

(2) メタゲノム解析による生物多様性の把握とサンゴ礁レジリエンス過程の観察

国立研究開発法人水産総合研究センター

長井敏

国立研究開発法人水産総合研究センター

田邊晶史・本郷悠貴（平成26-27年度のみ）

平成25～27年度累計予算額：29,434千円（うち平成27年度：9,478千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

石西礁湖周辺海域における生物多様性の程度を把握するため、プランクトンメタゲノム解析を実施した。3年間に取得した合計136個のメタゲノム解析データにおいて、OTU（Operational Taxonomic Units）数と取得した次世代シーケンス（NGS）数の関係を解析したところ、右上がりの指数曲線に近似し（ $P<0.05$ ）、海水3L中に出現するプランクトンは、約20,000配列読めば、だいたい網羅的に検出（400-650 OTUs）できることが判明した。最大8回の広域多点調査によるメタゲノム解析の結果から、地点間の生物多様性を比較したところ、各地点の平均OTU数は、100.0-248.8の範囲にあり、石垣島の南部と北部で多く、逆に石垣島西部とヨナラ水道付近で少ない傾向が認められ、地点によりプランクトン出現種多様性に差があることが判明した。また、陸源負荷の影響評価のため、河川由来のケイ酸塩を利用して増殖する珪藻に着目して解析したところ、複数の調査で、石垣島の南部を中心に高頻度の分布が見られたことから、特に降雨時の陸源負荷の起源が、主に石垣島南部にあることを明らかにした。

サンゴ着底板のメタゲノム解析を行った結果、OTU数は、98-278の範囲で算出された。配列数が多かった上位10位は、3種を除いて海藻類であり、着底板には多くの海藻が付着していたことが判明した。

オニヒトデ幼生を人工的に大量作出し、これに天然のプランクトンを餌として与え、胃内容物のメタゲノム解析を行うことで、餌生物を特定できる方法を、世界で初めて開発した。約500個体について解析を行ったところ、OTU数の割合として、渦鞭毛藻36%、珪藻36%、動物プランクトン24%、繊毛虫10%、クリプト藻・ハプト藻10%、原生動物9%を検出することに成功し、オニヒトデ幼生は、微細藻類を中心にデトライタスを捕食している可能性のあることが示された。

[キーワード]

メタゲノム解析、OTUs（Operational Taxonomic Units）、類似度指数、珪藻、渦鞭毛藻

1. はじめに

最近の研究で藻類は、およそ11の植物門から構成されており、細胞の形態、葉緑体の組成と構造、鞭毛装置の構造・機能、生活環、遺伝子配列などが、分類の基準となっている。比較的大型の植物プランクトンでは、遺伝子情報は充実してきたが、採集地点等の詳細な情報が登録されておらず、10ミクロンより小型の超微細種の情報になると、何種類いるのか未だに不明である。沿岸域に普遍的に出現する珪藻で20,000種、渦鞭毛藻で2,000種、ハプト藻で2,000種、クリプト

藻・ユーグレナ藻で共に 800 種、藍藻で 2,000 種程度は存在すると見積もられている。特に小型の海産珪藻、ハプト藻、クリプト藻、ユーグレナ藻では未記載種が多く、その遺伝子情報の蓄積は極めて乏しい状況にあると言える。動物プランクトン・無脊椎動物群は植物プランクトン同様、極めて多様な動物群を含み、分布域、生活史などの生態も多様性に富んでおり、原生動物を除いた種で 7,000 種、このうちカイアシ類で 2,000 種類、原生動物 2,700 種存在すると言われている(日本産生物種数調査)。実際には、その数倍の種数の存在が推定されている。動物プランクトンに特化したデータベースとして **Census of Marine Zooplankton (CMrarZ <http://www.cmarz.org/>)** が知られており、形態と遺伝情報の総合化を目指した取り組みが行われている。

各都道府県市の海洋研究機関が1970年代前半から、環境モニタリングを実施しており、動植物プランクトンのデータは蓄積されてきたが、優占種の情報がほとんどであり、レア種や微細な植物プランクトンの情報はほとんどない。次世代型と呼ばれるシーケンサーは、従来型シーケンサーの千倍～数万倍の性能を発揮する。シーケンス革命の到来により、メタゲノムから“ペタゲノム”という言葉が使われる時代になり、従来の形態情報を重視していたモニタリングのスタイルに加え、大量に得られるゲノム情報をフル活用した革新的なスタイルも導入していく必要がある。当研究グループでは、既に、高精度でメタゲノム解析をすることができるプログラムを完成させ、それを用いてメタゲノム解析を実施しており、多数の原著論文として発信されつつある^{1), 2), 3), 4)}。試みに、2009年に広島湾および沖縄県石垣島の2ヶ所からそれぞれ5回ずつ海水をサンプリングし、次世代シーケンサーを用いて、動植物プランクトンの出現種について遺伝子解析(5万リード、500bpのPCR産物)したところ、各海域から、広島湾、石垣島サンプルから、それぞれ645個、791個のOTUが検出され、99個が両海域から検出され546個が広島湾のみで、692個が石垣島のみで検出された。両海域では出現種が相当異なることが既に明らかにされている。加えて、広島湾サンプルではプランクトン群集の明瞭な季節的出現特性が検出されたが、石垣島ではそれが見られない。以上のように、従来の研究手法だと、1個の海水サンプルからは、20、30種しか出現種を記載できなかったことに対して、メタゲノム解析を行うと、数百種のレベルで出現種の把握と時系列的なモニタリングが可能である¹⁾。

石西礁湖周辺海域において、環境生物モニタリングは実施されてはいるが、メタゲノム解析による微細藻類の網羅解析とモニタリングは実施されていない。農業、牧畜、観光など、周辺海域の富栄養化が進行する要素が多くなっている現状において、周辺海域の富栄養化の把握や陸源負荷起源の特定、オニヒトデの大量発生における「栄養塩仮説」の検証などを行うために、植物プランクトン出現種の組成や生物多様性の程度、他海域との差異、周辺海域内における地点間の差異に関する情報を、メタゲノム解析によるモニタリングで蓄積することは緊急を要する重要な研究課題である。

2. 研究開発目的

石西礁湖内外における島嶼からの陸源負荷が生物多様性・分布密度・種組成に及ぼす影響をメタゲノム解析により明らかにする。次いで、サンゴの深刻な食害種であるオニヒトデ幼生の胃内容物をメタゲノム解析の手法で検出し、餌生物特定を行う。また、サンゴの着底板を設置し、サンゴ幼生の着底後の初期減耗に影響する要因を明らかにする。さらに、環境ストレスがもたらす生体影響を総合的に評価する的一環として、高水温における生体応答に着目し、石西礁湖に同

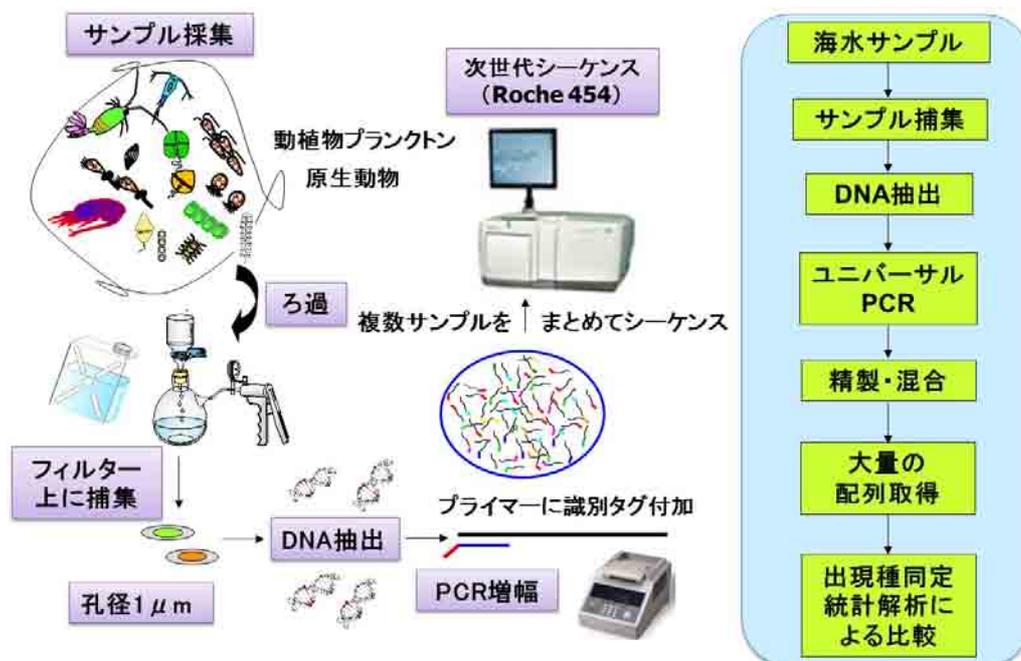
所的に存在するサンゴの遺伝子発現解析を行い、現場海水温の季節的上昇に伴う発現遺伝子を比較し、高水温時に応答して発現する遺伝子の同定を目的とする。

3. 研究開発方法

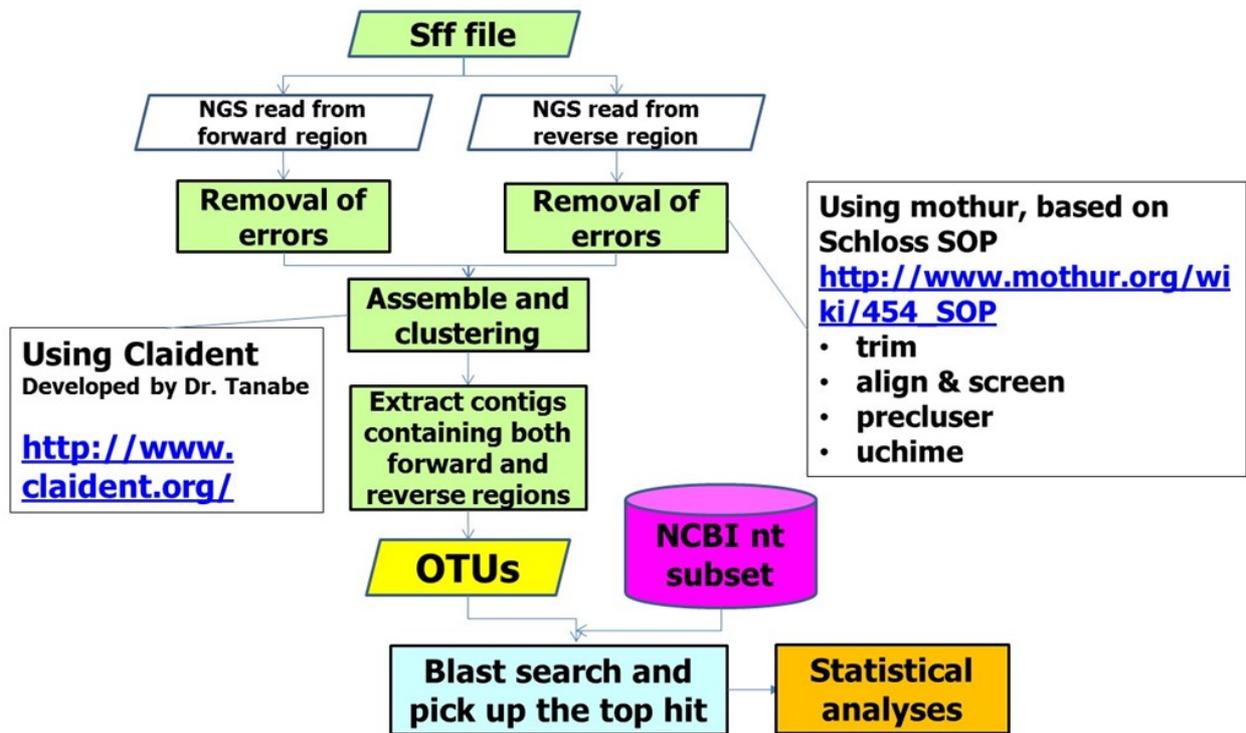
(1) 石西礁湖内外における島嶼からの陸源負荷が生物多様性に及ぼす影響評価のためのメタゲノム解析

1) 石西礁湖4定点における周年調査(月1回):

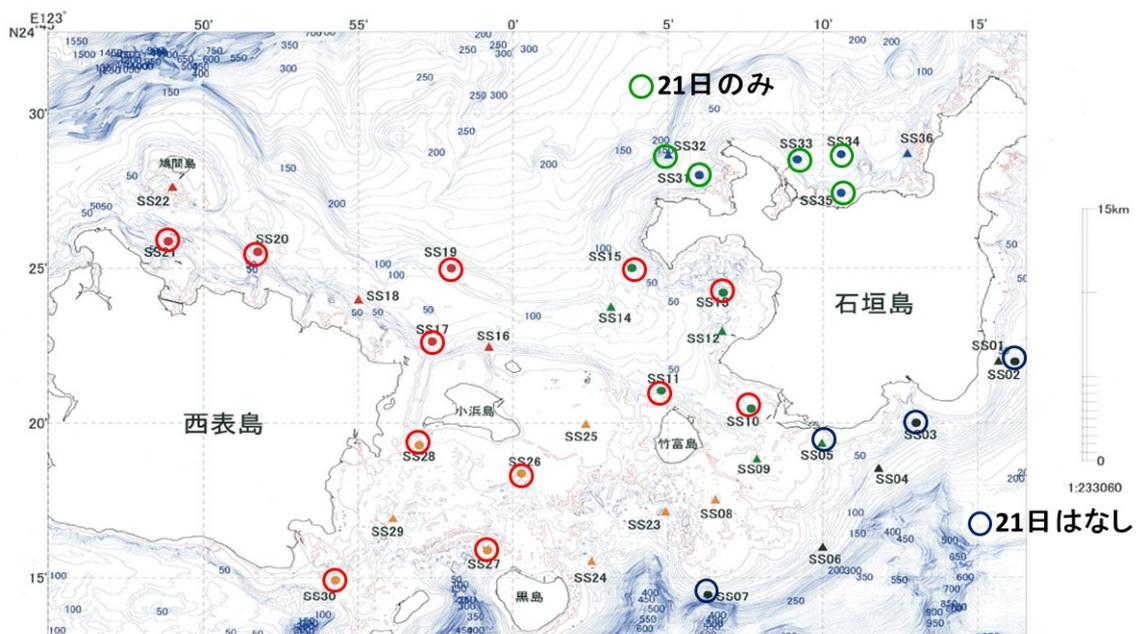
石西礁湖周辺海域に出現するプランクトンの基本的な生物多様性・出現種やその季節性の把握のため、石西礁湖の4地点(図は省略)において、環境調査を実施、5 mのホースを鉛直に降ろして鉛直採水し、海水1~3L中に出現したプランクトンのメタゲノム解析を実施した。方法は、長井ほか^{1),5)}に従い、次世代シーケンス(NGS)データを取得し、種同定を行う。サンプリングは、サブテマ4により実施した。メタゲノム解析の概略としては、海水中に含まれる動植物プランクトンをろ過法によりフィルター(1 μ mのヌクレポアフィルター)上に捕集し、ろ紙をアルミホイルに包んだ後、凍結保存した。DNA抽出については、ろ紙の半分を切断、それを1.5mLのプラスチックチューブに入れ、5% Chelexバッファー150 μ Lを添加した。DNA抽出効率を上げるため、ハンディ式ホモジナイザーを用いてろ紙ごと、30-60秒間、ホモジナイズを行った。これに、5% Chelexバッファー350 μ Lを追加し、97 $^{\circ}$ Cで20分間加熱後、ろ紙を除去し、DNA抽出を完了した。Roche454 FLX Titanium systemを用いて、メタゲノム解析のためのNGSを取得するため、ユニバーサルプライマー18S-rDNAを用いてPCR増幅を行った。サンプル毎に異なるタグ付けしたプライマーでPCR増幅を行うので、PCR増幅産物を精製後、PCR産物のDNA濃度を測定し、等量になるよう混合した。その後、NGSを行うためのライブラリー調整を行い、NGSを得た(図(2)-1)。



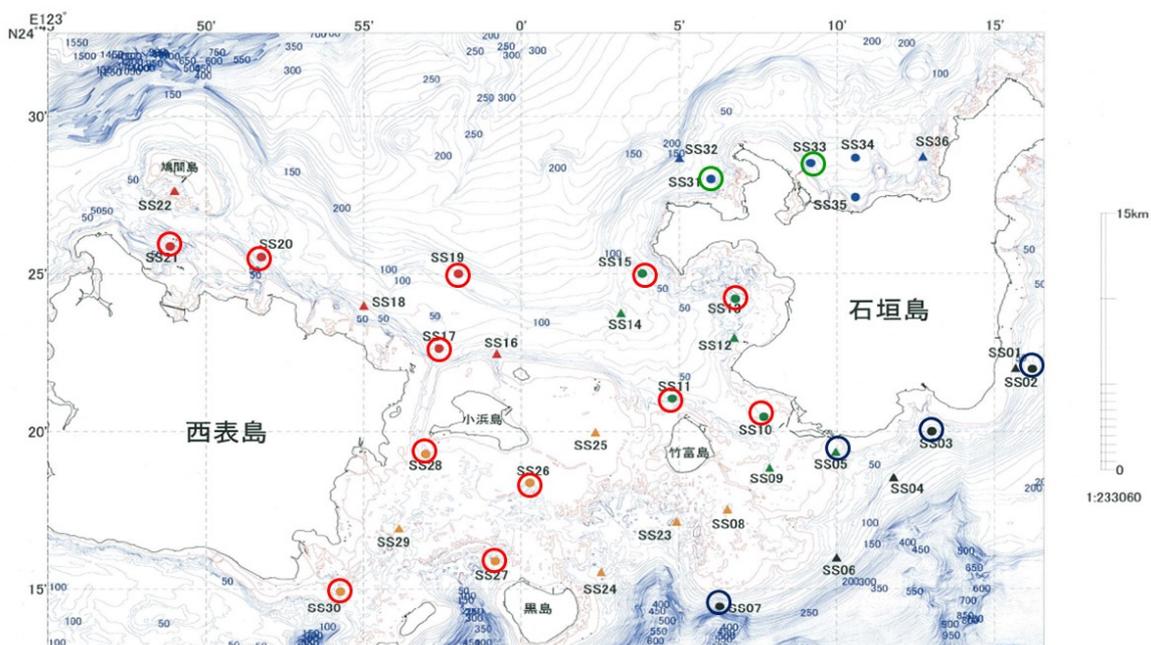
図(2)-1 メタゲノム解析フロー図



図(2)-2 次世代シーケンスデータの解析プラットフォームの概略図



図(2)-3 広域多点調査地点図 (メタゲノム解析用海水サンプル最終地点+オニヒトデ幼生採集地点)。6月17、18、21日に調査を実施



図(2)-4 広域多点調査地点図（メタゲノム解析用海水サンプル採集地点）．8月27日、9月5日に調査を実施

次世代型シーケンサーは、一度に大量の配列を取得することが可能だが、同時に大量のエラー配列も発生する。このため、バイオインフォマティクス技術を駆使したエラー除去や種同定の技術が必要となるが、使用するプログラムも研究者により統一が取れていない状況にある^{1), 3), 4), 5)}。このため、シーケンスエラー除去、キメラ配列除去を行うプログラムを完成させ、本解析にはそのプログラムを用いた（図(2)-2）。

2) 石西礁湖周辺海域における広域多点調査

陸源負荷によるプランクトン多様性の影響評価、あるいは陸源負荷の起源を明らかにするため、広域多点調査（基本的に、毎年6、8月に実施、16地点）を行い、海水中に出現するプランクトンのメタゲノム解析を実施した。2013年は6月17、18、21日（台風の通過後）の3回（16地点、図(2)-3）と8月27日、9月5日（台風の通過後）の2回調査（18地点、図(2)-4）を実施した。2014年は6月7、13日の2回のサンプリング調査を実施した。2015年は、6月25日に19地点で広域多点調査（1回）、6月22、23日に2地点において24時間連続調査した。いずれも、5 mのホースを用いて鉛直採水し、海水3 L中に出現するプランクトンのメタゲノム解析を実施した。海水サンプリングは他のサブテーマと連携して実施した。

3) オニヒトデ幼生の胃内容物調査

昨年度までの研究において、オニヒトデの大量発生機構解明のため、幼生の分布調査と餌生物の特定を目的としたネットサンプリングによる調査を実施し、オニヒトデ幼生をマイクロピペットで分取し、DNA抽出、種判別プライマーで種同定後、オニヒトデ幼生と判定されたDNAサンプルについて、さらに微細藻類検出用の葉緑体ユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅を試みるという研究計画を検討してきたが、予想以上に、天然のネットサンプルのエタノール固定標本からオニヒトデ幼生を見出すのは困難であった。また、仮にオニヒトデ幼生であると同定できても、

身体の回りに複数の植物プランクトンが絡みついていたたり、突き刺さっていたりするので、餌生物の特定をするのは、困難であると判断した。このため、本年度は、親個体から採卵誘発して、幼生を人為的に大量に作出し、ネットで濃縮した天然プランクトンを餌として与え、胃内容物をメタゲノム解析により同定する手法の確立を試みた。



図(2)-5 オニヒトデ幼生飼育実験に用いた精巢、卵巣および受精卵の写真
左上、卵巣；左下、精巢；右、受精卵をそれぞれ示す。

石西礁湖から採集してきた複数の成熟オス個体およびメス個体を水槽に飼育しておき、まずはメス3個体から卵巣を取り出し、10-25房/L海水として、これに 10^{-5} Mの濃度となるよう1-methyladenineを添加し、1時間後に、浮遊した成熟卵を回収した^{6),7)}。400卵/mLの密度で1Lの海水に懸濁させ、これに成熟した精巢液を10 μ L添加し、20-60分間放置した(図(2)-5)。その後、受精卵を数回、清浄海水で洗浄し、400卵/mLの密度となるように清浄海水で希釈し、1L容の容器、複数個に懸濁して、温度29°Cに設定した水槽に浮かべて飼育を開始した。飼育海水は、24時間毎に交換した。これまでの報告で、オニヒトデ幼生は、自分の胃の口径より小さい微細藻類を捕食することが知られおり⁶⁾、飼育3日に緑藻*Donariella* sp.および珪藻*Chaetoceros calcitrans*を5,000 cells/mLの初期密度で添加して、幼生がこれらの微細藻類を捕食するかどうか、24時間後に蛍光顕微鏡下で観察を行った。また、飼育5日後、サブテーマ(4)のリーダーである鈴木豪研究員の所属する西海区水産研究所亜熱帯研究センターの地先の天然海域で、プランクトンネットにより採集したプランクトンを餌として与え、24時間後、蛍光顕微鏡観察を行った。胃の内部に赤い自家蛍光を発する微細藻類の存在を確認したので、幼生を篩で濃縮洗浄し、約1,000個体を99.5%エタノール保存した。次に、幼生の胃内容物のメタゲノム解析を行うため、メタゲノムこれを25個体ずつ、洗浄しながらマイクロピペットで集め、DNA抽出を行った。DNA抽出後、ユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅を行い、増幅産物が認められたので、メタゲノム解析を行った。

(2) サンゴ礁レジリエンス過程の観察のためのサンゴ着底板のメタゲノム解析: サンゴの白化後のレジ

リエンス過程を観察するため、サンゴ幼生の着底後の成長、初期減耗に影響する要因解明を目的としたサンゴ着底板に付着する生物のメタゲノム解析を実施すべく、2013年度に4回（6、7、10、11月）、複数の地点に設置した着底板を約10枚ずつ回収し（合計29サンプル、表(2)-1）、着底板に付着した生物を金属のスクレーパーを用いてそぎ落とし、50 mLの遠沈管に入れ、凍結保存した。

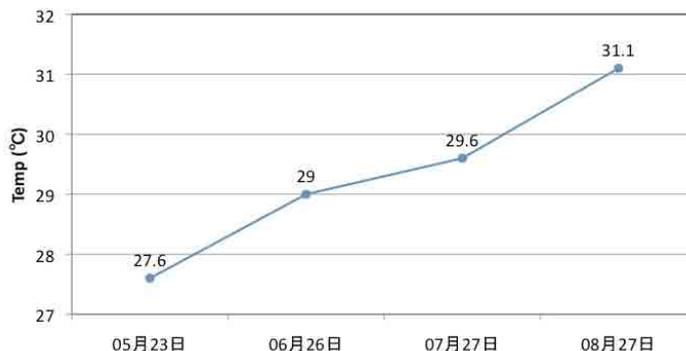
表(2)-1 サンゴ着底板の設置および回収情報

| 番号 | 基盤設置日 | 基盤回収日 | 場所詳細 | サンゴ情報 |
|----|-------|-------|-------------------------|---|
| 1 | 3月15日 | 6月3日 | 石垣島浦底湾・魚礁・水深2m | 3年前まで枝状のミドリイシ属サンゴの優占地帯であったが、2年前にオニヒトデによってほぼ全滅。 |
| 2 | 3月15日 | 6月5日 | 嘉弥間島北・水深3m | 石西礁湖の北側、いわゆる「北礁」。サンゴは、様々な種類が高被度に分布。この水深はミドリイシが一番多い。 |
| 3 | 3月15日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深6m | この水深では、ミドリイシと他のサンゴが半々くらい。 |
| 4 | 3月15日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深10m | この水深では、ミドリイシ以外のサンゴが多くなる。 |
| 5 | 3月15日 | 〃 | サクラグチ(石垣港南側)・水深3m | 港からの航路出口に近い。1998年の白化以降は、ソフトコーラルが優占して、造礁サンゴの回復はまばら。 |
| 6 | 3月15日 | 〃 | サクラグチ(石垣港南側)・水深7~8m | この水深(6~15m)は、特にソフトコーラルが多い。 |
| 7 | 4月15日 | 7月8日 | 小浜東の礁湖内東寄り(D1)・水深3m | 生サンゴほとんどなし。太枝の死サンゴ原型留める。 |
| 8 | 4月15日 | 〃 | 小浜東の礁湖内中央(D2)・水深4m | 生サンゴほとんどなし。砂地にハマサンゴの根が点在 |
| 9 | 4月15日 | 〃 | 嘉弥間島南西側(D3)・水深3m | 水路わきのパッチリーフ。この2、3年でミドリイシが増えてきた。 |
| 10 | 4月15日 | 〃 | 小浜東の礁湖内西寄り(D4)・水深2~3m | 生サンゴほとんどなし。枝は原型留めず散乱。基質は海藻に覆われている。 |
| 11 | 4月15日 | 〃 | 小浜東の礁湖南端(内側)・H2)・水深3m | 生サンゴほとんどなし。太枝の死サンゴ原型留める。 |
| 12 | 4月15日 | 〃 | 小浜東の礁湖南東端(H1)・水深6m | 枝状ミドリイシがまばらに分布。 |
| 13 | 4月15日 | 〃 | 小浜東の礁湖南端(外側)・H3)・水深4.5m | 生サンゴわずかに残る。太枝の死サンゴ原型留める。スズメダイモドキの縄張りあり |
| 14 | 4月15日 | 〃 | 黒島北側のパッチリーフ(H4)・水深7m | 枝状ミドリイシが高被度に分布。 |
| 15 | 6月5日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深3m | 上記のKN3と同じ場所。 |
| 16 | 6月5日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深6m | 上記のKN6と同じ場所。 |
| 17 | 6月5日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深10m | 上記のKN10と同じ場所。 |
| 18 | 6月5日 | 〃 | サクラグチ(石垣港南側)・水深3m | 上記のSA3と同じ場所 |
| 19 | 6月5日 | 〃 | サクラグチ(石垣港南側)・水深7~8m | 上記のSA6と同じ場所 |
| 20 | 7月10日 | 10月9日 | 石垣島浦底湾アウトリーフ・水深2m | 3年前までサンゴ高被度。2年前のオニヒトデで全滅。かつてはテーブル状ミドリイシが優占。 |
| 21 | 7月10日 | 〃 | 石垣島浦底湾アウトリーフ・水深5m | かつては枝状ミドリイシが優占。 |
| 22 | 7月10日 | 〃 | 石垣島浦底湾アウトリーフ・水深10m | かつては枝状ミドリイシとその他のサンゴが半々。 |
| 23 | 7月8日 | 11月6日 | 小浜東の礁湖内東寄り(D1)・水深3m | 上記の石西Aと同じ場所。 |
| 24 | 7月8日 | 〃 | 小浜東の礁湖内西寄り(D4)・水深2~3m | 上記の石西Dと同じ場所。 |
| 25 | 7月8日 | 〃 | 黒島北側のパッチリーフ(H4)・水深7m | 上記の石西Hと同じ場所。 |
| 26 | 7月8日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深3m | 上記のKN3と同じ場所。 |
| 27 | 7月8日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深6m | 上記のKN6と同じ場所。 |
| 28 | 7月8日 | 〃 | 嘉弥間島北・水深10m | 上記のKN10と同じ場所。 |
| 29 | 7月8日 | 〃 | サクラグチ(石垣港南側)・水深3m | 上記のSA3と同じ場所 |
| 30 | 7月8日 | 〃 | サクラグチ(石垣港南側)・水深7~8m | 上記のSA6と同じ場所 |

(3)石西礁湖に同所的に存在するサンゴの遺伝子発現解析:六放サンゴ亜種のクシハダミドリイシと八放サンゴ亜種のアオサンゴの遺伝子発現解析を行った。クシハダミドリイシは熱に弱い種、アオサンゴは熱に強い種として既に報告がある事から、これらの種を対象にし、現場海水温の季節の上昇に伴う発現遺伝子を比較し、高水温時に応答して発現する遺伝子の同定を試みた。

石西礁湖内に2つの定点(24.258E,124.129N; 24.258E,124.130N)を設け、現場に水温計を設置した。5月~9月までの5ヶ月間のうち計8回、クシハダミドリイシとアオサンゴのサンプリングを実施し、各個体の遺伝子発現の解析を行った。5月~9月までの5ヶ月間のうち計8回、クシハダミドリイシとアオサンゴのサンプリングを実施し、最終サンプリング時に、水温計の回収を行った。水温計のデータを解析し(図(2)-6)、サンプリング間で温度変化のある時点4点を選択して、サンゴ個体よりtotal RNAを抽出した。サンプルは、5月と8月に採取されたクシハダミドリイシ(*Acropora hyacinthus*; Ahy)とアオサンゴ(*Helipora coerulea*; Hco)を使用した。サンゴ個体よりtotal RNAを抽出した。BioanalyzerによるRNAのクオリティーを確認後、Illumina TruSeq RNA sample prep kitにて計12のcDNAライブラリーを作成した(2時点×2種×3個体)。作成したcDNA LibraryはIllumina社のNextSeq500を用いて、150bpのペアエンドシーケンスを行った。得られた全リードからアダプターと低クオリティーの除去を行い、Trinity *de novo* assembler⁸⁾によって種ごとにアセンブルした。各種のコンティグには、サンゴと共生藻の両者が混在している状態であるため、両者を分ける必要がある。沖縄科学技術大学院大学が解読した六放サンゴ亜綱のコユビミドリイシ(*Acropora digitifera*)、イソギンチャク(*Nematostella vectensis*)、褐虫藻(*Symbiodinium minutum*)のゲノム情報^{9), 10), 11)}と、公共データベースに既存の褐虫藻(クレードA, C1, C15, D1a)の発現遺伝子情報¹²⁾と

Blastを利用して、AhyとHco内の宿主・共生藻の遺伝子を同定し、さらに、同定できた宿主と共生藻のコンティグGC含有量(GC%)を調べた。次に、現場海水温の季節的上昇に伴う発現変動遺伝子を同定するため、アセンブルされたコンティグとリードを用いて、発現変動解析を行った。さらに、この解析結果から、上昇減少する遺伝子がどのような遺伝子種であるかを明らかにするため、Gene ontology (GO)を用いたenrichment解析を行った。



図(2)-6 クシハダミドリイシとアオサンゴの採集地点 4ヶ月間における水温変化

4. 結果及び考察

(1) 石西礁湖内外における島嶼からの陸源負荷が生物多様性に及ぼす影響評価のためのメタゲノム解析

1) 石西礁湖4定点における周年調査(月1回)

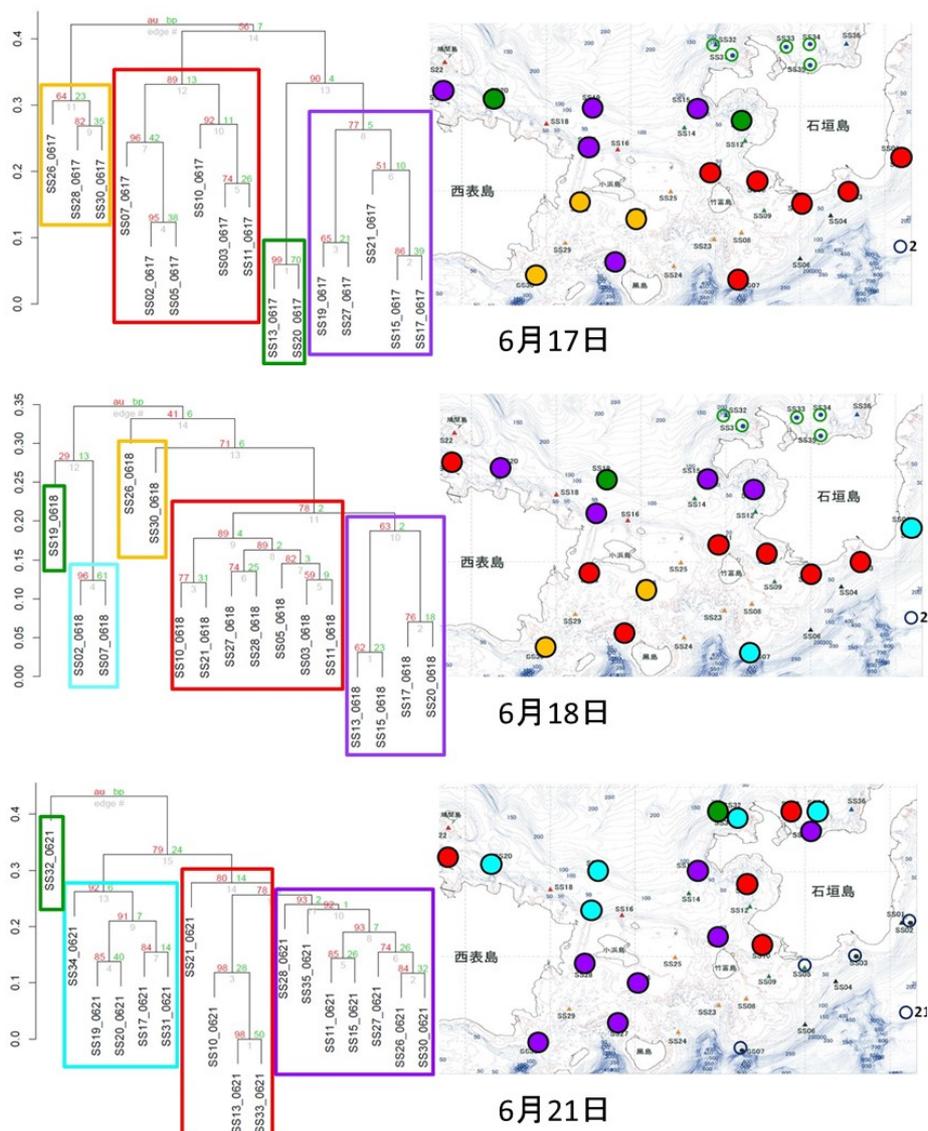
基本的に月1回の定期的なモニタリング調査を実施し、2014年6月から2016年1月下旬まで海水サンプリングを行い、メタゲノム解析のサンプルを採集した。これら全てのサンプルからDNA抽出を行い、冷凍庫に保存した。現在、メタゲノム解析を実施中であり、本報告書に結果を加えることができなかった。

2) 石西礁湖周辺海域における広域多点調査

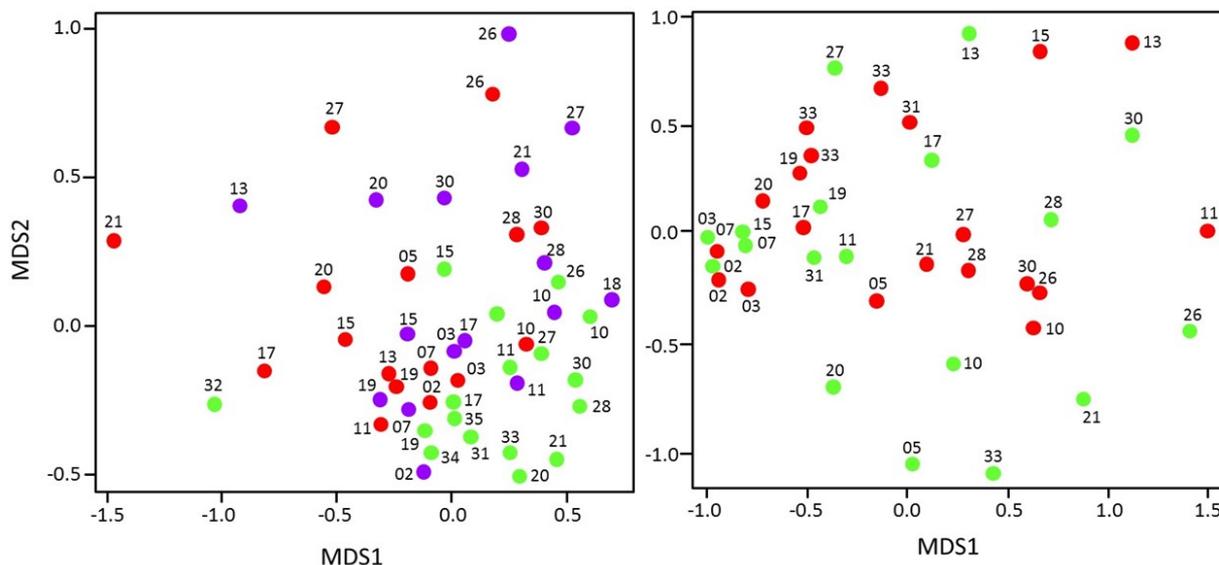
2013年の広域多点調査の結果において、生のOTU (Operational Taxonomic Units) 数は、6月の調査で、131-677の範囲、8、9月の調査では177-881の範囲にあった。1サンプルあたりの取得配列数の多少によるOTU数への影響を補正するため、全サンプルの中で最小の取得配列数に合わせてOTU数を再計算したところ、OTU数は、6月の調査で、72-226の範囲、8、9月の調査では71-407の範囲に算出された。5回の広域多点調査から、地点毎のOTU数を比較すると、St.02、07、31で多く、逆にSt.32、13、10、5、26で少ない傾向が認められ、一元配置分散分析の結果でも有意な差が見られたことから ($F(17, 64)=2.25, p<0.05$)、地点によりプランクトン出現種多様性に差があることが判明した。特にSt.02で多く、St.13やSt.32で少ない結果となった。類似度指数から見た生物多様性の地点間の差異については、狭い海域ながら、栄養塩分布や海流、地形構造等の要因により、プランクトンの多様性に差異が生じていた (図(2)-7)。平穏時における地点間のプランクトン生物多様性と台風通過後のパターンとはそれなりに類似しており、石西礁湖の北部と南部で生物多様性(種組成)が異なることを示唆する結果が得られた。一方、NMDSプロット解析の結果を見ると、6月17、18日の両日のサンプルは、広範囲かつ混在してプロットされる傾向にあった。一方、台風通過後の21日のサンプルは、図右下に比較的集中的にプロットされ、台風通過による海水の擾乱により出現プランクトンの組成が変化かつ均一になったことを示唆する結果を得た。

(図(2)-8、左図)。8月27日、9月5日のNMDSプロットの結果は、一見、台風通過の影響はないように見えるが、台風通過前後でプロットの位置が大きく異なっている点と異なっていない点があることから、台風による擾乱の影響は少なからずあったことが示唆された(図(2)-8、右図)。

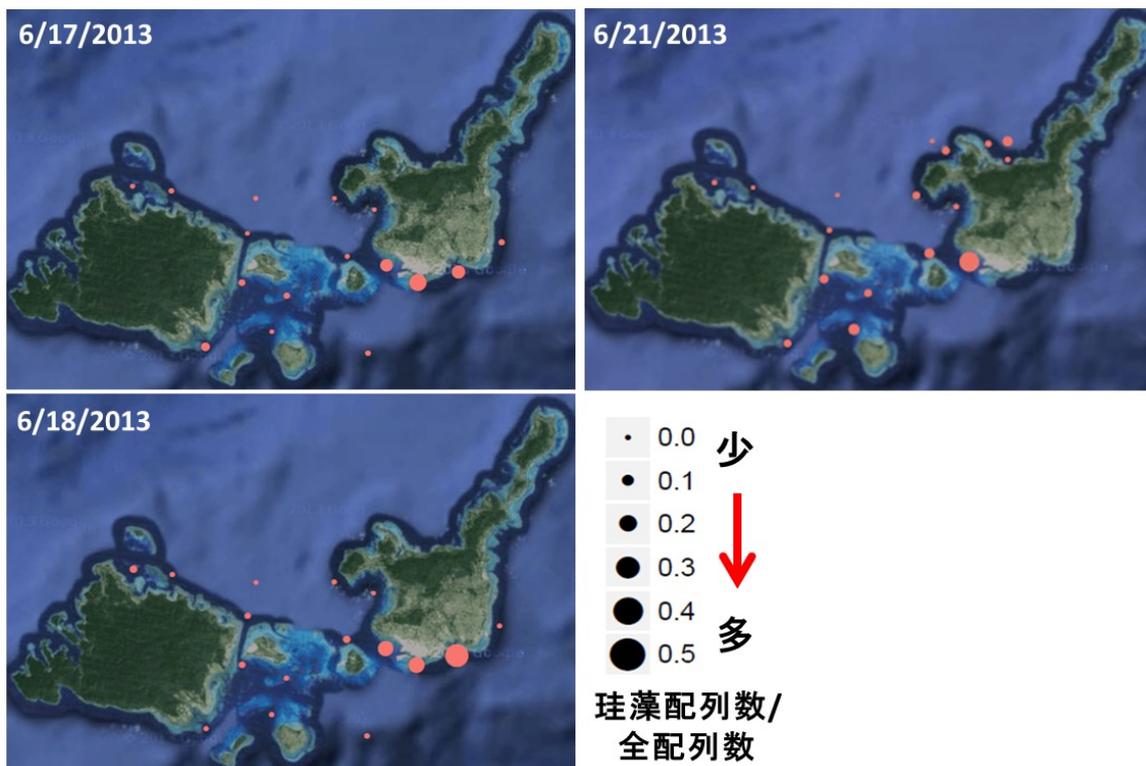
河川水由来のケイ酸塩を利用して増殖する珪藻は、陸源負荷の起源を推定するのに、最も良い生物群であるため、各サンプルにおける単位配列数あたりの珪藻の配列数を調べると、6月17、18、21日では、いずれも石垣島南部海域の地点で多く(図(2)-9)、8月27日も石垣島南部で多く、9月5日では石垣島北部海域で多く(図(2)-10)、以上の結果から、陸源負荷の起源が石垣島周辺、とりわけ南部海域にあることが強く示唆された。石垣島南部に位置する石垣市は、近年の観光地化等により、おそらく高濃度の窒素、リンを含む生活排水や工業用排水が河川水に入り、それが南部沿岸域に流入し、石西礁湖周辺海域の富栄養化に寄与している可能性の高いことが示された。



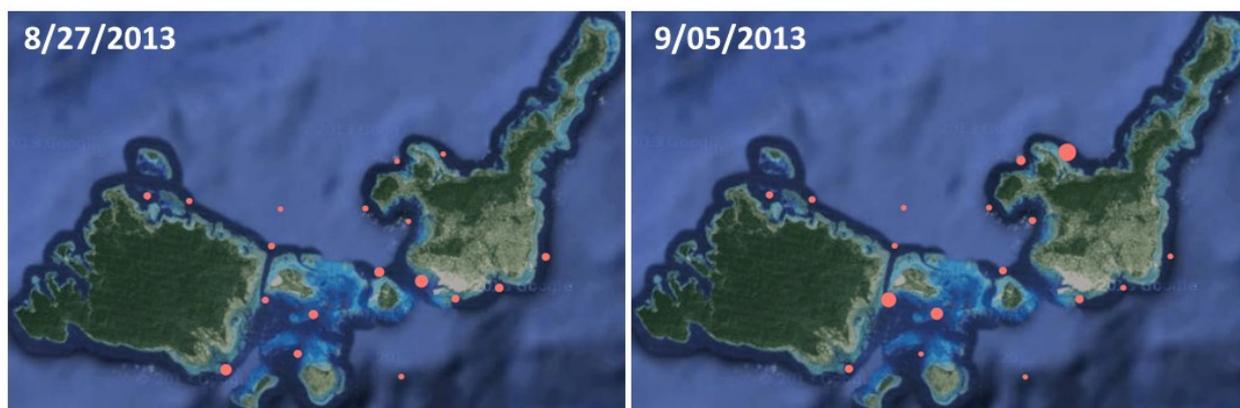
図(2)-7 2013年における広域多点調査のうちメタゲノム解析による類似度指数を用いた解析結果各調査日におけるクラスタリングデンドログラム(左図)と各クラスタリンググループごとの水平的な分布(右図)を示す。



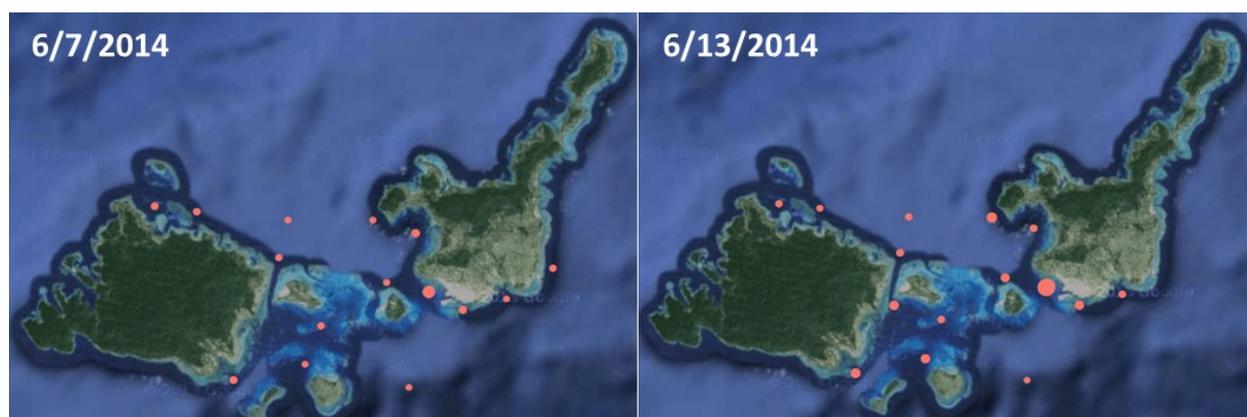
図(2)-8 NMDSプロット解析の結果. 左図は6月の調査結果を示し、右図は8、9月の調査結果を示す. 6月17日, 赤色の丸; 18日, 紫色の丸; 21日, うす緑色の丸. 8月27日, 赤色の丸; 9月5日, うす緑色の丸.



図(2)-9 2013年6月、石西礁湖周辺海域の広域多点調査における珪藻の分布量. 6月調査時においてメタゲノム解析より得られたNGSデータのうち、珪藻配列数/総配列数の大小を5段階に分けて、地図上にプロットした. 石垣島南部海域で珪藻の出現量が多いことを示しており、陸源負荷の起源が石垣島南部にあることを示す.



図(2)-10 2013年8月、石西礁湖周辺海域の広域多点調査における珪藻の分布量。8月下旬および9月上旬の調査時においてメタゲノム解析より得られたNGSデータのうち、珪藻配列数/総配列数の大きさを5段階に分けて、地図上にプロットした。8月の調査時も6月と同様に石垣島南部海域で珪藻の出現量が多く、9月は石垣島北部で高い値を示しており、陸源負荷の起源が石垣島周辺にあることを示す。



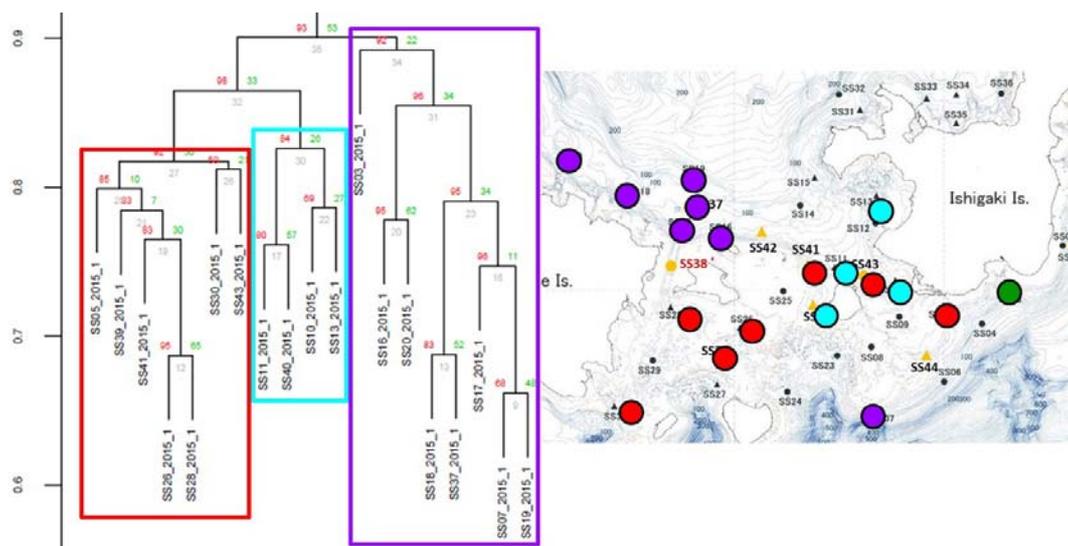
図(2)-11 2014年6月、石西礁湖周辺海域の広域多点調査における珪の分布量。6月調査時においてメタゲノム解析より得られたNGSデータのうち、珪藻配列数/総配列数の大きさを5段階に分けて、地図上にプロットした。石垣島南部海域で珪藻の出現量が多いことを示しており、陸源負荷の起源が石垣島南部にあることを示唆する。

2014年は、6月7、13日の2回の広域多点調査を実施し、プランクトンのメタゲノム解析を行った。生のOTU数は、6月の調査で、190–697の範囲にあった。1サンプルあたりの取得配列数の多少によるOTU数への影響を補正するため、全サンプルの中で最小の取得配列数に合わせてOTU数を再計算したところ、OTU数は、6月の調査で、118–293の範囲に算出された。検出された生物群を見ると、渦鞭毛藻、動物プランクトン（カイアシ類）、珪藻、原生動物の配列数およびOTUで70–80%を占めていた。河川水由来のケイ酸塩を利用して増殖する珪藻は、陸源負荷の起源を推定するのに、最も良い生物群であるため、各サンプルにおける単位配列数あたりの珪藻の配列数を調べると、6月7、13日では、いずれも石垣島南部海域の地点で多く（図(2)-11）、昨年度の同時期の

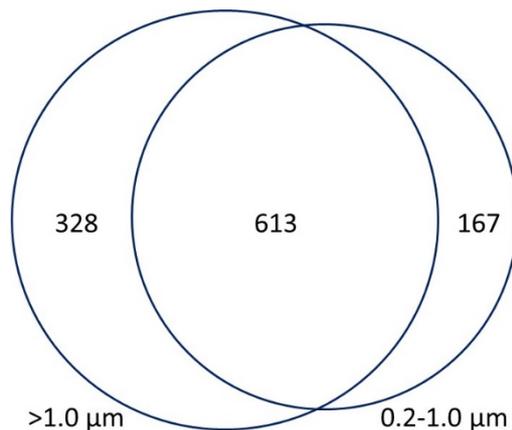
調査とほぼ同様な結果が得られた。以上の結果から、陸源負荷の起源が石垣島周辺、とりわけ南部海域にあることが強く示唆された。

2015年の広域多点調査は19地点において、6月25日に1回のみ実施した。プランクトンメタゲノム解析結果において、OTU数は70–422 (260.5 ± 81.6 , 平均 \pm 標準偏差) の範囲にあった。昨年や一昨年と同様、石垣島南部、石西礁湖内側、西表島～ヨナラ水道付近と水平的に幾つかのグループに区分することができた。狭い海域ながら、栄養塩分布や海流、地形構造等の要因により、プランクトンの多様性に差異が生じていることが示唆された (図(2)-12)。今回のメタゲノム解析による生物調査では、 $>1\mu\text{m}$ と $0.2-1\mu\text{m}$ の各サイズ画分で検出された生物多様性を比較してみたところ、 $>1\mu\text{m}$ のサイズ画分から、941 OTUが検出され、 $0.2-1\mu\text{m}$ の画分から、780 OTUが検出され、613個のOTUは、共通して検出された (図(2)-13)。 $0.2-1\mu\text{m}$ 画分だけから検出された167 OTUsについてピコプランクトンを解析したところ、そのほとんどはいわゆる環境DNAで、渦鞭毛藻等が死滅した細胞からDNA断片が捕集されたものであり、それ以外では、小型のハプト藻・クリプト藻が3種程度、検出された。以上から、少なくとも今回の調査においては、 $0.2-1.0\mu\text{m}$ サイズのメタゲノム解析の結果は、さほど重要な情報を含んでいないと考えられた。

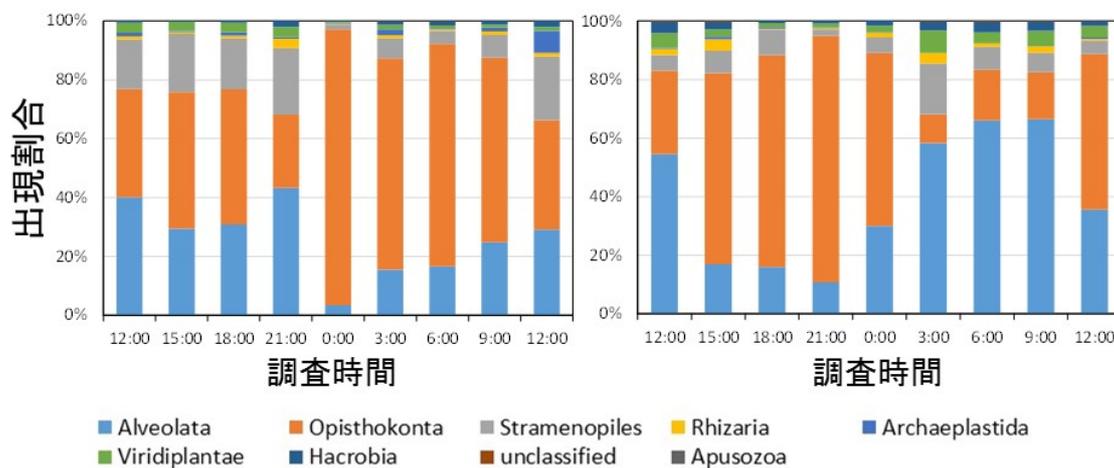
2015年、6月に石西礁湖内の2地点において、3時間毎に連続調査を実施した。OTU数は、183–355 (278.1 ± 50.2 , 平均 \pm 標準偏差) の範囲にあった。2地点各9サンプルにおけるスーパーグループの配列数から見た出現頻度を見ると、渦鞭毛藻に代表されるAlveolataと動物プランクトンが属するOpisthokonta、および珪藻に代表されるStramenopilesで90%以上占められた。時間経過とともに、動物プランクトンの割合が最多である時間帯と、渦鞭毛藻が最多の時間帯が認められた。地点間で大きく異なるパターンを示し、一定していなかった (図(2)-14)。この原因としては、大きな潮汐による攪拌が考えられた。また、通常、渦鞭毛藻は日周鉛直移動を示し、午前6時から午後3時頃までは、光合成のため表層付近に集積する傾向にあり、両地点において、夜中に底層付近まで沈降し、表層 (0-5 m) に渦鞭毛藻が少なくなる現象は観察することができた。



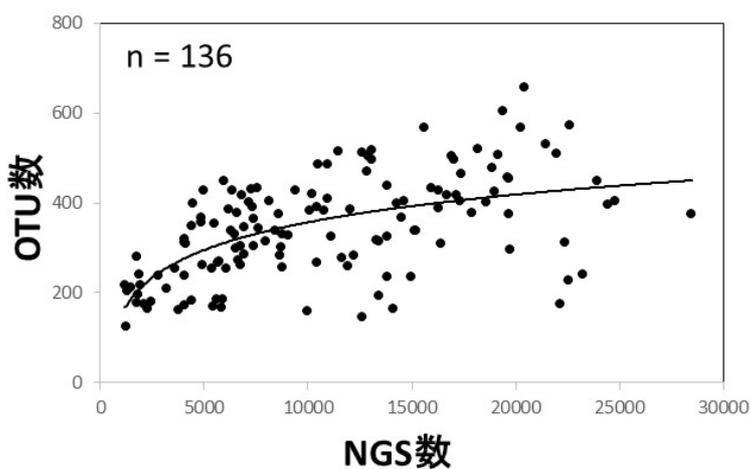
図(2)-12 2015年における広域多点調査のうちメタゲノム解析による類似度指数を用いた解析結果クラスタリング dendrogram (左図) と各クラスタリンググループ毎の水平的な分布 (右図) を示す。



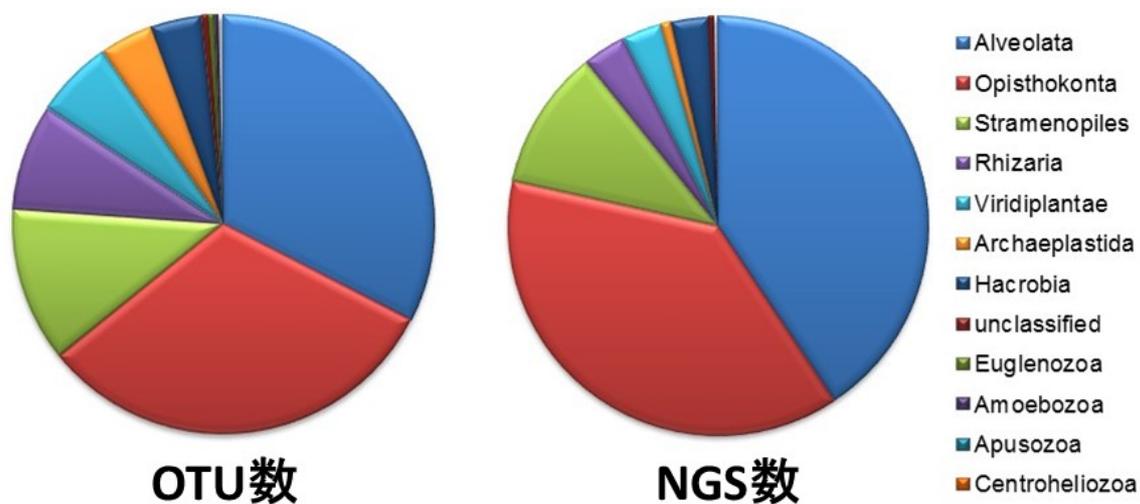
図(2)-13 広域多点調査のうちプランクトンメタゲノム解析結果を示す。>1.0 μm と0.2-1.0 μm のサイズ画分から検出されたOTUの類似性を示す。



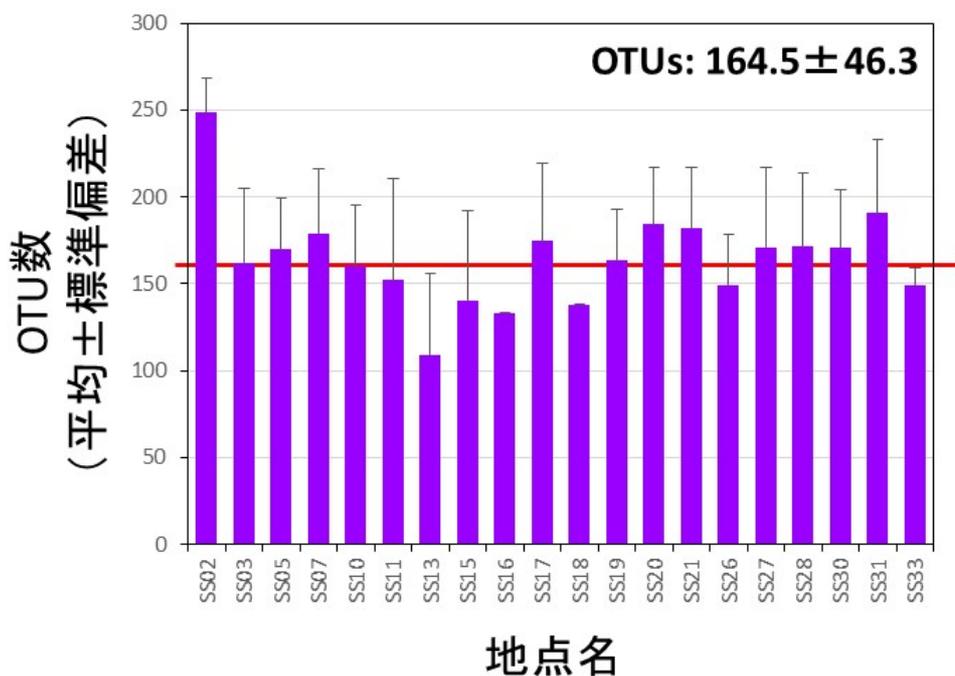
図(2)-14 24時間連続調査のうちメタゲノム解析の結果（左図：SS11，右図：SS17）。



図(2)-15 3年間に取得した海水3Lに出現した生物のメタゲノム解析データにおける各サンプルあたりのNGS取得配列数とOTU数のXYプロット。



図(2)-16 3年間に取得した海水3Lに出現した生物のメタゲノム解析データにおけるスーパーグループレベルの出現割合 (n = 136). 左図, OTU数で比較; 右図, NGS数で比較.



図(2)-17 各サンプルあたりの平均OTU数 (n = 136). 図(2)-15に示した通り、OTU数は取得したNGS配列数によって影響を受けるため、最少のNGS配列数に合わせて、NGS配列をランダムに抽出することで補正し、OTU数を計算. 図中の赤線は、全地点の平均OTU数を示し、図右上の数字は、平均±標準偏差を示す.

OTU数は通常、取得した配列数に依存するので、各サンプルにおける生OTU数と取得NGS数(エラー除去後)の関係について、3年間合計136個の海水のメタゲノム解析データをXYプロットで示したところ、右上がりの指数曲線に近似した(図(2)-15)。スピアマン検定の結果、相関係数は有

意と判定され、つまり、取得配列数が多いほどOTU数も多くなることが示された。しかし、20,000配列前後に曲線は横に傾き、石西礁湖周辺海域の海水3L中に出現するプランクトンは、約20,000配列読めば、だいたい網羅的に検出（400-650 OTUs）できることを示すことができた。石垣島周辺海域に出現する生物群をスーパーグループレベルで取り纏めたところ、1位は渦鞭毛藻や繊毛虫を代表とするAlveolataで、2位は、動物プランクトンやベントスを代表とするOpisthokontaで、3位は珪藻を代表とするStramenopilesであった（図(2)-16）。基本的に、広島湾等の富栄養化した日本の内湾域の組成と大きな相違はなく、生物多様性に富んだ海域であることが判明した。ただし、富栄養化した内湾域の場合、8 μ mのポアサイズのろ紙で500 mLの海水をろ過するだけでも目詰まりを起こすことがあるが、石西礁湖の場合、3Lの海水を1 μ mのポアサイズのろ紙で直接、ろ過しても目詰まりすることはなかったことから、富栄養化の影響はあるものの、まだ、微細藻類の出現密度は、基本的に低いと言える。

1サンプルあたりの取得配列数の多少によるOTU数への影響を補正するため、全サンプルの中で最小の取得配列数に合わせてOTU数を再計算したところ（n = 136）、各地点の平均OTU数は、100.0-248.8の範囲にあり、最大8回の広域多点調査の結果から、地点毎のOTU数を比較すると、St.02、07、31、つまり石垣島の南部と北部で多く、逆にSt.13、15、16、18、石垣島西部とヨナラ水道付近で少ない傾向が認められ、地点によりプランクトン出現種多様性に差があることが判明した（図(2)-17）。

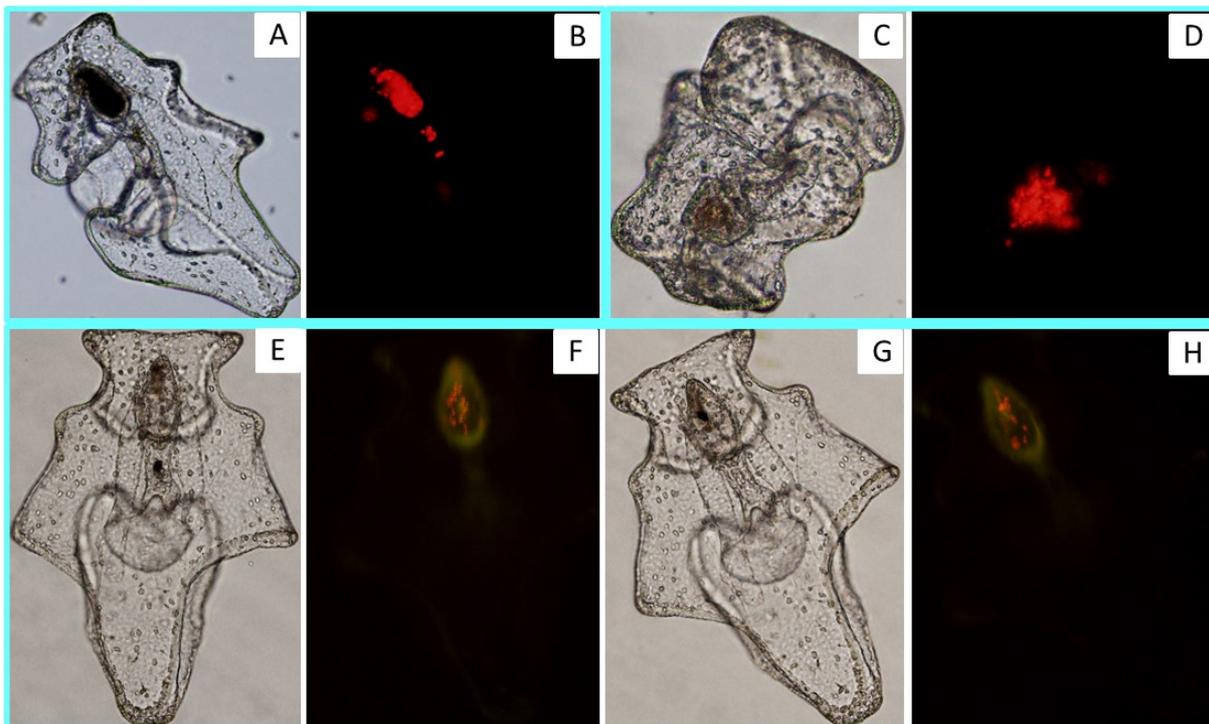
3)オニヒトデ幼生の胃内容物調査

人工的に作出したオニヒトデ幼生（生後、7日目）に、餌料藻類として知られる緑藻の*Donariella* sp.と珪藻の*Chaetoceros calcitrans*を餌として与えたところ、12時間後には、胃にこれらの餌生物が充満していた（図(2)-18）。同様に、石垣島北部の天然海水からネットで捕集したプランクトンを餌として与えて12時間後に観察したところ、小型の微細藻類を捕食しているのを確認することができた。幼生約500個体からDNAを抽出し、18SrRNA遺伝子の一部の領域を増幅し、メタゲノム解析を実施、餌生物の特定を行ったところ、OTU数の割合として、渦鞭毛藻36%、珪藻36%、動物プランクトン24%、繊毛虫10%、クリプト藻・ハプト藻10%、原生動物9%を検出することに成功した（図(2)-19）。オニヒトデ幼生の口のサイズは、20 μ m程度で、動物プランクトンを直接捕食できるはずがなく、以上の結果から、オニヒトデ幼生は、微細藻類のみならず、デトライタス等の生物由来の分解産物も食している可能性が示唆された。

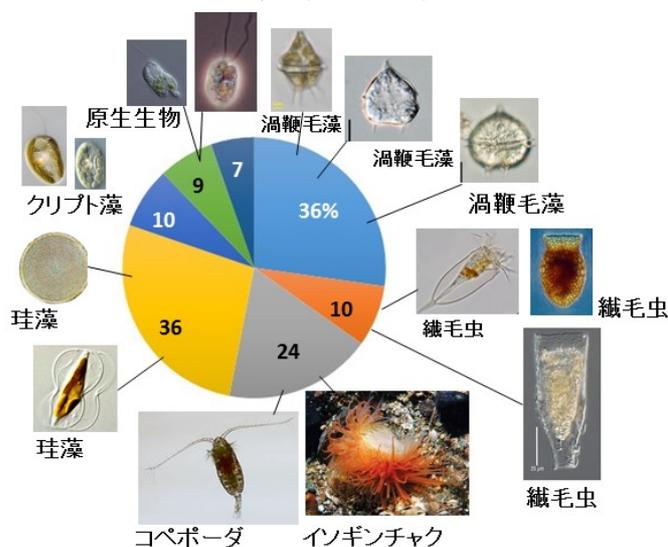
(2)サンゴ礁レジリエンス過程の観察のためのサンゴ着底坂のメタゲノム解析

着定板1枚から0.8-9.2（2.8 \pm 2.0, 平均 \pm 標準偏差）gの付着物が回収され（図(2)-20）、地点や採集時期により大きく異なった。0.5gの付着物からDNAを抽出0.2-6.2（3.3 \pm 1.6） μ gのDNAが抽出された。付着物量とDNA量の間、明瞭な関係は見られなかった（図(2)-21）。メタゲノム解析の結果、OTU数は、190-697の範囲にあった。1サンプルあたりの取得配列数の多少によるOTU数への影響を補正するため、全サンプルの中で最小の取得配列数に合わせてOTU数を再計算したところ、OTU数は、98-278の範囲で算出された。配列数が多かった上位10位は、3種を除いて海藻類であり、着底板には多くの海藻が付着していた（図(2)-22）。また、類似度指数によるNMDSプロット解析の結果、着底板を回収した時期（季節）でサンプルが近隣にプロットされ、サンブ

ル間の出現種の特徴が似る傾向にあり、今回の解析結果のみから、付着生物群の特徴について、地点間の差異を検出するのは困難であった。しかし、ほぼ同時期に採集した海水中のプランクトンメタゲノム解析から得られた出現種組成とは大きく異なること、また、着底板の付着生物群の特徴が、着底板間でかなり異なることから、今後、データを蓄積することにより、着底板上の生物群の特徴と、稚サンゴの生残と成長の関係が明らかになることが期待される。

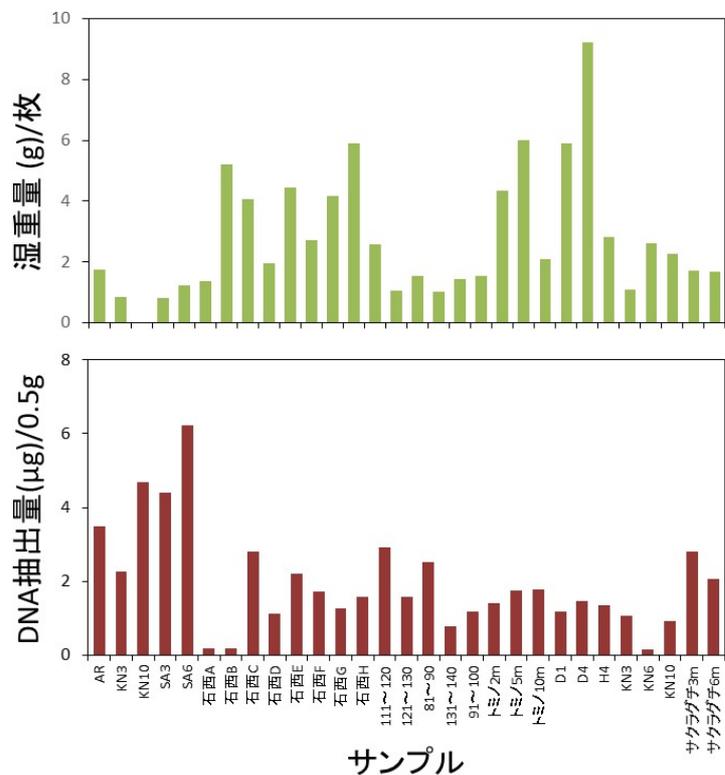


図(2)-18 人工的に作出したオニヒトデ幼生の光学顕微鏡写真．A & B, 緑藻*Donariella* sp.を餌として与えた．C & D, 珪藻*Chaetoceros calcitrans*を餌として与えた．E～H, 天然の微細藻類を餌として与えた．A, C, E, Gは通常光下にて撮影、B, D, E, Fは蛍光下にて撮影し、微細藻類由来のクロロフィルの自家蛍光が赤く光っていることを示す。

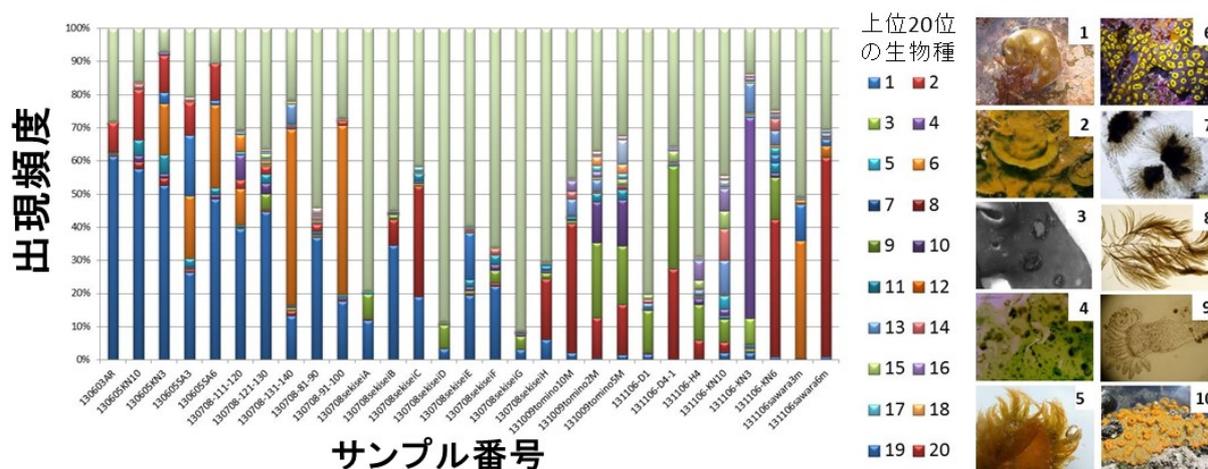




図(2)-20 サンゴ着底板上に付着した付着物（生物および泥）．上，最も付着物が少なかったサンプル（左は表で右は裏）；下，最も付着物が多かったサンプル（左は表で右は裏）



図(2)-21 各サンプルにおけるサンゴ着底板1枚当たりの質重量およびDNA抽出量.



図(2)-22 石西礁湖周辺海域におけるサンゴ着底板のメタゲノム解析の結果．配列数が多かった上位10位の生物を右図にて示す．6, 9, 10以外は全て海藻であった．

(3)石西礁湖に同所的に存在するサンゴの遺伝子発現解析

得られたリードは、クシハダミドリイシからtotal 9.0 Gbp, 177Mリード、アオサンゴからはtotal 9.8Gbp, 191Mリードであった。得られたリードを種ごとにアセンブルを行ったが(表(2)-2)、50 bp single endリードを使用しているためか、平均コンティグ長が1 kbp以下でN50の値も低いため、アセンブルが十分でない可能性が考えられた。クシハダミドリイシとアオサンゴの全contig数に対する同定された宿主遺伝子の割合はそれぞれ、27%, 14%とアオサンゴの同定された割合が低い結果となった(表(2)-3)。しかし、両種の同定された共生藻遺伝子の割合は、56%, 73%であった。アオサンゴの遺伝子同定では、優先的に共生藻の遺伝子が宿主遺伝子よりも多く得られた。アオサンゴのcontig数は、クシハダミドリイシと比べると2万の差があった。これは、ショートリードを元とするアセンブルが起因と考えられた。同定された遺伝子の相同性を見てみると、クシハダミドリイシは、同族のコユビミドリイシの遺伝子に対して高い相同性を持つcontigの割合が、*G. ventalina*をデータベースにする場合より多い事がわかった(図(2)-23)。逆に、アオサンゴでは同じ亜綱の*G. ventalina*をデータベースに利用した方が、コユビミドリイシの遺伝子に対するよりも、高い相同性を持つcontigが多い結果になった。クシハダミドリイシとアオサンゴの共生藻では、ゲノムが解読済みの*S. minutum* (clade B)よりも、clade Cに属する褐虫藻のデータベースを利用した方が、相同性の高いcontigの割合が多い事が分かった。さらに、褐虫藻の遺伝子型を決めるゲノムのITS領域を、得られたcontigの中から検索すると、クシハダミドリイシとアオサンゴの褐虫藻は、clade Cの遺伝子型であるITS領域を持つ事が明らかになった。クシハダミドリイシからは、20,241 ORFs、アオサンゴからは6,209 ORFsが検出された。これらORFが検出された遺伝子の中で、互いに相同性があった物が6,031遺伝子であった(図(2)-24)。共生藻では、26,742の遺伝子が相同でさらに、非常に高い相同性を示した(図(2)-25,26)。今年度の研究では、シーケンスに関して予定通りとはならなかったが、亜種の異なるサンゴから同じ遺伝子型の褐虫藻が得られ、遺伝子の相同性も高い事が明らかになった。

2014年度に行われたシーケンスでは、リードのクオリティーが悪く、後の解析に支障が出る事が明らかになった。2015年度では、水産総合研究センターに新たに導入されたNextSeq500を用い

て、再度シーケンスを行った。使用したサンプル月の現場水温は、それぞれ27.6°Cと31.1°Cであった。AhyとHcoから得られたリード数は、それぞれ212M, 67Mリードであった(表(2)-4)。得られたコンティグ数は、Ahyが349,351、Hcoが209,065であった。それぞれのN50値は、1kを超えていたため、よくアセンブルされていると判断した。AhyとHcoの全contig数に対する同定された宿主遺伝子の割合はそれぞれ、22%、18%とHcoの同定された割合が低い結果となった(図(2)-27)。一方、両種の同定された共生藻遺伝子の割合は、27%、37%であった。Hcoの遺伝子同定では、優先的に共生藻の遺伝子が宿主遺伝子よりも多く得られた。全コンティグのGC含有量(GC%)について調べると、2つのピークを持つ分布が得られた(図(2)-28)。共生藻コンティグのGC%は、Ahyで53%、Hcoで54%であった。*S. minutum*のゲノム配列中のGC含有率は51%を占めることが報告されている¹¹⁾。従って、共生藻由来のシーケンスをうまく分離できていることが示唆された。公共データベースのUniref90とBlastを用いた相同検索の結果は、Ahyが30%、Hcoが35%であった(図(2)-27)。発現変動解析では、温度上昇に伴って上昇する宿主と共生藻の遺伝子数は、Ahyで4,567と1,820、Hcoで1,322と1,112、逆に温度上昇に伴って減少する宿主と共生藻の遺伝子数は、Ahyで3,483と2,577、Hcoで1,345と1,000であった(図(2)-29)。Gene ontologyを用いたenrichment解析では、Ahy宿主で減少する遺伝子群は、DNA複製に関連する遺伝子群、Ahy共生藻で上昇する遺伝子群は、光合成に関連する遺伝子群であった。Hcoの宿主で減少する遺伝子群は、ヘム合成に関連する遺伝子群であり、Hco共生藻で上昇する遺伝子群は、アポトーシスに関連する遺伝子群であった。今後、詳細な解析を行うことで、熱ストレスの回避メカニズムも明らかにできると期待している。また、ストレスに応答して発現する遺伝子を特定できれば、環境下での個体のストレス評価も可能になると考えている。

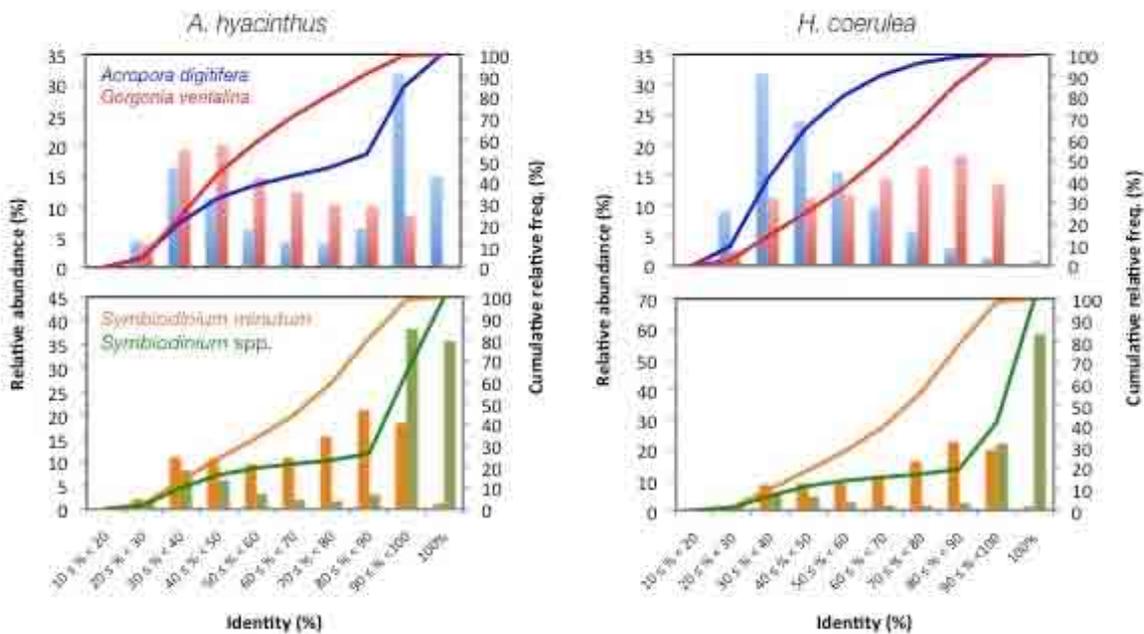
表(2)-2 Trinity *de novo* assemblerによるアセンブル結果

| | <i>A. hyacinthus</i> | <i>H. coerulea</i> |
|------------------------|----------------------|--------------------|
| Number of contigs | 82,833 | 63,955 |
| Total bases | 33,251,518 | 24,887,315 |
| Longest contig length | 11,664 | 5,082 |
| Shortest contig length | 201 | 201 |
| Average length | 401.4 | 389.1 |
| N50 | 419 | 403 |
| N90 | 228 | 226 |

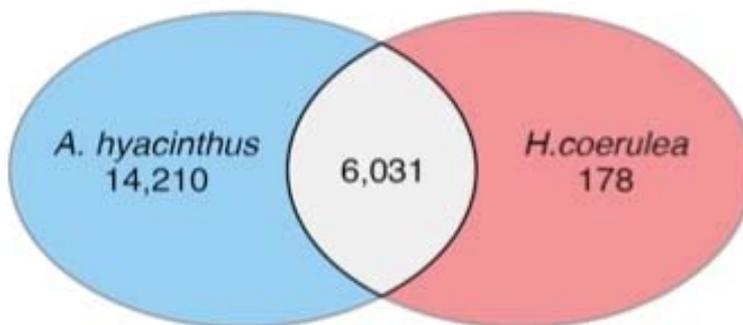
表(2)-3 宿主、共生藻遺伝子の相同検索結果

| | | <i>A. hyacinthus</i> | <i>H. coerulea</i> |
|-------------------|--|----------------------|--------------------|
| Chidaria | <i>Acropora digitifera</i> genome | 20,063 (10,781) | 3,323 (2,299) |
| | <i>Gorgonia ventalina</i> transcriptome | 2,503 (2,027) | 5,473 (3,817) |
| Symbiodinium spp. | <i>Symbiodinium minutum</i> genome | 4,532 (3,423) | 4,605 (3,423) |
| | Symbiodinium spp. Clade C1 transcriptome | 42,105 (20,732) | 41,909 (20,754) |
| | No hit | 13,630 | 8,645 |

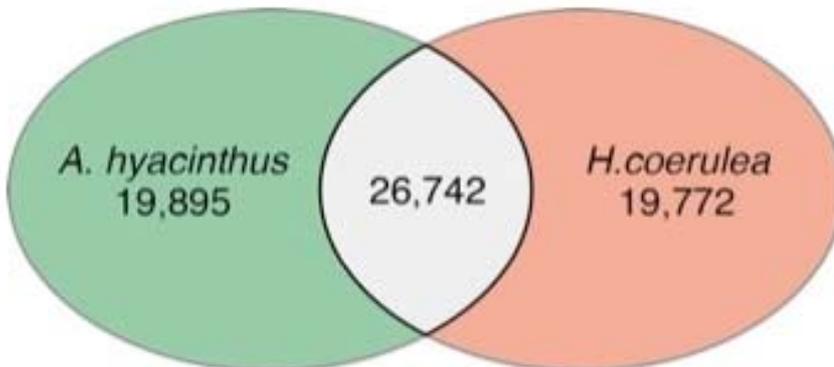
Contig number (Unique gene number)



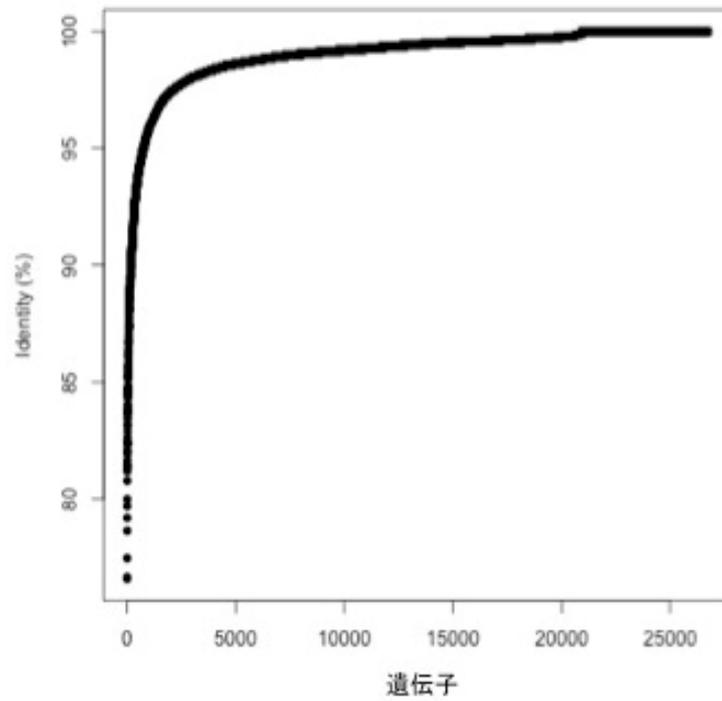
図(2)-23 宿主、共生藻遺伝子の相同性の割合



図(2)-24 宿主遺伝子間の相同数



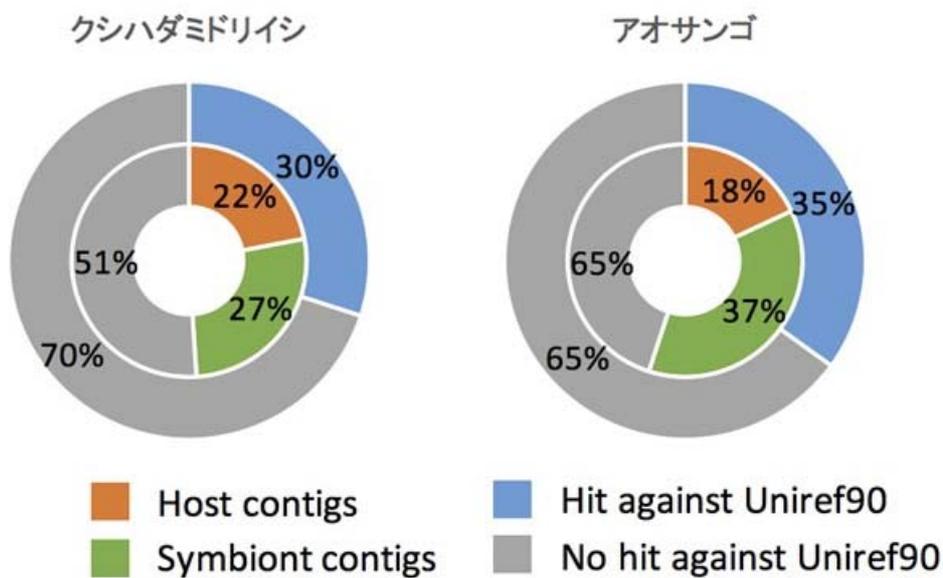
図(2)-25 共生藻遺伝子間の相同数



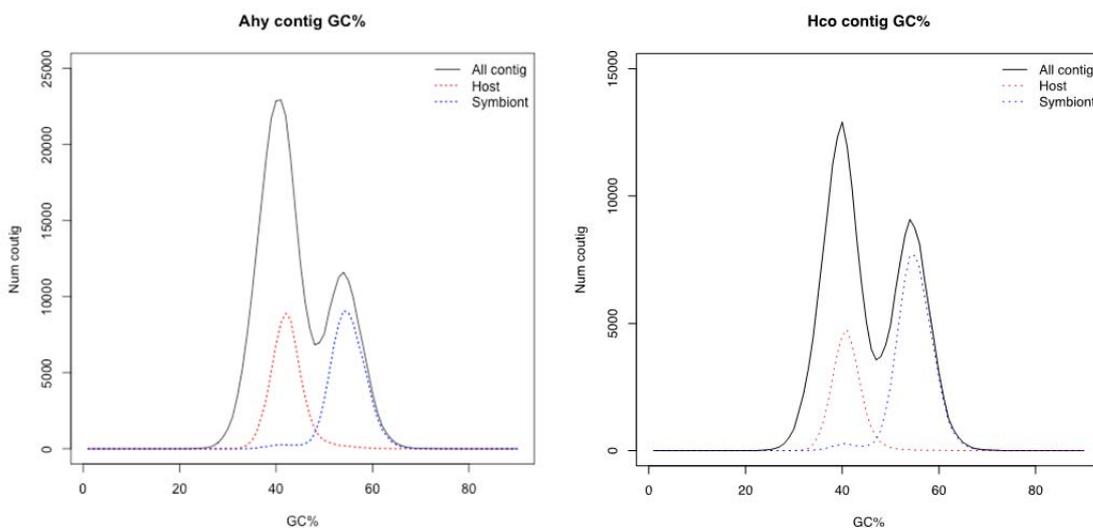
図(2)-26 共生藻遺伝子間の相同性

表(2)-4 2種のシーケンス・アセンブル結果

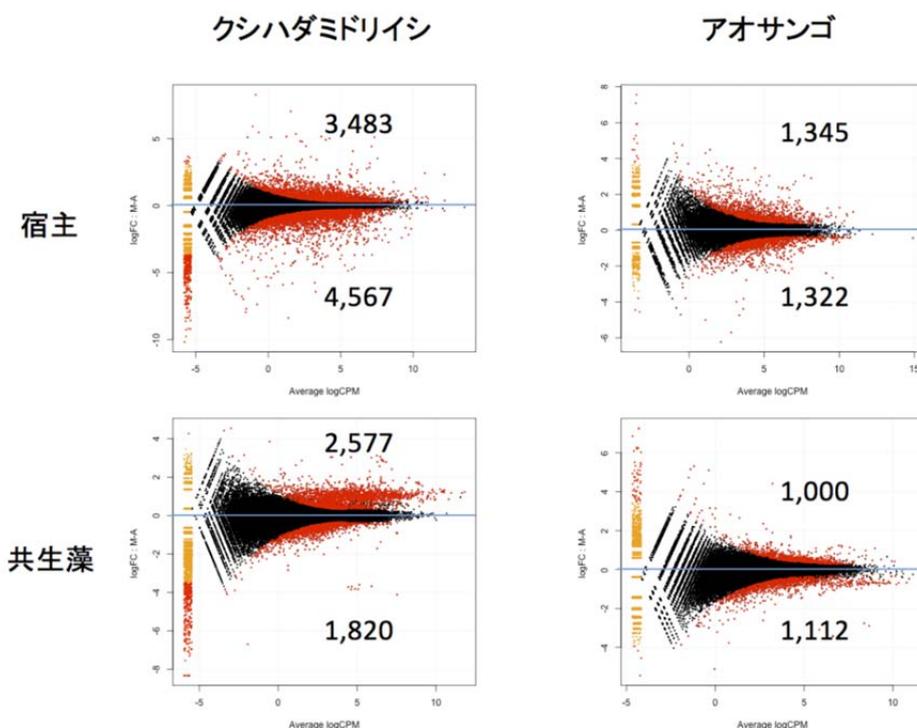
| | <i>Acropora hyacinthus</i> | <i>Helipora coerulea</i> |
|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Total bases | 64 G b | 20 G b |
| Total reads | 212 M | 67 M |
| Number of contigs | 349,351 | 209,065 |
| Total bases (bp) | 336,909,425 | 222,366,075 |
| Longest contig length (bp) | 26,095 | 27,757 |
| Shortest contig length (bp) | 201 | 201 |
| Average length (bp) | 964 | 1,064 |
| N 50 (bp) | 1,632 | 1,802 |
| N 90 (bp) | 373 | 418 |



図(2)-27 全コンテイングに対する宿主、共生藻コンテイングの割合とUniref90に相同のあったコンテイングの割合



図(2)-28 全コンテイング、宿主コンテイング、共生藻コンテイングのGC含有率



図(2)-29 発現変動遺伝子の検出数

青い線より上，温度上昇で発現が減少した遺伝子；青い線より下，温度上昇で発現が上昇した遺伝子；赤プロット，変動遺伝子 (FDR; $q < 0.05$)

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

石西礁湖周辺海域における広域多点調査の一環として、プランクトンメタゲノム解析を実施した。各サンプルにおけるOTU (Operational Taxonomic Units) 数と取得した次世代シーケンス (NGS) 数の関係を合計136個のメタゲノム解析データについて検討したところ、海水3L中に出現するプランクトンは、約20,000配列読めば、おおよそ網羅的に検出 (400-650 OTUs) できることを明らかにした。石西礁湖周辺海域において、最大8回の広域多点調査によるメタゲノム解析の結果から、地点間の生物多様性を比較したところ、各地点の平均OTU数は、100.0-248.8の範囲にあり、石垣島の南部と北部で多く、逆に石垣島西部とヨナラ水道付近で少ない傾向が認められ、地点によりプランクトン出現種多様性に差があることが判明した。また、陸源負荷の影響評価のため、河川由来のケイ酸塩を利用して増殖する珪藻に着目して解析したところ、複数の調査で、石垣島の南部を中心に高頻度の分布が見られたことから、特に降雨時の陸源負荷の起源が、主に石垣島南部にあることを明らかにした。

サンゴ着底版のメタゲノム解析を行った結果、OTU数は、98-278の範囲で算出された。配列数が多かった上位10位は、3種を除いて海藻類であり、着底版には多くの海藻が付着していたことが判明した。今後、稚サンゴの成長率・生残率の低い地点と高い地点から回収した着底版のメタゲノム解析を精力的に行うことで、生物叢の違いを明らかにできる可能性がある。

オニヒトデ幼生を人工的に大量作出し、これに天然のプランクトンを餌として与え、胃内容物

のメタゲノム解析を行うことで、餌生物を特定できる方法を、世界で初めて開発した。約500個体について解析を行ったところ、OTU数の割合として、渦鞭毛藻36%、珪藻36%、動物プランクトン24%、繊毛虫10%、クリプト藻・ハプト藻10%、原生動物9%を検出することに成功し、オニヒトデ幼生は、微細藻類を中心にデトライタスを捕食している可能性のあることが示された。本法により、栄養塩仮説が正しいかどうかの検証が可能になり、重要な餌生物の特定に貢献できると考えている。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

石西礁湖周辺海域における広域多点調査によるプランクトンメタゲノム解析の結果により、当該周辺海域におけるプランクトン出現種の組成や、生物多様性の程度が明らかとなり、また、陸源負荷の影響評価のため、河川由来のケイ酸塩を利用して増殖する珪藻に着目して解析したところ、石垣島の南部を中心に高頻度の分布が見られたことから、陸源負荷の起源が、主に石垣島南部にあることを示すことができた。これにより、今後、河川水由来の陸源負荷をどの様に軽減していくか、行政サイドと連携を深めていくデータを提示することができた。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 長井 敏・田邊晶史・本郷悠貴. 石西礁湖周辺海域における陸源負荷の影響評価 メタゲノミクスによる推定. 水産総合研究センター 研究の動き 第12号. (2014年11月)
- 2) 長井 敏・田邊晶史・本郷悠貴. 石西礁湖周辺海域における陸源負荷の影響評価 メタゲノミクスによる推定. 平成26年中央ブロック推進会議成果情報 (2014年12月)

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 本郷悠貴, 安田仁奈, 田邊晶史, 長井 敏: NGS現場の会(つくば国際会議場)「現場の温度変化に呼応して発現・抑制するサンゴの遺伝子探索」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 長井敏・飛田晃介・漆崎慎吾・田邊晶史ほか. メタゲノミクスによるプランクトンモニタリングの実践 (植物プランクトンを中心に). 日本プランクトン学会報 62: 65-72 (2015).
- 2) Tanabe AS, Nagai S, Hida H, Yasuike M, Fujiwara A, Nakamura Y, Takano Y, Katakura S. Comparative study of the validity of three regions of 18S-rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12459 (2015).
- 3) Nagai S, Hida K, Urushizaki S, Onitsuka G, Yasuike M, Nakamura U, Fujiwara A, Tajimi S, Kimoto K, Kobayashi T, Gojobori T, Ototake M. Influences of diurnal sampling bias on fixed-point monitoring of plankton biodiversity determined using a massively parallel sequencing-based technique. *Gene* 576: 667–675 (2016).
- 4) Nagai S, Hida K, Urushizaki S, Takano Y, Hongo Y, Kameda T, Abe K. Massively parallel sequencing-based survey of eukaryotic community structures in Hiroshima Bay and Ishigaki Island. *Gene* 576: 681–689 (2016).
- 5) 長井敏・野口大毅・阿部和雄. メタゲノム解析による海洋低次生態系の多様性比較. *DNA多型*, Vol.19: 129-133 (2011).
- 6) Okaji K, Ayukai T, Lucas JS. Selective feeding by larvae of the crown- of thorns starfish, *Acanthaster planci* (L.). *Coral Reefs* 16: 47-50 (1997).
- 7) Uthicke S, Logan M, Liddy M, Francis D, Hardy N, Lamare M. Climate change as an unexpected co-factor promoting coral eating seastar (*Acanthaster planci*) outbreaks. *Scientific reports* 5: 8420, DOI: 10.1038/srep08402
- 8) Grabherr, M.G., et al., *Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome*. *Nat Biotechnol.* **29**(7): p. 644-52 (2011).
- 9) Shinzato, C., et al., Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature.* **476**(7360): p. 320-323 (2011).
- 10) Putnam, N.H., et al., Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* **317**(5834): p. 86-94 (2007).
- 11) Shoguchi, E., et al., Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. *Curr Biol.* **23**(15): p. 1399-408 (2013).
- 12) Keeling, P.J., et al., *The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing*. *PLoS Biol.* **12**(6): p. e1001889 (2014).

(3) 石西礁湖を中心としたサンゴ礁生物のreef-scape connectivityの解明

国立大学法人宮崎大学

安田仁奈

平成25～27年度累計予算額：23,134千円（うち平成27年度：7,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本研究では、サンゴ礁生物の幼生分散によるreef-scape connectivityを明らかにし、海洋保護区の配置に重要となる知見を得ることおよびオニヒトデ大量発生の早期予測と大量発生メカニズムの解明を目的とした。石西礁湖周辺海域で造礁サンゴ類(ハナヤサイサンゴ類、ミドリイシ類、アオサンゴ類)合計2103群体について遺伝子解析を行い、まず野外の形態観察ではわからない隠ぺい種の分布を明らかにし、隠ぺい種の分布を決める環境要因を統計モデルにより明らかにした。各種について集団遺伝解析を行い、石西礁湖内における各種のconnectivityを空間遺伝構造から推定した。さらに種間で共通している石西礁湖ないにおける遺伝構造から、ひとつの独立した海域として保全した方がよい空間を保全管理ユニットとして同定した。さらに、最も強い遺伝構造をもつアオサンゴを用いて、親群体および1世代での加入を評価するための着底実験による各群体の起源推定を行い、重要海域を絞り込んで既存の保護区と対照させた。石西礁湖の南北ではconnectivityが限られていること、ヨナラ水道の小浜島側の海域や、黒島と新城島間の離れ礁は他の海域への幼生供給を行う重要海域であることを同定した。西表島周辺の集団間は集団の孤立性が高い一方、石垣島の南西の海域は相対的にconnectivityが強く、重要な供給源としての役割を果たしているため、この海域の陸源負荷の軽減が重要であると考えられた。

一方、サンゴ捕食者オニヒトデに関しては、形態では判別できないオニヒトデ幼生を遺伝子により判別する技術の確立し、2013年には石西礁湖において様々な生物の再生産の場として重要なヨナラ水道周辺で世界初めてのオニヒトデ幼生の高密度集団を発見した。この結果から、高密度幼生は大量発生の引き金になると示唆され、これらを形成する $0.25 \mu\text{g/L}$ 以下にクロロフィルa濃度を抑える必要があることがわかった。同時に、石西礁湖では台風が高密度幼生を外洋に分散させるため、大量発生を抑える影響がある可能性が示唆された。

[キーワード]

集団遺伝解析、幼生分散、connectivity、造礁サンゴ、オニヒトデ

1. はじめに

サンゴ礁生態系は高い生物多様性を誇る生態系であるが、近年オニヒトデの大量発生や、高水温による白化などにより世界中で激減する傾向にある。日本で最大のサンゴ礁海域を誇る石西礁湖においても同じ傾向にあり、慢性化したオニヒトデの大量発生およびローカルなストレスにより回復の兆しが見られない状況にある。サンゴ礁生物は、親が固着性でほとんど動かないものにおいても、生活史の初期に浮遊幼生期を持ち親とは離れた場所に着定する。そのため、生態系の基盤となっている造礁サンゴが安定して加入できるように、幼生分散が主に起きている範囲を同

定し、特に幼生を他の海域へ供給しているソース海域を中心に保全していくことが重要である。一方オニヒトデに関しても、2週間から6、7週間の浮遊幼生期を持っており、この時期の減耗ないし高い生存率が大量発生に深くかかわっていると指摘されているものの、野外での挙動が全く分かっていない状態である。そのため、石西礁湖周辺海域において、大きな2つの課題として①造礁サンゴが効率的に加入し、保全できるための重要海域の選定および②オニヒトデ大量発生の機構や早期モニタリングができるシステムを整え、できるだけ早くオニヒトデ大量発生を抑えることが重要である。加えて、造礁サンゴにおいては、野外において形態で種を識別することが困難であり、これまでの形態識別では、真に生殖隔離が起きている「種」を間違えて同定してしまっている可能性がある。そこで、本研究では、遺伝子解析を用いて、まず、造礁サンゴについては互いに交雑している種の境界を集団遺伝学的に明らかにすることを試みた。アオサンゴにおいては、遺伝的に異なる集団が本当に保全上別々に扱うべき別種であるのかを確認するため、また、サブテーマ1の数値シミュレーションによって幼生分散を推定する際の初期値となる産卵期を明らかにするために、生殖細胞の観察も行った。造礁サンゴにおける隠ぺい種は、野外において形態では判別が困難なものの、類縁種がどのような環境を好んですみわけをしているのかを明らかにすることで、環境要因からどちらの種が多く分布しているか予測できるようになる。そのため、サブテーマ1で収集した環境データを用いて、類縁種間における分布の割合を説明する環境因子を統計モデルにより推定した。さらに、長い時間スケールにおいて、石西礁湖ないで様々な生活史を持つ造礁サンゴの集団間でどの程度connectivityが起こっているのかを明らかにするために、高度型分子マーカーを用いて集団遺伝解析を行った。また、長い時間スケールにおけるconnectivity推定に加え、着定板を海水中に設置し、着底した幼生の遺伝子型からソースとなっている集団を決定することにより、1世代で起きている幼生分散の範囲も推定した。

一方、オニヒトデの大量発生に関しては、まず石西礁湖内で遺伝構造を持っているかどうかを確認したうえで、過去60年間失敗に終わっていた野外幼生採集によるオニヒトデ幼生の野外分布を明らかにすることを試みた。オニヒトデ幼生は他のヒトデ幼生やナマコ幼生などに形態が酷似しているため、オニヒトデ幼生を種判別できる遺伝子マーカーを確立させることが重要となる。そこで、まず、サンゴ礁の他のヒトデとオニヒトデの遺伝子配列を比較してオニヒトデと同定できる領域を探し、その領域に遺伝子マーカーを作成した。その後、全サブテーマが協力して物理データと一緒に採集した海水プランクトンサンプルを顕微鏡下でソーティングし、オニヒトデ幼生の同定を行った。これらのデータと野外のクロロフィル a 濃度を比較することで、野外オニヒトデ幼生の分布特性を明らかにし、オニヒトデ幼生のエサ環境を把握することを試みた。

2. 研究開発目的

本研究では以下の3つを明らかにすることを目的とした。

- (1) 石西礁湖に幅広く分布する造礁サンゴ普通種の隠ぺい種とその分布の解明による正しい生物多様性評価方法の確立と、野外調査において形態では区別できない種の環境要因からの分布推定を可能にすること。
- (2) 石西礁湖周辺海域において、生活史の異なる様々な種において集団間のconnectivityを明らかにし、長い時間スケールでの造礁サンゴが個体群を維持している空間範囲（保管理に最適なユニット）を同定する。さらに、着底板を使った稚サンゴの遺伝子型を同定することにより、1世

代で起こっている加入の範囲が長い時間スケールで起きている幼生分散の推定と一致するかどうかを確認する。

(3) 野外オニヒトデ幼生を同定する遺伝解析方法を確立し、それを用いて石西礁湖の広域調査を行い、野外におけるオニヒトデ幼生の分布特性から大量発生との関連を推定する。さらにオニヒトデ幼生のエサとなるクロロフィル a の濃度分布と比較し、オニヒトデ幼生の石西礁湖におけるエサ環境を明らかにする。

3. 研究開発方法

(1) 集団遺伝解析用の研究試料の採集

サンゴ礁生物において成体は固着性であっても生活史の初期にはプランクトン幼生期間をすごし、幼生分散を行うものが多くいる。またサンゴ礁は複雑な地形・環境を擁するため、物理的な幼生分散が可能な範囲であっても生息できる着底場所は限られる。そのため、複雑な地形を細かく捉えた上での詳細なサンプリングによる集団間の **connectivity** を明らかにすることが海洋保護区などの重点海域を明らかにするために必要である。既存の海中公園の配置に関する科学的な評価および新たな海洋保護区を設定するにあたって、分散能力や生活史戦略の異なる生物を複数種調べてその効果を検証する必要がある。そこで本研究では、サンゴ礁生態系の基盤となる生物として、造礁性のサンゴを3種類（アオサンゴ *Heliopora spp.*・クシハダミドリイシ *Acropora spp.*・ハナヤサイサンゴ *Pocillopora spp.*）および、サンゴ捕食者として生態系の保全に重要となるオニヒトデを対象種とした。クシハダミドリイシとハナヤサイサンゴはともにサンゴ礁生態系、特に本研究の対象海域である石西礁湖において普通種として幅広く分布している。両種ともに、白化やオニヒトデの大量発生など大きなかく乱があったときにいち早く加入と成長が起これ、サンゴ礁の回復に寄与する種である。一方アオサンゴは、高水温白化やオニヒトデによる被食を受けにくく、生息域も他の造礁サンゴが比較的少ない場所に繁茂する。クシハダミドリイシの仲間は放精放卵型の生殖生態をもち、水中で受精を行う。クシハダミドリイシの幼生は1週間程度から、長くて50日弱の浮遊幼生期間をもつ。アオサンゴは保育型の生殖生態をもち、1年に一度雌雄異体のコロニーのうち、雄によって放精されると、雌の体内で受精が起こる。雌はしばらく発生した幼生を保育したのちに幼生を海水中へ放出する。幼生は70%程度が数時間以内着定するが、最大で2週間程度の浮遊幼生期間を持つ。ハナヤサイサンゴ類においては、形態による種判別が一部困難ため、産卵様式の情報十分に整理されていないものの、イボハダハナヤサイ *P. verrucosa* は主に放卵放精型で生殖していることが知られるが、フィリピンで一度だけ保育型の幼生放出が目撃されている。チリメンハナヤサイ *P. meandrina* も放精放卵ともに報告されている。ヘラジカハナヤサイ *P. eydouxi* は、放精放卵のみが報告されている。*P. damicornis* は基本的に保育型であるが、西オーストラリアや東太平洋などの一部の海域では放精放卵しているところが目撃されている。

本研究では、石西礁湖およびその周辺海域を中心とした海域においてサンゴ礁生物（オニヒトデ・アオサンゴ類・クシハダミドリイシ類・ハナヤサイサンゴ類）の採集を行った。サンゴの採集と個々のサンゴや環境要因に関する記録は、サンプル名・サンプル No・時間・種・色・群体の大きさ・周辺の種・水深・温度・緯度/経度・地質・周辺の種・形状の項目を防水ノートに記載した。

集団遺伝解析用のサンゴサンプリングは極力3種類が同所的に分布する場所で採集を行った。オニヒトデに関しては、大量発生がすでに収束傾向にあったため、2014年にヨナラ水道とタギドングチの2地点においてそれぞれ30個体のサンプルを採集した。

(2) アオサンゴ類の種境界と connectivity の推定

アオサンゴの遺伝子による種の同定（遺伝子および生殖時期による生殖隔離の確認）と集団遺伝解析、共生褐虫藻の多様性の解析、着定板を用いた1世代における加入の検証

1) アオサンゴの種同定（遺伝子解析）

アオサンゴは、高度多型遺伝子マーカーである核のマイクロサテライト解析により、黒潮海域に2つの遺伝的に異なる遺伝タイプ(HC-A および HC-B)が含まれていることが明らかとなっている¹⁾。しかし、これは多検体を取り扱う集団遺伝解析を行わない限り、個々の個体のタイプの推定が難しい。そこで、単一の遺伝子座の配列でもタイプを判別することが可能であるかどうかを調べるため、本研究では、マイクロサテライトマーカーの解析をまず行い、その後別の遺伝子領域も加えて解析した。さらに、これら遺伝子で示されている“隠ぺい種”が、本当に生態学的にも異なっており、保全する上で、別々に扱うべきであるかどうかを確認するため、また数値シミュレーションや幼生の加入実験に必要な知見を得るために、野外での観察および年間を通じた生殖細胞の観察を行った。

集団遺伝解析では、親群体を用いた遺伝子流動解析による幼生分散の推定とともに、1世代で加入した幼生がどこからきたものかを同定することにより、1世代でどの程度の範囲から加入が起きているかを明らかにした。

2) アオサンゴ2種のマイクロサテライト解析によるタイプ決定（ベイズ法によるクラスタリング解析）

アオサンゴ2種の判別を行うため、ソフトウェアStructure ver2.3.4²⁾を用いて、GeneAlexで作成したstructureファイルを開き、ベイズ法によるクラスタリング解析で個体ごとのアサイメントを行った。Burninは100000、MCMCは500000に設定し、事前情報として地理情報を入れないAdmixtureモデルと事前情報として地理情報を入れるLOCPRIORモデル³⁾を使用した。地理情報のないAdmixtureモデルでは仮想的な祖先集団数であるK値を1~5、地理情報を入れるLOCPRIORモデルでは石西礁湖とそれ以外にわけ、K値を1~5に仮定し、それぞれ10回異なるランダムシード反復して結果の安定性を調べた。

3) マイクロサテライト以外の ITS2・ミトコンドリア遺伝子による確認

しばしば動物の種判別に用いられる核のITS2と呼ばれる領域およびミトコンドリアの部分領域でも遺伝的な違いが検出できるかを確認した。ITS2はアオサンゴが属する八放サンゴ類でよく用いられるプライマー5.8S-436 および 28S-663⁴⁾を用いた。ミトコンドリア領域は、GenBankに登録されているアオサンゴのミトコンドリア領域の配列を基に、多型性が大きいと考えられる配列を増幅できるようなプライマーを新規に作成した(HC-NDF-50, AAATGAGTCAAGTACCTATGCAG, HC-MutR, CCCCATAACTTCAATTCTAGC)。PCR法を用いて上記の領域を増幅し、キャピラリーシークエンサーを用いたダイレクトシークエンス法によって配列を決定した(Yasuda et al. 2015を参照)。決定した配列は、ソフトウェアBioEdit ver7、GENETIX ver11、MEGA6を用いてアライメントおよびエディットを行った。遺伝子配列の遺伝的多様性（ハプロタイプ多様性および塩基多

様度)は DNAsp ver5 によって算出した。ITS2 に関しては、当該領域の遺伝子領域の進化を明らかにするため、ソフトウェア Network を用いてハプロタイプネットワーク図を作成した。

4) アオサンゴ2タイプの分布と環境相関(サブテーマ1と共同) :

各地点におけるアオサンゴ2タイプが生息する割合と環境因子の間の相関を調べ、reef-scape環境の何が分布を決めているのかを明らかにした。物理環境データはサブテーマ1が収集したものを使用し、遺伝子データと環境相関の一般化線形モデル (GLM) と AICモデル選択による解析によるテストはサブテーマ1の向が行った。誤差分布を二項分布と仮定すると過分散になったため、ベータ二項分布を仮定した。環境変数間の相関を考慮し、相関の高い変数は一方を排除した(多重共線性の排除)。

考えられる環境変数を全て考慮したグローバルモデルは :

同じ地点でサンプリングされたアオサンゴ類のうちHCAの割合 ~ 水深 + 表層水温 + 表層塩分濃度 + 表層塩分濃度の標準偏差 + 表層クロロフィルa濃度 + 表層濁度とした。

5) アオサンゴの種における生態学的な違いの検出(野外調査および生殖細胞の観察) :

生殖細胞観察用の採集は、沖縄県の石垣島と西表島の間にある石西礁湖周辺の3地点(ヨナラ水道(Yn)、ターヤグチ(Ty)、ケングチ(Kn))でスクーバダイビングにより行った。2014年6月から2015年8月までの約一年間にわたり約1ヶ月から2ヶ月に1度の頻度で採集を行い、ヨナラ水道では合計249群体(A147群体、B102群体)、合計4群体(A0群体、B3群体、AとBの中間タイプ1群体)、ターヤグチでは合計23群体(A15群体、B2群体、AとBの中間タイプ6群体)を採集した(表(3)-1)。標本は、AタイプおよびBタイプがそれぞれ最低6群体以上となるようにランダムに群体を選んで採集した。採集時には、幼生保育行動ないし幼生放出を行っているか否かも記録するとともに、個々の群体の形態写真や位置情報を毎回記録した。標本採集時のダメージに起因する生殖行動の変化を考慮し、同一群体からの複数回の採集は出来るだけ避けた。標本はサンゴの先端から3-10cm程度を採取した。組織観察用の標本は10%海水ホルマリン溶液に保存するとともに、遺伝子解析用に0.5-1cm程度を99.5%エタノールに保存した。さらに、マイクロサテライト遺伝子による解析で2タイプが両方いる場所および片方ずつのタイプしかいない場所に水温計ロガーTidbitを設置して2タイプの生息域の水温環境を調べた。

表(3)-1 生殖時期推定のための各タイプにおける標本採集・観察数

| 地点名 緯度・経度 | 年 | 月 | 日 | 潮汐 | N | 標本種タイプ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|-------|----|-------|-------|--------|----------------|------|-------|-------|----|---------|---------|-------|-------|----|------|---|------|------|---|---|---|---|---|
| | | | | | | A | | | B | | | A and B | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | 観察数 (組織切片数) | ♀ | ♂ | 観察数 | ♀ | ♂ | 観察数 | ♀ | ♂ | | | | | | | | | | |
| ヨナラ水通 (Yn) 24°21'16"N, 123°57'16"E | 2014 | 6 | 5 | 小潮 | 26 | 16(5) | 4 | 19 | 3 | 12 | 10(10) | 4 | 12 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| | | | | | 7 | 13 | 大潮 | 28 | 13(6) | 0 | 0 | 0 | 0 | 15(3) | 3 | 0 | 4 | 8 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | | | 17 | 中潮 | 14 | 14(3) | 1 | 5 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | 21 | 長潮 | 21 | 9(7) | 0 | 0 | 0 | 0 | 12(0) | 2 | 10 | 1 | 4 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | 25 | 大潮 | 12 | 6(0) | 1 | 2 | 0 | 0 | 6(2) | 1 | 1 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | 28 | 大潮 | 20 | 9(1) | 1 | 5 | 0 | 0 | 11(3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | 8 | 29 | 中潮 | 27 | 14(8) | 2 | 11 | 0 | 0 | 13(3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | 10 | 29 | 中潮 | 20 | 12(7) | 4 | 14 | 0 | 0 | 8(0) | 3 | 13 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | 1 | 13 | 小潮 | 15 | 12(0) | 6 | 27 | 0 | 0 | 3(3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | 2 | 16 | 中潮 | 18 | 12(0) | 5 | 21 | 0 | 0 | 6(3) | 2 | 10 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 14 | 小潮 | 18 | 12(0) | 5 | 18 | 4 | 16 | 6(3) | 3 | 12 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 7 | 24.25 | 小潮 | 18 | 12(7) | 4 | 20 | 0 | 0 | 6(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 8 | 18.19 | 中潮 | 12 | 6(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 6(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| | | | | 小計 | 249 | 147(44) | 33 | 142 | 7 | 28 | 102(30) | 18 | 58 | 5 | 0 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| ケンダチ (Ka) 24°13'22"N, 124°14'7"E | 2014 | 6 | 12 | 大潮 | 4 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 3(2) | 0 | 0 | 2 | 8 | 1(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| | | | | | 小計 | 4 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 3(2) | 0 | 0 | 2 | 8 | 1(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| ターヤグチ (Ty) 24°16'57"N, 123°49'50"E | 2015 | 7 | 24.25 | 小潮 | 10 | 5(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(0) | 1 | 1 | 0 | 0 | 4(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| | | | | | August | 18.19 | 中潮 | 13 | 10(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | | 小計 | 23 | 15(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(0) | 1 | 1 | 0 | 0 | 6(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |

6) アオサングの集団遺伝解析 :

a DNA抽出とジェノタイプング

アオサングのDNA抽出は熱アルカリ法を用いた。マイクロサテライト遺伝子座はsaki06、saki08、miho04、miho30、miho33、mayu09、mayu41、mayu49、emi20⁵の9種類を用いて、それぞれPCRを行うことにより、目的の領域を増幅した。PCRカクテルは1サンプルあたり3.86μLのddH2O、各0.035μLの蛍光プライマーとそれに対応した非蛍光プライマー、5μLのno color GOTaq Master Mix、1μLの抽出したDNA溶液で合計10μLとした。設定条件はdenature 94°Cで3分を1サイクル、denature 94°Cで30秒・annealing 60°Cで30秒・extension 72°Cで20秒を35サイクル、final extension 72°Cで5分を1サイクルとした。プライマーにSaki06を用いる場合のみannealingは50°Cに設定した。1%のアガロースゲルを作成し、電気泳動により増幅とサイズを確認した。増幅が確認できたら、ddH2Oでそれぞれ200倍に希釈した。100サンプルあたりLIZ600を20μLとHiDiを1000μLとして混ぜ合わせたHiDi with LIZ溶液を10μLに対して、200倍に希釈したPCR産物を1μL加えたジェノタイプング用サンプルを作成した。作成したサンプルは神奈川県の水産総合センター中央水産研究所に輸送し、ABi3730での解析を行った。ジェノタイプングソフトウェアであるGeneMapper ver4.1(ABi)を用いて、中央水産研究所のABi3730 (ABi)で解析をして帰ってきたデータのジェノタイプングを行った。GeneMapperでは、増幅に用いたマーカーの蛍光の色と検出される領域を設定したパネルを作成し解析を行った。そして、それぞれのマーカーでアレル(対立遺伝子)を決定するビンを作成し、再び解析を行うことで遺伝子型を決定した。この段階でバンドパターンが不明瞭ないし、明らかな連鎖不均衡がみられたmiho30、miho33、mayu9、mayu49は解析から除いた。

b 遺伝分化係数F_{ST}による遺伝構造の算出

石西礁湖周辺海域におけるアオサング2タイプの遺伝構造を調べるため、AMOVA(Analysis of Molecular Variance)によってサンプル全体の遺伝的分化係数である全F_{ST}とペア集団間の遺伝的分化の程度をみるpairwise F_{ST}を求めた。AMOVAは集団間の分化の大きさを計算し、遺伝分化係数のP値によって有意に大きいか検定できる手法である。地理的ないし生物学的に共通する意味のありそうな集団同士を複数まとめてグループ化し、グループ間の分化を調べることも可能である。ま

た、 F_{ST} は遺伝分化係数といい、集団間の遺伝的分化を表すのに用いられる指標である。ベイズ法によるクラスタリング解析(STRUCTURE解析)によって明らかになった2つの隠蔽種をそれぞれに事前情報としてグルーピングしてわけて検定を行った。

c Barrierによる空間遺伝構造の推定と地理的距離と遺伝的距離の関係性の検定(IBD検定)

ソフトウェアBarrier ver22⁶⁾を用いて、空間における遺伝障壁を検出するバリアー解析を行った。Barrierを用いる際に必要な集団間の遺伝距離はソフトウェアpopulations ver1.2.32によって求めた。遺伝距離はマイクロサテライトにおいて集団系統推定能力が高いDa⁷⁾のモデルを使用した。求めた集団間の遺伝距離と10進法に直した緯度と経度の情報を用いて、バリアー解析を行った。

7) 着定板の設置による1世代における幼生分散の推定調査

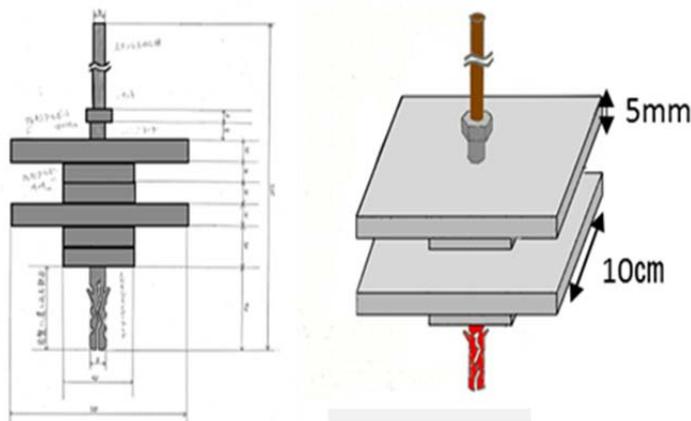
a 着定板の設置方法

2014年および2015年に着定板の野外実験を行い、稚サンゴの遺伝子型を推定することで1世代における幼生分散による加入がどの程度あるかを明らかにすることを試みた。2014年は試験的に着定板を設置したものの、台風によりターゲットであるアオサンゴの生殖時期よりも早くに回収せざるを得なく有効なデータが取れなかったため、2015年の結果のみをここに示す。

b 2015年 着定板とtidbitの設置

アオサンゴAおよびBの産卵期だと考えられた6月末から8月上旬を目安にし、2015年の4月末から9月下旬にかけてカノカワ、ユシングチ、ターヤグチ、ヨナラの西表側礁斜面の合計4海域に10cm四方のフレキシブルボードで作成した着定板(図(3)-1)を設置した。

そのうち、ターヤグチでは、HC-AとHC-Bの生息の割合が異なっている、2~4m、6~7m、8~10mと水深ごとに3か所、ヨナラの西表側では北と南に2か所に設置した。着定板回収後、稚サンゴを採集し、遺伝子解析によりターヤグチの37サンプル、ユシングチの11サンプル、ヨナラ西表側の1サンプルがアオサンゴであると上記のITS2の配列により同定できたので、それらに対しマイクロサテライト5遺伝子座を用いた個体の起源推定解析等に用いた。また、アオサンゴの生息域の温度推移を見るため、2014年の5月から8月にかけてヨナラのAのみが生息する地点、Bのみが生息する地点、AとBが同所的に生息する2地点の合計4地点にデータロガーであるtidbitを設置した。



図(3)-1 海底に設置した着定板の構造

GeneClass解析による成体および着定板について1世代の分散を推定するための稚サンゴの起源推定

「ある個体はどの集団に起源したのか?」、「集団Aで採取した個体のどれくらいが集団Bからの移住者か」などの情報は生態学的、進化的にだけでなく、集団の管理、保全などの面においても重要とされる。多型性の高い分子マーカーの普及により、遺伝子型からその個体がどの集団に起源したか推定可能になりいくつかの解析法が提案されている。その中でも、個体の遺伝子型が最も生じやすい集団にその個体を割り振る方法はアサイメント法、アサイメントテストと呼ばれている。本研究では、ソフトウェアGeneClass2.0.⁸⁾を用いて、アサイメントテストを行った。GeneClass2を立ち上げ、GenePopファイルを読み込み、目的として、個体を起源したと考えられる集団に割り振る「Assign/Exclude population as origin of individuals」を選択した。次に割り振り方法として、Frequencies-based methodを選択し解析を行った。

8) アオサンゴの共生褐虫藻の解析

PCRにより、抽出したアオサンゴDNAから共生褐虫藻遺伝子のITS2領域を増幅した。PCRは非特異的な配列の増幅を避けるため、タッチダウンPCR法を行った。使用したプライマーはITS2とGCクランプ付きの

ITS2clamp(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCGGGATCCATATGCTTAAG TTCAGCGGGT: 下線部はGCクランプ)である⁹⁾。PCRカクテルは1サンプルあたり15.2 μ LのddH₂O、2 μ Lのbuffer、1.6 μ LのdNTP、各0.028 μ LのITS2F・Rプライマー、0.1 μ LのexTaq、1 μ Lの抽出したDNA溶液で合計20 μ Lとした。設定条件はdenature 9 $^{\circ}$ Cで分を1サイクル、denature 9 $^{\circ}$ Cで30秒・annealing 62 $^{\circ}$ Cで30秒(1サイクル毎に-1 $^{\circ}$ C)・extension 72 $^{\circ}$ Cで20秒を10サイクル、denature 9 $^{\circ}$ Cで30秒・annealing 52 $^{\circ}$ Cで30秒・extension 72 $^{\circ}$ Cで20秒を30サイクル、final extension 72 $^{\circ}$ Cで5分を1サイクルとした。1%のアガロースゲルを作成し、電気泳動により増幅とサイズを確認した。PCR後、DGGE法(denaturing gradient gel electrophoresis、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)により、褐虫藻の塩基配列の違いを視覚化した。DGGE法はGCクランプを付加することによって高い検出率が得られ、各塩基配列のT_m値等の違いにより、1塩基の違いを検出できる。実験方法は濃度勾配が20から75%の8%アクリルアミドゲルを作成し、約10 μ Lの10 \times Loading Dyeを添加したPCR産物をアプライして電気泳動を行った。電気泳動は1 \times TAE Bufferで満たした泳動槽中において、90V、60 $^{\circ}$ Cで15時間行い、バンドパターンを確認した。さらに、検出したバンドの配列を調べるためシーケンス反応による配列決定をした。

(3) クシハダミドリイシ類の遺伝子による種の同定と集団遺伝解析

1) クシハダミドリイシ類の種の同定と分布範囲:

クシハダミドリイシ類は近年、温帯域まで生息しているクシハダミドリイシ(*Acropora specifera*)と、ナンヨウミドリイシ(*Acropora hyacinthus*)の最低2種いることが知られる。2種は群体形での識別が困難である。そのため、アオサンゴ同様に本研究では、Amil2-2、Amil2-23、Amil2-10、Amil2-12、8346m3、11401m4、8499m4、10366m5の8種のマイクロサテライトマーカー^{10, 11)}を用いて、それぞれPCRすることにより、8種類の領域を増幅しジェノタイピングを行った。STRUCTURE解析によって種の判別を行った。

クシハダミドリイシとナンヨウミドリイシの分布に関しては、誤差分布を二項分布と仮定すると過分散になったため、ベータ二項分布を仮定した。環境変数間の相関を考慮し、相関の高い変数

は一方を排除した。考えられる環境変数を全て考慮したアオサンゴ同様に、グローバルモデルはクシハダミドリイシの割合～水深+表層水温+表層塩分濃度+表層塩分濃度の標準偏差+表層クロロフィル a 濃度+表層濁度、とした。

2) クシハダミドリイシ類の集団遺伝解析：

クシハダミドリイシの集団遺伝解析は、上記の 8 種類のプライマーを用いて行った。

ハナヤサイサンゴ類の遺伝子による種の同定と集団遺伝解析

(4) ハナヤサイサンゴ類の遺伝子による種同定と集団遺伝解析

1) ハナヤサイサンゴ類の遺伝子による種の同定：

ハナヤサイサンゴと考えられる野外の群体について採集を行いミトコンドリア ORF 領域の配列によって¹²⁾を基準として種の同定を行った。この方法により、*P. meandrinna* と *P. eydouxi* 以外のハナヤサイ属の種を分類することが出来る。ハナヤサイサンゴ類全サンプルについて、ミトコンドリア ORF 領域で解析を行ったのち、マイクロサテライト 4 遺伝子座を用いて集団遺伝解析を行った。

2) ハナヤサイサンゴ類の集団遺伝解析

クシハダミドリイシ・アオサンゴ同様に、マイクロサテライト遺伝子座をジェノタイプングしたデータから F_{ST} を求めた後、空間遺伝構造の推定をバリアー解析にて行った。

(5) オニヒトデの遺伝子マーカー開発と集団遺伝解析

竹島北およびヨナラ水道周辺で採集した合計30個体のオニヒトデをRAD法により解析を行った。

Stacksを用いてアライメントとSNPs検出を行い、遺伝構造を推定した。

また、別途解析を行っていた全ゲノム配列より、2bpのタンデムリピートを検索し、オニヒトデのマイクロサテライトの設計を行った。

(6) オニヒトデのconnectivity解明のための野外幼生調査と遺伝学的解析

オニヒトデの大量発生は浮遊幼生期の生存率に関わるとしてされているにも関わらず、野外での採集報告がない。石西礁湖周辺海域におけるオニヒトデ幼生の分布・分散および存在水深などを把握するため、2013年、2014年は広域調査による海水サンプリングを行い、野外オニヒトデ幼生の分布同定を試みた。また、2015年に石西礁湖の水路に位置する2地点において24時間観測による水深別サンプリングをおこなったが、68個体発見し、単離した棘皮動物幼生についてユニバーサルプライマーでミトコンドリアDNAを用いて同定したところ、他種のヒトデおよびナマコ類のみで、オニヒトデ幼生は採集できなかったなのでここでは詳細は省く。

1) 野外オニヒトデ幼生の同定方法の確立

オニヒトデ幼生は他の棘皮動物と形態が酷似していて判別がつかないため、遺伝子領域を用いてオニヒトデと同定できる領域を探した。サンゴ礁に生息する主なヒトデ類で産卵期がオニヒトデと近い種(マンジュウヒトデ、コブヒトデ、アオヒトデ、ゴマフヒトデ)とオニヒトデで配列に違いがありかつ増幅効率のよい領域を探索した。さらに、さまざまなプライマーセットにおいて、オニヒトデでは増幅しやすいが、その他のヒトデ類では増幅しない、ないししにくいプライマーのスクリーニングを行い、オニヒトデ幼生を同定する遺伝子マーカーを開発した。

2) 顕微鏡下での幼生のソーティングおよびDNAによる同定

広域調査では7m水深から、合計16地点で採集を行い、24時間観測では12時、24時、6時、12時の4回、表層、10m、20mの3水深にて採集をおこなった。これらは全て60マイクロメッシュのプランクトンネット及び濾水計を用いておこなった。

海水はエタノールで固定し、実体顕微鏡下で海水サンプルの観察をおこない、ヒトデ幼生の形態をしたものをピペットでひとつひとつ単離した。DNAを抽出した後、オニヒトデのみで増えるプライマーおよび棘皮動物のユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅し、配列を決定した。配列はBLASTサーチによりジーンバンクに登録されている配列と比較して、それぞれの幼生の種を同定した。

4. 結果及び考察

(1) 造礁サンゴ類の集団遺伝解析による種の同定とconnectivity解明

1) 集団遺伝解析用の研究試料の採集

造礁サンゴに関しては、クシハダミドリイシ類を合計 699 群体、アオサンゴ類を合計 587 群体、ハナヤサイサンゴ類を合計 2103 群体採集した。

表(3)-1 採集・解析したサンゴサンプルと遺伝子で判定した種組成

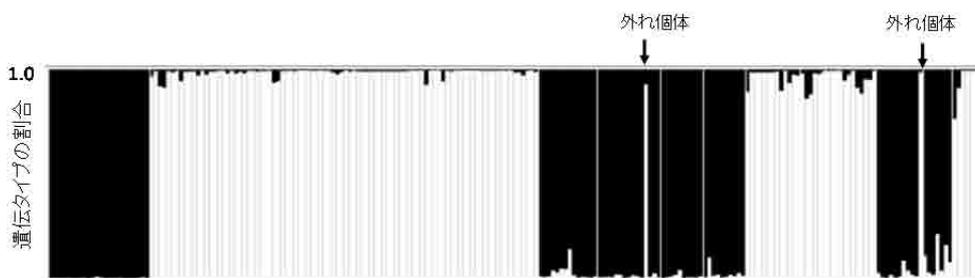
| sampling sites | N | E | 水深m | 底質 | ハナヤサイ | | | | アオサンゴ | | ミドリシ | |
|----------------|-----------|------------|------|----|-------|-------|------|-----------|-------|-----|------|------|
| | | | | | ホソエダ | ハナヤサイ | イボハダ | ヘラジカ/チリメン | sp | HGA | HCB | クシハダ |
| 網取pt2 | 24.347464 | 123.687286 | 2.5 | 岩 | | 1 | 0 | | 1 | | 0 | 0 |
| 網取pt9 | 24.341550 | 123.697431 | 13.0 | 岩 | | 0 | 0 | 5 | | | 0 | 0 |
| 網取pt5 | 24.331822 | 123.691519 | 10.0 | 岩 | | 0 | 0 | 5 | | | 0 | 0 |
| 網取pt8 | 24.329639 | 123.696056 | 13.0 | 岩 | | 2 | 0 | 14 | 4 | | 0 | 0 |
| 網取pt7 | 24.331531 | 123.702350 | 3.0 | 岩 | | 1 | 0 | 1 | | | 0 | 0 |
| 網取pt4 | 24.320331 | 123.704161 | 4.0 | 岩 | | 1 | 0 | 2 | | | 0 | 0 |
| west Hatoma Is | 24.473100 | 123.802717 | 4.7 | 岩 | | 0 | 0 | 8 | 13 | 1 | 1 | 6 |
| 西表クン | 24.421128 | 123.800039 | | | | | | | | | 0 | 0 |
| 西表ハナ | 24.420571 | 123.800629 | | | | 36 | 0 | | | | 0 | 0 |
| ユシングチ | 24.402406 | 123.888853 | 10.2 | 岩 | | 4 | 0 | 6 | 4 | 1 | 32 | 5 |
| カノカワ東浜 | 24.283253 | 123.745736 | 3.9 | 岩 | | 30 | 0 | 1 | 1 | 2 | 13 | 14 |
| ターヤグチ | 24.268158 | 123.830592 | 3.1 | 岩 | | 12 | 0 | 3 | 10 | | 22 | 9 |
| ハイミ 2013 | 24.246878 | 123.898586 | 4.0 | 岩 | | 1 | 1 | 6 | | | 0 | 13 |
| ハイミ 2014 | 24.246800 | 123.898650 | 4.0 | 岩 | | 5 | 0 | | | | 9 | 0 |
| 西表側斜面 2013 | 24.362378 | 123.948289 | 3.3 | 岩 | | 3 | 0 | | | | 0 | 7 |
| YT1 | 24.362603 | 123.949456 | 2.5 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| 西表側斜面 0713 | 24.363586 | 123.949225 | 1.6 | 岩 | | 6 | 0 | 7 | 4 | | 14 | 23 |
| 西表側斜面 0717 | 24.364494 | 123.949794 | 2.0 | 岩 | | 12 | 0 | 1 | 3 | | 14 | 4 |
| 西表側斜面 0721 | 24.365036 | 123.950006 | 3.0 | 岩 | | 1 | 0 | | | | 0 | 0 |
| 西表側斜面 0725 | 24.366353 | 123.950017 | 2.0 | 岩 | | | | | | 105 | 15 | 0 |
| 西表側斜面 0728 | 24.367706 | 123.950611 | 2.6 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| 西表側斜面 0829 | 24.368175 | 123.951111 | 4.6 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| 西表側斜面 1029 | 24.367383 | 123.951000 | 3.9 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| 西表側斜面 0113 | 24.364400 | 123.950067 | 7.1 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| YT3 | 24.356500 | 123.953872 | 13.0 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| YT4 | 24.354408 | 123.954042 | 5.0 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| YT5 | 24.353156 | 123.953858 | 5.0 | 岩 | | | | 6 | 1 | | 0 | 0 |
| YT5 0713 | 24.353072 | 123.953892 | 5.0 | 岩 | | 0 | 0 | 5 | 3 | 5 | 12 | 7 |
| YT5南 0717 | 24.351586 | 123.953594 | 5.0 | 岩 | | 12 | 0 | | | | 64 | 16 |
| YT4 0721 | 24.354547 | 123.954361 | 5.0 | 岩 | | | | | | | 9 | 8 |
| 小浜西斜面 0725 | 24.356500 | 123.954197 | 5.0 | 岩 | | | | 1 | | | 0 | 0 |
| 小浜西斜面 0829 | 24.349197 | 123.952517 | 5.0 | 岩 | | | | | | | 0 | 0 |
| 小浜西斜面 1029 | 24.355300 | 123.953917 | 5.0 | 岩 | | | | 27 | 1 | | 0 | 0 |
| 小浜西斜面 0728 | 24.363842 | 123.957275 | 5.0 | 岩 | | | | 1 | | | 14 | 0 |
| YT6 | 24.355144 | 123.960425 | 2.0 | 砂 | | | | | | | 0 | 0 |
| YT7 | 24.354342 | 123.957283 | 2.0 | 砂 | | | | | | | 0 | 0 |
| 小浜島西イノー 2013 | 24.353242 | 123.958336 | 2.0 | 砂 | | 19 | 0 | | | | 0 | 7 |
| 小浜島西イノー 0713 | 24.354317 | 123.959217 | 2.0 | 砂 | | 10 | 0 | | | | 0 | 12 |
| 小浜島西イノー 0717 | 24.354425 | 123.958889 | 2.0 | 砂 | | 20 | 0 | | | | 0 | 11 |
| 小浜島西イノー 0721 | 24.354422 | 123.958206 | 2.0 | 砂 | | 10 | 0 | | | | 0 | 0 |
| YT7 0725 | 24.353667 | 123.956983 | 2.0 | 砂 | | | | | | | 0 | 0 |
| YT6 0728 | 24.354942 | 123.960253 | 2.0 | 砂 | | | | | | | 0 | 0 |
| 小浜島西イノー 0829 | 24.352217 | 123.956858 | 1.2 | レキ | | | | | | | 0 | 0 |
| 小浜島西イノー 1029 | 24.355300 | 123.960250 | 2.0 | レキ | | | | | | | 0 | 0 |
| 小浜島北カヤマグチ | 24.360419 | 123.987464 | 4.6 | 砂 | | 0 | 0 | | | | 0 | 26 |
| 小浜島北東 | 24.349094 | 124.015056 | 1.9 | 砂 | | 39 | 0 | | | | 0 | 28 |
| シラマゲ西側 | 24.298308 | 123.981053 | 4.0 | 岩 | | 3 | 6 | 1 | | | 0 | 16 |
| シラマゲ東側 | 24.299458 | 123.988433 | 2.7 | 岩 | | 11 | 6 | 6 | 1 | 8 | 0 | 16 |
| ハナリ東 | 24.218922 | 123.941733 | 2.8 | 岩 | | 6 | 1 | | 8 | | 0 | 7 |
| ケングチ午前 | 24.222472 | 124.030056 | 6.9 | 岩 | | 6 | 0 | 2 | 2 | | 0 | 10 |
| ケングチ午後 | 24.222811 | 124.029750 | 5.1 | 岩 | | 4 | 0 | 6 | 3 | | 0 | 70 |
| 黒島-新城島間大型離礁 | 24.257561 | 123.967978 | 3.6 | 岩 | | 11 | 0 | 6 | 2 | 1 | 0 | 8 |
| 黒島さらけ北 | 24.286167 | 124.004119 | 3.0 | 岩 | | 1 | 0 | 9 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 黒島北方 | 24.279806 | 124.008308 | 2.6 | 岩 | | 1 | 0 | 4 | 15 | 2 | 0 | 1 |
| ウラビシ | 24.266269 | 124.027519 | 0.5 | 岩 | | 3 | 1 | 12 | 7 | 1 | 0 | 0 |
| シモビシ | 24.304450 | 124.044158 | 3.0 | 岩 | | 2 | 0 | 11 | 2 | 1 | 0 | 4 |
| タキドングチ | 24.334886 | 124.061939 | 3.9 | 岩 | | 14 | 1 | 6 | | | 0 | 3 |
| カタグア | 24.271225 | 124.092294 | 1.0 | 岩 | | 0 | 0 | 13 | 4 | | 0 | 1 |
| ウーロー 2013 | 24.258806 | 124.130844 | 3.3 | 岩 | | 2 | 4 | 6 | 5 | | 0 | 21 |
| ウーロー 2014 | 24.257733 | 124.130694 | 3.3 | 岩 | | 9 | 0 | | | | 0 | 14 |
| 名蔵大橋 | 24.403797 | 124.120464 | 4.0 | 砂 | | 26 | 0 | 2 | | | 0 | 28 |
| 名蔵カード | 24.386097 | 124.122203 | 3.3 | 岩 | | 10 | 0 | 18 | 1 | | 0 | 0 |
| サクラグチ 2013 | 24.317633 | 124.161508 | 4.6 | 岩 | | 1 | 4 | | 1 | 1 | 0 | 3 |
| サクラグチ 2014 | 24.319636 | 124.162486 | 4.6 | 岩 | | 7 | 1 | 34 | 12 | 1 | 0 | 29 |
| 森りーフ内 | 24.395097 | 124.257792 | | | | 19 | 0 | | 1 | | 0 | 0 |
| 轟スロープ | 24.398411 | 124.265083 | | | | 1 | 3 | | 2 | 4 | 0 | 0 |
| 明石礁池内 | 24.546611 | 124.311783 | | | | 19 | 1 | | | | 0 | 0 |
| 明石スロープ | 24.544783 | 124.319061 | | | | 3 | 0 | | 3 | | 0 | 0 |
| 平久保 | 24.589233 | 124.297142 | 3.8 | 岩 | | 0 | 0 | 3 | 12 | | 0 | 17 |
| 赤崎 | 24.551181 | 124.284758 | 1.2 | 砂 | | 5 | 0 | | | | 0 | 1 |
| 栄 | 24.516228 | 124.251069 | 6.0 | 砂 | | | | | | | 0 | 1 |
| 野底 | 24.512336 | 124.236558 | 4.0 | 岩 | | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 3 |
| 合計 | | | | | | 389 | 29 | 240 | 118 | 41 | 260 | 327 |
| | | | | | | | | | | | 436 | 263 |

2) アオサンゴ類の遺伝子による種の同定 (遺伝子および生殖時期による生殖隔離の確認) と集団遺伝解析、共生褐虫藻の多様性の解析

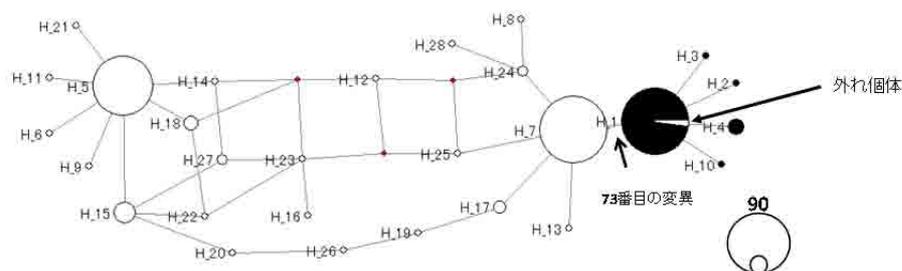
a アオサンゴの種同定 (遺伝子解析) :

マイクロサテライトおよび ITS2 およびミトコンドリア領域において、アオサンゴのタイプ同定が出来るかどうかを 226 群体について調べた結果、ミトコンドリア領域は 1 塩基も変異がなく 2 タイプの区別はおろか、多型性を見つけることが出来なかった。特にミトコンドリア領域の進化速度が遅いことで知られる刺胞動物の中でも八放サンゴ類は特に遅いことが知られているため、進化速度が遅いことが原因で近縁タイプの区別が出来なかったと考えられた。一方 219bp かな

る ITS2 領域ではマイクロサテライト領域と合致するデータが得られた。HC-A タイプと HC-B タイプは基本的にハプロタイプを共有しておらず、ITS2 における 73 番目の塩基がシトシン(C)かチミン(T)であるかによって 2 タイプが区別できることがわかった(図(3)-2)。さらに、ITS2 領域において、2 つのタイプ HC-A と HC-B では遺伝的多様性が著しく異なることがわかった。HC-A は塩基多様度が 0.0008 であるのに対し、HC-B は 0.0140、ハプロタイプ多様度も同様に HC-A は 0.162 であるのに対して HC-B は 0.669 であった。マイクロサテライト領域では 2 タイプの間でほとんど遺伝的多様性に差が見られなかったことから、ITS2 領域は何らかの環境要因によって多様性が制御されており、2 タイプが独自の進化を遂げていることが明らかとなった(Yasuda et al. 2015 において詳細を報告)。



マイクロサテライトによるクラスタリング解析結果: 横軸は個体で縦軸は推定祖先遺伝子型で黒がHC-Aに、白がHC-Bに該当。ほとんど全ての個体が90%以上の割合でHC-A(黒)かHC-B(白)どちらかのタイプに分類される



ITS2によるハプロタイプネットワーク: 円は異なる遺伝子型を示し、円の大きさは遺伝子型が見つかった頻度を示す。マイクロサテライト解析で推定されたHC-A(黒)およびHC-B(白)に塗り分けた結果。73番目の変異を基準で、HC-AとHC-Bが区別できる。(マイクロサテライト解析と合致しなかったのは外れ個体のみ)

図(3)-2 アオサンゴのタイプ判別のためのマイクロサテライト(上)および ITS2 領域解析

b アオサンゴの種における生態学的な違いの検出 (野外調査および生殖細胞の観察) :

野外観察による保育時期の特定

2014 年に石西礁湖周辺海域の 6 地点において、野外観察した結果、HC-A タイプは、今回の調査地点と時期においては幼生保育や幼生放出行動を観察することはできなかった。一方、HC-B タイプでは各地点において、幼生保育行動が観察された。ヨナラ水道 (Yn) では、2014 年 7 月 21 日、25 日、28 日に幼生保育行動が観察された。それ以外の石西礁湖各地では、2014 年 7 月 15 日 (ターヤグチ (Ty)) および 2014 年 7 月 19 日 (ケングチ (Kn)、ウーロー (Ur)、シモビシ (Sm)、黒島新城間大型礁 (Kr)) でそれぞれ幼生保育行動を行っているのを確認した。アオサンゴがロゼッタ状のポリプを精力的に伸張する幼生保育行動を開始してから幼生放出を開始するまで約 6 から 14 日かかることから^{13, 14)}、ヨナラ水道周辺はでそれ以外の地点よりも 1 週間程度

の幼生保育の開始が遅かった可能性はあるものの、石西礁湖周辺海域のアオサンゴ B タイプは、概してほぼ同時に 7 月中旬から下旬にかけて幼生保育を行うと考えられた。

石西礁湖周辺各地において、タイプ B では小潮から大潮までの間に幼生保育していた。今回の観察では、幼生放出の瞬間は捉えられなかったため、幼生放出のタイミングと潮汐との直接的な関係は不明であるが、大潮時に幼生放出直前の群体が観察されたため 2014 年では大潮前後であった可能性が高い。

c 組織観察

卵母細胞の月別の平均長径値は、A タイプでは、B タイプよりもやや小さいながら 2014 年 6 月初旬に最大 (505 μm (標準偏差 386)) となり、次の採集時 (2014 年 7 月 13 日) には消失していた。A タイプで最も大きかった卵母細胞の長径は、ヨナラ水道で採集された群体の 1250 μm (2014 年 6 月 5 日採集) であった。B タイプでは、2014 年 7 月下旬に最大 (990 μm (標準偏差 123)) となり、次の採集時 (2014 年 8 月 29 日) には消失していた。また、B タイプで最も大きかった卵母細胞の長径は、ヨナラ水道で採集された群体の 1200 μm (2014 年 7 月 25 日採集) であった。一方、精巣の月別の平均長径値は、A タイプでは、2014 年 6 月初旬に最大 (331 μm (標準偏差 69)) となり、次の採集時 (2014 年 7 月 13 日) には消失していた。B タイプでは、2014 年 7 月下旬に最大 (353 μm (標準偏差 73)) となり、次の採集時 (2014 年 8 月 29 日) には消失していた。最も大きかった精巣の長径は、両タイプともにヨナラ水道で採集された 2014 年 6 月 5 日の群体 (A タイプ) と 2014 年 7 月 13 日の群体 (B タイプ) であり、その長さは両タイプともに 450 μm であった。

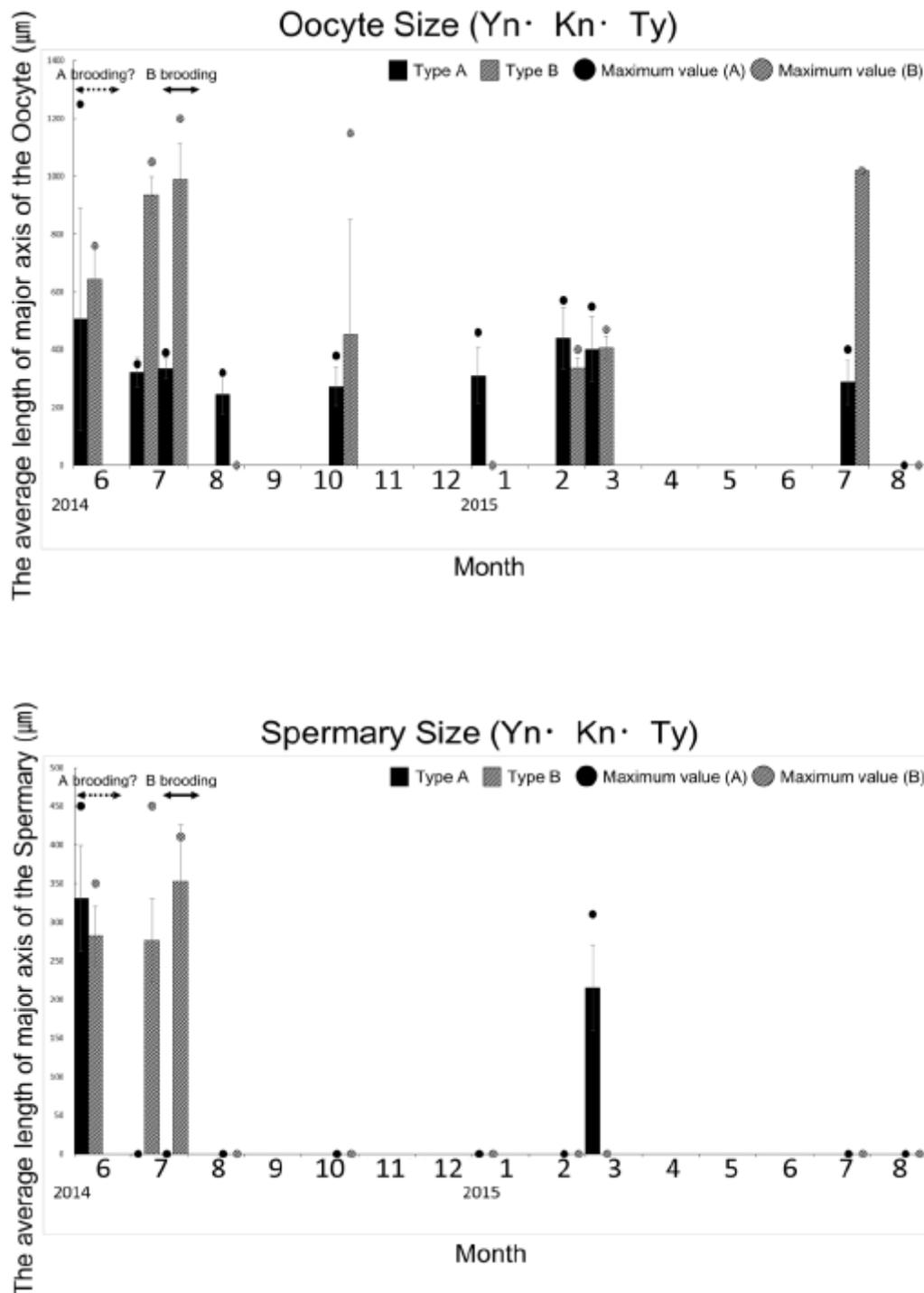
また、実体顕微鏡を用いた各生殖細胞の観察より、アオサンゴ 2 タイプとも、幼生保育時期のそれぞれの生殖細胞は、おおよそ卵母細胞では長径と短径が 2:1 の楕円形に、精巣では長径と短径が 1:1 の円形になることがわかった。組織切片観察では、核酸はヘマトキシリンに細胞はエオジンに染まり、卵母細胞と精巣の有無を確認できた。組織標本の実体顕微鏡観察では生殖細胞を確認できなかった標本のうち、5 サンプル (A タイプ: 2014 年 6 月 5 日 2 サンプルと 8 月 29 日 1 サンプル、B タイプ: 2014 年 7 月 28 日 1 サンプルと 2015 年 1 月 13 日 1 サンプル) は組織切片の観察によって卵母細胞ないし精巣を確認することができた。

d アオサンゴ A タイプおよび B タイプの周年の石西礁湖における生殖周期

組織切片の観察により精巣は、A タイプでは 6 月初旬に、B タイプでは 7 月下旬に、それぞれ平均 331 μm (標準偏差 69) および 353 μm (標準偏差 73) の発達した精巣が確認されてから、両タイプともに 1 ヶ月以内に消失しており、放精したと考えられた (図(3)-3)。その後精巣は、両タイプともに 2015 年 2 月までは全く見つからなかったが、2015 年 3 月に A タイプのみで平均 215 μm (標準偏差 55) の精巣が見つかった。

それに対し卵母細胞では、A タイプでは 6 月初旬に、B タイプでは 7 月下旬に、それぞれ平均 505 μm (標準偏差 386) および 990 μm (標準誤差 37) の発達した卵母細胞が観察された。A タイプでは、最大径 (1250 μm) を記録した 2014 年 6 月 5 日から約 1 ヶ月後の 2014 年 7 月 17 日には平均 322 μm 程度の小さい卵母細胞が観察された。その後 2015 年 1 月くらいまで平均 244–350 μm 程度の卵母細胞が観察された後、2015 年 2 月 3 日には平均 440 μm 程度まで発達した。B タイプでは、最大径 (1200 μm) を記録した 2014 年 7 月 25 日の約 3 ヶ月後の 2014 年 10 月 29 日には平均 452 μm 程度の卵母細胞が観察された。その後やや小さい平均 337–406 μm 前後の大きさの卵母

細胞が2月と3月に観察された。本研究の1年を通じた組織の観察により、石西礁湖周辺に生息するアオサンゴのAタイプは6月に、Bタイプは7月に放精・幼生保育を行っていると思われる。



図(3)-3 アオサンゴの生殖時期の推定(上が卵細胞、下が精細胞のサイズの時系列変化) HC-A が黒、HC-B が灰色で示されており、HC-A の生殖時期が HC-B よりも約1ヶ月早いことが示唆された。

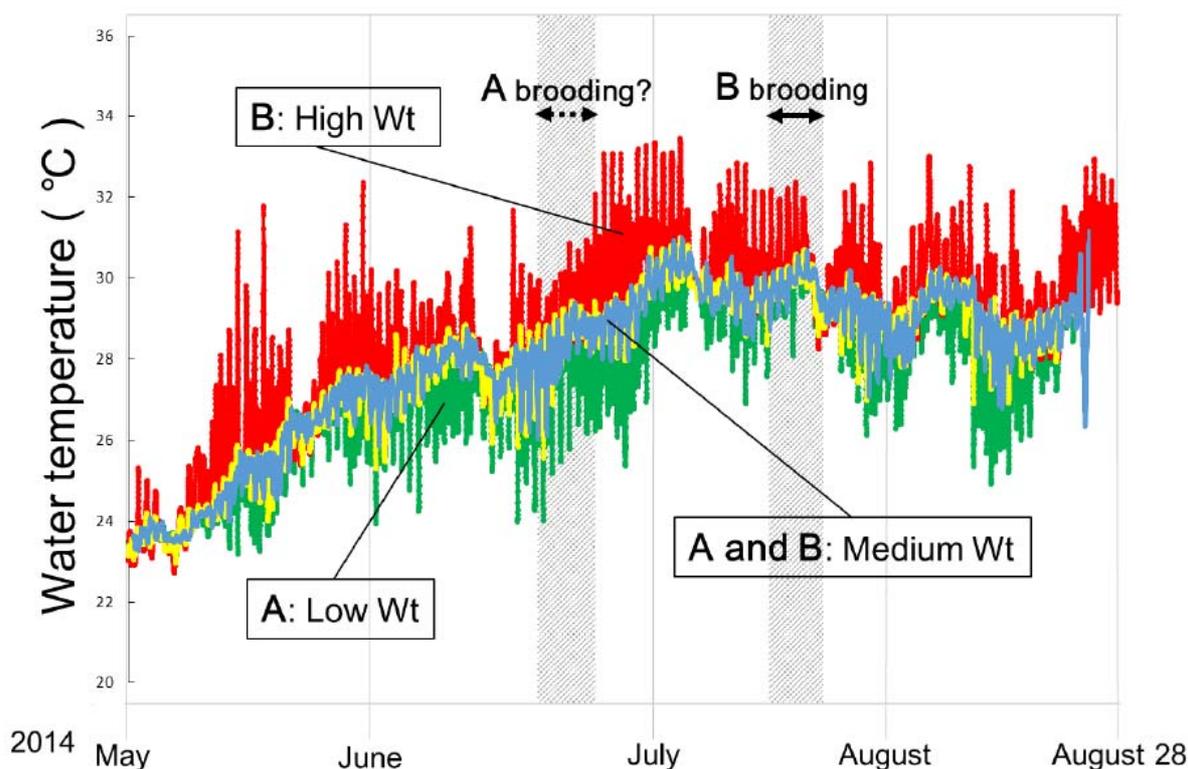
e ヨナラ水道付近の異なるタイプが生息する場所における水温の経時変化

各地点の水温結果から、Aタイプのみが生息する場所は最高水温が比較的低温（30.2℃、7月中旬）に、Bタイプのみが生息する場所は最高水温が比較的高かった（34.1℃、7月上旬から中旬）。2タイプが同所的に分布する場所の最高水温は（31.0℃、7月中旬）で、各タイプのみが生息する水温の間をとるような中間的水温で推移していたことがわかった（図(3)-4）。最低水温はどの地点も水温の測定を始めた5月上旬の22.8℃であった。

標本の採集地点に設置した水温計の計測結果とアオサンゴ2タイプの幼生保育時期を比較したところ、今回Aタイプでは28℃前後の時期に、Bタイプでは30℃前後の時期に放精および幼生保育を行っていたと推定された。

本研究で水温計を設置したヨナラ水道のAタイプとBタイプそれぞれが同所的に生息する場所は互いが500m以内しか離れておらず、浮遊期が短いアオサンゴ幼生（数時間から12日程度、¹⁵⁾）であっても十分に幼生の行き来が物理的には可能であろう範囲にある（中村ら未発表データ）。それにも関わらず水温環境の大きく異なる場所でそれぞれAタイプとBタイプが異所的に分布することから、2タイプが生息するための最適水温は異なっている可能性が考えられた。2タイプの存在が認識される以前には、アオサンゴは主として生息できるのは最低水温の平均が22℃以上の海域であり、28–29℃が最適水温であると報告されている¹⁶⁾。また、同時に過去の気候変動でアオサンゴの分布は大きく変わってきたことから、アオサンゴは耐性のある水温帯の幅が他のサンゴよりも狭いことが指摘されている¹⁶⁾。最高水温は、Bタイプのみが生息する場所（34℃）は、Aタイプの生息が確認できる場所（31℃）よりも高く、Bタイプの方がより高温耐性を持っている可能性がある。大規模なアオサンゴ群落がみられる石垣島東岸の白保海域では、1998年に多くのサンゴで高温白化現象が見られた際、アオサンゴは最も被害が小さく、高温耐性が最もある種であると報告されているが¹⁷⁾、この白保礁内のアオサンゴは全てタイプBに該当する¹⁾。逆に低温耐性については、本研究では冬季の水温を計測していないため不明であるが、現在までにおけるタイプBの北限生息域が宮古島¹⁾であるのに対し、Aタイプはさらにずっと北の屋久島まで見つかっている（安田未発表データ）。このことから、AタイプはBタイプよりも低温耐性に優れている可能性がある。アオサンゴの2タイプの分布が水温にどの程度支配されるかを明らかにするためには、さらに今後室内実験等で個々のタイプの水温耐性を調べていく必要がある。

AタイプとBタイプでは放精および幼生保育行動を行う時期の水温も、Aタイプでは28℃前後、Bタイプでは30℃前後と約2℃異なっていると推定された。海洋無脊椎動物の幼生や配偶子の放出時期は、幼生の最適水温にあわせて行われることが多い¹⁸⁾ため、AタイプとBタイプの幼生に最適水温の違いがあるかどうかは興味深い。ミドリイシ属サンゴでは、水温や光の影響で生殖細胞の成熟や幼生保育が促されている。アオサンゴでも同様の機構がはたらいっている可能性があり、今後さらに水温以外の因子が関与している可能性も考えられるため、今後水温以外の流速・塩分・日射などの環境要因との関係を調べていく必要がある。



図(3)-4 HC-Aのみ、HC-Bのみ、AとB両方、が生息する3地点における産卵時期の水温変化
 HC-Aのみの場所では、HC-Bのみの場所よりも全体的に水温が低く、AとB両方がいる場所では
 中間的な水温変化を示した

f アオサンゴの2種の分布：

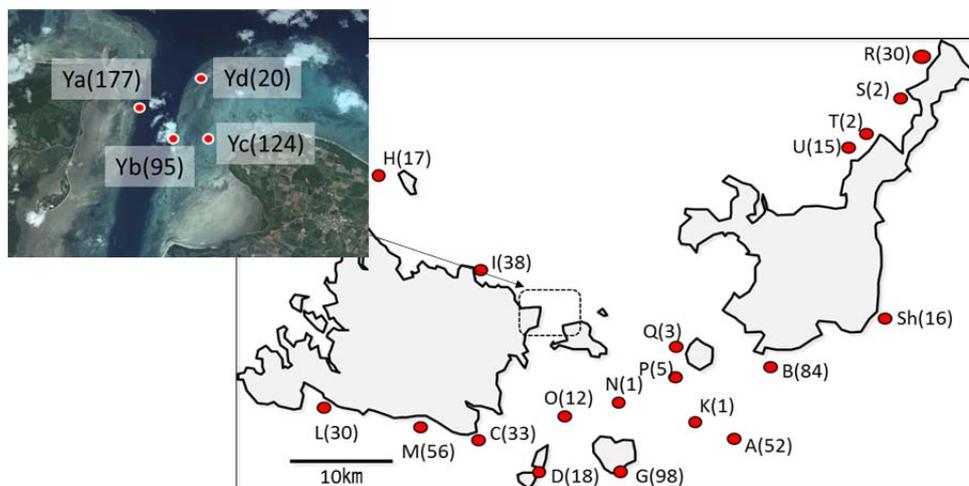
ソフトウェア STRUCUTERE を用いたマイクロサテライト遺伝子座によるクラスタリング解析の結果、石西礁湖内における HC-A と HC-B2 種の分布が明らかとなった。今回調べた範囲では、石西礁湖周辺海域においてアオサンゴの HC-A は西表島周辺に集中しており、HC-B はより広範囲に分布していることがわかった(図(3)-5)。

以後は HC-A と HC-B は生態学的にも異なる生殖隔離された別種として扱い、個々のタイプにおける遺伝構造を推定した。

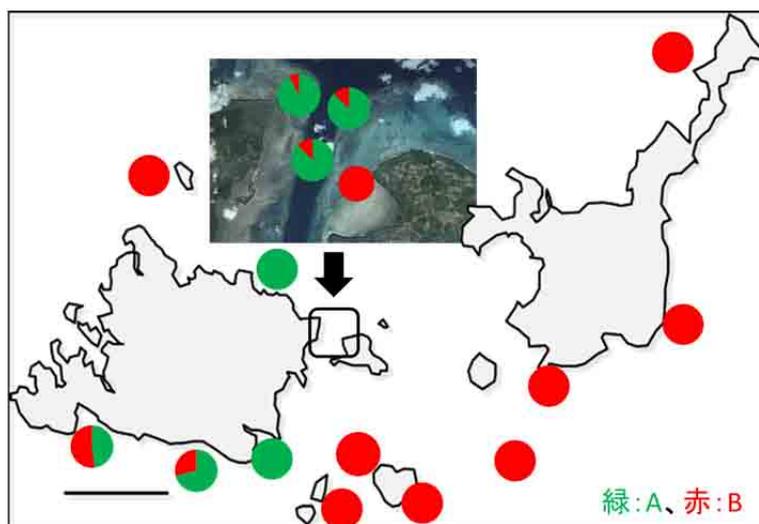
HC-A と HC-B においてタイプごとにひとつのグループとして AMOVA 解析を行った結果、HC-A と HC-B の間は遺伝分化係数 F_{CT} が $0.301(P<0.001)$ となり、それぞれのグループ内における分散は F_{SC} が $0.136(P<0.001)$ であることがわかった。このことから、アオサンゴではタイプ間の遺伝的違いが大きいと同時に、それぞれのタイプ内においても強い遺伝構造を持っていることがわかった。すなわち、アオサンゴではそれぞれの集団の独立性が全般的に高く、幼生分散が限られていることが示唆された。

アオサンゴの集団において、5 遺伝子座を用いた集団におけるクローン率の推定を行ったところ、地点によってクローン率が大きく異なっていることがわかった(図(3)-6)。クローンの割合が高い地点は石西礁湖の南側およびヨナラ水道の一部の場所において高くなっていた。こうした地点

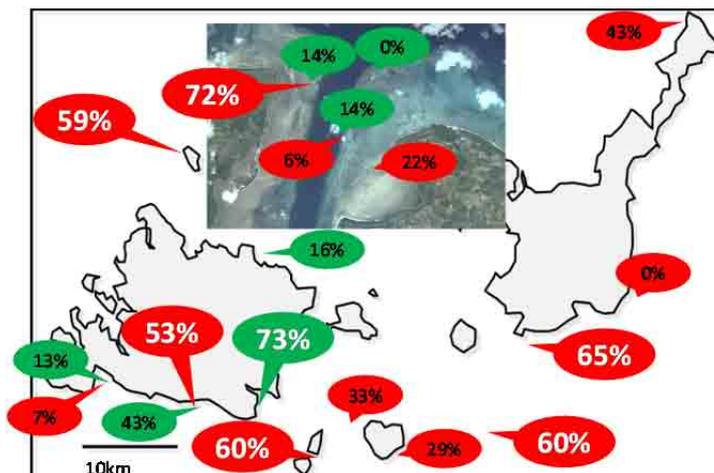
は、サンゴの群体数や被度がたとえ高かったとしても遺伝的多様性は低く、有性生殖による加入があまりうまくいっていない可能性があるため、クローン率が高い集団と比較して脆弱であることが推定された。



アルファベットは地点名を示し、その右のカッコ内の数字は採集体数を示す。



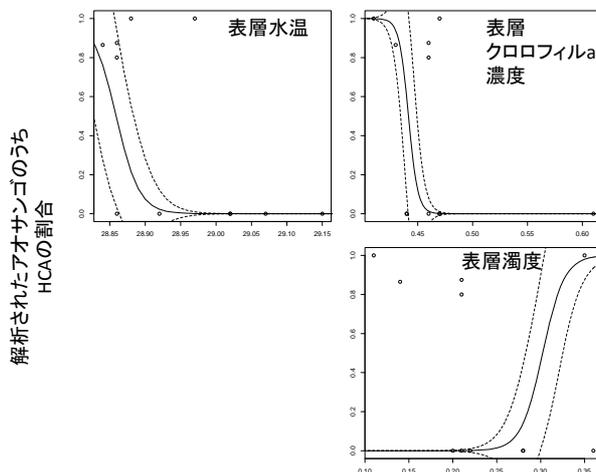
図(3)-5 採集できたアオサンゴとアオサンゴの2タイプの石西礁湖内における分布（緑が HC-A で赤が HC-B）



図(3)-6 アオサンゴ HC-A(緑)および HC-B (赤) のそれぞれの地点におけるクローン率
50%以上の高いクローン率の集団を白い数字で示した。

g アオサンゴ 2 タイプの分布と環境要因：

アオサンゴ 2 タイプの分布の割合を説明する環境要因を推定した結果、表層水温、表層クロロフィル *a* 量、表層濁度の 3 要因が分布と関連していることが AIC によるモデル推定で明らかとなった(図(3)-7)。HC-A は、表層水温がより低く、表層クロロフィル *a* 濃度がより低く、濁度が高い場所を好み、HC-B は水温がより高く、表層クロロフィル *a* 濃度が高く、濁度が低い場所をより好んで分布していることが明らかとなった。



図(3)-7 アオサンゴの A 種と B 種の分布を説明する環境変数

h アオサンゴの集団遺伝解析：

遺伝分化係数 F_{ST} による遺伝構造の算出

アオサンゴのペア集団間における遺伝分化係数を算出するために、それぞれのタイプに分けて pairwise F_{ST} を算出した。その結果、HC-Aでは、隣あわせのヨナラ水道の地点 (ybとyd) 西表北と

石垣東等々力川集団 (iとTi) 以外の全ての地点で有意な集団分化が見られた。HC-Bでも同様にほぼ全ての集団間で有意な集団分化が検出されたが、石垣島南西、石西礁湖の南東側の海域では集団間の遺伝分化係数が比較的小さく、幼生分散によるconnectivityが強いことがわかった(表(3)-2)。

表(3)-2 石西礁湖周辺海域のアオサンゴのタイプHC-A(上)およびHC-B(下)のペア集団間の F_{ST} 太字は $P<0.05$ 、下線は <0.01

HC-A

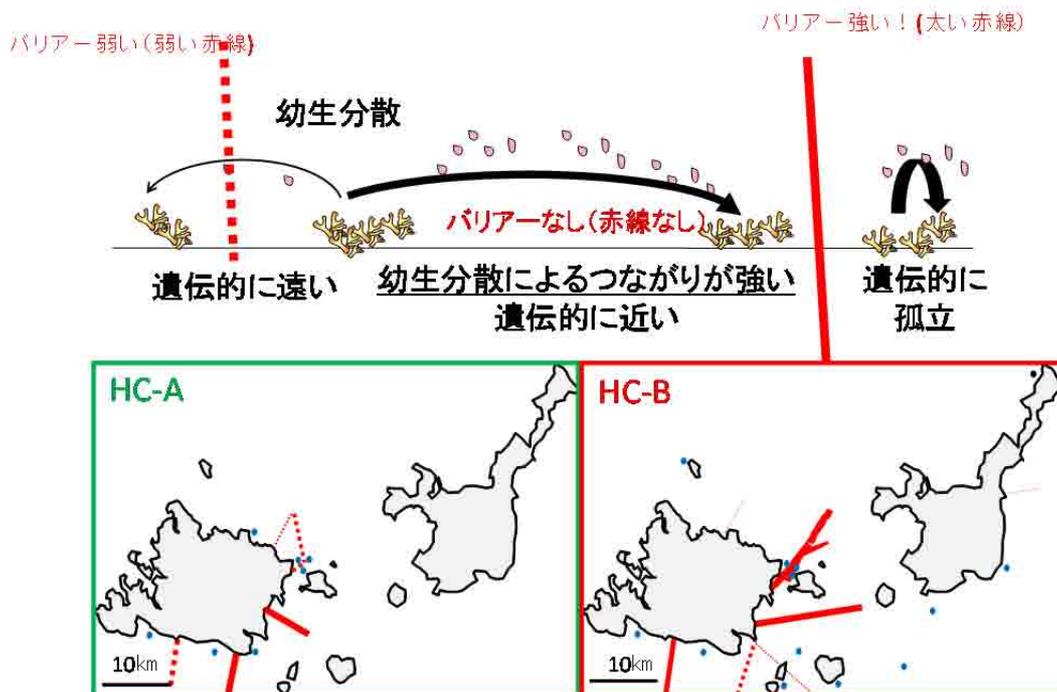
| | AHC | SHCc | SHCi | SHCIA | SHCmA | SHCYa | SHCYb | SHCYd | Ti | Tm |
|-------|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| AHC | 0 | <0.001 |
| SHCc | 0.360 | 0 | <0.001 |
| SHCi | 0.226 | 0.088 | 0 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.271 | <0.001 |
| SHCIA | 0.196 | 0.250 | 0.131 | 0 | <0.001 | 0.005 | 0.006 | 0.006 | <0.001 | <0.001 |
| SHCmA | 0.080 | 0.252 | 0.131 | 0.089 | 0 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.004 |
| SHCYa | 0.204 | 0.133 | 0.047 | 0.042 | 0.101 | 0 | <0.001 | <0.001 | 0.009 | <0.001 |
| SHCYb | 0.272 | 0.245 | 0.174 | 0.034 | 0.155 | 0.054 | 0 | 0.333 | <0.001 | <0.001 |
| SHCYd | 0.317 | 0.261 | 0.174 | 0.052 | 0.177 | 0.057 | 0.006 | 0 | <0.001 | <0.001 |
| Ti | 0.245 | 0.110 | 0.009 | 0.129 | 0.114 | 0.044 | 0.185 | 0.176 | 0 | <0.001 |
| Tm | 0.103 | 0.286 | 0.174 | 0.142 | 0.033 | 0.152 | 0.209 | 0.226 | 0.161 | 0 |

HC-B

| | Sh | SHCa | SHCb | SHCd | SHCe | SHCh | SHCIb | SHCmB | SHCo | SHCr | SHCYaB | SHCYbB | SHCYc |
|--------|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Sh | 0 | <0.001 |
| SHCa | 0.102 | 0 | 0.026 | <0.001 | 0.254 | <0.001 | 0.013 | <0.001 | 0.036 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCb | 0.068 | 0.024 | 0 | <0.001 | 0.002 | <0.001 | 0.086 | <0.001 | 0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCd | 0.197 | 0.148 | 0.134 | 0 | <0.001 |
| SHCe | 0.099 | 0.004 | 0.026 | 0.186 | 0 | <0.001 | 0.002 | <0.001 | 0.008 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCh | 0.245 | 0.160 | 0.119 | 0.218 | 0.130 | 0 | 0.024 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCIb | 0.087 | 0.038 | 0.015 | 0.118 | 0.043 | 0.054 | 0 | 0.004 | 0.005 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCmB | 0.214 | 0.178 | 0.153 | 0.206 | 0.172 | 0.215 | 0.077 | 0 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCo | 0.227 | 0.049 | 0.085 | 0.149 | 0.056 | 0.228 | 0.089 | 0.186 | 0 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCr | 0.186 | 0.135 | 0.118 | 0.383 | 0.082 | 0.195 | 0.135 | 0.345 | 0.338 | 0 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| SHCYaB | 0.145 | 0.109 | 0.107 | 0.209 | 0.089 | 0.148 | 0.096 | 0.168 | 0.128 | 0.236 | 0 | <0.001 | <0.001 |
| SHCYbB | 0.296 | 0.196 | 0.239 | 0.309 | 0.173 | 0.259 | 0.255 | 0.385 | 0.283 | 0.278 | 0.206 | 0 | 0.045 |
| SHCYc | 0.209 | 0.160 | 0.184 | 0.255 | 0.145 | 0.210 | 0.198 | 0.317 | 0.219 | 0.233 | 0.132 | 0.022 | 0 |

空間遺伝構造を調べるバリアー解析を行った結果、HC-AおよびHC-Bに共通してヨナラ水道の東西および石西礁湖の南北にわたるラインが特に強く存在することがわかった。

本研究により強いバリアーが検出された海域間は、基本的に幼生分散が限られているため、別々の保全管理区域として扱うことが適切であると考えられた。アオサンゴでは後述する別のサンゴと比較して最も強いバリアーが存在しており、保全管理区域の細部を設定する際に有力な情報を提供できることがわかった(図(3)-8)。



図(3)-8 アオサンゴにおける遺伝障壁バリアー解析の結果（アオ丸が採集・解析地点、隣り合わせの集団の遺伝距離が大きいほど赤線の太さが太く記されている）

i アオサンゴ群および着定板についての稚サンゴ個体の起源推定解析：

それぞれの集団におけるサンゴがどの海域に由来するかを明らかにし、どの集団からどの集団に向かって幼生が供給されているのか、どの程度自己加入ないし他海域からの加入が起こっているのかを推定するためにGeneClassを用いた群体ごとの起源推定を行った。その結果、アオサンゴにおいて自己加入率は地点によって大きく異なっていた。地点としては西表島の南側のターヤグチ(SHCmA、図(3)-5のMに該当)、石垣島の北(SHCr、R)、ハナリ(SHCd、D)、黒島と新城の間の離れ礁(SHCo、O)、ハイミ(SHCc、C)などにおいて70%以上の高い自己加入率が検出され、これらの海域では個々の集団の孤立性が高いことが推定された(表(3)-3)。逆に、HC-Bにおける石垣島の南西海域であるウグチ(SHCa、A)やサクラグチ(SHCb、B)においては、他の海域からの加入によって集団が形成されている割合が高く、ウグチはさらにその下流域への供給量も多いことがわかった。これらの海域の供給源は海流の上流側である白保周辺である。このことから、上流側に位置する白保海域は幼生を供給するソースとして、ウグチは石西礁湖南部の集団を幼生分散によってつなぐ中継地点として、重要な役割を果たしていることがわかった。サクラグチやウグチなどの海域は石垣島の人口密度の高い場所から赤土や栄養塩などが流れ出ることもわかっており（サブテーマ1、2）こうした陸源負荷を小さくするとともに、上流域である白保などのソース海域を保全することが重要であることが考えられた。

西表島側の海域は、 F_{ST} 解析やバリアー解析でも明らかになったように、島の南側と北側の間にはほとんど幼生分散による繋がりはなく、北側は北側で、南側は南側で独立していることがわかった。

次に1世代あたりの幼生分散を調べるために、2015年に着定板から回収できたアオサンゴ幼生の起源を調べた。アオサンゴAとBの両方がいる地点であったにもかかわらず、回収できた個体は全てA種であった。B種の方が産卵期は7月末と約1ヶ月遅いため、B種が採集できなかった理由としてはハビタットがすでにA種に占有されてしまっていた、ないし7月末の台風時に、B種は着定直後だったために着定が不完全ではがれてしまった等の理由が考えられた。

採集された個体の起源は、ユシングチ、ターヤグチ、ヨナラ水道ともに自己加入が見られたが、ユシングチでは半分以上が周辺の海域から来ていることが分かった。それに対し、ターヤグチでは東西からの加入がわずかにあるだけであった。今回の着定板についての幼生の遺伝子型から、1世代で加入するアオサンゴは主に10km範囲以内の海域に限られており、幼生分散の距離が非常に限られていることが明らかとなった。

表(3)-3 各アオサンゴ群体の起源推定解析の結果。HC-A（上）、HC-B（下）グレーで示されたセルは自己加入に相当する場所

HC-Aの集団における起源推定

| 加入先 | クローン率 | 供給源 | 西表南 | ユシン | カノカワ | ターヤグチA | ヨナラ西表 | ヨナラ小浜 | ヨナラ小浜北 | 外から加入 | 自己加入率 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | 東ハイミ | SHCi | SHCIA | SHCmA | SHCYa | SHCYb | SHCYd | | |
| 西表南 | 0.73 | SHCc | 7 | 1 | | | 1 | | | 0.222 | 0.778 |
| 東ハイミ | | | | | | | | | | | |
| ユシン | 0.16 | SHCi | 3 | 21 | | | 2 | | | 0.344 | 0.656 |
| カノカワ | 0.13 | SHCIA | | | 4 | | 1 | 2 | 3 | 0.692 | 0.308 |
| ターヤグチA | 0.43 | SHCmA | | | | 1 | 15 | 2 | | 0.136 | 0.864 |
| ヨナラ西表 | 0.14 | SHCYa | 4 | 26 | 2 | | 2 | 31 | 17 | 0.708 | 0.292 |
| ヨナラ小浜 | 0.14 | SHCYb | 3 | 1 | 4 | | 1 | 2 | 28 | 0.563 | 0.438 |
| ヨナラ小浜北 | 0.00 | SHCYd | | | 2 | | | | 6 | 0.571 | 0.429 |
| | | ばら撒き率 | 0.588 | 0.571 | 0.692 | | 0.318 | 0.279 | 0.533 | 0.885 | |
| ユシン着定板 | 0.00 | Ti | 1 | 4 | | | 1 | 4 | | 0.636 | 0.364 |
| ターヤグチA着定板 | 0.03 | Tm | 1 | | 4 | | 29 | | | 0.147 | 0.853 |
| ヨナラ着定板 | 0.00 | Ty | | | | | | 1 | | 0.000 | 1.000 |

HC-Bの集団における起源推定

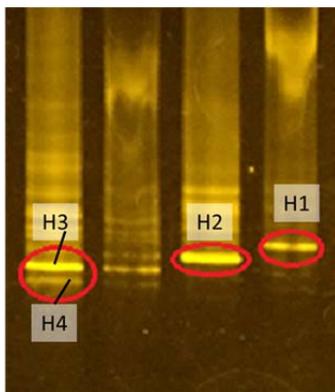
| 加入先 | クローン率 | 供給源 | 白保 | ウーグチ | サクラグチ | ハナリ新城 | ケングチ | 鳩間 | カノカワ | ターヤグチ | 黒島新城間 | 石垣の北 | ヨナラ西表側 | ヨナラ北小浜 | 小浜礁内 | 外から加入 | 自己加入率 |
|--------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|
| | | | Sh | SHCa | SHCb | SHCd | SHCg | SHCh | SHCIB | SHCmB | SHCo | SHCr | SHCYaB | SHCYbB | SHCYc | | |
| 白保 | 0.000 | Sh | 10 | 1 | 1 | | | | | | | 1 | 1 | | | 0.333 | 0.667 |
| ウーグチ | 0.596 | SHCa | 2 | 2 | 4 | | 2 | | | | | 6 | 3 | | 1 | 0.905 | 0.095 |
| サクラグチ | 0.655 | SHCb | 4 | 2 | 13 | | 2 | | | | | 5 | 1 | 2 | | 0.552 | 0.448 |
| ハナリ新城 | 0.611 | SHCd | | 1 | | 6 | | | | | | | | | | 0.143 | 0.857 |
| ケングチ | 0.286 | SHCg | 1 | 9 | 6 | 3 | 21 | 2 | 1 | | | 8 | 9 | 4 | 3 | 0.700 | 0.300 |
| 鳩間 | 0.588 | SHCh | | | | | | 2 | 2 | | | | 2 | | | 0.714 | 0.286 |
| カノカワ | 0.067 | SHCIB | | | 3 | | | 1 | 5 | 2 | | | 1 | 1 | 1 | 0.643 | 0.357 |
| ターヤグチ | 0.526 | SHCmB | | | | | | 1 | 1 | 6 | | | 1 | 1 | | 0.333 | 0.667 |
| 黒島新城 | 0.333 | SHCo | 2 | | | | | | | | 6 | | | | | 0.250 | 0.750 |
| 石垣の北 | 0.433 | SHCr | | | | | | 1 | | | | 15 | | | 1 | 0.118 | 0.882 |
| ヨナラ西表側 | 0.722 | SHCYaB | 1 | | 1 | | 1 | | | | | 1 | | | 1 | 0.333 | 0.667 |
| ヨナラ北小浜 | 0.059 | SHCYbB | | | | | 1 | | | | | 1 | | 9 | 5 | 0.438 | 0.563 |
| 礁斜面 | 0.218 | SHCYc | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | | | | | 5 | 5 | 31 | 47 | 0.515 | 0.485 |
| 小浜礁内 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 供給源としての役割 | 0.524 | 0.882 | 0.552 | 0.455 | 0.276 | 0.714 | 0.444 | 0.231 | 0.786 | 0.605 | 0.600 | 0.791 | 0.203 | | |

j アオサンゴの共生褐虫藻の解析：

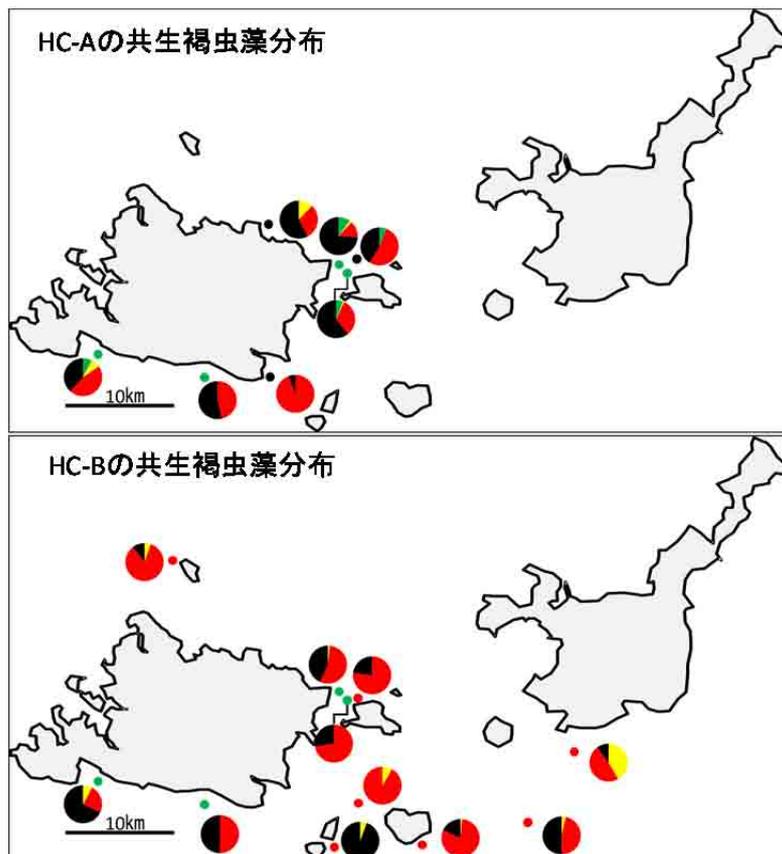
サンゴと共生する褐虫藻は、サンゴ内で光合成を行いサンゴの栄養を作るほか、高温ストレスなどで共生関係が崩れることでサンゴが死滅する可能性があるため重要である。1 群体のサンゴ内には複数の遺伝子型の褐虫藻が共生している。褐虫藻の遺伝子型が異なることによってサンゴの生存特性が変化する可能性があるため、アオサンゴの共生褐虫藻の遺伝子型組成を調べた。

PCR-DGGE 法により合計 4 種類の褐虫藻遺伝子型が見つかった(図(3)-9)。シーケンズにより 4 種類の褐虫藻遺伝子型の配列を調べ、NCBI の BLAST 検索を行った結果、C3 と 6 塩基違いのユニ

ークな遺伝子型(図(3)-9 中、H1)、C3(図(3)-9 中 H2)、C1(図(3)-9 中 H3)、C1 と 3 塩基違いのユニークな遺伝子型(図(3)-9 中 H4)の 4 種類の遺伝子型がアオサンゴに共生していることが分かった。その中でも、褐虫藻遺伝子型 H1(C3 と 6 塩基違い)は HC-A のアオサンゴからのみ検出された。石西礁湖内における共生褐虫藻の分布を HC-A と HC-B に分けて図(3)-10 に示す。海域ごとに褐虫藻遺伝子型の組成が異なっており、比較的高温にさらされやすく、浅場に生息する海域では C1(図中の赤)の褐虫藻遺伝子型を持つものが多い傾向にあることが分かった。今回調べた範囲ではアオサンゴと共生する全ての褐虫藻遺伝子型が比較的高温ストレスに弱いとされるクレード C であった。アオサンゴは他のサンゴよりも高温ストレスに強いことが知られるが、ミドリイシ等の他のサンゴとは異なり、高温環境でもクレード C の褐虫藻と共生関係を維持できる機構がアオサンゴには存在することが示唆された。



図(3)-9 アオサンゴ内の共生褐虫藻の遺伝子型パターン(DGGE 泳動図)

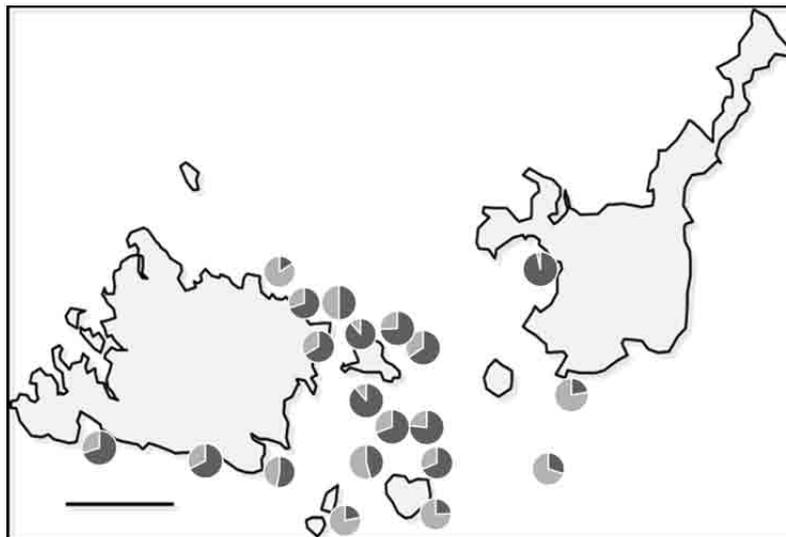


図(3)-10 褐虫藻の遺伝子型の空間分布。上(HC-A)、下(HC-B)。図中のパイグラフはひとつの集団内で見つかった共生藻の割合を示す。緑 C3 と 6 塩基違い、黄 C3、赤 C1、黒 C1 と 3 塩基違い

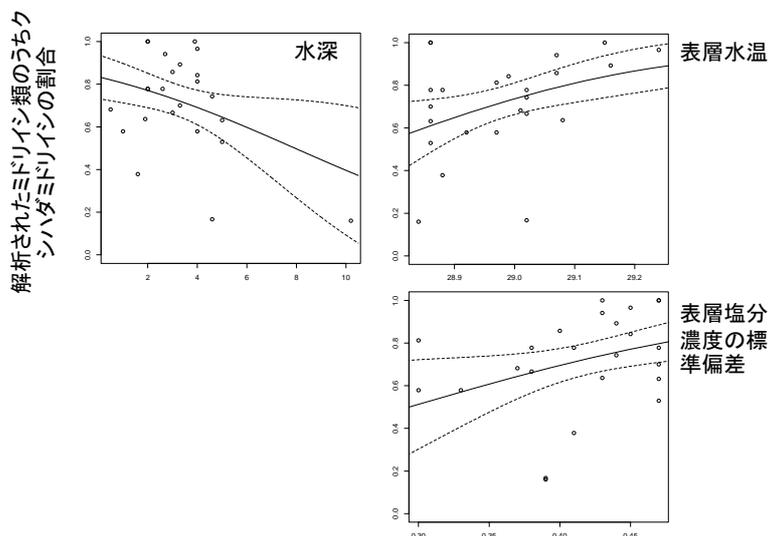
(3) クシハダミドリイシ類の遺伝子による種の同定と集団遺伝解析

1) クシハダミドリイシ類の 2 種類と分布：

STRUCTURE で解析した結果、2 種類の大きなクレードに分かれ、2 種の存在が明らかとなった。2 種の分布は、ナンヨウミドリイシが石西礁湖中心部に多く、外洋側にクシハダミドリイシが多い傾向にあった(図(3)-11)。AIC によるモデル推定を行った結果、形態では識別が困難な 2 種の分布の割合としては、水温が深く、表層水温が暖かく、表層塩分の標準偏差が大きいほどナンヨウミドリイシが生息する割合が高くなっていた(図(3)-12)。クシハダミドリイシとナンヨウミドリイシではクシハダミドリイシのほうが北の温帯域まで生息しているため、ナンヨウミドリイシの方がより暖かい水を好むという事実と合致する。



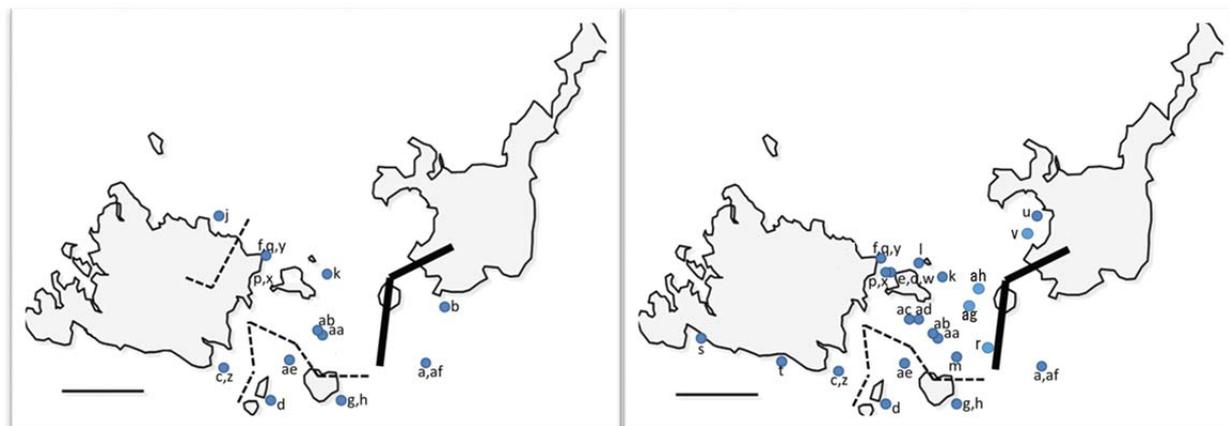
図(3)-11 クシハダミドリイシ(AS、灰色)およびナンヨウミドリイシ (AH、黒) の分布



図(3)-12 クシハダミドリイシとナンヨウミドリイシの分布を説明する環境変数

2) クシハダミドリイシおよびナンヨウミドリイシの集団遺伝構造 :

STRUCTURE 解析で別れた 2 種を別々にあつかい、 F_{ST} を算出した結果、両種ともに弱い遺伝構造を持っており、クシハダミドリイシで $0.010(P < 0.001)$ およびナンヨウミドリイシで $0.012(P = 0.005)$ であった。アオサンゴ等と比較すると、幼生分散範囲が広く、互いの集団間における connectivity は強いことが示唆された。それぞれの種の空間遺伝構造を推定した結果、石西礁湖の南北および、名蔵湾と石垣島南西の海域を分ける場所に共通してバリアーが検出された (図(3)-13)。これらのバリアーアオサンゴやハナヤサイサンゴ類と比較するとやや弱いバリアーであるものの、異なるサンゴ種間で共通して検出されているため、保全上重要であると考えられる。

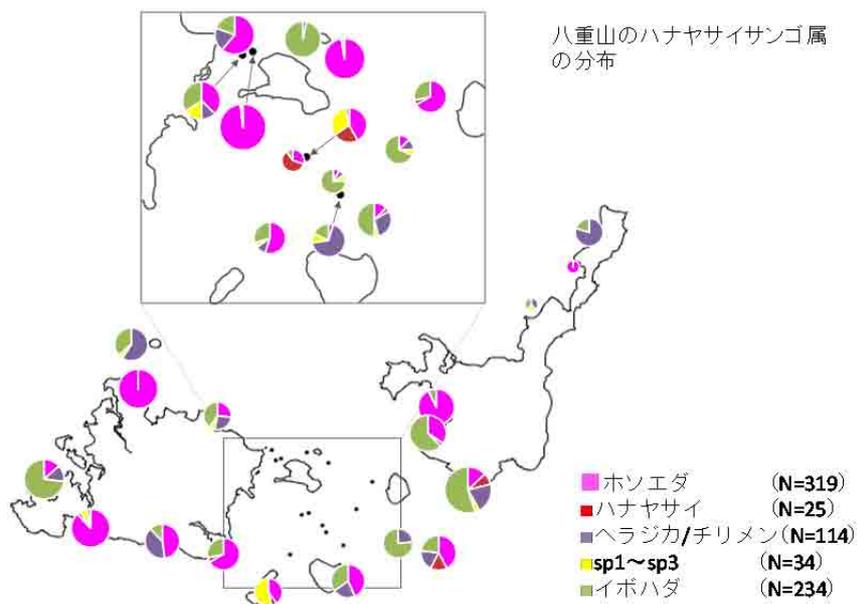


図(3)-13 ナンヨウミドリイシ(左)およびクシハダミドリイシ(右)の空間遺伝構造

(5) ハナヤサイサンゴ類の遺伝子による種の同定と集団遺伝解析

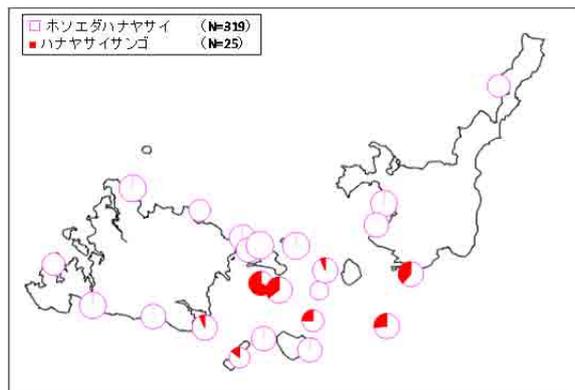
1) ハナヤサイサンゴ類の種同定と分布：

ハナヤサイサンゴ類、特に判別の困難なハナヤサイサンゴとホソエダハナヤサイサンゴをミトコンドリアの ORF 領域を用いて解析を行った。その結果、八重山海域にはこれまでに記載のあるハナヤサイサンゴ、ヘラジカ/チリメンハナヤサイ、イボハダハナヤサイのほか、本邦記録初となるホソエダハナヤサイ(*P. acuta*)および未記載種が3種類見つかった(図(3)-14)。これまで群體形でハナヤサイサンゴやイボハダハナヤサイと考えられていた群體の多くが実はホソエダハナヤサイであることが分かった(Kitano et al, 2015で報告)。これまでのハナヤサイサンゴ属の生態学的、生理学的実験における種分類において、見直しを迫るとともに八重山地域の最も普通種の生物多様性を見直す極めて重要データが得られた。さらに、ハナヤサイ属全種の分布を石西礁湖周辺海域で見ると、石垣島の南側および石西礁湖の内側において多様性が高く、特に保全の価値が高いことが示された(図(3)-14)。



図(3)-14 八重山地域におけるハナヤサイサンゴ属の分布

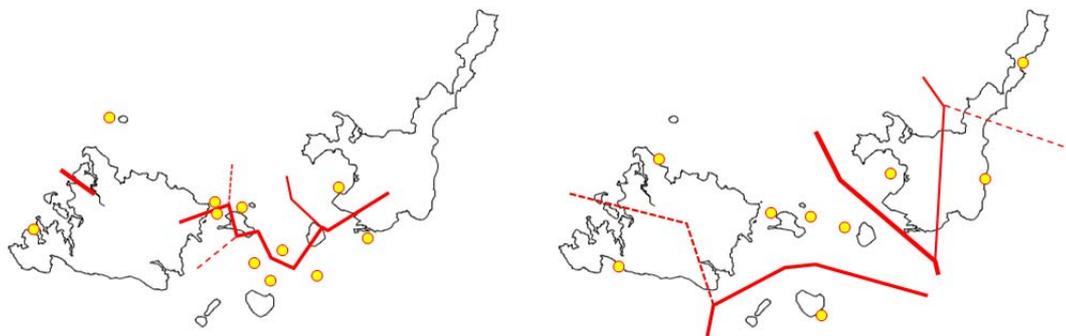
次に形態が特に判別の困難なホソエダハナヤサイとハナヤサイサンゴの生息場所(図(3)-15)と生息環境の相関を調べた。ハナヤサイサンゴおよびホソエダハナヤサイの分布に関連する環境要因をGLM (logit link、 binomial error) と尤度比検定により解析したところ、濁度との相関に関する z 値が-4.597 (P 値=4.29×10⁻⁶)、クロロフィル a では-3.798 (P 値=1.46×10⁻⁵) と、有意な相関が見られた。濁度とクロロフィル a 濃度が高いほどハナヤサイサンゴが多くなり、これらが低くなるほど、ホソエダハナヤサイが優占することがわかった (図(3)-15)。すなわち、クロロフィル a 濃度が高く比較的富栄養で淀みやすい場所にハナヤサイサンゴが生息しており、潮通しがよく、貧栄養の海域にホソエダハナヤサイが多く生息することがわかった。



図(3)-15 石西礁湖周辺におけるホソエダハナヤサイとハナヤサイサンゴの分布

2) ホソエダハナヤサイとイボハダハナヤサイの集団遺伝構造：

保育型のホソエダハナヤサイと、放卵放精型の生殖をするイボハダハナヤサイでは、前者では全集団の F_{ST} が 0.069 ($P < 0.001$) であったのに対し、後者では全集団の F_{ST} が 0.032 ($P = 0.032$) であり、保育型のホソエダハナヤサイのほうが強い遺伝構造を持っていて幼生分散が限られていることが分かった。空間遺伝構造を Barrier 解析によって示した結果、ホソエダハナヤサイ、イボハダハナヤサイに共通して、名蔵湾とその他の石西礁湖をわけるバリアー、石西礁湖の南北を分けるバリアー、西表島西の南北をわけるバリアーが見つかった。こうした海域には共通して幼生分散が起こりにくいことがわかり、別々の管理ユニットとして保全するとよいと考えられた。特に名蔵湾の集団は他の集団と遺伝的に離れており地域絶滅しないような保全管理に注意が必要であると考えられた。



図(3)-16 イボハダハナヤサイ (左) およびホソエダハナヤサイ(右)における空間遺伝構造とバリアー (赤線) 黄色はサンプル採集地点

(5) オニヒトデの遺伝子マーカー開発と集団遺伝解析

オニヒトデ 30 個体に対し RAD 解析を行った結果、DNA の状態および共通して使用できる SNPs の抽出とのバランスを見て 16 個体分について解析を行うことが出来た。しかし、石西礁湖内 2 地点の集団間には全く遺伝構造が存在せず、石西礁湖内で調べたオニヒトデ集団は同一の生殖グループであることが分かった。

オニヒトデのゲノム情報からあらたに 200 のマイクロサテライト領域を抽出することに成功した。マイクロサテライト領域を用いた場合にも石西礁湖内において集団遺伝構造は見られなかった。特に自然選択のかかっている遺伝子座も見つからなかったことから、サンゴと比較してオニヒトデは環境因子とあまり関係なく広域に分布することが可能で、かつ幼生分散範囲も広いことが明らかとなった。

(6) オニヒトデのconnectivity解明のための野外幼生調査と遺伝学的解析

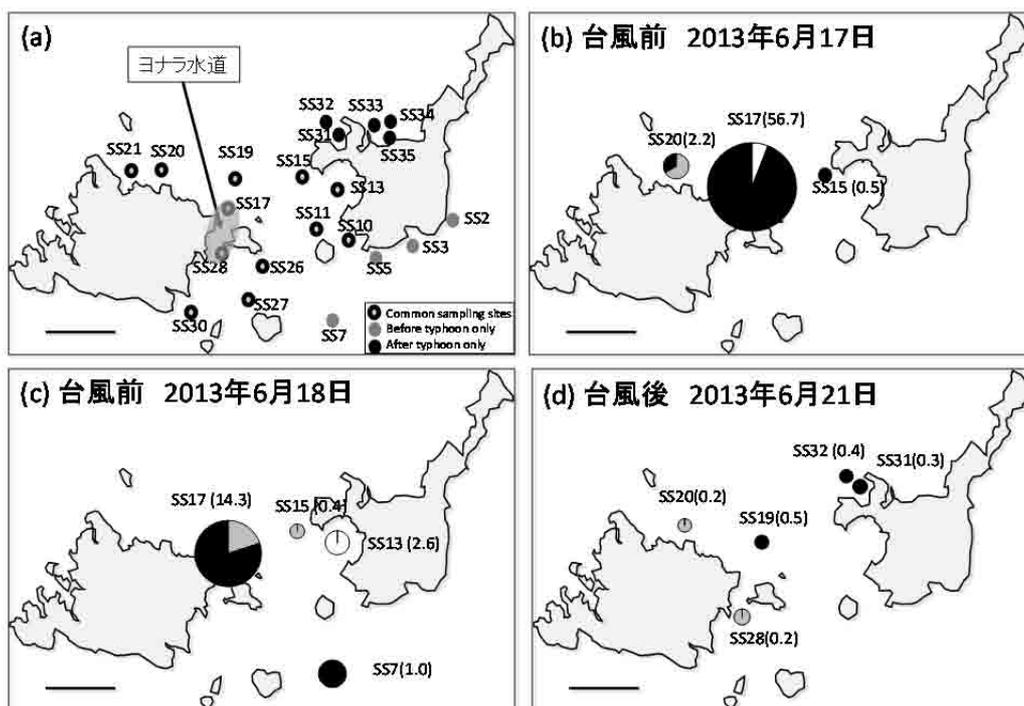
1) 野外オニヒトデ幼生の検出

動物の種判別にしばしば使われるミトコンドリア領域を中心にオニヒトデ幼生を同定するのに良いマーカーを探したところ、最も増幅効率がよく、オニヒトデ以外の生物で増幅されにくいのは、16S と調整領域を含むプライマーセットであることが分かった。また同様に CO1 と呼ばれるミトコンドリア領域のプライマーセットでも安定した増幅が見られた。そのため、この 2 種類の領域の配列を用いてオニヒトデ幼生の同定を行った。

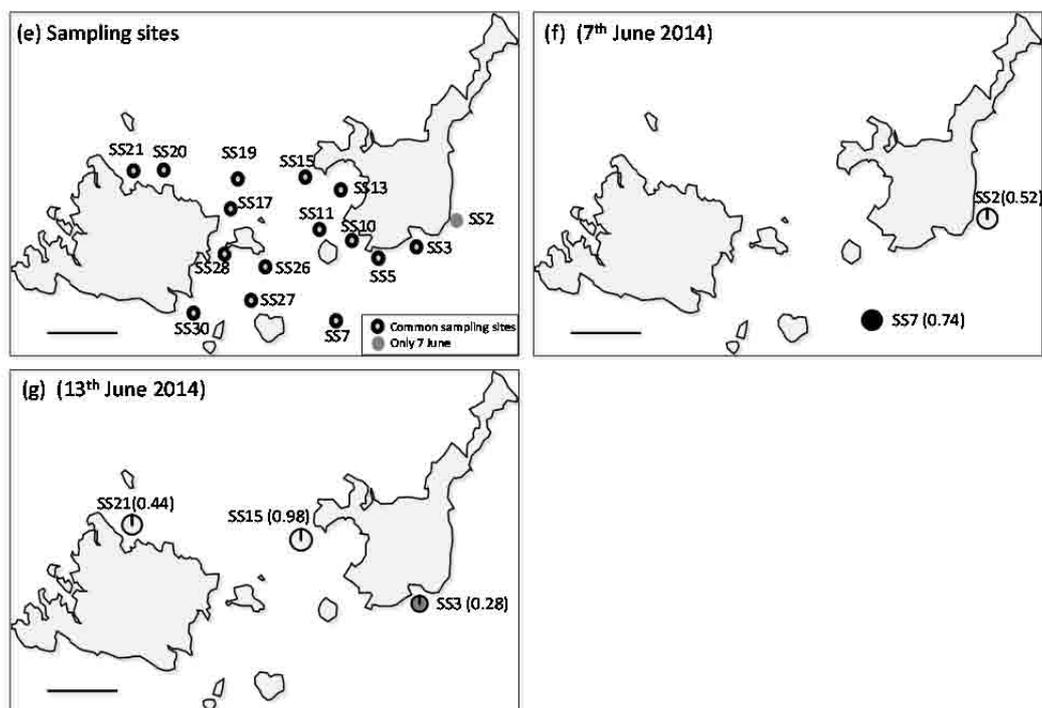
2) 顕微鏡下での幼生のソーティングおよび遺伝子同定

2013 年は台風の前に 2 回、台風後に 1 回採集を行った。その結果ヨナラ水道周辺において、世界で初めて高密度のオニヒトデ幼生の集団を発見した(図(3)-17)。このとき栄養塩濃度やクロロフィル *a* 濃度はヨナラ水道付近では特に高い傾向はなかったため、餌を求めて集合していたわけではないと考えられた。高密度集団のほとんどがブラキオラリア幼生で発生後期の幼生であったことから、こうしたオニヒトデ幼生の高密度集団がまとまって良好に着定することによって大量発生が起きる可能性が示唆された。実際、ヨナラ水道周辺で 2013 年の冬に地元の漁師が新規加入したと考えられる稚オニヒトデを大量に目撃している。このことから、こうしたオニヒトデ幼生の高密度集団を捕らえることができれば、早期モニタリングとして駆除に役立てられると考えられた。また、台風後には密度が低くなっていたため、台風によるかく乱はオニヒトデ幼生を外洋側へと散らす効果があり、オニヒトデの高密度幼生を消失させる正の効果があることが示唆された。

一方 2014 年は、2013 年よりも水温の上昇が遅く、産卵期が遅れたこと、またオニヒトデの親集団そのものが小さくなっていったことからほとんど幼生が見つからなかった(図(3)-18)。この理由として、2014 年は海水温の上昇が 2013 年よりも遅く、産卵ピークが遅かった可能性が考えられる。また、2014 年、2015 年と徐々にオニヒトデの親集団が小さくなっていったことを反映している可能性がある。



図(3)-17 2013年のオニヒトデ幼生分布調査結果。円が大きいほど発見された幼生密度が高い。白はガストルーラ幼生、グレーはビピンナリア幼生、黒はブラキオラリア幼生を示しており、色が濃くなるほど発生後期の幼生となる。括弧の中の数字は、幼生密度で個体/m³

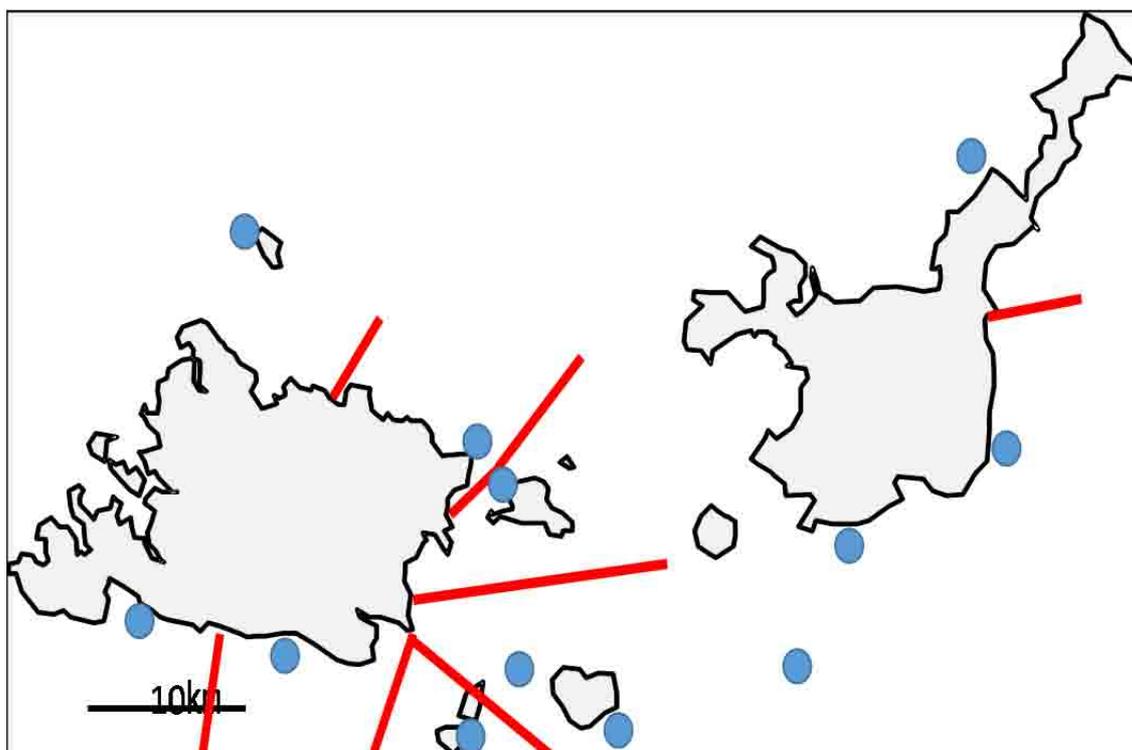


図(3)-18 2014年のオニヒトデ幼生広域調査の結果

(7) 石西礁湖周辺海域における海洋保護区の有効性とさらなる重要海域の同定

本研究により、様々な生活史を持つ、代表的な造礁サンゴ類のreef-scape connectivityを明らかにすることに成功した。石西礁湖において異なる種間でも共通するバリアーから、保全管理に重要なユニットを選定し(図(3)-19)、さらにそれらのユニット内外における遺伝的多様性・幼生のソース・シンクの関係を踏まえて、石西礁湖のサンゴ礁を持続的に保全するために重要なサンゴ群集の存在している海域の選定を行った。保全の重要度は下記の図(3)-20をベースとしたところ、保育型の分散能力が限られるサンゴでは、以下の3種類の海域の重要性が明らかとなった(図(3)-21)。

- ・他の海域のソースとして特に重要な海域：西表北東ユシグチ周辺・黒島と新城島間の礁周辺・石垣島東岸からサクラグチにかけて(図(3)-21の赤丸実線)
- ・周囲とのconnectivityが限られていてかつ遺伝的多様性があまり高くない海域：石垣島北西海域、西表島南のターヤグチ周辺、新城島周辺(図(3)-21の青三角)
- ・Connectivityに頼って持続しているため、石垣島からの陸源負荷を減らした方が良い海域：石垣島南東から、石西礁湖の黒島周辺までのサンゴ礁海域(図(3)-21の赤丸点線)



図(3)-19 : 分散期間の短い保育型のアオサンゴから推定された遺伝的バリアー(赤線)を考慮にいたれた保全管理ユニット。隣り合わせの集団であるにも関わらず遺伝的に離れている集団間は幼生分散が少ないため、赤いバリアーの線が引かれている。(青マルがサンプル採集地点)

*ただし、空間的ユニット構造は、ユニットとしての保全の必要性が高い保育型のサンゴに限っても、種ごとに多少とも異なる空間構造を有するため、今後解析対象種をさらに増やして情報を蓄積していく必要がある。今後さらにサンプル数を増やすとともに、幼生分散シミュレーション結果と組み合わせた分析を行うなどして、区分精度を高め、図の更新をしていく必要がある。

保全の優先度: 高い

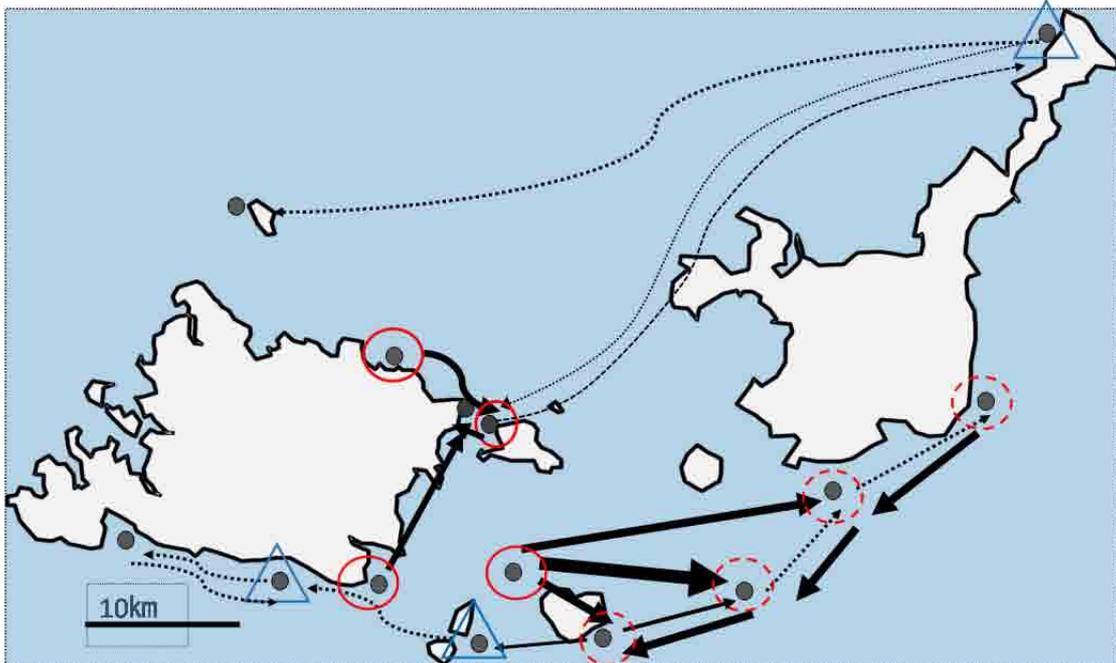


- 1 ソース海域として重要な海域
- 2 孤立性が高い海域
(他海域とのつながりがほとんどない)
- 3 シンク海域で、ソース海域とはならない

+ 遺伝的多様性が低いほど集団の絶滅の危険度は高い

ソースシンクの関係と遺伝的多様性の両方を考慮に入れて重要海域を絞り込む

図(3)-20 connectivityから考えたサンゴ保全のための海域の重要度





図(3)-21 集団遺伝解析によって特に重要だと考えられたサンゴ群集

上：分散期間の短いアオサンゴ類のみの遺伝子解析から推定された重要海域(赤丸で囲まれた場所はソースとして周囲のサンゴを維持するのに重要、青い三角の地点は遺伝的多様性の低さおよび周辺の集団との孤立性の観点から重要)。点線の赤丸は互いにソース・シンクの関係で結びつきが深いため、特に上流海域が重要であると考えられたサンゴ群集。矢印はアオサンゴで推定された遺伝子流動。矢印が太いほど遺伝子流動が大きいことを示す。

下：保全優先度が高いと考えられたサンゴ群集（今回解析した6種から推定）。赤丸：ソースとして重要、青三角：集団の孤立性・遺伝的多様性の観点から保全すると良い群集、赤丸・斜線：サンゴ群集のコネクティビティによってなりたっているのので、上流域が絶滅しないように配慮が必要なサンゴ群集。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 野外オニヒトデ幼生を検出するための技術を確立し、オニヒトデ幼生の高密度集団を世界で初めて発見することに成功した。こうした幼生の高密度集団が大量発生を引き金となっている可能性を明らかにした。

2) 石西礁湖周辺海域において、サンゴ類に関して、これまで、明らかになっていなかった種境界を明らかにし、それら隠ぺい種の分布を予測する環境要因をそれぞれの種について明らかにした。このような景観遺伝学的解析は世界でもまだ数が少なく、大きなインパクトがある。

3) アオサンゴに関して、それまで1目1科1属1種とされていたところ、隠ぺい種を発見し、それらの好む環境因子の違いや産卵期などの生態学的な違いを明らかにした。サンゴの隠ぺい種は近

年遺伝学的な手法で見つかったのはいるものの、このような生態学的な違いまで明らかにした例は少ない。また八放サンゴでしばしば種判別や系統解析に用いられるITS2領域において、隠ぺい種2種間で極めて珍しい進化を遂げていることを発見し、IFの比較的高い雑誌に報告した。

4) 石西礁湖にいる様々な生活史をもつ造礁サンゴ類の普通種6種類に関して、類似する遺伝構造を明らかにした。石西礁湖において、保育型のアオサンゴのconnectivityをベースに、保全管理ユニットを提言できた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) connectivityから推定された保全管理ユニットごとの保全管理。主に本研究で提示した保全管理ユニット内ごとにサンゴの加入の大半が起きていることから、それぞれの海域において地域絶滅が起こらないように保全していく必要がある。
- 2) 石西礁湖周辺海域におけるソース・シンクの観点からサンゴを持続させるうえで特に重要な海域の情報図(3)-20から、既存保護区の見直し、ないし新たにサンゴ礁を保全するための保護区選定時の科学的知見。

6. 国際共同研究等の状況

- 1) オーストラリアのオーストラリア海洋科学研究所AIMSのDr. Sven Uthicke氏らと野外オニヒトデ幼生の検出を行うための技術開発について共同研究が始まった。本研究の成果と先方の研究開発の情報交換のため、2016年6月27日からDr. Sven Uthicke氏を宮崎大学へ招へいすることが決まっている。(JSPS海外研究者招へい短期)
- 2) 上記と関連して2014年12月にAIMSに招へいされ、本研究成果の講演を行うとともに、乗船調査に同船し、技術面でのフォローを行った。この成果は、6月にハワイで開催される国際サンゴ礁学会にて、発表予定である。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) N. YASUDA, K. KAJIWARA, S. NAGAI, K. IKEHARA, and K. Nadaoka: Galaxea, Journal of Coral Reef Studies, 17, 1, 15-16 (2015) First report of field sampling and identification of crown-of-thorns starfish larvae
- 2) 安田仁奈、灘岡和夫、長井敏: 日本プランクトン学会報、62、1、33-38 (2015) サンゴ礁無脊椎動物における集団遺伝解析による種分化および幼生分散の推定
- 3) N. YASUDA, C. TAQUET, S. NAGAI, M. D. FORTES, F. TUNG-YUNG, S. HARI, T. YOSHIDA, Y. SAITO, and K. NADAOKA: Molecular Phylogenetics and Evolution, 93, 161-171 (2015) Genetic diversity, paralogy and incomplete lineage sorting of mtDNA, ITS2 and microsatellite flanking region in closely related *Heliopora* species

- 4) Y. SAITO, M. UENO, Y. F. KITANO, and N. YASUDA: Bulletin of Marine Science, 91, 397-398 (2015) Potential of different reproductive timing between sympatric *Heliopora coerulea* lineages southeast of Iriomote Island, Japan
- 5) Y. F. KITANO, S. NAGAI, M. UENO, and N. YASUDA: Galaxea, Journal of Coral Reef Studies, 17, 1, 21-22 (2015) Most *Pocillopora damicornis* around Yaeyama Islands are *Pocillopora acuta* according to mitochondrial ORF sequences
- 6) G. SUZUKI, N. YASUDA, K. IKEHARA, K. FUKUOKA, T. KAMEDA, S. KAI, S. NAGAI, A. WATANABE, T. NAKAMURA, S. KITAZAWA, L.P.C. BERNARDO, T. NATORI, M. KOJIMA and K. NADAOKA: Diversity, 8, 9 (2016) doi:10.3390/d8020009 Detection of a High-Density Brachiolaria-Stage Larval Population of Crown-of-Thorns Sea Star (*Acanthaster planci*) in Sekisei Lagoon (Okinawa, Japan)

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 石西礁湖周辺海域におけるアオサンゴよび共生褐虫藻の遺伝構造[第16回日本サンゴ礁学会大会] 齊藤佑太・長井敏・灘岡和夫・波利井佐紀・上野光弘・安田仁奈(2013年12月09日－2013年12月13日、沖縄OIST)
- 2) オニヒトデ幼生広域分布調査のための簡易ソーティング方法の探索と応用[第16回日本サンゴ礁学会大会] 池原浩太・安田仁奈・齊藤佑太・長井敏・鈴木豪・福岡弘紀・山下洋・亀田卓彦・甲斐清香・中村隆志・渡邊敦・Lawrence Patrick C. Bernardo・北沢駿介・灘岡和夫(2013年12月09日－2013年12月13日、沖縄OIST)
- 3) 大量発生したオニヒトデの詳細遺伝構造-フレンチポリネシアと沖縄の比較[第16回日本サンゴ礁学会大会] 安田仁奈・池原浩太・長井敏・山川英治・岡地賢(2013年12月09日－2013年12月13日、沖縄OIST)
- 4) 分布境界における造礁サンゴの遺伝構造の変化[第16回日本サンゴ礁学会大会] 中林郎・井口亮・齋藤佑太・池原浩太・長井敏・上野光弘・安田仁奈 (2013年12月09日－2013年12月13日、沖縄OIST) 口頭発表・自由集会
- 5) サンゴ礁無脊椎動物の幼生分散と遺伝子構造[2014年3月26日 東京海洋大学 プランクトン学会シンポジウム] 安田仁奈・灘岡和夫・長井敏
- 6) Yuta Saito, Satoshi Nagai, Kazuo Nadaoka, Saki Harii, Mitsuhiro Ueno, Terutoyo Yosida, **Nina Yasuda**: Asia Pacific Coral Reef Symposium (2014) 「Genetic structure of two cryptic *Heliopora coerulea* species and their symbiont around Sekisei Lagoon」 (2014年06月22日－2014年06月27日、Taiwan 墾丁) Student Award 受賞
- 7) **Nina Yasuda** [Invited talk at Australian Institute of Marine Science] Study of early

- life ecology of *Acanthaster planci* in Japan. 12) Genetic connectivity along Kuroshio Current [Asia-Pacific Coral Reef Symposium] (2014年09月05日 - 2014年09月05日、HIMB)
- 8) 中林朗、長井敏、上野光弘、名取竜哉、北野裕子、**安田仁奈**：第17回日本サンゴ礁学会 (2014) 「石西礁湖におけるクシハダミドリイシの詳細集団遺伝解析」 [第17回日本サンゴ礁学会大会]
- 9) **Nina Yasuda**：[Invited talk at ハワイ大学 HIMB] (2014) 「Genetic structure and connectivity of coral species in Japan」
- 10) 湯浅英知、小椋義俊、林哲也、長井敏、Christopher Bird、Michael Hart、Rob Toonen、**安田仁奈**：第17回日本サンゴ礁学会 (2014) 「オニヒトデの受精関連遺伝子を用いた系統地理解析」
- 11) 池原浩太、**安田仁奈**、長井敏、鈴木豪、福岡弘紀、山下洋、亀田卓彦、甲斐清香、中村隆志、渡邊敦、Lawrence Patrick C. Bernardo、北沢駿介、灘岡和夫：第17回日本サンゴ礁学会 (2014) 「オニヒトデ幼生の同定 2013年と2014年の調査結果の比較」
- 12) 齊藤佑太、長井敏、灘岡和夫、波利井佐紀、上野光弘、谷中絢貴、**安田仁奈**：第17回日本サンゴ礁学会 (2014) 「アオサンゴ隠蔽種2種は何が違うのか? -遺伝的生態学的な比較-
- 13) 北野裕子、中林朗、谷中絢貴、湯浅英知、上野光弘、長井敏、**安田仁奈**：第17回日本サンゴ礁学会 (2014) 「石西礁湖を中心としたハナヤサイサンゴの集団遺伝構造の比較」
- 14) **安田仁奈**、井口亮、山川英治、岡地賢：第17回日本サンゴ礁学会 (2014) 「黒潮海域におけるサンゴ礁無脊椎動物の遺伝構造比較」
- 15) **Nina Yasuda**、Satoshi Nagai、Coralie Taquet、Tung-Yung Fan、Miguel Fortes、Ken Okaji、Eiji Yamakawa、Kazuo Nadaoka: Asia Pacific Coral Reef Symposium (2014) 「Genetic connectivity along Kuroshio Current」
- 16) **安田仁奈**、長井敏、山川英治、岡地賢：第18回日本サンゴ礁学会 (2015) 「オニヒトデの遺伝子流動とconnectivity 推定」
- 17) 齊藤佑太、長井敏、灘岡和夫、波利井佐紀、上野光弘、北野裕子、**安田仁奈**：第18回日本サンゴ礁学会 (2015) 「石西礁湖周辺海域におけるアオサンゴ2種の遺伝構造の比較」
- 18) 北野裕子、上野光弘、長井敏、**安田仁奈**：第18回日本サンゴ礁学会 (2015) 「八重山におけるハナヤサイサンゴ属の分布」
- 19) 野口七海、北野裕子、上野光弘、鈴木豪、長井敏、**安田仁奈**：第18回日本サンゴ礁学会 (2015) 「石西礁湖周辺海域における着定稚サンゴの種組成と遺伝子型分布」
- 20) 中林朗、井口亮、北野裕子、上野光弘、長井敏、**安田仁奈**：第18回日本サンゴ礁学会 (2015) 「黒潮流域におけるクシハダミドリイシおよびナンヨウミドリイシの遺伝子流動解析」
- 21) 小島萌々香、長井敏、鈴木豪、福岡弘紀、亀田卓彦、中村隆志、渡邊敦、灘岡和夫、北沢駿介、Lawrence Patrick C. Bernardo、池原浩太、**安田仁奈**：第18回日本サンゴ礁学会 (2015) 「オニヒトデ幼生の水平分布?石西礁湖のどこにいる?」
- 22) 谷中絢貴、波利井佐紀、香川浩彦、上野光弘、北野裕子、齋藤佑太、**安田仁奈**：第18回日本サンゴ礁学会 (2015) 「アオサンゴ隠蔽種 2種における産卵期推定～同じ海域で同時に産卵しているのか?」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 食いしん坊のオニヒトデの生態を探る[奄美群島サンゴ礁シンポジウム]
(平成26年08月23日ー平成26年08月23日、参加者約50名 におワールドかごしま水族館)にて講演
- 2) 平成27年度石西礁湖自然再生協議会 学術調査ワーキンググループ(主催:石西礁湖自然再生協議会、平成28年2月13日、国際サンゴ礁研究・モニタリングセンター・レクチャー室、参加者36名)にて講演
- 3) 平成27年度石西礁湖自然再生協議会(主催:石西礁湖自然再生協議会、平成28年2月14日、石垣市健康福祉センター集団検診ホール、参加者63名)にて講演
- 4) 平成27年度 一般市民公開講座 海を拓く(主催:宮崎大学、平成27年9月5日、南延岡市民センター、参加者33名)にて講演
- 5) 平成27年度 サンゴ礁ウィーク シンポジウム「身近な海が温まったらどうなるの?魚は?サンゴは?」(主催:国連生物多様性の10年市民ネットワーク、日本サンゴ礁学会サンゴ礁保全委員会、国立環境研究所、平成28年3月12日(土) TKP品川カンファレンスセンター)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 八重山毎日新聞
2016年4月20日、「オニヒトデ幼生高密度で分布 世界初、石西礁湖で集団発見」
<http://www.y-mainichi.co.jp/news/29690/>
- 2) 朝日新聞
2016年4月21日(沖縄)世界初、オニヒトデ幼生の巣発見
<http://www.asahi.com/articles/ASJ4N5TBCJ4NUEHF00S.html>
<http://stacknews.net/news/www.asahi.com/articles/ASJ4N5TBCJ4NUEHF00S.html>
- 3) 琉球新報
2016年4月20日 <http://ryukyushimpo.jp/news/entry-263007.html> オニヒトデ幼生を集団確認 世界初、石西礁湖で亜熱帯研と宮崎大
- 4) 沖縄タイムス
2016年4月21日(沖縄)世界初、オニヒトデ幼生の巣発見
<http://www.okinawatimes.co.jp/article.php?id=164524>
- 5) 宮崎日日新聞
2016年5月1日、「オニヒトデ幼生大群確認」
- 6) 朝日新聞宮崎地方版 ひむかの人5月14日 「オニヒトデ幼生の集団の発見」
- 7) 宮崎テレビ(MRT) ニュース「オニヒトデ幼生の高密度集団の発見」で特集された。

(6) その他

- 1) Student Award 受賞 アジア太平洋サンゴ礁学会

Yuta Saito、 Satoshi Nagai、 Kazuo Nadaoka、 Saki Harii、 Mituhiro Ueno、 Terutoyo Yosida、 **Nina Yasuda** : Asia Pacific Coral Reef Symposium (2014) 「Genetic structure of two cryptic *Heliopora coerulea* species and their symbiont around Sekisei Lagoon」

(2014年06月22日－2014年06月27日、 Taiwan 墾丁) Student Award 受賞

2) 優秀ポスター賞 九州・沖縄女性研究者支援シンポジウム 安田仁奈

平成27年9月11日 鹿児島大学

8. 引用文献

- 1) Yasuda N.、 Taquet C.、 Nagai S.、 Fortes M.、 Fan T.Y.、 Phongsuwan N.、 Nadaoka K. (2014) Genetic structure and cryptic speciation in the threatened reef-building coral *Heliopora coerulea* along Kuroshio Current. *Bulletin of Marine Science*, 90: 233-255
- 2) Pritchard J.K.、 Stephens M.、 Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 958-959.
- 3) Hubisz、 M.J.、 Falush、 D.、 Stephens、 M.、 Pritchard、 J.K. (2009) Inferring weak population structure with assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322- 458 1332.
- 4) Aguilar C.、 Sánchez J.A. (2007) Phylogenetic hypotheses of gorgoniid octocorals according to ITS2 and their predicted RNA secondary structures. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 43: 774-86.
doi:10.1016/j.ympev.2006.11.005
- 5) Yasuda N.、 S. Nagai C. L. Lian M. Hamaguchi、 T. Hayashibara、 K. Nadaoka (2008) Identification and characterization of microsatellite loci in the blue coral *Heliopora coerulea* (Alcyonaria: Coenothecalia). *Conservation Genetics*, 9:1011-1013
- 6) Manni F.、 Guérard E.、 Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic、 morphologic、 linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Human Biology*, 76: 173-190.
- 7) Nei M.、 Maruyama T.、 Wu C.I (1983) Models of evolution of reproductive isolation. *Genetics* 103:557-579.
- 8) Piry S.、 Alapetite A.、 Cornuet JM.、 Paetkau D.、 Baudouin L.、 et al. (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95: 536–539
- 9) LaJeunesse TC.、 Trench RK (2000) Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissimi* (Brandt). *Biological Bulletin* 199:126-134
- 10) Shinzato C.、 Yasuoka Y.、 S Mungpakdee.、 Arakaki N.、 Fujie M.、 Nakajima Y.、 Satoh N (2014) Development of novel、 cross-species microsatellite markers for *Acropora* corals using next-generation sequencing technology. *Frontiers in Marine Science*, 1:11
- 11) Van Oppen M.、 Underwood J.、 Muirhead AN.、 Peplow N (2007) Ten microsatellite loci for the reef-building coral *Acropora millepora* (Cnidaria, Scleractinia) from the Great Barrier Reef, Australia. *Molecular Ecology Resources*.7, 436–438
- 12) Schmidt-Roach S.、 Miller KJ.、 Lundgren P and N. Andreakis (2014) With eyes wide open: A revision of species within and closely related to the *Pocillopora damicornis* species complex (Scleractinia; Pocilloporidae) based on morphology and genetics *Zoological Journal of the Linnean Society*. 170: 1-33.

- 13) Harii S、 Kayanne H (2003) Larval dispersal、 recruitment、 and adult distribution of the brooding stony octocoral *Heliopora coerulea* on Ishigaki Island、 southwest Japan. *Coral Reefs* 22:188–196
- 14) Babcock R (1990) Reproduction and development of the blue coral *Heliopora coerulea* (Alcyonaria: Coenothecalia). *Marine Biology* 104: 475–481
- 15) Harii S、 Kayanne H、 Takigawa H、 Hayashibara T、 Yamamoto M (2002) Larval survivorship、 competency periods and settlement of two brooding corals、 *Heliopora coerulea* and *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* 141:39-46
- 16) Zann LP、 Bolton L (1985) The distribution、 abundance and ecology of the blue coral *Heliopora coerulea* (Pallas) in the Pacific. *Coral Reefs* 4: 125-134
- 17) Kayanne H、 Harii S、 Ide Y、 Akimoto F (2002) Recovery of coral populations after the 1998 bleaching on Shiraho Reef、 in the southern Ryukyus、 NW Pacific. *Marine Ecology Progress Series*、 239: 93-103
- 18) Yasuda N、 Ogasawara K、 Kajiwarra K、 Ueno M、 Oki K、 Taniguchi H、 Shinichiro K、 Okaji K、 Nadaoka K (2010) Latitudinal differentiation of crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) in the reproduction patterns through the Ryukyu Island archipelago. *Plankton and Benthos Research* 5:156-164