

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03391

研究課題名(和文) 海藻類バイオマーカーを用いた沿岸環境汚染の診断法の開発

研究課題名(英文) Development of pollution diagnosis for coastal environment using seaweed biomarker.

研究代表者

岡村 秀雄 (OKAMURA, HIDEO)

神戸大学・内海域環境教育研究センター・教授

研究者番号：90253020

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)：KU-MACCが保有する海藻類を用いて、有機物フリーの培地で化学物質の増殖阻害試験を開発した。海藻類25株に対する防汚剤(銅、ジウロン、シブトリン)の種の感受性分布の実験値を文献値と比較したところ、海藻類は淡水産の植物プランクトンや水生植物に比して、概して高い感受性を示した。シオミドロの銅処理によって発現抑制される遺伝子とジウロン処理によって発現誘導される遺伝子は同一であった。これら6遺伝子のプライマーを合成してワカメゲノムを用いてPCRを行った結果、ワカメにはシオミドロ遺伝子のオソログ遺伝子が存在していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

沿岸域の岩場等に固着して生育する海藻類は、生息海域の汚染を表すバイオモニター生物であり、室内試験によって防汚剤に対する感受性が高いことが明らかとなった。我が国沿岸域に生育するワカメに、防汚剤に反応するバイオマーカー候補遺伝子を見出したことから、沿岸汚染の診断法の開発に近づくことができた。今後、銅およびジウロンを添加した人工海水中でワカメを培養し、選抜したバイオマーカー候補遺伝子の発現変動を定量RT-PCRにより確認すると共に、野外で採取したワカメを用いて遺伝子発現変動を確認し、これが採取海域に含まれる銅並びにジウロン濃度と相関するか確かめ、バイオマーカーとしての性能を評価することが重要である。

研究成果の概要(英文)：Macroalgal growth inhibition test in an organic-free medium using seaweeds from KU-MACC was developed. Comparing the experimental values of the species sensitivity distribution of antifouling agents (copper, diuron, cybutryne) to 25 seaweed strains with the literature values, seaweeds are generally more sensitive than freshwater phytoplankton and aquatic plants. The gene whose expression was suppressed by copper treatment of Ectocarpus and the gene whose expression was induced by diuron treatment were the same. A PCR using synthesized primers of these 6 genes and Undaria genome suggested that the ortholog genes of Ectocarpus exist in Undaria.

研究分野：環境毒性学

キーワード：防汚剤 銅 ジウロン シブトリン 増殖阻害 無影響濃度 誘導発現遺伝子 RNA-seq

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

沿岸域は、海を使用する産業からだけでなく、陸からの産業排水・生活排水など多種多様な化学物質の負荷を受ける。産業排水には排水基準値が定められ、環境基準値を超過しないよう排出量が規制されている。先進諸国では、個別化学物質の排水基準に加えて、生物を用いた排水管理対策が採用され、主として淡水産水生生物種に及ぼす産業排水の影響を元に排出量を規制している。産業排水は最終的に海域へと流下するので、排水の海産生物への影響評価のための適切な試験法の開発が望まれているが、沿岸の一次生産を保全することを目的とした海産生物種を用いた水環境管理手法は未だ開発途上にある。海藻類は沿岸域の一次生産を担い、水生生物の餌、食用資源、魚介類の産卵・生育の場として重要な生態学的地位を有する生物種であると同時に、船体や漁網に付着して産業活動を阻害する生物種でもある。海藻類を化学物質に対するバイオモニターとして活用した報告は少なく、詳細に検討する価値がある。神戸大学内海域環境教育研究センターは日本で唯一の海藻類系統株コレクション(KU-MACC)を有しており、大型海藻類を約300種、合計約1000系統を収集、保存している。これら海藻類の防汚剤に対する感受性や遺伝情報を指標とした新しい診断法を開発し、沿岸域における化学物質の環境管理に活用することが可能になると考える。

2. 研究の目的

海域で意図的に使用される有害化学物質の代表である防汚剤に着目し、①海藻類に対する防汚剤の有害性データを算出すること、②化学物質応答遺伝子から探索した海藻類のバイオマーカーを用いて沿岸海域の汚染の診断法を開発することにより、沿岸域の環境管理に資することを目的とする。課題①では、KU-MACCからの系統株を供試し、室内実験によって防汚剤ごとに得られる実験値を用いて海藻種の感受性分布解析によって有害性を算出する。②では、全ゲノム配列が解読されたモデル海藻シオミドロを供試し、防汚剤に応答する海藻類バイオマーカーを探索し、自生する海藻類をバイオモニターとして使用して沿岸海域の汚染を定量的に評価する。このように海藻類の機能を活用して、沿岸域における化学物質の環境管理に資することを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 海藻類増殖阻害試験の開発

温度を15℃、LED蛍光灯を用いて照度を200 lux、明暗周期を10/14に固定し、24穴マイクロプレート培養器および測定器として用いた。培地の種類、海藻の均質化の方法、初期バイオマス量が増殖に及ぼす影響について検討した。培地には有機物フリー培地(SW-ASW)とKU-MACCが用いている保存培地(PESI)を用いた。海藻はホモジナイズあるいはカッターで細切してろ過によって均質化した藻体を用いて培養を開始し、蛍光マイクロプレートリーダーを用いてバイオマスを経時的に計測した。供試化学物質には難分解性の防汚剤(銅、ジウロン、シプトリン)を用いた。2週間後の海藻類の増殖量を指標として、供試物質の50%影響濃度(EC50)、無影響濃度(NOEC)を算出した。

(2) 銅・有機防汚剤に対する海藻類バイオマーカーの網羅的探索

モデル海藻シオミドロを用い、生育に影響が出る最低の濃度の銅、ジウロンを添加した海水で数日間培養した。これら海藻から総RNAを抽出し、RNA-seq受託解析に供した。コントロールとして防汚剤を含まない海水で培養した海藻を用いた。防汚剤の処理により発現が2倍以上、もしくは2分の1以下に変化した遺伝子を選別し、変化が大きい遺伝子について定量RT-PCRにより発現変化を確認した。また、遺伝子産物の機能が化学物質応答に関与しているかどうかを文献調査により確認した。銅・有機防汚剤の処理により発現する遺伝子についてクラスター化し、特定の汚染物質により発現する遺伝子、複数の汚染物質により発現する遺伝子等、誘導発現遺伝子の種類により汚染物質を推定できる方法の開発を目指した。

4. 研究成果

(1) 海藻類増殖阻害試験の開発

前培養した海藻類をカッターで細切し、ろ過によって供試藻体を均質化し、初期バイオマスをクロロフィルa量として10 µg/lとし、SW-ASW培地を用いて培養を開始し、2週間後の増殖量から有害性を算出する標準的な海藻類増殖阻害試験を開発した。

(2) 防汚剤の有害性に及ぼす培地の影響

2種類の培地で増殖させた海藻6株を用いて、3種類の防汚剤がそれぞれの海藻の増殖阻害に及ぼす影響を評価した。銅のEC50は、SW-ASW培地では8~96 µg/l、PESI培地では全ての株で100 µg/l以上であり、明らかにSW-ASW培地では強い有害性が認められた。これに対して両培地からのEC50の比(PESI/SW-ASW)はジウロンでは0.6から3倍程度、シプトリンでは0.6から4倍程度であった。以上のことから、銅の有害性は培地の有機物質によって顕著に抑制されたことから、以後の研究では有機物フリーのSW-ASW培地を用いることとした。

(3) 防汚剤に対する海藻類の感受性

SW-ASW培地で海藻類50株を培養したところ、25株(緑藻5株、褐藻14株、紅藻6株)が良好な増殖を示した。そこで、これら海藻類25種に対する3種類の防汚剤(銅、ジウロン、シプトリン)の増殖阻害試験を行い、有害性データ(2w-EC50)を赤色マークで図1、2、3に示

した。それぞれの図には、文献で公表されている水生生物（植物、甲殻類、貝類、魚類など）への生態毒性データ（EC50/LC50）を青色で加え、このうち植物のデータを抜き出して黄色で示した。銅は、文献にある植物データに比して海藻類への有害性が高いことが明らかである。ジウロンは、極めて低い1つの文献値（0.0002 μg/l）を除いて評価すると、銅と同様に文献の植物データに比して海藻類への有害性が高いと言える。シブトリンも他の防汚剤と同様、海藻類への有害性が高いことが示された。

供試した25株のうち、防汚剤のEC50が低い（感受性が高い）5株（図中の赤色マークの低い方から5つ）は、銅ではKU-0220, 3056, 1405, 1155, 3155、ジウロンではKU-3056, 1636, 1336, 1372, 3155、シブトリンではKU-1401, 1333, 3051, 1377, 0856であり、3化合物共に共通の株はなかった。防汚剤のEC50が低い10株には、紅藻 KU-3155 と褐藻 KU-0856 が含まれていた。

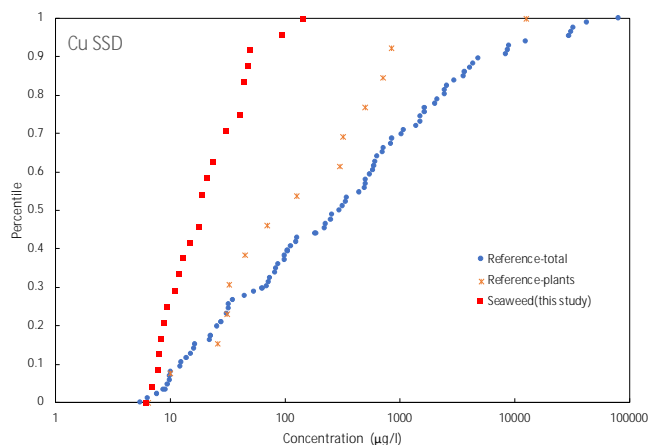


図1 銅の種の感受性分布

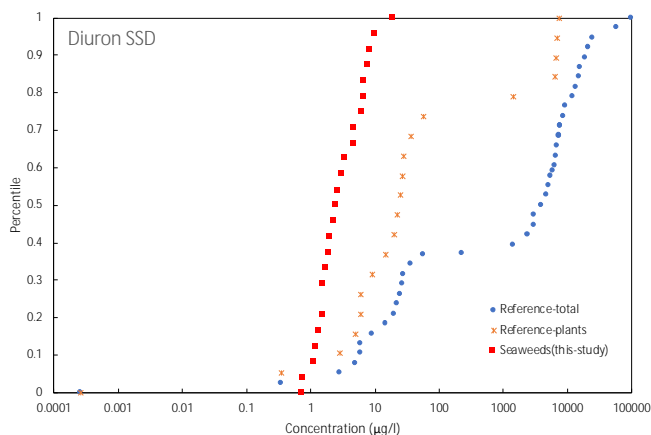


図2 ジウロンの種の感受性分布

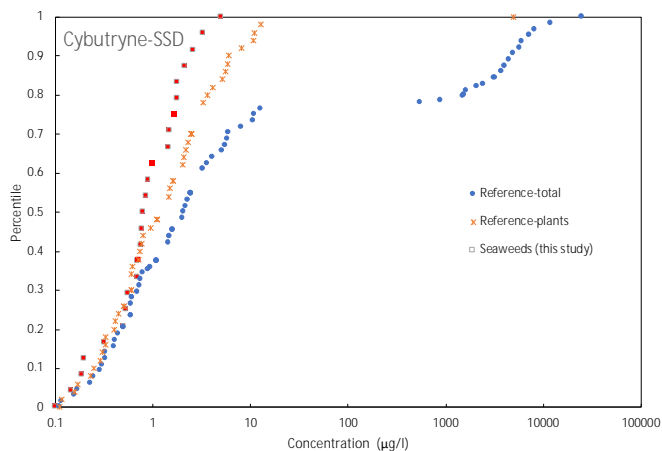


図3 シブトリンの種の感受性分布

(4) 海藻類バイオマーカーの探索

ゲノム情報が開示されているシオミドロを用いて、これを培養する人工海水に、生育に影響の出ない最大濃度の銅、もしくはジウロンを添加し、抽出した総 RNA を用いて RNA-seq を行った。その結果、銅処理では総リード数のうち 96%以上がゲノム上にマッピングされ(表 1)、495 遺伝子、358 遺伝子がそれぞれ発現誘導・抑制された(図 4)。また、ジウロン処理では 97%以上のリードがマッピングされ(表 1)、413 遺伝子、333 遺伝子がそれぞれ発現誘導・抑制された(図 4)。そのうち変化が大きかった上位 10 遺伝子をそれぞれ選抜した。計 40 遺伝子のうち、26 種程度の遺伝子について、定量 RT-PCR によりその発現変化を定量した結果、銅処理により 4 遺伝子の発現上昇、1 遺伝子の発現抑制を確認した。同様に、ジウロン処理により 1 遺伝子の上昇、3 遺伝子の抑制を確認した。興味深いことに、銅処理によって発現抑制される遺伝子とジウロン処理によって発現誘導される遺伝子は同一であった。これら 8 遺伝子を銅汚染、ジウロン汚染のバイオマーカーとするためには、日本近海で容易に採取できる海藻種の遺伝子を利用すべきである。そこで、ゲノム情報が入手でき、採取容易なワカメ (*Undaria pinnatifida*) を選抜した。シオミドロの 8 遺伝子のうち、6 遺伝子がワカメゲノム中に存在し、これら遺伝子のプライマーを合成した。これらプライマーとワカメゲノムを用いて PCR を行ったところ、遺伝子断片の増幅を確認できたことから、供試したワカメにシオミドロ遺伝子のオーソログ遺伝子が存在していることが明らかとなった。

表 1 RNA-seq におけるマッピングされたリード数

Sample ID	# of processed reads	# of mapped reads (%)	# of unmapped reads (%)
- Copper	40,072,500	38,884,215 (97.03%)	1,188,285 (2.97%)
+ Copper	41,763,208	40,325,929 (96.56%)	1,437,279 (3.44%)

Sample ID	# of processed reads	# of mapped reads (%)	# of unmapped reads (%)
- Diuron	51,280,604	49,799,623 (97.11%)	1,480,981 (2.89%)
+ Diuron	59,469,162	57,719,815 (97.06%)	1,749,347 (2.94%)

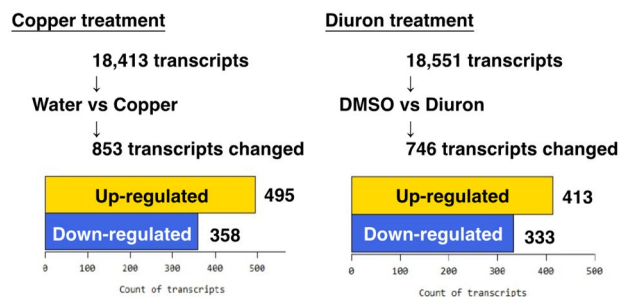


図 4 RNA-seq により 2 倍以上、2 分の 1 以下に増減した遺伝子数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamura,H., Kano,K., Yap, C.K., and Emmanouil,C.	4. 巻 -
2. 論文標題 Floating particles with high copper concentration in the sea-surface microlayer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11356-021-14518-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawai, H., Hanyuda, T., Akita, S., Uwai, S.	4. 巻 -
2. 論文標題 The macroalgal culture collection in Kobe University (KU-MACC), and a comprehensive molecular phylogeny of macroalgae based on the culture strains.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Phycology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/26388081.2020.1745685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Okamura, H.
2. 発表標題 Protect “LIFE BELOW WATER” from ship antifouling agents.
3. 学会等名 AIST World Conference 2020- International Symposium for Innovative Sustainable Materials & The 7th International Symposium for Green-Innovation Polymers 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okamura,H., Kano,K., C. K. Yap,C.K., and Emmanouil,C.
2. 発表標題 Suspended particles with high copper concentration in the sea-surface microlayer.
3. 学会等名 Sixth International Symposium on Green Chemistry, Sustainable Development and Circular Economy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideyuki Inui, Ryoko Yasuda, Hiroshi Kawai, Vladimir Beskoski, Hideo Okamura
2. 発表標題 Selection of biomarker genes from the brown alga <i>Ectocarpus siliculosus</i> , treated with antifouling agents
3. 学会等名 The 16th International Symposium on Persistent Toxic Substances, Hoboken, USA, 2019(10), Oral presentation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡村秀雄, 安田諒子, 乾秀之, Vladimir P Beskoski, 川井浩史.
2. 発表標題 海藻類の増殖に及ぼす防汚剤の有害影響
3. 学会等名 第25回日本環境毒性学会研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡村秀雄, 安田諒子, 乾 秀之, 川井浩史
2. 発表標題 沿岸域の汚染を評価するための海藻類増殖阻害試験法の開発
3. 学会等名 平成30年度瀬戸内海研究フォーラムin兵庫
4. 発表年 2018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	川井 浩史 (Kawai Hiroshi) (30161269)	神戸大学・内海域環境教育研究センター・教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	乾 秀之 (Inui Hideyuki) (90314509)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授 (14501)	

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