

第5章 酸素不足に対する適応

無脊椎動物には、潮間帯に生息する貝類のように長期の酸素不足に耐え得るものや、寄生虫のように定常的に酸素欠乏の状態にあるものがあり、これらの生物は乳酸生成の少ない特殊な無気代謝によってエネルギーを獲得している (Hochachka, 1984; Hochachka & Somero, 1984)。

しかし、湖沼などに発生する貧酸素水塊にしばしば曝される二枚貝や環形動物については、無気代謝に関する研究はほとんどなく、ヤマトシジミに関する報告としては、わずかに溶存酸素と酸素消費量の関係や、酸素欠乏に伴う乳酸の蓄積を調べた断片的なものがあるにすぎない (佐伯・熊谷, 1989a, b)。

第3章第3節においてヤマトシジミの酸素不足時の耐性について検討した結果、ヤマトシジミは汽水産二枚貝のうちで最も高い貧酸素耐性を持つことが示された。

ここではヤマトシジミの酸素不足に対する生体内の適応が、どのようなメカニズムにより行われているのかを解明することを目的として実験を行った。このような代謝メカニズムの解明には、生体成分の代謝酵素の研究のほか、代謝産物の量的な変動を明らかにする必要がある。そこで本章では代謝上重要と考えられるグリコーゲン、遊離アミノ酸、有機酸、アデニンヌクレオチドおよびオピン類を詳細に分析した。

まず、第1節では無酸素状態の体内成分の挙動を観察した。第2節では溶存酸素が飽和状態の水槽で飼育を開始し、以後ヤマトシジミの呼吸により溶存酸素濃度が減少していく過程の中で、生体成分がどのように変動していくのかを明らかにした。

第1節 無酸素適応

本節では、飼育水槽の温度を 20 および 30 に設定し、無酸素状態におけるヤマトシジミ生体成分の変動を調べ、酸素欠乏に耐える代謝メカニズムを明らかにする。

材料および方法

試料および飼育方法 実験に供したヤマトシジミは 1995 年 7~9 月に第 3 章第 1 節と同様の地点及び方法で採集し、同様の方法で実験室に持ち帰った。飼育方法は第 3 章第 3 節実験 1 と同様の方法で行った。

分析方法

1. エキス調製方法 トリクロロ酢酸 (TCA) 抽出法を採用した。すなわち、50m ℓ容の遠沈管中に細切し均一にした貝の軟体部試料約 5g に 10%TCA5m ℓ、および 5% TCA30m ℓを加え、ウルトラタラックスを用いてホモジナイズした。そのホモジネートを 3000rpm10 分間遠心分離して上清をえた。残渣はさらに 5%TCA30m ℓを加えて同様の操作を行い、上清を合一し 100m ℓに定容し、これを 5% TCA エキスとした。

2. グリコーゲン量 フェノール硫酸法により測定した。

50m ℓ容の遠沈管に試料 2~3g、および 30%KCl 10m ℓをいれ、沸騰水浴中で 2 時間加熱した。冷却後 95%エタノール 20m ℓを加え攪拌し冷蔵庫中で一晩放置した。

3000rpm10 分間遠心分離して上清と沈殿物に分け、沈殿に 3m ℓの蒸留水を加えた後、加温しながら溶解し、飽和 KCl 1 滴および 95%エタノール 4.5m ℓを入れ、一晩冷蔵保存した。

上清を除き、沈殿中のエタノールを湯浴中で留去した後、沈殿を蒸留水で溶かし 50m ℓに定容した。

の溶液を 100 倍に希釈後、その 1m ℓを試験管にとり、ここへ 5%フェノール溶液 1m ℓを加えてよく混合した。次いで、濃硫酸 5m ℓを液面に直接加え、できるかぎり激しく発熱させてよく混合した後、室温に 30 分放置してから 490nm における吸光度を測定した。

濃度既知のグリコーゲン標準液についても同様の操作を行い、検量線を作成した。

3. 有機酸の定量 島津高速液体クロマトグラフ有機酸分析システムを用いて、有機酸を測定した。分析条件を Table 5-1-1 に示した。有機酸の種類はリンゴ酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、ギ酸、酢酸、ピログルタミン酸およびプロピオン酸の 8 種類について定量した。

4. ヌクレオチドの定量 高速液体クロマトグラフィを用いて、ヌクレオチドを分析した。分析条件を Table 5-1-2 に示した。ヌクレオチドの種類は ATP, ADP, AMP, IMP の 4 種である。

5. オピン類の定量

5-1. オクトピンの定量 エキス中のオクトピンをベンゾイン誘導体にし、Table 5-1-3 の分析条件

で定量した。

5-2. 酸性オピンの定量 エキス中の酸性オピン類を以下のように、イオン交換樹脂により前処理した。まず、TCA を除去したエキスを Dowex 1x8 (酢酸型) のガラスカラムに吸着させ、蒸留水で洗浄した。次いで、4N の酢酸にて酸性オピン類を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮後、一定量に定容した。この前処理液の一部をフェニルチオカルバミル誘導体にし、Table 5-1-4 の分析条件で定量した。なお、酸性オピンの種類はアラノピン、ストロンピン、タウロピンおよび -アラノピンの4種である。

分析結果の表示 全窒素量およびエキス窒素量は表中では湿重量 100g あたりの mg 数、および乾物 1g あたりの mg 数で表現し、図では乾物 1g あたりの mg 数の変動を示した。遊離アミノ酸、有機酸およびアデニンヌクレオチドは表と図とも乾物 1g あたりの μmol 数で表し、グリコーゲンおよびオクトピン量に関しては湿重量 100g あたりの g 数および mg 数で表した。

結果

水分含量: 20 無酸素適応に伴うヤマトシジミの水分含量の変動 (Table 5-1-5 および Fig. 5-1-1) では、飼育開始直後 82.2%の値は飼育 3 時間目まで一定であった。6 時間目以降 24 時間目までに 84.0%に上昇した。以後 7 日目に減少しているが飼育終了日の 25 日目まで緩やかな上昇が認められた。30 における水分の変動 (Table 5-1-6 および Fig. 5-1-2) は、飼育開始直後 81.1%の水分が 1 時間目から 9 時間目までに 83.5%に上昇し、以後 24 時間目までやや減少した。2 日目以後緩やかに上昇し、10 日目には 85.6%の最高値に達した。20 および 30 における水分変動を比較すると、高水温ほど水分の上昇が速いことがわかる。しかし、20、30 飼育とも水分の変動パターンは類似しており、無酸素代謝が進行すると水分が上昇することが判明した。

全窒素量: 20 および 30 での無酸素飼育におけるヤマトシジミの全窒素量の変動をそれぞれ Table 5-1-5, Fig. 5-1-1 および Table 5-1-6, Fig. 5-1-2 に示した。全窒素量の変動パターン (Figs. 5-1-1, 5-1-2) は 20、30 飼育とも類似しており、無酸素状態が続くとやや上昇する傾向が認められた。これは水分含量の上昇に伴う固形分の減少による見かけ上の増加とも考えられる。

エキス窒素量: エキス窒素量の変動において、20 では (Table 5-1-5 および Fig. 5-1-1) 飼育開始直後 11.7mg/g (以後 mg と省略する) 認められた窒素量は、7 日目までに緩やかに 16.3mg まで上昇したが、11 日目に 13.9mg まで減少し、以後飼育終了 25 日目までほぼ一定の値で推移した。30 では (Table 5-1-6 および Fig. 5-1-2) エキス窒素量は 20 に比べ急激に増加した。すなわち、飼育開始直後 10.6mg が約 12 時間で 14.3mg まで上昇した。以後、多少増減を観察したがほぼ一定の値で推移した。

遊離アミノ酸: 20 における遊離アミノ酸の変動 (Table 5-1-5, Fig. 5-1-3a,b) において、まず遊離アミノ酸総量 (Fig. 5-1-3a) は、飼育開始から 24 時間目まで 155 μmol 前後のほぼ一定の値を

示した。48 時間目以降、徐々に増加し 25 日目に 223.9 μmol と最高値を記録した。

30 (Table 5-1-6, Fig. 5-1-4a,b) における総量変動 (Fig. 5-1-4a) は水分やエキス窒素と同様に顕著で、無酸素飼育 1 時間目に 143 μmol から 185 μmol へと 43 μmol の急激な変動を認めた。以後 6 日目まで 195 μmol 前後の値で推移し、10 日目に約 230 μmol まで上昇した。無酸素飼育に伴う遊離アミノ酸総量の増加速度は高水温ほど速いことが判明した。

20 における個々の遊離アミノ酸の変動 (Table 5-1-5, Fig. 5-1-3a,b) では、アラニン (Fig. 5-1-3a) が最も増加量が大きく、アラニン 1 成分で遊離アミノ酸変動の大部分を占めた。変動パターンは総量変動とほぼ一致しており、飼育開始から 24 時間目までは 50 μmol 前後でほぼ一定の値で推移し、48 時間目に 70.3 μmol まで急激に上昇した。これ以後、緩やかに増加し、14 日目に最高値 (97.94 μmol) を記録し、以後やや減少傾向を示した。無酸素飼育中で 2 倍以上上昇した高含量成分は、プロリン、バリン、ロイシンの 3 成分で、次いで、 γ -アラニン、イソロイシン、リシン、アルギニンなどが上昇した。中でも、プロリン (Fig. 5-1-3a) の上昇は顕著で、飼育開始時 2.64 μmol が飼育終了時には 12.56 μmol と約 4.8 倍の増加を示した。飼育期間中あまり変動しなかった成分としては、アスパラギン酸、グリシン、グルタミンなどが挙げられる。一方、グルタミン酸 (Fig. 5-1-3a) は飼育開始時 22.95 μmol と総量の 15% を占める重要な成分である。しかし、無酸素飼育中、含量は徐々に下降し飼育終了時の 25 日目には 13.95 μmol と約 40% 減少した。

30 における個々の遊離アミノ酸の変動 (Table 5-1-6, Fig. 5-1-4a,b) では、20 飼育と同様アラニン (Fig. 5-1-4a) の変動が大きく、遊離アミノ酸変動の大半を占めた。変動のパターンは 20 飼育に比べ急激に変動した。すなわち、飼育開始時に 48 μmol 検出されたアラニンが 1 時間後には 73.3 μmol と約 1.5 倍の上昇を認めた。これ以降、ほぼ一定の値で推移し、飼育終了付近の 10 日目 (最高値 86.0 μmol) に多少増加した。次いで、グリシン (Fig. 5-1-4a) がアラニンと同様、飼育初期段階で 7.8 μmol から 16.1 μmol と約 2.3 倍の急激な上昇を示した。しかし、2 時間目以降顕著な変動は示さなかった。その他、プロリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、リシン、アルギニン (Fig. 5-1-4a,b) が無酸素飼育中にかなり増加し、20 飼育と同様の傾向を示した。特に、プロリン (Fig. 5-1-4a) は変動が大きく、飼育開始時 3.6 μmol が飼育終了時には 15.6 μmol と約 4.3 倍の上昇を示した。また、飼育終了付近 (10 日目) で急激な増加を示し注目された。アスパラギン酸や γ -アラニンは飼育期間中あまり変動しなかった。他方、グルタミン酸 (Fig. 5-1-4a) は 20 同様、その含量は徐々に下降し飼育終了時には初期値 (24.7 μmol) に比べ約 40% の減少を示した。

無酸素適応時の生体成分変動と比較するため、20 および 30 の酸素が十分な環境下で飼育したときの生体成分の変動を Table 5-1-7 に示した。まず、20 では遊離アミノ酸は飼育 21 日経過時でも初期値とほとんど変わらなかった。30 においても飼育 8 日目の遊離アミノ酸はグリシンがやや上昇し、 γ -アラニンがやや減少した以外はほとんど初期値と変わらなかった。

有機酸: 20 における有機酸の変動 (Table 5-1-8 および Fig. 5-1-5) において、まず有機酸総量は飼育開始 3 時間目から上昇傾向が観察され、以後 21 日目に最高値 (146.6 μmol) に達するまで上

昇し続け、初期値に比べ約 6.8 倍の増加を認めた。アミノ酸の変動に比べより早い時期に上昇することがわかった。個々の成分ではコハク酸の変動が大きく、コハク酸 1 成分で有機酸変動のほとんどを占めた。変動パターンは飼育開始 3 時間目から上昇が認められ、1 日目で約 2.5 倍 (25.4 μmol)、2 日目で約 5 倍 (43.3 μmol)、7 日目で約 7 倍 (71.3 μmol)、14 日目には最高値の 103.7 μmol を記録し、飼育開始時 (10.9 μmol) に比べ、約 10 倍増加した。しかし、14 日目で降減少に転じ、飼育終了の 25 日目には 59.5 μmol まで減少した。次いで、プロピオン酸の変動が大きく、特徴的な変動を示した。すなわち、飼育開始時から 2 日目まで全く検出されず、4 日目に約 3 μmol 検出された。以後、11 日目に 17.9 μmol と急激に上昇し、飼育を終了した 25 日目には 34.1 μmol と最高値を示した。酢酸の変動も上記 2 成分に次いで大きかった。変動パターンはプロピオン酸に類似しており、初期値 (3.4 μmol) に比べ、最高値を記録した 25 日目には 16.2 μmol と約 4.8 倍の増加を認めた。乳酸の変動は 4 日目までやや減少傾向を示したが、以後飼育終了まで上昇傾向を認めた。その他、リンゴ酸、ギ酸、フマル酸およびピログルタミン酸には顕著な変動は認められなかった。

20 好気条件下における有機酸の変動 (Table 5-1-9) では、飼育開始時に比べ、21 日目ではプロピオン酸は全く検出されず、プロピオン酸は主に嫌気状態で代謝される有機酸であると思われた。また、コハク酸と酢酸が 21 日目で初期値に比べ約 2 倍の、それぞれ 14.4 μmol と 7.4 μmol の値を示したが、無酸素条件下の 21 日目の値 (97.3 μmol と 12.5 μmol) と比べ含量が著しく少なく、両成分は主として嫌気代謝に関与する成分と思われた。なお、リンゴ酸、乳酸、ギ酸およびフマル酸はほとんど変動しなかった。

30 における有機酸の変動 (Table 5-1-10 および Fig. 5-1-6) において、有機酸総量は飼育 1 時間目よりわずかな上昇が観察され、以後 10 日目まで上昇し、初期値に比べ約 6.2 倍 (143.8 μmol) の増加を認めた。30 飼育は 20 飼育に比べ、無酸素に対して早期に変動した。しかし、有機酸の変動は遊離アミノ酸の変動に比べ応答が遅かった。個々の成分では 20 飼育同様コハク酸の変動が大きく、飼育開始時 8.2 μmol が 1 時間後には 12.9 μmol (約 1.6 倍)、3 時間で 18.8 μmol (2.3 倍)、6 時間で 25.2 μmol (3.1 倍)、24 時間で 41.1 μmol (5 倍)、2 日目で 59.5 μmol (7.3 倍)、10 日目には最高値の 74.8 μmol (9.1 倍) まで達した。次いで、プロピオン酸の変動が大きく、特徴的な変動を示した。20 飼育同様、飼育開始時から 12 時間目まで全く検出されず、24 時間後に約 7.8 μmol 検出された。以後、3 日目に 23.4 μmol と急激に上昇し、飼育 6 日目には 45.2 μmol と最高値を示し、以後 10 日目に多少の減少が認められた。酢酸の変動も上記 2 成分に次いで大きく、しかも変動パターンはプロピオン酸に類似していた。すなわち、初期値 (5.5 μmol) に比べ、最高値を記録した 6 日目には 17.1 μmol と約 3.1 倍の増加を示した。乳酸の変動は飼育開始から 10 日目までほとんど変動しなかった。その他、リンゴ酸、ギ酸、フマル酸およびピログルタミン酸においても顕著な変動は認められなかった。

30 好気条件下における有機酸の変動 (Table 5-1-11) では、飼育開始時に比べ 8 日目までプロピオン酸は全く検出されず、20 飼育同様、プロピオン酸は嫌気代謝時に蓄積する有機酸であると

思われる。また、コハク酸と酢酸が 8 日目に初期値と比べやや増加したが、無酸素条件下の最高値（74.8 μmol と 19.5 μmol ）と比べ、含量が極めて少なく、両成分は嫌気代謝に關与する成分と思われる。なお、リンゴ酸、乳酸、ギ酸、フマル酸およびピログルタミン酸には顕著な変動は認められなかった。

アデニンヌクレオチド：20 におけるアデニンヌクレオチドの変動（Table 5-1-12, Fig. 5-1-7）では、エネルギー通貨とされる ATP の変動は飼育開始数時間と 4 日目に減少した以外はほぼ一定の値で 21 日目まで推移し、飼育終了時の 25 日目にまた減少した。しかし、ADP および AMP 含量には ATP ほどの変動は観察されなかった。また、ATP、ADP および AMP の合計はほぼ一定の値を示し、ATP の供給が常に行われていたものと判断される。一方、IMP は特徴的な変動を示した。すなわち、無酸素飼育開始 2 日目まで 30 μmol 前後の値を示したが、4 日目以降急激な減少に転じ、25 日目には検出されなかった。

30 におけるアデニンヌクレオチドの変動（Table 5-1-13, Fig. 5-1-8）では、ATP の変動は 24 時間目にやや減少した以外はほぼ一定の値で 10 日目まで推移した。しかし、ADP および AMP 含量には ATP ほどの変動は観察されなかった。また、ATP、ADP および AMP の合計はほぼ一定の値を示し、20 の飼育と同様、ATP の供給が常に行われていたものと判断される。他方、IMP も 20 飼育と同じ特徴的な変動を示し、無酸素飼育開始 6 時間目までは 20 μmol 以上の値を示したが、9 時間目以降急激な減少に転じ、3 日目以降は検出されないときもあった。嫌気代謝が進行中に IMP だけがなぜ減少するのか興味ある問題である。

グリコーゲン：20 および 30 無酸素飼育時のヤマトシジミ軟体部のグリコーゲン含量の変動を黒丸実線で、対照として好気条件下で飼育したときのグリコーゲン含量の変動を白丸点線で示した（Fig. 5-1-9）。

20 におけるグリコーゲンの変動は無酸素飼育開始時の 3.5g/100g（以後 g と省略する）が徐々に減少し、飼育 25 日目には 1.6g まで低下した。しかし、好気条件下における飼育ではグリコーゲンは 21 日目で 3.1g 検出され、飼育開始からわずかな減少にとどまった。

30 におけるグリコーゲンの変動は 20 に比べ、無酸素状態に曝されると速やかに応答した。飼育開始時 3.9g 認めたものが徐々に減少し、飼育 10 日目には 1.1g まで低下した。しかし、好気条件下における飼育ではグリコーゲンは 8 日目で 3.5g 検出され、20 の好気飼育同様わずかな減少にとどまった。

これらより、無酸素状態でヤマトシジミを飼育した場合、グリコーゲンを消費してエネルギーを生産することが推測される。

オクトピン：20 および 30 無酸素飼育時のヤマトシジミ軟体部のオクトピン含量の変動を Fig. 5-1-10 に示した。

20 におけるオクトピンの変動は無酸素飼育開始時の 1.09mg が飼育 3 時間目で急激に減少し、その後 7 日目までほぼ一定の値で推移した。30 においてもオクトピンの変動は 20 と同様で、無

酸素状態に曝されると速やかに応答した。飼育開始時の 1.03mg が飼育 3 時間で半減し、6 日目には 0.07mg まで低下した。なお、アラノピンなど他の酸性オピン類は本実験では検出されなかった。

考察

ヤマトシジミを無酸素状態に曝すと、水分含量が上昇することを観察した。佐伯・熊谷 (1989) によると、グリコーゲンの減少時に細胞の空隙を埋めるため、水分が上昇すると報告している。水分とグリコーゲンとの関連では、アサリ (佐伯・熊谷, 1982; 白石ら, 1995), マガキ (高木・清水, 1963), ムラサキイガイ (de Zwaan & Zandee, 1972; 白石ら, 1986) で同様の結果が見られる。本研究においても、無酸素状態で飼育すると顕著なグリコーゲンの減少が観察され、それと同時に水分の上昇を認めた。特に、30 におけるグリコーゲンと水分含量の消長はよく対応しており、ヤマトシジミもグリコーゲンの減少分を水分で補うと思われる。

全窒素量について、これまで無酸素呼吸時のタンパク質の変動に関する報告は見当たらない。しかし、ヤマトシジミ軟体部中の全窒素量が無酸素状態においてもほとんど変動しなかったことより、ヤマトシジミはエネルギー源としてタンパク質を利用しないものと思われる。

エキス窒素量および遊離アミノ酸総量の変動に関しては、無酸素飼育開始直後から急激に増加し、飼育水温が高いほど増加速度は速いという結果を得た。これらは後述のアミノ酸の変動とよく対応している。

グリコーゲンをはじめ、遊離アミノ酸、コハク酸やピルビン酸などの有機酸、オピン類など嫌氣的解糖による代謝産物の研究が海産の二枚貝 (カキの類 (*Crassostrea*) やイガイの類 (*Mytilus*) およびテキサスウミシジミの類 (*Rangia*)) について主に欧米を中心に研究され、二枚貝の低酸素適応のメカニズムが解明されつつある (Baginski & Pierce, 1975; Collicutt & Hochachka, 1977; Bowlus & Somero, 1979; Henry *et al.*, 1980; Dando *et al.*, 1981; Zurburg & de Zwaan, 1981; de Zwaan & Zurburg, 1981; de Zwaan *et al.*, 1981; Powell *et al.*, 1982; Hochachka, 1984; Hochachka & Somero, 1984; Holwerda *et al.*, 1984; Gade & Grieshaber, 1986)。それらによると、貧酸素状態におくと複数の嫌氣的最終代謝産物、すなわちアミノ酸のアラニン、有機酸のコハク酸やプロピオン酸、オピン類のアラノピンやストロンピンが蓄積することが知られている。無酸素状態の初期段階ではコハク酸とアラニンが生成され、無酸素状態の後半の段階でプロピオン酸が生成されるという (Hochachka, 1984)。本研究においても、無酸素飼育開始直後から顕著なコハク酸とアラニンの増加が観察され、無酸素の初期段階において両成分がヤマトシジミの嫌氣代謝の重要な産物であることがわかる。特に、高水温で飼育したヤマトシジミほど蓄積速度が速いのが注目される。また、プロピオン酸は無酸素 20 飼育で 2 日目、30 で 12 時間目まで検出されず、その後検出されてから急激に増加した。このことより、プロピオン酸はイガイ (de Zwaan *et al.*, 1981) などでも観察されたように、無酸素状態の後半に主に代謝される産物と判断される。ヤマトシジミにおいて、上記以

外で顕著に蓄積が認められた成分として、アミノ酸ではプロリン、有機酸では酢酸があり、しかも無酸素状態の後半から増加傾向が目立ち、プロピオン酸と同様の変動パターンを示した。

無酸素状態におけるグリコーゲンの消長に関しては、ムラサキガイ (de Zwaan & Zandee, 1972) や淡水産の *Pleurobema coccineum* (Badman & Chin, 1973) で研究されている。それらによると無酸素状態でグリコーゲンの消費が激しく、24 時間の無酸素飼育で初期値の約 30% が減少すると報告されている。本研究においても無酸素飼育で顕著なグリコーゲンの減少を観察した。さらに、20 より 30 無酸素飼育時のグリコーゲンの減少が著しかった。また、グリコーゲンが約 30% 減少するのに要した時間は 20 飼育で約 7 日間、30 飼育で約 3 日間であった。

二枚貝の無酸素代謝で注目される成分としてオピン類が挙げられる。Livingston *et al.* (1983) は広範な動物についてオピンデヒドロゲナーゼ類の分布を調べ、高い活性を示すものは環形動物と軟体動物であるが、注目されるのはすべてが海産種で汽水や淡水産は一部筋肉組織に弱いオクトピンデヒドロゲナーゼ活性はあるものの、オクトピン、アラノピン、ストロンピンの脱水素酵素はともに検出されないという。本研究でも、オクトピンがごく少量検出されたが、他の酸性オピンの存在は認められなかった。

二枚貝は環境が悪化すると貝殻を閉じ、環境の回復を待つ。貝殻を閉じた二枚貝は水管での濾過水量を低下させるとともに酸素の取り込み量も減少させる (Thompson & Bayne, 1972)。貝殻という狭い閉鎖系内で長時間の生存を可能にさせるためには、エネルギーの消費と老廃物の蓄積をできるだけ避ける必要がある。Gade (1983) はミノガイの仲間 (*Lima hians*) を空中放置したときの ATP の消費量を調べ、はじめの 2 時間に比べ、次の 15 時間はその消費量が 1/10 に低下すると報告している。また、彼は二枚貝の低酸素環境下でのエネルギーの獲得は、嫌氣的解糖反応に依存する割合が大きいと述べている。本研究においても、無酸素環境での飼育中、ATP 含量にほとんど変動がなく、嫌氣的解糖系による供給がおこなわれていることが推測される。

これまでの研究から、Hochachka (1984) は海産の二枚貝における低酸素適応のメカニズムを下記のようにまとめている。

- 1) 貯蔵エネルギーとしてグリコーゲンおよびアミノ酸がある。
- 2) 細胞質およびミトコンドリア中の酸化還元調節のメカニズムとしては、細胞質中ではグルコースとアスパラギン酸の共役代謝、アラノピン生成による NAD⁺ の供給、ミトコンドリア中ではコハク酸関与の TCA 回路の逆回転による NAD⁺ の供給
- 3) コエンザイム A 供給メカニズムとしてコハク酸チオキナーゼとプロピオン酸チオキナーゼによる共役およびケトカルボン酸脱水素酵素とチオキナーゼ類による共役の可能性
- 4) ATP の収率として グルコースからプロピオン酸への発酵はグルコース 1mol あたり ATP6mol。アスパラギン酸からコハク酸への発酵で ATP1mol
- 5) 解糖で生じる共役中間体の数と種類を調節するためのメカニズムがある。共役中間体としては トリオース-P, ヘキソース-P, フォスフォエノールピルビン酸, アセチル CoA, -ケトグルタル

酸，サクシニル CoA，オキザロ酢酸の計 8 種である。

6) 異なる種類および量の最終産物を生成するメカニズムがあり，結果としてコハク酸，プロピオン酸，アラニン，アラノピンなどのオピン類が最終産物として検出される。

上記のメカニズムを図示すると Fig 5-1-11 のようになる。

本研究において，最終代謝産物などからヤマトシジミの低酸素適応のメカニズムは以下のような。

1) 海産二枚貝と同様，貯蔵エネルギーとしてグリコーゲンおよびアミノ酸が存在する。

2) 酸化還元調節のメカニズムとして，細胞質中ではグルコースとアスパラギン酸の共役代謝，乳酸生成による NAD⁺の供給，アルコール生成による NAD⁺の供給の可能性，ミトコンドリア中ではコハク酸関与の TCA 回路の逆回転による NAD⁺の供給，アルギニン，グルタミン酸から α -ケトグルタル酸とプロリン生成における共役が考えられ，海産二枚貝より多くの調節メカニズムを有する。

3) コエンザイム A 供給のメカニズムとしてコハク酸チオキナーゼとプロピオン酸チオキナーゼの共役，ピルビン酸脱水素酵素と酢酸チオキナーゼによる共役，さらにケトカルボン酸脱水素酵素とチオキナーゼ類による共役の可能性？があり，海産二枚貝よりコエンザイム A 供給メカニズムが多い。

4) ATP の収率として グルコースからプロピオン酸で ATP6mol。 アスパラギン酸からコハク酸最終的にプロピオン酸で ATP2mol。 グルタミン酸からコハク酸最終的にプロピオン酸で ATP2mol。 グルコースから酢酸で ATP4mol が供給され，海産二枚貝より多くの ATP を供給できる。

5) 解糖で生じる共役中間体の数と種類を調節するためのメカニズムがある。共役中間体としてはトリオース-P，ヘキソース-P，フォスフォエノールピルビン酸，アセチル CoA， α -ケトグルタル酸，サクシニル CoA，オキザロ酢酸の計 8 種で海産二枚貝と同様である。

6) 異なる種類および量の最終産物を生成するメカニズムがあり，結果としてコハク酸，プロピオン酸，酢酸，乳酸，アラニンおよびプロリンが最終産物として検出され，海産二枚貝より多種である。

上記のメカニズムを図示すると Fig 5-1-12 のようになる。

このようにヤマトシジミの無酸素環境に適応する能力は，海産のカキ類やイガイ類よりも優れていることが推測される。

第 2 節 貧酸素適応

本節では，溶存酸素飽和状態の密封した実験水槽にヤマトシジミを封入し，呼吸による溶存酸素の減少と，それによって生ずる貧酸素状態におけるヤマトシジミの生体成分の変動を調べ，酸素不

足に耐え得る代謝メカニズムの解明を目的とした。

材料および方法

試料および飼育方法 第3章第3節実験2の方法に従った。

分析方法 本章第1節と同様の方法で行った。

結果

閉鎖系の実験水槽中でヤマトシジミを飼育すると、水槽内の溶存酸素濃度は飼育直後(6.8mg/ℓ)から4時間目(0.94mg)までに急激に減少した。その後極めて緩やかに減少し、12時間目に0.55mg、24時間目では0.23mgまで低下し、以後46時間目まで溶存酸素量は変動せず、水槽内が無酸素状態(0.05mg以下)になったのは48時間目であった(Fig. 5-2-1)。なお、飼育直後から4時間目まではヤマトシジミは溶存酸素を1時間当たり1.1~2.1mg/ℓ消費しており、この間は好氣的条件の飼育環境と考えられた。しかし、5時間目から48時間目まで酸素消費量は極めて少なく貧酸素状態におかれたものと判断された。なお、48時間目以降は酸素消費は観察されなかったため無酸素状態の環境下にあったと判断した。

水分含量(Table 5-2-1 および Fig. 5-2-2) : 飼育開始直後82.0%の値を示し、好氣的条件時(実験開始時から4時間目まで)および貧酸素状態時(実験開始5時間目から48時間目まで)においてほぼ一定の値で推移し、以後4日目まで多少の変動はあるものの一定の値で推移した。無酸素状態時(実験開始48時間以降)になってから2日後(実験開始から4日目)以降増加傾向が認められ、8日目には86.9%と最高値を示した。

全窒素量(Table 5-2-1 および Fig. 5-2-2) : 全窒素量は好氣的条件時や貧酸素状態時ではさほど変動しなかった。しかし、無酸素状態になった2日目以降無酸素状態が続くと上昇する傾向が認められた。

エキス窒素量(Table 5-2-1, Fig 5-2-2) : 飼育開始時の14.1 mgが、好氣的条件時、貧酸素状態時そして無酸素状態時を通して、実験終了日の8日目まで顕著な増減は認めなかった。

遊離アミノ酸(Table 5-2-1 および Fig. 5-2-3a, b) : まず遊離アミノ酸総量(Fig. 5-2-3a)は、飼育開始から好氣的条件時、貧酸素状態時の途中(9時間目)まで多少の減少傾向が認められた。以後緩やかな上昇に転じ、無酸素状態になって3日後の飼育開始5日目に271.7 μmolと最高値を記録した。

次に、個々の遊離アミノ酸の変動では、アラニン(Fig. 5-2-3a)が好氣的状態時から貧酸素状態時の9時間目までやや減少した。これ以降、無酸素状態になって1日後の3日目まで緩やかに上昇し、4日目以降やや急激な上昇に転じた。無酸素状態になって3日後の飼育開始5日目に140.2mg

と最高値を記録した。

飼育中に上昇した高含量成分は、プロリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、リシン、アルギニンであった。中でも、プロリン (Fig. 5-2-3a) は、飼育開始時から 2 日目までの好気条件時から貧酸素状態時ではさほど変動せず、無酸素状態になった 2 日目を以降上昇し、飼育終了時の 8 日目には $13.6 \mu\text{mol}$ と初期値 ($4.6 \mu\text{mol}$) の約 3 倍の増加量を示した。好气的条件時、貧酸素状態時、無酸素状態時を通して、飼育期間中あまり変動しなかった成分としては、トレオニン、グリシンなどが挙げられる。一方、グルタミン酸 (Fig. 5-2-3a) は飼育開始時 $29.2 \mu\text{mol}$ と総量の 15% を占める重要な成分である。しかし、飼育中含量は徐々に下降し、特に無酸素状態に達した 2 日目を以降に減少傾向が顕著で、飼育終了時の 8 日目には $11.9 \mu\text{mol}$ と約 60% 減少した。含量は低いがアスパラギン酸もグルタミン酸と同様の変動を示した。

有機酸 (Table 5-2-2 および Fig. 5-2-4) : 有機酸総量は飼育開始から好气的条件時、貧酸素状態時の途中 (12 時間目) までに大きな変動は認められなかった。しかし、貧酸素状態時の 18 時間目を以降、無酸素状態になって 3 日後の 5 日目まで急増し、初期値に比べ約 3.9 倍増の最高値 ($104.3 \mu\text{mol}$) を記録した。個々の成分では、コハク酸は飼育開始から好气的条件時の間 (4 時間目まで) に変動は観察されなかったが、貧酸素状態になって 4 時間後の 9 時間目を以降急激な上昇が認められ、無酸素状態になって 3 日後の 5 日目には最高値の $88.1 \mu\text{mol}$ を記録し、飼育開始時 ($13.8 \mu\text{mol}$) に比べ、約 6.4 倍の増加を認めた。しかし、その後飼育終了の 8 日目には $9.6 \mu\text{mol}$ まで激減した。次いで、プロピオン酸が特徴的な変動を示した (Fig. 5-2-4)。すなわち、飼育開始時から無酸素状態になって半日後の 2.5 日目まで全く検出されず、無酸素状態になって 1 日後の 3 日目を以降 5 日目までに少量検出されただけであったが、飼育終了時の 8 日目には $23.7 \mu\text{mol}$ と急激に上昇し、有機酸中最高値を示した。酢酸の変動も上記 2 成分に次いで大きかった。変動パターンはプロピオン酸に類似しており、初期値 ($5.14 \mu\text{mol}$) に比べ、最高値を記録した 8 日目には $17.3 \mu\text{mol}$ と約 3.4 倍の増加を認めた (Fig. 5-2-4)。乳酸の変動は好气的条件時と貧酸素状態時の間 (2 日目まで) は著しく増減したが、無酸素状態になって 2 日後の 4 日目を以降増加傾向を示した。リンゴ酸はコハク酸と同様の変動パターンを示した。その他、ギ酸、フマル酸およびピログルタミン酸において顕著な変動は認められなかった (Fig. 5-2-4)。

アデニンヌクレオチド (Table 5-2-1, Fig. 5-2-5) : エネルギー通貨とされる ATP の変動は飼育開始から貧酸素状態になって 1 時間後の 6 時間まで、増減した以外はほぼ一定の値で 4 日目まで推移し、無酸素状態になって 3 日後の 5 日目にやや減少した。ADP および AMP 含量は ATP ほどの変動は観察されなかった。また、ATP、ADP および AMP の合計はほぼ一定の値を示した。一方、IMP は特徴的な変動を示し、飼育開始から貧酸素状態時の 1 日目まで $20 \mu\text{mol}$ 前後の値を示したが、それ以後急激な減少に転じ、無酸素状態になって 3 日後の 5 日目には検出されなかった。これらより、無酸素状態においても常時 ATP の供給が行われていたものと判断される。

グリコーゲン (Fig. 5-2-6) : グリコーゲンは飼育開始時には 3.98g 認められた。貧酸素状態にな

って4時間後の9時間目までさほど大きな減少はなかった。しかしそれ以降、減少傾向が顕著で、無酸素状態になって6日後の8日目には0.7gまで低下した。

オクトピン (Fig.5-2-6) : オクトピンは飼育開始時の0.43 mgが、貧酸素状態になって7時間後の12時間目で急激に減少し、その後、貧酸素状態時(2日目まで)の間ほぼ一定の値で推移した。なお、アラノピンなど他の酸性オピン類は本実験では検出されなかった。

考察

本章第1節において無酸素状態の体内成分の動態を調べた。そこで、本節では溶存酸素が飽和状態の水槽において飼育を開始し、以後ヤマトシジミの呼吸により溶存酸素濃度が減少していく過程の中で、生体成分の変動について検討した。その結果、酸素消費量 (Fig. 5-2-1) より飼育開始後4時間目までは好氣的条件下の呼吸、48時間目までを貧酸素状態における呼吸、以後無酸素呼吸と判断した。成分変動では調べたほとんどの成分が貧酸素状態の48時間目まではさほど変動しなかった。しかし、コハク酸の変動は貧酸素状態に達した頃から上昇が観察され、酸素不足時に最初に蓄積する産物と思われた。有機酸では無酸素状態に達した2日目から5日目までコハク酸のみ蓄積した。無酸素状態が進行した5日目以降コハク酸は減少に転じたが、プロピオン酸、酢酸および乳酸が急激に上昇し、無酸素状態が進行したときの代謝産物と思われる。他方、遊離アミノ酸ではコハク酸ほど即時に蓄積する成分は認められなかったが、貧酸素状態が進行している9時間目以降から徐々にアラニンの増加が観察され、コハク酸同様5日目に最高値に達し、以後減少傾向を認めた。その他の成分ではプロリンが5日目以降も上昇し、無気代謝の最終段階で作用する成分と思われる。

以上の結果を総合すると、ヤマトシジミは貧酸素状態では主にコハク酸とアラニン蓄積系の代謝が進行する。次いで無酸素状態初期では、同様のコハク酸、アラニン蓄積系で対応するが、さらに無酸素が進行するとプロピオン酸、酢酸、乳酸およびプロリン蓄積系の代謝が進行し、無酸素状態に適応していると推測した。

酸素濃度の異なる環境で二枚貝を飼育し、遊離アミノ酸や有機酸の変動を調べた de Zwaan *et al.* (1991) はイガイ科の *Mytilus galloprovincialis* およびフネガイ科の *Scapharca inaequivalvis* の海産二枚貝を用いて調べている。それによると、*M. galloprovincialis* は飼育水の酸素濃度が3ppm以下から無酸素状態までアラニンとコハク酸の体内濃度が高まり、アスパラギン酸やアルギニンリン酸の濃度が反対に減少すると述べている。一方、*S. inaequivalvis* は酸素濃度が1ppm以下のより貧酸素状態になるとアラニンとコハク酸の急激な増加が観察され、反対に *M. galloprovincialis* と同様、アスパラギン酸の減少を観察したと報じている。

本研究においても、*S. inaequivalvis* と同様、酸素濃度1ppm以下の貧酸素状態の進行と共に、まずコハク酸とアラニンが蓄積し、アスパラギン酸が減少する点では一致した。しかし、ヤマトシジミは貧酸素状態が進行し、無酸素状態になるとアミノ酸ではプロリンの増加、有機酸ではプロピ

オン酸，酢酸および乳酸の蓄積が認められたことから，別の経路の代謝が進行し，上記の海産二枚貝より多くの代謝系が関与して無酸素状態に適応していると思われる。

以上より，ヤマトシジミは酸素濃度の程度と蓄積される代謝産物の濃度，もしくは無酸素状態に曝されている時間などにより，数々の無機的代謝系を選択し，機能させて無酸素状態に対応していると思われる。すなわち，ヤマトシジミは酸素濃度が 1ppm以下になると，まず，酸素消費量を急激に低下させ，グリコーゲンやアスパラギン酸などを利用して，コハク酸とアラニン蓄積する代謝系により，エネルギーを獲得する。次いで，無酸素状態になると，コハク酸濃度がかかりのレベルに達するまでコハク酸とアラニン蓄積系に依存してエネルギーを獲得する。次いで無酸素状態が進行すると，プロピオン酸，酢酸，乳酸およびプロリン蓄積系の代謝メカニズムを新たに導入してエネルギーを獲得するものと推測される。

Table 5-1-1. Analytical conditions of organic acid.

Column	Shim-pack SCR-102H (8.0 ϕ \times 300mm L) 2-column serial connection. Equipped with a guard column SCR-102H (6.0 ϕ \times 50mm L)
Mobile phase	5mM -toluenesulfonic acid aqueous solution
Flow rate	0.8m ℓ / min
Column temp.	40
Detector	CDD-6A

Table 5-1-2. Analytical conditions nucleotide.

Column	Shodex Asahipak GS-320 7G (7.6 ϕ \times 500mm L) Equipped with a guard column GS-2G (7.6 ϕ \times 50mm L)
Mobile phase	100mM NaH ₂ PO ₄ aqueous solution (pH 3.0)
Flow rate	0.8m ℓ / min
Column temp.	ambient temp.
Detector	UV (254nm)

Table 5-1-3. Analytical conditions of octopine.

Column	Shim-pack ODS-H (4.6 ϕ \times 250mm L)
Mobile phase	A solution; 20% acetonitrile in 0.25MTris-HCl (pH 9.5) B solution; 80% acetonitrile
Flow rate	0.4m ℓ / min
Column temp.	ambient temp.
Detector	FS (Ex; 352nm, Em; 425nm)

Table 5-1-4. Analytical conditions of acidic opine

Column	TSKgel ODS-80Ts (4.6 ϕ \times 250mm L)
Mobile phase	A solution; 10% acetonitrile in 140mM CH ₃ COONa (pH 5.0) B solution; 60% acetonitrile
Flow rate	0.1m ℓ / min
Column temp.	40
Detector	UV (254nm)

Table 5-1-5. Changes in concentrations of free amino acids of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 20 .

Time (hour or day)	0	1H	3H	6H	12H	24H	2D	4D	7D	11D	14D	18D	21D	25D
Water content (%)	82.2	82.2	82.1	82.8	83.1	84.0	83.7	83.7	82.9	83.6	83.9	84.7	84.4	84.5
Total (mg/100g)	1697	1741	1703	1631	1647	1604	1634	1700	1729	1737	1658	1607	1638	1738
nitrogen (mg/dry1g)	83.6	85.6	82.9	82.1	83.9	85.0	85.3	87.8	84.8	92.0	89.0	92.4	91.8	98.1
Extractive (mg/100g)	207.6	216.9	219.0	218.1	230.3	245.4	242.1	269.3	278.1	228.6	224.9	192.5	206.6	216.7
nitrogen (mg/dry1g)	11.7	12.2	12.2	12.7	13.6	15.3	14.9	16.5	16.3	13.9	14.0	12.6	13.2	14.0
Phospho serine	2.28	2.06	1.66	1.98	2.11	1.59	2.35	2.29	1.74	3.06	2.18	2.40	2.25	2.51
Taurine	0.90	1.26	1.25	1.07	1.09	0.90	0.83	0.74	0.75	0.93	0.94	1.04	1.08	0.88
Aspartic acid	3.88	3.93	3.99	3.63	3.69	4.09	3.69	4.19	3.43	4.21	3.55	4.37	4.09	4.12
Threonine	2.83	2.59	2.77	2.64	2.53	2.89	3.25	2.88	3.09	3.38	3.55	3.29	3.44	3.47
Serine	2.99	2.99	2.92	2.54	2.70	2.97	3.04	2.98	2.89	3.07	3.07	2.80	3.11	2.64
Glutamic acid	22.95	22.15	21.72	19.76	21.20	23.11	19.85	19.94	17.17	16.62	15.83	15.73	15.08	13.95
Glutamine	8.45	8.91	9.67	9.98	9.15	10.60	6.88	6.88	5.84	7.97	5.52	6.66	6.71	7.33
Proline	2.64	3.12	3.20	3.23	3.44	3.80	5.38	5.38	6.50	7.84	10.52	10.56	11.31	12.56
Glycine	13.54	16.01	14.80	14.55	12.37	14.90	14.79	13.48	14.95	15.26	14.56	13.84	12.63	15.38
Alanine	33.20	30.60	33.20	33.40	35.90	34.50	34.50	40.10	42.50	41.90	45.80	42.70	43.10	42.70
-Aminobutyric acid	0.44	0.44	0.43	0.68	0.63	0.24	0.24	0.30	0.23	0.41	0.36	0.44	0.50	0.75
Valine	2.25	2.11	2.43	3.08	2.22	2.62	3.04	2.93	3.30	3.96	4.40	4.63	4.60	5.40
Cystine	0.07	0.09	0.09	0.15	0.07	0.10	0.10	0.08	0.07	0.05	0.08	0.11	0.05	0.08
Methionine	0.26	0.15	0.30	0.23	0.24	0.25	0.41	0.41	0.67	0.69	0.67	0.70	0.90	1.08
Cystathionine	0.13	0.05	0.10	0.05	0.11	0.08	0.08	0.08	0.13	0.11	0.08	0.12	0.09	0.12
Isoleucine	1.37	1.20	1.49	1.42	1.44	1.62	2.06	2.01	2.32	2.93	3.03	3.19	3.18	3.84
Leucine	1.58	1.46	1.87	2.13	2.07	2.24	2.95	2.71	3.39	4.18	4.36	4.63	4.69	5.31
Tyrosine	1.21	1.12	1.29	1.25	1.21	1.48	1.63	1.69	1.81	2.09	2.23	2.42	2.44	2.53
Phenylalanine	0.75	0.75	0.85	0.81	0.79	0.87	1.11	1.23	1.42	1.88	1.80	2.14	2.02	2.62
-Alanine	7.31	7.63	7.52	6.59	6.84	9.05	7.92	9.43	9.12	10.47	10.11	10.71	10.00	11.01
Ammonia	10.91	10.58	8.54	10.94	6.61	6.62	9.02	6.50	6.88	9.68	8.04	7.30	10.56	8.35
Ornithine	3.95	4.25	4.23	4.88	3.63	4.16	5.20	4.18	4.38	4.94	4.84	5.39	4.65	5.42
Tryptophan	0.14	0.17	0.22	0.14	0.14	0.12	0.33	0.12	0.11	0.18	0.18	0.22	0.22	0.25
Lysine	4.23	4.46	4.39	4.53	4.33	4.75	5.50	4.83	5.48	6.38	6.25	7.64	6.27	8.34
Histidine	0.90	1.01	0.97	0.97	0.88	1.09	1.15	1.07	1.13	1.41	1.56	1.47	1.53	1.95
Arginine	6.58	6.84	7.09	6.91	6.22	7.64	6.80	6.94	6.81	7.77	8.09	7.13	7.25	8.52
Total	153.4	151.7	155.3	156.4	149.3	164.6	177.8	172.3	180.2	205.7	213.7	207.4	208.3	223.8
	9	3	6	8	8	7	8	8	9	7	2	5	2	6

Table 5-1-6. Changes in concentrations of free amino acids of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the anoxial condition (dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 30 .

Time (hour or day)	0	1H	3H	6H	9H	12H	24H	2D	3D	4D	6D	10D
Water content (%)	81.1	82.0	82.8	83.2	83.5	82.7	82.4	83.3	83.7	84.0	84.4	85.6
Total (mg/100g)	1730	1686	1613	1611	1513	1663	1679	1599	1672	1590	1595	1570
nitrogen (mg/dry1g)	80.9	80.3	81.7	83.4	78.6	81.8	83.4	82.9	88.1	86.1	87.1	94.5
Extractive (mg/100g)	200.1	241.2	208.2	210.6	216.3	246.8	211.4	213.7	235.9	213.1	236.0	209.4
nitrogen (mg/dry1g)	10.6	13.4	12.1	12.5	13.1	14.3	12.0	12.8	14.5	13.3	15.1	14.5
Phospho serine	1.34	1.86	1.76	1.41	1.90	2.09	2.03	1.84	1.89	2.06	1.94	2.18
Taurine	0.97	0.89	1.16	1.19	1.60	1.20	1.23	1.48	1.32	2.05	1.79	2.05
Aspartic acid	3.90	3.76	4.59	4.38	3.78	3.95	3.76	3.91	4.38	4.46	4.24	4.70
Threonine	1.87	2.57	3.03	2.90	3.15	3.15	3.34	3.37	3.55	3.62	3.71	4.26
Serine	1.56	2.06	2.32	2.32	2.42	2.47	2.00	1.99	2.51	2.50	2.32	1.98
Glutamic acid	24.67	27.65	29.25	27.19	28.72	28.10	23.06	21.00	17.47	17.04	16.60	18.32
Glutamine	3.44	8.21	8.31	6.55	7.38	7.16	6.96	6.92	9.40	9.02	9.08	8.93
Proline	3.59	3.57	4.29	4.55	4.16	5.07	5.23	5.67	6.34	8.15	9.02	15.57
Glycine	7.75	16.13	14.79	15.77	14.36	15.47	14.30	14.27	16.91	14.81	14.85	16.09
Alanine	48.04	73.26	74.65	78.63	79.31	79.21	77.86	82.86	77.26	74.00	68.13	85.97
-Aminobutyric acid	0.15	0.43	0.39	0.46	0.53	0.34	0.50	0.46	0.54	0.55	0.44	0.74
Valine	1.27	2.09	2.33	2.44	2.59	2.52	2.96	3.12	3.82	3.95	4.22	5.57
Cystine	0.09	0.05	0.10	0.07	0.05	0.07	0.07	0.05	0.08	0.08	0.05	0.12
Methionine	0.32	0.52	0.47	0.56	0.53	0.54	0.61	0.68	0.82	1.01	0.99	1.49
Cystathionine	0.07	0.10	0.10	0.13	0.11	0.08	0.08	0.08	0.11	0.11	0.14	0.16
Isoleucine	0.81	1.14	1.33	1.50	1.48	1.50	1.78	1.96	2.48	2.91	3.03	4.08
Leucine	1.05	1.52	1.86	2.04	2.12	2.03	2.47	2.83	3.46	4.00	4.20	5.50
Tyrosine	0.99	1.26	1.44	1.54	1.47	1.44	1.76	1.85	2.34	2.31	2.72	3.26
Phenylalanine	0.70	0.71	0.84	0.97	0.95	1.01	1.24	1.38	1.78	1.82	2.17	3.11
-Alanine	13.30	11.97	12.72	12.83	11.90	12.39	11.41	11.16	10.88	12.42	12.37	14.26
Ammonia	8.71	8.17	7.18	7.00	6.42	6.80	9.02	8.10	11.55	13.24	8.30	8.99
Ornithine	9.77	4.45	4.44	4.64	4.08	4.50	3.95	4.17	3.48	3.55	3.49	4.04
Tryptophan	0.13	0.19	0.20	0.26	0.33	0.23	0.17	0.21	0.36	0.37	0.41	0.61
Lysine	2.32	4.79	4.77	5.13	5.43	5.38	5.56	5.86	6.80	6.80	7.59	9.02
Histidine	0.78	0.97	1.05	1.19	1.13	1.12	1.13	1.20	1.38	1.37	1.49	1.83
Arginine	5.41	6.70	6.94	7.28	6.85	7.00	7.63	7.15	8.59	8.22	8.57	9.25
Total	142.9	185.00	190.33	192.96	192.76	194.82	190.09	193.59	199.51	200.38	191.87	232.07

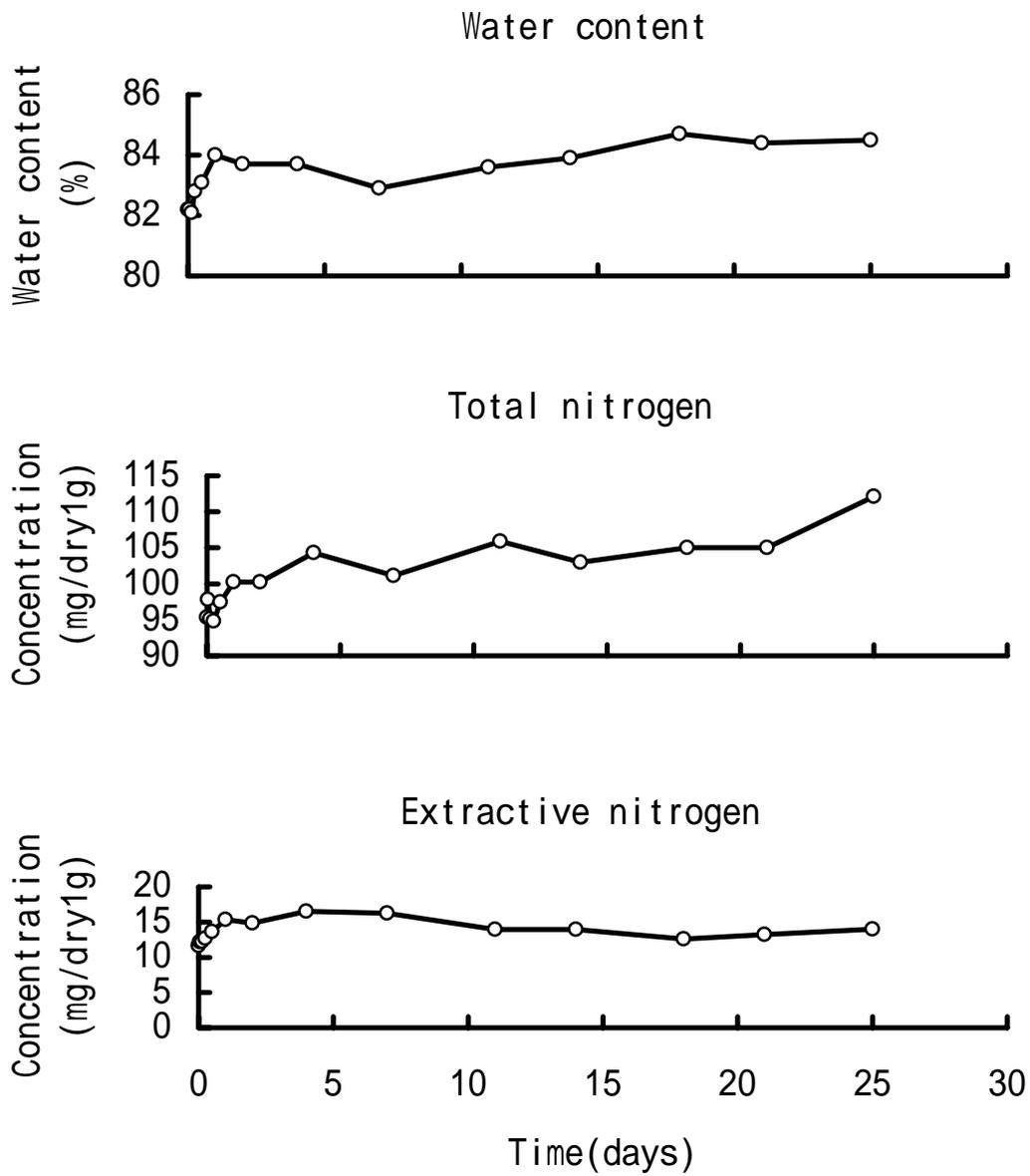


Fig. 5-1-1. Changes in water content, total nitrogen and extractive nitrogen of *C. japonica* exposed to the anoxic condition (dissolved oxygen <math>< 0.05\text{mg} / \ell</math>) at 20 .

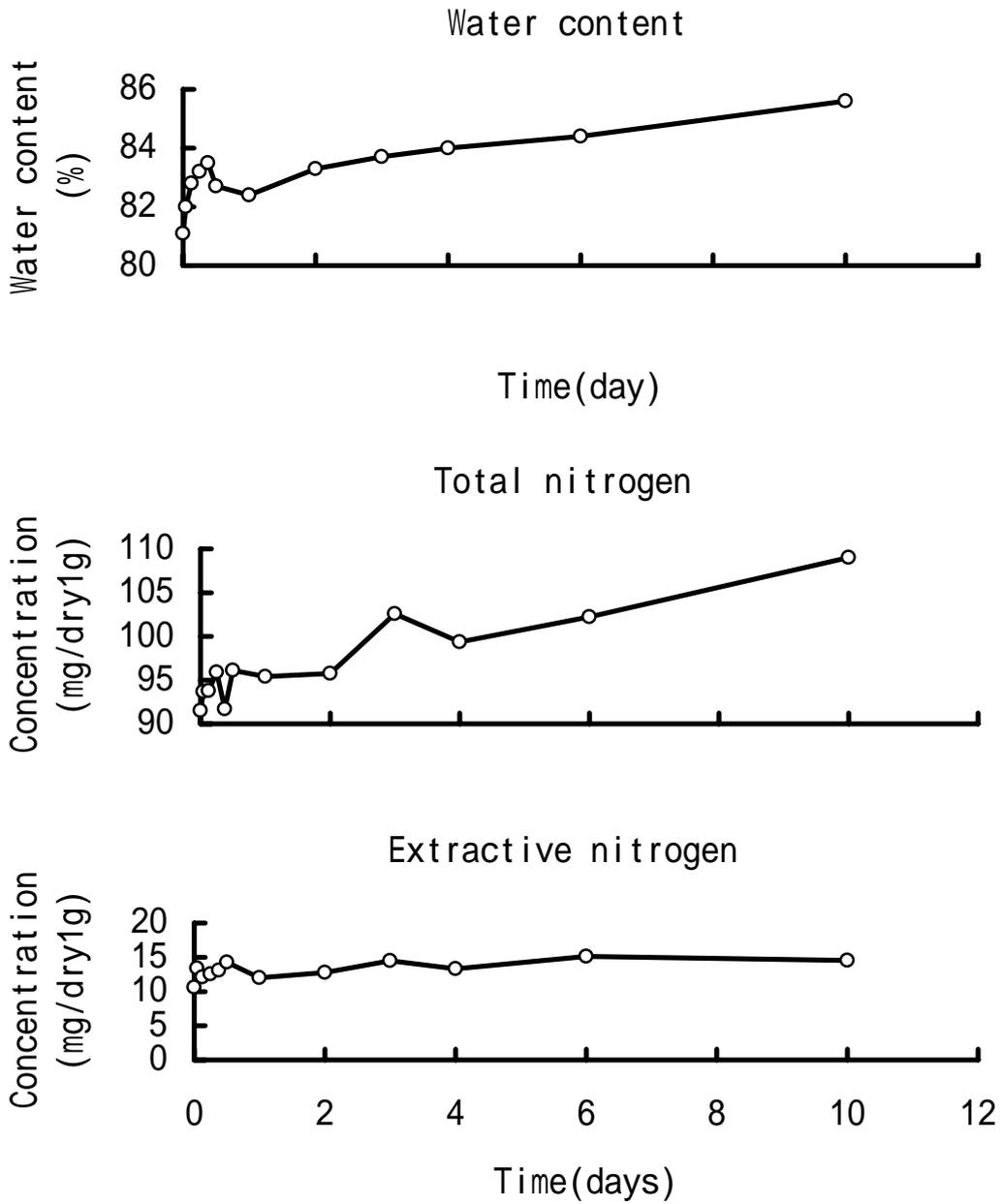


Fig. 5-1-2. Changes of water content, total nitorogen and extractive nitrogen in *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen <math>< 0.05\text{mg} / \ell</math>) at 30 .

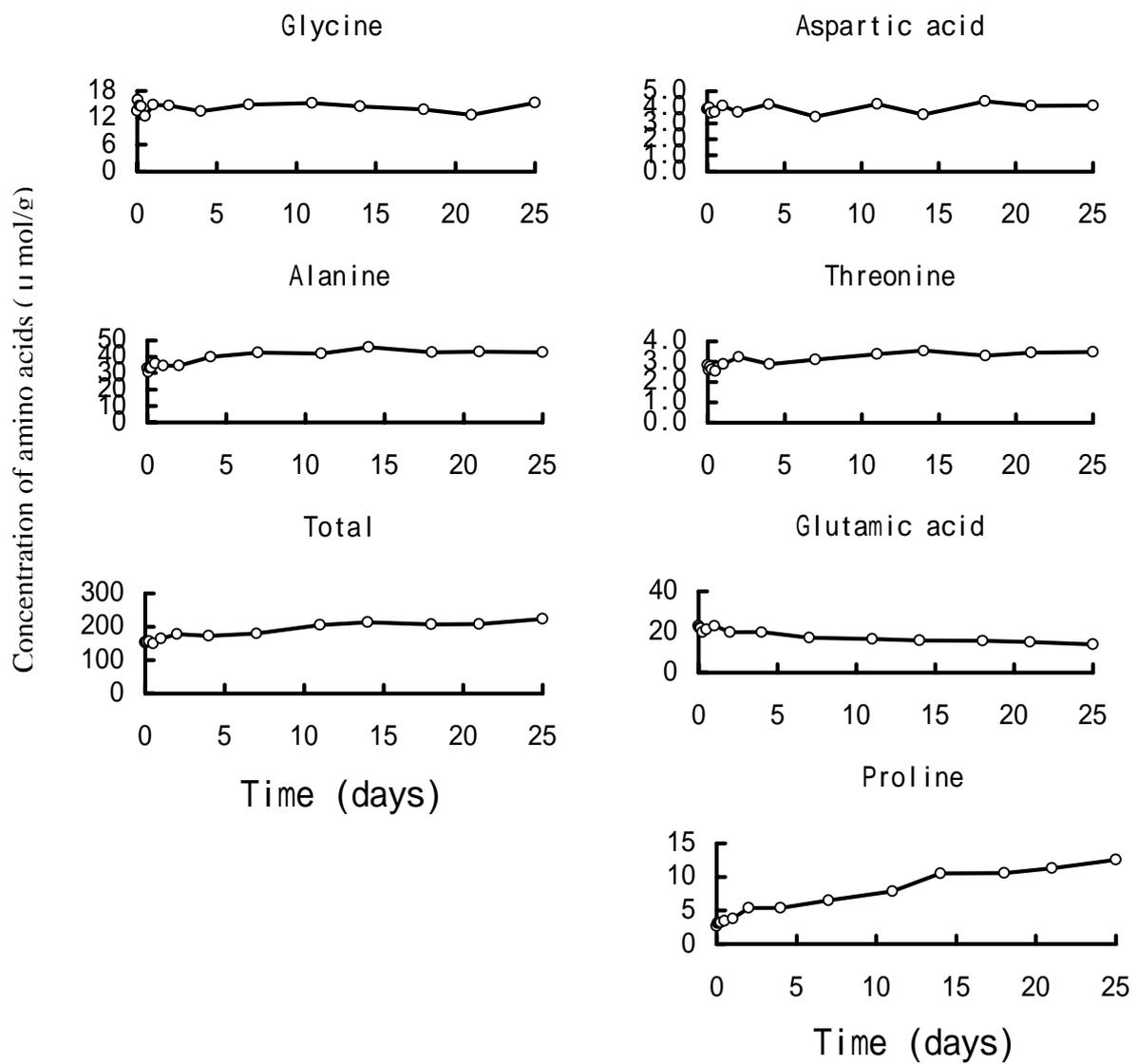


Fig. 5-1-3a. Changes in Gly, Ala, total free amino acid, Asp, Thr, Glu and Pro of *C. japonica* exposed to the anoxic condition (dissolved oxygen <math>< 0.05\text{mg} / \ell</math>) at 20 .

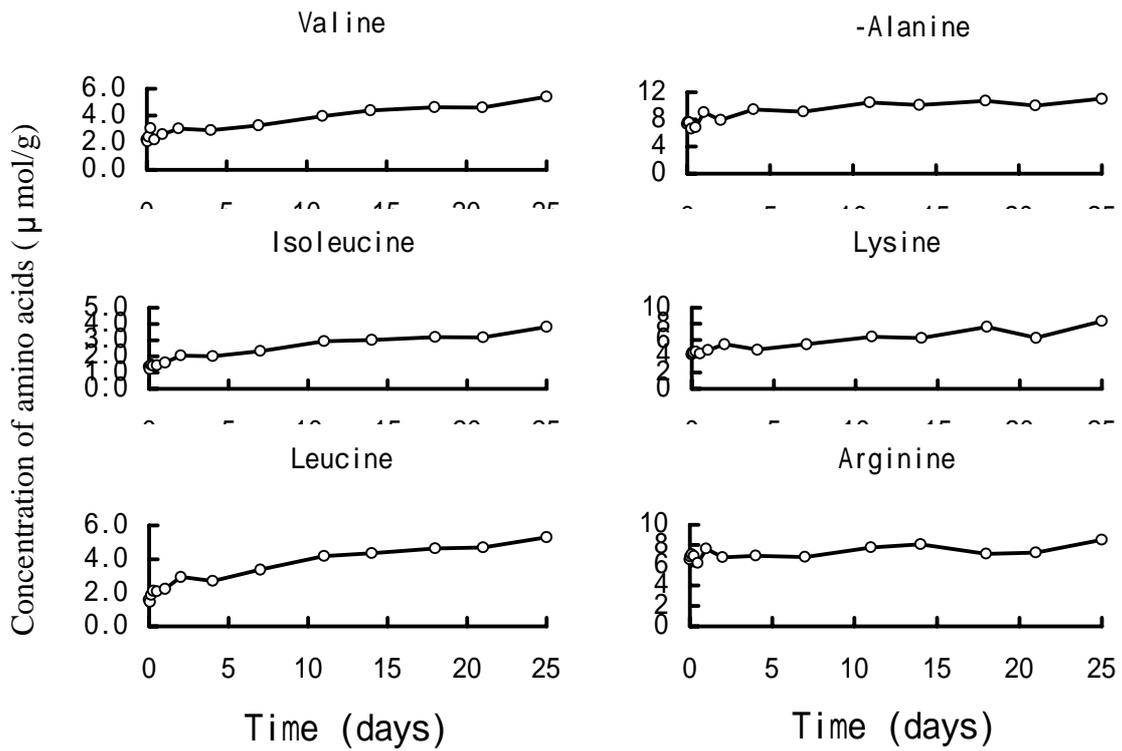


Fig. 5-1-3b. Changes in Val, Ile, Leu, -Ala, Lys and Arg of *C. jaonica* exposed to the anoxic condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 20 .

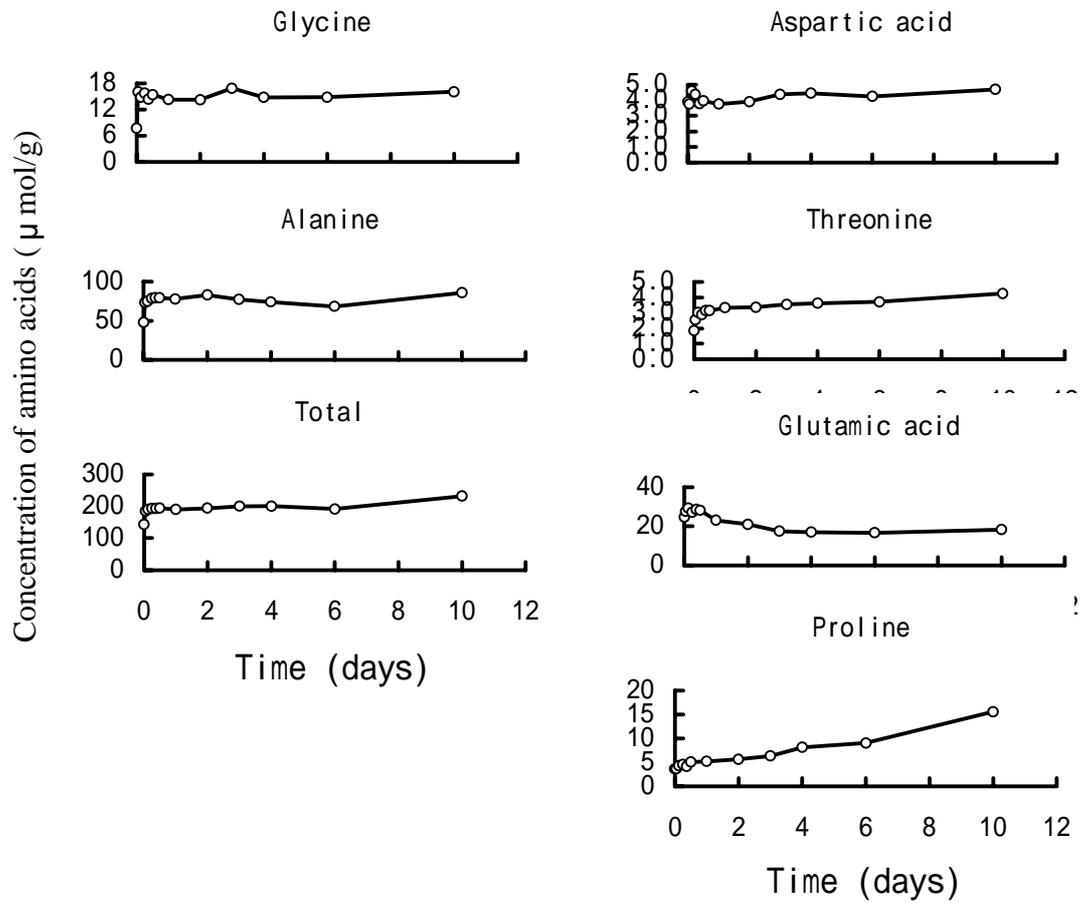


Fig. 5-1-4a. Changes in Gly, Ala, total free amino acid, Asp, Thr, Glu and Pro of *C. japonica* exposed to the anoxia condition (dissolved oxygen <math>< 0.05\text{mg} / \ell</math>) at 30 °C.

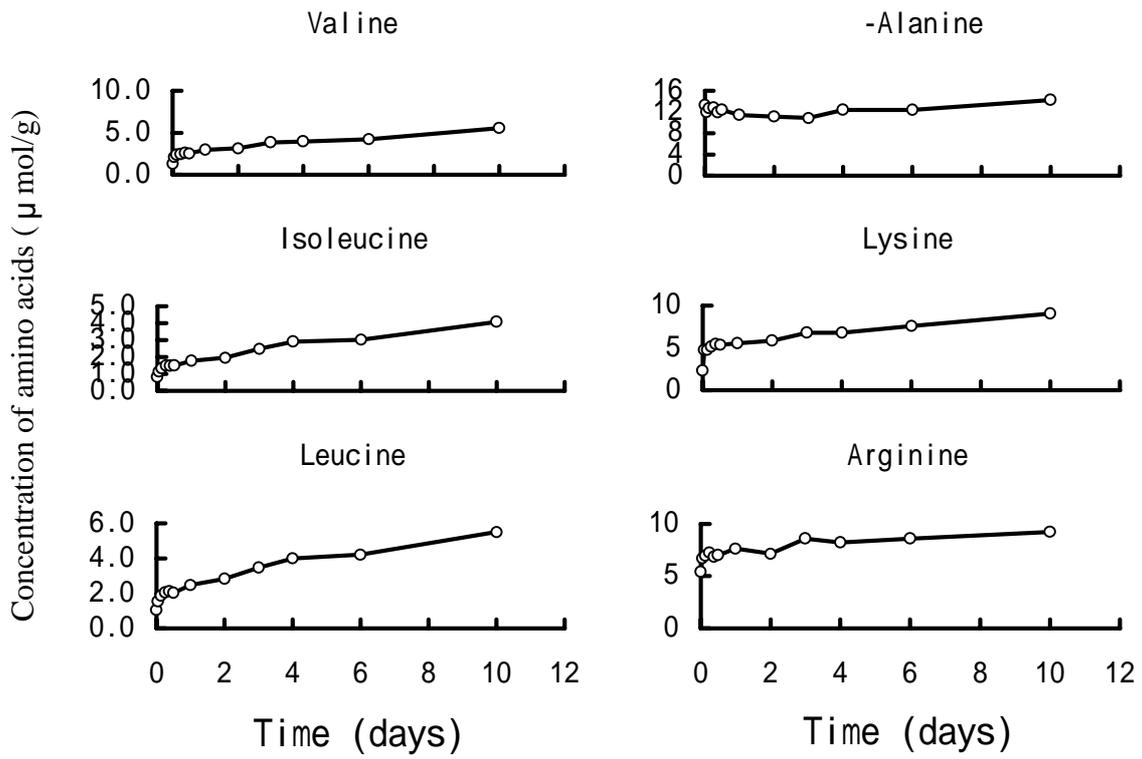


Fig. 5-1-4b. Changes in Val, Ile, Leu, -Ala, Lys and Arg of *C. jaonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 30 .

Table 5-1-7. Changes in concentrations of free amino acids of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the aerobic condition at 20 (dissolved oxygen 8.83mg / ℓ) and 30 (dissolved oxygen 7.03mg / ℓ).

Time (day)	20		30	
	0	21D	0	8D
Water content (%)	82.2	82.2	81.1	81.1
Total (mg/100g)	1697	-	1730	-
nitrogen (mg/dry1g)	95.3	-	91.5	-
Extractive (mg/100g)	207.6	244.3	200.1	252.48
nitrogen (mg/dry1g)	11.7	13.7	10.6	13.3
Phosphoserine	2.28	1.64	1.34	1.94
Taurine	0.90	0.58	0.97	1.22
Aspartic acid	3.88	3.42	3.90	4.40
Threonine	2.83	1.98	1.87	2.31
Serine	2.99	2.35	1.56	1.86
Glutamic acid	22.95	21.95	24.67	22.79
Glutamine	8.45	5.35	3.44	12.42
Proline	2.64	1.91	3.59	2.52
Glycine	13.54	11.83	7.75	12.37
Alanine	50.95	45.76	48.04	52.26
-Aminobutyric acid	0.44	0.27	0.15	0.46
Valine	2.25	1.39	1.27	1.89
Cystine	0.07	0.12	0.09	0.13
Methionine	0.26	0.19	0.32	0.21
Cystathionine	0.13	0.00	0.07	0.05
Isoleucine	1.37	1.03	0.81	1.13
Leucine	1.58	1.46	1.05	1.33
Tyrosine	1.21	1.21	0.99	0.93
Phenylalanine	0.75	0.82	0.70	0.58
-Alanine	7.31	7.20	13.30	7.41
Ammonia	10.91	10.92	8.71	12.11
Ornithine	3.95	6.93	9.77	5.03
Tryptophan	0.14	0.00	0.13	0.21
Lysine	4.23	4.04	2.32	4.41
Histidine	0.90	1.12	0.78	0.85
Arginine	6.58	8.59	5.41	8.00
Total	153.49	142.07	142.99	158.83

Unit is μ mol/g

Table 5-1-8. Changes in concentrations of organic acids of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 20 .

Time(hour or time)	0	1H	3H	6H	12H	24H	2D	4D	7D	11D	14D	18D	21D	25D
Malic acid	1.49	1.26	1.52	1.89	1.68	2.48	3.27	3.51	2.59	3.18	4.30	3.41	4.24	2.68
Succinic acid	10.87	9.32	13.08	17.72	23.56	25.41	43.33	48.79	71.29	78.49	103.66	74.30	97.26	59.49
Lactic acid	2.70	2.34	4.29	3.33	2.41	3.71	1.77	1.14	3.57	5.43	3.88	3.56	3.71	4.92
Formic acid	2.74	2.83	2.74	3.04	2.62	2.30	3.64	2.87	3.04	3.12	3.33	2.77	2.90	3.26
Fumaric acid	0.37	0.39	0.55	0.32	0.36	0.42	0.43	1.10	0.91	0.64	1.30	1.58	1.69	1.53
Acetic acid	3.38	2.51	3.50	3.12	4.01	3.71	4.96	7.25	3.79	11.21	6.94	13.67	12.46	16.19
Propionic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.18	2.11	17.91	8.45	25.25	24.31	34.09
Total	21.55	18.65	25.68	29.42	34.64	38.03	57.40	67.84	87.30	119.98	131.86	124.54	146.57	122.16

Unit is μ mol/g

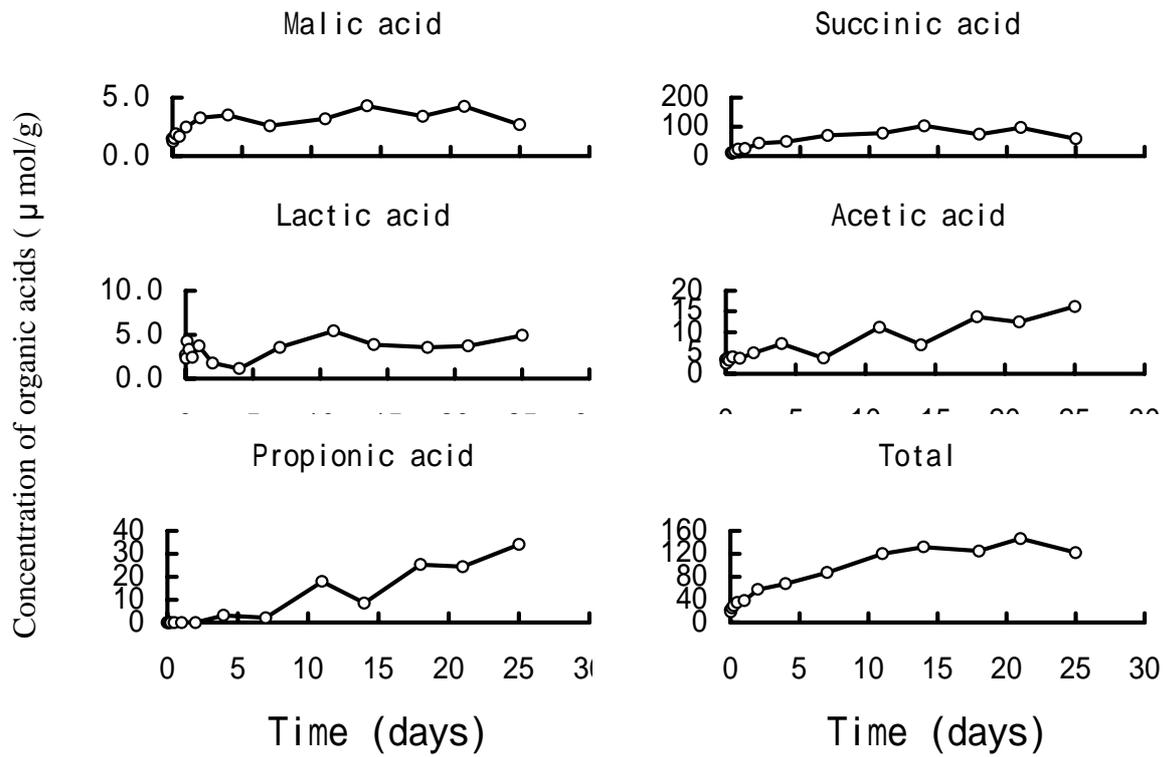


Fig. 5-1-5. Changes in organic acids of *C. japonica* exposed to the anoxic condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 20 .

Table 5-1-9. Changes in concentrations of organic acids of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the aerobic condition(dissolved oxygen 8.83mg / ℓ) at 20 .

Time (day)	0	21D
Malic acid	0.88	2.13
Succinic acid	7.26	14.40
Lactic acid	1.19	4.86
Formic acid	2.49	2.36
Fumaric acid	0.44	0.53
Acetic acid	3.28	7.35
Propionic acid	0.00	0.00
Total	15.54	31.63

Unit is μ mol/g

Table 5-1-10. Changes in concentrations of organic acids of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 30 .

Time(hour or day)	0	1H	3H	6H	9H	12H	24H	2D
Malic acid	1.29	1.37	1.59	2.10	1.88	2.27	2.20	3.21
Succinic acid	8.15	12.90	18.79	25.18	28.31	30.83	41.13	59.45
Lactic acid	4.34	4.57	1.33	0.33	3.10	1.34	1.19	1.44
Formic acid	3.18	2.06	1.83	1.78	1.92	1.68	2.67	2.30
Fumaric acid	0.63	0.51	0.50	0.29	0.39	0.57	0.58	1.00
Acetic acid	5.51	3.11	2.68	6.15	3.66	4.23	5.24	5.85
Propionic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.77	10.38
Total	23.10	24.52	26.72	35.83	39.26	40.92	60.78	83.63

Unit is μ mol/g

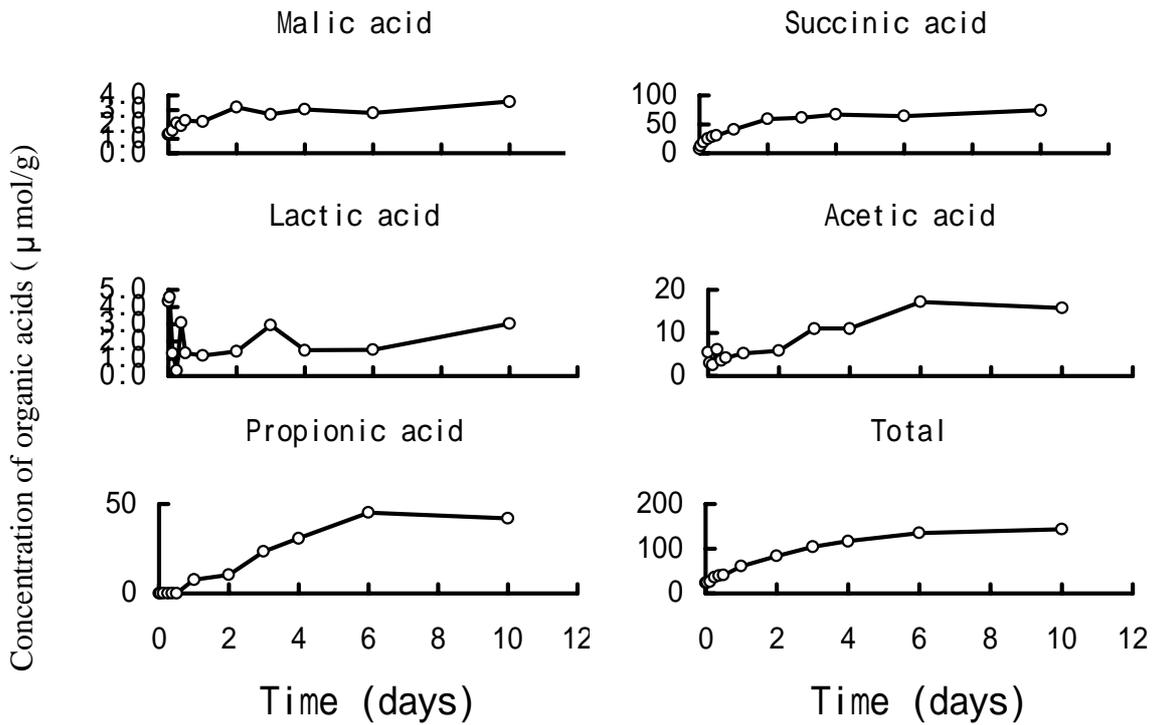


Fig. 5-1-6. Changes in organic acids of *C. japonica* exposed to the anoxic condition(dissolved oxygen <math>< 0.05\text{mg} / \ell</math>) at 30 .

Table 5-1-11. Changes in concentrations of organic acids of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the aerobic condition(dissolved oxygen $7.03\text{mg} / \ell$) at 30 .

Time (day)	0	8D
Malic acid	1.29	1.43
Succinic acid	8.15	10.70
Lactic acid	4.34	11.73
Formic acid	3.18	3.87
Fumaric acid	0.63	0.54
Acetic acid	5.51	7.38
Propionic acid	0.00	0.00
Total	23.10	35.65

Unit is $\mu\text{mol/g}$

Table 5-1-12. Changes in concentrations of adenine nucleotide of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 20 .

Time(hour or day)	0	1H	3H	6H	12H	24H	2D	4D	7D	11D	14D	18D	21D	25D
ATP	2.56	2.98	5.09	2.35	6.19	4.71	4.30	2.90	5.26	5.74	5.54	6.31	6.15	2.01
ADP	18.82	16.26	22.67	17.24	22.26	21.35	21.16	15.44	20.03	18.67	18.81	17.14	17.70	14.78
AMP	187.33	155.10	193.00	151.90	191.68	182.89	157.14	177.25	188.91	199.54	180.93	178.83	189.57	177.24
Subtotal	208.71	174.34	220.76	171.49	220.13	208.95	182.60	195.59	214.20	223.95	205.28	202.28	213.42	194.03
IMP	18.50	30.30	26.85	38.57	16.43	16.60	31.73	9.08	13.41	5.60	7.21	3.96	6.23	0.00
Total	227.21	204.64	247.61	210.06	236.56	225.55	214.33	204.67	227.61	229.55	212.49	206.24	219.65	194.03

Unit is $\mu\text{mol/g}$

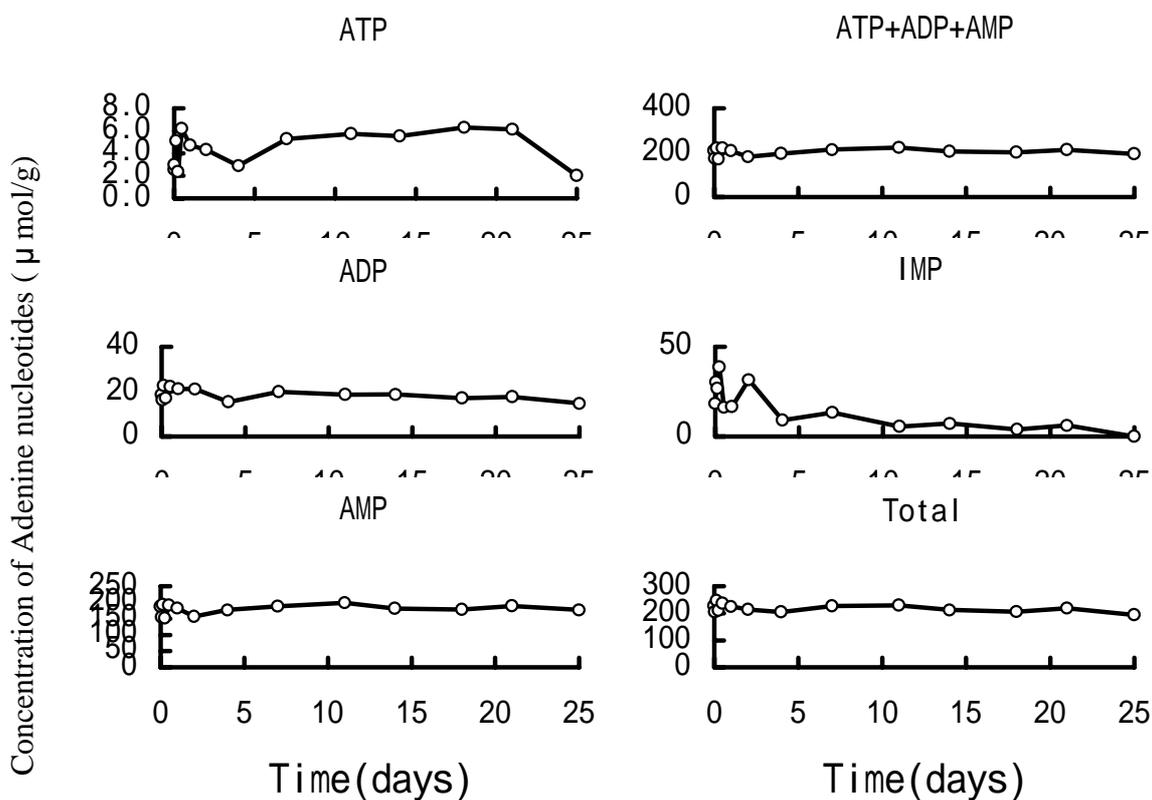


Fig. 5-1-7. Changes in nucleotides of *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 20 .

Table 5-1-13. Changes in concentrations of Adenine nucleotide of the brackish water bivalve *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 30 .

Time(hour or day)	0	1H	3H	6H	9H	12H	24H	2D	3D	4D	6D	10D
ATP	3.06	6.68	6.84	5.80	6.96	6.92	4.36	7.37	7.10	6.21	7.81	6.84
ADP	51.92	58.75	63.95	56.95	52.39	58.73	56.06	46.91	53.72	50.60	47.05	42.53
AMP	166.91	164.33	159.74	163.85	169.79	164.20	172.38	175.20	174.71	188.28	179.78	163.51
Subtotal	221.89	229.76	230.53	226.60	229.14	229.85	232.80	229.48	235.53	245.09	234.64	212.88
IMP	35.81	27.86	28.32	23.18	15.34	19.93	17.78	7.70	+	7.78	+	1.38
Total	257.70	257.62	258.85	249.78	244.48	249.78	250.58	237.18	235.53	252.87	234.64	214.26

Unit is $\mu\text{mol/g}$

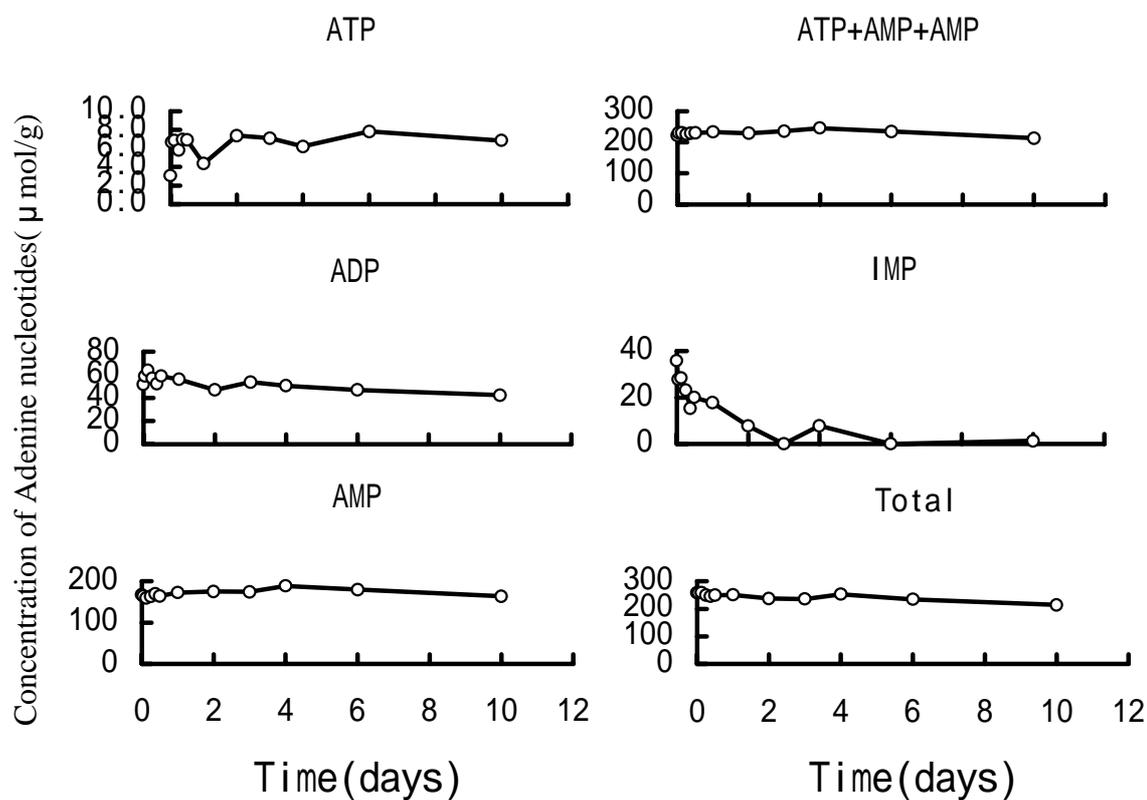


Fig. 5-1-8. Changes in nucleotides of *C. japonica* exposed to the anoxial condition(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 30 .

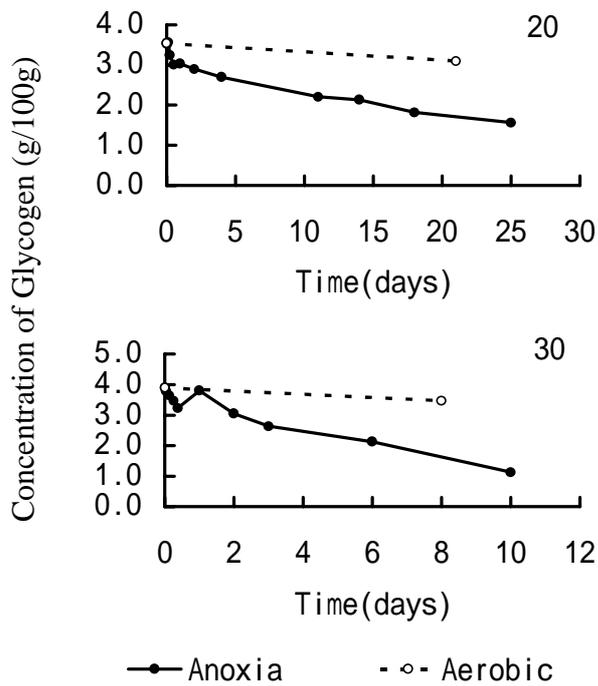


Fig. 5-1-9. Changes in glycogen of *C. japonica* exposed to the anoxia(dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) and aerobic(dissolved oxygen; 20 8.83, 30 7.03mg / ℓ) condition at 20 and 30 , respectively.

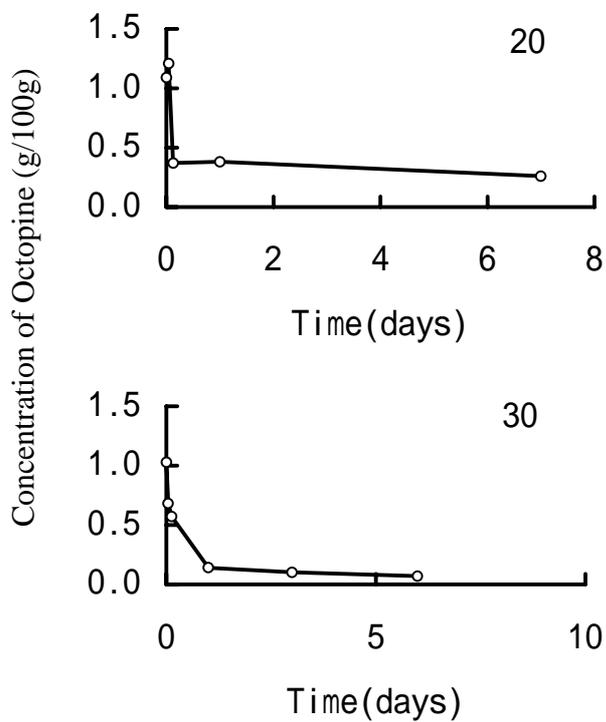


Fig. 5-1-10. Changes in octopine of *C. japonica* exposed to the anoxic condition (dissolved oxygen < 0.05mg / ℓ) at 20 and 30 .

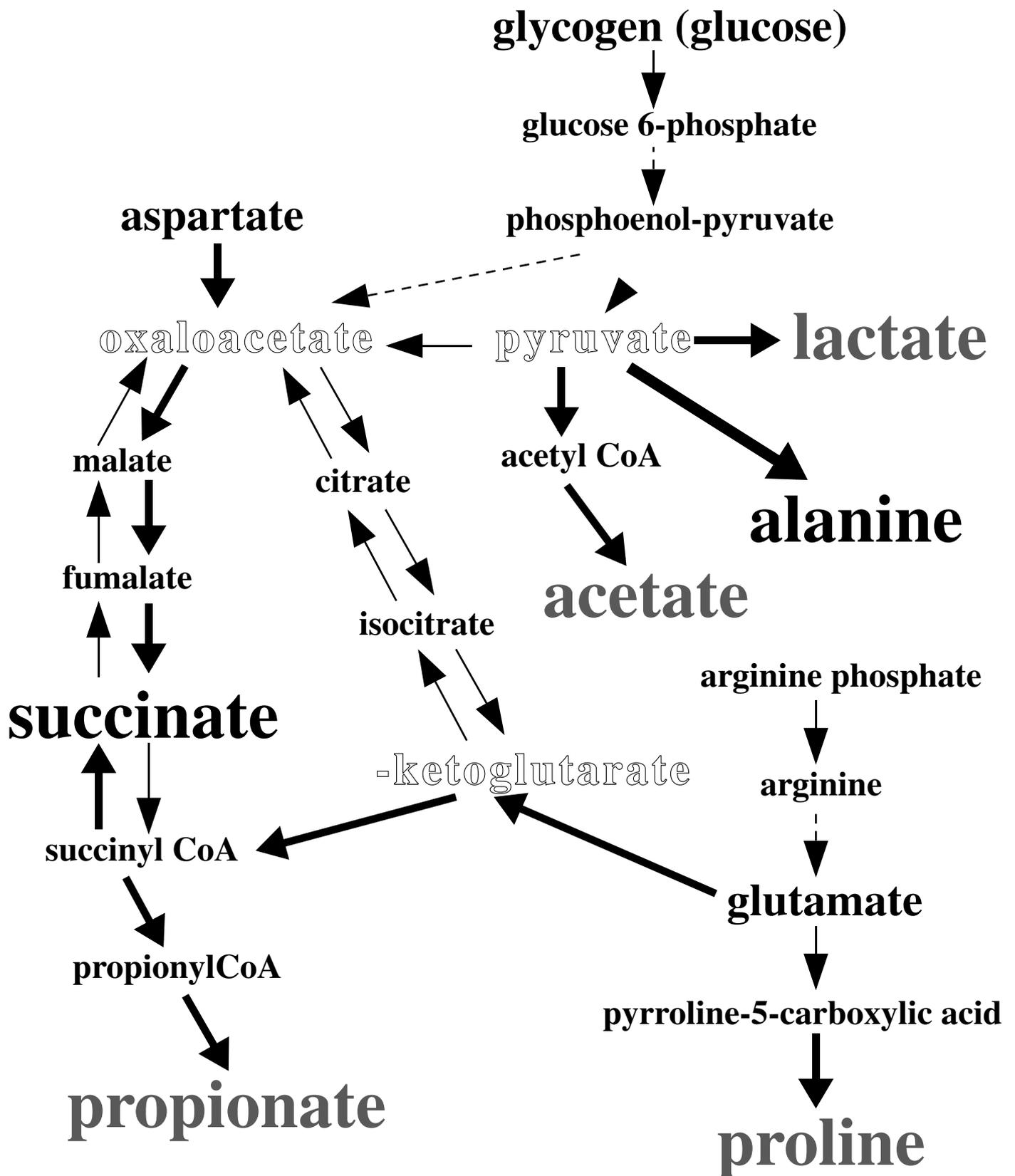


Fig. 5-1-12. Scheme for anaerobic metabolism in *C. japonica*.

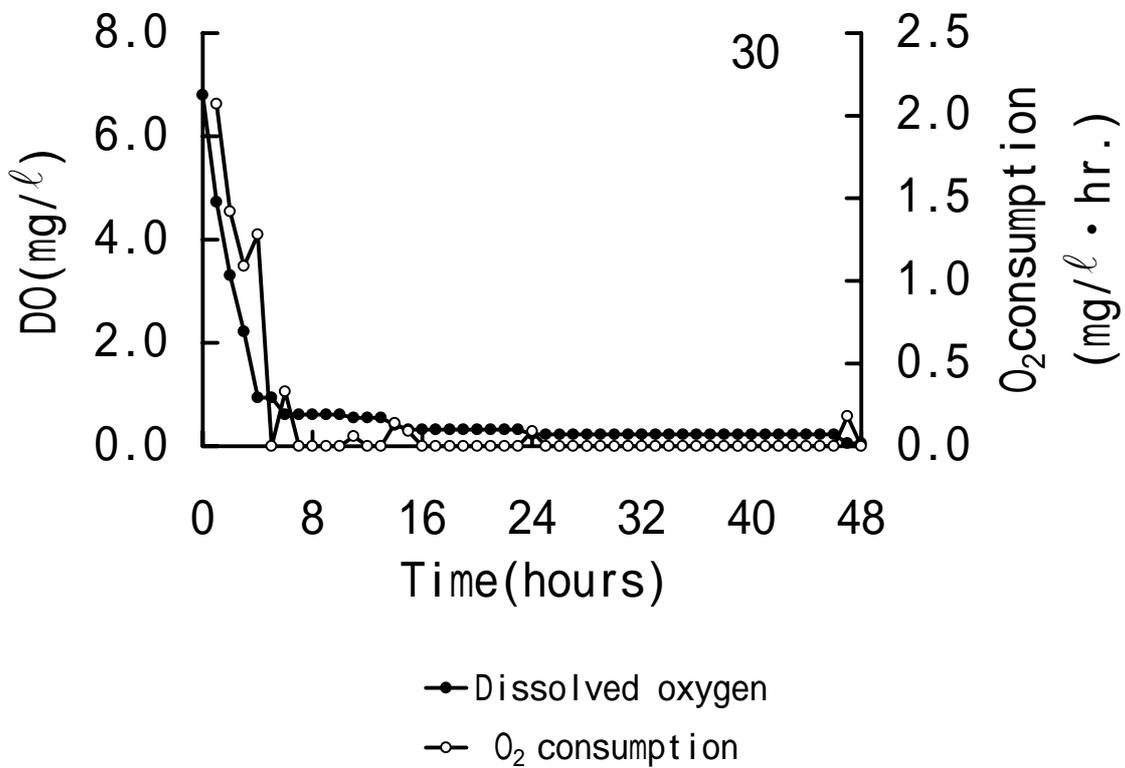


Fig. 5-2-1. O₂ consumption of *C. japonica* at 30 for 48 hours.

Table 5-2-1. Changes in concentrations of free amino acids of the brackish water bivalve *C. japonica* under declined dissolved oxygen.

Time (hour or day)		0	1H	2H	3H	4H	5H	6H	9H	12H	18H	24H	36H	48H	60H	3D	4D	5D	8D
Water content (%)		82.0	83.2	83.8	83.6	83.2	84.1	83.3	83.4	84.3	84.0	83.0	83.4	84.6	85.1	84.0	83.6	84.2	86.9
Total	(mg/100g)	1687.5	1630.1	1582.2	1572.6	1615.8	1582.2	1621.2	1639.7	1587.6	1592.5	1621.7	1598.2	1575.7	1572.6	1593.1	1648.7	1692.8	1586.9
nitrogen	(mg/dry1g)	93.5	96.9	97.4	98.3	96.1	99.6	97.3	98.8	100.9	99.5	95.6	96.1	102.6	105.4	99.3	100.2	107.3	121.1
Extractive	(mg/100g)	254.4	253.0	229.3	226.5	221.2	225.1	215.7	277.6	237.2	206.5	214.9	258.8	214.0	212.9	213.5	236.9	192.3	185.3
nitrogen	(mg/dry1g)	14.1	15.0	14.1	13.8	13.2	14.2	13.0	16.7	15.1	12.9	12.7	15.6	13.9	14.3	13.3	14.4	12.2	14.1
Phospho serine		1.62	1.41	1.86	1.48	1.64	1.80	1.98	1.69	1.75	1.82	1.46	1.36	1.86	2.03	1.68	1.74	1.85	2.14
Taurine		0.93	1.14	1.08	0.92	1.00	1.06	1.10	1.06	1.42	1.20	1.27	0.82	1.09	1.61	1.84	1.55	1.21	1.46
Aspartic acid		5.25	5.40	4.67	4.84	4.73	4.16	4.01	4.25	4.44	4.55	4.21	3.98	4.16	3.83	3.51	3.88	4.00	2.29
Threonine		2.70	2.85	2.59	2.40	2.55	2.54	2.47	2.68	2.61	3.09	2.28	2.68	3.06	3.15	2.93	3.27	3.25	3.52
Serine		2.95	2.15	2.99	3.07	2.72	2.76	2.74	2.64	3.39	2.85	2.69	2.69	3.28	3.38	2.90	2.83	4.04	1.67
Glutamic acid		29.17	29.50	26.83	25.47	27.89	25.00	25.26	26.29	26.56	23.86	24.36	22.81	23.10	21.55	18.64	19.18	23.61	11.93
Glutamine		11.60	12.20	11.41	11.36	11.75	10.77	11.78	10.26	12.47	10.94	9.23	10.57	10.20	11.92	9.80	9.36	7.85	7.88
Proline		4.58	4.08	2.73	2.80	3.87	2.74	2.87	3.87	2.87	3.20	3.48	4.18	4.64	5.42	5.09	6.92	9.47	13.59
Glycine		14.32	16.78	19.76	15.96	17.18	13.42	13.43	13.88	16.33	15.14	14.99	15.05	12.83	15.26	13.69	13.36	17.55	12.09
Alanine		72.67	75.80	61.51	61.51	65.39	57.46	59.08	60.92	63.96	67.93	66.27	73.29	77.31	84.33	81.88	94.63	140.19	113.09
-Aminobutyric acid		0.48	0.58	0.66	0.41	0.58	0.55	0.47	0.53	0.62	0.79	0.63	0.70	0.63	0.85	0.54	0.65	0.80	0.96
Valine		2.32	2.59	2.42	1.97	2.18	2.37	2.00	2.26	2.39	2.61	2.52	2.57	2.78	3.26	2.98	3.37	3.25	5.02
Cystine		0.00	0.22	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.06
Methionine		0.37	0.24	0.37	0.41	0.36	0.30	0.24	0.28	0.21	0.46	0.32	0.28	0.39	0.45	0.50	0.61	0.42	0.66
Cystathionine		0.00	0.21	0.11	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.06	0.08	0.08	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Isoleucine		1.31	1.40	1.36	1.21	1.31	1.06	1.24	1.29	1.36	1.52	1.44	1.56	1.74	2.04	2.09	2.32	2.22	3.43
Leucine		1.65	1.72	1.60	1.48	1.50	1.25	1.42	1.65	1.55	1.90	1.84	2.02	2.38	2.66	2.61	3.15	2.99	4.48
Tyrosine		1.35	1.25	0.99	1.07	1.12	0.80	0.99	1.13	1.16	1.31	1.27	1.33	1.47	1.29	1.55	1.95	1.78	2.23
Phenylalanine		0.64	0.90	0.48	0.63	0.76	0.88	0.58	0.55	0.73	0.79	0.71	0.73	0.87	1.22	1.13	1.29	1.19	2.59
-Alanine		10.27	10.88	8.57	8.40	8.81	9.12	7.07	6.83	7.77	8.27	8.33	7.02	7.31	8.20	7.41	9.55	12.16	9.85
Ammonia		12.72	12.24	11.95	9.30	9.79	8.52	8.47	8.15	7.47	11.02	7.63	6.72	8.43	9.86	8.80	8.22	10.06	15.70
Ornithine		4.74	3.69	3.26	2.71	3.33	2.86	2.68	3.37	3.08	5.43	4.23	3.23	3.84	4.06	3.58	3.68	4.94	2.02
Tryptophan		0.22	0.35	0.15	0.00	0.00	0.34	0.00	0.12	0.16	0.15	0.23	0.27	0.22	0.00	0.31	0.24	0.25	0.49
Lysine		5.54	5.04	5.81	4.95	5.45	4.57	4.93	5.07	5.21	5.72	5.56	5.39	6.10	6.28	6.01	6.86	6.94	8.87
Histidine		0.93	1.11	1.15	0.94	1.00	0.85	0.97	0.93	0.98	1.25	1.03	1.05	1.05	1.38	1.16	1.25	1.59	1.77
Arginine		6.81	7.20	7.14	7.09	7.64	6.58	6.79	7.47	7.80	8.18	7.78	8.46	7.92	9.50	7.69	8.17	10.00	8.28
Total		195.10	200.94	181.58	170.39	182.53	161.80	162.57	167.17	176.43	184.09	173.92	178.81	186.67	203.51	188.33	208.02	271.67	236.05

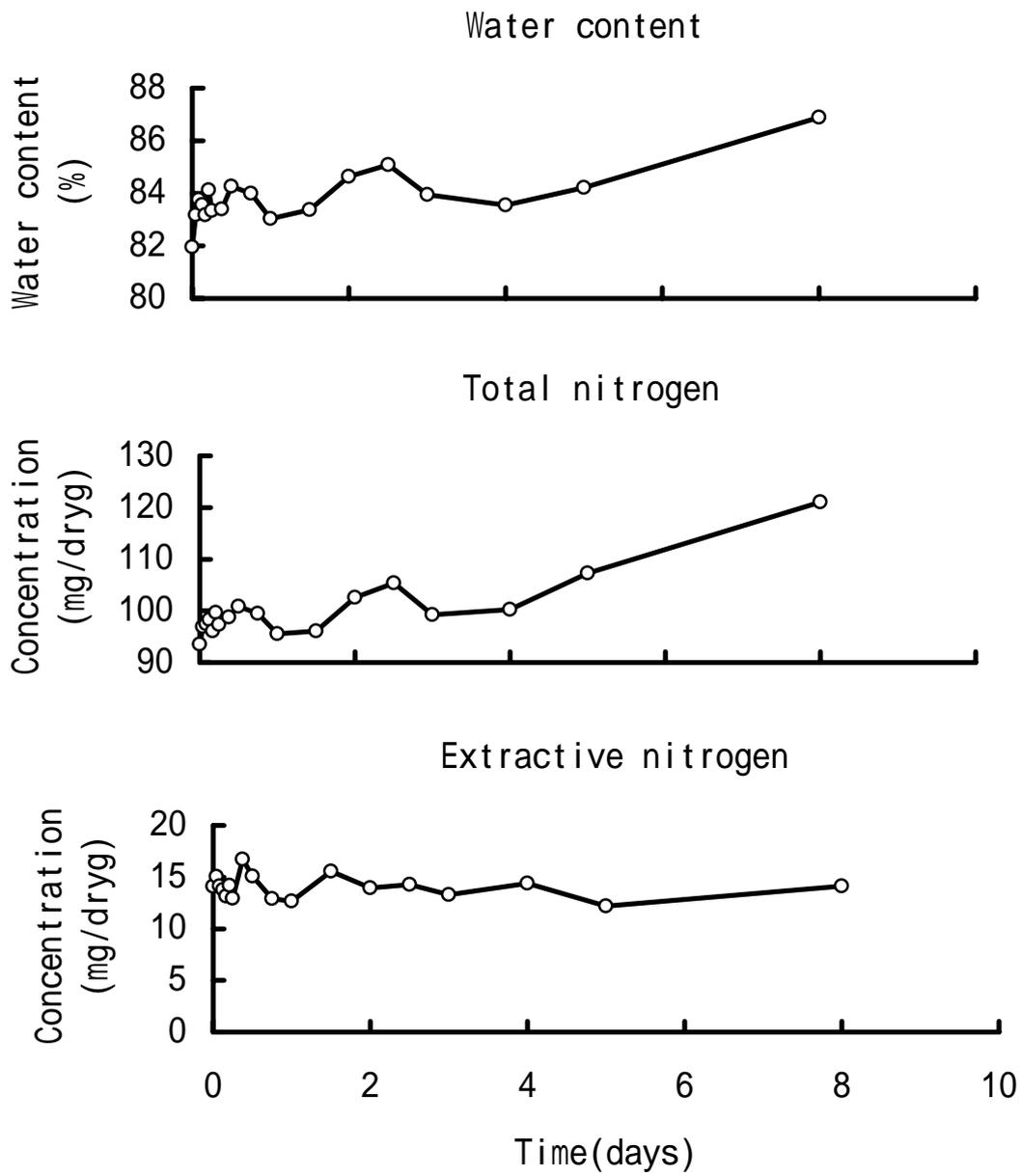


Fig. 5-2-2. Changes in water content, total nitrogen and extractive nitrogen of *C. japonica* under decline of dissolved oxygen.

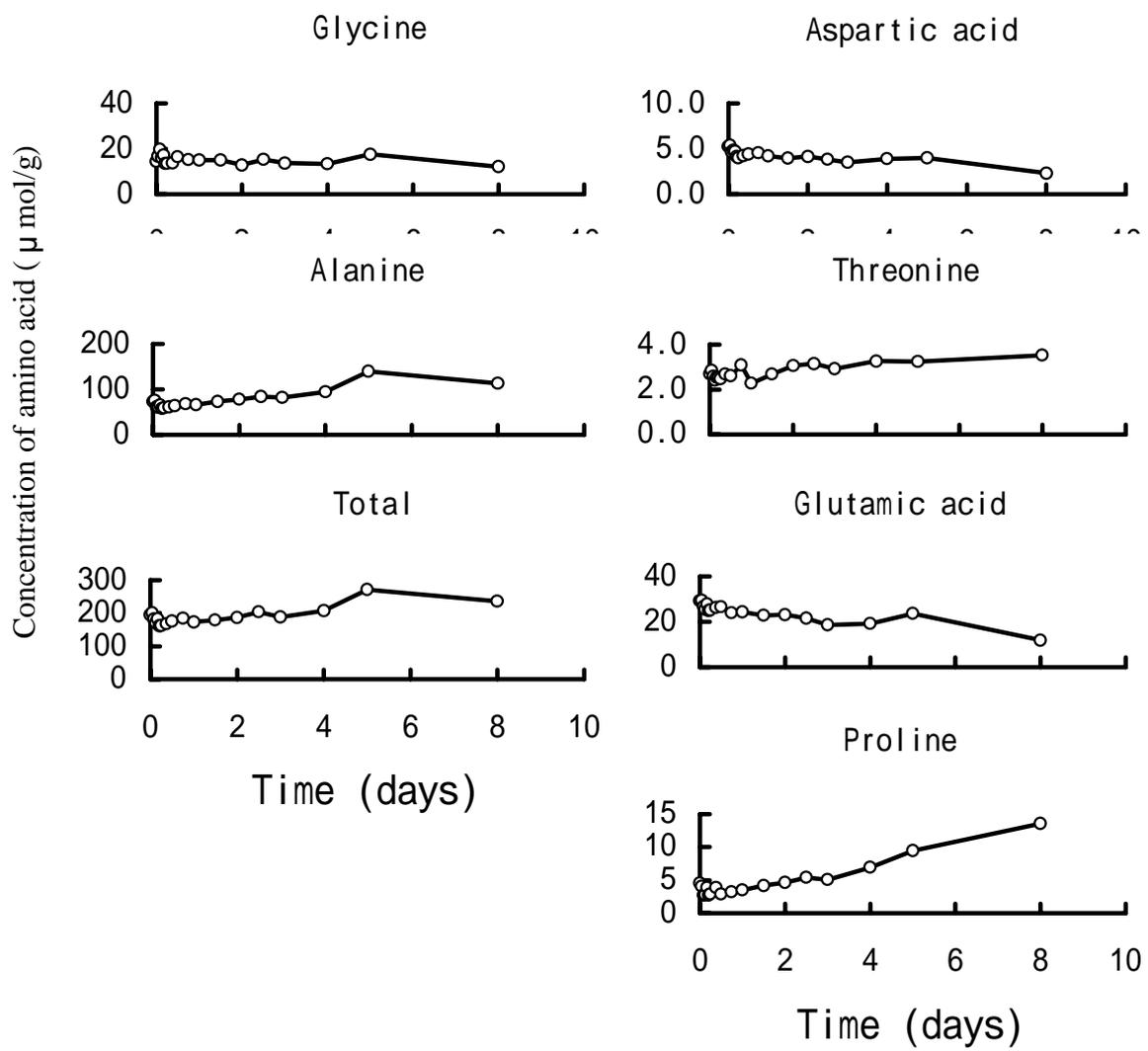


Fig. 5-2-3a. Changes in Gly, Ala, total free amino acid, Asp, Thr, Glu and Pro of *C. japonica* under decline of dissolved oxygen.

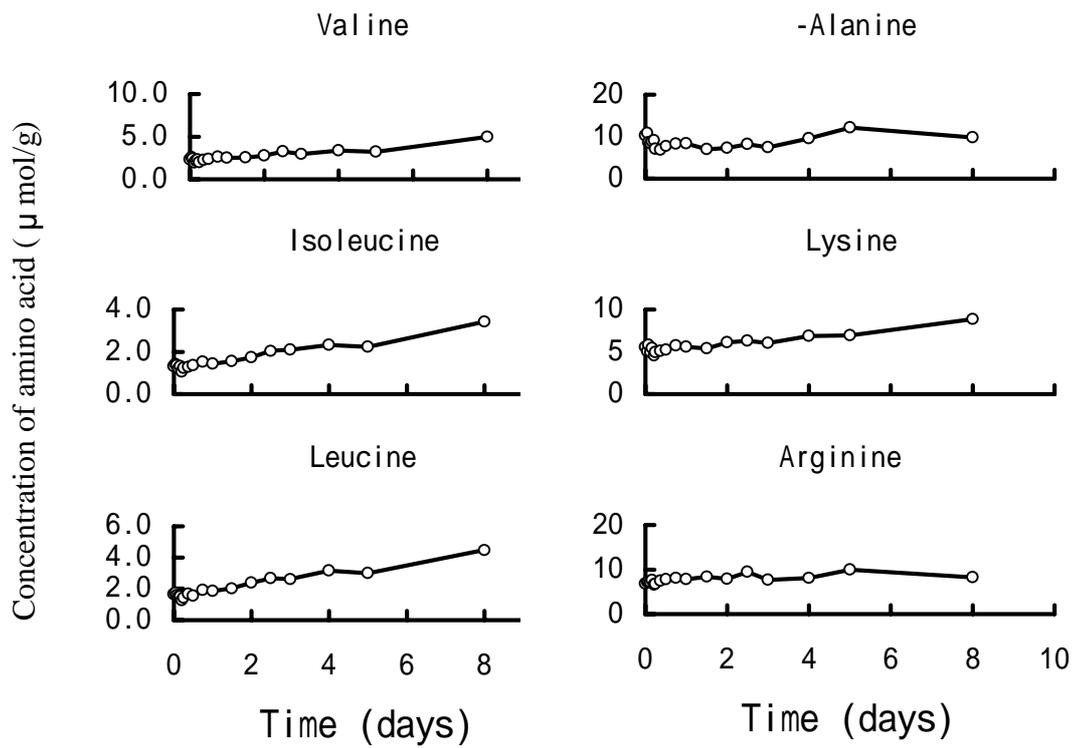


Fig. 5-2-3b. Changes in Val, Ile, Leu, -Ala, Lys and Arg of *C. japonica* under decline of dissolved oxygen.

Table 5-2-2. Changes in concentrations of organic acids of the brackish water bivalve *C. japonica* under declined dissolved oxygen.

Time(hour or day)	0	1H	2H	3H	4H	5H	6H	9H	12H	18H	24H	36H	48H	60H	3D	4D	5D	8D
Malic acid	1.89	1.41	1.20	1.31	1.65	1.50	2.15	2.18	1.47	2.01	2.23	2.75	2.94	3.17	3.67	3.59	4.43	0.42
Succinic acid	13.84	10.02	6.41	8.64	10.44	12.97	10.43	17.34	14.35	25.28	29.39	42.16	58.70	55.22	65.90	81.54	88.08	9.57
Lactic acid	2.29	0.94	3.25	6.41	2.75	3.86	8.34	5.90	2.36	2.34	0.65	4.90	9.88	3.70	9.02	2.18	2.00	8.12
Formic acid	2.88	3.14	2.74	2.60	4.01	3.40	2.94	3.67	1.97	2.47	2.50	2.19	2.64	2.99	2.82	3.17	2.18	4.15
Fumaric acid	0.75	0.74	0.62	0.64	0.41	0.54	0.39	0.74	0.28	0.50	0.39	0.40	0.19	1.22	1.23	1.28	0.27	1.49
Acetic acid	5.14	3.98	3.82	3.89	5.81	5.84	3.74	6.03	2.77	3.78	4.01	5.43	5.40	8.21	6.70	7.11	6.93	17.31
Propionic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.45	3.84	0.36	23.66
Total	26.79	20.23	18.04	23.49	25.07	28.11	27.99	35.86	23.20	36.38	39.17	57.83	79.75	74.51	90.79	102.71	104.25	64.72

Unit is $\mu\text{mol/g}$

Table 5-2-3. Changes in concentrations of adenine nucleotide of the brackish water bivalve *C. japonica* under declined dissolved oxygen.

Time(hour or day)	0	1H	2H	3H	4H	5H	6H	12H	24H	48H	3D	4D	5D	8D
ATP	5.82	5.50	3.00	5.30	5.94	4.32	5.03	5.52	5.80	6.15	6.94	6.92	2.52	
ADP	62.06	46.65	46.23	46.04	47.02	42.28	40.57	41.78	36.82	41.18	34.93	38.88	21.40	25.35
AMP	196.63	168.84	158.47	153.57	175.29	166.04	169.35	177.02	167.97	172.72	180.82	191.21	135.69	147.47
Subtotal	264.51	220.99	207.70	204.91	228.25	212.64	214.95	224.32	210.59	220.05	222.69	237.01	159.61	172.82
IMP	15.25	28.40	23.38	20.68	23.30	19.44	13.44	18.61	17.35	11.75	5.40	6.49	0.00	
Total	279.76	249.39	231.08	225.59	251.55	232.08	228.39	242.93	227.94	231.80	228.09	243.50	159.61	172.82

Unit is $\mu\text{mol/g}$

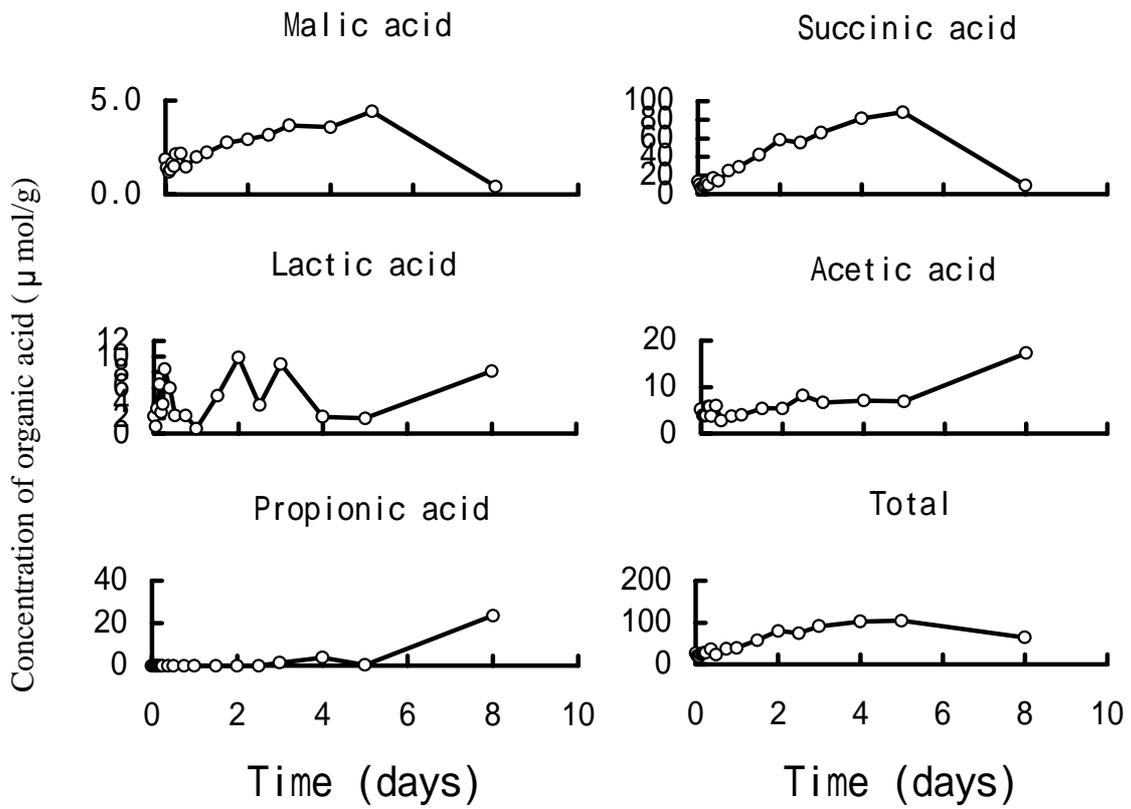


Fig. 5-2-4. Changes in organic acids of *C. japonica* under decline of dissolved oxygen.

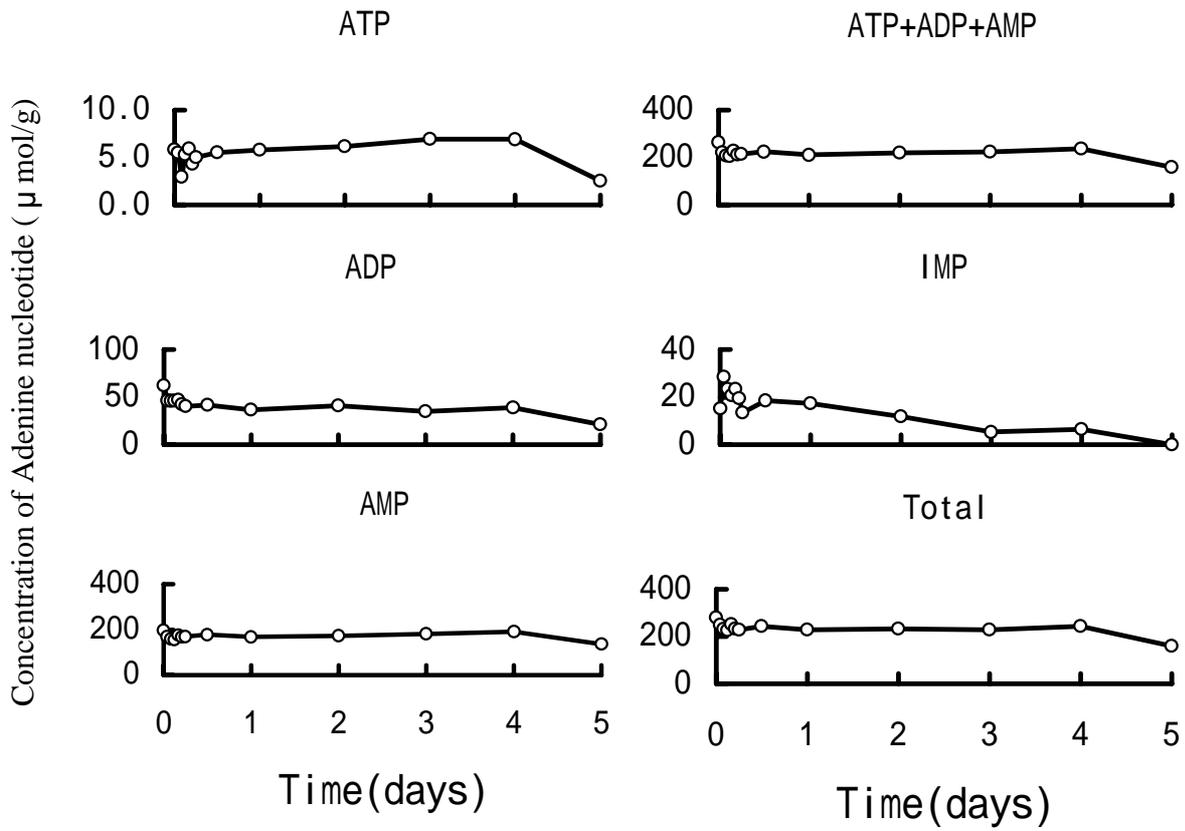


Fig. 5-2-5. Changes in adenine nucleotide of *C. japonica* under decline of dissolved oxygen.

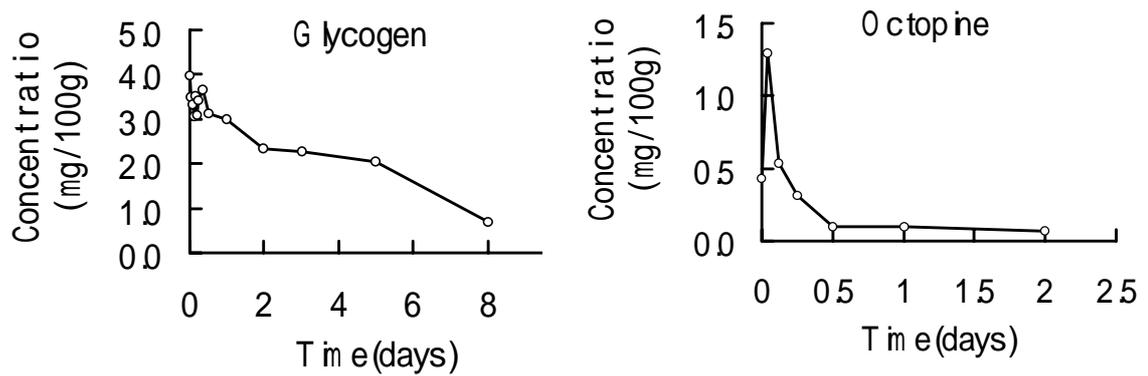


Fig. 5-2-6. Changes in glycogen and octopine of *C. japonica* under decline of dissolved oxygen.