

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

4-1907 高CO₂時代に対応したサンゴ礁保全に資するローカルな環境負荷の閾
値設定に向けた技術開発と適応策の提案

(JPMEERF20194007)

令和元年度～令和3年度

Technical development and adaptation strategy to define local environmental threshold for coral
reef conservation in an era of high CO₂

〈研究代表機関〉

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

〈研究分担機関〉

国立大学法人 琉球大学

学校法人北里研究所 北里大学

国立研究開発法人 国立環境研究所

〈研究協力機関〉

ブルネイ・ダルサラーム大学

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）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5－1. 成果の概要	
5－2. 環境政策等への貢献	
5－3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6－1. 査読付き論文	
6－2. 知的財産権	
6－3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II－1 遺伝子解析手法によるサンゴ石灰化応答マーカーの開発と適用	・・・・・・・・・・19
（国立研究開発法人 産業技術総合研究所）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II－2 島嶼特有の水循環と陸域負荷の実態把握とサンゴ礁生態系との関係解明	・・・・・・・・・・34
（国立大学法人 琉球大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	

Ⅱ－３ 蓄積型栄養塩の測定法の開発と複合ストレス実験によるサンゴ石灰化評価	・ ・ ・ ・ ・ 49
(学校法人北里研究所 北里大学)	

要旨

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

Ⅱ－４ 統合的統計モデリングによる複合ストレス影響の解析・予測方法の開発と適用	・ ・ ・ ・ ・ 64
(国立研究開発法人 国立環境研究所)	

要旨

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細	・ ・ ・ ・ ・ 76
Ⅳ. 英文Abstract	・ ・ ・ ・ ・ 83

I. 成果の概要

課題名 4-1907 高CO₂時代に対応したサンゴ礁保全に資するローカルな環境負荷の閾値設定に向けた技術開発と適応策の提案

課題代表者名 井口 亮 (国立研究開発法人産業技術総合研究所地質調査総合センター
地質情報研究部門主任研究員)

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⑬】森・里・川・海のつながりの保全・再生と生態系サービスの持続的な利用に向けた研究・技術開発

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (4-1) サンゴ礁生態系への陸源負荷の複合的な影響メカニズムの解明及び包括的な対策手法の提案

研究実施期間 令和元年度～令和3年度

研究経費 (千円)

	契約額	実績額 (前事業年度繰越分支出額含む)
令和元年度	35,194	35,194
令和2年度	35,194	35,194
令和3年度	35,194	35,194
合計額	105,582	105,582

研究体制

- (サブテーマ1) 遺伝子解析手法によるサンゴ石灰化応答マーカーの開発と適用
(産業技術総合研究所)
- (サブテーマ2) 島嶼特有の水循環と陸域負荷の実態把握とサンゴ礁生態系との関係解明
(琉球大学)
- (サブテーマ3) 蓄積型栄養塩の測定法の開発と複合ストレス実験によるサンゴ石灰化評価
(北里大学)
- (サブテーマ4) 統合的統計モデリングによる複合ストレス影響の解析・予測方法の開発と適用
(国立環境研究所)

研究協力機関

ブルネイ・ダルサラーム大学

本研究のキーワード サンゴ礁生態系、陸域負荷、栄養塩、地下水、CO₂増加、サンゴ、石灰化

1. はじめに（研究背景等）

今後ある程度の人為的なCO₂増加が避けられない状況の中で、社会が依存する生態系サービスへの変化にどう適応していくかが大きな課題である。わが国でも、亜熱帯沿岸における主要生態系の一つであるサンゴ礁生態系が、地球的規模の環境変化に鋭敏に反応することが知られており、特に高水温ストレスによって起こる、生態系の基盤構成生物である造礁サンゴ類（以下「サンゴ」とする）の大規模白化現象は1990年代以降に頻発している。一方で、サンゴに負の影響を与えるローカルな環境要因として、陸域からの赤土等の流出や栄養塩負荷・バクテリア負荷等によるサンゴの生育環境の悪化が知られているが、温暖化に伴うサンゴ減少と、陸域影響による被害増加や回復阻害の実態は不明な点が多い。赤土流出の対策としては、1995年から赤土等流出防止条例が施行されているが、河川が発達していない島嶼特有の水循環は複雑で把握されておらず、栄養塩負荷に対する対策は未だない。

2. 研究開発目的

人為的活動の影響が顕著に異なるサンゴ礁域（与論島・沖縄島・慶良間諸島・石西礁湖等）において、サンゴ及び栄養塩等の野外調査を実施し、島嶼特有の水循環とローカルな環境負荷の実態を明らかにする。また、遺伝子解析によるバクテリア負荷等の詳細説明も検討する。2100年までの現実的なCO₂増加シナリオに沿って、栄養塩等のローカルなストレス負荷を加えた複合ストレス条件におけるサンゴ石灰化応答パターンを室内飼育実験によって明らかにし、環境負荷に対するサンゴの応答メカニズムの解明と、サンゴ石灰化限界の閾値を浮き彫りにする。主な対象としては、サンゴの中でも最も種数の多いミドリイシ属サンゴに焦点を当てる。構築したサンゴ石灰化-環境パラメータモデルを踏まえて、海水温、炭酸カルシウム飽和度（酸性化海水の指標）、クロロフィル量（栄養塩の指標）等を用いて、主に琉球列島沿岸サンゴ礁域における複合ストレスによる石灰化影響を地理的に可視化し、各地域で求められるローカルな環境負荷の閾値を提案する。

3. 研究目標

全体目標	人為的活動の影響が顕著に異なる場所での地下水及び沿岸海域の栄養塩・バクテリア負荷等の調査を実施する。IPCCによって提案されているCO ₂ 増加シナリオでの高水温・酸性化海水を想定した実験区に、野外調査で明らかとなった陸域起源の負荷（栄養塩等）を考慮した複合ストレスによるサンゴへの影響評価を行う。実験系を確立し、サンゴの健全な生育を保証する環境要因の閾値を明らかにする。飼育実験で明らかとなったサンゴ石灰化-環境パラメータモデルと、全球的なデータが利用可能な海水温・炭酸カルシウム飽和度（酸性化海水の指標）に、ローカルなストレス負荷も加味して、複合ストレスによる石灰化影響を地理的に可視化し、各地域で求められるローカルな環境負荷の閾値（基準値）を提案する。
------	--

サブテーマ1	遺伝子解析手法によるサンゴ石灰化応答マーカーの開発と適用
サブテーマリーダー /所属機関	井口 亮／産業技術総合研究所
目標	サンゴ飼育実験で得られたサンプルを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施し、環境応答のメカニズムの把握を進める。また、環境要因との相関分析を実施することで環境応答マーカーの絞り込みを進める。得られたマーカーを用いて詳細な遺伝子発現解析を実施し、環境負荷の影響が見られる閾値を把握する。また、飼育実験・野外サンプルの微生物類の遺伝子解析を進め、バクテリア負荷等の実態説明を進める。

サブテーマ 2	島嶼特有の水循環と陸域負荷の実態把握とサンゴ礁生態系との関係解明
サブテーマリーダー /所属機関	安元 純／琉球大学
目標	与論島・沖縄島・慶良間諸島・石西礁湖・多良間島等での海水・海底堆積物、陸域の地下水等の水循環特性及び栄養塩、特に、各種リン酸塩の動態解析を実施する。また、サンゴ礁池内外の海水・海底堆積物の栄養塩集積調査及びサンゴの被度及び藻類や微生物相の分布調査を実施する。加えて、サンゴ産卵期に採取した配偶子や成体サンゴを用いた複合ストレス実験を実施し、環境負荷の影響が見られる閾値を把握する。また、複合影響の1つの因子である底質微粒子による影響評価も進める。

サブテーマ 3	蓄積型栄養塩の測定法の開発と複合ストレス実験によるサンゴ石灰化評価
サブテーマリーダー /所属機関	安元 剛／北里大学
目標	野外調査で得た各地点の底質サンプルを用いて蓄積型栄養塩測定法の開発を行う。そして野外調査で得た各地点のサンプルの蓄積型栄養塩測定を網羅的に行う。成体サンゴ及び稚ポリプの石灰化評価法を構築し、各種栄養塩の複合ストレス実験を実施し、石灰化影響を定量的に評価する方法を構築する。また、飼育実験サンプルの微生物類の遺伝子解析を進め、バクテリア負荷等の実態解明を進める。

サブテーマ 4	統合的統計モデリングによる複合ストレス影響の解析・予測方法の開発と適用
サブテーマリーダー /所属機関	熊谷直喜／国立環境研究所
目標	モデリングに必要となる環境要因データ（特に栄養塩類・クロロフィル量）の収集・整理を進める。飼育実験で得られたサンゴ石灰化と環境要因のデータを解析してモデル式の構築を進める。環境要因については、海水温、炭酸カルシウム飽和度、クロロフィル量、地形等の陸域に関する特徴量等を説明変数として加え、各地域の環境要因の類似性・異質性評価につなげる。作成された統合モデルにより、複合ストレスによる石灰化能を琉球列島中心部について推定し、地図上に投影・可視化する。また、変数をIPCCシナリオに沿って変化させることで、今後の変化予測を行う。

4. 研究開発内容

本研究では、島嶼特有の水循環と栄養塩負荷の実態を把握し、現在IPCCによって提案されているCO₂増加シナリオでの高水温・酸性化海水を想定した実験区に、ローカルな環境要因としての陸域起源の負荷（栄養塩等）を考慮した複合ストレスによるサンゴへの影響評価を行う実験系を確立し、サンゴの健全な生育を保障する環境要因の閾値を明らかにする（サブテーマ1-4）。特に、サンゴの生活史維持において重要であり、かつ環境応答指標として定量化に優れている、サンゴ石灰化に着目した影響評価を実施する。加えて、骨格重量測定や顕微鏡観察のような既存のサンゴ石灰化評価手法に、ゲノム情報の拡大に伴い利用可能となってきた、各種石灰化関連遺伝子に着目した新規の遺伝子マーカー開発と適用を検討する（サブ1）。また、遺伝子解析によるバクテリア負荷等の詳細解明も検討する（サブ1・3）。

島嶼特有な環境負荷の実態を明らかにするため、応募者らによる長年の野外調査の実績があり、人為的活動の影響が顕著に異なる場所（与論島・沖縄島・慶良間諸島・石西礁湖・多良間島等）での地下水及び沿岸海域の栄養塩等の調査を実施し、飼育実験での条件設定に反映させる（サブ2）。また、栄養塩濃度だけでなく、総量（負荷量）や石灰質の底質に蓄積した栄養塩（蓄積型栄養塩）がサンゴ石灰化に大きく影響を及ぼすことが明らかになってきているため、濃度に加えて、野外での蓄積型栄養塩負荷の詳細を明らかにする（サブ3）。これらのアプローチから得られた数値を用いて、CO₂増加シナリオに沿ったサンゴ石灰化-環境パラメータモデルを構築し、石灰化能の増減を基に、環境負荷の閾値を浮き彫りにする。また、全球的なデータが利用可能な海水温・炭酸カルシウム飽和度（酸性化海水の指標）に、栄養塩の指標としてクロロフィル量を用いることで、複合ストレスによる石灰化影響を地理的に可視化し、各地域で求められるローカルな環境負荷の閾値（基準値）を提案する（サブ4）。

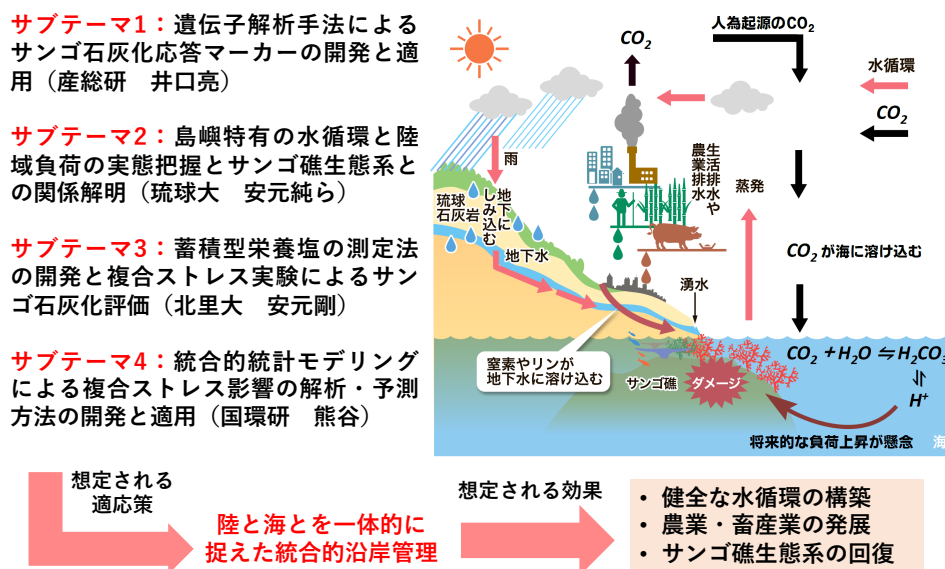


図0.1 研究プロジェクト全体の流れ。

サブテーマ1 遺伝子解析手法によるサンゴ石灰化応答マーカーの開発と適用

サブテーマ2・3と連携して稚サンゴを用いたサンゴ飼育実験を実施し、得られたサンプルからDNA・RNAを抽出し、網羅的遺伝子発現解析であるRNA-seq解析を実施して環境要因との相関分析を実施することで石灰化評価用マーカーの絞り込みを進めた。得られたマーカーを用いてリアルタイムPCRを実施し、骨格阻害をすることが分かっているリン酸塩負荷の閾値評価を行った。窒素負荷と、リン酸塩とpCO₂負荷の複合ストレスに対するサンゴの環境応答メカニズムの評価を行った。サブテーマ2と連携して実施した成体サンゴの飼育実験で得られた共生藻類の組成解析を行った。また、本課題と関連のある行政ニーズでも求められているバクテリア負荷の実態を把握するために、野外で採取された水サンプルを用いた細菌類のメタゲノム解析を進めた。

サブテーマ2 島嶼特有の水循環と陸域負荷の実態把握とサンゴ礁生態系との関係解明

琉球列島の広範囲（与論島・沖縄島・慶良間諸島・石西礁湖・多良間島等）において、サンゴ礁池内外の海水・海底堆積物の栄養塩集積調査及びサンゴの被度及び藻類等の分布調査を実施した。主に沖縄島での地下水等の水循環特性及び栄養塩、特に、各種リン酸塩の動態解析を実施した。加えて、成体サンゴを用いた飼育実験を実施し、栄養塩負荷及びpCO₂も加えた複合ストレス実験を実施した。

サブテーマ3 蓄積型栄養塩の測定法の開発と複合ストレス実験によるサンゴ石灰化評価

サブテーマ2の野外調査で行った野外調査で得た各地点の底質サンプルを用いて蓄積型栄養塩測定法の開発を行い、各地から採取された底質の栄養塩測定を行った。成体サンゴ及び稚ポリプの石灰化評価法を構築し、各種栄養塩のストレス暴露実験を実施し、石灰化影響を定量的に評価する方法を構築し

た。また、稚ポリブを高CO₂条件下で飼育し、石灰化影響の定量的評価法を構築した。さらに、サンゴサンプル骨格の詳細な骨格形態の把握を電子顕微鏡とX線μCTを用いて行った。また飼育実験サンプルを用いて、次世代シーケンサーによる微生物叢把握のためのメタバーコーディング解析を進めた。

サブテーマ4 統合的統計モデリングによる複合ストレス影響の解析・予測方法の開発と適用

サンゴの環境応答評価のためのモデリングに必要となる環境要因データの収集・整理を進めた。飼育実験で得られたサンゴ石灰化と環境要因のデータを解析してモデル式の構築を進めた。環境要因については、海水温、炭酸カルシウム飽和度、クロロフィル量、地形等の陸域に関する特徴量等を説明変数として加え、各地域の環境要因の類似性・異質性評価につなげた。作成された統合モデルにより、複合ストレスによる石灰化能を琉球列島中心部について推定し、地図上に投影・可視化した。また、変数をIPCCシナリオに沿って変化させることで、今後の変化予測を行った。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

【野外調査の結果の概要】

石西礁湖、沖縄島、与論島、屋久島、慶良間諸島で野外調査を行った結果、サンゴ・藻類等の組成には明確な地理的変異が見られた（図2.4）。石西礁湖内の31地点における平均底質組成割合は微細・芝状藻類が最も高く（33.5%）、次いで礫（RB、17.6%）、造礁サンゴ（17.3%）、砂と微細・芝状藻類（ともに8.6%）が高い割合で確認された。沖縄島周辺海域の5調査地（各2水深域）、計10地点では、微細・芝状藻類（MA）が最も高く（40.8%）、次いで造礁サンゴ（HC、34.9%）、砂（SD、6.9%）、ソフトコーラル（SC、5.6%）が確認された。与論島周辺海域の6地点の平均では、微細・芝状藻類が最も高く（48.6%）、次いで造礁サンゴ（30.0%）、大型藻類（7.1%）、礫（3.9%）、サンゴモ（3.8%）が高い割合で確認された。また、屋久島周辺海域の10地点の平均では微細・芝状藻類が最も高く（58.5%）、造礁サンゴ（26.8%）、大型藻類（5.0%）、砂（3.0%）、ソフトコーラル（2.8%）が高い割合で確認された。慶良間諸島や多良間島でも他の海域と同様のパターンが見られた。いずれの海域でも微細・芝状藻類が最も高い被度を示し、北上するにしたがって割合が増加する傾向が見られた。ほぼ全ての海域でミドリイシ属が最優占サンゴ属として記録された（全体で約190種のうち、ミドリイシ属を約40種確認）ことから、琉球列島全域での本属の重要性が示されたといえる。

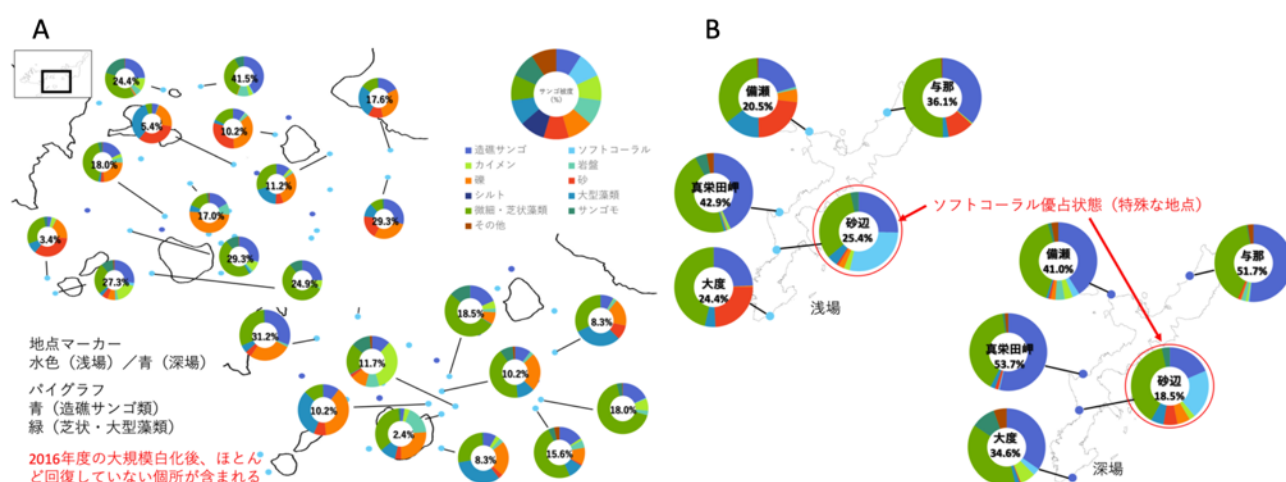


図2.4 サンゴ・藻類等の分布パターン（A：石西礁湖、B：沖縄島）。

沖縄島南部をモデルに水文学的調査を実施し、河川流量や地下水位など、現地で測定されたデータを概ね再現する2つのモデルを用いて、八重瀬周辺流域の流動特性について分析を行った結果を以降に示す。解析対象地域の地下水の流れは、基盤岩上面が低くなっている慶座方向と港川（雄飛川）とに集

中していることが明らかとなった。一方、坂名城方向への地下水の流れは少ないことが示された。

慶座地下ダム流域と米須地下ダム流域にて、栄養塩濃度の比較を行った結果、窒素濃度自体は両流域間で顕著な差異は見られなかった（図2.9）。その一方で、リン酸塩に関しては、米須地下ダムで高い傾向が見られ（図2.9）、周辺の陸地利用の違い（特に農業用地）が、地下ダムの栄養塩の差異にも寄与している可能性が示唆された。こうした地下水の栄養塩の差異は、沿岸域に影響することが予想される（図2.16）。

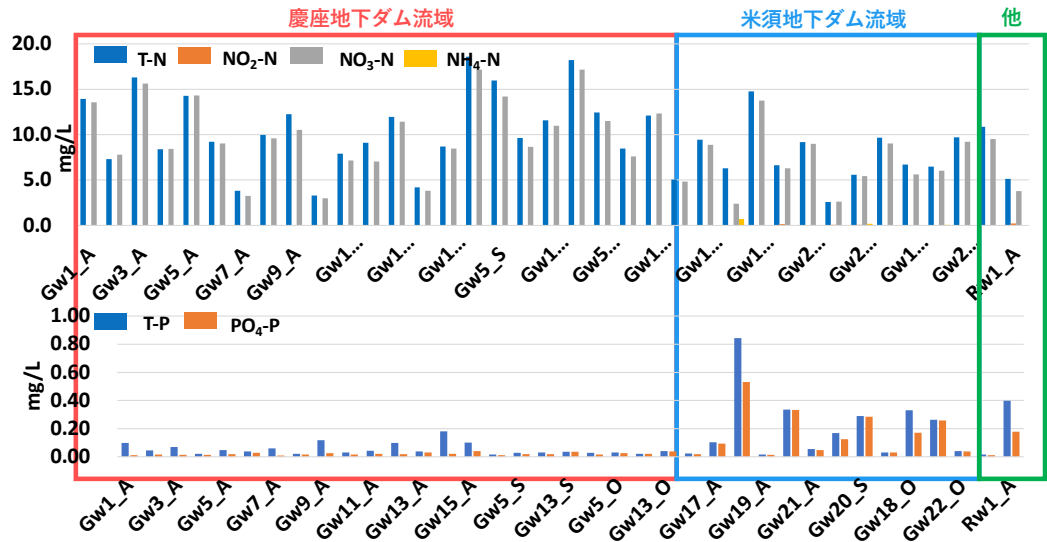
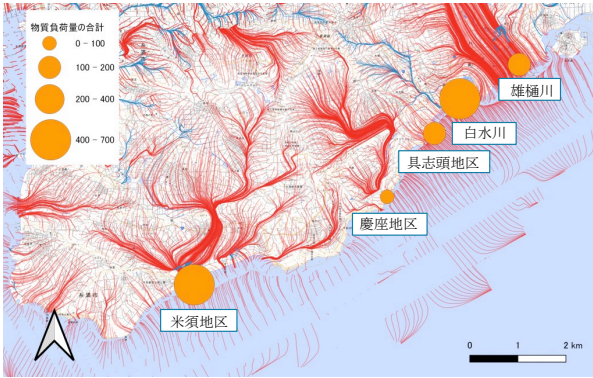


図2.9 慶座地下ダム流域と米須地下ダム流域での、栄養塩濃度の詳細。

物質負荷量の推定結果

	SS (t/year)	T-N (t/year)	T-P (t/year)
米須地区	407.2	121.8	4.75
慶座地区	9.8	14.4	0.03
具志頭地区	37.2	109.6	0.40
白水川	313.5	134.8	8.57
雄樋川	104.7	73.6	1.72

↑ 地下水（3地区）、河川水の負荷量



↑ SS,T-N,T-Pを合計した負荷量分布図

図2.16 沖縄島南部地域における陸域からの物質負荷量の推定結果。

沖縄島南部における地下水・沿岸水を対象としたメタバーコーディングによる細菌叢解析を行った。種レベルでの各地点の細菌叢組成の行列データを用いたクラスター解析では、2つのクラスターが確認され、地下水メインのグループと、沿岸水メインのグループに対応していた。地下水メインのグループには、沖縄島南部西側地点のサンプルが多く含まれており、地下水の影響を受けて沿岸の細菌叢も変化していることが示唆された（図1.16）。また、地下水メインのグループ内においても2クレードが存在することが明らかとなり（図1.16）、地下水の栄養塩濃度の違いが反映されていると考えられた。

地下水を対象としたショットガンメタゲノム解析で、機能遺伝子の中の窒素代謝と硫黄代謝の遺伝子の中で、栄養塩濃度が異なる慶座・米須の流域間で顕著な差がある遺伝子を抽出して調べた結果、米須では窒素代謝遺伝子の *nar I*、*nar V* の出現割合に差が見られた（図1.21）。これは、米須は比較的地下水の流れが緩やかで、有機物濃度が高いため還元反応が起こりやすい可能性が示唆された。一方で、慶座では硫黄代謝遺伝子の *cysNC* の出現割合に差が見られた。これは、慶座は泥岩や風化土壌によって地

層が形成されており、硫酸イオン濃度が高い傾向があることが関係していることが示唆された。

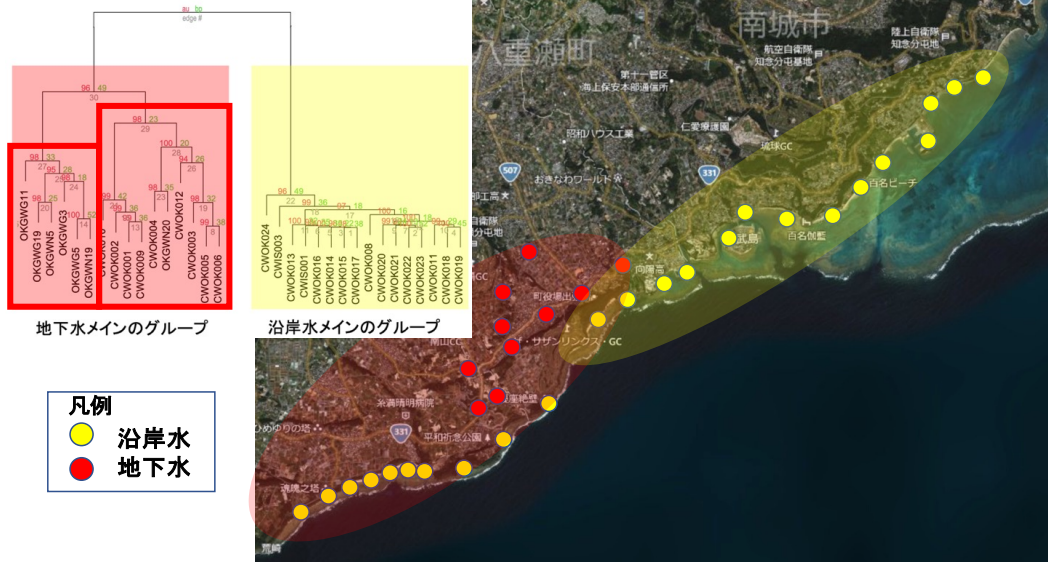


図1.16 メタバーコーディング解析に用いた沿岸・地下水サンプリング地点と、各地点の細菌叢類似度を示したクラスター解析の図と地理的な対応関係。

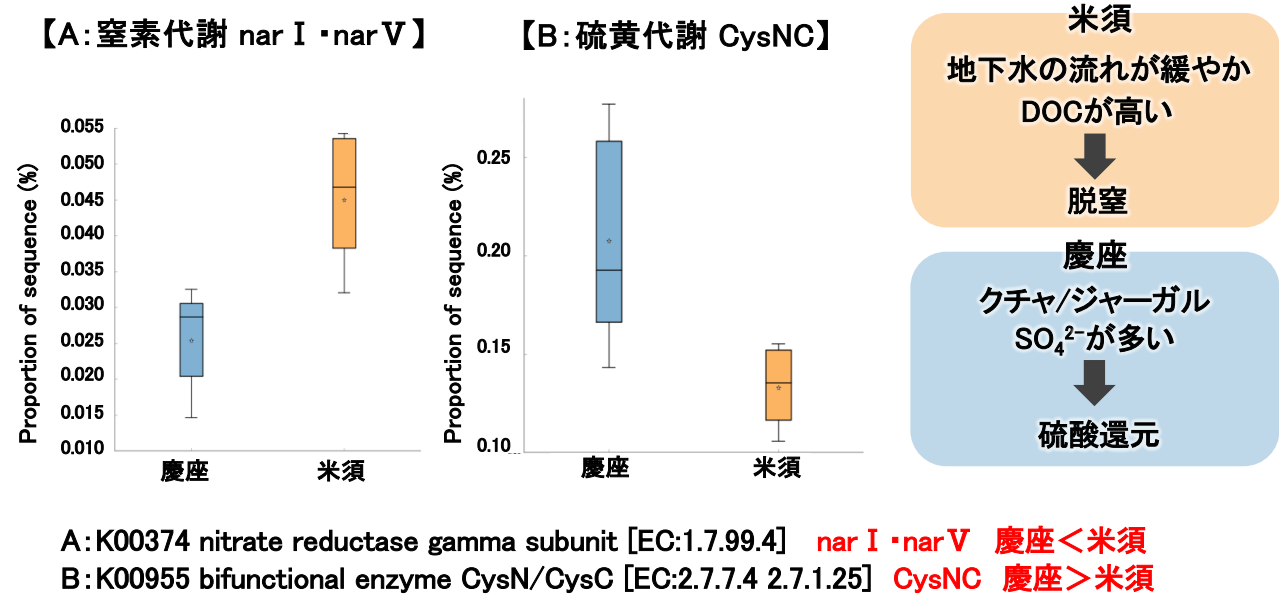


図1.21 ショットガンメタゲノム解析で流域間にて顕著な差異が示された機能遺伝子の配列割合の比較図。

続いて、沖縄島南部沿岸での蓄積型栄養塩の空間分布と、稚サンゴの加入量との関係を検証した(図3.5)。PO₄-Pの値が高い米須地下ダムからの地下水が一部湧出している米須海岸で蓄積リンは72.3 μMと高値を示し、平均 15.1±1.1 μMで地下ダムの水質の影響を受けていることが示唆される。一方、PO₄-Pの値が低い慶座地下ダムが溶出している沿岸部で蓄積リンは2.6 μMで米須海岸と比較して低かった。また、白水川河口の具志頭海岸で蓄積リンは平均 17.1±2.5 μMで高く、雄樋川河口の港川海岸の蓄積リンも平均 7.5±0.3 μMと高かった。白水川河口付近にはエビ養殖場や畜産場がありその影響が示唆される。雄飛川も12.6 μMと高い濃度のPO₄-Pが検出され流量も多く付近の港川海岸まで影響が及んでいると考えられる。稚サンゴ加入量と蓄積型栄養塩も相関を調べたところ高い相関が見られた(図3.8)。

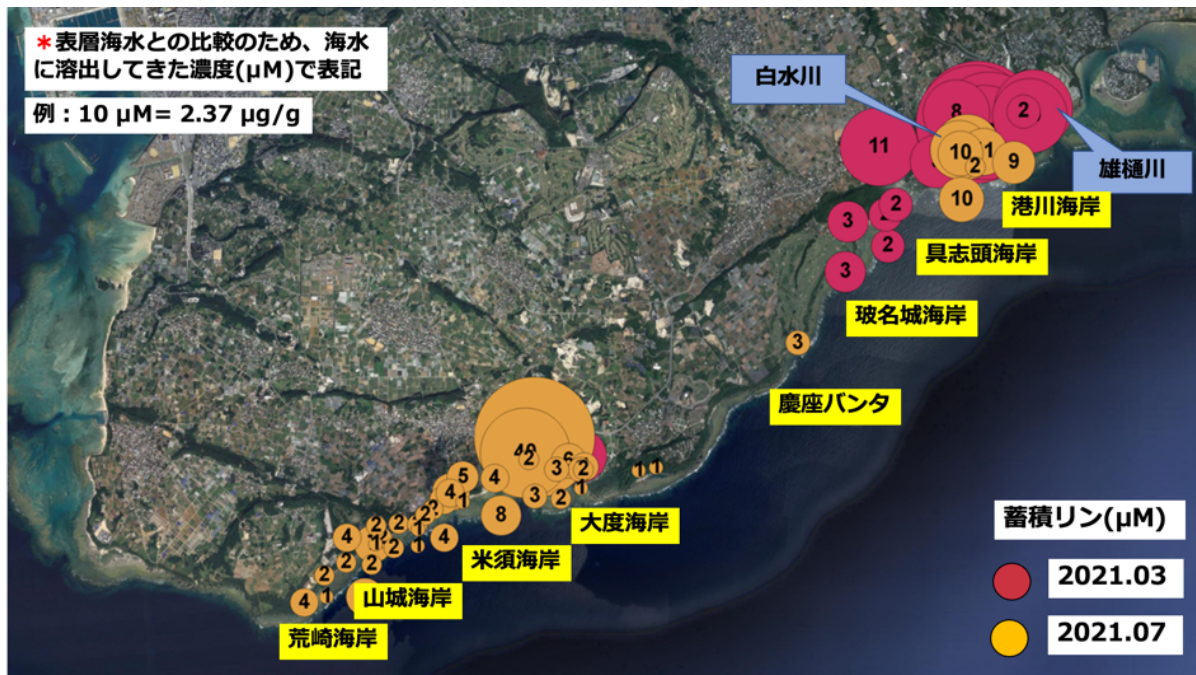


図3.5 沖縄島南部の蓄積型栄養塩マップ。

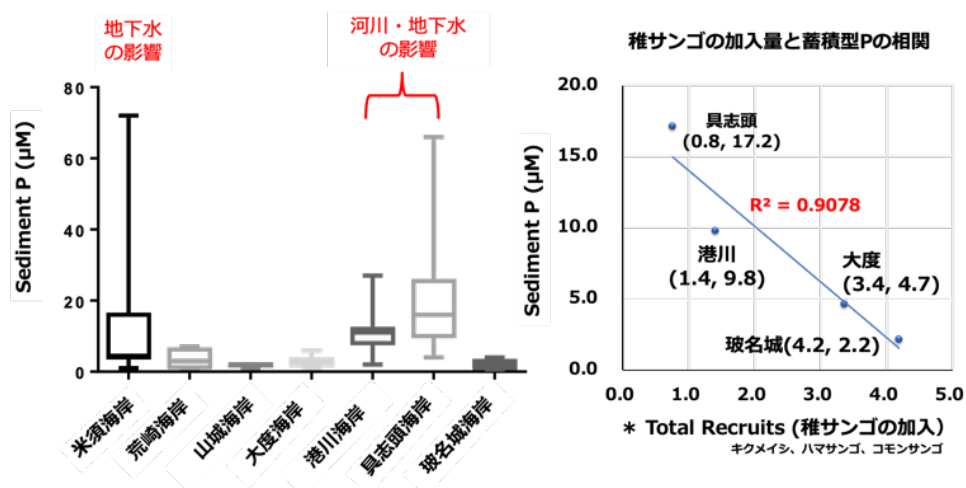


図3.8 沖縄島南部の蓄積型栄養塩の比較と稚サンゴ加入量との相関図。

我が国を代表するサンゴ礁生態系である石西礁湖と多良間島を調査対象地域に底質を採取し、蓄積栄養塩を用いて陸域負荷の現状把握を試みた(図3.10)。竹富島南部に位置するエビ養殖場付近の地点で $79.3 \mu\text{M}$ と高値であった。この地点は、陸域からエビ養殖場の排水と推測される水が放出されていることから、高い値が検出されたと考えられる。黒島周辺では、最大 $58.8 \mu\text{M}$ 、リーフ内で $10 \mu\text{M}$ 以上検出される地点が多かった。黒島は畜産が盛んなため、野積みなどの影響が地下に浸透し沿岸域に流出したため蓄積型栄養塩の値が高くなったと考えられる。一方、石西礁湖海域の溶存態リンはほとんどの地点で検出限界以下($< 0.06 \mu\text{M}$)となったが、竹富島エビ養殖場は $7.0 \mu\text{M}$ 、石垣島新川河口で $15.7 \mu\text{M}$ と淡水域では高かった。蓄積型栄養塩の値は深度が 5 m 以内の浅瀬で高かった。また、稚サンゴ密度が調査されている地点と蓄積リン濃度と関係を検証したところ、蓄積型栄養塩が $3 \mu\text{M}$ 以上で稚サンゴ密度は $0 \text{ 個体}/\text{m}^3$ となることがわかった(図3.15)。サンゴの種間差をみると、ミドリイシ稚サンゴの密度が 10 以上地点の蓄積型栄養塩は $1 \mu\text{M}$ 程度で、ハナヤサイサンゴの稚サンゴの密度は $2 \sim 2.9 \mu\text{M}$ であっても稚サンゴの密度が高い地点があり、種によって蓄積型栄養塩への耐性の高低が推測された。

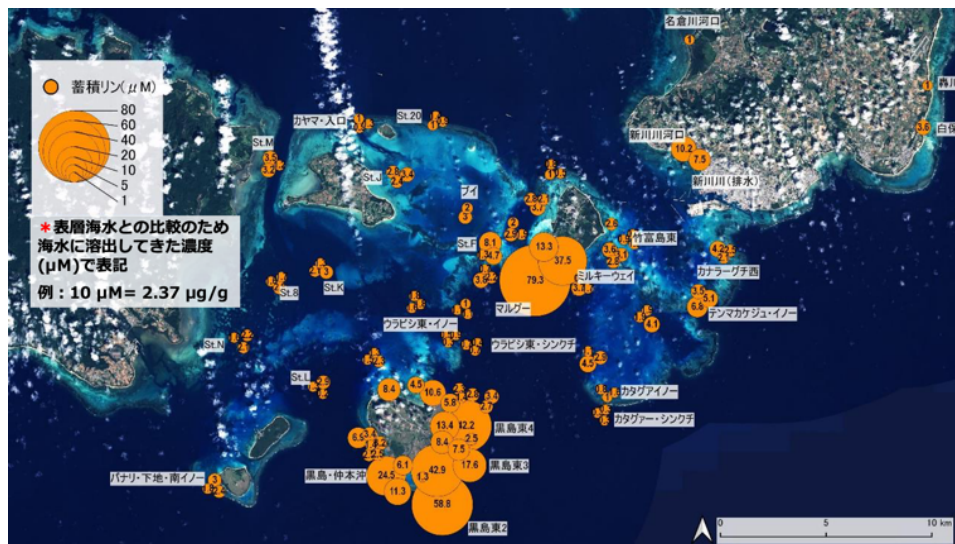
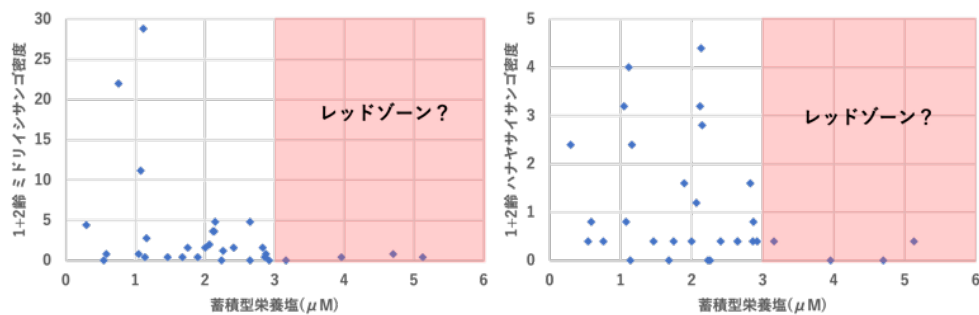


図3.10 石西礁湖での蓄積型栄養塩マップ。

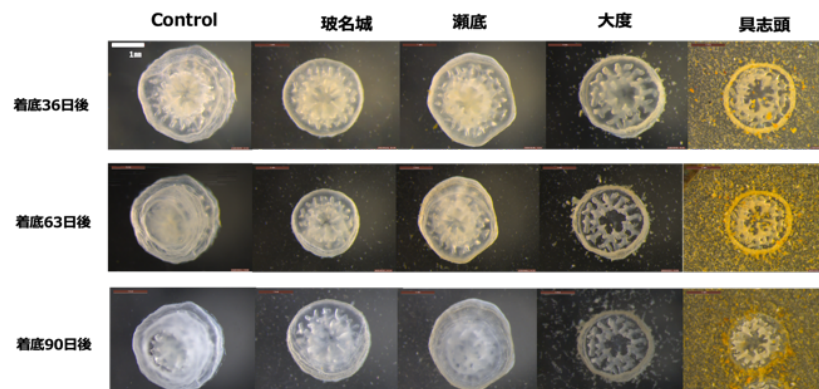


・3 μM 以上の地点ではサンゴ密度が0 個体/ m^3

図3.15 石西礁湖での稚サンゴ密度と底質の蓄積型栄養塩との相関。

【室内飼育実験結果の概要】

陸域からの影響が異なると考えられる玻名城、大度、瀬底、具志頭の各沿岸底質と共存した状態で稚サンゴを飼育し、稚サンゴの骨格形成への影響を調べたところ、稚サンゴ加入量の高い、玻名城、瀬底での骨格に比べ、稚サンゴ加入量が低い大度、具志頭の骨格は小さくなった(図3.17)。飼育海水に溶出したリンは大度が4.5 μM 、具志頭が15 μM であり骨格の大きさと関係があった。 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度が最も高かった具志頭では、飼育開始33日目から、大度では45日目から著しい生存率の低下が確認された。



具志頭と大度で骨格形成阻害

図3.17 底質を敷き詰めた状態で飼育した稚サンゴの骨格成長。

リン酸塩濃度を3段階の海水で飼育した稚サンゴを用いてRNA-seqを行った。その結果、リン酸塩濃度が高い海水では、多くの遺伝子で発現が減少していることが明らかとなった（図1.1；36780遺伝子中、負の相関を示したのは27975遺伝子）。リン酸塩によるサンゴ石灰化への負の影響は既に報告があり、リン酸塩が炭酸カルシウムに吸着することによって石灰化の阻害が起きると考えられたため、石灰化に直接関わる遺伝子以外はあまり影響がないと想定していたが、実際には多くの遺伝子で変化が見られた。

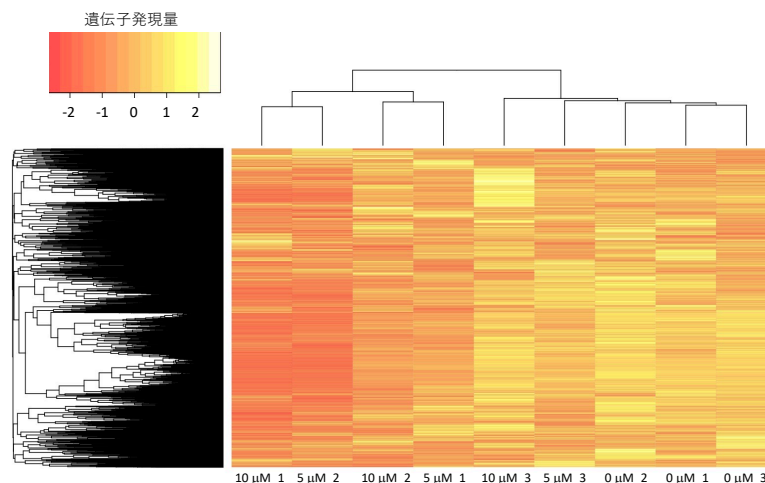


図1.1 3段階の濃度のリン酸処理における遺伝子発現のヒートマップ図。縦軸は各遺伝子、横軸は各処理区を示す（_数値はレプリケート番号）。遺伝子発現量は、遺伝子毎のTPM値を正規化して得られたZ-scoreで示している。

上記のRNA-seq解析で絞られた、リン酸濃度に鋭敏な遺伝子を抽出して作成したプライマーのうち、adi_EST_assem_20415、adi_EST_assem_29478、adi_EST_assem_7484の3遺伝子で、低濃度でのリン酸濃度における発現量の定量化に成功した（図1.9）。そのうち、adi_EST_assem_29478以外では、一元配置分散分析にて有意差が検出された（ $p < 0.01$ ）。また、adi_EST_assem_20415においては、コントロールと0.25 μM の間においても、多重比較で有意な減少が検出された（ $q < 0.01$ ；Tukey's HSDテスト）。先行研究におけるリン酸がサンゴ骨格形成に及ぼす影響を評価した事例では、5 μM 以上のリン酸処理でないと有意差が検出されなかったことから、今回の遺伝子マーカーを用いることで、低濃度におけるリン酸負荷での影響評価に成功した。

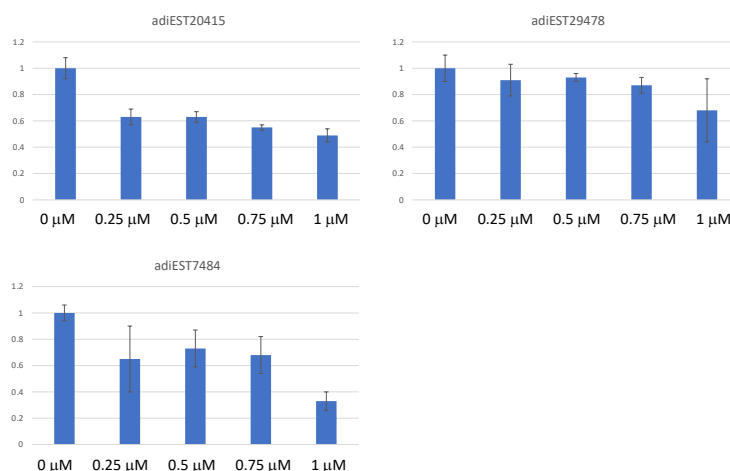


図1.9 リアルタイムPCRで得られた遺伝子の発現パターン。横軸がリン酸塩濃度、縦軸は0 μM におけるターゲット遺伝子の相対発現量を1とした時の各群の発現量（fold change）を表す。

また、リン酸とCO₂複合ストレス評価での遺伝子発現変化を調べ、各処理区で有意なDEGのリストを作成したところ、リン酸負荷5 μM 処理区では308遺伝子、 $p\text{CO}_2$ 負荷1000 μatm 処理区では538遺伝子、リン酸濃度・ $p\text{CO}_2$ をそれぞれ5 μM ・1000 μatm にした（複合ストレス条件区では557遺伝子のDEGが検出された（図1.13）。リン酸負荷区よりは $p\text{CO}_2$ 負荷区でDEGが多めに検出されたが、複合ストレス区でDEGが顕著に増えるような傾向は見られなかった。その一方で、複合ストレス区で相加的に遺伝子発現が減少するものも少なからず見られ、サンゴ石灰化の有機基質として知られるGalaxin、MAM遺伝子もその中に含まれていた。

高CO₂条件下で稚サンゴを約1週間飼育し、飼育実験後の稚サンゴの成長解析を行った。着底後から2週間、底面骨格の偏光写真を撮影し、ImageJを用いて石灰化率を算出したところ、高CO₂条件下で稚サンゴの骨格形成が阻害されることが明らかになった（図3.19）。また、複合ストレス実験で海水に溶出したリン酸塩濃度は0.04%にくらべて0.1% CO₂では平均で1.3倍高くなることが分かった（図3.22）。

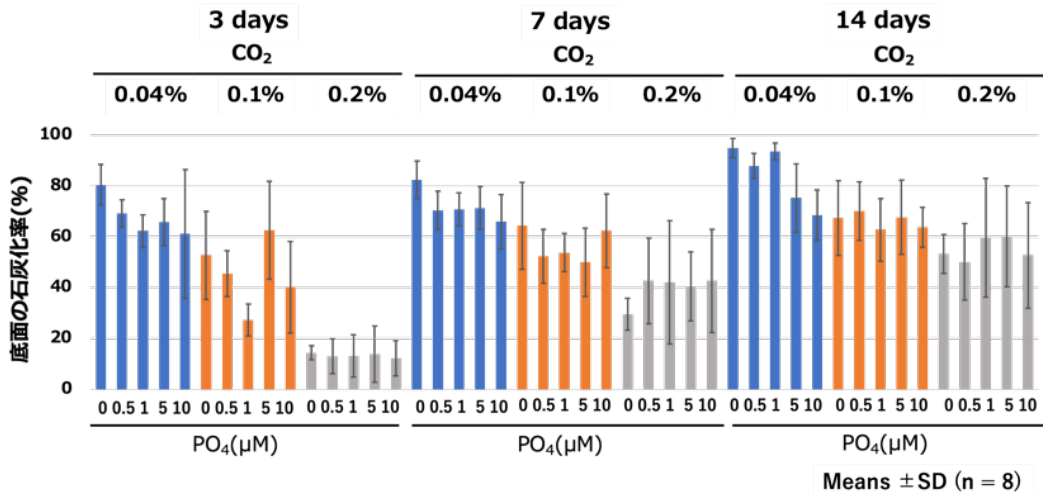


図3.19 高CO₂高リン酸塩の複合ストレス実験における稚サンゴ底面の骨格面積の平均。

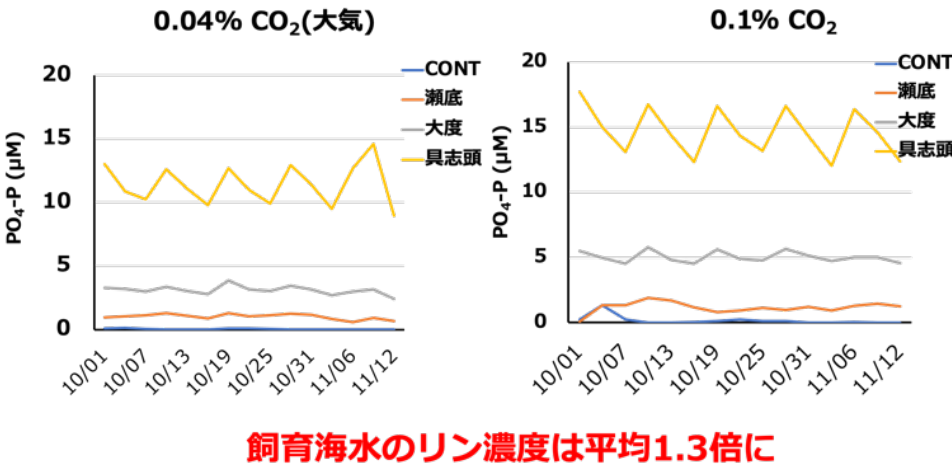


図3.22 複合ストレス実験で底質から海水に溶出したリン酸塩濃度の推移。

また、GETFLOWSによる陸域水循環モデルにより得られた地下水および河川水の沿岸域への流出量と、蓄積リンの関係性を、サブ3でCO₂上昇実験による底質リンの放出量も考慮して、高CO₂時代も想定して検証したところ、サンゴの石灰化が保証される現在の蓄積型リンの閾値は3.0 μM 辺りであるが、将来的には、2.3 μM まで下がりうることが推定された（図2.17）。

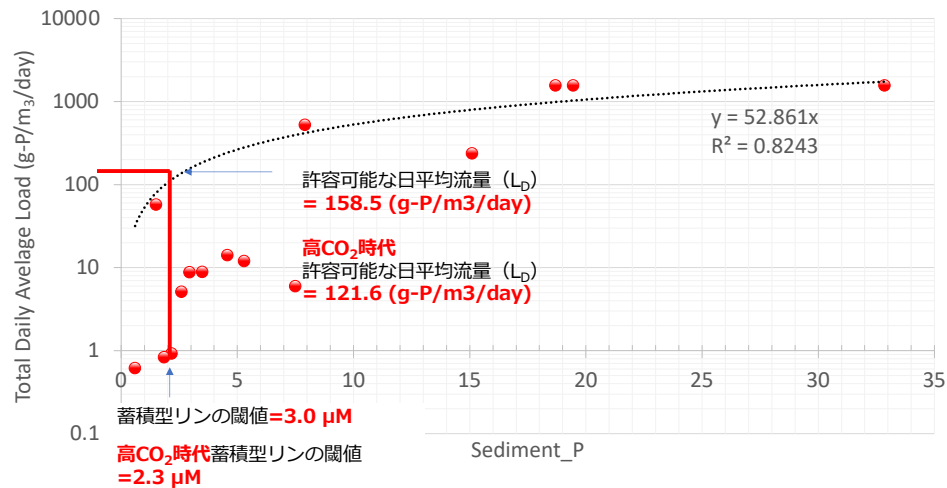


図2.17 許容可能な日平均流入負荷量(LD)の推定。

栄養塩供給のラインを組み込んだ流水系での複合ストレス影響評価を可能にする成体サンゴの飼育実験系を構築し、栄養塩負荷を与えた実験を行った。栄養塩負荷のみの実験での石灰化率に関しては、エダコモンサンゴでは栄養塩負荷区で減少する傾向が見られた（図2.18）。栄養塩と pCO_2 負荷での複合ストレス実験での石灰化率に関しては、エダコモンサンゴでは栄養塩負荷区で減少する傾向が見られたが、 pCO_2 負荷に応じた減少傾向は見られなかった。これらの栄養塩負荷への応答に見られた種間差は、共生褐虫藻の遺伝子型の違いに起因するものと考えられた。

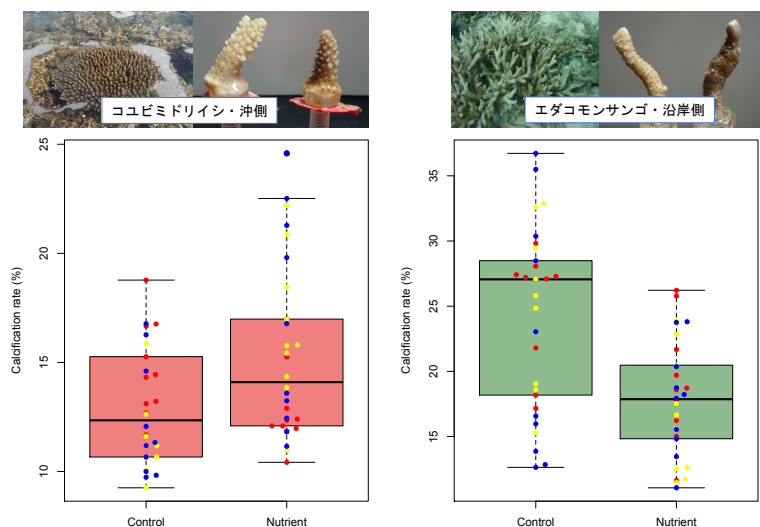


図2.18 サンゴ2種を用いた栄養塩負荷実験の成長率の結果。左はコントロール区、右は高栄養塩添加区。

稚サンゴを用いた窒素負荷実験においては、褐虫藻有・ NH_4Cl 処理における石灰化の低下が顕著であった（図3.30）。網羅的遺伝子発現解析の結果でも、褐虫藻有・ NH_4Cl 処理で多くのDEGが抽出された（図1.11）。これらの結果からも、褐虫藻の有無によって栄養塩負荷の影響が大きく異なること、リン酸だけでなく、窒素負荷も、サンゴ骨格形成に直接的に影響を及ぼしうることが明らかとなった。

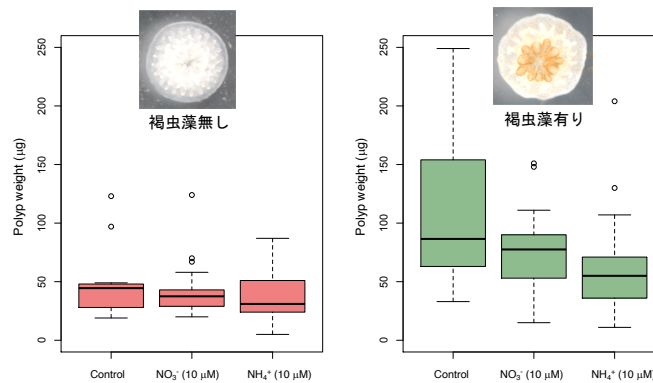


図3.30 褐虫藻有り無しポリプを用いた窒素負荷処理における石灰化評価。縦軸はポリプ重量、横軸は各処理区を示す。

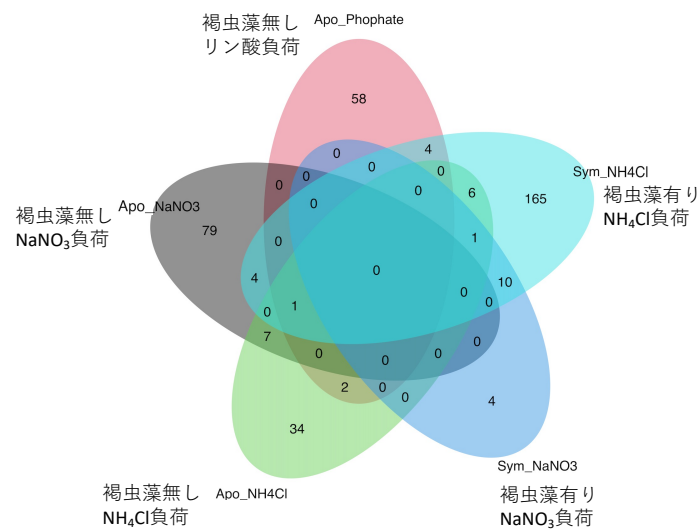


図1.11 栄養塩負荷処理におけるDEGの共有・非共有を示したベン図。数値はDEG遺伝子数を示している。

【統合的統計モデリング結果の概要】

集水域と土地利用データを用いた陸域負荷の地図化に関しては、農地や畜産の負荷を自然植生の1～1000倍まで変化させつつ、負荷の海岸線における値から野外観測の蓄積リン酸値を推定する回帰モデルを構築したところ、負荷を100倍としたときに約50%弱の説明力をもつモデルが得られた。このモデリングによって、陸域負荷のGIS変数は底質蓄積リン酸濃度の推定値として用いることができるようになった。沖縄本島全域について推定地図を構築したところ、多くの沿岸において蓄積リン酸の目標閾値と考えられる $3\mu\text{M}$ を上回ることがわかった(図4.7)。ただし、この推定は地表面における集水域から陸域負荷を推定しており、サブテーマ2で解析している地下水脈の影響は考慮できていない。しかし地下水域の多い沖縄本島南部においても、地表面の標高分布は地下構造と大きく乖離することはなかった(図4.7)。今後より多くの沿岸海域の蓄積リン酸値データを追加したモデリングによって推定モデルを改良することで、より広域の陸域負荷の推定地図を高精度で得られるようになることを期待できる。

複合ストレスによるサンゴの初期成長への影響に関しては、室内実験データを統合的に解析し、将来気候モデルの出力値と対応づけることによって、サンゴ初期成長における石灰化速度を将来の地理的分布へと予測投影した。室内実験データの解析では、*Acropora digitifera*の褐虫藻無しのポリプを対象とした。現在から将来(RCP2.6、RCP8.5)にかけての環境変化を想定し、水温を $27\sim 33^{\circ}\text{C}$ の4段階、 $p\text{CO}_2$ を $300\sim 1000\mu\text{atm}$ の4段階に変化させた。リン酸塩濃度については、沖縄本島で観測されている濃度のレンジを網羅する $0\sim 50\mu\text{M}$ の6段階に対する石灰化速度データを用いた。 $p\text{CO}_2$ とリン酸塩濃度は無

機的には独立と見なせるため、サンゴ初期成長については、交互作用は考慮しなかった。これら3要因の複合ストレス応答を標準化することで統合した多変量モデルを解析した。その結果、石灰化速度は、水温に対しては最適値をもつ山型の応答パターンを示し、 $p\text{CO}_2$ の増大に対しては単調減少、リン酸塩濃度の増大に対しては指数関数的な減少を示した（図4.8）。さらに、集水域解析より得られた推定蓄積リン酸値と将来水温・ $p\text{CO}_2$ の値を複合影響モデルに適用することにより、稚サンゴの石灰化速度の将来予測モデルを構築した。その結果、蓄積リン酸が水温や $p\text{CO}_2$ の影響を大きく上回ることがわかり、気候シナリオRCP8.5の21世紀末においても、リン酸濃度が1/5になれば、現在よりも石灰化速度が大きいという予測結果が得られた（図4.9）。さらにサブテーマ1でリン酸塩と $p\text{CO}_2$ の複合影響が見られた骨の有機基質であるGalaxin・MAM遺伝子のTPM（遺伝子発現量）と蓄積リン酸濃度の関係のモデル式を構築し、これを同様に沖縄本島地図へと可視化した。Galaxinについてはリン酸濃度により増減するものの、 $p\text{CO}_2$ 濃度の増加による負の影響が大きい予測となった。MAMについてはリン酸濃度影響がGalaxinと比べて小さく、RCP8.5の $p\text{CO}_2$ 濃度でとくに悪化する予測となった。このように野外調査・室内実験・遺伝子分析の結果をGISモデルへと関連付け、サンゴへの気候変動・地域環境ストレスの複合影響を推定・予測する体制を構築することができた。このような解析により、複合環境ストレスとサンゴ生存環境の関連がより明確になれば、今後の土地利用管理計画を検討する上で有用な判断材料になると期待できる。

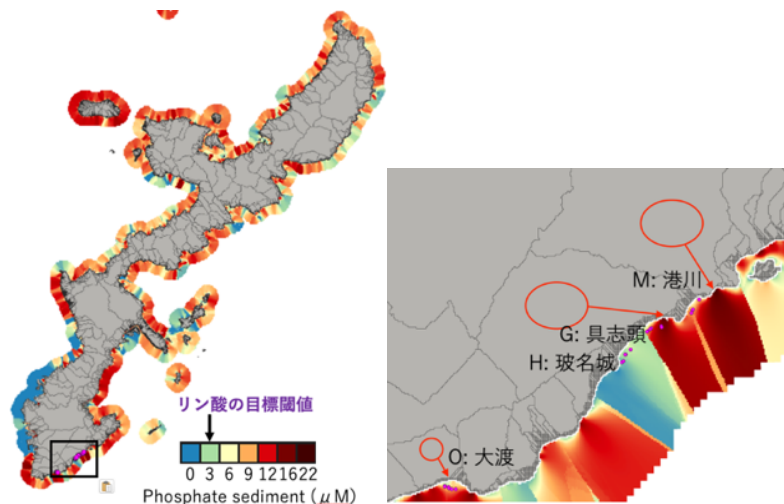


図4.7 集水域解析と土地利用解析より求めた蓄積リン酸値の推定地図。左：沖縄本島全域、右：本島南部の拡大図（全域図の枠内）

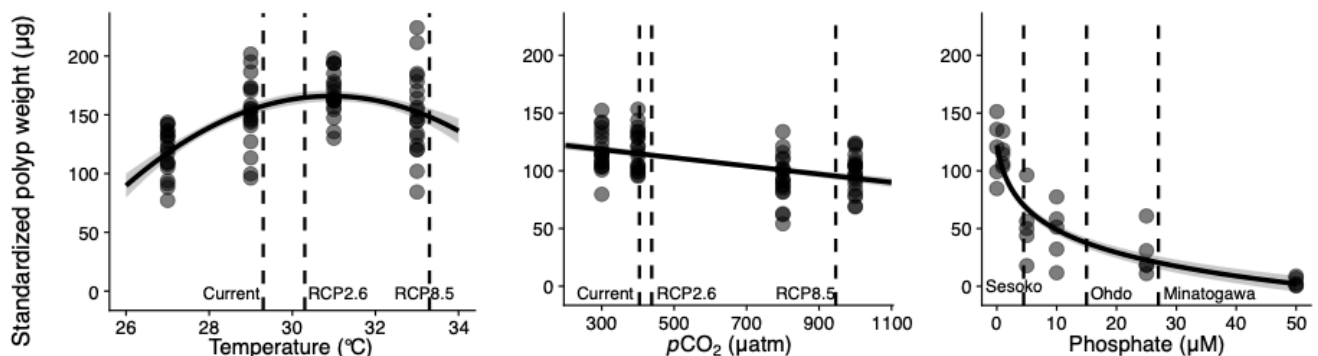


図4.8 沖縄本島への可視化のための稚サンゴ飼育実験データの回帰モデル。海水温（Temperature）および溶存 CO_2 濃度（ $p\text{CO}_2$ ）について現在気候（Current）、将来気候（RCP2.6、RCP8.5）に相当する値、蓄積リン酸（Phosphate）について各地の観測値レベルに相当する値について点線で明記した。

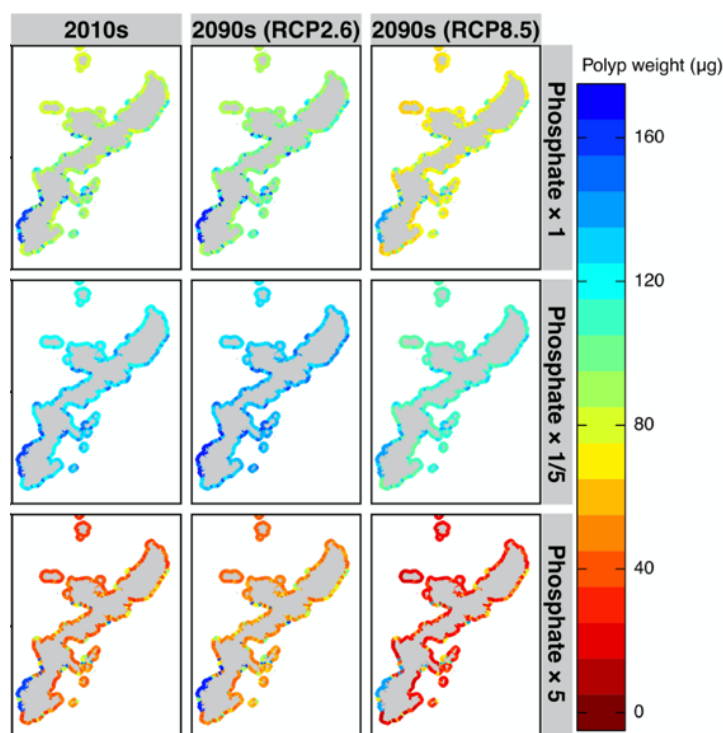


図4.9 沖縄本島における稚サンゴの石灰化量の予測地図：将来気候シナリオ（現在気候、21世紀末 RCP2.6、RCP8.5）および蓄積リン酸濃度管理シナリオ（現在同等、1/2削減、5倍増加）における複合影響のもとでの予測。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

本研究は、2019年度行政ニーズ「(4-1) サンゴ礁生態系への陸源負荷の複合的な影響メカニズムの解明及び包括的な対策手法の提案」に直結する内容である。安元純助教、安元剛講師、熊谷直喜研究員は、環境省が事務局として運営している石西礁湖自然再生協議会のメンバーとして昨年度から参画し、従来からメンバーであった中村崇准教授（学術調査部会・部会長）とともに石西礁湖でのサンゴ礁保全・回復に向けた議論に加わり、本成果で得られたサンゴ類の分布情報や蓄積型栄養塩評価手法に関する助言を行った。酒井教授は、沖縄県が行っており、県庁環境保護課が毎回参加している「沖縄県サンゴ礁保全再生地域モデル事業調査研究等推進会議」の議長を務めており、中村崇准教授もメンバーの一人である。この会議においても、本研究で得られた研究成果を踏まえた助言を行った。安元純助教は、八重瀬町地下水審議会の委員を務めており、主に本研究で得られた水文学的調査の成果に基づいた陸域利用に関する助言を行った。井口亮主任研究員、安元剛講師は、日本サンゴ礁学会保全委員会から、サンゴ礁域の栄養塩に関するガイドライン作成への協力依頼を受け、関連情報の提供を行った。また、本課題で確立した蓄積型リン評価に関しては、沖縄県環境科学センター・沖縄県衛生環境研究所からも手法に関する問い合わせがあり、沖縄県内での本研究の成果の活用が進んでいる。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

本課題で確立した蓄積型栄養塩評価は、これまで水サンプルでは検出できなかった高濃度のリン酸塩の時空間分布の把握が可能であるため、今後のサンゴ礁海域でのモニタリングで測定すべき項目に加わることが期待される。また、水文学的手法・統計モデリング手法で示した、地下水・表層水を介した陸域からの物質流出パターンを示した地図は、今後沿岸域に生息するサンゴ群集への負荷を軽減するための方策を検討する材料として活用されることが期待される。また、遺伝子解析で絞り込まれた遺伝子マーカーとX線CTによる骨格観察は、野外でサンゴがどの程度栄養塩のストレスを受けているかを評価するツールとして活用されることが期待される。本課題の提案する適応策をより効果的に社会実装してい

くためには、対象地域それぞれで、多様なステークホルダーと協働し陸と海とを一体に捉えた島嶼型の統合的沿岸域管理体制を構築することが必要である。この統合的沿岸域管理では、計画（Plan）→実行（Do）→評価（Check）→改善（Act）という4段階のいわゆるPDCAサイクルが継続される必要がある。計画（Plan）では、地域の水循環の特性に応じた適応策が立案され、多様なステークホルダーの合意のもと実行（Do）される必要がある。評価（Check）では、陸域からの栄養塩負荷量、海底下質の蓄積型栄養塩濃度や、サンゴの被度の継続的にモニタリング体制の構築が求められ、その結果に応じて、陸源の負荷低減に向けた適応策を改善（Act）していく必要がある。今後、本課題メンバーが参画している石西礁湖自然再生協議会や沖縄県サンゴ礁保全再生地域モデル事業調査研究等推進会議、八重瀬町地下水審議会などと連携しながら、本課題で提案する適応策の実証試験を試みたい。

5-3. 研究目標の達成状況

サブテーマ1では、上記目標のうち、網羅的遺伝子発現解析の実施と詳細な解析により、リン酸塩・窒素負荷、そしてリン酸塩と pCO_2 負荷の稚サンゴへの影響は、石灰化だけでなく他の生理的機構にも及ぶことが示され（図1.1・1.11）、サンゴの環境応答のメカニズム解明が進んだ。また、リン酸塩影響を評価可能なマーカーの絞り込みにも成功し、形態観察では把握できなかった低濃度でのリン酸塩によるサンゴへの影響が浮き彫りとなった（図1.9）。また、各地点から得られた水サンプルを対象としたメタゲノム解析を行うことで、地下水に影響していると思われる沿岸域での微生物群集構造の差異の検出に成功した（図1.16）。以上のことから、目標どおりの成果をあげたと評価できる。

サブテーマ2では、サンゴ礁池内外の海水・海底堆積物の栄養塩集積調査及びサンゴの被度及び藻類等の分布調査を実施し、各項目の地理的変異の把握と優占種の確認に成功した（図2.4）。また、沖縄島での地下水等の水循環特性及び栄養塩、特に、各種リン酸塩の動態解析を実施し、その詳細を明らかにした（図2.9・2.16）。また、陸域負荷の閾値の推定にも成功した（図2.17）。加えて、サンゴ産卵期に採取したサンゴ幼生及び成体サンゴを用いた飼育実験を実施し、サンゴのストレス応答の詳細を明らかにした（図2.18）。以上のことから、目標どおりの成果をあげたと評価できる。

サブテーマ3では、野外調査で得られた底質サンプルを用いて蓄積型栄養塩の分析手法を確立した。また、同手法を用いて栄養塩負荷が想定された沿岸域の底質を調査したところ、実際のサンゴの分布と栄養塩の蓄積具合が関連していることが示唆された（図3.8・3.15）。栄養塩が蓄積した底質はサンゴ石灰化を顕著に阻害すること（図3.17）、また CO_2 上昇に応じて蓄積したリン酸塩の放出も高まることを明らかにし（図3.22）、サンゴの健全な石灰化を保証するリン酸塩の閾値の提案にも繋がった。また、飼育実験でのサンゴサンプルを用いた石灰化評価法や微生物群集解析を確立することができた。そして成果の一部が論文として査読付国際誌に掲載され、プレスリリースも実施し、関連成果の社会実装も進んでいることから、目標を大きく上回る成果をあげたと評価できる。

サブテーマ4では、国内のサンゴ白化の記録を収集・整備し、時間・地理情報を付加してデータベース化した。次に、リモートセンシング観測値を取得し、海表面水温とその季節・年変動、積算過剰水温指標Degree Heating Weeks（DHW）、栄養塩に関連するクロロフィル濃度と濁度、その年最小値～最大値、長期平均、変動、陸域関連指標などを、サンゴ白化記録がある年・場所に対応して算出・整備した。また、解析にはSparse modelingという指標選択と関係式の推定を同時に行うことによって多重共線性を回避する統計手法を採用し、DHWと濁度の長期平均の値が大きいほどサンゴの白化が起りやすく、水温の年変動やクロロフィル濃度の変動が大きいほど白化が起りにくいといった傾向が明らかとなった。また、陸域からの物質流出の詳細を可視化し、サンゴへの負荷を考慮して将来予測も可能な、サンゴ石灰化に対する栄養塩負荷ハザードマップの作製に成功した（図4.7・4.9）。以上のことから、目標を上回る成果をあげたと評価できる。

研究期間中は、オンラインミーティング等を頻繁に行い、各課題の進展状況を確認しながら目標達成に向けた話し合いの機会を設けるように努めた。各年度で主要な人件費を異なるサブテーマに振り分けて、各サブテーマのコアとなる成果が着実に出てサブテーマ間が密接につながるように工夫した。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

4 件

<主な査読付き論文>

- 1) Manullang, C., Millyaningrum, I. H., Iguchi, A., Miyagi, A., Tanaka, Y., Nojiri, Y., & Sakai, K. (2020). Responses of branching reef corals *Acropora digitifera* and *Montipora digitata* to elevated temperature and $p\text{CO}_2$. *PeerJ*, 8, e10562.
- 2) 齋藤光代, 安元純, & 杉山歩. (2020). 地下水と生態系 これまでの研究動向と今後の展開. *地下水学会誌*, 62(4), 525-545.
- 3) Iijima M, Yasumoto J, Iguchi A, Koiso K, Ushigome S, Nakajima N, Kunieda Y, Nakamura T, Sakai K, Yasumoto-Hirose M, Mori-Yasumoto K, Mizusawa N, Amano H, Suzuki A, Jimbo M, Watabe S, Yasumoto, K. (2021). Phosphate bound to calcareous sediments hampers skeletal development of juvenile coral. *Royal Society open science*, 8(3), 201214.
- 4) Iijima M, Yasumoto J, Mori-Yasumoto K, Yasumoto-Hirose M, Iguchi A, Suzuki A, Mizusawa N, Jimbo M, Watabe S, Yasumoto, K. (2022). Visualisation of Phosphate in Subcalicoblastic Extracellular Calcifying Medium and on a Skeleton of Coral by Using a Novel Probe, Fluorescein-4-Isothiocyanate-Labelled Alendronic Acid. *Marine Biotechnology*, in press.

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	1 件
その他誌上発表（査読なし）	0 件
口頭発表（学会等）	4 2 件
「国民との科学・技術対話」の実施	1 7 件
マスコミ等への公表・報道等	1 件
本研究に関連する受賞	0 件

7. 国際共同研究等の状況

サンゴを対象とした複合ストレス実験システムの確立。ブルネイ・ダルサラーム大学の田中泰章助教を研究協力者として招聘。2019年9月30日から10月4日まで来日し、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設にて複合ストレス実験系の構築の助力を行った。

8. 研究者略歴

研究代表者：井口 亮

京都大学総合人間学部卒業、James Cook University（オーストラリア）博士課程修了、
Ph.D.、現在、産業技術総合研究所地質調査総合センター主任研究員

研究分担者：

1) 安元 純

高知大学農学部卒業、愛媛大学大学院連合農学研究科博士課程修了、現在、琉球大学農学部
助教

2) 中村 崇

The George Washington University, Columbian College of Arts & Sciences（アメリカ）
卒業、琉球大学大学院理工学研究科修了、現在、琉球大学理学部准教授

3) 酒井一彦

琉球大学理工学部卒業、琉球大学熱帯海洋科学センター助手、現在、琉球大学熱帯生物圏研
究センター教授

4) 安元 剛

高知大学理学部卒業、徳島大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、現在、北里大学海洋生
命科学部講師

5) 熊谷直喜

筑波大学第二学群生物学類卒業、現在、国立環境研究所気候変動適応センター研究員

Ⅱ．成果の詳細

Ⅱ－１ 遺伝子解析手法によるサンゴ石灰化応答マーカーの開発と適用

国立研究開発法人産業技術総合研究所研究所

地質情報研究部門 海洋環境地質研究グループ 主任研究員 井口 亮

研究グループ長 鈴木 淳

テクニカルスタッフ 西島 美由紀 (R1. 10-R2. 3)

産総研特別研究員 飯島 真理子 (R2. 4-R3. 3)

テクニカルスタッフ 儀武 滉大 (R3. 4-R3. 9, R3. 12-R4. 3)

〔要旨〕

栄養塩負荷等のストレスを与えたサンゴ飼育実験を実施し、得られたサンプルからDNA・RNAを抽出し、RNA-seq解析を実施して環境要因との相関分析を実施することで石灰化評価用マーカーの絞り込みを進めた。また、機能遺伝子の発現変化を踏まえて、どのような生理的機能に影響が生じるのかについても評価した。また、本課題と関連のある行政ニーズでも求められているバクテリア負荷の実態を把握するために、野外で採取された水サンプルを用いた細菌類のメタゲノム解析を進めた。その結果、リン酸負荷では、多くの遺伝子の発現変化が検出され、特に顕著な変化が見られた遺伝子群を絞り込んで、詳細な発現解析用マーカーを作成した。得られたマーカーを用いてリン酸塩負荷での遺伝子発現量を再評価し、形態変化では明らかにできなかった低濃度でのリン酸塩負荷に対してもサンゴがストレスを受けていることを検出することに成功した。窒素負荷及びリン酸塩と pCO_2 の複合ストレス実験で得られたサンプルの網羅的遺伝子発現解析を実施し、栄養塩負荷がサンゴの様々な生理的機能に影響を及ぼしていることを明らかにした。また、地下水・沿岸域の水サンプルのメタゲノムを実施することで、地下水が沿岸域にも到達して細菌叢組成にも影響していること、地下水の栄養塩の変化で細菌類の機能遺伝子組成も変化していることが明らかとなった。

1. 研究開発目的

陸域負荷及び CO_2 上昇に伴う複合ストレスによるサンゴへのストレス状態を詳細に評価するために、遺伝子レベルでの生理的応答の詳細を明らかにするとともに、遺伝子マーカーによるストレスを受ける閾値の評価を行う。また、バクテリア負荷等の実態解明を行うために、メタゲノム解析による環境試料の微生物組成及び関連遺伝子組成の把握を行う。

2. 研究目標

サンゴ飼育実験で得られたサンプルを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施し、環境応答のメカニズムの把握を進める。また、環境要因との相関分析を実施することで環境応答マーカーの絞り込みを進める。得られたマーカーを用いて詳細な遺伝子発現解析を実施し、環境負荷の影響が見られる閾値を把握する。また、飼育実験・野外サンプルの微生物類の遺伝子解析を進め、バクテリア負荷等の実態解明を進める。

3. 研究開発内容

RNA-seq解析に関しては、サンゴ産卵時に採取されたコニビミドリイシの配偶子を用いて稚サンゴを作成し、リン酸塩濃度を3段階、0 μM (コントロール)、5 μM 、10 μM に調整した濾過海水を用意し、褐虫藻無しの状態で7日間の飼育を行った。また、窒素負荷の影響を評価するために、 NH_4Cl を10 μM 、 $NaNO_3$ を10 μM に調整した濾過海水を用意し、褐虫藻 (クレードA) を感染させたものと感染させていない稚サンゴを用いて21日間の飼育を行った。また、リン酸と CO_2 複合ストレス評価を実施するために、リン酸濃度・ pCO_2 をそれぞれ0 μM ・400 μatm (コントロール)、リン酸負荷5 μM 、 pCO_2 負荷1000 μatm 、リン酸濃度・ pCO_2 をそれぞれ5 μM ・1000 μatm (複合ストレス条件) に調整した濾過海水を用

意し、褐虫藻無の稚サンゴを用いて7日間の飼育を行った。リアルタイムPCRによる評価に関しては、リン酸塩濃度を5段階、0 μM (コントロール)、0.25 μM 、0.5 μM 、0.75 μM 、1 μM に調整した濾過海水を用意し、褐虫藻無の稚サンゴを用いて7日間の飼育を行った。RNA-seq用のサンプルに関しては、各サンプル辺り数百個体のポリブをRNA抽出キット (ISOGEN、ニッポン・ジーン) の抽出バッファーを用いて速やかに固定し、キットのプロトコルに従ってRNAを抽出し、DNase処理を行った。リアルタイムPCR用のサンプルに関しては、各サンプル辺り約百個体のポリブを用いて上記と同様にRNA抽出を行った。リアルタイムPCRに関しては、抽出したRNAより1 μg を用いて、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara)による逆転写、GeneAmp SYBR qPCR Mix α No ROX (ニッポン・ジーン)による発現量の定量化を行った。相対定量のリファレンス遺伝子としてRpl9を用いた。

RNA-seq解析実施前のRNAの質を評価するために、バイオアナライザーを用いてRNA Integrity Number (RIN) 値を算出した。高いRIN値を示したサンプルを対象に、各段階から3サンプルずつ、計9サンプルを用いて、RNA-seq解析を行った。RNA-seq解析では、DNBSEQ-G400 (MGI社)を用いて、2×150 bpのペアエンド配列をfastqファイルとして取得した。得られたfastqファイルは、ソフトウェアfastp version 0.20.0¹⁾を用いてQスコア20以上でフィルタリングを行い、40 bp以下の配列は除去した。得られた配列は、コビミドリイシのトランスクリプトーム配列

(https://marinegenomics.oist.jp/coral/viewer/info?project_id=3; 36,780コンティグ) にソフトウェアkallisto version 0.46.1²⁾を用いてマッピングを行い、Transcripts Per Kilobase Million (TPM) 値を算出した。

トランスクリプトーム配列毎に、TPMとリン酸塩濃度の相関分析を行い、相関係数とp値、p値をBenjamini-Hochberg 法による補正を行ってq値を算出し、マトリックスデータとして整理した。また、コビミドリイシの各トランスクリプトーム配列をSwiss-Prot database (2020年3月) にblastx (e-value <1e⁻⁵) で注釈付を行い、TPM値等を合わせたマトリックスデータを作成した。マトリックスデータの処理はソフトウェアR³⁾を用いて行った。全遺伝子のTPM値を用いて、Rのgplotsパッケージを用いてヒートマップ図を作成した。また、Rのcluster version 2.1.0パッケージを用いて、K-medoids法による非階層クラスター解析を行い、シルエット値を用いてクラスター数の推定を行った。得られたクラスター数の情報も合わせて、発現量を正規化した主成分分析によるサンプル間の類似度を可視化した。また、全遺伝子のマトリックスデータから、q値による選択、遺伝子の注釈情報込のマトリックスデータから遺伝子名による選択を行い、相関関係を可視化した。また、出力されたTPM値を用いて、RのedgeR version 3.30.0パッケージを用いて、統計的に有意差が見られたdifferentially expressed genes (DEG)の抽出を行った。DEGの抽出には、3処理区でのglmLRT関数 (coef = c(2, 3)) による尤度比検定を行い、q値が0.01以下の遺伝子を抽出した。また、Swiss-Prot databaseのアクセッション番号を元に、各遺伝子のGene Ontology (GO) 番号の情報を取得した。そしてDEGの情報をを用いて、エンリッチメント解析をG0seq version1.38.0⁴⁾を用いて行った。帰無分布にはWallenius非心超幾何分布を用いた。また、窒素負荷処理でのDEGの抽出には、2処理区でのglmLRT関数 (coef = 2) による尤度比検定を行い、q値が0.01以下の遺伝子を抽出した。各栄養塩負荷で検出された有意なDEGのリストを用いて、RのVennDiagramパッケージを用いてベン図の作成を行った。

細菌類を対象としたメタバーコーディング解析に関しては、地下水及び沿岸水サンプルを対象に実施した。地下水サンプルに関しては、10地点から採水サンプルを実験室に持ち帰り、0.2 μm フィルターで濾過した。得られたフィルターを、DNeasy PowerWater kit (Qiagen) を用いてDNA抽出を行った。沿岸水に関しては、24地点から0.2 μm のステリベクスフィルターを用いて濾過し、DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) を用いてDNA抽出を行った。また、参考情報として石垣島の2地点から得られたステリベクスフィルターサンプルも解析に加えた。メタバーコーディング解析に関しては、16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を増幅するプライマーペア⁵⁾を用いてPCRによる増幅を行った。PCR産物からライブラリを作製し、次世代シーケンサーMiSeq (Illumina社) を用いて、2×300 bpのペアエンド配列をfastqファイルとして取得した。得られたfastqファイルは、QIIME2⁶⁾を用いて配列処理を行ったあと、SILVAデータベース⁷⁾を用いて注釈付を行った。また、ソフトウェアRのVeganパッケージ⁸⁾を用いて、細菌類の

在不在行列を用いたクラスター解析を行った。

ショットガンメタゲノム解析に関しては、沖縄島南部の栄養塩濃度が異なる、米須地下ダム流域から4地点、慶座地下ダム流域から4地点の計8地点でサンプルの採取を行った。サンプリング方法・DNA抽出方法は、上記のメタバーコーディング解析での方法と同じである。各試料のDNA濃度を0.2 ng/μlになるよう蒸留水で希釈し、gDNAとした。次に、Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, California, USA) を用いてショットガンライブラリーを作製した。具体的には、PCRチューブにキット付属のTD Buffer 5 μl、ATM Buffer 2.5 μlおよびgDNA 2.5 μlを加えて混合し、1分間遠心分離した。その後55℃で5分間保温し、10℃に急冷した。次にNT Bufferを2.5 μl加えて1分間遠心分離した後、5分間室温に放置した。さらに任意のindex primer 1 (i7) およびindex primer 2 (i5) を各2.5 μl、NTA Bufferを7.5 μl加えて混合し、72℃で3分間、95℃で30秒間保温した後、95℃で10秒間、55℃で30秒間および72℃で30秒間のPCRを12サイクル行った。最後に72℃で5分間保温した後、10℃に急冷した。反応液を1.5 mlチューブへ移して遠心分離した後、さらに、AMPure XP beadsを15 μl加えて2分間混合した。5分間室温で放置し、これらのチューブをマグネットスタンドに立て、上清を除去した。このチューブに80%エタノールを100 μl加え、しばらく静置させた後に上清を除去した。再び80%エタノールで洗浄し、上清を除去した。その後、スタンド上で15分間風乾させた。次に、Resuspension Bufferを26.3 μl加え、2分間室温にて混合し、2分間室温で反応させた。2分間マグネットスタンドに立て、上清25 μlを回収した。その後、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) を用い、作製したライブラリーのDNAサイズを確認した。Nextera XT DNA Library Preparation Kit付属の精製ビーズを用いライブラリーのノーマライゼーションを行い、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いてMiSeq (Illumina) に供し、2×300 bpのペアエンド配列をfastqファイルとして取得した。次世代シーケンサーから得られたFASTQファイルをFLASH⁹⁾にてR1配列とR2配列を結合した。これらの配列につき、FASTX-Toolkit¹⁰⁾を用いQスコア20にてクオリティ調整を行い、SeqKit¹¹⁾にて50 bpより短い配列を除去した。得られた配列につきDIAMOND BLASTX¹²⁾を用いてNCBI nrデータベースと比較し、MEGAN6 Ultimate edition¹³⁾を用いて細菌叢および機能遺伝子組成を可視化した。細菌叢については属レベル、機能遺伝子組成についてはKEGG Tier3をベースとした。米須流域と慶座流域での窒素代謝と硫黄代謝に関わる遺伝子を比較するため、KEGG Tier4の機能遺伝子組成につきSTAMP¹⁴⁾を用いて統計解析を行った。

また、サブ2の飼育実験で得られた成体サンゴサンプルの褐虫藻に関しては、長期飼育されていたハマサンゴとコユビミドリイシの枝片を用いて行った。飼育後にエタノール固定した枝片から、DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) を用いてDNAを抽出し、核のInternal Transcribed Spacer 2 (ITS2) 領域を対象としたプライマー¹⁵⁾を用いてPCRによる増幅を行った。得られたPCR産物からライブラリーを作成し、MiSeq (Illumina社) で、2×300 bpのペアエンド配列をfastqファイルとして取得した。得られたfastqファイルは、褐虫藻専用の解析パイプラインであるSymPortal¹⁶⁾を用いて処理し、ITS2配列とITS2 type profile (specific sets of defining intragenomic ITS2 sequence variants: DIVs)として組成を確認した。

4. 結果及び考察

リン酸塩濃度を3段階の海水で飼育した稚サンゴを用いてRNA抽出を行った結果、当初ポリプ数が少なく、十分なRNAの抽出が行えなかった。そこでポリプ数を増やして実施した結果、RNA-seqを行うのに十分なRNAサンプルの確保を行うことができ、その中で特にRIN値の高い9サンプル（3段階のリン酸塩濃度、3反復）を用いてRNA-seqを行った。その結果、リン酸塩濃度が高い海水では、多くの遺伝子で発現が減少していることが明らかとなった（図1.1；36780遺伝子中、負の相関を示したのは27975遺伝子）。非階層クラスター解析では、クラスター数2において最大のシルエット値が示された。クラスターのパターンはコントロール区のサンプルはまとまったが、他の処理区は別クラスターに分かれて配置される傾向が見られた（図1.1）。主成分分析でも、コントロール区のサンプルはまとまる傾向が観察された（図1.2）。リン酸塩によるサンゴ石灰化への負の影響は既に報告があり^{17,18)}、リン酸塩が炭酸

カルシウムに吸着することによって石灰化の阻害が起きると考えられたため、石灰化に直接関わる遺伝子以外はあまり影響がないと想定していたが、実際には多くの遺伝子で変化が見られた。エンリッチメント解析では、phosphopantetheine bindingに関与するタームでのみ有意差が見られたが（FDR = 0.004）、エンリッチメント解析ではSwiss-Protでヒットした12269遺伝子のみを対象としており、他の機能未知の遺伝子の発現の多くでリン酸塩負荷は大きく影響していると考えられる。

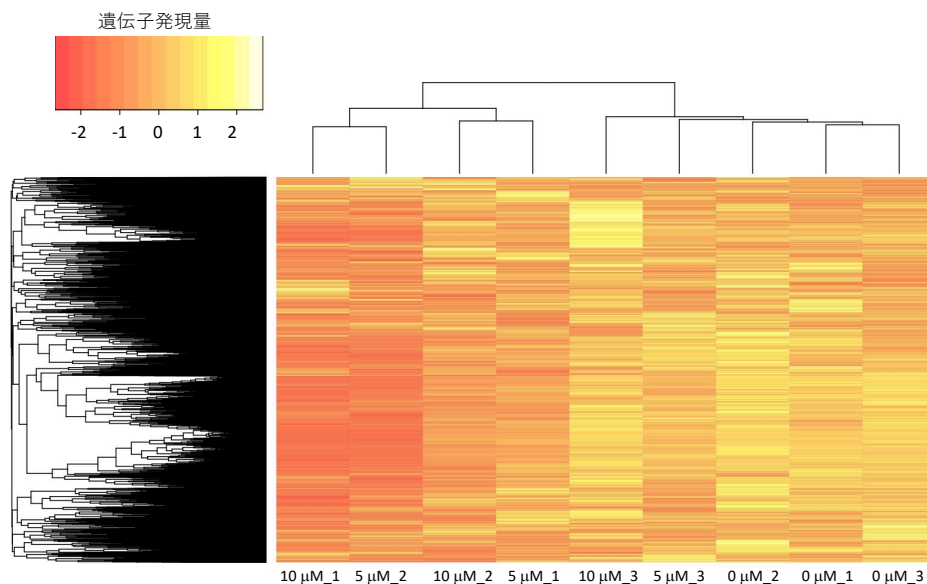


図1.1 3段階の濃度のリン酸処理における遺伝子発現のヒートマップ図。縦軸は各遺伝子、横軸は各処理区を示す（_数値はレプリケート番号）。遺伝子発現量は、遺伝子毎のTPM値を正規化して得られたZ-scoreで示している。

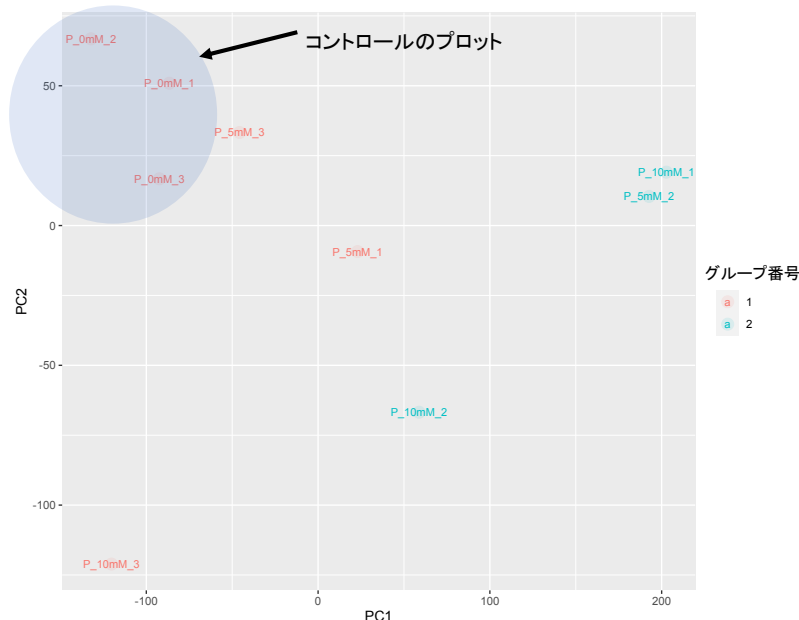


図1.2 遺伝子発現量による主成分分析。プロットの色は各クラスターを示す。

相関分析におけるq値が0.1以下の遺伝子を絞り込んだ結果、8遺伝子が抽出された（図1.3）。また、サンゴ石灰化の有機基質として知られるGalaxin¹⁹⁾・Skeletal Organic Matrix Proteins²⁰⁾をキーワードに抽出し、相関分析を行った結果、Galaxinに関しては発現量がリン酸塩濃度とともに低下する傾向が見られたが（図1.4）、SOMPにおいては発現量がリン酸塩濃度とともに顕著に減少するものもあれば変化が不明瞭なもの、あるいはわずかながら増加傾向の見られるものも混在していた（図1.5・図1.6）。先行研究においては、酸性化海水がサンゴ石灰化に及ぼす影響を、網羅的遺伝子発現解析で調

べた研究においても、有機基質をコードする遺伝子の発現パターンは複雑であることが示唆されている²¹⁾。また、これらの遺伝子の中で、リン酸塩濃度と発現量との間に明瞭な相関が見られた3遺伝子 (adi_EST_assem_20415、adi_EST_assem_29478、adi_EST_assem_30554) に絞り込んで、リアルタイムPCRによる発現量解析のためのプライマーセットを作成した (表1.1)。また、Swiss-Prot databaseでヒットした遺伝子群でのDEG抽出においては、15遺伝子が絞り込まれた。この内、1遺伝子以外はリン酸塩濃度の増加とともに遺伝子発現量が顕著に減少していることが確認された (図1.7・図1.8)。15遺伝子のうち変化が顕著であった3遺伝子 (adi_EST_assem_22860、adi_EST_assem_3475、adi_EST_assem_7484) に絞り込んで、リアルタイムPCRによる発現量解析のためのプライマーセットを作成した (表1.1)。

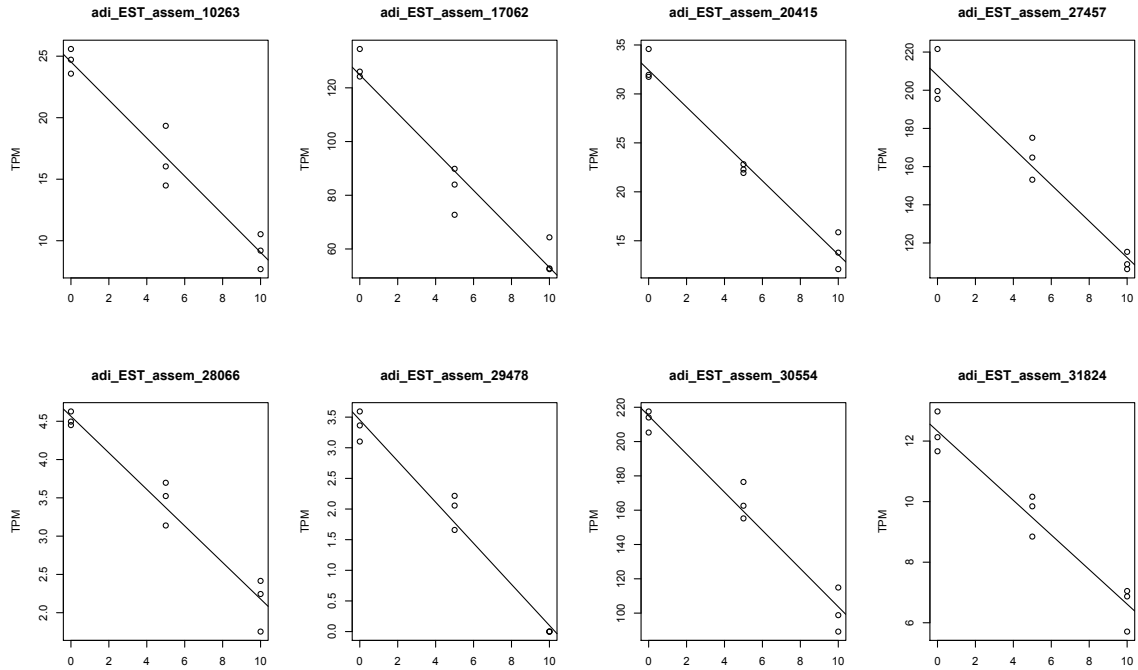


図1.3 リン酸塩濃度との相関が顕著な遺伝子の発現パターン。横軸がリン酸塩濃度、縦軸が発現量 (TPM) を表す。

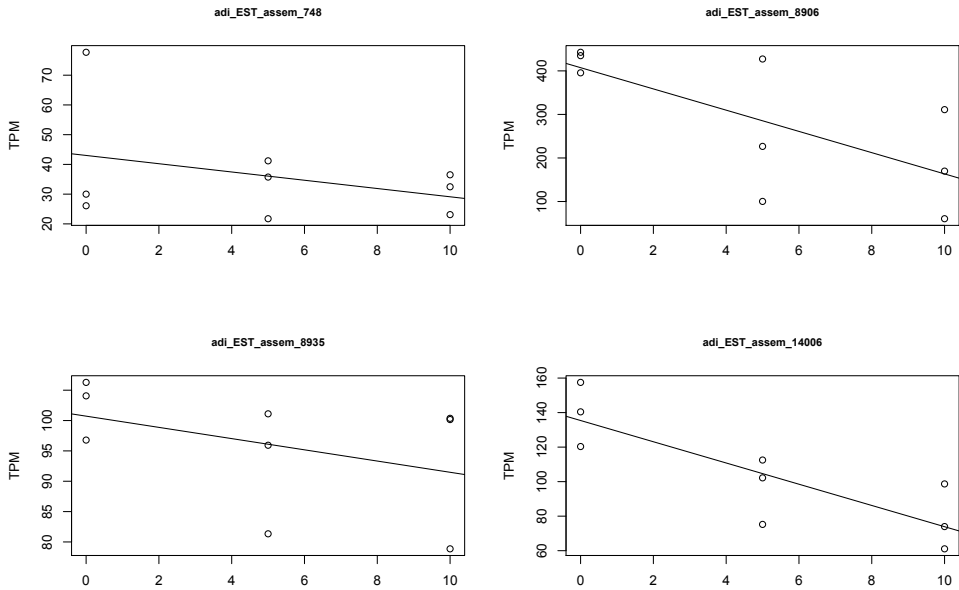


図1.4 注釈情報にGalaxinを含む遺伝子の発現パターン。横軸がリン酸塩濃度、縦軸が発現量 (TPM)

を表す。

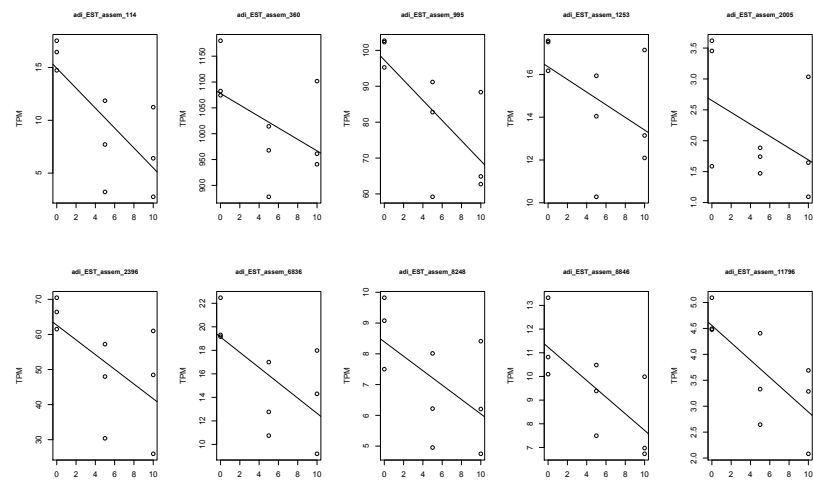


図1.5 注釈情報にSOMPを含む遺伝子の発現パターン。横軸がリン酸塩濃度、縦軸が発現量（TPM）を表す。

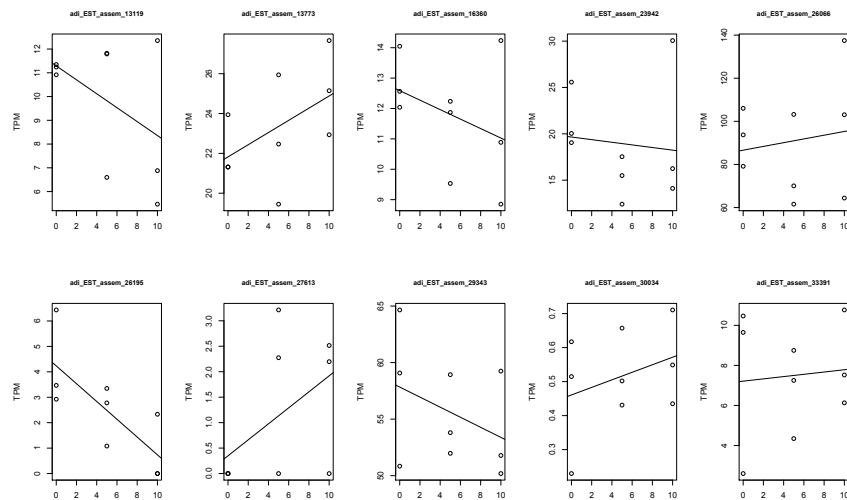


図1.6 注釈情報にSOMPを含む遺伝子の発現パターン（続）。横軸がリン酸塩濃度、縦軸が発現量（TPM）を表す。

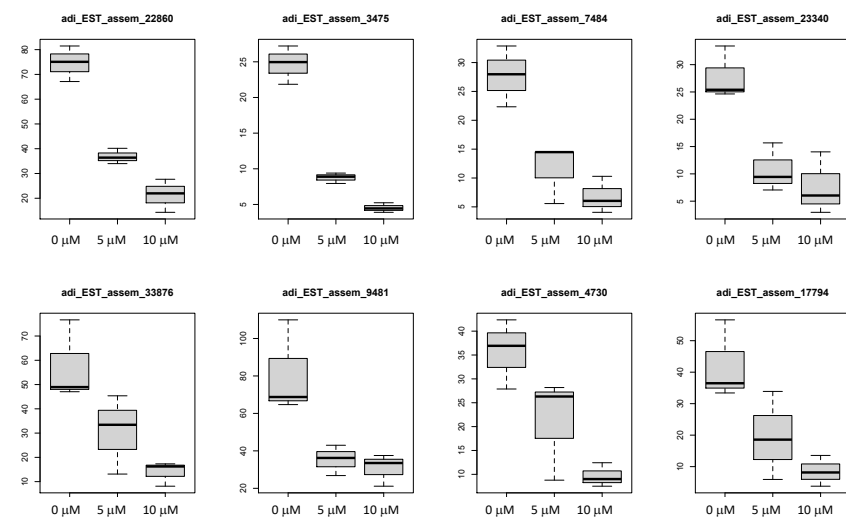


図1.7 DEG抽出で得られた遺伝子の発現パターンを示す箱ひげ図。横軸がリン酸塩濃度、縦軸が発現量（TPM）を表す。

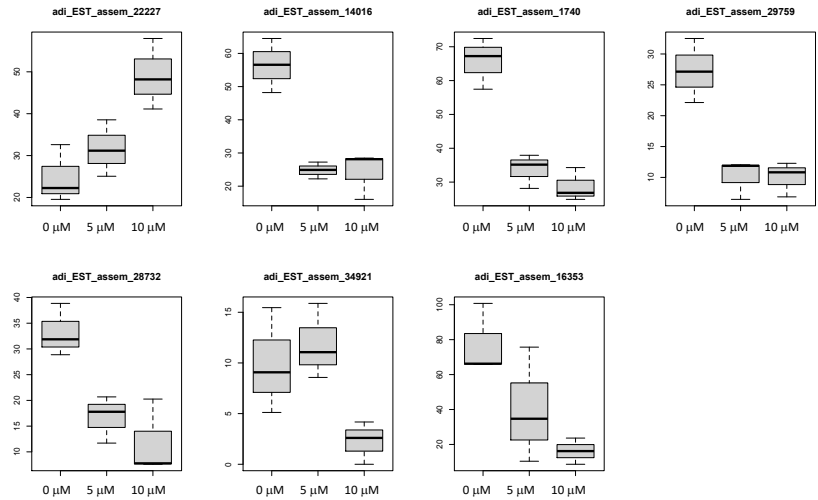


図1.8 DEG抽出で得られた遺伝子の発現パターンを示す箱ひげ図（続）。横軸がリン酸塩濃度、縦軸が発現量（TPM）を表す。

表1.1 作成したプライマーリスト

配列ID	プライマー配列（フォワード）	プライマー配列（リバース）	伸長サイズ（bp）
adi_EST_assem_20415	CACTGATTTCTTTGTGATCT	ATTTGCAAGACTCTTTTATG	123
adi_EST_assem_29478	TTCATGAAGCGTTATAAAAT	TTAAGGTTAAGGTTTTGGTA	103
adi_EST_assem_30554	ATTATTTGGATCTTCTCTCC	CTAAATTGAGCACTTGATTC	100
adi_EST_assem_22860	TCGGTATCATGAGGTATAAG	CTTCTTGTTTCGGAATCTT	122
adi_EST_assem_3475	CAGTTGGTTTAGTCATTCAT	AATTTTTCAAGAAGTTCACA	119
adi_EST_assem_7484	GTCTGATATGAATTGATGCT	TCATCCTTCTTTGATACAAC	132
adi_EST_assem_7011	TCCACCAATGTGCCATTCTCAGAG	AAGAGCTGGCCTGTGTGAAAAAC	132

リアルタイムPCRでは、表1.1で作成したプライマーのうち、adi_EST_assem_20415、adi_EST_assem_29478、adi_EST_assem_7484の3遺伝子で、低濃度でのリン酸濃度における発現量の定量化に成功した（図1.9）。そのうち、adi_EST_assem_29478以外では、一元配置分散分析にて有意差が検出された（ $p < 0.01$ ）。また、adi_EST_assem_20415においては、コントロールと0.25 μM の間においても、多重比較で有意な減少が検出された（ $q < 0.01$ ；Tukey’s HSDテスト）。先行研究におけるリン酸がサンゴ骨格形成に及ぼす影響を評価した事例¹⁸⁾では、5 μM 以上のリン酸処理でないと有意差が検出されなかったことから、今回の遺伝子マーカーを用いることで、低濃度におけるリン酸負荷での影響評価に成功した。

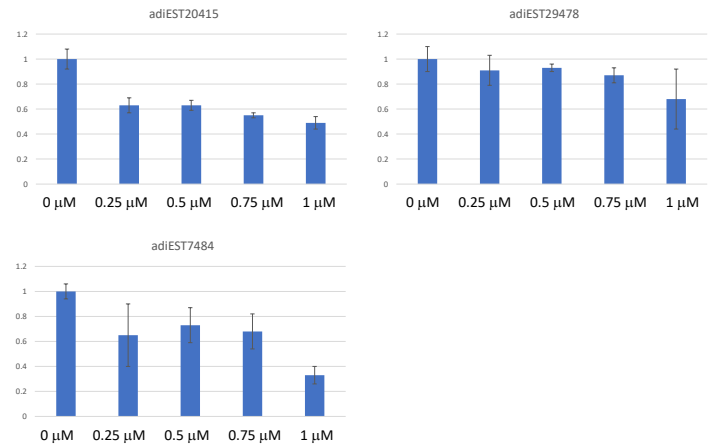


図1.9 リアルタイムPCRで得られた遺伝子の発現パターン。横軸がリン酸塩濃度、縦軸は0 μM におけるターゲット遺伝子の相対発現量を1とした時の各群の発現量（fold change）を表す。

DEGが多めに検出されたが、複合ストレス区でDEGが顕著に増えるような傾向は見られなかった。その一方で、複合ストレス区で相加的に遺伝子発現が減少するものも少なからず見られ、サンゴ石灰化の有機基質として知られるGalaxin (adi_EST_assem_14006)¹⁹⁾、MAM遺伝子 (adi_EST_assem_14016)²⁰⁾ もその中に含まれていた (図1.14; 表1.2)。

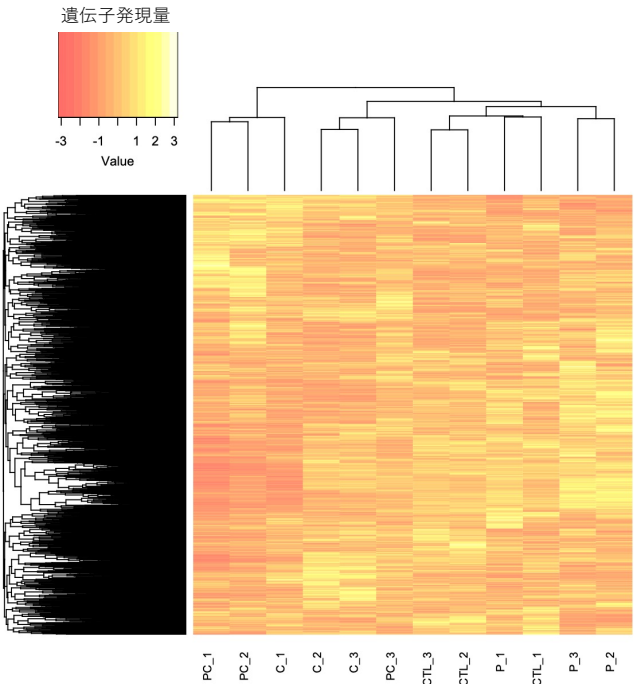


図1.12 リン酸負荷・ $p\text{CO}_2$ 負荷処理における遺伝子発現のヒートマップ図。縦軸は各遺伝子、横軸は各処理区を示す (CTLはコントロール、Pはリン酸負荷、Cは $p\text{CO}_2$ 負荷、PCはリン酸+ $p\text{CO}_2$ 負荷、_数値はレプリケート番号)。遺伝子発現量は、遺伝子毎のTPM値を正規化して得られたZ-scoreで示している。

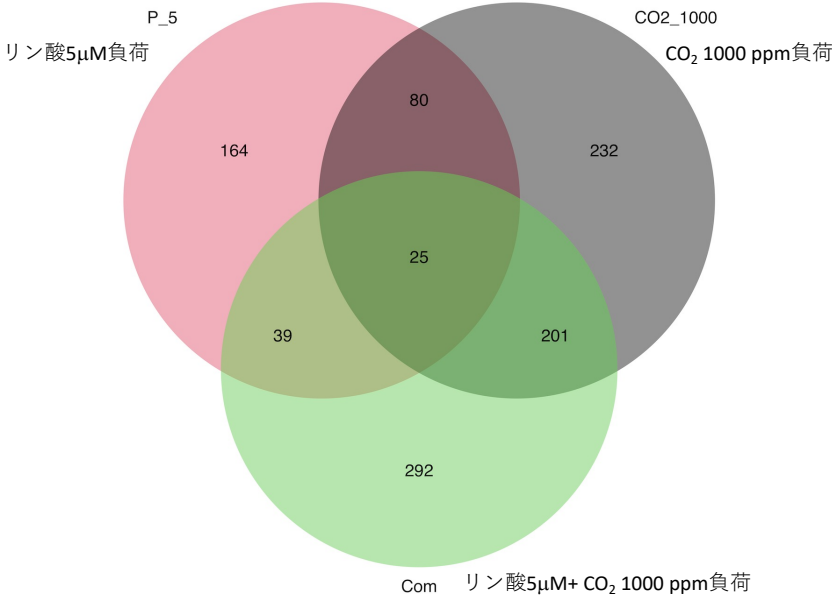


図1.13 リン酸負荷・ $p\text{CO}_2$ 負荷処理におけるDEGの共有・非共有を示したベン図。数値はDEG遺伝子数を示している。

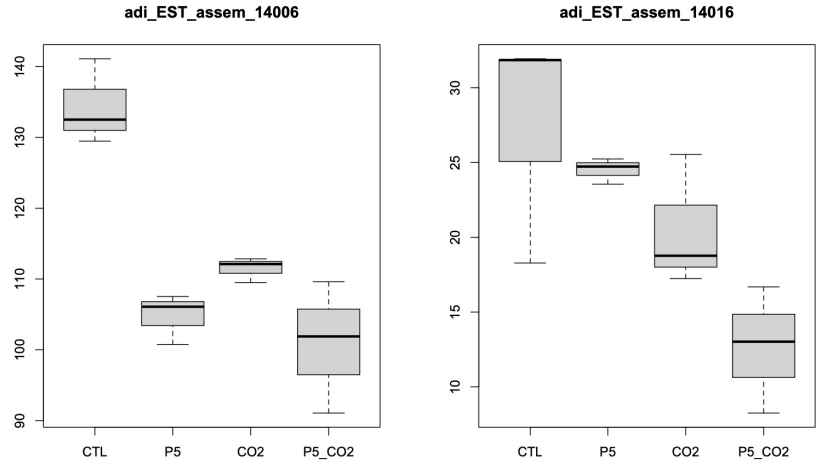


図1.14 リン酸負荷・ $p\text{CO}_2$ 負荷処理区で相加的に発現が減少していた遺伝子群の発現パターンを示す箱ひげ図。横軸が処理区（CTLはコントロール、P5はリン酸負荷、 CO_2 は $p\text{CO}_2$ 負荷、P5_ CO_2 はリン酸+ $p\text{CO}_2$ 負荷）、縦軸が発現量（TPM）を表す。

表1.2 網羅的遺伝子発現解析で注目した遺伝子群の注釈付情報一覧

配列ID	注釈付情報（Swiss-Prot databaseより引用）
adi_EST_assem_20415	NA
adi_EST_assem_29478	NA
adi_EST_assem_30554	NA
adi_EST_assem_22860	Q5R9A7.1 RecName: Full=Integral membrane protein GPR155 (872)
adi_EST_assem_3475	Q796Y5.4 RecName: Full=Uncharacterized FAD-linked oxidoreductase YgaK (451)
adi_EST_assem_7484	C5H5C4.1 RecName: Full=Palmitoleoyl-protein carboxylesterase notum1a; Flags: Precursor (500)
adi_EST_assem_14006	D9IQ16.1 RecName: Full=Galaxin; Flags: Precursor (338)
adi_EST_assem_14016	B3EX02.1 RecName: Full=MAM and fibronectin type III domain-containing protein 1 (422)
adi_EST_assem_7011	P51410.2 RecName: Full=60S ribosomal protein L9 (192)

地下水・沿岸水を対象としたメタバーコーディングによる細菌叢解析においては、門レベル（QIIME2ではLevel 2）では主にProteobacteria、Bacteroidetes、Bacteroidetesが優占していた（図1.15）。種レベル（QIIME2ではLevel 7）では、沿岸域ではBacteroidetesのuncultured marine microorganismが多く見られた。種レベルでの各地点の細菌叢組成の行列データを用いたクラスター解析では、2つのクラスターが確認され、地下水メインのグループと、沿岸水メインのグループに対応していた。地下水メインのグループには、沖縄島南部西側地点のサンプルが多く含まれており、地下水の影響を受けて沿岸の細菌叢も変化していることが示唆された（図1.16）。

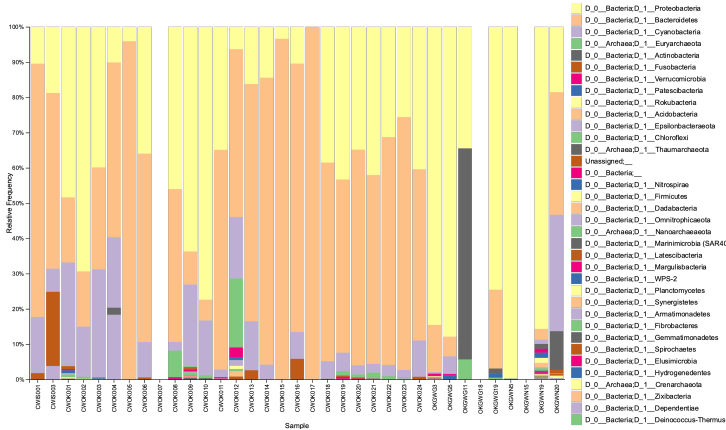


図1.15 メタバーコーディング解析で示された各地点の細菌叢組成。CWISは石垣島、CWOKは沖縄島南部沿岸、OKGWは沖縄島南部地下水の地点を示す。白抜きはデータが取得できなかった地点を示す。

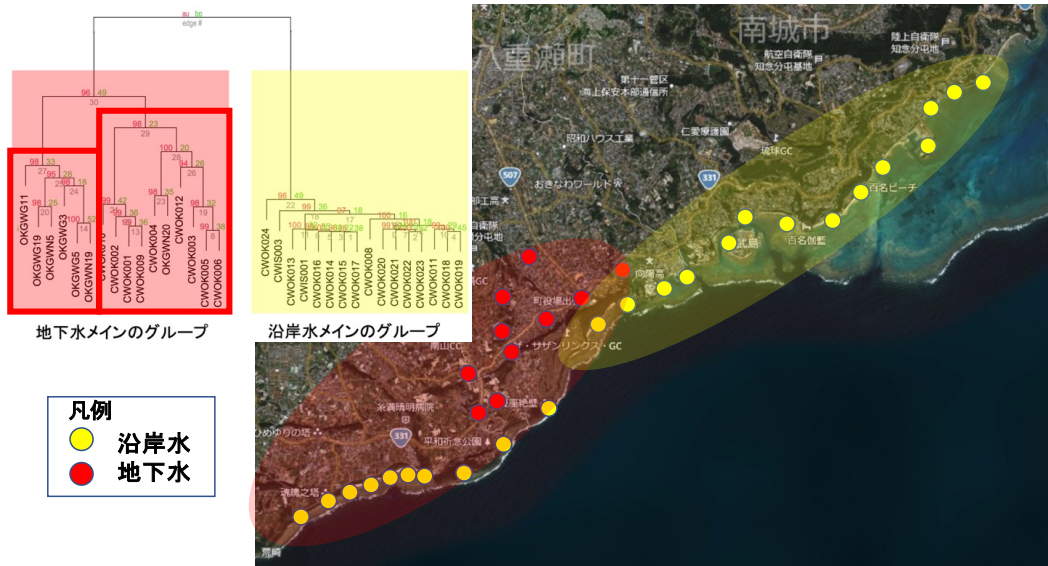


図1.16 メタバーコーディング解析に用いた沿岸・地下水サンプリング地点と、各地点の細菌叢類似度を示したクラスター解析の図と地理的な対応関係。

地下水を対象としたショットガンメタゲノム解析においては、綱レベルの細菌叢では、Actinobacteria、Gammaproteobacteria、Betaproteobacteria、Alphaproteobacteriaなどが慶座・米須のどちらの流域にも共通して見られた（図1.17）。米須地下ダム流域においては、米須にProteobacteriaに多く、特にβ、その中でもBurkholderialesが多かった（図1.18）。このBurkholderialesは湖沼などでも溶存有機物が多いと増加することが報告されており、米須流域では、溶存有機物が高いことを裏付ける結果となった。一方、慶座地下ダム流域において、目レベルではGammaproteobacteria、Alphaproteobacteriaの一種が多かった（図1.18）。属レベルの細菌叢では、採取した地下水毎に特徴があり、G11では地下水中にもかかわらず藍藻が優占化しており、N5では亜硝酸酸化細菌である*Nitrospira*が優占していた。G23、Y1、M8E10では*Candidatus*が優占していた。M8E07、M8E10で優占している*Acinetobacter*は土壌などに多い細菌で、この地点の地下水位の低さと関係があると考えられた。*Sphingobacterium*はグルコース非発酵の細菌で*Phenylobacterium*は特殊な有機物を炭素源とする細菌であるため、これらは溶存有機物と関連が示唆された。

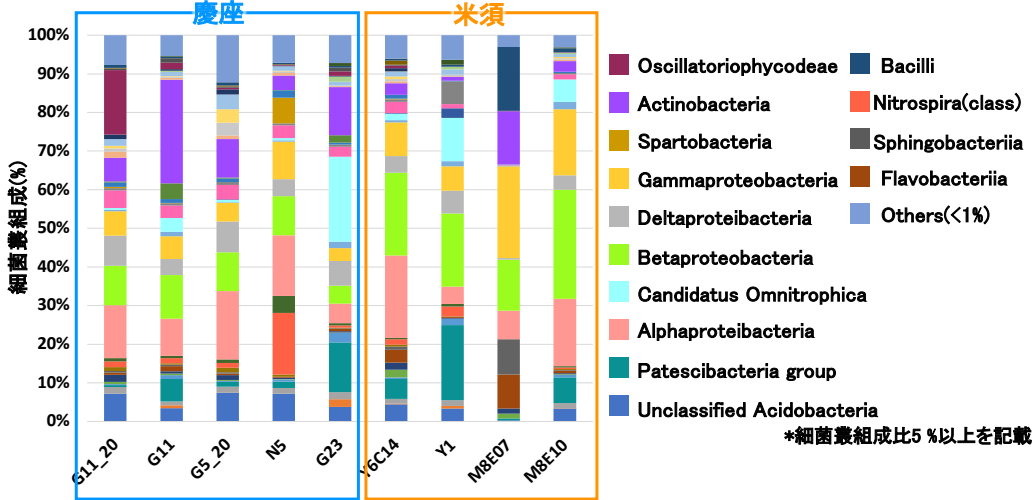


図1.17 ショットガンメタゲノム解析で示された綱レベルでの各地点の細菌叢組成。

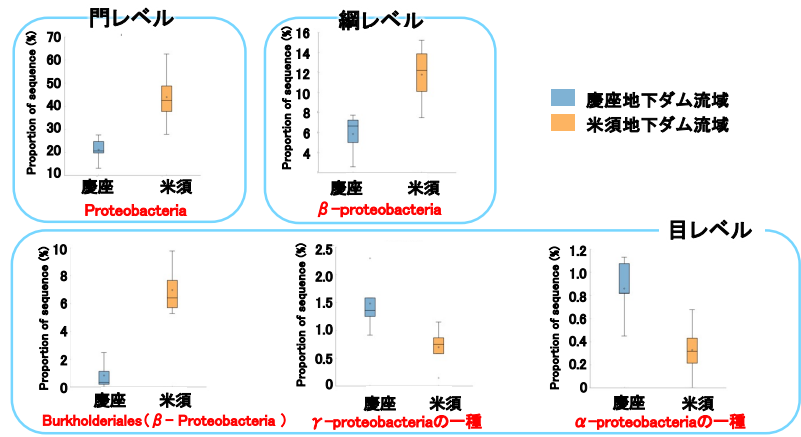


図1.18 ショットガンメタゲノム解析で流域間にて顕著な差異が示された細菌叢の配列割合の比較図。

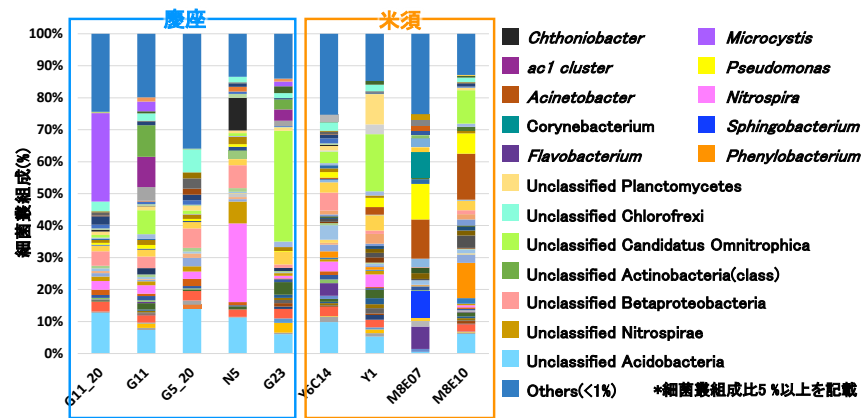


図1.19 ショットガンメタゲノム解析で示された属レベルでの各地点の細菌叢組成。

地下水を対象としたショットガンメタゲノム解析での機能遺伝子組成に関しては、代謝に関わる機能遺伝子などが見られ、どの地点も似たような組成を示していた（図1.20）。図1.20で示した機能遺伝子の中の窒素代謝と硫黄代謝の遺伝子の中で、慶座・米須の流域間で顕著な差がある遺伝子を抽出して調べた結果、米須では窒素代謝遺伝子の *nar I*、*nar V* の出現割合に差が見られた。これは、米須は比較的地下水の流が緩やかで、有機物濃度が高いため還元反応が起こりやすい可能性が示唆された。一方で、慶座では硫黄代謝遺伝子の *cysNC* の出現割合に差が見られた。これは、慶座は泥岩や風化土壌によって地層が形成されており、硫酸イオン濃度が高い傾向があることが関係していることが示唆された。

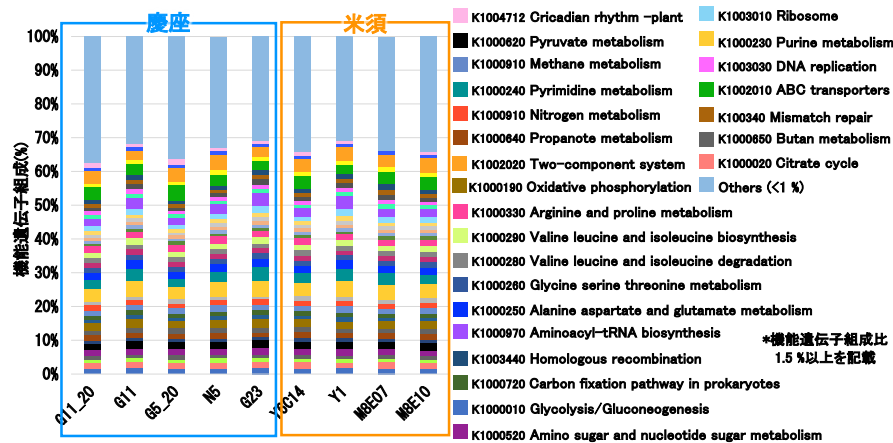
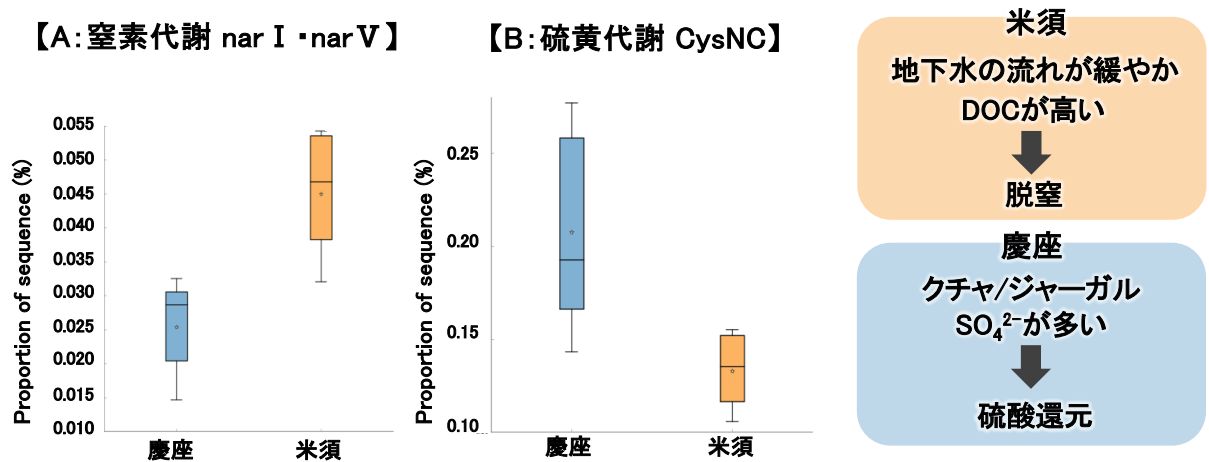


図1.20 ショットガンメタゲノム解析で示された各地点の機能遺伝子組成。



A: K00374 nitrate reductase gamma subunit [EC:1.7.99.4] nar I · nar V 慶座<米須
B: K00955 bifunctional enzyme CysN/CysC [EC:2.7.7.4 2.7.1.25] CysNC 慶座>米須

図1.21 ショットガンメタゲノム解析で流域間にて顕著な差異が示された機能遺伝子の配列割合の比較図。

成体サンゴ片を用いて飼育実験後の褐虫藻組成解析を、次世代シーケンサーとSymPortalパイプラインを用いて行った。その結果、サンゴ体内に共生する褐虫藻の詳細な組成情報を把握することに成功した（図1.22）。ITS2配列組成・DIVs組成のどちらにおいても、種間で明瞭な組成差が見られた。

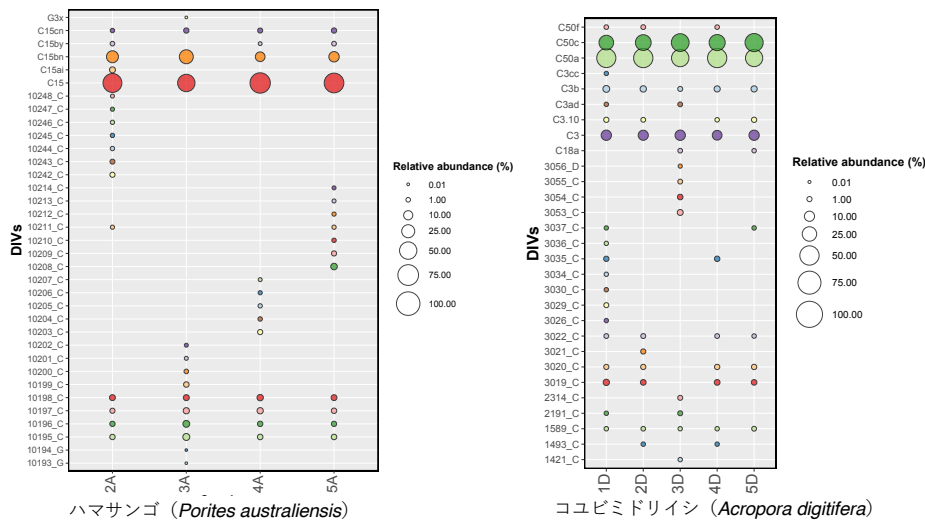


図1.22 ハマサンゴとコビミドリイシの褐虫藻ITS2の配列組成を示すバブルプロット図。横軸は異なるサンゴ群体、横軸は褐虫藻遺伝子型を示す。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ1では、上記目標のうち、網羅的遺伝子発現解析の実施と詳細な解析により、リン酸塩、窒素負荷、そしてリン酸塩とpCO₂複合負荷の稚サンゴへの影響は、石灰化に加えて他の生理的機構にも及ぶことが示され（図1.1・1.11・1.13）、サンゴの環境応答のメカニズム解明が進んだ。また、リン酸塩影響を詳細に評価可能なマーカーの絞り込みにも成功し（表1.1）、形態観察では把握できなかった低濃度でのリン酸塩によるサンゴへの影響が浮き彫りとなった（図1.9）。また、各地点から得られた水サンプルを対象としたメタゲノム解析を行うことで、地下水に影響していると思われる沿岸域での微生物群集構造の差異の検出に成功した（図1.16）。以上のことから、目標どおりの成果をあげたと評価できる。

6. 参考文献

- 1) Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.
- 2) Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*, 34(5), 525-527.
- 3) Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing.
- 4) Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome biology*, 11(2), 1-12.
- 5) Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PloS one*, 9(8), e105592.
- 6) Bolyen, E., et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- 7) Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- 8) Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O' Hara, B., Stevens, M. H. H., Oksanen, M. J., & Suggests, M. A. S. S. (2007). The vegan package. *Community ecology package*, 10(631-637), 719.
- 9) Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957-2963.
- 10) Hannon, G. J. (2010). Fastx-toolkit.
http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html.
- 11) Shen, W., Le, S., Li, Y., & Hu, F. (2016). SeqKit: a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLoS one*, 11(10), e0163962.
- 12) Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59-60.
- 13) Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., & Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome research*, 17(3), 377-386.
- 14) Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123-3124.
- 15) Arif, C., Daniels, C., Bayer, T., Banguera - Hinestroza, E., Barbrook, A., Howe, C. J., LaJeunesse, T. C., & Voolstra, C. R. (2014). Assessing *Symbiodinium* diversity in scleractinian corals via next - generation sequencing - based genotyping of the ITS2 rDNA region. *Molecular ecology*, 23(17), 4418-4433.
- 16) Hume, B. C., Smith, E. G., Ziegler, M., Warrington, H. J., Burt, J. A., LaJeunesse, T. C., Wiedenmann, J., & Voolstra, C. R. (2019). SymPortal: A novel analytical framework and platform for coral algal symbiont next - generation sequencing ITS2 profiling. *Molecular ecology resources*, 19(4), 1063-1080.
- 17) Dunn, J. G., Sammarco, P. W., & LaFleur Jr, G. (2012). Effects of phosphate on growth and skeletal density in the scleractinian coral *Acropora muricata*: A controlled experimental approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 411, 34-44.
- 18) Iijima, M., Yasumoto, K., Yasumoto, J., Yasumoto-Hirose, M., Kuniya, N., Takeuchi, R., Nanba, N., Nakamura, T., Jimbo, M., & Watabe, S. (2019). Phosphate enrichment hampers development of juvenile *Acropora digitifera* coral by inhibiting skeleton formation. *Marine biotechnology*, 21(2), 291-300.

- 19) Watanabe, T., Fukuda, I., China, K., & Isa, Y. (2003). Molecular analyses of protein components of the organic matrix in the exoskeleton of two scleractinian coral species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 767-774.
- 20) Takeuchi, T., Yamada, L., Shinzato, C., Sawada, H., & Satoh, N. (2016). Stepwise evolution of coral biomineralization revealed with genome-wide proteomics and transcriptomics. *PloS one*, 11(6), e0156424.
- 21) Moya, A., Huisman, L., Ball, E. E., Hayward, D. C., Grasso, L. C., Chua, C. M., Woo, H. N., Gattuso, J.-P., FORÊT, S., & Miller, D. J. (2012). Whole transcriptome analysis of the coral *Acropora millepora* reveals complex responses to CO₂ - driven acidification during the initiation of calcification. *Molecular ecology*, 21(10), 2440-2454.

Ⅱ－２ 島嶼特有の水循環と陸域負荷の実態把握とサンゴ礁生態系との関係解明

国立研究開発法人琉球大学

農学部 地域農業工学科 助教 安元 純

理学部 生物系 准教授 中村 崇

熱帯生物圏研究センター 瀬底研究施設 教授 酒井 一彦

熱帯生物圏研究センター 瀬底研究施設 技術補佐員 金城 裕美 (H31.4-R4.2)

〔要旨〕

与論島・沖縄島・慶良間諸島・石西礁湖・多良間島等での海水・海底堆積物、陸域の地下水等の水循環特性及び栄養塩、特に、各種リン酸塩の動態解析を実施した。また、サンゴ礁池内外の海水・海底堆積物の栄養塩集積調査及びサンゴの被度及び藻類や微生物相の分布調査を実施した。沖縄島南部地域に三次元水循環モデリングを適用し、現地観測結果と合わせ海域に流出する河川や地下水経由の陸域からの栄養塩（リン酸塩）の日最大流入負荷量（*TMDLs*）を算出した。稚サンゴの飼育実験や稚サンゴの加入量からサンゴの飼育可能な蓄積型リンの閾値を推定し、*TMDLs*と蓄積型リンとの対応関係から、サンゴの生育に許容可能な日流入負荷量（*L_D*）を推定した。稚サンゴの加入量が一定量みられた大度海岸や坡名城海岸は、蓄積型リンや*TMDLs*の値が小さくなっていた。沖縄島南部地域や石西礁湖で実施した稚サンゴの加入量からミドリイシの蓄積型リンの閾値が3.0 μM と推定された。沖縄島南部地域における蓄積型リンと*TMDLs*の間には高い正の相関関係が確認できることから、蓄積型リンの閾値が3.0 μM に対応する*TMDLs*の値、つまり許容可能な日平均流入負荷量（*L_D*）は158.5 g-P/ m^3/day と推定された。さらに、高CO₂時代における蓄積型リンの閾値は2.3 μM と低くなることから、高CO₂時代における許容可能な日平均流入負荷量（*L_D*）は121.6 g-P/ m^3/day と推定された。また、流水系での複合ストレス影響評価実験や赤土暴露による稚サンゴ飼育実験を実施し、サンゴの環境応答の詳細を明らかにした。

1. 研究開発目的

現地観測や稚サンゴの飼育実験などからサンゴの生育可能な蓄積型リンの閾値を推定すると共に、*TMDLs*と蓄積型リンとの対応関係から、現時点と高CO₂時代におけるサンゴの生育に許容可能な日流入負荷量（*L_D*）を推定することを目的とした。

2. 研究目標

与論島・沖縄島・慶良間諸島・石西礁湖・多良間島等での海水・海底堆積物、陸域の地下水等の水循環特性及び栄養塩、特に、各種リン酸塩の動態解析を実施する。また、サンゴ礁池内外の海水・海底堆積物の栄養塩集積調査及びサンゴの被度及び藻類や微生物相の分布調査を実施する。加えて、サンゴ産卵期に採取した配偶子や成体サンゴを用いた複合ストレス実験を実施し、環境負荷の影響が見られる閾値を把握する。また、複合影響の1つの因子である底質微粒子による影響評価も進める。

3. 研究開発内容

野外調査に関しては、調査はスキューバを用いた潜水によって、ライントランセクト法の1つであるポイントインターセプト法で行った。ポイントインターセプト法では20mのトランセクトラインを各調査地で5本ずつランダムに引き、0.5 m間隔でラインの直下に位置する底質を記録した。各調査地点では、採水・砂を実施した。沖縄島南部の4海域での稚サンゴ密度を推定するためのコドラート調査を実施した。対象海域として、具志頭、坡名城、港川、大度の4海域を選択し、それぞれに広がるサンゴ礁において、水深3m以浅（インリーフと呼ばれる礁池地形内）の半径200 mのエリアをそれぞれ3つえらんだ。各エリアにおいて、一辺50 cmの正方形枠を各10枠（30枠/海域）設置し、各枠内にて目視可能な直径数cmの稚サンゴ（ミドリイシ属*Acropora*、ハナヤサイサンゴ科*Pocilloporidae*、コモンサンゴ属*Montipora*、アナサンゴモドキ属*Millepora*、ハマサンゴ属*Porites*、キクメイシ科*Favidae*）群体の密度を記録した。また、枠内の底質（ラン藻、大型藻類、芝状藻類、サンゴ）の割合を5%単位で記録した。

また、蓄積型リンや稚サンゴの加入量データが充実している沖縄島南部地域を重点地域として、水

文学的調査を実施した。図2. 1 に示した沖縄島南部地域を解析対象とした。解析領域の北側と東側は、透水性の低い島尻層群が地表面近くまで分布する範囲まで広げ、地形的な尾根や谷部を通るように設定した。八重瀬町の西側や南側については琉球石灰岩が分布しており、地下水流動も含めた流域を設定するのが困難なため、海までモデル化するものとし、海岸線から十分に離れた位置を領域境界とした。また、鉛直方向については地表面から標高-300mまでとした。モデルの基本仕様は、気象、地形、土地利用、地質等のモデルへ組み込む基本データや、河川流量、地下水位等の検証に用いることのできるフィールド情報に加え、地下水揚水や農地灌漑の水利用データを収集・整理し、それらを組み込んだ沖縄島南部地域モデルを構築した。地下の地質構造については、既存の400本程度のボーリングデータに基づいてモデル化し、表土層、未固結堆積物、琉球石灰岩、基盤岩（島尻層群）に区分した。図2. 2左図は、構築した三次元数値シミュレーションモデルに対して地質の違いを濃淡で示したものである（地表面直下に設定した表土層は非表示としている）。右図は表土層、未固結堆積物、琉球石灰岩を非表示として、地下水流動に大きく影響を与える基盤岩（島尻層群）形状を慶座ダム周辺において拡大表示したものである。検証データには全155地点の地下水位観測データと、2地点の連続流量観測データを用いた。なお、図2. 3にこれらの観測地点位置を示す。沖縄島南部地域モデルの基本仕様を表2. 1 にまとめた。

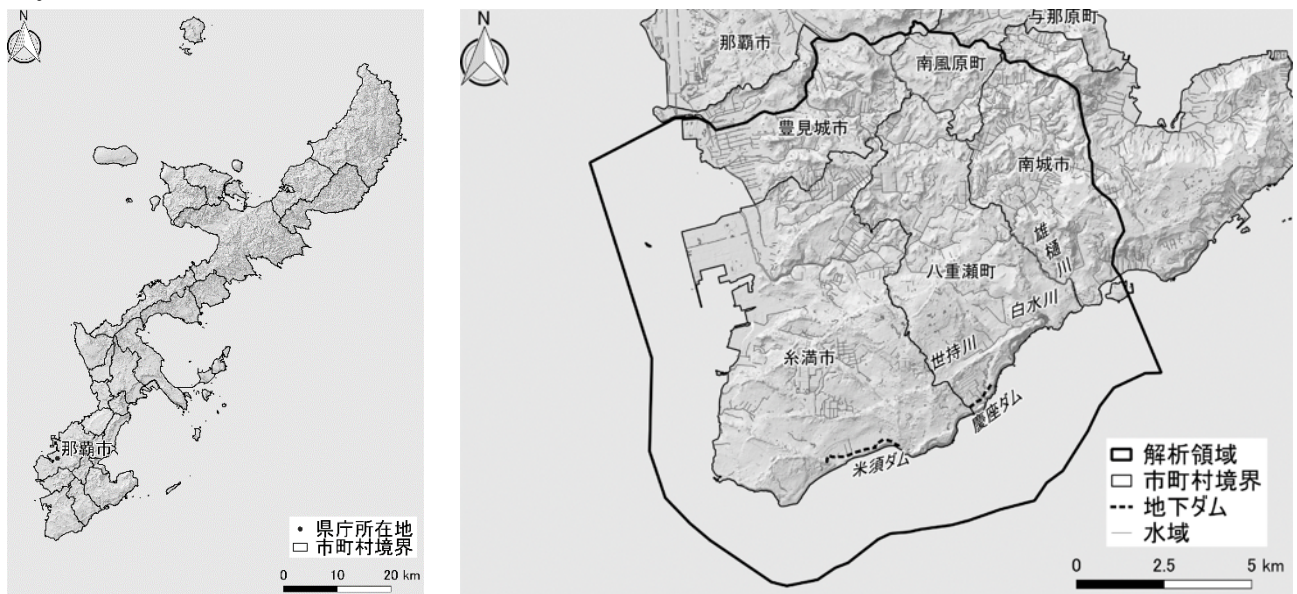


図2. 1 沖縄県八重瀬町の位置と解析領域

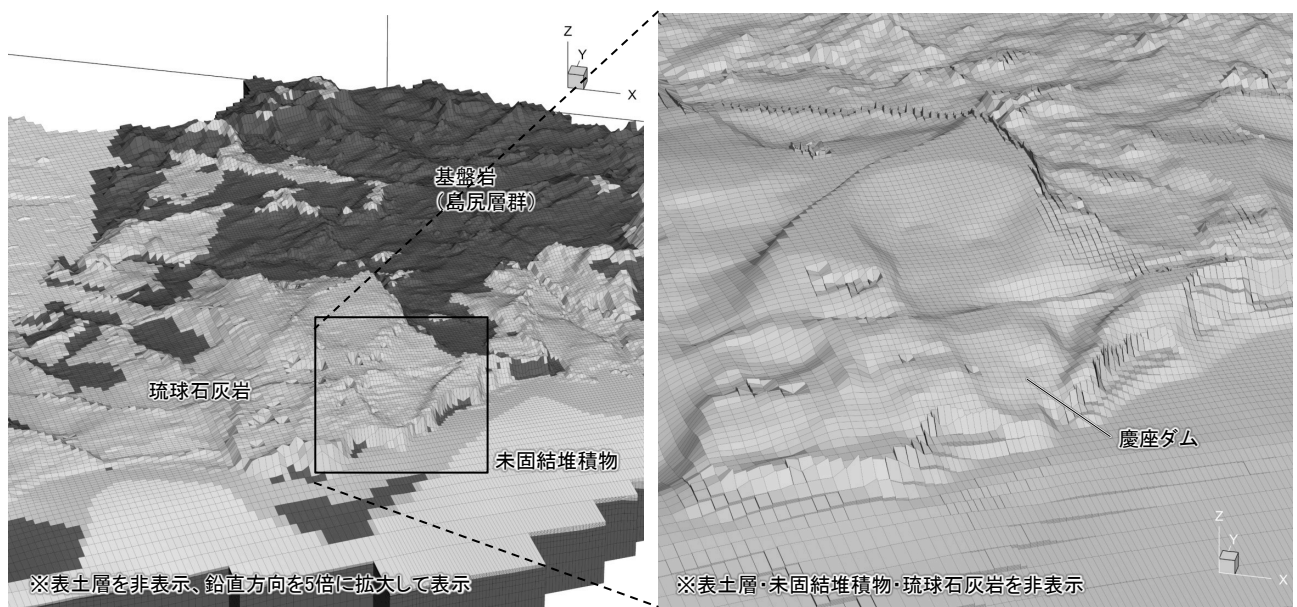


図2. 2 三次元数値シミュレーションモデル

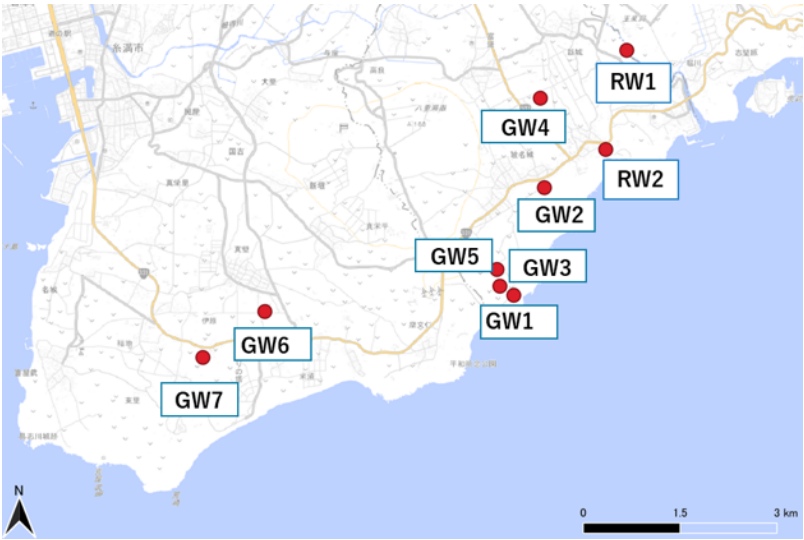


図2.3 河川調査、地下水調査地点図（RW：河川、GW：地下水）

表2.1 八重瀬町流域モデルの基本仕様

項目		基本仕様	
流体システム		水，空気 2 相 2 成分系	
地表水流動		マニング型の平均流速公式を適用した開水路流れ（拡散波近似）	
地下流体流動		多相多成分流体を対象とした一般化ダルシー則	
基本条件	解析領域	EW 16km×NS 16km（175km ² ），地表～標高-300m	
	解析格子数	768,580	
	空間分解能	水平方向: 50～100m，鉛直方向: 1.0～100m	
気象	降水量	メッシュ平年値 2010（統計期間 1981～2010 年の平年値を使って 1km メッシュで推定した平年値）における降水量データを用いて，以下の可能蒸発散量に 0.65 を乗じた値を差し引いた有効降水量を与えた。	
	蒸発散量	メッシュ平年値 2010（統計期間 1981～2010 年の平年値を使って 1km メッシュで推定した平年値）における気温データを用いて，日可能蒸発散量をハーモン法により算出した。	
	気圧	全域で標準大気圧（0.1MPa）とし，時間変化は考慮しない。	
地形	陸域	基盤地図情報数値標高モデル 5m メッシュ（国土地理院）を用いた。河川部については，下流に行くほど標高が低くなるようにスムージングを行った。	
	海域	500m メッシュ水深データ（J-EGG500）（日本海洋データセンター）を用いた。	
土地利用	土地利用	国土数値情報土地利用細分メッシュ（平成 28 年度）（国土交通省）を用いた。	
	粗度係数	地表部の各格子に割り当てた土地利用区分毎にマニングの粗度係数を設定した。	
		土地被覆区分	粗度係数（m ^{-1/3} s）
その他の農用地		0.3	
森林		0.6	
荒地		0.3	
建物用地		0.05	
道路		0.05	
その他の用地		0.05	
河川地及び湖沼		0.03	
海浜		0.03	
海水域	0.03		
ゴルフ場	0.3		
地質	地質	産業技術総合研究所 20 万分の 1 シームレス地質図，地下水マップ（沖縄県），沖縄本島南部農業水利事業所地質調査，国営地下ダムボーリング調査を基に構造をモデル化した。	
	透水係数	地下の各格子に割り当てた地質区分毎に透水係数，有効間隙率を設定した。	

	有効空隙率	地質区分	透水係数 (m/s)	有効間隙率(-)
		表土層	1.0×10^{-4}	0.4
		未固結堆積物	1.0×10^{-5}	0.2
		琉球石灰岩	$1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	0.2
		基盤岩 (島尻層群)	1.0×10^{-8}	0.1
	2 相流物性	一般的な毛管圧力, 相対浸透率を地質区分毎に設定した。		
水利用	地下水揚水・農地かんがい	沖縄本島南部土地改良区ウェブサイトより, 取水地点, 取水量, 受益範囲を設定した。取水対象は琉球石灰岩とした。		
水文観測	河川流量	全 2 地点の連続流量観測データ		
	地下水位	全 115 地点の定期観測データ		
境界条件		上面を標準大気圧による定圧境界, 側面及び底面は閉境界, 海域は水位 0m として水位固定境界とした。慶座ダム, 米須ダムの止水壁部においては, 止水壁上端標高で水位固定境界に設定した。		

沖縄本島南部地域に三次元水循環モデリングを適用し, 現地観測結果と合わせ海に流出する河川や地下水経由の栄養塩 (リン酸塩) の日最大流入負荷量 (TMDLs) を算出し, 海底堆積物の蓄積型リン酸塩との相関関係を把握した。現地観測では, 地下水調査と河川調査を実施した。地下水調査では, 月に 1 回定期調査を実施し, 地下水位, 地下水中の栄養塩として, 無機態窒素 (アンモニウムイオン, 硝酸イオン, 亜硝酸イオン) や各種形態のリン酸塩 (全リン (TP)、溶存態リン (DP)、オルトリン (PO_4^{3-}))、主要溶存イオン等の水質分析を行った。河川調査では, 対象地域を流れる 2 つの河川の潮汐の影響を受けない最下流地点において, 河川水位の連続観測を実施し河川流量を算定すると共に, 月 1 回の河川水のサンプリングを実施し, 全窒素 (TN)、全リン (TP) を測定した。沖縄本島南部地域の平均的な地下水の流動特性に着目し, 時間変動を考慮しない一定の気象外力を与えた解析を実施した。解析には地圏流体シミュレータ GETFLOWS¹⁾を用いた。

各種リン酸塩の形態分析のフローチャートを図 3-1 に示す。各種リン酸塩の定量は, ペルオキシ二硫酸カリウム-MB 法、分光分析を用いた MB 法、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS)、イオンクロマトグラフ (IC) を選定した。また, 今回の研究における, 各種リン酸塩の形態と呼称を図 3-2 に示す。ろ過前とろ過後のサンプルをペルオキシ二硫酸カリウム-MB 法によって分析したものをそれぞれ, 全リン (TP)、溶存リン (DP)、ろ過後のサンプルを ICP-MS を用いて分析したものを ICP-P、IC を用いて分析したオルトリン酸 (PO_4) を IC-P と呼称する。また, MB 法で分析されるリン酸塩は, PO_4 のみで, その他の形態を分析することはできないといわれている。そのため DP のうち, PO_4 を MB-P、DP から MB-P を除いた MB-P 以外のリン酸塩を DOP と呼称する。一方, フィルターに捕捉されるものを粒子状リン、通過するものを溶存態リンと定義していることから²⁾、今回フィルターろ過後に分析した, DP、ICP-P、IC-P および MB-P は溶存態リンと定義した。分析精度の検証方法のため, まず沖縄本島南部地域で採取した地下水をろ過した水と超純水を準備し, そこに各種リン酸 (オルトリン酸、ピロリン酸、トリポリリン酸、フィチン酸、グルコース 1 リン酸、ATP) を濃度が 1 mg/L、0.1 mg/L となるように添加したサンプルを作成した。作成した溶存の各種リン酸サンプルをペルオキシ二硫酸カリウム-MB 法と ICP-MS を用いて DP、MB 法を用いてオルトリン酸、IC を用いてオルトリン酸、ピロリン酸、トリポリリン酸、フィチン酸、ATP の分析を行い, 添加したリン濃度と回収されたリン酸から回収率を求めることにより, 各手法の分析精度の検証を行った。

分光分析による MB-P の分析は, MB 法で行った。この分析には, 250ml のポリプロピレン製容器に採水し, 現場からクーラーボックスで冷温に保ち, 持ち帰ったサンプルを ADVANTEC DISMIC -25CS020AS 0.2 μm のフィルターを使用し, ろ過したサンプルを用いた。試料 10ml を 15ml チューブに分注し, モリブデン酸アンモニウム溶液とアスコルビン酸溶液を 5:1 の割合で調整した発色試薬を 0.8ml 添加して, 室温 (20~40℃) で 15 分放置した後, 吸光度を測定した。

TP 及び DP の分析には, 工場排水試験法 JISK0102 を一部改変したペルオキシ二硫酸カリウム-MB 法を用

いて行った。DPの分析には、MB-Pと同様のろ過サンプルを、TPの分析には、250mlのポリプロピレン製容器に採水し、現場からクーラーボックスで冷温に保ち、持ち帰った未ろ過のサンプルを用いた。サンプル25mlを試験管に入れ、にペルオキソ二硫酸カリウム溶液5mlを加え、転倒混和した。オートクレーブで120℃、30分加熱分解を行い、放冷後、試料の上清10mlを15mlチューブに分注した。モリブデン酸アンモニウム溶液とアスコルビン酸溶液を5:1の割合となるよう調整した発色試薬を、0.8ml添加して、室温（20～40℃）で15分放置した後、吸光度を測定した。どちらの分析にも、島津製作所の紫外可視分光光度計 UV-1850 を使用し、分析波長は 880 nmとした。

ICP-Pと微量金属の分析は、ICP-MSで行った。この分析には、100mlの硝酸バスによって浄済したポリプロピレン製容器に採水し、現場からクーラーボックスで冷温に保ち持ち帰ったサンプルを用いた。現場から戻った後速やかに吸引ろ過を行った。ろ過後サンプルは酸洗浄済みの100mlポリプロピレン製容器に入れた。元素固定のためろ過サンプル100 mlに対して濃硝酸 0.65 ml を添加し、分析するまで冷蔵庫で保存した。分析には、Agilent 7700X ICP-MS(研究基盤センター)を使用した。

IC-Pの分析には、250mlのポリプロピレン製容器に採水し、現場からクーラーボックスで冷温に保ち、持ち帰ったサンプルをADVANTEC DISMIC-25CS020AS 0.2μmのフィルターを使用し、ろ過したサンプルを用いた。分析にはThermo Scientific DIONEX INTEGRION HPICを使用した。

成体サンゴの飼育実験に関しては、流水系にて水温・ $p\text{CO}_2$ を制御したサンゴ飼育実験は既に確立しているため、栄養塩負荷のための栄養塩供給ラインを組み込んだ飼育実験の確立を進めた。沖縄県本部町沿岸海域で採取したコブミドリイシ・エダコモンサンゴを用いて枝片を作成し、琉球大学瀬底研究施設の屋外水槽で養生させた後、栄養塩負荷実験に用いた。栄養塩濃度は、瀬底研究施設沖合から採水している海水をコントロール区とし（ NO_3^- : 約0.5 μM; PO_4^{3-} : 約0.05 μM）、高濃度の栄養塩海水をペリスタポンプでサンゴ飼育用水槽に一定量滴下して、 NO_3^- : 約5 μM、 PO_4^{3-} : 約0.3 μMとなるように調整した。そして30日間の飼育実験後、水中重量を測定し、成長率を算出した。また、同じ2種のサンゴを用いて、同程度の栄養塩負荷海水に $p\text{CO}_2$ 負荷（800 μatm、1200 μatm）を加えた複合ストレス条件での飼育実験を30日間行い、水中重量を測定し、成長率を算出した。

赤土実験に関しては、名護市二見で採取した赤土を70度で2晩乾燥させ、篩にかけて500 μm以下の赤土を実験に使用した。着底ポリプを用いて、300 mlの濾過海水中に、赤土を加えていないコントロール区、赤土0.1 g添加区、赤土1 g添加区、赤土10 g添加区を用意して、30日間の飼育を行った。

4. 結果及び考察

石西礁湖、沖縄島、与論島、屋久島、慶良間諸島で野外調査を行った結果、サンゴ・藻類等の組成には明確な地理的変異が見られた（図2.4・2.5）。全体では、17科55属、約190種のサンゴが確認された。そのうちミドリイシ属サンゴは約40種で、全体の19%を占めていた。石西礁湖内の31地点における平均底質組成割合は微細・芝状藻類が最も高く（33.5%）、次いで礫（RB、17.6%）、造礁サンゴ

（17.3%）、砂と微細・芝状藻類（ともに8.6%）が高い割合で確認された（図4.2.1A）。沖縄島周辺海域の5調査地（各2水深域）、計10地点では、微細・芝状藻類（MA）が最も高く（40.8%）、次いで造礁サンゴ（HC、34.9%）、砂（SD、6.9%）、ソフトコーラル（SC、5.6%）が確認された（図2.4B）。与論島周辺海域の6地点の平均では、微細・芝状藻類が最も高く（48.6%）、次いで造礁サンゴ（30.0%）、大型藻類（7.1%）、礫（3.9%）、サンゴモ（3.8%）が高い割合で確認された（図2.5A）。また、屋久島周辺海域の10地点の平均では微細・芝状藻類が最も高く（58.5%）、次いで造礁サンゴ（26.8%）、大型藻類（5.0%）、砂（3.0%）、ソフトコーラル（2.8%）が高い割合で確認された（図2.5B）。いずれの海域でも微細・芝状藻類が最も高い被度を示し、北上するにしたがって割合が増加する傾向が見られた。

出現した造礁サンゴ類は石西礁湖内で42属であり、最優占サンゴ属はミドリイシ属で、全体の23.1%を占めていた。その他の造礁サンゴ類はコモンサンゴ属（22.4%）、アナサンゴモドキ属（10.7%）、ハマサンゴ属（8.1%）、コカメノコキクメイシ属（5.9%）の順に多く確認され、これらの上位5属で全体の70.2%を占める結果となった。沖縄島周辺海域で出現した造礁サンゴは全部で34属であり、最優占サンゴ属はミドリイシ属 *Acropora*で、全体の21.5%を占めていた。その他の造礁サンゴ類はハマサンゴ

属 *Porites* (16.5%)、コモンサンゴ属 *Montipora* (12.3%)、コカメノコキクメイシ属 *Goniastrea* (6.0%)、キクメイシ属 *Dipsastrea* (5.5%) の順に多く確認され、これらの上位5属で全体の61.8%を占める結果となった。与論島周辺海域で出現した造礁サンゴは全部で28属であり、最優占サンゴ属はハマサンゴ属で、全体の24.0%を占めていた。その他の造礁サンゴ類はミドリイシ属 (16.6%)、コモンサンゴ属 (11.2%)、キクメイシ属 (8.4%)、コカメノコキクメイシ属 (4.6%) の順に多く確認され、これらの上位5属で全体の64.8%を占める結果となった。屋久島周辺海域で出現した造礁サンゴは全部で36属であり、最優占サンゴ属はミドリイシ属で、全体の17.8%を占めていた。その他の造礁サンゴ類はカメノコキクメイシ属 (11.1%)、コモンサンゴ属 (10.9%)、スリバチサンゴ属 (9.4%)、ハナガタサン

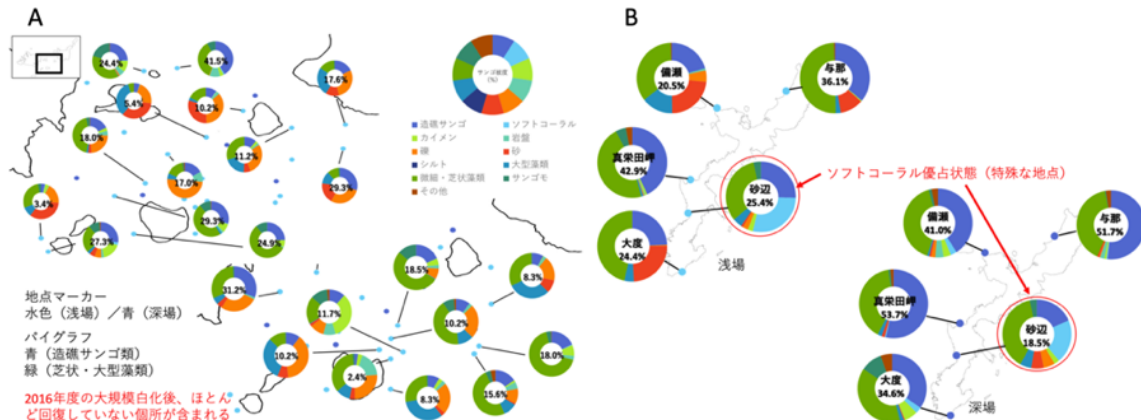


図2.4 サンゴ・藻類等の分布パターン (A: 石西礁湖、B: 沖縄島)。

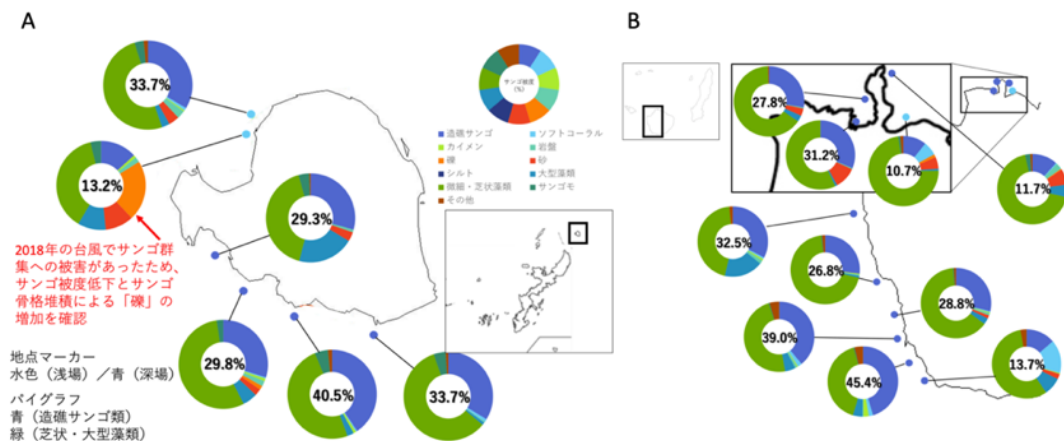


図2.5 サンゴ・藻類等の分布パターン (A: 与論島、B: 屋久島)。

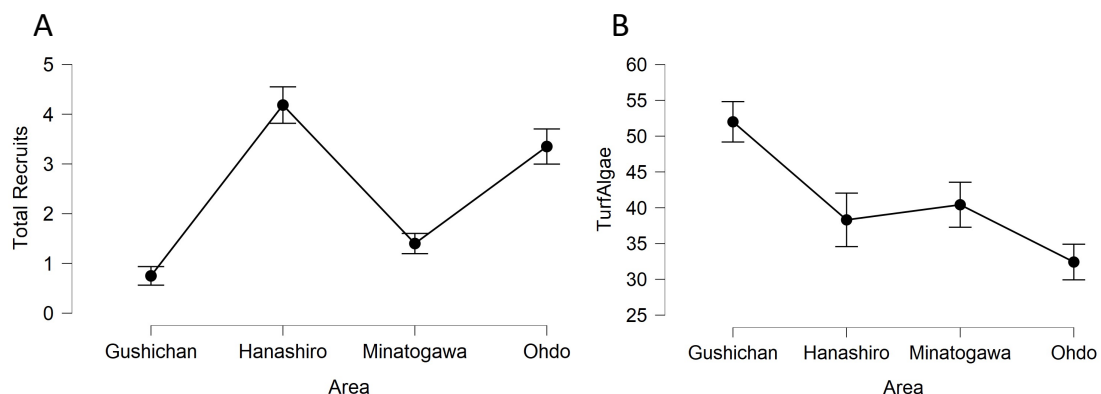


図2.6 A: 具志頭、坡名城、港川、大度の4海域での総稚サンゴ密度 (群体数/m²)。B: 具志頭、坡名城、港川、大度の4海域での芝状藻類被度 (%)。

ゴ属 *Lobophyllia* (5.7%) の順に多く確認され、これらの上位5属で全体の54.9%を占める結果となった。与論島を除く海域でミドリイシ属が最優占サンゴ属として記録されたことから、琉球列島全域での本属の重要性が示されたといえる。本年度の白化の程度として、石西礁湖内では1.6%、沖縄島周辺海域では0.4%、与論島周辺海域では0.5%、屋久島周辺海域では0.6%と、いずれも顕著な白化状況は確認されなかった。慶良間諸島や多良間島においても、基本他の海域と同様な生物分布パターンを示した。

また、沖縄島南部沿岸での調査結果から、これら4海域では、ハナヤサイサンゴ科 (2.18%)、アナサンゴモドキ属 (0.51%)、ミドリイシ属 (0.26%) の稚サンゴはほとんど出現しなかった一方で、ハマサンゴ属 (51.34%)、キクメイシ科 (37.77%)、コモンサンゴ属 (7.94%) が稚サンゴ群体のほとんどを占めていた。各海域での稚サンゴ密度は一平方メートル当たり0.75~4.18群体と相対的に低かったが、その中でも具志頭と港川では、琉名城・大度よりも稚サンゴ密度が有意に低く (図2.6A)、特に具志頭では、同時に底質を覆う芝状藻類の比率が約50%以上であった (図2.6B)。サブ3の蓄積型栄養塩の結果からも、ミドリイシ属サンゴが健全に生育できる蓄積型リンの閾値が3.0 μM 付近と推定され、それ以上だと、新たなサンゴの加入や成長が制限されている可能性が示唆された。

次に、各種リン酸塩の測定方法を検討した結果を図2.7及び図2.8に示す。図2.7に示すように、超純水に添加した各種リン酸のDPは、添加濃度によらず回収率93~106%で添加量と同程度の測定濃度値となった。MB法を用いたオルトリン酸の測定においては、オルトリン酸を添加したサンプルでは、回収率99~103%で添加量と同程度の測定値となった。オルトリン酸以外のリン酸を添加したサンプルでも、0.1 mg/L添加系では、0.01 mg/L、1 mg/L添加系は0.01~0.03 mg/Lのオルトリン酸が検出された。ICP-MSを用いたDPの測定においては、0.1 mg/L添加系は回収率84~114%、1 mg/L添加系は回収率95~98%とな

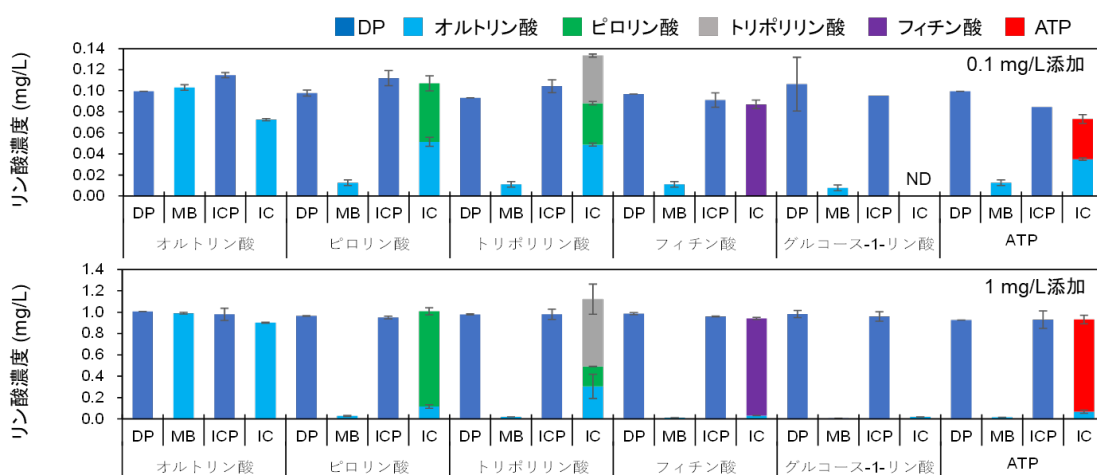


図2.7 超純水(H₂O)に添加した各種リン酸の測定結果。

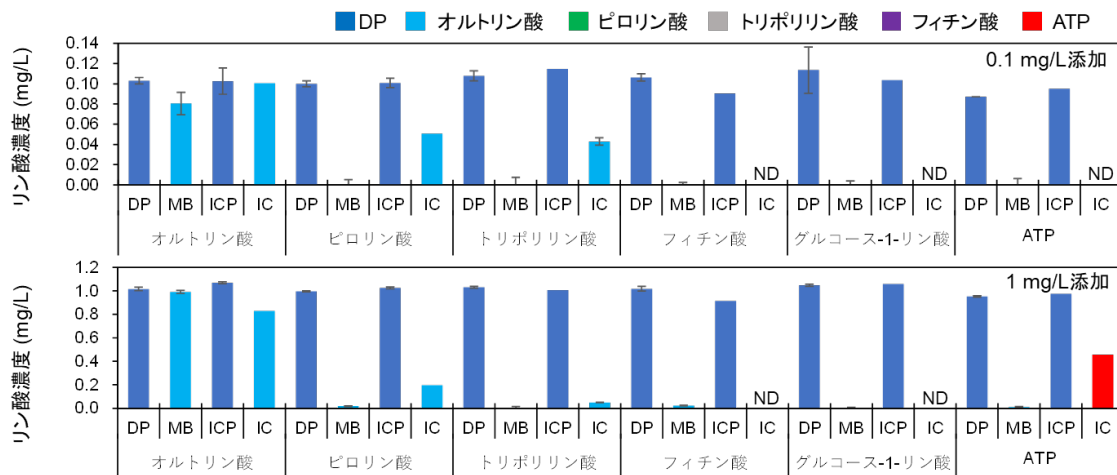


図2.8 地下水に添加した各種リン酸の測定結果。

り、濃度が低いとばらつきがみられるものの添加量と同程度の測定濃度値となった。ICを用いた各種リン酸の測定において、グルコース-1-リン酸以外のリン酸については検出できた。0.1 mg/L添加系の添加物質の回収率は38～87%となり添加量より低く検出され、ピロリン酸、トリポリリン酸、ATPからは、添加していないオルトリン酸やピロリン酸が検出された。1 mg/L添加系は回収率63～90%となり、こちらも添加量より低く検出され、トリポリリン酸は添加していないオルトリン酸やピロリン酸の検出値が高かった。ICで回収率にばらつきが発生したり、添加量より低く検出されたりした要因として、長期保存や冷凍保存により、添加した目的の物質が物質としてより安定している他の物質へと分解された可能性が考えられる。この結果から、特にトリポリリン酸、ピロリン酸、ATPは低濃度や保存期間が長くなるほど分解しやすい可能性が考えられる。

図2.8示すように地下水サンプルに添加した各種リン酸のDPは、添加濃度によらず回収率87～113%で添加量と同程度の測定濃度値となった。MB法を用いたオルトリン酸の測定においては、オルトリン酸を0.1 mg/L添加したサンプルでは、回収率80%であったが、1 mg/L添加系は回収率99%となった。オルトリン酸以外のリン酸を添加したサンプルの0.1 mg/L添加系では、ほとんど検出されず、1 mg/L添加系は0.002～0.02 mg/Lのオルトリン酸が検出された。ICを用いた各種リン酸の測定において、検出できたのはオルトリン酸とATPのみだった。0.1 mg/L添加系はオルトリン酸のみ検出でき、オルトリン酸以外の回収率は0%だった。オルトリン酸は回収率100%と添加量と同程度となり、ピロリン酸、トリポリリン酸からはオルトリン酸がそれぞれ0.05、0.04 mg/L検出された。1 mg/L添加系は、オルトリン酸とATPが検出でき、それ以外の回収率は0%だった。オルトリン酸は回収率82%でピロリン酸とトリポリリン酸から検出されたオルトリン酸がそれぞれ0.2、0.05 mg/L、ATPは回収率45%となった。このことから、ペルオキシ二硫酸カリウム-MB法とICP-MSによるDPの分析では、添加した水や濃度に関係なく、回収率の平均±標準偏差は99.8±6.2%であり高い回収率であることが分かった。MB法によるオルトリン酸の分析については、地下水添加の0.1mg/Lで回収率80%と低い値もあるが、回収率の平均±標準偏差は、95.4±10.1%であり、こちらも高い回収率となることが分かった。ICでは、オルトリンの回収率の高いものの、各種リン酸を添加する水が超純水から地下水に変わったことにより、リン酸の形態分析ができなくなり、明らかな回収率の低下がみられた。よって、ペルオキシ二硫酸カリウム-MB法やICP-MS、MB法は、溶存イオンの多い琉球石灰岩地域における地下水に対しても回収率が高く有効な方法であると考えられる。しかしICについては、多くの形態のリン酸の分析が可能であるが、地下水中の溶存成分、特に琉球石灰岩地域の地下水中に多く含まれる金属イオン等の夾雑物の影響を受け分析精度が落ちる傾向があると考えられる。琉球石灰岩地域等の溶存イオンが多いと考えられる環境サンプルに対し、ICでの分

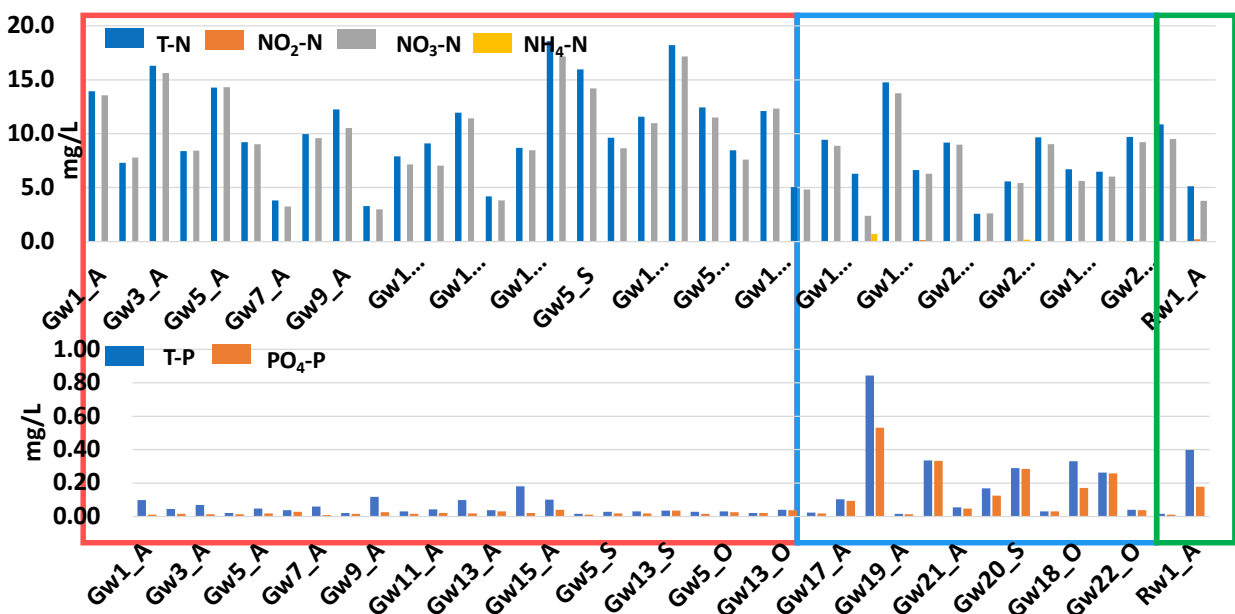


図2.9 慶座流域（左枠）と米須流域（右枠）での、栄養塩濃度の詳細。

析を行う場合、より正確な分析を行うためには溶存イオンの除去を行う必要があることがわかった。

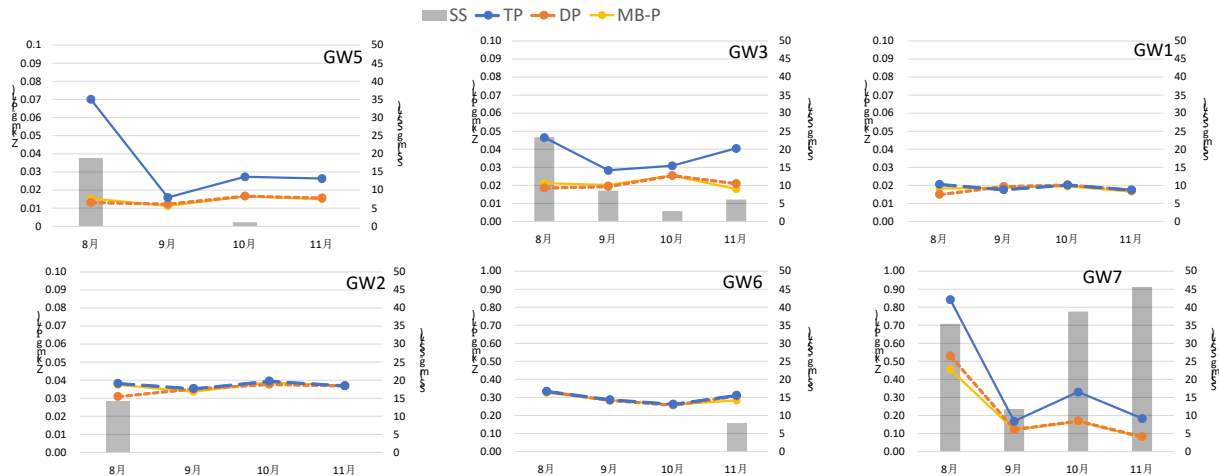


図2.10 定期調査地点における形態別リンの月別変動。

以上の結果を踏まえ、環境サンプルにおいては、回収率の高かったペルオキシ二硫酸カリウム-MB法によるTP、DPの分析結果とMB法によるMB-Pの分析結果を中心に動態解析を行うこととした。

慶座流域と米須流域にて、一斉観測により地下水中の栄養塩濃度の比較を行った結果、窒素濃度自体は両流域間で顕著な差異は見られなかった（図2.9）。その一方で、リン酸塩に関しては、米須流域で高い傾向が見られ、周辺の陸地利用の違いが、地下水中の栄養塩の差異にも寄与している可能性が示唆された。慶座流域と米須流域における地下水中のT-Pとオルトリン酸の2020年8～11月の別変動を図2.10に示す。沖縄島南部地域におけるGW1～GW7におけるT-Pの平均値は、0.02～0.04 mg-P/Lで、月ごとに変動は大きくはなく、T-P及びオルトリン酸が低濃度で存在していることが分かった。GW6では、月ごと変動は大きくないもののT-Pの平均値は0.3 mg-P/Lで先ほどの5地点平均の約10倍のリンが存在していることが分かった。GW7では、8月から9月にかけて急激に各種リン濃度が減少しており、その後も0.17～0.33 mg-P/Lの間で変動が見られた。GW1～GW5におけるオルトリン酸の濃度の平均値は、0.01～0.03mg-P/Lで、T-Pと同様、オルトリン酸も月ごと変動はなく低濃度存在していることが分かった。GW6では、2020年8月～10月までオルトリン酸濃度に変動はなく、先ほどの5地点の平均値の約10倍のオルトリン酸が含まれていたが、11月に急激な減少が見られ、濃度は0.05 mg-P/Lまで減少した。GW7では、T-P同様に8月から9月にかけて急激にオルトリン酸が減少しており、11月はT-Pが減少したがオルトリン酸濃度は増加した。以上、定期地下水調査の結果より、地下水中には溶存リンのほとんどがオルトリンであるが、その他にT-Pに影響を与えるのは主に浮遊性懸濁物質（SS）であり、SSの量が多いとTPと溶存Pの間に差が発生する場合があることがわかった。地下水でSSが多くなると懸濁態リンも多くなり、懸濁態を多く含んだ状態で地下水が海に流れ込むこと海域にリンが供給されることにもつながる。陸域負荷としてリンに着目した場合、浮遊懸濁物質（SS）も重要なモニタリング項目であるといえる。

つづいて、沖縄本島南部地域において、三次元水循環モデリングを適用し現地観測結果と合わせ海に流出する河川や地下水経由の栄養塩（リン酸塩）の日最大流入負荷量（TMDLs）を算出し、海底堆積物の蓄積型リン酸塩との相関関係を把握した結果を表示する。

観測データと計算結果の違いからモデルに反映されていない実際との違いを推定し、それらを組み込んでいく試行錯誤（例えば、ボーリングデータに矛盾しない範囲での基盤上面標高の見直し、一部の範囲についてのみ異なる透水係数を与えるなど）を通じて現況再現解析を実施した。その結果、観測された河川流量や地下水位を概ね再現可能な2つの構造が見出された。1つ目は、既存ボーリングデータがなく、基盤上面標高の不確実性が大きい断層部分を北側の流域から地下水が通過し南側（慶座バンタ）に流動できると仮定したモデルAと、もう1つは、断層部分を地下水が通過せずに西側に向かって流動すると仮定したモデルBである。以降では、これら両者の結果を示す。

図2.11に慶座ダム周辺における観測地下水位と計算地下水位を比較したグラフを示す。止水壁下流

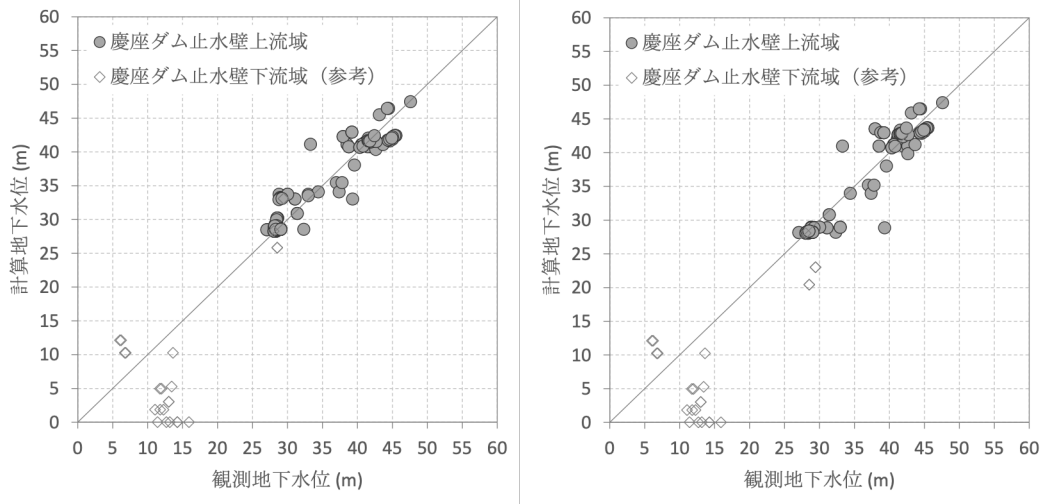


図2.11 観測地下水位と計算地下水位を比較 左図モデルA、右図モデルB。

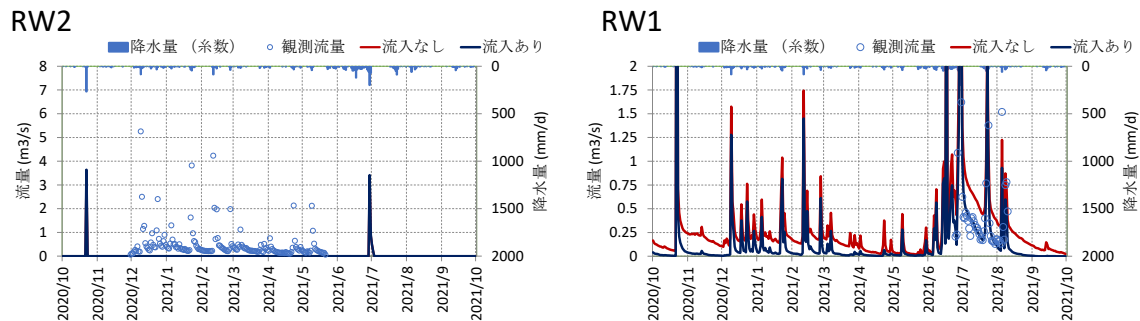


図2.12 3次元水循環シミュレーションによる河川流量の再現状況。

域のデータについては、止水壁部において止水壁上端標高で水位固定境界に設定していることから参考データとして取り扱った。図中の観測地下水位には、ダム建設以降の全観測期間のデータを対象とした平均値を用いている。止水壁上流域の地点を見ると、いずれのモデルにおいても観測と計算で概ね整合する結果を得ることができている。次に、図2.3に示した河川流量観測地点RW1、RW2地点における観測流量と計算流量を比較した図2.12に示す。RW1地点の観測流量は、2021年6月25日～2021年8月10日の平均値を、RW2地点については、2021年7月14日～2021年8月26日の平均値を用いた。また、観測期間の降雨量と計算で与えた降雨量も表中に併記している。これを見ると、計算流量は観測流量と比較してやや少ない結果となっている。モデルBについては、観測流量に対する計算流量の割合が、観測期間の降雨量と計算で与えた降雨量の割合と整合しており、降雨量の違いと考えれば概ね対応が取れているものと判断される。一方で、RW2地点上流で合流する北側の河川流域では、生活排水などが河川へ放流されている事実もあり、その水量は不明であるが、観測流量はその影響を含んだ

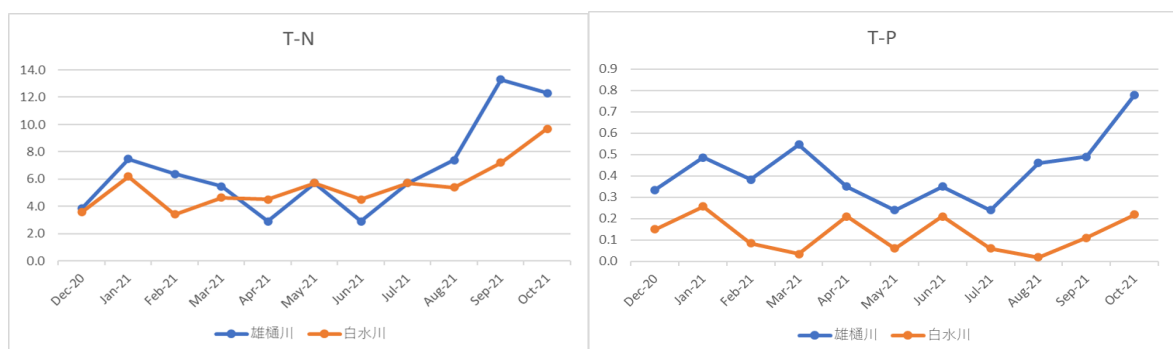


図2.13 河川水中のT-NとTP濃度の経時変化。

ものであるため、モデル A の計算流量が過小評価していると判断することは難しく、現時点ではいずれのモデルが確からしいかを定めることは困難である。

図2. 11に3次元水循環シミュレーションによる地表水と地下水の流動解析結果を示す。沖縄本島南部地域の沿岸域を①米須地区、②慶座地区、③具志頭地区の3つの地区に分類し地下水流出量の推定を行った。GETFLOWSを用いて地下水流動の解析を行った結果、地下水流出量の推定を行うことができた。解析対象地域の地下水の流れは、基盤岩上面が低くなっている慶座方向と港川（雄飛川）とに集中していることが明らかとなった。一方、玻名城方向への地下水の流れは少ないことがわかった。今後、地下水経路で海域へ流出する栄養塩負荷量を明らかにするとともに、慶座、玻名城、白水川及び雄樋川の沿岸海域の底質に蓄積している栄養塩濃度との関連性について検討する。

GETFLOWSを用いて地下水流動の解析を行った結果、地下水の平均流出量は米須地区で46,121 m³/day、慶座地区で2,881 m³/day、具志頭地区で30,510 m³/dayという結果が得られた。この3つの地区の地下水平均流出量を比べると、米須地区が特に地下水流出量が大きいたことが分かる。

次に、河川水中のT-NとT-P濃度の2020年12月～2021年8月までの経時変化を図2. 13に示す。T-Nの年平均値として雄樋川が6.7 mg/L、白水川が5.5 mg/Lという結果が得られた。白水川よりも雄樋川のT-Nの値が月ごとの変動が大きいことが分かった。また雄樋川の8月からの全窒素の値が大きくなっていることが分かる。T-Pの年平均値として雄樋川が0.4 mg/L、白水川が0.1 mg/Lという結果が得られた。二つの河川の測定結果を比べると、雄樋川のT-Pの値が白水川のT-Pの値と比べて高い値が出ていることが分かった。また、月ごとのT-Pの推移を比べてみると値の大きさに差はあるものの年間を通じた経時変化の傾向は類似していることが分かる。次に、地下水中のSS、T-N及びT-P濃度の2020年8月～2021年8月までの経時変化を図2. 14に示す。T-N濃度の年平均値は米須地区が7.2 mg/L、慶座地区が13.7 mg/L、具志頭地区が9.8 mg/Lという結果が得られた。T-N濃度は、慶座地区で高い値が出ていることが分かった。また、米須地区では2020年の11月から12月にかけて高い値が出ていることが分かった。T-P濃度の年平均値として米須地区が0.28 mg/L、慶座地区が0.03 mg/L、具志頭地区が0.04 mg/Lという結果が得られた。この2つの図からT-P濃度の値は、年間を通して慶座地区、具志頭地区と比べて米須地区が高いことが分かった。

図2. 15に河川水・地下水のSS、T-N及びT-P濃度の測定結果に、3次元水循環シミュレーションにより

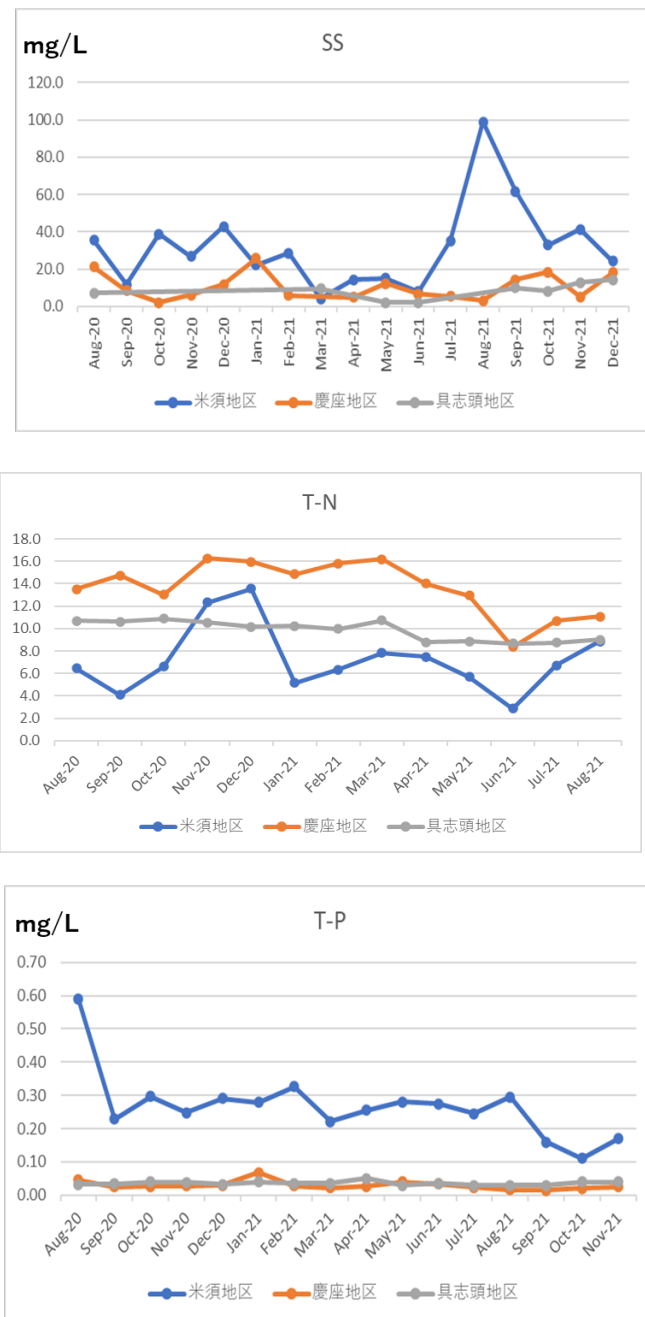


図2. 14 地下水中のT-NとTP濃度の経時変化。

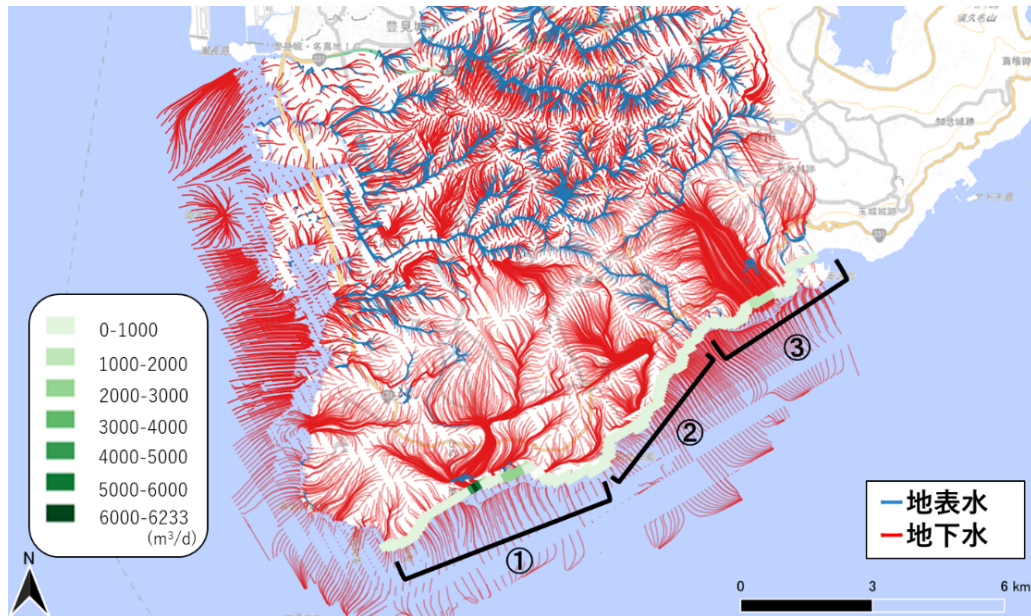
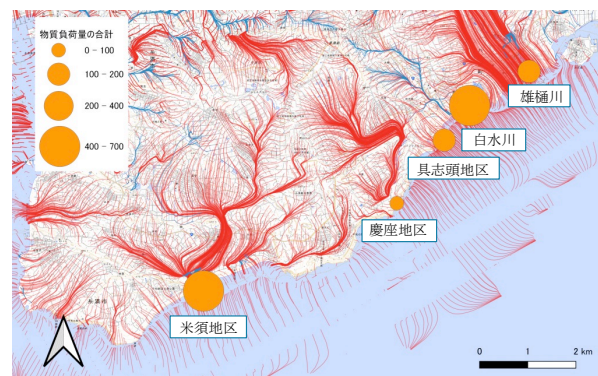


図2.15 3次元水循環シミュレーションによる計算結果。

物質負荷量の推定結果

	SS (t/year)	T-N (t/year)	T-P (t/year)
米須地区	407.2	121.8	4.75
慶座地区	9.8	14.4	0.03
具志頭地区	37.2	109.6	0.40
白水川	313.5	134.8	8.57
雄樋川	104.7	73.6	1.72

↑地下水(3地区),河川水の負荷量



↑SS,T-N,T-Pを合計した負荷量分布図

図2.16 沖縄島南部地域における陸域からの物質負荷量の推定結果。

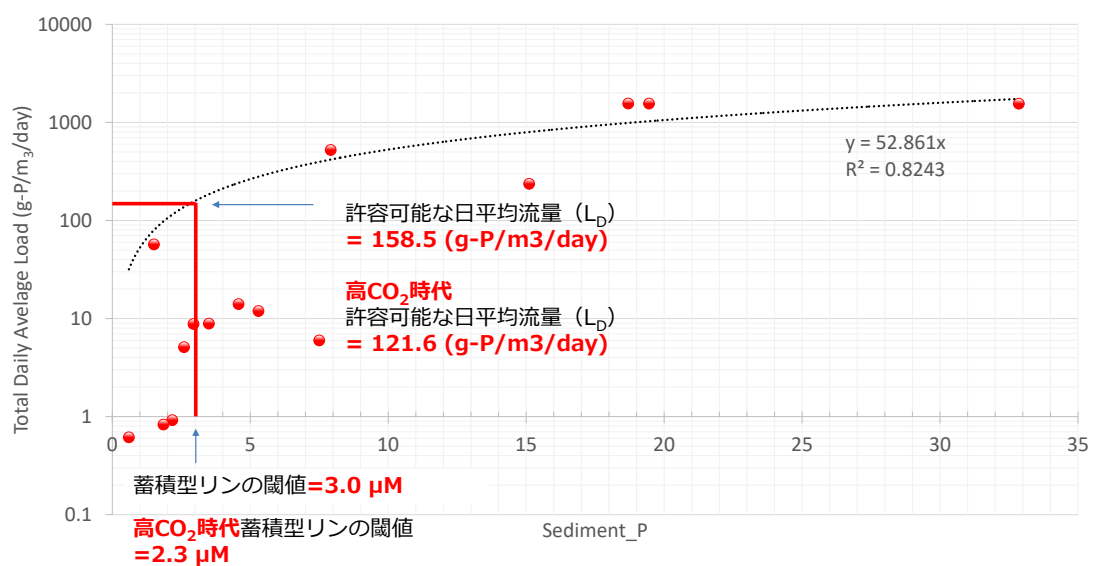


図2.17 許容可能な日平均流入負荷量 (L_D) の推定。

算出した河川流量と地下水流出量を乗じて沖縄島南部地域における陸域から海域への物質負荷量の推定

した結果を示す。推定された陸域からの物質負荷量は、雄樋川でT-Nが73.6 t/year、T-Pが1.72 t/year、白水川でT-Nが134.8 t/year、T-Pが8.57 t/year、米須地区でT-Nが121.8 t/year、T-Pが4.75 t/year、SSが407.2 t/year、慶座地区でT-Nが14.4 t/year、T-Pが0.03 t/year、SSが9.8 t/year、具志頭地区でT-Nが109.6 t/year、T-Pが0.40 t/year、SSが37.2 t/yearとなった。

以上の結果により、沖縄本島南部地域における地下水の陸域から海域への物質負荷量は河川に匹敵することが分かった。特に米須地区と白水川の物質負荷量が大きいこと、陸域から海域への物質負荷を算定する河川経由の物質負荷だけでなく地下水経由の物質負荷を考慮する必要があることが示された。

沖縄島南部地域において蓄積型リンと陸域からのリン酸塩の日平均流入負荷量（TDAL）を比較した結果を図2.15に示す。なお、このTDALの推定結果は、河川経由と地下水経由の負荷量の合計値となっている。沖縄島南部地域の沿岸海域は汀線からリーフエッジまでの距離が短いのが特徴である。図をみると、沖縄島南部地域における蓄積型リンとTDALの間には正の相関うかがえる。白水川や港川（雄樋川）の沿岸海域へのTDALの値が最も高くなっており、河川経由のリン酸負荷の影響が大きいことがわかる。地下水経由のリン酸負荷が最も大きいのは米須地区で地下水が集まりやすい地質構造になっていることや後背地の地下水中のリン酸濃度が高いことがその原因となっている。一方、稚サングの加入量が一定量みられた大度海岸や波名城海岸は、蓄積型リンやリン酸塩のTDALの値が小さくなっている。

他のサブテーマで得られた蓄積型リンの閾値を基に、許容可能な日平均流入負荷量（ L_0 ）の推定した結果を図2.16に示す。稚ポリプの飼育実験や沖縄島南部地域や石西礁湖で実施した稚サングの加入量からミドリイシの蓄積型リンの閾値が $3.0\mu\text{M}$ と推定された。沖縄島南部地域における蓄積型リンとTDALの間には高い正の相関関係が確認できることから、蓄積型リンの閾値が $3.0\mu\text{M}$ に対応するTDALの値、つまり許容可能な日平均流入負荷量（ L_0 ）は $158.5\text{ g-P/m}^3/\text{day}$ と推定される。さらに、高 CO_2 時代における蓄積型リンの閾値は $2.3\mu\text{M}$ と低くなることから、高 CO_2 時代における許容可能な日平均流入負荷量（ L_0 ）は $121.6\text{ g-P/m}^3/\text{day}$ と推定された。

栄養塩供給のラインを組み込んだ流水系での複合ストレス影響評価を可能にするサング飼育実験系を構築し、栄養塩負荷を与えた実験を行った。栄養塩負荷のみの実験での石灰化率に関しては、エダコモンサングでは栄養塩負荷区で減少する傾向が見られた（図2.18）。栄養塩と $p\text{CO}_2$ 負荷での複合ストレス実験での石灰化率に関しては、エダコモンサングでは栄養塩負荷区で減少する傾向が見られたが、 $p\text{CO}_2$ 負荷に応じた減少傾向は見られなかった（図2.19）。

赤土を用いた飼育実験からは、赤土添加量の増加とともにサングの生育が顕著に阻害されることが明らかとなった（図2.20）。また、赤土添加量とともに海水中のpHが低下することが確認されたことから、赤土に含まれるFeイオンなどによる酸性化効果により骨格形成が阻害されることが明らかになった。従来は、表面を覆うことによる褐虫藻の光合成阻害が懸念されていたが、一部には酸性化による直接的な影響も懸念されることが示唆された。

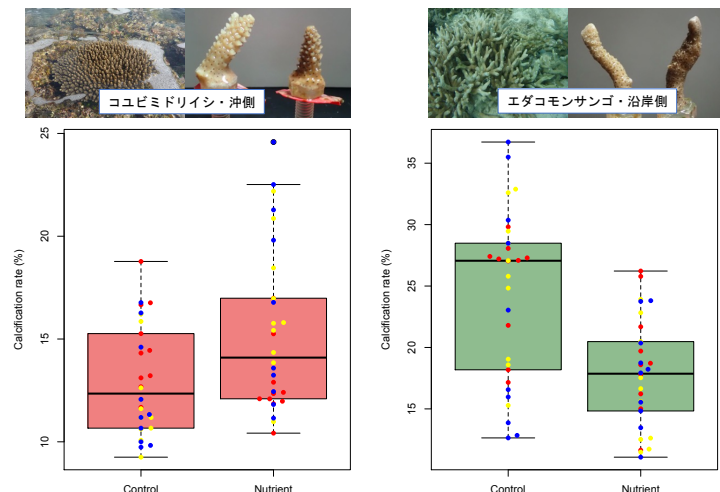


図2.18 サング2種を用いた栄養塩負荷実験の成長率の結果。左はコントロール区、右は高栄養塩添加区。

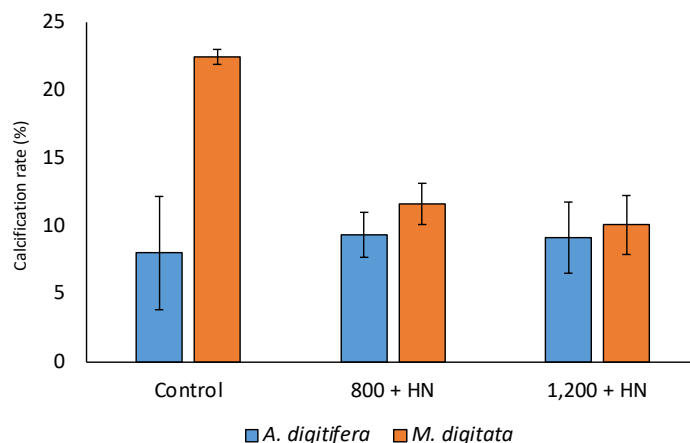


図2.19 サンゴ2種を用いた栄養塩と $p\text{CO}_2$ 負荷実験の成長率の結果。800+HNは $p\text{CO}_2$ 800 μatm と栄養塩負荷区。1,200+HNは $p\text{CO}_2$ 1200 μatm と栄養塩負荷区。

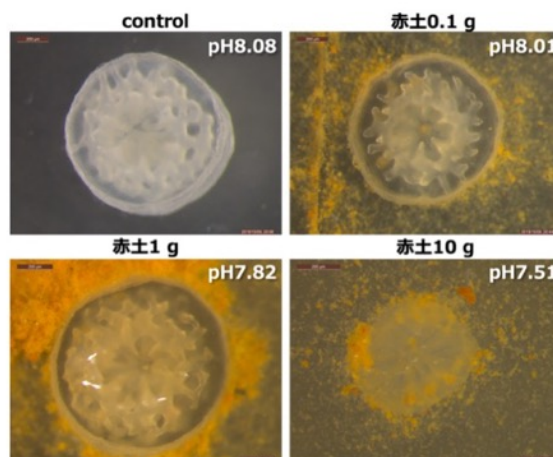


図2.20 コユビミドリイシポリプの赤土に対する応答。

5. 研究目標の達成状況

与論島・沖縄島・慶良間諸島・石西礁湖・多良間島等での海水・海底堆積物、陸域の地下水等の水循環特性及び栄養塩、特に、各種リン酸塩の動態解析を実施できた（図2.9・2.10）。また、サンゴ礁池内外の海水・海底堆積物の栄養塩集積調査及びサンゴの被度及び藻類や微生物相の分布調査を実施することができた（図2.4・2.5）。加えて、サンゴ産卵期に採取した配偶子や成体サンゴを用いた複合ストレス実験を実施し、サンゴの環境応答の詳細を明らかにした（図2.18-2.20）。また、複合影響の1つの因子である底質微粒子による影響評価も進めることができた。他のサブテーマで得られた蓄積型リンの閾値を基に、本サブテーマの目標である許容可能な日平均流入負荷量（ L_D ）の推定した結果を推定することができた。その結果は、稚ポリプの飼育実験や沖縄島南部地域や石西礁湖で実施した稚サンゴの加入量からミドリイシの蓄積型リンの閾値が3.0 μM と推定された（図2.6）。沖縄島南部地域における蓄積型リンとTDALの間には高い正の相関関係が確認できることから、蓄積型リンの閾値が3.0 μM に対応するTDALの値、つまり許容可能な日平均流入負荷量（ L_D ）は158.5 g-P/ m^3 /dayと推定された（図2.17）。さらに、高 CO_2 時代における蓄積型リンの閾値は2.3 μM と低くなることから、高 CO_2 時代における許容可能な日平均流入負荷量（ L_D ）は121.6 g-P/ m^3 /dayと推定された（図2.17）。以上のことから、目標どおりの成果をあげたと評価できる。

6. 引用文献

- 1) Mori, K., Tada, K., Tawara, Y., Ohno, K., Asami, M., Kosaka, K., & Tosaka, H. (2015). Integrated watershed modeling for simulation of spatiotemporal redistribution of post-fallout radionuclides: application in radiocesium fate and transport processes derived from the Fukushima accidents. *Environmental Modelling & Software*, 72, 126-146.
- 2) 鈴木昌弘, 塚崎あゆみ, 橋濱史典, 佐藤光秀, 梅澤有 (2015) : 貧栄養海域のリンの循環過程と解析手法, *地球環境*, 20 (1), 77-88.

Ⅱ－３ 蓄積型栄養塩の測定法の開発と複合ストレス実験によるサンゴ石灰化評価

学校法人北里研究所 北里大学

海洋生命科学部 資源化学研究室 講師 安元 剛

特任助教 水澤奈々美 (R1.4-R2.3)

特任教授 渡部終五 (R1.4-R2.3)

【要旨】

サブテーマ2で採取された沖縄県南部沿岸域、石西礁湖、多良間島などの底質を用いて、底質に吸着したリン酸塩（蓄積型栄養塩）の測定法の開発を行った。蓄積型栄養塩の比較と共に、稚サンゴの加入量との関係を検証した結果、地下水や河川の影響を受けやすい地点では蓄積型栄養塩の値は高かった。稚サンゴ加入量とも高い相関があることも分かった。表層海水のリン酸塩濃度は検出限界外であっても、蓄積型栄養塩を調べることでこれまで見る事が出来なかった陸域負荷の実態把握が可能となった。各地の底質存在下で飼育したサンゴポリプの石灰化率を算出し、海水に溶出したリン酸塩濃度との相関関係を調べた結果、底質から溶出したリン酸塩は多いところで約15 $\mu\text{mol/L}$ と高濃度であり、石灰化率とは負の相関関係があることが明らかになった。複合ストレス実験では高 CO_2 条件下でサンゴポリプの骨格形成が阻害されることが明らかになった。海水とポリアミンを利用した石灰化反応を利用し、高 CO_2 条件ではリン負荷の影響はより強くなることが分かった。また、底質から海水に溶出したリン酸塩濃度は0.04%に比べて0.1% CO_2 では平均で1.3倍高くなることが分かった。底質と共に飼育を開始してから30日以降に稚サンゴの生残率が低下し、水生生物に毒性を示すCuが具志頭と大度海岸で他の地点に比べて高く、底質共存下での稚サンゴの生残率低下の要因になっていることが示唆される。沖縄県南部沿岸でも蓄積したCuのサンゴへの慢性的な影響が懸念される。コユビミドリイシサンゴ成体の共生細菌叢解析および発生初期段階のサンゴ幼生の共生細菌叢を16S rRNA遺伝子領域を標的としたアンプリコンメタゲノム解析により検証したところ、サンゴ成体の細菌叢は*Endozoicomonas*属細菌が70%を占めることが確認できた一方、未受精卵、受精卵、初期胚、飼育海水からは*Endozoicomonas*属細菌は検出されなかった。稚ポリプにおいて細菌叢は安定せず、飼育海水の影響を強く受けることが明らかとなった。ストレス応答実験に稚ポリプを用いることは難しいことが明らかとなったが、稚ポリプはサンゴ成体と比較して周辺海水の細菌の影響を強く受けることが新たに明らかになった。次世代シーケンサーによる成体サンゴの褐虫藻組成の把握を行い、種間で組成が顕著に異なることが分かったが、ストレス暴露では変化が見られなかった。X線CTによる詳細な骨格形態評価を確立し、リン酸塩暴露を受けた際にサンゴ骨格が顕著に変化することを明らかにした。

1. 研究開発目的

陸域由来のリン酸塩の動態はこれまで、調査手法が乏しく実態把握が難しかったが、石灰質の底質に蓄積していると推定し、これを蓄積型栄養塩と定義し、測定手法と生物評価試験法の確立を目的とする。沖縄県南部、石西礁湖、多良間島などを調査対象地域とし、蓄積型栄養塩の実態把握を試みる。また、成体サンゴ及び稚ポリプの石灰化評価法を構築し、複合ストレス実験を実施し、石灰化影響を定量的に評価する方法を構築する。また、飼育実験サンプルの微生物類の遺伝子解析を進め、バクテリア負荷等の実態解明の手法を開発することを目的とする。

2. 研究目標

野外調査で得た各地点の底質サンプルを用いて蓄積型栄養塩測定法の開発を行う。そして野外調査で得た各地点のサンプルの蓄積型栄養塩測定を網羅的に行う。成体サンゴ及び稚ポリプの石灰化評価法を構築し、各種栄養塩の複合ストレス実験を実施し、石灰化影響を定量的に評価する方法を構築する。また、飼育実験サンプルの微生物類の遺伝子解析を進め、バクテリア負荷等の実態解明を進める。

3. 研究開発内容

サブテーマ2で採取した底質を乾燥後に篩分けし、粒径が0.5～1 mmのものに分けた。蓄積型栄養塩測定では、50 mL 遠沈管で底質 6 g を海水15 mLに浸漬し、30℃で72時間浸漬しリン酸塩を溶出させた。遠心後の上清を0.2 μm フィルターで濾過し、モリブデンブルー法でリン酸塩濃度を測定し、蓄積

型栄養塩の値とした（図3.1）。得られた海岸毎の蓄積リンの値を平均し、稚サンゴの加入量と相関関係を調べた。

底質を用いた稚ポリプの石灰化評価に関しては、粒径0.5～1 mmの底質 10 gをシャーレに敷き詰め、稚サンゴを着底させたチャンバースライドを砂の上において25 mLの海水で飼育した。2日毎に海水を交換しながら40日間飼育し、実体顕微鏡で経時観察し生残率を算出した（図3.2）。また、40日後に稚サンゴ骨格の底面積を、ImageJを用いて測定して骨格成長率を算出した。交換時に飼育海水中のリン酸塩濃度をメチレンブルー法で調べた。高CO₂条件での複合ストレス実験は、前述したシャーレをCO₂インキュベーター（0.1% CO₂）に設置し0.04%のラボ室内で飼育したものと比較し、石灰化影響の定量的評価法を構築した（図3.3）。

蓄積型金属塩の測定では、14 gの底質に35 mLの海水に浸漬し、30 °Cで72時間振盪し、底質から金属を溶出させた。pH 5.5に酢酸で調整しながら25 mLに定容し、この溶液を固相抽出キット（3M™エムポア™ ディスククキレート、GLサイエンス社製）で前処理し、10倍希釈検液とし、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）に供し蓄積型金属塩の値とした（図3.4）。

コユビミドリイシサンゴ成体および発生初期段階のサンゴ幼生の細菌叢を16S rRNA遺伝子のV1-V2領域を標的としたアンプリコンメタゲノム解析により確認し、研究室内で長期飼育を行った稚ポリプの細菌叢と比較した。コユビミドリイシから単離培養した*Endozoicomonas*属細菌を用いてプラヌラ幼生、褐虫藻を共生させた稚ポリプおよび非共生の稚ポリプに対して細菌曝露実験を行い、*Endozoicomonas*属細菌の共生成立メカニズムについて検証した。

細菌類のメタバーコーディング解析に関しては、稚サンゴ飼育で用いられたサンプルからフェノールクロロホルム抽出法を用いてDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV1-V2領域を増幅するプライマーペア（27Fmod-338R）でPCRによる増幅を行った。得られたPCR産物からライブラリを作成し、MiSeq

（Illumina社）で、2×300 bpのペアエンド配列をfastqファイルとして取得した。また、サブ2の飼育実験で得られた成体サンゴサンプルの褐虫藻に関しては、予備的に実施したコントロール海水（水温27°C・pCO₂ 400 μatm）、高温ストレス（32°C）のみ、pCO₂ストレス（1000 μatm）・複合ストレス（水温32°C・pCO₂ 1000 μatm）と、栄養塩負荷実験（コントロール区：NO₃⁻：約0.5 μM；PO₄³⁻：約0.05 μM、栄養塩負荷区：NO₃⁻：約5 μM、PO₄³⁻：約0.3 μM）を与えて飼育したコユビミドリイシ・エダコモンサンゴの枝片を用いて行った。飼育後にエタノール固定した枝片から、DNeasy Blood and Tissue Kit（Qiagen）を用いてDNAを抽出した。褐虫藻の遺伝子型決定に関しては、サブ1で確立した手法に従った。また、窒素負荷の影響を評価するために、NH₄Clを10 μM、NaNO₃を10 μMに調整した濾過海水を用意し、褐虫藻（クレードA）を感染させたものと感染させていない稚サンゴを用いて21日間の飼育を行い、ポリプ重量を用いた石灰化評価を行った。さらに、サンゴサンプル骨格の詳細な骨格形態の把握を電子顕微鏡とX線μCTを用いて行った。



図3.1 蓄積型栄養塩の測定法の開発。

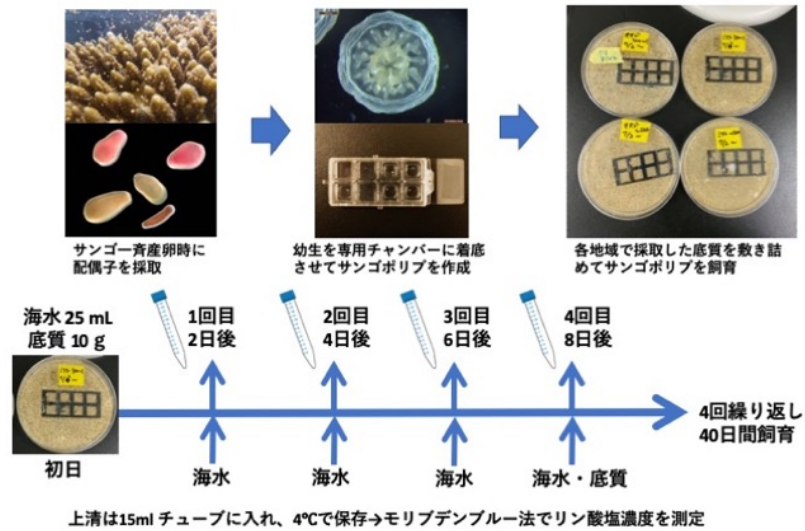


図3.2 蓄積型栄養塩によるサンゴ石灰化影響評価法に関する概略図。

コビミドリイシの産卵

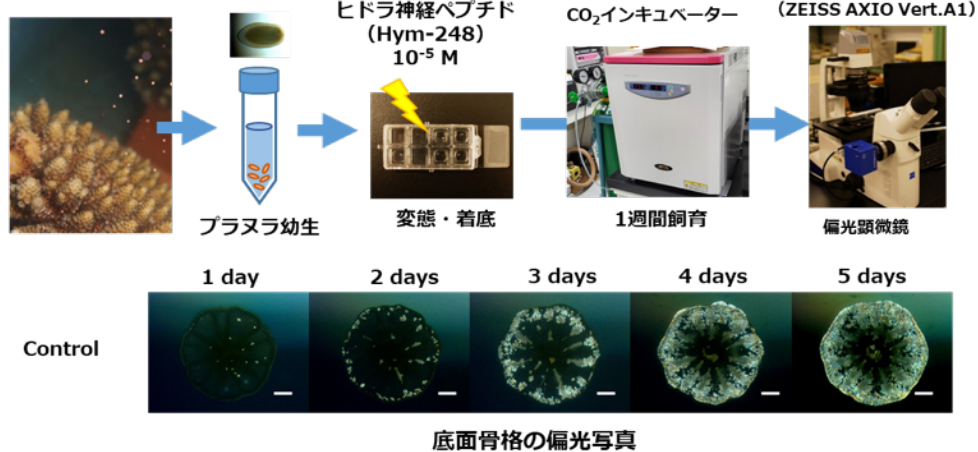


図3.3 稚サンゴに対する複合ストレス実験の概略図。

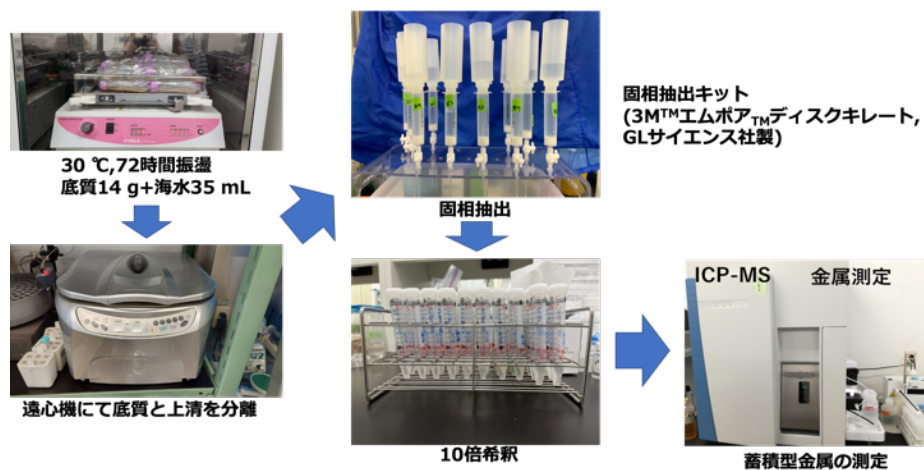


図3.4 蓄積型金属塩の測定法の開発。

4. 結果及び考察

蓄積型栄養塩は月変動が見られるものの表層海水と比較するとより長い期間の陸域負荷を評価する

ことができる。沖縄島南部では米須地下ダムと慶座地下ダムという2つの地下ダムと白水川と雄樋川の2つの市街地を流れる河川がある沖縄島南部地域を調査対象地域とし、蓄積型栄養塩の比較と共に、稚サンゴの加入量との関係を検証した(図3.5)。PO₄-Pの値が高い米須地下ダムからの地下水が一部湧出している米須海岸で蓄積リンは72.3 μMと高値を示し、平均 15.1±1.1 μMで地下ダムの水質の影響を受けていることが示唆される(図3.6)。一方、PO₄-Pの値が低い慶座地下ダムが溶出している沿岸部で蓄積リンは2.6 μMで米須海岸と比較して低かった。また、白水川河口の具志頭海岸で蓄積リンは平均 17.1±2.5 μMで高く、雄樋川河口の港川海岸の蓄積リンも平均 7.5±0.3 μMと高かった(図3.7)。白水川河口付近にはエビ養殖場や畜産場がありその影響が示唆される。雄飛川も12.6 μMと高い濃度のPO₄-Pが検出され流量も多く付近の港川海岸まで影響が及んでいると考えられる。稚サンゴ加入量と蓄積型栄養塩も相関を調べたところ高い相関が見られた(図3.8)。調査対象地域のGETFLOWSによる陸域水循環モデルにより得られた地下水および河川水の沿岸域への流出量と、蓄積リンの関係性を検証したところ相関関係があることが確認できた(図3.9)。

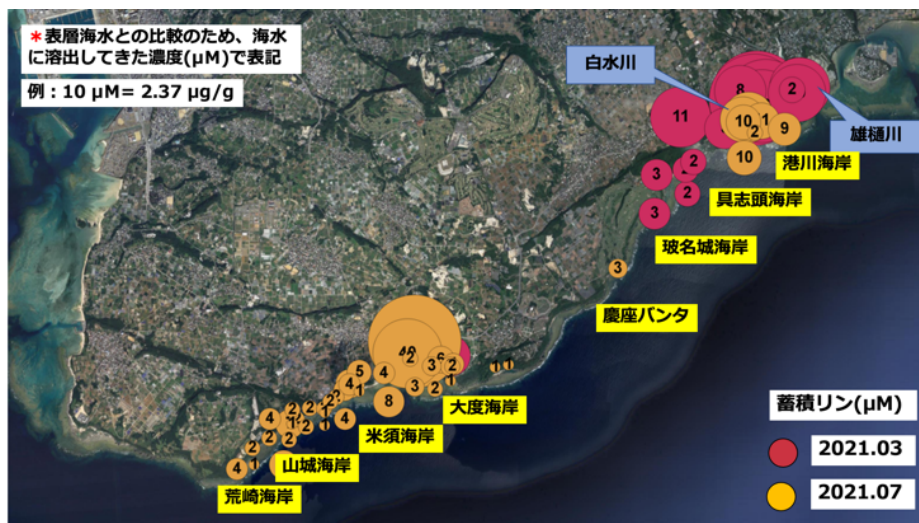


図3.5 沖縄島南部の蓄積型栄養塩マップ。

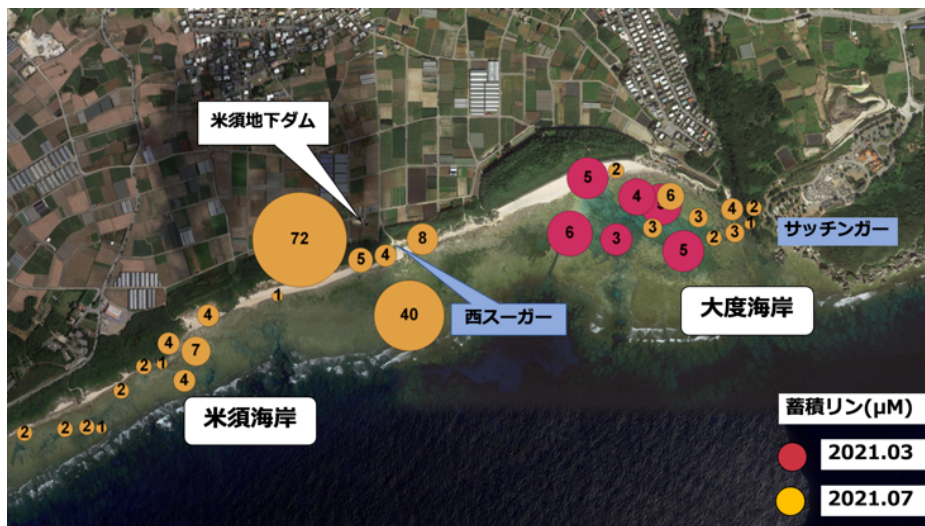


図3.6 沖縄島南部米須地区の蓄積型栄養塩マップ。

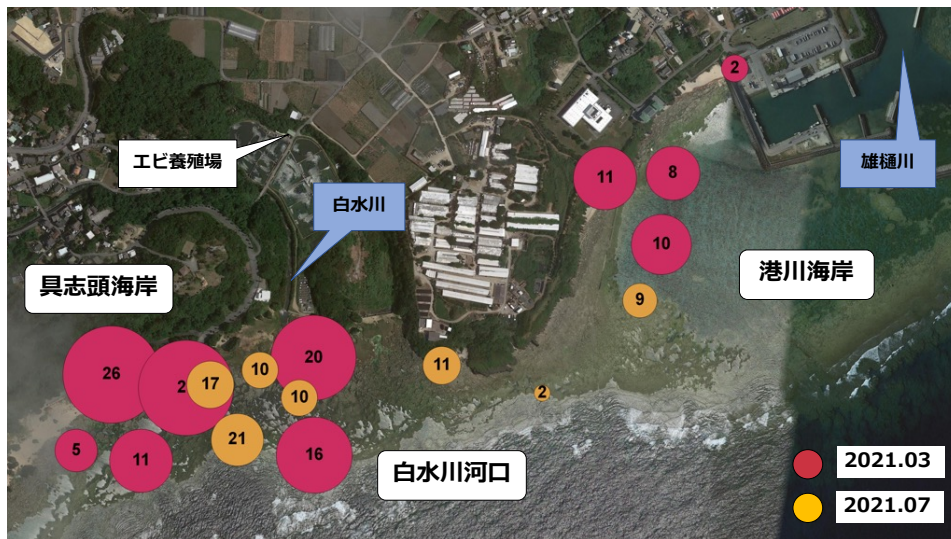


図3.7 沖縄島南部具志頭地区の蓄積型栄養塩マップ。

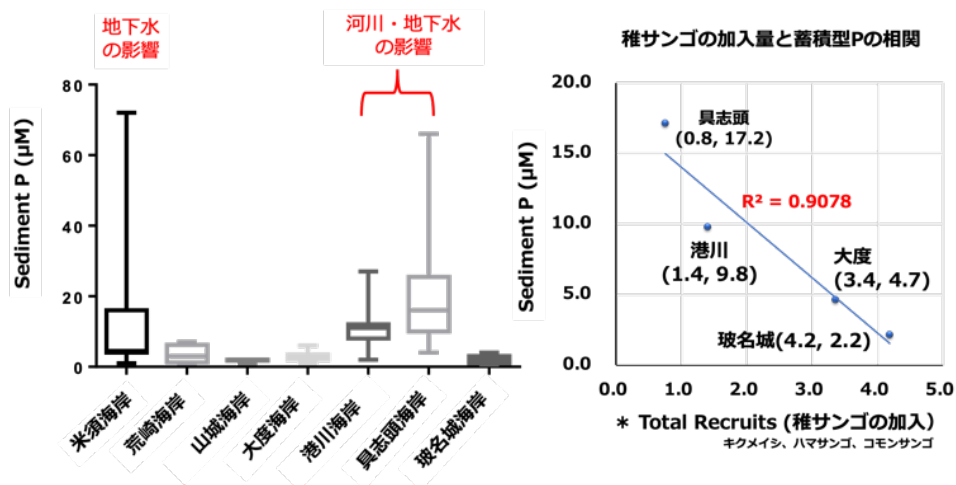
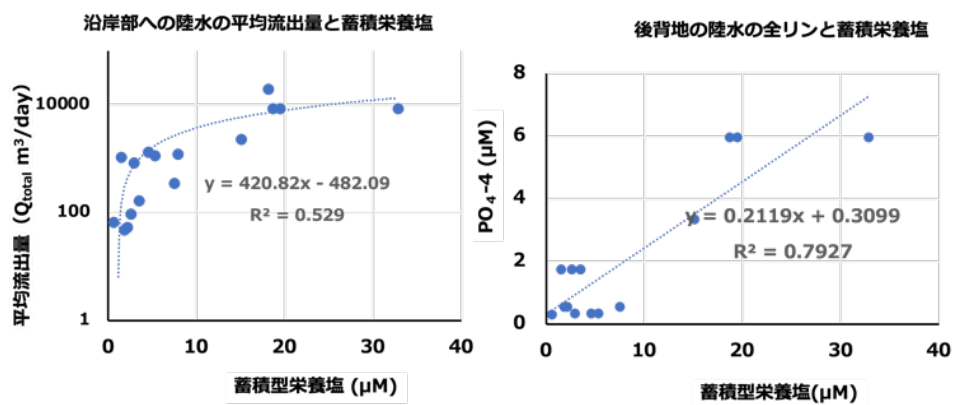


図3.8 沖縄島南部の蓄積型栄養塩の比較と稚サング加入量との相関図。



後背地の陸水の平均流出量、全リンと相関あり

図3.9 沿岸域部の陸水の平均流出量と全リンの蓄積リンとの相関。

我が国を代表するサンゴ礁生態系である石西礁湖と多良間島を調査対象地域に底質を採取し、蓄積栄養塩を用いて陸域負荷の現状把握を試みた（図3.10）。竹富島南部に位置するエビ養殖場付近の地点で79.3 μMと高値であった。この地点は、陸域からエビ養殖場の排水と推測される水が放出されていることから、高い値が検出されたと考えられる（図3.11）。黒島周辺では、最大58.8 μM、リーフ内で10 μM以上検出される地点が多かった（図3.12）。黒島は畜産が盛んなため、野積みなどの影響が地下に浸

透し沿岸域に流出したため蓄積型栄養塩の値が高くなったと考えられる。一方、石西礁湖海域の溶存態リンはほとんどの地点で検出限界以下($< 0.06 \mu\text{M}$)となったが、竹富島エビ養殖場は $7.0 \mu\text{M}$ 、石垣島新川河口で $15.7 \mu\text{M}$ と淡水域では高かった(図3.13)。蓄積型栄養塩の値は深度が5 m以内の浅瀬で高かった(図3.14)。また、稚サンゴ密度が調査されている地点と蓄積リン濃度と関係を検証したところ、蓄積型栄養塩が $3 \mu\text{M}$ 以上で稚サンゴ密度は0 個体/ m^3 となることがわかった(図3.15)。サンゴの種間差をみると、ミドリイシ稚サンゴの密度が10以上地点の蓄積型栄養塩は $1 \mu\text{M}$ 程度で、ハナヤサイサンゴの稚サンゴの密度は $2 \sim 2.9 \mu\text{M}$ であっても稚サンゴの密度が高い地点があり、種によって蓄積型栄養塩への耐性の高低が推測された。

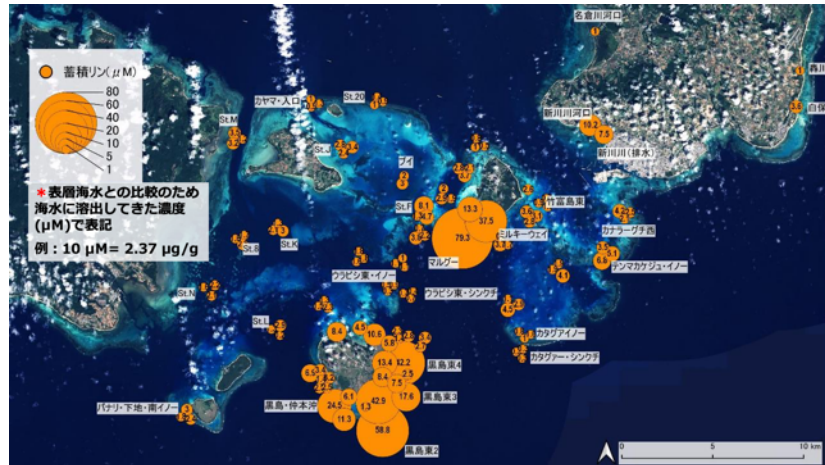


図3.10 石西礁湖での蓄積型栄養塩マップ。

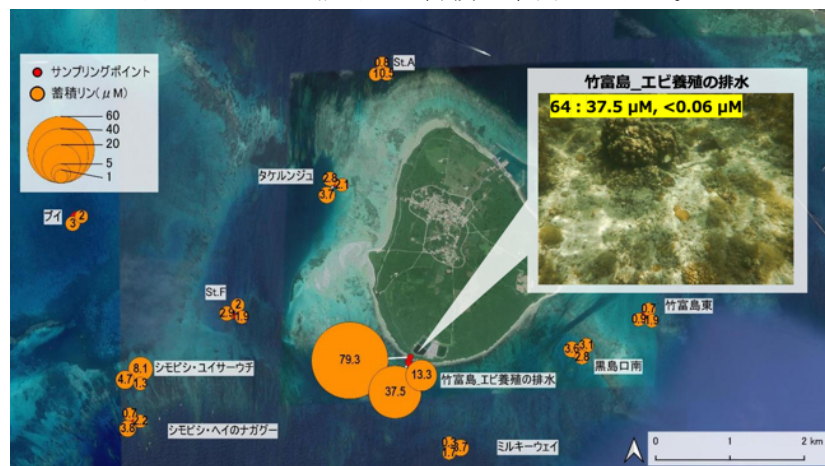


図3.11 竹富島での蓄積型栄養塩マップ。

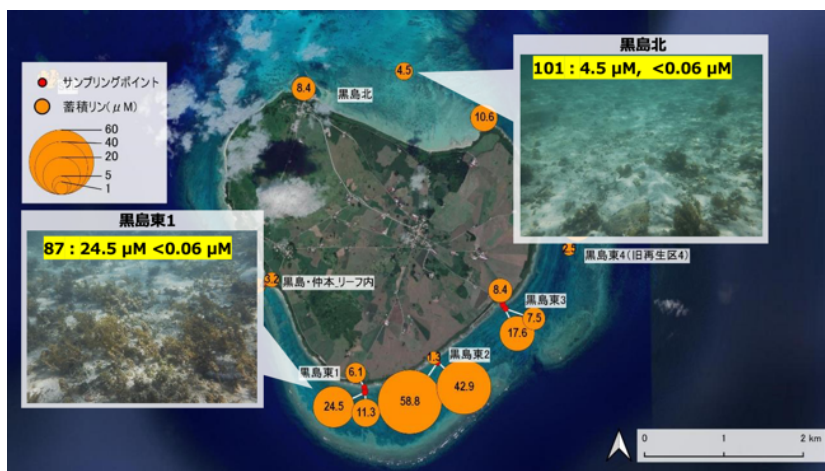


図3.12 黒島での蓄積型栄養塩マップ。

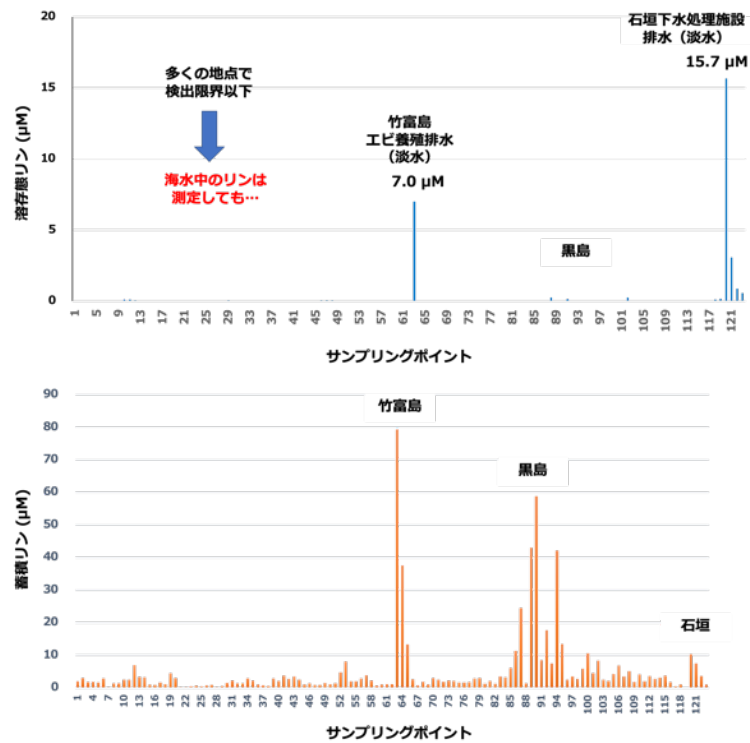


図3.13 石西礁湖での表層海水のリン酸塩濃度と蓄積型栄養塩の比較。

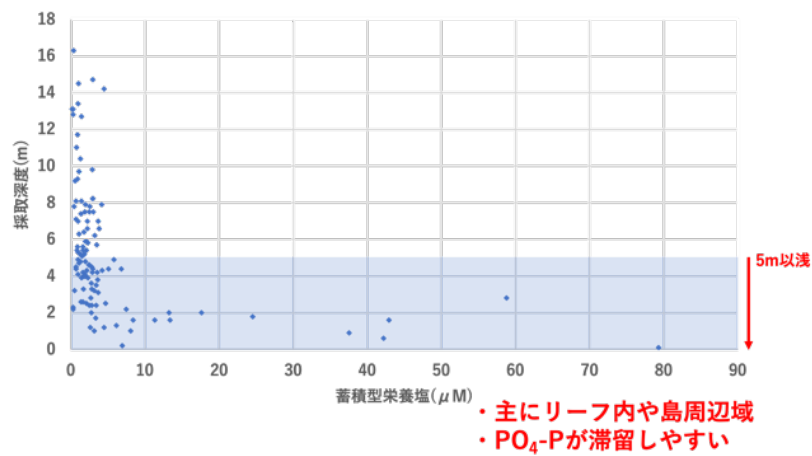


図3.14 石西礁湖での底質の採取深度と蓄積型栄養塩との相関。

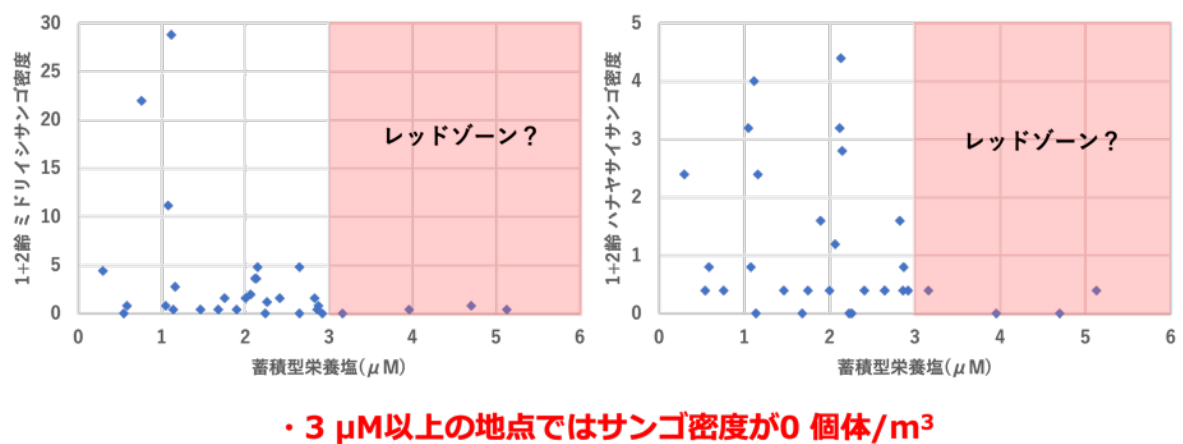


図3.15 石西礁湖での稚サンゴ密度と底質の蓄積型栄養塩との相関。

多良間島では、測定を行った11地点のうち7地点が10 μM を超え、蓄積型栄養塩が比較的高い値であることが明らかになった（図3.16）。サンゴが生息する礁縁部で採取した底質の蓄積型栄養塩を調べたが、陸から離れた位置であるにも関わらず平均7.9 μM と高い値が検出された。要因として、多良間島には淡水レンズと呼ばれる淡水と海水の比重の差によりレンズ状の淡水域が形成されている。これにより、レンズ層内の淡水域から海水にリン酸塩が流入し、陸域から離れた地点でも蓄積リンが高くなったと推測した。一方、海水中の溶存態リンは、ほとんどの地点で検出限界以下（ $< 0.1 \mu\text{M}$ ）であった。

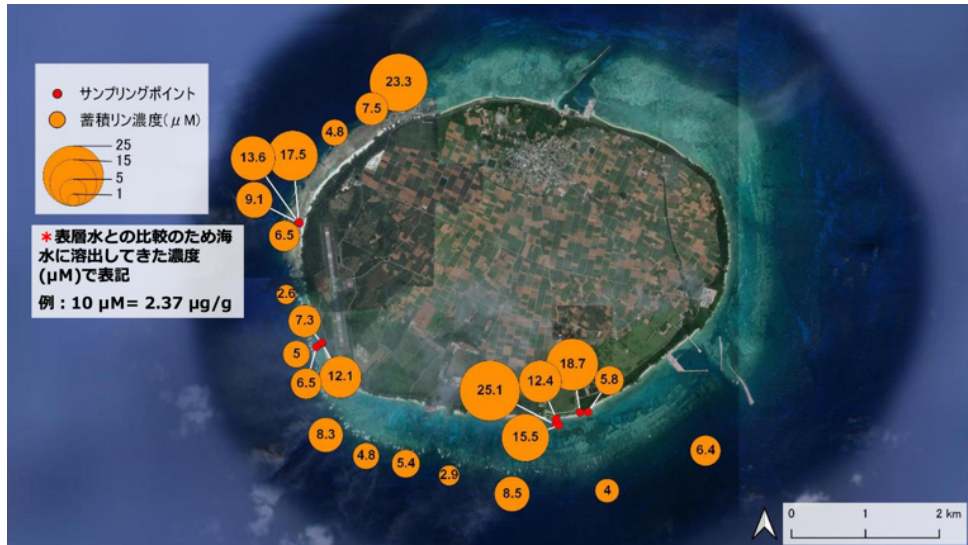
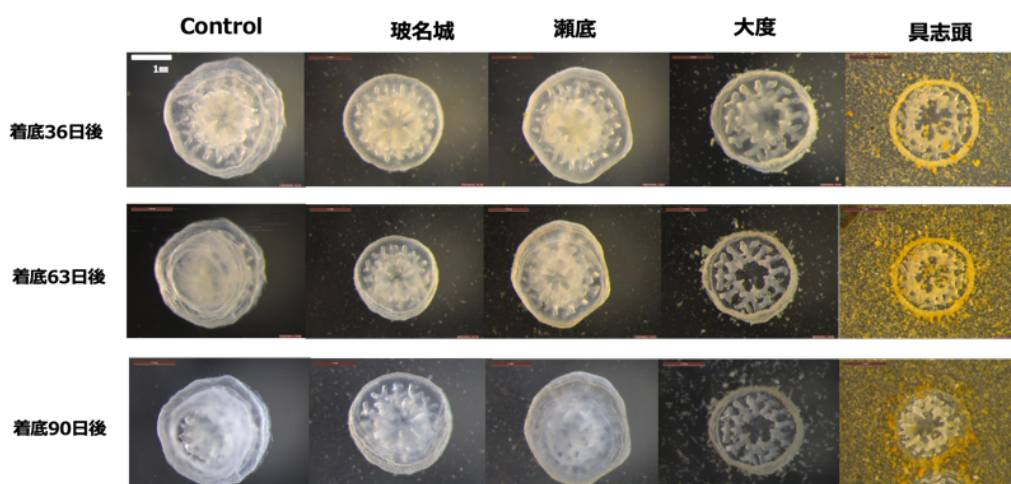


図3.16 多良間島での蓄積型栄養塩マップ。

陸域からの影響が異なると考えられる玻名城、大度、瀬底、具志頭の各沿岸底質と共存した状態で稚サンゴを飼育し、稚サンゴの骨格形成への影響を調べたところ、稚サンゴ加入量の高い、玻名城、瀬底での骨格に比べ、稚サンゴ加入量が低い大度、具志頭の骨格は小さくなった（図3.17）。飼育海水に溶出したリンは大度が4.5 μM 、具志頭が15 μM であり骨格の大きさと関係があった（図3.18）。陸域由来のリン酸塩は、沿岸域の石灰質の底質に蓄積しており、飼育実験においてはその一部が溶出することでサンゴの骨格形成を妨げることが明らかになった¹⁾。PO₄-P濃度が最も高かった具志頭では、飼育開始33日目から、大度では45日目から著しい生存率の低下が確認された。飼育90日目における各生残率は、Controlが98%、玻名城は97%、瀬底は85%、大度が2.6%、具志頭は0%であった（図3.18）。



具志頭と大度で骨格形成阻害

図3.17 底質を敷き詰めた状態で飼育した稚サンゴの骨格成長。

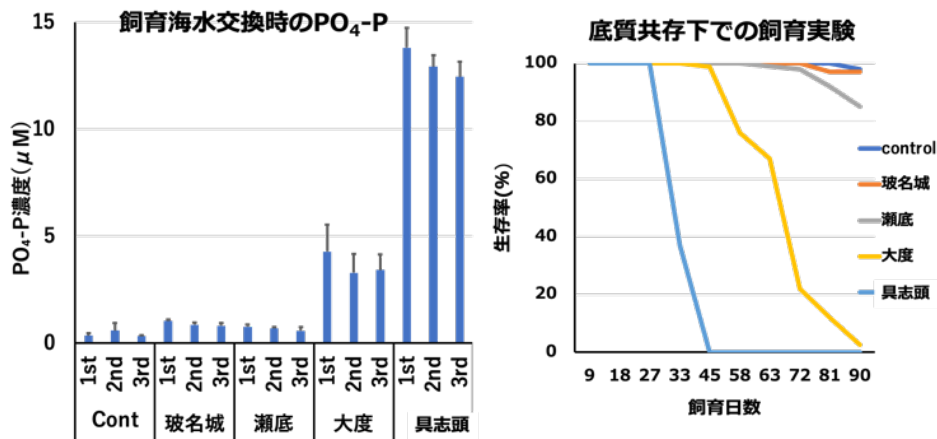


図3.18 底質を敷き詰めた状態で飼育した稚サンゴの致死率と海水に溶出したリン酸塩濃度。

高CO₂条件下で稚サンゴを約2週間飼育し、飼育実験後の稚サンゴの成長解析を行った。着底後から2週間、底面骨格の偏光写真を撮影し、ImageJを用いて石灰化率を算出したところ、高CO₂条件下で稚サンゴの骨格形成が阻害されることが明らかになった（図3.19）。しかし、稚サンゴでは骨格が小さくなりすぎて検出は難しかった。しかし、この種のみドリイシサンゴの産卵は年一回であるため年間を通して実験するのは難しい。そこで、海水と生体アミンであるポリアミンを利用した石灰化反応を利用し炭酸カルシウム形成への影響を検証した。本方法では、ポリアミンが空気中のCO₂を溶かし込むため、海水に添加するだけで炭酸カルシウム形成が引き起こされる²⁾。本方法は栄養塩添加実験において稚ポリプの骨格形成と高い相同性を示す³⁾。高CO₂条件においてポリアミンによる炭酸カルシウム形成試験を行ったところ、稚ポリプと同様に、高CO₂条件下では炭酸カルシウム形成が阻害されサンゴの骨格形成と高い相同性を示した。高CO₂条件下でのリン負荷の影響をPO₄-P:0~1 μMの範囲で検出することができた。0.04% CO₂では石灰率の傾きが-8.1であったが、0.1% CO₂、0.2% CO₂では、それぞれ-13.5、-29.7であり高CO₂時代にはリン負荷の影響はより強くでることが分かった（図3.20）。リン酸塩の結晶形成阻害機構を新規蛍光プローブであるFluorescein-4-Isothiocyanate-Labelled Alendronic Acid (FITC-AA) を合成して検証したところ、リン酸塩は稚サンゴの細胞内を通過せず、細胞間の隙間を通過し骨格表面に吸着することが明らかになった（図3.21）⁴⁾。骨格形成阻害がCaCO₃結晶表面吸着によるものであるため、結晶が小さくなるとリン酸塩の結晶形成阻害はより大きくなると考えられる。また、高CO₂条件、底質共存下での稚サンゴ飼育実験で、海水に溶出したリン酸塩濃度は0.04%に比べて0.1% CO₂では平均で1.3倍高くなることが分かった（図3.22）。

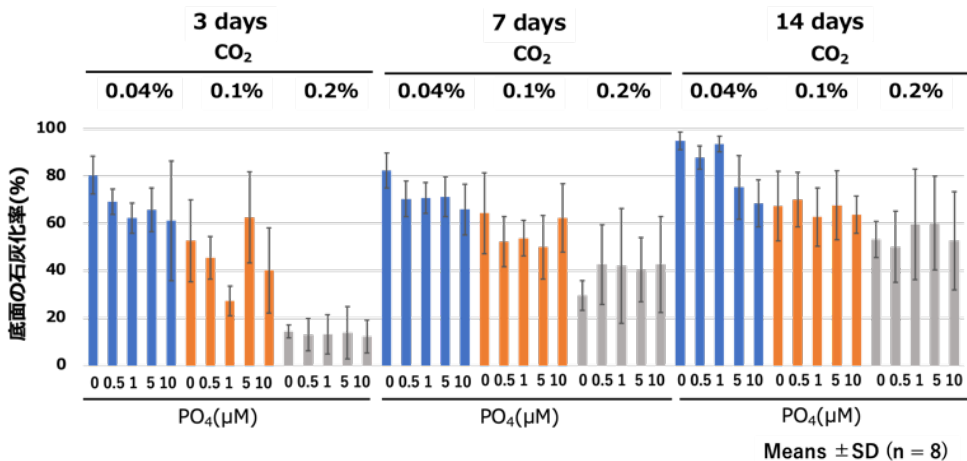


図3.19 高CO₂高リン酸塩の複合ストレス実験における稚サンゴ底面の骨格面積の平均。

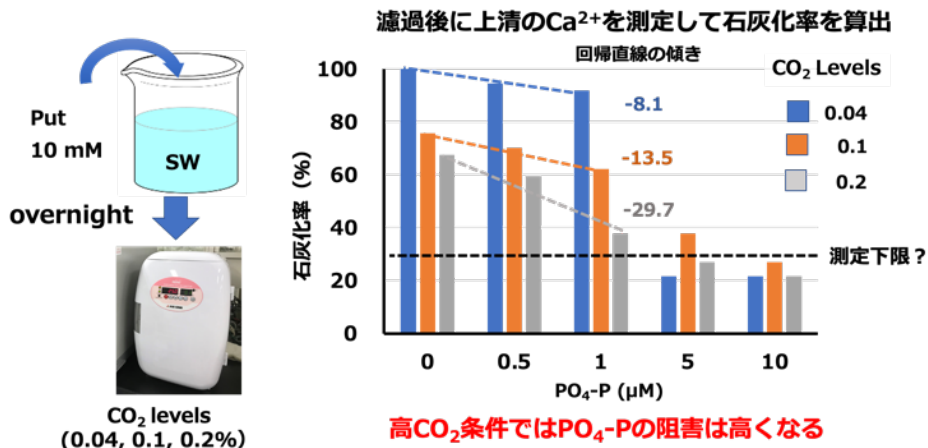


図3.20 海水と生体アミンであるポリアミンを利用した石灰化反応の高CO₂高リン条件下での石灰化量の変化。

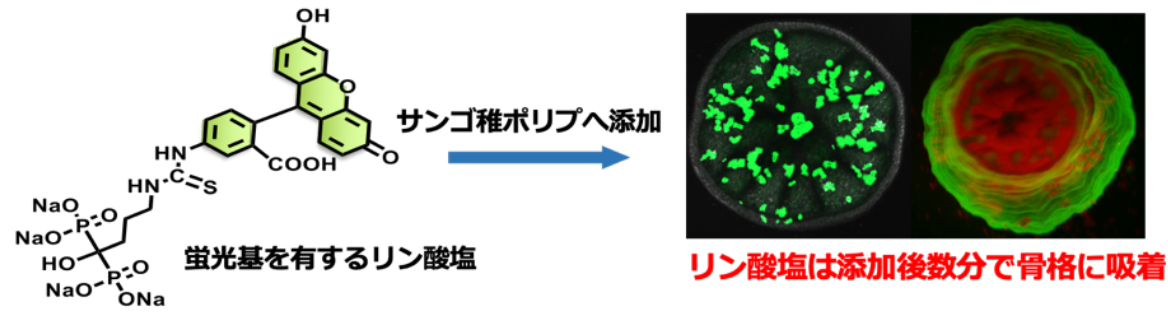


図3.21 蛍光基を有するリン酸塩を飼育海水に添加したサンゴ稚ポリプの蛍光顕微鏡写真。

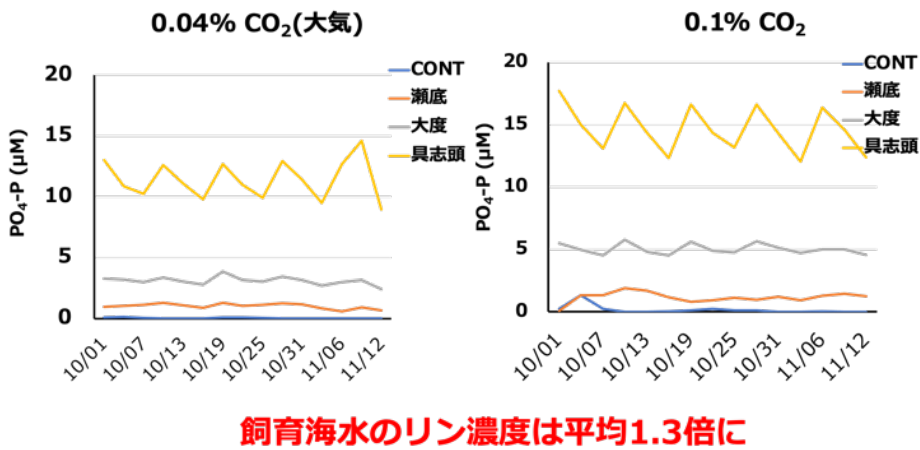
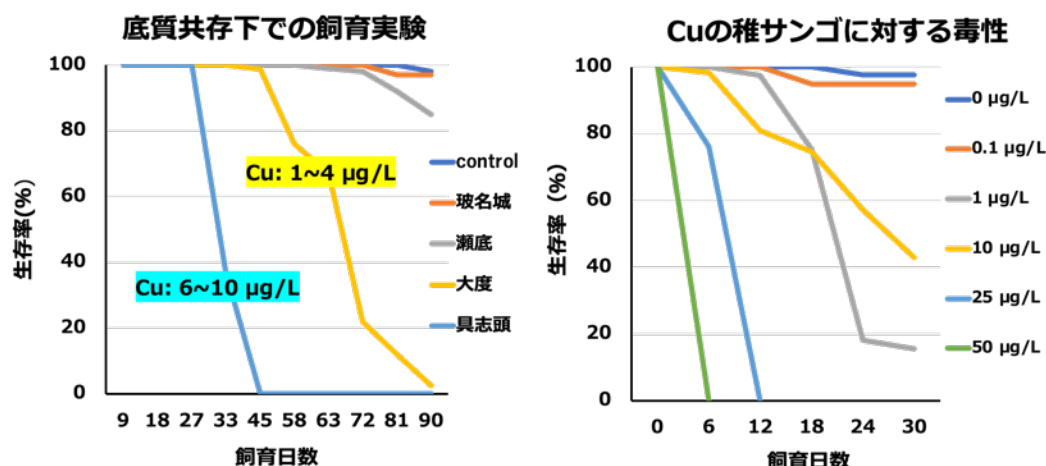


図3.22 複合ストレス実験で底質から海水に溶出したリン酸塩濃度の推移。

図3.18に示した様に、底質共存下での飼育実験では30日後以降稚サンゴの生残率が低下することが分かった。そこで、飼育海水中の重金属を調べたところ、水生生物に毒性を示すCuが具志頭と大度海岸で他の地点に比べて高く検出された（図3.23）。そこで、Cuの稚サンゴに対する毒性試験を行ったところ急性毒性LC50（3 day）は33 μg-Cu/Lであったが、慢性毒性LC50（30 day）は1～10 μg-Cu/Lの範囲であった。慢性毒性がでるCu濃度は飼育海水中のCu濃度と一致しており、底質共存下での稚サンゴの生残率低下の要因になっていることが示唆される。沖縄島南部沿岸で採取して底質から蓄積型栄養塩と同条件で溶出してくるCuを測定したところ生残率が高い具志頭海岸が平均8 μg-Cu/Lと高かったが、他の海岸でも3～4 μg-Cu/L程度であり、サンゴへの慢性的な影響が懸念される（図3.24）。



底質共存下での飼育実験で生存率が低下するのはCuが原因？

図3.23 底質から飼育海水に溶出したCuの濃度と稚サンゴに対するCu暴露実験。

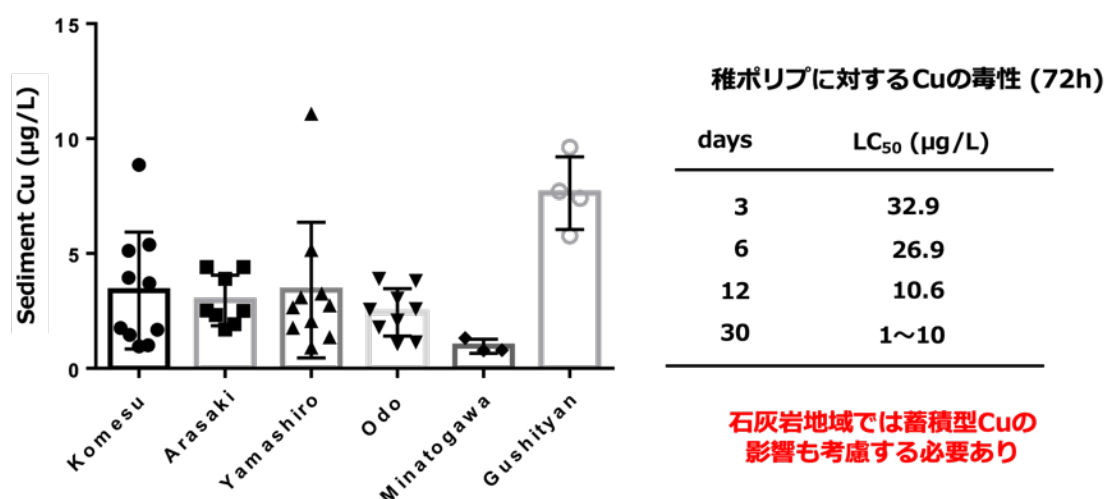


図3.24 各海岸の底質から飼育海水に溶出したCuの濃度と稚サンゴに対するCu毒性。

コユビミドリイシサンゴ成体の共生細菌叢解析および発生初期段階のサンゴ幼生の共生細菌叢を16S rRNA遺伝子領域を標的としたアンプリコンメタゲノム解析により検証した。また、研究室内での稚ポリプの長期飼育が細菌叢にどのような影響を及ぼすかを検証した。サンゴのプラヌラ幼生に対して、サンゴから単離した*Endozoicomonas*属および*Vibrio*属細菌を用いた細菌感染実験を行った。また、褐虫藻を共生させた稚ポリプと共生させていない稚ポリプに対して同様に細菌感染実験を行い、*Endozoicomonas*属細菌の共生成立メカニズムについて検証した。サンゴ成体の細菌叢は*Endozoicomonas*属細菌が70%を占めることが確認できた一方、未受精卵、受精卵、初期胚、飼育海水からは*Endozoicomonas*属細菌は検出されなかった(図3.25)。また、発生初期段階はGammaproteobacteria綱の細菌が優占化していたので飼育海水の影響を受けたものと考えられる(図3.26)。研究室内において長期飼育した稚ポリプでは、共生細菌叢はGammaproteobacteria綱からAlphaproteobacteria綱へと徐々に変化していくことが明らかとなった。飼育に用いた小笠原天然海水は非常に貧栄養な海水で、Alphaproteobacteria綱の細菌比率が高く、その影響を受けて長期飼育した稚ポリプはAlphaproteobacteria綱が優占する細菌叢へと変化したと推定できる。稚ポリプにおいて細菌叢は安定せず、飼育海水の影響を強く受けることが明らかとなった。ストレス応答実験に稚ポリプを用いることは難しいことが明らかとなったが、稚ポリプはサンゴ成体と比較して周辺海水の細菌の影響を強く受けることが新たに明らかになった。プラヌラ幼生

では、*Vibrio*属細菌は容易に感染が確認できた一方、*Endozoicomonas*属細菌の感染は確認できず、単に環境中に存在するだけでは共生は成立しなかった（図3. 27）。稚ポリプに対する曝露実験では、褐虫藻と共生した稚ポリプでのみ*Endozoicomonas*属細菌が5%程度の存在比で感染が確認できた（図3. 28）。褐虫藻非感染の稚ポリプでは*Endozoicomonas*属細菌を曝露しても感染は確認できなかったことから、感染成立には褐虫藻の共生が不可欠であることが明らかとなった。

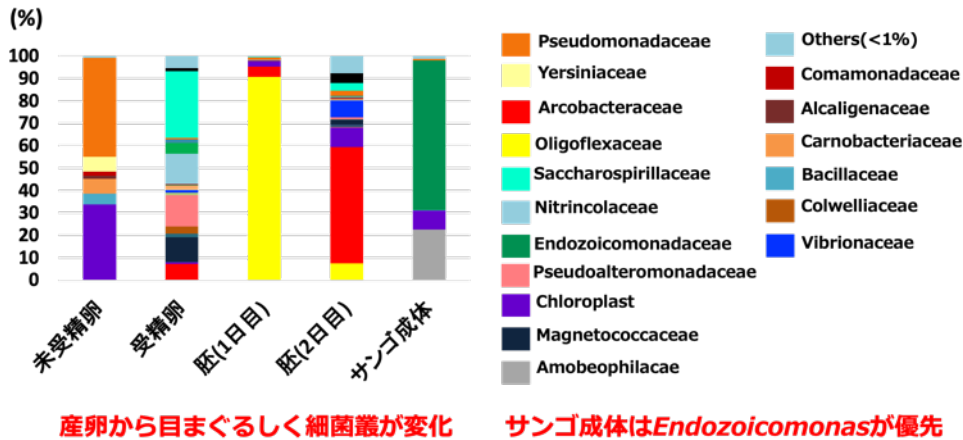


図3. 25 サング受精卵からの成長段階ごとの細菌叢解析-科レベル。

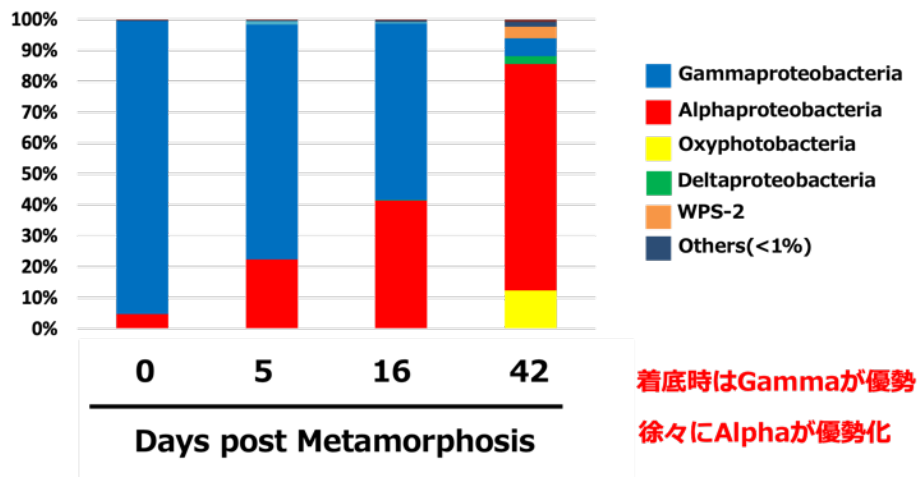


図3. 26 稚サングの室内飼育に伴う細菌叢の変化-綱レベル。

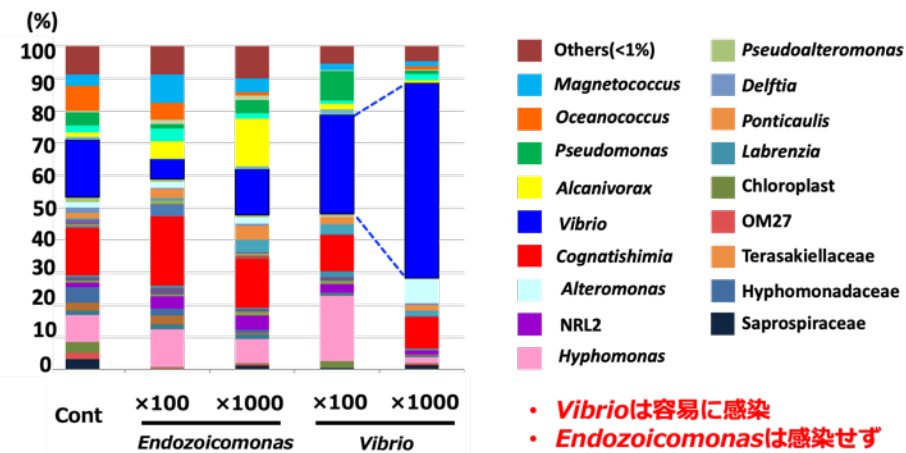


図3. 27 稚サングの室内飼育に伴う細菌叢の変化-綱レベル。

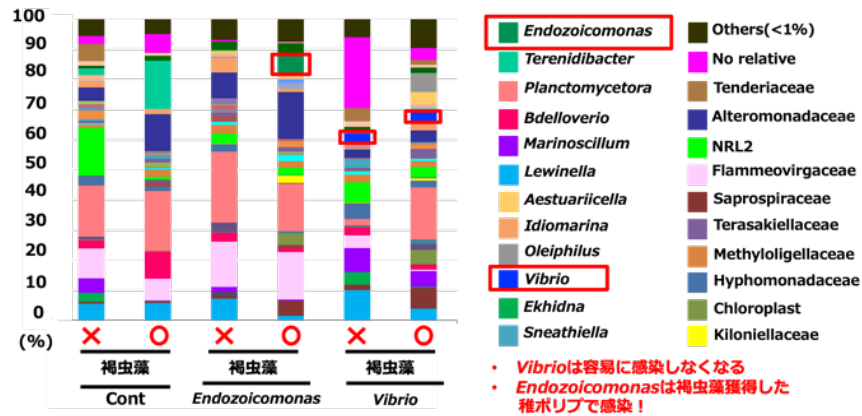


図3.28 稚サンゴへの細菌感染実験-褐虫藻の共生による細菌叢の変化-属レベル。

コユビミドリイシ・エダコモンサンゴの成体サンゴ片を用いて高水温・高 pCO_2 負荷を行った飼育実験前後の褐虫藻組成解析を、次世代シーケンサーとSymPortalパイプラインを用いて行った。その結果、サンゴ体内に共生する褐虫藻の詳細な組成情報を把握することに成功した。高水温・高 pCO_2 の複合ストレス、栄養塩ストレス後のサンゴ片のITS2配列組成・DIVs組成のどちらにおいても、種間で明瞭な組成差が見られた。種内での褐虫藻組成に着目すると、両サンゴ種において処理区間での差異は見られなかった。

リン酸塩の負荷量を加味した飼育実験の稚サンゴ格は、負荷の大きさに応じた顕著な骨格形成の阻害が見られた。X線マイクロCTを用いた稚サンゴ骨格の石灰化評価法を検証したところ、リン酸塩に曝露された稚サンゴ骨格は表面だけでなく内部骨格にも激しい凹凸が確認でき、骨密度も著しく減少していることが明らかになった（図3.29）。電子顕微鏡でも同様の变化傾向が確認された。また、X線CT観察は成体サンゴではサイズが大きく、更に容易に実施できたため、今後野外でのサンゴ骨格形成の健全性評価にも応用できることが期待される。また、稚サンゴを用いた窒素負荷実験においては、褐虫藻有・ NH_4Cl 処理における石灰化の低下が顕著であった（図3.30）。この結果から、リン酸だけでなく、窒素負荷も、サンゴ骨格形成に直接的に影響を及ぼしうることが明らかとなった。

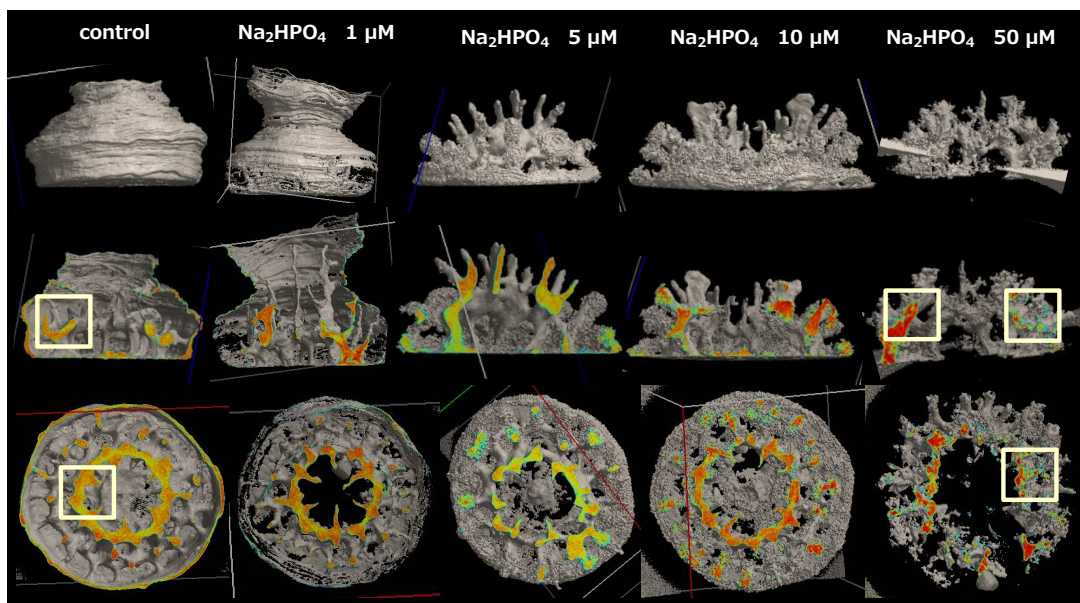


図3.29 異なるリン酸塩濃度で飼育した稚サンゴ骨格のX線マイクロCTによる形態観察の結果。

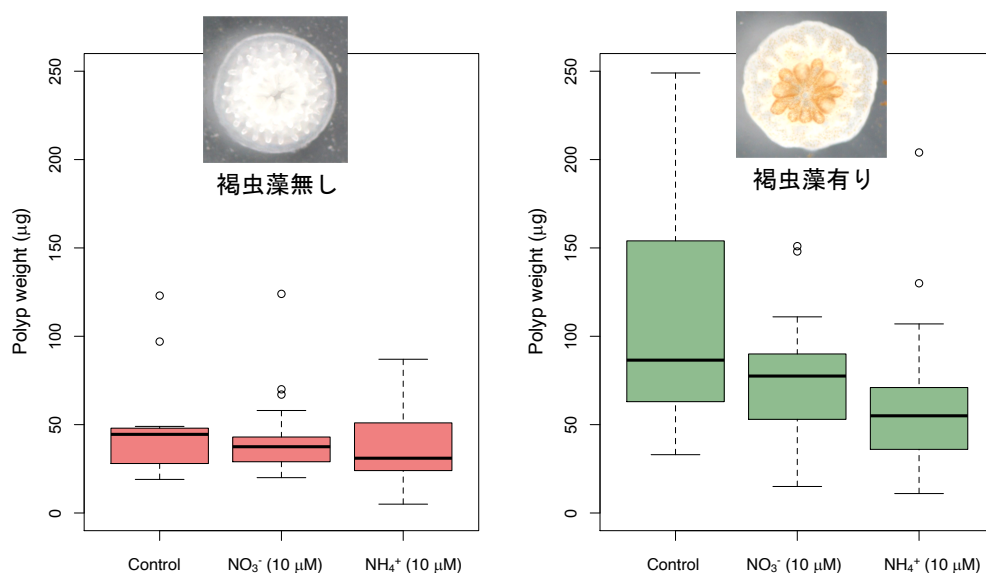


図3.30 褐虫藻有り無しポリプを用いた窒素負荷処理における石灰化評価。縦軸はポリプ重量、横軸は各処理区を示す。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ3では、各地域で採取された底質を篩分けし、粒径を揃えた底質を海水に浸漬し、底質に吸着したリン酸塩（蓄積型栄養塩）の測定法の開発を行った。蓄積型栄養塩は月変動が見られるものの表層海水と比較するとより長い期間の陸域負荷を評価することができる。沖縄島南部地域を調査対象地域とし、蓄積型栄養塩の比較と共に、稚サンゴの加入量との関係を検証した（図3.8）。その結果、地下水や河川の影響を受けやすい地点では蓄積型栄養塩の値は高く、これらの地点の底質と共に稚サンゴを飼育すると顕著に骨格形成が阻害されることが明らかになった。稚サンゴ加入量とも高い相関があることも分かった。石西礁湖での蓄積型栄養塩の調査からもエビ養殖や畜産の影響を受けている箇所を可視化することに成功した。表層海水のリン酸塩濃度は検出限界外であっても、蓄積型栄養塩を調べることでこれまで見る事が出来なかった陸域負荷の実態把握が可能となった。飼育実験では、粒径を揃えた各地の底質をシャーレに敷き詰めた後、海水で満たし、稚サンゴを海水や底質を交換しながら40日間飼育した。各地の底質存在下で飼育した稚サンゴの石灰化率を算出し、海水に溶出したリン酸塩濃度との相関関係を調べた。その結果、底質から溶出したリン酸塩は多いところで約15 $\mu\text{mol/L}$ と高濃度であり、石灰化率とは負の相関関係があることが明らかになった。複合ストレス実験では高 CO_2 条件下で稚サンゴの骨格形成が阻害されることが明らかになった（図3.19）。稚サンゴでは骨格が小さくなりすぎて検出は難しかったが、海水と生体アミンであるポリアミンを利用した石灰化反応を利用し炭酸カルシウム形成への影響を検証したところ、高 CO_2 条件下でのリン負荷の影響を $\text{PO}_4\text{-P:0}\sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の範囲で検出することができた。高 CO_2 条件ではリン負荷の影響はより強くでることが分かった（図3.20）。リン酸塩の結晶形成阻害は、 CaCO_3 結晶表面吸着によるものであるため、結晶が小さくなるとリン酸塩の結晶形成阻害はより大きくなると考えられる。底質から海水に溶出したリン酸塩濃度は0.04%に比べて0.1% CO_2 では平均で1.3倍高くなることが分かった（図3.22）。底質と共に飼育を開始してから30日以降に稚サンゴの生残率が低下することが分かった。飼育海水中の重金属を調べたところ、水生生物に毒性を示すCuが具志頭と大度海岸で他の地点に比べて高く検出された（図3.23）。慢性毒性がでるCu濃度は飼育海水中的Cu濃度と一致しており、底質共存下での稚サンゴの生残率低下の要因になっていることが示唆される。沖縄島南部沿岸でも蓄積したCuのサンゴへの慢性的な影響が懸念される（図3.23, 3.24）。

コユビミドリイシサンゴ成体の共生細菌叢解析および発生初期段階のサンゴ幼生の共生細菌叢を16S rRNA遺伝子領域を標的としたアンプリコンメタゲノム解析により検証したところ、サンゴ成体の細菌叢は*Endozoicomonas*属細菌が70%を占めることが確認できた一方、未受精卵、受精卵、初期胚、飼育海水からは*Endozoicomonas*属細菌は検出されなかった（図3.25）。また、発生初期段階はGammaproteobacteria

綱の細菌が優占化していた。研究室内での稚ポリプの長期飼育が細菌叢にどのような影響を及ぼすかを検証したところ、研究室内において長期飼育した稚ポリプでは、共生細菌叢はGammaproteobacteria綱からAlphaproteobacteria綱へと徐々に変化していくことが明らかとなった。稚ポリプにおいて細菌叢は安定せず、飼育海水の影響を強く受けることが明らかとなった（図3.25）。ストレス応答実験に稚ポリプを用いることは難しいことが明らかとなったが、稚ポリプはサンゴ成体と比較して周辺海水の細菌の影響を強く受けることが新たに明らかになった。プラヌラ幼生では、*Vibrio*属細菌は容易に感染が確認できた一方、*Endozoicomonas*属細菌の感染は確認できず、単に環境中に存在するだけでは共生は成立しなかった。稚ポリプに対する曝露実験では、褐虫藻と共生した稚ポリプでのみ*Endozoicomonas*属細菌が5%程度の存在比で感染が確認できた。褐虫藻非感染の稚ポリプでは*Endozoicomonas*属細菌を曝露しても感染は確認できなかったことから、感染成立には褐虫藻の共生が不可欠であることが明らかとなった（図3.26）。また、次世代シーケンサーによる成体サンゴの褐虫藻組成の把握と、X線CTによる詳細な骨格形態評価を確立し、リン酸塩暴露を受けた際にサンゴ骨格が顕著に変化することを明らかにした（図3.29）。

本サブテーマの成果の一部が論文として査読付国際誌に掲載され、プレスリリースも実施した。また、本サブテーマで確立した手法の社会実装も進んでいることから、目標を大きく上回る成果をあげたと評価できる。

6. 引用文献

1. Iijima, M., Yasumoto, J., Iguchi, A., Koiso, K., Ushigome, S., Nakajima, N., Kunieda, Y., Nakamura, T., Sakai, K., Yasumoto-Hirose, M., Mori-Yasumoto, K., Mizusawa, N., Amano, H., Suzuki, A., Jimbo, M., & Yasumoto, K. (2021). Phosphate bound to calcareous sediments hampers skeletal development of juvenile coral. *Royal Society open science*, 8(3), 201214.
2. Yasumoto K, Yasumoto-Hirose M, Yasumoto J, Murata R, Sato S, Baba M, Mori-Yasumoto K, Jimbo M, Oshima Y, Kusumi T, Watabe S. (2014). Biogenic polyamines capture CO₂ and accelerate extracellular bacterial CaCO₃ formation. *Marine Biotechnology*, 16, 465-474.
3. Iijima, M., Yasumoto, K., Yasumoto, J., Yasumoto-Hirose, M., Kuniya, N., Takeuchi, R., Nanba, N., Nakamura, T., Jimbo, M., & Watabe, S. (2019). Phosphate enrichment hampers development of juvenile *Acropora digitifera* coral by inhibiting skeleton formation. *Marine biotechnology*, 21(2), 291-300.
4. Iijima, M., Yasumoto, J., Mori-Yasumoto, K., Yasumoto-Hirose, M., Iguchi, A., Suzuki, A., Mizusawa, N., Mitsuru Jimbo, Shugo Watabe, & Yasumoto, K., (2022) Visualisation of phosphate in subcalicoblastic extracellular calcifying medium and on a skeleton of coral by using a novel probe, fluorescein-4-isothiocyanate-labelled alendronic acid, *Marine Biotechnology*, in press.

Ⅱ－４ 統合的統計モデリングによる複合ストレス影響の解析・予測方法の開発と適用

国立研究開発法人 国立環境研究所

気候変動適応センター

研究員 熊谷 直喜

高度技能専門員 林 文 (R2.8～R3.1、R3.4～R4.2)

高度技能専門員 瓜生 真也 (R3.5～R3.9)

アシスタントスタッフ 木田 弥生 (R4.1～2)

〔要旨〕

複合環境ストレス影響のモデリング技術構築のため、サンゴ白化の過去調査記録および多数のGIS環境変数を整備し、正則化多変量解析によってサンゴ白化に影響する環境指標群を絞り込み、将来の白化確率を予測するモデルを構築した。集水域と土地利用データを用いた陸域負荷の地図化に関しては、主に農地や畜産の負荷に着目し約50%弱の説明力をもつモデルの構築により、沖縄本島全域について底質蓄積リン酸濃度の推定値地図を得た。これにより多くの沿岸において蓄積リン酸の目標閾値と考えられる $3\mu\text{M}$ を上回ることがわかった。また、他サブテーマの野外調査・室内飼育実験・遺伝子発現の結果を、将来気候における地図上へ可視化するための技術開発を行った。これにより、気候変動のもとで陸域負荷を軽減する適応策を施した場合のサンゴ成長などについての予測値を得ることができ、今後の気候変動・土地利用の適応策を検討する上で有用な判断材料になると期待できる。

1. 研究開発目的

海水温上昇、 CO_2 濃度上昇および陸域負荷増大に伴う複合ストレスによるサンゴの白化や成長への影響を琉球列島中心部の広域において推定・将来予測を行うために、過去の調査記録やGIS環境変数、さらに他サブテーマによる野外調査・飼育実験・遺伝子発現のデータをつなぎ合わせた統合統計モデルを構築する。

2. 研究目標

モデリングに必要となる環境要因データ（特に栄養塩類・クロロフィル量）の収集・整理を進める。飼育実験で得られたサンゴ石灰化と環境要因のデータを解析してモデル式の構築を進める。環境要因については、海水温、炭酸カルシウム飽和度、クロロフィル量、地形等の陸域に関する特徴量等を説明変数として加え、各地域の環境要因の類似性・異質性評価につなげる。作成された統合モデルにより、複合ストレスによる石灰化能を琉球列島中心部について推定し、地図上に投影・可視化する。また、変数をIPCCシナリオに沿って変化させることで、今後の変化予測を行う。

3. 研究開発内容

サンゴ群集の持続性を評価するためには、人為的気候変動に伴う海水温の上昇のような広域的な影響に加えて、陸域からの流入や沿岸生態系に由来するような海水中に溶存・懸濁する物質濃度などによる影響¹⁾を複合的に解析する必要がある。そのような広域・地域的な環境負荷によるサンゴへの影響として視覚的に認識しやすく、観察事例が豊富な現象のひとつがサンゴの白化である。また、海水温のほか、海水中の陸域関連の環境変数として濁度やクロロフィルa濃度等については、衛星観測のリモートセンシング画像の分析によるデータが利用可能である。これらの環境指標は時間的に大きく変動するため、白化との関連を調べる上でどのような代表値（平均・最大など）を選択すべきかが課題である。また、単一の指標では不十分ならば、複数の環境指標の組み合わせと白化の関連を調べる多変量解析も利用しうるが、環境変数間に強い相関関係があると数学的に関係性が解けなくなる多重共線性の問題が解析の妨げとなってきた。しかし近年、こういった関連し合う多数の変数を含む解析において、変数間の

多重共線性を解決（正則化）しつつ同時に変数選択を行うことでデータ数の節約も可能なSparse modeling手法（仮に、以下“正則化多変量解析”と呼称）が活用され始めている。そこでサブテーマ4では、今後他サブテーマから得られるデータと、それらの広域的な衛星観測データを対応づけることを想定し、サンゴ群集の存続性を広域的に評価するためのデータ収集・整備・正則化多変量解析を用いた予備解析を行った。正則化多変量解析としては、Horseshoe事前分布を用いたBayesian Sparse modeling手法²⁾を適用した順位回帰モデル（Ordered logit model）を選択した。この方法は変数選択の識別が明確になり、さらに変数の重み付け（回帰係数）の推定精度も高いというメリットがある。

サンゴ白化・白化による死亡の記録として、おもに環境省モニタリングサイト1000の報告書による公開記録を整備して用い、その他データ数の多い順に、市民参加型のサンゴ調査プロジェクト「日本全国みんなで作るサンゴマップ（<http://www.sangomap.jp>）」、国立環境研のサンゴモニタリング等のデータを、解析に使用可能なデータ形式に整備した。さらに空間バイアスを減少させるため、毎年の1 km グリッド毎に白化最大の1データに制限する処理を施した。基本となる積算水温ストレスによる白化指標としてKumagai et al.³⁾で開発した1 km解像度のDegree Heating Weeks (DHW)⁴⁾を計算し、毎年の最大値を求めた。水温に関してはさらに、高温ストレスの緩和であるDegree Cooling Weeks (DCW) や水温の年変動、月変動を計算した。栄養負荷に関連する指標としては、全国の海岸線や河川河口からの距離など陸域に関する変数や、米国海洋大気庁NOAA観測によるクロロフィルa濃度や消散係数から複数段階の分位点および変動、長期平均、その他、紫外線照射量、流速を計算し解析に用いた。

陸域負荷による地域的影響の広域地図上への可視化に関しては、海水温や溶存CO₂濃度のようなGIS変数が公開されているデータと異なり、一般配布されているデータが存在しない。このため複数タイプのGIS情報や解析・モデリングを組み合わせつつ技術開発により作り出す必要があった。ここでは、サブテーマ2による沖縄本島南部における野外観測の底質蓄積リン酸値の空間分布と、土地利用分類との対応関係のモデルを構築し、推定蓄積リン酸値を沖縄本島全域の地図へと拡張するGIS変数を次の手順で作成した。（1）沖縄本島の標高データを用いて、ESRI社ArcGIS Proの水門解析ツールにより、河川ネットワークと集水域のGIS変数を作成した（図4.1）。沿岸へ流れ込む小規模な河川をすべて抽出するためには、一般的な標高データでは観測誤差が大きいため、グリッドセル間の流向の整合性が取れない問題がある。また小規模な河川の流路は、国土数値情報の河川データなどでも十分に記述されていない。このため、本研究ではこれらの誤差を軽減し整合性を高めたデータである、日本域表面流向マップ(J-FlwDir:Japan Flow Direction)⁵⁾の地表高データを用いた。（2）集水域毎に、農地や畜産、自然植生といった陸域負荷源の面積を集計した。これらの土地利用データは、沖縄県土地利用現況図

（<http://gis.pref.okinawa.jp/pref-okinawa/Portal>）から抽出した。（3）各集水域の海岸線との接点を流出ポイントとみなし、流出ポイントから海側へとInverse distance weighting法による空間補間を適用することにより、沿岸海域における陸域負荷のGIS変数を開発した。（4）サブテーマ2による沖縄本島南部の底質蓄積リン酸値データが取得されている地点について、（3）で得られた陸域負荷のGIS変数の値を抽出し、両者の対応関係が線形に漸近するように、土地利用の農地の重み付けを変化させつつ回帰分析を行った。農地は肥料の施肥が行われるため、自然植生と比べてリン酸などの非常に大きな陸域負荷源となっていると期待される。このため、農地の重み付けを1～1000倍まで変化させつつ、最適な重み付け値の推定を行った。

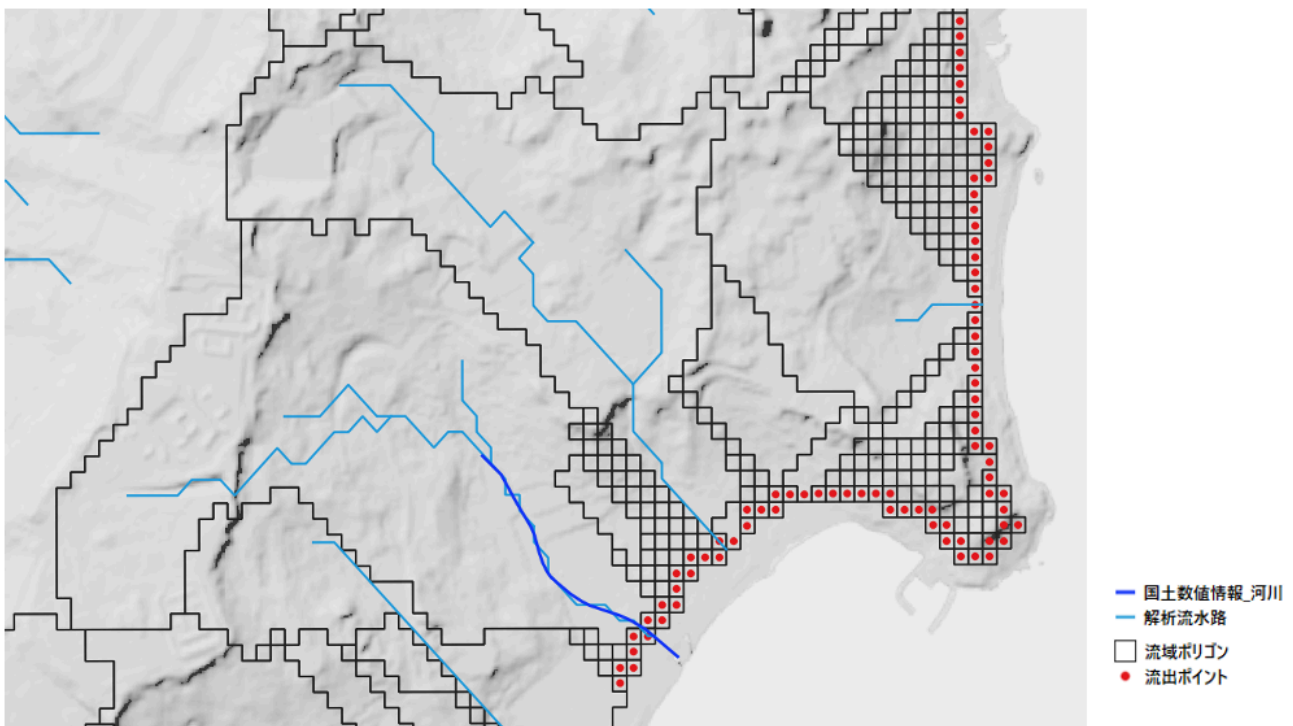


図4.1 水門解析ツールにより特定された沖縄本島南東部における集水域と推定された河川流水路。小河川の多くが国土数値情報の河川データには記載されていないことが分かる。

次に、他サブテーマの野外調査・室内飼育実験・遺伝子発現の結果を、将来気候における地図上へ可視化するための技術開発を行った。野外調査・室内飼育実験・遺伝子発現では水温上昇や溶存 CO_2 濃度 ($p\text{CO}_2$) の増大、リン酸塩濃度の増大によるサンゴ初期成長の阻害 (Iijima et al. 2019 Mar. Biotechnol.) といった、広域の気候変動影響に加え、陸域からの流入負荷のような地域的な環境変化が影響しうる。これらの複合環境ストレス影響を評価・予測するには、野外調査・室内飼育実験による影響メカニズムの検証からモデリングによる地理的スケールの予測投影へと連結する技術開発が必要となる。ここではサブテーマ1～3による野外調査・室内飼育実験のデータを統合的に解析し、データの標準化などを通じ、将来気候モデルの出力値と対応づけることによって、サンゴ初期成長における石灰化速度を将来の地理的分布へと予測投影した。

将来気候モデルの水温と $p\text{CO}_2$ の出力値としては、Miroc-ESM-CHEMモデル⁶⁾のものを扱い、現在気候と21世紀末のRCP2.6およびRCP8.5シナリオ（温室効果ガス削減、および成り行きシナリオに相当）における値を抽出・整備した。モデル出力値にはモデルバイアスが含まれているため、グリッドセルごとにリモートセンシング観測の気候値（5 km 解像度のCoralTemp、および1 km解像度のMUR SST、MODIS衛星観測の4 km解像度Chla、8 km解像度HYCOMモデルの塩分出力値：Skirving et al.⁷⁾；JPL MUR MEaSUREs Project 2015; <http://modis.gsfc.nasa.gov/data/dataproduct/>; <https://hycom.org/dataserver/gofs-3pt0/analysis/>）との差分を追加することによって、このバイアスを補正しつつ統計学的ダウンスケーリングを行った（バイアス補正・統計学的ダウンスケーリング手法の詳細：Kumagai et al.³⁾）。これらのバイアス補正済みの水温と $p\text{CO}_2$ の将来気候値を琉球列島について整備した（図4.2）。さらに、ここまでに作成した底質蓄積リン酸濃度の推定値地図を、気候変動・地域環境影響の複合効果のモデルに適用することによって、将来気候において地域環境ストレスを増大・軽減したシナリオのもとで、サンゴの生存率や成長率がどのように変化するかを将来予測できる解析プロセスを構築できた。

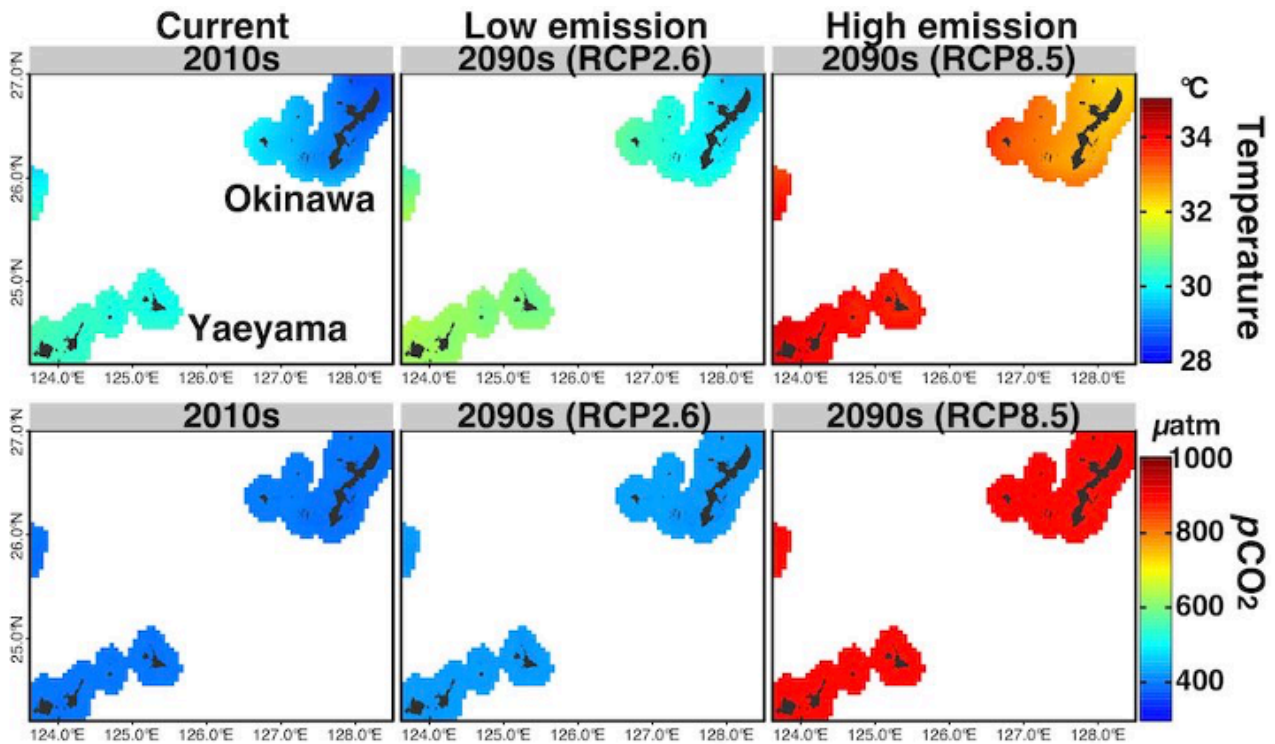


図4.2 現在気候・21世紀末の将来気候におけるRCP2.6およびRCP8.5シナリオ（温室効果ガス削減、および成行きシナリオに相当）の海表面水温・溶存CO₂濃度のバイアス補正済み統計的ダウンスケーリング値

4. 結果及び考察

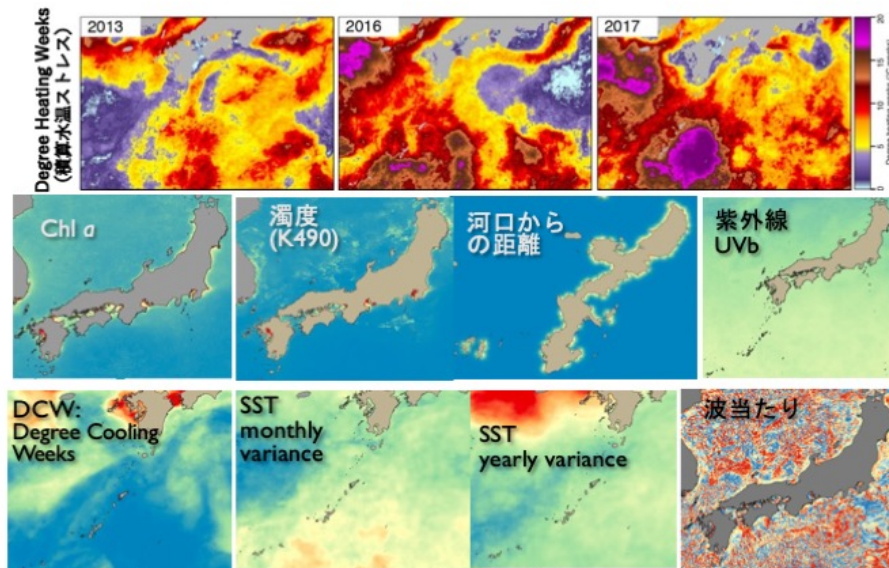
サンゴ白化に影響する広域・地域的な複合要因影響に関しては、広域・地域的な環境負荷要因の環境指標のデータセットの構築（図4.3）と、サンゴ白化に影響する環境指標の絞り込みに成功した（図4.4）。正則化多変量解析によって、応答変数と関連の強い変数は標準化回帰係数が0より大または小となり、逆に関連の弱い変数は回帰0の周辺に落とし込まれることで変数選択がなされる²⁾。解析の結果、使用した29環境変数のうち6変数の95%信用区間が0より大または小となった（図4.4）。関連の大きさの指標となる標準化回帰係数の大きさは、DHWが最大であり次に濁度の長期平均が大きく、白化の発生と関連する要因であることが示された。DHWは主要な白化指標であり、濁度もまた陸域負荷と関連して白化に繋がる地域的要因である¹⁾。一方、DHW履歴と水温年変動、河川、クロロフィルa濃度変動の回帰係数は負となり、これらは白化率の低下と関連する要因であることが示された。過去の過剰水温の履歴や水温の年変動が白化率を低下させることは先行研究によっても支持されている⁸⁾。しかし、クロロフィルa濃度変動や河川との関連は明確な解釈が難しい。クロロフィルa濃度変動は高頻度の植物プランクトン回転率や海水の入れ替わりと関連するかもしれない。また、河川影響は白化を増大させるとなると期待されたが、結果は逆であった。気候変動影響下においては、程々の濁りは強い日射を遮ることによって白化を軽減させる効果があることが解析的に示されている⁹⁾。このため、このような最適値が存在する効果をモデルに組み込む必要があるだろう。また、河川影響については単純に河口からの距離を基準にした指数であり、河川のサイズ・流量なども考慮していない。このため、陸域の影響を示す指数については次に行った集水域解析によって改定した。構築されたモデルへと2013、2016、2017年の環境変数の衛星観測データを適用することによって、沖縄県下のサンゴ白化ランクの推定地図を構築し、観測された白化被度と概ね合致する結果が得られた。この推定において、濁度を観察値（100%）と75%へと減少させた場合との差分を計算することによって、白化への濁りの推定影響の地理的な可視化にもつなげた（図4.5）。

集水域と土地利用データを用いた陸域負荷の地図化に関しては、農地や畜産の負荷を自然植生の1～1000倍まで変化させつつ、負荷の海岸線における値から野外観測の蓄積リン酸値を推定する回帰モデ

ルを構築したところ、負荷を100倍としたときに約50%弱の説明力をもつモデルが得られた（図4.6）。このモデリングによって、陸域負荷のGIS変数は底質蓄積リン酸濃度の推定値として用いることができるようになった。沖縄本島全域について推定地図を構築したところ、多くの沿岸において蓄積リン酸の目標閾値と考えられる $3\mu\text{M}$ を上回ることがわかった（図4.7）。ただし、この推定は地表面における集水域から陸域負荷を推定しており、サブテーマ2で解析している地下水脈の影響は考慮できていない。しかし地下水域の多い沖縄本島南部においても、地表面の標高分布は地下構造と大きく乖離することはない（図4.7）。今後より多くの沿岸海域の蓄積リン酸値データを追加したモデリングによって推定モデルを改良することで、より広域の陸域負荷の推定地図を高精度で得られるようになると期待できる。

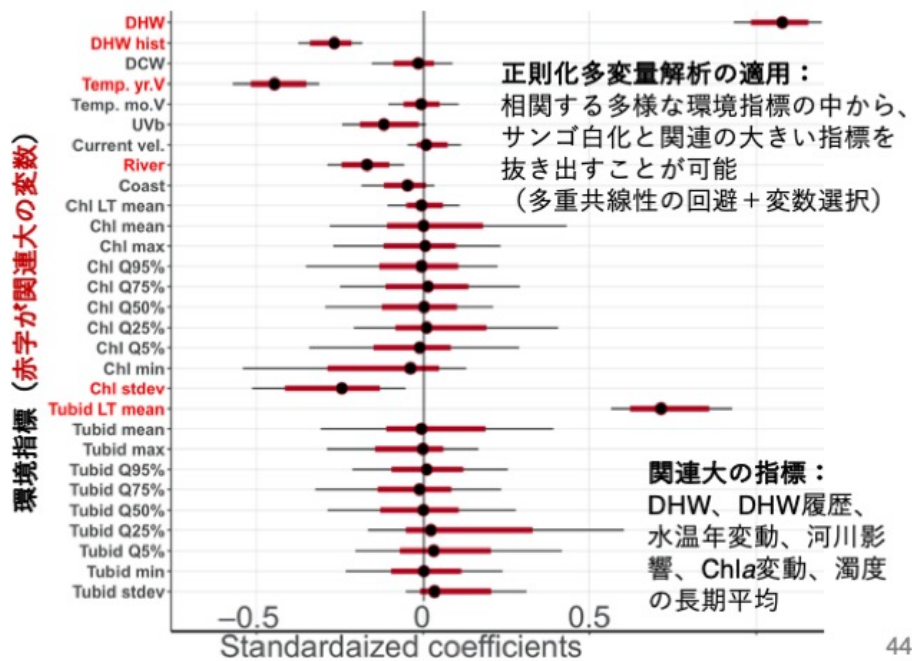
複合ストレスによるサンゴの初期成長への影響に関しては、室内実験データを統合的に解析し、将来気候モデルの出力値と対応づけることによって、サンゴ初期成長における石灰化速度を将来の地理的分布へと予測投影した。室内実験データの解析では、*Acropora digitifera*の褐虫藻無しのポリブを対象とした。現在から将来（RCP2.6、RCP8.5）にかけての環境変化を想定し、水温を $27\sim 33^{\circ}\text{C}$ の4段階、 $p\text{CO}_2$ を $300\sim 1000\mu\text{atm}$ の4段階に変化させた。リン酸塩濃度については、沖縄本島で観測されている濃度のレンジを網羅する $0\sim 50\mu\text{M}$ の6段階に対する石灰化速度データを用いた。 $p\text{CO}_2$ とリン酸塩濃度は無機的には独立と見なせるため、サンゴ初期成長については、交互作用は考慮しなかった。これら3要因の複合ストレス応答を標準化することで統合した多変量モデルを解析した。その結果、石灰化速度は、水温に対しては最適値をもつ山型の応答パターンを示し、 $p\text{CO}_2$ の増大に対しては単調減少、リン酸塩濃度の増大に対しては指数関数的な減少を示した（図4.8）。

さらに、集水域解析より得られた推定蓄積リン酸値と将来水温・ $p\text{CO}_2$ の値を複合影響モデルに適用することにより、稚サンゴの石灰化速度の将来予測モデルを構築した。その結果、蓄積リン酸が水温や $p\text{CO}_2$ の影響を大きく上回ることがわかり、気候シナリオRCP8.5の21世紀末においても、リン酸濃度が $1/5$ になれば、現在よりも石灰化速度が大きいという予測結果が得られた（図4.9）。さらにサブテーマ1でリン酸塩と $p\text{CO}_2$ の複合影響が見られた骨の有機基質であるGalaxin・MAM遺伝子のTPM（遺伝子発現量）と蓄積リン酸濃度の関係のモデル式を構築し、これを同様に沖縄本島地図へと可視化した（図4.10、4.11）。Galaxinについてはリン酸濃度により増減するものの、 $p\text{CO}_2$ 濃度の増加による負の影響が大きい予測となった（図4.10）。MAMについてはリン酸濃度影響がGalaxinと比べて小さく、RCP8.5の $p\text{CO}_2$ 濃度でとくに悪化する予測となった（図4.11）。このように野外調査・室内実験・遺伝子分析の結果をGISモデルへと関連付け、サンゴへの気候変動・地域環境ストレスの複合影響を推定・予測する体制を構築することができた。このような解析により、複合環境ストレスとサンゴ生存環境の関連がより明確になれば、今後の土地利用管理計画を検討する上で有用な判断材料になると期待できる。



- 陸域負荷と海洋のパラメータとの関連性の向上
- 蓄積型栄養塩データ及び飼育実験データを組み込んだ解析を今後実施予定

図4.3 統合的統計モデリングによる複合ストレス影響評価に向けたデータセット構築。



44

図4.4 多面的な環境指標の探索。

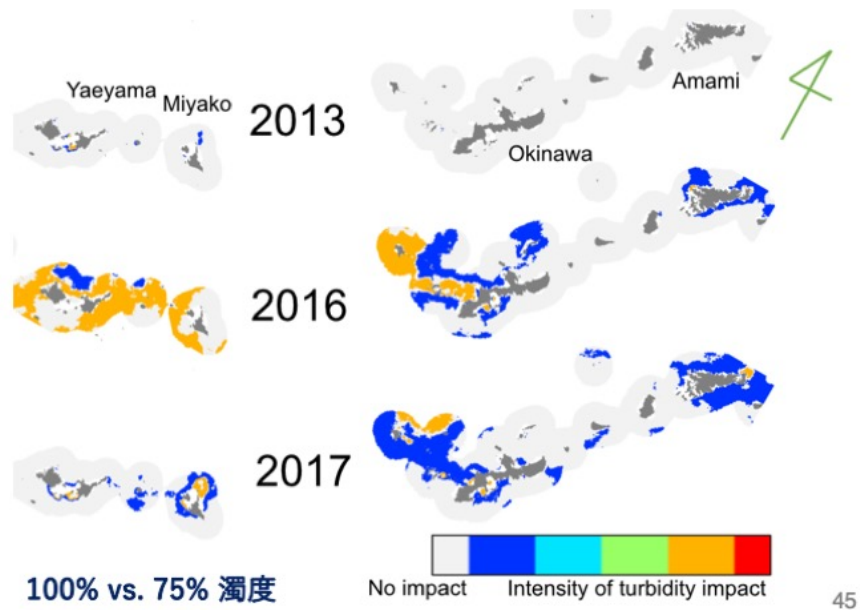


図4.5 白化への濁りの推定影響。

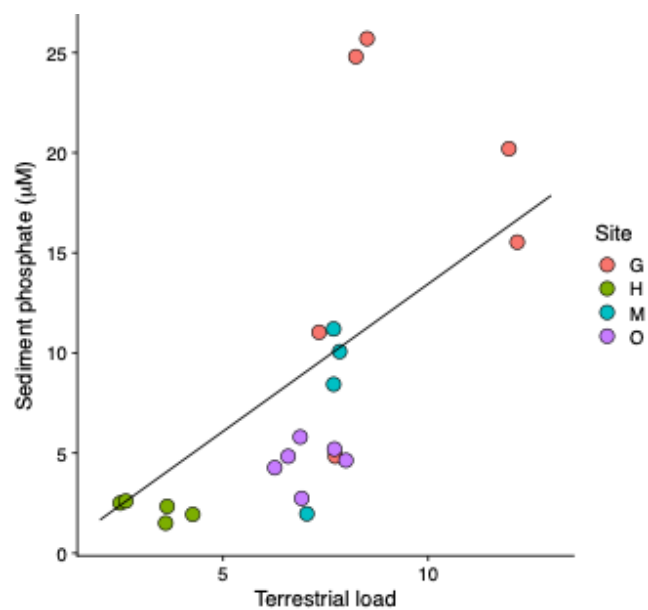


図4.6 沖縄本島南部における蓄積リン酸観測値 (Sediment phosphate) と集水域と土地利用解析から推定した推定リン酸値 (Terrestrial load) の関係 (G: 具志頭、H: 玻名城、M: 港川、O: 大渡)。

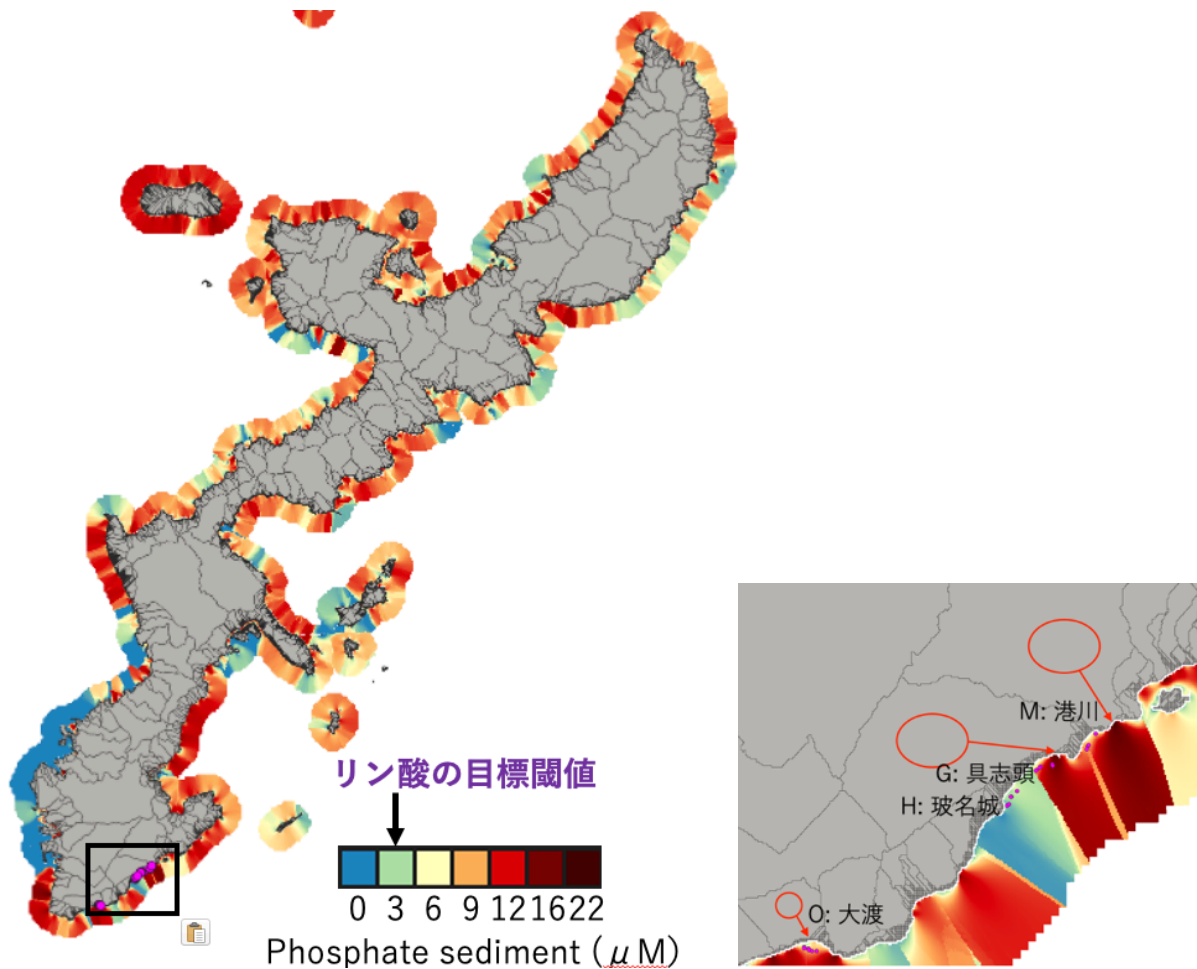


図4.7 集水域解析と土地利用解析より求めた蓄積リン酸値の推定地図。左：沖縄本島全域、右：本島南部の拡大図（全域図の枠内）。

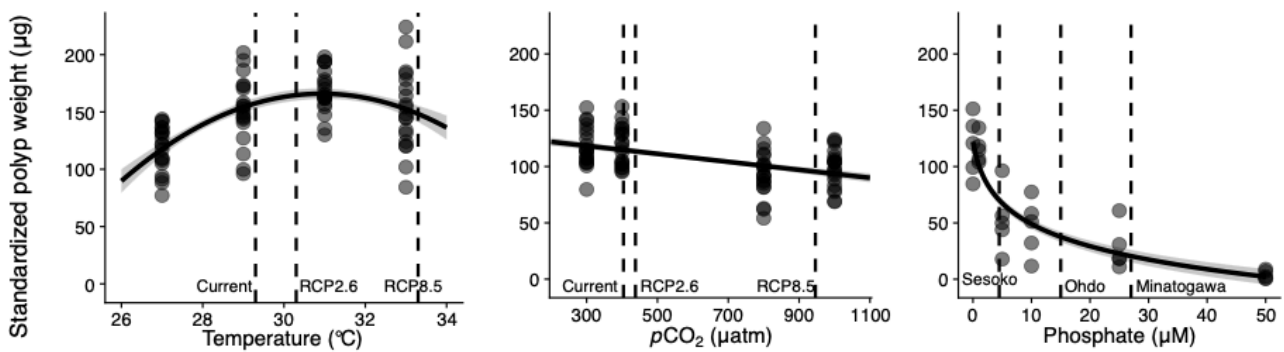


図4.8 沖縄本島への可視化のための稚サンゴ飼育実験データの回帰モデル。海水温（Temperature）および溶存 CO_2 濃度（ $p\text{CO}_2$ ）について現在気候（Current）、将来気候（RCP2.6、RCP8.5）に相当する値、蓄積リン酸（Phosphate）について各地の観測値レベルに相当する値について点線で明記した。

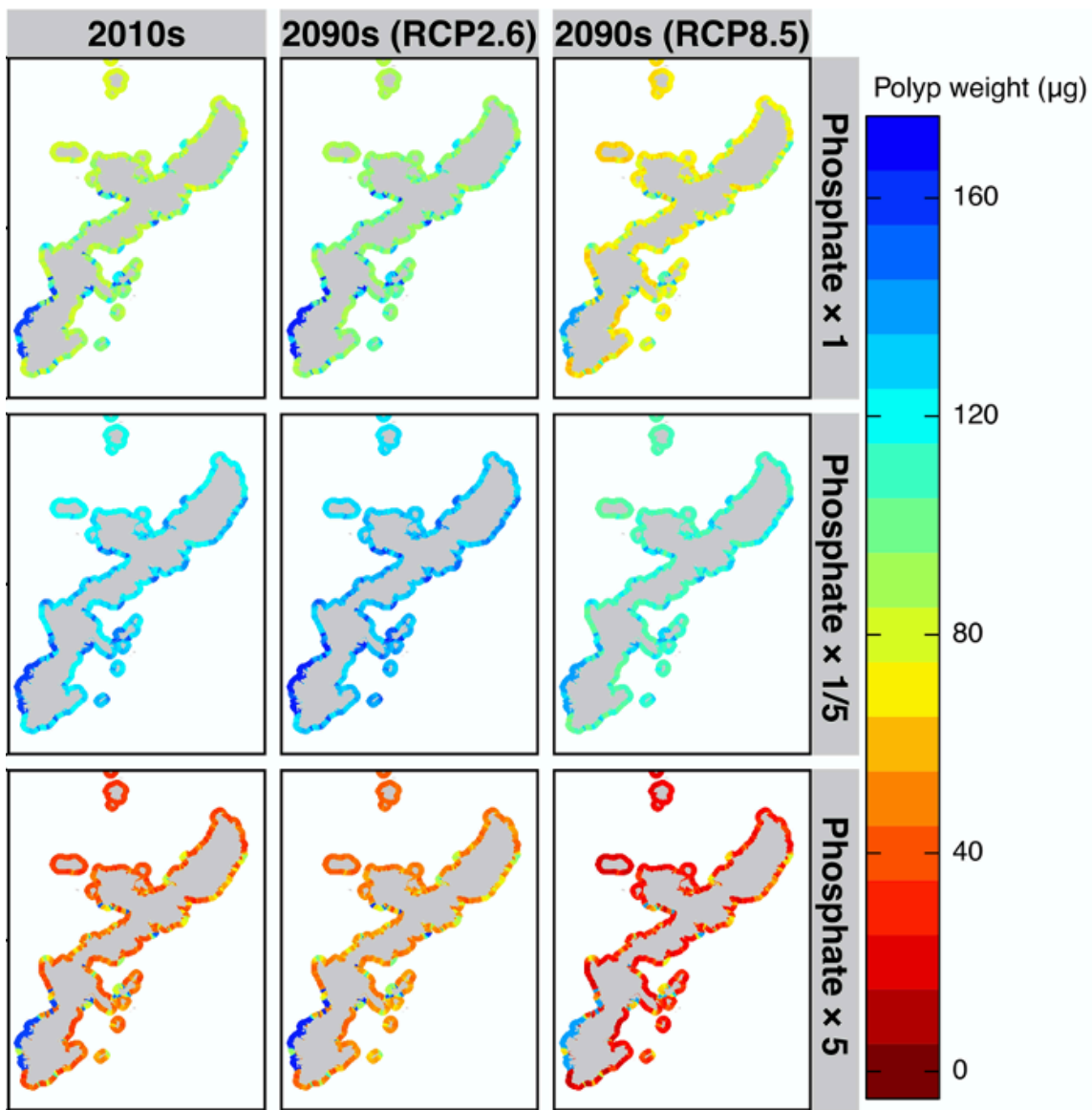


図4.9 沖縄本島における稚サンゴの石灰化量の予測地図：将来気候シナリオ（現在気候、21世紀末 RCP2.6、RCP8.5）および蓄積リン酸濃度管理シナリオ（現在同等、1/2削減、5倍増加）における複合影響のもとでの予測。

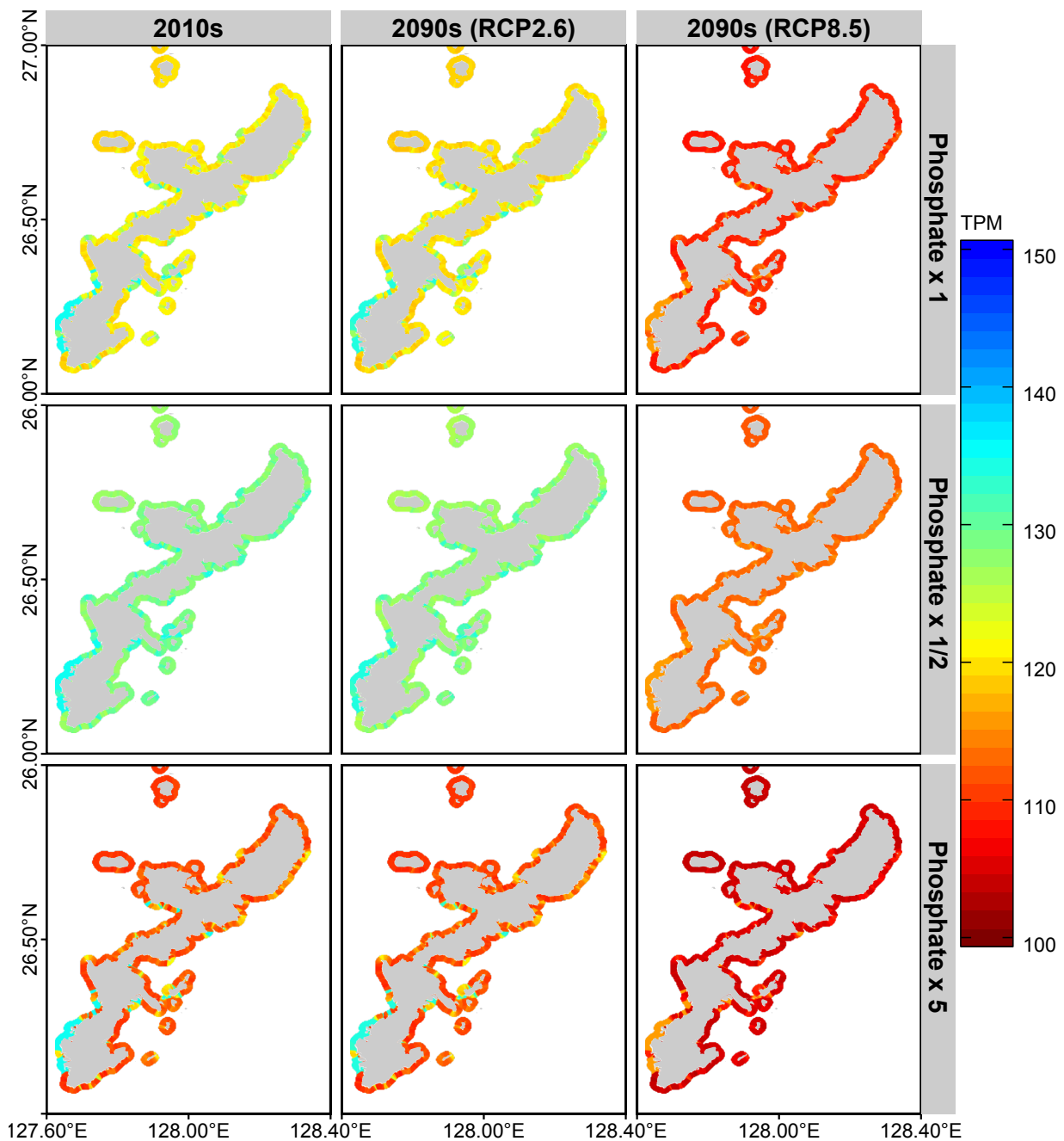


図4.10 沖縄本島におけるGalaxin遺伝子 (adi_EST_assem_14006) の発現量 (TPM) の予測地図：将来気候シナリオ（現在気候、21世紀末RCP2.6、RCP8.5）および蓄積リン酸濃度管理シナリオ（現在同等、1/2削減、5倍増加）における複合影響のもとでの予測。

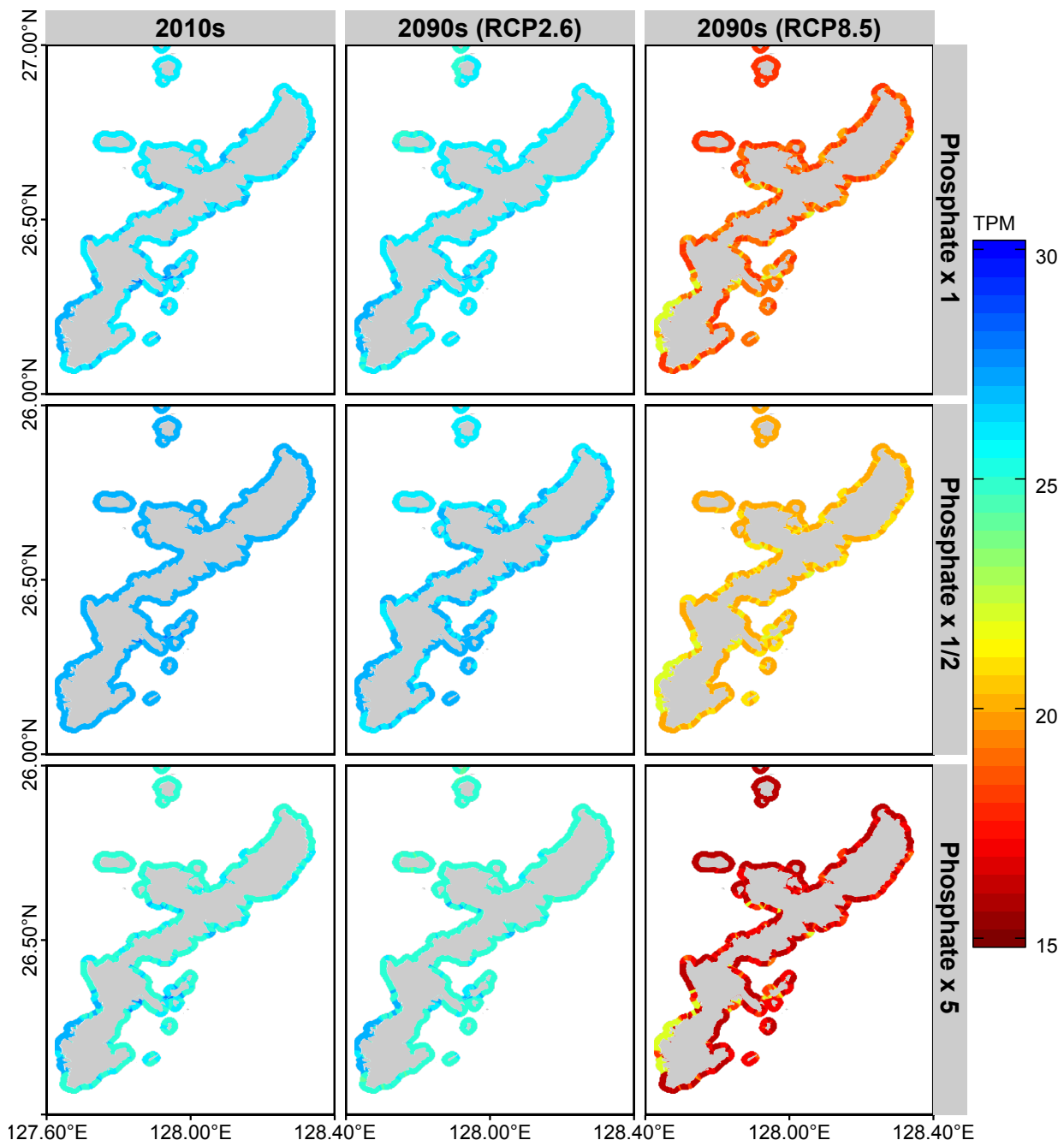


図4.11 沖縄本島におけるMAM遺伝子 (adi_EST_assem_14016) の発現量 (TPM) の予測地図：将来気候シナリオ（現在気候、21世紀末RCP2.6、RCP8.5）および蓄積リン酸濃度管理シナリオ（現在同等、1/2削減、5倍増加）における複合影響のもとでの予測。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ4では、全体目標に挙げた項目を一通り達成することができた。サンゴへの複合的な環境ストレスの影響メカニズムの予備的な解析においては、モデリングに必要となる環境要因データを整備し（図4.2、4.3）、また複合環境ストレス影響を解析するモデリング技術を確立した（図4.4）。環境要因データのうち、栄養塩類の指標については一般に公開配布されているデータでは不十分であることが分かったため、沖縄本島の全河川の集水域解析および土地利用データの整備・解析を通じて、明示的に陸域負荷を求め、サブテーマ2による底質蓄積リン酸濃度の推定値という形で地図データを得ることができたことは特筆すべき成果のひとつである（図4.7）。また、飼育実験による石灰化能や遺伝子発現といった他サブテーマから得られたデータを、将来気候のもとでの海水温や炭酸濃度、および地域環

境負荷としての蓄積リン酸濃度の複合環境影響のもとで将来予測に繋げ、さらに地域環境負荷の管理を行った場合に予測される変化量という形で気候変動適応策の効果の予測を行うところまでを達成することができた（図4.9、4.10、4.11）。このように本サブテーマでは、野外調査・室内実験・遺伝子分析の結果をGISモデルへと関連付け、サンゴへの気候変動・地域環境ストレスの複合影響を推定・予測する体制を構築することができた。これらの技術は応用範囲も大きく、今後大きく発展させられるポテンシャルがある。このように、サンゴへの負荷を考慮して将来予測も可能な、サンゴ石灰化に対する栄養塩負荷ハザードマップの作製にも成功したことから、目標を上回る成果をあげたと評価できる。

6. 引用文献

- 1) Oliver, J. K., Berkelmans, R., & Eakin, C. M. (2009). Coral bleaching in space and time. In *Coral bleaching* (pp. 21-39). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 2) Carvalho, C. M., Polson, N. G., & Scott, J. G. (2010). The horseshoe estimator for sparse signals. *Biometrika*, 97(2), 465-480.
- 3) Kumagai, N. H., & Yamano, H. (2018). High-resolution modeling of thermal thresholds and environmental influences on coral bleaching for local and regional reef management. *PeerJ*, 6, e4382.
- 4) Liu, G., Strong, A. E., & Skirving, W. (2003). Remote sensing of sea surface temperatures during 2002 Barrier Reef coral bleaching. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 84(15), 137-141.
- 5) 山崎大, 富樫冨佳, 竹島滉, & 佐山敬洋. (2018). 日本全域高解像度の表面流向データ整備. 土木学会論文集 B1 (水工学), 74(5), I_163-I_168.
- 6) Watanabe, S., Hajima, T., Sudo, K., Nagashima, T., Takemura, T., Okajima, H., ... & Kawamiya, M. (2011). MIROC-ESM 2010: Model description and basic results of CMIP5-20c3m experiments. *Geoscientific Model Development*, 4(4), 845-872.
- 7) Skirving, W., Marsh, B., De La Cour, J., Liu, G., Harris, A., Maturi, E., ... & Eakin, C. M. (2020). CoralTemp and the coral reef watch coral bleaching heat stress product suite version 3.1. *Remote Sensing*, 12(23), 3856.
- 8) Kim, S. W. et al. (2019). Refugia under threat: Mass bleaching of coral assemblages in high-latitude eastern Australia. *Global change biology*, 25(11), 3918-3931.
- 9) Sully, S., & van Woesik, R. (2020). Turbid reefs moderate coral bleaching under climate-related temperature stress. *Global Change Biology*, 26(3), 1367-1373.

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・3】

- 1) Iijima M, Yasumoto J, Iguchi A, Koiso K, Ushigome S, Nakajima N, Kunieda Y, Nakamura T, Sakai K, Yasumoto-Hirose M, Mori-Yasumoto K, Mizusawa N, Amano H, Suzuki A, Jimbo M, Watabe S, Yasumoto K. Phosphates bound to calcareous sediments hamper skeletal development of juvenile coral. Royal Society Open Science 8:201214. 2021 (Impact factor: 2.963).
- 2) Iijima M, Yasumoto J, Mori-Yasumoto K, Yasumoto-Hirose M, Iguchi A, Suzuki A, Mizusawa N, Jimbo M, Watabe S, Yasumoto K*. Visualisation of phosphate in subcalicoblastic extracellular calcifying medium and on a skeleton of coral by using a novel probe, fluorescein-4-isothiocyanate-labelled alendronic acid. Marine Biotechnology in press (Impact factor: 3.619).

【サブテーマ2】

- 1) Manullang C, Herwindra I, Iguchi A, Miyagi A, Tanaka Y, Nojiri Y, Sakai K. Responses of branching reef corals *Acropora digitifera* and *Montipora digitata* to elevated temperature and pCO_2 . PeerJ 8:e10562. 2020 (Impact factor: 2.984).
- 2) 齋藤光代, 安元 純, 杉山 歩, 地下水と生態系; これまでの研究動向と今後の展開. 地下水学会誌 (Journal of Groundwater Hydrology) 62:525-545. 2020.

【サブテーマ4】

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

【サブテーマ1】

- 1) Suzuki A, Iguchi A, Sakai K, Hayashi M, Nojiri Y. Chapter 8: Succession of Ocean Acidification and its Effects on Reef-building Corals. In: Takeuchi I, Yamashiro H (Eds.) Perspective of coral reef conservation under anthropogenic impacts. Springer Nature Singapore in press

【サブテーマ2 - 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 - 4】

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

【サブテーマ1】

- 1) 飯島真理子(北里大・海洋生命)・安元剛(北里大・海洋生命)・安元純(琉大・農)・廣瀬美奈(トロピカルテクノプラス)・神保充(北里大・海洋生命)・渡部終五(北里大・海洋生命)。「過剰リン酸塩はコユビミドリイシ稚サンゴの骨格形成を阻害する」. 2019年度日本地球惑星連合大会. 2019年5月30日. 幕張メッセ国際展示場. ポスター発表. 発表番号AHW22-P01.
- 2) Iijima M, Yasumoto K, Yasumoto J, Hirose Yasumoto M, Iguchi A, Jimbo M, Watabe S.

- Phosphorus enrichment hampers the development of juvenile coral by directly inhibiting biomineral skeleton elongation. 2019 AGU Fall Meeting. 12 December 2019. Moscone Center, San Francisco, USA. Abstract Number: PP41C-1564.
- 3) 井口亮（産総研）・飯島真理子（産総研）・ベル智子（グアム大）・西島美由紀（産総研）・中村崇（琉大・理）・酒井一彦（琉大・熱生研究）・鈴木 淳（産総研）・安元純（琉大・農）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・安元剛（北里大・海洋生命）．「底質リン酸塩によるサンゴ石灰化阻害とそのメカニズム解明」．2020年度日本プランクトン・ベントス学会合同大会オンライン大会．2020年9月20日．発表番号B38.
 - 4) 井口亮（産総研・地質情報）・飯島真理子（産総研・地質情報）・ベル智子（グアム大学・環境）・西島美由紀（産総研・地質情報）・中村崇（琉大理・琉大熱生研）・酒井一彦（琉大熱生研）・鈴木淳（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・安元剛（北里大・海洋生命）・熊谷直喜（国環研）．「地球的規模・地域的規模の環境変化がサンゴ石灰化に及ぼす影響ーサンゴポリプ実験系による検証ー」．東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会「バイオミネラリゼーションと石灰化ー遺伝子から地球環境までー」・共催：第15回バイオミネラリゼーションワークショップ．コンビーナー：中島礼（産業技術総合研究所）．2020年11月13日．オンライン集会．口頭発表（招待講演）．
 - 5) 飯島真理子（産総研・地質情報）・安元剛（北里大・海洋）・井口亮（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・鈴木淳（産総研・地質情報）・岩崎晋弥（JAMSTEC）・木元克典（JAMSTEC）・神保充（北里大・海洋）・渡部終五（北里大・海洋）．「蓄積型栄養塩のサンゴ骨格阻害メカニズムと影響評価法の構築」．2020年度日本サンゴ礁学会大会第23回大会．2020年11月23日．オンライン大会．口頭発表．発表番号0-35.
 - 6) 飯島真理子（産総研・地質情報）・安元剛（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・中村崇（琉大・理）・酒井一彦（琉大熱生研）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・水澤奈々美・神保充・渡部終五（北里大・海洋生命）．「蓄積型栄養塩が稚サンゴの骨格形成と生育に及ぼす影響」．令和3年度日本水産学会春季大会．2021年3月27日．オンライン大会．口頭発表．発表番号710.
 - 7) 飯島真理子（産総研・地質情報）・安元剛（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・中村崇（琉大・理）・酒井一彦（琉大熱生研）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・鈴木淳（産総研・地質情報）・神保充・渡部終五（北里大・海洋生命）．「蓄積型栄養塩の地域間比較と稚サンゴの骨格形成への影響」．第21回マリンバイオテクノロジー学会大会．2021年5月16日．オンライン大会．口頭発表．発表番号OF-4.
 - 8) 飯島真理子（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・中村崇（琉大理・琉大熱生研）・酒井一彦（琉大熱生研）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・安元加奈未（東京理科・薬）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・鈴木淳（産総研・地質情報）・天野春菜・神保充・渡部終五・安元剛（北里大・海洋生命）．「沿岸域の底質に吸着したリン酸塩はサンゴ稚ポリプの骨格形成を阻害する」．2021年度日本地球惑星連合大会．2021年6月4日．発表番号：AHW22-05.
 - 9) 儀武滉大（筑波大）・池内絵里（産総研・地質情報）・中村崇（琉大・理）・鈴木淳（産総研・地質情報）・井口亮（産総研・地質情報）．「造礁サンゴにおける褐虫藻の多様性とサンゴ石灰化速度の関係」．2021年度日本サンゴ礁学会大会第24回大会．2021年11月28日．オンライン大会．ポスター発表．発表番号P-5.
 - 10) 井口亮（産総研・地質情報）・鈴木淳（産総研・地質情報）・飯島真理子（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）・中村崇（琉大理・琉大熱生研）・酒井一彦（琉大熱生研）・安元剛（北里大・海洋生命）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・熊谷直喜（国環研）．「高CO₂時代に対応したサンゴ礁保全に資するローカルな環境負荷の閾値設定に向けた研究」．2019年

度日本地球惑星連合大会．2022年5月24日．オンライン大会．口頭発表．発表番号AHW24-07
(招待講演)．

【サブテーマ2】

- 1) 野崎真司 (琉大・農)・安元純 (琉大・農)・安元剛 (北里大・海洋生命)・廣瀬美奈 (トロピカルテクノプラス)・飯島真理子 (北里大・海洋生命)・新城竜一 (琉大・理)・ラザフィンラベバム (琉大・農)．「琉球石灰岩地域における土壌・地下水中の各種リン酸塩の動態に関する研究」．2019年度日本地球惑星連合大会．2019年5月30日．幕張メッセ国際展示場．ポスター発表．発表番号AHW22-P12.
- 2) 村尾海 (琉大・農)・安元純 (琉大・農)・安元剛 (北里大・海洋生命)・廣瀬美奈 (トロピカルテクノプラス)・水澤奈々美 (北里大・海洋生命)・井口亮 (産総研・地質情報)・ラザフィンラベバム (琉大・農)・渡部終五 (北里大・海洋生命)．「次世代シーケンサーを用いた琉球石灰岩帯水層中における微生物相解析」．2019年度日本地球惑星連合大会．2019年5月30日．幕張メッセ国際展示場．ポスター発表．発表番号AHW22-P06.
- 3) Manullang C (University of the Ryukyus), Iguchi A (Geological Survey of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), Nojiri Y (Hiroshima University), Sakai K (TBRC, University of the Ryukyus). "Ocean Acidification and Warming Decrease Calcification Rate and Increase Mortality of *Acropora digitifera*". 2019年度日本サンゴ礁学会大会第22回大会．2019年11月10日．北海道大学工学部フロンティア応用科学研究棟．口頭発表．発表番号0-24.
- 4) Shidha Afza M (University of the Ryukyus), Iguchi A (Geological Survey of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), Nakamura T (University of the Ryukyus). "Correlation between pigmentation intensity and mortality rates in larvae of *Acropora digitifera*". 2019年度日本サンゴ礁学会大会第22回大会．2019年11月11日．北海道大学工学部フロンティア応用科学研究棟．ポスター発表．発表番号P-36.
- 5) Yasumoto J, Nozaki M, Yasumoto K, Hirose Yasumoto M, Shinjo R, Iguchi A, Iijima M, Nakaya S. Dynamics of phosphate species in soil and groundwater in coastal limestone area, Okinawa, Japan. 2019 AGU Fall Meeting. 13 December 2019. Moscone Center, San Francisco, USA. Abstract Number: H53I-1860.
- 6) 村尾海 (琉大・農)・水澤奈々美 (北里大・海洋)・安元純 (琉大・農)・廣瀬 (安元) 美奈 (トロピカルテクノプラス)・飯島真理子 (産総研・地質情報)・丸山莉織 (北里大・海洋)・安元剛 (北里大・海洋)・井口亮 (産総研・地質情報)・渡部終五 (北里大・海洋)．「ショットガンメタゲノム解析に基づく琉球石灰岩地域における地下水中の微生物叢解析」．日本地下水学会秋季講演会．2020年11月4日．オンライン大会．口頭発表．発表番号08.
- 7) 中村崇 (琉大・理)・塚本陸 (琉大・理)・徳田 侑大 (琉大・理)・石田潤一郎 (琉大・理)・池田香菜 (琉大・理)・Mariam Shidha Afzal (琉大・理)・井口亮 (産総研・地質情報)．「琉球列島海域での造礁サンゴ群集比較」．2020年度日本サンゴ礁学会大会第23回大会．2020年11月23日．オンライン大会．口頭発表．発表番号0-39.
- 8) 安元純 (琉大・農)・新城竜一 (琉大・理)・Razafindrabe Bam (琉大・農)・土岐知弘 (琉大・理)・澤田和子 (琉大・戦略セ)・細野高啓 (熊本大・先端科学)・Hermawan Oktanius (熊本大・自然科学)・中屋眞司 (信州大・工)・高田遼吾 (信州大・総合医理工)・中川啓 (長崎大・環境科学)・利部慎 (長崎大・環境科学)・田原康博 (地圏環境テクノ)・村井敦子 (地圏環境テクノ)・安元剛・水澤奈々美・丸山莉緒 (北里大・海洋生命)・廣瀬美奈 (トロピカルテクノプラス)・井口 亮・飯島真理子 (産総研・地質情報)・宋科翰・相澤正隆 (琉球大・理工)「亜熱帯島嶼の持続可能な水資源利用に向けた参画・合意に基づく流域ガバナンス - SDGsの達成への貢献-」．2021年度日本地球惑星連合大会．2021年6月4日．発表番

号：AHW22-08.

- 9) Afzal MS, Takeichi K, Ikeda K, Ueno M, Iguchi A, Nakamura T. Status of Sekisei Lagoon's Coral Reefs Five Years Post Bleaching Event of 2016. 2021年度日本サンゴ礁学会大会第24回大会. 2021年11月29日. オンライン大会. 口頭発表. 発表番号0-34.
- 10) Nakamura T, Takeichi K, Afzal MS, Iguchi A. Various impacts of disturbances on coral communities in the southern Ryukyu Archipelago. 2021年度日本サンゴ礁学会大会第24回大会. 2021年11月29日. オンライン大会. ポスター発表. 発表番号P-18.
- 11) 飯島真理子（産総研・地質情報）. 「サンゴと栄養塩」. 日本地下水学会秋季講演会シンポジウム. 2021年12月3日. 沖縄産業支援センター. 口頭発表（招待講演）.

【サブテーマ3】

- 1) Kubota A, Hirano R, Yasumoto K, Iijima M, Yasumoto J, Yasumoto-Hirose M, Mizusawa N, Iguchi A, Jimbo M, Watabe S. Effect of polyamine transporter inhibitor on the pH increase in calcifying fluids of juvenile coral polyps possibly associated with calcification processes. Joint Conference of the 12th International Marine Biotechnology Conference and the 12th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference. 12 September 2019. Shizuoka city, Shizuoka, Japan. Poster No. P12-7.
- 2) 窪田梓（北里大・海洋生命）・安元剛（北里大・海洋生命）・平野蓮（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研）・井口亮（産総研）・安元純（琉大・農）（北里大・海洋生命）・渡部終五（北里大・海洋生命）. 「サンゴ石灰化母液のpH上昇の分子機構」. 東京大学海洋研究所共同利用研究集会「バイオミネラリゼーションと石灰化 -遺伝子から地球環境まで-」. コンビナー：鈴木道生（東大・大学院農学生命科学研究科）. 2019年11月8日. 東京大学大気海洋研究所. ポスター発表. 発表番号Poster 24.
- 3) Kunieda Y, Ushigome S, Koiso K, Nakajima N, Mizusawa N, Yasumoto K, Yasumoto J, Iijima M, Yasumoto-Hirose M, Jimbo M, Watabe S. Relationship between quality of calcareous sediments and juvenile corals growth. International Symposium on Aquatic Metagenomics 2019. 24 November, 2019, Minato-Ku, Tokyo, Japan. Poster No. P-16.
- 4) Yuze M, Yasumoto-Hirose M, Mizusawa N, Yasumoto K, Yasumoto J, Iijima M, Kasai H, Amano H, Jimbo M, Watabe S. Phylogenetic relationships of prokaryotic symbionts in hard coral based on 16S rRNA sequences. International Symposium on Aquatic Metagenomics 2019. 24 November, 2019, Minato-Ku, Tokyo, Japan. Poster No. P-17.
- 5) Yasumoto K, Kubota A, Yasumoto J, Mori-Yasumoto K, Iijima M, Hirose Yasumoto M, Iguchi A, Jimbo M, Watabe S. Effect of polyamine transporter inhibitor on the pH increase in calcifying fluids of juvenile coral polyps possibly involved in calcification processes. 2019 AGU Fall Meeting. 12 December 2019. Moscone Center, San Francisco, USA. Abstract Number: PP41C-1563.
- 6) 安元剛（北里大・海洋生命）・平野蓮（北里大・海洋生命）・窪田梓（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・天野春菜（北里大・海洋生命）・神保充（北里大・海洋生命）・渡部終五（北里大・海洋生命）. 「異なるCO₂濃度条件でのポリアミンによるCO₂取り込みとCaCO₃形成反応」. 2019年12月21日. 北里化学シンポジウム. 北里大学白金キャンパス.
- 7) 安元剛（北里大・海洋生命）・窪田梓（北里大・海洋生命）・平野蓮（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研）・安元純（琉大・農）・安元（森）加奈未（徳島文理大・薬学）・神保充（北里大・海洋生命）・渡部終五（北里大・海洋生命）. 「ポリアミン輸送体阻害剤の稚サンゴ石灰化部位のpH上昇に及ぼす影響」. 2020年1月25日. 日本ポリアミン学会年会. 東京慈恵医科大学.
- 8) 安元剛（北里大・海洋）・井口亮（産総研・地質情報）・飯島真理子（産総研・地質情報）・

- 安元純（琉大・農）・窪田梓（北里大・海洋）・財津桂（名大・高等研究院）・神保充（北里大・海洋）・渡部終五（北里大・海洋）．「サンゴの石灰化と温度耐性に対する生体ポリアミンの関与」．2020年度日本サンゴ礁学会大会第23回大会．2020年11月22日．オンライン大会．ポスター発表．発表番号P-19.
- 9) 安元剛（北里大・海洋生命）．「サンゴ礁域におけるサンゴ類の骨格形成と石灰質の底質」．第68回生態学会シンポジウムS14「海洋ベントス生態学のフロンティアー底質に着目してー」（企画者：井口亮（産総研・地質情報））．2021年3月21日．オンライン大会．口頭発表（招待講演）．発表番号：S14-5.
- 10) 丸山莉織（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研・地質情報）・水澤奈々美・安元剛（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・天野春菜・神保 充・渡部終五（北里大・海洋生命）．「琉球石灰岩地域における水環境中のメタゲノム解析」．令和3年度日本水産学会春季大会．2021年3月27日．オンライン大会．口頭発表．発表番号705.
- 11) 湯瀬水葵・安元剛・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・天野春奈・神保充・渡部終五（北里大・海洋生命）．「コユビミドリイシの共生細菌に関する研究」．令和3年度日本水産学会春季大会．2021年3月27日．オンライン大会．口頭発表．発表番号706.
- 12) 安元剛（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研・地質情報）・井口亮（産総研・地質情報）・鈴木淳（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）・中村崇（琉大・理）・酒井一彦（琉大熱生研）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・天野春菜・水澤奈々美・神保充・渡部終五（北里大・海洋生命）．「サンゴ稚ポリプに対する CO₂+リン酸塩の複合ストレス実験」．第21回マリンバイオテクノロジー学会大会．2021年5月16日．オンライン大会．口頭発表．発表番号OF-3.
- 13) 廣瀬（安元）美奈（トロピカルテクノプラス）・湯瀬水葵・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研・地質情報）・安元剛（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・天野春菜・神保充・笠井宏朗・渡部終五（北里大・海洋生命）．「サンゴからの *Endozoicomonas* 属細菌の単離と稚サンゴに対する感染実験」．第21回マリンバイオテクノロジー学会大会．2021年5月16日．オンライン大会．ポスター発表．発表番号PA-9.
- 14) 丸山莉織・飯島真理子・水澤奈々美・安元剛（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・新城竜一（琉大・理）・細野高啓（熊本大・理）・澤田和子（琉大・戦略セ）・天野春菜・神保充・渡部終五（北里大・海洋生命）．「沖縄県南部地下ダム流域における細菌叢解析」．第21回マリンバイオテクノロジー学会大会．2021年5月16日．オンライン大会．ポスター発表．発表番号PG-43.
- 15) 丸山莉織・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・飯島真理子（産総研・地質情報）・安元剛（北里大・海洋生命）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・井口亮（産総研・地質情報）・神保充・渡部終五・安元剛（北里大・海洋生命）．「琉球石灰岩地帯の地下水を対象としたメタゲノム解析」．2021年度日本地球惑星連合大会．2021年6月4日．発表番号：AHW22-P21.
- 16) 水澤奈々美（北里大・海洋生命）・井口亮・飯島真理子（産総研・地質情報）・丸山莉緒（北里大・海洋生命）・安元純（琉大・農）・安元剛（北里大・海洋生命）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・渡部終五（北里大・海洋生命）．「The effects of groundwater runoff on the coastal bacterial communities near the Ryukyu Limestone area」．2021年度日本地球惑星連合大会．2021年6月4日．発表番号：AHW22-P22.
- 17) 安元剛（北里大・海洋生命）．「サンゴの石灰化機構からみた陸域負荷の影響」．2021年度日本サンゴ礁学会大会第24回大会．2021年11月28日．オンライン大会．口頭発表（招待講演）．

発表番号S-4.

- 18) 丸山莉織（北里大・海洋生命）・安元剛（北里大・海洋生命）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・天野春菜（北里大・海洋生命）・神保充（北里大・海洋生命）・渡部終五（北里大・海洋生命）・高田遼吾（琉大・農）・廣瀬（安元）美奈（トロピカルテクノプラス）・新城竜一（総合地球研）・細野高啓（熊大先端科学）・飯島真理子（産総研・地質情報）・井口 亮（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）. 「琉球石灰岩地域における陸水のメタゲノム解析」. 日本地下水学会秋季講演会. 2021年12月3日. 沖縄産業支援センター. 口頭発表. 発表番号45.

【サブテーマ4】

- 1) 熊谷直喜（国環研）・山野博哉（国環研）・井口亮（産総研・地質情報）. 「衛星データを用いたサンゴ白化と栄養負荷の広域解析」. 2019年度日本サンゴ礁学会大会第22回大会. 2019年11月10日. 北海道大学工学部フロンティア応用科学研究棟. 口頭発表. 発表番号O-34.
- 2) 熊谷直喜（国環研）・飯島真理子（産総研・地質情報）・安元剛（北里大・海洋）・鈴木淳（産総研・地質情報）・酒井一彦（琉大・熱生研）・井口亮（産総研・地質情報）. 「サンゴ石灰化速度への複合環境影響を統合的に推定する試み」. 2020年度日本サンゴ礁学会大会第23回大会. 2020年11月22日. オンライン大会. ポスター発表. 発表番号P-3.
- 3) 熊谷直喜（国立環境研究所）. 「サンゴ群集と海藻藻場の境目から見える底質の役割」. 第68回生態学会シンポジウムS14「海洋ベントス生態学のフロンティアー底質に着目して」. （企画者：井口亮（産総研・地質情報））. 2021年3月21日. オンライン大会. 口頭発表. 発表番号：S14-7.

（3）「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 井口亮（産業技術総合研究所）. 郁文館高校PBLツアー（屋久島・口永良部島）事前学習講師. 高校生21名を対象に環境科学の講義と実習. 2019年4月20日. 郁文館高校.
- 2) 井口亮（産業技術総合研究所）. 横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校宮古島研修事前学習講師. 高校生10名、中学生10名、合計20名を対象に環境科学の講義と実習. 2019年8月28日. 横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校.
- 3) 井口亮（産業技術総合研究所）. 2019年度「特別講演会」及び「向陽SSH生徒研究発表会」講師. 高校生・教職員500名程度を対象に環境科学の講演. 2020年1月28日. 沖縄県立向陽高校.
- 4) 井口亮（産業技術総合研究所）. 沖縄県立八重山高等学校・高校生向け環境研究特別授業・演習講師. 高校生・教職員90名程度を対象に環境科学の講義と実習. 2020年3月17日（火）-18日（水）. 沖縄県立八重山高等学校.
- 5) 井口亮（産業技術総合研究所）. 「地球規模・地域規模の環境変化から読み解く海洋生物に迫る危機」. 2020年1年理数科SSH特別授業（環境科学）講師. 高校生・教職員76名を対象に環境科学の講演. 2020年12月8日. 沖縄県立向陽高校.
- 6) 井口亮（産業技術総合研究所）. 「海洋生物に迫る危機を地球規模・地域規模の環境変化から読み解けるか」. 2021年1年理数科SSH特別授業（環境科学）講師. 高校生・教職員85名を対象に環境科学の講演. 2022年1月18日. オンライン.

【サブテーマ2】

- 1) 中村崇（琉球大学）. 静岡県立榛原高校研修講師. 高校生15名、引率教員2名、合計17名を対象に環境科学の講義. 2019年8月28日. 琉球大学西原キャンパス.
- 2) 安元純・水山克（琉球大学）. 八重瀬湧き水クラブ9月会講師. 「海辺の生き物観察会@坡名城ビーチ、八重瀬町」. 主催：地域資源保全の会、水の環プロジェクト、環境研究総合推進費課題4-1907. 地元小学生と保護者、20名程度を対象に環境科学の実習. 2019年9月29日. 沖縄県八重瀬町.

- 3) 安元純・水山克（琉球大学）．サイエンスアゴラ2019講師．ESD（持続可能な開発のための教育）教材とプログラムの開発「ナゼ？ホント？多良間は科学の宝島！」．小中学生と保護者、20名程度を対象に環境科学の実習．2019年11月17日．テレコムセンタービル．
- 4) 中村崇（琉球大学）．第26回石西礁湖自然再生協議会での講演．石西礁湖でのミドリイシ属における大規模白化の影響について．主催：環境省．地元行政機関・観光業・漁業者・高校生など、9個人、16団体・法人（26名）、12行政（17名）の委員37機関、一般傍聴者含め計52名．2020年2月16日．石垣市商工会館．
- 5) 安元純（琉球大学）．八重瀬町水資源調査講師．主催：JST SOLVE for SDGsプロジェクト．地元高校教員3名を対象に環境科学の実習．2020年8月19日-23日．沖縄県八重瀬町．
- 6) 安元純（琉球大学）．「サンゴ礁島嶼における統合的水資源 /沿岸管理の在り方」．令和3年度石西礁湖自然再生協議会 学術調査部第2回作業チーム基調講演．環境省職員・研究者ら15名を対象に講演．2021年6月7日．オンライン．
- 7) 安元純（琉球大学）．「（2）陸域の影響調査について 水文モデルの作成方針」．令和3年度石西礁湖自然再生協議会 学術調査部第3回作業チーム．環境省職員・研究者ら15名を対象に講演．2021年6月7日．オンライン．
- 8) 安元純（琉球大学）．「（3）地下水調査について 地下水の観測計画案」．令和3年度石西礁湖自然再生協議会 学術調査部第3回作業チーム．環境省職員・研究者ら15名を対象に講演．2021年6月7日．オンライン．

【サブテーマ3】

- 1) 安元剛（北里大学）．第311回 京都大学生態研セミナー（一般公開）．2019年11月15日．京都大学生態学研究センター．
- 2) 安元剛（北里大学）．「リン酸負荷と蓄積型栄養塩がサンゴ骨格形成に及ぼす影響」．令和3年度石西礁湖自然再生協議会 学術調査部第2回作業チーム基調講演．環境省職員・研究者ら15名を対象に講演．2021年6月7日．オンライン．
- 3) 安元剛（北里大学）．「（1）蓄積型栄養塩の分布状況 令和3年9月調査における分析結果と考察」．令和3年度石西礁湖自然再生協議会 学術調査部第3回作業チーム．環境省職員・研究者ら15名を対象に講演．2021年6月7日．オンライン．

【サブテーマ4】

特に記載すべき事項はない。

（4）マスコミ等への公表・報道等＞

【サブテーマ1・3】

- 1) 「陸域からの過度のリン供給がサンゴの生育を妨げるメカニズムが明らかに」．2021年3月17日．北里大学・産業技術総合研究所・琉球大学からのプレスリリース．

（5）本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Technical development and adaptation strategy to define local environmental threshold for coral reef conservation in an era of high CO₂.

Principal Investigator: Akira IGUCHI

Institution: Geological Survey of Japan, National Institute of Advanced

Industrial Science and Technology (AIST), JAPAN

Tel: +81-298-61-5089 / Fax: +81-298-61-3765

E-mail: iguchi.a@aist.go.jp

Cooperated by: University of the Ryukyus, Kitasato University, National Institute for Environmental Studies

[Abstract]

Key Words: Coral Reefs, Terrestrial load, Nutrients, Groundwater, CO₂ increase, Corals, calcification

Coral reef ecosystems, one of the major ecosystems in tropical and subtropical coastal areas, are threatened with degradation due to various environmental changes in addition to the effects of climate change. In this study, we performed field studies, laboratory experiments, molecular analysis, and statistical modeling to elucidate the response mechanisms of corals to environmental stresses and to elucidate the threshold of calcification limit for coral skeletal development. Our research aimed to geographically visualize the effects of combined stresses of climate change and local environmental loads on coral calcification, and to propose local environmental load thresholds required in each region.

The accumulated nutrient assessment developed in this study revealed the phosphate loading status of each region. The results showed that coral recruitment was also low in areas with high levels of accumulated nutrients due to anthropogenic impacts, leading to the establishment of thresholds that would ensure healthy coral growth. Using hydrological methods, we also succeeded in showing the threshold of phosphate loading required for terrestrial use, with consideration for future increases in CO₂. Molecular analysis also revealed the details of the environmental response of corals to nutrient loading and other environmental factors, as well as the actual bacterial load in the field. Furthermore, we have created a nutrient loading hazard map for coral calcification, which is expected to be a useful decision-making tool for future climate change and land use.