

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00594

研究課題名(和文) 造礁サンゴの抗酸化能向上による白化耐性の評価

研究課題名(英文) Evaluation of coral resistance to bleaching event by enhancement of antioxidant activity

研究代表者

藤村 弘行 (FUJIMURA, Hiroyuki)

琉球大学・理学部・准教授

研究者番号：20398308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴの白化現象は高水温などによって引き起こされ1980年代から頻繁に世界中のサンゴ礁で生じており、サンゴ礁生態系の衰退が懸念されている。白化は高水温で生じる活性酸素種が原因である。これを体内で消去する抗酸化酵素の能力を高めることを目的とした。その結果、酵素の活性に必須な微量金属元素やそれらを含むプランクトンを添加することで、抗酸化酵素の活性を高め、サンゴの白化の耐性を強化できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Coral bleaching is observed in all over the world that can be attributed to global warming. Active oxygen species are generated in coral host and symbiotic algae when the coral receives the stresses such as high water temperature. Coral resists the active oxygen species by using an antioxidative enzyme. The antioxidative enzyme has the trace elements such as Zn, Cu, and Mn in the center of the enzyme structure as cofactors. Since these trace metals are important essential element of antioxidant enzymes, it is possible that metal enrichment can increase the enzymatic activity in coral and hence resistance to coral bleaching. However, the potential amount of trace metals incorporated into coral, the coral response of photosynthesis and calcification, and the antioxidant enzymatic activity during bleaching have not been elucidated. The purpose of this study is to investigate the effect of trace elements enriched in coral on photosynthesis, calcification and antioxidant enzyme activity.

研究分野：地球化学、サンゴ礁沿岸環境学

キーワード：造礁サンゴ 共生藻 白化現象 抗酸化酵素 微量金属元素 スーパーオキシドディスムターゼ 光合成速度 石灰化速度

1. 研究開始当初の背景

サンゴの白化現象はサンゴに共生している藻類の光合成色素が欠失し、サンゴ体内から失われる現象であり、高水温や低塩分、強光などの異常な環境によって引き起こされる。サンゴは共生藻の光合成産物である多糖類をエネルギー源として利用しているため、白化が数週間以上続くとサンゴ自身も死滅する。造礁サンゴの最適生育水温は27前後であり、30を超えると急速に白化が進行する。沖縄のサンゴ礁では、1998年と2007年に大規模な白化現象が観測されており、特に1998年では水深30mでも水温が30以上となるなど異常な高水温状態であったことが報告されている。そして、この時に多くのサンゴが死滅し、それからまだ回復していない海域が多く存在する。サンゴの白化現象は1980年代から頻りに世界中のサンゴ礁で確認されるようになり、サンゴ礁生態系の衰退が懸念されている。

高水温による白化現象のサンゴ体内でのメカニズムは、まず、共生藻の光合成の電子伝達系が高水温で損傷を受けることによって、行き場を失った電子が活性酸素種を生成する。これらがさらに光合成系を損傷し、光合成色素が失われていくとともに、光合成量も減少する。一部の活性酸素種はサンゴそのものにも損傷を与えるため、サンゴは自己防衛の手段として共生藻を消化または、排出する。サンゴの組織は透明なため共生藻類を失って白いサンゴ骨格が透けて見えるようになる。

通常、活性酸素種はスーパーオキシドディスムターゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼといった抗酸化酵素によって無毒化され、生体内の恒常性が保たれているが、白化の際は通常の抗酸化作用では対処しきれないほどの活性酸素種が生成していると考えられている。したがって、抗酸化酵素の活性を高めることができれば、過剰の活性酸素種を無毒化し、サンゴの白化現象を阻止または延引させることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

造礁サンゴに抗酸化酵素の補因子として利用されている微量金属元素を濃集させることにより、抗酸化酵素の活性を向上させ、白化現象の原因物質である活性酸素種を高効率に無毒化することで、白化を阻止または白化の進行を延引させることができるかどうか評価することを目的とした。

3. 研究の方法

数種類の造礁サンゴに微量金属元素を濃集させ、活性中心の金属別にスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の酵素活性を測定した。さらに濃集後のサンゴを高水温下に曝し、

酵素活性とともに白化の進行を定量的に評価した。このために、(1)活性中心金属別酵素活性定量法の確立、(2)微量金属元素の濃集条件の決定、(3)高水温下でのサンゴの酵素活性と白化耐性への影響評価の3項目に分けて本研究を遂行した。

(1)活性中心金属別酵素活性定量法の確立

対象とする微量金属元素と酵素

微量金属元素: Cu、Zn、Mn、Fe

酵素: Cu・Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD

スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は活性中心の金属に銅(Cu)、亜鉛(Zn)、マンガン(Mn)、鉄(Fe)の微量元素が使われており、Cu・Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SODの3種類のSODが存在する。予備測定では、これらの金属元素はサンゴ組織中にFe、Cu、Zn、Mnの順で数十～数百ppmのオーダーで含まれている。一方で共生藻中にはCuとMnはほとんど存在せず、Feが数千ppm含まれていることが分かっている。これらの金属元素は海水中にはほとんど存在しない(pptレベル)ため、通常の海水中でもサンゴは一定量の微量金属元素を濃集している。Cu・Zn-SODは酵素の活性中心において銅と亜鉛をアミノ酸のヒスチジンで架橋した構造をとったタンパク質の二量体であり、主に高等生物の細胞質に含まれている。一方でMn-SODとFe-SODは活性中心においてそれぞれMnとFeの単核金属が配位したタンパク質の二量体で、一般的に好熱菌や大腸菌などの微生物に含まれている。またMn-SODは高等生物のミトコンドリアにも存在していることが知られている。予備測定では、サンゴとその共生藻からCu・Zn-SODとそれ以外のMn-SODもしくはFe-SODが同程度の活性を示しており、どちらのSODも重要であることがわかっている。Cu・Zn-SODはシアン化物イオンを配位子として添加することにより阻害できるため、SODの全活性量から阻害時の活性量を差し引くことで、Cu・Zn-SODを定量することが可能である。定量方法はキサンチンオキシダーゼによって生成した O_2 をSODと競合的にヒドロキシルアミンと反応させ亜硝酸として測定する亜硝酸法、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)と反応させ測定するNBT法について行った。いずれの方法も生体試料に共存する特定の物質(タンパク質や過酸化水素など)の影響を受けるため、活性が最も高く安定した方法を選別した。酵素の定量法にはクロナル抗体を用いる免疫測定法もあるが、活性ではなく酵素量が得られる。本研究では初期発生の活性酸素種を無毒化できる能力(活性)が重要であるため、中心金属別のSOD活性を定量的に比較できるように、同一原理の定量法で活性を測定した。

(2)微量金属元素の濃集条件の決定

対象とするサンゴの種類

エダゴモンサンゴ・・・枝状 ポリプ小

アザミサンゴ・・・枝と塊の中間型
ポリブ大

ユビエダハマサンゴ・・・枝状 ポリブ小
ウスエダミドリイシ・・・枝状 ポリブ中

これらのサンゴは沖縄周辺によく見られる種類であり、それぞれ形状とポリブの大きさに特徴がある。特にポリブの大きい種は栄養源を共生藻からだけでなく、捕食に大きく依存していることから、溶存無機態の金属イオン源だけでなく、餌の粒子状物質に含まれる有機態金属源についても濃集の度合いを測定した。無機態の金属イオン源は塩化物(CuCl_2 、 ZnCl_2 、 MnCl_2)を用いて、海水中に溶解したときに、海水そのものの成分をほとんど変化させないようにした。有機態金属源としては、様々な海洋生物の餌として用いられている動物プランクトンのアルテミアをサンゴに与えた。金属源を与えたサンゴの組織と共生藻に含まれる微量金属元素を誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)または、同発光分析計(ICP-AES)を用いて測定した。これらを通常の海水で培養したサンゴと比較して、微量金属の濃集、クロロフィル蛍光や酸素量、共生藻密度、サンゴの石灰化速度を測定し、金属元素の添加によって、サンゴと共生藻の生理的狀態に影響がない濃集条件を決定した。

(3)高水温下でのサンゴの酵素活性と白化耐性への影響評価

生理的狀態に影響を与えない条件で、微量金属元素を濃集させたサンゴを連続流水混合系で高水温に曝す。この実験系は小さなチャンパーに入れたサンゴを流水下で水温と光量をコントロールしながら培養する実験系である。この実験系を使って、水温を 25~32 までコントロールし、共生藻の白化現象に関するクロロフィル蛍光(電子伝達速度)、酸素量(光合成量)、共生藻密度の変化を測定し、白化の推移を観測した。また、サンゴそのものの生理狀態は pH-アルカリ度法により見積もられる石灰化速度を指標とした。そして、確立した測定法によりサンゴと共生藻の酵素活性を金属 SOD 別に測定し、どのような金属をどの程度濃集させることで、どの SOD の酵素活性がどの程度増減し、それによって白化の耐性や延引が可能となるのか評価した。

4. 研究成果

(1)抗酸化酵素活性定量法の検討では、標準試薬のスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)を用いてヒポキサンチンおよび KCN の最適濃度を決定し、サンゴの Cu・Zn-SOD 活性測定法を確立した。

ヒポキサンチンの濃度は 1.5 mM 以上であれば活性酸素の量を安定して出せると判断し、濃度は 1.5 mM に決定した。KCN の濃度は Mn-SOD 活性に影響を与えず、Cu・Zn-SOD 活性の阻害がほぼ 100%になる 100 mM に KCN 濃

度を決定した。これらの条件において最も高い活性を示した亜硝酸法を本研究では採用した。サンゴ組織の SOD 活性量測定の結果、エダコモンサンゴとウスエダミドリイシでは Mn その他 SOD の活性量が Cu・Zn-SOD とほぼ同じか若干多く、50 NU/mg protein 以下の値をとった(NU は亜硝酸法による酵素活性単位)。ユビエダハマサンゴでは Cu・Zn-SOD が Mn その他 SOD よりも活性量が若干高く、両方とも 50 NU/mg protein 前後の値をとった。一方アザミサンゴでは Mn や Fe-SOD の活性量が Cu・Zn-SOD よりも多く、Mn や Fe-SOD は 100~200 NU/mg protein、Cu・Zn-SOD は 50~150 NU/mg protein の値となり他の 3 種と比べると高い活性量を示した。

(2)微量金属元素をサンゴに濃集させる実験では、銅、亜鉛およびマンガンをそれぞれ海水に添加し、エダコモンサンゴを培養した。サンゴの石灰化と共生藻の光合成速度を指標として、代謝量に影響を及ぼさない濃度を決定した。

0.1 ppm の ZnCl_2 または MnCl_2 で培養したサンゴは、石灰化量、光合成量、呼吸量のすべてにおいて対照区と有意な差はなく、亜鉛またはマンガンの影響はなかった。特に亜鉛の 1ppm と 10 ppm では添加の初期段階で影響が強く表れ、3 日目にはサンゴ表面の組織が剥離し、死滅していることから、1 ppm 以上の ZnCl_2 はサンゴに対して致死的であった。一方、銅では石灰化と光合成は 10 ppb を境に低下した。したがって、1 ppb 以下であれば銅によるサンゴの代謝への影響は見られないことが示された。

この条件でサンゴに濃集された微量金属のうちマンガンは通常の 2.3 倍であった。一方、銅や亜鉛さらにプランクトンを給餌した際のそれぞれの金属濃度も対照区と比べて高い傾向を示したが、サンゴの個体差が大きく、有意な結果を得ることはできなかった。したがって、銅や亜鉛よりもマンガンがサンゴに濃集しやすいことをこの結果は示しており、抗酸化酵素活性により大きく影響を与える可能性を示唆した。

(3)サンゴの抗酸化酵素活性の評価では、Mn を添加したものはわずかに Mn、Fe-SOD 活性が増加し、Zn および Cu を添加したものは Cu・Zn-SOD の活性量がそれぞれ有意に増加した。対照区に比べて、Zn 添加では約 3 倍、Cu 添加では約 3.6 倍高い酵素活性を示した。プランクトンを給餌したサンゴの Cu・Zn-SOD 抗酸化活性は約 10 倍と有意に高かった。これは酵素の活性中心に金属元素が効率的に取り込まれ、高い SOD 活性に寄与したものと考えられる。また、高水温下でも同様に高い抗酸化活性が維持されたことから、無機態金属および餌由来の微量金属が白化の耐性に寄与することが示唆された。さらに、32 の高水温で 1 週間培養したサンゴの光合成量は

Mn 添加で 47.3%、Zn 添加で 36.8%有意に上昇した。一方、石灰化速度と呼吸量は対照区と比較して有意な差は見られなかった。この結果は微量金属の添加によって光合成の低下をある程度防ぐことができることを示しており、サンゴの白化とそれに伴うその後の死滅過程を延引させる効果が示唆された。

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)

藤村 弘行、サンゴ礁の化学、化学と教育、査読無、Vol. 64、2016、pp. 560-563

[学会発表](計4件)

宮里 亜子、藤村 弘行、中野 義勝、須田 彰一郎、伊藤 通浩、竹山 春子、ウスエダミドリイシの白化による抗酸化酵素活性の変動、日本サンゴ礁学会第20回大会、2017年11月23-26日

中村 将平、藤村 弘行、中野 義勝、中井 達郎、Casareto E. Beatriz、鈴木 款、光合成・石灰化の炭素生産量から見た瀬底島サンゴ礁健全度評価、日本サンゴ礁学会第19回大会、2016年12月1-4日

宮里 亜子、藤村 弘行、中村 将平、樋口 富彦、Sylvain Agostini、造礁サンゴと褐虫藻の抗酸化酵素活性の季節変動、日本サンゴ礁学会第19回大会、2016年12月1-4日

Nakamura, S., H. Fujimura, Y. Nakano, T. Nakai, M. Igarashi, B. E. Casareto and Y. Suzuki, Measurement of carbon production by photosynthesis and calcification of shallow lagoon in Sesoko, 13th International Coral Reef Symposium (国際学会)、2016年7月19-24日

[その他]

ホームページ等

琉球大学理学部海洋自然科学科研究室

<http://chem.sci.u-ryukyu.ac.jp/?p=56>

琉球大学研究者データベース

http://kenkyushadb.lab.u-ryukyu.ac.jp/html/100000970_ja.html?k=藤村弘行#header

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤村 弘行 (FUJIMJURA, Hiroyuki)

琉球大学・理学部海洋自然科学科・准教授

研究者番号：20398308

(2)研究協力者

中村 将平 (NAKAMURA, Shyouhei)

宮里 亜子 (MIYAZATO, Ako)