

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22910

研究課題名（和文）植物プランクトンに由来するヒドロキシルアミンの生成・放出に関する研究

研究課題名（英文）Research on the production and release of hydroxylamine derived from phytoplankton

研究代表者

清家 泰（Seike, Yasushi）

島根大学・学術研究院環境システム科学系・特任教授

研究者番号：30243421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：ダム湖の有光層においてChl-aの増加に伴い、ヒドロキシルアミン（NH₂OH）が蓄積するという興味深い現象を発見した。そこで、藍藻によるNH₂OH産生の有無を調べるため、ダム湖から分離された *Dolichospermum crassum* の単一無菌培養株を用い、培養実験による検討を行ったところ、NH₂OHの明らかな増加が確認された。この結果は、夏季に有光層で検出されたNH₂OHが藍藻によって生成されたことを示唆する。我々の知る限り、NH₂OHが植物プランクトンの窒素代謝によって生成されるという報告はなく、これは植物プランクトンに由来するNH₂OHの生成を裏付ける最初の観測である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

藍藻によるNH₂OH産生の有無を調べるため、ダム湖から分離された *Dolichospermum crassum* の単一無菌培養株を用い、培養実験による検討を行ったところ、NH₂OHの明らかな増加が確認された。我々が検索した限りでは、NH₂OHの生成に対する植物プランクトンの関与を示す報告は国内外を問わず見当たらない（世界初の可能性あり）。本研究成果は、植物プランクトンには未知の窒素代謝プロセスが存在することを意味するものであり、本研究テーマは、学術体系の見直しを含む新たな発展性を有する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have discovered an interesting phenomenon in which hydroxylamine (NH₂OH) accumulates in high concentrations as Chl-a (a phytoplankton index) increases in the euphotic zone of a dam lake (reservoir). Furthermore, to investigate the presence or absence of NH₂OH production by phytoplankton, a sterile culture strain of cyanobacteria (*Dolichospermum crassum*) isolated from the reservoir was used, and a culture experiment was conducted. As a result, a clear increase in NH₂OH was confirmed, and the production and release of NH₂OH by the cyanobacteria *Dolichospermum crassum* was clarified. This result suggests that NH₂OH detected in the euphotic zone during the summer cyanobacteria outbreak was produced and released by the cyanobacteria. To our knowledge, there are no reports that NH₂OH is produced and released by nitrogen metabolism in phytoplankton, which is probably the first observation to support the production of NH₂OH derived from phytoplankton.

研究分野：環境化学，環境分析化学，生物地球化学

キーワード：ヒドロキシルアミン ラン藻類 *Dolichospermum crassum* 有光層 窒素代謝 単一無菌培養

1. 研究開始当初の背景

ヒドロキシルアミン (NH_2OH) は、バクテリアによる窒素サイクルにおいて、硝化プロセス及び硝酸還元プロセスの中間体として生成することが知られ、さらに近年、新たな窒素除去プロセスであるAnammox 反応の中間体としても生成されることが見出されている。このように、 NH_2OH は微生物代謝に係る重要化学種であるが、最近、我々は、フィールド調査により、植物プランクトンが NH_2OH を生成・放出していることを示唆する結果を得た。本結果は、植物プランクトンには未知の窒素代謝プロセスが存在することを意味するが、我々が検索した限りでは、 NH_2OH に対する植物プランクトンの関与を示す報告は国内外を問わず見当たらない(世界初の可能性あり)。したがって、本研究テーマは、学術的に重要かつ新たな発展性を有する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、植物プランクトンの未知の窒素代謝プロセス、すなわち植物プランクトンによる NH_2OH の生成能の有無の解明に資する基礎データの取得を目的とする。

3. 研究の方法

3-1. 調査水域

現地調査は三瓶ダム(北緯 35 度 10 分 19 秒、東経 132 度 33 分 31 秒)で月 1 回実施した。三瓶ダムは、島根県三瓶川の中央に位置し、治水、河川環境保全、水道水供給などに利用される多目的ダムである。このダム湖は、富栄養化が進み、藍藻の発生が毎年確認されるとともに、深水層では、夏季から秋季にかけて無酸素状態を呈する。

3-2. サンプリング

NH_2OH の分析用サンプルは、北原式採水器で湖水試料を採取し、ガラスバイアル(70 mL)に移した。次に、1.0 mL の緩衝液と 1.0 mL の塩化第二鉄溶液 (105 mmol L^{-1}) を添加して、生成した N_2O の分析を介して NH_2OH 濃度を定量した。なお、湖水サンプルに元々含まれる N_2O の分析では、生物活性を止めるためにホルムアルデヒド (1.0%最終濃度) を添加し測定した。これらの前処理操作は現場で実施し、そのサンプルを実験室に持ち帰り分析に供した。

NH_4^+ 、 NO_2^- 、および NO_3^- の分析用サンプルは、プラスチックボトルに収集して実験室に持ち帰り、ガラスフィルター (Whatman GF/C、粒子ろ過サイズ $1.2 \mu\text{m}$) を使用してろ過した。これらの分析はろ過直後に行った。Chl-*a* の分析用には、そのフィルター上の懸濁物を使用した。現場の水温、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP)、濁度、および pH は、水質モニター (HydroLab HL7) を使用してオンサイトで測定した。

3-3. 化学分析

N_2O の検出には、電子捕獲型検出器 (ECD) を備えた島津 GC-14B タイプのガスクロマトグラフを使用した。Unibeads C (メッシュ 60/80、GL Sciences) を充填したステンレス鋼カラム (長さ 2.0 m、内径 2.6 mm) を 130 のオープン温度で使用した。インジェクターと検出器 (ECD) の温度はそれぞれ 200 と 300 とした。キャリアーガスには 99.99995% グレ

ードの N_2 ガスを使用し 50 mL min^{-1} の流速で流した。サンプル中の水蒸気は、Unibeads C カラムに入る前に、 CaSO_4 が充填されたシーケンシャルプレカラムでトラップした (Senga et al. 2006 ¹⁾)。液相中の N_2O 濃度は、Weiss and Price の式 (Weiss and Price 1980 ²⁾) を使用して計算した。なお、 NH_2OH の定量化には、本研究では次亜塩素酸塩酸化法 (Seike et al. 2004 ³⁾; Kato et al. 2017 ⁴⁾) の代わりに、本研究により新規に開発した Fe(III) 酸化法 (Hikino et al. 2021 ⁵⁾) を使用した。これは、植物プランクトン由来の有機物を多く含むサンプルの場合、次亜塩素酸塩酸化法が NH_2OH の検出値を過小評価する可能性があるためである。

NH_4^+ は、インドフェノール法 (Sagi 1966 ⁶⁾) を使用して分析した。 NO_2^- および NO_3^- は、Bendschneider and Robinson (1952) ⁷⁾ および Wood et al. (1967) ⁸⁾ の方法をそれぞれ使用して分析した。 $\text{Chl-}a$ は、SCOR-UNESCO (1966) ⁹⁾ の方法を使用して分析した。各溶液の pH は HoribaF-23pH メーターで測定した。 NH_4^+ 、 NO_2^- および NO_3^- の測定には、島津 UV-1800 を使用した。

3-4. 藍藻の単一無菌培養株の調製

使用した藍藻 (シアノバクテリア) の単一の藻類培養株 (*Dolichospermum crassum*) は、2017 年 6 月 22 日に三瓶ダムから採取・分離し無菌化した。この実験室培養には CA 培地 (Ichimura and Watanabe 1974 ¹⁰⁾) を使用した。300 mL 三角フラスコ中の CA 培地 250 mL をオートクレーブ滅菌 (121 °C、20 分) した。滅菌した CA に 10 mL の培養株を添加し、卓上人工気象装置 (NK システム、LH-60FL12-DT) を使用して、12 : 12 の明暗サイクル (1300 ~ 1350 lx) および 20 °C で前培養した。この培養株は、滅菌パストツールピペット (Godo et al. 2017 ¹¹⁾; Hayashi et al. 2019 ¹²⁾) を使用したピペット洗浄法 (Pringsheim 1946 ¹³⁾) により、滅菌土壌抽出液を添加した CA 培地で毛状突起を 6 回洗浄することによって調製した。培養後、DNA を臭化エチジウムで染色することにより無菌化を確認した (Someya et al. 1995 ¹⁴⁾)。この単一無菌培養株を本培養に供した。

4. 研究成果

4-1. 三瓶ダムにおける窒素化学種と $\text{Chl-}a$ の鉛直分布

2019 年 7 月 30 日と 9 月 25 日の三瓶ダムにおける窒素化学種と $\text{Chl-}a$ の鉛直分布を  1 に示す。ダム湖の水位は年間を通じて変化するため、深度は、表層からの深さではなく、標高 (Elevation) で示している。 NH_2OH は表層水中に高濃度で検出され、2019 年 7 月 30 日と 9 月 25 日の値は、それぞれ $6.7 \sim 8.0 \text{ } \mu\text{gN L}^{-1}$ および $5.2 \sim 6.2 \text{ } \mu\text{gN L}^{-1}$ であった。一般に、 NH_2OH は硝化、硝酸還元、およびアナモックス反応の中間体として生成されることが知られている。しかしながら、表層では、硝化反応が光阻害され、硝酸還元反応やアナモックス反応が酸素阻害されるため、それらに起因する NH_2OH の発生は考え難い。7 月 30 日と 9 月 25 日に $\text{Chl-}a$ がそれぞれ $20.5 \sim 21.9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ と $38.0 \sim 45.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ のとき、特に植物プランクトン生産層で高濃度の NH_2OH が検出された。この結果は、表層での NH_2OH の形成が、硝化、硝酸塩還元、またはアナモックス反応ではなく、植物プランクトンに由来する可能性が高い

ことを示唆する。

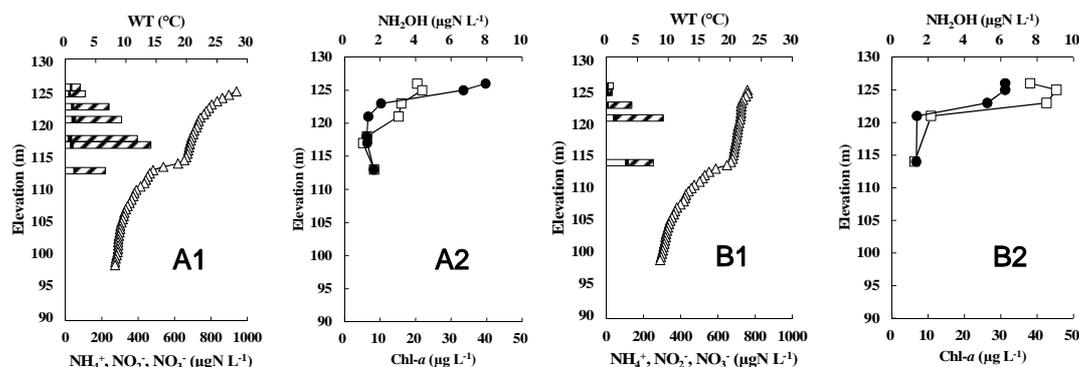


Fig.1 Vertical distributions of water temperature (WT - -), nitrogen species (NH_2OH ●; NH_4^+ □; NO_2^- ■; NO_3^- ▨), and Chl-*a* (-□-) in Sanbe Reservoir on July 30 (A1, A2) and September 25 (B1, B2) in 2019.

4-2. 三瓶ダムに生息する植物プランクトン種

三瓶ダムに生息する植物プランクトンの種類は、2019年6月から10月の現地調査で確認した。その結果、藍藻類: *Microcystis* sp., *Pseudanabaena* sp., *Dolichospermum crassum*, *Dolichospermum planctonicum*, *Aphanizomenon* cf. *flos-queae*; 珪藻類: *Cyclotella* sp., *Aulacoseira granularata*, *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*; 緑藻類: *Volvox aureus* が確認された。

4-3. 実験室培養実験による藍藻の NH_2OH 生成能の確認

藍藻の NH_2OH を生成する能力は、三瓶ダムで収集、分離された淡水性 *Dolichospermum crassum* の単一無菌培養株を使用し、生成された NH_2OH を測定して調べた。その結果、7日目から15日目まで NH_2OH の有意な増加が確認された(図2)。対照的に、コントロールの系では NH_2OH の増加は確認されず、ほぼ $0 \mu\text{gN L}^{-1}$ のままであった。培養期間中は無菌状態を維持し、*Dolichospermum crassum* を添加した系でのみ NH_2OH の増加が確認された。これにより、 NH_2OH の増加は、硝化、硝酸還元、アナモックス反応ではなく、藍藻 *Dolichospermum crassum* によるものであることが明らかになった。

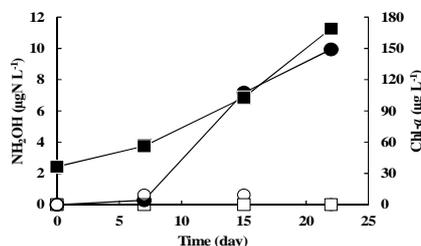


Fig.2 Culture experiment of *Dolichospermum crassum* (cyanobacteria) and control.

Chl-*a*: ■ *Dolichospermum crassum*, □ control.

NH_2OH : ● *Dolichospermum crassum*, ○ control.

結論

現地調査の結果、ダム湖の表水層に高濃度の NH_2OH と $\text{Chl-}a$ が同時に観測された。さらに、 NH_2OH が高濃度で検出されたときに出現する植物プランクトンの種を同定するとともに、分離されたシアノバクテリア *Dolichospermum crassum* の培養株の無菌化にも成功した。これにより、培養実験においてシアノバクテリアによる NH_2OH 産生能の有無を調べることができた。 NH_2OH レベルの明らかな増加は、この単一無菌培養株を使用した培養実験の日変化によって確認でき、シアノバクテリア *Dolichospermum crassum* による NH_2OH の生成と放出が明らかになった。この結果は、夏季に表水層で検出された NH_2OH が藍藻由来であることを示すと共に、植物プランクトンによる未知の窒素代謝過程の存在を示唆する。

しかしながら、本研究では、植物プランクトンのうち藍藻 1 種のみによる検証にとどまり、珪藻類や緑藻類については、単一培養株の無菌化を果たせず、検証を行うまでには至らなかった。今後、珪藻類や緑藻類についても同様な検証が必要である。

引用文献

- 1) Senga Y, Mochida K, Fukumori R, Okamoto N, Seike Y (2006) N_2O accumulation in estuarine and coastal sediment: The influence of H_2S on dissimilatory nitrate reduction. *Estuarine Coastal Shelf Science*, 67: 231–238.
- 2) Weiss RF, Price BA (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Marine Chemistry* 8: 347–359.
- 3) Seike Y, Fukumori R, Senga Y, Oka H, Fujinaga K, and Okumura M (2004) A simple and sensitive method for the determination of hydroxylamine in fresh-water samples using hypochlorite followed by gas chromatography. *Analytical Sciences* 20: 139–142.
- 4) Kato T, Sugahara S, Murakami M, Senga Y, Egawa M, Kamiya H, Omata K, and Seike Y (2017) Sensitive method for the oxidation-determination of trace hydroxylamine in environmental water using hypochlorite followed by gas chromatography. *Analytical Sciences* 33: 691–695.
- 5) Hikino A, Sugahara S, Kato T, Senga, Y., Egawa M, Park, J. Y., Kamiya H, Tanaka, H., Seike Y (2021): Sensitive gas chromatography detection of nanomolar hydroxylamine in environmental water by Fe(III) oxidation. *Analytical Sciences*, 37, 347–351. DOI:10.2116/analsci.20P254
- 6) Sagi T (1966) Determination of ammonia in sea water by the indophenol method and its application to the coastal and off-shore waters. *Oceanographical Magazine* 18, 43–51.
- 7) Bendschneider K, Robinson RJ (1952) A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Mar Res* 11: 87–96.
- 8) Wood ED, Armstrong FAJ, Richards FA (1967) Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* 47: 23–31.
- 9) SCOR-UNESCO (1966) Determination of photosynthetic pigments in seawater. Report of SCOR-UNESCO Working Group 17, Monographs on oceanographic methodology, 1, UNESCO, Paris
- 10) Ichimura T, Watanabe M (1974) The *Closterium calosporum* complex from the Ryukyu Islands. Variation and taxonomical problems. *Memoirs of the National Science Museum* 7: 89–102
- 11) Godo T, Saki Y, Nojiri Y, Tsujitani M, Sugahara S, Hayashi S, Kamiya H, Ohtani S, and Seike Y (2017) Geosmin-producing species of *Coelosphaerium* (Synechococcales, Cyanobacteria) in Lake Shinji, Japan. *Scientific Reports* 7: 41928
- 12) Hayashi S, Ohtani S, Godo T, Nojiri Y, Saki Y, Esumi T, and Kamiya H (2019) Identification of geosmin biosynthetic gene in geosmin-producing colonial cyanobacteria *Coelosphaerium* sp. and isolation of geosmin non-producing *Coelosphaerium* sp. from brackish Lake Shinji in Japan. *Harmful Algae* 84: 19–26
- 13) Pringsheim EG (1946) The Biphase or soil-water culture method for growing algae and flagellate. *Journal of Ecology* 33: 193–204
- 14) Someya T (1995) Three-dimensional observation of soil bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorganisms* 46: 61–69

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 HIKINO Aiko, SUGAHARA Shogo, KATO Toshikuni, SENGAKO Yukiko, EGAWA Michiko, PARK Ja Yeong, KAMIYA Hiroshi, TANAKA Hidekazu, SEIKE Yasushi	4. 巻 37
2. 論文標題 Sensitive Gas Chromatography Detection of Nanomolar Hydroxylamine in Environmental Water by Fe(III) Oxidation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 347 ~ 351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20P254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 引野愛子・加藤季晋・菅原庄吾・大谷修司・林昌平・江川美千子・清家泰
2. 発表標題 ダム湖表層におけるヒドロキシルアミンの生成に関する研究
3. 学会等名 日本陸水学会第84回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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	菅原 庄吾 (Sugahara Shogo) (30721302)	島根大学・学術研究院環境システム科学系・講師 (15201)	
研究分担者	神門 利之(神門利之) (Godo Toshiyuki) (70838408)	島根県保健環境科学研究所・環境科学部・部長 (85205)	
研究分担者	江川 美千子 (Egawa Michiko) (20565882)	島根大学・学術研究院環境システム科学系・助手 (15201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	加藤 季晋 (Kato Toshikuni) (20791734)	島根県保健環境科学研究所・水環境科・研究員 (85205)	
研究分担者	神谷 宏 (Kamiya Hiroshi) (50601928)	島根県保健環境科学研究所・環境科学部・主任研究員 (85205)	

	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	大谷 修司 (Ohtani Shuji)		
研究協力者	林 昌平 (Hayashi Shohei)		
研究協力者	引野 愛子 (Hikino Aiko)		

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