

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15897

研究課題名(和文) 海洋付着動物フジツボとマガキの付着行動に対する光の波長と強度の影響

研究課題名(英文) Effects of light wavelength and intensity on the larval attachment behavior of marine sessile organisms

研究代表者

金 禧珍 (KIM, Hee-Jin)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：10823437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：付着生物の多くは、幼生期に光センサーである眼点を持つ特徴から、幼生に与える光環境の影響を調べた。マガキは付着期のベディベリジャー幼生を、シロスジフジツボはすべての成長段階において眼点を持つためノープリウスI～II、ノープリウスVI、キブリスを対象に眼点の特徴と光反応を調査した。マガキのベディベリジャー幼生が持つ眼点は赤色光を高い値で吸収し、光強度と関係なく赤色光の照射下で正の走光性と高い付着率を示した。シロスジフジツボは、初期成長段階では明確な走光性のパターンが見られなかったが、後期成長段階の幼生は3原色の内、高い眼点吸光度が見られた青色光で正の走光性を示す個体の割合と付着率が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、付着生物が幼生期に持つ眼点の役割が明らかになり、光は岩盤潮間帯で観察される付着生物の帯状分布に影響を与える物理要因の一つであることが証明された。得られた結果は、マガキのような水産有用種に対しては、環境悪化による採苗率低減を解決する採苗記述改良に応用できる。また、フジツボのような汚損生物に対しては、付着防止技術(防汚システム)開発にも寄与する。現在、汚損生物の付着防止のため用いられている化学塗料は、広い範囲で悪影響を及ぼすため、その使用を制限している。本研究で得られた付着を抑制する光条件を用いることにより環境にやさしい防汚システムを構築することができる。

研究成果の概要(英文)：This study employed two sessile organisms the Pacific oyster and intertidal barnacle, and demonstrated the functional effects of eyespot on their phototactic behavior. Eyespot light absorbance as well as phototaxis and attachment were investigated under different light conditions established by the combinations of 6 wavelengths and 3 intensities. The Pacific oyster larvae on attachment stage efficiently absorbed red light and positive phototaxis and higher attachment rate was observed under red light. On the other hand, 3 developmental stages of intertidal barnacle larvae (nauplius I-II, VI, cyprid) showed the different pattern of phototaxis. Initial stage larvae showed no pattern of phototaxis, while the last two stages showed the strongest positive phototaxis and higher attachment rate under blue light among the tested visible lights. The obtained results define the light-response mechanisms that potentially affect the distribution of sessile organisms.

研究分野：動物プランクトン生態学

キーワード：付着生物幼生 光波長 光強度 眼点 走光性 付着行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) **付着期に出現する眼点** 沿岸域に分布する付着生物の大半は二枚貝類とフジツボ類である。カキの場合、孵化直後の D 型幼生は眼点を持たないが、付着期のペディベリシャー幼生になると眼点が形成される。フジツボの場合、孵化直後のノープリウス幼生の段階から単眼を持ち、強い正の走光性を示すが、成長に伴って付着期のキブリス幼生になると複眼が形成され、負の走光性を持つと知られている(図1)。これらの眼点は光を認識するセンサーであり、特に付着期に出現するものに対しては、付着機構との関係が予測されるが、光環境による光走性や付着に関する研究はまだ行われてない。現在、付着機構に関する研究の多くは付着生物の特徴である群集性から同種のタンパク質などのケミカルシグナルに集中されている。

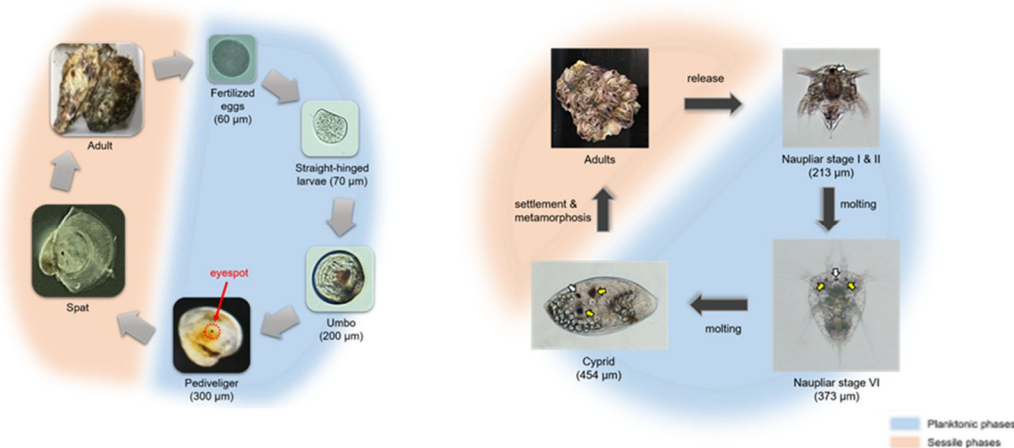


図1 . カキ類(左)とフジツボ類(右、白色矢印、単眼;黄色矢印、複眼)の生活史と眼点の変化

(2) **動物プランクトンの眼点の吸光度と光走性の関連性** 海洋動物プランクトン、シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* species complex、カイアシ類 *Tigriopus japonicus*、ミジンコ *Diaphanosoma celebensis* は眼点を有しており、各種の眼点の吸光度は光波長により異なる。各種の走光性を原色である青、緑、赤の光照射下で調べた結果、眼点の吸光度が高い光波長を認識しやすいことが判明された。一方、正の走光性が現れた光波長下でも、光の強度を増加させることにより、走光性が正から負へと反転、または消失する傾向があり、動物プランクトンの光走性には光の強度も強く影響することが分かっている。また、光の環境はワムシの付着行動にも影響与え、赤色光の照射下で付着率が高くなる傾向が確認されている。これらの現象から、眼点は周辺の光環境すなわち、波長と強度を認識して生物の行動の変化を及ぼすと考えられる。天然海域で観察される付着生物の多くは帯状分布を示しており、付着期の幼生のみ持つ眼点の影響が考えられる。そこで、付着生物の種類により付着期幼生の眼点吸光度は異なり、特定の光条件下で異なる付着率を示すのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は「海洋付着動物の付着行動に対する光の波長と強度の影響」を調べることを目的とする。これまで付着生物の付着機構に関する研究は、同種類から分泌されるタンパク質などの化学シグナル又は環境要因の中でも水温や塩分などの要因に限られてきた。大半の付着生物の幼生は付着期に眼点を持つ。その眼点の役割は光センシングであるにも関わらず、付着機構における眼点の役割はまだ明らかになっていない。

生物の光走性は光センサーと深い関連性を持つが、その特徴を判別する基準を決めることは難しい。本研究は、付着生物の眼点の特徴を明らかにする手段として吸光度を扱うことから独自性を持つ。次に、眼点が出現する現象を基に、光走性と付着機構の関連性を検討する点から創造性を持つ。

3. 研究の方法

本研究では、日本国内の潮間帯に多く分布しているフジツボ類および養殖の対象としても汎用されている二枚貝類マガキを用いた。これらの付着期幼生が持つ眼点の特徴(吸光度)から光走性と付着機構との関係について調べた。

(1) 付着期に出現する眼点の吸光度は付着生物種類により異なるか。

眼点を持った付着期のマガキのペディベリジャー幼生とフジツボのキブリス幼生をそれぞれのスライドガラスに収容した。その後酢酸で固定し、顕微分光システム(顕微分光光度計:米国 Craic Technologies 社製 308PV、光学顕微鏡:Olympus 社製 BX61)を用い、光波長 425 ~ 700 nm の間で眼点色素の吸光度を測定した。吸光度は以下の式で求めた。

$$\text{吸光度 (A)} = \log(I_0/I)$$

I_0 : 試料に対する入射光の強さ、 I : 試料に対する透過光の強さ

はじめに殻のみのリファレンス測定(図2)を行った後、眼点の色素の部分(図2)の測定を行うことで、眼点のみの吸光度を算出した。測定は、1 個体につき 5 回行い、10 個体の平均値を各幼生の眼点吸光度とした。

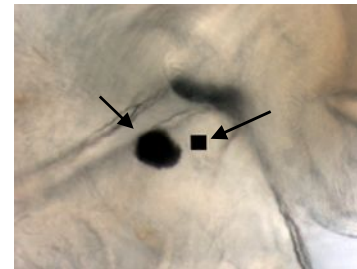


図2 . 眼点吸光度測定:
リファレンス、 眼点

(2) 眼点の吸光度と光環境は幼生の付着行動にどのような影響を与えるのか。

各付着期幼生の走光性を調べるため、直方体のプラスチック容器(15×3×3 cm、図3)を仕切りで水平方向 5 cm 毎に 3 つの空間に分けた容器を用いた。容器の底面は透明プラスチック板、側面は黒色プラスチック板であり、底面以外の所から光透過はなかった。プラスチック容器に 90 % 希釈の過海水(FSW) 20 mL を入れ、2 つの仕切りを付けた後、中央区に幼生 20 個体(1 ind./mL)を収容した。暗室内で 5 分間馴致させた後、仕切りを取り出し、容器の片方の底面から LED を 15 分間照射した。光照射後仕切りを戻し 3 つの区画の幼生個体を計数した。実験区は近紫外線(ピーク波長 375 nm)、青(470 nm)、白(460 と 570 nm)、緑(525 nm)、赤(660 nm)、近赤外線(735 nm)の 6 色の LED を照射した。放射照度は、可視光線は光センサー LI400(LI-COR 社)、近紫外線は強度計 UV-340C(CUSTOM 社)を用いて、5、15、25、W/m²の 3 段階になるようにした。光照射の反対側は約 0 W/m² になるよう LED 光源からの距離を調節した。近赤外線は分光放射照度計 MK-350(UPRtek 社)で 25、50、100 lux の 3 段階に調整した。対照区は暗条件下で同様過程を行った。各光波長と放射照度を組み合わせた 18 実験区と対照区において、6 回ずつ実験を繰り返して行い、それぞれの平均値を求めた。

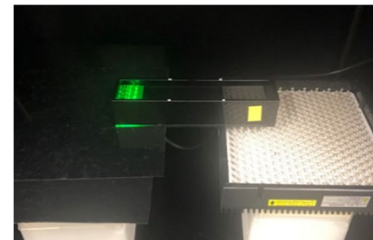


図3 . 走光性実験の様子

(3) ケミカルシグナル(同種のタンパク質)により、光走性パターンは変化するのか。

マガキの場合は、シャーレ(6 cm)に、90 % 希釈 FSW 20 mL と SC 50 mg、付着期幼生 20 個体を収容し、27 °C に設定したインキュベーターに 2 日間静置した。実験区は近紫外線、青、白、緑、赤、近赤外線の 6 色の LED (IS-mini, CCS 社)を真上から連続照射した。照度は光センサー (LI400, LI-COR 社)で、近紫外線、青、白、緑、赤では 5、15、25 W/m² になるように調節した。近赤外線では光センサー (MK-350, UPRtek 社)で 25、50、100 lux になるよう調節した。一方、対照区はシャーレをアルミホイルで包み暗条件とした。静置 24 時間後と 48 時間後に付着個体を計数した。

フジツボの場合、シャーレ(6 cm)に 90 % 希釈 FSW 20 mL と成体抽出液を塗布した陶紙とキブリス幼生 20 個体を収容し、27 °C に設定したインキュベーターに静置してからの 24 時間後と 48 時間後の付着率を求めた。実験区は近紫外線、青、白、緑、赤、近赤外線の 6 色の LED を真上から照射した。底面の放射照度は、事前に行った走光性実験の結果より、正の走光性を示した個体の割合が最も多かった 25 W/m²(近紫外線、可視光線)と 100 lux (近赤外線)に調整した。対照区はアルミホイルで包み暗条件とした。静置 24 時間後と 48 時間後の付着個体数を計数した。これらの値から次の式より付着率を求めた: 付着率 (%) = (付着個体数 / 収容個体数) × 100。

(4) 実海域でも同じ光作用は観察できるのか。

厚さ 3 mm の透明アクリル板を用いて、立方体の基盤 (20×20×3 cm) を作製した。実験区はその基盤の中に線型の LED (BASON 電子技術有限会社) を装着した。その時、装着していないものを対照区とした。作製した基盤の片面に 25 枚のスライドガラス (26×38 mm) を固定させ、付着する生物の分布を観察した。垂下場所は長崎県長崎市時津町西彼杵郡 (32° 8'N, 129° 8'E) にある棧橋とし、準備した基盤を水深約 1 m に垂下した。垂下期間は 2 週間 (2021 年 5 月 7 日 ~ 5 月 21 日、6 月 4 日 ~ 6 月 18 日、6 月 18 日 ~ 7 月 2 日) と 4 週間 (2021 年 7 月 2 日 ~ 7 月 30 日、7 月 30 日 ~ 8 月 27

日、9月28日～10月28日、11月19日～12月20日)にして垂下期間によるLED照射の影響を検討した。垂下期間中、対照区では自然光のみ、実験区では自然光に加えて夜間に青色光または赤色光の強光と弱光を12時間照射した。

垂下終了後、回収した基盤からスライドガラスを取り出し、FSW 100 mLを入れたシャーレ(12 cm)に収容して付着生物の種同定を行った。一眼レフカメラ(EOS kissX10, Canon社製)が装着した実体顕微鏡(SZX-10, OLYMPUS社製)及び、ソフトウェア(EOS Utility, Canon社製)で構成される顕微鏡撮影システムを用いて、スライドガラスに付着した生物の写真を撮影し、後日図鑑等を用いて目レベルまで種同定した。その後、スライドガラスに付着した生物を剥ぎ取り、総乾燥重量を測定した。

(5) 光刺激により、特定遺伝子の発現は変化するのか。

光照射がマガキに与える影響における分子生物学的にメカニズムを明らかにするため、RT-qPCR(Reverse Transcription qPCR)法を用いた。マガキの走光性や付着行動に違いが見られた光照射下で1日暴露させたマガキより総RNAを抽出した。抽出された総RNAからcDNAを合成して、特定の遺伝子の発現量を定量PCRで分析した。

4. 研究成果

(1) 付着生物幼生の眼点吸光度

付着生物種により異なる眼点の吸光度が観察された(図4)。付着期のマガキ幼生は640 nmの付近で最大値を、付着期のフジツボ幼生は、単眼と複眼全てにおいて575 nmで最大値を表した。

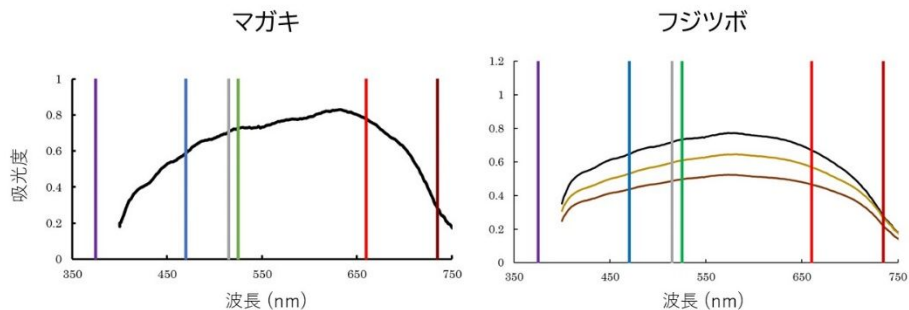


図4. 付着生物幼生の眼点吸光度。マガキペディバリジャー幼生とフジツボキブリス幼生の単眼(黒)と複眼(黄と褐)

(2) 光波長と強度により異なる付着期幼生の走光性

付着幼生の眼点の特徴は走光性に反映され、波長と強度により異なるパターンの走光性が観察された。図5は調査した強度の中で明確な走光性のパターンが見られた時の結果を示す。眼点の吸光度が高かった波長の光照射下では、弱強度でも反応して走光性を示した。マガキ幼生は、眼点吸光度が高かった赤色光のみ明確な正の走光性が観察された。一方、フジツボ幼生の眼点吸光度は可視光線的全範囲で比較的一定しており、走光性も近紫外線以外の光波長で明確な正の走光性のパターンが見られた。

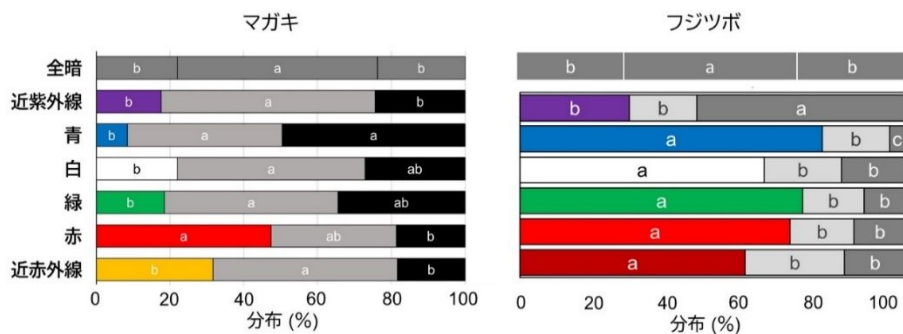


図5. 放射照度 15 W/m²、50 lux の異なる波長の光照射下で付着期のマガキ幼生とフジツボ幼生が示す走光性のパターン

(3) 光環境と幼生の付着行動

特定の照射度下で、波長による付着行動のパターンを観察した。その結果、各付着期幼生は、明確な正の走光性が観察された光条件下で比較的高い付着率を示した(図6)。可視光線の内、マガキ幼生は赤色光で、フジツボ幼生は青色光で最大付着率を表した。

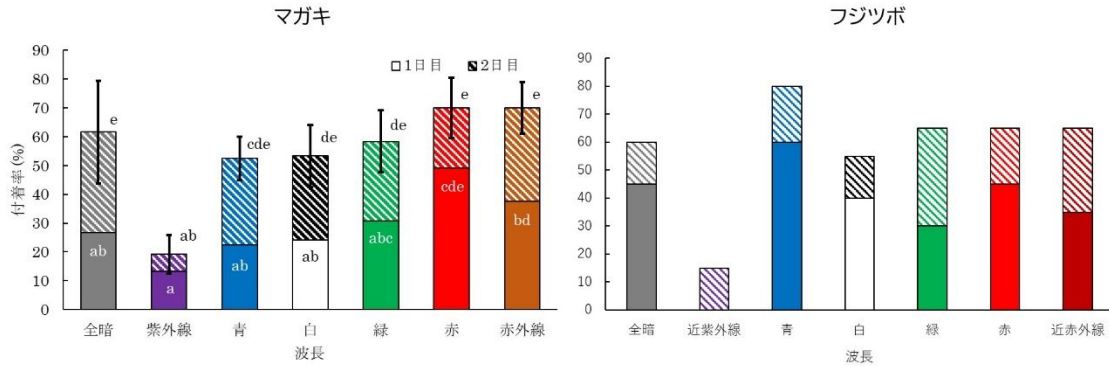


図6. 放射照度 25 W/m² (近紫外線と可視光線) と 100 lux (近赤外線) の6色の光波長がマガキ幼生とフジツボ幼生の付着行動に与える影響

(4) 実海域で実証試験

室内実験の結果を基に、実海域で実証試験を行った。その結果、赤色光では付着生物の分布が多くなる傾向が見られ、青色光では分布が抑制される効果が見られた。今回はそれぞれ異なる季節で観察を行っており、季節を合わせて光照射の影響を再度検討する必要がある(図7)。

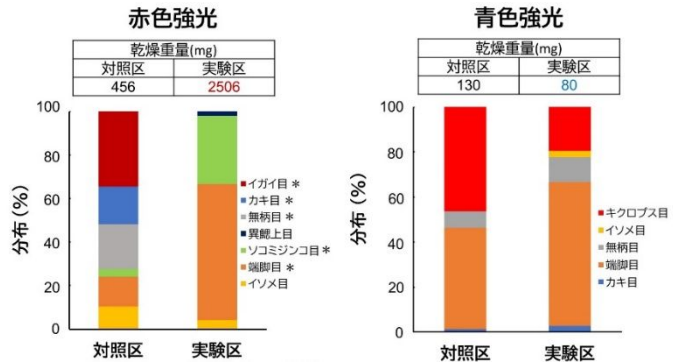


図7. 実海域で行った実証実験結果。異なる波長の光照射が付着生物の分布に与える影響

(5) 光環境とマガキ幼生の遺伝子発現

付着期のマガキ幼生を対象に光条件が特定の遺伝子発現にどのような影響を与えるのか調べた。高い付着率が見られた赤色光と近赤外線、また付着率が低かった青色光の照射下で実験を行った。その結果、付着率が高かった赤色光下では付着行動と関連する遺伝子が強く発現されたが、近赤外線の方では、熱ストレスや環境ストレスに関連する遺伝子が、付着抑制が見られた青色光下と同レベルまで多く発現された。今回はレファレンス遺伝子の発現が安定しなかったため、得られた結果を再度検討する必要がある(図8)。

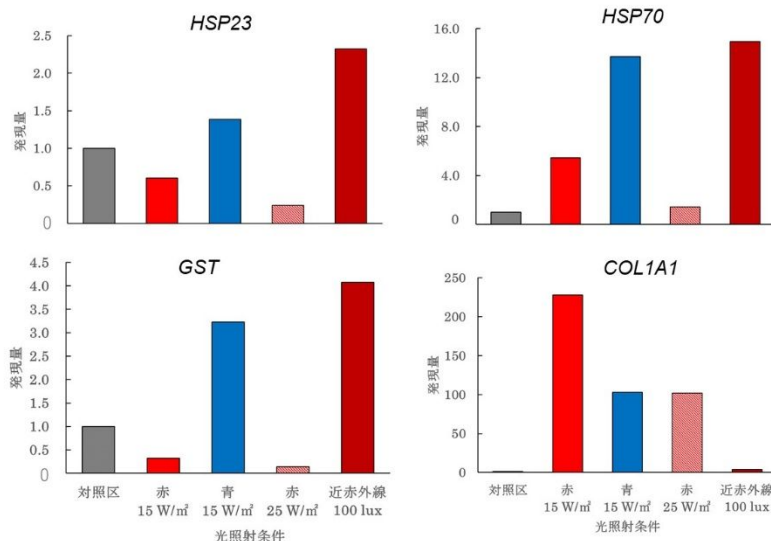


図8. 異なる波長と強度の光照射が付着期マガキ幼生の遺伝子発現に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim Hee-Jin, Suematsu Yumi, Kaneda Hayato, Satuito Cyril Glenn	4. 巻 848
2. 論文標題 Light wavelength and intensity effects on larval settlement in the Pacific oyster <i>Magallana gigas</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hydrobiologia	6. 最初と最後の頁 1611 ~ 1621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10750-021-04550-9	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 該当する

1. 著者名 Kim Hee-Jin, Araki Takumi, Suematsu Yumi, Satuito Cyril Glenn	4. 巻 849
2. 論文標題 Ontogenic phototactic behaviors of larval stages in intertidal barnacles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hydrobiologia	6. 最初と最後の頁 747 ~ 761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10750-021-04744-1	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 XiaoYu Wu, Cyril Glenn Satuito, Hee-Jin Kim
2. 発表標題 Larval settlement of the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> under different light conditions
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hee-Jin Kim, Hayato Kaneda, Cyril Glenn Perez Satuito
2. 発表標題 Effects of light wavelenths and intensities on larval settlement in the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i>
3. 学会等名 World Fisheries Congress
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------