

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：12501  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2012～2015  
課題番号：24310064  
研究課題名(和文)ヒザラガイの磁鉄鉱を主成分とする歯の形成メカニズム解明と環境・材料科学への応用  
  
研究課題名(英文) Study on formation mechanism of radular teeth of chiton which is composed with magnetite, and application for environmental and material science  
  
研究代表者  
沼子 千弥 (Numako, Chiya)  
  
千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授  
  
研究者番号：80284280  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：磁鉄鉱を主成分とするヒザラガイの歯の形成メカニズム解明のため、環境から歯に至るまでの鉄の移動過程と磁鉄鉱形成プロセスを検討した。またヒザラガイの元素濃集能力を応用し、Srや希土類元素のモニタリングの検討を行った。PIXEによる元素分析の結果、ヒザラガイの歯に対してSrの蓄積が認められた。また、ヒザラガイの歯のマトリクスであるキチンとリン酸化キチンに対するFeとCaの吸着実験を行い、リン酸化が金属元素の吸着に有利であることも見いだした。

研究成果の概要(英文)：Transportation of iron from environmental material till radular teeth of chiton and its formation process of magnetite, major material of tooth cups were investigated in order to elucidate formation of the teeth of chiton which are composed with magnetite. Monitoring of Sr or REEs using bio-accumulation abilities of chitons was also examined in this study. Accumulation of Sr into the teeth of chiton was observed with micro PIXE analyses. In addition, Fe and Ca absorption experiments to chitin or phosphate treated showed that phosphate treatment enhanced accumulation of metal ions to chitin.

研究分野：分析化学 X線分析

キーワード：ヒザラガイ 生体濃縮 環境モニタリング キチン 吸着

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は生物の必須元素であるが、体内で磁鉄鉱( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )を形成し硬組織の主成分とする生物は、走磁性バクテリアとヒザラガイのみである。なぜこれらの生物が磁鉄鉱を形成するのかという疑問から多くの研究者がヒザラガイに注目しているが、その磁鉄鉱形成メカニズムはまだほとんど明らかになっていない。ヒザラガイが環境に存在するどのような物質を鉄の供給源としているか、その鉄をどのような化学形で消化・運搬し、磁鉄鉱を形成しているか、どのように磁鉄鉱が選択的に形成されるのか、これらの根幹的な問題の解決は、理学分野での根幹的な課題でもある。

工学分野においても、常温常圧の穏やかな環境下における湿式での磁鉄鉱形成モデル・低環境負荷型の新たな材料合成モデルとして、その形成メカニズムの解明が望まれている。また、磁鉄鉱で形成される摂餌面の鉄濃度は70%に達し、海水からの鉄の濃縮係数は $10^8$ という驚異的な値であることから、生物活動により選択的な元素回収を行うことのできる重要な系でもある。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒザラガイの生息環境に存在する藻類や岩石、海水などをヒザラガイとともに採集し、それらに対してXAFS法をはじめとする非破壊状態分析を行うことにより、鉄が取り込まれヒザラガイの体内で磁鉄鉱に変化するまでの全プロセスを追跡することを計画した。さらに、ヒザラガイの持つ驚異的な元素濃集能力を利用し、ヒザラガイによる環境からの有用元素の効率的回収・有害元素除去・環境モニタリング(環境科学分野への応用)、ヒザラガイが行っている磁鉄鉱形成を実験室系で再現し、常温常圧・中性という穏やかな環境における、低エネルギー・低環境負荷・環境親和型の磁鉄鉱合成(材料科学分野への応用)を開発することを試みた。

(1) ヒザラガイの歯の形成において、鉄の供給源となる物質から鉄を効率的に消化・吸収し歯舌に蓄積し、磁鉄鉱が形成されるまでのすべてのプロセスを、同一の非破壊状態分析法によるモニタリングで明らかにすることを目的に、ヒザラガイの胃の内容物から、摂餌により取り込んでいる物質の特定を試みた。また、可搬型蛍光X線装置により、ヒザラガイの生息環境におけるそれらの鉄濃度を調査した。さらに、ヒザラガイとともに上述の環境物質を採集し、X線回折・XAFS法・蛍光X線分析により、そこに含まれる鉄化合物の種類と存在量の算出を試みた。

(2) 鉄とカルシウムを高濃度に蓄積する歯舌の形成に付随し、環境に存在する微量元素もヒザラガイに蓄積されるかを調べた。また、それを利用し、環境からの特定元素の回収・

浄化・リサイクル・環境モニタリング法など、環境科学分野へ応用することを試みた。また、ヒザラガイの歯舌以外にもこの目的にかなう放射性元素・希土類元素の濃縮系がアルかどうかについても探索を行った。

(3) 出発物質、pH、共存元素、生成速度を因子とし、ヒザラガイの行っている磁鉄鉱形成を、実験室系で再現する。さらに特定の鉱物成分の選択的形成、形成された無機成分の空間的配置を因子とし、自己組織化を伴う高効率、高選択性、高再現性を伴う新規のものづくり手法の確立を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 可搬型蛍光X線装置を利用し、ヒザラガイの生息環境に存在する鉄の量を調査した。また、ヒザラガイの胃の内容物から、摂餌により取り込んでいる成分を特定した。さらに、鉄が消化・吸収を経て歯冠に固定されるまでの全プロセスを、XAFS法により明らかにすることを試みた。

可搬型蛍光X線分析装置により、ヒザラガイの生息する潮間帯にある環境物質の鉄の分析を徳島・宮城で実施した。特に鉄の濃度が高く、ヒザラガイの摂餌に関連すると考えられる環境試料の探索と採集を行った。

ヒザラガイを採集し一週間冷蔵庫で放置し、ヒザラガイの糞を回収した。また解剖して胃の内容物も回収した。これらを実体顕微鏡で観察し、から、摂餌により鉄の回収に利用している物質を推測した。

環境試料、ヒザラガイの軟組織、歯舌の分析を採集した試料の同定をX線回折、XAFS、ラマン分光、IR等を用いて行った。

(2) ヒザラガイの歯は主成分である鉄とカルシウムを高濃度に濃集するため、これらと化学的性質が類似しヒザラガイの生息環境に存在するに環境に存在する元素も、それに伴い歯舌または硬組織である殻板に濃縮される可能性がある。この可能性を検証し、新規の元素回収・除去・リサイクル・モニタリングシステムとしての開発に着手した

生息地域によるヒザラガイの歯舌の含有元素の差異を明らかにするために、日本のヒザラガイ、ケハダヒザラガイ、ニシキヒザラガイ、リュウキュウヒザラガイと近縁種でオーストラリアに生息する4種のヒザラガイの採集を実施した。日本とオーストラリアで採集した試料について、PIXEやレーザーアブレーション質量分析により含有元素の種類と含有量、歯舌内での空間分布を検証した。

地球表層に存在する元素は、その物質循環において鉄と挙動が類似する親鉄元素と、ケイ素やカルシウムなどの造岩元素と挙動が類似する親石元素に分類される。ヒザラガイの歯は鉄濃集部と、リン酸カルシウム濃集部に明確に分かれているために、一つの歯から、親鉄元素と親石元素の特異的な取り込みを観測・比較することが期待された。同様に、

レアメタルや希土類元素、放射性元素も取り込む可能性があることと、ヒザラガイの活動範囲は限られているために、生息地域に特徴的な物質循環をモニターするのに有利であることが考えられた。これを受けて、特に原子力発電所の事故により Sr が拡散されている宮城・福島地域を定点観測の地域として設定し、ヒザラガイを用いた Sr のモニタリングを検討した。研究期間の中で複数回、宮城・福島で調査を行い、ヒザラガイの生息地域の特定とヒザラガイの採集を行った。またその歯舌試料に対して PIXE による元素分析を行い Sr の検出を試みた。

ヒザラガイ以外の生体濃縮・生体鉱物化現象の系で放射性元素や希土類元素などの濃集が確認できる試料の探索を行った。海洋生物の系では、リン酸カルシウムを基質として Mn・Zn を高濃度に濃集した腎臓結石を形成することで知られているワスレガイ、その他長期にわたり土壌と接していたリン酸カルシウム質の象の牙の化石を対象試料として、PIXE による元素分析を行った。

(3) ヒザラガイと同じ、常温・常圧、中性付近での湿式による磁鉄鉱形成を、実験室系で再現することを試みた。

ヒザラガイの歯舌の基質となっているキチンの共存下、もう一つの主成分であるリン酸カルシウムの共存下で、磁鉄鉱の形成がどのように進行するかを観察した。キチンは、甲殻類や軟体動物の外骨格や殻に存在する直鎖状の高分子であり、その構造はセルロースと類似している。キチンおよびその誘導体は重金属イオン、アルカリ金属、アルカリ土類金属に対して吸着能を示し、キチンにリン酸化処理を施すことで吸着能が飛躍的に向上することが報告されている。

本研究では、試薬のキチンと合成したリン酸化キチン、そしてヒザラガイの歯舌のなかで鉄がまだ沈着していない部分に対して Fe と Ca の吸着実験を行い、その吸着量を原子吸光法により、その化学状態を XAFS により明らかにすることを試みた。リン酸化キチンは IR によりリン酸の官能基が付着していることを確認した後、吸着実験に用いた。50ppm の  $\text{FeCl}_3$  溶液、 $\text{CaCl}_2$  溶液および両元素共存溶液に対して 50mL にキチンおよびリン酸化キチンは 100mg、ヒザラガイの歯舌は混合液 25mL に対して 50mg を浸漬し、25℃ でマグネチックスターラーで撹拌した。この拡販時間を変化させ、吸着量に変化があるかどうかを比較した。ろ過後、ろ液に対して原子吸光法による元素分析を行い、各元素の吸着量を求めた。

これらの吸着実験は酸性条件であったが、実際のヒザラガイの歯舌はほぼ中性を示すため、その条件に近い吸着実験を行うことを検討した。しかし、3 価の鉄は加水分解によって pH 3~4 くらいで沈殿してしまい、これよりも高い pH での実験では鉄の沈殿の方が

吸着形として優勢になることが考えられた。また、吸着基質のキチン・リン酸化キチンもアミド基・リン酸が吸着サイトであるため、pH の影響を受けると考えた。そこで、酸性の鉄溶液に NaOH 水溶液を滴下させ、pH を計測するとともに伝導度により沈殿形成の有無、自由に動くことのできるイオンの量を観測し、そこからヒザラガイの歯舌においてキチンに鉄が吸着する過程を推察することを試みた。塩化鉄(II)溶液(50 mg / L, 50 mL)にキチンまたはリン酸化キチンを 50.0 mg 添加後、 $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH 水溶液( $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ )を滴下していき滴下量に対し pH と電気伝導率をプロットした。無添加、キチン添加、リン酸化キチン(2.2 で合成)添加の 3 パターンについてそれぞれ 3 回ずつ実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 可搬型蛍光 X 線装置を利用し、徳島(鳴門海岸竜宮の磯)と千葉(勝浦付近の海岸)のヒザラガイの生息環境に存在する鉄の量を調査した。ヒザラガイの生息する潮間帯の岩石は砂岩・泥岩で、鉄の含有率は 0.5~5% 程度であった。その他、藻類やフジツボなどの生物も多数共存していたが、これらの鉄濃度は岩石よりも低く 1% 以下であった。これらの環境試料を実験室系で X 線回折や蛍光 X 線で分析を行ったが、特に鉄を高濃度に濃集している物質はみられなかった。

ヒザラガイを冷蔵庫で一週間放置し回収した糞と、ヒザラガイの胃の内容物を実体顕微鏡で観察したところ、岩石の破片や昆虫の外骨格、消化中の藻類の繊維、フジツボの外殻の破片などが観察された。胃の中の岩石はほとんど変質を受けていなかったことから、消化・吸収されていないと考えた。同様にフジツボの外殻も炭酸カルシウム質でもととの鉄濃度が低いことから特に鉄の回収プロセスには関わらないと考えた。本研究ではヒザラガイにみられる生体濃縮の鉄の供給源としては、胃の中で消化が確認された藻類か、またはゲル状で形状の観察が困難である水酸化鉄などの岩石表面の吸着物質であると考えられた。

環境試料、ヒザラガイの軟組織、歯舌に対して XAFS により鉄の非破壊状態分析を行った。砂岩・泥岩に含まれる鉄は酸素と結合した 3 価状態であった。フジツボに含まれる鉄は XAFS の検出限界以下で、スペクトルを得ることができなかった。ヒザラガイのあごや歯舌嚢に含まれる鉄は濃度が低く、結晶性の低い 3 価の化合物状態であったが、これが有機物配位子を含む錯体なのか単純な溶存体なのかを XAFS で区別することはできなかった。一方、歯舌に固着された鉄はすぐに磁鉄鉱に変換され、高濃度に濃集されながら化学状態が変化していくことがわかった。これらのことから、ヒザラガイにおける鉄の高濃度濃縮に最も効率が高く影響を与える課程は食物等による鉄の摂取や消化・吸収プロセス

スではなく、その後の歯舌形成における無機鋳物がプロセスであることがわかった。今後は、この歯舌形成の過程に重点を置いて、ヒザラガイの鉄の高濃度蓄積について検討を継続する。

(2) 徳島・沖縄・千葉で採集した4種のヒザラガイと、オーストラリアのシドニー、サンシャインコースト、ケアンズで採集した4種のヒザラガイの歯舌と貝殻に対して、蛍光X線分析、マイクロPIXE、レーザーアブレーション質量分析による元素分析を行った。歯舌の主要構成元素はFe, Ca, Pであり、そのた微量成分としてMgやZnなども検出されたが、ヒザラガイの亜種や生息地域によりこれらの元素量にはあまり大きな差異は見られなかった。亜種によりFeの濃集部位とCa・Pの濃集部位にはっきりと境界があるもの、あまり境界がみられないものがあり、鉄の含有率は前者の方が大きい傾向があった。

宮城県石巻と福島県いわき市でヒザラガイの採集を行った。当初の予定では当該地のヒザラガイの歯舌について他地域よりも有意差を持ってSr濃縮が観察できるかどうかを検討する事と、一地点のヒザラガイを複数回採取し、経時変化をモニタリングする計画であったが、2011年の東日本大震災において発生した津波により海岸線が浸食されたり潮間帯が泥をかぶることにより海岸領域の海洋生物の生態系が大きく変化してしまい、ヒザラガイをほとんど発見することができなかつたり、発見しても数個体のみで、本研究のためにヒザラガイを採集してしまうとその地域のヒザラガイが絶滅してしまう可能性があり、2014年度まで、ヒザラガイの採集を行うことができなかった。そこで科研費の遂行期間を1年延長し、2015年に福島県いわき市で採集を行ったところ、ヒメケハダヒザラガイが潮間帯で繁殖していることが確認され、これを採集することができた。地域による差を検討する必要があったため、徳島県鳴門海岸のヒメケハダヒザラガイの採集も行い、それぞれの歯舌に対してマイクロPIXEでの元素分析を実施した。

通常の測定条件では主成分のFeのサムピークが妨害してSrを適切に検出することが難しかったため、プロトンの入射出力を減少させてこの影響を抑えながら分析を行うことと、歯舌のなかでFeが少なくCaが多い部分を探し、その部分のPIXE分析を行うことでSrのピークを見ることができるようになった。しかし、今回採集を行ったいわき市と鳴門海岸のヒメケハダヒザラガイでは、PIXEの感度の範囲でSrの含有量に差異をみることはできなかった。これは福島の潮間帯の生態系が復帰したのが最近なのでSrの蓄積が顕著でなかったのか、すでに福島地域のSr濃度が拡散により低下しているのか、それともヒメケハダヒザラガイという亜種があまりSrの蓄積をしないからなのか、理由を特定することができなかった。ただ、本研究に

よりPIXEではほぼ非破壊状態で生体硬組織試料に含まれるSr濃度の検討を行うシステムの構築には成功しているため、この環境モニタリングを今後も続けて、ヒザラガイが有用であるかどうかの検証を引き続き行う予定である。

ワスレガイの腎臓結石と象の牙の化石についてPIXEによる元素分析を行った。ワスレガイの腎臓結石では、Pはほぼ均質に分布していたが、(Mn+Zn)が同心円の縞状に分布し、Caの濃度分布と負の相関をとった。それ以外の元素、特に希土類元素については顕著な濃集は見られなかった。

一方、絶滅してしまった象の一種のマストドンの牙の化石にウランやイットリウムが濃集していることを見いだした。特にウランの濃集は非常に顕著で、生きている時から蓄積があったのか、化石化するプロセスで土壌からウランが移行したのか、興味もたれた。天然で鋳物として産するウランとしては、閃ウラン鋳( $UO_2$ )とリン灰ウラン鋳( $Ca(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 10-12H_2O$ )が知られている。象牙の基質はハイドロキシアパタイト( $Ca_5(PO_4)_3OH$ )であり、そこにウランが置換して、リン灰ウラン鋳のような化学状態を作っている可能性が示唆された。またイットリウムもカルシウムと置換することが可能である。この事象より、海水のような希薄系からの希土類やウランの濃縮現象を生体鋳物でモニターすることは困難だが、土壌中の堆積物でハイドロキシアパタイト質のものであれば環境モニタリングに活用できる可能性が浮上してきた。この知見を次の研究の展開で活用していく予定である。

(3) 合成環境の中で鉄を酸化・還元したりスピネル構造をとりやすい元素が存在すると、中性付近でも磁鉄鋳が部分的に形成されることを確認したが、水酸化鉄や酸化水酸化鉄の形成のほうが優勢であるのと、磁鉄鋳形成について良い再現性が得られなかったことから、今後引き続き検討を行う予定である。

キチンとリン酸化キチンに50ppmのCa水溶液を浸漬させた実験の結果、それぞれの吸着量は0.6%と37%であった。同様に50ppm Fe水溶液の吸着実験では、9.9%と95%の吸着率を示した。いずれの元素でもキチンよりもリン酸化キチンのほうが高い吸着率を示した。この理由としてはアニオン性のリン酸基が金属イオンと結合を形成するためだと考えられた。ヒザラガイの歯舌ではリン酸カルシウムを形成するためにリン酸イオンが供給されるが、これは鉄濃集部への鉄沈着を促す効果もあることが推測された。2つの元素で吸着を比較すると、CaよりもFeの方が選択的ともいえる高い吸着率を示すことがわかった。この理由として、キチンでは、電気陰性度・イオン半径の影響により、鉄がカルシウムよりも大きな相互作用を受けたと考えた。また、リン酸化キチンでは、リン酸基の酸解離定数から、酸性条件下ではリン酸基の

水素が1つ解離した状態が主を占め、カルシウムよりも鉄の方がより安定な結合を形成するためだと考察した。機構としては、酸性水溶液において鉄原子に結合したヒドロキシ基が水素イオンを取り込み正電荷量が増加し、リン酸化キチンのリン酸基と配位子交換の後に結合したためだと考えられた。

ヒザラガイの歯舌を用いてFeとCaの混合水溶液で吸着実験を試みたが、約30個体分のヒザラガイの歯舌でも50mgと微量であったため、母液の金属イオンの吸着量も微量で、本吸着実験においてピーカーへの吸着の影響や原子吸光法の誤差を加味して、適切な吸着量を算出することができなかった。

吸着実験後のキチンとリン酸化キチンに対して測定したFe K-XAFSスペクトルを比較したところ、キチンとリン酸化キチンでは吸着後の鉄に変化は見られず、価数は3価の状態のままであることが確認された。キチンとリン酸化キチンのスペクトルで違いは観察されなかった。この2つのスペクトルは $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沈殿とは異なっており、 $\text{FeCl}_3$ 水溶液に類似していた。このことから、本系に鉄は水和錯体または一部塩化物イオンを置換した錯体の形でキチンやリン酸化キチンに吸着していることが推察された。

攪拌時間を变化させた試料でもXAFSスペクトルに変化は見られず、時間の变化による酸化数や化学形の変化が起こっていないことがわかった。

本吸着実験の条件では、リン酸化キチンの95%という吸着率の場合でさえも、磁鉄鉱の形成は確認されなかった。ヒザラガイの磁鉄鉱形成現場の体液の鉄濃度が未知であるために、今回の吸着実験は、海水中の鉄濃度を高めに見積もった設定で行ったが、これは本来のヒザラガイの歯舌の条件と大きく異なっていることが示唆された。

徐々にNaOH水溶液を滴下し伝導度滴定を行ったところ、無添加溶液及びキチン添加溶液ではpH5付近から終点(pH11)に至るまで酸化水酸化鉄( $\text{FeOOH}$ )と思われる褐色沈殿が生じたが、リン酸化キチンではpH5付近において生成した沈殿がpH6を超えてから祖消失し、コロイド溶液となった。これは、リン酸化キチンから脱離したリン酸が酸化水酸化鉄と反応し $[\text{Fe}(\text{OH})_3]_m(\text{PO}_4)_n$ のようなコロイドを生成したためではないかと推察した。また、吸着実験に用いた50ppm塩化鉄溶液50mLにリン酸50 $\mu\text{L}$ を添加し、NaOH水溶液を滴下すると、pH2.4でコロイド溶液を得ることが出来た。このことからコロイドはpHによらず、リン酸の影響により生成していることが確認された。

pH曲線を比較するにおいては、無添加のものよりキチンやリン酸化キチンを添加した系ではpHジャンプの勾配が緩やかになり、2段階のジャンプも確認された。これは、キチンおよびリン酸化キチンのアミド基やリン酸化キチンのリン酸基によって水酸化ナ

トリウムが消費されたためと、分子内のアミド基又はアミノ基が酸性領域において正に荷電しているためと考察した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Chiya Numako, Characterization for bio-inorganic materials composing a radural teeth of Chiton using X-ray analyses and several material scientific method, BIOMIN12, 2013/8/27-8/30 Freiberg, Germany

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沼子 千弥 (NUMAKO, Chiya)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 80284280