

Coral species: *Montipora digitata* エダコモサンゴ (一つのボトルに3本)

Circulating water: natural seawater with a flow rate of 20 ml min⁻¹

実験海水の流速: 自然海水 実験の流速 毎分20ml

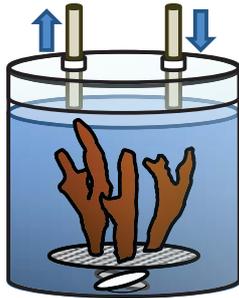
Incubation cases: 27°C, 27°C+bact., 32°C, 32°C+bact. 3 replicates of each)

飼育条件: 27°C、27°C+バクテリア、32°C、32°C+バクテリアの4条件

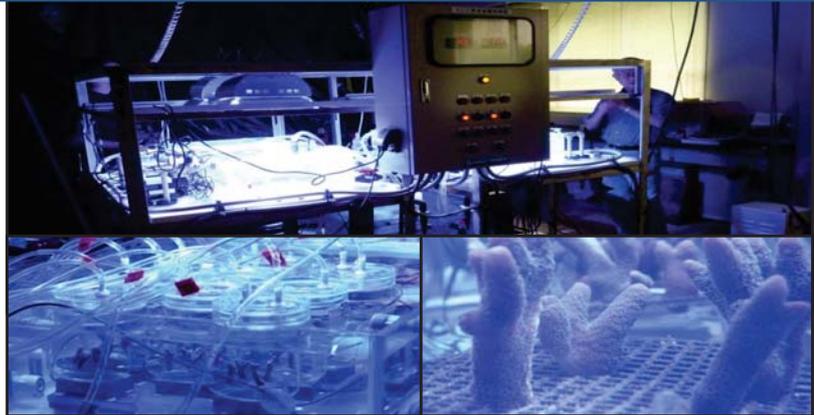
Sampling on day 0, 4 and 8 試料採取日: 0日目、4日目、8日目

Illumination: metal halide lamp (~280 μmol m⁻² s⁻¹) with 12:12h light:dark cycle

メタルハライドランプ 12時間(明)・12時間(暗)

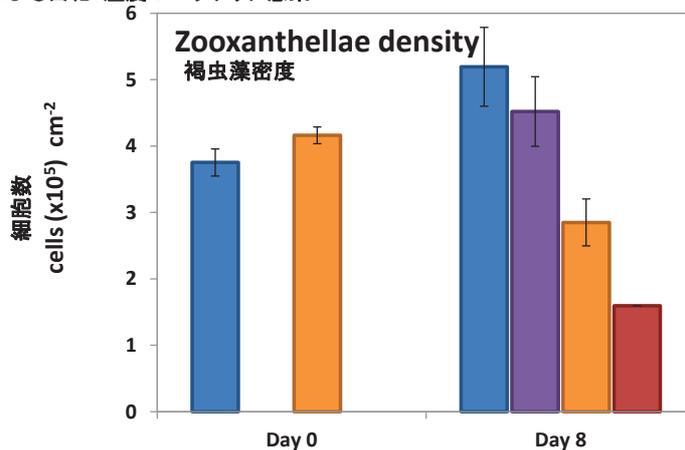


- *800 ml of natural seawater
- *3 coral branches
- *Stirring continuously



2) multiple stress bleaching: Temperature plus bacterial infection

複合ストレスによる白化: 温度+バクテリア感染



The combined effects of high temperature and bacterial infection enhance bleaching

高水温とバクテリア感染の複合的な影響が白化を促進する。
高水温下でサンゴの生理的機能が弱くなり、そこにサンゴが放出する有機物やアンモニアを利用してバクテリアが増殖し、感染し、白化を促進する(新たな検証)

Aspect of coral branches after 8 days incubation

8日間の飼育後のサンゴの様子

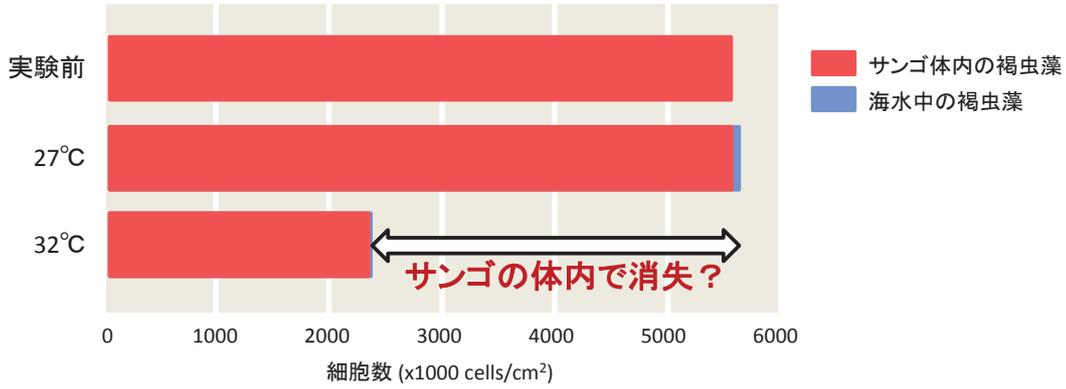


After 8 days of incubation

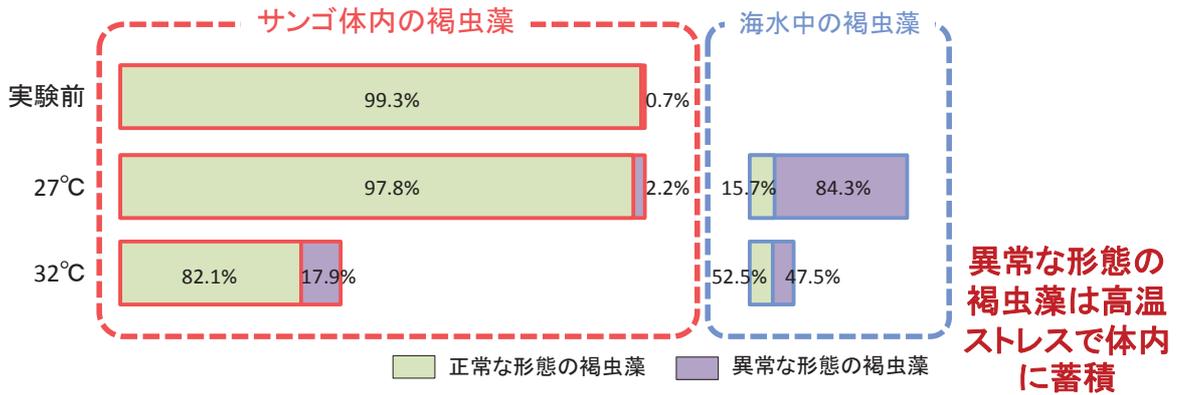
32°C + Bacteriaの条件が実験期間中に白化が認められた

■サンゴ体内の褐虫藻および放出された褐虫藻の細胞数と形態

○ 褐虫藻の細胞数

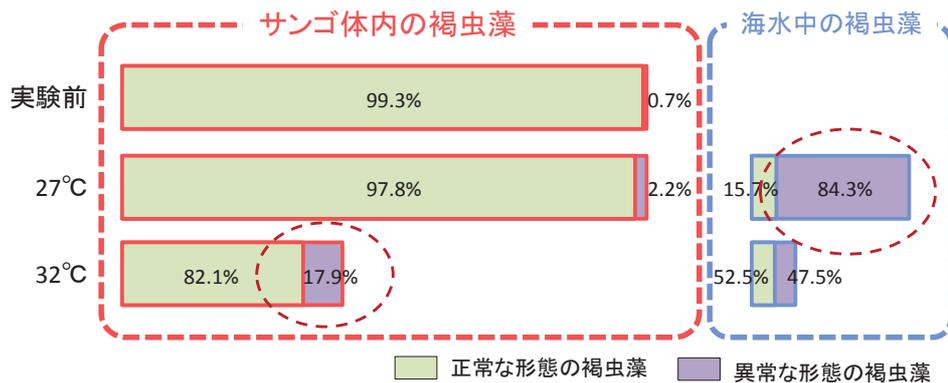


○ 褐虫藻の形態

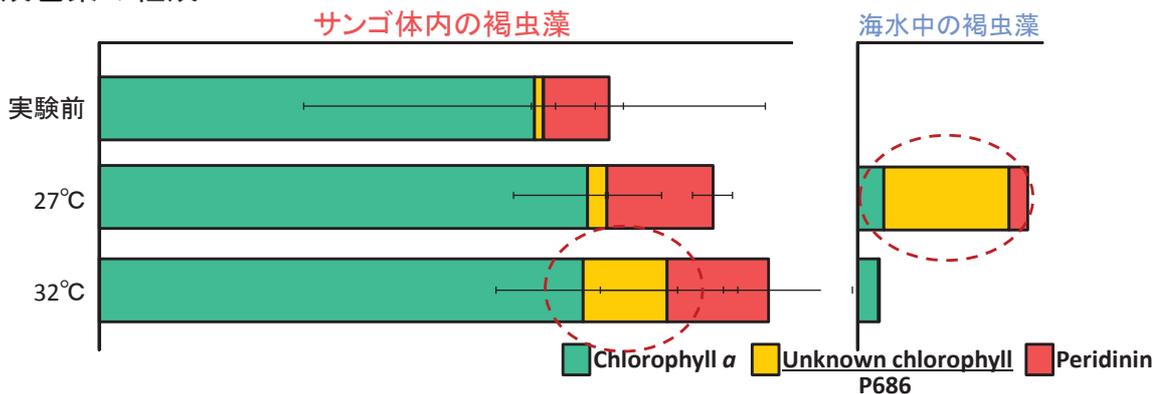


■サンゴ体内・体外の褐虫藻の光合成色素分析

○ 褐虫藻の各形態の組成



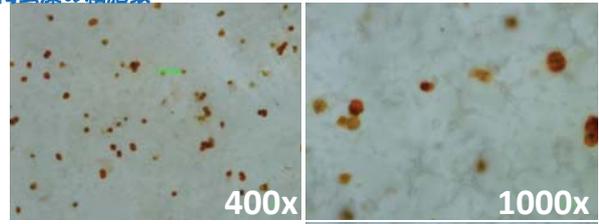
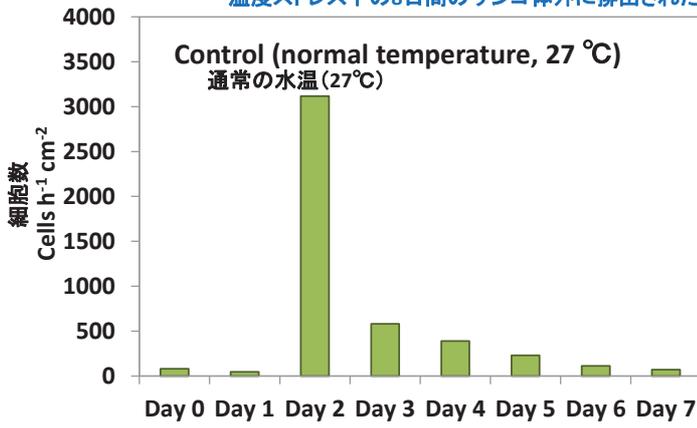
○ 光合成色素の組成



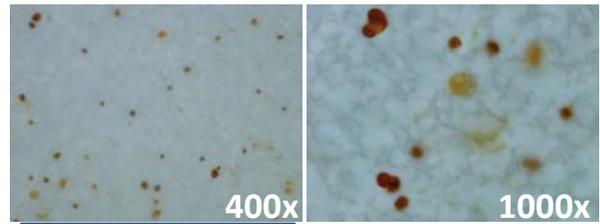
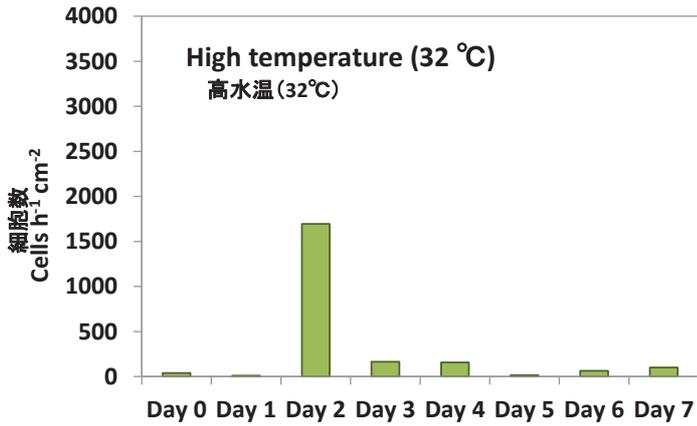
具体例

Number of expelled zooxanthellae during 8 days under thermal stress

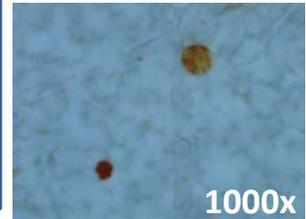
温度ストレス下の8日間のサンゴ体外に排出された褐虫藻の細胞数



通常の海水温度で褐虫藻排出されるが、0.1%以下。褐虫藻も正常な形



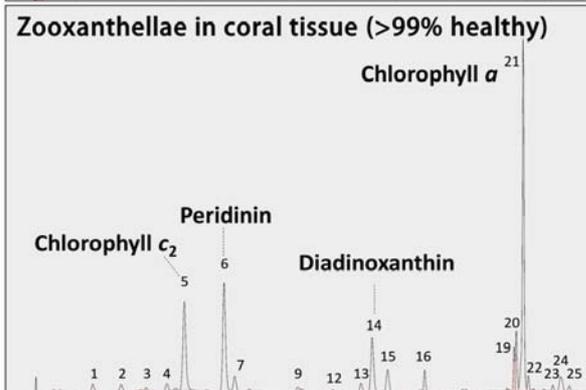
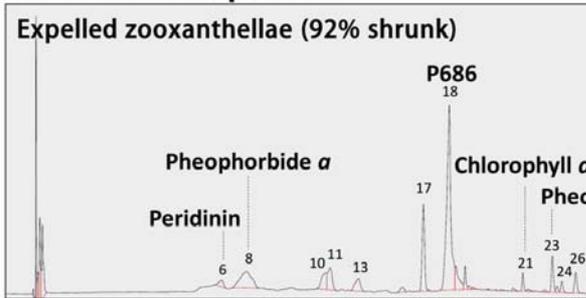
高水温で褐虫藻が排出されるが、さらに僅か。排出される形も異常。体内で死滅。



■ 単離した褐虫藻の光合成色素分析

Pigment analysis

HPLC elution profiles

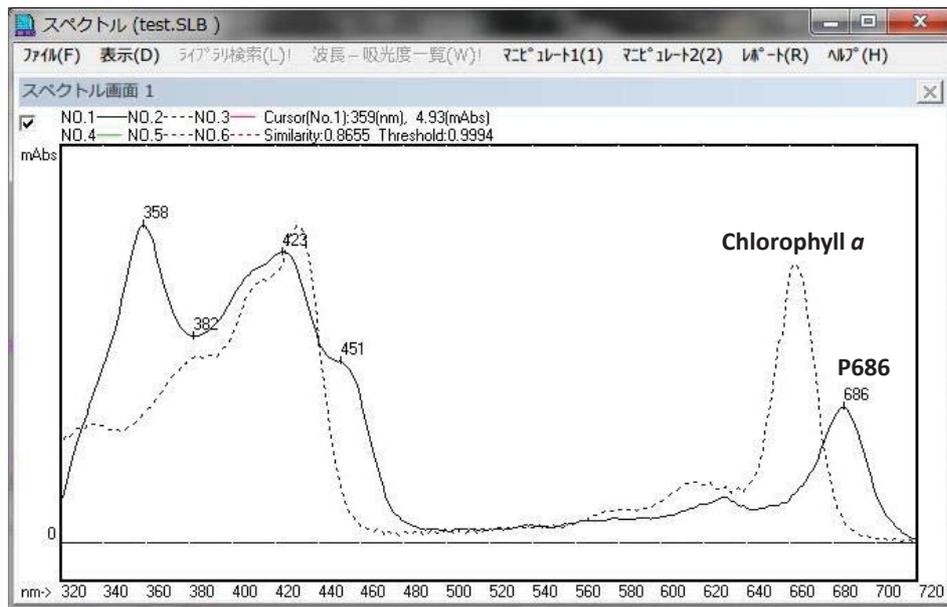


Identification table

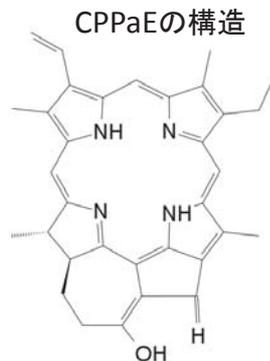
Peak no.	Retention (min)	Maxima in eluant (nm)		Identification
1	6.09	475		Peridinin like pigment
2	8.08	464		Peridinin like pigment
3	9.82	451		633Chlorophyll c ₂ species
4	11.27	430		663Chlorophyllide a
5	12.50	452	584	633Chlorophyll c ₂
6	15.28	470		Peridinin
7	16.02	470		Peridinin species
8	17.05	410		665Pheophorbide a
9	20.43	455		Prasinolaxanthin
10	22.33	475		Peridinin species
11	22.69	475		Peridinin species
12	22.89	446	469	19'-hexanoyloxyfucoxanthin
13	24.86	429	457	
14	25.64	421	447	475Diadinoxanthin
15	26.72	418	441	470Dinoxanthin
16	29.04	339	441	468
17	29.22	453	482	
18	31.03	423	628	686P686
19	35.58	420		660Chlorophyll a like pigment
20	35.72	429	613	662Chlorophyll a allomer
21	36.21	430	618	662Chlorophyll a
22	36.57	429	616	662Chlorophyll a epimer
23	38.28	406	504	665Pheophytin a
24	38.89	452	477	β-carotene
25	39.43	432		667Chlorophyll a like pigment
26	39.93	409		668Pyropheophytin a

凝縮した褐虫藻は何らかの分解を受けている
未知の色素P686は凝縮した褐虫藻に特異的に含まれる

■吸収スペクトルの比較

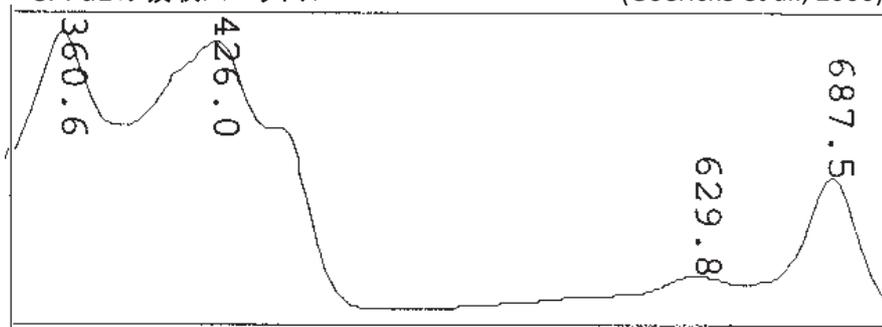


■凝縮した褐虫藻に含まれるP686は何か



CPPaEの吸収スペクトル

(Goericke et al., 2000)



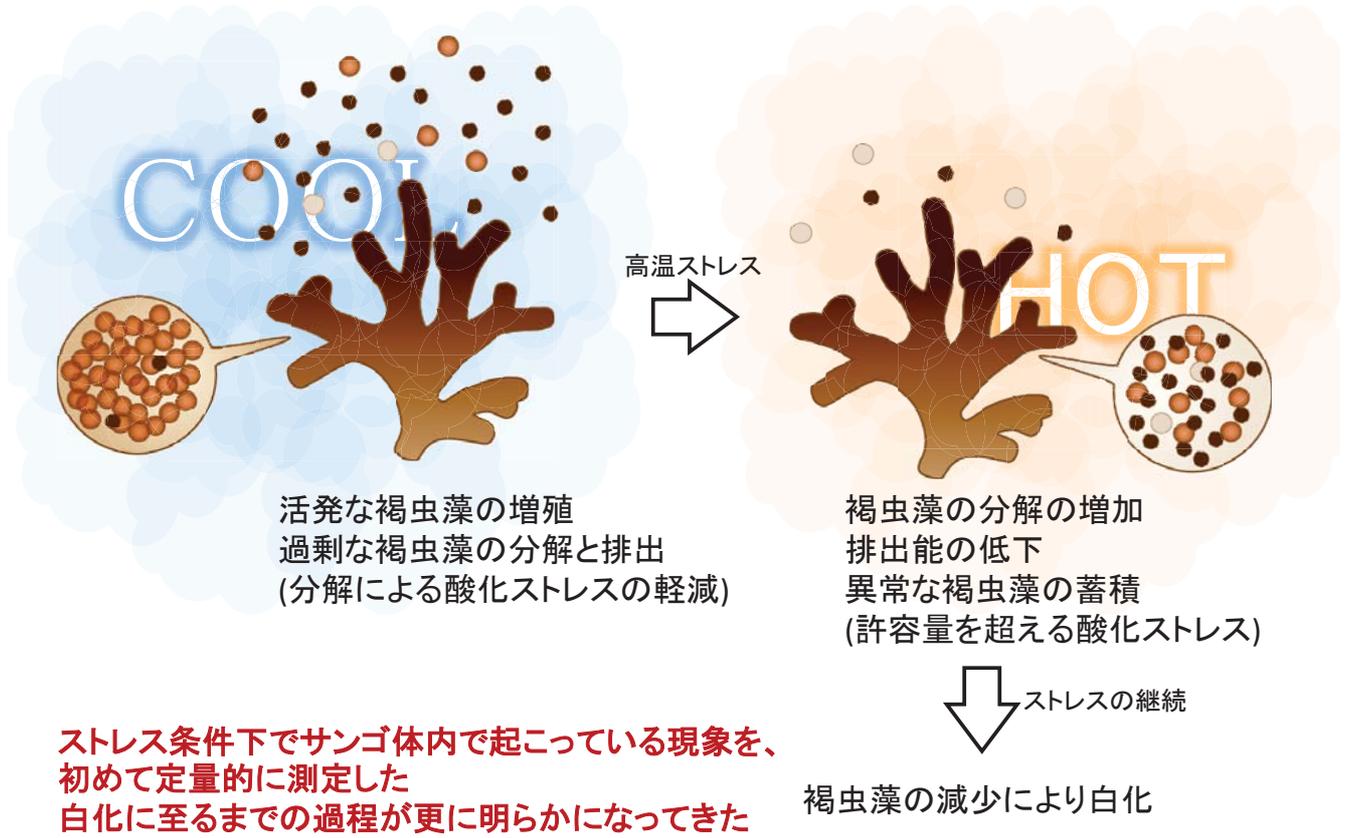
- P686のHPLCの保持時間と吸収スペクトルは、 $13^2,17^3$ -cyclophorbide *a* enol (CPPaE)とほぼ一致した。

$13^2,17^3$ -cyclophorbide *a* enol (CPPaE)とは

動物によるクロロフィルの分解産物

- 底質に多くみられるクロロフィル様物質
- 藻類を捕食する原生動物、海綿、二枚貝などの体内でしばしば見られる
- 二枚貝でchl *a* からの分解過程が明らかになり、原生生物でも微細藻類を捕食し消化する際に生成されることが明らかになった(柏山 他, 2012)。
- 葉緑体の分解により遊離したchlorophyll *a*は光を受けて活性酸素を発生するため、捕食者にとってchlorophyll *a*は有害な物質となりうる。原生生物によるchlorophyll *a*の無毒化の産物であるCPPaEは無蛍光性で、活性酸素を発生しない。この機構は捕食者が安全に捕食を行うための重要な分解経路である(柏山 他, 2012)。

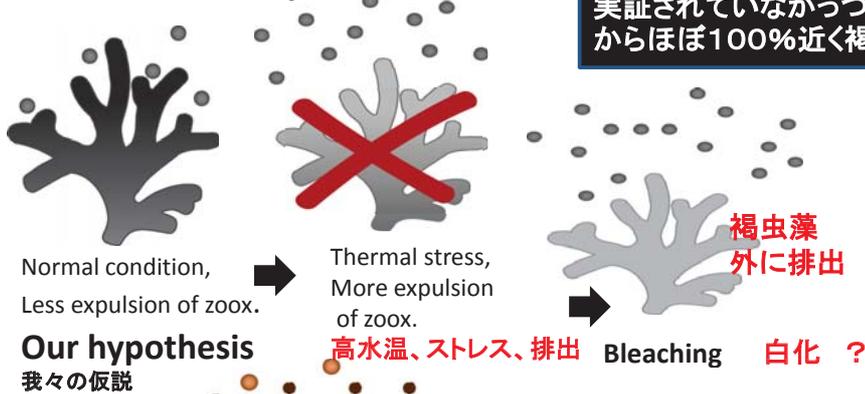
■ 目に見えない白化の前段階



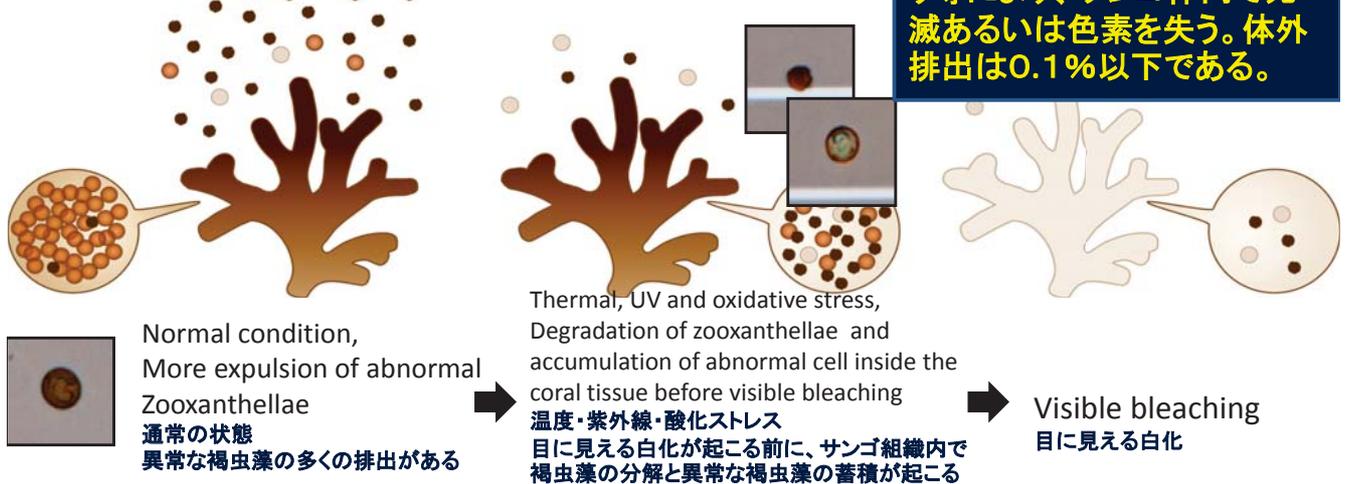
1) Temperature stress bleaching

Previous concept

本プロジェクト研究前は、サンゴの白化は温度ストレスによるのみと考えられていた。しかし、これも実際には実証されていなかった。高水温状態が長く続くと、サンゴからほぼ100%近く褐虫藻が逃げ出すと考えられてきた



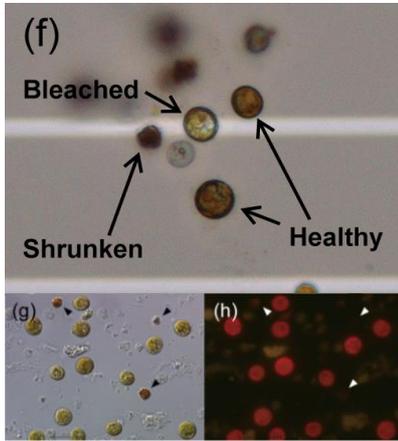
褐虫藻がサンゴの外に逃げ出すのは、正常な健康な時、飽和した褐虫藻が非常にわずかに排出される。高水温や強い紫外線の際は、褐虫藻の光合成能力は低下し、バクテリア等により、サンゴ体内で死滅あるいは色素を失う。体外排出は0.1%以下である。



高水温条件における造礁サンゴの白化プロセスの解明:従来説の誤りを検証

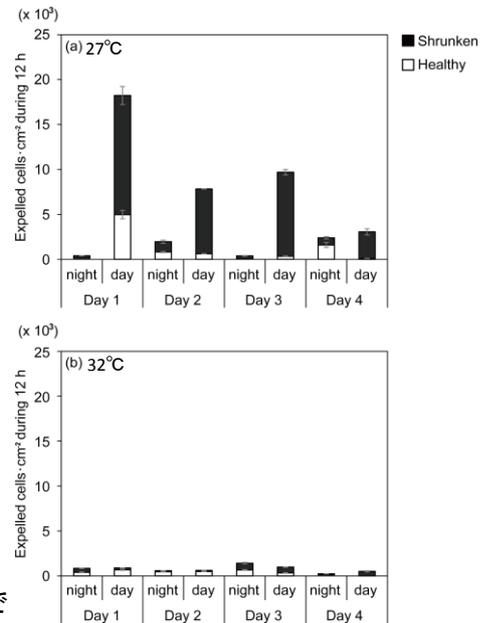
カサレト ベアトリス・鈴木 利幸・鈴木 款(創造科学技術大学院)

エダコモンサンゴを用いた室内実験を行い、高温ストレス下のサンゴ組織内と周囲の海水中の褐虫藻を分析した結果、サンゴの白化現象はこれまで知られていたものとは大きく異なるものであることが明らかになった。

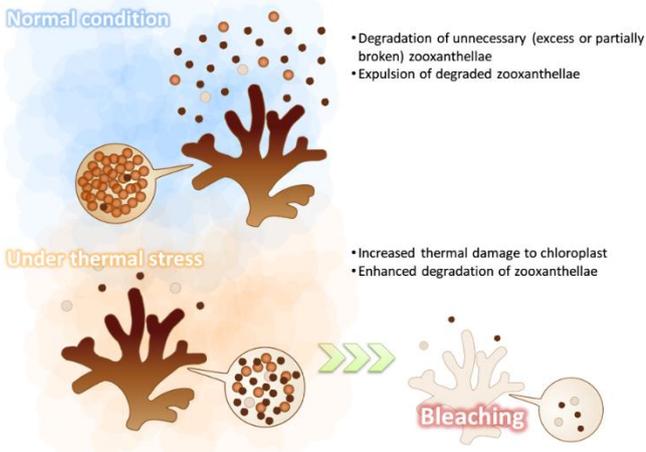


褐虫藻には正常な丸い形態のものだけでなく、葉緑体が分解され色の抜けたもの(Bleached)や細胞自身が凝縮して小さくなったもの(Shrunken)が観察された。正常な褐虫藻は紫外線を当てると赤い自家蛍光を発するが、凝縮した褐虫藻は蛍光を持たなかった。これは光合成色素であるクロロフィルを持っていないことを表している。この凝縮した細胞の色素組成を分析すると、クロロフィルのかわりにシクロエノールと呼ばれる色素を持っていることが明らかになった。シクロエノールはクロロフィルの分解により生じるものであるため、凝縮した細胞は何らかの分解により生じたものであると言える。

これまでサンゴの白化は高水温で褐虫藻が外へ逃げてしまうことで起こると言われていた。しかし実際に飼育実験を行った結果、この考えは誤りであることが明らかになった。サンゴ組織内の褐虫藻とサンゴから外へ放出された褐虫藻の数を計測した結果、通常の水温(27°C)では褐虫藻の放出がみられるが、高水温(32°C)ではほとんど放出がないことが明らかになった。また27°Cで放出された褐虫藻の数は1日あたりおよそ1万~2万細胞であるが、サンゴの組織には1cm²あたり600万細胞の褐虫藻が存在し、常に分裂して増殖するため27°Cの飼育では褐虫藻の放出が起こってもサンゴ組織内の細胞数に変化がみられない。さらに放出された褐虫藻の大半は凝縮した形態の細胞であった(体内では1%以下の存在率)。これらのことから、サンゴからの褐虫藻の放出は、健康なサンゴの体内のメンテナンスによるものであり、放出が原因で白化が起こるわけではないと考えられる。



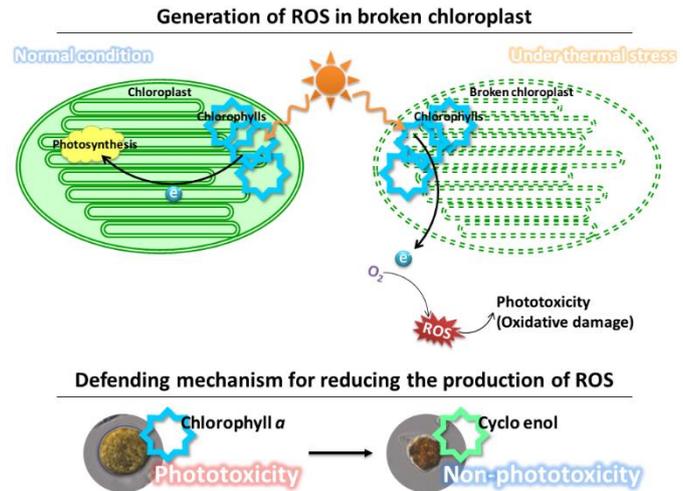
New concept of coral bleaching



高水温条件では褐虫藻の放出はほとんど無いのに、なぜサンゴから褐虫藻がいなくなってしまうのか。サンゴ組織内の凝縮した褐虫藻の数を数えてみると、高温ストレスを受けたサンゴでは放出が減る代わりに組織内の凝縮した褐虫藻の割合が大幅に増加していた(約20%)。健康なサンゴでは1%以下)。従って白化現象は、サンゴから褐虫藻が逃げることで起こるのではなく、サンゴ体内で褐虫藻が分解されることで起こることが明らかになった。

サンゴは褐虫藻に栄養塩類を供給し、褐虫藻はサンゴに光合成で得られた有機物を供給する共生関係を築いている。それなのになぜサンゴは自ら褐虫藻を分解してしまうのか。褐虫藻は高温条件下で葉緑体が損傷し再生できなくなることが知られている。損傷した葉緑体からは、クロロフィルが遊離する。クロロフィルは光合成を行うために重要な色素で、葉緑体内に配置されているときは光エネルギーを正常に光合成機関に受け渡すが、遊離したクロロフィルにはエネルギーの受け渡し先がないために光エネルギーを電子として放出

する。放出された電子は水中の酸素と反応し、活性酸素を発生させる。活性酸素は酸化力が強く周囲の細胞（サンゴ）を傷付けてしまう。すなわち高温条件下で葉緑体の損傷した褐虫藻は、光合成を行わないだけでなく有害な活性酸素を発生する、サンゴにとって危険な存在である。ところがクロロフィルの分解産物であるシクロエノールは、光を受けても電子を放出せず、活性酸素を発生させない。サンゴは損傷した褐虫藻を分解することで凝縮させ、酸化ストレスを軽減し、残った褐虫藻による光合成産物や触手による捕食によって水温が正常化するのを待つことで生き延びようとするのだろう。自ら褐虫藻を分解するメカニズムは、サンゴの高温ストレスに対する防御応答であると考えられる。これまでサンゴは白化の被害者であると考えられてきたが、この一連のメカニズムから、白化現象はサンゴにとっての生存戦略の一部であるのかもしれない。



Ramphul C, Casareto BE, Suzuki T, Yoshinaga K, Yeemin T, Suzuki Y (2015): Abundance of virus-like particles and its links to phytoplankton, bacteria and nutrients cycling in coastal coral ecosystem. **Eco-Engineering**, 27 (3), 81-90

Miyata W, Suzuki T, Casareto BE, Suzuki Y, Shioi Y (2015): A survey of photosynthetic pigments from surface to oligotrophic deep seawater in Suruga Bay, Japan. *Procedia Chemistry* 14, 444-454. doi: 10.1016/j.proche.2015.03.060

Suzuki T, Casarteto BE, Shioi Y, Ishikawa Y, Suzuki Y (2015): Finding of 132, 173-cyclophorbide a enol as a degradation product of Chlorophyll in shrunk zooxanthellae of the coral *Montipora digitata*. **Journal of Phycology**, 51 (1) 37-45 DOI: 10.1111/jpy.12253

Higuchi T, Agostini S, Casareto BE, Yoshinaga K, Suzuki T, Nakano Y, Fujimura H, Suzuki Y (2013): Bacterial enhancement of bleaching and physiological impacts on the coral *Montipora digitata*. **Journal of Experimental marine Biology and Ecology**, 440, 54-60

Weil E, Irikawa A, Casareto BE, Suzuki Y (2012): Extended geographic distribution of several Indo-Pacific coral reef diseases. **Diseases of Aquatic Organisms**, vol. 98, no. 2, pp. 163-170

Agostini S, Suzuki Y, Higuchi T, Casareto BE, Yoshinaga K, Nakano Y, Fujimura H. (2012): Biological and chemical characteristics of the coral gastric cavity. **Coral Reefs**, vol. 31, no. 1, pp. 147-156

(国際サンゴ礁学会から 2012 最優秀論文賞受賞)