

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291098

研究課題名(和文) 地球環境変動に連動する藻場生態系の炭素固定機能とデトリタス連鎖系の応答

研究課題名(英文) Response of the seagrass-bed ecosystem to global environmental changes with an emphasis on carbon sequestration and detrital food web

研究代表者

宮島 利宏 (Miyajima, Toshihiro)

東京大学・大気海洋研究所・助教

研究者番号：20311631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：大気中の二酸化炭素濃度の上昇によって引き起こされる海洋酸性化が海草藻場生態系の群集構造、特にデトリタス食物網に及ぼす影響を評価するために、基礎的な研究技術の開発と飼育培養実験による検証を2本の柱として研究を進めた。主要な成果として、海草由来のデトリタスの生成・集積・分解過程を実証的に追跡する方法としての環境DNA法の確立と有効性の検証、食物連鎖系の動的構造を定量的に解明するための重水素パルスチェイス実験法を開発、海草藻場根圏の微生物群集クローンライブラリの確立と分類学的特徴の抽出と比較、酸性化メソコズムを用いた生食・腐食連鎖系の酸性化応答の違いの直接的証明等が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：Response of the seagrass meadow ecosystem to ocean acidification induced by the rise of atmospheric CO₂ was studied with an emphasis on the detrital food web. Major achievements can be summarized as follows. A novel eDNA technique was developed for tracing production, accumulation, and decomposition processes of seagrass-derived detritus. A clone library of seagrass rhizosphere bacterial community was established and analyzed to extract characteristics specific to such an environment. A novel ²H-based pulse-chase experimental method was developed to evaluate turnover time and conversion efficiency associated individual channels within the seagrass meadow epibenthic food web. Differential responses to ocean acidification between the grazing and detrital food chains of the seagrass meadow food web was demonstrated by mesocosm manipulation experiments with the aid of the developed pulse-chase technique.

研究分野：海洋生態系の物質循環論

キーワード：海草藻場 食物網構造 炭素循環 海洋酸性化 デトリタス 底生動物 環境DNA 微生物群集

1. 研究開始当初の背景

海洋酸性化は大気中二酸化炭素濃度の増大に伴って必然的に進行する環境変動であるが、海洋酸性化が食物連鎖系にどのような影響を及ぼすかは十分に解明されていない。特に海洋沿岸生態系のように質の異なる複数の一次生産者や異地性資源が基底資源として供給される生態系では、酸性化に対して予想される応答が資源ごとに異なっているため、食物網を通しての影響の伝播が複雑である。また海洋沿岸生態系を構成する重要な二つ連鎖系のうちの一つであるデトリタス食物網に関しては、その出発点において微生物学的プロセスが重要な役割を担っているが、デトリタス生成にかかわる微生物学的プロセスが海洋酸性化によって影響を受けるかどうかについてはほとんど分かっていない。海洋沿岸生態系が提供する重要な生態系機能である水産資源生産、水質維持機能、炭素隔離機能などの環境変動応答を的確に予測して対処するためには、こうした食物網や微生物連鎖系を通しての海洋酸性化の間接効果を適切に評価してモデルに反映させていく必要がある。本研究では温帯浅海域の生態系として機能的重要性が極めて高い海草藻場(アマモ場)を対象として、デトリタス食物網を含む海草藻場の生態構造が地球規模の環境変動、特に海洋酸性化(二酸化炭素分圧上昇)から受ける影響を理解することを目的として、必要な研究技術の開発を含めて基礎的な研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では当初は研究の目標を、①アマモ場デトリタス食物網の基礎にある微生物連鎖系の構造と炭素フラックスの解明、②自然な物理条件によって平均二酸化炭素分圧が異なる海草藻場を選び、一次生産者やデトリタス食物網および堆積物への炭素隔離状況を比較すること、③酸性化実験メソコスムを開発してアマモ場食物網の海洋酸性化応答を直接に解明すること、の三項目に大別した上で、それぞれの項目の下に具体的な研究目標を数個の小項目として掲げた。

その後、採択時までには判明した内外の研究状況や我々の準備状況の進展と、実際の交付金額での実行可能性等を加味して目標を再検討し、上記②に関しては実施項目を削減して、これまで我々の実施した先行事業の成果に基づく情報の整理と、本事業の後継として計画する研究事業に向けた予備的調査を行うに留めることにした。

一方、③に関しては、類似研究を精査したところ、こうした操作実験において特に食物連鎖系の回転速度や転換効率などの動的なパラメータを実測する研究手法に弱点があることが見出されたことから、当初計画にはなかった重水素パルスチェイス法による食物網解析法を新たに設計・実用化して、これを酸性化メソコスム実験に適用することを目標に含めることにした。このため、実験方法の開発

検討に時間を要したことから、目標として定めた実験そのものは順調に終了したものの、一部のサンプルの分析とデータの解析を補助事業期間中に終了できず、完全な結果をここに報告することができない。

3. 研究の方法

(1) 研究目的①にかかわる作業は研究分担者の浜口が中心となり、研究協力者の島袋の協力で実施した。瀬戸内海より採集されたアマモを室内分解実験に供し、分解過程に現れる典型的な微生物群集の構造をクローン・ライブラリの作成を通して解析し、代表種の同定と細菌相のキャラクタリゼーションを実施した。

また分解過程及び堆積物中での続成作用を通しての海草由来デトリタスを追跡する手法として、環境DNAを利用したバイオマーカー法の開発を進めた。開発された手法を適用し、室内分解実験における海草の分解度と残存DNAコピー数との関係を調査した。

また当初の計画になかったことであるが、海草の分解に深く関係するセルロース分解酵素をモノクローナル蛍光抗体法を用いて検出する手法の開発を試み、特にバクテリア由来のセルロース分解酵素と動物など真核生物由来の酵素とを識別することが可能かどうか検討を行った。

(2) 研究目的②にかかわる作業は前述のように申請段階での計画を縮小して、研究代表者がほぼ単独で行った。先行の既に終了したプロジェクトにおいて採集され保存されていた瀬戸内海、沖縄、タイ、フィリピン、海草藻場堆積物試料を使用し、海草由来のデトリタス性有機炭素の残存率の評価と残存条件の推定を目的とした再解析を実施した。

またそれと並行して主として沖縄の亜熱帯海草藻場において、海草藻場の水質環境、海草による海洋酸性化緩和効果、およびそれらと海草藻場の立地条件との関係を探ることを目的とした予備的なモニタリング調査を実施した。調査はpHロガーなどによる経時観測と、採水試料の分析によって行われた。環境モニタリングに当たっては研究協力者の森本が協力した。

(3) 研究目的③にかかわる作業は研究分担者の堀と研究協力者の佐藤が実験作業を担当し、研究代表者が実験試料の分析を分担する形で実施された。実験試料の採集と一部の処理は研究協力者の濱岡らの協力を得て行われた。実験には瀬戸内海区水産研究所の屋外水槽施設を利用し、瀬戸内海から採集されたアマモと各種底生動物を材料として、二酸化炭素通気により3段階の酸性化段階に設定した水槽とコントロール水槽の中で一定期間の飼育実験を行った。

あらかじめ重水素で標識されたアマモを各水槽に入れ、実験動物を投入した後、一定期間後に動物を採集してその重水素濃度を分析することにより動物の摂食量を求め、それが

酸性化段階に応じてどのように変化するかを解析した。

この実験に先立ち、重水素標識法により食物連鎖を通しての炭素フローが追跡できることを検証するための予備実験、および重水素標識の海草体内での転流を実証するための予備実験を1年かけて実施した。この予備実験は研究代表者により単独で行われたが、本補助事業だけでは予算が十分でなかったため、別の科研費補助事業とのコラボレーションの形で実施された。このため予備実験の結果は別の補助事業の目的実現のためにも使用されている。

4. 研究成果

(1) 微生物学的解析

アマモ (*Zostera marina*) の分解実験試料から分解系のバクテリア群集のクローン・ライブラリを作成して群集解析を実施した (図1)。この分野における唯一の既往研究であるデンマークのアマモ場堆積物の微生物群集 (Jensen et al. 2007) と比較した場合、優占種に共通性が見られることがわかり、この方法によりアマモ場に特有の分解者群集が確かに捉えられていることが示唆された。

(2) 環境 DNA 技術の構築

環境 DNA を用いたデトリティス生成プロセスの研究のために、アマモの2種類の遺伝子配列に対するプライマー・プローブ系を確立

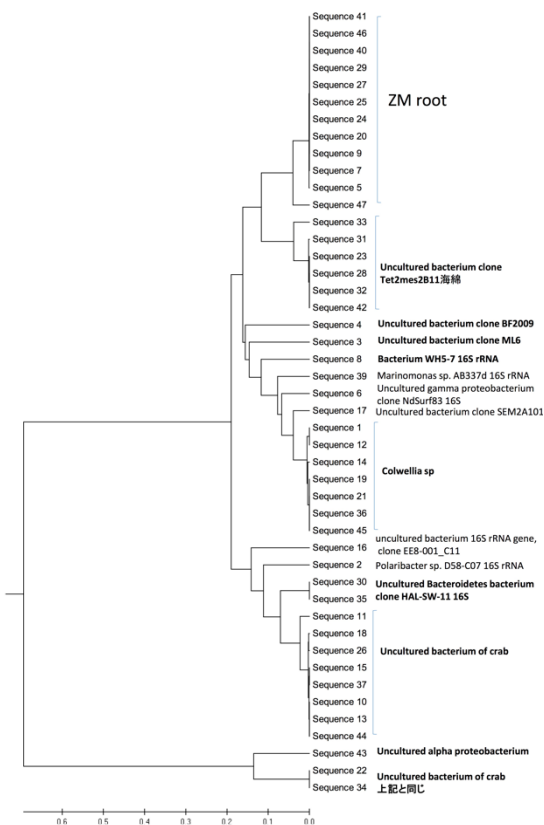


図1. アマモ根圏堆積物の細菌群集クローン・ライブラリの解析結果例。

し、堆積物からの環境 DNA の効率的な抽出手法を比較検討した。さらに quantitative PCR と digital droplet PCR による定量的検出技術を確立し、瀬戸内海で得られているアマモ場及び沖合の堆積物試料に適用した。以後、これまでにアマモに加えて琉球地方から東南アジアに優占する熱帯性海草の *Thalassia hemprichii*, *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata* に対する遺伝子プローブを作成した。さらに数種類の代表的なマングローブ植物に対するプローブの開発にも成功している。

本項の研究成果は学会発表①④⑦において発表され、図書①の中でも一部の成果に言及されている。またアマモ DNA プローブに関する成果を論文を国際的な学術誌に投稿して現在審査中である。他の成果についても近日中に論文化される予定である。

(3) 実際の海草藻場におけるデトリティス生成・蓄積の実態調査

我々自身の先行研究によって得られていたデータとサンプルの再解析に基づいて、海草藻場由来のデトリティスの堆積物中の蓄積量と貯留速度について解析し、その広域的な分布を論文①として報告した。また瀬戸内海での堆積物におけるアマモ由来デトリティスの集積・残存量を支配する一般的な要因について考察した論文②を発表した。既に論文公表済みであるので内容についてはここでは詳述しない。さらに同様の比較検討を熱帯性海草藻場まで拡張した結果を学会発表③において報告し、現在なお追加データを揃えつつ、詳細に検討を加えているところである。

(4) 実際の海草藻場における pH 調整機能の検証

海草藻場の海洋酸性化応答に関しては、海草藻場そのものの代謝活性が海洋酸性化に対して緩和効果をもたらす可能性が以前から指摘されていた。このことを検証するために、沖縄県石垣島の複数の海草藻場で、藻場の内外で pH の連続測定を実施したところ、藻場の pH 調整機能の発現のしかたは、藻場の分布や流動場の特性等、立地条件に依存して大きく異なることがわかった。図2の Case 1 は流れ

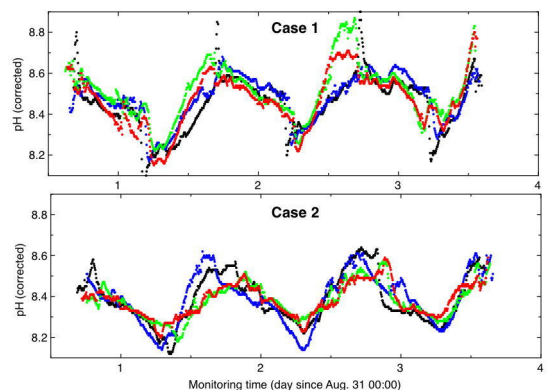


図2. 海草藻場の内外における pH 連続観測。黒は藻場外、赤と緑は藻場内、青は境界部の観測結果。Case 1 と Case 2 は 1 km ほど離れている。

の滞留しがちな条件下にパッチ状の海草藻場が存在する場合で、このような条件では藻場の代謝が局所的に水質に反映され、藻場の外部に比べて藻場の内部の方が pH の日周変動が著しく大きくなること、またその効果は局所的な藻場の被度によって変わることがわかる。Case 2 は広く一様に分布する海草藻場が一定方向の流れのある条件下に立地している場合で、Case 1 とは対照的に、海草藻場の内部の方が pH の日周変動が小さく、環境が安定化されていることが分かる。日平均 pH は Case 1, 2 とも藻場内部の方が高くなっており、海草藻場に海洋酸性化緩和効果が期待されることは立証された。これらは今後の後継の研究事業に向けた予備調査と位置づけており、この成果単独での学会・論文等による発表の予定はない。

(5) 重水素パルス・チェイス実験法の開発

海草藻場の生物群集における食物網のチャネルは大別して生食連鎖系（海草や付着微細藻類を基底資源とするもの）と腐食連鎖系（海草や外来性有機物のデトリタスを基底資源とするもの）に分けられる。時定数や転換効率の点で大きく異なるこのような複数のチャネルが共存することは生物群集の安定性や復元力の基礎になっていると考えられている。したがって海洋酸性化のような環境変動が各チャネルの時定数・転換効率・寄与率にどのような影響を及ぼすのかを解明することが求められているが、安定同位体比法のような従来の食物連鎖解析法では、チャネルの構造を把握することはできても、その時定数や転換効率などのダイナミクスを定量化することは困難であった。本研究ではこのような問題点を認識し、その克服を図るために、当初計画には含まれないことであるが、同位体トレーサーによるパルス・チェイス実験を導入することにした。この際、炭素・窒素安定同位体比に

よる従来の食物網マッピング法も併用できるようにするため、トレーサーとして重水素 (^2H) を用いることを検討した (図3)。

石垣島の海草藻場の葉上生底生動物群集の場合について ^2H - ^{13}C デュアルラベル法による予備実験を実施したところ、 ^2H と ^{13}C の相関が十分高く、 ^2H は食物連鎖（炭素ベース）のトレーサーとして有効で或ることが分かった (図4)。しかしながら動物による消化吸収の際に ^{13}C に比べて ^2H が離脱しやすいことから、完全に定量的な評価を行うためにはこの離脱率についてモデル化を試みる必要があることが分かった。

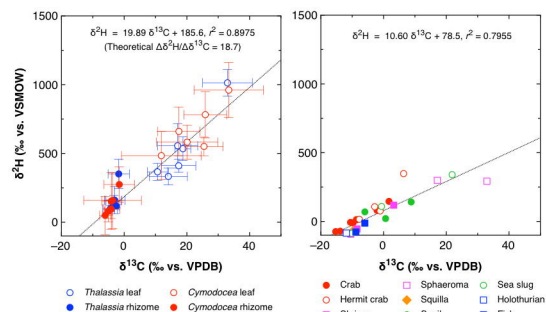


図4. 生物に摂取された ^2H と ^{13}C の関係。左は ^2H と ^{13}C でパルスラベルした海草、右はそれを摂食した動物。

本実験では ^2H のみによるパルスラベル法を用い、実験動物の $\delta^{13}\text{C}$ から主に依存している基底資源を、 $\delta^2\text{H}$ からその動物が属するチャネルの回転速度を推定するというアプローチを採用した。基底資源としては海草とサンゴを使用した (図5)。このアプローチは時定数の相対的に高い食物連鎖のチャネルと低いチャネルとを識別するために有効であることが実証された。海草藻場葉上生底生動物群集の場合、藻食性の小型甲殻類や無殻軟体動物は相対的に回転の極めて速いチャネルを形成していた。一方、デトリタス連鎖系を構成すると考えられる雑食性甲殻類やデトリタス食性

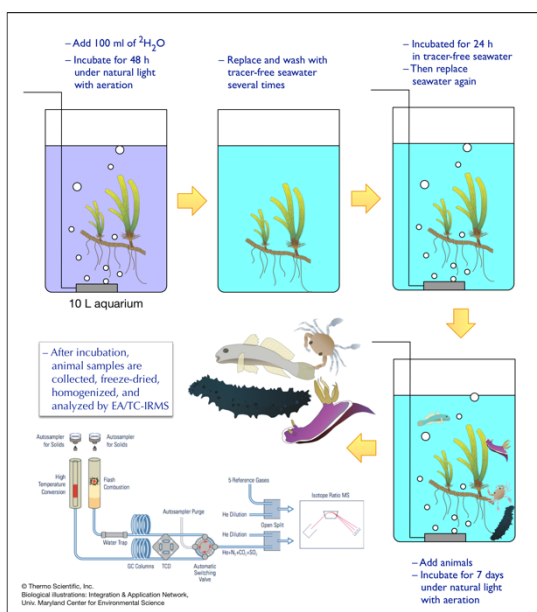


図3. 重水素による食物連鎖追跡実験の基本的な手順。

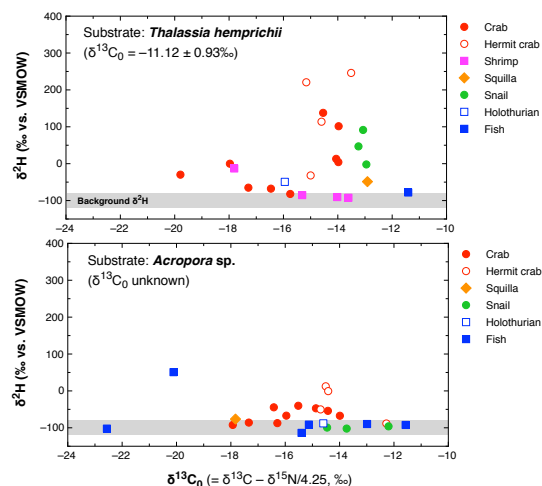


図5. ^2H パルスチェイス法による食物連鎖解析の適用例。海草藻場葉上動物群集にパルスラベルした海草（上）または枝サンゴ（下）を与えて7日間飼育した。

棘皮動物は回転の遅いチャンネルを代表していた。魚類(稚魚)の中でも藻食性のもは比較的回転の速いチャンネルに含まれていた。

(6) 屋外メソコズムを用いた酸性化応答実験

屋外メソコズムによる酸性化実験は 2015 年と 2016 年に行われた。通常海水中で ^2H パルスラベルされたアマモをよく洗浄後、酸性化水槽に移し、底生動物として代表的な植食性動物 2 種、デトリタス食性動物 2 種、雑食性動物 1 種を投入して経過を観察した。酸性化水槽は対照区と酸性化度低・中・高の計 4 段階が設定された。1 週間ごとに各種の動物を 3 個体ずつ採集して分析に供した。

2015 年の実験では酸性化操作の設定で手違いがあり CO_2 濃度が予定より高くなってしまったため、対照区と低酸性化区のみデータしか利用できなかったが、その結果は、海洋酸性化により植食性動物による生食連鎖のチャンネルが弱まる一方、デトリタス連鎖系のチャンネルは顕著な影響を受けないことを示していた。このことは海洋酸性化が底生動物群集のダイナミクスを変化させること、特に、酸性化した環境下ではデトリタス連鎖系の役割が相対的に重要になる可能性を示唆している。しかしながら実験期間が長くなるにつれて植物の新たな一次生産のためにパルスラベルの希釈が進行し、それが動物にも波及して、特に植食性動物において 1 週間目以降にラベル濃度が低下する現象が明瞭に観察されている。したがってパルスチェイス法によって食物連鎖を定量的に解析するために、希釈効果を含めた何らかのモデルを作成してデータに当て嵌め、回転時間や同化効率について定量化を行う手法を今後開発する必要がある。

補助事業期間終了までに得られていたパル

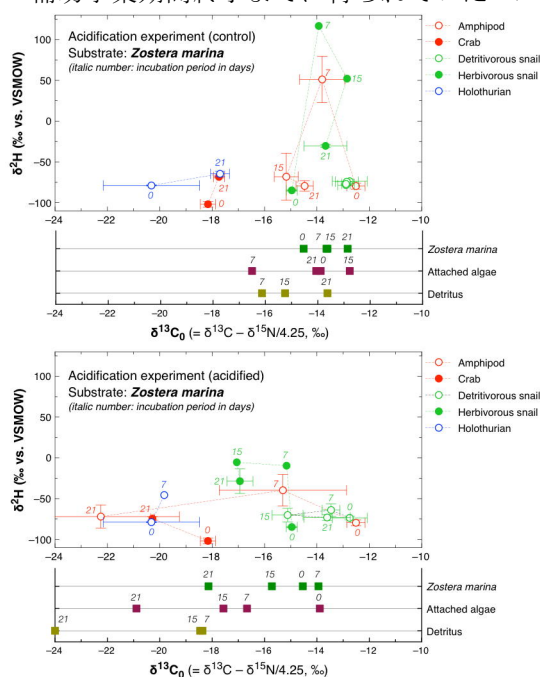


図 6. 酸性化メソコズム実験における動物の ^2H 取込量の変化。上の図は対照区 (pH 8.2)、下の図は酸性化区 (pH 7.2) における結果を示す。

スチェイス実験関係のデータを取りまとめて学会発表⑧として発表した。2016 年にも同様の実験を行っており、現在そのサンプルの分析と結果の整理を急いでいるところである。すべての実験結果を得た後、論文化して発表することを予定している。

本事業で行った実験は、いずれも動物群集における酸性化応答を調べることを意図したものであり、一次生産者における酸性化順応の効果については確認していない。また技術上の問題のため実験期間が比較的短期 (2 ヶ月以内) となっており、動物の生活環全体をカバーすることが意図されていない。一次生産者が環境変動に順応する場合でも生食連鎖・腐食連鎖の対比的な応答の違いが同様に観察されるかどうか、また動物の生活環全体を見た場合に酸性化応答においてボトルネックとなっている段階 (特に発生初期など) がないかどうかは現段階では未解明であり、今後新しい研究プロジェクトを立てて追求すべきテーマである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Miyajima T, Hori M, Hamaguchi M, Shimabukuro H, Adachi H, Yamano H, Nakaoka M (2015) Geographic variability in organic carbon stock and accumulation rate in sediments of East and Southeast Asian seagrass meadows. *Global Biogeochem. Cycles* 29: 397-415. doi:10.1002/2014GB004979.

② Miyajima T, Hori M, Hamaguchi M, Shimabukuro H, Yoshida G (2017) Geophysical constraints for organic carbon sequestration capacity of *Zostera marina* seagrass meadows and surrounding habitats. *Limnol. Oceanogr.* 62: 954-972. doi:10.1002/lno.10478.

[学会発表] (計 8 件)

① 浜口昌巳・宮島利宏・堀正和・島袋寛盛・吉田吾郎: DNA バイオマーカーを利用した海洋堆積物中有機炭素の起源評価の試み. 2013 年日本地球化学会年会, 2013 年 9 月 12 日, 茨城県つくば市.

② Miyajima T: Nutrient sources and export production in coral reefs: A case study on Shiraho coral reef, Southwest Japan. International Workshop of Ocean Acidification in Coral Reefs, 29 September 2013, 東京都文京区.

③ 宮島利宏・堀正和・島袋寛盛・安達寛・浜口昌巳・仲岡雅裕・灘岡和夫: 熱帯・亜熱帯海草藻場堆積物における有機炭素の保存機構—非吸着態有機炭素の重要性とその起源. 2014 年日本地球惑星科学連合大会, 2014 年 5

月 1 日, 神奈川県横浜市.

④ Hori M, Miyajima T, Hamaguchi M: Millenary blue carbon extracted from temperate seagrass-bed sediments using DNA markers. 2nd Asian Marine Biology Symposium, 1-4 October 2014, Cheju, Korea.

⑤ 森本直子・梅澤有・渡邊敦・San Diego-McGlone ML, Ferrera CM, Regino GL, 宮島利宏: 沿岸域における陸源物質動態: 水、DIC, POM 安定同位体比による評価. 2016 年日本地球惑星科学連合大会, 2016 年 5 月 24 日, 千葉県千葉市.

⑥ Miyajima T, Morimoto N, Tanaka Y, Watanabe A, Nakamura T, Yamamoto T, Nadaoka K: Spatiotemporal variation in carbon and nitrogen stable isotope ratios of suspended and settling particles in coral reefs. 2016 年日本地球惑星科学連合大会, 2016 年 5 月 24 日, 千葉県千葉市.

⑦ Hori M, Hamaguchi M, Shimabukuro H, Yoshida G, Miyajima T: Quantitative DNA assays for detecting *Zostera marina* DNA in coastal sediments. JpGU-AGU Joint Meeting 2017, 2017 年 5 月 24 日, 千葉県千葉市.

⑧ Miyajima T, Hori M, Sato M, Hamaoka A, Hamaoka H: Application of deuterium tracer techniques to food-web analysis of seagrass meadows. JpGU-AGU Joint Meeting 2017, 2017 年 5 月 24 日, 千葉県千葉市.

[図書] (計 1 件)

①堀正和・桑江朝比呂 (編著) 『ブルーカーボン——浅海における CO₂ 隔離・貯留とその活用』 地人書館, 2017 年, 276 ページ.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮島 利宏 (MIYAJIMA, Toshihiro)
東京大学・大気海洋研究所・助教
研究者番号: 20311631

(2) 研究分担者

堀 正和 (HORI, Masakazu)
国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・研究員
研究者番号: 50443370

浜口 昌巳 (HAMAGUCHI, Masami)
国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬

戸内海区水産研究所・研究員
研究者番号: 60371960

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

佐藤 允昭 (SATO, Masaaki)
島袋 寛盛 (SHIMABUKURO, Hiromori)
森本 直子 (MORIMOTO, Naoko)
濱岡 明子 (HAMAOKA, Akiko)
濱岡 秀樹 (HAMAOKA, Hideki)