

## 高 CO<sub>2</sub> 処理と窒素付加がオノエヤナギの葉のメタン放出に与える影響

日本学術振興会特別研究員(北海道大学大学院農学研究院) 渡辺 誠

日本学術振興会特別研究員(森林総合研究所北海道支所) 北岡 哲

森林総合研究所北海道支所 飛田 博順・上村 章・宇都木 玄

王子製紙株式会社 幸田 秀穂

北海道大学大学院農学研究院 小池 孝良

### はじめに

メタンは地球温暖化の主要な原因物質の一つで、CO<sub>2</sub> に比べて質量ベースで約 23 倍の温暖化効果があると考えられている(5)。一般に、メタンは酸素が極度に少ない嫌気的な環境下でメタン生成細菌によって生成され、大気中に放出されると考えられている。しかし、2006 年 1 月にドイツの Keppler ら(7)によって「好氣的条件下における陸上植物からのメタン放出」という驚くべき報告がなされた。Keppler らは実験で得られたデータをもとに植物からの好氣的条件下におけるメタン放出量を全球レベルで推定し、これまで知られているメタン放出源からの総メタン放出量の 10~30%にあたるメタンが、陸上植物から放出されていると報告した。この全球レベルでのメタン収支に関する推定は、さまざまな検証が行われた結果、過大評価であったとされるが(9, 11)、依然として陸上植物が重要なメタン放出源である可能性が指摘されている。また、全球レベルのメタン収支だけでなく、好氣的条件下における植物からのメタン放出現象そのものについても疑問が投げかけられていたが(2)、植物体のペクチンがメタンを放出しうることが、同位体を用いた実験により明らかになっている(1, 8)。なお、国内においても樹木からのメタン放出に関する研究が行われており、Keppler らと同程度のメタン放出が確認されている(6, 9)。

一方、現在進行している大気 CO<sub>2</sub> 濃度や窒素沈着量の増加によって、樹木の生理的・形態的な変化が起こる事が予想されており、将来環境においては、樹木のメタン放出速度が現状と異なる可能性がある(3, 5)。この点に関して、Kitaoka ら(9)は開放系大気 CO<sub>2</sub> 増加 (FACE, Free air CO<sub>2</sub> enrichment) 装置による高 CO<sub>2</sub> 環境で育成したカラマツ、ウダイカンバおよびミズナラの葉におけるメタン放出について予備調査を行っているが、知見は極めて限られている。さらに、植物の生理活性とメタン放出速度の関係については世界的にも全く解明されていない。そこで本研究では高 CO<sub>2</sub> 処理と窒素付加がバイオエタノールの原材料として期待の大きいオノエヤナギ(*Salix sachalinensis* F. Schmidt)(4)の葉のメタン放出に与える

影響を調査した。本種のメタン放出量を調査することは、オノエヤナギを用いたバイオエタノール生産におけるメタン放出リスクを評価するうえで重要であると考えた。さらに、最も重要な生理活性の1つである光合成活性とメタン放出の関係を明らかにする事を目的とした。

### 材料と方法

供試材料としてオノエヤナギの挿し穂(長さ 18 cm)を用いた。2008 年 4 月 30 日に、鹿沼土と赤玉土を 1:2 の割合で混合した土壌を詰めたビニール製ポット(直径 21 cm)に挿し穂を移植した。移植後 8 日目(5 月 8 日)に、各個体を森林総合研究所北海道支所の自然光型環境調節室(気温: 昼 25°C/夜 16°C)に移し CO<sub>2</sub> 処理を開始した。設定した CO<sub>2</sub> 濃度は 360  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (対照区)と 720  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (高 CO<sub>2</sub> 区, 100 年後を想定)の 2 段階である。各 CO<sub>2</sub> 処理は 3 部屋の繰り返しを設けた。土壌への窒素処理は 6 月 6 日と 16 日の 2 回に分けて行い、合計窒素付加量が 30 kg N ha<sup>-1</sup> となるように(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を土壌に添加した処理区(HN 区)と窒素処理を行わなかった処理区(LN 区)の 2 処理区を設けた。CO<sub>2</sub> 濃度 2 段階と窒素付加 2 段階を組み合わせた合計 4 処理区で実験を行った。なお、6 月 27 日と 7 月 20 日に液肥(N:P:K=5:10:5, ハイボネックスジャパン)1000 倍希釈液 150ml を、すべてのポットに添加した(合計 N 付加量: 4.8 kg ha<sup>-1</sup>)。

7 月 28-29 日に完全展開した若い葉を対象として、携帯型光合成蒸散測定装置(LI-6400, Li-Cor, Nebraska, USA)とクロロフィル蛍光ユニット(LI-6400-40)を用いてガス交換速度とクロロフィル蛍光反応の測定を行った。ガス交換速度の測定中は葉温および光量子束密度が、それぞれおよそ 25°C および 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  となるように調整した。また飽差は 1.5 kPa を超えないようにした。純光合成速度-葉内 CO<sub>2</sub> 濃度曲線を作成し、最大炭酸同化速度( $V_{cmax}$ )と最大電子伝達速度( $J_{max}$ )を算出した(12)。また CO<sub>2</sub> 濃度 1700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  における純光合成速度を CO<sub>2</sub> 飽和時の最大純光合成速度( $A_{max}$ )とした。クロロフィル蛍光反応は上記ガス交換速度の測定時と一晚暗処理を行った後に測定し、2 回の測定結果から各種

Makoto WATANABE (JSPS Research fellowship, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589), Satoshi KITAOKA (JSPS Research fellowship, Hokkaido Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), Sapporo 062-8516), Hiroyuki TOBITA, Akira UEMURA, Hajime UTSUGI (Hokkaido Research Center, FFPRI, Sapporo 062-8516), Takayoshi KOIKE (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589)  
Effects of elevated CO<sub>2</sub> and N supply on the methane emission from leaves of *Salix sachalinensis* F. Schmidt.

パラメーターを算出した。測定は生育 CO<sub>2</sub> 濃度(360 あるいは 720 μmol mol<sup>-1</sup>)環境において行った。

葉からのメタン放出速度の測定は Kitaoka ら(9)に基づいた。即ち、生重量で 6 g の葉を内容積 500 ml のセパブルフラスコに入れて密封し、室温 35°C、光量子束密度 350 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の条件下で 24 時間培養した。培養前と培養後に容器内の空気をシリンジでサンプリングし、FID 検出機付きガスクロマトグラフ(GC-14B, 島津製作所, 京都)を用いてメタン濃度を測定した。培養した葉は 70°C に設定した乾燥機で 5 日間乾燥し、乾燥重量を測定した。

**結果**

メタン放出速度は高 CO<sub>2</sub> 処理によって有意に増加した(図-1)。一方で、窒素付加の有意な単独影響および高 CO<sub>2</sub> 処理と窒素付加の有意な交互作用は認められなかった。

育成 CO<sub>2</sub> 濃度における純光合成速度(*A*)に対して、CO<sub>2</sub> および窒素付加の有意な影響は認められなかった(表-1)。一方で、蒸散速度(*E*)、気孔コンダクタンス(*G<sub>s</sub>*)、*A<sub>max</sub>*、*V<sub>cmax</sub>*、光化学系 II の実効量子収率( $\Phi_{PSII}$ )、光化学系 II の最大量子収率(*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*)、光化学消光(*qP*)および電子伝達速度(*ETR*)は高 CO<sub>2</sub> 処理によって有意に低下した。また  $\Phi_{PSII}$ 、*qP* および *ETR* は窒素付加によって有意に増加した。いずれのパラメーターに対しても高 CO<sub>2</sub> と窒素付加の有意な交互作用は認められなかった。

**考察**

好氣的条件下における葉からのメタン放出に関するメカニズムは、まだ解明されていないが、いくつかの研究事例がある。それらによると、メタンの放出速度は温度上昇に伴って増加する(7, 8)。また、紫外線照射に

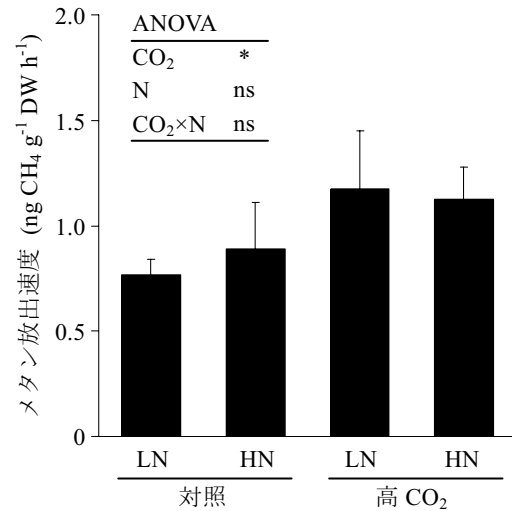


図-1 オノエヤナギの葉のメタン放出速度に対する高 CO<sub>2</sub> と窒素負荷の影響。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。ANOVA: \* *p*<0.05, ns 有意差なし

よってメタン放出速度が著しく増加することが知られており(10, 13), McLeod ら(10)は葉における活性酸素がメタン放出の原動力になっている可能性を指摘している。本研究におけるオノエヤナギの場合、高 CO<sub>2</sub> 処理によって気孔閉鎖に伴う蒸散速度の低下が認められたため、葉温が増加しやすい状況であったと考えられる。一方で、高 CO<sub>2</sub> 処理によって *A<sub>max</sub>* や *V<sub>cmax</sub>* の低下に起因する光合成活性の低下が引き起こされた。またクロロフィル蛍光反応のパラメーターである  $\Phi_{PSII}$  や *qP* も高 CO<sub>2</sub> 処理によって低下しており、葉において得られた光エネルギーの、光合成反応への利用効率が低下した。したがって、

表-1 オノエヤナギの葉の光合成およびクロロフィル蛍光の各パラメーターに対する高 CO<sub>2</sub> と窒素付加の影響

	対照		高CO <sub>2</sub>		ANOVA		
	LN	HN	LN	HN	CO <sub>2</sub>	N	CO <sub>2</sub> ×N
<i>A</i> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	14.9 (1.4)	16.1 (1.2)	16.8 (0.4)	16.0 (2.9)	ns	ns	ns
<i>E</i> (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	4.4 (0.3)	4.3 (0.4)	2.9 (0.4)	2.2 (0.9)	***	ns	ns
<i>G<sub>s</sub></i> (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.28 (0.02)	0.30 (0.06)	0.19 (0.02)	0.14 (0.05)	**	ns	ns
<i>A<sub>max</sub></i> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	21.4 (2.4)	24.1 (2.1)	19.1 (2.2)	19.1 (3.8)	*	ns	ns
<i>V<sub>cmax</sub></i> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	65.7 (6.9)	74.3 (10.9)	57.3 (12.6)	59.3 (9.4)	*	ns	ns
<i>J<sub>max</sub></i> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	89.4 (9.5)	105.6 (10.0)	90.7 (5.6)	87.8 (16.4)	ns	ns	ns
$\Phi_{PSII}$	0.18 (0.01)	0.22 (0.01)	0.16 (0.01)	0.19 (0.03)	*	*	ns
<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i>	0.82 (0.01)	0.82 (0.01)	0.80 (0.00)	0.80 (0.01)	*	ns	ns
<i>F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>'</i>	0.40 (0.01)	0.44 (0.03)	0.42 (0.02)	0.45 (0.03)	ns	ns	ns
<i>qP</i>	0.44 (0.03)	0.49 (0.01)	0.38 (0.02)	0.43 (0.03)	**	*	ns
<i>qN</i>	0.82 (0.02)	0.77 (0.04)	0.77 (0.03)	0.71 (0.06)	ns	ns	ns
<i>ETR</i> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	89.7 (3.5)	111.2 (6.9)	80.3 (6.6)	97.3 (12.9)	*	*	ns

*A*, 純光合成速度; *E*, 蒸散速度; *G<sub>s</sub>*, 気孔コンダクタンス; *A<sub>max</sub>*, CO<sub>2</sub> 飽和時の最大光合成速度; *V<sub>cmax</sub>*, 最大カルボキシル化速度; *J<sub>max</sub>*, 最大電子伝達速度;  $\Phi_{PSII}$  光化学系 II の実効量子収率; *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*, 光化学系 II の最大量子収率; *F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>'*; *A* の測定条件における量子収率; *qP*, 光化学消光; *qN*, 非光化学消光; *ETR*, 電子伝達速度

*A*, *E* および *G<sub>s</sub>* は育成 CO<sub>2</sub> 濃度 (対照区: 360 μmol mol<sup>-1</sup>, 高 CO<sub>2</sub> 区: 720 μmol mol<sup>-1</sup>) における値である

ANOVA \* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01, \*\*\* *p*<0.001, ns 有意差なし

表-2 他樹種のメタン放出速度とオノエヤナギのメタン放出速度の比較(9)

樹種	メタン放出速度 (ng g <sup>-1</sup> DW h <sup>-1</sup> )
スギ ( <i>Cryptomeria japonica</i> )	39.1
カラマツ ( <i>Larix kaempferi</i> )	31.3
シラカシ ( <i>Quercus myrsinifolia</i> )	22.6
ヨーロッパブナ ( <i>Fagus sylvatica</i> )	21.6
ウダイカンバ ( <i>Betula maximowicziana</i> )	10.0
セイヨウトネリコ ( <i>Fraxinus excelsior</i> )	9.1
ミズナラ ( <i>Quercus crispula</i> )	9.1
オノエヤナギ [本研究] ( <i>Salix sachalinensis</i> )	0.8~1.2

オノエヤナギの葉において、光エネルギーが十分に処理されず、過剰なエネルギーによって活性酸素の発生量が増加した可能性がある。この葉温上昇と活性酸素の発生量増加が、高 CO<sub>2</sub> 処理によって葉からのメタン放出速度が増加した原因であると考えられる。

表 2 に、これまで報告されている木本植物からのメタン放出速度の測定結果をまとめた。生育環境や培養方法が異なるため、これらの値を直接比較することは難しいが、これまでに報告されたメタン放出速度が 9~39 ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> であったのに対して、本研究のオノエヤナギのメタン放出速度は 1 ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> 程度とかなり少ないものであった。したがって、オノエヤナギを用いたバイオエタノール生産におけるメタン放出のリスクは、将来の高 CO<sub>2</sub> 環境で若干高くなる可能性があるが、基本的には低いものであると考えられる。

### 謝 辞

本研究は、日本学術振興会特別研究員奨励費(代表: 渡辺誠, 北岡哲)と基盤研究 B(代表: 小池孝良)の一部支援を得た。また実験データの採取にあたり、北海道大学大学院農学院の兼俊壮明氏と日向潔美氏に助力いただいた。記して感謝する。

### 引用文献

(1) Dueck T. A., de Visser R., Poorter H., Persijn S., Gorissen A., de Visser W., Schapendonk A., Verhagen J., Snel J., Harren F. J. M., Ngai A. K. Y., Verstappen F., Bouwmeester H., Voeselek L. A. C. J. and van der Werf A. (2007) No evidence for substantial aerobic methane emission by terrestrial plants: a <sup>13</sup>C-labelling approach. *New Phytol.*

175: 29–35.

- (2) Dueck T. and van der Werf A. (2008) Are plants precursors for methane? *New Phytol.* 178: 693–695.
- (3) Galloway J. N., Dentener F. J., Capone D. G., Boyer E. W., Howarth R. W., Seitzinger S. P., Asner G. P., Cleveland C. C., Green P. A., Holland E. A., Karl D. M., Michaels A. F., Porter J. H., Townsend A. R., Vöörsmarty C. J. (2004) Nitrogen cycles: past, present and future. *Biogeochemistry* 70: 153–226
- (4) 北海道開発局 (2008) 木質系バイオマス資源のエタノール化への取組。局長定例記者会見配付資料 (URL <http://www.hkd.mlit.go.jp/kyokutyuu/h20/0416/02.pdf>).
- (5) IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2001) *Climate change 2001: The scientific basis*. University Press, Cambridge, UK and New York.
- (6) 石塚成宏・高橋正通 (2006) 森林生態系は地球温暖化を促進するか? 抑制するか? —Nature誌に掲載された「植物体によるメタン発生」の追試験結果と問題点, および今後の研究課題—。森林科学 47: 67–69.
- (7) Keppler F., Hamilton J. T. G., Braß M. and Röckmann T. (2006) Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* 439: 187–191.
- (8) Keppler F., Hamilton J. T. G., McRoberts W. C., Vigano I., Braß M. and Röckmann T. (2008) Methoxyl groups of plant pectin as a precursor of atmospheric methane: evidence from deuterium labelling studies. *New Phytol.* 178: 808–814.
- (9) Kitaoka S., Sakata T., Koike T., Tobita H., Uemura A., Kitao M., Maruyama Y., Sasa K. and Utsugi H. (2007) Methane emission from leaves of larch, birch and oak saplings grown at elevated CO<sub>2</sub> concentration in northern Japan —preliminary study—. *J. Agric. Meteorol.* 63: 201–206.
- (10) McLeod A. R., Fry S. C., Loake G. J., Messenger D. J., Reay D. S., Smith K. A. and Yun B. -W. (2008) Ultraviolet radiation drives methane emissions from terrestrial plant pectins. *New Phytol.* 180: 124–132.
- (11) Parsons A. J., Newton P. C. D., Clark H. and Kelliher F. M. (2006) Scaling methane emissions from vegetation. *Trends Ecol. Evol.* 21: 423–424.
- (12) Sharkey T. D., Bernacchi C. J., Farquhar G. D. and Singsaas E. L. (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves. *Plant Cell Environ.* 30: 1035–1040.
- (13) Vigano I., van Weelden H., Holzinger R., Keppler F., McLeod A. and Röckmann T. (2008) Effect of UV radiation and temperature on the emission of methane from plant biomass and structural components. *Biogeosciences* 5: 937–947.