

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18212

研究課題名(和文) 褐藻に対する鉄の細胞壁吸着性及び生物利用性への腐植物質の寄与

研究課題名(英文) Effect of humic substances on the cell-adsorptivity and bioavailability of Fe to brown macroalgae

研究代表者

岩井 久典(iwai, hisanori)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・博士研究員

研究者番号：70733765

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)：藻の孢子体形成には溶存鉄が必要不可欠であることが分かっているが、その鉄の生物利用性の評価手法は定まっていない。本研究では、鉄の細胞壁吸着性によって生物利用性が変化すると考え、アルギネイト薄膜コーティングろ紙(AMF)を用いた細胞壁透過性の鉄の分画方法を提唱した。海水可溶性の腐植物質の添加によりAMF透過性の鉄濃度が増加し、この結果は褐藻の生殖生長の度合いとも相関があった。また、実海域における褐藻孢子体のサイズおよびクロロフィルa含有量との比較から、全溶存鉄ではなく、むしろAMF透過性鉄濃度が孢子体の生育状態に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、褐藻細胞壁の機能を鑑みた褐藻に対する鉄の生物利用性の新規評価法を提唱した。これらは、鉄供給による藻場再生保全技術における鉄の生物利用性及び腐植物質の機能の解明につながる。これは鉄の生物利用性を分析化学及び藻類学の両分野からの検証に基づく新たな試みである。また、藻場再生は水産及び環境分野において重要視されている大きな課題であり、本研究の背景となる鉄供給による藻場再生保全技術は工業副産物及び未利用バイオマスの有効活用の利点もあり、これらの課題に対する新たな検証項目の提案をする意味で社会的な貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study reported that the cell wall-passable Fe, which was evaluated by a thin-alginate membrane coated glass fiber filter (AMF), was a bioavailable species. The AMF passable Fe increased with increasing the concentration of LMW 1 to 5 mg L<sup>-1</sup>, and the maturity of brown algal gametophyte also increased relating to the passable Fe concentration. The size and chlorophyll-a content in sporophyte (*S. japonica* var *religiosa*) in actual coastal areas around Mashike, Hokkaido were larger in the area containing higher concentration of AMF passable Fe, rather than the total dissolved Fe concentration. These findings suggested that the Fe species that can pass the algal membrane is an important fraction for evaluating the bioavailability of brown algae, and the separation of AMF would be expected as a helpful technique.

研究分野：環境保全、分析化学、環境分析

キーワード：腐植物質 藻場再生 褐藻 鉄 溶存鉄

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

海藻群落(藻場)が消失する“磯焼け”が全国各地の沿岸域で深刻な問題となっており、沿岸生態系保全及び水産資源確保を考える上で藻場の復元・保全が大きな課題となっている。コンブ等の褐藻類の生長には鉄が必要不可欠な栄養素であることが分かっている(e.g., Motomura and Sakai, *Jpn. J. Phycol.* 1984; Matsunaga et al., *J. Appl. Phycol.*, 1994)。そのため、溶存鉄の欠乏が磯焼けの原因の一つとして注目されている。製鋼スラグと堆肥から成る施肥材を用いた沿岸域への溶存鉄の供給による藻場の再生保全技術が試みられ、この技術による磯焼け海域での溶存鉄濃度の増加と藻場の再生が報告されている(e.g., Yamamoto et al., *J. Chem. Eng. Jpn.*, 2010)。また、堆肥から海水中へ溶出する腐植物質分画は、褐藻へ生物利用性の高い鉄を供給できることが報告されている(Iwai et al., *J. Appl. Phycol.*, 2015)。

近年、褐藻のゲノム及びポストゲノム研究により(Cock et al., *Nature* 2010; Böttger et al., *J. Exp. Bot.*, 2012; Miller et al., *J. Exp. Bot.*, 2014) 褐藻の鉄摂取メカニズムでは鉄の吸着能を有するアルギン酸を主成分とする細胞壁の機能が重要と考えられるが、これは未だ検討されていない。藻場再生保全技術の発展のため、褐藻の鉄摂取メカニズムを十分に考慮し、褐藻に対する鉄の細胞壁吸着性及び生物利用性への腐植物質の寄与を解明することが必要である。

### 2. 研究の目的

鉄供給による磯焼け海域の藻場再生保全において、褐藻の生活史の観点から生物利用可能な鉄の供給が必要と考えられる(Motomura and Sakai, *Phycologia*, 1984; Yamamoto et al., *J. Chem. Eng.*, 2010)。ここで、鉄の生物利用性の評価が重要となる。褐藻の特徴の一つに、細胞壁が鉄吸着性の高いアルギン酸を主成分としている点あげられる。そのため、溶存鉄のアルギン酸膜透過性は鉄の摂取過程における重要な因子になると考えられるが、その機能や評価手法については検討されてこなかった。そこで、本研究では、アルギン酸薄膜に対する鉄の膜透過性の評価手法を確立し、褐藻成熟との関係から鉄の生物利用性を考察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Alginate-Membrane coated Filter (AMF) の調製及び透過性の評価

AMF は次の手順にて調製した: ポリカーボネイト製シャーレ(直径 60 mm)に 1% アルギン酸ナトリウム水溶液を加え、フィルター(Whatman GF/F 直径 47 mm)を浸漬し、オープンにて乾燥させた(60 °C、12 h)。次に、アルギネイト膜生成のため、0.1 M CaCl<sub>2</sub> 水溶液を乾燥した濾紙に加え、10 分間静置した。純水でよく洗浄した後、シャーレから AMF をはがし、乾燥デシケータ内にて乾燥して保管した。使用時には、前もって純水に十分浸し、湿潤状態で使用した。

AMF 透過性に関する評価は、分子サイズ及び鉄濃度変化について行った。ここで、海水中の鉄のキレート剤として、褐藻配偶体の生殖アッセイから鉄供給の効果が期待できる堆肥由来の低分子量溶出分画(LMW)を、先行研究に従い抽出精製し、本実験に用いた(Iwai et al., *J. Appl. Phycol.*, 2015)。鉄濃度は、Ferrozine (FZ) を用いた比色定量により決定した。試料 10 mL に 1 M アスコルビン酸水溶液を 100 µL 及び 10 mM FZ を 50 µL 加え、一晩静置し十分に反応させた後、吸光度計(光路長 10 cm)によって 562 nm の吸光度を求め鉄濃度を決定した。

#### (2) 褐藻の生殖アッセイ

褐藻の生殖アッセイは、先行研究に従い(Iwai et al., *J. Appl. Phycol.*, 2015) *Saccharina japonica* のメス配偶体を用いて無菌培養により検討した。14 日間の培養後、細胞のカウントから生殖生長した細胞の数の割合を算出し、成熟度(%)として評価した。

#### (3) 現場沿岸域の河川海水中の鉄濃度測定への応用

AMF による溶存鉄の分画は、実河川及び海域の観測にも応用した。実験フィールドは北海道増毛町のポンオタルマナイ川(POriv; 43.846, 141.503)及び暑寒別川(SKriv; 43.855, 141.512)及びそれぞれの河口周辺の沿岸域(POcos 及び SKcos)で行った。調査地近辺の褐藻胞子体(*Saccharina japonica* var. *religiosa*)を地元漁業組合の許可のもと採取し、サイズおよび含有クロロフィル a の定量評価を行った。クロロフィル a の定量は、直径 1-cm の円盤にカットした胞子体からクロロフォルム・メタノール混液(2:1, v/v)で抽出後、1 mL の 80% ジメチルスルホキシドに濃縮し、吸光度の値から先行研究の式に基づき算出した(Seely et al., *Mar. Biol.*, 1975)。

### 4. 研究成果

#### (1) AMF の溶存有機物透過性

上記手法に従い作成した AMF は、末端の余分なアルギネイト膜を排除した後、コーティング前後の重量差からコーティングアルギネイト量を試算した。その結果、ろ紙(Whatman GF/F 直径 47 mm) 1 枚当たり 34.5 ± 0.6 mg のアルギネイトを保持している。

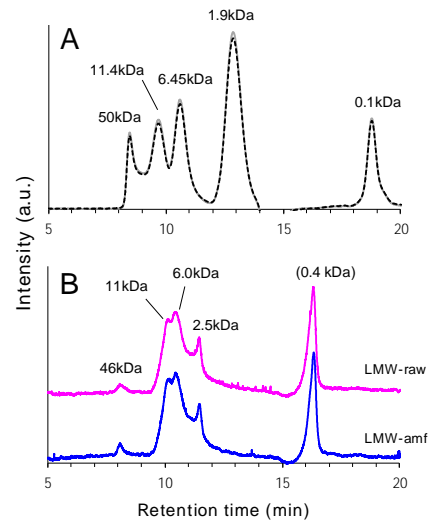
溶存有機物の AMF 透過性を検証した HPSEC クロマトグラムを Fig. 1 に示す。Fig. 1-A は標準物質(ブルーデキストラン(50kDa)及びポリエチレングリコール(11.4kDa - 0.1kDa))の AMF 透過前後のクロマトグラムを示すが、本機のサイズ排除限界である 50kDa 及び低分子量の 0.1kDa もピーク強度に変化は見られなかった。これは、アルギネイト膜中の多糖ネットワークは、溶存有機物が通過する十分なサイズであること、及び溶存有機物の吸着も起きないことを示してい

る。Figure 1-B に、人工海水培養液 (ASP12) に溶解した LMW (5 mg L<sup>-1</sup>) の分子量分布を示す。ただし、0.4kDa のピークは ASP12 に固有のピークである。LMW は重量平均分子量 46kDa、11kDa、6.0kDa 及び 2.5kDa のサイズの成分で構成されていた。AMF 透過後もピーク形状に大きな変化は見られず、クロマトグラムの面積差から 90% は AMF を透過していることが分かった。各成分では、46kDa で 11%、11kDa-6.0kDa で 2%、及び 2.5kDa で 26% の減少がみられ、低分子成分で AMF へ若干量吸着することが分かった。

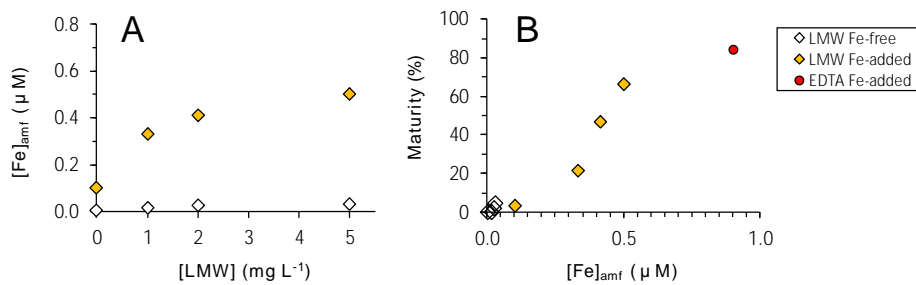
### (2) AMF の鉄透過性と生殖アッセイ

Figure 2 に LMW 添加による AMF の鉄透過性の変化 (A) と LMW 添加環境下での褐藻の生殖アッセイの結果 (B) を示す。LMW-free では、その 10% しかアルギネイト膜を通過できていないが、LMW の添加量の増加に伴い透過性の鉄は最大 60% 程度まで増加した (Fig. 2-A)。AMF 透過性の鉄濃度は、LMW 濃度を増加させ続けると飽和する傾向にあるが、これは LMW 濃度増加に伴う凝集効果の影響が大きくなるためだと考えられる。

AMF 透過性の鉄濃度と褐藻の成熟度の関係を見ると、AMF 透過性の鉄濃度の増加に伴い成熟度が増加した。EDTA (1 μM) を添加した場合は、90% 以上の鉄が AMF 透過可能な形で溶存しており、高い成熟度も確認できる。この結果は、アルギネイト膜透過性の鉄が生物利用性であることを示している。



**Figure 1.** HPSEC chromatograms recorded using RI (A) and UV (B, 280 nm) detectors. Solid and broken lines on (A) represent before and after AMF filtrate solutions contained PEG standards, respectively. LMW-raw and -amf represent before and after AMF filtration of LMW (5 mg L<sup>-1</sup>), respectively.



**Figure 2.** The relationships between AMF passable Fe ( $[Fe]_{amf}$ ) (A) and LMW concentration (mg L<sup>-1</sup>) or maturity (%) (B). Total spiked  $[Fe]$  in these experiments were 1 μM.

### (3) フィールド調査

実環境中の鉄の分画に応用するため、北海道増毛町の河川水 (ポンオタルマナイ川: PO<sub>riv</sub>、暑寒別川: SK<sub>riv</sub>) 及びその河口付近の沿岸水 (PO<sub>cos</sub> 及び SK<sub>cos</sub>) をモデルとしてフィールド調査を行った (2020 年 8 月)。当該 2 河川は、源流は同じであるが、PO<sub>riv</sub> は SK<sub>riv</sub> から水田を経由して沿岸に流入しているため、PO<sub>riv</sub> には水田由来有機物の影響が色濃く反映されている (Yamamoto and Iwai, *Anal. Sci.*, 2019)。

当該調査結果を Table 1 にまとめた。PO<sub>riv</sub> では溶存有機物 (Total C) が多いが、沿岸域では半減した。SK<sub>riv</sub> では、SK<sub>riv</sub> と比べて溶存有機物濃度は低く、沿岸海水では検出できないほど低濃度だった (<0.02 mg L<sup>-1</sup>)。鉄濃度も同様に、両河川において、河川水で高く沿岸海水では大きく減少している。しかし、アルギネイト膜透過性の鉄濃度 (AMF) を比べると、PO<sub>cos</sub> よりも SK<sub>cos</sub> のほうが高くなっていった。褐藻のサイズおよびクロロフィル含有量 (Chl-a) を比べると PO<sub>cos</sub> よりも SK<sub>cos</sub> の方がサイズも大きく色の濃い胞子体が生育していることが分かった。溶存鉄濃度及び AMF 透過性鉄濃度との関係を見ると、実環境中の鉄濃度のうち褐藻の生育にはアルギネイト膜透過性の鉄の貢献度が高いと考えられた。これらことから、鉄と藻場再生保全の関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

係を考える上で、細胞壁透過性の鉄の分画は意義があり、本研究で開発した AMF を用いた分画は当該分野における活用が期待できる。

**Table 1.** The concentration of dissolved carbon, nitrogen and Fe concentration in the river water and coastal seawater around Mashike, Hokkaido, and the information of sporophyte (*S. japonica* var. *religiosa*) taken at the near location of the above sampling sites (2020Aug).

Location	Long./Lati.	POriv	POcos	SKriv	SKcos
		43.85/141.50	43.84/141.50	43.85/141.51	43.86/141.51
< 0.45 $\mu$ m-Total C (mg L <sup>-1</sup> )		1.46	0.730	0.634	n.d.
< 0.45 $\mu$ m-Total N (mg L <sup>-1</sup> )		0.311	n.d.	0.390	n.d.
[Fe(II)] (nM)	< 0.45 $\mu$ m	458	27.8	76.4	20.3
	AMF	136	24.1	87.6	50.2
[total-Fe] (nM)	< 0.45 $\mu$ m	3475	275	241	95.1
	AMF	1665	61.5	230	80.2
Sporophyte-data ( <i>S. japonica</i> var. <i>religiosa</i> )	wide (mm)	-	21.3 $\pm$ 2.5	-	53.0 $\pm$ 2.9
	thickness (mm)	-	1.45 $\pm$ 0.03	-	1.72 $\pm$ 0.12
	Chl-a (ng mm <sup>-3</sup> )	-	95.7 $\pm$ 1.26	-	106 $\pm$ 5

n.d. = Not detected

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩井久典
2. 発表標題 Effect of fulvic acid on Fe adsorption on the thin alginate membrane
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩井久典
2. 発表標題 アルギン酸コーティングGF/Fを用いた溶存鉄の膜分離と褐藻成熟における鉄生物利用性
3. 学会等名 日本分析化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井久典
2. 発表標題 逐次抽出された堆肥の海水可溶有機物分画の蛍光特性および分子量特性の変化
3. 学会等名 日本分析化学会
4. 発表年 2020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
---------	---------