

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月22日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02843

研究課題名(和文) 環境変動に伴って増加する造礁サンゴの病変予防技術の基盤研究

研究課題名(英文) Basic biology of the black band disease in corals

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、世界各地でサンゴ病変が拡大しており、サンゴ礁生態系衰退の要因として危惧されている。本研究では、ブラックバンド病(BBD)を対象に、サンゴ病変予防技術確立に必要な生物学的基礎知見を得ることを目的とした。調査の結果、沖永良部島、宮古島、台湾緑島の広域でBBD発症サンゴが確認され、被覆状コモンサンゴの高率罹患が沖縄近海で認められた。沖縄で見られるBBDに関連するシアノバクテリアとして、*Roseofilum reptotaenium*を同定し、他にも数多くの未記載種の存在が確認された。BBDの治癒を促す各種処理を検討した結果、連続暗黒処理が現時点で最も有効な手段である事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Black band disease (BBD) can be defined as a polymicrobial disease of corals whose direct cause is not clear yet. Aiming to find out practical methods to mitigate the disease, we have investigated BBD to understand its basic biology. BBD-infected corals were found in Okinoerabu-jima, Miyako-jima, and Okinawa-jima; they were mostly encrusting *Montipora* corals. In Okinawan BBD corals, a filamentous cyanobacterium *Roseofilum reptotaenium* was identified as a dominant cyanobacterial species. The BBD-infected colonies produced fluorescent micro-particles in the tissues that were recognized as fluorescent bands or rings on corals, a novel observation that can be applied for diagnosis of BBD. Among various treatments tested, a continuous dark condition was found to be the most effective to cure the disease; the BBD symptom completely disappeared with a 9 days dark-treatment. As a possible mechanism for the BBD infection, D-amino acid metabolism was explored with model systems.

研究分野：環境生理学

キーワード：造礁サンゴ サンゴ ブラックバンド病 シアノバクテリア 感染症 環境変動 病変 細菌

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や海水の富栄養化によって海洋環境が悪化し、世界中のサンゴ礁生態系が急速に衰退している。沖縄では、サンゴが病変によって死滅する事例が増加しており、サンゴ礁衰退の新たな脅威となっている。しかし、サンゴの病変に関する学術的基礎知見は少なく、感染性生物が原因かどうかも不確定な病変も多い。そのため、異常個体を手作業で除去する以外に有効な対策がないのが現状である。サンゴ礁生態系は、海洋生物の生産性と生物多様性の維持に必要な基盤であることから、早期の病変原因の究明と予防・治療技術の確立が望まれている。

サンゴ病変の多くは単一の病原性生物によるものではなく、複数の微生物が共存して発症する複数菌感染症 (Polymicrobial Disease) であると考えられている。ブラックバンド病 (BBD, Black Band Disease) は、既知のサンゴ病変の中では比較的研究報告が多く、複数菌感染症であることが認められている数少ない例である。しかし、微生物集合体形成のメカニズムや致死性毒素の実体は確定しておらず、予防・治療技術も確立していない。

2. 研究の目的

本研究では、野外で実行可能なサンゴの病変予防および治療技術を確立することを念頭に、複数菌感染症であることが認められているブラックバンド病 (BBD) の生物学的学術基盤を得ることを目的とした。研究は、感染状況調査、BBD シアノバクテリアの同定、病理学的解析、微生物コンソーシアム成立の要因探究の4つのサブテーマに従って実施した。

(1) BBD の感染状況調査

BBD は、サンゴの致死性感染症でシアノバクテリアを中心とする細菌集合体 (微生物コンソーシアム) で構成されている。日本国内には2000年以降に侵入または発生している。国内における分布状況、罹患しやすいサンゴ種等に関する情報が少なく、BBD に対する実行可能な対処策もないのが現状である。BBD の南北の分布状況を明らかにするとともに、沖縄県瀬底島を中心とした詳細な感染状況の実態把握を行うことを目的とした。

(2) BBD シアノバクテリアの同定

BBD は、様々な細菌・微生物からなるコンソーシアムで構成されている。主たる構成微生物として、黒い色調を与える糸状のシアノバクテリアが知られている。BBD が1973年に発見されて以来、形態観察から *Phormidium* sp. *Oscillatoria* sp., *Geitlerinema* sp. などの既知属の未記載種が報告されている。その後、16S rRNA 遺伝子部分塩基配列に基づく系統解析から、*Pseudoscillatoria coralii* や *Roseofilum reptotaenium* などの未記載属・

未記載種も提案された。現在、BBD シアノバクテリアに関して分類学的な混乱が認められる。そこで、沖縄島や琉球列島から採集された BBD 構成主要シアノバクテリア種を明らかにすることを目的とした。

サンゴ礁域で群体を形成する糸状シアノバクテリアの多くは、ほぼ単一種により構成されている。毒性物質を含め、多くの生理活性物質は特定されており、BBD の解析モデルとして有用である。基礎知見として、サンゴ礁域で見られる肉眼的群体を形成する糸状シアノバクテリアの多様性と分類を明らかにすることを目的とした。

(3) BBD の病理学的解析

過去の野外調査によって、BBD の病変発症には種間差があることが示唆されている。BBD 発症の種間差を明らかにするために、接触感染実験を実施し、感染しやすい種、感染しにくいサンゴ種を明らかにする。あわせて、BBD 感染防止あるいは、治療に有効な手段について様々な手法を試み、効果の試験検証を行う。

BBD に感染すると宿主細胞は死ぬが、細胞内の共生藻 (褐虫藻) に及ぼす影響は不明である。そこで、BBD が褐虫藻に及ぼす影響を調べる。また、サンゴ断片を暗黒下においた場合の BBD の進行を定量化し、シアノバクテリアの動態を蛍光顕微鏡観察によって明らかにする。

(4) 微生物コンソーシアム成立要因探究

BBD は、多種類の微生物の増殖で成立する複数菌感染症の一つだと考えられている。また、嫌氣的微環境の形成と硫化水素 (H_2S) の発生が知られており、主要微生物によるコンソーシアム形成機構の解明が病変の予防と対策の立案に必要である。しかし、一般的な微生物マット (Microbial mat or Biofilm) 形成を含めて、微生物コンソーシアム形成機構に関する学術的知見は限られている。最近、D-アミノ酸が微生物集合体形成の制御因子となることが報告された。ヒトの統合失調症の発症原因として D-アミノ酸代謝の関与が指摘されているものの、一般生物学における D-アミノ酸の生理的機能および生物毒性は不明である。

近年、D-システインに依存した硫化水素発生系が哺乳類で見いだされ、BBD の硫化水素発生に D-アミノ酸が関与している可能性が浮上してきた。サンゴ病変発症メカニズムを解明する基盤研究として、非哺乳類生物モデル系を用いて D-アミノ酸による硫化水素の発生、生理作用および分解系の基礎知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BBD の感染状況調査

BBD の分布状況について、南は台湾の離島 (緑島)、宮古島、沖縄島周辺離島および

1192bp) を得て解析したところ、*Okeania* 属に属することが分かった。*nifH* 遺伝子の解析 (LC296287, 262bp) 結果から、今まで報告されている *Okeania* 属とは配列が異なることが判明し、未記載種であることが明らかとなった。

本研究の実施により、造礁サンゴおよびサンゴ礁生態系に関与する多種多様なシアノバクテリアの未記載種の存在が明らかとなった。

(3) BBD の病理学的解析

健康なサンゴ組織では、茶褐色の褐虫藻が顕微鏡下で観察され、糸状シアノバクテリアは見られなかった。一方、BBD 発症部分では、褐虫藻と糸状シアノバクテリアが同所的に見られ、褐虫藻密度の低下と、赤く縮小した変性褐虫藻が多く観察された (図2)。

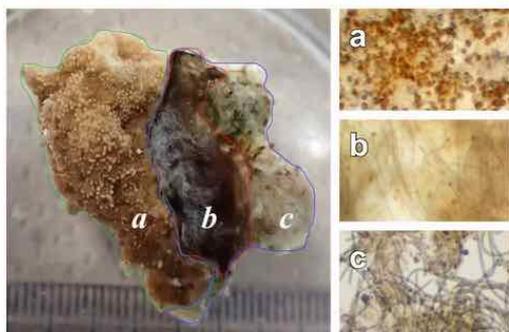


図2. 健全部(a)、BBD病変部(b)、死亡部(c)の顕微鏡写真

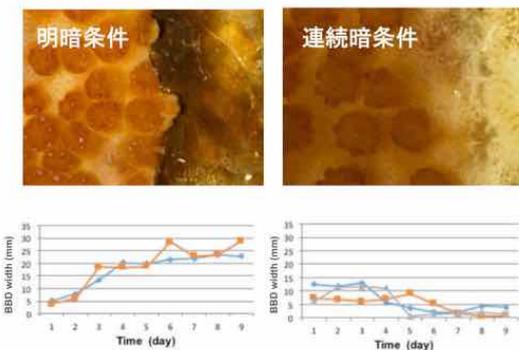


図3. 連続暗黒処理によるBBDの消失

BBD を発症したサンゴを9日間の完全暗黒条件下で飼育した結果、BBD の最大の特徴である黒帯 (ブラックバンド) が消失し、シアノバクテリアからの赤色クロロフィル蛍光も消失することが観察された。暗黒処理後では、糸状シアノバクテリアは完全に消失し、BBD の進行は停止した (図3)。一方、既にBBD の影響を受けた部分は回復が見られず、その後、サンゴ骨格の露出が確認された。

糸状シアノバクテリア消失後は、サンゴ組織の損傷は生じていなかったことから、硫酸還元菌等の細菌が生産する硫化水素がBBD 毒性の本体ではない可能性を示唆しているものと思われる。

接触実験の結果、分類群が離れるヒドロサンゴやアオサンゴとでは全く感染が起こらず、ハマサンゴ等は罹患するもののすぐに消失することが分かった。このことから、BBD に極めて罹患しやすいサンゴ種、罹患するものの途中で消失する種、全く罹患しない種に分けることができ、BBD 感染に明確な種間差が認められることが明らかになった。

BBD に犯された箇所、特徴的な蛍光性物質の出現が認められた。出現する蛍光物質は、毎朝9時頃に形成される。そのため日変動が蛍光物質の蓄積として反映され、サンゴ骨格上に履歴として残ることが今回明らかとなった (図4)。この蛍光は直径10 μ mの球状物質の集合体から発せられ、サンゴ骨格表面を覆う膜の下面に付着、あるいは一部埋没していた。組織染色、元素分析および燃焼分析の結果、膜状物質は多糖類からなるバクテリアルセルロースの可能性が示唆された。蛍光性物質の実体はまだ明らかではないが、感染に伴う化学反応物の蓄積に由来している可能性が高いと思われる。今回の発見は、今後のBBD 病理診断の指標になり得ると考えている。

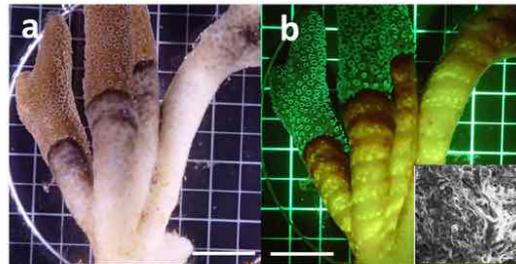


図4. エデモモンサンゴのBBDに見られた日輪性の蛍光帯状パターン

本研究の実施によって、BBD の治療法として連続暗黒条件処理 (約10日間) が有効であることが明らかとなった。野外のBBD 罹患サンゴに黒い板を用いて暗黒処理を施した所、BBD 進行が抑制される事が確認できた。この暗黒条件処理は、BBD の進行を止めるだけでなく、その後の再発も防止する点でも有望な手法である。その他の治療法の開発も試みたが、エアフロス剥離処理、低出力レーザー照射、フコイダン浸漬処理、納豆菌浸漬処理、赤ゴケキラー浸漬処理のどれも有効な結果は得られなかった。現時点では、連続暗黒処理が最も確実なBBD 治療法である。

(4) 微生物コンソーシアム成立要因探究

タマネギ *Allium cepa* の鱗茎無細胞抽出液に、各種アミノ酸を添加して硫化水素の発生を調べた。その結果、L-システインに加えて、その異性体である D-システインおよび非含硫アミノ酸の D-アラニン添加時に硫化水素の発生が見られた。このことから、タマネギには、D-アミノ酸を基質とした未知の硫化水素発生経路が存在することが示唆された。

糸状シアノバクテリアと水性シダの共生体であるアカウキクサ *Azolla pinnata* は、

ストレスを検知して根の基底部分を自切する現象を見せる事が知られている。アカウキクサは、シアノバクテリアを含めた微生物コンソーシアムとの共生体であり、微生物代謝がストレス応答に関与している可能性も指摘されている。根の急速脱離現象を指標として、各種D-アミノ酸応答を検討した。その結果、ヒトの統合失調症発症に関与しているD-セリンに強力な根脱離作用があることが明らかになった。D-セリンの他にも、L-アルギニンとL-システインおよびD-システインにも若干の作用が認められたことから、一酸化窒素(NO)と硫化水素発生の関与が示唆された。

生物作用あるいは毒性を有するD-アミノ酸の制御には、D-アミノ酸を分解するシステムの存在が不可欠である。D-アミノ酸酸化酵素に対する抗精神病薬の効果を確認した。各種抗精神病薬で、D-アミノ酸酸化酵素の阻害効果が確認された。

今回、非哺乳類生物におけるD-アミノ酸に依存した硫化水素発生系の存在、およびD-アミノ酸分解系に対する阻害剤の確認ができたことは、サンゴ病変に対する薬理的治療法開発も可能である事を示唆している。

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11件)

① Das, R.R. and Yamashiro, H. 2018. Corals dominate monofilament in Sesoko Island, Japan. *Current Science*, 査読有, 114, 730.

② Hutabarat, P.U.B., Nguyen, X.H. and Suda, S. 2018. Black band disease-related (BBD) cyanobacterium from Okinawa Corals. *J. Appl. Phycol.* 査読有, 印刷中.

③ Takeuchi, I. and Yamashiro, H. 2017. Large *Porites* microatoll found by aerial survey at Sesoko Island, Okinawa, Japan. *Coral Reefs*, 査読有, 36:1317. DOI 10.1007/s00338-017-1626-1

④ Watanabe, N.S. and Yamasaki, H. 2017. Dynamics of nitrite content in fresh spinach leaves: evidence for nitrite formation caused by microbial nitrate reductase activity. *J. Nutr. Food Sci.* 査読有, 7: 572.
doi: 10.4172/2155-9600.1000572

⑤ Yamasaki, H., Watanabe, N.S., Sakihama, Y. and Cohen, M.F. 2016. An overview of methods in plant NO research: Why do we always need to use multiple methods? *In Plant Nitric Oxide: Methods & Protocol* (Gupta, K.J. Ed.), 査読有, pp. 1-14, Humana Press, Totowa, NJ.
DOI 10.1007/978-1-4939-3600-7_1,

⑥ Yamasaki, H. and Cohen, M.F. 2016.

Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: Gases of primordial Earth linking plant, microbial and animal physiologies. *Nitric Oxide*, 査読有, 55-56, 91-100.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2016.04.002>

⑦ Cohen, M.F., Gurung, S., Birarda, G., Holman, H.-Y.N. and Yamasaki, H. 2015. Bimodal effect of hydrogen peroxide and oxidative events in nitrite-induced rapid root abscission by the water fern *Azolla pinnata*. *Front. Plant Sci.* 査読有, 6:518.
doi: 10.3389/fpls.2015.00518

⑧ 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.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.008>

⑨ Gurung, S., Cohen, M.F. and Yamasaki, H. 2014. Azide-dependent NO emission from the water fern *Azolla pinnata*. *Russ. J. Plant Physiol.*, 査読有, 61, 543-547.
DOI: 10.1134/S1021443714040086

⑩ 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, 血管, 査読有, 37, 107-114.

⑪ Yamasaki, H., Watanabe, N., 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, pp.35-54, Springer, The Netherlands.
DOI 10.1007/978-1-4939-0679-6_3

[学会発表] (計17件)

① Nuryadi, H., Hutabarat, P.U.B., Nguyen, X.H., Teruya, T. and Suda, S. Polyphasic study of macroscopic colony-forming cyanobacteria that are related to produce bioactive secondary metabolites from Okinawa. 日本藻類学会第42回大会, 2018年3月24日-25日, 東北大学, 仙台.

② 竹内一郎, 山城秀之. ドローンによる空撮によって確認された瀬底島沖のハマサンゴの巨大マイクロアトール. 日本サンゴ礁学会第20回大会. 2017年11月23日, 東京工業大学, 東京.

③ Das, R.R., and Yamashiro, H. Coral fragments infected with disease effects larval settlement and survivorship in experimental conditions. 20th JCRS, November 23, 2017.

Tokyo Institute of Technology, Tokyo.

④ 宮城愛夏, 善岡祐輝, 井口 亮, 山城秀之, 酒井一彦, 林正裕, 鈴木淳, 野尻幸宏. 海洋酸性化が付着生物の加入定着に及ぼす影響評価実験. 日本サンゴ礁学会第 20 回大会. 2017 年 11 月 23 日, 東京工業大学, 東京.

⑤ Hutabarat, P.U.B., Nguyen, X.H. and Suda, S. Black band disease-related (BBD) cyanobacterium from Okinawa Corals. 8th Asian Pacific Phycological Forum, October 8-13, 2017, Kuala Lumpur, Malaysia.

⑥ 山城秀之, 竹内一郎. 沖縄県瀬底研究施設前のサンゴ白化状況報告. 日本動物学会第 88 回大会, 2017 年 9 月 21 日-23 日, 富山県民会館, 富山.

⑦ 須田彰一郎, Nguyen, X.H., Hutabarat, P.U.B., Nuryadi, H., 照屋俊明. 新規二次代謝産物を生産する沖縄県糸満市喜屋武岬地先から採集された糸状シアノバクテリアについて. 第 19 回マリンバイオテクノロジー学会, 仙台大会, 6 月 3 日~4 日, 2017, 東北大学, 仙台.

⑧ Nuryadi, H., Sauvage, T, Schmidt, W.E., Fredericq, S. and Suda, S. Diversity assessment of coral endolithic cyanobacteria using *tufA* metabarcoding. 日本藻類学会第 41 回大会, 3 月 24 日~25 日, 2017, 高知大学, 高知.

⑨ Hutabarat, P.U.B., Nguyen, X.H., Nuryadi, H., Teruya, T. and Suda, S. *Okeanina* sp. from the shore region of Kyan, Itoman, Okinawa (Cyanobacteria). 日本藻類学会第 41 回大会, 3 月 24 日~25 日, 2017, 高知大学, 高知.

⑩ Passarelli, C., Loubet, A., Hubas, C., Harii, S., and Yamashiro, H. Composition of microphyto-benthic biofilms in coral reefs and consequences on coral recruitment. British Phycological Society Meeting, January 11-13, 2017, Bangor, UK.

⑪ Yamashiro, H. Fluorescent daily banding on the surface of diseased coral. 22nd International Congress of Zoology. November 17, 2016, Okinawa Convention Center, Japan.

⑫ Yamashiro, H. Daily fluorescent band formed under Black Band Disease. 13th International Coral Reef Symposium. June 24, 2016, Hawaii Intern Convention Center, USA.

⑬ Watanabe, N.S. and Yamasaki, H. Dynamics of nitrite content in fresh spinach leaves, 9th International congress on biology, chemistry and therapeutic applications of nitric oxide, May

20-22, 2016, Sendai International Center, Sendai, Japan.

⑭ Yamasaki, H. ONS biology for bridging the gaps, 9th International congress on biology, chemistry and therapeutic applications of nitric oxide, May 20-22, 2016, Sendai International Center, Sendai, Japan.

⑮ Hutabarat, P.U.B., Nguyen, X.H. and Suda, S. Characterization of Black Band Disease (BBD) related cyanobacteria from Okinawa. 日本藻類学会第 40 回大会, 3 月 19 日~20 日, 2016, 日本歯科大学, 東京.

⑯ Karim W., 日高道雄. 褐虫藻の突然変異によるサンゴ-褐虫藻共生体の環境適応の可能性を探る試み. 日本サンゴ礁学会第 18 回大会, 2015 年 11 月 26 日-29 日, 慶応義塾大学, 東京.

⑰ Nguyen, X.H. and Suda, S. Taxonomy and molecular phylogeny of coral disease-related cyanobacteria from Okinawa, Japan. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science in the East China Sea, November 1, 2015, Jeju National University, Korea.

[図書] (計 1 件)

山城秀之, 成山堂, サンゴ-知られざる世界-. 2016 年, 165pp. ISBN-10:4425830717.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

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: 4 0 2 2 2 3 6 9

(2) 研究分担者

山城 秀之 (YAMASHIRO, Hideyuki)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号: 8 0 3 4 1 6 7 6

(3) 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: 0 0 3 5 9 9 8 6

(4) 研究分担者

日高 道雄 (HIDAKA, Michio)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号: 0 0 1 2 8 4 9 8