

リン酸－酸素安定同位体分析が拓くリン循環研究の黎明

Phosphate oxygen isotope analysis to study phosphorous cycling

奥田 昇*

Noboru OKUDA*

大学共同利用機関法人 人間文化研究機構 総合地球環境学研究所
Research Institute for Humanity and Nature

摘 要

リン (P) に安定同位体は 1 種類しか存在しないが、リンの主要形態であるリン酸 (PO_4^{3-}) に含まれる酸素には 3 種類の安定同位体が存在する。リン酸の P-O 結合は、自然条件下で安定なため、生物によって代謝されない限り、その酸素安定同位体情報は化学的に保存される。換言すれば、生物過程が無視できる系に存在するリン酸の酸素安定同位体比 ($\delta^{18}\text{O}_p$) は、各種負荷源の混合割合に応じてそれらの同位体情報を反映する。一方、生物によるリン代謝が卓越する系では、リン酸と環境水の間で酸素安定同位体比の温度依存的な交換平衡が迅速に起こる。このリン酸の化学的・生化学的特性に基づいて、生態系のリン循環を駆動する二つの主要なプロセス、すなわち、「負荷源の混合」及び「生物による再循環」を評価することが可能となる。本稿では、リン酸－酸素安定同位体分析を用いて、流域生態系におけるリン循環を評価する研究事例を紹介するとともに、今後の課題と展望を述べる。

キーワード：安定同位体混合モデル，温度依存的同位体交換平衡，
速度論的同位体効果，熱分解型安定同位体質量分析計，
ピロホスファターゼ

Key words：stable isotope mixing model,
temperature-dependent isotope exchange equilibrium,
kinetic isotope effect, TC/EA-IRMS, pyrophosphatase

1. はじめに

生命の必須元素であるリン (P) は、情報因子 (DNA; Dioxynucleic acid, デオキシリボ核酸)，エネルギー源 (ATP; Adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸)，物質生産場 (RNA; Ribonucleic acid, リボ核酸)，細胞骨格 (リントタンパク・リン脂質) などの主成分として、生物代謝の重要な機能を担う。また、リンは生物に利用可能な形態での存在量が希少であるゆえ、生態系の代謝速度 (生産性) を制御する律速因子ともなりうる。このような特性のため、人間活動に伴うリン資源の局在化は、富栄養化など水系の生産過多を引き起こし、他方、リン資源の過剰消費は、将来的に農地の生産性低下を引き起こし、食糧安全保障をも脅かす¹⁾。

リンは、そのほとんどが水を介して運搬される。流域圏から海域に散逸したリンは、やがて海底に沈降する。海底に堆積したリンが、地殻変動に伴って再び陸上に出現するのは数千万年後²⁾。かたや、リン鉱石が肥料や食料に形を変えて消費されるまでの

期間は、数年から数十年。現代のリン資源サイクルが持続可能でないことは明白である。持続可能な流域圏社会を構築するには、流域生態系におけるリンのリサイクル (再循環) を促す取り組みが欠かせない。この人類の究極目標を達成するには、流域生態系におけるリンの動態を正確に把握し、人間活動に伴うリン循環の攪乱を科学的に評価する研究が必要である。

従来、リンの循環は、全リン (無機態と有機態のリンの総量) の濃度を測定することによって推し量られてきた。面源負荷量に基づく推定法は、リンが大気とほとんど交換せず、水系に負荷される全リンを保存量と見なせることに依拠したモデルである。しかし、いかにリン濃度を感度よく高精度で測ろうとも、現場に存在するリンの由来を直接的に知ることはできない。また、面源負荷量に基づく推定法では、生物による再循環プロセスをブラックボックスにしたままリン循環を扱ってきた。いま、流域生態系のリン循環を理解する新たな手法の開発が必要とされている。

受付：2015 年 1 月 9 日，受理：2015 年 4 月 9 日

* 〒 603-8047 京都市北区上賀茂本山 457-4, e-mail : nokuda@chikyuu.ac.jp

温暖化や窒素汚染といった地球環境問題を背景として、物質循環研究の科学的・社会的重要性は増しつつある。炭素(C)・窒素(N)安定同位体比を天然トレーサーとして用いる分析技術・方法論の革新は、生物地球化学的循環プロセスに対する我々の理解を飛躍的に前進させた。一方、安定同位体が1種類しか存在しないリンの循環研究は、炭素・窒素循環研究の後塵を拝してきた。

しかし近年、リン循環を可視化する画期的な安定同位体手法が開発された。リンの主要形態であるリン酸(PO₄³⁻)に含まれる酸素(O)には、3種類の安定同位体が存在する。このリン酸の酸素安定同位体比(δ¹⁸O_p)に着目することで、流域生態系におけるリンの循環パターンを解き明かす手法が脚光を浴びている。

本稿では、急速に発展しつつあるリン酸の酸素安定同位体比を分析する手法とその原理を解説する。さらに、本手法を用いて流域生態系におけるリン循環を評価する研究事例のいくつかを紹介するとともに、今後の課題と展望を述べる。

2. リン酸－酸素安定同位体分析の歴史

リン酸－酸素安定同位体分析を用いた研究の歴史をひも解くと、古生物学や古気候学に辿り着く。海洋生態系の古環境、特に、海水温を復元するツールとして無脊椎動物の化石骨格(炭酸カルシウム)の酸素安定同位体分析が用いられてきた。これは、骨格形成時の炭酸カルシウム(CaCO₃)と海水(H₂O)の間に酸素同位体比の温度依存的な交換平衡が生じることを利用したものである^{3), 4)}。ところが、この炭酸カルシウム骨格は風化しやすいため、続成作用による同位体比改変の影響が指摘されてきた。この短所を補う手法として、生物由来のアパタイト(リン灰石)の酸素同位体比に目が向けられるようになった。炭酸カルシウム骨格と同じく、アパタイト骨格が形成される際、リン酸(PO₄³⁻)と環境水の酸素同位体の間に温度依存的な交換平衡が生じる。アパタイトの利点は、炭酸カルシウムより化学的に安定なため、環境復元性が高いことである。この温度依存的な同位体交換平衡は、さまざまな海産生物のリン酸塩骨格と海水の酸素安定同位体比、及び環境水温のデータ

から演繹的に以下のように定式化された⁵⁾。

$$T(^{\circ}\text{C}) = 111.4 - 4.3 * (\delta^{18}\text{O}_p - \delta^{18}\text{O}_w) \quad (\text{式 } 1)$$

ここで、Tは環境水温、δ¹⁸O_pとδ¹⁸O_wは、それぞれリン酸と環境水の酸素安定同位体比を表す。この関係式は、海産生物に限らず、淡水生物や陸上生物など幅広い分類群に適用可能である。その理由は、後述するように、この同位体反応が全ての生物によって共有されるリン代謝の生化学的メカニズムに基づくためである。

3. リン酸－酸素安定同位体手法の原理

3.1 リン酸の化学特性

全ての生物が利用可能なリン酸の形態は、溶存無機態のオルトリン酸(H₃PO₄)である。以下、断りなく「リン酸」という語を用いる場合は、「オルトリン酸」を指す。先述のように、リン酸の酸素同位体情報は続成作用の影響を受けにくい。これは、リン酸分子中のリン原子と酸素原子の結合力が強く、自然条件下で切断されにくいためである。リン酸分子に含まれる酸素原子が環境中に存在する酸素原子と置き換わらないため、リン酸の酸素安定同位体情報は化学的に保存されるというわけである。

したがって、水系に存在するリン酸の酸素安定同位体比(δ¹⁸O_p)は、後述するように、生物によって代謝されない限り、そこに負荷されるリン酸の由来を反映する。Youngら⁶⁾は、水系に負荷されるさまざまな潜在的リン源のδ¹⁸O_pを測定し、それぞれのリン源が固有の同位体情報をもつことを報告した。

3.2 リン代謝の生化学基盤

全ての生物にとって最も利用しやすいオルトリン酸を細胞内に取り込んで代謝するには、まず環境中に存在するポリリン酸やピロリン酸(H₄P₂O₇)をオルトリン酸に変換する必要がある。無機ピロホスファターゼは、オルトリン酸2分子の縮合体であるピロリン酸をオルトリン酸に可逆的に加水分解する細胞内酵素である(図1)。この酵素反応によって、P-O結合が開裂する際にオルトリン酸の酸素原子と環境水の酸素原子が置換する。この反応は可逆的に起こるため、PO₄³⁻の4か所のP-O結合の全ての部位にお

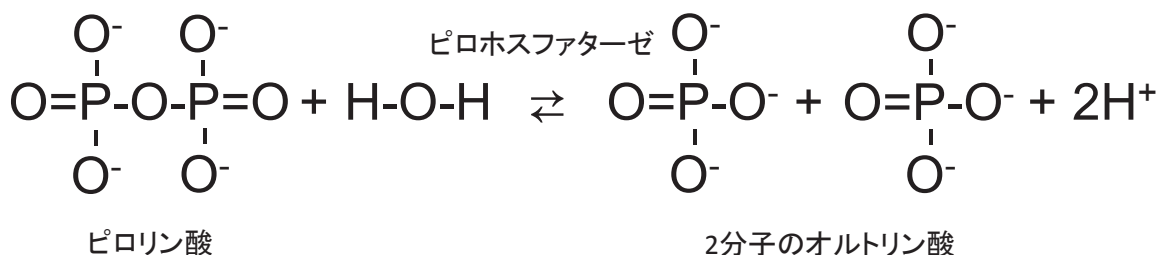


図1 細胞内リン代謝酵素である無機ピロホスファターゼの酵素反応。

いて水の酸素同位体と迅速に交換平衡が生じる。

Blake ら⁷⁾は、既知の酸素同位体比で標識された水とリン酸を用いて、ピロホスファターゼの加水分解に伴うリン酸-酸素同位体比($\delta^{18}O_p$)の挙動を調べた。実験の結果、 $\delta^{18}O_p$ は速やかに交換平衡に達し、その収束値が Longinelli と Nuti⁵⁾によって経験的に求められた温度依存的同位体交換平衡式(式1)の期待値とよく一致することを実証した。ピロホスファターゼは、全ての生物が共有する必須のリン代謝酵素である。この実験結果は、生物界に普遍的にみられる温度依存的同位体交換平衡反応がピロホスファターゼを介した生化学的基盤をもつことを示唆する。

環境中の有機態リン酸(リン酸エステル)は高分子であるため、通常、そのまま細胞内に取り込むことができない。微生物の中には、細胞膜貫通型輸送タンパク質であるポリンを介して、有機態リン酸を直接的に取り込める種も存在するが、細胞外酵素であるアルカリホスファターゼを用いてリン酸エステルを加水分解し、副産物の無機態リン酸を細胞内に取り込むのが一般的である。この細胞外酵素は、リン酸モノエステルを加水分解する際、四つのP-O結合の1か所のみ水分子の酸素と置換する(図2)。グルコース-1-リン酸を大腸菌アルカリホスファターゼで加水分解する *in vitro*(イン・ビトロ)実験をおこなったところ、リン酸と環境水の酸素同位体比をプロットした傾きは0.228 となり、リン酸の酸素同位体の25%が水の酸素同位体と置換すると仮定したシンプルな混合モデルの予測(傾き0.25)とほぼ一致した⁸⁾。この結果は、逆にいえば、残りの75%の酸素同位体が有機物由来の酸素同位体を反映することを意味する。これを履歴効果(inheritance effect)とよぶ。また、この酵素反応では、大きな速度論的同位体効果が生じる。

これらを踏まえて、Blake ら⁷⁾は、細菌にグルコース-1-リン酸を基質として与える *in vivo*(イン・ビボ)実験をおこなった。この培養実験におけるリン酸と環境水の酸素同位体比プロットの傾きは、ピロホスファターゼのみを用いた *in vitro* 実験から得られる傾き(式1より温度一定のもとで理論値は1)より低く、アルカリホスファターゼのみを用いた *in vitro* 実験(理論値0.25)より高い値を示した(図3)。

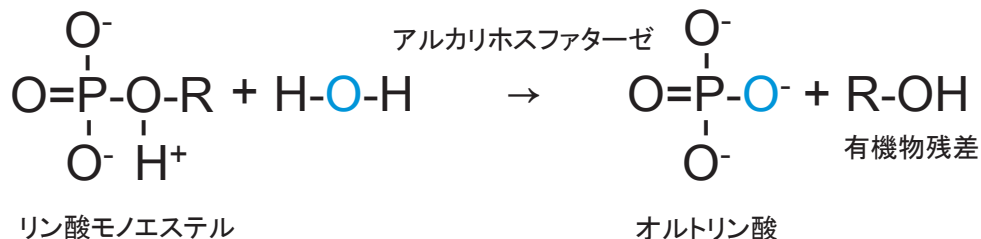


図2 細胞外リン代謝酵素であるアルカリホスファターゼの酵素反応。生成したオルトリン酸の青色で示した酸素原子は水分子の酸素に由来する。

これは、細菌のリン代謝において、ピロホスファターゼのみならず、アルカリホスファターゼによる細胞外の有機態リン酸の加水分解が生じている可能性を示唆する。しかし、実験結果の解釈にはさらなる注意が必要である。というのも、培養系では、実験終了後の同位体分析に供試する十分量のリン酸を確保せねばならないため、自然条件では起こりえない高濃度のリン酸基質を添加するからである。このような条件下で、全てのリン酸基質が代謝回転されることはなく、速度論的同位体効果が卓越すると予想される。リン酸濃度が低い自然環境下では、リン酸と環境水の酸素同位体比プロットの傾きが1に近くと期待される。

3.3 安定同位体混合モデル

先述の $\delta^{18}O_p$ の同位体効果の化学的・生化学的メカニズムを踏まえたうえで、水系に存在する溶存態無機リン酸の $\delta^{18}O_p$ に基づいて、流域生態系のリン動態を評価する安定同位体手法の基本原則について解説する。3.1節で述べたように、水系に負荷されるリン酸の酸素安定同位体情報($\delta^{18}O_p$)は、自然条件下で化学的に保存されている。したがって、生物に

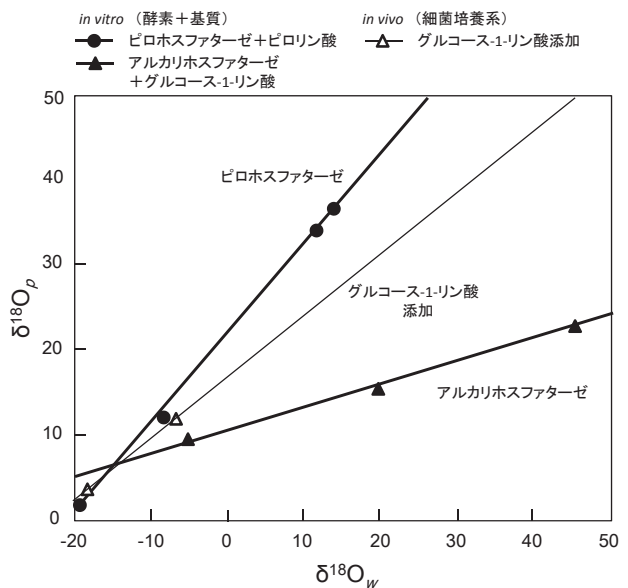


図3 リン代謝の *in vitro* 及び *in vivo* 実験後の水-酸素同位体比($\delta^{18}O_w$)に対するリン酸-酸素同位体比($\delta^{18}O_p$)のプロット。Blake ら⁷⁾の図を改変(アルカリホスファターゼを用いた *in vitro* 実験は、Liang と Blake⁸⁾のデータの一部を追加)。

よるリン代謝が全くない条件下で、環境中に存在するリン酸の $\delta^{18}\text{O}_p$ は負荷源の $\delta^{18}\text{O}_p$ とその混合割合によって決まる。この安定同位体混合モデルは、以下のように定式化できる。

$$\delta^{18}\text{O}_{p\text{-sample}} = a_1 * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } 1} + a_2 * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } 2} + \dots + a_n * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } n} \quad (\text{式 } 2)$$

ここで、 $\delta^{18}\text{O}_{p\text{-sample}}$ は環境中の溶存無機リン酸の酸素同位体比、 $\delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } n}$ は負荷源 n のリン酸の酸素同位体比、 a_n は負荷源 n の混合率 ($a_1 + a_2 + \dots + a_n = 1$) を表す。負荷源が2種類の場合は解析的に混合率を求めることができる。図4aの例では、2種類の負荷源を仮定しており、それぞれの混合率は30%と70%と推定される。ただし、三つ以上の負荷源が想定される場合、それぞれの混合率を解析的に求めることはできない。このような場合、シミュレーションにより混合率の確率分布を推定する方法もある。いくつかのモデルが提案されているが、一般公開されているソフトウェアとして IsoSource (<http://www.epa.gov/wed/pages/models/stableIsotopes/isosource/isosource.htm>) やベイズ推定を用いた MixSIR (<http://conserver.iugo-cafe.org/user/brice.semmens/MixSIR>) などがよく使われている。解析原理の詳細は、PhillipsとGregg⁹⁾や MooreとSemmens¹⁰⁾を参照されたい。

式2のモデルのように、水系においてリンが全く生物代謝されないという仮定は現実的でない。実際には、水中に存在するリン酸の一部、ないし全てを生物が取り込んで代謝回転する。生物によるリン代謝を組み込んだ混合モデルは、以下のように記述できる。

$$\delta^{18}\text{O}_{p\text{-sample}} = b * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-IEE}} + (1-b) * \sum (a_n * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } n}) \quad (\text{式 } 3a)$$

$$\delta^{18}\text{O}_{p\text{-IEE}} = \delta^{18}\text{O}_w - T (\text{°C}) / 4.3 + 25.9 \quad (\text{式 } 3b)$$

$$\sum (a_n * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } n}) = a_1 * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } 1} + a_2 * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } 2} + \dots + a_n * \delta^{18}\text{O}_{p\text{-source } n} \quad (\text{式 } 3c)$$

ここで、 b は水系に負荷されたリン酸のうち、生物によって代謝回転されたリン酸の寄与率を示す ($0 \leq b \leq 1$)。 $\delta^{18}\text{O}_{p\text{-IEE}}$ は、環境中に存在する全てのリン酸が生物によって代謝回転される、換言すれば、同位体交換平衡に達した場合 ($b = 1$) に期待される $\delta^{18}\text{O}_p$ の理論値を表す。式3bは式1を変形したもので、採水地点の水温と環境水の酸素安定同位体 ($\delta^{18}\text{O}_w$) が既知なら、 $\delta^{18}\text{O}_{p\text{-IEE}}$ を求めることができる。図4(b)は、水系に負荷されたリン酸のおよそ半分が生物によって代謝回転された場合を示す。ただし、負荷源が2種類以上ある場合、それらの混合率 a_n と生物代謝の寄与率 b を解析的に求めることはできない。複数の負荷源を想定して a_n と b の確率分布を同時に推定するソフトウェアは、残念ながら公開されていないので、この変則型混合モデルにおける各変数の確率分布をシミュレーションするプログラムを自作するしかない。

この変則型混合モデルは、微生物の基質となるリン酸が全て溶存無機態の場合を仮定するが、有機態リン酸が卓越する系では、前節で述べたように、有機態リン酸由来の酸素同位体の履歴効果も考慮せねばならない。また、リン酸基質が余剰に存在する系では、速度論的同位体効果も無視できない。これらの効果は、混合モデルをさらに複雑なものにする。現実世界を再現するモデルがどの程度まで簡略化で

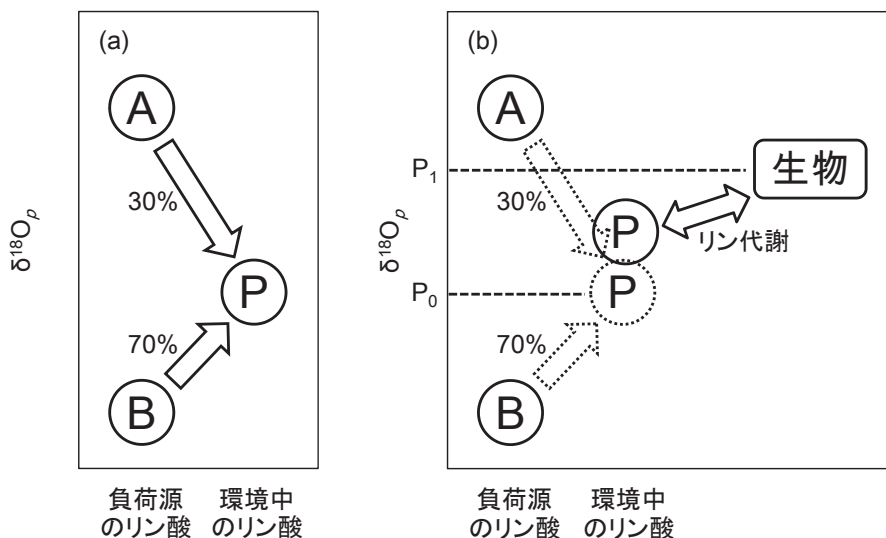


図4 二つのリン負荷源を仮定した安定同位体混合モデル。

生物によるリン代謝を仮定しない混合モデル(a)と生物代謝を仮定した変則型混合モデル(b)。P₁は図4(a)における負荷源の混合のみを仮定した ($b=0$) 理論値、P₀は全てのリン酸を生物が代謝回転する場合(同位体交換平衡: $b=1$)の理論値。 $\delta^{18}\text{O}_p$ はリン酸(PO_4^{3-})の酸素安定同位体比。

きるか、さらなる実験的検証と理論化が必要である。

要約すると、流域に負荷されるリン源の候補及び水中に存在するリン酸の $\delta^{18}\text{O}_p$ 、環境水の $\delta^{18}\text{O}_w$ 、水温を測定しさえすれば、生態系のリン循環を駆動する二つの主要なプロセス、すなわち、「負荷源の混合」及び「生物による再循環」を評価することが原理的には可能となる。

4. リン酸-酸素安定同位体分析手法の技術開発

先述のように、古生物学・古気候学のツールとしての $\delta^{18}\text{O}_p$ 分析の歴史は古い。しかし、この分析手法がリン循環研究のツールとして、そのまま普及することはなかった。その理由として、リン酸ビスマス (BiPO_4) をフッ化する従来の方法は、分析に多量の試料が必要で、試料調製に多大な時間を要し、さらに、難分解なリン酸アパタイトの溶解処理に酸化反応性の高い5フッ化臭素 (BrF_5) を用いねばならなかったことが挙げられる。

安定同位体分析手法を用いた水系のリン循環研究に先鞭をつけたのは、アメリカのペイタン博士らの研究グループである^{11), 12)}。彼女らは、マグネシウム誘導共沈法 (MagIC; magnesium - induced coprecipitation) : (Karl と Tien¹³⁾ 参照) を用いて、溶存態無機リン酸を濃縮・精製・固化して分析する方法を考案した¹⁴⁾。その後、さまざまな改良が試みられるが、溶存態無機リン酸をリン酸銀 (Ag_3PO_4) に変換し、熱分解型元素分析装置付き安定同位体比質量分析計 (TC/

EA-IRMS; thermal conversion / elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometer) を用いて、熱分解により生じた一酸化炭素ガスの酸素安定同位体比を分析するのが、現時点で最も簡便な方法である (図5)。

流域生態系では、しばしばリンが律速資源となるため、溶存態無機リン酸は低濃度で存在し、時として検出限界以下の場合さえある。このような低濃度のリン酸を分析するには大量の試水を採集・処理せねばならない。この試水量を減容するには、できる限り少量の同位体分析試料を高精度で測る技術が必要となる。図5に示したように、熱分解炉につづるキャリアガス流路の前段に還元炉を配置することによって、キャリアガスに含まれる微量の酸素を除去したり、オートサンプラーの密閉効果を高めたりすることによって、測定時の酸素のバックグラウンドを低く抑えることができる。さらに、熱分解炉の内部を二重構造にして反応炉全体をキャリアガスで充填する改良によって、LaPorteら¹⁵⁾は、200~500 μg のリン酸銀試料 (オルトリン酸で約 0.5~1.2 μmol に相当) を $\pm 0.15\%$ の測定精度で分析することに成功した。

測定誤差は、リン酸銀試料に溶存態無機リン酸以外の酸素化合物が混入することによっても生じる。その混入源の1つが溶存態有機物 (DOM; dissolved organic matter) である。溶存態有機物の混入によって、 $\delta^{18}\text{O}_p$ の値が測定誤差範囲を超えて変異することさえある¹⁶⁾。さらに、マグネシウム (Mg) で共沈した溶存態有機物が酸で処理されると、その加水分解によって無機リン酸が少なからず生じる。これは、精

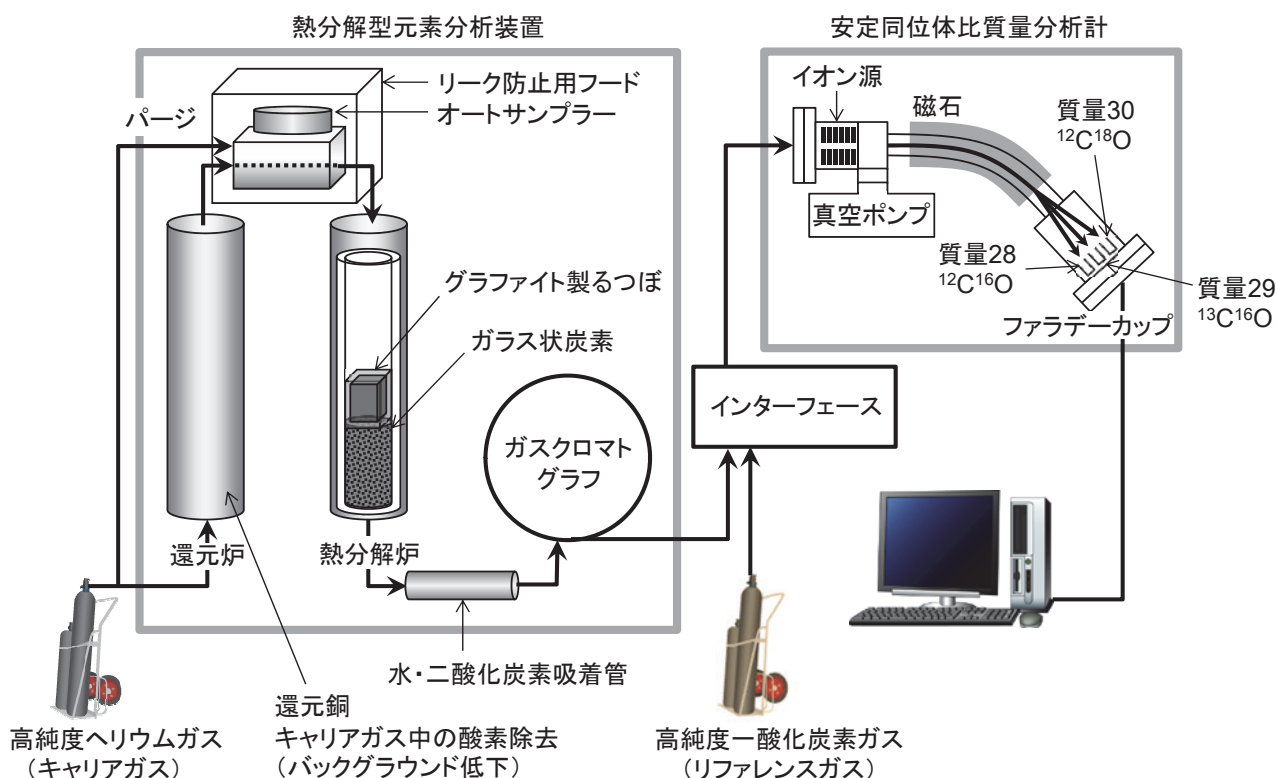


図5 熱分解型元素分析装置付き安定同位体比質量分析計 (TC/EA-IRMS) の仕組み。

製リン酸銀試料に溶存態有機物由来酸素の履歴効果をもたらす。そのため、試水から溶存態有機物を除去する前処理を施すことが推奨される^{16), 17)}。

現在までに、さまざまなプロトコルが提案されているが、同一試料を異なる手法で分析した値は相互に比較・検討されていない¹⁸⁾。筆者の経験では、既存の手法をそのまま用いても MagIC がうまくいかなかったり、リン酸銀試料の濃縮・精製過程で不純物が混入したりするなどの問題に直面することがままある。試料の化学的性状に応じて、前処理法を調整・変更するなどの事前検討が欠かせない。

本手法のもう一つの未解決な問題は、国際標準物質が存在しないことである。IAEA(国際原子力機関)や NIST(アメリカ国立標準技術研究所)など国際機関によって承認された標準物質の提供が待たれるが、当面は、内部標準物質を研究室間で共有するなど、分析値の品質保証に努める必要がある¹⁹⁾。

5. 流域生態系のリン循環研究への適用事例

リン酸-酸素安定同位体手法は、陸域・水域生態系を問わず、リン循環の研究ツールとして幅広く活用されつつある(例えば、陸域研究の総説として Tamburini ら²⁰⁾、水域研究の総説として Paytan と McLaughlin¹¹⁾や Davies ら²¹⁾を参照)。それらの知見の蓄積はまだ十分とはいえないが、本章では、流域生態系の構成要素である河川・汽水、地下水、湿地、湖沼の各生態系において適用された研究事例のいくつかを紹介したい。

5.1 河川・汽水生態系

Young ら⁶⁾は、異なる流域の複数地点から河川水を採用し、それらの $\delta^{18}\text{O}_p$ 値の地理的変異について調べた。同一流域内の地点間で同位体変異が認められるとともに、流域間においても同位体比の有意な差異が検出された。これらの調査地点のほとんどで、河川水の $\delta^{18}\text{O}_p$ 値に同位体交換平衡は観察されなかった。以上の結果より、河川水のリン酸には地域・流域固有の負荷源の同位体情報が刻印されていると示唆された。各種リン源が統計的に識別可能な同位体比をもつことを考慮すると、本手法はリン負荷源を特定するツールとして有望といえよう。しかしながら、本研究では、安定同位体混合モデルを用いた負荷源の混合率推定は試みられておらず、多種負荷源を想定した混合モデルを構築することの難しさを物語っている。

サンフランシスコ湾の汽水域では、サン・ウォーキン川とサクラメント川が形成する三角州から湾口まで $\delta^{18}\text{O}_p$ の流れ変異とその季節変化が調査された²²⁾。この水域の $\delta^{18}\text{O}_p$ の流れ変異は、あえて外部負荷源の由来を不問にするならば、淡水と海水に含まれるリン酸の単純な混合によってほぼ説明できた。観測結果は生物による再循環を考慮したモデル

の予測とは一致せず、一次生産がリンによって律速されていない本水域では、淡水・海水産リン酸の混合プロセスが卓越すると結論づけられた(ただし、生物による再循環の寄与率は式 3(a) - (c) のような変則型混合モデルを用いて定量的に評価されていない)。本調査水域では、時として、海水と淡水の混合や生物による再循環から期待される予測値から大きく外れる値が観察されたが、このズレをもたらす要因として、都市排水処理施設からの点源負荷の可能性が示唆された。

5.2 地下水生態系

流域生態系へのリンの面源負荷経路として、地下水はしばしば大きなインパクトをもつが、その定量的評価は容易でない。Blake ら²³⁾は、マサチューセッツ州ケープコッドの浅部帯水層から採取された高濃度リン酸を含む地下水が下水によって汚染されている可能性を示唆し、この人為起源リン酸が生物によって十分に代謝回転されていないことを安定同位体手法により明らかにした。しかし、地下水の $\delta^{18}\text{O}_p$ は同一水系内でも採水深度によって大きく異なることが報告されており⁶⁾、分析結果の解釈や同位体混合モデルの適用には細心の注意が必要である。自然負荷源として地下水中の母岩由来リン酸の同位体比変動をもたらす生物地球化学のプロセスはまだよく分かっていない。

5.3 湿地生態系

Li ら²⁴⁾は、フロリダ州エバーグレーズの湿地生態系に負荷される農業肥料由来リン酸の影響を $\delta^{18}\text{O}_p$ によって評価した。国立公園内の貧栄養水域の $\delta^{18}\text{O}_p$ は、同位体交換平衡に近い値を示し、生物による再循環プロセスが卓越している可能性が示唆された。一方、高濃度のリン酸が検出される農地近傍の攪乱水域では、同位体交換平衡値からのズレが観察された。肥料からの負荷と生物による再循環のみを仮定したシンプルな同位体混合モデルに基づいて、人為攪乱水域に溶存するリン酸のおよそ 15~100% が肥料由来であると推定された。

カリフォルニア州エルクホーン湿地では、潮の干満の影響下にある下流域から淡水の上流域まで、調査時期によらず一貫して $\delta^{18}\text{O}_p$ の流れ変異が観察された。下流は海水由来リン酸の同位体シグナルを反映し、上流域に向かうほど保護区域の土壌や地下水中のリン酸の $\delta^{18}\text{O}_p$ 値に近づいた。ところが、農業地帯に隣接する湿地最上流部の止水及び湿地に流入する灌漑水路堆積物から海生肥料由来と推測されるリン酸の同位体シグナルが検出され、農地からの面源汚染の影響が示唆された²⁵⁾。

5.4 湖沼生態系

過去に富栄養化の著しかった北米のエリー湖では、1970年代に集水域の栄養塩負荷削減対策が実施されて以降、リン濃度は減少傾向を示した。にもかかわらず、1990年代から再び増加傾向に転じたこと

が報告されている。Elsburyら²⁶⁾は、湖水の $\delta^{18}\text{O}_p$ を測定し、同位体比が地点・水深・季節によって大きく変動することを見いだした。同位体交換平衡の理論値、及び河川から負荷される低い $\delta^{18}\text{O}_p$ を示すリン源を考慮しても説明できない高い同位体比が湖盆中央部から観察された。この同位体シグナルは深度勾配を示し、湖底付近でより高い値を示した。本湖で観察される高い同位体比をもたらす原因として、湖底からの内部負荷の影響が示唆された。 $\delta^{18}\text{O}_p$ に基づいて堆積物内リン循環プロセスを評価する手法は、海洋生態系において確立されているものの^{27), 28)}、湖底から溶出するリン酸の $\delta^{18}\text{O}_p$ を同定し、湖沼生態系のリン循環における内部負荷の寄与を評価した研究はまだない。

砂漠気候で流入河川に乏しいイスラエルのガリラヤ湖では、乾季に山地から吹き降ろす強風によって運搬される大気降下物が湖盆への主要なリン負荷源と考えられている。これらの風塵中に含まれるリン酸の $\delta^{18}\text{O}_p$ を調べたところ、風上の農地から採取された土壌由来の $\delta^{18}\text{O}_p$ に近い値を示すことが明らかとなった²⁹⁾。集水域の農業活動の影響が示唆される一方、風塵由来リンの湖盆での拡散範囲や降下後の湖内での動態について、今後の調査が期待される。

6. 課題と展望

本稿では、流域生態系におけるリン循環を評価するツールとして、リン酸-酸素安定同位体分析の基本原則といくつかの適用事例を紹介した。その潜在的有用性にもかかわらず、本手法を利用した研究の多くが、現状では、想定される負荷源や水試料の同位体比の記載に留まり、リン循環の全容解明には程遠い。混合モデルを用いた量的評価、とりわけ、生物による再循環を評価するには、リン代謝に関わる同位体変動プロセスのさらなる理解とモデルの精緻化が必要である。また、現行の同位体試料調製手順は、改良されたとはいえ、まだまだ煩雑で時間の要する作業を強いられる(McLaughlinら¹⁴⁾に従うと、試料調整に最短でも5日間を要する)。とりわけ、貧栄養水域の試料では、分析可能なリン酸量を得るための採水・濾過作業が大きな律速段階となっている。大容量試料の高速・簡便処理と微量試料の高精度分析を実現する技術革新が、本手法の普及に向けた大きな課題といえよう。かつての炭素・窒素安定同位体分析手法がそうであったように、演繹的な観察データの蓄積と理論基盤の構築によって、本手法がリン循環研究の汎用性の高いツールとなる日はそう遠くない。

謝 辞

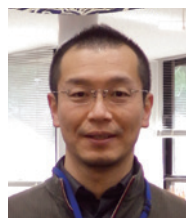
本稿の執筆に際して、陀安一郎氏から有益な助言

をいただいた。本稿のアイデアは、大学共同利用機関法人人間文化研究機構総合地球環境学研究所の栄養循環プロジェクト(D-06)、及び独立行政法人日本学術振興会科研費(24370010, 24405007)により着想された。

引用文献

- 1) Elser, J. and E. Bennett (2011) A broken biogeochemical cycle. *Nature*, 478, 29-31.
- 2) Vaccari, D. A. (2009) Phosphorus: A looming crisis. *Scientific American*, 300, 54-59.
- 3) Urey, H. C. (1947) The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society*, 1, 562-581.
- 4) Epstein, S., R. Buchsbaum, H. A. Lowenstam and H. C. Urey (1953) Revised carbonate-water isotopic temperature scale. *Geological Society of America Bulletin*, 64, 1315-1325.
- 5) Longinelli, A. and S. Nuti (1973) Revised phosphate-water isotopic temperature scale. *Earth and Planetary Science Letters*, 19, 373-376.
- 6) Young, M. B., K. McLaughlin, C. Kendall, W. Stringfellow, M. Rollog, K. Elsbury, E. Donald and A. Paytan (2009) Characterizing the oxygen isotopic composition of phosphate sources to aquatic ecosystems. *Environmental Science & Technology*, 43, 5190-5196.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Phillips, D. L. and J. W. Gregg (2003) Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia*, 136, 261-269.
- 10) Moore, J. W. and B. X. Semmens (2008) Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models. *Ecology Letters*, 11, 470-480.
- 11) Paytan, A. and K. McLaughlin (2012) Tracing the sources and biogeochemical cycling of phosphorus in aquatic systems using isotopes of oxygen in phosphate. In: M. Baskaran ed., *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*, 419-436, Springer-Verlag, Berlin.
- 12) McLaughlin, K., M. B. Young, A. Paytan and C. Kendall (2013) The oxygen isotopic composition of phosphate: A tracer for phosphate sources and cycling. *Application of Isotope Techniques for*

- Assessing Nutrient Dynamics in River Basins*, IAEA-TECDOC-1695, 93-110, International Atomic Energy Agency.
- 13) 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.
 - 14) McLaughlin, K., S. Silva, C. Kendall, H. Stuart-Williams and A. Paytan (2004) A precise method for the analysis of $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved inorganic phosphate in seawater. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2, 202-212.
 - 15) LaPorte, D. F., C. Holmden, W. P. Patterson, T. Prokopiuk and B. M. Eglington (2009) Oxygen isotope analysis of phosphate: improved precision using TC/EA CF-IRMS. *Journal of Mass Spectrometry*, 44, 879-890.
 - 16) Tamburini, F., S. M. Bernasconi, A. Angert, T. Weiner and E. Frossard (2010) A method for the analysis of the $\delta^{18}\text{O}$ of inorganic phosphate extracted from soils with HCl. *European Journal of Soil Science*, 61, 1025-1032.
 - 17) Gruau, G., M. Legeas, C. Rioua, E. Gallacier, F. Martineau and O. Hénina (2005) The oxygen isotope composition of dissolved anthropogenic phosphates: a new tool for eutrophication research? *Water Research*, 39, 232-238.
 - 18) Vennemann, T. W., H. C. Fricke, R. E. Blake, J. R. O'Neil and A. Colman (2002) Oxygen isotope analysis of phosphates: a comparison of techniques for analysis of Ag_3PO_4 . *Chemical Geology*, 185, 321-336.
 - 19) Halas, S., G. Skrzypek, W. Meier-Augenstein, A. Pelc and H. F. Kemp (2011) Inter-laboratory calibration of new silver orthophosphate comparison materials for the stable oxygen isotope analysis of phosphates. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 579-584.
 - 20) Tamburini, F., V. Pfahler, C. von Sperber, E. Frossard and S. M. Bernasconi (2014) Oxygen isotopes for unraveling phosphorus transformations in the soil-plant system: A review. *Soil Science Society of America Journal*, 78, 38-46.
 - 21) Davies, C. L., B. W. J. Surridge and D. C. Gooddy (2014) Phosphate oxygen isotopes within aquatic ecosystems: Global data synthesis and future research priorities. *Science of the Total Environment*, 496, 563-575.
 - 22) 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.
 - 23) Blake, R. E., J. C. Alt and A. M. Martini (2001) Oxygen isotope ratios of PO_4 : An inorganic indicator of enzymatic activity and P metabolism and a new biomarker in the search for life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 2148-2153.
 - 24) Li, X., Y. Wang, J. Stern and B. H. Cu (2011) Isotopic evidence for the source and fate of phosphorus in Everglades wetland ecosystems. *Applied Geochemistry*, 26, 688-695.
 - 25) McLaughlin, K., B. J. Cade-Menun and A. Paytan (2006) The oxygen isotopic composition of phosphate in Elkhorn Slough, California: A tracer for phosphate sources. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70, 499-506.
 - 26) Elsbury, K. E., A. Paytan, N. E. Ostrom, C. Kendall, M. B. Young, K. McLaughlin, M. E. Rollog and S. Watson (2009) Using oxygen isotopes of phosphate to trace phosphorus sources and cycling in Lake Erie. *Environmental Science & Technology*, 43, 3108-3114.
 - 27) Jaisi, D. P., R. K. Kukkadapu, L. M. Stout, T. Varga and R. E. Blake (2011) Biotic and abiotic pathways of phosphorus cycling in minerals and sediments: insights from oxygen isotope ratios in phosphate. *Environmental Science & Technology*, 45, 6254-6261.
 - 28) Goldhammer, T., T. Max, B. Brunner, F. Einsiedl and M. Zabel (2011) Marine sediment pore-water profiles of phosphate $\delta^{18}\text{O}$ using a refined micro-extraction. *Limnology and Oceanography: Methods*, 9, 110-120.
 - 29) Gross, A., A. Nishri and A. Angert (2013) Use of phosphate oxygen isotopes for identifying atmospheric-P sources: A case study at Lake Kinneret. *Environmental Science & Technology*, 47, 2721-2727.



奥田 昇 / Noboru OKUDA

1969年、山梨県生まれ。京都大学大学院理学研究科生物科学科博士後期課程修了。京大大学生態学研究センター准教授を経て、プロジェクト研究「生物多様性が駆動する栄養循環と流域圏社会-生態システムの健全性」を主宰するため2014年より大学共同利用機関法人 人間文化研究機構総合地球環境学研究所に赴任。学部では分子生物学、大学院では行動生態学、その後、群集・生態系生態学に関する研究を展開し、ミクロとマクロをつなぐ生物学の統合を図る。現在は、超学際アプローチによって、地球環境問題の解決に資する社会と科学の共創を目指す。人と自然と酒をこよなく愛する。