

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17885

研究課題名（和文）光合成及び石灰化のリアルタイム観測が可能にするサンゴのCO₂ストレス閾値の推定研究課題名（英文）Estimation of CO₂ stress threshold of corals by real-time observation of photosynthesis and calcification

研究代表者

山本 将史（Yamamoto, Shoji）

東京都立大学・都市環境科学研究科・特任教授

研究者番号：90775751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者が開発したアルカリ度計測システムをサンゴの実験系に適用し、今まで把握できなかった分スケールでの光合成及び石灰化応答を捉えることに挑戦した。その結果、枝サンゴであるウスエダミドリイシの石灰化応答と共生している褐虫藻の光合成応答のリアルタイム観測に成功した。また、様々な光量条件下でヒメマツミドリイシの石灰化を連続観測したところ、1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ を超える強光条件下では、石灰化が阻害されることがわかった。本研究を通じて、サンゴの石灰化と共生している褐虫藻の光合成応答を分スケールで測定する手法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、サンゴの石灰化と共生している褐虫藻の光合成応答を分スケールで測定することに成功した。サンゴと褐虫藻の共生関係の理解がより一層深まる点で学術的な意義を持つ。また、地球規模の社会問題である温暖化や海洋酸性化に対して、高い生物多様性をもつサンゴ礁生態系およびサンゴが、具体的にどの程度まで健全でいられるかの指標を提供でき、実社会へも大きく貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：In this research, the total alkalinity measurement system devised by Yamamoto was employed to assess photosynthetic and calcification reactions within a coral, allowing for the examination of minute-scale responses. Notably, we achieved real-time monitoring of the photosynthetic response exhibited by symbiotic zooxanthellae and the calcification response of *Acropora tenuis*. Furthermore, the continuous observation of calcification in *Acropora aspera*, under varying light intensity conditions, revealed a noteworthy inhibition of calcification when exposed to intense light surpassing 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. By employing our experimental system, which integrates a continuous total alkalinity measurement device with a dissolved oxygen meter, we have successfully established a method for measuring coral calcification and zooxanthellae photosynthetic response on a minute scale.

研究分野：海洋化学


キーワード：連続測定 アルカリ度 石灰化 サンゴ 海洋酸性化 地球温暖化

1. 研究開始当初の背景

人為起源の CO₂ 増加による海洋酸性化によって、海洋の生態系は危機にさらされている。その中でもサンゴ礁生態系は、地球表面の 0.1%に過ぎないにもかかわらず、全海洋生物の 25%もの割合が確認されている生物多様性の非常に高い生態系である。サンゴ礁生態系は、造礁サンゴ(以下、サンゴ)の骨格が複雑な構造を作ることによって高い生物多様性を保持している。サンゴ礁生態系保全のためには、サンゴの CO₂ ストレス応答を明らかにすることが非常に重要であるが、いまだに明快な答えは出ていない[Kroeker et al. 2013]。その大きな要因として、サンゴという生物の特殊性と測定手法の二点が挙げられる。

サンゴ自体は刺胞動物に分類されるが、体内の褐虫藻と呼ばれる植物プランクトンと共生している。サンゴは褐虫藻に棲みかを提供している一方、褐虫藻の光合成によって 90%以上のエネルギーを得て、自らの骨格を形成し生きている。しかし、これまでの研究では、サンゴの動物的側面である「骨格形成 = 石灰化」のみに焦点を当てた研究がほとんどであった。そのため、褐虫藻の活動に影響を与える環境要因の飼育条件が研究間で異なり、統一的な見解が得られていない[Albright 2018]。正しい将来予測とサンゴ礁生態系保全のためには、サンゴを、共生している褐虫藻を含めた系として捉え、共生の基礎となる光合成と石灰化双方で評価する必要がある。

一方、測定手法については、光合成の応答は海水中の溶存酸素(DO)、石灰化の応答はアルカリ度の変化で捉えることができる。DO は、すでに短時間分解能(1分オーダー)で測定できる技術がある。しかしアルカリ度は、これまで採水による測定しかできなかったうえ、分析に多大な労力がかかっていた。つまり、アルカリ度のリアルタイム計測手法がなかったために、光合成及び石灰化の相互関係の有無や大小すら把握できていないのが現状である。申請者は、従来はそれぞれの海水サンプルを 100mL 程度採取し、15-20 分程度の滴定分析が必要だった海水中のアルカリ度計測について、1 秒ごとの連続データから測定する計測システムを、Scripps 海洋研究所の Dickson 教授と共同で新たに開発した[Yamamoto et al. 2020, 国内特許出願済, 国際特許検討中](図 1)。



	データ	所要時間	サンプル量	サイズ
従来	間欠 (サンプルごと)	15-20 分	~100mL	10-30 kg
新システム	連続(毎秒)	< 3 分	< 5 mL	5 kg

小型で持ち運びも可能 ※測定精度はどちらもおよそ 2-3 μmol kg⁻¹

図 1. 申請者が開発した計測システムの写真およびスペック比較

2. 研究の目的

そこで本研究では、飼育実験中のサンゴの海水中のアルカリ度と DO を連続計測し、石灰化と光合成をリアルタイムで観測することに挑戦する。そして、サンゴの石灰化と共生する褐虫藻の光合成応答を分スケールで測定する手法を確立することで、サンゴと褐虫藻の共生関係の理解をより一層深めることをめざす。また、さまざまな光量条件下でのサンゴの石灰化応答を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サングサンプルの採取

本研究のサング類はすべて沖縄県瀬底島アンチ浜前 (26.649 N, 127.874 E) の沿岸パッチリーフ (水深 0.5-1m) で採取した。採取後、飼育実験中のサングを固定しやすくするため、全長 5cm 程度のサングの根本にプラスチック製のネジを接着剤で固定した。サングは実験開始の 10 日前に採取し、屋外水槽 (1.2 m × 0.7 m × 0.2 m、容積 187 L) で飼育した。屋外水槽は、実験施設である琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設前の水深 4-5 m から汲み上げた海水 (1.5 L min⁻¹) を継続的に供給した。

(2) 実験システム

飼育実験システムは下記の通りである (図 2)。容積 420ml のガラス製専用容器 (チャーミークリア、星硝株式会社) に海水とサングを 1 - 2 時間程度密閉し、そのときの海水中の溶存酸素とアルカリ度の変化から光合成速度と石灰化速度を求めた。容器内にはサングのほか、小型の台座と攪拌子をセットし、下部から水中スターラーを用いて、容器内の海水が均一になるよう混合した。溶存酸素の計測には、非破壊酸素濃度計 (Fibox3、PreSens)、アルカリ度の計測には、申請者が開発した微量連続アルカリ度計測装置 (3 - 3 で後述) を用い、それぞれの毎秒データを取得した。この際、アルカリ度の計測のために容器内から毎秒 1ml 程度海水が減ってってしまうため、その補填のためにゴム風船を取り付け、減少した分の海水は風船が膨らむように工夫を施した。また、実験中の水温変化を極力小さくするため、海水で満たした大型水槽にガラス容器を沈めて実験をおこなった。実験中の光量は、上部に設置した LED ライト (Hydra26HD、C2 Development) で制御し、大型水槽内に設置した光量子計 (DEFI2-L、JFE アドバンテック) で 10 分ごとに測定した。また、海水中の CO₂ 濃度の調整は、45L バケツ内の海水に、空気と純 CO₂ を混合して作った様々な濃度の CO₂ ガスを 3.0-5.0 L min⁻¹ の流量で連続バブリングすることでおこなった。なお、空気および CO₂ ガスの流量調整には、マスフローコントローラ (SEC-E40、HORIBASTEC) を用いた。実験後のサングは漂白し標本サンプルにしたのち、アルミホイル法によって表面積を測定した [Marsh 1970]。

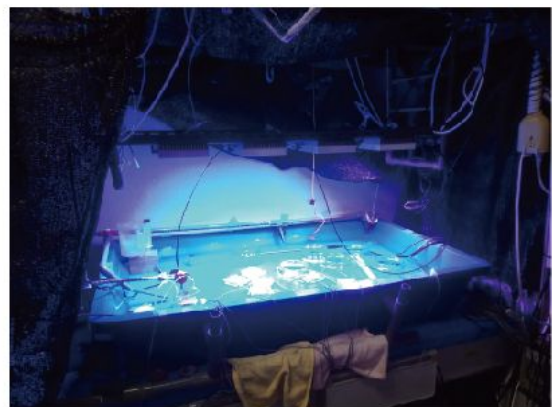
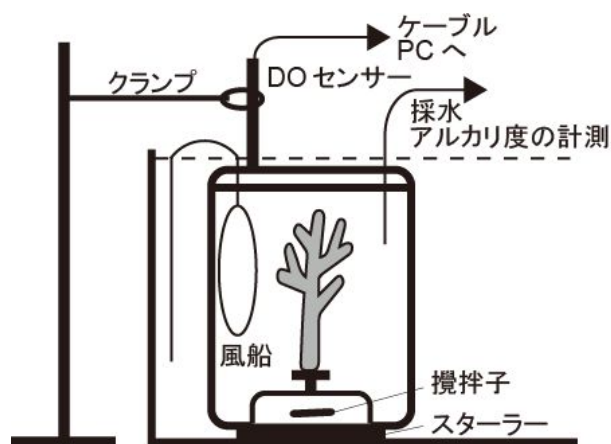


図 2 . 飼育実験システムの概略図および写真

(3) アルカリ度の計測方法

アルカリ度は、グランプロット法による酸滴定によって計測され、当量点がアルカリ度を示す [Gran 1952]。一般的には 100-300 mL の海水を採水し、海水試料に塩酸を添加し、その pH 変化をガラス電極で計測する。一試料にかかる測定時間は 15-20 分程度である。相対不確かさは 0.05% 程度 [Dickson et al. 2003] と高い精度だが、計測には時間と労

力、技術が必要である。

そこで申請者は、ISFET センサーと mm スケールの小型流路を利用することで、短時間（5 分以内）・少サンプル量（10ml 未満）で連続的にアルカリ度を計測できる装置の開発に成功した[図 1、Yamamoto et al. 2021]。本装置は、二連のペリスタルティックポンプで等量の海水サンプルと塩酸を mm スケールの小型流路に引き込み、ミニスターラーで十分に混合した後の電圧値を毎秒測定している。pH 一点法の原理に加え、あらかじめ値付けされた CRM3 点から検量線を求める工夫をすることで、相対不確かさ 0.1% の高精度でのアルカリ度の連続測定に成功した。センサー部には従来のガラス電極ではなく、独自に製作した ISFET（イオン感応性電界効果トランジスター）センサーを採用し、5 分以内の短時間測定と細かい流路部への作りこみを実現した。本研究では、サンゴの実験海水をダイレクトに開発した計測装置とつなげることで、サンゴの石灰化応答を毎秒間隔で観測した。

4. 研究成果

(1) サンゴの光合成および石灰化応答のリアルタイム観測

構築した実験システムを用いて、ウスエダミドリイシの光合成および石灰化応答のリアルタイム観測に挑戦した。代謝の変化を分かりやすくするために、測定開始から 20 分後まではライトを消した状態で実験をおこない、20 分後以降は約 $400 \mu \text{ photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光をあてた。図 3 に示すように、開始から 20 分後までの暗条件では、溶存酸素濃度が低下しサンゴおよび褐虫藻の呼吸が卓越していることがわかる。一方、アルカリ度についてはほぼ一定で、石灰化も溶解も起こっていなかった。その後明条件にしたところ、25 分以降で酸素濃度が増加し、サンゴに共生している褐虫藻による光合成の影響が大きくあらわれた。また、それに伴いアルカリ度も減少しており、サンゴの石灰化が活発になったことがわかった。

以上のことから、本研究で初めて、海水中のアルカリ度低下を指標としたサンゴの石灰化応答のリアルタイム観測を捉えることに成功した。また、本実験システムを用いた実験を繰り返しおこなうことで、共生している褐虫藻の光合成応答とサンゴの石灰化応答の相互関係やエネルギー収支をより詳細に明らかにできると考えられる。

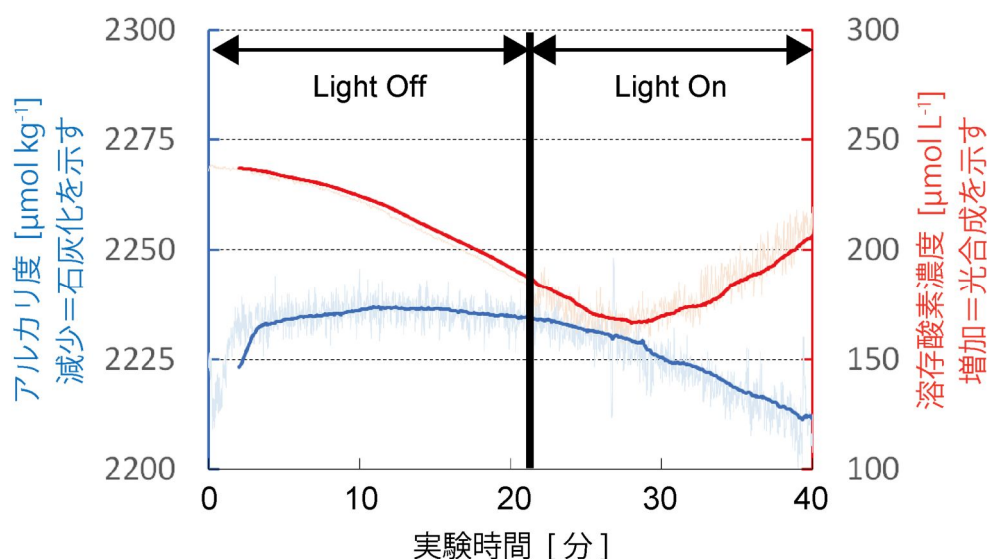


図 3 . 光量を変化させたときのウスエダミドリイシの光合成および石灰化応答変化
青字（左軸）がアルカリ度、赤字（右軸）が溶存酸素濃度を示している。それぞれ薄
色は毎秒データ、濃い実線が 60 秒の移動平均データを示している。

(2) サンゴの石灰化の強光阻害について

つぎに、様々な光量での石灰化応答実験をおこなった。図4(a)は、光量を変化させたときのアルカリ度の時間変化の結果の一部である。縦軸に海水中のアルカリ度をとっており、アルカリ度の低下が石灰化を示している。それぞれ、アルカリ度が値付けされたCRM (Certificated Reference Material) 3種を測定した後、サンゴ容器内の海水中のアルカリ度を毎秒計測している。光量 0, 40, 190, 370, 1150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の5条件で石灰化応答を観測した。一部値がスパイク状になっているところでは、採水のラインが外れてしまいエアが入ってしまった。どの結果でもアルカリ度が低下しており、サンゴの石灰化応答を捉えることができた。

これらの結果を光量別にまとめたのが図4(b)である。実験中、容器内の海水は徐々に減っているが、その分を考慮したうえでアルカリ度の変化から石灰化速度を算出した。その結果、光量が0の暗条件でも0.5 $\text{mmol m}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 程度の石灰化をしていることがわかった。そして、370 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ までは2.5 $\text{mmol m}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 程度まで石灰化速度が増加するが、1150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では極めて弱光条件 (40 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) よりも低い石灰化速度になり、強光による石灰化の阻害が示唆された。今後、500-1000 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 条件での実験をおこなうことで、強光阻害がおこる閾値を明らかにする必要がある。

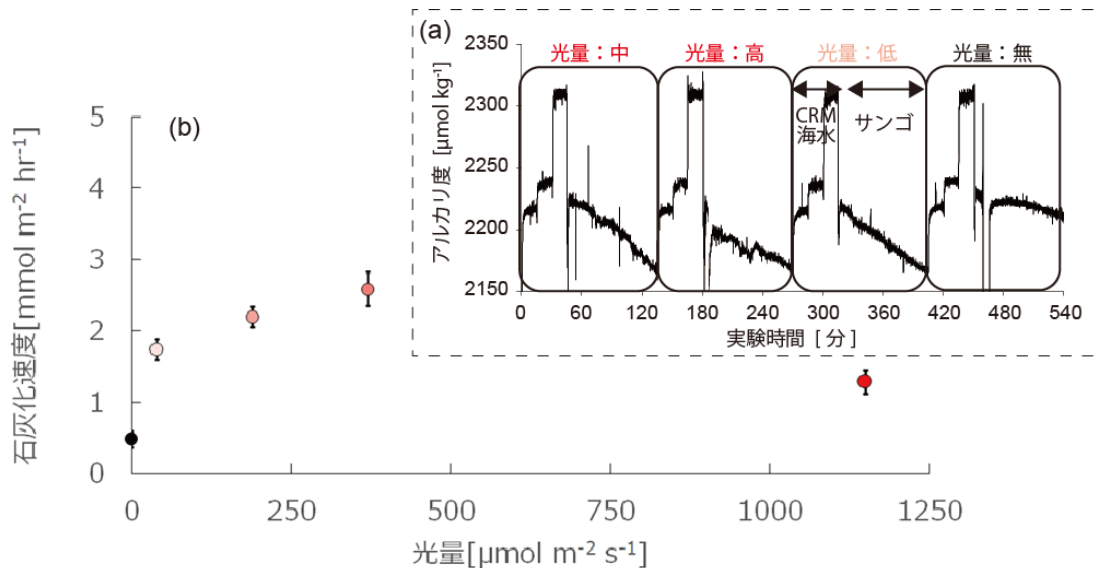


図4(a)様々な光量条件での海水中のアルカリ度の変化 (b)光量と石灰化速度の関係

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）

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------