

降水中のアミノ酸濃度の定量

森田理絵¹・宗林留美²・鈴木 款²

Determination of amino acids in rain water

Rie MORITA¹, Rumi SOHRIN² and Yoshimi SUZUKI²

Abstract Ice nucleation plays an important role in the precipitation process of supercooled water in the air. Many studies have shown that various amino acids have an effective ability for nucleation of supercooled water, but there are few studies in which amino acids were measured in rain water. To constrain better estimate of amino acids in rain water, we checked preservation and analytical method of amino acids. As the result of our examinations, we concluded that rain water is to be collected in a 50ml-polystyrene centrifuge tube and to be kept frozen in the tube until analysis. Analysis of amino acids is required to do as soon as possible by a high performance liquid chromatography (HPLC) to avoid significant decrease of amino acids which we confirmed during a preservation for 24 hours. Measurement of amino acids by a spectrofluorometer is not adequate, because high concentration of NH_4^+ causes overestimation of amino acids. NH_4^+ interfere in determination of α -aminobutyric acid and methionine, but it is removed by evaporation with a vacuum oven in the presence of 1 M borate-citrate buffer (pH 11).

Rain water samples were collected at the Mt. Norikura, Mizugatsuka Park at the Mt. Fuji and Shigaraki. Concentration of total free amino acids ranged from 219 to 3090 nmol/l, showing a large variability depending on the study area: Shigaraki samples marked one order of magnitude higher than that of the Mt. Norikura and Mizugatsuka. On the other hand, composition of amino acids was not markedly different among the three area. 11 to 47% of amino acids were comprised by glycine, serine and alanine. Our findings of the lower concentrations and major composition of amino acids are consistent with the previous results of marine rains, but the higher concentration implies the possibility of the effect of air pollution and/or Chinese loess on amino acids in rain water at Shigaraki.

Key Words: amino acid, rain water, NH_4^+

緒言

水は1気圧下では0℃で凍る。雲粒も水であるから気温が0℃以下になればすべて凍ると考えられるが自然の雲は-30℃から-40℃にまで低下しないと凍らない。蒸留水で実験をした結果、直径10μmの水滴は-40℃まで過冷却状態であり、完全に凍結した状態ではなかった(Mason, 1971)。過冷却状態の雲の中で微小な氷晶

が生まれると、氷晶の急激な成長が起こる。この時雲の中では水と氷が共存しており、氷に対する飽和水蒸気圧が水に対する飽和水蒸気圧よりも低いため、雲粒から蒸発した水蒸気は氷晶の表面に凝結し、氷晶の成長を助ける。その結果、微小な氷晶は六角柱などの形の氷晶に成長し、重力落下して雪または雨として降ってくる(Bergeran, 1935)。従って、過冷却水雲のなかで氷晶が発生することは、降水現象にとって非常に重

¹ 静岡大学理学部生物地球環境科学科, 〒422-8529 静岡市大谷836

¹ Department of Biology and Geosciences, Shizuoka University, 836 Oya, Shizuoka, 422-8529 Japan

² 静岡大学理学部地球科学教室 〒422-8529 静岡市大谷836

² Institute of Geosciences, Shizuoka University, 836 Oya, Shizuoka, 422-8529 Japan

要である。

水滴の中に水分子の結晶配列を助ける特別な物質が含まれていれば、 -40°C よりも高い温度で凍結することが可能である。水の凍結を早める粒子を凍結核といい、これに対し水蒸気から直接氷晶の生成を助ける粒子を昇華核といい、両者をまとめて氷晶核という(山崎, 1993)。大気中において氷晶核として働く物質には直径 $0.1 - 1.5\ \mu\text{m}$ の大きさの土壌粒子、特にカオリナイト、モンモリロナイトなどの粘土鉱物が挙げられ、これらが氷晶核として作用することは低温槽を用いた室内実験でも確認されている(Mason, 1960; Isono *et al.*, 1960)。また、田中(1991)は、火山灰や黄砂の粒子が氷晶核数の増加をもたらすことを報告している。これらの観測および実験結果から、大気中の氷晶核には天然土壌に由来する粘土鉱物粒子が重要であると推定されている。また、Vonnegut(1947)はヨウ化銀の格子常数と水の格子常数の類似性から、ヨウ化銀が人工氷晶核としてすぐれた能力をもっていることを指摘している。これらの氷晶核化の温度は、カオリナイト、モンモリロナイトでは -13°C から -9°C 、黄砂では -15°C から -12°C 、ヨウ化銀では -4°C から -8°C である(村上, 1998)。

同様にPower & Power(1962), Parungo & Lodge(1967), Evans(1966)は数種のアミノ酸が -10°C 以上で氷晶核化作用を有することを発見した。このことは、アミノ酸は他の氷晶核に比べて、比較的暖かい上空でもより有効に氷晶核として働くことを意味している。この機構として、アミノ酸の分子双極子モーメントが大きく関係していることや、アミノ酸と水分子との間の水素結合が重要な役割を果たしていることが明らかになった(Mason, 1971)。大気中のアミノ酸粒子は植物破片、孢子、花粉やバクテリアなどの生物起源の有機物粒子であり、大気輸送の過程で拡散されて上空に舞い上がると考えられる。しかし、これまでの大気中のアミノ酸に関する研究のほとんどはcloud chamberを用いた氷晶核化室内実験であり、実際に降水中のアミノ酸濃度を分析した報告例は極めて少なく、海洋上のエアロゾルや降水中のアミノ酸濃度を測定したMopper & Zika(1987)やGorzelska & Galloway(1990)などに限られている。

以上のことから、本研究は降水中のアミノ酸を正確に定量する手法を確立することを目的として、降水の採取と保存法およびアミノ酸の測定方法の検討を行った。本論文では特別な表記のない限り、アミノ酸は全て遊離アミノ酸を指し、タンパク質やペプチドのように共有結合しているものは含まない。

保存方法の検討

(方法)

降水を採取する際に、アミノ酸の濃度に影響しないような採取・保存容器を検討する必要がある。そこで、既知濃度のグリシン標準溶液を容器に入れて保存し、濃度の変動を経時的に観察した。容器には材質の異なる以下の3種類を用いた。(1)個別包装、 γ 線滅菌済み、内蓋つきの100 mlポリエチレン容器、(2)2%エキストランと25%塩酸で洗浄した後、 110°C 20分でオートクレーブにより滅菌した100 mlポリプロピレン容器、(3) γ 線滅菌済み、50 mlポリスチレンの遠沈管である。各容器にグリシン標準溶液 $2\ \mu\text{mol/l}$ と $7\ \mu$

mol/l をそれぞれ入れ冷凍保存し、6時間後、24時間後、1週間後にアミノ酸濃度の測定を行った。

また、降水試料の安定性を観察するために、降水試料を採取後冷凍保存し、6時間後、24時間後、1週間後、3ヶ月後にアミノ酸濃度を測定した。容器は50 ml遠沈管を使用し、同一試料から経時的に一部を採取した。そのため、測定毎に試料の解凍と凍結の繰り返しを行った。加えて、降水中の粒子によるアミノ酸測定への影響を確認するため、ろ過により粒子を除去したろ液と未ろ過の降水でアミノ酸濃度を比較した。ろ過にはGF/Fフィルター(公称の孔径 $0.7\ \mu\text{m}$)を 500°C 、3時間で燃焼処理し、有機物を除去して使用した。容器は50 ml遠沈管を使用し、ろ過後測定まで冷凍保存した。これらの実験には静岡で2001年1月と2月に採取した降水を用いた。降水の採取は採取面直径45 cm(採取面積約 $0.07\ \text{m}^2$)の自動降雨採取器を用いて行った。自動降雨採取器の漏斗はサンプリングする直前にアセトン(20%)とMill-Q水(MILLIPORE社の超純水装置: Mill-Q SP TOCを用いて精製した水)で約1ℓ以上、十分に洗浄した。さらに、採取容器を交換する度に漏斗を約500 mlのMill-Q水で洗浄した。試料は採取容器から移し替えずに、すぐに冷凍保存した。

アミノ酸の定量は、Lindroth & Mopper(1979)とParsons *et al.*(1984)に従い、アミノ酸をオルトフタルアルデヒド(OPA)で蛍光誘導化した後、蛍光光度計で行った。具体的には、試料に等量のOPA混合試薬を加えよく混合し、室温で約2分間反応させた後、測定条件を励起波長342 nm、蛍光波長452 nmに設定した蛍光光度計(RF-5300PC; SHIMADZU)を用いて蛍光強度を測定した。OPA混合試薬は、OPA $0.2\ \text{g}$ をエタノール20 mlに溶解したOPA溶液20 mlにpHを 9.5 ± 0.02 に調整したホウ酸緩衝液400 mlと高純度の2-メルカプトエタノール1 mlを加え、1時間安定させてから使用した。検量線の作成にはグリシン標準溶液を用い、傾きとブランクから試料のアミノ酸濃度を算出し、アミノ酸濃度をグリシン当量で表記した。ブランクには試料の代わりにMill-Q水をOPA混合試薬と反応させたものを用いた。同一試料の測定繰り返し誤差は $\pm 2.5\%$ であった。蛍光光度計で測定した検量線の測定限界は $0.01\ \mu\text{mol/l}$ であった。

(結果と考察)

2種類の濃度のグリシン標準溶液を3種類の保存容器で長期冷凍保存した場合の、アミノ酸濃度の経時変化を表1に示した。全期間を通じて、容器間におけるアミノ酸濃度には有意な違いは見られなかった(student's *t*-test, $P > 0.03$; $n = 6$)。よって、今後の試料採取では、使用しやすいポリスチレン製の50 ml遠沈管を使用する。さらに表1から、時間経過するにしたがって標準溶液 $2\ \mu\text{mol/l}$ 、 $7\ \mu\text{mol/l}$ ともに濃度がわずかながらも減少していることがわかった。ポリスチレン製の50 ml遠沈管を用いた場合、6時間後から24時間後または6時間後から1週間後までの減少は $2\ \mu\text{mol/l}$ の溶液で3.2 - 4.3%であるのに対し、 $7\ \mu\text{mol/l}$ の溶液では1.3 - 1.2%となった。この結果は、1週間保存を行うとアミノ酸の分解または容器内壁への吸着が生じ、アミノ酸濃度が希薄な場合にその影響が無視できないことを示唆している。アミノ酸濃度が希薄な濃度の降水試料はこの影響を大きく受ける。従って、試料はできるだけ早く測定する必要がある。

図1に静岡で連続的に採取した降水試料を3ヶ月間

表1 冷凍保存期間による保存容器間でのグリシン標準溶液のアミノ酸濃度の比較.

Table 1 Comparison of amino acids concentration of glycine standard among collection bottles during preservation in a freezer.

standard of glycine	preservation period	concentration of amino acids($\mu\text{mol/l}$)*		
		reserved in		
		polystyrene	polyethylene	polypropylene
2 $\mu\text{mol/l}$	6 hours	2.03	2.06	2.07
	24 hours	1.97	2.00	1.98
	one week	1.94	1.95	1.97
7 $\mu\text{mol/l}$	6 hours	7.15	7.21	7.21
	24 hours	7.05	7.12	7.10
	one week	7.06	7.06	7.02

*Average of duplicated measurements.

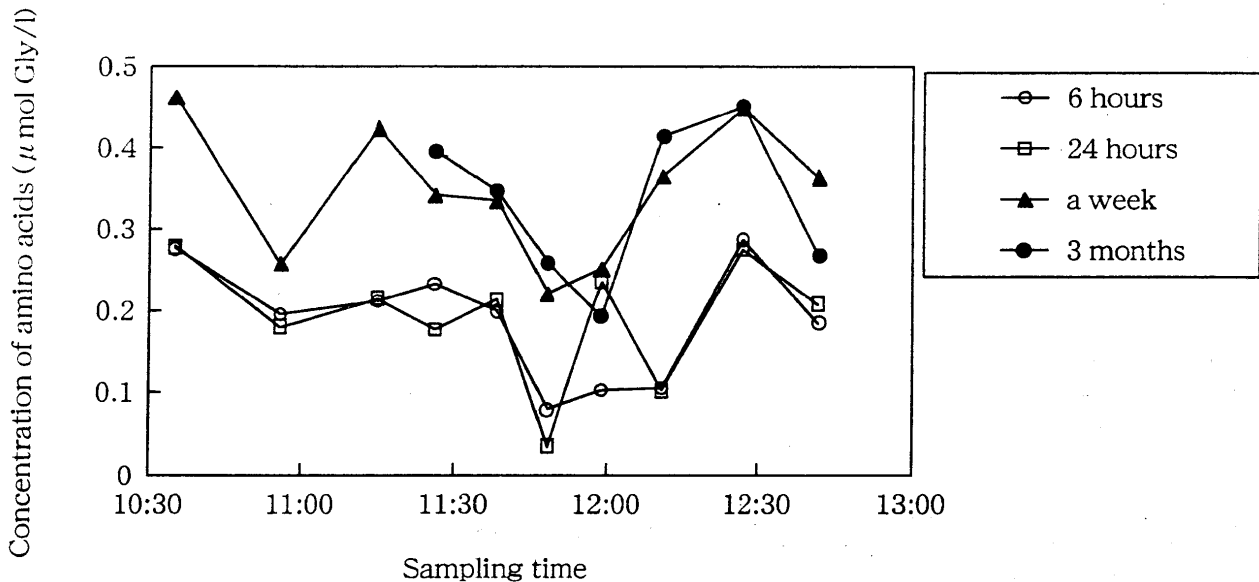


図1 冷凍保存期間による降水中のアミノ酸濃度の違い。(2001年2月1日静岡における降水)

Fig. 1 Comparison of amino acids concentration in rain water among preservation period in a freezer. (Sampled at Shizuoka university on February 1, 2001)

長期冷凍保存した場合のアミノ酸濃度の変動を示した。冷凍開始から6時間後の試料と比較して、24時間後の試料には顕著な変化はみられなかった。しかし、1週間後と3ヶ月後の試料中のアミノ酸濃度は6時間後に比べて明らかに高くなった。この結果は、同一試料を測定毎に解凍、冷凍を行ったために、途中でペプチドなどの結合態アミノ酸の分解が生じ、遊離アミノ酸が増加したことを示していると考えられる。従って、試料を測定まで確実に冷凍保存することが重要である。

静岡の降水試料を孔径0.7 μm のフィルターによりろ過し、その前後でアミノ酸濃度を比較した結果を図2に示した。未ろ過の降水とろ液ではアミノ酸濃度に有意な違いは見られなかった (student's *t*-test, $P > 0.59$; $n = 6$)。このことから、降水中に存在する0.7 μm より大きい粒子への遊離アミノ酸濃度への影響は小さいと考えられる。よって、遊離アミノ酸を測定する際には、試料のろ過を行わないことにした。

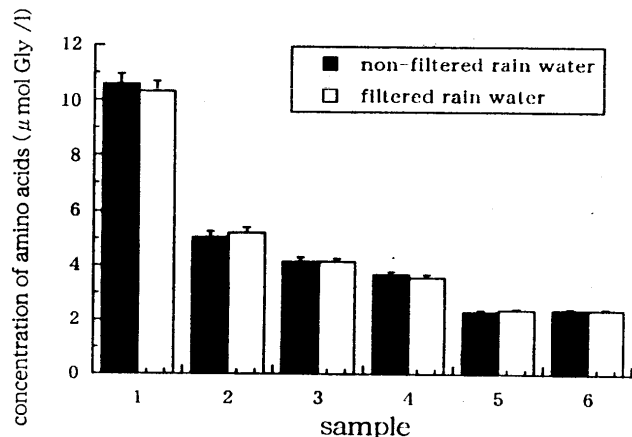


図2 ろ過前後による降水中のアミノ酸濃度の比較。(2001年1月7日静岡における降水) 横軸の1-6は試料名である。

Fig. 2 Comparison of amino acids concentration between filtered and non-filtered rain water. (Sampled at Shizuoka university on January 7, 2001) X-axis(1-6) means a name of rain water sample.

表2 蛍光光度計とHPLCによるアミノ酸濃度(AA)の比較

Table 2 Concentration of amino acids (AA) analyzed by a Spectrofluorometer and HPLC.

sample		HPLC-AA (nmol/l)	spectrofluorometer-AA (nmol Gly /l)
standard of amino acids	5 nmol/l	95 ¹	120±10 ²
(including 19 amino acids)	10 nmol/l	190 ¹	190±10 ²
	20 nmol/l	380 ¹	370±10 ²
rain water	Mt. Norikura (Sep.)	479	930
	Mizugatsuka Park (Jun.)	1115	8210
	Mizugatsuka Park (Jul.)	138	280

¹ Multiplied each concentration by 19.² Average±standard deviation (n=3).

測定方法の検討

蛍光光度計と高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography ; HPLC)によるアミノ酸測定値の比較

(方法)

アミノ酸の定量法を検討する目的で、蛍光光度計と高速液体クロマトグラフィー (HPLC)でアミノ酸混合標準溶液と降水試料中のアミノ酸を測定し、値を比較した。HPLCは逆相ODSカラム(CAPCELL PAC C18 ; 資生堂)を装着したNANOSPACE(資生堂)を使用し、溶離液にpH 7の0.05 mol/l酢酸緩衝液とメタノールを用い勾配溶離を行った。試料2 mlにpH 11の1 mol/lホウ酸-クエン酸緩衝液20 μlを加えてpHを8-9に調整した後、OPA混合試薬20 μlを加えて正確に2分間反応させ、HPLCに導入した。OPA混合試薬はOPA0.1 gをメタノール2 mlに溶解後、2-メルカプトエタノール100 μlと1 mol/lホウ酸-クエン酸緩衝液0.5 mlを加えて、4℃で一晩保存した後使用した。定量は19種類のアミノ酸について行った。標準試料には15種類のアミノ酸が含まれているアミノ酸混合標準溶液、H型(和光純薬工業)に4種類を加えた標準溶液を用いた。H型標準溶液に含まれる15種類のアミノ酸はアスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、ヒスチジン(His)、セリン(Ser)、アルギニン(Arg)、グリシン(Gly)、スレオニン(Thr)、チロシン(Tyr)、アラニン(Ala)、メチオニン(Met)、バリン(Val)、フェニルアラニン(Phe)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、リシン(Lys)である。これに加えた4種類はオルニチン(Orn)、β-アラニン(β-Ala)、α-アミノ酪酸(α-Aba)、およびγ-アミノ酪酸(γ-Aba)である。なお、測定の際に使用したバイアルはすべて予め550℃で5時間以上燃焼処理したものを用いた。

(結果と考察)

表2にアミノ酸混合標準試料に含まれる19種類の各アミノ酸の濃度が5 nmol/l, 10 nmol/l, 20 nmol/lの時に、アミノ酸混合標準溶液を蛍光光度計で測定した結果を示した。また、図3 aにアミノ酸混合標準試料をHPLCで測定した場合のクロマトグラムを示し、降水試料の結果を表2と図3 bに示した。混合標準試料のクロマトグラムはアミノ酸の種類により蛍光強度が異なることを示したが(図3 a)、蛍光光度計によるアミノ酸混合標準溶液の測定値は含まれる19種のアミノ酸に各濃度(5 nmol/l, 10 nmol/l, 20 nmol/l)をかけた理

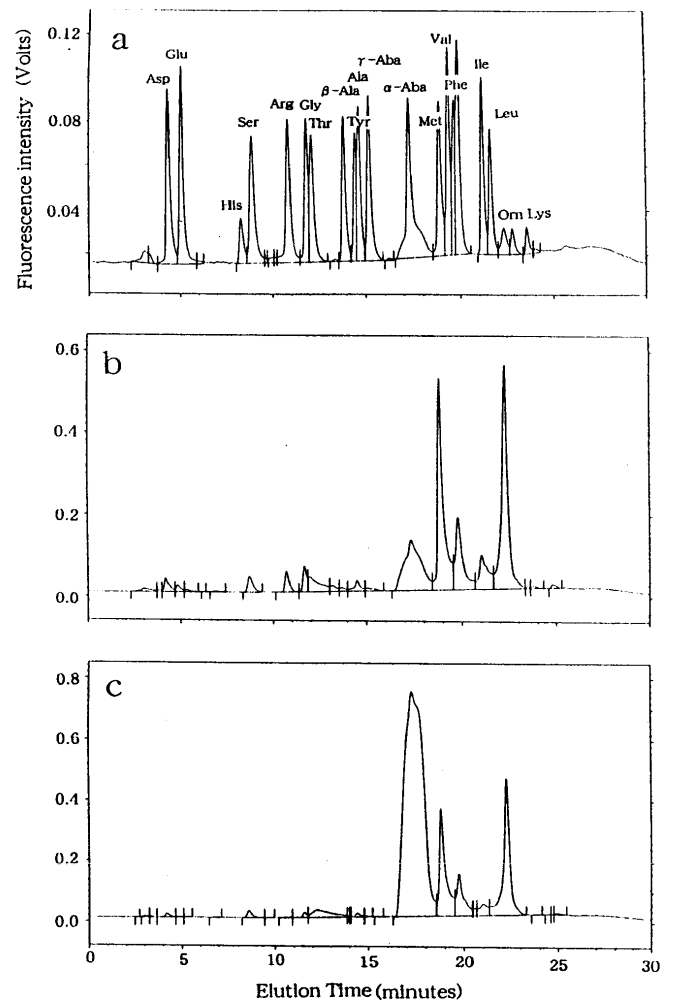


図3 HPLCのクロマトグラム。a:アミノ酸混合標準溶液、b:降水試料(2001年6月30日富士山麓水ヶ塚公園における降水)、c:アンモニア標準溶液

Fig. 3 Chromatogram obtained by HPLC. a: standard of amino acids, b: rain water (Mizugatsuka Park on June 30, 2001), c: standard of NH₄⁺

論値とほぼ一致した(表2)。蛍光光度計の測定には標準溶液としてグリシンを用いたが、この結果よりグリシンによるアミノ酸の代表性に問題はないと考えられる。

しかし、降水試料を蛍光光度計とHPLCで比較した結果、蛍光光度計のほうがHPLCよりも濃度が2倍から8倍高い値となった(表2)。OPAと反応する第一級アミンにはアミノ酸の他にNH₄⁺があるため、NH₄⁺濃度が高いサンプルではアミノ酸濃度が過大評価になる。蛍光光度計ではアミノ酸とNH₄⁺を分離できないため、表2の結果は蛍光光度計による測定ではサンプルによってアミノ酸量を過大評価することを示唆している。中村修論(2000MS)は乗鞍岳と水ヶ塚公園でのNH₄⁺濃度として8.3~139 μmol/lという結果を報告している。NH₄⁺濃度の変動が顕著なのは降水強度や降水量に依存していると考えられる。また、二酸化窒素(NO₂)、アンモニア(NH₃)などの大気中の窒素化合物は人間活動の影響を大きく反映し、時空間的に大きな変動を示すことが知られており、NH₄⁺エアロゾルは家畜の排泄物に含まれるNH₃と硫酸粒子や酸性ガスとの反応により生成したものが41%を占める(笹川・植松, 2001)。他の主な起源は肥料と農地(28%)、生物燃焼(11%)、人間の排泄物(5%)と続き、海洋表面からの放出は15%である(Bouwman *et al.* 1997)。このことから陸域においては、アンモニアの大気への放出量は大きく、降水に溶存し、降水中にNH₄⁺の状態が多く存在しているといえる。水ヶ塚公園のNH₄⁺濃度を静岡県環境衛生センターにてイオンクロマトグラフィー(DX-500; DIONEX)を用いて測定し、蛍光光度計によるアミノ酸量の測定値と比較した結果を図4に示した。測定は、前処理と

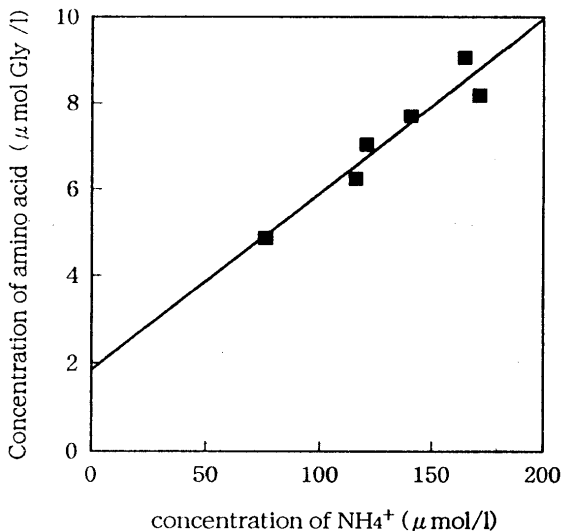


図4 降水中のNH₄⁺濃度と蛍光光度計で測定したアミノ酸濃度の比較。(2001年6月30日富士山麓水ヶ塚公園における降水)

Fig. 4 Relationship between NH₄⁺ concentration and amino acids concentration in rain water at Mizugatsuka Park on June 30, 2001. Amino acids concentration was measured by a spectrofluorometer.

して孔径0.45 μmのHPLC処理用ディスクフィルターを用いて試料をろ過し、ろ液を1mlのポリプロピレン容器に入れて行った。NH₄⁺濃度は76 μmol/lから171 μmol/lであり、比較的高い値を示した(図4)。また、蛍光光度計によるアミノ酸濃度の測定値はNH₄⁺濃度と有意に相関(r² = 0.92, n = 6, P<0.002)し、蛍光

光度計によるアミノ酸濃度の定量にNH₄⁺濃度が影響する可能性を示した。

図3cにアンモニアの標準試料をHPLCで測定したときのクロマトグラムを示した。これをアミノ酸混合標準溶液のクロマトグラム(図3a)と比較すると、α-アミノ酪酸(α-Aba)、メチオニン(Met)、バリン(Val)、そしてフェニルアラニン(Phe)とピークの箇所が重なった。アンモニア標準溶液を0.1 μmol/l, 1 μmol/l, 10 μmol/lの濃度で作成し検量線を作成した結果、α-アミノ酪酸とメチオニンと同じ溶出時間を持つピークがアンモニア濃度の増大と共に突出し、アンモニア濃度と高い相関(r² = 0.9998, 0.9997)を示した。従って、高濃度のNH₄⁺が存在する降水試料ではα-アミノ酪酸とメチオニンのピークが強い影響を受け、この2つのアミノ酸を正確に定量できない。非タンパク構成アミノ酸であるα-アミノ酪酸は海水中や河川水中では全溶存遊離アミノ酸濃度に対して最大4%を占めることが報告がされている(多田・米田, 1998)。従って、アミノ酸全量を正確に定量するためには、NH₄⁺の除去が極めて重要である。

NH₄⁺の除去の検討

(方法)

NH₄⁺は塩基性条件下で加熱すると、



の反応が生じ、アンモニアNH₃として溶液から蒸発する。しかし、降水のpHは一般に3から5の弱酸性であることが知られている。そこで、アミノ酸濃度に影響を与えずにNH₄⁺を効率よく除去する方法を、降水試料とアミノ酸混合標準試料に対して(1)蒸発乾固、(2)塩基性にした後、蒸発乾固、そして(3)蒸発乾固の処理をしない(コントロール)と比較、検討した。蒸発乾固は、初め、減圧下でホットプレートにより加熱する方法により行った。具体的には、試料0.2 mlを分注したアミノ酸測定用の5 mlガラスバイアルをデシケーターに入れ、水流アスピレーターによりデシケーター内部を減圧しながらデシケーターを載せたホットプレートを約95℃に加熱して、試料を完全に蒸発乾固させた。しかしこの方法では乾固するまでに約5時間を要したため、真空乾燥機を用いて乾固する方法に替えた。その際、蒸発に要する時間を短縮するため、底面積の大きい秤量びんに試料0.2 mlを分注し、45℃に設定した真空乾燥機に秤量びんを並べて内部を真空にした。この時、試料の飛散を防ぐため減圧にする際にはゆっくり行い細心の注意を払った。その結果、約1.5時間で試料を乾固させることに成功した。秤量びんから測定用バイアルに移す操作の回収率を求めたところ、降水試料の場合、回収率は97.8%、繰り返し誤差9%以内の値を得た。乾固した試料はMill-Q水2 mlに溶解した後、pH11の1 Mホウ酸-クエン酸緩衝液20 μlを添加した後、OPA混合試薬と反応させてHPLCで測定した。蒸発乾固前に試料を塩基性にする場合は、試料0.2 mlを容器に分注し、pH11の1 Mホウ酸-クエン酸緩衝液20 μlを添加した後に真空乾燥機を用いて蒸発乾固を行い、乾固後の試料をMill-Q水2 mlに溶解してOPA混合試薬と反応させて測定した。コントロールは試料2 mlと同ホウ酸-クエン酸緩衝液20 μlを加えた後、OPA混合試薬と反応させて測定した。

(結果と考察)

図5 aにアミノ酸混合標準溶液20 nmol/lを、図5 b

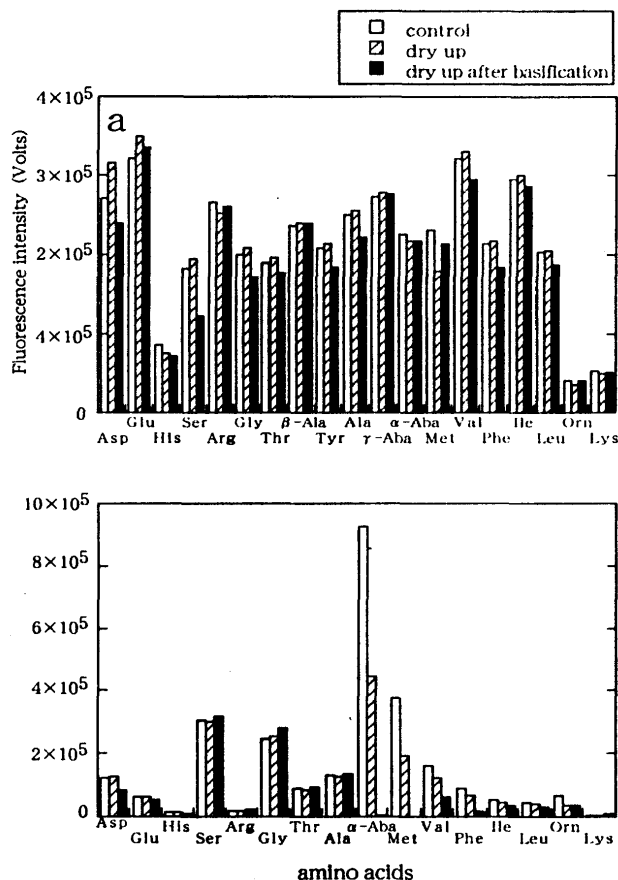


図5 真空乾燥機によるNH₄⁺除去の効果。a: アミノ酸混合標準試料 b: 降水試料 (2001年5月23日信楽における降水)
Fig. 5 Changes in Fluorescence intensity of samples by removal of NH₄⁺ with a vacuum oven. a: standard of amino acids, b: rain water at Shigaraki on May 23, 2001.

に2001年5月23日の信楽における降水試料を真空乾燥機で蒸発乾固した結果をそれぞれ示した。混合標準溶液では、コントロール、蒸発乾固、塩基性条件下で蒸発乾固の、3つの試料の蛍光強度の違いは小さかった(図5 a)。一方、降水試料では、塩基性条件下で蒸発乾固した試料中のアミノ酸ピークの蛍光強度の減少率はコントロールに対してα-アミノ酪酸99.7%、メチオニン100%、バリン63.4%、フェニルアラニン80.3%となり、この減少は塩基性にしないで蒸発乾固した試料よりも顕著であった(図5 b)。しかし、上記4つ以外のアミノ酸のピークについては、コントロールで検出限界以下であったβ-アラニンとスレオニンを除いて、変動は明らかに小さかった(図5 b)。これらの結果から、塩基性条件下での蒸発乾固はアミノ酸に影響せずにNH₄⁺濃度の減少を促す効果があると考えられる。今後、塩基性条件下で蒸発乾固した試料中のNH₄⁺濃度をイオンクロマトグラフィーで測定し、NH₄⁺の正確な除去率を算出する必要がある。

降水試料の分析

(観測地点)

降水試料の採取地点を図6に示した。採取は岐阜県乗鞍岳(標高2770m)と富士山麓水ヶ塚公園(標高

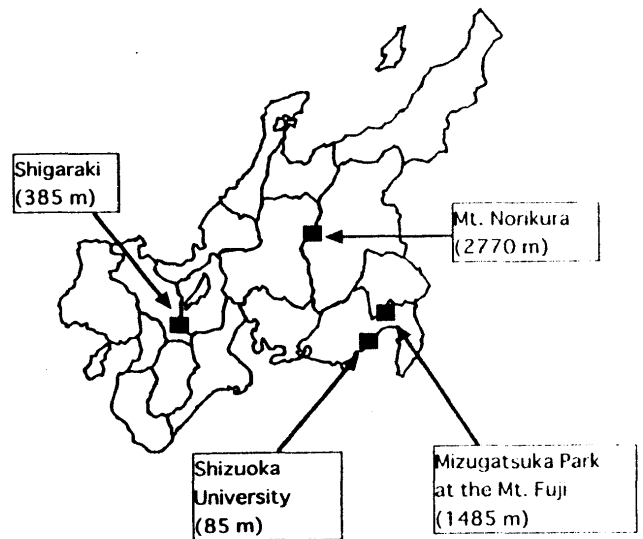


図6 降水試料の採取地点。
Fig. 6 Sampling stations of rain water.

1485 m)、および滋賀県信楽観測所(標高385 m)の3地点で行った。岐阜県乗鞍岳では、乗鞍岳山頂付近にある東京大学宇宙線研究所観測所で2001年9月13日から17日の期間、観測を行った。乗鞍観測所は森林限界に近く、周囲には高木はほとんどみられず、排気ガス等の人為起源の汚染物質の影響は他の3地点に比べて極めて低いと考えられる。富士山麓水ヶ塚公園の観測は、静岡県環境衛生科学研究所と共同で2001年6月25日から7月7日に行った。水ヶ塚公園は富士山の中腹にあり、北側に富士山頂、南側に富士市街地と駿河湾が位置する。富士市街地から離れているため都市域からの汚染による影響は低いと考えられるが、多少の車の往来や人通りがある。滋賀県信楽の観測は、京都大学宇宙電波研究センターで2001年5月12日から23日にかけて行った。観測所から離れたところを国道422号線が通っているが、観測所は国道から細い林道に入った小高い山の上であり、周辺には林が広がっている。信楽では3月から5月の期間に中国大陸から飛来してくる黄砂が観測されている。以上の地点で降水採取と同時にポータブル型気象観測ステーション(Mini-Met03; Phoenix)を設置して、気温、相対湿度、風向、風速、降水量、日射量、大気圧を測定したが、本論文ではアミノ酸の結果のみを示した。

(結果と考察)

乗鞍岳、富士山麓水ヶ塚公園および信楽における降水中のアミノ酸濃度をHPLCで測定した結果を表3に示した。NH₄⁺濃度の強い影響により、定量性の良くないα-アミノ酪酸、メチオニン、バリン、フェニルアラニンを除いた15種類のアミノ酸の結果のみ表記した。15種類のアミノ酸の総量は乗鞍では403 nmol/l、水ヶ塚では218 nmol/lと311 nmol/lであった。一方、信楽の値は2747 nmol/lと3090 nmol/lと水ヶ塚の約10倍であり、他の2地域に比べて非常に高かった。表4に15種類のアミノ酸の総量に対する各アミノ酸のモル分率を示した。アミノ酸組成は3地点すべてでグリシンの割合が高く、乗鞍と信楽ではグリシンの他にセリンとアラニンの割合が高い傾向が見られた。これに対し、水

表3 乗鞍, 水ヶ塚, 信楽における降水中のアミノ酸濃度 (nmol/l).
Table 3 Amino acids concentration in rain water at the Mt. Norikura, Mizugatsuka and Shigaraki (nmol/l).

Sample		Mt. Norikura	Mizugatsuka Park		Shigaraki	
		14 Sep. '01	30 Jun. '01	7 Jul. '01	22 May '01	23 May '01
amino acids (nmol/l)	Asp	31	13	12	198	259
	Glu	8	5	7	55	69
	His	12	0	0	31	106
	Ser	124	30	19	603	1051
	Arg	4	5	6	41	16
	Gly	82	75	57	491	758
	Thr	25	36	0	201	260
	β -Ala	0	0	15	43	0
	Tyr	0	26	8	0	0
	Ala	32	0	16	233	331
	γ -Aba	1	0	10	59	0
	Ile	7	54	24	64	79
	Leu	10	0	42	80	90
	Orn	61	0	0	576	0
	Lys	8	66	3	73	70
total (nmol/l)		403	311	219	2748	3090

表4 乗鞍, 水ヶ塚, 信楽における降水中のアミノ酸組成 (mol %).
Table 4 Composition of amino acids (mol %) in rain water at the Mt. Norikura, Mizugatsuka and Shigaraki (%)

Sample		Mt. Norikura	Mizugatsuka Park		Shigaraki	
		14 Sep. '01	30 Jun. '01	7 Jul. '01	22 May '01	23 May '01
amino acids	Asp	8	4	5	7	8
	Glu	2	2	3	2	2
	His	3	0	0	1	3
	Ser	31	10	9	22	34
	Arg	1	1	3	1	1
	Gly	20	24	26	18	25
	Thr	6	12	0	7	8
	β -Ala	0	0	7	2	0
	Tyr	0	8	4	0	0
	Ala	8	0	7	8	11
	γ -Aba	0	0	5	2	0
	Ile	2	17	11	2	3
	Leu	2	0	19	3	3
	Orn	15	0	0	21	0
	Lys	2	21	1	3	2

ヶ塚ではイソロイシンが高い値を示した。また、サンプリング期間の間隔が比較的に短かった水ヶ塚と信楽において、採取日よりそれぞれロイシンとリシンまたはオルニチンが大きく変動した。乗鞍においてもオルニチンは高い割合を示したが、降水試料では、この3つのアミノ酸は他に比べて再現性が低かったため、今後さらに分析法を改良する必要がある。

Mopper & Zika (1987) はフロリダのマイアミ沖における降水中のアミノ酸濃度を測定し、アミノ酸15種類の総量が330 nmol/lから556 nmol/lで、セリン、グリシン、アラニンが優勢であると報告している。本研究では乗鞍と水ヶ塚の値がこれに近い値 (219-403 nmol/l) を示した。しかし、信楽では一桁高い濃度 (2748-3090 nmol/l) を観測しており、人為的汚染や黄砂による降水中のアミノ酸濃度への寄与や晴天時と雨天時の期間の長さといった地域的な違い、または降

り始めから採取までの経過時間が関係することが考えられる。

一方、アミノ酸組成については乗鞍と信楽でセリン、グリシン、アラニンが高い割合を示し、Mopper & Zika (1987) のマイアミ沖の観測結果と一致した。この3種のアミノ酸は細菌の主要構成アミノ酸であり (Simon & Azam, 1989)、降水中でも細菌が存在すること (夏目・鈴木, 2001) から、その起源の一つとして細菌が示唆される。しかし、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸も細菌の主要構成アミノ酸である (Simon & Azam, 1989) が、降水に含まれる両者の割合は低かった (表4)。このことは、アミノ酸が氷晶核となるためにはセリンやグリシンのように中性であるか、またはアラニンのように疎水性であるといったアミノ酸の電気的な性質が関与している可能性が考えられる。

まとめ

大気中や降水中のアミノ酸の濃度を分析した報告例は比較的少なく、採取方法や保存方法から詳しい検討実験を行っている研究はほとんどない。そのため本研究では、アミノ酸の測定方法と共に保存容器、保存方法、保存期間の検討を行った。その結果を以下に示す。

- ・降水採取には、ポリスチレン製の50 ml遠沈管を用いる。
- ・採取後はろ過は行わずに-20℃で冷凍保存し、採取からできるだけ1週間以内に測定を行うのが良い。
- ・解凍と凍結を繰り返すとアミノ酸濃度が高くなる現象が確認され、測定するまで試料を確実に冷凍させることが重要である。
- ・測定にHPLCを用いたことにより、降水に溶存しているNH₄⁺濃度が高い場合に蛍光光度計による定量ではアミノ酸を過大評価することがわかった。
- ・HPLCで測定する前にpH 11の1 Mホウ酸-クエン酸緩衝液を添加して真空乾燥機で蒸発乾固を行うことでNH₄⁺濃度を低くし、アミノ酸をより正確に定量できるように分析法を改良した。

乗鞍、水が塚、信楽における降水中のアミノ酸の値は219 nmol/lから3090 nmol/lの範囲を示した。試料を採取した地点によりアミノ酸濃度が大きく異なり、同じ地点でも日によって組成が異なったことから、今後はさらに多くの試料を分析して降水中のアミノ酸と観測地点の標高や地形、気象条件などとの関連を調べる必要がある。

謝辞

東京大学海洋研究所の小川浩史博士をはじめとする研究員の方々には分析の際に多大なる御助力を頂きました。水ヶ塚公園観測においては、静岡県環境衛生研究所の太田良和弘さんをはじめとする職員の方々、乗鞍岳観測においては、東京大学宇宙線研究所乗鞍観測所の職員の方々、信楽観測においては、京都大学宇宙電波研究センター信楽MU観測所の職員の方々に観測施設やデータ提供等の御協力をいただきました。御協力いただいたすべての方々に深く御礼申し上げます。

引用文献

- Bergeron T. (1935), *On the physics of clouds and precipitation*. Proc.5th Assembly UGGI, Lisbon, 2, 156p.
- Bouwman A. F., Lee D. S., Asman W. A. H., Dentener F. J., Van Der Hork K. W. & Olivier J. G. J. (1997), A global high-resolution emission inventory for ammonia. *Global Biogeo-chemical Cycle*, 11, 561-587.
- Evans L. F. (1966), Ice Nucleation by Amino Acid. *Journal of the atmospheric sciences*, 23, 751-752.
- Flynn K. J. & Butler I. (1986), Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. *Marine Ecology Progress Series*, 34, 281-304.
- 磯野謙治 (1979), 大気汚染物質の動態. 大気環境の科学 2, 東京大学出版会, 東京. 257p.
- Isono K. & Ishizaka Y. (1960), On the ice-nucleating ability of rock-forming minerals and soil particles. *Journal of Meteorology Society of Japan*, 38, 213-230.
- Lindroth P. & Mopper K. (1979), High performance liquid chromatographic determinations of sub-picomol amount of amino acid by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Analytical Chemistry*, 51, 1667-1674.
- Mason B. J. (1960), Ice-nucleating properties of clay minerals and stony meteorites. *Quarter Journal of the Royal Meteorology Society*, 86, 552-556.
- Mason B. J. (1971), *The physics of Clouds*, 2nd Edition, Oxford Univ. Press, London, 671p.
- Mopper K. & Zika R. G. (1987), Free amino acids in marine rains: evidence for oxidation and potential role in nitrogen cycling. *Nature*, 325, 246-249.
- 夏目崇匡・鈴木 敦 (2001), 降水中の微生物粒子の存在量, 静岡大学地球科学研究報告 28, 57 - 65.
- 中村昭彦 (2000MS), 大気中サブミクロン粒子の除去機構. 静岡大学理学部修士論文, 98p.
- Parsons T. R., Maita Y. & Lalli C. M. (1984), A manual of chemical and biological method for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford, 173p.
- Parungo F. P. & Lodge J. P. (1967), Amino Acid as Ice Nucleators. *Journal of the atmospheric sciences*, 24, 274-277.
- Power B. A. & Power R. F. (1962), Some amino acids as ice nucleators. *Nature*, 194, 1170.
- Simon M. & Azam F. (1989), Protein content and protein synthesis rates of planktonic bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 51, 201-213.
- 笹川基樹・植松光夫 (2001), 大気から海洋に降下する窒素化合物の挙動とその降下量, 月刊海洋, 33, 483-486.
- 多田邦尚・米田義昭 (1988), 高速液体クロマトグラフィーによる海水中の溶存アミノ酸の蛍光分析. 北海道大学水産学部研究彙報, 39, 151-159.
- 多田邦尚・米田義昭 (1992), ベーリング海における溶存遊離アミノ酸の挙動と生物活動. 沿岸海洋研究ノート, 29, 206-214.
- 田中豊頭 (1991), 降水と黄砂, 大気水圏の科学 黄砂, 名古屋大学水圏科学研究所編, 古今書院, 東京.
- Vonnegut B. (1947), The nucleation of ice formation by silver iodide. *Journal of Applied Physics*, 18, 593-594.
- 山崎道夫・廣岡俊彦 (1993), 気象と環境の科学. 天気予報の科学からエル・ニーニョまで. 養賢堂, 321p.