

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25709045

研究課題名(和文) 化学反応速度論に基づく実環境中での藻類の鉄摂取モデルの開発

研究課題名(英文) Iron uptake model by phytoplankton in actual natural water based on chemical kinetics

研究代表者

藤井 学 (Fujii, Manabu)

東京工業大学・理工学研究科・特任准教授

研究者番号：30598503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：鉄は、様々な水環境において藻類の増殖や代謝を支配する因子であり、これまで鉄の化学動態や生物利用性に関する研究が進められてきた。しかし、室内実験を基礎とした既往研究では、腐植物質やその他の水質因子の影響は全く考慮されておらず、実環境中の環境・水質変動が藻類の鉄摂取に及ぼす影響は未だ明らかにされていなかった。本研究では、室内実験・培養系から得られた種々のキネティックデータを基に鉄の速度論モデルを構築した。自然水中に存在する腐植物質が存在する系では、暗条件下での還元により十分量の生物利用可能な第一鉄が生成されるため、藻類は暗条件でも十分に鉄を摂取可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Iron is important factor that control growth and metabolism of phytoplankton in natural waters. Therefore, iron chemical dynamics and bioavailability have been investigated for the last few decades. Yet, effects of water and environmental factors on iron uptake in actual water environment remained largely unclear, partially because humic substances and other water quality factors were not considered in the previous model where synthetic ligands were often used. In this study, kinetic model for iron transformation and bioavailability was developed based on the kinetic data from phytoplankton incubational experiment under actual natural water conditions where concentrations of humic substances and other water quality factors were manipulated. One of results indicated that phytoplankton is capable of acquiring iron at sufficient amount even under the dark condition, as dark reduction in the presence of humic substances sufficiently produces biologically available ferrous iron form.

研究分野：土木工学・土木環境システム

キーワード：鉄 藻類 反応速度論 化学反応 鉄摂取モデル 腐植物質 競合金属

1. 研究開始当初の背景

鉄はほぼすべての生物にとって不可欠な微量必須金属である。例えば、微細藻類細胞内において様々な酵素の補因子として働き、光合成や呼吸における電子伝達、窒素固定、活性酸素濃度の調整など生命活動の中心的役割を担っている。自然水中では、酸素分圧や pH、有機リガンド濃度など水質因子に依存して、鉄は様々な化学形態で存在する(図1)。地下水や深海など酸素分圧が低い還元環境では、主に第一鉄(Fe(II))として存在する一方、湖沼や沿岸域、海洋などの基礎生産が生じる有光層では、Fe(II)は多くの場合数分の半減期で、酸素や過酸化水素により第二鉄(Fe(III))に酸化される。酸化体である Fe(III)は、腐植物質などの自然有機リガンドが存在する環境では鉄は好んで錯体を形成するが、有機リガンドが十分でない環境では難溶性の水酸化鉄として沈殿・除去されてしまう(4)。鉄は地殻中に4番目に多く含まれる元素でありながら、このような化学的特性により、外洋や遠沿岸域表層、いくつかの湖沼での溶解性鉄濃度は非常に低く(0.01-10 nM)、一次生産を制限する微量栄養素であることが認識されている。一般的な淡水では、陸域由来の自然有機リガンドが高濃度で存在し、かつ競合金属イオン濃度が低いいため、溶解性の鉄は有機錯体として海水よりも数オーダー高い濃度となる(0.01-10 μM)。しかし、藍藻類など鉄要求性の高い一部の淡水性藻類にとって、鉄は増殖や二次代謝物の生産など代謝活動を支配する因子となっていることが明らかにされつつある。

鉄は微細藻類の生長に深く関わり、多くの水域(例えば海洋の30%)で基礎生産を支配する栄養素であることから、過去30年間、主に海洋学の分野が中心となり、鉄の摂取メカニズムについて多くの研究がなされてきた。これら国内外の既往研究から、1990年代半ばまでには「微細藻類に利用可能な鉄の形態は、溶解性の無機鉄(Fe²⁺: Fe(II)と Fe(III))に限られる」というコンセンサスが得られていた。特に、藻類は効率的に鉄を摂取するため、直接利用不可能な形態の鉄を還元・溶解し、Fe(III)より溶解度の高い Fe(II)の濃度を増加させるといった研究成果が報告されている。しかし、ほとんどの既往研究では、鉄結合リガンドとしてシデロフォアやエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を使用しており、自然水中を反映した系となっていない。

そのため課題の一つとして、これまでに提案されている鉄摂取モデルが実環境において有効かどうか検証し、必要に応じて修正していくことが重要となる。例えば、湖沼などの実環境中には腐植物質が存在するが、鉄の化学動態に関わる腐植物質の特性(鉄結合親和性や光特性等)はEDTAのような人工リガンドと大きく異なると考えられる。また、自然水中には鉄以外の金属イオン(CaやMg)が共存するため、このような共存物質が藻類

の鉄摂取に及ぼす影響も明らかにしている必要がある。以上のように未だ検討されたことのない多様な水質因子を考慮したうえで、実環境下での藻類の鉄摂取機構を明らかにしていく必要がある。

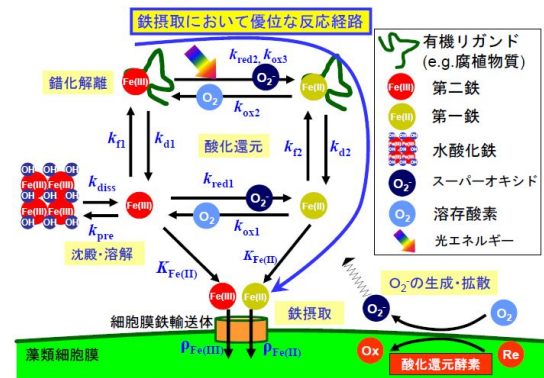


図1. 自然水中における鉄の形態とこれまでに提案されている鉄摂取経路。しかし、本モデルは人工リガンドである EDTA を用いた実験系から得られた結果を基にしているため、腐植物質のような自然有機物が存在する系で同様のモデルが成立するかは、研究開始当初は不明であった。

2. 研究の目的

本課題は、実環境中で生じる種々の反応について反応速度論モデルを構築し、実環境に即した藻類の鉄摂取モデルを構築することを目的とする。上述のように、鉄は様々な水環境中において藻類の増殖や代謝を支配する因子であり、過去30年間、鉄の化学動態や生物利用性に関する研究が進められてきた。しかし、EDTA等の人工有機リガンドによる培養実験を基礎とした既往研究では、腐植物質の特性や他の共存金属の影響は全く考慮されておらず、実環境中の環境・水質変動が藻類の鉄摂取に及ぼす影響は未だ明らかにされていない。

3. 研究の方法

(1) 鉄摂取試験

マイクロ波滅菌した Fraquil*培地で、淡水性藍藻類(アオコ藻類) Microcystis aeruginosa PCC7806株を温度 27°C、光強度 157 μmol m⁻² s⁻¹(蛍光灯を使用)、14:10hr サイクルの明暗条件で培養した。培地は pH 8、第二鉄(Fe(III))濃度 200 nM に調整した。その他の栄養塩は既往研究と同様とした(Andersen 2005)。対数増殖期後期に細胞を 0.65 μm メンブレンフィルター上に回収して以降の鉄摂取実験に用いた。

鉄摂取試験では、まず Fe(III)と鉄結合リガンド、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)を添加していない Fraquil*無菌培地を新たに用意し、フィルター上に回収した細胞を再浮遊させた。この培地に、鉄結合リガンドとして、腐植物質(スワニー川フルボ酸、SRFA)もしくは人工有機リガンドである EDTA もし

くはクエン酸(Citrate)のいずれかを添加した。また、Ca、Mg についても濃度を变化させて適量を添加した。また、鉄も添加するが、細胞内に摂取される微量な鉄の量を検出するために放射性同位体 $^{55}\text{Fe}(\text{III})$ を添加した。試薬の添加後は、明暗条件で数時間攪拌培養した。明条件では、太陽光シミュレータならびに蛍光灯を使用した。培養後、細胞をフィルター上に回収し、さらに EDTA/シュウ酸溶液と重碳酸バッファーにより、細胞表面に付着した ^{55}Fe を洗い流した。その後、フィルター上の放射線量を液体シンチレーションカウンタ測定することで、細胞内鉄量を算出した。培養試験は光学フィルターにより特定波長光を遮断した系でも行った。

(2) Fe(II)生成実験

藻類による鉄摂取は還元反応により生じた Fe(II)を細胞が摂取する経路が提案されている。そこで、培地内で光還元により生成される Fe(II)の生成速度を測定した。この実験では、細胞を添加していない Fraquil*培地に Fe(II)キレートである Ferrozine を投入し、Fe(II)-Ferozine 錯体濃度を 562nm の吸光度により測定することで、Fe(II)生成速度した。

4. 研究成果

(1)人工リガンド(EDTA)を用いた鉄摂取試験

暗条件と比較して、光照射条件下で Fe(II)生成速度と鉄摂取速度が増加した。光学フィルターにより、特定波長光を遮断した系における *M. aeruginosa* の鉄摂取速度と Fe(II)生成速度の結果(図 2)から、波長 = 400-500 nm の光が、EDTA 系における鉄摂取と鉄還元的重要であることが分かった。具体的には、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{EDTA}$ 錯体の光還元により生じた第一鉄イオン(Fe(II))を *Microcystis* 細胞が摂取することで、鉄摂取速度が増加すると考えられた。また、光合成に重要とされる 500nm 以上の光は鉄摂取や還元にあまり重要でなく、細胞外において非生物学的要因より生成される Fe(II)が鉄摂取に重要であると考えられた。

(2)腐植物質(SRFA)を用いた鉄摂取試験

腐植物質(SRFA)と人工リガンド(EDTA)を用いた鉄摂取試験結果を図 3 に示した。EDTA 系における鉄摂取速度は、暗条件(黒色)と比較して蛍光灯条件(白色)ならびに擬似太陽光条件(ストライプ)が 1 オーダー高い値を示し、前述した光還元により鉄摂取が増加する結果と一致した。一方で、腐植物質(SRFA)の系では、暗条件、蛍光灯条件ならびに擬似太陽光条件すべてにおいて、EDTA と比較して高い鉄摂取速度を示した。暗条件で特に鉄摂取が減少することはなかった。

その原因を調べるため、Ferozine(FZ)の存在下において、鉄摂取速度を調べた(図 4)。暗条件においても、光条件下と同様に FZ 存在下で鉄摂取速度が減少していた。従って、腐

植物質(SRFA)の系では、暗条件においても還元が生じており、Fe(II)が生成されていると考えられた。実際に、腐植物質(SRFA)中に含まれるキノン構造が還元的性質を有しており、鉄を含めた遷移金属を還元することが知られている。

以上の結果は、鉄結合リガンドの種類が異なると鉄摂取経路が異なることを示している。自然水中に存在する腐植物質の系では、暗条件下で既に還元が生じており、十分量の Fe(II)が生成され、藻類は暗条件でも十分に鉄を摂取可能であることが示された。

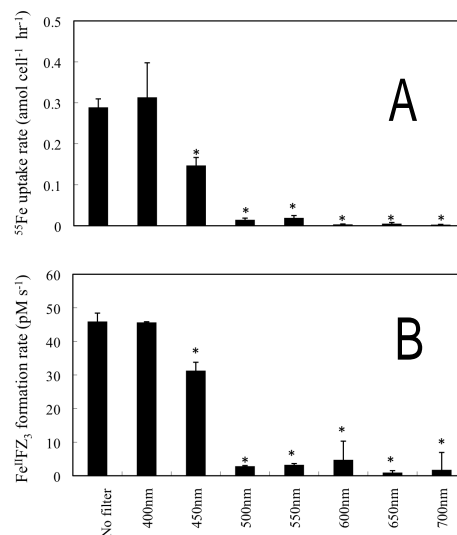


図 2. 光学フィルターにより、特定波長光を遮断した系における *M. aeruginosa* の(A) ^{55}Fe 摂取速度と(B) Fe(II)生成速度。光学フィルターがない系と比較して有意差がある場合、* ($p < 0.05$) で示した。エラーバーは標準偏差 ($n=3$) を表す。

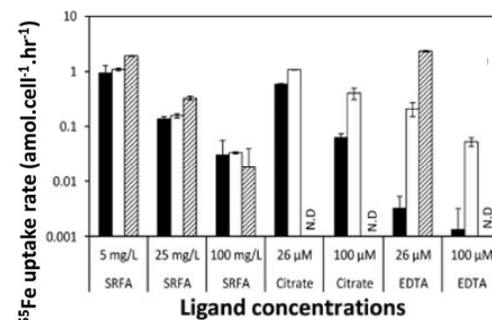


図 3. 腐植物質(SRFA)と人工リガンド(EDTA)を用いた鉄摂取試験結果。各バーは、暗条件(黒色) 蛍光灯条件(白色) 擬似太陽光(ストライプ)を表す。エラーバーは標準偏差 ($n=3$) を表す。N.D. は測定値なし。

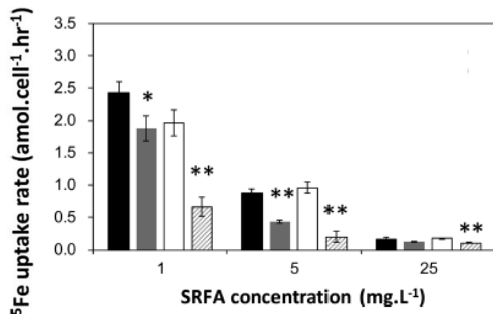


図4. Ferrozine(FZ)が鉄摂取に及ぼす影響。各バーは、暗条件でFZなし(黒色)、暗条件でFZあり(灰色)、蛍光灯条件でFZなし(白色)、蛍光灯条件でFZあり(ストライプ)を表す。FZなしと比較して有意差がある場合、*($p < 0.05$)で示した。エラーバーは標準偏差($n=3$)を表す。

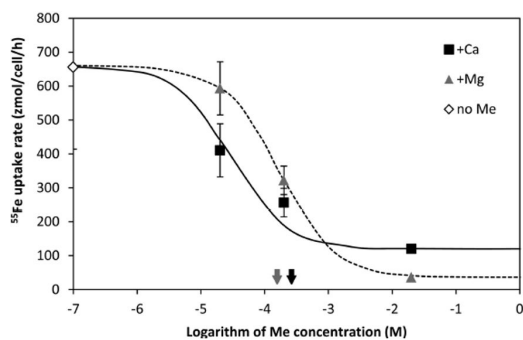


図5. 金属イオン(カルシウム[Ca]とマグネシウム[Mg])が鉄摂取に及ぼす影響。鉄摂取試験は腐植物質(SRFA)を含むFraquil*を用いて実施した。実線と点線はモデル値。エラーバーは標準偏差($n=3$)を表す。

(3) 鉄摂取における共存金属の影響

金属イオン(カルシウム[Ca]とマグネシウム[Mg])が鉄摂取に及ぼす影響を調べるため、自然水中における金属イオン濃度が0.002–20 mM範囲において、鉄摂取試験を行った。鉄摂取試験は、腐植物質(SRFA)を含むFraquil*を用いて実施した。図5に示すように、金属イオン濃度が増加するに従い、鉄摂取速度は減少した。腐植物質とCaとMgは結合親和性が低く、平衡計算から鉄と腐植物質の結合においてCaとMgは競合することがなかった。一方で、CaとMgは*M. aeruginosa*の鉄輸送体と結合することにより、鉄摂取を妨げる働きを示すと考えられた。

(4) 腐植物質の影響を考慮した自然水中における鉄の反応速度論モデルの構築

図6と表1に、腐植物質の影響を考慮した鉄の反応速度論モデルを示した。モデルでは、鉄の錯形成反応、酸化還元反応、活性酸素関連反応等を含む18の反応式を考慮した。そして、感度分析を行い、鉄摂取において重要な反応を6反応抽出した(表1においてグレーでハイライトされた反応)。その結果、暗還元、光還元によるFe(II)の生成が鉄摂取において重要な反応であることがわかった。さらに、生成されたFe(II)とリガンドの錯形成反応やFe(II)の酸化反応も重要であり、これ

らの反応は鉄摂取速度(Fe(II)濃度)を減少させる働きを持つことが示された。

(5) まとめ

鉄は、様々な水環境中において藻類の増殖や代謝を支配する因子であり、これまで鉄の化学動態や生物利用性に関する研究が進められてきた。しかし、室内実験を基礎とした既往研究では、腐植物質やその他の水質因子の影響は全く考慮されておらず、実環境中の環境・水質変動が藻類の鉄摂取に及ぼす影響は未だ明らかにされていない。本研究では、室内実験・培養系から得られた種々のキネティックデータを基に鉄の速度論モデルを構築した。自然水中に存在する腐植物質が存在する系では、暗条件下での還元により十分量の生物利用可能な第一鉄が生成されるため、藻類は暗条件でも十分に鉄を摂取可能であることが示された。また、二価の競合金属イオンは藻類の鉄輸送体と結合することで、鉄摂取を妨げる働きを示すと考えられた。以上のような、反応を組み込むことで、鉄の反応速度論モデルと藻類摂取モデルを構築した。

表1. 腐植物質の影響を考慮した自然水中における鉄の反応速度論モデル

No	Reaction	Rate constant
<i>Rate constants for organically complexed Fe</i>		
1	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{L} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}} + \text{L}$	$k_{\text{red-dark}}^{\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}}$ $1.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
2	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{L} + h\nu \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}} + \text{L}$	$k_{\text{red-light}}^{\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}}$ $2.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $1.7 \times 10^{-4} \text{ c}$
3	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{L} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{L} + \text{O}_2$	$k_{\text{red}}^{\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}}$ $2.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
4	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{L} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{L} + \text{O}_2^-$	$k_{\text{ox}}^{\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}}$ $1.5 \times 10^2 \text{ d}$ $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
5	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{L} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{L} + \text{H}_2\text{O}_2$	$k_{\text{ox}}^{\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}}$ $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
6	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{L} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{L} + \text{OH}^-$	$k_{\text{ox}}^{\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}}$ $3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
7	$\text{Fe}^{\text{III}} + \text{L} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{L}$	$k_{\text{f}}^{\text{Fe}^{\text{III}}}$ $7.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
8	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{L} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{L}$	$k_{\text{d}}^{\text{Fe}^{\text{III}}}$ $3.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
9	$\text{Fe}^{\text{II}} + \text{L} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{L}$	$k_{\text{f}}^{\text{Fe}^{\text{II}}}$ $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
10	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{L} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}} + \text{L}$	$k_{\text{d}}^{\text{Fe}^{\text{II}}}$ $7.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
<i>Rate constants for unchelated Fe</i>		
11	$\text{Fe}^{\text{III}} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}} + \text{O}_2$	$k_{\text{red}}^{\text{Fe}^{\text{III}}}$ $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
12	$\text{Fe}^{\text{II}} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{O}_2^-$	$k_{\text{ox}}^{\text{Fe}^{\text{II}}}$ 8.8^d $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
13	$\text{Fe}^{\text{II}} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{H}_2\text{O}_2$	$k_{\text{ox}}^{\text{Fe}^{\text{II}}}$ $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
14	$\text{Fe}^{\text{II}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{OH}^-$	$k_{\text{ox}}^{\text{Fe}^{\text{II}}}$ $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
15	$\text{Fe}^{\text{II}} + \text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{OH}^-$	$k_{\text{ox}}^{\text{Fe}^{\text{II}}}$ $5.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
<i>Rate constants for superoxide</i>		
16	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	k_{disp} $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
17	$\text{Microcystis cells} \rightarrow \text{O}_2^-$	k_{prod} $1.2 \times 10^{-18} \text{ mol cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$
18	$\text{O}_2^- + \text{B} \rightarrow \text{O}_2 + \text{B}^-$	k_{SRFA} $(3.3 \times 10^{-2}) / [\text{B}_1]^e \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

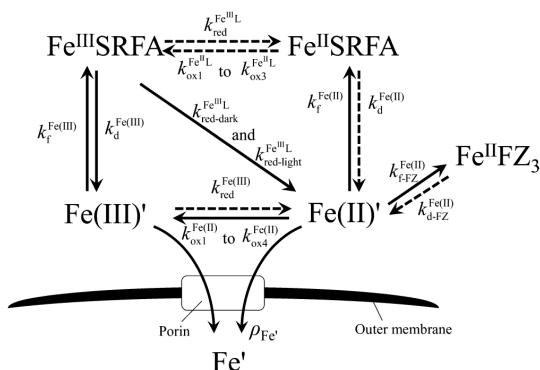


図 6. 腐植物質の影響を考慮した自然水中における鉄の反応速度論モデルと鉄摂取経路。実線は主反応であり、点線は無視できる反応。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Fujii, M., Imaoka, A., Yoshimura, C., Waite T. D., (2014) Effects of Molecular Composition of Natural Organic Matter on Ferric Iron Complexation at Circumneutral pH, *Environmental Science & Technology*, ACS, Vol 48, No 8, pp4414-4424. (査読有).
- (2) Fujii, M., Dang T. C., Bligh M Rose A. L. and Waite T. D., (2014) Effect of Natural Organic Matter on Iron Uptake by the Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Environmental Science & Technology*, ACS, Vol 48, No.4, pp365-374. (査読有).
- (3) Ito, H., Fujii, M., Masago, Y., Waite, T. D., Omura, T. (2015) Effect of ionic strength on ligand exchange kinetics between a mononuclear ferric citrate complex and siderophore desferrioxamine B, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Elsevier, Vol 154, pp81-97. (査読有).
- (4) Fujii, M., Yeung, A. C. Y., Waite, T. D. (2015) Competitive Effects of Calcium and Magnesium Ions on the Photochemical Transformation and Associated Cellular Uptake of Iron by the Freshwater Cyanobacterial Phytoplankton *Microcystis aeruginosa*, *Environmental Science & Technology*, ACS, Vol. 49, No. 15, pp9133-9142. (査読有).

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 藤井学, 微量金属と放射性物質に関する最近の研究～藻類による鉄摂取と阿武隈川の放射性セシウム動態～、第1回環境水質工学シンポジウム、東北大学、2014年5月9日
- (2) 藤井学, 化学反応速度論による藍藻類 *Microcystis aeruginosa* の鉄摂取機構解明、

日本陸水学会第79回大会、筑波大学、2014年9月11日

- (3) Kikuchi T., Terao K., Fujii M., Yoshimura C. Oxidation of ferrous iron in the presence of humic substances with different origins at pH 7.0-8.0, 2014 Ocean Sciences Meeting, Feb. 2014, Hawaii USA.
- (4) Fujii M., Yoshimura C., Imaoka A., Effects of Molecular Composition of Natural Organic Matters on Iron Complexation, 2014 Ocean Sciences Meeting, Feb. 2014, Hawaii USA.

〔その他〕

- (1) 研究代表者個人のホームページ (<https://sites.google.com/site/manabufujiiittit/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・特任准教授
研究者番号：3059850