

# 赤土等負荷によるエダコモンサンゴのストレス応答の確認

大城洋平・金城孝一・仲宗根一哉・宮城俊彦

## Characterization of Stress-response of *Montipora sp.*

### Loaded with Red soil

Yohei OSHIRO · Koichi KINJO · Kazuya NAKASONE and Toshihiko MIYAGI

要旨：ハナヤサイサンゴ(*Pocillopora domicornis*)が赤土負荷により HSP70 様 mRNA を顕著に増幅させるとの報告<sup>1)</sup>をもとに、エダコモンサンゴ(*Montipora sp.*)について同様なストレス応答が見られるか確認した。その結果、227bp (bp:base pair) あたりに試験区(赤土負荷試験区)において顕著な増幅が確認され、ハナヤサイサンゴの HSP70 様 mRNA と相同性検索したところ 84.5%の相同性が見られた。

Key words: エダコモンサンゴ, ストレス応答, 赤土負荷, HSP70 様 mRNA

## I はじめに

亜熱帯地方に属する沖縄県は、本土とは異なる独特な自然環境を有し、その恵まれた自然環境の経済的価値は計り知れない。しかし経済発展に伴って自然が破壊され、豊かであったサンゴ礁も衰退しており、自然環境の保全および再生が急務となっている。

サンゴ礁衰退には様々な要因があるが、その一つに赤土等流出による影響が考えられている。赤土負荷(赤土ストレス)によるサンゴへの影響については、懸濁粒子の摩擦による組織の損傷、日陰効果による褐虫藻への光合成阻害(サンゴの成長阻害)、粒子の堆積による窒息死、赤土を除去するために相当のエネルギーの消費等が考えられると報告されている<sup>2)</sup>。

当研究所では、現在、赤土等流出防止を啓発するための調査として SPSS(底質中懸濁物質含有)調査やサンゴ被度調査等によって環境モニタリングを行っている。

しかし、サンゴ調査については目視による観測であるために、サンゴの健康状態を把握するには限界があり、初期のストレス応答を把握することは困難である。

最近の研究において、ハナヤサイサンゴが赤土負荷によって HSP70 様 mRNA(ヒートショックプロテイン:タンパク生合成時、タンパクが凝集しないように保護する。また、変性したタンパクを再生する。)が顕著に増幅することが確認されており、サンゴの生理反応を指標とした手法について期待できると報告されている<sup>1)</sup>。また、遺伝子工学を用いた環境調査は、Michael ら<sup>3, 4)</sup>の殺虫剤汚染に対するサンゴの生理応答や、Heinz C ら<sup>5)</sup>の重金属汚染に対する海綿動物のメタロチオネン mRNA 応答によって報告されており、環境モニタリングの新たな手法として、その可能性が期待できる。しかし、サンゴ種間のストレス応答反応の違いや海域環境中におけるサンゴのストレス応答反応の特徴などについてはこれまでほとん

ど知見がない。

そこで、今回、サンゴの生理応答を指標とする海域環境モニタリング手法の開発に向けた基礎的な調査として、沖縄本島周辺海域においてよく見られ、採取し易く、多くの研究がなされているエダコモンサンゴを用いて赤土負荷によってストレス応答することを確認したので報告する。

## II 材料

### 1. サンゴ採取

環境負荷の影響が少ないと考えられる座間味村阿嘉島周辺海域にてサンプル採取を行った(許可番号特第17-53号)(図1)。対象は、エダコモンサンゴ(図2)とし、サンゴ片5cm程度を持ち帰り、室内において赤土負荷試験を行った。また、海環境中のストレス応答を考慮して、サンゴ片5mm程度を現場で直接固定した(環境コントロール)。固定液に ISOGEN(フェノール製剤 ニッポンジーン社)を用いた。

### 2. 赤土の調整

試験用の赤土(島尻マージ 糸満市)は、乳鉢で細かく砕き、64メッシュのふるいを通して調整した。

## III 方法

### 1. 負荷試験

持ち帰ったサンゴ片を数日慣らした後、試験区サンゴが入った10L水槽に赤土濃度が約500ppmになるようにふりかけ、4時間の負荷試験を行った(図3)。試験区は30分に一回攪拌した。試験海水は天然海水を使用しており、比較のため、対象区も同時に調査した。

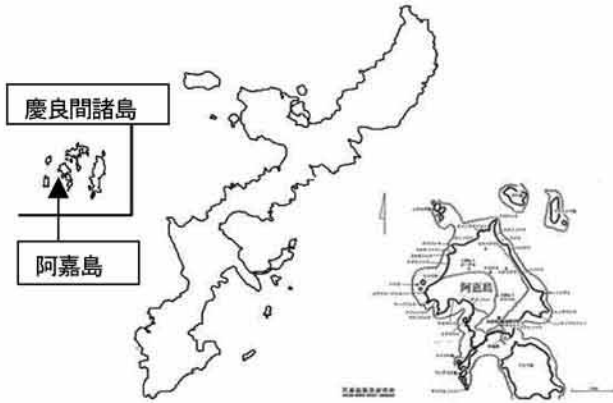


図1. 沖縄本島(左), 阿嘉島周辺海域(右)

阿嘉島(右)地図については 阿嘉島臨海研究所資料を使用

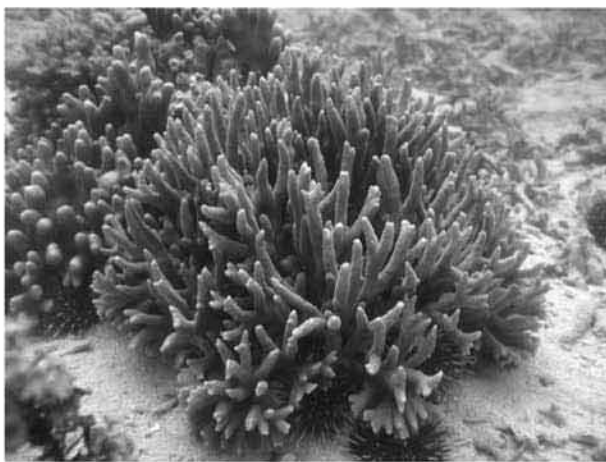


図2. エダコモンサンゴ



図3. 負荷試験の様子. 左が対象区, 右が試験区

2. 全RNA抽出

約5mmのサンゴ片を採取した後, すぐに ISOGEN 約1mL に固定した. 全RNA抽出は, グアニジン酸塩・フェノール・クロロホルム法 (AGPC法) (図4) で行った. 環境コントロールについても同様に操作した.

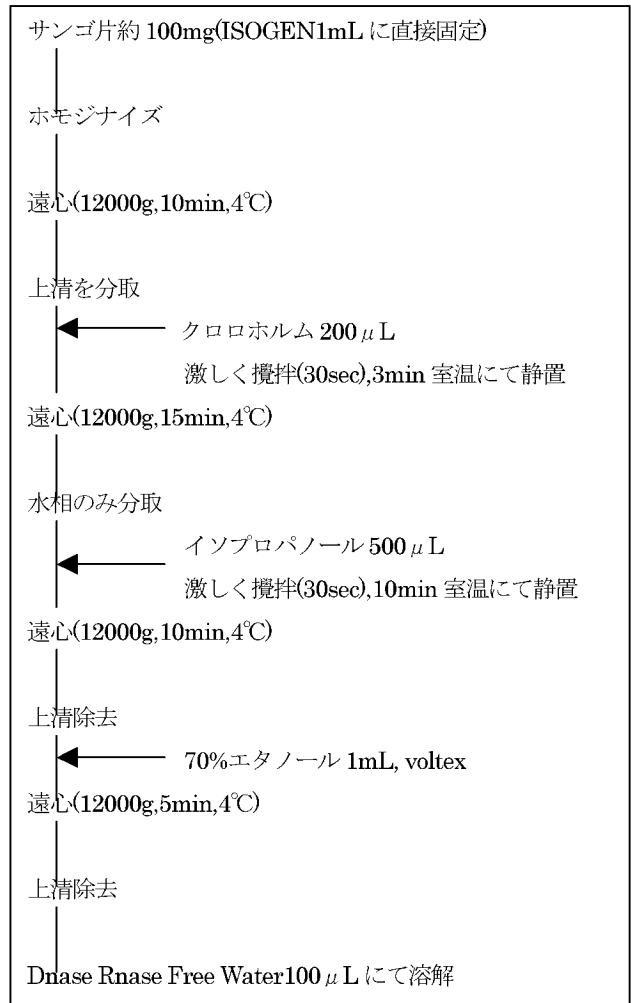


図4. 全RNA抽出操作

3. HSP70 様 mRNA の増幅の確認

全RNA濃度を約  $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  に調整して, その中の mRNA を cDNA へ逆転写 ( $42^\circ\text{C} 30 \text{分}, 99^\circ\text{C} 5 \text{分}$  を1回行う) を行った (TaKaRa PCR Kit Ver. 3.0 タカラバイオ社). 次に特異的プライマー (Forward: CAACCAGAACACAGTTACTATCCA, Reverse: AGCCTGTTCTGGTCATTGG) を用いて, PCR 反応 ( $94^\circ\text{C} 2 \text{分}$  を1回,  $94^\circ\text{C} 30 \text{秒} \cdot 50^\circ\text{C} 30 \text{秒} \cdot 72^\circ\text{C} 30 \text{秒}$  を26回繰り返し,  $72^\circ\text{C} 5 \text{分}$  を1回) を行い, ターゲット mRNA のみを増幅させた (TaKaRa PCR Kit Ver. 3.0 タカラバイオ社). PCR 反応によるターゲットの増幅の様子は, 2%アガロースゲル電気泳動で確認を行い, 塩基配列の確認についても行った (BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit QIAGEN 社). 相同性検索については, 日本 DNA データバンク (DDBJ) で BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析を行った.

IV 結果

1. mRNA 増幅の確認

赤土負荷試験を4時間行ったところ, 試験区において200~300bpの辺りにバンドを確認した (図5). 試験区サンゴは, 対象区サン

ゴに比べて赤土ストレスに対し強く応答を示していることが分かった。また、環境コントロールは、海環境中のストレス応答は確認されなかった。

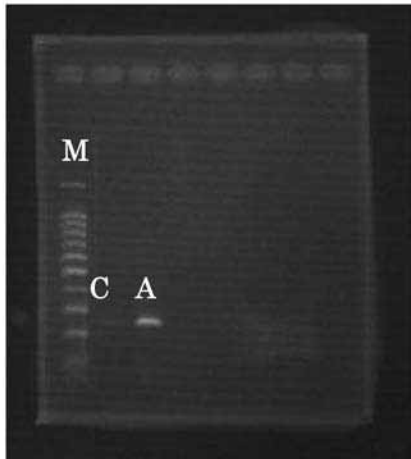


図5. エダコモンサンゴのストレス応答の様子。  
100bp ラダー(M) , 対象 (C) 区 試験 (A) 区

2. 塩基配列の確認

図5の試験区のコマについて塩基配列解析したところ、227bpの塩基配列について決定できた。図5で得られたコマは、ハナヤサイサンゴのHSP70様mRNAと84.5%の相同性を示していた(図6)。



図6. HSP70様mRNAのシーケンスの一部

V 考察

今回の赤土負荷試験において、試験区サンゴがHSP70様mRNAを顕著に増幅していたことから、エダコモンサンゴは、赤土負荷によってストレス応答することが示された。よって、サンゴ礁海域では、赤土等流出が起こることによりその海域に生息しているサンゴへ直接影響を与えている可能性が考えられる。

今後は、他種のサンゴにおいても同様な結果を得られるか確認し、サンゴのストレス応答等の生理応答を利用した環境モニタリング法について検討していきたい。

また、今回の結果は、HSP70様mRNA増幅の有無で示したが、将来、環境中のストレス因子の影響を定量的に評価できるモニタリング手法へ発展させるために、ストレス因子とmRNAの定量的な関係

について明らかにする必要がある。

さらに、サンゴが種々のストレス因子に対応した生理応答を示すことも十分考えられることから、これらのストレスに応答する物質を定量的に把握することができれば、サンゴがどのような環境傾度によってストレス応答しているか、またストレスの大きさはどの程度なのかを評価することが可能になる。

以上のことから、リアルタイムPCRシステムを用いたmRNAの定量化と各種ストレスによるHSP70様mRNAの増幅の確認およびHSP70様mRNA以外のストレス応答物質の探索が今後の課題となっている。

<謝辞>

実験を遂行するにあたり、橋本和正氏(農林水産省)をはじめ当研究所職員のご助言ご協力に大変感謝申し上げます。

VI まとめ

1. エダコモンサンゴは、赤土負荷によりHSP70様mRNAを顕著に増幅することを確認した。

2. 試験区のエダコモンサンゴで増幅した227bpの塩基配列について相同性検索を行ったところ、ハナヤサイサンゴのHSP70様mRNAと84.5%の相同性が示された。

VII 参考文献

1) K. Hashimoto, T. Shibuno, E. Murayama-Kayano, H. Tanaka and T. Kayano (2004) Isolation and characterization of stress-responsive genes from the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs* 23 : 485-491

2) 山根青 (1991) サンゴの生物学 (財) 東京大学出版会 136-138

3) Michael B. Morgan, Terry W. Snell (2002) Characterizing stress gene expression in reef-building corals exposed to the mosquitocide dibrom Marine Pollution Bulletin 44 : 1206-1218

4) Michael B. Morgan, Dale L. Vogelien, and Terry W. Snell (2001) ASSESSING CORAL STRESS RESPONSES USING MOLECULAR BIOMARKERS OF GENE TRANSCRIPTION Environment Toxicology and Chemistry, Vol. 20, No3 : 537-543

5) Heiz C et al. Kateryna Shostak, Vera Gamulin, Markus Lacorn, Alexander Skorokhod, Vadim Kavsan, Werner E. G. Muller (2000) Purification , cDNA cloning and expression of a cadmium-inducible cysteine-rich metallothionein-like protein from the marine sponge *Suberites domuncula* MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES Vol. 200 : 149-157