

植物プランクトン生長に関する鉄スペシエーションの解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/26719

氏名	奥村 真子
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第881号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	植物プランクトン生長に関する鉄スペシエーションの解析
論文審査委員(主査)	長谷川 浩(自然科学研究科・助教授)
論文審査委員(副主査)	上田 一正(自然科学研究科・教授), 上田 穰一(教育学部・教授), 国本 浩喜(自然科学研究科・教授), 平山 直紀(自然科学研究科・助教授)

Fertilizing the oceans with iron may help to reduce carbon dioxide in the atmosphere since it stimulate phytoplankton growth in the oceans. In general, the availability of iron to phytoplankton depends on the chemical forms and concentrations in the aquatic environment. In this study, I established a simple, sensitive and reliable method for determination of low-level iron in laboratory cultures of marine phytoplankton using a radioisotope tracer ^{55}Fe with liquid scintillation counting. Interference studies showed that nitrate depress the counting efficiency of ^{55}Fe in the liquid scintillation although the other components in culture media have no effect. It is possible to correct the measurement values using the decrease rate of the specific nitrate concentration. In addition, I demonstrate the effect of iron complexation by chelating ligands on the growth of phytoplankton. Under low-iron conditions, the growth rates were affected by the concentrations of chelating ligands in the culture media, which well agreed with iron uptake amounts of the cells. The results from iron uptake experiments show that bioavailability of iron to phytoplankton is related to the ratios of iron to chelating ligands in the media and the abilities of the chelating ligands to complex ferric ions, in which colloidal fractions are important for iron uptake of marine phytoplankton.

1. 緒言

近年、人為的要因による気候変動に対する懸念が強まっており、大気中の二酸化炭素量を減少させるための対応策が必要となっている。その一つとして、大気中や陸上に比べて炭素貯蔵量が著しく多い海洋に注目が集まっている。海洋では、植物プランクトンが主な一次生産者として生態系へエネルギーと物質を供給している。一般に、植物プランクトンは溶存している栄養塩を使い尽くすまで増殖するため、表層における栄養塩の溶存濃度は極めて低くなる。しかし、栄養塩が豊富に存在しているにもかかわらず、植物プランクトン量が少ない海域が存在する。この要因の一つとして考えられたのが鉄の不足である。実際にこの海域での硫酸鉄散布実験により、植物プランクトンの増殖速度及び大気から海洋への二酸化炭素移動量が増加し、海水の二酸化炭素分圧は減少したという結果が得られている。

植物プランクトンによる鉄の利用形態を解明するために、海水中の鉄濃度を定量することは重要である。海水中における鉄の濃度は極めて低く、また塩の妨害を受けるため、直接測定は非常に困難であり、脱塩・濃縮して行うのが一般的である。しかし、鉄は実験環境中に多量に存在するため、分析過程で混入する可能性が高い。鉄濃度を測定する方法の一つに、放射性核種を用いた分析法が挙げられる。放射

性核種を用いた鉄濃度測定ではコンタミネーションによる測定誤差が少なく、低濃度でも測定可能であるという利点がある。本法は、脱塩操作を行わずに感度の良い測定が可能であり、室内培養実験における植物プランクトンの利用する鉄の化学形態分析やメンブレンフィルター上に捕集した粒子態鉄の定量に利用されている。

本研究では、必須元素である鉄の溶存化学形が植物プランクトンの生長に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。第1に、鉄の安定同位体と物理的、化学的、生物学的に性質の差がなく、同一の挙動を示す放射性同位体⁵⁵Feをトレーサーとして用いて、植物プランクトンの培養中においても共存物質の影響を受けることの無い鉄の化学形態分別法を確立した。第2に、各種EDTA類縁体及び鉄(III)を用いて溶存鉄のスペシエーションを制御した条件下での植物プランクトンの生長実験を行い、培養液中における配位子濃度や化学的性質の違いが植物プランクトンの生長に与える影響について検討した。第3に、植物プランクトンの培養中における鉄の挙動を測定し、生長曲線との相関から鉄の存在形態による生長への影響について検討を行うとともにその原因となる環境因子の解明を試みた。

2. 実験操作

本研究では、植物プランクトンとして *Skeletonema costatum*、*Pleurochrysis carterae*、*Cricosphaera roscoffensis*、*Prymnesium parvum*、*Heterosigma akashiwo*、*Chattonella antiqua* をキレート配位子として6種のEDTA類縁体(EDTA、EDTA-OH、GEDTA、DTPA、DPTA-OH、EDTPO)を用いた。植物プランクトンの培養は、FeCl₃ 0-1.5 μM、キレート配位子 0~150 μM に調製した改変 f/2 培地を用いて水温 20℃、明暗サイクル 12 h-12 h、光強度 0~110 μmol E/m²/s の条件下において行った。植物プランクトンの生長量は 540 nm における濁度として分光光度計を用いて測定した。

鉄の定量には、放射性トレーサーとして⁵⁵Feを用いた液体シンチレーション法を用いた。試料水をFeCl₃(⁵⁵Feを含む)1.5 μM、キレート配位子 0-150 μM、NaNO₃ 0-50 mM に調製し20℃で静置した。一定時間毎に採取した試料水 100 μl を液体シンチレーションカクテル(ブチル PBD 3.03g/トルエン 500 ml) 5 ml の入った液体シンチレーションバイアル瓶に入れ、液体シンチレーションカウンター(LSC-6100、ALOKA)を用いて⁵⁵Fe量を測定した。鉄の形態別測定では、試料水を0.025、0.20及び3.0 μmヌクレポアフィルターを用いてサイズ分画した後、自然乾燥させたフィルターまたはろ液 100 μl を液体シンチレーション溶液 5 ml の入ったバイアル瓶に入れ測定した。また、植物プランクトンによる鉄取り込み量の測定では、3.0 μm フィルター上にプランクトン細胞をろ過捕集後、人工海水、0.047M Ti(III)-EDTA-クエン酸溶液、人工海水の順で洗浄し、このフィルター上の⁵⁵Fe量を測定し細胞内の鉄量とした。一方、細胞内外の鉄量は人工海水のみの洗浄で求め、両者の差を細胞外の鉄量とした。

3. 結果及び考察

放射性トレーサー⁵⁵Feを用いた鉄濃度測定において、改変 f/2 培地及び人工海水の成分が測定に影響を及ぼす可能性がある。そこで、溶液中の塩の影響について検討するために、鉄濃度 1.5 μM (⁵⁵Fe

を含む) に調製した EPW、3%NaCl 水溶液、人工海水及び改変 f/2 培地の鉄濃度を測定した結果、硝酸ナトリウムを含まない試料水では 1.50-1.54 μM であったが、他の試料水では測定値が 1.27-1.34 μM と低くなった (Fig. 1)。硝酸ナトリウム濃度 0-50 mM における鉄の測定値は、 NaNO_3 濃度の増加に伴って減少し、特に硝酸塩濃度が 7.5 mM 以上の条件では一定値 1.31 μM に近づく傾向が得られた (Fig. 2)。

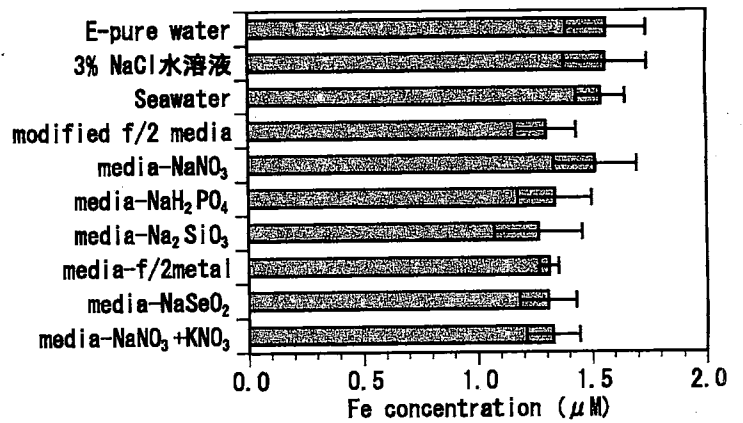


Fig. 1 試料水中の鉄濃度測定値

また、フィルターを用いたサイズ分画において、ろ液及び未ろ過の溶液では NaNO_3 添加による鉄濃度の測定値の減少が見られたが、フィルター上に捕集された鉄に関しては影響は見られなかったことから、溶液中に硝酸イオンが存在することにより測定が妨害される可能性が高い。その他に、0-15 μM EDTA 類縁体の添加及び pH の影響について検討したが、鉄濃度測定値への影響は見られなかった。

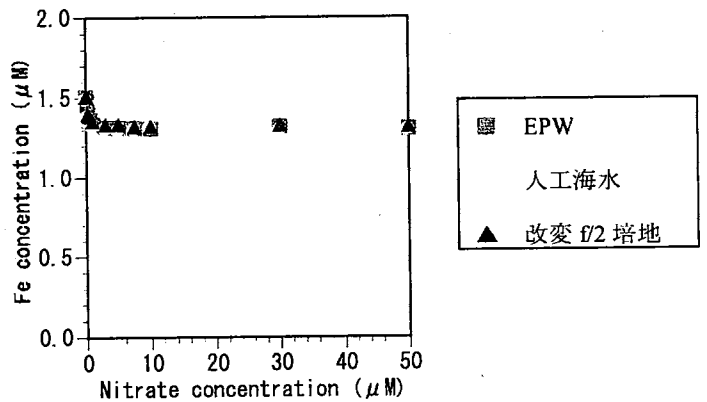


Fig. 2 試料水中の硝酸塩濃度と鉄濃度測定値の関係

硝酸塩の妨害による測定値の減少率は、硝酸塩濃度 0.88 mM の条件では 9.3% であり、硝酸塩濃度 7.5 mM 以上では 12.4% で一定となった (Fig. 3)。この減少率は硝酸塩濃度によりのみ依存することから、減少率を用いて測定値を補正することが可能であると考えられる。この方法を 1.5 μM FeCl_3 を含む植物プランクトン培養の実試料に適用したところ、1.47-1.50 μM となり、植物プランクトンによって放出された有機物の影響も見られなかった。

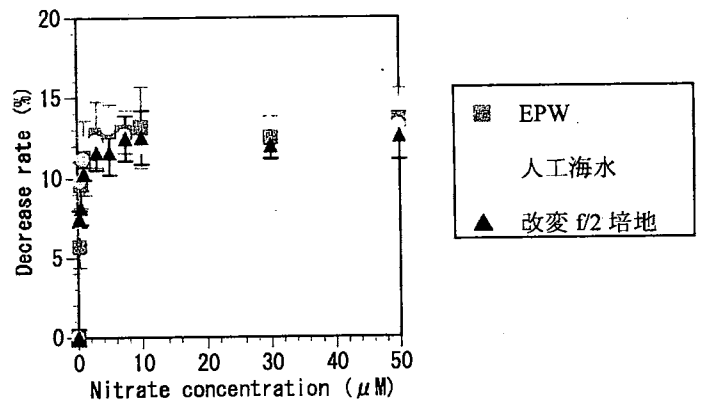


Fig. 3 試料水中の硝酸塩濃度と鉄濃度減少率の関係

以上の結果より、試料水中の硝酸塩濃度に応じて、または過剰の硝酸ナトリウムをマトリクスモディファイアとして添加することによって、正確な鉄濃度を求めることが可能である。

次に、植物プランクトンの生長に及ぼすキレート配位子の影響を解析するために、EDTA 類縁体を含む改変 f/2 培地を用いてプランクトンの生長実験を行った (Fig. 4)。

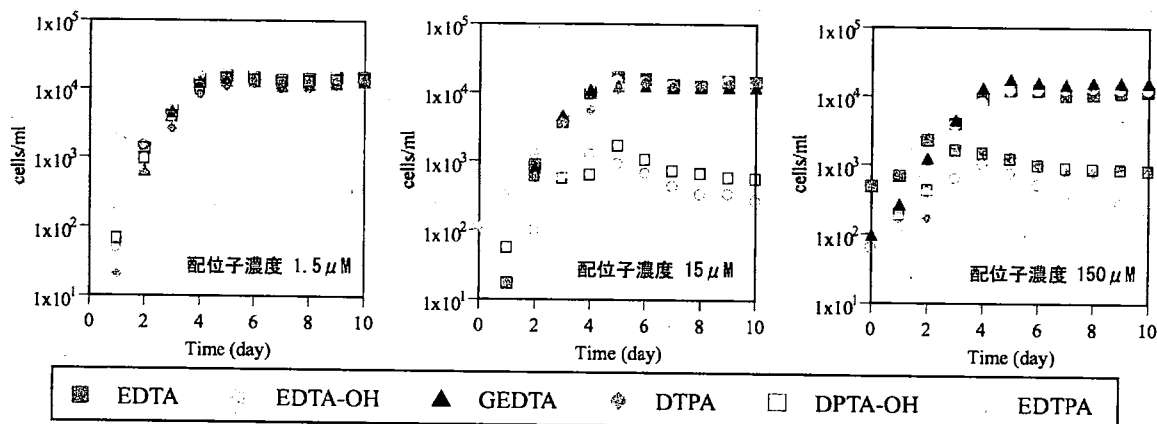


Fig. 4 EDTA 類縁体存在下における *Skeletonema costatum* の生長曲線

その結果、鉄制限下におけるキレート配位子による生長抑制は、濃度が高いほど抑制され易く、種類による生長抑制効果は EDTPO > DPTA-OH > DTPA > EDTA-OH > EDTA = GEDTA の順で大きく、また、その効果は植物プランクトン種によって異なり、*C. roscoffensis* > *H. akashiwo* > *P. carterae* > *C. antiqua* > *S. costatum* > *P. parvum* の順で抑制を受けやすいという傾向を得た。さらに詳細に植物プランクトンの生長過程におけるキレート配位子による生長抑制効果を明らかにするために、対数増殖期における植物プランクトンを用いて、3種類のEDTA類縁体 (EDTA、DTPA、EDTPO) の生長への影響について検討した結果、鉄制限下において生長抑制効果が現れる条件と同程度またはより低い濃度のキレート配位子の添加によって生長抑制が見られた。

キレート配位子の種類及び濃度による抑制効果の差異は、植物プランクトンによる鉄取り込み経路および取り込みに関わる鉄の存在形態に関係があると考えられる。第1の要因としては、植物プランクトン種によって生長に必要な鉄量が異なることが挙げられる。植物プランクトンの鉄要求量 (抑制を受けずに生長可能な培地中の鉄濃度) は種によって異なり、*H. akashiwo* > *C. antiqua* > *P. carterae* > *S. costatum* > *C. roscoffensis* > *P. parvum* の順で多いことがわかった。細胞あたりに必要な鉄量は、*S. costatum* > *C. roscoffensis* > *C. antiqua* > *H. akashiwo* > *P. carterae* > *P. parvum* の順で多くなった。生長実験の結果と比較すると、鉄要求量及び細胞あたりに必要な鉄量が多い植物プランクトンはキレートによる抑制を受けやすい傾向が得られた。また、鉄要求量と細胞あたりに必要な鉄量は完全には一致しないことから、植物プランクトン種間で鉄取り込み機構が異なる可能性が高い。次に、EDTA類縁体の種類によって受ける生長抑制の程度が異なる要因として、キレート配位子によって鉄の存在形態が変化し、植物プランクトンに対する bioavailability (生物可用性) が変化することが考えられる。そこで、鉄欠乏下における植物プランクトンの鉄取り込み実験を行った結果、キレート配位子による鉄取り込み量の抑制効果は濃度が高いほど強く現れ、EDTPO > DPTA-OH > DTPA > EDTA-OH > EDTA > GEDTA の順で鉄取り込み量が減少することがわかった (Fig. 5)。さらに、対数増殖期にある海洋植物プランクトン培養に、3種類のEDTA類縁体 (EDTA、DTPA、EDTPO) を添加して鉄取り込み量の測定を行い、キレート配位子添加後の鉄取り込み量の変化を明らかにした。

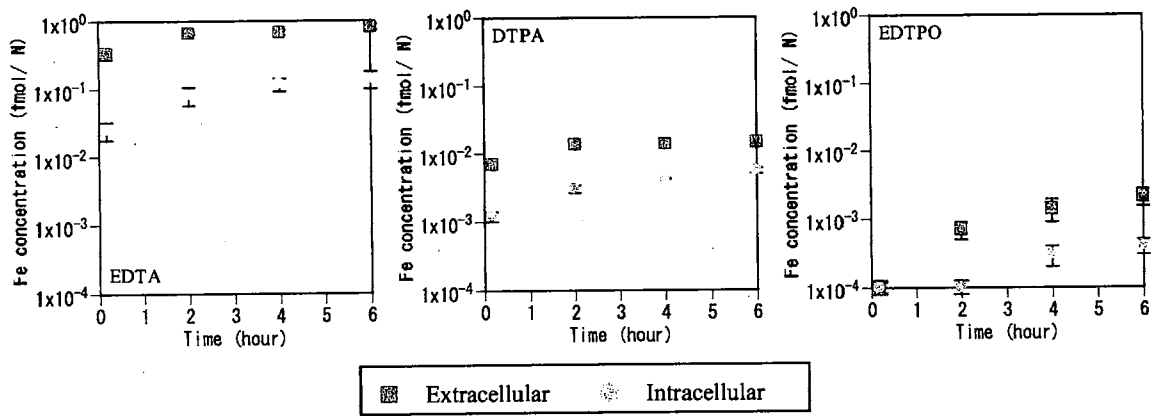


Fig. 5 EDTA 類縁体存在下における *Skeletonema costatum* の鉄取り込み量

Bioavailability の高い鉄の存在形態を明らかにするために、EDTA 類縁体を含む改変 f/2 培地中の鉄のスペシエーションについて検討した (Fig. 6)。その結果、植物プランクトンへの生長抑制効果の少ないキレート配位子存在下 (EDTA、EDTA-OH、GEDTA) では真の溶存態画分が少なく、コロイド態または粒子態の画分が存在するのに対して、生長抑制を及ぼすキレート配位子 (DTPA、DPTA-OH、EDTPO) を含む培地ではほとんどが真の溶存態鉄として存在する傾向が得られた。これらの培地では、粒子態鉄の画分 ($0.20 \mu\text{m} <$) がゆるやかに減少する一方、 $3.0 \mu\text{m} <$ の画分が増加するのに対し、コロイド態 ($0.025\text{--}0.20 \mu\text{m}$) 及び真の溶存態の画分 ($<0.025 \mu\text{m}$) は一定であった。このような鉄のスペシエーション変化はキレート配位子の濃度及び種類によらず同様に推移した。

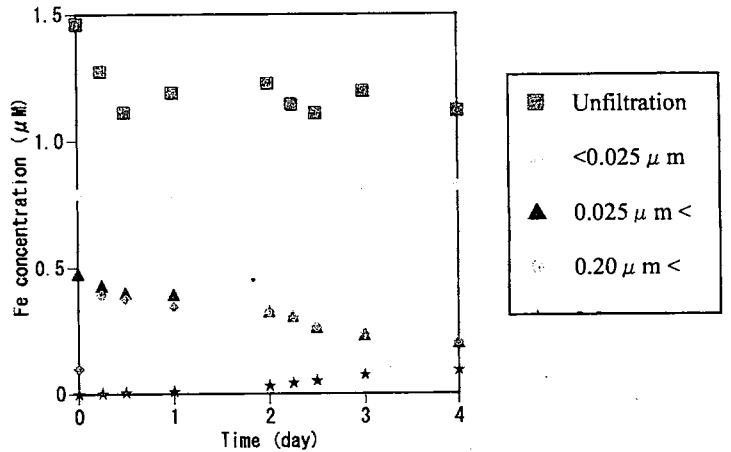


Fig. 6 EDTA 存在下における植物プランクトン培養中の鉄のスペシエーション

また、植物プランクトン存在下ではコロイド態鉄が涵濁し、 $3.0 \mu\text{m} <$ の画分の増加速度が速くなった。この要因として、植物プランクトン細胞表面へのコロイド態の吸着または取り込みと粒子態鉄からコロイド態鉄への移動が考えられる。

以上の結果より、植物プランクトンはコロイド態鉄を細胞表面に捕集し、その鉄を細胞内に取り込んで生長に利用する可能性が高いと考えられる。EDTA 類縁体の添加は、コロイド態鉄を減少させるために、植物プランクトンの生長を抑制する効果があると考えられる。

学位論文審査結果の要旨

提出された学位論文に関して、各審査委員が審査を実施するとともに、平成 19 年 2 月 9 日に口頭発表会と論文審査委員会を開催し、以下のように判定した。

水圏における微量元素が生態系に与える影響を化学的に考察するためには化学種組成（スペシエーション）の解明が不可避の問題である。とりわけ海洋における鉄の bioavailability については、海洋の一時生産を制限し、更には大気中 CO₂ の増減に影響を及ぼす要因として注目を集めている。本論文では、鉄化学種のスペシエーションの観点から、有機配位子存在下における植物プランクトン近傍の鉄の化学平衡とその生長に及ぼす影響について詳細に研究を行った。

申請者は、植物プランクトンの室内培養において nM レベルの鉄のスペシエーション変化を正確に把握するために、放射性トレーサー⁵⁵Fe を用いた高感度定量法を確立した。同法は、液体シンチレータに独自の工夫を加えて妨害物質の消光作用を極力抑えたものであり、共存物質の多い培養系においても鉄の高精度定量が可能になった。本分析法を駆使して、有機配位子存在下の植物プランクトン培養中における鉄化学種の組成変化をサイズ分画して解析するとともに、植物プランクトンに取り込まれた鉄の分布観測と合わせて、鉄の取り込み過程に関与する化学的因子を明らかにした。

以上、本研究は、海洋における植物プランクトンの増殖に及ぼす鉄化学種の影響を解き明かしたものであり、将来の環境改善技術につながる研究として博士（工学）の学位に値するものと判定した。