

琵琶湖難分解性有機物の有機物組成および 核磁気共鳴分光法による構造特性の解明

京都大学 日下部武敏

1. はじめに

近年、流域から湖沼への流入汚濁負荷は、各種点源・面源対策の実施により減少傾向にあるものの、湖沼水中の有機物濃度は横ばいあるいは漸増傾向が観られる。琵琶湖をはじめとした湖沼や閉鎖性内湾においても難分解性有機物の増加・蓄積が報告され、そのヒトや生態系への悪影響が懸念されている¹⁾。しかし、多くの研究機関において、難分解性有機物量や起源の推定が行われているものの、その詳細については不明な点も多い。研究担当者らはこれまでに難分解性有機物量を把握するための分解性評価試験方法を確立し、琵琶湖天然有機物 (NOM) の分解性評価や藻類を用いて難分解性有機物の生態影響評価を実施してきた。

本研究は、琵琶湖 NOM の分解過程における有機物組成の変動および琵琶湖難分解性有機物の構造特性を分子レベルで解明することを最終目標とする。平成23年度は、季節毎に採取した琵琶湖北湖 NOM を分解性試験に供してその分解特性の評価を行うと共に、琵琶湖難分解性有機物の構造特性を解明するための分析手法の検討・確立を行った。

2. 実験方法

2.1 分解性試験方法の概要²⁾

本研究では、ろ過試料および未ろ過試料約 11 L をそれぞれ 5 L ガラス瓶 3 本 (5 L × 1 本および 3 L × 2 本) に分注し、シリコセンをして通気状態を保った状態で、20°C・暗所でシェーカーを用いて 60rpm で振とう攪拌をした。研究代表者ら²⁾は、これまでに琵琶湖 NOM の分解性を評価するためには従来の試験期間 (100 日間) では不十分であることを明らかにしている。そのため、本研究では、試験期間をあらかじめ設定せずに有機物 (DOC) 濃度の減少傾向が見かけ上収まるまで試験を継続することとし、試験終了時に残存している有機物を琵琶湖難分解性有機物と定義する (長期間分

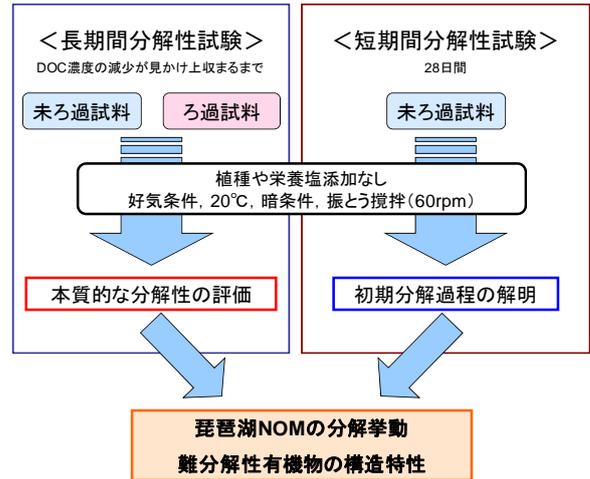


図1 本研究における分解性試験の概要

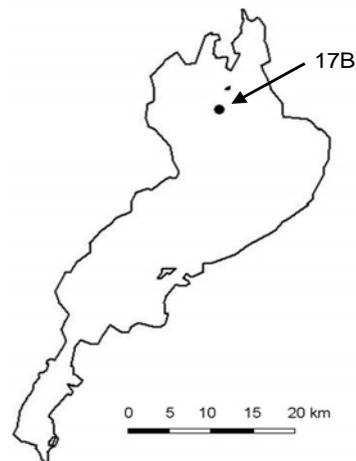


図2 本研究の採水地点

解性試験)。さらに、琵琶湖 NOM の初期分解過程における詳細な分解挙動を調べることを目的として 28 日間の短期分解性試験を実施した (図 1)。本研究では、長期にわたる試験期間中に有機物の光分解および藻類の増殖をできるだけ抑えることを目的として、試料容器をアルミ箔で包んで遮光した。本法の特徴は、より現場に近い条件での本質的な分解性 (inherent biodegradability) を評価することを目指し、植種や栄養塩の添加を行っていない点にある。

2.2 採水方法および前処理方法

本研究では、流域からの影響を受けにくいこと、また滋賀県の環境基準点であり水質データベースが充実していること等を考慮して、今津沖中央 (17B) を調査地点として選定した (図 2)。本研究における採水調査は、2010 年 7 月 (夏季)、10 月 (秋季)、2011 年 1 月 (冬季) および 5 月 (春季) (長期分解性試験)、ならびに 2011 年 8 月、10 月、12 月 (短期分解性試験) に実施し、ステンレスバケツを用いて表層水を採取した。採取した水試料は保冷しながら速やかに実験室に持ち帰り、試料の一部を 450°C で 4 時間熱処理した Whatman GF/B (1.0 μm) を用いて吸引ろ過をして、ろ液をろ過試料 (DOM のみ) とした。未ろ過試料 (DOM + POM) については、可能な限り均一な試料となるように十分に攪拌してから試験に供試した。

2.3 分析方法

本研究では、ろ過試料・未ろ過試料ともに、水試料 3 L を入れた容器を 2 本ずつ用意して経時的に交互に水試料の一部を採取し、DOC および POC 濃度と併せて DO, pH, ORP 等の水質項目についても測定した。本研究では、450°C で 4 時間熱処理を施した Whatman GF/B (1.0 μm) を用いて吸引ろ過をし、ろ液中に含まれる有機物を DOM、ろ紙に補足された有機物を POM と定義した。DOC 濃度は、2 N HCl を用いて試料を酸性通気処理し、TOC- V_{CPH} (島津製作所) を用いて NPOC として求めた。POC 濃度は、ろ過後のろ紙を 105°C で 2 時間乾燥させた後、元素分析装置 Flash EA 1112 (Thermo Electron) を用いて有機物含有量を求めて検水量から算出した。また、本研究では分解性試験の前・後に SS, Chl. *a*, TN, D-TN, TP, D-TP, 全菌数を測定した。なお、短期試験においては、試験期間中も全菌数を計数した。琵琶湖 NOM の分解に伴う質的な変化を調べるため、3 次元蛍光 (EEMs) 分析による特性把握を行った。EEMs 分析には蛍光度計 F-4500 (日立製作所) を用い、水の Raman ピークの蛍光強度を用いて補正し、MQ 水の EEMs スペクトルをブランクとして差し引くことで得た。

NOM の分解挙動のみならず湖沼有機物の機能的つながり (リンケージ) 等を明らかにするためにも、その有機物組成を分子レベルで詳細に調べることは非常に重要であると考えられる。本研究では、植物プランクトン中の構成比率の多さ、生物分解性および生物利用性などの観点から、NOM 中の単糖およびアミノ酸の組成に注目した。平成 23 年度は、蛍光検出器付き HPLC を用いたプレカラム誘導体化法による組成分析法の検討・確立を行った。プレカラム誘導体化法の特徴は、必要な装置構成がシンプルで、かつ多様な誘導体化試薬が開発・市販されているため汎用的な検出器 (UV 検出器、蛍光検出器など) を用いて逆相系カラムで高感度分析できることにある。

本研究では、難分解性有機物の化学構造を評価するために核磁気共鳴分光法 (NMR) を適用する。これは、例えば LC/MS/MS は高感度を得られるものの、イオン化しない成分については原理上検出できない等の欠点があり、NMR は原理上試料に含まれるすべての成分につ

いて構造情報を得ることができるためである。ただし、NMRはLC/MS/MSと比べて感度が低いため、適宜凍結乾燥等による試料濃縮、脱塩等の精製を行い、分析・解析を実施することが必要となる。平成23年度は、分子科学研究所所有の600 MHz NMR分光計 JNM-ECA600 (JEOL)を用いて、国際腐植物質学会(IHSS)から頒布されている米国Suwannee河NOM(SRNOM)に複数のパルスシーケンス(1D, 2D)を適用して測定条件の検討を行った。さらに、2011年10月3日に採取した琵琶湖水を研究代表者らが開発した方法により脱塩・精製された琵琶湖DOMについても1D, 2D測定を行った。

3. 結果および考察

3.1 琵琶湖天然有機物(NOM)の分解性試験結果

本研究で得られた季節毎の長期間分解性試験の結果を図3および表1にまとめて示す。図3および表1より、すべての季節のサンプルにおいて、分解性試験開始後100日を超えた後も有機炭素濃度の減少傾向が観られ、琵琶湖NOMの分解には200~500日程度かかることが明らかとなった。このことから、湖沼の有機物の厳密な分解性評価には従来の100日間試験では不十分であり、NOMの分解性が過小評価されている可能性が示された。

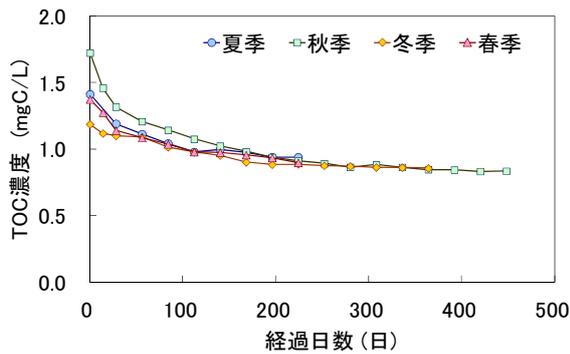


図3 琵琶湖 NOM の長期間分解性試験結果

表1 長期間分解性試験で得られた有機炭素残存率

試料	0日目			最終値			経過日数	
	DOC	POC	TOC	DOC	POC	TOC		
夏季	OC濃度 (mgC/L)	1.24	0.17	1.41	0.90	0.04	0.94	224日
	残存率 (%)	-	-	-	72.6	22.3	66.5	
秋季	OC濃度 (mgC/L)	1.32	0.40	1.72	0.79	0.05	0.83	448日
	残存率 (%)	-	-	-	59.7	11.5	48.4	
冬季	OC濃度 (mgC/L)	1.06	0.13	1.19	0.82	0.03	0.86	364日
	残存率 (%)	-	-	-	77.5	27.1	72.2	
春季	OC濃度 (mgC/L)	1.18	0.19	1.37	0.86	0.04	0.90	224日
	残存率 (%)	-	-	-	72.5	21.4	65.4	

3.2 Multi-G model による琵琶湖 NOM の分解特性の解析

次に、Berner³⁾によってその有効性が示された Multi-G model を琵琶湖 NOM の分解特性解析に適用した。この Multi-G model は、複雑な混合物である有機物を無機化速度が同じと見なされる複数の成分に便宜上分類し、それぞれの成分が1次分解反応に従うとするものである(式1)。

$$C(t) = \sum C_i \exp(-k_i t) + C_R \quad (1)$$

式(1)において、 $C(t)$ は時刻 t における全有機炭素濃度 (mgC/L)、 C_i および k_i はそれぞれ成分 i の初期有機炭素濃度 (mgC/L) および1次分解反応速度定数 (1/day)、 C_R は見かけ上濃度変化しない難分解性成分 (R) の有機炭素濃度 (mgC/L) である。なお、成分 i には、易分解性成分 (labile, L) や準易分解性成分 (semi-labile, SL)、準難分解性成分 (semi-refractory, SR) などを設定することが多い。

式 (1) より, Multi-G model では, 琵琶湖 NOM の分解が複数の (離散的な) 反応速度定数で説明されること, および NOM 分解による有機炭素の他の成分への移行は考慮されていないこと (すなわち, 無機化過程のみを考慮すること) になる。

本研究では, 実測データと Multi-G model を最小二乗法によるフィッティングを行って成分数を決定し, 各々の成分に対して初期濃度 (C_i) および反応速度定数 (k_i) を求めた。まず, 本研究で得られたデータを, 1~4成分からなる Multi-G model に当てはめて成分数を決定した。

夏季サンプルを例に長期間分解性試験結果に Multi-G model (3 成分モデル) を当てはめた結果を図 4 に示す。結果をまとめると, TOC, POC, DOC いずれの指標を用いても, すべての季節において 3 成分モデル (L, SL および R 成分) で琵琶湖 NOM の分解挙動を精度よく再現・説明できることが明らかとなった。しかしながら, DOC 濃度の経時変化は分解初期 (約 28 日目まで) において分解が緩やかな時期が存在するため若干のずれが生じていたことから, 有機炭素の POM-DOM 間の移行過程を考慮する必要があると考えられた。Ishikawa and Nishimura⁴⁾の報告によれば, 内湾における藻類等の POM 初期分解過程では, POM の DOM への分解過程よりも無機化過程が卓越する。しかしながら, 琵琶湖 NOM 分解モデルでは, POM の DOM への分解過程についても考慮する必要がある。POC および DOC データを用いた Multi-G model 解析結果から, 各季節の湖水中に存在していると推定される POM および DOM 中の各成分濃度を図 5 に示す。図 5 より, 琵琶湖難分解性有機物は, 季節によらずほぼ一定の濃度となり, 季節的な変動が少ないことが明らかとなった。また, POM 中の難分解性成分は季節によらずほぼ一定の濃度で存在し, NOM 中の難分解性成分の量に対して十分小さく, 難分解性有機物の主要な存在形態は溶存態 (DOM) であることが分かった。一方, POM 中の易分解性成分の反応速度定数 (k_L) は季節によらずほぼ一定の値を示すことが明らかとなった。

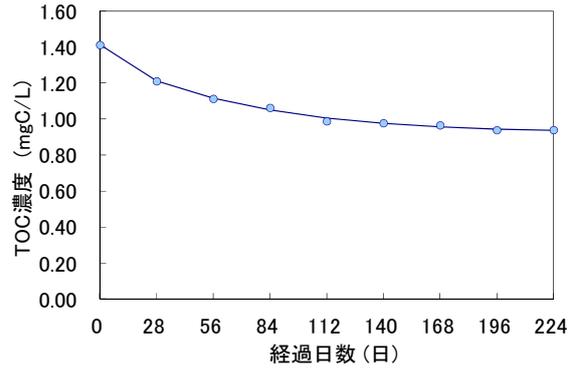


図 4 長期間分解性試験における夏季試料の Multi-G model(3 成分)による解析結果

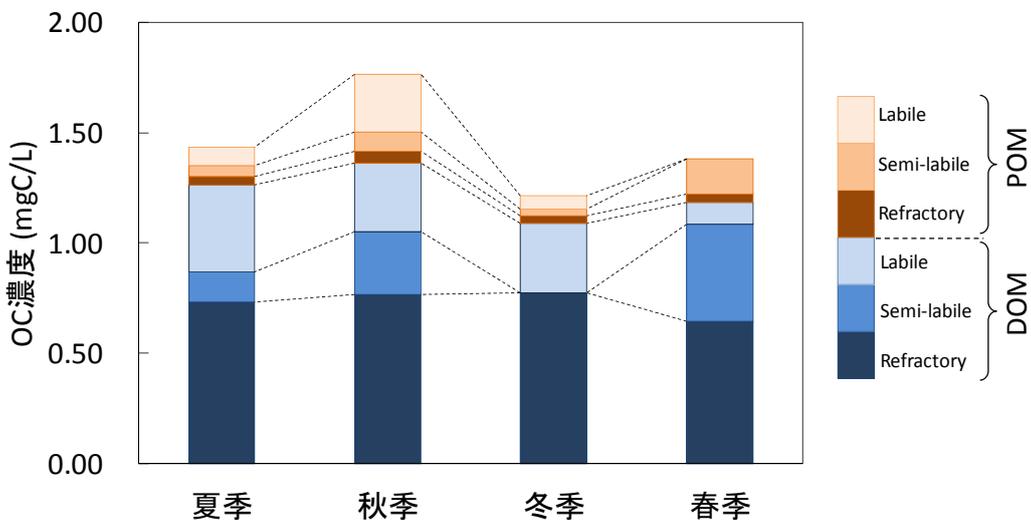


図 5 Multi-G model(3 成分モデル)解析結果の季節間比較(長期間分解性試験)

3.3 短期間分解性試験による琵琶湖 NOM の初期分解過程の解明

長期間分解性試験の結果より、琵琶湖 NOM の初期分解過程においては、藻類由来と考えられる易分解性 POM は直接無機化されずに DOM に分解・変換されていることが示唆された。そのため、POM の分解が卓越していると考えられる初期分解過程における NOM および POM の分解挙動を詳細に把握するために短期間分解性試験を行った。図 6 に夏季試料の短期間分解性試験の結果を示す。図 6 より、夏季試料においては試験開始 10

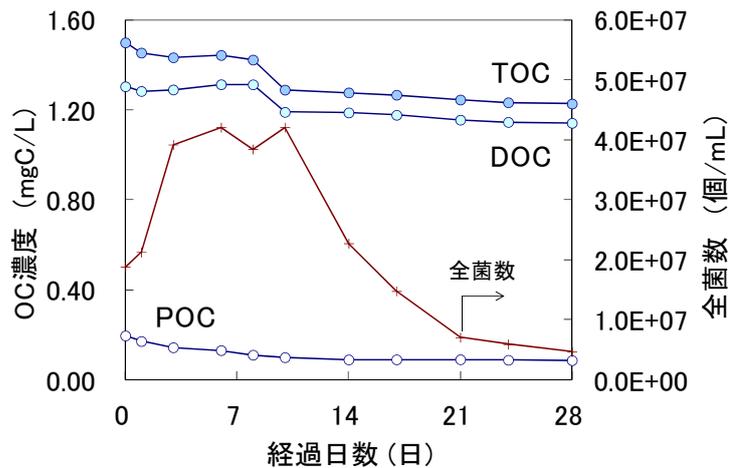


図 6 琵琶湖 NOM の短期分解性試験結果(夏季)

日程度までに全菌数が増加するとともに、POC 濃度が減少する傾向が観られた。一方で、DOC 濃度は試験開始から 8 日目までいったん増加した後、POC 濃度の減少が落ち着いたところから DOC 濃度が減少し始め、さらに全菌数が減少し始めた。このことから、琵琶湖 NOM の初期分解過程においては、POM 分解に伴う DOM への有機物の移行量が DOM の分解量に対して無視できないと推測された。

3.4 三次元励起・蛍光マトリックス法(EEM)スペクトルによる琵琶湖 NOM の分解特性の把握

夏季試料の長期間分解性試験におけるタンパク質様物質 (EX 270/EM 350 nm) およびフミン酸様物質 (EX 250/EM 435 nm) の蛍光ピーク強度の経時変化を図 7 に示す。図 7 より、生物起源と考えられるタンパク質様物質は、試験期間中に一時的な増加が観られるものの、分解に伴って減少した。一方、春季を除く 3 つの季節の琵琶湖 NOM では、フミン物質様物質 (フミン酸様およびフルボ酸様) は分解されずに湖水中に長期にわたって残留・蓄積していることを示唆する結果であった。TOC 検出 HPSEC (高速サイズ排除クロマトグラフィ) 分析においても、バイオポリマーと考えられる高分子量画分が長期間分解性試験終了時には消失する一方で、低～中分子量画分が残留・微増していることを確認している。このことから高分子量画分は易-準易分解性成分であることが示唆される。したがって、琵琶湖 NOM の初期分解過程においては、主に藻類由来と考えられる易分解性 POM が分解されて高分子量画分へ移行し、最終的には分解・無機化されて消失していると考えられる。つまり、Multi-G model 解析の結果から、季節ごとに藻類 (個体数) 濃度 (あるいは Chl.a 濃度) が異なるにも関わらず、難分解性成分濃度 (C_R) に大きな差がないことが示唆されたことから、湖内一次生産由来有機物の琵琶湖難分解性有機物への寄与は決して大きいものではないと言えるのではないだろうか。また、ここでは報告をしていないが、ろ過した湖水 (DOM のみ) の長期間分解性試験では時間が経つにつれて POC 成分が検出されることから、従属栄養細菌をはじめとする微生物の作用による DOM の POM 化過程についても抑えておく必要がある。このように湖水中の有機物分解過程は複雑で、様々な因子の影響を受けており、試験法の改良に加え、さらなるデータの蓄積や精緻な解析・検討が必要であろう。

分解メカニズムを詳細かつ定量的に解明するためにも琵琶湖 NOM の分解過程における有機物組成の変動および難分解性有機物の構造特性の解明と併せてそれらの影響因子を把握することが必要不可欠となる。

そこで、本研究では琵琶湖 NOM の分解過程における単糖およびアミノ酸組成変動の把握、そして NMR による構造特性の解明を目指して分析法の検討・確立を行ったので、それらの概要を以下に示す。

3.5 単糖組成分析法の確立

本研究では、琵琶湖 NOM の単糖組成分析に、カラムに注入する前に、水試料中の溶存有機物を酸加水分解し、還元アミノ化反応によって単糖のアルデヒド基（還元末端）を 4-aminobenzoic ethyl ester (ABEE) で誘導体化する ABEE 法を選定した⁵⁾。ABEE 誘導体化には ABEE 糖組成分析キット（J-オイルミルズ）を用いた。本研究では、加水分解条件（酸の種類、濃度、時間）、分析に用いる器具の材質、凍結・融解安定性等について検討を行い、単糖組成分析法を確立した。本研究における HPLC の分離条件（表 2）、単糖混合標準液の分析例（図 8）および検量線の例（図 9）をまとめて示す。図 8 および図 9 より、8 種類の単糖を高感度で分析できていることが分かる。本法で得られた 5 回注入時の標準偏差の 10 倍（10σ）で求めた定量下限値は、3.5～12.5 pmol/10uL の範囲であった。なお、本研究で求めた酸加水分解条件は、1 M TFA (trifluoroacetic acid), 100°C, 4 時間であった。

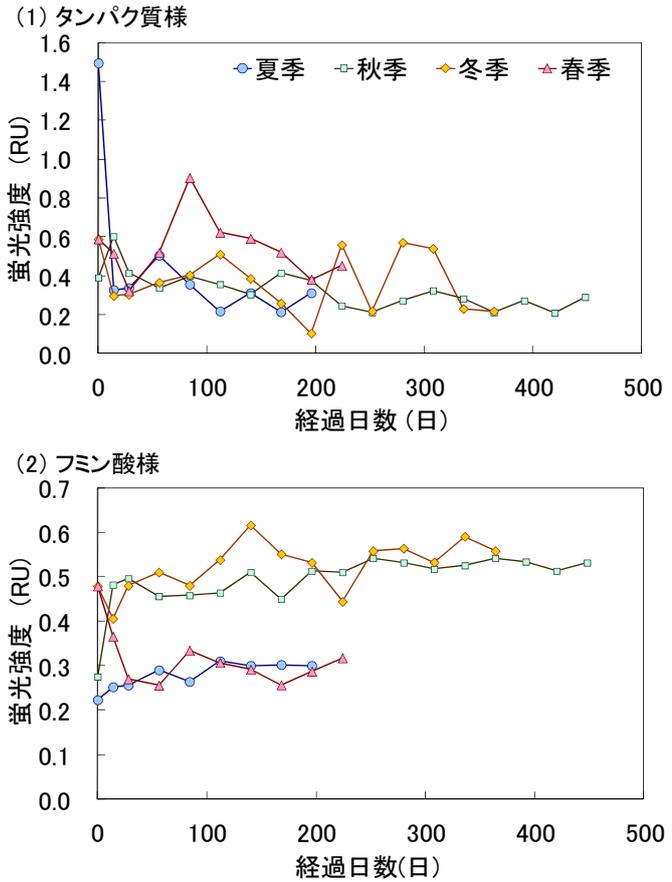


図 7 長期間分解性試験におけるタンパク質様およびフミン酸様物質の蛍光ピーク強度の経時変化

表 2 本研究における単糖組成分析の条件

分析装置	: waters Alliance HPLCシステム e2695セパレーションモジュール
検出器	: 2475マルチ波長蛍光検出器
カラム	: Honenpak C18 (75 mm×4.6 mmID)
移動相	: A 0.2 M ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 8.9) / アセトニトリル (93/7) : B 0.02% TFA / アセトニトリル (50/50)
グラジエント	: 0 → 50 min, B = 0% (分析) : 50 → 55 min, B = 100% (洗浄) : 55 → 75 min, B = 0% (平衡化)
流量	: 1.00 mL/min
温度	: 30°C
検出器	: 蛍光 (Ex. 305 nm, Em. 360 nm)
注入量	: 10 uL

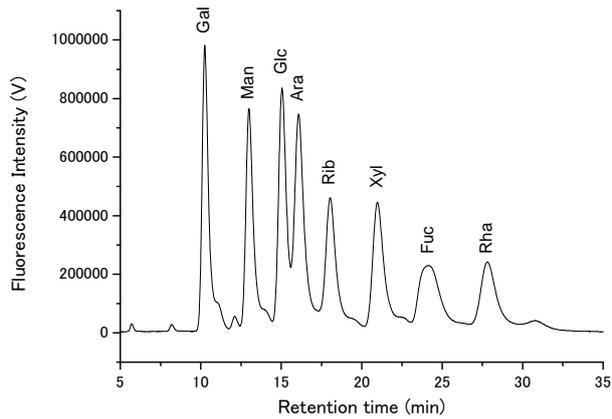


図 8 単糖組成分析法 (ABEE 法) による分離例

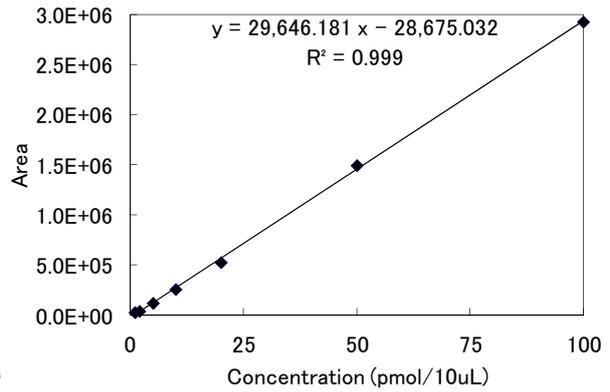


図 9 本研究で得られた検量線の例 (Galactose)

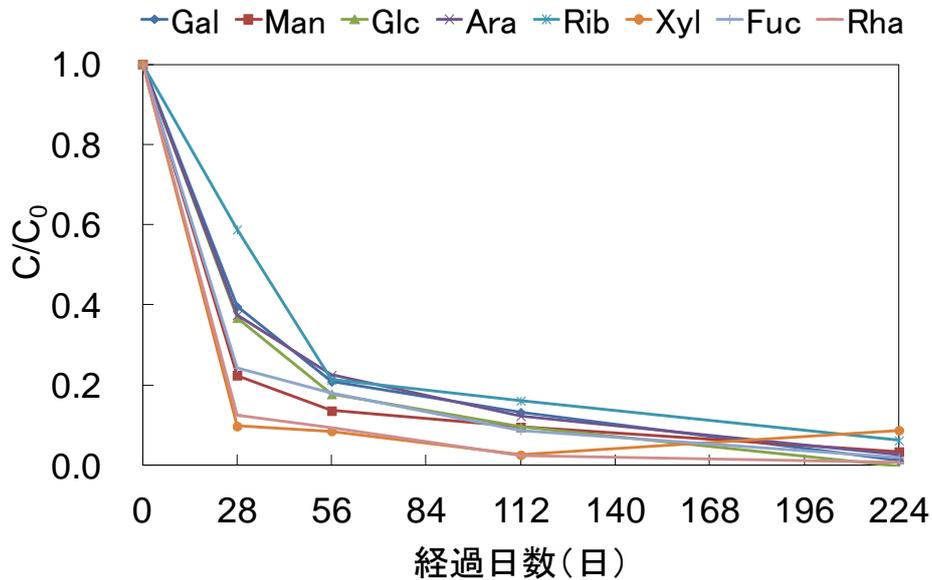
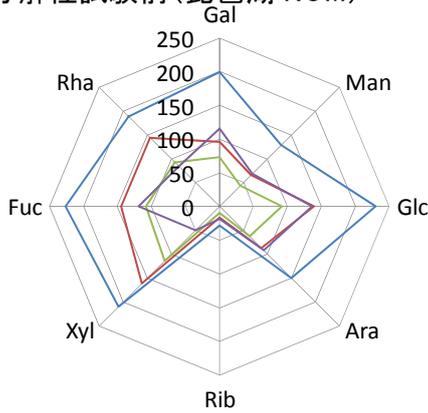


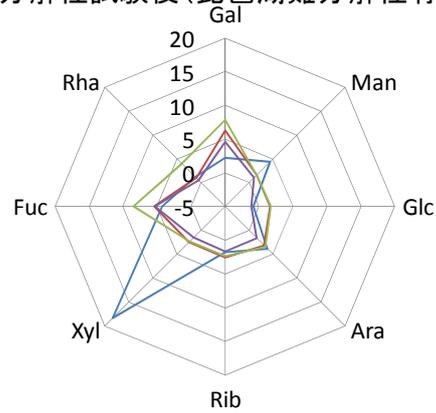
図 10 長期間分解性試験における夏季試料中単糖組成の経時変化

長期間分解性試験における夏季試料中単糖組成の経時変化を図 10 に示す。図 10 より、夏季の琵琶湖 NOM 中の単糖は次第に分解され、最終的にはほぼ全て分解されていることが分かった。夏季以外の季節のサンプルについても、各単糖は長期間分解性試験終了までにほぼ全て分解されていたことが分かった (図 11)。このことから、(多)糖類の難分解性有機物への寄与は比較的小さいものと考えられる。しかしながら、湖水中には陸域の植物や植物プランクトンの細胞壁を構成するセルロース、リグニン、ペプチドグリカン等の微生物分解されにくいとされる構造多糖類や微生物が細胞外に分泌する細胞外代謝産物 (extracellular polymeric substances, EPS) などが存在していると考えられることから、それらの環境中運命についても詳細に把握していく必要がある。

(1) 分解性試験前(琵琶湖 NOM)



(2) 分解性試験後(琵琶湖難分解性有機物)



—夏季 —秋季 —冬季 —春季

図 11 長期間分解性試験前後の単糖組成比較(単位は nM)

3.6 アミノ酸組成分析法の検討

前述のとおり，分解メカニズムを詳細かつ定量的に解明するためには琵琶湖 NOM の分解過程における有機物組成変動の把握，そして NMR による構造特性の解明が必要不可欠である。ここでは，アミノ酸組成分析法の検討を実施したので，その概要を報告する。

本研究では，琵琶湖 NOM のアミノ酸組成分析に，カラムに注入する前に，水試料中の溶存有機物を酸加水分解し，加水分解アミノ酸残基を AQC (6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate) で誘導体化する AccQ-Tag 法を選定した⁶⁾。本法は，1級・2級アミノ酸ともに誘導体化でき，誘導体が安定，ダイナミックレンジが広い，塩類の影響を受けにくい等の特徴を有する。AQC 誘導体化には AccQ-Tag アミノ酸キット (日本ウォーターズ) を用いた。アミノ酸組成分析に用いるガラス器具類については，コンタミを防ぐことを目的に，6 N HCl に 2 日間浸漬した後，500℃ で 4 時間加熱処理を行った。

表3 本研究におけるアミノ酸組成分析の条件

分析装置	: waters Alliance HPLCシステム e2695セパレーションモジュール
検出器	: 2475マルチ波長蛍光検出器
カラム	: AccQ-Tag RP Column (3.9 mm × 150 mm)
移動相	: A アセトニトリル : B AccQ-Tag Eluent A : C H ₂ O
流量	: 1.00 mL/min
温度	: 37°C
検出器	: 蛍光 (Ex. 250nm Em. 395nm)
注入量	: 5 μL

表4 アミノ酸分析におけるグラジエント条件

時間	流量	%A	%B	%C
0	1.00	0	100	0
0.5	1.00	1.5	98.5	0
17	1.00	5	95	0
18	1.00	11	89	0
23	1.00	13	87	0
35	1.00	17	83	0
35.5	1.00	17	0	83
40	1.00	80	0	20
43	1.00	60	0	40
46	1.00	0	100	0
56	1.00	0	100	0

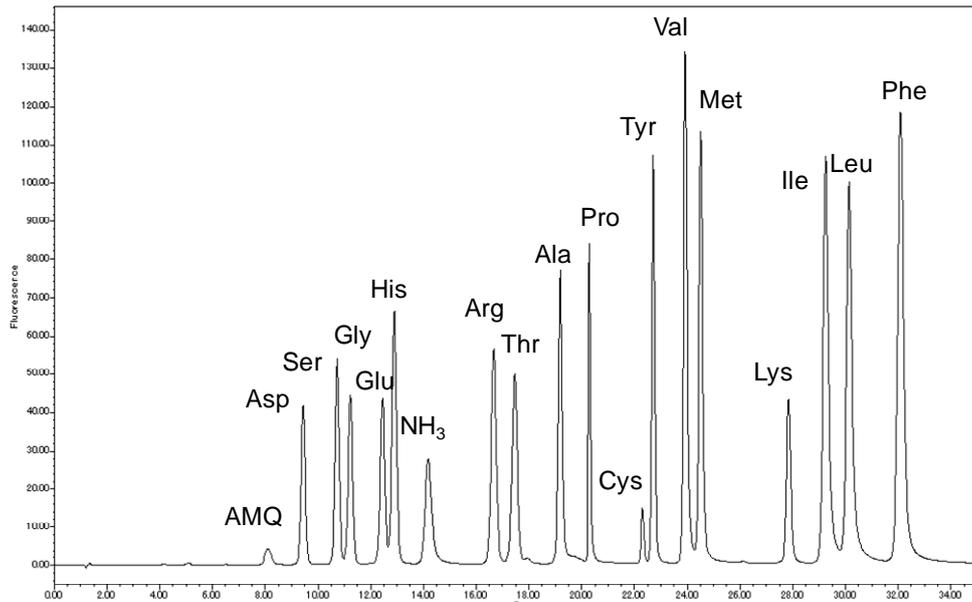


図12 アミノ酸混合標準液の分離例(17種類+NH₃)

本研究では、加水分解条件（酸の種類、濃度、時間）、分析に用いる器具の材質等について検討を行い、アミノ酸組成分析法を検討した。本研究におけるHPLCの分離条件（表3）、グラジエント条件（表4）、アミノ酸混合標準液の分析例（図12）および検量線の例（図13）をまとめて示す。図12より、アンモニア（NH₃）を除いたアミノ酸17種を良好に分離できていることが分かる。本研究において、現在までに得られた定量下限値は、0.06～2.23 pmol/uLであった。

本研究で求めた酸加水分解条件は、4 M MSA (methane sulfonic acid), 110°C, 24時間であった。一般に、酸分解はアルカリ分解と比べれば副反応は少なく、特に光学活性のアミノ酸は、短時間の分解ではラセミ化をとまなうことなく回収される⁷⁾。なお、グルタミン (Gln) やアスパラギン (Asn) のような酸アミドについては、酸加水分解によってグルタミン酸 (Glu)、アスパラギン酸 (Asp) に変化する。そのため、グルタミンとグルタミン酸の和をグルタミン酸 (Glx) として、アスパラギンとアスパラギン酸の和をアスパラギン酸 (Asx) として表示されることがある。トリプトファン (Tyr) は酸分解でほぼ完全に分解されて定量的はできない。なお、本研究では酸化副生成物の形成を抑えることを目的として加水分解用ガラス管を減圧下で封管して加水分解反応に供した。

今後は、琵琶湖 DOM 等を用いて平成23年度に検討した条件をさらに検討を重ねて分析方法を確立する。確立したアミノ酸組成分析法の適用により、琵琶湖 NOM および難分解性有機物のアミノ酸組成を調べ、最終的にはEEMスペクトルや分子量分布情報などと併せて琵琶湖 NOM 分解モデルの構築を行っていく予定である。

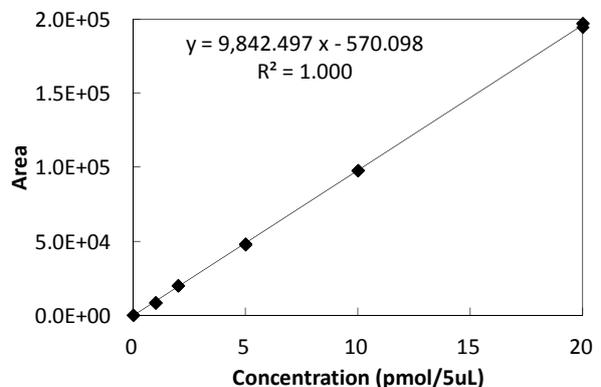


図13 本研究で得られた検量線の例(Asp)

3.7 NMR 分析条件の検討

本研究では琵琶湖 NOM の分解挙動および難分解性有機物の構造特性を明らかにすべく NMR による構造特性解析を試みた。前述のとおり、NMR の特徴は網羅性（もれなく見られる）にあるが、感度が低いことが NOM の構造解析を難しくしている。ここでは、IHSS から頒布されている SRNOM に複数のパルスシーケンス（1D, 2D）を適用して測定条件の検討を行った。さらに、2011 年 10 月 3 日に採取した琵琶湖水を研究代表者らが開発した方法によって脱塩・精製された琵琶湖 DOM についても 1D (¹H), 2D (COSY, ¹H-¹³C HSQC) 測定を行ったので、その結果について報告する。

SRNOM を用いた予備検討では、有機物の溶解性を考慮して DMSO-d₆ を溶媒として選択し、約 20 mg/mL (≒10 mgC/mL) となるように調製した。本研究の予備検討で適用したパルスシーケンスとその概要を表 5 にまとめて示す。なお、予備検討で考慮した主な測定パラメーターには、積算回数[scans], 繰り返しパルスの待ち時間[relaxation_delay], 混合時間[mix_time], ¹J_{CH} 値[j_constant], ロングレンジ J_{CH} 値[long_range_j]等があり、室温で測定を行った。しかし、COSY 以外の 2D 測定では、今回の調製濃度においてシグナルは検出されなかったか、非常に弱かった。本研究では、大量の湖水から DOM を濃縮・精製することや週単位でマシンタイムを確保することが困難であったため、シグナルがある程度検出できた COSY が琵琶湖 NOM および難分解性有機物の構造特性を調べる目的に適した 2D 測定法であると判断した。

図 14 に化学シフト 0.5~4ppm の領域を拡大表示した SRNOM の COSY スペクトルを示す。図 14 より、拡大表示した領域の中でも 2.8~3.6ppm に多くの相関信号が観られた。この領域は（置換）脂肪族プロトンの領域に相当し、SRNOM 中の脂肪族成分の構造は多種多様であることが分かる。

次に、2011 年 10 月 3 日に採取した琵琶湖 DOM の COSY スペクトルを図 15 に示す。なお、本研究では 20 L の湖水を研究代表者らが開発した脱塩方法により精製した後、凍結乾燥したものを NMR 測定に用いた。DOC の回収率は、約 90%であった。図 15 より、琵琶湖 DOM についても、2.8~3.8ppm の領域で多くの相関信号が観られ、SRNOM と

表 5 本研究で検討を行ったパルスシーケンス⁸⁾

パルスシーケンス	観測核 × 照射核	概要	
1D	¹ H	¹ H	¹ Hを検出する、最も基本的な測定方法
	¹³ C	¹³ C	¹³ Cを検出する、最も基本的な測定方法
¹ H- ¹ H COSY	¹ H × ¹ H	2結合または3結合離れている ¹ H同士を検出する測定方法 f ₁ 軸, f ₂ 軸ともに ¹ Hの化学シフトを表す。f ₁ 軸, f ₂ 軸が交わる場所に相関信号が現れる。	
TOCSY	¹ H × ¹ H	¹ Hと ¹³ Cを通して、同じスピンス系に属する ¹ H同士の相関を観測できる測定方法 f ₁ 軸, f ₂ 軸ともに ¹ Hの化学シフトを表す。f ₁ 軸, f ₂ 軸が交わる場所に相関信号が現れる。混合時間を長くするほどより離れた核との相関信号が得られるが、SN比が減少する。	
2D	¹ H- ¹³ C HSQC	¹ H × ¹³ C	直接結合している ¹ Hと ¹³ Cを検出する測定方法 f ₂ 軸は ¹ Hの化学シフトを示し、f ₁ 軸は ¹³ Cの化学シフトを示す。f ₂ 軸とf ₁ 軸の垂線の交わる場所に相関信号が現れる。相関信号は、対応するHと ¹³ Cが直接結合していることを示す。
	¹ H- ¹³ C HMBIC	¹ H × ¹³ C	2結合または3結合離れている ¹ Hと ¹³ Cを検出する測定方法 f ₂ 軸は ¹ Hの化学シフトを示し、f ₁ 軸は ¹³ Cの化学シフトを示す。f ₂ 軸とf ₁ 軸の垂線の交わる場所に ¹ Hと ¹³ Cのロングレンジ結合の相関信号が現れる。また、直接結合している ¹ Hと ¹³ Cの相関信号も観測される。

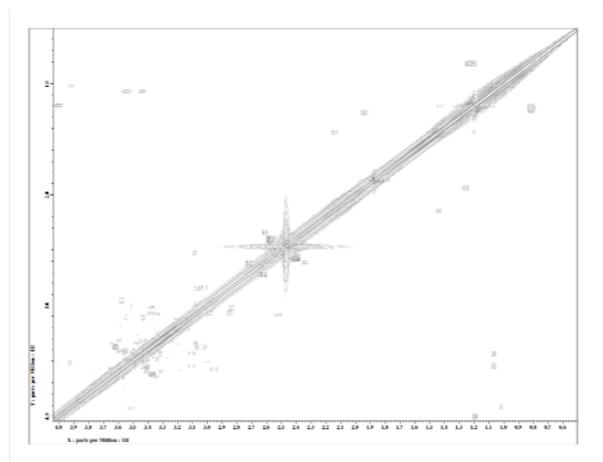


図 14 SRNOM の拡大 COSY スペクトル (0.5~4ppm)

比べて他の領域においてもシグナルが検出された。SRNOM と同様に、琵琶湖 DOM の脂肪族成分の構造が多様であること、SRNOM とは異なる成分が含まれていることが明らかとなった。このことは、琵琶湖 NOM の構成成分として脂質・脂肪酸の重要性を示唆する結果である。

本研究では、1D 測定ではシグナルの重なりがひどく解析が困難となることから、複数の 2D 測定の適用可能性を検討した。しかしながら、感度不足のため、ロングレンジ結合の相関信号は得られなかった。そこで、唯一適用可能性があった COSY についてさらなる解析を進めるため、想定される琵琶湖 NOM の起源や水環境中における動態等を考慮し、いくつかの参照物質を選定して COSY スペクトルを取得することとした。ここでは、多環式セスキテルペン類の一種であるカリオフィレン (caryophyllene) を例にとり、その COSY スペクトルを図 16 に示す。図 16 より、1.4~2.4ppm 付近に多くの相関信号が観られ、環状セスキテルペン類の構造に特徴的なパターンを示していると考えられる。本研究では、このほかにフィトール (phytol)、ルチン (rutin)、カフェイン (caffeine) 等のスペクトルを取得しており、今後も参照物質の NMR スペクトル情報の収集を行っていく予定である。

平成 23 年度においては、NMR 分析条件の検討を行ったが、今後は検出されたシグナルの帰属や構成成分の同定に向けた解析手法について検討する必要がある。琵琶湖 NOM の分解過程においては、非常に多くの成分がダイナミックに変動していると考えられ、多変量解析を利用した STOCSY 法や 2D NMR スペクトルの差分から変動成分を推定する DANS 法などの原理を応用して解析を行っていく必要があると考えている。

4. おわりに

本研究は、琵琶湖 NOM の分解過程における有機物組成の変動および琵琶湖難分解性有機物の構造特性を分子レベルで解明することを最終目標とした。平成 23 年度は、季節毎に採取した琵琶湖北湖 NOM を分解性試験に供してその分解特性の評価を行うと共に、琵琶湖難分解性有機物の構造特性を解明するための分析手法の検討・確立を行った。本研究で使用した分解性試験法の特徴は、より現場に近い条件での本質的な分解性 (inherent biodegradability) を評価することを目指し、植種や栄養塩の添加を行っていない点にある。

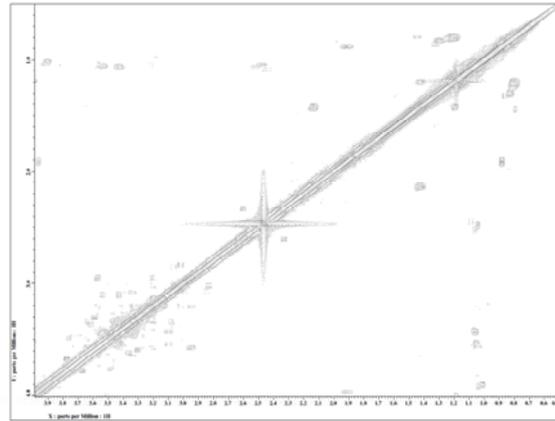


図 15 琵琶湖 DOM の拡大 COSY スペクトル (0.5~4ppm)

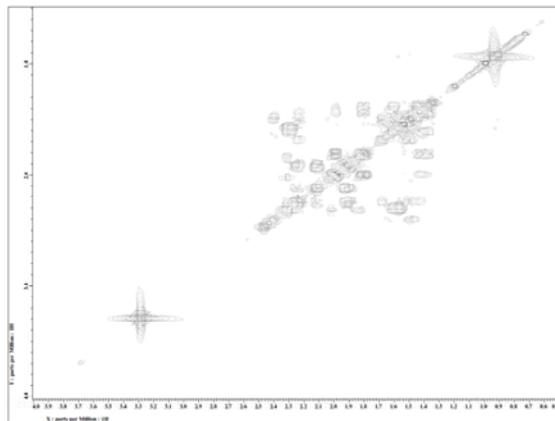


図 16 Caryophyllene の拡大 COSY スペクトル (0.5~4ppm)

長期間分解性試験では、有機物濃度の減少が見かけ上収束するまで試験を継続し、より厳密に琵琶湖北湖 NOM の本質的な分解性を評価した結果、琵琶湖 NOM の分解には 200~500 日程度が必要であり、従来の 100 日間試験では琵琶湖 NOM の分解性を過小評価していることが明らかとなった。

Multi-G model を琵琶湖 NOM の分解特性解析に適用した結果、TOC、POC、DOC いずれの指標を用いても、すべての季節において 3 成分モデル（易分解性成分、準易分解性成分および難分解性成分）で琵琶湖 NOM の分解挙動を精度よく再現・説明できることが明らかとなった。その他、琵琶湖 NOM 分解過程では POM の DOM への分解過程についても考慮する必要があること、琵琶湖難分解性有機物は季節によらずほぼ一定の濃度となり、季節的な変動が少ないこと、難分解性有機物の主要な存在形態は溶存態（DOM）であること、POM 中の易分解性成分の反応速度定数 (k_d) は季節によらずほぼ一定の値 1.149 (1/day) を示すこと等が明らかとなった。

琵琶湖 NOM の初期分解過程における詳細な分解挙動を調べるために行った短期間分解性試験の結果より、POM の分解に伴う DOM への有機物の移行量が DOM の分解量に対して無視できないことが示唆された。

三次元励起・蛍光マトリックス法（EEM）スペクトルによる琵琶湖 NOM の分解特性の把握では、琵琶湖 NOM の初期分解過程において、主に藻類由来と考えられる易分解性 POM が分解されて高分子量画分へ移行し、最終的には分解・無機化されて消失していると考えられた。

本研究で実施した分解性試験の結果より、分解メカニズムを詳細かつ定量的に解明するためにも琵琶湖 NOM の分解過程における有機物組成の変動および難分解性有機物の構造特性の解明と併せてそれらの影響因子を把握することが必要であることが分かった。そこで、本研究では琵琶湖 NOM の分解過程における単糖およびアミノ酸組成変動の把握、そして NMR による構造特性の解明を目指して分析法の検討・確立を行った。本研究では、単糖組成分析に ABEE 法を、アミノ酸組成分析に AccQ-Tag 法を選定し、いずれもプレカラム誘導体化法による分析手法の検討・確立を行った。単糖組成分析の結果より、各単糖は長期間分解性試験終了までにはほぼ全て分解されており、(多)糖類の難分解性有機物への寄与は比較的小さいことが明らかとなった。

本研究では、琵琶湖難分解性有機物の構造特性の解明に向けて NMR 分析条件の検討を実施した。COSY 以外の 2D 測定では、シグナルは検出されなかったか、非常に弱かったため、相関信号をある程度検出できた COSY が、琵琶湖 NOM および難分解性有機物の構造特性を調べる目的に適した 2D 測定法であることが分かった。脱塩・精製した琵琶湖 DOM の COSY スペクトルから、琵琶湖 DOM は多種多様な脂肪族成分の構造を有していることが明らかとなった。今後は検出されたシグナルの帰属や構成成分の同定に向けた解析手法について検討する必要がある。

今後は、琵琶湖 NOM の分解過程における有機物組成の変動および琵琶湖難分解性有機物の構造特性を解明すべく、分子量分布情報などと併せて琵琶湖 NOM 分解モデルの構築を行っていく予定である。

5. 参考文献

- 1) 今井ら：湖沼において増大する難分解性有機物の発生原因と影響評価に関する研究，国立環境研究所特別研究報告 SR-36-2001, 2001.
- 2) 秋田ら：長期間生分解性試験を用いた夏季の琵琶湖天然有機物質（NOM）の分解性評価，

環境衛生工学研究, 25(3), 116-119, 2011.

- 3) Berner: “Early Diagenesis: A Theoretical Approach”, Princeton Series in Geochemistry, 1980.
- 4) Ishikawa & Nishimura: A New Method of Evaluating the Mineralization of Particulate and Dissolved Photoassimilated Organic Matter, *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, **39**, 29-42, 1983.
- 5) Yasuno *et al.*: Two-mode Analysis by High-performance Liquid Chromatography of ρ -Amino benzoic Ethyl Ester-derivatized Monosaccharides, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**(11), 1944-1946, 1997.
- 6) Cohen & De Antonis: Application of Amino Acid Derivatization with 6-amino quinolyl-N-hydroxy succinimidyl carbamate, *Journal of Chromatography A*, **661**, 25-34, 1994.
- 7) 安藤鋭郎ほか編: 『タンパク質化学 2 基礎』, 1979.
- 8) JEOL ユーザーズマニュアル【測定編】, 2004.

謝辞

本研究は、京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター・清水芳久教授のご指導の下、大学院生・秋田泰典君をはじめとする研究室所属メンバーと共に実施したものである。ここに記して、心からの謝意を表します。

本研究の遂行において、採水調査のみならず研究設備、分析装置、各種水質データの提供の面において、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターのご支援をいただいた。とりわけ、岡本高弘専門員、早川和秀専門研究員には多大なるご支援、ご協力を賜りました。研究代表者として深く感謝の意を表します。また、NMR 測定では、分子科学研究所・機器センターのご支援を賜りました。ここに謝意を表します。