

37. 微量鉄化学種による植物プランクトンの光合成制御

Phytosynthesis Regulation of Phytoplankton by Organic Complexation of Iron

長谷川 浩^{*}・篠浦美聡^{**}・水本英伸^{*}・上田一正^{*}

Hiroshi HASEGAWA^{*}, Misato SHINOURA^{**}, Hidenobu MIZUMOTO^{*}, Kazumasa UEDA^{*}

ABSTRACT; Storing carbon dioxide in the oceans is expected to provide a useful means of tackling climate change. Especially, the availability of iron to marine phytoplankton has received considerable attention. There is a hypothesis that fertilizing the oceans with iron may help to reduce carbon dioxide in the atmosphere, because they increase the amount of carbon dioxide absorbed by phytoplankton in the oceans. In this study, we present data on the effect of the chemical form of iron on the growth of phytoplankton in artificial seawater media, in which we have varied the composition of dissolved iron species using synthetic chelators. It was found that chemical forms of iron in the culture media influenced the cell growth of phytoplankton. Under low-iron conditions, the phytoplankton growth was affected by the concentrations of synthetic chelators in the culture media. Under high-iron conditions, there was little difference in growth rates of phytoplankton between chelators in the media. On the basis of the data obtained, we discuss equilibrium conditions controlling the phytoplankton growth in the cultures.

KEY WORDS; global warming, fixation of carbon dioxide, phytoplankton

1 はじめに

将来の気候変動に対する危惧から大気中二酸化炭素の増加を防ぐ解決法が求められている。その一つの可能性として、海洋に鉄を散布して一次生産を制御し炭素を固定化する方法が、経済性、効率性の点から有望視されている (Martin and Gordon, 1988, 1990)。高栄養塩-低クロロフィル (HNLC) 海域である太平洋北東域、赤道域、南氷洋等では、微量 (nMレベル) の硫酸鉄を供給すると植物プランクトンの一次生産量が増加することが実証されている (Martin *et al.*, 1994, Coale *et al.*, 1996)。一方、必須元素である鉄の細胞内への取り込みは、鉄の存在形態に大きく依存することが知られている (Hutchins *et al.*, 1999)。一般に、植物プランクトンの培養では、鉄の供給体としてエチレンジアミン4酢酸塩 (EDTA鉄) が用いられるが、その理論的根拠は乏しい。そこで本研究では、各種キレート鉄存在下における海洋植物プランクトンの生長実験を行い、一次生産量の増加に最も適した鉄の供給体を探索するとともに、植物プランクトンの鉄利用度の向上及び生長に関与する因子を明らかにした。

^{*}金沢大学工学部物質化学工学科 Department of Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kanazawa University, Kodatsuno 2-40-20, Kanazawa, 920-8667, Japan

^{**}京都大学化学研究所 Institute for Chemical Research, Kyoto University

2 手段・方法

海洋植物プランクトンとして、*Cricosphaera roscoffensis* (Haptophyceae), *Rhodomonas ovalis* (Cryptophyceae), *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *Oltmannsiellopsis viridis* (Chlorophyceae), *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae)を用いた。

海水培地には、Lyman-Flemingの組成(1940)に従って特級試薬を用いて調製した人工海水を使用した。鉄、有機配位子を除いたf/2培地又はASP培地(西澤, 1992)を調製し、高圧滅菌(120 °C, 20 min)後、1-3日間室温で保存した。クリーンベンチ中で培養液 20 mlを 30-ml 角型ポリカーボネート容器(Nalge社)に移し、高圧滅菌した各種EDTA類縁体/0.1M NaOH溶液及びFeCl₃/0.1M HCl溶液を各 100 μl添加して鉄及びキレート配位子の初濃度([Fe]₀及び[L]₀)を調整した。この培地に、あらかじめ同じ組成の培地で1-2週間前培養して対数増殖期にある植物プランクトンを 20 cells ml⁻¹以下になるように植え継ぎ、水温 20 °C、光照射 50 μE m⁻² s⁻¹、明暗サイクル12-12 hの条件下培養した。植物プランクトンの生長量は、30-ml 角型ポリカーボネート容器を装着できるようにセル設置部を改造した分光光度計を用いて波長 540 nmにおける光散乱を吸光度として測定し、細胞密度/吸光度の比例式より換算して求めた。また、培地の無菌状態は、DAPIで染色した懸濁物を 0.1 μmフィルターに捕集後、落射型蛍光顕微鏡で目視して確認した(Bohlool and Schmidt, 1980)。

3 結果および考察

3.1 植物プランクトンの生長曲線における鉄キレート錯体の影響

6種類のEDTA類縁体(EDTA, EDTA-OH, DTPA-OH, DTPA, EDTPO, GEDTA; Fig. 1)を用いて、海洋植物プランクトンの生長に対する影響を調べた。

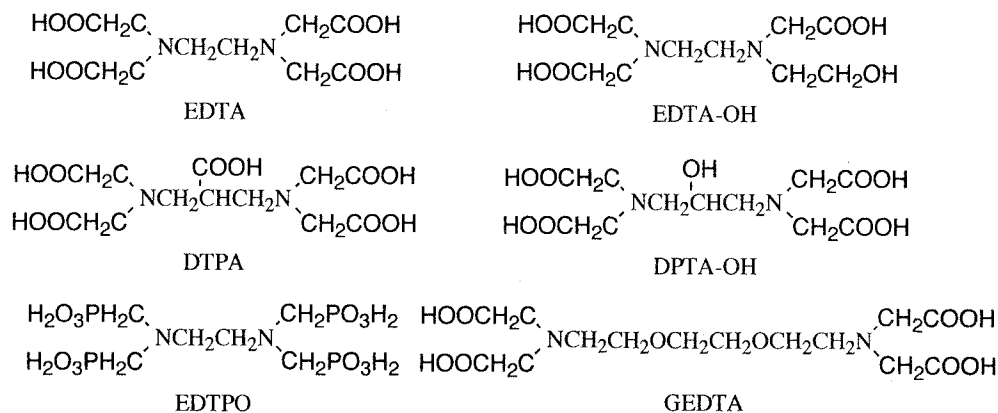


Fig. 1 EDTA類縁体の構造式

[Fe]₀: 1.5 μM, [L]₀: 1.5-150 μMに調整した改変f/2培地中における*C. roscoffensis*の生長曲線を Fig. 2 に示す。植物プランクトンの増殖は、制限因子である鉄の供給量を反映しており、鉄が十分ある環境下では一定の細胞分裂速度で増加した(対数増殖期)が、培地中の鉄が枯渇すると増殖は停止し定常期を迎えた。このような鉄制限下における植物プランクトンの生長曲線では、培地中のキレート配位子の種類と濃度により、対数増殖期の増殖速度が速い場合と遅い場合に分かれた。キレート配位子の影響は、配位子濃度が高くなるにしたがって以下の順に生長抑制効果として現れた。



Fig. 2において、キレート配位子の初濃度 ($[L]_0$) が $1.5 \mu\text{M}$ ではEDTPOにのみ増殖速度に対して抑制効果がみられたが、 $[L]_0$ が大きい条件ではEDTPOだけでなくDPTA-OH, DTPA, EDTA-OHに関しても抑制効果が現れた。一方、EDTA, GEDTA については全ての濃度において生長抑制効果は観測されなかった。

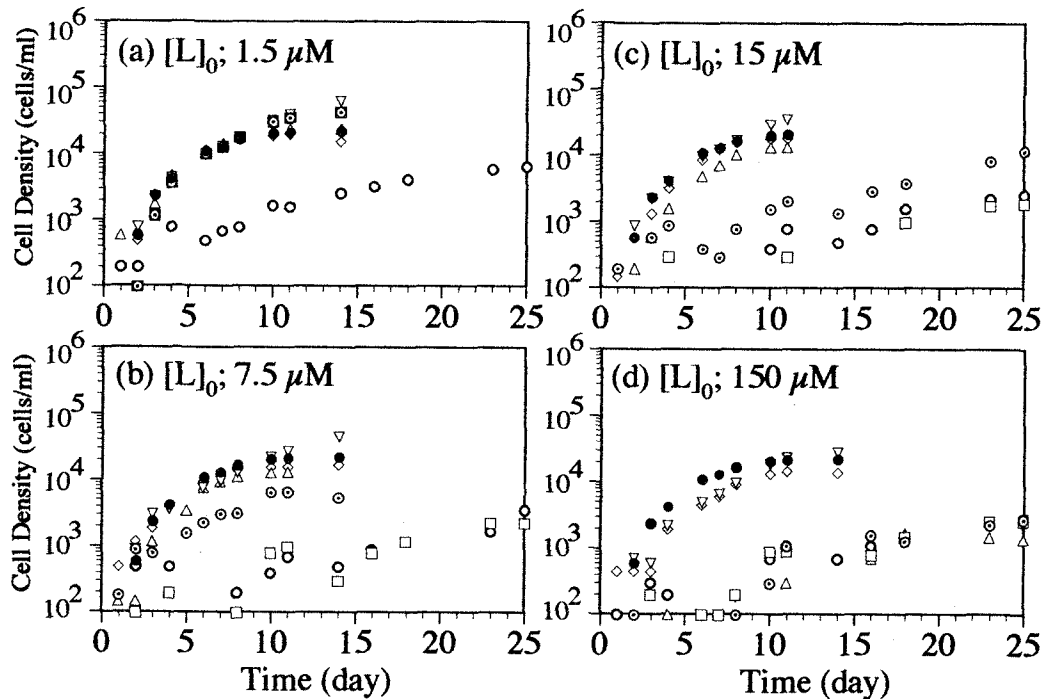


Fig. 2 EDTA類縁体共存下における*C. roscoffensis*の生長曲線
 $[\text{Fe}]_0$; $1.5 \mu\text{M}$, GEDTA; ▽, EDTA; ◇, EDTA-OH; △, DTPA; ○,
DPTA-OH; ●, EDTPO; ○, Control; ●.

キレート配位子の生長に与える効果は、培地中の鉄濃度により大きく変化した。 $[\text{Fe}]_0$; $6.0 \mu\text{M}$, $[L]_0$; 1.5 - $150 \mu\text{M}$ に調整した改変f/2培地中において*C. roscoffensis*を培養した場合、定常期における全細胞数については、鉄制限下 ($[\text{Fe}]_0$; $1.5 \mu\text{M}$; Fig. 2) において観測されたキレート配位子の生長抑制効果と同じ傾向が僅かに生じたが、対数増殖期における増殖速度については、各キレート配位子間にほとんど差が生じなかった。この条件 ($[\text{Fe}]_0$; $6.0 \mu\text{M}$) では、*C. roscoffensis*の生長は鉄によって制限されないことから、キレート配位子の生長阻害効果は、鉄制限下のプランクトンにおいて強く発現することが推察される。

EDTA類縁体存在下における培養実験を他の植物プランクトン株 (*R. ovalis*, *H. akashiwo*, *O. viridis*, *S. costatum*) で行った結果、すべてのプランクトンについて(1)と同様の傾向が観測されたが、キレート配位子の抑制効果の程度については異なることが分かった。複数のプランクトン種において同様の傾向が観測されたことから、各植物プランクトンは比較的似通った鉄取り込み機構を有していると考えられる。しかしながら、植物プランクトンはそれぞれの属が経過してきた進化の変遷によって大きく分岐しており、各プランクトンが有する代謝経路や細胞膜の構造は種によって異なる点が多く見いだされている(千原, 1999)。キレート配位子の抑制効果の程度に差が生じたことは、鉄の取り込み機構に関してもプランクトン種間で多様性が存在する可能性を示唆している。

3. 2 植物プランクトンの鉄取り込み機構の解析

キレート配位子が共存する海水培地中では、鉄の化学平衡に主に関与しているのは、Fe、キレート配位子、及び、キレート配位子に配位可能な主要成分であるCa、Mgである。植物プランクトンの鉄の取り込み機構としては、細胞表面における輸送配位子に結合したFe(III)が還元されて細胞膜を通過する経路 (Yokote and Honjo, 1985)、低分子量の輸送配位子 (鉄運搬体; シデロホア) を放出して取り込む経路 (Raymond *et al.*, 1983) が考えられている。そこで本研究では、プランクトンの輸送配位子をYとして、海水中及び細胞表面における鉄の化学平衡を Fig. 3 に示すようにモデル化した。

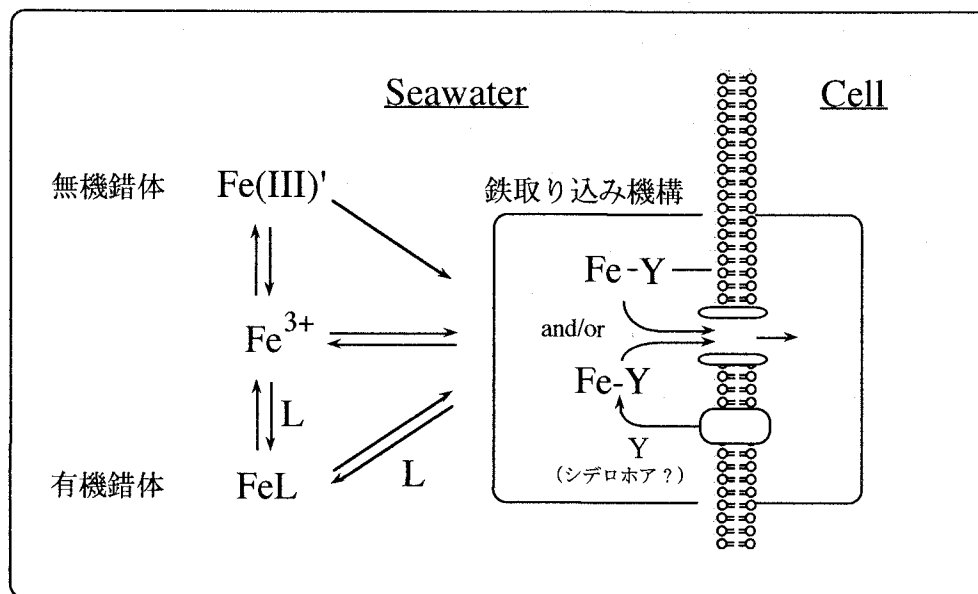


Fig. 3 キレート配位子存在下における植物プランクトンの鉄取り込み機構の化学平衡モデル

キレート配位子 (L) 及び輸送配位子 (Y) とFe, M (M=Ca, Mg) との錯生成反応において、平衡状態では次の各式が成り立つ。

$$K_{FeY} = \frac{[FeY]}{[Fe][Y]} \dots (2) \quad K_{FeL} = \frac{[FeL]}{[Fe][L]} \dots (3) \quad K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \dots (4)$$

ここで、植物プランクトンが利用できる鉄、すなわち鉄の利用度は、輸送配位子に結合した鉄の割合 ([FeY]/[Y]) に比例すると仮定する。(2)-(4)式より、[FeY]/[Y]は以下のようにあらわすことができる。

$$\frac{[FeY]}{[Y]} = \frac{K_{FeY} \cdot K_{ML}}{K_{FeL}} \cdot \frac{[FeL][M]}{[ML]} \dots (5)$$

鉄及びキレート配位子の総濃度を[Fe]_{total}、[L]_{total}とすると、配位子が大過剰 ([Fe] < [L]) の条件では、[FeL] ≃ [Fe]_{total}とみなすことができる。また、キレート配位子はほとんどが海水中の主要成分であるCa及びMgイオンと錯生成するので、[ML] ≃ [L]_{total}の近似式が成り立つ。よって、

$$\frac{[FeY]}{[Y]} = K_{FeY}[M] \cdot \frac{K_{ML}}{K_{FeL}} \cdot \frac{[Fe]_{total}}{[L]_{total}} \dots (6)$$

培養期間を通して海水培地中のCa, Mgイオンの濃度は一定であることから、(6)式第一項は定数である。したがって、植物プランクトンの鉄の利用度は、キレート配位子の性質を示す第二項

(K_{ML}/K_{FeL}) と培地中の化学組成により決定される第三項 ($[Fe]_{total}/[L]_{total}$) により決定されると考えられる。

(6)式第二項は、キレート配位子のFeとCa (及びMg) に対する錯生成定数の影響をあらわしている。EDTA類縁体のFe, Ca, Mgに対する錯生成定数をTable 1に示す。Ca (及びMg) はFeに比べてEDTA類縁体との錯生成定数は小さいが、海水中の濃度は著しく高いので、植物プランクトンの鉄の利用度を求める場合にはこのイオンと配位子の錯生成を考慮する必要がある。EDTA類縁体存在下におけるプランクトンの培養実験 (Fig. 2) において、Caに対する錯生成定数が同じ程度のGEDTA, EDTA, DTPAを比較すると、Feとの錯生成定数が大きいDTPAで抑制効果が強く生じた。これは、キレート配位子がFeと強く結合し、プランクトンの鉄の利用度が減少した結果と考えられる。また、Feとの錯生成定数が同じ程度のGEDTA, EDTA-OH, EDTPOで比較すると、プランクトンの培養実験ではCaとの錯生成定数が小さい順 (EDTPO>EDTA-OH>GEDTA) に抑制効果が増加した。Caとキレート配位子間の相互作用が弱くなった結果、FeL錯体の安定度が増加し、プランクトンの鉄の利用度が減少したと考えられる。

(6)式第三項では、植物プランクトンの鉄の利用度は、培地中の鉄/キレート配位子の濃度比に相関することを示している。同項は、EDTA類縁体存在下におけるプランクトンの培養実験においてキレート配位子の濃度が高くなるとプランクトンの生長速度が抑制されたこととよく一致している。また、鉄を多く含む培地中で配位子の抑制効果が弱くなることも説明できることが分かった。

Table 1 EDTA類縁体とFe, Ca, Mgとの錯生成定数

Chelator	$\log K_{FeL}^a$	$\log K_{CaL}^{a, b}$	$\log K_{MgL}^{a, b}$
DTPA	28.6	10.74	9.3
EDTA	25.1	10.96	8.69
GEDTA	20.5	11.0	5.21
EDTAOH	19.8	8.14	7.0
EDTPO	19.6	6.93	5.69
DPTAOH	-	6.69	5.3

^a 錯生成定数; $M + L \rightleftharpoons ML$

^b $[Ca^{2+}] = 10 \text{ mM}$, $[Mg^{2+}] = 53 \text{ mM}$

4 結語

EDTA類縁体を添加した海水培地中において、海洋植物プランクトンの生長は必須元素である鉄の存在状態により大きく影響されることが分かった。特に、鉄の濃度が低くその供給量が制限因子となる培養条件では、培地中のキレート配位子の種類と濃度の効果が対数増殖期の増殖速度に顕著に現れた。熱力学的な平衡計算により、鉄溶存化学種の組成、キレート配位子の化学的性質を解析した結果、植物プランクトンの鉄の利用度は、海水中に溶存するキレート配位子と鉄の濃度比、及び、キレート配位子の鉄、カルシウム、マグネシウムに対する錯生成能と相関することを明らかにした。同様の傾向が複数のプランクトンの生長曲線において観測されたことから、これらの知見は広範囲のプランクトンに適用できると考えられる。

従来の研究では、有機錯体を生成した鉄は植物プランクトンにはほとんど取り込まれず、植物プランクトンの鉄の取り込み速度や増殖速度は、遊離鉄イオン活量に依存すると考えられていた

(Anderson and Morel, 1978, Sunda and Huntsman, 1985)。しかし最近では、植物プランクトンは有機配位子と強く結合した鉄も利用することが報告されている (Maldonado and Price, 2000)。本研究で得られた結果は、植物プランクトンの増殖には、海水中の遊離鉄イオンよりも、有機配位子と鉄の化学平衡が重要であることを示している。実際の海洋において有機配位子を用いて植物プランクトンが利用可能な鉄の量を調整することは十分可能であろう。本研究がプランクトンの一次生産量及び群集構造をコントロールする手法の確立につながるものと期待される。

5 謝辞

研究で用いた植物プランクトンは、京都大学農学部今井一郎先生に提供していただきました。今井先生のご厚意に心から謝意を表します。また、本研究は、(財)地球環境産業技術研究機構平成12年度委託RITE優秀研究企画の一部であることを付記します。

6 参考文献

- Anderson, M. A., F. M. M. Morel (1978) *Nature*, **276**, 70.
- Bohlool, B. B., E. L. Schmidt (1980) In: Alexander, M. (Ed). *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 4. Plenum Press, New York, pp. 203-210.
- Coale, K. H., K. S. Johnson, S. E. Fitzwater, R. M. Gordon, S. Tanner, F. P. Chavez, L. Ferioli, C. Sakamoto, P. Rogers, F. Millero, P. Steinberg, P. Nightingale, D. Cooper, W. P. Cochlan, M. R. Landry, J. Constantinou, G. Rollwagen, A. Trasvina, R. Kudela (1996) *Nature*, **383**, 495.
- Hutchins, D. A., A. E. Witter, A. Butler and G. W. Luther III (1999) *Nature*, **400**, 858.
- Lyman, J., Fleming, R. H. (1940) *J. Mar. Res.*, **3**, 134.
- Maldonado, M. T., Price, N. M. (2000) *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 814.
- Martin, J. H., R. M. Gordon (1988) *Deep-Sea Res.*, **35**, 177.
- Martin, J. H., R. M. Gordon (1990) *Nature*, **345**, 156.
- Martin, J. H., K. H. Coale, K. S. Johnson, S. E. Fitzwater, R. M. Gordon, S. J. Tanner, C. N. Hunter, V. A. Elrod, J. L. Nowicki, T. L. Coley, R. T. Barber, S. Lindley, A. J. Watson, K. Van Scoy, C. S. Law, M. I. Liddicoat, R. Ling, T. Stanton, J. Stockel, C. Collins, A. Anderson, R. Bidigare, M. Ondrusek, M. Latasa, F. J. Millero, K. Lee, W. Yao, J. Z. Zhang, G. Friederich, C. Sakamoto, J. Chavez, K. Buck, Z. Kolber, R. Greene, P. Falkowski, S. W. Chisholm, F. Hoge, R. Swift, J. Yungel, S. Turner, P. Nightingale, A. Hatton, P. Liss, N. W. Tindale (1994) *Nature*, **371**, 123.
- 西澤一俊、千原光雄 (1992) 藻類研究法、共立出版
- Raymond K. N., G. Müller, B. F. Matzanke (1984) In: Boscheke, F. L. (Ed). *Topics in current chemistry*. v. 123, Springer, pp. 49-102.
- Sunda, W. G., S. A. Huntsman (1985) *Limnol. Oceanogr.*, **30**, 71.
- 千原光雄 (1999) 藻類の多様性と系統、裳華房
- Yokote, M., T. Honjo (1985) *Experientia.*, **41**, 1143.