

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学研究系自然環境学専攻
地球海洋環境学分野

2008 年度 修士論文

異なる培養温度条件下での白潮形成円石藻の増殖特性と
円石の元素分析

Growth characteristics of white tide forming coccolithophorids and
elementary analysis of the coccolith under different temperatures

2009 年 1 月 30 日提出

2009 年度 3 月修了

指導教員 川幡穂高 教授

076750 渡邊陽子

I. はじめに

現在、環境問題の1つとして地球温暖化が大きく注目されている。これは産業革命以降の人間活動の結果として、二酸化炭素排出量が増加したためだと言われており、これによって大気だけでなく陸や海洋を含めた様々な方面から地球環境に対する影響が懸念されている。産業革命以降に排出された二酸化炭素は大気中を移動しながら一部は海洋に溶解し海洋と大気とで平衡状態を保ちつつ増加している。溶解した二酸化炭素は炭酸イオンや重炭酸イオンに形を変えながら海水中で循環し、海洋における炭素循環を担っている。海洋における炭素循環は大気からの二酸化炭素の溶解以外にも様々な経路が考えられており、一部は再放出され、また一部は海底に堆積し固定されるため、この炭素循環は地球環境の形成に重要な役割を担っていると考えられている（田中裕一郎 1994）。この海洋の炭素循環に大きく関与する生物としてサンゴや珪藻、有孔虫、円石藻などが挙げられ、近年盛んに研究が進められている。

円石藻はハプト植物門に所属する単細胞性の植物プランクトンで、海洋環境に広く生息し、円石と呼ばれる炭酸カルシウムで出来た細胞外被構造により細胞が覆われる特徴をもつ。現世の種類として、約100種ほどの円石藻が知られており、そのうち、*Emiliania huxleyi* と *Gephyrocapsa oceanica* の2種は、海洋において大規模なブルームを形成する。円石自体の高い反射特性により、ブルーム時には衛星写真で白い水塊として確認できることから、円石藻によるブルームを白潮 (white tide) と呼ぶこともある。

円石藻は、円石の生成過程でCO₂が発生する一方で、円石自体は海底堆積物として蓄積することから海洋環境の炭素循環に深く関わる生物と言える。また円石藻は硫黄化合物であるジメチルスルフォニオプロピオネート(DMSP)を生成することが知られている。DMSPは海水中に放出されると揮発性のジメチルスルフィド(DMS)に変化し、大気中でSO_xなどの硫黄化合物に変化する。雲の凝集核となって、酸性雨を引き起こすとともに、太陽光反射の原因物質になる可能性が指摘されている。地球の大気環境を含むイオウ循環に無視できない規模で寄与すると考えられている（Stoll et al. 2007）。

このように円石藻は地球環境に大きな影響を与え得る植物プランクトンと言える。また *Emiliania huxleyi* や *Gephyrocapsa oceanica* は、低緯度から高緯度、また沿岸から外洋環境といった様々な海洋環境に生息するにも関わらず、増殖特性に関する過去の研究は、*Emiliania huxleyi* において、ごく僅かの培養株について調査されたにすぎない。近年の地球温暖化や海洋環境の変動に伴い、円石藻はどのような影響を受け、ブルームの頻度や規模、分布パターンはどのように変化するのだろうか？こうした課題を明らかにする上でも、円石藻の培養特性に関する基礎的知見を集積することが必要と言える。

そこで本研究では、海洋環境に広く生息し、ブルームを形成する *Emiliania huxleyi* と *Gephyrocapsa oceanica* の2種について、日本及び世界各地から採取された29株の培養株を用いて、海水温度の変化に伴う増殖特性と円石の元素特性を明らかにすること、そして異なる栄養塩濃度条件下で、円石藻及び自然界で円石藻と競合する珪藻の増殖特性を調査・比較することを目的として研究を実施した。

II. 方法

本研究では、円石藻ブルーム（白潮）を形成する種として知られる *Emiliania huxleyi* 及び *Gephyrocapsa oceanica* の 2 種を対象として、白潮形成時の試料及び日本沿岸各地を含む様々な環境から収集された培養株を実験に供した。実験に使用した全ての培養株は国立環境研究所の微生物系統保存施設で確立、保存されているものである。全ての培養実験は、国立環境研究所の微生物系統保存施設で実施した。また培養試料の一部について、円石の元素分析を産業技術総合研究所の中央・第 7 号館で行った。

(1) mIMR 培地の作成法

- ・培養株の継代培養及び培養実験には、mIMR 培地 (Eppley et al. 1967) を用いた。以下の手順で培地を作成した。
- ・小笠原沖で採取され、冷暗所に 3 ヶ月以上保管した海水を培地のベース海水として用いた。培地作成前に GF/F で濾過を行った。
- ・mIMR 培地専用のトレースメタルは、以下の組成・濃度で作成し、冷暗所に保存した。
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.7×10^{-6} mol/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.83×10^{-6} mol/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.65×10^{-5} mol/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.37×10^{-5} mol/l、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61×10^{-8} mol/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.6×10^{-8} mol/l、 Na_2SeO_3 1.0×10^{-5} mol/l、 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 3.7×10^{-6} mol/l
- ・濾過海水に KNO_3 を 1.25×10^{-4} mol /l、 K_2HPO_4 を 1.25×10^{-5} mol /l、 Na_2SiO_3 を 5.0×10^{-5} mol /l、mIMR トレースメタル（上記）を 1ml/l、チアミンを 200 μg /l、ビタミン B12 を 200 μg /l、ビオチンを 1 μg /l 加え、よく混合した。
- ・作成した mIMR 培地を 10ml 試験管もしくは三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌を行い (120°C、20 分間)、滅菌後に室温にて放冷した。放冷後は、実験に使用するまで冷暗所で保管した。

(2) 培養試験

- ・微生物系統保存施設で保存されている円石藻培養株から、予備的な増殖試験、光学顕微鏡による形態観察、産地等の履歴について、確認作業を行い培養試験に用いる培養株の選抜を行った。選抜した培養株は、以下の条件で継代培養を行い、適宜、培養特性試験や形態観察等の実験に用いた。

温度：18°C、照度：15 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、明暗周期：12 時間明期、12 時間暗期

- ・異なる温度条件下での温度特性試験は、試験管内あるいは三角フラスコ内で、指数関数的に増殖している培養株を、一定量、48 穴（最終液量 1ml）ないし 96 穴（最終液量 250 μl ）のマイクロプレートに植え付け、5、10、15、20、25、30°C に各々設定した温度勾配培養庫 (EYELA 社、MTI-202) で、同一の光条件下 (22 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、12 時間明期 12 時間暗期) で培養を行った。
- ・栄養塩制限下における培養特性試験は、前述と同光条件 (22 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、12 時間明期 12

時間暗期) で三角フラスコ内で培養を行った後、測定の度に 96 穴マイクロプレート (最終液量 250 μ l) に移した。

(3) クロロフィルの測定と増殖速度

- ・ クロロフィルは蛍光光度計 “Cytofloure” (Perseptive Biosystems 社、 multiple-well plate reader series 4000) を使用して測定した。
- ・ 装置に培養株を植え付けたマイクロプレートをセット。
- ・ 入射光 450nm、検出光 685nm、Gain 75、reads/well 50 でマイクロプレート中の円石藻のクロロフィルを測定した。測定は最低 2 回ずつ行った。
- ・ 測定は 1~4 日に 1 回の頻度で行い、約 1 ヶ月間継続した。
- ・ 測定したクロロフィル値の変化量をグラフ化し、成長曲線とした。
- ・ 成長曲線において、指数関数的に増殖している箇所を近似的に直線の傾きから増殖速度を算出した。

(4) 走査型電子顕微鏡用試料の作成

- ・ 試験管またはマイクロプレート内で培養している円石藻をピペットで採取
- ・ 試料を孔径 1.0 μ m ポリカーボネート製メンブレンフィルター (Milipore 社) で濾過して、脱塩のため、蒸留水を数 ml 滴下
- ・ フィルターはデシケーター内で保管
- ・ 走査型電子顕微鏡で観察する際に、フィルターの一部を切り出して、走査型電子顕微鏡用の試料台にカーボン両面テープで接着
- ・ オスミウムコーター (真空デバイス社、HPC-1S 形ホローカソードプラズマ CVD オスミウムコーター) で、約 20 秒コーティング
- ・ 走査型電子顕微鏡 (日立製作所, series 4800) により観察 (ワーキングディスタンス : 5mm、加速電圧 1kV)

(5) 細胞カウント

- ・ 細胞のカウントには血球計算盤 (バクテリア・カウンター) を使用した。
- ・ 培養しクロロフィルが 20 以上になったものをピペットで採取し血球計算盤にのせた。
- ・ クロロフィルがあまりに高いものについては GF/F 濾過海水または mIMR 培地にてクロロフィル値が 10-100 の間になるように希釈した。
- ・ 倒立顕微鏡にて細胞数をカウントした。
- ・ 細胞数の多いものに関しては中央のブロックを使用しカウントを行い、細胞数が少なくばらつきの多い

ものに関しては四隅の4ブロックないし全9ブロックで計数した。

- ・ 計数した細胞数を使用したブロックの大きさにより変えながら計算、計数室 $0.18 \mu\text{l}$ 中の細胞数を算出した(図-1)。
- ・ 算出した値をもとに元の培地中の細胞数を推定した。(希釈した場合は希釈率をもとに培地中の細胞数を推定した。)

(6) 円石の元素分析

- ・ 温度特性実験に使用した試料を遠心管に移し、遠心により集菌 (35000 回転、5 分間)
- ・ 上澄みを取り除き、純水を入れて懸濁し、再度遠心 (35000 回転、5 分間)
- ・ この洗浄作業を 3~5 回繰り返した
- ・ 最後に上澄みを注意深く取り除き、ペレット試料をデシケーター内で乾燥
- ・ 乾燥ペレット試料に HCl を適量、添加し溶解試料を作成
- ・ 溶解試料に 2% HNO_3 を加え、全量を 10ml にした
- ・ ブランクは 2% HNO_3 のみ、標準試料は標準海水に 2% HNO_3 を加えて全量 10ml にした試料を用いた
- ・ 作成したブランク、標準試料、円石試料を ICP-AES) および ICP-MS を用いて、Mg/Ca、Sr/Ca、酸素同位体比、炭素同位体比、U/Ca、Ba/Ca を測定した。

III. 結果と考察

(1) 円石藻 2 種の温度特性

実験を始めるにあたり、まず培養実験に適した株の選定を行った。約 200 株の円石藻培養株の中から、継代培養状態の観察を行うことで、安定した増殖及び円石生産を行う株の選別を行った。福岡県博多湾の円石藻ブルーム時に採取・確立された培養株、黒潮海流や対馬海流から採取された培養株、日本沿岸各地から採取された培養株、冷水環境のベーリング海から採取された培養株、タイの熱帯海域で採取された培養株などの合計 29 株を選定した(表-1, 図-2)。

選定した株について培養試験を行い、その増殖速度の算出を行い、図-3、図-4 に示す結果を得ることができた。図中の増殖速度はいずれも一日あたりのクロロフィル量の変化で示した。予備的な培養試験から、指数関数的に増殖している時期には、クロロフィル量と細胞数の間に高い相関が認められたことから、本研究ではクロロフィル量の変化を増殖速度の変化として用いている。また多くの培養株では 1 日 1 回、あるいはそれ以下の細胞分裂速度を示したが、一部の培養株で指数関数増殖期に最大で 1 日 2 回の分裂速度を確認することができた。

Emiliana huxleyi 6 株及び *Gephyrocapsa oceanica* 23 株の温度に対する増殖速度の比較から、増殖至適温度と増殖可能な温度範囲といった温度特性は、株によって大きく異なっていた。三宅島と八丈島の円石藻培養株は、15-20°C 近辺に増殖のピークをもち、現場環境の平均水温である 18°C とほぼ一致していた。同様の関係は、東シナ海由来の株でも認められた。一方、島根、岡山、長崎の培養株、そして多くの博多湾由来の培養株において、増殖至適温度のピークは 20-25°C の間に認められた。調査した株のうち博多湾由来の株は約 1/3 に達する。春先のブルーム形成時に採取された株に加えて、夏から冬にかけてマイナーなプランクトン種として存在していた時期に採取・確立された培養株など、他の地域に比べると、季節的に多様な時期に採取された培養株を含んでいる。博多湾の株の中で、10-15°C に増殖のピークをもつ株が 1 株存在していたが、この株 (K319) は 2007 年 11 月に採取され、現場環境はより低い水温条件であった。更に北海道で採取された株は 10°C に増殖のピーク、青森で採取された株は 10-25°C または 10-15°C に増殖のピーク、そしてベーリング海で採取された株は 15°C にピークが認められた。増殖速度に株間の差はあるものの、他の日本沿岸及び黒潮海域から採取された株では、増殖が認められなかった 5-10°C という低温条件下で、これら北方海域で採取された培養株は生存ないし増殖することが明らかになった。中でもベーリング海の株は、幅広い温度範囲での増殖に加えて、5°C で顕著な増殖が認められるなど、他の培養株と比べて、ユニークな温度特性が認められた。熱帯海域であるタイとグレートバリアリーフで採取された培養株の場合、いずれも 30°C での増殖ピークが確認できた。別系列の実験では、これらの株はいずれも 35°C の条件下で、大幅な増殖の低下が認められ、30°C 前後が増殖の至適温度と考えられた。

以上から、*Emiliana huxleyi* と *Gephyrocapsa oceanica* では、培養株によって異なる温度特性をもつこと、そしてその温度特性と採取された海域の地理条件や季節との関連性が明らかになった。これらで *E. huxleyi* と *G. oceanica* は、コスモポリタンの種として、多様な環境に生息することが指摘されて

きたが (Jordan et al. 1997)、本研究で確認された株ごとの温度特性の違いは、様々な海域の環境に適応した地域集団の存在を示唆すると考えられる。一方で、円石の形態の違いや細胞サイズの違いに基づいて識別可能である *E. huxleyi* と *G. oceanica* の2種間では、特に温度特性の点で明瞭な違いは認められなかった。両種は遺伝的に極めて近縁な種であることが知られており (Fujiwara et al. 2001)、生息環境の類似性からも、類似した温度特性をもつことは、それほど奇異なことではないのかもしれない。

(2) 異なる温度条件下における細胞状態の観察

温度特性に関する培養試験に並行して、同培養試料における細胞の形状変化について、定期的に光学顕微鏡による観察を行った。培養開始直後には、全ての株において、円石を細胞表面に付けた円石細胞が観察された。その後、培養経過とともに、円石をもたない非円石細胞の存在が観察されるようになった (図-5)。非円石細胞としては、2本の鞭毛をもち紡錘形の形状の遊泳細胞、球形で円石をもたずに浮遊する細胞、そして凝集性・付着性をもつ細胞が観察された (図-6)。非円石細胞は培養開始時には存在せず、培養日数の経過とともに確認されるようになったことから、円石細胞から誘導された細胞ステージと考えられた。凝集性・付着性を示す細胞は、一部の培養株でのみ確認され、観察される頻度も極めて低かった。培養株ごとの各細胞ステージの割合に関する調査では、円石細胞、非円石細胞、そして遊泳細胞の3ステージのみを対象として、株ごとに記録した。また培養条件によっては、全ての細胞が死滅することがあり、その場合は死細胞として記録した。

培養を始めてから、指数対数増殖期を過ぎた20日後以降に、10、15、20、25、30℃で培養されている各々の培養株を倒立顕微鏡で観察することで、どのような細胞ステージが存在するのか確認した (図-6, 7)。20日後には円石細胞のみが確認された培養株でも30日後のより古い培養株では、非円石細胞や遊泳細胞が観察されるようになった。より古い培養株において、そしてより高い温度条件下で、非円石細胞及び遊泳細胞の割合が増加する傾向が認められた。特に遊泳細胞は、10℃では観察されずに、温度が高くなるにつれて、その出現の割合が顕著に増加した。非円石細胞が頻繁に出現した古い培養株の多くでは、細胞密度が高く、既に増殖の定常期から衰退期に入っていたことから、非円石細胞が出現する要因の1つには栄養塩制限が寄与している可能性も考えられた。

採取された海域別の比較でも、より高温条件で、そしてより古い培養株で非円石細胞や遊泳細胞が観察されるという基本的な傾向は一致していた。その一方で、青森、ベーリング海由来の培養株では25℃以上の条件下で死滅し、タイ、グレートバリアリーフ由来の培養株では15℃以下で死滅するなど、各々の海域の環境に適応した温度特性をもつことが、細胞状態の観察からも明らかになった。

温度の違いにより、円石細胞と非円石細胞の各々の占める割合が変化することから、両細胞ステージでは、増殖至適温度が異なる可能性が考えられた。自然界で刻々と変化する環境に適応する上で、こうした細胞ステージの移行に伴う生理・生態的な特性の変化は、生存に大きく関与している可能性も考えられた。

円石藻ブルームの特徴の1つに、短期間に高い細胞密度状態に達することが挙げられる。例えば福岡県水産海洋技術センターの2007年4月5日の赤潮発生状況速報

(<http://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/>) では、博多湾内の最高細胞数が 1,125 細胞/ml だったのが、翌日には約 19 倍の 21,190 細胞/ml に変化した。円石藻の分裂速度は、最適な条件でも最大で 1 日 2 回の分裂であることから、こうした急激な細胞数の増加には、海流や風の影響による細胞の集積や海底で休眠していた細胞が新たに参入・増加するというような別の現象が関与している可能性が考えられた。本研究から、円石細胞から非円石細胞への移行、あるいはその逆の移行には、温度や栄養塩濃度等の環境要因の変化が関与する可能性が示唆された。現時点では想像の域を脱しないが、円石藻ブルームの急速な拡大には、非円石細胞の関与の可能性もあるのではないかと考えている。非円石細胞の場合、細胞サイズが小さく、円石をもたないため、自然界サンプルにおいて検出、種の特定を行うのは不可能に近い。また円石をもたないため円石細胞のような太陽光反射もなく、衛星でも確認することはできない。もしこうした非円石細胞が大繁殖していたとしても、これまで行われてきた海洋観測では、正確に細胞密度を計測することは不可能と思われる。こうした状況下で、もし非円石細胞が一斉に円石細胞ステージへと移行したならば、短期間に高密度の円石藻ブルームが形成される可能性は十分に考えられる。今後、モニタリング調査や実験室での培養試験によって、こうした可能性を検証することは重要な課題と言える。

(3) 栄養塩制限下における培養特性

次に異なる温度条件に加えて、栄養塩を制限した条件下での増殖特性について調査した。温度特性について調査した培養株から、島根、博多湾、タイ、ベーリング海の計 4 株の円石藻培養株を選定し、これに珪藻 *Leptocylindrus* sp. (K392 株) を比較対象として加えて培養実験を行った。この珪藻株 K392 株は、2007 年 4 月に博多湾で *Gephylocapsa oceanica* がブルームを起こした後に優占していた中から分離・確立した培養株である。培地中の栄養塩のうち、 $\text{NO}_3\text{-N}$ と $\text{PO}_4\text{-P}$ の濃度を 100 倍に希釈して、各々 $1.25 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.125 \mu\text{mol/L}$ 濃度の培養液を作成した (表-2)。通常培地をコントロール条件として用いた。10、15、20、25、30°C の 4 段階の温度条件下で、そしてコントロール、窒素制限、リン制限下で、各々培養を行った。温度特性の培養試験と同様に定期的にクロロフィル量を計測し、培養結果を増殖速度として示した (図-8, 9)。

栄養塩を制限していないコントロール条件では、円石藻、珪藻のどちらの培養株も 10-30°C の間でそれぞれの株に適した温度帯でよく増殖した。これに対して、窒素やリンを欠乏させた培地ではその増殖速度は顕著に低下した (コントロールの 0.38-0.5 倍)。コントロール条件で最も増殖速度の高かったのはタイ由来の *Emiliana huxleyi* で、窒素制限下での増殖が認められなかったが、リン欠乏培地では、他の株と比較して最も高い値を示した。博多湾由来の株は通常培地よりも栄養塩欠乏培地の方が明らかに低く、その温度特性も異なっており、15°C のピークを境に増殖速度は落ちそれ以降全く増殖は見られなかった (図-8, 9)。

窒素欠乏とリン欠乏とで比較した場合、全体の傾向として窒素欠乏培地の方が増殖速度の低いことが明らかとなった。こうした傾向は、同様に栄養塩を制限した実験からも明らかとなり、円石藻全体を通

して、リン欠乏培地の方がより増殖速度が高く、窒素欠乏培地の増殖速度の約 1.5 倍になった。

一般に円石藻の中でも *Emiliana huxleyi* は低リン酸環境に対し適応能力があるといわれているが (Townsend et al. 1994)、少なくとも今回の実験に使用した栄養塩濃度においては *Emiliana huxleyi* と同様に *Gephylocapsa oceanica* についても低リン酸環境に対し適応能力があると思われる。

次に博多湾由来の円石藻と珪藻について増殖曲線の比較を行った(図-9)。この 2 種でその増殖曲線を比較した結果、*Gephylocapsa oceanica* はクロロフィルの上昇割合は低いものの全ての培地で継続的に増殖したのに対し、*Leptocylindrus* sp. は最初の立ち上がりが大きいがすぐに減衰し、以降再びクロロフィル値が上昇することはなかった。また、円石藻と比較して、通常培地と窒素およびリンを制限した培地との増殖曲線の傾きが明らかに異なり、特に窒素を制限した培地の傾きが小さく、またすぐに減衰していた。これは同じ博多湾内に生息しブルームを起こす *Gephylocapsa oceanica* とは明らかに異なる傾向であり、ブルーム発生時期の両種のタイムラグはこうした栄養生理的な違いに起因する可能性も考えられた。

海洋環境における珪藻及び円石藻ブルームの一般的な傾向として、珪藻がはじめにブルームを起こし、その後を追うように円石藻がブルームを起こすケースが知られている (Rickaby et al. 2007)。今回の実験で同じ博多湾内から採取された円石藻と珪藻とで比較したときに、珪藻の方が初期増殖速度は高かったが、栄養塩の制限条件に対して大きく影響を受けることが分かった。博多湾内においては、春先の穏やかな天候の続く条件下で、栄養塩の欠乏が起き、貧栄養塩環境下でも栄養塩を有効に利用出来る円石藻が先にブルームを起こした。その後、円石藻に特異的に感染するウイルスの発生や栄養条件の悪化等が引き金となって、円石藻ブルームが衰退、細胞が死滅することで、バクテリアの分解活性が上がり、湾内の閉鎖環境で栄養塩濃度が高くなった。その結果として、増殖速度の高い珪藻が優占したというような一連の可能性が考えられる。こうした生物相及び環境の変化についてモニタリング調査を行うことで、円石藻と珪藻の生態的ニッチェの違いや自然界における遷移プロセスの解明に手がかりを与えてくれるものと考えられる。今回の実験ではごく限られた株しか用いておらず、海洋全般的なことに關して、この実験結果から一般化することは出来ないが、今後より多くの円石藻株や珪藻株を用いて、栄養塩条件を更に細かく設定することで有用な知見を得ることができると考えている。

(4) 栄養塩制限下における細胞の形態観察

次に異なる栄養塩条件下で培養された円石藻および珪藻の細胞形態について光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察を行った。光学顕微鏡で観察された円石藻の形態変化として、(1) 通常培地で培養した細胞より、リン欠乏条件下で、個々の細胞が大きくなること、そして逆に窒素欠乏培地では細胞がより小さくなることが明らかになった。また異なる温度条件下における細胞状態の観察の項でも触れたように、(2) 培養温度が高くなると非円石細胞や遊泳細胞の割合が高くなり、増殖可能な温度範囲を外れることで増殖せずに死滅するのが観察された (図-5, 6, 表-3)。

光学顕微鏡で観察した結果、培地中の円石の残存量および生産量は窒素欠乏培地の方がリン欠乏培地

より少なかったように見受けられた (図 10-14)。これは増殖速度を窒素欠乏培地とリン欠乏培地とで比較した場合、窒素欠乏培地の方が低かったためか、あるいは本実験で確認されたように細胞のサイズ自体が窒素欠乏培地で培養した方がより小さく、それに伴って細胞の周囲に作られる円石の生産量が落ちたといった理由により説明できるのかもしれない。これら細胞を走査型電子顕微鏡で観察したが、光学顕微鏡で観察されたような差は見つからず、通常培地も栄養塩制限培地も細胞や円石の形態に特に違いは見られなかった (図-17, 18)。

前述の栄養塩制限下における培養特性の項において、実験に用いた珪藻 *Leptocylinthus* sp. についても光学顕微鏡で観察を行った (図-15, 16)。その結果、珪藻は円石藻と比べその形態変化が大きく、リン欠乏条件では形態変化に加えて、有性生殖時に認められる増大胞子様の細胞が観察された (図-14 矢印)。窒素欠乏培地においても、通常培地で培養した細胞よりサイズが小さく、また細胞外の珪藻殻 (ケイ酸) は薄く、透明化していた。これは設定した全ての温度条件下で確認された。

通常培地で培養した場合においても 10°C や 15°C で全くと言っていいほど増殖せず、30°C の高温で培養したものは対数増殖期後期でも増大胞子様の細胞が観察された。一般的に珪藻の細胞史として、増大胞子様の細胞が観察されるのは栄養塩の欠乏などによる過度のストレスがかかることによる応答であることが知られている。細胞周囲に存在するケイ酸の細胞外殻が薄くなり顕微鏡で観察したときにほぼ透明に見えるのも、細胞にとって同様に過度のストレスが生じたときである。従って、今回行った栄養塩制限下での培養実験においては、20°C や 25°C で通常培地を用いた培養環境以外では細胞にとってかなりストレスがかかった状態であり、それによって細胞サイズの縮小化、あるいはケイ酸の薄膜化が発生したり、または増大胞子様の細胞が大量に観察されたりした可能性が考えられた。

今回観察された細胞形態の変化は、前述の 栄養塩制限下における培養特性の項で考察した海洋環境における栄養塩変動が円石藻と珪藻との存在比率や生態学的ニッチに影響を与える可能性を支持するものである。今後より詳細に研究を進め、海洋での円石藻や珪藻の挙動を明らかにすることで、海洋における物質循環および生態系への影響を解明する手がかりになるのではないかと期待される。

(5) 異なる培養温度条件下での円石の元素分析

太古の地球環境を知るための指標として生物鉱化作用を持つ生物が注目されている。はじめに記したように円石藻は生物鉱化作用をもつ生物の 1 種であり、サンゴと同様、炭酸カルシウムを分析することで古海洋の環境復元ができると注目されている。しかしそれを証明した論文はこれまでほとんど存在していない。本項では(1) 円石藻 2 種の温度特性の項で用いた 29 株のうち 5 株を元素分析した結果を記した (図-19)。なお、ICP-MS および ICP-AES で分析するにあたり、事前に円石を溶解して分析を行ったが、この処理条件では有機物は溶解しないものとして本実験を行った。

円石の分析を行った結果、酸素同位体比、炭素同位体比、Sr/Ca、Mg/Ca、Ba/Ca、U/Ca といった分析結果のうち、酸素同位体比の分析において、全ての培養株で温度との高い直線的な相関関係が認められ、($R^2=0.97$) その近似直線の傾きがサンゴと比較して低く $-1.8\text{‰}/\text{°C}$ になった (サンゴは約 $-2.5\text{‰}/\text{°C}$) (鈴

木淳 2007)。また炭素同位対比に関しては、株による炭素同位対比との相関関係がある可能性が示唆され。一方、Sr/Ca や Mg/Ca は全く相関関係がなかった。特に本実験では Mg/Ca が異常に高い値を示したため、これを説明する原因として、円石の洗浄が不十分だったために有機物が残存していた可能性があり、溶解しなかった有機物が直接 Mg/Ca の値に影響したものとみられる。

研究室内で培養したいくつもの株の円石藻を使用して分析した研究結果はこれまでほとんどなかったが、今回酸素同位体比で得られた値が株による傾きの差を示唆する可能性があることから、実際のセジメントトラップ中や堆積物中の円石を分析する際にその分析から得られた炭素同位対比から環境復元するのは難しく、また、少なくとも酸素同位体比に関しては、本実験から円石藻自身の種の違いや温度特性の違いに関係なく、温度に関して古海洋の環境推定（古海洋環境復元）に有効である可能性が示唆された。しかし分析に用いたサンプル量が不足していたため、分析に用いた種類数が少なかったことも確かである。古海洋環境復元に際して、本研究の結果が、より普遍的に、円石藻一般に適用可能かどうかについて議論をするにはまだ不十分である。更に一般にサンゴにおいて環境指標に使われている Sr/Ca の分析結果でも円石藻に適用できるかどうか、本実験からは明らかにすることは出来なかった。今後、分析試料の処理内容について検討を重ねるとともに、分析精度の向上を図り、培地成分と残存円石との比較分析等について検討した上で、改めて分析を行う必要がある。これにより、現世の円石藻や様々な海域の海洋堆積物中の円石から過去の地球環境を推定するための重要な基礎的知見を得ることが期待される。

IV. 結論

円石藻は海洋では珪藻と並んで、様々な海域でブルームを起こし、そのブルームが海洋環境や生態系多大な影響を及ぼすことが考えられている藻類であり、また現在起きている地球温暖化や海洋の酸性化への関与が指摘されているにも関わらず、実験室内における培養株の確立、維持の難しさからごく限られた種を対象とした、限られた培養株を用いた研究しか行われていなかった。本研究ではこうした円石藻のうち海洋で広く存在しブルームを起こす *Emiliania huxleyi* と *Gephylocapsa oceanica* の2種、29株と珪藻1株を用い培養実験、培養状態の形態観察、そして円石の元素分析を行った。

本研究により以下の点を明らかにすることができた。(1) *Emiliania huxleyi* と *Gephylocapsa oceanica* の2種の円石藻培養株では、培養株ごとの温度特性が認められたこと、(2) 多くの株において、増殖速度の至適温度は20-25°C付近であり、30°Cを超える温度帯での増殖は認められなかったこと、(3) ベーリング海で採取・確立された株でのみ5°Cで継続的に増殖が可能であること、そしてタイやグレートバリアリーフで採取された株でのみ30°Cで継続的に増殖が可能であったこと、(4) 調査した培養株全般において、温度が高くなるにつれて非円石細胞の割合が高くなったこと、(5) 培地中の窒素およびリン濃度を 1.25×10^{-6} mol/Lおよび 1.25×10^{-7} mol/Lまで低下させた時、円石藻 *Gephylocapsa oceanica* と調査した珪藻のいずれも増殖速度は低下したこと、その一方で、リン制限条件下に対して円石藻株は珪藻株と比較してより高い耐性と適応力を示したこと、(7) 栄養塩の制限による細胞の形態変化に関して、円石藻株ではほとんど変化が認められなかったのに対して、珪藻株では大きな形態変化が観察されたこと、(8) 様々な元素分析結果から、少なくとも酸素同位体比に関しては、株の示す温度特性等の違いにも関わらず古海洋復元の指標として使用できる可能性が高いことである。より包括的に円石藻のもつ温度特性や環境の変化に対する細胞の応答の多様性と基本特性について明らかにすることが出来た。また本実験に用いた株には、ブルーム状態の集団から分離され、培養株として確立された株を含んでおり、こうした培養株についての温度特性に関する調査結果は、ブルームの発生機構の解明等、今後の調査・研究を推進する上で貴重な基礎的情報を提供することになり、本研究の意義は大きいと考えている。

V. 参考文献

- Antoine, S., Jérôme, H. and Domonidue, L. (2003): Response of coccolithophore *Emiliania huxleyi* to elevated partial pressure of CO₂ under nitrogen limitation. Marine ecology progress series, 261: 111-122
- Båtvik, H., Heimdal, B.R., Eagebakke, K.M. and Green, J.C. (1997): Effects of unbalanced nutrient regime on coccolith morphology and size of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). European journal of phycology, 32: 151-165
- Eker-Develi, E., Kideys, A.E. and Tugrul, S. (2006): Effect of nutrients on culture dynamics of marine phytoplankton. Aquatic sciences, 68: 239
- Eppley RW, Holmes RW, Strickland JDH (1967) Sinking rates of marine phytoplankton measured with a fluorometer. J Exp Mar Biol Ecol 1: 191-208
- Erba, E. (2006): The first 150 million years history of calcareous nannoplankton: Biosphere-geosphere interactions. Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology, 232: 237-250
- Fujiwara S., Kawachi, M., Minaka, N., Tsuzuki, M. and Inouye, I.: (2001) A molecular phylogeny of the Haptophyta based on the rbcL gene and the spacer region of RuBisCO operon. J. Phycol. 37: 121-129
- Harris, R.P. (1994) : Zooplankton grazing on the coccolithophore *Emiliania huxleyi* and its role in inorganic carbon flux. Marine biology, 119: 413-419
- Houdan, A., Probert, I. and Zatylny, C. (2006): Ecology of oceanic coccolithophores. I. Nutritional preferences of the two stages in the life cycle of *Coccolithus braaudii* and *Calcidiscus leptoporus*. Aquatic microbial ecology 44: 29-301
- 池田嘉子 (2008) : 博多湾における *Gephyrocapsa oceanica* の大量発生事例. 福岡市保険環境研究所報, 第33号: 85-90
- Jordan, R.W. and Chamkerlain, A.H.L. (1997): Biodiversity among haptophyte algae. Biodiversity and conservation, 6: 131-152
- Marsh, M.E. and Dickinson D.P. (1997) Polyanion-mediated mineralization - mineralization in coccolithophore (*Pleurochrysis carterae*) variants which do not express PS2, the most abundant and acidic mineral-associated polyanion in wildtype cells. Plantasma, 199: 917
- Okada, H. and McIntyre, A. (1979): Seasonal distribution of modern coccolithophores in the Western North Atlantic Ocean. Marine biology, 54: 311-328
- Rickaby, R.E.M, Bard, E. and Sonzogni, C. (2007): Coccolith chemistry reveals secular Variations in the global ocean carbon cycle? Earth and planetary science letters, 253: 83-95
- Satoh, A., Kurano, N. and Miyachi, S. (2001): Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentrations of CO₂. Photosynthesis research,

68: 215-224

- Schulz, K.G., Rost, B. and Riebesell, U. (2007): The effect of iron availability on the regulation of inorganic carbon acquisition in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* and the significance of cellular compartmentation for stable carbon isotope fractionation. *Geochimica et cosmochimica Acta*, 71: 5305-5312
- Soetaert, K., Hofmann, A.F. and Middelburg, J.J. (2007): The effect of biochemical process on pH. *Marine chemistry*, 105: 365
- Stanley, S.M., Ries, J.B. and Hardie, L.A. (2005): Seawater chemistry, coccolithophore population growth, and the origin of Cretaceous chalk. *Geology*, 33: 5996
- Stoll, H.M., Ziveri, P. and Geisen, M. (2002): Potential and limitation of Sr/Ca ratios in coccolith carbonate: new perspectives from cultures and monospecific samples from sediments. *The royal society*, 360: 719-747
- Stoll, H.M., Arevalos, A. and Burke, A. (2007): Seasonal cycles in biogenic production and export in Northern Bay of Bengal sediment traps. *Deep sea research II*, 54: 558-580
- Stoll, H.M., Ziveri, P. and Shimizu, N. (2007): Relationship between coccolith Sr/Ca ratios and coccolithophore production and export in the Arabian Sea and Sargasso Sea. *Deep sea research II*, 54: 584-600
- Stoll, H.M., Shimizu, N., Archer D. and Ziveri, P. (2007): Coccolithophore productivity response to greenhouse event of the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Earth and planetary science letters*, 258: 192-206
- 鈴木淳・川幡穂高 (2007): サンゴなどの生物期限炭酸塩および鍾乳石の酸素・炭素同位体比にみる反応速度論的効果. *地球化学*, 41: 17-33
- 田中裕一郎 (1994): 円石藻による環境復元. *地質ニュース* 475号, 475: 34-38
- Tanaka, Y. and Kawahata, H. (2001): Seasonal occurrence of coccoliths in sediment traps from West Caroline Basin, equatorial West Pacific Ocean. *Marine micropaleontology*, 43: 233
- Townsend, D.W., Keller M.D. and Holligan P.M. (1994): Blooms of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) and the potential use of its pigment ratios as quantitative physiological marker. *Journals of phycology*, 36: 523-539
- Van der Wal, P., Kempers, R.S. and Veldhuis, M.J.W. (1995): Production and downward flux of organic matter and calcite in a North Sea bloom of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Marine ecology progress series*, 126: 247-265
- Ziveri, P., Stoll, H. and Probert, I. (2003): Stable isotope 'vital effects' in coccolith calcite. *Earth and planetary science letter*, 210: 137-149
- Ziveri, P., Probert, I. and Stoll, H.M. (2006): Coccolith chemistry response to nutrient limitation. *Geophysical research abstracts*, vol.8, 10697

Zondervan, I. (2007): The effect of light, micronutrients, trace metals and CO₂ on the production of calcium carbonate and organic carbon in coccolithophores: a review. Deep-sea research II, 54: 521-537

VI. 謝辞

本研究に関し、研究初め様々なところまで親切にご指導頂いた川幡穂高先生、円石藻をはじめ藻類研究の全般にわたり貴重な助言を頂いた国立環境研究所の河地正伸先生ならび関係各位、分析および地球化学全般にわたり丁寧に助言して頂いた(独)産業技術総合研究所の鈴木淳先生ならび関係各位、以上の方々に深く感謝を致します。また北海道大学理学研究科の萩野恭子様には円石藻株を実験に提供頂いたことを心より感謝申し上げます。

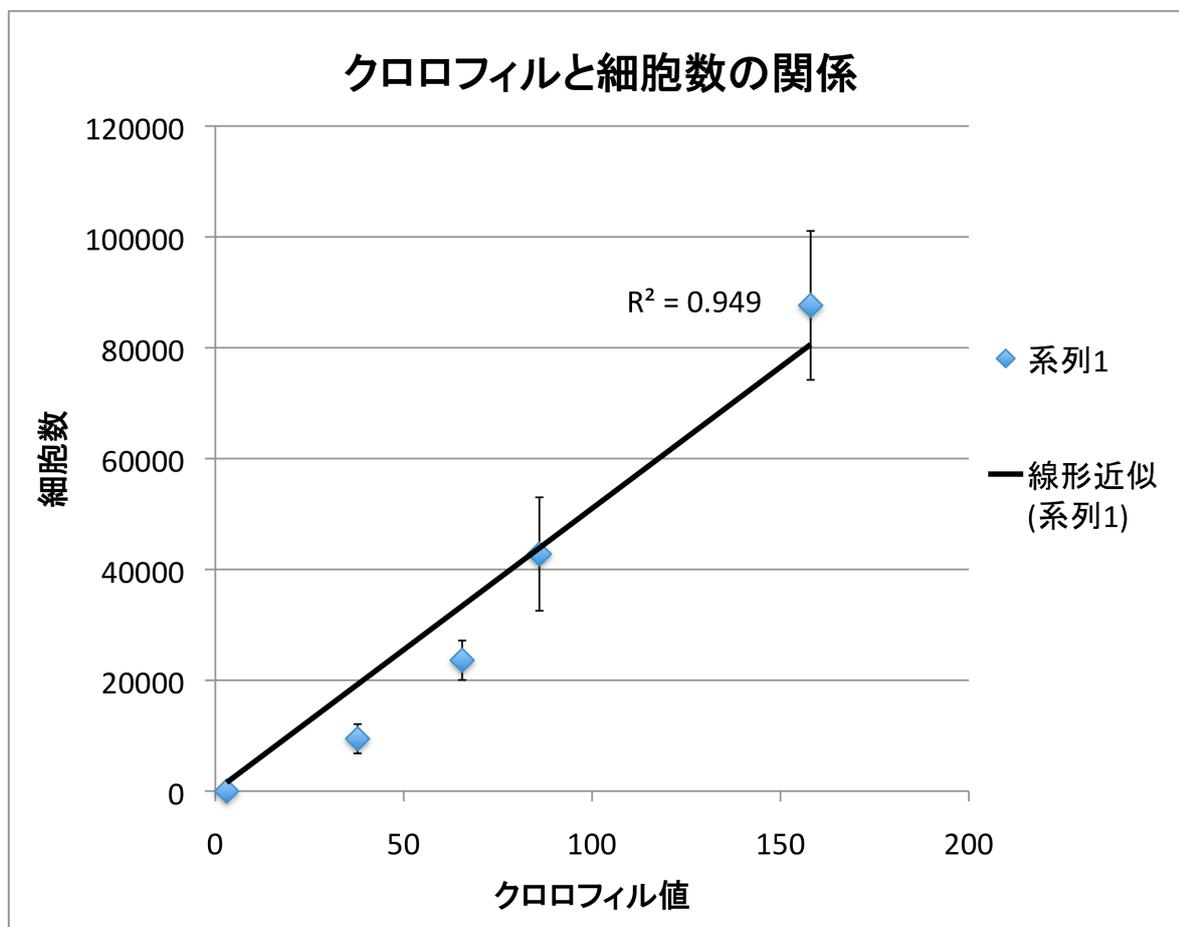


図-1 クロロフィルと細胞数の相関関係図

表-1 実験に使用した円石藻の株一覧

| 株 | 種 | サンプリング地域 (時期, 分離者) |
|----------|------------------------------|---------------------------------|
| G1 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| G3 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| G5 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| G10 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| G11 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| G13 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| G14 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| G20 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2007年4月, M. Kawachi) |
| K319 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2008年11月, M. Kawachi) |
| K336 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 博多湾 (2008年3月, M. Kawachi) |
| K381 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 島根 (2008年4月, H. Semura) |
| K367 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 島根 (2008年4月, H. Semura) |
| K366 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 島根 (2008年4月, H. Semura) |
| YK03-11 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 東シナ海 (2003年7月, M. Kawachi) |
| YK03-7 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 東シナ海 (2003年7月, M. Kawachi) |
| MH63 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 東シナ海 (2003年8月, M. Kawachi) |
| MH64 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 東シナ海 (2003年8月, M. Kawachi) |
| MK11 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 三宅島 (1999年11月, M. Kawachi) |
| MH38 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 八丈島 (2002年1月, M. H. Noël) |
| YM-01 | <i>Emiliana huxleyi</i> | 八丈島 (2002年12月, M. H. Noël) |
| YM-06 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 岡山 (2003年6月, N. Yubuki) |
| nies-353 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 長崎 対馬 (1986年3月, I. Inoue) |
| T03-28 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | タイ (2003年11月, M. Kawachi) |
| T03-30 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | タイ (2003年11月, M. Kawachi) |
| EH01 | <i>Emiliana huxleyi</i> | グレートバリアリーフ (1990年11月, I. Inoue) |
| MT3-6 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 青森 (2006年9月, K. Hagino) |
| MT0610G | <i>Emiliana huxleyi</i> | 青森 (2006年10月, K. Hagino) |
| MM4-6 | <i>Gephyrocapsa oceanica</i> | 北海道 (2006年6月, K. Hagino) |
| MH28B | <i>Emiliana huxleyi</i> | ベーリング海 (2002年9月, M. H. Noël) |

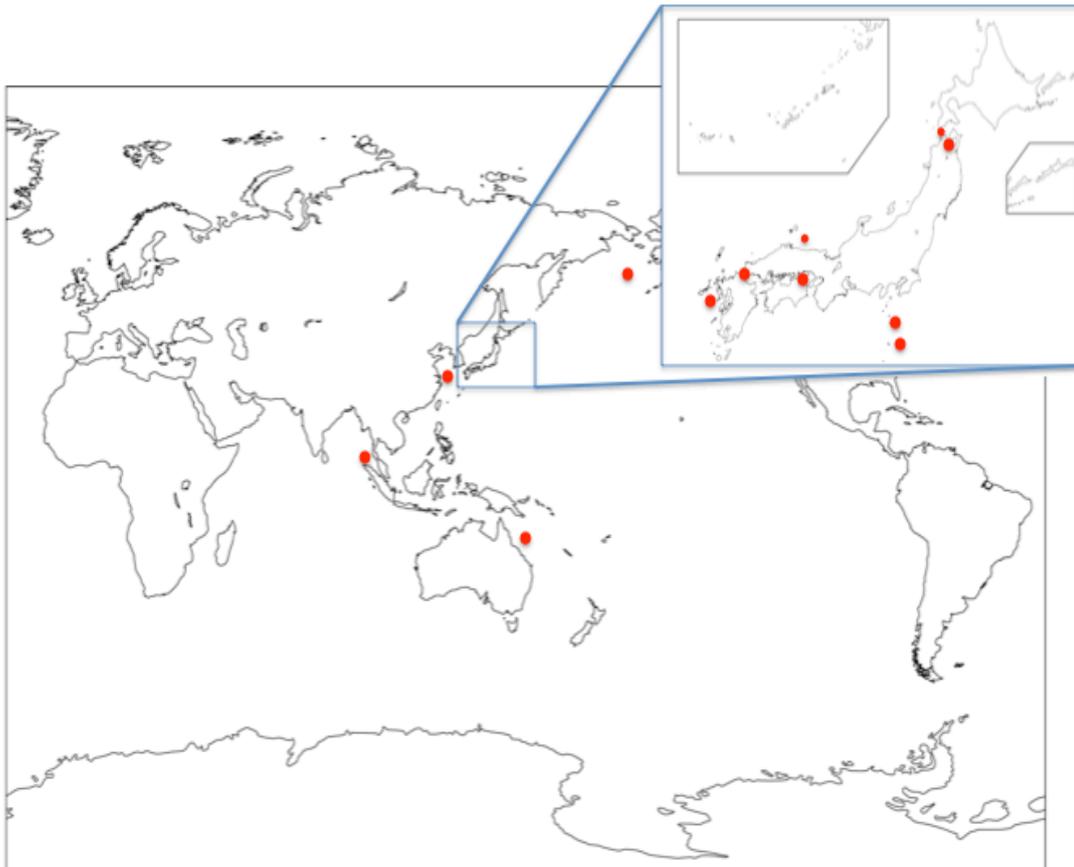


図-2 実験に使用した円石藻の採取場所一覧

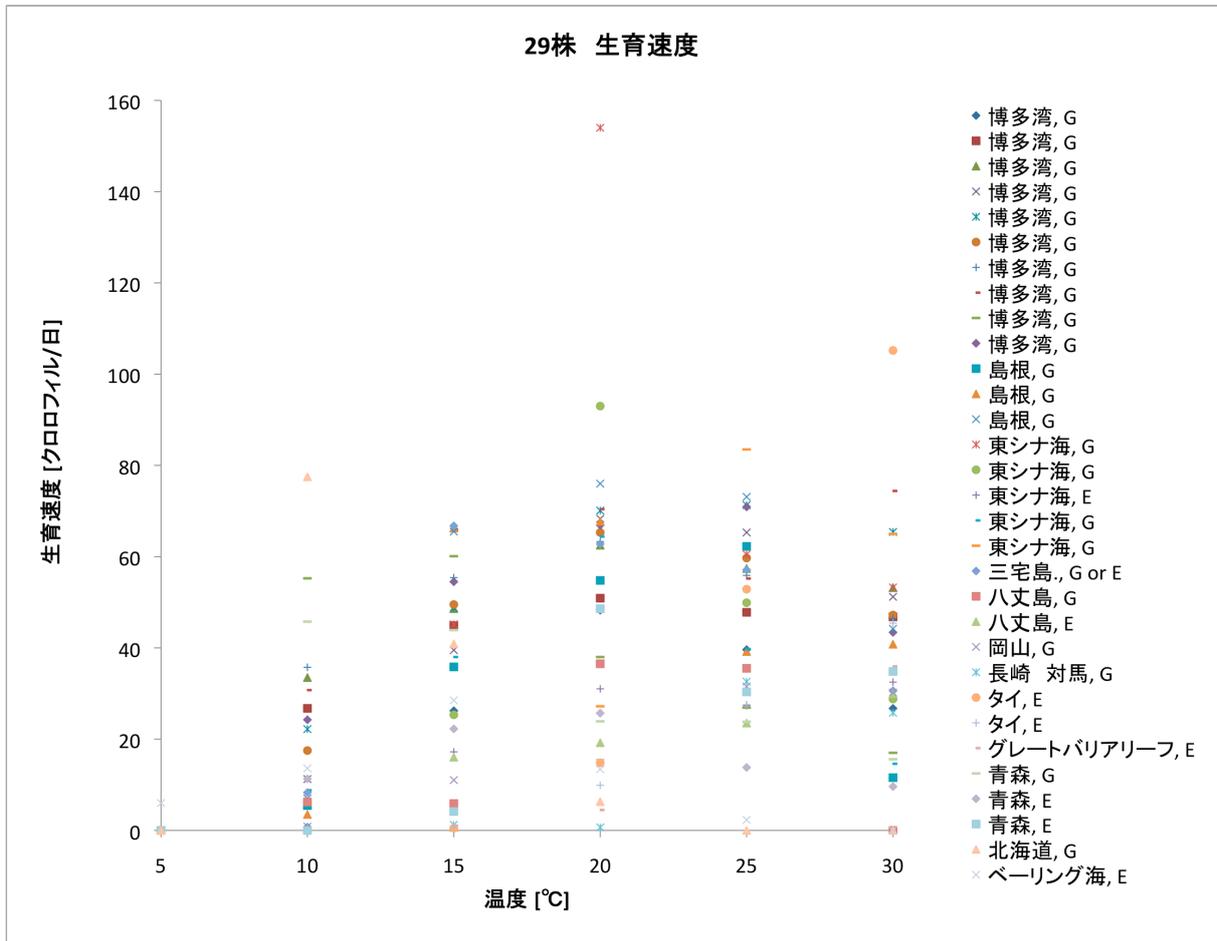


図-3 円石藻 29 株全体の温度別生育速度

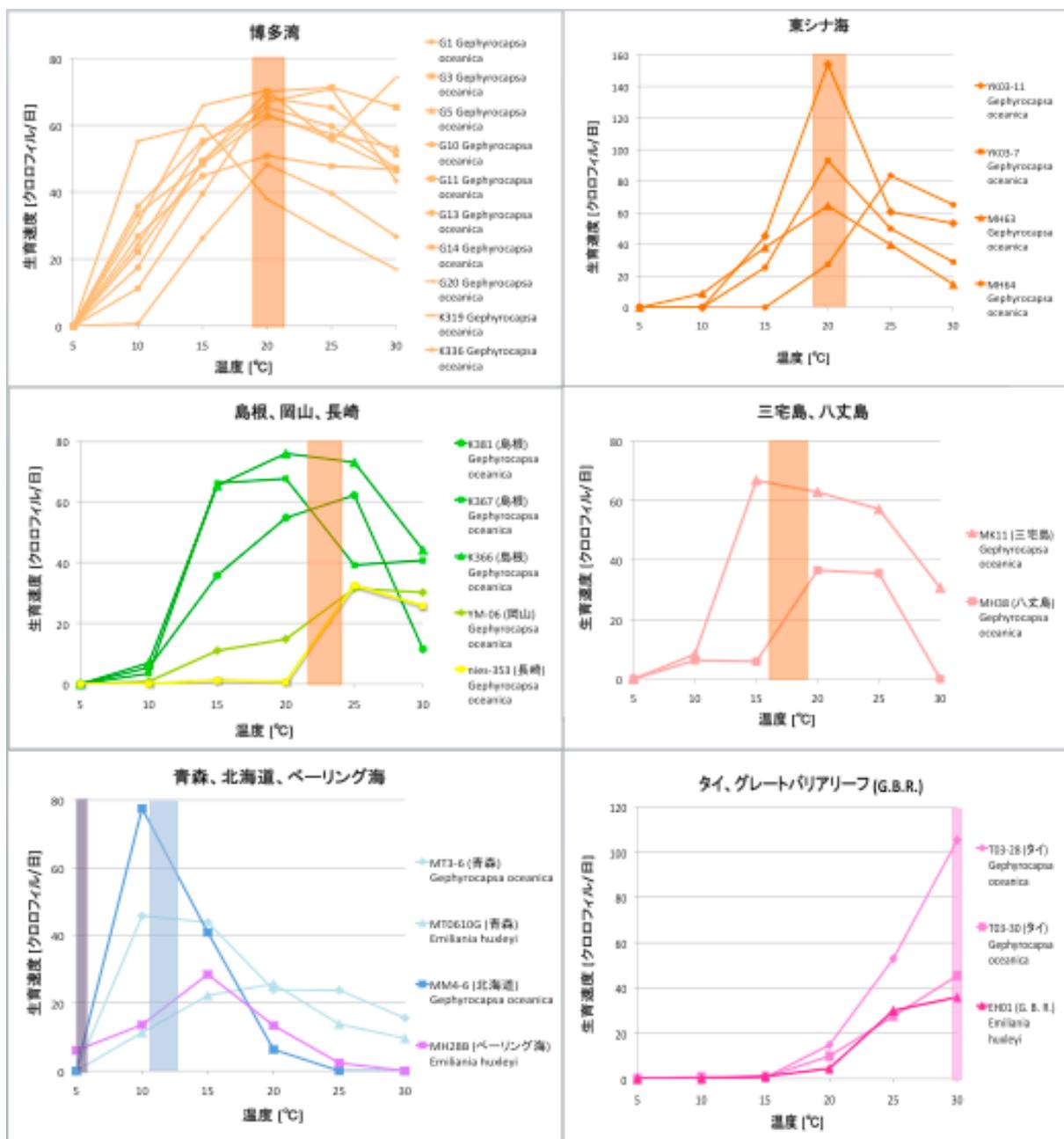


図4 採取場所別の円石藻の生育速度 (表中のカラーバーは採取された場所の年平均水温を表す)

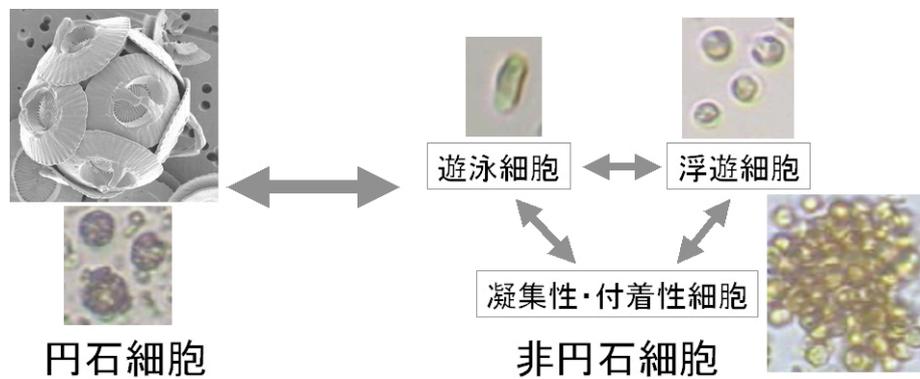


図-5 円石藻の細胞ステージ

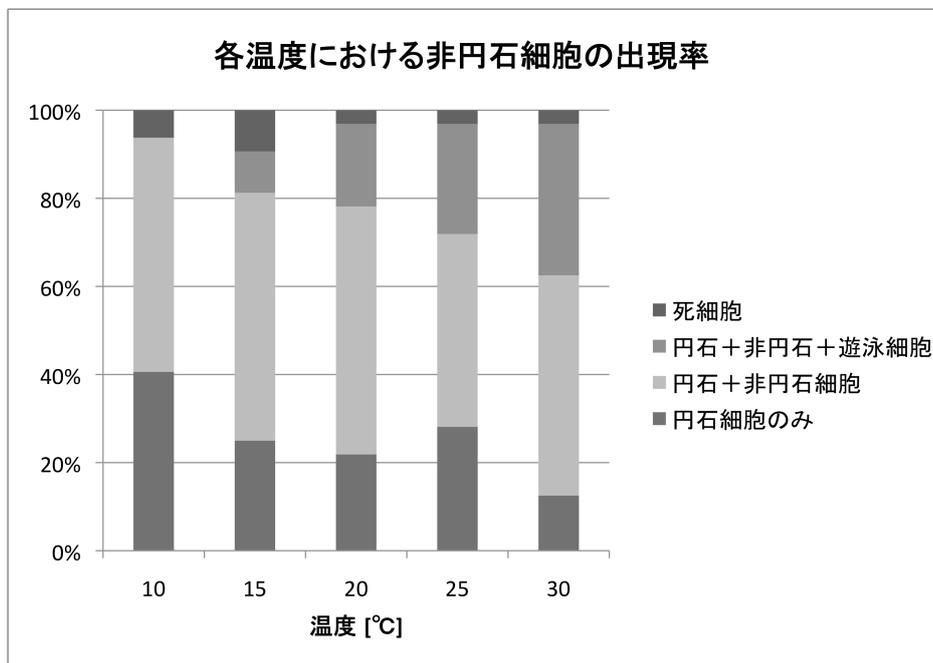


図-6 培養した円石藻全体の細胞形態変化の温度推移

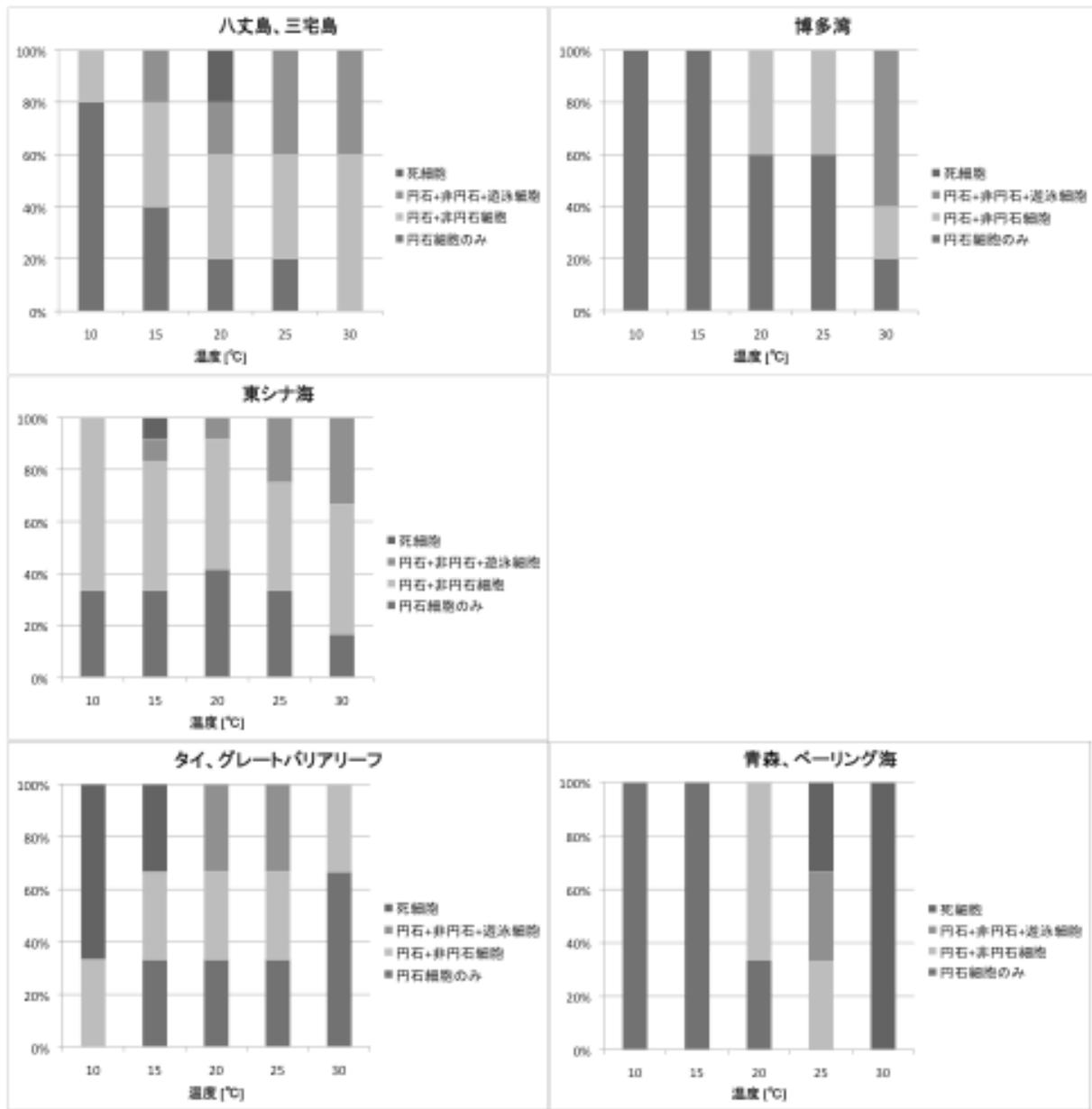


図-7 採取された場所別の円石藻の細胞形態の変化の温度推移

表-2 栄養塩制限時の培地中栄養塩濃度一覧

| | 通常培地 | 窒素欠乏培地 | リン欠乏培地 |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| KNO ₃ | $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol / l}$ | $1.25 \times 10^{-6} \text{ mol / l}$ | $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol / l}$ |
| K ₂ HPO ₄ | $1.25 \times 10^{-5} \text{ mol / l}$ | $1.25 \times 10^{-5} \text{ mol / l}$ | $1.25 \times 10^{-7} \text{ mol / l}$ |
| Na ₂ SiO ₃ | $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol / l}$ | $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol / l}$ | $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol / l}$ |
| mIMR トレースメタル | | | |
| チアミン | 200 $\mu \text{ g / l}$ | 200 $\mu \text{ g / l}$ | 200 $\mu \text{ g / l}$ |
| ビタミン B ₁₂ | 10 $\mu \text{ g / l}$ | 10 $\mu \text{ g / l}$ | 10 $\mu \text{ g / l}$ |
| ビオチン | 1 $\mu \text{ g / l}$ | 1 $\mu \text{ g / l}$ | 1 $\mu \text{ g / l}$ |

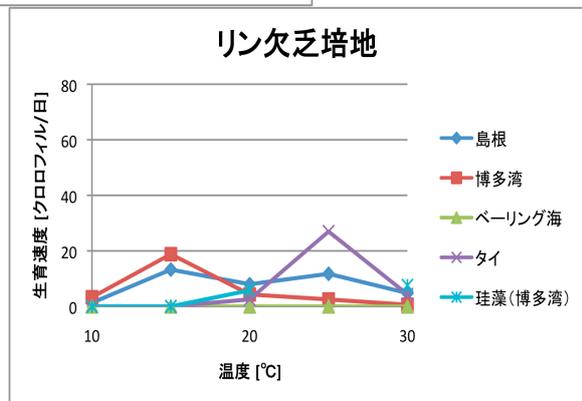
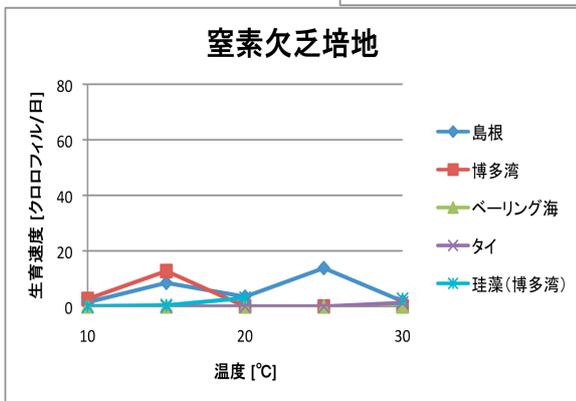
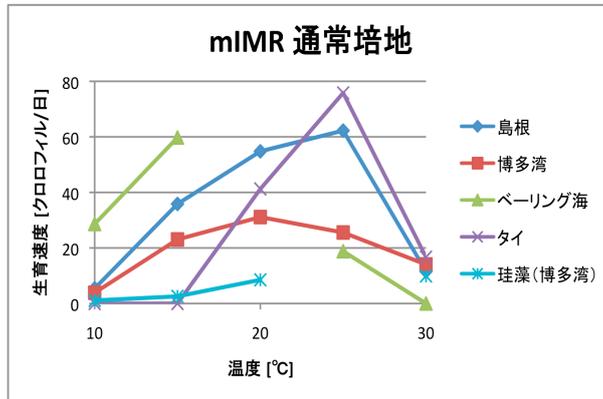


図-8 培地別の栄養塩制限下の円石藻と珪藻の生育速度

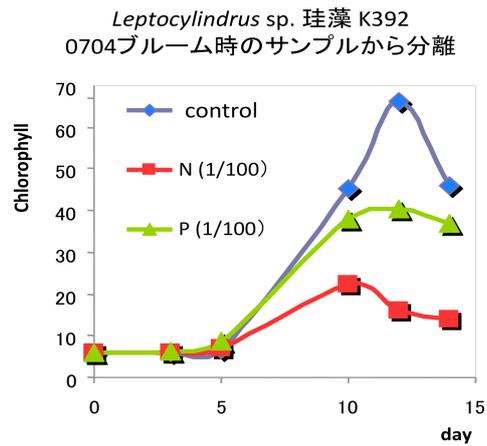
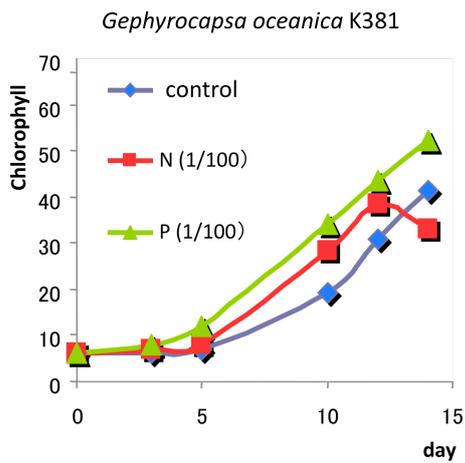


図-9 20°Cで培養した時の円石藻と珪藻の生育曲線

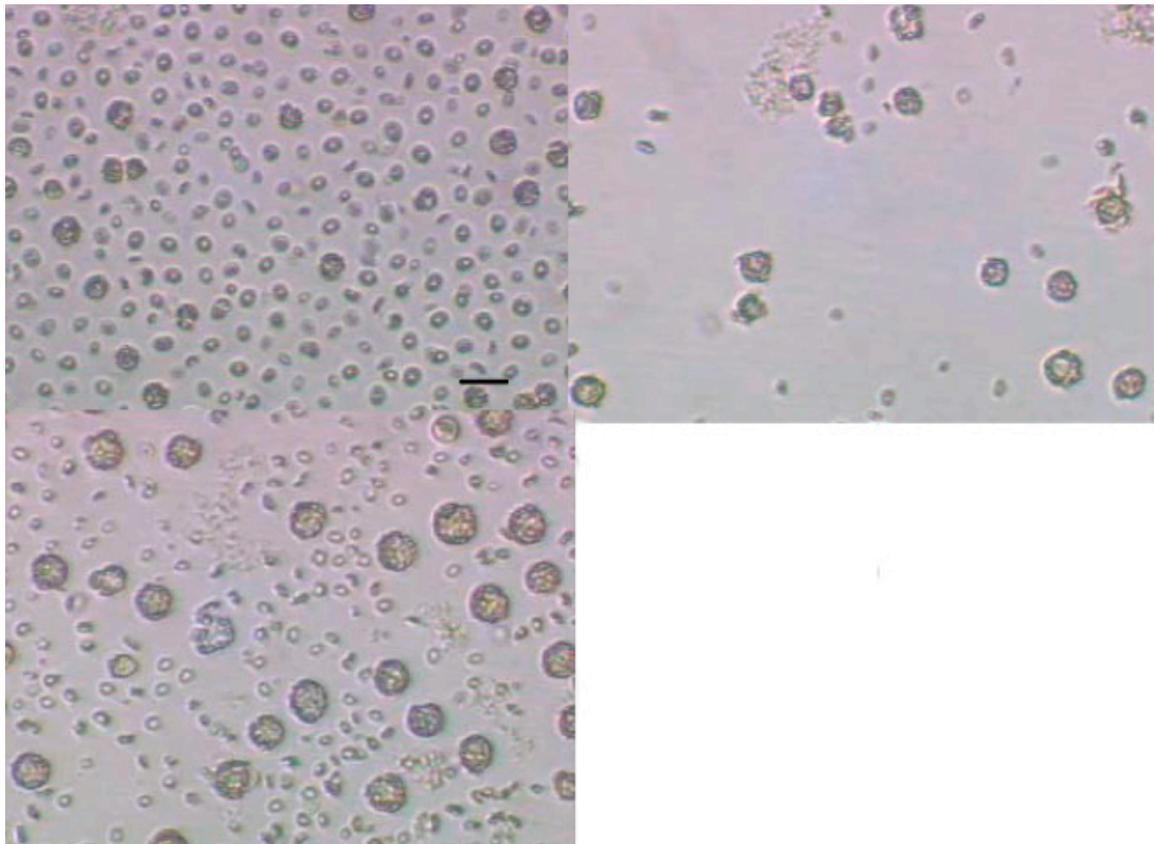


図-10 30°C 島根 (K381) 通常(左上), 窒素欠乏(右上), リン欠乏 (左下) スケールバー=10 μ m

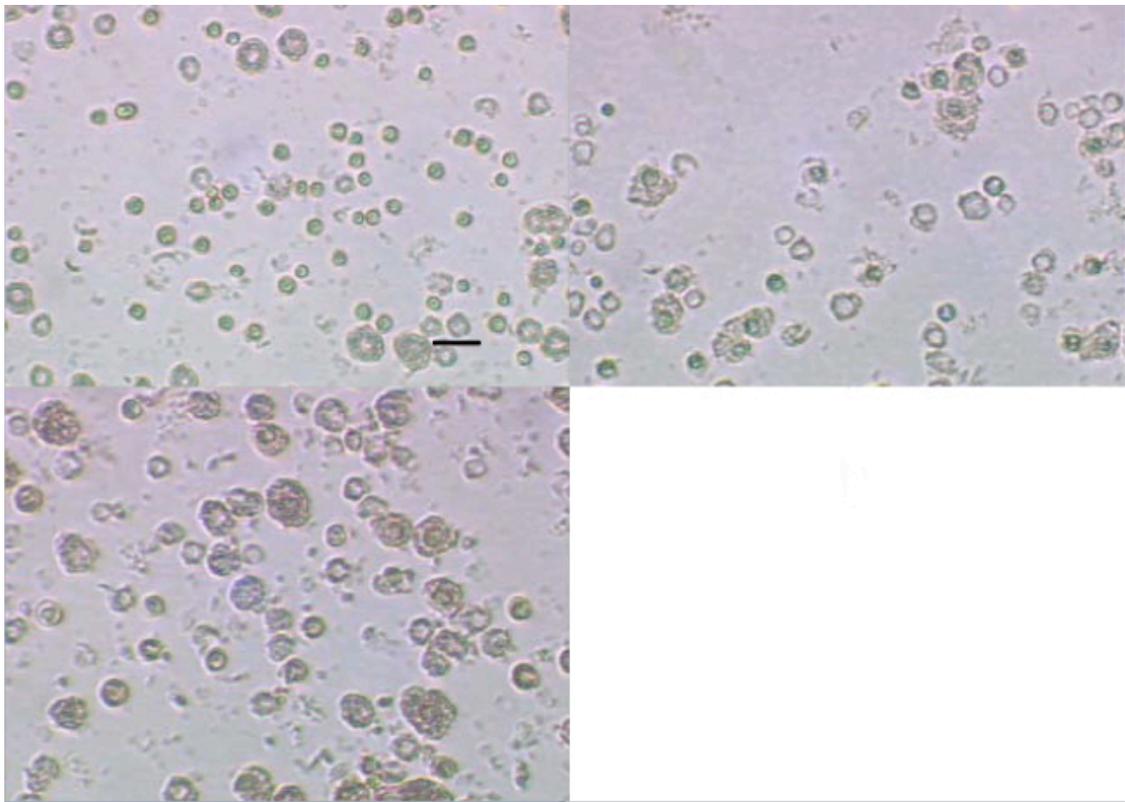


図-11 30°C 博多湾 (K319) 通常(左上), 窒素欠乏(右上), リン欠乏 (左下) スケールバー=10 μ m

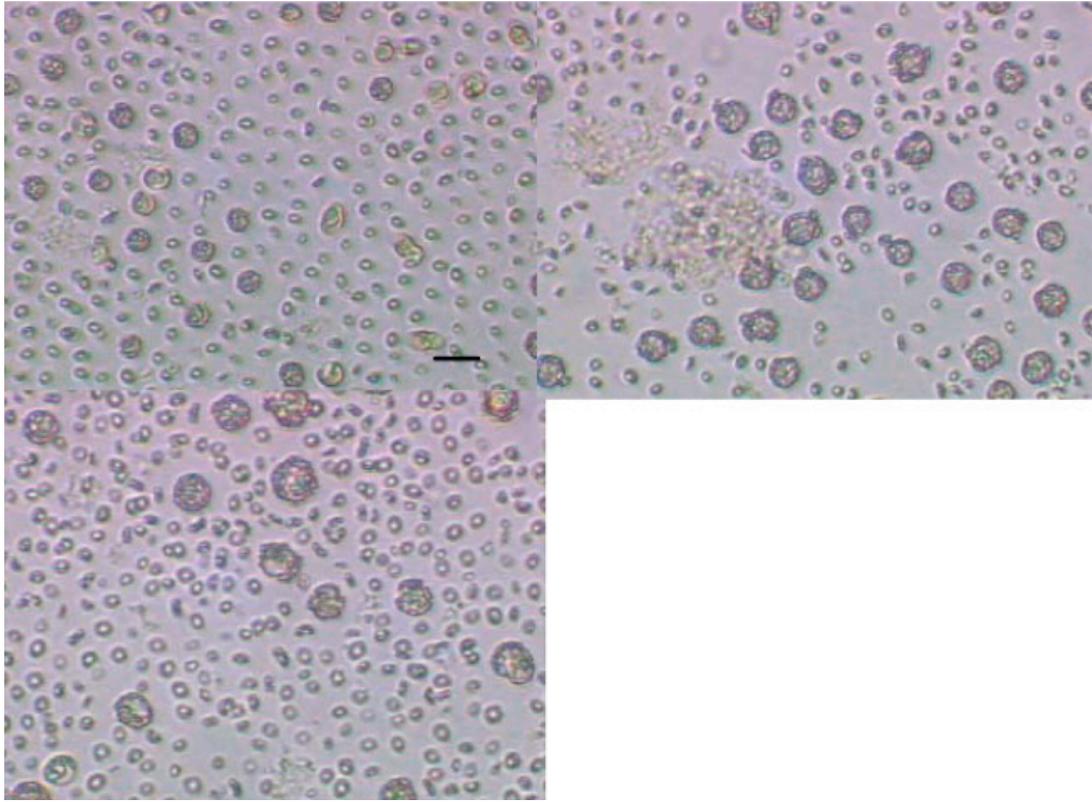


図-12 20°C 島根 (K381) 通常(左上), 窒素欠乏(右上), リン欠乏 (左下) スケールバー=10 μ m

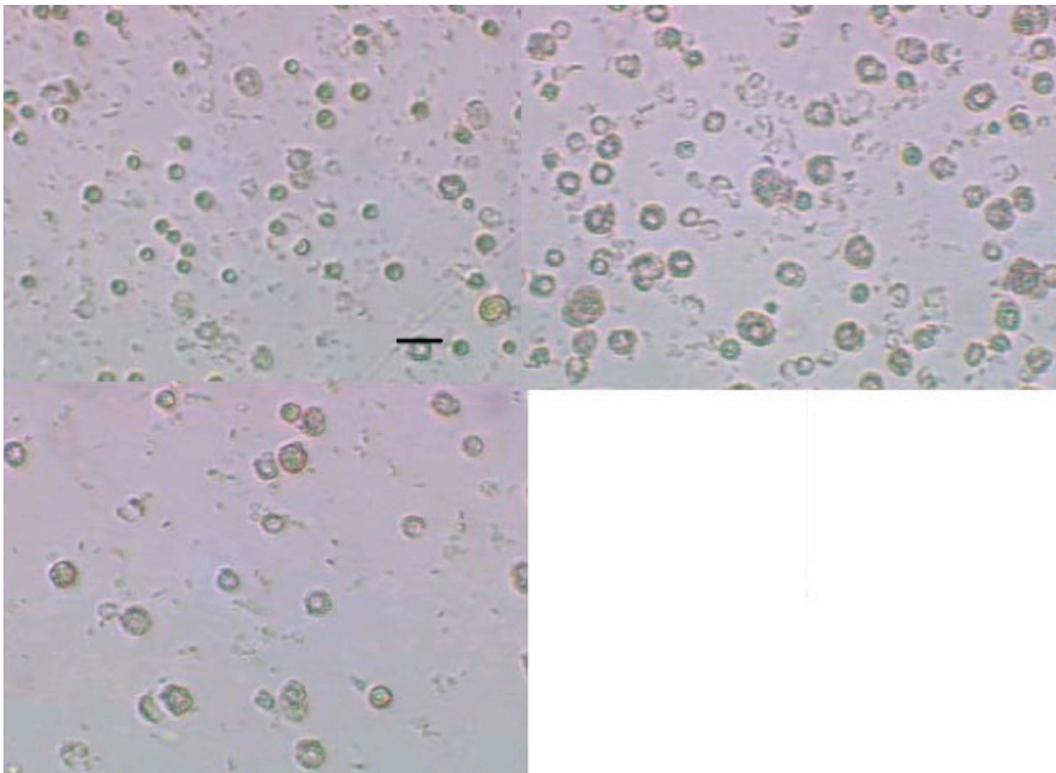


図-13 20°C 博多湾 (K319) 通常(左上), 窒素欠乏(右上), リン欠乏 (左下) スケールバー=10 μ m

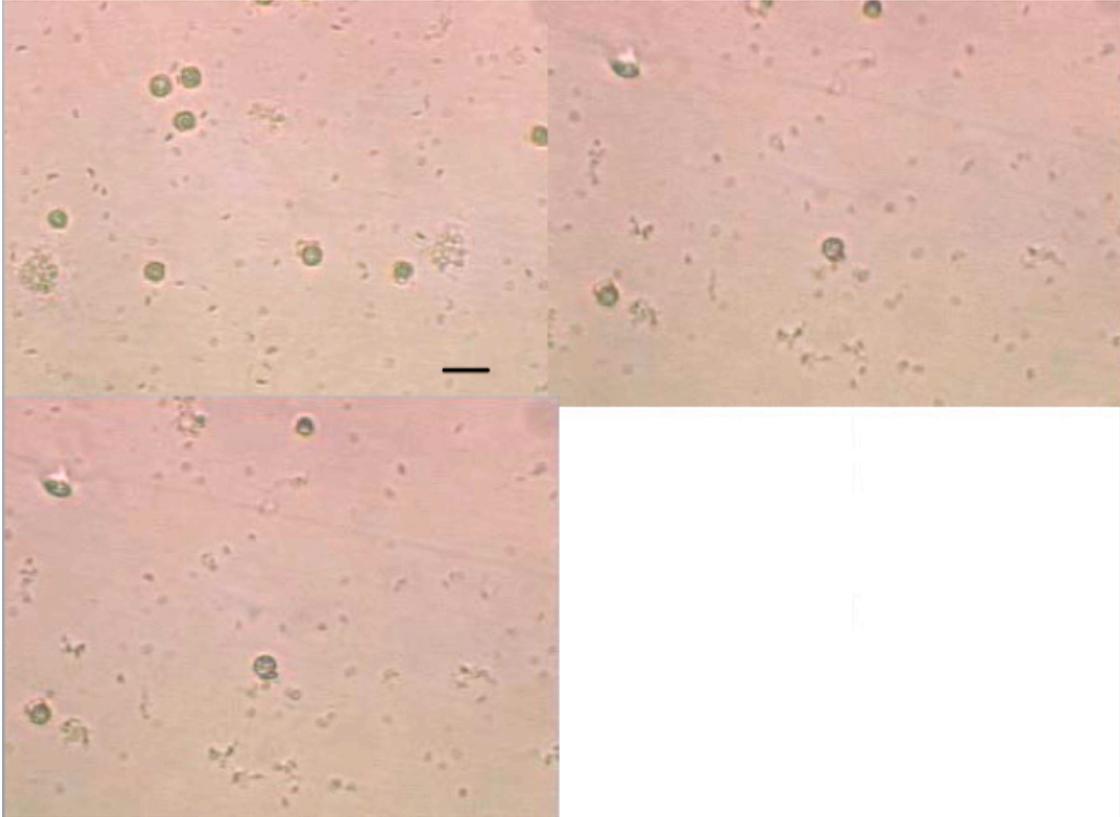


図-14 20°C ベーリング海 (MH28B) 通常(左上), 窒素欠乏(右上), リン欠乏 (左下)
スケールバー=10 μ m

表-3 通常培地および窒素欠乏、リン欠乏培地の培養における細胞の形態比較
(15℃以下でも全体的な傾向は同じ。なお 15℃以下では N cell と S cell は観察されなかった)

| 培地種類 | K381 (30℃) | K319 (30℃) | K381 (20℃) | K319 (20℃) | MH28B (20℃) |
|------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------|
| 通常 | N cell あり | 円石だけの細胞痕あり | N cell あり | 円石だけの細胞痕あり N cell あり | |
| 窒素欠乏 | N cell なし P less より 円石が少ない | 円石だけの細胞痕あり、 S cell あり | N cell なし P less より 円石が多い | 円石だけの細胞痕あり N cell あり | 散らばる円石が通常培地より少ない |
| リン欠乏 | N cell なし N less より 円石が多い | 円石だけの細胞痕あり 細胞大きめ | N cell あり 細胞大きめ | 円石だけの細胞痕あり N cell あり | cell 少ない 細胞大きめ |

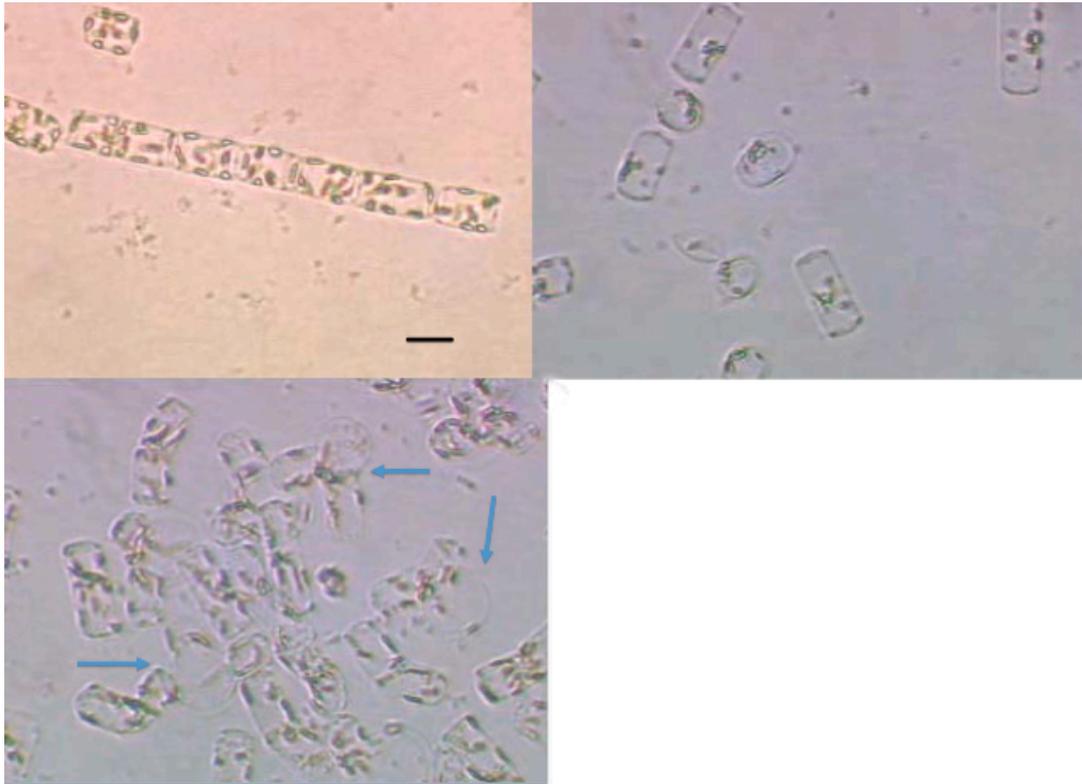


図-15 博多湾 (珪藻) 30°C 通常 (左上), 窒素欠乏(右上), リン欠乏 (左下) スケールバー=10 μ m

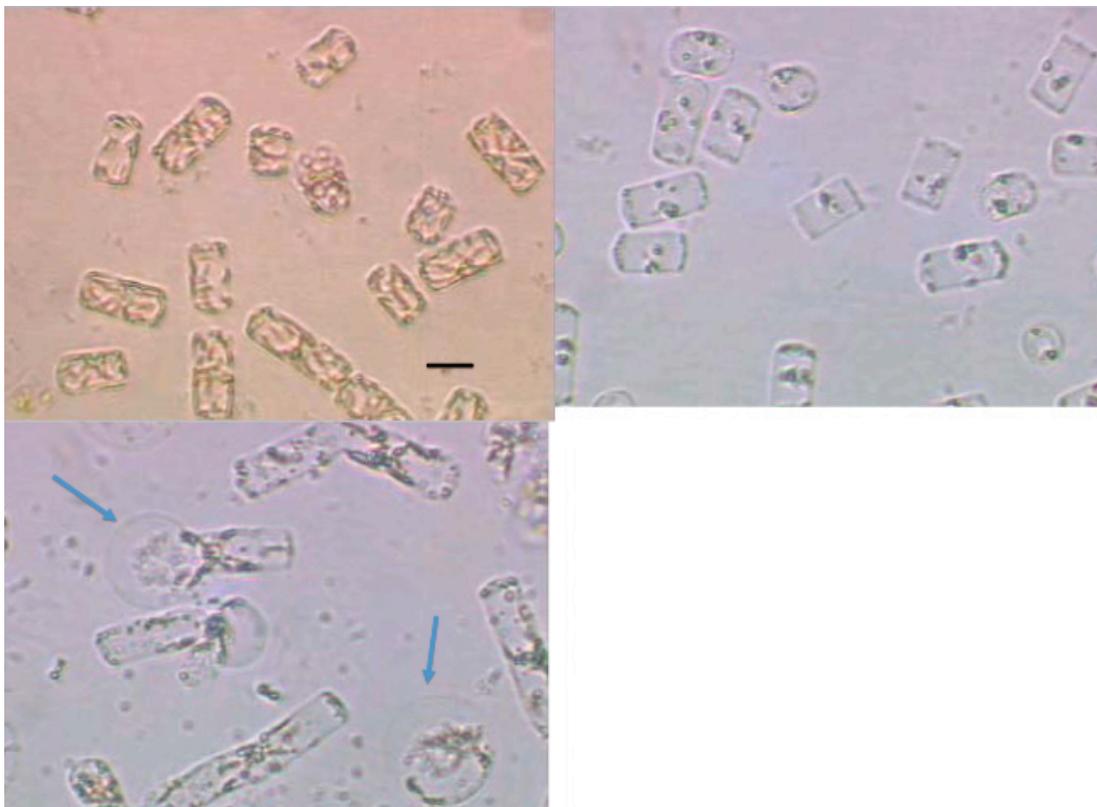
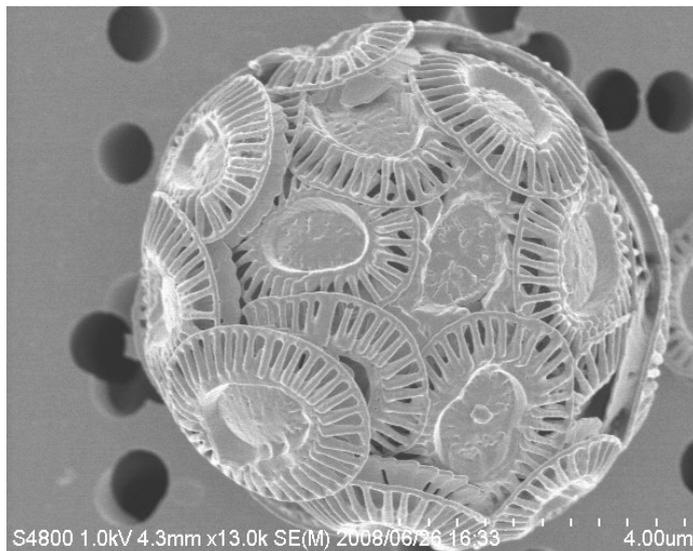
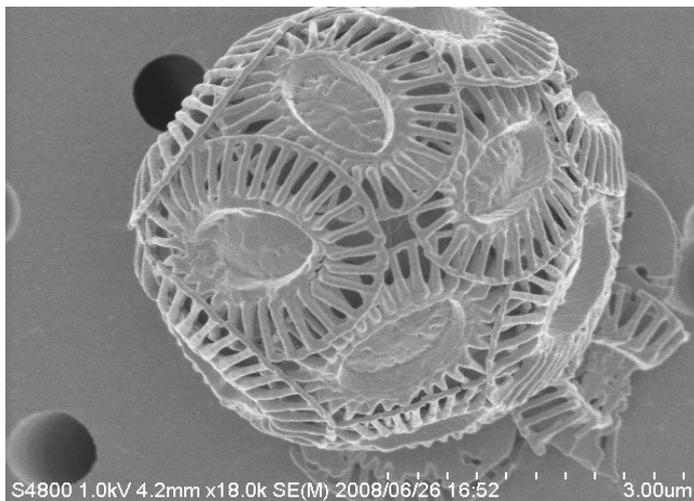


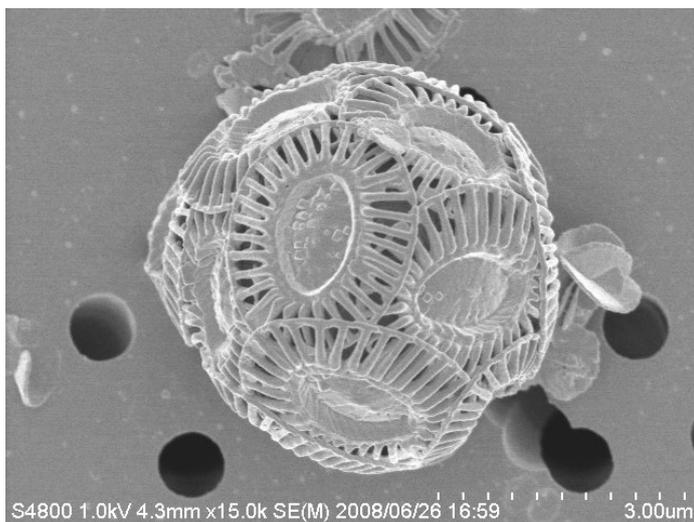
図-16 博多湾 (珪藻) 20°C 通常 (左上), 窒素欠乏(右上), リン欠乏 (左下) スケールバー=10 μ m



博多湾 20°C 通常培地

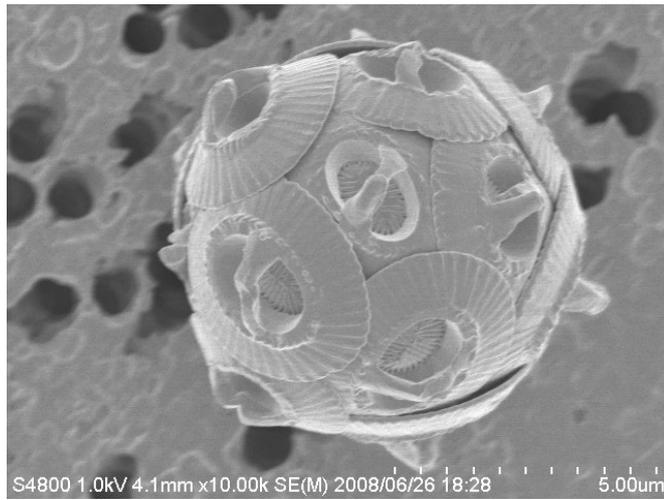


博多湾 20°C 窒素欠乏培地

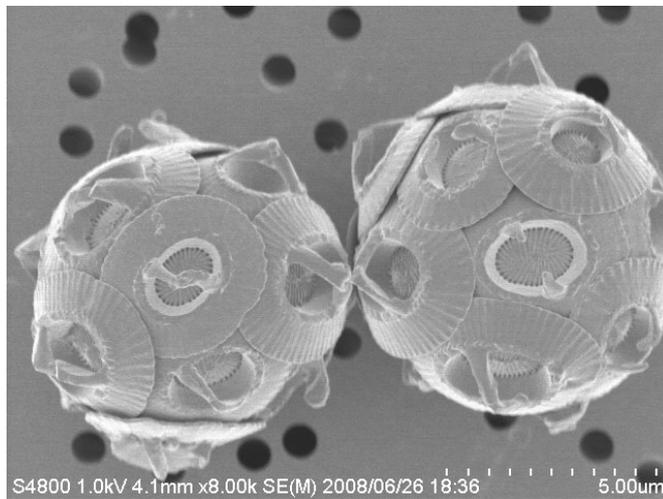


博多湾 20°C リン欠乏培地

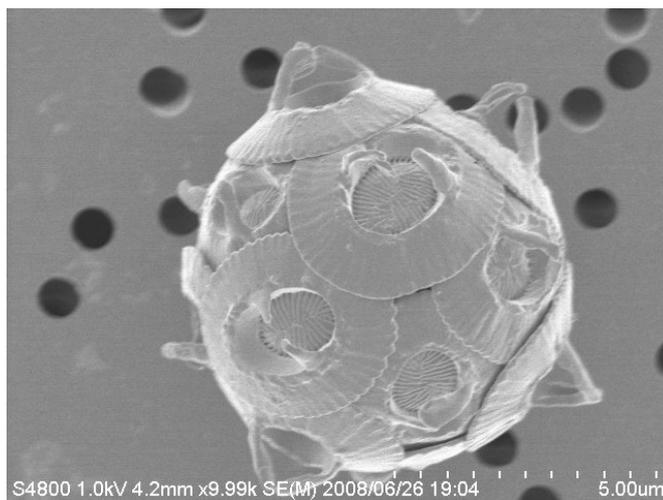
図-17 博多湾 (K381) 20°Cの SEM による細胞の形態変化



島根 20°C 通常培地



島根 20°C 窒素欠乏培地



島根 20°C リン欠乏培地

図-18 島根 (K319) 20°Cの SEM による細胞形態変化

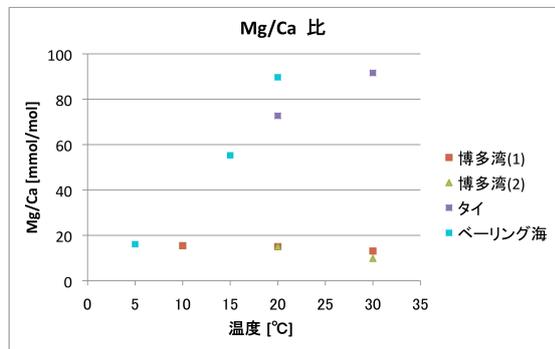
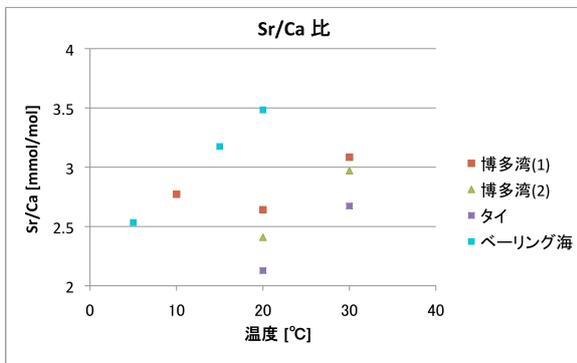
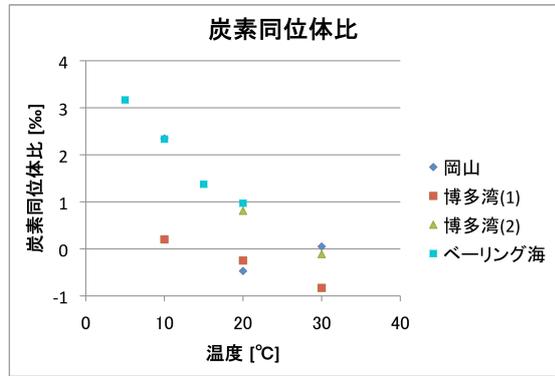
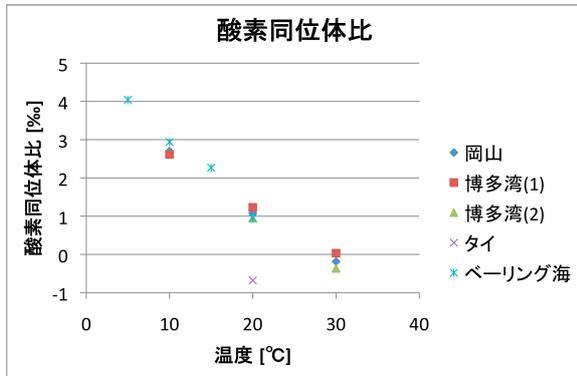


図-19 円石藻 4 株の円石の元素分析結果