

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651003

研究課題名（和文）クロロフィル派生物の海洋有機物プールにおける寄与—包括的分析手法による検証

研究課題名（英文）Contribution of chlorophyll derivatives in ocean organic matter pool-evaluation by comprehensive method

研究代表者

濱 健夫 (HAMA TAKEO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30156385

研究成果の概要（和文）：海洋におけるクロロフィル派生物の有機物プールに対する寄与を明らかにするため、クロム酸酸化によりクロロフィルから生じたクロリン環を定量する手法を開発した。標品を用いた方法の検討において、良い定量性を示した。植物プランクトンが有するクロロフィル a の分解実験を実施し、蛍光を有するクロロフィル a およびその派生物は急速に減少する事が明らかになった。一方、蛍光を失った派生物は比較的長期間残存することが確認された。また、東シナ海を中心に実施した海洋観測では、蛍光を失ったクロロフィル派生物が、蛍光を有するクロロフィル派生物の 20 倍程度の濃度で存在していることが明らかとなった。しかしながら、懸濁態有機炭素に対するクロロフィル派生物の寄与は数%程度であり、懸濁態有機物プールへの寄与は限定的であった。今後、溶存態クロロフィルの研究を進める必要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The new method to estimate the contribution of chlorophyll derivatives to oceanic organic carbon pool has been developed. In this method, chlorophyll molecule was converted to chlorine by chromic acid oxidation. The study using authentic chloropigments proved the quantitative estimation of derivatives. The decomposition experiments of chlorophyll were conducted using natural phytoplankton populations. Though chloropigments with fluorescence decomposed rapidly, the decomposition rate of chloropigments without fluorescence were low. Observation of in the East China Sea showed that the concentration of chloropigments without fluorescence was 20 times higher than that with fluorescence. However, the contribution of chlorophyll derivatives was about a few % to particulate organic carbon. The study on the dissolved chloropigments is necessary to elucidate the contribution to ocean organic carbon pool.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：生物地球化学

科研費の分科・細目：環境学、環境動態解析

キーワード：海洋溶存態有機物、有機炭素プール、植物プランクトン色素、色素派生物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋に存在する有機炭素量は 800PgC 程度と推定され、地球表層の有機炭素プールにおいて陸上植生と並んで最大級の一つである。この海洋有機炭素のほとんどは海水に溶存する溶存態有機物により占められている。このため、海洋溶存態有機物が地球表層の炭素循環、更には地球温暖化に対する影響について、大きな関心が寄せられている。

(2) 海洋溶存態有機物を構成する有機物の中で、炭水化物、タンパク質、脂質などの生体成分が占める割合は 20%程度であり、大半の有機物の構造は明らかになっていない。

(3) クロロフィルは海洋の一次生産者である植物プランクトンが共通して保有する有機物で有り、植物プランクトン有機炭素量の 5%程度を占めている。クロロフィルの定量はその蛍光により測定されることが通例であるが、海洋の表層を除き蛍光強度はほとんど認められないため、植物プランクトンの死後、クロロフィルは比較的速やかに分解されると考えられていた。しかしながら、蛍光発生部位が部分的に分解され、他の部位が有機物として残存する可能性がある。このようなクロロフィル派生物が長期的に残存する場合には、海洋の有機物プールを構成する物質として重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

(4) しかしながら、クロロフィル派生物は多岐にわたるため、化合物の定性、定量を個別に実施するのは非常に困難で有り、派生物全体を包括的に測定する手法の開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

(1) クロロフィル派生物が共通して有するポルフィリン環を構成するピロール環の定量する事により、クロロフィル派生物を包括的に定量するクロム酸酸化法を確立する。

(2) 植物プランクトンが有するクロロフィル a の分解過程を、確立したクロム酸酸化法と高速液体クロマトグラフィーを併用することにより明らかにする。

(3) 沿岸および外洋域から鉛直的に採取した海水試料について、クロロフィルおよび派生物の濃度を測定することにより、海水中へのクロロフィル派生物の蓄積量を明らかにする。

(4) これらを通して、海洋の有機物プール

に対するクロロフィル派生物の寄与を推定する。

## 3. 研究の方法

(1) クロム酸酸化法によるクロロフィル派生物の包括的定量

3 種類のクロロフィル及び派生物の標品

(クロロフィル a、フェオフィチン a、およびフェオフォルバイド a) をアセトンに溶解した後、クロム酸を主体とした酸化剤と混合し、氷冷下で 2 時間、および常温で 2 時間反応させた。反応液からジクロロメタン:アセトン (9:1) を用いて生成物を抽出し、シリカゲルカラムにより精製した。得られた生成物であるエチルメチルマレイミド (EEMi) は、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)

(Varian, 300) を用いて、SIM 法により分離定量した。

自然試料を対象とした本法の定量性を確認するため、東京湾および大洗から海水試料を採取した。試料はガラス繊維濾紙 (ワットマン GF/F) を用いて濾過し、濾紙上の懸濁態有機物 (POM) に含まれるクロロフィル派生物について、同様の方法を用いて分析を行った。

(2) クロロフィル a の分解過程

2010 年 7 月と 2011 年 4 月に、筑波大学下田臨海実験センターより自然植物プランクトン群集を含む海水を採取した。栄養塩を添加した後、自然光下で 1.5 日間培養し、植物プランクトン現存量を増加させた。その後、培養器を暗に移し、3 ヶ月間に渡り、微生物によるクロロフィルの分解実験を実施した。期間中に、適時試料を採取し、ガラス繊維濾紙 (ワットマン GF/F) により濾過する事により、POM と溶存態有機物 (DOM) に分別した。

得られた試料について、クロム酸酸化-GC/MS 法によりエチルメチルマレイミドを定量した。また、蛍光検出器を接続した高速液体クロマトグラフ (HPLC) により、クロロフィル a および 7 種類の派生物の定量を行った。

(3) 海洋におけるクロロフィル a および派生物の分布

2011 年 2 月 18 日-25 日に、東京大学研究船淡青丸の航海の際、北緯 26-30 度、東経 124-128 度の海域の 5 測点において、各測点 5 層から海水を採取した (図 1)。海水試料は直ちにガラス繊維濾紙により濾過し、POM と溶存態有機物 (DOM) に分別した。

得られた試料について HPLC により、7 種類のクロロフィル a 派生物の定量を行った。

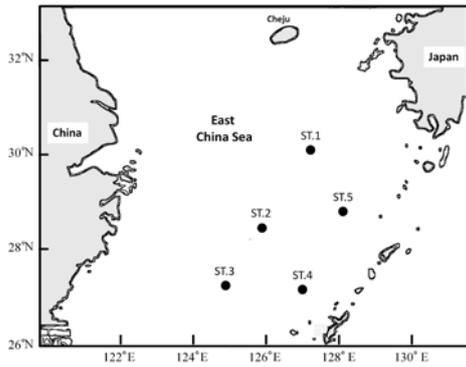


図 1 沖縄西方から東シナ海における観測点。

#### 4. 研究成果

##### (1) クロム酸酸化法による分析

クロロフィル *a* およびその派生物のクロム酸酸化により生じた EEMi は、GC/MS による分析条件下では 14.6 分の保持時間であり、電子衝撃法 (EI 法) によるイオン化では、 $m/z$ :139 の主イオンが認められた (図 2)。このため、以降は EEMi の  $m/z$ :139、および内部標準 (エイコサエキサエン酸) の主イオンである  $m/z$ :143 の両ピークを選択し分析を行った。

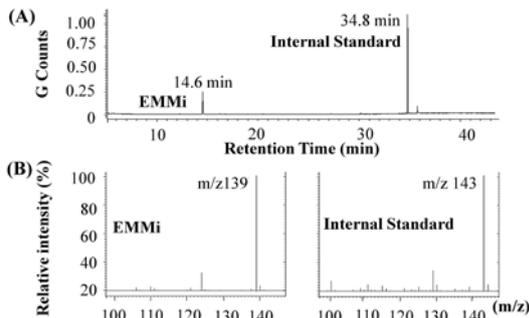


図 2 GC/MS による EMMi と内部標準のクロマトグラム (A)。EMMi および内部標準のマスプロファイル (B)。

標品であるクロロフィル *a*、フェオフィチン *a* およびフェオフォルバイド *a* の GC/MS による分析で得られた結果について、内部標準に対するモル比と面積比を比較した (図 3)。3 種類の標品においてモル比と面積比は良い直線性を示した。この結果は、クロム酸酸化による EEMi 生成、ジクロロメタン:アセトンによる抽出、および GC/MS による測定が定量的に進むことを示している。反応に用いた標品に含まれる EEMi 濃度と GC/MS により定量された EEMi 濃度との比較から回収率を求めると、36.1–39.7% と 3 種類のクロロフィル *a* 関連物質で、ほぼ同等の値が得られた。

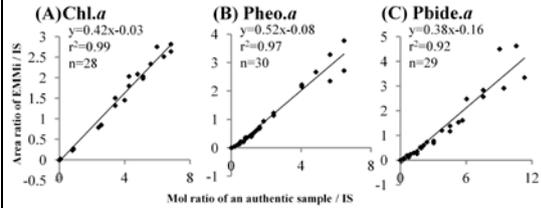


図 3 内部標準に対する EMMi のモル比および面積比の関係。

東京湾および大洗において測定された EEMi 濃度はそれぞれ 50.7 および 3.4 nM であった。また、試水に含まれるクロロフィル *a* が含む EEMi が全 EEMi に対する寄与を算出すると、東京湾および大洗において、29.6 および 58.5% であった。この結果は、海水の懸濁態有機物中には、クロロフィル *a* の派生物が含む EEMi が 70.4 および 41.5% を占めることを意味する。すなわち、クロロフィル *a* の分解過程において、クロロフィル *a* 派生物が比較的長期的に残存することが明らかとなった。また、この際に測定した、遊離 EEMi 濃度は、東京湾および大洗において、全 EEMi の 0.4 および 2.9% を占めるのみであった。つまり、海洋の POM に含まれる EEMi は、ポルフィリン環等の構造単位として存在していることが分かる。

複数試料の分析による変動係数は、東京湾試料で 12.0% ( $n=7$ )、大洗試料で 6.8% ( $n=5$ ) であった。有機物濃度の高い東京湾試料において高い変動係数が得られたことは、試料の有機物濃度が高い場合には、酸化の際に用いるクロム酸が不足する可能性のある事が示唆された。このため、自然試料の分析の際には、十分量のクロム酸を添加する必要がある。

以上の結果から、クロム酸酸化によるクロロフィル *a* 派生物からの EEMi の生成、および EEMi の GC/MS による分析法を確立することができた。

##### (2) クロロフィルの分解過程

EEMi を含むクロリン環および HPLC により定量が可能であったクロロフィル派生物 (HPLC クロロフィル:クロロフィル *a* および 6 種の派生物) の濃度変化を図 4 に示す。

2010 年 7 月の実験では、HPLC クロロフィル濃度は明期培養期において  $27 \mu\text{g/L}$  まで増加したが、暗に移した後 7 日までに  $6 \mu\text{g/L}$  まで急激に低下した。7 日以降は状況に低下し、60 日以降はほぼ検出限界程度の濃度であった。一方、HPLC による測定が不可能な派生物を含む全クロリン濃度は明期において  $50 \mu\text{g/L}$  まで増加し、暗中には減少の傾向を示した。しかし、その減少速度は、HPLC クロロフィルに比較して低く、15 日以降は  $18 \mu\text{g/L}$

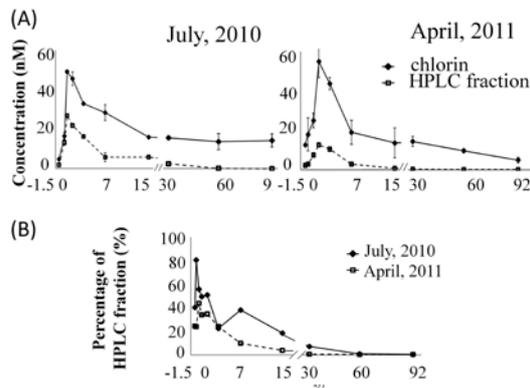


図4 クロロフィルa分解実験におけるHPLCクロロフィルと全クロロフィル派生物(Chlorin)濃度の経時変化(A)。全クロロフィル派生物に対するHPLCクロロフィルの割合の変化(B)。

程度で一定の値を示した。

2011年4月における結果も、全体的な傾向は2010年7月とほぼ同様であり、HPLCクロロフィルは明期において増加を示し、暗期においては急激な減少を示した。特に、15日以降は非常に低濃度となった。一方、全クロロリン濃度は明期において、1回目の実験とほぼ同程度の濃度まで増加した。暗期の初期における減少は1回目よりも急速であったが、7日以降の減少速度は穏やかであり、92日まで減少が継続した。

全クロロリン濃度におけるHPLCクロロフィルの寄与を算出した(図5(B))。1回目の実験では、実験開始時に40%であったが、明期終了時には80%まで増加した。暗期に移した後は減少し、15日で20%程度を示した後、60日にはほぼ0%となった。2回目の実験での、明期における割合は1回目よりも低い値であり、明期終了時では40%であった。暗期に移した後は、1回目と同様に減少の傾向を示し、30日後にはHPLCでは検出不可能な(蛍光をもたない)派生物がほぼ100%を占めた。

両実験に共通して得られた結果から、蛍光を発するクロロフィルaおよびその派生物の蛍光強度は、暗所に設置してから一週間以内に、初期の70%以上減少することが明らかになった。これは、クロロフィルの蛍光を発する部位が、易分解な性質を有していることを示している。一方、蛍光をもたないクロロリン環の濃度の減少速度は低く、これらの派生物が比較的安定な性質を有することを示唆する。

蛍光を有するクロロフィル派生物(HPLCクロロフィル)については、その組成の変化を明らかにした。ここでは、同定した8種類のクロロフィル派生物を、クロロフィルaからの構造改変部位の数により、1部位が改変し

た化合物(第1画分)、2部位が改変した化合物(第2画分)および3部位が改変した化合物(第3画分)に分けた。

1回目の実験では、クロロフィルaの全HPLCクロロフィルに占める割合は、明期期間中(-1.5日~0日)に大きく増加し、明期終了時では、80%近くに達した。暗所に移してからは、まず第1画分の割合が増え、3日から15日にかけて、第2画分の割合が15から75へと大きく増加した。この結果は、クロロフィルaの化学構造の1から2部位の変化が、1から2週間程度の時間オーダーで生じていることを示している。

また、第3画分は実験開始後15日までは確認できなかったが、30日目に全体の40%程度に増加した。改変が3箇所目に及ぶまでにほぼ1ヶ月を有したことを示唆する。

一方、2回目の実験では、実験開始時から、改変を受けないクロロフィルa分子が占める割合は少なく、明期の終了時でも25-30%程度であった。それに対して、第1画分は明期終了時から暗期の初期にかけて最大の割合を占め、全体の約60%に達した。第2画分は明期中にも10%程度を占めており3日から7日にかけて、30%程度に増加した。これと平行し、第3画分も3日目から7日にかけて大きく増加した。

両実験を通して、クロロフィルaの改変部位の数が時間の経過と共に増加する事が実験的に確認された。また、その変化が、週から月の時間スケールで進行することが明らかとなった。しかしながら、両実験では明期における組成が大きく異なっていた。光合成が活発に行われる明期においては、クロロフィルaが主要な構成成分であることが予想される。1回目の実験では、この様な予想に沿った結果が得られている。しかし、2回目の実験においては、明期中にすでに1部位が改変した派生物が60%以上を占めていた。この原因はまだ確定されていないが、植物プランクトンの生理状態の違いが主要な原因であろうと考えられる。

### (3) 海洋におけるクロロフィルaおよび派生物の分布

沖縄西方から東シナ海にかけて、合計5測点においてクロロフィルaおよび派生物の深度分布を明らかにした。HPLCクロロフィルの組成を図7に示す。各測点共に、一部の深度を除いてクロロフィルaが60-80%と最大の割合を占めた。測点1の深度290mにおいては、クロロフィルaの占める割合は低く、20%程度であった。派生物では第1画分の割合が大きく、全測点で20~30%を占めた。また、第2画分の占める割合は小さく、数%から多くとも10%程度であった。

一般に深度の増加につれてクロロフィル a の占める割合は減少し、逆に派生物の占める割合が増加する傾向にあった。また、深度の増加につれて第 2、第 3 画分の割合が増加した。この結果は、深度の増加につれて植物プランクトン有機物の分解が進む事を示唆しており、分解実験で得られた傾向と一致している。しかしながら、(2) の分解実験においては、クロロフィル a の占める割合は生産の後 7 日目以降に急速に減少したのに対し、海洋環境下では、多くの測点においてクロロフィル a の割合は高く保たれていた。海洋の有光層以深に存在する POM は、有光層で生産されてから経過した時間が一週間以内とは考えにくい。その様な粒子において高いクロロフィル a の割合が認められた理由については、現在のところ明らかになっていない。

HPLC クロロフィルが全クロロフィル派生物に占める割合を算出すると一部を除いて、全て 5%以下と低いものであった。また、多く測点では、50m 以深では HPLC クロロフィルの寄与は更に減少する傾向にあった。

全体として全クロロフィル派生物に対する HPLC クロロフィルの割合が低い結果は、これらの海域において、蛍光を失ったクロロフィル派生物が主要な構成成分である事を示している。つまり、これらの海域においては、生産から長期間の分解を経た粒子が主要な構成成分となっている可能性が高い。

本研究を通して得られた懸濁態のクロロフィル派生物が、懸濁態有機炭素 (POC) に占める割合は、高くても数%であった。植物プランクトンにおいては、細胞を構成する有機炭素の約 2%がクロロフィル a で占められる事を考慮すると、植物プランクトン有機物の分解に伴って、その寄与は増加する傾向が認められる。しかし、これまでその構造が解明されなかった未同定有機物の主要な構成物という確証は得ることはできなかった。

## 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 1 件)

① SATO YUHI・HAMA TAKEO・NOMOTO SHINYA、Comprehensive analysis of Chlorophyll Derivatives by Chromic Oxidation, Chemistry Letters、査読有、2012、41、571-573.

[学会発表] (計 3 件)

① 佐藤雄飛・濱 健夫・野本信也、水柱中におけるクロロフィル改変過程の実験的解析、2012 年日本海洋学会春季大会、2012 年 3 月

28 日、筑波大学

② SATO YUHI・HAMA TAKEO・NOMOTO SHINYA、Comprehensive analysis of Chlorophyll Derivatives by Chromic Oxidation Method、Ocean Sciences Meeting、2012 年 2 月 23 日、Salt Lake City, Utah, USA.

③ 佐藤雄飛・濱 健夫・野本信也、クロロフィル派生物を指標とした光合成生産物分解過程の解析、2011 年日本海洋学会春季大会、2011 年 3 月 25 日 (震災により講演要旨のみによる発表)、東京大学柏キャンパス

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱 健夫 (HAMA TAKEO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30156385

### (2) 研究分担者

和田 茂樹 (WADA SHIGEKI)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：60512720

### (3) 研究協力者

佐藤 雄飛 (SATO YUHI)

筑波大学・生命環境科学研究科・博士後期課程