

沿岸海水中におけるアルカリフォスファターゼ活性および フォスファターゼ加水分解性リンの分布と消長

山口晴生,¹ 西島敏隆,^{2*} 小田綾子,² 深見公雄,² 足立真佐雄²

(2003年5月6日受付, 2004年1月7日受理)

¹愛媛大学大学院連合農学研究科, ²高知大学農学部

Distribution and variation of alkaline phosphatase activity and
phosphatase-hydrolyzable phosphorus in coastal seawaters

HARUO YAMAGUCHI,¹ TOSHITAKA NISHIJIMA,^{2*} AYAKO ODA,²
KIMIO FUKAMI² AND MASAO ADACHI²

¹United Graduate School of Agricultural Science, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-0905, ²Faculty of
Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

In eutrophic coastal environments in Japan, red tides have caused mass mortality of cultured and wild fish. Some of the red tide phytoplanktons can produce alkaline phosphatase (AP) under low ambient phosphate concentration, which suggests that such phytoplankton can utilize phosphatase-hydrolyzable phosphorus in the water as a phosphorus source. In the present study, the distribution and variation of AP activity and AP-hydrolyzable phosphorus (APHP) in coastal seawater was examined to elucidate the contribution of organic phosphorus to the growth of red tide phytoplankton.

Total AP activity in surface seawater of Uranouchi Inlet was 1.2-70.1 nmol/L/min, and increased in temperate seasons (spring-autumn). The contribution of planktonic AP to total AP activity was larger (average 65%) than free and bacterial AP in temperate seasons.

APHP concentration in coastal seawaters (Uranouchi, Nomi and Urado Inlet, and Hiroshima Bay) were < 0.02-0.29 μ M (average 0.04-0.10 μ M except APHP non-detectable samples), and there were no significant differences among these concentrations. The ratio of APHP to AP producing algae-available phosphorus (AAP: the sum of dissolved inorganic phosphate and APHP) was high (average 0.45) in surface seawater of Uranouchi Inlet.

These results suggest that AP-producing phytoplankton can grow by utilizing APHP as a phosphorus source in coastal eutrophic seawaters.

キーワード：浦ノ内湾, 野見湾, 浦戸湾, 広島湾, 赤潮プランクトン, 有機態リン, アルカリフォスファターゼ, フォスファターゼ加水分解性リン

富栄養化が進行した日本の沿岸・内海域では、依然として有害赤潮による水産被害が頻発し、赤潮の発生防除や予知技術の確立のため、赤潮発生機構の解明が緊急の課題となっている。これまで、現場における赤潮プランクトンの増殖を制御する主要な栄養物質として、リンに関しては、従来無機態リン（オルトリン酸塩）のみが考慮されていたが、^{1,2)} 近年、赤潮プランクトンのなかには有機態リンをリン源として増殖に利用できる種があると

の報告があり、赤潮発生機構の解明における有機態リンの重要性が指摘されている。³⁻⁵⁾

これまでに著者らは、赤潮プランクトンのなかには有機態リンをリン源として利用する種があり、その利用能の差異はアルカリフォスファターゼ（AP）の産生能に依存していること、さらに、赤潮プランクトンのAP産生はオルトリン酸塩濃度が低下した時に誘導され、その活性は種によって差異はあるものの、ポテンシャル活性

* Tel : 81-88-864-5149. Fax : 81-88-864-5197. Email : nisijima@cc.kochi-u.ac.jp

は極めて高いことを培養試験によって明らかにした。⁶⁾ 実際, いくつかの沿岸海域では, 海水中から AP 活性が検出され, 赤潮プランクトンを含む植物プランクトンがリン欠乏状態にあることを示唆した報告がある。⁷⁻¹⁰⁾ これらのことから, 現場でも赤潮プランクトンが AP を産生し, 有機態リンを増殖に利用している可能性は高い。

しかしながら, 実際の現場海水中には植物プランクトンが生産した AP 以外にも, 細菌が保有する AP や遊離態の AP が存在していることから,^{7,11)} それら個々の活性が海水中全体の AP 活性に対してどの程度寄与しているのかは不明である。さらに, AP の基質となり得る有機態リンがどの程度溶存し, 海域によってどのような分布・消長を示すのかはほとんど不明であり, 赤潮の発生に対する有機態リンの寄与は未だ十分には解明されていない。

そこで, 本研究では富栄養化が進行した日本沿岸海水中の AP 活性およびフォスファターゼ加水分解性リン (Alkaline Phosphatase-Hydrolyzable Phosphorus: APHP) について, それらの分布・消長を明らかにし, 赤潮発生に対する有機態リン寄与の可能性を解析した。

方 法

調査水域の概況 浦ノ内湾は土佐湾のほぼ中央部に位置し, 湾内には多くの枝湾が発達し, 湾口部から湾奥部までの海上距離約 12 km, 幅約 0.5~1.5 km の極めて閉鎖性の強い峡湾である (Fig. 1A)。また, 本湾は問題となるほどの流量を有する流入河川をもたないため, 海水交換が悪く, 大規模に行われているハマチ等の養殖による自家汚染の影響を受け, 水質汚濁が進行している。

野見湾は土佐湾のほぼ中央部, 浦ノ内湾から山を隔てて西方に位置し, 湾口部の幅約 1 km, 湾口部から湾奥部までの距離約 2.5 km で, 湾奥にはいくつかの枝湾が発達している (Fig. 1B)。湾口部が深く, かつ比較的閉鎖性が弱いため潮汐流による海水交換は良好である。また, この湾は特筆すべき流入河川をもたない。浦ノ内湾と同様, ハマチ等の養殖に起因する自家汚染により水質汚濁が進行している。

浦戸湾は土佐湾の中央部, 高知市街の東部に位置し, 湾口部から湾奥部までの距離約 7 km, 幅約 0.3~2.5 km で, 多くの流入河川をもつ (Fig. 1C)。湾口部は深く, 海水交換は良好である。河川から流入する生活・工場廃水の流入により富栄養化が進行している。

広島湾は瀬戸内海西部に位置し, 南北約 50 km, 東西約 30 km の楕円形の湾で, いくつかの枝湾が発達している (Fig. 1D)。本湾は湾全体が湾外水と隔てられており, 閉鎖性の強い水域を形成している。この湾は大田川をはじめとするいくつかの流入河川をもち, 生活・工場廃水の流入により富栄養化が進行している。

試料の採取と処理 高知県浦ノ内湾では, 1998 年 6 月から 2000 年 8 月および 2001 年の 4 月から 12 月に, 光松 (Fig. 1A) より表層 (2 m) および底層水 (16 m) を, 週 1 回から月 1 回程度の頻度で計 30 回採取し, 約 4°C に冷蔵して 2~3 時間以内に実験室に持ち帰った。採取した試料は直ちに実験に用いるとともに, GF/F フィルター (Whatman) により濾過し, 濾液を栄養塩の分析まで -20°C にて保存した。また, 高知県野見湾および浦戸湾では, それぞれ 2001 年 8 月 28 日および 10 月 5 日に, 3 定点 (Fig. 1B, C) で試料を採取し, 同様に実験室に持ち帰り処理した。広島湾では, 2000 年 9 月 21 日に, 3 定点 (Fig. 1D) で試料を採取し, 船上で直ちに濾過後, 濾液を凍結して実験室に持ち帰り, 分析まで凍結保存した。

AP 活性の測定 試料の AP 活性は, 全水, ならびに孔径 0.8 μm および 0.22 μm Nuclepore フィルター (Whatman) によるそれぞれ重力濾過および吸引濾過した試料 (濾液) について測定した。0.22 μm 濾過試料の活性を主に遊離態の AP (Free AP) 活性, 0.8 μm 濾過試料の活性と 0.22 μm 濾過試料の活性との差を主に細菌細胞に保持された細菌態 AP (Bacterial AP) 活性, 全水の活性 (Total AP) と 0.8 μm 濾過試料の活性との差を主にプランクトン細胞に保持されたプランクトン態 AP (Planktonic AP) 活性とした。AP 活性は田中⁸⁾の比色定量法に準じて行った。すなわち, 試料にトリス緩衝液ならびに基質としてフェニルリン酸二ナトリウムを加え, pH 9.0, 25~26°C で 18~24 時間培養後, 生成されるフェノールを分光光度計によって定量し, 単位時間当たりのフェノール生成量を AP 活性とした。

クロロフィル a の測定 クロロフィル a は, 試水を GF/F フィルター (Whatman) で濾過し, フィルターを 90% アセトンによってクロロフィルを抽出し, SCOR/UNESCO¹²⁾の方法で算出した。

溶存態リン・窒素の定量 溶存無機態リン (DIP) および溶存無機態窒素 (DIN) の測定は, Strickland, Parsons¹³⁾の方法に準じて, TRAACS-800 (BRAN + LUEBBE) を用いて行った。溶存有機態リン (DOP) は, 酸化剤として過硫酸カリウムを用いる方法¹⁴⁾により求めた全溶存態リン (TDP) から DIP を差し引いて求めた。

フォスファターゼ加水分解性リンの定量 アルカリフォスファターゼ加水分解性リン (APHP) の定量は Suzumura *et al.*¹⁵⁾によるリン酸モノエステル定量法に準じて定量した。すなわち, 海水試料 10 mL に 1 M トリス緩衝液 (pH 10) および 5 mM アジ化ナトリウム溶液をそれぞれ 100 μL 添加し, 仔牛腸製の AP 標品 (オリエンタル酵母) を添加した試料を恒温槽で培養した。本培養は Francko, Heath¹⁶⁾に準じて恒温槽内で 37°C, 2 時

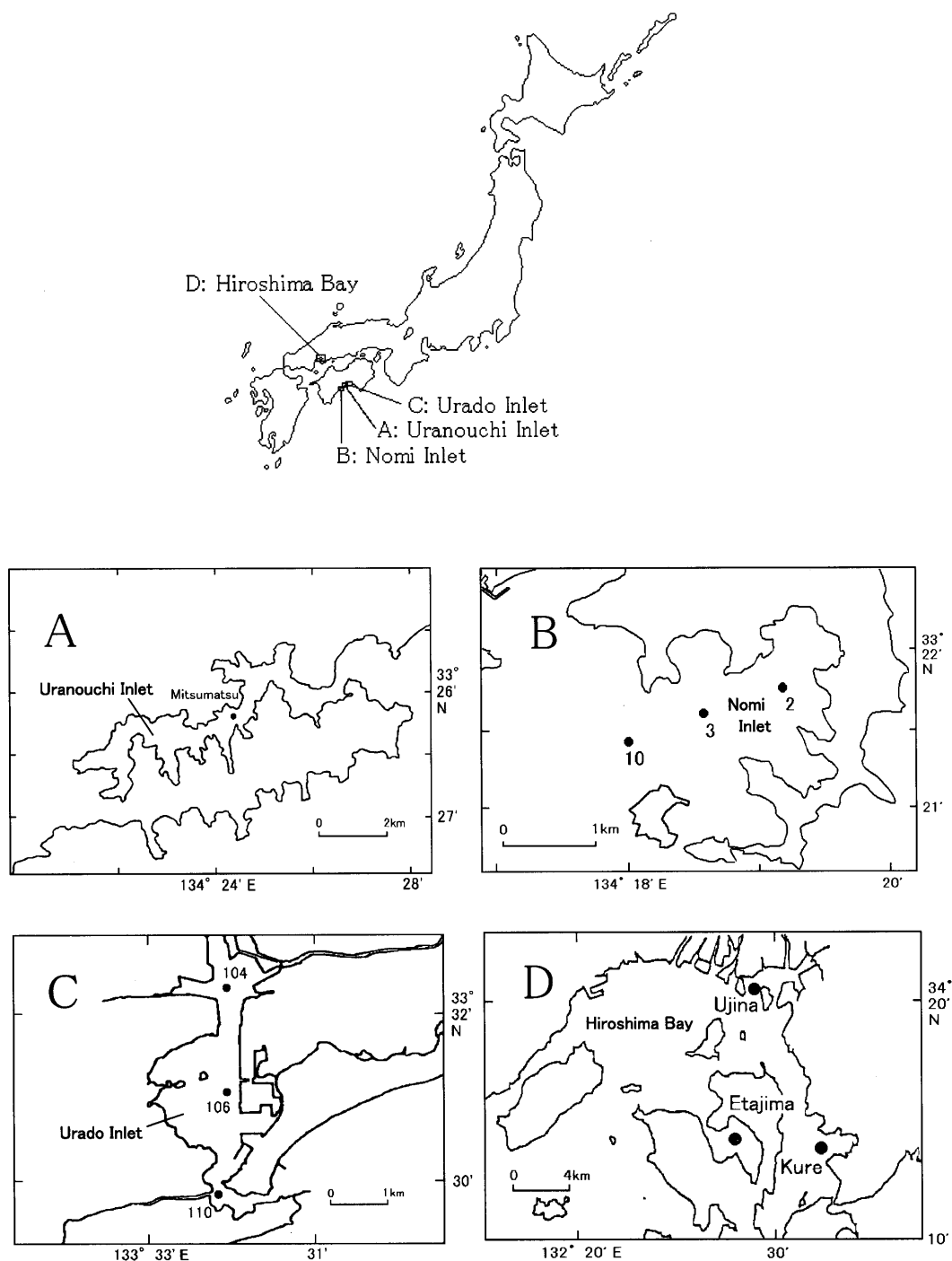


Fig. 1 Location of the sampling station in coastal sea. A, Uranouchi Inlet; B, Nomi Inlet; C, Urado Inlet; D, Hiroshima Bay.

間の条件で行った。これらの操作を AP 標品の代わりに純水を添加したものについても同様に行い、生成されたオルトリン酸塩を前項と同様に TRAACS-800 (BRAN + LUEBBE) を用いて定量した。試料中の APHP 濃度は、AP 標品添加試料のオルトリン酸塩濃度から AP 標品非添加試料のそれを差し引くことで求めた。

AP 標品の基質特異性 無機リン化合物としてピロリン酸 (PP) およびトリポリリン酸 (TPP)、一リン酸モ

ノエステル化合物としてグリセロリン酸 (GYP)、グルコース 1-リン酸 (G1P) およびフルクトース 6-リン酸 (F6P)、ニリン酸モノエステル化合物および三リン酸モノエステル化合物としてそれぞれアデノシンニリン酸 (ADP) およびアデノシン三リン酸 (ATP)、リン酸ジエステル化合物としてビスパラニトロフェニルリン酸 (Bis-*p*NPP) について、試験に用いた AP 標品の基質特異性を解析した。基質特異性は、これらリン化合物を

2.5 μM になるように人工海水に溶解し, 前項と同様の操作により遊離してくるオルトリン酸塩を測定して判定した。

AP 標品の必要添加量および APHP 回収率の検討
人工海水に GYP を終濃度 2.5 μM になるように加えたものをモデル海水試料とし, AP 標品を $5.0 \times 10^{-4} \sim 10$ units/mL の範囲で段階的に添加した後, 上述の方法で遊離されるオルトリン酸塩を測定し, 添加した GYP を完全に分解するのに要する AP 標品の添加量を解析した。加えた AP 標品の活性が現場海水試料中において有意に阻害されないかどうかは, 広島湾海水に終濃度 2.5 μM になるように GYP を試料に添加し, それに相当するオルトリン酸塩が回収できたかどうかで判定した。

結 果

浦ノ内湾海水中の AP 活性 浦ノ内湾表層水中における AP 活性は, 全水をプランクトン態, 細菌態および遊離態に分画したのについて Fig. 2A に示している。まず, 春季から秋季 (4 月~10 月) の全水の AP (Total AP) 活性は 3.5~70.4 nmol/L/min であり, 平均では 22.8 nmol/L/min であった。一方, 冬季 (11 月~3 月) の全水の AP 活性は 1.2~6.4 nmol/L/min, 平均 3.1

nmol/L/min であり, 海水中の AP 活性は春季から秋季で高く, 冬季に低くなる傾向が顕著であった。

次に, 全水の AP 活性に占めるプランクトン態, 細菌態および遊離態の AP 活性の割合を Fig. 2B に示す。これを見ると, 全水の AP 活性に対してプランクトン態の AP 活性が占める割合は, 全試料の平均で 51.0%, 春季から秋季の試料では平均で 65.0% であり, いずれもかなり高かった。一方, 全水の AP 活性に対する細菌態および遊離態の AP 活性の占める割合は, 春季から秋季の試料でそれぞれ平均で 7.7 および 27.3% であり, いずれもプランクトン態 AP 活性の占める割合に比べてかなり低かった。

全水の AP 活性と各画分の AP 活性との相関関係をみると, 全水の AP 活性はプランクトン態, 細菌態および遊離態のいずれの AP 活性とも正の相関が認められ (Fig. 3), 海水中の AP 活性に対する寄与は, プランクトン態の AP 活性が最も大きかった。

次に, プランクトン態 AP 活性とクロロフィル *a* 濃度および DIP 濃度との関連を Fig. 4 に示す。クロロフィル *a* 濃度は冬季は低く, 高水温期 (4 月~9 月) では 2.1~17.9 $\mu\text{g/L}$ の範囲で変動した。一方, DIP 濃度は 0.02 未満 (Non-Detectable)~0.58 μM の範囲で変動

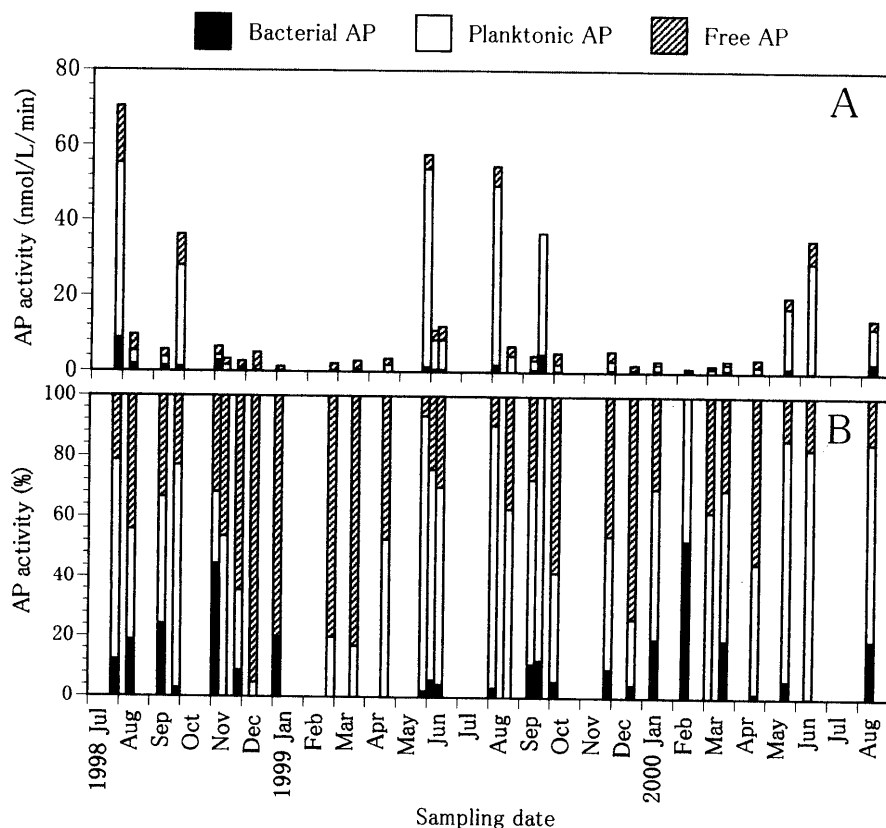


Fig. 2 Seasonal variation and distribution of AP activity in surface seawater of Uranouchi Inlet. A, AP activity; B, Percentage of each AP activity to total AP activity.

し、その変動に一定の傾向はみられなかった。これらクロロフィル *a* 濃度および DIP 濃度はプランクトン態 AP 活性との間に有意な相関は認められなかったが、夏季のプランクトンブルーム発生時にしばしばプランクト

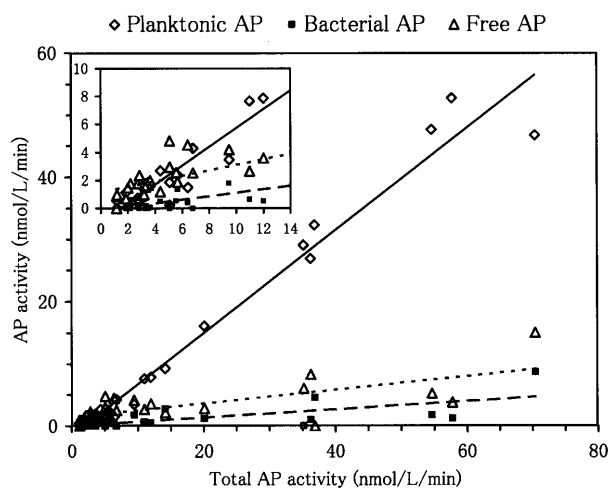


Fig. 3 Relationship between total AP activity and planktonic, bacterial, and free AP activity in surface seawater of Uranouchi Inlet. The inset displays the same relationship in the lower total AP activity. The solid line (—) represents the regression between total and planktonic AP activity [$r^2=0.972$ ($p<0.001$)], inset, $r^2=0.811$ ($p<0.001$), the broken line (---) represents the regression between total and bacterial AP activity [$r^2=0.504$ ($p<0.001$)], inset, $r^2=0.218$ ($p<0.05$), and the dotted line (.....) represents the regression between total and free AP activity [in A, $r^2=0.515$ ($p<0.001$)], inset, $r^2=0.470$ ($p<0.001$)].

ン細胞の AP 活性が増大する場合がみられた。このうち 1999 年 8 月 4 日の優占種は AP 産生能を有するとされている *Skeletonema costatum*⁶⁾であった。

AP 標品の基質特異性 APHP の定量に用いた AP 標品の基質特異性を試験した結果は Fig. 5 に示されている。本試験に用いたリン化合物の中で、一リン酸モノエステルの GYP, G1P, F6P ならびに二リン酸および三リン酸モノエステルの ADP および ATP は分解されたが、リン酸ジエステルの Bis-*p*NPP ならびに無機リン化合物の PP および TPP は分解されなかった。したがって、本標品を用いて求めた APHP は、AP の基質とされる一リン酸モノエステル化合物ならびに 2 および 3 分子のリン酸が結合した ADP および ATP の二リン酸

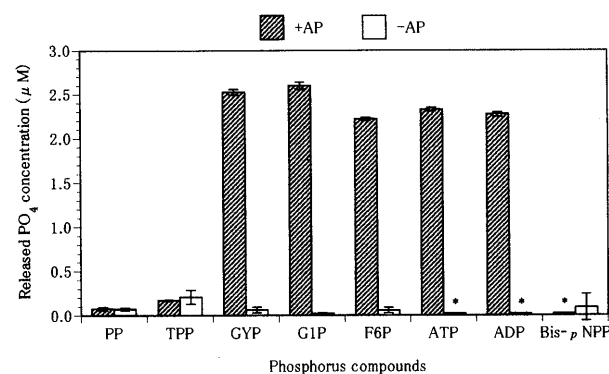


Fig. 5 Substrate specificity of AP used for the determination of APHP. Bars show standard deviation. * denotes Non-Detectable values for PO_4 (ND: $<0.02 \mu M$).

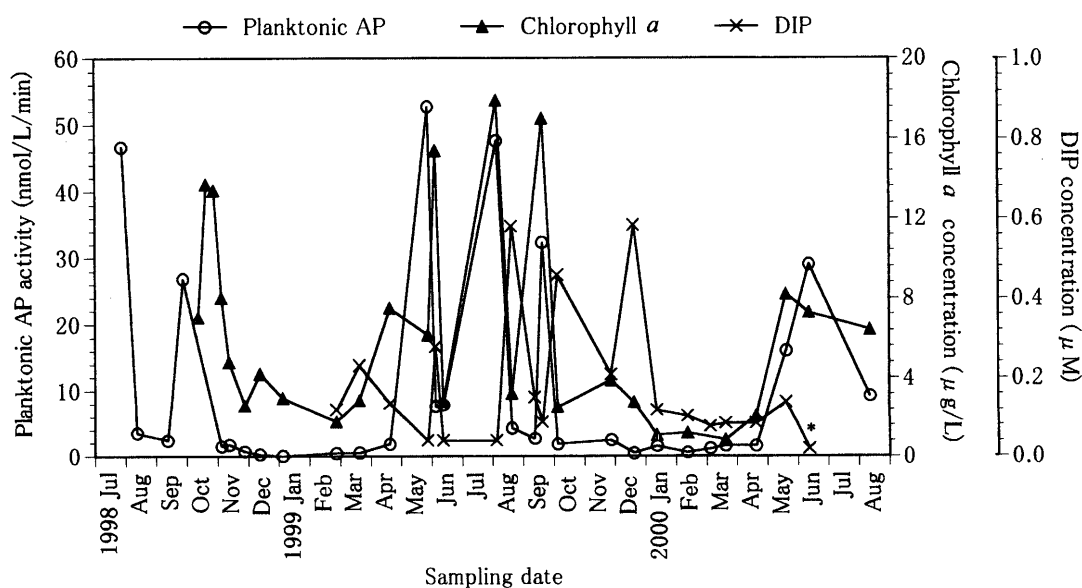


Fig. 4 Variation of planktonic AP activity, chlorophyll *a* and DIP concentration in surface seawater of Uranouchi Inlet. * denotes Non-Detectable values for DIP (June 2000), ND: $<0.02 \mu M$.

および三リン酸モノエステル化合物から構成されることがわかった。

AP 標品の必要添加量および APHP 回収率 本研究で用いた AP 標品は、試料 1 mL 当たり 5.0×10^{-4} units 以上添加することにより、 $2.5 \mu\text{M}$ の GYP を完全に分解可能であることがわかった。この結果をふまえ、現場試料中のオルトリン酸塩などの物質による AP 活性の阻害を抑えるために、AP 添加量を十分量の $2.5 \sim 5.0$ units/mL になるように設定した。さらに、活性阻害の有無は広島湾現場試料を用いて本試験法の GYP の回収率により評価した。その結果、本試験による GYP 回収率はいずれの試料でも 98% 以上であり、この条件では本 AP 標品の有意な活性阻害は認められなかった。これらのことから、海水中の APHP は、AP 標品を $2.5 \sim 5.0$ units/mL になるように添加して定量し、現場海水中で AP 標品の有意な活性阻害は無いものとして取り扱った。

沿岸海水中の APHP 浦ノ内湾表層水中における DIP, フォスファターゼ非加水分解性リン (AP-nHP: Alkaline Phosphatase-Non-Hydrolyzable Phosphorus) および APHP の濃度, ならびに DOP に占める APHP

の割合および AP 産生藻類利用可能リン (AAP: AP Producing Algae-Available Phosphorus) に占める APHP の割合の変動を Fig. 6 に示す。ここで AP-nHP は DOP から APHP を差し引いた有機態リンを表し, AAP は AP 産生能を有する藻類が利用可能なリンの総量ととらえ, DIP と APHP の和とした。

まず、これらの表層水中における分布をみると、12 月の試料を除く全ての海水試料で DOP が DIP を上回り、TDP に占める DOP の割合は全試料の平均で 79.5% であった (Fig. 6A)。APHP はほとんど全ての試料で検出され (最大 $0.18 \mu\text{M}$)、しばしば DIP 濃度を上回った。DOP に占める APHP の割合は大きな変動を示さず (3.6 未満 \sim 36.6%)、APHP および DIP が検出限界以下だった 2 試料を除く平均でみると 17.7% 程度であった。DIP に対する APHP の比は、DIP が検出されなかった 8 月 2 日の試料を除くと、0.07 未満 \sim 2.18 の範囲で変動した。次に、AAP に占める APHP の割合は、高水温期 (4 月 \sim 9 月) で高く、DIP が検出されなかった前述の試料を除くと、平均で 45.5% であり、本湾表層では DOP に占める APHP の割合は比較的小さいものの、高水温期では AP 産生藻類に利用可能なリンに占

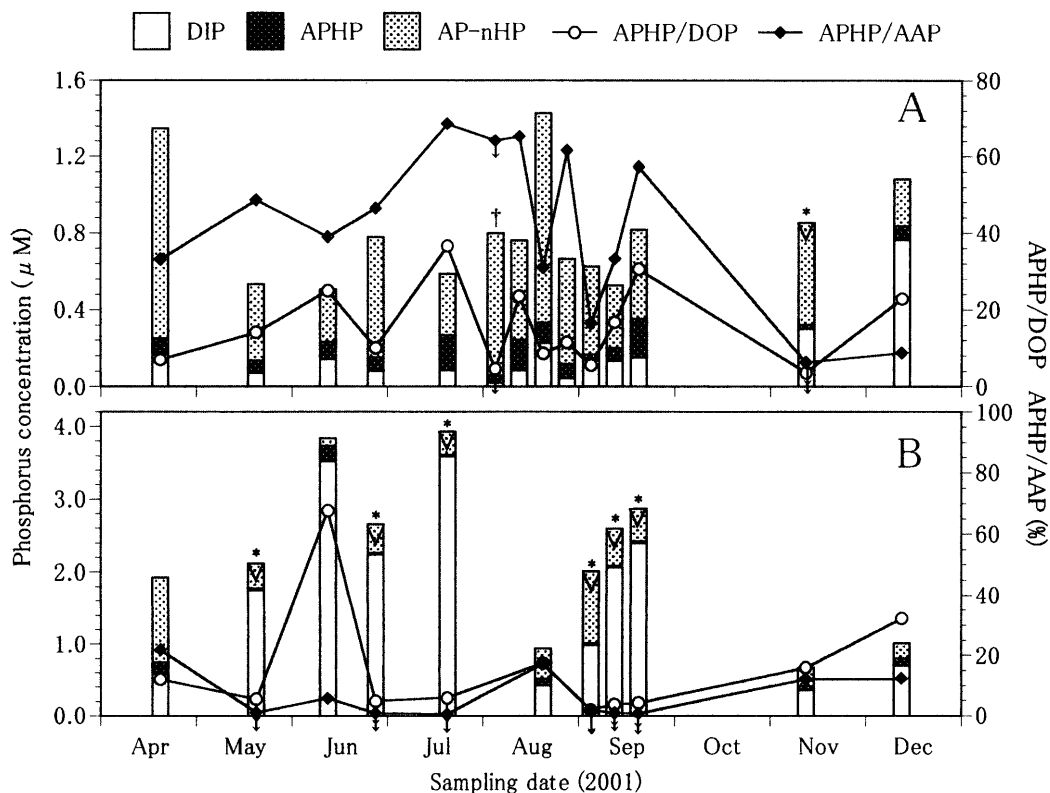


Fig. 6 Variation of APHP, DIP, and AP-nHP concentration, and the percentage of APHP/DOP and APHP/AAP in surface (A) and bottom (B) seawater of Uranouchi Inlet. † and * denote Non-Detectable values for DIP and APHP (ND: $< 0.02 \mu\text{M}$) in (A) and (B), respectively. ∨ and ↓ indicate that the concentration of AP-nHP as well as the percentage of APHP/DOP and APHP/AAP are less than the values shown in the figure.

Table 1 The distribution of APHP and dissolved phosphorus in seawaters of Nomi Inlet, Urado Inlet, and Hiroshima Bay

Regions	Station	Sampling Depth (m)	DIP (μM)	DOP (μM)	APHP (μM)	DOP/TDP (%)	APHP/DOP (%)	APHP/DIP	APHP/AAP*1 (%)
Nomi Inlet	2	2	0.10	0.67	<0.02*2	87.0	<3.0	<0.20	<16.6
		B-1*3	0.65	0.32	0.08	7.3	25.2	0.12	11.0
	3	2	0.17	1.04	0.03	86.3	2.5	0.16	13.6
		B-1	0.87	0.80	0.29	47.7	36.1	0.33	24.8
		10	2	0.30	0.37	0.02	54.9	5.9	0.07
		B-1	0.74	0.64	0.10	46.6	15.9	0.14	12.2
Urado Inlet	104	1	1.25	0.38	0.05	23.4	13.2	0.04	3.9
		B-1	0.77	0.34	<0.02	30.3	<5.9	<0.03	<2.5
	106	1	1.28	0.28	0.02	17.9	5.8	0.01	1.2
		B-1	0.24	0.29	0.07	55.1	25.7	0.31	24.0
	110	1	1.03	0.35	0.02	25.7	6.3	0.02	2.1
B-1		0.18	0.30	0.06	63.1	19.4	0.33	24.9	
Hiroshima Bay	Etajima	0	0.32	0.21	0.05	39.9	26.2	0.17	14.8
		B-1	1.34	0.11	0.12	7.3	—*4	0.09	8.0
	Ujina	0	0.16	0.29	0.10	64.5	36.0	0.65	39.6
		B-1	1.52	0.15	0.08	9.0	53.3	0.05	5.0
	Kure	0	0.40	0.19	0.10	32.8	49.4	0.24	19.4
		B-1	1.94	0.14	0.17	6.7	—	0.09	8.2

*1 AAP: AP Producing Algae-Available Phosphorus (DIP + APHP). *2 <0.02: Non-Detectable.

*3 B-1: One meter above the bottom. *4 —: No data.

める APHP の割合は高いことが明らかとなった。これら APHP 濃度とクロロフィル *a* 濃度および AP 活性との間に有意な相関は認められなかった。

一方、底層水中の分布をみると (Fig. 6B), DOP 濃度は DIP 濃度を大きく下回り、APHP 濃度は 0.02 未満 (Non-Detectable) ~ 0.21 μM であり、DIP に対する APHP の比は表層の 10 分の 1 以下であった。

次に、野見湾、浦戸湾および広島湾海水中の各溶存態リンおよび APHP の濃度は Table 1 に示されている。野見湾海水における DOP 濃度は浦ノ内湾と同程度であり、表層では DIP 濃度を上回った。また、APHP 濃度は 0.02 未満 ~ 0.29 μM であり、表層より底層で高かった。DOP および AAP に占める APHP の割合は、それぞれ最大で 36.1% および 24.8% であり、表層よりも底層で大きい傾向を示した。DIP に対する APHP の比は 0.07 ~ 0.33 であり、平均で 0.16 (APHP が検出されなかった 1 試料を除く) であった。

浦戸湾海水中の DOP 濃度は 0.28 ~ 0.38 μM であり、ほとんどの試料で DIP 濃度を下回った。APHP 濃度は 0.02 未満 ~ 0.07 μM であり、DOP および AAP に占める APHP の割合は、それぞれ 5.9 未満 ~ 25.7% および 1.2 ~ 24.9% であった。これらは表層より底層で高い場合が多かった。DIP に対する APHP の比は、平均で 0.14 (APHP が検出されなかった 1 試料を除く) であった。

広島湾海水中の DOP 濃度は 0.11 ~ 0.29 μM であり、ほとんどの試料で DIP を下回った。APHP 濃度は 0.05 ~ 0.17 μM であり、その DOP および AAP に占める割合は、それぞれ表層で 26.2 ~ 49.4% および 14.8 ~ 39.6%、底層では 53.3% および 5.0 ~ 8.2% であった。DIP に対する APHP の比は 0.09 ~ 0.65 であり、その平均は 0.22 であった。

考 察

海水中の AP 活性は、従来、蛍光定量法または比色定量法により測定されている。しかし、海水中の AP 活性は定量法によって異なる結果を与え、蛍光定量の場合は比色定量の場合より高くなる傾向があることが指摘されている。⁷⁾ これらの差異が何に基づくのかは明らかにされていないが、異なる定量法を用いて測定された海水中の AP 活性を比較・評価する際には、これらの差異を考慮する必要がある。

主要な海域について測定された海水中の AP 活性は、その定量法 (基質) とともに Table 2 に示す。浦ノ内湾海水の AP 活性は、同様の比色定量法により測定された徳山湾⁸⁾のそれとはかなり低いものの、東京湾⁷⁾や富栄養とされる紅海¹¹⁾の AP 活性より相当高い。また、蛍光定量法で測定された結果でも、太平洋^{17,18)} インド洋¹⁹⁾ および東京湾²⁰⁾より長崎湾⁹⁾で高く、現場海水中の AP 活性は、東京湾を除いて、外洋よりも内湾や富栄養

Table 2 The distribution of AP activity in seawaters

Regions	Method	Substrate*	AP activity (nmol/L/min)	Author
Uranouchi Inlet	Colorimetry	Phenyl-P	1.2~70.4	Present Study
Tokuyama Bay		Phenyl-P	ND [†] ~141.6	
Tokyo Bay		GYP	ND [†] ~ca. 3	
Red Sea		pNP-P	0.6~4	
Tokyo Bay	Fluorometry	MF-P	0.02~0.34	Kobori, Taga ²⁰⁾
Nagasaki Bay		MUF-P	0.1~2.0	
Pacific Ocean		MF-P	0.000~0.130	
		MUF-P	5.2×10^{-4} ~ 2.5×10^{-2}	
Indian Ocean		MUF-P	2×10^{-3} ~0.1	

* Abbreviations: Phenyl-P, Phenyl phosphate; pNP-P, *p*-Nitrophenyl phosphate; GYP, β -Glycerophosphate; MF-P, 3-*o*-Methylfluorescein phosphate; MUF-P, 4-Methylumbelliferyl phosphate.

[†] ND: <0.5 nmol/L/min; ‡, ND: <1 nmol/L/hour.

養化した海域で高いことがわかった。

東京湾では、いずれの測定法の場合も、貧栄養海域や外洋域と同程度の低い AP 活性しか検出されていないが、これは東京湾海水中の DIP 濃度がかかなり高く、^{7,20,21)} その濃度は海水中の植物プランクトン群集の AP 産生が誘導される 0.2~0.4 μM 程度以下^{6,10)}に低下していなかったことによると推定される。これらのことから、現場海水中の AP 活性は、植物プランクトン群集が豊富で、しかもそれらの増殖が無機リンによって制限された、DIP 濃度が低い海域で高くなるものと推察される。

浦ノ内湾における海水中の AP 活性は高水温期に高く、プランクトン態の寄与が最も大きかった (Fig. 2, 3)。植物プランクトンの AP は、多くの場合オルトリン酸塩濃度が低下した時に誘導生産され、その濃度は 0.2~0.4 μM 程度以下¹⁰⁾と考えられている。⁶⁾ 高水温期の浦ノ内湾において、高い AP 活性が検出された 1999 年 5 月 27 日、8 月 4 日、9 月 21 日ならびに 2000 年 6 月 20 日試料では、DIP 濃度は 0.02 未満~0.09 μM であり (Fig. 4)、現場海水中でも DIP 濃度の低下とともに植物プランクトンが AP を産生していることが実証された。一方、高水温期で DIP 濃度が 0.2 μM 以下の場合でもプランクトン態 AP 活性が低い場合がみられた (Fig. 4)。これはこの時期に AP 産生能を有するプランクトンが少なかったものと推察され、本湾ではプランクトン相が短期間にかかなり変動したことを示唆している。

本試験で得られた APHP は、一リン酸モノエステル化合物ならびに二リン酸および三リン酸モノエステル化合物の ADP および ATP から構成されることがわかった (Fig. 5)。これらのリン化合物は、著者らが試験した AP 産生能を有するプランクトン *Karenia mikimotoi* および *S. costatum*,⁶⁾ ならびに *Heterocapsa circularisquama* や *Chaetoceros ceratosporum* (山口ら未発表) の利

用可能な有機リン化合物とよく一致している。すなわち、本試験に用いた AP 標品の基質特異性は、AP 産生能を有する赤潮プランクトンの有機リン化合物の利用能と矛盾はないことがわかった。したがって、本試験では赤潮プランクトンが利用する APHP を矛盾なく測定されているものと考えられる。

一方、AP を有しない種は一リン酸モノエステル化合物は利用できないものの、ADP および ATP は利用できることが明らかにされている。⁶⁾ 沿岸海水中に溶存するアデノシン一リン酸 (AMP)、ADP および ATP 濃度は、それぞれ最大でも 1 nM 程度であり、²²⁻²⁵⁾ Ammerman²⁶⁾によると、海水中に溶存している全ヌクレオチド態リンの濃度は 5 nM 程度であると推算されている。したがって、本試験で得られた APHP に含まれる ADP および ATP の割合はかなり小さく、それらの濃度は過大に評価しても APHP の検出限界以下であると推察される。

本試験の結果、比較的水温の高い時期において、有機汚濁源が異なると考えられる浦ノ内湾、野見湾、浦戸湾および広島湾の APHP 濃度は、0.02 未満~0.29 μM の範囲であり、海域による有意な濃度差はみられず、APHP が検出されなかった試料を除くと、平均で 0.04~0.10 μM であった (Fig. 6, Table 1)。さらに、これら沿岸海水中的の APHP 濃度は高水温期 (8 月) の東京湾 (0.08~0.35 μM) および相模湾 (0.00~0.15 μM)²⁰⁾ で測定されたものと大差がなく、少なくとも生物活動の活発な比較的水温の高い時期において、APHP は沿岸海水中にかかなり普遍的に分布しているものと推察される。

これら沿岸海水中的の APHP の給源として、生活廃水やパルプ廃水等の有機質の廃水、水中の微生物体内から死滅後に放出されるリン化合物が考えられる。前者については、生活およびパルプ廃水が流入する河川水中で

APHP が高濃度に検出されたとの報告²⁷⁾があるものの、APHP を構成する成分や含有量などに関する資料は少なく、海水中の APHP に対する微生物生体由来のリンの寄与についても詳細は不明である。赤潮の発生に APHP が寄与していることが示唆されることから、赤潮の発生防除のためには APHP の起源を知り、その流入を防ぐことが重要な課題の一つになると考えられる。

AP 産生能を有しない植物プランクトンはリン源として DIP しか利用できないが、産生能を有するプランクトンは DIP と APHP の両者 (AAP) を利用することができる。したがって、植物プランクトン群がリン源を巡って競合した場合、APHP が溶存している海水では、前者より APHP の利用可能な後者が有利に増殖し得る。さらにその有利さの程度は、AAP に占める APHP の割合 (APHP/AAP) が大きいほど大きくなると考えられる。浦ノ内湾では全般に APHP/AAP が高く、DIP 欠乏時に植物プランクトンの高い AP 活性と AP 産生能を有する種 (*S. costatum*) の優占がみられた。さらに、東京湾では全般に DIP 含量が高く、AAP に占める APHP の割合も小さく (3.7~9.0%)、AP 活性も低いことが報告されている (Table 2)。^{7,20)} これらの結果は、海水中の AAP に占める APHP の割合は、AP 産生能を有する植物プランクトンの増殖のみならず、AP 産生能を有する種と有しない種間の競合や種の交代過程にも寄与していることが示唆される。

DOP を構成する有機態リンは、AP による加水分解作用を受ける化合物 (APHP) と受けない化合物 (AP 非加水分解性リン: AP-nHP) に分けることができる。海水中の AP-nHP としてリン酸ジエステル化合物¹⁵⁾やフォスフォネート^{28,29)}などが報告されている。今回調査した海域では DOP に占める APHP の割合 (APHP/DOP) は 2.0 未満~67.7% の範囲で、試料によって大きな差異がみられた (Fig. 6, Table 1)。前述のとおり、APHP 濃度の差異はあまり大きくなかったことから、これら APHP/DOP の差異は APHP よりも AP-nHP の含量の差異に起因していることが考えられる。また、広島湾海水の 2 つの試料で APHP/DOP の値が 100% を超えたが、本試料中には DOP 分解に用いた酸化剤、過硫酸カリウムでは完全に分解されない有機物が含まれており、¹⁴⁾ DOP を過小評価している可能性が考えられる。

以上のことから、富栄養化が進行した内湾では、DIP 濃度の低下に伴って AP を産生している植物プランクトンが存在しており、沿岸海水中に存在する APHP はそれらプランクトンのリン源として有効に利用されていることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、広島湾海水試料の採取に御協

力いただいた広島県水産試験場の高山晴義氏ならびに調査船乗組員各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Nakamura Y. Kinetics of nitrogen- or phosphorus-limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan* 1985; **41**: 381-387.
- 2) 渡辺正孝. 海洋メゾコズムによる現場実験. 「赤潮の科学 第二版」(岡市友利編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 98-104.
- 3) Yamaguchi M, Itakura S. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the toxic red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 367-373.
- 4) Yamaguchi M, Itakura S, Uchida T. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the 'novel red tide' dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Phycologia* 2001; **40**: 313-318.
- 5) Oh SJ, Yamamoto T, Kataoka Y, Matsuda O, Matsuyama Y, Kotani Y. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fish. Sci.* 2002; **68**: 416-424.
- 6) 山口晴生, 西島敏隆, 西谷博和, 深見公雄, 足立真佐雄. 赤潮プランクトン 3 種の有機態リン利用特性とアルカリフォスファターゼ産生能. *日水誌* 2004; **70**: 123-130.
- 7) Taga N, Kobori H. Phosphatase activity in eutrophic Tokyo Bay. *Mar. Biol.* 1978; **49**: 223-229.
- 8) 田中克正. 水中アルカリフォスファターゼ活性測定方法の検討. 山口県公害センター年報 1984; **9**: 134-139.
- 9) Hirayama K, Doma T, Hamamura N, Muramatsu T. Role of alkaline phosphatase activity in the growth of red tide organisms. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (eds) *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*. Elsevier, New York. 1989; 317-320.
- 10) Nausch M. Alkaline phosphatase activities and the relationship to inorganic phosphate in the Pomeranian Bight (southern Baltic Sea). *Aquat. Microb. Ecol.* 1998; **16**: 87-94.
- 11) Li H, Veldhuis MJW, Post AF. Alkaline phosphatase activities among planktonic communities in the northern Red Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1998; **173**: 107-115.
- 12) SCOR/UNESCO. Determination of photosynthetic pigments in seawater. *Monographs on Oceanographic Methodology 1*. UNESCO Publication Center, Paris. 1966; 1-69.
- 13) Strickland JDH, Parsons TR. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, Ottawa. 1972; 1-310.
- 14) 日本規格協会. 工場廃水試験方法 JIS K 0102. 日本規格協会, 東京. 1981; 1-236.
- 15) Suzumura M, Ishikawa K, Ogawa H. Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnol. Oceanogr.* 1998; **43**: 1553-1564.
- 16) Francko DA, Heath RT. Functionally distinct classes of complex phosphorus compounds in lake water. *Limnol. Oceanogr.* 1979; **24**: 463-473.
- 17) Perry MJ. Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluoromet-

- ric method. *Mar. Biol.* 1972; **15**: 113-119.
- 18) Koike I, Nagata T. High potential activity of extracellular alkaline phosphatase in deep waters of the central Pacific. *Deep-Sea Res. II* 1997; **44**: 2283-2294.
- 19) Hoppe H-G, Ullrich S. Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquat. Microb. Ecol.* 1999; **19**: 139-148.
- 20) Kobori H, Taga N. Phosphatase activity and its role in the mineralization of organic phosphorus in coastal sea water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1979; **36**: 23-39.
- 21) 風呂田利夫, 小倉紀雄, 高田秀重, 山口征矢, 青木浩之, 平井正風, 佐々木克之. 東京湾. 「海洋環境を考える」(日本海洋学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1994; 69-93.
- 22) Azam F, Hodson RE. Dissolved ATP in the sea and its utilization by marine bacteria. *Nature* 1977; **267**: 696-698.
- 23) Hodson RE, Azam F, Carlucci AF, Fuhrman JA, Karl DM, Holm-Hansen O. Microbial uptake of dissolved organic matter in McMurdo Sound Antarctica. *Mar. Biol.* 1981; **61**: 89-94.
- 24) Hodson RE, Maccubbin AE, Pomeroy LR. Dissolved adenosine triphosphate utilization by free-living and attached bacterioplankton. *Mar. Biol.* 1981; **64**: 43-51.
- 25) McGrath SM, Sullivan CW. Community metabolism of adenylates by microheterotrophs from the Los Angeles Harbor and Southern California coastal seawaters. *Mar. Biol.* 1981; **62**: 217-226.
- 26) Ammerman JW. Role of ecto-phosphohydrolases in phosphorus regeneration in estuarine and coastal ecosystems. In: Chróst RJ (ed) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer Verlag, New York. 1991; 165-186.
- 27) Hernández I, Pérez-Pastor A, Pérez-Lloréns JL. Ecological significance of phosphomonoesters and phosphomonoesterase activity in a small Mediterranean river and its estuary. *Aquat. Ecol.* 2000; **34**: 107-117.
- 28) Clark LL, Ingall ED, Benner R. Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature* 1998; **393**: 426.
- 29) Clark LK, Ingall ED, Benner R. Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnol. Oceanogr.* 2001; **46**: 309-320.