

## サルボウガイ (*Scapharca kagoshimensis*) の呼吸代謝 に及ぼす低酸素の影響

本田, 匡人

九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室 | 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門海洋生命化学講座水産生物環境学研究室

郡司掛, 博昭

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門海洋生命化学講座水産生物環境学研究室

松井, 繁明

福岡県水産海洋技術センター | 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門海洋生命化学講座水産生物環境学研究室

諸石, 淳也

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門水圏バイオモニタリング学講座 | 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門海洋生命化学講座水産生物環境学研究室

他

<https://doi.org/10.15017/18861>

---

出版情報 : 九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 65 (2), pp.31-37, 2010-10-29. 九州大学大学院農学研究院

バージョン :

権利関係 :

## サルボウガイ (*Scapharca kagoshimensis*) の呼吸代謝に及ぼす低酸素の影響

本田 匡人<sup>1</sup>・郡司掛 博昭・松井 繁明<sup>2</sup>・諸石 淳也<sup>3</sup>  
姜 益俊<sup>3</sup>・島崎 洋平・大嶋 雄治\*

九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室  
(2010年5月13日受付, 2010年5月14日受理)

### The effect of hypoxia on respiratory metabolism of ark shell (*Scapharca kagoshimensis*)

Masato HONDA<sup>1</sup>, Hiroaki GUNJKAKE, Shigeaki MATSUI<sup>2</sup>, Junya MOROISHI<sup>3</sup>,  
Ik Joon KANG<sup>3</sup>, Yohei SHIMASAKI and Yuji OSHIMA

Laboratory of Marine Environmental Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University,  
Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

#### 緒 言

近年日本沿岸海域において、二枚貝の資源量が激減し（漁業・養殖業生産統計年報, 2009）、水産上大きな問題となっている。中でも水産上重要な種であるサルボウガイ (*Scapharca kagoshimensis*) は、特に有明海で大量へい死が報告され（真崎・小野原, 2003）、1960年代には年間2万トンを越えていた漁獲量は近年1万トンを下回っている（神尾ら, 2008）。この原因として乱獲や生息域の減少の他に貧酸素水塊、赤潮の発生等による影響が考えられ、その早急な原因解明と資源回復への対策が必要とされている。

貧酸素水塊は、閉鎖性が高い富栄養化した内湾域の底層において、夏季を中心に頻りに形成される傾向がある。有明海では、夏季の水温・塩分躍層の形成時や潮流が弱まる小潮時やシャットネラ赤潮の消滅時などに形成され、底層に生息する二枚貝に対する影響が懸念されている（松井, 2002）。貧酸素水塊に暴露されたアサリ *Ruditapes philippinarum* はへい死率が上昇する

こと（Uzaki *et al.*, 2003）、低酸素および無酸素に暴露されたアメリカガキ *Crassostrea virginica* の幼生では、着底、成長および生存に悪影響が出る（Baker and Mann, 1992）などが報告されている。郡司掛ら（2009）はタイラギ *Atrina lischkeana* を1日6時間の低酸素に連日暴露すると、暴露開始20日目よりへい死が起こり、31日目に全個体が死滅したことを報告している。

貧酸素水塊にさらされた二枚貝は、陸上動物とは異なる嫌気呼吸代謝経路を用いて低酸素に対する高い耐性を持つことが報告されている（Hochachka, 1980）。貝は好気条件下では陸上動物と同様にグリコーゲンを出発基質として呼吸代謝を行い、グルコース 1分子より ATP 38分子を生成する。しかし長期の無酸素状態では、主としてグリコーゲンを基質として、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸、リンゴ酸に代謝した後、TCA回路の一部を逆行して、プロピオン酸へと代謝しグルコース 1分子より ATP 6分子を生成する嫌気呼吸代謝（Fig.1）を行うがその効率は悪い。長期の低酸素に暴露されたヤマトシジミ *Corbicula japonica*

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室

<sup>2</sup>福岡県水産海洋技術センター

<sup>3</sup>九州大学大学院農学研究院水圏バイオモニタリング学講座

<sup>1</sup>Laboratory of Marine Environmental Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University

<sup>2</sup>Fukuoka Fisheries and Marine Technology Research Center

<sup>3</sup>Aquatic Biomonitoring and Environmental Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University

\* Corresponding author (E-mail: yoshima@agr.kyushu-u.ac.jp)

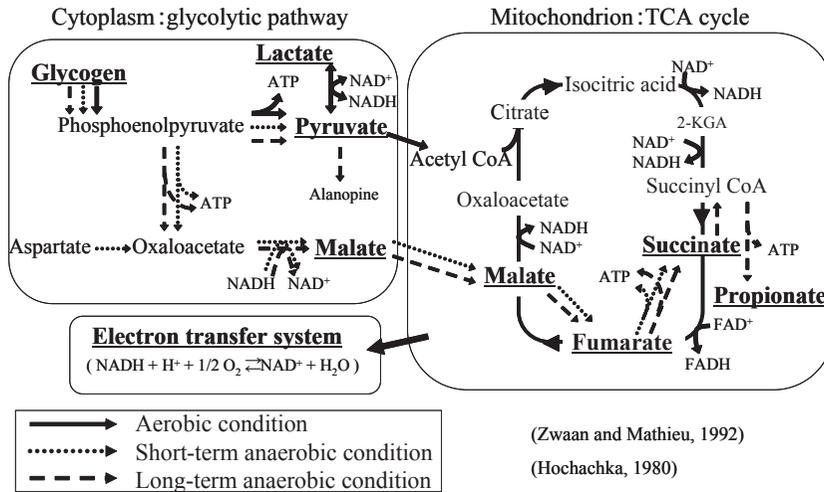


Fig.1. The metabolic pathway map of bivalves in aerobic conditions, short term anaerobic conditions and long term anaerobic conditions. This figure involves cytoplasm, mitochondrion and electron transfer system.

ではグリコーゲン含量の減少およびコハク酸、プロピオン酸濃度の増加が報告されている (中村, 1998)。

よって本研究では、サルボウガイ資源減少の原因解明の一端として、サルボウガイを低酸素に連続暴露して、その生存と呼吸代謝およびグリコーゲン含量に及ぼす影響を調べた。

Key words : ark shell; hypoxia; mortality; metabolite

## 材料と方法

### 1. 供試個体

2008年10月に有明海大和沖より採取したサルボウガイ(殻長 $34.3 \pm 3.32$ mm : 平均±標準偏差)を、砂(平均粒径0.5mm)を厚さ20cmに敷き詰めた120Lポリカーボネート製円形水槽(Dia600×H400mm)2個に各200個体を入れ、ろ過海水を流しながら無給餌で12日間、実験開始まで馴致した。

### 2. 試薬類

硫酸は和光純薬工業製の精密分析用試薬を用い、アンスロンはナカライテスク株式会社製を用いた。乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、プロピオン酸およびその他の試薬は和光純薬工業製の特級試薬を用いた。

### 3. 低酸素暴露実験

プラスチック水槽(W237×D253×H100mm)6個

にサルボウガイ計60個体を収容し、低酸素暴露区とした。各水槽にろ過海水を流し、一昼夜無給餌で馴致した。実験開始日の午後1時に低酸素暴露区および対照区の溶存酸素濃度が十分に高いこと( $6.78 \pm 0.02$ mg/L)を確認した後、一旦水を止め、ビニールで水面を覆って窒素ガスを通気し低酸素状態にした。光学式DO計(Hach社, HQ30d, USA)で溶存酸素濃度が0.3mg/L前後まで低下したことを確認した後、海水を30L/日の流量で流し、低酸素に7日間連続暴露した(低酸素暴露区)。対照区では60個体を暴露区と同様に水槽に入れ、窒素ガス通気の代わりにエアレーションを行い、同じ流速で海水を流した。その時の酸素濃度は $6.75 \pm 0.04$ mg/Lであった。実験期間中、自然日長および無給餌条件下で飼育を行い、水温は19.8~23.7°Cであった。毎日午後1時にサルボウガイの生存を観察し、同時に溶存酸素濃度を光学式DO計で測定した。実験0, 3, 7日目に暴露区および対照区より各4個体採取し、殻長、殻幅、殻高、全重量、殻重量および軟体部重量を計測後、軟体部を-30°Cで冷凍保存した。後日、軟体部の有機酸濃度およびグリコーゲン含量の測定を行った。

### 4. 有機酸濃度の測定

得られた軟体部について、呼吸代謝物である有機酸(乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、プロピオン酸)の濃度をInoue *et al.* (2007)の方法に

従い測定した。採取した軟体部全体に等量の純水を加え、ポリトロンホモジナイザー (PT3100, Kinematica, Switzerland) を用いて粉碎, 均一化した。この試料 0.6g に 8 倍量の 7% 過塩素酸を加えて 30 分間遠心分離 (10,000rpm, 5°C) し, 上清を 0.45 $\mu$ m フィルター (DISMIC-13HP, アドバンテック) でろ過した。高速液体クロマトグラフィー (Waters2690, 日本ウォーターズ) を用いてろ過後の試料 100 $\mu$ L の有機酸の測定を行った。カラムは Aminex HPX-87H organic acid analysis column (300 $\times$ 7.8mm, Bio-Rad Laboratories, USA) を, 有機酸の検出には UV 検出器 (Waters 2487, 日本ウォーターズ; 測定波長, 210nm) を使用した。カラム温度は 60°C, 流速は 0.6mL/min に設定し, 移動相には 8mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いた。スタンダードとして乳酸 (1mM), ピルビン酸 (0.1mM), リンゴ酸 (1mM), フマル酸 (0.1mM), コハク酸 (2mM), プロピオン酸 (1mM) の混合標準液を用いた。測定後, 試料と混合標準液における各有機酸のピークの面積比から軟体部全体の湿重量 1g 当たりの濃度 ( $\mu$ mol/g) を算出した。

#### 5. グリコーゲン含量の測定

グリコーゲン含量は鎌田・浜田 (1985) の方法に従い測定した。軟体部全体に等量の純水を加えた後, ポリトロンホモジナイザーを用いて粉碎し, この試料 0.3g に 30% 水酸化カリウム溶液 1.5mL を加え, 湯浴 (100°C) で 20 分間加熱した。更に飽和硫酸ナトリウム溶液 0.25mL と 95% エタノール溶液 2mL を添加し, 湯浴で沸騰するまで加熱後, 5 分間遠心分離 (3,000rpm, 5°C) を行った後に上清を取り除き, 得られた白色沈殿を純水 5mL に溶かした。この試料 200 $\mu$ L に純水 800 $\mu$ L を加え, 更にアンスロン試薬 (純水 76mL, 硫酸 196mL, チオ臭素 250mg, アンスロン 250mg) 5mL を加え, 100°C で 15 分間加熱後, 1 時間以上冷却し, 620nm で比色定量した。グリコーゲン含量は軟体部全体の湿重量 1g 当たりの含量 (mg/g) として算出した。

#### 6. 統計検定

低酸素暴露による生存数の有意差は一般化 Wilcoxon 法 (R, version 2.9.1; Ihaka and Gentleman, 1996) により, 各有機酸の濃度およびグリコーゲン含量の有意差は二元配置分散分析 (SPSS 13.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) により, 5% を有意水準として検定した。

## 結 果

### 1. 溶存酸素濃度

実験中の水中における溶存酸素濃度を Fig.2 に示す。実験期間を通して低酸素暴露区の平均溶存酸素濃度は 0.35 $\pm$ 0.11 mg/L であり, サルボウガイは連続して低酸素に暴露されていた。

### 2. 生存

低酸素に連続暴露したサルボウガイの生存個体数の変化を Fig.3 に示す。全 60 個体のうち, サンプルングした 12 個体を除く 48 個体で生存を観察した。低酸素暴露 1 日目からへい死が観察され, 7 日目までに 48 個体中 28 個体がへい死した。なお対照区でも暴露終了時までに 48 個体中 12 個体がへい死したが, 統計検定の結果, 生存における低酸素の影響は有意であった ( $p < 0.05$ )。

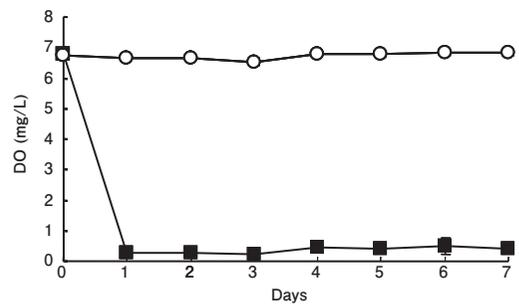


Fig. 2. Dissolved oxygen (DO) concentrations of seawater in hypoxia (■) and in control (○) (mean  $\pm$  SD; n = 3–6 for each point).

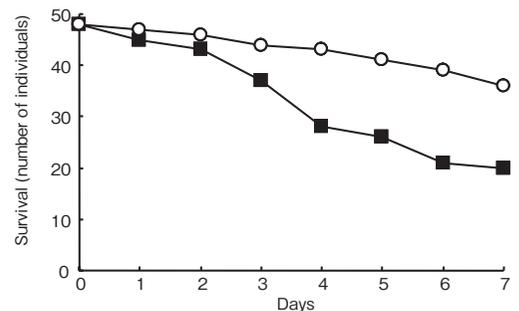


Fig. 3. Number of survivors of *S. kagoshimensis* treated with hypoxia (■) and control (○).

### 3. 有機酸濃度

低酸素暴露区および対照区におけるサルボウガいの軟体部全体の有機酸濃度の測定結果をFig.4に示す。リンゴ酸とピルビン酸の測定結果は両者のピークの分離が完全にできなかったため合算値として表記した(リンゴ酸+ピルビン酸)。二元配置分散分析の結果、リンゴ酸+ピルビン酸およびフマル酸で低酸素暴露因子と時間の因子による減少は有意であった(リンゴ酸+ピルビン酸： $p=0.041$ ,  $<0.001$ ；フマル酸： $0.005$ ,  $<0.001$ )。プロピオン酸では低酸素暴露因子

および低酸素と時間因子の交互作用による増加が有意であった( $p=0.012$ ,  $0.019$ )。しかし乳酸およびコハク酸では両因子とその交互作用は共に有意でなかった。

### 4. グリコーゲン含量

低酸素暴露区および対照区におけるサルボウガいの軟体部全体のグリコーゲン含量の測定結果をFig.5に示す。低酸素暴露区において、0日目では7.85mg/g、7日目では3.05mg/gであった。対照区において0日目

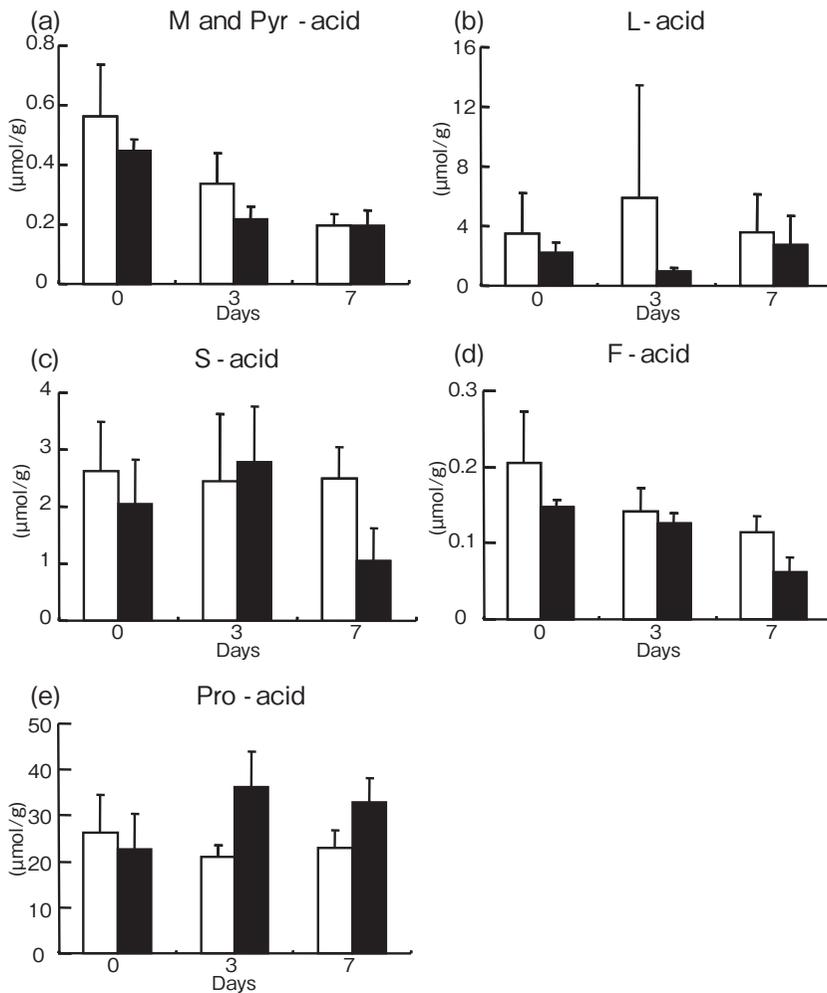


Fig. 4. Concentrations of organic acids in adductor muscles of *S. kagoshimensis* treated with hypoxia (■) and control (□) (mean  $\pm$  SD;  $n=4$  for each replicate). (a) malic and pyruvic acid, M- and Pyr-acid; (b) lactic acid, L-acid; (c) fumaric acid, F-acid; (d) succinic acid, S-acid; (e) propionic acid, Pro-acid.

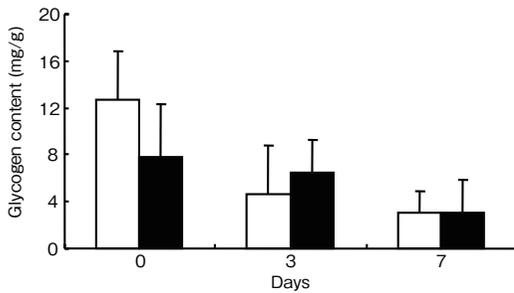


Fig. 5. Glycogen contents in *S. kagoshimensis* treated with hypoxia (■), and control (□) (mean  $\pm$  SD;  $n = 4$  for each replicate).

では12.6mg/g, 7日目では3.03mg/gであった。二元配置分散分析の結果, 低酸素暴露の因子は有意ではなかったが, 時間因子が有意であった ( $p = 0.002$ )。

## 考 察

室内実験の結果, サルボウガイは連続低酸素暴露によってへい死し, 本条件下での推定半数へい死時間は130時間であった。Theede *et al.* (1969) は, 水温30°Cでムラサキガイ *Mytilus edulis* が840時間, ザルガイ *Cardium edule* が102時間の低酸素暴露でその半数がへい死することを示している。アサリでは水温25°Cで貧酸素水に暴露すると48時間で半数へい死に至ることが報告されている (中村, 1998)。本実験でのサルボウガイの半数へい死時間はザルガイと同程度の130時間であり, サルボウガイの低酸素に対する感受性は他の二枚貝類に近いと考えられた。

低酸素暴露したサルボウガイでは, リンゴ酸+ピルビン酸, フマル酸の濃度は有意に減少し, プロピオン酸濃度は有意に増加した。中村 (1998) はヤマトシジミを20°Cで低酸素に暴露すると, 暴露4日目までは乳酸濃度が減少し, その後増加することを報告している。サルボウガイの乳酸濃度は, 低酸素暴露による有意な低下は認められず, 嫌気呼吸時における代謝系の種差による違いが示唆された。その一方, 中村 (1998) は, 低酸素に暴露したヤマトシジミのプロピオン酸濃度は暴露終了14日まで経時的に増加することを報告しており, プロピオン酸の挙動が両種間で一致した。Fig.1に示す様にプロピオン酸が嫌気呼吸代謝の最終代謝物であるため, その濃度が上昇したと推測された。

本実験でサルボウガイに低酸素を暴露しても, グリコーゲン含量に影響を与えなかった。ヤマトシジミは嫌気呼吸時にグリコーゲン含量が減少することが報告

されている (中村, 1998)。しかしシラトリドブガイ *Anodonta cygnea* を水温15°Cで低酸素に暴露してもグリコーゲン含量に有意な差が確認されなかったこと (Gade and Wilps, 1975) が報告されている。一方 Watanabe *et al.* (2005) はアカガイ *Scapharca broughtonii* はアスパラギン酸を消費して初期の嫌気呼吸を行うことを報告している。よってサルボウガイがグリコーゲン以外の基質を用いて嫌気呼吸を行っている可能性が考えられた。

本実験の結果, サルボウガイは低酸素に連続して暴露されるとへい死率が上昇することが確認された。しかし, サルボウガイの漁獲量が減少している有明海では貧酸素水塊が長期間持続しておらず (杉野ら, 2009), 貧酸素水塊による影響による直接断定できない。一方, 郡司掛ら (2009) は, タイラギを1日6時間の低酸素に繰り返し暴露すると, 20日目よりへい死が起り, 31日目に全個体がへい死したことを報告している。よって, 貧酸素水塊による低酸素暴露が短時間であっても複数回反復して発生すればサルボウガイにプロピオン酸など嫌気呼吸代謝物が蓄積して異常を引き起こし, へい死が起る可能性が考えられた。

本実験でサルボウガイのプロピオン酸濃度は, 低酸素暴露3日目以降に上昇し, へい死個体数も増加していた。生田ら (2009) は無酸素に暴露したアサリにおいてプロピオン酸濃度が上昇し, 3  $\mu$ mol/mL前後のプロピオン酸濃度が生存限界に達した指標と考えられると報告している。本実験で低酸素暴露によりサルボウガイのプロピオン酸濃度は対照区と比べて有意に増加していたことから, サルボウガイにおいても高濃度に蓄積されたプロピオン酸が生理的变化をもたらし, 生存に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。

グリコーゲン含量への低酸素暴露による影響はみとめられなかったが, 時間による有意な影響が確認された。この原因として実験期間中無給餌であったことが考えられる。また無給餌が対照区で48個体中12個体がへい死した一因と考えられる。今後二枚貝において長期の暴露実験を行う場合には給餌を行う必要があると考えられた。

以上の結果より, 低酸素に長時間暴露されたサルボウガイでは嫌気呼吸代謝において下流に位置する代謝物の濃度が上昇し, へい死率も上昇することが明らかとなった。今後サルボウガイにおける嫌気呼吸代謝物濃度とへい死の関係をより詳細に検討する必要がある。

## 要 約

有明海産サルボウガイ (*Scapharca kagoshimensis*; 平均殻長34.3mm) 計60個体を6水槽 (W237×D253×H100mm) に入れ、馴致後7日間流水下で低酸素 (DO < 0.5mg/L) に連続して暴露し生存および呼吸代謝物の濃度変化を調べた。その結果、サルボウガイは連続低酸素暴露3日目以降、乳酸およびフマル酸濃度が有意に減少し、プロピオン酸濃度が有意に増加した。また低酸素暴露に伴い死亡個体の増加が観察され、暴露7日目で暴露期間中にサンプリングした12個体を除く48個体の内28個体がへい死した。低酸素暴露によりサルボウガイの呼吸代謝が変化し、生存時間が短縮したと考えられた。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり福岡県海洋技術研究センターの職員皆様の御協力を得、此処に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 郡司掛博昭・大嶋雄治・松井繁明・田上 航・今石幸治・本田匡人・諸石淳也・姜益俊・島崎洋平・本城凡夫 2009 低酸素海水に反復暴露したリシケタイラギ (*Atrina lischkeana*) の浮上行動とへい死. 九大農学芸誌, **64**: 19-22
- 生田和正・日向野純也・桑原久実・辻本哲郎 2009 アサリと流域圏環境 伊勢湾・三河湾での事例を中心として. 恒星社厚生閣, 東京, pp.87-97
- 鎌田八郎・浜田龍夫 1985 グリコーゲンの定量におけるアンスロン法との比較. 畜産試験場研究報告, **43**: 85-91
- 神尾光一郎・松川康男・興石裕一 2008 浅海干潟域における二枚貝の生態と生息環境 (総説). 水産総合研究センター中央水産研究所, 横須賀
- 真崎邦彦・小野原隆幸 2003 有明海奥部におけるサルボウの漁業実態と分布状況. 佐有水研報, **21**: 29-36
- 松井繁明 2002 有明海北東部漁場におけるタイラギの資源変動. 福岡水技セ研報, **12**: 29-35
- 中村幹雄 1998 宍道湖におけるヤマトシジミ

- Corbicula japonica* PRIME と環境との相互関係に関する生理生態学研究. 鳥根県水産試験場研究報告, **9**
- 農林水産省大臣官房統計部編 2009 平成18年 漁業・養殖業生産統計年報. 財団法人農林統計協会, 東京
- 杉野浩二郎・吉田幹英・伊藤輝昭・松井繁明 2009 有明海福岡県地先におけるタイラギ斃死要因に関する研究II. 福岡水海技セ研報, **19**: 83-90
- Baker, S. M. and R. Mann 1992 Effects of hypoxia and anoxia on larval settlement, juvenile growth, and juvenile survival of the oyster *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.*, **182**: 265-269
- De Zwaan, A. and M. Matieu 1992 Cellular biochemistry and endocrinology. In "The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture", ed. by G. Elizabeth, Elsevier, London, 223-307
- Gade, G. H. Wilps 1975 Glycogen degradation and end products of anaerobic metabolism in the fresh water bivalve *Anodonta cygnea*. *J. Comp. Physiol.*, **104**: 79-85
- Hochachka, P. W. 1980 *Living without Oxygen*. Harvard Univ. Press, Harvard (US)
- Ihaka, R. and R. Gentleman 1996 R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J. Comp. Graph. Stat.*, **5**: 299-314
- Inoue, S., Y. Oshima, S. Abe, R. S. S. Wu, N. Kai and T. Honjo 2007 Effects of tributyltin on the energy metabolism of pen shell (*Atrina pectinata japonica*). *Chemosphere*, **66**: 1226-1229
- Theede, H., A. Ponat, K. Hiroaki and C. Schlieper 1969 Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen-deficiency and hydrogen sulfide. *Mar. Biol.*, **2**: 325-337
- Uzaki, N., M. Kai, H. Aoyama and T. Suzuki. 2003 Changes in mortality rate and glycogen content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during the development of oxygen-deficient waters. *Fish. Sci.*, **69**: 936-943
- Watanabe, T., K. Shibata, Y. Kera, S. Takahashi and R. Yamada 2005 Effects of hypoxic and osmotic stress on the free D-aspartate level in the muscle of blood shell *Scapharca broughtonii*. *Amino Acids*, **28**: 291-296

## Summary

We examined the effect of hypoxia on respiratory metabolism of ark shell, *Scapharca kagoshimensis*. The shell samples (average body length of 34.3mm), collected from Ariake sea, were placed in six chambers (W237×D253×H100mm) and exposed to hypoxia (DO, <0.5mg/L) for 7 days. During exposure period, we observed their survival and measured the concentrations of respiratory metabolites (succinic, pyruvic, fumaric, lactic, malic and propionic acids) in their soft tissues. As a result, concentrations of malic, pyruvic and fumaric acids were decreased, and that of propionic acid was increased significantly. In addition, the mortality rate was significantly decreased by exposure to hypoxia. Thus, we could conclude that hypoxia altered respiratory metabolism in *S. kagoshimensis* and affect their survival.

