

令和4年度伊藤光昌氏記念学術助成金(研究助成)成果報告書

研究課題番号	R4-R5
研究課題名	チオール類を新規バイオマーカーに用いた海洋における銅毒性の評価技術の開発
研究代表者	Wong Kuo Hong
所属・職 (または学年)	金沢大学理工研究域・助教

背景

高濃度の銅は海洋生態系の基盤となる植物プランクトンにとって有毒である。銅の毒性は生物に取り込まれやすい化学種である Cu^{2+} イオンの濃度によって決定されると考えられてきた。 Cu^{2+} は植物プランクトンによる活性酸素種の生産を促進し、DNA の損傷を引き起こす。銅の毒性を制御するため、植物プランクトンは有機配位子を放出し、 Cu^{2+} と錯生成する。従来の研究では、ボルタメトリー法を用いて海水中の銅有機配位子の情報を取得し、 Cu^{2+} 濃度を求めて毒性の指標として用いてきた。しかし、 Cu^{2+} 濃度が銅毒性の指標として用いるには二つの問題点がある：(1) ボルタメトリーによって求めた Cu^{2+} 濃度の不確実性が大きい；(2) Cu^{2+} 以外の銅化学種が植物プランクトンに対する毒性が生じない仮定が必要である。そこで、 Cu^{2+} 濃度測定の大難点を踏まえて、本研究では、植物プランクトンが銅の毒性に対抗する際に生産するチオール類に着目し、チオール類を用いた海水植物プランクトンに対する銅毒性の新しいバイオマーカー評価法を確立する。

方法

1. 銅添加培養培養

海洋植物プランクトンの一種、珪藻である *Thalassiosira sp.* は銅添加有無の条件下において単一株無菌培養を行った。また、石川県内において四つの地点(図1)において植物プランクトン群集を採取し、自然条件と銅添加条件下で培養した。培養はインキュベーターを用いて最適条件下において行った。

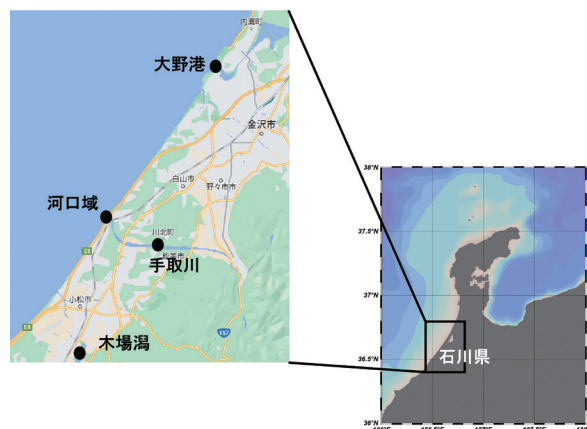


図1. 石川県におけるサンプリング地点。手取川と木場潟では淡水試料，河口域と大野港では海水試料を採取した。

2. 外洋における試料採取

GEOTRACES 計画の一環として2022年6月-7月に実施した学術研究船白鳳丸による KH-22-7 次研究航海(図2)に参加し、北太平洋西部にお

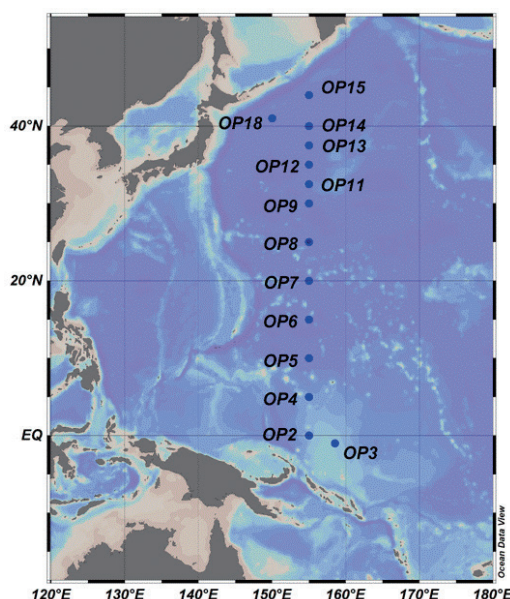


図2. KH-22-7 次研究航海において北太平洋西部におけるサンプリング地点。

いて表層水（10 m–100 m）中のチオール類及び色素の分析に用いる試料を採取した。チオール類と色素の試料に関しては海水を4 L吸引濾過した後、濾紙を冷凍保存して実験室に持ち帰った。

3. チオール類の分析

チオール類は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分析した。培養した植物プランクトンを孔径0.45 μmの濾紙によって濾過し、濾紙上の細胞を粉砕した後、ペンテト酸溶液にチオール類を抽出した。溶液中のチオール類はmonobromobimaneにより蛍光誘導化した後、HPLCにてC₁₈カラムを用いてチオール誘導体を分離し、蛍光で検出した。細胞中のチオール含有量はチオールの総含有量をクロロフィル濃度で割った値とした。

4. 色素の分析

色素はチオール類の分析と同様に濾紙上の細胞を粉砕した後、アセトンで抽出し、シリンジフィルターによって濾過した。アセトン溶液中の色素はC₈カラムを用いたHPLCによって分離し、可視光/紫外線の吸収スペクトルから検出した。

結果と考察

チオールバイオマーカーの適用可能性

本研究では、銅毒性のバイオマーカーとして植物プランクトン細胞中に一般に生産される二種類のチオール類：Cysteine (Cys) と Glutathione (GSH) に注目した。石川県内において採取した植物プランクトン群集を培養した後の粒子態CysとGSH濃度は図3に示す。100 nMの銅添加条件下において培養した淡水植物プランクトンにとっては、銅の毒性が低く、生長に大きな影響を与えなかったが、同条件における海水植物プランクトンが衰弱した。

すべての培養条件における植物プランクトン細胞中のCys含有量が一定であったのに対し、銅添加により弱まれた海水植物プランクトン細胞中

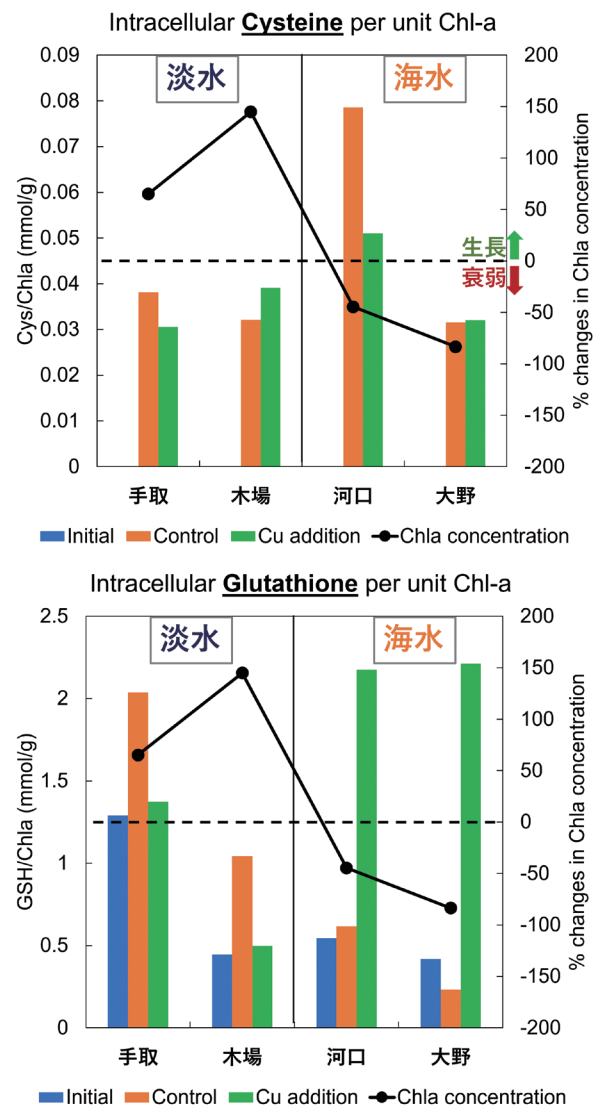


図3. 培養前後の淡水と海水植物プランクトン細胞中のチオール類含有量。淡水植物プランクトンは銅に対する耐性が強いが、海水植物プランクトンは銅添加条件下において衰弱になり、細胞中GSH含有量が増加した。GSHは海水植物プランクトンに対する銅毒性のバイオマーカーとして有効である可能性が高い。

のGSH含有量が大きく増加した結果から、CysよりはGSHの方が銅毒性のバイオマーカーとして適用できると考えられる（図3）。

北太平洋西部におけるGSHの分布

北太平洋西部表層水における粒子態GSHは亜熱帯において最も高い濃度を示した（図4）。粒子態GSHは水塊の分布と関係性がなく、主に沈降粒子として亜表層に到達したと考えられる。粒子態GSH濃度が高い海域では、ラン藻のマー

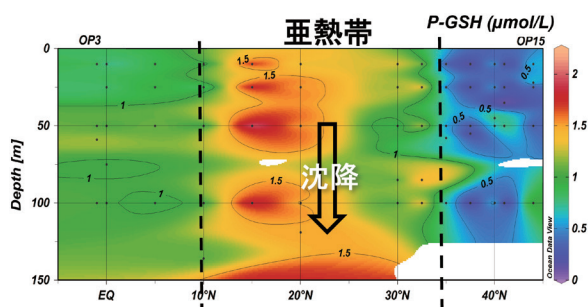


図 4. 北太平洋西部における粒子態 GSH の分布. 粒子態 GSH は主に亜熱帯に分布している.

カーである Zeaxanthin の濃度が高く、ラン藻が主な植物プランクトン種である可能性が高い。ラン藻は銅に対する耐性が弱いため、GSH を多く生産して銅の毒性を対抗するメカニズムを持つ可能性がある。一方、銅に対する耐性の高い珪藻が多く生息している亜寒帯では、生態系における銅の毒性が低いため、粒子態 GSH 濃度も低下した。

珪藻の銅に対する耐性

珪藻の培養実験により、珪藻が銅に対して高い耐性を持つことがわかった。100 nM の銅の添加条件下においても細胞中 GSH 含有量の増加が観測されなかった。

今後の展望

GSH の銅毒性のバイオマーカーとしての有効性を検証するには、植物プランクトンによる銅の取り込みと GSH の生産量の関係性を調べる必要がある。今後は、銅の放射性同位体を用いて銅の取り込み速度を解明する予定である。

謝辞

本研究では、公益財団海洋化学研究所の伊藤光昌氏記念学術助成を受けて実施可能となりました。この場を借りてお礼を申し上げます。実験と試料採取にお力添えいただいた高村晃拓君と西谷佳祐君にも感謝を申し上げます。