

湖沼における細菌由来溶存有機物の寄与： 鏡像異性体バイオマーカーを用いた定量法の確立

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・研究員 山口保彦

1. はじめに

琵琶湖など水圏の有機物動態・収支には、湖沼細菌によるDOMの生産・放出が、有機物動態・収支の鍵となるプロセスである可能性がある。例えば、細菌が活発にDOMを放出している状況では、細菌によるDOMの再利用が進むことで有機物の無機化が促進されたり、有機物の難分解化が進行されたりすることが考えられる。こうした状況は、生態系にとっては「利用できる有機物が減少する」ことを意味し、特に魚など高次の捕食者には悪影響を与える可能性がある。また、琵琶湖では近年のBODとCODの乖離から（図1）、難分解性DOMの濃度が増加している可能性が指摘されているが、難分解性DOMの生成源として細菌が重要である可能性がある。

海洋では、DOMの生産生物として細菌が量的に特に重要であることが近年分かってきて、「微生物炭素ポンプ」という概念が提唱されるに至った（Jiao et al., 2010など）。しかし湖沼環境では、手法の制約から、細菌由来DOMに関する知見は非常に限られている。これまで湖沼環境で細菌由来DOMの研究が進んでいない理由の一つに、海洋で用いられてきた研究手法をそのまま応用することが難しいことが挙げられる。

海洋では様々な海域で、D-アミノ酸（通常の生物が持つL-アミノ酸の鏡像異性体）など細菌特有の有機分子をバイオマーカーとして、DOMの生成源への細菌寄与度が調べられてきた（例えばMcCarthy et al., 1998; Kaiser & Benner, 2008など）。

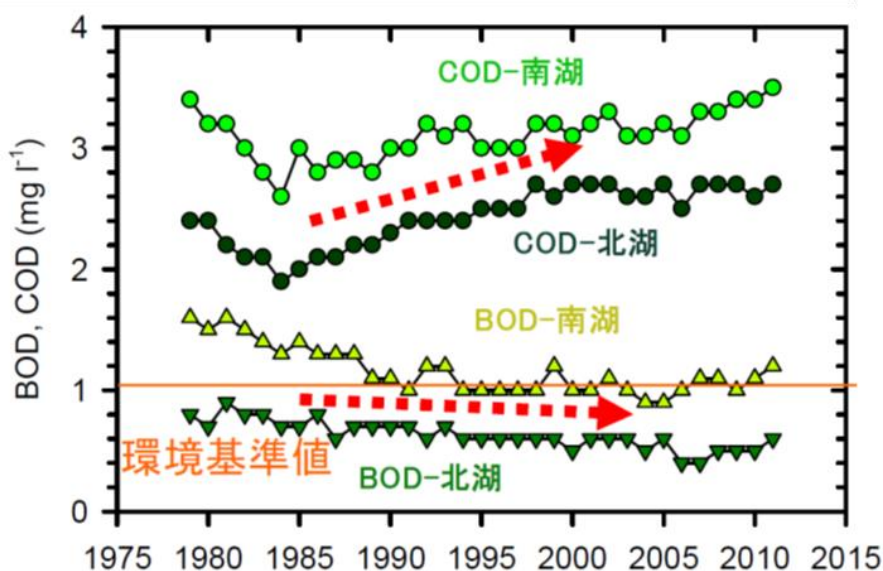


図1：琵琶湖におけるCOD、BODの年平均濃度の変化（北湖、南湖）。（琵琶湖環境科学研究センター報告書を改変）

この定量法では、海洋遠洋域の微生物由来のDOMが、ある一定濃度の有機分子バイオマーカーを含むことを利用し、その値を100%の端成分として定量計算に用いている。淡水湖沼では、Kawasaki et al. (2013) が霞ヶ浦でD-アミノ酸を用いて細菌由来DOMの寄与定量を行っているのが唯一の報告となる。しかし、Kawasaki et al. (2013) の研究では、細菌寄与度の定量法や、D-アミノ酸の分析法など手法に課題が残っていた。湖沼などの陸水環境では、グラム陽性細菌が多いなど細菌群集組成が海洋と大きく異なるため、海洋と同じ定量計算法を用いられない可能性がある。また、湖沼中の有機物は、陸域由来の腐植物質を多く含むため、D-アミノ酸などの分析に際して、夾雑物を除いて正確に有機分子を同定する必要がある。

2. 本研究の目的

本項目の研究では、「D-アミノ酸を有機分子バイオマーカーとした、水圏DOM中の細菌成分の寄与度定量」を、湖沼でも適用可能な手法として、世界で初めて開発・確立することを目的とした。まず、D-アミノ酸の化学分析技術を、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）を用いて、湖沼のDOMにも適用できるように確立する。次に、琵琶湖の天然細菌を用いた培養実験により、湖沼の微生物由来DOMに含まれる有機分子バイオマーカーの濃度を制約し、定量のための端成分を確立する。さらに琵琶湖の湖水DOM中D-アミノ酸濃度の深度分布、季節変動を明らかにして、琵琶湖の難分解性DOM（系外に流出する有機物）と準易分解性DOM（湖内で再利用される有機物）それぞれについて細菌の寄与度を定量する。難分解性と準易分解の成分に分けて定量することで、有機物動態・収支の中での細菌の詳細な役割解明につなげる。

3. 試料と手法

3-1. DOM試料の採取

琵琶湖湖水は、琵琶湖北湖17Bサイト（今津沖中央）の表層（水深5 m）および深層（水深60 m）において、琵琶湖環境科学研究センターの調査船「びわかぜ」の多筒型ニスキン採水器またはバンドーン採水器を用いて、2018年8月27日、9月27日、

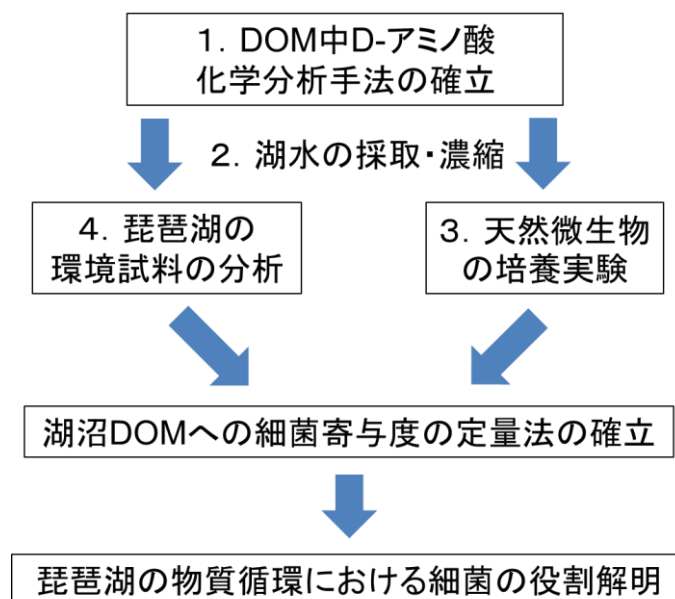


図2：本研究の構成

10月25日に採水した。採取した湖水は、ナイロン製プランクトンネット（150 μm メッシュ、超純水で洗浄済）、Whatmann GF/Fフィルター（孔径0.7 μm 、450°Cで5時間加熱済）、ポリカーボネート製Nucleporeフィルター（孔径0.2 μm 、酸洗浄済）を用いて、三段階の濾過で粒子状有機物と細菌細胞を除去し、湖水DOM試料を採取した。アミノ酸分析用の試料は、ポリプロピレン製容器（アルカリ・酸洗浄済）に入れて、-30°Cで冷凍して保存した。

3-2. 琵琶湖細菌を用いた培養実験

2018年9月27日に17Bサイト水深5 mから採取した湖水について、プランクトンネット（同上）とGF/Fフィルター（同上）の二段階濾過を行い、生物として湖水表層細菌細胞のみを含む濾液を得た。地下水中細菌を用いた培養実験を行ったShen et al. (2015) の手法に基づき、グルコース、硝酸ナトリウム、リン酸二水素カリウムをそれぞれ単一の炭素源、窒素源、リン源とした人工培地を作製した。湖水濾液を培地で50倍希釈し、ポリカーボネート製容器（酸洗浄済）に移して密栓した後、暗所20°Cで振盪（60 rpm）し、培養実験を行った。培養実験開始後、27日目に試料を分取し、Nucleporeフィルター（同上）を用いて濾過を行い、培養実験DOM試料を採取した。アミノ酸分析用の試料は、濾過後、ポリプロピレン製容器（アルカリ・酸洗浄済）に入れて、-30°Cで冷凍して保存した。

3-3. DOM試料の分析

湖水DOM試料および培養実験DOM試料のDOC濃度は、TOC計（島津製作所TOC-L）を用いて、濾過した当日に測定した。

アミノ酸分析用の試料はまず、内標準物質（L-ノルロイシン：L-Nle）を添加した後、凍結乾燥でDOM成分を濃縮した。濃縮試料をリアクティブバイアルに移してアスコルビン酸を添加した後、ヘッドスペースを窒素ガスで置換した状態で、6N塩酸で液相加水分解（110°C、20時間）を行った。加水分解で遊離体として放出されたアミノ酸について、イオン交換樹脂による精製と、TFA-iPr誘導体化、液々抽出による精製を行った（Takano et al., 2010; McCarthy et al., 2013; Yamaguchi & McCarthy, 2018; Veuger et al., 2005）。

誘導体化したアミノ酸について、キラルカラム（Agilent CP-Chirasil-L-Val：カラム長25 m、内径0.25 mm、膜厚 0.12 μm ）を装着したGC-MS（Agilent 7890A GC - 5975C MSD）を用いて、D-アミノ酸、L-アミノ酸それぞれについて、選択イオンモニタリングモードで、各アミノ酸の特徴的なフラグメントイオンを用いて定量した（Yamaguchi & McCarthy, 2018の手法を改変）。酸加水分解と誘導体化におけるラセミ化ブランクは、Kaiser et al. (2005)とYamaguchi & McCarthy (2018) の手法に基づいて補正した。

3-4. D-アミノ酸濃度を用いた細菌由来DOMの寄与定量

D-アミノ酸濃度は、Kaiser and Benner (2008) に基づき、同試料のDOC濃度で規格化し、有機炭素量あたりの値とした。細菌由来DOMの寄与定量は、Kaiser and Benner (2008) に基づき、培養実験DOM試料の規格化D-アラニン（D-Ala）濃度を100%として、湖水DOM試料の規格化D-Ala濃度から定量した。湖水の難分解性DOMと準易分解性DOMの値は、二成分モデルを用いたMaki et al. (2010) の手法を用いて計算

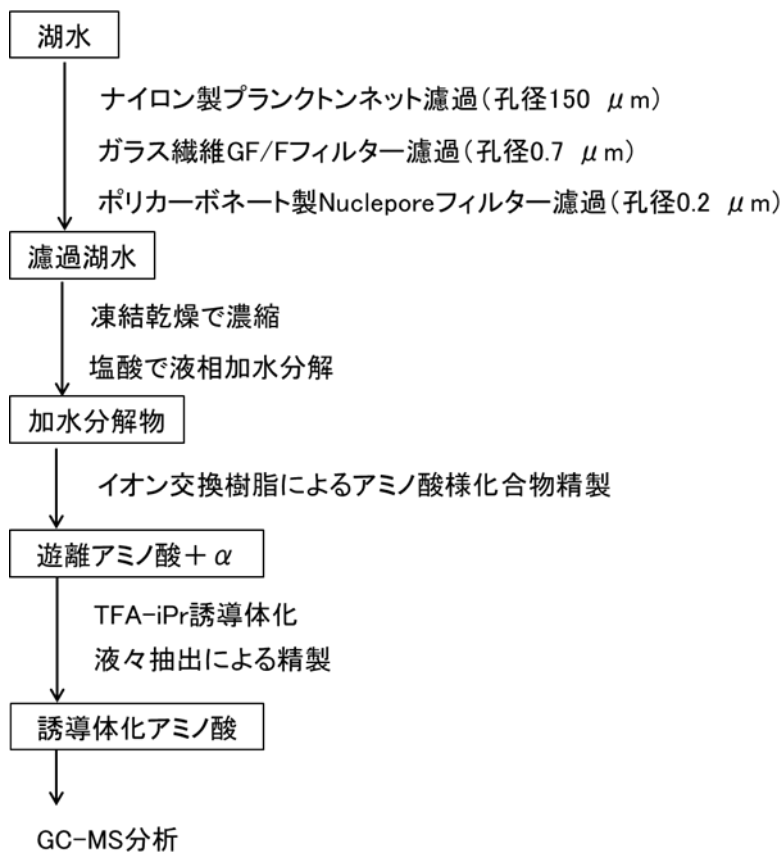


図3：湖水DOM中のD-アミノ酸の分析法の流れ

した。10月水深60 m試料の値を難分解性DOMの代表値として、8～10月水深5 mの試料の値を難分解性DOMと各時期の準易分解性DOMの和として仮定した。

4. 結果および考察

4-1. GC-MSを用いたD-アミノ酸の分析法開発

まずアミノ酸標準試料を用いて、GC-MSによるD/L-アミノ酸分析法を最適化した。本研究の手法では、アラニン (Ala)、バリン (Val)、スレオニン (Thr)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、セリン (Ser)、アスパラギン酸 (Asx)、グルタミン酸 (Glx)、フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr) の10種類のアミノ酸について、D-アミノ酸をL-アミノ酸から分離して、高感度に定量ができた。選択イオンモードを用いることで、他のアミノ酸や化合物のピークと分離して、各D-アミノ酸を定量できた。これにより、HPLC蛍光法で値が報告されてきた主要4種類のD-アミノ酸 (Ala, Glx, Asx, Ser) に加えて、新たに6種類のD-アミノ酸 (Val, Thr, Ile, Leu, Phe, Tyr) についても、DOM中の定量が可能になった。

検出限界は、GC-MSへの注入量で10 fmol程度で、HPLC蛍光法で報告されている値 (3-20 fmol: Kaiser et al., 2005) と同程度の値となり、湖水DOM試料の分析に十分な感度となった。

図4にアミノ酸標準試料の、図5に湖水DOM試料の分析例 (GC-MSクロマトグラム) を示す。

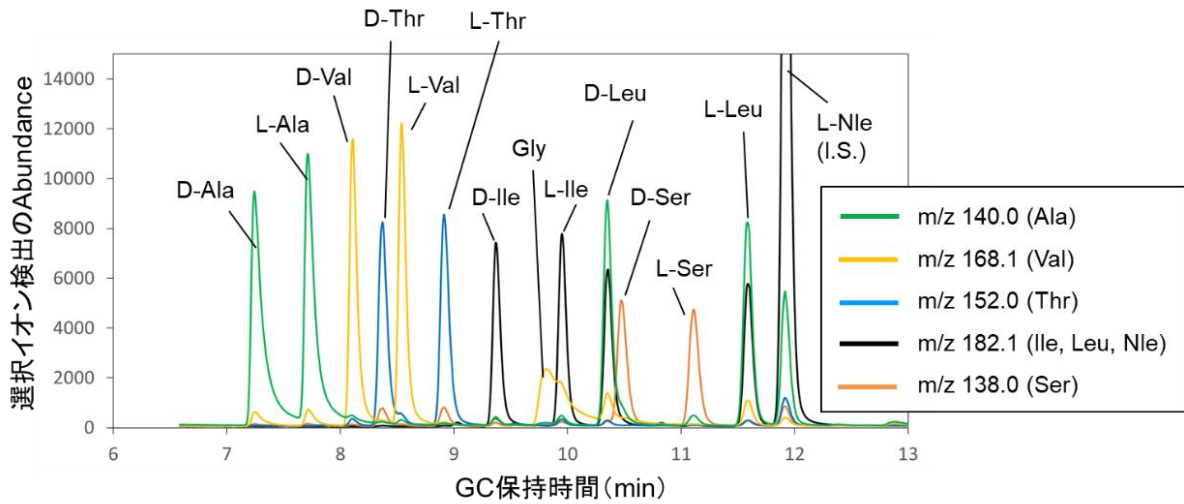


図4：GC-MSによるDLアミノ酸標準試料（～1.8 pmol注入）の分析における、各アミノ酸に対応する選択イオンのクロマトグラムの一部。各アミノ酸に対応するイオンフラグメントを、色で変えて重ね合わせて示した。

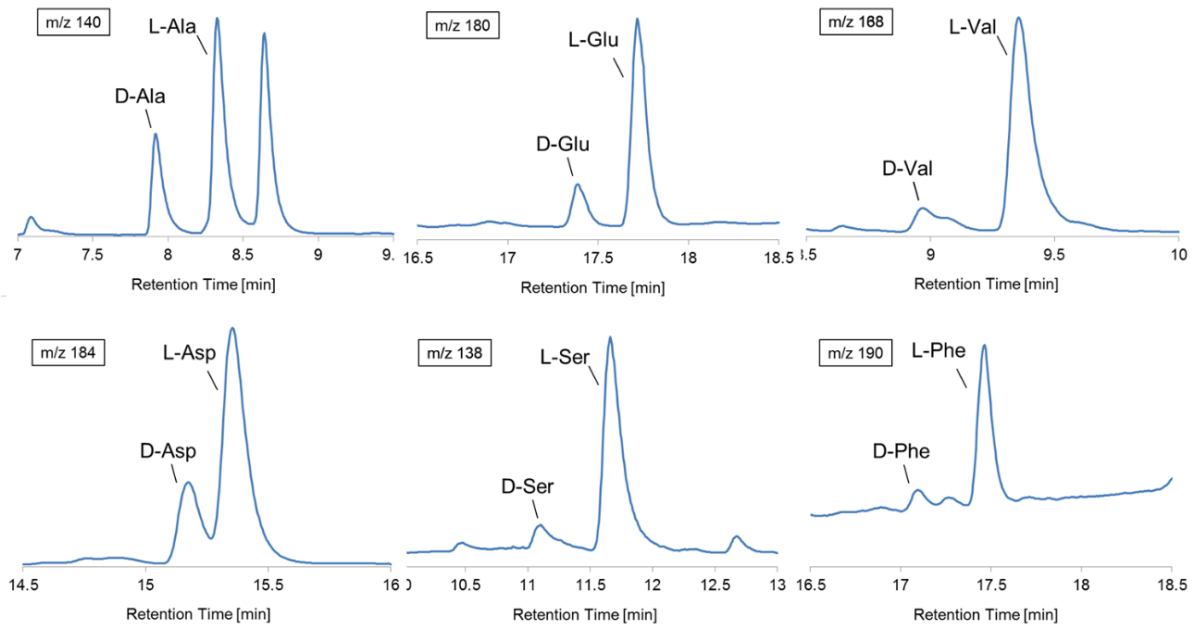


図5：琵琶湖の天然DOM試料（2018年10月水深60m）の、GC-MSによるD-アミノ酸分析のクロマトグラムの例。各アミノ酸に対応するイオンフラグメントを分けて示した。

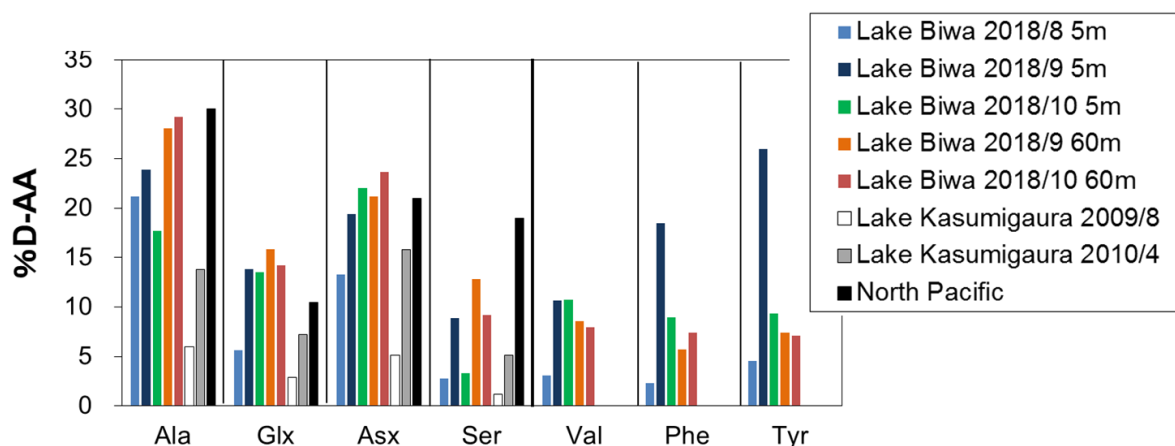


図6：琵琶湖および他環境での天然DOMの氨基酸D/L比。D/L比は、 $\%D = \frac{[D-AA]}{[D-AA]+[L-AA]} \times 100$ として示した。琵琶湖DOM（2018年8～9月：水深5m・60m）が本研究による値（色付）。霞ヶ浦DOMの値（白、灰色）はKawasaki et al. (2013) より、北太平洋DOMの値（黒）はKaiser et al. (2005) より、それぞれ引用した。氨基酸の略称は、本文4.1に示した。

4-2. 湖水DOM中のD-氨基酸

図6に、琵琶湖（本研究）および他環境（北太平洋、霞ヶ浦：文献値）における、天然DOM中の氨基酸のD/L比を示した。海洋と霞ヶ浦のDOMについては、HPLC蛍光法を用いてD-氨基酸が分析されているため、主要4種氨基酸（Ala、Glx、Asx、Ser）の値のみを示した。

琵琶湖DOM中のAla、Glx、Asx、Serは、霞ヶ浦DOMよりも全体的に高い氨基酸D/L比を示して、北太平洋（海洋遠洋）のDOMと近い値となった。琵琶湖DOMの成分として、細菌由来DOMが重要であることがこの結果からも示唆された。

また、琵琶湖DOMでは、GC-MS法を用いたことで、新たにVal、Phe、TyrでD-氨基酸が有意な濃度で検出された。これらのD-氨基酸は、湖水DOMの起源（内部生産由来か外部流入由来か）を詳細に推定できる新たな指標として有用である可能性がある。今後、様々な試料について、同様にGC-MS分析でこれらのD-氨基酸を定量していくことが重要となる。

4-3. D-氨基酸規格化濃度を用いた細菌寄与度推定

図7に、琵琶湖（本研究）および他環境（海洋、霞ヶ浦、地下水：文献値）における、天然DOMおよび培養実験DOMのDOC規格化D-Ala濃度を示した。琵琶湖の湖水天然DOMの値は、10～18 nmol mg C⁻¹の範囲を示し、北太平洋および霞ヶ浦の値（それぞれKaiser and Benner, 2008; Kawasaki et al., 2013）と同程度となった。琵琶湖の湖水中細菌を用いた培養実験DOMの値は48 nmol mg C⁻¹となり、同様の培養実験が行われた海洋と地下水の値（それぞれ35 nmol mg C⁻¹: Kaiser and Benner, 2008; 24 nmol mg C⁻¹: Shen et al., 2015）よりも高い値を示した。

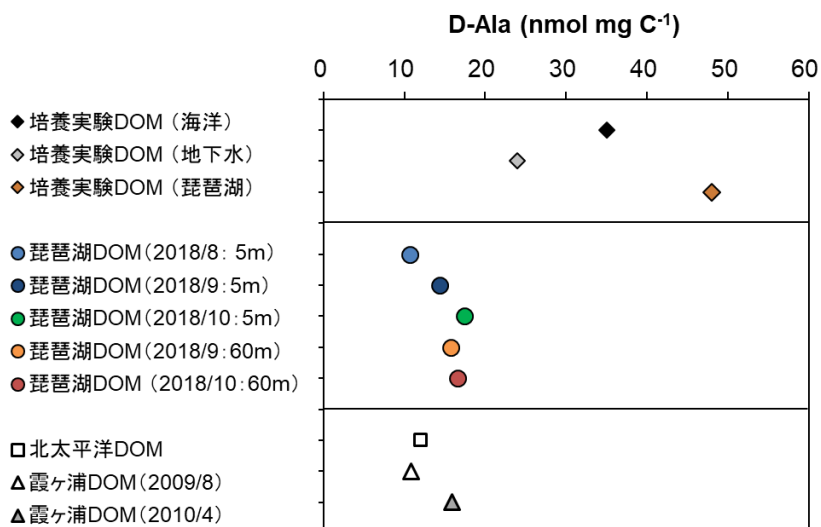


図7：琵琶湖および他環境での、天然DOMと培養実験DOM中のD-AlaのDOC規格化濃度。琵琶湖DOM（2018年8～9月：水深5m・60m）と培養実験DOM（琵琶湖）が本研究による値（それぞれ、丸印とオレンジ菱形印）。培養実験DOM（海洋）と北太平洋DOMの値（それぞれ、黒菱形印と白四角印）はKaiser and Benner (2008) より、霞ヶ浦DOMの値（三角印）はKawasaki et al. (2013) より、培養実験DOM（地下水）の値（灰菱形印）はShen et al. (2015) より、それぞれ引用した。

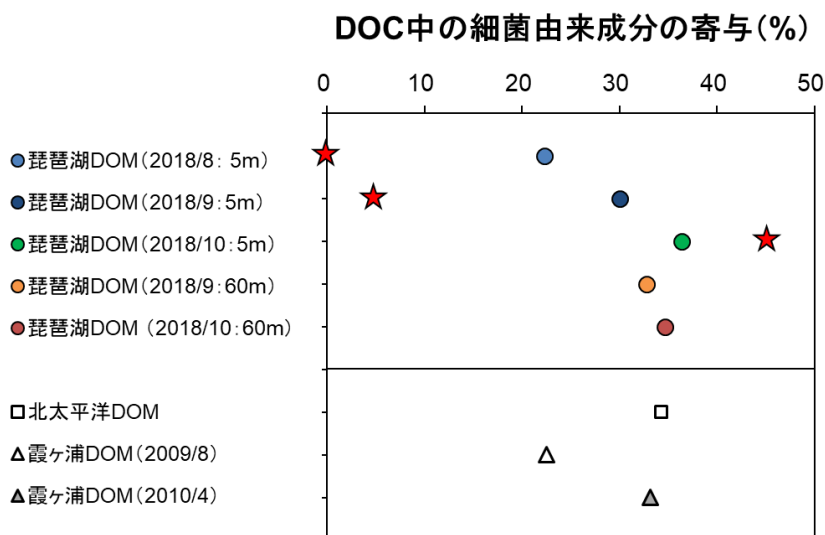


図8：DOCで規格化したD-Ala濃度を用いて計算した、琵琶湖および他環境の天然DOMにおける、DOC中の細菌由来成分の寄与。琵琶湖DOM（2018年8～9月：水深5m・60m）が本研究による値。丸印がDOM全体の値で、星印は二成分モデルを用いて計算した各月表層の準易分解性DOMの値。北太平洋DOMの値（四角印）はKaiser and Benner (2008) より引用し、霞ヶ浦DOMの値（三角印）はKawasaki et al. (2013) の値を基に再計算した。

図8には、DOC規格化D-Ala濃度を用いて計算した、琵琶湖および他環境の天然DOMにおける、DOC中の細菌由来成分の寄与度を示した。琵琶湖の難分解性DOMを代表すると考えられる10月水深60 mの値は、35%となった。つまり、琵琶湖の難分解性DOMには、細菌由来DOMとそれ以外（植物プランクトン由来など）、少なくとも二種類の生成源が重要と言える。この琵琶湖の難分解性DOM（10月水深60 m）の値は、北太平洋DOMの値（Kaiser and Benner, 2008）と、霞ヶ浦DOMのうち2010年4月の値（Kawasaki et al., 2013の天然DOMの値を基に、琵琶湖の培養実験DOMの値を端成分として再計算した）と、同程度となった。それぞれ、各環境における難分解性DOMを代表すると考えられる値であり、琵琶湖のような貧～中栄養湖と、霞ヶ浦のような富栄養湖の両方で、海洋遠洋域と同様に「微生物炭素ポンプ」が重要であることを示唆する。さらに、同程度の値になったことは、共通のメカニズムが背景に存在する可能性を示唆するが、詳細の解明にはさらなる研究が必要となる。

8～9月の琵琶湖表層の準易分解性DOMの値は、それぞれ $0 \pm 12\%$ 、 $4 \pm 15\%$ と計算され、測定・計算に伴う誤差を考慮しても、最大でも20%以下となった。細菌由来成分の寄与度が低かったことは、夏季の表層で生産され蓄積する準易分解性DOMは、主に真核植物プランクトン由来であることを示唆する。

一方で、10月（秋季）の琵琶湖表層の準易分解性DOMにおいて、細菌由来成分の寄与度は $47\% \pm 20\%$ となり、8～9月の値よりも有意に大きかった。真核植物プランクトン由来の準易分解性DOMを表層湖水中の細菌が取り込み、細胞内の代謝で作った後、細菌由来DOMが放出されたことが示唆される。2018年8月から10月にかけてのD-Ala濃度の変化から、細菌由来の準易分解性DOMの放出フラックスを計算すると、表層（0-20 m）の積算値で、約 $0.04 \text{ gC m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ と推定された。これは、夏季表層の細菌生産フラックスの5%程度の値となる。細菌生産の残り（95%）が、原生生物による捕食とウイルス感染による易分解性DOMの放出・再利用で、生態系に有機炭素を供給していると考えられる。

5. 研究のまとめと意義

湖沼の細菌由来DOMの動態や物質循環における役割については、海洋での研究の進展に比べて、知見が極めて限られていた。本研究では、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターによる濾過、GC-MSを用いた正確なD/L-アミノ酸の分析、天然湖水中細菌を用いた培養実験を、それぞれ湖沼DOMのD-アミノ酸分析について初めて適用したことで、D-アミノ酸バイオマーカーを用いた細菌由来DOMの寄与度定量を、湖沼環境でも適用可能なアプローチとして世界で初めて確立した。本研究で開発した手法は、他の湖沼にも応用可能であり、今後様々な環境の湖沼で細菌由来DOMの動態解明が進むことが期待される。

本研究で得られた、琵琶湖の2018年8～10月のD-アミノ酸データからはまず、琵琶湖のような貧～中栄養湖と、霞ヶ浦のような富栄養湖の両方で、海洋遠洋域と同様に「微生物炭素ポンプ」（細菌による難分解性DOMの生産）が重要であることが示唆された。難分解性DOMの生成源としては、細菌による生産と、真核植物プランクトンなどによる生産の、少なくとも二種類の異なる経路が量的に重要であることが示された。今後、湖水外部から流入するDOM（河川や堆積物間隙水）についてもD-アミノ酸分析を行い、内部生産と外部流入の寄与をそれぞれ推定することが重要となる。

また、夏季の琵琶湖表層湖水に蓄積する準易分解性DOMは、安定炭素同位体比の解析から、内部生産由来であることは判明していたが (Maki et al., 2010)、本研究によって大部分は細菌由来ではなく真核植物プランクトン由来であることが初めて示された。また、細菌による準易分解性～難分解性DOMの放出フラックスを、細菌生産フラックスと比較することで、細菌生産の大部分は、捕食や易分解性DOM放出などにより、短い時間スケールで利用可能な有機炭素として生態系に供給されていることが示唆された。

6. 参考文献

- Jiao N., Herndl G. J., Hansell D. A., Benner R., Kattner G., Wilhelm S. W., Kirchman D. L., Weinbauer M. G., Luo T., Chen F. and Azam F. (2010) Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 593-599.
- Kaiser K. and Benner R. (2005) Hydrolysis-induced racemization of amino acids. *Limnol. Oceanogr. Methods* 3, 318-325.
- Kaiser K. and Benner R. (2008) Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen. *Limnol. Oceanogr.* 53, 99-112.
- Kawasaki N., Komatsu K., Kohzu A., Tomioka N., Shinohara R., Satou T., Watanabe F. N., Tada Y., Hamasaki K., Kushairi M. R. M. and Imai A. (2013) Bacterial contribution to dissolved organic matter in eutrophic Lake Kasumigaura, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7160-7168.
- McCarthy M. D., Hedges J. I. and Benner R. (1998) Major Bacterial Contribution to Marine Dissolved Organic Nitrogen. *Science.* 281, 231-234.
- McCarthy M. D., Lehman J. and Kudela R. (2013) Compound-specific amino acid $\delta^{15}\text{N}$ patterns in marine algae: Tracer potential for cyanobacterial vs. eukaryotic organic nitrogen sources in the ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 103, 104-120.
- Maki K., Kim C., Yoshimizu C., Tayasu I., Miyajima T. and Nagata T. (2010) Autochthonous origin of semi-labile dissolved organic carbon in a large monomictic lake (Lake Biwa): carbon stable isotopic evidence. *Limnology* 11, 143-153.
- Shen Y., Chapelle F. H., Strom E. W. and Benner R. (2015) Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry* 122, 61-78.
- Takano Y., Kashiya Y., Ogawa N. O., Chikaraishi Y. and Ohkouchi N. (2010) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids: application to biogeochemical samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2317-2323.
- Veuger B., Middelburg J. J., Boschker H. T. S. and Houtekamer M. (2005) Analysis of ^{15}N incorporation into D-alanine: A new method for tracing nitrogen uptake by bacteria. *Limnol. Oceanogr. Methods* 3, 230-240.
- Yamaguchi Y. T. and McCarthy M. D. (2018) Sources and transformation of

dissolved and particulate organic nitrogen in the North Pacific Subtropical Gyre indicated by compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ analysis of amino acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 220, 329-347.

謝辞

本研究は、平成30年度の琵琶湖・淀川保全機構「水質保全研究助成」の支援を受けました。アミノ酸のGC-MS分析にあたっては、総合地球環境学研究所の陀安一郎教授と由水千景博士、および京大生態学研究センターの木庭啓介教授に協力していただきました。ここに記して、関係者の皆さまに感謝いたします。