

— 報 告 —

ハマサングの光制御下での長期飼育実験 — 骨格炭素同位体比と共生藻光合成の相関解析 —

佐藤 崇範^{1a*}, 小俣 珠乃^{2b}, 鈴木 淳³, 蓑島 佳代³, 能丸 恵理子⁴,
村上 明男⁴, 村山 昌平⁵, 川幡 穂高^{6,3}, 丸山 正²

熱帯から温帯の浅海域に広く生息している造礁サンゴは、水温や水質、光などの環境要因に鋭敏に応答する。特に、骨格に形成される年輪様構造や骨格中の元素の組成比・同位体比は、生育環境により大きく変動することが知られている。我々は、炭素同位体比に影響を与える環境要因の解明を目的として、約500日間に及ぶハマサングの飼育実験を行った。共生藻の光合成活性に直接関わる光条件（強度と日長）を変えて飼育し、飼育期間中に形成された骨格の炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）について光条件や共生藻の光合成色素量などとの相関を解析した。ここでは、これらの研究を進める過程で開発してきたハマサングの飼育法や各種の実験手法を中心に報告する。

キーワード：サンゴ，飼育実験，共生藻，光合成，炭素同位体比，酸素同位体比

2009年8月13日受領；2010年6月16日受理

- 1 環境総合テクノス（旧：関西総合環境センター）
- 2 海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター
- 3 産業技術総合研究所・地質情報研究部門
- 4 神戸大学・自然科学系先端融合研究環・内海域環境教育研究センター
- 5 産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門
- 6 東京大学大学院・新領域創成科学研究科・環境学系自然環境学専攻／東京大学・大気海洋研究所・海洋底科学部門

現在の所属

- a 黒潮生物研究所
- b 海洋研究開発機構・地球深部探査センター

*代表執筆者：

佐藤 崇範
黒潮生物研究所
〒788-0333 高知県幡多郡大月町西泊560-イ
0880-62-7077
sato@kuroshio.or.jp

著作権：独立行政法人海洋研究開発機構

— Report —

**Long-term culture experiment of *Porites* under light-controlled conditions:
Analyses of skeletal $\delta^{13}\text{C}$ and photosynthetic parameters**

Takanori Satoh^{1a*}, Tamano Omata^{2b}, Atsushi Suzuki³, Kayo Minoshima³, Eriko Nomaru⁴,
Akio Murakami⁴, Shohei Murayama⁵, Hodaka Kawahata^{6,3}, and Tadashi Maruyama²

Reef-building corals are susceptible to environmental stresses such as high water temperature and strong light intensity. Growth-ring formation and isotopic compositions of coral skeletons are known to be affected by various environmental factors. To understand the effect of light on skeletogenesis of corals, we conducted a long-term indoor culture experiment of *Porites* under different light conditions and analyzed the correlation between the carbon isotope fractionation and the photosynthetic parameters of the symbiotic alga. Here, we report the detailed protocols about over 500-day coral culture and biological and geochemical analyses.

Keywords: coral, culture experiment, symbiotic alga, photosynthesis, carbon isotope ratio, oxygen isotope ratio

Received 13 August 2009 ; Accepted 16 June 2010

- 1 The General Environmental Technos Co., Ltd. (Kansai Environmental Engineering Co., Ltd.)
- 2 Extremobiosphere Research Center, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
- 3 Biogeochemical Cycles Research Group, Institute of Geology and Geoinformation, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
- 4 Kobe University Research Center for Island Seas
- 5 Research Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
- 6 Graduate School of Frontier Sciences / Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Present affiliation

- a Biological Institute on Kuroshio
- b The Center for Deep Earth Exploration, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

*Corresponding author:

Takanori Satoh
Biological Institute on Kuroshio
560 Nishidomari, Otsuki, Kochi 788-0333, Japan
Tel. +81-880-62-7077
satoh@kuroshio.or.jp

Copyright by Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

1. はじめに

熱帯から温帯の浅海域に広く生息している造礁サンゴ（以下、サンゴと呼ぶ）は、水温や水質、光などの生育環境の変化に対して敏感に応答する（Aharon, 1991）。サンゴは軟組織のポリプを基本単位として、多くの種では多数のポリプからなる群体となり、石灰質の骨格を形成する。ポリプには、一般的に褐虫藻とも呼ばれている単細胞性の光合成微生物、渦鞭毛藻 *Symbiodinium* が高密度で共生しており（Allemand et al., 1998）、サンゴの成長・骨格の形成は共生藻の光合成により支えられている。サンゴ骨格の形成は、光や水温などの生育環境の影響を直接的、間接的に受けることが知られ（Kawaguti and Sakumoto, 1948）、樹木の年輪構造に類似した年輪バンドがしばしば出現するとともに、骨格の元素組成比や酸素や炭素の同位体比も大きく変動する。従って、骨格の成長軸に沿って元素組成比や同位体比を精密分析することで、サンゴの成長過程の環境情報を解読することが可能である。例えば、ストロンチウム/カルシウム比や酸素同位体比は、水温指標として有効であることが明らかになっている（Fairbanks and Dodge, 1979; Smith et al., 1979）。一方、他の構成元素や同位体比については変動パターンが複雑なこともあり、どの環境情報と対応するのかなど不明な点が残されている。炭素同位体比については、従来の研究から共生藻の光合成および呼吸や石灰化反応（生物鉱化反応、バイオミネラリゼーション）と密接に関わることが示唆されている（McConnaughey, 1989; 小俣ほか, 2006）。しかし、海水温と高い相関を示す酸素同位体比の場合とは異なり、炭素同位体比と環境要因との関係については未解明の部分が多い。これは、炭素同位体比に影響を与える共生藻（光合成と呼吸）とポリプ（呼吸と石灰化）の生理代謝には様々な環境要因が複雑に関わっているためである（例えば Swart, 1983）。さらに、炭素同位体比の研究の遅れは、サンゴや共生藻の生理代謝を長期間にわたり一定に保ちながら、解析を進めることが困難であることが主な要因として挙げられる。

そこで我々は、サンゴ骨格の炭素同位体比と環境要因や共生藻のエネルギー代謝との関係を明らかにするため、共生藻の光合成代謝に重要な環境要因である光条件（光強度と日長）を段階的に変えて約500日間にわたりサンゴを屋内で飼育し、飼育期間中に形成された骨格の炭素同位体比の変動を比較する実験を計画した。本研究で用いたハマサンゴ（*Porites* spp., 刺胞動物門花虫綱六放サンゴ亜綱イシサンゴ目ハマサンゴ科ハマサンゴ属）は主に塊状の群体を形成するサンゴで、西太平洋海域ではオーストラリアから日本まで広く分布しており（Veron, 2000）、古環境復元などの研究に広く利用されている（Gagan et al., 1994）。屋内施設で飼

育したハマサンゴを用いて、共生藻密度、光合成色素量、骨格成長量、炭素・酸素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{18}\text{O}$ ）など各種の生物学的、化学的パラメータについて精密分析を行い、その成果の一部を *Journal of Geophysical Research* 誌に報告した（Omata et al., 2008）。本報告では、この研究を進める過程で開発・蓄積してきたサンゴの飼育法や各種の分析法を詳細にまとめた。

2. 方法

2.1. サンゴ飼育実験施設

サンゴの養生および飼育は、関西総合環境テクノス（旧関西総合環境センター）の印南臨海実験場（和歌山県日高郡印南町）で実施した（Fig. 1）。

試験飼育には、屋内に設置された掛け流し式（開放式）のアクリル水槽（容量100 L、直径60 cm×高さ33.8 cmの円柱型）を採用した。水槽上部の外縁から海水を供給し、

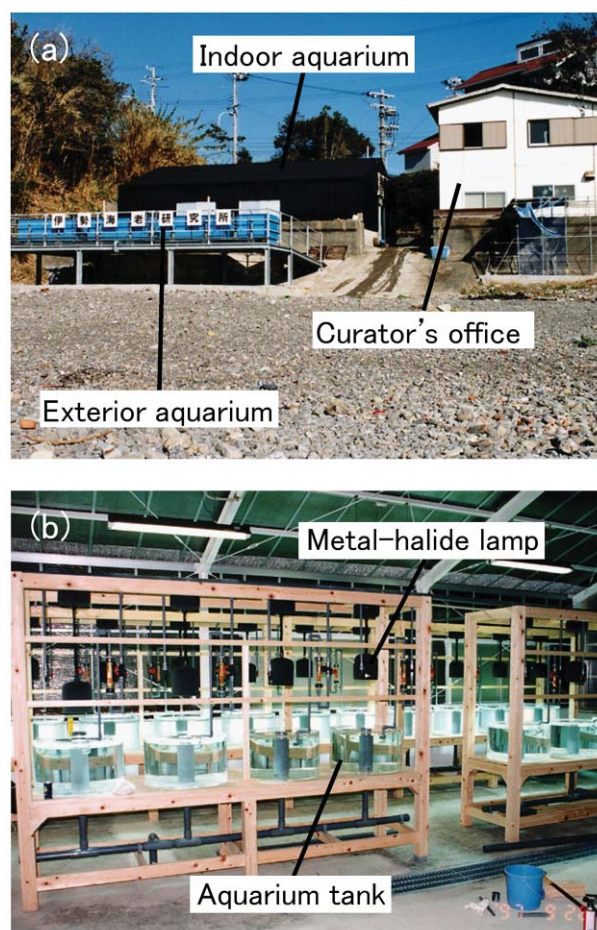


Fig. 1. Coral culture facility in INAMI marine station
(a) Overview from coastal side, (b) Indoor aquarium tank

図1. 印南臨海実験場のサンゴ飼育施設
(a) 海岸側から見る施設外観, (b) 屋内に設置した水槽

水槽中央部のオーバーフロー管から排水させた (Fig.2). サンゴ照明用としてメタルハライドランプ (Dupla社製, Duplalux HQI-TS150W; 色温度5,200 K) を水槽の上方に設置した. 照射時間は24時間タイマーにより, 光強度はランプと水槽の距離によりそれぞれ制御した.

飼育用の海水は前浜 (汀線から沖合約100 m, 水深約1.5 m) から揚水ポンプで常時汲み上げ, 砂ろ過装置でろ過した. 屋内水槽に供給する海水は, 熱交換器を通すことにより任意の水温に設定可能であり, また装置の故障などによる異常水温を検知するため, 給水管内の温度センサーに警報システムも連動させた.

2.2. サンゴ試験区

サンゴ飼育の光条件として, 3段階の光強度 (100, 300, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) と2段階の照射時間 (10時間照射–14時

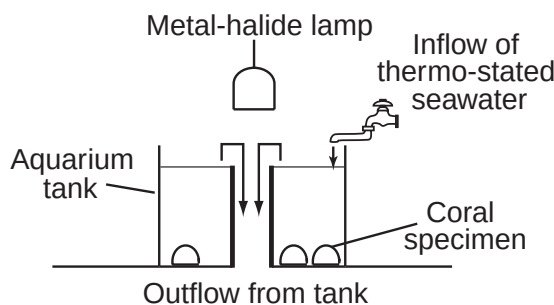


Fig. 2. Indoor aquarium system for coral culture

図2. サンゴ飼育用の屋内水槽: 模式図

間暗所, 12時間照射–12時間暗所) を組み合わせて6条件の試験区を設定し (Table 1), それぞれ独立した飼育水槽として設置した. なお, 当初は700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の試験区も設置したが, 徐々に白化の兆候が現れたため10日後に中止した (Table 3参照). 光強度は, 光量子計 (Biospherical Instruments社製 QSL-2100) を用いた週一回の実測に基づき, 水槽と光源との距離を再調整することで一定の値に維持した. 飼育海水の温度は $25.0 \pm 0.6^\circ\text{C}$, 流量は $1.0\text{--}1.5 \text{ l min}^{-1}$ に設定した. 6試験区間での水温むらを防ぐため, 温度調整後の海水を通す送水管を, 水槽直前で6口に分岐させた.

2.3. サンゴ飼育環境のモニタリング

各試験区の設定条件 (水温, 光強度など) を随時測定し, その都度再調整を行った (Table 2). 水温は1日2回 (10時と16時) 実測するとともに, 各水槽に設置した水温データロガー (Onset社製StowAway TidbiT Temp Logger/Hobo Water Temp Pro) で1時間毎に自動計測した. 塩分は1日1回 (10時) 採水した試料 (塩検瓶300 ml) を用い, 塩分計 (YEO-KAL社製 Model 601Mk1V) で計測した. また, 溶存無機炭素 (DIC) の炭素同位体比および酸素同位体比の測定用に, 海水をガラス製バイアル瓶 (100 ml) 2本に密封保存した. 海水試料中に混在する微生物の作用による海水溶存無機炭素の炭素同位体比変化 (Goreau, 1977) を防ぐため, 海水試料に塩化第二水銀 (HgCl_2) 飽和溶液を微量加えた.

Table 1. Condition for *Porites* culture

表1 サンゴ群体飼育の設定条件

Water temperature ($^\circ\text{C}$)	25.0 ± 0.6					
Light intensity ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	100		300		500	
Light-dark regime (hour:hour)	10:14	12:12	10:14	12:12	10:14	12:12
Daily light dose ($\text{mol m}^{-2} \text{day}^{-1}$)	3.6	4.3	10.8	13.0	18.0	21.6

Table 2. Monitoring of seawater in aquarium tank

表2 飼育海水の水質管理

Parameter	Method	Sampling interval
Temperature ($^\circ\text{C}$)	Data logger	Every hour
Salinity	Salinometer	Daily (10:00 a.m.)
DIC*	Vaporization	Occasionally (10 times)
$\delta^{13}\text{C}$ in DIC*	Mass spectroscopy	Occasionally (10 times)

* Dissolved inorganic carbon

Table 3. Logbook of *Porites* culture experiment

表3 サンゴ群体の飼育実験の記録

ID for coral culture		ID for isotope analysis	ID for seawater temperature	Date for culture and treatments							Culture period (days)	
				Alizarin staining	Start of culture	Transfer of specimen	Alizarin staining (2nd)	Restarat of culture	Transfer of specimen	End of culture		
100μE-12hL	-1	-	b	2003/2/20	2003/2/22	-	2003/11/7	-	-	2003/12/29	310	
	-2	100μ-12h-2				-		-	2004/2/7	350		
	-3	100μ-12h-3				-		-	2004/2/14	357		
	-4	100μ-12h-4				-		-	2004/7/25	520		
	-5	100μ-12h-5				-		-	2004/7/25	520		
	-extra	-				to 500 μ E-12hL-3 (2003.11.7)				-	-	
100μE-10hL	-1	100μ-10h-1	f	2003/2/20	2003/2/22	-	-	-	-	2003/7/28	156	
	-2	-				to 500μE-12hL-1 (2003.11.7)				-	-	
	-3	100μ-10h-3				-	-	2004/7/25	520			
	-4	100μ-10h-4				-	-	2004/7/25	520			
	-5	100μ-10h-5				-	-	2004/7/25	520			
	-extra	-				to 700μE-12hL-1 (2003.11.7)				-	-	
300μE-12hL	-1	300μ-12h-1	c	2003/2/20	2003/2/22	-	2003/11/7	-	-	2004/2/7	350	
	-2	300μ-12h-2				-		-	2004/2/14	357		
	-3	300μ-12h-3				-		-	2004/7/25	520		
	-4	-				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-5	300μ-12h-5				-		2003/11/7	-	-	2004/7/25	520
	-extra	-				to 500μE-12hL-4 (2003.11.7)				-	-	
300μE-10hL	-1	300μ-10h-1	g	2003/2/20	2003/2/22	-	-	-	-	2003/7/28	156	
	-2	-				to 500μE-12hL-2 (2003.11.7)				-	-	
	-3	300μ-10h-3				-	-	2004/7/25	520			
	-4	300μ-10h-4				-	2003/11/7	-	-	2004/7/25	520	
	-5	300μ-10h-5				-	-	-	2004/7/25	520		
	-extra	-				to 700μE-12hL-2 (2003.11.7)				-	-	
500μE-12hL	-1	500μ-12h-1	d			from 100μE-10hL-2 (2003.11.7)	2003/11/7	2003/11/9	-	2004/2/7	90	
	-2	500μ-12h-2				from 300μE-10hL-2 (2003.11.7)			-	2004/2/7	97	
	-3	500μ-12h-3				from 100μE-12hL-extra (200.11.7)			-	2004/7/25	262	
	-4	-				from 300μE-12hL-extra (2003.11.7)			-	2004/1/24	76	
	-5	500μ-12h-5								from 700 μ E-12hL-2 (2004.2.12)	2004/7/25	165
	-old-1	500μ-12h-6	e	2003/2/20	2003/2/22	Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-old-2	500μ-12h-7				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-old-3	500μ-12h-8				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-old-4	500μ-12h-9				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-old-5	500μ-12h-10				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-old-extra	500μ-12h-11				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
500μE-10hL	-1	500μ-10h-1	h	2003/2/20	2003/2/22	-	-	-	-	2003/7/28	156	
	-2	500μ-10h-2				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-3	500μ-10h-3				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-4	500μ-10h-4				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-5	500μ-10h-5				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
	-extra	500μ-10h-6				Dead (2003.8.8)				2003/8/8	167	
700μE-12hL	-1	-	c			from 100μE-10hL-extra (2003.11.7)	2003/11/7	2003/11/9	to 100μE-12hL due to bleaching (2003.11.19) and dead (2004.2.12)	2004/2/12	-	
	-2	-				from 300μE-10hL-extra (2003.11.7)	2003/11/7	2003/11/9	to 100μE-12hL due to bleaching (2003.11.19) and to 500μ E-12hL-5 (2004.2.12)	-	-	

2.4. 海水溶存無機炭素の炭素同位体比測定

ガラス製バイアル瓶に密封保存した海水は、産業技術総合研究所所有のガス精製のガラスラインを利用して、海水試料にリン酸 (H_3PO_4) を添加して溶存無機炭素を二酸化炭素 (CO_2) の形で気化させて精製し、ガラスチューブに捕集した二酸化炭素を質量分析計に導入して、炭素同位体比の測定を行った。

2.5. サンゴ群体の採取および養生

本実験に用いた塊状のハマサンゴ (*Porites* spp.; 以下、サンゴ群体と呼ぶ) は、柏島 (高知県幡多郡大月町) 周辺の浅海域に生育する複数の群体から採取し (2001年4月, 10月, 2002年10月), 直ちに印南臨海実験場へ移送して、屋外に設置した開放式FRP製水槽 (500 L) で1ヶ月間以上養生させた。飼育環境に順化させたサンゴ群体は、ハンドソー (刃渡り20–30cm) を用いて骨格ごと試験飼育に適したサイズ (長径3–5cm) に切断し、さらに屋外水槽で3ヶ月間以上養生させた。なお、屋外水槽は直射日光の影響を強く受けるため、水槽上部に遮光ネットを取り付けて光量を調節した。

切断によって骨格が剥き出しになった面が完全に軟組織で覆われたサンゴ群体の中から、投影面積が一定のサイズのものを36群体選抜し、屋内水槽 (光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12時間照射–12時間暗所) に移動させた (2003年2月3日)。なお、屋外水槽での飼育水温が約22℃であったため、サンゴ群体にストレスを与えないように、屋内水槽の水温を22℃から25℃まで18日間かけて徐々に上昇させた。



Fig. 3. Staining of *Porites* skeleton with Alizarin red S

図3. サンゴ群体骨格のアリザリン染色

2.6. サンゴ骨格のアリザリン染色

試験飼育中のサンゴ骨格の形成過程を解析するため、屋内水槽で順化させたサンゴ群体の試験飼育開始直前に形成された骨格部位に、Barnes and Lough (1993) の手法に従ってアリザリン染色法によるマーキングを行なった (2003年2月20日)。海水に溶かしたアリザリンレッドS (Alizarin red S, 15 mg l^{-1}) をガラスフィルター (Whatman GF/E, 47 mm ϕ , $0.45 \mu\text{m}$) で吸引ろ過した。この溶液を満たしエアレーションした閉鎖水槽にサンゴ群体を移し、水温を24–25℃に保ちながら24時間飼育して染色した (Fig. 3)。

2.7. サンゴ群体の飼育経過と回収

アリザリン染色を行った36群体を6試験区の飼育水槽に6群体ずつ入れ、試験飼育を開始した (2003年2月21日; Table 3)。飼育期間中に大阪湾を通過した台風10号の影響で海水揚水システムが停止した (2003年8月8日)。このため、光強度 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の2試験区で飼育水槽の海水温が33.1℃まで上昇し、これらの試験区のサンゴ群体が全滅するトラブルが発生した。対策として、他の試験区からサンゴ群体を1群体ずつ集め、光強度 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12時間照射–12時間暗所) の試験区を新たに設置した (2003年11月7日)。同時に、全試験区のサンゴ群体に、同様の手法で再度アリザリン染色を行なった。

サンゴ群体は数回に分けて回収し (2003年7月28日, 12月29日, 2004年1月24日, 2月7日, 2月14日, 7月25日), 軟体部および骨格部に分けて分析した (Fig. 4)。

2.8. 軟組織の分析

サンゴ群体のポリプに共生する渦鞭毛藻 *Symbiodinium* について、光合成関連の指標として、細胞数の計測と光合成色素の定量を行った。

2.8.1. サンゴ群体の移送

軟体部の解析は、神戸大学・内海域環境教育研究センター (兵庫県淡路島) で実施した。分析当日の早朝に、サンゴ群体を飼育海水で満たした二重のビニール袋に1群体ずつ入れ、酸素ガスを充填した。約3時間の移送中の水温変化を避けるため、保温材とともにクーラーボックスに入れた。到着後、サンゴ群体を海水ごとガラス水槽に移し、直ちにエアレーションを開始した。

2.8.2. 軟組織の分取

サンゴ軟体部の分取は、ウォーターピック法 (Johannes and Wiebe, 1970) に基づき以下の手順で行った。市販のウォーターピック (WaterPik™ 口腔洗浄器) を用い、サン

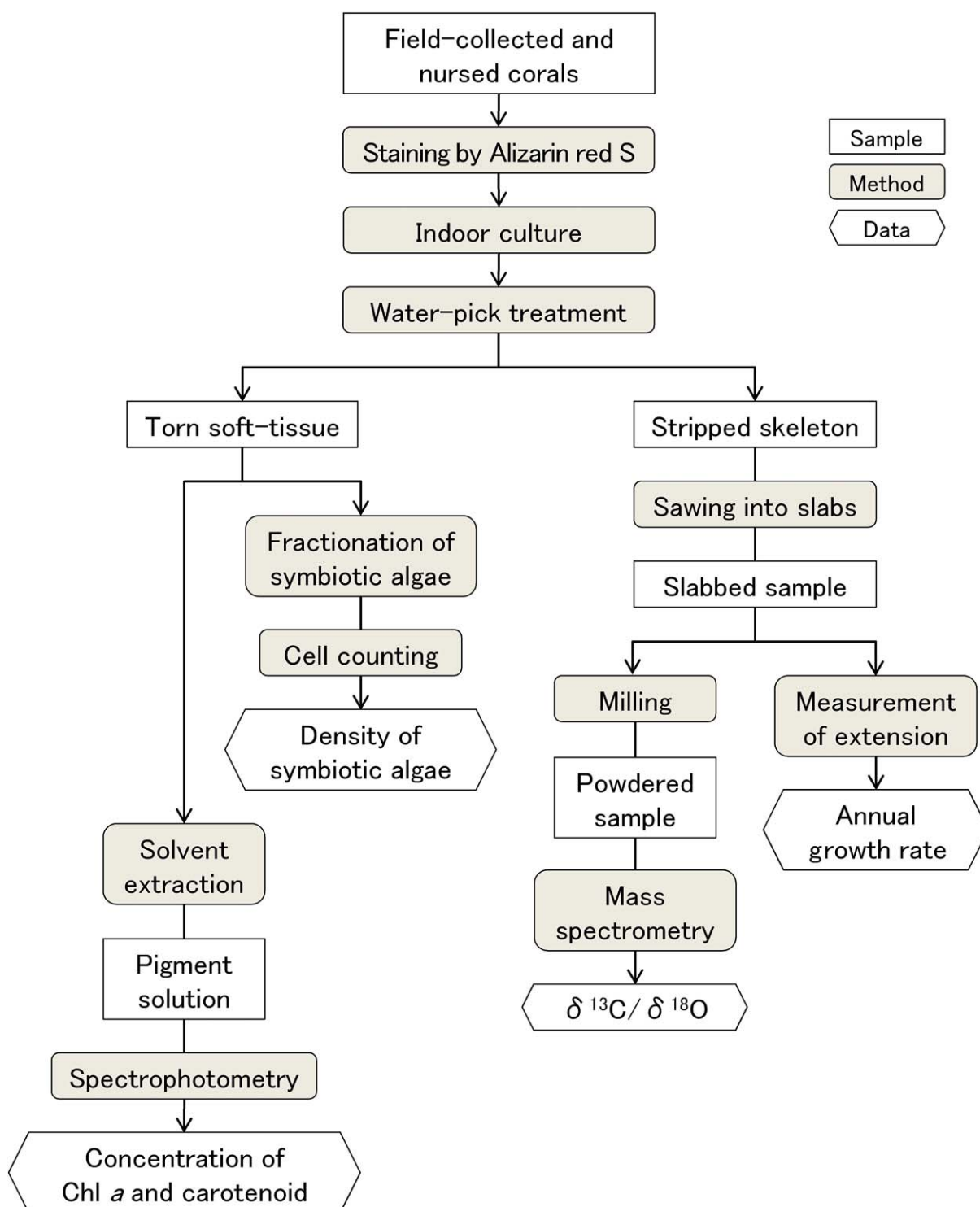
Fig. 4. Flowchart for analyses of skeletons and the symbiotic alga of *Porites*

図4. サンゴ群体骨格と共生藻の分析フローチャート

ゴ群体の表面に強いパルス噴流を吹き付けることで、軟組織を完全に剥がし取った。

- (i) サンゴ群体の中央縁辺の平坦部にコルクボーラー（5号、内径10 mm）を用い骨格に深さ1-2 mmの円形の溝をつける（Fig. 5a）。溝周辺の骨格屑や表面の粘液物質（ミューカス）を丁寧に取り除く。
- (ii) 単位面積当たりのポリプ数を記録するために、軟体部を分取する区画内（円形溝の内側）を実体顕微鏡で写真撮影する（Fig. 5b）。
- (iii) ウォーターピックのタンクにろ過海水を入れて水圧を調整する。先端部を真っ直ぐに加工したウォーターピックノズルを用い、噴流のON-OFFはフットスイッチにより行う。
- (iv) 傾斜台（木製、約45度、幅15-20 cm × 長さ20-30 cm）にビニール袋（厚手、120 × 230 mm）の口を上向きに置き、サンゴ群体を袋の中央付近に入れる。傾斜台は、サンゴ群体が袋の底に溜まった軟体部に触れ、粘液物質が分泌するのを抑えるために用いる。
- (v) サンゴ群体の円形溝に、同じ大きさの穴を開けたプラスチック製ガイドを押し当て、ウォーターピックの噴流を吹き付ける。剥がれた軟組織が外に飛び出ないようにビニール袋の口を閉じ、なるべく少量の海水（20-30 ml）で処理する（Fig. 5c）。ノズルからの漏水を防ぐため、ノズル位置は常に海水タンクより上方に保つ。
- (vi) 上記の手順により、軟組織を分取したサンゴ群体は、アーカイブ、骨格分析（成長量、炭素・酸素同位体比）、光合成色素定量、共生藻計測、および予備保存のために分別して保存する（Fig. 6）。

2.8.3. 軟組織の共生藻分画

サンゴ群体の骨格から分取した軟体部中の共生藻細胞数および光合成色素量を分析するため、以下の処理を行った。

- (i) 分取中に飛散した軟組織をろ過海水でビニール袋の底に洗い落とす。この軟組織懸濁液の容量を測定する。テフロンホモジェナイザーを用いて粘液物質と軟組織を手動で摩砕する。
- (ii) 摩砕した試料を遠心管（50mlファルコンチューブ）に移し、遠心分離する（5,000 rpm, 15 min, 25℃）。共生藻を含む沈澱をろ過海水（約10 ml）で再懸濁する。共生藻が遠心管の底に凝集する場合は、ボルテックス処理や超音波処理により分散させる。試料が泡立っている場合は、真空デシケーターなどを用い脱泡する。

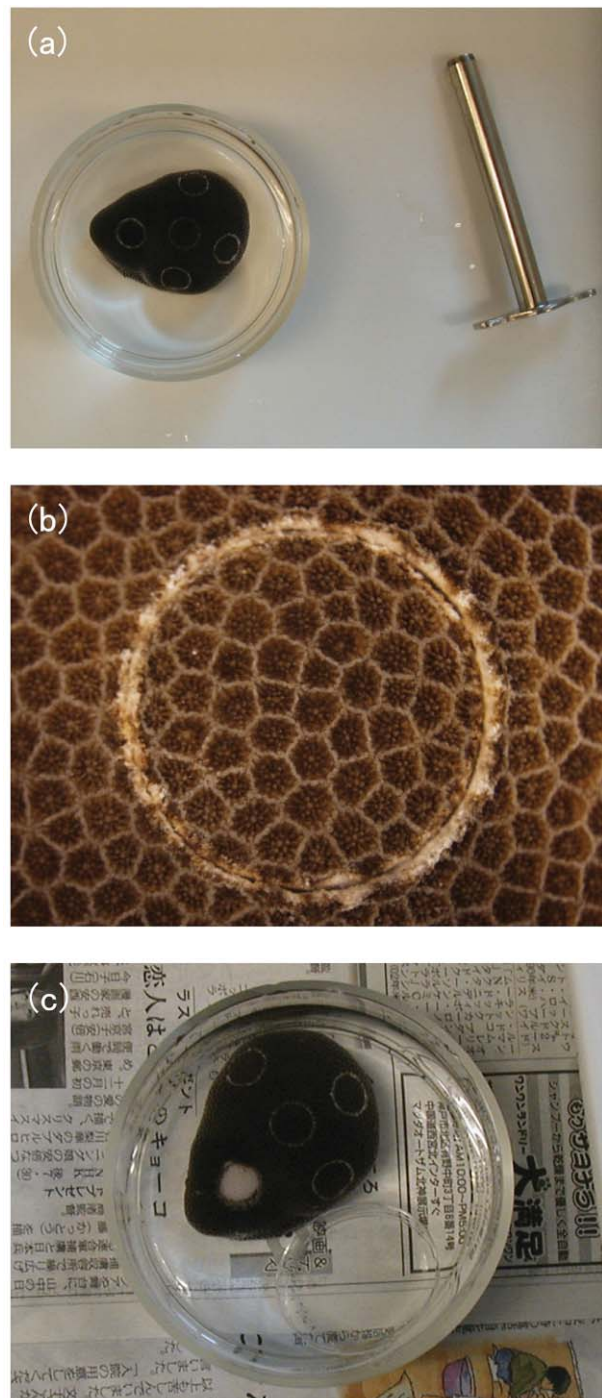


Fig. 5. Quantitative sampling of *Porites* tissue with symbiotic algae
(a) Marking on coral skeleton (ϕ 10 mm circular ditch by cork borer),
(b) Close-up image of (a), (c) Specimen after removing tissue by water-pick

図5. サンゴ群体ポリプの定量的分取法

(a) 分取区画の目印：コルクボーラー（右）による円周溝（ ϕ 10 mm）、(b) 分取区画の拡大像：ポリプ数の計数、(c) ウォーターピックによるポリプ剥離後の試料

- (iii) 軟組織懸濁液をメスシリンダー (20 ml) に移し、全容量を15 mlに合わせてから、マイクロチューブ (1.5 ml) 2本に1 mlずつ分注し静置する。
- (iv) 残りの懸濁液13 mlを遠心管 (15 mlファルコンチューブ) に移し、遠心分離する (5,000 rpm, 15 min, 25°C)。沈殿が巻き上がらないように上清を捨て、さらにチューブ内の水滴をキムワイプで拭き取る。光合成色素の定量用として凍結保存 (-80°C) する。
- (v) (iii)のマイクロチューブを遠心分離し (13,000 rpm, 7 min, 4°C)、上清を捨てた後、4% Paraformaldehyde (PFA) -海水を1 ml加えて静置 (10 min) する。試料をろ過海水で遠心洗浄し (13,000 rpm, 5 min, 4°C, 2回)、共生藻計測用としてマイクロチューブごと保存する。

2.8.4. 共生藻細胞数の計測

冷蔵保存したマイクロチューブにろ過海水500 μ lを加え容量を確認した後、ボルテックス処理により共生藻を分散させた。ミューカス塊が残っている場合は遠心分離 (13,000 rpm, 7 min) により除き、再懸濁、超音波処理により、共生藻を均一に分散させた。試料12 μ lを用い改良ノイバウエル血球計算盤により細胞数を計測し、サンゴ群体の表面積あたり (分取部位, 10 mm ϕ) の共生藻密度として換算した。

2.9. 光合成色素の定量

光合成色素の抽出溶媒として、抽出効率と抽出後の色素の安定性から、*N, N*-Dimethylformamideを採用した。ここでは、共生藻がもつ光合成色素 (クロロフィルa, クロロフィルc₂, ペリジニン) のうちクロロフィルaについて測

定した。可視域の吸収スペクトルを測定し、Porra et al. (1989) の分子吸光係数を用いてクロロフィルa量を計算した。

2.9.1. 光合成色素の抽出

光合成色素の抽出は、Suzuki and Ishimaru (1990)の方法を参照して行った。

- ファルコンチューブ (15 ml) に、サンゴ軟組織を入れる。
- 各チューブに*N, N*-Dimethylformamide (DMF, Wako 045-02916) を3 mlずつ加える。
- ウォーターバスにチューブをラックごと浸し、60°Cで約8分間加温する。抽出効率を高めるため、薬さじ (小) をチューブに差し込みラックごと振動させる。
- 抽出操作後、直ちにチューブを氷冷する。
- チューブを遠心分離する (3,000 rpm, 5 min, 4°C)。
- 上清を沈殿が混在しないように注意して別のチューブに移す。沈殿に色素が残存している場合は、さらに(ii)-(vi)の操作を繰り返す。
- 抽出操作や抽出液の保存の際には、色素の分解・退色を防ぐため冷暗条件 (氷冷, アルミホイル遮光) を保つ。

2.9.2. クロロフィルの定量：吸収スペクトル法

抽出液の色素濃度が十分高い場合は、吸収スペクトル法でクロロフィル定量を行った。

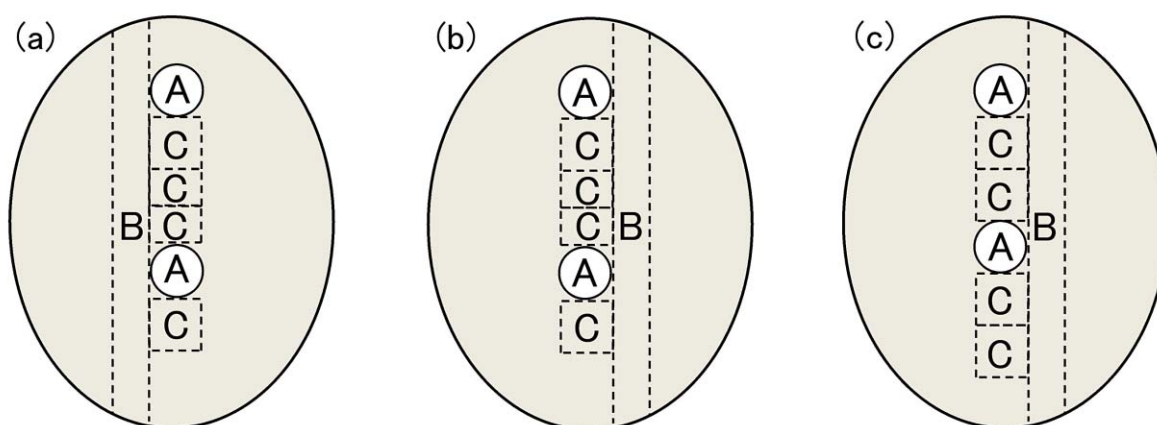


Fig. 6. Sampling maps for cultured *Porites*: for analysis of photosynthetic pigments and density of symbiotic algae (A), measurement of stable isotope and annual extension rate (B), for archives (C)

(a) Map for the colony, 300 μ -12h-2, (b) Map for the colony, 500 μ -12h-1, (c) Map for the colonies, 100 μ -12h-1, 100 μ -12h-2, 300 μ -12h-1, 500 μ -12h-2

図6. サンゴ群体試料の区分け：光合成色素定量及び共生藻計測(A), 骨格分析(B), 保存用試料(C)

(a) 300 μ -12h-2, (b) 500 μ -12h-1, (c) 100 μ -12h-1, 100 μ -12h-2, 300 μ -12h-1, 500 μ -12h-2

[分光光度計の操作]

- (i) 石英キュベット (10 × 10 mm, 2面透明, テフロン栓) 2本にDMF (3ml) を入れる。
- (ii) キュベットを紫外可視分光光度計 (HITACHI, 340) にセットし, 波長範囲400-800 nmにおいてベースライン補正を行う。
- (iii) 試料側キュベットに色素抽出液を入れ替え, 吸収スペクトルを記録する。

[クロロフィル濃度の計算]

- (iv) クロロフィルa濃度は以下の式に基づいて定量する (Porra et al., 1989)。
$$[\text{Chl a}] = A_{663.8} / 88.74 \text{ (g/l)}$$
$$[\text{Chl a}] = A_{663.8} / 79.29 \text{ (mM)} \quad (1)$$
$$*A_{663.8}: 663.8 \text{ nmにおける吸光度}$$

2.9.3. クロロフィルの定量：蛍光スペクトル法

試料が微量の場合, あるいは色素濃度が低い場合は, より高感度な測定が可能な蛍光スペクトル法を用いた (能丸, 2005)。

[クロロフィル標準液の作成]

- (i) 渦鞭毛藻 *Symbiodinium* の培養液をガラススピッツ管2本に10 mlずつ分注し, 遠心分離 (3,000 rpm, 5 min, 4℃) する。
- (ii) 上清を捨て, 細胞沈殿に脱イオン水を加え再懸濁・遠心分離により培地由来の塩を除去する。遠心管内の水滴を取り除き, DMFを6mlずつ加える。試験管に薬さじ (小) を差し込みラックごと振動させながら60℃のウォーターバスで約8分間抽出する。抽出後は, 試験管ごとすみやかに氷冷する。
- (iii) (ii)の試料を遠心分離し (3,000 rpm, 5 min), 沈殿を巻き上げないように上清を分取する。この上清を原液 (1/1) とし, 希釈液 (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200濃度) を5 mlずつ作成する。希釈液は測定時までアルミホイルで遮光の上, 氷冷保存する。
- (iv) 1/1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20の希釈液の吸収スペクトルを分光光度計で測定する。
- (v) (1)式に従い吸光度からクロロフィルa濃度を計算し, 検量線を作成する。

[蛍光分光光度計の操作]

- (vi) 蛍光分光光度計 (HITACHI, F4500) の測定条件を以下のように設定する。
励起波長435nm, 波長走査範囲600-750 nm, 走査速度60 nm min⁻¹, 励起側スリット幅10 nm, 蛍光側スリット

幅5 nm, 検出器側フィルターToshiba O-56。

- (vii) 蛍光用高感度微量キュベット (ブラック石英製) に1/50, 1/100, 1/200の希釈液を入れ, 蛍光スペクトルを測定する。
- (viii) 極大波長 (670 nm付近) での蛍光強度とクロロフィルa濃度の検量線を作成する。
- (ix) 測定試料200 μlを同じキュベットに入れ, 蛍光スペクトルを測定する。
- (x) 670 nm付近の蛍光極大波長の蛍光強度を読み取り, 検量線からクロロフィルa濃度を計算する。

2.10. サンゴ骨格部の分析

サンゴ群体の骨格部については, 石灰化速度の指標となる骨格成長量の測定および炭素・酸素同位体比の分析に用いた。

2.10.1. サンゴ骨格試料の区分け

飼育実験後に水槽から回収したサンゴ群体について, Fig. 6の要領で最大成長方向に沿って厚さ7 mm程度の板状に切断を行い, ミリQ水 (Millipore) で洗浄を行った後, 骨格の年輪観察を行うために海洋研究開発機構所有のSOFTEX CMB-2を用いて軟X線撮影を行った。

2.10.2. 骨格成長量の計測

骨格成長量は, 板状に切断した側断面から計測した。サンゴ群体ごとに飼育期間が異なるため, 成長速度を一定と仮定して, 下記の方法で年間成長量を計算した。

- (i) 骨格中のアリザリン染色部から骨格表面までの距離を計測し, これを飼育期間中の成長量とする。
- (ii) 年間成長量は以下の式により換算する。

$$[\text{年間成長量 (mm yr}^{-1}\text{)}] = [\text{飼育期間中の成長量 (mm)}] \times [365(\text{day}) / \text{飼育期間 (day)}] \quad (2)$$

2.10.3. 質量分析用のサンゴ骨格粉末試料の採取

軟X線撮影後, Gagan et al. (1994, 1998) の手法に従い, 炭素・酸素同位体比分析用の粉末試料の削り出しを行った (Fig. 7)。

- (i) 板状に切断した試料をミリングマシン (SAKAI MM-180) に取り付け, 口径11 mmのビットを用いて, 上部および下部を削り取ることににより, 厚さ2 mmのレッジを作成する (Fig. 7a)。
- (ii) レッジ作成後, ミリQ水と超音波洗浄機を用いて試料の洗浄を行い, 骨格内の細かい空隙に入りこんだ骨格粉末を取り除く。

- (iii) 乾燥させた試料を再びミリングマシンに取り付け、口径3 mmのビットを用いて、サンゴの成長軸方向に200 μ mまたは400 μ m間隔でレッジ部分をミリングし (Fig. 7b), 同位体比分析用の粉末試料とする (鈴木・川幡, 2000). 粉末試料は一旦薬包紙に集め、ガラス製マイクロチューブに保管する.
- (iv) 質量分析を行う直前に粉末試料約100 μ gを秤量し、質量分析用の反応容器に封入する.

2.11. 質量分析

同位体比分析は産業技術総合研究所所有のマイクロマス社製オプティマ (OPTIMA: 質量分析部分), マルチプレップ (MULTIPREP 自動炭酸塩岩処理装置: 二酸化炭素精製部分), オートサンプラー (Gilson Autosampler: 試料導入部分) を組み合わせて行った (Fig. 8). 2.10.3. で封入した粉末試料をオートサンプラーにセットし, 以下の流れで自動分析を行なった.

- (i) 90℃に保たれたオートサンプラーに設置された反応容器のゴム蓋に対して, 真空ラインとリン酸ラインを組み込んだチューブ針が差し込まれる.
- (ii) チューブが差し込まれると, 反応容器中の空気が抜かれてバイアル内部は真空状態になる.
- (iii) チューブ内のリン酸ラインを通してリン酸が反応容

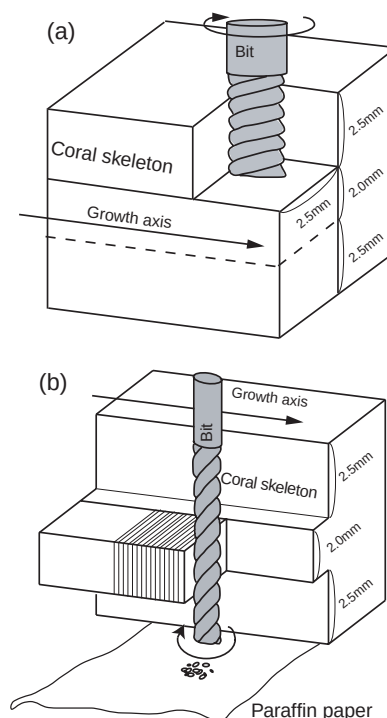
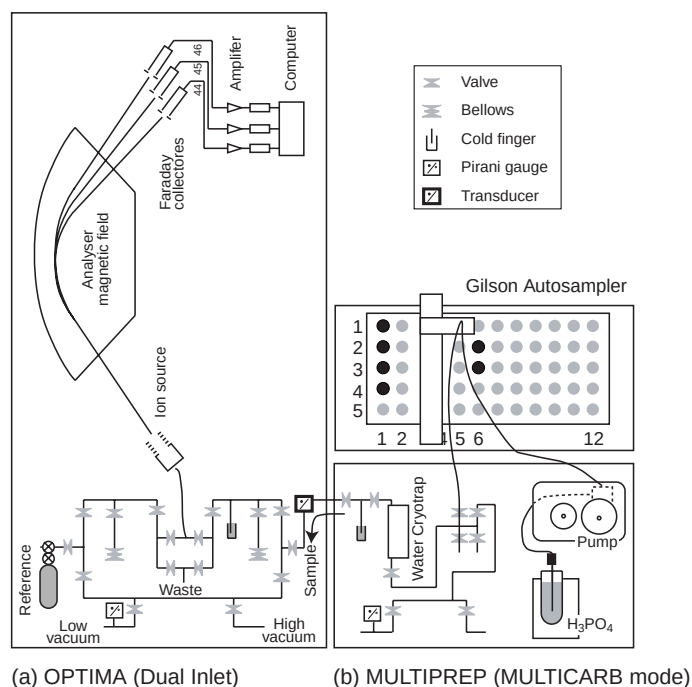


Fig. 7. Milling of *Porites* skeleton for carbon and oxygen isotope analyses

(a) Making of ledge on skeleton by drilling, (b) Milling of skeleton by drilling

図7. サンゴ群体骨格の同位体分析試料の作成

(a) レッジの作成, (b) レッジ部分のミリング



(a) OPTIMA (Dual Inlet)

(b) MULTIPREP (MULTICARB mode)

Fig. 8. Analytical system of carbon and oxygen isotope in *Porites* skeleton
(a) Mass spectrometry (OPTIMA), (b) Carbonate device (MULTIPREP)

図8. サンゴ群体骨格の炭素同位体比の分析システム

(a) 質量分析計 (OPTIMA), (b) 自動炭酸塩処理装置 (MULTIPREP)

器中に滴下される。粉末試料はリン酸と反応してガス試料（二酸化炭素と水）を発生させ、質量分析部分の手前に設置されたマルチプレッ内に導入される。

- (iv) マルチプレッ内のガス試料は金属製のラインを通過し、液体窒素により-190℃以下まで冷却されたトラップに導入され、液体または固体に変化する。
- (v) 次にトラップ内を約-110℃まで暖め、水と二酸化炭素のうち二酸化炭素のみを再度気化させてトラップを通過させ、オプティマへ導入する。
- (vi) オプティマの内部には分析試料ガス用とレファレンスガス用のチャンバーがそれぞれ設置されており、1試料の分析につき8回ずつ、双方のガスを交互にオプティマに送り込む。
- (vii) オプティマに送り込まれたガスはイオン化されて電荷をもつようになる。電荷をもったガス（分子）はマグネティックフィールドに送り込まれ、電荷と磁場の作用によりローレンツ力がかかることで円軌道を描く。イオン化したガス（分子）は質量に応じた円軌道で分離され、それぞれの軌道上に設置されたコレクター部分で検知される。二酸化炭素の場合、質量数46の分子（ $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ）は一番外側の軌道を、質量数44の分子（ $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ）は一番内側の軌道を描いて移動する。
- (viii) このようにして測定した値から、以下の式に基づいて炭素同位体比 $\delta^{13}\text{C}$ および酸素同位体比 $\delta^{18}\text{O}$ を計算する。単位は‰を用いて表記される。

$$\text{炭素同位体比 } \delta^{13}\text{C} = \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{sample}} - ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{std}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{std}}} \cdot 1000 \quad (3)$$

* $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{sample}}$: 分析試料の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{std}}$: 標準試料の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

$$\text{酸素同位体比 } \delta^{18}\text{O} = \frac{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{sample}} - ^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{std}}}{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{std}}} \cdot 1000 \quad (4)$$

* $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{sample}}$: 分析試料の $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{std}}$: 標準試料の $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

本研究で使用した分析機器の測定誤差は、NBS-19の繰り返し分析結果より、炭素同位体比については0.03‰、酸素同位体比については0.04‰である。

3. 結果

本飼育実験に関する炭素同位体比の科学的考察などは、Omata et al. (2008) においてすでに報告している。ここでは、飼育実験の技術的側面を中心に、各種の分析実験の

詳細を報告するとともに、測定データの解釈や再現性について述べる。

3.1. 水温

各水槽に設置してロガーで連続計測した水温データをFig. 9b-hに示した。なお、全ロガーは、計測開始直前および終了直後に同一水槽で24時間の水温計測を行い、全データの平均値をもとにロガー間の機差を補正した。

各水槽の水温は設定値の25℃を概ね維持していたが、1-2週間毎に行った海水ろ過装置の洗浄時の給水中断(2-3時間)の際と、台風接近時(2003年8月8日)、施設設備の故障時(2003年11月7日、2004年2月7日)の給水停止(1-2日間)の際に、気温などの影響により飼育水温が一時的に変動した。

3.2. 塩分

毎日採取した海水の塩分データをFig. 9aに示す。なお、分析は数十日分をまとめて行った。塩分計の特性から多検体試料を連続的に計測すると測定値が若干ドリフトしたため、10試料毎に校正用海水を計測してデータ補正を行った。

飼育水槽に給水している海水の塩分は季節的変動がみられ、夏季(特に、梅雨期、台風期)に塩分の低下が顕著であった。堤防内側の水深約1.5 mに設置した海水取水口に、降雨や河川水が混入したためと思われる。全飼育期間中の塩分は30.6から34.9の間で推移し、平均値は34.1 ± 0.7 (1σ, n=310) であった。

3.3. 飼育海水中の溶存無機炭素および炭素同位体比

海水中の溶存無機炭素濃度および、その溶存無機炭素の炭素同位体比の分析結果をTable 4に示す。溶存無機炭素の濃度は、1,826-1,981 μmol kg⁻¹の間で変動した。一方、溶存無機炭素の炭素同位体比は0.36‰から1.14‰の間で変動した。同一海水サンプルにおける溶存炭素の炭素同位体比の繰り返し測定の分析誤差は0.05‰であることから、これらの変動は採水の時間帯(昼夜)にも依存しており、植物プランクトンや微生物の代謝が海水成分に影響を与えているものと考えられる(Swart et al., 2005)。

3.4. 共生藻密度およびクロロフィルa量

共生藻密度およびクロロフィルa量の分析結果をTable 5に示す。単位面積当たりの共生藻密度は2.73 × 10⁶ cells cm⁻² (300 μ -12h-1) から7.60 × 10⁶ cells cm⁻² (500 μ -12h-2) と大きく変化した。検体ごとにばらつきがみられるものの、光量の増加に伴い共生藻密度が増加する傾向が示された。単位面積当たりのクロロフィルa量は18.98 μg cm⁻² (500 μ -

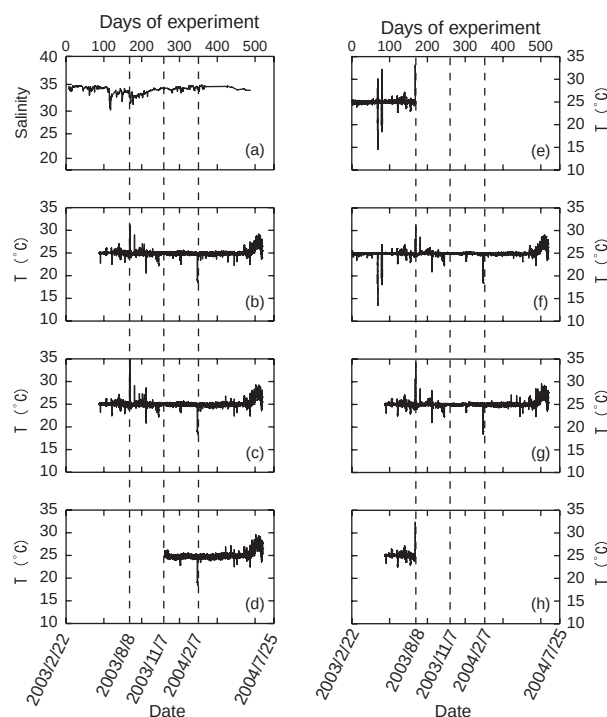


Fig. 9. Salinity and temperature of seawater recorded during culture experiment. (a) Salinity, (b)-(h) Seawater temperature of aquarium tanks (see Table 3)

図9. サンゴ群体飼育海水の塩分と水温の記録 (a) 飼育海水の塩分の変動, (b)-(h) 各水槽の水温 (表3参照)

Table 4. Concentration and $\delta^{13}\text{C}$ of dissolved inorganic carbon (DIC) in the seawater*

表4 飼育海水の溶存無機炭素濃度と炭素同位体比

Sampling time	DIC ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	$\delta^{13}\text{C}(\text{DIC}) (\text{‰})$
3 Feb 2004 16:22	1,979	0.85
17 Feb 2004 16:24	1,981	0.36
2 Mar 2004 16:25	1,967	0.71
25 Mar 2004 16:07	1,905	0.91
23 Jul 2004 5:00	1,959	0.40
23 Jul 2004 5:00	1,978	0.44
23 Jul 2004 11:00	1,870	0.79
23 Jul 2004 17:00	1,826	1.14
23 Jul 2004 17:00	1,904	0.93
23 Jul 2004 23:00	1,935	0.80

*from Omata et al., (2008)

Table 5. Photosynthetic-related parameter of symbiotic algae in the cultured *Porites*

表5 サンゴ群体の共生藻の光合成関連パラメータ

Light Intensity ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)	Daily light exposure time (hours)	Sample ID	Area No.	Cell density ($10^6 \text{ cell cm}^{-2}$)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Chl <i>a</i> /cell (pg 10^{-6} cell)	Car/Chl <i>a</i> (A_{480}/A_{662})
100	12	100 μ -12h-2	1	4.11	31.16	7.58	1.46
		100 μ -12h-2	2	5.45	40.50	7.43	1.41
		100 μ -12h-3	1	5.99	52.58	8.78	1.42
		100 μ -12h-3	2	6.64	59.00	8.89	1.48
300	12	300 μ -12h-1	1	2.73	20.35	7.45	1.47
		300 μ -12h-1	2	7.00	31.53	4.50	1.54
		300 μ -12h-2	1	7.08	49.40	6.98	1.56
		300 μ -12h-2	2	5.95	55.19	9.28	1.38
500	12	500 μ -12h-1	1	4.69	24.48	5.22	1.67
		500 μ -12h-1	2	3.64	18.98	5.22	1.64
		500 μ -12h-2	1	7.10	51.44	7.24	1.65
		500 μ -12h-2	2	7.60	40.78	5.37	1.67

Definition of "Area No." is shown in Fig. 6.

Chl *a*: chlorophyll *a*, Car: total carotenoids

12h-1) から $59.00 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($100 \mu\text{-12h-3}$) の値を示した。一方、共生藻細胞あたりのクロロフィル *a* 量は $4.50 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ ($300 \mu\text{-12h-1}$) から $9.28 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ ($300 \mu\text{-12h-2}$) の値を示した。単位面積当たりおよび共生藻細胞あたりのクロロフィル *a* 量は、光量の増加に伴い低下する傾向がみられた。また、吸収スペクトルから概算した総カロテノイド/クロロフィル *a* の値 (A_{500}/A_{665}) は、1.38 ($300 \mu\text{-12h-2}$) から 1.67 ($500 \mu\text{-12h-1}$, $500 \mu\text{-12h-2}$) の値を示し、光量の増加に伴いカロテノイドの相対含量が高くなる傾向がみられた。一般的に植物や藻類を強光条件のもとで生育させると、クロロフィル量が低下し、カロテノイドが相対的に増加することが知られている (Fujita et al., 2001)。本実験の飼育サンゴ群体においても、設定した光強度にตอบสนองして共生藻の光合成系の生理的順化が起きているものと判断される。

3.5. アリザリン染色

12時間照射-12時間暗所の試験区のサンゴ群体のなかで、アリザリン染色が確認されたのは、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で2群体、 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で4群体、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で9群体であった。一方、10時間照射-14時間暗所の試験区では、 $100 \mu\text{mol m}^{-2}$

s^{-1} で2群体、 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で3群体、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で4群体のサンゴが染色されていた。染色が確認できなかった3群体 ($500 \mu\text{-10h-4}$, $500 \mu\text{-10h-6}$, $500 \mu\text{-12h-1}$) については、骨格成長量および同位体比分析から除外した。

3.6. 骨格成長量

全サンゴ群体の年間骨格成長量は 3.3 ($100 \mu\text{-10h-5}$) - 17.5 mm yr^{-1} ($500 \mu\text{-12h-10}$) の値を示した。試験区ごとの年間平均骨格成長量は、 $4.9 \pm 0.7 \text{ mm yr}^{-1}$ ($100 \mu\text{-12h}$) から $14.7 \pm 2.4 \text{ mm yr}^{-1}$ ($500 \mu\text{-10h}$) の値を示し (Table 6)、光量の増加に伴い骨格成長が促進される傾向がみられた。

3.7. サンゴの炭素・酸素同位体比

サンゴ骨格の炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) は -5.13‰ から $+0.51\text{‰}$ の変動を示し、酸素同位体比は -5.43‰ から -2.90‰ の変動を示した。試験区ごとの平均値については、炭素同位体比は $-3.34 \pm 0.76\text{‰}$ ($100 \mu\text{-12h}$) から $-2.13 \pm 1.05\text{‰}$ ($500 \mu\text{-12h}$) の値を示し、酸素同位体比は $-4.80 \pm 0.53\text{‰}$ ($500 \mu\text{-12h}$) から $-3.28 \pm 0.29\text{‰}$ ($100 \mu\text{-10h}$) の値を示した (Table 7)。飼育期間中の積算光量が大きいほど、炭素同位体比についてはわずかに増加する傾向がみられ、

Table 6. Growth rate in skeleton of *Porites*

表6 サンゴ群体の骨格成長速度

Light conditions	Annual extension rate (mm year^{-1})	
	Average	SD (1σ)
100 μ -10h	5.6	2.0
100 μ -12h	4.9	0.7
300 μ -10h	6.3	2.5
300 μ -12h	12.2	1.4
500 μ -10h	14.7	2.4
500 μ -12h	12.8	3.3

SD: standard deviations

Table 7. Isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) in skeleton of the cultured *Porites*

表7 飼育サンゴ群体骨格の炭素同位体比と酸素同位体比

Light conditions	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{18}\text{O}$	
	Average	SD (1σ)	Average	SD (1σ)
100 μ -10h	-3.28	1.33	-3.28	0.29
100 μ -12h	-3.34	0.76	-3.98	0.42
300 μ -10h	-2.39	0.93	-4.35	0.49
300 μ -12h	-2.82	1.00	-4.63	0.48
500 μ -10h	-2.67	1.13	-4.68	0.62
500 μ -12h	-2.13	1.05	-4.80	0.53

SD: standard deviations

酸素同位体比は減少する傾向がみられた。

炭素同位体比については、Omata et al. (2005) で提唱したベクトル表記法により光合成/呼吸による同位体効果の大きさを見積もった。その結果、低光量の場合は同位体効果が小さく、光量の上昇に伴い同位体効果が増加し、 $300\mu\text{-}12\text{h}$ 付近で同位体効果の増加率が一定となる傾向が示された。この光量と同位体効果の関係は、光合成-光飽和曲線と類似した傾向を示し、Swart (1983) が提唱した光合成と呼吸による同位体効果を裏付ける結果にもなっている。

4. まとめ

今回の飼育実験中に揚水ポンプが短時間停止するというアクシデントがあったものの、共生藻密度やクロロフィル a 量、サンゴ骨格の炭素・酸素同位体比などは光量の変化の影響を受ける傾向を示しており、アクシデントによる影響は無視できるものと思われる。このことは、炭素同位体比が年間成長量と光合成活性の指標と良い相関を示していることから裏付けられた。また、サンゴ群体の骨格記録において、採取前後の違いが歴然と現れていたことから、野外と飼育下のサンゴの違いについても比較可能になるものと思われる。また、飼育期間中に台風による飼育設備の損傷により、1試験区のサンゴが全滅してしまったものの、死滅前の骨格の炭素・酸素同位体比に関するデータは問題なく利用できた。また、サンゴ骨格の炭素同位体比に関しては、光合成/呼吸による同位体効果の大きさと光合成活性との間で高い相関性が示されたことから (Omata et al. 2005), 今後両者の関係を定量化するうえで今回報告したような長期飼育実験によるアプローチは非常に有用であると思われる。

サンゴ骨格の生理学的解析や化学分析は、生育環境および代謝機能の指標評価に重要なアプローチであり、今回のように複合的、学際的な視点での共同研究を進展させることで、サンゴ骨格形成のメカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。

なお、印南臨海実験場は2004年10月20日に紀伊水道を通過した台風23号の波浪により壊滅的な損害を受け、廃止された。1997年より7年間にわたりサンゴの飼育研究が行なわれ、多くの成果が得られた。この間に蓄積されたサンゴの飼育技術がいずれ役立つことを願ってこの報告をまとめた。

謝辞

飼育実験において、(株)KANSOテクノスの大下郁人、佐々木清、岡地賢 (現所属：有限会社コーラルクエスト)、日比野浩平 (現所属：財団法人自然環境研究センター) の各氏に大変お世話になりました。サンゴ骨格試料の分析前処理は、産業技術総合研究所の吉永弓子、高岡光枝の各氏により行われました。また、本稿の改訂にあたり、狩野彰宏 (九州大学) および浅海竜司 (琉球大学) の両氏には多数の有意義なコメントを頂きました。これらの方々にこの場を借りて厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- Aharon, P. (1991), Recorders of reef environment histories: Stable isotopes in corals, giant clams and calcareous algae, *Coral Reefs*, 10, 71-90.
- Allemand, D., P. Furla, and S. B  n  zet-Tambutt   (1998), Mechanism of carbon acquisition for endosymbiont photosynthesis in Anthozoa, *Can. J. Bot.*, 76, 925-941.
- Barnes, D. J., and J. M. Lough (1993), On the nature and causes of density banding in massive coral skeletons, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 167, 91-108.
- Fairbanks, R. G., and R. E. Dodge (1979), Annual periodicity of the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in the coral *Montastraea annularis*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43, 1009-1020, doi:10.1016/0016-7037(79)90090-5.
- Fujita, Y., K. Ohki, and A. Murakami (2001), Acclimation of photosynthetic light energy conversion to the light environments, In: Rai, L. C., and J. P. Gaur (eds) *Algal Adaptation to Environmental Stresses*, Springer-Verlag, 135-171.
- Gagan, M. K., A. R. Chivas, and P. J. Isdale (1994), High-resolution isotopic records from corals using ocean temperature and mass-spawning chronometers, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 121, 549-558, doi:10.1016/0012-821X(94)90090-6.
- Gagan, M. K., L. K. Ayliffe, D. Hopley, J. A. Cali, G. E. Mortimer, J. Chappell, M. T. McCulloch, and M. J. Head (1998), Temperature and surface-ocean water balance of the Mid-Holocene tropical western Pacific, *Science*, 279, 1014-1018, doi:10.1126/science.279.5353.1014.
- Goreau, T. J. (1977), Coral skeletal chemistry: physiological and environmental regulation of stable isotopes and trace metals in *Montastrea annularis*, *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 196, 291-315.

- Johannes, R. E., and W. J. Wiebe (1970), A method for determination of coral tissue biomass and composition, *Limnol. Oceanogr.*, 21, 540-547.
- Kawaguti, S., and D. Sakumoto (1948), The effect of light on calcium deposition in corals, *Bull. Oceanogr. Inst. Taiwan*, 4, 65-70.
- McConnaughey, T. A. (1989), ^{13}C and ^{18}O isotopic disequilibrium in biological carbonate: I. Patterns, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 53, 151-162.
- 能丸恵理子 (2005), 共生藻数を制御したサカサクラゲにおけるストロビレーションの解析, 神戸大学自然科学研究科修士論文, 86pp.
- Omata, T., A. Suzuki, H. Kawahata, and M. Okamoto (2005), Annual fluctuation in the stable carbon isotope ratio of coral skeletons: The relative intensities of kinetic and metabolic isotope effects, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 3007-3016, doi:10.1016/j.gca.2004.12.018.
- 小俣珠乃, 鈴木淳, 川幡穂高, 丸山正 (2006), 総説: サング骨格の炭素同位体比の変動要因に関する研究, *地球化学*, 40, 137-146.
- Omata, T., A. Suzuki, T. Sato, K. Minoshima, E. Nomaru, A. Murakami, S. Murayama, H. Kawahata, and T. Maruyama (2008), Effect of photosynthetic light dosage on carbon isotope composition in the coral skeleton: Long-term culture of *Porites* spp., *J. Geophys. Res.*, 113, G02014, doi:10.1029/2007JG000431.
- Porra, R. J., W. A. Thompson, and P. E. Kriedemann (1989), Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 975, 384-394.
- Smith, S. V., R. W. Buddemeier, R. C. Redalje, and J. E. Houck (1979), Strontium-calcium thermometry in coral skeletons, *Science*, 204, 404-407.
- Suzuki, R., and T. Ishimaru (1990), An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using *N*, *N*-dimethylformamide, *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, 46, 190-194, doi:10.1007/BF02125580.
- 鈴木淳, 川幡穂高 (2000), 骨格の酸素・炭素同位体比分析によるサンゴ白化現象の解析, *Isotope news*, 9, 2-5.
- Swart, P. K. (1983), Carbon and oxygen isotope fractionation in scleractinian corals: A review, *Earth Sci. Rev.*, 19, 51-80, doi:10.1016/00128252(83)90076-4.
- Swart, P. K., A. Szmant, J. W. Porter, R. E. Dodge, J. I. Tougas, and J. R. Southam (2005), The isotopic composition of respired carbon dioxide in scleractinian corals: Implications for cycling of organic carbon in corals, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 1495-1509, doi:10.1016/j.gca.2004.09.004.
- Veron, J. E. N. (2000), Corals of the World 1, Australian Institute of Marine Science, 463 pp.