

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03387

研究課題名(和文) 先端的分分子生物学的手法によるサンゴ白化に及ぼす高水温と化学物質の複合影響の解明

研究課題名(英文) Combined effects of high seawater temperature and anthropogenic chemicals on coral bleaching using advanced molecular biological analysis

研究代表者

竹内 一郎 (Takeuchi, Ichiro)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：30212020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミドリイシ属サンゴは、日本南岸の造礁性サンゴの主要な一群である。ミドリイシ属サンゴを対象に、高水温下でのイルガロール1051の影響評価に関する毒性評価実験等を実施した。なお、イルガロールは除草剤であるが、近年、船底防汚塗料としても使用されている。その結果、ミドリイシ属サンゴは30℃では白化しないが、32℃の高水温下では数日後に白化すること、サンゴに共生する褐虫藻(共生藻)の光合成収率、及び、サンゴ及び共生藻、双方の熱ショックタンパク質遺伝子等の多様な遺伝子の発現等の複合影響が認められた。以上より、32℃の高水温下では、サンゴ、共生藻の双方ともに除草剤の影響を受けやすいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴ礁生態系は地球上で最も生物多様性及び生産性が高い生態系であるが、近年、世界各地で大規模なサンゴ白化が発生している。サンゴの白化は、高水温だけでなく、赤土、富栄養化や人工化学物質等も関与していることが指摘されている。本研究により、32℃の高水温下では、近年、船底防汚塗料としても使用されているイルガロールが、ミドリイシ属サンゴへ複合影響を及ぼすことが明らかになった。よって、除草剤等の人工化学物質の影響を低減させると、高水温の影響が緩和される可能性が示唆され、気候変動下でのサンゴ礁生態系の保全政策立案に貢献すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The genus *Acropora* comprises one of the major groups of hermatypic corals along the southern coast of Japan. Irgarol was originally formulated as an herbicide and is now also used in antifouling paints for ship hulls. Toxicity experiments were conducted to evaluate the effects of Irgarol 1051 and high seawater temperatures on *Acropora* spp. *Acropora tenuis*, a representative species in southern Japan, was bleached at 32 °C, but not at 30 °C. The combined effects of high sea water temperature (32 °C) and herbicides were confirmed on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae, symbiotic algae within the coral, and on the expression of various genes, including those encoding heat shock protein, of both corals and symbiotic algae. The results suggest that both corals and symbiotic zooxanthellae are susceptible to the effects of Irgarol at a seawater temperature of 32 °C.

研究分野：環境毒性学

キーワード：サンゴ 高水温 環境化学物質 毒性影響評価 分子生物学的解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁生態系は、地球上で最も生物多様性及び生産性が高い生態系であるが、近年、急激にその面積が減少している。Hoegh-Guldberg et al. (2015)はこの30年間にオーストラリア、東南アジア等の沿岸域でサンゴ礁が約半分にまで減少していることを指摘している。近年、状況はさらに悪化し、2016年以降、オーストラリア・グレートバリアリーフや日本・南西諸島等の世界各地で大規模なサンゴ白化が発生しており、2040年までに世界のサンゴ礁が壊滅する、いわば、「サンゴ礁は、今、存亡の危機の中にある」と考えられている (Normile, 2016)。

サンゴの白化は、一般的に、高水温、赤土の流入等によりサンゴから共生する褐虫藻(共生藻)が離脱することによると考えられてきた。近年、オーストラリアでは農業排水が流入する沿岸ではサンゴの白化水温が2 程低下することが報告され (Wooldridge, 2009)、我々の近年の研究でも、海洋環境中で検出される低濃度のイルガロール 1051(以下、イルガロール)により白化がおこることが明らかになった(Hirayama et al., 2017)。なお、イルガロールは除草剤の一つであり、近年、船舶防汚剤の助剤としても使用されている。

以上より、サンゴの白化は水温上昇のみではなく、富栄養化や除草剤等の人工化学物質も関与していることが考えられ、早急に、水温上昇と除草剤等の化学物質のサンゴ白化に影響を及ぼす複合影響に関する研究を実施する必要がある。

2. 研究の目的

日本南岸のサンゴ礁では、ミドリイシ属*Acropora*、コモンサンゴ属*Montipora*、ハマサンゴ属*Porites*やキクメイシ属*Dipsastraea*等のサンゴが優占していたが、近年、ミドリイシ属サンゴは塊状のハマサンゴ属等の造礁性サンゴよりも高水温の影響を受けやすく、減少傾向にあることが報告されている (Hongo and Yamano, 2013)。

そこで、本研究では、日本南岸のミドリイシ属サンゴの主要種を対象として、28~34 付近の高温耐性を明らかにするほか、1~10 µg/Lのイルガロール等に曝露し、化学物質曝露におけるサンゴ白化のメカニズムを、サンゴ体色の変動パターン、褐虫藻の光合成活性の変動、サンゴ及び褐虫藻の熱ショックタンパク質(HSP)ファミリー遺伝子の発現量や次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現等の解析により解明する。数µg/Lレベルのイルガロールは、シンガポール等のサンゴ礁に隣接した港湾地域から検出されている (Basheer et al., 2002; Ali et al., 2013等)。なお、HSPは熱ストレス等に応答し、細胞内タンパク質のフォールディング(立体構造形成)を助ける働き、いわゆる分子シャペロン機能をもつことが知られている。

また、32 の高水温下で低濃度のイルガロールに曝露し、高水温と化学物質の複合影響を、上記の実験と同様に、体色の変動パターン、褐虫藻の光合成収率の変動や先端的な分子生物学的手法等により解析する。

以上より、高水温と化学物質曝露のサンゴへの複合影響を解明する。

3. 研究の方法

上記の目的のため、本研究では、主に下記の実験、解析等を行った。

(1) ミドリイシ属サンゴの高温耐性

沖縄県で養殖されているウスエダミドリイシ*Acropora tenuis*を購入し、愛媛県松山市の愛媛大学大学院農学研究科の実験室に輸送し、実験に供した。インキュベータ、LEDライト、小型シャーレ等を用い28、30、32、及び、>32(=33.3) の4温度区を設定し、1週間、サンゴを各温度区に曝露した。その間、毎日、デジタルカメラによるサンゴの体色の撮影を行った。撮影した画像から、Photoshop等によりサンゴ体色のRGB(R, 赤;G, 緑;B, 青)値を解析した。なお、RGB値は色の数値表現方法の一種であり、それぞれ、0~255間で変化し、白色に近いほど値が上昇する。また、曝露後のサンゴをRNAlater等により固定、精製等を行い、サンゴ及び褐虫藻のHSP各種の発現解析に供した。なお、ウスエダミドリイシは沖縄県等の日本南岸のミドリイシ属サンゴの代表的な種の一つである。

(2) イルガロールに曝露したミドリイシ属サンゴの遺伝子発現解析

沖縄県で養殖されているウスエダミドリイシを、27.5 で、1 µg/L及び10 µg/Lイルガロールに曝露し、1週間の飼育実験を実施した。その間のサンゴの体色等を(1)の実験と同様の方法で測定した。

実験後、RNAlaterによりウスエダミドリイシを固定した。その後、固定したサンゴ試料からtotal RNAを抽出後、アジレント社製バイオアナライザーを用いてRNAの品質確認を行い、RNAの精製、cDNA合成、アダプター付加によりmRNAライブラリーを調製した。次世代シーケンサーによるRNAシーケンス(RNA-Seq)はサーモフィッシャーサイエンティフィック社製Ion PGMあるいはイルミナ社製NovaSeq 6000プラットフォームを用いて行った。得られたシーケンシング配列データは*Acropora tenuis*あるいは*Symbiodinium*のゲノム配列を対象としたマッピング後、遺伝子発現量を解析した。

(3) 高水温下でイルガロールに曝露したミドリイシ属サンゴの毒性評価

養殖ウスエダミドリイシを27.5 と32 で1 µg/Lイルガロール濃度に1週間曝露し、その間のサンゴ体色と褐虫藻の光合成収率を測定した。その結果、曝露後の数日間、光合成収率の減少率に高水温(32)とイルガロール曝露の複合影響が発現することが示唆された。

そこで、高水温とイルガロールの複合影響の詳細を明らかにするため、以下の4試験区を設定し、ウスエダミドリイシを12時間曝露した。

- ・ 27.5 の対照区(27.5 区)
- ・ 27.5 の1 µg/Lイルガロール曝露区(27.5 +イルガロール区)
- ・ 32.0 の高水温曝露区(32.0 区)
- ・ 32.0 の高水温下の1 µg/L イルガロール曝露区(32.0 +イルガロール区)

この4試験区で、曝露6時間及び12時間後のサンゴの体色と褐虫藻の光合成収率の測定を実施した。また、6時間及び12時間後に、(2)の実験と同様に、RNAlaterで固定し、固定したサンゴ資料からtotal RNAを抽出し、分子生物学的解析を行った。

4 . 研究成果

(1) ミドリイシ属サンゴの高温耐性

1週間の実験期間中、28 と30 ではサンゴの体色は変動しないものの、32 及び33.3 では、体色が3日目以降、白色方向に変動した。また、サンゴのHSP90や褐虫藻のHSP70等の解析したHSPファミリーの遺伝子発現も、28 と30 ではほぼ一定であった。

なお、本実験の他に、沖縄本島北東部の瀬底島沿岸から採集したウスエダミドリイシやコクビミドリイシ*Acropora digitifera*の関しても1~2週間の高温曝露実験を行い、サンゴの体色や褐虫藻の光合成収率の変動を解析したが、30 では体色および褐虫藻の光合成収率は、ほぼ、一定であった。

以上より、30 は沖縄県の夏期の平均海水温より1 高いものの、ウスエダミドリイシ等のミドリイシ属サンゴには生息可能な水温であることが示唆された。

(2) イルガロールに曝露したミドリイシ属サンゴの遺伝子発現解析

1週間の実験期間中、いずれの濃度区でもウスエダミドリイシは白化しなかったが、10 µg/Lイルガロールでは、4日目以降、RGB値は白色方向に変動した。

RNA-Seqにより、イルガロール曝露後のウスエダミドリイシと褐虫藻における発現変動遺伝子(DEGs)を明らかにした。ウスエダミドリイシのDEGには緑色蛍光タンパク質、青色光受容体クリプトクローム、クロモプロテイン、カスパーゼ8、核内受容体等が、褐虫藻のDEGには光捕集タンパク質、光化学系IIタンパク質、熱ショックタンパク質(HSP70、HSP90)、ユビキチンなどが含まれていた。

バイオインフォマティクス解析の結果、イルガロールの両曝露区では、様々な遺伝子オントロジー、パスウェイ、タンパク質相互作用ネットワークに影響することが明らかになり、これらは、ウスエダミドリイシ(酸化的リン酸化、代謝経路、トランスフォーミング増殖因子βシグナル伝達経路、接着結合、アポトーシス等)と褐虫藻(小胞体タンパク質プロセッシング、炭素固定化、代謝経路、光合成等)で異なっていた。

(3) 高水温下でイルガロールに曝露したミドリイシ属サンゴの毒性評価

12時間の曝露期間中、いずれの実験区もサンゴ体色の顕著な変動は認められなかった。褐虫藻の光合成収率はイルガロール曝露区では減少し、特に、32.0 +イルガロール区の光合成収率は32.0 区および27.5 +イルガロール区より有意に低下した。

qRT-PCRを用いてサンゴ及び褐虫藻のHSPファミリー遺伝子の発現を解析した結果、サンゴHSP90・HSP70遺伝子の発現は32.0 区が27.5 区及び27.5 +イルガロール区より有意に増加したが、32.0 +イルガロール区では抑制傾向が認められた。また、褐虫藻HSP90・HSP70は遺伝子の発現は32.0 区で27.5 区あるいは27.5 +イルガロール区と比較して抑制傾向を示したが、32.0 +イルガロール区ではさらに抑制される傾向があった。よって、32.0 下でイルガロールに曝露すると、サンゴ及び褐虫藻、双方のHSPファミリーの発現に複合影響が認められた。

サンゴのDEGsの少なかった27.5 +イルガロール区を除き、32.0 区と32.0 +イルガロール区について、曝露6時間後及び12時間後で共通したDEGsを抽出した。32.0 区では約1700 DEGsが共通し、曝露6時間及び12時間後のDEGsの約50%及び約70%に相当した。32.0 +イルガロール区では約1400のDEGsが共通し、6時間及び12時間後のDEGsの約30%及び約80%に相当した。よって、いずれの実験区でも、曝露時間が長くなるに従い、DEGsは増加する傾向が示唆された。

以上のように、ウスエダミドリイシは、32.0 の高水温下の1 µg/L イルガロールに曝露すると、褐虫藻の光合成収率や、サンゴ及び褐虫藻、双方のHSPファミリーに複合影響が発現するほか、サンゴ及び共生する褐虫藻、双方の高水温・イルガロール複合曝露によるDEGsを特定することができた。

以上より、ミドリイシ属サンゴは日本南岸の夏期の水温より高い30 °Cでも生息可能であること、32.0 の高水温下では、ミドリイシ属サンゴ及びサンゴに共生する褐虫藻ともに、HSPファミリーの発現や光合成収率等に、イルガロールとの複合影響が発現すること等が明らかになった。

<引用文献>

- Ali, H.R., Arifin, M.M., Sheikh, M.A., Shazili, N.A.M. and Bachok, Z. 2013. Occurrence and distribution of antifouling biocide Irgarol-1051 in coastal waters of Peninsular Malaysia. *Mar. Pollut. Bull.* 70: 253–257.
- Basheer, C., Tan, K.S. and Lee, H.K. 2002. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 697–703.
- Hirayama, K., Takayama, K., Haruta, S., Ishibashi, H. and Takeuchi, I. 2017. Effect of low concentrations of Irgarol 1051 on RGB (R, red; G, green; B, blue) colour values of the hard-coral *Acropora tenuis*. *Mar. Pollut. Bull.* 124: 678–686.
- Hoegh-Guldberg, O., Beal, D., Chaudhry, T., Elhaj, H., Abdullat, A., Etesy, P. and Smits, M. 2015. Reviving the Ocean Economy. The Case for Action - 2015. WWF International, Gland, Switzerland, Geneva, 60 pp.
- Hongo, C. and Yamano, H. 2013. Species-specific responses of corals to bleaching events on anthropogenically turbid reefs on Okinawa Island, Japan, over a 15-year period (1995–2009). *PLoS One* 8: e60952. doi:10.1371/journal.pone.0060952
- Normile, D. 2016. El Niño's warmth devastating reefs worldwide. *Science* 352: 15–16.
- Wooldridge, S.A. 2009. Water quality and coral bleaching thresholds: Formalising the linkage for the inshore reefs of the Great Barrier Reef, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 58: 745-751.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shitaoka, R., Ishibashi, H. and Takeuchi, I.	4. 巻 162
2. 論文標題 Thermal tolerance of the hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> elucidated by RGB analysis and expression of heat shock proteins in coral and symbiotic dinoflagellates.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 111812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marpolbul.2020.111812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi, H., Takaichi, D. and Takeuchi, I.	4. 巻 780
2. 論文標題 Effects of the herbicide Irgarol 1051 on the transcriptome of hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> and its symbiotic dinoflagellates.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of the Total Environment	6. 最初と最後の頁 14652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2021.146542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi, I., Takaichi, D., Katsumata, M. and Ishibashi, H.	4. 巻 154
2. 論文標題 Succession of delayed fluorescence correlated with coral bleaching in the hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 111008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marpolbul.2020.111008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamei, M., Takayama, K., Ishibashi, H. and Takeuchi, I.	4. 巻 150
2. 論文標題 Effects of ecologically relevant concentrations of Irgarol 1051 in tropical to subtropical coastal seawater on hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> and its symbiotic dinoflagellates.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 110734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marpolbul.2019.110734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi, I., Yamashiro, H. and Gushi, M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Usage of UV-curable oligomer-based adhesive agent in hermatypic coral experimental research.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 1600-1607.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mex.2019.06.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Gushi, M., Takayama, K., Ishibashi, Yamashiro, H. and Takeuchi, I.
2. 発表標題 Effects of high temperature and a PSII herbicide (Irgarol 1051) on hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> evaluated using a compact ecotoxicity experiment system
3. 学会等名 SETAC SciCon. SETAC Europe 30th Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 具志美香子・高山弘太郎・石橋弘志・竹内一郎
2. 発表標題 高水温下でIrgarol 1051 (除草剤) に曝露したウスエダミドリイシ <i>Acropora tenuis</i> の体色と光合成収率の変動過程の解析
3. 学会等名 2020年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水口雅貴・石橋弘志・高山弘太郎・山城秀之・竹内一郎
2. 発表標題 30~32 の高水温に曝露したココビミドリイシ <i>Acropora digitifera</i> の体色と光合成収率の変動過程の解析
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第23回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeuchi, I., Takaichi, D., Katsumata, M. and Ishibashi, H.
2. 発表標題 The mechanism underlying Acropora tenuis bleaching by a photosystem II herbicide, elucidated by measuring delayed fluorescence.
3. 学会等名 The 9th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 具志美香子・高山弘太郎・山城秀之・石橋弘志・竹内一郎
2. 発表標題 30 でIrgarol 1051に曝露したウスエダミドリイシAcropora tenuisの体色とクロロフィル蛍光収率の変動過程
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第22回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi, H., Takaishi, D., and Takeuchi, I.
2. 発表標題 Transcriptome analysis to assess coral bleaching induced by Irgarol 1051.
3. 学会等名 The Second International Workshop on Eco-shoreline Designs for Sustainable Coastal Development. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi, I., Kamei, M., Takayama, K., and Ishibashi, H.
2. 発表標題 Effects of ambient levels of Irgarol 1051 in tropical coastal seawater on the hard coral Acropora tenuis.
3. 学会等名 What's in Our Water WiOW2018 Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内一郎・高市大輔・勝又政和・石橋弘志
2. 発表標題 イルガロール 1051に曝露したウスエダミドリイシの体色及びクロロフィル遅延発光の長期変動
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第21回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高山 弘太郎 (Takayama Kotaro) (40380266)	愛媛大学・農学研究科・教授 (16301)	
研究分担者	山城 秀之 (Yamashiro Hideyuki) (80341676)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授 (18001)	
研究分担者	石橋 弘志 (Ishibashi Hiroshi) (90403857)	愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------