

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25740005

研究課題名(和文) 海洋生物の石灰化機構の解明とそれに及ぼす沿岸汚染の影響

研究課題名(英文) Impact of costal water pollution for the calcification of marine organisms

研究代表者

安元 純 (Yasumoto, Jun)

琉球大学・農学部・助教

研究者番号：70432870

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)：本研究ではポリアミンが関与する新たな海洋生物の石灰化機構を提唱し、海洋生物の骨格形成に及ぼす沿岸汚染の影響を検証することを目的とした。その結果、沖縄本島南部地域の琉球石灰岩分布地域において、地下水経由で海域に流出する栄養塩の物質負荷量を算定し、農業活動との関係を定量的に明らかにすることができた。サンゴの稚ポリプ生物活性試験により、硝酸塩に比べてリン酸塩がサンゴの石灰化を強く阻害すること、リン酸塩の種類によってサンゴの石灰化を阻害する度合いが異なることを明らかにした。また、地下水中の浮遊する懸濁物質にはリン酸塩が多く吸着されており、各形態のリン酸塩を海域へ供給していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we propose the new role of polyamine in calcification of marine organisms, and investigated that the effects of coastal pollution of nutrients on the skeleton formation of primary polyps for hard coral *Acropora digitifera*. As a result, the various types phosphate clearly inhibited the skeleton formation of primary polyp at low concentration. In contrast, nitrate did not inhibit the calcification of the primary polyp. And it was revealed that the costal groundwater and spring water in an agricultural region located in the southern part of Okinawa main Island contained relatively high concentration of phosphate and nitrate. Furthermore, the suspended solids in the groundwater adsorbed the various types phosphate supplies phosphate to the sea.

研究分野：農業土木学，地下水文学

キーワード：海洋生物の石灰化機構 地下水 懸濁物質 栄養塩 リン酸塩 サンゴ

1. 研究開始当初の背景

人為的な二酸化炭素が気候変動に与える影響が危惧されているが、地球規模の二酸化炭素の循環はいまだ正確に理解されておらず、1年間で人為的に放出される二酸化炭素:80億炭素トンのうち19億炭素トンが行方不明である(Stephen's, 2007)。海洋への二酸化炭素の吸収量は22億炭素トンと推定されているが、その大部分は海洋水への吸収であり生物相の寄与はほとんど考慮されていない。その理由は教科書的に説明されている海洋生物の石灰化機構にある。すなわち海洋生物が海水中の重炭酸イオン(HCO_3^-)を利用して炭酸カルシウムの骨格を形成した場合、余った水素イオンが海水中に溶けている CO_2 を大気中に戻してしまう。この原理で考えると、海洋生物の石灰化反応は、陸上植物の光合成とは異なり、大気中の CO_2 を固定してはいないことになる。実際にIPCCの報告書においても、海洋生物の骨格形成が CO_2 固定に貢献しているとは説明されていない。しかし、陸上および海底には太古の海洋生物が作り上げた膨大な量の石灰岩が存在する。その総量は地球上の全炭素の約40%を占め、これらの炭酸塩すべてを気体に戻すと CO_2 濃度は原始地球に近い30気圧になると推定されている(1990, 北野)。このことは大気中 CO_2 濃度の減少に海洋生物が多きく関与してきた証拠であり、前述した現在の炭素循環における海洋生物相の見積もりとは大きな矛盾がある。海水中の CaCO_3 濃度は、3~6倍も過飽和と計算されているにもかかわらず、無機的な沈殿は特殊な海域を除いて存在していない。すなわち、海洋環境において炭酸カルシウム形成には生物の関与が必須なのである。従って、無機的な反応式を基に海洋生物の CaCO_3 形成反応を説明し、炭素循環を考えるのは非常に危険である。この大きな矛盾を解消するためには海洋生物による CaCO_3 形成機構の解明が不可欠である。

海洋生物の石灰化機構の研究は、主に骨格中の有機成分の探索が行われ、ナクレインなど多くのタンパク質が同定されてきた。しかし、生物間でそれらタンパク質の一次配列に関連性はなく、 CaCO_3 形成機構への関与も不明な部分が多い(長澤, 2009)。申請者らは、石灰化機構を研究している過程でこれまで主流であった骨格中に存在する Ca^{2+} キレート物質ではなく、空気中の CO_2 の取り込みを促進する物質としてポリアミンに着目している。産業的には、工場排ガスの CO_2 吸収液としてアルカノールアミンなどのアミン類が用いられているが、生体成分であるポリアミンが CO_2 濃縮に関与しているという報告は皆無である。ポリアミンは分子内に複数のアミノ基有する脂肪族アミンの総称で、すべての

生物の細胞内に数mM~数十mMという高濃度で存在しているがその役割には不明な部分が多い。申請者らは海水に細胞内と同程度のポリアミンを添加するだけで、ポリアミンが空気中の CO_2 を溶液中に顕著に溶かし込み、 CaCO_3 が析出することを発見した。

海洋生物が生産するポリアミンが炭酸カルシウム骨格形成に関与しているならば、 HCO_3^- から H^+ をポリアミンが引き抜くため、炭酸カルシウム形成に伴う CO_2 の放出は起こらない。そのため炭素循環における海洋生物相の寄与が増大し、長年謎であったMissing carbon sink問題も解決できる可能性が高い。さらに、ポリアミンによる炭酸カルシウム形成反応は30~40が最適温度であり10以下ではほとんど進行しないことから、サンゴなど大きな炭酸カルシウム骨格を有する生物が熱帯に生息していることや、海底に存在する膨大な量の炭酸塩堆積物が温暖な地域に多い理由を説明できる可能性がある。また、申請者らは、ポリアミンを用いた石灰化反応において、無機リン酸塩、ペプトンなどに特に強い石灰化阻害能があることを見出した。このポリアミンを用いた石灰化反応は Ca^{2+} とポリアミンを混合し、一晩静置するだけの非常に簡便な方法である。反応は緩やかで安定しており、さまざま物質の石灰化に与える影響を検討するのに適している。

現在、サンゴを始めとした石灰化生物の生産量が減少するなど、サンゴ礁形成力が低下している(Death et al., 2009)。主な原因として、地球温暖化や海洋酸性化などの気候変動や人為的影響による沿岸汚染が考えられる。申請者は、科学研究費補助金(若手B_H21~H22)「沖縄本島南部地域における海底地下水湧出がサンゴに及ぼす影響」を通じ、沖縄本島南部地域における詳細な現地観測と数値シミュレーションにより、海域への地下水流出量とそれに伴う栄養塩負荷量を推定した。その結果、後背地の農地で1年間に使用される施肥に含まれる窒素やリンの総量に相当する量の栄養塩が、地下水を經由して沿岸海域に流出していることが明らかになった(安元, 2010)。くわえて、地下水中やサンゴ礁池内の海水中のリン酸濃度はポリアミンによる石灰化を阻害するのに十分な濃度であることを確認している。リン酸濃度が検出限界($<0.1 \mu\text{M}$)以上になると、サンゴの骨格形成を阻害する要因になる可能性が指摘されており(KOOP, 2001; 中野, 2002)、これら報告は、ポリアミンを用いた石灰化反応を数十nM濃度程度のリン酸塩が阻害する実験結果との整合性も高い。実際、調査地域の沿岸海域でも陸域の影響を受けやすいサンゴ礁池内では、サンゴの発達はほとんどみられず、陸域の影響の少ない礁縁部では発達した

サンゴが確認できる。

今後は、サンゴ礁海域における栄養塩に関する環境基準を設け、基準値を達成するために地下水などを經由して陸域から輸送される栄養塩濃度を規制するなどの方策が望まれる。しかしその一方で、褐虫藻と共生するサンゴの複雑な生態から、陸域から供給される栄養塩等の物質との因果関係が明らかになっておらず、明確な環境基準も設定出来ないなど、対策が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

海洋生物の石灰化機構は多くの研究にも関わらず詳細な分子メカニズムは不明である。申請者らは生物に普遍的に存在する物質であるポリアミンが関与する新たな石灰化機構を提唱するとともに自然環境下においてこのメカニズムを検証することを目的として、陸域の地下水及びサンゴの生息する礁池内外の海水中の栄養塩類を継時的にモニタリングすると共に、サンゴの稚ポリブを用いた生物活性試験を研究協力者と共に実施した。

3. 研究の方法

(1) 陸域の地下水及びサンゴの生息する礁池内外の海水中の栄養塩類の動態調査

地下水調査は、海底地下水湧出に伴う栄養塩等の物質負荷量と農業活動（主に施肥）との関係を把握するため、月1回の頻度で実施する。水質測定項目としては、現地測定項目として、水温、電気伝導度（EC）、pH、溶存酸素（DO）、酸化還元電位（ORP）、室内測定項目として主要陽・陰イオン（ NH_4^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 HCO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} ）、溶存有機炭素（DOC）、浮遊懸濁物質（SS）を選定した。地下水調査により各月の地下水中の栄養塩等の溶存物質濃度が明らかになり、海底地下水湧出に伴う栄養塩等の物質負荷量を数値シミュレーションにより算出した。

次に、地下水中及び地下水中に含まれるSSによるリン酸塩の輸送状況を把握する目的で、2015年8月10日に地下水調査を実施した。地下水試料に含まれる溶存態リンおよび全リンの測定はモリブデンブルー吸光光度法を用いた。

最後に、 ^{31}P -NMRを用いた地下水・湧水に含まれるリンの形態分析を実施した。

(2) サンゴの幼生を用いた生物活性試験

サンゴや円石藻などは貧栄養の環境に適応した生物であるため富栄養化した海水中では成長が困難であることが知られている。申請者らがやっているポリアミンを用いた石灰化反応において、無機リン酸塩が比色法による検出限界以下（ $< 0.1 \mu\text{M}$ ）の濃度においても強い石灰化阻害活性が認められた。つ

まり、リンが検出されないよう海域においても実際にはサンゴなどの生育に影響が出ている可能性がある。そこで、実際に石灰化を行う生物を用いて生物検定試験法を確立し、サンゴ幼生の飼育を行い骨格形成に与える影響を詳細に検証する。

サンゴについては産卵期の後、2～3か月は飼育が可能なプラヌラ幼生を用いる。特にミドリイシのプラヌラ幼生は、ヒドラの神経ペプチド Hym-248 を用いて刺激すると、変態・着底が起こることが知られている。着底後約12時間程度では着底面に炭酸カルシウム骨格が広がることが確認できる。その様子は、簡易偏光の倒立顕微鏡を用いることで観察可能であることこれまでに確認済みである。サンゴの成長は非常に緩やかであるため成体を用いた検証は困難であるが、発生初期のプラヌラ幼生を用いることで実験室でもサンゴの石灰化過程の詳細な観察が可能である。沿岸域の商業施設や農作地とサンゴ礁海域の生息環境保護を協力して行っていくため、本実験によりサンゴ礁海域における栄養塩に関する明確な環境基準の目安を明らかにすることを目的とする。

4. 研究成果

(1) 陸域の地下水及びサンゴの生息する礁池内外の海水中の栄養塩類の動態調査

調査地域の土地利用状況（2011年）における農耕地面積660haのうち、花卉類76.11ha、工芸作物405.15ha、野菜類168.16ha及びその他10.58haとなっていた。肥料の年間施肥量は、リン及び窒素それぞれで、36.6t-P/year、161.1t-N/yearとなった。一方、調査地域における家畜は牛1,076頭、豚4276頭、鶏140,000羽であり、この値を基に推定されるリン及び窒素の年間発生量はそれぞれ、130.20t-P/year、227.42t-N/yearと算定された。

2014年3月から2014年11月において実施した月1回の地下水調査から得られた調査地域における地下水中の溶存態窒素（ NO_3^- -N）及び溶存態リン（ PO_4^{3-} -P）の平均値は、それぞれ、8.29 mg-N/L、0.530mg-P/Lであった。次に、調査流域において地下水流動解析を実

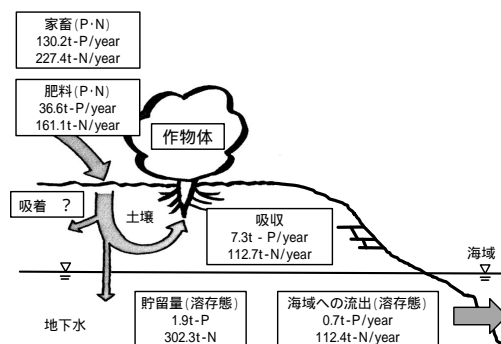


Fig. 1 米須地下ダム流域における栄養塩の物質収支
実施した結果、調査地域における地下水貯留量

は $3.6 \times 10^7 \text{m}^3$, 海域への地下水流出量は $3.7 \times 10^4 \text{m}^3/\text{day}$ と推定された。

以上, 得られた結果を基に, 調査地域における栄養塩の物質収支を推定した (Fig.1)。なお, 作物体における肥料中の栄養塩の吸収量は, リン 20% (7.32t-P/year), 窒素 70% (112.74t-N/year) と仮定した。

Fig.1 より 調査地域の地下水中に溶存している栄養塩量は, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ が 1.9t-P, $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ が 302.3t-N と推定され, リン及び窒素の全負荷量(肥料+家畜)に対して, それぞれ, 1.1%, 78%に相当した。また, 海域への地下水経由の栄養塩負荷量は, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ が 0.7t-P/year, $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ が 112.4 t-N/year と推定され, リン及び窒素の全負荷量に対して, それぞれ, 0.4%, 29%に相当した。リン酸イオンは, 非常に吸着性が強く, 土壌や石灰岩に多くの量が吸着されていると考えられる。しかし, 本地域の地下水の特徴として, 地下水中の浮遊懸濁物質 (SS) が多い (平均値: 170.3mg/L) ことが挙げられ, SS に対するリン酸イオンの吸着量も多いことが予想される。

次に, 2015年8月10日に実施した4ポイントにおける溶存態リンおよび全リン濃度は, Pt.1の地下水は, 溶存態リンが $14.0 \mu\text{M}$ と4ポイントの中で最も多く, 全リンも $15.2 \mu\text{M}$ と同程度であった。Pt.2の地下水は, 全リンが $37.9 \mu\text{M}$ と4ポイントの中で最も多く, 溶存態リンの $3.5 \mu\text{M}$ と比べ10倍以上も高かった。これは, Pt.2の地下水に浮遊懸濁物質 (SS) が多く見られたためと思われる。Pt.3およびPt.4の湧水は, 溶存態リン, 全リンともに $3 \sim 5 \mu\text{M}$ 程度であった。今回調査した4ポイントの地下水および湧水中の平均リン酸塩濃度は, 溶存態リンが $6.26 \mu\text{M}$, 全リンは $15.6 \mu\text{M}$ となった。これらの結果から, 農業地帯の地下水および湧水には, サンゴ稚ポリブの骨格形成を阻害するのに十分な量のリン酸塩が含まれていることがわかった。

(2)で示すサンゴの稚ポリブを用いた生物活性試験の結果と合わせ, 沖縄本島南部地域の地下水・湧水には, CaCO_3 形成阻害が起こる程度あるいはそれ以上の濃度のリン酸塩が含まれていることが明らかになったが, リン酸塩はその形態により阻害の程度が異なるため, その存在形態も明らかにする必要がある。そこで, Pt.1の地下水を濃縮し 250mM NaOH と 50mM EDTA 中で室温および 85°C で2時間処理し, それぞれ ^{31}P -NMR を測定した。室温で処理した場合は, オルソリン酸 (δ : 4.92), ピロリン酸エステル (δ : -11.36) およびポリリン酸 (δ : -49.57) と推定されるピークが検出できた。 85°C で処理した場合には, δ : オルソリン酸 (δ : 4.98) およびピロリン酸 (δ : -5.85) に由来するピークが確認できた。また Pt.4 付近の泥を 250mM NaOH と 50mM EDTA 中で室温および 85°C で2時間処理した。室温で処理した場合は, ポリリン酸 (δ : -49.51) と推定されるピークが検出でき, 85°C で処理した場合には, オルソリン酸 (δ : 5.04)

のピークが確認できた。

(2) サンゴの稚ポリブを用いた生物活性試験

2013年に実施したサンゴのポリブを用いた生物活性試験から, 石灰化面積比の平均がコントロールでは 63.2%であったのに対し, Na_2HPO_4 $1 \mu\text{M}$ ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$: 0.003mg/L) で 20.4%, $50 \mu\text{M}$ ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$: 0.155mg/L) で 1.5%と有意な阻害がみられた。しかし, NaNO_3 10mM ($\text{NO}_3^{-}\text{-N}$: 140mg/L) では 38.7%で有意差はみられなかった。以上の結果, サンゴのポリブの初期の骨格形成の阻害は, 硝酸塩に比べリン酸塩の影響が大きいことが明らかになった。

2015年に実施したサンゴのポリブを用いた生物活性試験では, リン酸塩類 (Na_2HPO_4 , ピロリン酸 Na, エチドロン酸 Na) を添加して飼育した稚ポリブ底面の偏光顕微鏡写真から, 骨格形成はいずれのリン酸塩の場合も, $5 \sim 10 \mu\text{M}$ 以上の濃度で添加した際は, 骨格形成が明らかに遅れることが確認できた。偏光顕微鏡から稚ポリブ底面の石灰化率を求めたところ, $5 \sim 50 \mu\text{M}$ Na_2HPO_4 を添加した場合, 着底 5 日後まで有意な阻害が見られた。 $25 \sim 50 \mu\text{M}$ ピロリン酸 Na を添加した場合, 着底 14 日後まで有意な阻害が見られた。 $0.5 \sim 50 \mu\text{M}$ エチドロン酸 Na を添加した場合, $0.5 \mu\text{M}$ の濃度でも着底 5 日後まで有意な阻害が見られ, $5 \mu\text{M}$ 以上の濃度では着底 14 日後でも有意な阻害が見られた。エチドロン酸 Na はリン酸塩類の中でも顕著な骨格形成阻害を有することが明らかになった。

リン酸塩によるサンゴの石灰化阻害メカニズムに関して考察したところ, リン酸塩は CaCO_3 結晶の核となる CaCO_3 の微結晶に吸着することで結晶形成を阻害し, CaCO_3 結晶が歪になったり大きく成長できなかつたりすることが考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Ko Yasumoto, Mina Yasumoto-Hirose, Jun Yasumoto, Ryo Murata, Shun-ichi Sato, Megumi Baba, Kanami Mori-Yasumoto, Mitsuru Jimbo, Yasukatsu Oshima, Takenori Kusumi, Shugo Watabe, 2014, August, Biogenic Polyamines Capture CO_2 and Accelerate Extracellular Bacterial CaCO_3 Formation, Marine Biotechnology, 16:465-474(平成 26 年度 マリンバイオテクノロジー論文賞受賞), 査読あり。
2. 安元純, 阿部真己, 中野拓治, 2015 年 2 月, 琉球石灰岩帯水層における広域地下水流動モデルの構築, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.71, No.4: I_217-I_222, 査読あり。

[学会発表] (計 15 件)

1. Ko Yasumoto, Mina Yasumoto-Hirose, Jun Yasumoto, Kanami Mori-Yasumoto, Mitsuru Jimbo, Takenori Kusumi, Shugo Watabe, Biogenic Polyamines Capture CO₂ and Accelerate Extracellular Bacterial CaCO₃ Formation, December 15 - 20, 2015, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, Oral.
 2. 安元剛, 飯島真理子, 神保充, 渡部終五, 廣瀬(安元)美奈, 安元純, 2015年12月, リン酸塩のサンゴ石灰化阻害機構と石灰岩帯水層中の濃度, 第10回バイオミネラルイゼーションワークショップ, 東京大学本郷キャンパス, 口頭.
 3. 飯島真理子, 安元剛, 神保充, 渡部終五, 廣瀬美奈, 安元純, リン酸塩はサンゴにとって脅威か?, 第18回日本サンゴ礁学会大会, 2015年11月, 慶應義塾大学三田キャンパス, ポスター.
 4. 安元純, 仲本一喜, 安元剛, 廣瀬美奈, 2015年11月, 琉球石灰岩帯水層におけるリン酸塩の挙動とそれが及ぼすサンゴの石灰化への影響, 第16回地下環境水文学に関する研究集会, 土木学会水文部会地下環境水文学研究グループ, 大同大学, 口頭.
 5. 安元純, 仲本一喜, 安元剛, 廣瀬美奈, 中野拓治, 2015年9月, サンゴの石灰化にリン酸塩が及ぼす影響, 第18回日本水環境学会シンポジウム(2015年度), 熱帯・亜熱帯地域における水環境の現状・課題と保全・創造への取組 熱帯・亜熱帯地域の水環境研究委員会, 信州大学工学部, 口頭.
 6. 安元純, 仲本一喜, 中野拓治, 安元剛, 廣瀬(安元)美奈, 2015年5月, サンゴ礁海域への地下水経由の栄養塩負荷量の推定と富栄養化がサンゴの石灰化に及ぼす影響, 日本地球惑星科学連合2015年大会 A-HW27 流域の水及び物質の輸送と循環 - 源流域から沿岸域まで -, 幕張メッセ, 口頭.
 7. 飯島真理子, 安元剛, 神保充, 廣瀬美奈, 安元純, 渡部終五, 2015年5月, リン酸塩がサンゴ稚ポリプの石灰化に及ぼす影響, 第17回マリンバイオテクノロジー学会大会, 東京海洋大学, ポスター.
 8. 飯島真理子, 安元剛, 神保充, 廣瀬美奈, 安元純, 渡部終五, 2015年3月, サンゴ稚ポリプの骨格形成にリン酸塩が与える影響, 平成27年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 口頭.
 9. 仲本一喜, 安元純, 中野拓治, 安元剛, 廣瀬(安元)美奈, 2015年3月, サンゴ礁海域への地下水経由の栄養塩負荷量の算定とサンゴへの影響評価, 第49回日本水環境学会年会(2014年度), 金沢大学, ポスター(日本水環境学会年会学生ポスター発表賞(ライオン賞)受賞).
 10. 安元純, 阿部真己, 中野拓治, 2015年2月, 琉球石灰岩帯水層における広域地下水流動モデルの構築, 土木学会59回水工学講演会, 早稲田大学 西早稲田キャンパス, 口頭.
 11. 飯島真理子, 安元剛, 宇野興一, 神保充, 安元純, 廣瀬美奈, 渡部終五, 2014年12月, ココビミドリイシ稚ポリプの石灰化機構に関する研究, 第9回バイオミネラルイゼーションワークショップ, 東大柏キャンパス, ポスター.
 12. 飯島真理子, 安元剛, 神保充, 廣瀬美奈, 安元純, 渡部終五, 2014年8月, ココビミドリイシ稚ポリプの石灰化にリン酸塩が与える影響, 第27回北里大学バイオサイエンスフォーラム, 北里大学相模原キャンパス, ポスター.
 13. 安元剛, 飯島真理子, 神保充, 安元純, 廣瀬美奈, 渡部終五, 2014年5月, 栄養塩がサンゴ幼生の石灰化に与える影響, 第16回マリンバイオテクノロジー学会大会, 三重大学生物資源学部校舎(三重県津市), 口頭.
 14. 安元剛, 飯島真理子, 神保充, 安元純, 廣瀬美奈, 渡部終五, 2014年5月, 栄養塩がサンゴ幼生の石灰化に与える影響, 第28回海洋生物活性談話会, 九州大学生物資源環境科学府附属水産試験所およびサンピア福岡(福岡県福岡市), 口頭.
 15. 飯島真理子, 安元剛, 神保充, 渡部終五, 廣瀬美奈, 安元純, 2014年3月, サンゴ幼生の石灰化にリン酸塩が与える影響, 平成26年度日本水産学会春季大会, 北海道大学函館キャンパス(北海道函館市), 口頭.
- 〔図書〕(計 0件)
なし
- 〔産業財産権〕
○出願状況(計 0件)
なし
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織
(1)研究代表者
安元 純 (YASUMOTO Jun)
「琉球大学 農学部 助教」
研究者番号: 70432870
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし