

博士論文

瀬戸内海における貧栄養化と強光ストレスの組み合わせが
代表的な植物プランクトン種に及ぼす影響に関する研究

Study on the combination effect of oligotrophication and high light stress in the Seto
Inland Sea influencing on representative phytoplankton species

(要約)

令和6年3月

広島大学大学院統合生命科学研究科

生物資源科学プログラム

矢野 諒子

本研究の目的は、近年の瀬戸内海における植物プランクトンの種遷移に、これまで指摘されている海域の貧栄養化だけでなく、近年顕著な強光イベントの増加が複合的なストレスを与えうるとの考えに基づき、瀬戸内海で代表的に出現する植物プランクトン種の栄養塩制限と強光への応答を明らかにすることである。本論文は全5章から成る。

第1章の緒言では、基礎生産者としての植物プランクトンの重要性に加え、近年観察されている瀬戸内海における植物プランクトンの主構成種の変化と、従来その要因と考えられてきた貧栄養化との関連性について述べている。1980年代以降瀬戸内海の栄養塩環境は劇的に変化し、1960~1970年代の高度経済成長期の影響による海域の富栄養化を経て、瀬戸内海環境保全特別措置法による水質規制により現在は貧栄養化状態にあるとされる。水質改善の結果、赤潮の発生件数は減少したものの、基礎生産低下による漁業生産の減少が指摘され、同時に基礎生産構造の変化も報告されている。代表的な基礎生産者である珪藻類の構成種について、1980年代半ばを境にかつての優占種であった *Skeletonema* 属から *Chaetoceros* 属に遷移したとされる。また、現在でも年間100件程度の赤潮が依然として発生し、特に有害鞭毛藻類のラフィド藻 *Chattonella* 属による赤潮は夏季に猛威を振るっている。上記の珪藻優占種の変化は海域の貧栄養化と関連して議論されることが多く、*Chattonella* 属の赤潮も珪藻衰退後のニッチ獲得として説明されている。一方で、*Skeletonema* 属の衰退や *Chattonella* 属の優占はしばしば夏季の強光下で確認されているが、これら生物種の強光ストレスに対する応答はこれまで着目されてこなかった。近年の瀬戸内海は大気の大気清澄化による日射量の増加や海水の透明度上昇によって、植物プランクトンが強光に曝されやすい環境に変化していると考えられ、貧栄養化だけでなく強光イベントの増加も相乗的に植物プランクトンの動態に影響している可能性がある。

第2章では、目的とする栄養塩種の枯渇状態を任意に調節できる連続培養(ケモスタット培養)を用いて、珪藻 *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros lorenzianus*, ラフィド藻 *Chattonella marina* var. *antiqua* について、窒素(硝酸塩)あるいはリン(リン酸塩)制限と強光の組み合わせに対するPSIIの光合成応答を、パルス変調(PAM)型蛍光法を用いて測定した。第1節では珪藻2種を対象とし、栄養塩制限細胞に強光($800 \mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$)を1時間照射するとPSIIの実効量子収率(ϕ_{II})の低下および非光化学消光(NPQ)の上昇が観察されたが、より窒素制限が厳しい細胞ではNPQの上昇の程度は小さく、リン制限の場合は逆に大きい傾向がみられた。この時、リン制限細胞ではPSII下流の電子伝達効率を示す q_P が著しく低下し、特に *S. costatum* での低下が顕著であった。この結果から、リン制限下の *S. costatum* では、積極的なNPQ誘導による強光防御が不十分であり、深刻な光阻害が引き起こされる可能性が示唆された。制限栄養塩を添加すると、損傷したPSIIのリカバリー、つまりNPQの緩和と ϕ_{II} および q_P の上昇が見られたが、この回復は *Chae. lorenzianus* の方が早く、*S. costatum* が光合成回復の点でも不利であることが示唆された。さらに、夏季の瀬戸内海を模したリン制限下で両種の混合連続培養を行った結果、*S. costatum* の衰退と *Chae. lorenzianus* の優占は強光によって加速した。第2節ではラフィド藻 *Chat. antiqua* を対象と

し、窒素あるいはリン制限で連続培養した際、10~20 日目にかけて 30 秒の強光照射下で NPQ が顕著に上昇した。最終的に 30 日目では 1 時間の強光照射でも高い qP を維持する一方で NPQ は低い値となり、貧栄養環境に馴化し NPQ をほぼ誘導せずに PSII 下流の電子伝達を維持できることが示唆された。*Chat. antiqua* と珪藻 2 種それぞれをリン制限下で混合連続培養すると、適光条件下で *Chat. antiqua* は *S. costatum* を凌いで優占し、強光条件下では *Chat. antiqua* がリン制限と強光環境に馴化する様子が再度示された。*Chat. antiqua* と *Chae. lorenzianus* の混合培養では *Chae. lorenzianus* が *Chat. antiqua* を駆逐し、強光によって両種の遷移は加速した。以上の結果は、かつての優占珪藻 *Skeletonema* は栄養塩制限、特にリン制限下で強光阻害を受けやすい一方で、*Chaetoceros* や *Chattonella* は栄養塩制限下でも強光に耐性をもつ、あるいは強光を利用し有利に増殖出来ることを示唆した。

第 3 章では、珪藻 *S. costatum* とラフィド藻 *Chat. antiqua* に着目し、第 2 章で示された種ごとに異なる NPQ 誘導機構の詳細を調べた。NPQ の主要な要素である熱放散 qE に関して、微細藻類についての詳細な機構は未だ未解明であるが、珪藻に関しては以下 3 つの相互作用が存在するとされる：(1) チラコイド膜内外のプロトン勾配、(2) キサントフィルサイクルを担うジアジノキサントニン (Dd) からジアトキサントニン (Dt) への脱エポキシ化 (Dd-Dt サイクル)、(3) Lhcx タンパク質の関与である。なお、珪藻とラフィド藻は同じ不等毛植物門に属しながら、後者においては主要なキサントフィルサイクルがピオラキサントニンサイクル (VAZ サイクル) であることが知られている。しかし、Lhcx 遺伝子については本研究で対象とした 2 種においては報告がない。第 1 節では、各種の Lhcx 遺伝子の同定を目的とし、RNA-seq で得たトランスクリプトームを用いた相同性検索および系統解析によって、*S. costatum* では 6 配列 (*ScLhcx1-6*)、*Chat. antiqua* では 5 配列 (*CaLhcx1-5*) の Lhcx 遺伝子を同定した。その上で、第 2 節では、適光および強光に順次 1 時間ずつ曝した両種の細胞に対して、PAM 蛍光法による光合成パラメーターの測定、HPLC によるキサントフィル色素の定量を行い、RT-qPCR により各 Lhcx 遺伝子の発現を定量した。実験に供した細胞は非栄養塩制限の連続培養により得られたが、両種ともに適光照射下 ($150 \mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) で 0.6 以上の比較的高い ϕ_{II} を維持していた一方で、*S. costatum* は適光でも NPQ を誘導した。強光下 ($800 \mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) では *Chat. antiqua* も NPQ 誘導を示したが、NPQ 値は *S. costatum* の 0.6、*Chat. antiqua* の 0.3 と 2 倍の差があった。色素分析の結果、*S. costatum* は Dd-Dt サイクル、*Chat. antiqua* は VAZ サイクルを主に有していた。また、*S. costatum* では強光下において 3 つの Lhcx 遺伝子 (*ScLhcx2-4*) の高い発現量と、Dd から Dt への脱エポキシ化を示す DES (De-epoxidation state) の上昇が観察された。*Chat. antiqua* では、光強度の変化に応じた Lhcx 遺伝子の発現量変化はみられなかったが、強光下で VAZ サイクルと Dd-Dt サイクル両方の DES が上昇し、同条件下で Dd-Dt サイクルのみの脱エポキシ化と複数の Lhcx 遺伝子の発現上昇がみられた *S. costatum* と比較して、*Chat. antiqua* の高い NPQ 誘導能が示唆された。

第 4 章では、第 2 章および第 3 章を踏まえ、珪藻 *S. costatum* とラフィド藻 *Chat. antiqua*

を対象とし、栄養塩制限および強光下での NPQ 誘導機構の発現・制御状態を調べた。第 1 節で示す *S. costatum* については、非栄養塩制限 (Control)、窒素制限、リン制限の 3 つの栄養条件で、適光および強光下で連続培養した。第 2 章と同様に、窒素制限下での低い NPQ とリン制限下での積極的な NPQ 誘導が観察された。Dd-Dt サイクルを担う各色素量 (プールサイズ) はいずれの栄養塩条件でも強光下で増加したが、栄養塩制限区のプールサイズは Control 区よりも有意に小さかった。一方で、DES は強光条件下のリン制限区で最も高く、窒素制限区で低い傾向にあった。このことから本種の NPQ 誘導能には脱エポキシ化の活性化 (DES の上昇) が重要であると考えられた。加えて、*S. costatum* の 6 つの *Lhcx* 遺伝子のうち特に *ScLhcx2* がリン制限区で発現上昇したことから、*ScLhcx2* が本種のリン制限下での高い NPQ 誘導に特に重要であることが示唆された。第 2 節で示す *Chat. antiqua* については、強光下で Control、窒素制限、リン制限の栄養条件で連続培養した。リン制限下で NPQ が上昇し、この時 VAZ サイクルと Dd-Dt サイクルのプールサイズに栄養塩条件間で大きな差は無かったが、両キサントフィルサイクルの DES はリン制限下で上昇した。*Lhcx* 遺伝子発現は、栄養塩条件に関わらず *CaLhcx1* が常に高い発現量を示し、2 つのキサントフィルサイクルによる高い NPQ 誘導能と共に、本タンパク質の強光防御への関与が示唆された。

第 5 章では上記の結果を踏まえ総合考察を行った。まず、瀬戸内海で近年減少している珪藻 *Skeletonema* 属は栄養塩制限、特にリン制限と強光の組み合わせに対して強光阻害を受けやすいことが確認された。*S. costatum* はリン制限と強光の複合ストレス下での PSII 全体の電子伝達の阻害が顕著であるため、積極的に NPQ を誘導して光合成系を保護しようと試み、この時 Dd-Dt サイクルの脱エポキシ化と複数の *Lhcx* 遺伝子の発現上昇が NPQ に寄与すると考えられた。しかし、このような複合ストレス環境での *S. costatum* の積極的な NPQ 誘導は光合成系を保護するに十分ではなく、その結果として qP の低下が見られた。近年増加している *Chaetoceros* 属もリン制限および強光下で PSII の電子伝達が阻害されたが、栄養塩の再供給によって素早く光合成系をリカバリー出来る点で、*S. costatum* よりも有利であることが示唆された。加えて競合実験の結果より、リン制限下での *S. costatum* の衰退は強光によって加速し、近年の強光イベントの増加が *Skeletonema* 属から *Chaetoceros* 属への遷移に関与していることが示された。ラフィド藻 *Chat. antiqua* は栄養塩制限と強光の複合ストレス下でも珪藻 2 種より高い電子伝達効率を維持し、さらに VAZ サイクルと Dd-Dt サイクルの両方の寄与による高い NPQ 誘導能を持つことが示唆され、リン欠乏と強光に晒されやすい瀬戸内海夏季の表層環境下での *Chattonella* 属の優位性が示された。しかし、*Chat. antiqua* と *Chae. lorenzianus* の混合培養では、どちらの光条件下でも *Chae. lorenzianus* が *Chat. antiqua* を駆逐し、強光条件下でより *Chat. antiqua* は素早く衰退したことから、制限栄養塩が供給された際の *Chae. lorenzianus* の素早いリカバリー能力によって、リン欠乏および強光下でも *Chae. antiqua* を凌駕すると考えられ、近年の瀬戸内海における *Chaetoceros* 属の多種への圧倒的優位性を示唆した。

以上の結果は、近年瀬戸内海で顕著な貧栄養化、特にリンの不足に加え、これも近年顕

著な強光イベントの増加が相乗的に働き、かつての優占種である *Skeletonema* 属に不利な状況を生み出していること、一方同じ珪藻でも *Chaetoceros* 属は栄養塩の再供給により素早く回復可能であること、依然として赤潮を形成するラフィド藻 *Chattonella* 属はストレス環境への高い馴致能力と強光防御機構により、栄養塩が枯渇しやすく強光に曝されやすい夏季の表層で有利に増殖が可能であることを、各々の生理学的・分子生物学的特徴から明らかにしたものである。この成果は、瀬戸内海の基礎生産の低下に起因する深刻な漁獲漁業の不振や、依然として被害を与える有害赤潮の対策を講じる上で、これまで見過ごされてきた観点を加えるものであり、今後も本研究分野の進展が期待される。