

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23760501

研究課題名（和文） 湖沼水中における活性酸素種の化学的動態の解明

研究課題名（英文） Kinetics and Mechanism of Reactive Oxygen Species in a lake

研究代表者

藤井 学 (Fuji Manabu)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：30598503

研究成果の概要（和文）：活性酸素種は多様な分子・化合物と高い反応性を示すため、その動態を理解することは生態系評価において重要である。しかし、自然水中での活性酸素種生成や消費に関わる因子は十分に解明されていない。本研究では、腐植物質と光学反応が活性酸素種の化学的動態に及ぼす影響に着目し、多様な腐植物を用いた光照射実験から腐植物質の芳香族含有量が、自然水中でのスーパーオキシド及び過酸化水素の生成に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Although it is important to understand the behavior of reactive oxygen species (ROS) for proper assessment of aquatic ecosystem due to the high reactivity of ROS with a range of molecules and chemical compounds, kinetics and mechanism of ROS redox reactions in particular the factor(s) influencing ROS formation still remain largely unclear. In this study, effect of photochemical reaction of humic substances on ROS generation was investigated, yielding that aromatic content in humic substance is one of major factors responsible for ROS generation (e.g., superoxide and hydrogen peroxide) in sunlit freshwater systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：環境システム

1. 研究開始当初の背景

自然水や大気、生体細胞内など様々な環境における酸化還元反応は、活性酸素種と密接に関連する。たとえば、細胞内の電子伝達や細胞老化などは代表的な活性酸素種を消費もしくは産生する化学反応である。ここで活性酸素種とは、三重項酸素が還元されて水分子ができる過程で生成される三種のラジカルであるスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル(OH^{\cdot})に一重項酸素を加えたラジカル種の総称であり(図 1)、様々な分子や化合物と反応性が高く、半減期

が短いという特徴を有する。自然水中では、遷移金属(鉄や銅)や自然有機物質(フミン物質など)の酸化還元反応、光化学反応等で活性酸素種が生成されることがこれまで報告されている。しかし検出感度の問題から、多くの先行研究では、自然水中での活性酸素種濃度より非常に高い濃度で実験が行われていたり、限られた反応プロセスに焦点を置いた研究であるため、実水域での活性酸素種の消長およびそれに与える環境要因は未だよく分かっていない。このような状況下で、近年の微量検出技術の発展に伴い、過去 3 年

間で特に海洋および近沿岸において、実際に近い濃度（サブナノモラーレベル）で研究が行われるようになった。陸水では、遷移金属や自然有機物質、pH、活性酸素種を産生する藻類が海水とは大きく異なり、活性酸素生成ポテンシャルも異なることが予想されるが、これを明らかにした研究事例はない。その反応性の高さから活性酸素種は栄養金属循環や生物毒性に影響を及ぼしている可能性があり、湖沼など淡水中での水質や生態系を適切に理解し、それに基づいた水質管理を施策するためには、新たに活性酸素種の動態を評価していくことが重要と考えられる。

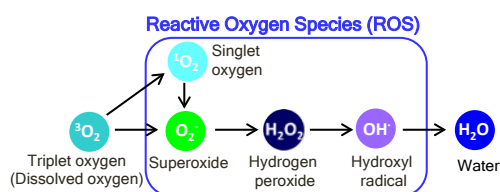


図 1. 活性酸素種の生成

2. 研究の目的

本研究課題では、湖沼などの淡水中において活性酸素生成の重要な要因と考えられる腐植物質の光化学反応に焦点を当て、活性酸素の生成機構を反応速度論により明らかにすることを目的とした。

活性酸素種の中でも、比較的半減期が長く、正確な定量分析を行える、スーパーオキシド (O_2^- 、酸素の一電子還元体) と過酸化水素 (H_2O_2 、酸素の二電子還元体) を対象とした。ヒドロキシラジカルや一重項酸素について調査測定は実施されなかったが、これらの生成等も、上記 2 種のラジカルと関連すると考えている。

図 2 に示したように、 O_2^- と H_2O_2 は三重項酸素の還元反応により生じるものと予想される。しかし、腐植物質の光化学反応においてこのような活性酸素種がどの程度生成されるのか、もしくはどのような反応経路で生成されるのかは分かっていない。そこで、本研究では、具体的には以下の 3 項目について詳細に調べることで、活性酸素の生成機構を明らかにする

- (1) O_2^- と H_2O_2 の生成量について経時変化の測定
- (2) 反応速度論を用いた光を介した活性酸素種生成機構の解析
- (3) 腐植物質の化学的性質が活性酸素種の生成に及ぼす影響

本課題より得られる知見を用いて、淡水中での活性酸素種の化学反応速度論を明らかにし、水環境中における活性酸素の動態を評価する。

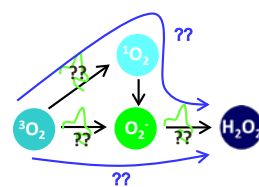


図 2. 活性酸素種生成経路における問題点

3. 研究の方法

(1) 実験の概要

図 3 に本課題における実験の流れを示した。流れは以下のとおりである。(1) 光照射下もしくは暗条件での過酸化水素等の活性酸素種の生成、(2) 光波長が活性酸素種の生成に及ぼす影響、(3) 反応経路を阻害する化学薬品が活性酸素の生成に及ぼす影響、(4) 腐植物質存在下における活性酸素種の生成ならびに消費速度、(4) 化学反応速度論を用いた活性酸素種生成のモデル化ならびに反応経路の解析、(5) 腐植物質の化学性質が活性酸素種の光化学的生成に及ぼす影響。

1. Time-course of H_2O_2 under the dark and light
2. Effect of light wavelength manipulation on H_2O_2 generation
3. Effect of Chemical treatment (e.g. D_2O , SOD, β -carotene) on H_2O_2 generation
4. Dark decay and photo-generation of O_2^- for 15 HS (eq. 1-4)
5. Calculation of H_2O_2 generation by using kinetic rate constants (eq. 5) and comparison with measured data.
6. Examination of key factor of HS properties in the photochemical H_2O_2 and O_2^- generation.

図 3. 実験の流れ

(2) 実験の詳細

超純水 (Milli-Q) を用いて炭酸水素ナトリウム 2mM、塩化ナトリウム 10mM かつジエチレントリアミン 5 酢酸 (DTPA) 15mM の水溶液を $\text{pH} 8 \pm 0.3$ となるように pH 調整し、バッファー溶液(緩衝剤)を準備した。腐植物質試料としては、表 1 に示したように、起源の異なる 15 種類の腐植物質(日本腐植物質学会、国際腐植物質学会提供のフミン酸およびフルボ酸)を使用した。腐植物質試料を $\text{pH} 12$ の水酸化ナトリウムに 10 g/L となるように溶解し、十分に溶解しない場合はさらに塩基 (NaOH) を加え溶解させた。この腐植物質の溶液を $\text{pH} 8.0 \pm 0.2$ となるように pH 調整した。この腐植物質溶液を上記のバッファー溶液に腐植物質濃度が 5 mg/L となるよう添加し、模倣自然水とした。このサンプル水は、暗所で 1 日以上放置した後、後続の光照射実験に用いた。なお、DTPA を添加することで、溶液中の金属をキレート結合によりマスキングさせ、金属が活性酸素種の動態に及ぼす影響を排除した。

光照射実験は、模倣自然水 1mL を 1.5mL

ガラス瓶に加え、キセノンランプ光(150 W, Hamamatsu Photonics, Japan)を47cm手前から照射することで行った(図4)。その後、下記の手順により過酸化水素やスーパーオキシド濃度の分析を行った。光照射実験は、後述するように、化学薬品を追加で添加した系でも実施した。

過酸化水素測定には、Amplex Ultra Red (AUR)吸光法を用いた。西洋ワサビ(HRP)が触媒となり過酸化水素がAURを酸化することで、568 nmの波長を吸光する物質を生成するため、吸光度計で測定した。AUR/HRP試薬と試料中の過酸化水素を完全に反応させるため、吸光度は、試薬をサンプルに添加してから10分後に測定を行った。また、スーパーオキシドの測定にはFeLumeケミルミネッセンス装置を使用し、MCLA試薬とスーパーオキシドが反応することで生じる430nmの光を素早く測定した。

表1. 本研究で使用した腐植物質

No	Name of humic substances	Code	Source
1	Leonardite humic acid	1S104H	IHSS
2	Suwannee River II humic acid	2S101H	IHSS
3	Elliott Soil humic acid	1S102H	IHSS
4	Pahoekee Peat humic acid	1S103H	IHSS
5	Nordic Lake humic acid	1R105H	IHSS
6	Waskish Peat humic acid	1R107H	IHSS
7	Dando Soil humic acid	DHA	JHSS
8	Inogashira Soil humic acid	IHA	JHSS
9	Nordic Lake fulvic acid	1R105F	IHSS
10	Pony Lake fulvic acid	1R109F	IHSS
11	Suwannee River I fulvic acid	1S101F	IHSS
12	Suwannee River II fulvic acid	2S101F	IHSS
13	Dando Soil fulvic acid	DFA	JHSS
14	Inogashira Soil fulvic acid	IFA	JHSS
15	Biwa lake fulvic acid	BFA	JHSS

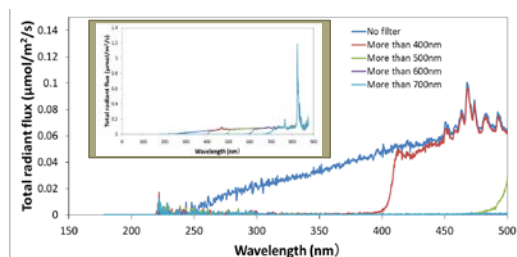
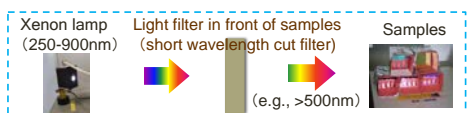


図4. 光化学反応実験の様子と光照射強度

4. 研究成果

(1) 光照射による活性酸素種の生成

腐植物質(1S101F)を含有する模倣自然水にキセノンランプ(模倣太陽光)を8時間程度照射した結果、過酸化水素は一定速度により生成され、その速度は腐植物質濃度に依存した(図5)。その後、光を遮断し暗条件にした結果、過酸化水素の生成は見られなかった。従って、腐植物質に光照射することにより、活性酸素種が生成されたことが確認された。

過酸化水素の生成速度は、照射光の光量子密度により標準化した場合、既往の文献値と一致した。また、キセノンランプの光量子密度は $41 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ と全波長の光量子密度より非常に低い値を示したが、図6に示したように、波長が400nm以下の光を遮断するような光学フィルターを光源と試料の間に挿入したところ、過酸化水素生成が大きく減少した。従って、本実験において生成された活性酸素種は、照射光の紫外線の寄与によるものと考えられる。

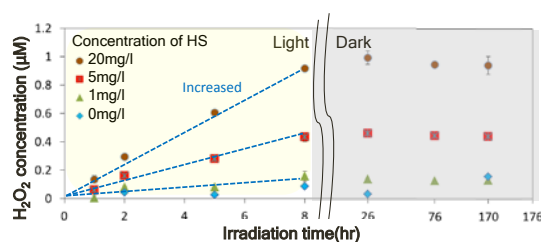


図5. 光照射下における過酸化水素濃度の経時変化(溶液条件: pH 8、NaCl/NaHCO₃バッファー、15mM DTPA、0-20mg/L Suwannee River I fulvic acid)

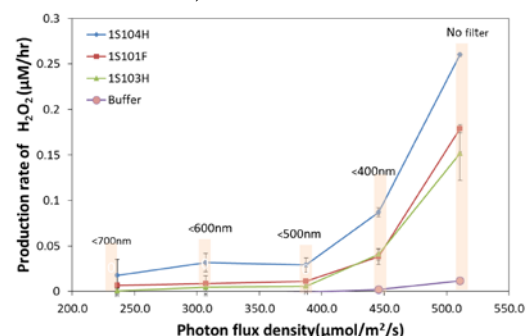


図6. 光波長が過酸化水素生成に及ぼす影響。光学フィルターにより試料に照射される光波長を操作した。例えば、<400nmは400nm以下の光波長を遮断した系を示す。

(2) 活性酸素種の生成経路

一重項酸素の生成経路が過酸化水素の生成に及ぼす影響を明らかにするため、様々な化学処理を施した系で照射試験を行った。この試験では、典型的な腐植物質(1S101F, 1S103H, 1S104H)について実施した。重水(D₂O)中では、水(H₂O)中より一重項酸素の消滅速度は16倍小さいことが知られている。しかし、本実験において光照射による過酸化水素の生成を比較すると、D₂O中ではH₂O中より1.1-1.5倍程度しか上昇しなかった(図7)。さらに、一重項酸素スカベンジャー(特異的に反応し一重項酸素を消滅させる)であるベータカロテンを添加した系において、ベータカロテンが存在しない対象系と比較し、過酸化水素生成濃度の変動は-13(±1.5)%から15(±17)%の範囲にとどまった。同様に、D₂O中にベータカロテンを添加した系において

も、過酸化水素の変化は-8.9 (±3.9) % から 24 (±6.3) % に留まった。以上より、一重項酸素が過酸化水素の生成に及ぼす影響は使用した3種の腐植物質について13%以下であることが示され、一重項酸素の過酸化水素生成への寄与は低いものと判断した。

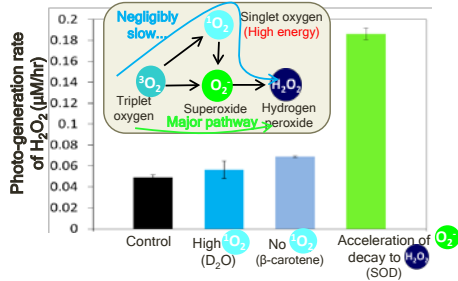
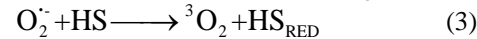
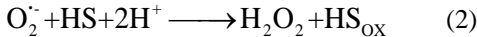
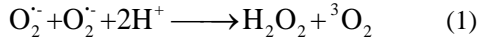


図 7. 化学的処理が光照射での過酸化水素生成に及ぼす影響。(溶液条件: pH 8、NaCl/NaHCO₃ バッファー、15mM DTPA、5mg/L Suwannee River I fulvic acid)

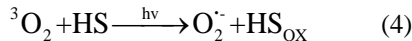
(3) 活性酸素種の生成メカニズム

活性酸素種の生成メカニズムを調べるため、まず、暗条件下におけるO₂^{•-}の減衰速度を測定した(図 8)。すべての腐植物質溶液において、腐植物質がない対象系と比較して、O₂^{•-}の減衰速度は上昇した。これは、腐植物質は、潜在的にO₂^{•-}を消費することを示している。O₂^{•-}減衰に関する一次反応速度(k_{hs})を、下記のO₂^{•-}の自己不化反応(式 1)と腐植物質が触媒的にO₂^{•-}を不均化する反応(式 2-3)を実測データに適合させることで算出した。



ここで、HS_{OX}とHS_{RED}は、腐植物質の酸化体ならびに還元体を示す。

照射試験を開始後、即座にO₂^{•-}濃度を測定した(図 9)。照射直後には、すべての腐植物質溶液において 5 分以内に徐々にO₂^{•-}が生成された。O₂^{•-}の生成は腐植物質の種と照射時間により変化した。光ならびに腐植物質を介したO₂^{•-}生成速度(k_{hv})は以下の式 4 と前述の式 1-3 を用いて算出した。



照射条件下におけるH₂O₂の生成速度は、O₂^{•-}生成の1/4がH₂O₂生成に直接寄与すると仮定して、以下の式 5 より算出した。

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = k_{disp} [O_2^{\cdot-}]_{ss}^2 + \frac{k_{hs}}{4} [O_2^{\cdot-}]_{ss} \quad (5)$$

以上のモデルから計算された予測値は測定値と良い整合性を示した(p-value = 0.0005)(図 10)。しかしながら、「O₂^{•-}生成の1/4がH₂O₂生成に直接寄与する」という仮定がない場合、H₂O₂生成速度は約 10 倍過剰評価される結果

となる。従って、本研究で対象としたプロセス以外にも、(長時間)照射条件下においてO₂^{•-}の減衰に及ぼす反応があることが推測される(図 11)。

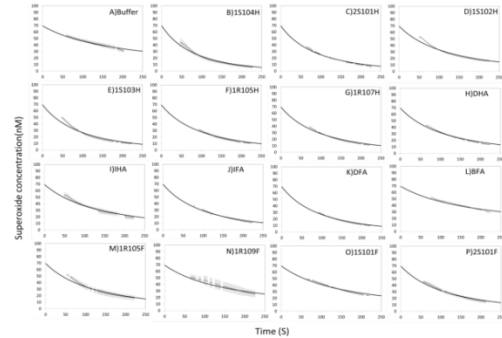


図 8. 暗条件下で様々な腐植物質の触媒反応により消滅するスーパーオキシドの減衰速度(溶液条件: pH 8、NaCl/NaHCO₃ バッファー、15mM DTPA、4mg/L 腐植物質)。

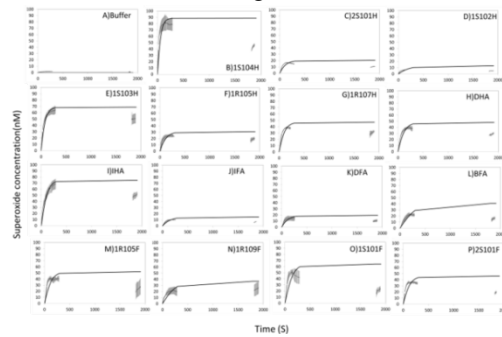


図 9. 光照射下におけるスーパーオキシドの生成(溶液条件: pH 8、NaCl/NaHCO₃ バッファー、15mM DTPA、4mg/L腐植物質)。

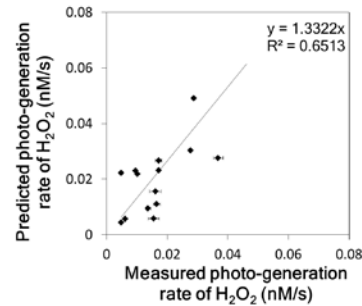


図 10. 過酸化水素生成速度の測定値とモデル予測値。

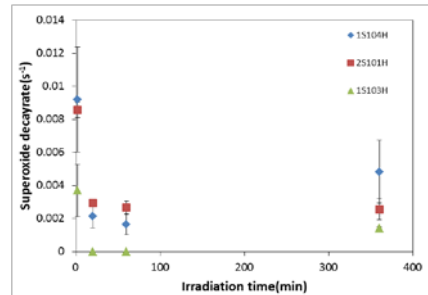


図 11. 光照射時間がスーパーオキシドの減衰速度に及ぼす影響。

(4)腐植物質の化学的性質が活性酸素種の生成に及ぼす影響

本研究に用いた標準腐植物質の化学的性質について、元素分析や核磁気共鳴分析により元素組成や部分構造情報が明らかにされている。従って、これら腐植物質の化学的性質と、本研究で得られた活性酸素種の生成速度定数について、単回帰分析を行った(表 2、図 12)。その結果、 $O_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 生成速度と腐植物質の芳香族炭素量に有意な正の相関関係が認められた。このことは、キノン系の官能基など酸化還元に活性のある芳香族部位が、腐植物質を介した活性酸素種の生成に寄与していることを示している。さらに、腐植物質の中でもフルボ酸よりフミン酸の方が(単位重量当たりで比較すると)活性酸素の生成が高かった。従って、比較的高分子であるフミン酸は芳香族部位を多く含み、自然水中の活性酸素の生成において寄与が高いことが推測される。

表 2. 腐植物質の化学的性質と活性酸素種生成速度の相関関係。

	k_{hv}^*	k_{HS}^*	Measured H_2O_2 production rate
Aromatic C	**0.70	**0.71	***0.90
Aliphatic C	•-0.45	**0.64	•-0.62
Carbonyl C	-0.02	0.04	-0.34
Carbohydrate C	•-0.53	-0.43	-0.10
Acidity	•-0.51	0.00	-0.42
Carboxyl content	-0.49	0.04	-0.34
Phenol content	0.07	-0.43	-0.10
H (%)	-0.31	**0.70	•-0.50
C (%)	***0.77	0.10	•0.63
N (%)	-0.01	-0.38	0.15
O (%)	•-0.51	0.22	-0.43
S (%)	-0.10	-0.40	-0.19
O/H	-0.21	•-0.49	-0.01
O/C	•-0.59	0.15	•-0.45
O/N	-0.14	0.15	-0.41
O/S	-0.35	0.23	-0.14
H/C	•-0.62	**0.70	**0.74
N/C	-0.08	-0.39	0.09
S/C	-0.14	-0.42	-0.23
C/H	**0.69	**0.69	***0.82
C/N	0.08	0.19	-0.28
C/O	**0.65	-0.06	•0.58
C/S	-0.33	0.23	-0.13

***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, $n = 15$).

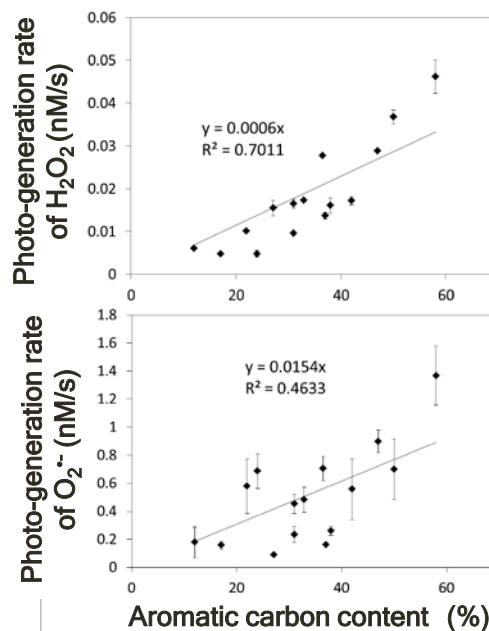


図 12.腐植物質の芳香族炭素含有量と光照射による(A)過酸化水素ならびに(B)スーパーオキシド生成速度の関係。

(5)本研究成果のまとめと環境への意義

活性酸素種は多様な分子・化合物と高い反応性を示すため、その動態を理解することは生態系評価において重要である。腐植物質を介した光化学反応は、湖沼を含めた淡水中において、活性酸素の生成に寄与していると考えられているが、その活性酸素種生成や消費を介する腐植物質の化学的因子は十分に解明されていない。本研究では、活性酸素の中でも特に過酸化水素(H_2O_2)とスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)の生成機構に着目し、淡水中において腐植物質を介した活性酸素種の化学的動態を明らかにすることを目的とした。

本課題では、起源を異にする多様な腐植物質を含む模倣自然水に、模倣太陽光であるキセノンランプ光を照射する実験系を構築した。その結果、 H_2O_2 濃度は時間とともに線形的に増加し続け、一方で、 $O_2^{\cdot-}$ 濃度は光照射直後に増加するものの、その後減少する傾向が観測された。また、活性酸素の生成は紫外波長光により生じることが示された。 $O_2^{\cdot-}$ は H_2O_2 と比較すると不安定であり、自己不均化反応や腐植物質との反応により H_2O_2 に変換されるという仮定のもと速度論モデルを提案した。速度論モデルを活性酸素濃度の経時変化データに適合させることで、 H_2O_2 と $O_2^{\cdot-}$ の生成速度定数を算出し、腐植物質の化学的性質と比較した結果、各速度定数は腐植物質の芳香族化合物の割合と高い正の相関がある

ことが明らかとなった。これは、光照射することで芳香族化合物部分、特に電子授与体の働きがあるキノン系部位によって O_2^- 、 H_2O_2 が生成されうると考えられる。

湖沼を含めた淡水中において腐植物質が遍在することを鑑みると、晴天時に太陽光の中でも紫外光が表層水に吸収されることで、スーパーオキシドや H_2O_2 等の活性酸素が容易に生成されることが推測される。実際に、本課題の一部で行った実験では、相模湖において採取した自然水サンプルに、模倣太陽光を照射したところ、本実験において得られた活性酸素生成速度と同程度の値が得られている。このような活性酸素が自然環境中において微生物や金属循環を含めどのような影響を及ぼしているのか、不明な点が多い一方で、 O_2^- は H_2O_2 より比較的反応性が高いことを考えると、環境中での動態は両分子で大きく異なると予想される。本課題において、腐植物質を介した活性酸素種の生成を定量的に示すことができるとは、このような両活性酸素分子の環境中での動態を明らかにするための重要な基礎的知見となる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) 今岡亮, 藤井学, 吉村千洋, 腐植物質の化学的性質が鉄との錯形成に及ぼす影響, 土木学会論文集G(環境), (社)土木学会, 68 巻, III_525-III_533, 2012 (査読有).

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 今岡亮, 藤井学, 吉村千洋, 分子構造に着目した腐植物質の鉄との錯形成特性の評価, 第 47 回日本水環境学会年会, 2013 年 3 月 12 日, 大阪工業大学
- (2) Imaoka A., Fujii M., Yoshimura C., (2012) Effect of chemical structure of humic substance on complexation with ferric iron in natural waters, 2012 ASLO Aquatic

Sciences Meeting, Otsu (Japan), 2012 年 7 月 13 日.

- (3) Fujii M., Otani E., Yoshimura C., (2012) Effect of chemical properties of humic substances on photochemical generation of reactive oxygen species, 2012 ASLO Aquatic Sciences Meeting, Otsu (Japan), 2012 年 7 月 12 日.
- (4) 今岡亮, 藤井学, 吉村千洋, 腐植物質の化学的性質が鉄との錯形成に及ぼす影響, 第 50 回環境工学研究フォーラム, 2012 年 11 月 28 日, 京都大学.
- (5) 大谷絵利佳, 藤井学, 吉村千洋, 腐植物質の化学的性質が光化学反応による活性酸素種の生成に及ぼす影響, 日本水環境学会, 2012 年 3 月 14 日, 東洋大学 (東京)
- (6) 大谷絵利佳, 藤井学, 吉村千洋, 光照射下における腐植物質による過酸化水素生成, 日本陸水学会 第 76 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 島根大学 (松江)

[その他]

- (1) 研究代表者個人のホームページ (<https://sites.google.com/site/manabufujiiattit/home>)
- (2) 研究代表者が所属する研究室のホームページ (<https://sites.google.com/site/waterenvironmentlab/home>)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

藤井 学 (Fujii Manabu)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号 : 30598503