

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310025

研究課題名(和文) サンゴ礁における海水富栄養化の慢性毒性評価法の確立

研究課題名(英文) Development of new assay for evaluating chronic effects of eutrophication in coral reefs

研究代表者

山崎 秀雄 (Yamasaki, Hideo)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：40222369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,700,000円、(間接経費) 2,910,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、海水の富栄養化によってサンゴが受ける「慢性ストレス」の評価技術の確立を目的として、生化学的な新規定量法の開発を試みた。「活性酸素」と良く似た性質を持つ「活性窒素」の生成と消去のバランス崩壊が、ヒトの慢性ストレス障害に関与していることが指摘されている。そこで、富栄養化に伴う活性窒素障害(窒素毒性)の生化学的痕跡として生体成分のニトロ化に着目し、普及を念頭においた簡便技術の開発を検討した。ニトロ化合物を酸化分解処理し、遊離してくる硝酸イオンをイオンクロマトグラフィーによって検出することで、ニトロ化レベルが定量化できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Eutrophication of seawater caused by run-off from land appears to change the reef ecosystems in Okinawa. Until now, however, there has been no measure to assess its physiological impact on reef-building corals. A major objective of this research project was to find a quantitative measure for the physiological impact of eutrophication on a biochemical basis. Focusing on uncontrolled production of reactive nitrogen species (RNS) under stress conditions, this study attempted to quantify nitrated biomolecules with simple procedures. We suggest that hydroxyl radical generated by the Fenton reaction liberates nitro group from its parent compounds and produces nitrate ion that can be quantified with ion chromatography technique, a novel method to evaluate nitrogen toxicity.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：サンゴ礁 富栄養化 活性窒素 ストレス 慢性毒性

1. 研究開始当初の背景

沖縄のサンゴ礁衰退の原因として、生活排水や農畜産業廃水による「海水の富栄養化」が一因として考えられている。しかし、富栄養化した海水の毒性実体は不明で、サンゴ礁衰退との因果関係も未だ証明には至っていない。

海水の富栄養化は、植物プランクトンの増殖に必要な窒素やリンなどの栄養塩の濃度上昇を引き起こす。一般に、栄養塩濃度の上昇は、共生藻をもつ造礁性サンゴにとって有利に働くと考えられている。最近、サンゴ礁を形成する基盤種では、富栄養化によって顕著な生長抑制がおり、長期生存率も著しく低下することが明らかとなった。このことは、富栄養化海水には生体毒性を示す「負の効果」もあることを示唆している。しかし、富栄養化海水の毒性実体は明らかにならず、サンゴ礁生態系衰退との因果関係も証明までには至っていない。

2. 研究の目的

サンゴ礁を対象とした従来の環境影響評価法は、長期間の経過観察および生態学的調査を必要とするため、富栄養化の被害を予知・予見・予防するには不向きである。本研究計画では、これまで判定が難しかったサンゴの慢性ストレスを定量化し、新しい影響評価法を確立することで、サンゴ礁生態系の保全・回復に資する技術基盤の形成と、生物における慢性ストレス障害の発生機序の学術的知見を得る事を目指す。

3. 研究の方法

サンゴ礁海域の富栄養化状態を示す環境指標生物として微細藻類の同定を行った。沖縄本島、宮古島、石垣島、西表島でサンプリングを行い、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく糸状ラン藻の系統的關係を調べた。

富栄養化海水の共通特性として窒素過多が知られている。サンゴ礁の生物は、貧栄養環境および低窒素環境下に適応進化した生物群である。これまでに、窒素の生物学的な急性毒性作用は知られておらず、主な生理的影響は慢性毒性と考えられる。しかし、窒素過多の慢性毒性誘発のメカニズムは不明のままである。最近、無機窒素体から活性酸素と良く似た性質をもつ「活性窒素」が細胞内で生産され、様々な生理機能を発揮していることが明らかとなってきた。また、活性酸素と同様に、活性窒素が細胞死の誘導や様々な代謝障害の原因ともなっていることも指摘されている。窒素過多による慢性毒性評価法確立を目指して、活性窒素生成のフィンガープリントであるニトロ化物質の定量技術に関する基礎反応の生化学的解析を行った。

造礁サンゴは、刺胞動物と褐虫藻との共生体であるため、毒性の発生機序の実験的解析が困難である。そこで、活性窒素 (RNS) および活性酸素 (ROS) および活性硫黄 (RSS)

の相互作用を研究するためのモデル系として、シダ植物の *Azolla* を採用した。近年、ヒトのメタボリックシンドロームが食生活によって誘発されることが指摘されている。生物における活性窒素の正負両作用の理解を深めるために、本研究で検討している手法を食品にも適用し、生物に共通した慢性窒素毒性の発生機序を考察した。

4. 研究成果

(1) 富栄養化指標生物の探索

サンゴ礁における海水富栄養化の影響の具体例として西表島の宇那利崎の現地調査を行った。岬北側から東側の浦内川河口の淡水影響が少ない場所と、やや西側で陸水影響が考えられる地点において、糸状ラン藻の繁茂に顕著な差異が認められた (図1)。この違いは、陸域から継続的な栄養供給がもたらされる海域と、外洋に面して栄養分が急速に希釈される海域との栄養塩供給の違いによるものと考えられる。また、サンゴ礁域の富栄養化に対して、糸状ラン藻類が敏感に反応することを示している。今回の調査結果より、糸状ラン藻がサンゴ礁域における海水富栄養化の指標として利用できる可能性が示された。

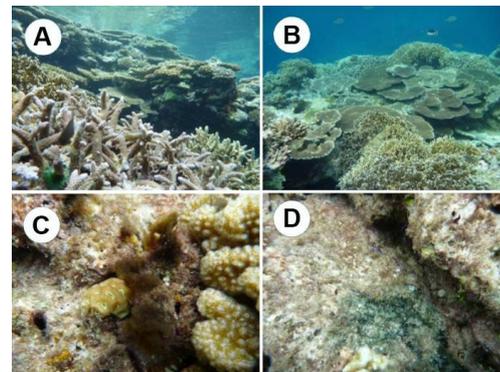


図1. 西表島宇那利崎における貧栄養 (A,B) および富栄養 (C,D) 環境。

糸状ラン藻類は、サンゴが死滅する高度富栄養化環境下でも繁茂する種類もあり、低レベル富栄養化で出現する糸状ラン藻類と区別する必要がある。そこで、ラン藻特異プライマーの組み合わせを検討し、肉眼的な糸状ラン藻の分類を明らかにする手

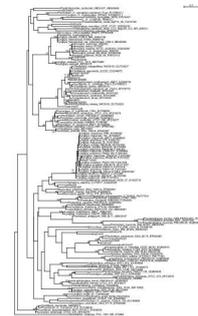


図2. 肉眼的糸状ラン藻の16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹

法を確立した。この方法を用いて、沖縄本島や石垣島、宮古島などから採集した肉眼的な糸状ラン藻について系統的關係を明らかにした(図2)。

(2) 窒素障害定量手法の開発

造礁サンゴは、熱帯・亜熱帯の貧栄養環境に適応進化してきた生物群である。そのため、富栄養化によって無機窒素濃度が上昇すると、環境ストレスとして働き、生体の機能障害を引き起こしてしまう。しかし、富栄養化による機能障害は急性反応を示すことは希で、多くは長期的な慢性ストレスとして作用する。急性反応に比べて慢性反応は、原因との因果關係特定が難しく、医学臨床分野でも長年の課題となっている。加えて、生命科学領域全般においても、長期慢性ストレスの作用機序は未だに不明である。

本研究課題では、富栄養化に伴う長期ストレスの評価法確立を目的として、ラジカル反応を用いた新規定量法の開発を試みた。特に、活性窒素による生体物質のニトロ化に着目し、普及実用化を視野に入れて簡便技術の開発を主眼に検討をおこなった。

素反応の解析には、ニトロフェノールをモデル化合物として用い、特に、亜硝酸遊離を伴う脱ニトロ化反応の検討を行った。最初に、酵素処理による脱ニトロ化反応の応用可能性を調べた。沖縄のマングローブ土壌より、ニトロフェノールを炭素源として、分解菌のスクリーニングを行った。ニトロフェノール培地で生育する細菌を同定したところ、*Pseudomonas putida* sp. であることが分かった。土壌細菌による分解系では、ニトロフェ

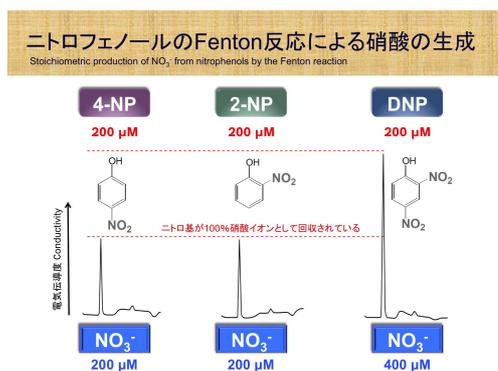


図3. イオンクロマトグラフィーとFenton反応を用いたニトロ基の定量

ノールの消失と亜硝酸の生成が連動して起こる事が確認されたが、4-ニトロフェノール以外の光学異性体を分解しないなど、汎用目的に不向きな基質特異性の高さが明らかとなった。そこで、非酵素的にニトロフェノールから亜硝酸を遊離する反応を検討した。

酸化チタンを用いて、ニトロフェノールから亜硝酸を遊離する光触媒反応を検討したところ、紫外線照射によってニトロフェ

ノールの分解が見られた。構造特異性はなく、分解量と遊離亜硝酸生成にも良い対応が見られ、光触媒法によって、ニトロ基が亜硝酸イオンへ変換されることが示めされた。この反応は、マンニトール添加で抑制されることから、光触媒で発生するヒドロキシラジカルによって、ニトロ基の置換反応が起きていると考えられる。

光触媒法は、紫外線照射が必要であるため、処理量に制限があり、光を通さない濁った物質には定量性が期待できない。そこで、Fenton反応により化学的にヒドロキシラジカルを発生させ、遊離してくる硝酸、亜硝酸イオンを定量する手法を試みた。反応条件を検討した結果、親化合物のニトロ基量に対応して、硝酸イオンを検出することができた。Fenton反応による前処理とイオンクロマトグラフィーによる硝酸イオンの定量によって、親化合物の種類に依存することなく、ニトロ化合物を定量化する技術基盤ができたと考えている(図3)。

(3) 慢性ストレス障害発生機構

環境ストレスおよび慢性ストレスによる機能障害には、細胞内で発生する活性酸素が関与していることが知られている。近年、活性窒素が活性酸素と相互作用し、様々な細胞応答を引き起こしている可能性が指摘されている。しかし、造礁サンゴはおるか、生物全体を見渡しても、活性酸素(ROS)・活性窒素(RNS)・活性硫黄(RSS)の相互作用が解明された例は未だない。

本研究では、富栄養化の影響評価のモデル生物として、シダ植物の一種であるアカウキクサ *Azolla* を採用し、ROS・RNS・RSS相互作用の機序を調べた。*Azolla* は、富栄養条件等の環境ストレス負荷状態になると、根が急速に脱離する特徴的な性質を持っている。この現象を富栄養解析の指標にして、ストレスに対するアカウキクサの生化学的応答を

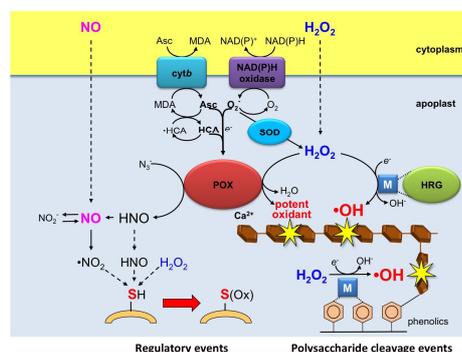


図4. *Azolla* における ROS/RNS/RSS 相互作用モデル (Cohen, Grung, Fukuto, Yamasaki 2014)

調べた。その結果、亜硝酸、高温、ポリアミン等の様々なストレスに対して感受性を示し、根の急速脱離を起こすことが確認された。

窒素原子を3つもつアジ化ナトリウムで最も激しい脱理応答が見られ、その際に大量にRNSである一酸化窒素NOを放出することを見いだした。赤外線顕微分光法を用いて脱離部分の細胞を調べたところ、ストレス負荷後では、細胞構成成分がニトロ化されていることが示唆された。研究結果を基に、様々なストレスによって同一の生理的応答が得られる新たな仕組みを仮説として提唱した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計14件)

山崎秀雄・渡邊なお子(2014)「硝酸塩・亜硝酸塩を基質としたNO合成機構研究の現在・過去・未来」, 日本心臓血管作動物質学会機関誌 Japanese Society for Circulation Research 「血管」, 査読有, vol. 37.

Yamasaki, H., Watanabe, N. S., Fukuto, J. and Cohen, M. F. (2014) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: diversity of NO production systems, *In Oxidative stress in applied basic research and clinical practice: studies on pediatric disorders* (Tsukahara H, *et al.* eds), 査読有, Springer, The Netherland.

Cohen, M. F., Gurung, S., Fukuto, J. and Yamasaki, H. (2014) Controlled free radical attack in the apoplast: A hypothesis for roles of O, N and S species in regulatory and polysaccharide cleavage events during rapid abscission by *Azolla*. *Plant Science*, 査読有, 217, 120-126.

Gurung, S., Cohen, M. F. and Yamasaki, H. (2014) Azide-dependent NO emission from the water fern *Azolla pinnata*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 査読有, 61, 543-547.

Iwasaki, A., Ohno, O., Sumimoto, S., Suda, S. and Suenaga, K. (2014) Kurahyne, an acetylene-containing lipopeptide from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *RSC Advances*, 査読有, 4, 12840-12845.

Iwasaki, A., Sumimoto, S., Ohno, O., Suda, S. and Suenaga, K. (2014) Kurahamide, a cyclic depsipeptide analog of Dolastatin 13 from a marine cyanobacterial assemblage *Lyngbya* sp. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有, 87, 609-613.

Suda, S., Moriya, R., Sumimoto, S., Ohno, O. and Suenaga, K. (2013) Genetic diversity of filamentous cyanobacteria from shore regions of Okinawa. *Journal of Marine Science and Technology TAIWAN* 21, 査読有, Suppl.:

175-180.

Gurung, S., Cohen, M. F., Fukuto, J. and Yamasaki, H. (2012) Polyamine-induced rapid root abscission in *Azolla pinnata*. *Journal of Amino Acids*, 査読有, Volume 2012, Article ID 493209, 9 pages, doi:10.1155/2012/493209.

Mollick, A. S. and Yamasaki, H. (2012) Phenotypic variations in croton *Codiaeum variegatum* (L.) Blume characterized by digital image-based procedure. *Acta Horticulturae*, 査読有, 937, 393-400.

Figueiredo, J., Baird, A. H., Cohen, M. F., Flot, J.-F., Kamiki, T., Meziane, T., Tsuchiya, M. and Yamasaki, H. (2012) Ontogenetic change in the lipid and fatty acid composition of scleractinian coral larvae. *Coral Reefs*, 査読有, 31, 613-619.

Mollick, A. S., Shimojia, H., Denda, T., Yokota, M. and Yamasaki, H. (2011) Croton *Codiaeum variegatum* (L.) Blume cultivars characterized by leaf phenotypic parameters, *Scientia Horticulturae*, 査読有, 132, 71-79.

Mahdi, S. H. A., Yamasaki, H., and Otaki, J. M. (2011) Heat-shock-induced color-pattern changes of the blue pansy butterfly *Junonia orithya*: Physiological and evolutionary implications, *Journal of Thermal Biology*, 査読有, 36, 312-321.

Hossain, K. K., Nakamura, T. and Yamasaki, H. (2011) Effect of nitric oxide on leaf non photochemical quenching under heat-stress conditions, *Russian Journal of Plant Physiology*, 査読有, 58, 629-633.

Yamasaki, H., Itoh, R.D., Bouchard, J.N., Dghim, A.A., Hossain, K.K., Gurung, S., Cohen M.F. (2011) Nitric oxide synthase-like activities in plants. *In Annual Plan Reviews Volume 42, Nitrogen Metabolism plants in the Post-Genomic Era* (Foyer, C.H. and Zhang H. eds), 査読有, pp. 103-125, Blackwell Publishing Ltd., West Sussex, UK.

[学会発表](計8件)

山崎秀雄・渡邊なお子 “サンゴ白化現象における一酸化窒素NOの関与: 活性窒素障害評価法の探索” 日本サンゴ礁学会第16回大会(沖縄)2013年12月

Yamasaki, H. "Nitrite as a crossroad of multidisciplinary: its past, present and future". The International Symposium on Food, Nutrition and Vascular Function 2013, December 3, 2013,

Tokushima, Japan

Gurung, S., Cohen, M. F. and Yamasaki, H. “Azide-dependent NO emission from the water fern *Azolla pinata*” 第13回日本NO学会学術集会（沖縄）2013年6月

渡邊なお子・山崎秀雄 “沖縄食材の亜硝酸供与ポテンシャル” 第13回日本NO学会学術集会（沖縄）2013年6月

Sumimoto, S., Moriya, R. and Suda, S. Genetic diversity of filamentous cyanobacteria from shore regions of Okinawa. 9th East China Sea Conference, Keelung, 2013, Taiwan.

Gurung, S., Watanabe, N. S., Cohen, M. F. and Yamasaki, H. “NO emission from the water fern *Azolla pinata* in rapid root abscission” 第12回日本NO学会学術集会（神戸）2012年6月

Mollick, A. S. and Yamasaki, H. Characterization of the tropical ornamental tree *Codiaeum variegatum* cultivars by chlorophyll fluorescence imaging. Photosynthetic Research for Sustainability, July 24-30, 2011, Baku, Azerbaijan.

Heshiki, R. and Yamasaki, H. Application of *Ficus Microcarpa* cv. Golden Leaves to photosynthetic education. Photosynthetic Research for Sustainability, July 24-30, 2011, Baku, Azerbaijan.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.biology.sci.u-ryukyu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎秀雄 (YAMASAKI Hideo)
琉球大学・理学部・教授
研究者番号：40222369

(2) 研究分担者

須田彰一郎 (SUDA Shoichiro)
琉球大学・理学部・教授
研究者番号：00359986

(3) 連携研究者

()

研究者番号：