

D-4 大型船舶のバラスト水・船体付着により越境移動する海洋生物がもたらす生態系攪乱の動態把握とリスク管理に関する研究

(1) バラスト水・船体付着により越境移動した生物群集の起源、拡散経路および動態の解析に関する研究

国立大学法人神戸大学

内海域環境教育研究センター 川井浩史・上井進也・羽生田岳昭

国立大学法人三重大学 生物資源学部 木村妙子

<研究協力者>

国立大学法人神戸大学 自然科学研究科 山田味佳

国立大学法人北海道大学 先端科学技術共同研究センター 瀧田智

国立大学法人広島大学大学院 生物圏科学研究科 大塚攻

独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所 浜口昌巳

平成16～18年度合計予算額	79,474千円
(うち、平成18年度予算額	26,062千円)

[要旨]

褐藻ワカメはミトコンドリア遺伝子による解析から、原産地北東アジアでは4つの系統群に区分された：(I)大陸沿岸タイプ；(II)北日本タイプ；(III)中部日本太平洋岸タイプ；(IV)日本海タイプ。一方、海外移入集団はタスマニア、カリフォルニア、メキシコは日本からの船舶を介した移入の可能性が示されたが、豪州本土やアルゼンチンへは、韓国に由来するニュージーランド集団からの二次拡散の可能性が示唆された。ニュージーランドについては過去の乾燥標本の解析とマイクロサテライト法による解析から、優占集団の経時変化が明らかになった。三河湾と大阪湾で優占する緑藻アオサ・アオノリ類について遺伝子マーカーによる分類を行った結果、*U. californica*, *U. scandinavica*, *U. armoricana*などの最近日本へ移入したと考えられる種が新たに発見されたが、逆に移入種とされてきたミナミアオサは日本自生種である可能性が示された。極東アジア原産のアナアオサは葉緑体遺伝子による解析からオセアニア、北米太平洋沿岸の広い範囲に移入している可能性が示された。代表的な船体付着海藻シオミドロ類について、遺伝子マーカーによる分類システムの構築を目指し、世界各地と船体表面・バラスト水中から採集された標本についてミトコンドリア遺伝子による多様性解析を行った。北米太平洋沿岸に新たに移入した大型褐藻を形態学的観察と遺伝子マーカーによる解析で瀬戸内海周辺の集団に由来するシダモクと同定した。ミトコンドリア遺伝子塩基配列とその制限酵素断片解析から日本のコウロエンカワヒバリガイがオーストラリアに由来するとの解析結果を得た。大陸間航路の輸送船の船体付着生物調査で7門90種を越える底生動物を確認し、優占するフジツボ類には日本未産のものが含まれることを示した。大陸間航路の輸送船のバラストタンク内の海藻、動物プランクトンの動態調査を行い、その多様性を明らかにするとともに、熱帯を通る航路では出航後1週間程度でほとんどの海藻類幼体、動物が死滅するが、一部は豪州まで到達し放出されることを明らかにした。

[キーワード] バラスト水、船体付着、海藻類、底生動物、越境移動

1. はじめに

近年多様化・加速化・グローバル化した物流移動に伴い生物種の越境移動に拍車が掛かっており、これによる生態系の攪乱が大きな問題になっている。20世紀以降だけでも日本の沿岸では40種を超える海洋生物の移入があったとされているが、そのうち約半分が船舶を介した移入と考えられている。なかでもタンカーやバラ積み運搬船等の大型船舶が積載するバラスト水は膨大な量が移動すると見積もられており、我が国は圧倒的なバラスト水輸出国（資源輸入国）として世界各国から問題視されている。しかしながら海洋生態系への関心は比較的希薄であり、バラスト水による生物移動の実態は明確ではない。国際海事機関 (IMO) は、バラスト水による生態系越境移動対策として、バラスト水の処理を義務づける国際条約を採択した。しかしながら、バラストタンク内の生物モニタリング手法はいまだ確立されておらず、現在開発が進行しつつあるバラスト水処理装置の性能評価の妥当性を検証するためにも、バラストタンク内の物理化学環境や生物の動態把握は急務である。またこれらの船舶の船体には様々な生物が付着しており、バラスト水と同様、越境移動の原因となっている。実際、一部の海洋生物は日本から世界各地へ分布を広げ、各地の沿岸生態系の脅威となっているとの批判があり、またこの逆に世界各地から日本に侵入し、生態系を攪乱している生物も多いと考えられるが、その実態は十分に解明されていない。従って、このような船体付着生物群集の動態と、移入生物の起源および拡散経路の解析も早急に進める必要がある。

2. 研究目的

(1) 遺伝子マーカーを用いた移入大型海藻類の生物多様性解析と拡散経路の推定

1) ワカメ各地集団の遺伝的多様性解析

大型褐藻ワカメ（コンブ目； *Undaria pinnatifida*）は、北アジア海域における重要な資源海藻であるが、1970年代初めに養殖目的で地中海に導入されたカキ稚貝に伴って欧州へ侵入したほか、1980年代後半以降は大型船舶（船体付着/バラスト水）による移動でオーストラリア、ニュージーランド、北米太平洋岸、アルゼンチンなどへ分布を広げたとされており、国際海事機関 (IMO) による「10の最も沿岸生態系攪乱のリスクの大きい海洋生物」のリストにも含まれている。一時期タスマニアの集団が日本のバラ積み運搬船によるとの批判がなされたこともあるが、これら海外におけるワカメ集団の実際の起源については不明である。そこで本研究では、これまでに得られていた日本周辺のワカメのミトコンドリア *cox3* 遺伝子DNA塩基配列に基づく遺伝的多様性に関する情報を基礎に、北アジア沿岸における、より詳細な遺伝的多様性の解析を行うとともに、世界各地の集団について解析を行い、各地集団の起源と拡散経路の推定を行った。また、ワカメ集団の、より詳細な遺伝的多様性解析技術の確立を目指して、フランスの研究グループが開発した核遺伝子マイクロサテライトマーカーの導入を行い、韓国、北日本及びニュージーランドのワカメ集団を対象に遺伝的多様性の解析を行った。また、大陸間航路の大型船舶バラストタンク内および船体表面を模した温度・日長環境の培養条件で、ワカメ孢子体・配偶体の培養を行いその生存率を解析することで、大型船舶を介した大陸間移動の可能性を検証した。

2) アオサ・アオノリ類の遺伝的多様性と生物地理に関する研究

緑藻アオサ・アオノリ類（アオサ目； *Ulva/Enteromorpha* spp.）は、港湾を含む浅い沿岸域の

代表的な海藻だが、閉鎖性海域の富栄養化により大量に発生し、沿岸生態系に悪影響を与えたり、浜辺に打ち上げられることでグリーントイドと呼ばれる沿岸環境問題を引き起こしている。また、本研究により実施した大型輸送船の船体付着生物調査やバラスト水の培養実験においても、アオサ・アオノリ類が頻繁に出現しており、船舶を介した移入リスクが高い海藻である。しかし、アオサ・アオノリ類はその形態が単純でかつ可塑性が大きいにもかかわらず、成長が速く寿命が比較的短いため、同一地点においても一年を通して同じ種類が生育しているかどうかは明らかではなく、種レベルの同定が非常に困難なグループである。このため、実際にどの程度のアオサ・アオノリ類が日本に持ち込まれ、また日本から他大陸に移入し定着しているかは明らかではない。そこで、代表的な閉鎖性海域である三河湾と大阪湾の各地において優占する個体群を中心にアオサ・アオノリ類を季節的に採集し、遺伝子マーカーを用いた方法により種同定することで、日本へ移入・定着したアオサ・アオノリ類の実態を明らかにすることを目指した。また、極東アジア原産のアナアオサは、近年欧州や北米で新たにその分布が確認され、越境移入の可能性が示唆されている。そこで日本および世界各地で採集されたアオサ類標本のうちアナアオサと同定されたものにつき、より詳細な遺伝子解析を行い、アナアオサの越境移動の実態解明を目指した。

3) 褐藻シオミドロ類のミトコンドリア *cox3* 遺伝子DNA塩基配列による遺伝的多様性解析

糸状褐藻シオミドロ類（シオミドロ目； *Ectocarpus* spp.）はアオサ・アオノリ類と並んで、代表的な船体付着海藻であるが、温帯域から寒帯域にわたる広い沿岸域に分布する種が多く、またその世代時間が短く繁殖力が高いことから、その移入・定着は広範に、また頻繁に起こっていると考えられる。しかしこれらの種はその藻体が小さいため肉眼的に種レベルの同定を行うことはできず、また形態的特徴に乏しく顕微鏡観察によっても種レベルの分類を行うのは容易ではない。実際、船体付着生物の調査においても、頻繁にかつ広い範囲にわたってシオミドロ類の着生が確認されるが、これらの種の同定はきわめて困難である。このためシオミドロ類の同定には遺伝子マーカーを用いた分類手法を開発する必要がある。一方、シオミドロ類の世界各地における越境移動の実態が明らかに出来れば、シオミドロ類と同様にそのサイズが小さいために同定が困難な、微細な付着動植物の越境移動の動態を知る手がかりになる。そこで、船体表面から採取された標本をはじめ、世界各地で採集されたシオミドロの系統株を用い遺伝的多様性の解析を行い、遺伝子マーカーによる分類のための基礎データの収集を行った。

4) 大型褐藻シダモク（ヒバマタ目； *Sargassum filicinum*）北米新規移入集団の起源解析

本研究の実施期間中に、新たに北米太平洋沿岸への移入・定着に関する情報がもたらされたホンダワラ類（褐藻）について、その正確な種同定を行うとともに、遺伝子マーカーを用いた同定の検証と移入起源の推定を行った。

（2）コウロエンカワヒバリガイの遺伝的多様性と移入起源・拡散経路の解析

コウロエンカワヒバリガイ *Xenostrobus securis* はオセアニア原産のイガイ科の二枚貝であり、1972年の瀬戸内海における初報告以来、本各地に分布を広げ、現在では多くの富栄養化した港湾や河口域において底生動物相の優占種となっている。また、1990年代以降は欧州や韓国への移入も確認され、日本からの二次拡散の可能性も示唆されている。本種はKimura et al. (1999)¹⁾によるア

イソザイム分析でオーストラリアと日本の種の類縁性が指摘されているが、ニュージーランドも含めた分布域全体での遺伝的多様性の解析は行われていない。そこで日本への移入経路と国内での拡散過程を明らかにするために、遺伝子マーカーを用いた遺伝的解析を行った。

（３）大陸間航路の大型輸送船の船体付着生物群集の多様性解析

大陸間航路の大型船舶が頻繁に入出港し、また水質汚濁の進んだ閉鎖性海域に設置されることの多い国際港湾は、在来種の生物相が貧弱であることから、大型船舶に付着する生物群が持ち込まれ、あるいは持ち出される、いわば海洋生物の移入・移出のホットスポットである。また、これらの港湾は、様々なタイプの運搬船、フェリー、漁船なども頻繁に入港・停泊することから、移入生物の周辺海域への二次拡散源となる。そこで、我が国を代表する国際港湾の一つである大阪湾に寄港する大陸間航路大型運搬船と、船体補修のために乾ドック入りした大陸間航路大型運搬船を対象に、船体付着生物の種多様性と船体部位による多寡に関する調査を行うとともに、海藻アオサ・アオノリ類については遺伝子マーカーを用いた種同定と起源地の推定も行った。

（４）バラ積み船バラストタンク内で生存する海藻類および動物プランクトンの動態解析

本研究第２サブグループと連携し、本研究全体でバラストタンク内の物理化学環境と生物多様性のモニタリングを実施したバラ積み運搬船・コンテナ船を対象に、運行時のバラストタンク内の浮遊動物の動態を明らかにし、リバラスト時などに放出される可能性のある浮遊動物および海藻類の解析を行った。

３．研究方法

（１）遺伝子マーカーを用いた移入大型海藻類の生物多様性解析と拡散経路の推定

１）ワカメ各地集団の遺伝的多様性解析

日本各地、韓国、中国、フランス、オーストラリア、ニュージーランド、米国カリフォルニアにおいてワカメ藻体（胞子体）の採集を行うとともに、アルゼンチン、メキシコ等のワカメ藻体の標本を研究協力者から入手した。またニュージーランドについては、1987年の最初の移入報告以来、各地で採集され博物館に保存されていた乾燥標本を解析対象に加えることで、移入集団の時間的变化を解析した。遺伝子解析にはワカメ藻体から全DNAを抽出し、ミトコンドリア`cox3`遺伝子の一部（以後`cox3`、470塩基）、および`tatC`遺伝子末端から`tLeu`遺伝子までの領域（以後`tatC-tLeu`、438塩基）をPCR法により増幅し、ダイレクトシーケンス法によりDNA塩基配列を決定した。また、多くのサンプルのDNA塩基配列の解析を効率的に行うため、SSCP（単鎖DNA形状多型分析）法も導入し、解析に用いた。一方、より詳細な遺伝的多様性の解析と、ミトコンドリア遺伝子による解析結果の検証のため、フランス・ロスコフ海洋生物学実験所F. Viard博士らが開発した核遺伝子マイクロサテライトプライマーを用いて、日本産のワカメ集団の遺伝的多様性を解析する手法を確立するとともに、韓国、北日本及びニュージーランドのワカメ集団を対象に比較解析を行った。また、熱帯域を通過する日豪航路の大型運搬船のバラストタンク内・船体表面の物理化学環境を模した温度・日長の培養条件でワカメ胞子体及び配偶体を培養し、その航海後の藻体の生存率を推定し、大型船舶による移動の可能性を検証した。

2) アオサ・アオノリ類の遺伝的多様性と生物地理に関する研究

a. 三河湾、大阪湾において優占するアオサ・アオノリ類移入種の分類

三河湾および大阪湾の数地点でアオサ・アオノリ類のうち優占している種の季節的な採集を行い、核rDNAの介在配列(ITS領域)DNA塩基配列を用いた遺伝子マーカーによる分類を行った。本研究の一部（三河湾産アオサ・アオノリ類の解析）は、蒲郡市役所、愛知県水産試験場と共同で「三河湾環境チャレンジ」と連携して実施した。また、日本沿岸や韓国、中国（香港）、オーストラリア産のアオサ類の核rDNA ITS領域DNA塩基配列を解析し、移入種とされた*U. californica*の分布を明らかにした。また、データベースに登録されている北米や欧州集団のDNA塩基配列データと併せて分子系統学的解析を行った。

b. 海外アナアオサ集団の起源の推定

日本各地、韓国、中国、欧州、オセアニア、北米太平洋沿岸（アラスカ、カナダ、カリフォルニア）から採集されたアオサ類を対象に、核rDNA ITS領域DNA塩基配列による種同定を行い、その結果アナアオサと同定された標本の55集団90個体について、新たに開発した遺伝子マーカー（葉緑体*atpH-atpI*介在領域）を用いてそのハプロタイプ分布を解析した。

3) 褐藻シオミドロ類のミトコンドリアcox3遺伝子DNA塩基配列による遺伝的多様性解析

コンスタンツ大学D.G. Mueller博士が世界各地から収集し、神戸大学海藻類系統株保存室に保存されている系統株と、今回の調査で各地および船体表面・バラスト水中より採集した系統株型65株を用いて、ミトコンドリアcox3領域のDNA塩基配列を決定し、分子系統学的解析を行った。

4) 大型褐藻シダモク（ヒバマタ目；*Sargassum filicinum*）北米新規移入集団の起源解析

本研究開始後の2006年に、北米の藻類研究者から北米カリフォルニア・サンタカタリナ島において、新規のホンダワラ類移入種の定着に関する情報がもたらされた。そこで、このホンダワラ類海藻の標本を採集し、形態学的観察を行うとともに、ミトコンドリアcox3遺伝子領域のDNA塩基配列解析を行い、日本のホンダワラ類と比較を行い、種同定を行うとともにその移入集団の起源の推定を行った。

（2）コウロエンカワヒバリガイの遺伝的多様性と移入起源・拡散経路の解析

2004年10月、2005年12月にニュージーランド・オークランド、2005年2月、7月にオーストラリア・パースおよび西オーストラリア、2004-05年に東京湾大井埠頭、浜名湖、三河湾汐川干潟、伊勢湾志登茂川河口、大阪湾紀ノ川河口、浦戸湾、宍道湖でコウロエンカワヒバリガイを採集し、ミトコンドリアCO1領域と16SrDNA領域のDNA塩基配列を決定し、またPCR-RFLP法による解析を行った。

（3）大陸間航路の大型輸送船の船体付着生物群集の多様性解析

大陸間航路のバラ積み船を対象に、停泊時に潜水作業で、または乾ドック内で船体表面を調査し、船体各部に着生している海藻類、付着動物類を採集した。これらの付着生物はその形態に基づいて分類するとともに、海藻類の一部については遺伝子マーカー（*rbcL*, 核rDNA ITS領域）を用いた解析により原産地を推定した。

(4) バラ積み船バラストタンク内で生存する海藻類および動物プランクトンの動態解析

2004年8月、12月、2005年6月の3回、日本東北部とオーストラリア東岸を往復するバラ積み運搬船において、出港から入港までの10-13日間採水調査を行った。バラストタンク内の海水は、国内港内での荷下ろし時に漲水され、5-7日後に熱帯水域の外洋でリバラスト後、オーストラリアの港内にて全て排水された。採水は1日1回バラストタンクから、表層水はマンホールから、近底層水はサウンディングパイプからポンプでくみ上げ、目合100 μm のプランクトンネットで濃縮した。採集試料は5%中性ホルマリンで固定後、光学顕微鏡で同定し、また個体数の計測を行った。また、バラスト水中で生存する海藻類の孢子または発芽体を航海中に採水して採取し、船中で予備培養した後、実験室内で培養し（PESI栄養塩強化培地、15℃長日条件）、出現した可視的な藻体を分子マーカー（*rbcL*、核rDNA ITS領域）を用いた解析により種同定した。

4. 結果・考察

(1) 遺伝子マーカーを用いた移入大型海藻類の生物多様性解析と拡散経路の推定

1) ワカメ各地集団の遺伝的多様性解析

ワカメの原産地であるとされる北東アジア（日本、韓国、中国）産の121サンプルから27のハプロタイプ（遺伝子型）が確認されたが（図1a）、これらはその塩基置換数とMinimum Spanning Network系統樹による解析から、大きく以下の4つのグループに分けられた（図1b）：(I) 大陸沿岸（韓国・中国）タイプ；(II) 北日本タイプ；(III) 中部日本太平洋岸タイプ；(IV) 日本海タイプ。このうち、(I) 大陸沿岸タイプは韓国及び中国に分布するが、これらの沿岸では一部に(II)のハプロタイプも見られる。(II) 北日本タイプは北海道と東北地方の太平洋岸に分布し、(I) 大陸沿岸タイプと近縁である。(III) 中部日本太平洋岸タイプは黒潮の影響のある九州から房総半島へかけての太平洋沿岸に分布し、東部と西部で地理的な変異が認められる。(IV) 日本海タイプは遺伝的には(III)と近縁だが、日本海の広い範囲において同じハプロタイプが見られることに特徴がある（図1a）。日本国内においても、ワカメの養殖が盛んで、また各地から種苗が持ち込まれている大阪湾周辺ではこれら全てのタイプに含まれるハプロタイプが見られ、遺伝的な攪乱の実態が明らかになった。逆に、各地域に特徴的な遺伝子型が存在し、また対馬海峡などの海峡を越えては交流していないことから、人為的な移入が起これなければ地域集団の遺伝的多様性は良く保持されていることが確認された。

一方、図1c, d に示すように、海外のワカメ集団では、欧州およびメキシコの集団は(II) 北日本タイプを示した。このうち、欧州の集団ではこれまでに北アジアでは確認されていないハプロタイプが見いだされたが、DNA塩基配列からは北日本タイプと近縁である。オーストラリア南東部（メルボルン周辺）とアルゼンチンの集団は(II) 大陸タイプを示した。カリフォルニア（北米太平洋岸）の集団は三浦半島で採集された標本と同じ(III) 中部日本太平洋岸タイプを示した。ニュージーランドでは複数のタイプが見いだされたが、北島では(I) 大陸タイプが優占していたのに対し、南島では(I) 大陸タイプと(II) 北日本タイプなどが混在していた。

またニュージーランド沿岸において1980年代後半から90年代に採集され、乾燥標本として保存されていたワカメ藻体についてDNAを抽出しそのハプロタイプを調べた結果、北島のウェリントンでは現在優占しているものと同じハプロタイプ（大陸タイプ）であったが、南島のTimaruや

Oamaruの標本は現在優占的な大陸タイプではなく、現在はかなり希な北日本タイプであることが示された（図2）。即ち、1980年代に初めてワカメが侵入した当時から現在にかけて優占集団が変化してきたことになる。また、これら1980年代後半に採取されたワカメ標本には、トロール漁船の船体表面から採取されたもの（大陸タイプ）も含まれており、比較的小型の漁船の船体に付着したものが移入した可能性が示唆される。

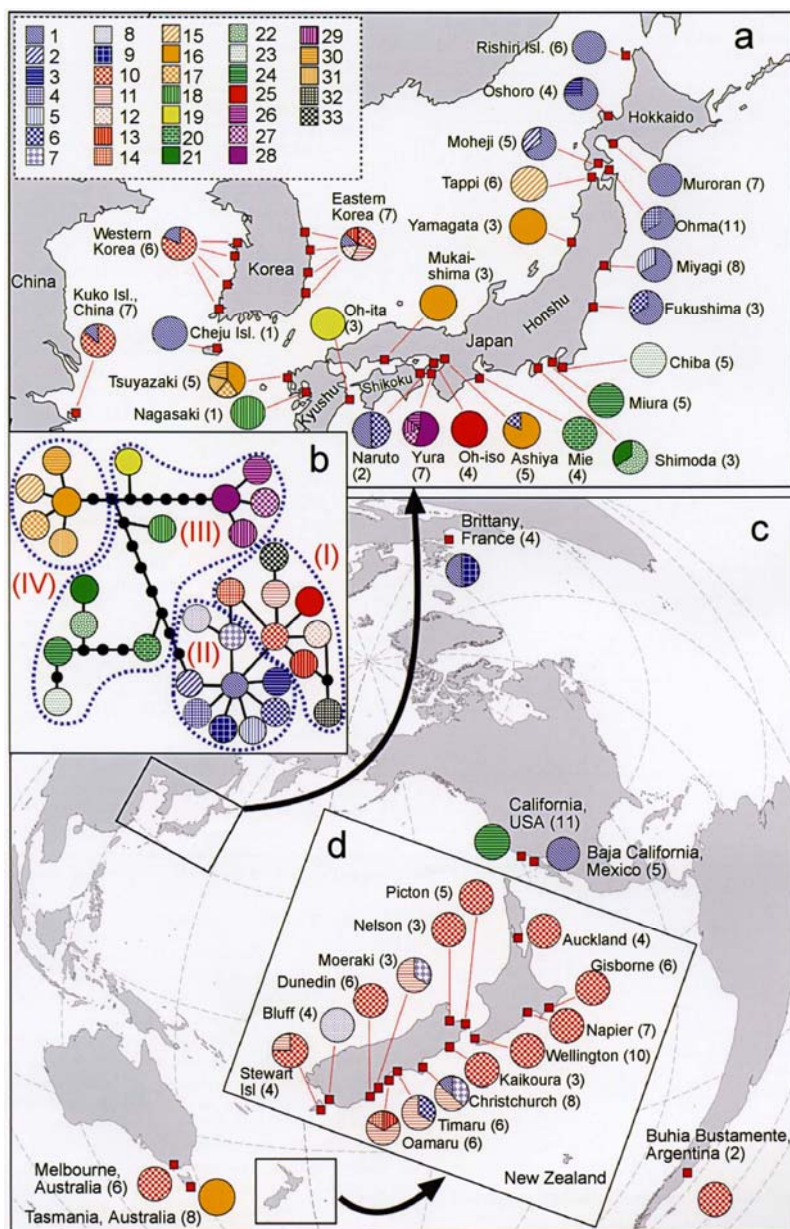


図1. 原産地及び移入先におけるワカメ集団の、ミトコンドリア遺伝子ハプロタイプ分布とMinimum Spanning Network系統樹。括弧内の数字は標本数を示し、パイグラフは左上図に色分けして示したハプロタイプの比率を示す。a. 北東アジア沿岸（原産地）におけるハプロタイプ分布。b. Minimum Spanning Network系統樹。図中の色塗りされた○はa. 左上のハプロタイプに対応し、それらをつなぐ線上の小さな●は遺伝子の置換を示す。

ミトコンドリアハプロタイプに基づく解析によると世界各地に移入しているワカメ集団のうち特にニュージーランドの集団については日本の東北・北海道の集団と韓国・中国の集団の両方からの移入が示唆されている。そこで5つのマイクロサテライトマーカーを用いてニュージーランドの移入集団における北日本と韓国・中国の集団の遺伝的貢献度を比較した。韓国10地点から採集した12個体、日本の室蘭・大間・福島の3地点から採集した55個体、ニュージーランドについては2004年に13地点から採集した72個体を用いた。この結果に基づきSTRUCTURE v.2プログラム

を用いたグルーピング解析を行った。この方法は解析に供したサンプルが複数の仮想的祖先集団の混合の結果生じたという仮定の下、サンプルをグループ化する方法であり、いずれの祖先集団の遺伝的影響をどの程度受けているかを推定することができる。

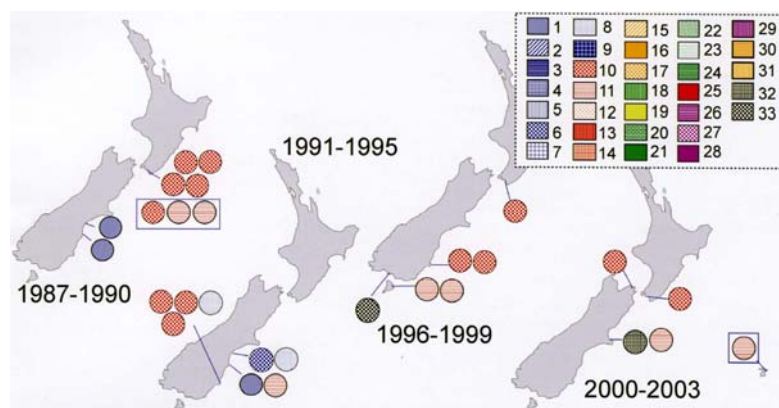


図2. ニュージーランドにおけるワカメ集団のハプロタイプ分布の経年変化。現在の分布は図1参照。

その結果、解析した5つのマイクロサテライト遺伝子座においては4-8個の対立遺伝子が確認された。自生集団と移入集団の比較では、それぞれの集団のもつ対立遺伝子の数は多くの場合、自生集団の方が多かった。最も多様性の高かった遺伝子座1h5における対立遺伝子の数は自生集団が2-6、移入集団が1-4であった。しかし遺伝子座1h5におけるGene diversity（一つの集団から抽出した対立遺伝子の異なる確率）では自生集団が0.271-0.723、移入集団が0.00-0.767、同じく最小サンプル数（3個体）当たりの対立遺伝子数（Allele Richness）では自生集団が1.673-3.24、移入集団が1.00-3.34となりいずれも遺伝的多様度の高い移入集団（ニュージーランド南島のTimaruとOamaru）では自生集団に近い多様度が示された。

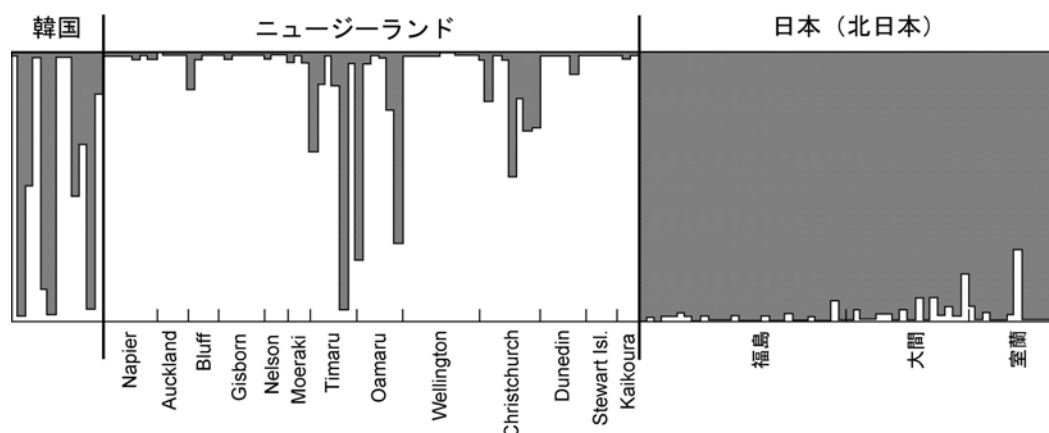


図3. マイクロサテライトによる移入集団の地理的起源の推定(STRUCTUREプログラムによるグルーピング)。韓国のサンプルの中には日本の集団で優占的な遺伝的要素（黒い領域）をもつサンプルもあり、韓国と日本を完全に区別できなかった。一方、ニュージーランドのサンプルのほとんどは韓国の集団でふつうに見られるが、日本ではほとんど見られない遺伝的要素（白い領域）をもっていた。

結果として得られたグループ化では日本の3地点から得たサンプルがほぼ全て単一の遺伝的グループに属していたのに対し、韓国のサンプルでは日本と同じ遺伝的グループと、日本の集団にはほとんど見られないもう一つの遺伝的グループに属する個体が各々約半分を占め、個体レベル

でも両方のグループから遺伝的影響を受けている個体が見られた（図3）。このように韓国の集団と日本の集団と明確に区別することはできなかった。ニュージーランドの集団をみると13地点のほとんどで韓国にしか見られない遺伝的グループに属する個体ばかりが見られた。特にニュージーランド北部においてこの傾向がはっきりと見られ、南島北部に位置するKaikoura以北の6集団では韓国特有の遺伝的グループに属する個体のみが見られた。日本にも見られたもう一つの遺伝的グループの影響はChristchurch、Timaru、Oamaruの3地点とDunedin、Bluffの2地点にわずかに見られたにすぎなかった。またこれら南部の集団でみられた日本グループの遺伝的要素を受け継いでいる個体の全てが、程度の違いこそあれ韓国グループの遺伝的要素も併せ持っていた。

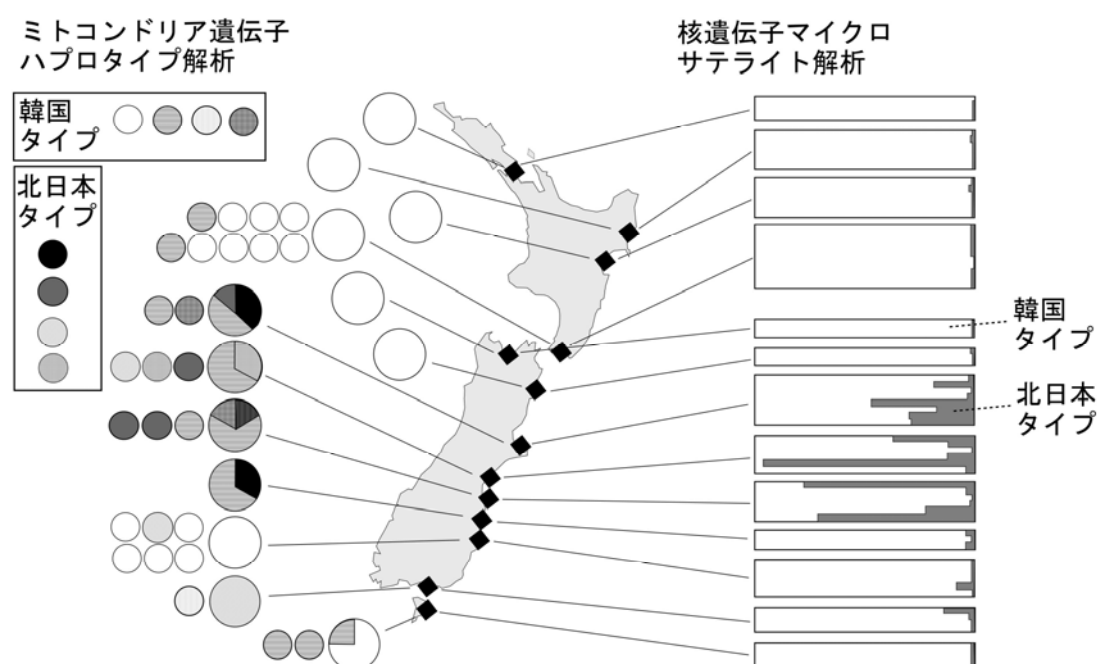


図4. マイクロサテライトによる移入集団の地理的起源の推定（ミトコンドリア遺伝子ハプロタイプと、核遺伝子マイクロサテライトによる解析結果の比較）。左図の小さな丸は過去の標本で、大きなパイ図の丸は現在の標本で見られたハプロタイプを示す。現在あるいは過去に北日本グループのハプロタイプが見られた地点では、核ゲノムでも北日本集団の遺伝的要素が検出された：それぞれの場所で北日本と大陸に起源をもつ移入集団が混ざり合って現在の移入集団が形成されている。Oamaruでは2004年のサンプル6個体からは北日本グループは見つからず、1988年、1991年のサンプルでのみ見つかった。

今回のマイクロサテライトマーカーをもちいた解析ではニュージーランド北部をはじめとする多くの移入集団で韓国の自生集団の影響のみがみられ、日本の自生集団で優占的にみられる、韓国特有の遺伝的グループとは異なる遺伝的グループの影響はニュージーランド中部から北部にかけてわずかながら見られたにすぎなかった（図4）。残念ながら韓国の自生集団にも日本でみられる遺伝的グループが混在しているため、ニュージーランドの移入集団でみられた両グループの混在が二つの地域からの移入であると結論づけることはできないが、いずれにせよこれらの結果はニュージーランドの移入集団における韓国・中国の自生集団の影響の大きさを示している。今回の核ゲノムに基づく解析の結果はミトコンドリアハプロタイプに基づく解析の結果と矛盾しておらず、特に今回日本で優占的な遺伝的グループが見つかったChristchurch、Timaru、Oamaruでは、現在あるいは過去において日本（東北・北海道）に多いミトコンドリアハプロタイプが見つかったことを考えると非常に興味深く、やはりニュージーランド南島においては北日本と韓国・

中国の両方からの移入が起きており、両地域に由来する移入集団が混在していることが強く示唆された。また日本集団の遺伝的要素を受け継いでいる個体のほとんどが韓国集団特有の遺伝的要素も併せ持っていることから、両地域由来の移入集団がこの沿岸で交雑を起こしている可能性が高い。

日本産のワカメ配偶体と若い孢子体の単藻培養株を、本研究サブグループ2において実施した、日豪航路バラ積み運搬船のバラストタンク内水温連続測定結果に基づき、29.0-31.2℃で7日間暗黒下で培養した結果、若い孢子体は死滅したが、配偶体は生存していた。一方、31.0℃で8日間連続培養した場合、配偶体は生存したが、32.0℃では一部が死滅し、33.0℃では全て死滅した。したがって、日豪航路の航行中の水温環境はワカメの生存にとって閾値周辺にあるが、配偶体であれば移動可能であることが示された。

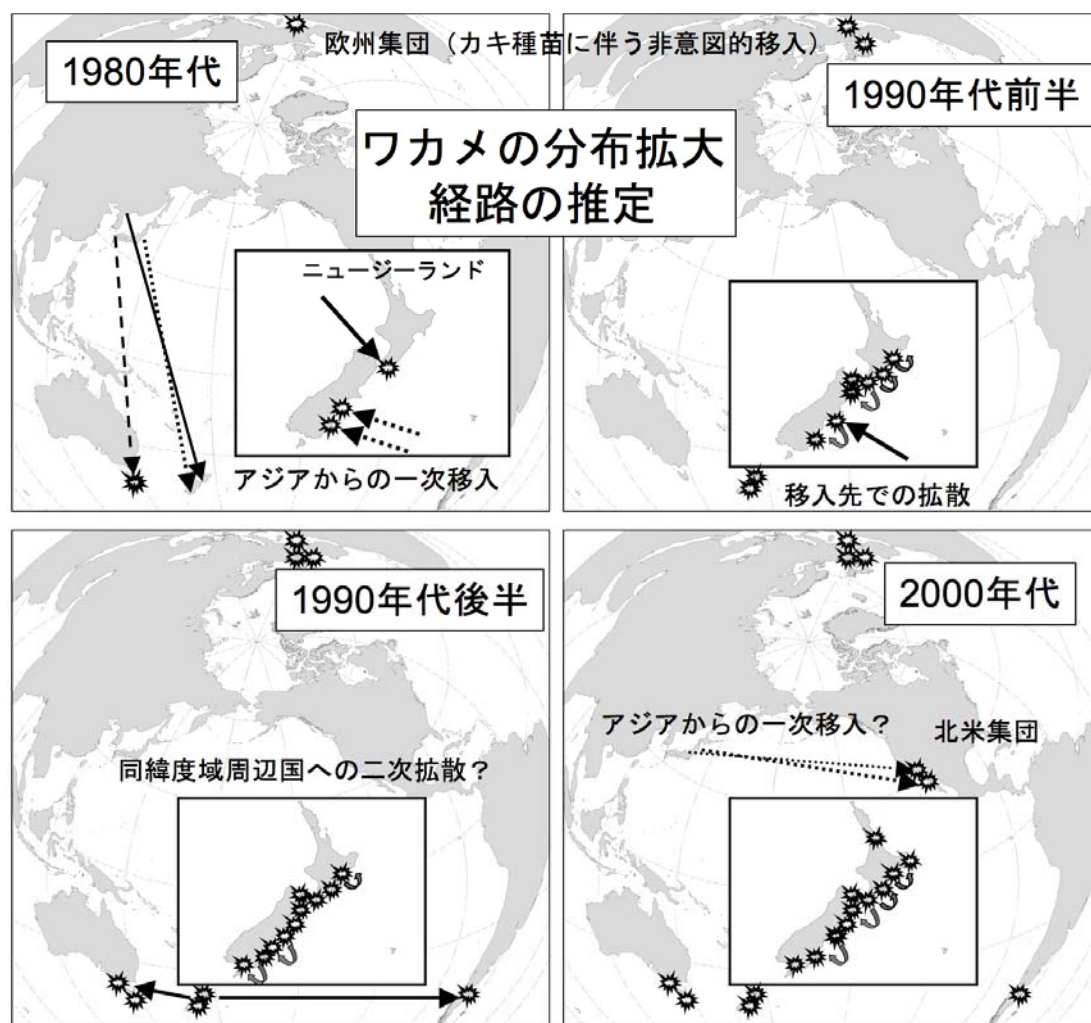


図5. 遺伝子解析に基づくワカメ移入集団の起源と拡散経路の推定。

本研究で得られた世界各地のワカメ集団の起源に関する結果は、文献などにおいて報告されている以下の歴史的な事情と一致する。すなわち、中国のワカメ集団は養殖目的で韓国から導入されたものであり²⁾、また、欧州へ導入されたカキ種苗は日本の三陸沿岸産のものとされている。一方、カリフォルニアおよびメキシコの集団は、移入集団の成立が比較的新しいが、歴史的に欧州

同様カキ種苗の導入が行われたワシントン州ではワカメの報告はないことから水産活動に伴う移入とは考えにくく、比較的最近、本州から大型船舶などによって一次移入された可能性が示唆される。また、オーストラリアの内部でもタスマニアは日本からの船舶を介した移入の可能性が高いが、オーストラリア本土やアルゼンチンの集団は、同緯度帯にあるため船体を介した移動においてより生存する可能性はるかに高いニュージーランドからの二次的な拡散の可能性が考えられる。本研究で得られた結果に基づき、世界のワカメ移入集団の起源と拡散過程を推定すると図5のようにまとめられる。

2) アオサ・アオノリ類の遺伝的多様性と生物地理に関する研究

a. 三河湾、大阪湾において優占するアオサ・アオノリ類の分類

核rDNA ITS領域DNA塩基配列解析から今回の調査で得られた三河湾および大阪湾のアオサ類は以下の種が確認された：アナアオサ *Ulva pertusa*；ミナミアオサ *U. ohnoi*；ナガアオサ *U. arasaki*；リボンアオサ *U. fasciata*；ウスバアオノリ *U. linza* (= *Enteromorpha linza*)；ヒラアオノリ *U. compressa* (= *E. compressa*)；*U. flexuosa* (= *E. flexuosa*)；ヒメボタンアオサ *U. tanneri*；*U. californica*；*U. scandinavica*；*U. armoricana*（図6）。これらのうち、特に大型で大量に発生するアオサ類はアナアオサとミナミアオサの2種であったが、春から夏にはアナアオサが、秋から冬にはミナミアオサが優占した。ミナミアオサは移入種であるとされてきたが、原産地は明らかにならず、もともと日本に分布していた可能性もある。一方、*Ulva armoricana*、*U. scandinavica*は何れも本研究において初めて日本での分布が明らかになったもので、比較的最近日本に移入してきた種であると考えられる。*U. flexuosa*については日本未産だが、日豪航路のバラ積み運搬船の船体からオーストラリアで報告されている個体と同じ遺伝子型を示す個体が採集されており、今後移入するリスクが高い種である。

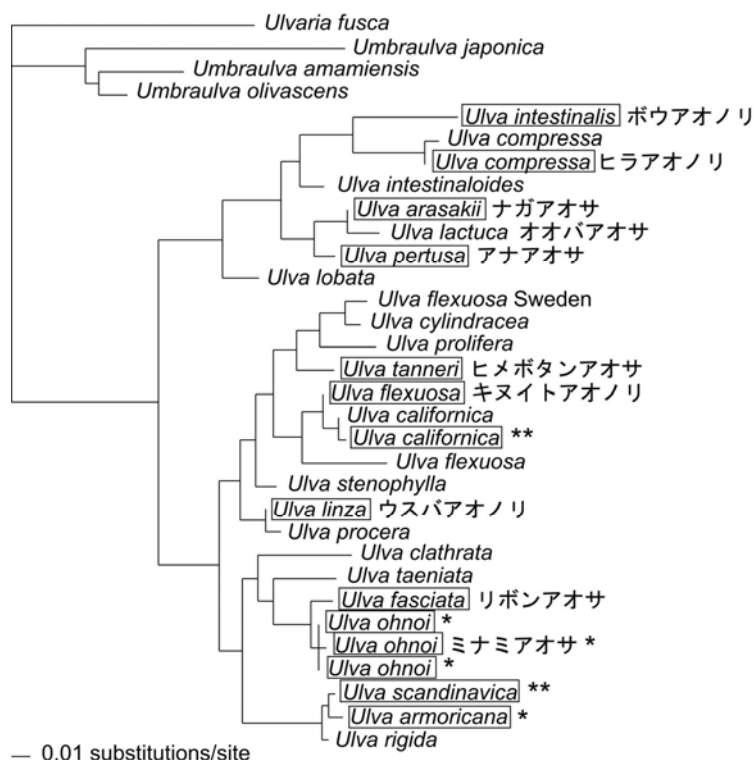


図6. アオサ類核rDNA ITS領域DNA塩基配列による最尤分子系統樹。本研究で採集した三河湾と大阪湾で優占したアオサ・アオノリ類を□で示す。*は最近移入したと考えられる種を、**は今回の調査で初めて日本での分布が確認された種を示す。

Ulva californica は米国カリフォルニアを原記載地とするアオサ属の1種であり、従来は北米とアフリカのみでその生育が報告されていた。これに対して、本研究において日本での分布（三河湾と大阪湾）を初めて確認したのに続き、外川（千葉県）や韓国、オーストラリアで採集したアオサ類の中にもこの種が含まれていることを確認した。このうちオーストラリアの標本は大阪湾（淡路島）の標本の1つと同一の核rDNA ITS領域DNA塩基配列を示した。また、本種と同じDNA塩基配列を持つものは英国からも*U. linza* と誤同定して報告されており、欧州にも分布していることが確認された。これら本研究で決定したDNA塩基配列データに北米集団のデータも加えて系統解析を行った結果、アジア・オーストラリアの標本は北米・欧州のそれとは別の系統群を形成した（図7）。また、標本間の遺伝的変異もアジア・オーストラリアのそれは北米・欧州のそれと同程度かそれ以上であった。これらの結果は、この種が日本の在来種である可能性を示唆している。また、淡路島の標本のうちの1つとオーストラリアの標本が同一のDNA塩基配列を示したことから、日本とオーストラリアの間で越境移入が起こった可能性が示唆される。

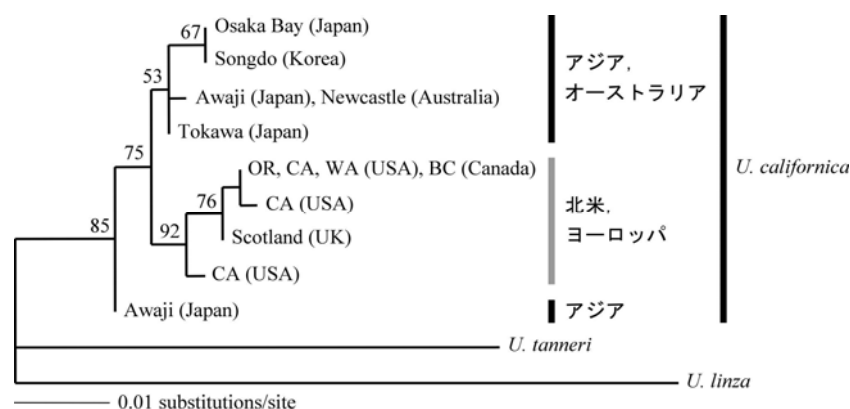


図7. *U. californica*の核rDNA ITS領域DNA塩基配列による最尤系統樹。

資料表1に本研究における遺伝子マーカーを用いた分類によって、日本の沿岸における生育、大型船舶の船体付着、バラスト水中での生存が明らかになった種の一覧を示す。

b. 海外アオサ集団の起源の推定

葉緑体遺伝子 $atpH$ - $atpI$ 介在領域配列では日本を含む極東アジアからは15のハプロタイプが見出され、また1つの集団内にも複数のハプロタイプが存在するなど、比較的高い遺伝的多様性が認められた（図8a, b）。一方、越境移入であろうと考えられるオセアニア、欧州、北米から採集された標本は、その広い地理的な分布にかかわらず全て1つ（オセアニア、北米）または2つ（欧州）のハプロタイプに属しており、きわめて低い遺伝的多様性しか見られなかった（図8b）。このうちオセアニアの集団は、日本の本州太平洋沿岸に広く分布する1つのハプロタイプと一致し、欧州の集団はこれに加え日本海沿岸に広く分布する1つのハプロタイプが見られた。このため極東アジア以外の集団は極東アジアの限られた地域からの人為的な移入に基づいていることが強く示唆される。

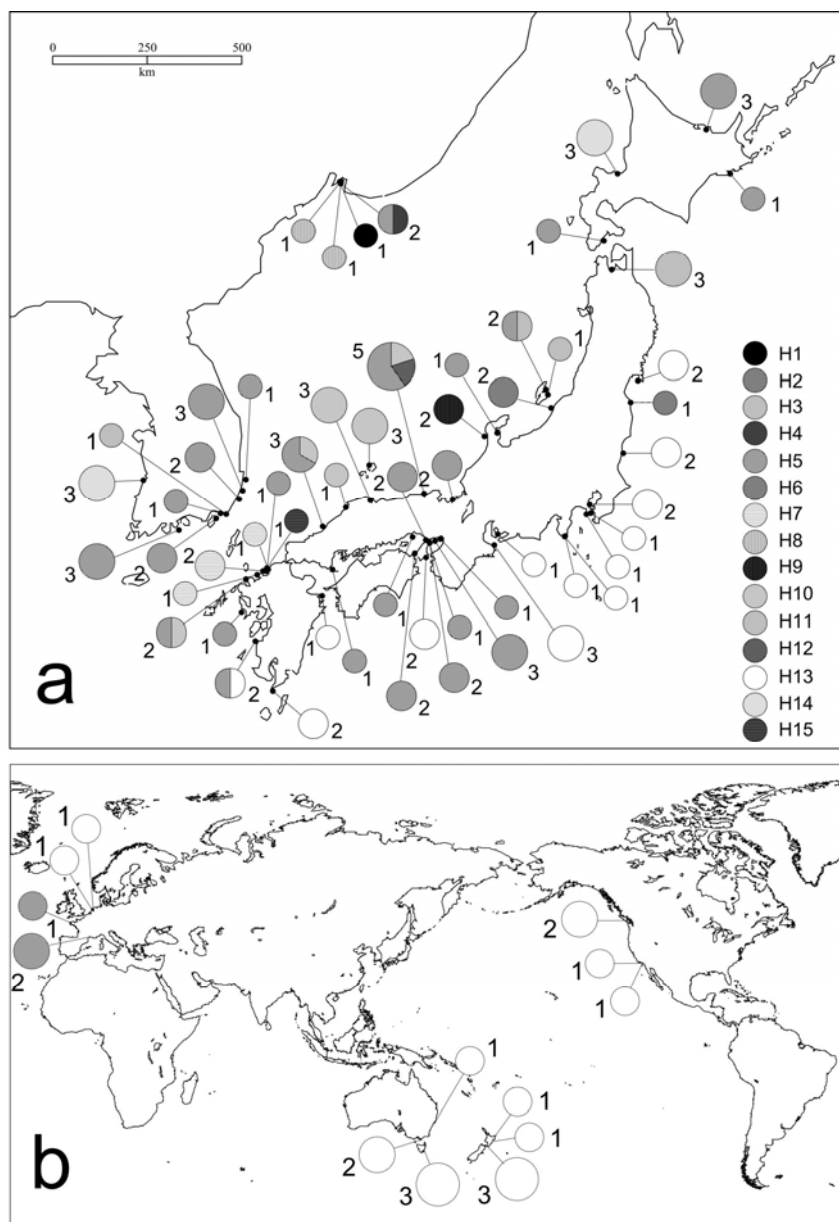


図8. アナアオサの葉緑体*atpH-atpI*介在領域ハプロタイプの分布。a図右下に示した網掛けのパターンがハプロタイプを、パイグラフは出現比率を示している。図中の数字は解析に用いた標本数を示す。a. 日本におけるハプロタイプ分布；b. 海外におけるハプロタイプ分布。オセアニア、北米、欧州の一部で見られるものは、本州と九州の太平洋岸で見られるものと一致する。

3) 褐藻シオミドロ類のミトコンドリア *cox3* 遺伝子DNA塩基配列による遺伝的多様性解析

*cox3*領域のDNA塩基配列による分子系統解析の結果、全ての解析法（近隣結合法、最節約法、最尤法）で支持された系統群のうち、15塩基（2.3%）以上の変異を含む系統群は5つであった。これらの系統群はそれぞれ独立した種に相当する可能性があり、従って世界各地産のシオミドロ属は *Ectocarpus fasciculatus* を除き、少なくとも4つの種に分類される可能性が示唆された。このうち本研究において船体付着およびバラスト水中から得られた株は、*Hincksia* 属あるいは *Pilayella* 属に近縁な種その他、*Ectocarpus* 属の2つのクレードに含まれた（図9）。これらのクレード内の株はこれまで東アジア以外に南米および欧州から得られているものであり、これらのクレードで広範囲の

海で採集された個体と同一のDNA塩基配列 (GenBank accession number: AB264797) を示した。このため、カリフォルニアに新規に移入したホンダワラ類はシダモクであり、瀬戸内海周辺の個体群に由来する可能性が高いことが示された。本種は一般に養殖に用いられる種ではなく、また北米カリフォルニア周辺では水産目的の海産動物の導入も行われていないため、船舶を介した移入によることが強く示唆される。

これまでに移入種として定着し、世界的に分布をひろげた海藻類には、1) 栄養繁殖または雌雄同株であるなど、1個体だけの移入からでも繁殖できる種；2) 一年生の種または大量の生殖細胞を作る種が多く知られている（例：イチイヅタ、タマハハキモク、アオサ・アオノリ類、ワカメ）。今回カリフォルニアに新たに定着したと考えられるシダモクは、一年生で、雌雄同株であり、これらの条件に適合するほか、気胞により浮き、流れ藻として容易に分布を広げる可能性があることから、世界各地に分布を広げたタマハハキモクと同様に、今後世界各地に拡散する可能性が危惧される。実際、本種はすでにカリフォルニアの本土側（ロサンゼルスロングビーチ）やメキシコ・バハカリフォルニアにも移入していることが確認されており、後者についても遺伝子マーカーを用いた解析で本種であることを確認した。



図10. 米国カリフォルニア州サンタカタリナ島で採集されたシダモク。きわめて最近この海域におそらく日本の瀬戸内海周辺に由来する集団が移入し、定着拡大していることがミトコンドリア遺伝子マーカーの比較から確認された。

（2）コウロエンカワヒバリガイの遺伝的多様性と移入起源・拡散経路の解析

1) 日本国内に移入したコウロエンカワヒバリガイの原産国の推定

DNA塩基配列を決定し、全個体についてアライメントを取ったところ、*mtCOI*領域は654塩基となった。外群に同属のクログチガイを用い、近隣結合法（neighbor-joining）にて作成した系統樹を示す（図11）。

ニュージーランドのコウロエンカワヒバリガイは単独でクレードを形成することが確認された。また同じニュージーランドの国内でも、北島のAuckland産の個体と南島のHavelock産の個体においてクレードが独立しており、ブートストラップ値が99と高い信頼性で2系統に分かれていることがわかった。このような結果から、ニュージーランドのコウロエンカワヒバリガイは独自性があり、北島、南島でも分化が進んでいることを示唆する。

オーストラリアのコウロエンカワヒバリガイは、東海岸のBrisbaneと西海岸のPerthから採集され

た個体を示す。日本の個体は、千葉（Chiba）、愛知(Aichi)、三重（Mie）から採集されたものを示す。オーストラリアの個体と日本の個体は混在するものもあり、ニュージーランドの個体群と比べ多様性が高いと考えられる。また、日本でもオーストラリアでもいくつかのクレードは見られるものの、地域単独のクレードは形成されず、一つの地域で二つのクレードあるいはほかの地域との混合などが見られた。

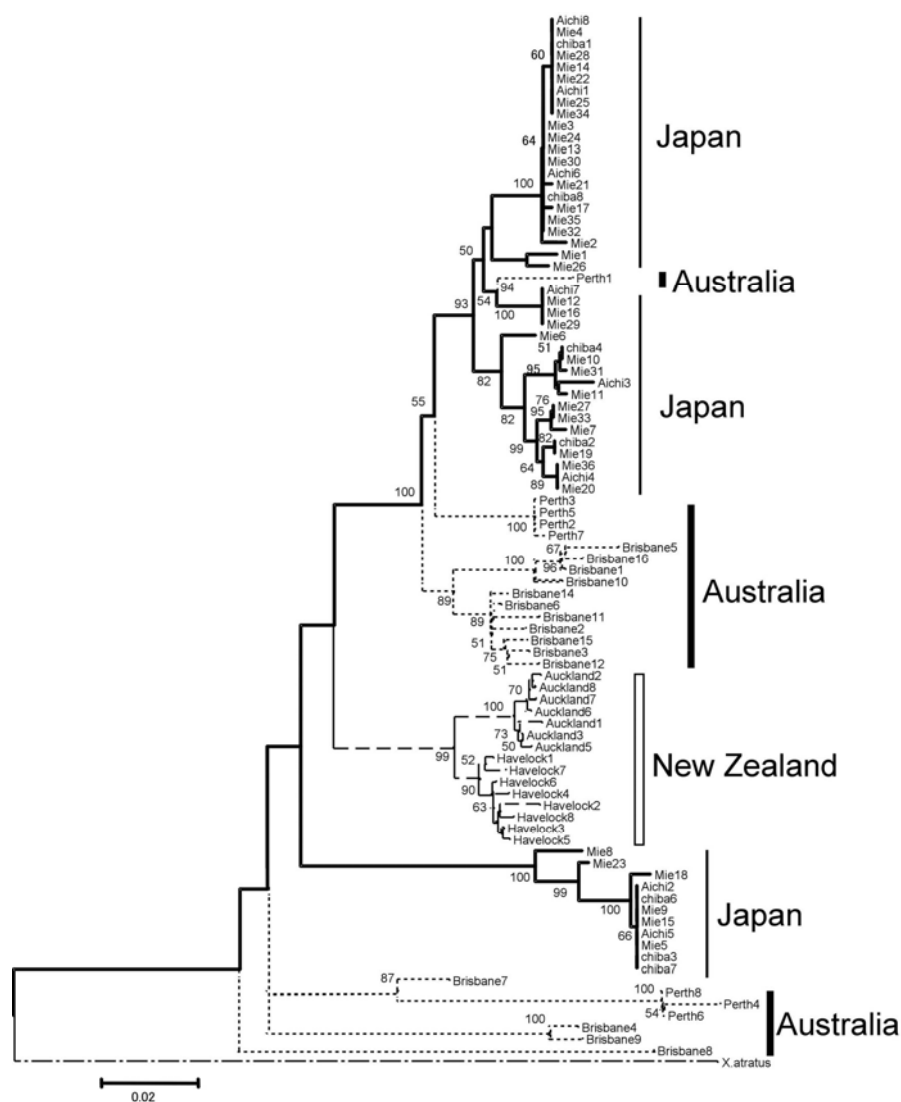


図11. 日本、オーストラリア、ニュージーランド産コウロエンカワヒバリガイ個体群のミトコンドリアCOI遺伝子による分子系統解析結果（近隣結合法系統樹）。

ニュージーランドの2集団（合計54個体）と日本国内の5集団（合計300個体）について、制限酵素EcoT22 I を用いPCR-RFLP法によって分析を行った。その結果、ニュージーランドの2集団には、大部分の個体に酵素による切断が確認されたのに対し、日本ではいずれの集団の個体においても酵素による切断は全く確認されなかった（図12）。

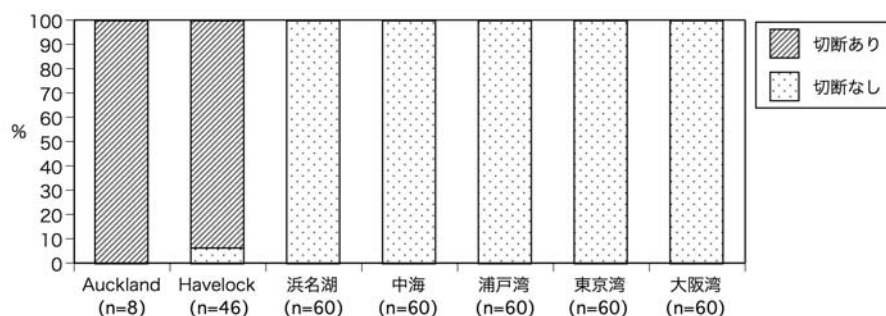


図12. EcoT22 I を用いたPCR-RFLPによる頻度分布のニュージーランドと日本の地域比較。

2) オーストラリアと日本の集団間比較

オーストラリアの5集団（合計453個体）と日本国内の5集団（合計300個体）について、制限酵素Afa I を用いPCR-RFLP法によって分析を行った。その結果、オーストラリアの試料には6種類の多型が確認されたのに対し、日本のそれにはそのうち3種類の多型のみが確認された（図13）。東オーストラリアのBrisbaneでは、約44.3%の個体はAfa I によって切断が起こらないハプロタイプN（以下、ハプロタイプ省略）であった。その他、A、B、C、Dが満遍なく出てきており、多型の偏りをもっとも少ない。Gold Coastでは、Nが約53.3%、他の地域で多く現れるAが地点内で最も少ない5.0%という結果であった。NewcastleではNが約3.1%、Aが約90.5%、Bが約3.2%、Cが約3.2%であった。計4多型が出現してはいるものの、多数はAに占められ、遺伝的多様性が最も低い。Sydneyでは比較的満遍なく多型が現れており、Brisbaneと同様に遺伝的多様性が高いと考えられる。一方、西オーストラリアのPerthでは他の地域では現れていない特異的なEが出現したが、BとDは現れなかった。

日本国内では、東京湾、浜名湖、大阪湾、中海、浦戸湾の5地点合わせて約96.7%がAという非常に偏った結果が得られた。Nは1.0%、Cは約2.3%と少数が検出された。また、日本国内においては、B、D、Eを持つ個体は出現しなかった。

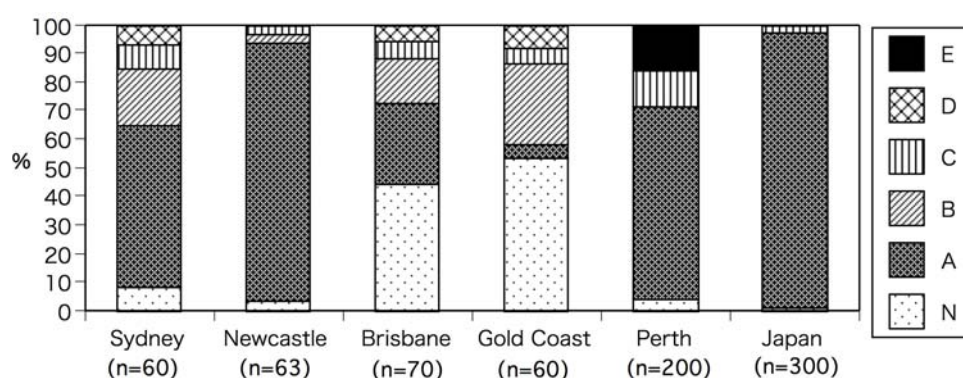


図13. Afa I を用いたPCR-RFLPによる頻度分布のオーストラリアと日本の地域比較。

日本国内の各地点の結果を図14に示す。東京湾は60個体中56個体がA、1個体がN、3個体がCであった。浜名湖では、60個体中のすべてがAであった。大阪湾では、60個体中59個体がA、1個体がCであった。中海では、60個体中57個体がA、1個体がN、2個体がCであった。浦戸湾では、60

個体中58個体がA、1個体がN、1個体がCであった。

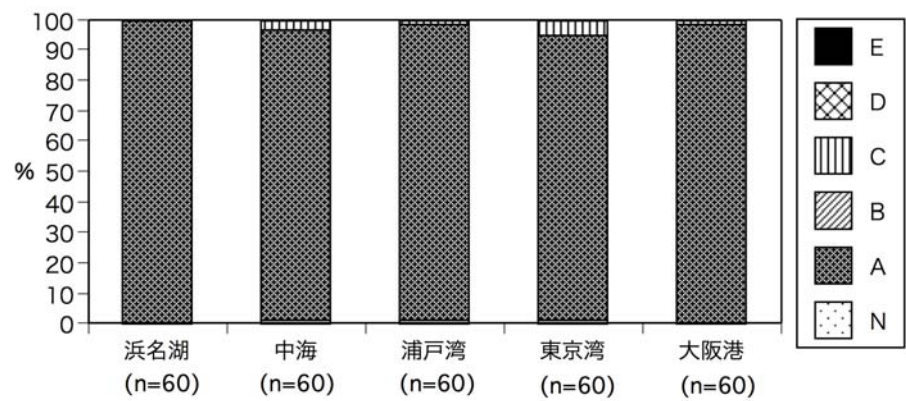


図14. Afa I を用いたPCR-RFLPによる頻度分布の日本国内の地域比較

3) 集団間の遺伝的距離 F_{ST}

Afa I を用いたPCR-RFLP解析から得られた結果が、統計的に有意な差なのかどうか確認するために統計的処理を行った。オーストラリア5地点、日本5地点、合計10地点でそれぞれペアを作り、2地点間の F_{ST} を求めた（表1）。結果、オーストラリア国内同士では最小0.068（Newcastle-Perth）から最大0.602（Newcastle-Gold Coast）までの値をとり、平均値は0.224となった。日本国内では最小-0.016（東京湾-大阪湾）から最大0.025（東京湾-浜名湖）までの値をとり、平均値は-0.001となった。この値を見ても分かるとおり、日本の個体は遺伝的分化に非常に乏しいことが分かる。次に、日本とオーストラリアの地点間では平均値は0.299という値を示すのに対し、オーストラリアのNewcastleと日本の個体に限って言えば、平均値は0.016という値を示す。このことからNewcastleの個体は日本の個体と同じように遺伝的多様性に乏しく、Newcastleと日本のコウロエンカワヒバリガイは統計的に見ても類似した遺伝子構造を持っているということが確認できる。この表から、日本国内の各地点間のペアでは F_{ST} に有意な差は見られないと同時に、日本の各地点とNewcastleの間にも有意な差は検出されなかった。

表1 亜集団ペアワイズ F_{ST} による集団間の検定（ $P<0.05$ ） 枠内は有意差がなかったことを示す。

	Brisbane	Gold Coast	Newcastle	Sydney	Perth	東京湾	浜名湖	大阪湾	中海
Brisbane									
Gold Coast	0.066								
Newcastle	0.384	0.602							
Sydney	0.069	0.225	0.176						
Perth	0.201	0.364	0.068	0.086					
東京湾	0.440	0.651	-0.004	0.226	0.086				
浜名湖	0.492	0.700	0.047	0.284	0.105	0.025			
大阪湾	0.480	0.689	0.027	0.270	0.100	0.000	0.000		
中海	0.441	0.653	0.000	0.230	0.086	-0.016	0.014	-0.007	
浦戸湾	0.461	0.673	0.012	0.252	0.093	-0.005	0.000	-0.011	-0.013

4) コウロエンカワヒバリガイの移入経路と移入手段の推定

前年度のシーケンス解析の結果、ニュージーランドのコウロエンカワヒバリガイは北島と南島において独立して分化が起こっており、遺伝的な交流はないと考えられる。

さらに今年度のEcoT22Iを用いたPCR-RFLP解析の結果、ニュージーランドのコウロエンカワヒバリガイは、日本に生息する同種とは異なる遺伝子型を持っていると言う事が判明した。もしニュージーランドから日本にコウロエンカワヒバリガイが持ち込まれたのだとしたら、ニュージーランドで多くを占めているEcoT22Iで切断の起こる遺伝子型が持ち込まれる可能性が高い。しかし、今回調査した日本のコウロエンカワヒバリガイは5地点300検体を調べたが、全ての個体で切断が確認された。遺伝構造を比較した場合において、ニュージーランドが日本のコウロエンカワヒバリガイの原産国という可能性は極めて低く、オーストラリアが原産国と考えられる。

オーストラリアと日本の集団についてAfaIを用いたPCR-RFLPの解析をした結果、日本では3つのハプロタイプしか出現しなかったのに対して、オーストラリアでは一地域でも最大で5種類のハプロタイプを有し、オーストラリア全体では6種類のハプロタイプが存在し、遺伝的多様性が高い。さらに、ハプロタイプ出現頻度には地域ごとの特徴も見られた。まずハプロタイプDはオーストラリアの東海岸に現れ、Perthでは出現しなかった。ハプロタイプEは西海岸のPerthだけに現れた。この2つのハプロタイプはそれぞれの地域において独立して分化した遺伝子型であると考えられる。

日本とオーストラリアのコウロエンカワヒバリガイを比較した場合、Newcastleの個体は日本の個体と遺伝子構造が似通っている。地域内でハプロタイプAの割合が90%以上と圧倒的に大きく、その他のハプロタイプの割合は小さい。統計的処理を行ってみたが、 F_{ST} の値は日本とNewcastleの間では遺伝的距離において有意な差は無いことが明らかになった。

オーストラリアから日本へ輸出している貿易品目として重要な石炭は、Newcastleが最大の輸出港になっている。後述の船体付着動物の調査において、石炭を運ぶバルカーの船体は付着動物が種数、生物量ともに多い。また、コンテナ船における付着動物調査では、船体から本種の生体が採集された。本種の移入手段としてはバラスト水と船体付着が考えられるが、オーストラリアから日本へのバラスト水の輸送は少ないことを考えると、船体付着の方が移入手段として可能性が高いと思われる。このような貿易構造の特徴と、今回の集団遺伝学的構造の解析から、日本のコウロエンカワヒバリガイはオーストラリアNewcastleから持ち込まれた可能性が高いと考えられる。

(3) 大陸間航路の大型輸送船の船体付着生物群集の多様性解析

1) 海藻類

海藻類については大阪湾に寄港する船舶などの船体に緑藻アオサ・アオノリ類数種、糸状褐藻（シオミドロ類）、紅藻アクロケチウム類、マサゴシバリ類などの着生が確認された。このうち、アオサ・アオノリ類について行った遺伝的解析（核rDNA-ITS領域）から、船体またはバラスト水から採集された個体と同じハプロタイプの個体が、寄港地である東北地方南部太平洋側の港やオーストラリアNewcastleから採取されており、これらの種が船体付着によって容易に分布を広げていることが示唆される（図15）。

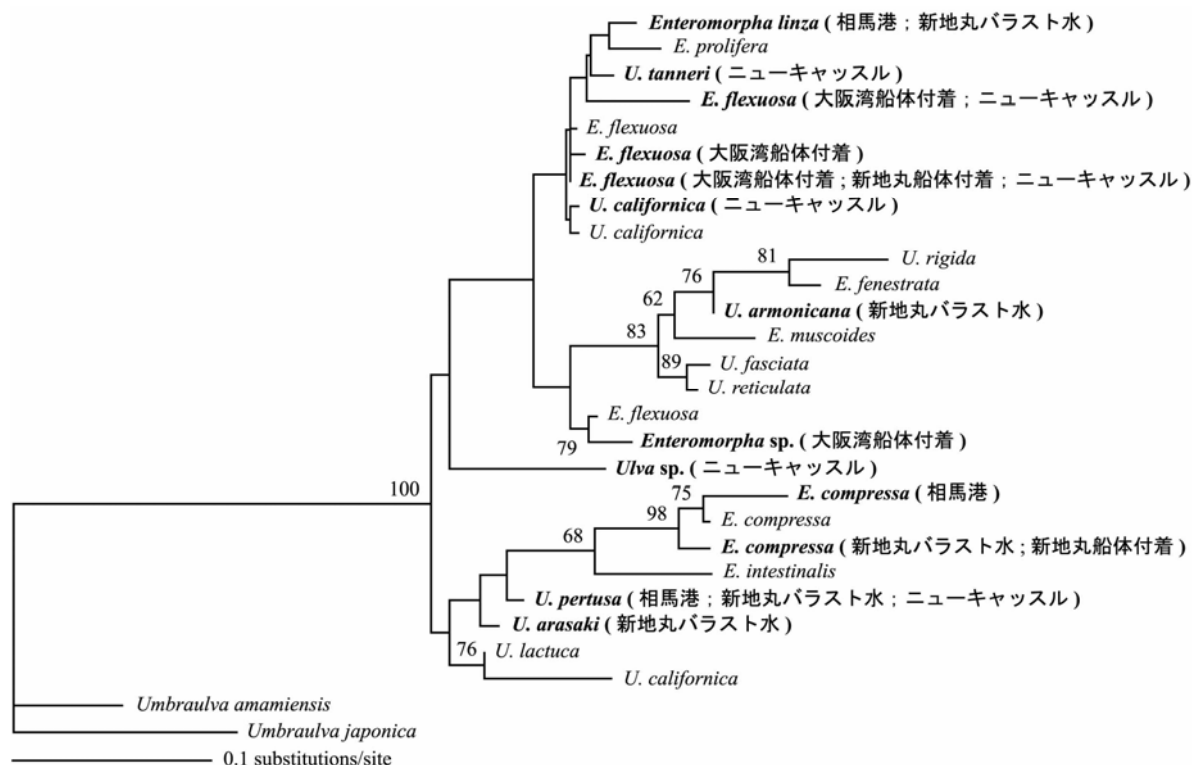


図15. 本研究において大阪湾に寄港するバラ積み船石炭運搬船および新地丸の船体表面、新地丸バラスト水、これらの船舶の寄港地（オーストラリアNewcastleを含む）などで採集されたアオサ、アオノリ類の分子系統樹（核rDNA-ITS領域、最尤法系統樹）。

2) 船体付着動物

船体付着動物については、大阪湾に入港するバラ積み船では2隻各一回の潜水調査だけでも船体から50種を超える底生動物の付着が確認され、そのうち22種はフジツボ類であった（資料表2）。これらフジツボ類のうち4種はこれまで日本国内から報告されたことのない種であった。このうち *Austrobalanus imperator*, *Tetracilitella purpurascens*, *Austromegabalanus nigrescens* の3種はオーストラリア原産であり、また *Eliminius modestus* はオーストラリアとニュージーランドを原産地とする種であるが、このうち *Eliminius modestus* は原産地の水温、塩分などから日本沿岸への移入、定着の可能性が極めて高い種であると考えられる。

一方、乾ドック入りしたバラ積み船4隻とコンテナ船2隻、自動車運搬船2隻の船体付着生物では、刺胞、触手、節足、軟体、環形、扁形、脊索の7門90種類が確認された（資料表3）。バラ積み船4隻には、いずれも多く付着動物が確認されたが、コンテナ船や自動車運搬船の船体付着動物は種数、生物量ともに少なく、わずかにシーチェストや舵部分に見られただけだった（図16）。この違いは船足や停泊時間、航路の塩分などの環境変動によると考えられる。

特に付着動物が多かったバラ積み船4隻について、動物群別の個体数頻度を検討したところ、フジツボ類と端脚類が優占していた。このうち、3隻ではフジツボ類が優占していたが、1隻だけはフジツボ類よりも端脚類の方が優占していた。これはこの船が特にフジツボ類の死殻が多かったため、間隙に住み込む端脚類のような生物が多かったためと考えられる。フジツボ類の湿重量頻度では、平滑な船体ではサンカクフジツボが優占し、次いで *Tetracilitella purpurascens* やヨー

ロoppaフジツボが優占していた。一方、後部の腐食板の周辺やシーチェスト、プロペラカバー、船尾部では多くの場合、*Megabalanus tintinnablum*が優占し、次いで*Austrobalanus imperator*、ミナミアカフジツボ、アカフジツボが優占していた。

	船底前部～後部	ビルジ キール	シーチェスト	腐食板 プロペラカバー	舵 とも
サンカク フジツボ	● ● ● ● ● ●	●	● ●	● ● ●	●
<i>Megabalanus tintinnablum</i>	○ ○ ○ ○ ○	●	● ●	● ● ●	●
オオアカ フジツボ	○ ○ ○ ○ ○	○	○ ●	● ● ●	○
アカフジツボ	○ ○ ○ ○ ○	○	○ ●	● ● ○	○
ミナミアカ フジツボ	○ ○ ○ ○ ○	●	○ ●	○ ● ●	●
<i>Austrobalanus imperator</i>	○ ○ ○ ○ ○	●	● ●	● ● ●	●

図16. 船体表面のフジツボ類の分布の1例（バラ積み運搬船B；丸の大きいものは密度が高いことを示し、白丸は分布していないことを示す）。

一方、コンテナ船で海藻類、動物の何れでも付着が極めて少なかったことは入港時に河川の淡水域を通行するため、海産生物の多くが死滅するためと考えられる。

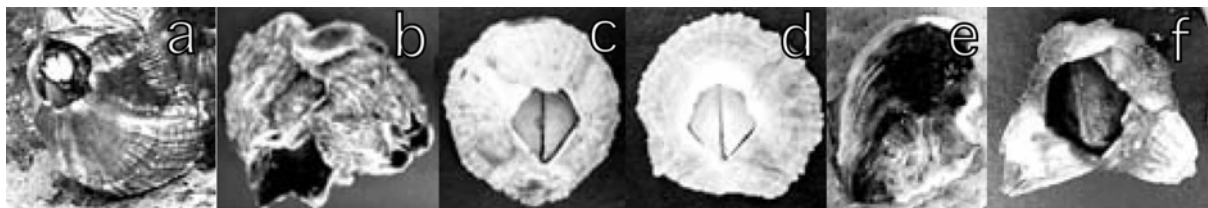


図17. 2004年6月調査においてバラ積み船の船体から採集された付着生物。a. *Megabalanus tintinnablum*; b. *Austrobalanus imperator*; c. *Tetracitella purpurascens*; d. *Tesserpora rosea*; e. *Saccosterra*属の1種; f. アミメフジツボ *Balanus variegatus*。

付着生物では多くの日本に分布していない種が確認された。フジツボ類ではオーストラリアに分布している *Megabalanus tintinnablum*, *Austrobalanus imperator*, *Tetracitella purpurascens*, *Tesserpora rosea*が、二枚貝類では *Saccosterra* 属の1種の付着が確認された（図17a-e）。また、1930年代に国内での分布が確認され、1970年代以降は分布記録のないアミメフジツボ *Balanus variegatus* の付着が確認された（図17f）。船体から確認された生物は付着性種だけではなく、フジツボ類の死殻の中や付着生物の間隙に生息するヨコエビ類、等脚類、エビ類などの自由生活する種も多く確認された。船体後部の舵部やプロペラ軸周辺、シーチェスト外面には *Megabalanus tintinnablum* が優占し、船底には日本にもオーストラリアにも分布するサンカクフジツボが優占していた。付着している生物は成熟個体も多く、これらの結果は現在日本に分布していない種が船舶を介して、新たに移入してくる可能性が大きいことを強く示唆している。

（4）バラ積み船バラストタンク内で生存する海藻類および動物プランクトンの動態解析

1）タンク内の水温・塩分の変動

日豪航路のバラ積み運搬船のバラストタンク内の水温は17.3-31.7℃、塩分は29.3-33.9 psuの間で変動した。水温は日本出航後、毎日上昇し、2004年12月と2005年6月では調査開始からリバラストまでの5日間で10℃以上上昇した。リバラスト以降は30℃前後に安定した。塩分はリバラスト後上昇したが、季節・日変動は小さかった。タンク内の表層と近底層の間では、水温や塩分の変動傾向に差が認められなかった。

2) 海藻類

日豪航路のバラ積み船の日本出航後2日目、4日目、8日目の採水サンプルからはアオサ、アオノリ類の大型藻体が出現したが、リバラスト後12日目、15日目のものでは大型海藻類は確認されなかった（図18）。これらのことから出航後1週間程度までは、大型海藻類の幼体がタンク内に生存しており、リバラストなどにより排出されうることが明らかになった。これらの海藻類の胞子は通常数時間程度でタンクなどに基質に着生する。従って数日を超えて連続して遊泳しているとは考えられないため、水面・水中などでタンク表面などに付着せずに発芽し浮遊していたもの、またはタンク表面に付着していたが、攪乱によりはがれ落ちたものが採水サンプルに入ったものと考えられる。

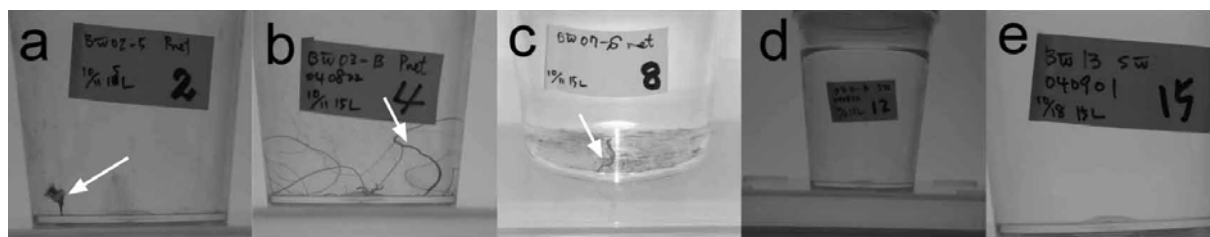


図18. 運行時定期的に採取されたバラスト水から培養により発達した海藻類。a. 2日目（アオサ属の1種）；b. 4日目（アオノリ属の一種）；c. 8日目（アオサ属の一種）；d. 12日目（大型海藻の発達無し）；e. 15日目（大型海藻の発達無し）。

3) 動物プランクトンの多様性と経時変化

今回確認された主な動物プランクトンは、有孔虫類、有鐘纖毛虫類、アカンソメトロン（放散虫）類（原生動物門）、枝角類、カイアシ類（節足動物門）、腹足類幼生、二枚貝類幼生（軟体動物門）、多毛類幼生（環形動物門）であった。調査を通じて多数の種が確認されたのは、カイアシ類で、カラヌス目6種、キクロプス目5種、ハルパクチクス目2種、ポエキロストム目6種の合計18種（成体）が確認された。（資料表4）

バラスト水内の全動物プランクトンの個体数密度は、どの調査においても調査初期に最も高く（160-4200個体/100L）、日が経つに連れて急速に減少し、リバラスト直前までに1割以下になった（図19）。リバラスト直後にわずかに増加するが、再び減少した。2004年8月と12月の調査では、入港までに動物プランクトンは確認されなくなったが、2005年6月の調査ではリバラスト5日後の調査終了時に、密度は低いが多毛類幼生とアカンソメトロン類、有孔虫類が確認された。表層と近底層の動物の個体数密度は、2004年8月と2005年6月の調査開始時には大きな差があったが、その後密度の低下に伴い差は小さくなり、調査終了時まで変動傾向は類似していた。

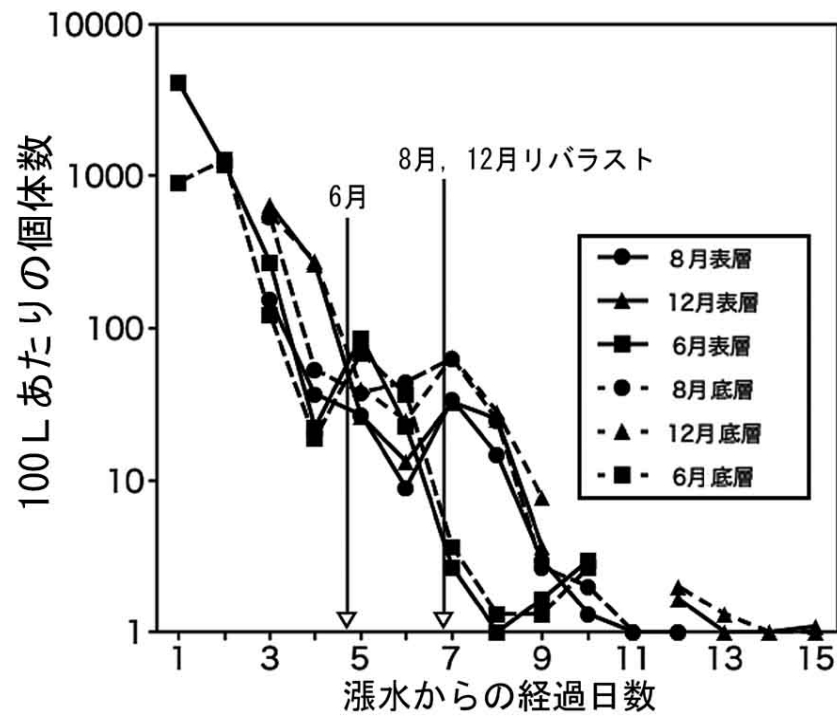


図19. バラスト水内の動物プランクトンの密度変動。

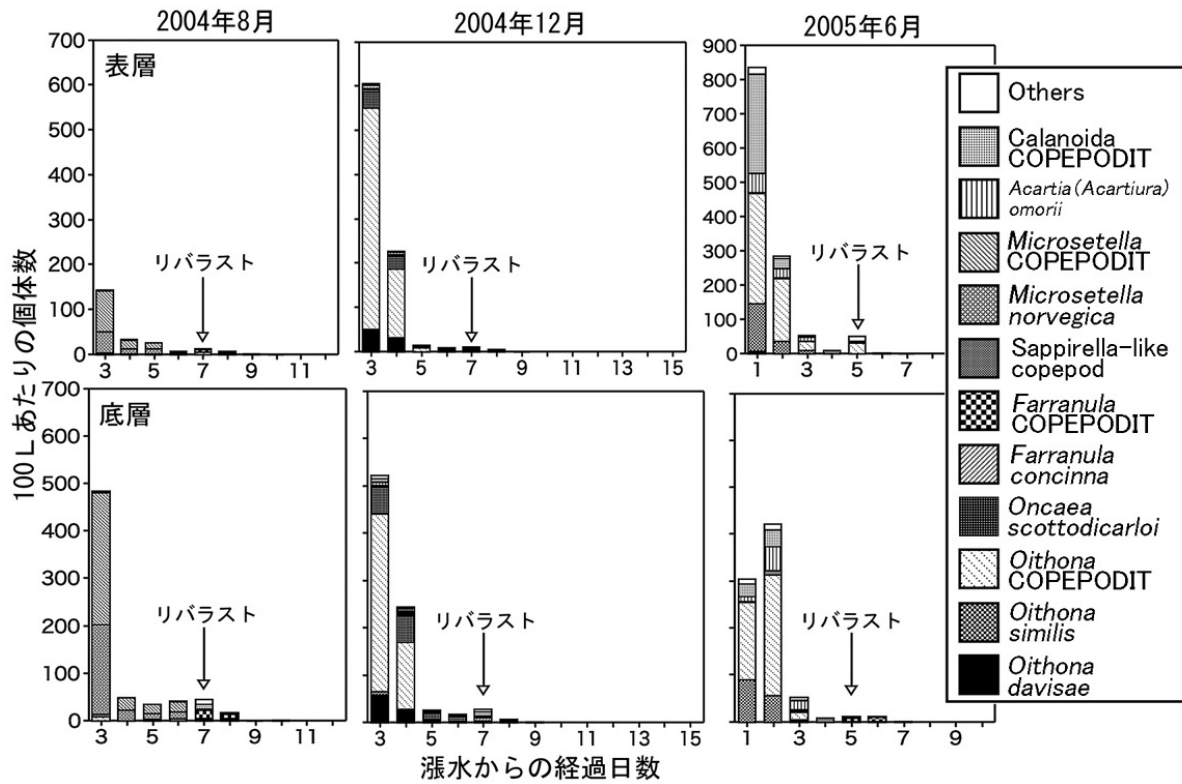


図20. バラスト水内のカイアシ類の個体数変動。

バラスト水内のカイアシ類の種別の個体数変動を図20に示す。調査開始時にはいずれの調査でもカイアシ類が優占し、全生物の個体数密度の8割以上を占めた。2004年8月の調査では *Microsetella norvegica* と *Microsetella* 属幼体が、2004年12月の調査では *Oithona davisae* と *Oithona* 属幼体が、2005年6月の調査では *Oithona similis* と *Oithona* 属幼体がそれぞれ優占していたが、いずれも調査終了時には確認されなかった。一方、リバラスト時にはいずれの調査においても暖水性のカイアシ類 *Farranula concinna* や *Farranula* 属幼体が優占していたが、これらも調査終了時まで確認されなくなった。

今回出現したカイアシ類のうち、*Oithona davisae* と *Acartia omorii* はアジアから北米や南米に移入した外来種として知られている。今回の調査では、カイアシ類はいずれの種も調査終了時には確認されなかった。減少し確認されなくなる種のほとんどは、時間経過とともに死滅していると考えられる。減少率は肉食性種や懸濁物食性種では急激であるのに対し、堆積物食性や寄生性種では緩やかだった。また今回の調査で多毛類幼生が調査終了まで確認されたが、種の同定はできなかった。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

世界各地に分布を拡大しつつあり、各地での生態系の攪乱が危惧されている褐藻ワカメについて、原産地である北東アジアと世界各地の移入集団の遺伝的多様性を、ミトコンドリア遺伝子塩基配列及び核遺伝子マイクロサテライト解析を併用して解析することで、世界の移入集団の起源を明らかにし、また経時的な拡散過程を推定することができた。中でもニュージーランドの集団は移入初期から現在まで複数回の移入があり、優占する集団が変化していることが初めて明らかになった。また、大陸間航路の大型輸送船のバラストタンクの水温環境を模した条件での培養により、実際に船舶を介した移動が、ワカメの場合微小世代である配偶体では起こりうることを実験的にも明らかにした。このような、大型海藻類の越境移入と拡散の動態を経時的に、かつ実験的に解析した例はほとんど無く、底生動物を含めてもきわめて少ない重要な成果であると考えられる。

日本沿岸でのアオサ・アオノリ類の調査からは三河湾、大阪湾などの代表的な閉鎖性海域において、*Ulva armoricana*, *U. californica*, *U. flexosa*, *U. scandinavica* などの、これまでほとんど報告されなかった移入種が、地域によってはすでに優占していることが初めて明らかになった。逆に、日本以外の調査では、極東アジア原産のアナアオサが極めて広範囲に拡散している事が示され、またそれが日本の太平洋沿岸に起源する事が示唆された。このことは、昨年度の成果で明らかになったワカメの動態と考え合わせても、海藻類の大陸間越境移動がこれまで考えられていたよりはるかに広範囲で、また急速に進行していることを示している。

一方、もう一つの代表的な船体付着海藻であるシオミドロ類については、種レベルの同定に適した解像度を持つと考えられるミトコンドリア遺伝子を用いて世界各地の系統株の遺伝的多様性解析を行い、船体付着シオミドロ類の遺伝子マーカーを用いた種同定システムの構築にむけ大きく前進した。また底生動物についてはコウロエンカワヒバリガイの起源特定にむけて遺伝子解析を行い、オーストラリアから日本へ移入した可能性が高いことが明らかになった。これは国内に移入した海洋無脊椎動物についてDNA分析により原産国を特定した初めての例である。また

PCR-RFLP法による解析に成功したので、より簡便に多くの試料を検査することが可能になった。

大陸間航路の大型運搬船の船体付着生物に関する調査では、数回の調査でも10種を超える海藻類、50種を超える底生動物の付着が確認され、また船体の部位によってその組成、量に違いがあることが示された。これらの一部は日本での分布が確認されていない種であり、今後の移入が危惧されるが、その一部については原産地と移入先の生育環境の比較から我が国への移入・定着のリスクについても検証した。底生生物の船体付着は、その量や多様性において部位による差が顕著であり、また船体塗料が脱落した部分で多くの着生が見られる。一方、淡水域を航行するコンテナ船では付着生物が極めて少なかった。これらのことは、今後の付着生物対策を策定する上で有用な知見である。

また、また日本と南半球の間を往復するバラ積み運搬船のバラストタンク中の海藻類及び動物プランクトンの動態解析においては、出航後数日で、著しい個体数の減少が見られ、ほとんどの種がバラスト時または到着時には死滅していることが初めて検証されたが、一部の動物では季節によっては大陸間の航行期間を通しての生存が確認され、バラスト水による分布拡大の可能性が確認された。

（２）地球環境政策への貢献

本研究で得られた、船舶などを介して越境移動する海洋生物の起源と拡散経路を推定するための方法論と解析技術、及び越境移動する主要な海洋生物の動態に関する知見は、新たに制定された「海洋基本法」第三章基本的施策の第十七条（海洋資源の開発及び利用の促進）における“水産資源の保存及び管理、水産動植物の生育環境の保全及び改善”、第十八条（海洋環境の保全等）における“生育環境の保全及び改善等による海洋の生物の多様性の確保”、第二十二条（海洋調査の推進）における“海洋環境の変化の予測その他の海洋に関する施策の策定及び実施に必要な調査の実施並びに海洋調査に必要な監視、観測、測定等の体制の整備”などの各項目に関わる施策策定において、重要な貢献をする成果であると考ええる。

ワカメの起源と拡散経路に関する研究成果からは、温帯域に成育する生物は熱帯を越えた大陸間航路による移動は比較的小きく、一旦新たな沿岸域に定着すると急速に拡散し、周辺海域に蔓延する可能性が示唆され、移入後早期の検出と駆除などの対応が重要であることが確認された。また、本研究による日本側研究者の調査の結果、これまで分布が報告されていなかった北島オークランド港周辺にもワカメの分布が拡大していることが明らかになり、この情報に基づき直ちにニュージーランド生物安全局(Biosecurity New Zealand)が詳細な現地調査と駆除作業を行った。また、北米・カリフォルニアおよびメキシコ・バハカリフォルニアにおける、新規の大型海藻移入種（シダモク）の同定および起源推定に関する共同研究とその研究成果の提供は、現地における速やかな駆除計画の策定と対策に貢献した。

また、バラストタンク内の海藻・動物プランクトンの動態および船体付着生物の多様性に関する成果は、バラスト水条約に基づくバラスト水処理の実施過程において、その効果を検証するためのモニタリングの実施上、有用な情報を提供するほか、今後の船体付着生物を含めた船舶による生物移動の法的な規制の必要性を検証する上でも重要な知見を提供すると考える。本研究の成果の一部は、実際、環境省を含む関連省庁のバラスト水条約対応に関する委員会、北大西洋海洋科学機構(PICES)における海洋移入生物の多様性解析と対策に関わる委員会での検討において有用

な情報を提供してきたほか、新聞報道などにより、一般市民にもこの問題に関する興味を喚起してきた。また、船体の部位によりその多寡・種組成に大きな違いが見られることが明らかにされたことは、今後船体付着生物を抑制するための技術的方策を考える上でも有効な資料となる。

6. 引用文献

1) Kimura, T., M. Tabe & Y. Shikano 1999. *Limnoperna fortunei kikuchii* Habe, 1981 (Bivalvia: Mytilidae) is a synonym of *Xenostrobus securis* (Lamarck, 1819): Introduction into Japan from Australia and/or New Zealand. VENUS (Jap. Jour. Malac.), 58(3): 101-117.

7. 国際共同研究等の状況

ニュージーランド沿岸におけるワカメの生育状況と拡散経路に関して、ニュージーランド国立水圏大気圏研究機構(NIWA)のWendy Nelson、Kate Neill博士らと、ワカメ移入集団の解析のため中国海洋水産研究所Wei Ting Wang博士、メキシコ・バハカリフォルニア大学Luis E. Aguilar-Rosas博士、フランス・ロスコフ臨海実験所Akira F. Peters博士、韓国・忠南大学Sung Min Boo博士と、ワカメ集団のマイクロサテライト法による遺伝的多様性解析のためフランス・ロスコフ海洋生物学実験所Frederique Viard博士と、緑藻アオサ類の生物地理に関して、韓国・忠南大学Sung Min Boo博士、マレーシア大学Siew Moi Phang博士、香港大学Put Ang Jr.博士と、褐藻シオミドロ類の遺伝的多様性解析のため、ドイツ・コンスタンツ大学Dieter G. Mueller博士、英国Culture Collections of Algae and ProtozoaのFithjof Küpper博士、フランス・ロスコフ海洋生物学実験所Akira F. Peters博士と共同研究を行った。また、コウロエンカワヒバリガイの生物地理学的解析のため、オーストラリア・オーストラリア博物館Ian Loch氏、クイーンズランド博物館Peter Davie博士ら、西オーストラリア博物館Shirley Slack-Smith氏、ニュージーランド・コウスロン研究所Ashley Coutts博士らと共同研究を行った。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

〈論文（査読有り）〉

- 1) S. Uwai, W. Nelson, K. Neill, W.D. Wang, L.E. Aguilar-Rosas, S.-M. Boo, T. Kitayama and H. Kawai: Phycologia, 45, 687-695 (2006) “Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* deduced from mitochondria genes – Origins and succession of introduced populations”
- 2) M. Ohtani, T. Ohmi, S. Uwai, T. Hanyuda, R.E. Prabowo, T. Yamaguchi, H. Kawai: *Biofouling* 23: 277-286. (2007). “Occurrence and diversity of barnacles on international ships visiting Osaka Bay, Japan, and their risk of introduction.”
- 3) K.A. Miller, J. Engle, S. Uwai, H. Kawai: *Biological Invasion*. 9: 609-613. (2007) “First Report of the Asian Seaweed *Sargassum filicinum* Harvey (Fucales) in California, USA.”

〈その他誌上発表（査読あり）〉

- 1) L.E. Aguilar-Rosas, R. Aguilar-Rosas, H. Kawai, S. Uwai, E. Valenzuela-Espinoza: *Algae* 22: 17-21 (2007) “New record of *Sargassum filicinum* Harvey (Fucales, Phaeophyceae) in the Pacific Coast of Mexico.”

〈その他誌上発表（査読なし）〉

- 1) 川井浩史・福代康夫 (2007) 「海洋生物の越境移動と沿岸生態系の攪乱」特集に寄せて：越境移入の動態把握をめざした研究とバラスト水管理条約、海洋と生物: 29 (3): 191-194.
- 2) 川井浩史・上井進也・羽生田岳昭・山田味佳・寫田智・中村規代典 (2007) 大型海藻類の大陸間越境移動、海洋と生物: 29 (3): 212-220.
- 3) 木村妙子・大谷道夫 (2007) 大型輸送船に付着する底生動物の実態とその起源の探索、海洋と生物: 29 (3): 221-230.

(2) 口頭発表（学会）

- Uwai, S., Kawai, H. PICES (North Pacific Marine Science Organization)13th Annual Meeting. 14-24 October 2004, Hololulu, Hawaii. “Introduced Seaweeds – genetic diversity of introduced and native *Undaria pinnatifida*–“.
- 上井進也・Nelson W.・Neil K.・Boo S. M.・王偉定・Aguilar-Rosas L. E.・北山太樹・Peters A. F.・川井浩史「ミトコンドリアハプロタイプからみた移入ワカメの起源地の推定」日本藻類学会第29回大会．京都．2005年3月27-29日．
- S. Uwai, W. Nelson, K. Neill, S.-M. Boo and H. Kawai 8th International Congress, Durban, South Africa, August, 2005. “Genetic diversity of *Undaria pinnatifida* in Asia and New Zealand deduced from mitochondrial genes –origins and succession of introduced populations”
- S. Uwai, W. Nelson, K. Neill, S.-M. Boo and H. Kawai 8th International Congress, Durban, South Africa, August, 2005. “Genetic diversity of *Undaria pinnatifida* in Asia and New Zealand deduced from mitochondrial genes –origins and succession of introduced populations”
- H. Kawai, W. Nelson, K. Neill, M. Yamada, S. Uwai. International Conference on *Innovations and Technologies in Oceanography for Sustainable Development (ITOS 2005)*, 24-27 September 2005, Malaysia. “Dynamics of introduced *Undaria* (Laminariales; Phaeophyceae) populations in New Zealand, and the potential role of intercontinental ship operations as their introduction vectors.”
- S. Uwai, W. Nelson, K. Neill, W. T. Wang, L. E. Aguilar-Rosas, S.-M. Boo, T. Kitayama, H. Kawai. 4th Asian Pacific Phycological Forum, Bangkok, Thailand, 2005. “Genetic diversity of introduced and native *Undaria pinnatifida*”
- Kawai, H., Hanyuda, T., Uwai, S. PICES (North Pacific Marine Science Orgniazation)14th Annual Meeting. 29 September- 9 October 2005, Vladivostok, Russia. “Macroalgal diversity of hull communities on trans-ocean coal carriers.”
- Tomaru, A., Fukuyo, Y., Kawachi, M., Kawai, H. PICES (North Pacific Marine Science Orgniazation) 14th Annual Meeting. 29 September- 9 October 2005, Vladivostok, Russia. “Effect of mid-ocean exchange of ballast water on bacterial community in ballast tanks.”
- Hanyuda, T., Shimada, S., Kawai, H. 7th International Conference on the Environmental Management of Enclosed Coastal Seas. University of Caen, France. 9-12 May 2006.”Genetic diversity in the green tide alga *Ulva pertusa* deduced from rDNA and chloroplast genes: Evidence of multiple trans-ocean introduction events”
- Shimada, S., Hanyuda, T., Suzuki, T. Gamagori City Office, Kawai, H. 7th International Conference on

the Environmental Management of Enclosed Coastal Seas. University of Caen, France. 9-12 May 2006.”Species diversity and seasonal changes of dominant *Ulva* species in Mikawa Bay deduced from rDNA its region sequences”.

羽生田岳昭、寫田智、新井章吾、川井浩史：日本藻類学会 30 回大会(2007)「緑藻アオサ (*Ulva pertusa*) の越境移入に関する分子系統地理学的研究」

上井進也、Marie Voisin、新井章吾、Frédérique Viard、川井浩史：日本藻類学会第31回大会．神戸(2007)「マイクロサテライトとミトコンドリアハプロタイプからみた日本沿岸のワカメ属集団の遺伝的關係について」

中村規代典・羽生田岳昭・牛原康博・川井浩史：日本藻類学会第31回大会．神戸(2007)「大阪湾におけるアオサ属藻類の遺伝的同定」

木村妙子・大谷道夫：2005年度日本ベントス学会・プランクトン学会合同大会．北海道厚岸(2005)「大陸間航路の大型船舶の船体付着動物」

木村妙子・伊勢田真嗣・大塚攻：2006年度日本プランクトン学会シンポジウム．横浜(2006)「バラストタンク内における動物プランクトンの季節および日変動」

新田裕介・浜口昌巳・木村妙子・大塚攻：2006年日本プランクトン・日本ベントス学会合同大会．広島市（2006）「コウロエンカワヒバリガイはどこから来たのか？-DNA解析による移入経路の解明-」

木村妙子・新田裕介・浜口昌巳・大塚攻・木村昭一・大谷道夫：日本貝類学会大会．豊橋市（2007）「DNA解析と船舶調査によるコウロエンカワヒバリガイの移入経路の解明」

(公開シンポジウム)

上井進也・川井浩史：公開シンポジウム「大型船舶による海洋生物の越境移動と生態系攪乱」東京大学弥生講堂．(2007)「世界各地に拡散する褐藻ワカメの起源と拡散経路の解析」

羽生田岳昭・新井章吾・Sung Min Boo・川井浩史：公開シンポジウム「大型船舶による海洋生物の越境移動と生態系攪乱」東京大学弥生講堂．(2007)「アオサ類の越境移入」

木村妙子・新田裕介・浜口昌巳・大塚攻・伊藤泰人・伊勢田真嗣・木村昭一・大谷道夫・川井浩史：公開シンポジウム「大型船舶による海洋生物の越境移動と生態系攪乱」東京大学弥生講堂．(2007)「大型運搬船により移動する底生動物ー その現状と拡散経路の解析」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

本プロジェクトとプロジェクトメンバーが所属する東京大学の主催で、公開シンポジウム「大型船舶による海洋生物の越境移動と生態系攪乱」を2007年3月4日に東京大学弥生講堂で開催し（資料—1）、約90名の参加を得、シンポジウムにおける発表内容の一部は読売新聞（2007年3月11日；資料—2）において紹介された。

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) ナショナルジオグラフィック (2005年3月号、日経ナショナルジオグラフィック社)
- 2) 朝日新聞 (2005年9月25日、資料—2)
- 3) Techno-Ocean News (2005年10月号、テクノオーシャンネットワーク)
- 4) 国立科学博物館ニュース (No437.3、科学博物館後援会)
- 5) OECC会報 (2006年49号 7. 海外環境協力センター)
- 6) 朝日新聞 (2006年8月25日、資料—2)
- 7) 朝日新聞 (2006年9月22日、資料—2)
- 8) 読売新聞 (2007年3月2日、資料—2)
- 9) 読売新聞 (2007年3月11日、資料—2)

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

国内外の学会誌に論文を発表するとともに、プロジェクトメンバーが委員を務める各省庁や地方公共団体における沿岸環境に関する委員会、国際委員会などの討議において、研究成果を活用し、また今後海洋基本法による施策の策定に活用されるよう、学会、マスコミなどを通して積極的に情報の発信に努める。