

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26281010

研究課題名(和文) 海洋酸性化・温暖化がウニ類の再生産に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of ocean acidification and warming on the reproduction of sea urchins

研究代表者

石松 惇 (ISHIMATSU, Atsushi)

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・教授

研究者番号：00184565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：アカウニを2000および10000 ppmのCO<sub>2</sub>に平衡させた海水中で48日間飼育したところ、管足の収縮力が有意に低下した。管足から抽出したタンパク質を二次元電気泳動で解析した結果、タンパク質の翻訳後プロセッシングと分解に関連したプロテオームの変化によりウニの管足筋に障害を与えている可能性がある。パフウニを1000ppmのCO<sub>2</sub>と水温上昇を組み合わせた条件で9ヶ月間飼育したところ、対照区および高水温区では産卵が確認されたものの、高CO<sub>2</sub>および高水温・高CO<sub>2</sub>区では実験終了時まで産卵が起らなかった。将来の海洋酸性化および温暖化はパフウニの再生産を強く抑制する可能性があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Pseudocentrotus depressus was exposed to 400 (control), 2000 and 10,000 ppm CO<sub>2</sub> for 48 days. Acclimation to higher CO<sub>2</sub> conditions reduced contraction force of the tube feet. Two-dimensional gel electrophoresis showed that eight spots changed in protein volume. Using matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometry, three upregulated spots (tubulin beta chain, tropomyosin fragment, and actin N-terminal fragment) and two downregulated spots (actin C-terminal fragment and myosin light chain) were identified. Hemicentrotus pulcherrimus was used to study separate and combined effects of a 9-month exposure to 1,000 ppm CO<sub>2</sub> and temperature (2 °C above ambient). The sea urchins in elevated CO<sub>2</sub> showed a gradual decline in food intake. Spawning did not occur in both high CO<sub>2</sub> conditions. Temperature elevation alone caused earlier spawning. The projected changes in seawater conditions would disrupt physiological traits and reproduction of sea urchins.

研究分野：環境生理学

キーワード：生物海洋 海洋酸性化 海洋温暖化 再生産 生態系影響予測 ウニ

## 1. 研究開始当初の背景

気候変動が海洋生態系に及ぼす影響について、従来温暖化の影響が着目されてきた (Poloczanska et al. 2013) が、近年CO<sub>2</sub>が海水に溶解することによって引き起こされる海洋酸性化も生態系に深刻な影響を及ぼす可能性があることが明らかにされつつある (Gattuso & Hansson 2011)。海洋酸性化研究は、現在爆発的に進展しており、われわれのデータベース検索では2013年に発表された論文数は既に600編を越えている。気候変動に関する政府間パネル(IPCC)は、大気中CO<sub>2</sub>濃度の上昇が21世紀末までに世界表面海水の平均pHを最大で0.30程度低下させると予測している (IPCC 2013)。

海水の酸性化は炭酸カルシウムの溶解を促進することから、これまでは主にサンゴ等の石灰化生物を中心として研究が行われてきた (Andersson & Gledhill 2013)。しかし、近年石灰化以外の多くの生物過程にも様々な影響が及ぶことが明らかにされつつある。なかでも、初期発生が海水pHの低下に鋭敏に反応する 경우가多く (栗原 2013)、われわれも将来の南氷洋の海洋酸性化がナンキョクオキアミの初期発生を強く抑制することを見出し、*Nature Climate Change* に発表した (Kawaguchi et al. 2013)。

これに対して、初期発生以前の再生産プロセスである成熟・放卵・放精については、極めて情報が不足している。ウニ類は、海洋酸性化の影響が比較的良く研究されている動物群の一つではあるが、やはり初期発生に関する研究が圧倒的に多く (Byrne & Przeslawski 2013)、成熟・放卵・放精に関する情報は極めて限られている。

2005年以降に海洋酸性化の生物影響に関して発表された論文を精査した結果、成熟・産卵を研究主題とした例は13編のみであり、温暖化との相乗影響を評価した論文は皆無であった。海洋酸性化・温暖化研究において長期の曝露実験が必要であることはしばしば指摘される (Whiteley 2011) が、実際の研究例は、上記の我々の研究を除いてはごく少数にとどまる。その意味で、本

研究は特色・独創性のみならず、海洋気候変動研究の分野に警鐘を鳴らす意義をもつ。

既に我々の先行研究によって成熟・産卵阻害がバフンウニで起こる可能性が示されているが、本研究ではその事実を代表的な2種のウニについて確認し、さらにその機構に迫る点で大きな意義がある。本研究で得られる知見は、海洋気候変動に対する適応策策定にとって有用な情報を提供することとなる。

Andersson & Gledhill 2013 *Annu Rev Mar Sci* 5, 321.

Byrne & Przeslawski 2013 *Int Comp Biol* doi:10.1093/icb/ict049

Gattuso & Hansson (2011) *Ocean Acidification*, Oxford Univ Press

IPCC 2013 第5次評価報告書

Kawaguchi et al (2013) *Nature Climate Change* 3, 843.

栗原 2013 *海洋と生物* 35,332.

Poloczanska et al. 2013 *Nature Climate Change* 3,919.

Whiteley (2011) *Mar Ecol Prog Ser* 430, 257.

## 2. 研究の目的

海洋酸性化と温暖化が性成熟と放卵・放精に与える影響とその機構について、重要な水産無脊椎動物であるウニ類を用いて明らかにする。今世紀末に予測される大気中CO<sub>2</sub>濃度および対応する温度上昇を単独あるいは同時に与えた条件下で、ムラサキウニおよびバフンウニを用いて半年～1年程度の飼育実験を行う。曝露実験中は、行動などの *in vivo* 計測と、経時的な組織サンプリングに基づく *in vitro* 計測およびプロテオミクス、生化学分析を組み合わせ、実験動物の生理状態を経時的に把握する。産卵期には放卵・放精を常時監視して、産卵があった場合には卵数・授精率を求める。

海洋酸性化と温暖化が初期発生に与える影響については、この数年知見が劇的に増加しているものの、長期の飼育実験を必要とする成熟・放卵・放精に対する影響に関する情報は極めて乏しい。本研究では、将来に予測される海洋酸性化と温暖化が、ムラサキウニとバフンウニの摂餌、生殖巣へのエネルギー分配および性成熟、

そして幼生産生に至る一連の過程にどのような影響を与えるのかを明らかにする。In vivo および in vitro の系での生理機能測定、形態計測、プロテオミクス等、種々の研究技法を駆使し、これまで記述的研究が主流であった海洋酸性化・温暖化影響研究に新たな地平を拓く。

### 3. 研究の方法

先行研究に基づく仮説「海洋酸性化・温暖化は、単独あるいは相乗影響によって(1)筋機能障害を引き起こし、(2)摂餌量の減少から(3)成熟へ向けられるエネルギー量を低下させ、(4)生殖巣の発達抑制、さらに(5)産卵阻害を引き起こす」を検証する。この目的を達成するため、ムラサキウニ(夏季産卵種)およびバフンウニ(冬季産卵種)を用いて曝露実験を行い、以下について検証する。

- (1)筋機能の評価を、行動解析および in vitro での張力測定によって行う。
- (2)摂餌量の変化と摂餌行動を定量的に把握する。
- (3)生殖巣へ蓄積されたエネルギー量を推定し、摂餌、呼吸、排泄などの測定と併せて、生殖巣へのエネルギー分配率を求める。
- (4)生殖巣の組織学的検索および生化学分析から配偶子生産能を評価する。
- (5)放卵・放精の有無、産卵数、授精率および受精卵の性状、幼生孵化率などを比較する。
- (6)プロテオミクスを咀嚼筋組織について行い、影響の分子機構解明に迫る。

### 4. 研究成果

平成 26 年度

ムラサキウニを用いてCO<sub>2</sub>濃度3000および10000ppmの条件で46日間の曝露実験を行った。この間、海水のpHは対照区8.1、3000ppm区で7.5、10000ppm区で6.9に維持された。水温は24℃であった。摂餌率は10000ppm区で大きく減少したものの、対照区と3000ppm区の間には有意差は見られなかった。ウニが基盤面に接着する力を測定したところ、対照区と3000ppm区はい

ずれも約40Nであったが、10000ppm区では測定不能であった。これは10000ppm区の個体では管足の先端の吸盤がCO<sub>2</sub>曝露によって消失していたためである。管足の収縮力は、CO<sub>2</sub>濃度依存的に減少し、各区の間にはいずれも有意差が認められた。10000ppm区の値は、対照区の約4分の1であった。口器の後引筋の収縮力は各区間に優位さは認められなかった。

平成 27 年度

前年度に行ったムラサキウニを用いたCO<sub>2</sub>曝露実験で得られたサンプルについて、プロテオーム解析および組織学的検討を実施した。対照区、2000ppm区および10000ppm区より得られた管足を試料として二次元電気泳動を行った結果、4個のスポットでアップレギュレーションが、2個のスポットでダウンレギュレーションが確認された。マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法を用いてこれらのスポットの解析を行った結果、アップレギュレーションが見られた4個のスポットのうち、3個はチュープリンベータ鎖、トロポミオシン断片、およびアクチンN末端断片であることが確認された。また、ダウンレギュレーションが見られた2個のスポットは、アクチンC末端断片およびミオシン軽鎖であることが確認された。

平成 28 年度

当該年度には筋機能に着目し、行動解析および in vitro での張力測定さらにタンパク質組成解析による検討を行った。アカウニを2000および10000ppmのCO<sub>2</sub>に平衡させた海水中で48日間飼育したところ、管足の収縮力が有意に低下した。管足から抽出したタンパク質を二次元電気泳動で解析した結果、6種のタンパク質量が上昇(アップレギュレート)され、2種が低下(ダウンレギュレート)されていることが判明した。さらにこれら8

種のタンパク質について解析を進めたところ、アップレギュレートされた6種のうち、3つのスポットが同定できた(チューブリンベータ鎖、トロポミオシン断片、アクチンN末端断片)。また、ダウンレギュレートされたスポットは、アクチンC末端断片およびミオシン軽鎖であることが確認された。これらの知見は前年度と全く同一の結果となった。管足に対する影響とは対照的に、アカウニの咀嚼器官の主要な筋である前引筋の張力はCO<sub>2</sub>による有意な影響を被らなかった。これらの結果は、筋肉関連のタンパク質の翻訳後プロセッシングとタンパク質分解に関連したプロテオームの変化によりウニの管足筋に障害を与える可能性があることを示唆している。この発見は二酸化炭素上昇によるウニの筋肉機能障害の仕組みを理解するための手がかりとなる。

平成29年度

バフンウニを自然水温/低CO<sub>2</sub>濃度(380 ppm、対照区)、自然水温/高CO<sub>2</sub>濃度(1000 ppm、高CO<sub>2</sub>区)、自然水温+2 /低CO<sub>2</sub>濃度(高水温区)および自然水温+2 /高CO<sub>2</sub>濃度(高水温・高CO<sub>2</sub>区)の4条件で9ヶ月間飼育した。生残率は高水温・高CO<sub>2</sub>区で85%、他の3区では100%であった。殻径を指標としたウニの成長は、4区で有意差がなかった。摂餌量は、高CO<sub>2</sub>区および高水温・高CO<sub>2</sub>区では曝露期間の延長とともに低下し、実験終了時には高CO<sub>2</sub>区では対照区の73%、高水温・高CO<sub>2</sub>区では64%となった。酸素消費量は、実験開始時に高CO<sub>2</sub>区および高水温・高CO<sub>2</sub>区でそれぞれ対照区の140%および170%に上昇したものの、その後低下し実験終了時には対照区より有意に低い値を示した。光忌避を指標として測定した移動速度は、高CO<sub>2</sub>区および高水温・高CO<sub>2</sub>区で有意に低下し、実験終了時の測定では、高CO<sub>2</sub>区では対照区の83%、高水温・高CO<sub>2</sub>区では70%となった。また、餌探索に要する時間が高CO<sub>2</sub>区および高水温・高CO<sub>2</sub>区では対照区の約2倍に延長した。対照区では2月

に、高水温区では1月に産卵がそれぞれ確認された。産卵数は、対象区で137万粒、高水温区で113万粒であり、受精率はいずれの区でも95%以上であった。高CO<sub>2</sub>および高水温・高CO<sub>2</sub>区では実験終了の8月まで産卵が起らなかった。これらの結果は、将来の海洋酸性化および温暖化はバフンウニの再生産を強く抑制する可能性があることを示唆している。

#### 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 4 件)

1. Nasuchon, N., K. Hirasaka, K. Yamaguchi, J. Okada and A. Ishimatsu (2017) Effects of elevated CO<sub>2</sub> on contraction force and proteome composition of sea urchin tube feet. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 21D, 10-16 (査読有) .
2. Nasuchon, N., M. Yagi, Y. Kawabata and A. Ishimatsu (2016) Escape responses of the Japanese anchovy *Engraulis japonicas* under elevated temperature and CO<sub>2</sub> conditions. *Fisheries Science*, 82, 435-444 (査読有) .
3. Li, W., G. Han, Y. Dong, A. Ishimatsu, B. D. Russell and K. Gao (2015) Combined effects of short term ocean acidification and heat shock in a benthic copepod *Tigriopus japonicus* Mori. *Marine Biology*, 162, 1901-1912 (査読有) .
4. Wang, G., M. Yagi, R. Yin, W. Lu and A. Ishimatsu (2014) Effects of elevated seawater pCO<sub>2</sub> on feed intake, oxygen consumption and morphology of Aristotle's lantern in the sea urchin *Anthocidaris crassisipina*. *Journal of Marine Science and Technology//National Taiwan Ocean University*, 21(Suppl): 192-200 (査読有) .

{ 学会発表 } (計 10 件)

1. Nasuchon, N., R. Yin, G. Wang, K. Hirasaka, J. Okada, K. Yamaguchi and A. Ishimatsu (2017) Effect of ocean warming and acidification on the physiology of sea urchins. The 11th International Workshop on the Oceanography and Fishery Science in the East China Sea, Nov. 10-12, Nagasaki.
  2. Punchai, P., G. N. Nishimura and A. Ishimatsu (2016) Impacts of ocean acidification on *Sargassum thunbergii* community: two mesocosm studies. Inter disciplinary Symposium on Ocean Acidification and Climate Change, Dec. 5-9, The University of Hong Kong. (ポスター賞受賞)
  3. Do, V. B., N. Nasuchon, M. P. Tran, T. T. Chau, N. H. Tran, T. P. Nguyen, A. Ishimatsu and T. T. H. Do (2016) Development of embryo, larvae and post-larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) rearing at different temperature. International Fisheries Symposium–IFS2016, Oct. 31-Nov. 2, Hoa Binh Phu Quoc Resort, Phu Quoc, Vietnam.
  4. Do, T.T.H., V.B. Do, N. Nasuchon, T. T. Chau, N. H. Tran, M. P. Tran, T. P. Nguyen and A. Ishimatsu (2016) Development of embryo, larvae and post-larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) exposed to different CO<sub>2</sub> concentrations in rearing water. International Fisheries Symposium–IFS2016, Oct. 31-Nov. 2, Hoa Binh Phu Quoc Resort, Phu Quoc, Vietnam.
  5. Nasuchon, N., K. Hirasaka, J. Okada, K. Yamaguchi and A. Ishimatsu (2016) Effects of elevated CO<sub>2</sub> on muscle contraction and proteome composition of sea urchin tube feet. The 7<sup>th</sup> World Fisheries Congress, May 23-27, Busan Exhibition & Convention Center, Busan, Korea.
  6. Ishimatsu, A. (2015) Effects of ocean acidification and warming on coastal marine animals. International Workshop on Island Coastal Area Management, Jan. 25-28, Jeju National University, Korea (招待講演).
  7. パンチャイピーラポーン・石松 惇・ニシハラグレゴリー・ナオキ(2014) Impacts of ocean acidification on *Sargassum thunbergii* community: A mesocosm approach. 平成26年度日本水産学会秋季大会、9月19～22日、九州大学。
  8. Nasuchon, N., J. Okada, K. Yamaguchi, K. Hirasaka, R. Ono, S. Noma and A. Ishimatsu (2014) The effects of elevated CO<sub>2</sub> on the feeding muscular system of the red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. Human Impacts on Oceanic Environment, Ecosystem, and Fisheries, Nov. 11-12, Nagasaki.
  9. Ishimatsu, A., R. Yin, N. Nasuchon, P. Peeraporn, J. Okada, K. Yamaguchi, K. Hirata, G. N. Nishihara and K. Gao (2014) Effect of ocean acidification and warming on coastal animals and ecosystems. Human Impacts on Oceanic Environment, Ecosystem, and Fisheries, Nov. 11-12, Nagasaki.
  10. Punchai, P., G. N. Nishihara and A. Ishimatsu (2014) Impacts of ocean acidification on *Sargassum thunbergii* community: a mesocosm approach. Human Impacts on Oceanic Environment, Ecosystem, and Fisheries, Nov. 11-12, Nagasaki.
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 石松 惇(2014)「海がアシドーシスになっている？」『呼吸のトリビア3』(桑平ほか編) 中外医学社、東京、pp. 69-72.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://mmurata0224.wixsite.com/ishimatsu>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石松 惇（ISHIMATSU, Atsushi）

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・  
教授

研究者番号：00184565

### (2)研究分担者

岡田 二郎（OKADA, Jiro）

長崎大学・水産・環境科学総合研究科（環  
境）・教 授

研究者番号：10284481

征矢野 清（SOYANO, Kiyoshi）

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・  
教授

研究者番号：80260735

山口 健一（YAMAGUCHI, Kenichi）

長崎大学・水産・環境科学総合研究科（水  
産）・准教授

研究者番号：90363473

### (3)連携研究者

（なし）

### (4)研究協力者

（なし）