

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710284

研究課題名(和文) 遺伝子マーカーを利用した石灰紅藻サンゴモの生育特性の解明

研究課題名(英文) Characterization of coralline algae growth using genetic markers

研究代表者

加藤 亜記 (Kato, Aki)

広島大学・生物圏科学研究科・助教

研究者番号：00452962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：日本のサンゴ礁域と温帯域に代表的な4種の石灰藻(紅藻サンゴモ類)について、高濃度のCO₂が溶け込んだ酸性海水による生育への影響を確認した。とくに、ヒライボについて、夏期の酸性条件下でマイナス成長することを初めて示した。また、無節サンゴモからのRNA抽出法を改良し、ヒライボから生育に関与すると考えられるβ-炭酸脱水素酵素の3'末端側の部分配列を決定したことで、この遺伝子の発現解析用のプライマー設計を可能にできた。

研究成果の概要(英文)：The effects of acidified seawater made by bubbling CO₂ were confirmed on four coralline algal species each representing coral reefs and temperate regions in Japan. This study indicated for the first time that the summer temperature caused the negative growth of *Lithophyllum okamurae* under acidified condition. The RNA extraction method for nongeniculate coralline algae was improved and the 3'-end partial sequence of beta-carbonic anhydrase from *L. okamurae* was determined, which made it possible to design primers for the examination of mRNA expression levels.

研究分野：海藻類の系統分類・生理生態

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：石灰藻 紅藻サンゴモ類 海洋酸性化

1. 研究開始当初の背景

紅藻サンゴモ類は、炭酸カルシウムを細胞壁と細胞間隙に沈着した硬い体を持つ藻類で、とくにサンゴ礁では主要な造礁生物の1つである。しかし、近年の地球温暖化や海洋酸性化、沿岸の水質汚染などが、サンゴモ類の生育に悪影響を与え、その減少によって、サンゴをはじめとした海産無脊椎動物の新規加入の制限や、サンゴ礁の浸食が引き起こされる可能性が示唆されている (Nelson 2009 など)。これまで、サンゴモ類への高温や高濃度 $p\text{CO}_2$ (partial pressure of carbon dioxide, 二酸化炭素分圧) 条件下における影響については、世界的に比較的研究が行われている (Kuffner et al. 2008, Anthony et al. 2009 など)。しかし、サンゴモ類の石灰化量や成長量の変化を扱った研究が多く、サンゴモ類の生育に影響が出るメカニズムを扱った、特に遺伝子レベルの研究は報告されていない。そこで、今後予想される環境変動のサンゴモ類への影響を詳細に評価するためには、遺伝子レベルでの応答機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

紅藻サンゴモ類は、体に炭酸カルシウムを硬く沈着する、サンゴ礁では主要な造礁生物の1つであるが、近年の地球環境変動の影響による衰退が懸念されている。紅藻サンゴモ類の成長には、光合成と石灰化の共役が推定されているため、本研究では、サンゴモ類の光合成や石灰化に關与する遺伝子の同定ならびに、水温、光量、pH を制御した水槽実験による、目的の遺伝子の発現解析を行うことで、光合成や石灰化に影響を与える環境因子を推定する。そして、これらに關わる遺伝子をマーカーとして用いた、サンゴモ類への環境ストレスの影響評価を可能にする。

3. 研究の方法

当初、サンゴ礁域のサンゴモ類のみ対象にしていたが、近年の水温上昇等によって、温帯以北では、水産生物の生育場所として重要な藻場が大規模に消失する「磯焼け」と呼ばれる現象がおき、無節サンゴモが繁茂する「サンゴモ平原」がしばしば出現する。そのため、温帯域の無節サンゴモについても研究対象に加えた。

また、環境ストレスに応答する遺伝子として、サンゴモ類では、光合成と石灰化の両方に關与する炭酸脱水素酵素の配列決定を行った。

1. 研究対象種の決定

南西諸島のサンゴ礁域に多産する無節サンゴモのミナミイシモ *Lithophyllum kotschyannum*、サモアイシゴロモ *Hydrolithon samoense*、有節サンゴモのハネヒメシコロ *Jania spectabilis* を、沖縄本島北部で採集した。また、温帯域でよくみられる無節サン

ゴモのヒライボ *Lithophyllum okamurae* は、瀬戸内海中西部の広島県竹原市沿岸で採集した。

無節サンゴモは塊状体で、外形のみでは、属レベルでさえ同定が難しいので、組織を観察して種同定し、種レベルの判別に使われるミトコンドリアの COI 遺伝子の塩基配列を決定し、サンプル間の遺伝的変異を把握した。

II. 水槽実験

a. サンゴ礁域産のサンゴモ類

・サンプル調整

無節サンゴモのミナミイシモ、サモアイシモについて、各1個体を1cm角程度のチップ状に切り出したサンプルを作成し、実験水槽(後述)に配置する前に、1ヶ月程度、屋外水槽で養生した。有節サンゴモのハネヒメシコロについては、採集後すぐ、カルコフロールホワイト水溶液(終濃度 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$)に5分程度浸漬して蛍光染色を行い、実験水槽に配置した。

・実験水槽のセットアップ

作成したサンプルは、琉球大学瀬底研究施設(沖縄県国頭郡本部町)の実験水槽システムで生育試験を行った。実験水槽は、海水掛け流し式で、現在と将来の予測 CO_2 濃度の合計2段階の $p\text{CO}_2$ (約 $400, 700\mu\text{atm}$)、水温は、夏期の平均水温である 27°C 、光量は $40\text{--}60\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ に調整し、同条件の水槽を2個ずつ準備した。各水槽に上述3種を10サンプルずつ配置し、4週間生育させた。4週間後、各水槽から無節サンゴモ2種の各5サンプルの湿重量を計測し、初期重量との差を成長率とした。

酸性条件下での生育による生理的ストレスを評価するため、光合成活性として、クロロフィル蛍光測定装置(Diving PAM)を用いて量子収率(F_v/F_m)を測定した。この測定は、湿重量の測定をしたサンプルについて行った。

カルコフロールホワイトで染色したハネヒメシコロは、2, 4週間後にUV照射下で写真撮影して、成長量を比較した。

b. 温帯産無節サンゴモのヒライボ

・サンプル調整

ヒライボも、サンゴ礁産種と同様、1個体を1cm角程度のチップ状に切り出したサンプルを作成し、実験前に2~3週間、屋外水槽で養生した。その後、実験水槽の温度まで、 1°C ずつ変化させて馴致させた。

・実験水槽のセットアップ

作成したサンプルは、環境生物環境研究所(新潟県柏崎市)の実験水槽システムで生育試験を行った。実験水槽は、海水掛け流し式で、産業革命前、現在、将来の予測 CO_2 濃度4段階の合計6段階の $p\text{CO}_2$ (約 $280, 400, 550, 750, 1000, 1200\mu\text{atm}$)、水温は、広島県竹原

市沿岸の海藻の繁茂期の5月下旬(17°C)と8月(25°C)の平均水温, 光量は90-100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に調整し, 各条件につき1水槽ずつ準備した。各水槽に5サンプル(25°C)あるいは10サンプル(17°C)ずつ配置し, 6週間生育させた。6週間後, 全サンプルの水中重量を計測し, 初期重量との差を成長率とした。

III. 遺伝子実験

RNA抽出は, 生のサンプルをそのまま用いるか, 液体窒素で凍結させた後, あるいは固定液に浸漬した後, -80°Cで保存したサンプルを用いて抽出した。RNA抽出と抽出したRNAをもとにしたcDNA合成は, 市販のキットを用いた。

このcDNAをもとに, 炭酸脱水素酵素の配列を市販のキットを用いてRACE法により決定した。炭酸脱水素酵素の配列に特異的なプライマーは, 先行研究の紅藻スサビノリの配列をもとに設計した。

4. 研究成果

1. 水槽実験

a. サンゴ礁域産のサンゴモ類

ミナミイシモ, サモアイシゴロモともに, 400, 700 μatm での成長率とFv/Fmに有意差はなかった(図1, 2)。先行研究で, 今世紀末までに予想される最大CO₂濃度の約1000 μatm 前後では, サンゴモ類の成長が阻害されると推測されている。しかし, 現在の濃度から1000 μatm までの中間の濃度では, 放物線状に, いったん成長が増してから減少する場合や, CO₂濃度に応じて, あるいはCO₂濃度によらず増減する場合の両方が報告されている。おそらくこのような中間的な濃度では, 結果が実験条件や生物サンプルの状態に影響されやすいと考えられる。今回の場合は, さらに, 計量したサンプルが1水槽あたり5サンプルであったことと, 4週間の実験期間が湿重量から成長率を把握するには短かった可能性がある。

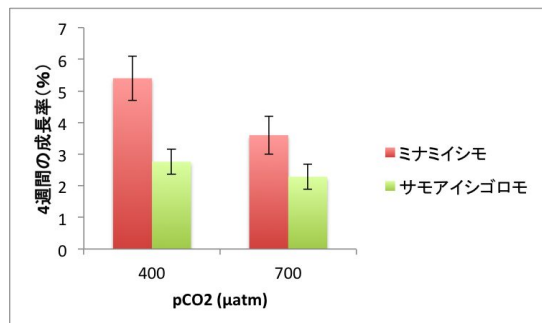


図1. 無節サンゴモ2種の酸性海水条件下での成長率(平均±標準誤差)。

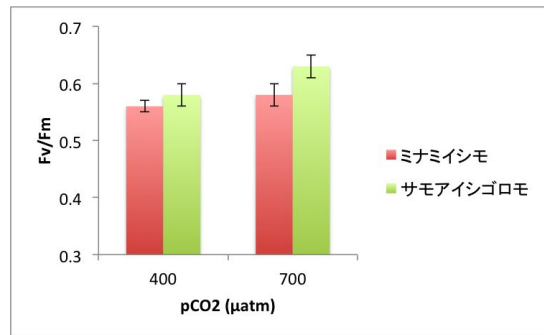


図2. 無節サンゴモ2種の酸性海水条件下でのFv/Fm(平均±標準誤差)。

カルコフロールホワイトで染色したハネヒメシコロは, 生育させてから2週間以内で正常な枝ではない細い枝が伸長し, その後も伸長を続けた。こうした違いは400, 700 μatm ともに見られたが, 両方の条件で, 成長に明瞭な違いは見られなかった。カルコフロールホワイト染色による, 成長量の比較を行った先行研究では, 野外で生育試験を行っており, こうした異常は報告されていなかった。おそらく, 水槽での生育試験で正常に成長させるには, 水流あるいは光量などの厳密な調整が必要であると考えられる。

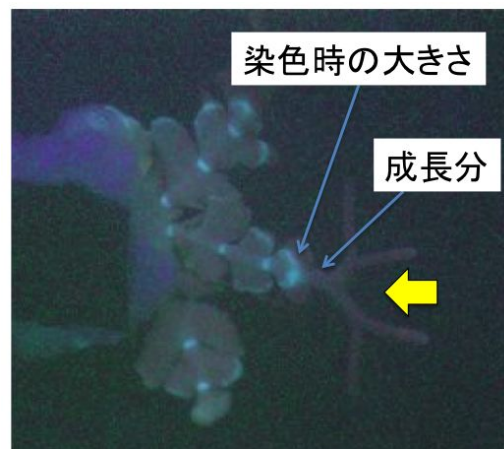


図3. 有節サンゴモ(ハネヒメシコロ)をカルコフロールホワイトで染色し, UV照射下で撮影。途中から正常に成長せず, 細い枝が伸長した(黄色矢印)。

b. 温帯産無節サンゴモのヒライボ

ヒライボは, 17°CではCO₂分圧によらず, 正の成長率を示したが, 25°Cでは酸性ストレス条件下で負の成長率を示した(図4)。

おそらく17°Cが海藻の繁茂期の好適な水温なのに対し, 25°Cは夏枯れの時期の高水温に相当していたため酸性ストレスの影響が大きかったと考えられる。すなわち, 17°Cでは, 酸性ストレス下で成長による石灰化が溶解を上回ったが, 25°Cでは, 成長が鈍化し, 石灰化が溶解より下回ったと考えられる。サンゴ礁域の種で行ってきた実験結果と同様, 温帯の代表的な種でも, 酸性ストレスに弱いことを確認できた上, 酸性ストレスの影響が

季節的な成長の違いによっても異なることを確認できた。

この結果から、将来、水温上昇と酸性化が進めば、夏期に成長がマイナスになる期間が長くなり、無節サンゴモが枯死して、磯焼け海域に生育する海藻種が変化することが予測される。しかし、将来、酸性化による海藻の生育種の変化がどのくらいの規模で起きるのかについては、磯焼け海域に優占する無節サンゴモの種や、同じ海域の藻場に生育するおもな海藻についての影響も考慮する必要がある。

例えば、無節サンゴモは、本研究において、CO₂分圧によって、成長に明瞭な違いが見られなかった。これは、使用したサンプルが、潮間帯のタイドプールに生育していたため、CO₂分圧の大きな変動に耐性があったためと考えられる。こうした、種や生育場所によって異なる酸性条件への耐性について、知見の充実が必要である。

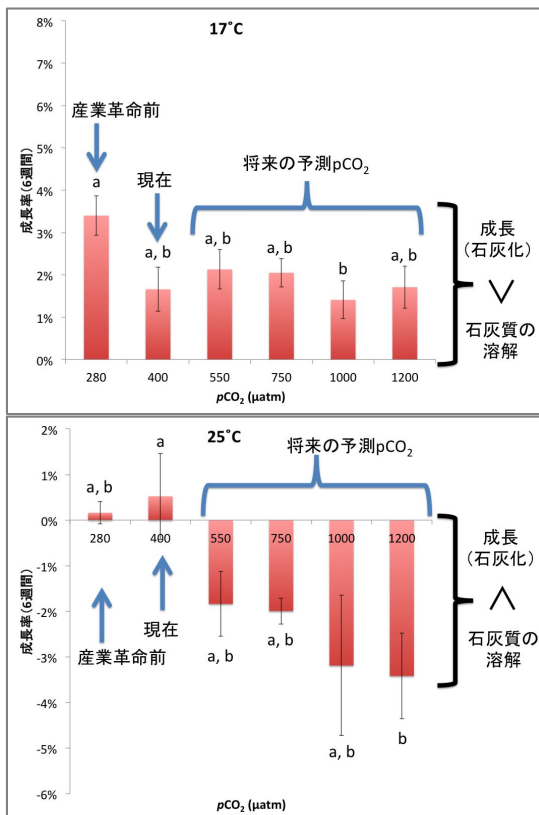


図4. 無節サンゴモ(ヒライボ)の17°Cと25°Cにおける成長率(平均±標準誤差)。棒グラフ上のアルファベットが同じでない場合は有意差がある($p < 0.05$, Tukey's HSD test)。

II. 遺伝子実験

沖縄県で採集したミナミイシモ、サモアイシモについて、液体窒素で生サンプルを瞬間的に凍結させ、-80°Cで保存しておいたサンプルを粉碎して抽出を行ったが、十分なRNAを得ることができなかった。その理由の1つとして、サンゴモ類の藻体の約90%は、炭酸

カルシウムであり、重量に占める組織の割合が少ないため、市販のキットの規定量では少なすぎた可能性がある。そのため、サンプル量を増やして抽出を行ったが、RNAの著しい断片化が起きていた。おそらく、組織が炭酸カルシウムで覆われているため、組織の固定が十分できていなかったと考えられる。

そこで、広島県で採集が容易なヒライボを用いて藻体の固定方法の改良を試みた。その結果、生サンプルを粉碎してから固定液に浸漬し、組織を十分固定してから抽出を行うことで十分なRNAを得られた。このRNAをもとに3'RACE法を行い、-炭酸脱水素酵素の部分配列を得た。無節サンゴモについて、RNA抽出法を改良し、3'末側配列を得たことで、発現解析用のプライマー設計を可能にできた。

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1件)

1. Kato, A., Hikami, M., Kumagai, N.H., Suzuki, A., Nojiri, Y., Sakai, K., 2014. Negative effects of ocean acidification on two crustose coralline species using genetically homogeneous samples. Marine Environmental Research 94, 1-6. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.10.010

〔学会発表〕(計3件)

1. 石灰藻ヒライボ(紅藻サンゴモ目)への海洋酸性化影響の水温による違い

*加藤亜記, 氷上愛, 金釧, 鈴木淳, 堀田公明, 林正裕, 山本雄三, 川幡穂高, 野尻幸宏
日本藻類学会第38回大会(東邦大学) 2014年3月14-16日

2. 海洋酸性化による無節サンゴモ2種の成長阻害

*加藤亜記・氷上愛・鈴木淳・野尻幸宏・酒井一彦
日本藻類学会第36回大会(北海道大学) 2012年7月13-15日

3. *Kato, A., Suzuki, A., Nojiri, Y., Sakai, K. Growth inhibition of two nongeniculate coralline species caused by acidified sea water.

October 9-14, 2011, The 6th Asian Pacific Phycological Forum, The ocean resort, Yeosu, Korea

〔その他〕

ホームページ等

国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 論文紹介

<http://www.nies.go.jp/biology/research/pu/2>

013/1314.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 亜記 (KATO AKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教

研究者番号：00452962

(2)研究協力者

鈴木 淳 (SUZUKI ATSUSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・地質情報

研究部門・研究グループ長

研究者番号：60344199

平山 真 (HIRAYAMA MAKOTO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教

研究者番号：40535465

氷上 愛 (HIKAMI MANA)

東京大学・大気海洋研究所・博士課程2年