

第 23 回 国立環境研究所琵琶湖分室セミナー

「水圏（海洋）生態系におけるリンの循環」

日時：2019 年 4 月 26 日（金）15:00–16:00

セミナー講師：鈴木 昌弘（産業技術総合研究所 環境管理研究部門）

講演内容

水圏（海洋）生態系の一次生産をはじめ、あらゆる生物の生命維持に必須の栄養塩元素であるリンについて、個別のリン化合物に関わるマニアックな話題から、水圏における循環過程や、さらにはリンの資源問題など包括的なテーマについて紹介する。

リンの重要性

2013 年、「NASA の無人探査機ローバー Curiosity が、火星で採取した岩石の試料から生命維持に必要な 6 元素『炭素、窒素、水素、酸素、硫黄、リン』を検出した」というニュースが大きく報じられた。“生命の維持”におけるリン（を含む化合物）の役割は多岐にわたり、核酸（DNA、RNA）は遺伝情報の伝達、ATP は細胞内のエネルギー代謝、イノシトールリン酸及びイノシトールリン脂質は細胞内シグナル伝達といったように、生物の自己複製と代謝にとって極めて重要である。また細胞・細胞小器官の膜を構成するリン脂質、動物の骨・歯牙を形成するリン酸カルシウム（アパタイト）といった生体の物理構造を支える「屋台骨」としても活躍する。水圏生態系においても、原核生物から大型動物まであらゆる生物にとってリンは生命維持に必須の元素である。

水圏生態系において、生元素の中でもリンと窒素がしばしば不足し、植物プランクトンの光合成生産を制限・律速する。特に陸からの栄養塩の供給がない外洋生態系ではリンや窒素の枯渇により砂漠化した環境にある。リンと窒素のどちらがより重要かについては議論の分かれるところであり、一般的には海洋生態系ではプランクトンが必要とする N/P 比（Redfield 比）よりも海水中の平均的な N/P 比の方が低いことから窒素制限にあると言われる。一方、ほぼ無尽蔵に存在する大気中の窒素を固定し、栄養塩として利用する能力（窒素固定能）を持つ微小プランクトンが広く分布していることから、究極的には河川からのリンの供給量が地質学的時間スケールで海洋全体の一次生産を制限しているとの見方もできる。

リン（と窒素）が一次生産を制限しているということは、極端に言えばこれらの栄養塩が供給された分だけ植物プランクトンは増殖可能ということである。その結果がいわゆる富栄養化であり（本来の陸水学的な定義とは少し異なる）、赤潮や有機汚濁、貧酸素水塊の発生といった沿岸生態系の環境問題を引き起こす要因となる。「希少で究極の律速因子」と「過剰な汚染物質」という二面性が海洋（水圏）生態系におけるリンの重要性、面白さを物語っている。

リンの形態

水圏生態系におけるリンの循環過程や役割を詳しく評価するためには、どれくらいの量のリンが、どのような形態で存在し、それがどういったプロセスにより、どれくらいの速さで量や形態を変化させているのかを知ることが必要である。炭素や窒素と比べて、リンは物質循環を

評価するための「指標」や「ツール」が不足している。安定同位体で見ると炭素は ^{12}C と ^{13}C 、窒素は ^{14}N と ^{15}N が存在するが、リンは ^{31}P のみである。酸化還元状態などの周辺環境や種々の生物化学反応によって、炭素と窒素の化学形・酸化数は大きく変化する（炭素はメタンの-IVから二酸化炭素の+IV、窒素はアンモニウム塩の-IIIから硝酸塩の+V）。一方リンは、無機リン酸塩とリン酸エステルなど「 PO_4 」をベースにした化合物（酸化数 V）が圧倒的であり、環境中のリンの動態を評価する分別指標は極めて限定される。

まずサイズによって、 $0.1\sim 1\ \mu\text{m}$ 程度の孔径のフィルターにトラップされるものを粒子状リン、通過するものを溶存リンと定義・分別する。実際は $0.1\ \mu\text{m}$ 以下であっても溶けているとは言い難いコロイド粒子や生物粒子（細菌・ウィルス）が存在するので、あくまでも操作上の定義である。もう一つは、有機物の構成成分（有機態リン）と無機物（無機態リン）の分別である。無機態リンは水中ではほとんどがオルトリン酸（ $\text{PO}_4\text{-P}$ ）として存在し、これは植物プランクトンにとって、食べやすく（吸収しやすい）、何にでも調理可能で（有機物合成）、貯蔵（ポリリン酸として）も容易な、最も簡単・便利に利用できるリンの化学形である。有機態リンは生物によって合成される種々の有機物（DNA、RNA、ATP・・・他）に含まれるリンであり、オルトリン酸と比べるとプランクトンにとっては利用しづらく、後述するように酵素による加水分解が必要となる。ちなみに「有機態リン=Organic phosphorus」ではなく「有機リン=Organophosphorus」という言葉もよく用いられるが、こちらは農薬、殺虫剤、化学兵器原料など人工化学物質を指し示すものと個人的に言い広めている。

粒子状無機態リンはリン酸の金属塩（鉄、カルシウム、アルミニウムなど）や粘土鉱物として堆積物や懸濁物中に存在する。例えば、鉄と結びついた無機態リンは、酸素の十分にある好氣的な環境では非常に安定であるが、東京湾をはじめとする内湾域で夏季に底層が貧酸素化して嫌氣的な環境になると速やかに鉄が還元され、一気にオルトリン酸として溶け出し始める。したがって閉鎖性水域の環境浄化を考える時、流入負荷の削減だけでなく既に堆積物中に大量に蓄積したリンについても検討することが不可欠である。

生物による直接の利用性が低いとはいえ、量的にみると有機態リンは水中及び堆積物中のリンの重要なストックである。これまでも海洋環境中では、リンを含む有機化合物として核酸、ATP、リン脂質などの計測がしばしば行われているが、これらの報告の多くは化合物そのものに着目しており（DNAであれば生物量の評価指標、リン脂質であれば脂肪酸組成に基づく細菌群集組成の評価指標など）、リンとしてどのくらい存在しているのかという検討はあまりなされていない。またこれら既知の化合物は有機態リン全体のごく一部にしか相当しないと考えられている。このような海洋の有機態リンの研究現状に対して陸上土壌のリン研究に目を向けると、全有機態リンの最大80%を占める特定の化合物が存在するという報告を目の当たりにする²⁴⁾。環状6価の糖アルコールである *myo*-イノシトールに6個のリン酸基がエステル結合した *myo*-イノシトール六リン酸 (*myo*-inositol hexakisphosphate) = フィチン酸である。

堆積物中のイノシトール六リン酸（フィチン酸）

フィチンは植物種子中のリン及びミネラル類の貯蔵物質であり、土壌中では鉄やカルシウムと不溶性の塩を形成して高濃度で蓄積すると考えられる。陸起源物質の影響を強く受ける沿岸海域であれば、堆積物中に河川経由で運ばれてきたフィチン酸が蓄積している可能性が高い。

そのためフィチン酸を研究対象とすることで、陸から沿岸海域におけるリンの動態解明と堆積物中の有機態リンの同定という二つの大きな成果が期待された。そこで、東京湾集水域の土壌、河川・河口域堆積物（荒川、隅田川、多摩川）、河川懸濁粒子（多摩川）、東京湾堆積物中のフィチン酸の分析を行った。海底堆積物中の有機態リン化合物として初めてフィチン酸の定量的評価に成功したものの、その量は全有機態リンの約 1%以下に過ぎなかった。海底堆積物の有機態リンの全容解明にはほど遠い結果となったが、陸上土壌、河川、河口域、湾奥から湾口といった陸から海域に向かってフィチン酸濃度が著しく減少してゆく分布を明らかにした⁵⁾。また堆積物中の鉛直分布を調べるとフィチン酸は表層数センチでほとんど検出できなくなった。さらに室内分解実験により、フィチン酸は好氣的な環境で比較的安定であるのに対して、還元状態となると極めて急速に分解（無機化）されることも分かった⁶⁾。これらの結果から、東京湾では陸上土壌を起源とするフィチン酸が河川経由で流入・到達するものの、堆積物中の嫌氣的生化学作用で速やかに分解無機化し、海水中に溶出することで富栄養化を促進する原因となりうるというプロセスが明らかになった。土壌の流入は出水時に特に大きくなると推測され、沿岸海域のリン循環を解明するためには、そのようなスποラディックな現象を的確に捉える観測の重要性を示唆する結果となった。

出水時のリンの動態を定量的に評価するためには河川や河口域における粒子状リン濃度のデータの蓄積が重要であるが、ここでも炭素・窒素と異なるリンの特性が問題となる。高温で揮発する炭素と窒素は 1 枚のフィルターサンプルから同時に、ほとんど自動化された方法で分析が可能であるのに対し、リンの計測では危険な酸やアルカリによる分解・抽出操作と煩雑な比色分析を行わなければならない。比較的簡便な過硫酸分解法の改良法⁷⁾なども提案してきたが、さらに無機態リンと有機態リンに分別する必要性を考えると依然として課題は多い。

易分解性・難分解性溶存有機態リン

海底堆積物中の有機態リンの全容は依然として不明であるが、海水中の溶存有機態リンの正体はさらに謎に包まれている。1990 年代に入ると、分子量 1,000 ダルトン以上の高分子を海水中の多量の塩分から分離・濃縮する限外濾過法が広く用いられるようになり、有機態リンについても核磁気共鳴分析（NMR）と組み合わせることで溶存有機態リンの化学形を同定する試みがなされるようになった^{8,9)}。予想通り、核酸、ヌクレオチド、糖リン酸、リン脂質など生体の主要なリン成分が含まれるリン酸エステル結合を有する有機物の存在が確認されると同時に、従来、自然界では微量成分と考えられていた C-P 結合を有するホスホン酸化合物も予想を遥かに上回る量で検出された。NMR 研究により、リン酸エステルや C-P 結合などリンの化学結合に関する情報が得られたものの、個々のリン化合物の同定には至っていない。そこで個別の化合物の分離同定を目指すのではなく、環境中での挙動に直結する「化合物の性質」に着目し、生分解性を指標とした有機態リンの分別を試みた。

プランクトンやバクテリアにとって最も利用しやすいリンはオルトリン酸であり、微生物が有機態リンを直接利用するためには、あらかじめ加水分解する必要がある。海水中にはリン酸エステルを加水分解するアルカリホスファターゼやリン酸ジエステルである DNA を分解する DNase 活性があることは知られており、特に前者に関しては人工基質を用いた活性測定法により海水中の有機態リンの代謝を解明する試みが既になされていた。このプロセスに準じるな

ら、逆に過剰量の加水分解酵素を海水に添加し、増加するオルトリン酸を測定することで、有機態リンのうち生化学（酵素）的に分解可能な易分解性画分と、同時に容易に分解されない難分解性成分を分別定量することが可能と考えられた。そこで富栄養化の進行した東京湾について、限外濾過法で分離・濃縮した溶存有機態リンの高分子量画分（分子量 10,000 ダルトン以上）を対象に易分解性及び難分解性成分の定量を行った。その結果、高分子量画分（溶存有機態リンの 14~36%）の最大 67%が難分解性成分であった。難分解性成分の由来としては、NMR による先行研究で発見された C-P 化合物の存在及び本来は易分解性のリン酸エステル類を酵素の作用から保護する未知のメカニズムが存在する可能性が考えられた。C-P 化合物の有無については不明であるが、難分解性と判定された溶存有機態リンのうちおよそ半分が実際は易分解性のリン酸エステルであり、それらは疎水性成分（リン脂質？）により形成されたリポソーム様構造により保護されているというメカニズムが示唆された。即ち、環境中における有機態リンの挙動は、構成する各化合物の特性に加え、他の物質・成分との相互作用により大きく変化することが明らかとなった。

貧栄養海域のリン

上述したようにオルトリン酸は植物プランクトンにとって最も利用性が高い化学種である。一般的に、海水中のオルトリン酸は比色分析（モリブデンブルー法）により測定される。この方法での検出限界は~20 nmol P/L (0.02 $\mu\text{mol/L}$) 程度であり、貧栄養海域を代表する亜熱帯海域などの表層海水では、しばしば検出限界以下となる。多様な微生物群集がそこで実際に活動しているにもかかわらず、従来の方法ではリンについて見かけ上は何も起こっていない希薄で均一な世界にしか見えない。海水にマグネシウムを添加し、リン酸を共沈・濃縮する手法（略称 MAGIC 法）が亜熱帯貧栄養海域の長期連続定点観測（Hawaii Ocean Time-series: HOT および Bermuda Atlantic Time-series Study: BATS）に導入され、初めて数ナノモルレベルでのオルトリン酸の時系列変動が評価可能になった¹¹⁻¹²。さらに、光路長が 1~2 m の LWCC（毛管セル）を用いた高感度連続観測システムにより、航走中の船上においてリアルタイムでナノモルリン酸が計測可能になった¹³。これまで「検出限界以下」という均一なイメージで括られてきた貧栄養海域において、リンが極めてダイナミックな動態を示すことが分かってきた。

このようなリン枯渇海域において微生物群種は様々な戦略で生存を図っている。例えば、細胞内のリン成分を高度に抑制する戦略である。一部の微小ラン藻類は、細胞膜の主成分であるリン脂質を硫脂質（硫黄を含む糖脂質）で代替する¹⁴。さらに遺伝情報を最小限にすることで DNA の合成量とそれに必要なリンの需要を少なくするという究極的とも言えるリンの節約戦術を行使する微生物も存在する¹⁵。また、リン酸に高い親和性を持つリン結合タンパクの遺伝子が種々の海洋微生物から見つかっており、リンの取り込み効率の向上が図られていると推測される¹⁶。オルトリン酸が枯渇した環境でも溶存有機態リンはある程度の濃度で存在する（オルトリン酸濃度が海域によって 4 桁変動するのに対し、溶存有機態リンの変動は 1~2 桁程度）。上述した易分解性溶存有機態リンはリン酸枯渇環境における重要なリンのソースであり、微生物は加水酵素を合成し群集としてリンのリサイクルを効率的に進めている。このように、海洋微生物はリン制限環境に適応するために単一あるいは群集レベルでの様々な戦略・手段を講じていると考えられる。

リン資源問題

貧栄養海域の微生物は生存をかけてリンの効率的利用とリサイクルに取り組んでいる。翻って人類はどうであろうか。

かつて人類は堆肥や下肥あるいは鳥の糞に由来するグアノを用いて細々とリンを集めていたが、20世紀後半からの大規模なリン鉱石の採鉱によって、とてつもない量のリンを利用する（できる）ようになった。当然であるが、リン鉱石は無限の資源ではなく2050年頃に枯渇するというショッキングな予測もなされている。Peak phosphate（リン鉱石資源の限界）がいつ訪れるのかについては議論の分かれるところであり、例えばまだ数百年は大丈夫といった見積もりもある。しかし、リン鉱石から産業利用に適した黄リンを製造するためには莫大な電力が必要であり、これは温室効果ガス（CO₂）の大規模発生源になりえる。さらにリン鉱石の採掘とは、重金属や放射性物質など様々な汚染物質をリンとともに地下から地上へ掘り出す行為であることにも注意が必要である¹⁷⁾。鉱石品位の低下、環境汚染対策に対するコスト負担は今後間違いなく増大し、物理的に採掘可能なリン鉱石であっても将来利用できなくなる可能性を考慮しなければならない。

またリン鉱石資源については地政学的な大きな問題が存在する¹⁸⁾。世界のリン鉱石の経済埋蔵量と年間生産量のいずれもが上位4カ国で約80%を占められており、リン鉱石は極めて偏在性の高い資源である。2008年、中国四川大地震を一つのきっかけに世界市場におけるリン製品の価格高騰と肥料争奪戦の激化が起こった。リン鉱石の偏在性は、このような大規模な価格の変動を引き起こし、食糧生産という国民の生命維持にも直結した安全保障問題になりえる。実際、アメリカは資源枯渇を理由にリン鉱石の禁輸措置をとっている。またエコロジカルフットプリントの問題も重要であり、我々が日本で利用するリンは海外の生産地域におけるCO₂の大量排出と著しい水質汚染を引き起こしている現実から目を逸らす訳にはいかない。我々は地表から枯渇しつつあるリンを食料という形も含めて大量に輸入し、リサイクルを十分に検討することなく無秩序に水圏環境に放出し、著しい環境問題（富栄養化）を引き起こしている。食料生産に直結するリン資源問題はCO₂（気候変動）以上に深刻な地球環境問題であるかもしれない。この現実を改めて直視し、資源（エネルギー）問題と環境問題の両側面からリンについて考えていくことが求められている。

関連文献

- 1) Codispoti, L. (1989): Phosphorus versus nitrogen limitation of new and export production. P. 377-394, In, Productivity of the Ocean: Present and Past, eds. W. Berger, V. Smetacek and G. Wefer, John Wiley & Sons, Chichester.
- 2) Cosgrove, D.J. (1977): Microbial transformation in the phosphorus cycle. *Advances in Microbial Ecology*, **1**, 95-134.
- 3) Omotoso, T.I. and A. Wild (1970): Content of inositol phosphates in some English soils. *Journal of Soil Science*, **21**, 216-233.
- 4) Irving, G.C. and D.J. Cosgrove (1982): The use of gas-liquid chromatography to determine the proportions of inositol isomers present as pentakis- and hexakisphosphates in alkaline extracts of soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **13**, 957-967.

- 5) Suzumura, M. and A. Kamatani (1995a): Origin and distribution of inositol hexaphosphate in estuarine and coastal sediments. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1254-1261.
- 6) Suzumura, M. and A. Kamatani (1995b): Mineralization of inositol hexaphosphate in aerobic and anaerobic marine sediments: Implications for the P cycle. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 1021-1026.
- 7) Suzumura, M. (2008) Persulfate chemical wet oxidation method for the determination of particulate phosphorus in comparison with a high-temperature dry combustion method. *Limnology and Oceanography: Method*, **6**, 619-629.
- 8) Clark, L.L., E.D. Ingall and R. Benner (1998) Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature*, **393**, 426.
- 9) Kolowitz, L.C., E.D. Ingall and R. Benner (2001) Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnology and Oceanography*, **46**, 309-320.
- 10) Suzumura, M., K. Ishikawa and H. Ogawa (1998) Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnology and Oceanography*, **43**, 1553-1564.
- 11) 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.
- 12) Wu, J., W. Sunda, E.A. Boyle and D.M. Karl (2000) Phosphate Depletion in the Western North Atlantic Ocean. *Science*, **289**, 759-762.
- 13) Hashihama F, K. Furuya, S. Kitajima, S. Takeda, T. Takemura and J. Kanda (2009) Macro-scale exhaustion of surface phosphate by dinitrogen fixation in the western North Pacific. *Geophysical Research Letter*, **36** L03610. doi:10.1029/2008GL036866
- 14) Van Mooy, B.A.S., G. Rocap, H. Fredricks, C.T. Evans and A.H. Devol (2006) Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proceedings of the National Academies of Sciences of the United States of America*, **103**, 8,607–8,612.
- 15) Bertilsson, S., O. Berglund, D.M. Karl and S.W. Chisholm (2003) Elemental composition of marine Prochlorococcus and Synechococcus: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnology and Oceanography*, **48**, 721–1,761.
- 16) Dyrman, S.T., J.W. Ammerman and B.A.S. Van Mooy (2015) Microbes and the Marine Phosphorus Cycle. *Oceanography*, **20**, 110-116.
- 17) 山本 英嗣 (2017) リン鉱石の採掘と環境問題. 『リンの事典』大竹久夫他編, p. 70-71.
- 18) 中島 謙一 (2017) リン鉱石の採掘量と枯渇問題. 『リンの事典』大竹久夫他編, p. 69-70.