

調査・報告 [Research Paper]

ため池における アルカリ性ホスファターゼによるリン酸の生成量の推定

砂濱成美¹⁾・岡留博信¹⁾・広谷博史^{1)*}

(2018年12月7日受付, 2019年2月3日受理)

Estimation of orthophosphate generated by alkaline phosphatase in a reservoir

Narumi Sunahama¹⁾, Hironobu Okadome¹⁾, and Hiroshi Hirotani^{1)*}

摘 要

ため池のオルトリン酸態リン（リン酸）濃度とアルカリ性ホスファターゼ活性（APA）の関係を月一度の調査で3年にわたり調べた。するとAPAが高いのはリン酸濃度が低い時のみであったが、リン酸濃度が低い場合でも必ずしもAPAが高いわけではなかった。また、同じため池から採取した試料水にリン酸を段階的な濃度で添加し、18時間静置後のリンの形態変化と、アルカリ性ホスファターゼ活性の変化を調べた。実験に用いた試料水においては、増加させたリン濃度がおよそ20 $\mu\text{g L}^{-1}$ 以下の場合には微生物によるリン酸の体内への取り込みが行われる一方、それ以上の濃度ではリン酸の取り込みが頭打ちになることを示唆する結果が得られた。リン酸の取り込みが起きる濃度域ではAPAの上昇が認められた。以上をもとに、ため池における、アルカリ性ホスファターゼによる年間のリン酸生成量の推定を試みた。

キーワード：ため池, 過剰取り込み, アルカリ性ホスファターゼ

Abstract

The correlation of orthophosphate concentration and alkaline phosphatase activity (APA) in an agricultural reservoir was investigated over three years. Increased APA was observed at only relatively low orthophosphate concentrations. The low concentration of orthophosphate, however, was not necessarily related to high APA. Various amounts of orthophosphate were added to the sample waters from the reservoir. After 18 h, the change in the forms of phosphorus and in the APA was compared. It was assumed that if the increased concentration was below 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, luxury uptake will occur, and above that concentration the uptake will level off. APA increased at phosphorus concentrations in which phosphorus uptake was observed. Finally, the amount of orthophosphate generated by APA in the reservoir was estimated.

Keywords: agricultural reservoir, luxury uptake, alkaline phosphatase

¹⁾ 大阪教育大学教育学部 〒582-8582 大阪府柏原市旭ヶ丘 4-698-1 Department of Science, Mathematics and Information, Osaka Kyoiku University, 4-698-1 Asahigaoka, Kashiwara, Osaka, 582-8582, Japan

* 連絡代表者 (Corresponding author): hirotani@cc.osaka-kyoiku.ac.jp

緒言

陸水環境は一般にリン欠乏状態にあるとされ (Schindler, 1977), そのため藻類はアルカリ性ホスファターゼの分泌やリンの過剰取り込みなどのリン欠乏を回避する手段を獲得してきた (ホーン・ゴールドマン, 1999) と考えられる. アルカリ性ホスファターゼは, 有機リン酸化合物からリン酸を遊離させ, リンを可給化する働きをする酵素 (Aaronson and Patni, 1976; Wynne and Gophen, 1981) で, 細胞外に分泌されて働くことが知られている (Steiner, 1938; Jansson et al., 1988). アルカリ性ホスファターゼはリン不足によって誘導され, そのためアルカリ性ホスファターゼ活性 (APA) は, リンの高濃度域では抑制される (Fitzgerald and Nelson, 1966; Thingstad et al., 1988). このため, APAが微生物のリン栄養の指標となると考えられていたこともあるが (Kuenzler and Perras, 1965; Rose and Axler, 1998), 今ではAPAをリン栄養状態と結びつけることはあまり意味があることとは考えられていない (Jansson et al., 1988; Jamet et al., 2001; 広谷ら, 2001; Hirotani et al., 2004). 藻類のAPAには光合成などの生理条件との関与も示唆されている (紀平ら, 2005; 国本・広谷, 2008).

藻類などの水圏微生物は, リン存在下で, 生理的に必要な量以上のリンを取り込み, 体内にポリリン酸として貯蔵することが知られている (Jansson et al., 1988). このことを過剰取り込みという. ポリリン酸を体内に蓄積させながら, かつアルカリ性ホスファターゼを分泌することは, エネルギー効率の点からも合理性を欠くと考えられる. そのため, 環境のリン濃度が低い場合であっても, 体内のリンプールにリンが蓄積されておりリン欠乏とはいえない場合には, アルカリ性ホスファターゼが必ずしも誘導されない (Elgavish et al., 1982) と考えられる.

リン栄養の欠乏により誘導されたアルカリ性ホスファターゼが, 環境中で実際に分解し無機化するリンの量は十分に調べられていないなど, 自然環境中のAPAには依然課題が残されている (広谷, 2010). 水圏のリンの形態変化において, 溶存態の有機体リンの無機化過程はこれからの課題と考えられている (篠原・古里, 2017). そこで, 本研究においては, ため池のリン濃度とAPAの関係を確認するとともに, 水圏の微生物が過剰にリンを取り込むことができる量を明らかにするための実験系を作成し, リン過剰取り込み量とAPAの関係を検討した. さらに, 以上の結果をもとにため池における年間のアルカリ性ホスファターゼによって分解され生成されるリン酸の量の推定を試みた.

材料と方法

調査方法

2014年1月～2016年12月に月一回, 奈良県香芝市の簀尾下池で採水を行った. この池は, 堤高9.1 m, 堤長130 m, 満水面積が27,000 m²の農業用ため池である.

リン成分測定用の試料はポリエチレン容器で直接表層水を採水した. 試料水にペルオキシ二硫酸カリウム (4 g/L) と硫酸を添加後121°Cで30分間加熱し全リン濃度を, 孔径0.45 μmのメンブランフィルター (混合エステル) で濾過しオルトリン酸態リン (リン酸) 濃度を, 濾過試料を全リンと同様の方法で処理し溶存態全リン濃度を, それぞれモリブデン青法を用いて測定した (Grasshoff et al., 1983). 全リン濃度から溶存態全リン濃度を差し引くことで, 懸濁態リン濃度を求めた. 懸濁態リン濃度は微生物体内に存在する生理的に必要なリンおよび貯蔵されたポリリン酸の総量を示していると考えた.

APA測定用の試料はガラス製ふらんびんを使って表層水から直接採水を行った. 採水時に泡が発生しないよう注意し, 容器に気相が残らないように採水し持ち帰った. 基質として4-Methylumbelliferyl phosphateを用いて, 試料水に2 μMの基質とともに0から3 μMの4-Methylumbelliferoneを添加した内部標準法で測定を行った. 反応は, 現場の水温と同じ温度で15分行い, pH6.50の200 mM Trisマレイン酸緩衝溶液を添加し反応を停止させた. 蛍光光度計 (島津, RF-5300PC) を用いて, 励起光365 nm, 蛍光448 nmの蛍光強度を測定し (Chróst and Overbeck, 1987), リン酸態リンの単位時間あたり生成量求め, 酵素の反応速度とした.

採水とリン酸添加培養

2017年12月22日に奈良県香芝市の簀尾下池の表層より, 滅菌済みのポリプロピレン製容器を用いてリン添加実験用採水を行った.

採水した試料を, 滅菌済みの6本の300 mL三角フラスコに分注した. リン酸濃度の増分が10 μg L⁻¹刻みで0～50 μg L⁻¹となるようにKH₂PO₄溶液を添加した. 添加量は, 予備実験を行い決定した. 溶液の添加により試料中の他の成分が薄まるのを防ぐため, 各三角フラスコに試料の薄まる量が均等になるように純水を加えた. リン酸及び純水添加による反応液のpH変化は無視できるほど微少であった. これらの三角フラスコを, 20°Cのインキュベータ内で18時間静置した. 静置後, 各試料の全リン, 溶存態全リン, オルトリン酸態リン濃度をモリブデン青法により測定した. 蛍光光度法を用いて静置後当日とさらに3日後のAPAを測定した.

結果と考察

ため池のリン濃度とAPAの関係

ため池のオルトリン酸濃度および全リン濃度とAPAの関係を調べた (図1)。オルトリン酸濃度の平均値, 最小値, 最高値はそれぞれ $14.3 \mu\text{g L}^{-1}$, $0.0 \mu\text{g L}^{-1}$, $56.5 \mu\text{g L}^{-1}$ であり, 富栄養化がやや進んだ池であると考えられる。夏季にはマイクロキスティスの繁殖が観察された。リン酸濃度が高い場合にはAPAは低く, リン酸濃度が低いときのみAPAが高かったが, リン酸濃度が低いにもかかわらずAPAが低いこともあり, 明確な反比例の関係は認められなかった。リン酸濃度が高い場合にはリン欠乏は生じていないため, APAが高くなることはないと考えられる。一方リン酸濃度が低い場合でも, 体内リン濃度が十分に高い場合は余分なリン酸を遊離させる必要がないと考えられる。

リン酸添加量によるリン吸収の違い

ため池から採水した試料に, リン酸を添加して静置後, リン濃度がどのように変化するかを調べた (図2)。全リンは添加したリン酸と比例して増加した。増加の割合は

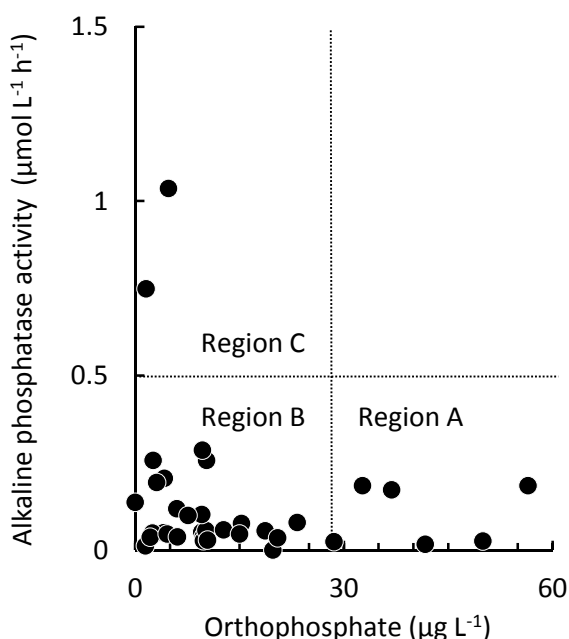


図1. ため池のリン酸濃度とアルカリ性ホスファターゼ活性の関係とリン酸動態に関する領域。

Fig.1. Relation between orthophosphate concentration and alkaline phosphatase activity in a reservoir, and the grouping of data by the nutritional condition of phosphorus.

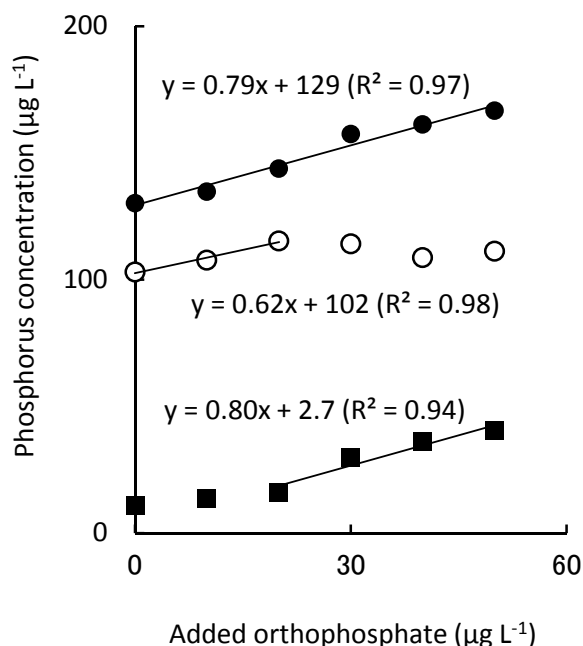


図2. リン酸添加による全リン (●), 懸濁態リン (○), リン酸 (■) 各濃度の変化。

Fig. 2. Change in the concentration of total phosphate (●) particulate phosphate (○), and orthophosphate (■) after addition of various amounts of orthophosphate.

回帰直線から添加量の8割程度であった。微生物体内に存在するリン成分を表すと考えられる懸濁態リンは, リン酸添加後の増加濃度がおおよそ $20 \mu\text{g L}^{-1}$ の実験区まで緩やかに増加し, それ以上の濃度域では変化しないかむしろ減少に転じた。直接藻類が利用可能な形態であるリン酸は, リン酸添加後の増加濃度がおおよそ $20 \mu\text{g L}^{-1}$ の実験区まではほぼ変化がないか微増し, それ以上の濃度域では全リンの増加割合と同程度の増加が認められた。

この結果より, リン酸添加後の増加濃度がおおよそ $20 \mu\text{g L}^{-1}$ を境としてリン吸収の状態が変化し, それ以下の濃度域ではリン酸は微生物に吸収され体内で利用または蓄積されたが, それ以上の濃度域ではリン酸は吸収されることがなくなると考えられる。

アルカリ性ホスファターゼ活性の変化

ため池から採水した試料に, リン酸を添加して静置直後と, さらに3日経過後のAPAを測定した (図3)。静置直後は $30 \mu\text{g L}^{-1}$ の実験区を境にそれより濃度が低い領域では高いAPAが認められた。さらに3日後には, $20 \mu\text{g L}^{-1}$ 以下ではAPAが増加し, それよりも高い濃度ではあまり

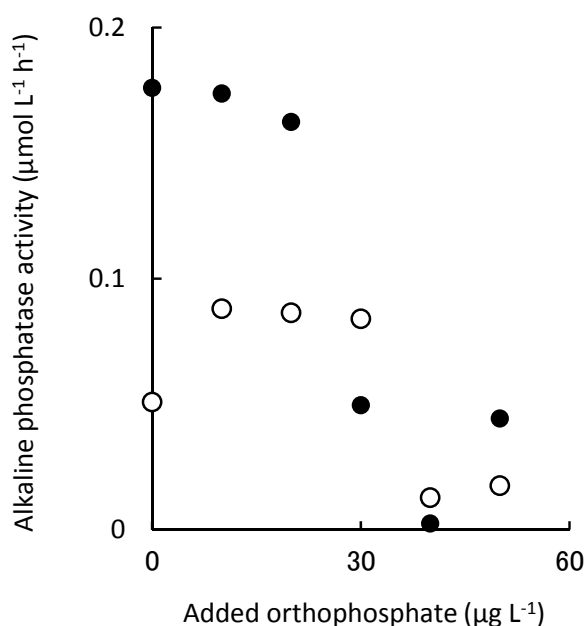


図3. リン酸添加後18時間(○)後とさらに3日後(●)のアルカリ性ホスファターゼ活性。

Fig. 3. Alkaline phosphatase activity after 18 h (○) and further 3 d (●), after the addition of various amounts of orthophosphate.

大きな変化は認められなかった。実験は一連で行っているために、統計的な処理を行うことはできないが、複数回行った予備実験においても、特定の濃度以下でリン吸収とAPA増加が認められた。この実験でリンの取り込みが頭打ちとなる濃度とAPAが変化する濃度が一致することは、体内リンがAPAと関係を持つ (Elgavish et al., 1982) という報告とも矛盾しない。もっとも、予備実験においても、境界の濃度は必ずしも一定せず、境界となる濃度はさまざまな複合的な要因により決定されていることが示唆された。なお、実験に用いた試料水のリン酸濃度は $8.0 \mu\text{g L}^{-1}$ であったことから、この実験の $20 \mu\text{g L}^{-1}$ という濃度は、実際には $25\sim 30 \mu\text{g L}^{-1}$ 付近を指すと考えられる。

リン酸生成量推定の試み

以上の結果より、アルカリ性ホスファターゼによるリン酸生成量の推定を試みた。前提として、以下の仮定をする。

- 1) 各月のAPAは調査日の値を当該月の値とし、APA測定値の速度でリン酸が生成し続けるとする。
- 2) APAは、現場の温度やpHの影響は受けずに、基質による速度の違いもないものとする。

表1. 体内リンとAPAの関係とリン酸濃度の変化。

Table 1. Relation between internal phosphorus and APA, and change in orthophosphate concentration.

Internal P	APA	Orthophosphate concentration	
		low	high
high	low	Mineralization exists (Region B)	Provided as orthophosphate (Region A)
low	high	Uptake occurs (Region C)	-

3) 生物群集によるリン酸取り込み、アルカリ性ホスファターゼ産生のリン酸濃度による応答は一定の濃度を境に変化するとする。

4) ため池の平均水深を 3.0 m と仮定するとともに、水位変動はしないとする。

リンの体内プールが飽和しているか否かがAPAに関与するとすれば、リン酸の過剰取り込みが生じる低体内リン状態と生じない高体内リン状態に分けて考える必要がある (表1)。APAは体内リン濃度に依存するという前提より、便宜的にAPAが $0.5 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を境界にそれ以下を高体内リン状態、以上を低体内リン状態とした。懸濁態リンをもとにふたつの状態に分類を行うことも可能ではあるが、現場データでは懸濁態リンとAPAの相関が低く ($r = 0.17$)、現場の試料水では懸濁態リンが必ずしも体内リンを示していないと考えられたため、この研究では採用しなかった。

高体内リン状態では、APAは低い。このとき、高いリン酸濃度が認められる (図1, Region A) のは、アルカリ性ホスファターゼの関与ではなく、リン酸が系外から直接供給された結果であると考えるのが妥当であろう。APAが低く、リン酸濃度が低いとき (図1, Region B) は、リン酸の供給が少なく、有機物に結合したリン酸がアルカリ性ホスファターゼの働きで遊離されるものの、リン酸の濃度の上昇にはつながらない。Region AとRegion Bの境界は実験により藻類群集のリン吸収が変化する濃度 $20 \mu\text{g L}^{-1}$ をもとの試料水のリン酸濃度 $8 \mu\text{g L}^{-1}$ に加えた $28 \mu\text{g L}^{-1}$ を便宜的に使用した。

低体内リン状態では、APAは高く、アルカリ性ホスファターゼがリン酸を生成するものの、すぐに吸収されリン酸濃度の上昇にはつながらない (図1, Region C)。APAが高く、かつリン濃度も高い状態というのは観察されていない。

上記をもとに、B領域、C領域のAPAを積算し、得られた単位水量あたりのリン酸生成量は $31.4 \text{ mg-P L}^{-1} \text{ y}^{-1}$ であった。ため池の平均水深を 3 m と仮定すると、水量は $81,000 \text{ m}^3$ と計算され、生成量と水量を乗じることにより年間 2500 kg-P のリン酸態リンが箕尾下池ではアルカリ性ホスファターゼにより生成された可能性があるとして推定された。調査期間を通じたリン酸濃度の平均値が $14.3 \mu\text{g L}^{-1}$ であることより、ため池のリン酸現存量の平均値は 1240 g と求められる。東京湾に存在する溶存無機態リンの 69% が有機体リンの分解によって供給されている(柳ら, 2004) という報告と比較すると、研究を行った環境や方法の違いを考慮したとしても、本研究のアルカリ性ホスファターゼの推定量は非常に大きなものである。本計算で用いた仮定や条件は便宜的なものである。今後は、環境水中でのアルカリ性ホスファターゼの意義を考える上では、計算に用いる仮定、条件を最適化し精度を上げることにより、リン酸の生成量を推定することが必要であると考えられる。アルカリ性ホスファターゼの基質となり得る有機態リン濃度、現場の水温やpHの変動、酵素の分泌に関与する生物群に関する知見を集積する必要があるであろう。

謝 辞

ため池調査の場所を提供いただいた箕尾土地改良区に感謝したい。ため池調査に協力いただいた大阪教育大学環境微生物学研究室の学生に感謝したい。

文 献

- Aaronson, S. and N. J. Patni (1976): The role of surface and extracellular phosphatases in the phosphorus requirement of *Ochromonas*, *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 837-845.
- Chróst, R. J. and J. Overbeck (1987): Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in Lake Plußsee (North German Eutrophic Lake), *Microb. Ecol.*, **13**, 229-248.
- Elgavish, A., M. Halmann, and T. Berman (1982): A comparative study of phosphorus utilization and storage in batch cultures of *Peridinium cinctum*, *Pediastrum duplex* and *Cosmarium* sp., from Lake Kinneret (Israel), *Phycologia*, **21**(1), 47-54.
- Fitzgerald, G. P. and T. C. Nelson (1966): Extractive and enzymatic analyses for limiting or surplus phosphorus in algae, *J. Phycol.*, **2**, 32-37.
- Grasshoff, K., M. Ehrhardt, and K. Kremling. (1983): *Methods of seawater analysis*, 2nd ed., 126-131 Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- 広谷博史 (2010) : ダム湖内のアルカリ性ホスファターゼ活性の分布と変動, 谷田一三・村上哲生編, ダム湖・ダム河川の生態系と管理, 59-76, 名古屋大学出版会, 名古屋.
- 広谷博史・中川歩・越智一希・大條真 (2001) : 隣接した集水域の河川水とダム湖水におけるアルカリ性ホスファターゼ活性の変動, *水環境学会誌*, **24**, 762-765.
- Hirofani, H., A. Nakagawa, and H. Kawaga (2004): Vertical profiles of alkaline phosphatase activity in dam reservoirs and its relation with microbial parameters, *Korean J. Limnol.*, **37**(4), 406-410.
- ホーン, A.J.・ゴールドマンC.R.著, 手塚泰彦訳 (1999) : *陸水学*, 京都大学出版会, 京都.
- Jamet, D., C. Amblard and J. Devaux (2001): Size-fractionated alkaline phosphatase activity in the hypereutrophic Villerest reservoir (Roanne, France), *Wat. Environ. Res.*, **73**, 132-141.
- Jansson, M., H. Olsson, and K. Pettersson (1988): Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes, *Hydrobiologia*, **170**, 157-175.
- 紀平征希・尾崎正樹・後藤直成・三田村緒佐武 (2005) : PAM法を用いた植物プランクトンの光合成活性 (Fv/Fm) とアルカリホスファターゼ活性の関係, 日本陸水学会第70回大会, 講演要旨集, 221.
- Kuenzler, E. J. and J. P. Perras (1965): Phosphatases of marine algae, *Biol. Bull.*, **128**, 271-284.
- 国本奈津子・広谷博史 (2009) : パルス変調法を用いた, ため池試料の光合成活性, 第43回日本水環境学会年会, 講演集, 123.
- Rose, C. and R. P. Axler (1998): Uses of alkaline phosphatase activity in evaluating phytoplankton community phosphorus deficiency, *Hydrobiologia*, **361**, 145-156.
- Schindler, D. W. (1977): Evolution of phosphorus limitation in lakes, *Science*, **195**, 260-262.
- 篠原隆一郎・古里栄一 (2017) : 湖沼におけるリンの動態研究に関する近年の動向, *地球化学*, **51**, 159-170.

Steiner, M. (1938): Zur Kenntnis der Phosphatkreisläufe in Seen. *Naturwissenschaften*, **26**, 723-724.

Thingstad, T. F., U. L. Zwifel and F. Røssvoll (1988): P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean, *Limnol. Oceanogr.*, **43**, 88-94.

Wynne, D. and M. Gophen (1981): Phosphatase activity in freshwater zooplankton, *Oikos*, **37**, 369-375.

柳哲雄・屋良由美子・松村剛・石丸隆 (2004) 東京湾のリン・窒素循環に関する数値生態系モデル解析, *海の研究*, **13**(1), 61-72.