

学際連携研究報告書

令和 2 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。令和2年度からは、琉球大学熱帯生物圏研究センターとの連携協定に基づく沿岸生態系比較研究も加わりました。

(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。

令和2年度の実績は、特定共同研究の実施数が4件（同応募数6件、採択数6件）、一般共同研究の実施数が9件（同応募数14件、採択数11件）であった。コロナウイルス感染拡大により一部の未実施課題は翌年度に延期した。

本冊子は、令和2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も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

令和2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	石澤 堯史	東北大学災害科学 国際研究所	助教	地溝帯内の堆積速度変化に基づく断層活動履歴の評価	横山 祐典
2	立原 一憲	琉球大学理学部	教授	西表島浦内川における魚類の多様性と汽水域の生態的役割の解明	兵藤 晋
3	加藤 英明	東京大学大学院総合文化研究科	准教授	海洋微生物の持つ酵素型ロドプシンの網羅的探索と機能解明	吉澤 晋
4	藤田 和彦	琉球大学理学部	教授	亜熱帯内湾域の古環境研究:過去から現在までの沿岸生態系の変遷	横山 祐典

【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	豊田 隆寛	気象庁気象研究所	主任研究官	海水モデル力学パラメータに対する観測・理論・数値的要請の融合	川口 悠介
2	荘司 一步	国立民族学博物館	外来研究員	先史アンデス海岸部における古環境変動と海民の適応戦略	白井 厚太郎
3	山田 洋輔	沖縄科学技術大学院大学	研究員	海洋環境要因が「細菌の表面粗さ」に及ぼす影響の解明	福田 秀樹
4	松田 純佳	北海道大学大学院水産科学研究院	学振特別研究員(PD)	炭素14を用いた大型鯨類の回遊経路の推定の試み	横山 祐典
5	中村 知裕	北海道大学低温科学研究所	講師	東樺太海流が知床周辺海域における季節海水の消長と大規模春季ブルーム発生に果たす役割	藤尾 伸三 柳本 大吾
6	馬谷 千恵	東京大学大学院理学系研究科	助教	軟骨魚類における不死化細胞株と遺伝子改変技術開発	神田 真司
7	吉武 和敏	東京大学大学院農学生命科学研究科	助教	eDNA中のD-loopハプロタイプから魚の個体数を網羅的に推定する手法開発	濱崎 恒二
8	坂本 達也	水産研究・教育機構 西海区水産研究所	学振特別研究員(PD)	蓄積された鱗のDNAが解明するマイワシの遺伝的多様性の変動	新里 宙也
9	伊藤 元裕	東洋大学生命科学部	講師	個体および環境情報から包括的に解明するチャネルキョットフィッシュの生態	白井 厚太郎

目次

学際連携研究報告書

【特定共同研究】

1. 地溝帯内の堆積速度変化に基づく断層活動履歴の評価
2. 西表島浦内川における魚類の多様性と汽水域の生態的役割の解明
3. 海洋微生物の持つ酵素型ロドプシンの網羅的探索と機能解明
4. 亜熱帯内湾域の古環境研究：過去から現在までの沿岸生態系の変遷

【一般共同研究】

1. 海氷モデル力学パラメータに対する観測・理論・数値的要請の融合
2. 先史アンデス海岸部における古環境変動と海民の適応戦略
3. 海洋環境要因が「細菌の表面粗さ」に及ぼす影響の解明
4. 炭素 14 を用いた大型鯨類の回遊経路の推定の試み
5. 東樺太海流が知床周辺海域における季節海氷の消長と大規模春季ブルーム発生に果たす役割
6. 軟骨魚類における不死化細胞株と遺伝子改変技術開発
7. eDNA 中の D-loop ハプロタイプから魚の個体数を網羅的に推定する手法開発
8. 蓄積された鱗の DNA が解明するマイワシの遺伝的多様性の変動
9. 個体および環境情報から包括的に解明するチャネルキャットフィッシュの生態

地溝帯内の堆積速度変化に基づく断層活動履歴の評価

Paleoearthquake record inferred from sedimentation rate changes in a tectonic graben

石澤 堯史, 東北大学・災害科学国際研究所, E-mail: ishizawa(at)irides.tohoku.ac.jp
鳥井 真之, 熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター, E-mail: mtorii(at)kumamoto-u.ac.jp

遠田 晋次, 東北大学・災害科学国際研究所, E-mail: toda(at)irides.tohoku.ac.jp

奥野 充, 福岡大学・理学部地球圏科学科, E-mail: okuno(at)fukuoka-u.ac.jp

宮入 陽介, 東京大学・大気海洋研究所, E-mail: miyairi(at)aori.u-tokyo.ac.jp

横山 祐典, 東京大学・大気海洋研究所, E-mail: yokoyama(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Takashi Ishizawa, International Research Institute of Disaster Science, Tohoku University

Masayuki Torii, Center for Water Cycle, Marine Environment and Disaster Management, Kumamoto University

Shinji Toda, International Research Institute of Disaster Science, Tohoku University

Mitsuru Okuno, Department of Earth System Science, Fukuoka University

Yosuke Miyairi, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Yusuke Yokoyama, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Estimating the size and frequency of past earthquakes is an important issue for hazard assessment. Traces of past surface rupturing earthquakes are usually revealed by stratigraphic offsets by faults. However, such offsets are often hard to detect where unconsolidated massive soil is thickly deposited. Here we show new approaches to reveal paleoearthquake history using high-resolution ^{14}C dating results at a trench site. Our results indicated that sedimentation rates of soil apparent increase at a flexure scarp due to tilting by the flexure. Moreover, we revealed that the usage of dating results from cracks that might be formed by past surface rupturing earthquakes. Our results demonstrate how we can find out the trace of surface rupturing earthquakes from thickly deposited soil. The proposed methods improve the identification of paleoseismic traces from trench sites and thus are important for hazard assessment.

1. はじめに

2016年4月に発生した熊本地震では、布田川・日奈久断層帯が活動しM7.3の地震が発生した。この地震では、同断層帯における布田川区間と高野―白旗区間の北部が主に活動したが(熊原, 2016)、それ以外の区間では目立った断層活動は認められず歪みの蓄積が継続していると考えられる。本研究で対象とした熊本県嘉島町の北甘木地区でも2016年熊本地震の際には明確な地表地震断層が表われなかったため、将来的な断層活動が予測される。北甘木断層の活動履歴は丸山ほか(2019)において、1万6千年前以後で3千あるいは6千年前と推定されているが、断層活動に伴う地層の変形が明瞭ではなく、その詳細な履歴については判明されていない。そこで本研究では北甘木地区でトレンチ調査を行い、多点数の年代測定結果を基にした断層活動履歴の評価を行った。

2. 問題設定・方法

従来、断層の活動時期は、その断層によって変位を与えられた層より若く、それを覆う層よりも古いという仮定から評価されてきた(例えば、地震調査委員会長期評価部会, 2010)。しかし、均質かつ軟弱な土壌層が厚く堆積するような地域では、地層中に生じた変位を読み取ることが難しく、断層活動履歴を復元することが困難であった。そこで本研究では、断層活動に伴い形成された地溝帯に厚く堆積する土壌層に着目し、土壌層を多点数年代測定することで堆積速度変化を読み取り、そこから断層活動履歴の復元を試みた。また断層活動に伴い形成されたと考えられる亀裂の充填物についても併せて年代測定を行った。 ^{14}C 年代測定については東京大学大気海洋研究所に設置してあるシングルステージAMS(Yokoyama et

al., 2020)を利用した。 ^{14}C 年代の較正はIntCal20(Reimer et al., 2020)を用いてOxCal 4.4.2(Bronk Ramsey, 2009)で実施した。

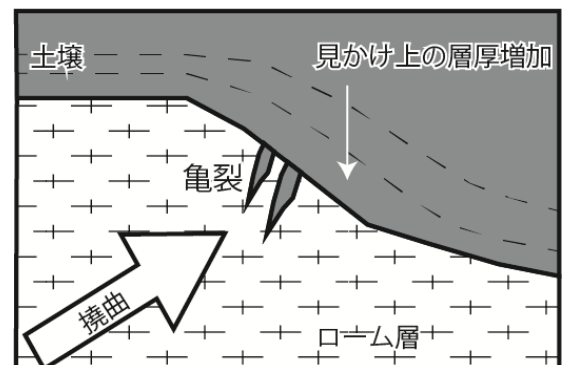


Fig. 1 A conceptual diagram of the study trench.

3. 結果と考察

その結果、土壌層が厚く堆積する地溝帯では周囲に比べ堆積速度が早いという特徴が認められた。周囲の地形状況等も考慮すると、この堆積速度変化は断層活動に伴う地層の撓み(撓曲)によるものと考えられる(Fig. 1)。具体的には撓曲により地層が傾動し、その結果見かけ上の堆積速度が増加したと考えられる。このように断層活動時期を推定することはできなかったが、撓曲という断層活動に伴う構造を年代測定

結果からも推定することが出来た。年代測定結果から断層による地層の変形構造を復元するという考え方はこれまでは無い視点であり、本結果から活断層研究における年代測定の新たな活用方法を示した。

また、トレンチ壁面で多数認められた亀裂の充填物について年代測定した結果、その年代は亀裂の周囲の層準から得られる年代よりも有意に若かった。これは断層活動に伴い亀裂が形成され、そこに当時の地表付近の堆積物が落ち込み充填したためと推定できる。そのため亀裂充填物の年代は断層活動時よりも古いと推定でき、その年代から断層活動時期を制約できると考えられる。本研究地域で認められた亀裂充填物から 6 千年前以前、1 万年前以前の断層活動が示唆され、可能性は低いものの 3 千年前以前にも断層活動があったことが示された (Fig. 2)。

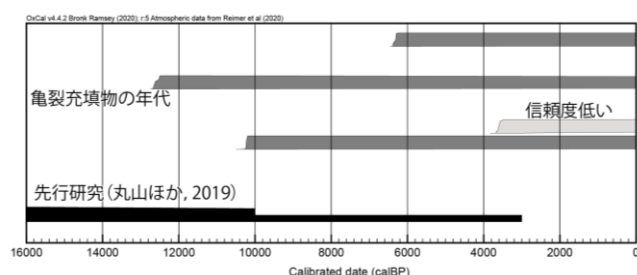


Fig. 2 Estimated ages of paleo surface rupturing earthquakes. Probability density distributions of black and grey are ages from crack-filling. Dating results of the previous study are represented in the black bar.

4. まとめと今後の展望

以上のように本研究から、土壌層が厚く堆積する地点における断層活動履歴の推定手法を新たに提案できた。従来、そのような地点では地層の変位量を推定することが難しく、断層活動履歴を推定することが困難であった。本研究で示した手法から、従来手法では地層中から読み取れていなかった断層活動履歴を復元することも期待され、より確度の高い断層活動履歴の評価を実施できる可能性もある。今後は本手法のさらなる高精度化、効率化を検討し、本手法を一般的な手法へと確立させることを目指す。

謝辞：本研究を進めるにあたり嘉島町都市計画課に多大になる便宜を図っていただいた。記して謝意を表する。

参考文献

- (1) Bronk Ramsey, C., 2009: "Bayesian analysis of radiocarbon dates", *Radiocarbon*, 51(1), 337-360.
- (2) 地震調査委員会長期評価部会, 2010: 「「活断層の長期評価手法」報告書」, https://www.jishin.go.jp/main/choukihyoka/katsu_hyokashuho/honpen.pdf
- (3) 熊原康博, 後藤秀昭, 中田 高, 石黒聡士, 石村大輔, 石山達也, 岡田真介, 椿原京子, 柏原真太郎, 金田平太郎, 杉戸信彦, 鈴木康弘, 竹竝大士, 田中 圭, 田中知季, 堤浩之, 遠田晋次, 廣内大助, 松多信尚, 箕田友和, 森本ひかる, 吉田春香, 渡辺満久, 2016: "2016 年熊本地震に伴う地表地震断層の分布とその特徴" 日本地球惑星科学連合大会 2016 年大会講演要旨.
- (4) 丸山 正, 斎藤 勝, 小峰佑介, 亀高正男, 2019: "熊本県上益城郡益城町島田地区における北甘木断層の活動履歴と 2016 年熊本地震で出現した地震断層の詳細" 活断層研究, 50, 13-31.
- (5) Reimer, P.J., Austin, W.E.N., Bard, E., Bayliss, A., Blackwell, P.G., Bronk Ramsey, C., Butzin, M., Cheng, H., Edwards, R.L., Friedrich, M., Grootes, P.M., Guilderson, T.P., Hajdas, I., Heaton, T.J., Hogg, A.G., Hughen, K.A., Kromer, B., Manning, S.W., Muscheler, R., Palmer, J.G., Pearson, C., van der Plicht, J., Reimer, R.W., Richards, D.A., Scott, E.M., Southon, J.R., Turney, C.S.M., Wacker, L., Adolphi, F., Büntgen, U., Capano, M., Fahrni, S.M., Fogtmann-Schulz, A., Friedrich, R., Köhler, P., Kudsk., S., Miyake, F., Olsen, J., Reinig, F., Sakamoto, M., Sookdeo, A., Talamo, S., 2020: "The IntCal20 northern hemisphere radiocarbon age calibration curve (0-55 cal kBP)", *Radiocarbon* 62(4), 725-757.
- (6) Yokoyama, Y., Miyairi, Y., Aze, T., Yamane, M., Sawada, C., Ando, Y., Natris, M.D., Hirabayashi, S., Ishiwa, T., Sato, N., Fukuyo, N., 2020: "A single stage Accelerator Mass Spectrometry at the Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam interactions with Materials and Atoms*.

西表島浦内川における魚類の多様性と汽水域の生態的役割の解明

Diversity of fish fauna and ecological role of brackish waters in the Urauchi River, Iriomote Island

立原一憲, 琉大・理学部, E-mail: ktachiha(at)u-ryukyu.ac.jp
兵藤 晋, 東大・大気海洋研, E-mail: hyodo@aori.u-tokyo.ac.jp
Katsunori Tachihara, Faculty of Science, University of the Ryukyus
Susumu Hyodo, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Surveys were conducted at the Urauchi River on Iriomote Island on July 13-16, December 11-14, 2020, and March 1-4, 2021. On July 14, three bull sharks *Carcharhinus leucas* were captured by a trammel net. These three bull sharks were estimated to be newborn year-old fish by their total length (798mm, 812mm, 860mm). As a result, it was confirmed that the year-old fish of the bull shark runs up to the Urauchi River every other year.

1. はじめに

西表島の浦内川は、中・南琉球最大の河川であり、その生息する魚類は、400 種を超えている（鈴木・瀬能, 2005）。我が国に生息する魚類は約 4,000 種であり、流程約 19 km の河川に日本産魚類の約 10%が生息していることになる。この多様性に富んだ魚類群集を維持する基盤は、浦内川全流程の約 50%に及ぶ広大な汽水域の存在である。

さらに浦内川の特殊性は、最上流部から河口に至るまで河川を分断する構造物が一つもなく、亜熱帯の自然河川がそのまま残されていることにある。すなわち、琉球列島で河川と海を行き来する魚類（通し回遊魚）を研究するには、最適な場所である。特に河口から約 10 kmに及ぶ広大な汽水域は、通し回遊魚や海域から河川に侵入する周縁性魚類にとって極めて重要な場所となっている。

さらにこの川には、数多くの絶滅危惧種が生息している（鈴木・森, 2016）。にもかかわらず、この汽水域の詳細な環境構造とそこに住む魚類群集の関連は、何もわかっていない。

2. 問題設定・方法

本研究では、メジロザメ科のオオメジロザメ *Carcharhinus leucas*（沖縄県版 RDB, NT）とボラ科のヒルギメナダ *Planiliza merinoptera*, モンナシボラ *Moolgarda engelii*（環境省版 RDB, DD）、タイワンメナダ *Moolgarda seiheli*（環境省版 RDB, DD）を主な対象種として、これらの魚類が、河川汽水域のどこに加入し、どこで成長していくのか、汽水域のどのような環境を必要としているのかを明らかにする。

本年度の調査は、2020 年 7 月 13-16 日、12 月 11-14 日、2021 年 3 月 1-4 日に行った。2020 年 7 月 14 日に漁船を備船し、三重刺網（目合：内 85 mm, 外 350 mm, 長さ x 丈：2 x 28m）による採集を行った。採集した魚類は、熟生研の実験室で計測、解剖した。また、2019 年 1 月に浦内川の 4 か所（河口域、遊覧船桟橋、軍艦岩、渓流域）に設置した水温データロガー（HOB01-800-LOGGERS）を回収し、周年にわたる水温変化を明らかにする。

3. 結果と考察

2020 年 7 月 14 日にメバラ川・カーシク川合流点に仕掛けた三重刺網（7 月 14 日 18:05-22:15 に設置）により、3 個体のオオメジロザメ（Fig. 1）が捕獲された。



Fig.1 Bull shark *Carcharhinus leucas* collected on July 14, 2020 in the Urauchi River.

採集されたオオメジロザメの計測結果は、以下のとおりである。

- No.1 全長 798mm, 尾叉長 648mm, 体重 3470g, 雄
- No.2 全長 812mm, 尾叉長 655mm, 体重 3450g, 雌
- No.3 全長 860 mm, 尾叉長 670mm, 体重 3640g, 雄

これら 3 標本は、氷冷して熟生研に持ち帰り、計測、計量後、解剖し、第一背鰭下の脊椎骨、消化管、DNA 解析用の肝臓を摘出し、現在、冷凍保管中である。これら 3 個体は、いずれも全長から当歳魚であると推定された。今後、脊椎骨を用いた年齢査定と胃内容物の同定を行う予定である。

今回採集された個体が当歳魚と推定されたことから、2020 年は、浦内川におけるオオメジロザメ当歳魚の加入年である

ことが明らかとなった。我々が、2014年から毎年行ってきたこれまでの研究によると、本種当歳魚の加入は、2014年、2016年、2018年に確認されている。本研究を行うに当たり、2020年は、本種の当歳魚が加入すると予想していたが、その予想どおり、浦内川へのオオメジロザメの加入が、隔年で行われることが改めて確認された。

2021年3月1日に水温データロガーを回収した結果、浦内川の最高・最低水温は、渓流域が33.0℃（2020年7月23日）・14.8℃（2022年2月1日）、軍艦岩が32.2℃（2022年7月24日）・10.8℃（2021年1月13日）、遊覧船棧橋が33.6℃（2022年7月14日）・13.4℃（2021年1月9日）、河口域が34.7℃（2020年6月21日）・13.8℃（2021年1月10日）であった。これまでの調査では、冬季に浦内川の中でオオメジロザメは採集された記録はなく、低水温時には海域に出ていると推測されていた。しかし、冬季に浦内橋直下でオオメジロザメと推測されるサメ類が目撃されており、冬季にも河川内に留まっている可能性もあり、今後の調査が望まれる。

4. まとめと今後の展望

本研究により、オオメジロザメの当歳魚は、隔年で浦内川に遡上することが確認された（2014年遡上、2015年末遡上、2016年遡上、2017年末遡上、2018年遡上、2019年末遡上、2020年遡上）。本種の当歳魚が隔年で遡上することから、浦内川の周辺海域に生息するオオメジロザメ個体群は、同調して隔年で産仔している可能性が示唆された。

本研究は、当初計画ではオオメジロザメの遡上時期である6月に三重刺網による採集と水質調査および環境DNAの解析を同時に行い、オオメジロザメの河川内における動態と生息環境の解明を試みる予定であったが、新型コロナウイルスの感染蔓延に伴い、国および沖縄県の非常事態宣言が宣言され、大幅に計画変更をせざるを得なくなった。また、ボラ科魚類の加入仔稚魚の出現状況の確認は、定期採集が出来なかったことから、結果を出すことが出来なかった。

今後は、2021年6月に今回予定していた調査を行い、オオメジロザメの河川遡上生態を明らかにする予定である。また、ボラ科魚類に関しては、加入が予想される時期に詳細な調査を行い、各種の仔稚魚の出現様式と生息環境を明らかにするとともに、これまでに記録の無いヒルギメナダ仔稚魚の形態を記載する予定である。

参考文献

- (1) 鈴木寿之、瀬能 宏、2005：“西表島浦内川とトゥドゥマリ浜の魚類御目録（予報）”西表島浦内川流域研究会（編）.pp12-22.
- (2) 鈴木寿之、森 誠一、2016：“西表島浦内川の魚類”魚類学雑誌, 63, 39-43.

海洋微生物の持つ酵素型ロドプシンの網羅的探索と機能解明

Exploration and characterization of enzyme rhodopsins in marine microorganisms

加藤 英明, 東大・総合文化, E-mail: hekato(at)bio.c.u-tokyo.ac.jp
吉澤 晋, 東大・大気海洋研, E-mail: yoshizawa(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Hideaki Kato, Komaba Institute for Science, The University of Tokyo
Susumu Yoshizawa, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

In recent years, with the development of genetic analysis technology, rhodopsin genes have been found one after another in microbial genomes. It has become clear that ion transporting rhodopsins such as H⁺ pump rhodopsins (proteorhodopsins) are widely distributed among prokaryotes in the marine environment, indicating that microorganisms use sunlight more than previously thought. Although most of these rhodopsins work as light-driven ion transporters, several enzyme-type rhodopsins have recently been found. The enzyme opsin gene encodes rhodopsin domain and an enzyme domain in a single polypeptide, and the enzyme function is regulated by light. However, not only the genetic diversity and distribution of enzyme rhodopsin in the marine environment, but even the mechanism of its function is still unknown. This study aims to clarify the light-induced metabolic changes in marine microorganisms by comprehensively searching, classifying, and analyzing the functions of enzyme rhodopsins in marine eukaryotes.

1. はじめに(節の表題: MS ゴシック 9pt)

近年、遺伝子解析技術の発展を背景に、微生物ゲノムからクロロフィルとは異なる光受容体であるロドプシン遺伝子が続々と見つかった。特に海洋環境には H⁺輸送型ロドプシン(プロテオロドプシン)などのイオン輸送型ロドプシンが海洋原核生物に広く分布することが明らかになり、これまで考えられてきた以上に微生物が太陽光を利用することが分かってきた。また、網羅的 mRNA 解析プロジェクト(MMETSP: The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project)から海洋性真核微生物も多様なロドプシン遺伝子を持つことが徐々に明らかになっている。単細胞緑藻であるクラミドモナスは、眼点にチャネル型ロドプシンを局在させることで光の方向を感知し、効率よく光合成が行える環境に移動する「走光性」を持つことなどが知られている(Berthold et al, 2008)。一方、非光合成微生物の光利用はこれまでほとんど注目されてこなかったが、近年「光」で機能を on-off する酵素型ロドプシンが数個体で見つかり、真核微生物が多様な光センサーを持つ可能性が示唆されている(Keeling et al, 2014; Luck et al, 2012)。

酵素型ロドプシン遺伝子は前半部分にロドプシンを後半部分に酵素をコードしており、光を受容すると酵素機能を発現あるいは抑制すると考えられている。例えば、海洋性襟べん毛虫ゲノム上にはロドプシン-ホスホジエステラーゼが連続した遺伝子が存在するが、このタンパク質は光に反応して環状ヌクレオチドを分解することが示されている(Yoshida et al., 2017)。しかしながら、酵素型ロドプシンの遺伝的多様性や海洋環境における分布のみならず、機構発現メカニズムさえも未だよく分かっていない。

2. 問題設定・方法

本研究では、海洋真核微生物が持つ酵素型ロドプシンを網羅的に探索・分類・機能解析を行うことで、未だ謎に包まれている海洋微生物の光による代謝変化を明らかにすることを目的とする。

具体的には以下の 2 つの課題を遂行することで海洋性微生物のもつ酵素型ロドプシンの多様性と機能を明らかにする。

1. 情報解析: 海洋微生物メタゲノム・メタトランスクリプトームを対象に酵素型ロドプシンを探索。得られた配列の酵素部分の機能予測までを行う。

2. 機能解析: 目的配列を人工的に合成し、大腸菌および哺乳類細胞を用いた異種発現系における発現系を構築する。得られた発現系を用いて目的のロドプシントンパク質を発現精製したのち、レチナールの結合能、吸収波長、光サイクルの評価を行う。さらに、融合した酵素ドメインの配列からその機能を予測し、酵素機能が実際に光によって制御されているのか、検証実験を行う。

3. 結果と考察

本年度は、様々な環境のメタゲノム(73 プロジェクト)、真核微生物トランスクリプトーム(MMETSP: 650 種以上の真核微生物 mRNA データを含むデータベース)及びタンパク質データベースから網羅的にロドプシン遺伝子の探索を行った。

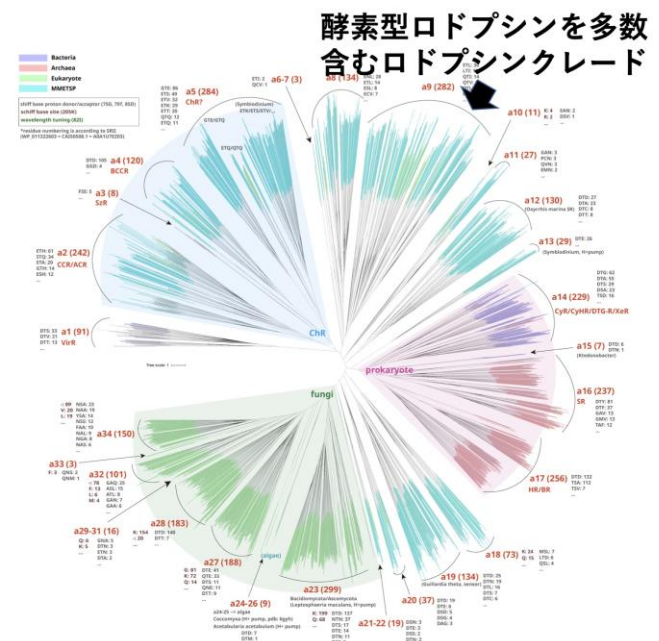


図1 本研究で得られたロドプシン配列を含む系統樹

この解析からロドプシンと推定される配列（アミノ酸配列長>200）を20万以上見出し、その中からロドプシン以外の機能ドメインをコードする6075配列を抽出することに成功した。また、抽出した配列はこれまでに報告のあるヒスチジinkinaseやホスホジェステラーゼなどだけでなく、それ以外の機能ドメインも多数含むことが分かった。また、酵素型ロドプシン候補配列は、1つのクレードに全て含まれるのではなく、複数のクレードに分散して存在する可能性が示された（図1）。得られた新規酵素型ロドプシン配列を、哺乳類細胞や大腸菌にコドン最適化後、人工的に遺伝子全合成を行った。これまでに複数の配列について大腸菌での異種発現を行ったが、ロドプシタンパク質の発現は確認できていない。現在は、培養時間や温度、転写誘導剤（Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside）の濃度、宿主大腸菌株の種類などの異種発現条件の検討を行なっている。加えて、アミノ酸配列から、ロドプシタンパク質の膜貫通領域予測や、タンパク質が立体構造をとる際に障害となり得る領域（disorder領域）の予測を行い、発現させるロドプシン配列についても最適化を試みている。遺伝子全合成を行なったロドプシン配列のうち3つにおいて、配列の最適化の候補を見つけており、今後これらの最適化配列の作製と機能解析を行う予定である。また、哺乳類細胞での発現については3種の新規酵素型ロドプシン（異性化酵素、アミノ基転移酵素、分解酵素）について発現が認められたが（図2）、発現時にフォールディング異常に起因すると思われる局在異常や分解がみられたため、大腸菌の系同様、発現コンストラクトの最適化を行なっている。また、酵素以外の機能ドメインとして、膜輸送体と融合した新規タイプのロドプシンを発見することに成功したため、こちらについても哺乳類細胞での発現を試みた。その結果、100以上の発現コンストラクトの最適化を経たのち、その発現系を構築することに成功した。このタンパク質について哺乳類細胞を用いて発現を行い、そのタンパク質を精製したのち、実際にレチナールの結合能や吸収波長を測定したところ、図3に示すような吸収スペクトルを得ることに成功している。今後はこの膜輸送体の輸送基質を調べるとともに、輸送能の光制御について検証を行う。

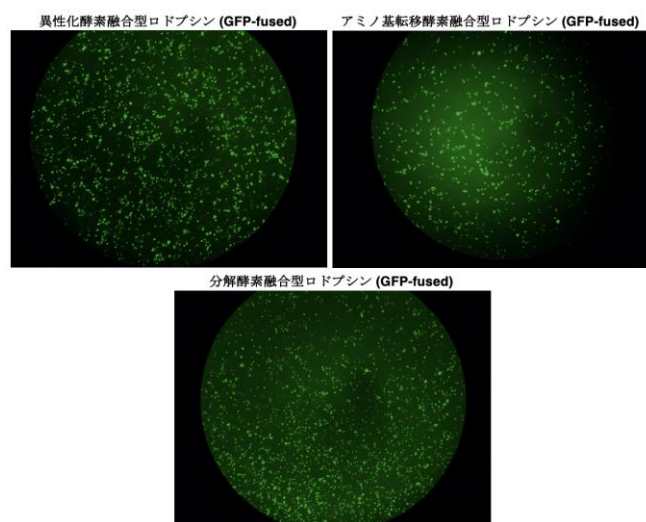


図2 新規酵素型ロドプシンの哺乳類細胞における発現

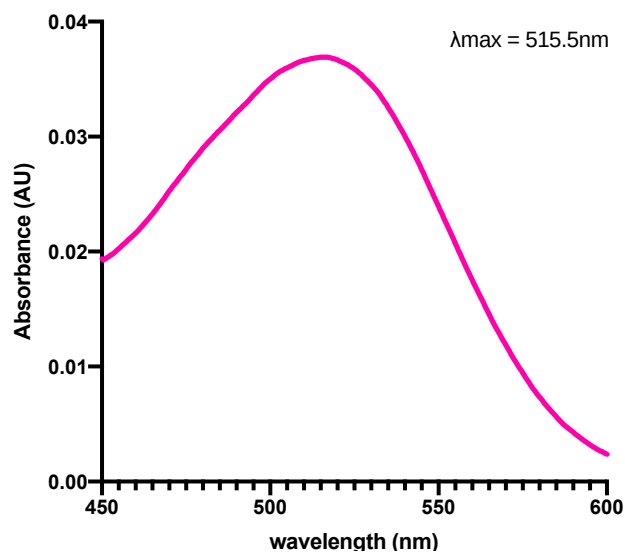


図3 新規ロドプシンの精製タンパク質における吸収波長スペクトル

4. まとめと今後の展望

特定の真核微生物が走光性を示すことは古くから知られていたが、光の存在が細胞内の代謝に影響を与える可能性が示唆されたのはごく最近であり、酵素型ロドプシンの基礎的な知見も殆ど存在しないのが現状である。本研究で実施した網羅的な情報解析から、多くの酵素型ロドプシン配列を見出すことに成功した。この成果は、従来は光を感知しないと考えられてきた微生物群が“光を感じ・利用している”可能性を示唆している。今後は、これらの遺伝子を持つ分類群や環境特異性に注目した解析を継続する予定である。また、見出した酵素型ロドプシン候補配列の配列最適化や異種発現条件を検討し、酵素型ロドプシンの機能ドメインの解析及び利用波長などを測定することで、新たな機能や細胞内での生理的役割の解明を目指す。

今後、上記の内容を解明することで、光に応じた微生物の形態・運動性・光合成効率の変化など“新たな光利用生態の概念”を創出したい。

参考文献

- (1) Berthold P et al., 2008: “Channelrhodopsin-1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in *Chlamydomonas* by Immediate Light-Induced Depolarization” *Plant Cell*, 6, 1665-1677.
- (2) Keeling PJ et al., 2014: “The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing”, *PLoS Biol.*, 12, e1001889
- (3) Luck M et al., 2012: “A Photochromic Histidine Kinase Rhodopsin (HKR1) That Is Bimodally Switched by Ultraviolet and Blue Light”, *J. Biol. Chem.*, 237, 40083-40090.
- (4) Yoshida K et al., 2017: “A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity”, *J. Biol. Chem.*, 292, 7531-754

亜熱帯内湾域の古環境研究：過去から現在までの沿岸生態系の変遷

Paleoenvironmental studies of subtropical inner bay systems: coastal ecosystems from Past to Present

藤田 和彦, 琉球大・理, E-mail: fujitaka(at)sci.u-ryukyu.ac.jp
千徳 明日香, 琉球大・理, E-mail: sentoku(at)sci.u-ryukyu.ac.jp
横山 祐典, 東大・大気海洋研, E-mail: yokoyama(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Abstract

In order to reconstruct the development history of subtropical coastal ecosystems, we focused on inner bay systems in the Ryukyu Archipelago as the study area. We analyzed sedimentary facies, grain size and compositions, microfossils (foraminifers), radiocarbon ages of plant and coral fragments in two long sediment cores (~40-m depth) retrieved from a landfill site at Nakagusuku Bay. Combined results indicate that the area was exposed before 10,000 years ago, then submerged by relative sea-level rise around 9,000 years ago, when mangrove forests were developed. From 8,000 to 4,000 years ago, the area was flooded and filled by terrigenous muddy sediment in response to relative sea-level rise and subsequent stabilization. Shallowing water depth promotes the development of coral reefs around 4,000 years ago. We found the accumulation rates of mangrove peats are highly correlated with the rate of relative sea-level rise.

1. はじめに

亜熱帯沿岸域にはサンゴ礁やマングローブ林、海草藻場など多様な沿岸生態系が広がる。現在のサンゴ礁は、7000~4000年前に形成されたが、それ以前のサンゴ礁は海底下に存在する。また、現在のマングローブ林や海草藻場は4000~1000年前以降に形成されたことが分かってきており、それ以前のマングローブ林や海草藻場の記録は海底下に存在すると考えられる。

本研究では、亜熱帯沿岸生態系の過去から現在までの変遷を記録する場所として、「内湾」に注目する。内湾は、海況が比較的穏やかなため、堆積物の擾乱が小さく、化石の保存状態も良い。そのため、過去の環境変遷の履歴が残されている可能性が高い。また、陸域と外洋の両方の影響を受けており、亜熱帯湿潤地域の陸域と海域との相互作用を含めた物質循環や古環境変遷を研究することが可能である。さらに内湾の深い海底には低海水準期や退氷期のサンゴ礁、マングローブ林、海草藻場の記録が残っている可能性がある。

2. 問題設定・方法

本研究は研究計画策定の時点では、西表島の内湾で実施する予定であったが、新型コロナウイルス感染拡大の影響により、調査地域を沖縄本島中城湾に変更した。

本研究では中城湾北部の埋め立て地で掘削された堆積物コアの分析により、亜熱帯沿岸環境・生態系の変遷と相対的の海水準変動との関連性の解明を目的とした。

沖縄県うるま市埋め立て地で掘削された2本のコアの堆積相を記載し、地質柱状図を作成した。深度1 m毎に採取された堆積物試料を水洗、乾燥、計量し、含泥率を求めた。砂礫試料については、ふるい分けした後に計量し、粒度組成を求めた。その後、>0.5 mm径の粒子よりサンゴ片、貝化石、植物片を選別・計量し、含有量を求めた。さらに堆積相が異なる代表的な6試料を選別し、実体顕微鏡下で有孔虫化石を抽出し、浮遊性有孔虫、*Ammonia* 属、*Elphidium* 属、その他の比率を求めた。サンゴ片と植物片については放射性炭素 (^{14}C) 年代測定を依頼した。

3. 結果と考察

コア1 (全長 40 m) の堆積相は、埋め立て層 (深度 0~6 m) を除いて、下位から上位へ大きく6つに区分される。深度 40~38 m は砂岩、深度 38~37 m は泥岩である。深度 37~28 m はシルト混じり粘土で、植物片を多く含む。深度 28~13 m はシルト質粘土で、貝化石を多く含む。深度 13~9 m は礫混じり

り粘土でサンゴ片を多く含む。深度 9~6 m はシルト混じり砂礫で、サンゴ片を多く含む。有孔虫組成は浮遊性有孔虫が深度 29 m と 18~12 m で高く、*Ammonia* 属と *Elphidium* 属の比率が深度 23 m で高い。コア2 (全長 30 m) の堆積相は、埋め立て層 (深度 0~5 m) を除いて、大きく5つに区分される。深度 30~27 m は砂岩、深度 27~26 m は泥岩、深度 26~12 m はシルト質粘土で植物片を多く含む。深度 12~9 m は礫混じり粘土でサンゴ片を多く含む。深度 9~5 m はシルト混じり砂礫でサンゴ片を多く含む。

以上の結果と年代測定結果から、10000 年前以前には新第三系島尻層群の砂岩・泥岩が陸上に露出していた (Fig. 1)。その後、海水準が上昇し、約 9000 年前はマングローブ林環境になった。その後、約 8000~4000 年前に海水準が上昇から安定に転じ、陸域からの土砂により埋積され、徐々に水深が浅くなっていった。その後、約 4000 年前からサンゴ礁が形成された。また、約 9000 年前に発達したマングローブ堆積物の堆積速度は約 10 mm/yr であり、当時の相対的の海水準上昇速度に比例すると考えられる。

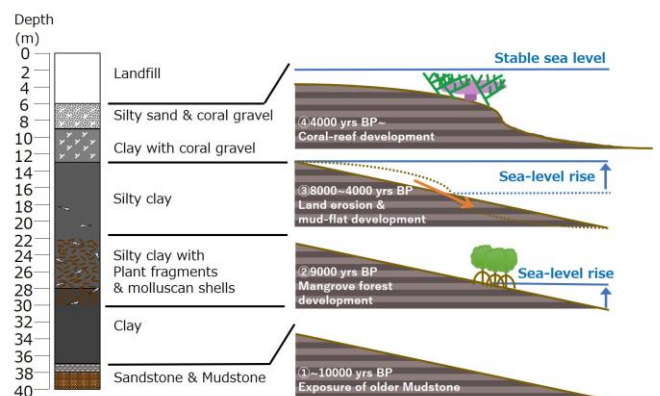


Fig.1 Lithostratigraphy of core 1 recovered at Nakagusuku Bay and inferred environmental history.

4. まとめと今後の展望

本研究により亜熱帯内湾の堆積物コアには、過去の沿岸生態系の変遷が記録されていることを確認できた。堆積物コアは分析途中であり、今後試料を追加して詳細を詰める必要がある。また、マングローブ起源の植物片の同定と年代測定を追加し、マングローブ林の発達期間や堆積速度を詳細に検討する必要がある。さらに現生のマングローブ林・干潟・海草

藻場・サンゴ礁の底質分析も進め、古環境解釈の妥当性を検討する必要がある。また、より深い海底の地形や底質の調査

も進めていきたい。

海水モデル力学パラメータに対する観測・理論・数値的要請の融合

Optimization of dynamic parameters of sea ice models based on integrated observational, theoretical and numerical approach.

豊田 隆寛, 気象庁・気象研, E-mail: ttoyoda@mri-jma.go.jp
川口 悠介, 東大・大気海洋研, E-mail: ykawaguchi@aori.u-tokyo.ac.jp
松村 義正, 東大・大気海洋研, E-mail: ymatsu@aori.u-tokyo.ac.jp
木村 詞明, 東大・大気海洋研, E-mail: kimura_n@aori.u-tokyo.ac.jp

Abstract

An optimization experiment of the sea ice dynamic parameters in a coupled sea ice-ocean model to the observational sea ice velocity data has been conducted, with the target parameters of air-ice and ice-ocean drag coefficients, turning angle of the ice-ocean drag, pressure parameters of the rheology. We extended a Green's function approach to include dependencies on the background conditions of the air, ice, and ocean. The estimated dependencies were basically consistent with previous theoretical knowledges and simulation results with the optimized parameters well reproduced the observed buoy trajectory and time series of salinity and temperature profiles at the buoy locations, which supported a robust estimation of the optimization.

1. はじめに

海水は気候形成とその維持に極めて重要なコンポーネントであり、極域の季節から経年・数十年スケールの変動を特徴づける要素の一つである。また、海水変動に伴うフィードバック機構が北極域における顕著な温暖化傾向を生じさせていると考えられる。海水分布およびその厚さの時間発展を記述する海水モデルが構築され、海洋モデルや地球システムモデルに組み込まれて成果を上げてきたが、基本的なパラメタリゼーションは1970年代の集中観測に準拠したもので、計算機資源が向上し、また、シミュレーション結果の検証が進展している現状では、海水モデルの表現が気候シミュレーションにおける高緯度気候の再現性のボトルネックの一つとなっている。

最近、Toyoda et al. (2020) は海水・海洋シミュレーションにおいて、衛星観測ベースの詳細な海水速度データ (Kimura et al., 2013) を利用して海水モデルの力学パラメータの最適化を行ったが、その中で気象・海洋条件や海水の状態に依存して最適値が変化する傾向が見いだされた。これは、過去の研究と矛盾しないが、大まかな海水分布を再現するための現状のパラメタリゼーションでは持ち越されてきた問題であり、モデルの高分解能化が進む現状において、海水表現の改善に向けて更新する必要がある。

このような背景のもと、今回の学際連携共同研究において、海水パラメータの状態変数依存性の客観推定と、その推定値に対する北極海で行われた海水ブイ観測 (Kawaguchi et al., 2012) を用いた検証と物理的解釈に向けた取り組みを行った。この独立データを用いた検証と議論は、最適化理論を用いたデータ同化アプローチに理論的背景を与えるもので、モデリング研究におけるパラメタリゼーションの改善に寄与し、更には極域・全球気候の再現・予測研究に貢献することが期待される (Fig. 1)。

2. 問題設定・方法

気象研海洋大循環モデルを用いた全球海洋・海水シミュレーションで、JRA55-do (Tsuji et al., 2018) により駆動した (1958–2017年)。分解能は東西 1° 、南北 $0.3-0.5^\circ$ で、 64°N 以北は3極座標系を用いた (Urakawa et al., 2020)。3次元変分法により海洋の水温・塩分・海面高度データと海水密度データとの同化を行った (Toyoda et al., 2016)。これを基準実験し、この2000年を初期値として擾乱実験と最適パラメータ実験を行った。

海水速度データは、人工衛星搭載のマイクロ波放射計 AMSR-E 及び AMSR2 による観測データから計算した2002年以降の日別値 (Kimura et al., 2013) を用いた。(最適化には2002–2014年のデータを使用。2015–2017年のデータは検証に使用した。)

推定するパラメータは、大気-海水間のドラッグ係数 (C_{dai})、海水-海洋間のドラッグ係数 (C_{dio})、海水-海洋ドラッグの回転角 (θ)、海水力学 (レオロジー) の圧力の係数 (P^* と C)、リッジングのシアエネルギー使用率 (C_s) の6つである。北極海縁辺部のように海水がフリードリフトに近い海域では大気と海洋のドラッグに関わる前の3つのパラメータの寄与が大きく、加えて海水が厚く内部応力が重要な海域では後3つのパラメータも寄与が大きくなると考えられる。

Green関数法を用いた最適化実験を行った。既存のパラメータセットを用いた基準実験に加え、各パラメータに擾乱を与えた実験を行い、各パラメータの観測空間への線形な影響を表すGreen関数を求め、これを用いて観測とモデルのミスフィットから設定した評価関数を最小とする最適パラメータが解析的に求まる。

本研究では、このGreen関数法を拡張して、モデル状態変数である海水厚 (H_i)、混合層深 (H_{mld})、地表面風速 (W_s)、

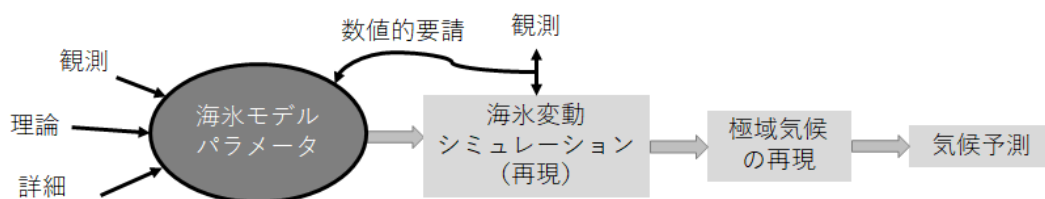


Fig. 1 A schematic of optimization of the sea ice model parameters and its impacts on the climate study.

地表面気温 (Ta) に対する線形な依存性を仮定して、このフィッティング係数を加えた計 16 のパラメータの最適化を行った。詳細は Toyoda et al. (2020, submitted) に記述したが、例えば、海水-海洋間のドラッグ係数は、

$$C_{dio} = 6.34 + 0.267 \cdot H_i - 0.00736 \cdot H_{mld} \quad (1)$$

と推定される。単位はそれぞれ、 C_{dio} [10^{-3}], H_i [m], H_{mld} [m] とする。

3. 結果と考察

まず、海水速度場 (Kimura et al., 2013) の再現性の検証 (同化していない 2015–2017 年の期間のコスト関数の比較) において、従来の Green 関数法による推定値を用いた実験 (OPT) は、初期推定値 (CTL) を約 20% 改善し、状態変数の依存性を加えて拡張した推定値を用いた実験 (OPT2) では約 24% 改善した。拡張した Green 関数法の有効性を示している。

本学際連携共同研究では、特に北極海で行われた海水ブイによる観測とシミュレーション結果の疑似トラジェクトリーとの比較を行った。海水ブイは 2010 年 4 月 16 日に北極点付近 (89.66°E, 89.28°N) に設置され、海水の動きに合わせて 2010 年 10 月 5 日 (4.32°E, 83.36°E) までの観測を行った (Fig. 2)。CTL 実験に比べて、OPT2 実験の結果は観測されたブイの軌跡に良く追従していることが分かった。また、ブイで観測された表層の塩分・水温との比較 (Fig. 3) から、季節的な海水融解による表層の低塩化とそれによる混合層の浅化傾向が OPT2 シミュレーションでも良く再現されている。

更に、状態変数への依存性を考慮した最適化係数について、過去の観測・理論的研究を踏まえた議論を行った。例えば、海水-海洋間のドラッグについて、Lu et al. (2011) は氷縁とキールの形状ドラッグと海水底の表面摩擦からなり、形状ドラッグの変化に対して底摩擦の変化は小さいことを示した。海洋大循環モデルでは、海水厚 H_i は氷盤の縦横比とリッジ強度の指標となり (例えば、Mei et al., 2019)、これらが氷縁・キールの形状ドラッグの強度に影響する。式 (1) は、これらの理論的研究と整合する依存性を表現している。

これらの結果は、今回の推定の有効性に対する観測・理論研究による補強になっており、総合的な評価に耐えうる汎用性の高いパラメタリゼーションを提示することが出来た。

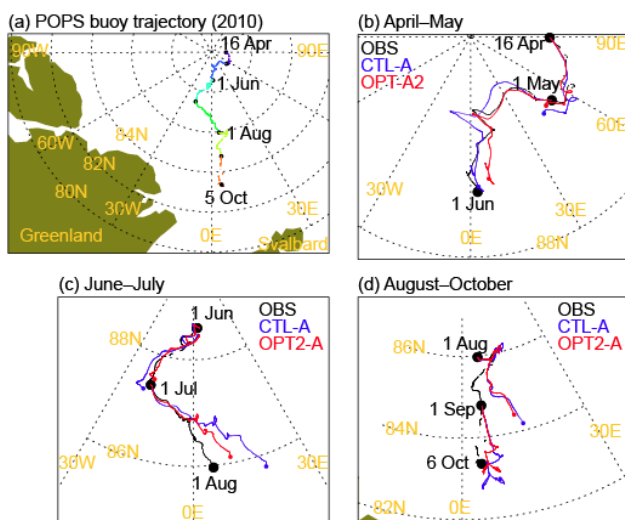


Fig. 2 (a) Observed buoy trajectory. (b-d) Observed (black) and simulated (blue and red for CTL and OPT2) buoy trajectories. Pseudo-trajectories were estimated for every month by using observed initial location and simulated sea ice motion field.

4. まとめと今後の展望

モデリング・データ同化のアプローチにより進めていた海水パラメータの最適化研究に対して、観測・理論的な検証・議論を行い、研究を進展させた。結果をまとめて、英文誌に投稿した (Toyoda et al., 2020, submitted)。

今後、この査読対応とともに、本学際連携共同研究の枠組みでの更なる観測・モデリング研究の融合・進展を目指して、データと知見を共有して議論する。

参考文献

- (1) Kawaguchi, Y., and coauthors, 2012: “Anomalous sea-ice reduction in the Eurasian Basin of the Arctic Ocean during summer 2010”, *Pol. Sci.*, 6, 39–53.
- (2) Kimura, N., A. Nishimura, Y. Tanaka, H. Yamaguchi, 2013: “Influence of winter sea-ice motion on summer ice cover in the Arctic”, *Polar Res.*, 32, 1–8.
- (3) Lu, P., Z. Li, B. Cheng, and M. Lepparanta, 2011: “A parameterization of the ice-ocean drag coefficient”, *J. Geophys. Res.*, 116, C07019.
- (4) Mei, M. J., T. Maksym, and H. Singh, 2019: “Estimating early-winter Antarctic sea ice thickness from deformed ice morphology”, *The Cryosphere*, 13, 2915–2934.
- (5) Toyoda, T., and coauthors, 2016: “Data assimilation of sea ice concentration into a global ocean-sea ice model with corrections for atmospheric forcing and ocean temperature fields”, *J. Oceanogr.*, 72, 235–262.
- (6) Toyoda, T., and coauthors, 2020: “Optimization of dynamic parameters of sea ice models based on satellite-derived sea ice velocity data”, E-6 (Feb. 18), *The 35th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans*, Feb. 16–21, 2020, Mombetsu City.
- (7) Toyoda, T., and coauthors, 2020: “Optimization of dynamic parameters of sea ice models based on satellite-derived sea ice velocity field”, *Clim. Dyn.*, submitted.
- (8) Tsujino, H., and coauthors, 2018: “JRA-55 based surface dataset for driving ocean-sea-ice models (JRA55-do)”, *Ocean Model.*, 130, 79–139.
- (9) Urakawa, L. S., and coauthors, 2020: “The sensitivity of a depth-coordinate model to diapycnal mixing induced by practical implementations of the isopycnal tracer diffusion scheme”, *Ocean Model.*, 154, 101693.

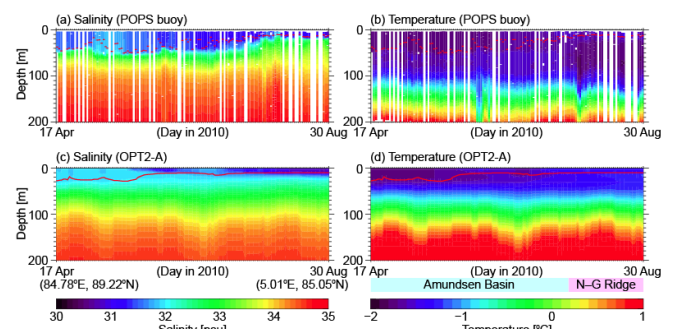


Fig. 3 (a, b) Salinity and temperature profiles obtained during the buoy observations. (c, d) Same as (a, b) but in the OPT2 experiment. Red lines indicate mixed layer depth.

先史アンデス海岸部における古環境変動と海民の適応戦略(1)

Paleoenvironmental changes and adaptation strategies of maritime community in the prehistoric Andean coast (1)

荘司 一步, 国立民族学博物館, E-mail: lpo.spd1418(at)gmail.com

白井 厚太郎, 東大・大気海洋研, E-mail: kshirai(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Kazuho Shoji, National Museum of Ethnology

Kotaro Shirai, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

This study aims to clarify the short-period paleoenvironmental changes and the corresponding changes in human behavior through interdisciplinary cooperation among geochemistry, sclerochronology, and archaeology. The sclerochronological analysis was conducted on recent and the archaeological remains of *Protothaca thaca* (Mollusca, Veneridae), a common upper subtidal bivalve. The results of the analysis showed that the growth pattern of the recent *P. thaca* was controlled by tidal cycle and sea temperature. Chronological analyses of growth patterns and oxygen isotope ratios indicate that growth anomalies greater than 400 μm are indicative of the El Niño phenomenon. Same analysis on archaeological remains showed that the scale and frequency of occurrence of growth anomaly increased from Phase CV-Ia (6200-6000BP) to Phase CV-Ib (6000-5800BP). It suggests us that the various changes in human activity in Phase CV-Ib were caused by an increase in the frequency and magnitude of the El Niño.

1. はじめに

数年周期で不定期的に起こる ENSO と長く歴史を共にしてきたアンデス地域では、湖底・海底堆積物などから古環境変動の復元が試みられてきた (eg. Jenny et al. 2002)。それに対して貝殻や動物骨のスクレクロノロジーは、サンゴ礁の分布圏外にあたるこの地域で過去の海域環境を復元する有効な研究手法であるものの、考古資料を対象とした研究事例が少ない点、発展の著しい成長線解析や地球化学の先端的な研究成果を十分に反映できていない点、長期的な環境変動史とミクロなスケールで考古学的に解明された人類史との対応関係が不明瞭な点などの課題が残る (eg. Carré et al. 2014)。

そこで本研究では、ペルーの沿岸部に生息するオオヌノメアサリ (*Protothaca thaca*) の成長パターンおよび、エル・ニーニョ現象と成長障害の関係性を微細成長線解析から明らかにし、この知見を用いてクルス・ベルデ遺跡から出土する貝殻の解析を実施した。クルス・ベルデ遺跡とは、ペルー北海岸に位置する考古遺跡であり、およそ 6000 年前の漁撈民が廃棄した食糧残渣の積み重なる廃棄遺構である。報告者は同遺跡で発掘調査を続けており、CV-Ia 期 (6200-6000BP) と CV-Ib 期 (6000-5800BP) という 2 時期の間で、遺跡における人間の活動が大きく変化したことを明らかにしてきた。環境変動がこれに関わっていた可能性が高いことから、考古学と地球化学、成長線解析を合わせた学際的なアプローチによって海域環境の変化が人類史に及ぼした影響を考察することにした。

2. 問題設定・方法

潮下帯に生息するオオヌノメアサリは、高い海水温に強い耐性を持つため、エル・ニーニョ時の海域環境下でも生存し続ける (Urban 1994)。このことから、オオヌノメアサリの貝殻には海域環境の変化に際した生理現象の変化が生体履歴として記録されていると考えられ、実際に微細成長線解析が進められてきた (eg. Lazareth et al. 2006)。しかし、エル・ニーニョ現象の被害が大きいペルー北海岸の個体については解析が行われた例がなく、遺跡出土の個体との比較には心もとない。そのため、本研究では、2018 と 2019 年に採集された 4 つの現生個体を用いて解析を実施した。

貝殻の最大成長軸に沿って、厚さ 2mm の切片を切り出し、成長パターンの観察、および同位体分析のための試料採取を

行った。観察にはデジタルマイクロスコープ (KEYENCE 社 VHX-2000) を用い、100~300 倍の倍率で観察し撮影を行った。撮影した写真をもとに写真解析ソフト Image J を用いて微細成長線のカウント、成長幅の計測を実施した。このデータをもとに 1 微細成長線単位における成長幅の変動をグラフに表し、過去 10 年間に観測された SST (海面水温) の変動と比較した。SST は現生個体の採集地とクルス・ベルデ遺跡の間に位置する IMARPE (ペルー海洋研究所) ワンチャコ支局の観測所で公開されているデータを用いている。同位体分析は、電動ドリルによって約 1mm 間隔で小さな穴を穿ち、その過程で採取した貝殻の粉末 (200 μg) を測定試料とした。

また、上述のような現生個体の解析によって得られた知見をもとに、成長障害輪に着目した解析を遺跡出土の貝殻についても実施した。解析の対象となったのは、CV-Ia 期と CV-Ib 期の地層から出土した計 47 点の貝殻である。現生個体と同様の手順で成長パターンの解析と同位体比の測定が行われた。

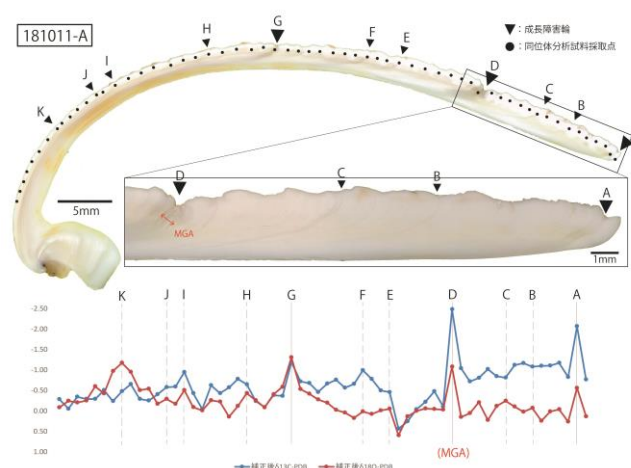


Fig.1 成長障害輪と酸素・炭素同位体比の関係

図中の●は試料の採取点、▼は成長障害輪。成長障害輪 D は 400 μm 以上の幅を持ち (MGA: Major Growth Anomaly)、低い酸素と炭素の同位体比が得られている。

3. 結果と考察

(1) 現生個体の成長パターンとエル・ニーニョ現象

現生資料の貝殻断面において微細成長パターンの観察を行った結果、10 μ m~250 μ m ほどの厚さを持つ微細成長縞と、それを区切る 3~5 μ m ほどの厚さを持つ暗色の微細成長線が連続的に確認された。この微細成長縞幅の計測値は一定の周期で増減を繰り返していることが確認されており、とくに貝殻生成が活発な成長の初段階において、この周期は 15 本の縞によって構成されている。このことから、これが大潮と小潮の周期に伴う 1 朔望日の成長量の変動を表している。すなわち 1 サイクルで 14~15 本が認められた上述の微細成長縞は、朔望日周期の成長縞に相当するであろうことがわかる。

また、貝殻断面には大きな成長障害輪が残されていることを確認した。この成長障害輪がどのような要因で形成されたのかを明らかにするため、大潮/小潮サイクルに伴う成長量の周期変動数に着目して、貝殻の採集日から生体履歴を遡る編年学的な操作を行った。その結果、いずれの個体においても 400 μ m 以上の成長障害輪が形成されたのは、2017 年 1 月~4 月に記録されたエル・ニーニョ現象の時期にあたることが分かった。さらに、貝殻断面から連続的に採取した試料の酸素および炭素の同位体比を測定した結果、大きな成長障害輪は海水温が非常に高い環境下で形成されたことが示唆される。以上のことから、400 μ m 以上の幅の成長障害輪が過去のエル・ニーニョ現象の指標となることが明らかになった。

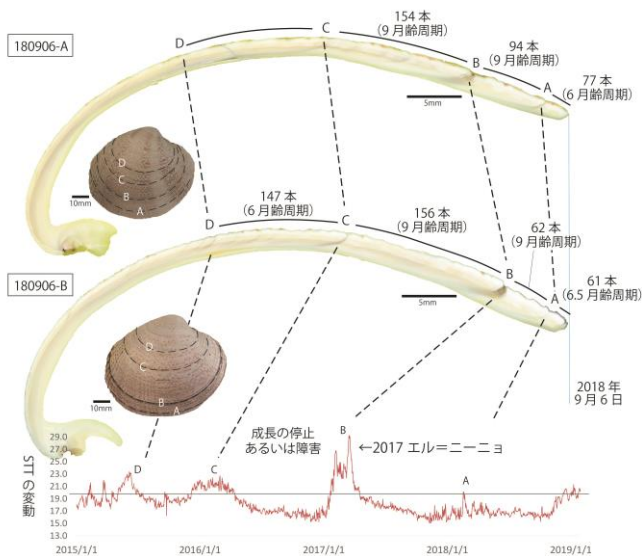


Fig.2 成長障害輪間の成長縞数と成長量の変動周期数から換算した月齢周期数および観測水温 (SST) の変動
現生個体の採取日から遡る編年学的検討によって、成長障害輪 B が 2017 年に起きたエル・ニーニョ現象で残されたことがわかる。

(2) 遺跡出土貝殻の成長障害輪と古環境変動

現生個体の成長線解析より得た知見を用いて、遺跡から出土する貝殻で観察された成長障害輪の計測とカウントを行った。その結果、18 点の CV-Ia 期から出土したオオヌメアサリにおいて、500 μ m 以上の成長障害輪を持つ個体が 2 点、400~500 μ m の成長障害輪を持つ個体についても 4 点確認された。このことから、CV-Ia 期においてもエル・ニーニョ現象のような急激な海水温の上昇を経験していた個体があったことが示唆される。一方の CV-Ib 期では、29 点のオオヌメアサリのうち、500 μ m 以上の成長障害輪を持つ個体が 14 点、400~500 μ m の成長障害輪を持つ個体は 7 点確認されている。成長障害輪を持つ個体の割合や、成長障害輪の大きさが急激に増加していることから、CV-Ib 期では、前時期と比べてエル・ニーニョ現象の頻度が増加し、その規模も大きくなるような環境変

動が起きていたことが指摘できる。

4. まとめと今後の展望

本研究を通じて、オオヌメアサリの貝殻の成長パターンと 400 μ m 以上の成長障害輪が残される要因が明らかになった。それは、この種の潮下帯の二枚貝の成長が潮汐と海水温の変化に大きく左右されているのであり、エル・ニーニョ現象による海水温の上昇が大きな成長障害を引き起こすことを意味する。クルス・ベルデ遺跡から出土した貝殻に、エル・ニーニョ現象の指標となる成長障害輪が多く残されるようになることは、6000BP を境にして同現象の発現サイクルが大きく変化していたことを示している。すなわち、この時期に環境の大きな変化が起きていたことが立証されたのであり、それに伴って当時の人々の資源利用の在り方や貝塚に対する認識、

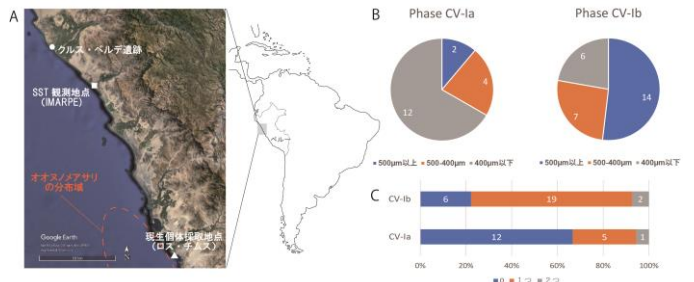


Fig.3 遺跡の位置と遺跡出土貝殻の解析結果

A: クルス・ベルデ遺跡と現生個体の採取地点、B: 400 μ m 以上の成長障害輪を持つ個体の割合 (時期ごと)、C: 一個体が持つ MGA の数で分類した資料群の割合 (時期ごと)

集団組織に変化が生まれていたことが明らかになった (cf. 莊司ほか 2019)。この時期の海域環境の変化が人類史に大きな影響を及ぼしたことがわかる。

また、大潮/小潮に伴って成長量の変動サイクルが認められることは、海水温の季節変化が少ないペルー沿岸の海域において、成長履歴の編年学的検討を可能にする重要な知見となった。これは、同海域の遺跡出土貝類を分析するうえでの課題を乗り越えることを意味し、スクレロクロノロジーの応用可能性を人間の採集活動や貝塚の形成過程の復元にまで広げるような展望をもたらす。

参考文献

- (1) Carré, M., J. P. Sachs, S. Purca, A. J. Schauer, P. Braconnot, R. A. Falcón, M. Julien, and D. Lavallée, 2014: "Holocene History of ENSO Variance and Asymmetry in the Eastern Tropical Pacific", *Science*, 345, 1045-1047.
- (2) Jenny, B., B. Valero-Garcés, R. Villa-Martínez, R. Urrutia, M. Geyh, and H. Veit, 2002: "Early to Mid-Holocene Aridity in Central Chile and the Southern Westerlies: the Laguna Aculeo Record (341S)", *Quaternary Research*, 58, 160-170.
- (3) Lazareth, C., G. Lasne and L. Ortlieb, 2006: "Growth Anomalies in *Protothaca thaca* (Mollusca, Veneridae) Shells as Markers of ENSO Conditions", *Climate Research*, 30, 263-269.
- (4) 莊司一歩, ビクトル・バスケス, テレサ・ロサーレス, 2019: "クルス・ベルデ遺跡出土遺物からみたペルー北部沿岸地域における古期の動物利用と変化" 古代アメリカ, 22, 101-118.
- (5) Urban, H.-J., 1994: "Upper Temperature Tolerance of Ten Bivalve Species off Peru and Chile Related to El Niño", *Marine Ecology Progress Series*, 107, 139-145.

海洋環境要因が「細菌の表面粗さ」に及ぼす影響の解明

Investigation of the effects of environmental parameters on the bacterial surface roughness in seawater

山田 洋輔, 沖縄科学技術大学院・MBU, E-mail: yosuke.yamada(at)oist.jp

福田 秀樹, 東大・大気海洋研, E-mail: hfukuda(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Yosuke Yamada, The Okinawa Institute of Science and Technology Graduate
University, Marine Biophysics Unit

Hideki Fukuda, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Bacterial surface is the largest reaction surface of living organisms in seawater. Nano-sized particles are also abundant in the ocean and they are utilized by bacteria. Bacterial surface roughness varies among species and growth phases, and the modification of surface properties seems to be one of the bacterial strategies to acquire these nano-sized particles as the carbon and nitrogen sources efficiently. However, the environmental and physicochemical effects on bacterial surface properties are still unknown. Here, we collected marine bacteria from Otuti bay and Kuroshio region. Our data indicated that there was no significant correlation among bacterial surface roughness and environmental and physicochemical parameters such as regions, water temperature, salinity, depths, and chlorophyll a concentration in seawater. Further analysis using samples collected from different sampling regions and depths is necessary to investigate the environmental and physicochemical effects on bacterial surface properties.

1. はじめに

海水 1 mL 中には約 100 万の細菌が存在し、その表面は海洋で最大の生物反応表面である。実際、海洋で 1 次生産により固定された炭素の約半分が細菌に利用され、本過程は海洋炭素循環の鍵プロセスとなっている (Azam 1998 Science doi:10.1126/science.280.5364.694)。溶存態有機物 (<1.0 μm) は、以前より、細菌の主要炭素源と考えられてきたが、近年、その中でも比較的サイズの大きいナノサイズ粒子 (コロイド粒子とも呼ばれる、0.001-1.0 μm) が海水中に細菌数の最大 1000 倍ほど存在し、炭素源として極めて重要であることが指摘され始めている (Santschi 2018 Mar Chem doi:10.1016/j.marchem.2018.11.003)。ナノサイズ粒子には微生物の死骸や破片、タンパク質や多糖類由来のポリマー凝集体等が含まれ、細菌はこれらを膜表面に付着させ、細胞外酵素で分解した後、吸収すると考えられているが、本機構の初期過程であるナノサイズ粒子の細菌への付着については未だ不明な点が多い (Azam & Malfatti 2007 Nat Rev Microbiol doi:10.1038/nrmicro1798)。

従来、細菌への粒子付着は物理化学的な海水攪拌による衝突頻度と、細菌と粒子の粘着率 (衝突の際の結合しやすさ) が重要だとされてきた (Jackson & Burd 2015 Prog Oceanogr doi:10.1016/j.pocean.2014.08.014)。しかし、細菌と粒子の粘着率は、その組合せや細菌が放出する粘性性ポリマー量や組成、構造等の複合的要因により決まるとされ、ナノサイズ粒子の細菌への付着に関する主な制御要因やその機構は謎であった。代表者は先行研究で細菌の「表面粗さ」は反応表面を増加させ、ナノサイズ粒子の付着を増大させるという仮説の元、世界で初めて細菌表面粗さとナノサイズ粒子の付着を定量的に測定した (論文作成中)。表面粗さの測定には微細な表面構造が観察可能な原子間力顕微鏡を用い、天

然の海洋細菌が 1 細胞ごとに大きく異なる表面粗さを持つことを発見した。また、表面粗さは細菌の種類や増殖期によって大きく変化することも明らかとなった。さらに、モデルナノサイズ粒子 (ポリスチレン粒子) と細菌単離株の培養実験により、細菌表面粗さとナノサイズ粒子の付着に強い正の相関があることを見出した。これらの結果は、表面粗さが細菌のナノサイズ粒子付着における主要な制御要因で、細菌は炭素源獲得戦略として表面粗さを変化させている可能性を示している。

2. 問題設定・方法

先行研究にて細菌表面粗さに対する生物学的影響 (細菌の種や増殖期) は解明されたものの、物理化学的な海洋環境要因の影響については十分な検討がされておらず、海洋細菌の炭素源獲得戦略を議論する上での基本的知見が欠如している。そこで本研究では、水温、塩分、深度、クロロフィル濃度等、どのような海洋物理化学環境要因が細菌の表面粗さを変化させるかについて、現場観測と培養実験とを組み合わせつつ解明を目指した。細菌表面粗さは、応募者所属大学が有する原子間力顕微鏡を用いて観察・測定を行った。現場観測は、大槌湾での観測、白鳳丸および新青丸航海 (KH-20-9: 黒潮周辺域、KS-21-4: 北海道南部・三陸沖) にて、CTD 観測および海水・細菌群集を深度別に採取し、各種海洋物理化学パラメータの分析、細菌表面粗さの顕微鏡測定を行った。細菌群集組成の解析も行った。なお、細菌の表面粗さは低濃度ホルムアルデヒド等の固定剤の影響を受けず、数か月程度は保存できることを確認済である。海水をろ過したフィルターサンプルを代表者所属大学に持ち帰り、顕微鏡観察・測定を行った。培養実験では、応募者所属大学の培養室や臨海実験施設の水槽にて、水温、塩分、深度、クロロフィル濃度等を変化させ

た条件下で、細菌単離株や天然細菌群集を培養した。以上より、各種海洋物理化学環境要因と細菌表面粗さの関係解明を試みた。

3. 結果と考察

大槌湾、黒潮周辺域、北海道南部・三陸沖における現場観測を行い、異なる海域・深度の細菌サンプル及び、海洋環境パラメータの取得を行った。培養実験は現在解析中であり、沖縄県の沿岸域から単離した細菌などを用いて、環境要因の影響を調べている。黒潮周辺域および北海道南部・三陸沖の現場観測サンプルに関しても、解析途中であり、ここでは大槌湾および黒潮周辺域のサンプルの一部分析結果を示す。

大槌湾内（3 測点）、および黒潮周辺域（4 測点）の表層・深度 200 m から採取した異なる海域・深度の海水サンプル（合計 24 サンプル）をフィルターに濾過し、細菌の表面粗さを原子間力顕微鏡で観察した。図 1 にその観察例を示す。細菌の表面粗さ（二乗平均平方根高さ）は、合計 500 cell ほどの細菌を測定した結果、1.0–10.0 nm の範囲で、平均 $\pm$ 標準偏差は 4.2 ± 0.4 nm であった。この範囲は過去のデータと比べ、比較的值の幅が広く、海洋細菌が海域や深度によって、大きく異なる表面粗さを持っていることを示している。このデータは、代表者が知る限り、海洋細菌の表面粗さを外洋域で測定した世界初の例である。サンプルを採取した測点・深度における各種環境要因の値の範囲は、水温：13.9–28.7 °C、塩分：26.2–34.9 ‰、クロロフィル a 濃度（蛍光強度）：0.15–2.02（ターナーによる検定を今後行う予定）であった。

Spearman の順位相関分析を行ったが、細菌表面粗さと海域、水温、塩分、深度、クロロフィル濃度の間に有意な相関はいずれも見られず（ $p > 0.05$ ）。観測した海域において、これらの環境要因は細菌表面粗さに大きく影響していない可能性が示唆された。

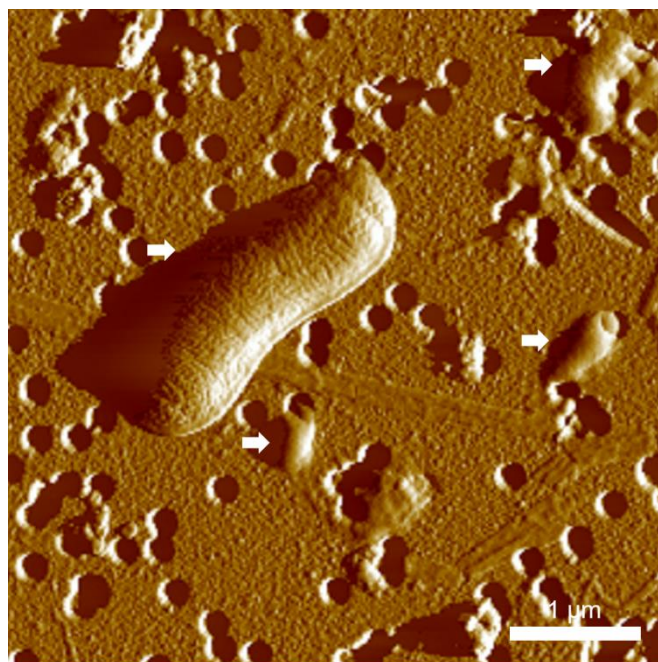


図 1 大槌湾で採取した海洋細菌の原子間力顕微鏡像。矢印が細菌。細菌は $0.2 \mu\text{m}$ 孔フィルター上にトラップし、ホルムアルデヒドで固定した。表面性状が細菌によって大きく異なることが見て分かる。

4. まとめと今後の展望

本研究により、沿岸域と外洋域で海洋細菌の表面粗さを測定し、細菌ごとに比較的大きな幅を持つことが明らかとなった。現時点では、水温、塩分、深度、クロロフィル濃度では、細菌表面粗さの変動を説明できないことが示唆された。今後、サンプルの解析を進め、サンプル数を増やした後、再度解析を行う予定である。また、現在解析途中である、細菌群集組成や栄養塩濃度、各種粒子濃度（粒状態有機物濃度、ポリマー濃度）等の情報が得られ次第、細菌表面粗さとの関係を明らかにしていく。そして、細菌の海水中における炭素獲得戦略と細菌表面粗さの関係を解明していく予定である。

参考文献

- (1) Azam, F. (1998), Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens, *Science*, 280(5364), 694–696, doi:DOI 10.1126/science.280.5364.694.
- (2) Santschi, P. H. (2018), Marine colloids, agents of the self-cleansing capacity of aquatic systems: Historical perspective and new discoveries, *Marine Chemistry*, 207, 124–135, doi:10.1016/j.marchem.2018.11.003
- (3) Azam, F., and F. Malfatti (2007), Microbial structuring of marine ecosystems, *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782–791, doi:10.1038/nrmicro1747.
- (4) Jackson, G. A., and A. B. Burd (2015), Simulating aggregate dynamics in ocean biogeochemical models, *Progress in Oceanography*, 133, 55–65, doi:10.1016/j.pocean.2014.08.014.

炭素 14 を用いた大型鯨類の回遊経路推定の試み

Estimation of migration routes of baleen whales by using carbon-14

松田 純佳, 北大・水産, E-mail: matsuda(at)fish.hokudai.ac.jp

永田 俊, 東大・大気海洋研, E-mail: nagata(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

横山 祐典, 東大・大気海洋研, E-mail: yokoyama(at)aori.u-tokyo.ac.jp

松石 隆, 北大・水産, E-mail: catm(at)fish.hokudai.ac.jp

Ayaka Matsuda, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

Toshi Nagata, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Yosuke Miyairi, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Yusuke Yokoyama, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Takashi Matsuishi, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

Abstract

We investigated the use of radiocarbon isotope, carbon-14, in the baleen plate for reconstructing the migration history and foraging area of baleen whale in the western North Pacific Ocean. $\Delta^{14}\text{C}$ -baleen values of stranded Right whale were measured and the migration history for the past eight years was tracked. The low $\Delta^{14}\text{C}$ value suggested that the right whale inhabited waters in the Oyashio current that originates in the Arctic Ocean and flows southward into the northern Pacific.

1. はじめに

鯨類は海中でその一生を過ごす。広大な海を移動するため、どのようなルートを利用して回遊しているかを知ることは容易ではない。ヒゲクジラ類と呼ばれる分類群の鯨種は、口内にヒゲ板と呼ばれる非代謝組織を持つ。ヒゲ板は摂餌に使用される器官であり、髪の毛や爪のように根本から先端へむかって伸長する。このような非代謝組織の安定同位体比を分析することで大將動物の回遊履歴が推定されてきた⁽¹⁾⁽²⁾。しかしながら、安定同位体の地域による変化量は非常にわずかで、多くの場合、餌の変化を安定同位体比のみから議論することが困難である。そこで、本研究では、大型鯨類の回遊経路推定のために、放射性炭素同位体 (^{14}C) を新たな手法として導入した。 ^{14}C 濃度は、親潮系の海流と黒潮系の海流で最大 200% もの大きな開きがある⁽³⁾⁽⁴⁾ ことから、親潮と黒潮がぶつかる日本近海ではこの差を利用することで回遊履歴の推定に制約を与えることができる。そこで本研究では、ヒゲクジラ類のヒゲ板における $\Delta^{14}\text{C}$ を時系列に沿って分析することで、大型鯨類の回遊ルートの推定を試みた。

2. 問題設定・方法

本研究には、2018 年 7 月に北海道根室地方に漂着したセミクジラ *Eubalaena japonica* (SNH18022; メス 約 17m) のヒゲ板 (約 2m) を用いた。セミクジラ *Eubalaena japonica* は北太平洋に広く分布するヒゲクジラであり、IUCN レッドリストにおいて絶滅危惧 (EN) に指定されているが、日本近海における回遊ルートなどの生態情報は乏しい。漂着した個体のヒゲ板を採取し、分析に用いた。ヒゲ板は先端から 4 cm 間隔で切断し、5~10mg ずつ分析に供した。分析には東京大学大気海洋研究所におけるシングルステージ加速器質量分析装置を用いた。

3. 結果と考察

ヒゲ板 1 枚から 198 点分の放射性炭素同位体比の分析を行った。 $\Delta^{14}\text{C}$ は最小で -65.17‰、最大で -38.31‰ となった。ヒゲ板先端から 120 cm 付近まではあまり値に変化がなかったが、

以降は大きな変動が見られた (図 1)。近縁種であるタイセイヨウセムクジラのヒゲ板の伸長速度は、60 日で 4 cm と推定されており⁽⁵⁾、本分析では、過去約 8 年分の回遊記録を推定できた。ヒゲ板は先端ほど古く、根本ほど新しいことから、本個体は直近 2 年ほどになって北太平洋において南北を移動していたことが分かった。また、一貫して低い値をとったことから、本個体は主に北太平洋北部のみを利用していたと考えられ、日本周辺海域では、北海道までしか来遊していないことが明らかになった。

本種は北太平洋において、主に、オホーツク海、ベーリング海、アラスカ湾、アリューシャン列島周辺に分布し、カリフォルニア半島南部や東シナ海、日本海での目撃報告もあり、春には北部へ秋には南部へ回遊するとされている⁽⁶⁾。しかし本研究による $\Delta^{14}\text{C}$ 分析結果では、東シナ海や日本海、カリフォルニア半島南部に来遊した形跡はなく、親潮流域における低い値のみを示した。

セムクジラの基礎生態については不明な点が多いが、本研究結果により、放射性炭素同位体比分析により過去 8 年分もの回遊履歴を追うことができ、本個体は日本周辺海域において、黒潮流域にまでは移動していなかったことが明らかになった。

4. まとめと今後の展望

本研究により、放射性炭素同位体比分析によって、セムクジラの回遊について新たな知見を得ることができた。また、漂着した死体から過去 8 年分もの回遊履歴を再現することができた。今まではヒゲクジラのみでしか分析できていなかったが、今後はハクジラ類においても放射性炭素同位体による回遊経路の推定ができるよう、研究を進めたい。

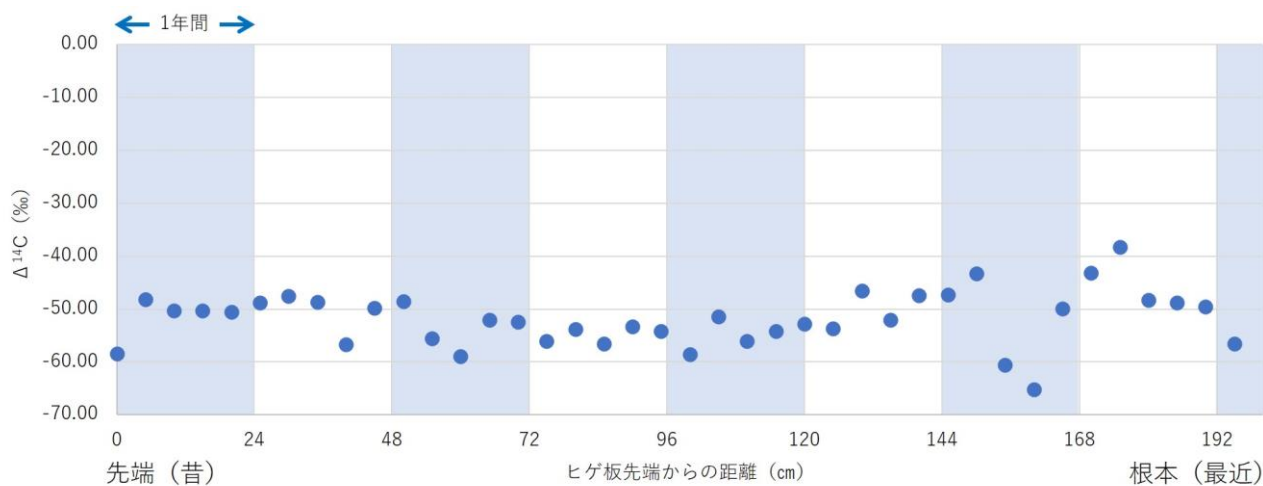


図 1. セミクジラヒゲ板の $\Delta^{14}\text{C}$ 分析結果

参考文献

- (1) D. M. Schell, S. M. Saipé, and N. Haubenstock, 1989: Bowhead whale (*Balaena mysticetus*) growth and feeding as estimated by $\delta^{13}\text{C}$ techniques, *Mar. Biol.*, 103, 433-443
- (2) Y. Mitani, T. Bando, N. Takai, and W. Sakamoto, 2006: Patterns of stable carbon and nitrogen isotopes in the baleen of common minke whale *Balaenoptera acutorostrata* from the western North Pacific. *Fisheries Sci.*, 72(1), 69-76.
- (3) 横山祐典, 大河内直彦, 2017: “放射性炭素-14 を使った海洋生物の動態・生態系理解”(特集 同位体の化学と食の安全) 現代化学 *Chemistry today*, 552, 44-46.
- (4) T. Larsen, Y. Yokoyama, and R. Fernandes, 2018: Radiocarbon in ecology: Insights and perspectives from aquatic and terrestrial studies. *Methods Ecol. Evol.*, 9(1), 181-190.
- (5) K. E. Hunt, S. N. Lysiak, M. Moore, and M. R. Rolland, 2017: Multi-year longitudinal profiles of cortisol and corticosterone recovered from baleen of North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*). *General and comparative endocrinology*, 254, 50-59.
- (6) T. A. Jefferson, M. A. Webber, and R. L. Pitman, 2015: Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification. Second edition. Elsevier/Academic Press, New York, New York, USA.

東樺太海流が知床周辺海域における季節海水の消長と大規模春季ブルーム発生に果たす役割

Effects of East Sakhalin Current on sea ice and spring bloom around the Shiretoko area

中村 知裕, 北大・低温研, E-mail: nakamura(at)lowtem.hokudai.ac.jp

藤尾 伸三, 東大・大気海洋研, E-mail: fujio(at)aori.u-tokyo.ac.jp

柳本 大吾, 東大・大気海洋研, E-mail: daigo(at)aori.u-tokyo.ac.jp

西岡 純, 北大・低温研, E-mail: nishioka(at)lowtem.hokudai.ac.jp

三寺 史夫, 北大・低温研, E-mail: humiom(at)lowtem.hokudai.ac.jp

Tomohiro Nakamura, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

Shinzou Fujio, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Daigo Yanagimoto, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Jun Nishioka, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

Humio Mitsudera, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

古市さん

Abstract

The Shiretoko area has a large-scale seasonal sea ice and high primary production that forms a biodiversity hotspot and thus is selected as a Natural World Heritage. Recently, a concern is arising that sea ice could reduce or even disappear due to the global warming, which in turn can change the ecosystem. However, although the East Sakhalin Coastal Current (ESCC) can affect both sea ice distribution by its low temperature and possible future change in primary production depends on the mechanism of the bloom, observations are very limited for ESCC under sea ice and spring bloom after sea ice melt. We therefore conducted the following observations by the Hakuho-maru Cruise KH-20-12 in December 2020. (1) Deployment of a mooring that observes ESCC throughout a year to investigate the relationship between current, water temperature, salinity, sinking particles, and sea ice. (2) Observation of water mass and nutrient distributions in the Shiretoko area just before sea ice coverage. The results will be analyzed with the observations in April 2021 just after sea ice melt, the mooring data after recovery planned in 2022, past observations and numerical simulations.

1. はじめに

知床周辺海域は、季節海水の到来と豊かな海洋生態系・生物多様性に特徴づけられ、海水をキーワードに世界自然遺産に登録されている。しかし近年、地球温暖化に伴い全球で海水が減少しつつあり、知床でも海水の消失の可能性と消失が生態系に与える影響が懸念されている。

知床海域は北半球における大規模な季節海水の南限である。この海域では冬季、海水直下に非常に冷たい沿岸流（東樺太沿岸流）が流れている。この東樺太沿岸流はその外洋の海水と比べて著しく低温・低塩のため、大陸棚端に強い熱塩フロントを形成し、海水融解を抑制することで、海水の消長に寄与している可能性がある。しかし、海水下の観測は非常に限られている。

また、知床海域では海水融解直後に植物プランクトンの大増殖が起こる。ここでも東樺太沿岸流は、アムール川由来の栄養物質の輸送により海水融解直後の植物プランクトン大増殖（ブルーム）に寄与している可能性がある。さらに海水は、鉄など栄養物質を含む大気降水物や陸棚堆積物を海水中に捕捉し、融解とともに海洋表層に放出する (Kanna et al., 2018) とともに、東樺太沿岸流表層の栄養物質の消費を抑制する。しかし、海水融解直後に生じる大規模なブルームの時期の観測はほとんど無い。

2. 問題設定・方法

本共同研究では、(1) 東樺太沿岸流と季節海水消長の関係、(2) 東樺太沿岸流と海水による海水融解期の大規模ブルームへの栄養物質供給、を明らかにすることを目指し、採択して戴いた4月19日から5月1日の新青丸航海 KS-20-5 で、以下を計画した。

(1) 海水下の東樺太沿岸流の観測、特に流速、水温・塩分の

季節進行と沈降粒子として捕捉される植物プランクトンを観測するために係留系を設置。

(2) 海水融解期の知床海域で水塊構造および栄養塩・栄養物質分布を三次元的に観測。

実際には、新型コロナウイルス感染症対策のため同航海は中止となり、代替として12月に白鳳丸航海 KH-20-12 が実施された。同航海では上記に加えて、植物プランクトン群集構造と基礎生産力の測定、表層堆積物中の底生珪藻類と Ice Rafted Debris 測定のための採泥、海棲哺乳類の目視観測も行われた。

海水融解直後の代わりに、海水到来直前の観測となり、目的(2)は直接果たせなかったが、今年4月に予定されている新青丸航海 KS-21-6 での観測と合わせることで、海水到来の前で比較ができるようになった。加えて、日本近海であるにもかかわらず、根室海峡における晩秋から冬季（11月-4月）におけるCTD断面観測は、代表者の知る限り、これが初めてである（小熊ほか、2007）。

3. 結果と考察

係留系で冬季混合層の水塊と流速および海水を捉えるため、CTDを水深約65mと200mに、ADCPを上向きに水深約110mに取り付けた。沈降粒子捕捉のために、セジメントトラップが水深約500mに取り付けた。加えて流速計を水深約200m, 500m, 海底直上に取り付けられている。係留系の位置は、東樺太沿岸流の観測に最適な陸棚端から漁業調整により少し沖合に移り水深1300m付近の陸棚斜面上となり (Fig. 1)、数は予算の都合で1つとなった。2022年の春に回収予定である。

CTD測点と採水の位置を Fig. 1 に示す。本報告書では、係留系を設置した測線と、晩秋から冬季では初めての観測である根室海峡北部について較正前のCTD断面を簡潔に紹介する。

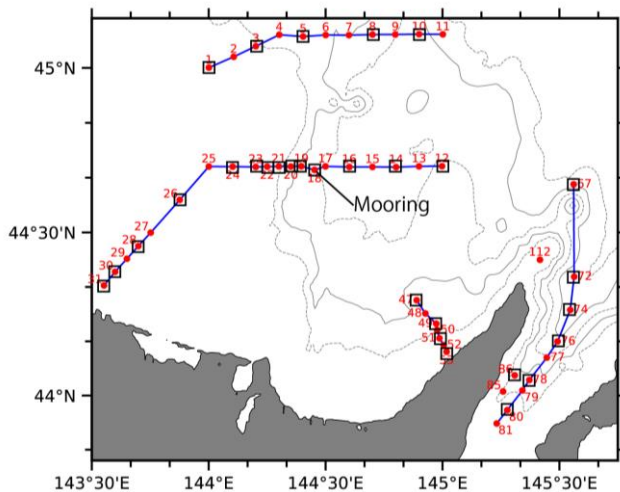


Fig. 1 Observation sites. Red dots and black square are CTD and water sampling sites, respectively. Mooring is placed near St. 18, indicated by a black arrow.

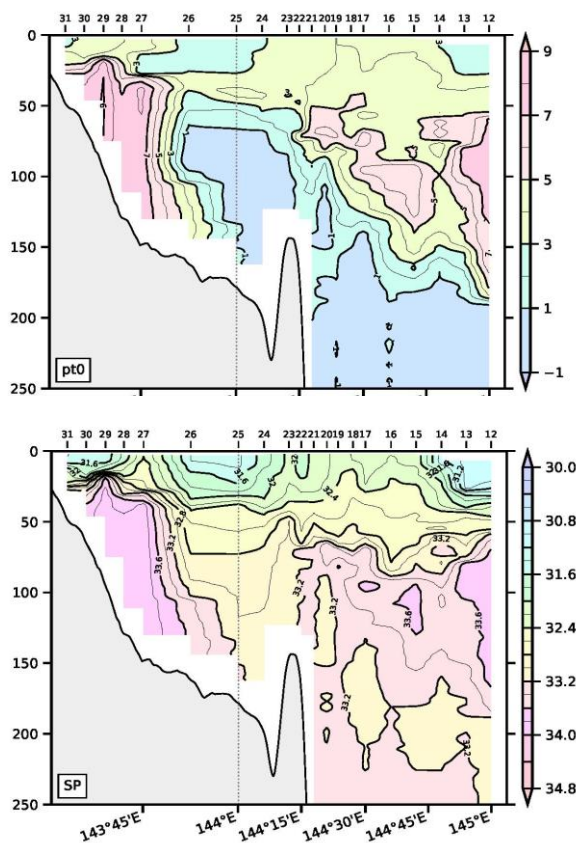


Fig. 2 The vertical section of (top) potential temperature (deg. C) and (bottom) salinity (PSU) along the line including the mooring site. The vertical axis is in dbar.

係留系設置点を含む測線の水温・塩分断面(250dbar 以浅)を Fig. 2 に示す。表層には、岸側(図左側)と最も沖側に低塩の東樺太海流水が分布し、北見大和堆(図中央付近の浅瀬)の沖側には、東樺太海流水よりわずかに高塩のオホーツク海表層水が分布していた。その下、亜表層では、岸側に宗谷暖流水、北見大和堆(図中央付近の浅瀬)より沖に宗谷暖流変質水が見られる。こ

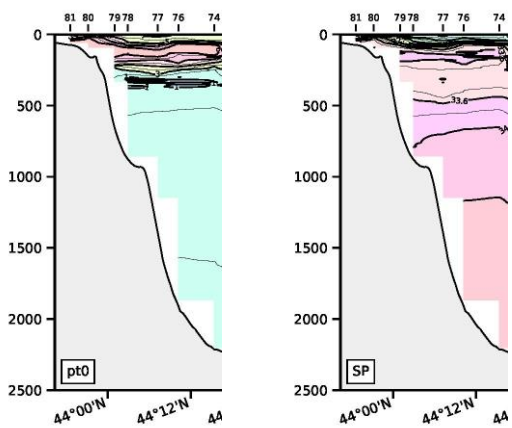


Fig. 3 Vertical section along the Nemuro Strait. (left) potential temperature and (right) salinity.

れらの特徴は、過去の研究の気候学的季節変動から予想される通りであり、夏季から冬季への水塊入れ替えが始まっている。

根室海峡北部の水温・塩分断面を Fig. 3 に示す。図では見にくいですが、表層には低塩低温の東樺太海流水がすでに流入してきている。しかし、その下には、水温が 10 度を超える高温高塩の宗谷暖流水がまだ残っていて、未だに夏季と同様の状態を保っていた。500dbar 以深は、夏季の観測と同様に、オホーツク海の水塊とほぼ同じようである。

4. まとめと今後の展望

知床周辺海域で 12 月白鳳丸航海 KH-20-12 において、東樺太沿岸流観測のための係留系設置、流水到来直前の水塊・栄養物質の分布の観測を行った。係留系による海水下の北海道沖合の東樺太海流観測はこれが最初の試みであり、根室海峡における晩秋から冬季の CTD 観測および根室海峡北部の採泥は、代表者の知る限り、本航海が初めてである。

観測海域までの往復を除くと約 11 日間の観測期間のうち約 6 日間荒天のため避難先(根室海峡羅臼沖合)から離れられなかった。それにもかかわらず、係留系の設置と優先順位の高い測線での観測を実施できた。御協力いただいた白鳳丸船長並びに乗組員と乗船研究者に感謝いたします。

今回の観測データと、この後予定されている 2021 年 4 月新青丸航海 KS-21-6 および 2022 年の係留系回収とを合わせることで、海水下の東樺太海流、流水前後の水塊・栄養物質分布、そして根室海峡北部の季節変動の実態を解明できるだろう。さらに、砕氷船「そうや」の冬季観測データや数値モデル出力も組み合わせることで、「温暖化に伴って海水は知床から消えるのか?」、「消えた時の生態系への影響は?」、「海洋生態系の保全と持続的水産業の両立」といった地域社会にとっての重要問題への科学的根拠に繋げていきたい。

参考文献

- (1) Kanna, N., Y. Shibano, t. Toyota, J. Nishioka, 2018: "Winter iron supply processes fueling spring phytoplankton growth in a sub-polar marginal sea, the Sea of Okhotsk: Importance of sea ice and the East Sakhalin Current", Mar. Chem., 206, 109-120.
- (2) 小熊幸子, 川崎康寛, 東屋知範, 2007: "根室海峡における春季および秋季の水質変化過程", 海の研究, 16 (5), 361-374.

軟骨魚類における不死化細胞株と遺伝子改変技術開発

Establishment of immortalized cell-line and genetic tool for cartilaginous fish studies

馬谷 千恵, 東大・大学院理学系研究科, E-mail: chie_u(at)bs.s.u-tokyo.ac.jp

藤森 千加, 東大・大気海洋研, E-mail: c-fujimori(at)aori.u-tokyo.ac.jp

神田 真司, 東大・大気海洋研, E-mail: shinji(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Chie Umatani, Graduate School of Science, The University of Tokyo

Chika Fujimori, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Shinji Kanda, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Protecting cartilaginous fish from extinction is important for the balanced ecosystem and the maintenance of biological diversity. However, the mechanisms of reproduction, feeding, and homeostasis in those fish, which play a key role for the protection of them, remain unclear. Unlike teleosts and mammals, in cartilaginous fish, there is a barrier blocking the use of genetic tools: internal fertilization and hard egg sheath. Thus, studies on these mechanisms have lack genetical evidence, although physiological and morphological approaches have advanced on the understanding of them. In the present study, to establish gene transfection in cartilaginous fish, we examined the culture condition of the primary culture, and then tried a couple of transfection methods in these cells. Here, we found that urea is important for the culture and that lipofection using lipofectamine and electroporation can be used for gene transfection in cartilaginous cells.

1. はじめに

軟骨魚類のサメ類は海洋生態系において食物連鎖の最上位に位置する動物群である。近年、絶滅が危惧されるサメ類の数は年々増加しており、生態系の保全や生物多様性の維持にとって大きな問題となってきた。一方で、サメ類の保全にとって必要不可欠な繁殖・摂食・環境適応のメカニズムには不明な点が多く、海洋生命科学の分野において重要な課題となっている。

これまでサメに関する繁殖・摂食・環境適応にかかわる研究は、既知のホルモンを投与した際の個体の行動や血中ホルモン量の解析といった生理学的アプローチや、組織切片を用いた遺伝子・タンパク質の解析といった形態学的アプローチを中心に行われてきた。その一方で、より明確な回答を得られる実験生物学的アプローチ、すなわちメダカやゼブラフィッシュをはじめとする硬骨魚類で行われている「遺伝子进行操作する技術」が切望されている。しかしながら、現在知られているすべての軟骨魚類は体内受精であり、卵生種においても受精後の胚は硬い卵鞘に覆われていることから、硬骨魚類や哺乳類などで確立された遺伝学的手法をそのまま適用することが不可能であった。そこで本研究では、大気海洋研究所でライフサイクルを通して飼育が確立されているトラザメを用いて、サメの不死化細胞株樹立と遺伝子導入法の検討を行うことにより、サメ類において遺伝子进行操作する技術の確立を目指した。

2. 問題設定・方法

①サメの不死化細胞株樹立の検討

細胞分裂が成体に比べて頻繁に生じていると考えられるトラザメ胚を用いて、頭部・胴部・尾部に分けて別々に細胞を解離し、培養することにより、生存率が高い部位を検証した。また、トラザメは体内浸透圧が 1000 mOsm 程度と一般的な細胞培養液の浸透圧 (～300 mOsm) より非常に高い。そのため、尿素やオスモライトのトリメチルアミン-N-オキシド (TMAO, 54 mM) を用いて培養液の浸透圧を高くした場合、また、細胞の増殖を促進するといわれる物質 (コンカナバリン A (Con A, 15 μ g/ml)、フィトヘマグルチニン-P (PHA, 18 μ g/ml)) の有無により増殖効率に違いがあるかを検証した。TMAO, Con A,

PHA の濃度は Uno et al., 2020 に準拠した。

②軟骨魚類への遺伝子導入法の検討

サメの初代培養細胞を用いて、哺乳類細胞で確立している lipofection、polyethyleneimine (PEI)、electroporation、また adenovirus を用いた遺伝子導入を試みた。具体的には、lipofection、PEI、electroporation 法を用いて EGFP-N1 vector (サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの直下に緑色蛍光タンパク質 EGFP 遺伝子をコードするプラスミド) を導入、もしくは、CMV プロモーター下で核において EGFP を発現するアデノウイルスの感染を検証した。

3. 結果と考察

①サメの不死化細胞株樹立の検討

まず、培養に用いる体の部位の検討では、尾部のほうが正常な細胞の形を数週間保つものが多く、細胞の生存率が高いことが示唆された。また、培養液の条件検討に関しては、尿素無しの場合、播種後数日で剥離することが分かった。一方、尿素を含んだ培地では、細胞が張り付いて広がる様子が観察され、1 か月程度培養することができた。

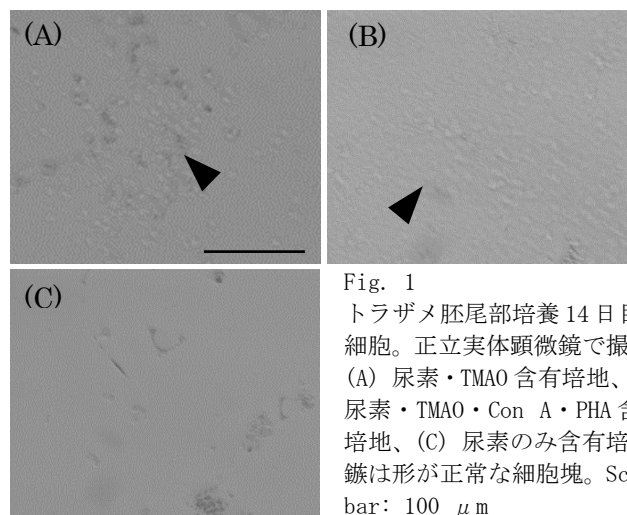


Fig. 1

トラザメ胚尾部培養 14 日目の細胞。正立実体顕微鏡で撮影。(A) 尿素・TMAO 含有培地、(B) 尿素・TMAO・Con A・PHA 含有培地、(C) 尿素のみ含有培地。鏝は形が正常な細胞塊。Scale bar: 100 μ m

次に、尿素のみだけではなく、TMAO や Con A・PHA を含む培地を用いて検証したところ、形が正常でクラスターとなっている細胞が多く観察された (Fig. 1)。今後これらの因子が実際に増殖に関与しているか、新たに増えた細胞を標識する BrdU 等を用いた定量的な検証が必要であると考えられる。

②軟骨魚類への遺伝子導入法の検討

最後に、軟骨魚類細胞への遺伝子導入を検討するため、①で確立した初代培養系を用いて、各種遺伝子導入法を試みた。条件検討の結果、4つの方法のうち、lipofection 法 (Fig. 2D) と electroporation 法 (Fig. 2J) でのみ EGFP に由来する緑色蛍光を発する細胞を観察することができた。各遺伝子導入法における緑色蛍光陽性率 (平均 $\pm$ SD%) は、対照群 (0.018 $\pm$ 0.021%)、lipofection (4.669 $\pm$ 1.544%)、PEI (0.004 $\pm$ 0.009%)、adenovirus (0.036 $\pm$ 0.061%)、electroporation (0.694 $\pm$ 0.357%) と、lipofection 法が最も導入効率が高いことが明らかとなった。なお、対照群でも自家蛍光の影響でごく少数の緑色蛍光陽性細胞がみられたが、lipofection 法と electroporation 法においては明らかに多くの細胞が緑色蛍光を示しており、EGFP の導入によることが強く示唆される。

一方、過去の知見において、メダカ (Suehiro et al., 2010) やゼブラフィッシュ (Kawasaki et al., 2009) といった硬骨魚類では、アデノウイルスを用いた遺伝子導入が可能であることが報告されている。しかしながら、本研究のサメ初代培養細胞では、アデノウイルスの感染は確認されなかった。本実験で用いたアデノウイルスは哺乳類細胞において感染性を確認したものであるため、軟骨魚類細胞と硬骨魚類細胞ではアデノウイルスに対する応答性が異なる可能性が示唆された。

4. まとめと今後の展望

本研究により、サメ細胞の培養に尿素が重要であることが示唆された。現在は数週間～1か月程度の観察であるため、細胞増殖因子等を含む培地において、さらに長期的に培養を行うことにより、分裂細胞から不死化細胞を得られるかどうか、検証したい。また、lipofection 法と electroporation 法により、外来遺伝子を軟骨魚類細胞へ導入可能であることが明らかとなったため、増殖を促進する遺伝子の導入という方向からも不死化細胞の樹立を検証したい。さらに、lipofection 法と electroporation 法の導入効率を向上させる条件を検討するとともに、組織・個体レベルでの遺伝子導入に取り組む予定である。それにより、サメ類における繁殖・摂食・環境適応のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにしていきたい。

参考文献

- (1) Yoshinobu Uno, Ryo Nozu, Itsuki Kiyatake, Nobuyuki Higashiguchi, Shuji Sodeyama, Kiyomi Murakumo, Keiichi Sato, Shigehiro Kuraku. Cell culture-based karyotyping of oreotolobiform sharks for chromosome-scale genome analysis. *Communications Biology* 2020; 3:652
- (2) Yuji Suehiro, Masato Kinoshita, Teruhiro Okuyama, Atsuko Shimada, Kiyoshi Naruse, Hiroyuki Takeda, Takeo Kubo Mitsuhiko Hashimoto, Hideaki Takeuchi. Transient and permanent gene transfer into the brain of the teleost fish medaka (*Oryzias latipes*)

using human adenovirus and the Cre-loxP system. *FEBS Letters* 2010; 584:1873-3468

- (3) Toshihiro Kawasaki, Kenji Saito, Kaoru Mitsui, Masahito Ikawa, Masakane Yamashita, Yoshihito Taniguchi, Shunichi Takeda, Kohnosuke Mitani, Noriyoshi Sakai. Introduction of a foreign gene into zebrafish and medaka cells using adenoviral vectors. *Zebrafish*. 2009; 253-258

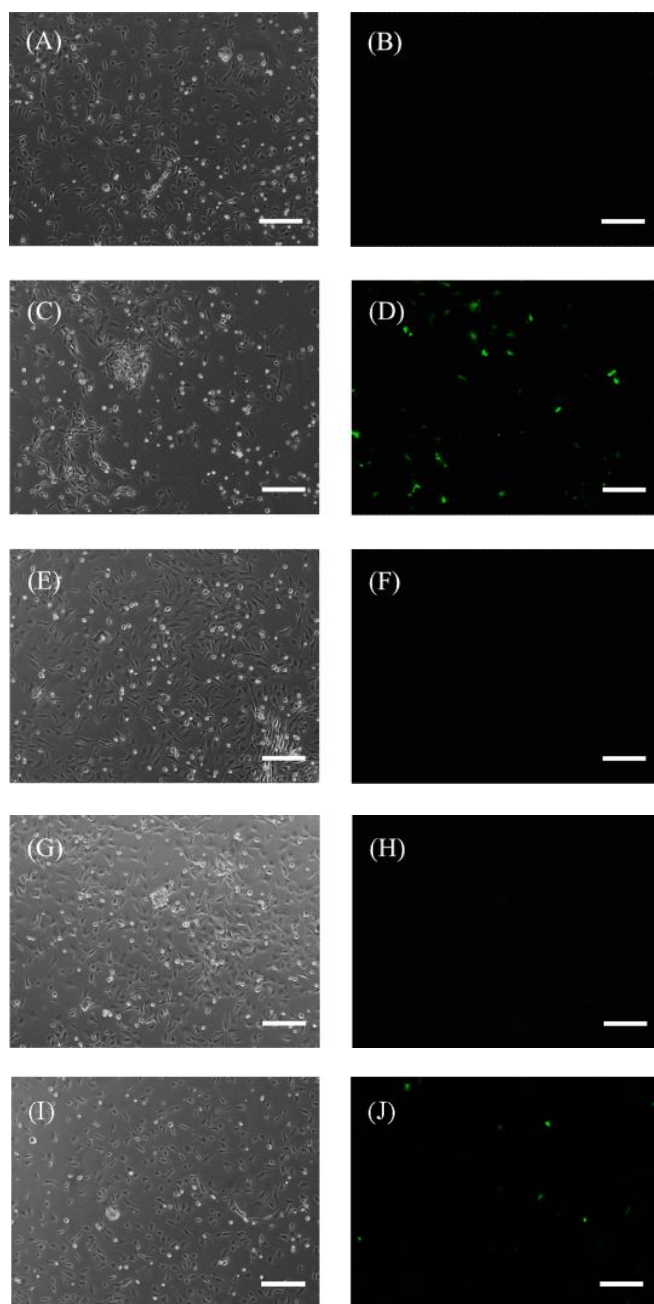


Fig. 2

各遺伝子導入法を行ったサメ初代培養細胞における EGFP 発現。左：微分干渉像、右：EGFP 蛍光像。(A・B) 対照群、(C・D) lipofection 法で遺伝子導入したもの、(E・F) PEI 法で遺伝子導入したもの、(G・H) アデノウイルスを含む培地で培養したもの、(I・J) electroporation 法で遺伝子導入したもの。Scale bar: 200 μ m

eDNA 中の D-loop ハプロタイプから魚の個体数を網羅的に推定する手法開発

Development of a method for comprehensive estimation of fish populations from D-loop haplotypes in eDNA

吉武 和敏, 東大・農水圏, E-mail: akyoshita(at)g.ecc.u-tokyo.ac.jp

濱崎 恒二, 東大・大気海洋研, E-mail: seibu(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Kazutoshi Yoshitake, Laboratory of Aquatic Molecular Biology and Biotechnology, The University of University

Koji Hamasaki, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

As a method for estimating fish resources from environmental DNA, we designed primers to amplify D-loop comprehensively in fish by two-step PCR, and sequenced D-loop by the LoopSeq library preparation kit. In the aquarium tank, it was possible to estimate the population for 6 out of 14 fish species.

1. はじめに(節の表題: MS ゴシック 9pt)

環境 DNA (environmental DNA, eDNA) とは土壌や水などのさまざまな環境中から採取される、そこに生息する生物由来の DNA のことで、環境 DNA を調べることでその環境に棲息する生物の情報を得ることが可能である。近年水圏の研究ではミトコンドリアの保存性の高い 12S rRNA を対象とした MiFish プライマーにより、魚類の分布を網羅的に調べる研究などが多数行われてきた。保存性の高い 12S rRNA を用いた環境 DNA の研究では、対象の魚種が存在するかどうかの議論は可能であるが、個体数についての情報は DNA 濃度が濃いか薄いかにもとに推測するしかなく、生物種によって、また魚のサイズによって放出する eDNA が異なるため、汎用性に乏しい。そこで、申請者は個体ごとに異なる配列を用いて、個体数を推定する新しい手法 HaCeD-Seq (Haplotype Count from eDNA) を開発した(2019, Mar. Biotechnol.)。この手法は進化速度の極めて速いミトコンドリアの D-loop 配列が、ウナギなどの魚種では 1 個体ずつ異なることを利用し、eDNA に含まれる D-loop のハプロタイプを数えることで個体数を推定する手法である。HaCeD-Seq を発表した研究ではウナギの D-loop 500 塩基を対象として PCR プライマーを設計し、Illumina の MiSeq シーケンサーでシーケンスを行った。HaCeD-Seq を行うことで、従来のように DNA 濃度から個体数を算出するよりも、簡単に精度よく個体数を算出できることが判明した。

2. 問題設定・方法

12S rRNA ではなく、D-loop を用いることで環境 DNA から個体数情報を取得できる可能性は示された。しかし、ウナギ用の D-loop プライマー、マグロ用の D-loop プライマーなどと種ごとにプライマーを設計するのはコストが掛かるため、MiFish プライマーのように網羅的に魚類の D-loop を増幅可能なプライマーを設計することを検討した。12S rRNA では保存性が高いため網羅的に魚類を検出するプライマーを 12S rRNA 内に設計することが可能であったが、D-loop 配列は多様性が高いため、D-loop 配列内に網羅的なプライマーを設計することは不可能である。そこで MitoFish データベースに登録されている 2,847 種を調べたところ、2,786 種(98%)で D-loop の両端に tRNA-Thr と 12S rRNA という保存性の高い配列が存在していた。それらの配列の中にプライマーを設計すれば、98%の魚類 D-loop を網羅的に増幅可能であり、平均 1,238 bp の PCR 産物が得られる計算となった。また、HaCeD-Seq では 1 塩基でもシーケンスが間違ってしまうと、別のハプロタイプ(別個体)とみなされてしまうため、1,238 bp のうち 1 度も

間違わないくらいの高精度のシーケンス技術が必要である。これを満たすシーケンス技術として PacBio の HiFi リードと、Illumina シーケンサーを用いる LoopSeq が利用可能である。本研究ではコストの安い LoopSeq を採用してシーケンスを行うこととした。

本研究では、新しく設計した魚類網羅的な D-loop プライマーを用いて、環境 DNA から網羅的に魚の個体数を推定することが可能かを調べる。その場合、同じ種であっても D-loop の配列が異なる必要がある。湖の魚や完全養殖の魚では D-loop の多様性が低いため、本研究では海産魚について調査することとした。サンプルについては、葛西臨海水族園の水槽の水を用いることとした。葛西臨海水族園では天然から捕獲した海産魚を飼育している水槽が多数あり、また種ごとに個体数情報が記録されているため、本研究に適していると考えられる。

3. 結果と考察

環境 DNA では長い DNA 断片を増幅しようとするほど増幅が困難になり、MiFish の 200 bp と比較して 700 bp を増幅しようすると、1/100 程度の収量になるとの報告もある。私達の設計した D-loop プライマーは平均 1,238 bp の断片長になるため、PCR が困難であると考えられる。実際に 1 度の PCR では増幅できないサンプルが多かったため、1st PCR の後に切り出し精製を行い、もう一度 PCR を行うことによって取得したすべてのサンプルで PCR 増幅可能な条件を確立した。

PCR 産物を LoopSeq のライブラリ調整キットを用いてライブラリ調整を行い、Illumina HiSeq シーケンサーを用いてシーケンスを行った後、LoopSeq 社のウェブサイトにて合成ロングリードを構築した。

得られたリードをハプロタイプごとにリード数をカウントし、水槽単位で検出されたハプロタイプの種類と数、水槽で飼育されている魚の種類と個体数を比較した(図 1)。HaCeD-Seq の結果として、どの水槽からでも 1 個体以上はユニークな種が検出されており、特にリード数が高ければ 5 倍以上の 10 万リードが得られていた 36 番水槽に関しては、HaCeD-Seq で検出された種数は飼育されている 14 種類中 6 種を検出可能であった。36 番水槽で最も個体数の多いタカベは、飼育されている個体数が 25 個体で、HaCeD-Seq で検出されたハプロタイプ数が 13 だった。

まとめと今後の展望

本研究により魚類 D-loop を網羅的に増幅するプライマー

が機能していること、LoopSeqを用いた合成ロングリードにより D-loop のハプロタイプ数を検出可能なシーケンス精度が得られていることが確認された。

問題点として、検出される種数、個体数を増やすためには、リード数を増やす必要性が示唆された。さらに、アンプリコン用の LoopSeq の販売が 2020 年 12 月で終了してしまったため、LoopSeq の代わりとなる手法を探す必要がある。現時点ではリード数を増やすにはよりコストをかけるしかないが、LoopSeq の代わりとしては、PacBio の HiFi リードを含め幾つかの手法が存在しており、今後検証を行う必要がある。

また、水族園で飼育されている魚には、MitoFish データベースに D-loop 配列が登録されていない種類も多く、図 1 の HaCeD-Seq の結果では「Other」として表示されているが、その割合が高い。今後 D-loop の参照配列を整備していくことも必要である。

本研究成果をもとにすぐに現実可能な応用としては、MiFish プライマーで網羅的に種の検出を行い、D-loop プライマーでそのうちの 50% 程度の種について個体数情報を得るという系が想定される。環境 DNA を用いた魚類の資源量調査は、非侵襲的で環境に優しく、持続的にモニタリング可能な新しい調査方法である。手法の標準化やデータベース化などの整備も並行して進めることで、多くの研究機関で資源量調査手法として採用されることが期待される。

参考文献

- (1) Kazutoshi, Y., et al., 2019: “HaCeD-Seq: a Novel Method for Reliable and Easy Estimation About the Fish Population Using Haplotype Count from eDNA”, Mar. Biotechnol. 2019 Dec;21(6):813-820

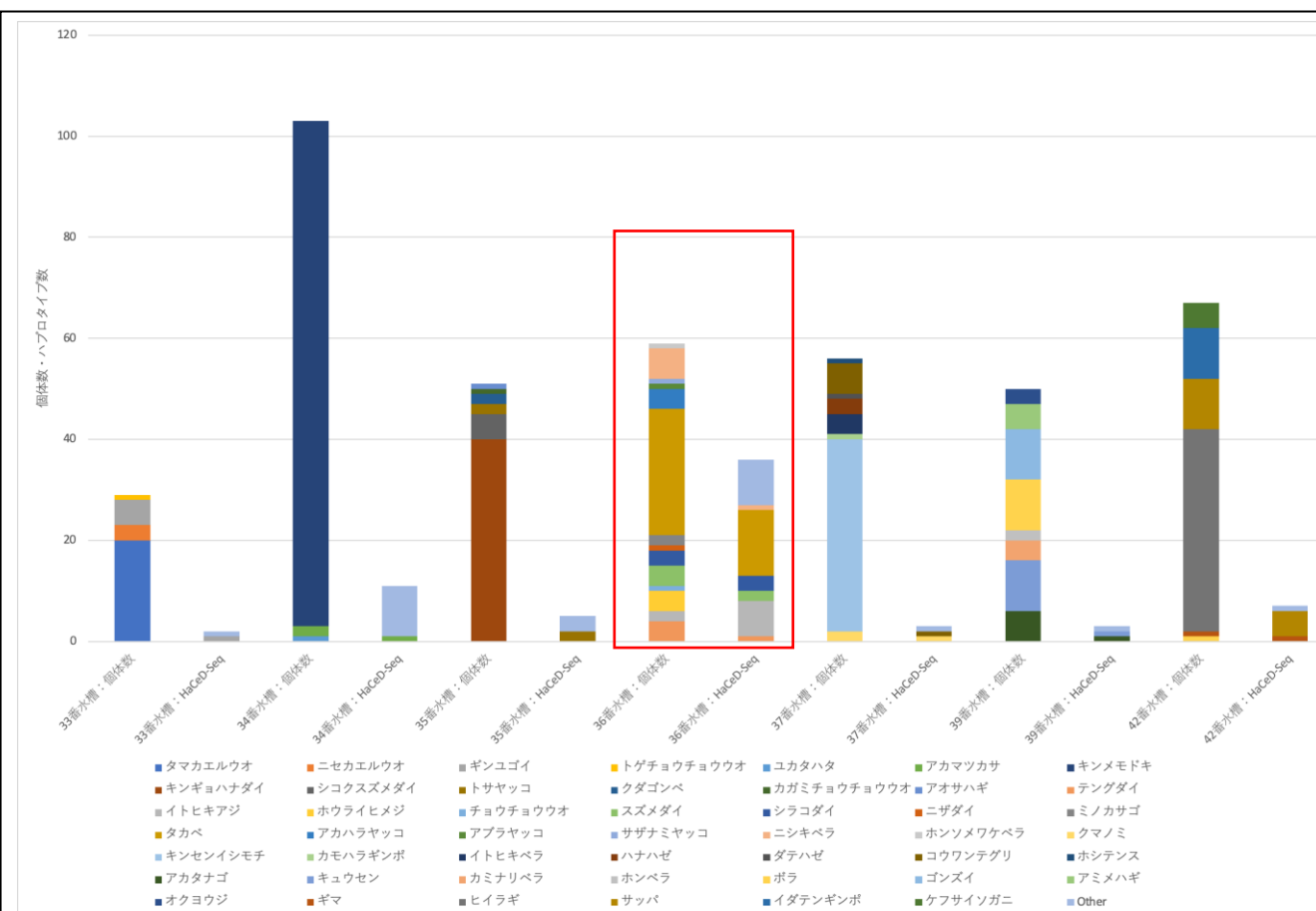


図 1 各水槽で飼育されている魚の種類と個体数、HaCeD-Seq の結果

蓄積された鱗の DNA が解明するマイワシの遺伝的多様性の変動

Revealing the temporal variation of genetic diversity of Japanese sardine using DNA from historical scale samples

坂本達也, 水産研究・教育機構, E-mail: tats(at)affrc.go.jp

新里宙也, 東大・大気海洋研, E-mail: c.shinzato(at)aori.u-tokyo.ac.jp

高橋素光, 水産研究・教育機構, E-mail: takahamt(at)affrc.go.jp

Tatsuya Sakamoto, Japan Fisheries Research and Education Agency

Chuya Shinzato, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Motomitsu Takahashi, Japan Fisheries Research and Education Agency

Abstract

Fish scales collected for aging may contain fish DNA of decades ago, which may provide an exciting opportunity to understand how key genetic features of fish populations have changed over time. In this study, we extracted DNA from scales of Japanese sardine fished near Nagasaki prefecture that have been archived since early 1950s, and genotyped using GRAS-Di[®] method to test its utility for population genetics. Extracted DNA concentrations were variable among years and individual samples ranging 0 to 25 ng/μl, and were extremely low in samples collected after 1980s likely due to careful cleanings before storage. In average, 15% of the reads obtained by next-generation-sequencing were properly mapped against the draft genome of Japanese sardine. Principal component analyses for 320 filtered SNPs indicated the immigration of different population in 1968, although its robustness needs to be rigorously tested. Our results show that the archived scale sample set can play an important role to understand population dynamics of Japanese sardine.

1. はじめに

マイワシ *Sardinops melanostictus* は日本近海に生息するプラクトン食性の小型浮魚であり、国内における主要な漁獲対象種の一つである。このマイワシの資源量は、海洋環境変動の影響を受けながら、数十年規模で 100 倍以上にも及ぶ幅で変動することが知られている。その変動を予測可能にすべく、様々な技術を用いて変動要因の究明が行われてきたが、遺伝子の観点からこのマイワシ資源量変動を眺めた研究はわずかである。例えば、遺伝的多様性は、集団の環境変化に対する耐性に影響する主要な要因である。また、数十年という時間スケールであっても、成長速度、成熟年齢等の生態パラメータが遺伝的に変化している可能性もある。これらのような集団の遺伝的な特性および集団構造が、資源量変動に伴ってどのように変化したのかを解析することで、マイワシ資源量変動機構に関して新たな断面を切り取ることが期待できる。

2. 問題設定・方法

水産研究・教育機構水産資源研究所長崎庁舎には、年齢査定を目的として、1950 年代より毎年、数百から千個体程度、日本近海で採集されたマイワシの鱗標本が、生物測定データとともに保存されている。この標本から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた解析を実施することができれば、過去 60 年以上にわたる集団遺伝学的特性の変化を把握することも可能になる。一方で、長期にわたって乾燥保存されている鱗から抽出される DNA は濃度が低く、断片化されていることが想定され、その状態によって実行可能な解析の種類や、その解析の信頼性は異なる。そこで本研究ではこの魚鱗標本から DNA 抽出を試み、次世代シーケンサーを用いた集団遺伝学的解析が可能か、実践・検証することを目的とした。

1953, 1954, 1967, 1968, 1985, 2005 年の冬から春に長崎県沿岸、1989 年夏に道東海域で漁獲されたマイワシ成魚各年 3~25 個体 (合計 122 個体) の鱗から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った。近年に採集されたマイワシの DNA 混入を可能な限り避けるため、ピペット作業はクリーンベンチ内、あるいは 2019 年以降に採集されたマイワシの DNA 抽出が行われたことのない実験デスク上

で行った。抽出液の DNA 濃度、純度は Nanodrop によって測定した。抽出液にマイワシ由来の DNA が含まれているか簡易的に判断するため、代表的な数個体に対して魚類のユニバーサルプライマー Mi-fish (Miya et al., 2015) を用いて PCR を行い、増幅バンドが見られるかを確認した。

1985, 2005 年を除き、各年 DNA 濃度が比較的高かった 8~20 サンプル (合計 68 サンプル) について、GRAS-Di[®]法によるジェノタイピングを行った。GRAS-Di[®]法は、ライブラリ調整の中で高濃度のランダムプライマーを用いた PCR を行うことでゲノム全体を比較的均質に縮約して配列を決定する手法であり、ある程度分解が進んだサンプルにも適用できるとされる (Hosoya et al., 2019)。ライブラリ調整、シーケンシングはユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。

得られたリードからアダプター配列・リードクオリティが低い配列をトリミングし、残存リードを bwa mem を用いてマイワシのドラフトゲノム (未発表) を参照配列としてマッピングした。加えて現代サンプルとして、2020 年夏に長崎県五島列島周辺、2019 年秋に千島列島沖親潮域で漁獲されたマイワシ各 10 尾ずつの尾びれから抽出された DNA から得られたシーケンシング結果も同様に処理し、併せて freebayes を用いて同時にジェノタイピングした。その後、年代・採集海域間で一塩基多型の頻度や遺伝的多様性等を比較した。

3. 結果と考察

【抽出 DNA 濃度・PCR 増幅】

抽出液の DNA 濃度は 0~25 ng/μl であり、最も古い 1953 年の標本からも 10 ng/μl 超える濃度が観測された一方で、1985, 2005 年の標本は全て 5 ng/μl 以下であった (Fig. 1a)。Mi-Fish プライマーを用いた PCR では、1953, 1967 年のサンプルでは目的である 220bp 付近にアンプリコンが確認できた (Fig. 1b)。しかし、1985, 2005 年のサンプルでは 300 bp 以上のアンプリコンが中心であり (Fig. 1b)、魚類由来の DNA がほとんど含まれていないと考えられた。1985, 2005 年漁獲個体の魚鱗は色が透明に近く、マイワシの DNA が含まれる表皮細胞や付着体液が除去されてしまっていたものと考えられる。また、本研究では使用しなかったの水産資源研究所長

崎岸舎における残りの鱗標本の状態を目視で確認したところ、1980年代以降は1985年の標本とおおむね似たような透明さであった。従って、過去50年間で最もマイワシ資源量が高かった1980年代の魚鱗標本の大部分はDNA解析には不向きであり、資源量変動に伴う遺伝的特性の変化を評価するためには別のDNAソースから補う必要がある。一方、他機関において処理されたのち送付されたものと考えられる、1989年道東沖採集標本の鱗には付着物が例外的に多く残っており、比較的高い濃度のDNAを抽出することができた (Fig. 1a)。

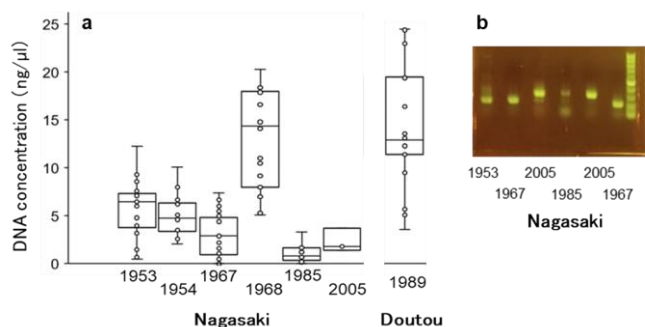


Fig. 1 (a) DNA concentrations extracted from archived scales of Japanese sardine. (b) Gel electrophoresis after PCR amplification of historical DNA using Mi-fish primer.

【マッピング率・ジェノタイピング率】

トリミング後、個体あたり300~900万、平均600万のリードが残り、そのうちマイワシのドラフトゲノムにマッピングクオリティ10以上でマッピングされるものは各個体5~49%、平均15%であった (Fig. 2a)。2019、2020年に採集されたマイワシから得られたリードのマッピング率は平均81%であったことから (Fig. 2a)、古い魚鱗標本から抽出されるDNAは多くの外来DNAを含みつつ、マイワシ由来のDNAも一部含んでいると考えられる。

古い魚鱗と現代の合計88サンプルについて検出された一塩基多型、挿入・欠損サイト候補のうち、カバレッジ5以上、ジェノタイプクオリティ30以上、マイナーアレルカウント3以上、10%以上のサンプルでジェノタイプされたサイトが126769カ所あった。このうち、1968年以前に採集された各サンプルでは0.06~14%、1989年採集各サンプルでは3~44%、2019-2020年採集各サンプルでは57~80%がジェノタイプされていた。従って古いDNAでは、分解の影響でランダムプライマーによるPCRで増幅しなかった領域が多数存在するが、一部現代サンプルと比較可能なサイトが存在することが示唆された。また、採集年代間や個別のサンプル間でDNAの程度は大きく異なっていた。特に1954年採集サンプルは全てジェノタイピング率が0.2%以下と著しく低く、今後費用対効果を高めるためには、ライブラリ調整前のスクリーニングの強化が必要と考えられた。

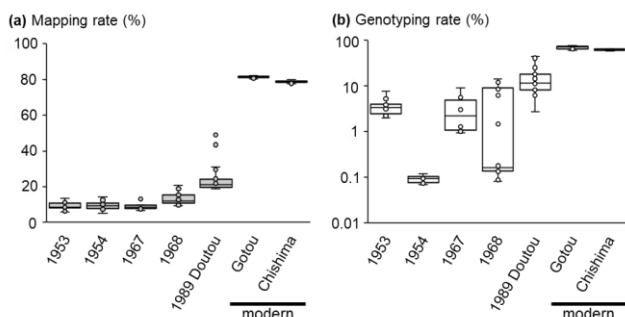


Fig. 2 Mapping rates (a) and genotyping rates (b) of reads from old and modern DNA samples.

【一塩基多型解析】

ジェノタイピング率が1%以下の22個体は、以降の解析では除外した。1968年以前に採集されたサンプルと現代サンプルのそれぞれの50%以上でジェノタイプされ、マイナーアレル頻度が5%を超える一塩基多型サイトは1361カ所あった。このうち、1967年以前採集のサンプルの50%以上においてカバレッジ10以上でジェノタイプされ、各集団内でハーディー・ワインベルグ平衡から著しく逸脱せず、連鎖不平衡でない320サイトをvcftoolsとplink 1.9によって抽出し、主成分分析を行ったところ、1953年と1967年採集サンプルは、第一主成分が以降の年代のサンプルと顕著に異なっていた (Fig. 3a)。また集団の遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度も、1953年、1967年サンプルは以降の集団に比べて高い数値を示した (Fig. 3b)。これらについては、1968年を境に遺伝的特性が異なる集団が長崎周辺海域へ移入し、以後優占するようになった、という解釈も可能である。しかし、1967年以前と以降のサンプルではDNA濃度やマッピング率、ジェノタイピング率も異なっており (Fig. 1a, Fig. 2a, b)、特性の変化がDNAの質やコンタミネーション、解析上のエラーに由来するものではないか、今後厳格に検証する必要がある。

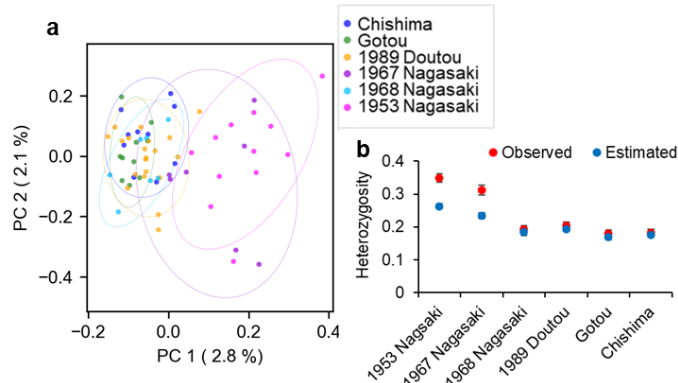


Fig. 3 (a) Result of principal component analysis for 320 filtered SNPs. (b) Observed and estimated heterozygosity for each population. Error bars are the standard errors of bootstrap resampling.

4. まとめと今後の展望

本研究では、最も古いもので1953年に漁獲、保存されていたマイワシ魚鱗から抽出したDNAが、GRAS-Di®によるシーケンスによって、集団遺伝学的解析に用いることができる可能性を示した。今後、ライブラリ調整前およびシーケンス後のパイオインフォマティクス解析におけるスクリーニング方法を確立した上で、他の年代や他魚種のサンプルに適用することができれば、近年の気候変動や戦後から続く強い漁獲圧が水産重要種にどのような影響を与えてきたかを解明できる可能性がある。

参考文献

- S. Hosoya, S. Hirase, K. Kikuchi, K. Nanjo, Y. Nakamura, H. Kohno, M. Sano, Random PCR - based genotyping by sequencing technology GRAS - Di (genotyping by random amplicon sequencing, direct) reveals genetic structure of mangrove fishes. *Molecular Ecology Resources*. **19**, 1153-1163 (2019).
- M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*. **2**, 150088 (2015).

個体および環境情報から包括的に解明するチャネルキャットフィッシュの生態

The comprehensive study of the ecology of channel catfish from individual and environmental information

伊藤 元裕, 東洋大・生命科学部, E-mail: ito@toyo.jp
山崎 彩, 北大・水産科学院, E-mail: yamazaki.usujiri@gmail.com
白井厚太郎, 東大・大気海洋研, E-mail: kshirai@aori.u-tokyo.ac.jp

Motohiro Ito, Faculty of Life Sciences, Toyo University
Aya Yamazaki, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University
Kotaro Shirai, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

In recent years, the channel catfish *Ictalurus punctatus* has been rapidly expanding its distribution in rivers throughout Japan, and is designated as a specified alien species. In this study, we 1) clarified its distribution over a wide area using eDNA, and 2) analyzed its diet and migration throughout its life stages using the stable isotope ratio in the eye lens. As a result, eDNA of the species were found many places all around Kanto area, not only in the waters where the distribution of the species has been already confirmed, but also in small rivers in the Boso Peninsula and the Izu Peninsula where the distribution of the species has been firstly confirmed. The size of the lens was strongly correlated with body length. Therefore, the eye lens was determined to be a suitable tissue for analyzing dietary changes with individual growth. The method of pyrothermal treatment with repeated freezing and thawing in running water for one week, was the best method for sample treatment. The results of the stable isotope ratio analysis of the eye lens were similar to the results of the stomach content analysis, confirming the effectiveness of the method.

1. はじめに

近年、日本全国の河川において、急速にその分布を広げているチャネルキャットフィッシュ *Ictalurus punctatus* は、特定外来生物に指定され、その分布の拡大や生態系、漁業への被害を軽減することが強く求められている (片野 2012)。

日本の中でもその増加と漁業被害が特に深刻な利根川において、これまで我々が行った研究の結果から、中型から大型の個体では、特にサイズの大きな魚類への依存度が高まるとともにズズキ *Lateolabrax japonicus* など汽水から海水域に生息する魚類も多く捕食するようになることが明らかとなった。成長に伴い中流から河口域 (50 km以上の距離) に至る広い範囲を移動している可能性が示唆された (伊藤翔太郎 2020, 東洋大学修士論文)。

利根川のような大河の河口域は淡水域と海域の生態系をつなぐ重要な役割を持つとともに、様々な有用漁業対象魚における重要な生息場所であるとされている。これまで、外来魚に関する問題は淡水域に限ったものが主であったが、これまでの想定を超え、本種がその高い行動能力と環境順応力を用いて、広く淡水域だけでなく、河口域を介して周辺海域生態系にまで影響を及ぼし得る種であることを示唆している。しかしながら、本種は移動性が高いために、孵化場所や、成長に伴った生息域や食性の変化を個体ごとに追うことが出来ない。さらに、本種は繁殖力が高く、広く分布を拡大させていることが予測されているものの、基礎研究が乏しく、全国的な分布状況は未だ十分に把握されていない。利根川のような分布域以外の小河川においてもその分布を広く把握することが本種の分布拡大防止のためにも欠かせない。

そこで本研究は、従来の漁獲個体の解剖から得られるその食性、成熟情報に加え、1) 最新の元素分析を用いた長期間の食性分析や生涯を通じた水域間移動情報の解析、2) 環境DNA (eDNA) を用いた広域での分布域特定という、個体内および環境情報を最新の分析手法を融合させ、日本の中でもその増加と漁業被害が特に深刻な関東地方におけるチャネルキャットフィッシュの生態情報を複数の時空間的・質的なスケールで解明する。得られたデータは、自治体に提供を行い、本

研究結果を受けた対策案の策定と自行うことで、被害対策と分布拡大対策において社会実装までを目指すものである。

2. 問題設定・方法

eDNA 分析のための採水は利根川本流の群馬県渋川市から茨城県神栖市までの13地点において、2020年11月から12月にかけて行った。除染したバケツで採水を行い、現地でシリレンジを用いて環境水 300 mL をろ過フィルターに加圧ろ過して実験室に持ち帰った。その後、研究室内で抽出液を加えて遠心することでDNAを抽出し、キット (QIAGEN 社 DNeasy Blood & Tissue kit) を用いたカラム吸着によりDNAを精製後、終濃度 900 nM の each primer により定量 PCR 解析を行い、チャネルキャットフィッシュのDNAの検出を試みた。更に、過去に行われた東京大学および北海道大学による、ニホンウナギ *Anguilla japonica* の分布調査のために収集されていた関東地域における広域の eDNA サンプルの供与を受け、これについても同様の方法でサンプル中のチャネルキャットフィッシュのDNAの検出を試みた。

更に、胃内容物および、筋肉、水晶体による食性、水域間移動情報のため、2016年から2021年にかけて千葉県香取郡神崎町周辺の利根川において刺網、張網、籠網によって捕獲されたチャネルキャットフィッシュをサンプルとして用いた。各個体の外部測定と胃、筋肉、水晶体の摘出を行った。

胃内容物は、可能な限り種同定と計測を行った。筋肉は乾燥および脱脂処理の上、安定同位体分析を行った。

水晶体は摘出後、シリカゲル上で完全乾燥させて乾燥した水晶体は重量と直径を計測した。また、標準体長さ約 40 cm (約 7 歳) の個体の水晶体については、1) 凍結乾燥処理、2) シリカゲル上で冷蔵乾燥処理、3) 乾熱処理、4) 凍結乾燥後シリカゲル上で冷蔵乾燥処理、また冷凍と流水解凍を1週間繰り返した後に、5) 凍結乾燥処理、6) シリカゲル処理、7) 乾熱処理を行う計 7 つの方法で完全に乾燥させた。この水晶体はプラスチックトレイ上で、金属棒やピンセットを使って層状剥離を行った上、それぞれの層の計量と作業に要した時間、剥離の容易さと剥離面の状況を記録し、操作毎に、獲得サン

プル量、乾燥処理の容易さ、層剥の容易さ、層剥面状態の観点で五段階評価した。これらのサンプルは、個体毎、層毎に安定同位体比分析を行った。

3. 結果と考察

関東一円の水域においてチャネルキャットフィッシュのeDNAの検出を試みたところ、これまで分布の報告が無かった、栃木県北部を流れる余笹川や、千葉県房総半島の一宮川等の複数河川、伊豆半島においても環境水から本種のeDNAが検出された (fig. 1)。本種のeDNAが検出されたのは全82地点の内31点に上り、これまで本種の目撃、捕獲実績がない河川も13地点含まれていた。この結果は、本種が関東全域の広い範囲において分布していることを示唆した。また本種のeDNAの検出は、上流域において少なく、中下流域で多い傾向があった (fig. 1)。利根川本流においても、本種のDNAは、中流、下流域において検出された。

一方で、最下流である河口堰よりも下流側と、高崎以北の上流域では検出されなかった。今回、河口堰より下流での採水を実施したのは、満潮時であり環境中の塩分濃度は26‰程度であった。高い塩分濃度が本種の分布を阻害していた可能性がある。また、上流域で検出されなかった要因として、主に水深が関係していることが考えられた。利根川本流において、特に冬季に水深6m以深に本種が生息すると報告されており、浅場が多い上流域は越冬に不適であるため、冬季にのみ採水を行った本研究では検出に至らなかったと考えられた。

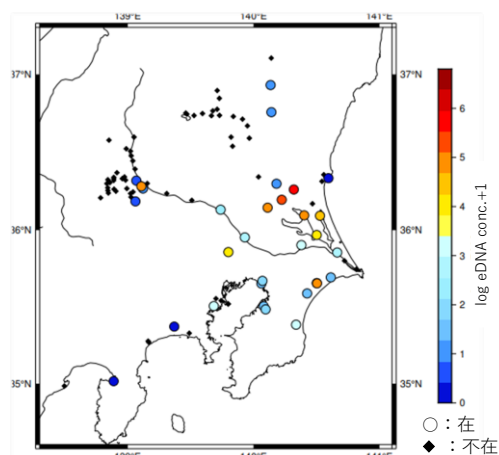


Fig.1 The channel catfish eDNA concentration at Kanto area.

胃内容物分析の結果、本種の0歳魚からはミジンコ *Daphnia pulex*、エビ類の破片、魚類の鱗や肉片、1歳魚からはスジエビ *Palaemon paucidens*、魚類の鱗や骨片、カゲロウ類の幼虫、植物片が出現した。一方3歳以上の個体からはミジンコや昆虫類は見られず、甲殻類や魚類の出現が増加した。特に40cmを越える個体は主にさらに魚食性が強まり大型の魚やボラ *Mugil cephalus*、スズキなどを利用しており、既存の研究と同様の傾向を示した。筋肉の安定同位体比においても胃内容物と同様に、本種は大型化するほど窒素および炭素安定同位体比の値が高まることが明らかとなり、大きい個体ほど栄養段階が高く、海水や汽水生態系に関係の深い生物を餌として利用している可能性が高いことが示された (fig. 2)。

元素分析を用いた本種の食性と生活史解析については、眼球の水晶体の安定同位体比分析を用いて行った。これまで、水晶体の安定同位体比分析はほとんど行われた前例がなかつ

た。本研究では、第一に手法の開発として、水晶体の乾燥と層剥離の手法検討を行った。さらに、剥離された水晶体の安定同位体比分析を行って個体ごとの生涯を通じた食性解析を行った。本種の水晶体のサイズは標準体長と強い相関があり、加齢とともに水晶体が大きくなることが確認された。

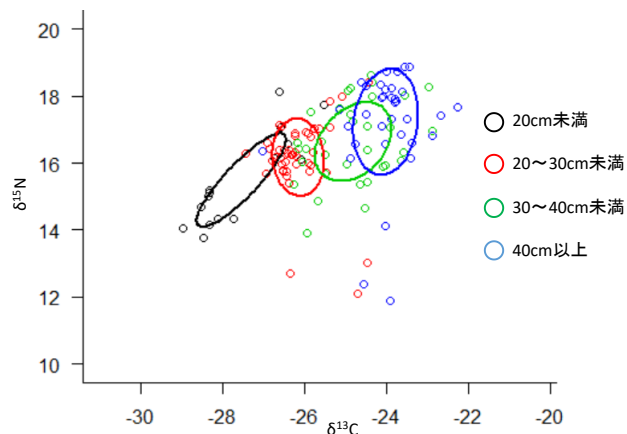


Fig.2 Carbon and Nitrogen stable isotope ratio in the muscle of channel catfish.

本種の水晶体は個体の成長に伴う食性変化を分析するのに適した組織であると判断された。水晶体は平均で7層に分離できた。本実験に用いた個体の年齢は約6-8歳であり、1層剥離層当たり約1年間の食性を反映するサンプルとなると考えられた。複数の乾燥処理の検討の結果、冷凍と流水解凍を1週間繰り返した後に、乾熱処理した手法の評価点が最も高く、平均剥離所要時間も1サンプル当たり16分と最短であった。

各層毎に分析をした結果、幼魚の時期は、栄養段階が低い餌を捕食しているが、成長に伴って、本種が、栄養段階が高く海や汽水域に関連する食物網に属する生物を餌として利用していることが示唆され、従来の食性解析の結果と概ね一致する結果が得られた。しかし、個体ごとに見ると、炭素同位体の値は同じ時期でも大きくばらつくことが分かり、食性の変化の傾向は種として同様の傾向があるものの、個体ごとに孵化して成長する水域に違いがある可能性が示唆された。

4. まとめと今後の展望

本研究は、チャネルキャットフィッシュがこれまでの想定以上に広く関東全域に広がっているとともに、利根川のような大河では成長に伴って、様々な環境を利用し、淡水域と海域の生態系をつなぐ重要な役割を持つことを示唆した。また、eDNAおよび水晶体の安定同位体比分析が本種の分布、餌、利用海域の成長に伴う変化を明らかにする上で有用な手法であることを示した。今後、さらにサンプル数を増やし、分布調査の時空間精度を上げることで、その分布の時間的な変化や個体毎の由来産卵場所の違いや、餌や水域利用履歴を詳細に明らかにできるものと期待される。これらは本種の生活史特性の詳細な解明につながり、都道府県と共有して、本種の分布拡大防止や被害対策の施策に貢献できると考えられる。

参考文献

- (1) 片野 修 (2012) アメリカナズ分布、生態、被害の現状、外来魚抑制管理技術開発事業報告書、水産庁 pp 128-131
- (2) 伊藤 翔太郎 (2020) 東洋大学大学院 修士論文