

## A-5 紫外線の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

#### ① 紫外線増加が海洋生態系の紫外線吸収物質に及ぼす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 田口 哲  
広島大学生物生産学部 上 真一

平成 11～13 年度合計予算額 7,293 千円  
(うち、平成 13 年度予算額 3,000 千円)

[要旨] 海洋動物プランクトンの代表的分類群であるカイアシ類の卵の孵化、海産魚類の代表種であるヒラメの卵の孵化、仔魚の生残などに及ぼす UVB の影響を調査し、いずれの場合にも UVB ドースが増大すると生物に対するダメージは増大することを明らかにした。海洋の極表層に棲息するニューストーン性カイアシ類は、水柱を日周鉛直移動する種類に比較すると、非常に高い UVB ドース下でも孵化が可能であった。それらの成体には紫外線吸収物質であるマイコスポリン様アミノ酸と活性酸素を沈静化させる作用を有するカロチノイド色素が高濃度で含まれていた。マイコスポリン様アミノ酸として、パリシン、シノリン、ポルファイラ-334、マイコスポリングリシンの 4 種が検出された。UVB に対する適応戦略として、ニューストーン性カイアシ類はこれらの物質を食物連鎖を介して蓄積するようになったものと考えられる。ヒラメの卵の発生、孵化、形態形成に及ぼす UVB の影響は、UVB ドースの上昇につれて増大し、また孵化が行われた場合でもその形態は奇形を呈する割合が高かった。ヒラメの卵の  $LD_{50}$  は  $11.6 \text{ kJ m}^{-2}$  であった。水産的に重要な魚種の多くは浮遊卵を産出し、それらは孵化するまで UVB の到達する海表面近くを 1～数日間漂っている。これらの卵には遊泳力は全くないので、有害な UVB から能動的に逃れることができない。そのため、UVB の増大はこれら魚類の再生産や資源動向に重大な影響を与えることが予測される。仔魚に及ぼす UVB の影響を生残率のみならず、DNA 損傷量でも定量化することができた。今後は DNA 損傷量を測定することにより、仔魚の生残をある程度推定することが可能となった。

[キーワード] 動物プランクトン、ベントス、仔魚、紫外線吸収物質、DNA 損傷

#### 1. はじめに

オゾン層の破壊に伴う紫外線(UVB)の増大は海洋生態系を構成する生物の生残に影響を与えるばかりでなく、海洋の生物生産構造を攪乱し、最終的には漁獲量にも重大な影響を与えることが危惧されている。海洋の低次生産過程は、基礎生産者とし

ての植物プランクトンと専らそれらを消費して成長する植食性の動物プランクトンにより構成されている。これらの一般的な特徴は体が小型であり、従って遊泳力が全くないかあってもわずかであることから、場合によっては海面に降り注ぐ有害な UVB から逃れることが困難である。また、魚類やベントスの多くは卵稚仔の時期をプランクトンとして過ごすことから、これらのステージも UVB の影響を受けることが予測される(Saito et al., 1998)。

特に本邦の水産重要魚類であるタカクチイワシ、マイワシ、マダイ、ヒラメ、カレイ、マグロなどは浮遊卵を産出し、それらは孵化するまで UVB の到達する海表面近くを1~数日間漂っている。これらの卵には遊泳力は全くないので、有害な UVB から能動的に逃れることができない。そのため、UVB の増大はこれら魚類の再生産や資源動向に重大な影響を与えると予測される(Hunter et al., 1979; Kouwenberg et al., 1999)。

総ての植物プランクトン、動物プランクトン、魚類やベントスの卵稚仔が一律に UVB に対して脆弱であるのではなく、種類や生活史のステージの違いにより UVB に対する脆弱性(あるいは耐性)は大きく変動する。この違いはどのようなメカニズムに起因するものであろうか。この点を解明することは、海洋生物の UVB に対する馴化、適応のメカニズムを理解するためだけでなく、将来不可避の UVB の増大に対して、海洋生物はどこまで耐え得るか、あるいはどの生物種が優占し、海洋食物連鎖はどのように変化するのかを推定する上でも重要な研究課題である。ある種の海洋生物にはマイコスポリン様アミノ酸(MAAs)と呼ばれる紫外線吸収物質が存在し、それらの物質が生物に対する UVB の有害性を緩和する重要な役割を果たしていることが明らかにされている(Karentz et al., 1991)。一方、UVB による生物に対するダメージは主として生体内の DNA が損傷を受けることに起因している。これまで動物プランクトンに対する UVB の有害性は卵の孵化率、個体の死亡率、摂食量、産卵速度などを基準として測定されてきたが、DNA 損傷物質の定量が可能となれば生物に対する UVB の悪影響をより詳細に明らかにすることが可能となる。

## 2. 研究目的

本年度は、主要動物プランクトンである各種カイアシ類の卵発生に及ぼす UVB の影響の違いを、それらの孵化率を指標として明らかにするだけではなく、同時にそれらに含まれる MAAs の相対含有量とその組成を測定し、カイアシ類の UVB に対する耐性と紫外線吸収物質との関係を明らかにすることを目的とした。また、魚類の代表種としてヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)の卵、孵化仔魚に及ぼす UVB の影響を、それらの孵化率、生残率、奇形発生率を指標として明らかにするだけではなく、同時に DNA 損傷量との関係を調査することを目的とした。

## 3. 研究方法

### (1) 材料

### ① カイアシ類

瀬戸内海各地あるいは島根県の中海で採集し、広島大学生物生産学部附属練習船「豊潮丸」の船上で、あるいは直ちに広島大学生物生産学部へ運搬した後、成体雌を分離し、濾過海水の入ったガラスビーカー内で産卵させた。産出後6時間以内の卵を分離し、下記の実験に供した。また、各種カイアシ類の成体を100-150個体分離し、MAAsの含有量の測定に使用した。

### ② ヒラメ

広島県竹原市の株式会社電発環境緑化センターにおいて、水温と光周期を調節してヒラメ親魚の成熟をコントロールし、20トン水槽内(水温:15-18°C)で自然産卵した受精卵をオーバーフローした海水と共に目合い300 $\mu$ mのネットで採集した。受精卵は魔法瓶に收容し、1時間以内に東広島市の広島大学生物生産学部まで運搬した。実験開始前の受精卵の主体は8-32細胞期であった。

また、約3日間インキュベートすることにより得た孵化直後の仔魚も下記の実験に供した。

### (2) 紫外線照射実験

カイアシ類とヒラメに対する紫外線照射実験は、温度と光の調節が可能なキャビネット(サンヨー、MLR-350)内で人工照明を使用して行った。カイアシ類の卵を適当数(50-100個)60mlの濾過海水を満たした75ml容ガラス製結晶皿に收容し、UVCを遮蔽するためにカッティングシートを貼り付けた。魚卵、孵化仔魚の場合には、適当数(約100個体)濾過海水を満たした800ml容石英ガラスビンに收容し、周囲をカッティングシートで覆った。

キャビネット上部に紫外線ランプ(光源:東芝健康線ランプ、20SE)を取り付け、ランプから異なる距離に結晶皿、ビンを置くことにより、異なるUVB放射照度に暴露させた。UVBの放射照度の測定にはInternational Light社のIL-1700を使用した。カイアシ類の実験では種類により温度を18-25°Cに設定し、UVBを12時間照射した後、卵は暗黒条件下で24時間インキュベートした。孵化したノープリウスを計数することにより孵化率を産出した。また、ヒラメの卵は温度17-18°CでUVBを12時間照射した後、暗黒条件下で48時間インキュベートし、孵化率、奇形発生率を決定した。孵化仔魚に対しても同様にUVBを12時間照射した後、生残率、奇形発生率を測定した。さらに、UVBを遮蔽するルミラーシートを覆った結晶皿、ビンにカイアシ類、ヒラメの卵、仔魚を收容したコントロール実験も用意した。

### (3) MAAs、カロチノイド色素の含有量の測定

各種カイアシ類成体雌100-150個体をホモジェネートビンに收容し、80%メタノール中でホモジェネートした。内容物を遠心分離ビンに移し、遠心分離(5000rpm、10分間)後、その上清液の250-800nmの範囲における吸光度を分光光度計(島津、UV-1200)で測定した。既にMAAsは310-360nmの範囲に、カロチノイド色素は470-506nm

にそれぞれ吸収極大が存在することが明らかになっているので、単位炭素重量当りの吸光度によりこれらの相対的な含有量を推定した。

また、一部のカイアシ類について、HPLCによるMAAsの定性、定量を行った(本測定には、北海道東海大学工学部、服部 寛、矢田和夫教授の協力を頂いた。なお、MAAsの標準物質は矢田教授所有のものを使用した)。

#### (4) DNA 損傷物質の測定

ヒラメの卵、仔魚は照射実験終了後、50-200 個体を塩水- エタノール混液の入った小プラスチック容器中に入れて-20 °Cの冷凍庫に保存し、後日 DNA を抽出キット(QIAamp DNA Blood Mini Kit、Qiagen)を用いて抽出し、DNA 損傷物質であるシクロブタン型ダイマー、(6-4)光産物量の測定を Elisa 法により行った(本測定には、奈良県立医科大学、森 俊雄助教授の協力を頂いた。なお、各損傷物質に対するモノクローナル抗体は森助教授ら(Mori et al., 1991)が開発したものである)。

### 4. 結果・考察

#### (1) 各種カイアシ類の卵発生に及ぼす UVB の影響と紫外線吸収物質

瀬戸内海あるいは地中海で採集したカイアシ類合計9種類(*Acartia hudsonica*, *A. omorii*, *A. sinjiensis*, *Calanus sinicus*, *Centropages tenuiremis*, *Paracalanus sp.*, *Pontellopsis tenuicauda*, *P. yamadae*, *Sinocalanus tenellus*)の卵の孵化率は、UVB ドースの増加に伴い低下した(図 1)。ドースと孵化率の関係から、LD<sub>50</sub>の値が 5 kJ m<sup>-2</sup>以下の比較的脆弱なグループと、LD<sub>50</sub>が 20 kJ m<sup>-2</sup>以上の高い UVB 耐性を有するグループの 2 つに分けられた。後者に属する 2 種は共にニューストン性のカイアシ類であり、昼夜を問わず海洋の極表層に分布している。それらの成体と卵はカロチノイド色素に由来する青あるいは濃緑色を呈している。一方、前者の多くは水柱内を日周鉛直移動し、夜間は表層付近に昼間は底層付近にそれぞれ分布して、太陽光から逃れる行動を示す。またそれらの成体や卵は比較的透明である。

以上のように、カイアシ類の卵の孵化に対する UVB の影響は、鉛直分布パターンの異なるカイアシ類間で大きな違いがあることが明らかとなった。そこで各種のマイコスポリン様アミノ酸の相対的含有量を、310~350 μm の吸収極大値をカイアシ類サンプルの炭素重量で除すことにより比較した。また同様にして 470 μm に吸収極大を有するカロチノイド色素の相対的含有量も比較した(図 2)。ニューストン性のカイアシ類は圧倒的に高いマイコスポリン様アミノ酸とカロチノイド色素を含有しており、これらの相対的含有量と卵の孵化の LD<sub>50</sub>は正の相関を示した(図 3)。このことから、前者による UVB の吸収無害化、後者による活性酸素の沈静作用がニューストン性カイアシ類の UVB に対する耐性を高めていると考えられる。

一方、日周鉛直移動を行うカイアシ類は、卵が表層付近にトラップされた場合とか浅い水底上に産出された場合には、UVB による再生産の阻害を受けることが予測される。

マイコスポリン様アミノ酸の測定の際に、マイコスポリングリシンと思われる物質が検出されたが、本標準物質を所有していないので、パリシンと同様の分子吸光係数を有すると仮定して、その含量を推定した。ニューストーン性カイアシ類4種 (*Labidocera euchaeta*, *Pontella spinicauda*, *Pontellopsis tenuicauda*, *P. yamadae*)には、 $0.54\text{--}3.53\ \mu\text{g mg C}^{-1}$ の高濃度のマイコスポリン様アミノ酸が含まれており、上記の吸光度を基準とした相対的な含有量の結果を裏付けた。4種のマイコスポリン様アミノ酸(パリシン、シノリン、ポルファイラ-334、マイコスポリングリシン)が検出され、そのうちポルファイラ-334、マイコスポリングリシンが最も主要な成分であった(図4)。

日周鉛直移動を行うカイアシ類の *Acartia hudsonica*, *A. sinjiensis*, *Sinocalanus tenellus* では、全くマイコスポリン様アミノ酸を含有していないか、あっても極微量であった( $0.05\ \mu\text{g mg C}^{-1}$ )。その場合、シノリンのみが検出された。

マイコスポリン様アミノ酸はカイアシ類によって生合成されることはないので、ニューストーン性カイアシ類は、マイコスポリン様アミノ酸を合成する植物プランクトンやそれらを捕食した微小動物プランクトンなどを餌として取り込み、その結果、高濃度のマイコスポリン様アミノ酸を蓄積するようになったのであろう。食物連鎖を介したマイコスポリン様アミノ酸の転送と濃縮課程は、今後の興味ある課題である。

## (2) ヒラメの卵発生と孵化仔魚の生残に及ぼす UVB の影響

ヒラメ受精卵は受精後約 60 時間までに孵化した。UVB ドース  $10\ \text{kJ m}^{-2}$  以下では 100 % 近い孵化率を示したが、それ以上では急激に孵化率は低下し、 $15\ \text{kJ m}^{-2}$  以上ではほとんど孵化しなかった。この時の  $\text{LD}_{50}$  は  $11.6\ \text{kJ m}^{-2}$  であった(図5)。

孵化仔魚の形態を観察して、正常魚と奇形魚に分け、奇形魚はさらに脊索が曲がって游泳に支障のある軽度奇形魚と発生が途中で停止して肉塊の状態になった重度奇形魚に分けた。孵化率が約 100 % の低ドースにおいても 50 % 以上の孵化仔魚が奇形魚となる場合もあった。ドースの増大につれて、重度奇形魚の発生頻度は上昇し、卵の  $\text{LD}_{50}$  ( $11.6\ \text{kJ m}^{-2}$ ) を超えたドースではほぼ 100 % の奇形発生率であった(図5)。

UVB を照射しない光条件下で発生し、孵化した仔魚に異なる UVB 光度で照射した場合、仔魚の生残率は  $28\ \text{kJ m}^{-2}$  までは平均 78% と高かったが、 $35.6\ \text{kJ m}^{-2}$  では生残個体はなかった(図6)。仔魚の生残を基準とした  $\text{LD}_{50}$  は  $32.7\ \text{kJ m}^{-2}$  であり、孵化を基準とした  $\text{LD}_{50}$  よりも遥かに高かった。奇形の発生率はドースが増大するにつれて一般には増大する傾向を示した(図6)。

UVB を照射した卵の DNA 損傷物質の定量を行うことを試みたが、DNA の濃度が低すぎて測定できなかった。これらのことから、約 200 卵のサンプルでは DNA 損傷物質の定量を行うには過少であることが確かめられた。しかし、仔魚 20~50 個体よりなるサンプルを用いて同様の測定を行ったが、今度は十分量の DNA の濃度が確保され、損傷物質であるシクロブタン型ダイマーと(6-4)光産物量の両方の定量が可能

であった。

孵化仔魚に含まれる DNA 損傷物質量を 9 段階の異なる UVB ドース条件下で測定した結果、損傷量はドースの増大につれてほぼ直線的に増加した(図 7)。また UVB ドースと最大奇形発生率との関係は図 8 のようになったことから、DNA 損傷物質量と最大奇形発生率との関係は図 9 のように示された。これらの結果が得られたことから、今後孵化仔魚に含有される DNA 損傷物質量を定量することにより、それらに対する最大奇形発生率を推定することが可能となる。

これまで浮遊性魚卵に対する UVB の悪影響は、カリフォルニア沖のタカクチイワシ(*Englauris mordax*)(Hunter et al., 1979)、セントローレンス湾のマダラ(*Gadus morhua*)(Kouwnberg et al., 1999)について報告されており、今回ヒラメの卵に対して同様に悪影響があることが確かめられた。ヒラメの産卵期に相当する初夏の太陽下でも卵発生の阻害による奇形魚の出現が起こる可能性が高いことが明らかとなった。天然条件下での本種受精卵に対する UVB の影響を正確に評価するには、卵や仔魚の鉛直分布、太陽 UVB の海中への透過状況などを明らかにする必要がある。さらに UVB の悪影響をより定量的に評価するためには、卵に含まれる DNA 損傷物質の測定を行うことが必要であるが、200 卵では測定に必要な DNA 量を確保することができなかった。しかし、20~50 個体の仔魚に含まれる DNA 損傷量は定量可能であり、それらと最大奇形発生率との関係が明らかとなったので、今後は天然の海から採集された本種仔魚に含まれる DNA 損傷物質を定量することにより、それらの生残をある程度推定することが可能となった。

## 5. 本研究により得られた成果

海洋動物プランクトン、魚類の卵稚仔は UVB に対して一般に脆弱であるが、海洋極表層に棲息するニューストーン性のカイアシ類の孵化は高いドース条件下でもほとんど阻害されなかった。それらの成体は日周鉛直移動を行うカイアシ類より遥かに高いマイコスポリン様アミノ酸とカロチノイド色素を含有していた。前者は紫外線吸収物質として、後者は紫外線照射によって発生する活性酸素の沈静剤としての役割を果していると思われる。即ち、紫外線に対する適応戦略として、ニューストーン性カイアシ類は紫外線吸収物質としてのマイコスポリン様アミノ酸を食物連鎖を介して摂取し、蓄積しているものと思われる。

UVB の照射により生体内の DNA が損傷を受けることから、損傷量と孵化率、生残率、奇形率などの生物学的パラメータとの関係を求めることが本研究の目的であった。残念ながら、ヒラメの卵の孵化率と DNA 損傷物質量の関係を明らかにすることはできなかったが、ヒラメ仔魚の最大奇形誘発率と DNA 損傷物質量との関係を初めて明らかにすることができた。

ヒラメの卵は現在の太陽光に含まれる UVB レベルでも、発生の阻害を受ける可能性が高いことが示され、特に、浮遊性魚卵を産出する多くの魚種にとって、今後の紫外線の増大は資源変動を考える上でも重要な要因となることが示唆された。

## 6. 引用文献

- 1) Hunter, J. R., J. H. Taylor and H. G. Moser: Effect of ultraviolet irradiation on eggs and larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and the Pacific mackerel, *Scomber japonicus*, during the embryonic stage. *Photochem. Photobiol.*, 29, 325-338 (1979).
- 2) Karentz, D., E. S. McEuen, M. C. Land and W. C. Dunlap: Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.*, 108: 157-166 (1991).
- 3) Kouwenberg, J.H.M, H.I. Browman, J.J. Cullen, R.F. Davis, J.F. St-Pierre and J.A. Runge: Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish. I. Atlantic cod (*Gadus morhua*) eggs. *Mar. Biol.*, 134, 269-284 (1999).
- 4) Mori, T., M. Nakane, T. Hattori, T. Matsunaga, M. Ihara and O. Nikaido: Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet irradiated DNA. *Photochem. Photobiol.*, 54, 225-232 (1991).
- 5) Saito, H., S. Uye and S. Taguchi: Effects of ultraviolet radiation (UVB) on marine zooplankton. *Global Environ. Res.*, 2, 203-210 (1998).

### [国際共同研究等の情況]

フィリピンの Lacuna 博士と共同研究を実施している。

### [研究成果の発表]

#### (1) 誌上発表(学術誌・書籍)

- ① Lacuna, D. G. and S. Uye (2000): Effects on the survival, feeding, and egg production of the brackish-water copepod, *Sinocalanus tenellus*, with notes on photoproactivation. *Hydrobiologia*, 434: 73-79.
- ② Lacuna, D. G. and S. Uye (2001): Effects of mid-ultraviolet (UVB) radiation on the physiology of the planktonic copepod *Acartia omorii* and the potential role of photoproactivation. *J. Plankton Res.*, 23: 143-155.

#### (2) 口頭発表

- ① Lacuna, D. G. and S. Uye: 7th International Conference on Copepoda, Curitiba, Brazil (1999) Mid-ultraviolet (UVB) radiation: influence on egg hatching success of planktonic copepods.

- (3) 出願特許  
なし
- (4) 受賞等  
なし
- (5) 一般への公表・報道等  
なし
- (6) その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について  
なし



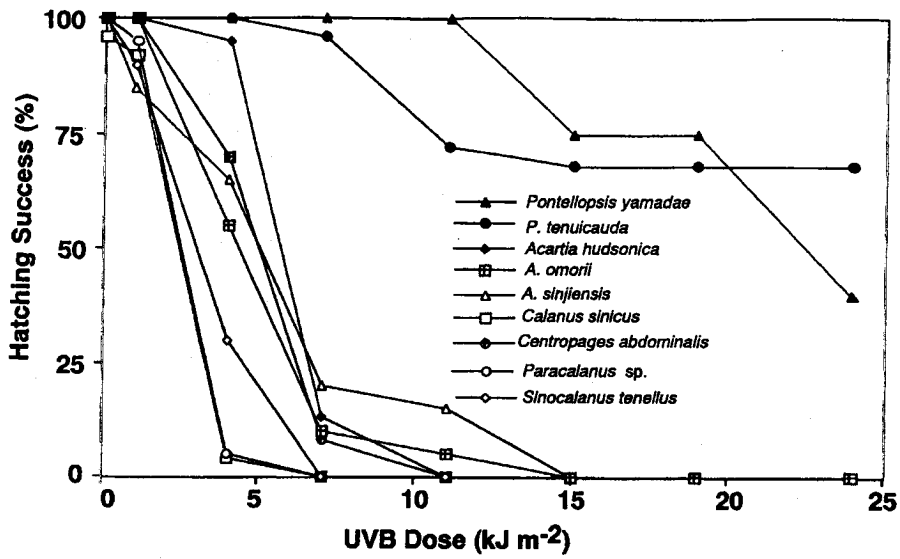


図1 9種類のカイアシ類の卵の孵化に及ぼすUVBの影響

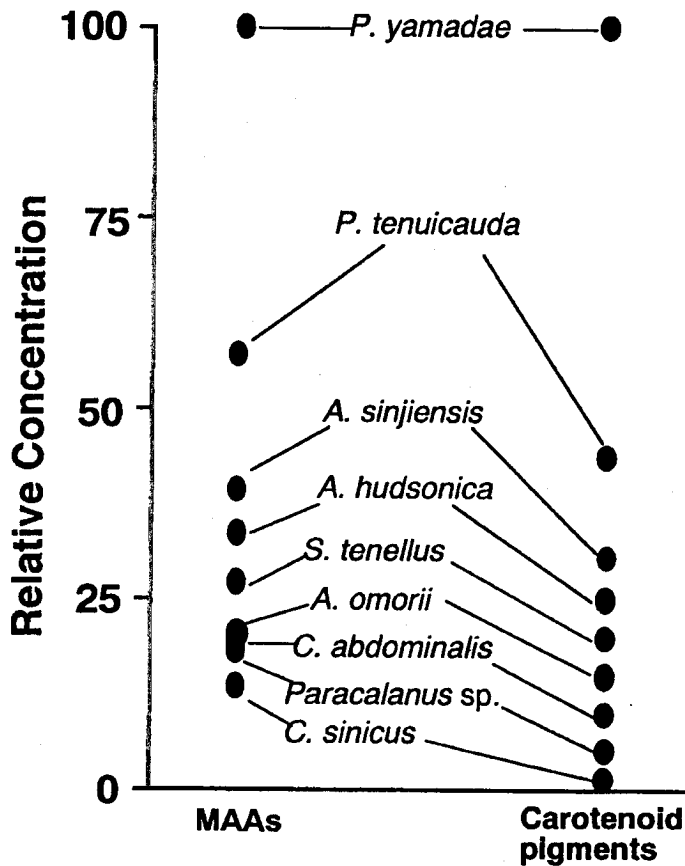


図2 9種類のカイアシ類の成体のマイコスポリン様アミノ酸とカロチノイド色素の含有量の相対的比較

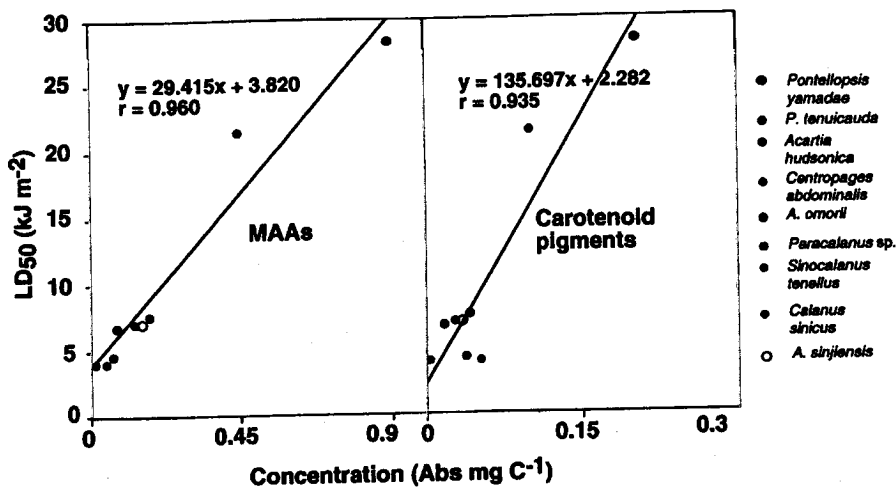


図3 9種類のカイアシ類の卵の孵化率に及ぼすUVBのLD<sub>50</sub>とマイコスポリン様アミノ酸とカロチノイド色素の相対的含有量の関係

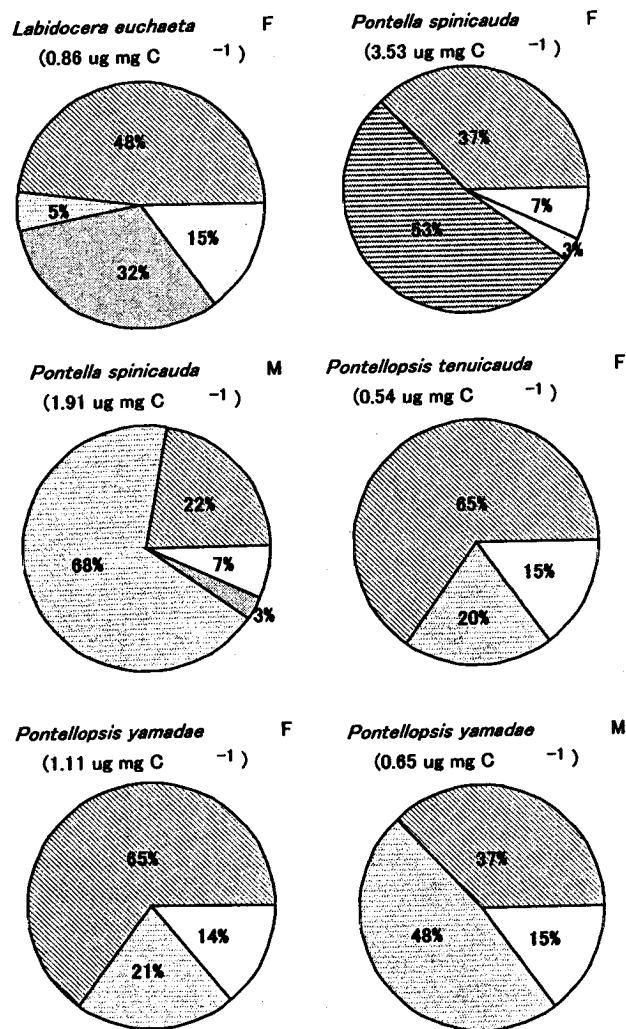


図4 ニューストン性カイアシ類4種の成体に含有されるマイコスポリン様アミノ酸の種類と量

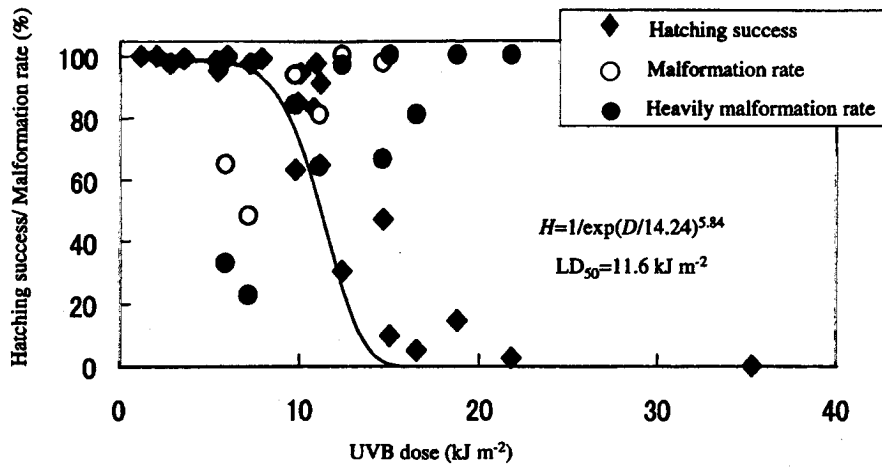


図5 ヒラメの卵の孵化率、孵化仔魚の奇形発生に及ぼすUVBの影響

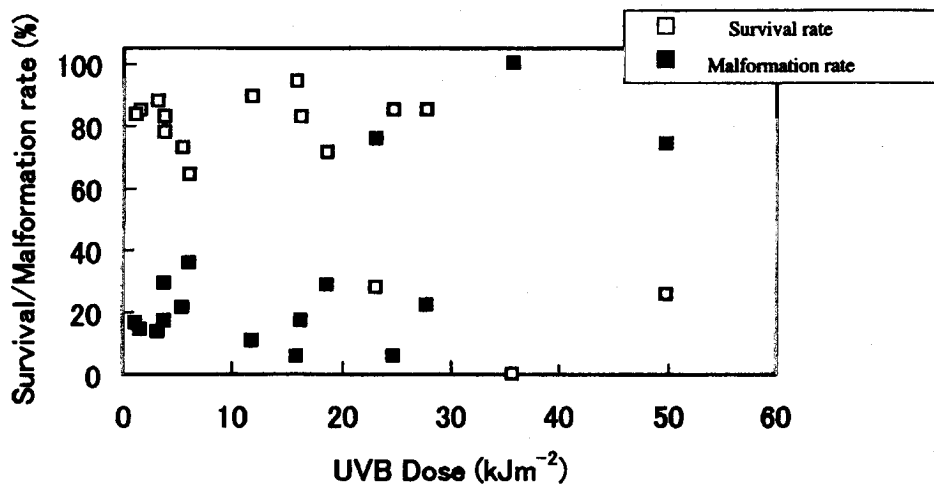


図6 ヒラメ仔魚の生残と奇形発生に及ぼすUVBの影響

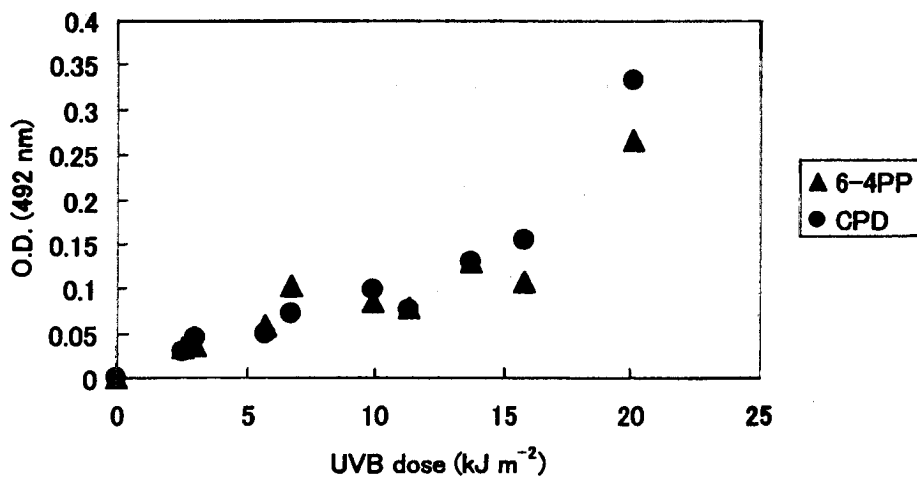


図7 異なるUVBドースで照射したヒラメの仔魚に含まれるDNA損傷物質(シクロブタン型ダイマー、(6-4)光産物)量の比較

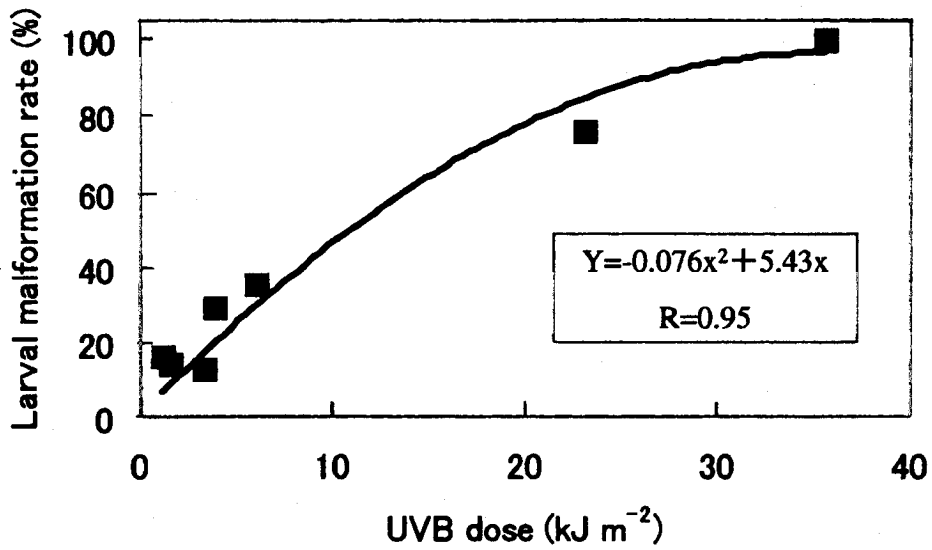


図8 ヒラメ仔魚の最大奇形発生率と UVB ドースとの関係

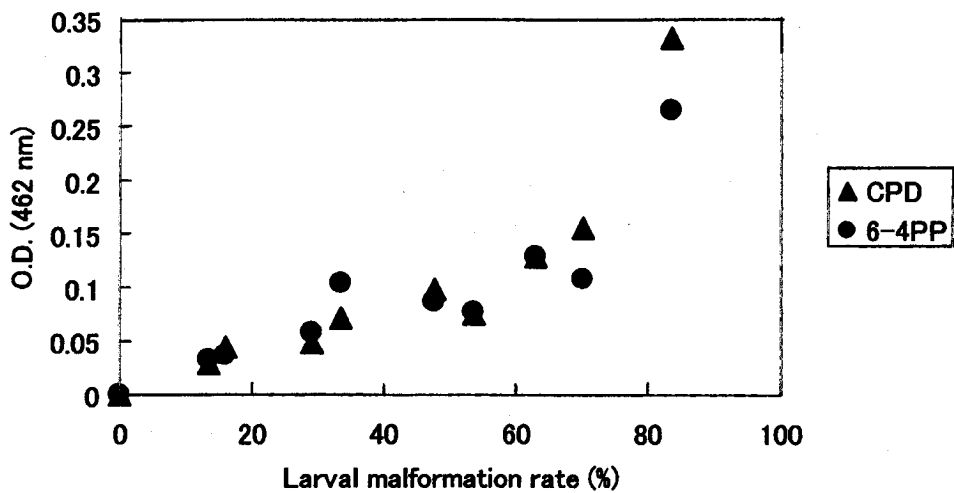


図9 ヒラメ仔魚の最大奇形発生率と DNA 損傷物質量との関係