

課題名 RF-1009 サンゴ骨格を用いたサンゴ礁環境に及ぼす人間活動の影響評価に関する研究

課題代表者名 井上 麻夕里 (東京大学 大気海洋研究所 海洋底科学部門)

研究実施期間 平成22～23年度

累計予算額 19,263千円(うち23年度 9,384千円)  
予算額は、間接経費を含む。

## 研究体制

- (1) 飼育実験に基づくサンゴの成長に及ぼす環境負荷の影響評価 (琉球大学)
- (2) 環境負荷要因に対するサンゴ骨格の化学的・物理的応答に関する研究 (東京大学)

## 研究協力機関

琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設

## 研究概要

### 1. はじめに(研究背景等)

サンゴ礁は熱帯から亜熱帯域に分布しており、全海洋の1%にも満たないが、その高い生物多様性により地球上で最も重要な生態系の一つとして位置づけられている。また、高波などから沿岸域を保護する機能や、その景観の美しさにより観光資源としての価値も高い。このような現在のサンゴ礁を構成している主要な生物が造礁サンゴであり、イソギンチャクなどと同じ刺胞動物門に分類される。造礁サンゴの大きな特徴は二つあり、一つは褐虫藻との細胞内共生であり、もう一つは炭酸カルシウムの外骨格を形成しながら成長することである。この2つの特徴はどちらも造礁サンゴの成長に密接に関わっており、それゆえサンゴ礁の発達と衰退の根幹にも関係している。しかしながら、このわずか数十年の間に、世界中でサンゴの病気や、褐虫藻がサンゴ体内から抜け出す白化現象などが多く報告されるようになり、その原因として地球温暖化や海洋酸性化、沿岸域の土地開発など人間活動の影響が少なからず指摘されている。世界中の70%近くのサンゴ礁域において、元の健全な状態への回復が見込めないことも報告されており、サンゴ礁は時間的にも空間的にもかなり急激な環境変化に曝され、ストレスを受けていることが伺える。しかしながら、実際の海域においては温度・塩分などの自然要因から赤土流出や廃水流入などの人為的要因が混在しているため、結局どのストレス要因がサンゴ骨格の成長を阻害しているかを検証することが難しい。さらに、共生関係や白化現象、骨格形成(成長)などのメカニズムは複雑で未だに詳細は明らかにされておらず、そのため適切な環境影響評価が難しいのが現状である。

### 2. 研究開発目的

本研究では、主に沖縄本島から採取したサンゴを用いて、飼育実験によって高温や酸性化ストレス、また栄養塩添加実験などを通してポリプ骨格(稚サンゴ)を2週間程度飼育し(サブテーマ1)、飼育後の骨格成長と共に、骨格に含まれる各種化学成分の測定を行い(サブテーマ2)、どのような環境負荷要因によって骨格にどのようなシグナル(骨格の粗密や特定の化学成分の増減など)が刻まれるかを明らかにしていくことを目的とする。飼育実験に際しては、環境負荷要因のレベルを数段階設定することで、それぞれの環境負荷要因が骨格成長に与える閾値の評価を行う。またどの要因が骨格成長を阻害する影響力が大きいかなども合わせて検証する。これまでも世界的に飼育実験は行われているものの、飼育期間が長期にわたり、かつ飼育の難しい成体サンゴを用いた実験がほとんどである。ポリプ骨格を用いることで、短期間でも環境負荷要因のサンゴの骨格成長に及ぼす影響を評価できる手法を確立することも本研究の目的の一つである。さらに、ポリプ骨格に褐虫藻を添加させることで、共生/非共生のポリプ骨格を作成することができるため、サンゴの共生関係および共生による骨格成長メカニズムについても考察を行う。

### 3. 研究開発の方法

(1) 飼育実験に基づくサンゴの成長に及ぼす環境負荷の影響評価

#### 1) 高水温・低塩分の影響評価

研究材料として、2010年5月から6月にかけて産卵したミドリイシ属サンゴの1種、コユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) の配偶子を用いた(図1)。コユビミドリイシは琉球列島において最も優先する種の一つであるため、本研究の対象サンゴとした。配偶子を発生させて得られたプラヌラ幼生を、変態ペプチドを用いて6穴プレートに着底させて初期ポリプを作成した。この初期ポリプのうち半分を、シャコガイから単離した褐虫藻を感染させ、褐虫藻有りの初期ポリプ (Symbiotic) と褐虫藻無しの初期ポリプ (Aposymbiotic) を作成した。初期ポリプは着底直後から石灰化活動を始め、以下の実験開始時にはすでに炭酸カルシウム骨格を有する直径約1mmの稚サンゴであった。これらの初期ポリプを、温度4段階 (27、29、31、33℃)、塩分濃度5段階 (26、28、29、32、34) に調整した海水下で10日間飼育した。飼育実験は琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設にて行った(図2)。温度実験については瀬底周辺海水の連続流水環境下で行い、塩分実験についてはあらかじめ塩分を調整した海水を作成し、それを用いて毎日ほぼ定時に水換えを行った。塩分実験の温度はどの水槽も27℃で調整した。飼育開始前にランダムに選択した15個体について、飼育期間中は毎日顕微鏡下で写真を撮影し、その表面積を画像解析ソフトを用いて解析した。

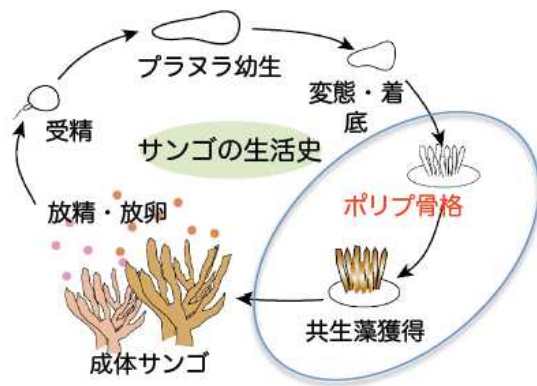


図1 造礁サンゴの生活史



図2 琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設における室内飼育実験設備

#### 2) 栄養塩負荷の影響評価

栄養塩に関する飼育実験では、図3に示すように二つの実験系を設定し、両実験系の結果から統合的評価を行うことを試みた。まず、実験対象として2011年6月にミドリイシ属サンゴの1種、コユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を採取し、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設内の屋外水槽において産卵を確認した後、それらの配偶子を得た。配偶子を発生して得られたプラヌラ幼生は、変態ペプチドを用いて6穴プレートに着底させて、サンゴ初期ポリプを作成した。この初期ポリプにシャコガイから単離した褐虫藻を感染させ、サンゴ-褐虫藻共生型の稚サンゴを作成した。

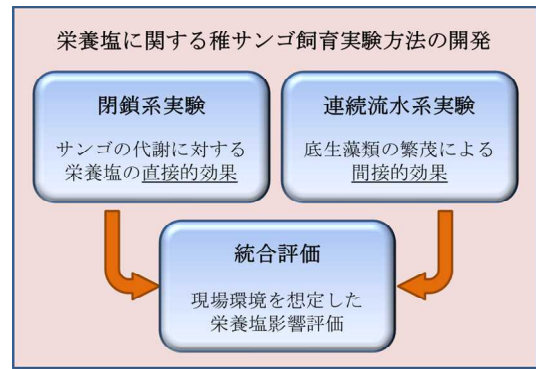


図3 栄養塩に関する実験手法の概要

#### a 閉鎖系実験

栄養塩添加区と対象区の二つの実験区を用意し、稚サンゴをそれぞれの水槽で15個体ずつ10日間飼育した。水槽内の海水は定期的に交換し（0、3、6日目）、毎回の交換後に栄養塩添加区にのみ栄養塩溶液（硝酸カリウム、リン酸二水素ナトリウム）を硝酸イオンとリン酸イオンがそれぞれ $2.4\mu\text{mol/L}$ （以下、 $\mu\text{M}$ ）、 $0.2\mu\text{M}$ になるように添加した。対象区では硝酸イオン $0.5\mu\text{M}$ 、リン酸イオン $0.1\mu\text{M}$ であり、それ以外の栄養塩は亜硝酸イオン（ $0.2\mu\text{M}$ ）、アンモニウムイオン（ $0.5\mu\text{M}$ ）ともに対象区と栄養塩添加区で同程度であった。通常のサンゴ礁海域における硝酸イオン濃度は $0.5\mu\text{M}$ 程度であり、 $2.4\mu\text{M}$ という添加区の濃度はサンゴ礁としては十分に栄養塩負荷であるといえる。水槽内の海水温は $27^\circ\text{C}$ に維持し、また水流ポンプを使って水槽内には緩やかな（約 $5\text{cm/s}$ ）水流を保った。水槽上部からはメタルハライドランプで1日12時間（7時—19時）照射し、照射時の平均光量は $110\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ であった。飼育実験期間中、0、3、6、10日目に稚サンゴを顕微鏡下で写真撮影し（図4a）、成長速度と褐虫藻由来のクロロフィル量を測定した。クロロフィルは画像解析ソフトによって図4bに示すように検出され、検出部分の面積割合をクロロフィル指数（CI）とした。実験終了後には稚サンゴから有機組織をウォーターピックで剥離し、東京大学大気海洋研究所において骨格乾燥重量を計測した。

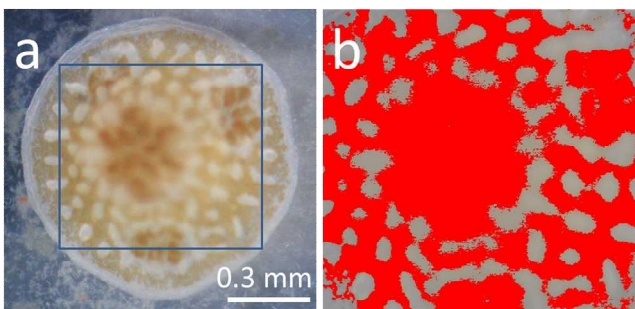


図4 サンゴ初期ポリプのクロロフィル解析

#### b 連続流水系実験

水槽に連続的に海水を供給することによって、底生藻類が繁茂する中での稚サンゴの成長について調査を行った。栄養塩濃度条件は対象区（SC）、低負荷区（SL）、高負荷区（SH）の3段階に設定し、閉鎖系実験と同様に共生型稚サンゴをそれぞれ15個体ずつ10日間飼育した。また、褐虫藻の機能を調査するため、褐虫藻を感染させない非共生型（Aposymbiotic）ポリプも用意し、共生型と同様に対象区（AC）、低負荷区（AL）、高負荷区（AH）の3条件下で10日間の飼育実験を行った。栄養塩溶液（硝酸カリウム、リン酸二水素ナトリウム）はペリスタポンプを使って連続的に各水槽に供給し、通常の貧栄養海水と混合することによって目標濃度になるように調整した。結果として硝酸イオン濃度は対象区、低負荷区、高負荷区においてそれぞれ平均 $0.2$ 、 $3.8$ 、 $8.8$ 、リン酸イオンはそれぞれ平均 $0.1$ 、 $0.4$ 、 $0.7\mu\text{M}$ であった。海水温や水流、光量、写真撮影などは上記の閉鎖系実験と同様に行った。

### （2）環境負荷要因に対するサンゴ骨格の化学的・物理的応答に関する研究

#### 1）骨格重量測定および微細構造の観察

ミドリイシ属サンゴの一種、コユビミドリイシ（*Acropora digitifera*）の初期ポリプについて実験を行った。環境ストレスとして、高温、低塩分、そして栄養塩について、褐虫藻の役割を調べるためにも、褐虫藻有り／無しのグループを作成し、飼育実験を実施した。飼育実験の詳細については、共同委託研究機関である琉球大学で行ったので、そちらの実施方法を参照されたい。琉球大学での温度、

塩分、栄養塩実験後のポリプ骨格は東京大学大気海洋研究所に持ち帰り、純水で洗浄、乾燥後、1個体ずつプレートから剥がした後に、マイクロ天秤を用いて秤量を行った（図5）。秤量後のポリプ骨格は1個体ずつ10穴プレートに保管し、後の分析に供した。琉球大学において飼育実験期間中はポリプ骨格の表面積を測定していたので、10日間の飼育期間中の石灰化率は表面積を重量で割り出すことで算出した。また、走査型電子顕微鏡（SEM）による骨格微細構造の観察も行った。

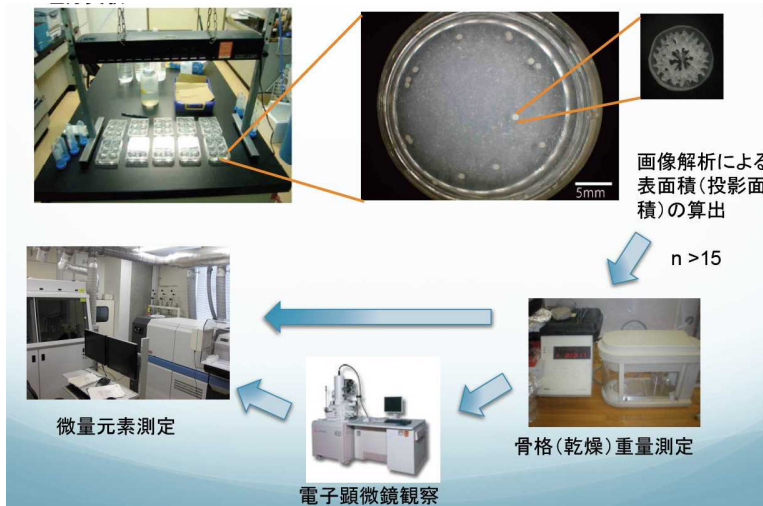


図5 サンゴ骨格の分析フロー

## 2) ポリプ骨格中の微量元素測定

海洋環境の間接指標として有用視されているサンゴ骨格中の微量元素が環境ストレス下においてどのような挙動を示すかを検証するため、海洋環境復元に重要な温度、塩分、 $pCO_2$ を制御した飼育実験で得られたポリプ骨格について、マグネシウム・カルシウム比（Mg/Ca比）、ストロンチウム・カルシウム比（Sr/Ca比）およびウラン・カルシウム比（U/Ca比）の精密測定を行った。地質調査所作成のサンゴ骨格の標準試料であるJCp-1の繰り返し測定による精度は、Mg/Ca, Sr/Ca, U/Ca比でそれぞれ、0.4% 0.4% 1.0%であった。

## 4. 結果及び考察

### (1) 飼育実験に基づくサンゴの成長に及ぼす環境負荷の影響評価

#### 1) 高水温・低塩分の影響評価

温度調整実験では、27℃及び33℃において、褐虫藻の有無によって成長に差が見られた（図6A）。褐虫藻感染グループでは、33℃で飼育したサンゴ初期ポリプの成長は、27、29、31℃で飼育したサンゴ初期ポリプの成長と比較して、有意な減少が見られた（一元配置分散分析、 $p < 0.05$ ）。一方で、褐虫藻非感染グループでは、各条件間で成長に有意な差は見られなかった。この理由として、褐虫藻の働きによって体内に活性酸素が蓄積することにより引き起こされる酸化ストレスが発生している可能性が考えられる。これまでの研究において、水温31℃以上では、サンゴ本体が褐虫藻によって酸化ストレスを受けるといった報告とも整合的である。また、海水温の上昇は炭酸カルシウム飽和度も上昇させるため、無機的な石灰化は温度の上昇と共に促進することが考えられるが、褐虫藻非感染ポリプにおいても高温環境下では頭打ちの成長パターンが見られたことから、31℃以上の高温は、共生関係だけでなくサンゴ自身にもストレスになっている可能性も示唆された。

塩分調整実験では、塩分34, 32, 28, 26の条件において、褐虫藻の有無によって成長に有意な差が見られた（図6B）。褐虫藻感染グループでは、塩分26で飼育した初期ポリプは、34, 32で飼育した初期ポリプと比較して、成長に有意な減少が見られた（一元配置分散分析、 $p < 0.05$ ）。これは、塩分濃度の低下と共に、炭酸カルシウム飽和度が減少するためだと思われる。興味深いこととして、褐虫藻有りのポリプ骨格の方が、成長低下が顕著であった。これは、低塩分下でも褐虫藻に起因する何らかのストレスが、サンゴに悪影響を与えていることを示唆するものであった。

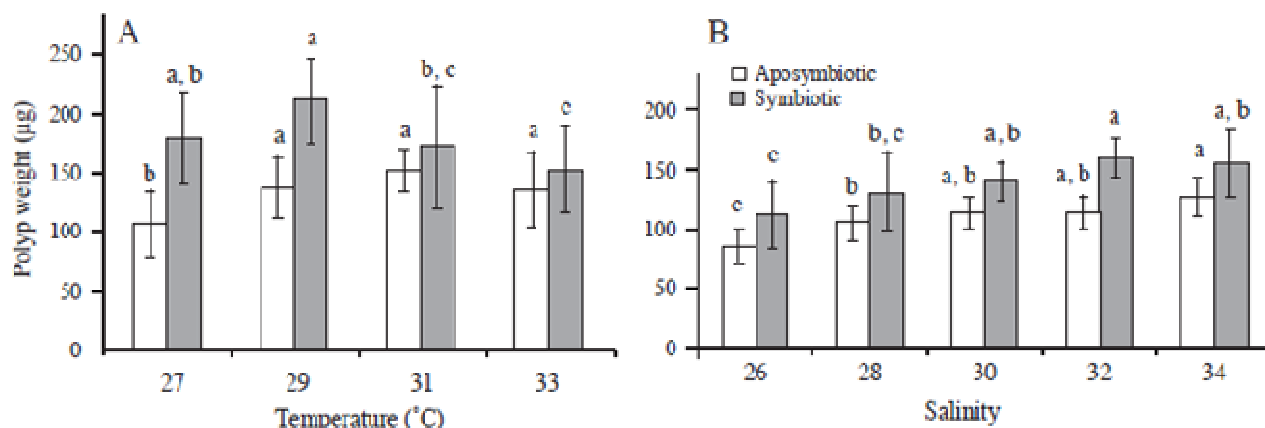


図6 温度・塩分実験終了時のサンゴ初期ポリプの骨格重量

## 2) 栄養塩負荷の影響評価

### a 閉鎖系実験

飼育実験開始時における栄養塩添加区と対象区の稚サンゴは、表面積、CIともに有意な差はなく、平均するとそれぞれ0.91 mm<sup>2</sup>、38であった（表1）。飼育期間中はすべての稚サンゴが順調に成長し、致死率は0%であった。飼育終了時のサンゴの表面積は、対象区に比べて栄養塩添加区で有意に大きく、10日間の平均成長速度は4.0%/dと計算された。また、表面積と骨格乾重量の間には良い正の相関が見られたことから、栄養塩添加はサンゴの見かけの大きさ（投影表面積）だけでなく炭酸カルシウム形成速度も促進したと考えられる。このような栄養塩による成長促進効果には次のような可能性が示唆される。①栄養塩吸収に伴って褐虫藻の光合成産物は窒素やリンをより多く含むようになり、褐虫藻の細胞分裂が活性化した。②その結果、面積当たりのクロロフィル量が増大し、褐虫藻の光合成速度が増加することによって無機化学的な石灰化促進効果が強く働いた。③褐虫藻から宿主サンゴへの有機物移行によって、動物体サンゴの細胞合成や骨格形成に必要な有機基質の合成が活発化した。これらはいずれも先行研究から推察される可能性であるが、稚サンゴが成長するためには褐虫藻、宿主サンゴ、炭酸カルシウム骨格のすべてが同調して成長していく必要があり、上記の3つの過程すべてが栄養塩によって促進された可能性が高い。

表1 閉鎖系実験開始時と終了時の稚サンゴ基本データ（カッコ内は標準誤差、n = 15）

	対象区		栄養塩添加区	
	0日目	10日目	0日目	10日目
表面積 (mm <sup>2</sup> )	0.92 (0.04)	1.06 (0.05)	0.90 (0.03)	1.25 (0.04)**
成長速度 (%/d)		1.6 (0.2)		4.0 (0.2)**
骨格乾燥重量 (µg)		188 (10)		217 (8)*
クロロフィル指数	37 (2)	44 (2)	39 (2)	67 (1)**

### b 連続流水系実験

対象区に比べて栄養塩添加区では稚サンゴの周囲に底生藻類が多く繁茂した。顕微鏡観察の結果、一部の共生型サンゴではこの底生藻類を上手く除去しながら骨格成長をしている様子が見られたが（図7a）、非共生型ではそのような様子は見られず、どの個体も底生藻類が密着していた（図7e）。共生型サンゴをさらに詳しく観察すると、サンゴ骨格と周囲の底生藻類の間には透明なスペースが確認できた（図7b）。共生型サンゴは褐虫藻の光合成によって多くの有機物を獲得することができるため、その有機物をもとに合成するサンゴ特有の粘液状物質の分泌などによって、周囲の底生藻類を除去することができたと推測される。しかし一方で、底生藻類によって部分的に被覆されてしまう個体や（図7c, f）、あるいは完全に被覆され死に至る個体も確認できた（図7d）。底生藻類に全く被覆されていない状態を”normal”と定義すると、実験終了時において共生型サンゴ対象区（SC）のすべての個体が”normal”であったのに対し、SL区・SH区では47%の個体に底生藻類による被覆が見られた。

非共生型では対象区（AC）においても20%の個体に被覆が見られ、AH区においては40%まで増加した。栄養塩添加が底生藻類の繁茂を促進し、稚サンゴの生残率を低下させたと考えられる。

### c 統合評価

本研究結果をまとめると、適度な栄養塩負荷は共生型稚サンゴの成長速度を高める効果を持つが、同時にサンゴ周囲の底生藻類の繁殖も促し、サンゴの成長を阻害することが示された。実際のサンゴ礁では、草食動物が底生藻類を減少させるため、サンゴに対する負の効果は軽減されると考えられる。つまり、栄養塩負荷環境下では底生藻類に対する捕食圧がどれだけ働くかが、稚サンゴの成長や生残を左右する大きな要因となるであろう。このように栄養塩負荷が直接的ではなく間接的にサンゴの成長に悪影響を及ぼすという概念は、サンゴ礁生態系としても報告されており、今回の研究結果は顕微鏡下のミクロな視点で栄養塩負荷時のサンゴ-底生藻類間関係を明示したといえる。また本研究は、着底直後の稚サンゴにとっては褐虫藻の獲得が底生藻類との競合に勝つ重要な条件である可能性を示した。造礁サンゴの中には、褐虫藻を親サンゴから受け継ぐ幼生もいるが（垂直伝播）、世界で最も多様といわれるミドリイシ科サンゴはそのほとんどが世代ごとに（着底後に）褐虫藻を海水中から獲得する必要がある（水平伝播）。従って、サンゴ礁に対するストレス応答評価としては、稚サンゴの成長速度や生残率だけでなく、海水中を浮遊する褐虫藻の生態生理・ストレス応答なども重要な評価項目であり、今後の課題である。

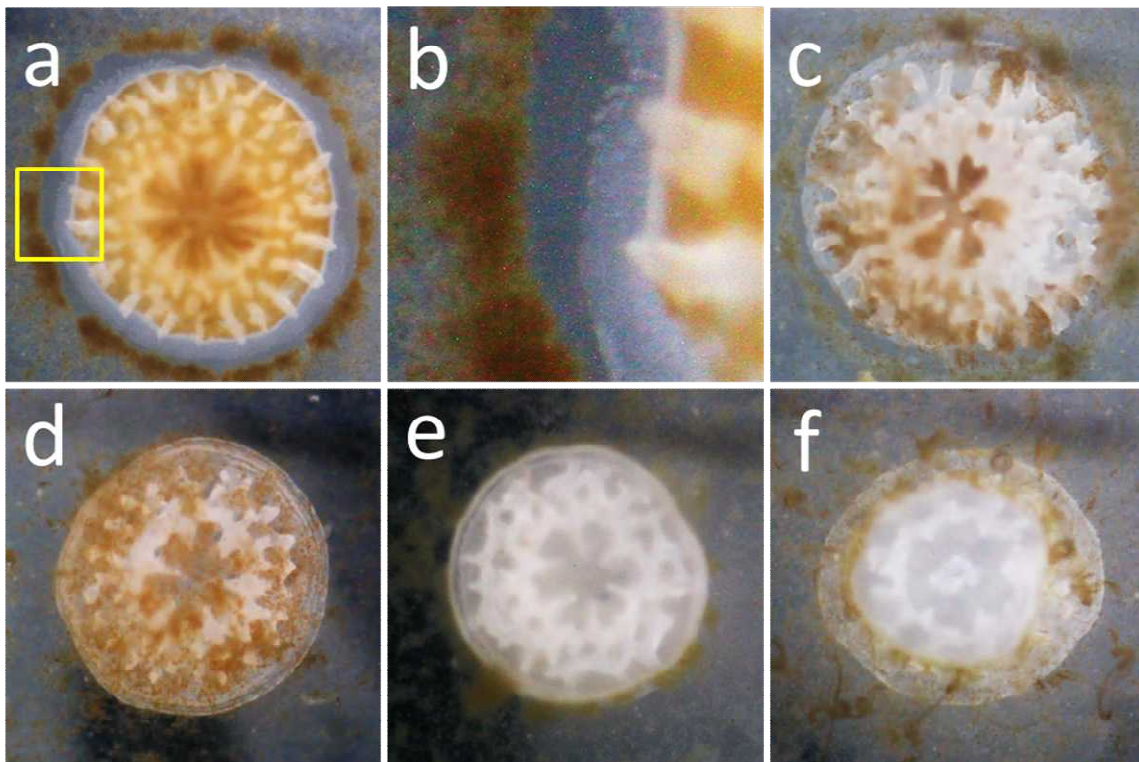


図7 (a) 栄養塩添加区において順調に育つ共生型稚サンゴ（SH区、6日目）。縮尺は図2と同じ。(b) 写真(a)の黄色四角部分の拡大図。サンゴ骨格の端と底生藻類の間に隙間が確認できる。(c) 共生型サンゴの一部が底生藻類によって被覆されてしまった様子（SL区、6日目）。ポリプ中心部はサンゴの組織がまだ残っているように見える。(d) 底生藻類によって完全に被覆されてしまった共生型稚サンゴ（SH区、10日目）。(e) 栄養塩添加区において順調に育つ非共生型稚サンゴ（AH区、10日目）。(f) 非共生型稚サンゴを底生藻類が部分的に覆ってしまった様子（AH区、10日目）。

## (2) 環境負荷要因に対するサンゴ骨格の化学的・物理的応答に関する研究

### 1) 骨格重量測定および微細構造の観察

各飼育実験による初期ポリプの骨格成長量を示した結果が図6である。結果として、温度4段階で初期ポリプを飼育した結果、褐虫藻有りの初期ポリプは、29℃で成長がピークに達した。褐虫藻無しの初期ポリプは、31℃でピークに達し、33℃以上では頭打ちになるような成長パターンを示した。塩分

濃度5段階でサンゴ初期ポリプを飼育した結果、褐虫藻有り無し両方の初期ポリプで、塩分濃度の低下と共に成長の低下が見られた（図6B）。栄養塩濃度3段階でサンゴ初期ポリプを飼育した結果、褐虫藻有りの初期ポリプで、栄養塩濃度の上昇に伴う骨格成長量の増加が確認された（表1）。

電子顕微鏡による骨格微細構造の観察の結果、高温ストレス下において異常な構造が認められた。通常、サンゴ骨格の微細構造には有機基質と炭酸カルシウムとが互層をなしていることが指摘されており、実際にコントロールである27℃で飼育したポリプ骨格にもそのような層状の構造が認められたが、33℃の高温下で飼育したポリプ骨格にはこの特徴が見られなかった（図8）。この高温下での異常な微細構造は褐虫藻の有無に関わらず認められたため、サンゴ宿主が高温ストレス下で骨格形成の鋳型となる有機基質を作り出せなかったことが原因ではないかと考えられる。高温下では白化現象がよく知られている現象であり、サンゴ-褐虫藻の共生関係の崩壊がサンゴ骨格の成長低下、さらには死滅をもたらすことが懸念されている。しかし、今回の結果から高温ストレスが共生関係への悪影響のみではなく、サンゴ宿主そのものにも何かしらのダメージを与えていることが示唆された。低塩分のストレスを与えたポリプ骨格では共生藻の有無に関わらず、このような異常な特徴は認められなかったため、高温ストレスがいかにサンゴにとって深刻な問題であるかが分かる。

## 2) ポリプ骨格中の微量元素測定

サンゴ骨格中のSr/Ca比は海水温の良い指標として知られており、これまでも数多くの海水温復元の研究が行われているが、その指標としての有用性が環境ストレス下においても適用可能であるかについては検証されていなかった。また、U/Ca比もSr/Ca比同様に海水温指標として指摘されている。本研究では、高温ストレス下で飼育されたポリプ骨格のSr/Ca比およびU/Ca比測定を行ったが、30℃以上で飼育されたポリプ骨格については、海水温と微量元素とのこれまで言われている逆相関関係が見られず、高温ストレス下で成長した骨格中の微量元素を用いて環境復元を行うことが危険であることが示唆された。一方、骨格の成長速度の指標として指摘されているMg/Ca比については、温度実験における骨格成長とMg/Ca比の変動がよく一致しており、環境ストレス下における骨格成長の低下などについても復元できる可能性が示唆された（図9）。

## 3) 総合評価

これまでに実施した飼育実験で得られたポリプ骨格の微細構造や微量元素測定を行うことで、各環境ストレスがどのように骨格成長に影響を及ぼしているか、そのメカニズムの考察を行い、どの環境要因がコユビミドリイシのポリプ骨格の成長により影響を及ぼし得るか検討した。その結果、高温の影響が最もポリプ骨格の成長に負の影響を及ぼすことが示唆された。さらに、具体的な温度としては29~31℃の間に閾値があることが推測され、これは野外で報告されている結果とも整合的であった。さらに、高温下では白化現象に見られるような共生関係の崩壊だけでなく、サンゴ宿主そのものにもダメージが及んでいる可能性も示唆され、その影響が深刻であることが推察された。

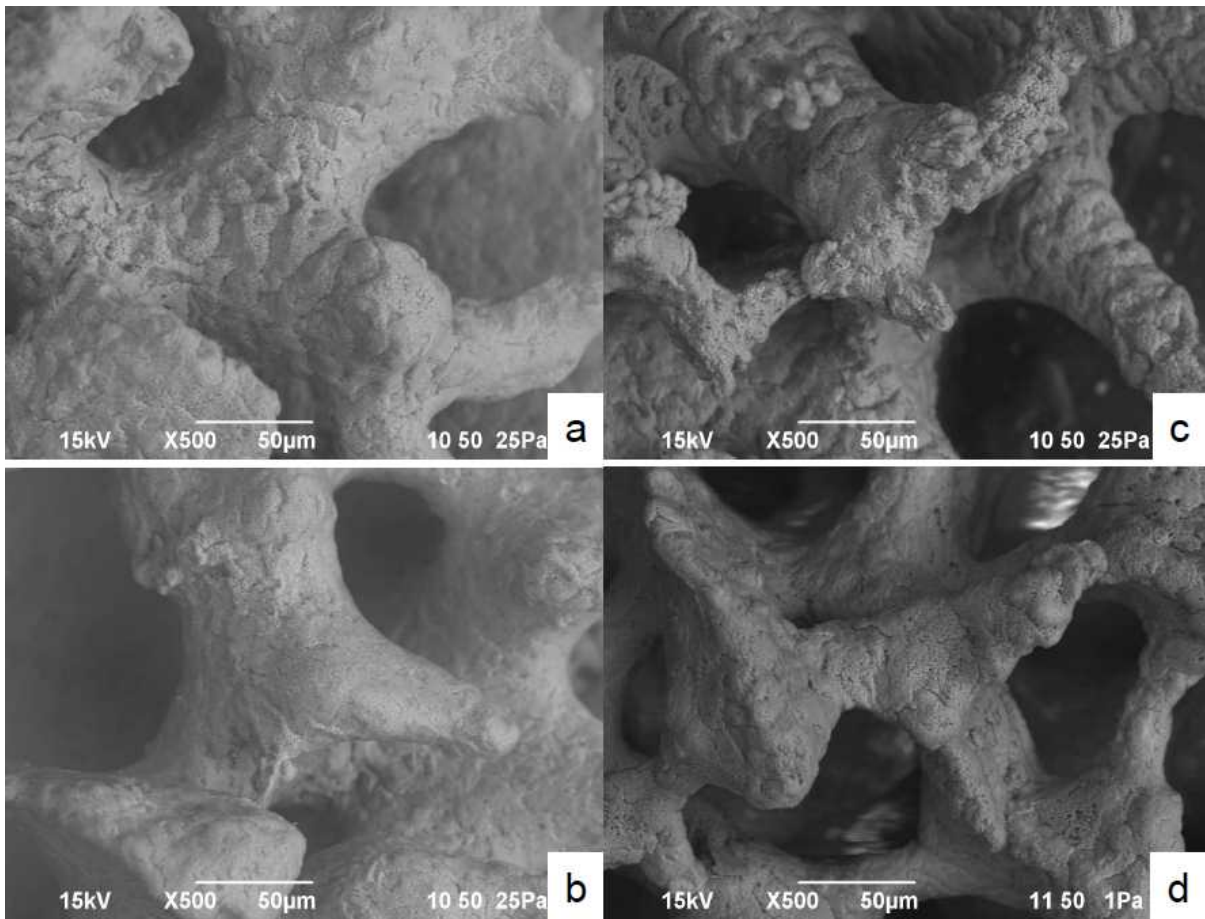


図8 温度制御実験で飼育されたポリプ骨格の微細構造。a: 27°C, 非共生 b: 33°C, 非共生 c: 27°C, 共生 d: 33°C, 共生

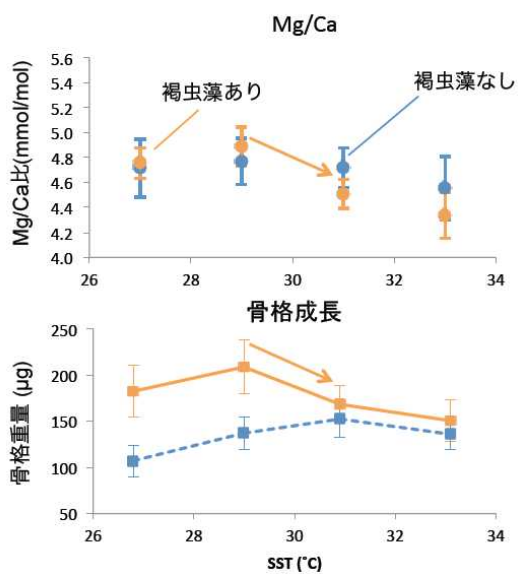


図9 温度制御実験で飼育されたポリプ骨格のMg/Ca比変動（上）と各温度区における骨格重量変動（下）。特に褐虫藻ありのポリプ骨格について、骨格重量とMg/Ca比の変動によく類似した傾向が見られる。



## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

本研究では、これまでに環境影響評価が困難であったサンゴの飼育実験について、ポリプ骨格を実験に供することで多種類の実験系を組み立て、実施することが可能であることが明らかとなった。さらに、本研究で確立された実験手法を用いることで追試や他の環境因子についてもその影響を評価することが可能であり、サンゴの骨格成長へ影響を与えることが懸念される様々な環境負荷要因に適用できる点は本研究により得られた成果である。

### (2) 環境政策への貢献

造礁サンゴは、サンゴ礁生態系の基盤を形成する、代表的な石灰化生物であるが、サンゴの白化現象が1997-98年の大規模エル・ニーニョイベント以降顕著になってきており、海水温の異常上昇がその要因と考えられている。本研究では、31℃以上になると骨格の成長量の低下が見られたため、29-31℃の間に骨格成長を低下させるしきい値があると考えられる。このように、今後慎重に実験を重ねることでサンゴの成長にとって負荷を与えるレベルやしきい値などを提唱することで環境政策に寄与・貢献していきたいと考えている。

## 6. 研究成果の主な発表状況(別添作成要領参照)

### (1) 主な誌上発表

#### <査読付き論文>

- 1) M. INOUE, R. SUWA, A. SUZUKI, K. SAKAI and H. KAWAHATA: Geophysical Research Letters, 38, L12809, doi:10.1029/2011GL047786, (2011) "Effects of seawater pH on growth and skeletal U/Ca ratios of *Acropora digitifera* coral polyps"
- 2) M. INOUE, K. SHINMEN, H. KAWAHATA, T. NAKAMURA, Y. TANAKA, A. KATO, C. SHINZATO, A. IGUCHI, H. KAN, A. SUZUKI, K. SAKAI: Global and Planetary Change, 92-93, 1-7, (2012) "Estimate of calcification responses to thermal and freshening stresses based on culture experiments with symbiotic and aposymbiotic primary polyps of a coral, *Acropora digitifera*"
- 3) 井上麻夕里: 海の研究(印刷中)「環境指標としてのサンゴ骨格中の微量元素とその変動メカニズムの解明に向けて」
- 4) 鈴木 淳・井上麻夕里: 海の研究(印刷中)「造礁サンゴ類の石灰化機構と地球環境変動に対する応答」
- 5) 中村 崇: 海の研究, 21-4, 131-144 (2012) 「造礁サンゴにおける温度ストレスの生理学的影響と生態学的影響」
- 6) 井口 亮、磯村尚子: 海の研究(印刷中) 「造礁サンゴの環境変化に対する順応機構に関するレビュー」
- 7) 田中泰章: 海の研究, 21-4, 101-117 (2012) 「造礁サンゴの栄養塩利用と生態生理学的影響」

#### <査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可)

特に記載すべき事項はない

### (2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 新免浩太郎、井口亮、井上麻夕里、中村崇、鈴木淳、酒井一彦、川幡穂高: 2010年日本プランクトン学会・ベントス学会合同大会(ポスター発表)「環境変動がサンゴポリプの初期骨格成長に与える影響」
- 2) 井口亮、加藤亜記、中村崇、井上麻夕里、鈴木淳、酒井一彦: 2010年度日本サンゴ礁学会大会(ポスター発表)「酸性化海水と富栄養化がサンゴポリプの成長と褐虫藻感染に及ぼす影響」
- 3) 井上麻夕里、小崎沙織、井口亮、酒井一彦、鈴木淳、川幡穂高: 2011年度地球化学会(口頭発表)「サンゴ骨格中U/Ca比のpH指標としての可能性」
- 4) Mayuri Inoue, Akira Iguchi, Shinmen Kotaro, Sakai Kazuhiko, Atsushi Suzuki, Hodaka Kawahata: 2011年度日本地球惑星科学連合大会(口頭発表) "Effects of thermal and salinity stresses on coral calcification: approach by aposymbiotic and symbiotic primary polyps"
- 5) 田中泰章、井口亮、井上麻夕里、森千晴、酒井一彦、中村崇、鈴木淳、川幡穂高: 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 第5回バイオミネラリーゼーションと石灰化(2011)-遺伝子から地球環境まで(口頭発表)「幼サンゴ骨格を利用した石灰化と栄養塩の関係評価」

- 6) 田中泰章、井口亮、井上麻夕里、森千晴、酒井一彦、中村崇、鈴木淳、川幡穂高：第14回日本サンゴ礁学会(2011)「サンゴ初期ポリプに対する栄養塩負荷の影響」
- 7) Mayuri Inoue, Akira Iguchi, Shinmen Kotaro, Sakai Kazuhiko, Atsushi Suzuki, Hodaka Kawahata: 12th International Coral Reef Symposium (2012) “Effects of thermal and salinity stresses on coral calcification”
- 8) Yasuaki Tanaka, Akira Iguchi, Mayuri Inoue, Chiharu Mori, Kazuhiko Sakai, Takashi Nakamura, Atsushi Suzuki, Hodaka Kawahata: 12th International Coral Reef Symposium (2012) “Nutrient assimilation for coral growth and the synergetic effect of elevated seawater temperature”

## 7. 研究者略歴

課題代表者：井上 麻夕里

1977年生まれ、岡山大学教育学部卒業、東北大学大学院理学研究科博士課程修了、現在、東京大学大気海洋研究所海洋底科学部門助教

研究参画者

(1): 中村 崇

1975生まれ、George Washington大学卒業、琉球大学理工学研究科博士課程修了、現在、琉球大学理学部講師

(2): 井上 麻夕里 (同上)

## RF-1009 サンゴ骨格を用いたサンゴ礁環境に及ぼす人間活動の影響評価に関する研究

## (1) 飼育実験に基づくサンゴの成長に及ぼす環境負荷の影響評価

琉球大学 理学部海洋自然科学科

中村 崇

## &lt;研究協力者&gt;

琉球大学 理学部海洋自然科学科

田中 泰章

琉球大学 熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設

井口 亮

平成22～23年度累計予算額：11,244千円

(うち、平成23年度予算額：7,149円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]** 近年、サンゴ礁生態系を衰退させる原因として様々な時空間スケールの環境変動が注目されている。例えば、地球規模では地球温暖化や海洋酸性化、地域規模では富栄養化や土壌流出などが挙げられる。サンゴ礁生態系の中でも、特に基盤構成種である造礁サンゴ（以下、サンゴ）は、こうした環境変化に伴うストレスの影響を鋭敏に受けるとされている。サンゴのストレス応答を調査するためには、環境要因を制御した室内飼育実験が有効な手法であるが、サンゴは室内飼育実験を実施するのが困難なため、これまで得られている実験結果も種や実験条件の違いによって結果が異なるなどの弊害が見られるのが現状である。サンゴは着底後、初期ポリプとして変態した後に石灰化を開始する。サンゴ初期ポリプの石灰化は急速に進み、かつ観察が比較的容易であるため、室内実験の対象として扱いやすい。本研究課題では、一斉産卵時に得られた配偶子から作成したサンゴ初期ポリプを用いて、複数の環境ストレス要因（高水温、低塩分、酸性化、富栄養化）を制御した飼育実験系の確立及び、これらの環境ストレスが初期ポリプの骨格形成に伴う成長に及ぼす影響評価を試みた。実験対象種として、南西諸島のサンゴ礁域に普通に見られるコユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を用いた。その結果、温度の上昇と塩分の低下によってサンゴの成長速度は有意に減少し、高水温は白化率の増加も引き起こした。一方で、高温ストレスに比べると酸性化の影響は比較的受けにくいことも示された。また、栄養塩負荷は潜在的にはサンゴの成長を促進するが、底生藻類との競合によってサンゴの成長が妨げられるという間接的な負の効果も持つことが観察された。今後はこれらの結果を追認するとともに、複合ストレス影響評価を行うことが、環境変動下のサンゴの成長・生残を評価する上で重要な課題である。

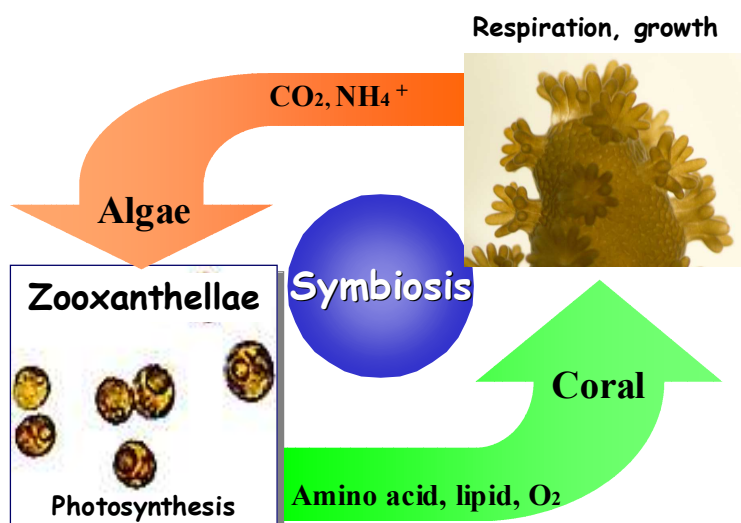
**[キーワード]** サンゴ初期ポリプ、地球温暖化、海洋酸性化、低塩分化、栄養塩負荷

## 1. はじめに

### (1) 環境変化によるサンゴ礁生態系と造礁サンゴの衰退

サンゴ礁生態系は熱帯・亜熱帯の浅海域に発達し、透明度の高い海と豊富な魚種で多くの人々を魅了する。サンゴ礁が広がる海の面積は、海洋全体からみるとほんの1%以下であるが、海産魚類種の約25%がサンゴ礁域で見つかるといわれるほど多種多様な生物が生息している<sup>1)</sup>。この生態系が漁業や観光、生物多様性などの様々な面で貴重な資源であることは言うまでもなく、世界各地でその保全活動が行われている。1992年ブラジルのリオデジャネイロで開かれた地球サミットにおいて採択された「持続可能な開発のための人類の行動計画（アジェンダ21）」には、「サンゴ礁やマングローブ林は、地球上でも最も多様で、総合的かつ生産的な生態系であり、生態学上の重要な機能を果たすと同時に、海岸を保護し、また食料、観光及び経済発展のための重要な資源となっている。その一方で、世界の多くの部分でこのような沿岸系が人為・自然の双方の多様な負荷要因によって脅かされつつある」との文言がみられる（UNEP, 1992）。それから約20年の間、オゾン層破壊、温暖化、さらには海洋酸性化など、地球規模での環境問題が次々に明らかになっており、我々人類を含めた生態系の健全性保持だけでなく、生物圏全体の存続が懸念されるに至っている。

造礁サンゴ（以下、サンゴ）は、サンゴ礁生態系の海底基盤を形成する代表的な石灰化生物である。サンゴの多くの種は、渦鞭毛藻類の仲間である褐虫(zooxanthellae)とよばれる単細胞の植物を共生させている。サンゴと褐虫藻との間には「相利共生」の関係が存在し、サンゴは褐虫藻がおこなう光合成産物の多くを受け取ることで、群体成長や生殖に必要なエネルギーの殆どを賄うことができる<sup>2),3)</sup>。加えて、褐虫藻は宿主であるサンゴが排出するアンモニアなどの窒素源などを利用して増殖をおこなうと同時に、サンゴが呼吸により排出する二酸化炭素をそのまま光合成に利用することができるため、サンゴと褐虫藻の共生関係は、熱帯海洋域特有の貧栄養な状態、特に硝酸、亜硝酸、アンモニアなどの窒素含量が少ない条件でも効率よく、安定した光合成をおこなうのに適しているといえる（図(1)-1）。また、排出される粘液は細菌による分解を経



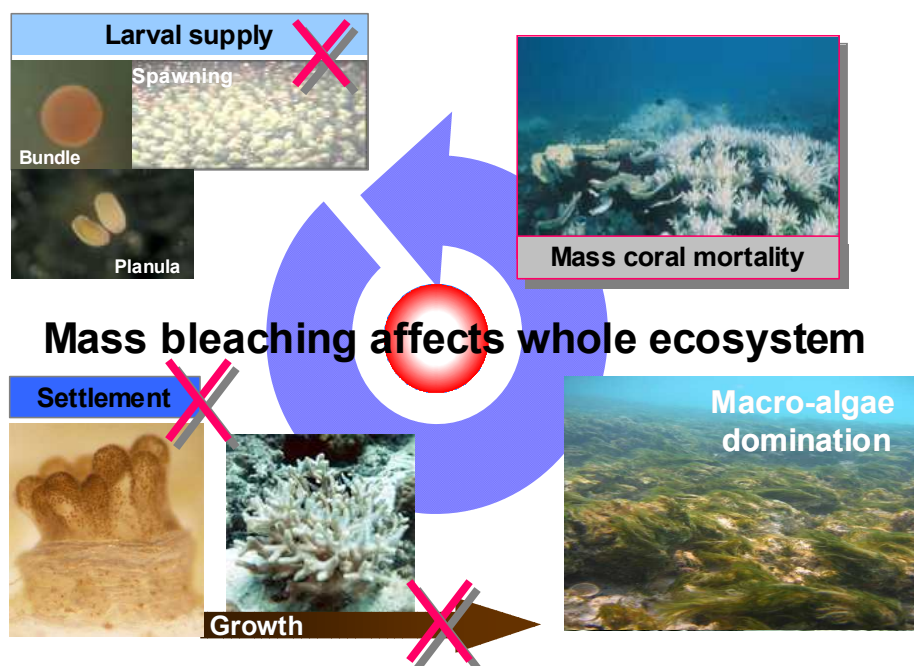
図(1)-1 サンゴと褐虫藻の共生関係

て、生態系の他の栄養段階の生物に利用される<sup>4)</sup>。サンゴの周囲には、活発に成長するサンゴ群体の炭酸カルシウム骨格がつくり出す複雑な3次元構造を巧みに利用しながら、極めて多くの海洋生物が生息している。これはサンゴが直接食糧源として他の生物に利用されるのと同時に、多様な生物の生息に適したさまざまな微環境を創出するからでもある<sup>5)</sup>。このように貧栄養環境にもかかわらず、サンゴ礁生態系が高い生物多様性を維持できるのは、光合成藻類との共生というサンゴのユニークな生活方式によるところが大きいといえる。

このように造礁サンゴは、サンゴ礁生態系の健全性を維持するためには必要不可欠な存在であるが、地球・地域規模の環境変化に伴うストレスによって近年は衰退の一途を辿っている。人為的に増加した二酸化炭素が要因とされる地球温暖化や海洋酸性化によって、サンゴ白化現象の増加や<sup>6)</sup> サンゴの石灰化率の低下が指摘されている<sup>7),8)</sup>。また、地球温暖化によって引き起こされる洪水の増加に伴う塩分低下も、サンゴに悪影響を及ぼす可能性もある<sup>9)</sup>。地域規模の環境ストレスとしては、陸域からの土壌流出や栄養塩負荷などが挙げられる<sup>10)</sup>。しかし、これらのストレスによって、サンゴが具体的にどのような影響を受けて衰退するのかは、まだ未解明な部分が多いのが現状である。本研究課題で注目する主要な環境変動として、海水温の上昇と栄養塩負荷についてここで詳しく研究背景をまとめてみたい。

## (2) 温度ストレスの影響

サンゴ礁をとりまく地球温暖化に伴う深刻な問題として、夏季海水温度の異常上昇による「サンゴ白化」現象と、その後のサンゴの斃死によって引き起こされる生態系の移行（フェーズシフト）が強く懸念されている<sup>11)</sup>。例えば、大規模白化に伴うサンゴの大量死によって空いた生息空間に、比較的成長の早い藻類が繁茂してしまう状態などが見受けられる。また、それと同時にサンゴ群集回復の基礎となる成熟群体からの新規幼生の供給も衰退した状態が続くため、元の状態への回復が一層困難になってしまう（図(1)-2）。通常、サンゴの多くは体内に高密度で存在する褐虫藻由来の褐色・緑褐色を基調とした色彩を持っているが、環境負荷の高い状態が続くと、共生していた褐虫藻が体内からいなくなってしまう。その結果、サンゴ本来の半透明な組織を透して、組織下にある炭酸カルシウムの白い骨格が透けて見えるため、漂白（Bleach）されたかのように真っ白い外観をもった状態となる。これが近年、世界中のサンゴ礁域で大きな問題となっている「サンゴ白化=Coral Bleaching」と呼ばれている現象である。白化の直後、サンゴはしばらくの間生存が可能であるが、褐虫藻を失った状態が続くと、サンゴは共生藻から得られていた光合成生産物を十分に受け取ることができなくなるために群体の成長速度や生殖能力が低下し<sup>12)</sup>、加えて様々な病原菌などへの抵抗力が弱まった状態となる。そのまま環境の改善が見られない場合サンゴが死亡してしまうのである。



図(1)-2 サンゴの白化現象に伴う生態系のフェーズシフト

大規模なサンゴ白化現象については、1980年代から蓄積されてきた野外調査による知見から、海水温度の上昇が主原因であることが示唆されていた<sup>13)</sup>。実際に、大規模なサンゴ白化現象はエルニーニョの傾向の強い年に各地から報告されており、1982-83年のエルニーニョの後、カリブ海沿岸の各国から米国フロリダ州にかけての広い大西洋地域でサンゴの白化が見られるなどの事例がみられた。また、1998年には、世界各地の主要なサンゴ礁域で大規模なサンゴ白化がみられ、日本国内では、沖縄県の石垣島周辺のサンゴ礁域で、ミドリイシ属サンゴを中心に60%以上が白化現象によって失われたと言われている<sup>14)</sup>。その後のオーストラリア海洋科学研究所（AIMS）による報告では、世界のサンゴ礁の27%が1980年代からの20年間に白化によって深刻な被害を受けていたことが示され、2012年頃までにさらに14%の健全なサンゴ礁が失われることが予測されていた<sup>14)</sup>。その後、サンゴ礁地形が発達し、多様なサンゴ種を要する東南アジア地域の広い範囲を中心として、広範囲での水温の異常上昇と大規模な白化現象、その後のサンゴ群集の衰退状態が報告されている<sup>15)</sup>。

もし、温暖化と連携した水温上昇傾向が続くと、多くのサンゴが死亡したままとなり、そのままサンゴ群集の回復が進まなければ、サンゴが残した骨格構造までもが物理的・生物的な要因によって時間と共に崩壊していく。そのため、サンゴを食料とする生物だけでなく、避難・生活・保育・産卵場所としてサンゴ骨格構造を利用していた生物までもが次第に影響を受け、姿を消す事になることが示唆されている。並行して、サンゴを基礎とした生態系から、大型の海草類や海綿などが海底面を覆う主な光合成生物として優占した別の生態系への移行が予測されている<sup>11)</sup>。2006年にオーストラリアの研究機関がまとめた「Reef Manager's Guide to Coral Bleaching」によると、1980年代以前にはわずか数件であった白化現象報告数がその後2000年までには500件以

上になったことが明らかになっている。白化の被害を受けた海域は1998年から更に拡がり、2006年時点では地球上のほぼすべてのサンゴ礁域における深刻な被害が報告されている。白化についての認識と研究の活発化にともない、白化報告数が増えた可能性を加味する必要があるが、温暖化に伴う水温異常がサンゴ礁生態系に対する世界的脅威として認識されてきていることがうかがえる。Wilkinson (2008)<sup>15)</sup>によれば、調査対象となっているサンゴ礁域全体の46%が比較的健全な状況にあるとする一方で、2004年の報告に比べ、調査対象となっていたサンゴ群集の19%が実質失われており、15%が深刻な状況に置かれていることを報告している。特に生物多様性の高い東南アジアで40%が実質失われた状況にあり、今後回復が難しいと考えられるサンゴ礁域の増加が懸念されている<sup>15)</sup>。

野外での環境変化は同時複合的に起こっており、それぞれの環境負荷とそのストレス応答のどちらについても単独に現れることは非常に稀である。そのため、複数の環境負荷がかかった状態のサンゴにおいては、個々の環境負荷と、それぞれのストレス応答の因果関係を特定することが容易ではない。特に野外で観察される白化現象については、ほぼ間違いなく複数のストレス要因が関与していること、それぞれのストレスの強さや時期のずれから、結果として主原因を特定することが困難な場合がある。

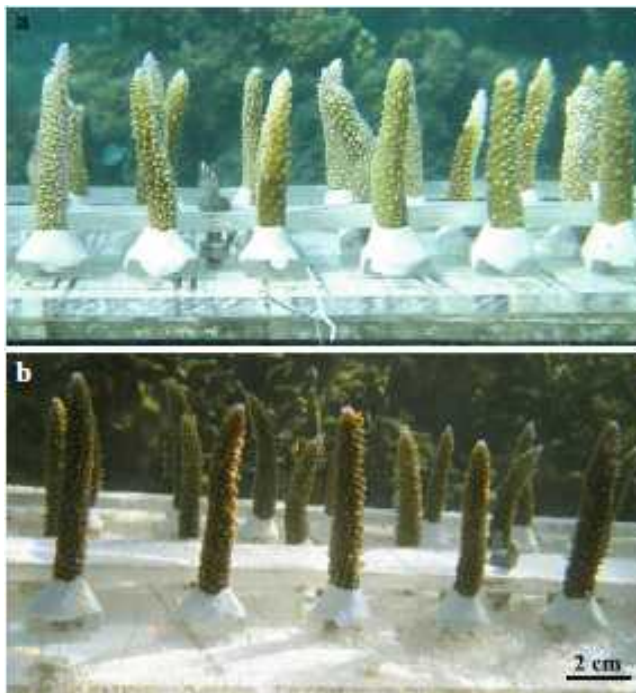
同種サンゴ間についても、サンゴ礁特有の複雑な地形に由来する微環境の違い、例えば、水深・透明度や傾斜による光量の違いや、潮流の速さによっても反応が異なり、あるサンゴ種では、一般的に白化が見られるような30℃を超える水温でも、濁りのある場所では白化が見られないケースなども報告されている<sup>16), 17), 18), 19), 20)</sup>。また、白化しやすい種・白化はするが回復しやすい種・白化すると高確率で死亡してしまう種といった種間での違いも報告されている<sup>12)</sup>。しかしながら、さまざまなストレス応答とその原因を個々に解明し、理解していくことは、サンゴ礁保全の観点からも期待されることである。そこで、各複合ストレス要因を分けて考えていくために、各負荷要素の度合いを段階的に変えながら相互影響を調べることで、自然環境下でサンゴが示すストレス応答の一端を解明する方法がとられている<sup>21)</sup>。また、それら基礎的知見から、サンゴ種ごとの耐性の違いの原因が明らかになりつつあり、将来的にはサンゴ群集の構成や、種の分布に温暖化が与える影響について、積み上げ式に考えていくことが可能となるかもしれない。

### (3) 栄養塩負荷の影響

サンゴ礁の栄養塩濃度は主に陸水と外洋海水との混合比率や、生物による吸収・再生産（有機物の無機化）などによって変動するが、なかでも陸水の流入は沿岸域の栄養塩濃度を大きく左右する。バイーア州（ブラジル）では沿岸域の土地開発と人口増加によって地下水の汚染が進み、沿岸域への栄養塩流入量が増加した結果、サンゴ礁海水としては極めて高い5~10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ （以下、 $\mu\text{M}$ ）の硝酸イオン（ $\text{NO}_3^-$ ）やアンモニウムイオン（ $\text{NH}_4^+$ ）、約1  $\mu\text{M}$ のリン酸イオン（ $\text{PO}_4^{3-}$ ）が観測され、造礁サンゴの被度は10%以下に低下した<sup>22)</sup>。後述するように、栄養塩とサンゴの成長の直接的な因果関係については見解が分かれているが、栄養塩負荷が藻類の増殖を促すことは間違いなく、生態系構造に何らかの変化を及ぼすことになる。このような富栄養化という環境学的観点から、サンゴに対する栄養塩負荷の影響評価が行われてきた。

その結果、造礁サンゴを富栄養化させた海水中で飼育すると、栄養塩吸収量の増加によって褐

虫藻の光合成産物は窒素 (N) やリン (P) を多く含むようになり、褐虫藻の細胞分裂が促進される。そして面積当たりの褐虫藻数やクロロフィル量が増加し、面積当たりの光合成速度も増加することが多くの先行研究で報告されていった (表 (1)-1)。褐虫藻密度の増加によって、造礁サンゴは見た目にも分かるほど濃い褐色に変色する (図 (1)-3)。造礁サンゴは共生する褐虫藻の一部を常に海水中に放出していることが知られているが<sup>23)</sup>、富栄養化によって宿主内の褐虫藻密度が増加すると、海水中へ放出される褐虫藻数も増加する<sup>24)</sup>。この放出速度の増加は正午から夕方にかけて顕著に見られたことから、放出機構は褐虫藻の光合成活動に深く関係すると思われる。このような栄養塩吸収に伴う褐虫藻の代謝活性化は、言い換えると通常のサンゴ礁においては褐虫藻の成長が栄養塩によって律速されていることを示唆する。実際に、共生体中の褐虫藻の分裂時間は12~100日<sup>25), 26), 27)</sup>であり、分離培養された褐虫藻<sup>28)</sup>やサンゴ礁の植物プランクトン<sup>29)</sup>と比べて非常に遅い。褐虫藻は動物細胞内という一見、栄養状態の良い (栄養塩濃度が高い) 環境に置かれているが、細胞内外の栄養塩濃度勾配によって物理化学的に、あるいは宿主によるコントロールで<sup>30), 31)</sup>、その増殖速度が低く抑えられているようである。海水の富栄養化は細胞内外の栄養塩濃度勾配を大きくし、褐虫藻への栄養塩移送が促進される結果、褐虫藻代謝の活性化につながると考えられる。表 (1)-1を見ると、 $\text{NO}_3^-$  または  $\text{NH}_4^+$  が  $5 \mu\text{M}$  を超えると、褐虫藻 (クロロフィル) の増加が起こるようであるが、それ以下の濃度で実験を行った研究例は少なく、影響が表われ始める濃度については注意が必要である。実験開始時における共生体の栄養状態 (生息環境の栄養塩濃度やプランクトン捕食状況) によって、応答を示す栄養素や濃度は異なることが推測される。



図(1)-3 褐虫藻 (クロロフィル) 密度の異なるサンゴ写真。a : 低栄養塩環境、b : 高栄養塩環境



表(1)-1 栄養塩負荷に関する造礁サンゴの生態生理学的研究。CA：骨格単位面積当たりのクロロフィル、CZ：褐虫藻細胞当たりのクロロフィル、ZA：骨格単位面積当たりの褐虫藻密度、GPA：骨格単位面積当たりの総一次生産速度、RA：骨格単位面積当たりの呼吸速度、GR：骨格成長速度。  
+：増加、0：変化なし、-：減少

Nutrients ( $\mu\text{M}$ )	Responses						References
	CA	CZ	ZA	GPA	RA	GR	
$\text{NH}_4^+$ (20, 50)	+	0	0		0		Stambler <i>et al.</i> (1994) <sup>46)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (2-46)	+		+	+	0		Hoegh-Guldberg and Smith (1989) <sup>25)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (20)	+	0	+				Muscatine <i>et al.</i> (1989) <sup>47)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (20) + $\text{PO}_4^{3-}$ (4)	+	0	+				
$\text{NH}_4^+$ (20)	+	+	+				Muller-Parker <i>et al.</i> (1994) <sup>48)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (20)		+				0	Steven and Broadbent (1997) <sup>49)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (20) + $\text{PO}_4^{3-}$ (4)		+				+	
$\text{NH}_4^+$ (20)						-	Ferrier-Pagès <i>et al.</i> (2000) <sup>40)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (20) + $\text{PO}_4^{3-}$ (2)						-	
$\text{NO}_3^-$ , $\text{NH}_4^+$ (20)	+					-	Marubini and Thake (1999) <sup>50)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (15)		+					Snidvongs and Kinzie (1994) <sup>51)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (15)	0		0	-	0	-	Nordemar <i>et al.</i> (2003) <sup>52)</sup>
$\text{NH}_4^+$ (10)						0	Ferrier-Pagès <i>et al.</i> (2000) <sup>40)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (5-20)	+		+	+	0	-	Marubini and Davies (1996) <sup>39)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (5-10)						-	Renegar and Riegl (2005) <sup>53)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (5-10) + $\text{PO}_4^{3-}$ (2-4)						-	
$\text{NO}_3^-$ (6)						0	Marubini and Atkinson (1999) <sup>54)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (5)				0	0		Faxneld <i>et al.</i> (2010) <sup>55)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (5) + $\text{PO}_4^{3-}$ (0.3)	+						Tanaka <i>et al.</i> (2007) <sup>56)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (5) + $\text{PO}_4^{3-}$ (0.3)						0	Holcomb <i>et al.</i> (2010) <sup>57)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (5) + $\text{PO}_4^{3-}$ (0.1)	+					+	Chauvin <i>et al.</i> (2011) <sup>41)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (2)	0		0	0	-	0	Ferrier-Pagès <i>et al.</i> (2001) <sup>58)</sup>
$\text{NO}_3^-$ (1)	0		0	0	0	-	Marubini and Davies (1996) <sup>39)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (5)						+	Dunn <i>et al.</i> (2012) <sup>59)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (4)	0	0	0				Muscatine <i>et al.</i> (1989) <sup>47)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (4)		0				+	Steven and Broadbent (1997) <sup>49)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (2-4)						-	Renegar and Riegl (2005) <sup>53)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (2.5)	-		0			+	Godinot <i>et al.</i> (2011) <sup>60)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (2)						-	Kinsey and Davies (1979) <sup>35)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (2)						-	Ferrier-Pagès <i>et al.</i> (2000) <sup>40)</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$ (1.2)		0					Snidvongs and Kinzie (1994) <sup>51)</sup>

栄養塩吸収に伴う褐虫藻と宿主の有機物代謝の応答は、上記のように多くの一致した見解が得られてきたが、宿主の石灰化への影響についてはいまだに明らかにされていない部分が多い。石灰化は狭義にはサンゴ骨格の形成のみを指すが、細胞などの有機軟組織は骨格に比べて十分に重量が小さいため、本論文では石灰化は細胞組織を含めた造礁サンゴとしての成長（縦横方向への拡大）と同義とする。石灰化は炭酸カルシウムを主成分とするため、一見、栄養塩とは無関係のように思われがちだが、サンゴ骨格には貝殻と同様に微量の有機物が含まれ、炭素（C）だけでなくNやPもタンパク質<sup>32)</sup>やリン脂質<sup>33)</sup>として骨格に組み込まれている。Allemand et al. (1998)<sup>32)</sup>は*S. pistillata*のタンパク質合成を阻害した結果、すぐに石灰化速度の低下が見られたことから、骨格に組み込まれる有機基質（タンパク質）の合成が石灰化を律速しているのではないかと考えた。また、宿主や褐虫藻の細胞合成には当然のことながらNやPなどの栄養素を必要とし、長期的には有機軟組織の成長なくして骨格の成長はない。さらに、褐虫藻の光合成は石灰化にとって化学的に好適な環境を作ることが知られており<sup>34)</sup>、栄養塩濃度はこの光合成活性を大きく左右する。このように、様々な過程で石灰化と栄養塩は直接的あるいは間接的に関与していることは間違いない。

1970年代からサンゴ礁海水中の栄養塩濃度と造礁サンゴの成長速度の間に負の相関があることが報告され、海水の富栄養化が造礁サンゴの成長を阻害し、サンゴ礁生態系の荒廃につながっていることが注目され始めた<sup>35), 36), 37)</sup>。現場では栄養塩濃度の変動に伴い様々な水質が同時に変化するため、造礁サンゴの成長と栄養塩の直接的な因果関係を示すに至らなかったが<sup>37)</sup>、Stambler et al. (1991)<sup>38)</sup>は研究施設内の環境条件管理下のもとで造礁サンゴ*Pocillopora damicornis*を飼育し、富栄養化海水（15 $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ ）が石灰化を阻害することを初めて明瞭に示した。著者らはその機構について、富栄養化によって褐虫藻から宿主への有機物移行量が減少し、宿主がエネルギー不足になったため、あるいは褐虫藻の光合成速度が増加したことにより、サンゴ細胞内のDICが多く消費されるようになり、石灰化に利用可能なDICが減少したためと考えた。その後、Marubini and Davies (1996)<sup>39)</sup>は0.2~20 $\mu\text{M}$ の $\text{NO}_3^-$ 濃度下で*Porites porites*と*Montastrea annularis*を飼育し、わずか1 $\mu\text{M}$ の $\text{NO}_3^-$ によってもサンゴの石灰化速度が大きく低下したことを示し、Stambler et al. (1991)<sup>38)</sup>の後者の説を支持した。わずかな栄養塩濃度増加でさえも石灰化の抑制効果があることを示したため、この結果は非常にインパクトが大きかった。しかしそれ以降、同様の低レベルな栄養塩負荷でサンゴの石灰化が抑制されたという研究結果は報告されておらず、Ferrier-Pagès et al. (2000)<sup>40)</sup>は*S. pistillata*について10 $\mu\text{M}$ の $\text{NH}_4^+$ 濃度では成長速度の変化は見られず、20  $\mu\text{M}$ で有意な低下が見られたことを報告した。これはStambler et al. (1991)<sup>38)</sup>と同レベルの高い濃度であり、その他の先行研究においても多くの場合10 $\mu\text{M}$ 以上の高い $\text{NH}_4^+$ または $\text{NO}_3^-$ 濃度条件において石灰化速度の低下が観察されている。しかしながら、実際のサンゴ礁海域で10 $\mu\text{M}$ を超えるような濃度が観測されることはほとんどなく、実験的研究と現実環境とのギャップの一つといえる。

Chauvin et al. (2011)<sup>41)</sup>は、実際のサンゴ礁海域における栄養塩の濃度勾配を利用して、栄養塩濃度の低い沖側（ $\text{NO}_3^-$ : 0.6 $\mu\text{M}$ ）に生息する造礁サンゴ*Acropora muricata*と栄養塩流入量の多い岸付近（ $\text{NO}_3^-$ : 5 $\mu\text{M}$ ）に生息する同種サンゴを採取し、両者の代謝速度を比べた結果、岸付近のサンプルの方が光合成・石灰化速度が大きいことを報告した。Sawall et al. (2011)<sup>42)</sup>も現場の栄養塩濃度勾配を利用して*Stylophora subseriata*の代謝速度を比較したところ、Chauvin et al.

(2011)<sup>41)</sup>と同様の結果を示した。これらはサンゴ礁の現実的な栄養塩負荷環境に適応した造礁サンゴの代謝を比較したという点で重要な知見といえる。また、Atkinson et al. (1995)<sup>43)</sup>はワイキキ水族館（ハワイ）で長期間飼育されている造礁サンゴについて、高い栄養塩環境 ( $\text{NO}_3^-$ :  $5\mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4^+$ :  $2\mu\text{M}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ :  $0.6\mu\text{M}$ ) にもかかわらず、現場海域の造礁サンゴに比べて早い成長速度を維持していることを報告している。その他の先行研究を見ても、 $\text{NO}_3^-$ が $5\mu\text{M}$ 程度の栄養塩環境であれば、サンゴの石灰化速度が有意に低下したという報告はほとんど見られない（表(1)-1）。栄養塩が造礁サンゴの成長を促進する機構としては、上述した石灰化に必要な有機基質の合成、宿主・褐虫藻の細胞組織の合成、光合成による化学的な石灰化促進効果、などのいずれかまたは複数が挙げられる。

ここ数十年でサンゴ礁生態系の衰退が注目され、環境ストレスの一つとして富栄養化を想定した調査研究が行われてきた。造礁サンゴの代謝変化と栄養塩の直接的な因果関係を評価するため、水槽などを利用した実験的研究が行われてきたが、その多くがサンゴ礁にはあまりにも高い栄養塩濃度を設定し、現実的な栄養塩環境が想定されていないと言わざるを得ない。サンゴ礁は貧栄養海域にありながら高い生産性を持つため、栄養塩が生物個体スケールあるいは群集スケールで迅速に吸収と再生を繰り返しているという古くからの見方があるが、サンゴ礁における海水の滞留時間は通常短く、そのようなりサイクルは物理化学的に不可能だとも考えられている<sup>44), 45)</sup>。Atkinson (2011)<sup>45)</sup>の総説では、陸域から栄養塩が流入したとしても、一次生産者と海水の境界層における拡散律速によって、栄養塩の大部分は吸収されずに外洋に流されるという機構が解説されている。恒常的に高い栄養塩濃度が維持される可能性があるのは、サンゴ礁の中でも河川水や地下水が流入する一部の限られた地点のみであり、サンゴ礁全体の富栄養化に容易にはつながらない。多くのサンゴ礁で栄養塩負荷が進行していることは事実であるが、実際に想定される栄養塩の濃度変動を考慮しながら、より現実的な造礁サンゴの応答を評価していくことが望まれる。

## 2. 研究開発目的

上記の研究背景を踏まえ、沖縄周辺の造礁サンゴの代表種の一つであるコユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を対象に、サンゴ初期ポリプの環境ストレス応答を評価することを目的とした。ストレス要因としては、高水温、低塩分、酸性化、栄養塩負荷を取り上げ、各種条件を精密に制御した飼育実験系を確立する。同一サンゴ種について多様な環境ストレスの影響を同時期・同一空間で調査することによって、これまでにない包括的評価を得ることを目指す。

## 3. 研究開発方法

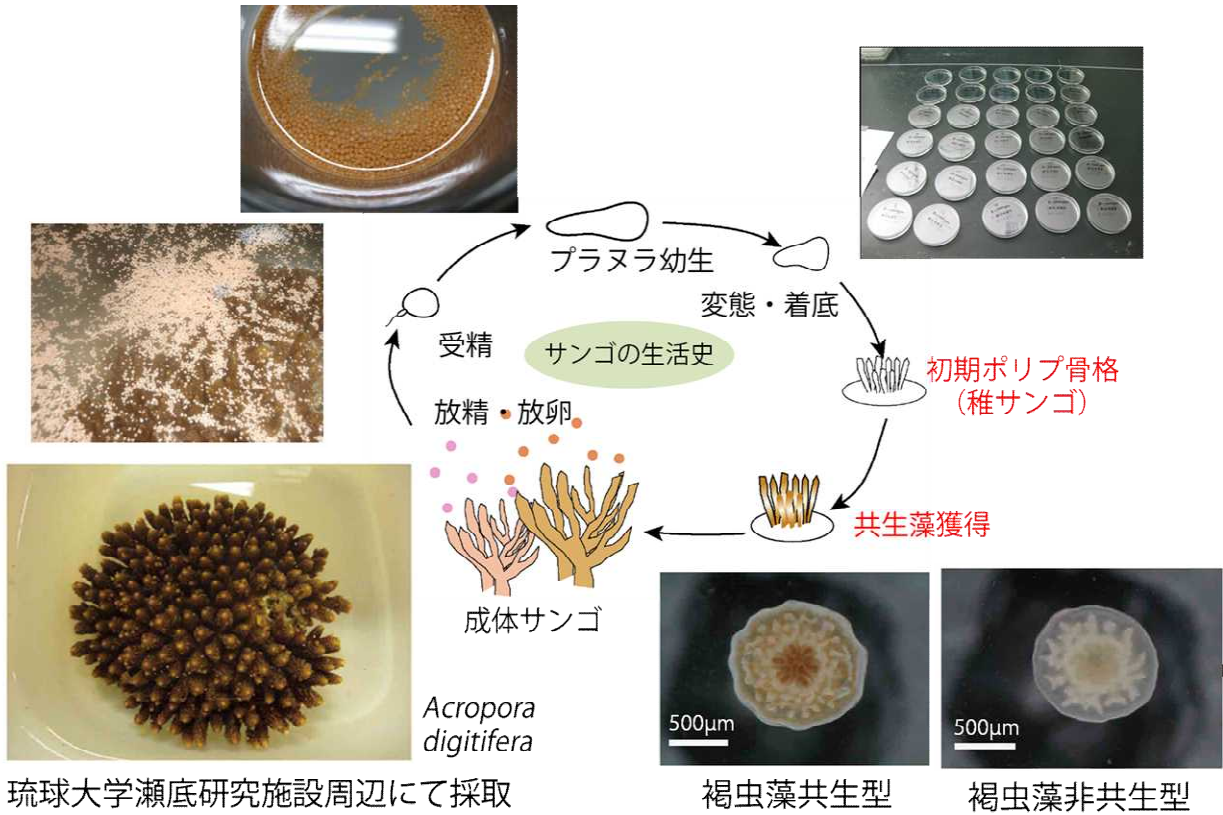
### (1) 高水温・低塩分・酸性化の影響評価

2010年7月6日に産卵した、コユビミドリイシ4群体から配偶子を採集した（図(1)-4）。産卵後の配偶子採集方法はMorita et al. (2006)<sup>61)</sup>と同様である。6穴プレートに幼生を移し、変態誘引ペプチドによってサンゴ幼生の変態を誘引しプレートに定着させた<sup>7)</sup>。プレートは、褐虫藻感染グループと褐虫藻非感染グループに分け、褐虫藻感染グループの初期ポリプは、シャコガイから単離した褐虫藻培養液を加えることで感染させた。褐虫藻の感染が確認された後、初期ポリプが

定着したプレートをランダムに各実験水槽へと移した。これらの初期ポリプを用いて、以下の高水温、低塩分、酸性化の実験を行った。

1) 高水温

温度調整実験に関しては、光照射はメタルハイドランプ(FUNNEL 2、150W、カミハタ)を使用した。照射時間は12時間毎の明暗周期(午前7時から午後7時まで点灯)とした。光量は $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に調整した。ペリスタポンプ(MASTER FLEX, Cole-Parmer Instrument Company)を用いて流量毎分200 ml のかけ流しで、各飼育水槽へ海水を供給した(図(1)-5)。飼育水槽は褐虫藻感染、非感染グループ毎に飼育水槽を分け、実験を行った。各飼育水槽は大型浴槽内に設置し、クーラー(ZENSUI、NISSO)によって冷却水を循環させ、外側からの冷却を行った。設定温度は27°C(コントロール)、29°Cの飼育水槽を入れた浴槽内には24°Cの冷却水を、31°Cと33°Cの設定区の水槽を入れた浴槽内には、29°Cの冷却水を循環させ、外部からの冷却を行った。水温は各水槽内にデジタルサーモスタット(POWER THERMO ET-30B、コトブキ(株))を設置し、設定水温よりも低くなった場合にヒーター(MICRO SAFE POWER-HEATER 150、(株)EVERS)が作動するように設定した。各水槽には水温ロガー(サーモクロン SL、KN ラボラトリーズ)を設置し、30分毎に水槽内の水温を記録した。また、水銀温度計を用いて、1日2回飼育水槽内水温の確認を行った。実験水槽内は、水中フィルターポンプ(MINI BOX 120、コトブキ(株))を入れ、海水を循環させた。



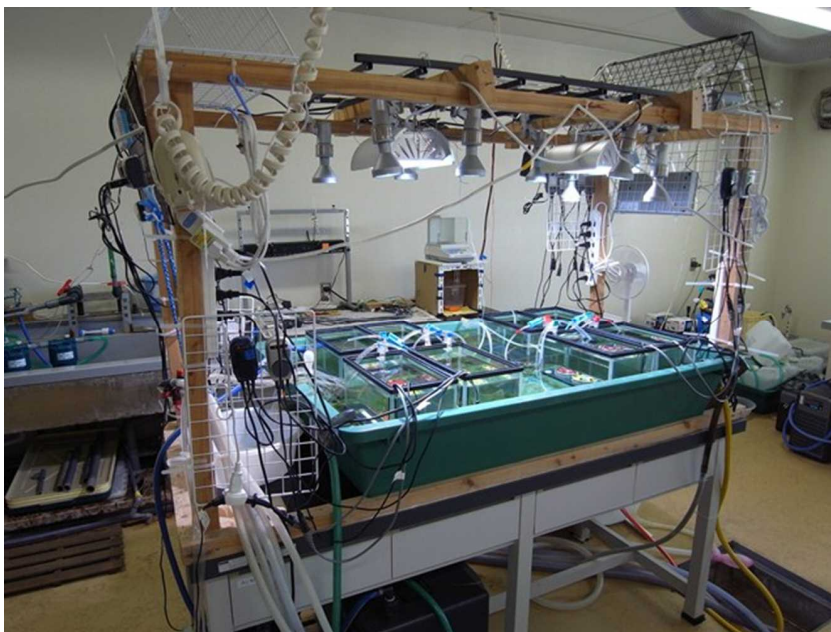
図(1)-4 造礁サンゴの生活史

## 2) 低塩分

塩分調整実験では、実験開始前に塩分34（コントロール）、32、30、28、26 の塩分の海水を2L ずつ調製した。これらの海水を各設定塩分プレート内の1穴に10mlずつ入れ、実験を開始した。その後は1日に1回、海水を交換した。交換した海水は、毎日スクリー管に保存し、実験終了後、塩分測定器を用いて実験期間中の塩分の変動を確認した。また、各飼育6穴プレートは実験室内のエアコンの温度を27℃に設定し、実験期間中はこれにより外部からの冷却を行った。光照射は蛍光灯を使用した。照射時間は12時間毎の明暗周期(午前7時から午後7時まで点灯)とした。光量は  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  に調整した。温度設定は27℃にし、上記の温度調整実験と同様の方法で、温度調整を行った。

## 3) 酸性化

酸性化実験では、二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) を海水にバブリングさせることで海水中の二酸化炭素分圧 ( $\text{pCO}_2$ ) を制御し、1) の高水温実験と同様に流水系で実験を行った<sup>62)</sup>。 $\text{CO}_2$ 濃度は300, 400（コントロール）、800, 1000ppmに設定した。飼育期間中の海水温は27℃に設定し、サーモスタットによるモニターの結果、飼育期間中は海水温が常時一定に保たれていることが確認された。

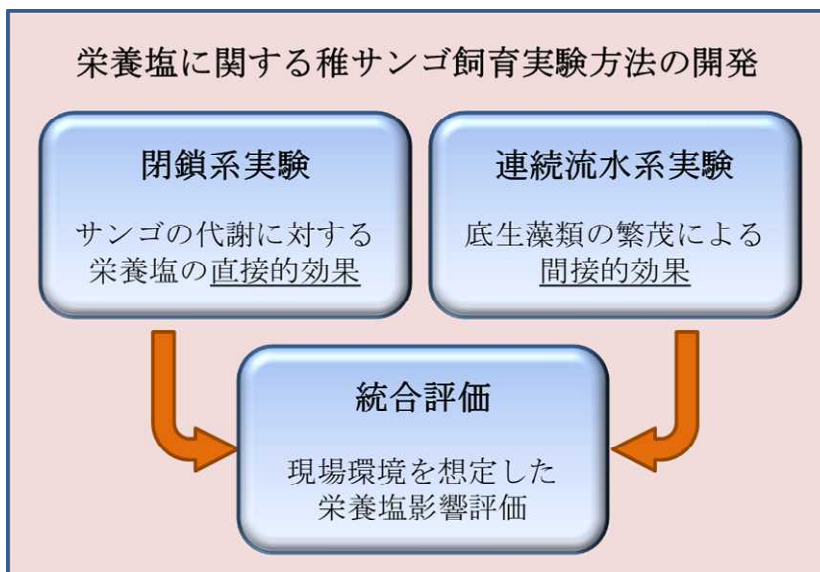


図(1)-5 屋内飼育実験設備

## (2) 栄養塩負荷の影響評価

栄養塩に関する飼育実験では、図(1)-6に示すように二つの実験系を設定し、両実験系の結果か

ら統合的評価を行うことを試みた。まず、実験対象として2011年6月にミドリイシ属サンゴの1種、コユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を採取し、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設内の屋外水槽において産卵を確認した後、それらの配偶子を得た。配偶子を発生して得られたプラヌラ幼生は、変態ペプチドを用いて6穴プレートに着底させて、サンゴ初期ポリプを作成した。この初期ポリプにシャコガイから単離した褐虫藻を感染させ、サンゴ-褐虫藻共生型の稚サンゴを作成した。

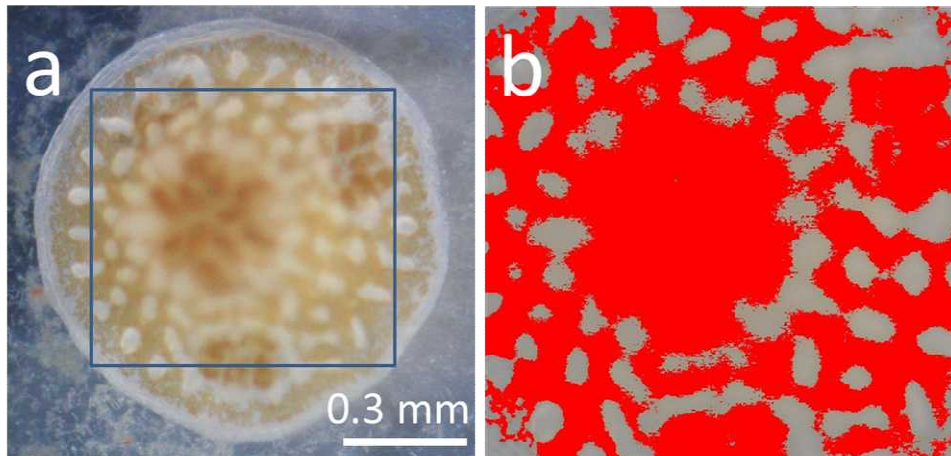


図(1)-6 栄養塩負荷に関する実験手法

### 1) 閉鎖系実験

栄養塩添加区と対象区の二つの実験区を用意し、稚サンゴをそれぞれの水槽で15個体ずつ10日間飼育した。水槽内の海水は定期的に交換し(0、3、6日目)、毎回の交換後に栄養塩添加区にのみ栄養塩溶液(硝酸カリウム、リン酸二水素ナトリウム)を硝酸イオンとリン酸イオンがそれぞれ $2.4\mu\text{mol/L}$ (以下、 $\mu\text{M}$ )、 $0.2\mu\text{M}$ になるように添加した。対象区では硝酸イオン $0.5\mu\text{M}$ 、リン酸イオン $0.1\mu\text{M}$ であり、それ以外の栄養塩は亜硝酸イオン( $0.2\mu\text{M}$ )、アンモニウムイオン( $0.5\mu\text{M}$ )ともに対象区と栄養塩添加区で同程度であった。通常のサンゴ礁海域における硝酸イオン濃度は $0.5\mu\text{M}$ 程度であり、 $2.4\mu\text{M}$ という添加区の濃度はサンゴ礁としては十分に栄養塩負荷であるといえる。水槽内の海水温は $27^\circ\text{C}$ に維持し、また水流ポンプを使って水槽内には緩やかな(約 $5\text{cm/s}$ )水流を保った。水槽上部からはメタルハライドランプで1日12時間(午前7時から午後7時)照射し、照射時の平均光量は $110\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。飼育実験期間中、0、3、6、10日目に稚サンゴを顕微鏡下で写真撮影し(図(1)-7a)、成長速度と褐虫藻由来のクロロフィル量を測定した。クロロフィルは画像解析ソフトによって図(1)-7bに示すように検出され、検出部分の面積割合をクロロ

フィル指数（CI）とした。実験終了後には稚サンゴから有機組織をウォーターピックで剥離し、東京大学大気海洋研究所において骨格乾燥重量を計測した。



図(1)-7 稚サンゴの顕微鏡写真(a)とクロロフィル検出(b)。写真(a)の四角部分をクロロフィル解析に使用した。

## 2) 連続流水系実験

水槽に連続的に海水を供給することによって、底生藻類が繁茂する中での稚サンゴの成長について調査を行った。栄養塩濃度条件は対象区（SC）、低負荷区（SL）、高負荷区（SH）の3段階に設定し、閉鎖系実験と同様に共生型稚サンゴをそれぞれ15個体ずつ10日間飼育した。また、褐虫藻の機能を調査するため、褐虫藻を感染させない非共生型（Aposymbiotic）ポリプも用意し、共生型と同様に対象区（AC）、低負荷区（AL）、高負荷区（AH）の3条件下で10日間の飼育実験を行った。栄養塩溶液（硝酸カリウム、リン酸二水素ナトリウム）はペリスタポンプを使って連続的に各水槽に供給し、通常の貧栄養海水と混合することによって目標濃度になるように調整した。結果として硝酸イオン濃度は対象区、低負荷区、高負荷区においてそれぞれ平均0.2、3.8、8.8、リン酸イオンはそれぞれ平均0.1、0.4、0.7 $\mu$ Mであった。海水温や水流、光量、写真撮影などは上記の閉鎖系実験と同様に行った。

## (3) 赤土の影響評価予備実験

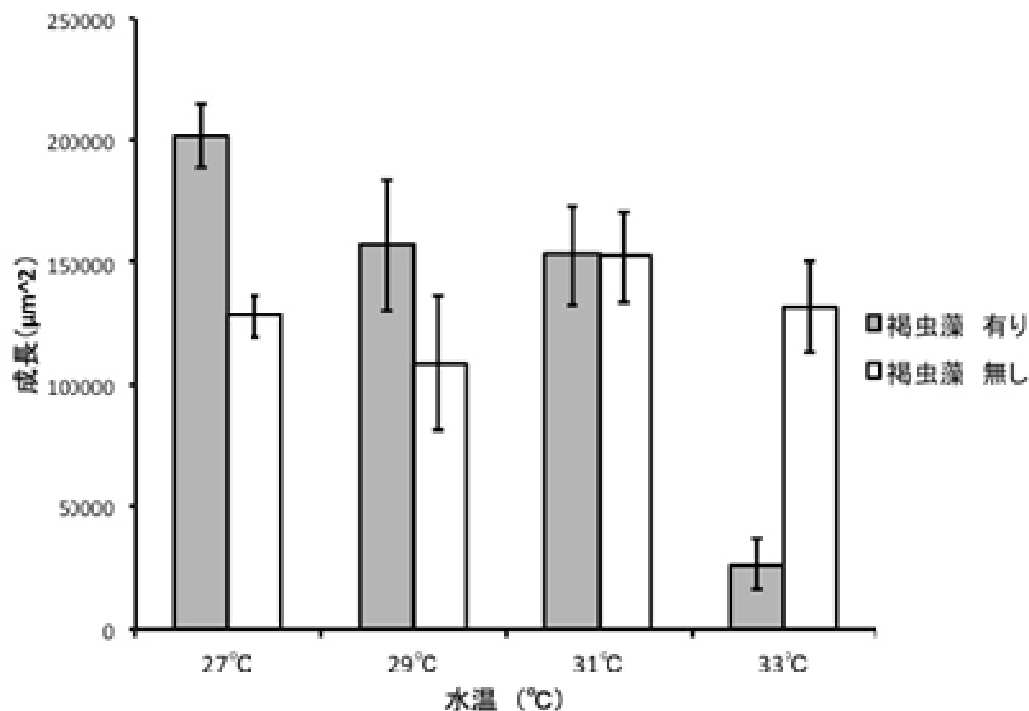
赤土流出の影響を見積もるため、降水直後の瀬底島周辺に流れ込む河口域から海水をバケツ採水し、よく攪拌した赤土海水、フィルター（0.45 $\mu$ m）でろ過した赤土海水を準備し、通常のろ過海水をコントロールとして毎日水換えを行うことで実験室内環境での閉鎖系実験として赤土海水

の影響評価を試みた。試料は褐虫藻非感染ポリプのみを用いて行った。

#### 4. 結果及び考察

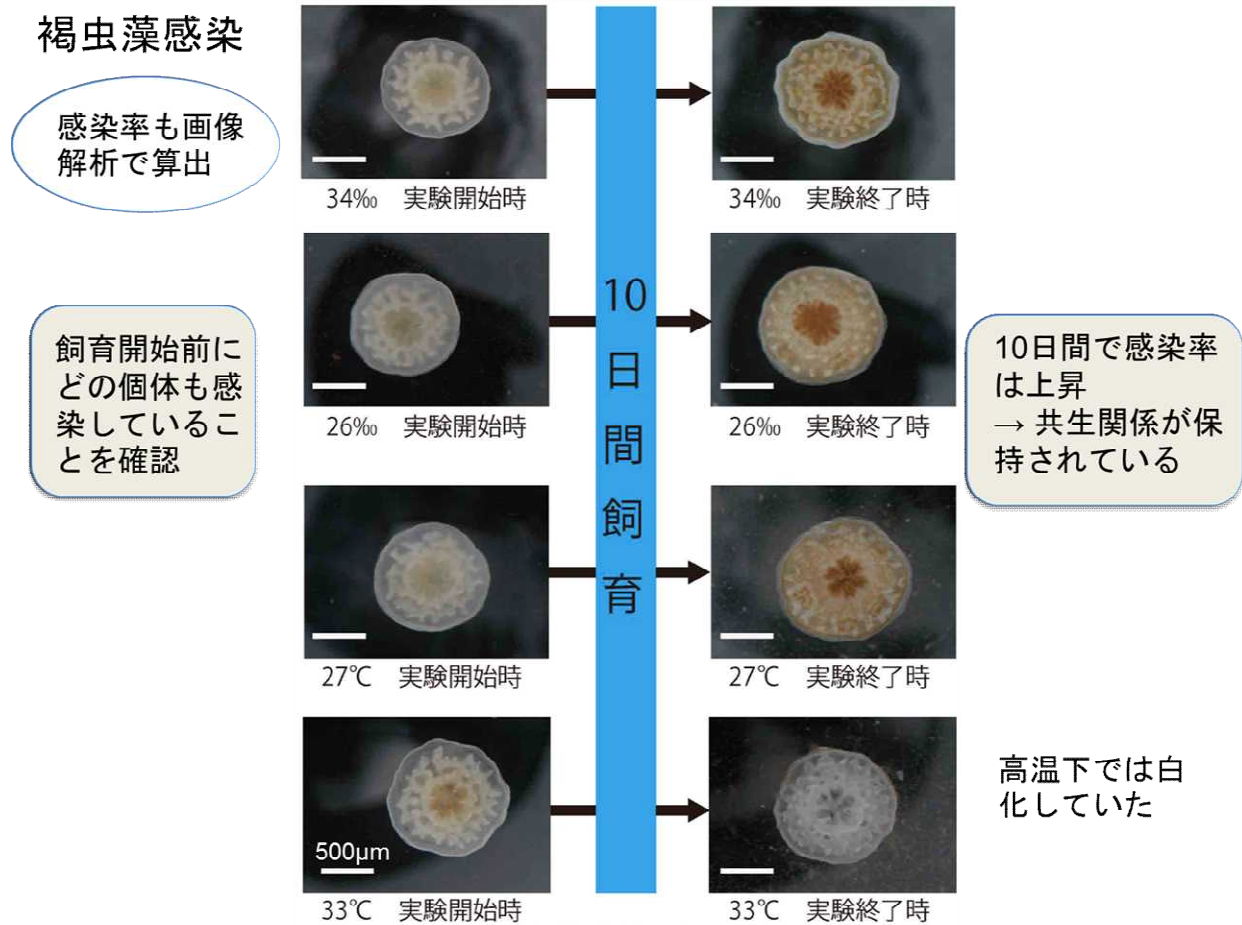
##### (1) 高水温の影響評価

温度調整実験では、27℃及び33℃において、褐虫藻の有無によって成長に差が見られた（図(1)-8）。褐虫藻感染グループでは、33℃で飼育したサンゴ初期ポリプの成長は、27、29、31℃で飼育したサンゴ初期ポリプの成長と比較して、有意な減少が見られた（一元配置分散分析、 $p < 0.05$ ）。また、飼育前はすべての個体が褐虫藻に感染していたのに対し、実験終了時には白化している個体も見られ、白化率は29℃から31℃で大きく増加した（図(1)-9, 10A）。一方で、褐虫藻非感染グループでは、各条件間で成長に有意な差は見られなかった。この理由として、褐虫藻の働きによって体内に活性酸素が蓄積することにより引き起こされる酸化ストレスが発生している可能性が考えられる。これまでの研究において、水温31℃以上では、サンゴ本体が褐虫藻によって酸化ストレスを受けるといった報告とも整合的である<sup>63), 64)</sup>。また、海水温の上昇は炭酸カルシウム飽和度も上昇させるため、無機的な石灰化は温度の上昇と共に促進することが考えられるが、褐虫藻非感染ポリプにおいても高温環境下では頭打ちの成長パターンが見られたことから、31℃以上の高温は、共生関係だけでなくサンゴ自身にもストレスになっている可能性も示唆された。

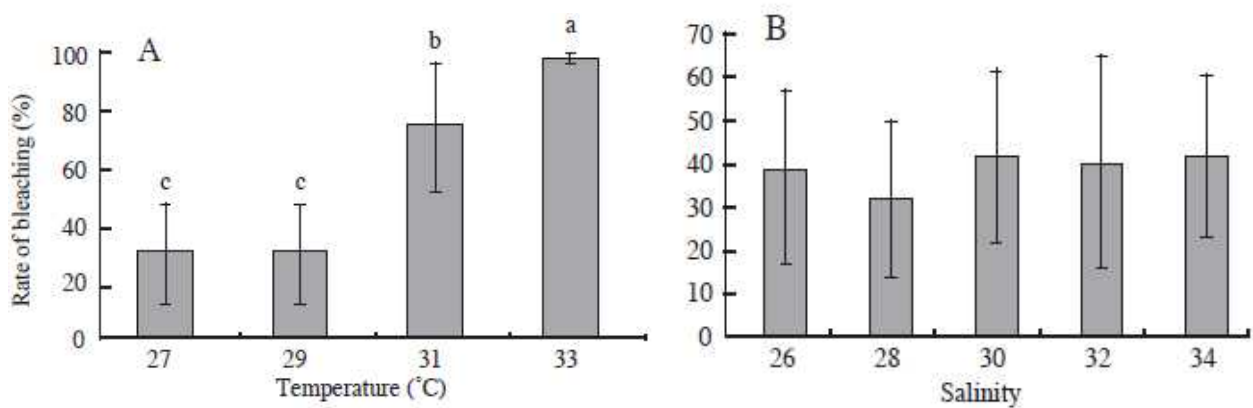


図(1)-8 高温ストレスがコユビミドリイシ初期ポリプの成長に及ぼす影響。縦軸は面積、横軸は実験に用いた海水の温度を示す。灰色バーが褐虫藻有り、白色バーが褐虫藻無し。図中のエラーバーは標準誤差を示す。





図(1)-9 高水温・低塩分実験における実験開始時および終了時のサンゴ初期ポリプの写真

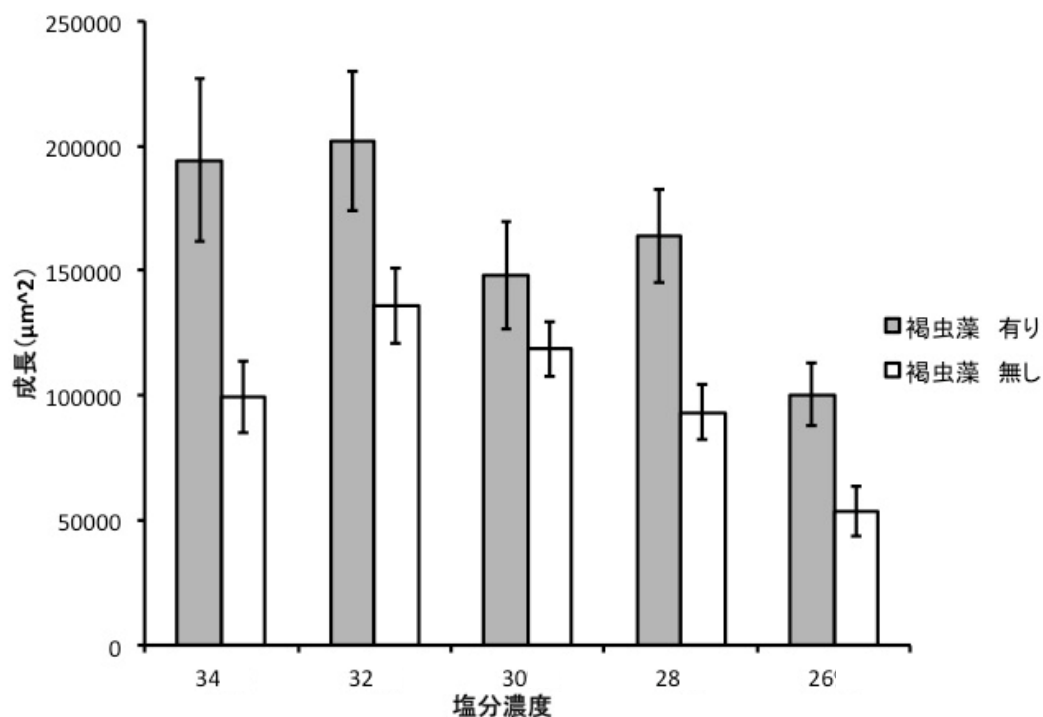


図(1)-10 高水温 (A) ・低塩分 (B) 実験終了時の褐虫藻感染ポリプの白化率。縦軸はそれぞれの実験条件における白化率 (%) を示す。各バーの上のアルファベットの違いは有意差を示す。

## (2) 低塩分の影響評価

塩分調整実験では、塩分34, 32, 28, 26の条件において、褐虫藻の有無によって成長に有意な差が見られた(図(1)-11)。褐虫藻感染グループでは、白化率の減少は確認されなかったが(図(1)-9, 10B)、塩分26で飼育した初期ポリプは、34, 32で飼育した初期ポリプと比較して、成長に有意な減少が見られた(一元配置分散分析、 $p < 0.05$ )。これは、塩分濃度の低下と共に、炭酸カルシウム飽和度が減少するためだと思われる。興味深いこととして、褐虫藻有りのポリプ骨格の方が、成長低下が顕著であった。これは、低塩分下でも褐虫藻に起因する何らかのストレスが、サンゴに悪影響を与えていることを示唆するものであった。また、先行研究では、低塩分環境への曝露が、サンゴの光合成量を低下させているという報告もあり<sup>65)</sup>、初期ポリプの成長速度の減少は、褐虫藻の光合成速度の減少に起因している可能性もある。自然界では、雨期に降雨量が増大し、陸水の流入が強化されることによって塩分低下が起きており<sup>66)</sup>、今後環境変動によって洪水が生じ、降水量が増大した場合に、海水塩分の低下がサンゴの成長に負の影響を与える可能性が示唆される。

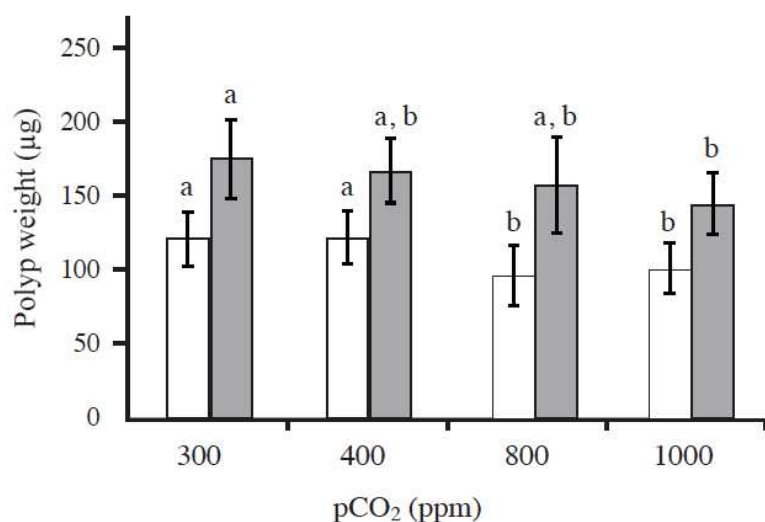
以上の結果、高温ストレス、低塩分ストレスは、サンゴ初期ポリプの成長において、負の影響を及ぼすことが示唆された。サンゴの生存率は一般的にサイズに依存するため<sup>67)</sup>、初期ポリプが環境変化に伴うストレスを受けて成長が下がり、死亡率が上がるのであれば、新規加入量が減少し、サンゴ個体群が維持されなくなる可能性がある。



図(1)-11 低塩分ストレスがコユビミドリイシ初期ポリプの成長に及ぼす影響。縦軸は面積、横軸は実験に用いた海水の温度を示す。灰色バーが褐虫藻有り、白色バーが褐虫藻無し。図中のエラーバーは標準誤差を示す。

### (3) 酸性化の影響評価

酸性化実験の結果についてはポリプ骨格の重量をもとに骨格成長量の評価を行った(図(1)-12)。その結果、褐虫藻非感染ポリプにおいては海水中の $p\text{CO}_2$ が800ppm以上で300, 400ppmに比べ有意な成長低下が見られたのに対し、褐虫藻感染ポリプでは、1000ppmのみにおいて、それ以外の実験区と有意な差が認められた。前述のように、サンゴ骨格の成長にとって褐虫藻による光合成は重要な要素であるが、光合成には $\text{CO}_2$ が必要である。そのため、 $\text{CO}_2$ 濃度の高い800ppmにおいては褐虫藻による光合成活性が上昇したため、褐虫藻感染ポリプにおいては骨格成長低下が見られなかったことが考えられる。一方、1000ppmという高 $p\text{CO}_2$ 下においてはどちらのタイプのポリプも有意な骨格成長の低下が認められたため、1000ppm以上の高い $p\text{CO}_2$ 環境下ではポリプ骨格の成長に大きく影響を及ぼすことが示唆された。



図(1)-12 酸性化ストレスがココビミドリイシ初期ポリプの成長に及ぼす影響。縦軸はポリプ骨格の重量、横軸は実験に用いた海水の $\text{CO}_2$ 濃度を示す。灰色バーが褐虫藻有り、白色バーが褐虫藻無し。図中のエラーバーは標準偏差を示す。褐虫藻有りと無しのバーの上にそれぞれ示されているアルファベットについては、異なるアルファベットは有意差があることを示す。

### (4) 栄養塩負荷の影響評価

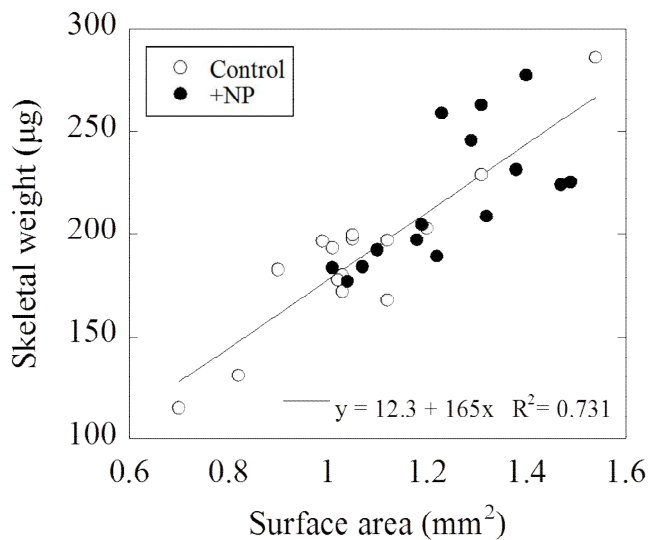
#### 1) 閉鎖系実験

飼育実験開始時における栄養塩添加区と対象区の稚サンゴは、表面積、CIともに有意な差はなく、平均するとそれぞれ $0.91 \text{ mm}^2$ 、38であった(表(1)-2)。飼育期間中はすべての稚サンゴが順調に成長し、致死率は0%であった。飼育終了時のサンゴの表面積は、対象区に比べて栄養塩添加区で有意に大きく、10日間の平均成長速度は $4.0\%/d$ と計算された。また、表面積と骨格乾重量の間には良い正の相関が見られたことから(図(1)-13)、栄養塩添加はサンゴの見かけの大きさ(投影表面積)だけでなく炭酸カルシウム形成速度も促進したと考えられる。褐虫藻のクロロフィルと骨格成長速度の間には正の相関が見られたことから(図(1)-14)、栄養塩による成長促進効果

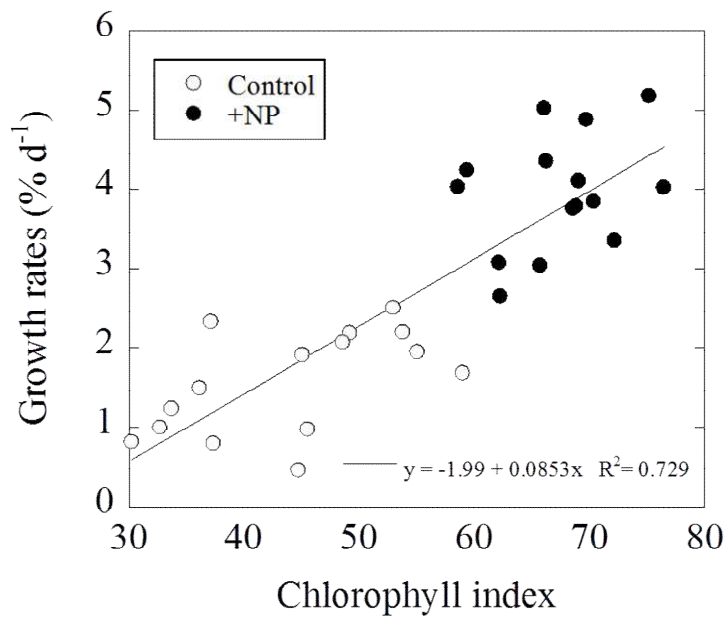
として次のような可能性が示唆された。①栄養塩吸収に伴って褐虫藻の光合成産物は窒素やリンをより多く含むようになり、褐虫藻の細胞分裂が活性化した<sup>25),47)</sup>。②その結果、面積当たりのクロロフィル量が増大し、褐虫藻の光合成速度が増加することによって無機化学的な石灰化促進効果が強く働いた<sup>56)</sup>。③褐虫藻から宿主サンゴへの有機物移行によって、動物体サンゴの細胞合成や骨格形成に必要な有機基質の合成が活発化した<sup>32),68)</sup>。これらはいずれも先行研究から推察される可能性であるが、稚サンゴが成長するためには褐虫藻、宿主サンゴ、炭酸カルシウム骨格のすべてが同調して成長していく必要があり、上記の3つの過程すべてが栄養塩によって促進された可能性が高い。

表(1)-2 閉鎖系実験開始時と終了時の稚サンゴ基本データ（カッコ内は標準誤差、n = 15）。\*：p < 0.05, \*\*：p < 0.01

	対象区		栄養塩添加区	
	0日目	10日目	0日目	10日目
表面積 (mm <sup>2</sup> )	0.92 (0.04)	1.06 (0.05)	0.90 (0.03)	1.25 (0.04)**
成長速度 (%/d)		1.6 (0.2)		4.0 (0.2)**
骨格乾燥重量 (μg)		188 (10)		217 (8)*
クロロフィル指数	37 (2)	44 (2)	39 (2)	67 (1)**



図(1)-13 実験終了時における各種サンゴの投影表面積と骨格乾燥重量の関係



図(1)-14 栄養塩実験終了時における各種サンゴのクロロフィル指数と成長速度の関係

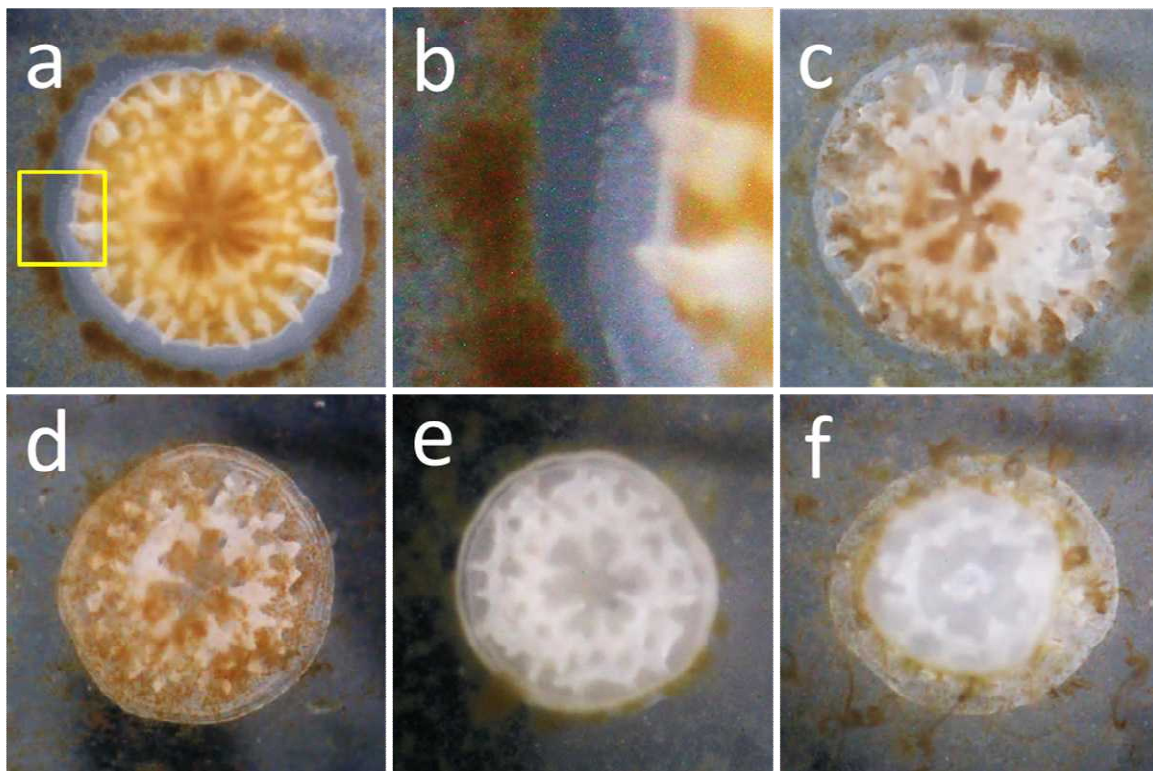
栄養塩がサンゴの石灰化にどのような影響を与えるのかという問題については、これまで比較的負の効果が指摘されるケースが多く、そのメカニズムとしては栄養塩吸収で過度に増大した褐虫藻の光合成活性によって、石灰化に利用されるはずの溶存無機炭素までもが奪われてしまい、結果的に石灰化速度が低下するという仮説が立てられた<sup>39), 46)</sup>。しかし一方で、本研究と同様に栄養塩によって石灰化が増加したとする先行研究も見られ<sup>41), 42)</sup>、いまだに詳細なメカニズムの解明には至っていない。負の影響を報告する研究の多くは非現実的に高濃度の栄養塩条件下で実験を行ってきたことが問題点の一つと考えられ、今後は本研究のようにサンゴ礁の現実的な栄養塩環境を想定した、比較的低レベルな栄養塩負荷実験を積み重ねていく必要がある。

## 2) 連続流水系実験

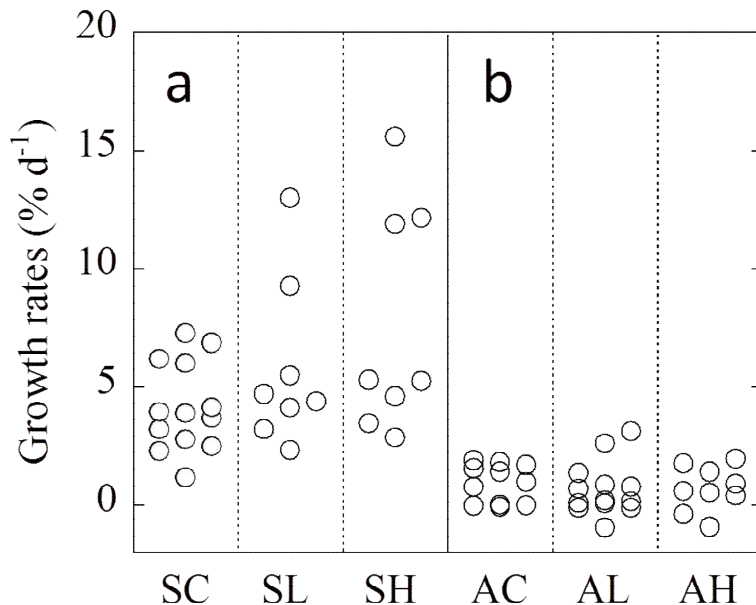
対象区に比べて栄養塩添加区では稚サンゴの周囲に底生藻類が多く繁茂した。顕微鏡観察の結果、一部の共生型サンゴではこの底生藻類を上手く除去しながら骨格成長をしている様子が見られたが(図(1)-15a)、非共生型ではそのような様子は見られず、どの個体も底生藻類が密着していた(図(1)-15e)。共生型サンゴをさらに詳しく観察すると、サンゴ骨格と周囲の底生藻類の間には透明なスペースが確認できた(図(1)-15b)。共生型サンゴは褐虫藻の光合成によって多くの有機物を獲得することができるため、その有機物をもとに合成するサンゴ特有の粘液状物質の分泌などによって、周囲の底生藻類を除去することができたと推測される。しかし一方で、底生藻類によって部分的に被覆されてしまう個体や(図(1)-15c, f)、あるいは完全に被覆され死に至る個体も確認できた(図(1)-15d)。底生藻類に全く被覆されていない状態を”normal”と定義すると、実験終了時において共生型サンゴ対象区(SC)のすべての個体が”normal”であったのに

対し、SL区・SH区では47%の個体に底生藻類による被覆が見られた。非共生型では対象区（AC）においても20%の個体に被覆が見られ、AH区においては40%まで増加した。栄養塩添加が底生藻類の繁茂を促進し、稚サンゴの生残率を低下させたと考えられる。

稚サンゴの成長と栄養塩のより直接的な関係性を評価するため、“normal”と判定された個体のみを抽出して解析した結果、一部の共生型サンゴでは栄養塩によって成長速度が大きく増加したものの、統計的に有意な成長促進効果は確認できなかった（図(1)-16）。上述の閉鎖系実験では栄養塩吸収によって有意な成長速度の増加が見られたことから、連続流水系実験では底生藻類の増殖がサンゴの成長を妨げたと考えられる。非共生型サンゴでは褐虫藻がないため栄養塩を吸収することができないと考えられ、予想通りどの個体も成長速度の増加は見られなかった。また、共生型サンゴの平均成長速度は非共生型に比べて有意に高く、褐虫藻の存在が稚サンゴの成長速度を増加させる大きな要因であるといえる。



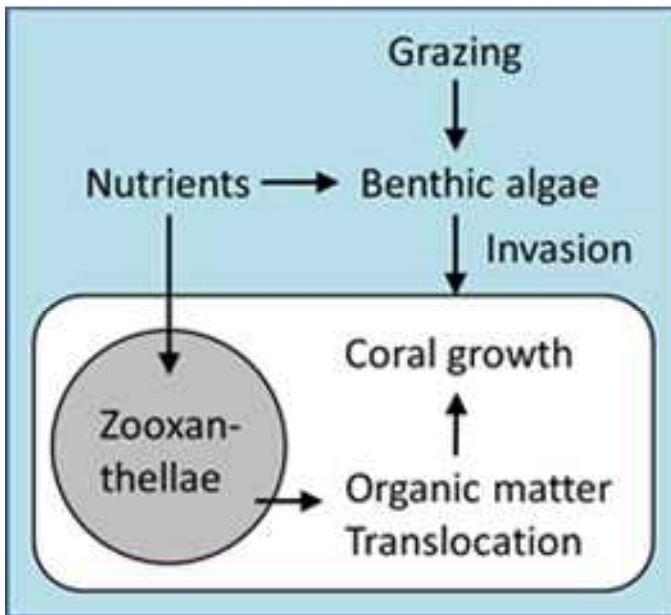
図(1)-15 (a) 栄養塩添加区において順調に育つ共生型稚サンゴ（SH区、6日目）。縮尺は図(1)-2と同じ。(b) 写真(a)の黄色四角部分の拡大図。サンゴ骨格の端と底生藻類の間に隙間が確認できる。(c) 共生型サンゴの一部が底生藻類によって被覆されてしまった様子（SL区、6日目）。ポリプ中心部はサンゴの組織がまだ残っているように見える。(d) 底生藻類によって完全に被覆されてしまった共生型稚サンゴ（SH区、10日目）。(e) 栄養塩添加区において順調に育つ非共生型稚サンゴ（AH区、10日目）。(f) 非共生型稚サンゴを底生藻類が部分的に覆ってしまった様子（AH区、10日目）。



図(1)-16 “normal”と見なされた共生型(a)・非共生型(b)稚サンゴの平均成長速度の分布。それぞれのプロットがサンゴ個体を示す。

### 3) 栄養塩負荷に関する統合評価

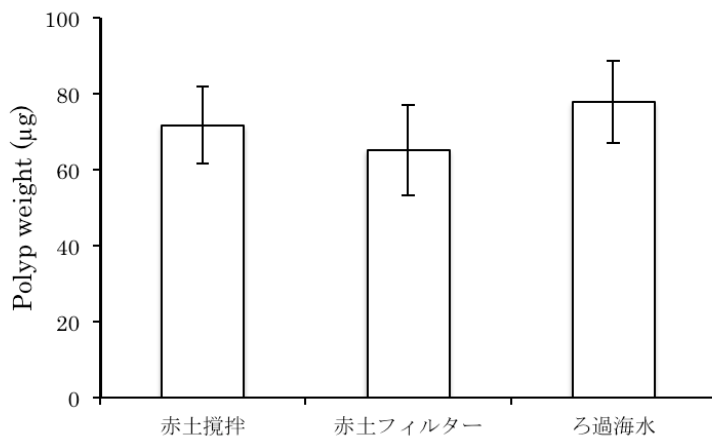
本研究結果をまとめると、適度な栄養塩負荷は共生型稚サンゴの成長速度を高める効果を持つが、同時にサンゴ周囲の底生藻類の繁殖も促し、サンゴの成長を阻害することが示された。実際のサンゴ礁では、草食動物が底生藻類を減少させるため、サンゴに対する負の効果は軽減されると考えられる<sup>69)</sup>。つまり、栄養塩負荷環境下では底生藻類に対する捕食圧がどれだけ働くかが、稚サンゴの成長や生残を左右する大きな要因となるであろう(図(1)-17)。このように栄養塩負荷が直接的ではなく間接的にサンゴの成長に悪影響を及ぼすという概念は、サンゴ礁生態系としても報告されており、今回の研究結果は顕微鏡下のミクロな視点で栄養塩負荷時のサンゴ-底生藻類間関係を明示したといえる。また本研究は、着底直後の稚サンゴにとっては褐虫藻の獲得が底生藻類との競合に勝つ重要な条件である可能性を示した。造礁サンゴの中には、褐虫藻を親サンゴから受け継ぐ幼生もいるが(垂直伝播)、世界で最も多様といわれるミドリイシ科サンゴはそのほとんどが世代ごとに(着底後に)褐虫藻を海水中から獲得する必要がある(水平伝播)。従って、サンゴ礁に対するストレス応答評価としては、稚サンゴの成長速度や生残率だけでなく、海水中を浮遊する褐虫藻の生態生理・ストレス応答なども重要な評価項目と考えられ、今後の課題である。



図(1)-17 栄養塩負荷がサンゴの成長と底生藻類に及ぼす影響をまとめた図。

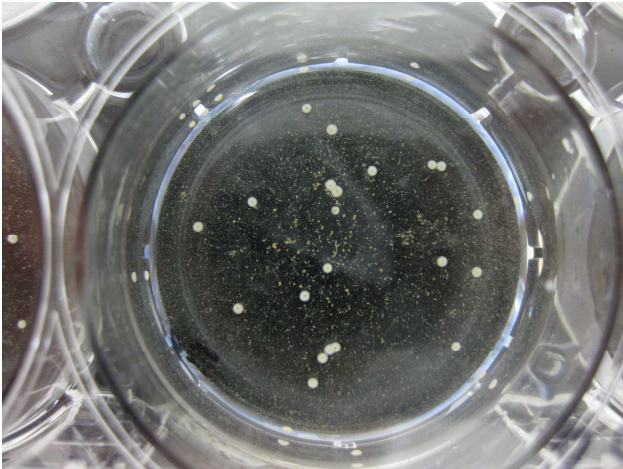
#### (5) 赤土の影響評価

実際の海域より採取した赤土海水を添加した実験では、赤土に含まれる懸濁物質を除いた赤土ろ過海水（赤土フィルター）では骨格成長の低下が見られたが、懸濁態も含めた赤土海水では、通常のろ過海水に比べて有意な骨格成長の差は見られなかった（図(1)-18）。自然のサンゴ礁域では赤土流出により懸濁物質がサンゴ表面を覆ってしまうことや濁度の増加により光合成が遮られることが懸念されるが、本実験では懸濁物質がプレートの底面に溜まっていたので（図(1)-19）、今後は自然環境を再現できるような実験が必要であることが示唆された。一方、赤土をろ過した海水で飼育したポリプ骨格は成長の低下が見られたが、河川水や陸水は赤土だけではなく、陸域の栄養塩や化学物質なども同時に沿岸海域に運ぶため、溶存態として存在するこれらの陸源物質がポリプ骨格の成長に影響を与えた可能性も考えられる。しかし、この成長低下の要因については、追試も含めた今後のより詳細な研究が必要であろう。



図(1)-18 褐虫藻非感染ポリプのみを使用した赤土添加飼育実験の結果。





図(1)-19 赤土海水を添加した時のプレートの様子。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

上記の成果により、今後起こりえる地球・地域規模での環境変化に伴うストレスは、サンゴの初期生活史段階に深刻な影響を及ぼし、サンゴ礁生態系の衰退につながるということが強く示唆された。本研究は高水温、低塩分、酸性化、栄養塩負荷を精密に制御した飼育実験系を確立することに成功し、サンゴの初期ポリプを用いた新規の環境影響評価法を提示した。今後、さらにこの実験系を活用することで、様々なサンゴ礁生物のストレス応答評価を迅速かつ精密に実施することが可能となった。

### (2) 環境政策への貢献

造礁サンゴは、サンゴ礁生態系の基盤を形成する、代表的な石灰化生物である。サンゴ礁は漁業、観光、防災などの面から、経済的価値の高い生態系であるため、その衰退は人間社会においても大きな損失につながる。本研究課題において、環境変化に伴うストレスがサンゴの生存に悪影響を与える可能性を示したことは、今後の環境政策を考えるうえで重要な科学的知見になると期待される。今後も引き続き、新聞報道や学会発表等を通じて、今後の環境変化に伴うストレスが、サンゴの生残に深刻な影響を与える可能性を広く普及することで、サンゴ礁保全に適した環境保全の指針作りのための科学的根拠として活用されるように努める。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 中村崇：海の研究, 21-4, 131-144 (2012) 「造礁サンゴにおける温度ストレスの生理学的影響と生態学的影響」
- 2) 田中泰章：海の研究, 21-4, 101-117 (2012) 「造礁サンゴの栄養塩利用と生態生理学的影響」
- 3) 井口亮、磯村尚子：海の研究, (印刷中) 「造礁サンゴの環境変化に対する順応機構に関するレビュー」

<査読付論文に準ずる成果発表>（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。）

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) 井口亮：東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 第4回バイオミネラリゼーションと石灰化(2011)-遺伝子から地球環境まで-「環境変化がサンゴの石灰化に及ぼす影響」.
- 2) 田中泰章、井口亮、井上麻夕里、森千晴、酒井一彦、中村崇、鈴木淳、川幡穂高：東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 第5回バイオミネラリゼーションと石灰化(2011)-遺伝子から地球環境まで-「幼サンゴ骨格を利用した石灰化と栄養塩の関係評価」
- 3) 田中泰章、井口亮、井上麻夕里、森千晴、酒井一彦、中村崇、鈴木淳、川幡穂高：第14回日本サンゴ礁学会（2011）「サンゴ初期ポリプに対する栄養塩負荷の影響」
- 4) Yasuaki Tanaka, Akira Iguchi, Mayuri Inoue, Chiharu Mori, Kazuhiko Sakai, Takashi Nakamura, Atsushi Suzuki, Hodaka Kawahata: 12th International Coral Reef Symposium (2012) “Nutrient assimilation for coral growth and the synergetic effect of elevated seawater temperature”

### (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）

特に記載すべき事項はない

### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

## (6) その他

特に記載すべき事項はない

## 8. 引用文献

- 1) M.D. SPALDING, C. RAVILIOUS and E.P. GREEN: UNEP-WCMC, Cambridge. 436pp. (2001)  
“World atlas of coral reefs”
- 2) L. MUSCATINE: Science, 156, 516-519 (1967)  
“Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and Tridacna and its control by the host”
- 3) L. MUSCATINE, J.W. PORTER and I.R. KAPLAN: Mar Biol, 100, 185-193 (1989)  
“Resource partitioning by reef corals as determined from stable isotope composition. I.  $\delta^{13}\text{C}$  of zooxanthellae and animal tissue vs depth”
- 4) H. ODUM and E.P. ODUM: Ecol Monogr., 25, 291-320 (1995)  
“Trophic structure and productivity of a windward coral reef community on Enewetok Atoll”
- 5) 西平守孝、酒井一彦、佐野光彦、土屋誠、向井宏：共生の生態学 5. pp.232, 平凡社 (1995)  
「サンゴ礁—生物がつくった<生物の楽園>」
- 6) O. HOEGH-GULDGERG: Mar Freshwater Res 50:839-866 (1999)  
“Coral bleaching, climate change, and the future of the world’s coral reefs”
- 7) G. DE’ATH, J.M. LOUGH and K.E. FABRICIUS: Science 323:116-119 (2009)  
“Declining coral calcification on the Great Barrier Reef”
- 8) N.E. CANTIN, A.L. COHEN, K.B. KARNAUSKAS, A.M. TARRANT and D.C. MCCORKLE: Science 329:322-325 (2010)  
“Ocean warming slows coral growth in the central Red Sea”
- 9) X. LI, H. HUANG, J. LIAN, L. HUANG and J. DONG: Acta Ecologica Sinica 29:155-159 (2009)  
“Effects of the multiple stressors high temperature and reduced salinity on the photosynthesis of the hermatypic coral *Galaxea fascicularis*”
- 10) K.E. FABRICIUS: Mar Poll Bull 50:125–146 (2005)  
“Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis”
- 11) D.R. BELLWOOD, T.P. HUGHES, C. FOLKE and N. NYSTROM: Nature, 429, 827-833 (2004)  
“Confronting the Coral Reef Crisis”
- 12) A.H. BAIRD and P.A. MARSHALL: Mar. Ecol. Prog. Ser., 237, 133-141 (2002)  
“Mortality, growth and reproduction in scleractinian corals following bleaching on the Great Barrier Reef”
- 13) O. HOEGH-GULDBERG and B. SALVAT: Mar Ecol Prog Ser, 121, 181-190 (1995)  
“Periodic mass-bleaching and elevated sea temperatures: bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French Polynesia”
- 14) C.R. WILKINSON: Australian Institute of Marine Science, pp. 363 (2002)

- “Status of Coral Reefs of the World: 2002”
- 15) C. WILKINSON: Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Center, Townsville, Australia. pp. 296pp (2008)  
 “Status of Coral Reefs of the World: 2008”
- 16) P.A. MARSHALL and A.H. BAIRD: *Coral Reefs*, 19, 155-163 (2000)  
 “Bleaching of corals on the Great Barrier Reef: differential susceptibilities among taxa”
- 17) Y. LOYA, K. SAKAI, K. YAMAZATO, Y. NAKANO, H. SAMBALI and R. VAN WOESIK: *Ecol. Letters*, 4, 122-131 (2001)  
 “Coral bleaching: the winners and the losers”
- 18) P.J. MUMBY, J.R.M. CHISHOLM, A.J. EDWARDS, S. ANDREFOUET and J. JAUBERT: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 222, 209-216 (2001)  
 “Cloudy weather may have saved Society Island reef corals during the 1998 ENSO event”
- 19) J. STIMSON, K. SAKAI and H. SEMBALI: *Coral Reefs*, 21, 409-421 (2002)  
 “Interspecific comparison of the symbiotic relationship in corals with high and low rates of bleaching-induced mortality”
- 20) T.R. MCCLANAHAN, A.H. BAIRD, P.A. MARSHALL and M.A. TOSCANO: *Mar. Poll. Bull.*, 48, 327-335 (2004)  
 “Comparing bleaching and mortality responses of hard corals between southern Kenya and the Great Barrier Reef, Australia”
- 21) S. TAKAHASHI, T. NAKAMURA, M. SAKAMIZU, R. VAN WOESIK and H. YAMASAKI: *Plant Cell Physiol.*, 45, 251-255 (2004)  
 “Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals”
- 22) O.S. COSTA Jr., Z.M.A.N. LEÃO, M. NIMMO and M.J. ATTRILL: *Hydrobiologia*, 440, 307-315 (2000)  
 “Nutrification impacts on coral reefs from northern Bahia, Brazil”
- 23) O. HOEGH-GULDBERG, L.R. MCCLOSKEY and L. MUSCATINE: *Coral Reefs*, 5, 201-204 (1987)  
 “Expulsion of zooxanthellae by symbiotic cnidarians from the Red Sea”
- 24) J. STIMSON and R.A. KINZIE III: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 153, 63-74 (1991)  
 “The temporal pattern and rate of release of zooxanthellae from the reef coral *Pocillopora damicornis* (Linnaeus) under nitrogen-enrichment and control conditions”
- 25) O. HOEGH-GULDBERG and G.J. SMITH: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 57, 173-186 (1989)  
 “Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*”
- 26) A.M. SZMANT, L.M. FERRER and L.M. FITZGERALD: *Mar. Biol.*, 104, 119-127 (1990)  
 “Nitrogen excretion and O:N ratios in reef corals: evidence for conservation of nitrogen”
- 27) Z. DUBINSKY and N. STAMBLER: *Glob. Change. Biol.*, 2, 511-526 (1996)  
 “Marine pollution and coral reefs”
- 28) S.S. CHANG, B.B. PRÉZELIN and R.K. TRENCH: *Mar. Biol.*, 76, 219-229 (1983)

- “Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*”
- 29) M. FURNAS, A. MITCHELL, M. SKUZA, and J. BRODIE: Mar. Poll. Bull., 51, 253–265 (2005)  
 “In the other 90%: phytoplankton responses to enhanced nutrient availability in the Great Barrier Reef Lagoon”
- 30) L. MUSCATINE and R.R. POOL: Proc. R. Soc. Lond. B, 204, 131–139 (1979)  
 “Regulation of numbers of intracellular algae”
- 31) R.J. JONES and D. YELLOWLEES: R. Soc. Lond. B, 352, 457–468 (1997)  
 “Regulation and control of intracellular algae (= zooxanthellae) in hard corals. Phil. Trans”
- 32) D. ALLEMAND, É. TAMBUTTÉ, J.-P. GIRARD and J. JAUBERT: J. Exp. Biol., 201, 2001–2009 (1998)  
 “Organic matrix synthesis in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: role in biomineralization and potential target of the organotin tributyltin”
- 33) Y. ISA and M. OKAZAKI: Comp. Biochem. Physiol., 87, 507–512 (1987)  
 “Some observations on the Ca<sup>2+</sup>-binding phospholipids from scleractinian coral skeletons”
- 34) D. ALLEMAND, C. FERRIER-PAGÈS, P. FURLA, F. HOULBRÈQUE, S. PUVEREL, S. REYNAUD, É. TAMBUTTÉ, S. TAMBUTTÉ and D. ZOCCOLA: C. R. Palevol., 3, 453–467 (2004)  
 “Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control”
- 35) D.W. KINSEY and P.J. DAVIES: Limnol. Oceanogr., 24, 935–940 (1979)  
 “Effects of elevated nitrogen and phosphorus on coral reef growth”
- 36) R.A. PASTROK and G.R. BILYARD: Mar. Ecol. Prog. Ser., 21, 175–189 (1985)  
 “Effects of sewage pollution on coral-reef communities”
- 37) T. TOMASCIK and F. SANDER: Mar. Biol., 87, 143–155 (1985)  
 “Effects of eutrophication on reef-building corals”
- 38) N. STAMBLER, N. POPPER, Z. DUBINSKY and J. STIMSON: Pac. Sci., 45, 299–307 (1991)  
 “Effects of nutrient enrichment and water motion on the coral *Pocillopora damicornis*”
- 39) F. MARUBINI and P.S. DAVIES: Mar. Biol., 127, 319–328 (1996)  
 “Nitrate increases zooxanthellae population density and reduces skeletogenesis in corals”
- 40) C. FERRIER-PAGÈS, J.-P. GATTUSO, S. DALLOT and J. JAUBERT: Coral Reefs, 19, 103–113 (2000)  
 “Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*”
- 41) A. CHAUVIN, V. DENIS and P. CUET: Coral Reefs, 30, 911–923 (2011)  
 “Is the response of coral calcification to seawater acidification related to nutrient loading?”
- 42) Y. SAWALL, M.C. TEICHBERG, J. SEEMAN, M. LITAAY, J. JOMPA and C. RICHTER: Coral Reefs, 30, 841–853 (2011)  
 “Nutritional status and metabolism of the coral *Stylophora subseriata* along a eutrophication gradient in Spermonde Archipelago (Indonesia)”
- 43) M.J. ATKINSON, B. CARLSON and G.L. CROW: Coral Reefs, 14, 215–223 (1995)

- “Coral growth in high-nutrient, low-pH seawater: a case study of corals cultured at the Waikiki Aquarium, Honolulu, Hawaii”
- 44) M.J. ATKINSON and J.L. FALTER: In *Biogeochemistry of marine systems*, edited by K. D. Black and G. B. Shimmield, p. 40-64, Blackwell publishing, Oxford (2003)  
“Coral Reefs”
- 45) M.J. ATKINSON: In *Coral Reefs: an ecosystem in transition*, edited by Z. Dubinsky and N. Stambler, p. 199–206, Springer (2011)  
“Biogeochemistry of nutrients”
- 46) N. STAMBLER, E.F. COX and R. VAGO: *Pac. Sci.*, 48, 284–290 (1994)  
“Effect of ammonium enrichment on respiration, zooxanthellar densities, and pigment concentrations in two species of hawaiian corals”
- 47) L. MUSCATINE, P.G. FALKOWSKI, Z. DUBINSKY, P.A. COOK and L.R. MCCLOSKEY: *Proc. R. Soc. Lond. B*, 236, 311–324 (1989)  
“The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral”
- 48) G. MULLER-PARKER, L.R. MCCLOSKEY, O. HOEGH-GULDBERG and J. MCAULEY: *Pac. Sci.*, 48, 273–283 (1994)  
“Effect of ammonium enrichment on animal and algal biomass of the coral *Pocillopora damicornis*”
- 49) A.D.L. STEVEN and A.D. BROADBENT: *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.*, 1, 867–872 (1997)  
“Growth and metabolic responses on *Acropora palifera* to long term nutrient enrichment”
- 50) F. MARUBINI and B. THAKE: *Limnol. Oceanogr.*, 44, 716–720 (1999)  
“Bicarbonate addition promotes coral growth”
- 51) A. SNIDVONGS and R.A. KINZIE III: *Mar. Biol.*, 118, 705–711 (1994)  
“Effects of nitrogen and phosphorus enrichment on in vivo symbiotic zooxanthellae of *Pocillopora damicornis*”
- 52) I. NORDEMAR, M. NYSTRÖM and R. DIZON: *Mar. Biol.*, 142, 669–677 (2003)  
“Effects of elevated seawater temperature and nitrate enrichment on the branching coral *Porites cylindrica* in the absence of particulate food”
- 53) D. A. RENEGAR and B.M. RIEGL: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 293, 69–76 (2005)  
“Effect of nutrient enrichment and elevated CO<sub>2</sub> partial pressure on growth rate of Atlantic scleractinian coral *Acropora cervicornis*”
- 54) Marubini, F., and M. J. Atkinson (1999): Effects of lowered pH and elevated nitrate on coral calcification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 188, 117–121.
- 55) S. FAXNELD, T.L. JÖRGENSEN and M. TEDENGREN: *Est. Coast. Shelf Sci.*, 88, 482–487 (2010)  
“Effects of elevated water temperature, reduced salinity and nutrient enrichment on the metabolism of the coral *Turbinaria mesenterina*”
- 56) Y. TANAKA, T. MIYAJIMA, I. KOIKE, T. HAYASHIBARA and H. OGAWA: *Limnol. Oceanogr.*, 52, 1139–1146 (2007)  
“Imbalanced coral growth between organic tissue and carbonate skeleton caused by nutrient

enrichment”

- 57) M. HOLCOMB, D.C. MCCOKLE and A.L. COHEN: J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 386, 27–33 (2010)  
 “Long-term effects of nutrient and CO<sub>2</sub> enrichment on the temperate coral *Astrangia poculata* (Ellis and Solander, 1786)”
- 58) C. FERRIER-PAGÈS, V. SCHOELZKE, J. JAUBERT, L. MUSCATINE and O. HOEGH-GULDBERG: J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 259, 249–261 (2001)  
 “Response of a scleractinian coral, *Stylophora pistillata*, to iron and nitrate enrichment”
- 59) J.G. DUNN, P.W. SAMMARCO and G. LAFLEUR Jr.: J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 411, 34–44 (2012)  
 “Effects of phosphate on growth and skeletal density in the scleractinian coral *Acropora muricata*: A controlled experimental approach”
- 60) C. GODINOT, R. GROVER, D. ALLEMAND and C. FERRIER-PAGÈS: J. Exp. Biol., 214, 2749–2754 (2011)  
 “High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*”
- 61) M. MORITA, A. NISHIKAWA, A. NAKAJIMA, A. IGUCHI, K. SAKAI, A. TAKEMURA, M. OKUNO: J Exp Biol 209:4574-4579 (2006)  
 “Eggs regulate sperm flagellar motility initiation, chemotaxis, and inhibition in the coral, *Acropora digitifera*, *A. gemmifera*, and *A. tenuis*”
- 62) M. HIKAMI, H. USHIE, T. IRIE, K. FUJITA, A. KUROYANAGI, K. SAKAI, Y. NOJIRI, A. SUZUKI, H. KAWAHATA: Geophys. Res. Let., 38: doi:10.1029/2011GL048501 (2011)  
 “Contrasting calcification responses to ocean acidification between two reef foraminifers harboring different algal symbionts, “
- 63) B. NESA and M. HIDAKA: J Exp Mar Biol Ecol 368:81-87 (2009)  
 “High zooxanthella density shortens the survival time of coral cell aggregates under thermal stress”
- 64) I.M. YAKOVLEVA, A.H. BAIRD, H.H. YAMAMOTO, R. BHAGOOI, M. NONAKA and M. HIDAKA: Mar Ecol Prog Ser 378:105–112 (2009)  
 “Algal symbionts increase oxidative damage and death in coral larvae at high temperatures”
- 65) F. MOBERG, M. NYSTRÖM, N. KAUTSKY, M. TEDENGREN and P. JARAYABHAND: Mar Ecol Prog Ser 157:53-59 (1997)  
 “Effects of reduced salinity on the rates of photosynthesis and respiration in the hermatypic corals *Porites lutea* and *Pocillopora damicornis*”
- 66) D. MENASVETA and V. HONGSKUL: In: Postma, H. and J.J. Zijlstra editors. Ecosystems of the world, Vol 27, pp. 363-383, Continental shelves. Elsevier, Amsterdam, (1988)  
 “The Gulf of Thailand”
- 67) T.P. HUGHES and J.B. JACKSON: Ecol Monog 55:141-166 (1985)  
 “Population dynamics and life histories of foliaceous corals”
- 68) Y. TANAKA, T. MIYAJIMA, I. KOIKE, T. HAYASHIBARA and H. OGAWA: J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 336, 110–119 (2006)  
 “Translocation and conservation of organic nitrogen within the coral-zooxanthella symbiotic system of *Acropora pulchra*, as demonstrated by dual isotope-labeling techniques”

- 69) M.J.A. VERMEIJ, I. VAN MOORSELAAR, S. ENGELHARD, C. HÖRNLEIN, S.M. VONK and P.M. VISSER: Plos One 5:e14312 (2010)  
“The effects of nutrient enrichment and herbivore abundance on the ability of turf algae to overgrow coral in the Caribbean”



## (2) 環境負荷要因に対するサンゴ骨格の化学的・物理的応答に関する研究

東京大学大気海洋研究所

井上 麻夕里

平成22～23年度累計予算額：8,019千円

(うち、平成23年度予算額：2,235千円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]** 高い生物多様性で知られるサンゴ礁は全球的な問題である地球温暖化や海洋酸性化、そして地域から局所的な問題である陸・海域における様々な人間活動により、現在その健全さが失われつつある。サンゴ礁の基盤構成生物である造礁サンゴは炭酸カルシウムの骨格を形成しながら成長していくため、造礁サンゴ骨格の成長はサンゴ礁の成長に直結していると言っても過言ではない。近年、そのサンゴ骨格の成長量の低下が報告されており、温暖化や酸性化が要因として挙げられているものの、はっきりとした原因は特定されていない。また、サンゴの骨格形成初期段階（ポリプ骨格）における骨格形成および骨格成長はサンゴのリクルートを考える上で大変重要であるが、環境ストレスがこの初期ポリプ骨格に与える影響についてはあまり研究がされていない。そこで本研究課題では、各種ストレス要因と骨格成長との関係を明らかにすることを目的として、ストレスを負荷した環境下で初期ポリプ (*Acropora digitifera*) の飼育を行い、実験後のポリプ骨格の成長量の違いについて比較検討を行った。本サブテーマでは、高温、低塩分および高栄養塩ストレスについて実験を行った。さらに、骨格成長に与える褐虫藻の影響を調べるために、初期ポリプに褐虫藻を添加したグループと添加しないグループを作成し、それぞれ同条件の実験に供した。10日間の飼育実験の結果、全ての実験において褐虫藻を添加したポリプ骨格の方が有意に骨格成長量が高かった。また、褐虫藻の有無に関わらず、温度の上昇、塩分の低下に伴い骨格成長量の低下が見られたが、褐虫藻感染ポリプの方がより顕著な成長量の低下が認められた。一方、栄養塩による骨格成長への影響は見られなかった。以上のことから、本研究によって、高温、低塩分によって骨格成長が有意に低下することが実験的に示された。

**[キーワード]** サンゴ骨格成長、サンゴ初期ポリプ、環境ストレス、褐虫藻、飼育実験

## 1. はじめに

豊かな生態系で特徴づけられるサンゴ礁は全球的な問題である地球温暖化や海洋酸性化、そして地域から局所的な問題である陸・海域における様々な人間活動により、現在その健全さが失われつつある。1970年代のハワイ、カネオヘ湾での調査を始め、サンゴ礁への環境負荷要因の中でも、生活廃水や農地から流出する栄養塩に焦点を当てた研究はこれまで世界的にも比較的研究が行われているが<sup>1),2)</sup>、水質のモニタリングや生態系（サンゴ群集）の変化などが中心で、サンゴの骨格そのものに焦点を当てた研究はほとんど行われていない。炭酸カルシウム（あられ石）からなるサンゴの骨格は、種類によって1年に～2cm程度も成長するので、サンゴ骨格の健全な成長はサンゴ礁の健全度そのものと言っても過言ではない。実際に高濃度の重金属元素に曝されたサンゴや白化を経験したサンゴからは、骨格密度の低下や骨格成長の停止が報告されている<sup>3),4)</sup>。骨格が脆くなったサンゴは、台風などの物理的な被害から、オニヒトデや虫食いのような直接的な被害に対する抵抗力が弱くなることが容易に予想される。つまり、近年顕在化しているサンゴ礁の荒廃は、様々な人為的影響によるサンゴ骨格の脆弱化が原因の一つとして考えられる。実際にグレートバリアリーフや紅海のサンゴ礁からは、近年、造礁サンゴの骨格成長量が低下していることが報告されており、その要因として海洋酸性化や温暖化が挙げられている<sup>5),6)</sup>。しかしながら、実際の海洋においては全球規模の温暖化や酸性化に加え、栄養塩濃度や塩分といった局地的な環境因子も複雑に絡み合いながら変化しているため、どの環境因子がどのようにサンゴ骨格の成長に影響を与えているかを個々に判断することが困難である。さらに、近年報告されている造礁サンゴの骨格成長量の低下は成体のサンゴについての報告であり、サンゴの生活初期段階（初期ポリプ）に対する知見はまだ限られている。初期ポリプは環境変化への感受性が高いことが指摘されているため<sup>7),8)</sup>、サンゴのリクルートを考え、さらにサンゴ礁の発達を考える上で各種の環境負荷要因がサンゴの骨格形成初期段階（ポリプ骨格）へ与える影響を見積もっておくことは重要と考えられる。

産業革命以降の人間活動による大気中二酸化炭素濃度の上昇に関連して、地球温暖化や海洋酸性化が懸念されているが、特に海洋酸性化は海水中のpHの低下に伴い、サンゴ骨格を構成するあられ石の飽和度の減少を招くため<sup>9)</sup>、サンゴの骨格成長に直接的に影響を与えることが懸念されている<sup>10)</sup>。そのため、酸性化影響については造礁サンゴについて近年活発に研究が行われている<sup>11),12)</sup>。一方で温暖化に関しては、野外において温暖化が原因と考えられる白化現象が報告されているものの<sup>13)</sup>、骨格成長そのものに対する影響評価はこれまであまり行われていない。さらに温暖化と並んで、ごく最近では強大化したサイクロンなどに伴う豪雨イベントが報告されているが<sup>14)</sup>、熱帯から亜熱帯表層海域に広がるサンゴ礁域では、河川水の流入なども含め降雨の影響を強く受けて、塩分が急激に低下することが予想される。過去には低塩分化によるサンゴの一部死滅も報告されているが、系統的な研究は行われていない。また、造礁サンゴは褐虫藻を細胞内共生させており、一般的には褐虫藻による光合成産物を栄養源として骨格成長が促進させられていると考えられているが、環境ストレスにより、この共生関係と共に骨格成長にどのような影響が現れるかについては、未だ実験的に検証されていない。サンゴと褐虫藻の共生関係は、サンゴの骨格形成および骨格成長の基礎を考える上で欠かせない事象であり、サンゴのみに関わらず、共生藻を有する生物のバイオミネラリゼーションを考える上で重要なテーマである。

さらに、サンゴの骨格にはカルシウムイオン（Ca<sup>2+</sup>）などと同時に周辺海水の水温・塩分などの

情報や各種化学成分もその骨格に取り込まれている。ハマサンゴ属 (Genus *Porites*) のような塊状サンゴでは、サンゴ骨格の成長量は1年に約1~2 cmであり、中には直径3~5 mにまでも成長する群体もある。このような群体のサンゴ骨格には主に季節の違いを反映して密度の異なる骨格が形成されており、X線写真を撮ると明瞭な高密度・低密度バンドが可視化される。これがサンゴ年輪と呼ばれており、この年輪に沿って各種化学成分を測定することにより、過去の海洋環境を高時間分解能で詳細に復元することが可能である。特に骨格中の酸素同位体比 ( $\delta^{18}\text{O}$ ) は海水温の間接指標 (プロキシ) として古くから測定されている<sup>15), 16)</sup>。しかし、サンゴ骨格中の $\delta^{18}\text{O}$ は海水温と共に海水中の $\delta^{18}\text{O}$  (塩分) からの影響も受けて変動するため、温度のみに依存していると考えられているストロンチウム・カルシウム (Sr/Ca) 比をより良好な海水温指標として測定し、 $\delta^{18}\text{O}$ と組み合わせることで海水温と塩分を切り離してそれぞれの詳細な復元を行うことも試みられている<sup>17)</sup>。これまでにサンゴ年輪を用いて数多くの古環境・古気候復元が行われており、その結果はIPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) にも引用されている。しかしながら、近年の測定機器の発展に伴い、サンゴ骨格中の微小領域 (~ $\mu\text{m}$ ) での微量元素測定が可能となり、それらの研究ではサンゴ骨格中の微量元素が周囲の海水環境を正確に記録していない可能性が懸念されている。サンゴ年輪を用いた具体的な研究例や近年懸念されている問題点については井上 (井上, 印刷中) にレビューされているのでそちらを参照されたいが、サンゴ年輪を用いたより正確な環境復元のためにも、サンゴのバイオミネラリゼーションの解明が求められているのが現状である。

そこで本研究では、琉球列島周辺のサンゴ礁域における優占種の一つであるコユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を対象種として選定し、そのポリプ骨格について、褐虫藻添加グループと非添加グループを作成し、環境負荷要因を与えて飼育実験を行った。そして、温度、塩分、栄養塩について10日間の飼育実験を実施し、実験後のポリプ骨格の重量測定から、飼育期間中における骨格成長量を見積もり、各環境負荷要因と骨格成長との関係、また共生藻と骨格成長の関係と、その関係に与える環境負荷要因の影響についてそれぞれ考察を行った。

## 2. 研究開発目的

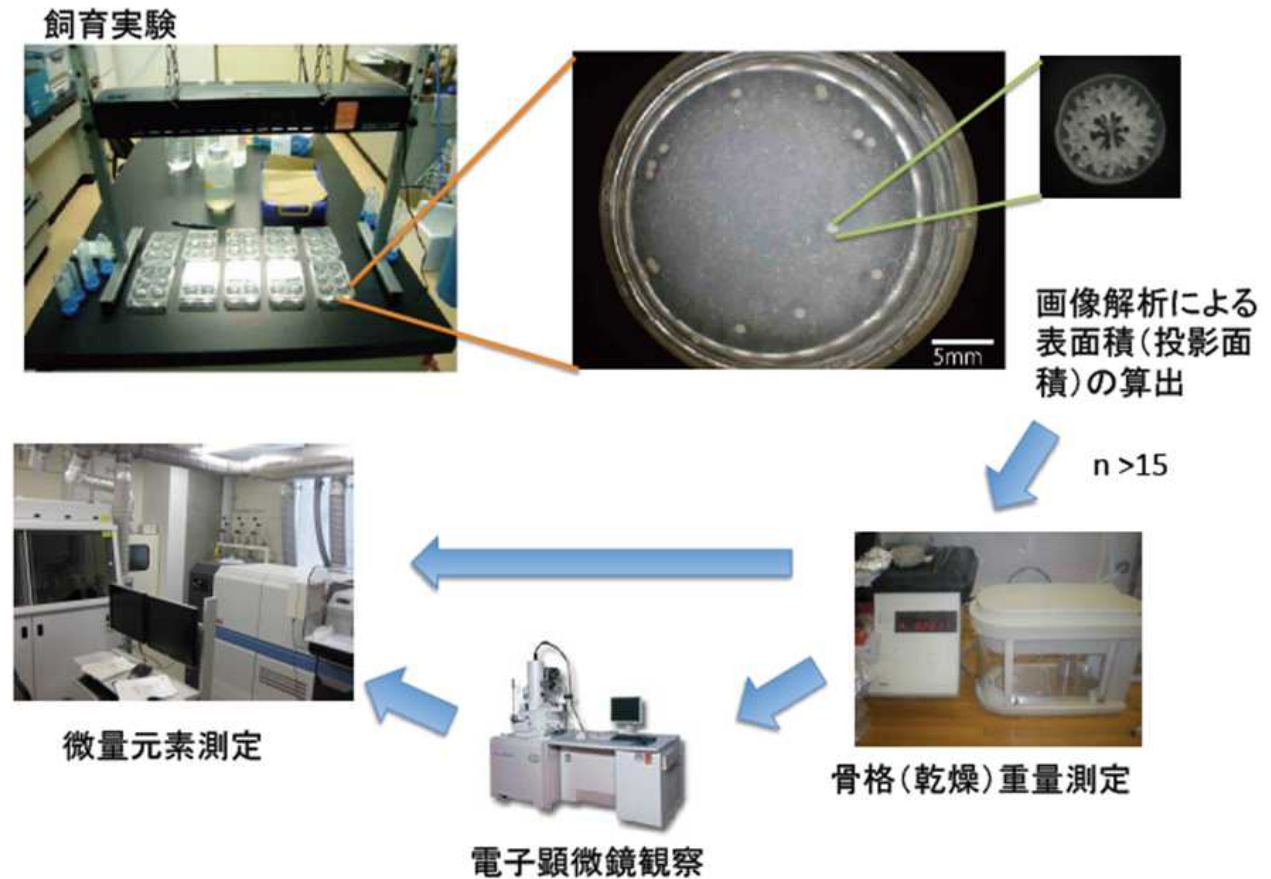
本研究では、主に沖縄本島から採取したサンゴを用いて、飼育実験によって高温や低塩分ストレス、また栄養塩添加実験などを通してポリプ骨格 (稚サンゴ) を2週間程度飼育し (サブテーマ (1))、飼育後の骨格成長と共に、骨格に含まれる各種化学成分の測定を行うことによって (サブテーマ (2))、どのような環境負荷要因によって骨格にどのようなシグナル (骨格の粗密や特定の化学成分の増減など) が刻まれるかを明らかにしていくことを目的とする。さらに、ポリプ骨格に褐虫藻を添加させることで、共生/非共生のポリプ骨格を作成することができるため、サンゴの共生関係および共生による骨格成長メカニズムについても考察を行う。

## 3. 研究開発方法

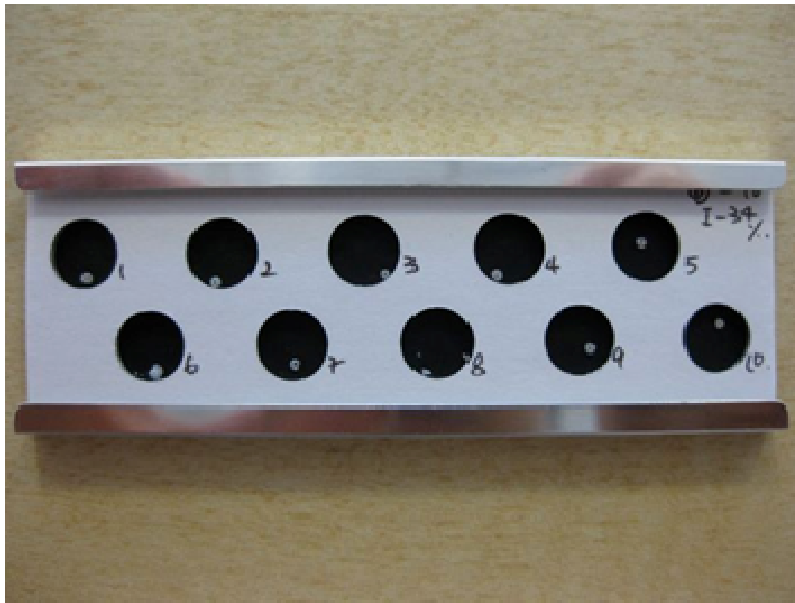
### (1) 骨格重量測定および微細構造の観察

サブテーマ (1) の飼育実験終了後、サンゴ初期ポリプはウォーターピックにより組織を剥離し、水道水で洗浄後、室温にて乾燥させ、東京大学大気海洋研究所に持ち帰った。その後、純水

にて初期ポリプを再度洗浄し、1個体ずつ骨格をプレートから剥がして、完全に乾燥させた後、マイクロ天秤（Thermo Cahn-C35）にて乾燥重量を測定した（図(2)-1、2）。ここでは温度と塩分実験について、後の微量元素変動との比較のためにも、骨格成長量（炭酸カルシウム生成重量）にて結果を示した。成長量の比較には、JMPソフトウェアを用いたTurkeyのHSD検定による多重比較法により統計解析を行った（ $\alpha = 0.01$ ）。温度、塩分実験については重量測定後のポリプ骨格について、走査型電子顕微鏡（SEM, 日本電子 JSM-6390LA）による骨格微細構造の観察も行った。



図(2)-1 ポリプ骨格の分析フローチャート



図(2)-2 プレートから剥がして秤量済みのポリプ骨格は、今後の分析のために1個体ずつ保管。この写真は褐虫藻感染ポリプを塩分34で飼育し、秤量したポリプ骨格を示す。

## (2) ポリプ骨格中の微量元素測定

海洋環境の間接指標として有用視されているサンゴ骨格中の微量元素が環境ストレス下においてどのような挙動を示すかを検証するため、海洋環境復元に重要な温度、塩分を制御した飼育実験で得られたポリプ骨格について、マグネシウム・カルシウム比 (Mg/Ca比)、ストロンチウム・カルシウム比 (Sr/Ca比) およびウラン・カルシウム比 (U/Ca比) の精密測定を行った。主な分析法はInoue et al. (2007<sup>20</sup>), 2011<sup>21</sup>)と同様であり、測定には誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS, ELEMENT XR) を用いた。地質調査所作成のサンゴ骨格の標準試料であるJCp-1の繰り返し測定による精度は、Mg/Ca, Sr/Ca, U/Ca比でそれぞれ、0.4% 0.4% 1.0%であった。

## 4. 結果及び考察

### (1) 骨格重量測定および微細構造の観察

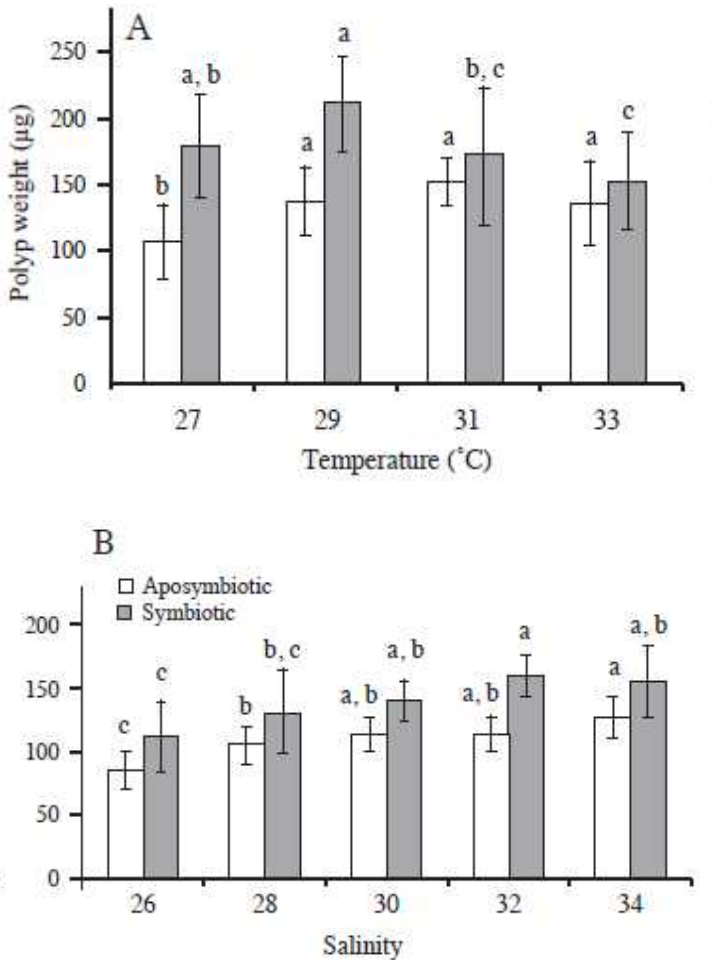
#### 1) 高水温の影響評価

温度4段階で飼育されたサンゴ初期ポリプの骨格重量を測定した結果、褐虫藻有りの初期ポリプは29℃で成長がピークに達した (図(2)-3A)。褐虫藻無しの初期ポリプは31℃でピークに達し、33℃以上では頭打ちになるような成長パターンを示した。これは、水温が31℃以上だと、体内の褐虫藻による酸化ストレスが顕著となり、サンゴにストレスになるためだと推察される。高温下での褐虫藻による酸化ストレスの可能性は、サンゴ白化現象の要因として知られているが、本研究の結果も、その可能性を支持する結果となった。また、海水温の上昇は炭酸カルシウム飽和度

も上昇させるため、無機的な石灰化は温度の上昇と共に促進することが考えられるが、褐虫藻非感染ポリプにおいても高温環境下では頭打ちの成長パターンが見られたことから、31°C以上の高温は、共生関係だけでなくサンゴ自身にもストレスになっている可能性も示唆された。

2) 低塩分の影響評価

塩分濃度5段階で飼育されたサンゴ初期ポリプの骨格重量を測定した結果、褐虫藻有り無し両方の初期ポリプで、塩分濃度の低下と共に成長の低下が見られた (図(2)-3B)。これは、塩分濃度の低下と共に、炭酸カルシウム飽和度が減少するためだと思われる。興味深いこととして、褐虫藻有りの初期ポリプの方が、成長低下が顕著であった。これは、低塩分下でも褐虫藻に起因する何らかのストレスが、サンゴに悪影響を与えていることを示唆するものである。



図(2)-3 骨格成長量と温度 (A)、塩分 (B) との関係。縦軸はAB図ともに実験終了時の骨格重量 (µg) で、グレーのバーは共生ポリプ、白のバーは非共生ポリプの結果を示す。また、各実験における、共生/非共生ポリプの各バーの上の文字は有意差の有無を示しており、異なる文字間には有意差があることを示す。

### 3) 栄養塩負荷の影響評価

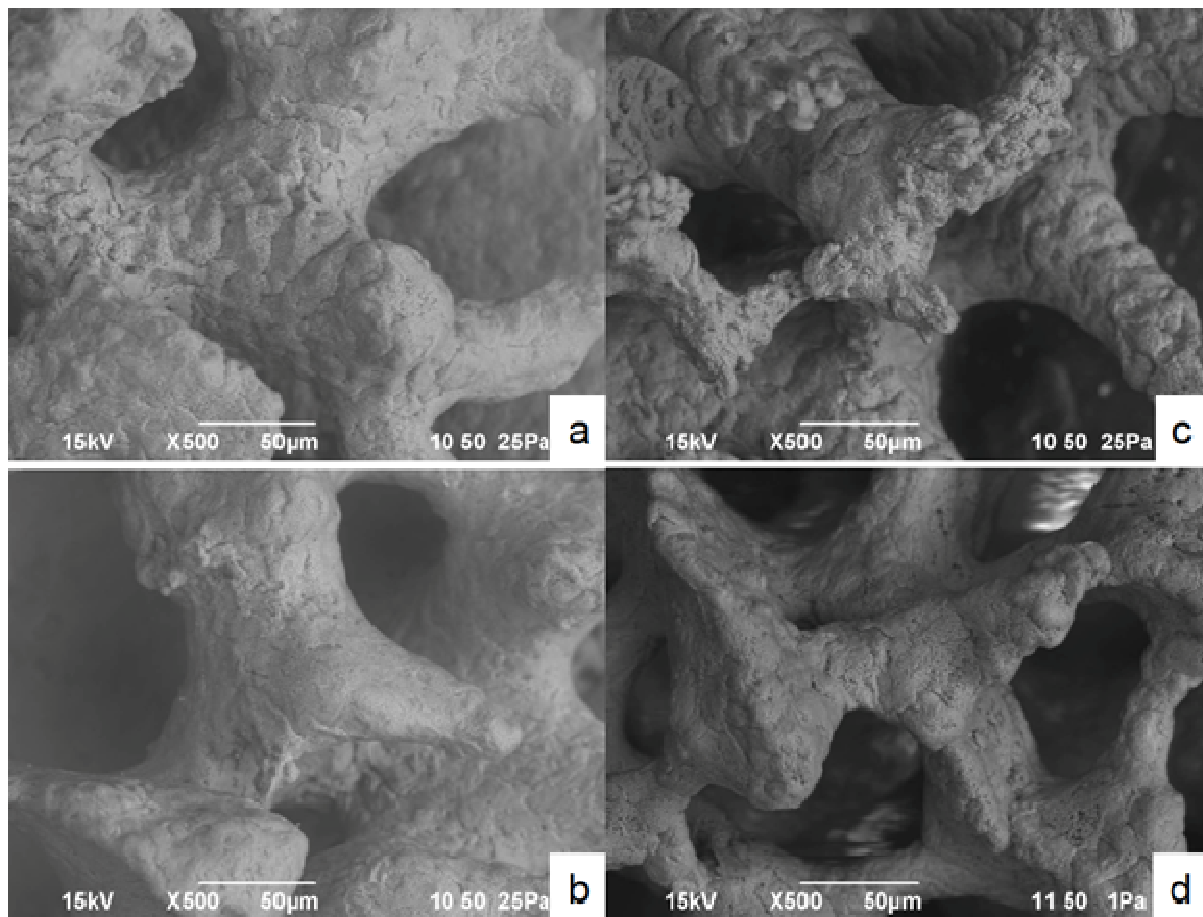
閉鎖系の栄養塩負荷実験の結果、褐虫藻感染ポリプは栄養塩によって骨格重量が有意に増加した(表(1)-2)。これは褐虫藻が栄養塩を吸収し、光合成速度が増加することによって、石灰化速度も増加したためと考えられる。また、骨格重量とポリプ表面積の間には直線的な相関関係が見られた(サブテーマ(1)図(1)-13)。このことは、着底直後のサンゴ初期ポリプにおいては、骨格重量と表面積はともに成長速度の指標として利用可能であること、縦方向よりも横方向への(平面的な)成長が卓越していることを示した。閉鎖系実験において栄養塩の潜在的な成長促進効果が示されたものの、連続流水系実験では、サブテーマ(1)で示したように底生藻類の繁茂によってサンゴの致死率が増加しており、栄養塩負荷がもたらす負の効果も指摘された。

### 4) 骨格微細構造の観察

SEMによる観察の結果、コントロール環境下で成長した褐虫藻添加ポリプの骨格には図(2)-4に見られるような明瞭な層状の構造が認められ、これはCuif et al. (1990)<sup>22)</sup>で報告されている有機基質の生成とその後の炭酸カルシウム鉱物の沈積のサイクルで形成されていると考えられる。この層状の構造は褐虫藻非添加ポリプにも見られ、褐虫藻の有無や骨格成長量の違いにそれほど関わっていない構造であることが分かる。一方、33°Cで飼育したポリプ骨格にはこの明瞭な層構造が見られず、表面が溶解しているような滑らかな構造が見られた。特に、この高温下での異常な微細構造は褐虫藻の有無に関わらず認められたため、サンゴ宿主が高温ストレス下で骨格形成の鋳型となる有機基質を作り出せなかったことが原因ではないかと考えられる。高温下では白化現象がよく知られている現象であり、サンゴ-褐虫藻の共生関係の崩壊がサンゴ骨格の成長低下、さらには死滅をもたらすことが懸念されている。しかし、今回の結果から高温ストレスが共生関係への悪影響のみではなく、サンゴ宿主そのものにも何かしらのダメージを与えていることが示唆された。低塩分のストレスを与えたポリプ骨格では共生藻の有無に関わらず、このような異常な特徴は認められなかったため、高温ストレスがいかにサンゴにとって深刻な問題であるかが分かる。

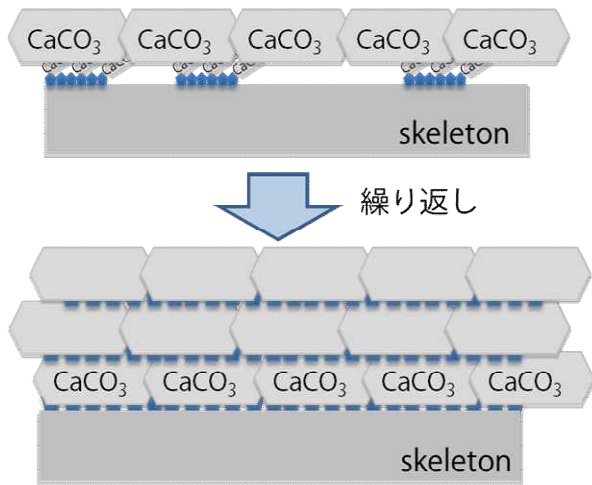
図(2)-5にこの骨格微細構造から推察される骨格形成メカニズムについて模式図を示したが、第一段階として炭酸カルシウムの鋳型となる有機基質が生成され、その後に物理化学的にCaCO<sub>3</sub>が沈積し、それが繰り返され積み重なって骨格が成長していくと考えられる。そして、非共生ポリプにもこの層構造が見られることから、最初の有機基質の生成はサンゴ宿主によって最終的には行われていることが予想される。ただし、共生ポリプにおいては、褐虫藻からの栄養の供給により、より効率よく有機基質の生成が行われていることも考えられる。33°Cという高温ストレス下においては、この第一段階の有機基質の生成がうまく行われなかったため、その後の骨格成長も促進されず、結果として成長量の低下を招いたものと考えられる。実際に温度の上昇により炭酸塩飽和度(Ω<sub>arag</sub>)は上昇し、物理化学的にはアラレ石が析出しやすい環境となるが、それに反して骨格成長の低下が見られたことは、骨格の鋳型がうまく生成できなかったことを裏付けているだろう(図(2)-5)。一方、塩分実験においては、どの塩分区でもこの層構造が認められたことから、

骨格形成の第一段階には低塩分の影響は及ばなかったが、第2段階目にあたる物理化学的な作用によりアラレ石の析出が抑えられたことにより、結果として骨格成長が低下したものと推察される。実際に図(2)-6からも分かるように、本研究で実施した純水の希釈による塩分の低下は $\Omega_{\text{arag}}$ の低下を招くため、この仮説を支持する。このように、骨格微細構造の観察から、本研究では2段階の骨格成長メカニズムが提唱でき、第一段階への外的ストレスはその後の骨格成長も妨げることから、結果として骨格がそれ以上生成かつ成長できなくなってしまうため、より深刻であることが分かる。



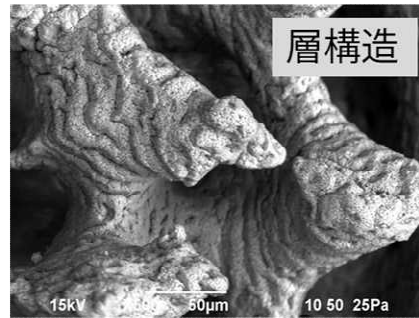
図(2)-4 温度制御実験で飼育されたポリプロピレン骨格の微細構造。a: 27°C, 非共生 b: 33°C, 非共生 c: 27°C, 共生 d: 33°C, 共生





Second step: 物理化学的な $\text{CaCO}_3$ の沈積

First step: 有機基質の合成とそれを鋳型とした $\text{CaCO}_3$ の核形成



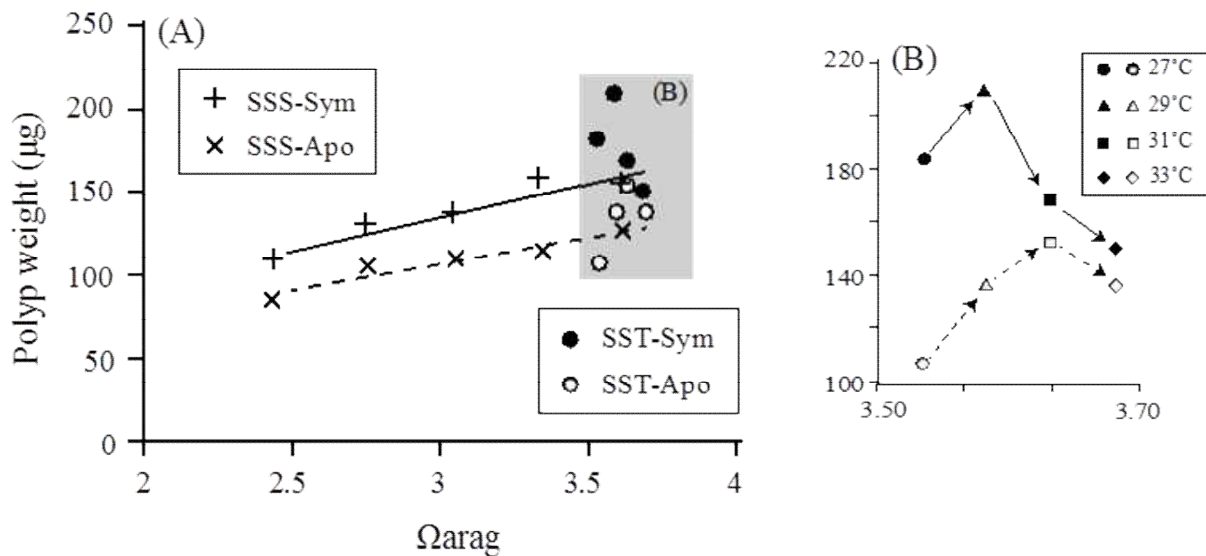
### 低塩分ストレス

層構造は維持された  
→塩分の低下に伴う $\text{CaCO}_3$ 飽和度の低下により、2段階目の物理化学的な $\text{CaCO}_3$ 沈着速度が低下

### 高水温ストレス

層構造が消失  
→動物体サンゴの代謝異常によって、1段階目の有機基質合成が機能せず、2段階目の $\text{CaCO}_3$ 沈着速度も低下

図(2)-5 骨格成長の2段階メカニズム（上）と高水温、低塩分ストレスが骨格の2段階メカニズムに与える影響

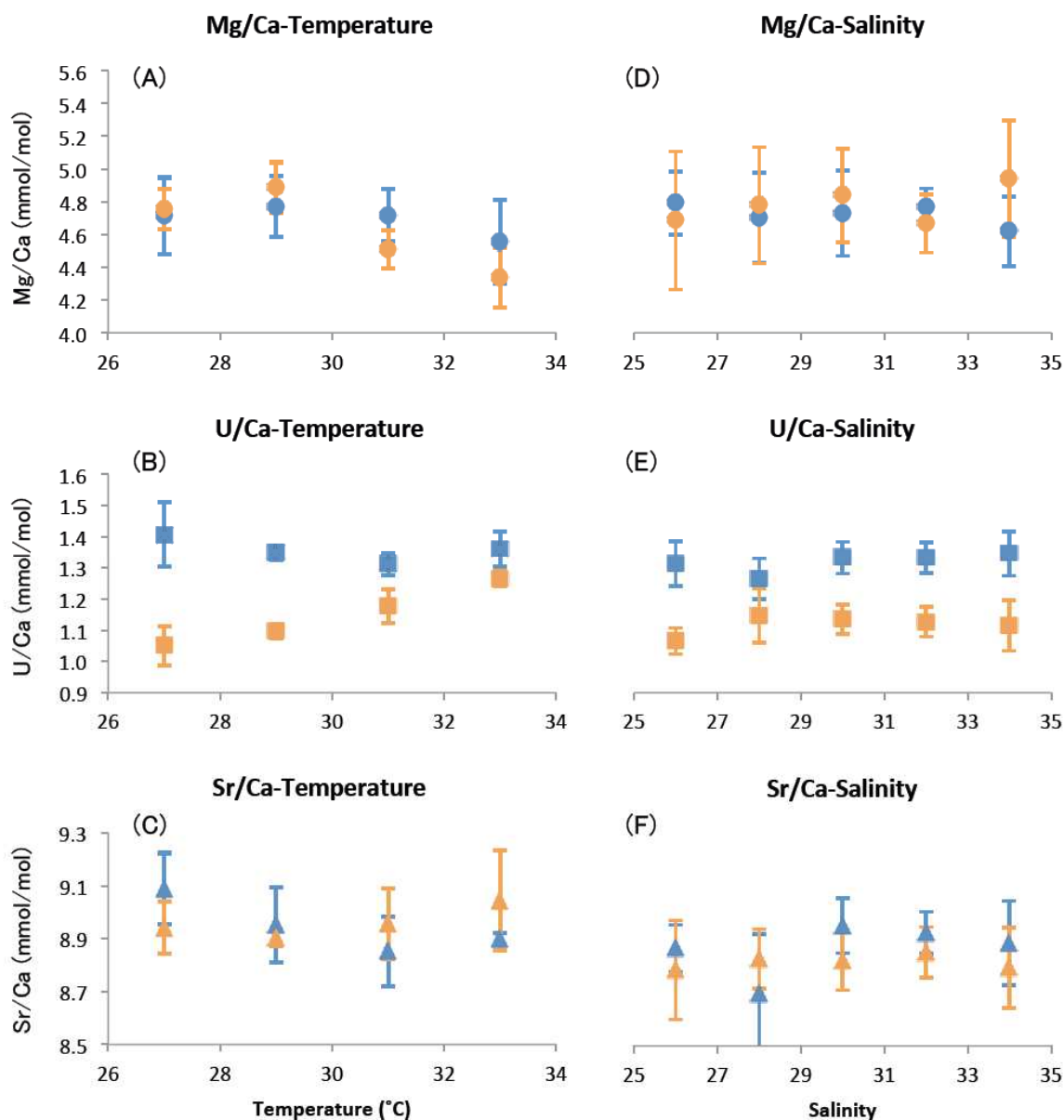


図(2)-6 (A) 飼育海水中のアラレ石に対する飽和度 ( $\Omega_{arag}$ ) と骨格成長との関係を示した図。  
 (B) 図 (A) におけるグレーで囲んだ範囲を拡大した図。低塩分実験 (SSS) では、 $\Omega_{arag}$  の低下と共に骨格成長も減少していることが分かるが、高温実験 (SST) では、 $\Omega_{arag}$  の上昇にも関わらず、高温下では骨格成長が減少していることが分かる。

## (2) ポリプ骨格中の微量元素測定

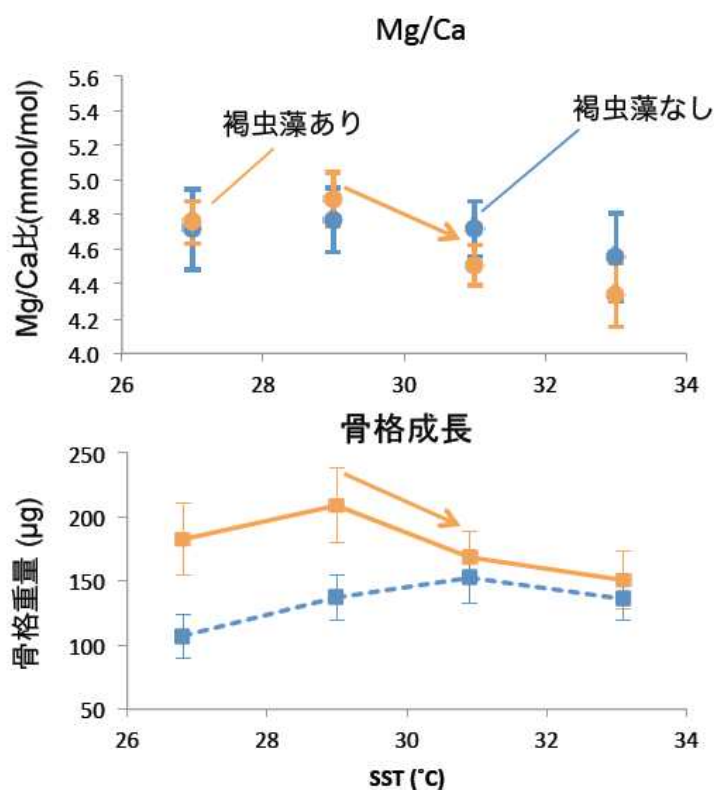
温度実験と塩分実験について、ポリプ骨格中のストロンチウム・カルシウム比 (Sr/Ca比)、ウラン・カルシウム比 (U/Ca比) およびマグネシウム・カルシウム比 (Mg/Ca比) の測定結果を図(2)-7に示した。サンゴ骨格中のSr/Ca比は海水温の良い指標として知られており、これまでも数多くの海水温復元の研究が行われているが、その指標としての有用性が環境ストレス下においても適用可能であるかについては検証されていなかった。また、U/Ca比もSr/Ca比同様に海水温指標として指摘されているが、近年ではInoue et al. (2011)<sup>21)</sup>によって、U/Ca比は海水のpHの指標にもなり得ることが指摘されている。熱力学的にサンゴ骨格を形成するアラゴナイト結晶へのSrの取り込みは、温度と逆相関の関係が知られており、U/Ca比についてもその傾向が報告されている。そこで、高温ストレス下における微量元素-海水温の関係を検討したところ、この2つの元素共に温度との逆相関関係は認められなかった(図(2)-7)。興味深いことに、非共生ポリプの骨格については、27-31°Cまでは逆相関関係が見られ、褐虫藻を持たないサンゴ骨格についてもその微量元素変動は環境指標として使用可能であることが示唆された。しかしながら、33°Cではこの直線関係が崩れるので、やはり高温ストレス下においては、サンゴ宿主そのものに影響が及び、その結果、ストレス下で成長した骨格中の微量元素は周囲の環境を正確に記録していないことが推察される。一方、共生ポリプについては、Sr/Ca比は27-29°Cの間でわずかに減少が見られるものの、これまでに指摘されているようなSr/Ca-海水温の直線関係は見られなかった。白化や骨格成長の低下が

検出される31°C以上においては温度上昇と共にSr/Ca比の上昇も顕著なことから、共生ポリプにおいても成長異常が見られる骨格中の微量元素については、周囲の環境を正確に記録していないことが明らかとなった。この結果については慎重な検討が必要ではあるものの、サンゴ骨格を用いて環境復元を行う際に注意すべき項目として提唱することができるであろう。塩分と微量元素に関しては、骨格成長、塩分共に明瞭な関係は見られなかった（図(2)-7）。



図(2)-7 共生(青)／非共生(黄)ポリプの骨格中の微量元素と環境パラメータとの関係。(A)Mg/Ca比と海水温，(B)U/Ca比と海水温，(C)Sr/Ca比と海水温，(D)Mg/Ca比と塩分，(E)U/Ca比と塩分，(F)Sr/Ca比と塩分

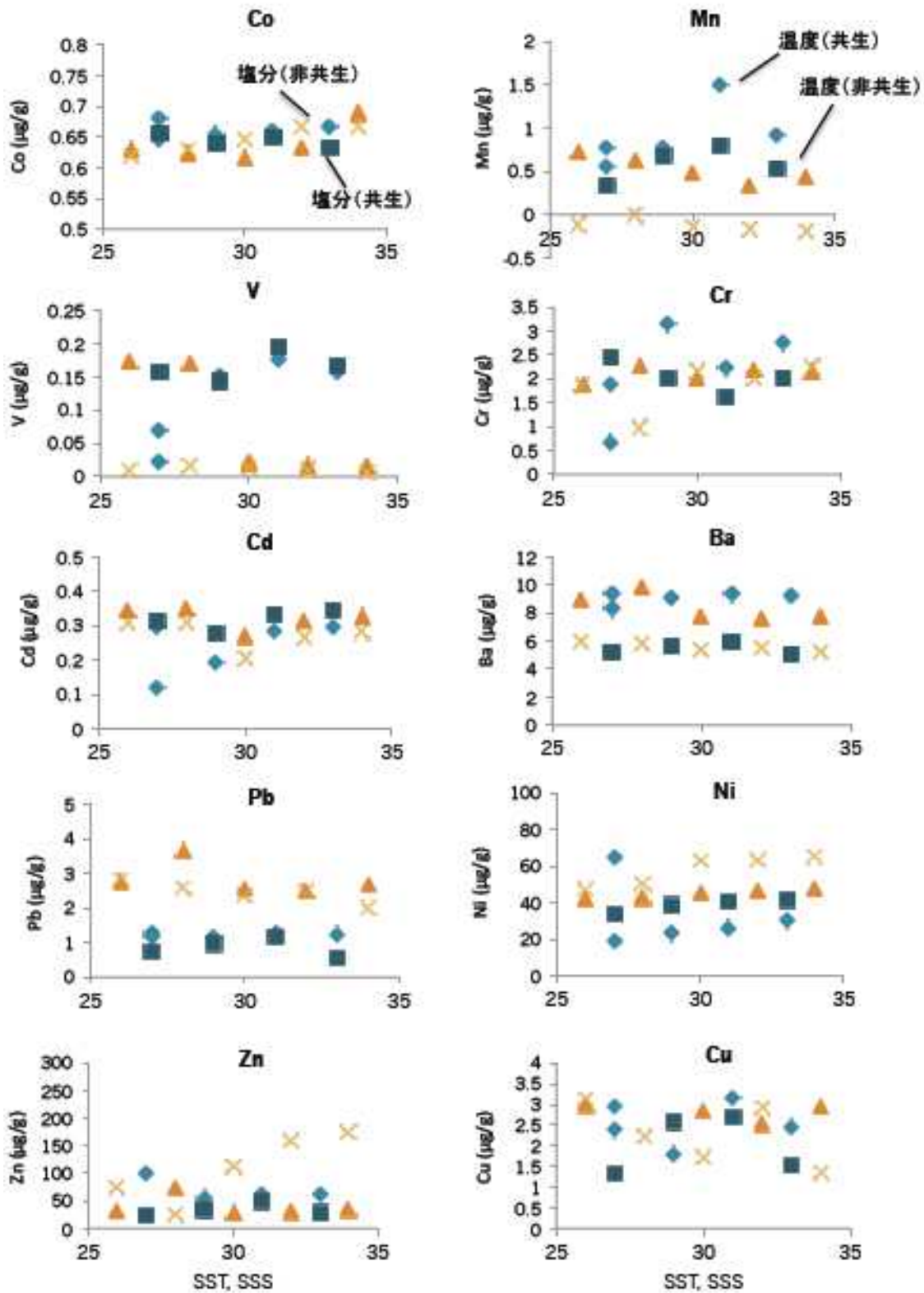
一方、骨格の成長速度の指標として指摘されているMg/Ca比については、温度実験における骨格成長とMg/Ca比の変動がよく一致しており、環境ストレス下における骨格成長の低下などについても復元できる可能性が示唆された（図(2)-8）。特に、Mg/Ca比については、共生／非共生ポリプ共に骨格成長変動と連動した変動が見られ、共生藻の有無に関わらず、骨格成長の指標として使用可能であることが示唆される。これまでにサンゴ骨格中のMgは骨格内部の石灰化中心に濃集している可能性が指摘されている<sup>23)</sup>。今回の骨格微細構造の観察結果から推察されるように、骨格の成長が2段階構造であるとする、第一段階目にあたるサンゴ宿主による有機基質の生成は骨格成長と関わっており、さらに骨格成長と骨格中のMg/Ca比に一致が見られることから、褐虫藻の有無に関わらず骨格中のMg/Ca比は第一段階目の骨格形成について議論することが可能かもしれない。これがどの程度定量化できるかについては、今後の課題ではあるものの、本研究によって、サンゴ骨格中の微量元素が環境指標としてのみではなく、サンゴのバイオミネラル化の解明にも役立つことが示され、今後の研究の発展につながるものと思われる。



図(2)-8 温度制御実験で飼育されたポリプ骨格のMg/Ca比変動（上）と各温度区における骨格重量変動（下）。特に褐虫藻ありのポリプ骨格について、骨格重量とMg/Ca比の変動によく類似した傾向が見られる。

### (3) ポリプ骨格中の重金属元素測定

サンゴ骨格中の鉛や銅、カドミウムなどの重金属元素に関しては、海水温の指標としてのSr/Ca比などに比べると研究例は少ないものの、1980年代から環境汚染の指標として様々な海域で測定が行われている<sup>24)-27)</sup>。これらの研究では、過去の環境政策による海洋環境の改善なども報告されており、環境アセスメントの一環としても応用できることが示唆されている<sup>26)</sup>。サンゴ骨格中の重金属元素については、Sr/Ca比やMg/Ca比、U/Ca比のように海水温やサンゴの骨格成長というよりは、海水中の重金属濃度の変動に起因して変動すると考えられている。そこで、前項と同様に高温および低塩分ストレス下において、サンゴ骨格中の重金属元素の系統的な変動の有無について調べるために、各実験で得られたポリプ骨格を複数個回収して、ICP-MSによる重金属測定を行った。測定元素はコバルト (Co)、マンガン (Mn)、バナジウム (V)、クロム (Cr)、カドミウム (Cd)、バリウム (Ba)、鉛 (Pb)、ニッケル (Ni)、亜鉛 (Zn)、銅 (Cu) の10元素である。サンゴ骨格中に含まれる重金属元素は一般的には数十ppb～数ppmと微量である。よって、測定にはポリプ骨格試料が1mg (5～10固体) 必要なため<sup>28)</sup>、本実験においては繰り返し測定が行えなかった。また、重金属元素の測定に関しは実験に供した6穴プレートなどからのコンタミも考えられるため、より慎重な検討のためには飼育海水の重金属元素の測定も必要になってくることが考えられる。しかしながら、同条件下で飼育したサンゴ骨格中の重金属元素測定の結果、図(2)-9に見られるように、各環境ストレスに応じた明瞭かつ系統的な重金属元素の変動は見られなかった。つまり、少なくともバルク骨格で評価する限り、ストレスに応じてある特定の元素をより濃縮あるいは排除するような機構はないことが推察され、これまでの研究で示されているように海水の重金属濃度を反映していることが示唆された。



図(2)-9 温度・塩分実験で飼育されたサンゴ骨格中の重金属元素測定の結果。横軸は温度 (SST)、塩分 (SSS) を示す。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

サンゴ礁の衰退が世界各地で報告されているものの、その要因についてはこれまで明らかになっていない点が多かった。実際にサンゴ礁は熱帯から亜熱帯の沿岸域に広がっているため、環境負荷要因として全球的な問題から局所的な問題までが混在しており、サンゴ礁への負荷要因を絞ることは容易ではない。そこで本研究では、温度、塩分、栄養塩をコントロールした室内実験に基づいて初期ポリプを飼育し、その骨格成長量によって環境影響評価を行った。その結果、温度で31°C以上、塩分では32以下から骨格成長の低下が見られた。一方で栄養塩については明瞭な影響は見られなかった。また、高温区では骨格の微細構造にも異変が見られるなど、高温ストレスはサンゴの骨格成長にとって負の要素が大きいことが本研究で実験的に示された。野外を模した複合ストレスの下で飼育実験を行うことも今後重要であると考え、まずは一つ一つの環境要因がサンゴの骨格成長にどのような影響を与えるかを評価する方法を本研究において確立できたことは、近未来のサンゴ礁生態系の変遷を予測する上で意義があると考えられる。

### (2) 環境政策への貢献

サンゴの白化現象が1997-98年の大規模エル・ニーニョイベント以降顕著になってきており、海水温の異常上昇がその要因と考えられている。本研究では、31°C以上になると骨格の成長量の低下が見られたため、29-31°Cの間に骨格成長を低下させるしきい値があると考えられる。このように、今後慎重に実験を重ねることでサンゴの成長にとって負荷を与えるレベルやしきい値などを提唱することで環境政策に寄与・貢献していきたいと考えている。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) M. INOUE, R. SUWA, A. SUZUKI, K. SAKAI and H. KAWAHATA: Geophysical Research Letters, 38, L12809, doi:10.1029/2011GL047786, (2011)  
“Effects of seawater pH on growth and skeletal U/Ca ratios of *Acropora digitifera* coral polyps”
- 2) M. INOUE, K. SHINMEN, H. KAWAHATA, T. NAKAMURA, Y. TANAKA, A. KATO, C. SHINZATO, A. IGUCHI, H. KAN, A. SUZUKI, K. SAKAI: Global and Planetary Change, 92-93:

1-7 (2012)

“Estimate of calcification responses to thermal and freshening stresses based on culture experiments with symbiotic and aposymbiotic primary polyps of a coral, *Acropora digitifera*”

- 3) 井上麻夕里：海の研究，（印刷中）「環境指標としてのサンゴ骨格中の微量元素とその変動メカニズムの解明に向けて」
- 4) 鈴木淳・井上麻夕里：海の研究，（印刷中）「造礁サンゴ類の石灰化機構と地球環境変動に対する応答」

<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) 新免浩太郎、井口亮、井上麻夕里、中村崇、鈴木淳、酒井一彦、川幡穂高：日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会（2010）  
「環境変動がサンゴポリプの骨格形成と褐虫藻感染に与える影響」
- 2) M. Inoue, K. Shinmen, H. Kawahata, T. Nakamura, A. Iguchi, A. Suzuki and K. Sakai, Goldschmidt Conference, Prague, Czech, 2011  
“Effects of thermal and salinity stresses on growth of aposymbiotic and symbiotic primary polyps”
- 3) Mayuri Inoue, Akira Iguchi, Shinmen Kotaro, Sakai Kazuhiko, Atsushi Suzuki, Hodaka Kawahata: 2011年度日本地球惑星科学連合大会（2011）  
“Effects of thermal and salinity stresses on coral calcification: approach by aposymbiotic and symbiotic primary polyps”
- 4) Mayuri Inoue, Akira Iguchi, Shinmen Kotaro, Sakai Kazuhiko, Atsushi Suzuki, Hodaka Kawahata. 2012 International Coral Reef Symposium.  
“Effects of thermal and salinity stresses on coral calcification”

## （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）

特に記載すべき事項はない



## (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

## 8. 引用文献

- 1) A.H. BANNER: Proc 2nd Int Coral Reef Symp 2: 685-702 (1974)  
“Kaneohe Bay, Hawaii; Urban pollution and a coral reefs ecosystem”
- 2) S.V. SMITH, W.J. KIMMERRE, E.A. LAWS, R.E. BROCK and T.W. Walsh: Pacific Sci 35: 279-402 (1981)  
“Kaneohe bay sewage diversion experiment: Perspectives on Ecosystem response to nutritional perturbation”
- 3) D.W. KINSEY and P.J. DAVIES: Limnol Oceanogr 24: 935-940 (1979)  
“Effects of elevated nitrogen and phosphorus on coral reef growth”
- 4) A. SUZUKI, M.K. GAGAN, K. FABRICIUS, P.J. ISDALE, I. YUKINO and H. KAWAHATA: Coral Reefs 22: 357-369 (2003)  
“Skeletal isotope microprofiles of growth perturbations in *Porites* corals during the 1997–1998 mass bleaching event”
- 5) G. DE’ATH, J.M. LOUGH and K.E. FABRICIUS: Science 323:116-119 (2009)  
“Declining coral calcification on the Great Barrier Reef”
- 6) N.E. CANTIN, A.L. COHEN, K.B. KARNAUSKAS, A.M. TARRANT and D.C. MCCORKLE: Science 329:322-325 (2010)  
“Ocean warming slows coral growth in the central Red Sea”
- 7) H. KURIHARA: Mar Ecol Prog Ser 373: 275-284 (2008)  
“Effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on the early developmental stage of invertebrates”
- 8) R. SUWA, M. NAKAMURA, M. MORITA, K. SHIMADA, A. IGUCHI, K. SAKAI and A. SUZUKI: Fisheries Science 76: 93-99 (2010)  
“Effects of acidified seawater on early life stages of scleractinian corals (Genus *Acropora*)”
- 9) K. CALDEIRA and M.E. WICKETT: Nature, 425: 365 (2003)  
“Anthropogenic carbon and ocean pH”
- 10) J.P. GATTUSO, D. ALLEMAND, and M. FRANKIGNOULLE: Amer Zool 39: 160-183 (1999)  
“Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: A review on interactions and control by carbonate chemistry”
- 11) R. ALBRIGHT, B. MASON and C. LANGDON: Coral Reefs 27: 485-490 (2008)  
“Effect of aragonite saturation state on settlement and post-settlement growth of *Porites astreoides* larvae”
- 12) F. MARUBINI, C. FERRIER-PAGÈS, P. FURLA and D. ALLEMAND: Coral Reefs 27: 491-499 (2008)  
“Coral calcification responds to seawater acidification: a working hypothesis towards a physiological

- mechanism”
- 13) J.K. OLIVER, R. BERKELMANS and C.M. EAKIN: In Coral Bleaching by van Oppen, M. J. H. and Lough, J. M. (eds.), p. 21-39, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2009)  
“Coral Bleaching in Space and Time”
  - 14) T.R. KNUTSON, J.L. MCBRIDE, J. CHAN, K. EMANUEL, G. HOLLAND C. LANDSEA, I. HELD, J.P. KOSSIN, A.K. SRIVASTAVA, M. SUGI: Nature Geoscience 21:157-163 (2010)  
“Tropical cyclones and climate change”
  - 15) J. WEBER and P.M.J. WOODHEAD: Chem Geol., 6, 93-117 (1970)  
“C and O isotope fractionation in the skeletal carbonate of reef-building corals”
  - 16) P.K. SWART and A. GROTTOLI: Coral Reefs, 22, 313–315 (2003)  
“Proxy indicators of climate in coral skeletons: a perspective”
  - 17) E.J. HENDY, M.K. GAGAN, C.A. ALIBERT, M.T. MCCULLOCH, J.M. LOUGH and P.J. ISDALE: Science, 295, 1511-1514 (2002)  
“Abrupt decrease in tropical Pacific sea surface salinity at end of little ice age”
  - 18) M. MORITA, A. NISHIKAWA, A. NAKAJIMA, A. IGUCHI, K. SAKAI, A. TAKEMURA, M. OKUNO: J Exp Biol 209:4574-4579 (2006)  
“Eggs regulate sperm flagellar motility initiation, chemotaxis, and inhibition in the coral, *Acropora digitifera*, *A. gemmifera*, and *A. tenuis*”
  - 19) K. IWAO, T. FUJISAWA and M. HATTA: Coral Reefs 21:127-129 (2002)  
“A cnidarian neuropeptide of the GLWamide family in duces metamorphosis of reef-building corals in the genus *Acropora*”
  - 20) M. INOUE, A. SUZUKI, M. NOHARA, K. HIBINO and H. KAWAHATA: Geophys. Res. Lett., 34, doi:10.1029/2007GL029628 (2007)  
“Empirical assessment of coral Sr/Ca and Mg/Ca ratios as climate proxies using colonies grown at different temperatures”
  - 21) M. INOUE, R. SUWA, A. SUZUKI, K. SAKAI and H. KAWAHATA: Geophys. Res. Let. 38, L12809, doi:10.1029/2011GL047786 (2011)  
“Effects of seawater pH on growth and skeletal U/Ca ratios of *Acropora digitifera* coral polyps”
  - 22) J.P. CUIF, Y. DAUPHIN and P. GAUTRET: Int. J. Earth Sci. 88: 582-592 (1999)  
“Compositional diversity of soluble mineralizing matrices in some recent coral skeletons compared to fine-scale growth structures of fibres: discussion of consequences for biomineralization and diagenesis”
  - 23) T. MITSUGUCHI, T. UCHIDA, E. MATSUMOTO, P.J. ISDALE and T. KAWANA: Geochim. Cosmochim. Acta 65: 2865-2874 (2001)  
“Variations in Mg/Ca, Na/Ca, and Sr/Ca ratios of coral skeletons with chemical treatments: Implications for carbonate geochemistry”
  - 24) G.T. SHEN, E.A. BOYLE and D.W. LEA: Nature 328, 794-796 (1987)  
“Cadmium in corals as a tracer of historical upwelling and industrial fallout”
  - 25) M. MCCULLOCH, S. FALLON, T. WYNDHAM, E. HENDY, J. LOUGH and D. BARNES: Nature

421, 727-730 (2003)

“Coral record of increased sediment flux to the inner Great Barrier Reef since European settlement”

- 26) M. INOUE, A. SUZUKI, M. NOHARA, H. KAN, A. EDWARD and H. KAWAHATA: Environmental Pollution, 129, 399-407 (2004)

“Coral skeletal tin and copper concentration at Pohnpei, Micronesia: Possible index for marine pollution by toxic anti-biofouling paints”

- 27) M. INOUE and M. TANIMIZU: Science of the Total Environment, 406, 123-130 (2008)

“Anthropogenic lead inputs to the western Pacific during the 20th century”

- 28) M. INOUE, M. NOHARA, T. OKAI, A. SUZUKI and H. KAWAHATA: Geostandards and Geoanalytical Research, 28, 411-416 (2004)

“First report on concentrations of trace elements in carbonate reference materials, coral JCp-1 and giant clam JCt-1 by inductively coupled plasma mass spectrometry”

## **Evaluation of Impact from Human Activities on Coral Reef Environments Based on Coral skeleton**

Principal Investigator: Mayuri INOUE

Institution: Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of  
Tokyo

Cooperated by: University of the Ryukyus

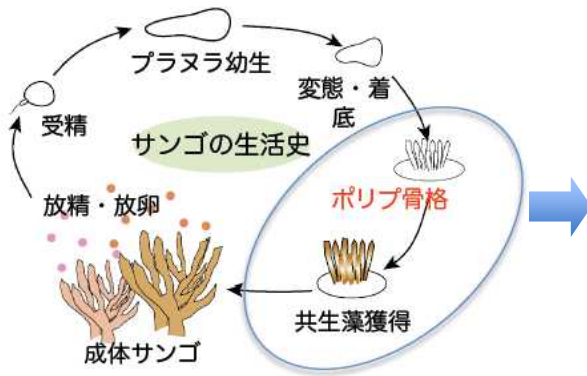
### [Abstract]

**Key Words:** Juvenile coral, Zooxanthellae, Carbonate skeleton, Environmental stresses, Laboratory culture experiment

Although coral calcification is directly related to coral health, few studies have examined the responses of coral calcification to environmental stresses, with the exception of ocean acidification. In this study, we experimentally exposed aposymbiotic (lacking symbionts) and symbiotic primary polyps of the scleractinian coral *Acropora digitifera* to several seawater temperatures (27, 29, 31, and 33 °C) and salinities (26, 28, 30, 32, and 34) to investigate the effects of thermal and freshening stresses on coral calcification from the standpoint of coral-algal symbiosis. Calcification rates were higher for symbiotic versus aposymbiotic polyps in both sets of experiments, except for those reared at 31 °C and 33 °C. Calcification responses of symbiotic polyps were a non-linear function of temperature, and the threshold temperature affecting skeletal growth and bleaching was between 29 °C and 31 °C. Calcification rates of aposymbiotic polyps were also a non-linear function of temperature, with a maximum polyp weight at 31 °C, suggesting that thermal stress also did some damage to the coral host itself. In contrast, skeletal growth of both aposymbiotic and symbiotic polyps decreased linearly with increased salinity. Observations of the microstructure of polyp samples revealed a clearly cyclic feature of skeletal surfaces that was likely related to organo-mineral deposition of calcium carbonate even under lowered-salinity conditions. However, neither type of polyp reared at 33 °C evidenced this characteristic, suggesting that thermal stress had compromised the normal calcification process, which involves secretion of an organic matrix by the coral host. Our results suggest that the effects of future global warming will include a reduction in coral calcification itself and the collapse of coral-algal symbiosis, at least at the primary polyp stage. The present experiments showed that thermal stress

would affect the host's physiological functionality, whereas freshening stress, which is simply the dilution of ambient seawater, would affect the mineralization process associated with coral calcification. The experiments on nutrient enrichment showed that the nutrient incorporation itself had a positive effect on the symbiotic coral growth but the concomitant overgrowth of benthic microalgae (BMA) disturbed the extension of the coral skeleton. Some symbiotic corals successfully swept away BMA even under the nutrient enrichment but aposymbiotic corals could not remove BMA and their mortality increased. The acquisition of zooxanthellae could be an important bifurcation for post-settlement juvenile corals to survive in a nutrient-enriched coral reef.

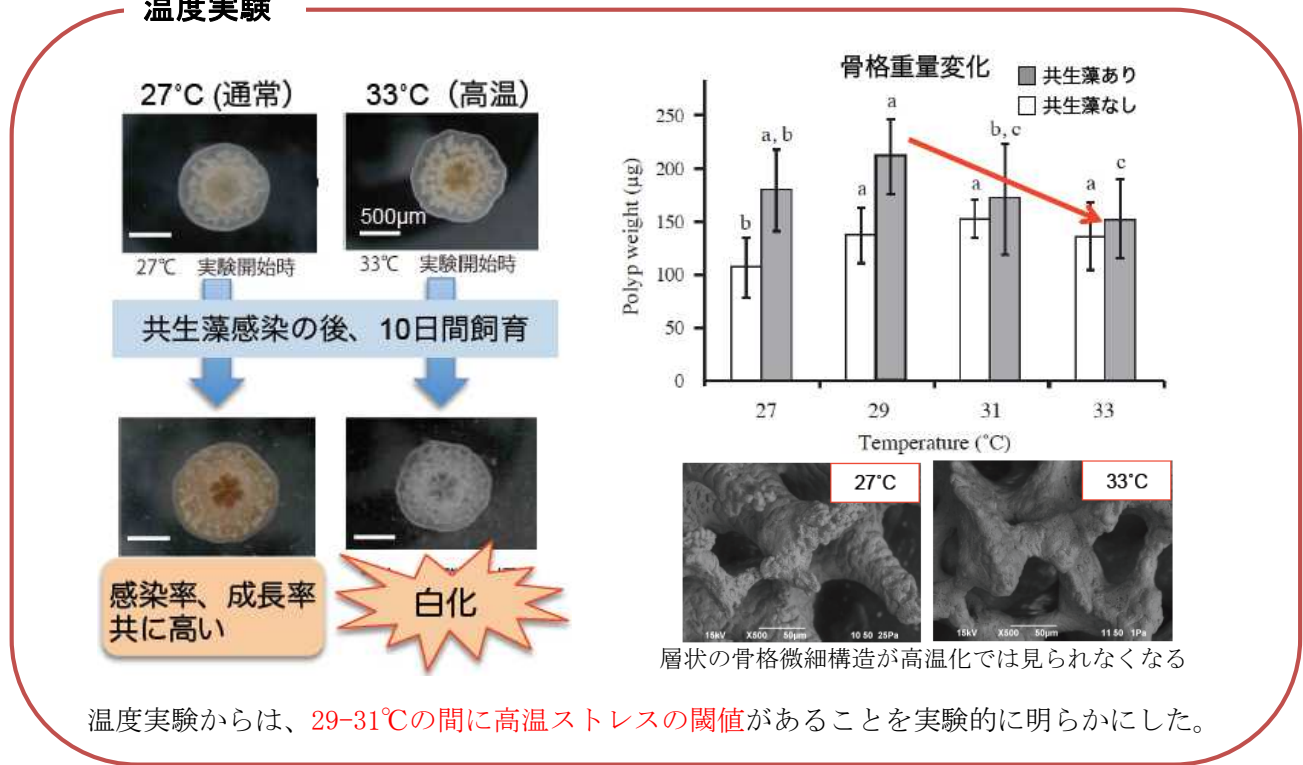
【RF-1009】サンゴ骨格を用いたサンゴ礁環境に及ぼす人間活動の影響評価に関する研究  
 研究代表 井上麻夕里（東大・大気海洋研） 参画研究者 中村 崇（琉大・理学部）  
 協力研究者 井口 亮、田中泰章（琉大・熱生研・瀬底）



共生／非共生ポリプ骨格について、温度、塩分、二酸化炭素濃度、栄養塩濃度を変化させた飼育実験

**研究成果**  
 ポリプ骨格を用いた飼育実験を行うことで、短期間でも環境負荷要因のサンゴの骨格成長に及ぼす影響を評価できる手法を確立

**温度実験**



**栄養塩実験**

