

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281048

研究課題名(和文) 熱帯産サンゴ・大型海藻を用いた基礎生産者の新たな化学物質リスク評価システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of a new chemical risk assessment system for primary producers using tropical coral and algae

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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：実験室内でLED照明装置、人工海水等によるサンゴやサボテングサ用の飼育システムを構築した。本システムにより、低濃度のイルガロール 1051およびジウロン(1および10 µg/L)のミドリイシ属のサンゴ等への毒性実験を実施したが、RGB値(R、赤;G、緑;B、青)によるサンゴ等の体色解析、高感度ルミノメーターによる遅延発光の解析ともに、イルガロール 1051の毒性影響がジウロンより強い傾向が認められた。イルガロール 1051では、これらの濃度下で、2週間以内の曝露でサンゴが白化した。また、次世代シーケンス解析により、これらの除草剤曝露によって特異的に発現変動するサンゴの遺伝子群が同定された。

研究成果の概要(英文)：We developed a rearing system for hard-coral and Halimeda spp. (green macroalga) using LED light and artificial seawater in the laboratory. We used this system for ecotoxicological studies on Acropora spp. (hard-coral) exposed to low concentrations of Irgarol 1051 and Diuron (1 and 10 µg/L). Measurement of RGB values (R, red; G, green; B, blue) and delayed fluorescence using a high sensitivity luminometer showed that Irgarol 1051 is more toxic to Acropora spp. than Diuron. Exposure to Irgarol 1051 at the concentrations used induced loss of body colour in Acropora, and bleaching within 2 weeks. The RNA-seq analysis revealed the potential for up- and down-regulated genes in Acropora tenuis by exposure to these herbicides.

研究分野：生態系保全学、環境毒性学

キーワード：環境 リスク評価 環境化学物質 基礎生産者 サンゴ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、世界各地で海藻(海草)群落生態系の減少やサンゴ白化とそれに伴うサンゴ礁の崩壊が報告されるようになった。サンゴ白化は高水温、土壌の流入等により共生藻がサンゴから離脱することやオニヒトデの大量発生によると考えられてきた。しかし、近年、イルガロール 1051(以下イルガロールと記載)やジウロン等の除草剤がアマモやサンゴの共生藻類の光合成を阻害すること(Jones and Kerswell 2003)や、オーストラリア・グレートバリアリーフでは陸域からの影響が強い沿岸域において、30 以下の海水温でもサンゴが白化することが報告されている(Wooldridge 2009)。また、これらの除草剤は、近年、TBT(トリブチルスズ)の代替物質として船底等の防汚剤としても広く使用されている。よって、サンゴの白化は水温上昇のみではなく、除草剤等の人工化学物質等が関与していることが考えられ、早急に人工化学物質の海藻(海草)やサンゴへの影響評価に関する研究を実施する必要があるが、大型の海藻(海草)やサンゴを対象とした評価システムは構築されていない。

植物は光合成により細胞内にエネルギーを蓄えるが、光が遮断されると細胞内のエネルギーが光合成の逆反応によるフォトン(微弱な光の粒)を再放出する。この現象は遅延発光と呼ばれている。近年、この微弱なフォンの発光量と変化パターンを最先端の光電子増倍管等を用いて計測する高感度ルミノメーターが開発された。除草剤等の化学物質に曝露されると、サンゴや大型海藻も遅延発光が変化することが予想され、基礎生産者(=植物)に対する環境化学物質のリスク評価において有力な指標となることが期待されている。

一方、近年、次世代シーケンサー等による遺伝子発現解析技術が急速に発展している。サンゴ等の白化が起こる際に、これらの生物やサンゴ内の共生藻類にどのような遺伝子発現変化が起きるのかを解析すれば、白化メカニズムの解明に重要な知見が得られると考えられる。

## 2. 研究の目的

浅海域では、世界的にサンゴ白化や海藻(海草)群落生態系の減少が大きな問題となっているが、近年、イルガロール 1051 等の除草剤等の化学物質がサンゴの共生藻類や海藻の光合成を阻害することが指摘されている。これらの化学物質は近年では防汚剤としても使用されている。そこで、本研究では、サンゴや大型海藻を対象とした化学物質曝露の影響を、1) 画像解析、2) 極微弱発光計

測技術による遅延発光の解析、3) RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析等で評価する。

また、日本南岸のサンゴ礁域等に浅おけるイルガロールとジウロンの濃度の現状を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 体色変動

インキュベーター(恒温器)内に 36L 水槽等を設置し、人工海水や LED ライト等を用いた小型のサンゴ飼育実験システムを構築した。

ウスエダミドリイシ *Acropora tenuis* およびヒロハサボテングサ *Halimeda macroloba* を、本システムで馴致・飼育した。

試験生物はいずれも約 1cm にカットし、コントロールと低濃度のイルガロール(1.0、10  $\mu\text{g/L}$ )に、2 週間(ウスエダミドリイシ)、または、は 30 日間(ヒロハサボテングサ)、曝露した。

毎日、デジタルカメラで試験生物を撮影し、撮影した画像からサンゴの RGB(R、赤: G、緑: B、青) 値を測定した。なお、R、G、B 値はそれぞれ 0 ~ 255 の値をとり、R=G=B=255 で白、R=G=B=0 で黒となる。

ココビミドリイシ *Acropora digitifera* を対象に、コントロールと低濃度のジウロン(1.0、10  $\mu\text{g/L}$ )の 30 日間の毒性実験を、上記とほぼ同様の方法で実施した。

### (2) 遅延発光

ココビミドリイシを約 1cm にカットし、コントロールと低濃度のイルガロールとジウロン(1.0  $\mu\text{g/L}$ )に 24 時間、曝露させ、高感度ルミノメーター等により遅延発光の発光量と変化パターンを計測した。

### (3) RNA-seq 解析

ウスエダミドリイシを約 1cm にカットし、コントロールと低濃度のイルガロールとジウロン(1.0、10  $\mu\text{g/L}$ )に 7 日間、曝露させ、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。

なお、上記の 3-(1)~3-(3)のミドリイシ属サンゴおよびサボテングサは沖縄県から輸送し、実験に供した。

### (4) 日本南岸域のイルガロールとジウロンの濃度

採水後、48 時間以内に、固相抽出装置による前処理を実施し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)により、イ

ルガロール、ジウロンともに定量下限 0.20 ng/L 以下での超微量分析を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 体色変動

イルガロールに曝露したウスエダミドリイシの体色は、コントロール区から 1 µg/L 区、10 µg/L 区になるにつれ、RGB 値とともに上昇傾向を示し、2 週間後には、いずれの濃度区でも白化した。イルガロールに曝露したヒロハサボテングサの体色も、同様に、イルガロール濃度が高くなるにつれ白色方向に変化した。

ジウロンに曝露したコユビミドリイシの RGB 値は、コントロール区、曝露区(1 µg/L、10 µg/L)ともに実験期間中、上昇傾向を示したが、実験区間の顕著な差は認められず、また、実験終了時にも白化には至らなかった。

##### (2) 遅延発光

イルガロール、ジウロン曝露の両実験ともに、コントロール区では、コユビミドリイシからの実験期間中の顕著な発光量の増減はなかったが、曝露区(1.0 µg/L)の発光量は、初期発光量と比較して、曝露時間が経過するに従い、減少した。

また、イルガロールに曝露したサンゴのほうが、発光量の減少は大きかった。

##### (3) RNA-seq 解析

イルガロールあるいはジウロンの曝露(1.0 µg/L、10 µg/L)によって、ウスエダミドリイシでは、蛍光タンパク質、色素タンパク質、青色光受容体、核内受容体、石灰化、発生等に関与する遺伝子群の発現が変動した。また、イルガロール曝露の 1.0 µg/L 区と比較して、体色が白化方向に変化した 10 µg/L 区では、発現抑制された遺伝子数の増加がみられた。

一方、褐虫藻では、イルガロールあるいはジウロンの曝露によって、光合成に関与する集光性タンパク質や光化学系 II 等に関与する遺伝子群の発現が変動した。また、ジウロン曝露区と比較して、イルガロール曝露区では、発現変動した遺伝子数の増加がみられた。

以上の 4-(1)~4-(2)の解析により、イルガロール、ジウロンともに 1 µg/L の低濃度レベルで、ミドリイシ属サンゴへの毒性影響が発現した。また、イルガロールがジウロンよりも毒性影響が強い傾向が認められた。4-(3)の RNA-seq 解析により、イルガロールおよびジウロン曝露により発現変動する遺伝子群が明らかとなった。

#### (4) 日本南岸域のイルガロールとジウロンの濃度

愛媛県南部等では、イルガロール、ジウロンともに最大濃度は 10 ng/L 以下であった。

沖縄県北部のサンゴ礁およびその周辺域では、イルガロールはいずれの地点でも 10 ng/L 以下であったものの、ジウロンでは、最大約 16 ng/L の濃度が検出された。

以上のように、愛媛県南部や沖縄県北部等からは、瀬戸内海の港湾地域等(Balakrishnan et al. 2012)で報告されたような µg/L レベルのイルガロール、ジウロンは検出されなかった。沖縄県北部海域では、イルガロールとジウロンで、採水場所の違いによる濃度の高低パターンは異なり、イルガロールとジウロンでは、主たる汚染源が異なる可能性が示唆された。

以上の本科学研究費で実施した研究成果を中心に、2017年3月22日に、愛媛大学農学部にて、愛媛大学大学院農学研究科附属環境先端技術センター主催の第14回環境先端技術セミナー「先端技術を用いた新たな環境毒性研究の展開」を開催した。

#### <引用文献>

- Balakrishnan, S., Takeda, K. and Sakugawa, H. (2012) Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan. *Geochemical Journal* 46: 169-177.
- Jones, R.J. and Kerswell, A.P. (2003) Phytotoxicity of Photosystem II (PSII) herbicides to coral. *Marine Ecology Progress Series* 261: 149-159.
- Wooldridge, S.A. (2009) Water quality and coral bleaching thresholds: Formalising the linkage for the inshore reefs of the Great Barrier Reef, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 58: 745-751.

#### 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)

- Hirayama, K., Takayama, K., Haruta, S., Ishibashi, S. 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*. *Marine Pollution Bulletin* (査読有) <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.027>

〔学会発表〕(計 8 件)

高市大輔・石橋弘志・竹内一郎 (2016) 低濃度のイルガロール 1051 に曝露したウスエダミドリイシにおける RNA-seq 及び発現変動遺伝子の解析. 日本サンゴ礁学会第 19 回大会、沖縄タイムスビル(沖縄県那覇市)、2016 年 12 月 3 日.

勝又政和・竹内一郎 (2016) クロロフィル遅延発光計測によるサンゴ光合成阻害の評価. 日本サンゴ礁学会第 19 回大会、沖縄タイムスビル(沖縄県那覇市)、2016 年 12 月 3 日.

Hirayama, K., Takayama, K., Iguchi, A. and Takeuchi, I. (2016) Effect of low concentrations of Irgarol 1051 on colour of the tropical green macroalga *Halimeda macroloba*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia/Pacific 2016 Conference, National University of Singapore (Singapore), 18 September, 2016.

Katsumasa, M. and Takeuchi, I. (2016) Utility of delayed luminescence as an indicator for detection of influence of Irgarol 1051 in hard coral. 8th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, The University of Hong Kong (Hong Kong, China), 24 June, 2016.

Hirayama, K., Takayama, K., Iguchi, A. and Takeuchi, I. (2016) Effect of low concentrations of Irgarol 1051 on colour of the hard-coral *Acropora tenuis*. 8th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, The University of Hong Kong (Hong Kong, China), 24 June, 2016.

竹内一郎・平山景太・井口 亮・高山弘太郎 (2015) 低濃度レベルのイルガロール 1051 に曝露したヒロハサボテングサの 体色 (RGB 値) の長期変動. 日本サンゴ礁学会第 18 回大会、慶應義塾大学三田キャンパス(東京都港区)、2015 年 11 月 27 日.

Takeuchi, I., Hirayama, K., Chikamatsu, K., Takayama, K. and Iguchi, A. (2015) Evaluating the color succession of the hard coral, *Acropora tenuis*, using digital color imaging under different light intensities. International Conference on Biodiversity, Ecology and Conservation of Marine Ecosystems 2015 (BECOME 2015), The University of Hong Kong (Hong Kong, China), China, 1 June, 2015.

平山景太・近松建佑・高山弘太郎・井口 亮・竹内一郎 (2014) 光強度の異なる LED 照明下で飼育したウスエダミドリイシ *Acropora tenuis* の体色 (RGB 値) の長期変動. 日本サンゴ礁学会第 17 回大会、高知城ホール・高知会館(高知県高知市)、2014 年 11 月 28 日.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 一郎 (TAKEUCHI, Ichiro)  
愛媛大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：30212020

### (2) 研究分担者

治多 伸介 (HARUTA, Shinsuke)  
愛媛大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：60218659

高橋 真 (TAKAHASHI, Shin)  
愛媛大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：30370266

高山 弘太郎 (TAKAYAMA, Kotaro)  
愛媛大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：40380266

石橋 弘志 (ISHIBASHI, Hiroshi)  
愛媛大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：90403857