学際連携研究報告書

平成２９年度

東京大学　大気海洋研究所

はじめに

学際連携研究は、平成２３年度より開始した公募型の共同研究事業である。本共同研究では、全国の個人またはグループの研究者と本研究所の教員が協力して、海洋や大気に関わる基礎的研究および地球表層圏の統合的理解の深化につながる研究を実施する。特に、複数の学問分野の連携による学際的な共同研究の推進を目指すことから、「学際連携研究」と名付けられた。本共同研究には以下の二つの形態がある。

（１）特定共同研究
本研究所が提案し、地球表層圏変動研究センターが中心となって計画的に推進する特定共同研究課題について、所内の研究グループと所外の研究者が協力して進める共同研究。

（２）一般共同研究
全国の個人またはグループが提案する研究テーマについて、所外と所内の研究者が協力して進める共同研究で、本所の研究目的に貢献が期待できるもの。新しい研究の展開のきっかけとなるポテンシャルを秘めた萌芽的あるいは試行的研究を歓迎する。また、新規プロジェクトの立案にむけてのフィージビリティ研究（打ち合わせ会議や予備調査の実施などを含む）も審査の対象とする。

平成２９年度の実績は、特定共同研究の応募数が５件（同採択数４件）、一般共同研究の応募数が１０件（同採択数５件）であった。

本冊子は、平成２９年度採択課題の成果報告をまとめたものである。関連分野の研究者の皆様に有効にご活用いただけると幸いである。

東京大学大気海洋研究所
共同利用運営委員会
学際連携研究部会

平成29年度学際連携研究　一覧

【特定共同研究】

番号	申込者氏名	所属機関	役職	研究課題	大気海洋研究所共同研究教員
1	平瀬　祥太朗	東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所	助教	更新世の日本海隔離によって生じたアゴハゼ2グループの交雑集団のゲノミクス	木暮　一啓 吉澤　晋 岩崎　渉
2	須藤　雄気	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）	教授	海洋微生物ロドプシンの多様な光エネルギー利用機構の解明	木暮　一啓 吉澤　晋
3	後藤　和久	東北大学災害科学国際研究所	准教授	高精度放射性炭素年代測定に基づく仙台平野における古津波履歴の再評価	横山　祐典
4	鈴木　淳	産業技術総合研究所	グループ長	石灰化生物の体サイズを用いた古水温復元技術の開発	入江　貴博

【一般共同研究】

番号	申込者氏名	所属機関	役職	研究課題	大気海洋研究所共同研究教員
1	神田　真司	東京大学大学院理学系研究科	准教授	遺伝学的・生理学的アプローチによる環境適応研究の推進	兵藤　晋
2	水川　薫子	東京農工大学農学部	助教	二枚貝を用いた沿岸環境汚染モニタリングの新たな可能性：高疎水性下水汚染マーカーLABsを用いたアプローチ	白井　厚太朗 井上　広滋
3	山下　麗	東京農工大学農学府・農学部	産学官連携研究員	海洋マイクロプラスチックの沈降過程の検証	福田　秀樹 津田　敦
4	筧　茂穂	水産研究・開発機構東北区水産研究所	主任研究員	サンマ耳石の酸素安定同位体比の高精度分析による産卵回遊時の水温履歴の推定	伊藤　進一 白井　厚太朗
5	塩崎　拓平	海洋研究開発機構	特任研究員	亜熱帯生物ポンプを支配するプランクトン群集の解明	濵崎　恒二

目次

学際連携研究報告書

【特定共同研究】

１．更新世の日本海隔離によって生じたアゴハゼ２グループの交雑集団のゲノミクス

２．海洋微生物ロドプシンの多様な光エネルギー利用機構の解明

３．高精度放射性炭素年代測定に基づく仙台平野における古津波履歴の再評価

４．石灰化生物の体サイズを用いた古水温復元技術の開発

【一般共同研究】

１．遺伝学的・生理学的アプローチによる環境適応研究の推進

２．二枚貝を用いた沿岸環境汚染モニタリングの新たな可能性：高疎水性下水汚染マーカーLABs を用いたアプローチ

３．海洋マイクロプラスチックの沈降過程の検証

４．サンマ耳石の酸素安定同位体比の高精度分析による産卵回遊時の水温履歴の推定

５．亜熱帯生物ポンプを支配するプランクトン群集の解明

更新世の日本海隔離によって生じたアゴハゼ 2 グループの交雑集団のゲノミクス

Genomic consequence of hybridization between the two groups of *Chaenogobius annularis* caused by isolation events of the Sea of Japan

平瀬祥太朗，東大・水実，E-mail: ashirase@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
細谷 将，東大・水実，E-mail: ahosoya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
菊池 潔，東大・水実，E-mail: akikuchi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
吉澤 晋，東大・大気海洋研，E-mail: yoshizawa@aori.u-tokyo.ac.jp
木暮一啓，東大・大気海洋研，E-mail: kogure@aori.u-tokyo.ac.jp
岩崎 渉，東大・理学，E-mail: iwasaki@bs.s.u-tokyo.ac.jp
Shotaro Hirase, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Sho Hosoya, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Kiyoshi Kikuchi, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Susumu Yoshizawa, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Kazuhiro Kogure, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Wataru Iwasaki, Department of Biological Sciences, The University of Tokyo

Abstract

Hybridization between divergent groups is recognized as a powerful mechanism of speciation and driving force in generating the biodiversity. *Chaenogobius annularis* is an intertidal goby distributed around Japanese archipelago with two geographical groups: Sea of Japan and Pacific Ocean groups. Our previous studies revealed that these groups exhibit a substantial genetic divergence and are forming a hybrid population that consists of mainly post-F_2 hybrids at the Taro coast of Iwate prefecture. We analyzed the genomic status of this population by *de novo* genome sequencing, RAD-Seq, amplicon sequencing, and whole mitogenome sequencing, and investigated genome evolution upon hybridization. RAD-Seq data revealed that the hybridization between the two divergent groups has generated a stable hybrid population with novel genomic composition. Moreover, mitogenome sequencing showed that significantly large numbers of nonsynonymous substitutions occurred in most haplotypes of the Pacific Ocean mitogenomes in the hybrid population. These findings would provide crucial insights on genome evolution upon hybridization between divergent groups.

１．はじめに

異所的に進化した集団間の交雑は、遺伝的変異の新たな組み合わせを生みだす重要な進化プロセスである(Seehausen, 2004)。ハゼ科魚類のアゴハゼには、更新世の日本海の隔離によって分岐した 2 つのグループが存在し、それらの交雑集団が分布境界にあたる岩手県田老に存在している(Hirase & Ikeda, 2015)。一般的には、交雑集団を介してグループ間のゲノム浸透が進行することが予測されるが、田老の交雑集団は数万年前に生じ、独自のゲノム組成を保持してきたことが示唆された(Hirase & Ikeda, 2015)。田老の海水温が他の沿岸域より低く、温帯生物にとって劣悪な環境であることを考え合わせると、この交雑集団は当該環境に適応した新規なグループである可能性がある。

２．問題設定・方法

遺伝的に異質な集団間の交雑で生じた個体はゲノム不和合を回避する必要があり、さらに両親集団との戻し交配も可能であることを考えると、一般には交雑集団が独立した第 3 のグループへ進化するのは困難である(Mallet, 2007)。しかし、ゲノム不和合を回避でき、両親集団からもたらされた多様なゲノム構成に起因する適応進化によって新規ニッチを獲得した場合には、第 3 のグループへの進化へと発展し得る(Mallet, 2007)。本研究は、このような交雑起源の新規集団の成立に伴うゲノム進化を捉えることを目的としている。前年度の本学際連携研究では、貴所地球表層圏変動研究センター生物遺伝子変動分野との連携により、RAD-Seq による交雑集団の集団ゲノミクス解析と②遺伝子内 SNP マーカーによる解析を行うための予備的解析を行った。本年度は、田老の交雑集団周辺のアゴハゼ標本をさらに拡充し、遺伝子内 SNP マーカーやミトコンドリアゲノム（ミトゲノム）も用いることで、交雑集団のゲノム進化についてさらに詳細に検討した。

３．結果と考察

（１）RAD-Seq による集団ゲノミクス解析

田老周辺においてアゴハゼを新たに採集して追加の RAD-Seq を行い、前年度までのデータと合わせて集団ゲノミクス解析を行った。SNP マーカーは、前年度に作成したアゴハゼのリファレンスゲノムに RAD-Seq リードをマッピングすることにより検出した。得られた 5,306 SNP マーカーを用いてクラスタリング解析を行った結果、岩手県の田野畑村から重茂半島にかけて、ゲノム構成の急激な変化が生じており、田老集団はその中心に位置していることが明らかとなった (Fig. 1)。BayesAss によって現在（最近の数世代）の遺伝子流動を推定したところ、世代あたりの個体の移出入は 1%となり、現在における遺伝子流動はある程度制限されていると考えられた。

田老の交雑個体は約 50%の混合比で各グループ由来のゲノムを有していることが示唆され、クラスター数を 4 と仮定した場合、田老とその周辺の集団は第 3 の独立したクラスターに帰属された (Fig. 1)。田老の交雑集団に 2 グループのゲノムがランダムに浸透しているかどうかを調べたところ、60%の座で一方のグループに偏ったゲノムの浸透が生じており、2 グループの交雑によって新たなゲノム構成を有するグループが生まれたことが示唆された。BayesAss の結果も考え合わせると、田老の交雑集団は過去に生じ、現在まで安定的に再生産を行ってきたと推測された。

（2）アンプリコンシーケンスによるミトゲノム-核ゲノム連鎖不平衡解析

核ゲノムの 80 遺伝子とミトゲノムの 13 遺伝子（OXPHOS 遺伝子群）は共進化しており（ミトコンドリア膜状の 4 つタンパク質複合体を形成するため）、異なる集団間の核 OXPHOS 遺伝子-ミトゲノムのペアはゲノム不和合を引き起こす。しかし、田老の交雑集団では 2 グループの核ゲノム、ミトゲノムがおおよそ 50%の割合で共存しており、尚且つ安定的に再生産を行なってきたと推測された。この結果は、核 OXPHOS 遺伝子-ミトゲノムの不和合を回避する何らかのメカニズムが存在する可能性を示している。このようなメカニズムとして考えられるのは、核 OXPHOS 遺伝子とミトゲノムとの特定の組み合わせの交雑個体の選択である（連鎖不平衡状態）。そこで、2 グループ間でアリルの分岐が生じている 16 の核 OXPHOS 遺伝子とミトコンドリアゲノムの組み合わせを田老の交雑個体について調査した。その結果、核 OXPHOS 遺伝子とミトゲノムの特定の組み合わせが選択されている傾向は検出されず、他の機構が関与していると考えられた。

（3）並列ミトゲノムシーケンス

2 グループの核ゲノム、ミトゲノムが安定的に共存してきた要因として他に考えられるのは、不和合を克服するような新たな変異が交雑集団のミトゲノムで生じている可能性である。この可能性については、Long PCR を用いた並列ミトゲノムシーケンスにより検証した。交雑集団とその他の集団のミトゲノム配列を比較した結果、交雑集団の太平洋型ミトゲノムのタンパク質コード領域において、アミノ酸を変化させる非同義置換が多く生じていることが明らかとなった。この結果は、核ゲノム-ミトゲノム間の不和合が急速なゲノム進化をもたらし、不和合が解消された可能性を示している。

４．まとめと今後の展望

ゲノムワイド SNP マーカーを用いた集団ゲノミクス解析により、田老の交雑集団は新規のゲノム構成を有しており、新たな遺伝的グループとして存在していることが改めて明らかとなった。さらに、この集団には 2 グループの核ゲノム、ミトゲノムがおおよそ 50%の割合で共存しており、さらに太平洋型のミトゲノムにおいて非同義置換が多く生じていることが示された。本研究の結果は、交雑に伴う核ゲノム-ミトゲノム不和合が、ミトゲノムの進化によって克服されている可能性を示しており、本研究をさらに発展させることで、交雑起源の新規集団の成立に関与するゲノム進化を明らかにできると考えられる。

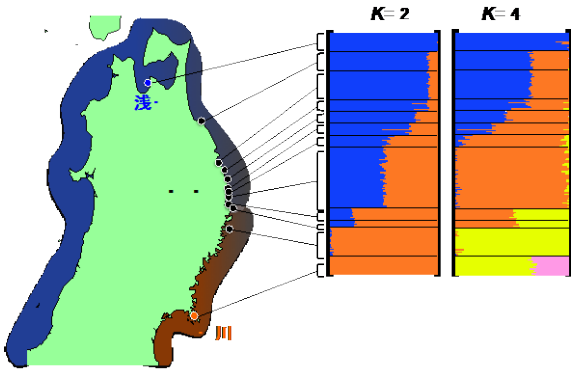


Fig. 1 Assignment plots of the Taro hybrid population and surrounding populations.

参考文献

(1) Seehausen, O., 2004: “Hybridization and adaptive radiation”, *Trends Ecol. Evol.*, 19, 198-207.

(2) Hirase, S., Ikeda, M., 2015: “Hybrid population of highly divergent groups of the intertidal goby *Chaenogobius annularis*”, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 473, 121-128.

(3) Mallet, J., 2007: “Hybrid speciation”, *Nature*, 446, 279.

海洋微生物ロドプシンの多様な光エネルギー利用機構の解明

Elucidation of light energy conversion mechanisms in the ocean by microbial rhodopsins

須藤 雄気, 岡山大・院医歯薬(薬), E-mail: sudo(at)okayama-u.ac.jp
木暮 一啓, 東大・大気海洋研, E-mail: kogure(at)aori.u-tokyo.ac.jp
吉澤 晋, 東大・大気海洋研, E-mail: yoshizawa(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Yuki Sudo, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University
Kazuhiro Kogure, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Susumu Yoshizawa, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

In organisms, including human beings and microorganisms in ocean, biological protein molecules are responsible for the light reception. However, in general, proteins are transparent and are thus not responsive in the visible light region. Therefore, photoreceptive proteins have evolved with a chromophore molecule, which can absorb visible wavelengths of light. One of the largest groups of photoreceptive proteins is the rhodopsin protein family (also called retinal protein), where vitamin-A aldehyde retinal is employed as a chromophore. On the basis of the background, rhodopsins serve as models both for membrane-embedded proteins and photoactive proteins. In addition, the photoresponsibility of rhodopsins is utilized as a fundamental tool for optogenetics, a new technology to control biological activity with light. In this study, we found and analyzed several new rhodopsin molecules from the microorganisms living in ocean surface for understanding the use of light energy on the earth.

１．はじめに

「どんな海洋生物が太陽の光エネルギーを利用しているのか？」と問われると「藻類などのクロロフィルを持つ光合成生物」、と答えるのが 2000 年代初頭までの常識であった。しかし、１５年ほど前に海洋細菌がプロテオロドプシン（PR）と名付けられた新しいタイプの光受容タンパク質を持つことが明らかとなりこの常識はくずれた。PR はレチナールを発色団として持つ光受容タンパク質ロドプシンの仲間で、光が当たると細胞内からプロトン（H^+）を排出するポンプ（外向き H^+ポンプ）として働く。作られた H^+濃度勾配は ATP 合成酵素を介して細胞内に再び取り込まれ、その際に ADP から ATP が産生される。ATP は生物のエネルギー通貨とも称され、高エネルギー物質として生物内の様々な反応に利用される物質であるため、結果として海洋細菌は光をエネルギーとして利用することができる。海洋表層では実に１３―８０%もの原核生物が PR 様のタンパク質を持つと見積もられており、ロドプシンが受け取る太陽光エネルギー量の推定は海洋生態系の理解に必要不可欠であると考えられている。

また近年の遺伝子解析技術の発展に伴い、未知ロドプシンが海洋細菌を中心に続々と見つかっている。また、ロドプシンの光応答性を利用して、動物の神経活動を含めた生命機能を操作する技術であるオプトジェネティクス（光遺伝学）において近年利用が進んでいる。このようにロドプシンは機能理解のみならず、光操作ツールへの応用までを含む基礎・応用の両面で注目されている。東京大学大気海洋研究所の木暮・吉澤らのグループは、海洋性微生物のロドプシンタンパク質の単離・同定の世界的トップランナーとして、２０１３年に光が当たるとナトリウムイオン（Na^+）を細胞内から細胞外に輸送するロドプシン（NaR）、２０１４年に塩化物イオン（Cl^-）を細胞外から細胞内に輸送するロドプシン（ClR）などの新規ロドプシンを海洋細菌から相次いで発見している。これにより、ロドプシンを介した光エネルギー利用がこれまで考えられていた以上に多様であることが示されてきた。一方、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）の須藤グループでは、様々なロドプシンの分光学的解析を通じて、機能発現メカニズムの詳細を続々と明らかにしており、ロドプシン解析の世界的トップランナーとして認められている。このような背景のもと、本プロジェクトでは、これら２つのグループの相互の利点を生かした新規ロドプシンの探索と機能発現メカニズムの解明に焦点をあて、共同研究の推進を計画した。

２．問題設定・方法

本研究は、海洋を中心とした環境中から新しいロドプシンを探索し、発現・精製および機能解析を行うことで、太陽光エネルギーと海洋生態系を繋ぐ、“微生物型ロドプシンによる新しい光合成機能”の多様性を解明することを目的とした。木暮・吉澤グループでは、これまでの研究で蓄積してきた「海洋メタゲノムデータおよび海洋細菌ゲノムデータ」から未知ロドプシンをバイオインフォマティクスを駆使することで見つけ出し（選定は共同で行った）、同グループが保有する「ロドプシン機能解析システム」で未知ロドプシンの機能の初期的な解析を行った。須藤グループでは、見出された未知ロドプシンを細胞中に発現させ、発現タンパク質を精製後、「分光学的解析システム」を用いて、タンパク質のフェムト秒～ミリ秒スケールでの変化を測定することで、ロドプシン機能の詳細を明らかにした。

本共同研究は 1. メタゲノム・微生物ゲノム解析によるビッグデータから目的遺伝子を探索する技術、2. 全遺伝子合成 DNA を用いた異種発現技術、3. 開発したロドプシン機能解析システムを用いた未知機能解析技術、4. フェムト～ミリ秒スケールでの分光解析技術を統合的に駆使することで可能となったものであり、世界的に見ても極めて独創的な研究テーマである。

３．結果と考察

本共同研究期間内（H29年度）に論文発表（もしくは掲載決定）した成果について、以下に時系列的な箇条書きでその結果と考察を述べる。

① 吉澤らが、日本海より単離同定した海洋性真正細菌 *Rubricoccus marinus*より、新奇クレードを形成する２つのロドプシンを見出し、それぞれ *Rubricoccus marinus* Xhenorhodopsin（*Rm*XeR）および *Rubricoccus*

marinus Halorhodopsin（*Rm*HR)と命名した。このうち、*Rm*XeRについて須藤グループで詳細な機能解析を行い、*Rm*XeRがPRと逆の機能である内向きH^+ポンプとして機能することを明らかにした。また、分光学的解析から、H+輸送メカニズムを提唱した［1]。

② *Rm*HRの分子系統的解析を行い、類似のロドプシン様タンパク質が広く海洋に存在することを明らかにするとともに、*Rm*HRが古細菌から真正細菌への水平伝播により*Rubricoccus marinus*に取り込まれたとの考察を行った。また、機能・分光学的解析を行い、*Rm*HRが細胞内から細胞外への外向きCl^-ポンプであることを明らかにするとともに、Cl^-輸送機構を提唱した［2]。

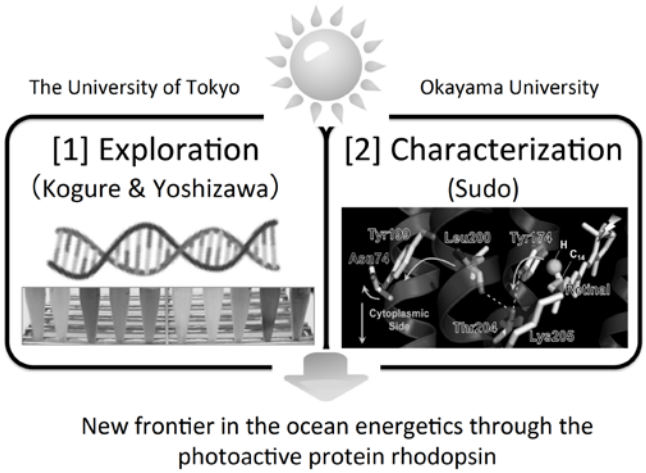


Fig. 1 Schematic collaboration diagram.

４．まとめと今後の展望

参考文献に記したように、昨年度（H28年度）の５報の原著論文［3-7]に加えて、今年度（H29年度）も引き続き複数（２報）の原著論文［1,2]を発表（もしくは掲載決定）することができた。このことが示す通り、共同研究は極めて順調に研究が進んでいる。また、これら以外にも、論文未発表の様々なロドプシンを続々と見出すことに成功しており、その分光学的解析を鋭意進めている。このように、今後も、更なる成果が得られることが強く期待される。

ロドプシンを介した太陽光エネルギー利用の理解は、微生物生態系の理解には必要不可欠であり、本研究による成果は「海洋生態系における新しい光エネルギーフローモデル」を創出するという大きなインパクトがある。また地球表層域でのエネルギーフローの概念を変えるだけではなく、進化上の起源、異なる微生物系統群の間での遺伝子の分布と伝搬パターン、他のロドプシンファミリーの中での進化的および機能的な位置づけ、などに関する多様な研究領域へのインパクトも期待される。加えて、ロドプシンを動物細胞に発現させ光で生命現象を操る手法（光遺伝学：オプトジェネティクスと呼ばれる）への応用も現在試みており、幾つかのロドプシンについては、既に成功している。このように、未知ロドプシンの機能解明は神経科学や環境科学を中心とした他分野の発展にも大きく貢献することが期待される。

参考文献

(1) Inoue S, Yoshizawa S, Nakajima Y, Kojima K, Tsukamoto T, Kikukawa T, & *Sudo Y, 2018: "Spectroscopic characteristics of *Rubricoccus marinus* xenorhodopsin (*Rm*XeR) and a putative model for its inward H^+ transport mechanism", Phys. Chem. Chem. Phys., 20, 3172-3183.

(2) *Nakajima Y, Tsukamoto T, Kumagai Y, Ogura Y, Hayashi T, Song J, Kikukawa T, Demura M, Kogure K, Sudo Y, & *Yoshizawa S, 2018: "Presence of a haloarchaeal halorhodopsin-like Cl^- pump in marine bacteria", Microbes Environ., in press.

(3) *Sudo Y, & *Yoshizawa S, 2016: "Functional and photochemical characterization of a light-driven proton pump from the gammaproteobacterium *Pantoea vagans*", Photochem. Photobiol., 92, 420-427.

(4) Doi S, Tsukamoto T, Yoshizawa S, *Sudo Y, 2017: "An inhibitory role of Arg-84 in anion channelrhodopsin-2 expressed in *Escherichia coli*" Sci. Rep., 7, 41879.

(5) Kanehara K, Yoshizawa S, Tsukamoto T, *Sudo Y, 2017: "A phylogenetically distinctive and extremely heat stable light-driven proton pump from the eubacterium *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941^T", Sci. Rep., 7, 44427.

(6) *Tsukamoto T, Yoshizawa S, Kikukawa T, Demura M, & *Sudo Y, 2017: "Implications for the light-driven chloride ion transport mechanism of *Nonlabens marinus* rhodopsin 3 by its photochemical characteristics", J. Phys. Chem. B, 121, 2027-2038.

(7) Niho A, Yoshizawa S, Tsukamoto T, Kurihara M, Tahara S, Nakajima Y, Mizuno M, Kuramochi H, Tahara T, Mizutani Y, & *Sudo Y, 2017: "Demonstration of a light-driven SO_4^{2-} transporter and its spectroscopic characteristics", J. Am. Chem. Soc., 139, 4376-4389.

高精度放射性炭素年代測定に基づく仙台平野における古津波履歴の再評価

Re-examination of paleotsunami history on the Sendai Plain based on high precision ^{14}C dating

後藤 和久，東北大・災害研，E-mail: goto(at)irides.tohoku.ac.jp
石澤 尭史，東北大・地学，E-mail: ishizawa.takashi.r8(at)dc.tohoku.ac.jp
手塚 寛，東北大・地学，E-mail: hiroshi.tetsuka.s1(at)dc.tohoku.ac.jp
横山 祐典，東大・大気海洋研，E-mail: yokoyama(at)aori.u-tokyo.ac.jp
宮入 陽介，東大・大気海洋研，E-mail: miyairi(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Kazuhisa Goto, IRIDeS, Tohoku University
Takashi Ishizawa, Department of Earth Science, Tohoku University
Hiroshi Tetsuka, Department of Earth Science, Tohoku University
Yusuke Yokoyama, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Yosuke Miyairi, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Tsunami deposit is useful tool for estimating prehistoric tsunami hazard. At Sendai plain, conflict between sedimentological and archaeological paleotsunami studies makes it difficult to reconstruct robust tsunami history. The difference may be due to the difference of geomorphological properties of each study site, and consequent ^{14}C dating results. We therefore concluded that paleotsunami history should be estimated from integrative approach with consideration of the preservation potential of tsunami deposit at each site. Our dating results at inland and nearshore sites were correlated reasonably, and thus could be contributed to reconstruct paleotsunami history.

１．はじめに

津波堆積物は、津波により侵食・運搬され、別の場所に再堆積した堆積物の総称である（澤井，2012）。ある津波で形成された堆積物の空間的な分布は、その津波による浸水域を推定する際の根拠となり、津波堆積物の年代からは津波の発生頻度を推定できる。このように、津波堆積物研究から古津波の履歴と規模の評価が可能であり、特に先史時代に発生した巨大災害の評価手法として重要視されている。

仙台平野では、1990 年代前半頃から津波堆積物研究が精力的に実施されてきた（例えば、Minoura and Nakaya, 1991）。そして、869 年貞観津波の浸水範囲や規模等が検討されるなど（Sawai et al.,2012）、世界的にみても仙台平野は古津波研究の先進的地域と言える。しかし、多くの研究が実施されたにも関わらず津波履歴の統一的見解が得られていない。地質学的研究によれば、約 400～600 年前（歴史記録によれば 1611 年あるいは 1454 年）、1100 年前（869 年貞観津波）、1500 年前（西暦 500 年）、2500 年前（紀元前 500 年）に巨大津波が発生したと推定されている（Sawai et al., 2012）。一方、考古学的研究では地質学の既往研究では報告されていなかった約 2000 年前の弥生時代に巨大津波が発生した可能性が示唆されている（仙台市教育委員会，2010）。その一方で、915 年十和田 a（To-a）火山灰の直下に貞観津波堆積物が見出されていない。このように、仙台平野では地質学と考古学で古津波履歴が一致していないという問題がある。そこで本研究は、地質・考古学的研究のギャップを埋め、仙台平野の古津波履歴を再評価することを目的とする。

２．問題設定・方法

仙台平野で古津波履歴が十分に解明されていない要因として、津波堆積物の調査地点選定及び年代推定の困難さが挙げられる。仙台平野は、約 1 km/1000 年の速度で海岸線が沖側に移動してきた。そのため、現在の沿岸部では古い時代の津波堆積物が、内陸部では新しい時代の津波堆積物がそれぞれ存在しないと考えられる。この点で、地質学的調査は堆積物が保存されやすい沿岸部の低湿地帯で行われたのに対し、考古学的調査は内陸部の遺跡発掘現場で行われてきた。また沿岸域では津波のエネルギーが強く、底面侵食の影響で津波堆積物直下の試料から得られる年代は、実際の津波発生年代よりも古い値を示すことも考えられる。

このような研究地点による古津波履歴の差を評価するため、仙台平野の内陸部（SND-1）と沿岸部（SND-2）で得られた津波堆積物の放射性炭素年代測定を行った（Fig. 1）。測定した年代は、測定試料の層位関係を用いた堆積年代のベイズ推定（Bronk Ramsey, 2008）を行い、高精度で年代推定した。

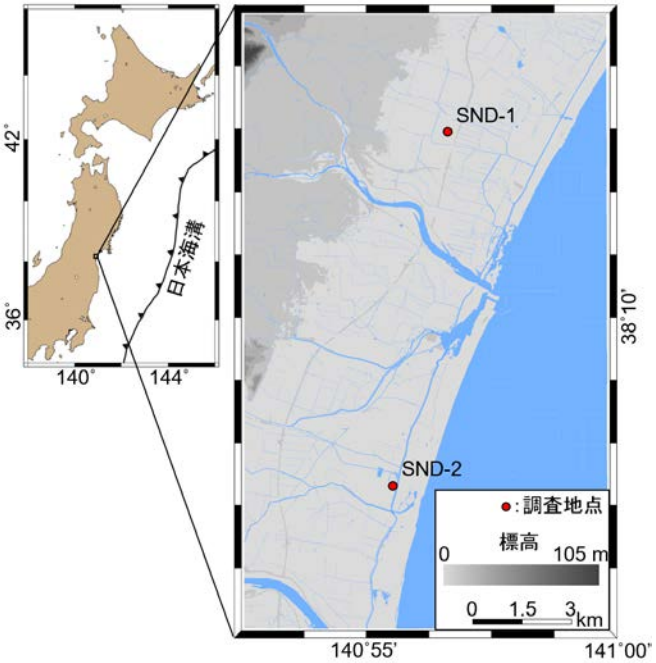


Fig. 1 Location map of the study area. Base map is made with 5 m mesh DEM data provided by the Geospatial Information Authority of Japan.

３．結果と考察

仙台平野で計 13 点の放射性炭素年代測定を実施した。測定試料としては泥炭層の全有機炭素（TOC）を用いた。得られた年代測定結果と To-a 火山灰層の堆積年代（西暦 915 年）を比較したところ、To-a 直下から得られた年代測定結果は西暦 801～903 年であり、両者の年代は整合的であった。各地点における年代測定結果は OxCal 4.3（Bronk Ramsey, 2009）を用いて解析した。層序順に連続的に測定した年代値について Sequence モデル（Bronk Ramsey, 2008）を用いて制約し、その結果を基に津波堆積物の年代を高精度で推定した。

沿岸部と内陸部で得られた年代値の比較から、調査地点と海岸からの距離に応じて復元される古津波履歴が異なる可能性があることがわかる（Fig. 2）。具体的には、沿岸部（SND-2）では 14 世紀頃のイベント層があるが内陸部では確認できず、このイベント層は沿岸域のみに影響を及ぼすような小規模津波あるいは高潮等で形成された可能性がある。一方、内陸部（SND-1）では考古遺跡の既往研究では確認されていなかった西暦 869 年貞観津波によると考えられる堆積物を認定できた。内陸部では人為的な地層の擾乱が激しいことが指摘されているため（例えば、斎野, 2012）、考古遺跡周辺ではその擾乱で貞観津波堆積物を含む地層が消失している可能性もある。また沿岸部での津波堆積物の年代測定結果は内陸部に比べて、全体的にやや古い年代値を示すという結果も得られた。この傾向は、形成年代が古い津波堆積物ほど大きく、最大で 150 年の年代差が生じている。今回調査対象とした年代では、仙台平野の海岸線は沖側に前進を続けてきたので、同一地点においても古い年代の津波堆積物ほど津波による侵食力の強い海岸付近で形成されたためと考えられる。

本研究成果を踏まえると、既往研究で未解決の問題であった古津波履歴の地点間の差異も、地点ごとの津波の外力あるいは地形的特性の違いを反映しているものと考えられる。こうした現象が起きていることを考えると、古津波履歴解明のためには、当該地域で複数地点における津波堆積物の年代対比を実施する必要がある。

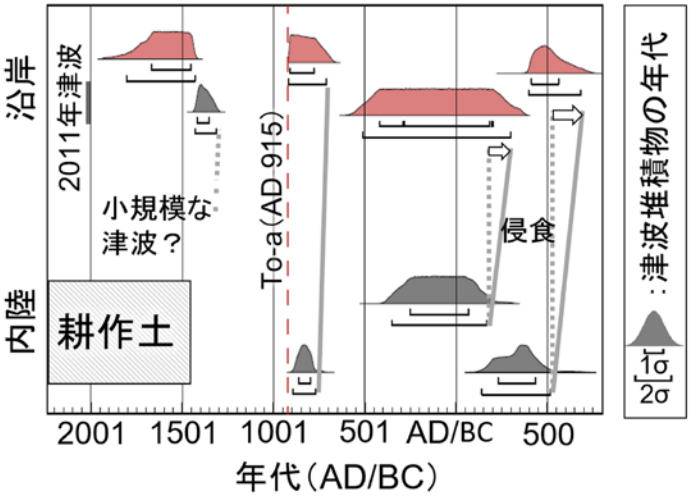


Fig. 2 Dating results of tsunami deposit at study sites. The probability distributions described in red were estimated from previous studies (Sawai et al., 2012; Miyairi et al., 2017).

４．まとめと今後の展望

本研究結果から、古津波履歴を復元する際の調査地点選定の重要性が明らかになった。各地点で津波堆積物の保存ポテンシャルや、得られる年代測定結果の確度を十分精査し、統合的に古津波履歴を復元することが重要である。

今後は年代測定の確度を上げるために、泥炭層の TOC だけではなく他種類の測定試料を用いた際にも同様の結果が得られるのかを検証すべきである。また、特に内陸部における人為的な地層の擾乱を評価するために、年代測定を高密度で実施し、地層記録の欠損が無いことを明らかにする必要もある。そうすることで連続的な地層記録の中での津波堆積物の有無を評価することができ、より信頼性の高い古津波履歴を復元できると期待される。

参考文献

(1) Bronk Ramsey, C., 2008: “Deposition models for chronological records”, Quat. Sci. Rev., 27, 42-60.

(2) Bronk Ramsey, C., 2009: “Bayesian analysis of radiocarbon dates”, Radiocarbon, 51(1), 337-360.

(3) Minoura, K., Nakaya, S., 1991: “Traces of tsunami preserved in inter-tidal lacustrine and marsh deposits: some examples from northeast Japan”, The Journal of Geology, 99(2), 265-287.

(4) 宮入陽介，石澤尭史，後藤和久，横山祐典，2017：“泥炭試料のウイグルマッチング法を用いた津波堆積物の高精度年代決定”，日本第四紀学会講演要旨，P-09.

(5) 斎野裕彦，2012：“仙台平野中北部における弥生時代・平安時代の津波痕跡と集落動態”，平成 19 年度～平成 23 年度文部科学省私立大学学術高度化推進事業「オープン・リサーチ・センター整備事業」東北地方における環境・生業・技術に関する歴史動態的総合研究　研究成果報告書Ⅰ，225-257.

(6) 澤井祐紀，2012：“地層中に存在する古津波堆積物の調査”，地質雑，118，535-558.

(7) Sawai, Y., Namegaya, Y., Okamura, Y., Satake, K., Shishikura, M., 2012: “Challenges of anticipating the 2011 Tohoku earthquake and tsunami using coastal geology”, Geophys. Res. Lett., 39, L21309.

(8) 仙台市教育委員会，2010：“沓形遺跡－仙台市高速鉄道東西線関係遺跡発掘調査報告書Ⅲ－”，仙台市文化財調査報告書，363，1-334.

石灰化生物の体サイズを用いた古水温復元技術の開発

Study on paleo-temperature reconstruction based on body size of marine calcifiers

鈴木 淳，産総研・地質情報，E-mail: a.suzuki@aist.go.jp
入江 貴博，東大・大気海洋研，E-mail: irie@aori.u-tokyo.ac.jp
Atsushi Suzuki, Geological Survey of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST).
Takahiro Irie, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

We examined the relationship between the stable oxygen isotope ratio ($\delta^{18}O$) of shells and the temperature at which the shells were mineralized by living intertidal cowries (*Monetaria annulus*), aiming to establish a new method for estimating paleo-temperature experienced by ectotherms from body size of their exoskeletal fossils. The shells analyzed in this study are the by-products of a previously performed laboratory experiment, in which wild-collected *Monetaria annulus* were reared at 6 constant temperatures. A simple regression analysis indicated that the relationship between temperature and $\delta^{18}O$ is linear with a negative slope, as widely known across marine calcifiers. We also preliminarily conducted an X-ray diffraction analysis of a fossil cowrie shell, collected from the Pleistocene Kazusa Group in Boso Peninsula. The fossil was shown to remain purely aragonitic, suggesting the possibility of the original $\delta^{18}O$ compositions were preserved in the fossil shells. The method for estimating paleo-temperature based on body size can be tested to fossil cowrie shell specimens.

１．はじめに

海洋無脊椎動物の作る外骨格や魚類の持つ耳石は、石灰化が起こった環境の情報を記録しているため、生物地球化学や水産科学の分野で、これまで詳しく研究されてきた(Campana, 1999；川幡，2008；ヘフス，2012)。特に温度計としての利用は歴史が古く、サンゴや有孔虫の炭酸塩骨格の酸素安定同位体比（$\delta^{18}O$）は、古気候の復元に大きく貢献してきた(鈴木, 2017; Suzuki, in press)。炭酸塩骨格の安定同位体比や微量元素比は、古環境の復元ツールとしてたいへん強力な手法であるが、初生的にあられ石からなる骨格の場合、とりわけ時代の古い化石では、地層中での続成作用によるあられ石から方解石への結晶形変化などによって、復元が正確に行えない場合も多い(Takada et al., 2017)。この問題を解決することができると期待されるひとつの方法として、「生育時の温度が低いほど成長後の体サイズが大きくなる」という外温動物で広く見られる経験則の利用が挙げられる。この経験則は表現型可塑性（遺伝子型が同じでも経験した環境条件によって表現型が変わる現象）の一種で、温度－サイズ則と呼ばれている(Atkinson, 1994; 入江, 2010)。このことは、骨格の化学的組成情報から復元された温度の情報とは別に、種内であれば体サイズ変異に関する情報もまた、古環境の復元に利用できる可能性を示唆している。

２．問題設定・方法

本研究では、これまで体サイズの種内変異について詳しい生態学的研究が進められてきたタカラガイ類（軟体動物門腹足綱）を材料に選んだ。決定成長者であるタカラガイでは、成長時の温度が高いほど最終的な体サイズが小さくなることが既に知られており、貝殻化石の体サイズから古水温を推定することが、原理としては可能であると考えられる。しかしながら、体サイズの決定因子は温度にも存在するため、本研究では現生個体と化石標本を対象として、温度・酸素安定同位体比 $\delta^{18}O$・体サイズの三者の関数関係をより詳しく理解するための基礎的知見を得ることをめざす。

①現生貝殻標本の分析：一定温度条件（21～34℃の 6 条件）での飼育(Irie and Morimoto, 2016)から得られた *Monetaria annulus* ハナビラダカラ計 51 個体の貝殻を Micromass 質量分析計で分析した（21℃：11 個体、24℃：10 個体、27℃：10 個体、30℃：3 個体、33℃：7 個体、34℃：10 個体）。分析に用いた粉末試料は、カルス形成期に石灰化で作られた貝殻の外縁部から電動工具を用いてサンプリングした。この炭酸塩サンプルからの二酸化炭素ガスの生成を行った。各サンプルを約 90 - 110 μg 程度秤量して、ガラス枝管内部に入れ、25℃の恒温槽内にて、真空下で 100% リン酸約 0.5 ml と 5 時間反応させた。反応によって発生したガスのうち、測定に用いる二酸化炭素ガスのみを精製し、ステンレス試料管に回収し同位体比測定に使用した。同位体比標準物質 NBS-19 を用いて分析値の標準化を行い、結果は VPDB スケールにて表記した。

②化石貝殻標本の分析：過去に実施した予備的な分析の結果として、タカラガイの殻はあられ石から構成されていることが判明している（未発表）。続成作用によってあられ石から方解石への変質が起こっていないことを確認するために、更新世上総層群梅ヶ瀬層で採集されたタカラガイ化石の一部を株式会社リガク製粉末X線回折装置 RINT2000 により X 線回折分析を実施した（Cu 管球, 40 kV, 100 mA）。回折プロファイルの測定範囲は 25～35°である（スキャン速度 2° / min）。

３．結果と考察

51 個体について得られた飼育温度 X と $\delta^{18}O$ の測定値 Y の間に直線関係 $Y = aX + b$ を仮定して、最小自乗法によって母数 a と b の値を推定した（図 1）。回帰直線の母数の点推定値は a = -3.277、b = -0.168 で、標準誤差はそれぞれ 0.158 と 0.00568 となった。$\delta^{18}O$ の温度依存性は、-0.305‰ $℃^{-1}$となり、サンゴなどに一般に知られている値（-0.25～-0.18, Gagan et al., 2012）よりも大きい。

X 線回折分析を実施した更新世上総層群梅ヶ瀬層のタカラガイ化石(試料番号 FCY074)のプロファイルを Fig. 2 に示す。方解石の主回折面である 2θ = 29°付近にはピークが認められず、あられ石の回折面のみにピークが見られた。これは、タカラガイの殻の初生鉱物であるあられ石が、比較的良好に保存されていて、貝殻の初生的な安定酸素同位体比組成が保持されている可能性を示唆するものである。

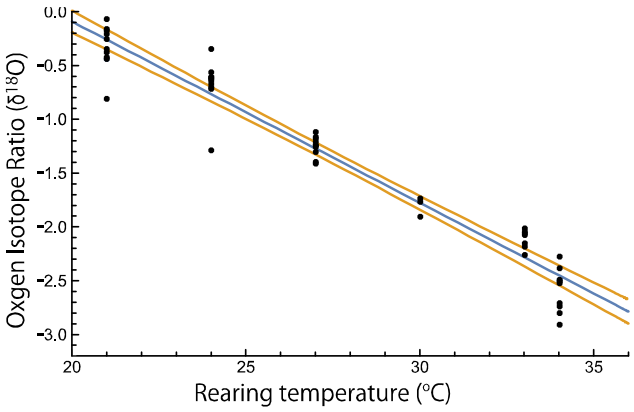


Fig 1. The relationship between rearing temperature and $\delta^{18}O$. A regression line with 95% confidence bands is shown.

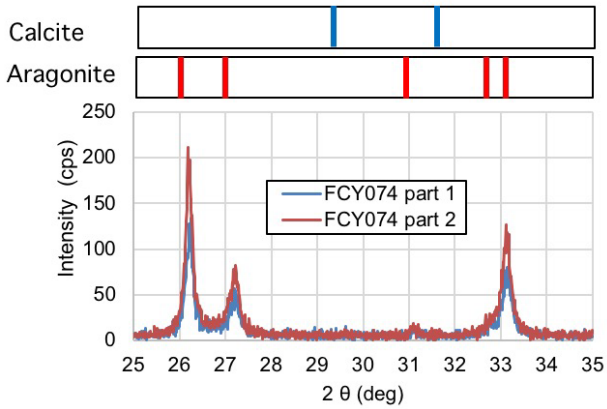


Fig. 2 X-ray diffraction (XRD) profiles of two fractions of a fossil shell specimen of *Erosaria helvola* (sample id: FCY074).

４．まとめと今後の展望

軟体動物門腹足綱に分類される *Monetaria annulus* ハナビラダカラでは、石灰化時の水温と安定酸素同位体比 $\delta^{18}O$ の間には負の直線関係が見出された。また上総層群梅ヶ瀬層で採集された貝殻化石では、続成作用による方解石への変質が見られなかったことから、今後 $\delta^{18}O$ を測定することで、古水温復元の可能性が示唆された。タカラガイの仲間では、既に体サイズと経験水温の間に負の可塑的関係性が実証されている (Irie et al., 2013)。従って、続成作用を被った標本に関しては、体サイズに対する温度以外の要因による効果を除去することさえできれば、サイズから古水温を復元する技術を将来確立することが可能であると期待される。

本研究を進めることで期待される今後の展望として、科学の様々な分野に対する貢献を以下の①～④にまとめた：

①生物地球化学への貢献：本研究で安定酸素同位体比の測定を実施した現生 51 個体の貝殻は、既に Sr/Ca 比の測定が完了している標本セットである。従って、今回得られた測定値と併せて誤差に関する分散共分散行列を推定すれば、$\delta^{18}O$ や Sr/Ca に対する海水の化学的組成（塩分・酸素同位体比・微量元素含有量）の影響を除去して、純粋に温度の成分だけを抽出するための統計的手法を確立することができるだろう。

②古気候学・古生態学への貢献：時代の古い化石では、地層中での続成作用による影響で炭酸カルシウムの組成分析から古環境を推定することが困難になる。本研究では、この問題の克服を目指して、経験温度に依存した体サイズの種内変異を利用するための枠組み構築を試みた。この体サイズの温度依存性は分類群の壁をまたいで広く見られるだけでなく、細胞サイズや卵サイズについてもあてはまることが知られている。従って、有孔虫のような単細胞生物や、造礁サンゴやコケムシのような群体生物の骨格化石の生物幾何学的情報から古水温を推定するという新技術を確立するための先駆けとなるかもしれない。

③生態学への貢献：地球温暖化の懸念を背景として、外温動物による温度適応の研究に関心が集まっている。本研究の成果として貝殻から石灰化当時の経験水温が推定できるようになれば、ある個体群がどのようなフェノロジーを経た個体から構成されているか、個体による経験水温の構成は個体群間でどのような地理的パターンを示すかといった、生態学の新しいアプローチが可能となる。

④水産科学への貢献：本研究で扱うタカラガイ類は、数多くの水産有用種を擁する軟体動物門に属する分類群である。各個体が成長期を通して経験した水温履歴を復元するための手法の確立は、水産科学において大きな需要がある。これまで、軟体動物の外骨格では、$\delta^{18}O$ が温度の指標として広く用いられてきた。それに対して、Sr/Ca が何の指標となるのかについては、コンセンサスがない。分類群によっては温度の指標として利用できるという報告もあるが、温度との相関は見かけ上のもので、利用すべきでないという主張も存在する。今回得られたデータを含めた一連の研究成果は、これらの議論に終止符を打つことに貢献できる可能性が高い。

参考文献

(1) Campana S. E., 1999: “Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications”, Mar. Ecol. Prog. Ser., 188, 263-297.

(2) 川幡穂高, 2008: "海洋地球環境学－生物地球化学循環から読む" 東京大学出版会.

(3) 鈴木　淳, 2017: "サンゴ骨格に基づく気候及び海洋環境の研究" 海洋化学研究, 30, 73-89.

(4) Suzuki A., “Coral-based approaches to paleoclimate studies, future ocean environment assessment, and disaster research” In Endo, K., Kogure, T., Nagasawa, H., eds., *Biomineralization - From Molecular and Nano-structural Analyses to Environmental Science*, Springer Japan, in press.

(5) Takada, N., Suzuki, A., Ishii, H., Hironaka, K., Hironiwa, T., 2017: “Thermoluminescence of coral skeletons: a high-sensitivity proxy of diagenetic alteration of aragonite”, Sci. Rep., 7, 17969.

(6) ヘフス J., 2012: "同位体地球化学の基礎" シュプリンガー・ジャパン.

(7) Atkinson D., 1994: “Temperature and organism size: a biological law for ectotherms?”, Adv. Ecol. Res. 25, 1-58.,

(8) 入江貴博, 2010: "温度-サイズ則の適応的意義" 日本生態学会誌, 60, 169-181.

(9) Irie T., N. Morimoto, 2016: “Intraspecific variations in shell calcification across thermal window and within constant temperatures: Experimental study on an intertidal gastropod *Monetaria annulus*”, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 483, 130-138.

(10) Irie T., N. Morimoto, K. Fischer, 2013: “Higher calcification costs at lower temperatures do not break the temperature-size rule in an intertidal gastropod with determinate growth”, Mar. Biol. 160, 2619-2629.

(11) Gagan, M.K., Dunbar, G.B., Suzuki, A., 2012: The effect of skeletal mass accumulation in Porites on coral Sr/Ca and δ18O paleothermometry, Paleoceanography, 27, PA1203

遺伝学的・生理学的アプローチによる環境適応研究の推進

Genetic and physiological analysis of the mechanism underlying adaptation to freshwater in teleosts

神田真司，東大・院理，E-mail: shinji(at)bs.s.u-tokyo.ac.jp
新屋美紗，東大・院理，E-mail: shinyamisa(at)bs.s.u-tokyo.ac.jp
今野紀文，富山大・院理工，E-mail: nkonno(at)sci.u-toyama.ac.jp
兵藤晋，東大・大気海洋研,，E-mail: hyodo(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Shinji Kanda, Graduate School of Science, The University of Tokyo
Misa Shinya, Graduate School of Science, The University of Tokyo
Norifumi Konno, Graduate School of Science and Engineering, Toyama University
Susumu Hyodo, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Teleosts, the most prospered vertebrate group, spread their lives to both seawater and freshwater environments. Accordingly, they should have at least two distinct mechanisms to adapt to these environments. However, both mechanisms are not understood precisely, probably due to the lack of genetic manipulation in these species. Here, we applied transgenic and genome techniques to an euryhaline teleost, medaka, and have been establishing genetically modified medaka for physiological experiments. In this report, we established a isotocin GFP transgenic line, whose isotocin neurons are visualized by GFP, and succeeded in establishing a single cell experimental protocol using loose-cell patch clamp technique. We found that isotocin neurons increase their firing activity in salt water environment, which is opposite to vasotocin neurons, neurotransmitters of which and isotocin neurons are supposed to be duplicated from a single gene. Target tissues of them are now ongoing by using in situ hybridization and gene knock-in technique.

１．はじめに

海洋で最も繁栄している脊椎動物は真骨魚類である。真骨魚類は、淡水、海水、汽水域に幅広く分布していることから、それぞれの環境に応じた適切な浸透圧調節機構を利用している。中には、広塩性と呼ばれ、一つの個体で淡水と海水を行き来する能力を持つ魚類が存在する。海で生まれ、川に遡上するウナギ、川で生まれ、海に下降するサケなど、多くの生物が知られるが、我々のペットとしてなじみ深いメダカもまた、海に多く分布するダツやサンマの仲間であり、海水に適応することのできる広塩性魚類である[(1)]。メダカは、2ヶ月で性成熟、繁殖し、トランスジェニックなどの技術も広く用いられている。さらに、ゲノムデータベースの充実などもあり、遺伝学的解析を行うのに最適な魚類のひとつである。本研究では、ヒトを含めた陸生生物で水分保持に必須な機能を持つバソプレシン神経系が水棲動物でどのような機能を持つか、メダカを用いて検証した際に明らかになった意外な結果を元に[(2)]、広塩性魚類における淡水適応の一端の理解と、海水、淡水双方へ対応できるメカニズムの解明に向けた実験系の確立を行うことができた。

２．問題設定・方法

本研究の最終的な目標は、広塩性魚類の淡水・海水への適応メカニズムを明らかにすることである。なぜ広塩性魚は海水にも淡水にも適応することができ、狭塩性魚はできないのか。適応生理学における長年の大きな謎を、遺伝学的手法により明らかにすべく、特に前年度の当グループの研究を含めた過去の研究により、浸透圧調節への関与が強く示唆されているイソトシン・バソトシンニューロンの神経科学的な解析を行った。本年度は、近年急速に普及が進んでいるTALEN/CRISPR 技術を用い作成した遺伝子ノックアウト個体の表現型の解析をさらに詳細に行った。また現在までいずれの魚種においても存在しないイソトシンを GFP で可視化したトランスジェニックメダカを作成、パッチクランプ法を用いた電気生理学的実験を通し、その電気生理学的性質を明らかにした。さらに、バソトシンやイソトシンがどのようなメカニズムで体内の浸透圧を調節するのかを検証するため、受容体からのアプローチも試みた。哺乳類の水分再吸収には、V2R受容体が重要であることが明らかになっている。そこで、昨年度までに作成した V2R 受容体のノックアウトメダカを用い、体含水率を測ることで、バソトシンやイソトシンの淡水における水分排出機能がこの受容体を介すのか検証した。

また、各種バソトシン／イソトシン受容体のプローブを用いた in situ hybridization により、腎臓でいずれの受容体サブタイプが発現しているか、を検証した。

３．結果と考察

新たに作成したイソトシン GFP メダカとその特異性

イソトシンニューロンを GFP で標識したメダカを fosmid の相同組み換え法を用いて作成した。 今回作成した イソトシン GFP メダカは GFP とイソトシン抗体による免疫組織化学の二重標識により、GFP 標識されているニューロンの100%がイソトシンニューロンであることが分かった（Fig.1A）。

パッチクランプ法による発火活動の記録

そこでこのトランスジェニックメダカを用い パッチクランプ法による 発火活動の記録 を試みた（Fig.1B）。 ルースセルパッチクランプ法により 単一ニューロンの発火活動を記録したところ、高浸透圧条件下で飼っていたメダカのイソトシンニューロンは等張条件あるいは低浸透圧条件下で飼育したメダカのそれと比べ、高い発火頻度を示すことが分かった。前年度報告したイソトシンノックアウトメダカが、高い筋含水率を持つことを考えると、イソトシンは高浸透圧条件下において、塩分の排出[(3)]などに関わっている可能性を考えた。そしてイソトシンノックアウトメダカは塩分の排出に障害があるため、浸透圧を一定に保つために二次的に体内の水分を多く保持していると考察した。

in situ hybridization での受容体の局在解析

前年度明らかにした、低浸透圧化における水分排出機能を示すバソトシンの末梢組織特に腎臓での作用機序を調べるために in situ hybridization 法を用いて各種バソトシン受容体の検出を試みた。しかしこれらの受容体は、脳では検出されるにもかかわらず、腎臓ではシグナルが検出されなかった。発現量の違いはあるものの NCC などの腎臓で発現する

チャネルは容易に腎臓で検出できたため（図 2）、基本的な検出方法に誤りはないと考えている。しかし、今回の in situ hybridization 法は脳の組織で最も強いシグナルになるプロトコルを用いているため今後プロトコルの改善も含めた検出感度の向上を試みる。また、より高感度に受容体を検出できると考えられる GFP のゲノムへのノックインによる各種受容体の局在解析を現在進めている。

なお、後述の通り哺乳類で水分の再吸収に関わる V2R 受容体以外の受容体を介している可能性が高いため、腎臓以外にバソトシンが働き、結果として筋含水率が増えている可能性も考えられる。哺乳類において、バソプレシンは血管の収縮作用も示すことから、バソトシンの循環系に対する影響というのも今後調べていく必要があると考えている。

受容体ノックアウト個体の解析

V2Ra,V2Rb 受容体をノックアウトしたメダカを作成し、体外含水量の比較を行った。その結果、いずれの V2R 受容体をノックアウトした個体を筋含水率に大きな変化はなくバソトシンのノックアウトのような表現型は見られなかった。したがって残るバソトシン受容体、特に V1R サブタイプ がバソトシンの筋含水率調節に関与している可能性が高いと考えられる。

そこで、さらに各種 V1R 受容体のノックアウトを作成した。これらを用い、筋含水率の評価を行う段階である。in situ hybridization あるいはノックインによる局在解析と合わせ、一体淡水魚における水分排出機能がどの臓器のどの受容体を介して行われているのかを検証できる段階に入ってきている。

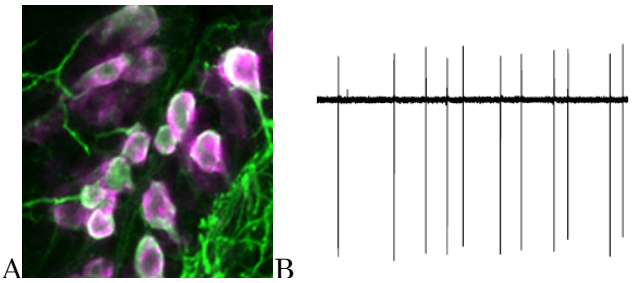


Fig. 1 イソトシンを GFP で標識したメダカを作成し、発火活動の記録をルースセルパッチクランプ法によって行った。A 作成したイソトシン GFP トランスジェニックメダカはきわめて高い特異性で GFP 標識できている。マゼンタは in situ hybridization によるイソトシン mRNA、緑は GFP の免疫組織化学である。図に示されたように、GFP を発現しているニューロンはすべてイソトシン mRNA ポジティブであるということがわかる。B. これを用いて、ルースセルパッチクランプ法によって発火活動の記録を行った。さらに、飼育環境を変化させたところ、高張液で飼育したときに、この自発発火活動の頻度が高くなることもわかった。

４．まとめと今後の展望

本年はイソトシンのノックアウトの表現型解析及び前年度までに明らかにしていたバソトシンの筋含水率調節機構に関して、受容体の解析をノックアウト法及び in situ hybridization 法によって進めた。イソトシンとバソトシンが本来無顎類ではひとつのホルモンであったにもかかわらず、顎口類では遺伝子重複後に水分調節とイオン調節に関わるようになったと考えることができる。また少なくとも哺乳類で考えられているような V2R 受容体を介した腎臓での水分再吸収機能は淡水魚のメダカにおいて一切存在しないということが強く示唆された。四肢動物と真骨魚類の共通祖先が淡水環境で生息していたこと、また、肺魚において水分がなくなる仮眠時特異的に発現するアクアポリンが陸生生物特有のサブタイプであることを考えると[4]、今回一連の研究で明らかになってきたバソトシンの水分排出機能というものは、我々と魚の共通祖先が本来持っていた機能である可能性が高い。現時点ではその作用機序に迫ることはできていないが、本研究を通じてブラッシュアップしてきたノックインをはじめとする遺伝操作を活用し、近々そのメカニズムに迫ることができると考えている。

さらに今回明らかになってきたイソトシンの塩分排出機能をさらに詳しく検証することにより、真骨魚類の海水適応についてのメカニズムについても明らかにすることを視野に入れられると考えている。メダカは 強い塩分耐性を持つ広塩性魚類であるので脊椎動物の特に硬骨魚類の出現以降の陸上進出および海水環境への進出について、脊椎動物の進化の中で起こってきたメカニズムを進化的に捉えることを今後の目標とする。

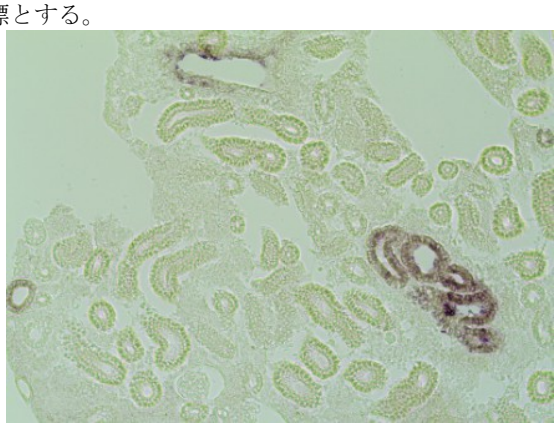


Fig. 2 淡水飼育下のメダカの腎臓における NCC mRNA の発現を in situ hybridization により検出した。Positive なシグナル（紫色）が集合管と思われるネフロン分節で検出された。

参考文献

(1) Inoue, K., Takei, Y., 2002. Diverse adaptability in oryzias species to high environmental salinity. Zoolog Sci 19, 727-734.

(2) Shinya, M., Kanda, S., Takahashi, A., Konno, N., Hyodo, S., Kagawa, N., Oka, Y., 2016. Electrophysiological and genetic demonstration that VT neuron is critical for water excretion in hypoosmotic conditions in medaka, The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society, Kunigami-son, Japan.

(3) Kanda, S., Akazome, Y., Mitani, Y., Okubo, K., Oka, Y., 2013. Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons. PLoS One 8, e62776.

(4) Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Matsuda, K., Uchiyama, M., 2010. Vasotocin/V2-type receptor/aquaporin axis exists in African lungfish kidney but is functional only in terrestrial condition. Endocrinology 151, 1089-1096.

二枚貝を用いた沿岸環境汚染モニタリングの新たな可能性：

高疎水性下水汚染マーカーLABs を用いたアプローチ

Advanced approach of coastal environmental monitoring by Mussel Watch using super hydrophobic compounds from sewage water

水川　薫子，東京農工大・農学部，E-mail: mzkako@cc.tuat.ac.jp
白井　厚太朗，東大・大気海洋研，E-mail: kshirai@aori.u-tokyo.ac.jp
井上広慈，東大・大気海洋研，E-mail: inouek@aori.u-tokyo.ac.jp;
Kaoruko Mizukawa, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology
Kotaro Shirai, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Koji Inoue, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Mussel Watch is one of coastal environmental monitoring for micropollutants using bivalves. Blue mussels and Green mussels are the most popular species for Mussel Watch. The authors have been observed that bioaccumulation patterns of some micropollutants, especially LABs, are different between Blue mussels and Green mussels because hyper hydrophobicity of LABs. To know the difference of elimination rate between the species, elimination experiment was conducted. Propotion of longer carbon chained- LABs and higher chlorinated PCBs were decreased after 7days breeding comparatively. It is suggested that green mussel would have high elimination ability than Blue mussel. On the other hands, LABs are kinds of molecular markers for sewage pollution. Mussels which have high LABs concentrations indicate lower $\delta^{15}N$ values. There are positive correlation between $\delta^{15}N$ in soft tissues of mussels and algae. It can be explained that $\delta^{15}N$ in mussels are reflected surrounding environment and contributed sewage pollution..

１．はじめに

沿岸海洋環境の化学物質汚染のモニタリングの標準的な手法として，イガイ科の二枚貝を用いたモニタリング(mussel watch)があり，1970 年代以降非常に多くのデータの蓄積がある．*Mytilus* 属と *Perna* 属は mussel watch の最も代表的な属であるが，蓄積特性の種差は考慮されていないのが現状である．そのため，異なる海域で異なる種を用いたモニタリング結果を単純に比較できないという課題があった．しかし，東京湾は熱帯アジアを起源とするミドリイガイ(*P. viridis*)と，比較的低水温の地中海を起源とするムラサキイガイ(*M. galloprovincialis*)の両種が外来種として生息しており，両種のバリデーションを行うことが可能な稀な海域である．こうした背景を受けて，申請者らは学際連携研究の枠組みの下，2015 年度にムラサキイガイとミドリイガイの種による汚染物質蓄積性の違いについて研究を行ってきた．

申請者らのこれまでの結果からは，ムラサキイガイとミドリイガイの二種において，有機汚染物質の蓄積性に種差が認められた．なかでも下水汚染マーカーである直鎖アルキルベンゼン(LABs)において，その組成の違いは顕著であった．LABs のミドリイガイの組成は堆積物と類似していた一方で，ムラサキイガイの LABs は東京湾に 1 ヵ月係留したポリエチレンシートから検出された LABs と組成が類似していた．ポリエチレンは海水中の疎水性有機化合物を吸着するため，ムラサキイガイはより溶存態の組成を反映していることが予想される．LABs は生物濃縮性のある人為起源有機化合物の中でもより疎水性が高い化合物である．そのため，溶存態と懸濁態において LABs 組成に差が生じ，結果としてこれまで明らかになっていなかった取り込み経路の違いによる生物濃縮性の種差が顕著に表れたことが示唆された．このような種差による高疎水性有機化合物の蓄積過程の違いを検証するために，両種における疎水性有機化合物の排泄速度の違いを調べる実験を実施した．

その一方，両種に共通して，LABs の濃度と窒素安定同位体比($\delta^{15}N$)の間には負の相関が示された．様々な窒素負荷源による$\delta^{15}N$ の値はこれまでにも報告されているがその値の幅は広く，特に生活排水と有機肥料が混合した集水域においては厳密な窒素負荷源の解明は困難であったと考えられる．一方，LABs は合成洗剤に不純物として含まれている難分解性の化合物であり，下水汚染のマーカーとして用いられている．Mussel watch において LABs と$\delta^{15}N$ を組み合わせることにより，沿岸海洋への人為起源の窒素負荷について新たな指標として有用である可能性が考えられた．

以上の背景から，本研究では A. ムラサキイガイとミドリイガイの疎水性有機化合物排泄能の種間差，B.イガイ類軟体部の窒素同位体変動要因の解明と人為起源の寄与，を調べることを目的とした．

２．問題設定・方法

A: 疎水性有機化合物の排泄能の種間差

2017年9月に第三管区海上保安本部管轄のブイの清掃時に採取した本牧沖ブイおよび根岸沖ブイのムラサキイガイ・ミドリイガイを，7 日間人工海水中で室温にて飼育した．期間中は無給餌で，換水は毎日行った．0 日目および 7 日目の個体について，生殖腺を凍結乾燥・粉化し，有機溶媒で抽出後に段階のシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびゲル浸透クロマトグラフィーで精製を行い，LABs，PCBs をガスクロマトグラフ質量分析計および電子捕獲型検出器にて同定・定量した．

B: イガイ類の窒素同位体変動要因と人為起源の寄与

LABs と窒素安定同位体比の関係をより詳細に調べるため，東京湾全域のブイおよび岸壁から採取した両イガイにおける LABs 濃度の分析と$\delta^{15}N$ の測定を行った．さらに，一次生産者として，イガイと同じ地点から採取した海藻の$\delta^{15}N$ の測定を行った．東京湾全域のイガイおよびアオサは，岸壁からま

たは A 同様に東京湾内各所のブイの清掃時に採取した．得られた試料について，LABs については軟体部約 30 個体をプールしてホモジナイズ後 A と同様の手順で分析を行った．$\delta^{15}N$ については，乾燥したアオサおよび軟体部を粉化し，窒素の信号強度が十分得られる分量をスズ箔につつみ大気海洋研究所に設置された安定同位体質量分析装置 Isoprime を用いて分析した．予備的な実験により酸処理による脱灰の有無は $\delta^{15}N$ に影響しないことは確認済みである．

３．結果と考察

A: 疎水性有機化合物の排泄能の種間差

排泄実験を行った結果，ミドリイガイは 7 日後に 1 個体しか生存できず，n=1 の結果を示す．また，実験操作中に LABs のコンタミネーションが発生したため，本分析結果の濃度はいずれも有意な値ではないため議論から除外する．ただし，全試料に同程度混入したと考えられるため，相対組成について考察を行うものとする．

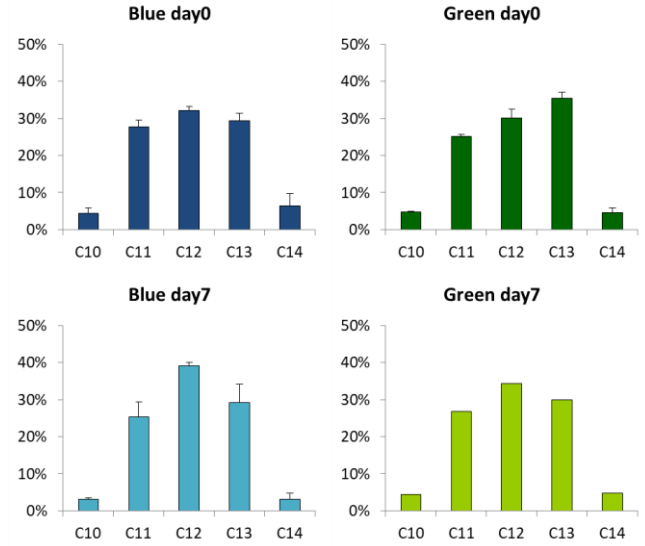


Fig. 1 排泄実験前後の LABs の同族異性体組成(Blue：ムラサキイガイ、Green:ミドリイガイ)

排泄実験における LABs の同族異性体組成を Fig.1 に示す．ムラサキイガイは day0,7 いずれも炭素鎖 12(以下 C12)の同族異性体が優占しており，7 日後に C12 割合は高まったものの大きな変化は認めらなかった．一方，0 日目のミドリイガイは C13 が優占する堆積物に近い組成を示していたが，7 日後には C12 よりも低い割合となった．PCBs においても，高塩素数の同族異性体の濃度・組成比が減少した．ムラサキイガイはミドリイガイよりもろ過量が多いとされているため(##)，溶存態から比較的疎水性が低い化合物がより排泄されやすいのではと予想をしていたが，実際には長炭素鎖の LABs や高塩素数の PCBs といった相対的に高い疎水性を持つ化合物での排泄割合が高い可能性が示された．

B: イガイ類の窒素同位体変動要因と人為起源の寄与

イガイの軟体部の窒素同位体比は摂餌物である粒子状有機物の同位体組成を反映すると考えられ，粒子状有機物は多様な起源に由来するが，沿岸域ではその大元は陸域から放出された硝酸やアンモニアなど一次生産者が利用可能な溶存態窒素態であると考えられる．この仮定を検証するため，東京湾沿岸域および太平洋沿岸域からムラサキイガイに加えアオサを採取し，それぞれの同位体比を比較した結果，アオサとムラサキイガイ軟体部には正の相関が見られた(Fig.2)．このことはムラサキイガイの軟体部の窒素同位体比は溶存態窒素源の組成を反映する事を示している．相関が R^2=0.65 とそれほど高くない要因としては，粒子状有機物が必ずしもアオサが同化する窒素源とは同一でないという起源の違いに由来する要因以外にも，ムラサキイガイの軟体部が代謝回転速度である 3 ヶ月程度の平均的な組成を反映するのに対し，アオサは数週間程度のより短時間の溶存態窒素の組成変動を反映するという時間スケールの違いも影響すると考えられる．陸由来の溶存態窒素は下水経由で沿岸域に付加され，その窒素同位体比が他の起源の同位体比と異なる事が考えられた．

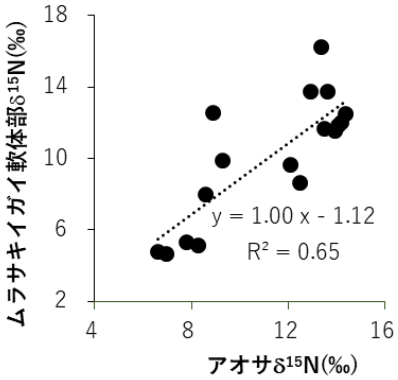


Fig. 2 同所的に採取されたアオサとムラサキイガイ軟体部の窒素同位体組成の関係

この結果を踏まえ，新たにデータ数を追加したイガイ中の LABs と $\delta^{15}N$ の関係を Fig.3 に示した．これまでと同様に $\delta^{15}N$ が高くなると LABs 濃度が減少する傾向が認められたが，$\delta^{15}N$ が 10‰以上になると LABs 濃度がばらつく傾向にあった（Fig.3a）．このことは，生活排水寄与の少ない地点における窒素源が多様であることを示していると考えられる．一般に，生活排水は高い $\delta^{15}N$ を持つことが知られているが，LABs 濃度が 2000ng/g-lipid 程度であれば生活排水の影響は窒素源に影響しない可能性が示された．

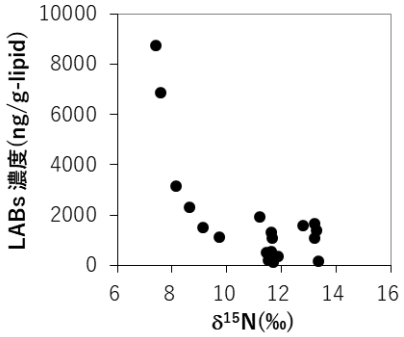


Fig. 3 イガイ中 LABs 濃度と窒素安定同位体比の関係

４．まとめと今後の展望

排泄能力の種間差については，ミドリイガイの飼育方法の確立も含め，部位別分析や経時変化を伴った再実験を行う必要があると言える．窒素負荷源と LABs の関係については，同一の集水域でバックグラウンドの異なる地点の試料を増やすことで生活排水由来の $\delta^{15}N$ の幅を狭めることが可能になると考えられた．

参考文献

(1) 磯野 良介，中村 義治，2000：″二枚貝による海水濾過量の推定とそれにおよぼす温度影響の種間比較″水環境学会誌，23，683-689

海洋マイクロプラスチックの沈降過程の検証

Evaluation of sedimentation process of marine microplastics

山下　麗，東京農工大，E-mail: reiy(at)cc.taut.ac.jp
福田　秀樹，東大・大気海洋研，E-mail: hfukuda (at)aori.u-tokyo.ac.jp
津田　敦，東大・大気海洋研，　E-mail: tsuda (at)aori.u-tokyo.ac.jp
Rei Yamashita, Tokyo University of Agriculture & Technology
Hideki Fukuda, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Atsushi Tsuda, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Microplastic pollution has been widely dispersed marine environment from surface water to sediment. In spite of their buoyancy, lower density microplastics were found in sediment. Due to know the behavior of microplastics in marine environment, we examined using sediment trap in Otsuchi Bay (Iwate Pref.). Moreover, we investigated abundance, size and polymer types of microplastics in sediment sample. Polymer types of all microplastics were detected by micro FT-IR. Fifteen particles (size; 40-300 μm) were detected from sediment sample (1.25 g-dry sediment). Most of microplastics were low density polymers (e.g. Poly(ethylene:propylene); PEP and Polypropylene; PP). Ten microplastics particles were found from “Appendicularian fecal pellets”, “zooplankton fecal pellets” and ”other fecal pellets” fraction of sediment trap samples (20 mL). These microplastics polymer types were mostly similar to those in sediment. It might be possible that plastics adhered to the particles and settled in the water column.

１．研究の背景と目的

プラスチックの生産量の増加や不適切な管理によって大量のプラスチックが海洋へと流出している。多くのプラスチックは比重が軽いため長期間海洋中を漂流し、紫外線などによる劣化によって微細化していく。このようなナノ或いはマイクロメータサイズのプラスチック（マイクロプラスチック）は、近年、海洋表層や海底の堆積物中からも検出されるようになってきた。しかし、海洋表層と海底の間の鉛直輸送過程および輸送量は不明である。これまでの野外調査で得られたマイクロプラスチックの状態から、予想される沈降過程には次の３つの現象が考えられている。

①沈降粒子への付着
②微生物や植物プランクトンなどに対する付着
③小型魚類や動物プランクトンによる摂食を経て排泄物と共に沈降

上記の現象は、①、②、③の順でプラスチックの鉛直輸送が加速すると考えられる。

そこで、セジメントトラップを設置し、採取された試料から、マイクロプラスチックの現存量と上記３つの沈降速度と輸送量を明らかにすることを目的とした。

２．材料と方法

共同研究者が定期的に行っている調査場所である大槌湾で 2017 年 6 月 6 日にセジメントトラップ（設置深度は 10 m および 20 m；水深 37m）を設置し翌日に回収した。マイクロプラスチックの現存量を測定するため、ニューストンネットを用いて表層を曳網し、バケツで 15 L 表層採水を行った。スミスマッキンタイヤー式採泥器を用いて堆積物表層の採取を行った。

セジメントトラップとニューストンネットで得られた試料はホルマリンで固定し、研究室へ持ち帰った。トラップの試料は 8 分割した 200 mL のうち 20 mL を分取し、顕微鏡下で尾虫類のハウスおよびその排泄物、動物プランクトンおよびその排泄物、それ以外の生物の排泄物、その他の６つに分類した。表層採取した海水は速やかに CN フィルターでろ過し、分析の前処理まで冷凍保存した。

堆積物（乾燥重量換算で 5 g）は 1 M の過酸化水素 150 mL で有機物を分解させた後、ヨウ化ナトリウム水溶液を加えて分液ロートで 1 昼夜静置させた。重い粒子は下部に沈降しているため、その部分を捨て、上澄みを結焼フィルターへ滴下させてマイクロプラスチックを得た。(今回の結果は 4 分割したものを用いた。)

トラップ試料の 6 つに分類したものは、それぞれ CN フィルターでろ過後、水酸化ナトリウム溶液で溶解させ、塩酸で中和した後、過酸化水素で有機物を分解させた。

得られた全ての試料は顕微 FT-IR でプラスチックとそれ以外に識別した。

大気中に繊維状のプラスチック（マイクロファイバー; Fig.1）が多数存在することが報告されており（Dris et al. 2016 等)、サンプリングおよび実験中のコンタミネーションを回避することが現時点では難しいことから、本実験ではマイクロファイバーは計数せず、破片状のもののみを計数した。

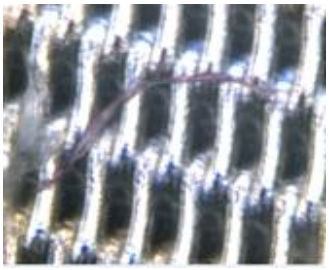


Fig.1 Microfiber in sediment of Otsuchi Bay.

３．結果と考察

堆積物（乾燥重量あたり約 1.25 g）中から 40-300 μm サイズのマイクロプラスチックが 15 個検出され(例えば､Fig. 2)、人口が少ない地域に面した大槌湾でもマイクロプラスチックが確認された。

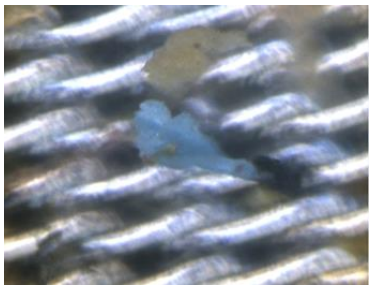


Fig.2 Microplastics in sediment of Otsuchi Bay.

プラスチックのポリマータイプは 7 種類が確認され、Poly(ethylene:propylene)(PEP) および Polypropylene (PP) が 27%と最も多く、次いで、Poly(ethylene:propylene:diene)（PEPD）が 20%と多く検出された(Fig. 3)。同定されたプラスチックポリマーのほぼ全てのプラスチック（13 個）は比重が 1 以下であり、比重の軽いプラスチックが堆積物中から検出されたことが明らかになった。

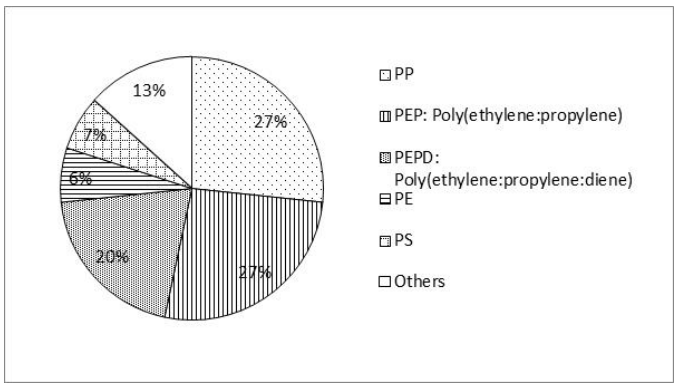


Fig.3 Polymer types of microplastics in sediment of Otsuchi Bay.

セジメントトラップ試料（深度 10m に設置したサンプルのうち 20mL）から、尾虫類のハウス 76 個、尾虫類の排泄物 51 個、動物プランクトン 6 個体、動物プランクトンの排泄物 149 個、その他の排泄物 48 個を同定・計数し、それ以外の画分も得た。分類した 6 つのうち、動物プランクトンとそれ以外の画分については分析中である。

尾虫類のハウスからはマイクロプラスチックは検出されなかったが、排泄物からは Polyethylene (PE) および Polypropylene (PP)が 1 個ずつ検出された。これらのサイズは 86×27 μm, 23×23 μm であり、尾虫類が採食するサイズより大きいことから、尾虫類の排泄したものではなく、排泄物へ付着していたものと推察された。

プランクトンはまだ分析途中であるため、マイクロプラスチックの有無は不明であるが、排泄物からは Poly(ethylene:propylene)(PEP)1 個(size: 50×35 μm; Fig.4) と Poly(ethylene terephthalate)(PET)2 個が検出された。

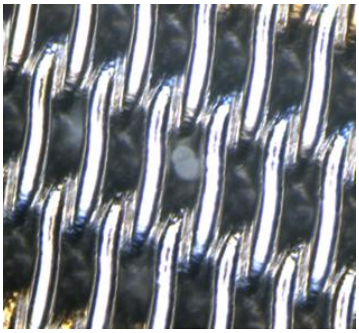
Fig. 4 Microplastics in zooplankton fecal pellets samples.

また、他の生物の排泄物試料からも合計 5 個（PE 2 個、PP 1 個、PEP 1 個、Poly(ethylene:vinyl acetate:vinyl chloride) 1 個）が検出された。

セジメントトラップ試料から得られたマイクロプラスチックは、堆積物から検出されたポリマーの種類と概ね同じものが検出された。また、その多くは比重が軽いプラスチックであることから、水柱におけるマイクロプラスチックが沈降粒子に付着し、海底へと沈む可能性が示された。

４．まとめと今後の展望

これまで、堆積物中から比重の軽いマイクロプラスチック



が検出されていることが報告されてきたが、セジメントトラップ試料を用いてマイクロプラスチックの有無を調べたことは著者が知る限り初めての報告である。本研究から、沈降粒子と共にマイクロプラウスチックが沈降することが明らかになり、海底への輸送過程の一端を知ることができた。

現在、分析の前処理方法を検討中であるため、今回の結果と当研究室で行っている東京湾堆積物中のマイクロプラスチックの結果とを比較することができなかった。分析のための前処理では、有機物をなるべく除去する方法を検討していかなければならない。そうしなければ、結焼フィルター上に多くの有機物が残ってしまい、顕微 FT-IR でマイクロプラスチックを検出することが難しくなるからである。今後、この前処理法を改善することが最重要項目になる。

また、大気経由のマイクロファイバーは、衣服の繊維からも発生する。こういったマイクロファイバーのサンプリングや実験中のコンタミネーションを防止する方法を考えなければならない。

参考文献

R. Dris, J. Gasperi, M. Saad, C. Mirande, B. Tassin (2016) Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? Marine Pollution Bulletin

サンマ耳石の酸素安定同位体比の高精度分析による産卵回遊時の水温履歴の推定

Estimation of temperature histories of Pacific saury in spawning migration using otolith oxygen stable isotope analysis

筧　茂穂，水産機構・東北水研，E-mail: kakehi(at)affrc.go.jp
伊藤　進一，東大・大気海洋研，E-mail: goito(at)aori.u-tokyo.ac.jp
石村　豊穂，茨城高専，E-mail: toyoho.ishimura(at)gmail.com
巣山　哲，水産機構・東北水研，E-mail:　suyama(at)affrc.go.jp
冨士　泰期，水産機構・東北水研，E-mail:　tfuji114(at)affrc.go.jp
白井　厚太朗，東大・大気海洋研，E-mail: kshirai(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Shigeho Kakehi, Tohoku National Fisheries Research Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency
Shin-ichi Ito, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Toyoho Ishimura, National Institute of Technology, Ibaraki College
Satoshi Suyama, Tohoku National Fisheries Research Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency
Taiki Fuji, Tohoku National Fisheries Research Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency
Kotaro Shirai, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Otolith oxygen stable isotope was analyzed to estimate the temperature histories of Pacific saury (*Cololabis saira*) in spawing migration. Four samples of otolith provided from saury caught in 25 September 2013 were analyzed. The otoliths were milled parallel to the growth increments with approximately 43.5 μm intervals from the edge to core of the otolith. From 16 to 21 samples of otolith powder were obtained from each otolith. The $\delta^{18}O$ of the powder was measured using a continuous-flow isotope ratio mass spectrometry system (MICAL3c). Measured otolith $\delta^{18}O$ was –0.6±0.3‰ near the core of the otolith, increased approximately 1.0 ‰ at the inner edge of the hyaline zone and was constant to the edge of the otolith. Three of 4 otoliths measured had the almost same $\delta^{18}O$ profile and the $\delta^{18}O$ of the rest of one was approximately 0.5 ‰ positive values than them. These results indicate that saury migrates to low-temperature area after the summer of 2012 and that the migration routes are different in individuals despite they are caught at the same fishing ground. Thus, we succeeded the analysis of otolith $\delta^{18}O$ of Pacific saury for the first time in the world.

１．はじめに

東北区水産研究所が実施しているサンマ漁期前調査によって，漁期前（6～7 月）にはサンマは主に東経 155°以東に分布し，これ以西の海域には少ないことがわかっている．秋になるとサンマは産卵のため日本近海に来遊し，このときに漁獲が行われる．日本近海における漁場の形成時期，形成場所を予測する上では漁期前調査以降のサンマの産卵回遊経路を明らかにする必要がある．しかしながら，サンマは小型であるとともに鱗がはがれやすい特徴を持っており，記録計装着はもとより，標識放流-再捕法の適用が難しく，回遊経路はよくわかっていない．為石（2000）は漁場データから 25m 深 8℃の等温線に沿ってサンマ群が分布していることを報告しており，サンマが等温線に沿った回遊を行っている可能性がある．しかし，漁場データでは同一群を追跡していないため，等温線に沿って回遊している確証はない．

魚類の経験水温は耳石の酸素安定同位体比を用いて復元が行われている（e.g. Kitagawa et al., 2013; Sakamoto et al., 2017）．前述の可能性を検証するために，本研究では，これまで実施例のないサンマ耳石の酸素安定同位体比測定を行い，経験水温履歴の復元を試みる．

２．問題設定・方法

サンマ耳石の酸素安定同位体比の測定を行う上で，①海水酸素安定同位体比の分離と，②耳石成長の鈍化という大きな 2 つの問題がある（伊藤ほか，2018）．問題点①は，耳石に蓄積される酸素安定同位体は，水温だけなく海水の酸素安定同位体比の影響も受けることによって発生する．海水の酸素安定同位体比は，降水および蒸発に伴う同位体分別の影響から塩分と良い相関があることが知られている．つまり，耳石の酸素安定同位体は，水温と塩分の関数となるため，経験水温を復元するためには，塩分の効果を分離する必要がある．この点に関しては，水産研究・教育機構で運用しているデータ同化モデル FRA-ROMS の再解析値を用いることで解決できる可能性がある．問題点②は，産卵回遊に入っているサンマの成長が鈍化するため，耳石の成長幅も極端に狭くなることに由来する．したがって，耳石縁辺部を極めて高い分解能で分離し，その少量の試料から酸素安定同位体比を分析する技術が必要となる．この問題点について，世界で最高峰の同位体分析を実施できる茨城高専と大気海洋研のチームと協力して研究を実施した．

分析に用いた個体は，2013 年 8 月 25 日に北緯 45.02 度，東経 153.53 度で，サンマ棒受け網漁船が漁獲した個体である．東北水研において体長等の測定を行った後に 1 対の耳石を取り出し，左側の耳石は樹脂に包埋後耳石核まで研磨し，電子顕微鏡による日周輪紋の計測を行った．右側の耳石は樹脂に包埋して光学顕微鏡による透明帯位置の計測を行ったのち，

酸素安定同位体比の分析のため大気海洋研に輸送した．大気海洋研では超音波カッターを用いて樹脂から取り出した．5 個体の耳石を取り出したが，1 個体の耳石は破損したため，4 個体を茨城高専に輸送し，切削と $\delta^{18}O$ 分析を行った．切削深度 20～60μm で耳石の縁辺から核まで，平均 43.5μm 間隔で連続切削を行い，それぞれ約 20 サンプルの耳石粉末を取得した．微小領域安定同位体比分析 システム（MICAL3c）を用いて $\delta^{18}O$ の測定を行った．

３．結果と考察

耳石縁辺部の $\delta^{18}O$ 測定値が捕獲場所の水温・塩分を反映しているか以下のように確認を行った．海水の $\delta^{18}O$ は，分析に用いたサンマの捕獲位置における FRA-ROMS 再解析値の 10m 深塩分から $\delta^{18}O$ 関係式（Yamamoto et al., 2001; Sakamoto et al., in prep.）を用いて推定した．推定した海水の $\delta^{18}O$ と FRA-ROMS 再解析値の 10m 深水温から Kim 平衡式（Kim et al., 2007）を用いて Kim 平衡カルサイトの $\delta^{18}O$ 値を求めた．求めた平衡 $\delta^{18}O$ 値と測定した耳石縁辺部の $\delta^{18}O$ は+0.5～+0.6‰であり，おおむね一致した．

測定された耳石の $\delta^{18}O$ は 4 個体とも核付近で低く，透明帯内縁部で約 1‰上昇し，縁辺部までほぼ一定であった．4 個体のうち 1 個体は他の個体より全体的に 0.5‰高い $\delta^{18}O$ を示した．

耳石の核から縁辺部まで高分解能で測定された $\delta^{18}O$ を用いて，経験水温を Kim et al. (2007)により復元した．このとき，海水の $\delta^{18}O$＝0‰とした．4 個体中 3 個体は 22℃付近で生まれ，透明帯形成期まで 20～22℃を経験した．また，これら 3 個体の内 2 個体は透明帯形成開始から採取日（耳石縁辺部）までは 16～18℃を経験し，もう 1 個体は 22℃前後の水温域から徐々に 18℃付近への移行した．残りの 1 個体は 20℃で生まれ，透明帯形成期まで 18～20℃を経験し，透明帯形成開始から採取日の 10 数日前（縁辺部から 2 番目の $\delta^{18}O$ 測定値）まで 14～16℃を経験した．縁辺部の $\delta^{18}O$ から復元した水温は約 18℃であった．

これらの結果から，透明帯が形成され始めた 2012 年の夏以降，サンマが低水温帯に移動し，その水温帯にとどまることが明らかとなった．この結果は産卵回遊時には等温線に沿って回遊しているという可能性を支持するものである．同じ場所で捕獲されたにもかかわらず，4 個体中 1 個体は他の 3 個体とは異なる $\delta^{18}O$ および $\delta^{13}C$ 履歴を記録していることがわかった．この 1 個体は，体長については他の 3 個体と同じであったが，生育環境が異なっていた可能性が高い．これらのことは，同じ漁場に分布するサンマであっても異なる回遊経路を持っていることを示唆している．

４．まとめと今後の展望

以上のように，サンマ耳石を核から縁辺部まで高分解能で切削し，その $\delta^{18}O$ を測定することに成功した．これは世界で初の成果である．

今後は，1 ヶ月以上産卵回遊を行ったと考えられる 10 月において，日本近海で漁獲されたサンマサンプルについて $\delta^{18}O$ 分析を行い，サンマの等温線に沿った産卵回遊について実証を行う．また孵化してから漁獲されるまでのサンマの一生の水温履歴をより高精度で復元し，サンマの回遊経路の全貌解明を行いたいと考えている．

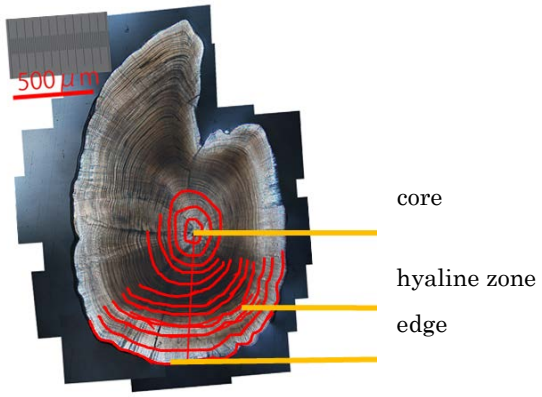


Fig. 1 Otolith of Pacific saury used for analysis. Otolith powder was obtained by milling along the growth increment from the edge to core.

参考文献

(1) 伊藤進一・船本鉄一郎・志田修・上村泰洋・高橋素光・白井厚太朗・樋口富彦・小松幸生・横井孝暁・坂本達也・郭晨穎・石村豊穂（2018）．気候変動が水産資源の変動に与える影響を理解する上での問題点と今後の展望．海の研究，27，59-73.

(2) Kim, S. T., O'Neil, J. R., Hillaire-Marcel, C., and Mucci, A. (2007). Oxygen isotope fractionation between synthetic aragonite and water: influence of temperature and Mg2+ concentration. Geochimica et Cosmochimica Acta, 71(19), 4704-4715.

(3) Kitagawa, T., Ishimura, T., Uozato, R., Shirai, K., Amano, Y., Shinoda, A., Otake, T., Tsunogai, U., and Kimura, S. (2013). Otolith δ180 of Pacific bluefin tuna Thunnus orientalis as an indicator of ambient water temperature. Marine Ecology Progress Series, 481, 199-209.

(4) Sakamoto, T., Komatsu, K., Yoneda, M., Ishimura, T., Higuchi, T., Shirai, K., Kamimura Y., Watanabe, C., and Kawabata, A. (2017). Temperature dependence of δ180 in otolith of juvenile Japanese sardine: Laboratory rearing experiment with micro-scale analysis. Fisheries Research, 194, 55-59.

(5) Yamamoto, M., Tanaka, N., and Tsunogai, S. (2001). Okhotsk Sea intermediate water formation deduced from oxygen isotope systematics. Journal of Geophysical Research: Oceans, 106(C12), 31075-31084.

亜熱帯生物ポンプを支配するプランクトン群集の解明

Eukaryotic plankton community contributing to the biological pump in the oligotrophic subtropical ocean

塩崎 拓平, 海洋研究開発機構, E-mail: takuhei.shiozaki(at)jamstec.go.jp
原田 尚美, 海洋研究開発機構, E-mail: haradan(at)jamstec.go.jp
濵﨑 恒二, 東大・大気海洋研, E-mail: hamasaki(at)aori.u-tokyo.ac.jp
小野寺 丈尚太郎, 海洋研究開発機構, E-mail: onoderaj(at)jamstec.go.jp
Takuhei Shiozaki, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Naomi Harada, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Koji Hamasaki, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Jonaotaro Onodera, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

Abstract

The ocean contains the largest active reservoir of carbon on Earth and serves as a major sink for atmospheric carbon dioxide. Carbon dioxide fixed by phytoplankton in surface waters is partly exported to the ocean interior; a process termed the biological pump. We examined eukaryotic plankton community both in sinking particles collected by sediment traps and suspended particles by Niskin-X water samplers at station S1 located in the western subtropical North Pacific. The plankton community differed between the two particles: *Chromalveolata* and *Fungi* were major groups in sinking particles while *Alveolata*, *Excavata*, and *Rhizaria* were major groups in suspended particles. Although *Fungi* accounted for less than 1% of total eukaryotic community in the suspended particles, they did for 26% and 41% in average in the sinking particles at 200 and 4810 m, respectively. Our results suggested that *Fungi* could significantly contribute to decomposition of sinking particles.

１．はじめに

生物ポンプは大気中の二酸化炭素量の海洋内隔離、及び海洋内部への有機物供給プロセスとして重要な役割を持つ。これまでどのような生物が生物ポンプを支配するかについて、様々なアプローチで研究が進められてきた。近年、懸濁態粒子の DNA 解析及び粒子サイズの鉛直分布から、生物ポンプに関わる生物群集を全球規模で割り出す試みが行われた(Guidi et al., 2016)。これは DNA 情報を用いて網羅的に生物群集と生物ポンプの関係を解析した初めての例である。しかしこのアプローチには大きな問題がある。それは沈降粒子≈懸濁態粒子と仮定していることである。本来、生物ポンプに寄与するのは、速やかに深層へ沈降する粒子であり、懸濁態粒子と採取されるものは生物ポンプに寄与しないものが多く含まれると考えられた。そこで本研究では沈降粒子中の群集組成を直接対象とするため、セジメントトラップで採取され、ホルマリン固定されている試料に着目した。我々のグループでは近年ホルマリン固定サンプルから DNA を抽出する方法を開発しており(Itoh et al., in prep.)、本研究が沈降粒子の DNA 情報から真核生物群集を解析する初めての例となる。また本研究ではセジメントトラップ観測と同時期に行われた船舶観測によって得られた懸濁態粒子の DNA 情報からも真核生物群集を解析し、懸濁態粒子と沈降粒子における真核生物群集の違いについても調べた。

２．材料と方法

本研究では西部北太平洋亜熱帯域の定点観測点 S1(30°N, 145°E)においてセジメントトラップで捕集された沈降粒子とニスキン採水器で捕集された懸濁態粒子を対象とした。トラップ試料は 2010 年 2 月-2011 年 7 月まで約半月間隔に採取され、ニスキン採水器によるサンプリングは同期間中 5 回行われた船舶観測によって得た。懸濁態粒子からの DNA 抽出には ChargeSwitch Forensic DNA purification kit (Invirogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた(Kaneko et al., 2016)。一方、ホルマリン固定された沈降粒子からの DNA 抽出には Ito et al. (in prep.)によって開発された手法を用いた。本手法ではホウ酸緩衝液(pH 11.0)に還元剤として 2-メルカプトエタノールを加えた溶液を試料に加え、熱処理を行うことで、ホルマリン固定された試料から DNA を抽出する。DNA 抽出後、真核生物の 18SrRNA V7,V8 領域を対象(Hadziavdic et al., 2014)に MiSeq 300bp ペアエンドシーケンスにより配列を得た。データ解析においては Claident(Tanabe and Toju)による OTU クラスタリングの後、METAXA2(Bengtsson-Palme et al., 2015)による生物同定を行った。

３．結果と考察

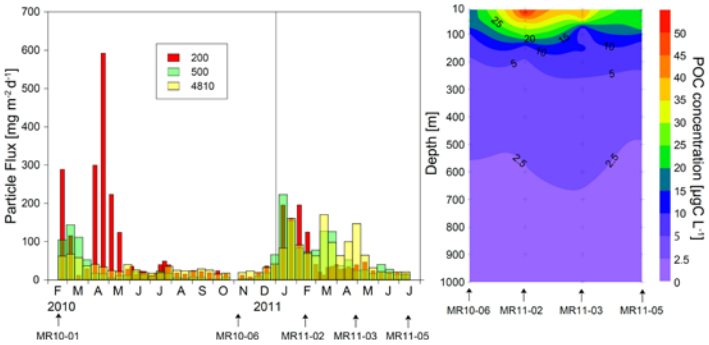


図 1 S1 で採取された沈降粒子量(左図)と懸濁態粒子量(右図)の季節変化

観測期間中、セジメントトラップで得られた沈降粒子量は季節的に大きく変化したが、懸濁態粒子濃度は 100m 以深では季節的にほとんど変化していなかった(図 1)。

懸濁態粒子中の真核生物群集組成は鉛直的に大きく変化した(図 2)。*Viridiplantae* と *Archaeplastida* は 100m 以浅に専ら検出され、それ以深ではほとんど見られなかった。また *Chromalveolata* も 100m 以浅において特に全群集中の割合が高くなった。これはこれらのグループが主に植物プランクトンを含むからと考えられる。一方、100m 以深では *Rhizaria* と

Excavata の割合が全群集中で高くなっていた。*Alveolata* は震度に関わらずほぼ一定の割合で存在していた。この鉛直分布傾向は季節的に顕著な変化は見られなかった(データ非表示)。

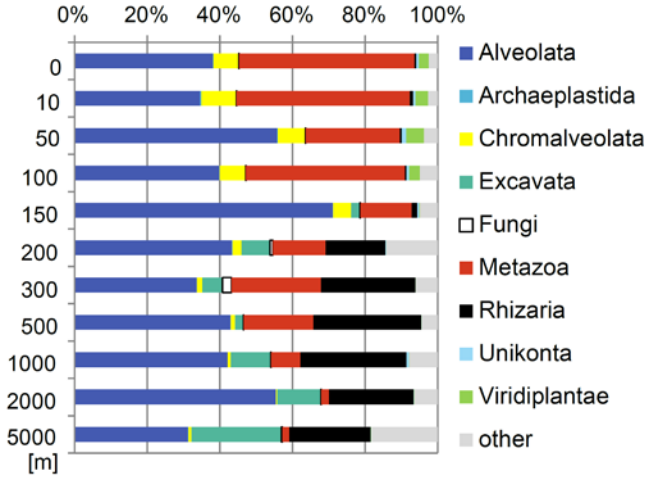


図 2 懸濁態粒子中の真核生物群集の鉛直分布

沈降粒子中の真核生物群集は懸濁態粒子のそれと同様に顕著な季節変化は見られなかったが、両者の組成は同じ深度でも大きく異なっていた (図 3a,b)。すなわち、懸濁態粒子は沈降粒子の生物組成をほとんど反映していないことが示された。その中でも両者の違いが顕著に見られたのは *Chromalveolata* と *Fungi* である。200m 水深において懸濁態粒子中の *Chromalveolata* は全体の 4%以下しかなかったのに対し、沈降粒子中には平均で全体の 41%も存在していた。*Fungi* は 200m 水深において懸濁態粒子中では全体の 1%以下であったが、沈降粒子中には平均で全体の 26%存在していた。*Fungi* の沈降粒子中の割合は 4810m ではさらに増加し、43%に達した。*Chromalveolata* はそれに対し 4810m のトラップサンプルでは平均で全体の 6%と 200m に比べて減少していた。ここで特に興味深いのは *Fungi* である。海洋一般に *Fungi* の存在は真核生物の中では稀な存在であることが知られている(Richards et al., 2012)。事実、本研究でも懸濁態粒子中の *Fungi* の割合は全体の 1%以下しかなかった(図 2)。一方で沈降粒子中に平均で 4 割以上も存在するということは *Fungi* の物資循環における役割を再検討すべきことを意味する。*Fungi* が海洋中に少ないとされる理由は、海洋のように自由生活様式が主要な食物網では Fungi の生活様式が主に寄生、腐生、共生であるため、陸上環境に比べて存在しづらいことにあると考えられている(Richards et al., 2012)。しかしそうだとすると、逆に沈降粒子のような凝集物に *Fungi* のニッチが存在しうると考えられる。200m のトラップサンプルに比べて 4810m のトラップサンプル中の *Fungi* の割合が増えていたのは、沈降中の有機物の分解に伴って特に *Chromalveolata* のような生物の現存量が減少する一方、*Fungi* の現存量は増加もしくは維持されていた可能性がある。

4．まとめと今後の展望

本研究では沈降粒子と懸濁態粒子中の真核生物群集が大きく異なることを示した。すなわち懸濁態粒子の解析から生物ポンプに関わる生物を推定することは困難であることを示している。沈降粒子中には *Fungi* の割合が顕著に高くなっていた。これは *Fungi* が亜熱帯貧栄養海域の生物ポンプに大きく関わっていることを示唆する。海洋での *Fungi* のニッチが沈降粒子のような凝集物にあるとすると、他海域でも同様の現象が起こっていても不思議ではない。*Fungi* の生態を明らかにするために、今後は異なる海域でも同様の解析を行っていく必要がある。

参考文献

(1) Bengtsson-Palme, J., et al., 2015: “METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data”, Mol. Ecol. Resour., 15, 1403-1414.

(2) Guidi, L., et al., 2016: “Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean”, Nature, 532, 465-470.

(3) Hadziavdic, K., et al., 2014: “Characterization of the 18SrRNA gene for designing universal eukaryote specific primers”, PLoS ONE, 9(2), e87624.

(4) Kaneko, R., T. Nagata, S. Suzuki, K. Hamasaki, 2016: “Depth-dependent and seasonal variability in archaeal community structure in the subarctic and subtropical western North Pacific”, J. Oceanogr., 72, 427-438.

(5) Richards, T.A., M.D.M. Jones, G. Leonard, D. Bass, 2012: “Marine Funigi: Their ecology and molecular diversity”, 4, 495-522.

(6) Tanabe, A.S., H. Toju, 2013: “Two new computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants”, PLoS ONE, 8(10), e76910.

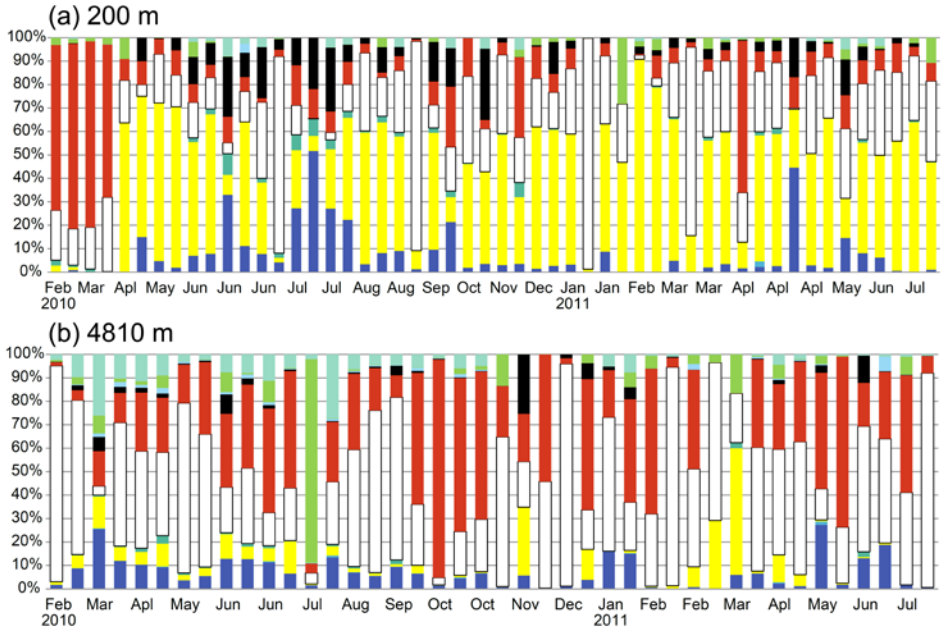


図 3 沈降粒子中の真核生物群集の季節変動(凡例は図 2 と同じ)