

大阪湾圏域の海域環境再生・創造に関する 研究助成制度（令和2年度実施）成果発表会

大阪湾広域臨海環境整備センター

事務局：特定非営利活動法人 瀬戸内海研究会議

令和3年4月26日（月） 13：30～16：30

三宮研修センター 6階 605号室

目 次

1. 流域圏の土地利用変遷および洪水流出を考慮した大阪湾への長期栄養塩流出量の推定（その2）
齋藤 光代 岡山大学 学術研究院 環境生命科学学域 1
2. 都市系面源由来マイクロプラスチックの海域への負荷量推定
中尾 賢志 大阪市立環境科学研究センター 5
3. 赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定と、赤潮動態予測法の開発（その2）
植木 尚子 岡山大学 資源植物科学研究所 9
4. 大阪湾から発見された寄生生物が麻痺性貝毒原因プランクトンのブルーム動態へ与える影響の解明
西谷 豪 東北大学大学院 農学研究科 13
5. DNAメタバーコーディングによる大阪湾の動物プランクトンモニタリング手法の開発（その2）
梅原 亮 広島大学 環境安全センター 17
6. 生理学的基盤を指標としたイカナゴの新しい資源管理法の確立（その2）
阿見彌 典子 北里大学 海洋生命科学部 21
7. 大阪湾湿地帯における有機物分解システムの解明—湿地帯生物の難分解性有機物分解能の把握と湿地帯健康度評価の試み（その2）
劉 文 京都大学 地球環境学堂 25

流域圏の土地利用変遷および洪水流出を考慮した 大阪湾への長期栄養塩流出量の推定（その2）

代表研究者：齋藤光代（岡山大学学術研究院環境生命科学学域・准教授）

共同研究者：岩田 徹（岡山大学学術研究院環境生命科学学域・准教授）

王 崑陽（広島大学大学院先進理工系科学研究科・博士後期課程）

白石朗光（岡山大学大学院環境生命科学研究科・博士前期課程）

〔研究目的〕

大阪湾に対する栄養塩流出量の長期変遷については、これまで原単位法¹⁾や公共用水域調査結果に基づく推定²⁾が行われてきたが、最も汚濁が顕著であったと考えられる1960～70年代にかけて、洪水時を含めてどの程度の栄養塩が大阪湾に流出したかは従来明らかにされておらず、洪水時に増大すると考えられる懸濁態栄養塩の起源や供給域に関する解析も不十分である。そこで本研究では、大阪湾に流入する一級河川の一つである大和川流域を対象とし、準分布型水文水質モデル（SWAT）を用いて実測データの整備が不十分な1970年代以前の栄養塩流出量を復元し、過去50年間を超える長期的な変化を推定することを目的とした。そのため、2年目に該当する今年度は、（1）週1回の水質モニタリングの継続に加えて、大和川支流の佐保川において洪水時の流量・栄養塩濃度変化を把握するとともに、（2）土地利用を考慮した日単位での窒素流出量の推定を行い、（3）窒素に加えてリンを含む流出量の長期変遷の推定を行った。

〔研究方法〕

1. **対象地域**：大和川は奈良盆地および大阪府南部を集水域とし、流域面積は1,077km²、本流の流下距離は68km、流域の年平均降水量は1,300mmである（図-1(a)）。大和川では1970年代に最も汚濁が深刻であったとされるが、近年は環

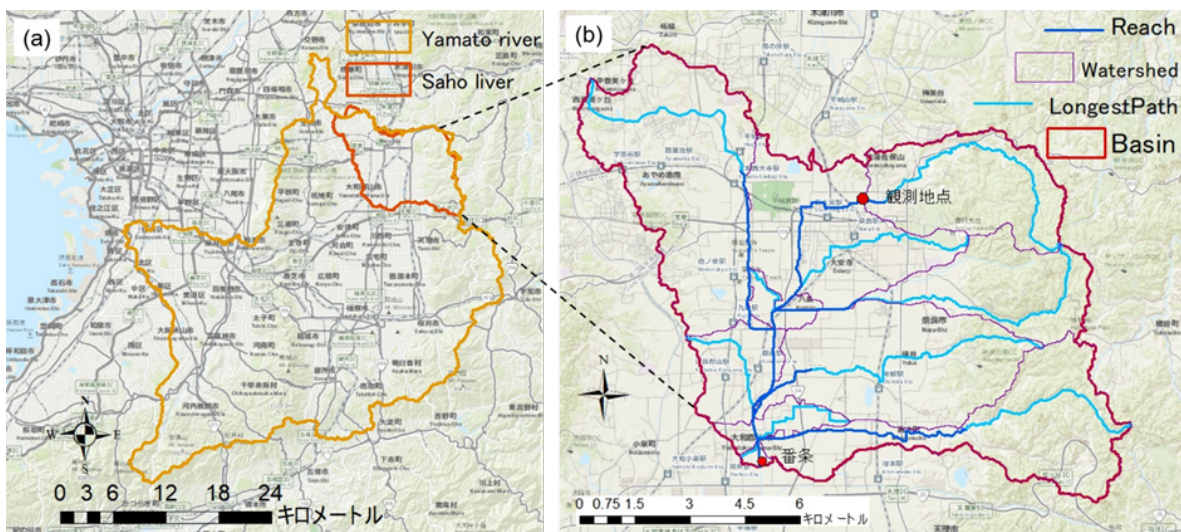


図-1 大和川流域と佐保川流域の位置(a)および佐保川の番条観測所と実測地点の位置(b))

境基準値を下回るまでに回復してきている。また、1970～2010年代にかけての土地利用変化をみると、特に堺市および奈良市を中心に農地（主に水田）から都市への変化が最も著しい³⁾。一方で、主要な土地利用の一つは森林であり、流域の約40%を占めている。また、特に洪水時の時間単位での水位、流量、および水質の変化を確認するため、調査対象として、大和川の支川の一つである佐保川を設定した（図-1(b)）。佐保川流域は大和川流域の北東部に位置し、流域面積は129km²で大和川流域の約12%を占め、流路延長は19kmであり、奈良市石切峠を水源とし、若草山を回り込み奈良盆地へ流出後、奈良市街地を流下し大和川に合流する。また、流域土地利用（平成28年時点）は、水田が16%、畑地が1.4%、森林が33%、市街地（建物用地、道路・鉄道、その他の用地を含む）が46%であり、市街地の占める割合が最も大きい。

2. 高頻度現地観測データの採取および試料分析：国交省による水質データを補完するため、大和川本流の堺、大和川の支流で奈良市を經由する佐保川および秋篠川の3地点において、週1回の頻度で採水を実施した。また、洪水時を含むモニタリングとして、佐保川において水圧センサーおよび濁度計を河床に設置し、河川の水位および濁度を10分間隔でモニターするとともに、水位の異なる時期に流量の計測を実施し、水位－流量関係式（H-Q式）を作成した。また、2020年7月から10月にかけて発生した数回の降雨イベント時に現地での集中観測を実施し、流量の計測に加えて数時間おきに採水を実施した。現地で採取した水試料については、栄養塩自動分析装置により溶存無機態窒素（硝酸態窒素：NO₃-N、亜硝酸態窒素：NO₂-N、アンモニア態窒素：NH₄-N）および溶存無機態リン（PO₄-P）の定量分析を行った。また、洪水時の水試料については、懸濁物質（Suspended Solids: SS）濃度の測定、および質量分析計による懸濁態有機物（Particulate organic Matter: POM）の窒素・炭素量および窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）、炭素安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）の分析を行った。

3. 水文水質モデル解析：大和川流域から大阪湾への長期栄養塩流入量を推定するにあたり、準分布型流域水文水質モデルであるSWAT（Soil Water Assessment Tool）⁴⁾を使用した。大和川流域全体における水文応答単位（Hydrologic Response Units: HRU）は3,300個に、小流域は51個に設定した。佐保川流域については、HRUを417個、小流域を10個とした。各種パラメータのキャリブレーションはSWAT-CUPを使用してSUFI2法によって行い、キャリブレーションの可否はNash-Sutcliffe efficiency (NSE)、Percent bias (PBIAS)、およびRMSE-observations standard deviation ratio (RSR)の指標を用いて評価した⁵⁾。解析に用いる既存データとして、大和川の堺および柏原観測所における最近約40年間の流量・水質データを、佐保川については番条観測所における2003～2010年の期間の流量データを収集し、同期間の気象観測データを収集した。また、流域の標高、土壌、土地利用データに加え、都市部のインフラ情報として、大阪府および奈良県における下水道普及率、下水処理区・処理量に関する情報を収集し解析に用いた。

〔結果と考察〕

(1) 洪水時を含む高頻度流量・栄養塩濃度

変化：本流下流部（堺）、支川の佐保川および秋篠川における 1 週間間隔での栄養塩濃度の変化に加え、佐保川において洪水時の集中観測を実施し、河川水位と流量の関係式（H-Q 式）を構築するとともに（図-2）、洪水イベント期間中の栄養塩および SS 濃度の数時間単位での変動を確認した（図-3）。以上の結果は、従来の月 1 回～数か月に 1 回の頻度の水質測定では捉えられないものであり、特に、洪水時の流量変化およびそれに対応する濃度変化の把握は栄養塩流出量の推定精度向上に大きく貢献した。

(2) 日単位および時間単位での流量・栄養塩

流出量の推定：洪水時を考慮した栄養塩流出量の推定を行うため、佐保川下流の国土交通省番条観測所および本研究で現地観測を行った実測地点を対象に、従来の日単位に加えて時間単位での流出解析を実施した。栄養塩流出量の解析は、今回は硝酸態窒素（ $\text{NO}_3\text{-N}$ ）に着目して実施した。その結果、洪水時を含む日・時間単位流量および日単位での $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量を比較的高い再現性で推定することができた（図-4）。今後は時間単位での栄養塩および SS 流出量の評価を行うことが課題である。また、すでに大和川本流においても日単位・時間単位での流量の推定を実施しており、今後大和川本流における高頻度栄養塩濃度データの分析が終了次第、栄養塩流出量の推定に着手することが可能な状況である。

(3) 大阪湾への長期栄養塩流出量変遷の推定

大和川から大阪湾への長期栄養塩流出量を復元するため、実測データの整備が不十分な 1970 年代以前を含む 1960 年～2018 年までを解析期間に設定し、昨年度実施した総窒素（TN）流出量に加え、総リン（TP）流出量についても長期変化の推定を行った。より詳細な下水処理量の情報を加味し、流域の土地利用およ

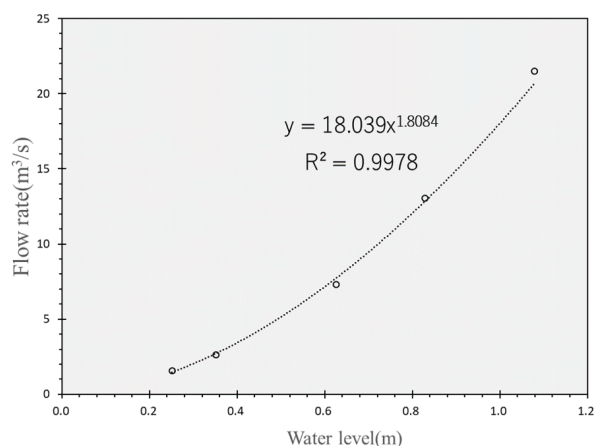


図-2 佐保川実測地点における水位-流量関係式（H-Q 式）

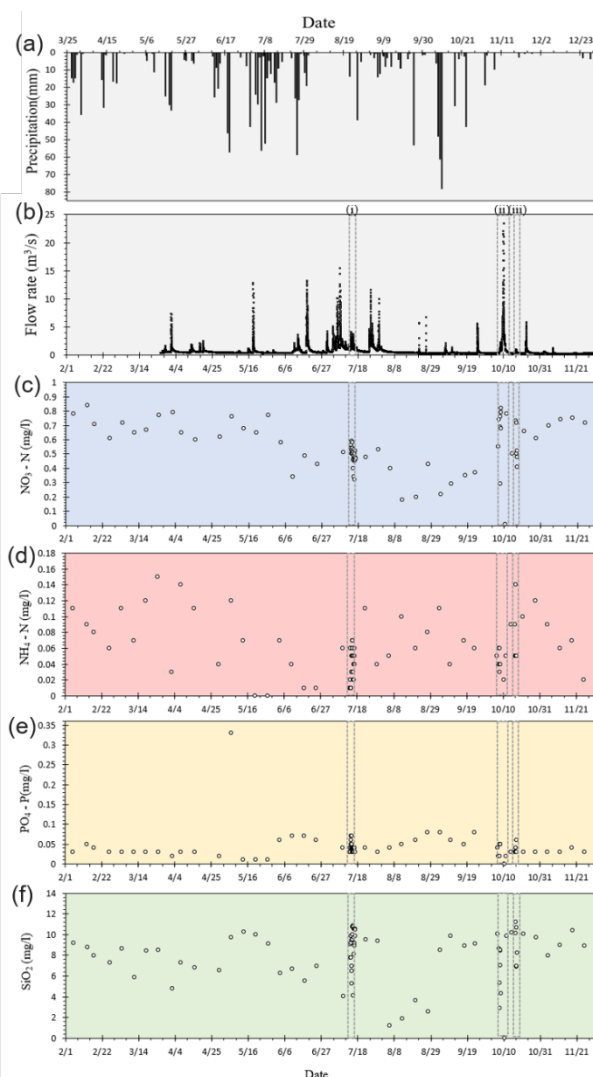


図-3 佐保川実測地点における降水量 (a)、河川流量 (b)、栄養塩濃度 (c: $\text{NO}_3\text{-N}$, d: $\text{NH}_4\text{-N}$, e: $\text{PO}_4\text{-P}$, f: $\text{SiO}_2\text{-Si}$) の変化

び下水道整備状況の変化にあわせて3つの期間（①下水道未整備～整備初期：1963～1984年、②整備中期：1985～2008年、③整備後期：2009～2018年）に分けてSWATモデルの検証を実施した。その結果、TNおよびTPともに1970年代に流出量がピークとなり、1980年代半ば以降は減少に転じていると推定され、今回の解析結果から、TPについても概ねTN流出量と同様の長期変化パターンを示していることが明らかになった（図-5）。また、TNとTPの空間的な流出量の違いには、支流単位での土地利用や供給源（点源、面源負荷）の違い、およびそれらの変遷が影響していると考察された。

謝辞

本研究の実施にあたり、現地での高頻度採水には佐保川清掃対策委員会の皆様、秋篠川桜の会の皆様、および雑魚寝館の亀井館長と採水チームの皆様にご協力をいただき、SWAT

モデルの解析に用いた流域下水道データについては、奈良県流域下水道センターおよび大阪府南部流域下水道事務所よりご提供をいただきました。以上を記し、深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 中辻啓二ほか（2003）大阪湾における汚濁負荷量の総量規制施策が水質保全に与えた効果の科学的評価．土木学会論文集，741，VII-28，69-87．
- 2) 中谷祐介ほか（2011）大阪湾に流入する陸域負荷の実態・変遷と海域環境の変化．土木学会論文集 B2（海岸工学），67(2)，I_886-I_890．
- 3) 王 崑陽・齋藤光代ほか（2019）SWATモデルによる都市化流域での地下水涵養量の長期的な変動評価－森林の成長及び都市化段階を考慮した大和川流域での例－．Kansai Geo-Symposium 2019 論文集．
- 4) SWAT (Soil & Water Assessment tool) (<https://swat.tamu.edu/>)（2021.3.13 閲覧）
- 5) Moriasi, D., et al. (2007) Model evaluation guidelines for systematic quantification of accuracy in watershed simulations. Transactions of the ASABE, 50, 3, 885–900.

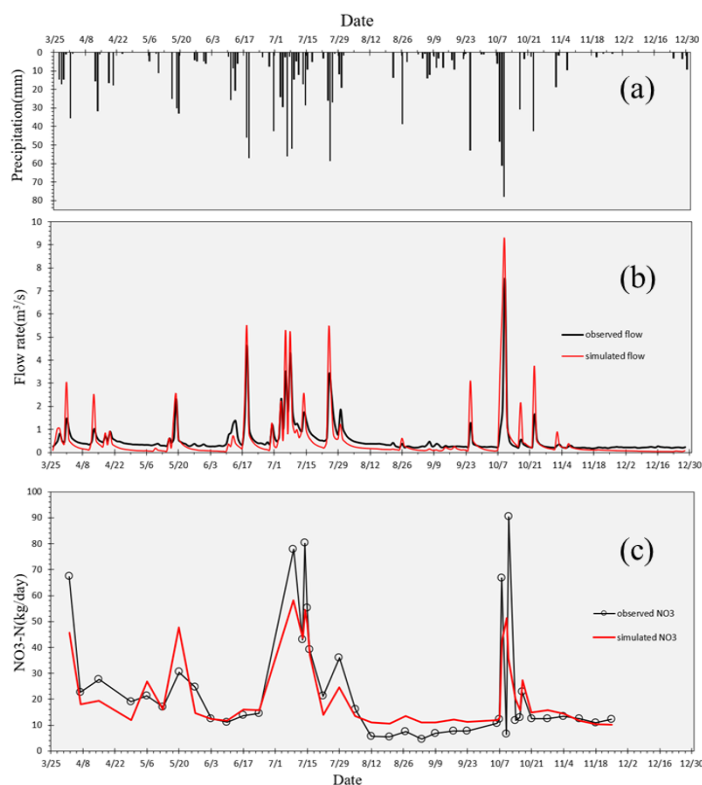


図-4 佐保川実測地点における降水量(a)、日単位流量(b)、および日単位 NO₃-N 流出量(c)のキャリブレーション結果

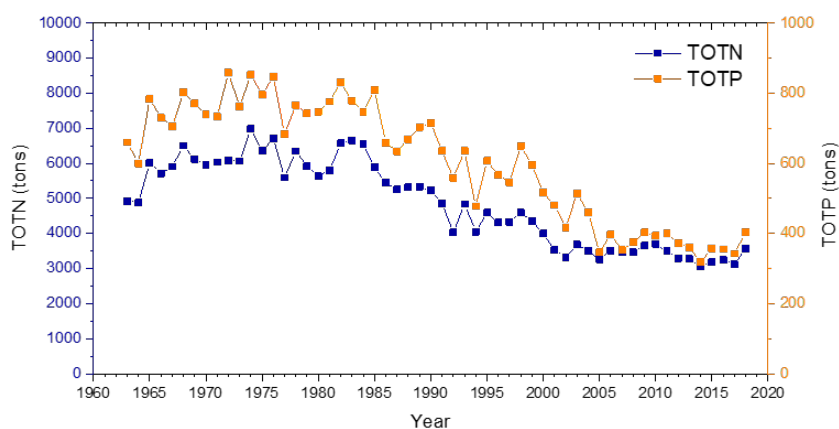


図-5 大和川から大阪湾への TN、TP 流入量の長期変遷

都市系面源由来マイクロプラスチックの海域への負荷量推定

○中尾 賢志¹⁾，秋田耕佑¹⁾，榊元 慶子¹⁾，尾崎 麻子²⁾，奥田哲士³⁾

1) 大阪市立環境科学研究センター

2) (地独) 大阪健康安全基盤研究所

3) 龍谷大学

1. 本研究の目的

マイクロプラスチック（以下，MPs）は 5mm 未満の微少なプラスチックのことで POPs（Persistent Organic Pollutants：残留性有機汚染化学物質）を吸着・吸収することから，その環境中の動態について多くの研究がなされている。これまで海域への MPs 供給は沿岸域で漂着ごみ中のプラスチックごみが紫外線や波浪といった物理的な力により微細化するという説明がなされてきたが，河川や下水から MPs が検出されることから陸域でも風雨や紫外線によって建物敷地や道路上等に放置されたプラスチック製品が微細化し，MPs 化することが指摘されている。MPs の海洋調査により海洋中の MPs の総量は 51 兆個とされている。しかし，近年の全球的な調査によってこの総量は全体の 1%と言われており，残りの 99%は行方不明である「ミッシングプラスチック」と呼ばれている。この原因として，主として海洋での MPs 研究は海洋表層を対象としていること，および海洋表層での MPs の採取は 300~350 μ m の目開きのプランクトンネットが用いられることが多く，それよりも小さい MPs の把握がなされていないことが考えられる。また，陸域起源の MPs がミッシングプラスチックにどの程度寄与しているかといったデータは今後の海洋中 MPs の総量予測に寄与すると考えられる。そこで本研究は比較的 MPs 負荷が高いであろう都市域からの 10 μ m 以上の MPs の海域への負荷量を推定することを目的とする。

2. 実験材料および方法

2.1 調査フィールドの選定

調査フィールドは大阪市全域とした。大阪市の人口および面積は令和 3 年 1 月 1 日現在約 275 万人，225.30 km²である。北部には神崎川と新淀川が東から西へ流下し，南部の大和川も同様に東から西へ流下している。

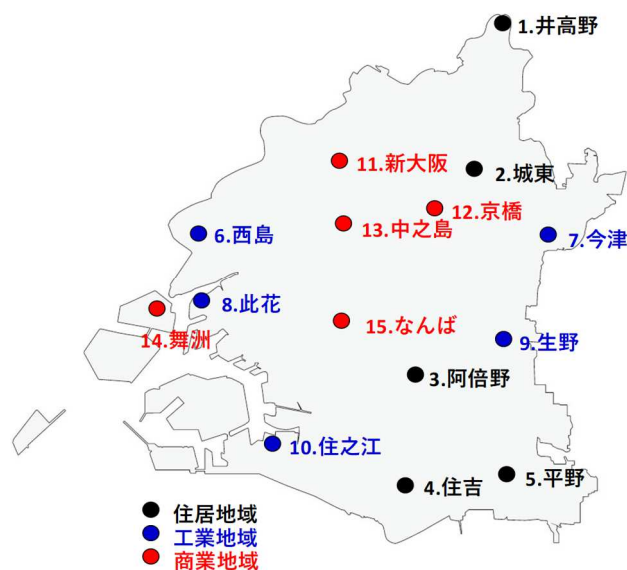


図 1 道路塵埃採取地点（大阪市）

2.2 試料採取

住居地域、工業地域、商業地域それぞれ5地点を任意に選定(図1)し、令和2年11月17~24日に道路塵埃をほうきとちりとりで採取した(計15地点)。採取による微細なプラスチックのコンタミネーションを最小限にするため、ほうきの毛はシダ製で、ちりとりはトタン製のものをを用い、採取する度に新品と交換した。採取した塵埃はガラス容器に保管した。採取方法は、道路の両脇の側溝が暗渠になっている道路(写真1)を選び、側溝の暗渠上部の塵埃をほうきとちりとりで採取し、道路の長さと幅を測定した。



写真1 塵埃を採取した道路(9. 生野)

2.3 道路塵埃の性状分析

採取した道路塵埃(写真2)は、実験室に持ち帰ってから目開き5mmの篩をとおり、篩を通過した塵埃の含水率を測定した。



写真2 採取した道路塵埃

2.4 MPsの抽出

試料(道路塵埃)約10mgを300mLのビーカーにとり、30%過酸化水素150mLを加えた。有機物の分解を促進するため硫酸鉄七水和物を50mg加えてフェントン反応を生じさせた。反応中はアルミ箔を被せ、反応が終了する(酸素の発生が目視で確認できなくなる)まで放置した。反応終了後、反応液を10μmの簡易プランクトンネットにとり、反応液と粒子を分離した。分離した粒子を5.3M 塩化ナトリウム溶液100mLが入った200mLビーカーに洗い流し、マグネチックスターラーで2分間攪拌後、3時間静置した。静置後、ビーカー内の上澄み液100mLを試験管に分取し、5.3M 塩化ナトリウム溶液100mLを加えて再度2分間マグネチックスターラーで攪拌後、3時間静置した。静置後、ビーカー内の上澄み液100mLを試験管に分取した。分取した上澄み液を2000rpmで10分間の条件で遠心分離し、上澄み液を目開き303μm、100μm、10μmの直径8mmの円形金属製フィルターを用いて目開きが広いフィルターから順にアスピレーターにより吸引ろ過した。ろ過にはアドバンテック東洋(株)製の減圧ろ過用フィルターホルダーKGS-04を3システム用いておこなった。本ろ過システムによるフィルター上の捕捉範囲は直径4mmの円形である。ろ過後のフィルターはほこりの混入を防ぐため蓋付きシャーレ内に保管し、室温にて乾燥させた。

2.5 MPsの同定

乾燥したフィルター上に捕捉した粒子を顕微 FTIR（Thermo Scientific 製 Nicolet iN10 MX）（反射法）で観察し、赤外吸収スペクトルのプレビュー機能を用いて、粒子一つ一つがプラスチックかどうかを観察した。スペクトルの確認後、ライブラリー（データベース）と照合し、プラスチックのスペクトルとの一致率が 60%以上のものをプラスチックと同定し、長径と短径を測定し、観察画像（写真 3）とスペクトルを記録した。記録した粒子数は 504 個であった。

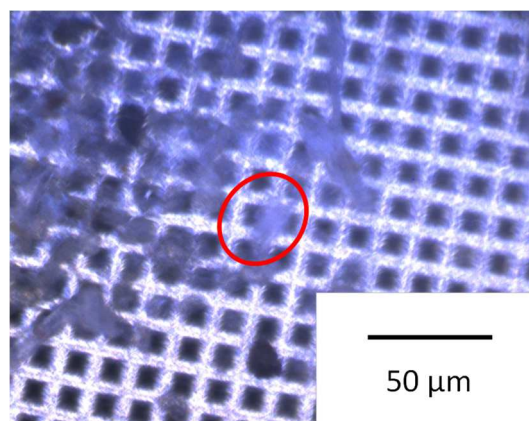


写真 3 顕微 FTIR でプラスチックと同定した粒子（赤丸内：ポリエチレン）

3. 結果および考察

3.1 検出された MPs の特徴

3.1.1 大きさ

検出された MPs の大きさ（MPs の長径と短径の算術平均値）の分布は、住居地域全体の算術平均は $123\ \mu\text{m} \pm 134\ \mu\text{m}$ ($n=148$)、工業地域は $153\ \mu\text{m} \pm 173\ \mu\text{m}$ ($n=155$)、商業地域は $156\ \mu\text{m} \pm 181\ \mu\text{m}$ ($n=201$) となった。住居地域の MPs が他の 2 地域よりも大きさは小さく、ばらつきも小さい傾向にあった。住居地域の MPs の大きさの平均値が小さい理由は不明であるが、ばらつきが小さい理由は、住居地域は工業地域や商業地域に比べて MPs の発生源と考えられる自動車や人の往来が少ないので、住居地域の 5 地点の MPs の大きさの平均値の差が小さかったからだと考えられる。

3.1.2 形状

形状は便宜上 3 種類（フラグメント、MFs（短）、MFs（長））に分類した。MPs のアスペクト比（長径／短径）が 10 以上で、長径が $500\ \mu\text{m}$ 未満は MFs（短）、 $500\ \mu\text{m}$ 以上を MFs（長）とし、それ以外は全てフラグメントとした。

住居地域から検出された MPs の形状において、フラグメントと MFs の割合の採取地点間の差は大きくなかったが、工業地域と商業地域の差は大きかった。この理由も大きさと同じく、住居地域よりも工業地域や商業地域の方が人や自動車の往来が激しいことが考えられる。

3.1.3 種類

住宅地域において、MPs の種類割合（組成）の各採取地点間の差は小さいのに対し、工業地域と商業地域では各採取地点のプラスチックの種類や割合がまちまちで、用途地域としての規則性は見いだせなかった。なお、MFs のうち 81.6%は PET（polyethylene terephthalate：ポリエチレンテレフタレート）であり、何らかの繊維由来であると考えられる。

海洋に浮遊するおおよそ $300\mu\text{m}$ 以上のマイクロプラスチックは PE (polyethylene : ポリエチレン) や PP (polypropylene : ポリプロピレン) が多いという報告があるが、報告者の下水処理場における MPs の挙動分析の結果を含め、道路塵埃中には PE と PP の共重合体の割合が高い。これは PP の剛性や耐熱性を高めるため、PE と共重合させ、自動車部品や家電部品、日用品、その他の工業用途に幅広く使用するためであるとされる。このように、陸域で発生する MPs には PET の他に、PE と PP の共重合体が多く検出され、また、自動車部品由来と考えられる ABS (acrylonitrile butadiene styrene) 樹脂も検出される。

3.2 MPs の面源および海域への負荷量の推定

住宅地域と工業地域、商業地域の道路における面源負荷量を表 1 に示す。上記の各用途地域の MPs 面源負荷量を合計し、大阪市内の「道路面積／全用途地域面積」($33.6\text{km}^2 / 211\text{km}^2$) を乗じて大阪市内の MPs ($10\mu\text{m}$ 以上) 道路面積負荷量を算出すると 4.1×10^{12} 個 (4.1 兆個) となる。筆者らの研究による合流式下水道における下水処理場の MPs ($20\mu\text{m}$ 以上) 除去率 95.4% を用い、前述の MPs 道路面積負荷量 4.2×10^{12} 個に流出率「 $1 - 0.954 = 0.046$ 」を乗じることにより 海域へ流出する MPs は 1.9×10^{11} 個 (1900 億個) と推計された。ただし、本推計の時間軸は不明であり、雨天時に全て海域へ流出するのか、それとも長い年月をかけて流出するのかは今後検討すべき課題である。

表 1 住宅地域と工業地域、商業地域における面源負荷量

用途地域	道路 1m^2 当たりの MPs の数 (LMPs (Particles / m^2))	LMPs $\times$ 各用途地域面積 (Particles)
住宅	4.1×10^4	3.8×10^{12}
工業	4.0×10^5	1.7×10^{13}
商業	6.9×10^4	5.2×10^{12}

※LMPs : Load of Microplastics

4. まとめ

1. 検出された MPs の大きさについて、住居地域全体の算術平均は $123 \pm 134\mu\text{m}$ 、工業地域は $153 \pm 173\mu\text{m}$ 、商業地域は $156 \pm 181\mu\text{m}$ となった。
2. 住居地域から検出された MPs のフラグメントと MFs の割合の採取地点間の差は工業地域と商業地域と比較して大きくなかったが、工業地域と商業地域での採取地点間の差は大きかった。この理由として、住居地域よりも工業地域や商業地域の方が人や自動車の往来が激しいこと、および地域内の用途が多様なことが考えられた。
3. MPs の種類割合 (組成) は住宅地域においては、各地点でそれほど差はないのに対し、工業地域と商業地域は各地点間にプラスチックの種類や割合に規則性はなかった。
4. 海域に流出すると考えられる大阪市内の道路塵埃中の $10\mu\text{m}$ 以上の MPs 数は 1.9×10^{11} 個 (1900 億個) と推計された。

赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定と、 赤潮動態予測法の開発（その2）

植木 尚子

岡山大学 資源植物科学研究所・准教授

[研究背景・目的]

『赤潮』は、真核性単細胞藻である赤潮原因藻が形成した群集である。赤潮原因藻には多くの種が知られ、赤潮構成種により、魚類弊死を惹起したり、産生する毒性物質が食用二枚貝に生体濃縮され、食中毒の原因となるなど、生態系及び水産業に影響をもたらす。通常時には、赤潮原因藻は低い細胞密度で他の様々な藻類と共存するが、何らかの原因により一種～少数種という限定された赤潮原因藻が増殖し、集積・優占することが多い。

現在までの生態学的研究により、水温・塩度・栄養塩濃度などの物理化学的因子が赤潮動態に与える影響について知見が蓄積されており、自然界における赤潮発生頻度は、高栄養塩環境や水温上昇とよく相関することが明らかになっている。一方で、環境で赤潮が形成された場合、その条件を実験室で人工的に再現して赤潮原因藻を培養しても、観察されるような高密度での増殖は観察されない場合が多い。つまり、上述の物理化学的要因以外に、未だに特定されていない異常増殖の誘発因子が存在するのでは？と推測される。

私たちは、この『未知の赤潮誘発因子』の候補として藻類に随伴する環境細菌に着目した。本研究では、特に大阪湾圏で発生が問題となっている魚類弊死を引き起こすヘテロシグマ（学名 *Heterosigma akashiwo*）と、二枚貝への毒性物質蓄積の原因となるアレキサンドリウム（学名 *Alexandrium tamarense*）に注目し、この2種の生理生態に影響を与える海洋細菌の単離同定を行うことを計画した。特に、これら2種の増殖を促進する細菌は、ヘテロシグマ赤潮およびアレキサンドリウム タマレンセ赤潮を誘発する因子である可能性がある。この可能性に着目し、

Step 1：環境中で赤潮原因藻に随伴する細菌を単離同定

Step 2：赤潮原因藻増殖を促進する細菌を同定する

Step 3: これらの環境細菌に特有な遺伝子配列を同定し、赤潮発生を予見する遺伝子診断マーカーとして利用する可能性を探る

Step 4: 実際にこれらの環境細菌が赤潮を惹起する可能性を探索することを計画した。

[研究方法]

R01年度は、Step1を行った。R02年度は、これらの細菌類より、ビタミンB類欠損や貧鉄状態など、貧栄養状態にて赤潮原因藻増殖を促進する細菌を特定し、そのメカニズムを理解することを目的として研究を行った（Step 2）。

1) 貧鉄・欠窒素・欠VB培地にてヘテロシグマ増殖を促進する細菌の同定

本研究では、広く使われている Modified SWM-III 培地を採用し、その組成を改変した培地での増殖を評価した。欠窒素培地では、硝酸塩を含まない SWM-III 培地を、欠 VB 培地では VB 類を含まない培地を作成した。また、貧鉄培地では、SWM-III 中の EDTA-Fe(水溶性が高く、遊離した Fe^{3+} が藻類に容易に取り込まれる)をリン酸鉄(III) (遊離性が低く、藻類に利用されにくい)に置換したものを作成した。これらを用いて、ヘテロシグマ、アレキサンドリウム、ヘテロカプサと昨年度単離同定した 47 株の細菌を共培養し、細菌の添加により藻類増殖が促進されるかを検討した。

また、細菌類が鉄キレート因子である siderophore 能を有するかを Chrome azurol S(CAS)による呈色反応にて検討した。さらに、一部の細菌株がオーキシンなど植物ホルモンとして知られる一群の低分子化合物を生合成するかを予備的に検討した。

[結果と考察]

1) 異なる栄養条件下におけるヘテロシグマ及び他の赤潮原因藻類の増殖能への細菌の影響

ヘテロシグマは、 $\text{VB}_1 \cdot \text{VB}_{12}$ 要求性である。また、EDTA-Fe(III)を含有する SWM-III 培地ではヘテロシグマは順調に増殖するが、同じ Fe^{3+} 当量濃度のリン酸化鉄存在下では、ほとんど増殖しない。一般に、 Fe^{3+} 塩の分子種によって、藻類による利用効率が大幅に異なるが、利用効率の悪い Fe^{3+} 塩の藻類による利用を siderophore が促進することが知られている。これらの条件下において単離細菌を添加した場合に、ヘテロシ

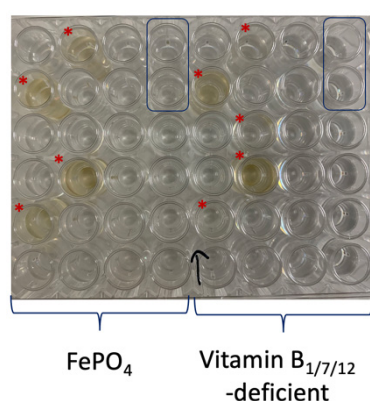


Fig 1 栄養欠損培地におけるヘテロシグマ増殖に対する海洋細菌株の影響

左側 4 縦列は貧鉄培地にて、右側 4 縦列は欠 VB 培地条件にて、各 well に異なる単離細菌株とヘテロシグマを培養し、三週間後に目視観察した (青四角で囲んだ well はヘテロシグマのみ培養)。顕著にヘテロシグマ増殖が観察される well では星印で示したように肉眼でも海水が褐色に着色したのが確認された。より軽微な増殖促進は、x10 の実体顕微鏡による観察で検証した。ほとんどの well においてヘテロシグマは四週間後に死滅したが、いくつかの well では六週間後にも高密度で生存し活発に遊泳するケースが見られた。

グマ増殖が変化するか (増殖促進は、添加した細菌がその代謝能により欠損成分を補完したためと考えられる) を検討した。単離株の多くが VB 欠損及び貧鉄状態を補完した (一部の結果を Fig 1 に示す)。貧窒素状態を顕著に補完する細菌は見られなかった。興味深いことに、VB を欠損した貧鉄培地においてヘテロシグマ増殖を促進する細菌が多く見られた。これらの細菌は、siderophore と VB 両方を産生する可能性が高い。

また、これらの細菌は、ヘテロシグマのみでなく、アレキサンドリウム とヘテロカプサの増殖も同じ培養培地条件で促進した。つまり、本研究で検討した限りでは、細菌類による増殖促進能は、藻類種特異性を示さなかった。

一方で、アレキサンドリウムへの増殖促進能については、興味深い知見を得た。本実験は、48-well プレートを用いて行ったことから、培養系のサイズは 1-mL 程度であ

った。培養容積が小さいため、ほとんどの藻類・細菌の組み合わせでは、培養開始後三週間から1ヶ月で、藻類増殖が停止し、その後溶藻→死滅という経過を辿る。しかし、特にアレキサンドリウム の場合、*Shewanella litoralis*#47 と *Roseicyclus marinus*#68 を添加した場合、1ヶ月以上の長期間にわたって藻類が増殖し、他の組み合わせに比べて藻類が遥かに高い密度まで増殖した。この原因は今のところ不明であるが、候補としては栄養塩類の効率的なリサイクルや、藻類の quorum sensing 関与分子、あるいは藻類増殖により蓄積する藻類への毒性物質の細菌による分解により、通常であれば存在する藻類増殖への密度障害が解除される可能性などが考えられる。つまり、これらの株については、VB 合成能および siderophore 合成能以外の何らかの代謝作用が藻類の継続的な増殖に寄与する可能性が高い。

2) 細菌による siderophore 合成能の評価

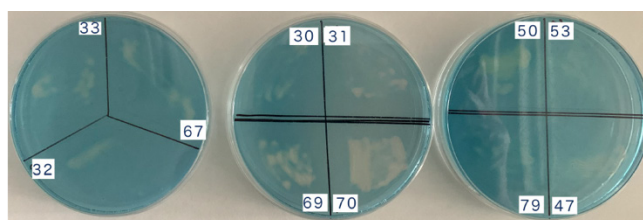


Fig 2 CAS assay による siderophore 検出 細菌により siderophore が産生されると、CAS に配位した Fe^{3+} が取り去られ、CAS の青色がオレンジ色に変化する。株により siderophore 産生能の多少があるのが検出できる。

細菌による siderophore 産生能を CAS 色素の変色を利用して検出した結果の一部を Fig 2 に示す。

興味深いことに、CAS 呈色反応では siderophore が検出される細菌で、藻類の増殖促進効果を持たないものが数株みられた。これまでの多くの研究により、細菌により合成された

siderophore が鉄あるいは他の金属イオンと結合した複合体は、藻類あるいは細菌が持つ特異的なレセプターにより取り込まれ、利用されることが知られる。CAS 呈色反応が陽性ながら藻類の増殖を促進しなかった細菌は、藻類がレセプターを持たないタイプの siderophore を産生する可能性がある。

3) siderophore と VB 類以外の特徴的な細菌代謝物について

藻類の増殖を促進する細菌として、siderophore 合成細菌や VB 類合成細菌に加えて、IAA を合成する細菌が知られる (IAA による藻類増殖促進の機序はいまだに不明)。特に、1) にて長期間にわたってアレキサンドリウム の高密度増殖を支持した *Shewanella litoralis* #47, 異なるサンプル地点より複数回にわたって得られたヘテロシグマ随伴細菌で、栄養欠損培地にてヘテロシグマ・ヘテロカプサ・アレキサンドリウム に増殖促進効果が見られた *Jannaschia cystaugens* #61、*Alteromonas marina* #62、*Planctobacterium marinum* #6 について、IAA などを含む植物ホルモン類の生

産能を調べた (Fig 3)。代表的な植物ホルモンとしては、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、エチレン、アブシジン酸、ブラシノステロイド、ジャスモン酸が知られている。これらのうち、今回計測に供した 5 株について、IAA およびサイトカイニン (ゼアチン= Fig3 tZ とイソペンテニルアデニン=Fig3 iPA) を産生するが、他の分子種は産生しないことが明らかになった。長期間にわたってアレキサンドリウム の高密度増殖を支持する *Shewanella litoralis* #47 と他の種の間、特徴的な違いは見られなかった。

[結論と今後の展望]

本研究により藻類増殖を特に貧栄養状態で促進する可能性の高い細菌が単離されたことは、一般的に言われる『富栄養状態』でなくとも赤潮を誘発しうる因子の候補として興味深い。

また、特に、近年、アレキサンドリウム の高密度化が報告されているが、その原因は依然明らかでない。本研究で同定した、長期間にわたり共培養系でアレキサンドリウム の高密度までの増殖を促進する細菌類が、自然界での高密度化に関係している可能性は、新年度の課題として検討する。

さらに本年度は、予備実験的に、藻類増殖を促進する細菌類の植物ホルモン産生能を検討したところ、分子種限定的に産生活性を確認した。報告は少ないものの、植物ホルモン、特に IAA は藻類増殖促進に関わるという報告がある。今後は、藻類と共培養した場合の植物ホルモン産生能について検討するとともに、増殖促進能を示さない細菌類 (JMIV_s (種未同定), *Neptuniibacter halophilus*, *Nereida ignave*, *Oceanospirillum sanctuarii*) との比較も行う。

本年度までの研究結果に基づき、来年度は、同定した細菌類による赤潮原因藻増殖促進の機序解明を試みる (Step2 続き)。また、増殖促進細菌のゲノム配列解読とアノテーションを完了し、特に藻類の増殖促進に関連する遺伝子群を特定する (Step3 進行中)。発生した赤潮サンプル中の細菌類 を 16S メタバーコーディング法にて検出同定すると共に、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析あるいは qPCR/qRT-PCR 法を利用して、赤潮サンプルに多く含まれる細菌由来遺伝子あるいは遺伝子転写物より、特に VBs 生合成系あるいは siderophore 合成系に関連する細菌由来遺伝子を検出することで、海水中に存在する『赤潮形成促進細菌』類の検出・定量への応用 (Step 4) を試みる。

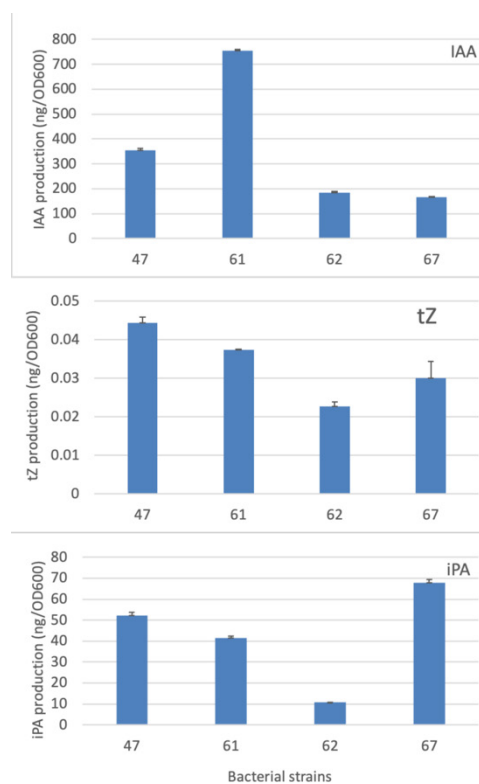


Fig 3 細菌による各種植物ホルモンの生合成能

大阪湾から発見された寄生生物が 麻痺性貝毒原因プランクトンのブルーム動態へ与える影響の解明

西谷 豪

東北大学農学部・助教

[研究目的]

麻痺性毒は有毒プランクトンを原因とする自然毒の一種で、それらを摂食して毒化した貝を人が食べると手足や口のしびれ・呼吸困難などを起こし、最悪の場合死に至る。大阪湾では 2002 年に初めて麻痺性貝毒が確認されて以降ほぼ毎年発生しており、特に 2018 年には大阪湾を含めた東部瀬戸内海で大規模に発生し、長期にわたる二枚貝の出荷停止のため漁業に大きな被害を与えた。大阪湾での貝毒原因種はアレキサンドリウム (*Alexandrium catenella*, group1) という渦鞭毛藻であるが、その発生を予測あるいは制御する手段は得られていない。

申請者らはアレキサンドリウム（以下、宿主と記す）に寄生して細胞を破壊するアメーボフリヤ (*Amoebophrya*) 属という生物（以下、寄生生物と記す）を 2019 年に大阪湾から見いだした。この発見は日本初である。そこで本研究では、この寄生生物の分類学的位置を DNA で精査し、その正体と種多様性を明らかにし、大阪湾において実際にどの程度の宿主が寄生生物に感染しているか明らかにすることを目的とした。また室内培養においても感染実験を行ない、その感染力を調査した。

[研究方法]

下記の 5 項目について調査・解析を行なった。

① 海水サンプル採取と環境測定、宿主の計数

これまでの大阪環農水研による調査で高頻度に宿主が出現することが明らかにされている大阪湾内の 2 定点 (St.17 と 19 : 図 1) において、大阪環農水研が有する調査船「おおさか」により柱状採水を実施し、水温や塩分等の環境項目を測定した。また、採取した試水中の宿主細胞数密度を顕微鏡により計数した。

② 感染細胞の計数

倒立型蛍光顕微鏡による特殊な励起光を用いて、宿主の細胞内を観察した。寄生生物が感染済みの宿主は細胞内に強い緑色自家蛍光を発するため、容易に識別・計数することが可能であった。

③ 感染した細胞内寄生生物の DNA 解析

顕微鏡下で感染が確認された宿主細胞を一つずつ拾い、DNA 解析用のチューブに入れる。DNA を抽出後、寄生生物の DNA 配列を PCR によって決定した。得られた全ての配列はデータベースにある既存の塩基配列と照合し、寄生生物の種の特定と分子系統解析を行った。

④ 宿主と寄生生物の二者培養実験

宿主と寄生生物の関係性について、現場調査だけでなく室内培養実験においても明らかにした。培養温度 14 度、IMK 培地を用いた。

⑤ 寄生生物が感染するホスト範囲の調査

寄生生物の感染に寄主特異性があるか確認するため、この寄生生物が他の植物プランクトン（珪藻や渦鞭毛藻など）に対し、寄生するのかわからないのかを 2 者培養実験により確認した。

[結果と考察]

現場調査の結果、寄生生物による寄生率は宿主の細胞密度と非常に密接な関係にあることが判明した。すなわち、現場で宿主が増殖し始めると寄生率が上昇し、その後急激に宿主の細胞密度が減少した。この現象は両定点で同様であり、寄生率は最大で 73% を記録した（図 2）。この結果から、寄生生物は宿主の現場個体群に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、調査期間内において寄生が認められた宿主を計 10 細胞単離し、遺伝子解析により寄生生物の種を同定した。その結果、大阪湾に存在する寄生生物種は、これまでアメリカと韓国で報告されていたアレキサンドリウムに感染するとされていた寄生生物種とは異なる新規種であることが判明した。

宿主と寄生生物の室内二者培養実験を行なった結果、感染率は最大 99% に達し、ほとんど全ての宿主が殺滅された（図 3、4）。今後は培養の条件を変えて、どのような条件下で寄生が起こりやすいのかを明らかにしていく予定である。

大阪湾から新たに発見された寄生生物がどの程度の宿主に寄生するのかわかる調査した結果、アレキサンドリウム属であれば他種でも寄生が可能であり、さらに同じ渦鞭毛藻のプロロセントラム属にも寄生が可能であることが判明した。それ以外の渦鞭毛藻やラフィド藻には寄生は確認されなかった。つまり、この寄生生物が有毒な渦鞭毛藻である宿主は殺滅するが、他のほとんどの生物群には影響を及ぼさないことが示唆された。この宿主特異性は将来的に現場海域において生物農薬としての利用を考える上で重要な知見となる。

我々は宿主のブルームが終了した 4 月以降も海水を採取し、同様の調査を継続した。その結果、2020 年 8 月に採取した渦鞭毛藻プロロセントラムの細胞内から、この寄生生物を検出した。このことは宿主のブルーム以外の時期では、この寄生生物が他の渦鞭毛藻に宿主を乗り換えて過ごしている可能性を示している。また、我々は 2018 年に大阪湾の海底から採取した泥からも寄生生物の DNA を検出しており、この寄生生物が海底で冬眠した状態で眠っている可能性も示している。今後、より多くのデータを蓄積していくことで寄生生物の生活史が明らかになり、宿主のブルーム予測や対策に繋がると期待される。

[まとめ]

- ・寄生生物はアレキサンドリムの現場動態（特に収束）に大きく影響している。
- ・その寄生生物は主に宿主のみを殺滅し、他の生物に影響を及ぼさない。

[今後の展望]

我々は、海水や底泥中から寄生生物の DNA を検出する手法を確立することに成功しており、今後は大阪湾内多数地点からの底泥サンプルを解析することによって、当該海域における寄生生物種の分布実態を明らかにする。また、寄生生物には多くの種が存在することが判明し、アレキサンドリウムを始めとする他の多くの渦鞭毛藻にも寄生する事実が明らかとなってきた。今後は現場において寄生生物が有害有毒プランクトンに与える影響をさらに調査するとともに、生活史、寄生特異性などの知見を充実させることにより、有害有毒プランクトンの収束時期予測や最大発生密度の予測などに応用していく予定である。

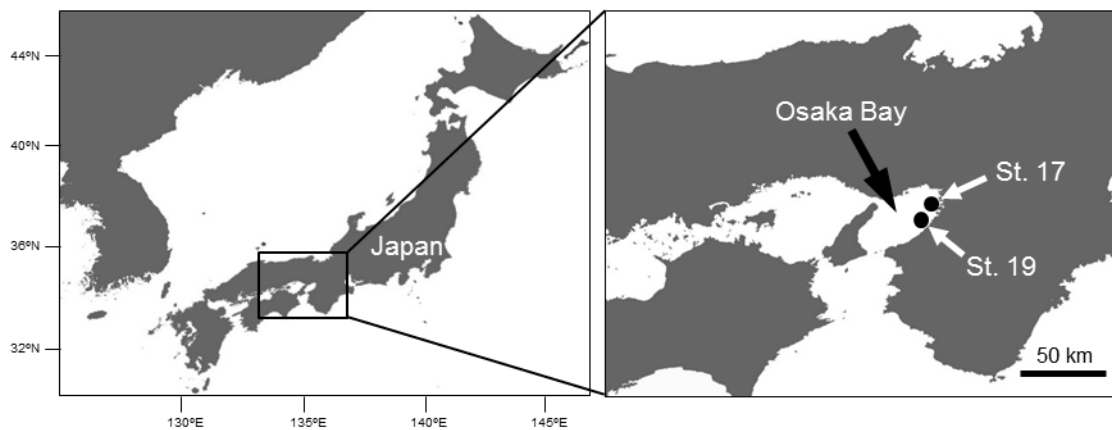


図 1. サンプルング地点

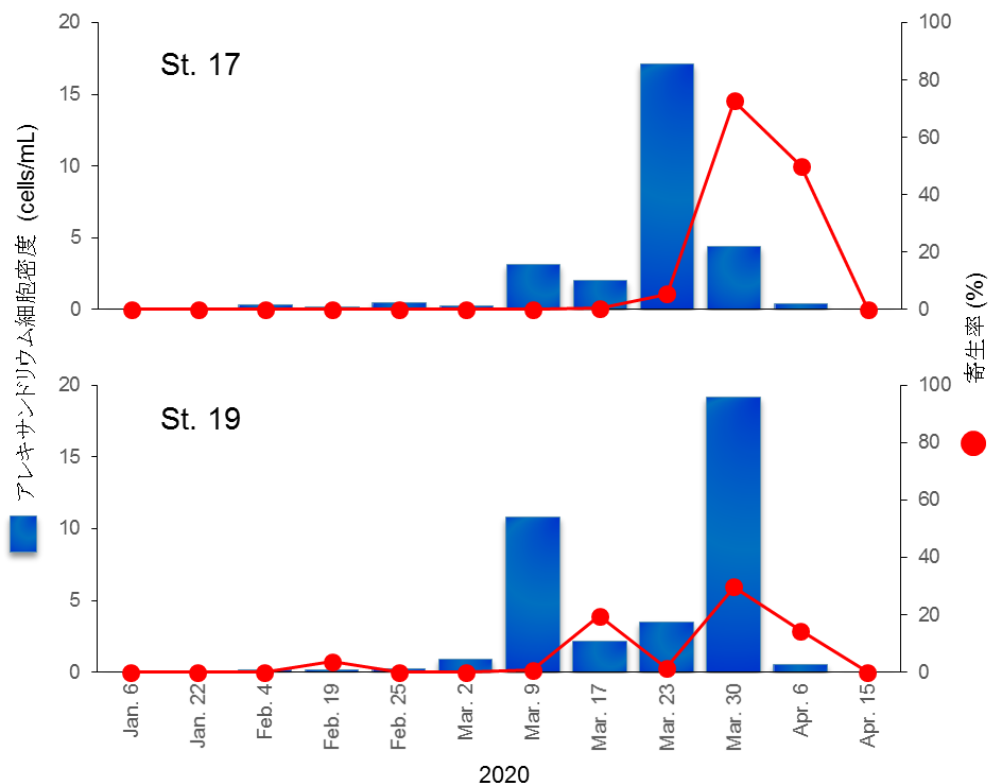


図 2. 両調査地点におけるアレキサンドリウムの細胞密度（棒グラフ：左軸）と寄生生物による寄生率（折れ線グラフ：右軸）の推移

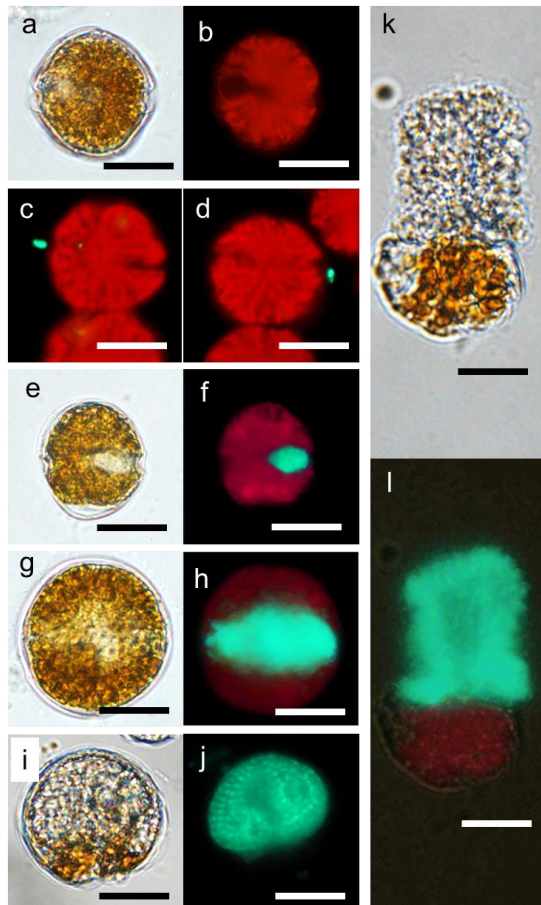


図 3. 有毒渦鞭毛藻アレキサンドリウムへ寄生する寄生生物の一連の過程（室内培養による）。a, b: 非感染細胞、c, d: 寄生生物（緑）がアレキサンドリム（赤は宿主の葉緑体）に付着した様子、e, f: 寄生生物（緑）が宿主の細胞内で増殖（感染初期）、g, h: 感染中期、i, j: 感染後期、k, l: 増殖した寄生生物の塊（緑）が宿主（赤）の細胞を突き破って外に出た瞬間。宿主の細胞内に入り込んだ 1 細胞の寄生生物が 3 日ほどで数百に増殖する。



図 4. 培養開始から 10 日目の室内培養実験の様子。左側のフラスコが寄生生物の添加あり。右側が寄生生物の添加なし。

DNA メタバーコーディングによる 大阪湾の動物プランクトンモニタリング手法の開発（その2）

梅原亮¹⁾ 西嶋渉²⁾ 中嶋昌紀³⁾

1) 広島大学環境安全センター 助教

2) 広島大学環境安全センター 教授

3) （地独）大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター 総括研究員

〔研究目的〕

総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。昨年度の成果により、検鏡にて発育段階のため同定できなかったノープリウス幼生をとらえることができ、またカイアシ類に属する動物プランクトンについては、ハルパクチクス目を除けば現段階においても DNA メタバーコーディングを用いて科や属レベルでのバイオマス推定について、存在割合での評価が可能であることがわかった。今年度は、昨年度検出されなかったハルパクチクス目等の未検出種について異なるバーコード領域を用いた検討、定量性の向上のための標準 DNA を用いた内部標準法等の検討、および実際のモニタリング適用のために大阪湾における DNA 分析結果を用いた代表種の季節変動の把握および広域調査を実施した。

〔研究方法〕

大阪湾 3 地点において毎月動物プランクトンを採集し、サンプルを等量に分割して、それぞれ DNA メタバーコーディング用と検鏡用とした。検鏡サンプルは昨年度同様に同定計数（外注）を実施して各分類群のバイオマスを推定した。DNA メタバーコーディング用サンプルについては、昨年度開発した方法に準じて DNA 抽出、PCR 増幅、および次世代シーケンス解析を実施し、バイオマス推定を試みた。

昨年度の課題であった検出種のカバー率向上のために、昨年度用いた COI 領域におけるプライマーに加え、さらに 3 つの遺伝子領域（COI、18SrRNA、16SrRNA）における 8 つのプライマーセットを用いてハルパクチクス目を含めた未検出種 7 種を対象に検討した。また、定量性向上のためには、PCR 増幅時のサンプル間および種間のバイアスの補正が必要であると考えられたため、標準 DNA（淡水生物等）を用いたサンプル間補正、および大阪湾サンプルから単離された動物プランクトンを用いた種ごとに固有の標準化係数を作成することにより種間補正を行った。現場モニタリングへの適用のために、代表種の季節および地点ごとの出現傾向を把握し、過去文献および検鏡結果と比較することで、DNA 分析結果の妥当性や代表種の時空間的な分布の違いについて評価した。また、大阪湾における広域的な動物プランクトン群集の空間分布解析のために、秋季に大阪湾 11 地点において動物プランクトン採集を実施した。

[結果と考察]

検出種のカバー率向上

大阪湾で多く出現した節足動物門のカイアシ類およびミジンコ類における DNA メタバーコーディングにより 38 種が検出された。また検鏡によって観察された種は 19 種であり、両分析手法にて共通で検出された種は 9 種であった。DNA メタバーコーディングでは捉えることができなかった種について、単離できた 7 種についてこれまでとは異なるプライマーを用いて PCR を行った結果、すべてにおいて、いずれかのプライマーによって増幅が可能であることが分かった（表 1）。現時点では生物種名を決定する際の参照用データベースが不足する遺伝子領域があることから、それらの遺伝子領域におけるデータベースの拡充が必須であり、複数の遺伝子領域を用いた同時定量評価は将来的に検討すべき事項となるが、基本的には本研究の方法に準じて各プライマーに対して定量的メタバーコーディングを行うことで定量が可能になると推測される。

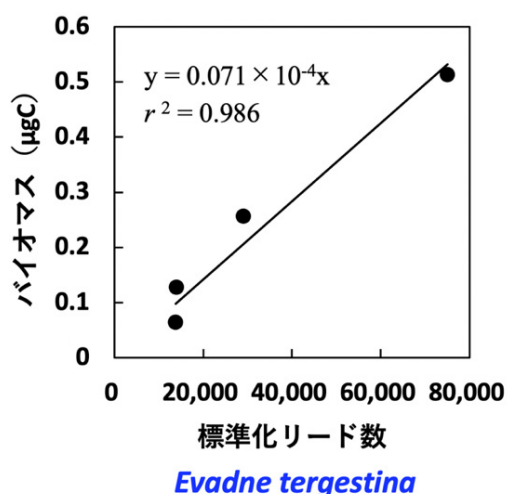
表 1. 9 つのプライマーを用いた DNA メタバーコーディング未検出 7 種の評価
(本研究における大阪湾サンプル分析の際には左端のプライマーを使用)

遺伝子領域	COI			18SrRNA			16SrRNA		
フォワードプライマー	IntF	IntF	LCO1490	1422F	1391F	Uni18SF	MiDecaF	glnsectF	Cop16SF
リバースプライマー	HCOm	HCO2198	III_C_R	1642R	EukBr	Uni18SR	MiDecaR	glnsectR	Cop16SR
<i>Acartia hudsonica</i>	×	○	×	○	○	○	○	×	○
<i>Calanus sinicus</i>	×	×	×	○	○	△	(?)	×	×
<i>Oithona brevicornis</i>	×	×	×	○	○	×	○	×	×
<i>Oithona davisae</i>	×	×	×	○	○	○	○	×	×
<i>Microsetella norvegica</i>	×	×	×	×	×	×	○	×	×
<i>Euterpina acutifrons</i>	×	○	×	○	○	○	×	△	○
<i>Corycaeus affinis</i>	×	○	×	○	○	○	×	×	×

サンプル間および種間補正による定量性の向上

サンプル間補正のために、標準生物 6 種から抽出した DNA のみをテンプレートとしたサンプルを用意し、PCR 増幅および次世代シーケンス解析を実施した結果、リード数はすべてのサンプルにおいてほとんど同じ割合であり、安定した結果を示したことから、これら 6 種から抽出した DNA を標準 DNA とした。また、種ごとに 6 サンプルのリード数の平均値を求め、大阪湾サンプルを標準化するためのリード数の基準値を得た。

種間補正のために、大阪湾サンプルから単離した動物プランクトン 32 種を用いてそれぞれ体長からバイオマスを推定し、同サンプルを用いて DNA 分析を実施したところ 15 種が検出され、種ごとに標準化リード数およびバイオマス (μgC) の関係を把握できた（図 1）。各種の回帰式の傾きを種固有の標準化リード数あたりのバイオマスの補正係数とした。



種名	回帰直線の傾き (×10 ⁻⁴)
<i>Evadne tergestina</i>	0.071
<i>Penilia avirostris</i>	0.066
<i>Acartia pacifica</i>	0.131
<i>Acartia omorii</i>	6.070
<i>Canthocalanus pauper</i>	1.427
<i>Centropages abdominalis</i>	1.869
<i>Centropages furcatus</i>	0.098
<i>Eucalanus crassus</i>	1.265
<i>Paraeuchaeta concinna</i>	2.317
<i>Paraeuchaeta plana</i>	8.480
<i>Acrocalanus longicornis</i>	1.453
<i>Paracalanus parvus</i>	0.124
<i>Paracalanus crassirostris</i>	0.400
<i>Labidocera acuta</i>	0.154
<i>Oithona similis</i>	0.131

図 1. 動物プランクトン 15 種における標準化リード数とバイオマスの関係
(左) *Evadne tergestina* の例 (右) 種ごとの補正係数

DNA 分析結果にサンプル間および種間補正を実施し、大阪湾サンプル中の種ごとの標準化リード数からバイオマスに換算した 7 種について、DNA メタバーコーディングから推定したバイオマスと検鏡から推定したバイオマスを比較した。バイオマス同士の比較において、両者には有意な正の相関関係が認められたが、DNA から推定したバイオマスは検鏡から推定したバイオマスに比べて高い傾向にあった。おおまかな指標ではあるが回帰式の傾きから考えると、DNA 推定バイオマスでは 1.5～10 倍程度過大評価されていた。

代表種の季節変動の把握

DNA メタバーコーディングを用いた動物プランクトンのモニタリング手法の現場適用における重要な課題として、①過去文献による一般的な季節的消長と一致するか？および②検鏡により推定された動物プランクトンバイオマス量の季節的なトレンドを DNA メタバーコーディングで表現できるか？の 2 点が挙げられた。

過去文献の季節的消長との比較においては、大阪湾サンプルにおいてサンプル間補正を実施し、さらに DNA 分析における種間での補正が可能であった 12 種を対象に評価を実施した。DNA 推定バイオマスの四季変化より、多くの種が夏季から秋季にかけての暖温期に豊富に出現し、また *Centropages abdominalis* や *Oithona similis* のように寒季に豊富に出現する種の特徴を DNA 分析においても表現することができた (図 2 左)。また、外洋性カイアシ類の空間分布から、外洋性種は大阪湾の湾口から湾央にかけてのバイオマスが比較的多く、湾奥ではあまり出現していなかったことがわかった (図 2 右)。外洋性種は黒潮の流れ込みによって紀伊水道側から大阪湾へ流入するため、流入部に近い湾口から湾央にかけて多く検出されたと考えられる。

検鏡による季節変動との比較から、いずれの種においても、暖季および寒季というレベルではほぼ確実に変動傾向を捉えることができ、種によっては四季レベルで精度良く変動傾向を表現することがわかった。

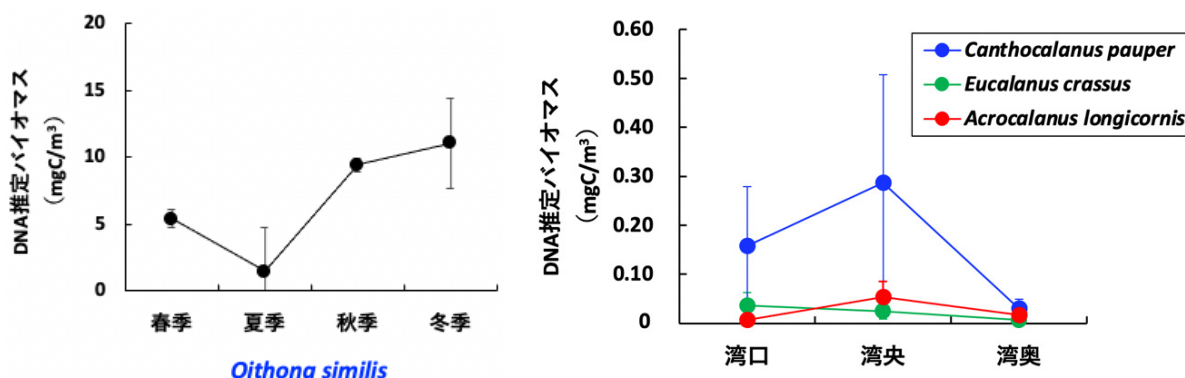


図 2. (左) *Oithona similis* の DNA 推定バイオマスの四季変動 (3 地点平均値) および (右) 外洋性種の空間分布 (年間平均値)

実際のモニタリングへの適用

大阪湾における空間的に高解像度な動物プランクトンデータの取得のために、今年度は 2020 年 11 月 2 日および 5 日に全域をカバーした形で 11 地点における動物プランクトン採集を実施した。本サンプルは、100%エタノール置き換え後に冷凍保管しているが、今年度の次世代シーケンサーの外注予算に含まれておらず、次年度の分析実施としたい。また、次年度も大阪湾において数回の広域多地点調査の実施を予定しており、DNA 分析を用いた面的なデータから、湾全域レベルでの動物プランクトン群集の空間分布について解析を行いたい。

[結論]

本研究では、総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。検出種のカバー率向上については、これまでに DNA メタバーコーディングにおいて未検出であった種について、異なるプライマーを用いることで検出することに成功した。サンプル間補正および種間補正により定量性が向上したが、未だにばらつきは大きく、DNA から推定したバイオマスは検鏡から推定したバイオマスに比べて高い傾向にあったため、さらなる改善が必要である。DNA 分析を用いた代表種のバイオマスの季節変動の把握により、過去の生態学的知見と良い対応を示すことがわかり、検鏡による季節変動との比較では、いずれの種においても暖季および寒季というレベルではほぼ確実に変動傾向を捉えることができ、種によっては四季レベルで精度良く変動傾向を表現できた。また、検鏡同定では評価の難しかった外洋性種についても定量的評価が可能となった。

生理学的基盤を指標としたイカナゴの新しい資源管理法の確立 (その2)

代表研究者 阿見彌典子 北里大学海洋生命科学部 講師
共同研究者 吉永龍起 北里大学海洋生命科学部 准教授

【研究目的】

2019年度は(1)栄養状態に応じて繁殖するかどうかが決まる時期は11月末であり、(2)12月初旬に性成熟を促進する脳ホルモンが一定量に達していることが繁殖の必要条件であることが分かった。一方、この基準値を超えて繁殖が可能となったとしても、栄養状態が劣った個体は卵数が減少して質(栄養分)が低下し、結果的に孵化した仔魚の生残率が悪くなると予想される。したがって、資源管理に必須な加入量を求めるためには、卵質を加味して仔魚の生残率を予測することが重要である。そこで2020年度は、親魚の栄養状態と脳ホルモンの量が卵の数と大きさに及ぼす影響を明らかにし、イカナゴの資源変動の動態を予測する新たな方法の確立を目指した。

【研究方法】

＜実験1＞

2020年4月に愛媛県斎灘で採集され、6月まで国立研究開発法人水産研究・開発機構 瀬戸内海区水産研究所で飼育されたイカナゴを用いた。給餌量に差をつけて高肥満度群と低肥満度群を作出した。北里大学海洋生命科学部に搬入し、高肥満度群(n=約400)と低肥満度群(n=約150)をそれぞれ自然水温・日長条件下で飼育した。サンプリングは9-12月にかけて実施した(計6回;n=6-16)。麻酔の処理後、全長、標準体長、体重の測定、生殖腺と脳の摘出、および採血を行った。生殖腺はヘマトキシレン・エオシン染色にて発達状態を観察した。また、孕卵数および卵径も計数した。さらに、脳内において性成熟を促進するホルモン(生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン;以下、GnRHと略す)と、血液中のテストステロン量をそれぞれ時間分解蛍光免疫測定法により測定した。

＜実験2＞

実験1の飼育実験を行った際に、低肥満度群と高肥満度群では飼育管理の際に生じる人為的な刺激に対する反応が異なる可能性が見出された。そこで、水槽内を網で掻き回す攪乱刺激を与えて、肥満度の違いが刺激に対する反応に及ぼす影響を比較した。なお、肥満度の違いは頭部に対する体高の高さで判断した。

＜実験3＞

肥満度の異なるメス親魚に由来する仔魚の生残率を比較するため、人工授精を試みた。本年度は、安定したイカナゴの人工授精および仔魚飼育の方法とともに、ミトコンドリアDNA(調節領域)の解析によるメス親判定技術について検討した。

[結果と考察]

<実験 1>

肥満度は観察期間を通じて、高肥満度群で高かった。生殖腺重量比 (GSI) も 11/6 以降は高肥満度群で有意に高くなった (図 1)。12/21 に観察した生殖腺は、オスでは 2 群ともに排精期に達していた。一方メスでは、高肥満度群では観察した 9 個体全てが第三次卵黄球期まで達していたのに対し、低肥満度群では 7 個体中の 1 個体だけであり、ほとんど未熟な個体であった。高肥満度群の脳内 GnRH 量は、9/8 から 12/21 にかけて常に高い値を示し、12/7、21 では有意に高くなった (図 2)。一方、低肥満度群では明瞭な変化は認められなかった。高肥満度群の血中テストステロン量は、脳内 GnRH 量および GSI の変化と連動して 12 月末にかけて高くなる傾向を示した (図 3)。一方、低肥満度群では若干の増減を繰り返しつつも成熟との関連は認められなかった (図 3)。

高肥満度群において孕卵数は体長と正の相関が認められ、肥満度が高い個体ほど孕卵数は多くなる傾向が示された。脳内 GnRH 量と孕卵数に関しては、観察例数は限られているものの、12/7 には負の相関が認められたが (図 4)、12 月 21 日では認められなかった。一方、テストステロン量と孕卵数には相関はなかった。脳内 GnRH 量が多いほど孕卵数は少なくなったことは、性成熟の進行を制御する内分泌経路である「脳-下垂体-生殖腺系」が変調したためと考えられる。一般に、魚類では最終成熟までは卵巢内にできるだけ多くの卵を保持するものの、最終成熟期に近づいて卵のサイズが大きくなると腹腔内に納められる数が制限されるため、卵の退行や吸収により数は減少する (隆島, 1986)。本研究においても、イカナゴの卵径は 12 月の上旬から下旬にかけて大きくなり、卵数は減少する傾向を示した。また、孕卵数と卵径は 12/7 では負の相関の傾向があるが 12/21 では正の相関を示したことからも、12 月上旬に脳ホルモンと連動して卵数の最終調整期に入ると考えられた。以上をまとめると、繁殖スキップする個体の出現状況は成熟期の約 3 ヶ月前には予想できること、および脳内 GnRH 量から産卵量を予測できる可能性が見いだされた。

<実験 2>

観察開始時の遊泳個体のうち高肥満個体は 37%、低肥満個体は 28%であった。刺激後では、高肥満群の遊泳個体はいなくなったのに対し、低肥満群のそれらは 75%に増加した (図 5)。この結果は、低肥満群は刺激後も遊泳し続け、さらに潜砂していた個体のうち低肥満の個体のみが遊泳を開始したことを示し、肥満度によって行動に差が生じることが示唆された。

<実験 3>

搾出法により人工授精を行い、卵を全て摘出した卵除去体重を測定した。この値と受精前に計測した体長と体重から肥満度を求めた。オス 1 個体から得られた精子で、最大で 4 個体のメスの卵を受精させることができた。また、これまでに 1 ヶ月齢を過ぎるまで飼育を継続できている (2021 年 2 月 24 日時点)。また、人工授精に用いた計 39 個体の親魚は、ミトコンドリア DNA 調節領域 (約 500 b.p.) の塩基配列の違いにより識別できた (図 6)。以上のことから、親個体の肥満度の違いが、孵化率や死亡率およびその後の成長に与える影響を明らかにするための研究基盤を確立できた。遺伝情報に基づ

いた厳密な個体識別が可能のため、複数の親に由来する仔魚を同一水槽内の均一な環境下で飼育することができる。これにより、メス親魚の肥満度に加えて、脳ホルモンの量や、繁殖スキップ経験の有無など多岐にわたる要因を考慮した加入量予測の手法の確立に繋がるものと考えられる。

[結論]

2年間の研究により、イカナゴのメスは栄養状態が悪いと繁殖スキップを行うことが確認された。また、スキップするか否かが決定される時期は、昨年度に示唆された11月より前の9月（夏眠開始直後）であることが示唆された。さらに、成熟期である12月上旬においては、成熟を制御する上位ホルモンである GnRH の動態から孕卵数を予測できる可能性が見いだされた。また、肥満度の低下は刺激に対する応答を鈍らせるため、天然では被食逃避に不利となるものと考えられた。すなわち、餌環境の悪化は（1）繁殖の抑制、（2）産卵量の減少、（3）被食の増大、など多岐にわたり資源の減少を引き起こしうることを実験的に証明できた。本課題では、さらに人工授精および親魚判別の技術開発により、今後の研究に重要となる研究基盤を整備することもできた。現段階では、瀬戸内海のイカナゴに生じうる現象を生理学的な側面に明らかにしたに過ぎない。今後は、実際に自然環境下の個体群を対象として調べていくことで、資源変動の動態を予測する精度を高め、これに基づいた管理策の立案が可能となる。生理学的な解析によるイカナゴ資源の評価は、今後、より効果的な大阪湾圏域の海域再生対策を考える上で重要な情報を生み出すと考えられる。

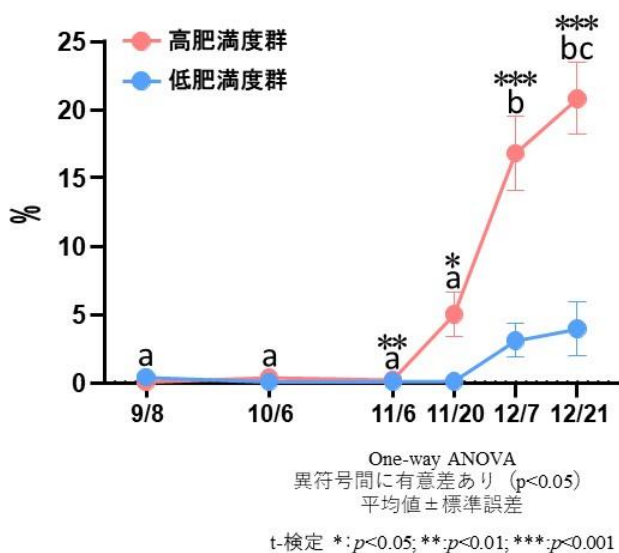


図 1. 各群における GSI の変化

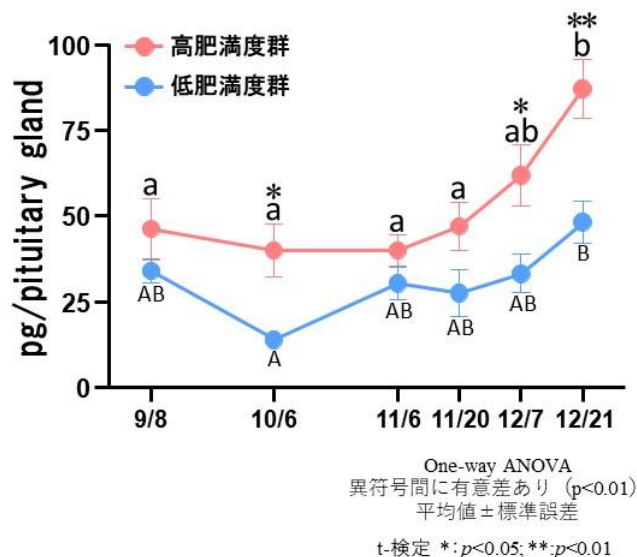


図 2. 各群における GnRH 量の変化

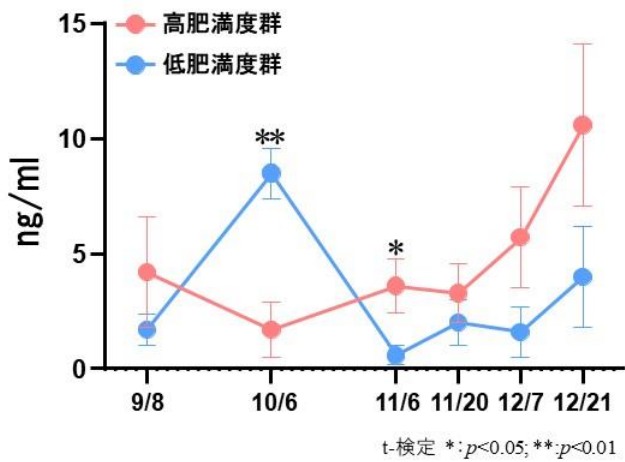


図 3. 各群におけるテストステロン量の変化

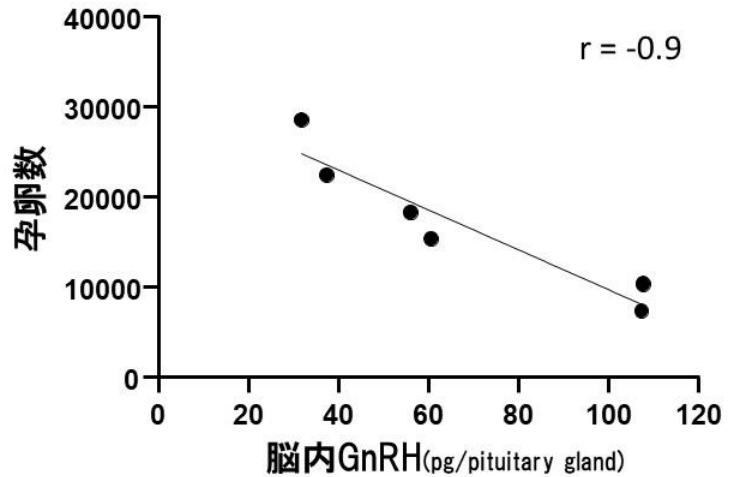


図 4. 高肥満度群での孕卵数と
GnRH 量の関係(12 月 7 日)

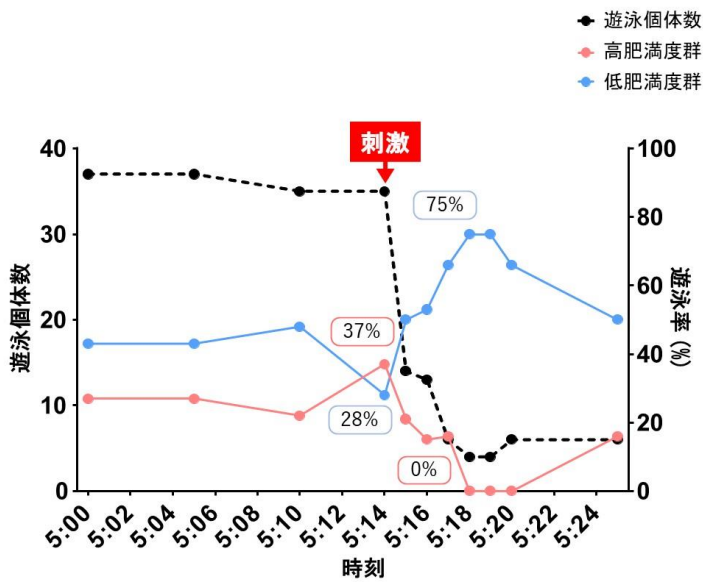


図 5. 刺激に対する異なる 2 つの肥満度群の遊泳割合の変化

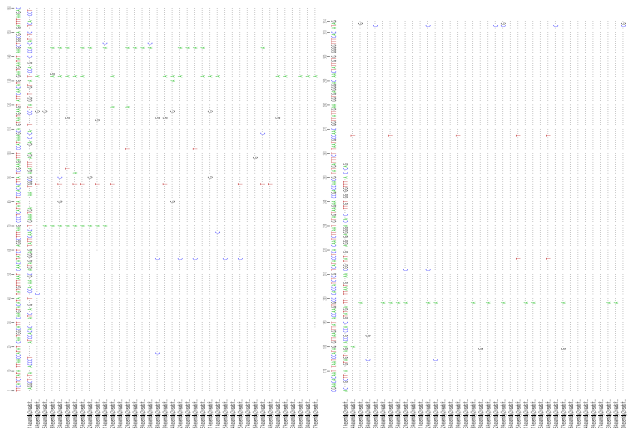


図 6. 親魚のミトコンドリア DNA 調節領域 (約 500 b.p.) の塩基配列の比較

大阪湾湿地帯における有機物分解システムの解明 —湿地帯生物の難分解性有機物分解能の把握と湿地帯健康度評価の試み(その2)

劉 文

京都大学 地球環境学堂 特定助教

目的：2019年度の調査研究では大阪湾沿岸の湿地帯に生息する多くのベントスがセルラーゼ活性を持ち、陸上植物由来準難分解性有機物の分解に関わっていること、また、安定同位体分析を用いてこれらセルラーゼ活性を持つベントスが「酵素保有者」だけではなく、実際に陸上植物由来難分解性有機物を分解・利用している「分解実行者」でもあることを明らかにした。しかし、それぞれのベントスの間で難分解性有機物の分解・利用量に違いがあるのか、また環境条件（特に餌）によってこの分解・利用量に季節的变化があるのかについて不明な点が残されていた。これを踏まえ、2020年度の調査研究は大阪湾湿地帯に生息するベントス優占種を対象に、それらの陸上植物由来準難分解性有機物分解能力（セルラーゼ酵素活性の定量）と実際の同化レベル（安定同位体分析）の季節変化に注目した。

また、これまで陸上植物由来難分解性有機物の利用状態で湿地帯を評価する研究が皆無であること、すなわち「湿地帯に優占するベントスがどの程度の陸上植物由来難分解性有機物を分解・低分子化する能力を持てば湿地帯が健康的な状態になる」のような基準が存在しないことを踏まえ、自然干潟（男里川河口）や人工干潟（阪南2区人工干潟）に生息する同種のベントスの酵素活性が示す準難分解性有機物分解能力と安定同位体比が示す実際の同化レベルの違いの有無とその要因について調べた。

結果と考察：一部のベントスを除き（フトヘナタリ）自然・人工に関わらず、干潟に生息するベントスの陸上植物由来準有機物同化率は季節によって変わることが明らかになった。当初の予想では、セルラーゼ酵素活性の季節変化パターンと安定同位体比の値の季節変化パターンが一致すれば、セルラーゼ酵素活性を基に単位当たりの安定同位体比絶対値の変化がどの程度のセルロース分解量に相当することが計算できると考えたが、自然・人工に関わらず、干潟に生息するベントスのセルラーゼ酵素活性の季節変化は実際の陸上植物由来有機物の同化率と必ずしも一致しないことが明らかになった（図1）。つまり、安定同位体分析の結果から、各生物が陸上植物由来有機物の利用度が「より多い」か「より少ない」かまでは把握できたが、酵素活性との関係性が認められなかったため、酵素活性からどの程度の陸上植物由来準難分解性有機物を利用しているかを見積もることができなかった。

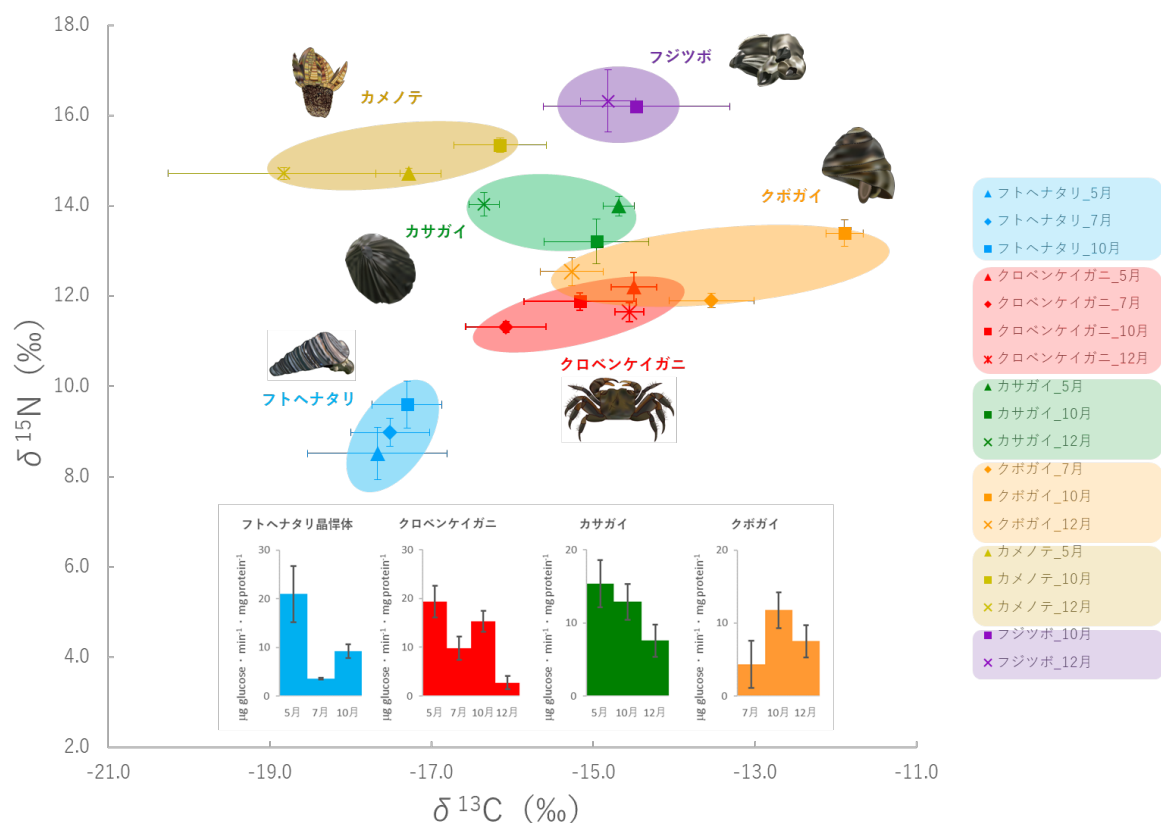


図 1：自然（男里川）干潟に生息するベントス優占種のセルラーゼ酵素活性および安定同位体比。横軸は炭素の安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$)、縦軸は窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$)。各季節の同種の安定同位体比は同じ色で示している。プロットの形は季節を示し ($\triangle$ =5 月、 $\diamond$ =7 月、 $\square$ =10 月、 $\times$ =12 月)、記号がない場合は該当季節に該当種のサンプルが採集できなかったことを示す。安定同位体比グラフの空白部分にはセルラーゼ酵素活性の季節変化を示す図を挿入している。単位 ($\mu\text{g glucose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$) は、単位時間 (1 分間) に単位タンパク量 (酵素以外のタンパクも含み総量 1 mg の内臓抽出液) がグルコースと同等な還元力を持つ単糖またはオリゴ糖の出現量 (μg) を示す。**注意**：同種内での酵素活性の比較は可能であるが、種間の比較はできない。なお、安定同位体比および酵素活性のバラツキは SEM (標準誤差) を示す。

一方、自然および人工干潟に生息する同種のベントスを比べたところ (図 2)、陸上植物由来の有機物に乏しい人工干潟に生息しているベントスは、自然干潟に生息する同種に比較して明らかに高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示した。このことは摂取された陸上植物由来難分解性有機物量の違いが安定同位体比に反映されていると考えられた。

今後の課題として、この差がどれほどの陸上植物由来有機物の分解・利用・同化量を意味するのかを解明しつつ、湿地帯の陸上植物由来難分解性有機物を低分子化する能力、いわゆる「健康度」の評価につなげるのかが残された。

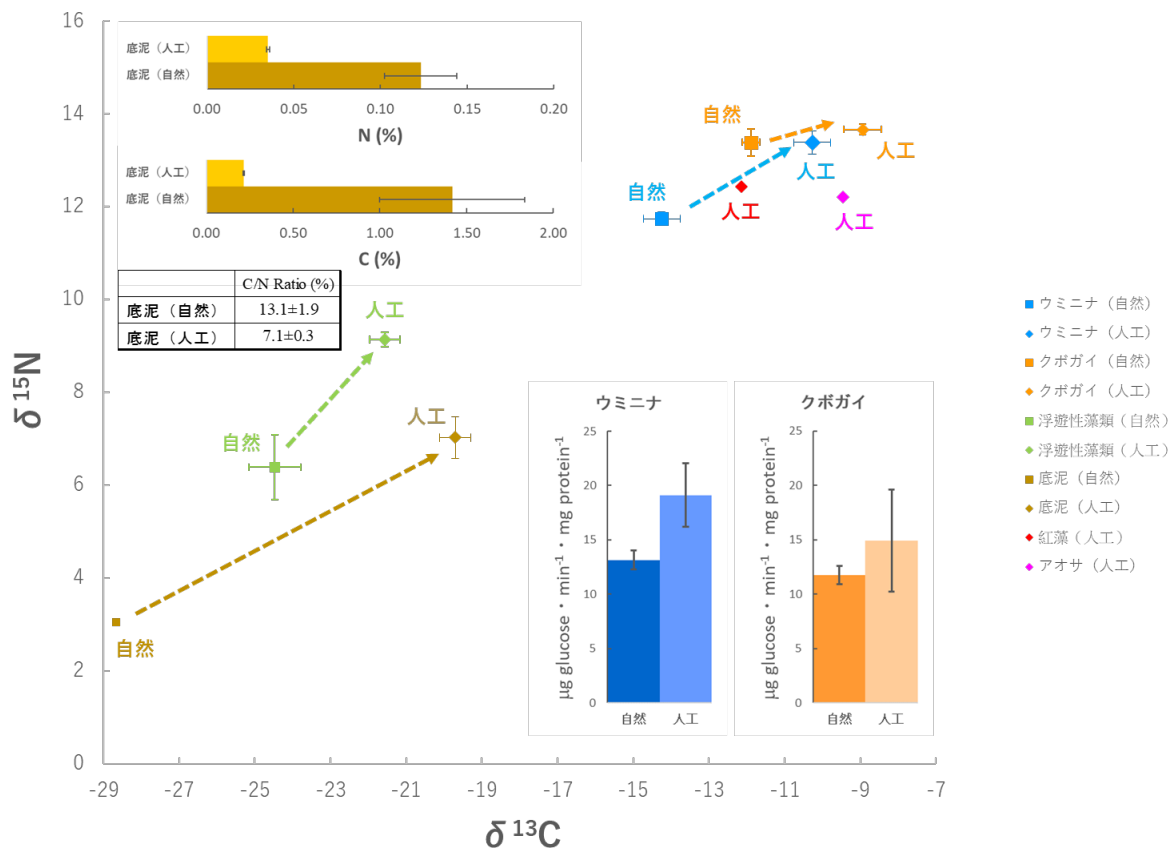


図 2：自然（男里川）干潟および人工（阪南 2 区埋め立て地区）干潟の比較（2020 年 10 月）。同系色は同種を示す。プロットの形は季節（◇＝7 月、□＝10 月、X＝12 月）を示し、記号がない場合は該当季節に該当種のサンプルが採集できなかったことを意味する。矢印は同種（または同底泥・海水サンプル）を対象とした時の自然干潟と人工干潟での変化の方向を示している。左上に挿入した図は底泥有機物中の窒素および炭素含有量（％）とその比率（C/N Ratio）を、右下に挿入した図はセルラーゼ酵素活性を示している。単位は図 1 と同様である。