

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02271

研究課題名(和文) 分子レベル有機錯体解析に基づく流域での溶存鉄の起源・輸送機構解明

研究課題名(英文) Molecular level analysis of dissolved organic matters for investigating origin and transport mechanisms of dissolved iron in watersheds

研究代表者

藤井 学 (Manabu, Fujii)

東京工業大学・環境・社会理工学院・准教授

研究者番号：30598503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：河川等を通して陸域から供給される溶存鉄は、沿岸海洋における生物生産性を維持する上で重要な役割を担っている。溶存鉄の多くが溶存有機物に配位し、河川流域から沿岸域まで輸送されると考えられるが、その輸送機構については分子レベルでの十分な理解には至っていない。本研究では、高分解能質量分析や分子組成同定アルゴリズム開発等を用いた分子レベルでの溶存有機物分析を通して、溶存鉄と関連性の高い溶存有機物の分子組成や起源を明らかにすることを目的とした。その結果、沿岸域などの下流域において溶存鉄と高い相関のある259の有機分子が得られ、その多くが分子量が小さく、酸化分解の進んだCHO型有機物であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高分解能質量分析を用いて下流域で溶存鉄と関連性の高い259の有機分子組成を抽出し、その分子的特性を明らかにすることができた点において学術的新規性が高い。また、下流域で存在するCHO型有機物組成の多くが上流域でも検出されたことは、溶存鉄と相関のある有機分子組成が上流域から輸送されてきたことを示唆する結果と言える。すなわち、本研究結果は、沿岸域への微量金属輸送や生物生産性の維持において、上流から供給される溶存有機物が重要な役割を担っていることを示唆している。従って、沿岸域生態系を保全する流域土地利用の提案という観点からも社会的意義のある結果である。

研究成果の概要(英文)：Dissolved iron transported from rivers and other terrestrial sources plays important roles in maintaining the coastal and marine productivity. Most of the dissolved iron is likely to be transported from river basins to coastal waters in the form of complexes with dissolved organic matters. However, the molecular level mechanism of transport has not been fully understood. This study therefore aimed to investigate the molecular composition and origin of dissolved organic matters that are highly relevant to dissolved iron via the molecular level analysis using high-resolution mass spectrometry and advanced molecular composition identification algorithms. As a result, 259 dissolved organic molecules highly correlated with dissolved iron were obtained in downstream regions such as coastal waters, and most of them were found to be CHO-type organic matters with small molecular weight and highly decomposed status.

研究分野：水環境工学

キーワード：溶存鉄 溶存有機物 河川流域 沿岸域 輸送機構 質量分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

河口・沿岸域は生物生産性が高く、豊かな水生生態系が形成されている。陸域から河川などを通して供給される微量金属(鉄や銅等)、土壌腐植物質等の有機物、栄養塩(窒素やリン等)は、沿岸域の高い生物生産を維持する上で重要な役割を担っていると考えられる。微量金属の中でも、鉄はほぼすべての生物に不可欠な必須元素であり、タンパク質や細胞酵素の補因子として種々の役割を果たす。植物プランクトンなどの微生物を例にとると、光合成や呼吸系の電子伝達、酸化ストレスの制御、窒素固定(ニトロゲナーゼ)などの代謝活動において鉄は重要な元素と認識されている。これまでに、世界各国の幾つかの沿岸域において、潜在的に鉄が不足するため、生物生産性に影響を及ぼしていることが示唆されている。

中性 pH において第二鉄の溶解度は非常に低いため、水中に溶存態として存在し、かつ植物プランクトンや水生微生物の摂取に重要な鉄形態の多くは、腐植物質などの溶存有機物と錯形成している形態と考えられている。溶存有機物は比較的大きいため、光化学反応や細胞膜酵素還元反応などを通して生じる溶解性の無機鉄を、最終的に細胞は摂取していることが示されている。しかしながら、溶存有機物による鉄の錯形成は、溶解性の鉄の維持や流域からの鉄輸送において重要な役割を果たしていると考えられる。土壌由来の腐植物質と鉄の結合体は、塩濃度が高くなる汽水域において、静電的中和作用により凝集作用が生じ、その多くは水中から除去されることが明らかにされている。従って、高い塩濃度においても鉄と高い親和性を示す溶存有機物の存在が確認されており、最終的にはそのような有機物が沿岸域における植物プランクトンの鉄利用に重要となると考えられる。

このように溶存有機物と鉄の相互作用においては、多くの既往研究がある。しかし、その多くが溶存有機物濃度や分光特性などのバルク分析に留まっており、分子レベルでの十分な理解に至っていない。特に、鉄の配位子となる溶存有機物は腐植物質や微生物由来有機物を含め非常に多様な分子構成を有しており、どのような有機分子組成が鉄の錯形成や流域での輸送に重要であるか、さらにはそういった有機物質はどのような起源を持つのかということは未だ良く分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、溶存鉄の主要形態である有機鉄錯体を対象として、その起源や上流域から沿岸域までの輸送メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、従来からのバルク測定(溶存鉄濃度、溶存有機物濃度など)に加え、高分解能質量分析等を用いた分子レベルでの溶存有機物(鉄の配位子)分析を実施することにより、溶存有機物・鉄錯体の起源や性質に関する知見を得ることに努めた。野外調査や室内分析を通して、流下過程での有機物の変換や有機物の起源や分子組成が鉄やその他の微量金属輸送に及ぼす影響を調べた。

### 3. 研究の方法

有機物ならびに鉄動態に関する野外調査を複数の河川流域で実施した。対象流域は、関東近郊ならびに東北地域とした。野外調査では、河川上流から下流まで複数地点を選定した。また、沿岸域や陸域土壌も対象とし、水・土壌試料を採取した。基礎水質項目の測定では、pH やイオン強度、溶存酸素濃度、水温、各種微量金属濃度、溶存有機炭素濃度、吸光度などを測定した。微量金属濃度については、キレート樹脂で濃縮・精製・抽出した後、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)法にて測定を行った。対象金属として鉄、銅、マンガン、亜鉛、モリブデン、カドミウム、ニッケル、コバルトを選定したが、濃度が検出限界を下回ったカドミウム、ニッケル、コバルトは解析の対象外とした。

一方で、水・土壌試料からの有機物質の抽出・精製は、PPL 固相抽出カラムを用いて行った。抽出・精製した有機物試料は 50%メタノールに保存し、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計(FT-ICR MS)によりエレクトロスプレーイオン化(ESI)法によりネガティブモードにて測定した。有機物の分子組成について、後述の通り既存のアルゴリズムを改良することで、高い精度を有する分子組成アルゴリズム(TRFu)を Matlab 環境にて開発した。共通分子組成の抽出などを含む統計解析は統計ソフトウェア R を使用した。

## 4. 研究成果

### 分子組成解析アルゴリズム開発

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析により、河川中の溶存有機物の測定を行うと、通常数千から数万の質量ピークが検出される。高分解能質量分析であるためこのようなピーク分離が可能となる。また、得られた  $m/z$  から分子組成を決定する解析アルゴリズムも開発されつつある。海洋学分野では、有機分子フラグメントライブラリを基に分子組成を割り当てるアルゴリズムが採用されている。また、環境中に存在する溶存有機物（天然有機物）は、通常ある特定の元素比を有しており、炭素、水素、酸素、窒素原子の数や比率なども考慮されている。一方で、本研究では新たにネストループ型の分子組成決定アルゴリズム（TRFu アルゴリズム）を Matlab 環境で開発した。TRFu アルゴリズムは上述の元素比などに加え、炭素やヘテロ原子、ハロゲン原子などの安定同位体にも着目し、モノアイソトピック質量ピークに対し同位体質量ピーク強度比も考慮することで、決定される分子組成の精度を高めた。実際に、分子組成が既に分かっている 8 千の天然有機物類似新興化学物質に対して、TRFu アルゴリズムを適用した結果、94%の分子組成に対して適合する結果を得た。さらに、エアロゾルや水・堆積物試料、海水試料など起源が異なる複数の有機物試料に対しても 99%の高い分子組成適合率が得られた。従って、本研究で開発された TRFu アルゴリズムは、自然環境中に存在する種々の有機物に対して、その分子組成を決定するために有効であると考えられ、本研究では、流域における有機物の起源や変換過程の把握に加え、微量元素と関連のある有機物分子組成を決定するために活用した。

### 上流域から沿岸域にかけての有機分子組成の変化

溶存有機物の性質の変化やそれが微量元素の下流域への輸送にどのような影響を及ぼすかを明らかにする前段として、有機物の供給源や河川上流から下流域、下水処理水、沿岸域における有機物の変換過程に着目し、野外調査を実施した。上流域では、炭素、酸素、水素から成るヘテロ原子を含まない有機分子組成が多数を占めていた。一方で、下水処理水やその下流域の水試料では、観測された多くの有機物が窒素やリン、硫黄などのヘテロ原子を含有していた。上流から下流沿岸域への溶存有機物の輸送や変換を明らかにするため、上流域で観測された有機分子組成、沿岸域のみで観測された有機分子組成、さらに、上流域と沿岸域の両方で（共通で）観測された分子組成に着目し、上流域と下流域でどの程度有機分子組成が共有されているかを調べた。その結果、ヘテロ原子を含む分子組成について、上流と下流域で共通する分子組成は比較的少なかった。これは、ヘテロ原子を含む分子組成は、流下過程における微生物活動により分解・変換されたり、もしくは、河口沿岸域等での塩濃度が増加する水域において凝集沈降などにより物理除去された可能性を示唆する。一方で、CHO 型の分子組成に関して、上流域由来の分子組成が沿岸域でも検出されることが分かった。CHO 型の有機物は、生分解などを受けにくいリグニン由来の有機物などを多く含み、このような有機物は微生物活動や光分解作用などの影響を受けにくく、沿岸域まで到達する可能性を示唆された。

### 陸水域から沿岸域への微量元素を輸送する分子の同定

陸水域から沿岸域へ微量元素を輸送する溶存有機物分子組成を同定することを目的として、以下の解析を行った。まず、陸水域から沿岸域へ輸送される分子組成を対象として、陸水域、下流域、沿岸域において共通の分子組成を抽出した。次に、ピーク強度により標準化された個々の分子組成のピーク強度（個々の分子組成の含有割合）と微量元素濃度を有機炭素濃度で除した値（単位有機物あたりの金属結合量）の相関をスピアマンの順位相関係数により解析した。その結果、各金属と相関関係にある溶存有機物分子組成が同定され、その関係性は各金属で異なる傾向が示された。

溶存鉄に関しては、259 個の分子組成と正の相関関係にあった。そのうち 245 個の分子が CHO 型有機物であり、van Krevelen diagram 上では主にリグニン領域にプロットされた。さらに、負の相関関係にあった 112 個の分子組成と比較して、正の相関関係を示した分子組成は分子量が小さく（主に 200-500 Da）、また酸素：炭素比（O/C）や二重結合当量（DBE）が小さく、飽和度の高い有機分子であった。この結果は、沿岸域などの下流域において、比較的分子量が小さく分解の進んだ分子が鉄の錯形成に重要であることを示唆している。一方で、銅と正の相関を示した分子は鉄と比較し分子量が大きく（主に 500-650 Da）、不飽和な分子と正の相関を示した。さらに、正の相関を示した 79 の分子のうち 55 個が CHON 型有機物質で 20 個が CHO 型有機物質であった。

これらの微量元素に寄与する分子の傾向は既往の研究と一定の整合性を示した。分子量に着目すると、単位有機炭素あたりの鉄吸着は高分子有機物 (>1 kDa) よりも低分子有機物 (<1 kDa) の方が大きいことが報告されており、一方で、銅と有機物（有機リガンド）との安定度定数は高

分子有機物がより大きいことが報告されている。以上の既往知見は、溶存鉄が比較的分子量が小さい分子と正の相関を示し、溶存銅が分子量の大きい分子と正の相関を示したことから整合する。さらに、有機物分子組成に着目すると、溶存鉄と正の相関を示した分子の大部分が CHO 型有機物であったことから、溶存鉄と錯形成する官能基として酸素原子を含んだ酸性官能基（カルボキシ基等）が重要とされている既往の知見と一致する。また、溶存銅の主要な有機リガンドとして、窒素原子を含む環形化合物であるアゾール様化合物が報告されており、本研究により得られた銅が主に CHON 型有機物と正の相関を示したことから一致する。

なお、以上の解析では、全調査地点における共通の分子組成に限定したが、それ以外の分子組成が微量金属の輸送に貢献している可能性もある。従って、本研究における統計的なアプローチに加え、溶存有機物と鉄の錯体を直接的に FT-ICR-MS 分析により検出する試みも今後は重要と考えられる。特に、錯体の安定度が低い場合は、イオン化などのプロセスで解離する可能性が高く、コールドスプレー法の検討など錯体を検出する手法の開発が重要になると考えられる。

河川上流域、下流域、沿岸域における有機分子組成の比較では、上流域には陸域由来（森林域由来）の CHO 型有機物が多く含まれ、下流域もしくは沿岸域で検出された CHO 型有機物のおよそ 2/3 の分子組成と一致していた。すなわち、構造異性体について詳細な検討は必要であるものの、下流域で検出された CHO 型有機物の多くが上流域から供給されている可能性がある。従って、沿岸域の植物プランクトンなどの水生生態系にとって非常に重要である微量金属栄養素（鉄や銅）との錯形成や輸送において、上流域由来の CHO 型有機物が重要であることが示唆された。

## 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 Fu Qing-Long, Fujii Manabu, Riedel Thomas	4. 巻 1125
2. 論文標題 Development and comparison of formula assignment algorithms for ultrahigh-resolution mass spectra of natural organic matter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 247 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2020.05.048	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 Fu Qing-Long, Fujii Manabu, Kwon Eunsang	4. 巻 92
2. 論文標題 Development and Application of a High-Precision Algorithm for Nontarget Identification of Organohalogens Based on Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13989 ~ 13996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02899	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 Endo Yuta, Allam Ayman, Natsuike Masafumi, Yoshimura Chihiro, Fujii Manabu	4. 巻 17
2. 論文標題 Export of dissolved iron from river catchments in northeast Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Landscape and Ecological Engineering	6. 最初と最後の頁 75 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11355-020-00435-6	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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井 学, 和田光央, Qing-Long Fu
2. 発表標題 流域における溶存有機物の多様性と将来変化について
3. 学会等名 第 23 回日本水環境学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井学, 吉村千洋
2. 発表標題 沿岸域における鉄と有機物の動態に関する研究
3. 学会等名 第22 回日本水環境学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井学
2. 発表標題 域での微量金属と有機物の動態に関する研究：森と海のつながりの視点から
3. 学会等名 スマートシティディスプレイの実装プロジェクトセミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京工業大学 藤井 学  <a href="https://sites.google.com/site/manabufujiiattit/home">https://sites.google.com/site/manabufujiiattit/home</a></p>
---

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	権 垠相  (Kwon Eunsang)  (10360538)	東北大学・理学研究科・准教授    (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	菊地 哲郎  (Kikuchi Tetsuro)  (50453965)	国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・任期付研究員    (82104)	
研究分担者	伊藤 紘晃  (Ito Hiroaki)  (80637182)	熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター・助教    (17401)	

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