

1. 研究課題名:

Extended Ecological Stoichiometry の確立に向けた海洋生物中微量元素の網羅的解析

共同研究者

板井 啓明 (東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻)

川島 彰吾 (東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻)

田村 一紗 (東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻)

北村 真一 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

大林 由美子 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

2. 研究目的

地球上には様々な生物が存在するが、生命活動の維持には 25 種類程度の必須元素の取り込みが必要である。海洋一次生産は、光や温度などの環境要因に加え、これら必須元素の利用可能量に依存する。一般的には窒素やリンが制限因子となるが、一部の外洋域では鉄が制限因子となることが知られている。プランクトン中の微量元素組成については、古くから研究があり、C: N: P = 106 : 16 : 1 のレッドフィールド比に微量元素を加えた拡張レッドフィールド比も提唱されている。例えば、Morel (2008)らは、太平洋のプランクトンについて、 $P_{1000} Fe_{4.1} Zn_{2.4} Mn_{0.35} Cu_{0.45} (Co_{0.2}) Cd_{0.54} Ni_{0.60}$ を提唱している。ただし、このような推定値が大きな幅を持つことは、海洋微量元素分析や低次生態系試料採集における困難をふまえると容易に想像ができる。

我々の関心は、水圏に生息する多様な生物中の微量元素存在比率 (Stoichiometry) について、低次から高次生態系までの変化過程を系統的に調べる枠組みの構築にある。具体的には、海外では R. Sterner と J.J. Elser、国内では占部らが牽引してきた C, N, P 相互比の規制要因に関する Ecological Stoichiometry の考え方を、微量元素に拡張するものである (Sterner & Elser, 2002)。すなわち、微量元素の分子レベルでの存在状態や、細胞内区画における分布などを詳細に調査し、各種 Elemental Ratio に基づく金属含有生体分子の存在量・役割の抽出法を整理していきたいと考えている。

水圏生態系を広く取り扱うには、各栄養段階生物の特性に応じて異なる障壁があり、これらを克服する初期戦略が必要である。低次生物は一般に小型であり、ネットで採集した試料が様々な生物種や非生物粒子を含有するため、種ごとの元素要求量 (quota) を精度良く決定することが困難である。高次生物については、小型生物と比較して長いタイムスケールで各種臓器に微量元素分配がなされるため、薬物動態学や魚類生理学の知見に基づき数値モデルを構築し、観測される Stoichiometry のバリエーションを成長段階や行動履歴等の関数として規格化す

る手法の開発が必要である。

今年度は、低次生物に関して、高輝度放射光 X 線マイクロビームを用いたプランクトン個体別の微量元素組成の分析に取り組んだ。放射光 X 線マイクロビーム蛍光分析 (μ -XRF) では、1 細胞ごとに amol オーダーの微量元素を検出し元素分布マッピングを非破壊で得ることが原理的に可能である。本研究では、国内の主要放射光施設のビームラインを用いた μ -XRF 分析を試行し、(1) ファンダメンタルパラメータ法 (FP 法) による絶対定量 (非検量線) の評価、(2) 富栄養湖を対象とした水中-ナノプランクトン間の微量元素比の比較解析を実施した【実験 1】。また、サブマイクロメートルレベルの分析が可能な走査型透過 X 線顕微鏡 (STXM) の、ピコプランクトン ($< 2 \mu\text{m}$) への応用可能性についても検討した【実験 2】。

2. 研究内容

【実験 1 放射光 X 線マイクロビームを用いた生物試料中微量元素定量法の検討と応用】

μ -XRF 分析は、フォトンファクトリーの BL-4A (ビーム径: $5 \times 5 \mu\text{m}$) と SPring8 の BL37XU (ビーム径: $1 \times 1 \mu\text{m}$) で実施した。FP 法による絶対定量の評価は、3 種類の微量元素測定用生物認証物質 (CRM) を用いて実施した。様々な条件における XRF を測定した後、スペクトル解析プログラム "PyMCA" (Sole et al., 2007) を用いてバックグラウンド処理、ピーク分離、装置の幾何学配置と光子減衰パラメータを最適化することで、非検量線法で濃度定量が可能な条件の確立を試みた。天然の珪藻試料は、2020 年 6 月と 8 月に霞ヶ浦、手賀沼、牛久沼の表層水から採取した。電子顕微鏡観察用のウインドウ上に微生物を濃縮した試水を少量滴下し、風乾させ、卓上走査型電子顕微鏡と超深度カラー 3D 形状測定顕微鏡で観察した。観察画像をもとに、ターゲットとする細胞の元素イメージングを μ -XRF により取得した。代表的なスポットでは、積算時間 60-120 秒で定量用の XRF スペクトルを取得した。各湖沼の溶存、懸濁態の金属濃度は、採水時に (1) $0.45 \mu\text{m}$ polycarbonate ろ紙でろ過した処理群、(2) ろ過をしない処理群、に各々酸を添加して採取し、ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technology) で測定した。

【実験 2 走査型透過 X 線顕微鏡 (STXM) を用いたピコプランクトンの観察】

KEK-PF・BL-19A の compact STXM を用いて、霞ヶ浦で採取した藍藻類 (*Synechococcus sp.*, *Microcystis sp.*) および微細珪藻 (*Cyclotella meneghiniana*) 中の炭素の分布と化学状態を分析した。透過電子顕微鏡用ウインドウにマウントした試料を超深度カラー 3D 形状測定顕微鏡で観察したのち、試料を compact STXM のチャンバー内に導入し、He 雰囲気置換した。ゾーンプレートにより集光さ

れた X 線ビームを照射し、透過率を基に炭素の細胞中濃度分布を取得後、炭素 K 吸収端付近での Image Stack を測定した。任意の領域における NEXAFS スペクトルを抽出し、ピーク位置の前後で画像の差分をとり炭素官能基分布を求めた。また、金属元素の吸収端前後の吸光度分布の差分から、元素分布を求めた。

4. 研究成果

【実験 1 放射光 X 線マイクロビームを用いた生物試料中微量元素定量法の検討と応用】

錠剤に整形した生物 CRM の XRF スペクトルを解析した結果、原子番号が Ca 以下の軽元素では、FP 法での推定値が認証値に対して過小評価の傾向が認められた。軽元素は、特性 X 線の試料内・試料-検出器間の吸収を受けやすいが、計算過程では両効果を過大評価したためと考えられる。一方、Ca よりも重い元素では、推定値と認証値は概ね一致した。試料濃度や励起エネルギーを変化させた実験結果、異なるビームラインでの分析結果の比較から、FP 法の計算法とパラメータの妥当性を評価し、プランクトン中微量金属の絶対定量が可能と判断した。天然試料について、全湖沼で高濃度 ($>10^3/\text{ml}$) で観察された珪藻類は、中心目の *Cyclotella sp.*、*Aulacoseira sp.* と羽状目の複数種で、大きさは $10\sim 50\ \mu\text{m}$ であった。顕微鏡観察により、珪藻と周辺の有機無機複合体の位置関係を確認し、元素イメージングとの照合により、分析対象細胞を特定した。各試料分析時の条件変動を考慮するため、微量元素の測定値をイオン濃度で規格化した値を解析に用いたところ、各湖沼の *Cyclotella sp.*、*Aulacoseira sp.*、羽状目珪藻類の間で、微量元素プロファイルに有意な差は認められなかった。一方、同一湖沼における

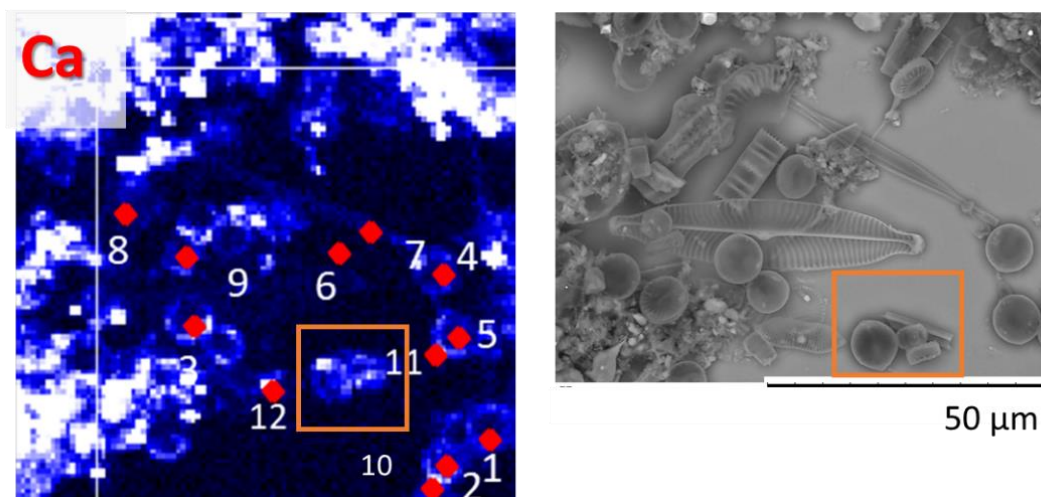


Fig. 1 Spring-8 BL37XU で取得した微細藻類の Ca 濃度分布と SEM イメージ。試料は 2020 年 6 月に牛久沼で採取。

Mn、Fe、Cu、Zn などの珪藻個体中微量元素濃度は、6月から8月にかけて減少する傾向が認められた。湖沼の pH は6月から8月にかけて上昇傾向であり、各種溶存態微量元素濃度は低下していた。これは、水酸化物や炭酸塩の沈殿によるものと推察された。6月から8月にかけての、湖水中溶存微量元素濃度の減少と、富栄養化による水中細胞密度の増大は、珪藻類の細胞中微量元素の減少と整合的であった。すなわち、個体レベルの微量元素分析により、環境因子の変化と生物への吸収量を対応付けられることが示された。

Cyclotella sp. について、空間分解能の高い BL37XU で明瞭な元素イメージングが得られたため、これを用いて輪郭部と細胞の中心部の XRF スペクトルを比較した (Fig. 1)。その結果、カルシウムなど一部の元素で有意な差が検出され、本手法がナノプランクトン中微量元素の局所構造分析にも応用可能であることが示された。

【実験2 走査型透過 X 線顕微鏡 (STXM) を用いたピコプランクトンの観察】

STXM 分析の結果、*Synechococcus sp.* では細胞内部に顆粒状にタンパク質が分布し、輪郭部に多糖類、細胞領域全体に炭酸塩が分布することが分かった (Fig. 2)。また、Ca と Fe は炭酸塩同様の分布を示した。グルタルアルデヒドで処理をした試料群の NEXAFS スペクトルには炭酸塩ピークは存在せず、pH の低下により炭酸塩が溶解消失したと考えられた。実験の結果から、STXM がピコプランクトン中生元素の局所化学形態分析に有効であることが示された。分析のハイスループット化、適切な試料前処理方法の確立、重元素イメージングとのスタッキングが今後の課題と考えられた。

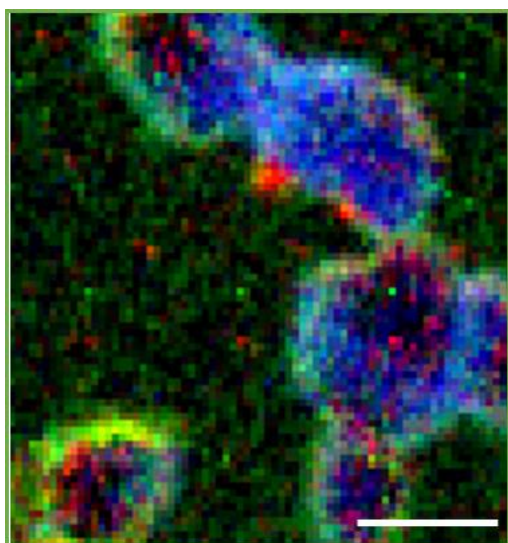


Fig. 2 フォトンファクトリーBL19A で取得した *synechococcus sp.* の STXM 分析結果. 各化学種の分布はイメージスタック法により解析. 試料は 2020 年 6 月に霞ヶ浦で採取.

R:Protein
G:Polysaccharide
B:Carbonate

【結論】

本研究により、国内主要放射光施設のマイクロビームビームラインを用いた微細藻類中微量元素の定量法が確立され、その応用範囲が示された。当手法を微細藻類の一般的な微量元素分析法として普及させ、X線吸収法を併用すれば、水圏微量元素の生物地球化学循環解析の精緻化に貢献が可能である。

5. 研究発表

1. 田村一紗, 板井啓明, 放射光 X エックス線マイクロビームを用いたナノプランクトンの個体別微量元素分析法の開発, 2020 年 日本プランクトン学会・ベントス学会 合同大会 (オンライン, 2020.9)
2. 田村一紗, 板井啓明, 砂村倫成, 高橋嘉夫, 放射光マイクロビーム蛍光 X 線分析によるナノプランクトンの個体別微量金属元素分析法の開発と応用, 2020 年度 日本地球化学会年会 (オンライン, 2020.11)

6. 今後の問題点

本研究により、ナノプランクトンについては個体別微量元素濃度の定量が可能であることが示された。一方、ハイスループット分析を可能にするには、各放射光ビームラインにおいて、顕微鏡画像と元素イメージをスタックする方法を、より簡便かつ正確にする工夫が必要である。