

トビハゼ・CO₂・シャットネラとの出会い

石松 惇

長崎大学環東シナ海海洋環境資源研究センター

Mudskippers, carbon dioxide and *Chattonella*: a gaseous connection

Atsushi ISHIMATSU

Institute for East China Sea Research, Nagasaki University

Tairamachi, Nagasaki 851-2213, Japan

この文章で紹介する私の研究は、トビハゼの再生産生態、二酸化炭素が海産生物に与える影響、および赤潮プランクトンシャットネラによる魚類斃死機構についてである。これらは一見何の関係もないように思われるであろうが、私の中ではしっかりつながっている。それらをつなぐキーワードは酸素と二酸化炭素という、ありふれた、しかし生物には必須の2種類のガスである。

トビハゼの再生産

トビハゼ・ムツゴロウ類(英語では *mudskipper* と総称される)は、水中から陸上に生活域を拡大させ、両生生活を送るようになった魚類(*amphibious fishes*)の代表的な例である。トビハゼ・ムツゴロウ類は分類学的には、ハゼ亜目(*Gobioidei*)、ハゼ科(*Gobiidae*)の *Oxudercinae* 亜科に属する魚類のうち、*Periophthalmus*, *Periophthalmodon*, *Boleophthalmus*, および *Scartelaos* 属の種を意味することが多い¹⁾。陸上生活に対する適応度は *Periophthalmus*, *Periophthalmodon* の2属で特に高く、これら2属の種は生活時間のほとんどを水の外で送る。トビハゼ・ムツゴロウ類はインドからベトナムにわたる東南アジアを中心に、東はオーストラリア北岸からミクロネシア、西はアフリカ西岸まで分布している。トビハゼ・ムツゴロウ類は古くから動物学者の興味を引き、分類・行動・生理等については、多くの研究がなされてきた²⁾。しかし、干潟の泥の中で行われる彼らの産卵、卵保護や初期発生についてはほとんど知見がなく、わずかに求愛行動や水槽内で発生させた仔魚の形態についての記載がある程度であった。トビハゼ・ムツゴロウ類は泥干潟に巣穴を掘り、卵は巣穴の一部に作られた産卵室の壁面に一層に産みつけられる。巣穴は干潮時でもほぼ完全に水で満たされているが、巣穴内の水はほとんど酸素を含んでいない^{3,4)}。このような環境で、トビハゼ・ムツゴロウの卵発生がどのように進んでいるのかは長い間謎であった。

この謎を解きかけは、我々がマレーシアで行なった *Periophthalmodon schlosseri* の生態調査によって得られた。*Periophthalmodon schlosseri* は体重が200gを越える大

型種(日本産トビハゼは3~5g)で, 巣穴も深さが1 mを越える. 1995年ペナン島の干潟で巣穴の調査中, 巣穴のそばを歩くと中から泡が大量に出てくることを大学院生が偶然見つけた. この発見がトビハゼの再生産についての謎を解く鍵であった. 巣穴から採取したガスが酸素を多く含んでいるという分析結果と, 干潮時に親魚が口を大きく膨らませて巣穴に繰り返し潜る行動の観察から, 我々は親魚が口腔内に外気を含んで巣穴内に貯蔵していると推論した³⁾.

マレーシアで得た知見をもとに, 我々は1998年から2006年にかけて有明海奥部の泥干潟で日本産トビハゼ *Periophthalmus modestus* の産卵生態に関する野外調査を行った. トビハゼの巣穴は, 干潟表面に2ないし3個の開口部をもつJ字型をしている. J字の末端部が産卵室となっており, そこに空気が貯蔵されているらしいことを発見した⁵⁾. また, その後の室内実験で, トビハゼの卵は空気中で正常に発育するものの, 孵化は空気中では決して起こらないことが明らかになった. ではどのようにして1週間の卵保護期間中, 雄親魚は産卵室の酸素濃度を維持しているのか? また孵化はどのようなメカニズムによって引き起こされるのか? これらの疑問を解き明かすため, 産卵室上部に工業用内視鏡, 酸素電極などからなるユニットを設置し, 巣穴下部の坑道には親魚の行動をモニタリングするための電極を設置した. これらの設置は不可避的にかんがりの巣穴の破壊を必要とするため, 装置設置後には破壊した巣穴の上部を作り直すとはいえ, 親魚はしばしば巣穴を放棄してしまい, 我々が行った44回の設置のうち, 4日以上記録が取れたのはわずか6例のみであった⁵⁾.

しかし, 学生諸君の頑張りの結果, トビハゼが泥中で行ってきた再生産の謎が徐々に明らかになった. 産卵室上部に設置した酸素電極のシグナルは, 産卵室に貯蔵された空気の酸素濃度が, 干潟干出時に上昇し, 水没時に減少することを明らかに示した. 酸素濃度が上昇する干出時には, 巣穴の坑道に設置した電極から頻繁にシグナルが記録され, 坑道を何か通過していることを示していた. このことから, 卵保護を行う雄親魚は干出時に外気を口に含み産卵室まで運搬することによって, 産卵室内空気の酸素濃度を上昇させるが, 水没時にはその行動が不可能になるため産卵室内空気の酸素濃度が減少するものと結論した. 泥干潟の高い場所に作られた巣穴は, 小潮時には満潮時でさえ水没しないものがある. そのような巣穴でも, 産卵室内空気の酸素濃度は干満のリズムとともに増減を繰り返すことがわかった. また, 産卵室空気の酸素濃度を人為的に下げると, 空気持込行動の頻度が顕著に上昇した. このことから, 空気持込行動を制御する要因として産卵室空気の酸素濃度と潮汐リズムが重要であること推測した⁵⁾.

このようにして約1週間の卵保護を続けた後, 卵孵化を迎える. 卵孵化は必ず夕方から夜間にかけての上げ潮時に起きる. この時, 親魚はそれまで行ってきたのとは正反対の行動を起こす. すなわち, 産卵室に貯蔵されていた空気を口に含んで産卵室から運び出すのである. すでに干潟は水没しているから, 空気が運び出されるたびに

同量の水が産卵室に入ってきて産卵室の水面は徐々に上昇し、最後には全ての卵が水中に没する。これが孵化誘引行動である。浸漬された卵は直ちに孵化し、多数の仔魚が産卵室水面を遊泳している様子が撮影された。ムツゴロウについては、様々な理由でトビハゼほどの情報は得られていない。しかし、産卵室の天井に卵が産み付けられていること、巣穴内に酸素濃度の高いガスが存在すること、産卵室天井壁面の泥が示す酸化還元電位が他の部位と比べて非常に高いことなどから、ムツゴロウもトビハゼと同様に空気を利用することによって胚胎への酸素供給を確保していると考えている。

これらの発見は、トビハゼの産卵期にあたる梅雨から初夏の時期に、干潟に突き出した栈橋にテントを張って、雨ニモマケズ風ニモマケズ、ひたすら観察を続けてくれた学生諸君の努力の賜物である。炎天下での泥だらけの作業を思う時、彼らのひたすらな情熱に頭が下がる思いである。

二酸化炭素と海産生物

二酸化炭素(CO₂)が海産生物に与える影響が着目されるようになった背景として、大気中CO₂濃度の上昇が引き起こしている海洋酸性化(ocean acidification)と、地球温暖化対策の一つであるCO₂隔離技術の台頭がある。大気中CO₂濃度が急激に上昇していることは周知の事実であるが、2007年に発行された気候変動に関する政府間パネルの第4次報告書は、CO₂濃度の増加が地球温暖化の原因であると結論した⁶⁾。しかし、大気中CO₂濃度の上昇は温暖化や海面上昇の原因となっているばかりでなく、海水を徐々に酸性化させており、その生態系影響が強く懸念されるようになってきた^{7,8)}。CO₂隔離はCO₂大規模発生源から分離回収したCO₂を地中(大陸下・海底下)あるいは深海へ注入・貯留することによって温暖化の抑制を図ろうとする技術である⁹⁾。海底下地中貯留の場合は遺漏によって、海洋貯留の場合は直接的に深海生物がCO₂濃度の高い環境に曝されることになる。これらの場合の生態系影響を評価することが、CO₂隔離技術の実施に際しての重要な課題である。

海洋酸性化の生物影響に関する研究は、2004年5月にユネスコで開催されたシンポジウム“The Ocean in a High-CO₂ World”を契機として急速に進展しつつある。しかし、まだ研究分野自体が揺籃期であり、CO₂増加による将来の海洋酸性化が海の生物に何をもたらすのかほとんど分かっていない。ただし、2009年2月現在、発表論文数が爆発的に増加して、急速に理解が進んでいることも事実である。この分野の研究は炭酸カルシウム骨格を持つ生物が特に強い影響を受けると考えられることから、サンゴと円石藻がこれまでは研究対象の中心であった。現在でもその傾向は続いているものの、徐々に多様な生物に対する近未来のCO₂環境が与える影響を解析する方向へと研究の流れが変わりつつある。

初期発生は一般に、動物の生活史の中で最も環境変動の影響を受けやすいステージであるにも関わらず、海洋酸性化影響研究の分野でデータの集積が非常に遅れ

ていた。我々は、2005年にポスドクとして栗原晴子氏を迎え、この分野の研究を開始した。将来予想される大気中CO₂の最高濃度(2000 ppm)に平衡させた海水中で発生させた際に、マガキとムラサキイガイで幼生の貝殻形成が強く抑制されることを見出した。マガキでは正常なベリジャー幼生に生育する割合はわずか5%に過ぎず(対照区68%),45%では貝殻が全く形成されなかった(対照区16%)¹⁰⁾。ムラサキイガイでは、全てのベリジャー幼生で形態異常が認められた¹¹⁾。これらの実験結果は将来のCO₂増加による海洋酸性化が二枚貝群集に大きな打撃を与える可能性があることを示唆している。なお、これらの実験は、給餌を必要としないベリジャー幼生期までで終了させたため、その後の生残については調べていないが、マガキにしてもムラサキイガイにしても異常な形態を示した個体は正常に発育していくとは思われない。

上記の初期発生に関する実験は短時間の影響を見たものだが、将来の生物は一生涯、現在よりも酸性化した環境で生きることになる。そこで我々は慢性影響を知るため、イソスジエビを使って長期曝露実験を試みた。最初はCO₂ 2000 ppmで15週間、続いて1000 ppmで30週間の実験である。2000 ppm実験では、7週目からエビが死に始めた。これに対して、2000 ppm実験では18週まで、つまり約130日も飼っても何も起こらない。担当の学生は、もう止めましょうかと言ってきた。せつかくここまで辛抱したのだからと言って説得し、飼育を継続したところ、徐々に実験区で死ぬ個体が増え始め、最終生残率は55%であった(対照区90%)¹²⁾。なぜ、1000 ppmのような低濃度のCO₂環境がこのような緩慢な死亡を引き起こすのか、現在のところ全く不明である。このほかにも脱皮や、抱卵、触角の長さなどにCO₂の影響が見られた。このような長期実験を行う時に、何時実験を止めるのかは非常に悩ましい問題である。もし、18週の時点で実験を止めていたら、我々の結論は「影響なし」となったはずで、その後は長期曝露から手を引いていただろう。

海洋酸性化は浅海の生物が先ず影響を受けるのに対して、CO₂ 隔離によって最初に影響を受けるのは深海生物である。深海生物は生きたまま実験に用いることはもちろん、生体を手に入れること自体が困難である。次善の策として我々は当初浅海の魚類を使って研究を開始した。魚類の卵仔稚は上記の無脊椎動物よりもCO₂に対する耐性が高いものの、シロギスとマダイのCO₂耐性が発育段階別に伴って共通のパターンをもって変化すること¹³⁾、CO₂と強酸を使って海水pHを同じ値まで低下させて魚類の初期生残に対する影響を比較した場合、CO₂の方がはるかに強い影響を与えること¹³⁾、さらに血液酸塩基平衡に与える影響もCO₂と強酸で全く異なること¹⁴⁾などを明らかにした。現在は深海魚(ザラビクニン)と高圧実験装置を用いて研究を進めているが、これは遅々とした歩みでなかなか論文まで行きつかないのが悩みの種である。

深海魚実験は寒さとの戦いでもある。私は依然20~25°Cで実験を行うことがほとんどであったが、ニジマスの実験で7°Cを経験し、ザラビクニンの2°Cである。水に入れた手が動かない。これが最低かと思っていたら、最近タスマニア Australian Antarctic

Division に勤める川口 創さんと始めたナンキョクオキアミの CO₂ 実験は、なんと 0°C！
もうこれ以下はほとんどあり得ない。

3. シャットネラによる魚類斃死機構

この研究は、私が長崎大学に赴任して最初に行ったものである。1986年、私は長崎大学水産学部附属水産実験所(長崎県西彼杵郡野母崎町:現長崎市)に赴任して、それまで大学院およびポストクの時代に習得した呼吸・循環生理学の技術と知識を生かして、どんな研究ができるかに頭を悩ませていた。そんな時、87年に高松で開催された赤潮に関する国際シンポジウム“Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology”に参加して、新たに取り組むテーマを見出した。それがシャットネラによる魚類斃死機構の研究である。シャットネラは、良く知られているように、養殖魚介類に大きな被害を与える赤潮プランクトンである。

しかし、始めてみてすぐわかったのは、この研究は大変な労力を要するというであった。まず実験魚として使っていた体重 1 kg 程度のブリを数 10~100 匹単位で入手するのは簡単ではなく、近くの養殖業者の方々に何とかお願いして分けてもらっていた。しかしもっと大変だったのはシャットネラの培養で、1回の曝露実験に細胞濃度数万 cells/ml まで培養したものを 20 リッター程度必要なため、毎日々々かなりの時間を割いて培養を続けた。また、シャットネラの準備が万全でも前日カニューレションを行っていたブリからの採血ができず(ブリの血液はストレス条件下では特に凝固しやすいようである)、培養したシャットネラを泣く泣く処分したことも数え切れないほどあった。シャットネラによる魚類斃死機構は水産大学校におられた小林 博先生が優れた研究を既にやっておられたので、我々は第2ランナーであった。

ブリが入った水槽中にシャットネラを加えると、動脈血の酸素分圧が急激に低下し、細胞濃度 4000 cells/ml の条件では 3 時間程度でブリは死亡した。¹⁵⁾ シャットネラに曝露したブリの鰓表面は、粘液細胞から放出された粘液で覆われ、これが鰓での酸素摂取を阻害して窒息に陥らせるものと結論した。¹⁶⁾ 共同研究者であった長崎大学水産学部の小田達也教授の研究によって、シャットネラは活性酸素(O₂⁻, 過酸化水素など)を常時産生していることが明らかになり、¹⁷⁾ さらに O₂⁻ の産生は魚類エラから得た粘液によって促進されることも判明した。¹⁸⁾ シャットネラの研究は、上記のように大変しんどいものであったため、私は水産実験所が移転したのをきっかけにこの研究を中断したが、小田先生はその後もこの分野で多くの業績を挙げておられる。

謝辞

私が魚類の呼吸生理に関する研究を始めたのは、当時九州大学農学部水産学第一教室の教授をしておられた板澤靖男先生の研究室に大学院生として加えていただいた1977年のことであった。板澤先生は魚類の呼吸生理学を開拓なさった先駆者であり、板澤研究室では多くの大学院生が魚類の呼吸に関わる様々な研究を行っており、活気にあふれていた。その後ポストク時代にお世話になったデンマークÅrhus大学のKjell Johansen教授、ドイツゲッチンゲンMax-Planck-Institute für Experimentelle MedizinのNorbert Heisler教授、Johannes Piiper教授は動物の比較生理学、特に呼吸や酸塩基平衡調節分野でのトップランナー達であり、彼らと過ごした日々は私の一生の宝である。

この文章で記した研究は、全て長崎大学に赴任してから行ったものであり、トビハゼ研究は田北 徹先生(長崎大学名誉教授)や多くの大学院生と行ったフィールド研究の成果である。また海洋隔離影響研究は(財)海洋生物環境研究所の喜田潤氏や吉川貴志氏との共同研究の成果でもある。比較的最近始めた海洋酸性化研究は、ポストクとして私の研究室に昨年末まで在籍した栗原晴子氏(現琉球大学助教)が研究をリードし、優れた成果を挙げてくれた。シャットネラの研究では、長崎大学水産学部の小田達也教授が活性酸素の産生を証明して、斃死機構の解明に対して大きな貢献をなされた。また、出会った当時南西海区水産研究所におられた本城凡夫先生(現香川大学瀬戸内圏研究センター長)は、私をシャットネラの世界に導いてくださった恩人である。お世話になった全ての方々のお名前を記すことはできないが、今回の授賞はこれらの方々とは分かち合うべきものであることは言うまでもない。

文献

- 1) Graham JB. *Air-breathing fishes: Evolution, diversity and adaptation*. Academic Press, San Diego. 1997.
- 2) Clayton DA. Mudskippers. *Oceanogr.Mar.Biol.* 1993;**31**:507-577.
- 3) Ishimatsu A, Hishida Y, Takita T, Kanda T, Oikawa S, Takeda T, Khoo KH. Mudskippers store air in their burrows. *Nature*, 1998; **391**: 237-238.
- 4) Ishimatsu A, Takeda T, Kanda T, Oikawa S, Khoo KH. Burrow environment of mudskippers in Malaysia. *J. Biosci.* 2000; **11**: 17-28.
- 5) Ishimatsu A, Yoshida Y, Itoki N, Takeda T, Heather HJ, Graham JB. Mudskippers brood their eggs in air but submerge them for hatching. *J. Exp. Biol.* 2007; **210**: 3946-3954.
- 6) IPCC. *Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge. 2007.
- 7) Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA. Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Rev. Mar. Sci.* 2009; **1**: 169–92.
- 8) Vézina AF, Hoegh-Guldberg O. Theme section: Effects of ocean acidification on marine ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2008; **373**: 199-309.
- 9) IPCC. *IPCC special report on carbon dioxide capture and storage*. Cambridge University Press, Cambridge. 2005.
- 10) Kurihara H, Kato S, Ishimatsu A. Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.* 2007; **1**: 91-98.
- 11) Kurihara H, Asai T, Kato S, Ishimatsu, A. Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Biol.* 2008; **4**: 225-233.
- 12) Kurihara H, Matsui M, Furukawa H, Hayashi M, Ishimatsu A. Long-term effects of predicted future seawater CO₂ conditions on the survival and growth of the marine shrimp *Palaemon pacificus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2008; **367**: 41-46.
- 13) Kikkawa T, Kita J, Ishimatsu A. Comparison of the lethal effect of CO₂ and acidification on red sea bream (*Pagrus major*) during the early developmental stages. *Mar. Pollut. Bull.* 2004; **48**: 108-110.
- 14) Hayashi M, Kita J, Ishimatsu A. Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three marine fishes. *Mar. Biol.* 2004; **144**: 153-160.
- 15) Ishimatsu A, Maruta H, Tsuchiyama T, Ozaki M. Respiratory, ionoregulatory and cardiovascular responses of the yellowtail *Seriola quinqueradiata* to exposure to the red tide plankton *Chattonella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 189-199.

- 16) Hishida Y, Ishimatsu A, Oda T. Mucus blockade of lamellar water channels in yellowtail exposed to *Chattonella marina*. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 315-316.
- 17) Oda T, Akaike T, Sato K, Ishimatsu A, Takeshita S, Muramatsu T, Maeda H. Hydroxyl radical generation by red tide algae. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; **294**: 38-43.
- 18) Nakamura A, Okamoto T, Komatsu N, Ooka S, Oda T, Ishimatsu A, Muramatsu T. Fish mucus stimulates the generation of superoxide anion by *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 866-869.