

D-0803 海洋酸性化の実態把握と微生物構造・機能への影響評価に関する研究

(3) 海洋酸性化が微生物群集構造と機能に及ぼす影響

筑波大学 大学院生命環境科学研究科 持続環境学専攻 濱 健夫
構造生物学専攻 井上 勲
情報生物学専攻 白岩善博

<研究協力者> 構造生物学専攻 中山 剛
情報生物学専攻 福田真也

平成20～22年度合計予算額 68,553千円
(うち、平成22年度予算額 25,804千円)
予算額には、間接経費を含む

[要旨]

今後予想される海洋酸性化が、微生物群集構造と機能に与える影響について、(1) 沿岸自然微生物群集を用いた大型培養器による野外実験と、(2) 石灰質の殻をもつ円石藻の培養種を用いた室内実験、により評価した。(1) の自然群集を用いた実験においては、3段階の異なったpHの培養器を設定し、合計5回の実験を実施し、植物プランクトン群集組成一次生産量等の変化を追跡した。酸性化に対する応答は、植物プランクトングループにより異なっていた。ハプト藻の *Chrysochromulina* sp. の増殖は、同種が構成種として確認された3回の実験全てにおいて、酸性化により阻害されることが確認された。最も阻害が顕著であった実験系では、有機窒素化合物の生産量が、現状のpH条件下の値の10%近くまで低下することが確認された。一方、シアノバクテリアは、酸性化による優占率が增大する傾向が得られた。また、酸性化により植物プランクトンのサイズ組成が変化する傾向が認められた。植物プランクトンのサイズは、海洋中深層への生物ポンプによる有機炭素の輸送とも密接に関係しており、酸性化により予想される植物プランクトンのサイズ組成の変化は、生物ポンプの炭素隔離量にも変化を与える影響が示唆された。(2) の円石藻 *Emiliania huxleyi* を用いた実験においては、1) そ円石藻が重炭酸イオンではなくCO₂分子を吸収するCO₂ userであり、その光合成によって海水をアルカリ化(alkalization)し、海水の酸性化を補償し、pHを上昇させる機能を持つ、2) 酸性ストレスを受けても、その光合成活性および光化学系の諸活性には殆ど影響がない、3) CO₂濃度上昇を伴わない酸性化のみによっては細胞増殖は抑制される、4) 石灰化は海水中の重炭酸イオン濃度に依存的であり低pH又は高溶存CO₂による直接的な石灰化への影響は無い、5) CO₂濃度上昇により引き起こされる酸性化においては、円石藻の増殖、光合成、ココリス形成(石灰化)はダメージを受けない、ことが明らかになった。結果として、円石藻 *E. huxleyi* は、pH7.5程度までの大気CO₂濃度上昇による海洋酸性化には直接的なダメージを受ける可能性は非常に低いことを実験的に示した。

[キーワード] 海洋酸性化、微生物群集構造、生元素循環、円石藻、石灰化

1. はじめに

海水中に吸収される二酸化炭素は、水に溶解することを通して水素イオンを放出するため、CO₂の吸収に伴い、海水の酸性化が進行することとなる。事実、産業革命以降、現在まで海水のpHは0.1程度低下したと報告されており、更に今後の放出量の推移によっては、今世紀末までに0.2から0.3程度減少するものと予想されている¹⁾。また、火山活動による大気CO₂濃度上昇も海洋酸性化を引き起こすことが明らかになっている²⁾。この様な海洋酸性化が海洋生物に対して与える影響に関しては、サンゴなどの主として炭酸カルシウムの殻をもつ生物に関して議論がなされてきた。

炭酸カルシウムの殻を生成するための炭酸イオン濃度が、増加する水素イオンとの反応を通して減少することが予想されるからである。pHを下げた海水中で培養した際に、炭酸カルシウムの殻の形状に異変が生ずることを報告した研究結果は、海洋酸性化による海洋生物、そして生態系への影響の大きさを示すものとして注目を集めた^{3), 4)}。そして、海洋酸性化は、地球温暖化に続く「もうひとつのCO₂問題」として認識されるに至っている⁵⁾。しかし、これまでの研究の多くは、炭酸カルシウムの殻をもつ生物の殻の生成過程のみに焦点が当てられている。殻をもたない生物や、光合成・呼吸など生物が普遍的に有する機能に対する酸性化の影響は、ほとんど検討されていないのが現状である^{5), 6)}。海洋環境を支える海洋の微生物群集に対し、酸性化がどのような影響を与えるかを評価するためには、微生物群集全体に対して研究を進めることが必要である。本研究では、自然植物プランクトン群集を対象として、異なったpH環境下で培養することにより、その際生ずる群集組成の変化を明らかにすると共に、その変化が物質循環および地球環境へ与える影響について検討する（図1）。

一方、炭酸カルシウムの殻をもつ植物プランクトンとして円石藻があげられる。植物プランクトン種の多様さからすると、円石藻はごく少数の種類からなるグループではあるが、海洋に大発生することが知られているほか、炭酸カルシウム生成に伴うCO₂発生の問題などで、海洋の炭素循環、さらには地球環境とも大きな関係をもつとされる。その代表種は細胞表面にココリスと呼ばれる炭酸カルシウムの殻を形成する*Emiliania huxleyi*である。*E. huxleyi*の懸濁液に光を照射すると培地のpHが上昇する現象が観察される⁷⁾。これは、光合成の基質であるCO₂の利用と密接な関係がある。一般に溶液中のCO₂は解離してCO₂、HCO₃⁻、CO₃²⁻として存在する。光合成で培地中のCO₂が消費されると化学平衡により図2に示す上方向に反応が進みH⁺を消費しOH⁻を産生するためpHが上昇する。一方、石灰化によってHCO₃⁻の取り込み

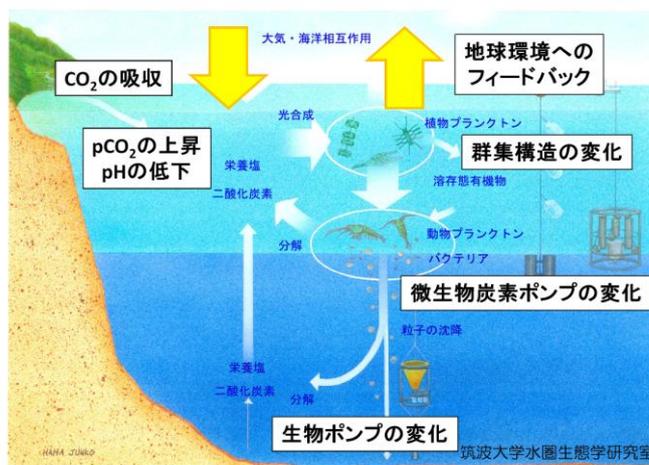


図1 海洋酸性化が微生物群集構造および機能へ及ぼす影響に関する概念図

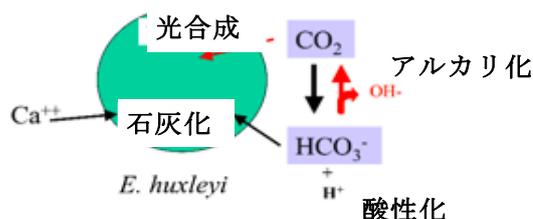


図2 光合成と石灰化によるpH変化の仕組み

が増加すると下向きの矢印が示す方向に反応が進み、 H^+ を生じてpHが低下する。これらの化学反応に基づき、石灰化機能を有する円石藻類は、海洋酸性化を加速させる「負の要因」として機能するのではないかと懸念がなされ、それらの現象に対する詳細な解析に基づく科学的検証が強く求められている。このため、本研究の遂行にあたり、円石藻に関しては、特に培養種を用いた詳細な検討を行うこととした。

2. 研究目的

本研究では、以下の事項を研究目的として、沿岸微生物群集と円石藻培養種を用いた実験的解析を行う。

- (1) 酸性化が沿岸植物プランクトン群集構造に与える影響を明らかにする
- (2) 酸性化に対して脆弱な植物プランクトングループの特定を図り、酸性化監視の指標種を提唱する
- (3) 群集構造の変化が物質循環に与える影響を検討する
- (4) 円石藻の生理機能と海水培地の CO_2 濃度およびpHの変化との関連を詳細に解析し、ミクロのレベルで海洋酸性化との関連を解明する

3. 研究方法

- (1) 沿岸微生物群集を用いた解析

1) 培養系

沿岸微生物群集を用いた実験は、筑波大学下田臨海実験センターにおいて、本研究期間中に、計5回実施した(表1)。400L容の亚克力製の円柱型大型培養タンク(内径800mm、高さ1000mm)を3基(実験1および2)あるいは6基(実験3~5)準備し、400Lの微生物群集を含む沿岸海水を入れ培養実験を行った(図3)。沿岸海水は洗浄したチューブを用い

表1 5回の実験実施日と培養条件

実験	実施日	期間	培養器数	設定栄養塩濃度 (mol/L)	トレーサー法
1	2008年11月4日-14日	11日	3	N:P:Si=14:0.88:14	—
2	2009年1月24日-2月7日	15日	3	N:P:Si=14:0.88:14	^{15}N
3	2009年5月22日-6月5日	15日	6	N:P:Si=14:0.88:14	^{13}C 、 ^{15}N
4	2009年11月12日-11月30日	15日	6	N:P:Si=4:0.25:4	^{13}C 、 ^{15}N
5	2010年7月9日-8月2日	26日	6	N:P:Si=4:0.25:4	^{13}C

て採取し、培養器に移す際には、捕食による影響を軽減するため、97 μm のメッシュを通した。

培養液のpHは CO_2 濃度を調整した気体を通気することにより調整した。大気(400ppm CO_2 と仮定)と3% CO_2 を混合することにより、400ppm、800ppmおよび1200ppmの気体を調整し、10lminの速度で各タンク底部にエアーストーンを通して導入した。尚、実験1、2においては各 CO_2 濃度の培養器を1基ずつ、実験3~5においては、各 CO_2 濃度を2基ずつ設置した。尚、一部の実験においては、 ^{13}C で標識したガスを混合し、培養器中の



図3 自然微生物群集を用いた培養実験。3段階の pCO_2 に調整した培養器を2基ずつ、計6基の培養器を用いた(実験3-5)。

炭酸物質を ^{13}C で標識する、あるいは ^{15}N で標識した硝酸塩を加えることにより、安定同位体トレーサー法による炭素、窒素の動態の解析を試みた。培養タンクは屋外の大型水槽内に設置し、沿岸水を流すことにより水温を調整した（図3）。

各実験共に海水試料を培養器に移した後、 CO_2 を調整した気体を40時間（実験1については10時間）通気し、培養液の pCO_2 および pH を調整した。実験開始時に植物プランクトンの増殖を促進するため、窒素、リン、ケイ素を添加した。実験1～3では、窒素、リン、ケイ素を、それぞれ約 $14\mu\text{M}$ 、 $0.88\mu\text{M}$ および $14\mu\text{M}$ となるよう添加した。一方、実験4、5においては、実験1、3で認められた植物プランクトンの増殖に伴う大きな pH の変化を抑制するため、栄養塩の添加量を従来の約1/4量に減少させた。

2) 試料採取および分析

実験開始日の午前9時に栄養塩を添加し、その後1時間の通気を行い培養タンク内を混合した。その後、1日目の試料採取は午前10時から、2日目以降は午前9時から試料採取を行い、ほぼ1時間で採取を終えた。 pH および無機炭素測定用試料はサイフォンチューブでガラス瓶に採取した後、塩化第二水銀により固定した。その後、内径80mmのアクリル製チューブを水槽内に挿入し、タンク表面から底部までの試水を均一に採取した。得られた試料は、ガラス繊維濾紙（ワットマンGF/F）を用いて濾過し、濾紙に残る懸濁態物質と濾液に含まれる溶存態物質に分別した。これらの試料について pH 、溶存無機炭素濃度、栄養塩濃度、クロロフィルを含む植物色素濃度、植物プランクトン組成等の分析を実施した。 pH 、溶存無機炭素濃度の測定及び pCO_2 の測定、算出はサブグループ（1）の気象研究所において実施した。また、フローサイトメーターを用いることにより、植物プランクトン群集に関する測定を行った。 ^{13}C および ^{15}N トレーサー法を実施した際は、質量分析計により同位体比を測定し、有機炭素、有機窒素の生産量を明らかにした。

(2) 円石藻 *Emiliana huxleyi* の培養種を用いた解析

1) *Emiliana huxleyi* 光合成による海洋酸性化の補償

20°C 又は 15°C で3日間培養して対数増殖期にある円石藻 *E. huxleyi* を用いて、光合成及び呼吸による細胞懸濁液の pH 変化を調べた。クラーク型酸素電極と pH スタットを組み合わせた装置を作成（図4）し、細胞懸濁液30 mlを O_2 電極の試料室内に入れ、終濃度10 mMになるように NaHCO_3 を加えた後、塩酸又は水酸化ナトリウムで pH を調整し測定を行った。光強度 $270\cdot\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の白色光を30分間照射し、その間に発生した酸素量を酸素電極で測定、それと同時に pH スタットによる細胞懸濁液 pH の監視と制御を行った。

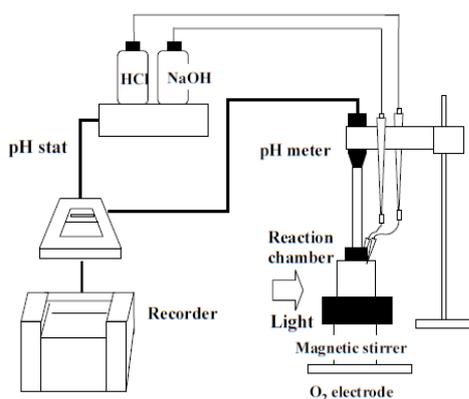


図4 実験装置概略図

2) 海洋酸性化が円石藻 *Emiliana huxleyi* の光合成に与える影響



図5 クラーク型酸素電極

クラーク型酸素電極を用いて光合成活性を測定した(図5)。温度を25°Cに設定して、30分間光強度 $270\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光を照射し、酸素発生活性($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$)を算出した。測定に先立ち*E. huxleyi*細胞を濃度 $1.0 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ に調整、同細胞懸濁液30 mlを実験に供した。さらに、測定開始10分前に光合成の炭素源として NaHCO_3 を終濃度2mM又は10 mMとなるように添加し、pHを7.2、7.7、8.2に調整した。

さらにクロロフィル蛍光を測定して得られた情報から酸性化が*E. huxleyi*の光化学系に与える影響についても調査した。実験にはFluorcam (PSI社)を使用し、光化学系IIに関する各種パラメーターを算出した(図6)。実験に用いた細胞は $1.0\mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ に濃度調整して NaHCO_3 を終濃度2 mM又は10 mMで添加して暗所室温にて15分間静置したものを測定した。



図6 FluorCam (PSI社)

3) 酸性化が円石藻 *Emiliana huxleyi*の石灰化に及ぼす影響

酸、塩基及び CO_2 通気によってpHを調整した培地で円石藻*Emiliana huxleyi*の培養を7日間行い、培養期間中の石灰化(ココリス形成)について調べた。

$^{45}\text{CaCl}_2$ によるトレーサー実験によって円石藻*Emiliana huxleyi*における石灰化能力の評価を試みた。培養した*E. huxleyi*細胞をリン酸制限培地に再懸濁することで石灰化促進条件に置き、同細胞に $^{45}\text{CaCl}_2$ を $20 \times 10^6 \text{ Bq/mM}$ の割合で添加し一定時間ごとにサンプリングして細胞から発せられる放射線量を液体シンチレーションカウンターにて測定することで単位時間あたりに細胞に吸収される ^{45}Ca の量を求めた。

4) 酸性化が円石藻 *Emiliana huxleyi*の細胞増殖に及ぼす影響

3日間pH8.2 (Air通気) 又は400 ppm CO_2 の調整空気で前培養した*E. huxleyi*細胞をpH 8.2, 7.7, 7.2(全てAir通気)又は400、800、1200 ppm CO_2 の調整空気を通気して7日間培養した。培養中は一日に一回サンプリングを行い顕微鏡下で各サンプルの細胞数を計測して細胞増殖速度を求めた。

4. 結果・考察

(1) 自然微生物群集を用いた実験的解析

本研究では、3年間を通して5回の実験を実施したが、ここでは、まず、5回の実験について、 pCO_2 、pH、無機窒素濃度(硝酸と亜硝酸塩)、クロロフィルa濃度、懸濁態有機炭素(POC)濃度、および懸濁態有機窒素(PON)濃度の基本パラメーターの変動を示し、各実験について簡単にまとめることとする。次に、5回の実験を通して得られた重要な点について記載する。

1) 実験における基本パラメーターの変動

a. 実験1 (図7)

実験1では、CO₂濃度を調整した気体を用いたpCO₂とpHを調整する400Lの培養系の確立と、微生物群集の変動を追跡する手法の確立とを主要な目的として実施した。

pCO₂は”400”、”800”および”1200”ppmの培養器について、それぞれ200-300ppm、380-480ppmおよび680-1050ppmの間で変動した(図7)。これらの値は、大気とCO₂ガスの混合比により設定した400、800および1200ppmを下回る値であった。通気気体を調整する気体混合機から得た試料のpCO₂は、ほぼ設定値にあることを確認しているため、培養器における設定値より低いpCO₂は、培養器への通気時間が不十分であったことによると推定される。しかしながら、3種類の培養器のpCO₂はそれぞれに明確な違いが認められ、pHにおいても、”400”、”800”および”1200”ppmでそれぞれ8.12-8.28、7.92-8.08および7.66-7.84と、pCO₂の高い培養器で酸性化が進む状況を維持することができた。

本実験では、栄養塩類の添加後、急速に栄養塩類の消費が生じ、クロロフィル*a*濃度の増加が認められた。それに伴い、懸濁態有機炭素(POC)および懸濁態有機窒素(PON)の上昇が生じた。無機窒素化合物とクロロフィル*a*との関係に注目すると、実験開始3日目までの無機窒素化合物濃度の低下は”800”および”1200”ppmにおいて”400”ppmより速く、クロロフィル*a*濃度の増加は、”800”および”1200”ppmで速い。POCおよびPONにおいても似た状況が認められた。これらの結果は、pCO₂がより高い条件下で、速い植物プランクトンの応答が生じていたことが示唆される。顕微鏡観察および植物色素組成の観察結果から、3-7日目に認められた植物プランクトンのブルームは珪藻によることが確認された。しかしながら、3培養器間における植物プランクトン現存量の差はそれほど顕著では無かった。

b. 実験2 (図8)

実験2において、pCO₂の値は実験開始後4日目までは緩やかに上昇し、4日目以降は設定値である”400”、”800”および”1200”ppmに近い値を維持した。pHの変化においても4日目以降はほぼ安定しており、”400”、”800”、”1200”ppmにおいて、8.02-8.07、7.77-7.80、7.62-7.65、の狭い範囲で変動した。本実験では、実験開始前の調整気体通気時間を1回目の実験に比較して大幅に増加させたが、その効果が出たものと考えられる。これから、異なったpCO₂のガスを通気する事により、400Lの大型培養器のpCO₂およびpHの設定方法はほぼ確立したと考えて良い。

本実験では1回目の実験とは異なり、実験期間中に顕著な栄養塩濃度の低下は認められず、クロロフィル*a*濃度も11日目までは低く保たれたままであった。実験期間中の光量子数の低さや水温の低さは、これらの条件が植物プランクトンの増殖を抑制した可能性を示唆している。しかし、11-15日目にかけて”400”ppmの培養器において、無機窒素化合物濃度が低下する傾向を示すとともに、クロロフィル*a*濃度の上昇が認められた。クロロフィル*a*濃度の増加傾向は、低pCO₂培養器ほどより顕著であった。同様の傾向は、POCおよびPON濃度においても確認された。

顕微鏡観察、フローサイトメーターおよび植物色素での解析結果は、11から15日目にかけてクロロフィル*a*濃度の増加が、ハプト藻の*Chrysochromulina* sp. の増殖によることを示しており、本グループの増殖が海洋酸性化により阻害の影響を受けている可能性が示唆される。これについては、後ほど詳細な議論を行う。 c. 実験3 (図9)

夏季に行った本実験では、実験開始直後に顕著な植物プランクトンのブルームが生じた。pCO₂

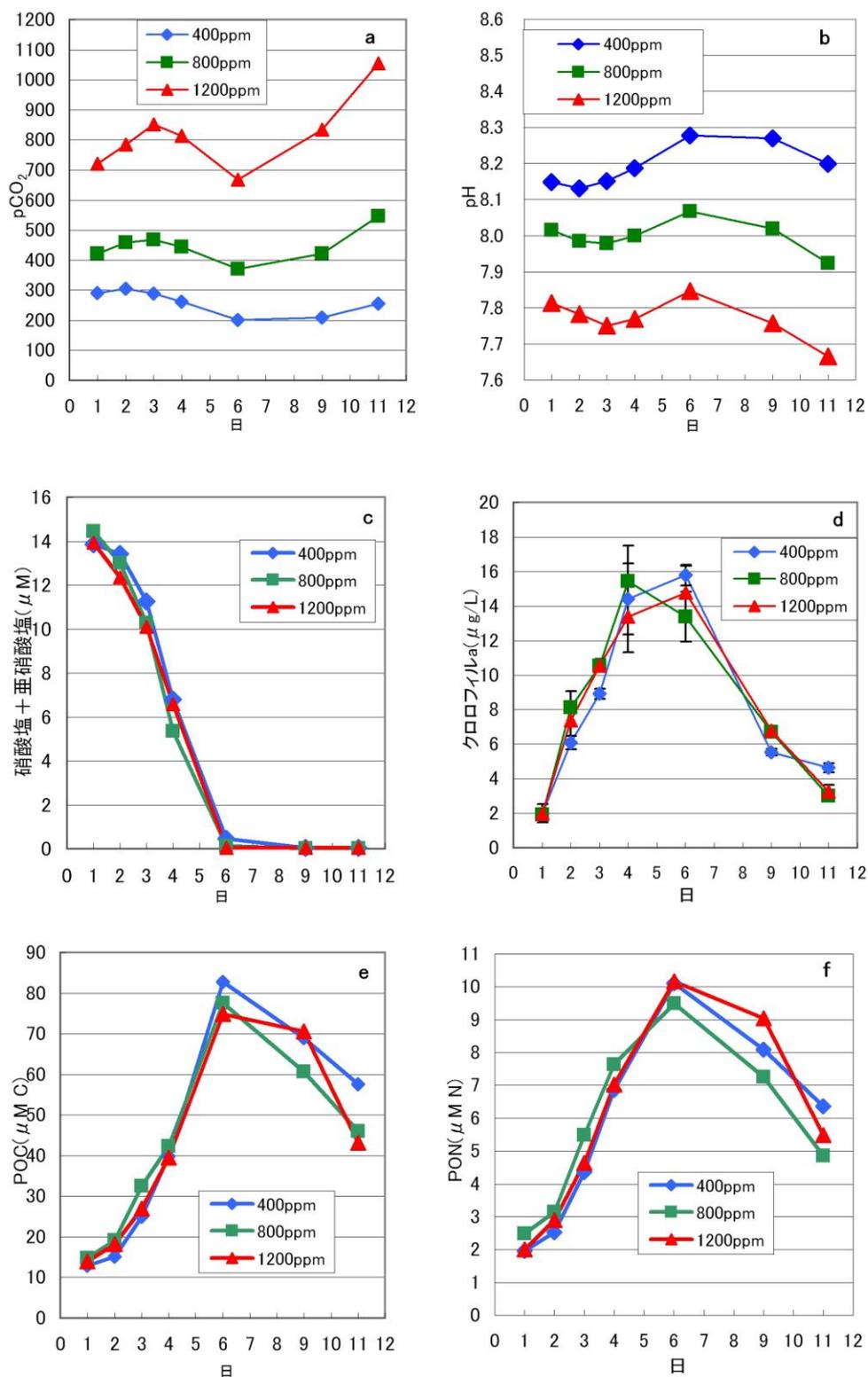


図7 実験1(2008年11月4日-14日)の”400”、”800”および”1200”ppm培養器におけるpCO₂(a)、pH(b)、硝酸塩 + 亜硝酸塩濃度(c)、クロロフィルa濃度(d)、懸濁態有機炭素(POC)濃度(e)、懸濁態有機窒素(PON)濃度の変化。クロロフィルaは2試料について得られた平均値と範囲を示す。

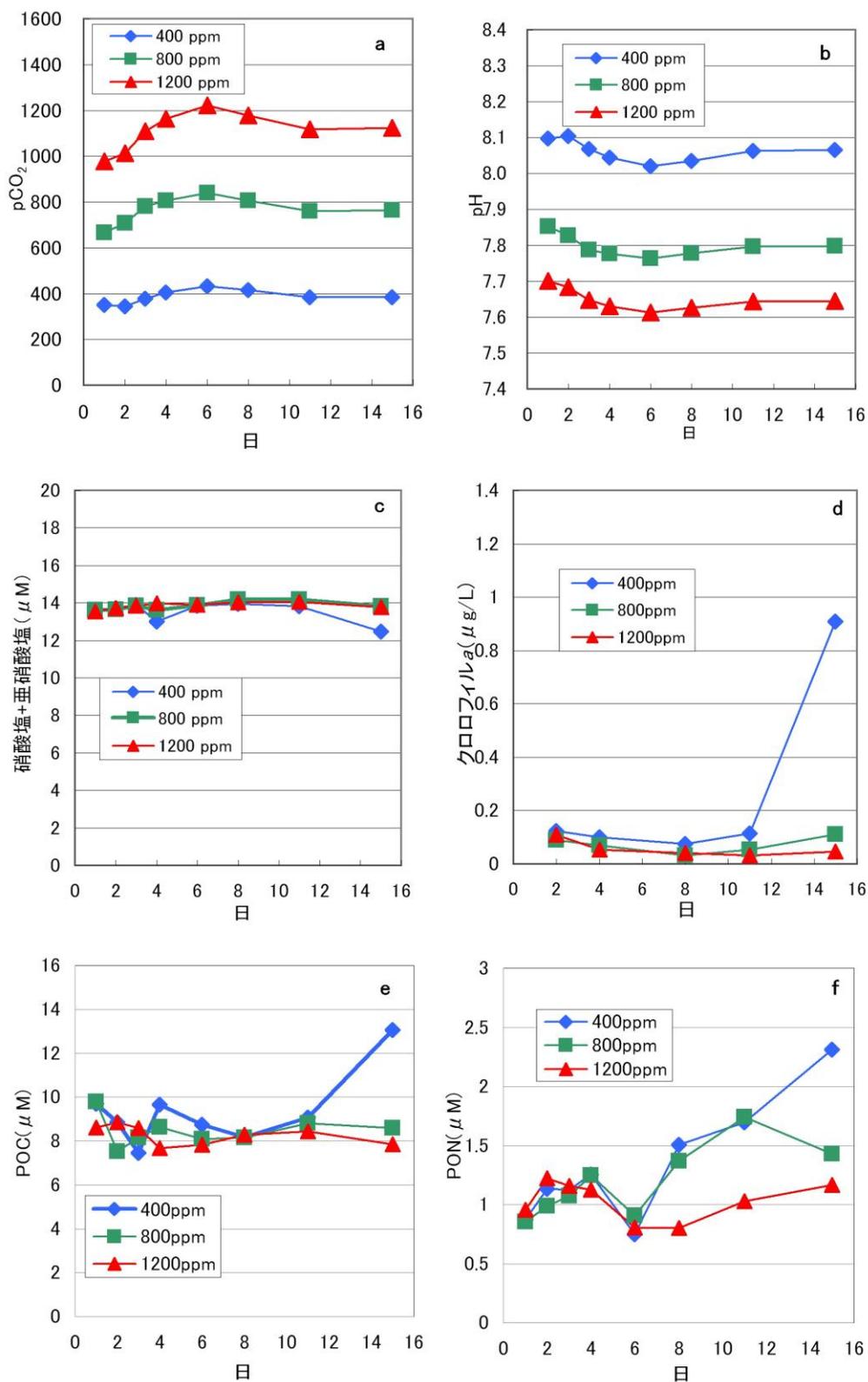


図8 実験2(2009年1月24日-2月7日)の”400”、”800”および”1200”ppm培養器におけるpCO₂(a)、pH(b)、硝酸塩+亜硝酸塩濃度(c)、クロロフィルa濃度(d)、懸濁態有機炭素(POC)濃度(e)、懸濁態有機窒素(PON)濃度の変化

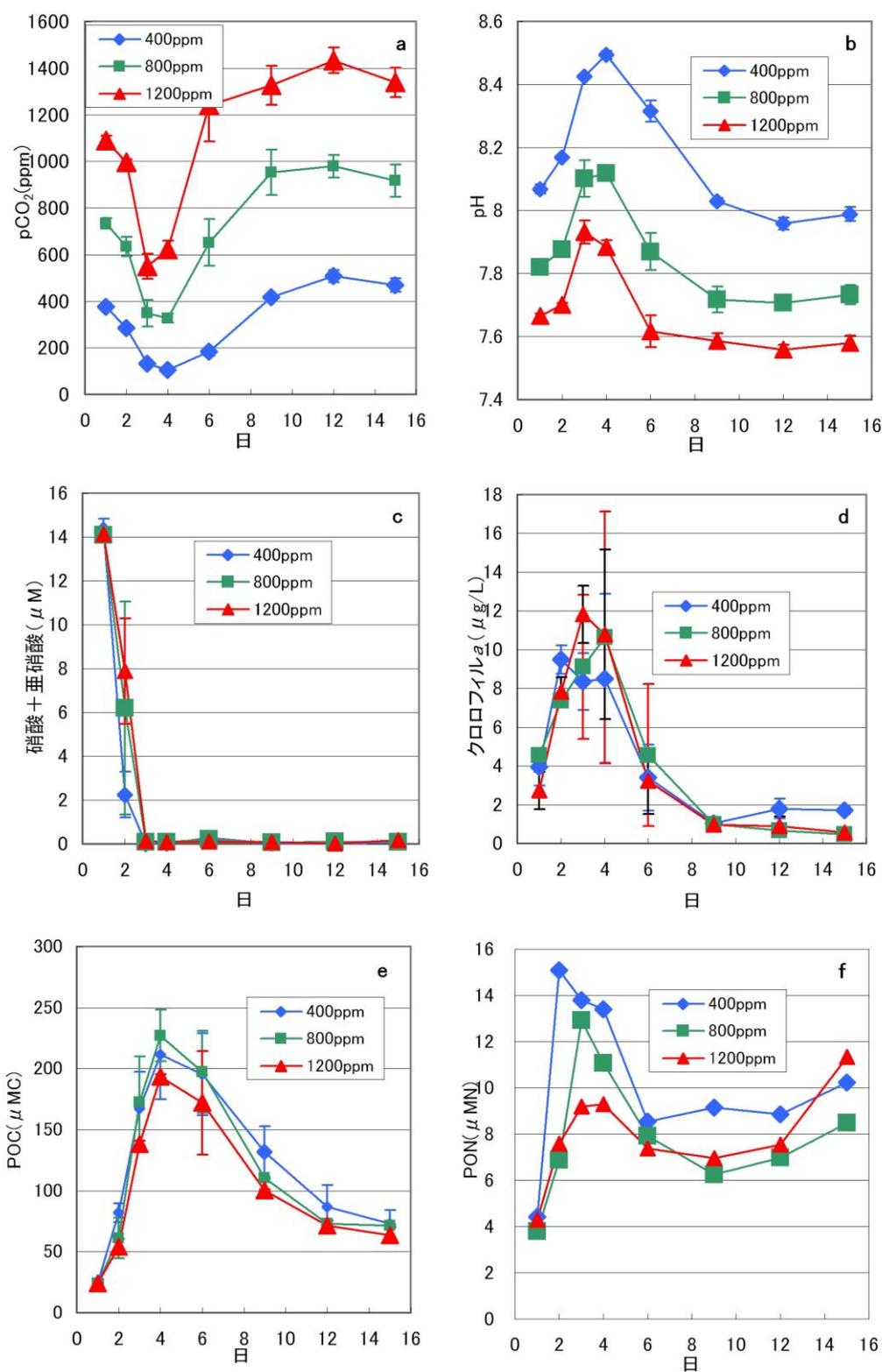


図9 実験3(2009年5月25日-6月5日)の”400”、”800”および”1200”ppm培養器におけるpCO₂(a)、pH(b)、硝酸塩+亜硝酸塩濃度(c)、クロロフィル*a*濃度(d)、懸濁態有機炭素(POC)濃度(e)、懸濁態有機窒素(PON)濃度の変化 2基の培養器で得られた値の平均値と測定範囲を示す

は、実験開始時にはそれぞれの培養器においてほぼ設定に近い値を示したが、2日目以降に急激な減少を示した。これは、無機窒素化合物濃度の低下およびクロロフィル*a*濃度の上昇で示されるように、植物プランクトンの光合成による無機炭素の消費によるものである。このpCO₂の減少に伴って、実験開始時に”400”、”800”、”1200”ppmタンクで8.15、7.82、7.66であったpHは、それぞれの培養器において、8.50、8.13および7.92まで増加した。これらの結果は、このpHの増加が認められた期間においても毎日実施した6時間の調整気体の通気では、光合成により低下したCO₂を供給するには十分ではなかったことを示している。

本実験から各pCO₂の培養器を2基に増やした実験系を適用した。pCO₂およびpHにおいては、各濃度の2タンク間の差はそれほど顕著では無く、比較的良好にコントロールされていたと考えられる。しかしながら、栄養塩濃度およびクロロフィル*a*濃度の2タンク間の差は大きかった。特に、クロロフィル*a*濃度の2基の培養器間の差は大きい。本実験では、植物プランクトンの鉛直的な沈降量を推定するため、沈降粒子捕集装置を培養器底部に設置した。2基の培養器間でこの捕集装置への捕集効率の違いが生じ、それが培養器間で生物量のやや大きな差を引き起こした可能性も考えられる。栄養塩類の消費から推定すると、植物プランクトン増殖時の1-3日目にかけた”400”ppm培養器での無機窒素濃度の低下速度は”800”および”1200”ppm培養器より高く、低CO₂条件下で、植物プランクトンの栄養塩吸収速度が高かったことが示唆される。これは、PONの増加速度も同様に”400”ppm培養器で最大であったことから裏付けられる。

d. 実験4 (図10、11)

本実験では各pCO₂について2基の培養器を用いた実験を実施した。しかしながら、一方のシリーズについては、実験期間中の降水の影響により、培養器内の海水試料の塩分の低下が認められた。このため、本実験結果としては、塩分の低下が認められなかった培養器について得られた結果のみを示す。

pCO₂およびpHとも良く制御されており、それぞれの培養器において、実験期間を通してほぼ設定に近い値が維持されていた。本実験では、培養期間中の植物プランクトンの増殖によるpCO₂およびpHの変化を少なくするため、実験開始時に添加する栄養塩類量を従来の実験1-3に比較して25%に減少させた。このため、本実験においては、pCO₂およびpHの変動が少なくおさえられたものと思われる。

硝酸塩および亜硝酸塩濃度は、実験開始時の4.3μMからゆっくりとした低下を示し、10日目にはほぼ検出されないレベルになった。低下の速度は”400”および”800”ppmの培養器においてやや高く、”1200”ppmの培養器で低い傾向にあった。クロロフィル*a*濃度は実験開始から6日目までは顕著な増加は示さなかったが、8日目から増加を示し、10日目に極大値に達した。8-10日目の”400”ppmの培養器では、他の培養器に比較してクロロフィル*a*濃度は1.6倍ほど高く、低pCO₂（高pH）下において、高い植物プランクトンの現存量が認められている。

本実験では、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた植物色素の分析を実施した。クロロフィル*a*と同様に、10日目に高い濃度を示した色素は、クロロフィル*b*、フコキサンチンであった。これらの指標色素と植物プランクトングループの対応から考えると、10日目に現存量の高かったグループは緑藻類、珪藻類と考えられる。顕微鏡観察では、緑藻類の*Pyraminmonas* sp. および*Tetracelmis* sp.が10日目の試料で優占することが確認されている。

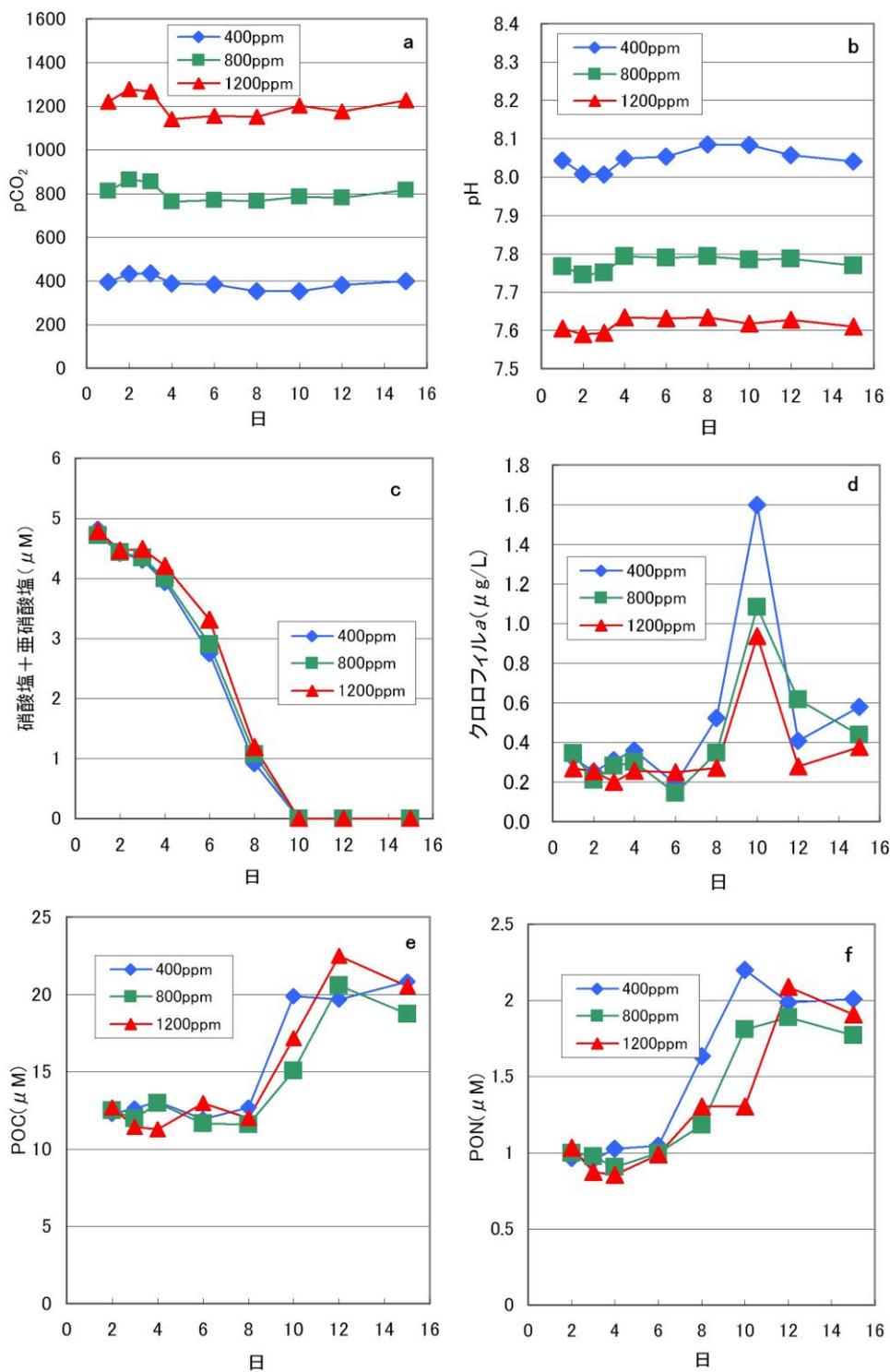


図10 実験4(2009年11月12日-30日)の”400”、”800”および”1200”ppm培養器におけるpCO₂(a)、pH(b)、硝酸塩+亜硝酸塩濃度(c)、クロロフィルa濃度(d)、懸濁態有機炭素(POC)濃度(e)、懸濁態有機窒素(PON)濃度の変化

おけるクロロフィル**b**の濃度が”400”ppmの培養器で最大の値を示したことは、これらの緑藻類が、 pCO_2 の増加あるいはpHの低下に対する脆弱性を有することが示唆される。

10日目から15日目にかけては、19'-ヘキサノイルフコキサンチンの増加が顕著に認められた。この増加は”400”ppm培養器において高く、”800”および”1200”ppm培養器における濃度の2倍程度に達した。15日目にはハプト藻の

Chrysochromulina sp.が優占することが顕微鏡観察で認められており、同種が高 pCO_2 下(低pH下)で増殖の阻害が生じていることが確認された。また、フローサイトメーターを用いた測定においても、*C. sp.*に相当するグループの粒子数が、”400”ppm培養器においては、他の pCO_2 の培養器の2倍以上高いことが確認されている。これらの結果は、冬季に実施された実験2において認められた結果と類似している。

ここで述べた指標色素濃度と、各植物プランクトングループのクロロフィル**a**: 指標色素の比を用いることにより、各植物プランクトングループが有するクロロフィル**a**濃度を推定

した。実験開始時は、植物プランクトングループ組成の変動は各 pCO_2 間で大きな差は無く、6日目までは珪藻類が主要なグループであったのに対し、8および10日目は、クロロフィル**b**を有する緑藻類が大きい割合を占めた。また、15日目には、ハプト藻類が主要なグループを占めることが明確となった。特に緑藻類とハプト藻の現存量は、”800”および”1200”ppmにおいては、”400”ppmに比較して低くなっており、先に述べた様に、酸性化がこれらの藻類に対して阻害的な影響を有す

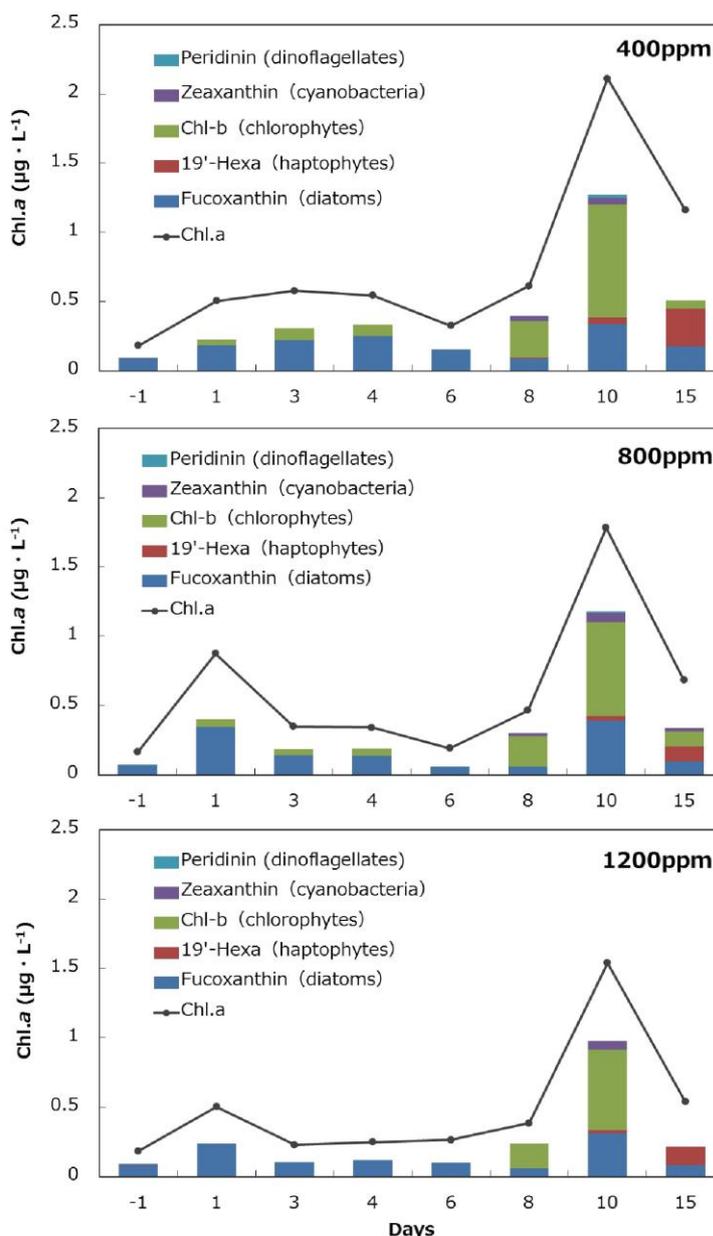


図11 実験4における植物プランクトンの指標色素濃度から見積もった、渦鞭毛藻(dinoflagellates)、シアノバクテリア(cyanobacteria)、緑藻(chlorophytes)、ハプト藻(haptophytes)、および珪藻(diatoms)の有するクロロフィル**a**濃度の変化

ることが本推定法によっても確認された。

e. 実験5(図12)

実験5における $p\text{CO}_2$ は各培養器共に、実験開始2日目に若干の低下を示したが、3日目から5日目にかけて回復し、それ以降はほぼ一定の値を示した。また、 $p\text{H}$ は2-5日目に設定値よりやや増加した値が得られたが、それ以降は大きな変動は示さなかった。これらから、通気による炭酸系の調整は順調に進んだものと判断できる。また、同一の $p\text{CO}_2$ の培養器2基における値も、26日目の“1200”ppmの値を除いては、良く一致していた。

硝酸塩および亜硝酸塩の濃度は実験開始後、急速に減少し、3日目においてほぼ検出限界以下の濃度となった。これは、植物プランクトンの増殖によるものであり、クロロフィル *a* 濃度は2日目に最大値に達した後、3日目以降は急速な減少を示した。同様に2日目ではフコキサンチン、クロロフィル *b*、パラシノキサンチンが、大きく増加しており、珪藻や緑藻などからなる比較的多様な植物プランクトングループが栄養塩の添加に応答して増殖したことを示している。また、シアノバクテリアの指標色素であるゼアキサンチンは、栄養塩添加前から比較的高い値を示していたが、3日目から18日目には低い値を示した。しかし、実験終了の26日目にかけて“1200”ppmの培養器で濃度が増加する傾向が見られた。ハプト藻が有する19'-ヘキサノイルフコキサンチンの濃度は全期間を通して低く抑えられていたが、8-10日目にかけて、また26日にやや増加する傾向が認められた。“400”ppmで同色素の高い濃度が認められた期間では、“1200”ppmの培養器では、低い値が認められた。これは、実験2、4において得られた結果と同様の傾向である。

図13には、上記の指標色素濃度から各植物プランクトンが有するクロロフィル *a* 濃度を算出し、全クロロフィル *a* 濃度に対する各植物プランクトンが占める割合を示す（同一の $p\text{CO}_2$ に調整した2基の培養器で得られた値の平均値として示す）。7日目までは各 $p\text{CO}_2$ 間で大きい差は認められず、珪藻を中心とした群集組成であったことが分かる。一方、14日目以降においては、 $p\text{CO}_2$ により差が認められた。“1200”ppmでは、ゼアキサンチンを有するシアノバクテリアの寄与が30-35%を占め、26日目では群集中で最大の割合を占めた。これに対し、“400”ppmの条件下では10%前後を占めるのみであった。逆に19'-ヘキサノイルフコキサンチンを有するハプト藻の寄与は、26日目において、“400”、“800”、“1200”ppm の培養器それぞれで、約30%、25%、15%と、酸性化が進行するにつれて減少する傾向が確認された。

また、本実験では、フローサイトメーターを用いて、プランクトン群集をサイズ別に評価することを試みた（図14）。1-3日目の間は $p\text{CO}_2$ 培養基間で、大きな差は認められなかったが、5日目以降においては、サイズ画分により $p\text{CO}_2$ および $p\text{H}$ の影響が確認された。すなわち、 $2\mu\text{m}$ 以下および $2 << 6\mu\text{m}$ の小サイズの画分においては、高い $p\text{CO}_2$ （低い $p\text{H}$ ）の培養器で粒子数が多い。一方、 $6 << 10\mu\text{m}$ および $10\mu\text{m}$ 以上の画分では、“1200”ppmにおいて粒子数が少ない傾向が認められた。海洋酸性化が、微生物群集のサイズ組成に対して影響を与える可能性は、本研究において初めて確認された。

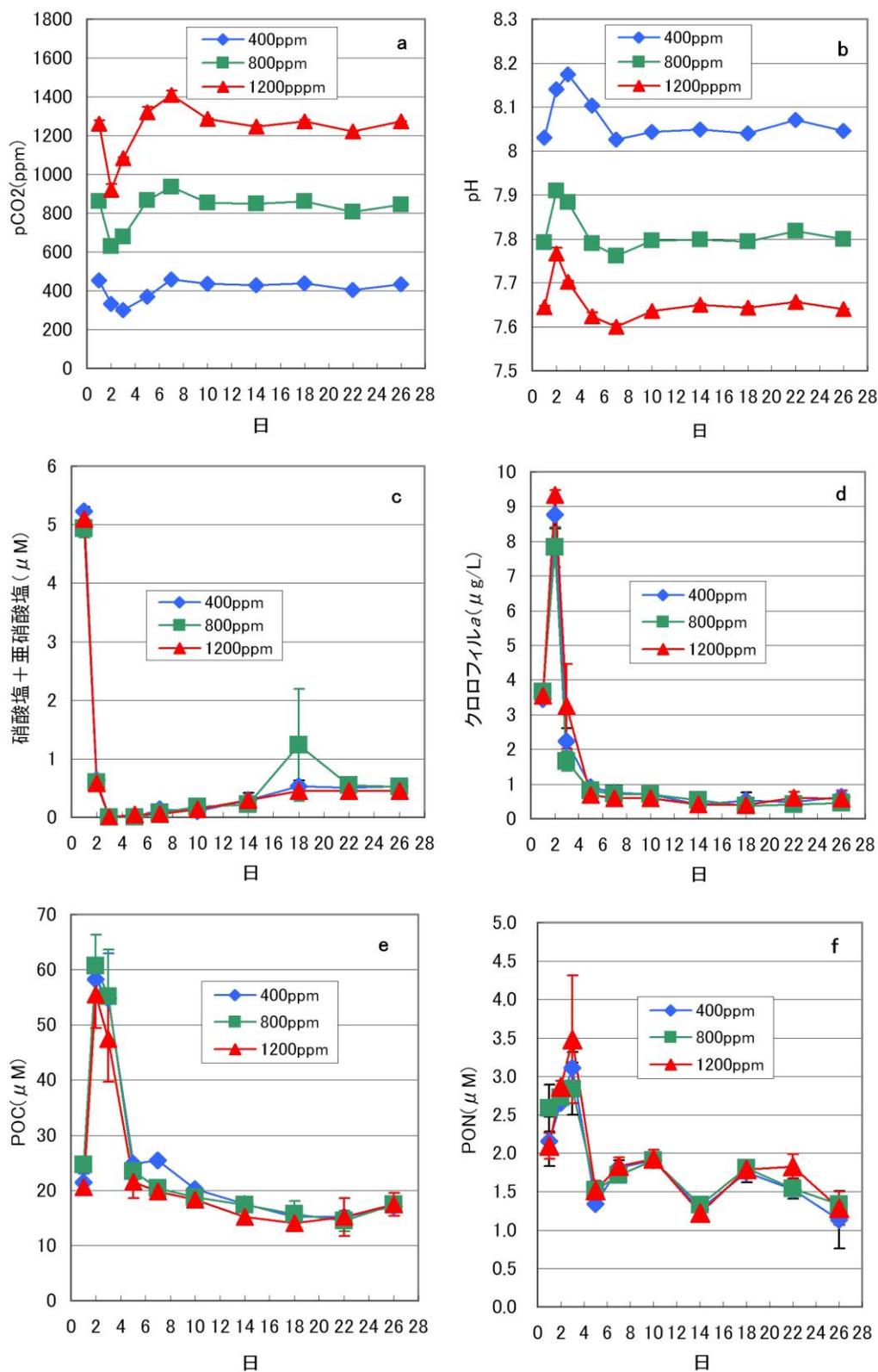


図12 実験5(2010年7月9日-8月2日)の”400”、”800”および”1200”ppm培養器におけるpCO₂(a)、pH(b)、硝酸塩+亜硝酸塩濃度(c)、クロロフィルa濃度(d)、懸濁態有機炭素(POC)濃度(e)、懸濁態有機窒素(PON)濃度の変化 2基の培養器で得られた値の平均値と範囲を示す

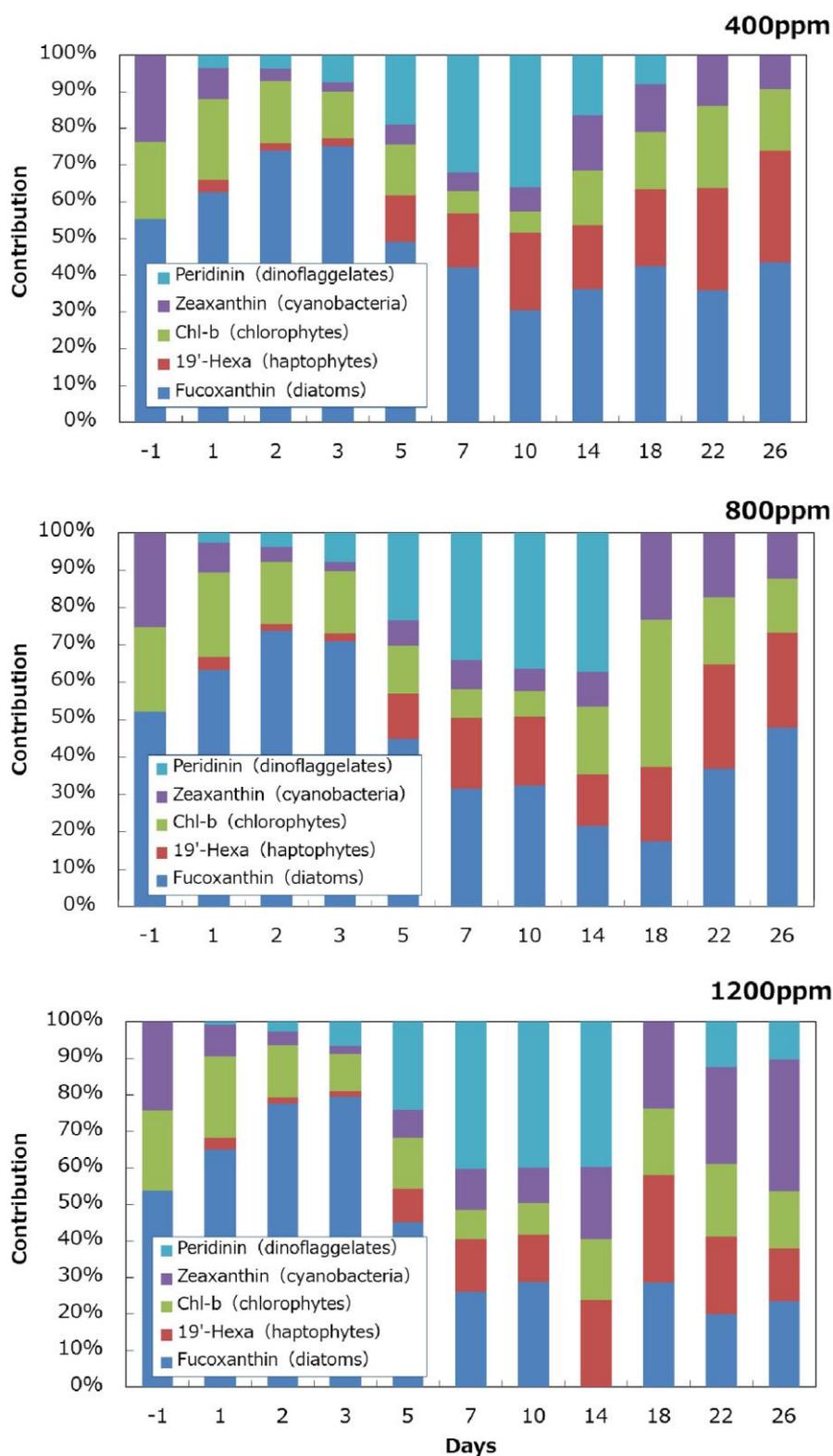


図13 実験5における植物プランクトンの指標色素濃度から見積もった、渦鞭毛藻 (dinoflagellates)、シアノバクテリア (cyanobacteria)、緑藻 (chlorophytes)、ハプト藻 (haptophytes)、および珪藻 (diatoms) の有するクロロフィル *a* 濃度の全クロロフィル *a* 濃度に対する割合 2基の培養器で得られた値の平均値を示す

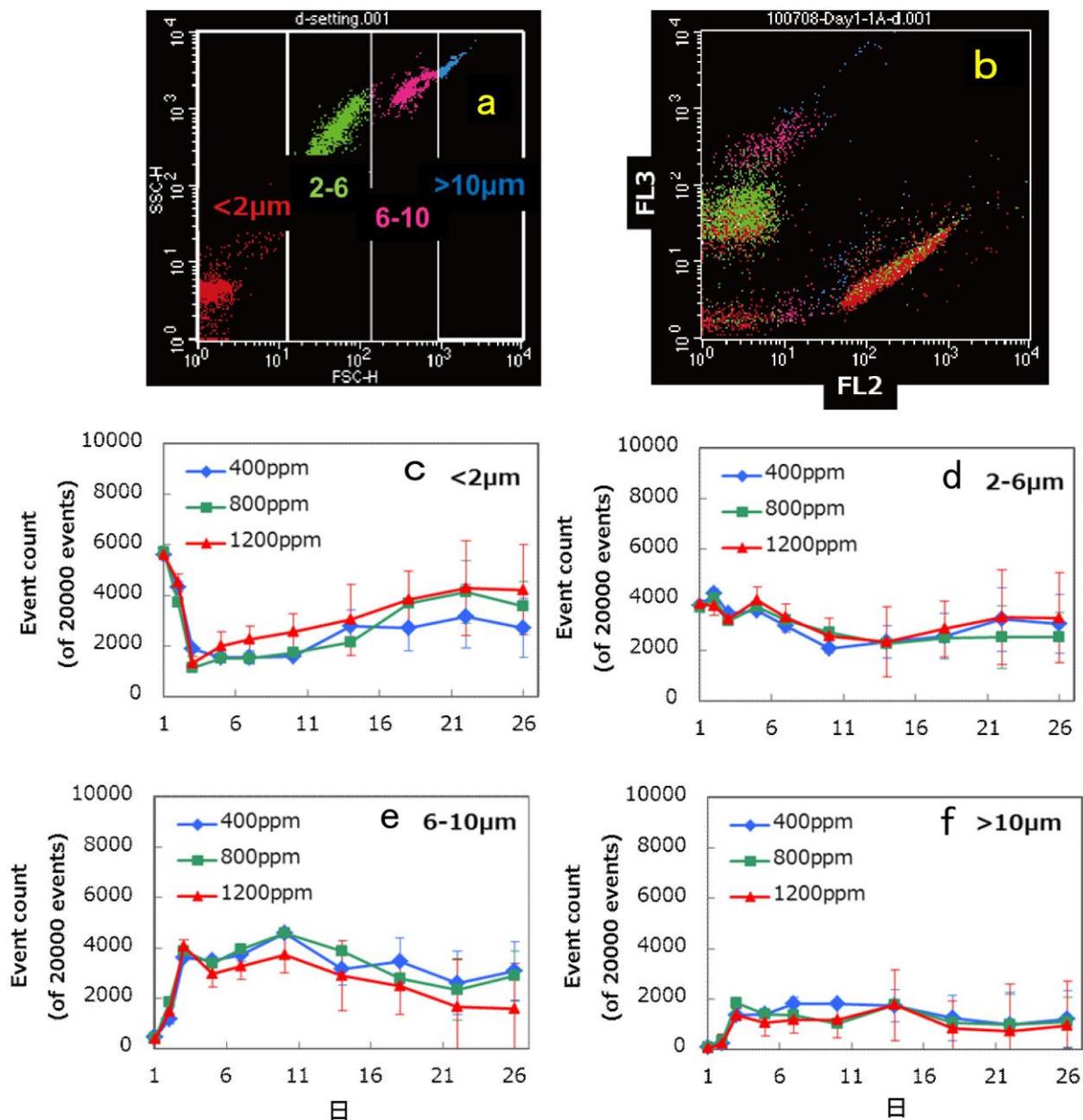


図14 実験5の植物プランクトン群集についてフローサイトメーターにより測定したサイズ組成の変化
 前方散乱(FSC)によるサイズ測定(a)、色素蛍光に基づく植物プランクトンのグルーピング(b)、
 "400"、"800"、"1200"ppmにおける2 μ m以下(c)、2-6 μ m(d)、6-10 μ m(e)および10 μ m以上(f)
 のサイズ画分における細胞数 2基の培養器で得られた値の平均値と範囲を示す

2) 海洋酸性化実験における $p\text{CO}_2$ および pH の制御

自然微生物群集に対する海洋酸性化の影響を評価するための実験的解析は、今世紀に入り、活発に行われる様になりつつある^{8,9)}。しかしながら、その手法は、酸性化の手法(CO_2 の通気、酸の添加)、培養器容量等において、非常に多様である。今後得られる情報を相互に比較し、また政策に反映することを考えると、早期に実験手法の統一を図る必要がある。本研究では、培養液の pH を調整する手法として、実際に海洋における酸性化をもたらす原因である海水中の CO_2 濃度の調整を用いることとした。また、海洋酸性化の影響を海洋物質循環まで含めて解析するためには、有機物濃度等の分析のため、実験期間を通して相当量の試料の採取が必要となる。このため、本研究では、炭酸系の専門家であるサブテーマ(1)のグループの協力を得て、400Lスケールの培養器を用いた実験系の確立を図った。

植物プランクトン群集組成に対する影響を評価する目的で、数L程度の培養系⁸⁾が用いられてきている。このような培養液量が少量の場合は、培養液に通気するガス量も少量で良いため、 $p\text{CO}_2$ および pH などの炭酸系を調整、維持することは比較的容易である。一方、より自然状態に近い中規模閉鎖系(メソコスム)と呼ばれる大型(27 m^3)の培養系を用いた解析も試みられてきている⁹⁾。しかしながら、このシステムでは実験期間を通して、ガスの通気により炭酸系の調整、維持を行うのは現実的では無い。このため、このような大規模な実験系では、海水試料への通気は実験開始前の数日のみ実施し、実験開始後は培養器部の大気部分のみの $p\text{CO}_2$ を維持する方法がとられている。このため、実験開始後に大型培養器内の海水の $p\text{CO}_2$ および pH は、開始時に設定した値から、自然の海洋では生じ得ないほどの幅で、大きく変動してしまう($p\text{CO}_2$ の低下、 pH の上昇)⁹⁾。このため、得られた結果が、酸性化の程度をどの程度反映したものかについて、大きな疑問が残る。

本研究では、実験期間中の $p\text{CO}_2$ および pH を可能な限り一定に保つことを前提にし、また採取試料量を勘案して、培養実験系のスケールを400Lとした。

400Lの海水試料の $p\text{CO}_2$ と pH の調整のため、実験開始までに一定時間の気体の通気を行った。実験1では、8時間程度実施し(培養海水容量のほぼ10倍量)、各培養基間で $p\text{CO}_2$ および pH の差は明確であったが、 $p\text{CO}_2$ の設定値を下回っていた(図7a)。これは通気量の不足によるものと考えられた。このため、2回目以降の実験では、実験前の通気時間を長くし、最終的には40時間の通気を行った。その結果、実験5では、実験開始時に”400”、”800”および”1200”ppmの設定値にほぼ近い値が得られた。この通気量は海水試料の50倍量に相当し、今後の酸性化実験における通気による炭酸系調整の基準として、「培養海水量の50倍量」を提唱する事が可能である。一方、実験期間中には毎日6時間の通気を実施したが、実験3および5においては、実験中に $p\text{CO}_2$ の低下と pH の上昇が認められた。この変化は、培養器中の植物プランクトンの現存量の増大に対応したものであり、光合成による CO_2 の消費によるものと考えられる。すなわち、毎日6時間(培養海水量の10倍量)の気体の通気では、植物プランクトンによる CO_2 消費を相殺することは不可能であったことを示す。微生物に対する $p\text{CO}_2$ および pH の変化の影響を評価するためには、これらのパラメーターは可能な限り不変であることが望ましい。植物プランクトンの光合成の影響を少なくするためには、実験4および5で実施したように、実験開始時の栄養塩の添加量を減少させることなどが有効であろう。

しかしながら、植物プランクトンの現存量が高い沿岸域等では、日中の光合成による CO_2 の消費

および夜間の呼吸によるCO₂の生成により、pCO₂およびpHが日周的に変化していることが予想される。これを考慮すると、微生物の代謝を反映したある程度の炭酸系の変化は、許容されると考えられる。今後は、自然条件下に近い状況のもとで酸性化の影響を評価する場合や、微生物代謝系に対するpCO₂およびpHの影響を代謝生理学的に明らかにする場合など、実験系の目的を明確にし、それぞれに妥当な培養条件を設定することが必要であろう。

3) 植物プランクトンの増殖と炭酸系の変化

5回の実験を通して得られたpCO₂とpHとの関係を図15aに示す。両者は良い関係にあり、炭酸系以外のアルカリ度等の条件が、5回の実験を通してほぼ一定であったことを示している。

pCO₂は、多くの場合設定値（”400”、”800”および”1200”ppm）に近い値をとったが、設定値から大きく減少する場合が認められ、この際にはpHの増加を伴っていた（図15b）。さらに、pCO₂の変化とクロロフィルa濃度との関係を見ると、pCO₂の低下がクロロフィルa濃度の高い時に認められていることが明確である。これは、先に述べたように、植物プランクトンの現存量が増加した際に、光合成によるCO₂の消費量が増加し、pCO₂の減少がもたらされていることによる。3種類に設定されたpCO₂の培養器それぞれについて、調整値（”400”、”800”および”1200”ppm）からの実測値の減少幅を算出すると、300ppm（設定値400ppm）、500ppm（設定値800ppm）、650ppm（設定値1200ppm）と、pCO₂設定値の低い培養器ほど、減少幅が少ない。特に”400”ppm培養器においては、最小値は100ppmを下回る非常に少ないものであった。この結果は、”400”ppm培養器においては、植物プランクトンの現存量が高い場合は、植物プランクトンの光合成が低濃度のCO₂により制限を受ける可能性を強く示唆する。一方、”1200”ppmの培養器においては、pCO₂の実測値は最小でも550ppmであることから、植物プランクトンの現存量が高い場合も、光合成が低いCO₂濃度により制限が生じている可能性は少ない。

海洋における植物プランクトン現存量の制限要因は、通常は栄養塩あるいは鉄等の微量元素と考えられている。沿岸域や湧昇域において、栄養塩および微量元素の有光層への供給量が多い場合は、高い植物プランクトン現存量が認められる。本実験で得られた結果は、このような海域において、植物プランクトンの光合成がCO₂により律速される可能性を示唆する。一方、海水中のpCO₂が上昇した場合には、”800”および”1200”ppmで認められた様に、このようなCO₂律速は生じにくい。言葉を換えると、栄養塩濃度が豊富で植物プランクトンの現存量、一次生産量が高い海

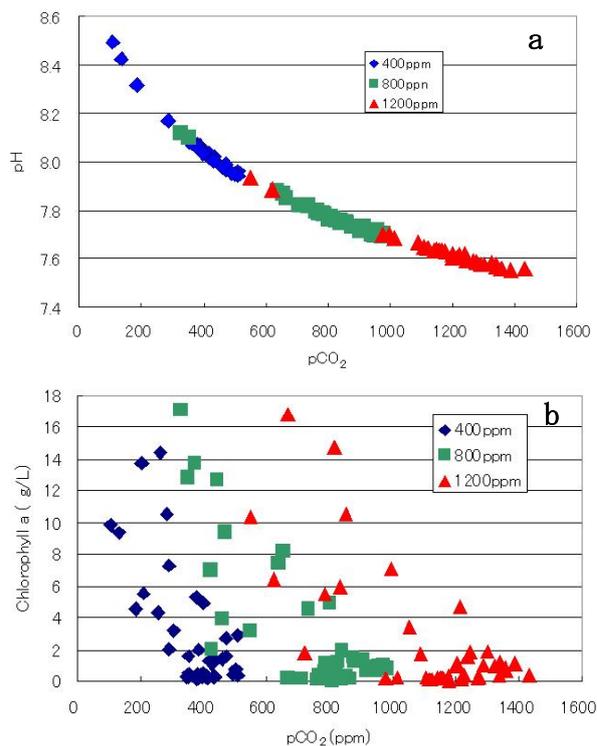


図15 5回の実験を通した海水試料のpCO₂とpH(a)、およびクロロフィルa濃度(b)との関係

域では、酸性化による $p\text{CO}_2$ の増加は、現存量、一次生産量の更なる増加をもたらす可能性もある。

“400”ppm培養器において $p\text{CO}_2$ が最小の100ppm近くまで低下した実験3の4日目において、溶存無機炭素（DIC）濃度は、 $1750\mu\text{M}$ 存在していた。これは実験開始時の $2070\mu\text{M}$ の85%に相当する値であり、DIC濃度から判断すると、この状況の下では光合成が無機炭素の律速に至っているとは考えにくい。光合成の一般的な炭素固定回路として知られるカルビン-ベンソン回路での炭素固定は、 CO_2 のみを基質として固定する。このため、海洋酸性化が植物プランクトンの光合成に与える影響については、全炭酸物質の濃度では無く、本研究の様に、 $p\text{H}$ による炭酸系の変化を考慮に入れた評価を行うことが強く望まれる。

本推進費の研究において特筆すべき点の一つは、炭酸系の専門家のサブテーマ（1）のグループと共同で培養実験を実施したことである。培養系の設計から、 $p\text{CO}_2$ 、 $p\text{H}$ の精密な測定と解析を含め、実験の細部にわたり炭酸系の専門家との協力の下で実験が進められたことは、本研究で成果を上げる上で大きな要因となった。上述した様な課題では、炭酸系の専門家との協力を通して、さらにより有効に研究が進められるものと思われる。

4) 珪藻の増殖への酸性化の影響

本研究で実施した5回の実験で、3回については栄養塩添加後数日以内に珪藻を中心とする植物プランクトンの現存量が増加した。これらの実験は、11月（実験1）、5-6月（実験3）および7-8月（実験5）に実施しているが、何れも好天が続き高い光量子量が得られたことがその原因と考えられる。このような栄養塩の添加に対する珪藻の応答は、同様のメソコスム実験においても一般的に認められているものであり¹⁰⁾、栄養塩濃度の高い条件下で高い増殖速度を有することが、珪藻が優占的に増殖する理由と考えられている。

これら珪藻の優占が生じた3回の実験を通して、 $p\text{CO}_2$ および $p\text{H}$ の差が珪藻に及ぼす影響は顕著では無く、また、実験によりその方向性が異なっていた。実験1では高 $p\text{CO}_2$ 条件下で、やや高いクロロフィルの増加速度が認められ、また、栄養塩の減少速度も“1200”ppmの培養器で高い傾向にあった（図7c、d）。この結果は、自然群集を用いた報告^{8,9)}と一致するものである。しかしながら、この結果は、珪藻は細胞内への炭素濃縮機構（CCM）が発達していることから、 CO_2 濃度の増加により光合成は増加しにくい¹¹⁾、とする一般的な認識とは異なっている。

一方、実験5では“1200”ppmの条件下で、光合成生産量が低下する傾向が認められた。本実験では、観測日毎の光合成生産量を、 ^{13}C トレーサー法により測定した。珪藻が優占種として大きな割合を占めた2、3日目のクロロフィル a あたりの光合成生産速度は、“400”および“800”ppmに比較して少ない傾向にあった（図16）。この結果は、 CO_2 濃度の増加が必ずしも光合成速度の増加をもたらさないことを示している。これらは、 CO_2 の増加が珪藻には阻害的な影響を与えたとするYoshimuraらが得た結果と一致している¹²⁾。し

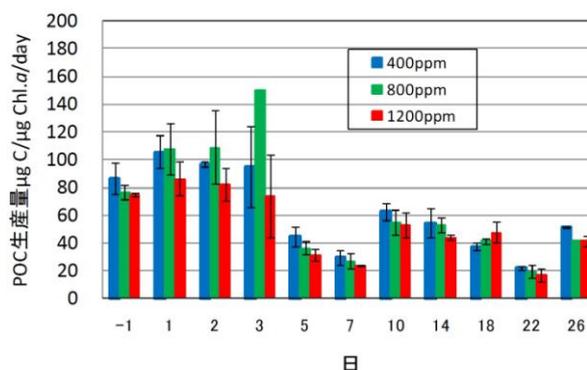


図16 実験5の観測日における光合成速度
2基の培養器において得られた値の平均
値と範囲を示す

かしながら、この期間には珪藻以外にも緑藻も比較的高い割合を占めていたことから（図13）、実験3や本実験により認められた緑藻の増殖への酸性化の阻害効果を反映している可能性も考えられる。

珪藻は上述した様に、栄養塩供給量の多い沿岸域や湧昇域で主要な一次生産者である。また、生物ポンプによる有機炭素の下方輸送過程において、重要な役割を果たしているグループである。このため、酸性化に対する珪藻の動向は、海洋の炭素循環や大気CO₂の海洋への吸収量等の変動に関わる可能性が大きい。本研究では、珪藻の酸性化への応答は一定の方向では無く、また、それほど顕著なものでは無かった。今後も情報を積み重ねる必要はあるが、CCMの発達程度から予測されているように、珪藻への酸性化の影響は限定的なものに留まる可能性が予想される。しかしながら、珪藻の増殖に必要な珪酸塩濃度と他の栄養塩濃度との関係などを含めて、今後さらに解析する必要がある。

5) 海洋酸性化のハプト藻*Chrysochromulina*属への阻害的影響

本研究を通して、石灰質の殻をもたないハプト藻*Chrysochromulina*の増殖が酸性化により阻害的な影響を受ける事が繰り返し確認された。

特に、実験2においては、“400”ppmと、pCO₂の増加した“800”および“1200”ppmとの差が顕著に認められた。フローサイトメーターによる粒子の分析結果から、*C. sp.*に相当する細胞数が、“800”および“1200”ppmにおいて、大きく低下することが見いだされた（図17）。この実験では¹⁵Nトレーサー法による懸濁態有機窒素（PON）の生産量の測定を実施したが、15日目の“800”および“1200”ppm培養器における値は、“400”ppmの値のわずか11-17%に相当するのみであった（図18）。また、実験4および5においても、植物色素（図11、13）やフローサイトメーターによる分析結果から、高pCO₂、低pH条件下で、*C. sp.*の増殖の阻害が生じていることが明らかとなっている。

このため、我々は、単離培養された同属種

（*Chrysochromulina sp.*）を用いて、実験室での培養実験を通して、pHの影響を評価することを試みた。培養実験で得られた結果の一例を図19に示す。培養開始後3日目までは各pH共に大きな差は認められなかったが、4日目以降、細胞数はpHの低下につれて減少する傾向が認められた。培養最終日における細胞数もpH8.2で最大であり、pHが低いほど細胞数も少ない傾向が認められた。この結果は、実験2で認められたpHによる現存量の差ほどは顕

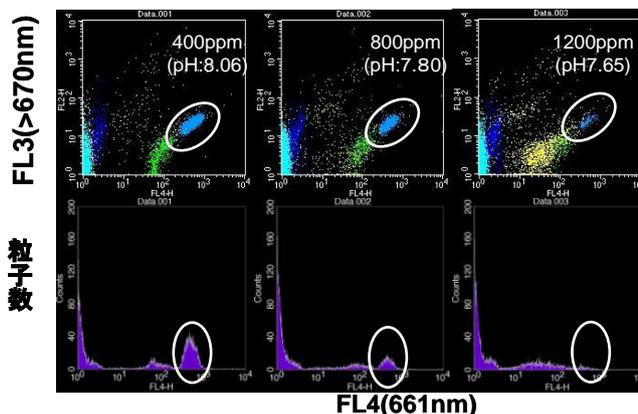


図17 実験2の15日目におけるフローサイトメーターによる植物プランクトン群集の解析 ○内がハプト藻 *Chrysochromulina sp.*

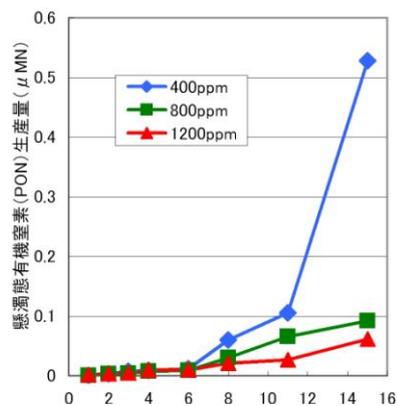


図18 実験2における懸濁態有機窒素 (PON)の蓄積生産量の変化

著では無かったが、単離株を用いた実験によっても、酸性化が同属に対して阻害的な影響を及ぼすことが示唆された。

Chrysochromulina sp.への酸性化の阻害的効果がどのような機構によるのかは、現在は明らかになっていない。CO₂濃度の増加は、一般的に光合成速度を増加させることから¹¹⁾、阻害的な影響を与える原因としては、今のところ考えにくい。特に単離培養株を用いた培養実験では、pHを変化させたのみでDIC濃度は変化させていない。これから考えると、pHの低下が何らかの阻害的影響を与えているものと考えられる。pHの変化が植物プランクトンの代謝に及ぼす影響としては、細胞内外のイオンバランスを維持するためのエネルギー消費量の増加¹³⁾や鉄などの微量元素の存在状態の変化¹⁴⁾などが提案されている。今のところ、この原因に関する手がかりは乏しいが、細胞内pHの測定など、培養種を用いた代謝生理化学的な解析を通して、重要な情報が得られるものと期待される。

*Chrysochromulina*属は沿岸から外洋まで、幅広く分布する植物プランクトングループとして知られている^{15,16)}。近年になり、Liuら(2009)は遺伝子解析の結果をもとに、海洋に生息するハプト藻において、同属は中心グループを構成するほどの重要性を有することを報告した¹⁶⁾。さらに、植物色素の結果を統合することにより、ハプト藻は富栄養海域から貧栄養海域に至るまで、最も主要な植物プランクトングループであり、ハプト藻、珪藻および原核藻類を合わせたクロロフィルa量の35-50%はハプト藻により占められる事を見いだした(図20)。このLiuらの研究は、海洋生態系において、*Chrysochromulina*属が重要なグループである事を示している。本研究で得られた様に、同属が海洋酸性化に対して高い感受性を有し、酸性化の進行につれてその現存量を減らす可能性があるならば、一次生産過程を含めた海洋の微生物生態系に大きな変化が生ずることが予想される。

一方、植物プランクトンを指標種として用いて、水質汚染の程度など、水環境を評価する方法が広く用いられてきている。このような環境指標種として生物種を用いる場合には、その分布域が広いことが望ましい。上述した様に*Chrysochromulina*属は、沿岸域から外洋域まで広く分布する事が知られているため、微生物生態系に対する海洋酸性化の影響を評価する際には、非常

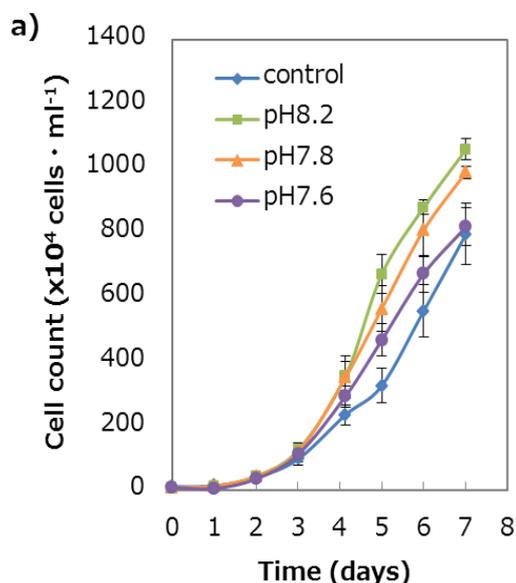


図19 *Chrysochromulina* sp.の単離培養株を用いた各種のpHにおける増殖曲線

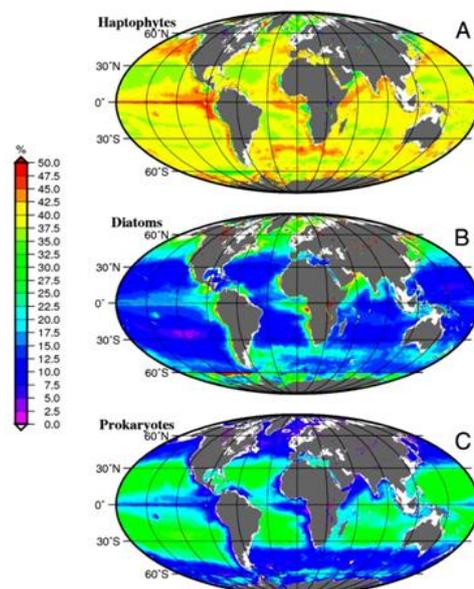


図20 海洋におけるハプト藻(A)、珪藻(B)、原核藻類(C)の3グループの、全クロロフィルa濃度に対するそれぞれの寄与¹⁶⁾

に優れたグループであると考えられる。この際、多くの試料を対象に、光学顕微鏡で本属の細胞数を計測することは時間と労力を要する。しかし、本研究で実施した様にHPLCによる同属の指標色素である19'-ヘキサノイルオキシフコキサンチンの定量や、フローサイトメーターを用いた細胞数の計測は、的確に同属のバイオマスを見積もることを可能にする。今後の海洋酸性化の進行を監視する有力な指標種として提唱できる。

6) 物質循環への影響

海洋の物質循環と気候変動との関係を考察する際に、海洋表層から中・深層の炭素過程は非常に重要である。「生物ポンプ」による表層から中・深層への炭素の鉛直輸送と¹⁷⁾、近年指摘され始めた「微生物炭素ポンプ」による難分解性溶存態有機炭素 (R-DOC) の生成¹⁸⁾がその中心的過程と考えられる。

「生物ポンプ」による炭素鉛直輸送についてはセジメントトラップを用いた研究等により、これまで多くの情報が蓄積してきている。一次生産者である植物プランクトンの分類群から考えると、大型の珪藻が優占する場合には、大型動物プランクトンによる捕食を通して、糞粒として比較的多くの有機炭素が中・深層へ輸送される¹⁹⁾。一方、2 μm 以下のピコプランクトンが優占する海域では、微生物食物連鎖の割合も増すことを含め、表層で分解される有機物が多く、相対的に中・深層へ輸送される有機炭素量は少ない¹⁹⁾。本研究で得られた結果のみから、酸性化が進んだ際に生物ポンプの効率が上がるか否かについて議論することは時期尚早かもしれないが、CO₂濃度の上昇が必ずしも珪藻の増殖の促進をもたらさないとすると、海洋酸性化によって、鉛直輸送量は大きく変わらない可能性がある。しかし一方で、本研究の結果から、海洋酸性化は植物プランクトン全体のサイズ組成を変化させる可能性もある。仮に、酸性化が進んだ海域において、2 μm 以下のピコプランクトンの細胞数が増加し、6 μm 以上のナノ、ミクロプランクトンが減少した場合には(図14)、鉛直輸送量は減少することも十分に考えられる。植物プランクトンサイズ組成の変化に関しては、本研究では実験5のみで検討したが、今後、注目すべき課題であると考えられる。

もう一つの炭素隔離過程として最近提唱された「微生物炭素ポンプ」に関連した観測として、本研究では溶存態有機炭素(DOC)の濃度に対する酸性化の影響も評価した。実験1、3および4ではDOC濃度にpCO₂の差による有意な変動は見られなかったが、実験2および5では、pCO₂の低い培養系でDOC濃度が高くなる傾向が認められた。実験5では珪藻、緑藻の増殖が生じた後の6日目からDOCの増加が認められた(図21)。

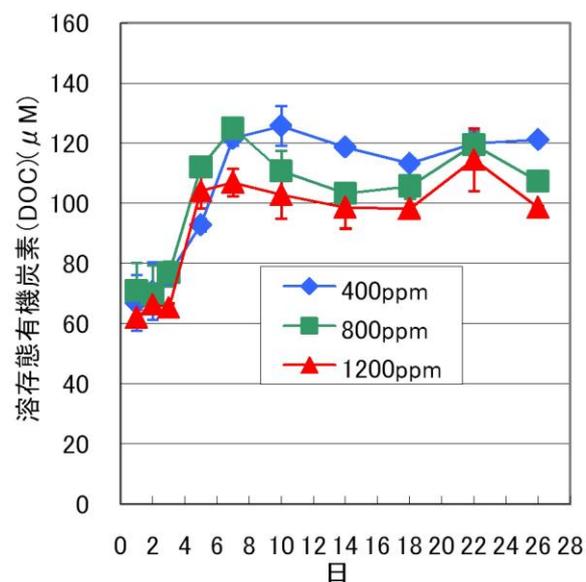


図21 実験5における溶存態有機炭(DOC)濃度の変化
2基の培養器で得られた値の平均値と範囲を示す

これは、植物プランクトン細胞を構成していた有機炭素が溶存化したものと思われる。また、増加したDOCは、ほぼ1ヶ月間にわたり有意な濃度の変動は認められなかったことから、溶存化したDOCが比較的安定な性質をもつことを示唆している。4日から8日にかけてのDOC濃度の増加は、”1200”ppmに比較して”400”および”800”ppmにおいて顕著であり、また実験後半においても”400”ppmにおいて高い濃度が維持された。このような安定なDOCは、「微生物炭素ポンプ」と呼ばれるように、バクテリアの代謝産物が主要な構成成分である可能性が高い。ここで認められたDOCの残存量の違いも各pCO₂培養系におけるバクテリアの現存量の違いを反映していることが示唆される²⁰⁾。より酸性化の進行した培養器でDOC濃度の残存量が少なかったことから、酸性化により「微生物炭素ポンプ」の効率が減少する可能性も考えられる。

このように、気候変動に大きく関与する海洋炭素循環過程に対して、海洋酸性化の影響が及ぶ可能性があることから、今後の酸性化に関する研究を、より生物地球化学的な観点により重視して進める必要がある。

(2) 円石藻*Emiliana huxleyi*の培養株を用いた解析

1) *Emiliana huxleyi* の光合成による海洋酸性化の補償

円石藻は光合成の基質として培地中の溶存CO₂を消費する。そのような藻類(CO₂ userと称する)は、光合成の際に吸収した培地中のCO₂分子の濃度低下を引き起こす。したがって、その不足を補うためHCO₃⁻→CO₂+OH⁻の反応が生じ、培地のアルカリ化が引き起こ

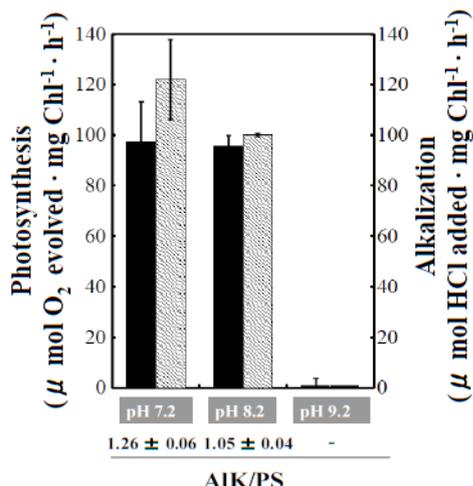


図23 様々なpHにおける*Emiliana huxleyi* の光合成に対するアルカリ化率
 黒色: 光合成 ハッチング: アルカリ化
 エラーバーは標準偏差を示す n=3

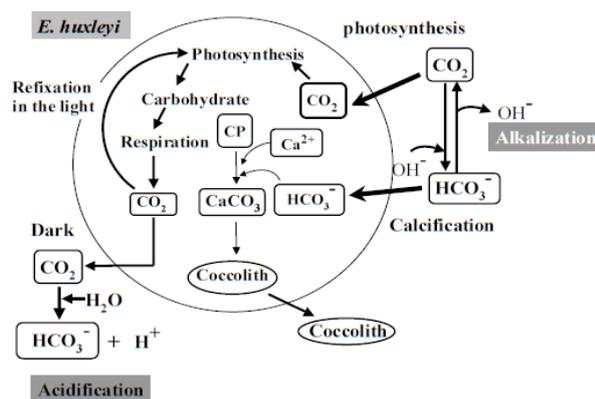


図22 *Emiliana huxleyi*における光合成とpH変化

されることは既に報告されている(Shiraiwa et al. Plant Cell Physiol. 34: 649-657, 1993)。本研究において、円石藻*Emiliana huxleyi*を用いた生理学的実験の結果、*E. huxleyi*には酸性化が進行した場合、それに対抗して周囲の環境のアルカリ化(alkalization)を引き起こす能力を向上させる機能、すなわち、円石藻細胞がpH変化に対する恒常性(補償)機能を有することを初めて明らかにした。

すなわち、光合成によって培地中の溶存CO₂が消費されるとその不足を補うためHCO₃⁻→CO₂+OH⁻の反応が進行し、CO₂濃度が維持されると同時にpHが上昇する(図22)。同様に、

呼吸によってCO₂が排出されると先ほどと逆の方向に反応が進みpHが低下することになる²¹⁾。尚、円石藻は石灰化機能を有することが特徴であるが、その反応速度は光合成の反応に比して10-50%であり、それ以上の石灰化反応速度を有する円石藻の報告はこれまでない。また、円石藻の石灰化は細胞内のココリス小胞において進行し、石灰化反応により生産されるCO₂分子は直ちに光合成によって吸収・固定される。また、*E. huxleyi*の石灰化反応は光合成反応の駆動時にのみ進行する。したがって、石灰化反応によって放出されるCO₂による酸性化は生じないしくみとなっている。ただし、夜間（暗期）においては、呼吸により放出されるCO₂が細胞外へと出され、平衡反応の結果海水の酸性化を引き起こすことは自明である。

円石藻が光合成を行っている場合、pHの上昇速度と光合成活性を我々の作成した装置で同時に測定すると、現行の海水pHに近似のpH8.2条件では両者の比は約1.05になる。しかし、同比は海洋酸性化条件を模したpH7.2条件において1.26の値を示した。対照的にpH9.2においては光合成が殆ど行われず、アルカリ化も観察されなかった。この結果は*E. huxleyi*が酸性化条件に置かれるとそれに対抗するかのように周囲のpHを上昇させようとする力（補償能力）が強まることを示唆している（図23）。つまり、酸性化に伴って引き起こされるpH上昇速度の増大は、前述した光合成による細胞外の培地中のCO₂消費とそれに伴うアルカリ化の増大だけでは説明出来ないことを意味している。この原因については未だに明らかになっていない。しかし、これらの結果は、生物が環境のpHに影響を及ぼす能力を有することを実験的に示した例として非常に重要な結果である。

2) 海洋酸性化が円石藻 *Emiliania huxleyi* の光合成に与える影響

1) の結果を受けて円石藻 *Emiliania huxleyi*の光合成の酸性化に対する応答を精査した。NaHCO₃を加え、溶存無機炭素濃度(Dissolved Inorganic Carbon : DIC)を2 mMとして実験を行った所、pH低下に伴う顕著な酸素発生活性の増加が観察され、pH7.2条件では現行の海水のpHに近い8.2に比べて5倍高い活性を示した(図24、2 mM DIC)。この結果はpH低下による炭酸平衡のずれによりCO₂が増加することで光合成活性が上昇したものと考えられる。そこで、NaHCO₃の添加量を増やし、10 mM DICとして測定を行った所、今度はpH7.8にピークを持つ山型のデータが得られた。ピークであるpH7.8条件の光合成活性はpH8.2の1.5倍であり、pH7.2においても8.2とほぼ同じレベルの活性が観察された(図24、10 mM DIC)。これらの結果は、光合成が酸性化の影響によって上昇することを示している。DIC濃度による違いは2mM DIC条件ではCO₂濃度に対する依存性が顕著に現れているが、10 mM DICではCO₂が十分に存在するため酸性化の影響が表出したものと思われる。次

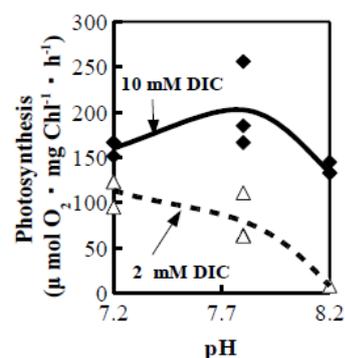


図24 *Emiliania huxleyi*における光合成の酸性化影響

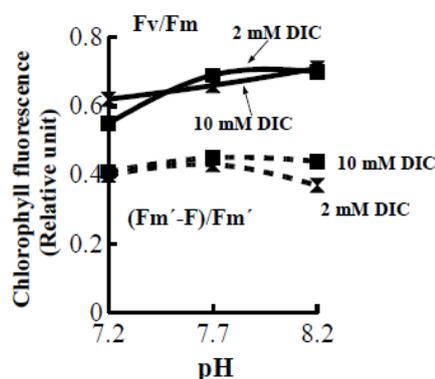


図25 *Emiliania Huxleyii*における光化学系活性の酸性化

に光合成の初期過程に当たる光化学系に酸性化が与える影響についても調べた所、光化学系は酸性化の影響をあまり受けないことが明らかになった(図25)。PH7.2~8.2条件において48h培養した*E. huxleyi*細胞のクロロフィル蛍光を測定すると、光化学系IIの状態を反映するFv/Fm値²²⁾は、pH 7.2条件においては、pH 8.2と比較して2 mM DICでは20%の減少、CO₂が十分存在する10 mM DICでも10%減少を観察した(図25, 実線)。一方、炭酸固定系の活性を反映する(Fm'-F)/Fm'²³⁾は、2 mM及び10 mM DICともにpH7.2においてpH8.2比で5%の活性減が観察された。しかしながら、pH 7.7では、Fv/Fm、(Fm'-F)/Fm'共にほとんど減少が見られなかった(図25 破線)。この結果は、今世紀末までに予想される0.3程度のpH低下では、*E. huxleyi*の光化学系にはほとんど影響が無いことを示している。むしろ、2 mM DICの(Fm'-F)/Fm'値はpH 8.2の場合よりも15%の上昇が認められ、炭酸固定活性が増加していると思われる。

3) 酸性化が円石藻*Emiliania huxleyi*の石灰化に及ぼす影響

海洋酸性化が *E. huxleyi* の石灰化に与える影響については全く異なる 2つの見解が存在する。

Riebesellら(2000)²⁴⁾は Nature 誌において酸性化によって石灰化の抑制が起こると報告し、Iglesias-Rodriguez ら (2008)²⁵⁾は酸性化によるココリス体積の増大を 2008 年の Science 誌に発表している。我々はこのような違いがなぜ起こったのかを生理学的手法を用いて解明する為、お互いの実験を再現し詳細な解析を実施した。

まず、両者の違いはその実験法にあった。Riebesellら²⁴⁾は酸添加によって酸性化条件を再現しているのに対し Iglesias-Rodriguez ら(2008)²⁵⁾は高

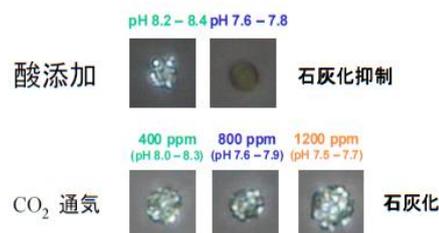


図26 酸添加およびCO₂ 通気実験における *E. huxleyi*の偏光顕微鏡写真
培養24h後の状態 白く光っているのがココリス

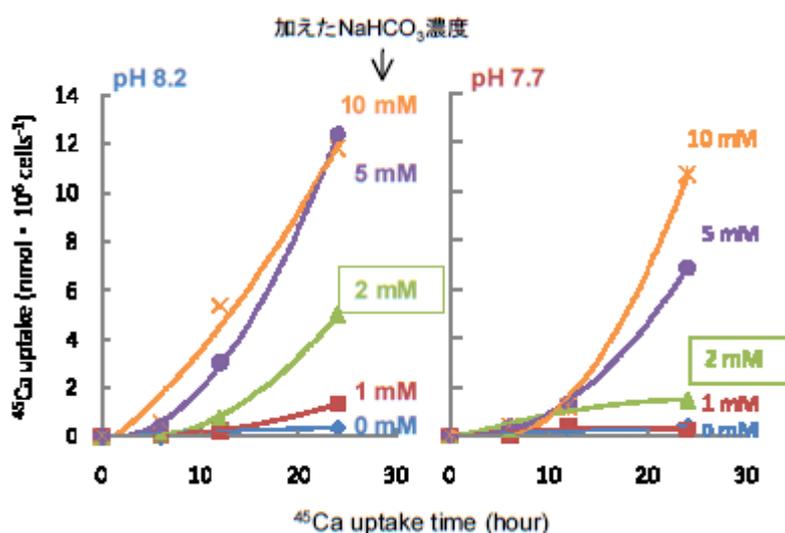


図27 *Emiliania huxleyi*におけるCa²⁺取り込みのHCO₃⁻濃度

濃度のCO₂を通気することで低pHの状態を作り出している。

そこでまず、我々は塩酸を添加してpHを8.2, 7.7, 7.2に調整した培地による培養実験(酸添加実験)とCO₂濃度を400, 800, 1200 ppmに調整した空気を通気しての実験(CO₂実験)を行いそれぞれの再現性を調べた。その結果、酸添加実験では石灰化の抑制が見られ、CO₂実験では石灰化の促進が認められたことで、

その再現性が確認できた(図 26)。一見するとどちらも同じく酸性化実験であるが、我々は溶存無機炭素量 (DIC) が両者の間で決定的に異なることを見出した。

CO₂ が水に溶けると溶存 CO₂、重炭酸イオン、炭酸イオンのという 3 種の化学種として存在する。この 3 者は $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$ という平衡関係にあり、DIC とはそれら (CO₂(aq), HCO₃⁻, CO₃²⁻) の総和に等しい。この平衡が酸添加では右から左、CO₂ 通気では左から右へと進むことになる。その結果、酸添加実験では増加した CO₂ が気相に放出される為 DIC の減少が起こる。計算の結果、酸添加後 24h で pH7.7 条件では 80%、pH7.2 では実に 95%もの溶存無機炭素が失われていることが分かった。一方 CO₂ 通気による実験では DIC の低下は起こらず実験期間を通じてほぼ一定に保たれていた。炭酸化学種の一つである重炭酸イオンは *E. huxleyi* における石灰化の基質である²⁶⁾。酸添加実験では同基質の欠乏が起こっているものと思われた。そこで、様々は重炭酸イオン濃度下における細胞への ⁴⁵CaCl₂ 吸収を調べる実験を行った。その結果、酸性化の如何に関わらずカルシウムイオンの取り込みが重炭酸イオンの濃度に依存していることが分かった(図 27)。これらの結果は、Riebessell ら (2000)²⁴⁾と Iglesias-Rodriguez ら (2008)²⁵⁾、それぞれの実験結果が違った原因が重炭酸イオン濃度の違いにあったことを明確に示している。それと同時に、現在、懸念されている大気中の CO₂ 増加による海洋酸性化では、*E. huxleyi* のココリス形成は影響を受けないことを示唆している。

4 4) 酸性化が円石藻 *Emiliania huxleyi* の細胞増殖に及ぼす影響

異なる CO₂ 濃度 (400、800、1200 ppm) を通気して炭酸平衡状態を達成した条件下で *E. huxleyi* の培養を行った結果、CO₂ 濃度が高くなり pH の低下が起こっても増殖速度、ココリス形成能は変化せず、光合成活性は高 CO₂ 条件ほど高いレベルを維持した。pH 7.7 であっても CO₂ 濃度が高ければ石灰化が阻害されない理由は、石灰化の基質となる HCO₃⁻ が十分供給されたためであることを明らかにした。

海洋酸性化予測には今世紀末までに pH が 7.7 程度まで低下すると予測するレポートもある中で、大気中 CO₂ 濃度上昇による海洋酸性化は、海洋において大増殖を引き起こす円石藻 *E. huxleyi* の増殖、光合成、石灰化 (ココリス形成) に大きなダメージを与える可能性は少ないことが明らかとなった。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 自然群集を用いた実験法の確立

海洋酸性化が海洋微生物群集に与える影響に関する実験的評価法は、まだ確立したとは言えない状況である。本研究では、400L の大量培養系において、培養液の pCO₂ および pH の調整に必要な気体の通気量について検討し、実験に用いる海水試料容量の 50 倍程度が目安となることを明らかにした。

2) 酸性化の進行により、ハプト藻 *Chrysochromulina* 属など、特定の分類群の増殖が阻害的な影響を受ける事を明らかにした。近年、*Chrysochromulina* 属は、海洋における一次生産者として非常に重要なグループであることが報告された。本研究で得られた結果は、海洋酸性化の進行は、海

洋の微生物群集構造に対して多大な影響を与える可能性を示唆している。

3) 海洋微生物が気候変動に影響を与える、炭素の長期貯留過程として重要な「生物ポンプ」および「微生物炭素ポンプ」に対して、海洋酸性化が影響を与える可能性を明らかにできた。前者においては、酸性化に対する植物プランクトングループによる応答の違いを通して、群集のサイズ組成の変化が重要な鍵を握ることが示唆された。また後者については、酸性化によるバクテリア代謝活動の変化が、難分解性溶存態有機物の生成過程の変化を引き起こす可能性がある。

4) 我々は本プロジェクトを通じて円石藻*Emiliania huxleyi*の酸性化に対する応答のメカニズムの解明に注力してきた。海洋酸性化研究は現在までの所、Iglesias-Rodriguezら(2008)²⁵⁾やRiebessellら(2000)²⁴⁾の例でも分かるように現象論に終始しているきらいがある。確かに海洋酸性化の脅威を一般に警告する意味でもこういった研究はとても重要であるが、それだけでは海洋酸性化の真の理解に至ることは難しい。今後、当分野の研究は各生物の酸性化応答メカニズムの研究に軸足を移すことになるだろう、その意味で本研究は非常に大きな意義を持つ。

(2) 環境政策への貢献

1) 2011年1月に沖縄で実施されたIPCCの海洋酸性化専門家会議サイドイベントにおいて、本サブテーマにおいて得られた成果について2課題の発表を行い、高い評価を得た。

2) 沿岸域から外洋域に一般的に見られるハプト藻*Chrysochromulina*属、緑藻*Tetraselmis*属、*Pramimonas*属は、海洋酸性化の進行に対する感受性が高く、海洋酸性化の進行と共に減少する可能性が示唆された。このことから、これらの分類群を生物指標種として用いることにより、海洋酸性化の海洋微生物群集に対する影響の程度を評価することが可能となる。これらについて、IPCCの酸性化会議等を通して、成果の広報・普及に努める。

3) 本プロジェクトにおいて我々は円石藻*Emiliania huxleyi*が海洋酸性化という事態に対してどの様に応答するかを明らかにした。この植物プランクトンがもつ光合成による酸性化抑制力を全地球規模で見積もることで、生物学的影響という新たなファクターを海洋酸性化モデルに加えることが出来、それによって酸性化予測の精度向上に大きく貢献できると考えている。

6. 引用文献

- 1) Caldeira, K. and M. E. Wickett, 2003: Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425, 365.
- 2) Hall-Spencer, J., R. Rodolfo-Metalpa, S. Martin, E. Ransome, M. Fine, S. M. Turner, S. J. Rowley, D. Tedesco and M. C. Buia, 2008: Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454, 96-99
- 3) Feely, R. A., C. L. Sabine, K. Lee, W. Berelson, J. Kleypas, V. J. Fabry and F. J. Millero, 2004: Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, 305, 462-366.
- 4) Orr, J. C., V. J. Fabry, O. Aumont, L. Bopp, S. C. Doney, R. A. Feely, A. Gnanadesikan, N. Gruber, A. Ishida, F. Joos, R. M. Key, K. Lindsay, E. Maier-Reimer, R. Matear, P. Monfray, A. Mouchet, R. G. Najjar, G. K. Plattner, K. B. Rodgers, C. L. Sabine, J. L. Sarmiento, R. Schlitzer, R. D. Slater, I. J. Totterdell, M. F. Weirig, Y. Yamanaka and A. Yool, 2005: Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681-686.
- 5) Doney, S. C., V. J. Fabry, R. A. Feely and J. A. Kleypas, 2009: Ocean Acidification: The Other CO₂

- Problem. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 1, 169-192.
- 6) Kim, J. M., K. Lee, K. Shin, J. M. Kang, H. W. Lee, M. Kim, P. G. Jang and M. C. Jang, 2006: The effect of seawater CO₂ concentration on growth of a natural phytoplankton assemblage in a controlled mesocosm experiment. *Limnol. Oceanogr.*, **51**, 1629-1636.
 - 7) Shiraiwa, Y., A. Goyal and N. E. Tolbert, 1993: Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. *Plant Cell Physiol.* 34, 649-657.
 - 8) Tortell, P. D., G. R. DiTullio, D. M. Sigman and F. M. M. Morel, 2002: CO₂ effects on taxonomic composition and nutrient utilization in an Equatorial Pacific phytoplankton assemblage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 236, 37-43.
 - 9) Riebesell, U., K. G. Schulz, R. G. J. Bellerby, M. Botros, P. Fritsche, M. Meyerhofer, C. Neill, G. Nondal, A. Oschlies, J. Wohlers and E. Zollner, 2007: Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature*, 450, 545-548.
 - 10) Hama, T., N. Handa, M. Takahashi, F. Whitney and C. S. Wong, 1988: Change in distribution patterns of photosynthetically incorporated C during phytoplankton bloom in controlled experimental ecosystem. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 120, 39-56.
 - 11) Riebesell, U. 2004: Effects of CO₂ Enrichment on Marine Phytoplankton. *J. Oceanogr.*, 60, 719-729.
 - 12) Yoshimura, T., J. Nishioka, K. Suzuki, H. Hattori, H. Kiyosawa, Y. W. Watanabe, 2010: Impacts of elevated CO₂ on organic carbon dynamics in nutrient depleted Okhotsuk Sea surface waters., *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 395, 191-198.
 - 13) Raven J. A. 1985: pH regulation in plants. *Science Progress*, 69, 495-509.
 - 14) Shi, D., Y. Xu, B. M. Hopkinson, F. M. M. Morel, 2010: Effect of ocean acidification on iron availability to marine phytoplankton. *Science*, 327, 676-679.
 - 15) Hajdu, S., H. Hoglander, and U. Larsson, 2007: Phytoplankton vertical distributions and composition in Baltic Sea cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 6, 189-205.
 - 16) Liu, H., I. Probert, J. Uitz, H. Claustre, S. Aris-Brosou, M. Frada, F. Not and C. Vargas, 2009: Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *PANS*, 106, 12803-12808.
 - 17) Eppley, R.W., and B. J. Peterson, 1979: Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean, *Nature*, 282, 677– 680.
 - 18) Jiao, N., G. J. Herndl, D. Hansell, R. Benner, G. Kattner, S. Wilhelm, D. L. Kirchman, M. G. Weinbauer, T. Luo, F. Chen and F. Azam, 2010: The microbial carbon pump in the ocean. *Nature Rev. Microbiol.* 8, 593-599.
 - 19) Legendre, L and J. Le Fevre, 1998: Hydrodynamic singularities as controls of recycled versus export production in oceans. In: Berger W. H., V. S. Smetacek and G. Wafer (eds.) *Production of the Ocean: Present and Past*. Wiley & Sons, Chichester.
 - 20) Shimotori, K., Y. Omori, and T. Hama, 2009: Bacterial production of marine humic-like fluorescent dissolved organic matter and its biogeochemical importance. *Aquat. Microb. Ecol.* 58, 55–66.

- 21) Fukuda, S., I. Suzuki, T. Hama, and Y. Shiraiwa, 2010: Compensatory Response of the Unicellular-Calcifying Alga *Emiliana huxleyi* (Coccolithophoridales, Haptophyta) to Ocean Acidification. *J. Oceanoogr.*, 67 (1), 17-25.
- 22) Demmig, B. and O. Bjorkman, 1987: Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171, 171-184.
- 23) Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker, 1989: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87-92.
- 24) Riebesell, U., I. Zondervan, B. Rost, P. D. Tortell, R. E. Zeebe, F. M. M. Morel, 2000: Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* 407, 364-67.
- 25) Iglesias-Rodriguez, M. D., P. R. Halloran, E. M. Rosalind, R. E. M. Rickaby, I. R. Hall, E. Colmenero-Hidalgo, J. R. Gittins, D. R. H. Green, T. Tyrrell, S. J. Gibbs, P. von Dassow, E. Rehm, E. V. Armbrust and K. P. Boessenkool, 2008: Phytoplankton Calcification in a High-CO₂ World. *Science* 320, 336 - 340.
- 26) Sekino, K. and Y. Shiraiwa 1994: Accumulation and utilization of dissolved inorganic carbon by a marine unicellular coccolithophorid, *Emiliana huxleyi*. *Plant Cell Physiol.* 35, 353-361.

7. 国際共同研究等の状況

実験的な解析により沿岸微生物群集に対する影響を評価するため、日韓共同研究への申請を念頭に、計画を立案中である。昨年11月に濱が韓国Hanyan大学における研究打ち合わせ会議に出席すると共に、海洋酸性化と溶存態有機物に関する講演を行った。また、韓国海洋研究所 (KORDI) においても講演、意見交換を実施し、今後の連携に関する打ち合わせを行った。

カウンターパート氏名・所属・国名

Dr. Kan Hon Shin、Hanyan University, Korea

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Fukuda, S., I. Suzuki, T. Hama, and Y. Shiraiwa, 2010: Compensatory Response of the Unicellular-Calcifying Alga *Emiliana huxleyi* (Coccolithophoridales, Haptophyta) to Ocean Acidification. *J. Oceanoogr.*, 67, 17-25.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表 (査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) Fukuda, S., I. Suzuki, T. Hama and Y. Shiraiwa, 2009: PICES 2009 Annual Meeting, Jeju, Korea.
“Control of seawater pH by the coccolithophorid, *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae)”
- 2) Hama, T., S. Kawashima, Y. Satoh et al., 2009:, PICES 2009 Annual Meeting, Jeju, Korea.
“Experimental study on the effect of ocean acidification on microbial structure and bioelemental cycles”
- 3) 濱 健夫、川島祥子、佐藤雄飛、霜鳥孝一、大森裕子、中山 剛、遠藤寛子、井上勲、安達大輝、長谷川瞬、緑川貴、石井雅男、斉藤秀、笹野大輔, 2009 :、2009年度日本海洋学会秋季大会
「海洋酸性化が微生物群集構造と生元素循環に及ぼす影響に関する実験的評価 1. 実験系および環境要因の変化」
- 4) 川島祥子、濱 健夫、佐藤雄飛、霜鳥孝一、大森裕子、中山 剛、遠藤寛子、井上 勲、安達大輝、長谷川瞬、緑川貴、石井雅男、斉藤秀、笹野大輔, 2009 :、2009年度日本海洋学会秋季大会
「海洋酸性化が微生物群集構造と生元素循環に及ぼす影響に関する実験的評価 2. 植物プランクトン組成の変化」
- 5) 佐藤雄飛、濱 健夫、川島祥子、霜鳥孝一、大森裕子、中山 剛、遠藤寛子、井上 勲、安達大輝、長谷川瞬、川貴、石井雅男、斉藤秀、笹野大輔, 2009 : 2009年度日本海洋学会秋季大会
「海洋酸性化が微生物群集構造と生元素循環に及ぼす影響に関する実験的評価 2. 生元素の動態」
- 6) 白岩善博, 2009:] 日本植物学会第73回大会
「藻類の代謝から見た海洋酸性化」
- 7) 福田真也、鈴木石根、白岩善博, 2009: 日本アイソトープ協会平成21年度オータムスクール
「大気中二酸化炭素濃度上昇による海洋酸性化は円石藻 *Emiliana huxleyi* にどのような影響を与えるか」
- 8) 福田真也, 2009: 2009 : 第1回海洋酸性化勉強会
「海洋酸性化が微生物の群集構造と機能に及ぼす影響」
- 9) 福田真也・鈴木裕理奈・白岩善博, 2010 : 第5回バイオミネラリゼーションワークショップ
「円石藻 *Emiliana huxleyi* は海洋酸性化にどう応答するか」
- 10) 白岩善博, 2010:] 第3回海洋酸性化勉強会プログラム,
「海洋酸性化と円石藻」

- 11) 佐藤真奈美、岩本浩二、鈴木石根、白岩善博, 2010: マリンバイオテクノロジー学会 (マリンバイオテクノロジー学会賞受賞講演)
「円石藻 *Emiliana huxleyi* の細胞内石灰化の生理学的制御要因の解析-リン酸欠乏誘導性のココリス形成の低温による促進効果」
- 12) Shiraiwa, Y. and H. Araie, 2010: The 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Selenium 2010)
“Physiological, Biochemical, and Molecular Aspects of Selenium Utilization by Photosynthetic Microorganisms”
- 13) Shiraiwa, Y. and H. Araie, 2010: The 13th International Nannoplankton Association Meeting, Yamagata, Japan.
“Strategy for the Utilization of Selenium as a Growth Regulator by the Coccolithophorid, *Emiliana huxleyi*”.
- 14) Shiraiwa, Y., 2010: The IX International Marine Biotechnology Conference (IMBC2010), Qingdao, China (Invited keynote speech)
“Impact of ocean acidification on carbon dioxide sequestration by a cosmopolitan marine unicellular calcifying alga, *Emiliana huxleyi*”
- 15) 安達大輝、濱 健夫、佐藤雄飛、澤井茉莉奈、緑川 貴、石井雅男、笹野大輔, 2010 : 第47回アイソトープ・放射線研究発表会
「海洋酸性化が物質循環に及ぼす影響－安定同位体トレーサ法による実験的解析」
- 16) 澤井茉莉奈、小森真里奈、佐藤雄飛、大森裕子、安達大輝、遠藤寛子、中山 剛、井上 勲、緑川 貴、石井雅男、斉藤秀、笹野大輔、小杉如央、濱 健夫, 2010 : 2010年度日本海洋学会秋季大会
「海洋酸性化が植物プランクトンの群集組成に与える影響に関する実験的解析」
- 17) Hama, T., 2010: Lecture in Hanyan University, Korea
“Production and transformation of dissolved organic matter by microbial activity”
- 18) Hama, T., 2010: Special Lecture in Korean Oceanic Research Institute, Korea
“Effect of ocean acidification on the production of dissolved organic matter”
- 19) Suzuki, Y., S. Fukuda and S. Shiraiwa, 2011: Side event of IPCC WGII/WGI Workshop on Impacts of Ocean Acidification on Marine Biology and Ecosystem, Nago, Japan.
“Physiological responses of the coccolithophorid, *Emiliana huxleyi* to low pH or high CO₂ Conditions”
- 20) Sawai, M., S. Kawashima, M. Komori, Y. Sato, Y. Omori, T. Adachi, H. Endo, T. Nakayama, I. Inoue, Y. Shiraiwa, S. Fukuda, T. Midorikawa, M. Ishii, D. Sasano, N. Koshugi, and T. Hama, 2011: Side event of IPCC WGII/WGI Workshop on Impacts of Ocean Acidification on Marine Biology and Ecosystem, Nago, Japan.
“Experimental analysis of the effect of ocean acidification on coastal phytoplankton community and a non-calcified phaptophyte *Chrysochromulina* sp.”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) 白岩善博、園池公毅 2009: 藻類で挑む地球環境問題。日本植物学会第73回大会、山形大学。(シンポジウム企画)
- 2) 白岩善博、都筑幹夫 2010: 国際微細藻類シンポジウム：微細藻類のバイオテクノロジー～食糧・環境・エネルギー、東京大学、東京。(シンポジウム企画・主催)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日小学生新聞（2009年11月3日、科学欄、朝日新聞社）本研究の成果と培養実験について写真付きで掲載された。
- 2) 科学雑誌ニュートン2010年4月号（2010年4月7日発行）のCO₂の特集記事において、本研究の成果の一部が紹介された。
- 3) 科学雑誌ニュートン別冊（2010年11月15日発行）の地球温暖化の特集記事において、本研究の成果の一部が紹介された。

(6) その他

特に記載すべき事項はない