

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	森林のメタボ判定:ハイスループット硝酸同位体比測定による森林窒素循環の健全性評価
研究機関・ 部局・職名	国立大学法人 東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
氏名	木庭 啓介

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	104,000,000	104,000,000	0	104,000,000	104,000,000	0	0
間接経費	31,200,000	31,200,000	0	31,200,000	31,200,000	0	0
合計	135,200,000	135,200,000	0	135,200,000	135,200,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	1,348,200	62,018,570	5,421,314	3,274,262	72,062,346
旅費	0	440,678	1,042,765	745,784	2,229,227
謝金・人件費等	0	9,148,086	8,592,965	8,627,252	26,368,303
その他	0	938,116	1,550,347	851,661	3,340,124
直接経費計	1,348,200	72,545,450	16,607,391	13,498,959	104,000,000
間接経費計	405,000	21,765,000	5,025,000	4,005,000	31,200,000
合計	1,753,200	94,310,450	21,632,391	17,503,959	135,200,000

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
ハイスループット安定同位体比質量分析装置		1	41,968,500	41,968,500	2012/1/10	東京農工大学
水質自動分析装置	QuAAtro 2HR	1	12,582,171	12,582,171	2011/9/1	東京農工大学
超純水製造装置		1	639,555	639,555	2011/7/5	東京農工大学
遠心機	KUBOTA5930	1	756,000	756,000	2011/2/22	東京農工大学

5. 研究成果の概要

本研究予算で雇用した研究員、購入した大型機器により、ハイスループットでの硝酸イオン窒素酸素安定同位体比測定をルーティンで行って行くだけの環境を整備することができ、年間約1500点以上の測定を行うことができた。この膨大な結果を基に解析を行い、渓流水硝酸イオンの濃度と窒素酸素安定同位体比および酸素同位体比異常を組み合わせて計算できる渓流水中の降水硝酸イオン濃度が森林での硝化と脱窒についての示唆を与えることが明らかとなった。この結果の一部についてはすでに総説として論文発表を行った。また、これまでの研究では土壌硝酸イオンについての酸素同位体比情報が曖昧であったが、我々の研究で、これまでの仮定では酸素同位体比が過大評価されており、より詳細な測定を行うことで、より正確な森林の持つ硝酸イオンの除去能を査定できることを示すことができた。しかし、一方で窒素飽和状況の定量的な査定、については、さらなる検証、具体的には脱窒や硝化、アナモックス反応におけるガス態窒素放出の際の同位体分別についての情報が必要であることも明らかとなった。これについては今後の検討課題であり、実際に次年度の研究提案に盛り込んでおり、本研究での成果をさらに発展させる予定である。これらの成果については国外から研究者を招聘し検討会を行ったりすることを通じて論文化を進めてきている。現在のところ、アジアだけでなくこれまで欧米で行われてきた研究との比較を含めた論文(上記とりまとめ目標A)の論文は投稿中、中国および日本の6集水域での集中観測結果も投稿中、日本の様々な地点での観測結果については、現在共同研究者とデータの解析手法についての最終打ち合わせ段階にあり、H26年度の早いうちに論文投稿できる予定である。今後はより詳細な窒素飽和林査定を可能にするための詳細なガス態窒素の安定同位体比分析とともに、より広域での調査へと展開し、本提案で得られた成果をより活用できるような環境を整備してゆきたいと考えている。

課題番号	GS008
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	森林のメタボ判定:ハイスループト硝酸同位体比測定による森林窒素循環の健全性評価
	Evaluation of nitrogen saturation of Japanese forests by stable isotopes of nitrate
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	東京農工大学大学院・農学研究院・准教授
	Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Associate Professor
氏名 (下段英語表記)	木庭啓介
	Keisuke Koba

研究成果の概要

(和文): 森林から流出してくる硝酸イオンについてその安定同位体比をハイスループトで測定し、森林の公的機能を削減する窒素飽和という現象がどれだけ生じているかを簡便にサーベイする新指標作成を試みた。同位体比から計算される渓流水中硝酸イオン中の降水硝酸イオン濃度というものが森林によって大きく異なり、渓流水中硝酸イオン濃度との関係を見ることで窒素飽和の指標となり得ることが明らかになった。今後この指標測定を数多くの森林に行うことでより詳細にこの新指標の有効性を吟味することが可能になると考えられる。

(英文): We explored the isotopic signature of streamwater nitrate (d15N, d18O and d17O) to get insights into the nitrogen dynamics in forest ecosystems, especially whether the studied watershed is nitrogen-saturated or nitrogen-limited. We found that the concentration of atmospheric nitrate in the streamwater calculated by the oxygen isotopic signature of streamwater and precipitation nitrate can be a good indicator for the nitrogen status of the studied watershed, and the application of this indicator to many forest watersheds will allow us to explore the usefulness of this new indicator to survey how vastly the nitrogen saturation is spreading in Japan.

1. 執行金額 135,200,000 円
 (うち、直接経費 104,000,000 円、 間接経費 31,200,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

森林生態系は植物による一次生産が窒素の供給速度により律速されていると考えられている。しかし、近年の人間活動により大量の窒素化合物が森林に供給され、足りなかった窒素が過剰に供給され、さらに窒素を使い切れない状態になっている、と考えられるようになってきた。この、外部からもたらされた窒素を森林内部の植物・微生物が利用できずに森林外へと流出させてしまう状態を「窒素飽和」状態と呼ぶが、この人間におけるメタボリックシンドロームに値する状態が世界中の森林で生じているのではないかと危惧されている。この窒素飽和に森林が陥ると、様々な「症状」、たとえば植物の光合成の低下、土壌からの一酸化二窒素の放出、メタン吸収能の低下、下流生態系への窒素流出など、森林の公益的機能の劣化が生じると考えられている。

このように窒素飽和状態の森林というのは健全な国民生活に果たす森林の公益的機能を低下させてしまうという点で問題であるが、実際には、どれだけ日本の森林が窒素飽和状態であるかはほとんどわかっていない。その理由は、森林が窒素飽和であるか否かの判定に、長期間にわたる詳細な窒素の収支測定(どれだけ窒素が降水によってもたらされ、どれだけ窒素が渓流水にとけ込んで流出してしまうかを観測し計算すること)が必要であるためである。この収支測定には大変なマンパワーが必要であるため、ごく限られた森林においての調査が行われているだけであり、簡便に森林の窒素飽和状態をサーベイできる新たな手法が求められている。

そこで本研究では森林から流出する窒素の大部分を占める硝酸イオンに着目した。この硝酸イオンの持つ酸素安定同位体比(16O と 18O の自然存在比)は降水硝酸イオンと土壌中で微生物によって生成される土壌硝酸イオンでは大きな違いを持つため、渓流水中の硝酸イオンについての酸素安定同位体比測定を行うことで、渓流水中にどれだけ降水硝酸イオンが利用されずにとけ込んでいるかがわかる(図 1)。窒素飽和森林であれば降水窒素が使い切れない状態であるため、渓流水中に高濃度で降水硝酸イオンが混じっていると考えられ、これを使えば簡便に森林の窒素飽和状態を診断することが可能であると考えた。この硝酸イオンの安定同位体比を窒素飽和診断の新指標として利用するための検討を本研究では行うこととした。

4. 研究計画・方法

硝酸イオン同位体比による新指標が窒素飽和診断に有効であるかを見るために、様々な窒素状態(窒素制限から窒素飽和と考えられる状態)の森林集水域を対象として、降水・渓流水そして土壌中の硝酸イオンの測定を行うことが必要であった。

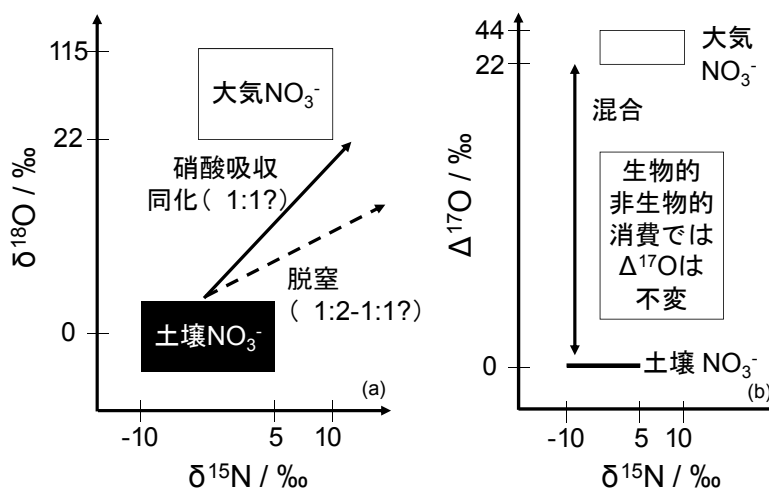


図 硝酸イオンの窒素と酸素安定同位体比 (a)、酸素安定同位体比異常 (b) の特徴。降水と土壌で大きく異なることを利用する。

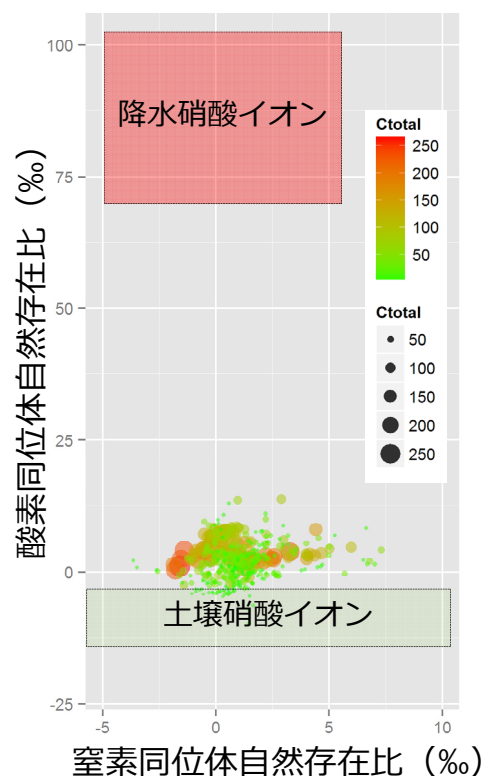
つまりかなりの点数を測定することが必要であり、測定を半自動化し、年間 1000 点以上の試料を扱えるハイスループット測定環境を整えることが必要であると考えた。そこで連続フロー型ガスクロマトグラフィー連結安定同位体比質量分析計 (GC-IRMS) を購入し、前処理部分および GC 部分の改造を行う(右図)とともに、硝酸イオンを一酸化二窒素に変換するために用いる特殊な脱窒菌の大量培養環境を整えた。また多くの共同研究者から降水・渓流水・土壌水・地下水などを提供いただき、様々な森林集水域での硝酸イオン測定を行った。これらの要素を軌道に乗せることができ、本研究では 3000 点以上の試料を測定することができた。



5. 研究成果・波及効果

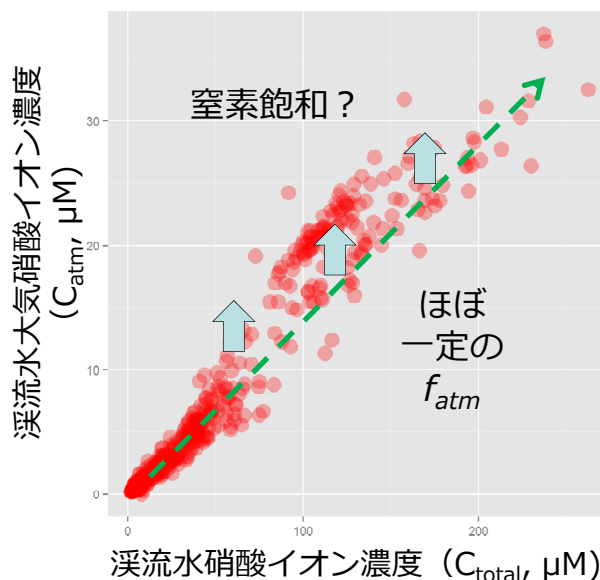
指標の有効性を議論するために、まず土壌硝酸イオンと降水硝酸イオンがどれだけ異なる酸素同位体比を持つかという点について吟味した。土壌硝酸イオンは土壌中の酸素ガスと水から酸素原子を受け継いでおり、この 2 つの酸素源がもつ酸素安定同位体比の特徴に影響される。しかし、どのような割合で土壌酸素ガスと水が硝酸イオンの酸素同位体比に影響を及ぼすかについては明確ではなく、これまでの研究では研究によってまちまちな議論を行っていた。我々は多摩川流域で土壌を採取し、土壌中の硝酸イオンについて現場に存在していたもの、培養によって生成したものそれぞれの同位体比測定を行った。すると、土壌硝酸イオンの酸素安定同位体比はこれまで予想されたものよりも遙かに低い値をとり、土壌酸素ガスの影響よりも水の影響が強いことがわかった。このことはこれまでの研究での、渓流水中降水硝酸イオン濃度の見積もりは過小評価されていることを示しており、見直しが必要であることを示唆するものである。本研究ではこの結果に基づいて、土壌硝酸イオンはほぼ水の同位体比と同じ酸素同位体比を取るとして議論を進めている。

全国の森林集水域から得られた渓流水中の硝酸イオンについてその酸素安定同位体比を測定したところ予想していたような変動は見られなかった(右図)。つまり、渓流水硝酸イオン中に含まれる降水



硝酸イオンの割合はあまり変化がなく、数%から高くても20%程度であった。降雨イベントや伐採という攪乱によってこの割合は変化を見せるものの、予想よりも小さな変動であった。いくつかの集水域において森林土壌中での硝酸イオンの挙動を見てみると、降水硝酸イオンが持つ高い酸素安定同位体比のシグナルが土壌硝酸イオンの供給によって薄められて行くのが確認された。つまり、窒素制限の森林では比較的少量

の降水硝酸イオンに比較的少量の土壌硝酸イオンが付け加わり渓流水硝酸イオンが生成され、窒素飽和の森林では大量の降水硝酸イオンに、大量の土壌硝酸イオンが窒素飽和によって刺激を受けた微生物反応(硝化反応)によって付け加わっており、結果として渓流水硝酸イオン中の降水硝酸イオンの割合はあまり変わらない、ということであることが明らかとなった(右図)。なぜこのように



に渓流水硝酸イオン中の降水硝酸イオンの割合が一定になるのかについては現在物質循環モデルを用いたシミュレーションによる検討、日本と全く異なる水文過程を持つ欧米の森林での結果との比較を通じて検討を行っているがまだ不明である。しかし、窒素が足りない森林でも窒素が足りている森林でも同じような割合で降水硝酸イオンを流亡させているという事実は世界的にも新しい知見であり、日米森林水文ワークショップでこの結果を発表した際にも多くの賞賛を得た。

新指標としては上記のように単純な降水硝酸イオンの割合、は有効でないことが明らかとなり、現在のところ渓流水硝酸イオンの濃度と酸素安定同位体比とから計算される渓流水硝酸イオン濃度中の降水硝酸濃度、さらにこれに硝酸イオンの酸素同位体比異常というもう一つの酸素同位体比指標を組み合わせたものが有効であるという結論に至っている(下図)。渓流水硝酸イオン濃度(どれだけ高濃度で硝酸イオンが渓流水に含まれているか)、そのうちにどれだけ降水硝酸濃度が貢献しているか(どれだけ直接降水硝酸イオンが利用されずに流出しているか)、酸素同位体比異常が低い(どれだけ脱窒や吸収という硝酸イオンの消費が森林内部で起きているか)という3つの指標を組み合わせることで、森林の窒素循環についての概略をとらえることが可能であり、窒素飽和林では脱窒による同位体比シグナルの異常をとらえることができることがわかった。この総合新指標を今後多くの森林に展開して行くことで、我々の水源森林が窒素飽和状態に陥っているのかというような重要な情報を国民に提供する環境を確立して行くことが可能になると期待される。

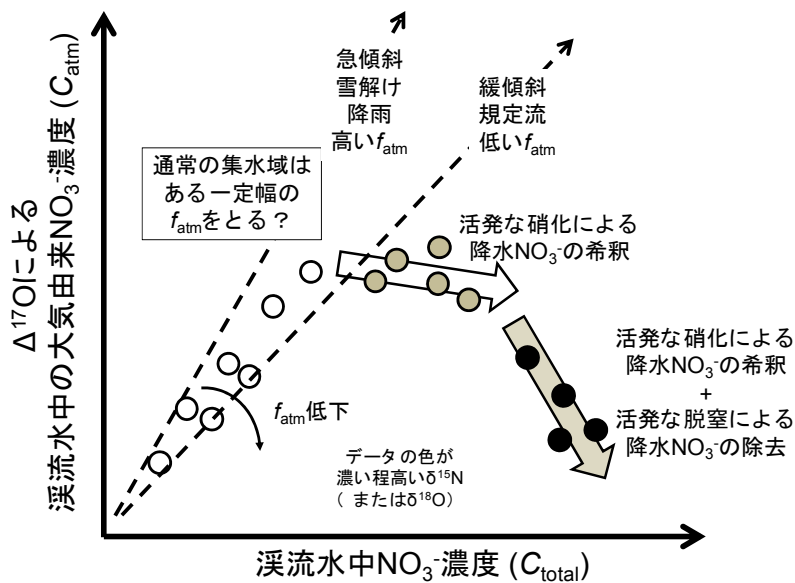


図 新指標としての $C_{total}-C_{atm}$ plot (概念図)。

6. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 16 件
計 18 件	<p>1. A. Wang, Y.-T. Fang, D.-X. Chen, K. Koba, A. Makabe, Y.-D. Li, T.-S. Luo, M. Yoh. 2014. Variations in nitrogen-15 natural abundance of plant and soil systems in four remote tropical rainforests, southern China. <i>Oecologia</i> 174: 567-580</p> <p>2. M. Yano, S. Toyoda, T. Tokida, K. Hayashi, T. Hasegawa, A. Makabe, K. Koba, N. Yoshida. 2014. Isotopomer analysis of production, consumption and soil-to-atmosphere emission processes of N₂O at the beginning of paddy field irrigation. <i>Soil Biology and Biochemistry</i> 70: 66-78.</p> <p>3. X.-Y. Liu, K. Koba*, A. Makabe, X.-D. Li, M. Yoh, C.-Q. Liu. 2013. Ammonium first: natural mosses prefer atmospheric ammonium but vary utilization of dissolved organic nitrogen depending on habitat and nitrogen deposition. <i>New Phytologist</i> 199: 407-419.</p> <p>4. X.-Y. Liu, K. Koba*, Y. Takebayashi, C.-Q. Liu, Y.-T. Fang, M. Yoh. 2013. Dual N and O isotopes of nitrate in natural plants: first insights into individual variability and organ-specific patterns. <i>Biogeochemistry</i> 114: 399-411.</p> <p>5. Y. Fang, K. Koba, M. Yoh, A. Makabe, X. Liu. 2013. Pattern of foliar $\delta^{15}\text{N}$ and its controls in Eastern Asian forests. <i>Ecological Research</i> 28: 735-748.</p> <p>6. M. Nishizawa, K. Koba, M. Makabe, N. Yoshida, M. Kaneko, S. Hirao, J. Ishibashi, T. Yamanaka, T. Shibuya, T. Kikuchi, M. Hirai, J. Miyazaki, T. Nunoura, K. Takai. 2013. Nitrification-driven forms of nitrogen metabolism in microbial mat communities thriving along an ammonium-enriched subsurface geothermal stream. <i>Geochimica et Cosmochimica Acta</i> 113: 152-173.</p> <p>7. X. Liu, K. Koba*, C.-Q. Liu, X.-D. Li and M. Yoh. 2012. Pitfalls and new mechanisms in moss isotope bio-monitoring of atmospheric nitrogen deposition <i>Environmental Science and Technology</i> 46:12557-12566</p> <p>8. Y. Fang, K. Koba*, A. Makabe, F. Zhu, S. Fan, X. Liu, and M. Yoh. 2012. Low $\delta^{18}\text{O}$ values of nitrate produced from nitrification in temperate forest soils. <i>Environmental Science and Technology</i> 46:8723-8730.</p> <p>9. X. Liu, K. Koba*, M. Yoh, C.-Q. Liu. 2012. Nitrogen and oxygen isotope effects of tissue nitrate associated with nitrate acquisition and utilization in the moss <i>Hypnum plumaeforme</i>. <i>Functional Plant Biology</i> 39:598-608.</p> <p>10. K. Isobe, K. Koba, Y. Suwa., J. Ikutani, M. Kuroiwa, Y. Fang, M. Yoh, J. Mo, S. Otsuka, K. Senoo. 2012. Nitrite transformations in an N-saturated forest soil. <i>Soil Biology and Biochemistry</i> 52:61-63.</p> <p>11. Y. Mochizuki, K.Koba*, and M. Yoh. 2012. Strong inhibitory effect of nitrate on atmospheric methane oxidation in forest soils. <i>Soil Biology and Biochemistry</i> 50:164-166.</p> <p>12. K. Isobe, K. Koba, Y. Suwa, J. Ikutani, Y. Fang, M. Yoh, J. Mo, S. Otsuka, and K. Senoo. 2012. High abundance of ammonia-oxidizing archaea in acidified subtropical forest soils in southern China after long-term N deposition. <i>FEMS Microbiology Ecology</i> 80:193-203.</p> <p>13. K. Koba, Y. Fang, J. Mo, W. Zhang, X. Lu, L. Liu, T. Zhang, Y. Takebayashi, S. Toyoda, N. Yoshida, K. Suzuki, M. Yoh, and K. Senoo. 2012. ¹⁵N natural abundance of the N lost from an N-saturated subtropical forest in southern China. <i>Journal of Geophysical Research-Biogeosciences</i>, VOL. 117, G02015, 13 PP., 2012 doi:10.1029/2010JG001615</p> <p>14. X. Liu, K. Koba*, Y. Takebayashi, C. Liu, Y. Fang, M. Yoh, X. Y. Liu, C. Q. Liu, and Y. T. Fang. 2012. Preliminary insights into delta 15N and delta 18O of nitrate in natural mosses: a new application of the denitrifier method. <i>Environmental Pollution</i> 162:48-55.</p> <p>15. Y. Sasaki, K. Koba*, M. Yamamoto, A. Makabe, Y. Ueno, M. Nakagawa, S. Toyoda, N. Yoshida, and M. Yoh. 2011.</p>

	<p>Biogeochemistry of nitrous oxide in Lake Kizaki, Japan, elucidated by nitrous oxide isotopomer analysis. Journal of Geophysical Research–Biogeosciences 116: G04030, doi:10.1029/2010JG001589.</p> <p>16. 木庭啓介 2012 広域評価を目指した室内実験および圃場観測：硝化を例とした実験室とモニタリングのつながりについての小考察、土壌の物理性 Vol. 122, 35– 39</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件</p> <p>1. 木庭啓介 2013 「森林出口同位体調査：渓流水に含まれる窒素化合物の同位体比測定から何が分かるか？」水環境学会誌 第 36 巻 第 7 号(2013)</p> <p>2. 木庭啓介, 楊 宗興. 2011 土壌圏における窒素循環と微生物 N₂O の動態を中心として 6. 同位体解析から見た窒素循環と微生物. 化学と生物. 日本農芸化学会. 49 巻. 711-717. 2011.</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 5 件</p>	<p>専門家向け 計 5 件</p> <p>1. Keisuke Koba, “Nitrogen dynamics in subtropical and temperate forests elucidated by stable isotope techniques”, Hawaii, 4-7, March, 2013 (発表は6 日), NSF-JSPS (JSPS 二国間交流事業)</p> <p>2. 木庭啓介, 「窒素酸素安定同位体比による森林生態系の窒素循環解析について」京都, 平成25 年2 月18-19日 (発表は18 日), 第二回環境同位体シンポジウム (総合地球環境学研究所)</p> <p>3. 木庭啓介, 「窒素酸素同位体トレーサーを用いた窒素循環解析：一酸化二窒素放出機構に着目して」日本水環境学会シンポジウム、東北工業大学、2011 年9 月10-11 日 (発表は10 日)</p> <p>4. 木庭啓介, 「植物の窒素安定同位体比を用いた窒素源推定の試み」日本生態学会、龍谷大学、2012 年3 月17-21 日 (発表は17 日)</p> <p>5. Koba, Keisuke, Fang, Yunting, “Recent advances of 15N analysis in stream water as indicator of nitrogen saturation in forest watershed”, Fifth EAFES International Congress, 龍谷大学、2012 年3 月17-21 日 (発表は19 日)</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 0 件</p>	<p>ございません</p>

様式21

産業財産権 出願・取得 状況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	題名: 森林のメタボ判定:ハイスループット硝酸同位体比測定による森林窒素循環の健全性評価 (最先端・次世代研究開発支援プログラム、グリーン・イノベーション) 名称: Kei Koba's website in TUAT URL: http://ecosystems.lab.tuat.ac.jp/NRI_Project.html
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>標題: 森林のメタボ判定:ハイスループット硝酸同位体比測定による森林窒素循環の健全性評価 実施日:2011年11月11-13日、農工大府中キャンパス、一般来校者対象、全体参加者不明(意見交換者約30名)内容: 学内で学園祭と同時に開催された科学技術展 2011 にて発表を行い、一般の方との意見交換を行った。ここで得られた河川や湖沼も対象にして欲しい、もっと窒素のない、人気のないところではどうなのか、という意見は H24 年度の研究計画に一部盛り込むこととした</p> <p>標題: 森林のメタボ判定:ハイスループット硝酸同位体比測定による森林窒素循環の健全性評価 実施日:2012年11月9-11日、農工大府中キャンパス、一般来校者対象、全体参加者不明(意見交換者約30名) 内容: 学内で学園祭と同時に開催された科学技術展 2012 にて発表を行い、一般の方との意見交換を行った。</p> <p>標題: 森林のメタボ判定:ハイスループット硝酸同位体比測定による森林窒素循環の健全性評価 実施日:2013年11月8-10日、農工大府中キャンパス、一般来校者対象、全体参加者不明 内容: 学内で学園祭と同時に開催された科学技術展 2013 にて発表を行い、一般の方との意見交換を行った。この際、水環境学会誌へ投稿した総説も配布した。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	ございません
その他	特にございません

7. その他特記事項

特にございません