

論文内容要旨

論文題目

リン酸塩によるサンゴの骨格形成阻害メカニズムの解明

指導教員 神保 充 准教授

要旨

【背景と目的】

近年、世界規模でのサンゴ礁減少が危惧されているが、サンゴ礁は、沿岸域開発に伴う土砂の流出、人間活動に伴う沿岸域の富栄養化など様々なローカルストレスに曝されている。沖縄県においても諸開発に伴う赤土の沿岸域への流出が問題となり、1995年に沖縄県赤土等流出防止条例が施行されている。他方、沿岸域の富栄養化がサンゴ礁減少の原因となることはよく知られているが、その科学的なメカニズムは明らかになっておらず、富栄養化対策は殆どなされていない。サンゴ礁海域の硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$)、リン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$) の濃度は通常低く、これらの栄養塩が検出されるような場所で、健全な状態にあるサンゴ礁はない。しかし、室内実験などによって富栄養化の影響を科学的に証明できた例はなく、栄養塩のサンゴ礁への影響を疑問視する人も少なくない。

富栄養化の主な要因としては、陸域の市街地、畜産、農業、工場などの人間活動に由来する廃水が、海域に流入することが考えられる。しかし、熱帯・亜熱帯のサンゴ礁が分布する島嶼域では大きな河川が発達していないことが多く、降雨の大部分が地下水を通じ海底湧水として沿岸域に流出している。目視できる河川とは異なり、多くの場合、海底湧水の正確な場所や流量などを把握するのは難しく、地下水の水質悪化が沿岸域の生態系に及ぼす影響は殆ど検証すらされていない。水資源が乏しい島嶼地域では、地下水を農業用水や飲用水に用いている場所も多く、持続可能な水環境を構築する上でも、より詳細な実態把握は欠かせない。

以上の背景のもと、富栄養化の原因となる硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$)、リン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$) がサンゴの骨格形成に及ぼす影響を科学的に解明することと、サンゴ礁海域の栄養塩汚染の実態解明を目的として研究を行った。

第一章では、無機的な CaCO_3 形成反応に栄養塩が及ぼす影響を化学的に検証した。第二章ではコユビミドリイシ *Acropora digitifera* 稚ポリプを用いて骨格形成に栄養塩が及ぼす影響を検証した。第三章では島嶼沿岸域の栄養塩動態と蓄積型栄養塩がサンゴ稚ポリプの骨格形成に及ぼす影響を検証した。

【結果と考察】

第一章：無機的な CaCO_3 形成に栄養塩が及ぼす影響

私が所属する資源化学研究室では、海水にポリアミンを添加するだけで多量のアラゴナイト (CaCO_3) 結晶が沈殿することを見出している (Yasumoto *et al.*, 2014)。この新規なアラゴナイト形成反応を用いて様々な物質の石灰化阻害能を検証したところ、硝酸塩は石灰化を阻害しないのに対し、リン酸塩類 (オルソリン酸塩, ピロリン酸塩, エチドロン酸塩) には顕著な石灰化阻害能があることを見出した。5 μM 以上のリン酸塩類を添加した場合、アラゴナイト結晶は殆ど生じず、僅かに生じた結晶も歪な形状のものが多かった。海水のようにマグネシウムが多い水溶液中では CaCO_3 結晶系はカルサイトよりアラゴナイトが優勢となり、サンゴ骨格は、大部分の種がアラゴナイトで構成されている。カルサイトとアラゴナイトの阻害程度の差を検証するため、無機的に合成したカルサイトおよびアラゴナイト各 2.5 g/L をリン酸塩 (HPO_4^{2-}) 溶液に添加し、 CaCO_3 結晶に吸着するリン酸塩量を比較した。その結果、アラゴナイトには 90% 以上のリン酸塩が、カルサイトには 20% のリン酸塩が吸着し、吸着はどちらも 10 分以内に起こった。アラゴナイトは針状結晶で、柱状結晶であるカルサイトより表面積が大きい。その為、アラゴナイト形成反応の方がリン酸塩による阻害を受けやすいと考えられる。リン酸塩は CaCO_3 結晶の核となる微結晶に吸着することで結晶形成を阻害し、 CaCO_3 結晶が大きく成長できなかつたり、形状が歪になつたりすると考えられる。

第二章：コユビミドリイシ *Acropora digitifera* 稚ポリプの骨格形成に栄養塩が及ぼす影響

飼育海水に添加した硝酸塩およびリン酸塩 (オルソリン酸塩, ピロリン酸塩, エチドロン酸塩) の影響を検証するために、*A. digitifera* 稚ポリプ各 5~10 個体を、3 か月間飼育し、偏光顕微鏡、実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡 (SEM) で骨格形成の経過を観察した。所定の濃度の栄養塩を添加した天然海水 0.5 mL で、水替えを 1 日 1 回行って飼育した。0.5~5 mM の NaNO_3 を添加した場合、栄養塩を添加せずに飼育した稚ポリプと比較して殆ど変化はなく、骨格形成に及ぼす影響は見られなかった。

他方、リン酸塩を添加した海水で飼育した場合、5 μM 以上添加した際に、稚ポリプ底面の骨格形成を有意に阻害した。また、着底 1 か月後に稚ポリプを覆うようにつくられる外殻の形成も通常より小さい、または全く形成されなかった。SEM 観察では、通常の稚ポリプでは滑らかであった外殻の骨格表面が、5 μM 以上のリン酸塩を添加して飼育した稚ポリプでは凹凸が激しく、所々に穴が空いていた。

リン酸塩の骨格形成阻害が吸着によるものなら、阻害の程度は、飼育液中の濃度だけでなく、負荷量 (総量) で決まるはずである。そこで、所定の濃度のリン酸塩を含んだ飼育海水の量を 0.5 mL day^{-1} ではなく、1 L day^{-1} とし、稚ポリプを飼育したところ、1 μM

$L^{-1} day^{-1}$ でも外殻が形成されず、 $0.5 \mu M L^{-1} day^{-1}$ でも外殻表面の凹凸や穴が生じた。リン酸塩の総量を増やすとその阻害の程度が上昇することを明らかに出来た。

飼育海水に添加したリン酸塩がどのような経路で、骨格に到達し、骨格伸長を阻害しているか検証するため、プロピルアミン側鎖と二つのリン酸基を有するアレンドロン酸を FITC と縮合し、FITC ラベルしたリン酸塩試薬 (FITC-AA) を調製した。着底 1 日後のサンゴ稚ポリプの飼育海水に $50 \mu M$ FITC-AA を添加し、その様子を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、数分以内に底面骨格および石灰化母液が蛍光染色され、底面骨格の伸長は 12 時間後でも確認できなかった。着底後すぐのサンゴ稚ポリプを着底面側から観察すると、骨格形成を行う場である造骨細胞に覆われた石灰化母液が観察できるため、FITC-AA が石灰化母液に素早く到達し、骨格表面に吸着することで骨格形成を阻害している様子を可視化することに成功した。また、 $0.1 \mu M$ FITC-AA を着底 3 ヶ月褐虫藻と共に飼育した稚ポリプに曝露すると、外殻は数分以内に FITC-AA 由来の蛍光が確認でき、徐々にその蛍光強度は増した。この FITC-AA は、細胞膜透過性は無いと考えられるため、リン酸塩は細胞内を通して、石灰化母液や骨格に輸送されるわけではなく、胃層や造骨細胞の細胞間の隙間を通して石灰化母液や骨格へ到達していることが明らかになった。

$PO_4\text{-P}$ は地下水の中性に近い pH では、 $H_2PO_4^-$ の形態だが、海水中の pH 8 程度では、 HPO_4^{2-} の形態となる。その為、海域では $CaCO_3$ への吸着性が急激に上昇しているものと考えられる。その為、海域に流出したリン酸塩は拡散しているのではなく、石灰質の底質に吸着し蓄積していると推定できる。そこで、底質に吸着したリン酸塩の影響を検証するため、リン酸塩で処理した $CaCO_3$ 基盤に稚ポリプを着底させたところ、稚ポリプの骨格形成が顕著に阻害された。炭酸塩に吸着したリン酸塩は早い着脱を繰り返すことが知られており、その際、稚ポリプ骨格に吸着し阻害したと推定できる。つまり、底質に蓄積しているリン酸塩がサンゴ骨格形成に影響を及ぼしていることが懸念される。

第三章：島嶼沿岸域の栄養塩動態と蓄積型栄養塩がサンゴ骨格形成に及ぼす影響

本研究で調査対象とした鹿児島県与論島は、数十年前までは、リーフ内にも琉球列島有数のミドリイシサンゴ群が生息していた。現在でも、サンゴ礁の礁縁部においては健全なサンゴがみられるが、リーフ内にミドリイシサンゴはほとんど見られない。

2016 年 7 月の調査では、沿岸域 9 地点の地下水に含まれている $NO_3\text{-N}$ は、平均で $412 \pm 117 \mu M$ と非常に高く、陸地から地下水へ栄養塩が涵養していると考えられる地下水中の溶存態 $PO_4\text{-P}$ は、平均で $0.4 \pm 0.3 \mu M$ とさほど高い値ではなかったが、全リン (TP) は $1.2 \pm 0.6 \mu M$ と比較的高かった。琉球石灰岩地域では地下水帯水層はシンクホールやケーブ等の空洞も多数発達しており、 $PO_4\text{-P}$ が帯水層を覆う石灰岩に吸着し溶存態 $PO_4\text{-P}$ が減少していると考えられる。TP が溶存態 $PO_4\text{-P}$ と比較して平均で 3 倍濃度が高かったのは、石灰質の懸濁粒子に吸着していることが考えられる。また、沿岸域の大金久海岸の海底湧水 (SGD) では、 $NO_3\text{-N}$: $165.4 \mu M$, 溶存態 $PO_4\text{-P}$: $0.9 \mu M$, TP: $1.0 \mu M$ であった。つまり、沿岸域の地下水中に涵養した栄養塩が海底湧水から海域に流出している実態を明らかに出来た。しかし、SGD のポイントから離れた距離の 10 地点の海水では、 $NO_3\text{-N}$: $1.2 \mu M$, 溶存態 $PO_4\text{-P}$ は検出されず、TP でも $0.1 \mu M$ と低かった。吸着

性の低い $\text{NO}_3\text{-N}$ は、海水と混合されて拡散した可能性があるが、 CaCO_3 への吸着性が高い $\text{PO}_4\text{-P}$ は、石灰質の底質に吸着した可能性が高い。SGD 付近の底質には、 $4.94 \mu\text{mol/g}$ の $\text{PO}_4\text{-P}$ が吸着していた。また、リーフの礁縁部に最も近い Pt.5 の底質にも $5.17 \mu\text{mol/g}$ と SGD 付近の底質と同程度の $\text{PO}_4\text{-P}$ が吸着しており、サンゴ骨格形成に及ぼす影響が懸念される。

実際、大金久海岸の SGD 付近で採取した底質 10 g の上に稚ポリプを着底させたスライドガラスを置き、20 日間、小笠原天然海水 $25 \text{ mL}/2 \text{ days}$ で飼育したところ、オルソリン酸塩を $5 \mu\text{M}$ $0.5 \text{ mL}^{-1} \text{ day}^{-1}$ の濃度で飼育した稚ポリプと同様に外殻が形成されなかった。底質に吸着していたオルソリン酸塩の一部が着脱したためと推定できる。底質に蓄積しているリン酸塩がサンゴ骨格形成に影響を及ぼすことを初めて明らかにすることができた。

総括

本研究により、リン酸塩はサンゴ稚ポリプの骨格表面に吸着し、骨格形成を阻害することが分かった。実環境での影響を検証するためには、陸域から流入するリン酸塩の負荷量や底質に蓄積したリン酸塩の実態解明をする必要があることが分かった。島嶼特有の水循環を考慮すると、陸域にある地下水の水質を管理改善することで、畜産や農業と沿岸域の生態系保全を両立出来ると考えられる。