

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03852

研究課題名(和文) 白化した有藻性イシサンゴの回復過程で生じる褐虫藻獲得に関する細胞応答機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cell response mechanism during recovery process of bleached corals

研究代表者

久保田 賢 (Kubota, Satoshi)

高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・教授

研究者番号：00314980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くの海洋生物の育成基盤として機能しているサンゴ礁を構成している有藻性イシサンゴの白化および回復過程に生じる細胞応答反応を解明する上で、自然環境に近い条件での白化や回復の過程を再現した水槽飼育条件を見出した。また、有藻性サンゴ細胞に加え生理的維持の役割を果たす可能性のある細菌のうち放線菌を対象として菌叢を調べ、4属16種の存在を見出した。また、自然環境に近い条件での白化および回復過程の群体を用いたトランスクリプトーム解析により、発現解析を可能とする十分なコンティグを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球規模の環境変動によりたびたび生じる造礁サンゴの白化は、海洋生態系の維持を脅かすことから、その解明が求められてきた。造礁サンゴを構成する有藻性イシサンゴの生物学的性質や施設面等の問題から、短期間のストレス実験は多く行われてきたが、自然環境のそれとはかけ離れてるという問題が付きまとっていた。本研究では自然環境を模した水槽実験には、少なくとも3ヶ月を要することを示すとともに、白化および回復過程に生じる細胞応答を解明する基盤を形成することができた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the cell response reaction under conditions close to the natural environment, bleaching and recovery of scleractinian corals composing coral reefs which contribute to support marine ecosystem. In this study, we found appropriate conditions for breeding and recovering by aquarium tank experiments. There were 4 genus and 16 species of actinomycetes which may play a physiological role of scleractinian holobiont system. In addition, we succeeded in obtaining sufficient contigs for expression analysis by transcriptome analysis using colonies in the bleaching and recovery process under conditions close to the natural environment.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：有藻性サンゴ 白化 回復 細胞応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 1998年に生じた世界的な有藻性イシサンゴの白化現象の発生により、地球規模の環境変動の海洋生態系に及ぼす脅威について、広く認識されるようになった。主に有藻性イシサンゴにより構築されるサンゴ礁は多くの海洋生物の育成基盤として機能していることが知られている。

(2) 炭素骨格でできた有藻性イシサンゴ表面には、動物であるサンゴ細胞により構成されるポリプと呼ばれる軟組織が無数に存在している。また、そのポリプから延びる触手の内側の胃層にのみ微細藻類である褐虫藻が共生している。この褐虫藻の離脱による退色が白化現象であり、生存に必要な多くの栄養分を褐虫藻の光合成産物の供給に依存しているため、有藻性サンゴの生存を脅かす生理状態を招く。回復時には褐虫藻の選択的取込と同時に細菌の感染を防御したり、取込後の褐虫藻の安定化を図ったりする必要があると推測される。また、細菌は軟組織表面の付着や共生に加え、炭素骨格内にも局在しており、サンゴ群体内に存在するサンゴ、褐虫藻および細菌の集合体(“holobiont”と呼ばれる)の生理的維持の役割も果たしていると考えられている。

(3) 有藻性イシサンゴの白化について、短期間の高水温暴露条件下では褐虫藻が減少するものの、海水温の低下に伴い再度増加して回復する場合もある。しかしながら、高水温ストレス条件が持続することにより、エネルギー供給の不足などの理由で衰弱し、成長あるいは繁殖が困難になり、最終的には死に至る。群体を形成している有藻性イシサンゴの多くが死に至ることにより、サンゴ礁の骨格の形成が停止し、最終的には崩壊をもたらすことになる。有藻性イシサンゴの死滅とそれに伴うサンゴ礁の崩壊は沿岸地形の崩壊や漁業資源の減少をもたらすことから、海洋保護区の設定等の社会基盤整備の検討、オニヒトデ除去や稚サンゴ移植等の保全活動とともに、それらの推進に欠かせない多様な基礎研究等が活発に推進されてきたが、いまだに抑制や回復をもたらす決定的な打開策を見出すには至っていない。

(4) 海水温の上昇や海洋酸性化といった褐虫藻の喪失を招くような環境ストレスを受けた場合、褐虫藻が共生する胃層細胞では、ネクローシスとアポトーシスの両方が観察されている。これらはいずれも、有藻性イシサンゴ細胞が危険回避のために起こした細胞応答の結果と思われる。一方、白化からの回復時には、健全な生育に最適な褐虫藻を積極的かつ選択的に取り込むと予想される。また、細菌感染を避ける生体防御機構も同時に働いていると思われる。したがって、白化からの回復時の胃層細胞周辺の微細環境で生じる生物現象の解明が急務である。そのためには、有藻性イシサンゴ細胞に加え、褐虫藻や細菌の動態を合わせて追跡する必要がある。

(5) 飼育水温を短期間で上昇させて白化を模した急性ストレス下での応答反応については、多くの研究例が報告されている。一方、観察に長期間を有すること、温度や照射光の厳密な調整が可能な実験条件の設定や対照条件下ですら長期の飼育で健康状態を維持することが容易でないことなどから、最終的に回復をもたらす緩やかな条件での温度上昇および低下による長期の観察報告は非常に限定的である。

(6) 本研究の対象海域とした高知県西南部の幡多郡大月町は、100種類を超える有藻性サンゴの生息が確認されており、温帯域で有藻性サンゴの多様性が高い海域の一つである。近年ではこの海域でも白化現象が観察されるが、大規模白化が認められる熱帯域とは異なり、約2ヶ月で回復する(図1)。理由として高水温が8月-9月上旬に限られることや9月以降速やかに海水温が低下することが挙げられる。著しい回復を示すため、回復のモニタリングに適している。

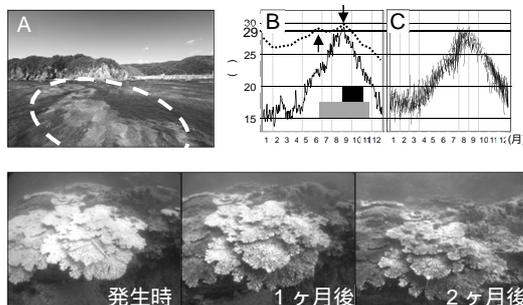


図1. 温帯域(高知県大月町)における有藻性イシサンゴの白化とその回復

- A: 高知県大月町海域で発生した有藻性イシサンゴの白化  
海上からでも容易に認識できる(白楕円内)
- B: 2010年の海水温(高知県大月町西泊、水深5m)の年間変化  
9月上旬に29℃を超える日が8日間持続し(下向矢印)、その3日後に白化し、約2ヶ月後に回復した(白化期間を黒四角で示した)。点線はカリブ海の海水温変化(Pinzon *et al.*, 2015)。6月半ばの高水温(29℃以上)で白化した(上向矢印)、5ヶ月間白化が持続した(灰色四角)。
- C: 高知県大月町における2001年-2010年の海水温の年間変化  
6月以前に29℃に達することはなく、9月下旬以降の海水温低下も早い。
- D: 2010年9月上旬に発生した白化の回復  
1ヶ月後には褐虫藻による着色が認められ、2ヶ月でおおむね回復している

### 2. 研究の目的

本研究では、白化が短期間で回復する温帯域の特徴に加え、自然環境下で生じる白化や回復過程を再現するのに適した調査・研究環境を最大限に活かし、高知県大月町で採取されるクシハダミドリイシ *Acropora hyacinthus* およびハナヤサイサンゴ *Pocillopora damicornis* の水槽飼育下での白化および回復過程を再現することを目的とした。その飼育条件下での光合成活性の変動、放線菌叢の解析および細胞応答を知るためトランスクリプトーム解析を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 高知県大月町西泊 (32.778 N 132.732 E) で多くの群体の生息が確認される *Acropora hyacinthus* および *Pocillopora damicornis* を主な対象種とした, 水温が概ね 20 以下となる冬季は避け, 少なくとも飼育開始 1 週間前までに採取し, くみ上げた自然海水によるかけ流し飼育が可能な, 室内に設置した水槽 (1,080mm × 1,640mm × 300mm) で事前馴化飼育を行なった (水温: 22 ~ 25)。馴化水槽内で長さ 3, 4cm 程度の長さに枝を切断し, 水中での使用が可能なエポキシ樹脂を用いて 1.5cm 角のタイルに固定し, さらに 1 週間程度事前馴化と同じ条件で飼育した。タイルに固定した枝を 420mm × 420mm × 300mm の水槽 10 個に移し, 26 でさらに 1 週間馴化飼育を行なった (換水率: 約 1%/時)。

(2) 馴化飼育後の有藻性サンゴ水槽の水温を 0.5 ~ 2.0 /日 で上昇させ, 温度ストレスを与え, 1 週間 ~ 7 週間高温状態を保った。その後 26 に戻して白化からの回復を行ない, 目視および PAM (Pulse-Amplitude-Modulation) を用いたクロロフィル蛍光測定を行ない, 緩やかな白化や回復を再現できる飼育条件の検討を行なった。飼育に用いた 10 水槽は, 浄化水槽, 送水ポンプや波長可変型 LED 光照射装置等をそれぞれ備えた 2 系統に分かれていることから, 1 系統を対照群とし, 26 の馴化飼育条件で維持した。

(3) *Acropora hyacinthus* および *Pocillopora damicornis* を含む 3 属 6 種の有藻性イシサンゴから放線菌を分離した。有藻性イシサンゴの試料を採取時と同じロットの濾過海水に入れ, 温度を維持したまま, 高知市内の実験室に持ち帰り, 収集から 1 週間以内に実験を行なった。0.5 ~ 1 cm の大きさに切断後, 各有藻性イシサンゴ片の表面を滅菌海水で十分に洗浄し, グライNDER を用いて粉碎した。得られたスラリーを放線菌選択培地にプレーティングし, 好氣的条件下, 28 で培養した。放線菌のような色や形状を示したコロニーを選択し, 新鮮な培地に移し, さらに培養した。細菌の同定のために, コロニー-PCR とサンガーシーケンスを使用して 16S リボソーム RNA 遺伝子解析を行なった。

(4) トランスクリプトーム解析は *Acropora hyacinthus* および *Pocillopora damicornis* を用いて, 馴化飼育前後, 白化後および回復後の枝から Trizol Reagent (Sigma Aldrich) により抽出した総 RNA 試料を用いて実施した。BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いた RNA のクオリティチェック後, cDNA 調製, ランダムフラグメント化およびそれに続く 5' および 3' アダプターライゲーションによってライブラリー構築を行なった。ライゲーション反応によりアダプター付加後, フラグメントを PCR 増幅し, 配列分析を行なった。

### 4. 研究成果

(1) 短期間の温度上昇条件下では, 効果的に白化した有藻性イシサンゴ個体を得ることが可能な一方で, 多くの枝が死に至った (図 2)。このことから, 自然環境を模した回復条件を再現するためには, 緩やかな白化条件の最適化が不可欠であることが明らかとなった。そこで, 長期間の培養において, 対照群と比較して白化実験群で死滅に至らない程度で適度な白化を示す日数について検討した (図 3)。馴化条件に対して +3 の温度上昇により, 約 3 週間後から対照群との差が認められた。約 5 週間後からの緩やかに更なる温度上昇により, ほぼすべての群体で当初の未白化状態と比較して色の薄い群体へと変化した。その後の回復過程では, 2 割以上の群体が死滅した一方で, 5 週間後には元の未白化状態に戻る群体も 2 割観察された。一方, 対照群の試料に着目すると, 約 2 ヶ月経過後, 約 3 割の群体について退色が確認された。以上の結果から, 自然条件を模した白化および回復の再現には, かなりの日数を要するため, 事前馴化時間も考慮すると, 1 シリーズの飼育で最低 3 ヶ月以上の期間が必要であることが明となった。なお, 海水温が 3 程度低い時期に同種の有藻性イシサンゴを用いた場合, 退色が認められる期間が短縮されたことから, 白化および回復のさらなる最適化の必要がある可能性も示された。

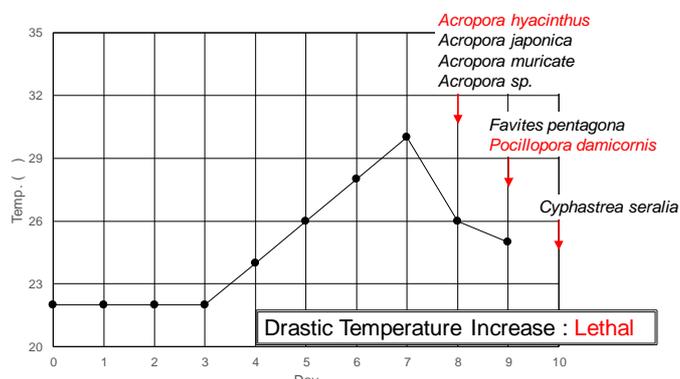


図 2. 短期間の温度上昇による各種有藻性イシサンゴの死滅日数  
7 種の有藻性イシサンゴを採取時の自然環境 (22) で馴化後, 2 /日 で温度上昇させた結果, 4 種は 5 日後に, 2 種は 6 日後に, 1 種は 7 日後にすべて死滅した。

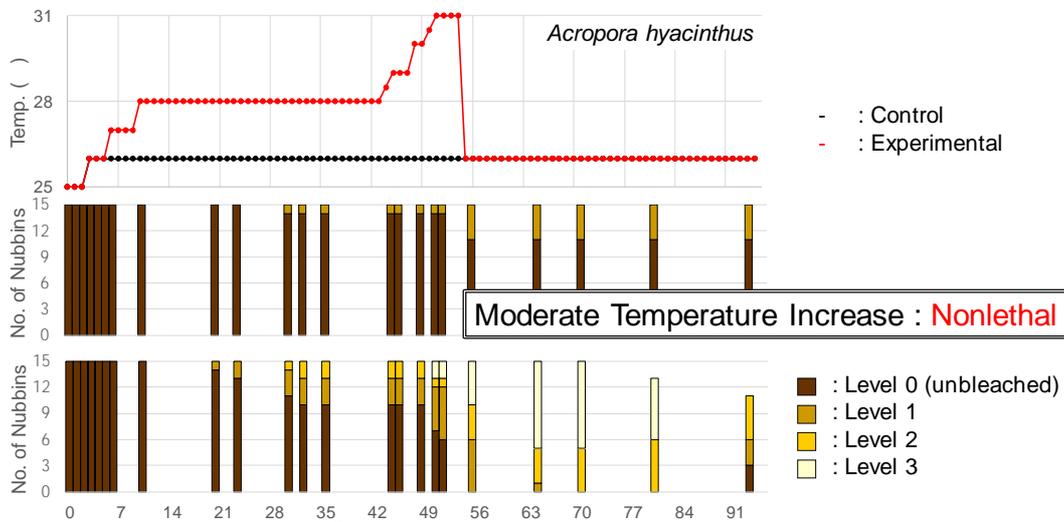


図3. 長期間の温度上昇による *Acropora hyacinthus* の変化

。馴化後約1週間で28℃まで段階的に水温を上昇させた後、6週間後から約10日間で31℃までさらに上昇させた。その後は26℃に戻し一部の群体の色が回復するまで5週間以上飼育を継続した。

(2) 全体として、16種の放線菌株が4種のサンゴから分離された。ほとんどの菌株は *Mycobacterium* 属に属し(81.25%)、続いて *Pseudonocardia*, *Rhodococcus* および *Gordonia* 属の3種の菌株がそれぞれ各6.25%を占めていた。放線菌の存在が確認できた4種全ての有藻性イシサンゴで *Mycobacterium* 属の放線菌が確認されたことから、細菌-サンゴの共生の基本的役割を果たしている可能性が予想された。

(3) トランスクリプトーム解析のために調製した総RNA試料のクオリティチェックの結果、RIN(RNA Integrity Number)値は、概ね8~9.6と比較的高い値を示すとともに、明確なリボソームRNAのバンド(28Sおよび18S)が検出されたが、全ての試料で100bp以下のサイズにピークが観察された。*Acropora hyacinthus* については、10実験群合計で約494億塩基対、*Pocillopora damicornis* では537億塩基対のデータが得られた。100bpに満たない解析結果を除いた解析対象の塩基対は、それぞれ98.5%~99.1%および98.2%~99.0%であった。両種ともコンティグ数は25万以上を示したが、1,000bpでのフィルタリングで6万~7万へと減少した。*Pocillopora damicornis* については公開済みのトランスクリプトームデータを参照配列としてコンティグを構築したが、*Acropora hyacinthus* については、利用可能なゲノムおよびトランスクリプトームの公開データが見当たらなかったことから、同属の *Acropora millepora* のトランスクリプトームデータを参照した。また、褐虫藻については *Symbiodinium microadriaticum* のものを用いた。両種それぞれの有藻性イシサンゴの参照配列に対して相同性を示したコンティグは9万以上を示したものの、褐虫藻のそれに対しては約1,100~1,700と少ない種類に留まった。*Acropora hyacinthus* および *Acropora hyacinthus* それぞれのコンティグ長の最大値は39,289および35,334、中央値は2,785および3,000を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Satoshi Kubota
2. 発表標題 Occurrence of multiple clades of zooxanthellae in scleractinian coral in Kochi, Japan
3. 学会等名 BARMan Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Kubota
2. 発表標題 Recent coral research projects in Kochi University, Japan
3. 学会等名 BatStateU forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kubota
2. 発表標題 DNA, RNA and Protein analysis as effective tool for marine organisms
3. 学会等名 Lecture series of Bicol university (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dana Ulanova, Takuma Mezaki, Satoshi Kubota
2. 発表標題 Culture-dependent study on actinobacteria associated with stony corals in Kochi
3. 学会等名 第34回日本放線菌学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Kubota, Dan Anthony Bataan, Takuma Mezaki, Shshank Keshavmurthy
2. 発表標題 Physiological Responses of Bleaching and Recovering Scleractinian Corals, Acropora hyacinthus and Pocillopora damicornis under aquarium condition
3. 学会等名 13th Kuroshio Science International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Kubota, Dan Anthony Bataan, Takuma Mezaki, Shshank Keshavmurthy
2. 発表標題 Physiological Responses of Bleaching and Recovering Scleractinian Corals under aquarium condition
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	目崎 拓真 (Mezaki Takuma) (20840482)	公益財団法人黒潮生物研究所・研究部局・研究所長  (86404)	
研究分担者	富永 明 (Tominaga Akira) (50172193)	高知大学・その他部局等(名誉教授)・名誉教授  (16401)	
研究分担者	関田 諭子 (Sekida Satoko) (70314979)	高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・准教授  (16401)	

## 6. 研究組織(つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	U l a n o v a D a n a  (Ulanova Dana)  (70610129)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・助教    (16401)	
研究分担者	櫻井 哲也  (Sakurai Tetsuya)  (90415167)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授    (16401)	