

Environment Research and Technology Development Fund

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

4-1806 サンゴの白化現象メカニズム究明と大規模白化に対する  
生物化学的防止・救済策の確立  
(JPMEERF20184006)  
平成30年度～令和3年度

Investigating Coral Bleaching Mechanisms and Potential Biochemical Prevention/Rescue Measures

〈研究代表機関〉  
琉球大学

〈研究分担機関〉  
東京大学  
筑波大学  
東京工業大学

〈研究協力機関〉

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和4年5月

## 目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	1
2. 研究開発目的	2
3. 研究目標	2
4. 研究開発内容	4
5. 研究成果	4
5-1. 成果の概要	4
5-2. 環境政策等への貢献	5
5-3. 研究目標の達成状況	5
6. 研究成果の発表状況	6
6-1. 査読付き論文	6
6-2. 知的財産権	6
6-3. その他発表件数	6
7. 国際共同研究等の状況	6
8. 研究者略歴	7
II. 成果の詳細	
II-1 サンゴ体内の活性酸素生成軽減および抗酸化作用増強による白化防止 (琉球大学)	
要旨	8
1. 研究開発目的	9
2. 研究目標	9
3. 研究開発内容	9
4. 結果及び考察	10
5. 研究目標の達成状況	18
6. 引用文献	19
II-2 サンゴの栄養供給経路の可視化とそれに基づく白化予防・救済戦略の構築 (東京大学)	
要旨	20
1. 研究開発目的	20
2. 研究目標	21
3. 研究開発内容	21
4. 結果及び考察	22
5. 研究目標の達成状況	31
6. 引用文献	31
II-3 オミックスとマイクロスケールから見る白化現象に対する適応性 (筑波大学)	
要旨	33

1. 研究開発目的	.....	34
2. 研究目標	.....	34
3. 研究開発内容	.....	34
4. 結果及び考察	.....	35
5. 研究目標の達成状況	.....	40
6. 引用文献	.....	40
II-4 生体内反応を考慮した白化モデルの開発と白化防止・救済策の効果予測 (東京工業大学)		
要旨	.....	42
1. 研究開発目的	.....	42
2. 研究目標	.....	42
3. 研究開発内容	.....	43
4. 結果及び考察	.....	43
5. 研究目標の達成状況	.....	54
6. 引用文献	.....	55
III. 研究成果の発表状況の詳細	.....	57
IV. 英文Abstract	.....	61

## I. 成果の概要

課題名 4-1806 サンゴの白化現象メカニズム究明と大規模白化に対する生物化学的防止・救済策の確立

課題代表者名 藤村 弘行 (琉球大学理学部海洋自然科学科教授)

重点課題 主：【重点課題12】生物多様性の保全とそれに資する科学的知見の充実に向けた研究・技術開発

副：【重点課題】なし

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (4-3) 大規模白化現象に対応するサンゴ群集の保全再生技術の開発

研究実施期間 平成30年度～令和3年度  
但し、新型コロナウイルスの影響のため、令和3年度まで延長

### 研究経費

92,603千円（合計額）

（各年度の内訳：平成30年度：28,763千円、令和元年度：31,920千円、令和2-3年度：31,920千円）

### 研究体制

（サブテーマ1）サンゴ体内の活性酸素生成軽減および抗酸化作用増強による白化防止  
(琉球大学)

（サブテーマ2）サンゴの栄養供給経路の可視化とそれに基づく白化予防・救済戦略の構築  
(東京大学)

（サブテーマ3）オミックスとマイクロスケールから見る白化現象に対する適応性 (筑波大学)

（サブテーマ4）生体内反応を考慮した白化モデルの開発と白化防止・救済策の効果予測  
(東京工業大学)

### 研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 地球温暖化、サンゴの白化現象、活性酸素、安定同位体比、網羅的遺伝子解析、生態系モデリング

### 1. はじめに（研究背景等）

近年、世界的にサンゴ礁の衰退が危惧されている。特に地球温暖化の影響によるサンゴの白化現象の頻発は大きな問題となっている。2016年には世界中で白化現象が起り、日本でも沖縄県石垣島近海の石西礁湖などで大規模な白化が発生した。世界最大のサンゴ礁グレートバリアリーフを持つオーストラリアでは学際的なチームが調査研究を進め、いち早く調査結果を世界に発信したことは記憶に新しい (Hughes et al. 2017, Nature)。しかし、白化現象のメカニズムに対する知見が未だ不足しているため

サンゴを白化から守る有効な手段が乏しく、NOAAのアラート等で白化の発生がある程度予測できるようになった今でもただ推移を見守るしかないのが現状である。

サンゴの白化は、共生藻類が抜け出て白色の骨格が透けて見える現象である。白化したサンゴは共生藻から光合成産物が得られなくなるため、長期間の白化は死に直結する。白化のメカニズムとして有力なのは活性酸素(ROS)の細胞毒性である(樋口、湯山ら 2014)。ROSは特に高水温時の光化学反応で多量に生成することがわかっている。有効な白化回避手段として、遮光メッシュを用いた物理的方法がこれまでに提案されている(Coelho et al. 2017)。但しこの方法では、生態系に対する人為操作の負荷が大きく、またサンゴの成長に必要な光も同時にカットしてしまうため、サンゴの成長が阻害される欠点がある。サンゴ礁全域に適用するには作業量を含めて多大なコストが必要となることも難点である。

一方、申請者らの研究により、ROSに対する抗酸化能力が増加したサンゴでは、白化が軽減される可能性が示唆され、また低濃度の無機金属亜鉛(Zn)への曝露が抗酸化酵素活性を向上させることが明らかとなっている(Higuchi, Fujimura et al. 2012等)。これらの知見を基に、栄養状態の改善など抗酸化能力の向上方法を適用することで、効果的で生態系への負荷が小さい代替的白化救済策が実現できるのではないかと考えた。

## 2. 研究開発目的

本研究では、サンゴ白化のメカニズムと諸要因を究明し、白化の素過程の理解を基に生物化学的観点からサンゴの白化に対する具体的な予防、軽減、救済策を提案するとともに、その効果と実施可能性を実証することを目的とする。

## 3. 研究目標

<p>全体目標</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・サンゴの栄養状態または抵抗力を人為的に強化することによって、サンゴの白化現象を生態系スケールで緩和し、生残率を向上させるための方策を提案する。</li> <li>・白化緩和・救済技術の正負の効果と実用性を説明し検証するための基礎理論・分析指標・シミュレーション技術を確立し、提案されている技術を理論的に評価するとともに、実験系において吟味する。</li> <li>・石西礁湖に適用されることを前提として、本研究で提案される技術の実地評価を行なう。</li> </ul>
<p>サブテーマ1</p>	<p>サンゴ体内の活性酸素生成軽減および抗酸化作用増強による白化防止</p>
<p>サブテーマリーダー /所属機関</p>	<p>藤村弘行／琉球大学</p>
<p>目標</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・白化防止に寄与する金属含有酵母、プランクトン、過酸化水素等の添加、UV制御の操作により生残率を1.5倍以上向上させる効果のある方法を選定する。</li> <li>・金属含有酵母およびそれを含む餌の添加によりサンゴの抗酸化活性を2倍程度向上させることのできる方法を選定する。</li> <li>・野外添加実験やチャンバー実験、移植操作実験等により、フィールドにおいても抗酸化活性と褐虫藻密度等の向上が実験室と同等に得られるような方法を検討する。</li> </ul>

サブテーマ 2	サンゴの栄養供給経路の可視化とそれに基づく白化予防・救済戦略の構築
サブテーマリーダー/所属機関	宮島利宏/東京大学
目標	<ul style="list-style-type: none"> <li>・救済技術の検証と重点保護区の監視に応用するため、安定同位体比と化学組成に基づくサンゴの健全性診断指標を4種類以上策定して実測データで検証する。</li> <li>・摂餌による栄養供給の判定に用いるアミノ酸窒素同位体比分析の分析精度を反復誤差0.2%以内まで向上させる（既往研究では30 ng Nの試料に対して0.5%）。</li> <li>・各国で開発が進められている代表的な白化予防救済技術3種以上を批判的に検討し、その実効性・費用対効果・副次影響を評価するための枠組を提示する。</li> </ul>

サブテーマ 3	オミックスとマイクロスケールから見る白化現象に対する適応性
サブテーマリーダー/所属機関	アゴスティーニ シルバン/筑波大学
目標	<ul style="list-style-type: none"> <li>・高水温などのストレス耐性や骨格形成遺伝子、金属に関連した遺伝子群の発現変動、共生菌の個体群変動から救済技術のメカニズムや副作用に関係する遺伝子群および細菌叢を特定する。</li> <li>・白化現象のメカニズムを調べるため、マイクロセンサー技術を用いてST4が開発しているモデルのバリデーションに必要な3つのパラメーター(光合成量、光阻害による光合成効率の低下、光条件下の呼吸量)の取得を目指す。</li> <li>・対策で用いる餌の効果が期待できる最小限の濃度を飼育実験によって求め、環境基準値以下となるよう方策を検討する。</li> </ul>

サブテーマ 4	生体内反応を考慮した白化モデルの開発と白化防止・救済策の効果予測
サブテーマリーダー/所属機関	中村隆志/東京工業大学
目標	<ul style="list-style-type: none"> <li>・既往文献およびサブテーマ1-3の実験結果を基に、サンゴが白化現象の際に引き起こされる妥当な生体内反応を推定し、それらの生体内反応を組み込むことでサンゴの白化プロセスや白化に伴うサンゴの死亡率、および白化からの回復過程を、Willmott (1981) のSkill Index (1が完全一致、0が不一致) において0.7以上の精度で再現出来る白化モデルの開発を行う。</li> <li>・サブテーマ1-3の実験結果から、白化防止・救済策を講じた際の生体内反応を理解し、そのプロセスを白化モデルに組み込み、WillmottのSkill Index で0.65以上の精度でサンゴの応答を再現出来るようにする。</li> <li>・白化モデルを3次元流動モデルに結合して生態系スケールに拡張する。</li> <li>・上記結合モデルを石西礁湖海域に適用し、防止・救済策の有無で白化状況にどの程度違いが出るかを数値シミュレーションによって推定することで対応策の実効性を検証できるようにする。</li> </ul>

#### 4. 研究開発内容

本研究ではサンゴの白化に対する生物化学的技術による防止・救済策の確立を目指す。サブテーマはそれぞれ、①抗酸化酵素の活性向上に関する研究（白化の近接因子の究明：琉球大）、②サンゴの栄養供給経路に関する研究（遠隔因子の究明：東京大）、③栄養供給の改善や抗酸化活性の向上の生理・生化学的効果を診断する技術に関する研究（分子レベルの適応操作の究明：筑波大）、④提案されたサンゴの白化防止・救済策を実海域に適用した場合の効果の検証（モデルによる白化防止・救済策の組織化：東工大）で構成され、各班の成果を共有し活用しつつ目標達成を目指す。

本研究では、白化の際の活性酸素種（ROS）防御機構である抗酸化物質とサンゴの栄養状態に着目し、防止・救済策を立案する。そのために、体内金属の富化による酵素活性の上昇、UV遮蔽による体内のROS生成軽減を試み、白化の防止に寄与するか検証する。また、サンゴの栄養供給経路を解明し、栄養供給の改善によりサンゴの健全性・高温耐性を維持増進することで白化を予防する方法、並びに白化発生時に従属栄養的エネルギー獲得をサポートし白化回復を促進する方法を開発する。さらに、マイクロセンシング技術や網羅的遺伝子発現解析を用いてこれらの手法の効果を検証するとともに、エネルギー要求量の算出、遺伝子レベルでの悪影響の評価（バクテリア個体群解析）も同時に行う。室内飼育実験や屋外水槽実験により、これらの防止・救済策の効果の検証を行う。その後、屋内添加実験により現場海域へ適応する際により効果の高い餌の評価を行う。これらと並行して、環境に対するサンゴの白化応答やそこからの回復過程までを記述できる白化モデルの開発を行い、白化抑制効果や白化からの回復促進効果の再現を行う。このモデルを流動場モデルに統合して生態系スケールに拡張し、防止・救済策の有無で白化状況にどの程度違いが出るかを数値シミュレーションによって推定することで対応策の実効性を検証する。さらに個別の生態系に適した対応策およびその実施規模・期間の決定を支援するシステムを作る。

最終的には、各自白化予防・救済策の効果範囲や費用対効果を検討することで、将来のサンゴ大規模白化に備えた効果的な白化防止・救済策を提案する。

#### 5. 研究成果

##### 5-1. 成果の概要

本研究では、白化の際の活性酸素種（ROS）防御機構である抗酸化物質とサンゴの栄養状態に着目し、防止・救済策を立案する。体内金属の富化による酵素活性の上昇においては、アルテミア幼生の添加によってサンゴの褐虫藻密度は高水温でも増加したままの状態を維持していることが示された。さらに、Fe酵母とアルテミア幼生の添加はサンゴの褐虫藻に含まれる抗酸化酵素の活性を強化することが示された。また、アルテミア幼生とMn酵母添加では3週間の高水温処理を経た後に、無給餌のサンゴよりも生残率が1.6倍高いことが示された。これらの餌の給餌により白化後により多くのサンゴが生き残ることや短い高温期間であれば白化後のすみやかな回復が期待できることを示した。

また、サンゴの栄養状態の改善により健全性・高温耐性を維持増進することで白化を予防し、回復を促進する方法の開発では、サンゴの貯蔵脂質、従属栄養依存度、窒素栄養塩の供給源、共生藻との栄養的共役度を反映する指標をまず開発した。これを使って各種餌を給餌したときの栄養状態を評価し、サンゴはアルテミア幼生を栄養源として同化し、脂質を貯蔵していることが示された。これによりサンゴの栄養状態が餌料投与により実際に改善していることを示した。さらに、サンゴ白化防止策として提唱されている生物化学的各種技術に関して実際の効果と作用機作をレビューし、モデル実験系を使ってその効果を検証した。

さらに、マイクロセンシング技術や網羅的遺伝子発現解析、バクテリア個体群解析を用いてこれらの手法の効果を検証し悪影響の評価を行った。アルテミア幼生を供与したサンゴでは有機物や糖代謝などの代謝関連の遺伝子発現が上昇し、温度により発現変動する遺伝子が給餌により抑制されていることから、ストレス緩和効果が示された。グルタミン酸合成酵素やアンモニウム輸送に関わる代謝関連の遺伝子発現が高いサンゴほど生存率が高く、逆に細胞毒性に関する遺伝子を発現するサンゴほど生存率が低いこ

とが明らかになった。サンゴの健全度の指標となる共生細菌のエンドゾイコモナスは、給餌の影響で減少する傾向は見られず、病原性微生物の増加もなかったことから、給餌がサンゴの細菌叢変化や有害バクテリアの繁殖を引き起こさないことが示された。

これらの対策の選定と評価の過程で実験的に取得した生理学的・生物化学的パラメーターと高温環境におけるサンゴの応答・回復特性を合理的に説明できるサンゴ-褐虫藻の共生系における白化モデルを開発し、実海域での大規模白化を再現するモデルへ拡張した。餌によって栄養状態が良くなったサンゴは栄養状態が悪いサンゴの1/3以下の期間で回復することがシミュレーションで示され、白化の緩和や白化からの回復にはサンゴの栄養状態を良好に保つことが重要であることがモデルからも支持された。

## 5-2. 環境政策等への貢献

### <行政等が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

### <行政等が活用することが見込まれる成果>

サンゴの白化は共生している褐虫藻が排出する活性酸素種の発生量を低減させるための処置であり、(1) 褐虫藻が自身のクロロフィル量を減らす、(2) サンゴが褐虫藻を排出し褐虫藻密度を下げる、このどちらの状態であるかによって白化による消耗の度合いや回復速度が異なることがシミュレーションによって明らかとなった。サンゴの白化の影響を低減し回復を早めるためには、(1)の白化状態に留める必要があり、そのためには、サンゴの栄養状態を良好に保つ必要がある。2016年の夏に沖縄県の石西礁湖で大規模に白化したサンゴ種において、動物プランクトンであるアルテミア幼生の添加による栄養状態の改善を行い、白化そのものを防止することはできなかったが、アルテミア幼生の添加は白化後の生存率を高め、白化からの回復効果を期待できることが示された。

プランクトンの給餌を含めた各種の人為的な白化救済技術は技術上の制約やコスト面の問題から広範なサンゴ礁域に適用することには困難な課題が伴うが、白化後の生態系再生過程を支持するためにサンゴ幼生供給拠点となる重点保護区域を設置し、その区域のみに救済技術を適用することが現実的であるとする提言を環境省の石西礁湖自然再生協議会等の場で行っていく。

## 5-3. 研究目標の達成状況

・サンゴの栄養状態または抵抗力を人為的に強化することによって、サンゴの白化現象を生態系スケールで緩和し、生残率を向上させるための方策を提案する目標に関しては、実験室での水槽レベルで生残率を向上させることができ、アルテミア幼生を添加する方法で白化の際に1.6倍の生残率を達成することができた。しかし、生態系スケールで白化現象を緩和する方法として、モデルの開発までは達成することができたが、摂食速度や同化効率などパラメーターの推定が困難であったため、実海域での効果を検証するシミュレーションの実施には至らず、サンゴ礁スケールでの方策提案は達成することができなかった。

・白化緩和・救済技術の正負の効果と実用性を説明し検証するための基礎理論・分析指標・シミュレーション技術を確立し、提案されている技術を理論的に評価する目標に関しては、サンゴの生理的な状態を基礎として生物化学的に白化緩和・救済技術として、各種餌の添加による方法、紫外線遮光による方法、過酸化水素添加による方法等を検証し、サンゴの抗酸化能や栄養状態を向上させるための理論や分析指標、シミュレーション技術を確立した。したがってこの目標は概ね達成している。

・石西礁湖に適用されることを前提として、本研究で提案される技術の実地評価を行うことに関しては、コロナ禍における活動制限により野外実験を遂行することができず、計画変更を余儀なくされた。そのため石西礁湖に適用するためのモデルは完成したが、その実地評価を行うことはできなかった。

## 6. 研究成果の発表状況

### 6-1. 査読付き論文

<件数>

6件

<主な査読付き論文>

- 1) Yuyama I, Ishikawa M, Nozawa M, Yoshida M, Ikeo K (2018). Transcriptomic changes with increasing algal symbiont reveal the detailed process underlying establishment of coral-algal symbiosis. *Scientific Reports*, 8, 16802. IF 4.380
- 2) Fujii, T., Tanaka, Y., Maki, K., Saotome, N., Morimoto, N., Watanabe, A., & Miyajima, T. (2020). Organic carbon and nitrogen isoscapes of reef corals and algal symbionts: Relative influences of environmental gradients and heterotrophy. *Microorganisms*, 8, 1221. doi:10.3390/microorganisms8081221. Impact factor 4.128 (2020)
- 3) 中村隆志, (2020) 複合環境影響評価のためのサンゴ礁生態系モデル開発にむけて: サンゴポリプモデルの開発と流動-物質循環モデルとの連成, *日本サンゴ礁学会誌*, 22, 45-60, doi: 10.3755/jcrs.22.45
- 4) Yuyama I, Higuchi T, Hidaka M (2021). Application of RNA Interference Technology to Acroporid Juvenile Corals. *Frontiers in Marine Science*, 8, 688876. IF 4.435
- 5) Yuyama I, Ugawa N, Hashimoto T (2021). Transcriptome Analysis of *Durusdinium* Associated with the Transition from Free-Living to Symbiotic, *Microorganisms*, 9, 1560-1560. IF 3.864 11:22
- 6) Yuyama I, Higuchi T, Mezaki T, Tashiro H, Kazuho Ikeo K (2022). Metatranscriptomic Analysis of Corals Inoculated with Tolerant and Non-Tolerant Symbiont Exposed to High Temperature and Light Stress. *Frontiers in Physiology*, 13, 806171. IF 4.566

### 6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

### 6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	2件
口頭発表（学会等）	16件
「国民との科学・技術対話」の実施	6件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	3件

## 7. 国際共同研究等の状況

- 1) 「サンゴの細菌組成解析に関する台湾との共同研究、研究者交流」  
受け入れた外国研究者名：Yang Sung-Yin 現所属：筑波大学/研究員 国名：台湾 参加・連携状況：サブテーマ③のポスドク研究員として招へい、雇用。サンゴ白化時の細菌個体群解析に従事。国際的な位置付け：台湾においてもサンゴの白化現象は問題となっている。両国間での知

識および技術の共有は、国際的なサンゴ礁保全に繋がる。

2) 「サンゴ礁における流動モデル開発に関するフィリピンとの共同研究、研究者交流」

受け入れた外国研究者名：Lawrence P. C. Bernardo 現所属：東京工業大学/研究員 国名：フィリピン、参加・連携状況：サブテーマ④のポスドクとして雇用。石西礁湖の3次元流動モデル開発と高度化の研究に従事。国際的な位置付け：世界で最も生物多様性の高い海域であるコーラル・トライアングルの一部を成すフィリピンにおいてもサンゴの白化現象は深刻な問題となっている。フィリピンにおいても本課題で提案する白化防止・予防策を適用することで、広範囲のサンゴ礁生態系の保全に繋がる。

## 8. 研究者略歴

研究代表者

藤村 弘行

琉球大学大学院理工学研究科海洋環境学専攻修了、博士(理学)、現在、琉球大学理学部海洋自然科学科教授

研究分担者

1) 宮島 利宏

京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了、博士(理学)、現在、東京大学大気海洋研究所助教

2) 樋口 富彦

琉球大学理工学研究科博士後期課程修了、博士(理学)、現在、東京大学大気海洋研究所特任研究員

3) Agostini Sylvain

マルセイユ大学・マルセイユ海洋学センター卒業、静岡大学大学院自然科学系教育部修了、博士(理学)、現在、筑波大学 助教(下田臨海実験センター)

4) 湯山 育子

静岡大学生物地球科学科卒業、東京大学理学系研究科、博士(理学)、筑波大学 特任助教  
現在、山口大学農学部生物機能科学科 助教

5) 中村 隆志

東北大学大学院理学研究科修了、博士(理学)、現在、東京工業大学 准教授

## II. 成果の詳細

### II-1 サンゴ体内の活性酸素生成軽減および抗酸化作用増強による白化防止

国立大学法人琉球大学

理学部海洋自然科学科化学系

藤村 弘行

<研究協力者>

国立大学法人琉球大学

理学部海洋自然科学科化学系

安田 直子(平成30年～令和2年度)

#### [要旨]

サブテーマ1では、白化の際に生成する有害な活性酸素種 (ROS) を消去する抗酸化酵素の防御機構に着目し、餌の添加で体内金属を富化させ、抗酸化酵素の活性を促進させる方法によりサンゴの白化防止・救済策を立案することを目的に研究を行った。白化防止に寄与する操作により生残率を1.5倍以上向上させ、抗酸化活性を2倍程度向上させることのできる方法を目標とし、金属酵母やアルテミア等のプランクトンをサンゴに摂食させ、餌に含まれる微量金属の作用により白化の防止に寄与するか検証した。さらに、紫外線を遮蔽することによる活性酸素種 (ROS) の生成軽減や、過酸化水素曝露の順化効果による耐性付与についても試みた。そのため、

(1) 一次スクリーニングとして、生体に無害な金属酵母やアルテミア、過酸化水素の添加、紫外線の制御など抗酸化作用や活性酸素種生成軽減につながる各種方法を一斉に試験した。

(2) これらの中で白化防止効果の高い方法を選定し、厳密な実験環境下で抗酸化酵素活性や生残率の添加実験を行った。

(3) さらに金属酵母をより自然に近い餌として取り込ませるため、金属酵母を使って培養したアルテミア(金属アルテミア)をサンゴに与え、さらなる抗酸化活性の向上を図った。

(4) また各種の天然又は人工の餌料がサンゴの抗酸化活性の強化につながるか、餌の優位性を評価した。

結果として、一次スクリーニングでは共生藻の生理的な状態からFeとMnの金属酵母およびアルテミア幼生を選抜した。このうちアルテミア幼生の添加ではサンゴの褐虫藻密度が増加し、高水温になっても増加したままの状態を維持していることが示された。さらに、Fe酵母とアルテミア幼生の添加はサンゴの褐虫藻に含まれる抗酸化酵素の活性を強化することが示された。また、アルテミア幼生とMn酵母添加では3週間の高水温処理を経た65日目の時点において、無給餌のサンゴよりも生残率が1.6倍高いことが示された。

金属アルテミア添加実験では、Mnアルテミア、Feアルテミアおよび通常アルテミア区の褐虫藻密度で有意に高い結果が得られた。また、SOD活性はFeアルテミア添加で有意に高いことが示された。

計画の変更によって行った各種餌の評価では、孵化工程を省くことのできる市販の餌を試験した。その結果、冷凍アルテミア幼生と冷凍コペポダの添加でサンゴの褐虫藻密度を高める効果があることが確認された。一方で抗酸化酵素の活性は無給餌のサンゴと比較して有意な差は得られず、抗酸化能や脂質貯蔵の観点から白化後の回復効果は生きたアルテミア幼生よりも低いことが示唆された。

これらのことから、金属含有酵母としてMn酵母、プランクトンとしてアルテミア幼生を添加した実験系において、無給餌のサンゴと比べて生残率を1.5倍以上向上させることができ、この目標は達成された。抗酸化酵素活性に関しては、無給餌のサンゴに比べてFe酵母を添加したときに1.49倍高い値となり、金属アルテミアでは最大で1.52倍であった。アルテミア幼生を給餌した結果では1.89倍となり、2倍に近い抗酸化活性を付与することができたことから、この目標は概ね達成された。

野外添加実験やチャンバー実験、移植操作実験等により、フィールドにおいても抗酸化活性と褐虫藻密度等の向上が実験室と同等に得られるような方法を検討することに関しては、餌を添加したサンゴをフ

フィールドへ戻して抗酸化活性向上の評価を行ったが、コロナ禍での活動制限によりフィールドでの実験を計画通り進めることができず、良い結果は得られなかった。そのため計画変更を余儀なくされ、この研究目標は達成することができなかった。

### 1. 研究開発目的

サンゴの白化現象は、高水温によりサンゴの共生藻である褐虫藻内で生成される活性酸素種(ROS)の増加に起因すると考えられている<sup>1)</sup>。損傷した光合成系に光を当てると、正常に伝達されなくなった電子と周囲の酸素から多量のROSが発生し、細胞中にある脂質やDNAを酸化するため、褐虫藻そのものが死滅したり、このような褐虫藻をサンゴが排出したりすることによって白化は進行する<sup>2,3)</sup>。一般に生体内で生成するROSはスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)などの抗酸化酵素によって消去されるが、白化の際は通常の抗酸化作用では制御できない多量のROSが生成していると考えられている<sup>4)</sup>。したがって白化の初期段階で褐虫藻内に生成する過剰の活性酸素種をすみやかに消去することが褐虫藻やサンゴへの損傷を最小限に留めるために重要となる。抗酸化酵素のSODは活性中心に補因子としてCu、Zn、Mn、Feの微量金属元素を保持しており、これらの元素は酵素の活性に必須である。そのため、サンゴ体内の微量金属元素を増加させ、抗酸化活性を強化することができれば、白化の防止や遅延、極度の白化に対する緩和の効果が期待される。

よって本研究では、白化の際に生成する有害な活性酸素種(ROS)を消去する抗酸化酵素の防御機構に着目し、餌の添加で体内金属を富化させ、それによって抗酸化酵素の活性を促進させる手法によりサンゴの白化防止・救済策を立案する。

### 2. 研究目標

- ・白化防止に寄与する金属含有酵母、プランクトン、過酸化水素等の添加、UV制御の操作により生残率を1.5倍以上向上させる効果のある方法を選定する。
- ・金属含有酵母およびそれを含む餌の添加によりサンゴの抗酸化活性を2倍程度向上させることのできる方法を選定する。
- ・野外添加実験やチャンバー実験、移植操作実験等により、フィールドにおいても抗酸化活性と褐虫藻密度等の向上が実験室と同等に得られるような方法を検討する。

### 3. 研究開発内容

本研究では、体内金属の富化による抗酸化酵素活性の上昇を促すために、金属含有量の多い酵母や自然の餌に近い無甲目の小さなエビであるアルテミア等のプランクトンをサンゴに摂食させ、餌に含まれる微量金属がサンゴを通して褐虫藻へ取り込まれ、白化の防止に寄与するか検証する。さらに、餌を利用した防止・救済策を基本としつつ、天然光に含まれる紫外線を遮蔽することによる活性酸素種(ROS)の生成軽減<sup>5)</sup>や、活性酸素種(ROS)としては比較的毒性の弱い過酸化水素に曝露することによって耐性を持たせる順化効果<sup>6)</sup>についても試みる。そのため、次の内容について研究開発を行った。

- (1) まず1次スクリーニングとして、生体に無害な金属酵母をサンゴに餌として取り込ませ、金属富化と抗酸化活性向上を図った。また、過酸化水素添加等によりROS消去系の抗酸化活性を評価した。さらにアクリル板を設置し、UV制御によるROS生成軽減を試みた。
- (2) 次にこれらの中で白化防止効果の高い餌を選定し、より厳密な実験系の環境下で抗酸化酵素活性や生残率を求めるための添加実験を行った。
- (3) さらに金属酵母をより自然に近い餌として取り込ませるため、金属酵母を使って培養したアルテミアをサンゴに与え、さらなる抗酸化活性の向上を図った。
- (4) また水槽実験により各種の天然又は人工の餌料の供与がサンゴの抗酸化活性の強化につながるか評価を行い、現場海域へ適応する際の抗酸化活性向上効果やコスト面でのそれぞれの餌の優位性を評価した。

(4)については当初、実生態系への抗酸化活性向上サンゴの移植または人工や天然の餌を使った野外添加実験で、現場海域への適応可能性を評価するというものであったが、コロナ禍の活動制限により野外での実験を計画的に進めることができなくなってしまったため、サンゴの抗酸化能が向上しコストや利用しやすさの面でより優位な餌を特定するための室内実験へと変更することとなった。

#### 4. 結果及び考察

##### 対象とするサンゴ

これらの研究開発に使用するサンゴは *Acropora hyacinthus* (和名：クシハダミドリイシ) を用いた。このサンゴは白化に特に弱いとされるミドリイシ科に属し、積斉唱で主要な種として2016年夏の大規模白化でもその多くが白化し死滅したことが知られている。白化に弱い種類で救済技術を確立することができれば、白化に対してより多くの種類を救済することが期待できる。採取したサンゴは直ちに琉球大学の瀬底研究施設に運び、枝を切り出してプラスチックのネジ頭に接着剤で固定した。これを一ヶ月以上新鮮な流水海水下で順化させた後に実験に供した(図II-1-1)。なお、造礁サンゴの採取にあたっては、沖縄県の漁業調整規則第33条2項に従い、採捕に関する特別許可を申請し規則に則って行った。



図II-1-1 実験に使用した造礁サンゴ *Acropora hyacinthus* (和名：クシハダミドリイシ)。写真左は野外から採取したクシハダミドリイシの群体。写真右は枝(フラグメント)をバンドソーで切り出しアクリルのネジに固定したもの。この状態で1ヶ月以上順化させ、切断で露出したサンゴ骨格が生体組織で覆われるようになってから実験に使用した。

##### (1) 一次スクリーニング

はじめに、一次スクリーニングとして各種金属含有酵母や低濃度の過酸化水素、アルテミアの添加、アクリル板によるUV遮光などを通常水温(27℃)と高水温(31~32℃)の温度条件下で一斉に試験した。

金属酵母の添加については、Cu、Zn、Mn、Feをそれぞれ豊富に含む不活化したパン酵母(オリエンタル酵母)が市販されておりこれらを用いた。抗酸化酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は、活性中心にCuとZnを持つCu-Zn SOD、FeやMnを持つFe SODやMn SODが主に知られている。これらは白化の初期段階で生成する毒性の高いスーパーオキシドラジカルを消去する酵素であることが知られている。また、非常に低濃度の無機金属を添加することでも同様の効果は期待できるが、濃度の制御が難しく僅かな濃度増加で非常に強い毒性を示すことから、本研究開発では有機金属の固体粉末として添加し、懸濁粒子の状態ですべてサンゴに給餌できる金属含有酵母を用いた。

過酸化水素の添加については、低濃度の過酸化水素をサンゴに暴露すると過酸化水素を分解するカタラーゼの活性が上がるという報告があり、その順化効果を期待した。共生藻の光合成系から生じる酸化力の強いスーパーオキシドラジカルは、SODによって無毒な酸素と酸化力の弱い過酸化水素に変換される。ここで生成した過酸化水素はさらにカタラーゼによって分解されるが、その際にカタラーゼ活性が律速段階となっているのであれば、この機能を高めることによって白化防止につながることを期待されるため、順化効果を誘発する過酸化水素の添加を試みた。

サンゴは動物プランクトンを捕食することが知られており、無甲目のエビの一種であるアルテミア

(*Artemia salina*) が捕食の実験によく用いられている。アルテミア幼生の添加については、そこに含まれる微量元素をより自然に近い状態で摂食させることができるだけでなく、タンパク質や脂質の供給源ともなることからサブテマ2の栄養蓄積の効果も期待できるため、アルテミア幼生の添加を実験した。

さらに遮光は白化を抑制する効果があることは知られているが、同時に光合成の低下も引き起こす。アクリル板によって光合成に必要な可視光を透過させ、紫外線(UV)のみを遮蔽することで、UVで光化学的に発生するROSの軽減効果を検証した。サンゴの白化は高温時に損傷した光合成系に強い光が当たることによって生じるROSが主要因であるとするメカニズムが考えられているが、これ以外にも天然光に含まれる紫外線によって光化学的にサンゴ体内で生成するROSも白化の一因となっている可能性があるため紫外線(UV)遮光を試みた。

一次スクリーニングでは共生藻の生理的な状態を第一義的に考え、褐虫藻密度、クロロフィル量および非破壊で測定できるパルス振幅変調蛍光法(PAM蛍光法)による光化学系IIの量子収率( $F_v/F_m$ )と最大相対電子輸送速度( $rETR_{max}$ )を指標として評価した。量子収率はクロロフィルで受け取った光エネルギーを使って電子を取り出す際の効率を表している。一般に光合成では受光した光エネルギーを100%使用することはできないため、正常な葉緑体の電子伝達系では量子収率( $F_v/F_m$ )はおおよそ0.7~0.8(70~80%)の値であることが知られている。一方で、相対電子輸送速度( $rETR_{max}$ )は取り出された電子が光合成の電子伝達系を流れる相対的な速度を表したものであり、光量とともに増大し、ある光強度で輸送速度は最大となる。このときの値が $rETR_{max}$ であり光合成の暗反応(カルビン・ベンソン回路)に問題があるときに、この数値が減少することになる。

一次スクリーニングの実験系について図II-1-2に示す。カートリッジフィルターでろ過した海水を一旦タンクに貯め水温を調節し、そこから各処理条件の水槽へ通水した。水温28℃で2週間以上飼育した後、段階的に32℃まで昇温させ約10日間維持した。処理条件は無処理のコントロール、金属を含まない通常の不活化パン酵母、金属含有不活化パン酵母3種類(Zn、Fe、Mn)、アルテミア、過酸化水素、アクリル板処理の計8条件とした。金属酵母とアルテミア幼生は事前に濃度試験を行い、サンゴの触手が正常に伸張する状態を維持できる濃度とした。金属酵母は添加した水中での濃度に換算するとZnが0.059 mg/L、Feが0.15 mg/L、Mnが0.12 mg/Lであった。またCu酵母に関しては非常に低濃度でも白化の兆候が見られたため、1次スクリーニングからは除外した。アルテミア幼生の濃度は10個体/mLとし、過酸化水素は文献値を参考に5  $\mu$ Mとした。これらをサンゴの摂食行動が最も活発となる午前3時から6時までの3時間作用させた。また、光はガラス天井から差し込む天然光を使って飼育し、アクリル板を設置した水槽では可視光領域の光を透過させ、UVのみを95%以上遮蔽したことを光センサー(Li-190SA、SD204AB、Li-1000、Li-COR)によって確認した。



図II-1-2 一次スクリーニングの実験系。左右にあるタンクで水温を調節したろ過海水を各処理条件ごとの水槽へかけ流す。

一次スクリーニングにおける10日間の高温操作後の各処理群の結果を表II-1-1に示す。無処理の水槽の結果を基準とし、この数値の範囲から外れて正の方向に効果があったものを「+」印で、負の方向に効果があったものを「-」印で表してある。またこの数値の範囲内であった場合は「±」とした。rETRmaxはアルテミア幼生で±となった以外はほとんどすべての処理区で正の値を示した。Fv/FmはUV遮蔽と過酸化水素添加処理で正の値を示した。褐虫藻1細胞あたりのクロロフィル量ではFeとMnの金属酵母およびアルテミア添加において無処理のサンゴと同等の結果が得られた。これらの結果から無処理の条件と同等かそれ以上の効果を示したFeとMnの金属酵母およびアルテミア幼生を選抜し、酵素活性や生残率を求めるための添加実験を行った。

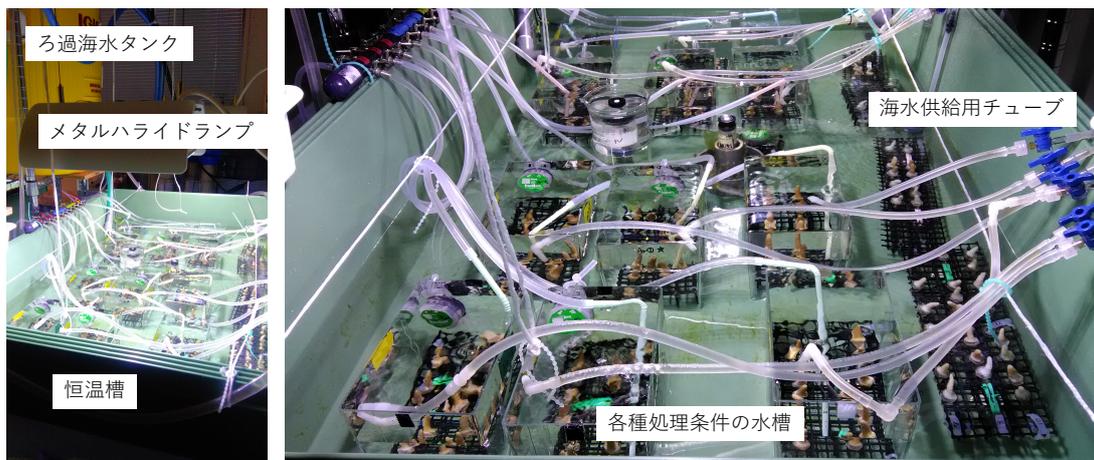
表II-1-1 一次スクリーニングでの各評価項目の結果

評価項目	無処理	UV遮蔽	過酸化水素	通常酵母	Zn酵母	Fe酵母	Mn酵母	アルテミア
Fv/Fm	0.37-0.43	++	+	-	--	±	-	±
rETRmax	13.1-14.0	++	++	++	+	++	++	±
クロロフィルa (µg/cell)	2.47-3.65	-	-	-	-	±	±	±
クロロフィルc2 (µg/cell)	0.98-1.51	±	-	-	-	±	±	±
全クロロフィル(µg/cell)	3.45-5.15	-	-	-	-	±	±	±
褐虫藻密度 (x10 <sup>6</sup> cell/cm <sup>2</sup> )	1.46-2.57	±	-	-	±	-	±	-

(2) Fe、Mn酵母、アルテミア幼生添加実験

一次スクリーニングで成績の良かったFe酵母、Mn酵母、アルテミア幼生の3種類の餌について、さらに詳しい評価を行った。Fe、Mn酵母およびアルテミア幼生添加の実験系を図II-1-3に示す。水温を27℃にしたろ過海水をかけ流し約10日間サンゴを飼育した後、半分のサンゴはそのままの水温を維持し、残り半分は段階的に昇温し31℃とした。27℃および31℃のそれぞれにおける餌条件は、無給餌(コントロール)、アルテミア添加、FeおよびMn酵母添加の4種類である。

サンゴに与えるアルテミアは次のように作成した。2種類のフィルター (TCYE-LS-S1FE(0.3~0.8µm)とTCW-50N-PPS(50µm)、ADVANTEC) を用いてろ過した天然海水にアルテミアの卵(ブライシュリンプエッグス、スペクトラムブランドジャパン)を浸漬した。そこから孵化した幼生を24時間以内に給餌した。



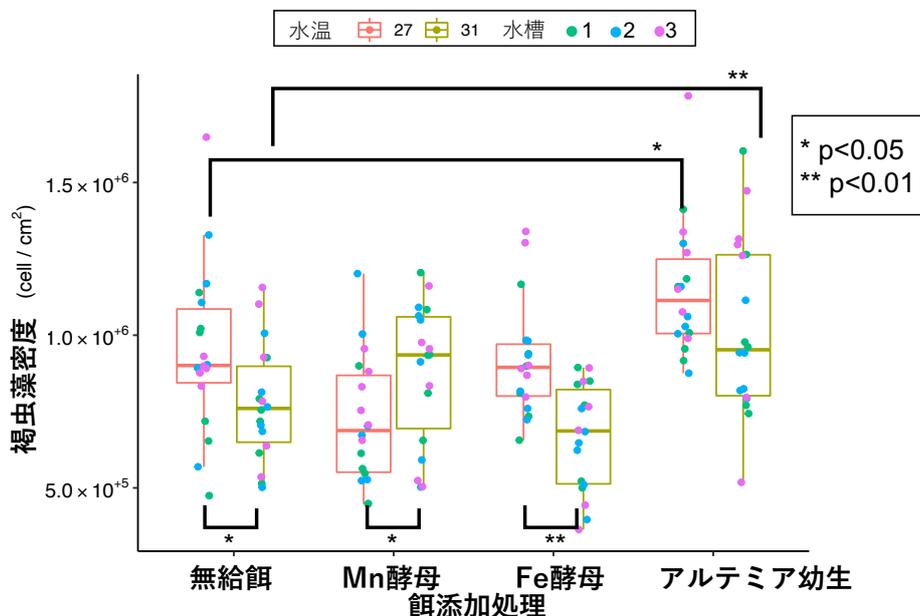
図II-1-3 Fe、Mn酵母およびアルテミア幼生添加の室内実験系。タンク内で水温を調節したろ過海水をチューブによって各実験水槽へ供給し、さらに水槽の水温は恒温槽によって厳密に制御した。光源にはメタルハライドランプを使用し、太陽光と同じように可視光と紫外領域の光が照射されるようにしてある。写真は高温(31℃)用の水槽である。

給餌は2日に1回とし、アルテミア幼生は10個体/mLになるように、金属酵母はFeが0.015 mg/L、Mnが0.012 mg/Lの濃度になるように添加した。実験条件をより厳密にするため、光はメタルハライドランプによる人工光源を使い、 $200\sim 350 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光量で6:00~18:00の12時間を毎日照射した。各水槽には6つの異なる親群体から作成した枝(フラグメント)を合計18本ずつ入れた。この水槽を各条件で3つずつ用意し、タンクエフェクトと呼ばれる特定的水槽に生じるバイアスを考慮した。フラグメントの総数は18本 $\times$ 3水槽 $\times$ 4餌条件 $\times$ 2温度条件で合計432本であった。

3週間の高水温処理の後、一部のサンゴは各種評価項目の分析のために水槽から採取し、直ちに生体組織を骨格からエアーフロスによる高圧水流を使って剥がし、遠心分離によってサンゴ組織と褐虫藻に分離した。水槽に残ったサンゴは27°Cの水温環境下で約6週間培養を継続し、サンゴ組織の壊死状態をUVランプの光照射によって確認する手法を用いて生残率を求めた。

Fe、Mn酵母およびアルテミア幼生添加実験における評価項目は(1)で説明した共生藻の生理状態を示す項目(褐虫藻密度、クロロフィル量、Fv/Fm、およびrETRmax)に加えて、光合成速度やサンゴの成長を表す石灰化速度、Cu-Zn SOD活性、MnおよびFe SOD活性の測定を行い、白化の防止に効果のある餌となりうるのか検討した。これらの測定値はサブテーマ4のモデル構築・最適化のために提供するとともに、実験に用いたサンゴの一部はサブテーマ2および3へ提供し、安定同位体比測定による栄養供給源としての効果や遺伝子発現解析による高水温下でのサンゴの応答を分析するために使用された。そのためここでは白化の状態と抗酸化力の指標である褐虫藻密度とFe、Mn-SOD活性の2つの項目を中心に説明する。

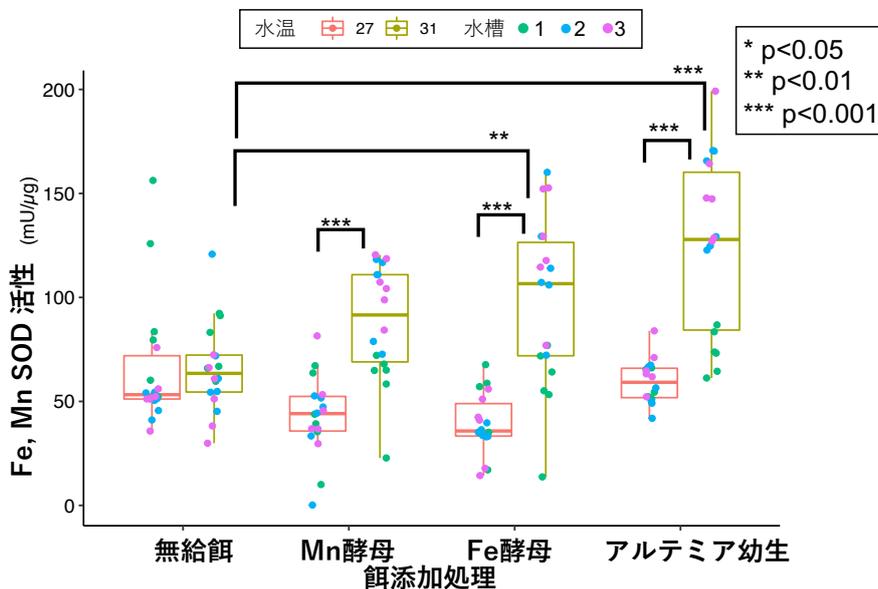
まず白化の状態を示す指標として褐虫藻密度の結果を図II-1-4に示す。二元配置分散分析により有意差検定を行った結果、交互作用が有意(ANOVA:  $p=0.0009$ )であったため全群の多重比較を行ったところ、27°Cと31°Cのそれぞれでコントロール(無給餌)に比べてアルテミア添加区で褐虫藻密度が有意に高いことが分かった(Tukey検定:  $p<0.038$ )。コントロールに対するアルテミア添加区の割合は27°Cで1.21倍、31°Cで1.32倍であった。また、コントロールでは27°Cより31°Cの褐虫藻密度が有意(Tukey検定:  $p=0.02$ )に減少していた一方で、アルテミア添加区では温度による有意差はみられなかった。これらの結果から、アルテミアの添加によってサンゴの褐虫藻密度は増加し、高水温になっても増加したままの状態を維持していることがこの実験では示された。



図II-1-4 Fe、Mn酵母およびアルテミア幼生添加実験の褐虫藻密度。

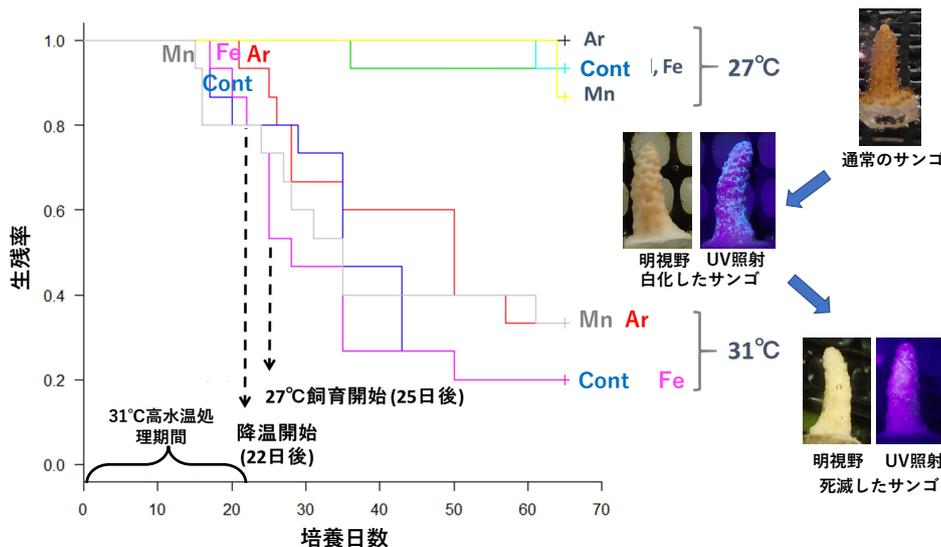
次に褐虫藻に含まれるFe、Mn-SODの活性の結果を図II-1-5に示す。二次元配置分散分析により交互作用が有意(ANOVA:  $p<0.0001$ )であったため全群での多重比較を行ったところ、31°Cではコントロール(無給餌)に比べてFe酵母添加とアルテミア添加区でそれぞれ1.49倍と1.89倍の有意に高い値を示した(Tukey

検定:  $p < 0.003$ )。またMn酵母はコントロールと比べて高い傾向にはあるものの $p = 0.062$ と5%の水準で有意ではなかった。27℃と31℃の比較ではコントロールで違いがなく、それ以外はすべての添加区で高水温でのSOD活性が有意に高い結果が得られた(Tukey検定:  $p < 0.001$ )。27℃に対する31℃のSOD活性の割合はMn酵母で2.06倍、Fe酵母で2.51倍、アルテミアで2.10倍であった。これらの結果からFe酵母とアルテミア幼生の添加はサンゴの褐虫藻に含まれる抗酸化酵素の活性を強化することが示された。



図II-1-5 Fe、Mn酵母およびアルテミア幼生添加実験の褐虫藻に含まれるFe, Mn SOD活性。

3週間の高水温処理の後、段階的に水温を27℃まで戻し、その後の経過を調べた結果を図II-1-6に示す。31℃の高水温処理開始から65日目(高水温終了から51日目)の生残率はすべての処理区で低下した。今回の実験では高温期間が3週間と長く、通常水温に戻した後に回復するサンゴは見られなかった。しかし、アルテミア幼生とMn酵母添加区では高水温処理から65日目の時点において、無給餌(コントロール)よりも生残率が1.6倍高いことが示された。これは、白化後により多くのサンゴが生き残ること、さらにより短い高温期間であれば白化後のすみやかな回復が期待できることを示唆している。



図II-1-6 Fe、Mn酵母およびアルテミア幼生添加実験における生残率。生残率はサンゴにUVランプの光を照射し、生きた細胞が持っているタンパク質の蛍光を目視で確認することによって判断した。FeはFe酵母、MnはMn酵母、Arはアルテミア幼生を添加したサンゴ、Contは無給餌のサンゴを示す。

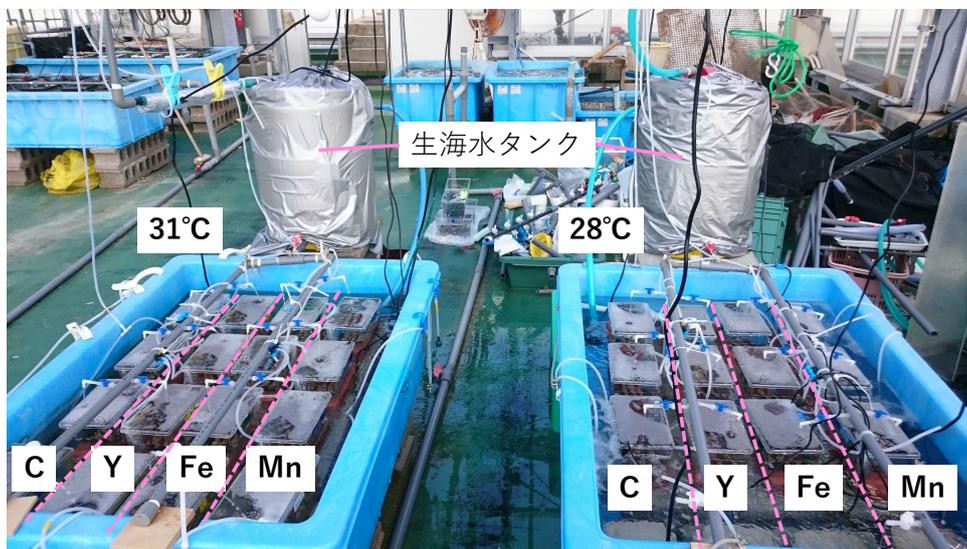
アルテミア幼生のタンパク質と脂質の含有量は金属酵母に比べてそれぞれ1.2倍と4.0倍である。またアルテミア由来の炭素と窒素をサンゴが同化していることがサブテーマ2の安定同位体の解析から明らかとなっている。これらのことから、アルテミア由来のタンパク質と脂質がサンゴ組織の細胞を經由して栄養素として褐虫藻へ供給され、成長と増殖に利用されたことが示唆された。一方で金属酵母はサンゴや褐虫藻の生育にとって良質な炭素・窒素源にはなっていないものの、含有する微量金属元素が抗酸化酵素の活性向上に寄与していることが示唆された。また、この実験で使用したアルテミア幼生に由来する微量金属は給餌中の実験水槽にFeが $2\mu\text{g/L}$ 、Mnが $0.2\mu\text{g/L}$ の濃度で含まれており、これらが幼生の炭素や窒素とともに効率よく取り込まれたことにより高い抗酸化酵素活性につながったものと考えられる。

この結果では、アルテミア幼生、FeおよびMn酵母添加は白化を防ぐことはできなかったが、サンゴと共生藻の褐虫藻を抗酸化作用と栄養面から支えることで、白化からの回復過程で効果が期待されることが示された。

### (3) 金属アルテミア添加実験

Fe、Mn酵母およびアルテミア幼生添加の実験では、結果としてすべての餌において高い抗酸化酵素活性を示し、さらにアルテミア幼生を添加したサンゴで有意に高い褐虫藻密度を示した。このことから、金属酵母を餌としてアルテミアを培養することで金属を富化させたアルテミア(金属アルテミア)を作成し、これを餌としてさらにサンゴに給餌することで高い抗酸化活性と褐虫藻密度を有するサンゴとなることを期待して培養実験を行った。

培養実験系を図II-1-7に示す。餌条件としては無給餌(C)、金属を含まない通常のパン酵母を与えたアルテミア(Y)、Fe含有酵母を与えたアルテミア(Fe)、Mn含有酵母を与えたアルテミア(Mn)の4種類とした。サンゴへ給餌する際の個体密度は10個体/mLとした。ただし、この実験からは実海域への実装を想定してより自然に近い条件としたため、海水はろ過をしていない生海水を使用した。そのため低濃度ではあるが天然のプランクトンが、すべての実験条件に含まれている。

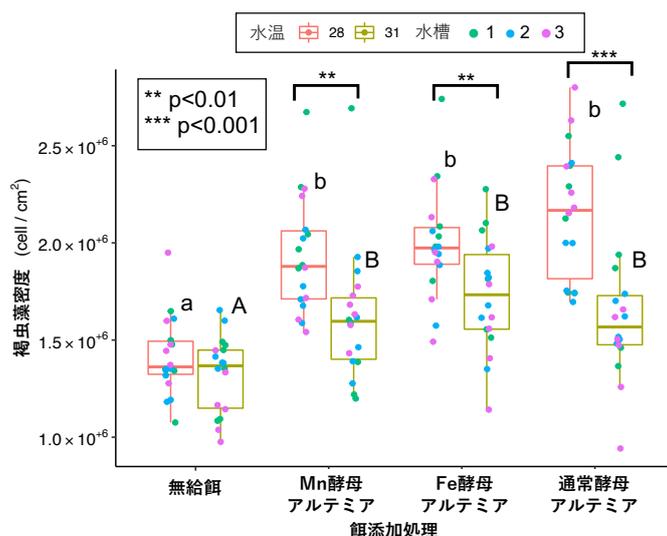


図II-1-7 金属アルテミア添加の実験系。Cは無給餌、Yは普通酵母のアルテミア、FeはFe酵母のアルテミア、MnはMn酵母のアルテミアを添加したサンゴの水槽を表す。海水はろ過をしていない生海水を用い、光はガラス天井を通して降り注ぐ太陽光を用いた。

サンゴに与えるアルテミアはまず(2)の実験と同様に2種類のフィルターを用いてろ過した天然海水に卵を浸漬した。そこから孵化した幼生をさらに2日間ろ過海水で培養し、腸管が形成されるまで成長させた。これに通常の酵母と金属酵母2種類(Fe、Mn)を餌としてアルテミアに与えた。このようにして金属酵母を取り込ませたアルテミアを常に培養し続け、2日に1回の割合で生きたままの新鮮なアルテミアをサンゴに給餌した。

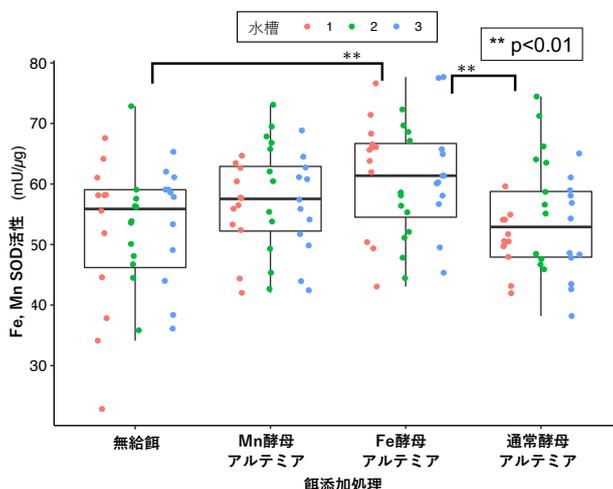
サンゴは水温28℃で13日間培養した後、半分のフラグメントを31℃の条件とし、約2週間高水温を維持した。条件ごとに3つの水槽を用意し、1つの水槽には6群体から採取した18本のフラグメントを入れた。フラグメントの総数は18本×3水槽×4餌条件×2温度条件で合計432本であった。光は屋外のガラス室の天井から降り注ぐ自然光とした。光量は最大で1600μmol/m<sup>2</sup>/sであった。高水温の実験期間終了後にサンゴを水槽から採取し、直ちに生体組織を骨格から剥がし、サンゴ組織と褐虫藻に分離した。これを(2)と同様に各種評価項目の測定に供した。

褐虫藻密度の結果(図II-1-8)では、二元配置分散分析で交互作用が有意であったため(ANOVA: p=0.035)、全群での多重解析を行った。28℃と31℃のそれぞれで無給餌に比べ、Mnアルテミア、Feアルテミアおよび通常アルテミア区の褐虫藻密度が有意に高い結果が得られた(Tukey検定: p<0.020)。無給餌に対する餌添加区の褐虫藻密度は28℃の通常アルテミアで1.52倍、31℃のFeアルテミアで1.30倍であった。また、すべてのアルテミア添加区で28℃より31℃の高水温で褐虫藻密度が低下した(Tukey検定: p<0.008)。



図II-1-8 金属アルテミア添加による褐虫藻密度。異なる記号aとbは28℃で有意であることを示し、記号AとBは31℃で有意であることを示している。

次に褐虫藻のSOD活性の結果を図II-1-9に示す。二元配置分散分析で有意な交互作用は見られず、餌の添加による影響のみ有意であった(ANOVA: p=0.0008)。餌処理間での多重比較では無給餌または通常アルテミア添加区に比べFeアルテミア添加区のSOD活性が有意に高いことが示された(Tukey検定: p<0.007)。



図II-1-9 金属アルテミア添加によるFe、Mn SOD活性量。

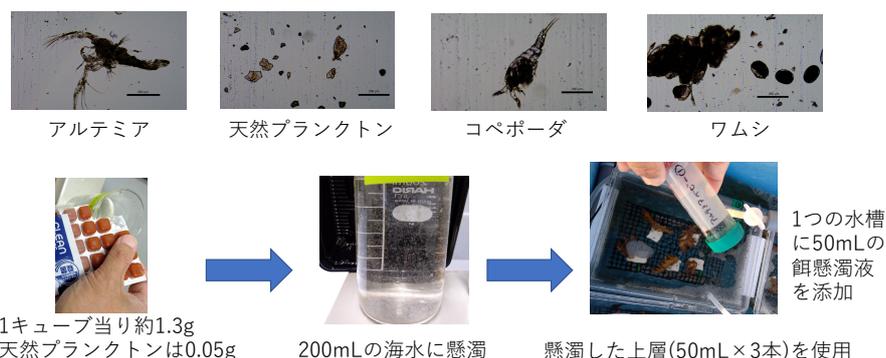
この実験の結果でもアルテミアの添加はサンゴの褐虫藻密度を増加させることが示された。その際に金属の強化には関係がなく、タンパク質や脂質の栄養源としてのアルテミアの効果が褐虫藻密度の増加に寄与していることが再度示唆された。ただし、この実験で安定同位体を測定したサブテーマ2の結果からは、餌の炭素や窒素がサンゴに同化されている明らかな証拠は得られなかった。この実験で添加したアルテミアは酵母を取り込ませるために十分に成長した体長2~3mmの成体であり、1mm程度のサンゴポリプの口のサイズよりも大きく成長していた。そのためサンゴはアルテミアを十分に食すことができず、たまたまちぎれたアルテミアの断片などを給餌期間中に取り込んでいたのではないかと推察される。その結果金属の取り込みも十分ではなく、Feアルテミア添加区のみが僅かに増加した可能性が考えられる。

このように金属アルテミアを餌としてサンゴへ給餌した実験では、褐虫藻密度は増加したものの抗酸化能の向上にはつながらなかった。安定同位体の結果からは明瞭な同化は確認できなかったため、酵母を取り込ませるために成体まで成長させたアルテミアを使つての給餌をミドリイシ属のようなポリプサイズの小さいサンゴ種へ適用するには難しいことが明らかとなった。

#### (4) 各種餌の評価

酵母をアルテミアに取り込ませ、金属を強化した餌をミドリイシ属のサンゴに摂食させることは難しいことが分かったことから、サンゴへ給餌可能な市販の様々な餌について抗酸化活性の強化につながるか、アルテミア幼生と同等以上の効果を持つ餌としての評価を行った。餌は冷凍アルテミア幼生、乾燥した天然のプランクトン、冷凍コペポダ、冷凍ワムシを用いた。これらはサンゴに給餌可能な餌として水族館や観賞向けに市販されているものである。そのため、これまでの実験で行ってきた卵からアルテミアを孵化させる工程を省くことができ、現場海域へ適用する際に孵化工程の人件費や設備維持のコストを削減することができる。

冷凍の餌はキューブ状に小分けにされており、1つのキューブには湿重量で約1.3gの餌が含まれている。これをトールビーカーのろ過海水(200mL)に懸濁させ均一に分散した後、上澄みをサンゴの入った実験水槽に添加した。各キューブの乾燥重量はワムシ(0.097g)を除いて約0.05gであったため、天然プランクトンの乾燥品は0.05g(50mg)を分取し、冷凍の餌と同様にろ過海水に分散させてから給餌を行った(図II-1-10)。餌に含まれるFeとMnの金属含有量を測定し、計算によって求めた水槽中での初期濃度(添加濃度)はFeが0.01-0.06 $\mu\text{mol/L}$ (0.6-3.3 $\mu\text{g/L}$ )、Mnが0.0004-0.0070 $\mu\text{mol/L}$ (0.022-0.38 $\mu\text{g/L}$ )であった。これは、清浄な沿岸海水の溶存微量金属濃度と同等か、一桁大きい値であった。これらの餌は毎日夕方の時間帯に3週間、実験水槽に給餌し続けた。

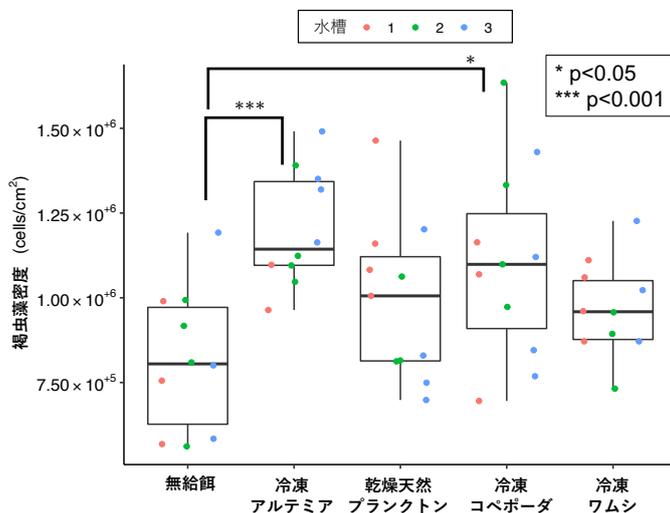


図II-1-10 評価に用いた餌と給餌への調製方法

実験水槽(2.4L)には採取した5群体のサンゴから作成したフラグメントを入れ、新鮮な海水を150 mL/minの流速で供給した。実験開始の水温は26~28 $^{\circ}\text{C}$ とし、10日後から徐々に昇温し最終的に30~31 $^{\circ}\text{C}$ とした。高水温は16日間維持した後、すべてのサンゴを水槽から採取した。サンゴは高圧水流(エアフロス)を用いて骨格から生体組織を剥離し、遠心分離によってサンゴ組織と褐虫藻に分離した。サンゴのフラグメントは5本 $\times$ 3水槽 $\times$ 5餌条件(無給餌を含む)の合計75本であった。生体試料の一部はサブテー

マ2の安定同位体解析に供し、残りの試料は褐虫藻密度や抗酸化酵素活性等の各評価項目の測定に供した。

結果は冷凍アルテミア幼生と冷凍コペポータにおいて無給餌のサンゴと比べて有意に高い褐虫藻密度を示した(Tukey検定: アルテミア幼生 $p=0.002$ 、コペポータ $p=0.031$ ) (図II-1-11)。無給餌に対する割合は冷凍アルテミア幼生で1.47倍、冷凍コペポータで1.35倍であった。この実験でもアルテミアは褐虫藻密度を高める効果があることが再度確認された。さらに、これまでにサンゴの給餌実験では使われたことのなかったコペポータもアルテミアと同様に褐虫藻密度を増強させる効果があることが分かった。



図II-1-11 各種餌の添加による褐虫藻密度。

一方で抗酸化酵素の活性は無給餌のサンゴと比較して有意な差は得られなかった。安定同位体の結果では各餌を添加したサンゴの $\delta^{13}C$ 値の大部分が無給餌のサンゴと餌の間にあることから、餌を食べて同化した傾向が見られた。しかし、ばらつきが大きく統計的に有意な結果を得ることはできなかった。またC/N比は無給餌に比べて低く、餌を貯蔵脂質として蓄積していないことも分かった。

これらのことから冷凍のアルテミア幼生とコペポータはどちらも褐虫藻密度を増加させることができるが、抗酸化能や脂質貯蔵の観点から白化後の回復効果は生きたアルテミア幼生よりも低いことが示唆された。

### 5. 研究目標の達成状況

- ・白化防止に寄与する金属含有酵母、プランクトン、過酸化水素等の添加、UV制御の操作により生残率を1.5倍以上向上させる効果のある方法を選定する目標に関しては、金属含有酵母としてMn酵母、プランクトンとしてアルテミア幼生を添加した実験系において、無給餌のコントロールと比べて生残率を1.5倍以上向上させる効果のあることがわかった。したがって、この目標は達成されている。

- ・金属含有酵母およびそれを含む餌の添加によりサンゴの抗酸化活性を2倍程度向上させることのできる方法を選定する目標に関しては、金属含有酵母ではFe酵母の酵素活性が無給餌のコントロールと比べて1.49倍高い値であった。金属酵母を含むアルテミアでは最大で1.52倍程度であった。アルテミア幼生を給餌した結果では1.89倍となり2倍に近い抗酸化活性を有することができた。これらのことから、この目標は概ね達成されている。

- ・野外添加実験やチャンバー実験、移植操作実験等により、フィールドにおいても抗酸化活性と褐虫藻密度等の向上が実験室と同等に得られるような方法を検討することに関しては、餌を添加したサンゴをフィールドへ戻して抗酸化活性向上の評価を行ったが、コロナ禍での活動制限によりフィールドでの実験をうまく行うことができず、良い結果は得られなかった。そのため計画変更を余儀なくされ、この研究目標は達成することができなかった。

## 6. 引用文献

- 1) Lesser MP, Stochaj WR, Tapley DW, Shick JM (1990) Bleaching in coral reef anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs* 8: 225-232
- 2) Brown BE, Dunne RP, Warner ME, Ambarsari I, Fitt WK, Gibb SW, Cummings DG (2000) Damage and recovery of Photosystem II during a manipulative field experiment on solar bleaching in the coral *Goniastrea aspera*. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 117-124
- 3) Jones R, Hoegh-Guldberg O (2001) Diurnal changes in the photochemical efficiency of the symbiotic dinoflagellates (Dinophyceae) of corals: photoprotection, photoinactivation and the relationship to coral bleaching. *Plant Cell Environ* 24: 89-99
- 4) Weis VM (2008) Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J Exp Biol* 211: 3059-3066
- 5) Higuchi T, Fujimura H, Hitomi Y, Arakaki T, Oomori T, Suzuki Y (2010) Photochemical formation of hydroxyl radicals in tissue extracts of the coral *Galaxea fascicularis*. *Photochem Photobiol* 86: 1421-1426
- 6) Higuchi T, Fujimura H, Arakaki T, Oomori T (2009) Activities of antioxidant enzymes (SOD and CAT) in the coral *Galaxea fascicularis* against increased hydrogen peroxide concentrations in seawater. *Int Coral Reef Symp* 11: 926-930

## II-2 サンゴの栄養供給経路の可視化とそれに基づく白化予防・救済戦略の構築

国立大学法人東京大学

大気海洋研究所 海洋化学部門

宮島 利宏

大気海洋研究所 海洋生物資源部門

樋口 富彦

<研究協力者>

海洋研究開発機構

松井 洋平

国立大学法人東京大学

大気海洋研究所 海洋化学部門

森本 直子

田中 健太郎（平成30年度）

### [要旨]

サブテーマ2では、高水温時の白化ストレスに対するサンゴの応答を支配する重要な因子としてサンゴの栄養状態に着目して、栄養制御によりサンゴ礁を白化から守る技術的可能性を検討した。まず、サンゴにおける栄養状態と供給源を可視化する4種類の指標を開発してその自然変動の法則性を解明した。特に従属栄養依存度の指標としてアミノ酸分子種別窒素同位体比がサンゴにおいて適用できることを実データで立証し、十分な分析精度と再現性をもってサンゴ試料を解析する手順を確立した。次に、給餌や抗酸化物質の投与によってサンゴが白化耐性を獲得することを明らかにするために、サブテーマ1との共同実験を実施し、動物性餌料の給餌が実際に白化を緩和しうることを実証した。その際上記の指標を適用して、サンゴの栄養状態が餌料投与により実際に改善していることを示した。さらに、サンゴ白化防止策として既往研究において提唱されている各種の生物化学的技術に関してそれらの実際の効果と作用機作をレビューし、代表的な5種類の手法に関してシンプルなモデル実験系を使ってその効果を検証した上で、こうした技術が実生態系に効果的に実装できる場合について暫定的な提言を行った。当初設定した3つの研究目標のうち、3番目に含まれる各種白化防止技術の費用対効果と副次作用の定量的評価に関しては、事業期間内に検証に堪える十分なデータを集めることができなかったが、それ以外の目標はおおむね達成された。

### 1. 研究開発目的

高水温ストレスを受けているサンゴにおいて白化耐性を規定する主要因の一つとして、サンゴの栄養状態の観点からの健全性が重要であることが指摘されている。また実際に白化が起きるとサンゴは共生藻の光合成からのエネルギーの供給を受けられなくなるため、高水温期間を生き延びて白化から回復するためには、サンゴ体内に貯蔵されているエネルギーや栄養分の量が重要な意義を持つ。このことからサブテーマ2では、高水温時の白化ストレスに対するサンゴの応答を規定する遠隔因子としてのサンゴの栄養状態と、従属栄養による資源獲得を診断（可視化）する指標を開発する。また、サンゴの白化緩和・回復促進のために人為的にサンゴに栄養補給を行う手法を実験的に検証し、考案された各種の生物化学的技術が実際にサンゴの栄養状態を改善する効果を有するかどうかを上記の指標により評価する。さらに栄養供給の改善によりサンゴの高温耐性を維持増進させて白化を予防する方法、並びにエネルギー補給を通して白化回復を促進する方法の効果を比較検討して政策提言に結びつけることを目指す。

### 2. 研究目標

1. 救済技術の検証と重点保護区の監視に応用するため、安定同位体比と化学組成に基づくサンゴの健全性診断指標を4種類以上策定して実測データで検証する。
2. 摂餌による栄養供給の判定に用いるアミノ酸分子種別窒素同位体比分析の分析精度を反復誤差0.2%以内まで向上させる（既往研究の水準では30 ng Nの試料に対して0.5%以内）。
3. 各国で開発が進められている代表的な白化予防救済技術3種以上を批判的に検討し、その実効性・費用対効果・副次影響を評価するための枠組を提示する。

### 3. 研究開発内容

#### (1) 安定同位体比・化学組成に基づく健全性診断指標の開発と高度化

動植物の炭素・窒素安定同位体比や化学組成は、その生物の栄養供給源や充足率を反映して変動することが知られている。このことを利用して、これらの項目の分析により、自然環境中のサンゴと共生藻のエネルギーと栄養分の供給経路と充足度を可視化する手法を開発し、試料処理から分析までの標準的手順を定式化した。具体的には、①貯蔵脂質量に連動するサンゴのバルク炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}C_{OC}$ ) と炭素/窒素比 (C/N)、②サンゴの従属栄養依存度に連動するサンゴと共生藻のアミノ酸分子種別窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}N_{AA}$ )、③窒素栄養塩の供給源、特に人為排水起源窒素への依存度に連動するサンゴのバルク窒素同位体比 ( $\delta^{15}N_{TN}$ )、④サンゴと共生藻の間の栄養的共役度を反映する両者の間での  $\delta^{13}C_{OC}$  及び  $\delta^{15}N_{TN}$  の差 ( $\Delta\delta^{13}C$  及び  $\Delta\delta^{15}N$ ) の4つの指標を対象として、これまでに実施した現地調査の試料を分析して得られたデータを利用してそれらの指標の有効性、自然条件下での変動性（種間変動・地理的変動・季節変動）について検証を行った。材料としては石垣島沿岸に生育する各種のサンゴを用いた。

#### (2) 操作飼育実験による白化防止技術の効果の検証

白化防止技術となり得るいくつかの有力な候補技術の効果を検証するために、サブテーマ1が中心になって琉球大学瀬底実験施設の飼育実験設備を利用した操作飼育実験が2回にわたって行われた。この中から、特に給餌による補助的栄養供給を行うことでサンゴの白化耐性を強化できるかどうかを調べた実験において、実験に用いたサンゴ試料を期間中経時的に採取し、サンゴと共生藻とに分離した上で、それぞれの安定同位体比・化学組成を上記(1)項の手法により分析した。材料としては同施設周辺海域に生育するクシハダミドリイシ (*Acropora hyacinthus*) を使用した。得られたデータをもとに、餌料の供給が実際にサンゴの栄養状態を改善して白化予防、もしくは白化時の生残率の向上に貢献しているかどうかを判定した。

#### (3) 各種白化予防救済技術の比較検討と効用の実験的評価

物理的または化学的な様々な操作によってサンゴの白化応答が改善されたり、白化状態からの回復が促進された事例は既往文献中に多数報告されている。そこでまず、これらを包括的にレビューして、効果の確実性やコスト面などの実用性の観点から批判的に検討し、その中で本研究で開発された生物化学的手法がなしうる貢献度を評価した。またそれらのアイデアの中から、中間研究成果報告書でも提示したいくつかの代表的な生物化学的白化緩和・回復手法（表II-2-1）のそれぞれについて実際の効用の程度、実施コスト、副次影響等を評価するため、上記(2)項に記したサブテーマ1との共同実験、及びサブテーマ2独自の水槽実験を実施することにより検証を行った。独自の水槽実験では沖縄本島で採取されて筑波大学下田臨海実験所で長期飼育されているアザミサンゴ (*Galaxea fascicularis*) を主な材料として用いた。

表II-2-1. 白化予防・救済策として考えられる生物化学的操作とその期待される効果

操作	効果
餌料（アルテミア等）の投与	白化予防、生存期間の延長、回復促進
機能強化餌料の投与	
金属富化アルテミア	抗酸化酵素（SOD）合成促進
UV防御物質を持つプランクトン	光阻害耐性の強化
水中溶存物質の操作	
栄養塩（ $NH_4^+$ , $PO_4^{3-}$ ）添加	白化予防効果、回復時の共生藻増殖促進
$NO_3^-$ の削減	活性酸素ストレスの緩和
抗酸化物質（マンニトール等）添加	活性酸素ストレスの緩和
金属イオン（Zn等）の添加	抗酸化酵素（SOD）合成促進
二酸化炭素の添加	光合成暗反応系の活性維持

### ※当初計画と異なる点

当初の研究計画では、上記の(1)項の健全性診断指標としてサンゴ組織の脂質・アミノ酸組成に基づく指標も検討する予定であったが、予備的な分析を通して試料の採取方法、保存条件と保存期間、脂質の抽出方法等が分析結果に大きな影響を及ぼし、実施期間中に信頼できる指標を確立することが困難と判断された(特に脂質組成)。またこれらの分析に必要な機器がアミノ酸分子種別窒素同位体比分析と重複するため十分なマシンタイムが取れなかったこともあり、研究が期間内に完了しなかった。

令和1年度末からのコロナ禍による移動制限・施設利用制限のため、当初予定していた沖縄における共同実験や野外実験の実施の目処が立たなくなったことから、(3)項末尾に記したようにサブテーマ2独自の室内水槽実験を企画し、延長期間である令和3年度に実施した。

上記(3)項に含まれる生物化学的白化緩和・回復手法の効果の実験的検証に関しては、コロナ禍による活動制限のために実験施設が利用できない期間があったことと、1種類の実験を終えるのに予想以上の長期間を要することが判明したため、表II-2-1に含まれる全ての項目を検証することができず、一部項目の検証にとどまった。また、十分な白化救済効果が定量的に検証できた手法については、それを実生態系に適用した場合の効果やコストに関してST4と共同でシミュレーションを行う予定であったが、実験的検証を実施できた項目に関しても効用と対価のバランスを定量化するために十分なデータが取れなかった場合が多く、アルテミア給餌の場合を除いて現在のところ実生態系でのモデル化までには至っていない。

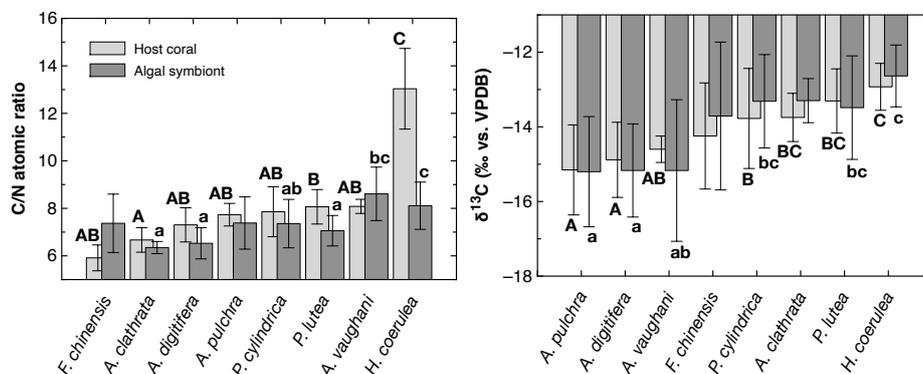
## 4. 結果及び考察

### (1) 安定同位体比・化学組成に基づく健全性診断指標の開発と高度化

はじめにサンゴの栄養状態の指標として利用される、前項に掲げた4つの指標に関して、それらの有効性と自然変動性に関する検証をそれぞれ以下のように行った<sup>1)</sup>。

①サンゴのバルク炭素安定同位体比( $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ )と炭素/窒素比(C/N)は、サンゴの栄養状態として貯蔵脂質量に連動する指標と考えられている。脂質は窒素を含まないか含むとしてもわずかであり、また脂質の $\delta^{13}\text{C}$ は生物体全体の $\delta^{13}\text{C}$ に比べて低いことが分かっているため、サンゴ組織中の脂質含量が高いほどC/N比は高く、 $\delta^{13}\text{C}$ は低くなると想定されるためである。

本研究では、サンゴ生体から水流噴射法、擦過法等により組織を共生藻もともに剥離させて人工海水懸濁液とした上で、サンゴ組織液は遠心上清として回収し、凍結乾燥することにより標品を得た。一方、共生藻は遠心沈澱物を反復遠心洗浄により精製、凍結乾燥することにより標品を得た。これらを希塩酸による脱炭酸処理(in-situ acidification)を経て元素分析計付き安定同位体比質量分析計で分析することにより、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ 、及びC/N比を求めた。 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ は国際標準物質(それぞれVPDB, 大気窒素)の同位体比に対する千分率偏差を示す。



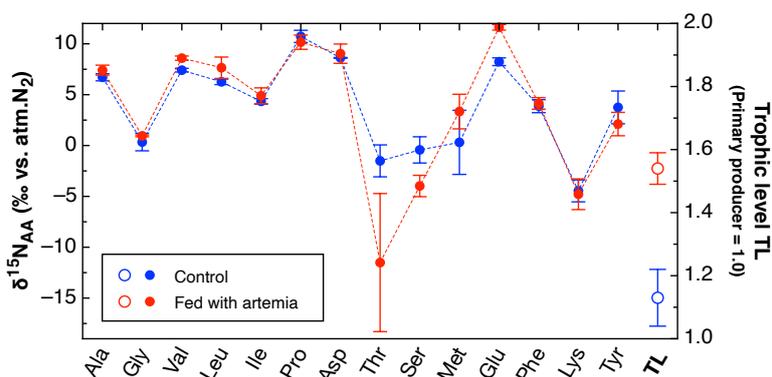
図II-2-1. サンゴ(host coral)とその共生藻(algal symbiont)の炭素/窒素比(C/N; 左)と炭素安定同位体比( $\delta^{13}\text{C}$ ; 右)の種間比較。いずれも石垣島のサンゴ礁で採取されたもの。A, B, a, bなどの記号は異なる記号間で有意差があることを示し、大文字はサンゴ組織、小文字は共生藻を表す。

どちらの指標も対象とするサンゴ種によって異なっていたが、同一種内であれば季節変動や採取場所による違いは相対的に小さかった(図II-2-1)。C/N比は特にアオサンゴ(*H. coerulea*)のサンゴ組織部分で高く、また $\delta^{13}\text{C}$ はアオサンゴや塊状ハマサンゴ(*P. lutea*)に比べて枝状サンゴ(*Acropora* spp. 等)で低かった。また $\delta^{13}\text{C}$ に関しては採取場所が外洋近くか海岸寄りかによって若干変化することが認められ、これは共生藻の光合成に利用される溶存無機炭素(DIC)の $\delta^{13}\text{C}$ の変動に連動しているものと推定された。したがって、よく制御された室内実験系の場合のように、同一サンゴ種内での比較であることとDICの $\delta^{13}\text{C}$ が比較対象区の間で有意に変化しないことが保証されているならば、サンゴ組織と共生藻の $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ とC/N比は、サンゴ宿主または共生藻にそれぞれ貯蔵されている脂質量に対する指標として利用できると考えられる。貯蔵脂質はサンゴの白化が起きた際の代替的エネルギー源として利用できるため、貯蔵脂質量が多いほど白化時のサンゴの生残率や生存期間が上昇すると期待される。

②アミノ酸分子種別窒素同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )は動物の食物段階をその餌資源をたどらずに決定できる手法として広く利用されるようになってきているが、サンゴを含む刺胞動物ではアミノ酸代謝経路が他の動物群と異なっていることから、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 指標が従来の研究例と同様のモデルを使って適用可能かどうか確認する必要がある。またサンゴのように共生藻類を持つ生物の場合に、宿主と共生藻の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ がどのような関係にあるのかもまだ十分に研究されていない<sup>2)</sup>。

本研究では①と同様にして得られたサンゴ組織と共生藻の標品に対して、文献3)に記載されている酸加水分解・誘導體化・GC/C/IRMS分析を適用することにより $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ を求めた。なお本研究ではサンゴ組織試料の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 測定の迅速化と測定精度改善のために、抽出と前処理の過程においていくつかの新しい工夫を試みている(本項末の「補遺」参照)。

$\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ の分析は特殊なハードウェアを必要とする上に実験手技上の難度が高く、実施可能な研究機関は世界でもなお少数に限られているが、その中でも最高水準にある海洋研究開発機構の研究設備では、アミノ酸標準物質を分析した際の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ の反復誤差が0.5%以内と報告されている<sup>3)</sup>。そこでまず、分担者等の研究室でこの水準の分析を達成できるように分析環境の整備を進め、可能であれば反復誤差0.2%以内となるように装置を最適化することを試みた。その結果、分析対象となる12種類のアミノ酸のうちグリシン、セリン、グルタミン酸の3種に関しては0.2%以内の反復誤差を達成した。またアラニン、バリン、ロイシン、アスパラギン酸、フェニルアラニンでは0.5%を下回る反復誤差となったが、残る4種のアミノ酸では反復誤差が0.5%を若干超える結果となり、全てのアミノ酸で目標を達成することはできなかった。なお本研究では従来測定されている12種類のアミノ酸に加えてリジンとチロシンの $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ の測定も試みたが、どちらも反復誤差が1%前後となり、目標の精度は得られなかった。



図II-2-2. サンゴ組織のアミノ酸分子種別 $\delta^{15}\text{N}$ の測定例。令和30年度の共同実験に用いたサンゴのうち、給餌を行わなかった対照区(青)とアルテミアを給餌した実験区(赤)の比較。給餌区のサンゴの方が食物段階(TL)が0.34だけ上昇していた。(エラーバーは3回測定の標準偏差)

標準物質ではなく実際のサンゴの試料の分析では夾雑物の影響により反復精度は悪くなるが、それでもアラニン、グリシン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニンでは反復誤差が0.5%未満に収まった(図II-2-2)。食物段階の解析上重要なアミノ酸はグルタミン酸とフェニルアラニ

ンであり、これらについては十分な精度が得られていると判断できる。

対象生物の食物段階はこれらの値を用いて次式により推定される<sup>3)</sup>：

$$\text{食物段階 TL} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glx}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1 \quad (\text{式1})$$

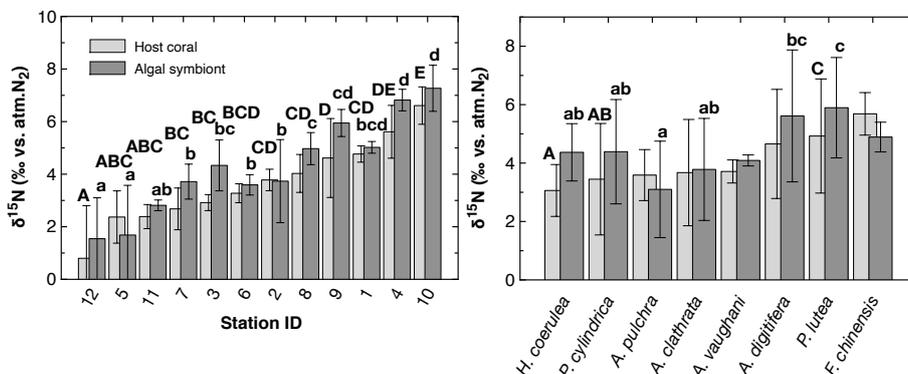
ここに $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glx}}$ と $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ はそれぞれグルタミン酸とフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値である。サンゴの場合、TL=1であれば共生藻の光合成にエネルギー源をほぼ依存していると判断される。TLが1より大きくなるほど、従属栄養(プランクトン等の捕食)に対する依存度が高いと判断される。

$\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ を食性解析に適用できるためには、まず対象となる食物網の基底にある一次生産者(サンゴの場合は共生する褐虫藻)の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ のパターンが既知でなければならない。そこで共生藻の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ のパターンを既往研究と比較したところ、共生藻の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ は一般に知られている真核性植物プランクトンやシアノバクテリアに見られるパターンとよく一致することが確認できた<sup>1)</sup>。次に、食物網を構成する消費者(サンゴの場合はサンゴ宿主)の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ の分布の特徴として、 $\delta^{15}\text{N}$ がその食物の値を反映するsource-AAと呼ばれるアミノ酸のグループと、 $\delta^{15}\text{N}$ がその食物よりも一定値だけ上昇する trophic-AA と呼ばれるグループに分けられることが知られている。そこでサンゴ宿主の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ についてこの関係を検証したところ、サンゴのアミノ酸に関しても一般的に知られている水生従属栄養生物と一致するパターンが見られることが確認できた<sup>1)</sup>。

以上から、サンゴ共生系の場合でも、サンゴ宿主と共生藻を分離精製した上で分析に供するのであれば、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ を用いた従来の食性解析の手法が適用可能であることが示された。本研究で改良された前処理方法を用いた場合、サンゴ試料に対する食物段階推定値(TL)の反復誤差は0.1未満となっており、食物段階が精度よく決定できることが分かる(図II-2-2)。ただしアミノ酸ごとの食物段階による濃縮係数(式1における3.4や7.6に対応する値)に関しては、サンゴのような刺胞動物では他の従属栄養生物の値とは必ずしも正確には一致しない可能性があり、今後のさらなるデータの集積が待たれる。

③サンゴのバルク窒素同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ )は、サンゴが共生藻の一次生産を通して獲得する有機物の窒素源を推定する指標として広く用いられている<sup>4)</sup>。共生藻が利用する窒素源は、化合物としては硝酸イオンやアンモニウムイオンなどの溶存無機物が主要なものであるが、溶存無機窒素の $\delta^{15}\text{N}$ は起源によって異なっており、サンゴ礁を囲む表層海水に内在的な溶存無機窒素に比べて、陸域から供給される汚染物質などに含まれる外来性溶存無機窒素の方が $\delta^{15}\text{N}$ が高い場合が多いとされている。

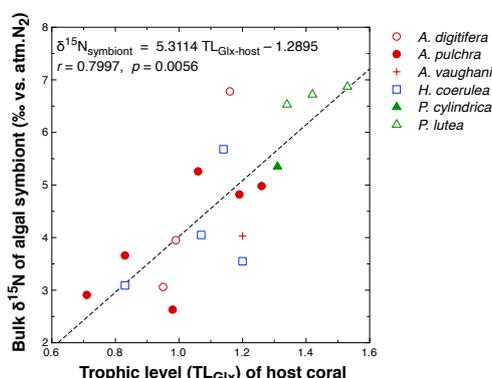
実際、異なるサンゴ礁域で採集されたサンゴの $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ は地点間で明瞭に有意差が見られ、下水や地下水起源の窒素負荷の高いサンゴ礁の試料ほど $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ が高くなることから(図II-2-3左; 分析方法は①と同じ)、サンゴの $\delta^{15}\text{N}$ は供給される窒素栄養塩によって大きく規定されていること、また概して富栄養な環境にあるサンゴ礁ほど $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ が高くなる傾向が認められる。また、サンゴ組織と共生藻の $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ を比較すると共生藻の方が $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ が若干高い場合が多いものの、地点間での変動傾向は両者でほぼ一致していた。



図II-2-3. サンゴ(host coral)とその共生藻(algal symbiont)のバルク窒素同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ )の人為起源窒素負荷の異なる様々なサンゴ礁間での比較(左)および種間比較(右)。いずれも石垣島のサンゴ礁で採取されたサンゴ試料。A, B, a, bなどの記号の意味は図II-2-1と同じ。

しかしながら特にサンゴ組織の $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ は、地点間の差ほど明瞭ではないものの種間差も確認でき(図II-2-3右)、*Favia*のような従属栄養依存度の高い種で $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ も高くなる傾向が認められた。また、栄養塩のみを直接利用する独立性藻類の $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ に比較すると、同一の場所で採取されたサンゴでも $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ が1~2‰高くなるが多かった。この事実も、サンゴは藻類と異なり従属栄養的にも窒素を獲得できることを反映しているものと考えられる。これらのことから、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ は窒素栄養塩の供給源の違いだけでなく、食物段階(従属栄養依存度)の違いも反映してしまうことが分かる。したがって、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ を窒素供給源に対する指標として用いる場合には、いくつかの代表的なサンプルに対して同時に②の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ を測定して、食物段階の違いを補正しておくことが望まれる。

一方、サンゴ組織の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ から推定したサンゴの従属栄養依存度(栄養段階TL)と、サンゴのバルク窒素同位体比(特に共生藻の $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ )との間に有意な正の相関が認められた(図II-2-4)。このことは、共生藻の $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ が高くなる、つまり富栄養化の進行したサンゴ礁ほど、そこに住むサンゴの従属栄養依存度が高まることを示唆している。このように栄養塩の供給源(または富栄養度)と従属栄養依存度は必ずしも独立に変化するわけではないことにも解釈上注意を要する。



図II-2-4. サンゴ組織成分のアミノ酸分子種別窒素同位体比 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ から式1を用いて推定されたそのサンゴの従属栄養依存度(TL)と、同じサンゴから抽出した共生藻の $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ との関係。

④サンゴと共生藻の間の $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ もしくは $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ の差( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ もしくは $\Delta\delta^{15}\text{N}$ ; いずれも共生藻の方が高い場合を正とする)はサンゴ宿主と共生藻との間で利用する炭素源や窒素源が異なる場合に大きくなると推定されることから、共生パートナー間の栄養的共役度を反映する指標と考えることができる。

今回調査したサンゴ試料の場合、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ と $\Delta\delta^{15}\text{N}$ のいずれも絶対値が概ね1‰以内と小さく、変動幅も小さかった。両者とも採集地点による有意差はなかった。 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ は冬季に負になり夏季に正になるという有意差が認められたが、 $\Delta\delta^{15}\text{N}$ にはこのような違いは認められなかった。 $\Delta\delta^{15}\text{N}$ には有意な種間差があり、従属栄養性の高い*Favia*で負、ハマサンゴ属とアオサンゴで正となり、ミドリイシ属では0に近いという結果になっているが、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ には有意な種間差は認められなかった。これらの傾向から、サンゴとその共生藻との間に炭素や窒素の受け渡しが行われている場合、その供与側よりも受容側の方が $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ がそれぞれ低くなる傾向があるのではないかという仮説が立てられる。しかしながら $\Delta\delta^{13}\text{C}$ や $\Delta\delta^{15}\text{N}$ を共生パートナー間の資源交換に対する信頼できる指標として確立するためには、操作実験等による検証がなお必要とされる。

**【補遺】アミノ酸分子種別窒素同位体比分析のためのサンゴ試料処理方法の改善**

サンゴ試料をサンゴ組織と共生藻とに分別して各種の分析を行う場合、通常行われる方法は、まずサンゴ組織を共生藻ごと剥離させて海水懸濁液とした上で、これに適当な重力をかけて遠心分離し、沈澱物を共生藻画分、上清をサンゴ組織画分と見做して扱うものである。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ や $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ を含む多くの分析項目に関してはこの分離方法で概ね満足のいく結果が得られる。しかしアミノ酸分子種別窒素同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )の分析のためには以下に述べるようにこの方法だけでは不十分であるため、分離方法の改善を試みた。

まず共生藻画分に関しては、上記の遠心分離法だけでは共沈して混入してしまう微量の宿主サンゴ組

織の影響が問題となる。というのは宿主組織には共生藻の数十倍から100倍以上の濃度のアミノ酸が含まれるためである。このため本研究では、遠心分離により得られる共生藻粗画分を、Ca, Mg-freeの人工海水に再懸濁し、孔径20  $\mu\text{m}$ のストレーナーを通して粒径の大きな宿主組織片を除去する作業を3回程度繰り返し行った。この操作により概ね $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ の分析に堪える純度の共生藻標品が得られる。しかし、宿主サンゴに由来する刺胞はストレーナーを通過する場合があるため、刺胞を多く含む組織懸濁液の場合はストレーナーによる精製後もなお共生藻標品中に多数の刺胞が混在していることが顕微鏡観察により確認された。共生藻細胞を宿主の刺胞から分離精製する試みとして、共生藻にクロロフィル由来の蛍光があることを利用してセルソーターを装備したフローサイトメーターにより分画することを試みた。しかし $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 分析に要する試料量をこの方法により得るためにはフローサイトメーターを6時間以上も連続稼働させなければならず、処理時間中の試料の変質が避けられない。また別の手法として、共生藻と宿主組織との密度差に着目して密度勾配遠心分離により分離する方法も試みたが、この方法も多大な時間と労力を要し、また共生藻を刺胞から完全に分離できる条件を見出すことは困難であった。このため現時点では共生藻画分をこれ以上分離精製することは断念し、本報告書中ではおもに宿主サンゴ組織部分の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ を報告することにした。

一方、遠心分離の上清として回収される宿主サンゴ組織液の方には、共生藻の残留があるとしてもアミノ酸量としては無視できるレベルである。しかしながら上清は海水懸濁液であるため高濃度の塩分が含まれており、このような試料をそのまま $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ の分析に供すると、アミノ酸の誘導体化が完全には進まないために顕著な同位体分別が起こり、信頼できる分析結果を得ることができない<sup>5)</sup>。この問題に対処するため本研究では、上清として回収された組織液に6%のトリクロロ酢酸を加えてタンパク質を凝集させたのち、超遠心分離で凝集タンパク質を電解質から分離し、沈澱物をアセトンで3回洗浄してトリクロロ酢酸を除去することによりサンゴ組織由来のタンパク質の標品を得た。この過程ではトリクロロ酢酸に反応しない単体アミノ酸等は除去されてしまい、またアセトン洗浄の過程でも幾分か損失があるものの、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 分析に適した良好な純度の十分な量の標品が得られた。こうして得られたタンパク質標品を塩酸加水分解、脱脂、誘導体化を経てGC/C/IRMSによる分析にかけたところ、主要なアミノ酸分子種に対して $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ の反復誤差が0.5%未満、式1による栄養段階(TL)の評価値の反復誤差が0.1未満という良好な結果を得ることができた。

## (2) 操作飼育実験による白化防止技術の効果の検証

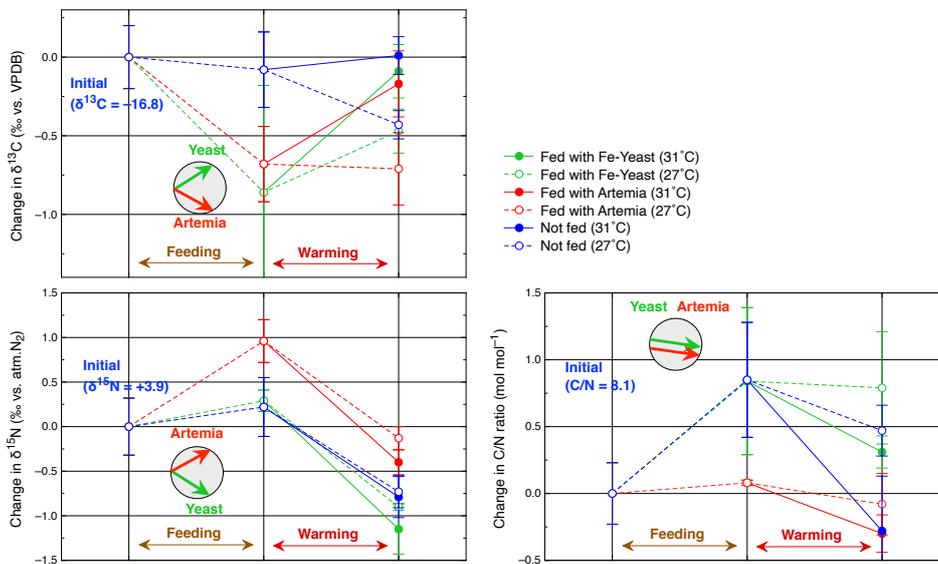
サンゴに対する給餌が白化を緩和するかどうかを検証することを目的とした室内実験が平成30年度と令和1年度にサブテーマ1を中心として琉球大学瀬底実験施設の屋内飼育施設にて実施された。

平成30年度の実験では、10月に採集され実験に適合したフラグメントに加工されたクシハダミドリイシ(*Acropora hyacinthus*)を約40日間水槽中で順化したのちに実験を開始し、開始4日後からアルテミア給餌区・金属付加酵母給餌区(Fe, Mn)、無給餌区に分けて給餌を開始し、14日間給餌後に昇温を開始した(高温区31°C、対照区27°C)。昇温中も給餌は続けられた。その結果、27°Cの対照区では白化が起らないのに対して、31°Cの高温区では給餌・無給餌フラグメントともに白化が進行した。しかし給餌したフラグメントでは無給餌のフラグメントに比較して生残率が改善され、特にアルテミア給餌区で顕著な改善が見られた(詳細はサブテーマ1の報告を参照)。

そこで各給餌区での白化応答の変化がサンゴの栄養状態の変化に起因するものかどうかを検証するために、サンゴを給餌開始前、給餌12日目、昇温完了後8日目に採取し、(1)項に記述した方法でサンゴ組織中のC/N,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ ,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ ,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ を分析した。

給餌前後のサンゴ組織の $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ と $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ を比較すると、アルテミア給餌区ではアルテミアの安定同位体比から予想される方向にサンゴ組織の同位体比が変化していたが、酵母給餌区では予想と一致しない変化を示した(図II-2-5)。C/N比は無給餌区でも上昇傾向が認められたが、アルテミア給餌区ではこの上昇傾向が弱まっていた。次に、昇温前後で比較すると、給餌区・無給餌区とも、高温区では対照区に比べて $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ が高く、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ が低く、C/N比も低くなる傾向が認められた。アミノ酸分子種別窒素同位体比から推定される従属栄養依存度に関しては、図II-2-2に例示したようにアルテミア給餌区のサンゴでは従

属栄養依存度(TL)が明瞭に高くなっていた。酵母給餌区のサンゴではTLのわずかな増加が見られたものの有意ではなかった。また、実験後期の試料では、無給餌区のサンゴでもTLが有意に上昇する傾向が認められた。



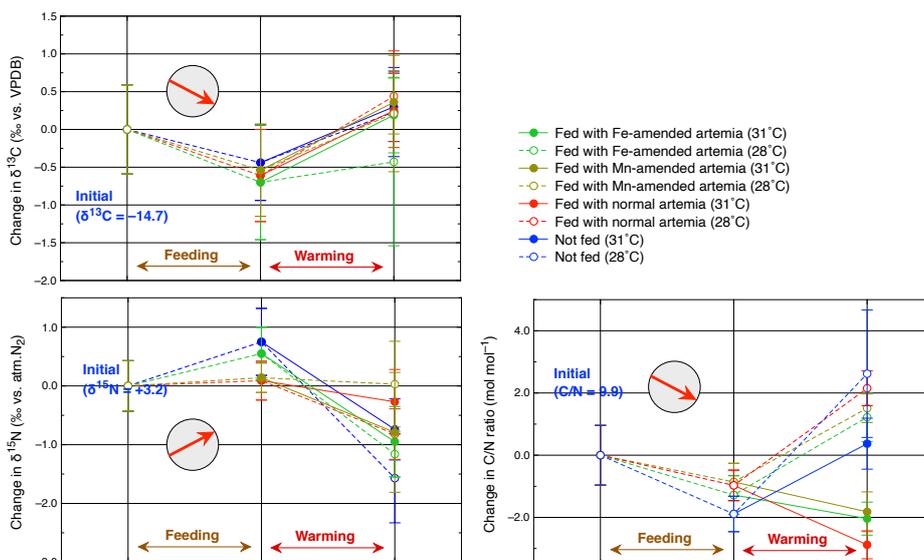
図II-2-5. 平成30年度の室内白化実験におけるサンゴ組織中の $\delta^{13}C_{oc}$ (左上),  $\delta^{15}N_{TN}$ (左下), C/N比(右下)の変化(給餌前、給餌後、昇温後の比較)。4個のフラグメントの平均値と標準偏差を示した。グレーの円の中の矢印は、酵母とアルテミアの安定同位体比とC/N比から、それらを摂食した場合に予測される変化の方向を示す。

以上の結果から、まずアルテミア給餌区では実際にサンゴが活発にアルテミアを摂食していたことが確認される。アルテミア給餌区で生残率の顕著な改善が見られたのは、アルテミアを摂食することにより副次的な栄養補給が得られたためである可能性が高い。一方、金属酵母給餌区では、 $\delta^{13}C_{oc}$ の変化からは何らかの生理的変化があったことが示唆されるものの、サンゴが酵母を摂食できたことを示す明白な証拠は得られなかった。また無給餌区の対照区のサンゴでも安定同位体比やC/N比の明瞭な変化が認められる事実は、飼育実験に使用した海水にもともと含まれていたプランクトン等がサンゴによって摂取されて、実験結果に予想外の効果をもたらしている可能性が示唆される。昇温時における安定同位体比やC/N比の変化は、いずれもサンゴ体内の貯蔵脂質量が昇温時に顕著に減少したことを示唆している。高温条件下では共生藻が十分に光合成を行うことができないため、代替的な栄養源として貯蔵脂質が消費されたものと考えられる。

この実験結果を受けて、令和1年度の実験では、同じクシハダミドリイシを材料として用い、給餌するアルテミアとして、通常の酵母を餌として生育したもの、鉄強化酵母を餌として生育したもの、マンガン強化酵母を餌として生育したものの3種類を用意し、これらに無給餌区を加えた4つの処理区を用意して前年度と同様の昇温実験を実施した。その結果、サンゴ表面の単位面積あたりの共生藻密度やクロロフィル濃度を比較すると、昇温区では対照区に比べて有意に低いこと、また対照区でも昇温区でも、給餌したサンゴでは無給餌のサンゴに比べて有意に高く保たれていることが示され、アルテミア給餌に白化緩和効果があることが再度示唆された。しかし給餌した3種類のアルテミアの間では、サンゴの応答には明瞭な違いが見られなかった(詳細はサブテーマ1の報告を参照)。

サンゴ組織の $\delta^{13}C_{oc}$ ,  $\delta^{15}N_{TN}$ , C/N比のパターンは前年度の実験結果とは異なり、実験期間中の変動幅が大きい上に、サンプル間のばらつきが大きく有意差がほとんど得られなかった(図II-2-6)。アルテミア給餌期間中の変動傾向はアルテミアの安定同位体比やC/N比から予測される向きと一致してはいるものの、無給餌区でも同様の変動が見られることから、摂食の結果としての変動なのかどうか判断できない。このため、給餌区のサンゴにおいて見られた共生藻密度やクロロフィル濃度の増大が摂食による栄養供給の結果としてもたらされたものなのかどうかは本実験では確認できなかった。しかしC/N比に対

する昇温の効果に関しては、高温区の方が対照区よりも一貫してC/Nが低くなっていることから、高温ストレスによる共生藻光合成機能の低下が貯蔵脂質の費消を帰結するという仮説は再度支持される。



図II-2-6. 令和1年度の室内白化実験におけるサンゴ組織中の $\delta^{13}C_{OC}$ (左上)、 $\delta^{15}N_{TN}$ (左下)、C/N比(右下)の変化(給餌前、給餌後、昇温後の比較)。4個のフラグメントの平均値と標準偏差を示した。グレーの円の中の矢印はアルテミアを摂食した場合に予測される変化の方向を示す。

### (3) 各種白化予防救済技術の比較検討と効用の実験的評価

#### 1. 既往研究のレビューに基づく各種白化対策とその効果の批判的検討

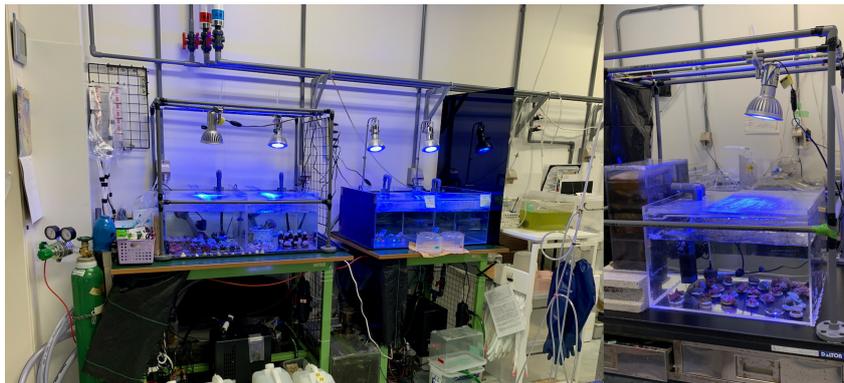
サンゴ礁の持続性および回復力を高めることを目的とした人的介入策に関する研究のレビューが National Academies Pressより2019年に公開された<sup>6)</sup>。この冊子では、具体的な人的介入方法やその効果や内容、現時点での実現可能性、適用できる規模や効果の制限、介入のリスク等についてまとめられている。例えば、遺伝子レベルの操作やストレス暴露による耐性強化、細菌叢の改変や遮光などの物理環境改変について述べられている。この中には、栄養補給によるストレス耐性を付与する効果が生理学的な介入として紹介されており、外的な給餌(ワムシやアルテミア幼生)が白化を軽減し、生存率を高めるといった結果が報告されている<sup>7,8)</sup>。但しこれらの研究では、給餌後のサンゴの栄養バランスについての理解が不十分で、餌となる生物のリーフ全体の輸送メカニズムについて知見が不足している。また、ストレス時の活性酸素生成に対し、アスコルビン酸やマンニトールといった抗酸化物質を添加することで、高水温白化が軽減されるという実験結果も紹介されている<sup>9)</sup>。一方で、海水中のMn濃度増加がクロロフィル濃度、光合成収率、光合成量を上昇させ、かつ高温ストレスによって白化せず、光合成や石灰化量を低下させないことが報告された<sup>10)</sup>。海水中のMnがサンゴの抗酸化酵素SODの活性を高めることで、高水温ストレスへの抵抗力を高める上で、重要な役割を果たしていると考えられている。但し、サブテーマ1で行ったようなSOD活性の実測などは行われておらず、Mnの効果は想像の域を出ない。

#### 2. 簡易室内実験による白化緩和・回復促進技術の比較

文献調査と並行して、知られている主要な白化対策手法の効果を簡易的に査定するための屋内モデル実験を実施した。当初の計画では表II-2-1に示した様々な生物化学的救済技術の効果を比較検討する予定であったが、1種類の実験に3ヶ月程度の期間を要することが判明したため、設備と時間の制約を考慮して、以下の3つの設問に答えることを目標とした。

1. 給餌による白化緩和を試みる場合、給餌は水温上昇より以前から開始する必要があるか、または高温ストレスがかかってからの給餌でも間に合うか?
2. 給餌の代わりに、白化の直接的原因と言われる活性酸素ストレスを軽減するための抗酸化剤等の薬物を投与することで緩和効果が得られるか?

3. 高温ストレスが過ぎ去ったのちに白化からの回復を促進するために有効な方法はあるか？  
屋内実験を実施するために、図II-2-7に示すような循環式の昇温実験水槽を導入設置した。



図II-2-7. 東京大学大気海洋研究所に設置された昇温実験用の循環式水槽。

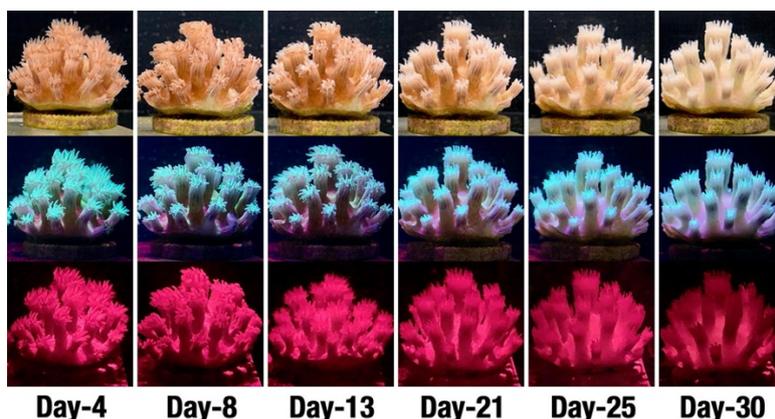
実験にはアザミサンゴ (*Galaxea fascicularis*) を使用した。サンゴは日常は培養ワムシと市販の液体餌料を定期的に給餌して健全な状態を維持したが、実験の目的によっては実験開始に先立つ3週間は絶食状態においた。通常は26°Cで飼育しているが、実験開始後は昇温区では1°C/日の速度で32°Cまで昇温し(昇温期)、3～5週間にわたり32°Cに維持した(高温維持期)。照明用LEDライトの出力を毎日6:00-11:00の間に0%から100%まで線形的に上昇させ、15:00まで100%で維持したのち、15:00-20:00の間に0%まで線形的に下げるという日周期を設定した。出力100%の状態での飼育中のサンゴ付近における光量が160-240  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となる。実験の目的によっては実験中のサンゴを別容器に入れ、温度を維持したまま2時間にわたり給餌や抗酸化剤投与等の操作を行い、その後また水槽に戻すという作業を昇温期と高温維持期の間、毎日実施した。

白化進行度の観察は、基本的に自然光ならびに近紫外線照射下での目視観察、及び青色単色光照射/赤色バンドパスフィルターを用いたクロロフィル蛍光の有無の観察により行った。アザミサンゴは32°Cにして10日から2週間で触手がほとんど出なくなり、3週間ほどでほぼ完全に白化したが、この条件では死亡することはなかった(図II-2-8)。

昇温期間終了後は1°C/日の速度で26°Cまで降温し(降温期)、そのまま26°Cで維持して白化からの回復の様子を観察した(回復期)。実験の目的によっては、降温・回復期間中にも上記と同様の1日2時間の給餌を行ったり、または光条件を高温維持期間中の40%に抑制するなどの操作を追加した。白化からの回復には降温完了後通常で3ヶ月程度を要した。

こうした実験を、条件を変えて4回実施した。その結果を要約すると以下のように整理される。

- 通常の給餌により健康状態を維持したサンゴに比べて、実験前に絶食させていたサンゴでは昇温後の衰弱(触手の縮退等)が明らかに早く、白化の進行も1週間前後早くなった。
- 昇温・高温維持期に入ってから市販の液体餌料の給餌を開始しても、白化緩和効果はほとんど確認できなかった。
- 昇温・高温維持期に光量を抑制すると、完全に白化するまでに要する時間が長くなった。
- 昇温・高温維持期に抗酸化剤としてカテキン(終濃度25  $\mu\text{M}$ )を投与すると若干の白化緩和効果が確認されたが、別の抗酸化剤であるアスコルビン酸(終濃度125  $\mu\text{M}$ )を投与した場合は効果が確認できなかった。
- 回復期間中に市販の液体餌料を推奨用量の10倍量給餌すると、共生藻の回復が若干早くなった(図II-2-9)。
- 昇温・高温維持期にカテキン処理やアスコルビン酸処理を行っていたサンゴでは、それを行わなかったサンゴに比べて回復期における共生藻の回復が若干早くなった。
- 回復期の光条件を40%に削減すると共生藻の回復が若干早くなった。



図II-2-8. アザミサンゴの白化の様子。上段は自然光、中段は近紫外線照射時の蛍光、下段はクロロフィルの赤色蛍光の写真。Day-7までに徐々に昇温して32℃とし、そのままDay-30まで32℃で維持した。Day-21までに触手がほとんど出なくなっており、給餌しても餌を捕獲できない状態になっていたと推定される。その後、急激に白化が進行してDay-30までにクロロフィルがほとんど失われた。



図II-2-9. 白化させたあと、回復期にあるアザミサンゴ。上段は回復期間中に液体餌料の投与を行っているサンゴで、下段の行っていないサンゴに比べて若干回復が速い（ポリプ上端の中央付近での共生藻による色付きが濃い）。

#### (4) 結論と提言

本研究の結果から、サンゴに給餌を行って栄養状態を改善維持することは白化救済策として有効であることが示された。しかし水温が白化温度付近に達してから対策として給餌を始めても間に合わない恐れが高く、水温が上昇する十分に以前から栄養状態を改善して維持する必要があると思われる。自然の広範囲のサンゴ礁に対して事前に長期間にわたり人工的給餌を続けることはコスト的に現実的とは言えないが、サンゴ礁の周辺環境(陸域・藻場等)を最適化すれば、さほどコストをかけずにサンゴ礁の栄養状態を改善することは可能と思われる。また、サンゴの栄養状態が高く維持される自然条件があらかじめ整っているサンゴ礁を特定して、そこを重点保護サイト(種苗供給拠点)として設定する方法も有力な政策オプションとなり得る。

天然のサンゴ礁の栄養状態のモニタリングの目的には(1)項で検討した各種の健全性診断指標が有益である。例えば $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ による窒素供給源の評価において人為起源窒素負荷が高いと示唆されるサンゴ礁は、白化が起きた後に回復しないままフェーズシフトに至る(恒久的に藻類群落になってしまう)リスクが相対的に高いサイトと考えられ、環境改善に向けた施策の検討が要請される。また特に、重点保護サイトとしてのポテンシャルを有するサンゴ礁を特定するためのスクリーニングには、アミノ酸分子種別同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )による栄養段階評価法も有用である。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ から従属栄養依存度が高いと判定されたサンゴ礁は、平生からサンゴにとっての良好な餌資源が供給されている場所である可能性が高いため

である。

サンゴの白化が起こった場合に、その回復率を向上させ回復速度を高めるには、白化によるサンゴの生理的なダメージを最小限にする努力が効果的と思われる。それにより白化終了時点でのサンゴ体内の共生藻残存数を或る程度維持できれば、白化からの回復が可能となり、かつ回復が早まると予想されるからである。高水温時の生理的ダメージを緩和するには、抗酸化剤として機能する化学物質の投与が一つの有効な手法となり得ることが示された。しかし本研究期間中にテストできた抗酸化剤の効果は必ずしも強力とは言えず、より効力の高い化学物質の探索と効果的な投与方法の比較検討のためなお研究を要する段階にある。またサンゴ種ごとの応答特性の違いについても今後の課題となっている。

遮光ネット等を用いた局所的な入射光量の抑制や、光量の低い高水深域への移植等も効果的であり、重点保護対象に設定したサンゴを緊急避難的に守る目的であれば検討に値するオプションと思われる。従来の研究では白化期間中の光量抑制が白化回避に有効とされてきたが、本研究では回復期間中の光量抑制もまた白化からの回復に有効である可能性も示唆されていることから、中長期的な光量抑制を実現する技術的ソリューションが求められる。

## 5. 研究目標の達成状況

第2項で記した3つの研究目標のうち、1については結果及び考察の(1)項に記載したように4種類の栄養状態評価指標を設定し、自然のサンゴ礁で得られたデータを用いて変動性を検証したほか、本研究で実施した共同室内実験においても活用したので、目標は達成されている。

2のアミノ酸分子種別窒素同位体比における精度向上に関しては、目標とした反復誤差0.2%未満を達成できたのは分析対象のアミノ酸のうちの一部にとどまった。分析装置や前処理装置のハードウェア面の制約を考えると、この水準の精度が現在のところ限界であるように思われる。しかし前処理方法等を改良した結果、実際のサンゴ試料を分析した場合でも大半のアミノ酸に対して反復誤差0.5%以内を達成しており、これは国際的なトップレベルの水準を満たすもので、実用上十分な分析精度である。

3の白化予防救済技術の比較検討に関しては、サブテーマ1と共同で行った実験を通して①給餌による栄養補給と②金属元素(Fe, Mn等)の補給の効果を検討した事に加え、独自の実験により③抗酸化剤の効果、④光量の抑制、⑤回復期における栄養補給の効果を検証した。しかし費用対効果と副次作用に関しては現時点ではデータが不足しており、それらの定量的評価に向けた枠組の確立までには至っていない。既往文献の包括的なレビューの助けも借りつつ、現段階で可能な提言を行った。

## 6. 引用文献

- 1) Fujii, T. and others (2020) Organic carbon and nitrogen isoscapes of reef corals and algal symbionts: Relative influences of environmental gradients and heterotrophy. *Microorganisms*, **8**, 1221. doi:10.3390/microorganisms8081221.
- 2) Ohkouchi, N. and others (2017) Advances in the application of amino acid nitrogen isotopic analysis in ecological and biogeochemical studies. *Org. Geochem.* **113**, 150-174. doi:10.1016/j.orggeochem.2017.07.009.
- 3) Chikaraishi, Y. and others (2009) Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr. Meth.* **7**, 740-750. doi:10.4319/lom.2009.7.740.
- 4) 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. In: N. Ohkouchi, I. Tayasu, & K. Koba (Ed.), *Earth, Life, and Isotopes*, (pp. 197-222). Kyoto, Japan: Kyoto University Press.
- 5) Takano, Y. and others (2010) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids: application to biogeochemical samples. *Rap. Comm. Mass Spectrom.*, **24**, 2317-2323. doi:10.1002/rcm.4651.
- 6) National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2019). *A research review of interventions to increase the persistence and resilience of coral reefs*. Washington, DC: The National Academies Press. doi:10.17226/25279.

- 7) Connolly, S.R., Lopez-Yglesias, M.A. and Anthony, K.R.N. (2012) Food availability promotes rapid recovery from thermal stress in a scleractinian coral. *Coral Reefs*, **31**, 951-960. doi:10.1007/s00338-012-0925-9.
- 8) Borell, E.M., and others (2008) The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **364**, 116-123. doi:10.1016/j.jembe.2008.07.033.
- 9) Lesser, M.P. (1997) Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs*, **16**, 187-192. doi:10.1007/s003380050073.
- 10) Biscéré, T. and others (2018) Evidence for mitigation of coral bleaching by manganese. *Sci. Rep.*, **8**, 16789. doi:10.1038/s41598-018-34994-4.

## II-3 オミックスとマイクロスケールから見る白化現象に対する適応性

国立大学法人筑波大学

生命環境系

Agostini Sylvain

湯山 育子 (平成30年～令和2年度)

〈研究協力者〉

国立大学法人筑波大学

生命環境系

Yang Sung Yin (平成30年～令和2年度)

### 【要旨】

サブテーマ3では、防止・救済策がサンゴの代謝活動や共生する細菌叢にとって有益な操作であるのかを分子レベルで検証する。そのためマイクロセンシング技術や網羅的遺伝子発現解析、バクテリア個体群解析の手法を用いて診断し、人工的な救済策のサンゴへの悪影響や白化への適応性を決定している因子を評価・特定し、防止・救済策に活かすことを目的とする。

次の3つの項目を研究目標とした。

(1) 高水温のストレス耐性や金属暴露に関連した遺伝子群の発現変動、共生菌の個体群変動から、白化救済技術のメカニズムや副作用に関係する遺伝子群および細菌叢を特定する。

(2) マイクロセンサー技術を用いてサブテーマ4が開発しているモデルに必要なパラメーターを取得する。

(3) 対策で用いる餌の効果が期待できる最小限の濃度を飼育実験によって求め、環境基準値以下となるよう方策を検討する。

救済技術の評価するために生理的なメカニズムまたはその技術による副作用を明らかにしなければならない。サンゴが捕食する餌の増加によって、海水中に有機物が増えることで細菌が増える可能性やサンゴに有害な病原菌が増える可能性が懸念される。また、白化現象は光合成システムが熱で壊れると活性酸素が発生し、細胞がダメージを受けることに起因すると考えられているが、生理的メカニズムはまだ完全には明らかにされてない。特に白化時の活性酸素の発生量や光阻害と光合成量の関係も不明であり、これらのパラメーターはサブテーマ4で開発している白化現象モデルに必要となる。

このようなことから、網羅的遺伝子解析(RNA-seq)とバクテリア個体群解析を行い、防止策によって分子レベルでどのような影響があるのか、サンゴ体内でのタンパク質の発現変動と細菌叢から悪影響評価を行った。さらに、白化ストレス下においてマイクロスケールでの代謝等を測定することで、給餌の有無や給餌量による白化への適応性を調べた。

網羅的遺伝子発現解析では、アルテミア幼生を供与したサンゴでは高温でも褐虫藻の増加が見られ、これにともない有機物や糖代謝などの代謝関連の遺伝子発現が上昇していることがわかった。温度により発現変動する遺伝子は給餌により抑制される傾向があり、ストレス緩和効果が示唆された。また、金属酵母よりもアルテミア幼生がサンゴの代謝活性を高め、褐虫藻密度の維持に効果的である可能性が示唆された。生存率に影響のある遺伝子として、グルタミン酸合成酵素やアンモニウム輸送、細胞のガン化に関わる遺伝子が検出された。物質代謝関連の発現が高いサンゴほど生存率が高く、細胞毒性に関する遺伝子を発現するサンゴほど生存率が低いことが明らかになった。

バクテリア個体群解析では、各種金属アルテミアの給餌や高温処理にかかわらず、サンゴの健全度の指標となるエンドゾイコモナス(Endozoicomonas)が優占しており、給餌の影響で減少する傾向は見られなかった。病原性微生物は餌の影響により増加せず、給餌がサンゴの細菌叢に大きな影響は与えず、有害なバクテリアの繁殖などの悪影響もみられないことがわかった。

最小限度の餌濃度の決定では、高温ストレスの期間に2個体/mlを与えた処理群以外で光合成収率と褐虫藻密度が低下したことから、金属酵母を与えたアルテミアを2個体/mlの濃度で与えることで、白化防止に効果があることが明らかとなった。

高水温や餌添加に関連する遺伝子群および細菌叢の特定では、金属アルテミア添加の対策によりサンゴの細菌および遺伝子発現に悪影響の反応は見られなかったことから、この目標は達成された。

白化現象のメカニズムに関連するパラメーターの取得では、光合成量、光阻害による光合成効率の低下、光条件下の呼吸量を測定し、日中と高温ストレスにおける光阻害とそれによる総光合成速度の低下を明らかにしたことから、この目標は達成された。

効果が期待できる最小限度の餌濃度の特定では、対策技術は金属酵母を与えたアルテミアを水中で2個体/mlになるまで減らすことが可能であることがわかったことから、この目標は達成された。

## 1. 研究開発目的

サブテーマ3では、抗酸化能と栄養状態の向上させる防止・救済策がサンゴの代謝活動や共生する細菌叢にとって有益な操作であるのかどうかを分子レベルで検証するために、マイクロセンシング技術や網羅的遺伝子発現解析の手法を用いて診断する。さらにエネルギー要求量の算出や遺伝子レベルでの悪影響の評価（バクテリア個体群解析）も同時に行う。

これらの知見をもとにオミックス、マイクロスケールで何が白化への適応性を決定しているのか、人工的な救済策がサンゴに影響を与えないかを明らかにし、防止・救済策に活かすことを目的とする。

## 2. 研究目標

サブテーマ3では白化現象の生理的メカニズムおよび対策法による効果のメカニズムや副作用を調べた。具体的に以下の三つの目標を取り上げた：

- ・高水温などのストレス耐性や骨格形成遺伝子、金属暴露に関連した遺伝子群の発現変動、共生菌の個体群変動から、白化救済技術のメカニズムや副作用に関係する遺伝子群および細菌叢を特定する。
- ・白化現象のメカニズムを調べるため、マイクロセンサー技術を用いてサブテーマ4が開発しているモデルに必要な3つのパラメーター(光合成量、光阻害による光合成効率の低下、光条件下の呼吸量)の取得を目指す。
- ・対策で用いる餌の効果が期待できる最小限の濃度を飼育実験によって求め、環境基準値以下となるよう方策を検討する。

## 3. 研究開発内容

救済技術の評価するために生理的なメカニズムまたはその技術による副作用を明らかにしなければならない。金属の添加による有益な効果または負の影響がこれまでに多数報告されている。例えば、高温ストレス下で熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein)の発現を下げ、酸化ストレスを緩和することが近年の研究で明らかにされている<sup>1)</sup>。また、マンガンは体内の活性酸素を減らす効果のある金属として報告されている<sup>2)</sup>。一方、金属による毒性や温度ストレスとの相互作用により負の影響も多数報告がなされている<sup>3-5)</sup>。金属に関する多くの研究は無機金属を対象としているが、本研究では金属含有酵母、プランクトンなど、有機物に含まれている金属を与えることで負の影響を減らすことが期待できる。一方で有機物の供給による直接的な影響を検討する事も必要である。サンゴは褐虫藻の光合成による独立栄養だけでなく餌による従属栄養によってもエネルギーを獲得することができる。サンゴが餌を捕食することにより褐虫藻密度や成長速度の増加が報告されている<sup>6-8)</sup>。しかし、その一方で海水中に有機物が増えることで細菌が増える可能性も指摘されている<sup>9)</sup>。細菌の増殖はサンゴにとって有害な病原菌が増える可能性が懸念される。さらに近年、サンゴの健康に必要な細菌叢としてのプロバイオティクスが注目されており<sup>10)</sup>、白化の防止対策により逆にプロバイオティクスが減る可能性も調べる必要がある。

また、白化現象は光合成システムが熱で壊れると活性酸素が発生し、細胞がダメージを受けることに起因すると考えられているが<sup>11)</sup>、生理的メカニズムはまだ完全には明らかにされていない。本研究では発生した活性酸素を除去するための抗酸化酵素の生産が金属または餌の供給により活性化するという仮説を立てている。白化現象の生理的メカニズムの基盤となっているのが光合成の光阻害現象である<sup>12, 13)</sup>。光阻害は過剰な光エネルギーによって生み出された電子が活性酸素を生成し、それが光合成を担うタンパ

ク質を破壊することで光合成が低下する現象である。このとき新たな活性酸素の生成も減少すると考えられ、サブテマ4の白化現象のモデルにもこのようなメカニズムが組み込まれている。しかし活性酸素をin vivoで測ることは困難であるため、白化時の活性酸素の発存量はわかってない。また光阻害と光合成量の関係も不明である。

このようなことから、サブテマ3では、サブテマ1および2で利用しているサンゴについて、網羅的遺伝子解析(RNA-seq)とバクテリア個体群解析を行い、防止策によって分子レベルどのような影響があるのか、サンゴ体内タンパク質の発現変動と細菌叢から悪影響評価を行った。さらに、白化ストレス下においてマイクロスケールでの代謝応答の測定方法を最適化し、これを用いて各ストレス処理群の代謝等を測定することで、給餌の有無や給餌量による白化への適応性を調べた。

そのために次の3項目について検討した。

- (1) 救済技術のメカニズムや副作用に関係する遺伝子群および細菌叢の特定
- (2) マイクロセンサー技術を用いての白化現象のメカニズム究明
- (3) 対策で用いる餌の効果が期待できる最小限の濃度の特定

#### 4. 結果及び考察

##### (1) 救済技術のメカニズムや副作用に関係する遺伝子群および細菌叢の特定

サブテマ1においてアルテミア幼生および金属強化酵母を供与し、高温ストレスに暴露したサンゴを用いて遺伝子発現解析を行い、サンゴの高温ストレス応答における給餌の効果についての影響を調べた。遺伝子発現解析の結果、無給餌条件において、常温と高温で発現差のある遺伝子は105個検出された。また、この105の遺伝子は給餌個体では大きな発現差は見られない傾向があった。さらに、各給餌条件と、無給餌条件で発現変動する遺伝子を比較したところ、Mn強化酵母では発現変動する遺伝子が1115個となり、給餌による影響が最も大きいことが明らかになった。各処理群のサンゴの生理学的応答と遺伝子発現との関係をまとめると、アルテミア幼生を供与した個体では高温でも褐虫藻の増加の効果が見られ、さらに遺伝子発現を調べるとアルテミア幼生を与えたサンゴでは有機物や糖代謝などの代謝関連の遺伝子発現が上昇していることがわかった。これまでの結果から、温度により発現変動する遺伝子は、給餌によりその変動が抑制される傾向があり、給餌のストレス緩和効果が示唆された。また、金属酵母を与えたサンゴよりもアルテミア幼生がサンゴの代謝活性を高め、褐虫藻密度の維持に効果的である可能性が示唆された。

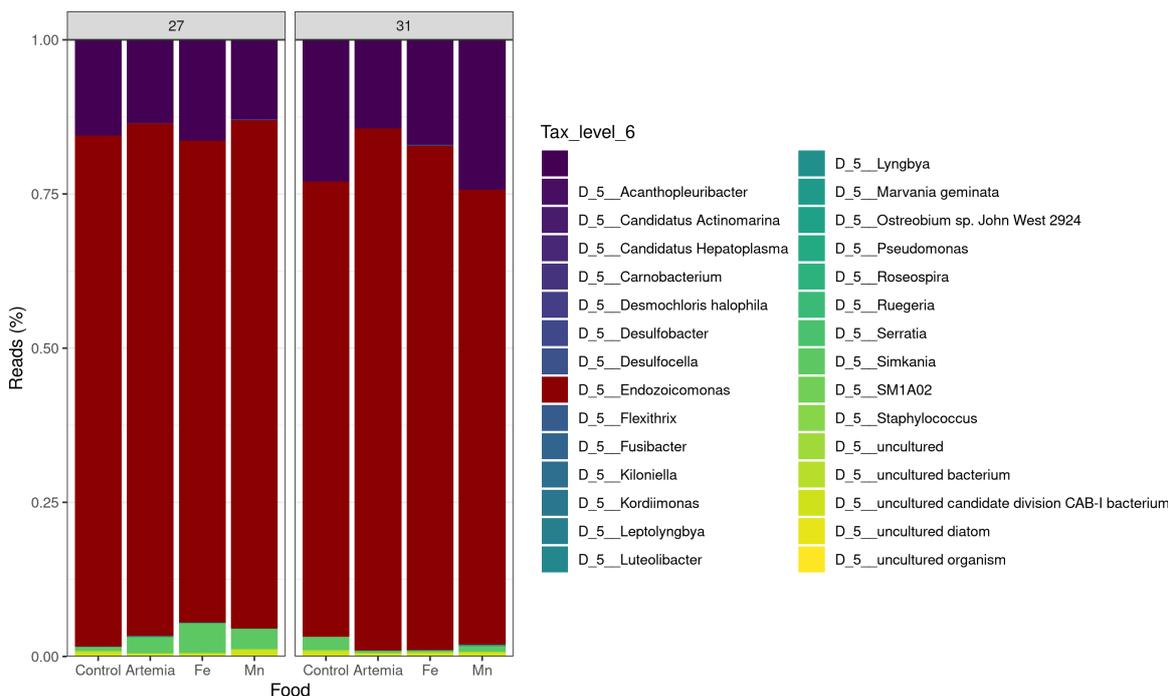
表II-3-1. 各処理条件の比較により検出された発現変動する遺伝子数 (DEG数)

飼育条件	DEG数
27°C vs 31°C (給餌なし)	105
給餌なし vs Fe 酵母給餌	0
給餌なし vs Mn 酵母給餌	1115
給餌なし vs Artemia 給餌	11

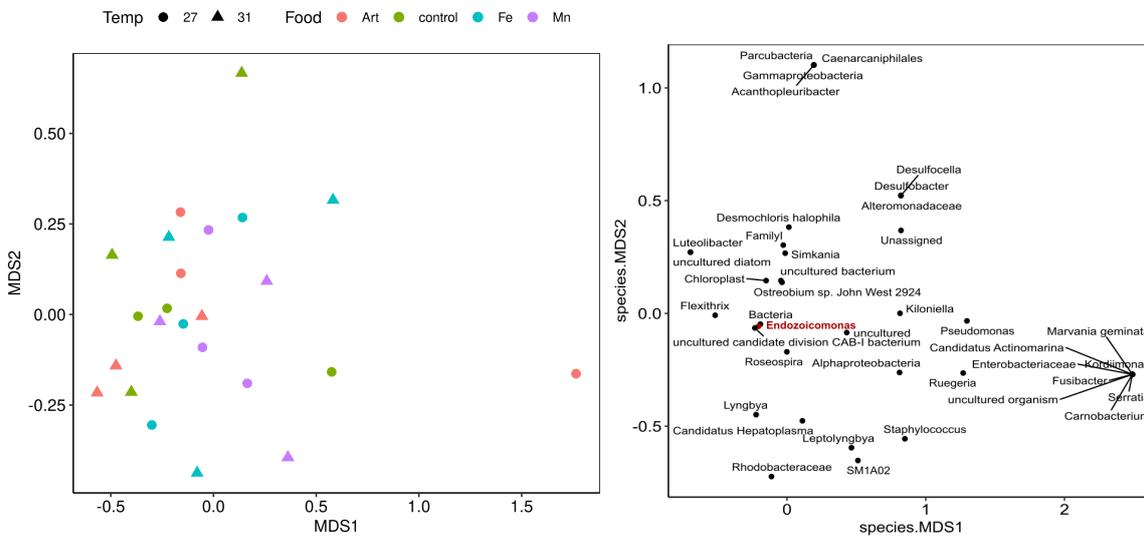
その後サブテマ1による金属酵母・アルテミア幼生の添加(2018年度)、および金属アルテミア添加(2019年度)の飼育実験で作成したサンゴ試料の遺伝子発現解析を行った結果と、生理学的な応答の結果をまとめて、各遺伝子発現と生理活性との関連性を調べる解析を行った。また、サンゴや褐虫藻のストレス反応に関連する遺伝子の推定を行った。その結果、褐虫藻の光合成能に関連する遺伝子として、硫黄代謝に関わる遺伝子、褐虫藻密度変化に関連する遺伝子としてγ-アミノ酪酸(GABA)を配位子とするイオンチャンネル受容体(GABA受容体)などが検出された。光合成能や褐虫藻密度はサンゴのストレス応答とも関連が大きいので、これらの遺伝子の変動がサンゴ-褐虫藻の健康状態の指標ともなると考えられる。また、生存率に正の影響を及ぼす可能性のある遺伝子として、代謝に関わるグルタミン酸合成酵素、アンモニウム輸送に関わる遺伝子群が検出され、負の影響を及ぼす可能性のある遺伝子として細胞のガ

ン化に関わる遺伝子が検出された。これらの結果から、代謝の高いサンゴほど生存率が高く、細胞毒性に関する遺伝子を発現するサンゴほど生存率が低いことが明らかになった。

サブテーマ1において2019年度に金属アルテミアを給餌し高温ストレスに暴露したサンゴ試料について細菌叢解析を行った。その結果、サンゴ体内で優占するバクテリアとしてエンドゾイコモナス (Endozoicomonas)が検出された(図II-3-1)。また、多次元尺度構成法による解析では、特定の温度条件や餌条件に偏ることなく均一に分散しており、エンドゾイコモナスを中心とした細菌叢と関係していることが示された(図II-3-2)。エンドゾイコモナスは高温耐性を持つサンゴにおいて検出されることが報告されており、サンゴの健康の指標にもなるバクテリアである。今回各種金属アルテミアの給餌や高温処理にかかわらず、ほとんどのサンゴで優占してエンドゾイコモナスが検出され、給餌の影響で減少する傾向は見られなかった。



図II-3-1：金属アルテミア供給実験におけるサンゴの細菌多様性（属レベル）。

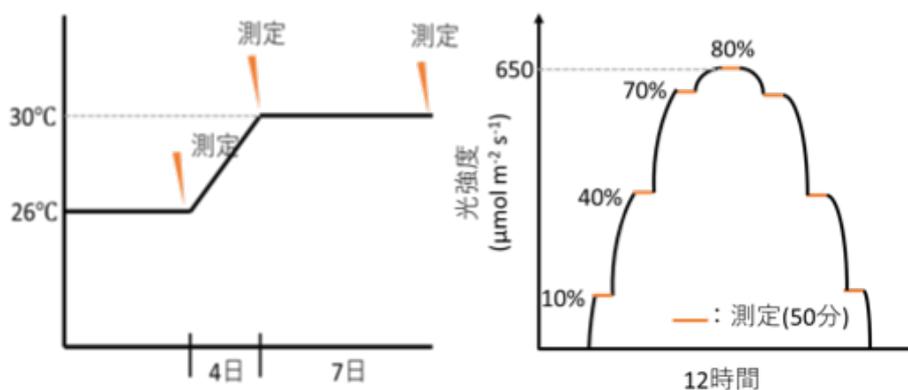


図II-3-2：金属アルテミア供給実験におけるサンゴの細菌群集の多次元尺度構成法解析

そのほか、サンゴにとって病原性微生物であるビブリオ(Vibrio)やファムキューテス(Firmicutes)は温度や餌の影響により増加しないことが明らかになった。給餌の影響としてサンゴ体内の細菌組成の変化によるサンゴへの負の影響も考えられたが、今回の結果から給餌がサンゴの細菌叢に大きな影響は与えず、有害な細菌の繁殖などの悪影響もみられないことがわかった。

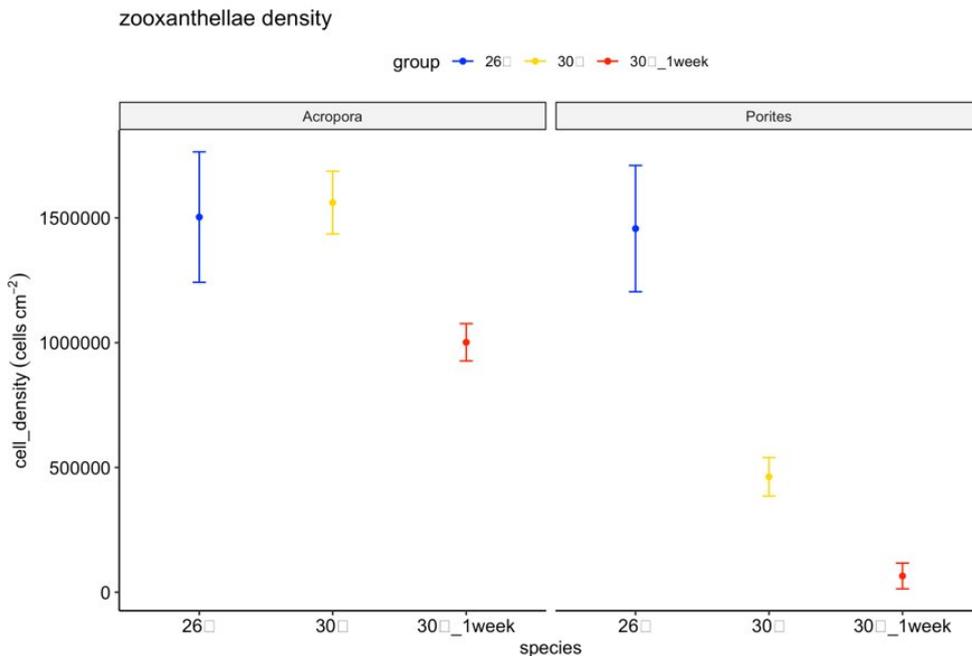
(2) マイクロセンサー技術を用いたの白化現象のメカニズム究明

サンゴに熱ストレスを与えて、日中と同じ光条件で純光合成、総光合成と光阻害を測定した。純光合成と総光合成の測定には、マイクロセンサー法を用い<sup>14, 15)</sup>、光阻害の測定にはパルス振幅変調蛍光法(PAM 蛍光法)(Junior PAM, Heinz Walz GmbH)を用いた<sup>16)</sup>。実験には2種類のサンゴ(フタマタハマサンゴ、エンタクミドリイシ)を用いて、水温26℃の水槽条件で1週間ならした後、水温を26℃から1日に1℃の昇温速度で30℃に上昇させ、高水温を一週間維持した。測定は26℃で1週間後、30℃に昇温後、1週間の高水温後に行った(図II-3-3)。



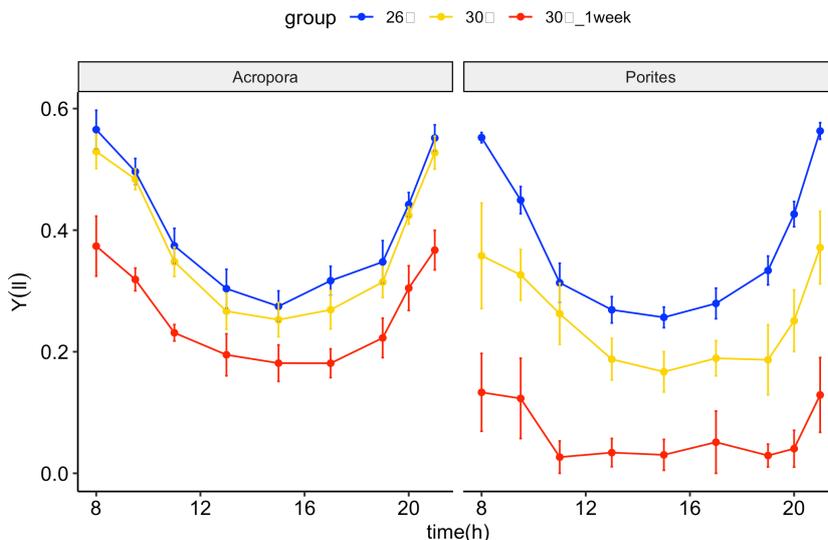
図II-3-3 : マイクロセンサーを用いた白化の実験での水温と光条件

その結果、エンタクミドリイシとフタマタハマサンゴでは30℃で白化現象が確認された。特にフタマタハマサンゴでは30℃になった時点で褐虫藻密度は通常の3分の1になり、30℃で1週間経過したあとでは完全に白化した(図II-3-4)。



図II-3-4 エンタクミドリイシとフタマタハマサンゴにおける各水温での褐虫藻密度。

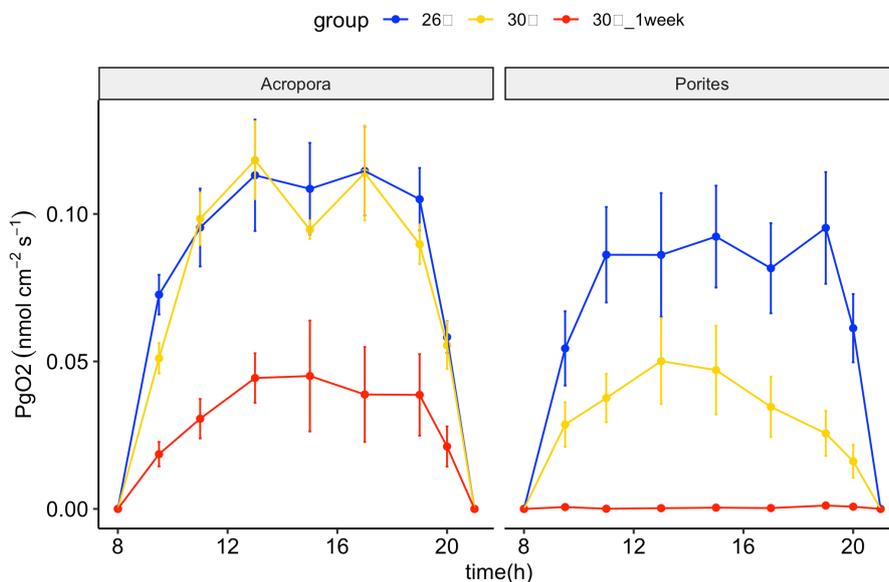
光の日周強度変動に対し、強光下において光強度の履歴を反映した光化学系の実効量子収率(Y(II))が低下し、高水温期間が長くなるほど著しく低下した(図II-3-5)。これは光阻害によるものと考えられ、高温ストレスは光阻害をより進行させると考えられる。



図II-3-5 : エンタクミドリイシとフタマタハマサンゴにおける各水温と光条件(時間)での光合成の実効量子収率

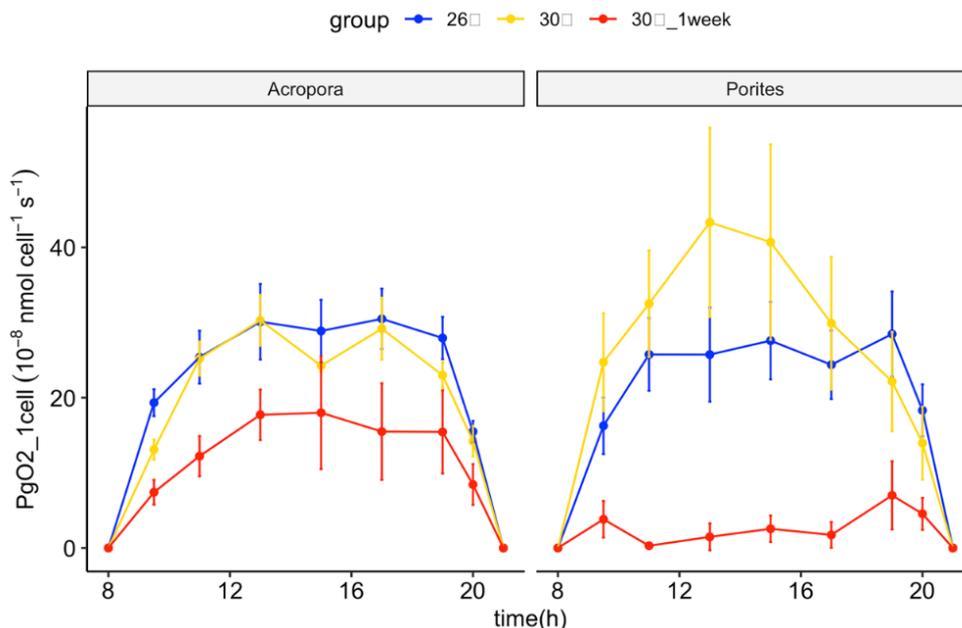
強光下では単位面積当たりの純光合成速度が飽和し、高温ストレスにより光合成速度が低下した。白化したフタマタハマサンゴではほとんど純光合成速度は見られなかった(図II-3-6)。純光合成速度の低下の一部は褐虫藻密度の低下によると考えられる。

PgO2



図II-3-6 : エンタクミドリイシとフタマタハマサンゴにおける各水温と光条件(時間)での純光合成速度(面積あたり)。

褐虫藻1細胞あたりの純光合成速度は単位面積あたりと同じ変動を示した(図II-3-7)。そのことから面積あたりの純光合成速度の低下は褐虫藻そのものの光合成能力の低下にもよることが明らかとなった。今回の結果により、高温および強光ストレス条件下では、光合成の低下は褐虫藻密度の低下および光阻害の進行に起因することが示唆された。

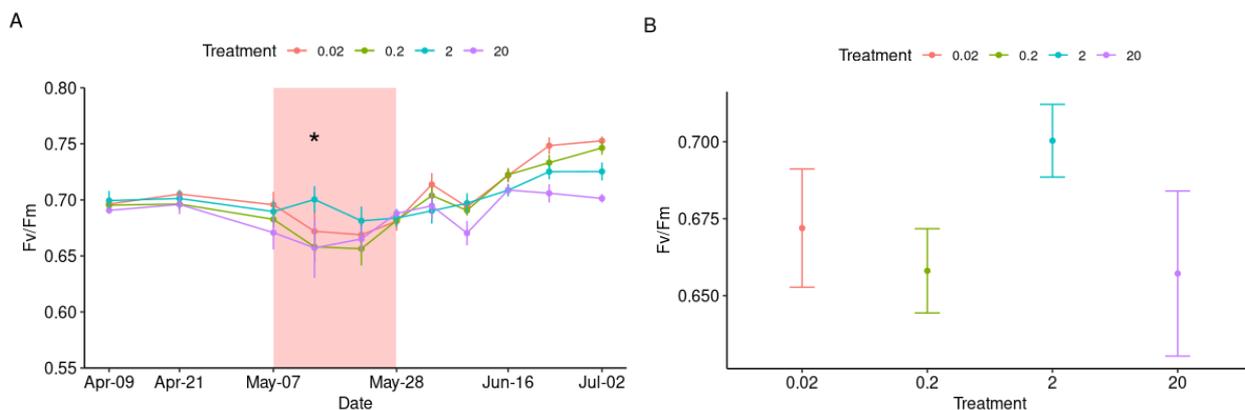


図II-3-7: エンタクミドリイシとフタマタハマサンゴにおける各水温と光条件(時間)での純光合成速度(褐虫藻あたり)

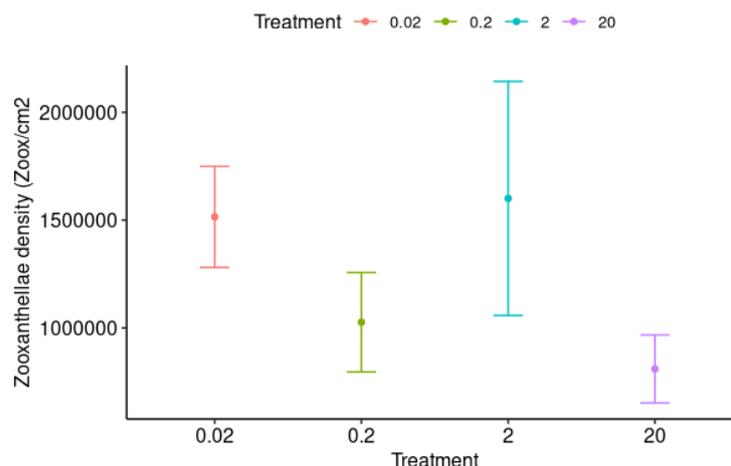
(3) 対策で用いる餌の効果が期待できる最小限の濃度の特定

対策におけるサンゴの副作用または環境への影響を最小にするためには、餌の供給量を最小限に抑えることが重要である。さらに餌の供給量を効果のある範囲で減らすことができれば対策実施のコストを下げる事が可能となる。最小限濃度の特定ではエンタクミドリイシを用いて、2週間金属酵母を与えたアルテミアをサンゴに与えた。異なる濃度のアルテミア0.02, 0.2, 2, 20個体/mlを毎日供給し、水温を26℃から1週間かけて30℃に上昇させた。この高水温を2週間維持した後、26℃に戻し6週間飼育した。実験中は生存率、光合成効率を測定し、高温ストレスの後に褐虫藻密度を測定した。

高温ストレスの期間では2個体/mlを与えた処理群以外では光合成の最大量子収率と褐虫藻密度が低下した(図II-3-8および図II-3-9)。その結果から、金属酵母を与えたアルテミアを2個体/mlの濃度で与えることで、白化防止に効果があると考えられる。それ以下の濃度では効果が見られなかった。さらに、20個体/mlを与えた処理群では、褐虫藻密度や光合成収率は低濃度でアルテミアを与えた群より低くなり、回復も遅れた。つまり、アルテミアを20個体/ml以上の密度で与えると悪影響が起こると考えられる。



図II-3-8 (A)実験中における光合成の最大量子収率(Fv/Fm)。赤い四角は高温ストレス期間を示す。(B) 5月14日における光合成収率であり、(A)の\*のついた日の測定結果。



図II-3-9：5月14日における褐虫藻密度。

## 5. 研究目標の達成状況

### (1) 救済技術のメカニズムや副作用に関係する遺伝子群および細菌叢の特定

2019年の実験で使った対策技術によるサンゴの細菌および遺伝子発現に悪影響の反応は見られなかった。この目標は概ね達成されている。課題としてはサンゴ以外の生き物への影響を調べる必要がある。

### (2) マイクロセンサー技術を用いての白化現象のメカニズム究明

日中と高温ストレスにおける光阻害とそれによる総光合成速度の低下を明らかにした。モデルのバリデーションに必要な3つのパラメーターである光合成量、光阻害による光合成効率の低下、光条件下の呼吸量を取得することができた。この目標は概ね達成されている。課題としてはこの光阻害による活性酸素の発生の防止を明らかにすることである。

### (3) 対策で用いる餌の効果が期待できる最小限の濃度の特定

本研究で試行した対策技術は金属酵母を与えたアルテミアを水中で2個体/mlになるまで調整する必要があることがわかった。それ以下の濃度では効果が見られず、それ以上では悪影響が発生する可能性が示された。この目標は達成することができた。

## 6. 引用文献

- 1) E. Montalbetti, T. Biscéré, C. Ferrier-Pagès, F. Houlbrèque, I. Orlandi, M. Forcella, P. Galli, M. Vai, D. Seveso, Manganese Benefits Heat-Stressed Corals at the Cellular Level. *Frontiers in Marine Science*. **8**, 803 (2021).
- 2) T. Biscéré, C. Ferrier-Pagès, A. Gilbert, T. Pichler, F. Houlbrèque, Evidence for mitigation of coral bleaching by manganese. *Sci Rep*. **8**, 16789 (2018).
- 3) J. da S. Fonseca, L. F. de B. Marangoni, J. A. Marques, A. Bianchini, Effects of increasing temperature alone and combined with copper exposure on biochemical and physiological parameters in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia harttii*. *Aquatic Toxicology*. **190**, 121-132 (2017).
- 4) A. P. Negri, M. O. Hoogenboom, Water Contamination Reduces the Tolerance of Coral Larvae to Thermal Stress. *PLoS ONE*. **6**, e19703 (2011).
- 5) A. Reichelt-Brushett, M. Hudspeth, The effects of metals of emerging concern on the fertilization success of gametes of the tropical scleractinian coral *Platygyra daedalea*. *Chemosphere*. **150**, 398-406 (2016).
- 6) E. BORELL, A. YULIANTRI, K. BISCHOF, C. RICHTER, The effect of heterotrophy on

- photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **364**, 116-123 (2008).
- 7) C. Ferrier-Pagès, D. Allemand, J. Jaubert, F. Rassoulzadegan, Microheterotrophy in the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*: Effects of light and ciliate density. *Limnology and Oceanography*. **43**, 1639-1648 (1998).
- 8) F. Houlbrèque, E. Tambutté, C. Richard, C. Ferrier-Pagès, Importance of a micro-diet for scleractinian corals. *Marine Ecology Progress Series*. **282**, 151-160 (2004).
- 9) A. F. Haas, M. F. M. Fairouz, L. W. Kelly, C. E. Nelson, E. A. Dinsdale, R. A. Edwards, S. Giles, M. Hatay, N. Hisakawa, B. Knowles, Y. W. Lim, H. Maughan, O. Pantos, T. N. F. Roach, S. E. Sanchez, C. B. Silveira, S. Sandin, J. E. Smith, F. Rohwer, Global microbialization of coral reefs. *Nat Microbiol*. **1**, 1-7 (2016).
- 10) R. S. Peixoto, M. Sweet, H. D. M. Villela, P. Cardoso, T. Thomas, C. R. Voolstra, L. Høj, D. G. Bourne, Coral Probiotics: Premise, Promise, Prospects. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **9**, 265-288 (2021).
- 11) C. a Downs, J. E. Fauth, J. C. Halas, P. Dustan, J. Bemiss, C. M. Woodley, Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free radical biology & medicine*. **33**, 533-43 (2002).
- 12) S. Takahashi, T. Nakamura, M. Sakamizu, R. van Woesik, H. Yamasaki, Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. *Plant and Cell Physiology*. **45**, 251-255 (2004).
- 13) S. Takahashi, N. Murata, How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*. **13**, 178-182 (2008).
- 14) D. de Beer, M. Kühl, N. Stambler, L. Vaki, A microsensor study of light enhanced Ca<sup>2+</sup> uptake and photosynthesis in the reef-building hermatypic coral *Favia* sp. *Marine Ecology Progress Series*. **194**, 75-85 (2000).
- 15) M. Kühl, Y. Cohen, T. Dalsgaard, B. Jorgensen, N. P. N. Revsbech, M. Kuhl, B. B. Joergensen, Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied with microsensors for O<sub>2</sub>, pH and light. *Marine Ecology Progress Series*. **117**, 159-172 (1995).
- 16) S. Beer, M. Ilan, A. Eshel, A. Weil, I. Brickner, Use of pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry for in situ measurements of photosynthesis in two Red Sea faviid corals. *Marine Biology*. **131**, 607-612 (1998).

## II-4 生体内反応を考慮した白化モデルの開発と白化防止・救済策の効果予測

国立大学法人東京工業大学

環境・社会理工学院

〈研究協力者〉

中村隆志

Lawrence Patrick C. Bernardo

(平成30年4月～令和2年7月)

### 〔要旨〕

サブテーマ4では、サンゴ白化のモデル化のために、まず実験データを尤も良く説明できる白化のメカニズムの検討を行った。白化現象がROSの発生およびそのリスクを緩和させるための対処であると仮定すると、褐虫藻およびサンゴのROSの発生対策として持てるアクションは主に、① 光阻害によって電子伝達を絞る、② 褐虫藻1細胞あたりのクロロフィル量を減らす、③ サンゴの褐虫藻密度を減らす、の3つであると考えた。この内、②は褐虫藻のROS対策に伴う白化、③はサンゴのROS対策に伴う白化であり、白化にも二種類メカニズムがあることを考慮する必要があることが分かった。また、この対策を講じてから元の状態に戻るためにかかる時間はそれぞれ大雑把に、① 数時間程度、② 数日程度、③ 100日程度となるため、ROS対策は①→②→③の順番に対策が講じられるものと考えた。そして、これらのメカニズムを考慮して褐虫藻およびサンゴの生体内反応を詳細に定式化したサンゴの白化モデルを開発した。その結果、サンゴの白化前に起こる光阻害の状況や、褐虫藻あたりのクロロフィル量の減少、サンゴ体内の褐虫藻密度の減少など、上記の異なるメカニズムでの白化現象の再現に成功した。このモデルを用いて給餌を行った場合と行わなかった場合とでの高温ストレス下での応答を計算した結果、給餌を行わなかった場合は褐虫藻あたりのクロロフィル量の低下は少なかったものの褐虫藻密度が低下したことで、白化からの回復に長い時間を要した一方、給餌を行った際には褐虫藻あたりのクロロフィル量は低下したが、褐虫藻密度はあまり下がらなかったため、クロロフィル量が速やかに回復し白化からの回復は早かった。この結果はST1の実験結果を良く再現している。このことから、白化の影響の緩和や白化からの回復には、サンゴの栄養状態を良好に保つことが重要であることがモデル研究からも支持された。次に、この白化モデルを実海域への拡張するために、サンゴ礁域の3次元流動-物質循環モデルと上述のサンゴ白化モデルとを結合させて、実海域でのサンゴ白化状況を再現するためのモデルフレームワークの開発を行った。さらにこのモデルシステムを石西礁湖海域へ展開するために、多重ネスティングによって石西礁湖海域を高時空間解像度で再現できるモデルを開発し、1994年から2020年までの26年間の長期ハインドキャストシミュレーションを行って当時の水温環境を再現した。この結果を用いた白化指標 (Degree Heating Week; DHW)<sup>1,2,3)</sup>とモニタリングサイト1000事業で観察された白化率とを比較すると、当時の白化状況を良く表していることが確認できた。この技術は、全球や領域の海洋・気象の再解析/現業解析プロダクトからダウンスケーリングする手法であり、日本全国のサイトに容易に適用可能である。本技術は、環境データが不足している全国の生態系のモニタリングサイトにおいて環境データを復元する強力な手法になり得る。実際の石西礁湖海域での白化防止・救済策の効果を検証するための数値シミュレーションの実施には至らなかったものの、それ以外の目標は概ね達成された。

### 1. 研究開発目的

実験室や屋外水槽のレベルで検討した抗酸化能向上や栄養状態改善の方法を実際の海域に拡張するためには対象海域に適したモデルの構築と解析が不可欠となる。そのため環境に対するサンゴの白化応答やそこからの回復過程までを記述できる白化モデルの開発を行い、白化抑制効果や白化からの回復促進効果の再現を行う。このモデルを流動場モデルに統合して生態系スケールに拡張し、防止・救済策の有無で白化状況にどの程度違いが出るかを数値シミュレーションによって推定することで対応策の実効性を検証する。

### 2. 研究目標

1. 既往文献およびサブテーマ1-3の実験結果を基に、サンゴが白化現象の際に引き起こされる妥当な生体内反応を推定し、それらの生体内反応を組み込むことでサンゴの白化プロセスや白化に伴うサンゴの死亡率、および白化からの回復過程を、Willmott (1981) のSkill Index<sup>4)</sup> (1が完全一致、0が不一致) において0.7以上の精度で再現出来る白化モデルの開発を行う。

2. サブテーマ1-3の実験結果から、白化防止・救済策を講じた際の生体内反応を理解し、そのプロセスを白化モデルに組み込み、WillmottのSkill Index で0.65以上の精度でサンゴの応答を再現出来るようにする。
3. 白化モデルを3次元流動モデルに結合して生態系スケールに拡張する。
4. 上記結合モデルを石西礁湖海域に適用し、防止・救済策の有無で白化状況にどの程度違いが出るかを数値シミュレーションによって推定することで対応策の実効性を検証できるようにする。

### 3. 研究開発内容

#### (1) サンゴの白化メカニズムの解明とサンゴの生体内反応を考慮したサンゴの白化モデルの開発

ST1~3から得られた成果や既往研究の知見を基に、結果を満足する尤もらしいサンゴの白化メカニズムを提唱する（詳細は後述）。そして、すでに開発済みのサンゴの海洋酸性化に対する応答や流れに対する応答などをシミュレートできるサンゴポリプモデル<sup>5,6)</sup>に、上記のサンゴの白化メカニズムをサンゴの生体内反応まで考慮してモデル化し、組み込むことで、水温や給餌の状況などに応じた実験結果を満足するサンゴの白化応答やそこからの回復過程までを記述できるモデルの開発を行った。

#### (2) サンゴ白化モデルとサンゴ海域の流動-物質循環モデルとの結合

実際のサンゴ礁域は遠浅な海域であるために、海洋面や海底面からの少しい熱フラックスや物質フラックスによって水温や水質がダイナミックに変動する。サンゴ礁域の水温の時空間変動を再現し、白化モデルにインプットするためにサンゴ礁域の3次元流動-物質循環モデルと上述のサンゴ白化モデルとを結合させて、実海域でのサンゴ白化状況を再現するためのモデルフレームワークの開発を行った。また、このモデルを石垣島白保サンゴ礁域へと適用させ、モデルのパフォーマンスを検証した。

#### (3) ハインドキャストシミュレーションによる石西礁湖海域の過去26年間の水温環境復元

石西礁湖海域へ展開するために、多重ネスティングによって石西礁湖海域を高時空間解像度で再現できるモデルを開発し、1994年から2020年までの26年間の長期ハインドキャストシミュレーションを行って当時の水温環境を再現した。また、このハインドキャストシミュレーションの結果を用いた白化指標（Degree Heating Week; DHW）<sup>1,2,3)</sup>と、環境省・生物多様性センターによるモニタリングサイト1000事業で観察された白化率の履歴との比較を行った。

#### \*当初計画と異なる点

当初の研究計画では、サンゴの白化から回復までの一連のプロセスについて精度を検証を行う予定であったが、ST1の負担の大きさから回復までの飼育実験を行うことができなかつたため、回復プロセスの精度検証の確認はできていない。また、ST1の実験により給餌の効果が確認されたが、給餌効果をモデルに組み込むための摂食速度や同化効率などの重要なパラメータの推定が困難であったため、石西礁湖海域のモデルを用いて給餌効果について数値シミュレーションで検証するには至らなかつた。

### 4. 結果及び考察

#### (1) サンゴの生体内応答を詳細に定式化したサンゴの白化モデルの開発と高度化

##### ・白化メカニズムの考察

光合成の明反応は葉緑体のチラコイド膜上にて起こる。まず光化学系IIで光エネルギーを用いて水から電子を引き抜き、プロトンと酸素をチラコイド膜内に生成させる。生成した電子は電子伝達系を経て光化学系Iへと運ばれると同時にプロトンをチラコイド膜外から膜内へと運ぶ。光化学系Iに伝達された電子は、再び光エネルギーで励起されてチラコイド膜外へと運ばれ、強い還元剤であるNADPHを産生する。一方で、光化学系IIでチラコイド膜内にプロトンが生成されたことと、電子伝達系でプロトンが膜内に輸送されたことによってプロトンの濃度勾配が生じ、これを駆動力にチラコイド膜上にあるATP合成酵素が駆動することでATPを産生する。明反応で産生されたNADPHとATPは、暗反応のカルビン

回路へと投入されて二酸化炭素を固定してグルコースを生産する。これが一連の光合成反応経路である。明反応と暗反応が同じ速度で駆動すれば問題は生じないが、炭素の固定に関与する酵素Rubiscoの活性の低下や二酸化炭素の不足などによって暗反応が律速された場合、明反応にて運ばれた電子は行き場を失い、酸素と結合して活性酸素種（ROS）を生成すると考えられる。特に、Rubiscoは31°C以上の高温で急激に活性を失うことが報告されており<sup>7)</sup>、これが強光・高水温でROSが生成する主な原因であると考えられる。

植物は、議論の余地はあるものの、ROSの発生を抑えるためと思われるいくつかの機構を備えている。その一つは電子伝達の最も上流側の光化学系IIで起こる「光阻害」であると考えられる。光化学系IIではクロロフィルから運ばれた電子をQAキノン電子受容体で一旦受け取って受けて電子伝達系へと流している。このQAは強光によって容易に損傷することが知られており<sup>8,9)</sup>、これによって電子伝達が制限される。これが光阻害のメカニズムである。光阻害は光合成を阻害するため起こらない方が良くと思われがちであるが、恐らく光阻害は強光によって過剰に電子が流れることを防ぐ安全弁の役割を担っていると我々は考えている。

光阻害は短期的なROS発生対策であるが、このような状態が慢性的に起こることは植物にとって好ましいことでは無い。そのような状態を緩和させるために、クロロフィル自体の量を減らし、インプットされる光エネルギー自体を抑制することも有効な対策であると考えられる。サンゴにおいては、褐虫藻の1細胞あたりのクロロフィル濃度が低下した状態は白化現象として観察されることとなる。つまり、このケースにおける白化現象とは褐虫藻側がROS発生を抑制するための処置であると考えられる。

サンゴは褐虫藻と共生することによって、光合成によって得られる莫大なエネルギーを享受している一方で、褐虫藻を細胞内に半閉鎖状態で高密度に抱え込むことによって、ROSによる細胞損傷のリスクを甘受することとなる。そこでサンゴ側のリスク対策として、多量のROSが褐虫藻から放出される事態となった場合には、細胞内から褐虫藻を排出することでROS濃度の上昇を抑えるという対策を取ると考えられる。これもサンゴの白化現象として観察されることになる。このケースにおける白化現象とは、サンゴがROSによる細胞損傷を回避するための緊急避難処置と考えられる。

実際、ST1による実験結果より、高水温下で褐虫藻1細胞あたりのクロロフィル量が減少しているケースと、褐虫藻密度自体が減少しているケースが見られた。そのため、白化現象がROSの発生対策であるという点は共通するが、サンゴの白化現象と呼ばれているものには、その実、2通りのメカニズムがあると考えられる。さて、これまでの議論をまとめると、褐虫藻およびサンゴのROSの発生対策として持てるアクションは主に以下の3つである。

- ① 光阻害によって電子伝達を絞る
- ② 褐虫藻1細胞あたりのクロロフィル量を減らす
- ③ サンゴの褐虫藻密度を減らす

このうち、①、②は褐虫藻側のアクション、③はサンゴ側のアクションということになる。この対策を講じた後、元の状態に戻るためにかかる時間はそれぞれ大雑把に、① 数時間程度、② 数日程度、③ 100日程度となり、一旦対策を講じると、その影響も大きくなるため、①→②→③の順番に対策が講じられるものと考えられる。ただし、急激なストレスが加わった際には、一気に③を実施することもあり得る。

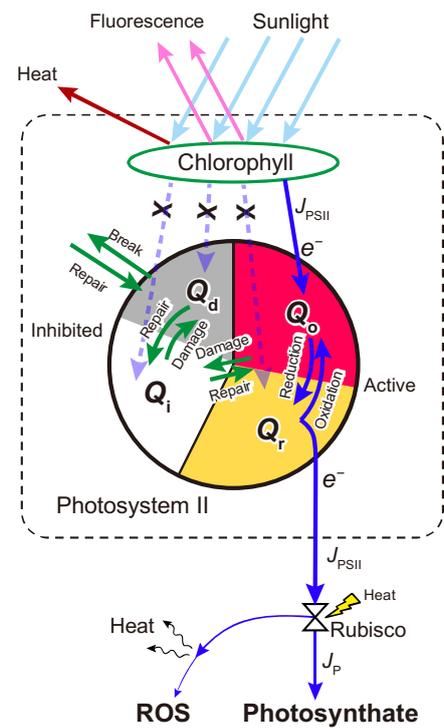
興味深い現象として、ST1が行った実験において、餌を与えなかった場合は、1細胞あたりのクロロフィル量は低くならなかったが褐虫藻数が有意に下がったのに対し、アルテミアを与えた場合には褐虫藻密度は下がらなかったが1細胞あたりのクロロフィル量が減っているという現象が確認された。恐らく、②の対策はやりすぎると褐虫藻自身が枯死してしまうので、褐虫藻自身の有機炭素収支がマイナスになるレベルまでは細胞内クロロフィル量を下げられないことが背景にあると推察される。ただし、②実施の際に外部（サンゴ）から十分な有機物の供給を受けられれば、褐虫藻はさらに大きくクロロフィル量を下げることができ、③に移行しなくてもROS放出量を削減できると考えられる。実際、ST3のアミノ酸同位体比を用いて褐虫藻とサンゴの栄養段階を調べた実験において、褐虫藻とホストがアミノ酸を共有していることを示唆する結果が出ている。

②までの対策で済んだ場合と③の対策まで移行した場合とでの大きな違いは、元の状態に戻るまでの時間であり、③を実施してしまうとサンゴは飢餓状態が続く期間が長くなり、結果的に死亡のリスクも高くなると考えられる。一方、②の対策までにとどまることができれば、回復までの時間が早いので、飢餓状態からの回復も早く、死亡のリスクが下がると考えられる。実際、ST1の実験において高水温ストレスに曝した際に、給餌を行った場合には有意な死亡率の低下が確認されている。ただし、この仮説ですべての現象を説明できたわけでは無い。ST1の実験においてアルテミを与えたときに、褐虫藻密度と褐虫藻当りのクロロフィル量の両方が増加したケースも見られた。ただ、このケースでは同時に抗酸化酵素SODの活性も増加しており、それによってROSの発生が抑制されたために、このケースでは褐虫藻密度とクロロフィル量の両方を下げずに済んだのではないかと推察される。この実験において、なぜSOD活性が向上したかを理解することは非常に重要ではあったものの、現在得られている結果からその原因を特定することは困難であったため、SOD活性の変化は本白化モデルにおいて考慮できなかった。

以上の考察により、白化モデルの開発において、①褐虫藻生体内における光阻害・ROS発生過程、クロロフィル動態のモデル化、②サンゴ生体内での褐虫藻の排出過程を含む褐虫藻の個体群動態のモデル化、がキーであると考えられる。また、褐虫藻からサンゴへの光合成産物の供与だけでなく、サンゴから褐虫藻への有機炭素を融通するプロセスも考慮する必要がある。

・褐虫藻生体内における光阻害・ROS発生過程、クロロフィル動態のモデル化

褐虫藻の光阻害、ROS発生、クロロフィル動態をモデル化するために、図4-II-1の枠組みでモデル化を行った。ここで、円で書かれている部分は $Q_A$ キノン電子受容体の総量を表しており、 $Q_o$ はそのうちで電子をまだ受け取っていないオープンなもの、 $Q_r$ は電子を受け取っているものである。この二つは合わせて損傷を受けていないアクティブなキノン ( $Q_a$ ) である。またこの二つの割合は光に応じた電子の流入速度と $Q_r$ の量に応じた流出速度のバランスで決まり、また、 $Q_r$ から下流側に電子が伝達され $Q_o$ に戻る反応速度は速いため、二つの速度は釣り合っていると仮定される。また、この電子の流入/流出速度 ( $J_{PSII}$ ) は光化学系の電子伝達速度と同等である。 $Q_i$ は強光によってダメージを受けたもの（光阻害）であり、 $Q_d$ は其中でさらに深刻なダメージを受けたものに分けられる。 $Q_i$ は比較的短時間で修復され $Q_a$ へと戻ることができる。一方で、 $Q_a$ から $Q_i$ への回復は遅く、またその修復速度はROSの発生量によって制限がかかると仮定した。また、 $Q_d$ が増加している状況は、慢性的にROSのストレスがかかっている状況であるため、この増加に伴いクロロフィルの減少が起こると仮定した。これは②の白化メカニズムに相当する。一方で、クロロフィルの生成は褐虫藻の栄養状態に依存すると考え、褐虫藻の栄養状態が悪い場合は、クロロフィル量を増加させて栄養状態の改善を行うようなフィードバックがかかるようにしている。このバランスによって、褐虫藻1細胞あたりのクロロフィル量の変動が計算される。また、クロロフィル生成に伴って $Q_a$ が生成されると仮定した。



図II-4-1. 褐虫藻の光阻害、ROS発生、クロロフィル動態のモデルの概念図。

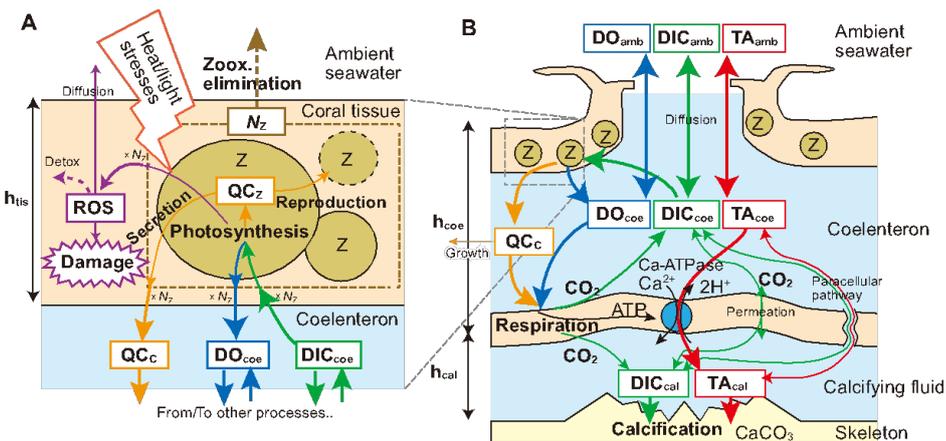
光化学系より流出した電子は、 $CO_2$ を材料に炭素固定されグルコース産生に使われるが、水温上昇に伴うRubisco活性の低下や $CO_2$ の獲得状況に応じて炭素固定速度に制限がかかり、光化学系から供給される電子 $J_{PSII}$ が炭素固定に使われる電子 $J_P$ を上回った場合に、その余剰分がROSを発生させる仮定してROS発生過程をモデル化した。また、前述のとおり、ROSの発生速度は $Q_a$ から $Q_i$ への修復速度を遅延させるため、電子伝達が絞られ、ROSの生成が抑制されるように調整が働くことになる。このプロセスで

褐虫藻1細胞あたりの光合成速度の計算も行われる。また、クロロフィルでは、受けた光エネルギーが、電子エネルギー、熱および蛍光としての消散されるエネルギーへと分配されるが、光障害の深刻度 ( $Q_i+Q_d$ の割合) の増加に伴い、熱エネルギーへの配分が増加すると仮定した。このプロセスは非光化学的消光 (Non-Photochemical Quenching) を再現するためのものであり、熱への散逸を増やすことで光化学系を保護しているとの仮定のもとに導入した。

・サンゴ生体内での褐虫藻の排出過程を含む褐虫藻の個体群動態のモデル化

サンゴ生体内での褐虫藻の排出過程を含む褐虫藻の個体群動態のモデル化は、これまでに開発を行っていたサンゴのポリスケールの生体内の物理・化学・生理学的な応答を詳細に記述し、複合的な環境ストレスに対する応答が再現できるサンゴポリモデル<sup>5,6)</sup>をベースに開発を行った。図II-4-2はその白化モデルの概念図である。このモデルは上記の褐虫藻生体内モデルと結合しており、褐虫藻1細胞あたりの光合成速度や呼吸速度、ROS発生速度などは褐虫藻生体内モデルからアウトプットされ、それに褐虫藻密度を乗じたものが、サンゴの表面積あたりの褐虫藻による光合成速度、呼吸速度、ROS発生速度となる。褐虫藻の増殖速度は褐虫藻の栄養状態 $QC_z$ によって決まり、サンゴによる褐虫藻の排出速度はサンゴの生体内のROS濃度に依存するものと仮定した。これは③の白化メカニズムに相当する。褐虫藻が生産した光合成産物は、一部サンゴの有機炭素プール $QC_c$ に渡される一方、褐虫藻の有機炭素プール $QC_z$ の欠乏状態に応じてサンゴからも有機炭素が融通されるようなパスも組み込んだ。

褐虫藻が生産した光合成産物は、一部サンゴの有機炭素プール $QC_c$ に渡される一方、褐虫藻の有機炭素プール $QC_z$ の欠乏状態に応じてサンゴからも有機炭素が融通されるようなパスも組み込んだ。



図II-4-2. サンゴポリスケールの白化モデル概念図。(a) サンゴに共生している褐虫藻の動態およびROS動態の概念図。(b) サンゴの生体内の物質循環、生化学応答過程の概念図。ROSはサンゴ組織内のROS濃度、 $N_z$ はサンゴ表面 $1\text{cm}^2$ あたりの褐虫藻個体数、 $QC_z$ は褐虫藻1細胞内に貯蔵される有機炭素量、 $QC_c$ はサンゴの生体内貯蔵される有機炭素量。 $TA_{amb}$ 、 $DIC_{amb}$ 、 $DO_{amb}$ はそれぞれ周辺海水中のアルカリ度、全炭酸、溶存酸素。 $TA_{coe}$ 、 $DIC_{coe}$ 、 $DO_{coe}$ はそれぞれ腔腸内のアルカリ度、全炭酸、溶存酸素。 $TA_{cal}$ 、 $DIC_{cal}$ はそれぞれ石灰化母液内のアルカリ度と全炭酸を表す。

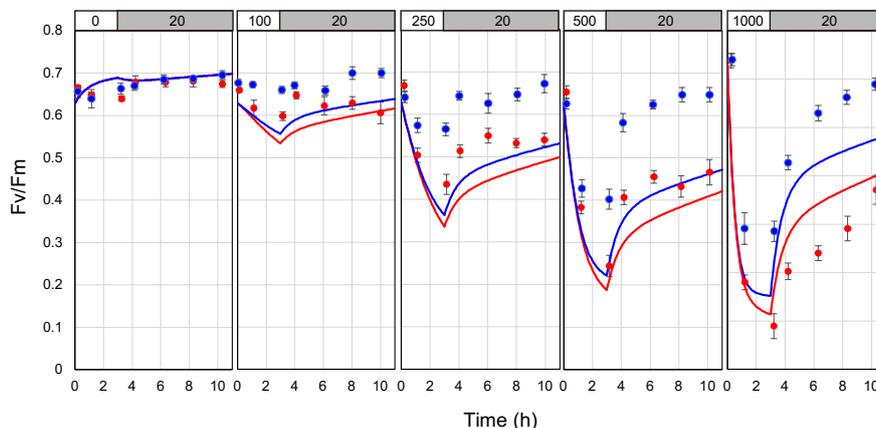
・シミュレーション結果とモデルのパフォーマンス

本課題で開発した白化モデルは、褐虫藻の光化学系IIの状態を詳細に記述しているため、PAMで観測される $F_v/F_m$ や $Y(II)$ をアウトプットし、実験結果と比較することができる。図II-4-3は、Takahashi et al.の実験<sup>10)</sup>を模倣したシミュレーション結果で、 $28^\circ\text{C}$ と $32^\circ\text{C}$ において $0, 100, 250, 500, 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量子フラックスを3時間照射した際とその後の $F_v/F_m$ の変化を示している。この結果からモデルは光化学系の挙動を精度良く再現できていることが確認できる。

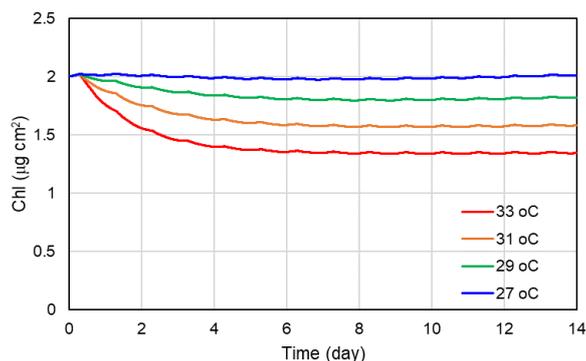
次に、開発したサンゴ白化モデルを用いて $27^\circ\text{C}$ 、 $29^\circ\text{C}$ 、 $31^\circ\text{C}$ 、 $33^\circ\text{C}$ 環境下で14日間飼育した状況をシミュレーションした結果を図II-4-4に示す。 $27^\circ\text{C}$ で飼育したケースでは高い褐虫藻密度を維持していた。 $29^\circ\text{C}$ では若干の褐虫藻密度の減少が見られたが、比較的高い褐虫藻密度を維持していた。一方、 $31^\circ\text{C}$ ではサンゴ表面積あたりのクロロフィル量は3/4程度まで減少し、 $33^\circ\text{C}$ では2/3程度まで減少した。これらの結果より、本白化モデルによって、サンゴの白化現象を良好し再現することが確認できた。

また、このモデルのユニークな点の一つは、時間発展方程式で記述したプロセスベースモデルであるため、白化過程のみならず白化後の回復過程も表現することも出来ることである。そこで、サンゴの栄養状態の違いが白化および白化からの回復に及ぼす影響を調べるために、サンゴの細胞内炭素貯蔵

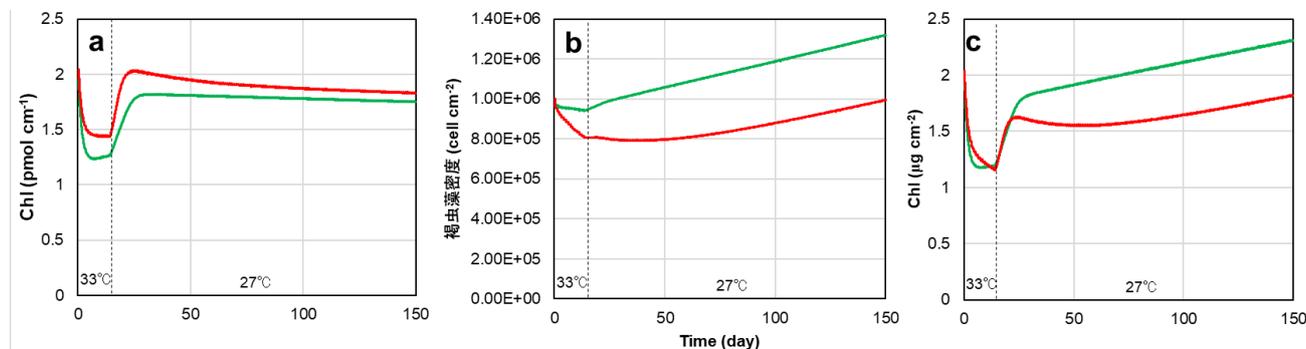
量 $QC_c=260 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-2}$  かつ褐虫藻の細胞内炭素貯蔵量 $QC_z = 53 \text{ pmol cell}^{-1}$ と栄養状態を悪くした場合と、 $QC_c=300 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-2}$  かつ $QC_z = 70 \text{ pmol cell}^{-1}$ と栄養状態を良くした場合で、 $33^\circ\text{C}$ で14日間飼育した後に $27^\circ\text{C}$ に戻す設定で数値シミュレーションを行った。この計算結果を図II-4-5に示す。この数値シミュレーションの結果、栄養状態が悪いケースでは、初めの高温ストレス下で褐虫藻あたりのクロロフィル量の減少よりも褐虫藻密度の減少が顕著であったが、栄養状態が良いケースでは高温ストレス下で褐虫藻あたりのクロロフィル量は大きく減少させたが、褐虫藻密度の減少は少なかった。この傾向はST1の実験結果と整合する。その後の回復過程では、栄養状態が良いものは、クロロフィル量が回復するこ



図II-4-3. モデルによるFv/FmのアウトプットとTakahashi et al. (2004)の実験結果<sup>10)</sup>との比較。赤は $32^\circ\text{C}$ 、青は $28^\circ\text{C}$ 、点は実験値、線は計算値を表す。



図II-4-4.  $27^\circ\text{C}$ 、 $29^\circ\text{C}$ 、 $31^\circ\text{C}$ 、 $33^\circ\text{C}$ 環境下で14日間飼育した状況の下でのサンゴ単位表面積あたりのクロロフィル量の時系列変化のシミュレーション結果



図II-4-5. 初期の14日間を $33^\circ\text{C}$ で、それ以降を $27^\circ\text{C}$ でサンゴを飼育した際の、白化から回復までのシミュレーション結果。(a) 褐虫藻1細胞あたりのクロロフィル量、(b) サンゴの表面積あたりの褐虫藻密度、(c) サンゴの表面積あたりのクロロフィル量の時系列変化。緑線はサンゴの栄養状態を良好に保った場合 ( $QC_c = 300 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-2}$ 、 $QC_z = 70 \text{ pmol cell}^{-1}$ ) で、赤線はサンゴの栄養状態が悪い場合 ( $QC_c = 260 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-2}$ 、 $QC_z = 53 \text{ pmol cell}^{-1}$ ) の計算結果。

とで比較的早く40日程度で元の状態に回復したが、栄養状態が悪いものは回復までに150日以上の時間を要した。そのため、白化の影響の緩和や白化からの回復には、サンゴの栄養状態を良好に保つことが重要であることがモデル研究からも支持された。なお、この回復パターンは、野外で観察された白化からの回復過程<sup>11)</sup>に類似していた。これらのシミュレーションが実際の白化現象や白化からの回復過程を良好に再現したことから、本白化モデルで用いた白化メカニズムの仮定が妥当であると考えられる。

**(2) サンゴ白化モデルとサンゴ海域の流動-物質循環モデルとの結合**

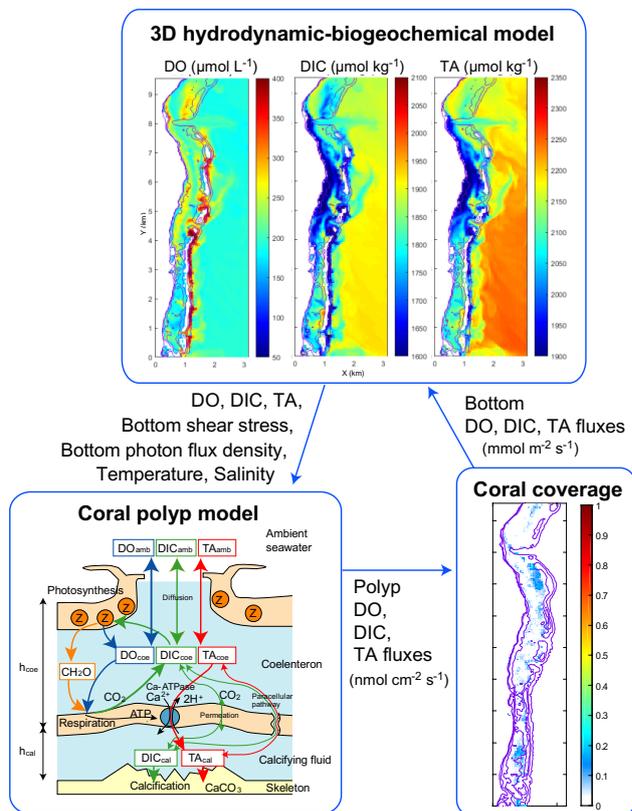
**・結合モデルのフレームワーク**

サンゴ礁域は遠浅な海域であるために、海洋面や海底面からの少しの熱フラックスや物質フラックスによって水温や水質がダイナミックに変動する。水温においては、昼間の日射や夜間の長波放射等の影響で5℃以上の日変化幅があることも少なくない。サンゴ礁生物群集による光合成や呼吸、石灰化などの影響でpHも8.4-7.9ぐらいの間で大きく変動する<sup>12)</sup>。RCP 8.5と呼ばれる最悪シナリオでは今世紀末までに海洋表層の水温は3.7℃程度上昇、pHは現在の8.0程度から7.8程度まで減少すると予想されているが<sup>13)</sup>、サンゴ礁域では、水温やpHなどの日周変動の変動幅は、今後100年間の変化幅よりも大きい。このようにサンゴ礁域では、グローバル環境変化の影響を予測する上で、ローカルな環境変動も無視できない。

このような問題を打破し、実環境でのサンゴ群集の白化応答を予測するために、サンゴの環境応答モデルへインプットするためのサンゴ礁域の環境の時空間データを流動-物質循環モデルを用いて数値シミュレーションによって再現することを試みた。ただし、水質等の環境変動がサンゴ礁生物群集の代謝に影響する一方で、サンゴ礁の水質環境のサンゴ礁生物群集の代謝によってダイナミックに変動するという相互作用があるため、単に数値シミュレーションによって得られた環境パラメータをサンゴの環境応答モデルにインプットするだけでなく、環境応答モデルによって計算された代謝速度に応じた水質の変化を流動-物質循環モデルにフィードバックさせる、2-wayのモデル連成が必要となる。このサンゴポリプモデルとサンゴ礁海域の流動-物質循環モデルとのカップリングフレームワークはすでに構築済みであり<sup>6,14)</sup>、本研究ではこのフレームワークを用いてサンゴの白化モジュールを組み込んだサンゴポリプモデルを石垣島白保サンゴ礁域の流動-物質循環モデルと連成させた。図II-4-6はそのカップリングフレームワークの概念図である。

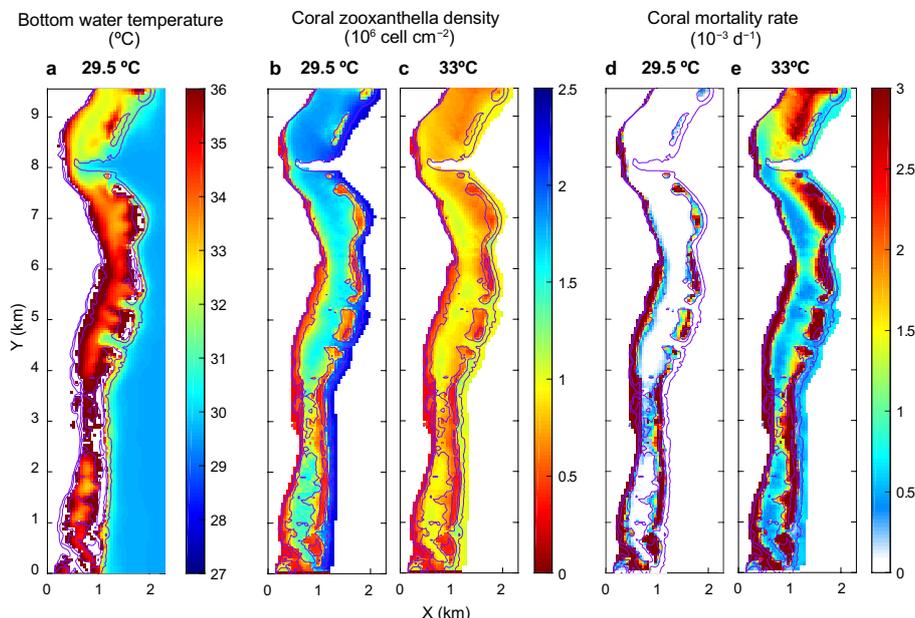
**・モデルの適用例**

図II-4-7は白保サンゴ礁域の流動-物質循環-サンゴポリプカップリングモデルのアウトプットの一例で、図II-4-7aは、外洋水温を29.5℃とした時の水温シミュレーションのスナップショットおよび、図II-4-7b,cは外洋水温が29.5℃および31℃の時のサンゴの細胞内褐虫藻密度をリーフスケールでマッピングしたものである。また、図II-4-7d,eではそれぞれのケースにおける死亡率のマップである。リーフスケールでは、外洋温度がサンゴの白化が起こる温度以下であっても、礁嶺や海岸付近の浅場は日中30℃を超えることも珍しくは無い。そのため、たとえ外洋水温が29.5℃（現状）の条件で計算を行っても、礁嶺や海岸付近の褐虫藻密度は低いというシミュレーション結果となっている。また、それに伴うサン



図II-4-6. サンゴポリプモデルとサンゴ礁域の流動-物質循環モデルのカップリングフレームワーク

ゴの死亡率の分布は褐虫藻密度分布を反映したものとなっている。この死亡率の分布はサンゴの被度分布と近い傾向があるため、白化がリーフスケールのサンゴの被度分布を決める主要因の一つになっている可能性は高い。また外洋水温を変化させた結果、全体の白化状況の空間分布は変わらないが、外洋水温が上昇するほど、全体の白化の度合いは深刻となり、死亡率の増加も確認された。ただし、本計算結果は、1つ古いバージョンのサンゴ白化モジュールを組み込んで計算した結果であり、(1)で述べた最新の成果を取り入れた白化モジュールで計算したものではないことに注意されたい。



図II-4-7. 計算された (a) 外洋水温29.5°Cのときの昼間の底層水温のスナップショットと、白化モジュールを組み込んだサンゴ礁生態系モデルによって計算された、(b) 外洋水温29.5°Cのときのサンゴ内の褐虫藻密度および (c) 33°Cのときの褐虫藻密度、(d) 29.5°Cのときのサンゴの死亡率および (e) 33°Cのときの死亡率。

### (3) ハインドキャストシミュレーションによる石西礁湖海域の過去26年間の水温環境復元

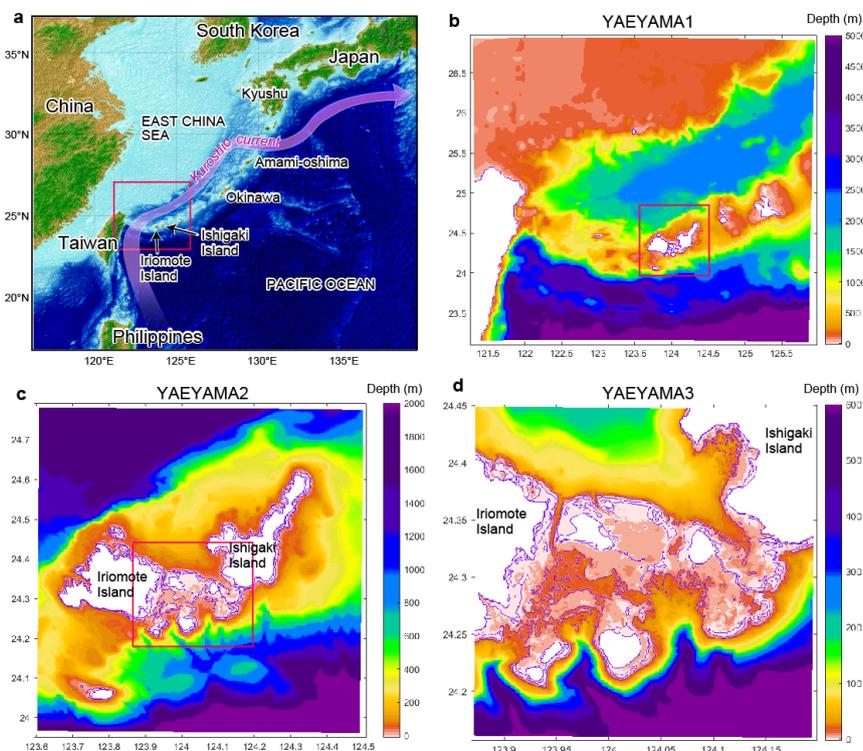
#### ・ハインドキャストシミュレーションの構成

環境省・生物多様性センターによるモニタリングサイト1000事業で、石西礁湖やその周辺海域において、200を超えるモニタリングサイトが設定され、重厚なサンゴ礁生態系のモニタリングが2003年より継続して行われている。そして、それらによってサンゴ群集の長期的な被度変遷が明らかになってきている<sup>15)</sup>。しかし、サンゴ群集被度がなぜそのような変遷を経て来たかは、それに対応した環境データの不足により原因究明が困難を極めている。しかし、当然のことながら過去に遡って観測機器を設置したり、採水を行ったりすることは不可能である。そこで、そのような慢性的な観測データの不足という状況を打破するために、石西礁湖サンゴ礁海域にフォーカスして1994年から2020年までの26年間に長期高時空間解像度で、過去の環境の数値シミュレーションによる再現、すなわちハインドキャストシミュレーション (hindcast simulation) を行った。

石西礁湖海域のハインドキャストシミュレーションは、海洋統合モデルシステムであるCoupled-Ocean-Atmosphere-Wave-Sediment Transport (COAWST) modeling system<sup>16,17)</sup>をベースに開発を行った。なお、COAWST modeling systemは、海洋モデルROMS<sup>18)</sup>と気象モデルWRF、波浪モデルSWANとWave Watch III、堆積物輸送モデルCSTMSに加え、いくつかの生態系モデルが結合された統合モデルシステムであるが、本シミュレーションではROMSのみを用いた。また、独自に改良を加えたCOAWST modeling systemのブランチを使用した ([https://github.com/NakamuraTakashi/COAWST\\_Eco](https://github.com/NakamuraTakashi/COAWST_Eco))。石西礁湖海域を高空間解像度で計算するために、全球/領域海洋モデルによってデータ同化された再解析/現業解析プロダクトから、3段階のネスティングを行った (図II-4-8)。最も粗い解像度はYAEYAMA1 計算領域

で、1.5 km メッシュの解像度である（図II-4-8a 赤枠；図II-4-8b）。これをさらに300 m メッシュのYAEYAMA2計算領域へダウンスケールし（図II-4-8c）、さらに100 m メッシュのYAEYAMA3領域へとダウンスケールしている（図II-4-8d）。

YAEYAMA1領域の側方境界条件には、1994年～2018年6月まではGlobal Ocean Forecast System (GOFS) 3.1の再解析/現業解析プロダクト (<https://www.hycom.org/>) を用いた。これは全球海洋モデルHYCOMをデータ同化システムNCODA<sup>19,20</sup> によってデータ同化させたプロダクトで、1/12° (~9 km) メッシュの空間解像度で3時間間隔のデータセットとして提供されている。潮汐外力は全球潮汐モデルTPX09-atlas<sup>21</sup>) を用いて加えている。2018年6月以降はJAMSTECが開発した1/36° (~3 km) メッシュの空間解像度で1時間間隔の時間解像度かつ潮汐も含まれた JCOPE-T DA<sup>22</sup>)を用いた。YAEYAMA2、YAEYAMA3の側方境界条件はそれぞれYAEYAMA1、YAEYAMA2計算領域からの取得し、offlineネスティングを行った。気象外力については、YAEYAMA1領域には、1994年から2006年3月までは気象庁の全球の気象庁55年長期再解析 (JRA-55)<sup>23</sup>)の日本周辺領域へのダウンスケーリングプロダクトであるDSJRA-55<sup>24</sup>)を用い、2006年3月以降は気象庁のメソスケール気象予報モデルMSM-GPVを用いた。YAEYAMA2およびYAEYAMA3領域には、気象庁石垣地方気象台の気象観測データをインプットした。

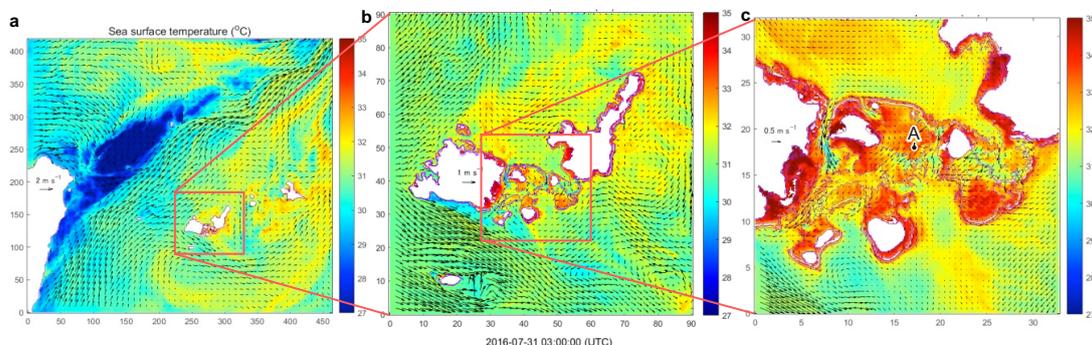


図II-4-8. ハインドキャストシミュレーションの計算対象領域。(a) 対象領域を含んだ広域図。赤枠はYAEYAMA1計算領域。(b) YAEYAMA1 (1.5 kmメッシュ)、(c) YAEYAMA2 (300 m メッシュ)、および(d) YAEYAMA3 (100 m メッシュ)で使用した海底地形情報。

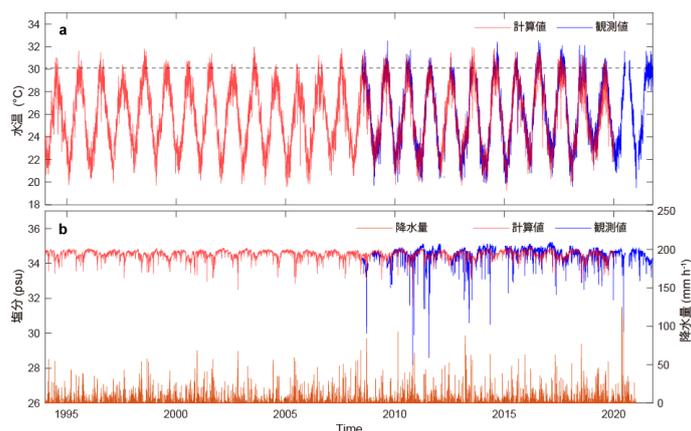
・ハインドキャストシミュレーションによる水温復元

図II-4-9はハインドキャストシミュレーションによる2016年7月31日正午の表層水温のスナップショットである。なお、水温の長期ハインドキャストシミュレーションの全計算結果は以下のHPにて公開している ([http://www.nakamulab.mci.titech.ac.jp/yaeyama\\_hindcast\\_simulation](http://www.nakamulab.mci.titech.ac.jp/yaeyama_hindcast_simulation))。図II-4-10は環境省が設置した石西礁湖常時モニタリングブイが設置されている図II-4-9 c地点Aにおける1994年から2020年までのハインドキャストシミュレーションによる水温、塩分の時系列グラフである（赤線）。また、常時モニタリングブイによる観測は2008年7月から行われており、青線はその観測結果を示している。また、図II-4-11は図II-4-10の時系列グラフの2015年1月から2018年1月までの期間についてクローズアップしたものである。図II-4-10aおよび図II-4-11aから、水温のハインドキャストシミュレーションは非常に高い精度

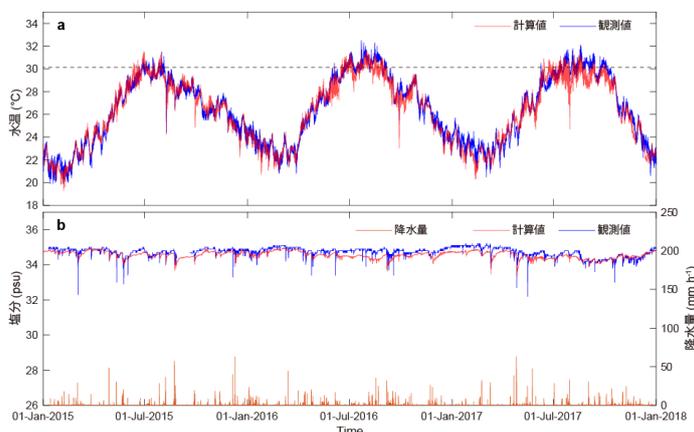
で再現できていることが確認できる。一方で、図II-4-10bおよび図II-4-11bから分かるように、塩分の傾向は概ね再現できているものの、度々起こっている大雨の後のスパイク的な塩分の低下が十分に再現できていないことが分かる。これは、モデルには河川や地下水経路での海域への淡水の流入が組み込まれていないことが原因と思われる。つまり、逆説的に、出水時には陸域から流出した栄養塩や赤土の影響が石西礁湖中心部にまで及んでいることが示唆され、石西礁湖のサンゴ群集の保全には陸域からの栄養塩や赤土流出対策も重要であると考えられる。



図II-4-9. 石西礁湖ハインドキャストシミュレーションの各計算領域における2016年7月31日12:00 (JST) の表層水温および表層流速ベクトルのスナップショット。(a) YAEYAMA1 (1.5 km メッシュ)、(b) YAEYAMA2 (300 m メッシュ)、(c) YAEYAMA3 (100 m メッシュ)。地点Aは環境省の常時モニタリングブイが設置されている地点。



図II-4-10. 環境省常時モニタリングブイ設置サイトにおける(a) 水温および (b) 塩分の計算結果と観測結果の時系列グラフ。赤線は1994年から2020年までの計算結果で、青線は観測が始まった2008年から現在までの観測値、オレンジ線は石垣气象台で観測された降水量を表す。

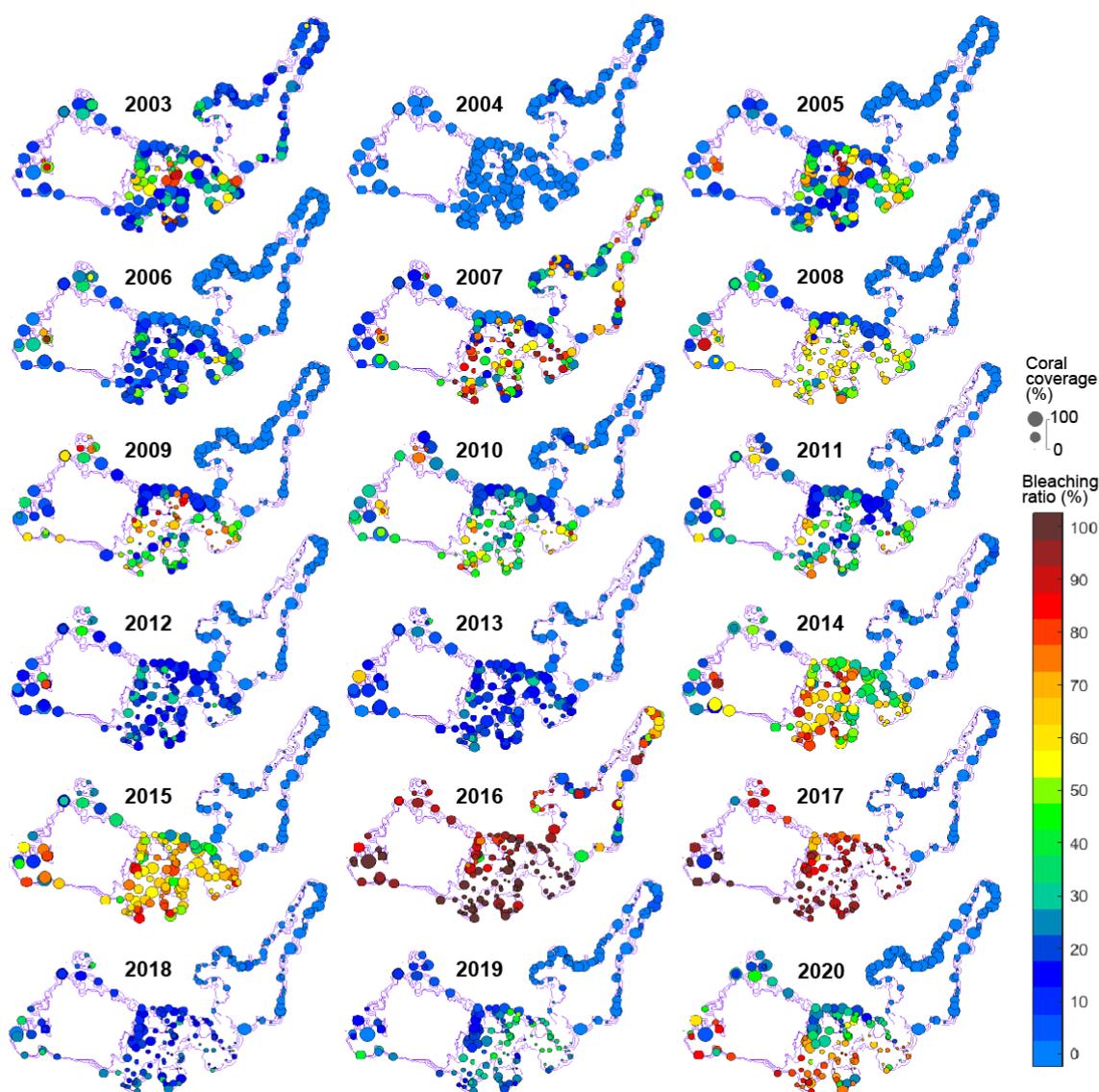


図II-4-11. 図II-4-10の2015年1月から2018年1月の期間にクローズアップしたもの。

・ハインドキャストシミュレーションとモニタリングサイト1000による白化指標の比較

サンゴの白化指標として現在最も広く用いられている指標にDegree Heating Week (DHW)<sup>1,2,3</sup>がある。そこで、(2)で述べた白化モデルとのカップリングモデルのシミュレーションに先立ち、環境省・生物多様性センターによるモニタリングサイト1000事業でモニタリングされている白化率をハインドキャストシミュレーションで計算された底層水温を用いたDHWでどの程度正しく推定できるかの検証を行った。なお、現業のDHWの計算には衛星観測によって推定した水温データを用いているため、空間解像度が粗く表層水温を用いざるを得ないが、本ハインドキャストシミュレーションを用いることで、高時空間解像度でサンゴのいる底層の水温等の環境情報が得られるということが最大の強みである。

図II-4-12はモニタリングサイト1000で報告された石西礁湖周辺海域の2003年から2020年までの各年の白化率と被度のマップである。また、図II-4-13は石西礁湖ハインドキャストシミュレーションによって計算された底層水温を用いて計算した1994年から2019年までの各年の夏のDHWの最大値である。図II-4-14石西礁湖ハインドキャストシミュレーションによって計算されたDHWが8以上となるサイトの総面積（赤線）とモニタリングサイト1000によって観察された全サイト数に対する白化率が30%以上を記録したサイト数の割合（青線）の年変化をまとめたものである。



図II-4-12. モニタリングサイト1000による石西礁湖周辺海域の2003年から2020年までの各年の白化率と被度の観測結果。各サイトにおける丸の大きさおよび丸の色は、それぞれ各サイトの被度および白化率を表す。

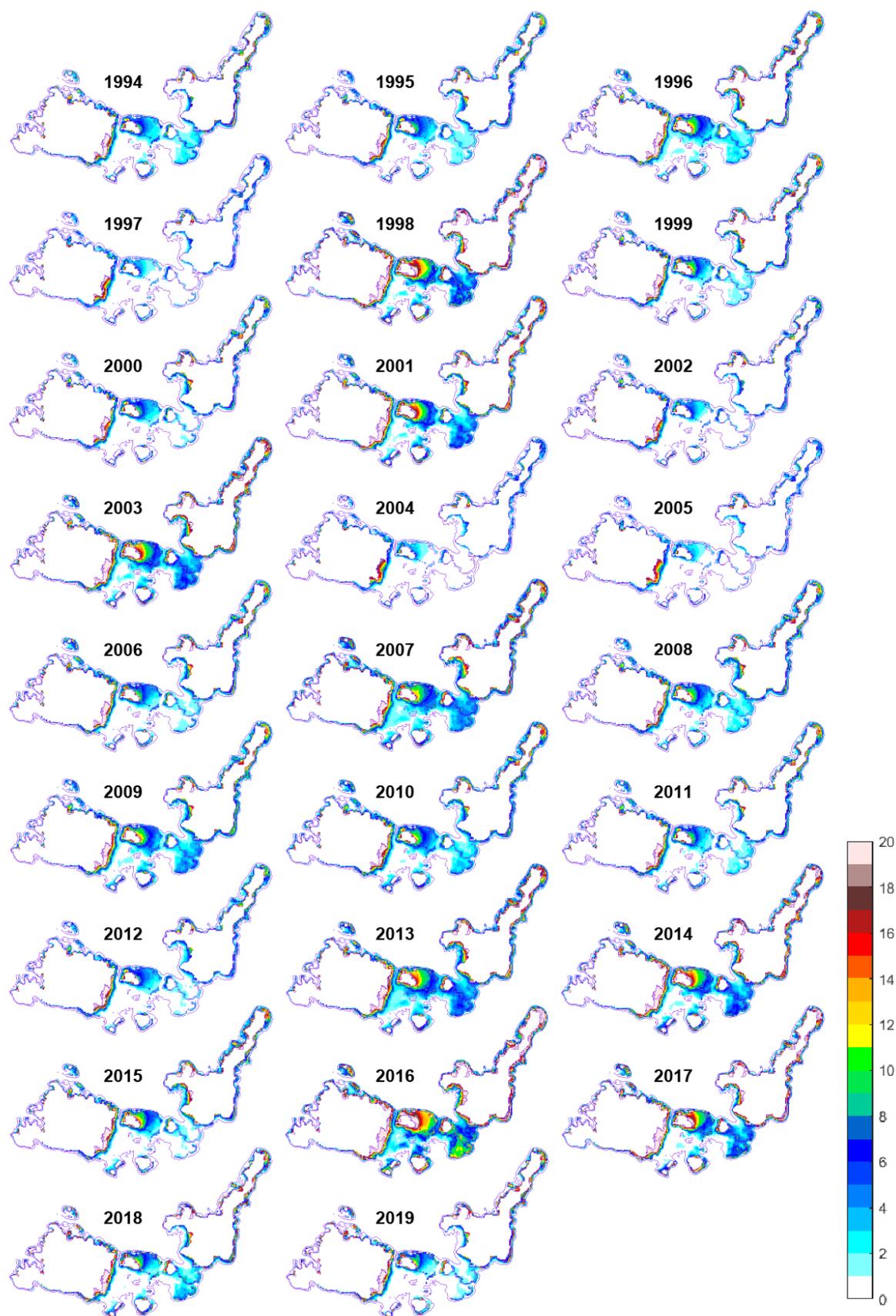


図4-II-13. 石西礁湖ハインドキャストシミュレーションによって再現した底層水温を用いて計算した、1994年から2019年までの各年の夏のサンゴ白化指標（DHW）の最大値

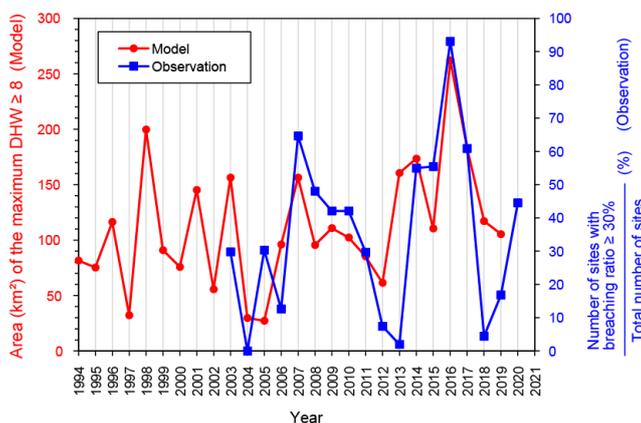


図4-II-14. 石西礁湖ハインドキャストシミュレーションによって計算されたDHWが8以上となるサイトの総面積（赤線）とモニタリングサイト1000によって観察された全サイト数に対する白化率が30%以上を記録したサイト数の割合（青線）の年変化。

ハインドキャストシミュレーションから計算したDHWが8以上の領域は、年によってばらつきが大きいものの、全体として上昇傾向にあり、地球温暖化の影響で水温ストレスが年々大きくなってきていることを示唆している。石西礁湖では1998年、2003年、2007年、2016年に高水温による大規模なサンゴの白化現象があり、特に2016年はサンゴの白化に伴う大量斃死によってサンゴ礁生態系に甚大な被害を及ぼしたことが報告されている<sup>25)</sup>。モニタリングサイト1000の観察結果からも2003年、2007年、2016年に白化率の上昇が確認できる。シミュレーション結果も2003年、2007年、2016年にDHWが高かったことが確認されたほか、モニタリングサイト1000の観測が始まる以前の1998年の白化の状況も知ることができた。ただ、2013年にモデルでは高い白化傾向を示したものの、モニタリングサイト1000の結果とは食い違いが見られた。モニタリングサイト1000の観察が行われたのは12月ごろであり、実際には7月中旬に白化のピークがあったが<sup>26)</sup>、観測までに白化から回復したためと考えられる。

今回開発した技術は、全球や領域の海洋・気象の再解析/現業解析プロダクトからダウンスケーリングする手法であり、日本全国のサイトに容易に適用可能である。本技術は、環境データが不足している全国の生態系のモニタリングサイトにおいて環境データを復元する強力な手法になり得る。

## 5. 研究目標の達成状況

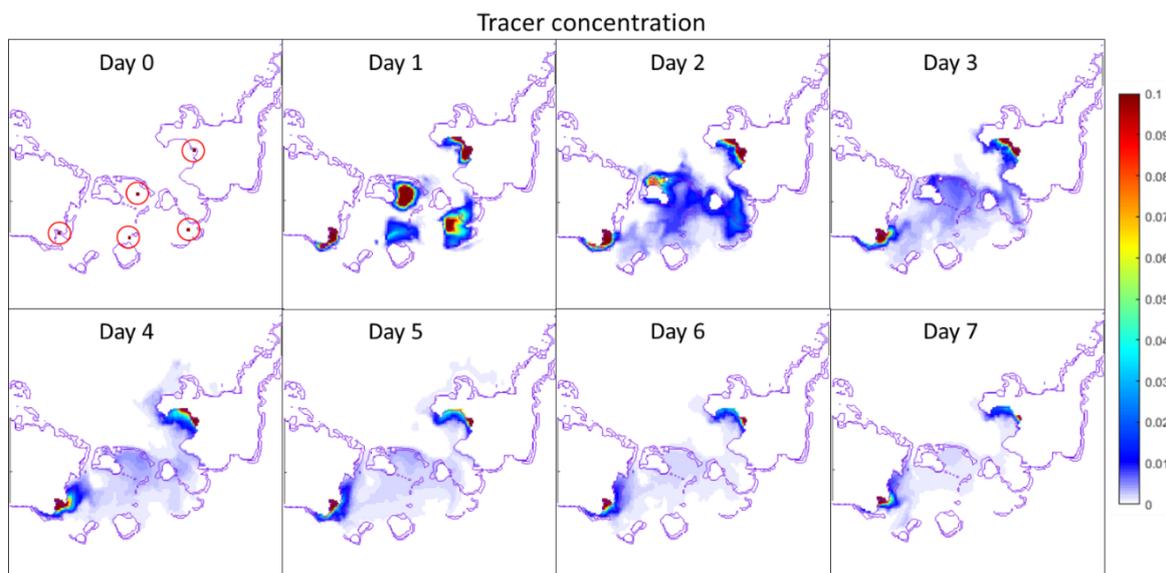
第2項で記した4つの研究目標のうち、1については結果及び考察の(1)項に記載したように、各STの結果や既往研究の知見を踏まえ、尤も妥当と思われるサンゴ白化に関連する生体内反応のメカニズムを提唱した。さらに、そのメカニズムを組み込み、サンゴ白化応答を精度よく再現できる白化モデルの開発に成功している。一方で、白化からの回復過程については、十分な実験データが得られなかったため精度検証はできていないが既往研究の回復過程を概ね再現できているため、目標は達成されている。

2については、同じく結果及び考察の(1)項に記載したように、給餌による白化の緩和、死亡率の低下を再現できるモデルの開発は完了した。しかし、実験結果からは餌の摂餌速度や同化効率など、重要な未知パラメータの推定が困難であったため、予測精度については検証できていない。

3については結果及び考察の(2)項に記載したように、ポリプスケールの白化モデルを流動一物質循環モデルに結合させることで生態系スケールへの拡張に成功しており、目標は達成されている。

4については、石西礁湖海域において防止・救済策がどの程度有効であるかシミュレーションによって検証することが目標であったが、そのためにはまず石西礁湖の過去の水温やその他の環境が精度良く再現できることが必須の課題であった。結果及び考察の(3)項に記載したように、この課題については達成している。さらに図II-4-15に示しているように、白化防止・救済で用いるサンゴの餌の拡散シミュレーターの開発も完了しており、餌投入後の餌濃度や持続時間および影響範囲などが予測可能となっている。しかし、実験結果の解釈や給餌による効果のメカニズムの理解に時間を要し、コアとなる白化

モデルの開発が遅れたため、また、計算自体にもかなりの時間を要するため、防止・救済策の効果を検証するシミュレーションの実施には至らなかった。ただ、対応策の実効性を検証するためのモデルシステムの開発自体は完了している。



図II-4-15. 石西礁湖流動モデルを用いた餌散布の数値シミュレーション結果。餌はDay0のときに赤丸の5地点の底層セルに初期濃度100として与えた。

## 6. 引用文献

- 1) Eakin C, Liu G, Chen M, Kumar A (2012) Ghost of bleaching future: Seasonal Outlooks from NOAA's Operational Climate Forecast System. Proc 12th Intl Coral Reef Symp 9–13
- 2) Liu G, Heron S, Eakin C, Muller-Karger F, Vega-Rodriguez M, Guild L, De La Cour J, Geiger E, Skirving W, Burgess T, Strong A, Harris A, Maturi E, Ignatov A, Sapper J, Li J, Lynds S (2014) Reef-Scale Thermal Stress Monitoring of Coral Ecosystems: New 5-km Global Products from NOAA Coral Reef Watch. Remote Sens 6:11579–11606
- 3) Liu G, Eakin CM, Chen M, Kumar A, De La Cour JL, Heron SF, Geiger EF, Skirving WJ, Tirak K V., Strong AE (2018) Predicting Heat Stress to Inform Reef Management: NOAA Coral Reef Watch's 4-Month Coral Bleaching Outlook. Front Mar Sci 5:1–23
- 4) Willmott CJ (1981) On the validation of models. Phys Geogr 2:184–194
- 5) Nakamura T, Nadaoka K, Watanabe A (2013) A coral polyp model of photosynthesis, respiration and calcification incorporating a transcellular ion transport mechanism. Coral Reefs 32:779–794
- 6) 中村隆志 (2020) 複合環境影響評価のためのサンゴ礁生態系モデル開発にむけて: サンゴポリプモデルの開発と流動-物質循環モデルとの連成, 日本サンゴ礁学会誌, 22, 45-60, doi: 10.3755/jcrs.22.45
- 7) Lilley RM, Ralph PJ, Larkum AWD (2010) The determination of activity of the enzyme Rubisco in cell extracts of the dinoflagellate alga Symbiodinium sp. by manganese chemiluminescence and its response to short-term thermal stress of the alga. Plant Cell Environ 33:995–1004
- 8) Tyystjarvi E, Aro EM (1996) The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. Proc Natl Acad Sci 93:2213–2218
- 9) Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Yamamoto H, Hayashi H, Murata N (2004) Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in Synechocystis sp. PCC 6803. Biochemistry 43:11321–11330
- 10) Takahashi S, Nakamura T, Sakamizu M, Van Woesik R, Yamasaki H (2004) Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. Plant Cell Physiol 45:251–255

- 11) Jones RJ (1997) Changes in zooxanthellar densities and chlorophyll concentrations in corals during and after a bleaching event. *Mar Ecol Prog Ser* 158:51–59
- 12) Kayanne H, Kudo S, Hata H, Yamano H, Nozaki K, Kato K, Negishi A, Saito H, Akimoto F, Kimoto H (2008) Integrated monitoring system for coral reef water pCO<sub>2</sub>, carbonate system and physical parameters. *2:1079–1084*
- 13) IPCC (2013) *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- 14) Nakamura T, Nadaoka K, Watanabe A, Yamamoto T, Miyajima T, Blanco AC (2018) Reef-scale modeling of coral calcification responses to ocean acidification and sea-level rise. *Coral Reefs* 37:37–53
- 15) Muko S, Suzuki G, Saito M, Nakamura T, Nadaoka K (2019) Transitions in coral communities over 17 years in the Sekisei Lagoon and adjacent reef areas in Okinawa, Japan. *Ecol Res* 1440-1703.12013
- 16) Warner JC, Sherwood CR, Signell RP, Harris CK, Arango HG (2008) Development of a three-dimensional, regional, coupled wave, current, and sediment-transport model. *Comput Geosci* 34:1284–1306
- 17) Warner JC, Armstrong B, He R, Zambon JB (2010) Development of a Coupled Ocean–Atmosphere–Wave–Sediment Transport (COAWST) Modeling System. *Ocean Model* 35:230–244
- 18) Shchepetkin AF, McWilliams JC (2005) The regional oceanic modeling system (ROMS): a split-explicit, free-surface, topography-following-coordinate oceanic model. *Ocean Model* 9:347–404
- 19) Cummings JA (2005) Operational multivariate ocean data assimilation. *Q J R Meteorol Soc* 131:3583–3604
- 20) Cummings JA, Smedstad OM (2013) *Variational Data Assimilation for the Global Ocean. Data Assimilation for Atmospheric, Oceanic and Hydrologic Applications (Vol. II).* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 303–343
- 21) Egbert GD, Erofeeva SY (2002) Efficient inverse modeling of barotropic ocean tides. *J Atmos Ocean Technol* 19:183–204
- 22) Varlamov SM, Guo X, Miyama T, Ichikawa K, Waseda T, Miyazawa Y (2015) M 2 baroclinic tide variability modulated by the ocean circulation south of Japan. *J Geophys Res Ocean* 120:3681–3710
- 23) Kobayashi S, Ota Y, Harada Y, Ebata A, Moriya M, Onoda H, Onogi K, Kamahori H, Kobayashi C, Endo H, Miyaoka K, Takahashi K (2015) The JRA-55 Reanalysis: General Specifications and Basic Characteristics. *J Meteorol Soc Japan Ser II* 93:5–48
- 24) Kayaba N, Yamada T, Hayashi S, Onogi K, Kobayashi S, Yoshimoto K, Kamiguchi K, Yamashita K (2016) Dynamical Regional Downscaling Using the JRA-55 Reanalysis (DSJRA-55). *SOLA* 12:1–5
- 25) 中村崇 (2017) 2016年夏期に発生した石西礁湖での大規模白化. *日本サンゴ礁学会誌* 19:29-40
- 26) 環境省自然環境局生物多様性センター (2013) 西表石垣国立公園石西礁湖及びその近隣海域におけるサンゴ礁モニタリング調査報告書. pp.136

### Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

#### (1) 誌上発表

##### <査読付き論文>

###### 【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

###### 【サブテーマ2】

- 1) Fujii, T., Tanaka, Y., Maki, K., Saotome, N., Morimoto, N., Watanabe, A., & Miyajima, T. (2020). Organic carbon and nitrogen isoscapes of reef corals and algal symbionts: Relative influences of environmental gradients and heterotrophy. *Microorganisms*, 8, 1221. doi:10.3390/microorganisms8081221. Impact factor 4.128 (2020)

###### 【サブテーマ3】

- 1) Yuyama I, Higuchi T, Mezaki T, Tashiro H, Kazuho Ikeo K (2022). Metatranscriptomic Analysis of Corals Inoculated with Tolerant and Non-Tolerant Symbiont Exposed to High Temperature and Light Stress. *Frontiers in Physiology*, 13, 806171. IF 4.566
- 2) Yuyama I, Higuchi T, Hidaka M (2021). Application of RNA Interference Technology to Acroporid Juvenile Corals. *Frontiers in Marine Science*, 8, 688876. IF 4.435
- 3) Yuyama I, Ugawa N, Hashimoto T (2021). Transcriptome Analysis of *Durusdinium* Associated with the Transition from Free-Living to Symbiotic, *Microorganisms*, 9, 1560-1560. IF 3.864 11:22
- 4) Yuyama I, Ishikawa M, Nozawa M, Yoshida M, Ikeo K (2018). Transcriptomic changes with increasing algal symbiont reveal the detailed process underlying establishment of coral-algal symbiosis. *Scientific Reports*, 8, 16802. IF 4.380

###### 【サブテーマ4】

- 1) 中村隆志, (2020) 複合環境影響評価のためのサンゴ礁生態系モデル開発にむけて: サンゴポリプモデルの開発と流動-物質循環モデルとの連成, *日本サンゴ礁学会誌*, 22, 45-60, doi: 10.3755/jcrs.22.45

##### <査読付論文に準ずる成果発表>

###### 【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

###### 【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

###### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

###### 【サブテーマ4】

特に記載すべき事項はない。

##### <その他誌上発表 (査読なし) >

###### 【サブテーマ1】

- 1) 藤村弘行: 琉球大学環境報告書2021、24 (2021)

「かけがえのないサンゴ礁生態系を白化の危機から 救うために」-

###### 【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

###### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

###### 【サブテーマ4】

- 1) 中村隆志, 小又寛也, 佐久間魁史, Oumou Kalsom Diegui BA (2022) ハインドキャストシミュレーションによる過去のサンゴ礁域の環境復元, 月刊海洋, 印刷中

## (2) 口頭発表 (学会等)

### 【サブテーマ1】

- 1) Hiroyuki Fujimura, Sayaka Higa, Toshihiro Miyajima, Tomihiko Higuchi, Sylvain Agostini, Ikuko Yuyama, Takashi Nakamura: 日本地球惑星科学連合2019年大会、千葉県千葉市幕張メッセ(2019年5月26-30日) “Enhancement of antioxidant activity of scleractinian coral *Galaxea Fascicularis* by feeding treatment” (ポスター発表)
- 2) 比嘉彩也香、藤村弘行: 日本サンゴ礁学会第22回大会、札幌 (2019年11月8-11日) 「造礁サンゴの摂餌による抗酸化能の促進」 (ポスター発表)
- 3) 藤ヶ崎将也, 藤村弘行, 安田直子, 藤ヶ崎将也, 樋口富彦, 宮島利宏, Sylvain Agostini, 湯山育子, 中村隆志: 日本サンゴ礁学会第23回大会, オンライン (2020年11月) 「サンゴの摂餌による微量金属元素の濃集」 (ポスター発表)
- 4) 塩見砂理菜, 藤村弘行, 安田直子, 藤ヶ崎将也, 樋口富彦, 宮島利宏, Sylvain Agostini, 湯山育子, 中村隆志: 日本サンゴ礁学会第23回大会, オンライン (2020年11月) 「褐虫藻のルビスコ活性の測定」 (ポスター発表)

### 【サブテーマ2】

- 1) 樋口富彦: 日本サンゴ礁学会第21回大会自由集会「喜界島サンゴロジー」 (2018.11) 環境ストレスがサンゴの白化と回復過程に与える影響
- 2) Tomihiko Higuchi: 日本地球惑星科学連合2019年大会 (2019.5) “Effects of environmental stresses on coral bleaching” (ポスター発表)

### 【サブテーマ3】

- 1) 湯山育子, 安田直子, 比嘉彩也香, Sung-Yin Yang, Sylvain Agostini, 樋口富彦, 宮島利宏, 中村隆志, 藤村弘行: 日本サンゴ礁学会第22回大会、札幌 (2019年11月8-11日) 「サンゴの白化対応策の検討-遺伝子発現レベルでの評価-」 (ポスター発表)
- 2) 寺山玲美, Agostini Sylvain, 中村隆志, 藤村弘行: 日本サンゴ礁学会第23回大会, オンライン (2020年11月) 「サンゴにおける熱ストレスを緩和する戦略としての光阻害」 (ポスター発表)

### 【サブテーマ4】

- 1) 中村隆志, 瀧岡和夫, 樋口富彦, 宮島利宏, 山本高大, 渡邊敦, Ariel C. BLANCO: サンゴの生体内応答を基にした白化現象のモデル化と礁スケールへの拡張、日本サンゴ礁学会第21回大会、沖縄県中頭郡西原町 (琉球大学)、2018年11月22日-25日 (口頭発表)
- 2) Takashi Nakamura, Tomihiko Higuchi, Toshihiro Miyajima, Lawrence Patrick C. Bernardo, Kazuo Nadaoka, Atsushi Watanabe, Hiroyuki Fujimura: Modeling coral polyp-scale bleaching phenomenon and upscaling to reef-scale, 日本地球惑星科学連合2019年大会、千葉県千葉市 (幕張メッセ), 2019年5月26日-30日 (口頭、招待講演)
- 3) Lawrence Patrick C. Bernardo, Takashi Nakamura, Kazuo Nadaoka: Numerical simulation of typhoon events in Sekisei Lagoon, Okinawa, Japan using a coupled ocean-wave model, 日本地球惑星科学連合2019年大会, 千葉県千葉市 (幕張メッセ), 2019年5月26日-30日 (ポスター発表)
- 4) 中村隆志, 樋口富彦, 宮島利宏, Agostini Sylvain, 湯山育子, 安田直子, 藤村弘行: 光阻害過程とサンゴの白化現象のモデル化. 日本サンゴ礁学会第22回大会、北海道札幌市 (北海道大学), 2019年11月8日-11日 (口頭発表)
- 5) Takashi Nakamura, Takafumi Sakuma: High-spatiotemporal-resolution hindcast simulation for reproducing coral reef environments in Sekisei Lagoon, Okinawa, Japan.

JpGU-AGU Joint Meeting 2021、オンライン、2021年5月30日－6月6日（口頭発表）

- 6) **Takashi Nakamura**: Modeling coral polyp-scale bleaching phenomenon and upscaling to reef-scale. 14th International Coral Reef Symposium, Online, July 19-23, 2021（口頭発表）
- 7) **Takashi Nakamura**, Atsushi Watanabe, **Lawrence P. C. Bernardo**, Oumou K. D. Ba, Takafumi Sakuma, Soyoka Muko, Kazuo Nadaoka, **Hiroyuki Fujimura**: 26-year high spatiotemporal resolution hindcast simulation for reproducing the coral reef environment in Sekisei Lagoon, Okinawa, Japan. 日本サンゴ礁学会第24回大会, 2021年11月27日-29日（口頭発表）
- 8) [予定] **Takashi Nakamura**, **Toshihiro Miyajima**, **Tomihiko Higuchi**, **Sylvain Agostini**, **Ikuko Yuyama**, **Hiroyuki Fujimura**: Coral Bleaching simulation in the Sekisei Lagoon, Okinawa, Japan, based on a coupled hydrodynamic-biogeochemical-polyp-scale coral bleaching model. 日本地球惑星科学連合2022年大会、ハイブリッド（幕張メッセ、オンライン）、2022年5月22日－6月2日（口頭発表）

### (3) 「国民との科学・技術対話」の実施

#### 【サブテーマ1】

- 1) 琉球大学オープンキャンパス理学部体験ツアー（2019年7月13日、来場者665名）  
研究紹介 「サンゴ礁の化学」と題して本研究課題を説明

#### 【サブテーマ2】

- 1) 東京大学大気海洋研究所（柏キャンパス）一般公開2018（平成30年10月26、27日、来場者のべ7,625名）にてプロジェクトの紹介
- 2) 東京大学大気海洋研究所（柏キャンパス）一般公開2019（令和1年10月25、26日、来場者のべ7,786名）にてプロジェクトの紹介

#### 【サブテーマ3】

- 1) つくばサイエンスラボ2018 科学と環境のフェスティバル（2018年11月10-11日、来場者約10,000名）研究紹介 「生物学ひろば イシサンゴ～植物のような石のような不思議な生物～」

#### 【サブテーマ4】

- 1) **中村隆志**、日本サンゴ礁学会・オンライン企画『サンゴ礁の研究室をオンラインで訪ねてみよう！』（主催：日本サンゴ礁学会教育普及啓発委員会、2020年11月22日、オンライン、参加者約50名）にて講演（<https://sites.google.com/view/jcrs23>）
- 2) **中村隆志**、第29回 石西礁湖自然再生協議会（主催：石西礁湖自然再生協議会、2022年2月25日、オンライン、参加者約50名）にて講演（<http://www.sekiseisyoko.com/szn/report/conf/conference-2022-29.html>）

### (4) マスコミ等への公表・報道等>

#### 【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

#### 【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

#### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

#### 【サブテーマ4】

特に記載すべき事項はない。

### (5) 本研究費の研究成果による受賞

**【サブテーマ1】**

特に記載すべき事項はない。

**【サブテーマ2】**

特に記載すべき事項はない。

**【サブテーマ3】**

- 1) Agostini Sylvain 日本サンゴ礁学会 川口奨励賞 2018年11月受賞
- 2) 寺山玲美, Agostini Sylvain, 中村隆志, 藤村弘行: 日本サンゴ礁学会第23回大会 (2020年11月) 「サンゴにおける熱ストレスを緩和する戦略としての光阻害」優秀ポスター賞受賞

**【サブテーマ4】**

- 1) 中村隆志、日本サンゴ礁学会 川口奨励賞 2019年11月受賞

## IV. 英文Abstract

**Investigating Coral Bleaching Mechanisms and Potential Biochemical Prevention/Rescue Measures**

Principal Investigator: Hiroyuki FUJIMURA

Institution: University of the Ryukyus, Senbaru 1, Nishihara, Okinawa 903-0213, JAPAN

Tel: +81 98 985 8528 / Fax: +81 98 895 8565

E-mail: fujimura@sci.u-ryukyu.ac.jp

Cooperated by:

Development of bleaching prevention and remediation measures based on coral nutrient supply pathways, Tokyo University

Bleaching phenomena elucidated from omics and microscale studies, Tsukuba University

Development of a bleaching model considering in vivo response and prediction of the effectiveness of bleaching prevention and remedial measures, Tokyo Institute of Technology

[Abstract]

Key Words: Global warming, Coral bleaching, Reactive oxygen species, Stable isotope ratios, Comprehensive genetic analysis, Ecosystem modeling.

This study focuses on the development of prevention and remedial measures for high temperature stress induced coral bleaching. The measures tested rely on the role of antioxidants, a reactive oxygen species (ROS) defense mechanism during bleaching, metal enrichment and coral nutritional status. The effect of supplementation in either metal enriched yeast or Artemia larvae as bleaching mitigation measures were tested. An increase in antioxidant enzyme activity of the coral host was observed after supplementation with metals enriched yeasts (Fe, Mn). Supplementation with Artemia larvae mitigated the coral zooxanthellae density decreased under high water temperature. Furthermore, supplementation with Fe-yeast and Artemia larvae enhanced the activity of antioxidant enzymes in zooxanthellae. Supplementation with Artemia larvae and Mn yeast resulted in a 1.6-fold higher survival rate compared to non-fed corals after 3 weeks of high water temperature treatment. These results indicate that supplementation in either metal enriched yeast or Artemia larvae could allow a higher survival rates of corals after a bleaching event, thereby providing a mitigation measure to bleaching induced by short high-temperature period.

To assess the role of the nutritional status in the mitigation of bleaching and increased survival rates following bleaching by supplementation we first developed indicators that reflect coral lipid stores, heterotrophic dependence, nitrogen nutrient sources, and trophic status with symbiotic algae. Using these indicators, we evaluated the nutritional status of corals when fed various diets and showed that corals assimilate Artemia larvae as a source of nutrients

and store this additional input in the form of lipids. This showed that the nutritional status of corals was actually improved by feeding. Furthermore, the effects and mechanisms of action of various biochemical techniques proposed to prevent coral bleaching were reviewed and verified using model experimental systems.

Microsensing techniques, comprehensive gene expression analysis, and bacterial population analysis were used to verify the effectiveness of these techniques and to evaluate potential adverse effects. Corals fed *Artemia* larvae showed increased gene expression related to metabolism, such as organic matter and sugar metabolism, and the change in genes expression that occurred under high temperature stress were mitigated by supplementation. This result confirms the potential of supplementation as a stress-relieving measure. Corals with higher expression of metabolism-related genes related to glutamate synthase and ammonium transport showed higher survival rates, while corals expressing genes related to cytotoxicity showed lower survival rates. The bacterium *Endozoichomonas*, an indicator of coral health, did not show any tendency to decrease in response to supplementation, and there was no increase in pathogenic microorganisms, indicating that supplementation does not cause changes in coral microbiome or the growth of harmful bacteria.

A bleaching model for the coral-zooxanthellae symbiosis was developed. This model can reasonably explain the physiological and biochemical parameters obtained experimentally during the selection and evaluation of these measures. Moreover, it can describe the response and recovery characteristics of corals in high temperature environments. This model was extended to a model that reproduces large-scale bleaching in a real marine area. Simulations showed that corals that were well nourished by food recovered in less than one-third of the time predicted for corals that were poorly nourished. The model supported the importance of maintaining good coral nutritional status in mitigating bleaching and recovering from bleaching.