

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19879

研究課題名（和文）ベイルアウトしたポリブを起点とするサンゴの超高効率増殖

研究課題名（英文）Ultra-high efficient proliferation of corals starting from bailed-out polyps

研究代表者

上田 正人（Ueda, Masato）

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：40362660

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：サンゴ断片を浸漬した人工海水の塩分濃度を所定のプロファイルに沿って制御することで環境ストレスを与え、ポリブのベイルアウトを人工的に誘発する手法を開発した。純Ti板では、表面が粗くなるほど、早期に基盤密着する傾向が認められた。さらに陽極酸化処理を施すとその密着は早期化した。また、ホウ珪酸ガラス表面においても単離ポリブの早期密着、骨格形成が観察できた。QCM法を利用することで、ポリブやプランナが基盤に密着する様子を定量的に捉えることもできた。数cmのサンゴ断片から200-300個以上のポリブが採取できることから、高効率でサンゴの増殖起点をつくりだす新規な手法を提案することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴにおいて効果的な増殖手法を見出すには、地道な正攻法では歯が立たない。従来の延長線上にない革新的な切り口が必要である。本研究では、研究が飛躍的に進んでいる再生医療の知見やテクニックをサンゴの増殖に利用した。具体的には、脊椎動物の骨再生の原理・手法をサンゴの増殖に転用・活用した。その結果、非常に効率的なサンゴ増殖方法を提案できた。さらに、一見、異分野に見えるものが包括的に理解できた。また、これらの知見は、将来的に骨関連分野へ新たな知見を提案できると考えている。本研究で確立したポリブの人工的な単離とチタンへの固定方法は、特殊な装置や薬品を使用しないことから、世界中のあらゆる場所で実施できる。

研究成果の概要（英文）：A method was developed to artificially induce polyp bailout by controlling the salinity of seawater with a predetermined profile, which induces environmental stress on corals. On pure Ti plates, the rougher the surface, the earlier the polyps adhere to the substrates was observed. Furthermore, anodic oxidation treatment accelerated the adhesion. The QCM method was also used to quantitatively capture the adhesion of polyps and planulae to the substrates. More than 200-300 polyps could be collected from a coral fragment, suggesting a novel method to create a highly efficient coral propagation starting point.

研究分野：材料物性

キーワード：ポリブ ストレス忌避反応 チタン

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁は地球表面の 0.1%の面積を占めるに過ぎないが、9 万種類もの多様な生物が生息し、人類を含めた多くの生物に多大な恩恵を与えている。近年、急激な気候変動などにより、サンゴ礁は破滅的な状況に曝されており、世界のサンゴ礁の 3 分の 1 が絶滅の危機にある。従来、サンゴ礁の保全は、天敵であるオニヒトデの駆除、陸域からの赤土流入の削減など、対症療法的な方法で行われてきたが、近年は、サンゴの破片を海底に固定し、増殖させる方法 (断片移植)、サンゴを固定した基盤に陸地から直流電流を通電することでサンゴの成長を促進する方法など、積極的な増殖方法も試行されている。しかし、いずれも画期的な成果は得られていない。したがって、新規な観点から、新規な原理に基づく、サンゴ礁の新規な再生手法を探索・提案・確立することは、喫緊の課題である。

再生医療分野では、基礎から応用まで詳細かつ多彩な研究が多数報告されている。生体内の患部に細胞を注入したり、培養した細胞シートを貼付したり、組織から単離した細胞の利用は、医療にパラダイムシフトをもたらせた。我々は、既に確立されている骨形成・再生手法をサンゴの増殖に転用する研究を進めている中、ポリプ (サンゴの軟組織) のストレス忌避反応に出会った。水温上昇など周囲の環境が悪化すると、そのストレスにより、ポリプが骨格から剥離・脱離する現象である [O.H. Shapiro, Nature Communications, DOI: 10.1038/ncomms10860.]。白化の原因である褐虫藻の放出と同様、ネガティブな現象であるため、それをサンゴ礁再生に利用する発想はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス忌避反応を人工的に誘発し、サンゴ片から採取したポリプを起点にサンゴを増殖する新奇な手法を確立することを目的とした。具体的には、(1) ポリプの高効率単離を実現する環境ストレスの適正条件、(2) ポリプの単離挙動に及ぼす骨格微細構造の影響、(3) ポリプの人工培養技術について系統的に調査した。いずれも QCM (Quartz Crystal Microbalance; 水晶振動子マイクロバランス) や μ CT (Computed Tomography; コンピュータ断層撮影) など、再生医療やバイオマテリアル研究で利用される装置や技術を駆使し、可能な限り定量的に評価した。さらに、骨とサンゴの骨格形成において、酷似している点、似て非なる点を系統的に整理することで、骨関連分野にサンゴ研究の知見をフィードバックし、アナロジーに着目した協奏的な研究・開発の実施例ならびに優位性を示すことも目的の一つとした。

3. 研究の方法

(1) ポリプの単離と骨格微細構造

様々な種類のサンゴ片に塩分濃度変化に由来する環境ストレスを与え (図 1)、ポリプのベイルアウトの有無、単離までの時間などを系統的に調査した。また、マイクロフォーカス CT [inspeXio SMX-90CT Plus] により微細構造を観察し、ポリプの単離現象、その難易と関連付けた。

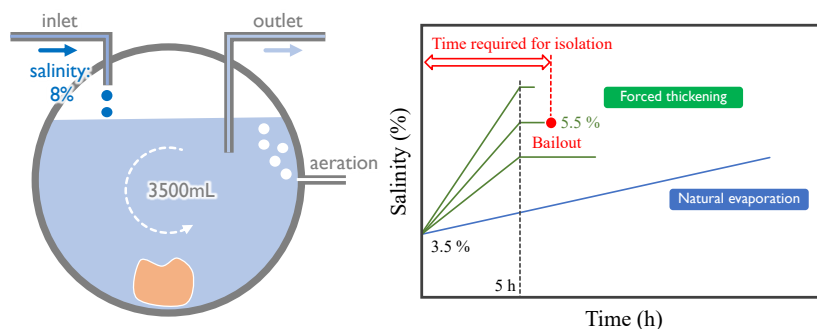


図 1 塩分濃度調整によるポリプベイルアウトの人工的な誘発

(2) ポリプの基盤接着

環境ストレスの付与により単離されたポリプを様々な基盤に播種し、接着挙動を観察した。細胞接着の促進効果が認められる Ti や TiO_2 から着手し、ポリプが接着しやすい表面の条件を整理した。ポリプやプラヌラを播種した基盤表面近傍で生じる現象を QCM [QCM922A] で定量的に捉えることにも挑戦した。

(3) ポリプの基盤密着に及ぼす外場の影響

ポリプの基盤接着性に及ぼす微弱電流通電や水流の影響を系統的に調査した。実験の一部は鹿児島県の与論島における茶花漁港沿岸の海底で行った。

(4) ポリプの基盤密着強さの評価

ドーナツ状水槽に水中ポンプを用いて水平方向の水流を発生させ、ポリプが密着したサンプルを水流内に設置した。デジタルマイクロスコープで上方から観察し、ポリプが基盤から剥離するまでの時間を計測した。

4. 研究成果

(1) ポリプの単離と骨格微細構造

ハナヤサイサンゴの断片を浸漬した人工海水の塩分濃度を所定のプロファイルに沿って上昇させることで環境ストレスを与え、ポリプのベイルアウトを誘発した。3.5%から5.5%に5hで上昇させた場合、最も早く、かつ活発な単離ポリプを得ることができた(図2)。一方、塩分濃度を低下させるとベイルアウトは誘発できなかった。なお、この比較は同じ個体から切断した断片で行った。また、異なる個体のハナヤサイサンゴに対して同じ塩分濃度上昇によるストレスを与え、ベイルアウト誘発に要する時間を比較した。CTにより微細構造を観察し、ポリプベイルアウトの難易と関連付けた。Corallite 間の距離が短く、開口径が大きくなるほどベイルアウトに要する時間が短くなる傾向が認められた。

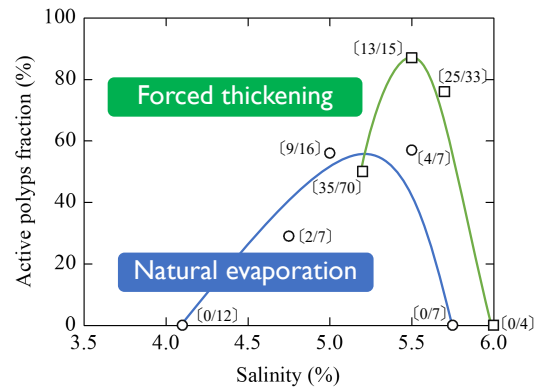


図2 自然蒸発法と強制濃化法における最終到達塩分濃度と活発な単離ポリプの割合

(2) ポリプの基盤接着

塩分濃度上昇を利用した環境ストレスを付与することで単離されたポリプを各種基盤に播種し、基盤密着挙動を観察した。まず、サンドブラスト処理(メディアサイズ: #24; 600~850 μm, #36; 425~600 μm, #46; 300~425 μm)により表面粗さを変化させた純Ti板(算術平均粗さ Ra: #24; 6.4 μm, #36; 3.3 μm, #46; 3.0 μm, w/o blast; 0.6 μm)(図3)にポリプを播種した。所定の時間経過後、基盤に密着していたポリプの割合の経時変化を図4に示す。なお、基盤をタッピングしてもポリプが移動しない場合、密着していると判断した。純Tiでは、粗くなるほど、早期に基盤密着する傾向が認められた。さらに陽極酸化処理を施すと純Tiに比べその密着は1h程度早期化した。水酸基密度が上昇したことに起因すると考えている。

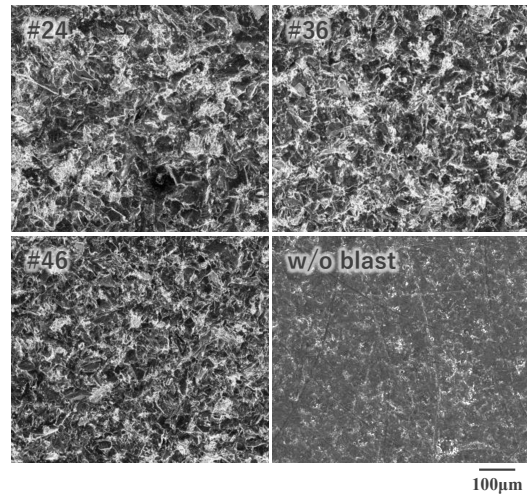


図3 サンドブラスト処理した純Ti表面

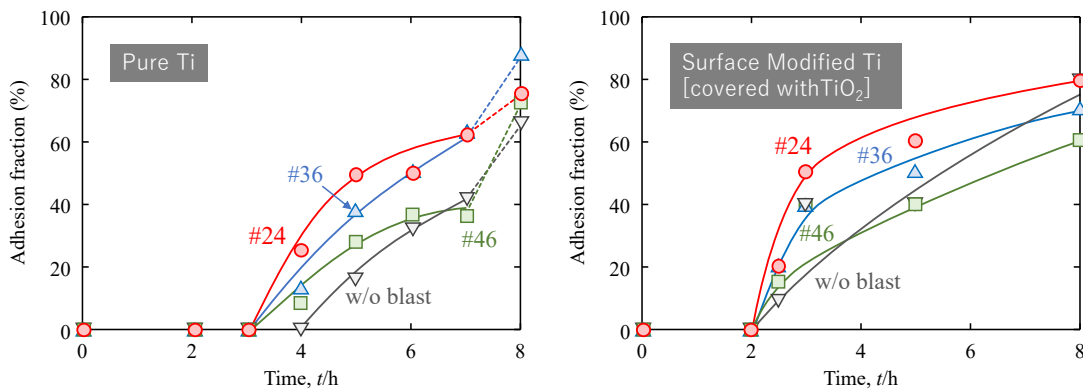


図4 サンドブラストした純Tiにおける単離ポリプの密着数変化とそれに及ぼす陽極酸化の影響

アザミサンゴから Corallite とポリプを切断し、ホウ珪酸ガラスに固定した (図 5)。海水の pH とホウ珪酸ガラスの等電点から、その表面は負に帯電し、TiO₂ と同様、ポリプの密着に適していると考えられる。ポリプは基盤表面へ旺盛に拡張し、無性生殖も確認された。また、ポリプ直下では骨格形成が始まり、莖壁も観察された。

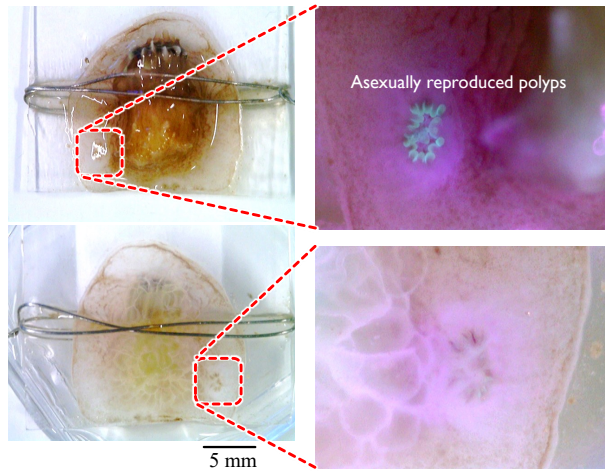


図 5 ホウ珪酸ガラスに固定したアザミサンゴ断片;上方・下方からの観察により確認される無性生殖と骨格形成

次に QCM 法を利用し、ポリプ、プラヌラの基盤密着過程のその場観察に挑戦した。共振周波数 (F) の減少・増加は表面付着物の質量増加・減少、共振抵抗 (R) の増加・減少は表面近傍の粘性増加・減少を示唆する。

TiO₂ を成膜した ITO 電極水晶振動子に単離したポリプを播種し、 F と R の経時変化を追跡した。播種 20 h 後に質量増加が、少し遅れて粘性増加が観察された。これはポリプの密着、拡張を反映していると考えている。Ti の表面修飾材に比べポリプの密着が遅いのは、表面水酸基密度が低かったことに起因する。図 6 は、TiO₂ を成膜した ITO 電極水晶振動子にプラヌラを 1 個体、5 個体播種した後の F 変化量 (播種直後を基準)、ならびに底面から観察したプラヌラを示す。播種したプラヌラが 1 個の場合、 $t=200$ ks 付近より、 F に明瞭な減少が観察された。一方、5 個の場合、 $t=50$ ks 付近から、 F に多段階の減少が観察された。 $t=320$ ks 付近における播種直後からの F 変化量は、プラヌラ 1 個体に対して 5 個体の場合、約 3.3 倍となった。水晶振動子底部から観察されるプラヌラにおいて、3 個体は大きく軟組織を拡張している様子が窺える。これらの結果は、この F 変化量がプラヌラの基盤密着に依存し、定量評価が可能であることを示唆している。

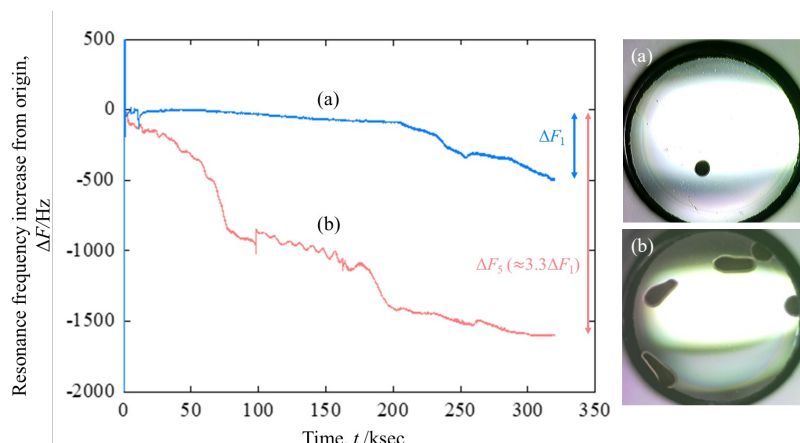


図 6 TiO₂ を成膜した ITO 電極水晶振動子にプラヌラを 1 個体、5 個体播種した後の F 変化量、ならびに底面から観察したプラヌラ

(3) ポリプの基盤密着に及ぼす外場の影響

単離ポリプを播種後、静置すると 2.5-3 h 程度から弱い基盤密着が始まる。さらに触手を伸ばすことができるまでには 24~48 h 程度必要であることがわかった。チタン基盤にポリプを播種

し、水槽中で3h 静置した後、水深5m 程度の海底（鹿児島県与論島茶花漁港沿岸）に設置した。約24h 後には剥離していたので、単離ポリプの基盤固定段階で水流を負荷することは好ましくないと判断した。なお、穏やかな海況での水流（往復）は最大30mm/s 程度であり、それは人がその流れを感じるできない程度である。

アザミサンゴのポリプと骨格莖部分を純チタン板に固定し、約1ヶ月水槽中で飼育することでポリプを板表面に拡張させた（図7(a)）。電圧1Vを負荷すると60min 後からポリプの収縮が始まった（図7(b)）。従来の塩分濃度調整によるポリプ単離が困難な種類においても、ベイルアウトを誘発できる可能性が示唆された。ポリプが収まっている莖状のcoralliteの深さ、直径が大きくなるほど、またそれらの間隔が狭くなるほど、塩分濃度上昇によるポリプベイルアウトが誘発されやすい傾向が認められた。同手法の適用が難しい種類においても、チタンと電圧印加を利用すれば、ポリプを単離できる可能性が高い。バラエティに富んだサンゴ種に対して、ポリプを起点としたサンゴ増殖が適用可能であることを示すことができた。一方、この結果から、電圧印加はポリプの基盤密着を促進できる可能性は低く、非常に狭いウィンドウになることが示唆している。

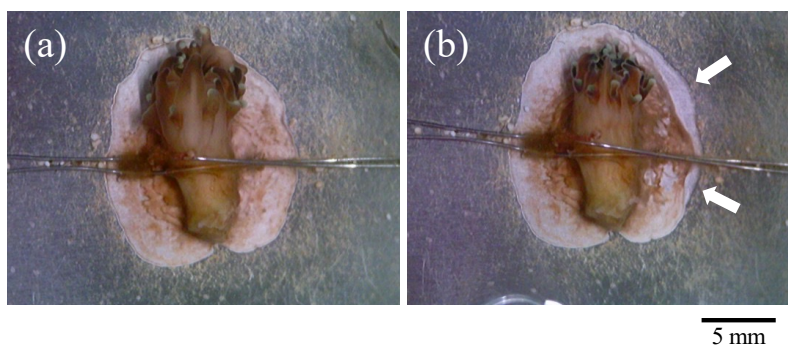


図7アザミサンゴのポリプと骨格莖部分を純Ti 基盤に固定し30 days 経過後、1Vの電圧負荷前後のポリプの形態；(a) 負荷前、(b) 60 min 負荷後

(4) ポリプの基盤密着強さの評価

ポリプの基盤密着性を評価するため、約60-170mm/sの一方向の水流をサンプルに与える装置を構築した。純チタン基盤にポリプを播種し、48h以上静置した後、約120mm/sの一方向水流を与えたところ60min程度、密着状態を維持できた。

(5) 総括

- ① サンゴ断片を浸漬した人工海水の塩分濃度を所定のプロファイルに沿って制御することで環境ストレスを与え、ポリプのベイルアウトを人工的に誘発する手法を開発できた。数cmのサンゴ断片から200-300個以上のポリプが採取できた。特殊な装置や酵素などの化学薬品が不要であることから、非常に汎用性が高い方法と考えている。将来、離島などでサンゴ礁再生を実施する際にも利用価値が高い。
- ② 現時点ではCorallite（ポリプの住処）の深いサンゴ種において、塩分濃度制御によるベイルアウト誘発法が確立できていない。電圧負荷と併用することでポリプを単離できる可能性はあるので、今後、ベイルアウト条件を最適化する必要がある。
- ③ 単離ポリプの固定基盤としてはチタンが有力であることを確認できた。サンドブラストで粗面化するとその基盤密着を早期化できた。さらに陽極酸化で酸化チタンをコーティングすると、さらにその密着は早期化できた。ホウ珪酸ガラス表面にもポリプが旺盛に拡張したことから、サンゴ軟組織の密着には表面水酸基が強く影響していることが推察された。
- ④ QCM法を利用することで、ポリプやプラヌラが基盤に密着する様子を定量的に捉えることができた。

環境ストレスによるポリプのベイルアウトとその単離ポリプのチタン・酸化チタンへの固定を利用すれば、高効率でサンゴの増殖起点をつくりだすことが可能であることを実験的に示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 上田正人
2. 発表標題 再生医療の発想とチタンを利用したサンゴの高効率増殖
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田正人
2. 発表標題 チタン表面におけるサンゴの石灰化
3. 学会等名 日本金属学会学会第174回講演大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 上田正人
2. 発表標題 再生医療技術を利用した海洋保全・カーボンニュートラル
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 上坂菜々子, 上田正人
2. 発表標題 チタン不織布におけるポリブ密着プロセスのin-situ観察
3. 学会等名 日本金属学会2022年秋期（第171回）講演大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上坂菜々子, 吉本瑞輝, 上田正人
2. 発表標題 ポリブを包持したCoralliteとチタン界面の骨格形成
3. 学会等名 日本金属学会2023年春季(第172回)講演大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nanako Kosaka, Tomoyuki Takahashi, Masato Ueda
2. 発表標題 Artificial Bailout of Polyps and their Immobilisation on Titanium Substrates
3. 学会等名 2022 ACRS Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masato Ueda, Nanako Kosaka, Tomoyuki Takahashi
2. 発表標題 Highly Efficient Coral Propagation using Regenerative Medicine Techniques
3. 学会等名 2022 ACRS Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 サンゴからのポリブ単離・培養方法とその装置	発明者 上田正人, 上坂菜々子, 猿渡ちひろ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-07163	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科 環境材料研究室
<https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/matt/>

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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------