

令和元年 11月 13日

ArCS サブプロジェクトディレクター  
齊藤 誠一 殿

氏 名 安藤 卓人

## 終了報告書

・ 派遣支援先 機関名：ブレーメン大学 海洋環境科学センター(MARUM) (国名：ドイツ)

・ 受入研究者 Karin Zonneveld

・ 研究課題名 (和文・英文)

(和文) 北極域堆積物中の海成パリノモルフの化学分析法の検討(英文) Chemical analysis of marine palynomorphs from Arctic sediments

・ 派遣支援期間：令和 元年 10月 6日 ~ 令和 元年 11月 3日

## 1. 派遣支援期間中の研究実施状況及びその成果

## 研究概要

派遣対象者は、ArCS (北極域研究推進プロジェクト) 若手研究者海外派遣事業の支援を受け、ドイツのブレーメン大学 海洋環境科学センター(marum)にて令和元年10月7日から11月2日まで研究活動を行なった。滞在中の目的は、堆積物中の海成パリノモルフ (有機質微化石) の分析手法の習得と検討であり、micro-FTIR (顕微フーリエ変換赤外分光光度計) を用いたパリノモルフ分析の前処理法の習得 (成果1)、渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の休眠期シストを含む楕円形・円形の無色パリノモルフの分析と高分子構造による分類法の検討 (成果2)、グリーンランド氷河周辺試料を含む堆積物中の異なる分類群に起源をもつ複数種のパリノモルフ分析 (成果3) については滞在期間中に十分な成果を得ることができた。

## 研究背景

渦鞭毛藻には独立栄養種、従属栄養種、混合栄養種が存在する。近年、栄養獲得形式によって渦鞭毛藻シストを構成する抵抗性高分子「ジノスポリン」の高分子構造が異なることが指摘されている (Bogus 仮説; Bogus et al., 2014)。この仮説が正しいなら、形成するシストの高分子構造解析によって、複雑な渦鞭毛藻の生態情報を紐解くことができるかもしれない。また、グリーンランド氷河周辺堆積物からは、形成した分類群が不明な有機質微化石「アクリターク」が多く観察されている。アクリタークも渦鞭毛

藻シスト同様に、抵抗性の高分子で構成されている。アクリターク形成種の同定には、長らく発芽実験で行われてきたが、最近ではジノスポリン分析のような有機質殻の高分子分析も起源種の特定に利用されつつある (Gurdebeke et al., 2018)。アクリタークをはじめ、多くの海成パリノモルフは急激な環境変動から身を守るために形成される。パリノモルフの起源を明らかにする手法の改良が進めば、環境変動に対する低次生態系の応答をより正確に知ることができる。パリノモルフの高分子構造を扱う「Palynochemistry (微化石有機化学)」は水産学から古生物学まで幅広い分野に対してアプローチができる高いポテンシャルをもった研究として、特に欧米で注目されつつあるが、日本では行われていない。

### 事前準備

派遣内定後から、受入研究者の Karin Zonneveld 教授、実質的な指導をいただいた Gerard Versteegh 博士と Eメールで連絡を取り合い、綿密に研究に関する議論を行なった。また、出発 1 か月前に *Alexandrium* シストを多く含む試料を長崎大学・松岡敦充 名誉教授 (現・(株) Seed Bank 顧問) から提供いただき、グリーンランド試料は酸処理を行なってパリノモルフを分離し、これらの試料を EMS (国際スピード郵便) で日本から marum の Zonneveld 研究室あてに郵送した。

### 研究成果

#### 成果 1 : micro-FTIR を用いたパリノモルフ分析の前処理法の習得

本研究では、Zonneveld 研究室ですで行なっていた前処理法を習得し、派遣対象者が一部を改良することで、最終的に以下のような手順の処理法を確立させた。

① 対象パリノモルフのサイズに合わせてマイクロインジェクタ (Narishige IM-5B) 先端部のマイクロピペットをガラスキャピュラリ (3 インチ長、外径 1 $\mu$ m) から作成する、② 酸処理・篩い分けして得られたパリノモルフ画分を含む水滴をスライドグラス上にのせる、③ 倒立顕微鏡 (カールツァイス社製 Axio シリーズ) 下でマイクロピペットを取り付けたインジェクタをマイクロマニピレータ (Märzhäuser 社製 DC-3K) で操作して、対象パリノモルフを 1 個体回収する、④ 回収した個体をスライドグラス上に用意した蒸留水滴内に移動し洗浄を行なう、⑤ ③~④を繰り返し行ない、蒸留水滴内に同一種を数個体回収する、⑥ 1 個体ずつマニピレータ/インジェクタを用いて、micro-FTIR 反射測定用の金ミラー (Thorlabs ME05-M01) 上に乗せ、蒸留水のみを吸引する、⑦ 数個体に対して⑤を行ない、micro-FTIR (Bruker 社製 HYPERION 1000) の作業台で観察可能なように位置を記載する。

①~④の作業はもちろん国内でも可能であり、倒立顕微鏡、マイクロマニピレータ、マイクロインジェクタがあればすぐに行える。研究費等を利用して設備をすぐに整える (実際に研究活動スタート支援研究費を用いて購入予定) 予定である。一方で、高分子の構造決定に必要な熱分解分析を行なうためには、数百~数千個体のパリノモルフを必要になる。これらの作業は、1 個体を回収するだけでも十数分程度要するため、より効率の良い前処理法を再度検討する必要があるだろう。

#### 成果 2 : 楕円形・円形の無色パリノモルフの分析と高分子構造による分類法の検討

本研究で主な対象とした有毒赤潮種を含む渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属は無色で楕円形もしくは円形の形態学的に特徴が薄いシストを形成する。このような楕円形・円形の無色パリノモルフは、今回用いた大阪湾とグリーンランド・Bowdoin フィヨルドの表層堆積物試料中には多く含まれていた。特に 20~30 $\mu$ m

の小型のパリノモルフが特徴的に含まれ、そのうちの多くがこれまでパリノモルフ群集を用いた生態系情報の抽出の際には除外されてきた起源不明のパリノモルフ「アクリターク」であった（図 1）。本研究では、起源が分かっている楕円形で比較的大型（50-60 $\mu\text{m}$ ）の *Alexandrium tamarense/catenella* シストとそれらの起源不明な小型のシストの高分子構造の比較を試みた。

*Alexandrium tamarense/catenella* シストを含む多くの楕円形・円形の無色パリノモルフは原形質を含むため、通常の測定では原形質に由来する分子の結合に由来する赤外スペクトルが得られる。本研究の目的はあくまで有機物殻の高分子組成を理解することなので、原形質を除去する必要があった。Zonneveld 研究室の micro-FTIR には ATR（減衰全反射：Attenuated Total Reflection）測定用対物鏡が搭載されていた。ATR 法とは、ダイヤモンドやゲルマニウムなどの結晶に試料を接

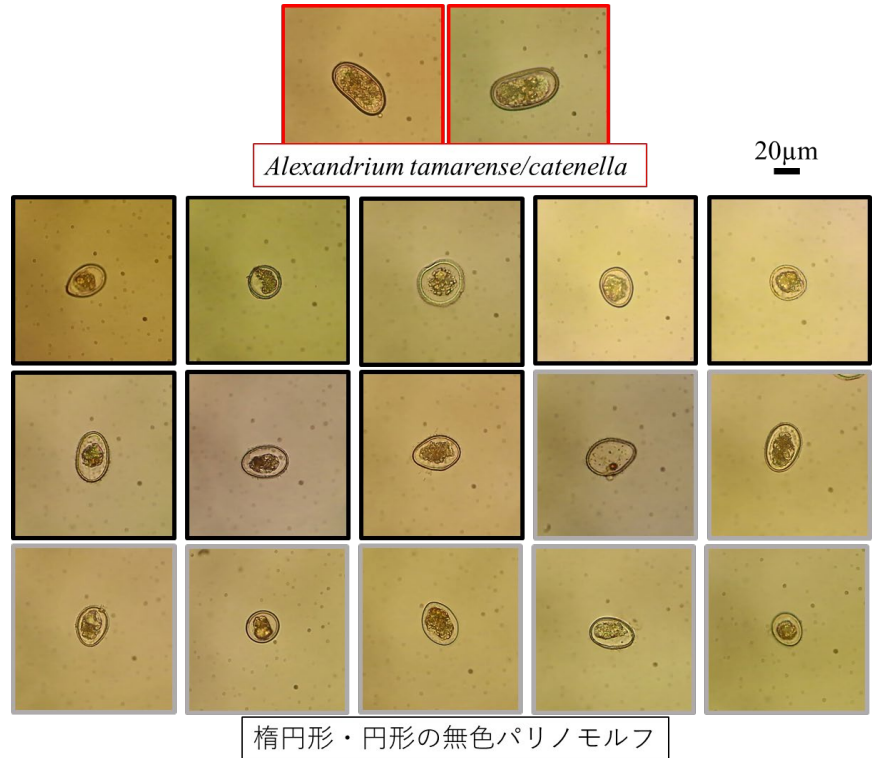


図 1: *Alexandrium tamarense/catenella* シストと他の楕円形・円形の無色パリノモルフ

触させ、界面にて赤外光を全反射させ、その際の試料表面（数  $\mu\text{m}$  程度）への潜り込みによる赤外吸収を利用した分析法である。これによって、外側の有機物殻のみが分析可能なばかりではなく、接触時にパリノモルフがつぶれるため、原形質を押し出すことができる。

今回の分析では、*Alexandrium tamarense/catenella* シストの間では IR（赤外）スペクトルに大きな差はみられなかった。そこで、類似 ATR 法で測定された IR スペクトルデータを用いて、主成分分析およびクラスター解析を行なった。その結果、*Alexandrium tamarense/catenella* シストと類似したスペクトルを示すグループ（図 1:黒枠）と、示さないグループ（図 1:灰色枠）に分けることができたものの、それぞれのグループ内において楕円形・円形の無色パリノモルフの形態的な類似性は特にみられなかった。形態と高分子構造に関係性がない可能性もあるが、遺伝子解析やより詳細な高分子分析を行なえる熱分解分析などを駆使し、今後より詳細に理解していく必要がある。

### 成果 3：異なる分類群に起源をもつ複数種のパリノモルフ分析

現生種渦鞭毛藻が形成するシストでよく知られているのは、Gonyaulacoid と Peridinoid であり、それぞれ無色と褐色のシストである。すなわち、この色の違いが高分子構造の違いを反映しており、無色シストが主に多糖類からなるセルロース様構造をしているのに対し、褐色シストはより窒素官能基を含むキチン様構造をしている。成果 2 の研究は、無色円形のパリノモルフを既存の渦鞭毛藻無色（＝Gonyaulacoid）シストと区別するための研究ともいえるが、堆積物中には同様に褐色円形のパリノモルフ

フも多く存在する。特に有孔虫が形成する有機質の「ライニング (Lining)」は破碎されて一部だけ残った場合、未発芽の渦鞭毛藻褐色 (=Peridinoid) シストと区別がつかない。そこで、大阪湾試料中に特徴的に含まれる有孔虫ライニングと Peridinoid シストの測定を行なった。結果として、図 2 のような IR

スペクトルが、それぞれから得られた。有孔虫ライニングと Peridinoid シストともに形態によらずそれぞれのグループで特徴的な IR スペクトルを示すことが分かった。高分子構造の違いから、これらの 2 つのグループを分けることが可能であるといえる。また、初期続成が異なると考えられる有孔虫ライニングを比較した

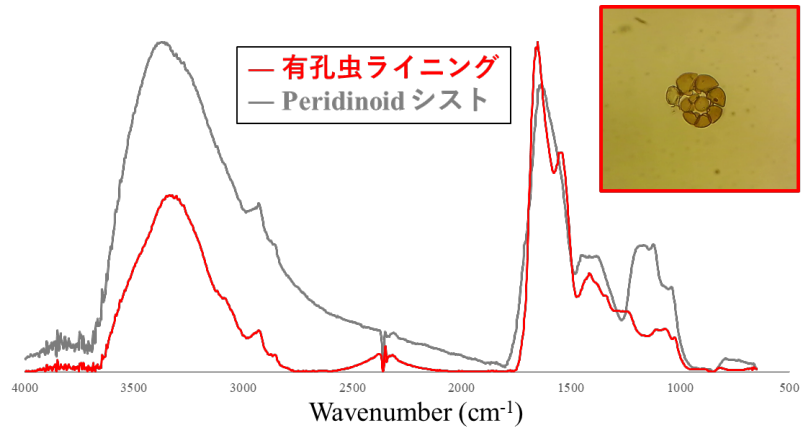


図 2: 有孔虫ライニングと Peridinoid シストの赤外スペクトル (ATR 測定)

ところ、初期続成が進んで黒色化している個体では C-H 結合のピークが比較して高いことがわかった。

その他のパリノモルフとして、大阪湾試料から Gonyaulacoid シスト *Tuberculodinium vancampoe*、(海成ではないが) 淡水生緑藻類 *Staurastrum dorsidentiferum*、アクリタークのうち *Micrystridium sp.* と未同定種、グリーンランド試料からは形成種不明の繊毛虫シスト、アクリターク未同定種 2 種 (A、B) の分析を行なった。*Tuberculodinium vancampoe* は既存の他の Gonyaulacoid シストと類似したスペクトルが得られた。*Staurastrum dorsidentiferum* はセルロース標準試薬とほぼ同一のスペクトルが得られ、セルロースで構成されていることがわかった。*Micrystridium sp.* は今回測ったどのスペクトルとも類似しなかった。このパリノモルフはプラシノ藻ファイコーマ (休眠期に形成する巨大細胞) に由来している可能性が高いため、今後ファイコーマと比較することで詳細が明らかになることが期待される。グリーンランド試料のアクリタークについては、未同定種 A は同一試料中の繊毛虫シストと、未同定種 B は大阪湾試料中の未同定種とスペクトルが類似していた。時間の都合上、それぞれ 1 個体のみからしかデータを得られなかったため、今後検討が必要であるものの、アクリタークの化学分類に赤外分光分析が有効である可能性が示されたといえる。

## 2. 派遣支援期間中の研究発表概要

該当なし。本成果によって得られた結果に関連した論文を今後執筆予定。

## 3. 派遣支援期間中の受賞歴・

該当なし。

## 4. 派遣支援期間中のアウトリーチ活動

該当なし。