

## 安定同位体より見た西部北太平洋における窒素循環

Stable isotope constraints on the nitrogen cycle in the western North Pacific.

(提出先：北海道大学大学院理学院，2009年3月)

今野祐多 (Uta Konno)

所属：北海道大学大学院理学院自然史科学専攻

海洋一次生産の制限因子は生物利用態窒素（あるいは結合態窒素，固定態窒素）であると考えられており，その窒素サイクルを解明する上で窒素安定同位体を利用した研究はこれまでに大きな貢献を果たしてきた。海洋全体における生物利用態窒素収支の見積もりは古くから行われており，窒素固定と脱窒がそれぞれ主流入源と主流出源だと考えられてきた。研究が進むにつれて，流入・流出の見積もり量は共に増加してきたが，その収支はほぼ釣り合っており，特に堆積物中の窒素同位体値から最近では大きな不均衡はないと考えられている。ところが近年，Codispoti *et al.* (2001) の研究で脱窒量がこれまでよりも大きく見積もられ，流入量に対して流出量が大幅に上回る結果となった。仮にその流入・流出の見積もり量が正しいとすると，およそ3000年程度で海洋中から生物利用態窒素が消失してしまう計算になり，流入量の見積もりにも過小評価があるのではないかと考えられ始めた。特に主流入源である窒素固定量の見積もりにも過小評価の疑いが掛けられている。

代表的な窒素固定速度定量法にアセチレン還元法と<sup>15</sup>Nトレーサー法がある。アセチレン還元法は，窒素還元酵素ニトロゲナーゼがアセチレン存在下ではN<sub>2</sub>の代わりにアセチレンを還元し，エチレンを生成する特徴を利用し窒素固定速度を求める。ところが，アセチレンを還元する際とN<sub>2</sub>を還元する際には還元効率が異なるため還元効率を補正する係数を求める必要がある。還元効率の補正係数は3~4という値がよく用いられてきたが，実際には窒素固定時に副次的に生成されるH<sub>2</sub>の有無によっても還元効率が様々に変化し，例えば係数が3.3~56と大きく変化することも報告されており一意に決めることはできない。そのため，定量的に窒素固定速度を求めるには<sup>15</sup>Nトレーサー法を用いることが必要となる。<sup>15</sup>Nトレーサー法は，同位体ラベルした<sup>15</sup>N<sub>2</sub>を添加して培養を行い，PON（粒子状有機窒素）の $\delta^{15}\text{N}$ 値の時間変化から窒素固定速度を定量する手法である。この手法ではPONを濃縮するために濾過を行うが，高感度な窒素同位体値測定のためには，blank源となる有機物を高温処理にて除去できるガラス繊維フィルターが適当であるため，GF/Fフィルターと呼ばれるおよそ0.7  $\mu\text{m}$  孔径のガラス繊維フィルターが用いられてきた。ところが，培養中に0.7  $\mu\text{m}$  よりも小さな画分（本研究ではDON（溶解有機窒素）画分とする）に窒素固定による影響が現れていた場合には，この手法では見過ごしてしまうことになり，窒素固定量の過小評価

に繋がる可能性がある。例えば，近年確認され始めたピコプランクトンサイズ（0.2~2  $\mu\text{m}$ ）の窒素固定生物が窒素固定を行っている場合や，培養中にバクテリアによる分解や細胞溶解，ストレスによるDONの放出などが起きた場合には一度窒素固定した<sup>15</sup>NがDON画分へ漏出している可能性が考えられる。また過去の研究でも，全固定窒素の約半分がDONとして放出される可能性を培養実験から指摘しており，フィルターを通り抜けるDON画分を無視することはできないと考えられる。しかし，従来の有機窒素の同位体分析には元素分析計が用いられており，フィルターなどに濃縮できない物質の測定は非常に困難である上，有機窒素をN<sub>2</sub>へと変換して測定するためブランクが大きく高感度な測定ができなかった。そこで，本研究は湿式の化学変換法による有機窒素のN<sub>2</sub>O化という手法を確立し，有機窒素の高感度測定を可能にした。この手法と<sup>15</sup>Nトレーサー法を合わせることで，従来のPON画分に加えDON画分の $\delta^{15}\text{N}$ 測定を行い，西部北太平洋海域の全窒素固定量を定量することに挑戦した。

本研究は，学術研究船白鳳丸による2006年5~6月（KH06-2次航海），2007年9月（KH07-2次航海），2008年8~9月（KH08-2次航海）の研究航海において試料採取および窒素固定培養実験を行った。多連式ニスキン採水器で海水を採取し，ポリカーボネート製の500 mL容器にヘッドスペースが無いように分取した。その後すぐに船内の実験室で<sup>15</sup>N<sub>2</sub>（<sup>15</sup>N: 99%）を1 mL添加し，光量と水温を採取深度に調節した甲板上の水槽で培養を行った。培養終了後，海水試料をGF/Fフィルターで濾過し，PON分析用に濾紙を，DON分析用に濾液を冷凍保存し持ち帰った。持ち帰った試料は上記した手法を用い $\delta^{15}\text{N}$ 値の定量を行った。

その結果，従来のPON画分では，KH06-2次航海における窒素固定速度は観測地点により大きなバリエーションを持つが，そのレンジを含め同海域の先行研究による報告値と非常に良く一致することが示された。それに対しKH07-2とKH08-2次航海での窒素固定速度は小さな値を示す結果となった。その原因として，先行研究やKH06-2航海はブルーミングの時期に当たる一方で，後の二つの航海は晩夏に当たり窒素固定生物量そのものが大きく減少した時期に当たるためだと考えた。特に小さな窒素固定速度が観測された地点においては，有光層下部までリン酸濃度が非常に低く，長期に渡るリン制限のため窒素

2010年4月以降所属

独立行政法人産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門

固定がほとんど行われていないと考えた。また、培養を行っていない天然の PON 窒素同位体値は大きな窒素固定速度が観測された地点ほど小さな値を示しており、観測された窒素固定速度の地理的バリエーションを支持している。

本研究で初めて測定された DON 画分における窒素固定速度は PON 画分と同様に試料採取地点により大きなバリエーションを持つ結果となったが、平均すると PON 画分と同等の窒素固定速度が示された。このことから、従来法ではおよそ半分の窒素固定を過小評価していた可能性が示唆される。Mulholland *et al.* (2006) はアセチレン還元法と<sup>15</sup>Nトレーサー法による窒素固定速度見積もり量の差異から、固定されたN<sub>2</sub>のDON画分への漏出量を計算しており、その量は9~81%と大きなバリエーションを持ち、平均で52%となると報告している。この漏出量はGF/Fフィルターをすり抜けた窒素固定に当たり、本研究で求めたDON画分における窒素固定量と同等の意味を持つ。彼女らの研究では、アセチレン還元法の際の補正係数として、理論値である3を採用しており定量性に問題が残るが、見積もられたDON画分の割合は初めて実測を行った本研究と非常に良く一致することがわかった。各試料採取地点における培養を行っていない天然のDON窒素同位体値はDON画分の寄与が大きいほど小さな値を示しており、PONと同様に窒素固定速度の地理的バリエーションを支持している。また、DON画分での窒素固定速度の平面分布から、特に中緯度海域においてその寄与が大きいことが明らかになった(全窒素固定速度に対して66~84%がDON画分による)。その原因として(1)GF/Fフィルターを通り抜けるピコプランクトンサイズの窒素固定生物によるDON画分における窒素固定、(2)PON画分サイズの窒素固定生物により一度固定された窒素が、培養実験中に細胞溶解やバクテリアによる分解、代謝過程でのDON放出などでDON画分に入り込むという二次

的な要因が考えられる。最近の研究で、窒素固定遺伝子を持つγ-プロテオバクテリアが東部北太平洋中緯度海域で発見されている。従来、窒素固定生物は暖かく貧栄養な低緯度海域を好み生息すると考えられていたが、小型の窒素固定生物は中緯度海域で活動する可能性が示唆され始めている。このようなことから、本研究ではDON画分での窒素固定のメカニズムを解明するため、定量PCR法を用い窒素固定遺伝子のコピー数を測定し、優先窒素固定生物種の特異性と窒素固定速度の比較を行った。測定は北海道大学大学院地球環境科学研究院の鈴木光次博士・陰泳峻氏に行って頂いた。その結果、中緯度海域においてはピコプランクトンの窒素固定遺伝子コピー数は少なく、トリコデスミウムの遺伝子がほとんどを占めていることがわかった。今回定量したものは窒素固定遺伝子の発現数ではないため窒素固定速度と直接の相関については議論できないが、本研究の中緯度海域における優先窒素固定生物種はトリコデスミウムだと特定することができた。このことから、本研究の中緯度海域におけるDON画分の窒素固定は培養中に何らかの原因でトリコデスミウムがDONを放出した可能性が高いと考えた。さらに詳しいメカニズムを追求するためには、より広範囲での観測を行いデータ数を増やすことや、培養時間を変化させるなど窒素固定生物の代謝過程との関係性を調査する必要があると考える。

本研究の結果から、見過ごされていたDON画分の窒素固定量は従来のPON画分と同等量であることがわかり、海洋全体の生物利用態窒素収支の見積もりを再考する必要があると考えられる。近年の脱窒の見積もり量の増大から生物利用態窒素収支見積もりは大きな不均衡を生じていたが、主流入源である窒素固定量が増大することが見込まれ、その不均衡は大きく減少すると提案する。

(2010年3月11日受付)