

#### D-4 サンゴ礁生態系の維持機構の解明とその保全に関する研究

##### (2) サンゴ礁生態系に及ぼす環境ストレスの影響の解明

###### ① サンゴ活性測定法の開発と評価

研究代表者 水産庁西海区水産研究所石垣支所 橋本 和正、澁野 拓郎  
資源増殖部 梅沢 敏

平成6-8年度合計予算額 9,080千円  
(平成8年度予算額 2,736千円)

[要旨] 近年、沖縄のサンゴ礁は、開発による赤土の流入、高水温、オニヒトデやレイシガイダマシ類による食害などの影響を受けており、造礁サンゴを中心とする生態系の崩壊が懸念されている。サンゴ礁の保全を考える上では、赤土流出の防止、食害生物の駆除、移植によるサンゴ群集の復元などとともに、現在生存しているサンゴの健康状態を把握することが重要である。

これまでに、橈脚類、マガキ、イワシの稚仔魚などで、核酸比(RNA/DNA)を成長量の指標とした研究例が報告されている。そこで本研究では、核酸比がサンゴの健康状態の指標として有効かどうか、について検討を行った。

まず、Clemmesenの方法による核酸の抽出法がサンゴに適用できるか、について検討した。そこで、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)液により核酸を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、DNAとRNAが抽出されていることが確認できた。また、抽出液をRNaseで処理したところRNAは分解されたこと、エチジウムブロマイドを加え蛍光光度計で測定すると核酸量が定量的に測定できたことから、Clemmesenの方法がサンゴにも応用できることが明らかとなった。また、サンゴ体内の共生藻が持つ核酸の量は無視できるほど微量であったことから、核酸比分析の際に共生藻を分離する必要のないことも明らかとなった。

アザミサンゴとエダコモンサンゴにおいて、核酸比と乾燥重量/DNAとの間に高い相関が認められた。乾燥重量/DNAは細胞あたりの乾燥重量の指数と考えられるため、核酸比はサンゴの栄養状態の指標として有効である、と考えられる。

次にアザミサンゴを自然光下と遮光下で飼育し、光の条件がサンゴに与える影響について検討を行った。その結果、遮光下において、飼育開始後4日目に核酸比、共生藻数、乾燥重量/DNAの値が有意に低下した。遮光下ではサンゴから共生藻が放出され、タンパク合成が抑制されることが推察された。また、乾燥重量/DNAの値の低下は、栄養状態の悪化を示しているものと思われる。

[キーワード] サンゴ、栄養状態、核酸比、乾燥重量/DNA

[本文]

#### 1. 序

近年、沖縄では造礁サンゴを中心とする生態系の破壊が懸念されている。1970年代から80年代にかけては、沖縄本島周辺や八重山諸島でオニヒトデの大発生が観察され、サンゴ群集は壊滅的

な打撃を被った。また、80年代以降、異常高水温が原因と思われるサンゴの白化現象（サンゴが共生藻を放出し白くなってしまいう現象で、そのまま死に至るケースも多いとされる）も観察されている。さらに、沖縄の本土復帰以後は、各地で行われた宅地開発・農地開発・公共事業などにより、大量の赤土がサンゴ礁へ流れ込むようになった。これらの要因の結果、沖縄のサンゴ礁の90%以上が死滅したとも言われている。今後、沖縄のサンゴ礁生態系の保全を考える上では、赤土流入の防止、食害生物への対応、移植によるサンゴ群集の復元、などと並行して、現在生存しているサンゴの健康状態を把握することが重要と考えられる。

これまでに、椋脚類、マガキ、イワシ・ニシンの仔魚などで、核酸比(RNA/DNA)を成長量の指標とした研究例が報告されている。たとえばBuckleyはハタや異体類の仔魚において核酸比が成長率の指標となっていることを示した<sup>1)・2)</sup>。ClemmesenはBuckleyの核酸抽出法よりも感度の良い蛍光色素による定量法、すなわち1尾のニシンの仔魚から核酸を抽出し定量できる手法を開発した<sup>3)</sup>。また、Shimizu et al.はイワシ仔魚の核酸比を分析し、黒潮外洋域の仔魚の栄養状態が沿岸域の仔魚に比べて悪いことを示した<sup>4)</sup>。サンゴの核酸比についてはこれまでに報告例が無いが、他の生物と同様に成長の指標として使える可能性がある。

サンゴでは、骨格表面積あたりのタンパク、脂質、炭水化物、共生藻数、クロロフィルなどを測定した研究例が多く報告されている。しかし、サンゴの骨格は複雑な形をしているため、その表面積の測定は大変手間がかかる。核酸比の場合、表面積の測定は不要であるため、成長量や栄養状態の指標として使えれば、簡便に評価できる方法として期待できる。

そこで本研究ではサンゴから核酸を抽出し測定する手法の検討を行った。また、核酸比の指標としての有効性を明らかにするため、サンゴにストレスを与えた場合の核酸比やその他の指標の変化を調べた。サンゴに対するストレスとしては水温・塩分・光などが挙げられるが、サンゴは共生藻からの光合成産物に依存していることから、本研究では遮光条件で飼育した場合のサンゴの反応について検討を行った。

## 2. 材料と方法

### (1) 核酸抽出・測定法の検討

#### ・サンゴ

沖縄県瀬底島及び石垣島で採集したアザミサンゴ *Galaxea fascicularis* 及びエダコモンサンゴ *Montipora digitata* を材料として用いた。

#### ・試薬類

エチジウムブロマイドはLifeTechnologies社製を用いた。核酸の標準試料には、サケ精子DNA（LifeTechnologies社製）と酵母RNA（和光純薬工業製）を用いた。ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール、プロティナーゼKは和光純薬工業製を用いた。RNaseはAmersham社製を用いた。プロティナーゼKとRNaseは、Tris-Buffer（0.05 M Tris, 0.1M NaCl, 0.01M EDTA, pH 8.0）に溶解し、最終濃度をそれぞれ1mg/ml、0.01mg/mlとした。電気泳動のゲルにはSIGMA社のAgarose Type II Medium EEOを用い、TBE-Bufferに溶解し濃度1%のゲルとした。

#### ・共生藻の分離

造礁サンゴ類はその細胞内に共生藻と呼ばれる渦鞭毛藻を有しているため、サンゴの核酸比を

測定する場合、混入する渦鞭毛藻の核酸量を確認する必要がある。そこで、サンゴ組織のホモジネートにプロティナーゼK（最終濃度0.2mg/ml）、ラウロイルサルコシン酸ナトリウム（最終濃度0.5%）を加え、5分間攪拌、37℃で1時間インキュベートの後、3000×gで5分間遠心した。この上清と沈殿物をそれぞれ生物顕微鏡で検鏡したところ、共生藻は上清には認められず、すべて沈殿していることを確認した。そして、この上清と沈殿物のそれぞれから、後に示す方法により核酸を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行い、DNAおよびRNAのバンドの有無を確かめた。またエチジウムブロマイドを用いた蛍光法（蛍光光度計で測定）により核酸の定量を行った。

・核酸の抽出

核酸の抽出はClemmesenの方法を一部改変して行った（図1）。まず、WaterPik（TELEDYNE WATER PIK社製）によりTris-Bufferをサンゴ群体に吹きつける方法で組織を骨格から分離した<sup>5)</sup>。

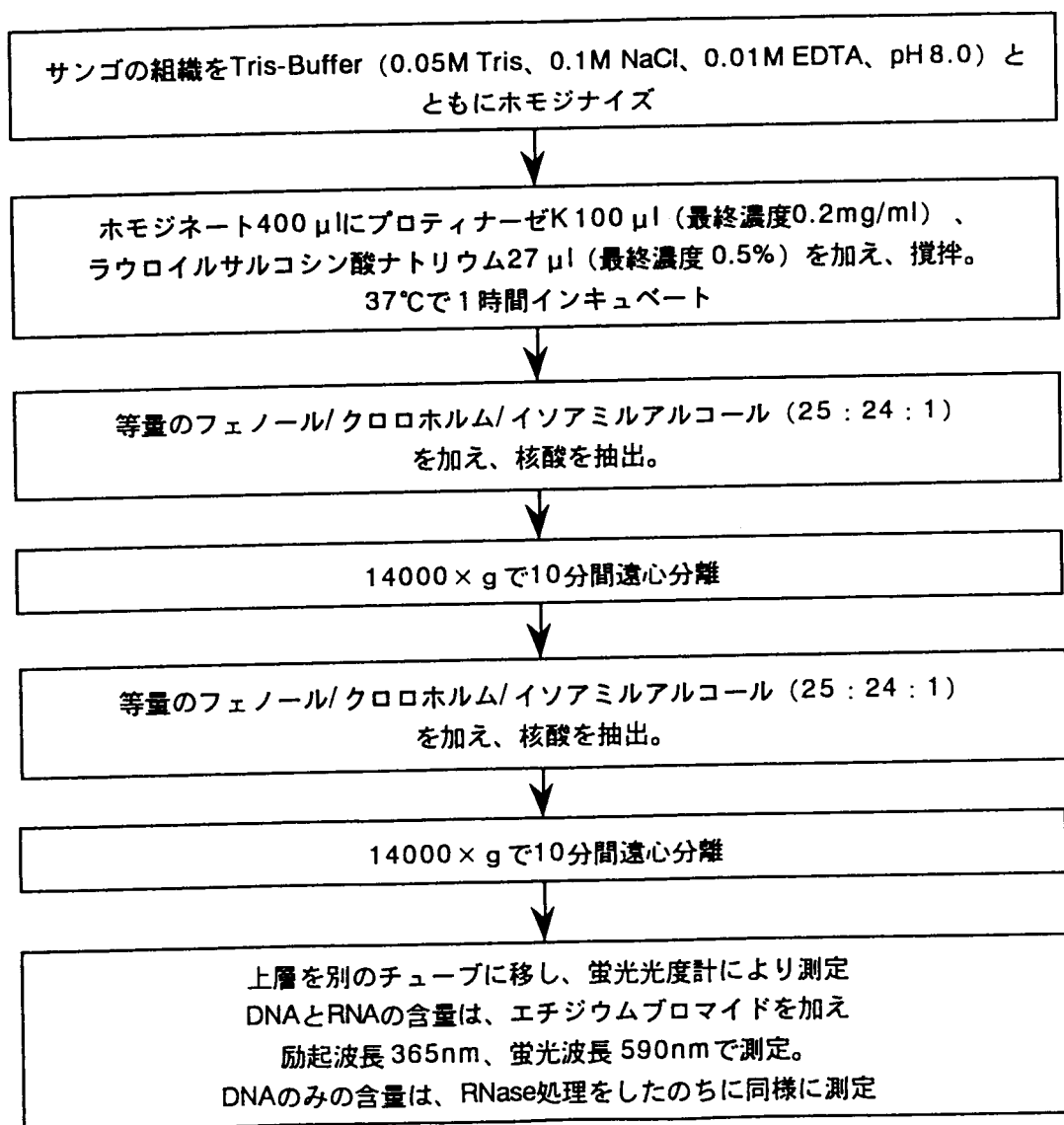


図1 サンゴにおける核酸抽出の手順

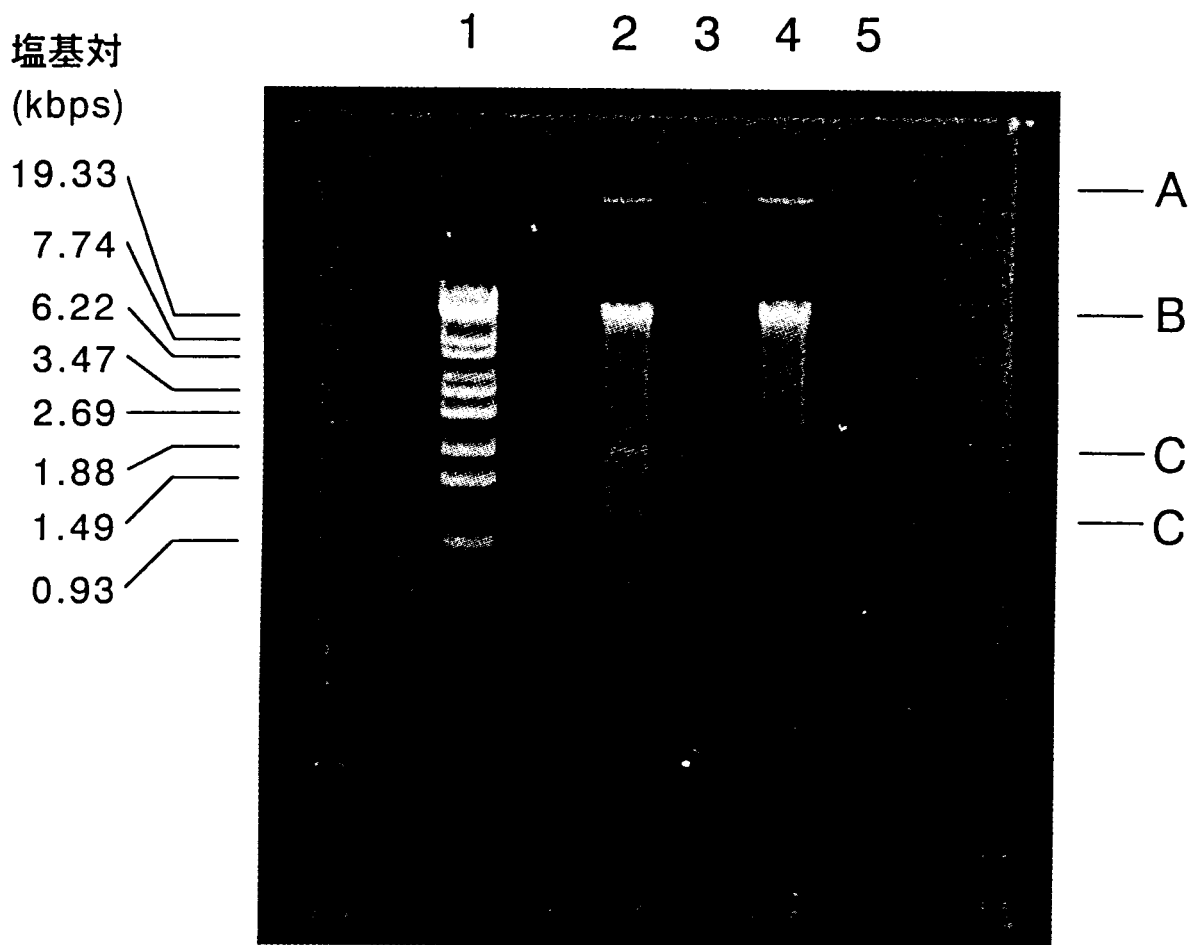


図2 アザミサンゴから抽出した核酸のアガロースゲル電気泳動

- レーン1 : 分子量マーカー (λ DNAをSty Iで分解)  
 2 : ホモジネートの上清から抽出した核酸  
 3 : ホモジネートの沈澱物から抽出した核酸  
 4 : レーン2のサンプルをRNase処理したもの  
 5 : レーン3のサンプルをRNase処理したもの

- A : 泳動開始点  
 B : DNAのバンド  
 C : RNAのバンド (2本)

この組織を冷却遠心機により沈澱させホモジナイズし、プロティナーゼK（最終濃度0.2mg/ml）、ラウロイルサルコシン酸ナトリウム（最終濃度 0.5%）を加え、5分間攪拌、37℃で1時間インキュベートし、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25:24:1）混液を等量加え、10分間攪拌した。そして14000×gで10分間遠心し、上層（核酸の溶けている水層）をマイクロピペットにより別のチューブへ移した。この抽出工程を2回行い、得られた抽出液を2つに分注した。一方には、抽出液0.15mlにTris Bufferを1.0ml、1mg/mlのエチジウムブロマイドを0.05ml加え、蛍光光度計（励起波長 365nm、蛍光波長 590nm）で核酸（DNA+RNA）の定量を行った。もう一方の抽出液にはRNaseを加え、37℃で30分間インキュベートしRNAを分解したのち、同様に核酸（DNA）を定量した。この2つの値の差をRNAの含量とした。蛍光強度から核酸量への換算には、サケ精子DNAと酵母RNAから得られた検量線を用いた。

#### ・ゲルへの泳動

電気泳動はミューピッド電気泳動システムにより行い、エチジウムブロマイドで染色したあと、ポラロイドカメラで写真撮影を行った。分子量のマーカーにはλDNAを制限酵素Sty Iで分解したものを使用した。

#### ・組織乾燥重量の測定

核酸比との比較を行うため、核酸抽出に用いたサンゴのホモジネートの一部を60℃で24時間乾燥させ、重量を測定した。

### （2）遮光実験

ストレスに対する反応を見るための飼育実験を、沖縄県石垣島の日本栽培漁業協会八重山事業場で行った。実験には石垣島浦底湾に生息するアザミサンゴを用いた。100個程度のポリプを持つ群体を一つ採集し、ポリプを一つずつプラスチック板に植えつけ、馴致させるため自然光下で3カ月間の流水飼育を行った。

FRP水槽を2個用意し、一方は日光が直接あたる場所に置き（明区とする）、もう一方は黒いビニールで覆った（暗区とする）。そして、馴致させたアザミサンゴをそれぞれの水槽に収容し、4日間の流水飼育を行った。飼育後、直ちにWater Pikを用いて組織を骨格から分離し、分析までの間-80℃で凍結保存した。

サンプルは解凍後ホモジナイズし、上記の方法により核酸を抽出し、蛍光光度計を用いて核酸量の測定を行った。また、ホモジナイズしたサンプルの一部を、乾燥器で60℃、24時間乾燥し、重量を測定した。さらに、血球計算盤を用いて、サンゴの組織に含まれる共生藻の計数を行った。

## 3. 結果

### （1）核酸抽出・測定法の検討

#### ・核酸の抽出

図2にアザミサンゴから抽出した核酸のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。ホモジネートの上清から抽出した核酸を泳動したレーン2では、塩基対約20kbp付近にDNAのバンドが、2kbp付近と1kbp付近にそれぞれRNAのバンドが認められた。一方、同じホモジネートの沈殿物から抽出した核酸を泳動したレーン3には、いずれのバンドも認められなかった。蛍光光度計による測定においても、上清からは核酸の定量ができたが、沈殿物中の核酸量は微量で計測できなかった。

また、レーン2のサンプルをRNase処理したレーン4では、DNAのバンドははっきりと認められたのに対し、RNAのバンドは全く認められなかった。

・核酸比と乾燥重量/DNAとの関係

図3にアザミサンゴにおける核酸比と乾燥重量/DNAとの関係を示す。核酸比と乾燥重量/DNAの間には、有意な相関 ( $P < 0.001$ ) が認められた。また、エダコモンサンゴにおいても核酸比と乾燥重量/DNAとの間に高い相関 ( $P < 0.001$ ) が認められた (図4)。

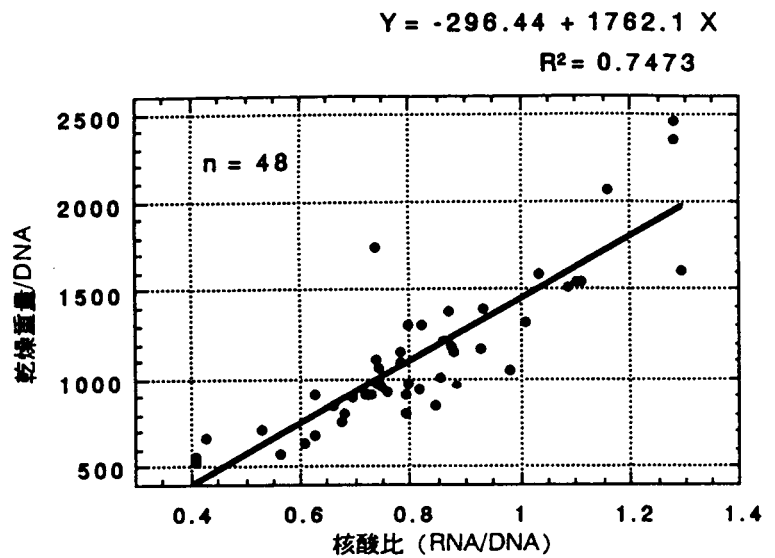


図3 アザミサンゴにおける核酸比と乾燥重量/DNAとの関係

(2) 遮光実験

飼育4日目のアザミサンゴにおける光条件と共生藻数との関係を図5に示す。共生藻数は乾燥重量1 $\mu$ gあたりで表した。明区において共生藻数は $21.72 \pm 5.10$ 個であったが、暗区では約 $12.12 \pm 2.57$ 個であり、明区と暗区との間には有意差 ( $P < 0.001$ ) が認められた。

次に、光条件と核酸比との関係を図6に示した。核酸比の値は明区で $0.77 \pm 0.07$ だったのに対し、暗区では $0.23 \pm 0.10$ であり、明区と暗区との間には有意差 ( $P < 0.005$ ) が認められた。

図7に光条件と乾燥重量/DNAとの関係を示した。乾燥重量/DNAの値は明区で $648.45 \pm 89.18$ だったのに対し、暗区では $481.95 \pm 67.65$ であり、明区と暗区との間には有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。しかし核酸比と乾燥重量/DNAとの間に統計的に有意な相関は認められなかった。

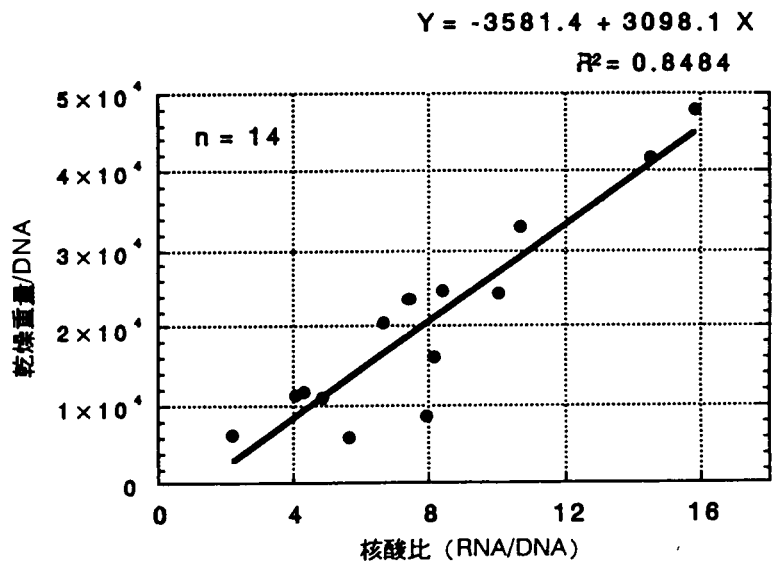


図4 エダコモンサンゴにおける核酸比と乾燥重量/DNAとの関係

4. 考察

(1) 核酸抽出・測定法の検討

・共生藻の分離

電気泳動の結果、サンゴのホモジネートの上清からは核酸が認められたが、その沈殿物からは

ほとんど核酸は認められなかった。ホモジネートの遠心分離後に検鏡した結果から、共生藻は刺胞とともに壊れずに沈澱していたので、共生藻が持つ核酸の量はほとんど無視できるものと思われる。これまでサンゴの共生藻が持つ核酸の量については報告例が無かったが、今回の結果から、サンゴの核酸比を測定する際には共生藻を取り除く必要がない、といえる。

・核酸の抽出

ホモジネートの上清の泳動像から、この抽出法によりDNA、RNAとも高分子の状態抽出できることが明らかとなった。また、このサンプルにRNase処理を施した場合の泳動像では、RNAのバンドのみが消失していたことから、RNase処理によりDNAのみを定量できることも明らかとなった。

これらの結果から、Clemmesenがニシンの仔魚に対して用いた方法は、サンゴに対しても有効であると言える。

・核酸比と乾燥重量/DNAとの関係

乾燥重量/DNAは細胞あたりの乾燥重量の指数と考えられ、サンゴの栄養状態を反映していると考えられる。今回の分析で核酸比と乾燥重量/DNAとの間に高い相関が認められたことから、核酸比はサンゴの栄養状態を表す指標として有効であり、核酸比が高ければ栄養状態は良い、と考えられる。

今回扱ったサンゴはわずか2種であったが、系統分類上遠い関係にあるアザミサンゴ（ビワガラシ科 Oculinidae）とエダコモンサンゴ（ミドリイシ科 Acroporidae）の双

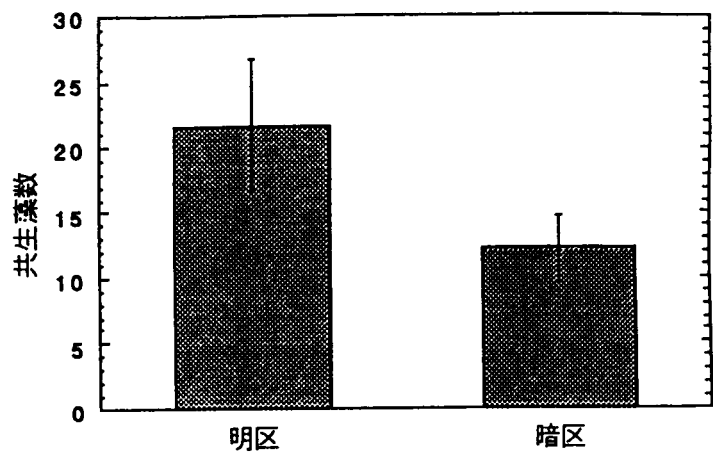


図5 アザミサンゴにおける光条件と共生藻数との関係  
共生藻数は乾燥重量 1 μg あたりの数  
垂線は標準偏差を表す

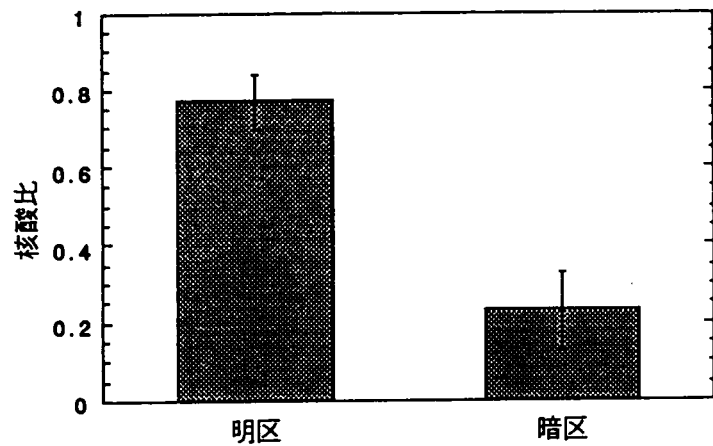


図6 アザミサンゴにおける光条件と核酸比との関係  
垂線は標準偏差を表す

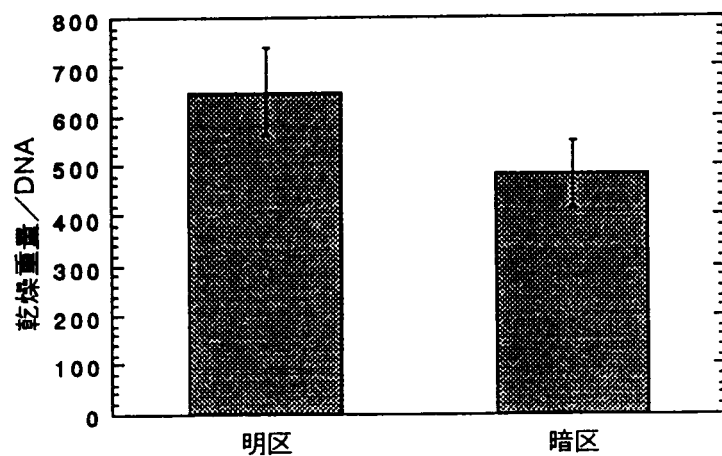


図7 アザミサンゴにおける光条件と乾燥重量/DNAとの関係。垂線は標準偏差を表す

方でこのような関係が認められたことから、他のサンゴについても核酸比が指標として有効であると示唆された。

## (2) 遮光実験

共生藻は光合成産物をサンゴに供給しているが<sup>61)・71)・81)</sup>、暗黒下では光合成ができない。今回の遮光実験のように暗黒下で共生藻数が減る現象については、Hoegh-Guldbergによる研究などいくつかの報告例がある<sup>91)</sup>。これまで、サンゴが共生藻を放出する理由については明らかとなっていないが、光合成をせず呼吸しか行わない共生藻を保持していても無駄なため能動的に放出しているのかもしれない。

さて、今回の我々の実験では、遮光というストレスを与えることにより、共生藻数の減少・核酸比の低下・乾燥重量/DNAの減少が認められた。このことから、遮光下ではサンゴのタンパク合成の抑制と、それに伴う栄養状態の悪化が起きたものと思われる。しかし核酸比と乾燥重量/DNAとの間に統計的に有意な相関は認められなかった。これは、サンプル数が少なかったことによるものと思われる。

Fittらはフロリダのサンゴ礁に生息するマルククメイシ属の1種 *Montastrea annularis* について、白化の度合い（つまり共生藻数）と表面積当たりの乾燥重量・タンパク質・脂質との間に高い相関のあることを示した<sup>101)</sup>。一方、本研究では遮光下において共生藻数の減少とともに核酸比・乾燥重量/DNAの減少も認められたものの、それらの間の相関は認められなかった。これは、Fittらがサンゴの表面積当たりの値で比較しているのに対し、本研究ではホモジネートの乾燥重量あたりの値で比較していること、Fittらが自然状態で見られた白化群体を用いたのに対し、本研究では遮光により共生藻を放出させたこと、といった相違があるためとも考えられる。

サンゴの核酸比測定法の検討を終えた1995年以降、沖縄地方ではサンゴの白化があまり見られず十分なサンプルが得られなかったため、本研究では自然状態で白化した群体についての検討は行えなかった。Fittらの報告から考えれば、白化した群体の栄養状態は良くないと思われるが、その際の核酸比はどのような値となっているのか、また、核酸比の測定をすることで将来の白化を予測できるか、といった点は今後の検討課題である。

## 5. まとめ

- 1) Clemmesenの方法により、サンゴから核酸を抽出できることが明らかとなった。
- 2) 共生藻に含まれる核酸の量はほとんど無視できるほど微量であるため、サンゴの核酸を定量する場合、共生藻の分離は不必要であることが明らかとなった。
- 3) アザミサンゴとエダコモンサンゴにおいて、核酸比と乾燥重量/DNAとの間に有意な正の相関 ( $P < 0.001$ ) が認められた。乾燥重量/DNAはサンゴの栄養状態を表す指数と考えられるので、核酸比はサンゴの栄養状態の指標として有効であることが明らかとなった。
- 4) 系統分類上遠い関係にあるアザミサンゴとエダコモンサンゴの双方において上記の相関が認められたことから、他のサンゴについても核酸比が栄養状態の指標として有効であると示唆された。
- 5) 遮光下でアザミサンゴを4日間飼育したところ、共生藻数の減少・核酸比の低下・乾燥重量/DNAの減少が認められた。統計的に有意ではなかったが、核酸比の低下とともに乾燥重量



DNAも減少する傾向が認められ、核酸比の栄養状態の指標としての有効性が示唆された。

6) 1995年以降、沖縄地方ではサンゴの白化がほとんど見られなかったため、自然状態で白化した群体についての検討を行うことができず、このことは今後の課題として残った。

## 6. 引用文献

- 1) Buckley, L. J. (1979). Relationships between RNA-DNA ratio, prey density and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36, 1497-1502
- 2) Buckley, L. J. (1980). Changes in ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and the effect of starvation. *Fishery Bulletin*, 77, 703-708
- 3) Clemmesen, C. M. (1993). Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 100, 177-183.
- 4) Shimizu, H., Nakata, K. and Nakano, H. (1989). Comparison of nutritional condition of sardine larvae, *Sardinops melanostictus* taken from the coastal and offshore region of the Kuroshio current. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 179
- 5) Johannes, R. E., & Wiebe, W. J. (1970). Method for determination of coral tissue biomass and composition. *Limnology and Oceanography*, 15, 822-824.
- 6) Muscatine, L. and Cernichiari, E. (1969). Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. *Biological Bulletin*, 137, 506-523
- 7) Pearse, V. B. and Muscatine, L. (1971). Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. *Biological Bulletin*, 141, 350-363
- 8) Rinkevich, B. and Loya, Y. (1983). Oriented translocation of energy in grafted corals. *Coral Reefs*, 1, 243-247

- 9) Hoegh-Guldberg, O. and Smith, G. J. (1989). The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylophora pistillata* Esper and *Seriatopora hystrix* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129, 279-303.
- 10) Fitt, W. K., Spero, H. J., Halas, J., White, M. W., & Porter, J. W. (1993). Recovery of the coral *Montastrea annularis* in the Florida Keys after the 1987 Caribbean "bleaching event". *Coral Reefs*, 12, 57-64.

[国際共同研究等の状況] なし

[研究発表の状況]

・学会発表

橋本和正・澁野拓郎・阿部寧・高田宜武(1997) 造礁サンゴの核酸比と光条件との関係、平成9年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p. 80