏付けられた。

一方で、有機炭素量、chlorophyll a、定量 PCR 法を用いた *M. aeruginosa* のバイオマスなどと相関を取ることで、それぞれのリン化合物の動態について解析を行った。その結果を図 6 に示す。

図 6a は、RNA-P と、粒子性有機炭素量 (POC) との関係性を示したものである。RNA-P の濃度は、POC と強い正の相関を示している。この結果は、バイオマスの増加に伴って、RNA が合成されていることを示している。事実、過去の研究によれば、RNA の合成速度は極めて速いことが知られている。本研究で示された強い正の相関はそのような状況を反映している可能性もある。

一方、図 6b は、DNA-P と、粒子性有機炭素量との相関である。DNA-P は、RNA-P と異なり、単純な正の相関を示していない。炭素量が多い場合にも、DNA-P が極めて少ない場合も存在していた。図 6c に示すように、RNA-P と POC との正の相関、DNA-P と POC との関係性は、RNA-P、DNA-P と *M. aeruginosa* のバイオマス(DNA)とも同様にみられている。DNA-P と *M. aeruginosa* のバイオマスを見てみると、*M. aeruginosa* のバイオマスが多いときにむしろ、DNA-P が減少している傾向が見られる。これは前出の、*M. aeruginosa* の中に、DNA-P が少ないという結果に起因していると推察される。つまり、*M. aeruginosa* が優先種であり、他の種が殆ど見られない場合、*M. aeruginosa* が持つ DNA-P が少量であることから図 6d に見られるような関係性であることが推察された。現在のところ、仮説段階ではあるが、DNA-P が少ない *M. aeruginosa* が増殖する際のプロセスと、他の植物プランクトンが増殖するプロセスとが存在し、DNA-P の存在を決定づけている可能性がある。このプロセスについては今後、仮説の検証が必要となろう。一方で、DNA-P の分解されやすさに関して、今後モデル化が必要になると推察される。

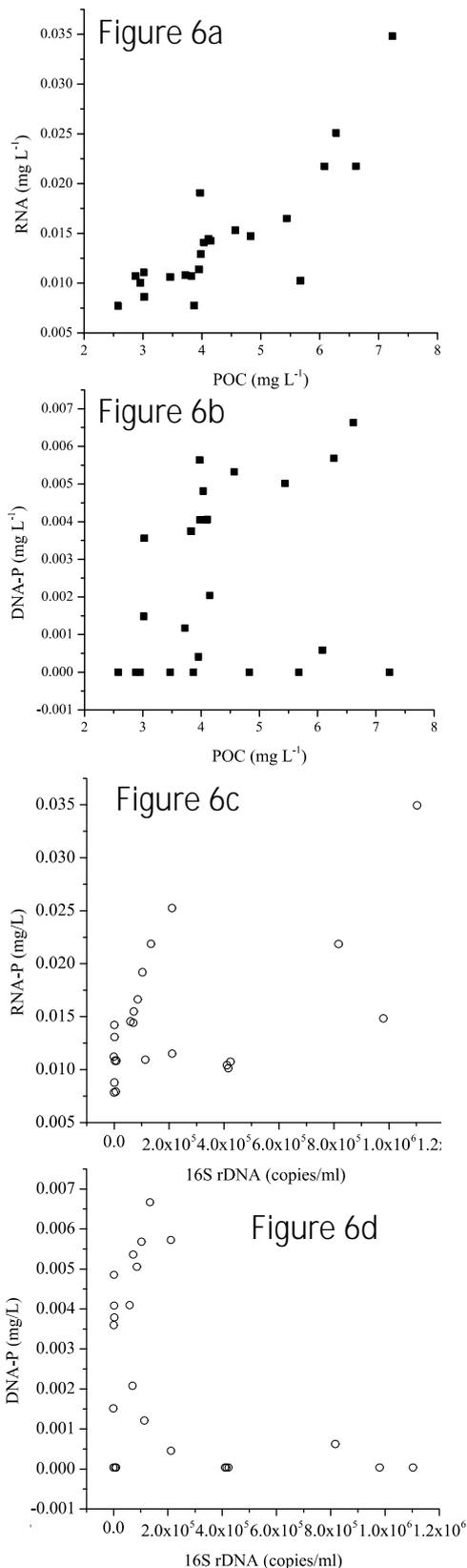


図 6: RNA-P, DNA-P と, POC, *M. aeruginosa* のバイオマスとの関係。

[引用文献]

Shinohara R, Imai A, Kawasaki N, Komatsu K, Kohzu A, Miura S, Sano T, Satou T, Tomioka N (2012) Biogenic phosphorus compounds in

sediment and suspended particles in a shallow eutrophic lake: A ³¹P-Nuclear Magnetic Resonance (³¹P NMR) study. Environmental Science & Technology 46: 10572–10578

Reitzel K, Ahlgren J, DeBrabandere H, Waldeck M, Gogoll A, Tranvik L, Rydin E (2007) Degradation rates of organic phosphorus in lake sediment. Biogeochemistry 82: 15-28

Tomioka N, Imai A, Komatsu K (2011) Effect of light availability on *Microcystis aeruginosa* blooms in shallow hypereutrophic Lake Kasumigaura. Journal of plankton research 33: 1263-1273

Cade-Menun B, Preston C (1996) A comparison of soil extraction procedures for ³¹P NMR spectroscopy. Soil Science 161: 770-785

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shinohara R, Asaeda T, and Isobe, M. (2014) Effects of phytoplankton on the distribution of submerged macrophytes in a small canal. (査読有り) 10:115–121

〔学会発表〕(計 5 件)

篠原隆一郎, 今井章雄, 富岡典子, 高津文人, 小松一弘, 佐藤貴之, 佐野友春, 三浦真吾, 霜鳥孝一 (2015) 霞ヶ浦流域圏における懸濁物・プランクトン・水生植物中に含まれるリン化合物の違いについて. 第 49 回日本水環境学会年会, 同予稿集, 307, 3 月 18 日(金沢大学(石川県, 金沢市))

篠原隆一郎, 今井章雄, 富岡典子, 高津文人, 小松一弘, 佐藤貴之, 佐野友春, 三浦真吾, 霜鳥孝一 (2014) 霞ヶ浦の懸濁物に含まれるリン化合物の動態について. 応用生態工学会第 18 回大会, 同予稿集, 223. 9 月 19 日(首都大学東京(東京都, 八王子市))

篠原隆一郎, 今井章雄, 富岡典子, 高津文人, 小松一弘, 佐藤貴之, 佐野友春, 三浦真吾, 霜鳥孝一 (2014) 霞ヶ浦懸濁物に含まれる核酸に含まれるリンの動態について. 日本陸水学会第 79 回大会, 同予稿集, 121, 9 月 11 日(つくば国際会議場(茨城県, つくば市))

Shinohara R, Imai A, Kawasaki N, Komatsu K, Kohzu A, Miura S, Sano T, Satou T, Tomioka N, Shimotori K. (2014) Temporal and Vertical Changes in Sediment P Compounds in Lake Kasumigaura, Japan - A³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Study. Joint

Aquatic Sciences Meeting 2014, 5 月 22 日
(Oregon Convention Center (Portland, Oregon,
USA)).

篠原隆一郎, 今井章雄, 川崎伸之, 小松
一弘, 高津文人, 三浦真吾, 佐野友春, 佐
藤貴之, 富岡典子 (2013) 霞ヶ浦底泥中に
存在する生物由来リンの形態と間隙水中の
リン濃度との関係. 応用生態工学会第 17 回
大阪大会, 同予稿集, 9 月 20 日 (大阪府立大
学 I-site なんば(大阪府, 大阪市))

〔その他〕
ホームページ等
http://crispus.web.fc2.com/index_j.html

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
篠原隆一郎 (SHINOHARA, Ryuichiro)
独立行政法人 国立環境研究所, 地域環境
研究センター, 研究員

研究者番号 : 00610817