

# 海水中の銅の有機配位子の分布および その循環に関する研究

Wong, Kuo Hong (黄国宏)\*

### はじめに

電気自動車などの先端技術では銅を含む様々な重金属が使用されている。近年、電気自動車の普及に伴って銅が環境中に流出する懸念は増えている。このように流出する銅は河川や地下水を経て最終的に海洋に流れ込む。特に河口域や沿岸域など陸域の影響を強く受けている海域では、銅濃度の増加が予想される。

銅は植物プランクトンの成長に必要とされている元素の一つである。海水中の遊離銅イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ ) の濃度は  $10^{-15}$  M より低くなると、植物プランクトンの生長が制限されると先行研究は報告した (Peers et al., 2005)。しかし、 $\text{Cu}^{2+}$  濃度が高くなると ( $> 10^{-12}$  M), 植物プランクトンの生長に悪影響を与える (Brand et al., 1986)。特に、植物プランクトンの中で、銅の毒性に対して最も弱い種であるらん藻は  $\text{Cu}^{2+}$  濃度が  $10^{-12}$  M の条件下で、生長が大幅に減少することがわかっている。一方、銅の毒性に対して耐性が比較的強い珪藻は  $10^{-11}$  M  $\text{Cu}^{2+}$  の存在下においても生長が影響されない。

これまで、河口域や沿岸域における溶存態銅の濃度は  $10^{-9}$  M 程度と報告されている。銅がすべて  $\text{Cu}^{2+}$  として存在すると、植物プランクトンに対して高い毒性を持つことになる。

しかしながら、銅の濃度が高い河口域や沿岸域では、陸域から様々な栄養塩の供給があるため、一次生産が非常に高い。これらの海域は漁業や養殖業が盛んであることから経済の面で重要視され

ている。漁業や養殖業を支える海洋食物連鎖の基盤として、銅の環境毒性に対する植物プランクトンの応答を理解する必要がある。

海洋植物プランクトンが銅の毒性に対抗する手段はいくつか挙げられる。中でも重要と考えられるのは有機配位子の生産と放出である。有機配位子は海水中の  $\text{Cu}^{2+}$  と錯生成し、銅の化学形態を銅有機錯体に変換する。このように形成された銅有機錯体のほとんどは植物プランクトンに取り込まれなくなるため、毒性がないと考えられる。海洋表層水では、銅の有機配位子は豊富に存在し、溶存態銅の濃度を遥かに上回っている (Wong et al., 2018, 2019, 2021a; 2021b)。  $\text{Cu}^{2+}$  濃度はそれらの有機配位子によって、毒性が生ず、植物プランクトンの生長に制限しない程度 ( $10^{-13}$ - $10^{-15}$  M) に抑えられると言われている。

### 銅有機配位子分析法の検討

銅の環境毒性を正確に評価するためには、まず銅の有機配位子の濃度と条件安定度定数を明らかにする必要がある。銅有機配位子の測定は、主に金属滴定を応用した競争配位子平衡吸着カソードリックストリップングボルタンメトリー法 (FT-CLE-AdCSV) によって測定する。この手法では、海水試料中の有機配位子がすべて錯生成されるよう、銅を試料に段階的に添加していく。その後、同じ濃度 ( $5 \mu\text{M}$ ) になるように人工配位子であるサリチルアルドキシム (salicylaldoxime または SA) を海水試料に添加し、試料中の銅と

\*金沢大学理工研究域物質化学系助教

結合している有機配位子を置換して銅-SA 錯体としてボルタメトリー法によって検出する。しかし、実際の海水において様々な銅の有機配位子が存在するため、特定の有機配位子の検出は難しい。

有機配位子をピンポイントで検出するため、「検出窓」(detection window)を調整する必要がある。検出窓とは添加したSAのサンプル中の銅有機配位子を置換する能力のことを指す。そのため、検出窓を調整する際、測定に使用する最適なSA濃度を検討する必要がある。

そこで、我々の研究グループ(東京大学大気海洋研究・海洋無機化学研究室)は海水において銅の毒性を制御できる比較的強い有機配位子をターゲットにし、分析法を検討した。海水中の溶存態銅濃度、銅有機配位子濃度および有機配位子の条件安定度定数を考慮し、SAを10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2  $\mu$ M および 1  $\mu$ M になるように海水試料に添加した(Wong et al., 2018)。実験した結果、各検出窓において一種類または二種類の有機配位子を検出できた。情報を多く獲得するため、二種類の有機配位子を同時に検出できる5  $\mu$ M, 2  $\mu$ M SA 検出窓をさらに検討した(10  $\mu$ M 及び 1  $\mu$ M SA では一種類の有機配位子しか検出できなかった)。その結果、5  $\mu$ M SA 検出窓はもっと優れた結果を示し、多様な海水試料中の有機配位子の検出に成功した。

5  $\mu$ M SA を最適化した検出窓として用い、我々は河口域である岩手県大槌湾、縁辺海である東シナ海および外洋である北太平洋亜寒帯で採取した海水試料を測定し、三つの海域における銅有機配位子の濃度と条件安定度定数を求めた。(Wong et al., 2018, 2019, 2021a; 2021b)。

最近では、我々はこのCLE-AdCSV法を改良し、より多くの有機配位子を測定できる方法を開発した。FT-CLE-AdCSV測定に用いられた金属滴定に対し、配位子滴定を海水試料に適用した。この手法(配位子滴定を応用した競争配位子平衡吸着カソーディックストリップングボルタメトリー法またはRT-CLE-AdCSV)では、海水試料に異

なる量のSAを添加し、それぞれのSA濃度の銅錯生成能力によって有機配位子を置換する。このようにしてFT-CLE-AdCSVよりも広い検出窓を実現できた。例えば、今までのFT-CLE-AdCSVでは、分析法の制限によって検出できる銅有機配位子の条件安定度定数は $10^{15}$ 程度が最大であったが、RT-CLE-AdCSVでは、 $10^{16}$ より高い条件安定度定数を有する有機配位子も難なく測定できた(Wiwit et al., 2021)。一方、低い条件安定度定数を有する有機配位子に関しても、RT-CLE-AdCSVはFT-CLE-AdCSVより多くの有機配位子を検出でき、様々な銅の有機配位子に関する詳しい情報を獲得できようになった。

## 海洋における銅有機配位子の挙動

### 1. 大槌湾

岩手県大槌湾における海水試料の採取は2013年3月、2016年5月および2020年1月に合計3回行った(Wong et al., 2018; Wiwit et al., 2021)。海水試料は東京大学大気海洋研究所国際沿岸海洋研究センターに所属する研究船弥生を用いて酸洗浄したNiskin-X採水器で採取した。その後、銅有機配位子の分析に用いる海水試料は0.2  $\mu$ m孔径のカプセルフィルターで濾過し、酸洗浄したフッ素加工ポリエチレン瓶に入れ、冷凍保存した(-20°C)。一方、溶存態銅の濃度分析に用いる試料は同様に濾過し、酸洗浄したポリエチレン瓶に入れ、酸性化(pH < 2)して保存した。銅の汚染を防ぐため、試料を酸性化するには超高純度塩酸を用いた。

また、大槌湾に流入する三つの河川(鵜住居川、大槌川、小槌川)においても水試料を採取した(Wong et al., 2018; Wiwit et al., submitted)。河川水試料は酸洗浄した手つきビーカーで試料水を掬い、5Lのキュービテナーに入れた。その後、国際沿岸海洋研究センターにおいてペリスタルティックポンプで試料を0.2  $\mu$ mのカプセルフィルターに通液し、フッ素加工ポリエチレン瓶またはポリエチレン瓶にいれ、それぞれ冷凍(有機配

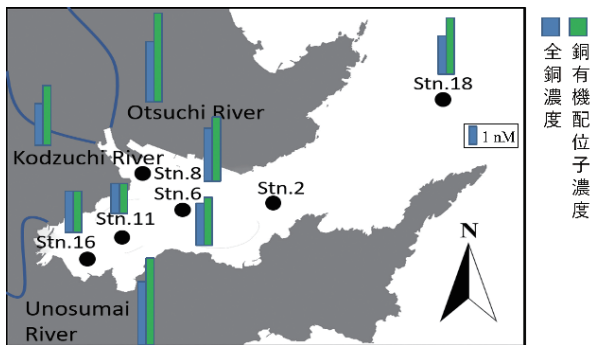


図1. 大槌湾における溶存態銅とその有機配位子の濃度分布

位子分析法用) または酸性化 (全溶存態銅濃度分析用) して保存した。

分析の結果は図1に示す。各測点において、二種類の有機配位子を検出した。銅有機配位子の濃度は溶存態銅の濃度を上回った。FT-CLE-AdCSVの分析によると、比較的強い有機配位子 (以降  $L_1$ ) の濃度は溶存態銅の濃度とほぼ一致していたが、比較的弱い有機配位子 ( $L_2$ ) の濃度は溶存態銅の濃度を遥かに上回った。

また、 $L_1$  と銅の錯生成に対する条件安定度定数 ( $10^{13.5}-10^{15}$ ) は  $L_2$  の条件安定度定数 ( $10^{11.5}-10^{13}$ ) より二桁高く、銅に対して強い錯生成能力を示した。従って、大槌湾における銅はほとんど  $L_1$  と錯生成し、有機錯体として存在していると考えられる (Wong et al., 2018)。実際に  $Cu^{2+}$  の濃度を計算すると、 $Cu^{2+}$  濃度は  $10^{-14}$  M より低い値を示し、植物プランクトンに対して毒性がないことがわかった。

銅はほとんど  $L_1$  と錯生成するにも関わらず、 $L_2$  は  $L_1$  と同様に銅の毒性を制御する役割を持つことが我々最近の植物プランクトン培養培養から明らかになっている (Wiwit et al., in prep)。  $L_2$  は銅との錯生成能力が弱いため、銅の毒性制御にあまり効果がないと考えてきたが、我々の研究によって今後は  $L_2$  の重要性がより明らかになり、 $L_2$  に関する知見も徐々に増えていくと期待される。

一方、RT-CLE-AdCSV を用いて大槌湾の海水試料を分析すると、 $L_1$  より銅との錯生成能力の強い有機配位子が存在することがわかった

(Wiwit et al., 2021)。大槌湾に流入する三つの河川と河口域における非常に強い有機配位子の濃度はほぼ一致したことから、このような有機配位子は河川由来のものではないと考えられる (Wiwit et al., submitted)。また、植物プランクトンの生長に伴って非常に強い有機配位子の増加は観測されなかった。これらの有機配位子は植物プランクトンが放出するものでもない (Wiwit et al., in prep)。大槌湾における水塊の分析を行うと、それらの非常に強い有機配位子の濃度は密度躍層の下では高く、表層では低い値を示した。そのため、非常に強い有機配位子は堆積物由来の可能性が高いことを我々の研究で明らかにした (Wiwit et al., in prep)。海洋における非常に強い有機配位子は銅との強い結合によって、植物プランクトンへの銅の取り込みや銅の毒性を制御すると考えられる。

## 2. 東シナ海

東シナ海における海水試料は2015年7月と10月にそれぞれ学術研究船新青丸と学術研究船白鳳丸によって採取した。海水試料の採取には大槌湾と同様に Niskin-X 採水器を用いて、 $0.2\ \mu\text{m}$  カプセルフィルターで濾過した。海水試料はポリエチレン瓶またはフッ素加工ポリエチレン瓶を用いて保存した。

東シナ海の陸棚域では、揚子江の水の流入によって塩分の低い表層水が観測された (図2; Wong et al., 2019; 2021b)。塩分の低下に伴って溶存態銅の濃度が急増した。東シナ海の陸棚上における溶存態銅は塩分と強い負の相関を示し、主に揚子江から供給されたと考えられる。銅の有機配位子は溶存態銅と分布がほぼ一致しており、揚子江に近い海域においても高い濃度を示した。これは植物プランクトンが銅の毒性を制御するため、有機配位子を放出したと考えられる。

東シナ海では大槌湾と同様に二種類の有機配位子が検出された。実際に東シナ海における銅の有機配位子の化学組成を調べると、 $L_1$  は蛍光性タンパク質であるチロシンと似た分布を示し、海洋

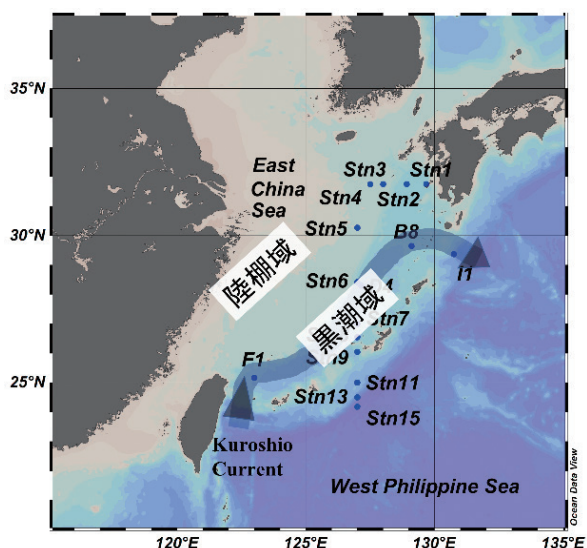


図2. 東シナ海の陸棚域と黒潮域の位置を示す。黒潮域において外洋水の流入によって溶存態銅とその有機配位子の濃度は低下する。

植物プランクトンにより生産・放出されたと示唆される。L<sub>1</sub>とL<sub>2</sub>は大槌湾で検出された有機配位子とそれぞれ類似した条件安定度定数を示し、両海域における有機配位子は近い化学組成を持つ可能性がある。

陸棚域の高濃度に対し、銅の有機配位子の濃度は東シナ海の黒潮域において、最も低い値を示した (Wong et al., 2021b)。これは黒潮が溶存態有機物濃度の低い海水を外洋域の西フィリピン海から東シナ海へ輸送するためである。西フィリピン海などの北太平洋亜熱帯海域の表層では、栄養塩が枯渇しているため、植物プランクトンの生長が遅く、一次生産も低い。その上、溶存態銅の濃度も低く、銅の毒性を制御するための有機配位子の生産はあまり進んでいないと考えられる。

我々の研究結果により、東シナ海の陸棚から外洋域にわたって、溶存態銅の濃度変化は大きいものの、Cu<sup>2+</sup>が非常に低い濃度レベル (< 10<sup>-13</sup> M) に保たれていることがわかった (Wong et al., 2019; 2021b)。植物プランクトンに対する毒性は強くないと考えられる。 (Wong et al., 2019; 2021b)。

### 3. 北太平洋亜寒帯 - GEOTRACES 計画

銅の有機配位子分析用の海水試料は北太平洋亜

寒帯の3測点において採取した。その中で、海水の性質によって測点は北太平洋亜寒帯西部の2点、アラスカ湾の1点に分けられる。本稿では、北太平洋亜寒帯西部とアラスカ湾を分けて議論する。

海水試料の採取は2017年7月-8月に学術研究船白鳳丸によって国際GEOTRACES計画の一環として行った。GEOTRACESは世界の海洋における微量金属元素とその同位体の挙動解明を目的とする国際協力研究プロジェクトである。海水中の多くの微量金属元素の挙動は有機配位子に左右されるため、GEOTRACESの目的を達するには有機配位子の分析が不可欠である。しかし、分析法、サンプルの保存などの問題により、現在外洋域における銅の有機配位子のデータは非常に少ない。北太平洋亜寒帯の海水試料を分析することで、貴重なデータを世界中の海洋学者に提供できる。有機配位子が外洋における銅の挙動にどのような影響を与えるかを検討した。

海水試料はGEOTRACESの採水手順を従って採取した (Cutter et al., 2010)。試料の汚染を防止するため、船上において「bubble」と呼ばれるクリーンスペースを築いた (図3)。Bubbleの中にHEPAフィルター付きのファンを設置して加圧することで、外部の空気の直接侵入を防いだ。海水試料を採取した直後、Niskin-X採水器をbubbleに搬入し、クリーンな環境下において0.2 μm カプセルフィルターで濾過して採水した。大槌湾と東シナ海と同様に、有機配位子分析用の



図3. GEOTRACES 航海中白鳳丸船内に築いたクリーンサンプリングスペース「bubble」。

試料はフッ素加工ポリエチレン瓶に入れて冷凍保存し、溶存態銅の濃度分析用の試料はポリエチレン瓶に入れ、酸性化して保存した。

### 3.1. 北太平洋亜寒帯表層水

北太平洋亜寒帯西部とアラスカ湾の表層水における銅の有機配位子は異なった分布を示した (Wong et al., 2021a)。

北太平洋亜寒帯西部の表層水では、二種類の有機配位子が検出され、大植湾と東シナ海と同様に銅の有機配位子は溶存態銅よりも濃度が高かった (Wong et al., 2021a)。 $L_1$  と  $L_2$  の条件安定度定数は大植湾と東シナ海の値に相当する。よって、 $\text{Cu}^{2+}$  は濃度が低くなり ( $< 10^{-13}$  M)、植物プランクトンに対して毒性が生じなかったと考えられる。

一方、アラスカ湾の表層水において一種類の有機配位子しか検出されなかった (Wong et al., 2021a)。その条件安定度定数は  $L_1$  に相当するが、 $L_2$  がないため、 $L_1$  だけでは銅の毒性を完全に制御できなかった。その結果、 $\text{Cu}^{2+}$  は  $10^{-11.5}$  M 程度の濃度で存在し、銅の毒性に比較的に弱いらん藻に対しては毒性を持ち、生長に悪影響を与える可能性がある。

銅の毒性に対して比較的に強い珪藻にとって、 $10^{-11.5}$  M 程度の  $\text{Cu}^{2+}$  濃度では生長に影響を与えない。そのため、アラスカ湾の表層水において珪藻が主な植物プランクトンの種として生息していたと考えた。 $\text{Cu}^{2+}$  濃度はやや高くても珪藻には毒性がないと考えられる。実際に先行研究では、北太平洋亜寒帯においては珪藻が多く存在することが報告されている (Tsuda et al., 2003)。この結果により、海水中の植物プランクトン組成は  $\text{Cu}^{2+}$  濃度に左右されている可能性が考えられる。

### 3.2. 北太平洋亜寒帯中層水

北太平洋亜寒帯の中層においては酸素極小層 (OMZ; oxygen minimum zone) と呼ばれる溶存酸素濃度が低い水塊がある。OMZ における銅有機配位子を測定すると、表層より条件安定度定数

の高い有機配位子が検出された (Wong et al., 2021a)。しかし、中層水においては、植物プランクトンが生息しないため、植物プランクトンによる有機配位子の放出は考えられない。先行研究では、OMZ において、酸素ではなくアンモニアや硝酸塩などの窒素化合物をエネルギー源として用いる微生物が存在すると報告されている (Pitcher et al., 2011)。それらの微生物は窒素を用いる際、銅が必要であるため、非常に強い有機配位子を放出し、海水中のより多くの銅を錯体として取り込むと考えられる。中層水に存在する有機配位子は銅の毒性を制御しているわけではなく、銅の取り込みメカニズムの一部として違う役割を担っている可能性がある。

### 3.3. 北太平洋亜寒帯深層水

北太平洋亜寒帯の深層は海洋大循環の終焉部にあるため、北太平洋亜寒帯深層水は世界の海洋において最も古い海水であると言われている (Khatiwala et al., 2012)。その深層水においては、一種類の銅に対する有機配位子しか検出されなかった。検出された有機配位子は溶存態銅より濃度が低く、条件安定度定数が表層水と中層水の  $L_1$  の値よりやや低い値を示した (Wong et al., 2021a)。

北太平洋亜寒帯深層における銅の有機配位子の濃度が低下するのは水塊の「年齢」と関係すると考えられる。超長期間深層に滞在した北太平洋亜寒帯深層水中では、表層から供給された有機物はほぼ分解されたと考えられる。そのため、銅の有機配位子の濃度が低下し、一部の銅は無機銅として存在することが示唆される。よって、深層水における  $\text{Cu}^{2+}$  の濃度は表層水と中層水の値より高かった ( $> 10^{-11}$  M)。

実際にこの  $\text{Cu}^{2+}$  濃度の値には不確実性が大きい。銅の有機配位子の分析に用いる FT-CLE-AdCSV 法では、手法の問題により、有機配位子の濃度が溶存態銅濃度より低い海水を測定する際、得られた値の信頼性が低い。そのため、深層にお

ける銅の有機配位子の濃度と条件安定度定数の値は正しくない可能性がある。信頼性が低いとはいえ、有機配位子の濃度が溶存態銅の濃度より低いことは間違っていないと考えられる。従って、Cu<sup>2+</sup>濃度は実際の計算通りに高いと予想される。

深層における銅の有機配位子を測定するため、新しい分析法が必要である。多くの分析法の中で、RT-CLE-AdCSVは一番有望である。RT-CLE-AdCSVは溶存態銅より有機配位子の濃度が低い海水に適用できる上、FT-CLE-AdCSVより広い検出窓を実現可能である。そのため、RT-CLE-AdCSVによる海洋深層水中の銅有機配位子の測定法の検討は今後の課題として計画している。

### Cu<sup>2+</sup>による銅毒性の評価の問題点

これまでの研究では、Cu<sup>2+</sup>濃度を海水中の銅毒性の指標として用いてきた。しかし、我々は大槌湾、東シナ海および北太平洋亜寒帯における銅の毒性を評価する際、いくつかの問題点を気付いた。その問題点は以下に挙げる：

1. 植物プランクトンの組成変化によってCu<sup>2+</sup>濃度が変わる可能性がある。例えば、アラスカ湾の表層水では、比較的に高いCu<sup>2+</sup>濃度が観測されたが、珪藻が主な植物プランクトンの種である場合、Cu<sup>2+</sup>濃度が高くても悪影響がないと考えられる。一方、らん藻が多く生息している東シナ海では、Cu<sup>2+</sup>濃度は非常に低くなっている。そのため、Cu<sup>2+</sup>濃度で銅の毒性を評価する際、植物プランクトン組成を考慮する必要がある。植物プランクトンの組成を測定するには、色素分析やDNA分析を行うのが一般的である。しかし、このようにして銅の毒性を評価すると、植物プランクトンの組成ごとに毒性を示すCu<sup>2+</sup>濃度を事前に求め、データベースを作る必要がある。
2. 銅の有機配位子はすべて銅を無毒化するために放出するものとは限らない。例えば、OMZに生息する微生物は銅を取り込むために有機配位子を生産・放出する機能を持っている可能性がある。よって、銅の有機錯体がすべて無毒であると想定

して計算されたCu<sup>2+</sup>濃度は銅毒性の指標として用いるのが難しい。

3. 分析法の問題により、Cu<sup>2+</sup>を強く錯生成できる非常に強い有機配位子はほとんど検出できない。我々は最近RT-CLE-AdCSVを用いて従来法であるFT-CLE-AdCSVで検出できなかった非常に強い有機配位子は堆積物から供給されていることを明らかにした(Wiwit et al., submitted)。非常に強い有機配位子を検出できないため、先行研究ではCu<sup>2+</sup>濃度を計算した際、この有機配位子の存在を無視した可能性がある。よって現在求められているCu<sup>2+</sup>濃度は銅の毒性の指標として信頼性が低いと考えられる。

以上の経緯により、銅の毒性を評価できる新しい方法が必要である。

### 今後の展望

我々が銅毒性の新しい指標として着目しているのがチオール類である。チオール類は植物プランクトンが銅を無毒化するために細胞内に生産するものであり、銅毒性のバイオマーカーとして利用できる可能性がある。このバイオマーカーを使うと、Cu<sup>2+</sup>濃度や植物プランクトンの種類に関わらず、銅から受けたストレスを確実に検出できるようになる。

### 参考文献

- Brand, L., Sunda, W., Guillard, R. (1986), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96, 225–250
- Cutter, G., Andersson, P., Codispoti, L., Croot, P., Francois, R., Lohan, M., Obata, H., van der Loeff, M. (2010), *Sampling and Sample-handling Protocols for GEOTRACES Cruises*
- Khatiwala, S., Primeau, F., Holzer, M. (2012). *Earth Planet. Sci. Lett.*, 325–326, 116–125
- Peers, G., Quesnel, S., Price, N. (2005), *Limnol. Oceanogr.*, 1149–1158
- Pitcher, A., Villanueva, L., Hopmans, E., Schouten, S., Reichart, G., Damste, J. (2011),

ISME J., 5, 1896–1904

Tsuda, A., Takeda, S., Saito, H., Nishioka, J., et al. (2003), *Science*, 300, 5621

Wiwit, Wong, K., Fukuda, H., Ogawa, H., Mashio, A., Kondo, Y., Nishioka, J., Obata, H. (2021), *Mar. Chem.*, 230, 103927

Wong, K., Obata, H., Ikhsani, I., Muhammad, R. (2021b), *J. Geophys. Res. Oceans*, 126,

e2020JC016997

Wong, K., Obata, H., Kim, T., Mashio, A., Fukuda, H., Ogawa, H. (2018), *Mar. Chem.* 204, 144–151

Wong, K., Obata, H., Kim, T., Kondo, Y., Nishioka, J. (2021a). *Limnol. Oceanogr.*, 66, 1424–1439

Wong, K., Obata, H., Kim, T., Wakuta, Y., Takeda, S. (2019). *Mar. Chem.*, 212, 96–107