

たった一つのサンゴポリプで代謝物解析が可能に —サンゴを調べる新たな評価手法の確立に成功—

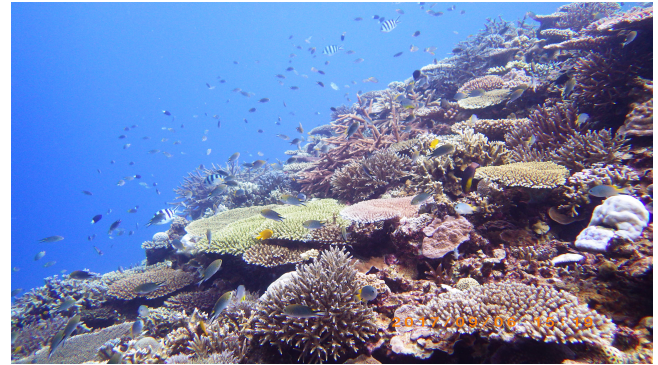
井口 亮^{1) 2)}・飯島 真理子³⁾・水澤 奈々美⁴⁾・大野 良和⁴⁾・
安元 剛⁴⁾・鈴木 淳^{1) 2)}・菅 駿一⁵⁾・田中 健⁵⁾・財津 桂⁶⁾

※本稿は、2024年3月5日に行ったプレス発表(https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2024/pr20240305_2/pr20240305_2.html)に加筆し、再編したものです。

1. はじめに

現在の社会において、人為由来の化学物質の自然界への流出や、栄養塩循環の崩壊による海洋生態系への悪影響が懸念されています。近年の地球の限界を示すプラネタリーバウンダリーの観点では、定義されている九つの境界のうち、化学物質の流出と栄養塩循環の崩壊を含む六つの境界は既に越境していることが報告されています(Richardson *et al.*, 2023)。そのため、マイクロプラスチックを始めとした、海洋における化学物質の規制への取り組みの意識が急速に高まっています。そうした流れの中で、企業の環境(Environment)・社会(Social)・ガバナンス(Governance)に対する取り組みを評価して行うESG投資にも大きな注目が集まっています。さらに、ESG投資を加速させるTNFD(自然関連財務情報開示タスクフォース)の最終提言も、2023年9月に発表されるなど、自然環境に配慮した企業活動が社会的にも強く求められ、社会・経済活動による自然生態系の損失を食い止めて、回復させていくことを目指すネイチャーポジティブの実現に向けた取り組みの重要性が高まっています。このような社会的背景から、化学物質が海洋生物にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするための評価手法のニーズが高まっています。

熱帯・亜熱帯域の沿岸に見られる、美しい景観で知られるサンゴ礁生態系(第1図)は、沿岸保護、漁業、観光など、さまざまな分野で人間活動においても重要な役割を担っています。しかし、サンゴ礁生態系の基盤を支えている刺胞動物の仲間である造礁サンゴ類(以下、サンゴ)が、地球的規模や地域的規模の環境変化に鋭敏であるため、世界的に減少していることが危惧されています。サンゴは、海洋生態系を代表する象徴的な存在として認識されているため、サンゴに対する信頼性の高い環境影響評価手法の確立は



第1図 沖縄県瀬底島近傍で撮影したサンゴ礁生態系。

急務となっています。特に近年、一部の日焼け止め成分がサンゴに悪影響を及ぼすとの報告がなされており、場所によってはその使用が禁止されています。一方で、法制化された根拠となる論文データには議論の余地が多分に残されているとの見方もあり、規制が先行している状態にあります。このような規制面の先行は、過度な紫外線から肌を守る重要な役割を持つ日焼け止めの可能性を制限することにも繋がりがかねません。こうした背景から、実際に日焼け止め成分がサンゴにどのような影響を及ぼすのかを迅速かつ簡便に評価する必要があります。

2. 成果の概要

今回の研究では、サンゴ礁生態系の中でも多く見られ、代表的グループとして知られているミドリイシ属サンゴの一斉産卵時(第2図)に得られたサンゴ幼生を変態ペプチドで着底させ、人為的に共生褐虫藻を添加することで、褐虫藻有無の条件に分けたサンゴポリプを育成して暴露実験に用いました。これまでのサンゴの化学物質影響評価に関する

1) 産総研 地質調査総合センター地質情報研究部門

2) 産総研 環境調和型産業技術研究ラボ

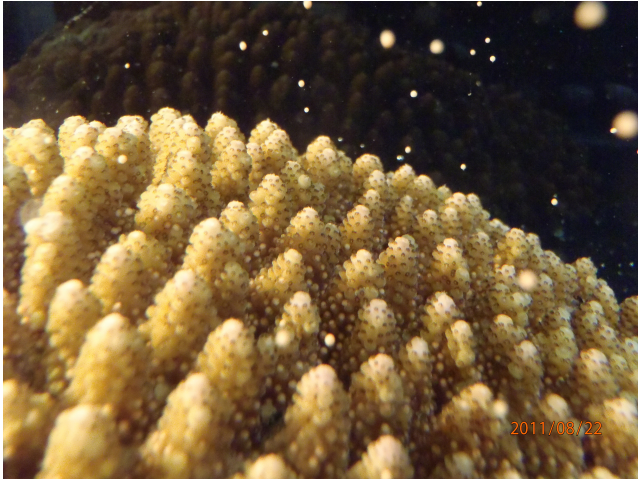
3) 産総研 地質調査総合センター地圏資源環境研究部門

4) 北里大学 海洋生命科学部 〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1

5) 株式会社コーサー 研究所 〒114-0005 東京都北区柴町48-18

6) 近畿大学 生物理工学部 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷930

キーワード：サンゴ、代謝物、環境影響評価、ネイチャーポジティブ



第2図 ミドリイシ属サンゴの一斉産卵の様子。

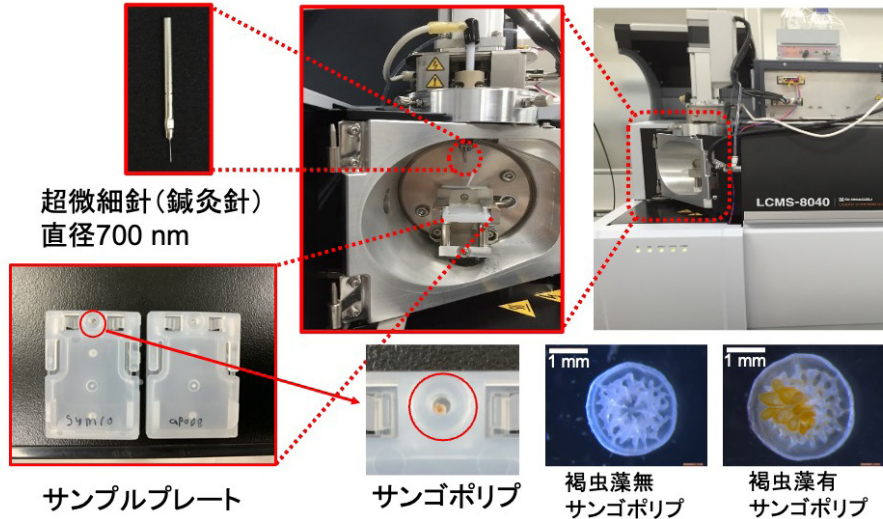
研究では、群体性の親サンゴ片を用いた実験が主流ですが、親サンゴ片は流水水系を用いないと飼育が難しく、止水条件では健全な状態に維持するのが困難です。飼育スペースの問題や、枝片及び飼育水槽の十分な反復数の確保も難しいという欠点があります。一斉産卵時に得られるサンゴ初期ポリプは、サンゴ群体片と比べるとスケールが小さいため、シャーレの上でも飼育ができ、反復数確保も容易で、止水下での化学物質暴露も容易です。そのため、サンゴポリプを用いることで、信頼性の高い暴露実験が可能になります。また、サンゴ初期ポリプが健全に生育できることは、サンゴ幼生の加入が成立する上で欠かせないステップであり、サンゴ個体群維持の観点からもサンゴ初期ポリプ段階での影響評価は極めて重要です。また、生活史の初期段階であるサンゴポリプは親サンゴよりも環境変化に鋭敏であるとされているため、感度の高い影響評価系としても優れています。仮にある化学物質暴露で親サンゴに影響がなかったとしても、サンゴ初期ポリプで影響があるならば、自然界におけるサンゴの個体群存続自体が困難になる可能性があります。また、今回研究対象としたミドリイシ属サンゴのポリプは幼生が共生褐虫藻を持っていないため、人為的に褐虫藻を添加することで、褐虫藻有無での応答評価を実施できることも長所です。サンゴポリプを用いることの大きな欠点は、その元となる配偶子の取得が限られていることですが、研究グループのこれまでのさまざまな工夫により、産卵の機会を複数回確保したり、飼育状況を改善することで、得られた幼生を比較的長く維持したりするなど、実験の機会を増やすことに成功しています。先行研究では、このサンゴポリプ実験系を用いることで、海水中のリン酸塩の負荷が増えると、サンゴの骨格成長が阻害され

ることを突き止めています (Iijima *et al.*, 2021 ; 2021 年 3 月 17 日にプレスリリースを実施)。

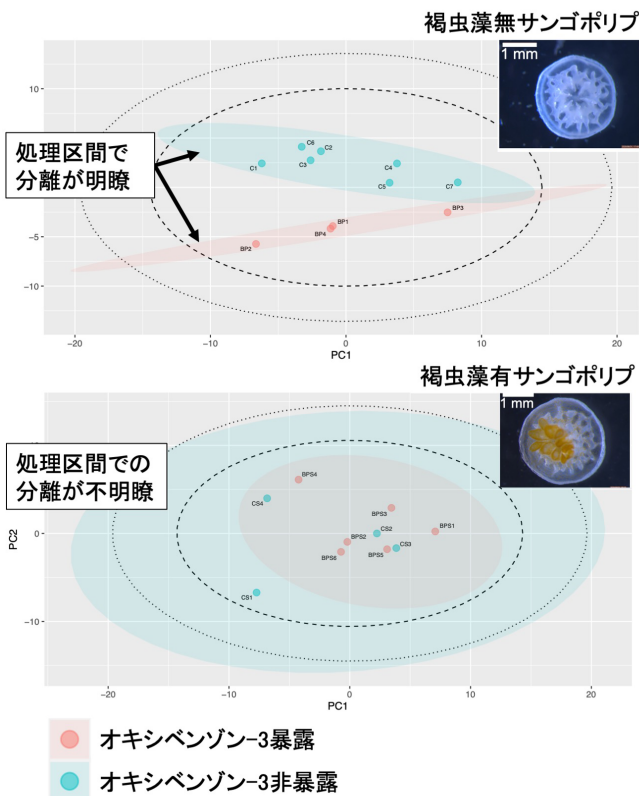
サンゴの飼育実験におけるサンゴの健全状態を評価するものとして、生残率や成長率(石灰化率)、触手運動の活発さなどの生物学的パラメーターが用いられていますが、外部からの観察ベースでの健全評価には限界があります。医学分野などでよく用いられているメタボローム解析(代謝産物(メタボライト)の総体であるメタボロームの増減を、網羅的に解析する手法)では、さまざまな代謝産物を同時に定量化できるため、対象とする生命現象に合わせて注目したい代謝産物の抽出が可能です。また、メタボローム解析は、表現型解析とも解釈できるため、既存の手法では分からない潜在的な影響の検出に優れており、環境影響やストレス評価にも適した手法です。

今回の研究では、ミドリイシ属サンゴの幼生から育成したサンゴポリプを用いて、日焼け止め成分の一つであるオキシベンゾン-3 と、サンゴ-褐虫藻共生体の環境感受性に影響を及ぼす栄養塩(アンモニウムと硝酸塩)暴露サンプルを用意しました。しかし、サンゴポリプの直径はわずか 2 mm 程度と非常に小さく、従来のメタボローム解析を適用しようとする、試料量を確保するために複数のサンゴポリプを混合し、抽出操作などの前処理を行う必要が生じてしまいます。この場合、大量のサンゴポリプを育成する必要があることに加え、得られた結果も平均化されてしまうという欠点が考えられます。そこで本研究では、微細試料の分析が可能な PESI/MS/MS(第3図)を用いた新たな代謝解析プラットフォーム: PiTMaP (Zaitso *et al.*, 2020 ; 2020 年 5 月 25 日にプレスリリースを実施)をサンゴポリプに適用しました。その結果、たった一つのサンゴポリプからでも、代謝プロファイルを取得することに成功しました。本研究では、サンゴポリプ一つごとに解糖系、クエン酸回路、尿素回路、ペントースリン酸経路、グルタチオン代謝、メチオニン経路を構成する代謝物を観察することが可能となりました。

PESI/MS/MS を用いて得られたメタボロームデータは PiTMaP プラットフォームを応用することで、多変量解析も自動的に実行されます。多変量解析の一つである潜在構造投影判別分析 (Projections to latent structures-discriminant analysis, PLS-DA) を適用した結果、褐虫藻のないサンゴポリプでは、オキシベンゾン-3 によっていくつかのアミノ酸の減少など、顕著な代謝プロファイルの変化が見られました(第4図上)。その一方で、褐虫藻を持ったサンゴポリプでは、オキシベンゾン-3 暴露による代謝プロファイルの変化は見られませんでした(第4図



第3図 PESI/MS/MSによる分析の概要図。※原論文の図を引用・改変したものを使用している。クリエイティブ・コモンズ・ライセンス (表示 4.0 国際)。



第4図 オキシベンゾン-3 暴露サンプルを用いた PLS-DA スコアプロット。横軸は第一主成分、縦軸は第二主成分を示す。上図は褐虫藻を持たないサンゴポリプ、下図は褐虫藻を持つサンゴポリプの結果を示す。各点は1サンゴポリプに相当する。破線、点線はそれぞれ全データの95%、99%信頼区間を示す。赤色及び水色の楕円は各群の95%信頼区間を示す。※原論文の図を引用・改変したものを使用している。クリエイティブ・コモンズ・ライセンス (表示 4.0 国際)。

下)。同様の傾向は、アンモニウム暴露サンプルでも確認されました。これは、共生褐虫藻が暴露物質によるサンゴ本体への悪影響を除去している可能性を示しています。今回確立した評価手法は、従来のメタボローム解析が必要であった煩雑な前処理操作が一切不要です。既存のメタボローム解析の前処理操作には1日から2日程度の時間を要していましたが、今回の手法を用いると、わずか3分程度でたった一つのサンゴポリプから内因性代謝物を解析することが可能となりました。

3. 今後の展望

今回確立された新たな評価手法は、ニーズが高まっているサンゴの環境影響評価に広く活用されることが期待されます。人為由来の化学物質による生物への悪影響は、近年大きな注目を集めており (Tian *et al.*, 2021; Vuckovic *et al.*, 2022), そうした影響を回避・あるいは緩和するための工夫が求められます。今回適用した手法は、人為起源物質の影響軽減に向けた代替物質探索のための迅速な手法としても活用可能です。また、化学物質などのリスク評価だけでなく、成長増加・代謝促進のようなポジティブな影響評価に活用されることも期待されます。共同研究先のひとつである株式会社コーセーは、サンゴ養殖の専門家と共同で日焼け止めやその成分が成体サンゴに与える影響の外観評価などを行ってきましたが、今回の評価手法も活用することで、サンゴポリプの微小な変化を捉えることにより、海の環境に最大限配慮した製品開発に今後も取り組んでいくと

しています。産総研では、今後他の研究機関とも協力して、今回の手法をサンゴ以外の魚類や端脚類等の海洋生物にも適用していくことも検討しており、既に遺伝子解析による評価は先行して進めています (Iguchi *et al.*, 2024; 2024 年 2 月 1 日にプレスリリースを実施)。サンゴ自体は、世界中で数百種以上生息するとされており、すべての種で環境影響評価を実施するのは、途方もない時間と労力がかかります。また、既に自然界に流出している化学物質も無数に存在すると考えられ、そうした物質の潜在的な生態系への影響は未知な部分が多いのが現状です。そのため、遺伝子解析や今回用いたような手法で、生体内の代謝産物や遺伝子発現の挙動の詳細を把握し、環境への応答に対する種間の共通性や異質性を理解することで、ネイチャーポジティブの実現に資するための迅速かつ精度の高い環境影響評価の高度化を進めていきたいと思っております。

謝辞：本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業挑戦的研究（萌芽）「サンゴエクスポソーム研究への挑戦」（代表研究者：井口 亮；2019～2020 年度）及び環境調和型産業技術研究ラボの支援を受けて実施しました。

論文情報

掲載誌：Scientific Reports

論文タイトル：Single-polyp metabolomics for coral health assessment

著者：Akira Iguchi, Mariko Iijima, Nanami Mizusawa, Yoshikazu Ohno, Ko Yasumoto, Atsushi Suzuki, Shunichi Suga, Ken Tanaka, Kei Zaitzu

doi：10.1038/s41598-024-53294-8

文 献

- Iguchi, A., Hayashi, M., Yorifuji, M., Nishijima, M., Gibu, K., Kunishima, T., Bell, T., Suzuki, A. and Ono, T. (2024) Whole transcriptome analysis of demersal fish eggs reveals complex responses to ocean deoxygenation and acidification. *Science of the Total Environment*, **917**, 169484. ※プレスリリースのリンクは以下：https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2024/pr20240201/pr20240201.html
- Iijima, M., Yasumoto, J., Iguchi, A., Koiso, K., Ushigome, S., Nakajima, N., Kunieda, Y., Nakamura, T., Sakai, K., Yasumoto-Hirose, M., Mori-Yasumoto K., Mizusawa, N., Amano, H., Suzuki, A., Jimbo, M., Watabe, S. and Yasumoto, K. (2021) Phosphates bound to calcareous sediments hamper skeletal development of juvenile coral. *Royal Society Open Science*, **8**, 201214. ※プレスリリースのリンクは以下：https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2021/pr20210317/pr20210317.html
- Richardson, K., Steffen, W., Lucht, W., Bendtsen, J., Cornell, S. E., Donges, J. F., Drüke, M., Fetzer, I., Bala, G., von Bloh, W., Feulner, G., Fiedler, S., Gerten, D., Gleeson, T., Hofmann, M., Huiskamp, W., Kummer, M., Mohan, C., Nogués-Bravo, D., Petri, S., Porkka, M., Rahmstorf, S., Schaphoff, S., Thonicke, K., Tobian, A., Virkki, V., Wang-Erlandsson, L., Weber, L. and Rockström, J. (2023) Earth beyond six of nine planetary boundaries. *Science Advances*, **9**, eadh2458.
- Tian, Z., Zhao, H., Peter, K. T., Gonzalez, M., Wetzel, J., Wu, C., Hu, X., Prat, J., Mudrock, E., Hettlinger, R., Cortina, A. E., Ghosh Biswas, R., Kock, F. V. C., Soong, R., Jenne, A., Du, B., Hou, F., He, H., Lundeen, R., Gilbreath, A., Sutton, R., Scholz, N. L., Davis, J. W., Dodd, M. C., Simpson, A., McIntyre, J. K. and Kolodziej, E. P. (2021) A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon. *Science*, **371**, 185–189.
- Vuckovic, D., Tinoco, A. I., Ling, L., Renicke, C., Pringle, J. R. and Mitch, W. A. (2022) Conversion of oxybenzone sunscreen to phototoxic glucoside conjugates by sea anemones and corals. *Science*, **376**, 644–648.
- Zaitzu, K., Eguchi, S., Ohara, T., Kondo, K., Ishii, A., Tsuchihashi, H., Kawamata, T. and Iguchi, A. (2020) PiTMAP: A new analytical platform for high-throughput direct metabolome analysis by probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry using an R software-based data pipeline. *Analytical Chemistry*, **92**, 8514–8522. ※プレスリリースのリンクは以下：https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2020/pr20200525/pr20200525.html

IGUCHI Akira, IJIMA Mariko, MIZUSAWA Nanami, OHNO Yoshikazu, YASUMOTO Ko, SUZUKI Atsushi, SUGA Shunichi, TANAKA Ken and ZAITSU Kei (2024) Metabolite analysis is now possible with just coral single-polyp—a new assessment method for studying corals has been successfully established.

(受付：2024 年 4 月 30 日)