

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03619

研究課題名(和文) 先端的分子生物学的手法による日焼け止め剤の造礁性サンゴの白化に及ぼす影響評価

研究課題名(英文) Assessing the effects of sunscreens on bleaching of hermatypic corals using advanced molecular analysing techniques

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：日焼け止め剤の使用は皮膚ガン予防等に不可欠である。本研究では実験室内でのミドリイシ属サンゴの長期飼育方法を確立した他、日焼け止め剤に含まれるオキシベンゾンや酸化チタンのミドリイシ属への毒性実験を行い、サンゴ体色や遺伝子発現等への影響を解析した。沿岸域より高濃度のオキシベンゾンや酸化チタンに1週間曝露したが、サンゴの体色は変動しなかった。オキシベンゾン曝露でのサンゴ及び共生藻への遺伝子発現への影響は極めて限定的であるが、酸化チタン曝露の場合、サンゴの遺伝子発現に一定の影響が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、小型ガラス水槽等を用いたミドリイシ属サンゴの長期飼育方法を確立することができた。日焼け止め剤の各主要成分のミドリイシ属サンゴへの毒性評価実験を実施し、サンゴ及びその共生藻の遺伝子発現等への影響評価をおこなった。その結果、特に、オキシベンゾン(日焼け止め剤の主要な紫外線吸収剤)のミドリイシ属サンゴへの影響は極めて限定的であった。本方法によりサンゴ礁域から離れた地域に位置する大学の実験室でもミドリイシ属サンゴを用いた毒性実験が可能になった。よって、サンゴ礁生態系保全に配慮した新たな日焼け止め剤等の開発に貢献することができるであろう。

研究成果の概要(英文)：The usage of sunscreens is essential for the prevention of skin cancer. In this study, we established a long-term rearing method for Acropora spp. of hermatypic corals in the laboratory, conducted rearing experiments with oxybenzone and titanium oxide contained in sunscreens on Acropora spp. and analysed coral colour succession and gene expression. Coral body colour did not change after 1-week of exposure to higher concentrations of oxybenzone and titanium oxide than in coastal waters. While the effects of oxybenzone exposure on gene expression in coral and its symbiotic algae were extremely limited, several effects on coral gene expression were observed with titanium oxide exposure.

研究分野：生態系保全学

キーワード：サンゴ 日焼け止め剤 白化 毒性実験 分子生物学的解析

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と生産性が高い生態系であるが、気温上昇の影響を最も受ける生態系である。近年、世界的に大規模なサンゴ礁白化が頻発し、急激にその面積が減少している。サンゴ白化は高水温、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って考えられてきたが、富栄養化や除草剤等の人工化学物質の流入も関与していることが報告されている。

日焼け止め等の医薬品・生活関連物質(PPCPs)は、紫外線による皮膚ガンの予防等に不可欠な化学物質であるが、日焼け止め剤に含まれる紫外線吸収剤の主成分であるオキシベンゾンは数10 µg/L レベルでサンゴが白化すること等が報告され、アメリカ合衆国ハワイ州、パラオ、アメリカ領バージン諸島等ではその使用が禁止されている。

しかし、近年、同レベルのオキシベンゾン濃度に曝露してもサンゴは白化しないとの報告もあり、オキシベンゾン等によるサンゴ白化のメカニズムは未解明であるのが現状である。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、日焼け止め剤の主成分である紫外線吸収剤のオキシベンゾンや紫外線拡散剤の酸化チタン等によるサンゴ白化のメカニズムを、ウスエダミドリイシ *Acropora tenuis* 等のミドリイシ属サンゴ等を対象に、1) サンゴ体色の RGB(R, 赤; G, 緑; B, 青)値計測による解析、2) サンゴの共生藻の光合成機能の測定、3) 次世代シーケンサーを用いたサンゴ及び共生藻の網羅的遺伝子発現解析等により、解明することを目的に実施する。なお、ミドリイシ属は、沖縄島沿岸等の日本南岸のサンゴ礁域の主要な造礁性サンゴの属の1つである。そのため、造礁性サンゴ中で、最も多数の研究成果が報告されている属であるが、沖縄島等では、近年、その被度は減少している。ウスエダミドリイシは、沖縄島沿岸域のミドリイシ属の主要な種の1つであり、世界的にみても同属で最も研究されているミドリイシ属5種の1つである。

また、沖縄県沿岸のサンゴ礁及び隣接海域から海水試料を採水し、近年のオキシベンゾン等の濃度実態の解明も行う。

3. 研究の方法

(1) 紫外線吸収剤等の測定方法の開発及びサンゴ礁及び隣接海域での測定

本研究期間中、クリーンアップや前処理方法を改良し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)等によりオキシベンゾン等の紫外線吸収剤や酸化チタン等の紫外線拡散剤の高感度の微量分析方法を開発した。

2023年8月に沖縄県中部から南部沿岸の海水浴場及び隣接地域の沿岸域から、海水試料を採取し、愛媛県の愛媛大学大学院農学研究科キャンパスに輸送した。

輸送した海水試料は4°Cで冷蔵保存後、固相カートリッジを用いたクリーンアップと膜ろ過による濃縮を組み合わせた前処理と、LC/MS/MS と ICP-MS 等によりオキシベンゾン等を分析した。なお、本方法により、ng/L レベルの高感度の微量分析が可能になり、オキシベンゾンの回収率は95%以上であった。

(2) ミドリイシ属サンゴの長期飼育方法の開発

本研究助成期間当初の2021年度は、新型コロナウイルスのパンデミックにより研究代表者が所属する愛媛大学では、長期間にわたり、県外への出張等の規制が実施されていた。そのため、沖縄県北部の瀬底島周辺域でのミドリイシ属サンゴの採集や、沖縄県から愛媛県へのミドリイシ属サンゴの輸送等の実施が困難であった。このような状況が継続してもミドリイシ属サンゴを用いた実験を愛媛県松山市の愛媛大学大学院農学研究科キャンパスで円滑に実施できる体制の構築が必要であった。そのためには、ミドリイシ属サンゴの長期間の飼育システムの構築が不可欠である。

そこで、大型のアクリル水槽(900mm×450mm×450mm)を購入したほか、ポータブル型のデジタル吸光度計等による飼育海水の高頻度の定期的な塩分濃度や栄養塩濃度の測定スキームを構築した。また、36L小型ガラス水槽に関しても、大型のアクリル水槽と同様に、飼育海水の高頻度の定期的な栄養塩濃度測定等を実施したほか、従来使用していた市販の海水濾過装置の濾過材の追加、交換等を実施した。

(3) オキシベンゾン(紫外線吸収剤)のミドリイシ属サンゴへの毒性影響の検討

沖縄県で養殖されているウスエダミドリイシを27.5°C下で、海水コントロール、溶媒(アセトン)コントロール、50 µg オキシベンゾン/L、500 µg オキシベンゾン/Lの4実験区を設定し、1週間の曝露実験を行った。

溶媒コントロールのアセトン濃度は、50 µg オキシベンゾン/L、500µg オキシベンゾン/L 区と同濃度に設定した。50 µg オキシベンゾン/L は、4.(1)で報告する沖縄県沿岸域から検出されているオキシベンゾン濃度と比較すると、2桁以上高い。

ウスエダミドリイシのコロニーの先端をカットし、ポリカーボネート製ボルトに接着し、1個体ずつ、小型シャーレに置いて実験した。実験期間中、毎日、ウスエダミドリイシをデジタルカメラで撮影し、画像データから RGB 値の 256 階調デジタルデータ等を抽出し、サンゴ体色の変動パターンを解析した。また、撮影後、ウスエダミドリイシの共生藻の光合成収率も測定した。

ウスエダミドリイシと共生藻のトランスクリプトーム解析を行った。実験終了後のウスエダミドリイシは RNAprotect Tissue Reagent で固定し、total RNA を抽出した。高品質の RNA 試料を用いて Strand-specific mRNA ライブラリーを調整後、次世代シーケンサー(NovaSeq 6000)による RNA シーケンスを行った。得られたリードについてウスエダミドリイシと共生藻のゲノムマッピング等により発現変動遺伝子(DEGs; 発現増加及び発現抑制遺伝子)を解析し、さらに遺伝子オントロジーおよびパスウェイ解析を行った。

(4) 酸化チタン(紫外線拡散剤)のミドリイシ属サンゴへの毒性影響の検討

沖縄県北部の沿岸域から採捕したココビミドリイシ *Acropora digitifera* を用いて、異なる粒子サイズ(ナノ及びマイクロレベル)の酸化チタン(10 mg/L)に 7 日間曝露し、サンゴの体色の変動等を計測した。ココビミドリイシもウスエダミドリイシと同様に、沖縄島沿岸のミドリイシ属の主要な種の 1 つであり、世界的にみても、最も研究されているミドリイシ属 5 種の 1 つである。

3.(3)と同様に、コロニーの先端をポリカーボネート製ボルトに接着し、1個体ずつ、小型シャーレに置いて実験に供したが、酸化チタンは沈殿しやすいために、ボルトのネジ部分を ETFE(Ethylene tetrafluoroethylene)製ネットの網目間に挿入しサンゴを直立させた。なお、10 mg/L の酸化チタン濃度は、フランスの地中海沿岸の表層から検出される濃度の約 10 倍である。

また、3.(3)の実験と同様に、ナノ及びマイクロレベルの酸化チタン(10 mg/L)に 24 時間に曝露後のココビミドリイシの次世代シーケンサーによる RNA シーケンスを行い、トランスクリプトーム解析を行った。DEGs や遺伝子オントロジーおよびパスウェイを解析した。

4. 研究成果

(1) 紫外線吸収剤等の測定方法の開発及びサンゴ礁及び隣接海域での測定

沖縄県中部から南部沿岸の海水浴場及び隣接地域の沿岸域のオキシベンゾン濃度は、いずれの地点も 0.50 µg/L 以下であり、2011 年の沖縄県沿岸域のオキシベンゾン濃度よりも、低い傾向が認められた。

(2) ミドリイシ属サンゴの長期飼育方法の開発

観賞用等に市販されている 2 種のミドリイシ属サンゴを購入し、大型の亚克力水槽中で、1 週間以上、馴致飼育し、2 週間の高温耐性(29、30、31、及び、32°C)の実験を行った。実験期間中、毎日、ミドリイシ属サンゴをデジタルカメラで撮影し、撮影した画像から RGB 値の変動パターンを解析した。その結果、2 種のミドリイシ属ともに、29°C と 30°C では、2 週間の実験期間中、RGB 値の白色方向への顕著な変動は観測されなかった。観賞用等のミドリイシ属サンゴを用いても、沖縄県産のミドリイシ属サンゴと同様に、各種の毒性実験が可能であることが確認された。

濾過材の交換、改良等を実施した 36L 小型ガラス水槽でも、定期的な栄養塩濃度等の測定を実施した。それらの測定結果を参照し、飼育海水の交換等を行い、小型ガラス水槽でもほぼ継続的に超低栄養塩環境(リン酸塩<0.05 mg/L; 硝酸塩<0.05 mg/L)を維持できるようになった。その結果、サンゴ礁域から離れた愛媛大学大学院農学研究所キャンパスでも、沖縄県沿岸から採集したミドリイシ属サンゴを 5 ヶ月間以上継続して飼育することが可能になった。

(3) オキシベンゾンのミドリイシ属サンゴへの毒性影響の検討

50 µg/L 及び 500 µg/L オキシベンゾンに 1 週間曝露期間中、ウスエダミドリイシの RGB 値は変動せず、光合成収率の変化の有意な変動も確認されなかった。

ココビミドリイシの遺伝子(約 23,700)のうち、海水コントロールと溶媒コントロール間での発現変動遺伝子(DEGs)は 20 未満であった。サンゴの溶媒コントロールと 50 µg/L 区間の DEGs は、11 検出され、海水コントロールと溶媒コントロール間よりも少なかった。溶媒コントロールと 500 µg/L 区間の比較では蛍光タンパク質遺伝子を含む 40 個の DEGs が検出された。一方、ウスエダミドリイシ中の共生藻では、*Cladocopium* sp. (クレード C)由来のリード数が多く取得されたが、検出された DEGs は、海水コントロールと溶媒コントロール間、溶媒コントロールとオキシベンゾン濃度区間ともに、ウスエダミドリイシよりも少なかった。

また、ウスエダミドリイシ及び共生藻の双方ともに DEGs は極めて少なく、エンリッチな遺伝子オントロジーおよびパスウェイもなかった。

これらの結果は、50-500 µg/L オキシベンゾン濃度区は、環境中から検出される濃度よりも極めて高いものの、ウスエダミドリイシの遺伝子発現に及ぼす影響は極めて限定的あり、共生藻への影響はそれよりもさらに小さいと推定された。

(4) 酸化チタン(紫外線拡散剤)のミドリイシ属サンゴへの毒性影響の検討

7 日間のナノ及びマイクロレベルの酸化チタン(10 mg/L)にココビミドリイシを 7 日間曝露したが、この間、サンゴの体色には変動が認められなかった。

24 時間の曝露後のココビミドリイシは、両粒子の酸化チタン曝露により、DEGs は 100 - 300 程度に及び、いずれの酸化チタン曝露でも膜貫通トランスポーター活性やリボソームなどの遺伝子オントロジーへの影響が見られた。パスウェイ解析では、いずれの酸化チタン曝露によって NOD 様受容体や ABC トランスポーター、リボソームなどに影響することが確認された。

一方、ココビミドリイシの共生藻でも、*Cladocopium* sp. (クレード C)由来のリード数が多く取得されたが、両粒子の酸化チタン曝露による DEGs は 10 未満であった。よって、オキシベンゾン曝露と同様に、酸化チタンの共生藻の遺伝子発現に及ぼす影響は、ミドリイシよりも極めて小さい傾向が認められた。

本研究では、ミドリイシ属サンゴの長期飼育方法を開発し、観賞用に市販されているミドリイシ属サンゴでも毒性実験を実施できる基礎が確立された。また、オキシベンゾン及び酸化チタン曝露によるミドリイシ属サンゴとその共生藻における DEGs や作用機序の一端が明らかになった。その結果、環境中よりも高濃度のオキシベンゾンに曝露しても、ウスエダミドリイシに及ぼす影響は極めて限定的あり、共生藻への影響はそれよりもさらに小さいと推定された。このように、本研究により日焼け止め剤及び各主要成分のミドリイシ属サンゴへの毒性評価実験及び影響評価方法が確立することができたことから、サンゴ礁生態系保全に配慮した新たな日焼け止め剤等の各種の PPCPs の開発に貢献することができるであろう。

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 0件）

1. 著者名 Ishibashi H, Minamide S, Takeuchi I	4. 巻 5
2. 論文標題 Expression analyses of stress-responsive genes in the hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> and its symbiotic dinoflagellates after exposure to the herbicide Diuron	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Marine Life Science and Technology	6. 最初と最後の頁 289-299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s42995-023-00183-0	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, Takeuchi I	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of anthropogenic chemicals on hermatypic corals with special reference to gene expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In, Takeuchi I, Yamashiro H (eds) Coral Reefs of Eastern Asia under Anthropogenic Impacts. Coral Reefs of the World	6. 最初と最後の頁 153-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-031-27560-9_9	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	4. 巻 17
2. 論文標題 Anthropogenic stresses in coral reefs and adjacent ecosystems of the East China Sea	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Takeuchi I, Yamashiro H (eds) Coral Reefs of Eastern Asia under Anthropogenic Impacts. Coral Reefs of the World	6. 最初と最後の頁 113-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-031-27560-9_7	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, Takayama K	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of a compact experimental system for ecotoxicological experiments on <i>Acropora</i> spp.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Takeuchi I, Yamashiro H (eds) Coral Reefs of Eastern Asia under Anthropogenic Impacts. Coral Reefs of the World	6. 最初と最後の頁 113-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-031-27560-9_8	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, Nishimura S, Tanaka K, Haruta S, Takayama K, Yamashiro H, Takeuchi I	4. 巻 201
2. 論文標題 Transcriptome analysis reveals limited toxic effects of the UV-filter benzophenone-3 (BP-3) on the hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> and its symbiotic dinoflagellates	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 116260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marpolbul.2024.116260	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 石橋弘志・西村紗織里・田中こころ・治多伸介・高山弘太郎・山城秀之・竹内一郎
2. 発表標題 環境中で検出される日焼け止め成分オキシベンゾンハウスエダミドリイシ <i>Acropora tenuis</i> の光合成収率や遺伝子発現に影響するの？
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第25回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋弘志・西村紗織里・田中こころ・治多伸介・高山弘太郎・山城秀之・竹内一郎
2. 発表標題 日焼け止め成分オキシベンゾンのミドリイシ属サンゴ / 褐虫藻に対する毒性影響
3. 学会等名 第2回環境化学物質3学会合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ishibashi H, Nishimura S, Tanaka K, Haruta S, Takayama K, Yamashiro H, Takeuchi I
2. 発表標題 Transcriptome analysis of the hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> and its symbiotic dinoflagellates exposed to the UV absorber oxybenzone (BP-3) included in sunscreens
3. 学会等名 SETAC Austrasia 2023 Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石橋弘志・南出成梧・竹内一郎
2. 発表標題 除草剤ジウロンを曝露したウスエダミドリイシとその共生藻におけるストレス応答遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第25回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeuchi I, Ishibashi H
2. 発表標題 Transcriptome analysis of hermatypic coral <i>Acropora tenuis</i> and its symbiotic dinoflagellates exposed to anthropogenic chemicals
3. 学会等名 10th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024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	治多 伸介 (HARUTA SHINSUKE) (60218659)	愛媛大学・農学研究科・教授 (16301)	
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)	
研究分担者	田代 豊 (TASHIRO YUTAKA) (20441959)	名城大学・国際学部・教授 (28003)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山城 秀之 (YAMASHIRO HIDEYUKI) (80341676)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・名誉教授 (18001)	

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