

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370008

研究課題名（和文） 新規同位体計測手法による沿岸海洋生態系における窒素負荷伝播と生態遷移過程の解明

研究課題名（英文） Evaluation of nitrogen loading and its ecological consequences in the coastal marine ecosystem using compound-specific isotope analysis

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

研究成果の概要（和文）： 沿岸海洋生態系、特にサンゴ礁生態系における人為起源窒素負荷の影響を評価するためにアミノ酸の化合物別窒素同位体比分析を適用した。窒素負荷環境勾配を評価する手法として従来のバルク窒素同位体比を利用する方法と比較検討した。飼育実験によりサンゴ宿主・共生藻間の窒素交換様式を解析した。また室内培養実験により腐食食物連鎖の基点となるバクテリアのアミノ酸同位体比パターンの特徴を抽出した。併せて、従来のサンゴ礁研究において見落とされていた大気降下物由来の人為起源窒素負荷量の評価を行った。硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比同時分析、水の酸素・水素安定同位体比同時分析を用いて大気降下物中の窒素の起源・輸送経路解析を行った。

研究成果の概要（英文）： Compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ analysis has been employed to investigate ecological effects of anthropogenic nitrogen loading to the coastal marine ecosystems, particularly coral reefs. Spatial change in $\delta^{15}\text{N}$ along environmental gradient of N loading was compared between the traditional bulk- $\delta^{15}\text{N}$ and the amino acid $\delta^{15}\text{N}$ measurements for both the host corals and the zooxanthellae. The mechanism for internal N exchange between the host coral and the zooxanthellae was investigated by comparing the amino acid $\delta^{15}\text{N}$ pattern among corals incubated under different light and feeding conditions. To evaluate the detrital food chain using the amino acid $\delta^{15}\text{N}$, bacteria were incubated under several different nutritional conditions and compared for the amino acid $\delta^{15}\text{N}$ pattern. We also evaluated the influence of atmospheric N deposition on coral reefs, which has been almost overlooked in previous works. The origin and the transport pathway were estimated using $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of rainwater nitrate, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ of meteoric water, and the backward trajectory analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：海洋生態，環境，窒素負荷，アミノ酸，安定同位体比

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁生態系は世界的にさまざまなス

トレスにさらされ、最近 100 年あまりの間に漸進的な劣化が進んでいる。中でも人為起源

物質負荷による富栄養化ストレスは、過剰水産活動・温暖化・海洋酸性化と並ぶ主要なストレス因子の一つとされているが、富栄養化がサンゴ礁の劣化をもたらす具体的なメカニズムは自明ではなく、幾つかの仮説が並立している状況である。

本研究課題では、富栄養化ストレスの中でも主要な要素である人為起源窒素負荷がサンゴ礁生態系の群集構造や群集代謝に及ぼす影響を解明することを目的とし、このために、最近実用化された新しい安定同位体応用技術である生物組織のアミノ酸の化合物別窒素同位体組成解析を体系的に適用することにより、従来手法では得られなかったメカニスティックな知見を得ると同時に、この新しい手法のポテンシャルを検証することを趣旨としている。

一方、研究計画調書の作成段階では十分に認識していなかったことであるが、サンゴ礁への人為起源窒素負荷に関する最近の知見を精査する中で、大気降水による窒素負荷がサンゴ礁への主要な人為起源窒素供給源となっている可能性を検証する必要性を認めるに至った。従来のサンゴ礁研究では、富栄養化の原因としては、富栄養化した地下水や河川水、処理排水等の流入による水質劣化が集中的に調査研究されている一方、大気降水による寄与についてはほとんど知見がない。このため、本研究課題の中に、最近確立された硝酸塩の窒素・酸素同位体比同時測定法を応用した大気降水起源窒素の解析を含めることにした。

なお、研究開始時点でのサンゴ礁窒素循環に関する知見の水準は、5項の図書①に掲げた総説の中で解説している。また雑誌論文④の中では石灰化に対する富栄養化の影響に関してまとめられている。

2. 研究の目的

(1) サンゴ礁に陸域から供給される人為起源窒素は、窒素固定や外洋に由来する自然起源窒素に比べて同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) が高く、人為起源窒素がサンゴ礁生物に窒素源として利用される寄与率を、生物の $\delta^{15}\text{N}$ を指標として評価できることが、大型藻類等の場合について既に明らかになっている。本研究では、①この手法がサンゴにも適用できるか、②サンゴ宿主と共生藻とで人為起源窒素負荷に対して同様の応答を示すか、③生物体から抽出したアミノ酸の化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ においても生物体全体の $\delta^{15}\text{N}$ と並行的な応答が見られるか、という3つの問題に取り組んだ。

(2) サンゴに対する富栄養化ストレスの機作として、健全時にはサンゴは共生藻に供給される窒素量を制限することで共生藻の密度をコントロールしているところが、富栄養化

によって窒素供給量の制御が効かなくなり、共生藻の密度と代謝が増大して光合成に由来する活性酸素ストレスがサンゴにとって致命的レベルにまで上昇するという仮説が提起されている(下記の学会発表②においてはこの仮説を代謝シミュレーションモデルとして記述している)。本研究では、飼育実験をしたサンゴ宿主と共生藻とのアミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ を調べることによって、サンゴと共生藻との間の窒素交換メカニズムを解明し、上記の仮説との整合性を検証することを目標とした。

(3) 富栄養化ストレスは、サンゴ個体レベルだけでなく群集レベルにも影響する。特に、健全なサンゴ礁で特徴的なサンゴ粘液を基点とする腐食食物連鎖に代わって、栄養塩を直接利用する付着藻類等を基点とする生食食物連鎖の優位性が、富栄養化とともに高まることが考えられる。本研究では、アミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ を使って腐食/生食連鎖比を解析することを最終的な目標として、まずその前提となる、腐食連鎖に重要な役割を持つ微生物分解者(バクテリア)のアミノ酸別 $\delta^{15}\text{N}$ 分布の特徴を明らかにするための室内実験を行った。

(4) 本邦主要なサンゴ礁域である八重山地方沿岸に大気降水物として供給される栄養塩量を評価するための降雨の観測と分析を行った。降雨による窒素負荷量を、他の主要なソースと量的に比較してその重要性を検証するとともに、硝酸態 $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ による生成起源の推定と、気象モデルを利用した流跡線解析による輸送経路推定とを併用することにより、この地方への大気降水物由来窒素の供給状況をトータルに解明することを目標とした。

3. 研究の方法

サンゴ礁における現地調査は、沖縄県石垣島の白保および吹通サンゴ礁で年1回実施した。また別の研究事業で同地に赴いた際にも追加の試料採集等を行った。サンゴは環境省ならびに沖縄県の許可を得た上で採集し、現地研究機関にて宿主・共生藻分離処理を行ったのち、東京大学にて分析を行った。サンゴの飼育実験も現地研究機関にて実施した。飼育実験には造礁サンゴ *Acropora pulchra* を用い、また餌料として *Artemia* を与えた。

降雨試料の採集は沖縄森林管理署の許可を得て沿岸部林内に採集容器を設置して行った。試料は持ち帰り、東京大学及び京都大学で分析した。

バクテリアの培養実験は *Vibrio harveyi* B-352 (ATCC 33842)株を用いた純粋培養系を用いて東京大学にて実施した。培養期間中に

培養細胞をガラス繊維濾紙上に捕集し、元素分析・安定同位体比分析に供した。

各種試料のバルク炭素・窒素安定同位体分析は常法に従って酸処理等を行った上で安定同位体質量分析計にて測定した。アミノ酸の化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ 分析は Chkaraishi et al. (2007) の方法により酸加水分解・精製・誘導体化を行ったのち、ガスクロマトグラフ付安定同位体質量分析計にて分析した。

降雨試料の成分分析は栄養塩自動分析計、イオンクロマトグラフ等により行った。また硝酸態 $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ の分析は Casciotti et al. (2002) の脱窒菌を用いる方法によりガスベンチ付安定同位体質量分析計を用いて測定した。水の $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$ は CRDS 分光分析法により行った。流跡線解析は NOAA の HYSPLIT モデルを利用して行った。

4. 研究成果

(1) 人為起源窒素負荷がサンゴの $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ に及ぼす影響：

人為起源窒素負荷の強度の環境勾配に沿ったサンプリングを行い、サンゴ (*Acropora* spp., *Porites* spp., *Heliopora coerulea*) の $\delta^{15}\text{N}$ を測定したところ、従来から知られていた大型藻類等に見られるのと同様、人為起源窒素の寄与率を反映する $\delta^{15}\text{N}$ の空間変動が確認された。宿主サンゴでも共生藻でもほぼ同一貫した変動が見られた (図1)。このことは、サンゴが他の一次生産者と同様、陸域から人為起源窒素栄養塩が流入している場所ではそれを窒素源として利用して生育していることを示している。

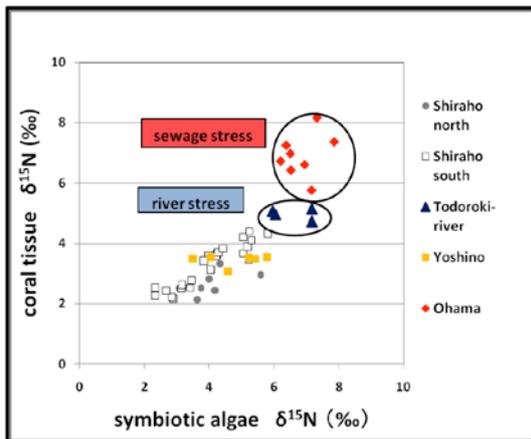


図1. サンゴ組織と褐虫藻の窒素同位体比。下水や河川水の影響のあるサイトでは両者とも高くなっている。

一方、 $\delta^{13}\text{C}$ には富栄養化環境勾配に沿った変化は明瞭ではなく、むしろサンゴの種による違いが見られ、また宿主と共生藻とで異なる値を取る場合が多かった。

サンゴのアミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ は、既往研

究では一次生産者に特徴的とされているものに近いパターンを示した。バルク $\delta^{15}\text{N}$ が人為起源窒素の寄与を反映して変動するのとはほぼ並行的に、各アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ も変動していた。従って窒素の起源評価という目的では、アミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ を測定しても、バルク $\delta^{15}\text{N}$ から得られる以上の情報を得ることは難しいことがわかった。

これらの成果は下記の学会発表⑤において報告した。

(2) 宿主サンゴと共生藻との窒素交換メカニズムの解析：

造礁サンゴが貧栄養な亜熱帯海洋環境下で繁栄することが可能なのは、宿主サンゴと共生藻の間で窒素を内部循環させるメカニズムを発達させているためであると一般に考えられている。この内部窒素循環の機構としては、宿主サンゴ側が老廃物として排泄するアンモニアなどの窒素化合物を、共生体外に出さずに共生藻が再利用しているとする解釈がなされている。一方、共生藻からサンゴ宿主への窒素の移動は、共生藻からの分泌物 (アミノ酸など) をサンゴが利用するという考えと、共生藻細胞をサンゴが摂食し消化して窒素源として利用するという考えとが主張されている。

本研究ではアミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ を活用して内部窒素循環機構にアプローチすることを試みた。石垣島白保サンゴ礁で採集した *Acropora pulchra* を明暗・給餌の有無の条件を変えて2週間飼育して $\delta^{15}\text{N}$ の変化を追跡したところ、暗条件下で給餌した場合に、アミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ から推定される食物段階の値が最高になった。サンゴ宿主だけでなく、共生藻の食物段階も上昇していた。この実験結果は、共生藻は単に宿主サンゴの老廃物を

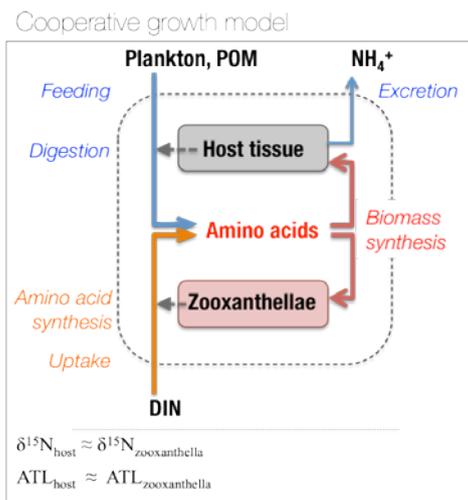


図2. サンゴ-共生藻窒素交換の新しいモデル。ATLはアミノ酸 $\delta^{15}\text{N}$ から推定される食物段階。

利用しているわけではないことを示している。また(1)の調査データからはサンゴ宿主と共生藻とが食物段階としてはほぼ同一であることが示唆され、このことはサンゴが共生藻を消化することでその窒素を利用しているという仮説を否定する。従って本研究の結果は、サンゴ内部の窒素循環機構は従来行われている仮説では十分に説明できないことを明らかにしている。

下記の学会発表④ではこれらの経過を報告するとともに、サンゴ-共生藻窒素交換に関する新しい仮説を提起した(図2)。

(3) バクテリアのアミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$:

バクテリアは動植物とは異なるアミノ酸の生合成系を持つため、そのアミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ は動植物とは異なるパターンを示すと考えられている。食物網の中でも腐食連鎖系は、その基点にバクテリアによる変性を受けたデトリタスを持つためにバクテリア由来のアミノ酸 $\delta^{15}\text{N}$ シグナルが食物連鎖を通して伝達され、その結果、腐食連鎖上にある動物と生食連鎖上にある動物とはアミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ パターンにより識別できる可能性が示唆されている。しかし現状では、基点となるバクテリアのアミノ酸 $\delta^{15}\text{N}$ に関する情報が少ないため、一般の動植物に比べてどのような点で異なるパターンを示すのか明確になっておらず、またその特徴は生態系によっても異なる可能性がある。

そこで本研究では典型的な海洋細菌の *Vibrio harveyi* をさまざまな栄養条件下で培養し、生産される菌体のアミノ酸化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ を比較することを通して、バクテリアに特徴的なパターンを抽出することを試みた。実験の結果、バクテリアのアミノ酸 $\delta^{15}\text{N}$ パターンは培養条件によって或る程度変動し、食物段階に対応する指標で1~2の間のパターンを示すこと、アミノ酸の中でいくつか、一般

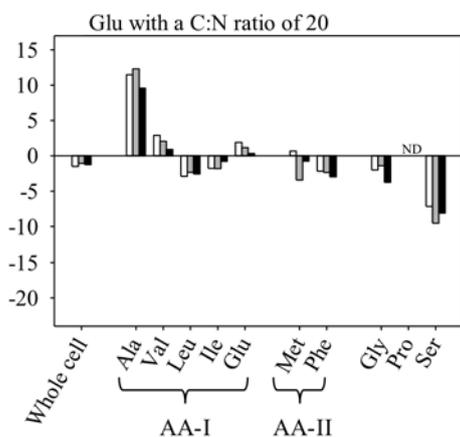


図3. バクテリア培養細胞のアミノ酸別 $\delta^{15}\text{N}$ 。アラニンの $\delta^{15}\text{N}$ が特異的に高くなる例。

の動植物では見られない $\delta^{15}\text{N}$ の変動を示すものがあること、特にアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ が他のアミノ酸に比べて特異的に高くなるケースが多いこと等が明らかになった(図3)。

これらの成果は既に英文の論文にまとめられており、国際的な学術誌に投稿して審査中の段階である。今後、別種のバクテリアを使ってより現場に近い条件で実験を行うなどして情報を蓄積し、一般的な特徴を抽出していく必要がある。特にサンゴ礁においてはサンゴ粘液を基点とする微生物食物網が重要であり、この問題に関しては下記の雑誌論文①~③の中で論ぜられている。

(4) 大気降下物による窒素負荷の評価 :

八重山諸島とその周辺の海域は、わが国の他の部分と同様、東アジアモンスーンの影響下にあり、春~秋季に降る雨と冬季の雨とでは水蒸気の起源が全く異なっている。このことは降水の安定同位体比、特に deuterium excess (d) が季節によって明瞭に異なることに現れている。春~秋季の降雨は主に太平洋起源であり ($d = 4 - 14$)、窒素栄養塩の濃度は通常きわめて低いのに対して、冬季の降雨は中国大陸から吹く季節風に東シナ海の水蒸気が加わって起るものであり ($d = 20 - 30$)、しばしば高濃度の窒素栄養塩を含んでいた。特に中国東北部の工業地帯上空を通過した気流が届いている場合の降雨には時として 1 mM を越える濃度の窒素栄養塩が含まれ、硝酸の $\delta^{18}\text{O}$ は $+90\%$ 以上と寒冷地特有の値を示していた(図4)。また $\delta^{15}\text{N}$ は夏季に比べて 5% 程度高く、石炭燃焼由来の NO_x の寄与が示唆される。しかし、夏季に起こる降雨にも時としてかなり高い濃度の硝酸が含まれている場合があった。このようなケースに流跡線解析を適用すると、気圧配置の一時的な変化によりたまたま大陸方面から気流が流れ込んでいた時期に相当することが判明した。

サンゴ礁域に降雨として供給される窒素の量を推算すると、サンゴ礁域で生物学的窒素固定により自然に生み出されている窒素の総量とほぼ同じになることがわかった。実際にはサンゴ礁海域以外に降った降下物も海水の移流や陸域からの流入によってサンゴ礁域に持ち込まれることがあることを考えると、サンゴ礁の窒素収支への大気降下物の寄与は無視できない量になると考えられる。八重山地方への大気降下物由来窒素負荷量は、数少ない既往研究がある北大西洋亜熱帯域に比べると2倍以上高い。これは大規模な発生源である中国大陸の工業地帯から比較的近いことと、この地域からの大気の輸送を促す冬季のモンスーンとが影響した結果と考えられる。

これらの成果の概要は下記の学会発表①③の中で報告した。また別に英文の総説を執

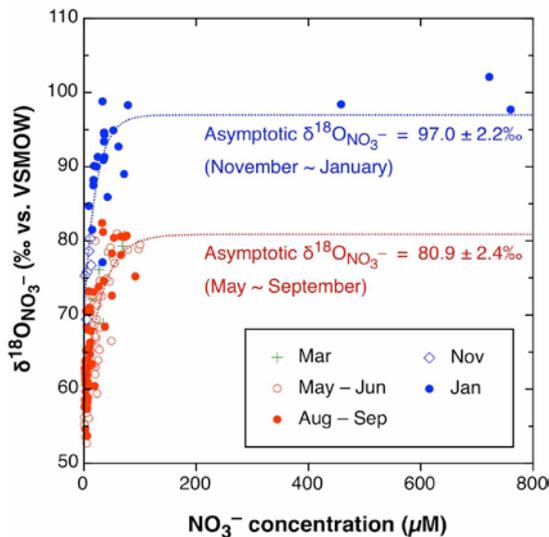


図4. 降雨中の NO_3^- の酸素安定同位体比 $\delta^{18}\text{O}$ と NO_3^- 濃度との関係。冬季の降雨の NO_3^- は寒冷地で発生したものであることを示す。

筆し、学術書に掲載されるべく審査中の段階である。

(5) 研究の現状と今後の展開：

本研究では安定同位体比を利用した新しい窒素循環研究技術であるアミノ酸の化合物別 $\delta^{15}\text{N}$ パターンをサンゴ礁生態学にシステムティックに適用することを主眼として企画された。しかしながら本手法を利用した試料の解析が山場にさしかかった2年目の終わり（2011年3月）に東日本大震災に見舞われ、本補助事業により購入された装置を含め、分析装置全体が利用不能となる事故に見舞われた。その後も、代替機として借用した装置の不調、業者側のミスによる機器更新の遅延、測定に不可欠なヘリウムガスの流通がストップするといった障害が相次ぎ、予定していた試料の分析が大幅に滞っている。このため、当初計画において目標としていた、富栄養化ストレスによる腐食食物網から生食食物網へのシフトという仮説を検証する段階にまで至っていない。

その一方で、当初計画には含まれていなかった大気由来窒素負荷の評価に関しては、別の研究事業で共同研究を行っている複数の作業チームの協力が得られたこともあり、思いのほか順調にデータが集まり、まとまった知見を得ることができた。

本研究で目標としていた腐食/生食食物網の遷移の問題は、もう一つの代表的な大気由来環境ストレスである海洋酸性化の影響との関係においても重要である。サンゴ礁やそれに伴う海藻場における腐食食物網の重要な担い手には、石灰質の殻や骨格をもつ無脊椎動物が多く、これらは海洋酸性化によって特に初期発生の段階で強いストレスを受

けることから、酸性化に伴う大幅な個体群変動が懸念されているためである。したがって本研究で確立を目指していた生態遷移研究の方法論は今後ますます重要度を増すと予想される。私共としても今後新しい研究事業を立ち上げてこの課題に本格的に取り組みたいと考えている。

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5件）

- ① Tanaka Y, Ogawa H, Miyajima T (2011) Bacterial decomposition of coral mucus as evaluated by long-term and quantitative evaluation. *Coral Reefs* 30: 443-449, doi: 10.1007/s00338-011-0729-3 (査読有)
- ② Tanaka Y, Ogawa H, Miyajima T (2011) Production and bacterial decomposition of dissolved organic matter in a fringing coral reef. *Journal of Oceanography* 67: 427-437, doi: 10.1007/s10872-011-0046-z (査読有)
- ③ Tanaka Y, Miyajima T, Watanabe A, Nadaoka K, Yamamoto T, Ogawa H (2011) Distribution of dissolved organic carbon and nitrogen in a coral reef. *Coral Reefs* 30: 533-541, doi: 10.1007/s00338-011-0735-5 (査読有)
- ④ 田中泰章, 宮島利宏, 小川浩史, 林原毅, 小池勲夫 (2009) 栄養塩負荷に対する石灰化応答機構の解明. 月刊『地球』号外 59: 34-38 (査読無)

〔学会発表〕（計8件）

- ① Miyajima T: Seasonal and regional variability in nutrient inputs to sea surface by precipitation. 1st Asia-Pacific Regional Symposium “Coastal Ecosystems Conservation and Adaptive Management”, 2012.11.7, Quezon.
- ② 中村隆志: サンゴの内部素過程を考慮したストレス応答モデルの開発. 日本サンゴ礁学会第15回大会, 2012.11.23, 東京
- ③ 宮島利宏: 八重山諸島サンゴ礁域における大気降水由来窒素負荷の状況とそのサンゴ礁生態系への潜在的影響. 日本地球惑星科学連合2011年大会, 2011.5.24, 千葉市
- ④ 藤井堯典: 造礁サンゴ-褐虫藻間の共生的窒素交換 —アミノ酸窒素安定同位体比による解析—. 日本地球惑星科学連合2011年大会, 2011.5.22, 千葉市
- ⑤ Fujii T: Determination of nitrogen sources for scleractinian corals by compound-specific isotope ratios of amino acids. International Symposium on Isotope Ecology in Kyoto 2010, 2010.11.2, 京都市

〔図書〕（計1件）

- ① Miyajima T, Umezawa Y (2010) Stable isotope composition of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) as a tool for investigating nitrogen cycling in coral reef ecosystems. p. 197-222. In: Ohkouch N et al. (eds.) Earth, Life, and Isotopes, Kyoto University Press.

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

永田 俊 (NAGATA TOSHI)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：40183892

(3)連携研究者

田中 義幸 (TANAKA YOSHIYUKI)

独立行政法人海洋研究開発機構・

むつ研究所・研究員

研究者番号：50396818