

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03585

研究課題名(和文) 淡水性微細藻類の個体レベル微量元素分析法開発による種別必須金属要求量の解析

研究課題名(英文) Evaluation of species specific elemental quota using new trace element analysis methods for individual microalgal cell

研究代表者

板井 啓明 (Itai, Takaaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：60554467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：微細藻類一個体の微量元素組成を分析する手法の確立を目的に、放射光源蛍光X線分析を用いた手法や、その応用的研究に取り組んだ。具体的な成果として、(1) 20 μm程度の微細藻類のFe, Cu, Zn濃度や相互比率の個体レベルで分析法確立、(2) 富栄養湖の珪藻中微量元素濃度の比較による細胞中元素濃度の支配要因解明、(3) 走査透過型X線顕微鏡(STXM)による1 μmレベルの微細藻類や細菌類における元素分布や炭素化学状態分析法の応用性評価、(4) メソサイズの動物プランクトン(カイアシ類)に対する個体レベルでのキレート洗浄とX線吸収微細構造によるFeの化学形態分析の達成、が挙げられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で取り組んだ手法は、海洋分野では北米の研究者1グループが進めてきた内容で、国内でその応用性を実証する取り組みはなかった。今回の研究成果が、国内の陸水学・海洋学コミュニティに波及すれば、水圏生態学の研究の深化につながり、気候変動に対する生態系応答などの課題にも貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：With the aim of establishing a method for analyzing the trace element composition of a single microalgae cell, we have been working on methods using synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis and its applied research. Specific achievements include: (1) establishing a method to analyze the concentrations and relative ratios of Fe, Cu, and Zn in microalgae approximately 20 μm in size at the individual level; (2) elucidating the controlling factors of intracellular element concentrations by comparing the trace element concentrations in diatoms from multiple eutrophic lakes (available element concentrations in water and cell density); and (3) analyzing 1-μm-level microalgae by STXM to evaluate the applicability of elemental distribution and speciation of carbon, (4) achieving chemical speciation analysis of Fe in mesoscale zooplankton (copepods) at the individual level using chelate washing and X-ray absorption fine structure analysis.

研究分野：環境地球化学

キーワード：放射光マイクロビーム 微細藻類 生物必須微量元素 湖沼 カイアシ X線吸収微細構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

水圏の生物生産制限因子として、主要栄養塩に加え、Fe, Cu, Zn, Coなどの微量金属が重要な役割を果たすことは、今日では広く認められている。生物側の元素要求量に対し、水中存在度が限られる金属は、その空間分布も生物生産の影響を受けて変化する。すなわち、生物生産性と微量金属動態は相互にフィードバックを及ぼす。水圏の環境因子が、環境-生物相間の物質交換へ及ぼす影響を定量化するには、天然の微細藻類を対象とした研究法が必要である。本研究では、主に放射光 X 線マイクロビームを用いた微細藻類の種別微量元素の精密計測法開発により、一次生産者への元素移行量を環境因子の関数として調べる手法開発を目標とした。

## 2. 研究の目的

下記 4 課題を計画し、研究を実施した。はじめに、基盤的手法である放射光 X 線マイクロビームを用いた分析法開発を実施し (1)、その手法を用いた応用研究として (2)を実施した。また、より微細 (<20  $\mu\text{m}$ ) または大型 (>100  $\mu\text{m}$ ) のプランクトンに適した手法の開発例として、(3)と(4)に取り組んだ。

### (1) 国内主要 X 線マイクロビーム分析ラインにおける $\mu\text{-XRF}$ 分析条件の整備と非検量線型微量元素定量法の検討

国内における主要 X 線マイクロビームの実験施設として、高エネルギー加速器研究機構・フotonファクトリー (以下、KEK-PF) の BL-4A, BL-15A, SPring-8 の BL37XU などが挙げられる。これらのビームラインは放射光 X 線マイクロビームを用いた蛍光 X 線分析 ( $\mu\text{-XRF}$ ) で広く利用されているが、微細藻類 1 個体の分析に応用するには、<100  $\mu\text{m}$  の生物種を高倍率の顕微鏡で観察した後、その細胞をビームライン上で同定し、検量線を用いずに元素濃度を定量する手法を確立する必要がある。両ビームラインは、集光される X 線のビームサイズ、得意とする X 線エネルギー領域、検出器の種類・配置などが異なっており、生物認証試料を用いた標準試料を作成し、それぞれのビームラインにおける分析条件の最適化を目的とした。

### (2) $\mu\text{XRF}$ 分析法の湖沼微細藻類への応用

確立した手法の応用研究として、関東近郊の富栄養湖である霞ヶ浦、手賀沼、牛久沼で採取された微細珪藻 (~20  $\mu\text{m}$ ) を対象に、個体別微量元素分析を実施した。得られた結果を、水中の微量元素濃度や pH などの環境データと比較して、微細藻類中微量元素濃度の支配要因について考察することを目的とした。

### (3) ピコプランクトンに応用可能な微小領域分析法の開発

上記課題で分析対象としたのは、>20  $\mu\text{m}$  のナノプランクトンだが、環境中にはより小型のピコプランクトンも存在し、環境中の生元素循環に重要な役割を担っていると考えられる。これらをターゲットとした分析法として、走査透過型 X 線顕微鏡 (Scanning Transmission X-ray Microscope: STXM) が挙げられる。本課題では、サブミクロンオーダーに集光した X 線ビームを用いて、1 $\mu\text{m}$  前後の微生物細胞について、C, Ca, Fe などのイメージングや、NEXAFS を用いた C の化学形態分析の可能性を試験することを目的とした。

### (4) メゾ動物プランクトンへの $\mu\text{XANES}$ 法による微量元素化学形態分析

微細藻類を捕食する大型の動物プランクトンでは、定量だけでなく体内での濃度分布解析や化学形態分析が原理的に可能である。このような手法開発が重要な金属として鉄が挙げられる。近年の我々の研究より、海洋の鉄は高次生物に転送される過程で安定同位体比 ( $\delta^{56}\text{Fe}$ ) を変化させ、その要因に鉄の化学形態 (ヘム鉄、フェリチンなど) が重要であることが示唆されてきた (Hasegawa et al., 2013)。そこで、本課題では、数 100  $\mu\text{m}$  サイズのカイアシ類を対象に、試料一個体のキレート溶液による洗浄法の評価と、微量元素の細胞内分布評価、Fe の化学形態分析を実施し、生体にとって重要な画分の鉄の化学形態分布を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) SPring8 の BL37XU、高エネルギー加速研究機構・フotonファクトリーの BL-4A で、 $\mu\text{-XRF}$  分析環境の最適化を実施した。微量元素濃度の定量法にはファンダメンタルパラ

メータ (FP) 法を用い、入射光強度、検出効率、マトリックスによる吸収などを考慮して算出した。また、算出された値の妥当性を評価するため、微量元素測定用認証物質 (CRM) である BCR 414 (freshwater plankton, 認証値: 17 元素)、DORM-4 (fish protein, 認証値: 7 元素)、DOLT-5 (dogfish liver, 認証値: 14 元素) の錠剤を調整し、それらの XRF スペクトルの解析から得られた濃度を参照値と比較した。

- (2) 霞ヶ浦、手賀沼、牛久沼において、6月と8月に採取した珪藻を測定に用いた。μXRF データは、各個体のイメージングを取得後に、代表的なスポットで 50–120 s 積算して取得し、pyMCA を用いて解析した。同じ試料について、蛍光顕微鏡による細胞数計測、ICP-MS を用いた各種金属濃度分析を実施し、個体別微量元素濃度と比較した。
- (3) KEK-PF・BL-19A の compact STXM を用いて、霞ヶ浦で採取した藍藻類 (*Synechococcus sp.*, *Microcystis sp.*) および微細珪藻 (*Cyclotella meneghiniana*) 中の C, Ca, Fe の分布と化学状態を分析した。任意の領域における NEXAFS スペクトルを抽出し、ピーク位置の前後で画像の差分をとり炭素官能基分布を求めた。また、金属元素の吸収端前後の吸光度分布の差分から、元素分布を求めた。
- (4) 茨城県大洗港および神奈川県真鶴港で、プランクトンネットで採集したカイアシ類 (*Acartia spp.*) を、2%グルタルアルデヒドで固定し KEK-PF・BL15A で分析した。分析対象は、先端をカットしたピペットで一個体ずつ採取し、ポリカーボネート濾紙上にマウントした後、EDTA-2Na, シュウ酸 Na を含む溶液により洗浄した。μ-XRF による個体全体の元素イメージングを取得した後、複数の Fe 濃集領域で Fe K 吸収端の μ-XANES を測定した。

#### 4. 研究の成果

- (1) 錠剤に整形した認証物質から得られたスペクトルを解析した結果、軽元素や試料中の不均一性の高い元素は、推定値と認証値に差が認められた。一方、遷移金属を中心に原子番号の大きい元素では両者の関係は線形であり、プランクトン中微量元素の絶対定量が可能と判断した。空間分解能の高い BL37XU では、直径 20 μm 程度の円中目珪藻について、明瞭な元素イメージングが得られたため、これを用いて輪郭部と細胞の中心部の XRF スペクトルを比較した。その結果、カルシウムなど一部の元素で有意な差が検出され、本手法がナノプランクトン中微量元素の局所構造分析にも応用可能であることが示された。
- (2) 霞ヶ浦、手賀沼、牛久沼で採取された試料について、全試料で珪藻が高密度 (>10<sup>3</sup>/ml) で観察され、主な種として *Cyclotella*, *Fragilaria*, *Aulacoseira* (10 ~ 50 μm) が観測された。複数の珪藻試料について、個体別 μ-XRF 分析を実施した結果、Ca, Mn, Fe, Cu, Zn についてピークが検出され、定量限界は 1 ~ 10 ppm であった。同じ環境で比較した場合、3 種間で元素濃度に有意差は見られなかった。Mn, Fe, Cu, Zn の細胞中濃度は、6 月の方が 8 月より高い傾向が認められた。8 月は光合成が活発で pH が高く、利用可能な金属分画が抑制されるためと推察された。各元素の溶存量と細胞レベルの間には正の相関が観察された。この相関は、溶存金属量を細胞密度で除すとより明瞭になり、細胞内の元素量は単位細胞で利用可能な元素量に支配されることが示された。今回推定された微細珪藻の微量元素組成を、培養研究で推定された海洋性珪藻と比較した結果、湖沼の珪藻中微量元素 (Mn, Fe, Cu, Zn) は海洋性に対して 1 桁以上高い値を持つことが明らかになった。本研究により、淡水系におけるナノプランクトン中の個々の微量元素の分析が可能となり、本手法が、水とプランクトン間の元素分配の理解や、各種元素の生物濃縮因子の決定などに有用であることが示された。

(3) STXM 分析により、ピコプランクトンの一種である *Synechococcus* や、5  $\mu\text{m}$  を下回る微細珪藻の単一細胞について、C, Ca, Fe などの元素についてイメージングを得ることができた (Fig. 1)。 *Synechococcus* については、C の K 吸収端 NEXAFS により、細胞内部に顆粒状にタンパク質が分布し、輪郭部に多糖類、細胞領域全体に炭酸塩が分布することが明らかになった。また、炭素の化学形態は、細胞固定に用いる試薬によって変化することも明らかになった。これらの結果から、STXM がピコプランクトン中生元素の局所化学形態分析に有効であることが示された。今後、分析のハイスループット化、適切な試料前処理方法の確立、重元素イメージングとのスタッキングが進めば、微細藻類や細菌類の分析において、強力なツールとなることが示された。

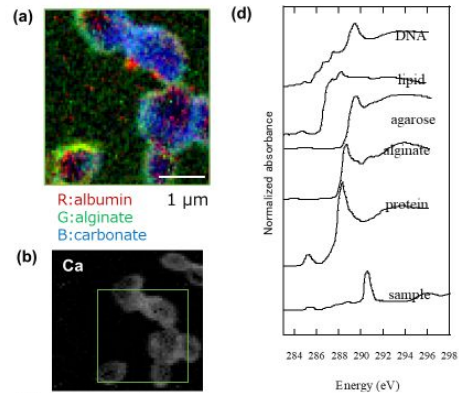


Fig 1. *Synechococcus* 単一細胞に対する (a) C の RGB イメージング、(b) Ca のイメージング、(c) Fe のイメージング、(d) 標準試料とサンプルにおける C の K 吸収端 NEXAFS.

(4) 採取されたカイアシ類を、個体別にキレート溶液で洗浄し、処理の前後で元素分布を比較した結果、17 個体のカイアシ試料における洗浄前後の微量元素カウントの減衰率平均値は、Fe, Cu, Zn でそれぞれ 41.5, 55.2, 80.6%であった。この結果は、洗浄処理の重要性を個体レベルの検証に成功した初めての事例である。この減衰傾向は、各個体でおおむね一貫しており、グルタルアルデヒド溶液による固定の有無や、pH への依存性は認められなかった。濃集領域における Fe の化学形態は、Fe K 端  $\mu\text{-XANES}$  の線形結合フィッティングの結果から、フェリチンの寄与が大きいと推定された。これは、脊椎動物において 2 価の Fe (ヘム鉄) が多いことと対照的であった。カイアシ類は、酸素運搬にヘムエリスリンを使うことが知られているが、本研究の結果から、ヘム鉄に対して過剰のフェリチンを保有している可能性が示唆された。この結果は、低次生態系生物の鉄獲得戦略や、動物プランクトン捕食者への吸収効率を議論する上で貴重な知見と思われる。

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 0件）

1. 著者名 Yamada, S., Ichinohe, Y., Tatsuno, H., Takahashi, Y. (11/42), Itai, T. (12/42), et al.	4. 巻 92
2. 論文標題 Broadband high-energy resolution hard X-ray spectroscopy using transition edge sensors at SPring-8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Review of Scientific Instruments	6. 最初と最後の頁 13103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0020642	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 Hasegawa, N., Itai, T., Kunisue, T., & Takahashi, Y.	4. 巻 51
2. 論文標題 Variation of iron stable isotopes in a marine ecosystem from the Northwest Pacific Ocean	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 556-560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.220099	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 Hasegawa, N., Takahashi, Y., & Itai, T. (2023). 881, 163449.	4. 巻 881
2. 論文標題 Tissue-variation of iron stable isotopes in marine fish coupled with speciation analysis using X-ray absorption fine structure. Science of The Total Environment,	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science of the Total Environment	6. 最初と最後の頁 163449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2023.163449	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takaaki Itai, Kazusa Tamura, Yoshio Takahashi
2. 発表標題 Variation of trace element level in diatom cells from Japanese eutrophic lakes using synchrotron radiation microbeam X-ray fluorescence spectrometry
3. 学会等名 The 8th International Symposium on metallomics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takaaki Itai, Kazusa Tamura, Yoshio Takahashi
2. 発表標題 Cellular level elemental analysis of freshwater diatom using microbeam X-ray fluorescence spectrometry
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板井啓明、石水浩喜
2. 発表標題 湖沼の微量元素ホメオスタシス 第一報
3. 学会等名 日本地球化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田柳紗英、板井啓明、石水浩喜、高橋嘉夫
2. 発表標題 富士五湖、仁科三湖、裏磐梯三湖におけるケイ素動態の解析
3. 学会等名 日本地球化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川菜々子、高橋嘉夫、板井啓明
2. 発表標題 X線マイクロビーム分析を用いた橈脚カイアシ類外殻に付着したFe, Cu, ZnのEDTA洗浄法の評価
3. 学会等名 日本地球化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋嘉夫、福土圭介、田中雅人、柏原輝彦、関根康人、板井啓明	4. 発行年 2021年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 444
3. 書名 分子地球化学	

〔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
研究分担者	平田 岳史 (Hirata Takafumi)  (10251612)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授  (12601)	
研究分担者	高橋 嘉夫 (Takahashi Yoshio)  (10304396)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授  (12601)	
研究分担者	砂村 倫成 (Sunamura Michinari)  (90360867)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教  (12601)	

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
---------	---------