

A-5 紫外線増加が生物に与える影響の評価

- (2) 紫外線増加による海洋生物における紫外線吸収物質と遺伝子損傷の評価方法に関する研究
- ② 紫外線増加が植物プランクトンの遺伝子損傷に与える影響の評価に関する研究

水産総合研究センター北海道区水産研究所亜寒帯海洋環境部（平成 11 年度）
創価大学工学部（平成 12 年度～） 田口 哲

平成 11～13 年度合計予算額 7,800 千円
（うち、平成 13 年度予算額 2,000 千円）

[要旨] 当研究では、植物プランクトンに対する紫外線増加の影響を評価するために、DNA 損傷と紫外線吸収物質の誘発を用いる方法の確立を図った。ハプト藻 *Pleurochrysis carterae* を用いて、細胞 DNA 含量と細胞周期との関係を明らかにする 12 : 12 時間明暗周期の実験を行った。UV-B 照射を除いた実験で細胞密度は変化しないが、細胞体積と細胞内 DNA 含量は増加した明記後半が細胞周期の S 期あるいは G2 期に相当し、UV-B 照射によるチミンダイマーの形成は細胞周期の G1 期に生じていることが示唆された。このことから、細胞密度、細胞体質、及び細胞内 DNA 含量の変化を測定することにより、UV-B の影響の有無を評価できることが明らかとなった。紫外線吸収物質のマイコスポリン様アミノ酸の含量が多いとされる渦鞭毛藻 *Scrippsiella sweeneyae* を用いて、人工紫外線照射実験を行った。当実験では、紫外線相対強度[UVB/(UVA+PAR)]及び紫外線組成によって成長速度には大きな差異が見られなかった。しかし、細胞体積は、紫外線相対強度が大きくなるほど、そして短波長の紫外線を多く含むほど、増加した。同種からシノリン、パリシン、ポルファイラ-334 のマイコスポリン様アミノ酸が同定されたが、310 nm と 360 nm に吸収極大を持ったマイコスポリン様アミノ酸が検出され、それぞれ M-310 と M-360 と命名した。シノリンとパリシンとポルファイラ-334 の細胞内合計含量は、紫外線波長組成に関係なく、紫外線相対強度の増加とともに増加した。しかし、それぞれの相対出現頻度は、紫外線相対強度によって異なった。この 5 種類の中で M-360 の誘発量が紫外線相対強度の増加に対して最も高くなる応答を示し、ポルファイラ-334 の誘発量が最も小さくなる応答を示した。これらの結果からこの種では、細胞内でそれぞれ 5 種類のマイコスポリン様アミノ酸の相互変換により、それぞれの相対含量を変化させ、紫外線照射から細胞を防御していることが示唆された。

[キーワード] 植物プランクトン、マイコスポリン様アミノ酸、DNA 含量、紫外線相対強度、紫外線波長組成

1. はじめに

植物プランクトンは日出とともに UVB 照射を受けると数時間で D1 蛋白複合体の分解が起こる。その後そのような損傷は継続するが、その損傷が少なければ、夜間に完全に修復する¹⁾。DNA 損傷を受け、その修復が追いつかないと、成長速度に障害が起こりその結果細胞肥大が起こる²⁾。植物プランクトンの珪藻 *Cyclotella sp.* では、UVB 照射下で起こる成長率の減少は、チミン・ダイマーを形成する細胞数の増加と直線的な関係がある³⁾。また、単波長の UVR を含めば含むほど、チミン・ダイマーを形成する細胞数は増加する³⁾。このような DNA の損傷と修復が、他の植物プランクトン種あるいは自然個体群集で起っているのかは明らかでない。

また、植物プランクトンは UVB 照射を受けると、細胞内に紫外線吸収物質を形成して自らを防御する機構を有している。陸上植物はフラボノイド色素を含有しているように、海洋生物はマイコスポリン様アミノ酸を持っている。このマイコスポリン様アミノ酸はバクテリア及び植物プランクトンだけが生産することができ、それらを捕食することにより高次栄養段階の生物へとその分布を広げている⁴⁾。植物プランクトンの中でも特に渦鞭毛藻類では、光合成色素クロロフィル *a* 含量と比較して、このマイコスポリン様アミノ酸は多量に含まれている⁵⁾。しかし、これらの物質は紫外線吸収物質と呼ばれているが、マイコスポリン様アミノ酸の機能についてはほとんど知られていない。特に、紫外線照射量や紫外線波長特性との関係は明らかでない。

2. 研究目的

培養植物プランクトンの珪藻では、UVB 照射により、DNA 上に隣り合ったピリミジンの間にシクロブタンピリミジン二量体を形成する²⁾。この DNA 損傷を明らかにするために、探索した DNA 定量に最も適した種類であるハプト藻の *Pleurochrysis carterae* を用いて、DNA 細胞含量を細胞周期との関係を明らかにすることを目的とした。

植物プランクトンの紫外線吸収物質としては、マイコスポリン様アミノ酸があり、その数は 19 種類が報告されている⁶⁾。しかし、その中でも比較的多く細胞内に蓄積されている種類は限られている。昨年度までに確立した方法で、マイコスポリン様アミノ酸のなかでも、シノリン、パリシン、及びポルファイラ-334 を同定し、それらの誘発量と紫外線放射量と波長組成との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究方法

温度 25 °C、暗明周期 12 時間で *Pleurochrysis carterae* を培養した。紫外線波長組成は、UV-B/(UVA+PAR)比を相模湾夏季の値に相当する 0.7 %と、それよりも少し高い値の 1.1 %に設定した。UV-B 照射を除いた培養を対照区とした。実験は、明期 6 時間、暗期 12 時間、そして明期 6 時間の順に行い、実験開始より、0、1、2、3、6、9、12、18、及び 24 時間後に資料を採集した。DNA の抽出は、QIAGEN 社の DNA plant mini kit を用いて行った。DNA 収量は分光光度計を用いて、260 nm の吸光を測定す

ることによって求めた。

温度 25 °C、12 時間ごとの明暗周期で光合成有効光子量(PAR)20.7 W・m⁻² で渦鞭毛藻 *Scrippsiella sweeneyae* を GSe 培地⁹⁾を用いて培養した。培養して対数増殖初期に到達してから 2 日間紫外線照射を行った。石英瓶に UV ガード・フィルムを巻き PAR のみを透過させるコントロールと、マイラー・フィルムを巻き UVA と PAR を透過させる実験区と、アセテート・フィルムを巻き 290 nm より長波長の UVB と UVA と PAR を透過させる実験区と、何も巻かない UVB と UVA と PAR の全ての波長を透過させる実験区を作った(図 1)。さらに 0.29、2.2、3.6、4.8、及び 6.8 %の紫外線相対照射強度[UVB/(UVA+PAR)]下で照射実験を行った。紫外線照射合計 24 時間となる照射実験 2 日後に、全ての実験区から試料を採集した。試料を遠心回収後、80 %エタノールで抽出し、波長 250 nm から 800 nm まで吸光度を測定した。その後、逆相 HPLC で、シノリン、パリシン、ポルファイラ-334 を測定した。また細胞数と細胞体積を顕微鏡下で測定した。

4. 結果

(1) DNA

どちらの UV-B/(UVA+PAR)比でも、細胞密度は $8.0 \pm 1.8 \times 10^5$ cells/ml、細胞体積は $79 \pm 11 \mu\text{m}^3$ 、細胞内 DNA 含量は $5.0 \pm 0.5 \times 10^{-6} \mu\text{gcell}^{-1}$ と、24 時間通じてあまり変化しなかった。しかし、UV-B 照射を除いた実験では、細胞密度は最初の明期の 6 時間の間には、ほぼ 6.7×10^5 cells/ml と変化がなかったが、暗期に入った 3 時間後から 8.7×10^5 cell/ml と、1.3 倍増加した。細胞体積は、最初の明期には増加し、明期終了時の 6 時間後には $99 \pm 12 \mu\text{m}^3$ 、と 1.3 倍増加した。その後暗期には減少し、暗期終了時の 12 時間後には、実験開始時の $71 \pm 10 \mu\text{m}^3$ 、にもどった。細胞内 DNA 含量は最初の明期には $6.4 \times 10^{-6} \mu\text{gcell}^{-1}$ から $8.7 \times 10^{-6} \mu\text{gcell}^{-1}$ と 1.4 倍増加した。その後、暗期には減少し、暗期終了時には $4.0 \times 10^{-6} \mu\text{gcell}^{-1}$ と最小値を示した。その後の明期にもあまり変化しなかった。

どちらの UV-B/(UVA+PAR)比でも、細胞内 DNA 含量は、細胞密度や細胞体積と有意な相関は見られなかった。しかし、UV-B 照射を除いた実験では、有意な相関($p < 0.05$)が見られた。

UV-B 照射を除いた実験で明期後半に細胞体積と細胞内 DNA 含量は増加したが、細胞密度は変化しなかったことから、この時期が細胞周期の S 期あるいは G2 期に相当すると考えられる。一方、UV-B 照射下では、この時期には細胞体積と細胞内 DNA 含量に変化が見られなかった。これは、UV-B 照射により DNA 合成が抑制され、細胞周期の進行が遅延されていると考えられる。したがって、UV-B 照射によるチミン・ダイマーの形成は細胞周期の G1 期に生じていることが示唆された。

DNA 損傷の修復は、光修復あるいは除去修復による。DNA の修復率は PAR や DNA に依存していると考えられる。今回の紫外線照射実験では、明期には DNA 合成が見られなかったため、DNA 損傷が光修復よりも上回ったものと思われる。また、暗期

にも DNA 合成が見られなかったので、DNA 損傷は除去修復を止まっていたと考えられる。

(2) マイコスポリン様アミノ酸

実験に用いた全ての紫外線相対強度では、*S.sweeneyae* の成長速度には統計的な有意な差は見られなかった(図 2)。しかし、最大紫外線相対強度である 6.8 %では、UVB+UVA+PAR の照射下で PAR だけの照射下の 78 %となり、有意に低い成長速度を示した。

細胞体積は紫外線相対強度が増加するにつれて、増加した(図 3)。また短波長紫外線が多く含まれる程、細胞体積が増加する傾向は、紫外線相対強度が大きいほど、顕著であった。

実験に用いた全ての紫外線相対強度で *S.sweeneyae* の吸光は、波長 323 nm と 360 nm で極大を持った(図 4)。PAR だけの照射下の吸光極大値に対する、各紫外線波長組成における吸光極大値の相対値は、紫外線相対強度が低い 0.29 %、2.2 %、そして 3.6 %において、統計的に有意な差が見られなかったが、紫外線相対強度が 4.6 % から 6.8 % と増加するにつれて、増加する傾向が見られた(図 5)。しかし、その増加傾向は、323 nm と 360 nm の各吸収域において異なりまた、紫外線波長組成によっても異なった。波長 323 nm では UVB+UVA+PAR と >290 nm だけを含む UVB+UVA+PAR では、直線的に増加したが、UVA+PAR では、飽和曲線を示す傾向にあった。一方、波長 360 nm では、全ての紫外線波長組成において、飽和曲線を示す傾向を示し、特に、UVA+PAR では、最大紫外線相対強度で抑制が起っているような傾向を示した。

実験に用いた全ての紫外線相対強度で 5 つのマイコスポリン様アミノ酸を検出することができた(図 6)。それらは、吸収極大波長 334 nm のシノリン、320 nm のパリシン、そして 334 nm のポルファイラ-334 と同定することができた。さらに未同定であるが、310 nm、360 nm にそれぞれ吸収極大を持つ M-310、M-360 の存在も確認できた。細胞あたりの含有量は、全ての紫外線相対強度でシノリンでは 0.175~0.613 pmol/cell、パリシンでは 0.051~0.22 pmol/cell、ポルファイラ-334 では 0.063~0.186 pmol/cell であった。細胞あたりのこれら 3 つのマイコスポリン様アミノ酸合計量は紫外線波長組成に関係なく、紫外線相対強度とともに増加した(図 7)。シノリンとパリシンとポルファイラ-334 の細胞あたりの含有量の 3 つの合計に対して、実験に用いた全ての紫外線相対強度で、シノリンは 55~64 % と最も多く、パリシンは 17~22 %、ポルファイラ-334 は 16~27 % であった。シノリンは、紫外線波長組成に関係なく紫外線相対強度が 3.6% で最大含有率の 64.3 ± 0.66 % を示した(図 8)。パリシンは、紫外線波長組成に関係なく、紫外線相対強度が 4.8 % 付近で最大含有率の 22.3 ± 0.72 % を示した。ポルファイラ-334 も紫外線波長組成に関係なく、紫外線相対強度が 3.6 % あるいは 4.8 % で最小含有率 14~15 % を示し、シノリンと相反する関係を示した。

PAR だけの照射下のマイコスポリン様アミノ酸の細胞含有量に対する各波長組成

ごとの相対細胞含有量は、紫外線相対強度の増加とともに増加した(図 9)。最も大きく増加したマイコスポリン様アミノ酸は M-360 であり UVB+UVA+PAR では、約 4 倍までほぼ直線的に増加した。しかし、UVA+PAR では 2 倍に増加して飽和曲線型の増加を示した。>290 nm UVB+UVA+PAR ではそれらの中間型の増加を示した。紫外線相対強度に最も少なく反応したのはポルファイラ-334 であった。またその反応の様式も他のマイコスポリン様アミノ酸とは異なっていた。紫外線相対強度が 0.29 % から 3.6 % では、PAR だけの照射に比較して、紫外線が加わると、ポルファイラ-334 の誘発量は抑制されるような傾向を示した。

紫外線相対強度 3.6 % から 6.8 % までと PAR だけの照射下のマイコスポリン様アミノ酸の細胞含有量に対する UVB+UVA+PAR 照射下の相対含量との間には、直線的な関係が見られた(表 1)。

表1.PAR だけの照射下のマイコスポリン様アミノ酸の細胞含量に対する UVB+UVA+PAR 照射下の相対含量と紫外線相対強度との関係。

マイコスポリン様アミノ酸	回帰式	相関係数
M-360	$y = 0.73 \times -1.21$	1.00
シノリン	$y = 0.48 \times -0.56$	0.98
M-310	$y = 0.44 \times -0.29$	0.98
パリシン	$y = 0.40 \times -0.12$	1.00
ポルファイラ-334	$y = 0.39 \times -0.65$	1.00

5. 本研究により得られた成果

QIAGEN 社の DNA plant mini kit を用いて行った DNA の抽出により、従来の方法⁷⁾とは異なり、短時間で DNA を抽出することができることを明らかにした。植物プランクトンから DNA を抽出することが可能であり、抽出した DNA の純度も高いことが明らかとなった。

シノリン、パリシン、及び、ポルファイラ-334 の定量測定方法を確立した。この 3 種類に加えて、未同定であるが、310 nm に吸収極大を持つ M-310 と 360 nm に吸収極大を持つ M-360 の合計 5 種類のマイコスポリン様アミノ酸の存在を渦鞭毛藻 *Scripsiella sweeneyae* で明らかにした。

この 3 種類のマイコスポリン様アミノ酸に対する紫外線放射強度と紫外線波長組成の影響を明らかにした。

この 3 種類のマイコスポリン様アミノ酸の相対的割合は紫外線波長組成には、あまり関係がなく、紫外線相対強度に依存していた。

未同定 2 種類の定量は、まだ出来ていないが、細胞あたりのそれらの含量も実験に供した紫外線相対強度の範囲で最大 4 倍の変動を示したので、紫外線相対強度に依存している可能性が示唆された。

UVB+UVA+PAR 照射によるマイコスポリン様アミノ酸の相対細胞含量の増加速度

は M-360 で最も速く、シノリン、M-310、パリシン、ポルファイラ-334 では、M-360 の 65 %以下と遅く、これら 4 種類の間ではあまり有意な差が見られなかった。

これらのマイコスポリン様アミノ酸の生合成過程は、まだ解明されていないが、相互変換による生合成の過程の存在が示唆された。

6. 引用文献

- 1) Schofield, O., B. M. Kroon and B.B. Prezelin 1995. Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for Antarctic ice algae. *J. Phycol.* 31: 703-715.
- 2) Buma, A. G. J., E. J. Van Hannen, L. Roza, M. J. W. Veldhuis and W. W. C. Gieskes 1995. Monitoring ultraviolet-B-induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimmer detection. *J. Phycol.* 31: 314-321.
- 3) Buma, A. G. J., A. H. Engelen and W. W. C. Gieskes 1997. Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella sp.* exposed to ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153: 91-97.
- 4) Dunlap, W. C. and J. M. Shick 1998. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like aminoacids in coral reef organisms: A biochemical and environmental perspective. *J. Phcol.* 34: 418-430.
- 5) Jeffrey, S. W., H. S. Mactavish, W. C. Dunlap, M. Vest and KI. Groenwoud 1999. Occurrence of UVA- and UVB- absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 189: 35-51.
- 6) Doblin, M.A., S. I. Blackburn, and G. M. Hallegraeff 2000. Interspecific variation in the selenium requirement of different geographic strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *J. Plankt. Res.* 22: 421-432.
- 7) Karentz, D., Cleaver, J. E. and Mitcell, D. L. (1991) Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 27: 326-341.
- 8) Wiencke, C., I. Gomez, H. Pakker, A. Flores-Moya, M. Altamirano, D. Hanelt, K. Bischof, and F. L. Figueroa (2000). Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197: 217-229.

[国際共同研究等の状況]

紫外線吸収物質であるマイコスポリン様アミノ酸の研究で、最も障害になっているのは、それぞれの標準試料の入手である。現在、インターネットを使って、世界中の研究者の組織を作る作業を始めたところである。国際的にこの問題の認識をたかめて、今後、商業的に主要なマイコスポリン様アミノ酸の標準試料が研究者に入手できるようにしていく計画である。

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表

- ① Ichikawa, T. and S. Taguchi: Verhandlungen of International Association of Theoretical and Applied Limnology 27, 3343-3348 (2001). "Influence of UVB radiation on growth, carbon/chlorophyll a ratio, and chlorophyll a specific absorption coefficient of marine diatom *Thalassiosira weissflogii*."
- ② Taira, H., K. Yabe, and S. Taguchi: Photomedicine and Photobiology 23, 47-51 (2001) "Absorption characteristics of ultraviolet radiation absorbing compounds of marine dinoflagellate *Scrippsiella sweeneyae*"
- ③ Sugawara, T., K. Hamasaki, T. Kikuchi, T. Toda, and S. Taguchi: Hydrobiologia (Accepted May 2002). Response of natural phytoplankton assemblages to solar ultraviolet radiation (UVB) in the coastal water, Japan.

(2) 口頭発表

- ① 平良ひとみ、田口 哲：光医学・光生物学会（2001）「海産渦鞭毛藻 *Scrippsiella sweeneyae* の紫外線吸収物質 MAAS に対する紫外線放射の影響： 光強度と波長組成」
- ② Taira, H. and S. Taguchi: 7th International Phycological Congress (2001) "Effects of UVR on UV absorbing compounds of marine dinoflagellate *Scrippsiella sweeneyae*"
- ③ 平良ひとみ、田口 哲：日本海洋学会秋季大会(2001)「海産渦鞭毛藻 *Scrippsiella sweeneyae* の紫外線吸収物質シノリンに対する紫外線放射の光度と波長組成の影響」

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

① 平良ひとみ、田口 哲: TAMA 産学連合シンポジウム(2001)「海産生物が作り出す日焼け止めクリーム」

(6) その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について

日本独自の研究を育てるという長期的な展望を持ち、研究を行う必要があるので、影響評価の研究の重要性を理解してもらうために、本研究の成果を利用されるべく努力する。

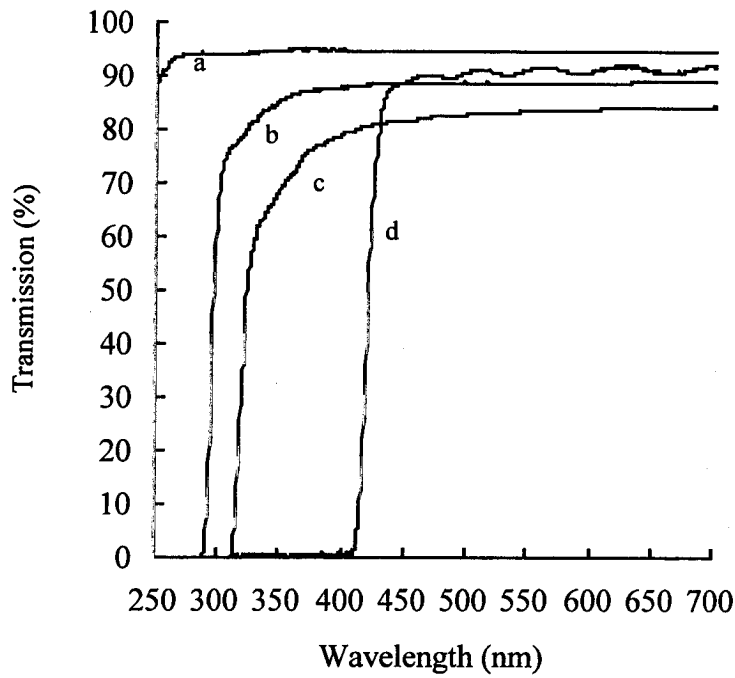


図1. 紫外線照射実験に用いた石英瓶(a)、アセテート・フィルム(b)、マイラー・フィルム(c)、及びUVガード・フィルム(d)の270 nm から700 nm までの光透過特性。

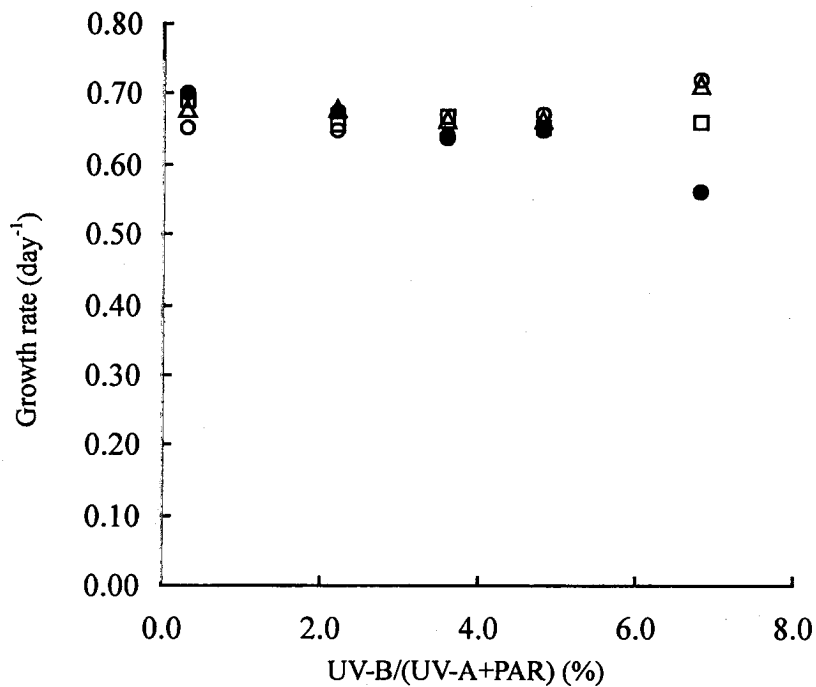


図2. UVB+UVA+PAR(●)、>290 nm UVB+UVA+PAR(□)、UVA+PAR(△)、及び PAR(○) 照射下の成長速度と紫外線相対強度との関係。

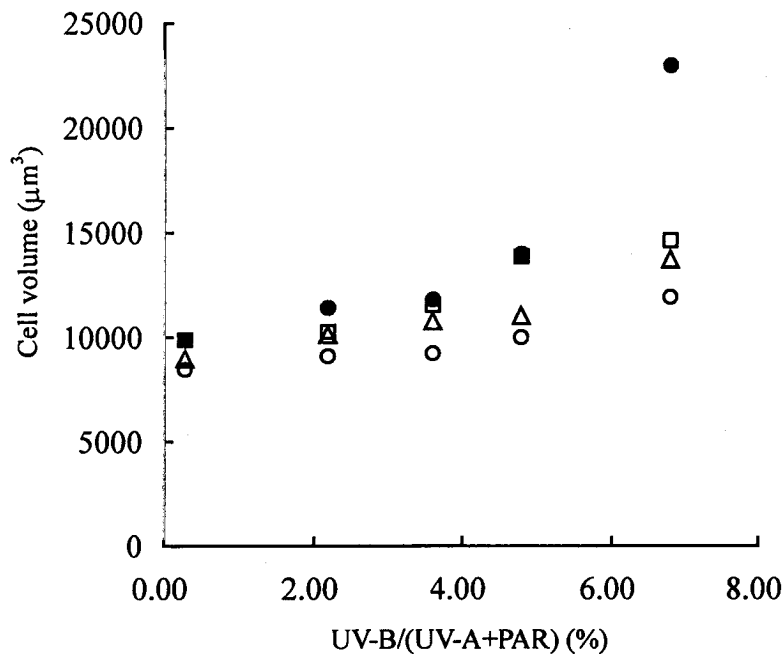


図3. 細胞体積と紫外線相対強度との関係。シンボルは図2を参照。

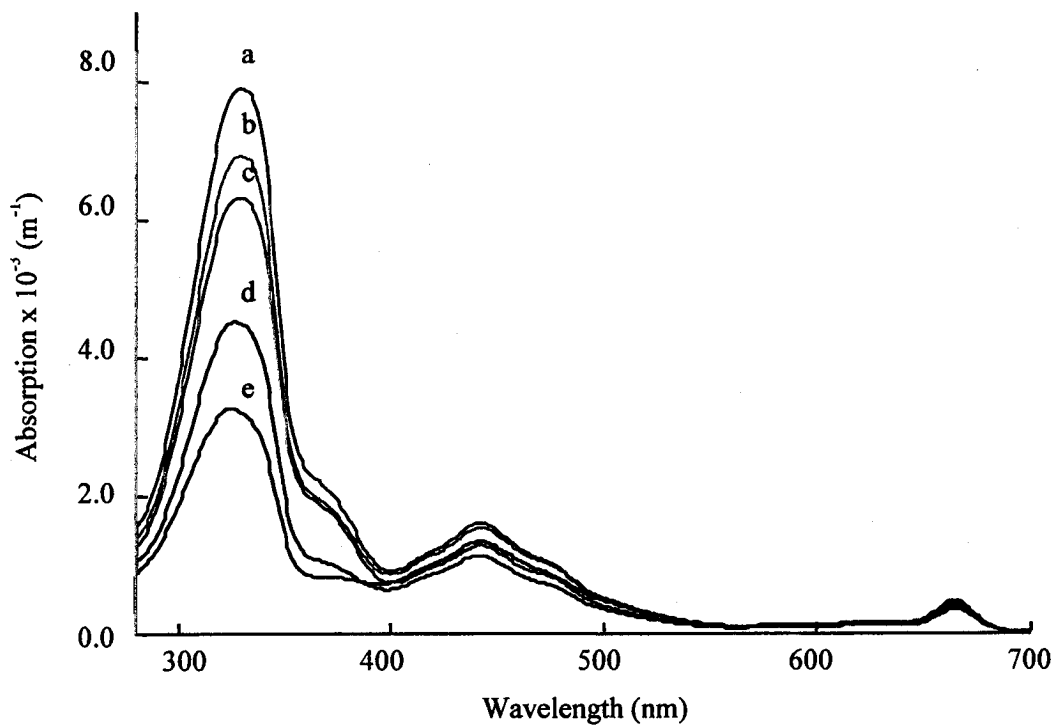


図4. 紫外線相対強度 4.8 %で、UVB+UVA+PAR(a)、>290 nm UVB+UVA+PAR(b)、UVA+PAR(c)、PAR(d)及び実験開始時の PAR(e)照射下における細胞の 80 %エタノール抽出液の吸光分光特性。

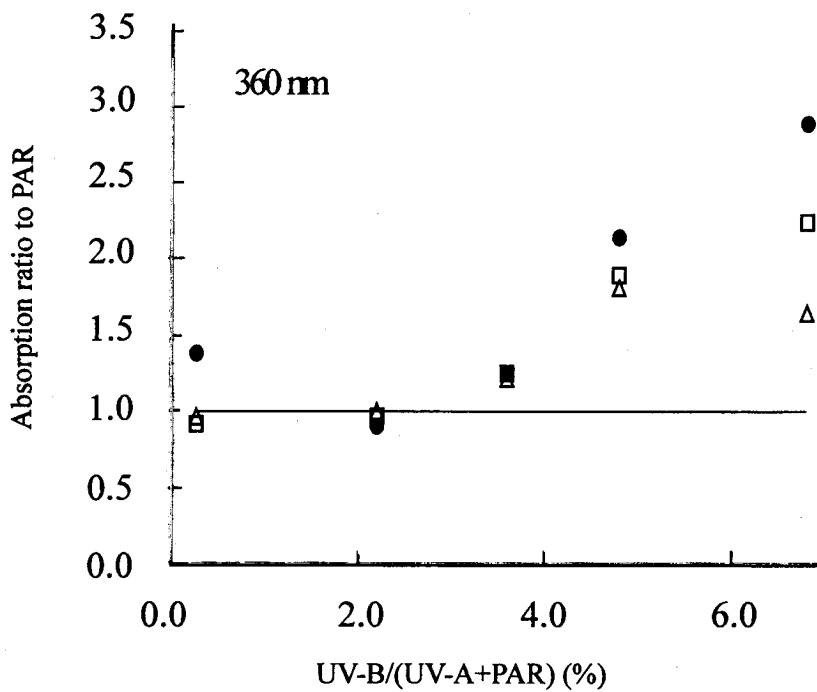
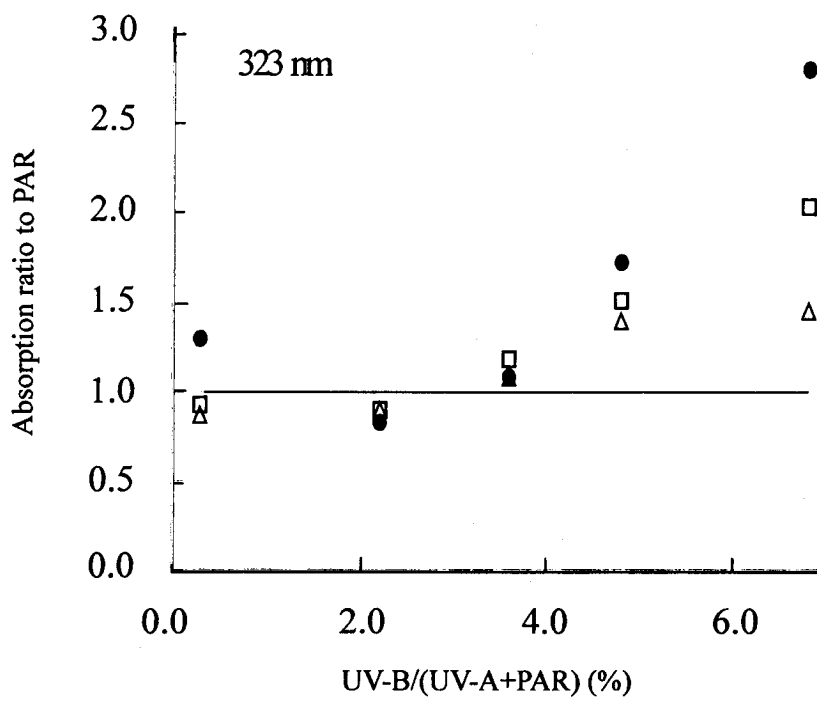


図5. PAR 照射下の 323 nm と 360 nm の吸光度(実線)に対する各紫外線相対強度における 323 nm と 360nm の吸光度の相対値。シンボルは図 2 を参照。

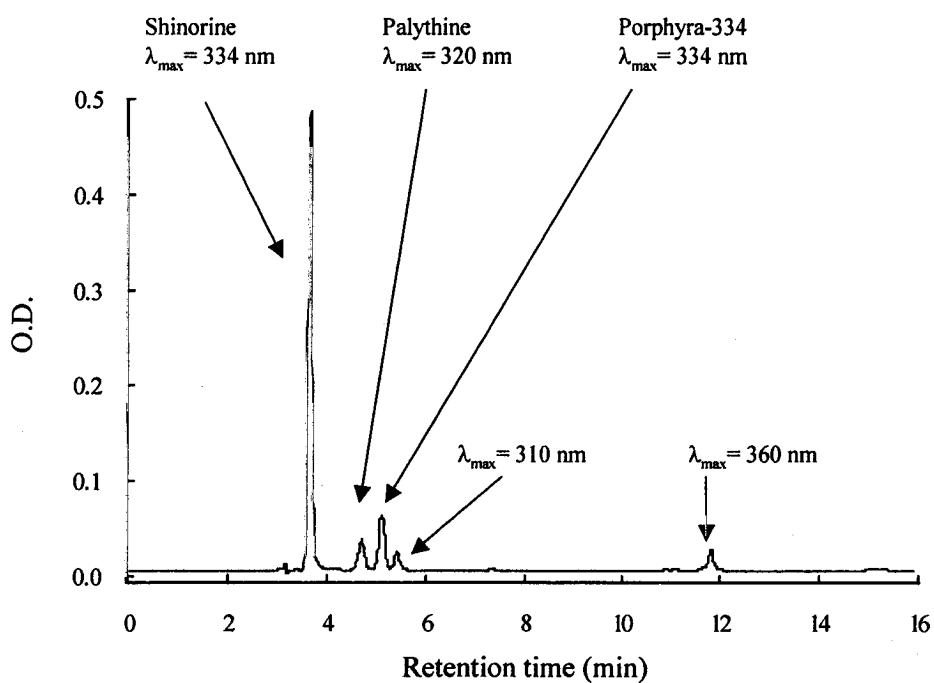


図6. 渦鞭毛藻 *Scrippsiella sweeneyae* で検出された5種類のマイコスポリン様アミノ酸のHPLCによる検出吸光度、最大吸光波長、及び検出時間。

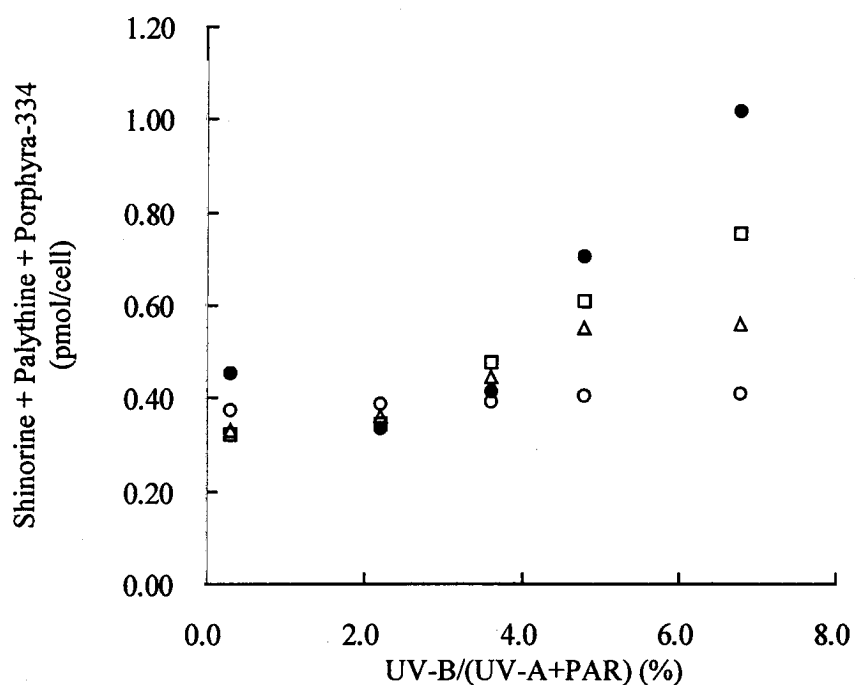


図7. 細胞内のシノリン+パリシン+ポルファイラ-334の合計含量と紫外線相対強度との関係。シンボルは図2を参照。

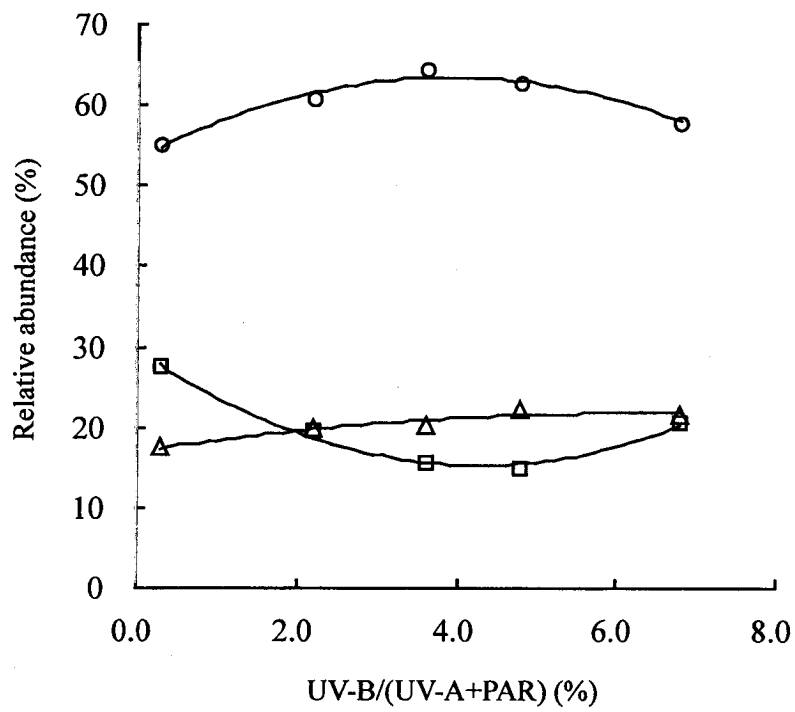


図8. 細胞内のシノリン(O)、パリシン(Δ)、及びポルファイラ-334(□)の相対含量と紫外線相対強度との関係。

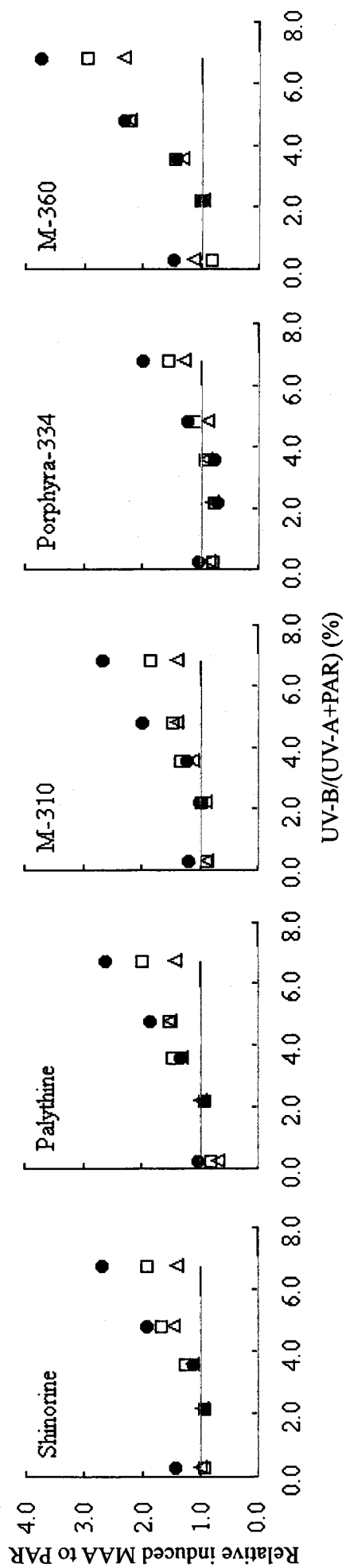


図9. PAR照射下に誘発されたマイコポリン様アミノ酸の細胞含量(実線)に対する各紫外線相対強度におけるそれぞれの細胞含量と相対値。シンボルは図2を参照。