

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340013

研究課題名(和文) 海水からサンゴ各部位へのメタロミクスとその環境応答

研究課題名(英文) Metallomics on each organ of coral from seawater and their environmental response

研究代表者

伊藤 彰英 (Itoh, Akihide)

麻布大学・その他部局等・教授

研究者番号：60273265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：造礁サンゴの各部位(軟組織、褐虫藻、骨格)と生育環境である海水における微量金属元素濃度を誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により多元素同時に測定し、各部位ごとの元素含有量の特徴を明らかにした。サンゴに共生する褐虫藻にはFe、Zn、Cdが海水に比べ100000以上と著しく高濃度であった。Fe、Cu、Zn、Cd、Pbを濃縮安定同位体でラベル化して添加した海水槽中でサンゴを飼育した結果、ZnとFeは海水から褐虫藻に24～48時間程度で摂取され、さらに軟体組織にも供給されていること、また、骨格にはZnとPbが蓄積され、軟体組織を経由して取り込まれたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the concentrations of trace elements in each organ in reef-building coral were multielementally measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). As a result, it was elucidated that the concentrations of Fe, Zn, and Cd in the symbiotic zooxanthellae were remarkably over 100000-fold larger than those in seawater. Furthermore, the breeding experiment using seawater tanks, in which enriched stable isotopes were added, were carried out to investigate the intake processes of trace elements from seawater to each organ in the coral. As the results, it was suggested that Zn and Fe were intaken in zooxanthellae from seawater after 24-48 hours and provided into soft tissues, and Zn and Pb were stored in skeleton via soft tissues.

研究分野：環境分析化学

キーワード：サンゴ 褐虫藻 骨格 海水 メタロミクス 微量金属 ICP-MS 濃縮安定同位体

## 1. 研究開始当初の背景

メタロミクス (Metalloomics) は生体金属支援機能科学と訳され、遺伝子科学であるゲノミクス (Genomics)、及びタンパク質科学であるプロテオミクス (Proteomics) と並ぶ新しい学問領域として提案された。メタロミクスは生体内金属の化学形態やその機能に関する研究のみならず、生物無機化学全般に関係し、水圏環境における生物の微量金属獲得戦略にも関連する。

本研究では、サンゴ礁海域の海洋生物とそれらの生育する海洋環境の両方の観点から、主成分元素と微量元素の定量 (総量分析) 及び微量金属元素を活性中心に持つ金属酵素の分析を行い、生体必須微量元素に着目した生物地球化学的循環、すなわち海水からサンゴへの微量金属の摂取、代謝、蓄積及び微量金属が関与する金属酵素の活性量の変化に関するメタロミクス研究の実施を計画している。

サンゴの微量元素に関する研究は、これまで骨格が中心に行われ、骨格の年輪にそって Ca に対する Sr, Mg, U, B などの微量元素の相対濃度の変動から、過去の水温変動や水深を探る古気候・古環境解析が行われてきた。また、Pb, Cd, Ag, U, Th などに関して海洋重金属汚染の指標として骨格分析を行った研究例も見られる。しかし、生育環境と骨格への元素の取り込み量との関係は必ずしも明確でなく、現在の生育環境の影響を直接的に受けると考えられる軟体組織や褐虫藻の微量元素に関しては、含有量すら明らかにされていない。また、貧栄養海域であるサンゴ礁海域におけるサンゴと褐虫藻の相利共生関係における栄養物質のやりとりに関しては、光合成を行う褐虫藻が生産する有機物をサンゴが利用し、サンゴの代謝物であるリン酸塩やアンモニウム塩などの栄養塩類を効率的に褐虫藻が利用することは広く知られているが、褐虫藻が栄養塩と同様に他の海域よりも低濃度である生体必須微量元素 (Fe, Zn, Cu, Mn など) を海水からどのように摂取し代謝しているのかについては明らかにされていない。

申請者は、これまでサンゴと類似した相利共生関係を有するシャコガイの一種であるヒメジャコについて軟体部の部位別分析と褐虫藻の多元素プロファイリングアナリシス (主成分元素から超微量元素までの多元素定量値から元素間の相関や拮抗などの関連性を踏まえた特徴把握) を行い、褐虫藻を経由して軟体部各部位に運ばれ、最終的には腎臓に多くの元素が蓄積されることを明らかにし、特に Zn, Cd については濃縮安定同位体を用いたトレーサー実験により摂取、代謝経路を確認した。同様にサンゴについても他の栄養分と同じように海水から褐虫藻を経てサンゴに供給され、軟体部内での代謝を経て最終的に一部は骨格内に蓄積されると予想している。このことが明らかにされれば、

環境変動による褐虫藻から軟体部への栄養摂取プロセスの変化や骨格への蓄積、代謝過程の変化を微量金属元素の挙動から明らかにできる可能性があると考え、本研究の着想に至った。

そこで、本研究では、海域のサンゴ採取と生育環境を制御した海水槽を用いた飼育実験により海水及びサンゴ各部位 (軟組織、褐虫藻、骨格、粘液) における微量元素の含有量と各元素間の関連性の特徴を多元素プロファイリングアナリシスにより明らかにし、生育環境の違いが各部位の微量元素の摂取、代謝、蓄積に与える影響をメタロミクスの観点から考察し、モデル化を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、貧栄養であるサンゴ礁海域において、微量金属元素が海水からサンゴへ摂取され、代謝されるプロセスの特徴を明らかにし、生育環境の違いがサンゴの栄養摂取に与える影響を、生体必須微量元素を中心としてメタロミクスの観点から考察し、モデル化することを目的とする。その際に、金属酵素中に含まれる生体必須元素である Zn, Fe, Cu や、海水中で栄養塩と類似した挙動を示す Cd などの微量金属元素に着目した。

## 3. 研究の方法

(1) サンゴと海水のサンプリング及び分析法  
沖縄本島北部本部町の琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所付近の海域でハマサンゴ、アザミサンゴを採取し、褐虫藻の単離の条件検討、粘液の採取、骨格の採取を行い、サンゴを各部位ごとに分離し、乾燥・粉末化した後、マイクロ波加熱酸分解法で溶液化し、ICP-MS を用いて多元素定量し、多元素プロファイリングアナリシスを行った。

海水の採水は琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所の小型船で夏場 (9 月) と冬場 (12 月) に、瀬底島沿岸の 3 地点 (A, B, C) でそれぞれサンゴ礁池内と礁池外で採水を行った。この 3 地点の特徴は、次の通りである。A : サンゴが多く生息するが、礁池の形成は小さい。B : サンゴの生息は少なく、礁池の形成もない。C : サンゴの生息は少ないが礁池の形成はある。採水した海水は 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターでろ過後、pH 1 となるように硝酸添加した試料 (溶存態) と硝酸添加後 1 週間後にろ過した試料 (酸可溶態) に分けた後、キレート固相抽出法により微量金属元素を 50 倍に脱塩濃縮し、ICP-MS で多元素定量した。

(2) 微量金属元素を添加した海水によるサンゴの飼育

ハマサンゴのトレーサー実験

琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所付近の海域でハマサンゴを採取し、5 種の微量金属元素 (Ni, Cu, Zn, Cd, Pb) を添

加した海水槽で飼育し、微量金属元素の摂取プロセスをトレーサー（追跡）実験した。海水槽中の金属濃度は、海水中の存在量の2倍、10倍、50倍濃度及びコントロールとし、数日ごとにサンゴを1群体ずつ取り出し、褐虫藻、軟体部、骨格、粘液を採取した。採取したサンゴ試料は1と同様の方法で分析した。骨格については飼育実験後、次亜塩素酸ナトリウム溶液で骨格以外の有機物質を分解・除去し、サンゴ骨格試料のみを分離した。その後、サンゴ骨格試料をICP-MS測定のために酸分解処理した。レーザーアブレーション(LA)-ICP-MS測定用にはダイヤモンドカッターを用いて、サンゴ骨格試料を厚さ5mm、また、測定部位が平面になるように切断処理を行い、測定を行った。

#### アザミサンゴのトレーサー実験

ハマサンゴは骨格の成長速度が遅かったので、サンゴ試料には骨格の成長速度が速いアザミサンゴを用いてトレーサー実験を行った。この際、添加する重金属に濃縮安定同位体を用い、コントロール海水、 $^{57}\text{Fe}$ 、 $^{68}\text{Zn}$  添加海水、 $^{57}\text{Fe}$ 、 $^{111}\text{Cd}$  添加海水、 $^{57}\text{Fe}$ 、 $^{65}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Zn}$ 、 $^{111}\text{Cd}$ 、 $^{206}\text{Pb}$  添加海水でアザミサンゴ群体を飼育した。各海水槽での添加金属濃度は、より実際の海水中に近い濃度となるよう瀬底島沿岸海水の5倍程度に調整した。12~24時間経過後に群体の一部を取り出して分割し、褐虫藻、軟体組織、骨格に分けて前処理を行い誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)で測定した。

この飼育実験は5月と11月に2回行った。

## 4. 研究成果

### (1) サンゴ褐虫藻の分析法の検討

褐虫藻の単離法を検討した結果、サンゴをホルマリン固定せずに生の試料からの褐虫藻の単離をすることができた。また、ウォーターピック(口腔内洗浄器)を用いて単離操作を行うことで、操作の短縮化を行うことができた。単離した褐虫藻は約120ポリプのサンゴ群体から13mg捕集することができた。ICP-MSとCHNコーダーによる分析を行い生体必須元素を中心に、希土類を含む約32元素の定量が可能であった。しかし、捕集できた試料が少量だったため、いくつかの試料でCHNコーダーによる分析が行えなかった。また、ホルマリン固定試料は元素流出する可能性が示唆されたため、今後の検討には用いなかった。

### (2) サンゴ褐虫藻及び軟体部の多元素分析と生育環境の影響

生物濃縮の観点から、サンゴ褐虫藻の分析結果をサンゴのサンプリングを行った瀬底島沿岸海水と比較した。その結果、生体必須元素の多くが $10^4$ 以上の高い濃縮係数となった。特に濃度が高かったFe、Zn、Cdの3元素は $10^5$ 以上であった。この3元素は植物プ

ランクトンの文献値やヒメジャコ褐虫藻の定量値から濃縮係数を求め比較を行った。その結果、植物プランクトンとは10倍以上高濃度であり、ヒメジャコ褐虫藻よりも2倍以上の濃度であった。このことからこれらの元素は、サンゴ褐虫藻が特異的に濃縮し、海水中にわずかに存在する微量元素を効率よく利用している可能性を示唆している。サンゴ褐虫藻と植物プランクトンの元素濃度を比較しても、Zn、As、Cdの3元素は植物プランクトンより高い濃度を示し、その他の元素は同程度か植物プランクトンより低い濃度となった。また、サンゴ褐虫藻と軟体部をそれぞれの炭素濃度で規格化したところ、ZnとCdは褐虫藻の値が高く、軟体部との差は5倍以上になった。Znはサンゴと褐虫藻両者にとって必須な元素であり、褐虫藻が何らかの形でサンゴに受け渡している可能性があると考えられる。

種の異なるサンゴに共生する褐虫藻の元素濃度を比較したところ、生体必須元素を中心とした多元素プロファイリングパターンは大きく類似する結果となった。このことから、宿主であるサンゴの種の違いは、褐虫藻の元素濃度に大きな影響を与えない可能性があると考えられる。

次に生育環境が褐虫藻の元素濃度にどのような影響を与えるかを評価するために、季節の異なるサンゴ褐虫藻の比較も行った。照度が高く褐虫藻が活発に光合成を行うと考えられる夏季の方が元素濃度が高いと予想したが、結果は多くの元素において冬季の方が高い濃度となった。これは、夏季の高水温と強光による強光阻害を褐虫藻が受けた可能性が考えられる。

### (3) サンゴ礁池内外における海水中微量元素濃度の比較

海水については瀬底島礁池内と礁池外の数カ所ですamplingし、キレート固相抽出/ICP-MSで測定を行った結果、Zn濃度に特色が見られ、サンゴの被度が比較的高い地点では礁池外の方が高濃度を示した。この結果からZnは礁池内ではサンゴ礁生物に摂取されて濃度が相対的に低かったことが示唆された。

酸可溶態濃度から溶存態濃度を差し引いて酸可溶粒子態濃度を求め、良好な定量結果が得られたV、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Mo、Cd、Pb、Uについて考察を行った。サンゴが最も生息しているが、礁池の発達小さいA地点では夏場の礁池内に着目すると、Fe、Znは、酸可溶粒子態の割合が80%以上と高く他の元素と比べて特異的であった。サンゴはほとんど生息せず礁池の発達もないB地点やサンゴは生息しないが他の地点に比べて礁池が比較的発達している地点Cの礁池内と比較すると、A地点ではFeは同程度、Znは20%ほど酸可溶粒子態の割合が高かった。また、A地点の礁池外と比較すると、Znにつ

いては礁池内と異なり、ほぼすべて溶解態であった。このことから酸可溶粒子態の Zn に関しては、サンゴや他の生物の代謝物を起源とする物質が含まれている可能性が高い。

#### (4)微量金属元素を添加した海水で飼育したサンゴのトレーサー実験

##### ハマサンゴ

ハマサンゴの褐虫藻の数を血球計算板で計測したところ、10 倍、50 倍濃度の海水槽で飼育したハマサンゴについては、飼育日数経過とともに褐虫藻の数が減少し、重金属ストレスでも褐虫藻の減少が引き起こされることが確認された。また、ICP-MS による測定結果から、50 倍濃度海水で飼育したサンゴ褐虫藻は、Zn, Cu が時間経過とともに増加傾向が見られた。このように Zn, Cu はいずれも飼育環境中濃度が増加するにつれて褐虫藻中濃度が増加し、さらに褐虫藻と軟体組織の濃度変化は類似していた。これに対して、Ni, Pb は海水中濃度が増加しても明確な増加は見られなかった。

レーザーアブレ - ション / ICP-MS により、平板に切断した骨格を成長輪に垂直に測定を行った。骨格の成長に対して各元素のイオン強度をカルシウムのイオン強度を基準とした相対強度としてプロットしたところ、今回の条件では、Ni, Cu, Zn, Cd, Pb については明確な骨格への取り込みが確認されなかった。

##### アザミサンゴ

濃縮安定同位体を添加した海水中でアザミサンゴの測定を行った。Zn に着目すると、5 月の結果では、褐虫藻及び軟体組織で 24 時間から 48 時間にかけて濃度が増加した。11 月では  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{68}\text{Zn}$  を添加した海水槽において、褐虫藻中の  $^{68}\text{Zn}$  は 24 時間で一時的に増加が見られ、5 月の結果と類似した傾向を示した。しかし、軟体組織では、そのような増加傾向は見られなかった。次に Fe に着目すると、11 月の  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{68}\text{Zn}$  を添加した海水槽において、褐虫藻中の Fe は 36 時間で  $^{57}\text{Fe}$  が一時的に増加した。また、軟体組織では飼育時間に比例して  $^{57}\text{Fe}$  の増加が確認された。このことから、Fe は海水からサンゴ褐虫藻及び軟体組織にほぼ同時に摂取されたと考えられる。

一方、生体必須及び有害微量元素を同時に添加した 5 元素添加水槽では、 $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{68}\text{Zn}$  の増加は見られなかった。故に、海水中に共存している元素の違いによって褐虫藻及び軟体組織の元素の摂取に差が出ることが分かった。

各サンプルの褐虫藻数を計測した結果、5 元素添加海水槽では白化現象の兆候と見られる褐虫藻数の減少が飼育時間の経過と共に確認された。

以上のことから生体必須微量元素で

ある Zn と Fe はサンゴの生育状態に問題なければ海水から褐虫藻に摂取されることが明らかになった。しかし、軟体組織への摂取は、褐虫藻を経由するプロセスと海水から直接摂取されるプロセスの 2 通りの可能性があると考えられる。

5 月飼育実験の場合、ICP-MS のサンゴ骨格試料全量分析では、金属元素の骨格への蓄積はほとんど確認できなかった。しかし、サンゴ骨格試料を直接局所分析ができる LA-ICP-MS 測定では、Sr/Ca の存在比から確認された成長部分で、Zn, Cd の高いピーク信号が得られ、これらの元素は 2 ヶ月間の飼育実験で海水から蓄積されたと考えられる。

11 月飼育実験の場合、濃縮安定同位体を海水に添加したため、各元素の同位体比の変動から金属元素の蓄積を考察することができる。ICP-MS 測定では、Zn 同位体比の変化が見られた。一方、LA-ICP-MS の測定では、飼育期間中に Zn, Pb の同位体比のピークが顕著に見られ、これらの元素が海水から蓄積されたことが確認された。逆に、Cu, Cd の同位体比に変化が見られず、ほとんど蓄積していないことが確認された。また、Fe については測定が不安定であったため、蓄積の有無について判断できなかった。

これらの結果から、海水からサンゴ骨格への Zn, Pb の蓄積が確認された。また、LA-ICP-MS 測定において、Zn や Pb の取り込みが同位体比ピークとして確認されたことから、サンゴ組織が石灰成分を分泌する過程のある時点でのみ、各元素が取り込まれたと判断した。つまり、海水から常に金属元素が取り込まれるのではなく、サンゴ組織を経由して取り込まれたことが示唆された。

#### 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 6 件)

Y. Zhu, A. Hioki, K. Chiba,

“Distribution of the Elements in Cotyledon, Embryonic Axis, and Testa of Peanut Seeds Obtained by ICP-MS with Microwave Acid Digestion”, *Anal. Sci.*, **29**, 1027-1033, 2013.

Y. Zhu, A. Hioki, K. Chiba,

“Development of an automatic pH-adjustment system for solid phase extraction prior to the determination of REEs in seawater by ICP-MS”, *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**, 883-889, 2013.

Y. Zhu, T. Narukawa, S. Miyashita, T.

Kuroiwa, K. Inagaki, K. Chiba, A. Hioki,

“ Development of a Certified Reference Material (NMIJ CRM 7512-a) for the Determination of Trace Elements in Milk Powder ”, *Anal. Sci.*, **29**, 247-253, 2013.

T. Arakaki, S. Azechi, Y. Somada, M. Ijyu, F. Nakaema, Y. Hitomi, D. Handa, Y. Oshiro, Y. Miyagi, A. Tsuchioka, H. Murayama, Y. Higaonna, A. Tanahara, A. Itoh, S. Fukushima, K. Higashi, Y. Henza, R. Nishikawa, H. Shinjo, H. Wangh: *Atmospheric Environment*, **47**, 479-485 (2014). “ Spatial and temporal variations of chemicals in the TSP aerosols simultaneously collected at three islands in Okinawa, Japan ” [論文, 査読有]

Y. Zhu, A. Hioki, K. Chiba, “ Measurement of strontium isotope ratio in nitric acid extract of peanut testa by ICP-Q-MS after removal of Rb by extraction with pure water ”, *Talanta*, **119**, 596-600, 2014. [論文]  
S. Guo, P. Liu, H. Yu, Y. Zhu, M. Chen, M. Ishida, H. Zhou, “ A Layered P2-and O3-Type Composite as a High-Energy Cathode for Rechargeable Sodium-Ion Batteries ”, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **54**, 5894-5899, 2015. [論文, 査読有]

[学会発表](計 6件)

伊藤彰英・上原一馬・伊豆味 祐・與儀愛・我那覇翔子・朱彦北、サンゴ礁池内外における海水中微量金属限の濃度の比較  
日本分析化学会 第 62 年会、近畿大学、2013/09/11

朱彦北・日置昭治・千葉光一・黒田寿晴・堀内道雄・奈良富雄、微量元素の固相抽出のための pH 自動抽出装置の開発

Yanbei Zhu, “ ICP-MS with Various Sample Introduction/Preparation Techniques ”, *Analytix2014*, Dalian, China, 2014/04/26.

朱彦北, 鹿籠康行, 日置昭治, 千葉光一, 「ICP-MS を用いた元素分析におけるマトリックス効果と対策」, 日本分析化学会 第 63 年会, 広島大学, 2014/09/17.

伊藤彰英: “ サンゴ礁海域に生息する共生生物(シャコガイ・サンゴ)の微量金属元素の摂取・代謝プロセス ” プラズマ分光分析研究会 第 93 回講演会 2015, [招待講演]

Y. Zhu: “ Development and Application of ICP-MS Techniques for Elemental Analysis in Chemical Metrology ”, 2<sup>nd</sup> Asian Symposium for Analytical Sciences, The 64th Annual Meeting of JSAC, Fukuoka, Japan, Sep. 09<sup>th</sup>, 2015.

[図書](計 2件)

大谷 肇 編著,(分担執筆) 伊藤彰英 他 16 名 “ 機器分析 ” 第 5 章 プラズマ発光分析とプラズマ質量分析, pp.45-62, 講談社 (2015). [著書]

Gary D. Christian 著、角田欣一監訳、伊藤彰英他 12 名訳、クリスチャン分析化学 (原著 7 版) 丸善出版, (2016)印刷中.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 彰英 (Itoh, Akihide)  
麻布大学・生命・環境科学部・教授  
研究者番号: 60273265

### (2) 研究分担者

朱彦北 (Zhu, Yanbei)  
独立行政法人産業技術総合研究所・標準計測部門・研究員  
研究者番号: 90422720

### (3) 連携研究者

中野 義勝 (Nakano, Yoshikatsu)  
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・技術職員  
研究者番号: 40457669