

東京大学大学院新領域創成科学研究科  
自然環境学専攻

平成 22 年度

修士論文

アミノ酸窒素安定同位体比を用いた造礁サンゴの窒素源の解明

Determination of nitrogen sources for scleractinian corals  
by compound-specific nitrogen isotope ratios of amino acids

2011 年 2 月提出

指導教員 小川浩史 准教授

47-096627 藤井 堯典

## 目次

第1章 序論 .....	3
1-1 サンゴ礁生態系	
1-2 造礁サンゴと褐虫藻の共生関係	
1-3 生態学指標としての安定同位体比	
1-3-1 Bulk 窒素安定同位体比分析	
1-3-2 アミノ酸窒素安定同位体比分析	
1-4 本研究の目的	
図表	
第2章 試料および方法 .....	11
2-1 造礁サンゴの採取と調査地概要	
2-2 造礁サンゴの処理方法	
2-3 全有機炭素・窒素 (Bulk) 安定同位体比分析	
2-4 アミノ酸窒素安定同位体比分析	
2-4-1 アミノ酸の誘導体化	
2-4-2 分析	
2-5 栄養塩分析	
2-6 造礁サンゴの飼育実験	
図表	
第3章 結果および考察 .....	17
3-1 飼育実験による造礁サンゴに対するアミノ酸窒素安定同位体比分析の適用検証	
3-2 造礁サンゴと褐虫藻の共生関係	
3-3 種による造礁サンゴの窒素源の違い	
3-4 生息環境の違いによる造礁サンゴの窒素源の変化	
図表	
第4章 結論 .....	39
謝辞 .....	40
参考文献 .....	41
要旨 .....	45

## 【第1章：序論】

### 1-1. サンゴ礁生態系

サンゴ礁は「海の熱帯雨林」と評されるように、地球上で最も単位面積当たりの生産力が高く生態系が豊かな場所の1つであり、全海洋面積に占めるサンゴ礁の面積はおおよそ0.2%程度にも関わらず海洋生物種の25%もの生物種がそこに生息している。サンゴ礁に実際に行ってみると、そこにはさまざまな形をしたサンゴをはじめ、色とりどりの熱帯魚、ヒトデやナマコなどの底生生物、時にはマンタやウミヘビ、ウミガメなど普段我々が目にしない生物をたくさん見ることができる。

サンゴ礁生態系は多種多様な生物が複雑な関係を保ちながら共存しているシステムである。しかし同時にサンゴ礁海域は一般的には海水中の栄養塩が少なく生物が生息するには適していない貧栄養海域としても知られており、それは海水の高い透明度を見てもすぐに理解できる。なぜサンゴが存在する場所にはあのような豊かな生態系が形成されているのか。それを知るためには、造礁サンゴをはじめとするサンゴ礁生物の間で成り立っている物質循環経路を詳しく解明する必要がある、現在でも世界中で数多くの研究が為されているものの未だ多くの問題が残されている。

またサンゴ礁生態系はその重要性や有益性がおかれる一方で、環境ストレスに非常に弱く(中村ほか, 2006)、近年では地球温暖化による海水温上昇や海洋酸性化、沿岸地域の人口増加や土地開発による赤土・栄養塩流入などの人間活動によって引き起こされる様々な要因によって大きな被害を受けている。国際自然保護連合(IUCN)の2008年の報告によると、世界中の1/3もの種のサンゴが絶滅の危機に瀕していると危惧しており、日本の沖縄地域でも大規模な白化現象が度々確認されて社会問題になっている。しかしこれらの人間活動が引き起こした現象に対してサンゴがどのような応答を示すのかは詳しくはわかっておらず、この問題を調べることはサンゴの生態にとっての負の要因を明らかにし、サンゴ礁を守るための保全活動の推進に繋がると思われる。

サンゴ礁は決して海洋生物たちにとってのみ重要な場所ではない。そこでの漁は大切な食料や収入源にもなり、沿岸域での台風の被害が少ないことも発達したサンゴ礁群が自然の防波堤の役割を果たしてくれているからである。また熱帯の島国にとっては観光地としての価値を持つ非常に重要な場所になっており住民の生活を根幹から支えている(土屋・藤田, 2009)。このように、サンゴ礁は沿岸域の住民をはじめ我々人間になくてはならない存在である。

## 1-2. 造礁サンゴと褐虫藻の共生関係

サンゴ礁を形成している造礁サンゴは、全ての種類で体内（内胚葉性の細胞内）に *Symbiodinium* 属の渦鞭毛藻である褐虫藻（以下共生藻と呼び、共生藻を取り除いたサンゴをサンゴ組織と呼ぶ）を共生させている。そして互いの間で物質の循環が密に行われており、サンゴ組織にとっても共生藻にとっても相手の存在が生命の存続に繋がる相利共生関係を築いている。

サンゴ体内に生息する共生藻はサンゴ組織が放出する  $\text{CO}_2$  や  $\text{NH}_4^+$  などを利用して光合成を行い、そして合成した有機物の 95% 以上を宿主であるサンゴに与え成長を助けているが (Muscatine et al., 1984)、これまでのところサンゴ組織は生存に必要な炭素源の 90% をこの共生藻からの供給に頼っていると言われている。

では窒素に関してはどうか。これまでの研究により、排泄物である  $\text{NH}_4^+$  などの窒素態がサンゴ組織と共生藻の間で循環して再利用されていると考えられてきたが (Heikoop et al., 1998, Roberts et al., 1999)、その過程は複雑であるため詳細はわかっておらず現在でも多くの研究が為されている。

続いて造礁サンゴが利用できる窒素源として、まず触手による“動物プランクトン”の捕食が挙げられる。サンゴが触手を出してプランクトンを捕食している光景は現場でよく目にするが、窒素源に対する捕食の依存度については意見が分かれている (Yamamuro et al., 1995, Grover et al., 2008)。またサンゴが捕食した動物プランクトン由来の窒素は共生藻でも利用されているのか、またそうであればどのような形で共生藻に供給されているのか全くわかっていない。次に海水中の“DIN（溶存態無機窒素）”の取り込みがある。サンゴの  $\text{NH}_4^+$  の取り込みについては Kawaguti (1953) や Muscatine et al. (1979) など古くから多くの研究が為されており、Yellowlees et al. (1994) ではグルタミン合成酵素を、Male and Storey (1983) や Catimull et al. (1987) ではグルタミン酸脱水素酵素を共生藻と同様にサンゴ組織が保有していると報告している。そのためサンゴ組織は独自の合成系によって  $\text{NH}_4^+$  を利用してアミノ酸を合成していると考えられることもできる (Fitzgerald and Szmant, 1997)。共生藻による  $\text{NO}_3^-$  の取り込みも Webb and Wiebe (1978) などで確認されており、田中 (2005) では共生藻が取り込んだ  $\text{NO}_3^-$  は共生藻によって一度  $\text{NH}_4^+$  に還元され、ただちにサンゴ組織に供給していると報告している。また貧栄養な環境では細胞内に存在する窒素固定菌（シアノバクテリア）による“窒素固定”が非常に重要な役割をしているとする研究報告も数多く存在している (Yamamuro et al., 1995, Arrigo et al., 2005, Lesser et al., 2007)。

以上のことから、(1)サンゴの主要な窒素源、(2)サンゴ組織と共生藻の間の窒素循環メカニズム、この2つの問題は未だ解決されておらず、そのためには従来行われてきた研究方法だけでなく、これまでとは異なるアプローチも必要であると考えられる。

### 1-3. 生態学指標としての安定同位体比

生物体に含まれる安定同位体比 ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  など) は、生態学分野の研究において特に食物連鎖網の構造や生物と周辺環境との関係性を解析する上で非常に優れた指標となる(Fry and sherr, 1984、南川・吉岡, 2006、大手ほか, 2008)。例えば捕食生物の炭素安定同位体比は餌の同位体比を反映し、窒素安定同位体比は栄養段階の推定などに利用され食性解析に用いられている (Minagawa and Wada, 1984、Hobson and Welch, 1992)。次に本研究の中心である窒素安定同位体比についてその原理を簡単に説明する。

自然界の窒素(N)には2種類の安定同位体が存在し、その多くが質量数 14 の  $^{14}\text{N}$  である。しかし極微量ではあるが質量数 15 の  $^{15}\text{N}$  も存在し、この 2 つの安定同位体の存在比を測定することによりさまざまな情報が得られる。その原理となるのが同位体分別である。窒素含有有機物は生物体の間を移動する際に少しずつ  $^{15}\text{N}$  の存在比が増えていくことが知られている(Wada and Hattori, 1981)。その代表的なものとして捕食が挙げられ、捕食者の体内には食物よりも選択的に  $^{15}\text{N}$  が多く残される事が知られている。

窒素安定同位体比は標準試料に対する千分偏差 ( $\delta^{15}\text{N}$ 、単位パーミル：‰) で表わされる (式(1))。

$$\delta^{15}\text{N}=[(\text{R}_{\text{試料}}/\text{R}_{\text{標準試料}})-1]\times 1000\text{ (‰)} \quad (1)$$

R は  $^{14}\text{N}$  の存在比に対する  $^{15}\text{N}$  の存在比率( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ )を示し、標準試料は大気中の窒素ガス ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}=0.0036765$ )が用いられる。この  $\delta^{15}\text{N}$  は前述のとおり食物連鎖が進むにつれて大きくなっていくため、対象生物が属する生態系の中での栄養段階や窒素循環の中での役割を調べるために用いられる。

#### 1-3-1. Bulk 窒素安定同位体比分析

現在生態学で広く用いられている窒素安定同位体比分析は、生物体全体もしくは一部組織に含まれる窒素を対象とする「全窒素安定同位体比分析(Bulk 分析)」が主流である。つまり、体内に存在するタンパク質をはじめ硝酸態や尿素など数多くの窒素含有物を全て分析に用いる方法である。造礁サンゴに関する研究でも、サンゴ礁における窒素固定の役割や(Yamamuro et al., 1995)、人為的窒素負荷がサンゴに与える影響(Heikoop et al., 2000a)、サンゴの生息深度と同位体比の変化(Alamaru et al., 2009)など、数多くの研究でこの分析技術が用いられてきた。この Bulk 窒素同位体比(以下  $\delta^{15}\text{N}$  と記す)は生物の栄養段階の推定によく用いられ、その推定式が式(2)である(Minagawa and Wada, 1984)。

$$\text{TL}=(\delta^{15}\text{N}_{\text{TL=n}}-\delta^{15}\text{N}_{\text{TL=1}})/3.3+1 \quad (2)$$

TL は栄養段階(Trophic Level)を意味し、対象生物の  $\delta^{15}\text{N}$  を  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TL=n}}$ 、その生態系におけ

る一次生産者の  $\delta^{15}\text{N}$  を  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TL}=1}$  と表す。この関係式はこれまでに多くの研究で用いられてきたが、同時に以下のような問題点も存在することが以前から議論の対象になってきた。

(1)食物連鎖に伴う 3.3‰ という  $\delta^{15}\text{N}$  の濃縮係数は経験的な平均値であり、大きな幅を持つ。DeNiro and Epstein(1981)によるとこの値は-0.5~+9.2‰、Minagawa and Wada(1984)によると+1.3~+5.3‰の幅を持つとされている。

(2)一次生産者（海洋では主に植物プランクトン）の  $\delta^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TL}=1}$ ) は場所や季節によって大きな変動を示すため (Roff, 2000)、代表的な同位体比を得ることが難しい。

これらの問題点により、Bulk 同位体比分析では栄養段階を正確に見積もることが難しく、この方法に代わる新しい技術の確立が求められてきた。

### 1-3-2. アミノ酸窒素安定同位体比分析

生物体を構成しているタンパク質は約 20 種のアミノ酸から成り立っており、このアミノ酸の窒素安定同位体比に注目して生態学の解析に用いる試みは 1960 年代から行われていたが(Gaebler et al., 1966、Macko et al., 1986、Macko et al., 1987)、当時はその分析技術が一部の技術者にしか使えない非常に特殊な方法であったため、その有用性にも関わらず広く利用されることはなかった。しかし近年ガスクロマトグラフィーと燃焼・還元炉、質量分析計が組み合わされた GC/C/IRMS が開発されたことにより、近年生態学を中心とした様々な研究分野でこの方法が利用されるようになってきている(McClelland and Montoya, 2002、Chikaraishi et al., 2007、Chikaraishi et al., 2009)。

この方法を用いる利点はいくつかあるが、まず原理としてアミノ酸は生物体内で  $^{15}\text{N}$  濃縮が起こるメカニズムが明確だということが挙げられる。これまでの Bulk 同位体比を用いた解析では栄養段階が 1 つ上がるにつれて  $\delta^{15}\text{N}$  が約 3.3‰ 上昇するという経験則が前提となっていたが、同位体分別が起こるメカニズムの詳細はわかっていなかった。一方、生物体組織のアミノ酸はその代謝過程の際に同位体分別が起こることが生化学的根拠に基づき確認されている (Fig 1.1)。

メチオニンとフェニルアラニン以外のアミノ酸（グルタミン酸やアラニンなど；下式(3)の x）は、代謝の初期反応の際にアミノ基( $\text{NH}_4^+$ )の脱離が起こる。そしてその際に  $^{14}\text{N}$  が多く存在する軽いアミノ基が選択的に脱離するため、残ったアミノ酸は相対的に  $^{15}\text{N}$  に富み、そしてその  $^{15}\text{N}$  濃縮の程度（濃縮係数）はアミノ酸の種類により特異的なものである(Macko et al., 1986)。一方フェニルアラニンとメチオニン（下式(3)の y）の代謝初期反応ではアミノ基の脱離が生じないため同位体分別が起こらず、 $\delta^{15}\text{N}$  はほぼ変化しない。した

がって食物連鎖が進むにつれ、 $x$  と  $y$  のアミノ酸の同位体比の差は次第に大きくなる。

次にアミノ酸窒素同位体比と栄養段階の関係について述べる。 $^{15}\text{N}$  濃縮が起こるアミノ酸と起こらないアミノ酸があるという原理を利用して栄養段階を推定する式を以下に示す(式(3)) (McClelland and Montoya, 2002、Chikaraishi et al., 2007)。

$$\text{TL}_{x/y} = (\delta^{15}\text{N}_x - \delta^{15}\text{N}_y - \beta_{x/y}) / (\Delta_x - \Delta_y) + 1 \quad (3)$$

$$\beta_{x/y} = \delta^{15}\text{N}_{\text{生産者 } x} - \delta^{15}\text{N}_{\text{生産者 } y}$$

$$\Delta_x = \delta^{15}\text{N}_{\text{捕食者 } x} - \delta^{15}\text{N}_{\text{非捕食者 } x}, \quad \Delta_y = \delta^{15}\text{N}_{\text{捕食者 } y} - \delta^{15}\text{N}_{\text{非捕食者 } y}$$

$\delta^{15}\text{N}_x$  は測定した生物の  $^{15}\text{N}$  濃縮が大きいアミノ酸の  $\delta^{15}\text{N}$  を、 $\delta^{15}\text{N}_y$  は  $^{15}\text{N}$  濃縮がほとんど起こらないアミノ酸 (フェニルアラニン、メチオニン) の  $\delta^{15}\text{N}$  を表わす。 $\beta_{x/y}$  は一次生産者 (海洋では主に植物プランクトン) における両者の差を、 $\Delta_x$  と  $\Delta_y$  は  $x(y)$  が栄養段階が 1 つ上がるとどの程度アミノ酸の  $^{15}\text{N}$  濃縮が起こるのかという濃縮係数を示しており (Fig 1.2)、 $\text{TL}_{x/y}$  はこれらの値から求められる対象生物の栄養段階である。 $\beta_{x/y}$  と  $(\Delta_x - \Delta_y)$  はすでに先行研究によって求められている (Table 1.1)。

以下この新しい分析方法を用いる利点を説明する。

- (1). 一次生産者の同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TL}=1}$ ) は必要なく対象生物の値のみで栄養段階を推定できる。
- (2). Bulk 同位体比を使った場合に問題となる濃縮係数 (3.3‰) の変動に対し、多くの生物でアミノ酸の濃縮係数 ( $=\Delta_x, \Delta_y$ ) は変わらない。

(1) は従来の Bulk 分析で問題であった生産者の同位体比 (式(3)中の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TL}=1}$ ) が求めにくいという欠点を根本的に解決している。実際の分析ではそれぞれのアミノ酸のピークが他のアミノ酸のピークと重ならないことや、濃縮係数が大きいこと、比較的生物体内に多く存在することなどの理由により、アミノ酸  $x$  にグルタミン酸 (Glu)、 $y$  にフェニルアラニン (Phe) が用いられる傾向がある。式(3)に両者を使用した場合、

$$\text{アミノ酸 TL}_{\text{Glu/Phe}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1 \quad (4)$$

となり (Chikaraishi et al., 2009)、対象生物の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$  と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  の値さえわかれば栄養段階が推定できる。さらにこの式で計算した栄養段階は、Bulk 同位体比で計算した栄養段階に比べ正確性が非常に増している (Chikaraishi et al., 2009)。

また(2)の利点からも、さまざまな環境での生態系の構造解析や過去の環境変動の復元などの研究に対して重要なツールとなり得る。

しかし問題点も存在し、分析を行うまでのサンプル処理 (誘導体化等) に手間がいることや分析に時間がかかること (1 サンプル約 1 時間)、また研究例が不足していることから (Schmidt et al., 2004、McCarthy et al., 2007、Lorrain et al., 2009)、今後更なる研究の発展が望まれている。

#### 1-4. 本研究の目的

近年、人口増加や土地開発に伴い世界各地で沿岸域の富栄養化が進行しており、それはサンゴ礁においても例外ではない。また地球温暖化に伴う海水温の上昇の影響も受け、現在世界中に生息している造礁サンゴのおよそ 1/3 近くの種が絶滅の危機に瀕している。しかしこのような環境変化に対するサンゴの応答の仕組みについては不明な点が多い。

これまでも陸起源の DIN を多く含み富栄養化が進む海域に生息するサンゴは、貧栄養な海域に生息するサンゴに比べ著しく高い  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  を持つことが報告されているが (Heikoop et al., 2000a)、富栄養化に伴うサンゴの窒素源の変化に関しては調べられていない。また 1-2 で述べたようにサンゴの窒素源についての研究はこれまでも数多く為されており、動物プランクトンの捕食以外にもシアノバクテリアによる窒素固定 (Yamamuro et al., 1995, Lesser et al., 2007)、DIN や DON の溶存態窒素の取り込み (Grover et al., 2008) 等が報告されているが、サンゴが実際にどの窒素源を最も利用しているのかは未だ詳しくはわかっていない。

そこで本研究では、近年開発された“アミノ酸窒素安定同位体比”を利用した栄養段階解析手法がサンゴにも適用できるのか飼育実験で検証し、それを利用して現場に生息するサンゴの栄養段階を推定し、実際に窒素源として何に依存しているのか、またそれは種の違いや富栄養化の影響によってどのように変化するのかを解明することを目的としている。

またサンゴ組織と同時に共生藻の同位体比も測定することにより、これまで未解明な点が多く残されてきた両者の間での窒素の循環メカニズムを解明することも目的の 1 つとする。

特に本研究では過去の研究例を踏まえた上で以下の 2 つの仮説を立て、これらを検証していくこととした。

.....  
仮説 1: 従来考えられてきたようにサンゴ組織と共生藻の間の窒素循環が DIN を介してのみによって起こっているならば、共生藻にはサンゴが捕食した動物プランクトン由来の窒素のうち、代謝産物である  $\text{NH}_4^+$  のみが移行して利用される。したがって共生藻の栄養段階は常に TL=1 であり、捕食の依存度に従って栄養段階が上昇するサンゴ組織との間に栄養段階の差が生じる。

仮説 2: DIN の流入によって富栄養化した海域に生息しているサンゴは、貧栄養海域のサンゴに比べ利用できる DIN が豊富に存在するため、窒素源として DIN に大きく依存し、窒素固定および動物プランクトンの依存度は相対的に小さくなる。  
.....



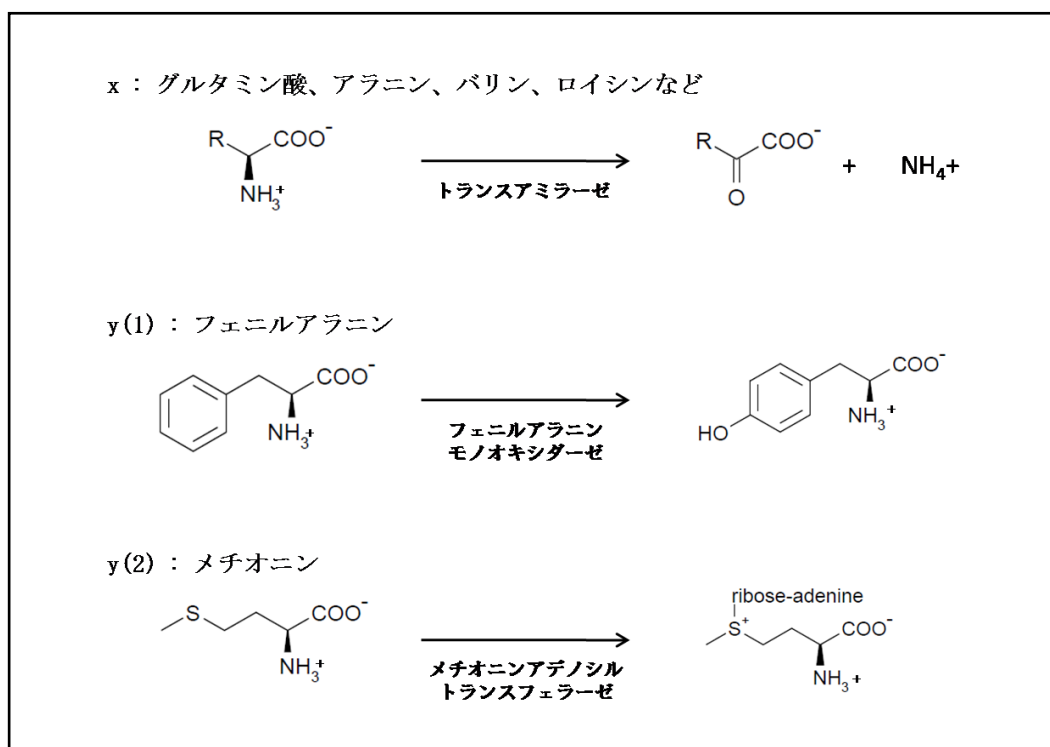


Fig 1.1 アミノ酸代謝による窒素の同位体分別機構

グルタミン酸などのアミノ酸グループ x とフェニルアラニン、メチオニンの初期代謝経路 (参照 : Chikaraishi et al., 2007)

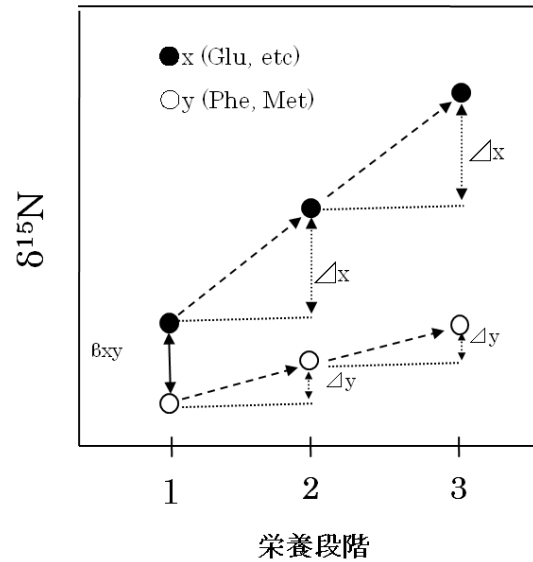


Fig 1.2 栄養段階と  $^{15}\text{N}$  濃縮の関係図

(参照 : Chikaraishi et al., 2009)

Table 1.1 それぞれのアミノ酸のフェニルアラニンを基準とした  $\beta$  (一次生産者の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  の差) と各アミノ酸の  $^{15}\text{N}$  の濃縮係数( $\Delta$ ) (McClelland and Montoya, 2002、Chikaraishi et al., 2009)

アミノ酸	$\beta_{\text{x-Phe}}$	$\Delta$
アラニン	$3.2 \pm 1.2$	$6.1 \pm 2.1$
グリシン	$-2.3 \pm 3.4$	$3.7 \pm 3.9$
バリン	$4.6 \pm 1.2$	$5.0 \pm 1.7$
ロイシン	$2.3 \pm 1.6$	$4.8 \pm 2.0$
イソロイシン	$2.9 \pm 0.8$	$4.8 \pm 1.7$
プロリン	$3.1 \pm 1.7$	$6.1 \pm 1.6$
セリン	$-4.6 \pm 2.2$	$3.6 \pm 3.0$
メチオニン	$-2.0 \pm 0.6$	$0.5 \pm 0.6$
グルタミン酸	$3.4 \pm 0.9$	$8.0 \pm 1.2$
フェニルアラニン	—	$0.4 \pm 0.5$

## 【第2章：試料および方法】

### 2-1. 造礁サンゴの採取と調査地概要

実験で用いた造礁サンゴは、石垣島（24°19'37"N、124°4'20"E）周辺で2009年6-7、8-9月、2010年1-2、5-6、8-9月に行われた計5回の現地調査の際に採取した(Fig 2.1)。また2010年9月には、石垣島と西表島の間に存在する日本最大のサンゴ礁域である石西礁湖でも採取した。石垣島は周囲を発達した裾礁に囲まれており、特に白保礁池（24°21'52"N、124°15'17"E）は海中公園地区に指定されるなど非常に多種多様なサンゴが生息している。しかし近年、新空港の建設や河川改修などの土地開発事業が行われており、赤土流出や栄養塩負荷による生態系への影響が懸念されている。

今回の調査ではサンゴの窒素源と環境負荷との影響を見るために、白保礁池の中の数地点のほかに、河川水の影響を受ける轟川河口周辺（24°23'46"N、124°15'18"E）、外洋と礁内との間の海水の通り道であるトゥール口付近（24°25'23"N、124°15'21"E）、島北部に位置し周辺に家屋が存在しない吉野浜（24°34'20"N、124°17'53"E）や平久保（24°35'42"N、124°18'39"E）、市街地に近く下水流入の影響が予想される大浜海岸（24°20'22"N、124°11'56"E）など様々な採取地点を設けた（Fig 2.1）。白保礁池内のP1、P2とはそれぞれその場所の目印となるポール1、ポール2を意味する。礁嶺とはサンゴ礁内と外洋を隔てている浅い場所のこと。また竹富島北および小浜島西は石西礁湖内に位置する。採取深度は干潮時で、白保P1、白保浜とP1の中間、大浜海岸、吉野、平久保で-1m、白保浜付近、白保礁嶺付近で-0.5m、白保P2、轟川河口流域、トゥール口、竹富島北で-2m、小浜島西で-5mである。

採取した造礁サンゴは、ミドリイシ科の *Acropora pulchra*（オトメミドリイシ）、*A. digitifera*（コユビミドリイシ）、*A. vauhani*（ボーンミドリイシ）、*A. clathrata*（サンボウミドリイシ）、ハマサンゴ科の *Porites lutea*（コブハマサンゴ）、*P. cylindrica*（ユビエダハマサンゴ）、アオサンゴ科の *Heliopora coerulea*（アオサンゴ）、ククメイシ科の *Favites chinensis*（シナキクメイシサンゴ）の8種である。種の同定は「フィールド図鑑・造礁サンゴ」（西平, 1988）などを参考に行った。また各地点の海水中のPOM（懸濁態有機物）を採取するため、20L容ポリタンクを用いて採水した。

## 2-2. 造礁サンゴの処理方法

採取したサンゴ片（直径 5cm 程度）は石垣島の市街地に近い国際サンゴ礁研究・モニタリングセンターに直ちに持ち帰り、当実験施設で処理をした。サンゴの処理方法は田中(2005)に改良を加えた方法で行った。

まずサンゴを GF/F フィルターで濾過した海水（以下濾過海水とする）30mL の中で、金属製のブラシを使って表面を擦り骨格からサンゴ組織＋共生藻を剥がした。次にその懸濁液を遠心用ポリチューブに移し、3000rpm, 6min 遠心分離し、サンゴ組織（上澄み懸濁液）と共生藻（ペレット状沈殿物）に分離させた。さらにサンゴ組織（上澄み懸濁液）を別の遠心チューブに移し、残った共生藻をもう一度濾過海水に懸濁させてそれぞれ遠心した。この作業はサンゴ組織と共生藻を確実に分離させるために 1~2 回繰り返した。その後分離したサンゴ組織を 50mL ポリビンに移して -20°C で凍結保存した。共生藻は 30mL の濾過海水に懸濁させ、あらかじめ加熱処理（450°C, 3h）しておいた 27mm の GF/F フィルターを用いて、1mL をクロロフィル a 分析用、1mL をアミノ酸濃度分析用、2mL を Bulk 同位体比分析用に濾過し、残りの懸濁液をもう一度遠心しペレット状にしてアミノ酸同位体比分析用とし、遠心チューブに保存しそれぞれ凍結保存した。クロロフィル a 分析用フィルターはザルステッドチューブに入れ、6mL の N,N-ジメチルホルムアミドを加えアルミホイルに包み遮光して分析まで凍結保存した。POM 用に採水した海水は、47mm GF/F フィルターを用いて濾過し（およそ 10L）、フィルター上に集めた POM は凍結保存した。

## 2-3. 全有機炭素・窒素（Bulk）安定同位体比分析

凍結保存したサンゴ組織液試料を凍結乾燥機にかけて 2 日間かけて完全に水分を飛ばした。乾燥させたサンプルを粉末状にし、約 60mg を銀製のコンテナーに入れた。共生藻の Bulk 同位体比分析用 GF/F フィルター試料は 40°C の乾燥機内で 2 時間放置し乾燥させた。その後 12N HCl を入れたビーカーを専用の容器の中に置き、その中に両サンプルを入れ塩酸蒸気で 2 日間かけて無機炭素除去を行った。塩酸処理後、数日間吸引乾燥機の中で乾燥させ分析に用いた。

分析は Conflo-III に接続した元素分析計/安定同位体比質量分析計（EA/IRMS : ThermoFinnigan、Delta plusXP）で行った。使用した標準試薬は Histidine(昭光通商:IS 用)で、測定精度は±0.2‰程度である。

## 2-4. アミノ酸窒素安定同位体比分析

### 2-4-1. アミノ酸の誘導体化

2-3 で乾燥させたサンゴ組織と同様に、共生藻のアミノ酸同位体比分析用サンプルも凍結乾燥機を用いて乾燥させた。

アミノ酸の誘導体化の方法は、Metges et al. (1996) を改良した Chikaraishi et al. (2007) に基づいて行った。それぞれのサンプルを適量（個々のアミノ酸に対し 0.2 $\mu$ mol N 必要）を 5mL 容リアクティブバイアルに量り入れ、12N HCl を 1mL 加え 110°C で 12 時間加水分解した。加水分解後、1mL ジクロロメタンをバイアルに加えて転倒混和し、上層（塩酸+アミノ酸）を石英ウール入りパスツールピペットを通して濾過し、新しいバイアルで受けた。ジクロロメタンが残存する元のバイアルに蒸留水（Milli-Q）を加え再分離させた上層を取って濾過し、先程の新しいバイアルに加えた。次にそのバイアルの中にヘキサン/ジクロロメタン（v:v=5:6）になるようにヘキサンを加え、上層（ヘキサン+ジクロロメタン+脂質）を取り除き（脱脂）、60°C に加温し N<sub>2</sub> を吹き付け、水+塩酸を蒸発させた。水層を完全に蒸発させたバイアルに 2-プロパノール/塩化チオニル（v:v=4:1）を 1mL 加え、110°C で 2 時間加熱したあと、60°C に加温し N<sub>2</sub> を吹き付け未反応溶液を蒸発させた。その後ジクロロメタンと塩化ピバロイルをそれぞれ 0.5mL ずつ加え、110°C で 2 時間加熱したあと、60°C に加温し N<sub>2</sub> を吹き付け未反応溶液を蒸発させた。ここまでの工程でアミノ酸は誘導体化されて、水に溶けずに有機溶媒に溶けるようになる。誘導体化されたアミノ酸にジクロロメタンを約 1mL、水を約 1mL、ヘキサンを約 1.5mL 加えて転倒混和させ、上層（有機溶媒層）を取って新しい試験管に移し、50°C に加温し N<sub>2</sub> を吹き付けジクロロメタン/ヘキサンを蒸発させた。アミノ酸残渣にジクロロメタンを加えて溶かし、GC 用バイアルに移し濃度調整をした。

### 2-4-2. 分析

$\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  はガスクロマトグラフィー（GC-6890, Thermo Fisher）、燃焼-還元炉（Combustion, Thermo Fisher）を繋いだ同位体比質量分析計（Delta plus XP, Thermo Fisher）で測定した（GC/C/IRMS）。誘導体化したアミノ酸を溶かしたジクロロメタンを適量（0.5-2mL）、splitless mode、インジェクション温度 250°C で GC に打ち込んだ。キャピラリーカラム（ULTRA-2; 50m  $\times$  0.32mm; film thickness, 0.52 $\mu$ m; Agilent Technology）を取り付けたオーブンの昇温条件は以下のように設定された： 初期温度 40°C、4 分保持、4°C/min で 110°C まで昇温、13°C/min で 150°C まで昇温、11°C/min で

220℃まで昇温、13分保持、30℃/minで260℃（最終温度）まで昇温、6分保持、その後冷却。Heガスの流量は1.5mL/min、燃焼炉と還元炉の温度はそれぞれ950℃と550℃に設定した。導入されたアミノ酸はそれぞれ燃焼炉でCO<sub>2</sub>・NO<sub>x</sub>・H<sub>2</sub>Oに酸化分解され、還元炉でNO<sub>x</sub>がN<sub>2</sub>に還元される。H<sub>2</sub>OとCO<sub>2</sub>は透水フィルターと液体窒素トラップで除去した。測定可能なアミノ酸は、アラニン(Ala)、グリシン(Gly)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、プロリン(Pro)、アスパラギン酸(Asp)、トレオニン(Thr)、セリン(Ser)、メチオニン(Met)、グルタミン酸(Glu)、フェニルアラニン(Phe)の12種であった。ただしグルタミン、アスパラギンは加水分解によってそれぞれGlu、Aspに酸化されてしまうため、本法によってこれらの成分を分離定量することはできない。標準試薬は、同位体比が判明している上記の12種類の単アミノ酸試薬（和光）を一つにまとめて誘導体化した試料を用いた。繰り返し測定精度は±0.5%程度である。また今回の分析ではProとMetは測定精度が低く信頼性に欠ける結果となったため、データとして用いなかった。

#### 2-4-3. 栄養段階の推定精度

対象試料の栄養段階の推定は、測定したそれぞれのアミノ酸の同位体比を式(3)に用いることで求められる。式(3)中のアミノ酸xを変えてそれぞれのアミノ酸で栄養段階を推定した時の誤差は（アミノ酸yにはPheを用いる）、Glu : 1σ=0.12、Gly : 1.05、Ser : 0.77、Ala : 0.23、Val : 0.28、Ile : 0.24、Pro : 0.26であり、Gluを用いて推定した栄養段階が最も誤差が小さい(Chikaraishi et al., 2009)。そのため本研究の栄養段階の推定にはGluとPheの同位体比を用いた式(4):  $TL_{Glu/Phe} = (\delta^{15}N_{Glu} - \delta^{15}N_{Phe} - 3.4) / 7.6 + 1$ を用いた。また本研究では同じ試料を3回分析しているが、その分析間での栄養段階の誤差は1σ=0.04~0.12であった（結果の図表：Table 3.3, 3.4, 3.6 参照）。

#### 2-5. 栄養塩分析

海水中の栄養塩濃度を測定するために、各サンゴ採取地点でスピッツを用いて採水した。硝酸(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、亜硝酸(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、アンモニア(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)、リン酸(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)、ケイ酸(SiO<sub>2</sub>)の濃度分析は栄養塩自動分析装置（BRAN+LUEBBE、AACS-Ⅲ）を用いて測定した。

## 2-6. 造礁サンゴの飼育実験

既往研究によってプランクトン群集を対象に得られたアミノ酸窒素安定同位体比を用いた栄養段階の推定式(4) :  $TL_{Glu/Phc} = (\delta^{15}N_{Glu} - \delta^{15}N_{Phc} - 3.4) / 7.6 + 1$  が造礁サンゴにも適用できるかを検証するため、2010年8-9月に20日間石垣島で飼育実験を行った。実験に用いたサンゴは *Acropora pulchra* (オトメミドリイシサンゴ) と *Porites cylindrica* (ユビエダハマサンゴ) の2種で、*P.cylindrica* は白保礁池の第1ポール付近、*A.pulchra* は第2ポール付近で採取し、採取したサンゴは直ちにモニタリングセンターに持ち帰った。

飼育用海水はモニタリングセンター近辺で採水した海水(栄養塩濃度;  $NO_3^- = 1.00\mu M$ 、 $NO_2^- = 0.10\mu M$ 、 $NH_4^+ = 0.15\mu M$ 、 $PO_4^{3-} = 0.10\mu M$ 、)を、孔径  $0.2\mu m$  のカートリッジフィルター(ADVANTEC, TOCEL®)で濾過したものを使用した。サンゴ片は容量12L(高さ30cm)のプラスチック製の水槽に、水面下約5cmと20cmの位置にナイロンワイヤーで吊るした。使用した水槽は6個でそれぞれの水槽にサンゴ各種7個体ずつ吊るした。餌にはアルテミア(節足動物の一種で体長は1mm程度、クラゲなどの飼育実験にも用いられる)を用いた。今回の飼育は日光(共生藻による光合成)の有無、また餌の捕食の有無でサンゴの利用できる栄養源の違いをつくりだし、それによるサンゴと共生藻の同位体比の変化の差を見ることが目的であるため以下の3つの実験系に分けた。

A: 日光に当て餌も与える。

B: 日光には当てるが餌は与えない。

C: 完全遮光し餌は与える。

実験系AとBは屋外に設置し、透明コンテナの底にレンガを敷いてその上に水槽を置き、コンテナの中に水道水を貯めて冷却装置で現場の水温に近い温度に保った(26-29℃)。実験系Cは27℃に保たれた屋内で青色コンテナの中に水槽を置き、必要時以外は完全に遮光した。水槽の中の海水は、毎日17時頃に新しいものに取り換えた。また水槽内の海水は常時スターラーで攪拌した。餌のアルテミアは卵1000mgを前日に海水に付けておき、孵化させた個体を毎日水槽内の海水を交換した直後に添加した。飼育サンゴのサンプリングは2日間隔で( $t=0\text{day} \sim 20\text{day}$ )15時に行い、採取後直ちに2-2で示した方法でサンゴ組織と共生藻に分け処理をした。ただし飼育中に数個体死亡が確認されたため、予定していた全ての日程でサンプリングを行うことはできなかった。最終的にはA:16日、B:20日、C:14日で実験を終えた。

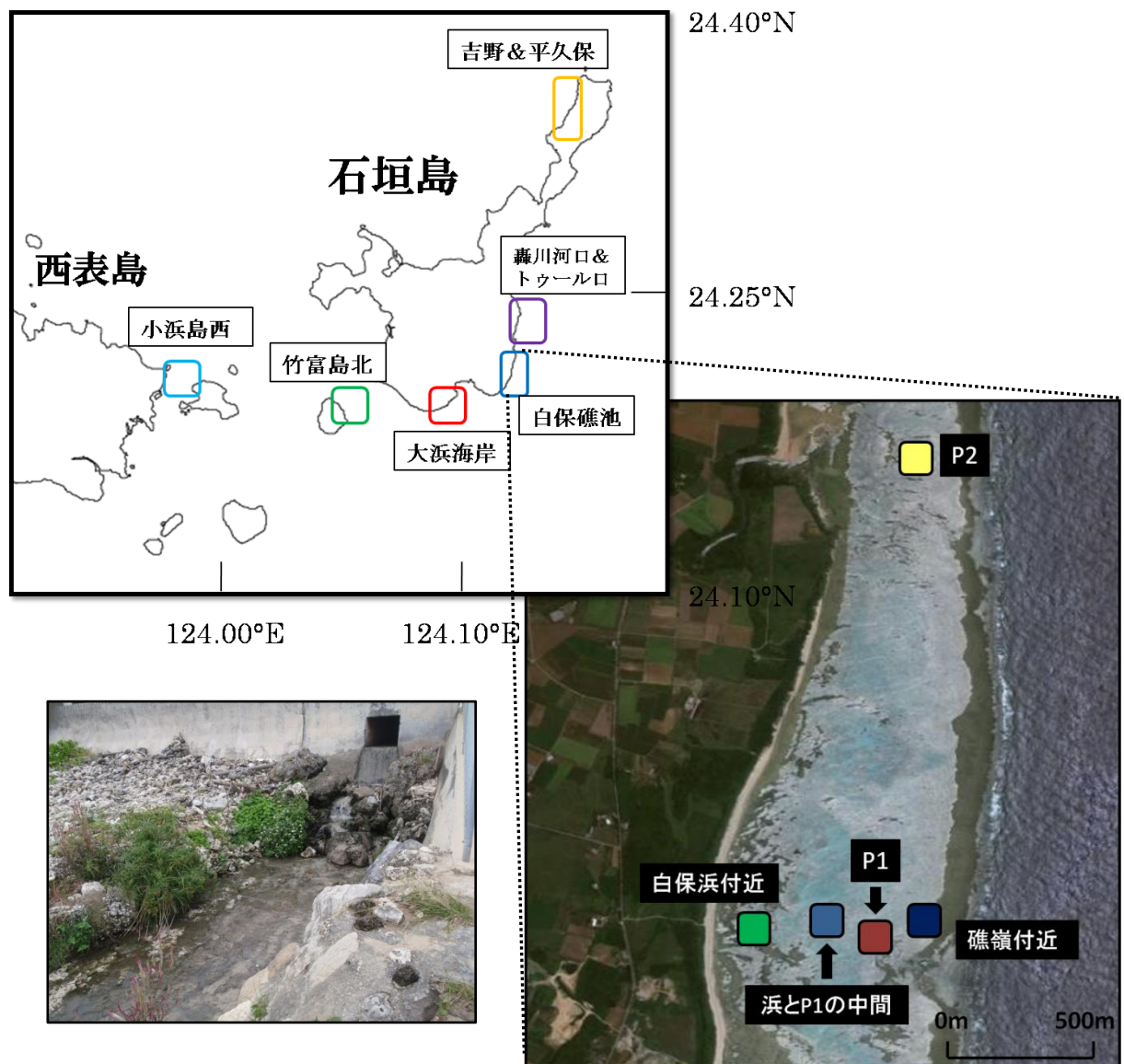


Fig 2.1 石垣島周辺のサンプリング地点および白保礁池の詳細図

2009 年、2010 年にサンゴの採取を行った 12 地点

注：左下の写真は白保海岸の下水流入の現場



### 【第3章 結果および考察】

#### 3-1. 飼育実験による造礁サンゴに対するアミノ酸窒素安定同位体比手法の適用検証

アミノ酸窒素安定同位体比分析はこれまでに様々な生物に適用されており、多くの生物では 1-3-2 で示した式(4)：アミノ酸  $TL_{Glu/Phe} = (\delta^{15}N_{Glu} - \delta^{15}N_{Phe} - 3.4) / 7.6 + 1$  を用いた栄養段階の推定が可能となっている。しかしこの式が適用できる条件として、ある生物が餌を捕食した際に一般に  $^{15}N$  濃縮が起こるとされるアミノ酸(1-3-2 参照)で実際に同程度の濃縮が起こっていることが必要であり、この条件を満たさない生物ではこの式は用いることができない。実際に町田（未発表）によると、*Aurelia sp.*（ミズクラゲ）をポリプの段階から飼育しアルテミアを餌に与えて成長させても Glu に対しほとんど  $^{15}N$  濃縮が起こらないことが確認されている（<1‰）。そのため造礁サンゴでも  $^{15}N$  濃縮が起こるか検証する必要があり、飼育実験を行った。

飼育に用いたサンゴは *A. pulchra* と *P. cylindrica* の 2 種である。しかし *P. cylindrica* は目視でポリプを出して餌を捕食していることが確認されず、Bulk 同位体比分析の結果も  $\delta^{15}N$  はほとんど変化がみられなかったため、アミノ酸の窒素安定同位体比（以下  $\delta^{15}N_{AA}$ ）の分析は行わなかった。一方 *A. pulchra* はサンゴ組織、共生藻ともに系 A,C で  $\delta^{15}N_{bulk}$  の上昇が確認されたため（サンゴ組織：2.6‰ → A:3.3‰, C:4.0‰、共生藻：2.2‰ → A:3.1‰, C:3.8‰）（Fig 3.1）、A、B、C それぞれの系の最終日の *A. pulchra* を用いて  $\delta^{15}N_{AA}$  を測定した（Table 3.1、Fig 3.2）。その結果、餌（アルテミア： $\delta^{15}N_{bulk}=12.4‰$ 、 $\delta^{13}C_{bulk}=-21.8‰$ ）を与えていた系 A,C のサンゴは大部分のアミノ酸で  $\delta^{15}N$  が上昇しており、特に遮光した系 C では大きく上昇していた。

その理由としては、自然界のサンゴや共生藻は炭素源の大部分を共生藻による光合成に依存しているが（Muscatine et al., 1984）、遮光した場合はその炭素供給経路がなくなり餌の捕食によって炭素を補おうとしたためと考えられる。そしてそれに伴いアルテミア由来の同位体比の窒素も体内に増加したため、サンゴや共生藻の  $\delta^{15}N$  も上昇したと推測される。実際 Falkowski et al.(1984)によると暗所に置かれた造礁サンゴは栄養のおよそ 60% を捕食によって得ていると計算している。一方餌を与えず光合成のみに依存していた系 B のサンゴは、飼育初期（t=0）から 20 日間まで  $\delta^{15}N_{AA}$  の変化が見られなかった。

サンゴ組織の培養開始前（t=0）とアルテミアのみを餌に与えた系 C の t=14 の場合を比較すると、 $\delta^{15}N_{Glu}$  は 6.2‰から 9.4‰に上昇しているのに対し、 $\delta^{15}N_{Phe}$  は 3.1‰から 3.2‰とほとんど変化していなかった（Table 3.1）。栄養段階の推定式(4)がこの場合に当てはまる

としてこれらの値からサンゴの栄養段階を計算すると、

$$t=0 : TL=(6.2-3.1-3.4) / 7.6 + 1 = 0.97$$

$$t=14(C) : TL=(9.4-3.2-3.4) / 7.6 + 1 = 1.37$$

が得られ、栄養段階が 0.4 程上がっていることが示唆される。また共生藻も同様に栄養段階が 0.95(t=0)から 1.33(C:t=14)と上昇傾向がみられた。今回の飼育実験でサンゴ組織とともに共生藻の栄養段階も上昇したことは、1-4 で示した“仮説 1”とは異なる結果を示しており、この結果は 3-2 で詳しく考察する。

以下の検証は、本来餌であるアルテミアのアミノ酸の同位体比も測定してサンゴ独自の<sup>15</sup>N 濃縮係数を求める必要があるが、現段階ではそのデータが得られていないため暫定的な検証に留めておく。

アルテミアの栄養段階が 3 と仮定すると、サンゴがアルテミアの捕食だけで窒素を獲得している場合はサンゴの栄養段階は 4 となるはずである。t=0 のサンゴは TL=0.97 なので、t = 14 までにアルテミアの捕食による窒素でサンゴ組織の窒素の x%が置換されたとすれば、t = 14 の時点でのサンゴ組織のアミノ酸の同位体比から推定されるサンゴの栄養段階 TL<sub>coral</sub> は次の式で与えられるはずである。

$$TL_{coral}=(1-x/100) \times 0.97 + x/100 \times 4$$

系 C の最終日のサンゴでは左辺=1.37 なので、置換率 x≒13%と求められる。

一方、餌に用いたアルテミアの δ<sup>15</sup>N<sub>bulk</sub> は 12.4‰であり、捕食に伴う Bulk 窒素同位体比の濃縮係数を 3.3‰と仮定すれば、アルテミアの捕食だけで窒素を獲得しているサンゴの同位体比は、δ<sup>15</sup>N<sub>bulk,coral</sub>=12.4+3.3=15.7‰となると予想される。t=0 のサンゴの δ<sup>15</sup>N<sub>bulk</sub> は 2.6‰なので、y%の窒素がアルテミアの捕食による窒素に置換された場合のサンゴの同位体比は次式で与えられることになる。

$$\delta^{15}N_{bulk,coral}=(1-y/100) \times 2.6 + y/100 \times 15.7$$

系 C の最終日(t=14)では左辺=4.0‰なので、y≒11%と計算される。

以上から、先行研究の<sup>15</sup>N 濃縮係数を用いた式(4)による栄養段階の計算からサンゴの窒素の置換率(x)を求め、もう一つ独立した別の指標として Bulk 窒素安定同位体比の変化から窒素の置換率(y)を求めた結果 x と y は近い値を示したので、式(4)を用いてサンゴの栄養段階を求めることには大きな問題はないことが示唆された。そこで以下では式(4)を用いて計算される TL<sub>coral</sub> の値をそのサンゴの平均的な食物段階を反映しているものと解釈して議論を進めることにする。

### 3-2. サンゴ組織と褐虫藻の共生関係

#### 3-2-1. Bulk 同位体比分析から見た共生関係

石垣島周辺の 12 地点の調査地点 (Fig 2.1) で生息しているサンゴを数種類採取し、同じ断片から分離したサンゴ組織と共生藻の Bulk 窒素安定同位体比 (以下  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  とする) と炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) をそれぞれ求めた (Table 3.2)。各種類について地点毎に 3-11 片のサンゴを採取した (同じ地点で複数回採取を行った種もあるためばらつきがある)。サンゴ片から回収してサンゴ組織と分離した共生藻のクロロフィル a 濃度と、回収できずサンゴ片に残った共生藻のクロロフィル a 濃度から、サンゴの骨格からの回収率を計算したところおよそ 10~25%であった。またサンゴ組織試料についてもクロロフィル a 濃度を測定した結果ほとんど検出されなかったため、本研究の分離方法による共生藻の混入は無視できる量であることが確認された。

サンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  をそれぞれ測定して結果、サンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  は 1.6~8.2‰の、共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  は 2.3~7.5‰の範囲で変動し、この値は Heikoop et al. (2000b)で報告されている造礁サンゴの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  (1.7-8.3‰) とほぼ等しかった (Fig 3.3)。この得られた変動は主に生息場所によるもので、外洋に位置する石西礁湖や河川水の影響がある轟川河口付近、下水の流出が見られる大浜海岸を含む環境の大きく異なる生息環境の特徴が表れた結果である。地点間の変動については 3-4 で詳しく考察する。

同一のサンゴ片から分離したサンゴ宿主組織 (以下、サンゴ組織) と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  は互いに近い値を示し ( $y=1.04-0.929x$ ,  $r^2=0.82$ ,  $p<0.0001$ ,  $n=147$ )、その関係は種や地点間の違いによらず常に認められた。これは、サンゴ組織と共生藻の間で窒素を緊密にリサイクルしている結果であると解釈されているが (Roberts et al., 1999)、リサイクルの機構については詳しくはわかっていない。Muscatine and Kaplan (1994)によると浅い場所 (1m) で採取した両者の値の差はおよそ 2‰で大きな差はないものの、多くの試料においてサンゴ組織の値の方が共生藻よりもやや高い値を示すと報告している。しかし本研究の結果では、一部の例外を除くサンゴ種 (3-3 参照) や富栄養化の影響がほとんど見られない地点に生息するサンゴの場合、共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の方がサンゴ組織の値よりも有意に高かった (平均 0.9‰,  $p<0.0001$ ,  $n=111$ )。

この両者の値がわずかに異なる要因としては、“サンゴ組織と共生藻の  $\text{NO}_3^-$  に対する利用方法の違い” が考えられる。

サンゴ組織と共生藻はともに海水中から  $\text{NH}_4^+$  や DON (尿素やアミノ酸) を取り込んで窒素源として直接利用できることが知られている (Kawaguti, 1953、Muscatine et al., 1979、Grover et al., 2008)。しかし  $\text{NO}_3^-$  を利用するために必要となる硝酸還元酵素は、共生藻にしか確認されておらず、サンゴ組織が直接  $\text{NO}_3^-$  を利用できるという報告はない

(Webb and Wiebe, 1978, Grover et al., 2003)。共生藻が取り込んだ  $\text{NO}_3^-$  はアミノ酸などの有機物や  $\text{NH}_4^+$  の形に変えられたのち、サンゴ組織にも移行すると考えられるが(田中, 2005, Tanaka et al., 2006)、摂食や窒素固定などの別の窒素源が存在する場合には、サンゴ組織ではそれらに由来する窒素が選択的に利用される一方、 $\text{NO}_3^-$  に由来する窒素は共生藻に選択的に利用され、結果的にサンゴ組織と共生藻とで  $\delta^{15}\text{N}$  が異なってくることが考えられる。地下水由来の人為起源の  $\text{NO}_3^-$  のように  $\delta^{15}\text{N}$  の高い  $\text{NO}_3^-$  が供給されている環境(Umezawa et al., 2002)でこのような現象が起こると、共生藻の方がサンゴ組織よりも  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  が高くなるものと考えられる。

また両者の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の近似関係はサンゴ組織と共生藻の間で密な窒素循環経路が確立しており、両者の窒素源はほぼ同一であることを示唆している(Fig 3.3)。サンゴが動物プランクトンの捕食を積極的に行っている場合、動物プランクトン由来の窒素が共生藻に渡されるメカニズムとしては、サンゴ組織によって一度代謝されてから代謝産物( $\text{NH}_4^+$ )の形で共生藻に移行するという可能性が考えられる。その場合はサンゴ組織と共生藻の間に栄養段階の差がある程度生じることになる。すなわち Minagawa and Wada (1984) の式(2)を使うと、栄養段階が 1 つ上がるにつれて  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  は約 3.3‰ 上昇するため、必ずサンゴ組織の方が高い同位体比を持っているはずである。しかし実際には多くの場合むしろ共生藻の方が若干高い同位体比を持っていることから、

- 1). これらのサンゴは摂食を行っていないか。
- 2). または摂食された餌に由来する窒素がサンゴに代謝される以前のアミノ酸の段階で共生藻と共有されているか。

これら 2 つの可能性のいずれかであると考えなければならない。特に白保サンゴ礁の場合、動物プランクトンの  $\delta^{15}\text{N}$  は 5~6‰ であるとされているので(Yamamuro et al., 1995)、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  が 5‰ より低いサンゴについては動物プランクトンの摂食は主要な窒素源になっていないものと考えられる。

炭素安定同位体比を見ると(Fig 3.4)、サンゴ組織の  $\delta^{13}\text{C}$  は -17.1~-12.1‰、共生藻は -17.0~-11.7‰ の範囲であった。両者の間に有意な近似関係が認められたが( $y=1.02x$ ,  $r^2=0.40$ ,  $p<0.01$ ,  $n=147$ )、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  と比べると生息地点間による顕著な差は見られなかった。主要質となる溶存無機炭素の同位体比の変動、もしくは光合成暗反応に伴う炭素同位体分別の大きさの変動によってもたらされることが考えられるが、いずれが主要な要因であるかは本研究の範囲では明らかにすることができなかった。

### 3-2-2. アミノ酸窒素安定同位体比分析から見た共生関係

次にサンゴ組織と共生藻の栄養共生関係を調べるために、白保礁嶺付近で採取した *A. digitifera* と白保 P1 で採取した *A. pulchra* を使ってサンゴ組織と共生藻のアミノ酸窒素安定同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )を調べた(Table 3.3、Fig 3.5)。その結果、Bulk 同位体比の場合とは対照的に、全体としてサンゴ組織の方が共生藻に比べ高い  $\delta^{15}\text{N}$  を示すアミノ酸が多く見られた。アミノ酸ごとに見ると、サンゴ組織が高い  $\delta^{15}\text{N}$  を持つアミノ酸（特に Ala, Val, Leu, Asp, Glu）は共生藻でも高い値を示し、両者の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  パターンはかなり類似していた。

また種や生息地点が異なる 12 個の試料に対し、式(4)を用いてサンゴ組織と共生藻それぞれの栄養段階を計算したところ、栄養段階に幅があるものの両者の間に有意な正の相関が認められた( $r=0.973$ ,  $p<0.0001$ ,  $n=12$  : Fig 3.6)。

サンゴ組織は動物プランクトンの捕食によってのみ栄養段階(TL)が上昇し、窒素源に対する動物プランクトンの捕食の依存度が増加するにつれて次第に高くなっていく。つまり DIN ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) や窒素固定由来の窒素に 100%窒素源を依存していると、TL=1 になる。したがって、従来考えられているようにサンゴ組織と共生藻の間の窒素循環が DIN を介して起こっているとすると、1-4 で述べた“仮説 1”のように捕食した動物プランクトン由来の窒素はサンゴ組織の代謝産物である  $\text{NH}_4^+$  として共生藻に移行して利用されることになる。この場合、捕食への依存度が上昇するとサンゴ組織の栄養段階は上昇するが、共生藻に関しては個々のアミノ酸の  $\delta^{15}\text{N}$  は上昇しても式(4)によって判定される栄養段階は 1 のまま変化しないはずである。(Fig 3.6 に示した赤線)。しかし実際にはサンゴ組織との間で正の相関が認められ、サンゴ組織とともに共生藻も栄養段階が上昇している。この結果から“仮説 1”は棄却されることになる。

したがって本研究の結果から、従来考えられてきた DIN プールの存在と同様に(Heikoop et al., 1998)、サンゴが捕食によって得た窒素もアミノ酸の段階で共生藻と共有し、共生藻が  $\text{NO}_3^-$  から合成したアミノ酸もサンゴ組織が利用できる、つまり“アミノ酸プール”のようなものがサンゴ体内に存在し、両者の間に密なアミノ酸相利共生関係が成り立っている可能性が示唆された。

また 3-1 の飼育実験の際に、サンゴ組織の栄養段階の変化に伴って共生藻の栄養段階も変化した結果は、サンゴが捕食した動物プランクトン由来のアミノ酸は短期間のうちに共生藻と共有していることを支持している。

### 3-3. 種による造礁サンゴの窒素源の違い

$\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の種差を見るため、Fig 3.3 を採取地点別に分け、さらにサンゴの種別に色分けしてサンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の関係を示した(Fig 3.7)。分類した採取地点は白保礁地や下水の流入が見られる大浜海岸および外洋に位置する石西礁湖であるが、各地点で生息しているサンゴの種類もまた生息環境も多様であるにも関わらず、各地点内で  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  に大きな種差はほとんど見られなかった。しかし白保浜と P1 の中間で採取した *F. chinensis* は例外で、他の種のサンゴに比べ明らかに高い同位体比を示した(サンゴ組織、*F. chinensis* : 6.1‰、*P. cylindrica* : 4.0‰、*H. coerulea* : 3.5‰)。また他の種と異なり、サンゴ組織と共生藻の同位体比を比べるとおよそ 1‰サンゴ組織の方が高い同位体比を持っていた。

Table 3.4 と Fig 3.8 は白保礁池 (P1 および礁嶺付近) で採取した 4 種 (*A. digitifera*, *A. pulchra*, *P. lutea*, *H. coerulea*) のサンゴの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  を分析した結果である。また同時に白保 P1 地点の POM (懸濁態有機物) も分析した。

その結果、*P. lutea* の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Ala}}$ =13.4‰のような他の種類と比較して突出したものもあるものの、全体として種類によらず非常に類似した  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  パターンを示した (Fig 3.8)。これは同地点で採取したサンゴの種間で窒素源に大きな差はないこと、また取り込んだ DIN の利用方法やアミノ酸の合成・代謝経路に大きな違いがないことを示唆している。しかし栄養段階を計算すると、*A. pulchra* の 0.97 から *P. lutea* の 1.39 まで若干の幅をもち、種によって窒素源の中に占める捕食の依存度にある程度の差があることを示している。実際に現場観察でも *P. lutea* は他の種類に比べて活発に触手を出して捕食をしている光景を見ることができるので、他の種類よりも高い栄養段階を示すこの結果は妥当であると思われる。またポリプの大きさと捕食の関係については過去の研究でも意見が分かれているが (Porter, 1976、Yamamuro et al., 1995)、上記で例外とした *F. chinensis* についてはその大きなポリプによって捕食を他の種に比べ積極的に行っていると思われ、それによって特異的に高い同位体比を持つものと考えられる。またサンゴ組織の方が共生藻よりも高い同位体比を持つということは、他の種でも捕食の依存度が増加すればサンゴ組織の方が高い同位体比を持つ可能性があることを示唆している。

次に POM のアミノ酸の同位体比と比較する。POM はデトリタスや動植物プランクトンなどさまざまな有機体の集合体であるが、今回はこの POM をサンゴの捕食対象として仮定して考察を行った。

分析の結果、POM の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  パターンは各サンゴの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  パターンに全体的に類似していた。一方、POM の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  は 0.5‰であったが、同じ場所に生息するサンゴの組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  は 1.2~3.1‰の範囲にあり、アミノ酸同位体比から見た栄養段階が高いサンゴほど  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  が低く POM に近い値となっていた。例えば *A. pulchra* の栄養段階は 0.97 で POM

との  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  の差は 2.6‰ であるのに対して、*P. lutea* の栄養段階は 1.39 で POM との差は 0.7‰ であった。この傾向は以下のように解釈される。

1-3-2 で Phe は  $^{15}\text{N}$  濃縮が起こりにくく、消費者の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  は餌の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  を反映していると述べた。摂食を行うサンゴの主要な餌資源は動物プランクトンと考えられるが、動物プランクトンの餌資源は POM の主要な成分である植物プランクトンであるから、POM の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  は食物連鎖を通してサンゴの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  にまで反映されるはずである。したがって窒素源を摂食に依存する比率の高い(言い換えれば栄養段階の高い)サンゴほど、その  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  が POM のそれに近い値を示すことになる。

このように、対象生物の栄養段階とともにその生態系の中での餌の推定も可能なことも、アミノ酸窒素安定同位体比を用いる大きな利点であると考えられる。

### 3-4. 生息環境の違いによる造礁サンゴの窒素源の変化

#### 3-4-1. Bulk 窒素安定同位体比の地点間の変動

過去の研究においてもサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の地理的变化についての報告は数多くあり、Mendes et al. (1997)や Heikoop et al. (2000a)は、富栄養な環境に生息するサンゴは貧栄養な環境に生息するサンゴよりも 5‰以上高い  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  をもつと報告している。また下水由来の DIN は 10-22‰という非常に高い  $\delta^{15}\text{N}$  を持ち「Heaton (1986)」、Heikoop et al. (2000a)は下水流入による人為的起源の DIN の増加によってサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  が著しく上昇することを示している。このように造礁サンゴにとって DIN は栄養源として重要であり、サンゴの  $\delta^{15}\text{N}$  は DIN のそれをしばしば反映している(Muscatine and Kaplan, 1994、Heikoop et al., 1998、Sammarco et al., 1999)。

本研究で得られた結果も同様の傾向を示し、下水流入の影響のある大浜海岸ではサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  は 5.4~8.2‰ (n=21)、河川水の流入がある轟川流域周辺のサンゴ組織では 5.0~6.0‰ (n=11) の範囲の高い値を常に示したのに対し、陸域の影響の小さい石西礁湖では 1.6~2.9‰ (n=12) の範囲の低い値を示した(Fig 3.9, 3.10)。白保礁地内における傾向を見ると、地下水の流入が見られる白保浜付近(浜からの距離 ; 70m)では 3.2~5.5‰ (n=10)、浜と P1 の中間 (300m) では 3.1~4.3‰ (n=23)、P1 (500m) では 2.1~3.1‰ (n=20)、礁嶺付近 (750m) では 2.0~2.9‰ (n=11) であり(Fig 3.11)、種差はあるものの、浜から礁嶺に近づくにつれてサンゴの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  が次第に低くなる結果が得られた。Umezawa et al. (2002) では石垣島の各地点の大型藻類の  $\delta^{15}\text{N}$  を測定しており、地下水や河川水の流入で陸域の影響がみられる地点の大型藻類は高い  $\delta^{15}\text{N}$  をもち、またその値は

浜から遠ざかるにつれて低くなることを示しており、本研究の結果はサンゴでも大型藻類と同様の傾向をもつことを示唆するものである。

実際、海水中の栄養塩濃度の分析結果と照合すると、栄養塩濃度が高い地点（大浜海岸や轟川河口周辺、白保浜付近）で採取したサンゴほど高い  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  を持つことがわかった (Table 3.5, Fig 3.9, 3.10)。栄養塩濃度が大きく異なる石西礁湖～大浜海岸にかけて 6 地点に対し、 $\text{NO}_3^-$  濃度とそこで採取したサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の間に非常に高い正の相関関係が示された ( $r=0.98$ ,  $p<0.0001$ ,  $n=6$ : Fig 3.12)。

以上のことから、サンゴ組織（＋共生藻）の  $\delta^{15}\text{N}$  を決めている最も主要な要因は、陸域から流入する  $\text{NO}_3^-$  などの DIN 濃度である可能性が高いことが示唆された。

#### 3-4-2. アミノ酸窒素安定同位体比の地点間の変動

次にアミノ酸窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ ) を用いた地点間差を見ていく。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  は *A. digitifera* では大浜海岸>白保礁嶺付近>石西礁湖・竹富島北、*P. lutea* では大浜海岸>轟川河口周辺>白保 P1 の順で高い値を示し、この順序はアミノ酸の種類によらず一貫していた (Table 3.6, Fig 3.13)。この結果はまた、前述で述べた Bulk の  $\delta^{15}\text{N}$  や栄養塩濃度に見られる地点間変化にほぼ一致している。特に  $^{15}\text{N}$  の濃縮係数が大きいアミノ酸 (Val, Asp, Glu など) については、*A. digitifera* の場合  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Val}}$  が 3.3‰、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Asp}}$  が 4.3‰、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$  が 4.7‰上昇するなど大きな地点間差が見られた。また  $^{15}\text{N}$  濃縮係数が小さいと考えられる Phe についても他のアミノ酸と同様の傾向が見られた (*A. digitifera*: 2.5‰上昇、*P. lutea*: 3.1‰上昇)。

これらの結果は、Bulk 同位体比を用いた結果と同様に下水や河川水などの陸起源の  $\delta^{15}\text{N}$  の高い DIN よってサンゴが影響を受けていることを示している。Phe は他のアミノ酸とは異なる代謝メカニズムを持つため (Fig 1.1)、ほとんど栄養段階による  $^{15}\text{N}$  濃縮を示さない (0.4‰ /TL)。したがって、他のアミノ酸と同様に Phe でも  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  の上昇が起こっているという今回の結果は、サンゴが下水や河川水に含まれる高い  $\delta^{15}\text{N}$  を持つ  $\text{NH}_4^+$  や  $\text{NO}_3^-$  を窒素源としてアミノ酸を合成しているからであると考えられる (Heaton, 1986)。

また  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  に地点間差が存在するということは、窒素固定の依存度にも地点間差がある可能性を示唆している。一般に窒素固定では大気起源の  $\text{N}_2$  ガスが利用されるため、0‰付近の低い  $\delta^{15}\text{N}$  をもつ有機物が作られることが知られている。Muscatine et al. (1989) や Muscatine and Kaplan (1994) は、ジャマイカの水深が深い場所に生息するサンゴの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  は -4～1‰という非常に低い値を持つと報告しており、極端に貧栄養な環境ではサンゴの窒素源として窒素固定が重要であると推測される。しかしサンゴが常に窒素固定に窒素源の大部分を依存していると仮定すると、窒素固定由来の窒素の同位体比はほとん



ど変わらないため( $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} \approx 0\%$ )、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  に地点間差は生じないはずである。したがって今回の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  の地点間差は、DIN が存在する環境では窒素固定の依存度は小さくなることを示唆している。

次に式(4)に従って  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  から各地点のサンゴの栄養段階を推定した。その結果、貧栄養な海域である竹富島北と白保礁嶺付近で採取した *A. digitifera* の栄養段階にはほとんど差は見られなかったが ( $\text{TL} \approx 1.1$ )、下水の流入があり富栄養化した大浜海岸のサンゴでは高くなった ( $\text{TL}=1.4$ )。同様に *P. lutea* では白保 P1 に比べ ( $\text{TL}=1.4$ )、河川水の流入がある轟川河口周辺でやや高く ( $\text{TL}=1.5$ )、大浜海岸ではさらに栄養段階は高くなっていた ( $\text{TL}=1.7$ )。

これらの結果は、1-4 の“仮説 2:「環境中の DIN 濃度の増加に伴い窒素源に対する捕食の依存度は低下する」”を支持しない。

仮説 1 の検証の際にも説明したように(3-2-2)、栄養段階が上がるということは窒素源に占める動物プランクトンの捕食の依存度が大きくなっていることを意味する。したがって、DIN が増加するにつれて栄養段階が上昇するという今回の結果は、環境中の DIN 濃度が増加すると共に捕食の依存度が増加することを示しており、すなわち仮説 2 は棄却される結果となった。

なぜ DIN が増加すると動物プランクトンを多く捕食するようになるのだろうか。一般的に、環境中の栄養塩濃度が高くなるほど一次生産者の植物プランクトンは増殖し、それに伴い植物プランクトンを餌とする動物プランクトンも同様に増殖すると考えられる。またサンゴは DIN と動物プランクトンの両窒素源が同時に存在した場合、DIN を利用する際にはサンゴが体内で自らアミノ酸合成を行う必要があるが、動物プランクトンは捕食することでそのまま栄養源として利用することができるため、動物プランクトンを選択的に捕食することが予測される。これらのことから、栄養塩濃度が高くなり富栄養化するにつれてサンゴの栄養段階も上昇していくと考えられる。

最後に、サンゴの窒素源に対する動物プランクトンの捕食の依存度の推定を試みた。仮に窒素源の 100%を動物プランクトンの捕食に依存している場合、栄養段階は  $\text{TL}=3$  である。また 100%DIN や窒素固定に依存していたら  $\text{TL}=1$  である。これらを踏まえて栄養段階 1.1 の白保礁嶺付近で採取した *A. digitifera* で捕食の依存度を逆算すると、

$$\text{栄養段階 } 1.1 = x \times 3 + (1-x) \times 1 \quad (x: \text{動物プランクトンの依存度}) \quad x=0.05 (=5\%)$$

と計算され、5%の窒素を動物プランクトンから得ていることがわかる。また大浜海岸で採取した *A. digitifera* は  $\text{TL}=1.4$  で依存度は 20%となる。捕食を活発に行う *P. lutea* は、白保 P1 に生息するものは同様に  $\text{TL}=1.4$  で依存度 20%、大浜海岸に生息するものは  $\text{TL}=1.7$  で依存度 35%と計算され、今回採取したサンゴに関しては、最も摂食への依存度が高いものでも動物プランクトンの捕食よりも DIN+窒素固定の依存度の方が相対的に大きいもの

と推定された。

以上の考察から、サンゴの窒素源に対する動物プランクトンの捕食や DIN、窒素固定による依存度は生息環境によって異なり、それは主に環境中の栄養塩濃度によって規定されることが示唆された。

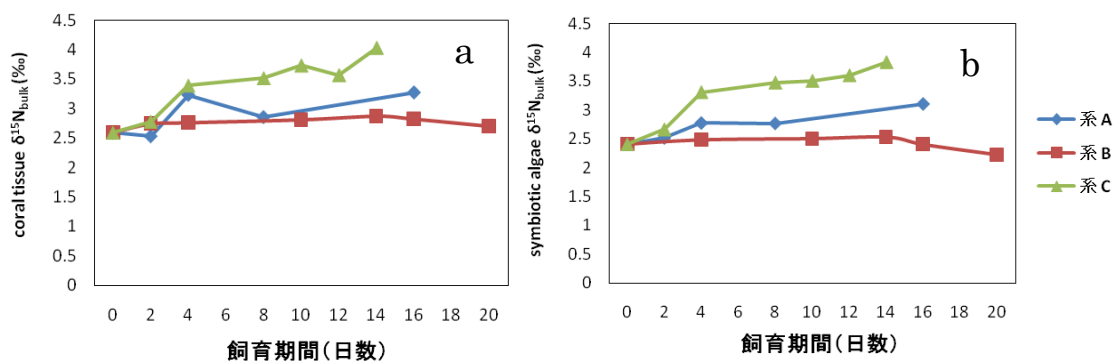


Fig 3.1 *Acropora pulchra* を用いた飼育実験による  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}(\text{‰})$  の時系列変化

a: サンゴ組織、b: 共生藻

注: 系 A は日光+餌 (アルテミア)、系 B は日光のみ、系 C は餌のみで飼育

Table 3.1 *A. pulchra* を用いた飼育実験によるサンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}(\text{‰})$  および栄養段階の比較

$\delta^{15}\text{N}$ source	coral tissue				symbiotic algae			
	t=0	A	B	C	t=0	A	B	C
Bulk sample	2.6	3.3	2.7	4.0	2.2	3.1	2.2	3.8
Amino Acids								
Ala	5.8	8.0	6.6	9.6	4.3	3.3	2.7	5.2
Gly	-0.3	2.1	1.8	3.5	1.4	3.2	2.8	0.0
Val	5.9	8.7	6.8	10.8	6.2	7.9	7.8	9.7
Leu	7.7	10.1	8.2	12.1	6.8	7.4	7.0	9.5
Ile	6.1	10.7	8.4	10.9	3.4	8.1	6.1	8.9
Asp	7.3	8.3	6.9	10.5	5.7	4.3	4.6	5.2
Thr	1.7	2.8	2.8	3.6	2.7	2.1	0.7	1.6
Ser	2.7	3.3	2.0	5.4	1.9	2.6	4.0	4.6
Glu	6.2	7.4	4.9	9.4	4.8	6.1	4.9	7.4
Phe	3.1	2.7	1.8	3.2	1.8	1.9	1.5	1.5
Trophic Level	0.97	1.17	0.96	1.37	0.95	1.10	1.00	1.33

注: 分析に用いたサンゴの飼育期間は、A=16日、B=20日、C=14日

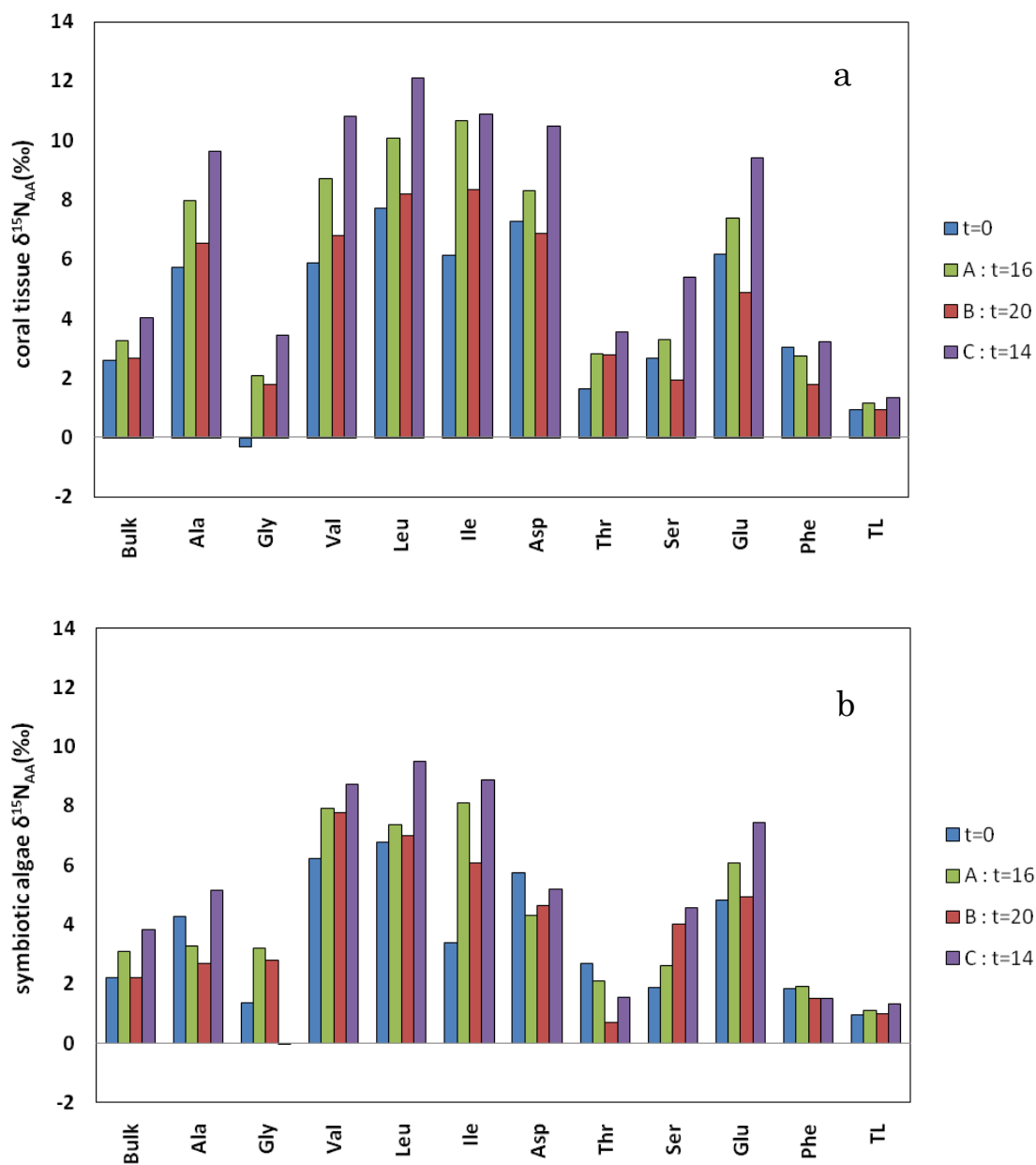


Fig 3.2 t=0 およびそれぞれの系の飼育サンゴの飼育最終日(A: t=16, B: t=20, C: t=14)の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  および  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ (‰)

a: サンゴ組織、b: 共生藻

Table 3.2 石垣島周辺で採取した造礁サンゴのサンゴ組織と共生藻の種類別、採取地点別のBulk窒素安定同位体比( $\delta^{15}\text{N}$ )と炭素安定同位体比( $\delta^{13}\text{C}$ )

種名	採取地点	採取数(n)	Bulk $\delta^{15}\text{N}$ (‰)		Bulk $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
			coral tissue	symbiotic algae	coral tissue	symbiotic algae
<i>Helipora coerulea</i>	白保礁嶺付近	5	2.12 ± 0.08	3.24 ± 0.10	-13.56 ± 0.53	-12.51 ± 0.51
	白保P1	8	2.30 ± 0.18	3.10 ± 0.36	-13.85 ± 0.50	-13.26 ± 0.42
	白保浜とP1の間	10	3.47 ± 0.26	4.39 ± 0.41	-12.97 ± 0.57	-13.12 ± 0.49
	白保浜付近	3	3.48 ± 0.26	4.74 ± 0.25	-14.15 ± 0.60	-13.68 ± 0.64
<i>Porites cylindrica</i>	白保P1	5	2.59 ± 0.38	3.64 ± 0.38	-14.52 ± 0.61	-13.85 ± 0.95
	白保浜とP1の間	10	4.01 ± 0.29	5.19 ± 0.24	-14.13 ± 0.79	-13.21 ± 0.52
	白保浜付近	5	4.90 ± 0.42	5.24 ± 0.15	-13.91 ± 0.34	-13.88 ± 0.72
	トウール口付近	6	2.46 ± 0.19	3.97 ± 0.29	-14.42 ± 0.41	-13.78 ± 0.66
	石西礁湖・小浜島西	3	2.33 ± 0.05	3.01 ± 0.42	-16.66 ± 0.13	-16.06 ± 0.30
<i>Porites lutea</i>	白保P1	4	2.60 ± 0.13	3.30 ± 0.17	-12.44 ± 0.24	-14.48 ± 0.91
	轟川河口周辺	11	5.54 ± 0.39	6.12 ± 0.37	-14.32 ± 1.43	-13.61 ± 1.29
	トウール口	6	2.99 ± 0.20	4.65 ± 0.59	-12.63 ± 0.43	-12.43 ± 0.85
	大浜海岸	7	7.54 ± 0.40	7.05 ± 0.47	-13.50 ± 0.72	-14.29 ± 0.69
	吉野	3	3.50 ± 0.03	5.58 ± 0.19	-13.87 ± 1.04	-13.74 ± 1.20
<i>Acropora digitifera</i>	白保礁嶺付近	3	2.84 ± 0.07	3.54 ± 0.10	-16.54 ± 1.00	-15.94 ± 0.75
	大浜海岸	11	6.22 ± 0.45	6.73 ± 0.39	-15.39 ± 0.81	-15.53 ± 0.94
	石西礁湖・竹富島北	3	1.70 ± 0.11	2.68 ± 0.24	-13.64 ± 0.35	-13.66 ± 0.74
<i>Acropora pulchra</i>	白保礁嶺付近	3	2.80 ± 0.13	3.81 ± 0.26	-16.04 ± 0.54	-14.33 ± 0.38
	白保P1	3	2.41 ± 0.12	2.47 ± 0.20	-15.87 ± 0.21	-16.51 ± 0.38
	白保P2	3	2.62 ± 0.28	2.41 ± 0.09	-13.43 ± 0.65	-13.59 ± 0.94
	吉野	8	3.37 ± 0.29	4.56 ± 0.34	-16.54 ± 0.62	-15.67 ± 1.09
	平久保	4	3.84 ± 0.53	4.64 ± 0.39	-14.98 ± 1.13	-15.57 ± 0.35
<i>Acropora clathrata</i>	大浜	3	6.44 ± 0.32	6.63 ± 0.24	-14.45 ± 0.06	-14.02 ± 0.29
	石西礁湖・小浜島西	3	2.58 ± 0.20	2.90 ± 0.13	-13.60 ± 0.31	-13.44 ± 0.39
	石西礁湖・竹富島北	3	2.72 ± 0.15	2.60 ± 0.17	-13.31 ± 0.83	-12.80 ± 0.41
<i>Acropora vaughani</i>	吉野	8	3.12 ± 0.44	3.91 ± 0.51	-15.62 ± 0.75	-14.71 ± 1.20
<i>Favites chinensis</i>	白保浜とP1の間	3	6.05 ± 0.38	5.27 ± 0.52	-14.73 ± 0.90	-14.51 ± 0.49

注: 採取地点の詳細はFig. 2.1参照。試料数n個の平均値±S.E.: nは同種同地点で採取したサンゴの片数

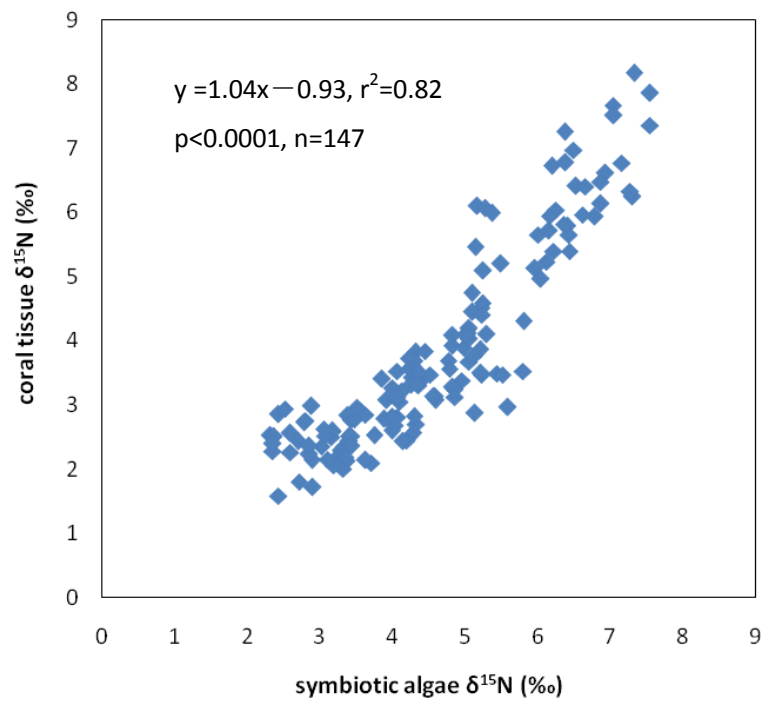


Fig 3.3 サンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の近似関係

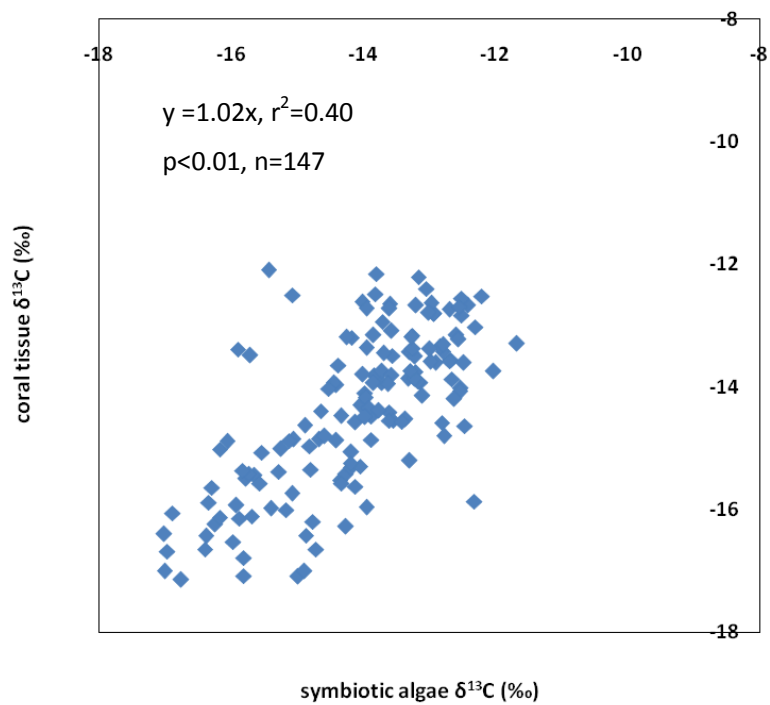


Fig 3.4 サンゴ組織と共生藻の  $\delta^{13}\text{C}$  の近似関係

Table 3.3 *A. digitifera* (白保礁嶺付近で採取) と *A. pulchra* (白保P1で採取) のサンゴ組織と共生藻の amino acid 窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )

$\delta^{15}\text{N}$ source	<i>Acropora digitifera</i>		<i>Acropora pulchra</i>	
	coral tissue	symbiotic algae	coral tissue	symbiotic algae
Bulk sample	2.84	3.54	2.94	3.51
Amino Acids				
Ala	7.2 $\pm$ 1.3	5.1 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.8
Gly	1.9 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.7	-0.3 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.7
Val	8.8 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.8	5.9 $\pm$ 1.2	6.2 $\pm$ 0.9
Leu	9.1 $\pm$ 0.5	8.1 $\pm$ 1.1	7.7 $\pm$ 1.1	6.8 $\pm$ 0.4
Ile	4.3 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.9	4.1 $\pm$ 1.5	3.4 $\pm$ 0.6
Asp	7.4 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 1.0	7.3 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 1.2
Thr	1.5 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.5
Ser	5.2 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 1.0	1.9 $\pm$ 0.7
Glu	6.9 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 0.5	5.8 $\pm$ 0.6
Phe	2.8 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.5
Trophic Level	1.08 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.07

注: n=3の平均値  $\pm$  S.E. (nは同じ試料を繰り返し分析した回数)

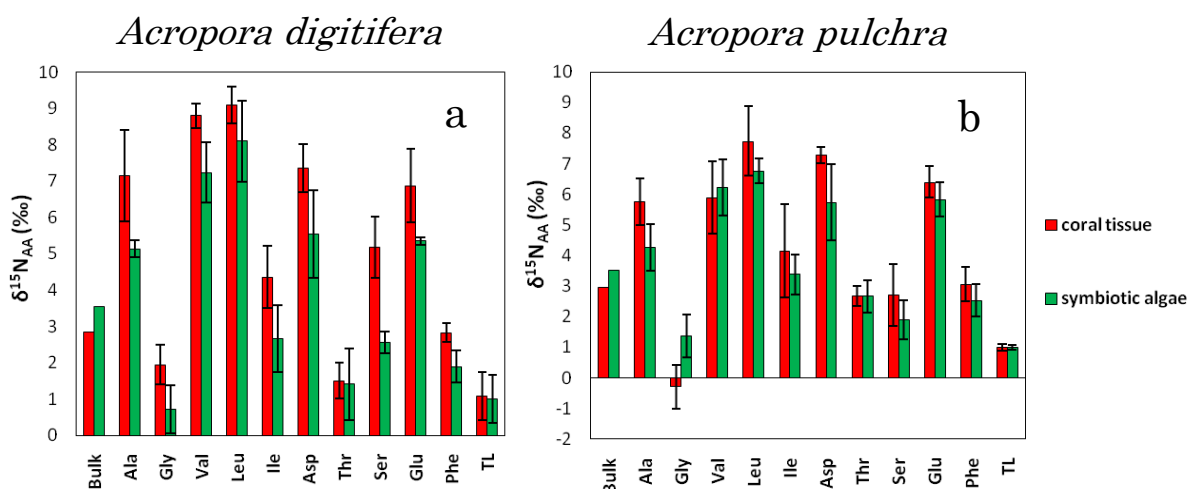


Fig 3.5 サンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  パターンの比較

a: *A. digitifera* (白保礁嶺付近で採取)、b: *A. pulchra* (白保 P1 で採取)

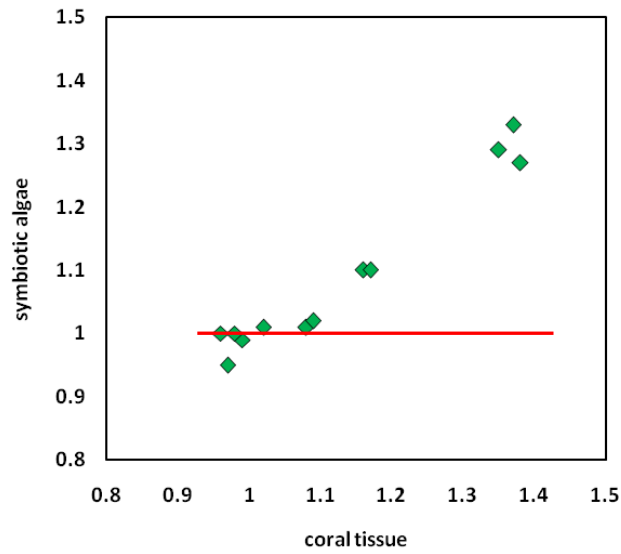


Fig 3.6 サンゴ組織と共生藻の栄養段階の近似関係

( $r^2=0.95$ ,  $p<0.0001$ ,  $n=12$ )

注：赤線は仮説 1 に基づいた直線

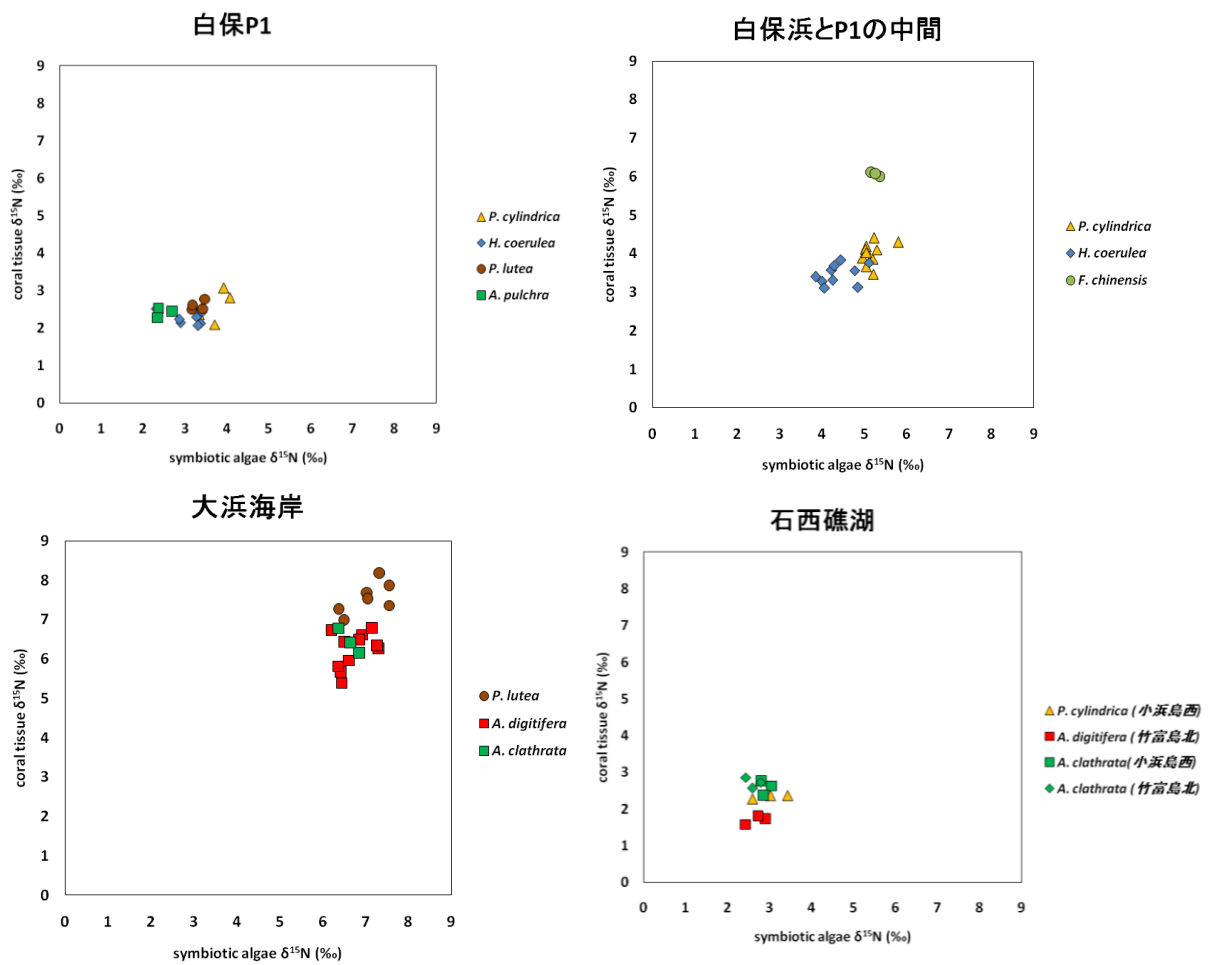


Fig 3.7 4 採取地点の造礁サンゴの種類別のサンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  (‰)



Table 3.4 白保礁池内で採取した造礁サンゴ(サンゴ組織)の種別の $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ および栄養段階(TL)の比較

$\delta^{15}\text{N}$ source	<i>A. digitifera</i>	<i>A. pulchra</i>	<i>P. lutea</i>	<i>H. coerulea</i>	POM
Bulk sample	2.84	2.94	3.99	2.14	3.33
Amino Acids					
Ala	7.2 $\pm$ 1.3	5.8 $\pm$ 0.8	13.4 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 1.9
Gly	1.9 $\pm$ 0.5	-0.3 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 1.4	3.0 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.2
Val	8.8 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 1.2	9.2 $\pm$ 1.5	5.4 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 0.4
Leu	9.1 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 1.1	9.0 $\pm$ 0.8	6.1 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 0.2
Ile	4.3 $\pm$ 0.9	4.1 $\pm$ 1.5	4.0 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 0.6
Asp	7.4 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 1.3
Thr	1.5 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.3	-2.1 $\pm$ 2.8	1.4 $\pm$ 0.7
Ser	5.2 $\pm$ 1.0	2.7 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 0.9	2.3 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.9
Glu	6.9 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.5
Phe	2.8 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1
Trophic Level	1.08 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.11	1.39 $\pm$ 0.10	1.06 $\pm$ 0.06	1.34 $\pm$ 0.05

注: *A. digitifera* のみ白保礁嶺付近で採取し、残りの種はP1で採取した。POMはP1で採取したもの

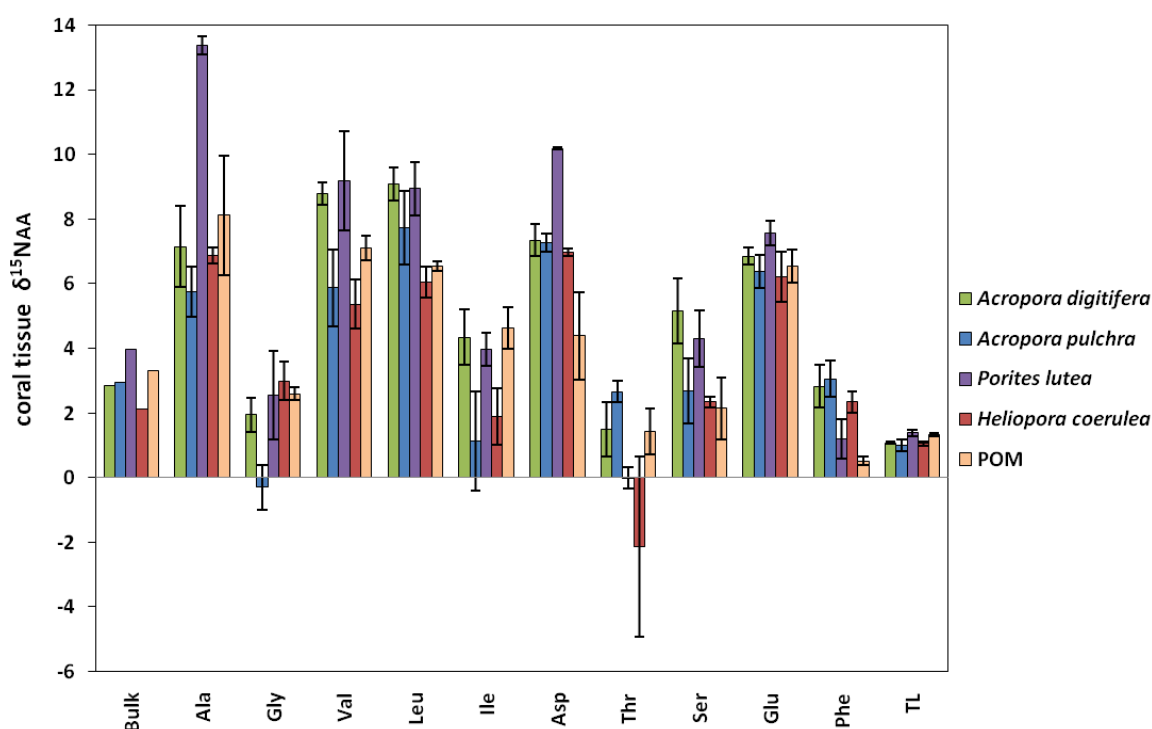


Fig 3.8 白保礁地内で採取した 4 種の造礁サンゴのサンゴ組織と POM の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  および栄養段階(TL)の比較

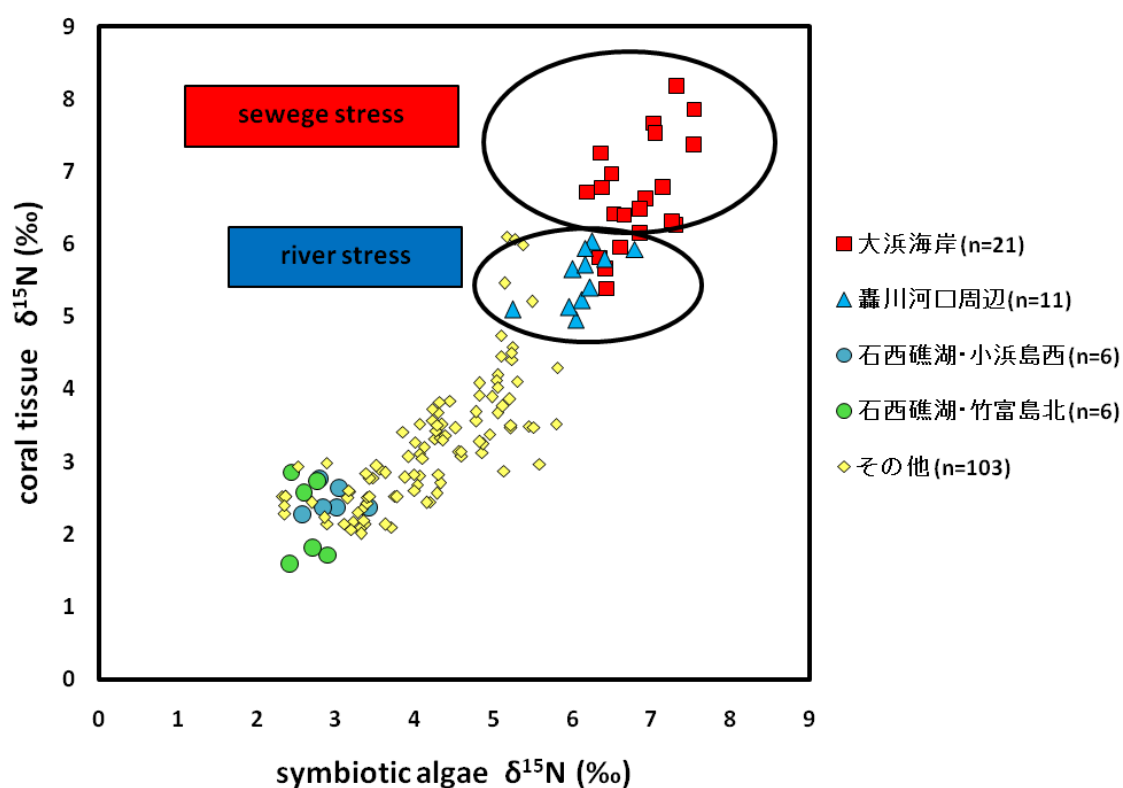


Fig 3.9 採取地点別に分類したサンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の近似関係

Table 3.5 各採取地点における海水の栄養塩濃度

採水地点	浜からの距離(m)	栄養塩濃度( $\mu\text{M}$ )				
		$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{PO}_4^-$	$\text{SiO}_2$
白保P1	500m	0.38	0.07	0.33	0.05	1.26
白保P2	300m	0.17	0.04	0.26	0.03	1.32
白保浜とP1の間*	300m	3.10	0.01	n.d.	0.10	n.d.
白保浜付近*	70m	4.0	0.1	n.d.	0.1	n.d.
轟川河口周辺*	200m	5.5	1.6	n.d.	0.2	n.d.
吉野	100m	1.66	0.09	0.48	0.15	20.44
平久保	100m	0.16	0.03	0.60	0.05	1.01
大浜海岸	250m	10.49	0.35	3.76	0.48	10.86
竹富島北	—	0.34	0.05	0.06	0.03	1.72
小浜島西	—	0.26	0.04	0.11	0.04	1.63

\*: 梅澤(2000)のデータを引用

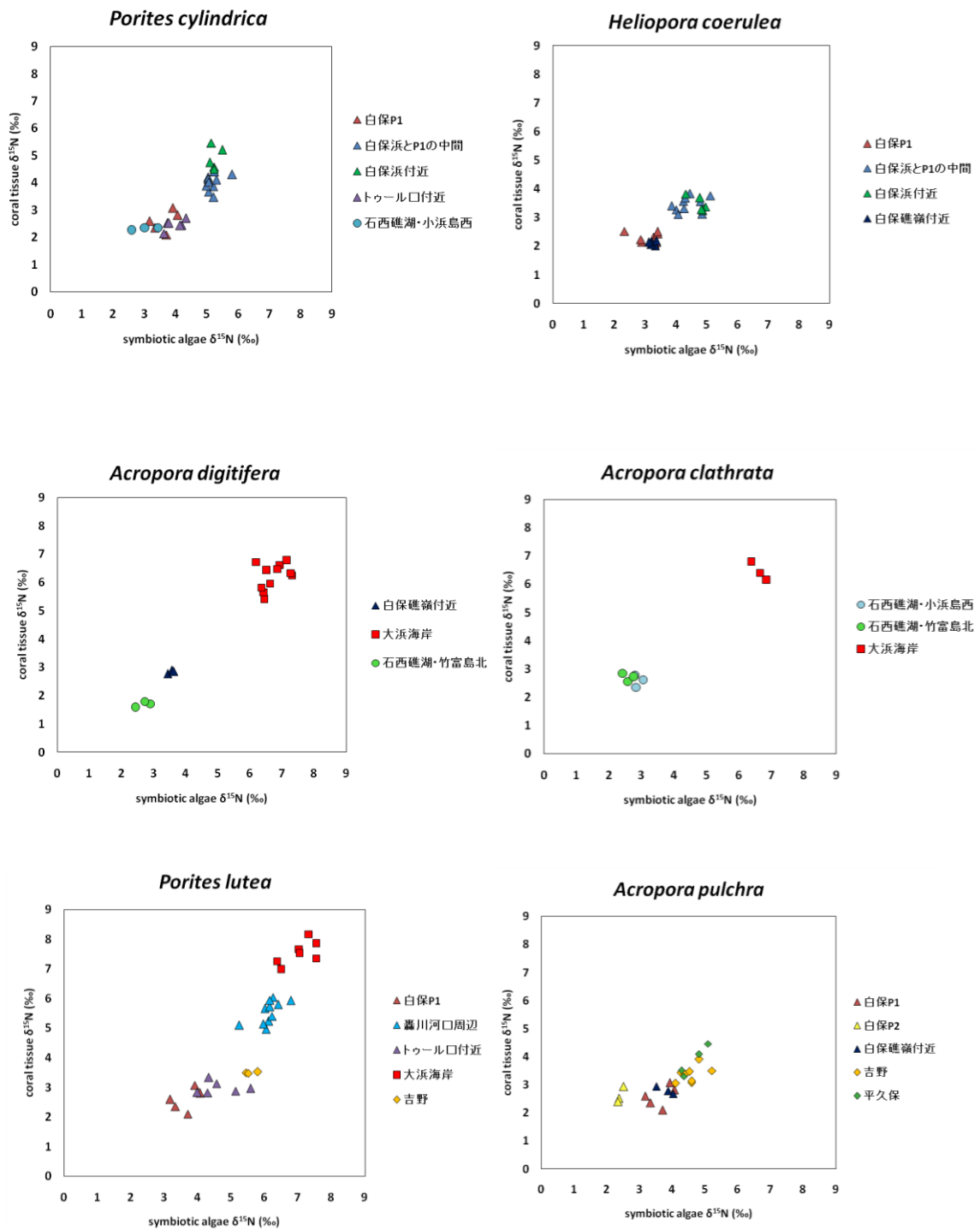


Fig 3.10 6種の造礁サンゴ (*P. cylindrica*, *H. coerulea*, *A. digitifera*, *A. clathrata*, *P. lutea*, *A. pulchra*) の生息地点別  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  比較図

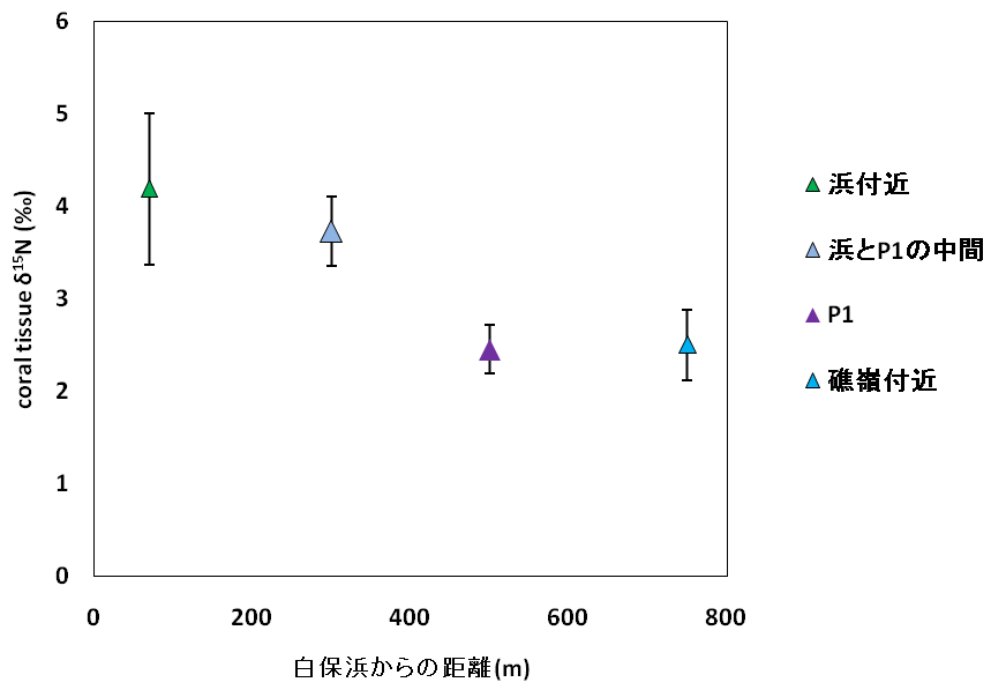


Fig 3.11 白保礁地の中の4地点の浜からの距離 (m) とサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の関係

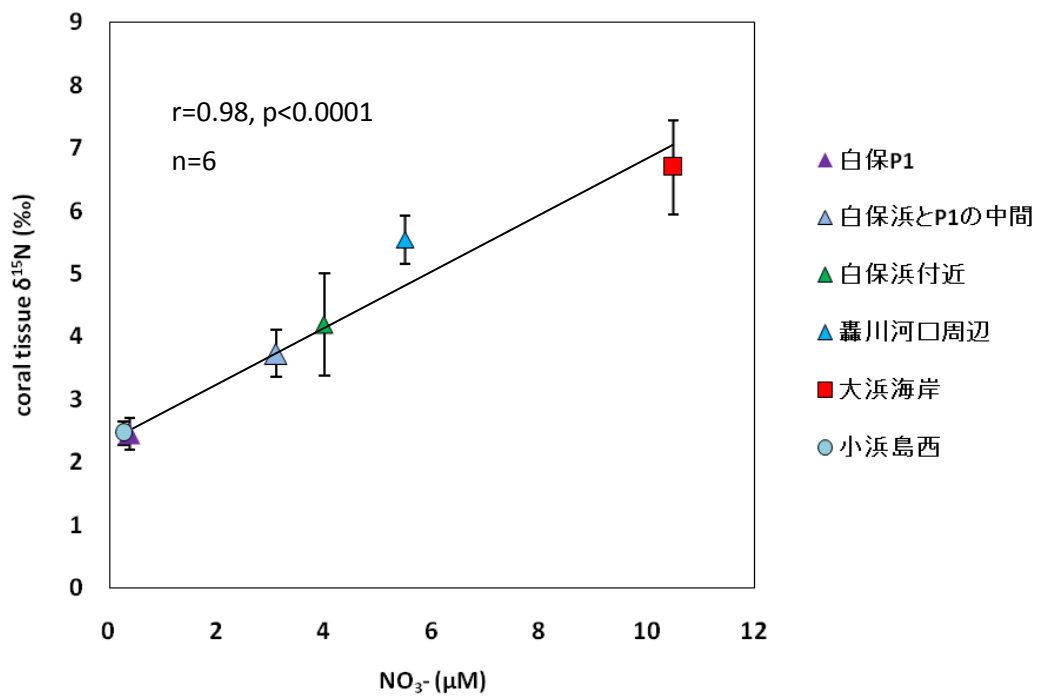


Fig 3.12 6地点の  $\text{NO}_3^-$  濃度とサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の相関関係

Table 3.6 *A. digitifera* と *P. lutea* の生息地点間の $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ のおよび栄養段階の比較

$\delta^{15}\text{N}$ source	<i>Acropora digitifera</i>			<i>Porites lutea</i>		
	石西礁湖・竹富島北	白保礁嶺付近	大浜海岸	白保P1	轟川河口周辺	大浜海岸
Bulk sample	1.65	2.84	6.52	3.99	6.04	6.39
Amino Acids						
Ala	7.1 ± 0.0	7.2 ± 1.3	8.2 ± 0.7	13.4 ± 0.3	11.0 ± 0.8	12.3 ± 1.1
Gly	-0.2 ± 1.4	1.9 ± 0.5	3.9 ± 2.6	2.6 ± 1.4	3.1 ± 0.2	5.8 ± 0.4
Val	6.7 ± 1.9	8.8 ± 0.3	10.0 ± 1.1	9.2 ± 1.5	9.8 ± 0.5	13.8 ± 0.5
Leu	8.4 ± 0.2	9.1 ± 0.5	11.9 ± 0.9	9.0 ± 0.8	11.8 ± 0.2	14.8 ± 1.3
Ile	1.4 ± 1.8	4.3 ± 0.9	5.1 ± 1.9	4.0 ± 0.5	5.7 ± 0.7	9.0 ± 0.3
Asp	6.6 ± 0.7	7.4 ± 0.5	10.9 ± 0.2	10.2 ± 0.0	11.1 ± 0.5	14.6 ± 0.4
Thr	0.6 ± 0.8	1.5 ± 0.8	2.1 ± 1.1	0.0 ± 0.3	2.9 ± 0.2	5.7 ± 0.7
Ser	0.2 ± 0.7	5.2 ± 1.0	5.0 ± 1.6	4.3 ± 0.9	5.6 ± 0.5	8.7 ± 0.3
Glu	6.3 ± 0.2	6.9 ± 0.3	11.0 ± 0.3	7.6 ± 0.4	9.7 ± 0.2	13.0 ± 0.6
Phe	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.7	4.7 ± 0.5	1.2 ± 0.6	2.7 ± 0.5	4.3 ± 0.6
Trophic Level	1.10 ± 0.05	1.08 ± 0.04	1.39 ± 0.11	1.39 ± 0.10	1.47 ± 0.08	1.69 ± 0.11

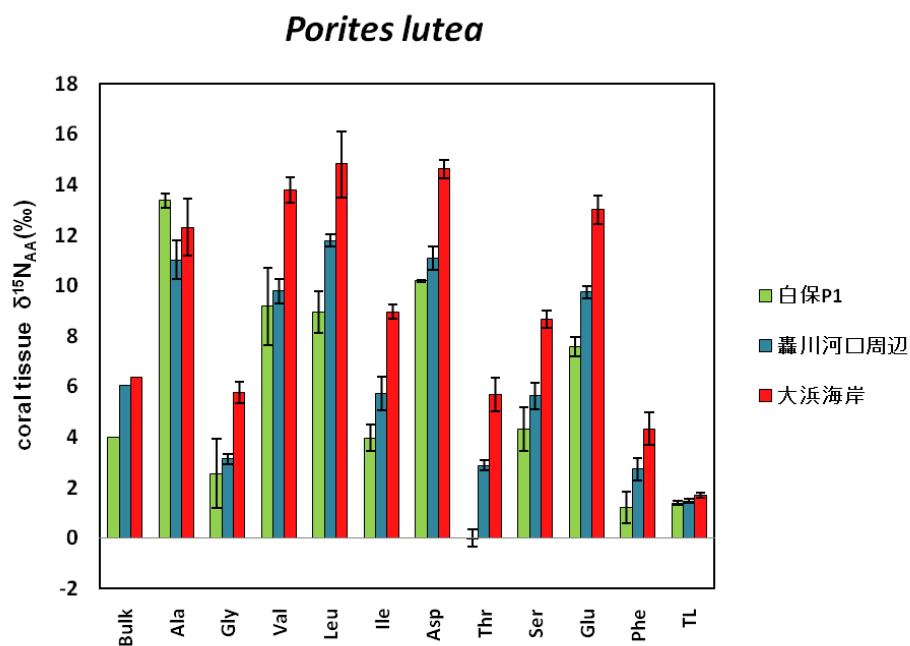
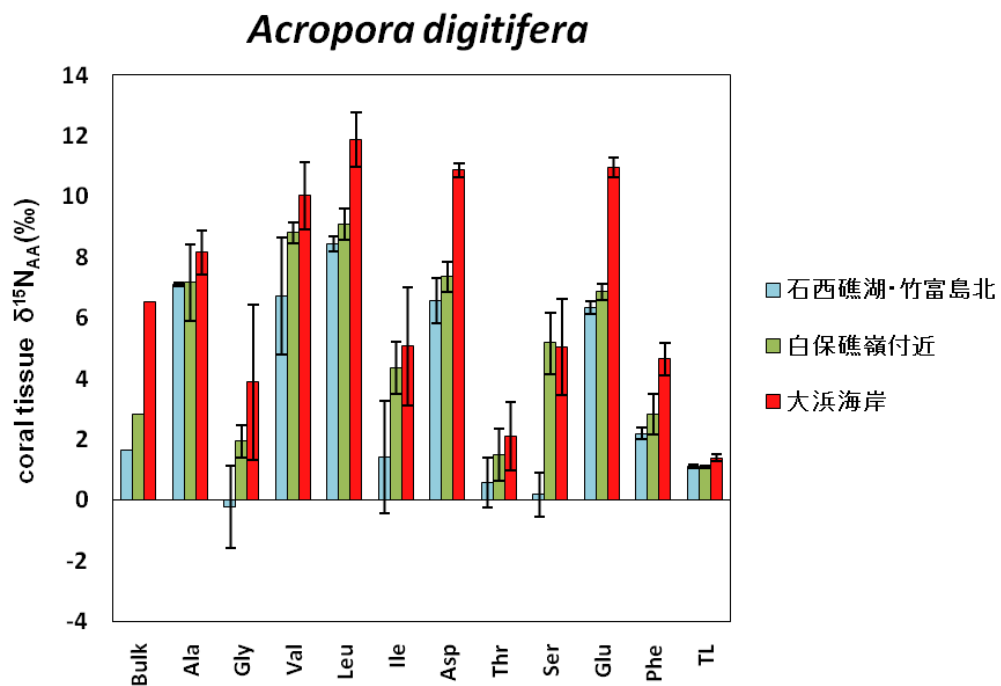


Fig 3.13 *A. digitifera* と *P. lutea* の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  および栄養段階 (TL) の生息地点間の比較

## 【第4章 結論】

本研究は、サンゴ礁を形成する造礁サンゴをサンゴ組織と細胞内に共生している褐虫藻に分離しそれぞれの「アミノ酸窒素安定同位体比」を測定することにより、従来の解析手法だけでは得ることが難しかったサンゴの栄養段階を推定し、“造礁サンゴの窒素源”と“サンゴ組織と共生藻の間の窒素循環”に関する新しい情報を得ることを目的として行った。また富栄養化がサンゴの生態に与える影響も調査した。その結果、最終的に得られた結論を下記にまとめて示す。

- ①：サンゴが捕食した動物プランクトン由来の窒素態は代謝産物の  $\text{NH}_4^+$  だけでなく、代謝途中のアミノ酸としても短期間のうちに共生藻に供給され、サンゴの体内には従来考えられてきた DIN プールの他に“アミノ酸プール”が存在し、サンゴ組織と共生藻の間にアミノ酸共有関係が成り立っている可能性が示唆された。(3-1, 3-2)
- ②：同地点に生息するサンゴの種間では、DIN の利用方法、アミノ酸の合成・代謝経路に大きな違いがないことが示された。一方、栄養段階の解析結果から窒素源に対する動物プランクトンの捕食の依存度に種間で差があることがわかった。(3-3)
- ③：河川水や下水の流入によって富栄養化した海域に生息する造礁サンゴは、Bulk 窒素安定同位体比と同様に各アミノ酸の同位体比も上昇することがわかった。また本来捕食によって同位体比がほとんど変化しない Phe の同位体比も他のアミノ酸と同様に上昇することが確認された。これは、富栄養化した海域では窒素源に対する DIN の依存度が増加し、またその DIN は陸起源の高い同位体比を持つため、それらを反映した結果であると考えられる。(3-4)
- ④：富栄養化に伴い、アミノ酸の窒素同位体比と共に造礁サンゴの栄養段階も上昇することがわかった。この結果は、富栄養化した海域のサンゴは窒素源として相対的に動物プランクトン由来の窒素を多く利用する傾向があることを意味している。また結論③と合わせると、造礁サンゴが依存する窒素源は生息海域の富栄養化に伴い、  
“窒素固定 → 窒素固定+DIN → DIN+動物プランクトン”  
と変動していくことが推察された。またこの変動は環境中の栄養塩濃度によって規定されることが示唆された。(3-4)

## 謝辞

私にとってこの大学院での2年間は、研究室の皆様の支えがあつてこそ得ることができた貴重な時間となりました。小川先生には、御自身の研究分野とは違う分野の研究を行いたいという私の願いを聞いて下さったこと、また研究のことだけでなく日々の学生生活のサポートもして下さったことに心から感謝致します。宮島先生には、石垣島でのフィールド調査にも同行していただき、またGC/Cをはじめとする各分析やデータ解析の際に細かなご指導をしていただきました。永田先生にはゼミの際に厳しいご指摘をしていただき、研究に対する姿勢を教えていただきました。

生元素分野の皆様には、日常生活から実験に至るまで様々な面でお世話になりました。早乙女さんにはHPLCをはじめ各実験の際に温かなご指導をしていただきました。田中泰章さんや森本直子さんには石垣島のフィールド調査の際に非常にお世話になりました。槇洸さんにはアミノ酸の同位体比の分析のために基礎知識から分析機器の使用方法まで細かなご指導をしていただきました。また碓井敏宏さん、吉山浩平さん、楊燕輝さん、藤本洋子さん、関根典子さん、THIBODEAU さん、清水安里佐さん、内宮万里央さん、黒田洸輔さん、前澤琢也さん、山田洋輔さんからは、ゼミでのご指摘や日常生活での楽しい充実した時間を頂き、快適な2年間を送ることができました。

また渡邊敦先生をはじめとする東京工業大学瀬岡研の皆様、石垣島の国際サンゴ礁研究・モニタリングセンターの職員の皆様にはフィールド調査の際に本当にお世話になりました。

この場をお借りして、感謝の意を表すとともに、厚くお礼を申し上げます。

そして最後に、生まれてから26年間、私を支え続けここまで育てて下さった家族に心から感謝したいと思います。



## 参考文献

- Alamaru, A., R. Yam, A. Shemesh, and Y. Loya. (2009). Trophic biology of *Stylophora pistillata* larvae: evidence from stable isotope analysis. *Mar Ecol-Prog Ser* 383:85-94.
- Arrigo, K.R. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437:349-355.
- Catmull, J., D. Yellowlees, and D.J. Miller. (1987). NADP<sup>+</sup>-dependent Glutamate dehydrogenase from *Acropora formosa* : purification and properties. *Mar Biol* 95:559-563.
- Chikaraishi, Y., Y. Kashiyamal, N.O. Ogawa, H. Kitazato, and N. Ohkouchi. (2007). Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Mar Ecol-Prog Ser* 342:85-90.
- Chikaraishi, Y., N.O. Ogawa, Y. Kashiyama, Y. Takano, H. Suga, A. Tomitani, H. Miyashita, H. Kitazato, and N. Ohkouchi. (2009). Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr:Methods* 7:740-750
- DeNiro, M.J., and S. Epstein. (1981). Influence of Diet on the Distribution of Nitrogen Isotopes in Animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45:341-351.
- Falkowski, P.G., Z. Dubinsky, L. Muscatine, and J.W. Porter. (1984). Light and the Bioenergetics of a Symbiotic Coral. *Bioscience* 34:705-709.
- Fitzgerald, L.M., and A.M. Szmant. (1997). Biosynthesis of 'essential' amino acids by scleractinian corals. *Biochem J* 322:213-221.
- Fry B, Sherr EB. (1984).  $\delta^{13}\text{C}$  measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contrib Mar Science* 27:13-47
- Gaebler, O.H., T.G. Vitti, and Vukmirov.R. (1966). Isotope Effects in Metabolism of  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  from Unlabeled Dietary Proteins. *Can J Biochem Cell B* 44:1249-&.
- Grover, R., J.F. Maguer, D. Allemand, and C. Ferrier-Pages. (2003). Nitrate uptake in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Limnol Oceanogr* 48:2266-2274.
- Grover, R., J.F. Maguer, D. Allemand, and C. Ferrier-Pages. (2008). Uptake of dissolved free amino acids by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *J Exp Biol* 211:860-865.
- Heaton THE. (1986). Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere: a review. *Chem Geol(Isot Geosci Sec)* 59: 87-102
- Heikoop, J.M., J.J. Dunn, M.J. Risk, I.M. Sandeman, H.P. Schwarcz, and N. Waltho. (1998). Relationship between light and the  $\delta^{15}\text{N}$  of coral tissue: Examples from Jamaica

- and Zanzibar. *Limnol Oceanogr* 43:909-920.
- Heikoop, J.M., M.J. Risk, A.V. Lazier, E.N. Edinger, J. Jompa, G.V. Limmon, J.J. Dunn, D.R. Browne, and H.P. Schwarcz. (2000a). Nitrogen-15 Signals of Anthropogenic Nutrient Loading in Reef Corals. *Mar Pollut Bull* 40:628-636.
- Heikoop, J.M., J.J. Dunn, M.J. Risk, T. Tomascik, H.P. Schwarcz, I.M. Sandeman, and P.W. Sammarco. (2000b).  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of coral tissue show significant inter-reef variation. *Coral Reefs* 19:189-193.
- Hobson, K. A., and H. E. Welch. (1992). Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84:9-18.
- Kawaguti, S. (1953). Ammonium metabolism of the reef corals. *Biol. J. Okayama Univ* I: 151-156.
- Lesser, M.P., L.I. Falcon, A. Rodriguez-Roman, S. Enriquez, O. Hoegh-Guldberg, and R. Iglesias-Prieto. (2007). Nitrogen fixation by symbiotic cyanobacteria provides a source of nitrogen for the scleractinian coral *Montastraea cavernosa*. *Mar Ecol-Prog Ser* 346:143-152.
- Lorrain, A., B. Graham, F. Menard, B. Popp, S. Bouillon, P. van Breugel, and Y. Cherel. (2009). Nitrogen and carbon isotope values of individual amino acids: a tool to study foraging ecology of penguins in the Southern Ocean. *Mar Ecol-Prog Ser* 391:293-306.
- Macko, S.A., M.L.F. Estep, M.H. Engel, and P.E. Hare. (1986). Kinetic Fractionation of Stable Nitrogen Isotopes during Amino-Acid Transamination. *Geochim Cosmochim Ac* 50:2143-2146.
- Macko, S.A., M.L. Fogel, P.E. Hare, and T.C. Hoering. (1987). Isotopic Fractionation of Nitrogen and Carbon in the Synthesis of Amino-Acids by Microorganisms. *Chem Geol* 65:79-92.
- Male, K.B., and K.B. Storey. (1983). Kinetic Characterization of NADP-Specific Glutamate-Dehydrogenase from the Sea-Anemone, *Anthopleura-Xanthogrammica* - Control of Amino-Acid Biosynthesis during Osmotic-Stress. *Comp Biochem Phys B* 76:823-829.
- McCarthy, M.D., R. Benner, C. Lee, and M.L. Fogel. (2007). Amino acid nitrogen isotopic fractionation patterns as indicators of heterotrophy in plankton, particulate, and dissolved organic matter. *Geochim Cosmochim Ac* 71:4727-4744.
- McClelland, J.W., and J.P. Montoya. (2002). Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* 83:2173-2180.

- Mendes, J. M., Risk, M. J., Swarcz, H. P. and Woodley, J. D. (1997). Stable isotopes of nitrogen as measures of marine pollution: a preliminary assay of coral tissue from Jamaica. *Proceedings of the Eighth International Coral Reef Symposium 2*, 1869-1872.
- Minagawa, M., and E. Wada. (1984). Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: Further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48:1135-1140.
- Muscantine, L., H. Masuda, and R. Burnap. (1979). Ammonium uptake by symbiotic and aposymbiotic reef corals. *B Mar Sci* 29:572-575.
- Muscantine, L., P.G. Falkowski, J.W. Porter, and Z. Dubinsky. (1984). Fate of photosynthetic fixed carbon in light-and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora Pistillata*. *P Roy Soc Lond B Bio* 222:181-202.
- Muscantine, L., and I. R. Kaplan. (1994). Resource partitioning by reef corals as determined from stable isotope composition. 2.  $\delta^{15}\text{N}$  of zooxanthellae and animal tissue versus depth. *Pac. Sci.* 48: 304-312.
- Poter, J. W. (1976). Autotrophy, heterotrophy and resource partitioning in Caribbean reef-building corals. *Am. Nat.* 110: 731-742
- Risk, M.J., B.E. Lapointe, O.A. Sherwood, and B.J. Bedford. (2009). The use of  $\delta^{15}\text{N}$  in assessing sewage stress on coral reefs. *Mar Pollut Bull* 58:793-802.
- Roberts, J.M., P.S. Davies, and L.M. Fixter. (1999). Symbiotic anemones can grow when starved: nitrogen budget for *Anemonia viridis* in ammonium-supplemented seawater. *Mar Biol* 133:29-35.
- Roff, C. (2000). Seasonal variation in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of size-fractionated plankton at a coastal station in the northern Baltic proper. *Mar Ecol-Prog. Ser* 203:47-65
- Sammarco, P.W., M.J. Risk, H.P. Swarcz, and J.M. Heikoop. (1999). Cross-continental shelf trends in coral  $\delta^{15}\text{N}$  on the Great Barrier Reef: further consideration of the reef nutrient paradox. *Mar Ecol-Prog Ser* 180:131-138.
- Schmidt, K., J.W. McClelland, E. Mente, J.P. Montoya, A. Atkinson, and M. Voss. (2004). Trophic-level interpretation based on  $\delta^{15}\text{N}$  values: implications of tissue-specific fractionation and amino acid composition. *Mar Ecol-Prog Ser* 266:43-58.
- Tanaka, Y., T. Miyajima, I. Koike, T. Hayashibara, and H. Ogawa. (2006). Translocation and conservation of organic nitrogen within the coral-zooxanthella symbiotic system of *Acropora pulchra*, as demonstrated by dual isotope-labeling techniques. *J Exp Mar Biol Ecol* 336:110-119.
- Umezawa, Y., T. Miyajima, M. Yamamuro, H. Kayanne, and I. Koike. (2002). Fine-scale

- mapping of land-derived nitrogen in coral reefs by  $\delta^{15}\text{N}$  in macroalgae
- Wada, E., Hattori, A. 1976. Natural abundance of  $^{15}\text{N}$  in particulate organic matter in the North Pacific Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 40, 249-251.
- Webb, K.L., and W.J. Wiebe. (1978). The Kinetics and Possible Significance of Nitrate Uptake by Several Algal-Invertebrate Symbioses. *Mar Biol* 47:21-27.
- Yamamuro, M., H. Kayanne, and M. Minagawa. (1995). Carbon and nitrogen stable isotopes of primary producers in coral-reef ecosystems. *Limnol Oceanogr* 40:617-621.
- Yellowlees, D., Rees, TAV., and Fitt, WK. (1997). Effect of Ammonium-supplemented Seawater on Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase Activities in Host Tissue and Zooxanthellae of *Pocillopora damicornis* and on Ammonium Uptake Rates of the Zooxanthellae. *Pac Sci* 48(3): 291-295
- 梅澤有. (2000). 亜熱帯サンゴ礁海域における定着性大型藻類の化学組成を用いた陸源窒素影響域の把握, 東京大学 理学系地理学課程地理学専攻. 平成 12 年度 修士論文, pp93
- 大手信人・高津文人・小川奈々子・大河内信彦・梅澤有. (2008). 環境負荷と除去プロセス 流域環境評価と安定同位体 (永田俊, 宮島利宏編) 京都大学学術出版会, p57-110
- 田中泰章. (2005). 造礁サンゴによる硝酸塩の利用と有機物代謝に関する研究. 東京大学 新領域創成科学研究科環境学専攻. 平成 17 年度 修士論文, pp48
- 土屋誠・藤田陽子. (2009). サンゴ礁の大切さ, サンゴ礁のちむやみ 東海大学出版会, p117-149
- 中村崇・山崎征太郎・神木隆行・山崎秀雄. (2006). サンゴ礁のストレス事情, 美ら島の自然史 東海大学出版会, p132-146
- 西平守孝. (1988). フィールド図鑑「造礁サンゴ」 東海大学出版会, pp264
- 南川雅男・吉岡崇仁. (2006). 安定同位体による生物環境の理解, 地球化学講座 5 生物地球化学 培風館, p144-200

# アミノ酸窒素安定同位体比を用いた造礁サンゴの窒素源の解明

2011 年 3 月 自然環境学専攻 096627 藤井堯典  
指導教員 准教授 小川浩史

キーワード：造礁サンゴ、窒素源、共生関係、アミノ酸窒素安定同位体比、富栄養化  
1. はじめに

熱帯・亜熱帯海域に存在するサンゴ礁は、貧栄養環境にも関わらず最も多様性と生産性が高い生態系をもつ海域の一つである。その豊かな生態系を支えている主役が造礁サンゴである。サンゴが利用できる窒素源としては、動物プランクトンや DIN(溶存態無機窒素)、シアノバクテリアによる窒素固定由来の窒素などが知られているが、どの窒素源が最も重要で、またその生息環境による違いについては未だ良くわかっていない。また造礁サンゴが細胞内に共生させている褐虫藻もサンゴ礁生態系の重要な生産者であるが、宿主サンゴと共生藻の間の物質循環は複雑なため詳細は不明である。

アミノ酸窒素安定同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )は、従来生態学の分野で広く用いられてきた全窒素安定同位体比分析( $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ )の欠点を補う新しい解析手法である。この方法は対象生物に対する分析のみで栄養段階を正確に推定できるなど多くの利点を持ち、近年急速に研究が進められている。

本研究は、この新しい解析手法を造礁サンゴに適用し、サンゴの主要な窒素源や共生藻との間の物質の動態を明らかにすることを目的とした。また近年サンゴ礁生態系の破壊が大きな問題となっており、その観点から特に富栄養化とサンゴの窒素源の変化の関連性を調べることにより、富栄養化がサンゴの生態に与える影響も検証した。

## 2. 試料および方法

### 【2-1. 調査地および採取サンゴ】

現地調査は、沖縄県石垣島周辺で 2009 年~2010 年の間に計 5 回行われた。採取したサンゴは *Acropora pulchra* (オトメミドリイシ) や *Porites lutea* (コブハマサンゴ) など 8 種である。採取地点は白保礁池内の 5 地点をはじめ河川水の影響がある轟川河口周辺、下水の流入によって富栄養化が進んでいる大浜海岸など 12 地点を設けた。

### 【2-2. アミノ酸窒素安定同位体比分析】

生物体の主要構成成分であるアミノ酸は約 20 種類が知られているが、捕食の際に  $^{15}\text{N}$  濃縮を示すもの(グルタミン酸;Glu など)と示さないもの(フェニルアラニン;Phe など)があり、この異なる性質を利用し対象生物の栄養段階(TL)を推定する方法である。式(1)は対象生物の Glu と Phe の  $\delta^{15}\text{N}$  を用いた TL の推定式である(Chikaraishi et al., 2009)。

$$\text{TL}_{\text{Glu/Phe}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1 \quad \dots \text{式(1)}$$

## 3. 結果および考察

### 【3-1. サンゴ組織と褐虫藻の共生関係】

採取した造礁サンゴ(n=147)のサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  は下水や河川水流入の影響などの

生息環境の違いから大きな変動を示したが（1.6~8.2‰）、同じサンゴ片から分離した共生藻との間には有意な近似関係が見られた( $r^2=0.82$ ,  $p<0.0001$  : Fig.1)。また両者の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  を測定した結果、非常に類似した  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  パターンを示した。これらのことから、両者の窒素源に大きな違いはなく、緊密な窒素のやりとりが行われていることが示唆された。またサンゴの TL は動物プランクトンを捕食にのみ上昇するが、式(1)を用いて各地点のサンゴの両者の TL を推定した結果、共生藻の TL はサンゴ組織の TL と共に変化した (Fig.2)。したがって、サンゴが捕食した動物プランクトン由来の窒素は完全に代謝される前にも共生藻に移行していると考えられ、サンゴ体内には従来考えられてきた DIN プールのほかに、アミノ酸プールも存在している可能性が示唆された。

### 【3-2. 生息環境の違いによる造礁サンゴの窒素源の変化】

環境の異なる 3 地点（白保 P1・轟川河口周辺・大浜海岸）で採取した *P. lutea* の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  を測定した結果、陸起源の栄養塩の流入により DIN 濃度が高い環境に生息するサンゴほど高い同位体比を持つことが示された (Fig.3)。また捕食によってもほとんど  $^{15}\text{N}$  濃縮を示さず餌の同位体比を反映する  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  も他のアミノ酸と同様に高くなっていた。これは富栄養化した海域に生息するサンゴは陸起源の高い  $\delta^{15}\text{N}$  を持つ DIN を利用してアミノ酸を合成していることを示している。一方各地点の TL は DIN の増加とともに高くなっており（1.4→1.5→1.7）、富栄養化が進むにつれてサンゴの窒素源に対する動物プランクトンの捕食の依存度が増加することが確認された（依存度：20%→25%→35%）。これは、DIN の増加が植物プランクトンの増殖を招き、さらにそれを餌とする動物プランクトンも増殖することで、サンゴの捕食量が増加したためと考えられる。

以上の結果から、サンゴの窒素源に対する動物プランクトンの捕食や DIN、窒素固定による依存度は生息環境によって異なり、それは主に環境中の栄養塩濃度によって規定されることが示唆された。

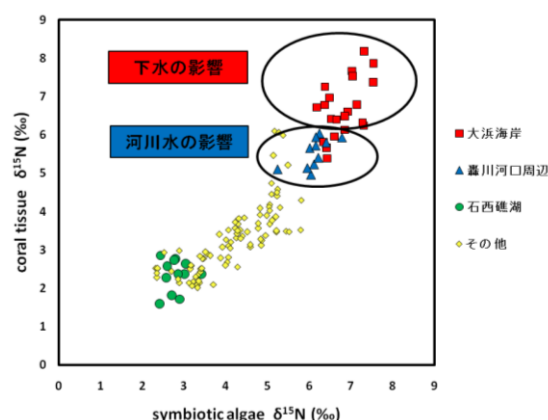


Fig.1 サンゴ組織と共生藻の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  の近似関係および地点間変動

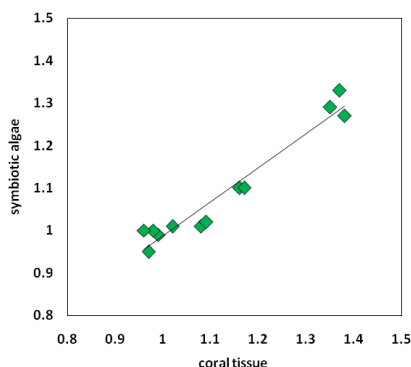


Fig.2 サンゴ組織と共生藻の栄養段階の相関関係

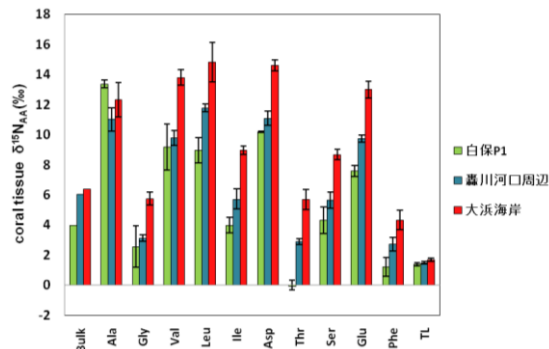


Fig.3 *P. lutea* のサンゴ組織の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  の地点間変動

## 4. 参考文献

Chikaraishi et al. (2009). *Limnol. Oceanogr. Methods* 7, 740-750

# Determination of nitrogen sources for scleractinian corals by compound-specific nitrogen isotope ratios of amino acids

Mar. 2011, Department of Nature Environmental Studies, 096627, Takanori Fujii  
Supervisor; Associate Professor, Hiroshi Ogawa

Key words; scleractinian corals, nitrogen sources, symbiotic relationship, compound-specific nitrogen isotope ratios of amino acids, eutrophication

## 1. Introduction

Coral reef is one of the most diverse and productive systems in the ocean. Scleractinian corals play a principal role to support this rich ecosystem. Although the nitrogen (N) sources of corals are zooplankton, DIN (Dissolved Inorganic Matter), and N fixed by cyanobacteria, it has not been understood clearly which nitrogen source is the most important for corals. Symbiotic algae in coral tissues are important primary producers in reef ecosystem, but it also remains unknown what mechanism of the material cycle exists between host corals and their symbiotic algae.

To investigate the trophic levels in the ecosystem, the compound-specific nitrogen isotopic ratio ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ ) of amino acids is useful, which improves the conventional method by using the isotope analysis of bulk organic materials ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ ). This new method is spreading rapidly owing to a lot of advantages, for example, the trophic levels can be estimated based on amino acids from a single organism.

The aim of this study is to clarify main nitrogen source for corals and the materials transport between host corals and their symbiotic algae. Moreover, this study dealt with the influence of eutrophication on the reef ecosystem from the background of the damage of coral reef in recent years.

## 2. Materials and Methods

### *2-1. Study sites and collected corals*

This study was performed using 8 coral species (ex, *Acropora pulchra*, *Porites lutea*) which were collected at around Ishigaki Island in Okinawa (May 2009~Sep. 2010). Shiraho-Reef, around the mouth of Todoroki river (river stress), and Ohama reef (sewage stress) are selected as study sites.

### *2-2. Analysis of compound-specific nitrogen isotope ratios of amino acids*

Amino acids (ca.20 kinds of compounds) are main nitrogen components of organism. Some amino acids (ex. Glu) are enriched in  $^{15}\text{N}$  as a result of isotopic fractionation during metabolism, whereas other amino acids (Phe, Met) show little change in their values. This method can identify the trophic levels (TL) of organism by using these different properties. The trophic level is estimated based on the  $\delta^{15}\text{N}$  of Glu ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ ) and Phe ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ ) in Eq.1.

$$\text{TL}_{\text{Glu/Phe}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1 \quad (1)$$

### 3. Result and Discussion

#### 3-1. Symbiotic system between host coral and symbiotic algae (zooxanthella)

The  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  of collected coral tissue (n=147) showed 1.6~8.2‰. Coral tissues and their symbiotic algae showed similar  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  to each other ( $r^2=0.82$ ,  $p<0.0001$ ; Fig.1). They also showed similar  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  variation pattern. It suggests that coral tissues and symbiotic algae have the same nitrogen sources and share their nitrogen to each other. In general, the TL of corals increase only by preying zooplankton. However, the TL of symbiotic algae showed similar values of coral tissues (Fig.2), suggesting that the nitrogen of the zooplankton which corals preyed has shifted to symbiotic algae before it is completely metabolized, and also that coral had “amino acids pool” as DIN pool.

#### 3-2. Change of nitrogen sources of scleractinian corals by the difference of site environments.

*P. lutea* collected at sites where high DIN concentrations were observed by the anthropogenic loading had higher  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  and  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  than coral collected at Shiraho Reef of low DIN (Fig.3). The  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$  which is hardly shown  $^{15}\text{N}$  enrichment with each trophic level and inherently reflects the  $\delta^{15}\text{N}$  of the primary producers also increased as well as other amino acids. This demonstrates that corals in eutrophication sites synthesize amino acids by utilizing DIN with high  $\delta^{15}\text{N}$ . On the other hand, the TL of coral tissues in each sites rose with increasing DIN concentration (1.4→1.5→1.7). Consequently, it was estimated that the dependency on preying zooplankton increased as eutrophication advanced (20%→25%→35%).

This may be because that DIN loading caused the increase of zooplankton following the increase of phytoplankton which is a food of zooplankton.

In conclusion, the nitrogen sources of corals could change by differences of environments, and it is controlled mainly by nutrient concentration.

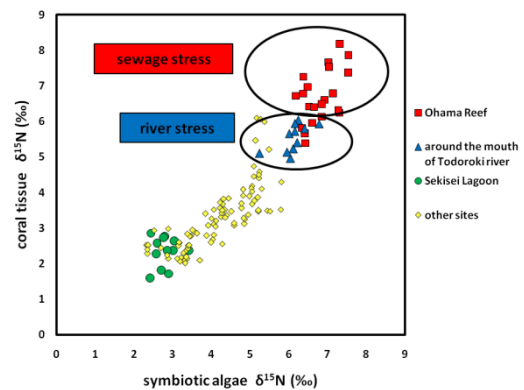


Fig.1  $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$  of coral tissues and symbiotic algae in Ishigaki Island

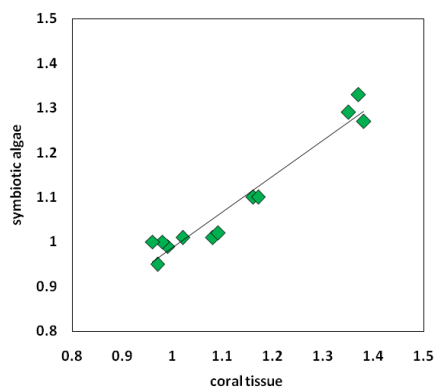


Fig.2 Trophic levels of coral tissues and symbiotic algae

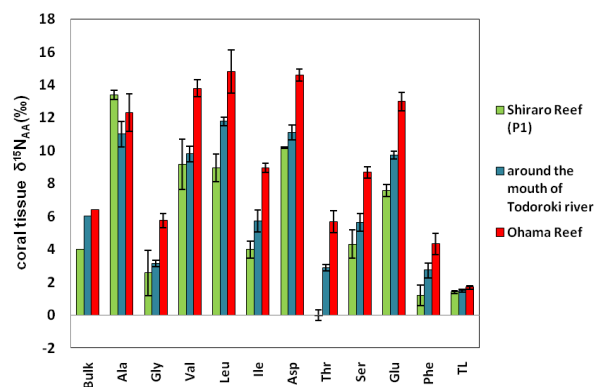


Fig.3 Comparison of  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  of *P. lutea* among 3 sites

### 4. Reference

Chikaraishi et al. (2009). *Limnol. Oceanogr.: Methods* 7, 740-750