

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04258

研究課題名（和文）生合成機構から探る熱帯植物による塩化メチル大量放出の要因

研究課題名（英文）Large emissions of methyl chloride from tropical plants

研究代表者

斉藤 拓也（Saito, Takuya）

国立研究開発法人国立環境研究所・地球システム領域・主幹研究員

研究者番号：40414370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,800,000円

研究成果の概要（和文）：熱帯植物、中でもフタバガキ科樹木は、自然起源の成層圏オゾン破壊物質である塩化メチルの主要な発生源として働いている。本研究では、複数のフタバガキ科樹木を対象に、個葉の塩化メチル放出速度と共に関連する生合成パラメーター（酵素活性量、基質濃度等）の測定を実施した。その結果、塩化メチル放出速度と酵素活性の間に相関を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成層圏のオゾン層は、フロンなどの人為起源オゾン破壊物質の規制により回復しつつあると考えられている。しかし、その回復過程を考える上で、自然起源のオゾン層破壊物質に関する知見が欠かせない。本研究では、ほぼ唯一の自然起源塩素系オゾン層破壊物質である塩化メチルについて、その主要な放出源である熱帯樹木からの放出量が酵素活性によって規定されていることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Tropical plants are considered a major source of natural methyl chloride, an important ozone-depleting substance. We quantified leaf methyl chloride emissions from dipterocarp trees and found that the variations in emissions of methyl chloride correlate with the relevant enzymatic activity.

研究分野：大気化学

キーワード：フタバガキ 塩化メチル 熱帯林 メチル基転移酵素 シロイヌナズナ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

大気中で最も存在量の多いハロカーボンである塩化メチルは、活性な塩素原子を地表から成層圏へと持ち上げる自然起源のキャリアーとして働き、成層圏オゾン破壊全体の約 15%に寄与している。一方、フロン類に代表される人為起源オゾン破壊物質の生産・排出がモントリオール議定書によって禁止されたため、ほとんど唯一の自然起源塩素系オゾン破壊物質である塩化メチルの成層圏オゾン破壊への寄与は今後より大きくなると予想される。

このような重要性にも関わらず塩化メチルの主要な発生源が何であるかについては、長くミッシングソース問題として議論されてきた。しかし、塩化メチルを大量に放出する熱帯植物が見つかること (Yokouchi et al., 2002) 植物起源の塩化メチルに関する研究が大気化学と植物生理学の両面から一気に始められた。こうした中、申請者の斉藤らは世界に先駆けて熱帯林におけるフィールド観測を実施し、熱帯植物がグローバルな塩化メチル発生量の約半分を占める最大の発生源であることを明らかにした (Saito et al., 2008; Saito and Yokouchi, 2008)。また、分担者の中村らは塩化メチルを含むメチルハライドの合成酵素遺伝子を、モデル植物のシロイヌナズナ (*AtHOL1*, *AtHOL2*, *AtHOL3*) (Nagatoshi and Nakamura, 2007) とイネ (*OsHOL1*, *OsHOL2*) (Takekawa and Nakamura, 2012) より単離し、酵素の反応速度論的解析により特徴を明らかにした。シロイヌナズナの *AtHOL1* については、その生理学的役割に関する知見を報告している (Nagatoshi and Nakamura, 2009)。しかしながら、こうした研究の進展にもかかわらず、熱帯植物からの塩化メチル放出量が多い理由はいまだに明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フタバガキ科などの熱帯樹木に見られる極めて大きな塩化メチル放出量の種間差を、放出量と生合成過程のパラメーター (酵素活性量、基質濃度など) との関係から解明することにある。全球スケールで最も重要な塩化メチル放出植物であるフタバガキ科などについて、塩化メチル放出量を生合成パラメーターに着目して調査した報告例はこれまでにない。

3. 研究の方法

植物試料及びガス試料の採取は東京大学樹芸研究所（静岡県南伊豆町）と国立環境研究所生態系研究フィールド（茨城県つくば市）で実施した。なお、本研究の調査は当初、フタバガキ科を中心とする樹木によって構成される典型的な低地熱帯雨林であるマレーシア国サラワク州のランピルヒルズ国立公園あるいはヌグリスンビラン州のパソ自然保護区で実施する予定だったが、新型コロナウイルスによる渡航制限を受けて計画を変更し、国内の熱帯林温室で全ての試料採取を行った。

樹芸研究所で栽培されているフタバガキ科樹木について、個葉の塩化メチル放出速度と生合成パラメーターの測定を実施した。放出速度の測定にはスタティックエンクロージャー法を用い、バッグ取付けから 30 分後のバッグ内空気をテドラーバッグに採取した。採取されたガス試料は大気濃縮装置/GC/MS を用いて分析され、温室内の空気と採取ガスに含まれる塩化メチルの濃度差等から塩化メチルの放出速度を計算した。また、スタティックエンクロージャー法に加えて、放出速度の連続的な測定が可能なダイナミックエンクロージャー法に基づく計測システムの検討を行った。

塩化メチルの測定に用いた葉試料は放出ガスの採取後速やかに採取され、分析まで冷凍保存された。葉試料は、生合成パラメーターの測定、具体的には、酵素活性量、基質である S-アデノシルメチオニン（SAM）及び塩化物イオン、関連成分として S-アデノシルホモシステイン（SAH）とアデノシンの測定に使用した。植物葉組織の破碎と分画により塩化メチル合成活性を示す画分を明らかにするとともに、酵素活性画分を用いて塩化メチル合成の反応速度論的解析を行った。酵素活性の測定法については、あらかじめシロイヌナズナを用いた条件検討を行った。



図1 フタバガキ科樹木（*Shorea roxburghii*）の個葉から放出されるガスを採取する様子（東京大学樹芸研究所）

4 . 研究成果

まず、塩化メチルの生合成に関わる酵素であるメチルハライドトランスフェラーゼ (MHT) 活性の測定法について検討を行った。酵素活性測定系の基礎検討には、塩化メチルを放出することが分かっているシロイヌナズナの葉を用いた。MHT 活性の測定系として、(1) 基質である SAM から酵素反応によって生成される SAH を LC-UV または LC-FL を用いて定量する方法、(2) 酵素反応によって生成するメチルハライド (ヨウ化メチル、塩化メチル) を GC/MS で定量する方法、の 2 つの方法について検討を行った。(1) については候補となる幾つかの分析法についてシロイヌナズナ抽出画分を用いた検討を行い、SAH と植物抽出液由来のピークの相互分離が最も良好な方法を採用した。また、植物からのタンパク質画分の調製方法について検討し、MHT 活性画分を高い回収率で抽出する方法を決定した。

シロイヌナズナを用いた基礎検討に続いて、本研究の対象植物であるフタバガキ科についても酵素活性測定系の検討を行った。上述のシロイヌナズナで確立した MHT 活性抽出方法をフタバガキ科葉に適用したところ、MHT 活性が検出されなかったことから、酵素活性の測定を行う上で妨害となる成分がフタバガキに含まれていると考えられた。そこで、妨害の影響を抑えるため、抽出 buffer に添加する組成等について種々の検討を行い、フタバガキ葉に含まれる MHT 活性画分の抽出と精製 (脱塩) の方法を決定した。

塩化メチル放出量の *in vivo* での測定法を確立するため、スタティックエンクロージャー法とダイナミックエンクロージャー法について検討を行った。ダイナミックエンクロージャー法を用いて長期間測定を行う場合、導入ガスの湿度が植物の生理に影響することがわかった。このため、ナフィオン膜と外気を利用して、ポンペ入り除湿エアーを外気と同程度まで加湿してから一定流量でバッグに導入するシステムを構築した。試験的に、フタバガキ科の植物葉による塩化メチル放出量をダイナミックエンクロージャーシステムにより連続的に測定したところ、日中に放出量が増加する傾向が捉えられた。

上記の検討を行った後、樹芸研究所のフタバガキ科樹木 (4 属 5 種) を対象にした実験を行った。その結果、5 種のうち 3 種のみにおいて塩化メチルの有意な放出が確認され、種 (遺伝的背景) が塩化メチル放出の規定要因であることが示唆された (図 2)。続いて塩化メチルの放出速度と生合成に関わるパラメーター群との比較を行ったところ、MHT 活性との間に最も高い相関が認められ、塩化メチルの生合成が酵素活性に支配されていることが示唆された。

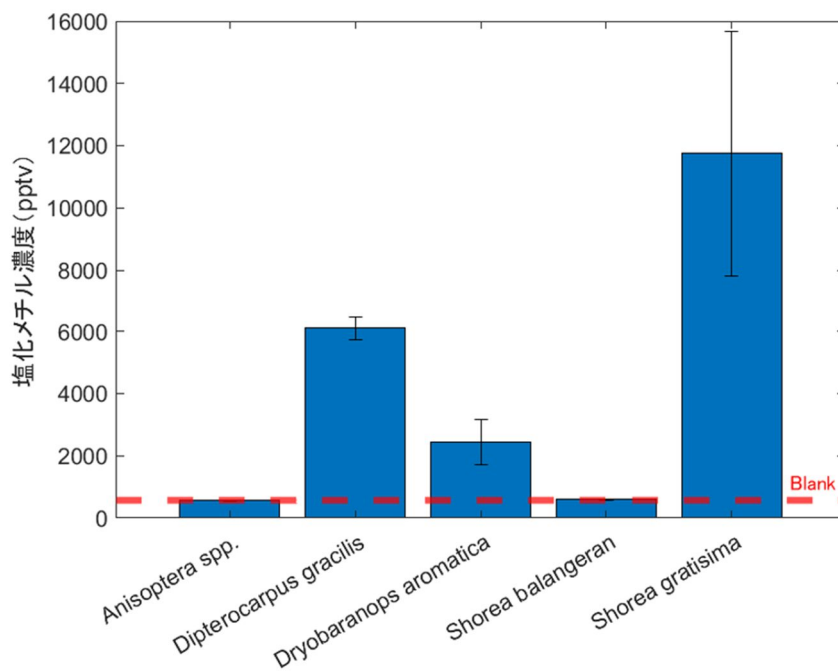


図2 フタバガキ科樹木の放出ガスに含まれる塩化メチル濃度。5種のうち、3種について塩化メチルの放出が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 斉藤拓也
2. 発表標題 オゾン層破壊に関わる熱帯生物圏と大気圏の相互作用
3. 学会等名 日本地球化学会第66回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura Y., Saito T., Nakamura T.
2. 発表標題 Enzymatic analysis of methyl chloride synthesis activities in Dipterocarpaceae trees
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤拓也
2. 発表標題 オゾン層破壊と生物の関係：最近の話題
3. 学会等名 生物環境イノベーション研究部門第2回シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅澤拓, 丹羽洋介, 斉藤拓也, 齋藤尚子, 豊田栄
2. 発表標題 大気化学の将来構想: 温室効果気体とオゾン層破壊物質
3. 学会等名 第26回大気化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野亮, 長浜智生, 江口菜穂, 秋吉英治, 斉藤拓也, 杉田考史, 山下 陽介, 坂崎貴俊
2. 発表標題 大気化学の将来構想: 成層圏・中間圏の大気化学の諸問題(Future Vision for Atmospheric Chemistry: Key Issues for the Stratosphere and Mesosphere)
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2022年大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 低温濃縮装置及び大気濃縮装置	発明者 斉藤拓也, ステファン ジョセフ アンドリュース	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6935116	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

生合成機構から探る熱帯植物による塩化メチル大量放出の要因 https://www.nies.go.jp/subjects/2019/25041_fy2019.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 達夫 (Nakamura Tatsuo) (50334636)	横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授 (12701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中村 祐子 (Nakamura Yuko)	横浜国立大学・大学院環境情報研究院・博士研究員 (12701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
マレーシア	マレーシア森林研究所			
英国	ヨーク大学			