

# 貧栄養海域のリンの循環過程と解析手法

Analytical perspectives of biogeochemical phosphorus cycle in oligotrophic marine environments

鈴木 昌弘<sup>1\*</sup>・塚崎 あゆみ<sup>1</sup>・橋濱 史典<sup>2</sup>・佐藤 光秀<sup>3</sup>・梅澤 有<sup>4</sup>

Masahiro SUZUMURA<sup>1\*</sup>, Ayumi TSUKASAKI<sup>1</sup>, Fuminori HASHIHAMA<sup>2</sup>,  
Mitsuhide SATO<sup>3</sup> and Yu UMEZAWA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 環境管理研究部門

<sup>2</sup> 東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 海洋環境学部門

<sup>3</sup> 東京大学大学院 農学生命科学研究科 水圏生物科学専攻

<sup>4</sup> 長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科

<sup>1</sup> Environmental Management Research Institute,

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<sup>2</sup> Department of Ocean Sciences, Tokyo University of Marine Science and Technology

<sup>3</sup> Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

<sup>4</sup> Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University

## 摘 要

貧栄養な外洋生態系におけるリンについて、その役割から存在状態について論じるとともに、リンの循環過程を定性的・定量的に把握するための解析手法の進展と応用について解説した。特に近年急速に進展したナノモルレベルの高感度分析によるオルトリン酸のダイナミクスと、海洋のリンの主要成分である溶存有機態リンの微生物的利用プロセス、さらにその動態解析ツールとして期待されるリン酸酸素同位体比による解析について詳述し、外洋域のリン研究の現状と今後の展開について議論した。

キーワード：オルトリン酸塩、ホスファターゼ、溶存有機態リン、リン、リン酸酸素同位体比

Key words: orthophosphate, phosphatase, dissolved organic phosphorus, phosphorus, phosphate oxygen isotope ratios

## 1. はじめに

リン(P; phosphorus)はあらゆる生命にとって必須の元素である。例えば核酸(DNA(デオキシリボ核酸), RNA(リボ核酸))はリン酸基によって繋がれた長大な鎖状構造を有し、リン酸基の部分で切断されることで初めて遺伝子としての機能を発現する。ATP(アデノシン三リン酸)はリン酸の結合と切断により細胞内のエネルギーの放出と貯蔵を制御する。タンパク質のリン酸化(ホスホリル化)あるいは脱リン酸化は、タンパク質の機能の発現(例えば酵素活性)を制御する機構である。イノシトールリン酸及びイノシトールリン脂質は細胞のシグナル伝達に不可欠な化合物である。細胞や生体の構造を支えるという点では、細胞膜を構成するリン脂質や動物の歯牙を形成するリン酸カルシウムが不可欠である。

リンは地殻構成元素で11番目に豊富な元素である<sup>1)</sup>。海水全体には85 Gtという膨大なリンが溶け込んでいると見積られている<sup>2)</sup>。しかし海洋生物にとって、リンは圧倒的に希少な存在である。表1に、

海水中に存在する代表的な元素の植物プランクトンの生体(細胞)中濃度と海水中濃度及びその比率を示した(Millero<sup>3)</sup>から抜粋)。この比率が低いほど、海水中の濃度が生体中の濃度に対して低く、植物プランクトンにとって希少な元素であるといえる。海水中の濃度が極めて低い元素(亜鉛(Zn), コバルト(Co))でも、生体の要求量(濃度)が低い場合はプランクトンの成長を制限する可能性が低くなる。生体の主要な元素である炭素(C)及び酸素(O)についてみると、海水中に豊富に存在するために、これらも制限要因となることがほとんど無い。比率が特に低いのは窒素(N), リン, ケイ素(Si)の3種類(ケイ素については珪藻類の場合)であり、生体内濃度に対する海水の濃度の比率が0.05~0.06と極めて小さく、プランクトンにとってこれらの元素の獲得が容易ではないことが分かる。リンは炭素や窒素などの他の親生物元素と異なり気体や揮発性成分としての存在量が極めて少なく、大気を経由した循環(流入・除去)が河川経由に比べて圧倒的に少ない<sup>2), 4)</sup>。大陸から離れた外洋は、湧昇域などごく一部を除いてリンソース

受付: 2015年1月14日, 受理: 2015年4月29日

\* 〒305-8569 つくば市小野川16-1 産業技術総合研究所つくば西事業所, e-mail: m.suzumura@aist.go.jp

表1 植物プランクトン生体中と海水中の元素の濃度及び濃度比。

元素	A 生体内濃度 (g/100 g)	B 海水中濃度 (g/m <sup>3</sup> )	B/A
Br(臭素)	0.0025	66	26,400
Cl(塩素)	4	19,300	4,825
Na(ナトリウム)	3	10,750	3,583
Mg(マグネシウム)	0.4	1,300	3,250
Ca(カルシウム)	0.5	416	832
Zn(亜鉛)	0.02	0.05	2.5
Co(コバルト)	0.00005	0.00	2.0
O(酸素)	47	90	1.9
C(炭素)	30	28	0.93
N(窒素)	5	0.30	0.06
P(リン)	0.6	0.03	0.05
Si(ケイ素) <sup>a)</sup>	10	0.50	0.05
Si(ケイ素) <sup>b)</sup>	0.5	0.50	1.0

a)珪藻類, b)植物プランクトン平均

が極めて限られた貧栄養海域となっている。一次生産者(植物プランクトン)や細菌は、わずかなリンをいかに効率よく利用するかといった点でさまざまな戦略を駆使している。

全海洋の約6割を占める貧栄養海域、特に熱帯・亜熱帯貧栄養海域におけるリン循環の理解は、海洋の物質循環全体、ひいては気候変動も含めた地球規模での物質循環の解明に不可欠である。特に微生物による分子レベルでの代謝反応や、従来法では検出できなかったナノモルレベルのリン濃度の変動が重要であることが分かってきた。本稿では、はじめに海水中のリンの形態について概説し、その形態や濃度のダイナミックな変動プロセス、そしてそれらを評価する手法について最新の知見とあわせて紹介する。

## 2. 海洋のリンの存在形態

海水中に存在するリンはさまざまな化合物を構成し、またそれらの化合物は溶存成分として単独で存在するものもあれば、懸濁粒子や生物体に含まれた状態のものもある。このようなリンの化合物の種類(化学形)や存在形(溶存又は粒子、あるいはそのサイズ)は、生物によるリンの利用性や拡散・沈降などといった物理的挙動を左右する。したがって、海洋におけるリンの循環過程の解明において、リンの存在状態を把握することが重要である。

分子(イオン)から生物体まで、海水中に存在する物質は厳密には全て「粒子」と捉えることができる。しかし一般的には、フィルター(ろ紙)を用いて海水をろ過し、フィルターに補足されるものを粒子状成分、通過するものを溶存成分として定義・分別

している。孔径0.1 μm~0.45 μm程度のメンブレンフィルターによって精密なる過が可能であるが、有機物を分析対象とする場合などは、無機材料で作られたガラス繊維フィルター(孔径0.7 μm~1 μm程度)を用いることが多い。図1にリンを含む海水中の種々の成分・物質のサイズ分布を示した。岩石や粘土鉱物に由来する無機成分をグレー、生物体及びその遺骸や排泄物由来成分を緑、化学的に化合物(群)として表現できるものを黄色で示してある。

粒子状リンは、例えば「濁り」として視覚的にも識別できるためにわかりやすい。河口域や海底近傍では無機的な成分が主体となるが、外洋表層では生物由来成分が大部分を占める。一方、溶存成分は注意が必要である。細菌やウイルスなどの細胞、すなわち「生物粒子」も溶存成分として扱われている。このような齟齬は、本来ならばイオンからマリンスノーまで切れ目の無い連続的な粒子のサイズ分布に対して、フィルターの孔径(性能)に依存した操作上の定義・分別を行なっているために生じる。粒子成分と溶存成分を分別する本来の目的は、海水中の物質がサイズによって大きく異なる物理挙動(沈降など)を取ることに由来する。その観点では、1 μm以下のサブミクロンサイズの粒子を溶存成分とみなすことに実際的な不都合は無い。ただし、サブミクロンサイズの粒子は粒子同士あるいは巨大粒子との凝集が起こりやすい性質を有することには注意が必要である<sup>5), 6)</sup>。

粒子状リンと溶存リンは、さらに化学形に基づいて無機物と有機物の構成成分に分別される。すなわち海水中のリンは、粒子状無機態リン(Particulate Inorganic Phosphorus; PIP)、粒子状有機態リン(Particulate Organic Phosphorus; POP)、溶存無機態リン(Dissolved Inorganic Phosphorus; DIP)及び溶存有機態リン(Dissolved Organic Phosphorus; DOP)に大別できる。上述した岩石や粘土鉱物に由来する粒子はPIPの主要成分といえる。一方、プランクトンの細胞などは大部分が有機物で構成されているため、ここに含まれるリンはPOPとみなされてきた。しかし細胞表面に無機リン酸塩が吸着していることが示されており<sup>7)</sup>、必ずしも生物体のリンを単純にPOPに分類できない状況にある。海水中の粒子状有機炭素(Particulate Organic Carbon; POC)及び粒子状有機窒素(Particulate Organic Nitrogen; PON)に比べ、POP(及びPIP)の観測データは圧倒的に不足している。POCとPONが元素分析計による同時分析が可能であるのに対し、POPの分析には追加のサンプリングとろ過操作が必要なうえ、測定手順も極めて煩雑なことが原因となっている。比較的容易な手法が提案されているが<sup>8)</sup>、依然としてPOPの観測は一般的とはいえない状況である。

海水中のDIPの大部分はオルトリン酸塩(Orthophosphate)(図2)として存在しており、海洋

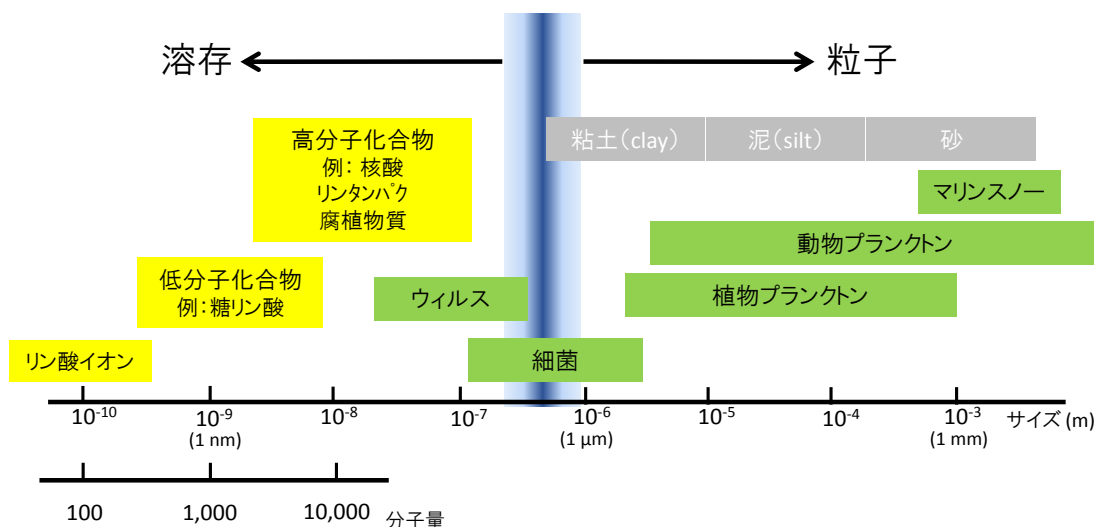


図1 海水中に存在するリン含有成分のサイズ分布.

の基礎生産を支える植物プランクトンにとって最も利用しやすい(生物利用性の高い)形態である<sup>9)</sup>。沿岸海域ではリン酸塩は過剰な負荷により富栄養化などの環境悪化を引き起こすが、3章で詳しく述べるように、貧栄養の外洋域では極めて希少な栄養塩として重要な役割を果たしている。一方 DOP についても、4章で述べるようにリンの潜在的なソースとしての役割が注目されるようになってきた。しかし DOP を構成する化合物種の詳細についてはほとんど分かっていない。1990 年代以降、タンジェンシャルフロー限外ろ過法により海水中の溶存有機物を分子量で分離する手法が急速に進展し、およそ 1 nm、分子量として 1,000 Da(ダルトン)を境界に高分子及び低分子成分に分画されるようになった<sup>10)</sup>。高分子成分はフィルター上に濃縮可能であることから、大量の海水を処理することで分析に必要な量の有機物を無機塩類(塩分)から分離・濃縮でき、核磁気共鳴吸収法など分子の化学構造の同定に極めて有効な手法が利用可能となった。これらの手法によって、海水中の高分子 DOP がリン酸エステル類と C-P 結合をもつホスホン酸類(図2)から構成されることが初めて実証された<sup>11)-13)</sup>。リンを含む個々の化合物の分析も行われており、これまでに ATP, 核酸(DNA 及び RNA), リン脂質などが DOP の一部を構成する化合物として同定されている<sup>14)-16)</sup>。しかし、これら同定された成分を全て足しあわせても全体像の把握には至っておらず、海水中の DOP の大部分が具体的にどのような化合物から構成されているのか十分にはわかっていない。

一方で、化合物の種類にはとらわれず、DOP を特性ごとに分離、定量しようという試みもなされている。例えば「疎水性」に着目した報告では、海水や懸濁粒子などの試料に含まれるリンをクロロホルムなどの溶媒で抽出することで、疎水性のリン成分(恐らくはリン脂質類により構成されていると推測

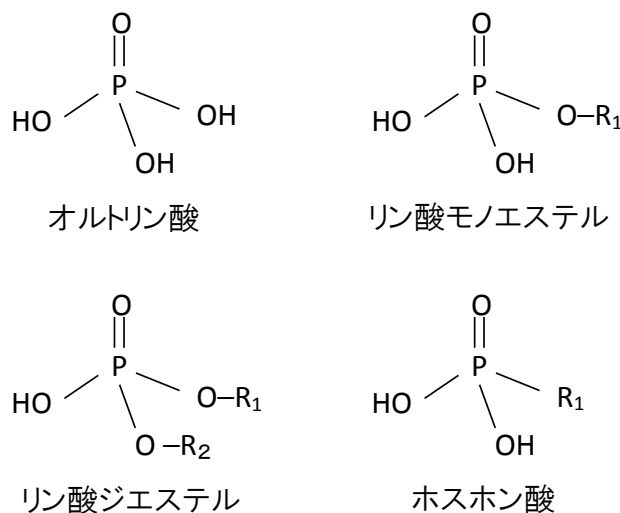


図2 海水中に存在する代表的なリンの化学形態.

される)が定量された<sup>17)-19)</sup>。さらにリン化合物の反応性・安定性を指標として、加水分解酵素によって容易に無機化される化合物を易分解性成分と定義し、特に生物にとって利用されやすい DOP 化合物群集として評価する試みもなされている<sup>20), 21)</sup>。この手法を疎水性リンの分析と組み合わせることによって、本来は容易に分解されるはずのリン脂質やリン酸エステルが、凝集することでサブミクロン粒子や巨大分子を形成し、酵素の分解を免れている可能性も沿岸海域で示唆されている<sup>22)</sup>。これらのことは、個々の有機態リン化合物の詳細を解明する(同定すること)以上に、実際の海洋中における粒子との反応性や生物にとっての利用性(易分解性)を明らかにしていくことが、海洋生態系におけるリンの循環を評価する手法としてより有用な情報を提供することを示唆している。次章以降では、まず化学形がしっかりと把握され、さらに生物利用性の最も高い無機リン酸塩の挙動について最新の技術や動向を説明

し、続いてDOPの利用性・易分解性に強くかわる加水分解酵素の役割を通して、貧栄養海域におけるリンの循環について議論してゆく。

### 3. ナノモルレベル計測で見えてきた海洋表層のリンの動態

貧栄養海域として特徴付けられる亜熱帯外洋域は全球表面積の約半分を占める広大な領域である。この海域では、周年、強い成層が発達し、中深層から表層への栄養塩類供給が著しく乏しいため、表層の栄養塩類は極低濃度に維持されている。一般に、海洋の栄養塩類濃度は吸光光度分析法によって計測されるが、それらの検出範囲はミリモル( $\text{mmol L}^{-1}$ )からマイクロモル( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )レベルである。この検出範囲では、貧栄養海域表層の栄養塩類濃度はほとんど検出できない。貧栄養海域表層の栄養塩類濃度は、多くの場合、検出限界以下(すなわちゼロ)として報告され、広大な領域における栄養塩類動態への理解は希薄で均一なイメージにとどまっていた。

2000年代にはいつてからは、栄養塩類計測に高感度分析技術が導入されるようになり、貧栄養海域表層の栄養塩類がナノモル( $\text{nmol L}^{-1}$ )レベルで存在し、時空間的に変動することが明らかになってき

た<sup>23), 24)</sup>。高感度分析では、硝酸塩(+亜硝酸塩)及びリン酸塩の計測法が先行して開発され、現場観測に基づくデータが集積されつつある。これまで得られた硝酸塩及びリン酸塩の地理分布を概観すると、硝酸塩はいずれの海域でも $20 \text{ nmol L}^{-1}$ 以下とナノモルレベルで見てもほぼ枯渇状態といえるが、リン酸塩に関しては検出限界の数 $\text{nmol L}^{-1}$ から数百 $\text{nmol L}^{-1}$ の範囲でダイナミックに変動していることがわかる(表2<sup>25) - 35)</sup>)。

ナノモルレベルのリン酸塩を計測する手法としては、マグネシウム誘導共沈(MAGIC(magnesium-induced coprecipitation))法<sup>36)</sup>や液相ウェーブガイド毛管セルを用いた長光路吸光光度分析法<sup>29), 37)</sup>が主として用いられている。前者は、海水中のリン酸塩を濃縮して吸光光度分析するのに対して、後者は、検出部に光路長1~2 mのセルを用いて吸光光度分析する手法である。両者は原理的に異なる手法であるが、比較実験の結果、両法から得られたリン酸塩濃度に有意な差はないことが報告されている<sup>38)</sup>。このことから、貧栄養海域表層におけるリン酸塩濃度のダイナミックな変動は、分析法の違いではなく、実際のリン酸塩の動態(供給と消費のバランス)に依存していると考えられる。

外洋表層における主な栄養塩類の源は拡散や混合

表2 高感度分析法によって得られた貧栄養海域表層の硝酸塩(+亜硝酸塩)及びリン酸塩濃度の海域比較。

海域	緯度経度	観測期間	硝酸塩(+亜硝酸塩)濃度( $\text{nmol L}^{-1}$ )	リン酸塩濃度( $\text{nmol L}^{-1}$ )	分析法	引用文献
西部北大西洋	25-32°N, 64-70°E	1998年3月	3~7	< 5	化学発光法, MAGIC法*	25), 26)
中部北大西洋	10-30°N, 30-40°W	2005年10~11月	1~15	1~10	長光路吸光光度法	27)
東部北大西洋	10-30°S, 10-25°W	2005年10~12月	2~15	100~300	長光路吸光光度法	27)
東部地中海	33°N, 32°E	2002年5月	< 10	< 4	長光路吸光光度法	28)
西部北太平洋	20-30°N, 140-170°E	2004年12月~ 2005年3月 2005年8~9月 2008年9月	< 13	< 10	長光路吸光光度法	29), 30)
中部北太平洋 (ハワイ沖時系列定地点)	22.75°N, 158°W	1998~1997年 ほぼ毎月観測	< 20(平均3)	8~200 (平均60)	化学発光法, MAGIC法*	31)
中部北太平洋	15-30°N, 170°E-155°W	2005年8~9月	< 5	10~150	長光路吸光光度法	29)
西部南太平洋	10-30°N, 150-170°W	2005年1~3月	3~10	20~200	長光路吸光光度法	29), 32)
東部南太平洋	10-30°S, 90-130°W	2004年10~12月	< 10	> 120	高感度 オートアナライザー法, MAGIC法*	33), 34)
西部インド洋	20-30°S, 50-65°E	2008年12月	4~15	32~90	長光路吸光光度法	35)
中部インド洋	10-20°S, 65-90°E	2008年12月	4~19	49~120	長光路吸光光度法	35)
東部インド洋	10°S, 90-115°E	2008年12月	< 17	< 72	長光路吸光光度法	35)

\* MAGIC法: Magnesium-Induced Coprecipitation法

による中深層からの供給である。有光層底部におけるリン酸塩の下層からのフラックスは亜熱帯外洋域で $1\sim 10\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{d}^{-1}$ 程度で、赤道湧昇域のフラックスの $1/100\sim 1/1000$ 程度と極めて小さいことが報告されている<sup>39), 40)</sup>。リン酸塩に加えて硝酸塩も中深層から表層に供給されるが、一般に外洋域では中深層におけるリン酸塩に対する硝酸塩の濃度比(モル比, N/P)は16以下であるのに対し、表層では窒素とリンは植物プランクトンによりレッドフィールド比(N/P=16)で利用されるため、リン酸塩よりも硝酸塩の方が先に枯渇すると考えられている<sup>41), 42)</sup>(図3(a))。事実、多くの貧栄養海域表層で硝酸塩は枯渇しており( $<20\ \text{nmol L}^{-1}$ )、硝酸塩濃度よりもリン酸塩の方が高濃度で余剰である(表2)。しかしながら、西部及び中部北大西洋、西部北太平洋、東部地中海では硝酸塩と同様にリン酸塩も $10\ \text{nmol L}^{-1}$ 以下と枯渇レベルにある。これらの海域ではなぜリン酸塩が枯渇するのであろうか。

全球における年平均ダスト降下の分布によると<sup>43)</sup>、西部及び中部北大西洋、西部北太平洋、東部地中海では顕著なダスト降下がある。ダストには鉄(Fe)が豊富に含まれており、鉄は硝酸塩枯渇下で有利な窒素固定プロセスに必須の元素である<sup>44)</sup>。実際、西部北大西洋、西部北太平洋ではシアノバクテリア(Cyanobacteria)などの窒素固定生物が現存しており、他の海域に比べて高い窒素固定活性が報告されている<sup>45), 46)</sup>。このことから貧栄養海域では、ダスト降下→窒素固定→リン酸塩枯渇のカップリングが普遍であり、鉄供給により窒素固定能が向上し、固定した窒素を植物プランクトンが消費する際にリン酸塩が消費されたと考えられる(図3(b))。

窒素固定によりリン酸塩が枯渇レベルまで低下することは明確になりつつあるが、リン酸塩の枯渇は窒素固定や一次生産を律速する可能性もある<sup>47), 48)</sup>。事実、東部地中海では極度のリン不足のため窒素固定活性及び一次生産が著しく低いことが報告されている<sup>49), 50)</sup>。上述したように、海水に溶存しているリンにはDIPに加えてDOPがある。貧栄養海域表層におけるDOP濃度は $0.1\sim 0.3\ \mu\text{mol L}^{-1}$ 程度であり、リン酸塩のように枯渇することはない<sup>19), 51)</sup>。リン酸塩枯渇下ではリン酸塩の代替としてDOPが一次生産に利用されることが指摘されており、中でも次章で詳述するアルカリフォスファターゼ(APase; Alkaline Phosphatase)によって加水分解されるリン酸モノエステルは容易に分解されるリン(Labile P; Labile Phosphorus)源として重要な役割を担っていると考えられている<sup>52), 53)</sup>(図3(b))。

Hashihamaら<sup>21)</sup>は、APaseを海水に添加して加水分解により生じたリン酸塩を長光路吸光度分析法で定量する手法を用いて、西部北太平洋におけるLabile Pの分布を調査した。その結果、深度200 m以浅では検出限界(3 nM)から243 nMの範囲で変動しており、リン酸塩(5~374 nM)と同様な空間分布を示すことを明らかにした。鉛直分布に着目すると、Labile P濃度はリン酸塩が枯渇した亜表層クロロフィル極大層以浅で低く、リン酸塩濃度が急激に上昇した亜表層クロロフィル極大層以深において上昇する傾向が認められた。リン酸塩が枯渇した亜表層クロロフィル極大層以浅では、それ以深に比べて顕著に高いAPase活性が認められ、リン酸塩枯渇下においてDOPが積極的に利用されていることが示唆された<sup>20)</sup>。

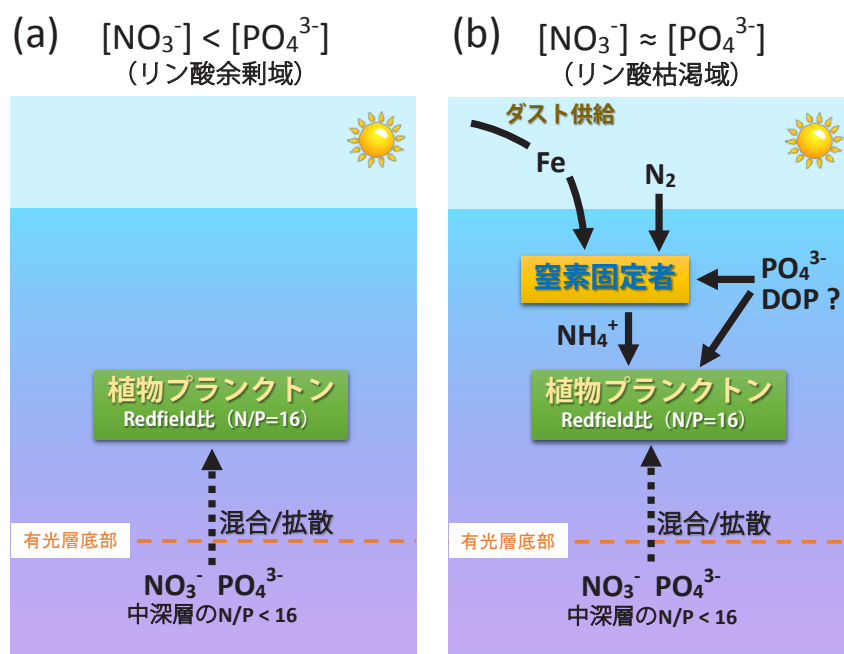


図3 リン酸塩余剰域(a)とリン酸塩枯渇域(b)の物質循環の模式図。  
DOP(Dissolved Organic Phosphorus): 溶存有機態リン,  $\text{NO}_3^-$ : 硝酸塩,  $\text{PO}_4^{3-}$ : リン酸塩,  $\text{NH}_4^+$ : アンモニウム塩。

上述のように、リン酸塩枯渇域では DOP、特に Labile P が重要なリン源である可能性が考えられるが、事実、貧栄養海域表層における Labile P 濃度は、リン酸塩と同様に枯渇レベルにある<sup>21), 54)</sup>。近年では、リン酸ジエステルやホスホン酸が貧栄養海域の一次生産を支えるリン源として重要との報告がある<sup>54), 55)</sup>。今後は DOP の組成別濃度定量や各種 DOP の生物学的利用能を現場海域において把握することが貧栄養海域のリン循環を明らかにするうえで重要になると考えられる。

#### 4. 生物生産を支える潜在的なリンソースとしての有機態リン：加水分解酵素の役割

前章で記したように、外洋表層では時として無機リン酸塩の濃度は極めて低くなる一方、DOP の濃度は比較的高く保たれており、DOP のリンソースとしての重要性は相対的に高くなる。微生物による DOP の利用には大きく分けて二つの経路がある。一つは直接的な細胞内への輸送であり、もう一つは細胞外で加水分解を経たあと、生成物のリン酸イオンを取り込むプロセスである。前者は細胞膜上のポリリン(細胞膜貫通輸送タンパク質)を介して行われていると考えられている。取り込まれた有機態リン分子の一部は細胞内で分解を受けるが、ヌクレオチドなどはそのまま生体物質の前駆体として利用されると考えられる<sup>51)</sup>。本章においては、研究例が多く、また、環境中に他の生物が利用可能なリン酸塩を放出するという点で生態学的により重要な、細胞外での加水分解に重点を置いて、海洋、特に表層における有機態リンの利用を概説する。

DOP の生物利用研究で主要な地位を占めるのが、海水の弱アルカリ環境下でリン酸モノエステル(図 2)を加水分解する酵素である APase である。APase は細菌から脊椎動物まで全ての生物が有し、その基質特異性や基質親和性はさまざまである。海洋においてはプランクトンや細菌などの細胞の膜表面上と海水中に溶存した形で存在するが、その比率は海域によって大きく異なる<sup>54), 56)</sup>。APase は一般的にリン酸塩充足環境下で発現が抑制されるため、蛍光基質の加水分解速度やそれを微生物の生物量で標準化した値はリンストレスの指標としてしばしば用いられる。リン酸塩枯渇環境下でのリン酸モノエステルの推定回転時間は 0.5~7 日程度であり<sup>54), 57)</sup>、生物地球科学的に極めて反応性の高い画分であるといえる。

APase 活性の測定には、リン酸エステル結合を有し、加水分解の前後で吸光又は蛍光特性が大きく異なる人工基質を試料海水に添加し、培養の前後での吸光又は蛍光の変化量から計測する手法が用いられる<sup>58), 59)</sup>。基質特異性の問題や海水中のリン酸エステルの化学組成(個々の化合物の形態)が不明なことか

ら、この手法は現場での加水分解速度をどの程度正確に反映しているのか不明な点が多いが、APase 活性の指標として広く用いられている。また、人工基質添加法では試料海水のバルクの活性を評価できる一方で、その活性を担う生物種を特定できないという短所がある。しかし現在では、加水分解後不溶化し細胞表面に蛍光粒子を形成する基質が市販化されており、海洋学にも応用されている<sup>60)</sup>。蛍光顕微鏡観察やフローサイトメトリーとの組み合わせにより、細胞外 APase を生産する生物を同定・計数することが可能になった。

APase 活性の測定では、事前に検討した過剰量(200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  程度)の基質を試料海水に添加し、最大活性値として見積る方法が広く用いられる<sup>61)</sup>。また現場の DOP に近いレベルで複数段階の濃度の基質を添加する方法も用いられている。後者は操作が煩雑で測定に手間もかかるが、最大活性に加えて、半飽和濃度( $K_m$  値)、回転時間、さらに別に測定した Labile DOP(APase に加水分解されうる DOP)濃度データとあわせて現場での DOP 分解速度の解析も可能となり、APase を介した DOP 利用に関するより包括的な情報を得ることができる。ただし、二つの方法で得られる最大活性値が異なる例も報告されており<sup>20)</sup>、APase の測定方法やその解析手法についてはさらに検討が必要であろう。

リン酸ジエステル(図 2)からリン酸基を加水分解する酵素であるホスホジエステラーゼ(PDEase; Phosphodiesterase)は、限られた種類の植物プランクトンからのみ活性が報告されている<sup>62)</sup>。蛍光基質を用いた測定では、リン酸枯渇海域における活性は APase より 1 桁以上低く、リン酸ジエステルの推定回転時間は 100 日を上回る<sup>54)</sup>。特定の化学構造をもつリン酸エステルを特異的に加水分解する酵素としては、アデノシン三リン酸ホスファターゼ(ATPase; Adenosine triphosphatase)、ヌクレアーゼ、ヌクレオチダーゼ(Nucleotidase)などが知られている。ヌクレアーゼにはデオキシリボヌクレアーゼ(DNase; Deoxyribonuclease)、リボヌクレアーゼ(RNase; Ribonuclease)などが含まれる。これら特定のリン化合物の動態を明らかにするためには、リンの放射性同位体標識による追跡が一般的である。ただし、この手法を用いた場合、化合物が細胞膜孔をつうじて直接取り込まれたのか、酵素による分解を受けたあとにリン酸イオン( $\text{PO}_4^{3-}$ )として取り込まれたのかを区別することはできない。これらの物質は一般的に反応性が高く、外洋表層における平均回転時間は ATP では 1~2 日程度であり<sup>63)</sup>、DNA では 1 日を大きく下回る<sup>64)</sup>。

ホスホン酸化合物中の C-P 結合は結合エネルギーが高く(約 65  $\text{kcal mol}^{-1}$ )、容易に開裂しない。その結合を切断する酵素である C-P リアーゼ(Lyase)は多数の遺伝子産物から構成されており、その反応は極

めて複雑である<sup>65)</sup>。適当な蛍光基質も市販されていないため、分子科学的手法や、ホスホン酸を唯一のリンソースとした培養により C-P リアーゼ活性の有無を推定する手法が現在は主流である。単細胞性窒素固定シアノバクテリアである *Crocospaera watsonii* からは C-P リアーゼ関連遺伝子は見つかっておらず、ホスホン酸を唯一のリンソースとして増殖することができない<sup>66)</sup>。それに対し、群体性窒素固定シアノバクテリア *Trichodesmium erythraem* は C-P リアーゼ関連遺伝子をいくつか有しており、リン酸欠乏下でその発現を高める<sup>55)</sup>。また、メチルホスホン酸(CH<sub>5</sub>O<sub>3</sub>P)やアミノエチルホスホン酸(CH<sub>6</sub>NO<sub>3</sub>P)を唯一のリンソースとして増殖可能であり、その際に分解産物であるメタン(CH<sub>4</sub>)やエタン(C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>)を増殖に伴い放出する<sup>67)</sup>。しかし、その遺伝子は他の生物でみられる C-P リアーゼ関連遺伝子のいくつかを欠いており、既知の経路とは異なる過程により分解が起こっている可能性がある。実際、C-P 化合物の分解過程は基質の構造により極めて多様であり<sup>65)</sup>、この基質・酵素・反応経路の多様性が海洋における C-P リアーゼ研究を挑戦的なものに行っているといえる。

## 5. 海洋のリンの生化学的動態解明の新たなツール：リン酸酸素同位体

リンには多くの同位体が存在し、<sup>32</sup>P や <sup>33</sup>P などの数週間の半減期をもつ放射性同位体は、リン化合物の植物プランクトンへの取込み実験などに有効に利用されてきたものの<sup>68)</sup>、<sup>69)</sup>、安定な同位体は <sup>31</sup>P の一つしかなく、海洋のリン循環の理解において P の同位体を利用することは限られていた。しかしながら、海水中の DIP の大部分を占めるオルトリン酸は、安定同位体比をもつ酸素原子とリンが強く結合した物質であり、この酸素原子は、通常的环境中では、生物による介在なしでは周囲の酸素原子と容易に置換されないことから、リン酸の酸素安定同位体比( $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ )を用いて、海洋のリン循環を明らかにしていくことが試みられてきている<sup>70)-74)</sup>。 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析のための前処理は複雑で、処理過程でのリン酸回収率の低下が同位体分別を伴って起こる場合や、有機物由来のリン酸の混雑などの要素が絡むため、特に低濃度試料中の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  を測定するには、高度な技術が必要となる。現在、海洋において報告されている  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値は限られており、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  に基づいたリン循環の解釈には不確実性も大きいのが実情であるが、リン酸が豊富な沿岸域から、リン酸濃度の低い外洋域のリン循環の解釈における  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  の利用例について下記に紹介する。なお、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析手法や、水柱の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  が、水温に依存した同位体交換平衡に従う場合と、その値から乖離するメカニズム(動的同位体効果、及び有機態リン酸由来の酸素同位体比

の継承効果)の詳細については、本特集号の奥田<sup>75)</sup>による水圏生態系のリン循環の理解に向けたリン酸の酸素安定同位体比の利用に関する総説を参照していただきたい。

内湾や沿岸域では、底層から貫入する外洋水や、淡水の河川や地下水など、高濃度のリン酸の起源が複数存在する。そのため、起源ごとに異なる  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  をもち、かつ、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  の主な変動要因の一つである生物による再循環の寄与が小さい場合には、水柱の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  と塩分を用いた混合モデルを用いて新規に流入するリン酸の起源の寄与率を求めることが可能である<sup>72)</sup>。

一方で、海水中や生物の細胞内で、有機態リン酸がリン酸に加水分解される際に、有機態リン酸由来の酸素を継承するだけでなく、一部が、周囲の水の酸素原子と置換される。そのため、リン律速環境下で、リンが生態系内で盛んに再利用される場合は、細胞内プールや海水中の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  は起源の値から離れ、水の酸素安定同位体比( $\delta^{18}\text{O}_w$ )と温度に依存した同位体交換平衡をもつ値に近づくと考えられる<sup>76)</sup>。したがって、海域の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  が、主要なリン酸供給源のエンドメンバーが作る混合ラインに近づいて供給源の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  の寄与率を示唆しているときは、リン酸が生物の需要に対して供給過剰で系内でのリン酸の回転時間が長く、逆に、 $\delta^{18}\text{O}_w$  と温度に依存した平衡状態に近づく場合は、生物活動が盛んで系内でのリン酸の回転時間が短くなっている状態と解釈できる。例えば、湧昇流が主要なリン起源とされるカリフォルニアのモンレー湾では、春～夏期に湧昇流が強く生じてリン酸を含む栄養塩供給量が増加するが、再生産を含む生物生産の増加の効果が上回り、海水中の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  ( $\cong 17\text{‰}$ ) が、現場水温での同位体交換平衡に基づく値( $\cong 23\text{‰}$ ) に近づくことが報告されている<sup>71)</sup>。ただし、リン酸濃度が高い培養実験下では、微生物、また、大型藻類やサンゴなどの一次生産者によるリン酸取り込み時には、動的同位体効果によって重たい  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  が培養水中に残されることも報告されており<sup>76)</sup>、<sup>77)</sup>、有光層への高濃度のリン酸供給がある海域では、海水中の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  の上昇について、これらの重複する影響を考慮して解釈することも求められる。一方で、3章、4章でふれてきたように、亜熱帯外洋域では、表層から躍層上部までのリン酸は枯渇し、DOP が APase やヌクレオチダーゼなどのさまざまな細胞外酵素によって無機化され、生物生産に利用される割合が大きくなる。タイトなリン循環となるため、海水中の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値は現場水温での同位体交換平衡に基づく値に近づくものの、細胞外酵素によるリン酸エステルやリン酸ジエステルの結合の加水分解に伴い同位体分別が生じるため(低濃度条件では効果は小さいが)、同位体交換平衡の値よりも  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  が低くなるという非平衡状態が生み出される。培養実験で測定された分別効果の大き

さは基質や酵素の種類に応じて大きく異なり、例えば、モノエステルに APase とヌクレオチダーゼが作用する場合はそれぞれ  $-30(\pm 8)\%$  と  $-10(\pm 1)\%$  であり、DNA と RNA に PDEase と APase という組み合わせで作用する場合、それぞれ、 $-25(\pm 6)\%$ 、 $-5(\pm 6)\%$  という報告がなされている<sup>78), 79)</sup>。そのため、DOP の利用が大きい海域には、相対的に軽い  $\delta^{18}\text{O}$  をもつリン酸が生成する。貧栄養海域で知られる大西洋西部のサルガッソー海では、水柱に残されたリン酸の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  は、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{w}}$  と現場の温度での同位体交換平衡の理論値から外れた軽い値が報告されており、これは、現場海域の有光層の APase の活性が大きいことと矛盾せず、DOP 由来のリン酸が生物に利用されていることを支持している<sup>74)</sup>。海水中の DOP の構成種や分解酵素の種類は多様であるため多くの仮定が必要となるが、培養実験によって明らかになっている DOP 種別の分解時の同位体分別係数を利用して、同位体マスバランス(質量保存則)計算を行うと、観測された  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  と、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{w}}$  との同位体平衡の理論値のズレの大きさから、DOP 由来の DIP の寄与を近似的に計算する試みもできる<sup>74)</sup>。

外洋の有光層より下部では、従属栄養バクテリアや動物プランクトンによる沈降粒子の代謝によって生成する DIP が増加し、易分解性の DOP が減少する。この傾向は、大西洋と太平洋亜熱帯海域で同じ傾向を示すが、大西洋北部の沈み込みによって始まる海洋大循環の始点に近い大西洋よりも、太平洋の亜熱帯海域の有光層下部の海水は平均的に年代が古く、DIP が蓄積して高濃度になっている<sup>70)</sup>。躍層以深の水深 300~1,000 m の中深層において、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  は、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{w}}$  と現場の温度での同位体平衡の理論値に近くなるという報告は、易分解性の DOP 利用が減少して動的同位体効果を生み出す細胞外酵素活性が低下し、同位体交換平衡で支配されるピロフォスファターゼ(Pyrophosphatase)による DIP の生成の寄与が大きいという深層のリン循環を示唆する結果となっている<sup>70), 74)</sup>。ただし、沈降粒子中の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  は、暖かい表層水中で  $\delta^{18}\text{O}_{\text{w}}$  との同位体交換平衡の影響を受けたものであり、冷たい深層水の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{w}}$  との同位体交換平衡の理論値よりは軽い値をもつとも考えられ、実際には複合的な要因が関係していると考えられる<sup>70)</sup>。

$\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  の示す現象を正しく解釈していくためには、今後もデータの蓄積が必要とされるが、海域調査で得られた海水試料中の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  は、それまでに海水が経験してきた栄養塩状態(リン酸の供給と生物による利用)の時間平均的な記録となるため、ナノモルレベルでのリン酸分析や DOP の分解に関わる酵素活性の測定というツールに加えて、貧栄養海域のリン循環を理解するうえで有効なツールといえる。

## 6. おわりに

貧栄養外洋域におけるリンの重要性は疑いの無いところであるが、オルトリン酸がナノモルオーダーで時空間的にダイナミックな変動をしていることや、DOP の生成・利用のプロセスの全体像が見えてきたのは近年になってからのことである。酸化数や安定同位体のバラエティに乏しいリンの動態研究は、炭素や窒素と比べて困難な部分も多いが、本稿で解説してきた化学分析手法の発展や微生物などによるリンの代謝過程の解明により、これまでブラックボックスであったいくつかのプロセスが質的にも量的(速度論的)にも明らかになりつつある。今後、気候変動や海洋酸性化といったグローバルな環境変動は、海洋生態系やそれを駆動する親生物元素の挙動にも大きな影響を及ぼすと考えられる。その影響の将来予測も含め、海洋におけるリンの循環についてより詳細な研究を進展させてゆくことが求められる。あわせて、これまで必ずしも十分とはいえなかった、陸-沿岸海域-外洋域におけるリン研究のシームレスな連携が必要であろう。

## 引用文献

- 1) McKelvey, V. E. (1973) Abundance and distribution of phosphorus in the lithosphere. *In*: E. J. Griffith, A. Beeton, J. M. Spencer and D. T. Mitchell, eds., *Environmental Phosphorus Handbook*, 13-31, John Wiley & Sons.
- 2) Paytan, A. and K. McLaughlin (2007) Phosphorus in Our Waters. *Oceanography*, 20, 200-206.
- 3) Millero, F. J. (1996) *Chemical Oceanography*, Second Edition, CRC Press.
- 4) MacKenzie, F. T., L. M. Ver, C. Sabine, M. Lane and A. Lerman (1993) C, N, P, S Global biogeochemical cycles and modeling of global change. *In*: R. Wollast, F. T. MacKenzie and L. Chou, eds., *Interaction of C, N, P and S Biogeochemical Cycles and Global Change*, NATO ASI Series, 4, 1-61, Springer-Verlag.
- 5) McCave, I. N. (1975) Vertical flux of particles in the ocean. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 22, 491-502.
- 6) Jackson, G. A. (1995) Comparing observed changes in particle size spectra with those predicted using coagulation theory. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies*, 42, 159-184.
- 7) Sañudo-Wilhelmy, S. A., A. Tovar-Sanchez, F.-X. Fu, D. G. Capone, E. J. Carpenter and D. A. Hutchins (2004) The impact of surface-adsorbed phosphorus on phytoplankton Redfield stoichiometry. *Nature*, 432, 897-901.
- 8) Suzumura, M. (2008) Persulfate chemical wet



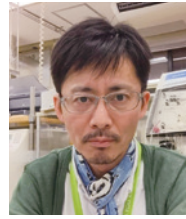
- oxidation method for the determination of particulate phosphorus in comparison with a high-temperature dry combustion method. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6, 619-629.
- 9) Björkman, K. and D. M. Karl (1994) Bioavailability of inorganic and organic phosphorus compounds to natural assemblages of microorganisms in Hawaiian coastal waters. *Marine Ecology Progress Series*, 111, 265-273.
  - 10) Benner, R. (1991) Ultra-filtration for the concentration of bacteria, viruses, and dissolved organic matter. In: D. C. Hurd and D. W. Spencer, eds., *Marine Particles: Analysis and Characterization*, Geophysical Monograph Series, 63, 181-186, American Geophysical Union.
  - 11) Clark, L. L., E. D. Ingall and R. Benner (1998) Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature*, 393, 426.
  - 12) Clark, L. L., E. D. Ingall and R. Benner (1999) Marine organic phosphorus cycling: Novel insights from nuclear magnetic resonance. *American Journal of Science*, 299, 724-737.
  - 13) Kolowitz L. C., E. D. Ingall and R. Benner (2001) Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 46, 309-320.
  - 14) Azam, F. and R. E. Hodson (1977) Dissolved ATP in the sea and its utilisation by marine bacteria. *Nature*, 267, 696-698.
  - 15) Parrish, C. C., P. J. Wangersky, R. P. Delmas and R. G. Ackman (1988) In situ measured profiles of dissolved and particulate marine lipid classes over the Scotian Slope and in Bedford Basin. *Marine Chemistry*, 23, 1-15.
  - 16) Karl, D. M. and M. D. Bailiff (1989) The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments. *Limnology and Oceanography*, 34, 543-558.
  - 17) Suzumura, M. (2005) Phospholipids in marine environments: a review. *Talanta*, 66, 422-434.
  - 18) Suzumura, M. and E. D. Ingall (2001) Concentrations of lipid phosphorus and its abundance in dissolved and particulate organic phosphorus in coastal seawater. *Marine Chemistry*, 75, 141-149.
  - 19) Suzumura, M. and E. D. Ingall (2004) Distribution and dynamics of various forms of phosphorus in seawater: insights from field observations in the Pacific Ocean and a laboratory experiment. *Deep-Sea Research Part I, Oceanographic Research Papers*, 51, 1113-1130.
  - 20) Suzumura, M., F. Hashihama, N. Yamada and S. Kinouchi (2012) Dissolved phosphorus pools and alkaline phosphatase activity in the euphotic zone of the western North Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology*, 3, 99, 1-13.  
doi: 10.3389/fmicb.2012.00099.
  - 21) Hashihama, F., S. Kinouchi, S. Suwa, M. Suzumura and J. Kanda (2013) Sensitive determination of enzymatically labile dissolved organic phosphorus and its vertical profiles in the oligotrophic western North Pacific and East China Sea. *Journal of Oceanography*, 69, 357-367.  
doi: 10.1007/s10872-013-0178-4.
  - 22) Suzumura, M., K. Ishikawa and H. Ogawa (1998) Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnology and Oceanography*, 43, 1553-1564.
  - 23) Karl, D. M. (2002) Nutrient dynamics in the deep blue sea. *TRENDS in Microbiology*, 10, 410-418.
  - 24) 橋濱史典(2013)高感度栄養塩類分析法を用いた亜熱帯海域表層の生物地球化学的研究. *海の研究*, 22, 169-185.
  - 25) Wu, J., W. Sunda, E. A. Boyle and D. M. Karl (2000) Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science*, 289, 759-762.
  - 26) Cavender-Bares, K. K., D. M. Karl and S. W. Chisholm (2001) Nutrient gradients in the western North Atlantic Ocean: Relationship to microbial community structure and comparison to patterns in the Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part I*, 48, 2373-2395.
  - 27) Moore, C. M., M. M. Mills, E. P. Achterberg, R. J. Geider, J. LaRoche, M. I. Lucas, E. L. McDonagh, X. Pan, A. J. Poulton, M. J. A. Rijkenberg, D. J. Suggett, S. J. Ussher and E. M. S. Woodward (2009) Large-scale distribution of Atlantic nitrogen fixation controlled by iron availability. *Nature Geoscience*, 2, 867-871.
  - 28) Krom, M. D., E. M. S. Woodward, B. Herut, N. Kress, P. Carbo, R. F. C. Mantoura, G. Spyres, T. F. Thingstad, P. Wassmann, C. Wexels-Riser, V. Kitidis, C. S. Law and G. Zodiatis (2005) Nutrient cycling in the south east Levantine basin of the eastern Mediterranean: Results from a phosphorus starved system. *Deep-Sea Research Part II, Topical Studies in Oceanography*, 52, 2879-2896.
  - 29) Hashihama, F., K. Furuya, S. Kitajima, S. Takeda, T. Takemura and J. Kanda (2009) Macro-scale exhaustion of surface phosphate by dinitrogen fixation in the western North Pacific. *Geophysical Research Letters*, 36, L03610, 1-5.  
doi: 10.1029/2008GL036866.
  - 30) Hashihama, F., J. Kanda, Y. Maeda, H. Ogawa and K. Furuya (2014) Selective depressions of surface

- silicic acid within cyclonic mesoscale eddies in the oligotrophic western North Pacific. *Deep-Sea Research Part I, Oceanographic Research Papers*, 90, 115-124.
- 31) Karl, D. M., K. M. Björkman, J. E. Dore, L. Fujieki, D. V. Hebel, T. Houlihan, R. M. Letelier and L. M. Tupas (2001) Ecological nitrogen-to-phosphorus stoichiometry at station ALOHA. *Deep-Sea Research Part II, Topical Studies Oceanography*, 48, 1529-1566.
- 32) Hashihama, F., M. Sato, S. Takeda, J. Kanda and K. Furuya (2010) Mesoscale decrease of surface phosphate and associated phytoplankton dynamics in the vicinity of the subtropical South Pacific islands. *Deep-Sea Research Part I, Oceanographic Research Papers*, 57, 338-350.
- 33) Moutin, T., D. M. Karl, S. Duhamel, P. Rimmelin, P. Raimbault, B. A. S. Van. Mooy and H. Claustre (2008) Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences*, 5, 95-109.
- 34) Raimbault, P., N. Garcia and F. Cerutti (2008) Distribution of inorganic and organic nutrients in the South Pacific Ocean – evidence for long-term accumulation of organic matter in nitrogen-depleted waters. *Biogeosciences*, 5, 281-298.
- 35) Ogawa, H., K. Kogure, J. Kanda, F. Hashihama and M. Suzumura (2014) Detailed variations in bioactive elements in the surface ocean and their interaction with microbiological processes. In: M. Uematsu, Y. Yokouchi, Y. W. Watanabe, S. Takeda and Y. Yamanaka, eds., *Western Pacific Air-Sea Interaction Study*, 177-197, Terra Scientific Publishing Company, Tokyo.
- 36) Karl, D. M. and G. Tien (1992) MAGIC: A sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments. *Limnology and Oceanography*, 37, 105-116.
- 37) Zhang, J. Z. and J. Chi (2002) Automated analysis of nanomolar concentrations of phosphate in natural waters with liquid waveguide. *Environmental Science & Technology*, 36, 1048-1053.
- 38) Li, Q. P. and D. A. Hansell (2008) Intercomparison and coupling of magnesium-induced co-precipitation and long-path liquid-waveguide capillary cell techniques for trace analysis of phosphate in seawater. *Analytica Chimica Acta*, 611, 68-72.
- 39) Vidal, M., C. M. Duarte and S. Agusti (1999) Dissolved organic nitrogen and phosphorus pools and fluxes in the central Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 44, 106-115.
- 40) Zimmerman, A. E., A. C. Martiny, M. W. Lomas and S. D. Allison (2014) Phosphate supply explains variation in nucleic acid allocation but not C : P stoichiometry in the western North Atlantic. *Biogeosciences*, 11, 1599-1611.
- 41) Fanning, K. A. (1992) Nutrient provinces in the sea: Concentration ratios, reaction rate ratios, and ideal covariation. *Journal of Geophysical Research*, 97, 5693-5712.
- 42) Anderson, L. A. and J. L. Sarmient (1994) Redfield ratios of remineralization determined by nutrient data analysis. *Global Biogeochemical Cycles*, 8, 65-80.
- 43) Jickells, T. D., Z. S. An, K. K. Andersen, A. R. Baker, G. Bergametti, N. Brooks, J. J. Cao, P. W. Boyd, R. A. Duce, K. A. Hunter, H. Kawahata, N. Kubilay, J. laRoche, P. S. Liss, N. Mahowald, J. M. Prospero, A. J. Ridgwell, I. Tegen and R. Torres (2005) Global iron concentrations between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. *Science*, 308, 67-71.
- 44) Raven, J. A. (1988) The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon and nitrogen sources. *New Phytologist*, 109, 279-287.
- 45) Sohm, J. A., E. A. Webb and D. G. Capone (2011) Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 499-508.
- 46) Luo, Y.-W., S. C. Doney, L. A. Anderson, M. Benavides, I. Berman-Frank, A. Bode, S. Bonnet, K. H. Boström, D. Böttjer, D. G. Capone, E. J. Carpenter, Y. L. Chen, M. J. Church, J. E. Dore, L. I. Falcón, A. Fernández, R. A. Foster, K. Furuya, F. Gómez, K. Gundersen, A. M. Hynes, D. M. Karl, S. Kitajima, R. J. Langlois, J. LaRoche, R. M. Letelier, E. Marañón, D. J. McGillicuddy Jr., P. H. Moisander, C. M. Moore, B. Mouriño-Carballido, M. R. Mulholland, J. A. Needoba, K. M. Orcutt, A. J. Poulton, E. Rahav, P. Raimbault, A. P. Rees, L. Riemann, T. Shiozaki, A. Subramaniam, T. Tyrrell, K. A. Turk-Kubo, M. Varela, T. A. Villareal, E. A. Webb, A. E. White, J. Wu and J. P. Zehr (2012) Database of diazotrophs in global ocean: abundance, biomass and nitrogen fixation rates. *Earth System Science Data*, 4, 47-73.
- 47) Sañudo-Wilhelmy, S. A., A. B. Kustka, C. J. Gobler, D. A. Hutchins, M. Yang, K. Lwiza, J. Burns, D. G. Capone, J. A. Raven and E. J. Carpenter (2001) Phosphorus limitation of nitrogen fixation by *Trichodesmium* in the central Atlantic Ocean. *Nature*, 411, 66-69.
- 48) Mills, M. M., C. Ridame, M. Davey, J. L. LaRoche and R. J. Geider (2004) Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature*, 429, 292-294.
- 49) Ibello, V., C. Cantoni, S. Cozzi and G. Civitarese (2010) First basin-wide experimental results on N<sub>2</sub> fixation in the open Mediterranean Sea. *Geophysical Research*

- Letters*, 37, L03608, 1-5.  
doi: 10.1029/2009gl041635.
- 50) Krom, M. D., K.-C. Emeis and P. Van Cappellen (2010) Why is the Eastern Mediterranean phosphorus limited? *Progress in Oceanography*, 85, 236-244.
- 51) Karl, D. M. and K. M. Björkman (2002) Chapter 6: Dynamics of DOP. In: Hansell, D. A. and C. A. Carlson eds., *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, 249-366, Academic Press.
- 52) Cembella, A. D., N. J. Antia and P. J. Harrison (1982) The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part 1. *Critical Reviews in Microbiology*, 10, 317-391.
- 53) Hoppe, H.-G. (2003) Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia*, 493, 187-200.
- 54) Sato, M., R. Sakuraba and F. Hashihama (2013) Phosphate monoesterase and diesterase activities in the North and South Pacific Ocean. *Biogeosciences*, 10, 7677-7688.
- 55) Dyhrman, S. T., P. D. Chappell, S. T. Haley, J. W. Moffett, E. D. Orchard, J. B. Waterbury and E. A. Webb (2006) Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature*, 439, 68-71.
- 56) Duhamel, S., K. M. Björkman, F. Van Wambeke, T. Moutin and D. M. Karl (2011) Characterization of alkaline phosphatase activity in the North and South Pacific Subtropical Gyres: Implications for phosphorus cycling. *Limnology and Oceanography*, 56, 1244-1254.
- 57) Van Wambeke, F., U. Christaki, A. Giannokourou, T. Moutin and K. Souvemerzoglou (2002) Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 43, 119-133.
- 58) Perry, M. J. (1972) Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Marine Biology*, 15, 113-119.
- 59) Hoppe, H.-G. (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series*, 11, 299-308.
- 60) González-Gil, S., B. A. Keafer, R. V. M. Jovine, A. Aguilera, S. H. Lu and D. M. Anderson (1998) Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 164, 21-35.
- 61) Hoppe, H.-G. and S. Ulrich (1999) Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 139-148.
- 62) Yamaguchi, H. (2005) Utilization of phosphate diester by the marine diatom *Chaetoceros ceratosporus*. *Journal of Plankton Research*, 27, 603-606.
- 63) Björkman, K. M. and D. M. Karl (2005) Presence of dissolved nucleotides in the North Pacific Subtropical Gyre and their role in cycling of dissolved organic phosphorus. *Aquatic Microbial Ecology*, 39, 193-203.
- 64) Brum, J. R. (2005) Concentration, production and turnover of viruses and dissolved DNA pools at Stn ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre. *Aquatic Microbial Ecology*, 41, 103-113.
- 65) Villarreal-Chiu, J. F., J. P. Quinn and J. W. McGrath (2012) The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Frontiers in Microbiology*, 3, 19, 1-13.
- 66) Dyhrman, S. T. and S. T. Haley (2006) Phosphorus scavenging in the unicellular marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1452-1458.
- 67) Beversdorf, L. J., A. E. White, K. M. Björkman, R. M. Letelier and D. M. Karl (2010) Phosphonate metabolism of *Trichodesmium* IMS101 and the production of greenhouse gases. *Limnology and Oceanography*, 55, 1768-1778.
- 68) Cotner, J. B., Jr. and R. G. Wetzel (1992) Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 37, 232-243.
- 69) Sohm J. A. and D. G. Capone (2006) Phosphorus dynamics of the tropical and subtropical north Atlantic: *Trichodesmium* spp. versus bulk plankton. *Marine Ecology Progress Series*, 317, 21-28.
- 70) Colman, A. S., R. E. Blake, D. M. Karl, M. L. Fogel and K. K. Turekian (2005) Marine phosphate oxygen isotopes and organic matter remineralization in the oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 13023-13028.
- 71) McLaughlin K, F. Chavez, J. T. Pennington and A. Paytan (2006) A time series investigation of the oxygen isotopic composition of dissolved inorganic phosphate in Monterey Bay, California. *Limnology and Oceanography*, 51, 2370-2379
- 72) McLaughlin, K, C. Kendall, S. R. Silva, M. Young and A. Paytan (2006) Phosphate oxygen isotope ratios as a tracer for sources and cycling of phosphate in North San Francisco Bay, California. *Journal of Geophysical Research*, 111, G03003.

doi: 10.1029/2005JG000079.

- 73) Paytan, A. and K. McLaughlin (2011) Tracing the sources and biogeochemical cycling of phosphorus in aquatic systems using isotopes of oxygen in phosphate. In: Baskaran, M. ed. *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*, 419-436, Springer-Verlag, Berlin.  
doi: 10.1007/978-3-642-10637-8\_21.
- 74) McLaughlin, K., J. A. Sohm, G. A. Cutter, M. W. Lomas and A. Paytan (2013) Phosphorus cycling in the Sargasso Sea: Investigation using the oxygen isotopic composition of phosphate, enzyme-labeled fluorescence, and turnover times. *Global Biogeochemical Cycles*, 27, 375-387.  
doi: 10.1002/gbc.20037.
- 75) 奥田 昇 (2015) リン酸-酸素安定同位体分析が拓くリン循環研究の黎明, *地球環境*, 20, 103-110.
- 76) Blake, R. E., J. R. O'Neil and A. V. Surkov (2005) Biogeochemical cycling of phosphorus: insights from oxygen isotope effects of phosphoenzymes. *American Journal of Science*, 305, 596-620.
- 77) Paytan, A., Y. Kolodny, A. Neori and B. Luz (2002) Rapid biologically mediated oxygen isotope exchange between water and phosphate. *Global Biogeochemical Cycles*, 16, 13-1-13-8.
- 78) Liang, Y. and R. E. Blake (2006) Oxygen isotope signature of  $P_i$  regeneration from organic compounds by phosphomonoesterases and photooxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 3957-3969.
- 79) Liang, Y. and R. E. Blake (2009) Compound- and enzyme-specific phosphodiester hydrolysis mechanisms revealed by  $\delta^{18}O$  of dissolved inorganic phosphate: Implications for marine P cycling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 3782-3794.



鈴木 昌弘 / Masahiro SUZUMURA

国立研究開発法人産業技術総合研究所環境管理研究部門海洋環境動態評価研究グループ研究グループ長。岐阜県出身。東京水産大学大学院水産学研究科修了, 博士(水産学)。河口・沿岸域から外洋域まで広範なリン循環が専門。近年は二酸化炭素海底地層貯留(CCS)技術や産業副生物を用いた沿岸生態系創生技術の評価にも携わっている。



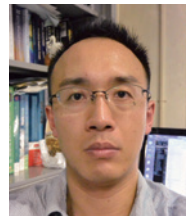
塚崎 あゆみ / Ayumi TSUKASAKI

国立研究開発法人産業技術総合研究所環境管理研究部門海洋環境動態評価研究グループ研究員。名古屋大学大学院環境学研究科地球環境科学専攻修了。博士(理学)。愛知県出身。専門は外洋域における有機物循環。現在は二酸化炭素海底地層貯留(CCS)技術や産業副生物を用いた沿岸生態系創生技術がリンを含む栄養塩類や有機物の動態に及ぼす影響評価に取り組んでいる。



橋濱 史典 / Fuminori HASHIHAMA

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科助教。東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻修了, 博士(農学)。広島県出身。専門は海洋表層における栄養塩環境と植物プランクトン群集動態。特に亜熱帯外洋域をフィールドに, 表層における低濃度栄養塩類の分布や循環, また, それらと植物プランクトンの現存量や群集組成との関係について, 船上での観測と実験を中心に研究を展開している。



佐藤 光秀 / Mitsuhide SATO

東京大学大学院農学生命科学研究科助教。東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻中退, 博士(農学)。東京都出身。植物プランクトンを中心とする海洋プランクトンにまつわる物質循環が専門。研究対象は外洋における植物プランクトンの増殖にリンや微量金属類が及ぼす影響, 微生物食物網における被食・捕食関係, 混合栄養生物の生理生態など, 多岐にわたる。



梅澤 有 / Yu UMEZAWA

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科准教授。東京大学理学部地学科卒業。東京大学理学系研究科地球惑星科学専攻修了, 博士(理学)。千葉県出身。専門は生物地球化学, 物質循環。東京大学海洋研究所, 及びハワイ大学ポスドク研究員, 総合地球環境学研究所上級研究員を経て, 現在に至る。陸域を含む沿岸域・縁辺海域, サンゴ礁海域において, 安定同位体・放射性同位体を用いた水・物質循環, 食物連鎖研究に従事している。