

## 赤潮藻の増殖における鉄取り込み機構に関する研究

助成研究者：内藤 佳奈子（京都大学高等教育研究開発推進機構）

共同研究者：今井 一郎（京都大学大学院農学研究科）

【目的】鉄は植物プランクトンの増殖に必須であり、その不足は外洋域だけでなく沿岸域でさえも生産性を制限することが立証されている。海水中の鉄の存在形態は、溶存態 (<0.2  $\mu\text{m}$ )・コロイド態 (1 nm–0.5  $\mu\text{m}$ )・粒子態 (0.2  $\mu\text{m}$  <) であるが、一般に生物が直接利用可能とされるのは溶存無機化合物と考えられている。しかし、熱力学的に安定な Fe(III)状態の溶解度が低いため海水中の溶存鉄濃度は極めて低く、その溶存態のほとんど (99% <) が有機配位子と結合しており、藻類の増殖を支えられる海水中の鉄濃度は極微量ということになる。一方、このような鉄不足環境下においても各地の沿岸域では、膨大な量の植物プランクトンが発生し、頻繁に赤潮被害が起こっている。そこで、赤潮発生機構を鉄利用の観点から解明することを目的とした。本研究では、栄養塩豊富条件下において赤潮藻の増殖に利用可能な鉄種の解明および取り込み機構についての検討を行った。

【方法】13種の赤潮藻を人工合成培地 IHN-培地中で無菌培養した。これらの培養を通常の10分の1量に鉄濃度を減少させた改変 IHN-培地へ移した後、対数増殖期後半の赤潮藻を各種鉄添加培地へと接種した。各種鉄添加培地は、鉄・キレート無添加改変 IHN-培地に粒子状難溶性鉄と有機鉄をそれぞれ全濃度 2  $\mu\text{M}$  となるよう添加し調製した。培養は、ポリスチレンチューブ (Fisher brand) 内で行い、蛍光光度計 (Turner Designs 10-AU) を用いて *in vivo* 蛍光値を日々測定し増殖を追った。赤潮藻による各鉄種の利用能は、改変 IHN-培地での増殖と比較することで表した。

【結果および考察】難溶性の水酸化鉄と酸化鉄の添加培地では、どの赤潮種も増殖はみられなかったが、難溶性の硫化鉄を添加した培地では、クリプト藻 *Rhodomonas ovalis*、渦鞭毛藻の *Heterocapsa circularisquama* と *Karenia mikimotoi* の増殖が確認でき、難溶性のリン酸鉄を添加した培地では、上記3種に加えて、ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo*、渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra*、珪藻 *Ditylum brightwellii* の増殖を確認することができた。

また、サリチル酸鉄添加培地では、*H. akashiwo*、*H. circularisquama*、*H. triquetra*、*D. brightwellii*、*R. ovalis*、緑藻 *Oltmannsiellopsis viridis* およびハプト藻 *Cricosphaera roscoffensis* の増殖が確認できた。さらに、クエン酸鉄添加培地においては、上記の7種に加え、ラフィド藻 *Fibrocapsa japonica* の増殖が見られた。EDTA 鉄添加培地中では検討した全ての種が増殖可能であった。さらに、各キレート培地中で鉄濃度に対して有機配位子濃度の割合を変化させた場合、赤潮藻の最大増殖量だけでなく増殖速度の変化が認められた。

以上の結果から、沿岸性植物プランクトンによる底層に存在する難溶性鉄および海水中の溶存有機鉄の利用が赤潮発生要因の一つとなっている可能性を提案する。



22

助成番号 0422

## 赤潮藻の増殖における鉄取り込み機構に関する研究

内藤 佳奈子(京都大学高等教育研究開発推進機構)

今井 一郎 (京都大学大学院農学研究科)

## 1. 研究目的

鉄は植物プランクトンの増殖に必須であり、その不足は外洋域だけでなく沿岸域でさえも生産性を制限することが立証されている。海水中の鉄の存在形態は、溶存態( $<0.2 \mu\text{m}$ )・コロイド態( $1 \text{ nm} - 0.5 \mu\text{m}$ )・粒子態( $0.2 \mu\text{m} <$ )であるが、一般に生物が直接利用可能とされるのは溶存態の中でもフリーな鉄イオンもしくは無機化合物と考えられている。しかし、熱力学的に安定な Fe(III)状態の溶解度が低いため海水中の溶存鉄濃度は極めて低く、その溶存態のほとんど(99% <)が有機配位子と結合しており、沿岸海水中の溶存無機鉄の濃度では、多くの植物プランクトンの増殖を支えることは難しいと考えられる(Okaichi 2003)。しかし、ラフィド藻 *Chattonella* を始めとする多くの赤潮藻は、沿岸域において大量に増殖し、魚介類などの有用生物を大量死させるなど多大な被害を及ぼしている。このような鉄不足ストレス環境条件下での赤潮プランクトンの大量発生は謎であり、赤潮発生と鉄との関係を解明することは重要な課題である。そこで、赤潮発生機構を鉄利用の観点から解明することを目的とした。

鉄などの栄養要求性の調査研究では、添加する栄養量を操作するため、組成と濃度を完全に決定できる化学合成培地が必須である。しかし、これまで人工海水を用いた合成培地では、赤潮藻種の多くは増殖不可能であり、限られた種でのみ検討が行われているにすぎなかった。本研究では、植物プランクトンによる鉄取り込みを普遍的に議論するために、広範な赤潮藻種の培養が可能な新たに開発した人工合成培地 (Imai *et al.* 2004) による培養実験を行った。赤潮が発生しやすい大阪湾、播磨灘、広島湾等では全鉄濃度または懸濁態鉄濃度が高いことから、懸濁している難溶性粒子態鉄の利用が考えられ、また自然海水中の溶存態鉄の大部分が有機配位子と結合していることから、赤潮藻の増殖における難溶性鉄利用および有機配位子による影響を検討した。

## 2. 研究方法

## 2.1 培養株と培地

ラフィド藻 *Chattonella antiqua*、*Chattonella marina*、*Chattonella ovata*、*Chattonella verruculosa*、*Fibrocapsa japonica*、*Heterosigma akashiwo*、渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi*、*Heterocapsa circularisquama*、*Heterocapsa triquetra*、珪藻 *Ditylum brightwellii*、緑藻 *Oltmannsiellopsis viridis*、ハプト藻 *Cricosphaera roscoffensis*、クリプト藻 *Rhodomonas ovalis* の計 13 種の赤潮藻無菌株を実験に使用した。培養には

人工合成培地である改変 IHN 培地を用いた (Table 1) 鉄制限培地を  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  及び  $\text{NaFeEDTA}$  無添加の改変 IHN 培地とした。

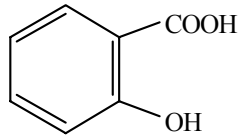
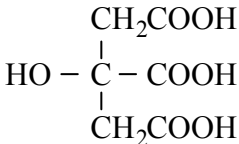
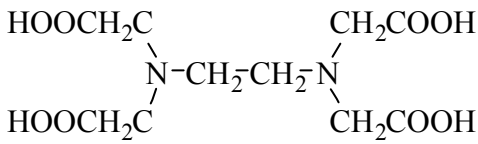
## 2.2 難溶性鉄添加培地

難溶性鉄 (水への溶解度:  $< 0.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ )) として、酸化水酸化鉄  $\text{FeO}(\text{OH})$ 、酸化鉄  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、リン酸鉄  $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、硫化鉄  $\text{FeS}$  の 4 種類を選定した。また、溶存無機鉄として  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を、コントロールとして改変 IHN 培地 ( $\text{Fe} : \text{EDTA} = 1 : 16$ ) を準備した。各種難溶性鉄の試薬は粒子状であるので、通常洗浄した乳鉢により粉碎した後、Milli-Q 水により各鉄種の水溶液を調製した。鉄制限培地に各種難溶性鉄および  $\text{FeCl}_3$  を全濃度  $2 \mu\text{M}$  当量となるよう添加した。各種難溶性鉄培地の調製は、外気からの金属の汚染を防止するためにクリーンボックス内で行った。培地中の溶存  $\text{Fe}(\text{III})$  もしくは  $\text{Fe}(\text{II})$  の化学平衡は、MINEQL+ (ver. 4.0) ソフトウェアにより計算した (Schecher & McAvoy 1992)。

**Table 1** Composition of the modified IHN-medium.

NaCl	0.43 M	S <sub>3</sub> Vitamin mix		PI metals	
KCl	9.4 mM	Vitamin B <sub>12</sub>	0.74 nM	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30 $\mu\text{M}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37 mM	Biotin	4.1 nM	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	35 $\mu\text{M}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.5 mM	Thiamine HCl	1.5 $\mu\text{M}$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.10 $\mu\text{M}$
$\text{NaNO}_3$	2.0 mM	Nicotinic acid	0.81 $\mu\text{M}$	$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.0 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.10 mM	Calcium pantothenate	0.21 $\mu\text{M}$	$\text{NaFeEDTA}$	2.0 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.33 mM	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	73 nM	$\text{ZnCl}_2$	4.0 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.0 nM	Inositol	28 $\mu\text{M}$	$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 nM
KI	0.47 $\mu\text{M}$	Folic acid	4.5 nM		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99 nM	Thymine	24 $\mu\text{M}$		
HEPES	5.0 mM				

**Table 2** Formation constants of Fe(III)-organic ligands complexes and structural formulae of organic ligands.

Organic ligand	Log $\beta^a$	Structural formula	
Salicylic acid (SA)	FeL	17.6	
	FeL <sub>2</sub>	28.6	
	FeL <sub>3</sub>	36.2	
Citric acid (CA)	FeL	13.5	
	Fe <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	56.3	
EDTA	FeL	27.7	
	FeHL	29.2	
	FeOHL	33.8	
	Fe(OH) <sub>2</sub> L	37.7	

<sup>a</sup>Constants are given as logarithms of the overall formation constants,  $\beta$ , for complexes at zero ionic strength and 25 °C. From Morel and Hering (1993).

### 2.3 有機鉄添加培地

有機配位子として、pH 8.0 の条件下で有機鉄錯体として水溶液中に存在するサリチル酸 (SA)、クエン酸 (CA)、EDTA を選択した (Table 2)。SA、CA および EDTA を滅菌 Milli-Q 水にそれぞれ溶かし、ろ過した後 (0.1  $\mu\text{m}$ ) ポリカーボネート製透明角型瓶中の鉄制限培地に添加し、各有機リガンド培地を用意した。各有機リガンド培地に 2  $\mu\text{M}$  FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 酸性水溶液 (0.017 M HCl) を添加し、鉄と配位子のモル比が 1 : 1、1 : 10、1 : 100 となるよう各有機鉄添加培地を調製した。

### 2.4 培養実験

改変 IHN 培地中 (0.2  $\mu\text{M}$  Fe) で培養した各種赤潮藻を、対数増殖期後半に各鉄種添加培地中へと接種した。培養は、ポリスチレンチューブ内で行い、蛍光光度計を用いて *in vivo* 蛍光値を日々測定し増殖を追った。Chattonella antiqua、C. marina、C. ovata、H. circularisquama の4種は 25°C、他の9種は 20°C の温度条件、K. mikimotoi は  $58 \pm 13 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、他の12種は  $91 \pm 15 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光量条件 (light : dark = 14 : 10 h) で培養した。各藻種につき 4–5 本組を少なくとも 3 回繰り返し行った。培養実験終了後、無菌株については、海洋バクテリアに対する液体培地により無菌であることを確かめた。

### 2.5 統計分析

赤潮藻の鉄利用能を評価するために、各鉄種添加培地中での最大増殖量のデータを用いて、エクセル統計 2002 (統計解析アドインソフト) により分散分析における多重比較検定を行った。等分散

性の検定にはバーレット検定を、多重比較には Scheffe、Bonferroni、Fisher の最小有意差法 (LSD) を行った。解析結果が  $P \leq 0.05$  であるときを有意とした。

### 3. 研究結果

#### 3.1 赤潮藻による難溶性鉄の利用

検討した赤潮藻は、鉄種の利用能に基づいて4つのグループに分けることができた。

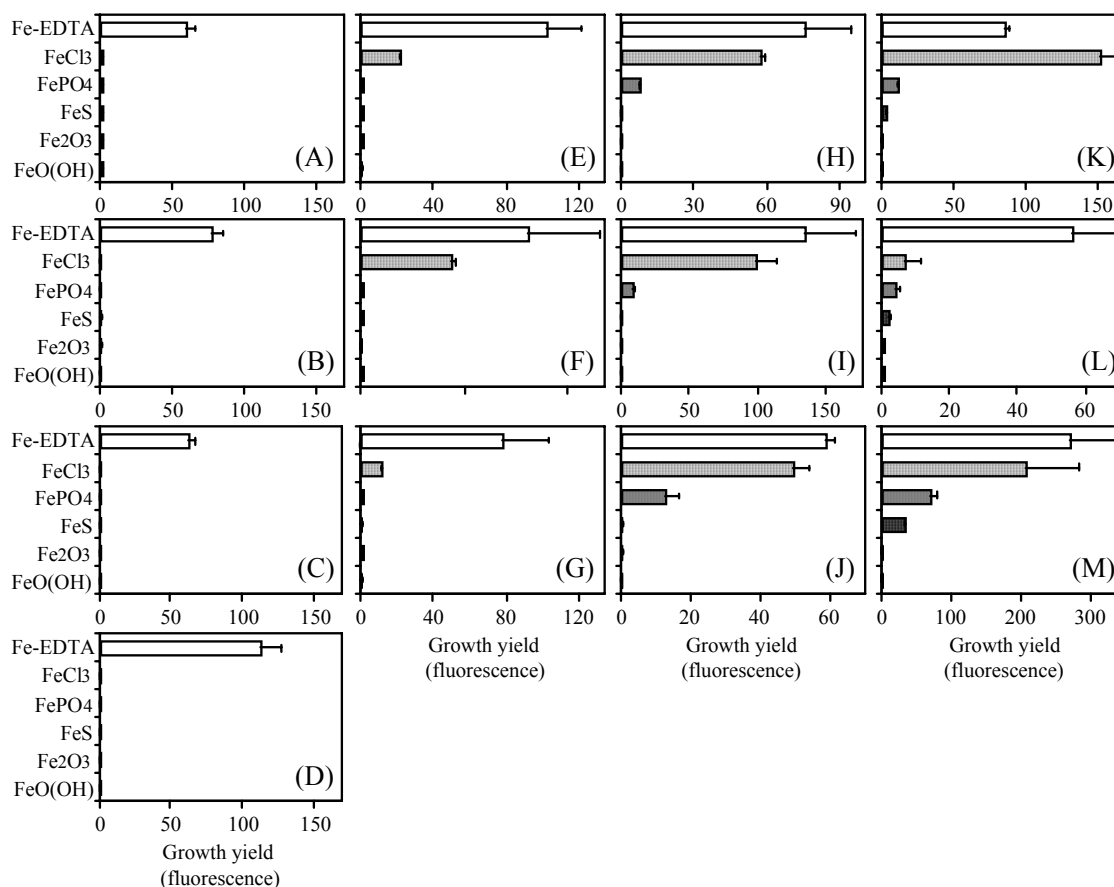
第一グループは、無機鉄種を、溶存態・不溶態ともに増殖において利用できないものであり、それは *Chattonella* 属の赤潮藻であった (Fig. 1 A-D)。

第二グループの藻種では、溶存無機鉄を増殖に利用でき (Fig. 1 E-G) *Fibrocapsa japonica*、*Oltmannsiellopsis viridis* および *Cricosphaera roscoffensis* において、鉄源である  $\text{FeCl}_3$  の利用能はそれぞれ  $\text{Fe-EDTA}$  の 21%、55% および 15% であった。 $\text{FeCl}_3$  と  $\text{Fe-EDTA}$  の増殖への利用能を比較すると、*F. japonica* と *C. roscoffensis* については有意な差があったが ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1 E, G) *O. viridis* においては有意な差は認められなかった ( $P > 0.1$ ) (Fig. 1 F)。

第三グループでは、難溶性鉄  $\text{FePO}_4$  と溶存鉄  $\text{FeCl}_3$  が増殖に利用できた (Fig. 1 H-J)。ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の  $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeCl}_3$  の利用能は、それぞれ  $\text{Fe-EDTA}$  の 9.9%、75% であった (Fig. 1 H)。 $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeCl}_3$  の利用性には有意な差があったが ( $P < 0.005$ )  $\text{FeCl}_3$  と  $\text{Fe-EDTA}$  の利用性の間には有意な差は見られなかった ( $P > 0.1$ )。渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra* の  $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeCl}_3$  の利用能は、 $\text{Fe-EDTA}$  の 7.3% と 74% であった (Fig. 1 I)。 $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeCl}_3$  の利用性との間には有意な差があったが ( $P < 0.001$ )  $\text{FeCl}_3$  と  $\text{Fe-EDTA}$  との間は有意でなかった ( $P > 0.1$ )。珪藻 *Ditylum brightwellii* においては、 $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeCl}_3$  の利用能は  $\text{Fe-EDTA}$  の 21% と 84% であった (Fig. 1 J)。 $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeCl}_3$  ( $P < 0.0001$ )  $\text{FeCl}_3$  と  $\text{Fe-EDTA}$  ( $P < 0.05$ ) の利用能の間には有意な差が認められた。

第四グループでは、難溶性鉄  $\text{FeS}$ 、 $\text{FePO}_4$  と溶存鉄  $\text{FeCl}_3$  が増殖に利用できた (Fig. 1 K-M)。渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の  $\text{FeS}$ 、 $\text{FePO}_4$  および  $\text{FeCl}_3$  の利用能は、 $\text{Fe-EDTA}$  の 4.0%、13% および 178% であった (Fig. 1 K)。利用能は、 $\text{FeCl}_3 > \text{Fe-EDTA} > \text{FePO}_4 \geq \text{FeS}$  の順であり、 $\text{FeCl}_3$  と  $\text{Fe-EDTA}$  との間、 $\text{Fe-EDTA}$  と  $\text{FePO}_4$  の間には有意な差があったが (ともに  $P < 0.0001$ )  $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeS}$  との間には有意な差はなかった ( $P > 0.1$ )。Karenia mikimotoi における  $\text{FeS}$ 、 $\text{FePO}_4$  および  $\text{FeCl}_3$  の利用能は、 $\text{Fe-EDTA}$  の 3.3%、7.2% および 12% であった (Fig. 1 L)。利用能は、 $\text{Fe-EDTA} > \text{FeCl}_3 \geq \text{FePO}_4 \geq \text{FeS}$  であり、 $\text{Fe-EDTA}$  と  $\text{FeCl}_3$  の間には有意な差があり ( $P < 0.0005$ )  $\text{FeCl}_3$  と  $\text{FePO}_4$  の間および  $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeS}$  の間には有意な差は見られなかった (ともに  $P > 0.5$ )。Rhodomonas ovalis に関しては、 $\text{FeS}$ 、 $\text{FePO}_4$  および  $\text{FeCl}_3$  の利用能は、 $\text{Fe-EDTA}$  の 12%、26% および 77% であった (Fig. 1 M)。そして、その順は  $\text{Fe-EDTA} \geq \text{FeCl}_3 > \text{FePO}_4 \geq \text{FeS}$  であり、 $\text{FeCl}_3$  と  $\text{FePO}_4$  の間には有意な差があり ( $P < 0.05$ )  $\text{Fe-EDTA}$  と  $\text{FeCl}_3$  の間 ( $P > 0.1$ )  $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeS}$  の間には有意な差は認められなかった ( $P > 0.5$ )。増殖に難溶性鉄を利用できる全ての赤潮藻において (Fig. 1 H-M)  $\text{FeS}$  と  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  の間 ( $P > 0.5$ )  $\text{FePO}_4$  と  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  の間 ( $P > 0.2$ 、ただし *D. brightwellii* に対してのみ  $P < 0.01$ )  $\text{FeS}$  と  $\text{FeO(OH)}$  の間 ( $P > 0.5$ )  $\text{FePO}_4$  と  $\text{FeO(OH)}$  の間 ( $P > 0.2$ 、ただし *D. brightwellii* に対してのみ  $P < 0.01$ ) に有意な差は

なかった。



**Fig. 1** Comparison of the ability to utilize insoluble and soluble iron species by red tide microalgae. Growth yields are shown for (A) *Chattonella antiqua*, (B) *Chattonella marina*, (C) *Chattonella ovata*, (D) *Chattonella verruculosa*, (E) *Fibrocapsa japonica*, (F) *Oltmannsiellopsis viridis*, (G) *Cricosphaera roscoffensis*, (H) *Heterosigma akashiwo*, (I) *Heterocapsa triquetra*, (J) *Ditylum brightwellii*, (K) *Heterocapsa circularisquama*, (L) *Karenia mikimotoi* and (M) *Rhodomonas ovalis*. Error bars represent standard deviations.

### 3.2 赤潮藻による有機鉄種の利用能

3種の有機鉄錯体の利用能を評価するために、各培地における赤潮藻の最大増殖量を見積もり比較検討した (Table 3)。有機鉄添加培地における増殖量が、有機配位子無添加である FeCl<sub>3</sub> 培地での増殖量よりも低い場合は、その有機配位子は増殖に対して抑制剤として働いているとみなすことができる。

Fe-SA 培地では、ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* (Fig. 2 F)、渦鞭毛藻の *Heterocapsa circularisquama* と *Heterocapsa triquetra* (Fig. 3 A, B)、珪藻 *Ditylum brightwellii*、クリプト藻 *Rhodomonas ovalis*、緑藻 *Oltmannsiellopsis viridis* およびハプト藻 *Cricosphaera roscoffensis* (Fig. 4) の7種の増殖を確認できた。Fe-CA 培地では、これら上記の7種に加えてラフィド藻 *Fibrocapsa japonica* (Fig. 2 E)

の増殖が見られた。そして、検討した全ての赤潮種が Fe-EDTA 培地において増殖可能であった (Figs. 2-4)。

SA は *O. viridis* と *C. roscoffensis* の増殖を促進し、CA は *H. akashiwo*、*H. triquetra* (ただし Fe:L = 1:10 のみ) および *C. roscoffensis* (Fe:L = 1:10、1:100 の時のみ) の増殖に対して促進効果を及ぼしている (Table 3) EDTA は Fe:L = 1:1 の場合に *K. mikimotoi* の増殖を促進している。Fe:EDTA = 1:10 で *Chattonella* 属の4種 (*C. antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*, *C. verruculosa*)、*F. japonica*、*H. akashiwo*、*H. triquetra*、*K. mikimotoi* および *C. roscoffensis* の増殖を促進し、Fe:EDTA = 1:100 では、*C. marina*、*C. verruculosa*、*F. japonica* および *C. roscoffensis* の増殖を促進していると認められる (Table 3)。

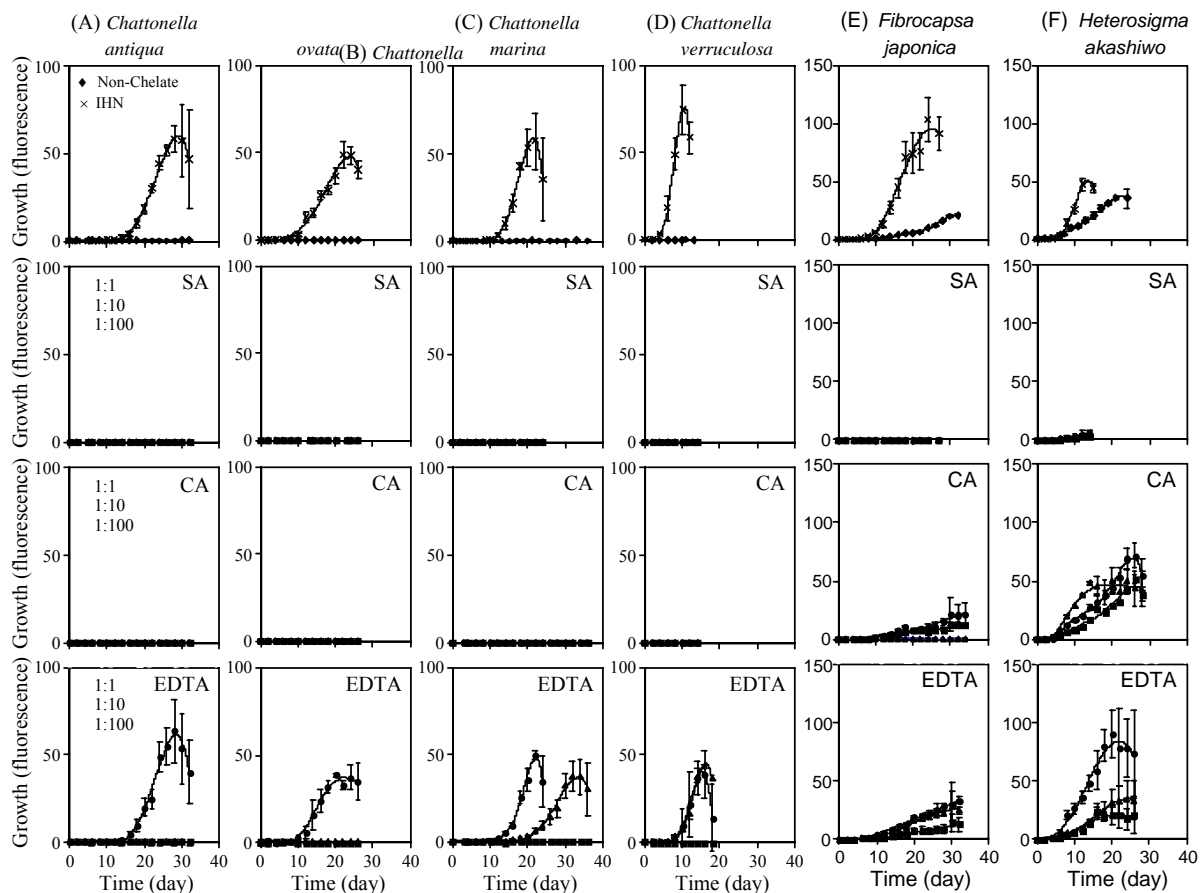
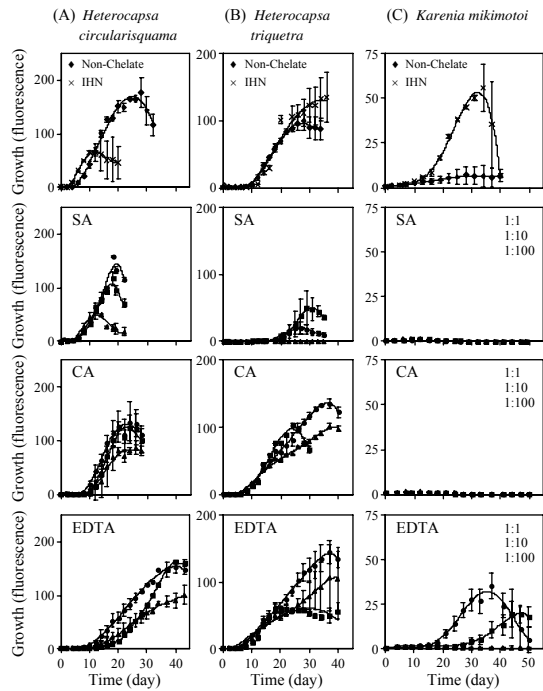
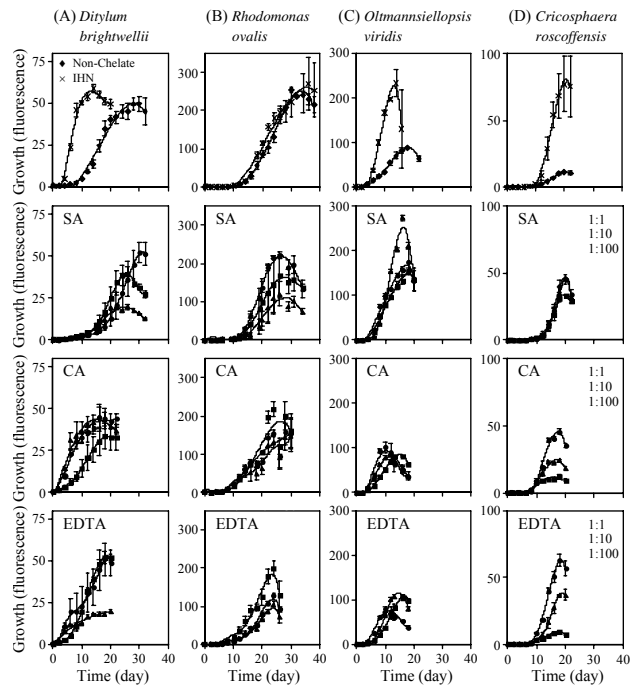


Fig. 2 Growth curves of the species of *Chattonella* (Raphidophyceae) in cultures supplied with iron salicylate (SA), iron citrate (CA), iron ethylenediaminetetraacetate (EDTA), FeCl<sub>3</sub> (Non-Chelate) and in the modified IHN-medium. Growth curves are shown for (A) *Chattonella antiqua*, (B) *Chattonella marina*, (C) *Chattonella ovata*, (D) *Chattonella verruculosa*, (E) *Fibrocapsa japonica*, (F) *Heterosigma akashiwo*. Data on fluorescence represent mean  $\pm$  SD.





**Fig. 3** Growth curves of the red tide dinoflagellate species in cultures supplied with iron salicylate (SA), iron citrate (CA), Fe-EDTA (EDTA), FeCl<sub>3</sub> (Non-Chelate) and in the modified IHN-medium. Growth curves are shown for (A) *Heterocapsa circularisquama*, (B) *Heterocapsa triquetra*, (C) *Karenia mikimotoi*. Data on fluorescence represent mean ± SD.



**Fig. 4** Growth curves of (A) *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), (B) *Rhodomonas ovalis* (Cryptophyceae), (C) *Oltmannsiellopsis viridis* (Chlorophyceae) and (D) *Cricosphaera roscoffensis* (Haptophyceae) in cultures supplied with iron salicylate (SA), iron citrate (CA), Fe-EDTA (EDTA), FeCl<sub>3</sub> (Non-Chelate) and in the modified IHN-medium. Data on fluorescence represent mean ± SD.

**Table 3** Comparison of availability of iron chelated with organic ligands for red tide phytoplankton (Iron sources: 2 μM FeCl<sub>3</sub>).

Ligands	Salicylic acid			Citric acid			EDTA			Non-Chelate
	Ratios (Fe:Ligand)			Ratios (Fe:Ligand)			Ratios (Fe:Ligand)			
	1:1	1:10	1:100	1:1	1:10	1:100	1:1	1:10	1:100	1:0
<i>Chattonella antiqua</i>	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-
<i>Chattonella marina</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
<i>Chattonella ovata</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
<i>Chattonella verruculosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
<i>Fibrocapsa japonica</i>	-	-	-	+	+	-	+	++	++	+
<i>Heterosigma akashiwo</i>	+	+	+	++++	++++	++++	++	++++	+++	+++
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>Heterocapsa triquetra</i>	++	+	-	+++	++++	+++	++	++++	+++	+++
<i>Karenia mikimotoi</i>	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	+
<i>Ditylum brightwellii</i>	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Rhodomonas ovalis</i>	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Oltmannsiellopsis viridis</i>	+++	+++	++++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Cricosphaera roscoffensis</i>	++	+++	+++	+	+++	++	+	+++	++	+

The maximal growth yield of red tide phytoplankton in the modified IHN-medium = 100 %.

(-) < 5 %, (+) 5~30 %, (++) 30~50 %, (+++) 50~100 %, (++++) 100~200 %, (+++++) > 200 % of yields in the modified IHN-medium.

## 4. 考察

### 4.1 難溶性鉄利用と生態戦略

ラフィド藻で唯一難溶性鉄を利用できる *Heterosigma akashiwo* は、遊泳による日周鉛直移動を行い、夜間に浅い沿岸域の海底へと到達することができる (Yamochi & Abe 1984)。渦鞭毛藻の *Karenia*

*mikimotoi* は卓越した遊泳能を有しており、夜間に深度 20 m もしくはそれ以深へと到達できる日周鉛直運動を行うことができる (山口 1994; Koizumi *et al.* 1996)。これら赤潮藻の特性は、*H. akashiwo* と *K. mikimotoi* が、海底堆積物表面に存在する粒子状のリン酸鉄もしくは硫化鉄に接近できる能力を持っていることを示している。渦鞭毛藻の *Heterocapsa circularisquama* は、海水中で起こる混合作用後に赤潮を形成する傾向がある (松山ら 1995)。また、溶存鉄制限下における鉄取り込み戦略として、クリプト藻の *Rhodomonas ovalis* は、シデロホア (鉄との強い錯生成能を持つ配位子) 様物質を生産することを確かめている (Naito *et al.* 2001)。それゆえに、*H. circularisquama* は、台風などの激しい混合作用後に、底層から供給される粒子状の  $\text{FePO}_4$  や  $\text{FeS}$  を利用することが考えられ、おそらく *R. ovalis* は、難溶性鉄種を獲得するのにシデロホアを介した鉄配位子交換の取り込み機構を持っているのであろう。*Ditylum brightwellii* のような大型藻類は、細胞表面に  $\text{FePO}_4$  の粒子を吸着させやすいと考えられるので、多量栄養素吸収時と同様に“沈降”戦略を通して Fe に接近し (Smayda 1997)、粒子状 Fe を細胞表面に吸着させた後に何らかの機構により細胞内へ取り込んでいると推測される。

以上の結果より、底層水中もしくは海底堆積物の表面に存在する難溶性鉄が、赤潮藻の大量増殖に重大な役割を果たすという仮説が提案できる。

#### 4.2 有機鉄の取り込み機構

$\text{FeCl}_3$  培地中の溶存鉄種は水酸化物  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$  が優占する。 $\text{FeCl}_3$  培地で高い増殖量を示した *Heterocapsa circularisquama* と *Rhodomonas ovalis* は、各有機鉄添加培地での水酸化物の濃度が高いとき (Fe : L = 1 : 1 もしくは 1 : 10) に良好な増殖が得られた (Table 3)。*H. circularisquama* と *R. ovalis* は、各培地で有機配位子が過剰に存在することによって増殖が抑制されているので、これらの藻種は有機鉄も利用可能であるにも関わらず、有機鉄よりも無機鉄を好んで取り込んでいると判断される。*Heterocapsa triquetra* と *Ditylum brightwellii* もまた  $\text{FeCl}_3$  培地で高い増殖量を示し、有機鉄に関しても上記の 2 種と同じような性状を示している (Table 3)。ただし、EDTA は *H. triquetra*、CA は *D. brightwellii* の増殖に対して促進効果を示す。また、これら 4 種の赤潮藻は難溶性の  $\text{FePO}_4$  もしくは  $\text{FeS}$  を増殖に利用可能である (Fig. 1)。それゆえに、これらの赤潮生物は無機鉄 (溶存態および粒子態) を優先的に取り込むという機構が考えられる。

有機鉄添加培地で増殖を示した *Heterosigma akashiwo*、*Oltmannsiellopsis viridis*、*Cricosphaera roscoffensis* の 3 種は、SA、CA、もしくは EDTA により増殖を促進され (Table 3)、有機鉄キレーターの存在により増殖しやすいと判断できる。ゆえに、これら 3 種の植物プランクトンの取り込みにおける鉄の形態を生成定数から分析した (Table 2)。*Heterosigma akashiwo* は増殖量が  $\text{CA} > \text{EDTA} > \text{SA}$  (Fe : L = 1 : 100) の順であるので、有機鉄を直接取り込むと結論できる。他方、*O. viridis* と *C. roscoffensis* は、増殖量が  $\text{SA} > \text{EDTA} > \text{CA}$  (Fe : L = 1 : 100) の順であるため、有機鉄錯体から解離した鉄を取り込むと考えられる。

$\text{FeCl}_3$  培地において増殖を示さなかった *Chattonella* 属の 4 種と低い増殖量を示した *Fibrocapsa japonica* と *Karenia mikimotoi* は、多座配位子 EDTA の存在、特に Fe:EDTA = 1:10 の時により高い増

殖量を示した (Table 3)。 *Fibrocapsa japonica* は、培地中の鉄と配位子の存在率が同じ時の増殖量は EDTA > CA >> SA の順であり、FeCl<sub>3</sub> 培地における増殖と Fe-CA (1:1, 1:10) および Fe-EDTA 培地での増殖が同程度であることから、培地中もしくは細胞表面上での有機鉄錯体の配位子交換反応および解離による無機鉄としての取り込みが考えられる。また、溶存鉄種として水酸化物が優占する Fe-SA (1:1) 培地でさえも Fe-SA 培地では増殖が認められなかったのは、SA (HSA<sup>-</sup>) が *F. japonica* の増殖に対して阻害剤として働くからではなかろうか。 *Karenia mikimotoi* は、FeCl<sub>3</sub> 培地、Fe-EDTA 培地で増殖可能であることから、無機鉄および有機鉄を増殖に利用すると判断でき、なかでも鉄との安定度が高い EDTA のみを利用できることから、細胞表面における鉄を解離する能力が弱いと考えられる。また、FeCl<sub>3</sub> 培地よりも Fe-EDTA 培地でより良い増殖を示すことから無機鉄よりも有機鉄を好むであろうことが推察される。無機鉄を利用しない *Chattonella* 属の4種は、細胞膜の外側にグリコカリックス層を有しており (Yokote & Honjo 1985)、その場を活用してシデロホア生産などの巧妙な戦略により有機鉄を取り込んでいるのかもしれない。このような赤潮形成種間の有機鉄の取り込み機構の相違は、地域毎に特色のある有害プランクトン種を赤潮発生へと導きうると考えられる。また、発生種の経年的変化も底質の変化による Fe の存在形態の変化と関係しているのかもしれない。

今回検討した赤潮藻類は増殖に Fe-SA (7種)、Fe-CA (8種)、Fe-EDTA (13種全て) を鉄源として利用することが明らかになった。それゆえに、天然海水中に流出している EDTA などの人工リガンドが、有害な植物プランクトンの増殖を促進し、赤潮の発生の引き金になるという可能性は考えられるので、人為的排出は厳に謹まなければならないであろう。

## 5. まとめ

本研究において、特定の赤潮藻の鉄取り込み戦略として、海底または底層に存在する難溶性鉄利用および溶存有機態鉄の利用を提唱することができた。また、沿岸水中における鉄のスペシエーションが、赤潮藻による鉄取り込み機構において重要な役割を果たしている可能性を示唆することができた。

鉄の取り込み形態を明らかにするためには、現場における鉄のスペシエーションおよび細胞表面における配位子交換反応を厳密に検討することが今後の課題であるといえる。

## 文献

- Imai, I., Hatano, M., Naito, K., 2004. Development of a chemically defined artificial medium for marine red tide-causing raphidophycean flagellates. *Plankton Biol. Ecol.* 51, 95–102.
- Koizumi, Y., Uchida, T., Honjo, T., 1996. Diurnal vertical migration of *Gymnodinium mikimotoi* during a red tide in Hoketsu Bay, Japan. *J. Plankton Res.* 18, 289–294.
- Matsuyama, Y., Nagai, K., Mizuguchi, T., Fujiwara, M., Ishimura, M., Yamaguchi, M., Uchida, T., Honjo, T., 1995. Ecological features and mass mortality of pearl oysters during red tides of *Heterocapsa* sp. in Ago

- Bay in 1992. *Nippon Suisan Gakkaishi* 61, 35–41.
- Morel, F.M.M. & J.G. Hering 1993. *Principles and applications of aquatic chemistry*. Wiley-Interscience, New York, 588 pp.
- Naito, K., Suzuki, M., Mito, S., Hasegawa, H., Imai, I., Sohrin, Y., Matsui, M., 2001. The pursuit of siderophore secreted by marine phytoplankton *Rhodomonas ovalis*. *Anal. Sci.* 17 (Suppl.), i817–i819.
- Okaichi, T. (Ed.), 2003. *Red Tides*. Terra Scientific Publishing Company, Tokyo.
- Schecher, W.D., McAvoy, D.C., 1992. MINEQL+: a software environment for chemical equilibrium modelling. *Comp. Environ. Urban Syst.* 16, 65–76.
- Smayda, T.J., 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1137–1153.
- Yamaguchi, M., 1994. Physiological ecology of the red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae)—Mechanism of the red tide occurrence and its prediction. *Bull. Nansei Natl. Fish. Res. Inst.* 27, 251–394.
- Yamochi, S., Abe, T., 1984. Mechanisms to initiate a *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay. II. Diel vertical migration. *Mar. Biol.* 83, 255–261.
- Yokote, M., Honjo, T., 1985. Morphological and histochemical demonstration of a glycocalyx on the cell surface of *Chattonella antiqua*, a ‘naked flagellate’. *Experientia* 41, 1143–1145.

## Mechanisms of iron uptake in the growth of red tide algae

Kanakano Naito, Ichiro Imai

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

## Summary

Iron is the essential bioactive trace metal for the growth of algae. However, dissolved iron fractions consist largely of colloidal hydrolysis species such as oxyhydroxide and most of those are bound by organic ligands in natural waters. As a result of above-mentioned iron speciation, the concentrations of directly bioavailable iron species are extremely low in natural waters. In coastal areas where red tides have frequently occurred, dissolved iron is present at concentrations of approximately 10 – 100 nM. It is hence difficult to explain the massive appearance of harmful algae. On the other hand, total or suspended iron exists abundantly in coastal waters. Therefore, it is supposed that red tide algae can utilize suspended iron or have other strategies of iron uptake for the growth under low iron conditions. The growths of the principal species of red tide phytoplankton were examined using a newly developed artificial synthetic medium in the presence of different iron species. Some microalgal species could utilize particulate  $\text{FePO}_4$  and  $\text{FeS}$  for growth. Particulate  $\text{FePO}_4$  was available for the growth of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*, the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* and the diatom *Ditylum brightwellii*. The dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Karenia mikimotoi*, and the cryptophyte *Rhodomonas ovalis* utilized both particulate  $\text{FePO}_4$  and particulate  $\text{FeS}$  for growth. In contrast, particulate  $\text{FeO}(\text{OH})$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  did not support the growth of any of the red tide microalgae examined. Except for *Chattonella* species (Raphidophyceae), the growth of red tide microalgae were confirmed in the medium with very easily soluble  $\text{FeCl}_3$  added. And, our study demonstrated that the organic iron of different ligands was bioavailable to red tide phytoplankton. In iron salicylate chelates medium, the growths were confirmed for *H. akashiwo*, *H. circularisquama*, *H. triquetra*, *D. brightwellii*, *R. ovalis*, the green alga *Oltmannsiellopsis viridis*, and the coccolithophorid *Cricosphaera roscoffensis*. Furthermore, in iron citrate chelates medium, we also found the growths of the raphidophyte *Fibrocapsa japonica* besides the above-mentioned seven species. And all phytoplankton species examined could grow in iron ethylenediaminetetraacetate chelates medium. And the differences in concentration of organic ligands in each medium caused the changes of the growth (maximal growth yield and specific growth rate) of red tide algae examined. These results suggest that the iron speciation may be an important role in controlling the uptake of iron by red tide forming phytoplankton in coastal water. We here suggest that the occurrence of red tides in coastal areas may depend on the combination of microalgal species and iron species present.