

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12358

研究課題名(和文) ラビリンチュラ類による揮発性有機化合物の生成の検討と環境影響評価

研究課題名(英文) Study on the production of monohalomethanes by Labyrinthula and assessment of their environmental impact

研究代表者

橋本 伸哉 (HASHIMOTO, Sinya)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、ラビリンチュラ類はモノハロメタンであるCH₃Cl、CH₃Br、CH₃Iを生成すること、その生成量は種によって異なること、ある種は海洋でのCH₃Cl濃度の6-23%、CH₃I濃度の0.5-0.6%を説明出来るため、海洋でのCH₃Clの主要な生成源の一つとなりうる事が明らかとなった。また、20、25、30℃でそれぞれ培養した結果、モノハロメタンの生成は培養温度による影響を受けること、例えば海水温度の上昇によってCH₃Iは生成量が減少しCH₃Clは生成量が増加することがわかった。モノハロメタンの生成に微量金属等が影響している可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気中のモノハロメタンは成層圏オゾン分解の触媒作用を示す。現在、モノハロメタンの地球規模の収支モデルにおいて、既知の生成源は地球規模の生成量を説明するには不十分である。本研究の成果より、ラビリンチュラ類は海洋でのモノハロメタンの生成源としての役割を担っていること、また地球環境の温度変化がモノハロメタンの生成に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The results of this study indicate that Labyrinthula species produce the monohalomethanes such as CH₃Cl, CH₃Br, and CH₃I. The amounts produced varied among species, with some species being able to explain 6-23% of the marine CH₃Cl concentration and 0.5-0.6% of the CH₃I concentration, indicating that they may be one of the major sources of CH₃Cl in the ocean. The results of incubation at 20 °C, 25 °C, and 30 °C, respectively, showed that the production of monohalomethanes was affected by incubation temperature; for example, the production of CH₃I decreased and that of CH₃Cl increased as the seawater temperature increased. It was also suggested that trace metals may have an effect on the formation of monohalomethanes.

研究分野：生態環境化学

キーワード：ラビリンチュラ 揮発性有機化合物 モノハロメタン

1. 研究開始当初の背景

CH₃Cl や CH₃Br 等のモノハロメタンは、最も単純な有機ハロゲン化合物で、大気中に数～数百 pptv の濃度で存在している。対流圏の大気中において CH₃Cl や CH₃Br は有機ハロゲン化合物の中では比較的長い寿命 (CH₃Cl は約 1 年) を有し、拡散により成層圏に到達するとハロゲンラジカルを放出することにより、オゾン分解の触媒作用を示す (Read et al., 2008)。現在、モノハロメタンの地球規模の収支モデルにおいて、CH₃Cl や CH₃Br の既知の生成源は、地球規模の生成量を説明するには不十分であることが知られている。したがって、CH₃Cl や CH₃Br の「未知」の生成源を探索することは現在に及んでも必要であると考えられている。海洋は、地球の表面積の約 7 割を占めており、その約 9 割は外洋である。大気-海洋間の物質循環は極めて重要で、海洋から放出される気体は大気は大きな影響を受ける。この外洋に「未知の」生成源がある可能性を考慮して、さまざまな種類の海洋植物プランクトンによるモノハロメタンを含む揮発性有機化合物の生成について研究が行われてきた。しかし、地球規模の収支を換算すると、「未知の」生成源が、例えば CH₃Br では約 30%残っている。

近年、海洋での観測から、植物プランクトンのブルーム (大増量) 後半に海洋中の揮発性有機化合物の濃度が高いこと (Kurihara et al., 2010) や、植物プランクトンの生物量の指標であるクロロフィル *a* 濃度と揮発性有機化合物の濃度の海水中の鉛直分布を比較すると、クロロフィル *a* 濃度は低いにもかかわらず、モノハロメタンを含む揮発性有機化合物の濃度が高くなる観測点が存在することが報告されている (Abrahamsson et al., 2004)。これらの観測結果は、海洋において「分解者」としての役割を担っている生物によるモノハロメタン等の生成の可能性を示唆している。陸上の分解者には一般に菌類とバクテリアが挙げられる。一方で海洋における分解者としてはバクテリアのみが挙げられることが多い。しかし、有機物を豊富に含む海水の分解に関して、ラビリンチュラ類の果たす役割が重要視されるようになってきている。すなわち、ラビリンチュラ類を中心とした真核生物の分解者が、陸における菌類に相当する生物として存在するのではないかということが議論されてきている (Bremer and Talbot, 1995)。しかし、これら海洋における真核生物であるラビリンチュラ類による揮発性有機化合物の生成に関する知見は乏しく、仮にこれらから生成が確認された場合、新たな揮発性有機化合物の生成源になりうる。

2. 研究の目的

現在、モノハロメタンの地球規模の収支モデルにおいて、CH₃Cl や CH₃Br の既知の生成源は生成量を説明するには不十分であるため、「未知」の生成源を探索することは将来の地球環境を予測するのに必要不可欠である。海洋での観測から、「分解者」としての役割を担っている生物によるモノハロメタン生成の可能性が示唆されている。近年、海洋での分解者の役割を担っている生物としてバクテリアとともに、真核の従属栄養生物である、ラビリンチュラ類やプレツボカビ科の重要性が報告されている。近年の研究から、*Schizochytrium* sp., *Aplanochytrium* sp., 及び *Oblongichytrium* sp. 等のラビリンチュラ類が、冬季 (水温 10 度程度) から夏季 (水温 30 度

程度)にかけて生息できることや、水温 6 度程度の試料から培養温度 25 度でも増殖可能なラビリンチュラ類が見出だされていることが報告されている (Ueda et al., 2015; Rosa et al., 2011)。これらの結果は、ラビリンチュラ類には広い温度耐性を持つ種があることを示唆しており、海水温の上昇がラビリンチュラ類による揮発性有機化合物の生成量に影響をもたらす場合、将来の地球環境の温度上昇が、ラビリンチュラ類による揮発性有機化合物の生成量に地球規模で影響を与えうることを示唆している。

本研究「ラビリンチュラ類による揮発性有機化合物の生成の検討と環境影響評価」の目的は、1:「ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビはモノハロメタンを含む揮発性有機化合物を生成するのか」、また生成する場合、2:「揮発性有機化合物の生成量は種ごとに異なるのか?」、3:「海洋での生成量はバクテリアと同等なのか?」、さらに、4:「ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビの揮発性有機化合物の生成量と海水温度に関係はあるのか?」という点について明らかにすることである。

3. 研究の方法

まず初めに、1:「ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビはモノハロメタンを含む揮発性有機化合物を生成するのか」を調べるために、ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビの複数の株 (*Aurantiochytrium* sp., *Botryochytrium radiatum*, *Schizochytrium* sp., *Ulkenia amoeboides*) を培養し、揮発性有機化合物の生成を調べた。培養には、従来の方法 (Takao et al., 2005) に基づいて、D(+)-グルコースや BBLTM 酵母エキスなどを添加したろ過海水 1 L に Agar powder (細菌培地用) を加えた medium-H 培地を用いた。培養試料に含まれる揮発性有機化合物の測定は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で行った。

次に、2:「揮発性有機化合物の生成量は種ごとに異なるのか?」、3:「海洋での生成量はバクテリアと同等なのか?」を調べるために、ラビリンチュラ類の細胞数の測定と揮発性有機化合物の生成速度の算出を行った。培養試料を中性ホルマリン緩衝液で保存後、段階的に希釈して、プランクトン計数板にセットして、光学顕微鏡 (Olympus BX51) で細胞数を計測した。細胞数と揮発性有機化合物の濃度の変化から、各培養試料における単位生物量当たりの揮発性有機化合物の生成速度 ($\text{pmol} (10^6 \text{細胞数})^{-1} \text{日}^{-1}$) を算出した。

最後に、4:「ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビの揮発性有機化合物の生成量と海水温度に関係はあるのか?」を調べるために、モノハロメタンを生成するラビリンチュラ類の中から、最もクロロメタンを生成する種である *Botryochytrium radiatum* を対象に選び、培養温度を 20、25、30 でそれぞれ培養して、モノハロメタン生成への温度の影響を調べた。培養には、従来の方法 (Takao et al., 2005) に基づいて、D(+)-グルコースや BBLTM 酵母エキスなどを添加したろ過海水 1 L に Agar powder (細菌培地用) を加えた medium-H 培地を用いた。培養試料に含まれる揮発性有機化合物の測定は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で行った。また、ラビリンチュラ類 *Parietichytrium sarkarianum* によるモノハロメタン生成への温度依存性及び人工海水及びろ過海水での培養実験を行い培地の組成による影響について調べた。

4. 研究成果

(1)「ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビはモノハロメタンを含む揮発性有機化合物を生成するのか」を調べた結果、複数の株がクロロメタン、プロモメタン、ヨードメタンを生成することが分かった。ラビリンチュラ類を培養した結果、*Aurantiochytrium* sp.、*Botryochytrium radiatum* と *Schizochytrium* sp. はモノハロメタンを生成するが、*Ulkenia amoeboidea* はモノハロメタンを生成しないことが分かった。この結果から海洋のラビリンチュラ類がモノハロメタンを生成することが初めて明らかとなった。種によってモノハロメタンの生成量は異なり、*Aurantiochytrium* sp. と *Schizochytrium* sp. はプロモメタンのみを生成し (50-100pmol/L)、*Botryochytrium radiatum* はクロロメタン (最大 15 nmol/L) とヨードメタン (最大 120pmol/L) を生成するがプロモメタンを生成しないことが明らかとなった。

(2)「揮発性有機化合物の生成量は種ごとに異なるのか？」、(3)「海洋での生成量はバクテリアと同等なのか？」を調べて、海洋でのラビリンチュラ類が「新たな無視できない」モノハロメタンの主要な生成源の一つとなりうるのか考察した。ラビリンチュラ類の細胞数と揮発性有機化合物の濃度の変化から、各培養試料における単位生物量当たりのモノハロメタンの生成速度を算出した。その結果と、海洋でのラビリンチュラ類の細胞密度 (インド洋でのラビリンチュラ; Raghukumar et al., 2001) と海洋でのモノハロメタンの濃度 (インド洋でのモノハロメタン; Smythe-Wright et al., 2005) とを比較した結果、*Botryochytrium radiatum* は、海洋でのクロロメタン濃度の 6-23%、ヨードメタン濃度の 0.5-0.6% を説明出来ることが分かり、少なくとも海洋でのクロロメタンの主要な生成源の一つとなりうることが示された。

(4)「ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビの揮発性有機化合物の生成量と海水温度に関係はあるのか？」を調べた結果、*Botryochytrium radiatum* によるクロロメタンの生成量は培養温度の上昇に伴い上昇することが明らかとなった。培養温度 20、25、30 で培養した培地中のクロロメタンの最大濃度は、約 6000、9000、14000 pmol/L であった。一方、*Botryochytrium radiatum* によるヨードメタンの生成量は培養温度の上昇に伴い減少し、20、25、30 で培養した培養液中のヨードメタンの最大濃度は、約 130、100、70 pmol/L であった。またラビリンチュラ類 *Parietichytrium sarkarianum* によるモノハロメタン生成への温度依存性を調べた結果、温度上昇によって CH_3I は生成量が減少し CH_3Cl は生成量が増加することが分かった。また、人工海水及びろ過海水での培養実験を行った結果、人工海水では CH_3Cl 生成量が減少し、モノハロメタンの生成に微量金属等が影響している可能性が示唆された。

これまでの研究成果から、海水の広い温度範囲においてモノハロメタンを生成するラビリンチュラ類が存在すること、また将来の地球環境の温度変化が、ラビリンチュラ類によるモノハロメタンの生成に影響を与えることが明らかとなった。ラビリンチュラ類は海洋における分解者や脂肪酸の一次生産者としての役割だけでなく、モノハロメタンの生成源としての役割も担っていることが明らかとなった。

引用文献

- Abrahamsson, K., Bertilsson, S., Chierici, M., Fransson, A., Froneman, P.W., Lorén, A., Pakhomov, E.A., 2004. Variations of biochemical parameters along a transect in the Southern Ocean, with special emphasis on volatile halogenated organic compounds. *Deep-Sea Res. II* 51, 2745-2756. doi:10.1016/j.dsr2.2004.09.004
- Bremer, G.B., Talbot, G., 1995. Cellulolytic Enzyme Activity in the Marine Protist *Schizochytrium aggregatum*. *Bot. Mar.* 38, 37-41. doi: 10.1515/botm.1995.38.1-6.37
- Kurihara, M.K., Kimura, M., Iwamoto, Y., Narita, Y., Ooki, A., Eum, Y.-J., Tsuda, A., Suzuki, K., Tani, Y., Yokouchi, Y., Uematsu, M., Hashimoto, S., 2010. Distributions of short-lived iodocarbons and biogenic trace gases in the open ocean and atmosphere in the western North Pacific. *Mar. Chem.* 118, 156-170. doi: 10.1016/j.marchem.2009.12.001
- Raghukumar, S., Ramaiah, N., Raghukumar, C., 2001. Dynamics of thraustochytrid protists in the water column of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 24, 175-186. doi: 10.3354/ame024175
- Read, K.A., Mahajan, A.S., Carpenter, L.J., Evans, M.J., Faria, B.V.E., Heard, D.E., Hopkins, J.R., Lee, J.D., Moller, S.J., Lewis, A.C., Mendes, L., McQuaid, J.B., Oetjen, H., Saiz-Lopez, A., Pilling, M.J., Plane, J.M.C., 2008. Extensive halogen-mediated ozone destruction over the tropical Atlantic Ocean. *Nature* 453, 1232-1235. doi:10.1038/nature07035
- Rosa, S.M., Galvagno, M.A., Vélez, C.G., 2011. Adjusting culture conditions to isolate thraustochytrids from temperate and cold environments in southern Argentina. *Mycoscience* 52, 242-252. doi:10.1007/s10267-010-0091-2
- Smythe-Wright, D., Boswell, S.M., Lucas, C.H., New, A.L., Varney, M.S., 2005. Halocarbon and dimethyl sulphide studies around the Mascarene Plateau. *Phil. Trans. R. Soc. A* 363, 169-185. doi: 10.1098/rsta.2004.1485
- Takao, Y., Nagasaki, K., Mise, K., Okuno, T., Honda, D., 2005. Isolation and Characterization of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infectious to a Marine Fungoid Protist, *Schizochytrium* sp. (Thraustochytriaceae, Labyrinthulea). *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4516-4522. doi: 10.1128/AEM.71.8.4516-4522.2005
- Ueda, M., Nomura, Y., Doi, K., Nakajima, M., Honda, D., 2015. Seasonal dynamics of culturable thraustochytrids (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles) in estuarine and coastal waters. *Aquat. Microb. Ecol.* 74, 187-204. doi: 10.3354/ame01736

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Nanae Sato, Kazuma Hamamoto, Michiko Kurihara, Minami Abe, Shinya Hashimoto | 4. 巻 208 |
| 2. 論文標題 Methyl halide production by cultures of marine thraustochytrids, Aurantiochytrium sp., Botryochytrium radiatum, and Schizochytrium sp. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Marine Chemistry | 6. 最初と最後の頁 95-102 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marchem.2018.11.009 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 酒井晃、奥田祐樹、橋本伸哉 |
| 2. 発表標題 ラビリンチュラ類による揮発性有機化合物生成への培養温度の影響 |
| 3. 学会等名 日本地球化学会 第67回オンライン学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 酒井晃、佐藤七恵、濱本和馬、奥田祐樹、橋本伸哉 |
| 2. 発表標題 ラビリンチュラ類による揮発性有機化合物の生成 |
| 3. 学会等名 日本地球化学会第66回年会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|