

## 報 文\*

キレート配位子存在下での海洋植物プランクトン  
培養液中の鉄化合物のサイズ分画奥村 真子<sup>®1</sup>, 長谷川 浩<sup>1</sup>, 水本 英伸<sup>1</sup>, 牧 輝 弥<sup>1</sup>, 上田 一正<sup>1</sup>Size fractionation of iron compounds in phytoplankton  
cultures in the presence of chelating ligandsChikako OKUMURA<sup>1</sup>, Hiroshi HASEGAWA<sup>1</sup>, Hidenobu MIZUMOTO<sup>1</sup>,  
Teruya MAKI<sup>1</sup> and Kazumasa UEDA<sup>1</sup><sup>1</sup> Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, 2-40-2, Kodatuno, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-8667

(Received 10 May 2004, Accepted 16 September 2004)

We determined iron speciation in laboratory cultures containing a radioactive tracer, <sup>55</sup>Fe, and chelating ligands using a size-fractionation method. For the size-fractionation of iron, filters with 0.025, 0.20 and 3.0 μm pore size were used. In the media with chelating ligands, major species of iron were colloidal and truly dissolved fractions. When cells of phytoplankton were added, the colloidal fractions decreased, while the large particle fractions (>3.0 μm) increased in the cultures. The iron uptake of phytoplankton, especially extracellular iron, was correlated with the colloidal iron fractions, of which the concentrations depended on the chelating ligands in the media. It is likely that phytoplankton absorbed the colloidal iron fractions onto the cell surface and that utilized the fractions as an iron source in the cultivated media.

**Keywords** : iron ; speciation ; chelating ligands ; phytoplankton growth.

## 1 緒 言

鉄は地殻中で5番目に豊富に存在する元素であるが、海洋においては生物学的及び地球化学的に重要な微量金属の一つである<sup>1)</sup>。最近の大規模な鉄散布実験から、アラスカ湾、南水洋、北太平洋赤道域等の高栄養-低クロロフィル海域において、一次生産の制限を引き起こす要因が鉄の不足であることが実証されている<sup>2)~5)</sup>。植物プランクトンにとって鉄は必須微量栄養素であり、光合成、呼吸における電子伝達、クロロフィルの合成など重要な生理的役割を果たしている<sup>6)~8)</sup>。

海水中において、鉄は主に熱力学的に安定な3価の酸化状態が存在する<sup>9)~11)</sup>。鉄の存在形態は、一般に0.20又

は0.45 μmを境界として、粒子態と溶存態に区分される。pH 8.0程度の海水中において鉄の溶解度は極めて低く、無機鉄のほとんどが水和酸化物の粒子態として沈殿する。溶存態鉄は、更に真の溶存態鉄とコロイド態鉄に区分され、前者としては無機遊離鉄イオン、有機鉄錯体が、後者としては鉄(III)の加水分解によって生成した水和酸化鉄、有機コロイドに吸着した鉄等が報告されている<sup>12)</sup>。

植物プランクトンが利用する鉄の化学形態に関しては、まだ完全には理解されていない。最近の研究では、海洋における溶存鉄はほとんどが天然有機配位子と有機錯体を形成していると考えられている<sup>13)14)</sup>。この場合、植物プランクトンは有機鉄(III)錯体から太陽光による光還元やプランクトンが放出する還元酵素によって生成した無機鉄(II)を経由して生成した遊離鉄(III)イオンを利用する取り込み経路が重要であると考えられる<sup>15)16)</sup>。プランクトンによる有機鉄の可用性はその配位に依存すると言う可能性も

\* 若手研究者の初論文特集

<sup>1</sup> 金沢大学大学院自然科学研究科: 920-8667 石川県金沢市小立野 2-40-20

Table 1 The composition of the modified f/2 medium

NaNO <sub>3</sub>	7.5	mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6	mg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.05	μg
Biotin	0.05	μg
Thiamine HCl	10	μg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	1	μg
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.2	μg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.1	μg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	18	μg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.7	μg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.7	μg
HEPES	1.2	g
Seawater		
Total	100	ml

指摘されている<sup>17)</sup>。一方、原核生物に属する植物プランクトンについては鉄と強いキレート錯体を形成する鉄運搬体(シデロホア)を放出し、利用しやすい化学形に変換して細胞内への取り込みを促進するというメカニズムが確認されている<sup>18)</sup>。それに対して、細胞表面に存在する輸送サイトに結合した無機鉄(III)を直接取り込んでいるという報告もある<sup>19)</sup>。また、植物プランクトンによるコロイド鉄の有用性に関して、いくつか報告されており<sup>20)~23)</sup>、以前はコロイド態鉄の熱分解によって形成される無機鉄<sup>24)</sup>や光還元によって生成した鉄(II)を利用する<sup>25)26)</sup>メカニズムが考えられていた。これと対照的に、コロイド鉄を直接取り込みに利用しているという報告もある<sup>27)</sup>。

本研究では、放射性同位体<sup>55</sup>Feをトレーサーとして用いてキレート配位子存在下の植物プランクトンの培養中における鉄の挙動を測定し、鉄の存在形態による生長への影響について検討を行った。

## 2 実験操作

### 2.1 試薬

鉄(III)に対するキレート配位子として6種のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)類縁体{Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA), *N*-(2-Hydroxyethyl)-ethylenediamine-*N,N,N'*-triacetic acid (EDTA-OH), O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (GEDTA), Diethylenetriamine-*N,N,N',N''*-tetraacetic acid (DTPA), 1,3-Diamino-2-hydroxypropane-*N,N,N',N''*-tetraacetic acid (DPTA-OH), Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetrakis(methylenephosphonic acid) (EDTPO); 同仁化学製}を使用した。

溶存鉄のサイズ分画及び海洋植物プランクトンの鉄取り込み実験では、人工海水を使用して調製した改変f/2培地を用いた(Table 1)。この培地では、緩衝剤として2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸

(HEPES; 特級, ナカライテスク製)を用いた。鉄の標準溶液は、塩化鉄六水和物(特級, 和光純薬製)及び放射性同位体である<sup>55</sup>Fe(第一化学薬品製, 740 MBq)をそれぞれ1 M 塩酸水溶液に溶解して調製した。植物プランクトンの洗浄には、0.05 M Na<sub>2</sub>EDTA-クエン酸ナトリウム溶液100 ml, 1.0 M KCl 1 ml, NaCl 12 gを混合した溶液に、20% TiCl<sub>3</sub>溶液3.108 mlをかき混ぜながら添加し、NaOH溶液でpH 8.0に調整し、1時間後に再度pH 8.0に再調整したものを使用した。この溶液は実験の直前に調製した。有機シンチレーション測定用溶液は、トルエン500 mlに2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazole(同仁化学製)3.03 gを溶解して調製した。

その他の試薬には特級あるいは同等以上のものを用いた。また、水は蒸留後、E-pure(Barnstead製)によってイオン交換した精製水(EPW)を用いた。

### 2.2 植物プランクトン株

海洋植物プランクトンとして、*Skeletonema costatum*(NIES-324)を用いた。*S. costatum*は、実験に先立ってキレート配位子を含まない鉄濃度0.2 μMの改変f/2培地で、水温20℃、明暗サイクル12 h-12 h、光強度110 μmol E/m<sup>2</sup>/sの条件下において対数増殖期まで培養したものを前培養とした。

### 2.3 器具及び装置

鉄濃度の定量には、偏光ゼーマン原子吸光分光光度計(Z-8100形, HITACHI製)を、<sup>55</sup>Fe量の測定には液体シンチレーションカウンター(LSC-6100, ALOKA製)を用いた。

実験には、60 ml又は250 mlの角型ポリカーボネート容器(Nalgen製)を用いた。容器は、蒸留水で希釈した5% Scat(20-X ナカライテスク製)洗液中へ24時間以上浸し、水道水で洗浄後、4 M HCl中に24時間以上浸した後、EPWで洗浄した。実験操作はクリーンベンチ(MCV-711ATS, SANYO製)中で行った。培地は、小型高圧蒸気滅菌器(MLS3750, SANYO製)、定温乾燥機(DX600, YAMATO製)を用いて滅菌した。

### 2.4 改変f/2培地中における鉄の定量

改変f/2培地30 mlにFeCl<sub>3</sub>標準溶液45 μlを添加して鉄濃度を1.5 μMに調整し、20℃で静置した。培地1 mlを一定時間毎に採取し、16,000 × gで30分間遠心分離した。上澄み液500 μlを0.1 M 硝酸水溶液を用いて10倍に希釈し、偏光ゼーマン原子吸光分光光度計を用いて鉄濃度を求めた。

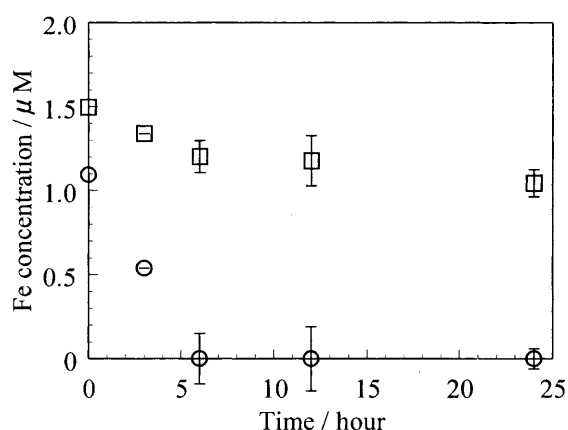


Fig. 1 Iron concentrations in the modified f/2 media without chelating ligands

Initial concentrations of Fe and EDTA are 1.5  $\mu\text{M}$  and 0  $\mu\text{M}$ , respectively.  $\square$ : no phytoplankton;  $\circ$ : with phytoplankton ( $4.8 \times 10^3$  cells/ml),  $n = 3$

## 2.5 キレート配位子存在下の培養液中の鉄のサイズ分画

鉄濃度 1.5  $\mu\text{M}$  ( $^{55}\text{Fe}$  1.25 MBq/l を含む) 及びキレート配位子濃度 15  $\mu\text{M}$  の改変 f/2 培地 30 ml を, 20 $^{\circ}\text{C}$  で静置した. 48 時間経過後に前培養した *S. costatum* を添加し, 軽く混合した後, 再び 20 $^{\circ}\text{C}$  で静置した.

本研究では, 鉄のサイズ分画を行うために, 0.025  $\mu\text{m}$  フィルター (ニトロセルロース, ミリポア製), 0.20 及び 3.0  $\mu\text{m}$  フィルター (ポリカーボネート, CORNING 製) の 3 種の孔径のフィルターを用いた. 0.20  $\mu\text{m}$  フィルターは, 海洋化学において溶液中の溶存態と粒子態を分別する際に用いられている. 0.025  $\mu\text{m}$  は, 分子量 200 kDa に相当し, 鉄の溶解度測定に用いられるサイズに近い. 本研究では, 溶存態をコロイド態と真の溶存態に分画するために使用した. 3.0  $\mu\text{m}$  フィルターは, 本研究で用いた植物プランクトン *S. costatum* の細胞サイズが 5~6  $\mu\text{m}$  であることから, この細胞表面に吸着した鉄を他の画分と分別して捕集するために用いた.

培地中における鉄のサイズ分画は, 培地 3 ml を吸引濾過により各孔径の 13 mm  $\Phi$  フィルターで濾過後, フィルターに人工海水 3 ml を通して洗浄し, シャーレ内で自然乾燥させた. このフィルターを液体シンチレーション溶液 5 ml の入った 20 ml バイアル瓶に入れ, 液体シンチレーションカウンターのトリチウムモードを用いて  $^{55}\text{Fe}$  量を測定した. コロイド態の鉄量は 0.025 及び 0.20  $\mu\text{m}$  フィルターに捕集された鉄量の差から算出した. また, 培地及び濾液は, 鉄の沈殿防止のため 1/100 量の 1 M HCl を添加し, 酸性溶液にして保存した. この培地及び濾液 100  $\mu\text{l}$  を用いて液体シンチレーションカウンターにて  $^{55}\text{Fe}$  量を求め, 培養液及び濾液中の鉄濃度を算出した.

## 2.6 植物プランクトンによる鉄取り込み量の測定

前培養した *S. costatum* の培養液 60 ml を, キレート配位子濃度 15  $\mu\text{M}$  及び Fe 濃度 1.5  $\mu\text{M}$  ( $^{55}\text{Fe}$  1.25 MBq/l を含む) に調製し, 水温 20 $^{\circ}\text{C}$ , 明暗サイクル 12 h-12 h, 光強度 110  $\mu\text{mol E/m}^2/\text{s}$  の条件下において培養を行った. 培養開始から 24 時間後に培養液 3 ml を採取し, 吸引濾過により 3.0  $\mu\text{m}$  メンブランフィルター上に植物プランクトン細胞を捕集した.

植物プランクトンの鉄取り込み量の測定は, Hudson らの方法に従った<sup>28)</sup>. 植物プランクトンを捕集したフィルターを人工海水 3 ml, 0.047M Ti(III)/クエン酸/EDTA 溶液 3 ml, 人工海水 3 ml の順で洗浄し, シャーレ内で自然乾燥させた後, 液体シンチレーションを用いて  $^{55}\text{Fe}$  量を測定し, 細胞内への鉄取り込み量を求めた. また, 植物プランクトンを捕集し, 人工海水 3 ml のみで洗浄したフィルターより得られた  $^{55}\text{Fe}$  量から, 細胞内外の鉄取り込み量を測定し, 細胞内鉄量との差から細胞外への鉄吸着量を算出した.

## 3 結果及び考察

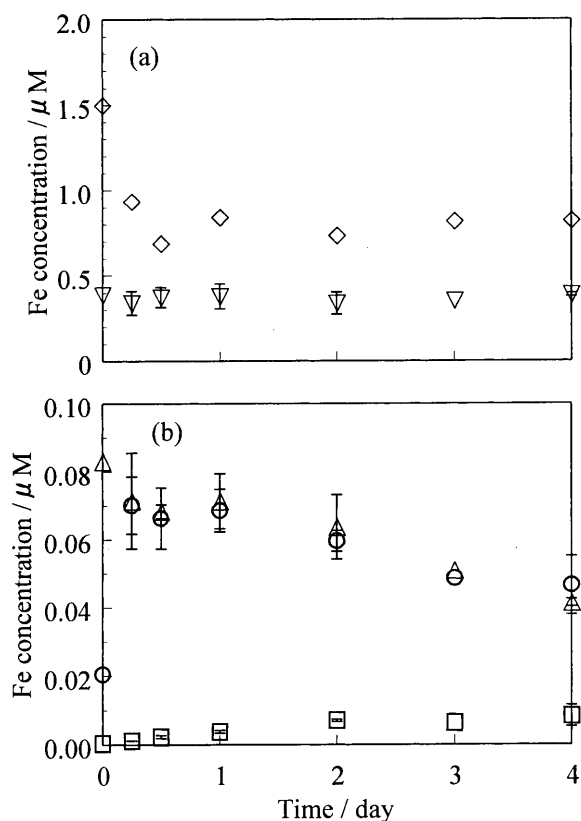
### 3.1 キレート配位子を含まない培養液中の鉄濃度

植物プランクトン培養中における鉄の濃度変化を明らかにするために, キレート配位子無添加の改変 f/2 培地に鉄 1.5  $\mu\text{M}$  及び植物プランクトンを添加して鉄濃度の測定を行った (Fig. 1). 植物プランクトンを含まない培地中において, 鉄の溶存態は鉄添加後 6 時間以内に 1.2  $\mu\text{M}$  まで減少し, 24 時間後には 1.0  $\mu\text{M}$  となった. これは, 鉄添加時に局所的に鉄濃度が高くなることなどによる水和酸化鉄の沈殿生成又は容器壁への吸着が原因であると考えられる.

一方, 培地中に植物プランクトンが存在する条件では, 鉄添加後 6 時間以内に鉄濃度が 0.05  $\mu\text{M}$  以下まで減少した. 植物プランクトンが存在する場合は, 植物プランクトンによる鉄の取り込み, 又は細胞表面への吸着が速やかである可能性が高い.

### 3.2 キレート配位子を含む培養液中における鉄のサイズ分画

**3.2.1 植物プランクトンが存在しない場合** 培地に EDTA 15  $\mu\text{M}$ , 鉄 1.5  $\mu\text{M}$  を添加した場合の鉄濃度の変化を Fig. 2 に示した. 培地中における鉄の全濃度は, 鉄及び EDTA 添加後 6 時間以内に 0.94  $\mu\text{M}$  まで減少し, その後, 約 0.81  $\mu\text{M}$  でほぼ一定値となった {Fig. 2(a)}. 添加した 1.5  $\mu\text{M}$  より低い値を示したが, これは, 水和酸化鉄の沈殿又は吸着によって損失したためであると考えられる. 一方, フィルターで分画した画分に関しては, 0.025  $\mu\text{m}$  以下の画分の鉄濃度は実験期間を通して約 0.37  $\mu\text{M}$  で



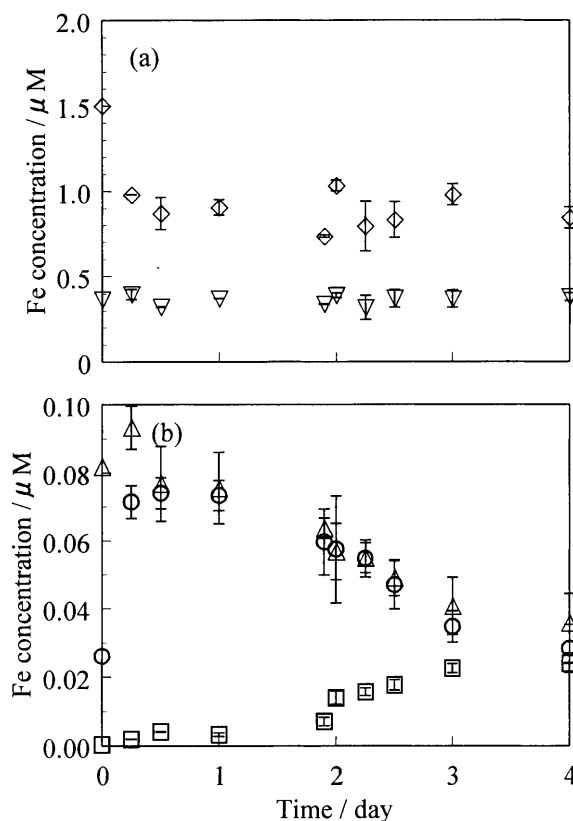
**Fig. 2** Size fractions of iron in the modified f/2 media

Initial concentrations of Fe and EDTA are  $1.5 \mu\text{M}$  and  $15 \mu\text{M}$ , respectively.  $\diamond$ : total;  $\nabla$ :  $< 0.025 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ :  $> 0.025 \mu\text{M}$ ;  $\circ$ :  $> 0.20 \mu\text{M}$ ;  $\square$ :  $> 3.0 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$

ほぼ一定であったが、 $0.025 \mu\text{M}$  フィルターに捕集された鉄量は、6 時間以内に  $0.08 \mu\text{M}$  から  $0.07 \mu\text{M}$  まで減少し、その後は徐々に減少して 4 日後には  $0.05 \mu\text{M}$  となった {Fig. 2(b)}.  $0.20 \mu\text{M}$  のフィルターに捕集された画分は、6 時間以内に  $0.02 \mu\text{M}$  から  $0.07 \mu\text{M}$  まで増加した後、 $0.025 \mu\text{M}$  フィルターに捕集された画分と一致する値で推移した。  $3.0 \mu\text{M}$  以上の画分については、時間の経過とともに増加し、2 日後以降は約  $0.007 \mu\text{M}$  でほぼ一定となった。

以上のように、培地中における鉄のスペシエーションでは、鉄添加から 6 時間以内に急激な濃度変化が生じ、それ以降はゆるやかにコロイド態鉄が減少するとともに凝集して  $3.0 \mu\text{M}$  以上のサイズとなった粒子態鉄が増加した。それに対して、真の溶存態の画分 ( $< 0.025 \mu\text{M}$ ) は一定であった。したがって、培地中の鉄は添加後 6 時間以内に EDTA-鉄錯体の生成反応が平衡に達した後、時間経過とともに主にコロイド態が水和酸化鉄の沈殿に変換されるために、粒子態が増加すると考えられる。

久万らは、海水培地中の溶存鉄濃度は、EDTA:Fe 比が  $100:1$  の条件下では時間経過によらずほぼ一定に保たれ



**Fig. 3** Size fractions of iron in phytoplankton cultures

Initial concentrations of Fe and EDTA are  $1.5 \mu\text{M}$  and  $15 \mu\text{M}$ , respectively.  $\diamond$ : total;  $\nabla$ :  $< 0.025 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ :  $> 0.025 \mu\text{M}$ ;  $\circ$ :  $> 0.20 \mu\text{M}$ ;  $\square$ :  $> 3.0 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$

るのに対し、 $2:1$  の条件下では時間の経過とともに徐々に減少し、有機配位子の存在しない条件では 1 日以内にほとんど枯渇することを報告している<sup>29)</sup>。Fig. 2 の結果は、EDTA-Fe 比が  $10:1$  の条件下で行われており、時間経過による鉄濃度の減少は久万らの結果と一致している。

**3.2.2 植物プランクトンが存在する場合** 植物プランクトンが存在する条件下で培養液中における鉄のサイズ分画を行い、プランクトンを含まない培地における結果と比較して、植物プランクトン培養中における鉄の挙動を求めた。Fig. 3 では、前章と同じ条件の培養液に対して植物プランクトン *S. costatum*  $4.8 \times 10^3$  cells/ml を添加した際の鉄の濃度変化を示している。培地中の鉄の全濃度は、植物プランクトン添加前は約  $0.92 \sim 0.98 \mu\text{M}$ 、添加後は約  $0.90 \mu\text{M}$  であり、植物プランクトン添加の影響はほとんど観測されなかった {Fig. 3(a)}。また、真の溶存態鉄 ( $< 0.025 \mu\text{M}$ ) の濃度は実験期間を通してほぼ一定の約  $0.36 \mu\text{M}$  であったがこの結果は植物プランクトンを含まない培地中の挙動と一致する {Fig. 2(a)}。したがって、培地中における鉄の全濃度及び真の溶存態濃度に対しては、植物プランクトン添加による影響は少ないと考えられる。

Table 2 Size fractions of iron in the media containing chelating ligands

	<0.025 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{M}$ )	0.025~0.2 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{M}$ )	>0.2 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{M}$ )	Total ( $\mu\text{M}$ )
EDTA	0.45 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.09	0.04 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.11
EDTA-OH	0.87 $\pm$ 0.08	0.10 $\pm$ 0.04	0.00 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.09
GEDTA	0.11 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.07	0.02 $\pm$ 0.01	1.09 $\pm$ 0.09
DPTA-OH	0.57 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.58 $\pm$ 0.05
DTPA	1.32 $\pm$ 0.13	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.33 $\pm$ 0.13
EDTPO	0.76 $\pm$ 0.10	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.77 $\pm$ 0.10
Control	0.05 $\pm$ 0.03	0.97 $\pm$ 0.07	0.07 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.04

一方, 0.025  $\mu\text{m}$  フィルターに捕集された画分は, 植物プランクトン添加前は 0.08  $\mu\text{M}$  であったが, 添加直後に 0.06  $\mu\text{M}$  まで減少し, 4 日後には 0.04  $\mu\text{M}$  となった [Fig. 3(b)]. 0.20  $\mu\text{m}$  フィルターに捕集された画分は, 添加前は 0.06  $\mu\text{M}$  であったが, プランクトン添加直後に 0.05  $\mu\text{M}$  まで減少し, 4 日後には 0.03  $\mu\text{M}$  となった. 対照的に, 3.0  $\mu\text{m}$  フィルターに捕集された画分は, プランクトン添加前は 0.007  $\mu\text{M}$  であったが, プランクトン添加とともに増加し, 4 日後には 0.02  $\mu\text{M}$  となった. 以上の結果をプランクトンが存在しない場合 [Fig. 2(b)] と比較すると, コロイド態鉄に関してはどちらの場合でも時間経過とともに減少しているが, プランクトンを含む培養液の方が減少速度が速い. それに対して, プランクトンが存在しない培地中では一定であった 3.0  $\mu\text{m}$  以上の画分は, プランクトン添加によって増加した. この要因として, プランクトン細胞表面へのコロイド態画分の吸着又は取り込みが考えられる. 植物プランクトンは, 細胞表面に濃縮されたコロイド態鉄を利用している可能性がある.

西岡らは, 自然海水中でケイ藻 *Chaetoceros sp.* を培養した場合, 植物プランクトンが増殖するにつれてコロイド態鉄が減少し, 他の画分の鉄が存在しているにもかかわらずコロイド態鉄の枯渇とともに増殖が停止したと報告している<sup>30)</sup>. 自然海水中における溶存鉄はほとんどがコロイド態として存在し<sup>31)~34)</sup>, 植物プランクトンの大発生の際には溶存鉄が減少することが報告されている<sup>35)~39)</sup>. 本研究における結果は, キレート配位子存在下の培養液中においても植物プランクトンの生長とコロイド態鉄に重要な関連があることを示していると考えられる.

### 3.3 EDTA 類縁体存在における鉄のスペシエーション

6 種の EDTA 類縁体 15  $\mu\text{M}$ , 鉄 1.5  $\mu\text{M}$  を含む改変 f/2 培地中における鉄のスペシエーションを Table 2 に示す. コントロールとしては, 配位子を含まない改変 f/2 培地を用いた. 0.025~0.20  $\mu\text{m}$  の画分には, GEDTA, EDTA, EDTA-OH を含む場合はそれぞれ 0.96, 0.48, 0.10  $\mu\text{M}$  の鉄量が捕集されたが, DTPA, DPTA-OH, EDTPO については, 0.01  $\mu\text{M}$  となり, 添加した鉄の 1% 以下となった.

0.20  $\mu\text{m}$  以上の画分については, EDTA, GEDTA ではそれぞれ 0.07, 0.04  $\mu\text{M}$  となり, EDTA-OH, DTPA, DPTA-OH, EDTPO では鉄の捕集は見られなかった. 0.025  $\mu\text{m}$  以下の画分に関しては, DTPA, EDTA-OH, EDTPO, DPTA-OH, EDTA, GEDTA, コントロールの順に減少した.

キレート配位子存在下における植物プランクトンの培養では, 本論文と同様の実験条件で, 植物プランクトンの生長速度及び生長量は GEDTA, EDTA, EDTA-OH, DTPA, DPTA-OH, EDTPO の順で減少し, 配位子の直接毒性ではなく培養液中における鉄化学種の種類及び濃度が植物プランクトンの生長を制限することが分かっている<sup>40)</sup>. Table 2 において, コロイド態に相当すると考えられる 0.025~0.20  $\mu\text{m}$  の画分の鉄量は GEDTA > EDTA > EDTA-OH > DTPA = DPTA-OH = EDTPO の順で減少し, プランクトンの生長と同様の傾向を示した. したがって, 植物プランクトンの生長に対して, 0.025~0.20  $\mu\text{m}$  の画分が主に関与している可能性が高い. また, 0.20  $\mu\text{m}$  以上の粒子態鉄に関しては, EDTA > GEDTA > EDTA-OH = DTPA = DPTA-OH = EDTPO の順で減少したが, 捕集量は全鉄量の 3% 以下であることから, 0.025~0.20  $\mu\text{m}$  の画分が凝集した結果と考えられる.

EDTA 類縁体存在下の培養において, 植物プランクトンに取り込まれた鉄量を存在状態別に定量した結果を Fig. 4 に示す. 細胞内の鉄量は, 実際にプランクトンによって細胞内部に取り込まれた鉄量を示すのに対し, 細胞外の鉄量は, プランクトン細胞表面に吸着した鉄量を表している.

植物プランクトンによる鉄取り込み量は, キレート配位子及び鉄添加後 1 時間以内に急激に増加し, EDTA, GEDTA 及び EDTA-OH 存在下において細胞外で 0.34, 0.18 及び 0.06 fmol/N, 細胞内では 0.03, 0.02 及び 0.01 fmol/N となった. 鉄取り込み量はその後も徐々に増加し, 24 時間後には細胞外で 0.90, 0.82 及び 0.15 fmol/N, 細胞内では 0.12, 0.11 及び 0.06 fmol/N に達した. 一方, DPTA-OH, DTPA, 及び EDTPO 存在下における鉄濃度は細胞外, 細胞内共に 0.03 fmol/N 以下であった.

このように, プランクトン細胞外への鉄吸着量は,

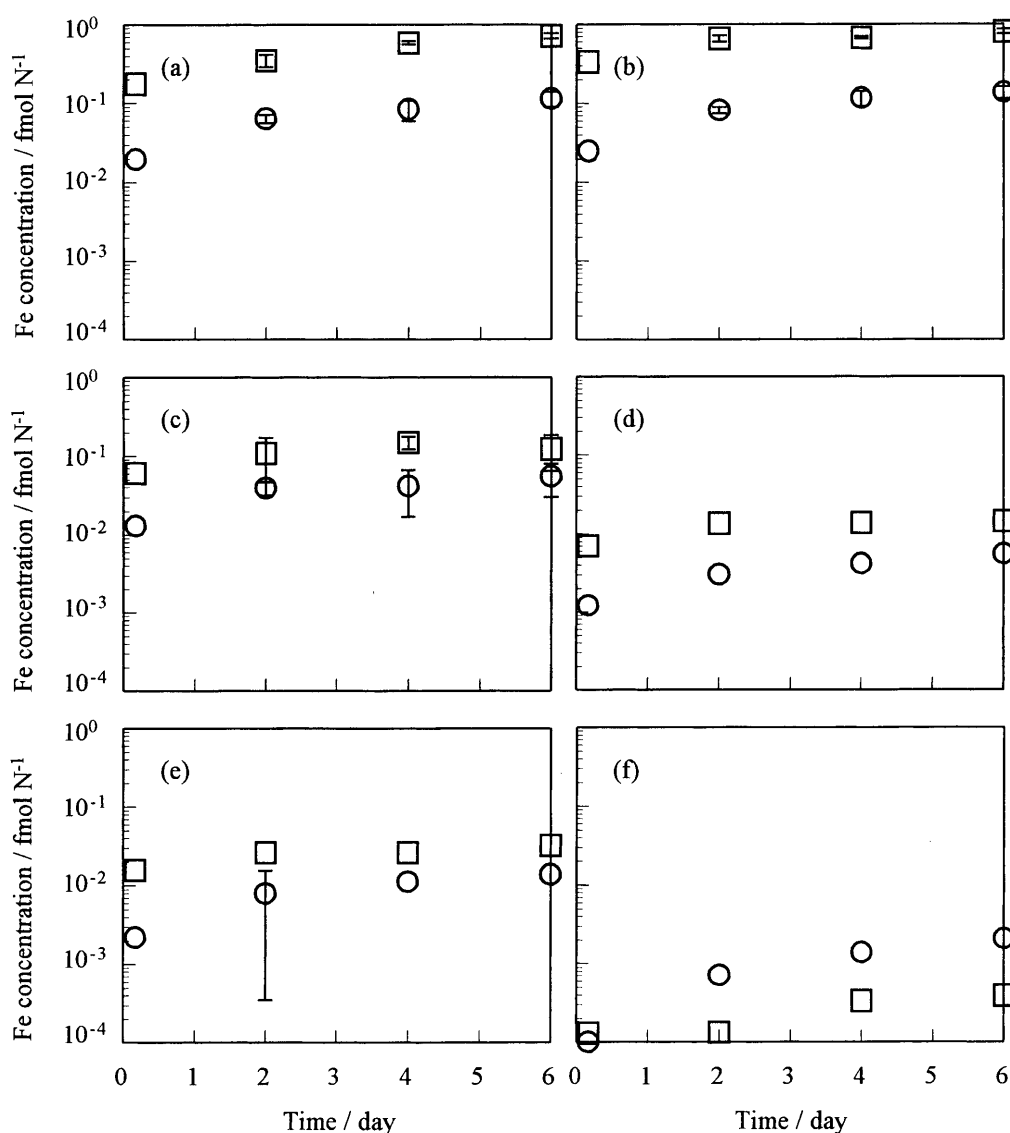


Fig. 4 Fe uptake quantity of *Skeletonema costatum*

Initial concentrations of Fe and chelating ligands are 1.5  $\mu\text{M}$  and 15  $\mu\text{M}$ , respectively. (a) GEDTA; (b) EDTA; (c) EDTA-OH; (d) DTPA; (e) DTPA-OH; (f) EDTPO. □: extracellular iron; ○: intracellular iron,  $n = 3$

EDTA, GEDTA, EDTA-OH, DTPA-OH, DTPA, EDTPO の順に減少し、コロイド態鉄量と相関が見られた。これは、Fig. 4 で得られた結果と一致している。一方、細胞内に取り込まれた鉄量に関しては、細胞外の鉄量に比例するがその量は 1/10 以下であったことから、細胞内への鉄の取り込み速度は細胞への吸着速度に比べて極めて遅いと考えられる。

#### 4 結 論

本研究では、鉄キレート錯体存在下において、<sup>55</sup>Fe を含む溶液中の鉄を限外濾過フィルターを用いてサイズ別に定量し、海洋植物プランクトン培養中における鉄の存在形態の解析を行った。EDTA 類縁体を含む培地中では、植物コ

ロイド態鉄量は配位子の種類に依存し、植物プランクトンによる取り込み量と正の相関を示した。したがって、EDTA 類縁体のようなキレート配位子を含む培養液中では、植物プランクトンは主にコロイド態鉄を細胞表面に取り込んで利用する可能性が高いと考えられる。しかしながら、本論文では植物プランクトンの細胞近傍におけるコロイド態鉄の挙動を直接測定するまでには至っていない。植物プランクトン存在下におけるコロイド態の減少に関しては、植物プランクトンに溶存態鉄が吸収された後速やかにコロイド態鉄が溶解した結果、見かけ上コロイド態が利用されているように観測された可能性が残されている。植物プランクトンの鉄の取り込みメカニズムにおける化学平衡を厳密に解析するためには、今後も更なる実験事実を積み

重ねる必要がある。

## 文 献

- 1) S. R. Taylor: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **28**, 1273 (1964).
- 2) J. H. Martin, R. M. Gordon: *Deep-Sea Res.*, **35**, 177 (1988).
- 3) J. H. Martin, R. M. Gordon, S. E. Fitzwater, W. W. Broenkow: *Deep-Sea Res.*, **36**, 649 (1989).
- 4) S. Takeda, H. Obata: *Mar. Chem.*, **50**, 219 (1995).
- 5) M. T. Maldonado: *Limnol. Oceanogr.*, **45** (4), 814 (2000).
- 6) 武田重信: 海洋, 号外 No. **10**, 69 (1996).
- 7) E. D. Weinberg: *Q. Rev. Biol.*, **64**, 261 (1989).
- 8) R. J. Geider, J. L. Roche: *Photosynthesis Res*, **39**, 275 (1994).
- 9) F. M. M. Morel, J. G. Hering: "Principles and Applications of Aquatic Chemistry", (1993) (Wiley-Interscience, New York).
- 10) K. Kuma, J. Nishioka, K. Mathunaga: *Limnol. Oceanogr.*, **41**, 396 (1996).
- 11) W. Stumm, J. J. Morgan: "Aquatic Chemistry. 3rd edn.", (1996) (Wiley-Interscience, New York).
- 12) J. Lewin, C. Chen.: *Limnol. Oceanogr.*, **18**, 590 (1973).
- 13) E. L. Rue, K. W. Bruland: *Mar. Chem.*, **50**, 117 (1995).
- 14) Van den Berg, C. M. G.: *Mar. Chem.*, **50**, 139 (1995).
- 15) D. A. S. Finden, E. Tripping, G. H. M. Jaworski, C. S. Reynolds: *Nature*, **309**, 783 (1984).
- 16) T. D. Waite, F. M. M. Morel: *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 860 (1984).
- 17) K. Kuma, J. Tanaka, K. Mathunaga: *Mar. Biol.*, **134**, 761 (1999).
- 18) C. G. Trick, R. J. Andersen, N. M. Prince, A. Gillam, P. J. Harrison: *Mar. Biol.*, **75**, 9 (1983).
- 19) N. M. Prince, F. M. M. Morel: *Met. Ions. Biol. Syst.*, **35**, 1 (1998).
- 20) E. D. Goldberg: *Biol. Assoc. U. K.*, **48**, 295 (1952).
- 21) J. Hayward: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **48**, 295 (1968).
- 22) A. G. Davies: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **50**, 65 (1970).
- 23) M. A. Anderson, F. M. M. Morel: *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 789 (1982).
- 24) M. L. Wells, N. G. Zorkin, A. G. Lewis: *L. Mar. Res.*, **41**, 731 (1983).
- 25) D. A. S. Finden, E. Tripping, G. H. M. Jaworski, C. S. Reynolds: *Nature*, **309**, 783 (1984).
- 26) T. D. Waite, F. M. M. Morel: *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 860 (1984).
- 27) M. L. Wells, N. G. Zorkin, A. G. Lewis: *J. mar. Res.*, **41**, 731 (1983).
- 28) R. J. M. Hudson, F. M. M. Morel: *Limnol. Oceanogr.*, **346**, 1113 (1989).
- 29) K. Kuma, J. Tanaka, K. Mathunaga: *Mar. Biol.*, **134**, 761 (1999).
- 30) J. Nishioka, S. Takeda: *Mar. Biol.*, **137**, 137 (2000).
- 31) J. H. Martin, M. H. Dai, G. Cauwer: *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 119 (1995).
- 32) R. T. Powell, W. M. Landing, J. E. Bauer: *Mar. Chem.*, **55**, 165 (1996).
- 33) S. A. Sanudo-Wilhelmy, I. Rivera-Duarte, A. R. Flegal: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **60**, 4933 (1996).
- 34) L. S. Wen, P. Santschi, G. A. Gill, C. Paternostro: *Mar. Chem.*, **63**, 185 (1999).
- 35) R. M. Ingle, D. F. Martin: *Environ. Lett.* **1**, 69 (1971).
- 36) H. E. Glover: *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 534 (1978).
- 37) K. Matsunaga, K. Igarashi, S. Tsubota: *Estuarine Coastal Shelf Sci.* **18**, 615 (1984).
- 38) C. J. Gobler, E. M. Cosper: "Harmful and Toxic Algal Blooms", p. 321 (1996), (IOC UNESCO, Paris).
- 39) E. Breuer, S. A. Sanudo-Wilhelmy, R. C. Aller: *Estuaries*, **22**, 603 (1999).
- 40) H. Hasegawa, M. Shinoura, H. Mizumoto, K. Naito, Y. Sohrin, K. Ueda: *Journal of Global Environment Engineering*, **8**, 45 (2002).

## 要 旨

放射性トレーサー  $^{55}\text{Fe}$  を含む海水培地中の鉄を限外濾過フィルターを用いてサイズ別に定量し、海洋植物プランクトンの培養中における鉄の存在形態の解析を行った。キレート配位子を含む培地中では、培地中に存在する鉄は主にコロイド態鉄及び真の溶存態鉄であり、粒子態はわずかであった。植物プランクトンの培養液における鉄のスペシエーションを測定したところ、時間の経過とともにコロイド態が減少し粒子態が増加した。培地中におけるコロイド態鉄の濃度が植物プランクトン細胞表面への取り込み量に相関が見られたことから、植物プランクトンは鉄の供給源として主にコロイド態鉄を利用している可能性が高いと考えられる。