HPLC-PAD 法を用いた糖類の高感度分析法への応用と 湖水及び藻類由来溶存有機物の糖類組成

篠原 梓* 今井 章雄** 小松 一弘**
 松重 一夫** 奈良 郁子**

Application of HPLC-PAD to Highly Sensitive Analysis of Dissolved Carbohydrates and their Composition in Lake Water and Extracellular Organic Matter Derived from Algae

Azusa SHINOHARA*, Akio IMAI**, Kazuhiro KOMATSU**,
 Kazuo MATSUSHIGE** and Fumiko NARA**

* Global Environmental Forum, Narita Bldg., 3F, 3-43-16, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

** National Institute for Environmental Studies, 16-2, Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

Abstract

We determined the monosaccharide composition of dissolved organic matter (DOM) to evaluate the origin of DOM in Lake Kasumigaura. We applied high-performance liquid chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPLC-PAD) for the analysis of monosaccharides. We collected water samples from Lake Kasumigaura in 2004 and prepared samples from culture medium used for growing blue-green algae that are typically found in Lake Kasumigaura. The dissolved total saccharides (DTS) content of the lake water ranged from 1.8 to 3.0 μM . The DTS content of the DOM from lake water ranged from 3 to 6%. The monosaccharide composition in the lake water was uniform all year round. The main monosaccharides were fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose and ribose. The algae released a large amount of DTS during the stationary phase. The concentration and composition of the released DTS differed substantially among the algal species. The released DTS was 43.2 to 126 μM . Glucose was the most predominant among the monosaccharides of the DTS. The DTS content of the algal DOM ranged from 11 to 33% depending on the type of algae. The monosaccharide composition was very different between the lake-water-derived and algal-derived DOMs.

Key words : carbohydrates, DOM, HPLC-PAD, lake water, algal culture

1. はじめに

近年、多くの湖沼において、流域発生源対策が行われているにもかかわらず、難分解性と考えられる溶存有機物 (dissolved organic matter, DOM) が残存する傾向が確認されている¹⁾。このような現象は過去に例がなく、何が起きているか推測するのは難しい。よって、適切な流域発生源対策を行うことができず、結果としてさらに水質が悪化することが懸念される。このような事態を回避するために、早急にこの現象を解明することが求められている。

我々は易分解性—難分解性、疎水性—親水性、酸性—塩基性の違いによって DOM をマクロ的に分画する手法を開発・確立し、湖水や河川水等を分画してその水質特性を評価してきた^{2~4)}。その結果、従来の知見とは異なり、代表的な難分解性 DOM であるフミン物質 (疎水性有機酸) だけではなく、親水性 DOM も非常に難分解性であることが明らかとなった。しかし、当該分画手法は

大まかな特性による分類であるため、DOM の化合物としての有機物組成についての情報は十分に明らかにされていない。特に親水性 DOM に含まれると考えられる糖類組成やタンパク質中のアミノ酸組成は、生物分解特性を表現するための代替指標として注目されており⁵⁾、DOM の有機物組成情報は DOM の生分解性や起源を解析する上で有用であると考えられる。また、易分解性と難分解性は表裏一体のものであり、分解しやすい有機化合物に関する情報は難分解性 DOM の特性評価にも役立つと着想した。そこで、本研究では、湖水 DOM 中の主要な同定可能有機化合物と考えられる糖類に着目して、その組成を調べることを目的とした。

日本国内の湖沼において糖類の分析は1990年頃まで分光光度法あるいはガスクロマトグラフィー (GC) により行われてきた。分光光度法はオルシノール硫酸法及びフェノール硫酸法⁶⁾、アンスロン硫酸法⁷⁾、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノン-塩酸ヒドラゾン法⁸⁾などがあげられる。しかし、分光光度法は簡便で迅速な測定である反面、糖

* (財) 地球人間環境フォーラム 〒113-0033 東京都文京区本郷 3-43-16 成田ビル3階

** (独) 国立環境研究所水圏環境研究領域湖沼環境研究室 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

類組成情報が得られず総量の情報しかわからないという欠点がある。かつ、標準として使用した単糖と他単糖類の発色に違いがあり、正確に定量できているとは言い難い⁹⁾。ガスクロマトグラフィー(GC)は糖類組成の情報は得られるが、糖類を分析前に誘導体化する操作が煩雑であるという欠点がある¹⁰⁾。また湖水中の溶存糖を測定するためには濃縮が必要であり、湖水を直接測定するには感度が不十分であるということも欠点としてあげられる。最近、天然水中の溶存糖濃度と組成を高感度で定量できる分析法として高速液体クロマトグラフィー・パルスドアンペロメトリ検出法(HPLC-PAD法)が開発され注目を浴びている^{11, 12)}。

しかし、HPLC-PAD法でも湖水のような濃度の低い試料の測定に使用するには適切な手法の改良が必要である。また湖水等に含まれる糖類の多くは多糖として存在している。その単糖組成情報を得るためには、多糖を分解し単糖にしてから測定する必要がある。そのため、酸性の条件下で加熱し多糖を単糖に分解するという前処理操作が必要となる。ところが、加水分解の処理時間は文献により違いがある^{10, 11, 13~15)}。実際のサンプルを測定する前に加水分解時間の最適化が必要である。

本研究の目的は、湖水のような濃度の低い試料に対して溶存糖類の単糖組成と濃度を定量することを展望して、(1) HPLC-PAD法の分析条件の最適化を行い糖類の高感度分析法を確立する；(2) 実際の湖水サンプルや藻類由来DOMを含む水サンプルを対象として糖類分析を実施して湖水DOMの起源について評価・考察する、ことである。霞ヶ浦を研究対象湖沼とし、藻類としては霞ヶ浦において代表的な3種の藍藻類を選択した¹⁶⁾。

2. 実験方法

2.1 湖水の採水

霞ヶ浦(西浦)の高浜入り(St.1)と湖心(St.9)において、2004年1月~12月の各月に、2 mの亚克力製円筒カラム採水器を用いて湖水を採水した。採水地点をFig. 1に示す。水サンプルは全て450℃、4時間の熱処理をした1 lのガラス瓶に採取した。ガラス瓶の密栓は全てテフロンライナー付きのものを用いた。水サンプルはクーラボックスに入れて実験室に氷冷状態で持ち帰り、450℃、4時間の熱処理を行ったガラス繊維濾紙(Whatman社GF/F、公称粒子径0.7 μm)で濾過し、DOM測定用サンプルとし

Fig. 1 Sampling sites in Lake Kasumigaura.

た。ろ液は3℃以下で保存した。分析まで長時間を要するケースでは、HClで前洗浄したポリカーボネイト容器に入れ-30℃で凍結保存した。

2.2 藻類の培養

供試藍藻類として独立行政法人国立環境研究所系統微生物保存施設から分与された無菌単藻株 *Microcystis aeruginosa* (NIES-44) (以下 *M. aeruginosa*)、*Anabaena flos-aquae* (NIES-74) (以下 *A. flos-aquae*)、*Oscillatoria* (現在は *Planktothrix* と称する) *agardhii* (NIES-204) (以下 *O. agardhii*) を用いた¹⁶⁾。これらの株は霞ヶ浦の水の華から単離されたものである。藍藻類はガラス製試験管で改変CB培地を用いて、25℃、約50 μE・m⁻²・s⁻¹、12h:12hの明暗周期で保存した。改変CB培地では、リン酸供給源としてβ-グリセロリン酸塩の代わりにK₂HPO₄を入れ、ビシン(pH緩衝剤)の代わりにNaHCO₃を用いた。この変更は、藍藻類培地中のDOM濃度をできる限り低く抑えるために行った。供試藍藻類を接種した直後の培地中の溶存有機炭素(DOC)濃度は1 mgC・l⁻¹以下に抑えることができた。

培養実験では、前培養した各藍藻類を改変CB培地10 lが入ったポリカーボネイト容器に接種し、25℃、約50 μE・m⁻²・s⁻¹、12h:12hの明暗周期で無菌的に培養した。エアポンプを使って、0.2 μmメンブレンフィルターに接続したガラス製散気球を介して、無菌空気を培養容器に通気した。各藍藻類を定常増殖期に至るまで培養した(*M. aeruginosa*, *A. flos-aquae*, *O. agardhii* で各々22, 19, 12日間)。採取したサンプルは、湖水と同様にガラス繊維濾紙でろ過を行い、DOM測定用試料とした。ろ液は-30℃で凍結保存した。

2.3 糖類の分析方法

2.3.1 糖類組成の測定を目的とした試料の前処理

試料1 mlを450℃、4時間の熱処理を行ったアンプル管に注入し、6N HClによってpH 1.1に調整した。次に、アンプル管をガスバーナーによって密栓し、ヒートブロック上で100℃の加水分解処理を行った。最後にアンプル管に残存するHClを除去するために凍結乾燥処理を施し、パウダー状となった試料に対し、1 mlのMilli-Q水を添加して再溶解させ、糖類の測定に供した。

2.3.2 糖類組成の測定

試料の単糖類組成は高速液体クロマトグラフィー・パルスドアンペロメトリ(HPLC-PAD)検出法により測定した。機器はDionex社製糖類分析システムDX-500を使用した(電気化学的検出器ED-50、グラジェントポンプGP-50、オープンLC-30、オートサンプラーAS-50)カラムは陰イオン交換分析カラムであるCarboPacPA1(Dionex社)を用い、溶離液として18 mM NaOH、流速は1 ml・min⁻¹、サンプル注入量は250 μlとした。分析システムはPeakNet 6クロマトグラフィーソフト(エーア(Dionex社)によって制御した)。

単糖の標準物質としては、マンニトール、フコース、6-デオキシグルコース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、グルコース、マンノース、キシロース、フルクトース、リボース(シグマ・アルドリッチ社)の11種類を使用した。ストック標準溶液は標準物質をMilli-Q水に溶かして1 mMとして5 mlずつポリビンにいれ-30℃で凍結保存した。ワーキング標準液としてストック標準溶

液を溶解後にMilli-Qで希釈したもの(10 μ Mと100 nM)を使用した。ワーキング標準液は約1ヶ月毎に作り直した。

2.4 その他の分析方法

溶存有機炭素(dissolved organic carbon, DOC)は、ろ液に2M HClを添加しpHを2に調整した後に、キャリアガス(純空気)を通気し無機炭素を除去した後、高感度白金触媒を搭載した全有機炭素計(島津 TOC-5000)により分析した。分析精度は概ね2%以下であった。

培養液中のクロロフィル-a濃度は、懸濁物サンプルをガラス繊維ろ紙上にろ過集積し、ろ紙をガラス遠沈管に入れメタノール10 mlを加え、暗所3 $^{\circ}$ Cの条件下で12時間静置してクロロフィル-aを抽出した後、遠沈管を3000 rpmで10分遠心分離して、抽出液上澄みの吸光度(750 nm, 665 nm, 645 nm, 630 nm)を測定して求めた。

3. 結果と考察

3.1 高速液体クロマトグラフィー・パルスドアンペロメトリ(HPLC-PAD)法による糖類の高感度分析手法の確立

本研究では糖類の分析法として糖類組成に関する情報が得られ且つ高感度な分析方法であるHPLC-PAD法を用いた。HPLC-PAD法は高い再現性と感度が特徴としてあげられ、主に海洋に関係する分野において幅広く適用されてきた。しかしながら、HPLC-PAD法には、溶存酸素の妨害などといった問題点が指摘されている¹³⁾。本研究では溶存酸素の徹底的な除去、加水分解前処理時間の最適化を通じて、HPLC-PAD法による糖類の高感度分析手法の確立を図った。

HPLC-PAD法の電気化学的検出器の原理は、糖が酸化される時に生じる電流を測定することに基づいている。そのため、試料中に電極と還元反応を起こす溶存酸素が存在すると大きなネガティブピークが生じてしまい、単糖の分離を不明瞭なものにしてしまう。検出器に試料が導入される直前に溶存酸素を十分に除去することが不可欠である。Fig. 2(a)に溶離液に対してのみヘリウム脱気を施した場合のベースラインを示した。17分前後においてベースラインのネガティブディップが生じ検出の障害となっていることがよく分かる。このディップは、試料中の溶存酸素によって引き起こされたものであると推察される。従って、溶離液だけではなく試料からも溶存酸素を除去する必要がある。そこで、試料インジェクターと検出器の間に減圧ディガッサー(モジュール)を取り付け、試料と溶離液の混合液中からの溶存酸素の除去を

試みた。その結果、Fig. 2(b)に示されているように、溶存酸素によるベースラインのネガティブディップが消失し、HPLC-PAD法の検出感度を従来のガスクロマトグラフィー(GC)法(検出限界0.15 μ M)法に比べ約100倍向上させることができた(検出限界1.1~5.7 nM)。

各単糖の100 nM標準液を測定した際に得られたクロマトグラムをFig. 3に示す。単糖の種類によって差はあるものの、nMレベルの低濃度でも、濃縮操作なしに、定量的に分析することが十分に可能であることが明示された。以上の作業を通じ、糖類組成の高感度分析手法を確立することができた。また、HPLC-PAD法ではGC法に必要な糖の誘導体化操作は不要であり、この点においてもより簡便な手法であると言える。さらに標準物質の測定を行えば、溶存態のアミノ糖測定にも応用は可能である。今後、湖水や河川水等の陸水中における溶存糖の濃度や組成の分析には、HPLC-PAD法が大いに適用されると期待される。

3.2 加水分解時間の最適化

3.2.1 加水分解処理による単糖類濃度への影響

加水分解処理は多糖類におけるグルコシド結合を切り離し単糖類にする操作であり、糖類組成の分析において不可欠な前処理である。しかし、加水分解処理によって単糖類自身が分解されることも懸念される。そこで本研究では、先ず、濃度100 nMの標準単糖類に対し加水分解処理を行い、単糖類自身が分解されるかどうか検討を行った。処理時間は0, 3, 6, 9, 12, 24時間に設定した。その結果、いずれの標準単糖類も加水分解時間が長くなると同じように濃度が減少することが分かった(Fig. 4)。例えば、グルコースの場合、6時間後の回収率は90%だったが12時間後には73%に低下し、24時間後には46%と約半分にまで減少した。他の単糖も24時間後に13-52%の回収率を示した。最も回収率が低かったのはフルクトースとリボースであった。この結果は既報の結果と整合していた。フルクトースとリボースは加水分解によって比較的破壊されやすいと報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。

本研究で観察された、加水分解時間に依存して単糖の回収率が低下する現象は、Borchら¹⁸⁾の結果や、Selvendranら²⁰⁾の結果と一致している。Borchらの実験では0.85 M H₂SO₄で24時間後に回収率は40-60%であり、Selvendranらの実験では1 M H₂SO₄の条件下で回収率は18時間後に75-81%であった。彼らの実験結果と比較して本研究での回収率は低い。この理由は使用した酸や、脱塩過程での処理の違いによるものと思われる。一方、Chengや

Fig. 2 Comparison between chromatograms with (a) and without degassing (b).

Fig. 3 Chromatograms of 100 nM monosaccharide standards : 1. mannitol; 2. fucose; 3. 6-deoxyglucose; 4. rhamnose; 5. arabinose; 6. galactose; 7. glucose; 8. mannose; 9. xylose; 10. fructose; 11. ribose

Mopperらが行った湖水（加水分解条件，HClでpH1.1にして12時間）や海水（加水分解条件，0.85 M H_2SO_4 で4-6時間）に単糖を添加した実験において，その回収率は100%に近い値であったと報告されている^{11, 13)}。

3.2.2 多糖類標準物質，湖水および藻類培養液における加水分解処理時間と単糖類濃度の関係

多糖類に対して加水分解処理を行うと，グルコシド結合が断ち切れ，多糖類を構成している単糖類がHPLC-PAD法によって検出される。しかし，生成された単糖類自身も加水分解によってさらに分解されることが前節3-2-1で確かめられた。そこで本研究では，最も回収率が高くなる加水分解の最適な処理時間を設定するために，予め構造が既知の多糖類標準物質であるマルトヘキサオース（構造式： $\text{Glc}(1-4)-[\text{Glc}(1-4)]_4-\text{Glc}$ ）およびスタキオース（構造式： $\text{Gal}(1-6)-\text{Gal}(1-6)-\text{Glc}(1-2)-\text{Fruc}$ ）に対して，それぞれ0，3，6，9，12，24時間で加水分解処理を行い，検出される単糖類の濃度変化を調べた（Fig. 5）。

マルトヘキサオースの分子中に含まれるグルコース（M-Glc）は9時間前後に最も高い回収率を示し，その値は72%であった。またスタキオースの分子中に含まれるグルコース（S-Glc）も同じく9時間前後に77%の回収率を示した。スタキオースに含まれるガラクトース（S-Gal）もグルコースと同様の挙動を示したが，フルクトース（S-Fruc）は3時間で最も高い回収率を示し，その後時間経過と共に著しく回収率が減少するなど，グルコースとは異なる挙動を示した。

Fig. 4 Recoveries of monosaccharide standards as a function of hydrolysis time. Each standard has a concentration of 100 nM

霞ヶ浦湖水及び藻類培養後培地も同じように加水分解処理を行い，多糖類標準物質の場合と同様に，時系列的に濃度変化を追った。霞ヶ浦湖水サンプルは St.1, 2004年8月に採取してろ過したものである。藻類培養液は *M.aeruginosa* の培養22日目（定常・死滅期）における培養培地ろ液を対象とした。その結果，湖水でも藻類培養培地でも加水分解処理24時間で単糖濃度は最大値を示した（Fig. 6）。単糖濃度がピークに達するのに多糖類標準物質の場合よりも時間がかかった。この時間的な遅れは，湖水や藻類培養培地に含まれる多糖類が多糖類標準物質よりも高分子量であるためと推測される。また湖水や培地では，多糖類標準物質とは異なり，単糖濃度がピークに達した後でも，その濃度は処理時間に伴い減少しなかった。すなわち湖水や培養培地に対して処理を行った場合，加水分解に伴って新たに生成する単糖類濃度と分解する単糖類濃度が平衡しているため，見かけ上単糖類濃度の減少が起きなかったと考えられる。いずれにしても24時間後には単糖類がある一定の濃度に達したのは確かであるため，加水分解時間を24時間として設定した。

Hanisch ら²¹⁾や Hayakawa²²⁾は，湖水中の溶存糖にはHClでは加水分解されない多糖類が存在すると報告している。彼らの結果によれば，湖水をHClよりも H_2SO_4 で加水分解した方が検出される溶存糖の量が多い。本研究では H_2SO_4 による加水分解実験は実施していない。今後 H_2SO_4 を用いた加水分解実験を行いHClの加水分解実験結果と比較検討する必要があると思われる。

3.3 湖水および藻類培養培地の糖類組成

3.3.1 湖水の全溶存糖量と糖類組成の季節変化

本研究では，検出された単糖類の総量を全溶存糖量とし，また全溶存糖量中の炭素量をDOCで除することにより，DOM中の糖含有率を求めた。霞ヶ浦湖心 St.9における全溶存糖量及びDOM中の糖含有率の2004年における季節変動をFig. 7に示した。全溶存糖量は1月に $1.8 \mu\text{M}$ ，7月に $3.0 \mu\text{M}$ となり，冬季の全溶存糖量は夏季のその約1.7倍と高い値を示した。また，12月における全溶存糖量は $1.2 \mu\text{M}$ であり，2004年の1年間で溶存糖はほとんど湖水に蓄積していないと言える。年間を通じて， $1.5 \mu\text{M}$ 程度の溶存糖が常に残存していると考えら

Fig. 5 Recoveries of oligosaccharides, maltohexaose and stachyose as monosaccharides as a function of hydrolysis time. M-Glc is glucose derived from maltohexaose, S-Gal is galactose from stachyose, S-Glc is glucose from stachyose, and S-Fruc is fructose from stachyose.

Fig. 6 Increases in monosaccharide concentration during hydrolysis treatment as a function of its treatment time. (a) is the case of the filtered lake water of Lake Kasumigaura, (b) is that of the filtered spent medium of *Microcystis aeruginosa*. ●: fucose, △: galactose, ▲: glucose

れる。琵琶湖 (1998-2000年) においては、吸光度計を用いた測定により、湖水中の全溶存糖量は $2-5 \mu\text{M}$ を示し霞ヶ浦湖水よりもやや高い値が報告されている²³⁾。しかし吸光度による測定ではHPLC-PAD法より値が大きくなる⁹⁾。従って、今回霞ヶ浦で得られた全溶存糖濃度は妥当な値であると思われる。

次に DOM 中の糖含有率に着目すると、1月で4%、7月で6%となっており、冬季で低く夏季で高い傾向が見られた。すなわち、夏季ではDOM全体に占める糖類の割合が冬季に比べて高くなることが分かる。また5月に糖含有率が顕著に減少する傾向が認められた。この減少は、溶存糖濃度自体は減少していないため、5月に糖類以外のDOMが比較的多量に湖水中に流入した結果と想定される。まとめると、全体的にDOM中の糖含有率は低く ($<7\%$)、湖水DOMに含まれる糖はそれほど多くないと言える。

Fig. 8に2004年における糖類組成比率の季節変動を示した。フコース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、グルコース、マンノース、キシロース、リボースの存在比率は年間を通してほぼ均一であった。全溶存糖量及びDOM中の糖含有率に季節変動があったのに比べ糖類組成は3、4月にキシロースやアラビノースに多少の変動があるものの、年間を通して大きな変化はなかった。Ochiar⁹⁾は均一化した糖類組成を示すものは分解が十分に行われたものであると述べている。従って、霞ヶ浦のSt.9の湖水は1年を通してバクテリアによる分解を十分に受けていると考えられる。一方、Hayakawa²²⁾は琵琶湖の糖類組成を測定し、冬季に比べて夏季ではアラビノースの比率が高く、ラムノースの比率が低いことを指摘した。こうした湖による違いは従属栄養生物による生産活動によって影響されると考えられた。今後、バクテリアの生産活動とDOM中糖組成の対応関係について調査を行う必要がある。

以上をまとめると、霞ヶ浦において、冬季ではDOMの全体量が少なくそこに含まれる糖類の割合も低い、一方、夏季ではDOM自体の濃度も高くそこに含まれる糖類の割合も高い。つまり冬季から夏季にかけて糖類を高い割合で含むDOMが何らかの起源から追加され、夏季から冬季にかけてはその追加されたDOMが生物分解などを経て分解されていると推察される。春季から夏季にかけて糖類を高い割合で含むDOMの起源としては藻類由来のものが考えられる。藻類が排出するDOMでは、マクロ

Fig. 7 Seasonal variations of dissolved total saccarides (DTS) and ratio of DTS over DOM at St.9 in 2004.

Fig. 8 Seasonal variation in percentage fraction of monosaccharides at St.9 in 2004. Others represent mannitol, 6-deoxyglucose and fructose.

的な分画手法によるものではあるが、糖類に区分されるDOMが卓越すると報告されている¹⁶⁾。

3.3.2 藻類培養培地の全溶存糖量、糖類組成及びDOM中の糖含有率

*M. aeruginosa*の培養実験における増殖曲線と培養日数に伴う全溶存糖濃度およびDOM中の糖含有率をそれぞれFig. 9に示した。*M. aeruginosa*は対数増殖期よりも定常期に多くの溶存糖を排出することが明らかとなった。溶存糖濃度およびDOM中の糖含有率は定常後期になるほど増加した。定常期に藻類から排出されるDOMには糖類が多く含まれていると示唆された。他の2種の藍藻類につ

Fig. 9 Time courses of Chl.-a and dissolved total saccharides (DTS) concentration and DTS / DOM ratio in a batch culture of *Microcystis aeruginosa*.

いても同じ傾向が認められた。

3種の藍藻類において培養最終日の全溶存糖量、及びそれぞれの単糖量を比較検討した (Table 1)。全溶存糖濃度については、*M.aeruginosa* が他の2種に比べ約2倍の126 μMの値を示し糖類をより多く排出することがわかった。また3種の藍藻類の排出する単糖で量が最も多かったのは共通してグルコースだった。

次に3種の藍藻類の培養最終日における糖類組成を比較した (Table 1)。3種の藍藻類共に単糖量としてグルコースの比率が最も高かった。しかしその比率には違いが見られた。生産されたグルコースの量が一番多かったのは *M.aeruginosa* だったが (Table 1)、最も高いグルコース比率を示したのは *O.agardhii* であり、その値は83%に達した (Table 1)。*M.aeruginosa* 及び *A.flos-aquae* のグルコース組成比率はそれぞれ66%、40%だった。これは、*O. agardhii* が排出する糖類は他の2種のものよりも組成が比較的単一なもので出来ていることを示している。結

Fig. 10 Ratio of DTS over DOM. Lake water samples were collected at Sts.1 and 9 in August, 2004. Culture samples were collected on the last day of cultivation. *M.a* stands for *Microcystis aeruginosa*, *A.f-a* does *Anabaena flos-aquae*, and *O.a* does *Oscillatoria agardhii*.

果として3種の藍藻類が排出する糖類はそれぞれ異なった組成であることがわかった。Nicolaus ら²³⁾によるさまざまな種類の藍藻類が排出する溶存糖類を調べた結果においても、ほとんどの種でグルコースが突出していたが、その組成は異なっていた。

3種の藍藻類において培養最終日におけるDOM中の糖含有率を比べた (Fig. 10)。DOM中の糖含有率が最も大きかったのは *O. agardhii* で33%だった。*M.aeruginosa* は23%、*A.flos-aquae* は11%だった。DOM中の糖の含有率が3種において違うことから、3種の藍藻類の排出するDOMの組成が異なることがわかった。これはChoiらの藻類培養培地ろ液のDOM分画結果からも示唆されている¹⁶⁾。また藻類から排出されるDOMの大部分は多糖類と言われていたがDOM中の糖含有率はあまり高くなく、最大でも30%前後であった。

Table 1 Dissolved monosaccharides concentrations, DTS concentrations (μM) and percentage fractions of monosaccharide components (%) of filtrates of spent growth cultures and lake waters

Sample	Manni	Fuc	6-deoxyGlc	Rham	Arab	Gal	Glc	Man	Xyl	Fru	Rib	DTS
Culture (<i>Microcystis aeruginosa</i>)	2.58 (2.0)	6.64 (5.3)	0.17 (0.1)	10.81 (8.6)	13.16 (10.4)	8.34 (6.6)	83.57 (66.2)	0.00 (0.0)	0.97 (0.8)	0.07 (0.1)	0.00 (0.0)	126.32
Culture (<i>Anabaena flos-aquae</i>)	2.16 (3.8)	7.40 (13.0)	1.09 (1.9)	4.11 (7.2)	1.08 (1.9)	5.62 (9.9)	22.74 (40.0)	4.88 (8.6)	7.51 (13.2)	0.06 (0.1)	0.22 (0.4)	56.88
Culture (<i>Oscillatoria agardhii</i>)	0.62 (1.4)	0.38 (0.9)	0.05 (0.1)	0.95 (2.2)	0.56 (1.3)	0.44 (1.0)	35.71 (82.7)	1.34 (3.1)	0.89 (2.1)	0.98 (2.3)	1.28 (3.0)	43.19
Lake water (St.1, Kasumigaura)	0.11 (2.3)	0.79 (16.5)	0.01 (0.2)	0.64 (13.3)	0.31 (6.4)	0.69 (14.4)	0.57 (11.8)	0.39 (8.2)	0.93 (19.4)	0.04 (0.8)	0.32 (6.7)	4.79
Lake water (St.9, Kasumigaura)	0.08 (2.9)	0.49 (17.8)	0.01 (0.3)	0.30 (10.7)	0.27 (9.8)	0.30 (11.0)	0.29 (10.6)	0.17 (6.3)	0.49 (17.7)	0.01 (0.2)	0.35 (12.7)	2.75

The unit is μM (%). Manni: mannitol, Fuc: fucose, 6-deoxyGlc: 6-deoxyglucose, Rham: rhamnose, Arab: arabinose, Gal: galactose, Glc: glucose, Man: mannose, Xyl: xylose, Fru: fructose, Rib: ribose. Lake water is a sample of August, 2004. Culture is a sample of last day of cultivation.

Table 2 Correlation matrix (R) of monosaccharides in concentration of lake water samples at St.9 in 2004.

	Manni	Fuc	6-deoxyGlc	Rham	Arab	Gal	Glc	Man	Xyl	Fru	Rib
Manni	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fuc	0.58*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6-deoxyGlc	0.58*	0.64*	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Rham	0.56	0.94**	0.49	--	--	--	--	--	--	--	--
Arab	0.38	0.48	-0.03	0.60*	--	--	--	--	--	--	--
Gal	-0.02	0.89**	0.46	0.91**	0.53	--	--	--	--	--	--
Glc	0.56	0.89**	0.52	0.82**	0.56	0.77**	--	--	--	--	--
Man	0.43	0.90**	0.62*	0.82**	0.19	0.78**	0.78**	--	--	--	--
Xyl	0.60*	0.78**	0.28	0.87**	0.78**	0.91**	0.71**	0.59*	--	--	--
Fru	0.39	0.68*	0.45	0.59*	0.16	0.49	0.64*	0.86**	0.33	--	--
Rib	0.35	0.81**	0.77**	0.68*	0.25	0.55	0.81**	0.78**	0.39	0.74**	--

Manni: mannitol, Fuc: fucose, 6-deoxyGlc: 6-deoxyglucose, Rham: rhamnose, Arab: arabinose, Gal: galactose, Glc: glucose, Man: mannose, Xyl: xylose, Fru: fructose, Rib: ribose. Bold lines indicate the value > 0.6. * means $p < 0.05$, ** means $p < 0.01$.

3.3.3 湖水と藻類培養培地中の糖類の比較

湖水と藻類培養培地の全溶存糖量を比較すると、湖水の全溶存糖量が 3–5 μM であるのに対して藻類培養培地の全溶存糖量は 43.2–126 μM と圧倒的に多い (Table 1)。また藻類が発生しやすい St.1 において St.9 よりも全溶存糖量が高い。加えて、アオコが発生する夏場において全溶存糖量が多いことから、湖水 DOM 中の糖類の大部分は藻類由来である可能性が高い。

湖水と藻類培養培地における DOM 中の糖含有率を比較すると、培養培地では 11–33% であるのに対して湖水では 3–6% であった (Fig. 10)。湖水では DOM 中の糖含有率が夏に高く、冬に減少する (Fig. 7)。藻類培養培地中では DOM 中の糖含有率が高いことから、湖水 DOM 中の糖類の大部分は藻類由来である可能性が裏付けられる。

しかし湖水 DOM 中の糖類の大部分は藻類由来であるという仮定とは反対に、クロロフィル a と全溶存糖量の相関は負の値を示した ($R = -0.456$)。藻類は定常期に多くの溶存糖類を放出するが、クロロフィル a の結果だけではどんな増殖期にあるか判断できないため、このような結果になったと思われる。現在、特定藻類種の RNA/DNA 比に基づいた藻類増殖速度測定手法が開発されつつある²⁴⁾。藻類の増殖速度と溶存糖の排出量は正に相関すると推察される。今後この手法を用いて藻類の増殖速度を測定し全溶存糖量と比較することにより、湖水 DOM 中の糖類と藻類の排出する糖類の関係がより明確になるとと思われる。

湖水と藻類培養培地の糖類組成を比較すると、湖水の組成が比較的均一であるのに比べ藻類培養培地ではグルコースが大部分を占めていた (Table 1)。Ochiai らは、中沼湖水 (1978 年 5 月採水) の 31 日間生分解実験において、グルコースとガラクトースが始めの 10 日間で大幅に減少したと報告している²⁵⁾。また Bunte らによって行われたバクテリアによる溶存糖類の代謝の実験では、グルコースが最も早い代謝を示し、ついでガラクトース、マンノースがそれに続き、フルクトースやグルコサミンは遅かった¹²⁾。これらの報告から、藻類によって排出されるグルコースやガラクトースはバクテリアなどによって速やかに分解され、結果、湖水中の糖類組成は均一になると考えられる。

最後に St.9 における 1 年を通した各単糖量の季節変動の相関関係を調べた (Table 2)。湖水中の糖類組成で主要なものは、フコース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、グルコース、マンノース、キシロース、リボースであるが、その結果、グルコース、ガラクトース、フコースなどといった主要なものは相関が高かった。これらのものは起源が同じであると考えられる。しかし、アラビノースは主要であるにも関わらず、キシロース以外のフコース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、マンノース、リボースとの相関が低かった。アラビノースやキシロースは特に高等植物に含まれることが知られている^{9, 17)}。また Ochiai らが森林自然系河川水 (安曇川、真野川、1985 年 12 月採水) の糖類組成を調べた結果では、グルコース、ガラクトースなどに次いでアラビノースの割合が高い²⁶⁾。霞ヶ浦において湖岸帯植物はほとんど無いことから、St.9 のアラビノースは流域から河川を

介して湖心まで到達したのではないかと推察される。

以上をまとめると、湖水と藻類培養培地の比較において、湖水と藻類培養培地中の糖類の明確な違いを見つけることができた。今後、他の地点の湖水や河川水や底泥間隙水などのサンプルについても糖類組成を調べることで、湖水 DOM の起源がさらに明らかにできるものと期待する。

4. まとめ

本研究では、まず糖類の高感度分析法を開発して、さらに湖水 DOM や主要な供給源である藍藻類培養培地中の溶存糖類の濃度および組成を測定し湖水 DOM の起源について検討した。得られた成果を以下にまとめた。

1) HPLC-PAD 法においてインジェクターと検出器の間に減圧ディガッサーを取り付けベースラインのディップを消失させ、糖類の高感度分析法を確立した。この改良により湖水に nM レベルで存在する糖類の分析が濃縮操作なしに行えるようになった。

2) 試料中の多糖を単糖にする加水分解前処理条件の最適化を行った。湖水や藻類培養培地ろ液の加水分解時間を 24 時間に設定した。

3) 2004 年霞ヶ浦湖水において全溶存糖量は 1.8–3.0 μM となり、冬季に比べ夏季において高い値を示した。DOM 中の糖含有率は 3–6% を示し、冬季で低く夏季で高い傾向が見られた。湖水中の糖類組成に顕著な偏りはなく年間を通してほぼ均一な組成を示した。代表的な単糖類はフコース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、グルコース、キシロース、マンノース、リボースであった。グルコースやフコース等の各単糖量はほぼ同じ季節変動を示した。

4) 藍藻類は定常期に多くの溶存糖を排出し、藍藻類の種類によって排出する溶存糖の量や質に違いがあった。排出された全溶存糖の濃度は 43.2–126 μM の範囲にあった。藍藻類が排出する溶存糖は主にグルコースであり、湖水の組成と明確な違いが認められた。また DOM 中の糖含有率は湖水に比べ、最大で 30% と顕著に高かった。

謝辞

本研究は、厚生労働省厚生労働科学研究費補助金 (H15-がん予防-102) からの財政的援助を受けた。ここに感謝の意を表します。

(原稿受付 2008 年 1 月 22 日)

(原稿受理 2008 年 6 月 5 日)

参考文献

- 1) 今井章雄 (2002) 湖沼における難分解性溶存有機物の蓄積、海洋と生物, 140, 203–208.
- 2) 今井章雄, 福島武彦, 松重一夫, 井上隆信, 石橋敏昌 (1998) 琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画, *Jpn. J. Limnol.*, 59, 53–68.
- 3) Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K. and Kim, Y. H. (2001) Fraction and Characterization of Dissolved Organic Matter in a Shallow Eutrophic Lake, Its Inflowing Rivers, and Other Organic Matter Sources, *Wat. Res.*, 35, 17, 4019–4028.
- 4) Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y. H. and Choi, K. (2002) Characterization of Dissolved Organic Matter in Effluents from Wastewater Treatment Plants, *Wat. Res.*, 36, 859–870.

- 5) Amon, R. M. W., Fitznar, H. P. and Benner, R. (2001) Linkages among the bioreactivity, chemical composition, and diagenetic state of marine dissolved organic matter, *Limnol Oceanogr.*, **46**(2), 287-297
- 6) Haan, H. De and Boer, T. De (1979) Seasonal Variations of Fulvic Acids, Amino Acid, and Sugars in Tjeukemeer, The Netherlands, *Arch.Hydrobiol.*, **85**, 30-40.
- 7) Alberts, J. J., Bowling, J. W., and Emmons, M. (1988) Dissolved Carbohydrate Distribution and Dynamics in Two Southern United States Reservoirs, *Can.J.Fish.Aquat.Sci.*, **45**, 325-332.
- 8) Byrne, C. M. and Sieburth, J. McN. (1977) Dissolved Carbohydrates in Sea Water. II, a Spectrophotometric Procedure for Total Carbohydrate Analysis and Polysaccharide Estimation, *Mar:Chem.*, **5**, 15-28.
- 9) 落合正宏 (1992) 7. 生体由来有機物の代謝, 季刊 化学総説 14 陸水の化学 (日本化学会編), pp56-65, 学会出版センター, 東京.
- 10) Ochiai, M. (1980) Determination of Dissolved Carbohydrates in Natural Water by Gas-liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, **194**, 224-227.
- 11) Mopper, K., Schultz, C. A., Chevolut, L., Germain, C., Revuelta, R. and Dawson, R. (1992) Determination of Sugars in Unconcentrated Seawater and Other Natural Waters by Liquid Chromatography and Pulsed Amperometric Detection, *Environ.Sci.Technol.*, **26**, 133-138.
- 12) Bunte, C. and Simon, M. (1999) Bacterioplankton Turnover of Dissolved Free Monosaccharides in a Mesotrophic Lake, *Limnol. Oceanogr.*, **44**(8), 1862-1870.
- 13) Cheng, X. and Kaplan, L. A. (2001) Improved Analysis of Dissolved Carbohydrates in Stream Water with HPLC-PAD, *Anal.Chem.*, **73**, 458-461.
- 14) 山岡到保, 滝村修 (1985) 赤潮プランクトン中の有機物組成, 日本化学会誌, **7**, 1488-1494.
- 15) 鶴崎実, 石渡良志 (1986) 日光湯ノ湖堆積物中の炭水化物—深度分布および供給源について—, *Jpn.J.Limnol.*, **47**, **3**, 257-267.
- 16) Choi, K., Imai, A., Kim, B., and Matsushige, K. (2001) Properties of Dissolved Organic Carbon (DOC) released by Three Species of Blue-green Algae, *Korean J.Limol.*, **34**(1), 20-29.
- 17) Wicks, R. J., Moran, M. A., Pittman, L. J., and Hodson, R. E. (1991) Carbohydrate Signatures of Aquatic Macrophytes and Their Dissolved Degradation Products as Determined by a Sensitive High-Performance Ion Chromatography Method, *Appl.Environ.Microbiol.*, **57**, 3135-3143.
- 18) Borch, N. H. and Kirchman, D. L. (1997) Concentration and Composition of Dissolved Combined Neutral Sugars (Polysaccharides) in Seawater Determined by HPLC-PAD, *Mar:Chem.*, **57**, 85-95.
- 19) Mopper, K. (1977) Sugars and Uronic Acids in Sediment and Water from The Black Sea and North Sea with Emphasis on Analytical Techniques, *Mar:Chem.*, **5**, 585-603.
- 20) Selvendran, R. R., March, J. F. and Ring, S. G. (1979) Determination of Aldoses and Uronic Acid Content of Vegetable Fiber, *Anal.Biochem.*, **96**, 282-292.
- 21) Hanisch, K., Schweitzer, B. and Simon, M. (1996) Use of Dissolved Carbohydrates by Planktonic Bacteria in a Mesotrophic Lake, *Microb.Ecol.*, **31**, 41-55.
- 22) Hayakawa, K. (2004) Seasonal Variations and Dynamics of Dissolved Carbohydrates in Lake Biwa, *Organic Geochemistry*, **35**, 169-179.
- 23) Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M. C., Giulio, A. D. and Gambacorta, A. (1999) Chemical Composition and Production of Exopolysaccharides from Representative Members of Heterocystous and Non-heterocystous Cyanobacteria, *Phytochemistry*, **52**, 639-647.
- 24) 国立環境研究所 (2004) 国立環境研究所特別研究報告 SR-62-2004, pp.31-36, (独) 国立環境研究所, つくば
- 25) Ochiai, M. and Hanya, T. (1980) Change in Monosaccharide Composition in the Course of Decomposition of Dissolved Carbohydrates in Lake Water, *Hydrobiologia*, **90**, 257-264.
- 26) Ochiai, M. and Nakajima, T. (1988) Distribution of Neutral Sugar and Sugar Decomposing Bacteria in Small Stream Water, *Arch.Hydrobiol.*, **113**, 179-187.