

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310010

研究課題名(和文)ピコプランクトンの単離と培養による揮発性有機ヨウ素化合物の新規生成源の探索

研究課題名(英文) Study on new source of volatile organoiodine compounds by isolation and culture of marine microorganisms

研究代表者

橋本 伸哉 (HASHIMOTO, Shinya)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：10228413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：初めに、ピコプランクトンを含む海洋微生物の単離法の最適化を行った。微生物分離装置を用いて、従来の顕微鏡下での単離法では単離が困難な海洋微生物を海水試料や粗培養試料から単離する手法を確立した。次に、野外調査で採集した水試料を対象に、揮発性有機化合物の生成種の探索を行い、海洋微生物がクロロメタン、プロモメタン及びヨードメタンを生成することを見出した。さらに、温帯域の海洋植物プランクトン、特に緑藻の近縁種に、ジヨードメタンを多量に生成する種を見出し、温帯域の海洋に含まれるジヨードメタンの生成起源を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The isolation and culture method for marine microorganisms was optimized using a flow cytometer. Bacteria were investigated for the production of halocarbon from natural waters. Bacteria were isolated and incubated at 25°C, and the concentrations of methyl halides (methyl chloride, methyl bromide, methyl iodide) in the gas phase above cultured samples were determined using dynamic headspace gas chromatography/mass spectrometry. Bacteria isolated from brackish water were identified by 16 Svedberg unit ribosomal-ribonucleic acid (16S rRNA) gene sequence analysis. Five genetically different strains of bacteria belonging to Erythrobacter or Pseudomonas produced methyl chloride, methyl bromide, and methyl iodide for several days in the culture. Maximum production rates for methyl halide were observed in the culture of isolated bacteria (HKF-1) belonging to Erythrobacter. Aquatic bacteria could be a new source of methyl halides in marine environments.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：植物プランクトン バクテリア 八口カーボン ジヨードメタン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋から大気へのヨウ素フラックスを考える上で、大気中で光化学反応によりヨウ素原子を放出するヨードメタンとジヨードメタンは重要な化合物である。ヨウ素原子は反応性が高く、対流圏のオゾン濃度の決定やエアロゾルの生成に関与する。これまでに、海洋の大型藻類、植物プランクトン、バクテリアによるヨードメタンの生成が報告されている。しかし、これら生物の培養実験によるヨードメタンの生成量の見積もりは、海洋全体でのヨードメタンの生成量の3%にも満たない。また、ジヨードメタンの生成は、一部の大型藻類や極域の植物プランクトンの培養実験において、その生成がわずかに示されているが、海洋全体でのジヨードメタン生成量の1%にも満たない。さらに温帯・熱帯域の海洋では高濃度のジヨードメタンが観測されているが、温帯・熱帯域の植物プランクトンやバクテリアでジヨードメタンを生成する種は、まだ見つかっていない。熱帯域の洋上では上昇気流による大気の高い鉛直混合が起こり易く、それにより分解しやすい揮発性有機ヨウ素化合物も下部成層圏まで運ばれ、成層圏オゾン(オゾン層)の分解にも関与すると考えられている。そのため、特に熱帯・亜熱帯域の海洋中で生成・放出される揮発性有機ヨウ素化合物の生成源の特定が急がれている。

(2) これまでに、海洋生態系における揮発性有機ヨウ素化合物の生成過程を明らかにするべく、沿岸域(汽水域)において、ヨードメタンやジヨードメタンなどの揮発性有機ヨウ素化合物を3年間にわたって観測し、主に夏期に濃度が増加することを見出した。この結果を踏まえ、ヨードメタンやジヨードメタンなどの揮発性有機ヨウ素化合物の生成をさらに詳細に調べるために、高濃度の揮発性有機ヨウ素化合物が観測された沿岸域の水試料を粗培養(混合培養)したところジヨードメタンが生成されることを確認した。そこで、バクテリアや細胞サイズが10 $\mu$ m程度の植物プランクトンの単離を試みた。そ

の結果、ヨードメタンを生成するバクテリアを単離することに成功した。しかし、現在のところジヨードメタンを生成する植物プランクトンやバクテリアを単離するには至っていない。これらの結果や、観測点で夏季にピコプランクトンである藍藻類(シアノバクテリア)が卓越することから、揮発性有機ヨウ素化合物の生成源としてピコプランクトンのような微小な植物プランクトンが注目される。一方、三陸沖での外洋での観測では、ジヨードメタンなどの濃度が、ピコサイズ(2 $\mu$ m以下)の植物プランクトンが多い観測点で高いことを見出した。このことから、ピコサイズの植物プランクトンにも生成能があることが考えられる。

## 2. 研究の目的

地球全体の揮発性有機ヨウ素化合物の生成量と消失量の見積もりの隔たりが大きいこと(既知の生成源は約1-3%)や、濃度分布が時空間的に不均一であるという多くの海洋データから考えて、揮発性有機ヨウ素化合物の未知の生成源が存在していることが示唆されている。以上のことを踏まえ、本研究の目的は、海洋から細胞サイズが2 $\mu$ m以下のピコ植物プランクトン及びバクテリアを単離して、その培養を通じて揮発性有機ヨウ素化合物の新規の生成起源を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) フローサイトメーターによる汽水試料からの植物プランクトンの分取と培養

初めに、自動細胞解析分離装置(フローサイトメーター)を用いて植物プランクトンを分取と培養するための実験条件の最適化を行った。植物プランクトンの分析・分取は、アルゴンレーザー488nmと半導体赤色レーザー635nmを用い、4個の蛍光検出FL1(515-545nm)、FL2(564-604nm)、FL3(670nm以上)及びFL4(653-669nm)にて行った。次に、開発した実験条件を用いて、天然試料からの植物プランクトンの分取と培養を試みた。

初めに、採取した汽水試料から動物プランクトン等の $5\mu\text{m}$ 以上の生物をメンブレンフィルターによるろ過により除いた。このろ過した試料(バクテリアや植物プランクトンを含む)を用いて培養実験を行った。培地は濃度 1/10 の人工海水とダイゴ IMK 培地を使用した。培養試料を数日毎に採取して、揮発性有機化合物の濃度およびクロロフィル *a* 濃度の測定を行った。揮発性有機化合物の濃度は、パージ&トラップ-ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いて、クロロフィル *a* 濃度は蛍光光度計を用いてそれぞれ測定した。ジヨードメタン等の揮発性有機化合物の生成が確認されたる過汽水試料を対象として、本装置により植物プランクトンの分取と培養を行った。

#### (2) ヨードメタンを含むモノハロメタンを生成する新規バクテリアの探索

佐鳴湖(汽水域)の湖水試料を採取し、この試料からバクテリアを単離後、マリンプロス培地にて $25^{\circ}\text{C}$ で培養した。単離培養したバクテリアによるヨードメタンを含むモノハロメタンの生成を調べるため、ダイナミックヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いて培養液中のモノハロメタンの濃度を測定した。モノハロメタンの生成が確認されたバクテリアの 16S rRNA 遺伝子系統解析を行い、既知の菌種との相同性を調べた。バクテリアによるモノハロメタン生成の経時変化を調べるために、10 日間培養を行いモノハロメタンの濃度測定を行った。また、測定時のバクテリアの生物量(菌体密度)の指標として、波長 600 nm における吸光度( $\text{OD}_{600}$ )の測定も同時に行った。モノハロメタン生成が顕著であったバクテリアは、コロニー計数法を用い、およその生物量を算出した。

#### (3) ジヨードメタンを生成する、温帯域の海洋植物プランクトンの探索

実験には、種々の株保存機関から購入した植物

プランクトンを用いた。培養は、一般的に海洋植物プランクトンの培養に使用される培地で行った。オートクレーブ滅菌(121、20分)した培地に、プランクトンをクリーンベンチ内で接種し、温度 $24^{\circ}\text{C}$ 、照度 $80\sim 90\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12:12 時間で培養した。数日おきに培養液中の揮発性有機化合物の濃度とクロロフィル濃度を測定した。揮発性有機化合物の濃度の測定は、パージ&トラップ-ガスクロマトグラフ質量分析装置で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) フローサイトメーターによる汽水試料からの植物プランクトンの分取と培養

フローサイトメーターを使用して植物プランクトンを分取して培養するための、種々の分取の条件を最適化した。次に、フローサイトメーターにより汽水試料に含まれる生物群の測定・解析を行った結果から、植物プランクトンの混合状態のろ過汽水試料をSに、Sからクロロフィルを含む試料(波長約700nmのもの)を分取した試料をAに、フィコシアニンを含む試料(波長約650nm)を分取した試料をBとする。試料Sでは、培養20日前後でジメチルスルフィドの生成が、また培養50日前後でヨードメタンの生成、培養70日以降ジプロモメタンの生成が確認された。この混合した生物群における揮発性有機化合物の生成を指標として、フローサイトメーターを使用して植物プランクトンを個別に分取し、培養することに成功した。本実験で確立したフローサイトメーターによるプランクトン分取培養法は、揮発性有機化合物を生成する微生物種の単離・培養に有効であることが明らかとなった。

##### (2) ヨードメタンを含むモノハロメタンを生成する新規バクテリアの探索

佐鳴湖湖水から単離したバクテリアの 88 株中 9 株から、モノハロメタン( $\text{CH}_3\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_3\text{Br}$ 、 $\text{CH}_3\text{I}$ )生成が確認された。16S rRNA 遺伝子系統解析の結果から、単離した 9 つのバクテリアはいずれもグラム陰性菌

であり、遺伝的に異なる5つ菌株(HKF-1~HKF-5)に分けられることが明らかとなった。HKF-1は、*Erythrobacter*属(protobacteria門)に属していた。HKF-2~HKF-5は*Pseudomonas*属(protobacteria門)に属していた。バクテリア培養試料中のモノハロメタン濃度の時間変化を図1に示す。図1と同様に、HKF-1~HKF-5のすべてのバクテリアで、培養試料中のモノハロメタン濃度が時間と共に増加した。特に生成が顕著であったHKF-1の最高濃度は、 $\text{CH}_3\text{Cl}$  (130 nmol/L)、 $\text{CH}_3\text{Br}$  (8100 pmol/L)、 $\text{CH}_3\text{I}$  (6310 pmol/L)であった。これまでに、バクテリアによるモノハロメタンの生成に関しては、 $\text{CH}_3\text{I}$ が報告(Amachiら2001年)されていた。しかし、 $\text{CH}_3\text{Cl}$ 及び $\text{CH}_3\text{Br}$ をバクテリアが直接生成する報告例はなかった。また、株保存機関より入手した*Erythrobacter*属2株と*Pseudomonas*属2株も同様に $\text{CH}_3\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_3\text{Br}$ および $\text{CH}_3\text{I}$ を生成することを確認した。以上のことから、海洋に広く分布するprotobacteria門にモノハロメタン生成能を有するものが存在することが推察できた。また、モノハロメタンの生成が顕著であったHKF-1の試料中の生物量を、海水中のバクテリアの生物量と比較し、海洋中の全バクテリアがHKF-1と同様にモノハロメタンを生成すると仮定すると、バクテリアによるモノハロメタンの生成量は、 $\text{CH}_3\text{Cl}$  (約130 pmol/L)、 $\text{CH}_3\text{Br}$  (約8.1 pmol/L)、 $\text{CH}_3\text{I}$  (約6.3 pmol/L)と計算された。海洋では、 $\text{CH}_3\text{Cl}$  (~150 pmol/L)、 $\text{CH}_3\text{Br}$  (~20 pmol/L)、 $\text{CH}_3\text{I}$  (~5 pmol/L)の濃度が観測されている。モノハロメタンの地球規模での収支のモデルから、未知の生成源があることが示唆されていることと併せると、海洋バクテリアがモノハロメタンの未知の生成源の1つとして地球規模でのハロゲンの循環に関与していることが示唆された。

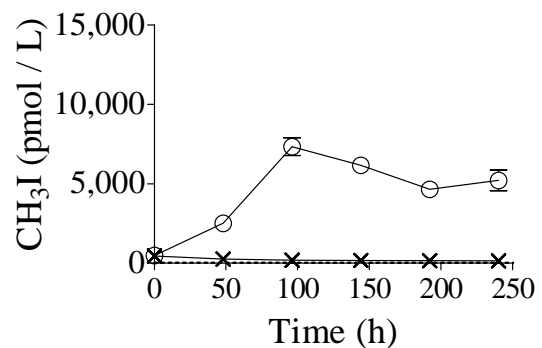


図1 HKF-1における培養容器内のヨードメタン濃度の時間変化

### (3) ジヨードメタンを生成する、温帯域の海洋植物プランクトンの探索

実験の結果から、緑藻に近縁の温帯域の海洋植物プランクトン種が、ジヨードメタンを生成することが明らかとなった。クロロフィル濃度が増加した時期にジヨードメタンの生成がみられたことから、植物プランクトンの成長とジヨードメタンの生成との間に関連があるのではないかと考えられた。現在、海洋でのジヨードメタンに関しては、極域での一部の植物プランクトンや温帯・熱帯域の大型藻類(生息は沿岸域に限られる)以外、温帯から熱帯域にかけての広範囲の外洋での生成源・生成機構が全く分かっていない(Carpenter, 2003)。過去の文献で、西部北太平洋の海域で海水中のクロロフィル *b* の濃度とジヨードメタンの濃度との間に、正の相関があると報告されており(Kurihara et al., 2010)、本実験で見いだした植物プランクトンは緑藻起源の葉緑体であるクロロフィル *a* と *b* を含むことから、この海洋での調査は、本培養実験の結果を支持するものである。

本研究の結果から、ジヨードメタンが最大濃度の試料で、Chl. *a* 1 $\mu\text{g}$  当たりのジヨードメタン濃度を算出すると約6~15 pmol となる。外洋では、Chl. *a* 濃度は最大で1 $\mu\text{g}$  /L程度であり、ジヨードメタンの最大濃度は、20~30 pmol/L程度である。本実験の結果は、海洋でのジヨードメタンの最大濃度の約1/2

から 1/3 程度を説明することが可能であり、温帯域の外洋でのジヨードメタンの主要な生成源が初めて見出された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

Gen Taniai, Hiroshi Oda, Yuki Yoneyama, Minami Abe, Takashi Yamakoshi, Keisuke Ambiru, Michiko Kurihara, Shinya Hashimoto, Simultaneous determination of 15 halocarbons at pico- to nano-mol per liter levels in water and biological samples using dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass-spectrometry, *Proceedings of The Institute of Natural Sciences Nihon University*, 査読有、**48**、2013、pp. 231-242

Michiko Kurihara, Motoko Iseda, Teru Ioriya, Naho Horimoto, Jota Kanda, Takashi Ishimaru, Yukuya Yamaguchi, Shinya Hashimoto, Brominated methane compounds and isoprene in surface seawater of Sagami Bay: Concentrations, fluxes, and relationships with phytoplankton assemblages., *Marine Chemistry*, 査読有、**134-135**、2012、pp. 71-79.

Takuya Fujimori, Yuki Yoneyama, Gen Taniai, Michiko Kurihara, Hideyuki Tamegai, Shinya Hashimoto, Methyl halide production by culture of marine proteobacteria *Erythrobacter*, *Pseudomonas* and isolated bacteria from brackish water., *Limnology & Oceanography*, 査読有、**57**、2012、pp. 154-162

DOI:10.4319/l.o.2012.57.1.0154

K. Kusunoki, M. Sakata, Y. Tani, Y. Seike and K. Ayukawa, Analysis of historical trend of carotenoid concentrations in sediment cores from Lake Shinji, Japan, *Geochemical Journal*, 査読有、**46**、2012、pp. 225-233.

J. Watanabe, Y. Tani, N. Miyata, H. Seyama, S. Mitsunobu, H. Naitou, Concurrent sorption of As(V) and Mn(II) during biogenic manganese oxide formation, *Chemical Geology*, 査読有、**306-307**、2012、pp. 123-128. DOI org/10.1016/j.chemgeo.2012.03.004

[学会発表] (計 17 件)

小泉亮、橋本伸哉、フローサイトメーターによる汽水湖試料からの植物プランクトンの分取と培養 第 14 回極限環境生物学会年会、明治大学生田校舎、東京、2013 年 10 月 27 日

柴崎彩人、安蒜啓佑、橋本伸哉、珪藻による揮発性有機化合物の生成、2013 年度日本海洋学会秋季大会、北海道大学、札幌、2013 年 9 月 20 日

阿部皆美、安蒜啓佑、橋本伸哉、緑藻によるテルペン類の生成、2013 年度日本海洋学会秋季大会北海道大学、札幌、2013 年 9 月 20 日

西 悠、安蒜啓佑、橋本伸哉、珪藻 *Chaetoceros* sp. による  $\text{CH}_3\text{Cl}$  と  $\text{CH}_3\text{Br}$  の生成、2013 年度日本海洋学会秋季大会、北海道大学、札幌、2013 年 9 月 20 日

Ayato Shibasaki, Noboru Enomoto, Michiko Kurihara, Shinya Hashimoto, Volatile Organic Compounds Production from Cultures of *Thalassiosira pseudonana*, ASLO 2013 Aquatic Science Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, 2013 2 21

Haruka Nishi, Michiko Kurihara, Shinya Hashimoto, Production of methyl chloride and methyl bromide by *Chaetoceros* sp., ASLO 2013 Aquatic Science Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, 2013 2 21

Kenichi Ichikawa, Yuki Yoneyama, Michiko Kurihara, Hideyuki Tamegai, Shinya Hashimoto, Production of volatile organic compounds in the culture of marine bacteria, ASLO 2013 Aquatic Science Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, 2013 2 21

Minami Abe, Michiko Kurihara, Shinya Hashimoto Survey of volatile organic compounds in

cultures of *Chlamydomonas* sp., ASLO 2013 Aquatic Science Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, 2013 2 21

橋本伸哉、栗原路子、微生物によるハロカーボンの生成、第 13 回極限環境生物学会年会、日本大学文 理学部・東京、2012 12 2

米山祐樹、藤森拓哉、谷合元、栗原路子、為我井秀行、橋本伸哉、バクテリアによるモノハロメタンの生成、第 13 回極限環境生物学会年会、日本大学文理学部・東京、2012 12 2

安蒜啓佑、栗原路子、為我井秀行、橋本伸哉 シアノバクテリア *Synechococcus* によるモノハロメタンの生成、第 13 回極限環境生物学会年会、日本大学 文理学部・東京、2012 12 2

柴崎彩人、栗原路子、為我井秀行、橋本伸哉 珪藻 *Thalassiosira pseudonana* による揮発性有機化合物の生成、第 13 回極限環境生物学会年会、日本大学 文理学部・東京、2012 12 2

土屋海、栗原路子、為我井秀行、橋本伸哉 シアノバクテリア *Synechococcus* によるイソプレンの生成、第 13 回極限環境生物学会年会、日本大学文理 学部・東京、2012 12 2

Keisuke Ambiru, Michiko Kurihara, Shinya Hashimoto, Methyl chloride production by two marine cyanobacteria: *Synechococcus* sp. (CCMP 1334) and *Synechococcus* sp. (NIES 981), ASLO Summer Meeting 2012、滋賀県大津市、2012 7 12

Yuki Yoneyama, Takuya Fujimori, Gen Taniai, Michiko, Kurihara, Hideyuki Tamegai, Shinya Hashimoto, Methyl halide production by marine proteobacteria, ASLO Summer Meeting 2012 滋賀県大津市、2012 7 12

米山祐樹 藤森拓哉 谷合元 栗原路子 為我井秀行 橋本伸哉、バクテリアによるモノハロメタンの生成、日本海洋学会春季大会、筑波大学、2012 年 3 月 27 日

Shinya Hashimoto, Gen Taniai, Takuya Fujimori, Michiko Kurihara, Dynamic head space GC-MS analysis for halomethanes in liquid and

viscous samples., IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (招待講演) Kyoto International Conference Center, 2011 年 5 月 25 日

[図書] (計 1 件)

栗原路子・橋本伸哉、エヌ・ティー・エス、藻類ハンドブック「ハロカーボン類を産生する藻類」2012 年 7 月、768 (435-436)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 伸哉 (HASHIMOTO, Shinya)  
日本大学・文理学部・教授  
研究者番号 10228413

### (2) 研究分担者

谷 幸則 (TANI, Yukinori)  
静岡県立大学・環境科学研究所・准教授  
研究者番号 10285190