

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05806

研究課題名(和文) アマモ場の衰退・再生阻害機構の解明—環境因子および除草剤の複合影響—

研究課題名(英文) Analysis of factors in the degeneration of eel grass (*Zostera marina*) beds and the impediments to their restoration: involvement in the multiple effect of environmental factors and herbicides.

研究代表者

持田 和彦 (Mochida, Kazuhiko)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(廿日市)・部長

研究者番号：00371964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アマモ親株に対する化学物質および環境因子の複合影響を解明するため、除草剤、光、および水温を変化させた複合曝露試験を実施した。試験の結果、20℃以下で、なおかつ光が不十分であると除草剤の影響が出やすい傾向が認められた。また、環境因子がアマモの発芽に及ぼす影響を評価するためのバイオマーカー(代謝物)を探索するため、アマモの発芽時に差次的に発現する代謝物の同定を試みた。得られた219の代謝物ピークの主成分分析の結果、発芽前後のサンプルは明瞭なクラスターとして分離され、それぞれのサンプルが特徴的な代謝物を持つことが示唆されるとともに、いくつかのマーカー候補となる物質を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、過去に生じたアマモ場の消失原因および再生阻害要因のより深い理解、さらに将来予測が可能となる。近年、生態毒性学の分野においても生物群集や生態系に対する化学物質と物理環境要因の複合影響を理解することの重要性が強調されている。しかしながら、実際に解析を試みた事例は少なく、本研究で得られる成果は生態毒性学分野における化学物質のリスク評価の高度化に向けた貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)：Eel grass (*Zostera marina*) was exposed to the various conditions with herbicide, light, and water temperature to understand the effect of the multiple stressors encountered in natural coastal environment on their growth. The multiple effect caused by the three factors were obviously observed especially under the condition that water temperature was less than or equal to 20 °C. To elucidate the effects of environmental factors on germination of *Zostera* seed, a metabolomic analysis was applied to the *Zostera* seed at various stages. The 219 metabolites were identified. The score plots of the two principal components for the metabolites showed that the seed of the initial, low water temperature-treated, or the germinated groups were distinct each other. As a result, we successfully identified a couple of candidates for biomarker metabolites to estimate the effects of various environmental stressors on the germination.

研究分野：生態毒性学

キーワード：アマモ 光合成 最大量子収率 生長阻害 除草剤 複合曝露試験 代謝物総体解析

1. 研究開始当初の背景

海産顕花植物のアマモは「アマモ場」と呼ばれる藻場を形成し、沿岸域の水質浄化や多様な魚介類(特に稚仔魚)の生育を支える重要な場を提供する。瀬戸内海においては1960-70年代の10年間でアマモ場が顕著に消失し、面積は約1/4にまで減少した。こうしたアマモ場の大規模な消失は、藻場への依存度が高い稚仔魚等の水産資源にも大きな影響を及ぼすことが明らかとなっている(水産庁2007)。近年、アマモ場の再生事業等が各地で行われているが(Morita, 2000; 大本ら、2005)、成功した事例は極めて少ない。これは、アマモ場の衰退・消失の機構についての科学的解明が十分になされないまま事業が進められたことに起因する。

アマモ場の衰退・消失の原因として、埋め立てや富栄養化等によって濁度が上昇することによる光量減少(Tamaki et al. 2002, 他)などの物理的要因のほか、陸域からの除草剤による化学的要因の可能性も指摘されている(Yamamuro et al. 2006)。ただし、埋め立てなどの直接的要因を除き、これらの要因がアマモ場の衰退を引き起こしたものとして特定された事例はほとんどない。実際に、濁度を示す透明度の変化等のみでは、アマモ場減少の説明は不可能であるという指摘もなされている(玉置ら、2002)。また、近年の地球温暖化にともなう海水温の上昇は、今後アマモ場に影響を及ぼす要因となっていくことも推察される。

瀬戸内海の特に河川の影響を受けやすい沿岸域では上述の除草剤が一定の濃度で恒常的に存在する(Okamura et al. 2003; Balakrishnan et al. 2012等)。しかしながら、それらはng/Lという極低濃度であり、除草剤の影響のみではアマモ場の衰退や再生阻害要因を説明できないことも事実である(Mochida et al. 2019)。一方、実際の環境中においては、アマモは除草剤の他にも光量や水温等の物理的要因の変化など、複数の環境因子に曝されているが、これらの環境因子がアマモに及ぼす複合作用については全く明らかにされていない。従って、これら物理化学的因子の複合作用を考慮した室内試験の実施および現場調査によりアマモ場衰退・再生阻害要因を究明することが、アマモ場再生や保全施策を考えるために必要である。

2. 研究の目的

我々はこれまで、除草剤、暗条件、あるいは高水温下でアマモを飼育し、光合成能や葉体内代謝物の変化を調べてきた。その結果、それぞれの処理により光合成能や代謝物に特徴的な変化が見られることを明らかにしてきた(Mochida et al. 2019)。本研究では、除草剤の化学的要因および、水温、光量等の物理的要因がアマモに対し複合的に及ぼす影響を解明することを目的とした。さらに、新たな影響評価指標を検索するためアマモの繁殖において重要なステージである発芽にも着目し、そこで生じる生理的イベントを代謝物総体解析(以下、メタボローム解析)により捉えることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 除草剤および環境因子の複合曝露試験

・被験物質については、瀬戸内海沿岸域で検出頻度が高く、光合成阻害作用を示す除草剤であるイルガロール1051(船底塗料用防汚物質)、ジューロン、プロマシル、およびシアナジン(除草剤)を被験物質とした。瀬戸内海沿岸域を再現するため、我々の予備調査により得られたそれぞれの物質の検出濃度の中央値(L濃度区)あるいは90パーセンタイル値(H濃度区)の濃度で混合した試験液をそれぞれ調製した。また、試薬の溶解に用いたdimethylsulfoxideのみの助剤対照区(SC区)を別途設定した。

水温については、瀬戸内海で一般に想定される海水温度の季節変化の範囲から致死温度まで

の複数区 (11, 14, 18, 20, 25, および 28) を設定した。なお、アマモの生育至適水温は 14 ~ 20 、致死水温は 29-30 からそれ以上である (例: Abe et al., 2008)。

アマモの生長には光量が少なくとも 15-25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ が必要とされる (Dennison and Alberte, 1985 等)。最低光量付近 (Dark 区) および飽和点 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Light 区) の 2 段階設定した。

アマモ親株を試験生物とし、除草剤濃度および光量を固定し、水温を様々に変化させて複合曝露試験を繰り返した。曝露期間は 14 日間とし、試験終了時に生長について計測した。また、曝露の状態を確認するため、PAM フルオロメトリー (Diving-PAM; Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) を用いて、光合成能 (最大量子収率 $F_v/[F_m - F_o]$) を測定した。また、試験の結果は、一般化線型モデル等を用いて各因子のアマモの生長に及ぼす影響を解析した。

(2) アマモの繁殖を標的とした新たな影響評価指標の検索:

環境因子がアマモの発芽に及ぼす影響を評価するためのバイオマーカー (代謝物) を探索するため、その最初のステップとしてアマモの発芽時に差次的に発現する代謝物の同定を試みた。2018 年 6 月に広島湾内で採取したアマモ花株をメッシュ袋に入れ、研究所内の流水水中に放置した。同年 8 月に枯れた葉片を除去して種子を採取した (イニシャル)。種子は活性炭を添加した濾過海水中にいれ、0 で保存した (低温処理区) 後に腐葉土および海砂を添加したバットに播種した。同時に一部の種子について外皮を除去し、テストチューブに入れて液体窒素で凍結し、-80 で保存した。およそ一月後に幼胚軸の発芽が認められた (発芽区)。それぞれのサンプルは、外皮を除去した後にテストチューブに入れて液体窒素で凍結し、-80 で保存した。以上の 3 種の水溶性代謝物を分析した。

4. 研究成果

(1) 複合曝露試験 曝露試験の結果、いずれのグループにおいても H 濃度区において最大量子収率は助剤対照区と比較し有意に低い値を示した。この傾向は異なる水温下でも同様であった。水温 20 で試験を実施した際の F_v/F_m (平均値 \pm 標準誤差) について一例を示すと、Dark 区における SC 区、L 濃度区、および H 濃度区がそれぞれ、 0.798 ± 0.011 、 0.800 ± 0.004 、および 0.769 ± 0.007 であり、Light 区における SC 区、L 濃度区、および H 濃度区がそれぞれ、 0.787 ± 0.002 、 0.754 ± 0.024 、および 0.754 ± 0.009 であった。また、葉の生長に関しては、いずれの水温においても Dark 区の個体が Light 区の個体より低くなる傾向を示した。また、水温が 20 を超えると、Dark 区および Light 区ともに SC 区および L 濃度区あるいは H 濃度区との間に顕著な差は認められなかったが、20 以下の場合には Dark 区において SC 区と比較して L および H 濃度区の個体の生長

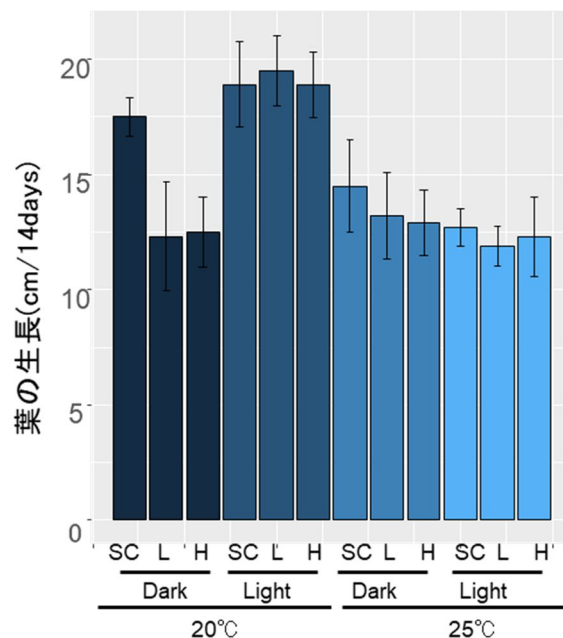


図 1. アマモ (*Zostera marina*) 親株の生長に対する除草剤、光、および水温の複合影響

は、統計的有意差は認められないが顕著に低い値を示した(図 1)。

生長を応答変数、除草剤曝露区、水温、および光条件を説明変数とした一般化線型モデルにより、各因子の生長に対する影響を解析した。水温 20 以下で実施した試験の結果について解析した結果、L 濃度区を除き、何れの指標も統計的に有意に生長に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。また、曝露、水温、および光条件のパラメータはそれぞれ -3.02、0.475、および 4.83 であった。水温 25 以上で実施した試験の結果について解析した結果、水温のみが有意に生長を及ぼす因子であることが明らかとなり、パラメータは -1.74 であった。

以上の結果から、水温 20 以下で、なおかつ光が不十分であると除草剤の存在がアマモの生長に対して複合的な影響を示すことが明らかとなった。また、25 のような高水温下では除草剤や光の影響は顕著ではなく、生長阻害は水温によってほぼ説明できると考えられた。

本研究で試験に用いた除草剤濃度は低濃度であり、それだけではアマモの生長に影響を及ぼさないが、水温や光の条件が整うとアマモの生長を阻害し得ることから、実環境中においても生長阻害が生じている可能性がある。本研究で用いた解析方法は野外におけるアマモ動態のより詳細な予測への応用も期待できる。

(2)種子の代謝物総体解析 キャピラリー電気泳動 - 飛行時間分解型質量分析計 (CE-TOFMS) による分析の結果、219 の代謝物ピークが検出された。主成分分析の結果、3 種のサンプルは明瞭なクラスターとして分離され(図 2 および 3) それぞれのサンプルが特徴的な代謝物を持つことが示唆された。イニシャルおよび低温処理区の間では、2-aminobutyric acid、3-phosphoglyceric acid、ADP-Glucose および GDP-Fucose、並びに Ascorbic acid 等の顕著な減少が認められた。また、発芽区を他の 2 区と比較すると TCA 回路における Citric acid は顕著に減少していたが、その下流にある Succinic acid, Fumaric acid および Malic acid は顕著に増加しており、TCA 回路が活性化していることが示唆された。さらに、Histidine, Lysine, Tryptophan、および Alanine などのアミノ酸も増加しており、その他の代謝経路も活性化されていることが示唆された。

以上、アマモ種子内の代謝物をデータベース化するとともに、様々な発達ステージにあるアマモ種子内代謝物の変動を調べることで、アマモ種子の発芽ポテンシャルを診断する評価指標を検出するための基盤情報を得ることができた。また、本研究で得られた情報は、沿岸域で検出さ

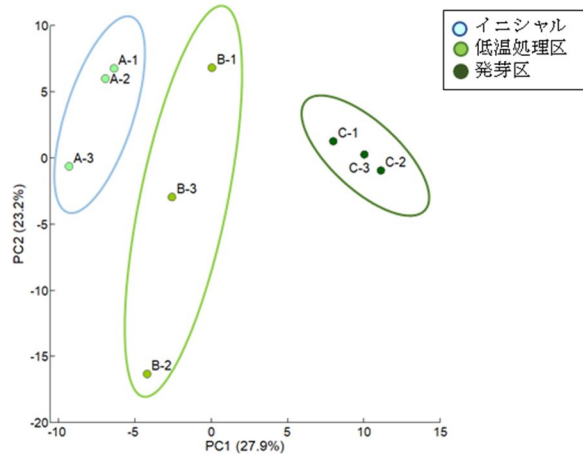


図 2. 様々な発達ステージのアマモ (*Zostera marina*) 種子代謝物に関する主成分分析結果

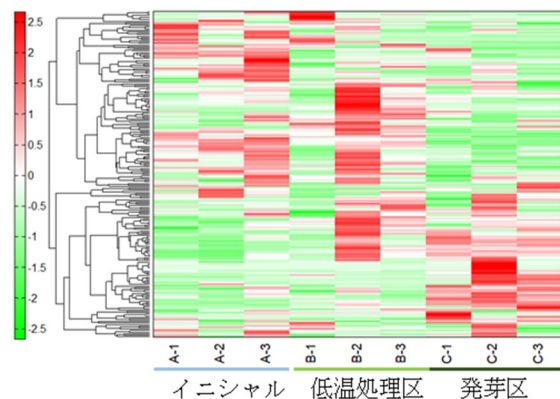


図 3. 様々な発達ステージのアマモ (*Zostera marina*) 種子代謝物の階層的クラスタリング解析およびHeatmap

れる化学物質や環境因子が発芽に及ぼす影響の評価への応用も期待できる。

引用文献

- Abe, M., Kurishima, A., Maegawa, M. 2008. Temperature requirements for seed germination and seedling growth of *Zostera marina* from central Japan. Fish. Sci. 74:589-593.
- Balakrishnan, S., Takeda, K., Sakugawa, H. 2012. Occurrence of diuron and irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan. Geochem. J. 46: 169-177.
- Dennison, W.C., Alberte, R.S. 1985. Role of daily light period in the depth distribution of *Zostera marina* (eelgrass). Mar. Ecol. Prog. Ser. 25:51-61.
- Mochida, K., Hano, T., Onduka, T., Ito, K., Yoshida, G. 2019. Physiological responses of eelgrass (*Zostera marina*) to ambient stresses such as herbicide, insufficient light, and high water temperature. Aquatic Toxicology. 208 : 20-28.
- Morita, K. 2000. Restoration of eelgrass bed. Environmental Science, 7 : 159-164.
- Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y., Nishida, T. 2003. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. Mar. Poll. Bull. 47: 59-67.
- 大本茂之・鳥井正也・三浦俊一・真鍋康司・西村和雄. 2005. 岡山県日生町地先の造成アマモ場の拡大. 水産工学. 42 : 75 - 78.
- 水産庁・マリノフォーラム21. 2007. アマモ類の自然再生ガイドライン. 水産庁, 東京.
- 玉置 仁・西嶋 渉・富永春江・寺脇利信・岩瀬晃盛・岡田光正. 2002. 海水の透明度変化がアマモ場面積の消長に及ぼす影響 - 広島県沿岸域におけるケーススタディ - . 水環境学会誌 . 25 : 151-156 .
- Tamaki, H., Tokuoka, M., Nishijima, W., Terawaki, T., Okada, M. 2002. Deterioration of eelgrass, *Zostera marina* L., meadows by water pollution in Seto Inland Sea, Japan. Mar. Poll. Bull. 44 : 1253-1258.
- Yamamuro, M., Hiratsuka, J., Ishitobi, Y., Hosokwa, S., Nakamura, Y. 2006. Ecosystem shift resulting from loss of of eelgrass and other submerged aquatic vegetation in two estuarine lagoons, lake Nakaumi and lake Shinji, Japan. J. Oceanogr. 62: 551-558.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mochida K, Hano T, Onduka T, Ito K, Yoshida G	4. 巻 208
2. 論文標題 Physiological responses of eelgrass (<i>Zostera marina</i>) to a ambient stresses such as herbicide, insufficient light, and high water temperature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 20-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquatox.2018.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

瀬戸内海区水産研究所環境保全研究センター化学物質グループ研究業績 feis.fra.affrc.go.jp/intro/kagaku/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	羽野 健志 (Hano Takeshi) (30621057)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(廿日市)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	吉田 吾郎 (Yoshida Goro) (40371968)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(廿日市)・主幹研究員 (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------