

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K14833

研究課題名（和文）精密定量分析および安定同位体分析による海洋におけるヘム鉄の動態の解明

研究課題名（英文）Revealing the dynamics of heme-iron in marine environments

研究代表者

伊左治 雄太（Isaji, Yuta）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門（生物地球化学センター）・研究員

研究者番号：80836320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、鉄を含む生体分子であるヘムBに着目し、海洋の微生物中に存在する鉄（＝生物源鉄）の分布と動態の解明に取り組んだ。具体的には、環境試料に含まれるヘムBを高感度で定量する手法を開発し、海水中や堆積物中のヘムBの濃度分布を明らかにするとともに、それを決める各環境因子（微生物量、植物プランクトン群集組成、光量、溶存鉄濃度、硝酸取り込み量）の影響を評価した。さらに、ヘムBの炭素・窒素安定同位体比分析法を新たに開発し、海水中のヘムBがどのような微生物群に由来するのかを明らかにした。ヘムBに関する世界で初めての知見に基づいて、海洋の生物源鉄の動態解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋における鉄の動態は、地球表層の物質循環や気候変動の重要な駆動因子である。しかし、海洋鉄循環の「生物プロセスが関わる側面」に関しては十分な知見が得られていない。本研究で明らかになった海水中の生物源鉄の由来や動態に関する新知見は、生物プロセスを含めた包括的な海洋鉄循環像を確立する上で不可欠な成果である。今後も同様の解析を全球的に進めることで、人間活動に起因する鉄供給分布の変化（例えば、人為起源鉄の排出、砂漠化、氷床溶解）に対する地球システムの応答を高精度に予測することが可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on heme B, an iron-chelated tetrapyrrole molecule, to trace the dynamics of biogenic iron in the ocean. We obtained concentration profiles of heme B in the ocean surface and the deep-sea sediments by applying our new highly-sensitive quantification method, and discussed their relevance to other environmental parameters (e.g., biomass size, phytoplankton community composition, light intensity, dissolved iron concentration, nitrate uptake ratio) which may influence the distribution of heme B. Furthermore, we established a new analytical method to determine stable carbon and nitrogen isotopic compositions of heme B, which enabled us to reveal the source microorganisms of heme B in the ocean surface and the deep-sea sediments. The sources and dynamics of biogenic iron in the ocean were discussed based on these first insights into heme B in natural environments.

研究分野：地球科学

キーワード：ヘム 海洋鉄循環 炭素・窒素安定同位体比 生物地球化学 高速液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

海洋の一次生産は、植物プランクトンの生育を支える必須元素の動態に支配される。鉄は必須微量元素の中で特に重要な律速因子であり、南大洋や北大西洋亜寒帯域など海洋表層の約 30% で植物プランクトンの生育を制限する。地球表層の物質循環や気候変動の駆動因子としての重要性から、海洋鉄循環に関する研究が 30 年以上にわたり行われており、溶存態鉄の濃度分布・供給源・化学種の解析が各海域で進んでいる。一方で、鉄循環が一次生産に与える影響を理解する上で欠かせない「生物プロセスが関わる側面」に関しては十分な知見が得られていない。特に問題なのが、海水中の生物粒子に含まれる鉄(生物源鉄)を詳細に分析する手法が存在しないことである。海洋鉄循環の全容を把握し、地球表層システムとの関係性を理解するためには、環境中の生物源鉄を詳細に分析する手法を開発する必要がある。今後も継続的に観測が続く溶存態鉄の動態に関するデータを最大限に活かすためには、この課題を解決することが急務である。

2. 研究の目的

本研究では、鉄を含む生体分子であるヘム B に着目する(図 1)。鉄が中心に配位したテトラピロール化合物であるヘム B は、ヘムタンパク質の補因子として生命活動に不可欠な電子伝達反応や酸化還元反応を駆動する機能性分子である。ほぼ全ての生物が主要な鉄成分としてヘム B を持つため、環境中のヘム B を詳細に分析することで、海水中の生物源鉄の動態に関する知見を得ることができる。

本研究ではまず、環境試料中のヘム B の定量法を開発する。海洋の懸濁態有機物、溶存態有機物、堆積物など多様な性状の試料に含まれるヘム B を高感度に定量する手法を開発することで、環境中の生物源鉄の分布を網羅的に明らかにする。また、環境試料中のヘム B を単離・精製し、化合物レベルの炭素・窒素安定同位体比を分析する手法を開発する。ヘム B の炭素・窒素安定同位体比は、環境中の生物源鉄がどのような微生物に由来するのかを解析するための指標となる。確立した手法を実試料に応用し、海洋における生物源鉄の動態を明らかにする。

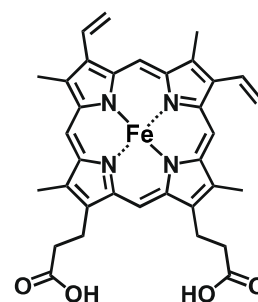


図 1 本研究のターゲットであるヘム B

3. 研究の方法

本研究で扱う天然試料は、多様な化合物が含まれる複雑物質である。僅かしか含まれないヘム B をそこから検出・定量し、安定同位体比分析を行うために化合物レベルまで精製するには、分析過程を綿密に組み立て、最適化する必要がある。試料の前処理段階については、海水・堆積物・生体など多様な試料からヘム B を効率的に抽出し、作業時のロスを最小限に抑えつつ粗精製を進める湿式化学分析の手法と条件の検討を行う。また、粗精製した試料中からヘム B を単離して検出・精製するために、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の分析条件を検討するとともに、吸光度検出法と質量分析法の条件を最適化し、定量分析の高感度化を図る。精製したヘム B の炭素・窒素安定同位体比分析には、微量化された元素分析/同位体比質量分析法を用いる(nano-EA/IRMS: Ogawa et al., 2010; Isaji et al., 2020)。

次に、確立した分析法を用いて環境中のヘム B の分布と動態を明らかにする。具体的には、東京湾沿岸において採取した懸濁態粒子・溶存態有機物と、2018 年の白鳳丸 KH18-6 航海にて東部インド洋東経 88 度測線(北緯 16 度から南緯 20 度)で採取した懸濁態粒子を分析する。また、研究室で保管している様々な海域の海底堆積物(例えば、日本海、相模湾、駿河湾、ナミビア沖、アラビア海)を分析し、堆積物中におけるヘム B の分布、動態、起源を明らかにする。

環境中のヘム B の分布や動態の規定因子を議論するためには、様々な生物群の細胞中のヘム B 濃度や炭素・窒素安定同位体比の特徴を知る必要がある。そこで本研究では、多様な微生物(シアノバクテリア、珪藻、メタン菌、硫酸還元菌、鉄還元菌)の培養試料について、ヘム B 濃度や炭素・窒素安定同位体比の測定を行う。

4. 研究成果

(1) ヘム B の定量法および炭素・窒素安定同位体比分析法の開発

本研究で開発した分析手法の概要を図 2 に示す(Isaji et al., 2020)。定量分析では、酸性アセトンでヘム B を抽出し、ジクロロメタンと 0.1 M 塩酸の液液抽出でジクロロメタン相に遊離したヘム B を回収した後、HPLC 分析を行った。本研究の HPLC 分析条件ではヘム B は 398 nm の波長を最も強く吸収したため、吸光度検出法による定量分析では 398 nm のクロマトグラムのピーク積分値を採用した(検出限界~1 pmol)。また、トリプル四重極質量分析計を検出器として MS/MS 分析を行うことで、夾雑物の影響を最小限に抑えつつ、検出限界~1 fmol の高感度化に成功している。これにより、ヘム B 濃度が極めて低い溶存態有機物や夾雑物が多い堆積物など、吸光度検出法では定量が難しい試料に関してもヘム B を定量することが可能になった。

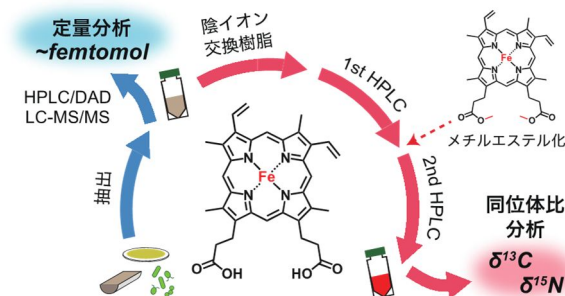


図 2 本研究で開発した分析法の概要

炭素・窒素安定同位体比分析のためのヘム B の単離・精製については、液液抽出の後に陰イオン交換樹脂を用いたオープンカラムクロマトグラフィーを行い、前処理段階での粗精製を更に進めた上で、HPLC 分析を行った。ヘム B を可能な限り高純度で精製するために、ここでは HPLC で単離・回収したヘム B をメチルエステル化し、ヘム B ジメチルエステルをさらに HPLC で単離・回収している(図 3)。本研究で用いた nano-EA/IRMS で炭素・窒素安定同位体比を測定するためには、2 μg のヘム B ジメチルエステルが必要である。上記の 2 段階 HPLC 精製法と微量安定同位体比分析法により、生体試料、海洋懸濁態粒子、海底堆積物など多様な環境試料中に存在する微量のヘム B の炭素・窒素安定同位体比を決定することが可能になった。

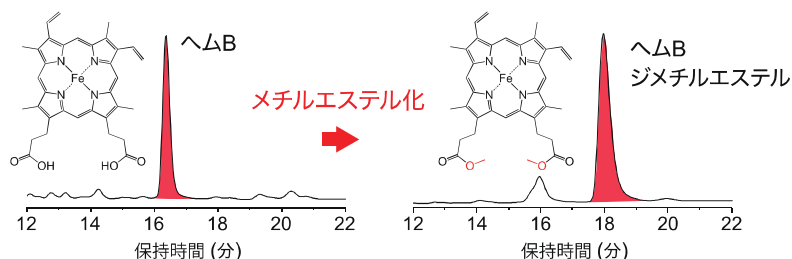


図 3 ヘム B (上) とヘム B ジメチルエステル (下) の HPLC クロマトグラム

(2) 生物中のヘム B

本研究で行った様々な生物試料の定量分析結果を図 4 にまとめた。ここでは、全有機炭素量濃度をバイオマス濃度の指標としてヘム B 濃度を規格化している(Heme B/TOC)。Heme B/TOC のレンジは 0.05–4.1 μmol mol⁻¹ で、光合成生物と非光合成生物の間に有意な差は認められなかった。光合成生物が光化学系 II やシトクロム *b₆f* でヘム B を使うのと同様に、非光合成生物の代謝過程においてもヘム B を使った電子伝達系が重要な役割を果たしていることを反映しているのだと考えられる。また、光合成生物のヘム B 濃度に対するクロロフィル色素濃度(TChl/heme B)は、およそ 10–1000 mol mol⁻¹ と広いレンジをとることが明らかになった。これは、光量や種によって光化学系の構成が変化することを反映しているのだと考えられる。

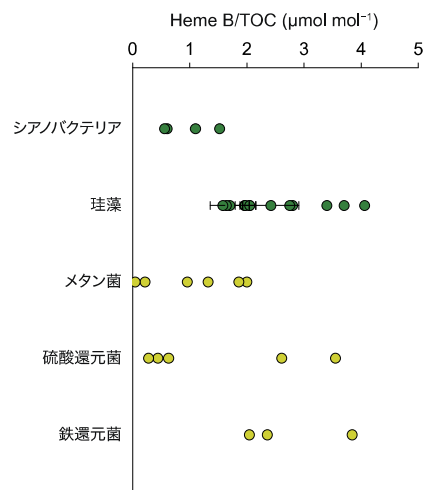


図 4 培養生物試料の Heme B/TOC 値

(3) 海洋におけるヘム B の分布

本研究で行った様々な環境試料の定量分析結果を図 5 にまとめた。懸濁態粒子中のヘム B に

関して重要なポイントの一つは、東京湾沿岸と比べて東部インド洋外洋のヘム B 濃度が 1 桁以上低いにも関わらず(東京湾沿岸: 16.4–307.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、東部インド洋外洋: 1.2–7.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$)、heme B/TOC や TChl/heme B が同等のレンジに収まるということである。これは、海水中のヘム B 濃度の主要な規定因子の一つがバイオマス量であることを示している。東部インド洋東経 88 度測線(北緯 16 度から南緯 20 度)の heme B/TOC のレンジは 0.9–3.0 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ で、北から南に向かって低下する傾向を示した。この変動の規定因子を明らかにすべく、様々な環境パラメータを解析したところ(クロロフィル濃度、プランクトン組成、光量、硝酸利用効率; Isaji et al., 2022、溶存態鉄濃度など) heme B/TOC は表層の溶存態鉄濃度と最もよく相関することが明らかになった($r^2 = 0.70$)。本測線の北部にあたるベンガル湾は、人為起源エアロゾルの供給で特徴付けられる。ベンガル湾表層水中に溶出したエアロゾル由来の溶存態鉄を植物プランクトンが取り込んだ結果、懸濁態粒子中の TOC に対するヘム B 量が増加したのだと考えられる。この結果は、海洋懸濁態粒子中のヘム B 濃度を植物プランクトンの鉄取り込み量の指標として使うことができる可能性を示唆する。

海底堆積物中のヘム B 濃度はサイト間で大きな違いが認められるものの、概して最表層の堆積物で最も高い値を示すことが確認された。Heme B/TOC にも同様の傾向が見られ、最表層の値は海洋懸濁態粒子と同じレンジに収まった一方で(0.3–4.6 $\mu\text{mol mol}^{-1}$)、堆積物深部では 0.012–0.15 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ という極めて低い値を示した。これは、堆積物中におけるヘム B の分解が TOC よりも進みやすいことを示唆する。ただし、堆積物の深度が深くなるにつれて heme B/TOC が単調減少するというわけではないため、分解プロセス以外にも堆積物中のヘム B 濃度を規定する因子が存在すると考えられる。堆積物が堆積した当時の海洋表層における植物プランクトンの鉄取り込み量や、堆積物中の微生物相の存在など、堆積物中のヘム B 濃度に影響しうる各要素を検証することが今後の課題となる。

このような海水中や堆積物中におけるヘムの動態を解明する上で鍵となるのが、ヘム B の炭素・窒素安定同位体比である。光合成生物のヘムとクロロフィルの生合成経路は共通しているため、ヘム B とクロロフィル色素の炭素・窒素安定同位体比は近い値を持つと予想される。培養植物プランクトンや陸上植物の葉のヘム B とクロロフィル *a* の炭素・窒素安定同位体比の分析結果は、この仮説を支持するものであった。一方で、海洋の懸濁態粒子中や海底堆積物中のヘム B はクロロフィル *a* と比べて炭素同位体比が低く、窒素同位体比が高い値を持つことが明らかになった。これは、環境中のヘム B が海洋表層の光合成生物のみに由来するわけではないことを意味する。ヘム B の主要な起源となっている非光合成生物を同定することで、環境中のヘムの動態に関する理解が今後さらに進むと期待される。

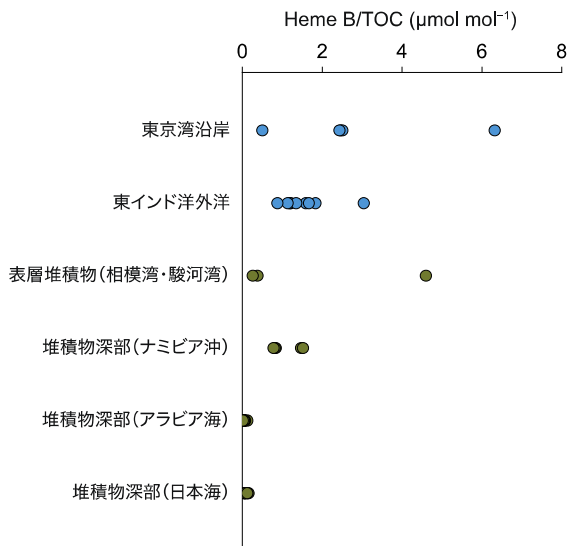


図5 海洋懸濁態粒子および海底堆積物中の Heme B/TOC 値

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuta Isaji, Nanako O. Ogawa, Yoshinori Takano, Naohiko Ohkouchi	4. 巻 92
2. 論文標題 Quantification and Carbon and Nitrogen Isotopic Measurements of Heme B in Environmental Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 11213 ~ 11222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c01711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuta Isaji, Nanako O. Ogawa, Christopher J. Boreham, Yuichiro Kashiya, Naohiko Ohkouchi	4. 巻 92
2. 論文標題 Evaluation of ¹³ C and ¹⁵ N Uncertainties Associated with the Compound-Specific Isotope Analysis of Geoporphyrins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3152 ~ 3160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b04843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuta Isaji, Chisato Yoshikawa, Nanako O. Ogawa, Kazuhiko Matsumoto, Akiko Makabe, Sakae Toyoda, Naoto F. Ishikawa, Hiroshi Ogawa, Hiroaki Saito, Makio C. Honda, Naohiko Ohkouchi	4. 巻 23
2. 論文標題 Nitrogen sources for phytoplankton in the eastern Indian Ocean determined from ¹⁵ N of chlorophyll a and divinylchlorophyll a	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Geochemistry, Geophysics, Geosystems	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1029/2021GC010057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuta Isaji, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi
2. 発表標題 Heme: The distribution and dynamics of a ubiquitous iron-tetrapyrrole molecule,
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合 2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Isaji, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi
2. 発表標題 The distribution and dynamics of a ubiquitous iron-tetrapyrrole molecule
3. 学会等名 29th International Meeting on Organic Geochemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊左治雄太, 小川奈々子, 高野淑識, 吉川知里, 小畑元, 本多牧生, 大河内直彦
2. 発表標題 海洋懸濁態有機物中のへムbの濃度分布
3. 学会等名 2019年度日本地球化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Isaji, Chisato Yoshikawa, Nanako O. Ogawa, Kazuhiko Matsumoto, Akiko Makabe, Sakae Toyoda, Naoto F. Ishikawa, Hiroshi Ogawa, Hiroaki Saito, Makio C. Honda, Naohiko Ohkouchi
2. 発表標題 Determination of nitrogen source for phytoplankton in the eastern Indian Ocean by $\delta^{15}N$ of chlorophyll a and divinylchlorophyll a
3. 学会等名 JpGU 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊左治雄太, 吉川知里, 小川奈々子, 松本和彦, 眞壁明子, 豊田栄, 石川尚人, 小川浩史, 斎藤宏明, 本多牧生, 大河内直彦
2. 発表標題 クロロフィル色素の窒素同位体比分析による東インド洋植物プランクトンの窒素源解析
3. 学会等名 2021年度日本地球化学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------