

(様式第3号)

論文要旨

論文題目

Metabolic responses and activities of antioxidant enzymes by the hermatypic coral against increased hydrogen peroxide in seawater

海水中の過酸化水素増加に対するサンゴの代謝応答および抗酸化酵素活性

This study attempts to obtain quantitative information on coral metabolic changes with increased hydrogen peroxide (H_2O_2) and to investigate antioxidant enzyme activities of zooxanthellae and host corals against increased H_2O_2 in seawater. We used the corals *Goniastrea aspera* and *Galaxea fascicularis* for exposure to various concentrations of H_2O_2 . Coral reef decline has recently been observed worldwide, caused by changes in the environment following natural and anthropogenic activities. Hydrogen peroxide, a strong active oxygen species, is one of the photochemically formed chemicals in both the ocean and atmosphere. Because of its strong oxidizing power, H_2O_2 affects plants and marine organisms. Increases in seawater temperature, irradiance and UV radiation can result in the formation of harmful, reactive oxygen species within zooxanthellae and coral hosts. Coral metabolism reflect the physiological condition of a coral colony. Metabolic activities were studied using a continuous-flow, complete mixing (CFCM) experimental system. Without the addition of H_2O_2 , coral metabolism, including gross primary production (photosynthesis) and calcification, was relatively stable and there were no significant metabolic changes, suggesting that without H_2O_2 added to the CFCM system, the corals did not suffer from significant stress of the experimental system over a 12-day incubation period. When H_2O_2 was added to the seawater, clear changes were observed in coral metabolism. Higher concentrations posed more stress to the coral colonies. Within 3 days, photosynthesis and calcification decreased due to the increased H_2O_2 , but respiration was not affected. However, the synergistic effect of high H_2O_2 combined with high seawater temperature resulted in a 134% increase in respiration rates, which surpassed the effect of either H_2O_2 or high seawater temperature alone. Thus, the incubation experiments suggest that higher H_2O_2 concentrations in seawater clearly influence coral metabolism. However, the results also suggest that current seawater H_2O_2 levels in Okinawa are not likely to pose significant acute effects on the metabolic activities of corals. The cellular response to the formation of oxygen radicals includes many defense mechanisms such as the increased activity of free radical scavenger enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). SOD catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and H_2O_2 , and CAT is responsible for degrading H_2O_2 into water and oxygen. In the exposure experiments, CAT activities in both coral tissue and zooxanthellae increased with increased H_2O_2 , but SOD activities remained relatively unchanged, suggesting that increased H_2O_2 in seawater affected the coral cytosol but did not induce superoxide formation. In contrast, elevated seawater temperature caused both SOD and CAT activities in coral tissue and zooxanthellae to increase. We indicated that coral have a defense mechanism against increased H_2O_2 in seawater. However, coral photosynthesis and calcification system were damaged by the increased H_2O_2 . Though CAT activities were increased, they were not sufficient to scavenge all H_2O_2 . Coral bleaching was not observed at the levels of H_2O_2 tested during the 5-day exposure period. Although the long-term effects of H_2O_2 remain unknown, these results suggest that coral bleaching is likely not to occur from short-term exposure to increased H_2O_2 concentrations in seawater. It may be that since the oxidative stress was not due to the in situ formation of H_2O_2 in the symbiotic algae, corals did not expel zooxanthellae.

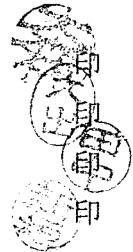
氏名 樋口 富彦

2009年 2月 17日

琉球大学大学院
理工学研究科長 殿

論文審査委員

主査 氏 名 大森 保
副査 氏 名 大出 茂
副査 氏 名 田中 淳一
副査 氏 名 新垣 雄光



学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 海洋環境学 氏名 樋口 富彦 学籍番号 XXXXXXXXXX
指導教員名	大森 保
成績評価	学位論文 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 最終試験 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格
論文題目	Metabolic responses and activities of antioxidant enzymes by the hermatypic coral against increased hydrogen peroxide in seawater (海水中の過酸化水素増加に対するサンゴの代謝応答および抗酸化酵素活性)
審査要旨 (2000字以内)	近年、サンゴ礁域では大規模な白化現象が起き、その原因として、海水温上昇だけでなく、人為起源物質の流入による被害も懸念されている。また、沖縄では赤土を含む海水中で、過酸化水素 (H ₂ O ₂) 増加が報告されているが、サンゴに与える影響については、よくわかっていない。また、実際の自然環境では、単一ストレスのみが影響することは少なく、高水温および過酸化水素といった複合的な環境ストレスがサンゴに与える影響を調べる必要がある。そこで、

(次頁へ続く)

本博士研究では、高水温および H_2O_2 がサンゴの代謝に及ぼす影響を定量的に評価する目的で研究が行われた。

実験では、サンゴ代謝量を長期的かつ連続的に測定することが可能な連続流水混合実験システムを用いて定量的にサンゴの代謝変化を求めている。連続流水混合実験システムでは、培養ビン中の海水の化学成分の変化を数式で表すことができ、サンゴによる取り込みまたは放出速度が算出できる。培養条件を変化させながらサンゴの培養実験を行い、海水試料を連続的に採取し、採取した海水のpH、全アルカリ度を測定し、測定値とモデル式を用いて光合成、呼吸、石灰化を算出している。

また、サンゴがストレスを受けた際に見られる抗酸化酵素（スーパーオキシドディスムターゼ SOD、カタラーゼ CAT）の変動は、サンゴ体内での活性酸素の動きを知る上で重要な指標として調べられている。 H_2O_2 および高水温ストレス下での培養後、サンゴ組織と共生藻を分離し、それぞれ抗酸化酵素活性および全溶存タンパク量を測定することで、酵素活性を全溶存タンパク量で規格化している。また、褐虫藻密度を測定し、白化の評価も行っている。

環境ストレスである H_2O_2 および海水温の上昇がサンゴに単一または複合的に与える影響について、 H_2O_2 を4段階（0, 0.3, 3, 30 μM ）、水温を2段階（27, 31 $^{\circ}C$ ）に設定し、様々な組み合わせでストレスを与え、実験を行っている。その結果、 H_2O_2 単一のストレス下では、 H_2O_2 濃度の増加にともない、光合成、石灰化量が減少していた。高濃度のストレスほどより大きな減少が見られたが、現状の海水濃度範囲である 0.3 μM 添加時では、光合成、石灰化がそれぞれ 5, 3%減少、30 μM 添加時で、それぞれ 27, 41%減少していた。よって、現状の濃度では、 H_2O_2 単一ではそれほど問題とならないが、将来、 H_2O_2 濃度が増加（UV線の増加等）すればサンゴにストレスとなることが予想される結果となっている。ただし、呼吸に変化は見られなかった。

高水温ストレス下では、光合成、呼吸、石灰化すべてで統計的に有意な影響が見られている。 H_2O_2 ・高水温の複合ストレス下では、統計的に、光合成および石灰化に複合的な影響は見られていない。ただし、代謝の減少が最も大きかったのは高水温+高濃度のストレス時であった。呼吸は、複合ストレスにより大きな増加が見られた。その結果、純生産量が低下し、石灰化にも影響したと示唆される結果が得られている。

次に、 H_2O_2 ストレス下では、SODは増加しなかった。サンゴ体内でスーパーオキシドアニオンの増加がなかったためだと考えられる。高水温時は、サンゴ組織・共生藻共に SODの増加が見られた。海水中での H_2O_2 濃度増加時および高水温時は、 H_2O_2 除去酵素である CATも増加していた。ただし、濃度・条件による違いはそれほどなかった。このことから、CATの生成能力に限界があることを示唆する結果が得られている。

H_2O_2 の濃度が増加すると、光合成や石灰化などサンゴの代謝が減少した。 H_2O_2 の高濃度ストレス時や、複合ストレス時には、サンゴの体内で H_2O_2 がより増加していることが予想される。しかし、CATの生成能力には限界があるため、 H_2O_2 の除去が間に合わず、サンゴがダメージを受け、代謝が減少してしまったと考えられる。サンゴは外的、内的発生の活性酸素に対する抗酸化能力は有するが、ある一定の量を超えると、限界を超えてしまい除去しきれなくなることが示唆された。 H_2O_2 ストレス下では、実験期間内に白化は見られなかった。よって、外的な H_2O_2 は、サンゴの光合成や石灰化機能にダメージを与えるが、短期間では直接白化を引き起こさないことが明らかとなった。

本博士論文の研究結果より、サンゴに与える海水温度と H_2O_2 の影響を定量的に評価することができ、サンゴの白化に関する新たな知見を得ている。また、研究成果は、2報の国際学術雑誌で発表しており、国際的に認められる水準にあると判断できる。

以上により、博士の学位論文および参考論文として提出された2編の査読付き学術論文、さらに、平成21年2月13日（金）に理系複合棟207教室で行われた博士論文の研究課題についての口頭発表による最終試験を厳正に審査した結果、全員一致で申請のあった博士論文が博士の学位論文として十分な内容を持つものであることを認め、最終試験も合格と判定した。