

D-0802 SEA-WP海域における広域沿岸生態系ネットワークと環境負荷評価に基づく保全戦略

(3) SEA-WP海域におけるサンゴ礁海産生物の集団遺伝学的解析

(独) 水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

赤潮環境部有毒プランクトン研究室

長井 敏

〈研究協力者〉

(独) 水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

安田仁奈 (日本学術振興会特別研究員PD、東京工業大学特別研究員)

東京工業大学 大学院情報理工学研究科情報環境学専攻 灘岡研究室

Coralie Taquet (ポスドク研究員、東京工業大学特別研究員)

平成20～22年度合計予算額：35,862千円 (うち平成22年度予算額：11,954千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] サンゴ礁劣化速度が世界で最も速いSEA-WP海域において、海洋保護区設定の基盤となる reef-connectivity を明らかにするべく、サンゴ礁における代表的な海洋無脊椎動物に関して集団遺伝構造及び系統地理を明らかにした。造礁サンゴの捕食者であるオニヒトデに関してマイクロサテライトを用いた解析を行ったところ、スラウェシ島北部周辺海域は遺伝子流動が強く、2次的大量発生に留意する必要があることが分かった。アオヒトデ類に関して核マイクロサテライトとミトコンドリア両方の分子マーカーで解析したところ、ミトコンドリアでは種判別不能であったが、マイクロサテライトでは種が識別できたと同時に、SEA-WP海域における強い遺伝子流動を検出した。コブヒトデとマンジュウヒトデに関してミトコンドリアの遺伝子を用いたところ、両種ともにSEA-WP海域全般において非常に強い遺伝子流動が検出された。マンジュウヒトデは、オニヒトデと同様にジャカルタ北部においてインド洋側及び太平洋側の両方の遺伝子型が検出されたが、それより東側では、インド洋側の遺伝子型はほとんどみられず、ジャワ海において西から東に向かう遺伝子流動が極めて限られていることが分かった。一方コブヒトデでは、広域的には非常に遺伝的均一性が高いにもかかわらず、局所的に数十キロの地点間で遺伝的に極端に異なる海域も見られた。アオサンゴに関しては、高水温低流速のサンゴ礁内に発達する葉状のものと比較的低温高流速のサンゴ礁外部に発達する小枝状のアオサンゴの間では遺伝子流動がほとんどなく、それぞれのアオサンゴを別種として保全する必要があることが分かった。ナマコ種のミトコンドリア解析の結果、ニセクロナマコなど広域分散種4種で黒潮海域における強い遺伝子流動が検出され、上流域の保全の重要性が明らかとなったほか、シカクナマコでは遺伝子流動が限られ、無性生殖が卓越していることから、個々の海域特に遺伝的多様性が高く祖先型遺伝子を含む久米島のような集団の保全が重要と考えられた。

[キーワード] reef-connectivity、遺伝的多様性、遺伝子流動、マイクロサテライト、ミトコンドリア

1. はじめに

東南アジア-西太平洋海域 (The South-East Asia and Western Pacific (SEA-WP) 海域) は、太平洋とインド洋の境界に位置する地質学的、生物生態学的、海洋物理学的に複雑な海域であり、浅海生態系における生物多様性の中心地であると言われている。一方で、SEA-WP 海域は人口過密によるローカルな、また地球温暖化によるグローバルな環境負荷により生態系の劣化も激しいため、適切な保全策の考案が急務となっている。浅海生態系の保全に際し、現在最も有効とされる海洋保護区を設定するにあたり、サンゴ礁生物の生活史初期における幼生分散による connectivity を明らかにすることは不可欠であるが、SEA-WP 海域における connectivity の知見は未だ乏しい。

2. 研究目的

本研究では、様々な時空間スケールでのサンゴ礁生物の connectivity の実態解明に基づく重要保全海域の同定を通じてサンゴ礁生態系保全に寄与することを目指す。本セクションでは、代表的なサンゴ礁無脊椎動物(造礁サンゴ、ナマコ、ヒトデ)に関し、多型性を示す遺伝子マーカーを開発・使用し、分子系統解析および集団遺伝学的解析によって遺伝子流動を明らかにすることで、SEA-WP 海域を中心とした connectivity の実態解明及び海洋保護区設定の上での指針となる知見を得ることを目的とする。

3. 研究方法

(1) オニヒトデのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析

オニヒトデ *Acanthaster planci* 個体を、インドネシアの5海域 North Jakarta (n = 7)、Derawan (n = 50)、Palu (n = 21)、Manado (n = 11)、Bontang (n = 20) において合計 112 個体を採集した (図 1)。DNA の抽出は Protease K の入った 5% Chelex 溶液で組織を溶解し、95 度で 30 分熱した後、1 X CTAB 溶液を用いた精製を行った。ジェノタイピングは Yasuda ら^{1, 2)}の方法で実施した。データ解析の際は、すでに発表したインド洋・太平洋のサンプルを加えて行った。Firsher' s exact test は GENEPOP on the web³⁾で行い、pairwise F_{ST} は ARLEQUIN ver 3.1⁴⁾を用いて行った。有意性の検定は、Bonferroni Correction⁵⁾を実施した。UPGMA 系統樹は、Nei の D_a ⁶⁾を用いて POPULATIONS 1.2.30⁷⁾で計算した。個体ごとの主成分分析は GENALEX ver 6⁸⁾を用いて計算した。

(2) アオヒトデ・ゴマフヒトデ・ムラサキヒトデの集団遺伝学的解析及び系統地理解析

1) 遺伝子解析用サンプルと DNA 抽出

アオヒトデ *Linckia laevigata* に関しては、フィリピン (Bolinao, Smul, Negro)、インドネシア (Sekotong)、琉球列島 (沖縄本島・久米島・石垣島・宮古島)、パラオ・トレス海峡 (Dugong Is, Kirkdale)、フィジー (Suva, Dravuni)、オーストラリア (GBR Rib, Western Australia Imperieuse Clerke)、ニューカレドニア、ソロモン島、グアム (Asan)、南アフリカ、タイ (Kata Beach, Puhket) の 23 海域から採集したサンプルを用いて解析した。ゴマフヒトデ *Linckia multifora* に関しては、インドネシア (Sulawesi)、フィリピン (Bolinao)、グアム、パラオ、フレンチポリネシア、サモア、フィジー、クック島、クリスマス島、ココスケーシング島、紅海 (Sinai) の 11 海域からのサンプ

ルを用いて解析した。さらに、アオヒトデとゴマフヒトデに最も近縁であるムラサキヒトデ *Linckia guildingi* (セイシェル) をアウトグループとした (図 2)。

2) ミトコンドリア Dloop 領域を用いた遺伝子解析

DNA 抽出は全ての種において、エタノール保存された管足ないし DMSO に溶解した組織の少量を 5% の Chelex 溶液に入れ 97 度で 30 分間熱したものをさらにエタノール精製し、PCR 反応のテンプレート DNA とした。ミトコンドリア Displacement loop (Dloop; DNA 複製時の起点となる領域) 解析に関しては、既存のプライマーである 12Sa: 5' -ACACATCGCCGTCCTACTC- 3' と 16Sb: 5' -GACGAGAAGACCCTATCGAGC- 3' (Williams & Benzie)⁹⁾ を用いて Dloop 領域を含む 16S-rDNA から 12S rRNA 約 1kbp の領域を増幅し、両サイドから配列を決定した後、16S-rDNA 側の Dloop 領域側にプライマーを新規に設定した。(DloopRevSp: 5' -GGGTTAGCGAGCACCTT-3') 16sSb と DloopRevSp のプライマーセットを用いて、部分 16S-rDNA 配列及び control region を含む約 600bp の領域を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンス法により配列を決定した。ミトコンドリア cytochrome c oxidase 1 (CO1) 領域の PCR 増幅に際しては、Arndt ら (1996)¹⁰⁾ によって開発されたプライマー (CO1EF: 5' -ATAATGATAATGATAGGAGGRTTGG- 3') と (CO1ER: 5' -GCTCGTGTRTCTACRTCCAT- 3') を用いて行った。PCR 組成は、全量で 10 μ l の反応系は、5 X Green Buffer を 2 μ l、25 mM MgCl₂ を 1 μ l、dNTP MIX 2.5mM を 0.5 μ l、純水を 5.35 μ l、50pM のプライマーセットをそれぞれ 0.1 μ l、テンプレート DNA を 1 μ l、Go taq (Progema) を 0.05 μ l とした。PCR は、熱かい離反応を 94 度 3 分 1 サイクル、伸長反応 94 度 30 秒・50 度 30 秒・72 度 1 分を 37 サイクル、最終ステップを 72 度 5 分間行った。配列決定は Big Dye ver3.1 を用いて行った。配列の決定に際しては、BioEdit を用いて波形データと比較を行い、シーケンスエラーを取り除いた。その後、プライマー領域を含む精度の低い配列をトリムし、合計約 485bp の 310bp の部分 16S-rDNA 配列及び約 175bp の control region を含む領域を解析した。

3) アオヒトデのマイクロサテライトマーカーの開発

ゲノム DNA は DNeasy Tissue kit (Qiagen) で抽出し、Lian et al. (2006)¹¹⁾ の方法に従い、マイクロサテライト領域の単離を行った。簡潔に単離方法を書くと、まず抽出したアオヒトデの全ゲノム DNA を制限酵素で切断した後、得られた DNA 断片の両サイドに既知の配列を付加し、ライブラリーを作成する。ライブラリーの中でマイクロサテライト領域を持つ DNA 断片のみを PCR 法によって増幅させ、プライマーを設計することでマイクロサテライト領域の増幅を可能とした。

4) アオヒトデ類のマイクロサテライトマーカーによる集団解析

比較的スコアリングが容易でかつすべての海域のサンプルで明りょうに行うことのできた 5 遺伝子座 (*Akiko111*, *Akiko3b*, *Hiroko32c*, *Hiroko40*, *Hiroko33*) のみを用いて行った。PCR 反応は Multiplex PCR 法を用いシーケンサー 3130XL (ABI) を使ってジェノタイピングを行った。1 サンプルあたり、キアゲン社の Type it master mix を 5 μ l、純水 3.4 μ l、10pM のプライマー各種を 2.1 μ l ずつ入れたものに 1 μ l のテンプレート DNA を加え、95 度 5 分 1 サイクル、95 度 30 秒・55 度 30 秒・72 度 30 秒を 30 サイクル、72 度 30 分間行った。スコアリングはソフトウエア GENEMAPPER (ABI) を用いて行った。

5) 各種遺伝学的統計量及び集団分化の検定

ミトコンドリア領域：ハプロタイプ多様度 (h)、塩基多様度 (π) の統計量算出および、標準中立モデル (中立、任意交配、集団サイズの一定性) を帰無仮説とした集団構造や歴史の検定を行うための F_S (Fu 1997) ¹²⁾ 算出、mismatch distribution、Rogers検定 ¹³⁾ をソフトウェアArlequin 3.11 ⁴⁾ を用いて行った。全てのテストは20,000 permutationで行った。遺伝子配列から検出されたハプロタイプ同士の近縁性を視覚的に表すハプロタイプネットワーク (Minimum Spanning Tree) はソフトウェアDNspでハプロタイプを検出したのち、ソフトウェアNETWORKを用いて描いた。また、検出されたハプロタイプの系統関係は、MEGA ver 4を用いて、近隣結合法によって描いた (ブートストラップは1000)。ミトコンドリアDloop領域に関しては、アオヒトデ、ゴマフヒトデそれぞれの集団構造と集団間のconnectivityの統計的有意性を調べるため、Analysis of molecular variance (AMOVA) ¹⁴⁾ とペア集団の Φ_{ST} をArlequin 3.1を用いて算出した。

マイクロサテライト解析：進化的時間スケールでアオヒトデとゴマフヒトデの集団間にどの程度の集団分化が起こっていたのかを調べるためにAMOVAに基づくペア F_{ST} と R_{ST} をALEQUIN ver. 311を用いて算出した (20,000 permutations)。遺伝距離の階層構造を視覚化するため、遺伝距離 D_a ⁶⁾ に基づく系統樹をPOPULATION Software ⁷⁾ を用いて近隣接合法によって描いた。さらに、遺伝距離に関して主成分分析をGENEALX V6 ⁸⁾ で行った。

(3) マンジュウヒトデ及びコブヒトデのミトコンドリアCO1遺伝子を用いた系統地理解析

SEA-WP海域において、マンジュウヒトデは15地点から合計273個体、コブヒトデは13地点から合計311個体を、Chelex10%溶液を用いてDNA抽出し解析した (表1, 2)。ミトコンドリアcytochrome c oxidase 1 (CO1) 領域のPCR増幅に際して、プライマー (CO1EF: 5' -ATAATGATAATGATAGGAGG RTTGG-3') と (CO1ER: 5' -GCTCGTGTRTCTACTCCAT- 3') ¹⁰⁾ を用いて行った。コブヒトデに関しては、CO1ER及びCO1ERから増幅される領域の内側に新たにKobuF1:5' -CCGTTCTAAATT AAACATTTCTCTG-3' 及びKobuR1:5' -GGCTAGGACTGGGAGTGATAG-3' というプライマーを設計し、PCR及びシーケンス反応を行った。CR組成は、全量で10 μ lの反応系は、5 X Green Bufferを2 μ l、25 mM MgCl₂ を1 μ l、dNTP MIX 2.5mMを0.5 μ l、純水を5.35 μ l、50pMのプライマーセットをそれぞれ0.1 μ l、テンプレートDNAを1 μ l、Go taq (Progema)を0.05 μ lとした。PCRは、94度3分1サイクル、94度30秒・45度1分 (KobuF1とR1は60度1分)・72度1分を37サイクル、72度5分間行った。配列決定は全てダイレクトシーケンス法により、Big Dye ver3.1を用いて行った。コブヒトデに関しては、今回新たに配列を決定したものに加え共同研究者¹⁵⁾の配列も加え、全合計31地点631配列を解析した (表2)。ハプロタイプ多様度 (h)、塩基多様度 (π) の統計量算出および、標準中立モデル (中立、任意交配、集団サイズの一定性) を帰無仮説とした集団構造や歴史の検定を行うための F_S (Fu 1997) ¹²⁾ 算出、Tajima' s、DをソフトウェアArlequin 3.5.1.2を用いて行った。全てのテストは20,000 permutationで行った。遺伝子配列から検出されたハプロタイプ同士の近縁性を視覚的に表すハプロタイプネットワークはソフトウェアDNspでハプロタイプを検出したのち、ソフトウェアNETWORKを用いて描いた。集団構造の検出に際しては、ソフトウェアDNspでハプロタイプを検出したのち、Analysis of molecular variance (AMOVA) ¹⁴⁾ とペア集団の Φ_{ST} をArlequin 3.5.1.2を用いて算出した。

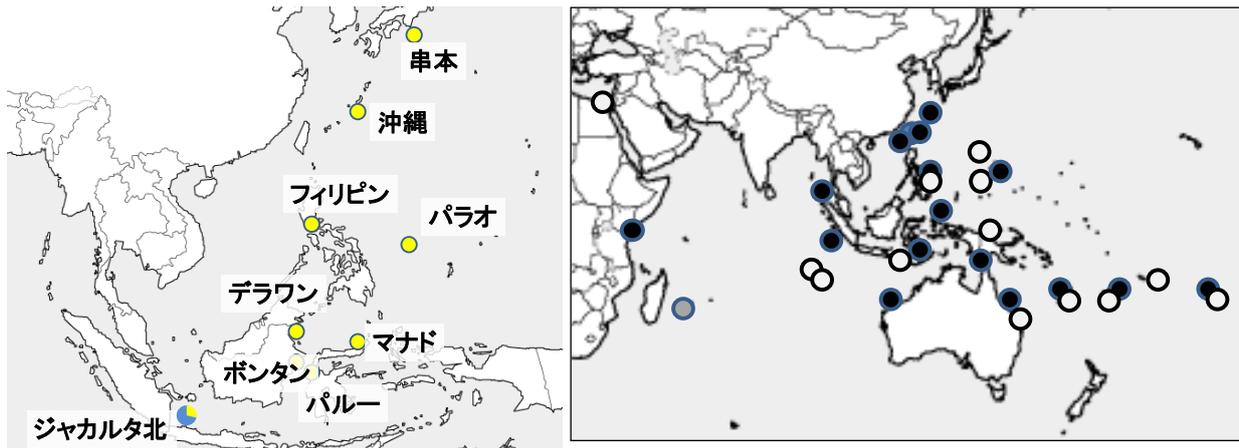


図1 (左図) SEA-WP海域周辺におけるオニヒトデのサンプリングサイト。パイグラフはインド洋の色形態が灰色、太平洋の色形態が白色を表す。

図2 (右図) アオヒトデ(黒)・ゴマフヒトデ(白)・ムラサキヒトデ(灰色)のサンプリングサイト

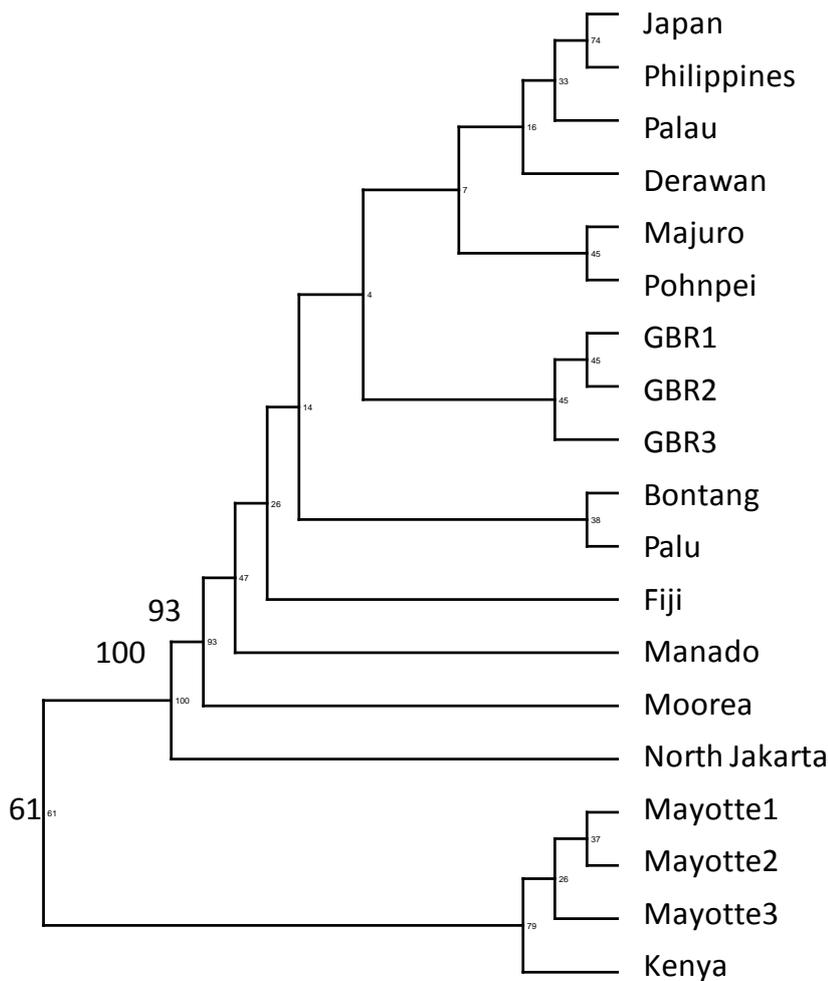


図3 マイクロサテライトによる解析結果。UPGMA法によるオニヒトデ集団の系統樹 (数字はブートストラップ)

表1 マンジュウヒトデのサンプルにおける統計値のまとめ. 全個体数 (N_{ind})、ハプロタイプ数 (N_{haplo})、ハプロタイプ多様度 (h)、塩基多様度 (π)、遺伝距離 (F_s)¹²⁾、Tajima's D ^{21, 22)}. 太字で灰色枠の値は有意差あり ($P < 0.05$)

サンプリング地点	国名	略称	N_{ind}	N_{haplo}	π	h	F_s	Tajima's D
Amami Ohshima	日本	AMM	5	4	0.0077	0.900	0.49	-0.95
Verde Island Passage Anilao	フィリピン	BAT	4	4	0.0041	1.000	-1.41	-0.21
Verde Island Passage Caban	フィリピン	CAB	10	7	0.0030	0.867	-3.35	-1.69
Verde Island Passage Lian	フィリピン	CAL	4	2	0.0008	0.500	0.17	-0.61
Verde Island Passage Maricaban	フィリピン	MAR	6	5	0.0142	0.933	0.68	0.66
Bolinao	フィリピン	BOL	8	3	0.0065	0.464	3.51	-1.81
Bacon	フィリピン	PAC	6	4	0.0022	0.867	-1.16	0.34
Palau	パラオ	PAU	13	10	0.0119	0.949	-1.58	0.41
Manado	インドネシア	BUN	32	16	0.0033	0.883	-10.78	-2.05
Derawan	インドネシア	DER	32	15	0.0054	0.802	-5.15	-1.94
Palu	インドネシア	PAL	29	14	0.0054	0.825	-4.54	-1.75
Bontang	インドネシア	BON	40	23	0.0046	0.915	-17.56	-2.19
Spermonde	インドネシア	SPE	34	21	0.0094	0.939	-7.65	-2.15
Pulau Pari	インドネシア	KES	48	27	0.0300	0.918	-0.97	0.72
Puhket	タイ	THI	2	2	0.0046	1.000	1.10	0.00

表2 コブヒトデのサンプルにおける統計値のまとめ. 全個体数 (N_{ind})、ハプロタイプ数 (N_{haplo})、ハプロタイプ多様度 (h)、塩基多様度 (π)、遺伝距離 (F_s)¹²⁾、Tajima's D ^{21, 22)}. 太字で灰色枠の値は有意差あり ($P < 0.05$)

サンプリング地点	国名	略称	N_{ind}	N_{haplo}	π	h	F_s	Tajima's D
Amami Ohshima	日本	AMM	8	4	0.014	0.64	-0.79	-1.60
Verde Island Passage Puertogarea	フィリピン	PUE	33	15	0.017	0.77	-11.92	-2.35
Bacon	フィリピン	PAC	11	4	0.012	0.78	-0.49	0.34
Palau	インドネシア	PAU	46	13	0.015	0.71	-8.02	-1.54
Derawan	インドネシア	DER	47	12	0.015	0.71	-6.33	-1.49
Palu	インドネシア	PAL	27	10	0.011	0.65	-7.51	-1.66
Bontang	インドネシア	BON	34	11	0.016	0.79	-5.54	-1.57
Spermonde	インドネシア	SPE	19	10	0.015	0.78	-6.84	-1.60
MAKASSAR_SSULA	インドネシア	sMAKe	15	8	0.018	0.84	-4.00	-1.32
SELAYAR_SSULA	インドネシア	sSELe	15	9	0.029	0.85	-3.44	-1.78
Bali	インドネシア	NUS	16	8	0.022	0.81	-3.00	-1.58
BALI	インドネシア	NUSe	12	4	0.012	0.74	-0.49	0.22
Karimunjawa	インドネシア	KARe	37	14	0.015	0.68	-10.81	-2.05
Komodo	インドネシア	KOM	35	10	0.012	0.61	-6.14	-1.57
SABOLOKECIL_FLORES	インドネシア	fSABe	9	3	0.019	0.64	1.45	0.69
SEBAYUR_FLORES	インドネシア	fSEBe	11	5	0.014	0.62	-1.53	-1.57
Manado	インドネシア	BUN	40	10	0.013	0.72	-4.96	-1.27
MANADO	インドネシア	BUNe	29	9	0.013	0.65	-4.81	-1.93
MISOOL_RA	インドネシア	rMISe	23	7	0.010	0.52	-3.50	-1.85
WAIGEO_RA	インドネシア	rWAlE	7	4	0.013	0.71	-1.22	-1.43
JEFMAN_RA	インドネシア	rJEFe	25	5	0.006	0.36	-2.45	-1.68
GURUABOSO_HALMA	インドネシア	hGURe	20	11	0.019	0.76	-6.98	-2.06
JEREWAI_HALMA	インドネシア	hJERe	17	8	0.017	0.73	-3.69	-1.53
TIDORE_HALMA	インドネシア	hTIDe	3	3	0.022	1.00	-0.69	0.00
TONUU_HALMA	インドネシア	hTONe	12	8	0.019	0.85	-4.64	-1.41
KOLORAI_HALMA	インドネシア	hKOLe	13	7	0.014	0.73	-3.73	-1.59
BIAK_TC	インドネシア	tBI Ae	23	9	0.020	0.75	-3.33	-0.88
WINDESI_TC	インドネシア	tWINe	7	4	0.017	0.71	-0.65	-0.32
YAPEN_TC	インドネシア	tYAPe	21	10	0.023	0.86	-4.16	-1.10
NUMFOR	インドネシア	tNUMe	15	6	0.020	0.79	-1.09	-0.97
JAYAPURA	インドネシア	JAYe	1	1	0.000	1.00	N.A.	N.A.

(4) アオサングのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析

1) 遺伝子解析用サンプリングと遺伝子型の決定

アオサングサンプルの集団遺伝学的解析については、11 海域 44 地点から採集した合計 693 個体を用いた(表 3)。DNA 抽出は Qiagen 社の DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いて行った。遺伝子型の決定は Yasuda et al. が開発したマイクロサテライトマーカー¹⁶⁾の中から、比較的スコアリングが容易でかつ全海域のサンプルで可能であった 8 遺伝子座 (*Saki06*, *Saki08*, *Miho04*, *Miho33*, *Mayu41*, *Mayu49*, *Kumiko02*, *Emi20*)を用いて行った。*Miho04* と *Miho33*の間には連鎖不平衡が見られたので、その後の解析は *Miho04*を除いた 7 遺伝子座を用いて行った。遺伝子型を決定したもののうち、同一サンプリング地点内で同一遺伝子型をもったクローンを除く異なる遺伝子型をもった個体が 6 以上あった地点に関して集団解析を行った。それぞれの海域において、ジェネット数 N_g (異なる遺伝子型を持った個体数) および集団の中でクローンの占める割合を求めた。遺伝的多様性を明らかにするため、その指標となる対立遺伝子の数 N_a 、有効対立遺伝子 N_e の数へテロ接合度の観測値 H_o と期待値 H_e 、および近親交配の起こっている程度を示す近交係数 (F_{IS}) を GENEALX V6 ソフトウェア⁸⁾ で計算した。

2) 集団遺伝学的解析

さらに、有性生殖による幼生分散の程度を調べるために、無性生殖によるクローンをそれぞれの集団内から抜いた後、 $N > 6$ であった 25 集団に関し、近年起きている幼生分散によってどの程度の集団分化が起きているのかを推定するため、遺伝距離の指標となるペア F_{ST} をソフトウェア GENEALX V6⁸⁾ を用いて算出した (9,999 permutations)。これら集団間の遺伝距離における階層構造を視覚化するため、遺伝距離 D_a ⁶⁾ に基づく近隣結合法による系統樹をソフトウェア POPULATIONS で描いた。また、遺伝的浮動と幼生分散のバランスを調べるために、遺伝的距離と地理的距離をプロットし、ソフトウェア TFGA を用いて mantel test を実施し、有意性を検定した。一方で遺伝距離に関する主成分分析をソフトウェア GENEALX V6⁸⁾ で行い、集団間の遺伝的距離を 2 次元にプロットした。一方で個体ごとの検定としてクラスタリング解析を行った。ソフトウェア STRUCTURE 3.3.2¹⁷⁾ を用いて、仮想的な先祖集団数 K を 1 から 10 までをシミュレーションし、最も確からしいクラスター (遺伝的集団) を推定した。

(5) ナマコ種の 16S-RNA を用いた集団遺伝学解析及び分子系統地理解析

熱帯性ナマコの種類および解析個体数については表 4 に示した。ゲノム DNA は真皮ないし管足組織の少量を ProteaseK $10 \mu\text{l}$ とともに $200 \mu\text{l}$ の 5% の Chelex 溶液に入れ 55 度で一晩組織を溶解させたのち、97 度で 30 分間熱したものをさらに 1 X CTAB 法¹⁾ で精製したのち、PCR 反応のテンプレート DNA とした。PCR 組成は、全量で $10 \mu\text{l}$ の反応系は、5 X Green Buffer を $2 \mu\text{l}$ 、25 mM MgCl_2 を $1 \mu\text{l}$ 、dNTP MIX 2.5 mM を $0.5 \mu\text{l}$ 、純水を $5.35 \mu\text{l}$ 、50 pM のプライマーセット (16Sar 5' -CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' 及び 16Sbr: 5' -CTCCGGTTTGAAC T CAGATCA-3'¹⁸⁾) をそれぞれ $0.1 \mu\text{l}$ 、テンプレート DNA を $1 \mu\text{l}$ 、Go taq (Progema) を $0.05 \mu\text{l}$ とした。PCR は、94 度 3 分 1 サイクル、94 度 30 秒・45 度 1 分・72 度 1 分を 37 サイクル、72 度 5 分間行った。配列決定は全てダイレクトシーケンシング法により、Big Dye ver3.1 を用いて行った。遺伝子配列から検出されたハプロタイプ同士

表3 アオサンゴのサンプリング地点等の情報

国名	海域	サンプリングサイト名	水深(m)	形態	遺伝子型	緯度	経度	ジェネット数		
								N	Ng	Ng/N
日本	奄美大島	Sankakuiwa (AMM)	6~9	小枝	A	28° 7'2.53"N	129°21'49.69"E	24	21	0.88
"	沖縄本島	Ooura Bay Jinza	2.5~6	葉状	A	26°32'16.2"N	128°04'53.1"E	41	1	0.02
"	"	Ooura bay Chiribishi	2~12	小枝	A	26°32'16.00"N	128° 4'46.00"E	40	1	0.03
"	"	Ooura Bay Okinose	8~10	小枝	B	26°31'49.4" N	128°04'36.1"E	46	2	0.04
"	"	Mizugama	2.5~3	中間	BC	26°21'50.21"N	127°44'5.78"E	3	2	0.67
"	久米島	KumeA-Ichiunda	2.5~4	小枝	A	26°20'55.00"N	126°50'48.50"E	5	5	1.00
"	"	KumeAA-Akashita	3~10	小枝	A	26°22'9.90"N	126°47'55.60"E	5	5	1.00
"	"	KumeB-Ichimonji	5	葉状	B	26°21'15.00"N	126°50'1.70"E	7	2	0.29
"	"	KumeC-Dougashima	7.5~8	中間	C	26°23'35.30"N	126°46'40.10"E	22	11	0.50
"	"	KumeE-NorthLine	5~6.5	中間	BC	26°19'56.70"N	126°49'40.82"E	4	4	1.00
"	"	KumeF-DoubleKurebasu	3~8	小枝	A	26°20'58.80"N	126°51'58.40"E	7	6	0.86
"	宮古島	Shimosaki	5	葉状	B	24°47'27.39"N	125°21'27.50"E	31	1	0.03
"	"	Bora River	0.4~0.7	中間	BC	24°43'44.90"N	125°25'55.70"E	8	2	0.25
"	"	Miyako south	6~10	葉状	B	24° 43' 02.7" N	125°20' 16.2" E	15	14	0.93
"	"	Shiratorisaki	4~9	中間	AC	24°51'52.10"N	125°10'42.90"E	7	6	0.86
"	石垣島	Shiraho reef	0~2	葉状	B	24°21'47.00"N	124°15'19.10"E	28	28	1.00
"	"	Akaishi(Ak)	1.5~2	葉状	B	24°32'51.85"N	124°18'26.60"E	49	45	0.92
"	"	Maezato	3	葉状	B	24°19'41.94"N	124°11'19.88"E	1	1	1.00
"	"	Ibaruma(IB)	5~11	葉状	B	24°31'36.00"N	124°15'2.00"E	3	3	1.00
"	"	Miyara	2~10	小枝	A	24°20'56.80"N	124°12'51.20"E	5	4	0.80
"	"	Kabira	12~14	小枝	A	24°29'19.50"N	124° 7'18.20"E	3	3	1.00
"	石西礁湖	SESA-Kengu	1.8~5.4	葉状	B	24°13'24.50"N	124° 1'44.90"E	20	18	0.90
"	"	SESB-East1	4~10	葉状	B	24°15'31.20"N	124° 7'51.20"E	20	10	0.50
"	"	SESC-East2	1.7~9.9	葉状	B	24°17'15.10"N	124° 8'58.60"E	5	4	0.80
"	"	SESD-Taketomi	2~9	葉状	B	24°16'16.30"N	124° 5'31.90"E	4	2	0.50
"	"	SESE-Ishigaki South	2.2~8.7	葉状	B	24°19'13.40"N	124° 9'46.10"E	20	12	0.60
"	"	SEN-Yonara East	1~3	葉状	B	24°21'10.30"N	123°57'14.70"E	26	13	0.50
"	"	SENB-Kohama	2.5~3.0	葉状	B	24°20'43.30"N	124° 0'14.30"E	5	5	1.00
"	"	SENA-Yonara West	1.5~8.6	小枝	A	24°21'40.10"N	123°56'53.50"E	15	14	0.93
"	西表島	Iriomote-north	3.9~8.5	小枝	A	24°24'5.50"N	123°53'21.70"E	15	15	1.00
"	台湾南	TWNA-Little Bay	5~9.8	小枝	A	21°56'12.10"N	120°48'20.50"E	10	10	1.00
"	"	TWNB-Chanfan Rock	9.6~11.4	小枝	A	21°56'1.07"N	120°49'19.19"E	10	10	1.00
"	"	TWNC-Leitashin	4~7	小枝	A	21°55'53.12"N	120°44'41.77"E	10	10	1.00
"	"	TWND-Outlet	1.4~2.5	小枝	A	21°55'54.60"N	120°44'43.40"E	10	9	0.90
"	"	TWNE-Taiooshi	2.3~5.1	小枝	A	21°57'12.20"N	120°46'8.90"E	10	10	1.00
"	"	TWNF-Wanlitong	2.8~4.7	小枝	A	21°59'43.29"N	120°42'18.96"E	10	10	1.00
"	"	TWNG-Hongchaikeng	4.4~5.7	小枝	A	21°58'23.27"N	120°42'55.01"E	10	10	1.00
フィリピン	バルデアイランド	VCAB-Caban	?	葉状	B	13°41'7.29"N	120°50'23.12"E	19	6	0.32
"	"	VMAR-Maricaban	?	葉状	B	13°39'45.18"N	120°52'27.35"E	19	17	0.89
"	"	VCAL-Lian	?	小枝	A	13°58'53.79"N	120°37'45.34"E	20	20	1.00
"	"	VBAT-Anilao	?	葉状	B	13°43'52.84"N	120°52'1.98"E	10	7	0.70
"	"	VPUE-Puerto Galera	?	葉状	B	13°30'52.71"N	120°57'8.14"E	10	4	0.40
パラオ	パラオ	Palau-Malakal	1~2	葉状	B	7°21'16.20"N	134°27'36.50"E	24	23	0.96
タイ	タイ	Puhket?	?	小枝	A	?	?	37	36	0.97
合計								693	421	

表4 熱帯性ナマコサンプルにおけるミトコンドリアDNA解析データのまとめ. 全個体数 (Nind)、ハプロタイプ数 (Nhaplo)、ハプロタイプ数/個体数 (hap/ind)

種名	和名	略称	N _{ind}	N _{hap}	hap/ind
<i>Actinopyga echinites</i>	トゲクリイロナマコ	Ae	18	8	0.44
<i>Actinopyga mauritiana</i>	クリイロナマコ	Am	33	24	0.73
<i>Bohadschia argus</i>	ジャノメナマコ	Ba	49	16	0.33
<i>Holothuria edulis</i>	アカミシキリ	He	34	15	0.44
<i>Holothuria leucospilota</i>	ニセクロナマコ	Hl	303	79	0.26
<i>Stichopus chloronotus</i>	シカクナマコ	Sc	256	8	0.03
合計			693	150	0.22

の近縁性を視覚的に表すハプロタイプネットワークはソフトウェアDNspでハプロタイプを検出したのち、ソフトウェアNETWORKを用いて描いた。

4. 結果・考察

(1) オニヒトデのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析

UPGMA 系統樹と pairwise F_{ST} とともに、北ジャカルタの集団と、インドネシアのそれ以外の海域では遺伝的に大きく異なった(図 3、表 4)。すなわち、今回サンプルを採集したジャカルタ北とそれよりも東側のインドネシアの海域間においては幼生分散が極めて限られていること明らかとなった。さらに、太平洋・インド洋のオニヒトデ集団と比較してみると、ジャカルタ北の集団は太平洋とインド洋(南アフリカ)の中間的な遺伝子組成を示すのに対し、その他のインドネシアのより東側から採集された集団は、太平洋の集団に遺伝的に近く(図 3、図 4)、この結果は、インド洋からジャワ海への海水流動の存在を示唆している。しかし、インドネシア東側の海域では、インド洋側の遺伝子型が見つからなかったことから、バンダ海から西ジャワ海への遺伝子流動は起こりうるが、その逆の西ジャワ海から、バンダ海への流動はオニヒトデの産卵期にはあまり起こらないことが推察される。北ジャカルタで採集された 7 個体のオニヒトデのうち、5 個体は紫色のインド洋に典型的な形態をしており、残りの 2 個体は太平洋で典型的なオレンジ色の形態をしていた。ジャカルタ北以外のインドネシアのオニヒトデ個体はみな、太平洋で典型的なオレンジ色の形態をしていた。ミトコンドリアの C01 領域の配列を調べると、最終氷河期に分断された時にインド洋と太平洋のオニヒトデは別種に進化したことが示唆されている⁹⁾。本研究によりジャカルタ北の海域は、オニヒトデにおいてインド洋と太平洋 2 種が共存するコンタクトゾーンであることが強く示唆された。

Fisher's exact tests 及びペアワイズ F_{ST} とともに Derawan と Manado, Manado と Bontang, Derawan と Bontang ($P > 0.05$ Bonferroni correction) のペア集団の間で統計学的に有意な集団分化が見られなかった。すなわちこの 3 集団間では幼生分散が起きていることを示唆している。海流モデルによると Derawan と Manado は Sulawesi, Mindanao 及び Kalimantan 島の間で起きる中規模渦によって幼生が運ばれる可能性がある(図 5、Kartadikaria et al. 準備中)。さらに、これらの幼生を含む海流は、インドネシアスルーフロー(ITF)によって南側の Bontang 等の海域に運ばれることが予想される。興味深いことに、Fisher's exact tests では、Bontang と Palu の地理的距離は非常に近く(直線距離で 284 km)、非常に強い流れである ITF が Bontang と Palu の間に流れているにも関わらず、わずかに集団分化しているという結果になった(表 5)。pairwise F_{ST} では有意性がみられなかったことから、統計的な変動性による可能性も否定できないが、もう一つの説明として、Palu は非常に切り込みの深い湾奥部に位置しており、この局所的な地形がわずかな集団分化を生じさせた可能性が考えられる。この結果は、2,600km 離れてもフィリピンと日本本州和歌山の集団との間に集団分化が見られなかった事実と対照的であり、インドネシア周辺海域におけるオニヒトデ遺伝構造は、太平洋海域に比べて明瞭であった。これは、当海域がインド洋と太平洋両方の遺伝子が検出される海域であること、太平洋に比べて複雑な地形と海流システムを有していることに起因すると考えられる。いずれにせよ、Manado、Derawan 及び Bontang のような遺伝的均一性が見られた海域はオニヒトデの 2 次的大量発生が起こる危険性もあるので、モニタリングの強化と、早期駆除が必須であると考えられる。

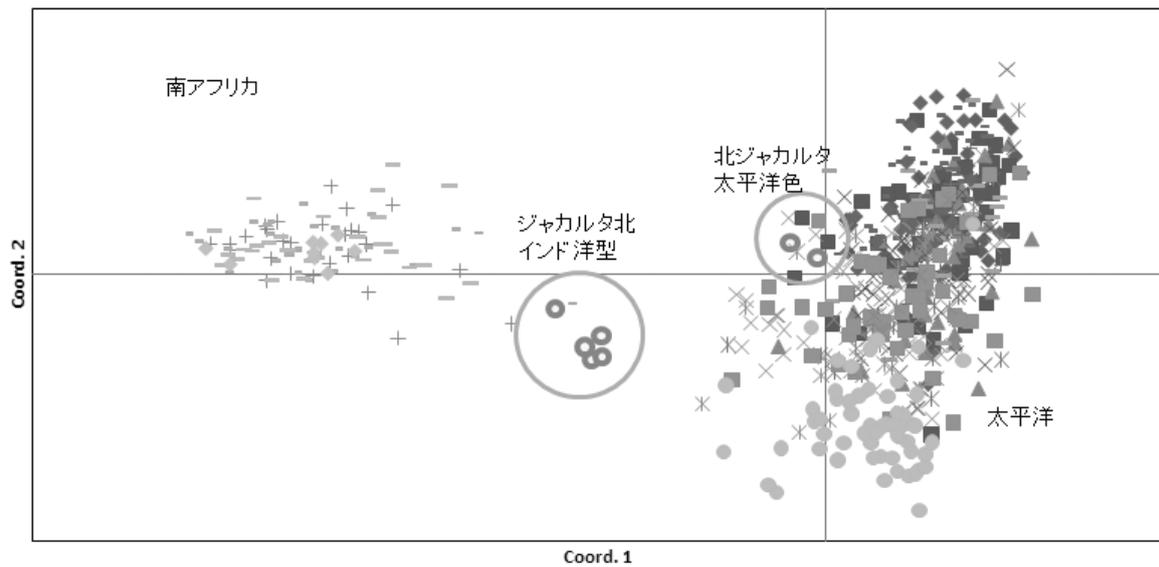


図4 オニヒトデ集団の主成分分析の結果。第2主成分まででデータの58.4%を表す。

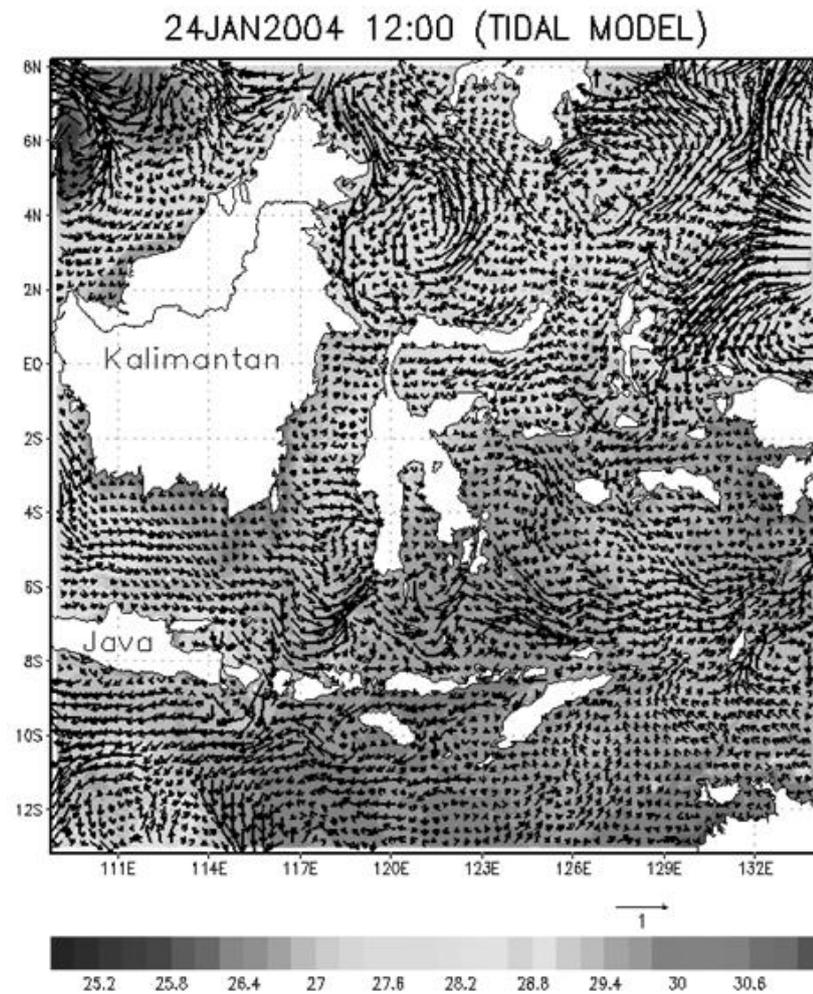


図5 オニヒトデの産卵期間におけるSEA-WP海域の海流シミュレーション結果（サブテーマ1との連携）。

表 5 オニヒトデ (*Acanthaster* sp.) 集団の集団分化の検定結果. フライツジャーの検定 (P 値, 右上) とペアワイズ FST 値 (左下). 太字は Bonferroni correction の後, $P < 0.05$ で有意差あり, 灰色枠の文字は Bonferroni correction の後, $P < 0.005$ で有意差あり

	Ishi	Philp	Palau	PON	Maju	KES	MAN	DER	BON	PAL	GBR	Fiji	Moorea	Mayyote	Kenya
Ishigaki		0.008	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$											
Philippines	0.002		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$											
Palau	0.022	0.016		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$										
Pohnpei	0.034	0.032	0.022		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$									
Majuro	0.039	0.032	0.024	0.020		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$								
KES	0.248	0.248	0.259	0.234	0.234		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$							
Manado	0.032	0.019	0.035	0.046	0.054	0.290		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$						
Deirawan	0.016	0.019	0.039	0.046	0.062	0.260	0.009		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$					
Bontang	0.019	0.009	0.036	0.042	0.054	0.280	0.013	0.013		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$				
Palu	0.015	0.017	0.033	0.044	0.065	0.313	0.029	0.013	0.014		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
GBR	0.032	0.024	0.022	0.031	0.013	0.222	0.043	0.053	0.038	0.046		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
Fiji	0.064	0.053	0.071	0.073	0.046	0.246	0.076	0.090	0.067	0.084	0.040		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
Moorea	0.131	0.120	0.113	0.109	0.091	0.265	0.126	0.139	0.117	0.147	0.088	0.109		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
Mayyote	0.262	0.260	0.264	0.256	0.265	0.350	0.318	0.265	0.293	0.294	0.239	0.270	0.289		$P < 0.0001$
Kenya	0.274	0.271	0.270	0.264	0.263	0.364	0.314	0.280	0.300	0.308	0.246	0.278	0.298	-0.009	

表6 アオヒトデおよびゴマフヒトデの集団遺伝学解析の各統計値 (by Arlequin 3.1⁴⁾, 塩基多様度 (π), ハプロタイプ多様度 (h), F_S ¹²⁾). 表中の太字および灰色枠の値は有意差あり ($P < 0.05$)

アオヒトデ (Dloop)						ゴマフヒトデ (Dloop)					
サンプリング地点	略称	個体数	π	h	F_S	サンプリング地点	略称	個体数	π	h	F_S
Solomon	SOL	4	0.021	1.000	0.314	Guam	GUM	5	0.004	0.900	-1.012
Fiji	FIJ	11	0.003	0.709	-0.228	French Polynesia	FPL	8	0.018	0.607	5.890
Western Australia	WA	19	0.017	0.965	-3.269	Papua New Guinea	PNG	12	0.010	0.439	5.276
New Caledonia	NCL	7	0.017	0.905	1.166	Samoa	SAM	7	0.016	0.762	4.646
Guam	GUM	5	0.015	0.968	-4.525	Cook	COO	8	0.011	0.893	6.238
Torres Strait	TRS	24	0.011	0.964	-8.909	Cocos-Keesing	CKE	8	0.005	0.893	-0.930
Palau	PLU	10	0.010	0.800	1.253	Red Sea	RES	8	0.000	0.000	0.000
Indonesia Sekotong	ISK	14	0.018	0.967	-3.229			56			
Philippines Negro	PhN	7	0.025	1.000	-1.342	ゴマフヒトデ (COI)					
Philippines Smul	PhS	8	0.009	0.964	-2.283	サンプリング地点	略称	個体数	π	h	F_S
Philippine Bolinao	PhB	34	0.013	0.945	-3.457	Papua New Guinea	PNG	9	0.003	0.222	3.450
Japan Ishigaki	JpI	13	0.019	0.936	-0.274	Samoa	SAM	9	0.007	0.778	2.112
Japan Miyako	JpM	11	0.006	0.836	-0.940	Cook	COO	11	0.012	0.327	9.482
Japan Okinawa	JpO	11	0.015	0.946	-1.810	Cocos-Keesing	CKE	10	0.013	0.756	2.543
Tahiketa	ThK	7	0.006	0.952	-2.276	Red Sea	RES	5	0.003	0.700	0.469
ThaiPu	ThP	10	0.006	0.978	-5.628			44			
South Africa	SA	22	0.002	0.680	-1.083						

表7 アオヒトデ、ゴマフヒトデDloop領域のペアワイズ Φ_{ST} の結果。(a)はアオヒトデ、(b)はゴマフヒトデの結果をそれぞれ示す。表中の太字および灰色枠の値は有意差あり ($P < 0.05$)

(a)																
	JpI	PhB	SOL	FIJ	WA	NCL	GUM	TRS	PhS	JpM	PLU	ISK	JpO	PhN	SA	ThK
PhB	0.033															
SOL	-0.001	-0.027														
FIJ	0.174	0.157	0.180													
WA	0.021	-0.003	-0.019	0.153												
NCL	0.058	0.052	0.018	0.181	0.002											
GUM	-0.007	0.001	-0.033	0.151	-0.012	0.025										
TRS	0.031	0.044	0.012	0.141	0.001	-0.022	0.018									
PhS	0.051	0.002	-0.045	0.171	0.003	0.065	0.009	0.036								
JpM	0.100	0.019	0.077	0.227	0.051	0.121	0.072	0.095	0.071							
PLU	0.116	0.033	0.097	0.246	0.073	0.139	0.095	0.106	0.086	-0.072						
ISK	-0.001	0.018	0.020	0.157	0.004	0.061	-0.004	0.014	0.008	0.047	0.066					
JpO	0.018	-0.001	-0.039	0.166	0.001	0.009	-0.003	0.034	0.023	0.063	0.076	0.031				
PhN	0.024	-0.012	0.000	0.158	-0.011	0.048	0.003	0.020	0.000	0.037	0.066	-0.003	0.016			
SA	0.203	0.181	0.213	0.308	0.181	0.231	0.178	0.177	0.202	0.252	0.269	0.186	0.202	0.190		
ThK	0.057	0.052	0.027	0.180	0.033	0.071	0.039	0.041	0.042	0.110	0.129	0.040	0.051	0.024	0.211	
ThP	0.044	0.040	0.013	0.159	0.024	0.057	0.027	0.030	0.029	0.094	0.111	0.028	0.039	0.012	0.157	-0.040

(b)						
	PNG	GUM	FRP	RES	SAM	COO
GUM	0.472					
FRP	0.258	0.093				
RES	0.483	0.787	0.298			
SAM	0.054	0.376	0.114	0.393		
COO	0.683	0.762	0.442	0.819	0.555	
CKE	0.304	0.448	0.177	0.262	0.216	0.753

(2) アオヒトデ・ゴマフヒトデ・ムラサキヒトデの集団遺伝学的解析及び系統地理解析

Dloop領域に関しては、アオヒトデは241配列、ゴマフヒトデ72配列、ムラサキヒトデは、6配列、合計319配列を決定できた。検出されたハプロタイプの数、Dloop領域ではアオヒトデで96、ゴマフヒトデで18、ムラサキヒトデで3であった。C01領域に関しては、ゴマフヒトデを中心に72配列決定で、ハプロタイプは合計24みつかった。そのうち、同じ地点から4配列以上の配列を得られた集団を対象にArlequinで計算した各統計量及び各集団における標準中立モデル試験の結果、紅海を除くすべての集団において、C01領域よりもDloop領域の方が高い遺伝的多様性が見られた(表6)。Dloop領域では単一のハプロタイプしかみつからなかったゴマフヒトデの紅海のサンプルを除き、0.607(ゴマフヒトデのフレンチポリネシア)から1.00(アオヒトデのソロモン島)と、高いハプロタイプ多様度を示した。C01領域においてもまた、0.222(ゴマフヒトデのパプアニューギニア)から0.778(サモア島)と高いハプロタイプ多様度が検出された。集団の歴史に関して、 F_s の値は、アオヒトデのグアム・トレス海峡・タイブーケットの3集団以外では統計的に有意ではなく、Dloop領域の標準中性モデルの帰無仮説は棄却されなかった(表6)。一方、Mismatch distributionとRogerの集団の急激な増加試験それぞれでは、アオヒトデの石垣・フィリピンボリナオ・トレス海峡、ゴマフヒトデの紅海・フレンチポリネシアの計5集団以外では統計的に有意ではなかった。このことから、今回解析したほとんどの海域で集団の急激な増大が起こっていることが示唆され、氷河期の海面上昇などによる一時的な集団の減少から、その後集団の急激な増大が起こったことが推察される。アオヒトデのC01領域の配列を解析した他の研究結果の多くでも、多くの集団において同様の集団の急激な増大の傾向がみられている¹⁵⁾。

*Linckia*属の種間関係に関しては、ミトコンドリアDloop領域の配列を用いてもゴマフヒトデとアオヒトデの種を遺伝的に識別することは不可能であった。アオヒトデとゴマフヒトデを混合して解析した場合、種とは関連のない2つのクレードに分かれた(図6)。Williams(2000)もすでにC01領域の配列を用いた系統解析によりゴマフヒトデとアオヒトデは、形態や生態、生息域に違いがみられるにもかかわらず、遺伝的に同一種であることを報告している。個々のハプロタイプの進化系統関係を示したハプロタイプネットワークを描いた結果(図7)においても、完全に独立したムラサキヒトデのみのクレードとは別に、系統樹と同様のゴマフヒトデとアオヒトデの両種が入り組んだ2つの大きなクレードが見つかった。これは、Williams⁹⁾によって、報告されている、インド洋クレードと太平洋クレードに相当するものと考えられる。クレード1には太平洋で採集されたアオヒトデ・ゴマフヒトデの個体が含まれ、クレード2にはアオヒトデ・ゴマフヒトデともに太平洋とインド洋全ての個体が含まれた他、太平洋で採集された遺伝的にアオヒトデと生殖隔離が起きている可能性もあるとされる⁹⁾オレンジ色のアオヒトデ3個体も全てクレード2に属していた。このことから、クレード1は太平洋特異的なハプロタイプの集合体であり、クレード2はインド洋太平洋両方に幅広く存在するより形態的にも多様化したハプロタイプの集合であることが推測される。採集氷河期に海水位が下がって太平洋とインド洋の間の遺伝子流動が大きく制限されていたことを踏まえ、インド洋(紅海を含む)と太平洋の集団間で遺伝的に有意な差があるかどうかをAMOVAにより調べたところ、アオヒトデ・ゴマフヒトデともに統計的に有意にはならず、特にゴマフヒトデでその傾向が強かった。一方で、グループ内の集団間・集団内の遺伝構造はアオヒトデ・ゴマフヒトデともに統計学的に有意であった。AMOVAの結果及び図7でみられた2つのクレードに属する個体の地理的情報から、アオヒトデ・ゴマフヒトデは一度氷河期に地質学的に集団

表8 マイクロサテライト解析におけるアオヒトデ(LL), ゴマフヒトデ(LM), ムラサキヒトデ(LG) 集団の解析個体数 (N), 対立遺伝子数 (Na), ヘテロ接合度の観測値 (Ho) 及び期待値 (He), 近交係数 (Fis) を示す。

サンプル名	遺伝子座	N	Na	Ho	He	Fis	サンプル名	遺伝子座	N	Na	Ho	He	Fis
LL-PhiBo	H32c	44	11	0.886	0.810	-0.095	LL-GBR	H32c	53	8	0.774	0.737	-0.050
	H40	46	6	0.326	0.596	0.453		H40	52	10	0.500	0.575	0.131
	H33	46	10	0.478	0.602	0.206		H33	53	8	0.528	0.623	0.152
	A111	47	9	0.553	0.522	-0.060		A111	53	6	0.472	0.380	-0.242
	A3ball	47	9	0.426	0.463	0.082		A3ball	45	6	0.200	0.261	0.234
LL-PhiSmu	H32c	11	4	0.909	0.607	-0.497	LL-NewCal	H32c	16	6	0.625	0.779	0.198
	H40	12	5	0.500	0.569	0.122		H40	19	5	0.316	0.457	0.309
	H33	12	6	0.500	0.576	0.133		H33	19	4	0.474	0.578	0.180
	A111	12	5	0.583	0.472	-0.235		A111	18	5	0.611	0.573	-0.067
	A3ball	12	4	0.250	0.229	-0.091		A3ball	19	5	0.105	0.284	0.629
LL-PhiNeg	H32c	19	9	0.947	0.813	-0.165	LL-Solomon	H32c	25	7	0.760	0.749	-0.015
	H40	20	4	0.300	0.379	0.208		H40	26	7	0.500	0.661	0.244
	H33	21	8	0.476	0.625	0.238		H33	26	8	0.500	0.536	0.068
	A111	21	4	0.476	0.416	-0.144		A111	25	6	0.640	0.536	-0.194
	A3ball	21	4	0.190	0.178	-0.070		A3ball	23	3	0.130	0.269	0.516
LL-IndoSK	H32c	38	9	0.842	0.791	-0.064	LL-Guam	H32c	28	7	0.821	0.747	-0.099
	H40	34	8	0.529	0.500	-0.059		H40	28	7	0.429	0.610	0.297
	H33	37	7	0.514	0.677	0.242		H33	28	8	0.607	0.661	0.082
	A111	38	12	0.447	0.483	0.073		A111	28	7	0.393	0.491	0.200
	A3ball	38	5	0.237	0.219	-0.082		A3ball	25	4	0.120	0.252	0.524
LL-TorDug	H32c	26	8	0.808	0.763	-0.058	LL-SA	H32c	49	11	0.878	0.851	-0.031
	H40	24	7	0.500	0.599	-0.165		H40	49	6	0.469	0.558	0.159
	H33	26	7	0.538	0.676	0.204		H33	50	5	0.520	0.544	0.044
	A111	26	6	0.423	0.473	0.106		A111	50	5	0.700	0.573	-0.222
	A3ball	25	4	0.200	0.186	-0.078		A3ball	44	4	0.250	0.323	0.226
LL-TorKir	H32c	29	8	0.862	0.684	-0.260	LL-WA	H32c	81	9	0.704	0.780	0.098
	H40	29	6	0.345	0.456	0.244		H40	79	10	0.557	0.557	0.000
	H33	29	7	0.414	0.571	0.275		H33	81	10	0.556	0.638	0.129
	A111	29	7	0.621	0.558	-0.113		A111	81	11	0.457	0.464	0.016
	A3ball	29	3	0.103	0.099	-0.042		A3ball	80	8	0.200	0.188	-0.065
LL-ThaiKata	H32c	25	9	0.880	0.744	-0.183	LL-JP	H32c	137	12	0.825	0.803	-0.027
	H40	25	6	0.320	0.406	0.213		H40	137	12	0.482	0.514	0.063
	H33	22	3	0.591	0.541	-0.092		H33	136	10	0.588	0.682	0.137
	A111	25	4	0.440	0.410	-0.072		A111	136	14	0.596	0.512	-0.164
	A3ball	23	2	0.130	0.122	-0.070		A3ball	137	9	0.248	0.230	-0.077
LL-ThaiPhu	H32c	14	8	0.786	0.742	-0.058	LL-Palau	H32c	11	5	0.545	0.731	0.254
	H40	13	6	0.385	0.500	0.231		H40	18	5	0.444	0.488	0.089
	H33	14	4	0.714	0.617	-0.157		H33	19	5	0.316	0.364	0.133
	A111	14	5	0.643	0.490	-0.313		A111	19	4	0.474	0.393	-0.204
	A3ball	13	2	0.231	0.204	-0.130		A3ball	19	3	0.105	0.101	-0.041
LL-Fiji	H32c	59	6	0.831	0.723	-0.149	LG-Seysh	H32c	7	4	0.571	0.541	-0.057
	H40	58	6	0.345	0.442	0.220		H40	9	4	0.778	0.698	-0.115
	H33	59	10	0.508	0.682	0.254		H33	8	5	0.875	0.625	-0.400
	A111	59	11	0.627	0.538	-0.165		A111	9	6	0.778	0.716	-0.086
	A3ball	56	6	0.268	0.483	0.446		A3ball	9	3	0.889	0.593	-0.500

表 9 アオヒトヅ (LL)、ゴマフヒトヅ (LM)、ムラサキヒトヅ (LG) のベテライズ Fst (via Frequency) の値。表内の太字で灰色枠の値は有意差あり (P<0.05)

	LLPhB	LLPhS	LLPhN	LLSK	LLTRSD	LLTRSK	LLThK	LLThP	LLFu	LLGBR	LLNCL	LLSOL	LLGUM	LLSA	LGSEY	LLWA	LLP	LLPLU	LMGUM	LMPNG	LMNSAM	LMFRP	LMCOO	LMCKE	LMFU	
LLPhB																										
LLPhS	0.013																									
LLPhN	0.035	0.044																								
LLSK	0.011	0.015	0.018																							
LLTRSD	0.013	0.016	0.017	0.007																						
LLTRSK	0.021	0.020	0.034	0.014	0.013																					
LLThK	0.030	0.037	0.014	0.014	0.013	0.019																				
LLThP	0.027	0.040	0.019	0.017	0.017	0.027	0.008																			
LLFu	0.015	0.028	0.039	0.016	0.020	0.027	0.034	0.031																		
LLGBR	0.010	0.011	0.027	0.005	0.007	0.013	0.017	0.020	0.017																	
LLNCL	0.014	0.023	0.035	0.012	0.015	0.019	0.027	0.025	0.013	0.015																
LLSOL	0.012	0.023	0.045	0.015	0.019	0.025	0.034	0.034	0.022	0.016	0.013															
LLGUM	0.010	0.015	0.028	0.006	0.008	0.017	0.025	0.027	0.015	0.007	0.011	0.009														
LLSA	0.021	0.044	0.044	0.024	0.028	0.029	0.032	0.026	0.034	0.030	0.023	0.024	0.027	0.120												
LGSEY	0.107	0.130	0.168	0.127	0.130	0.127	0.156	0.142	0.097	0.125	0.124	0.119	0.119	0.120	0.133											
LLWA	0.011	0.012	0.025	0.004	0.008	0.016	0.019	0.022	0.018	0.007	0.008	0.011	0.006	0.028	0.133											
LLP	0.009	0.014	0.020	0.003	0.006	0.012	0.016	0.017	0.013	0.006	0.008	0.013	0.005	0.021	0.125	0.003										
LLPLU	0.027	0.021	0.061	0.024	0.035	0.033	0.051	0.057	0.044	0.027	0.022	0.022	0.025	0.054	0.167	0.017	0.024									
LMGUM	0.143	0.182	0.211	0.170	0.189	0.184	0.204	0.181	0.157	0.179	0.149	0.152	0.171	0.144	0.191	0.173	0.167	0.186								
LMPNG	0.072	0.084	0.041	0.051	0.054	0.077	0.047	0.049	0.080	0.062	0.065	0.071	0.062	0.083	0.228	0.052	0.053	0.081	0.190							
LMNSAM	0.105	0.123	0.114	0.101	0.113	0.135	0.119	0.102	0.114	0.114	0.108	0.109	0.109	0.110	0.210	0.104	0.101	0.141	0.142	0.082						
LMFRP	0.085	0.090	0.065	0.060	0.071	0.081	0.065	0.070	0.082	0.076	0.066	0.074	0.070	0.098	0.232	0.058	0.061	0.075	0.188	0.027	0.084					
LMCOO	0.054	0.065	0.079	0.052	0.061	0.077	0.078	0.067	0.059	0.062	0.051	0.043	0.049	0.070	0.149	0.051	0.053	0.065	0.128	0.062	0.055	0.050				
LMCKE	0.110	0.143	0.147	0.122	0.139	0.135	0.140	0.124	0.114	0.136	0.102	0.114	0.128	0.102	0.172	0.126	0.120	0.148	0.025	0.145	0.118	0.129	0.103			
LMFU	0.108	0.109	0.098	0.084	0.098	0.113	0.101	0.102	0.107	0.101	0.101	0.101	0.094	0.127	0.245	0.085	0.086	0.106	0.227	0.059	0.051	0.044	0.052	0.181		

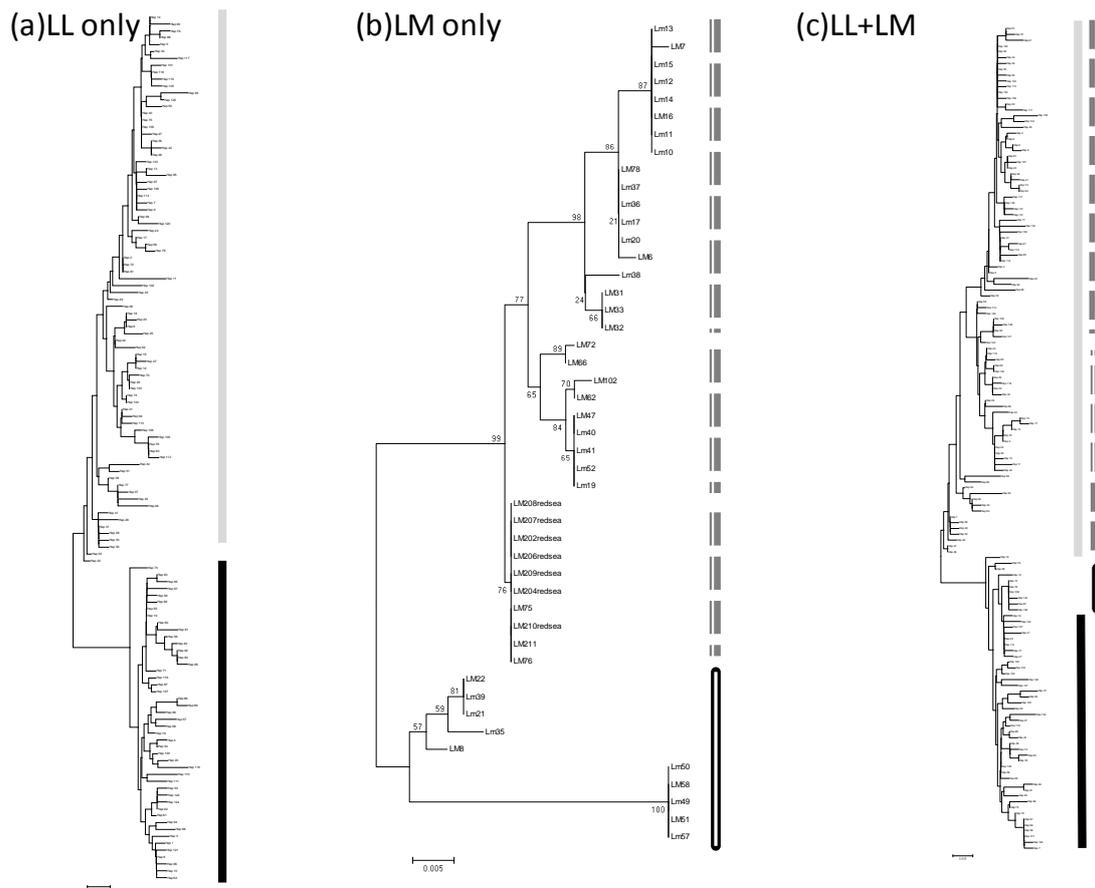


図6 ミトコンドリアDloop領域の配列を用いて描いた系統樹（近隣結合法により作成）
 (a) アオヒトデのみ (b) ゴマフヒトデのみ (c) アオヒトデとゴマフヒトデ両方

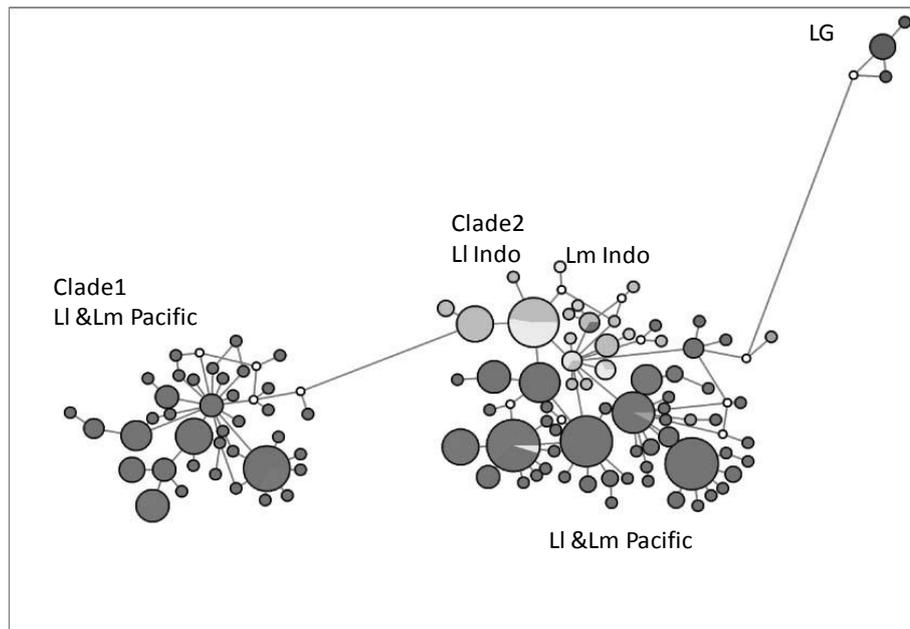


図7 ミトコンドリアDloop領域ハプロタイプネットワーク。黒：ムラサキヒトデ、濃灰：太平洋のアオヒトデ・ゴマフヒトデ、薄灰色:インド洋アオヒトデ、白灰：インド洋ゴマフヒトデ

分断され、太平洋側の祖先集団がクレード1を形成し、インド洋側の祖先集団がクレード2を形成したのち、海水面の上昇とともにインド洋型のクレード2の個体が太平洋側に分布を拡大しながら、オレンジ色のアオヒトデなど形態的な進化も同時に遂げていったことが推察される。一方で、太平洋で形成されたクレード1における海面上昇後の太平洋からインド洋への移住は西オーストラリアまでに限られていることが推測される（図8）。

種ごとに集団遺伝構造をDloop領域配列からAMOVAを算出した結果、アオヒトデ全体で Φ_{ST} は 0.062 ($p < 0.0001$)、ゴマフヒトデ全体では Φ_{ST} が 0.412 ($p < 0.0001$) となり、両種ともに統計学的に有意な遺伝構造を持っており、ゴマフヒトデの方が集団間で遺伝構造に差があることが判明した。

アオヒトデとゴマフヒトデそれぞれの集団間のconnectivityを解明するため、Dloop領域を用いてペアワイズ Φ_{ST} の値を求めた結果は表7のようになった。アオヒトデに関しては、ペアワイズ Φ_{ST} の値は -0.072 (宮古とパラオ間) から 0.308 (フィジーと南アフリカ間) であり、ゴマフヒトデでは、0.054 (パプアニューギニアとサモア) から 0.819 (紅海とクック島) であり、ゴマフヒトデの方が大きな遺伝構造をもっていた。アオヒトデにおいては、インド洋と太平洋のコンタクトゾーンであるSEA-WP海域（フィリピン3地点、琉球列島3地点、トレス海峡、西オーストラリア、東インドネシア (Sekotong)）の集団間では統計的に有意な集団分化は全く見られなかった ($P > 0.05$)。すなわち、アオヒトデにおいて太平洋とインド洋の間で大きな遺伝子流動があることが示唆された。一方で、アオヒトデにおいても地理的に離れた南アフリカとその他の集団間、フィジーとそれ以外の集団間では比較的大きな遺伝距離が検出され、幼生を通じたconnectivityが制限されていることが示唆された。一方ゴマフヒトデでは3つのペア集団（グアムとフレンチポリネシア、フレンチポリネシアとサモア、パプアニューギニアとサモア）を除くすべてのペア集団で遺伝的に分化しており、幼生分散は制限されていることが推察された。

5遺伝子座を使って合計765個体をマイクロサテライトマーカーでジェノタイプピングした結果、アオヒトデ(LL)、ゴマフヒトデ(LM)、ムラサキヒトデ(LG)の集団の解析個体数(N)、アレル数(N_a)、ヘテロ接合度の観測値(H_o)及び期待値(H_e)、近交係数(F_{is})は表8のようになった。解析した5マイクロサテライト遺伝子座は *Akiko03* におけるゴマフヒトデのフレンチポリネシアおよびゴマフヒトデのフィジーの集団で単一アレルであった以外は全ての集団で高い多型性を示した。アオヒトデの17集団の平均ヘテロ接合度は観測値と期待値でそれぞれ0.498と0.521、ゴマフヒトデの7集団では0.498と0.432、ムラサキヒトデ1集団で0.778と0.634であり、アオヒトデとゴマフヒトデではほぼ同程度、ムラサキヒトデはアオヒトデ・ゴマフヒトデよりもやや高い遺伝的多様性を示した。ペア集団間の F_{ST} を求め、集団構造の有意検定を行ったところ、種間関係としては、ムラサキヒトデの集団はゴマフヒトデ・アオヒトデの全ての集団と有意に分化していた(表9)。また全てのアオヒトデとゴマフヒトデの集団ペアは互いに有意な分化を示した。フィジーで採集されたアオヒトデとゴマフヒトデの F_{ST} は0.107と比較的高い値であり、アオヒトデとゴマフヒトデの生殖隔離が起きていることが示唆された。種内の遺伝距離をみると、アオヒトデ集団内の136ペアサンプルのうち89ペアで有意な値となった。遺伝距離は、インド洋(南アフリカ・タイ2地点)と太平洋で特に大きく、アオヒトデのSEA-WP海域内の遺伝子流動はフィリピン北から琉球列島にかけて遺伝子流動が大きかったが、フィリピン北(Bolinao)とフィリピン西(Negro)で集団分化が見られた。さらにNegroは、他のSEA-WP海域の集団とも比較的大きな遺伝距離を持っていた。Negroは海水面が低かったころ、長い間半閉鎖的な環境にあり、かつ現在

でもインドネシアスルーフロー (Indonesian through flow) の軌道からずれた場所にあるため、他海域との遺伝距離が大きくなっていると考えられる。同様にフィリピンとフィリピンの東側にあるパラオでは遺伝距離が $0.061 \sim 0.027$ あった。オニヒトデにおいてもフィリピン北から琉球列島にかけては黒潮を通じた幼生分散が見られるが、黒潮本流と外れる海域にあるパラオとフィリピン間は比較的幼生分散が起こりにくい¹⁾。一方、インドネシア Sekotong と琉球列島・トレス海峡 (Dugong)・フィリピン北・GBR・西オーストラリアは遺伝距離が近く ($F_{ST} = 0.003 \sim 0.018$) SEA-WP 海域のトライアングルの中心から北・東・南西へ遺伝子流動の中間地点になっていることが推測される。また西オーストラリアの集団はインド洋に位置するにもかかわらず、GBR やトレス海峡、インドネシア、フィリピン・グアムなどと遺伝距離が近かったことから、海水面の上昇が起きた後に、太平洋の GBR もしくはフィリピンなどからトレス海峡・インドネシア南等を飛び石的に移住してきた集団であることが推測される。Nei's Da を使った UPGMA による系統樹では (図 9)、大きく 3 つのグループに分かれ、それぞれがムラサキヒトデ (*L. guildingi*)、アオヒトデ (*L. laevigata*)、ゴマフヒトデ (*L. multifora*) の集団となった。このことからムラサキヒトデはもちろん、アオヒトデとゴマフヒトデは基本的に生殖隔離が確立していることが判明した。さらに、アオヒトデの中では、タイ 2 地点と南アフリカで 1 グループ、その他にもう 1 グループの存在が示唆されたことから、インド洋側と太平洋側で遺伝的な差異が生じている可能性がある。インド洋側にある西オーストラリアのみ太平洋グループに属し、ペアワイズ F_{ST} で推測されたのと同様、太平洋側の個体が海面上昇後に移住してきたことが推測された。さらに、ゴマフヒトデはアオヒトデよりも集団間の遺伝的差異が大きいことが、系統樹・主成分分析の両方の結果からも自明である。これら、ゴマフヒトデとアオヒトデの遺伝構造の結果は上記のミトコンドリア Dloop 領域を解析した結果と一致した。生殖形態がアオヒトデは有性生殖のみであるのに対してゴマフヒトデは無性生殖も行うため、遺伝的に近い個体が同地点で出現しやすいこと、また、浮遊幼生期がアオヒトデよりもゴマフヒトデの方が短く幼生分散が限られてしまっていることなどが理由として考えられる。

(3) コブヒトデ及びマンジュウヒトデのミトコンドリア CO1 遺伝子を用いた系統地理解析

マンジュウヒトデに関しては、650bp の長さの 273 配列から 97 個のユニークなハプロタイプ ($h = 0.880$, $\pi = 0.0121$) が得られ、それらは大きく分けて 5 塩基以上の変異を隔てた 3 つのクレードに分かれた (図 10)。クレード C は SEA-WP 海域の西側インド洋側のプーケットとインドネシアの西側 Pulau Pari で主に見つかり、クレード A と B は SEA-WP 海域の東側プーケット以外の地点で主に見つかった。このことから、このクレード A + B とクレード C の間に見られた遺伝距離は最終氷河期の際に海水面が低下した際にインド洋と太平洋が陸地で隔てられ、生息域が分断されたことによって形成されたクレードであることが推察された。同様の太平洋・インド洋における遺伝障壁が、他の生活史の酷似しているアオヒトデ^{15, 19)} やオニヒトデ²⁰⁾ でも見つかっている。また、クレード C が最東でも Spermonde でしか見つからなかったと同時に、ジャカルタ北とタイ及びその他の海域間で AMOVA により統計的に有意な遺伝構造が見られたことから ($\Phi_{CT} = 0.265$, $p < 0.01$) ジャワ海においてインド洋側の遺伝子型が西側から東側に流れ込むような幼生分散が非常に少ないことが推察された。同様の遺伝子流動のパターンがオニヒトデにおいてもみられている (上記)。また、同時にジャカルタ北とそれより東側の海域間での幼生分散が比較的限られていることが推

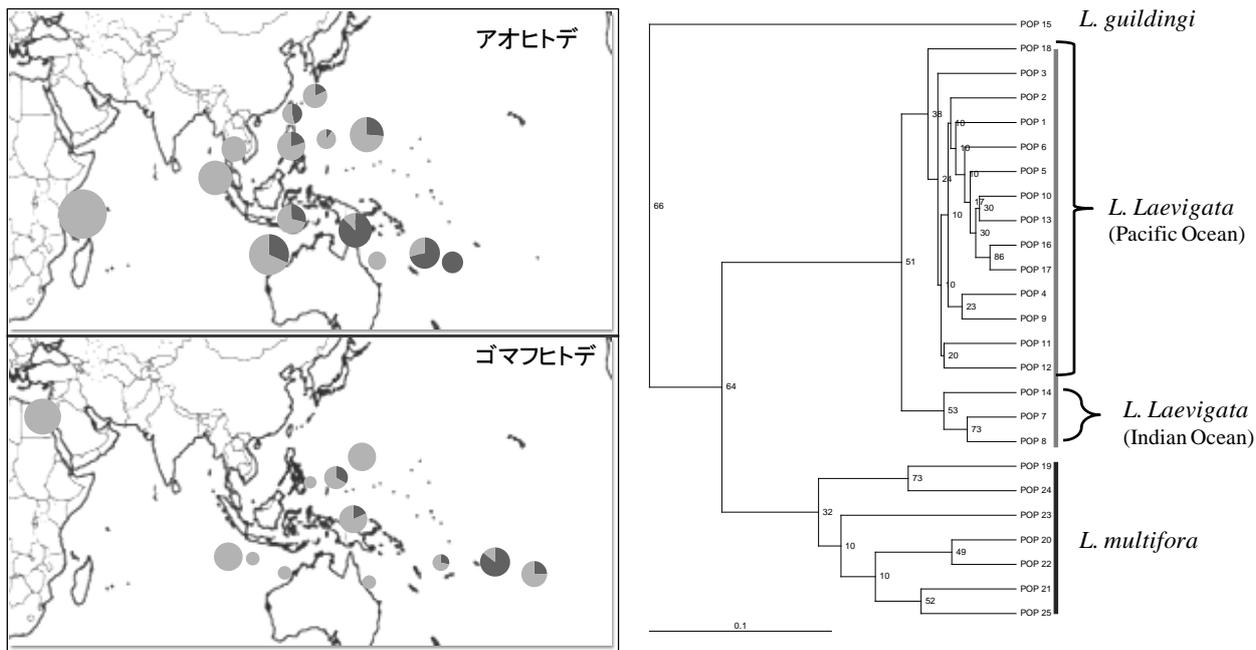


図8 (左図) Dloop領域でみられた2種類のハプロタイプの地理的分布。円の大きさはサンプル数に比例。黒：クレード1、灰色：クレード2
 図9 (右図) マイクロサテライトデータを用いたUPGMA法によるアオヒトデ(*L. laevigata*), ゴマフヒトデ(*L. multifora*), ムラサキヒトデ (*L. guildingi*)の系統樹 (Nei's Da 1988)

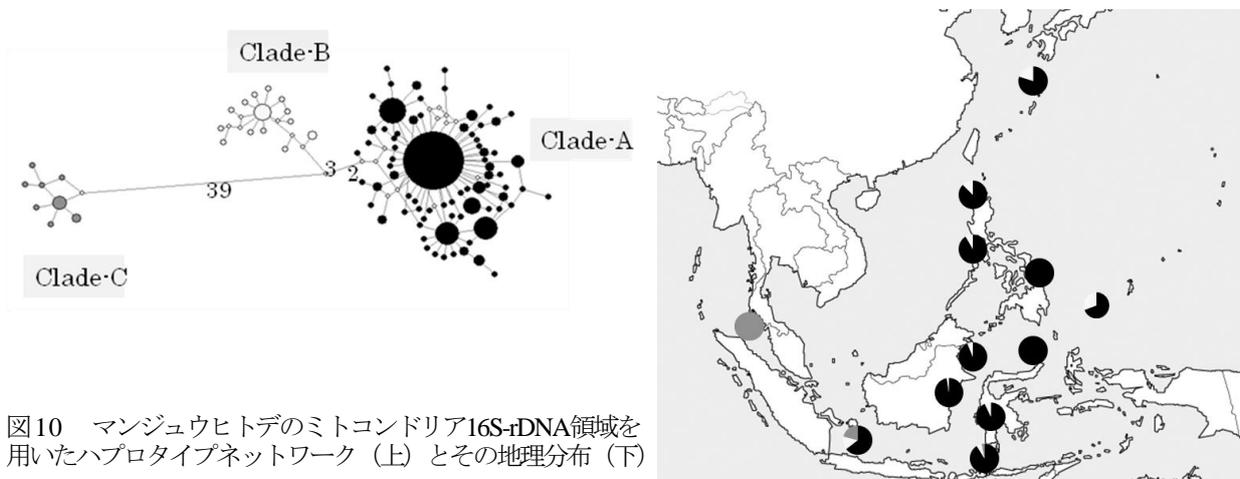


図10 マンジュウヒトデのミトコンドリア16S-rDNA領域を用いたハプロタイプネットワーク (上) とその地理分布 (下)

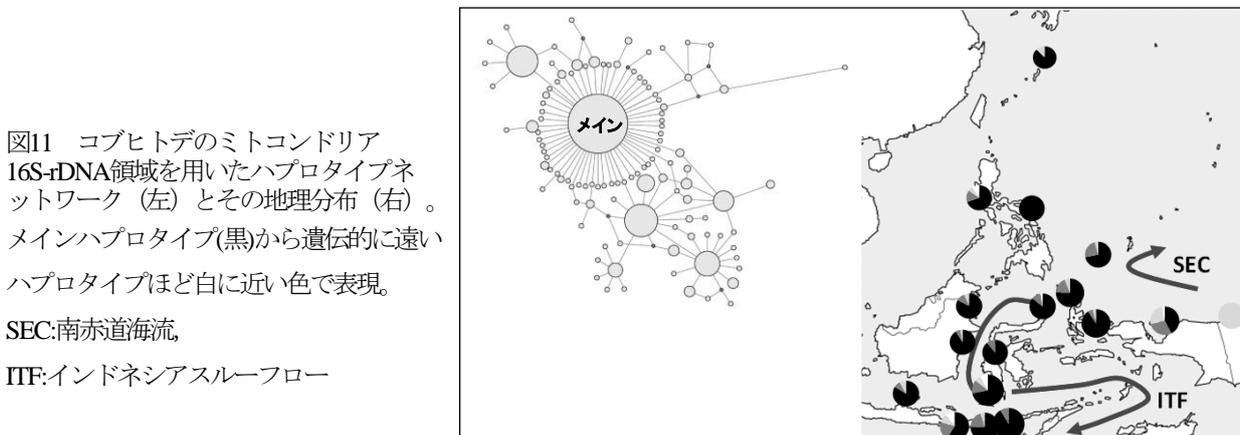


図11 コブヒトデのミトコンドリア16S-rDNA領域を用いたハプロタイプネットワーク (左) とその地理分布 (右)。メインハプロタイプ(黒)から遺伝的に遠いハプロタイプほど白に近い色で表現。
 SEC:南赤道海流,
 ITF:インドネシアスルーフロー

察されるが、これはインドネシアスルーフローがジャワ海に北から流れ込むさいに水深の浅い陸棚が壁となり、ジャワ海の西側に流れ込むのではなく、主にそのまま南側の海峡に抜けていくことに起因すると考えられる。

コブヒトデに関しては、623bpの長さの631配列から109個のユニークなハプロタイプ ($h=0.880$ 、 $\pi=0.00037$) が得られた。コブヒトデのハプロタイプネットワークは大きなクレードにわかれることなく星状となった。中心となるハプロタイプは、全地点から合わせて322個体が共有していたが、Teluk Cenderawasihにおいてはこのメインハプロタイプの占める割合は比較的少なかった。一方で、メインハプロタイプから離れた末端に属するハプロタイプに関しては、Teluk Cenderawasihの個体が高い割合を占めていた(図11)。Crandallらの解析¹⁵⁾のように、西パプアとその他のインドネシアの海域において、おそらく南赤道海流による遺伝子障壁があることがわかった。マンジュウヒトデ、コブヒトデともに、ペア Φ_{ST} の値はBonferroni補正の後、有意な集団分化は見られず、幼生分散能力の高さから全体の遺伝子流動が大きいことが分かった。

(4) アオサンゴのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析

1) 遺伝構造と形態

SEA-WP海域におけるアオサンゴ集団をジェノタイプングした結果、集団ごとに大きく異なる遺伝的多様性及び遺伝子型多様性が検出された(表3、10)。一方で、主成分分析及び近隣結合法による系統樹から、今回解析したアオサンゴの集団は大きく2つに分かれることが分かった(図12)。この2つに分かれたクレードは、系統樹のみからは地理的な距離との相関ははっきりと見られなかったが、異なる形態(小枝状か葉状)に対応して遺伝的に異なるクレードを形成していた。また、全サンプル、小枝状形態のみ、葉状形態のみの3通りでIBDを調べた結果、3通りともにおいて、遺伝的距離と地理的距離の間に、有意差が見られた($P < 0.0001$) が、相関係数は全サンプルを用いた時では、 $r = 0.40$ と比較的低い値であったのに対し、形態ごとに分けて検定した結果、葉状形態では $r = 0.77$ 、小枝状形態では $r = 0.92$ とより高い値を示し、地理的距離が大きくなるほど、遺伝的距離が大きくなる傾向(IBD)は明瞭となった(図13)。

STRUCTUREを用いたクラスタリング解析の結果も $K=2$ の時、形態と対応した遺伝子型が検出された(図14)。全個体693個体を解析したうち9割以上を占める634個体がいずれか片方のクラスターに80%以上の高い確率で帰属され、各クラスターは、小枝状形態と葉状形態に対応していた。主成分分析及び系統樹の両方で2つのクラスターの間際に位置していたKumeCの22個体は、クラスタリング解析においても、どちらにもはっきりと帰属しなかった。KumeCの個体が形態的にも小枝と葉状の間を示しており、遺伝的にも形態的にも小枝形態と葉状形態のハイブリッドであることが推察される。一方で、石西礁湖(ヨナラ水道)やフィリピンVerde Island PassageのVCALとVMARなどの地点では、地理的距離が数キロ程度と非常に短く数値シミュレーション上では幼生分散や精子分散が物理的に十分に起こりうることが証明されたにも関わらず、形態の異なる2集団は遺伝的に完全に分化し、ハイブリッドと疑われる個体もそれぞれの集団内に見つからなかった。このことから、互いの集団間において幼生分散は起こっていたとしても、着底後の環境要因などによって生育に不向きな遺伝子型が淘汰され、その環境下に適する遺伝子型が選別されていることが推察された。

以上のことから、アオサンゴにおける小枝状形態と葉状形態は時にハイブリッドを形成するこ

とが可能で、完全な生殖隔離は起こっていないものの、生態学的な集団の維持に関しては、基本的にそれぞれの形態の集団で互いに独立している別種であると推察される。

両方の形態が同海域中に見られた石西礁湖及びフィリピンVerde Island Passageの集団間におけるペア F_{ST} の値を、葉状形態と小枝状形態で比較した場合、葉状形態では、0.082~0.344（平均0.197）であったのに対し、小枝状形態では0.099~0.100（平均0.099）とより低い値を示した。このことから、葉状形態の集団間の方が、小枝状形態よりも遺伝子流動が制限されていることが示唆される。この理由として、一般に、白保サンゴ礁内の大群落を代表とする葉状形態は、サンゴ礁内のような浅場で海流の弱い高水温の海域によく発達し、しばしばマイクロアトールを形成するが、大浦湾の大群落を代表とする小枝状形態は、流れの比較的強い外洋に面する低水温のリーフスロープなどによく発達する。その為に、流れの強い外洋側に発達する小枝状形態の方が生息域の点から広域分散に向いているためにより大きな幼生分散範囲を示すと考えられる。もしくは、形態及び遺伝的な両者の違いが種分化を反映しているとも考えられるので、種に応じた生物的・生態学的な違い（産卵期やタイミングが異なるないし、小枝状形態がより長い幼生分散期間を持つ等）により、このような幼生分散の距離の差が生じている可能性もある。小枝状形態と葉状形態の集団分布は、今回の調査で採集された範囲では、高緯度低緯度ともに小枝状形態、葉状形態が観察され、水温の高い低緯度ほど葉状形態が発達するというような傾向は見られず、同程度の緯度、海域においてもしばしば異なる場所に両方の形態が見られた（表3）。どちらの形態が優占になるかを決定づける要因に関しては、今後、さらなる環境・生態調査が必要となる。

2) 海域間における集団構造と幼生分散connectivity

ペア F_{ST} の結果から、台湾の集団内、石西礁湖の東側の海域内を除くほぼ全ての集団間で統計学的に有意な集団分化が見られた。すなわち、地理的に近い集団同士でも形態の異なる集団間では遺伝子流動が制限されており、遺伝的な分化が起こっていることが判明した。これは、アオサンゴの比較的短い数時間から数日の間に70%の幼生が着底する性質に起因すると考えられる。葉状形態の集団においては、石垣島東海岸と石西礁湖の集団は遺伝的に近く、この結果と数値シミュレーション結果から石垣島東岸から流れ込む海流が石西礁湖に幼生を運んでいることが考えられる。小枝状形態に関しては、台湾南部の集団は遺伝的な分化がほとんど見られず、ひとつの遺伝子プールを形成していることが判明した。また、台湾と石西礁湖の北側・西表の集団は遺伝的に近いことから、黒潮を介した幼生分散が生じている可能性が示唆された。

3) アオサンゴの保全に向けて

本研究により、アオサンゴは形態によって判別できる葉状形態と小枝状形態の2種の存在が示唆された。これらは、久米島など一部の海域でハイブリッドが見られるように生殖不可能ではないものの、基本的には互いに遺伝的に独立して集団を形成しており、別々に保全する必要がある。サンゴ礁内によく発達する葉状形態の集団は、外洋側に主に発達する小枝状形態の集団に比べてconnectivityが限られているため、小枝状形態の集団よりも海域ごとに個別に保全する必要がある。また、石西礁湖集団、数値シミュレーションと合わせた解析結果から、石垣島東岸の集団を重点的に保全することの有効性が示されている。小枝状形態に関しては、台湾と石西礁湖の間で黒潮やその関連海流を使った比較的長距離の分散も起きていることがわかり、上流側海域の保全

表10 マイクロサテライト解析によるアオサンゴ集団（個体数、N>6）のペアワイズ Fst。太字で灰色枠の文字はBonferroni correctionの後でも集団分化有意のペア（ $P < 0.05$ ）

形態	MiyakoS	ak	Shiraho	SESA	SESB	SESE	Yonara	VCAB	VMAR	VBAT	VPUE	Palau	AMM	SENA	IRomote	TWNA	TWNB	TWNC	TWND	TWNE	TWNF	TWNG	VCAL	Thai	
葉状	MiyakoS																								
葉状	ak	0.167																							
葉状	Shiraho	0.079	0.078																						
葉状	SESA	0.068	0.135	0.109																					
葉状	SESB	0.152	0.025	0.048	0.101																				
葉状	SESE	0.123	0.048	0.066	0.048	0.048																			
葉状	Yonara	0.144	0.153	0.085	0.114	0.112	0.138																		
葉状	VCAB	0.316	0.328	0.218	0.245	0.227	0.321	0.205																	
葉状	VMAR	0.190	0.210	0.158	0.122	0.115	0.192	0.101	0.110																
葉状	VBAT	0.177	0.172	0.130	0.085	0.082	0.169	0.108	0.192	-0.011															
葉状	VPUE	0.251	0.302	0.224	0.228	0.214	0.344	0.224	0.301	0.130	0.098														
葉状	Palau	0.336	0.396	0.318	0.355	0.384	0.410	0.338	0.430	0.340	0.335	0.349													
小枝状	AMM	0.424	0.462	0.340	0.432	0.405	0.462	0.319	0.361	0.326	0.354	0.393	0.430												
小枝状	SENA	0.201	0.328	0.180	0.259	0.253	0.291	0.178	0.266	0.195	0.201	0.202	0.275	0.201											
小枝状	IRomote	0.226	0.337	0.188	0.284	0.265	0.310	0.205	0.260	0.220	0.227	0.230	0.272	0.207	0.005										
小枝状	TWNA	0.365	0.422	0.275	0.382	0.361	0.416	0.293	0.339	0.276	0.301	0.339	0.391	0.219	0.088	0.126									
小枝状	TWNB	0.278	0.372	0.229	0.308	0.295	0.351	0.239	0.278	0.200	0.215	0.253	0.318	0.229	0.047	0.078	0.048								
小枝状	TWNC	0.342	0.399	0.247	0.364	0.334	0.393	0.253	0.311	0.266	0.286	0.329	0.366	0.169	0.087	0.106	0.060	0.082							
小枝状	TWND	0.338	0.380	0.249	0.349	0.336	0.381	0.257	0.359	0.266	0.278	0.319	0.365	0.217	0.098	0.138	0.043	0.074	0.032						
小枝状	TWNE	0.329	0.409	0.258	0.363	0.343	0.394	0.274	0.355	0.269	0.290	0.308	0.368	0.194	0.056	0.101	0.030	0.053	0.068	0.066					
小枝状	TWNF	0.397	0.421	0.302	0.381	0.378	0.427	0.315	0.350	0.286	0.312	0.378	0.396	0.249	0.161	0.188	0.035	0.093	0.072	0.035	0.121				
小枝状	TWNG	0.314	0.368	0.246	0.313	0.309	0.352	0.261	0.307	0.238	0.241	0.287	0.335	0.213	0.085	0.115	0.018	0.047	0.045	0.028	0.056	0.002			
小枝状	VCAL	0.228	0.314	0.198	0.300	0.263	0.312	0.202	0.262	0.205	0.215	0.244	0.284	0.225	0.100	0.099	0.152	0.098	0.127	0.149	0.138	0.201	0.146		
小枝状	Thai	0.337	0.297	0.221	0.380	0.260	0.349	0.297	0.343	0.323	0.335	0.336	0.406	0.332	0.284	0.276	0.335	0.305	0.303	0.310	0.321	0.360	0.313	0.249	
中間	KumeD	0.343	0.354	0.183	0.369	0.304	0.372	0.244	0.399	0.324	0.333	0.394	0.401	0.298	0.184	0.198	0.298	0.261	0.250	0.294	0.280	0.354	0.279	0.236	0.315

表11 シカクナマコ (*Stichopus chloronotus*) のマイクロサテライトマーカーの特徴。Ta, アニリング温度; Ho, 観測値 (Ho) 及び期待値 (He), 近交係数 (Fis) を示す。

Locus	Repeat motif	Primer sequence	T _a (°C)	No. of non-amplifying samples	No. of alleles	Size range (bp)	H _O	H _E	F _{IS}	Genbank accession number
SC01	(GT) ₅	F: 6-FAM-GGGAAGCATTAAAAGTCGC R: GCGATACGGATCCTTTGTGG	57.5	0	2	309-312	0.083	0.081	-0.029	AB572599
SC08	(GT) ₉	F: CTAAATATAGGAAGGAATGGAAGTG R: NED-CAACTTTCTTCTTTTCGGAG	57.5	0	2	113-115	0.056	0.055	-0.014	AB572600
SC09	(GT) ₇ GC(GT) ₄ N ₁₄ (GT) ₆	F: PET-CAATGCTTTGATTCACAG R: CCAACTTGCACATATTGAG	57.5	0	2	186-192	0.306	0.300	-0.019	AB572601
SC10	(TG) ₄ AGTA(TG) ₄	F: GCCTCTAATCTCAAATTGTCG R: VIC-TGCGGTCTTCTTTGTCTC	57.5	0	3	128-148	0.083	0.133	0.375	AB572602
SC20*	(TG) ₅ CA(TG) ₆	F: PET-TCGTGIGTTTTGTACTGTTAGACCC R: CCCACAGACTGTCTAAGAG	57.5	0	3	123-129	0.278	0.624	0.558	AB572603
SC24	(TG) ₇ C(TG) ₆	F: NED-GTGGTTAAATTCCTAGGTATAGAG R: CTGGAATAAACCTGATGTAC	57.5	0	2	133-137	0.083	0.081	-0.029	AB572604
SC29	(GT) ₅ ATGG(GT) ₂ GC(GT) ₁₃	F: NED-GAGTAGCCATAAATCATTG R: GACCAACCCACACAGCAAG	57.5	0	2	199-201	0.556	0.493	-0.129	AB572605
SC33*	(GT) ₆ G ₁₁	F: PET-TGGTTCGGATTCACATAG R: CTACTTACGGTGAACCTTC	57.5	0	6	248-254	0.361	0.661	0.457	AB572606
SC41	(TC) ₇ CAAAGA ₉	F: NED-CAAGATGATGCGGATGAGGA R: AGTCGTTGAAAGTGGATTGGC	57.5	2	2	266-270	0.147	0.187	0.218	AB572607
SC43	(GT) ₉	F: 6-FAM-GTGACATACAACCTTCTAGC R: GAGATCACTTAGAGTTACGC	57.5	0	3	219-225	0.278	0.251	-0.109	AB572608

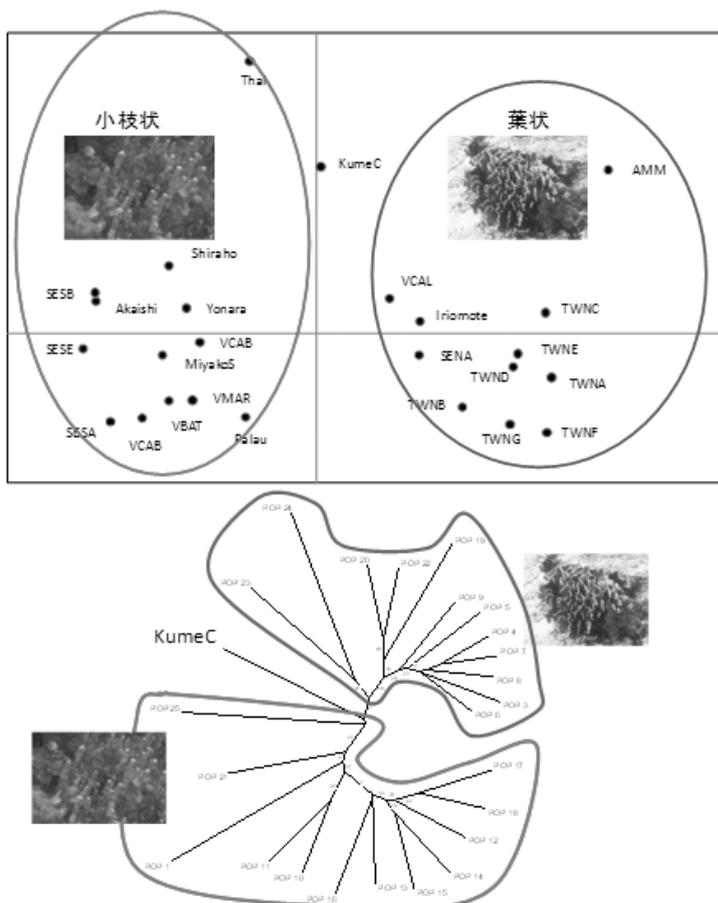


図12 アオサング集団のマイクロサテライトによる解析結果。(A) 主成分分析の結果（クローン抜きN>6の25集団）。第1主成分までで57%、第2主成分までで69%を説明 (B) 近隣結合法による系統樹

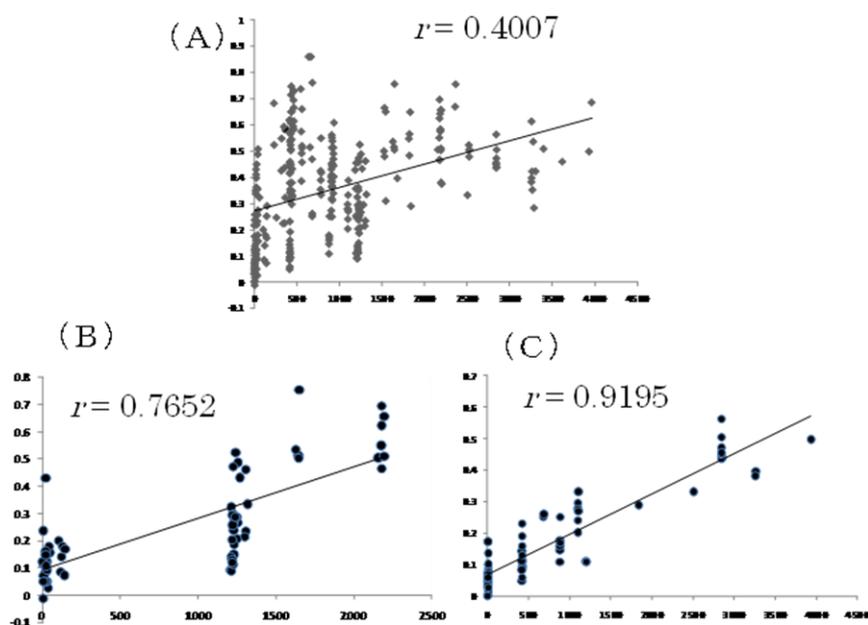


図13 アオサング集団の地理的距離と遺伝距離の関係。X軸：地理的距離 Y軸：Fst/(1-Fst)
 (A) 全サンプル, (B) 葉状形態の集団間のみ, (C) 小枝状形態の集団間のみ

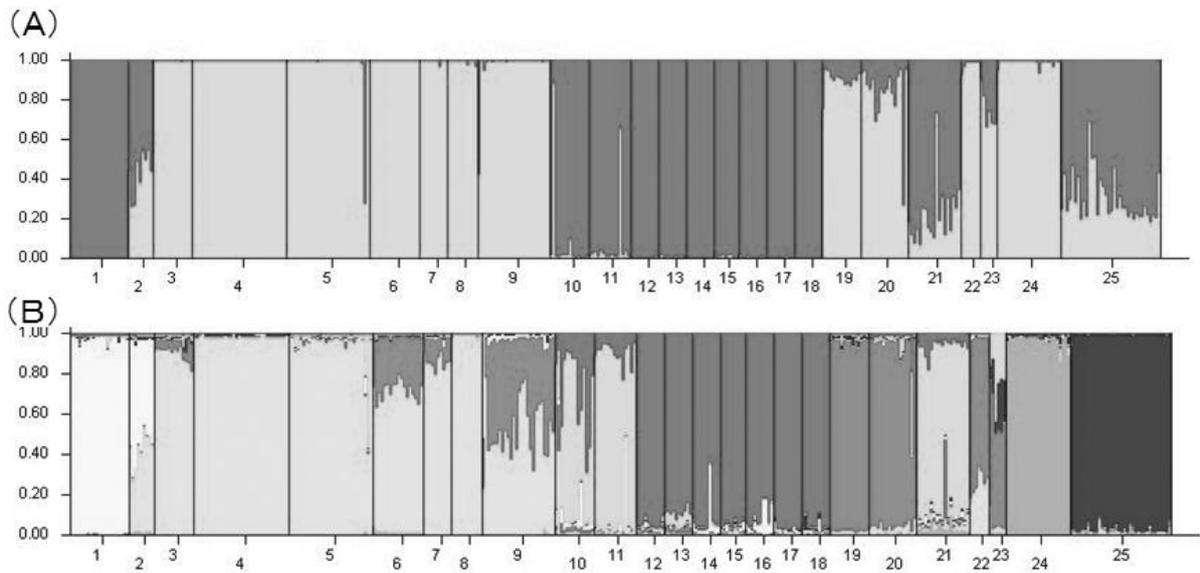


図14 アオサンゴ集団のクラスタリング解析の結果 (STRUCTUREによる)。横軸が各個体、縦軸が異なるクラスター (色) ごとのアサイメント確率を示す (A) , K=2 ; (B) K= 7 (by STRUCTUREによる)

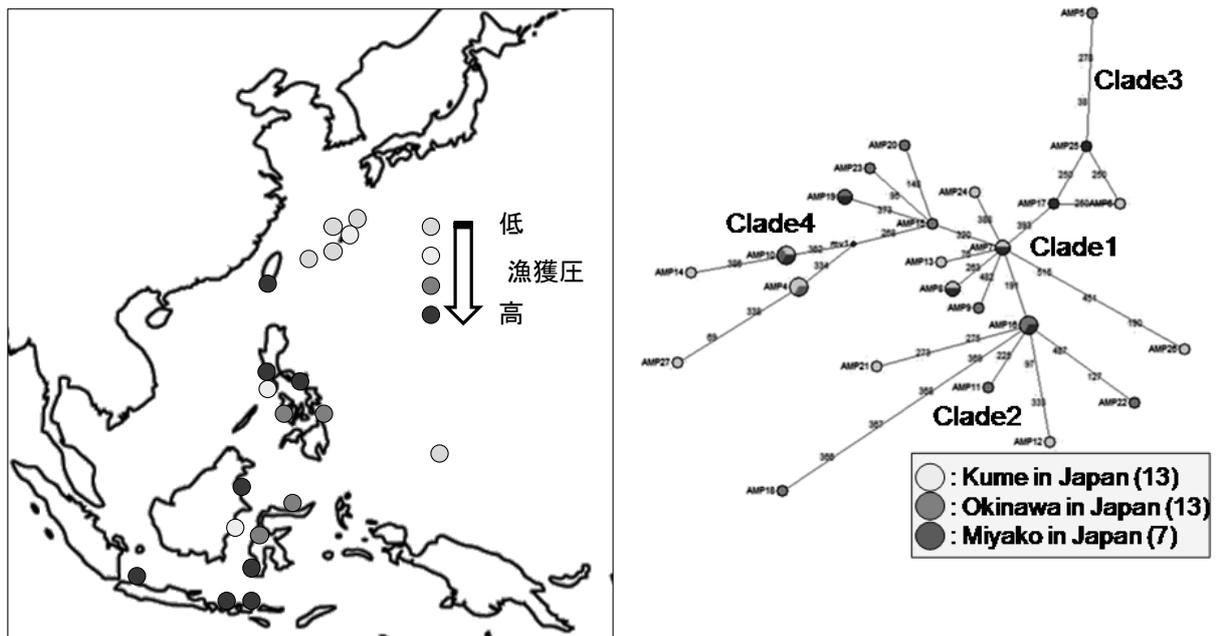


図15 (左図) SEA-WP海域におけるナマコの漁獲圧の高さを示す。データはサンプリング作業を実施した際の観察値に基づく。沖縄周辺海域およびパラオでは、ナマコ資源の保全が保たれているが、それ以外の海域では、極めて高い漁獲圧があり、集団遺伝学解析用の十分なナマコサンプルを採集できなかった。本図は、ナマコ資源が極めて深刻な状況にあることを示す。

図16 (右図) クロイリナマコのミトコンドリア16S-rDNA配列によるハプロタイプネットワーク (By NETWORKによる)

の重要性が示唆される。これまで、アオサンゴの生物的生態学的知見は主に葉状型形態の個体について調べられてきたが、今後は、生態学的にも異なると考えられる小枝状形態のアオサンゴについても研究し、保全につなげる必要があることがわかった。

(5) 熱帯性ナマコ種のみトコンドリア16S-rDNAを用いた集団解析及び系統地理解析

WEA-WP海域において、より多くの地点から各地点50個体前後のナマコ個体を採集しようと、サンプリングを実施したが、驚いたことに中華料理に使用するための漁獲圧が非常に高く、SEA-WPの多くの海域で、集団遺伝学解析の候補に挙げていた種類のサンプルを入手することが困難であった(図15)。熱帯性ナマコの生態系を保全する上で、この事実は大きな障壁であり、各海域単位で禁漁区を設けて資源量を管理するなど計画的漁業を行わないと、熱帯性ナマコの生態系を大きく損なう事態は避けられないと考えられる。

1) 熱帯性ナマコ種間における遺伝的多様性の比較

ナマコのターゲット種のうち6種類(トゲクリイロナマコ*Actinopyga echinites*、クリイロナマコ*Actinopyga mauritiana*、ジャノメナマコ*Bohadschia argus*、アカミシキリ*Holothuria edulis*、ニセクロナマコ*Holothuria leucospilota*、シカクナマコ*Stichopus chloronotus*)計693個体の部分16S-rDNA配列を決定した。分析個体数が最も多かったのがニセクロナマコで303個体、次いでシカクナマコの256個体であった。1個体あたりのハプロタイプ数が最も少なかったのはシカクナマコで、7地点256個体中8ハプロタイプしかみつからなかった。逆に最もハプロタイプ数が多かったのはクリイロナマコで、33個体中24ハプロタイプが検出された。シカクナマコは無性生殖を行うことが知られているため、他種と比較して極端に少なかったハプロタイプ数は、無性生殖による可能性もある。また、ジャノメナマコも10,000km以上離れたフレンチポリネシアから得られた個体を含めても49個体中16のハプロタイプしか見つからず、遺伝的多型性は比較的低いものであった(表4)。

2) クリイロナマコの分子系統

沖縄本島で採集されたクリイロナマコ33個体の16S rDNAの配列を解析したところ、24個のユニークなハプロタイプが得られた。NETWORKを用いてハプロタイプネットワークを作成した。推定された祖先型ハプロタイプAmhap-7を中心として、星状にハプロタイプネットワークが広がっていることが分かった(図16)。同一地点からこのように極めて高いハプロタイプ多様度が得られた原因としては、クリイロナマコの16S-rDNA領域は他のナマコの同一遺伝子領域と比較して進化速度が速いこと、また、遺伝的に1変異置換以上離れたハプロタイプが24ハプロタイプのうち7ハプロタイプも見つかったことから、近年の漁獲圧の高まりによって、特定のハプロタイプが消滅した可能性も考えられる。

3) トゲクリイロナマコの分子系統

18個体のトゲクリイロナマコを解析した結果、クリイロナマコのハプロタイプネットワークと同様、トゲクリイロナマコのハプロタイプネットワークは、主となるAEP1を中心に☆状のネットワークを示した。これは、先祖型と推定されるAEP1のハプロタイプを中心に、近年、トゲクリイ

ロナマコの集団の拡大が起こったことを示していると考えられる。

4) ジャノメナマコの分子系統

ジャノメナマコにおいて、主となる2種類のハプロタイプが見つかり、それら2つのハプロタイプは2塩基置換と類似したハプロタイプであった。琉球列島と10,000km離れた地点であるフレンチポリネシアタヒチで採集した個体も、琉球列島4地点で見つかったものと同一のハプロタイプを共有しており、比較的長い幼生分散期間を持つことが示唆された。一方で、久米島以外の各地点においては、その地点にしか存在しない固有のハプロタイプを持つことがわかった。フレンチポリネシアにおいて、明からに通常のジャノメナマコとは形態（体色および小骨）の異なる個体が見つかったが、遺伝的にはあまり離れていないことが分かった。今後解析個体を増やし、集団間の遺伝子流動と形態の異なる個体との種間関係を明らかにしていきたい。

5) ニセクロナマコにおいて、303個体の16S-rDNA領域について解析した結果、79個の異なるハプロタイプを検出した。個体あたりのハプロタイプ数は0.26であり、中程度の多様性を示した（表4）。これまで述べたクリイロナマコおよびトゲクリイロナマコ同様、1個のハプロタイプが中心となり、☆状のネットワークを示した。地理とハプロタイプの間には明瞭な関係は見られなかったが、興味深いことに、インド洋に面するレユニオンのサンプルだけは、固有のハプロタイプを有していた（図17）。一方で、日本、台湾、フィリピンの集団間では大きな遺伝子流動が検出された。

6) シカクナマコのミトコンドリア遺伝構造

久米島・宮古島・石垣島・奄美大島（2地点）、パラオおよびリユニオン（La Réunion）の7地点から得られた合計256個体の16S-rDNA領域から、8個のユニークなハプロタイプが得られた（図18）。シカクナマコでは、他種と比べて極めて少ないハプロタイプ数を示し、久米島およびリユニオンで固有のハプロタイプが検出され、また、各サンプリング地点において、最も出現頻度の高いハプロタイプがそれぞれ異なっており、大きな遺伝構造的分化を示すことが判明した。ハプロタイプ多様性は久米島・リユニオンにおいて大きく、これら祖先型を有する集団を重点的に保全することが重要であると考えられる。地理的距離が数十kmしか離れていない奄美大島2地点において、共通したハプロタイプが全く検出されなかったことから、この2地点間のconnectivityは皆無であり、遺伝子流動が大きく制限されていることが判明した。シカクナマコの浮遊幼生期間の報告はないが、ここで得られた遺伝構造から、浮遊幼生期間は極めて短く、ほとんど黒潮を通じた幼生分散は生じていないことが示唆された。さらに、他種に比べてハプロタイプ数が極端に少なかったこと、各ハプロタイプの出現頻度が集団により大きく異なったことから、これらの集団を形成するにあたり、無性生殖による増殖の割合が大きいことが強く示唆された。なお、本種の集団遺伝構造を解析するために、マイクロサテライトマーカーの開発を試み、多型性を示す9個のマーカーの開発に成功した（表11）。ミトコンドリア遺伝子同様、マイクロサテライト領域を用いた多型解析の結果、本種の集団の遺伝子多様度は他種に比べ著しく低い値を示した（表15）。

SEA-WP海域から採集した熱帯性ナマコについて、これまでミトコンドリア16S-rDNA領域を用いて解析を行った結果を系統樹として示したところ（図19）、熱帯産のナマコは単系統を取ること、種として独立した明瞭なクレード（クラスター）を作ること、*Stichopus*属のナマコが系統的に離

れていることを明らかにすることができた。

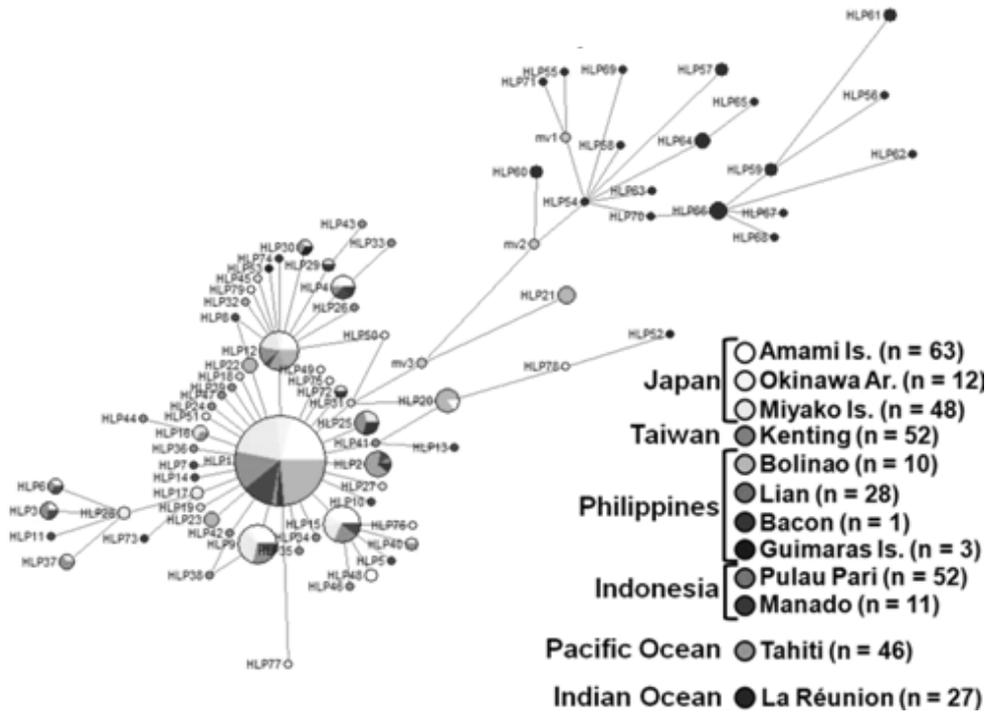


図17 ミトコンドリア16S-rDNA配列によるニセクロナマコのハプロタイプネットワーク (By NETWORKによる)

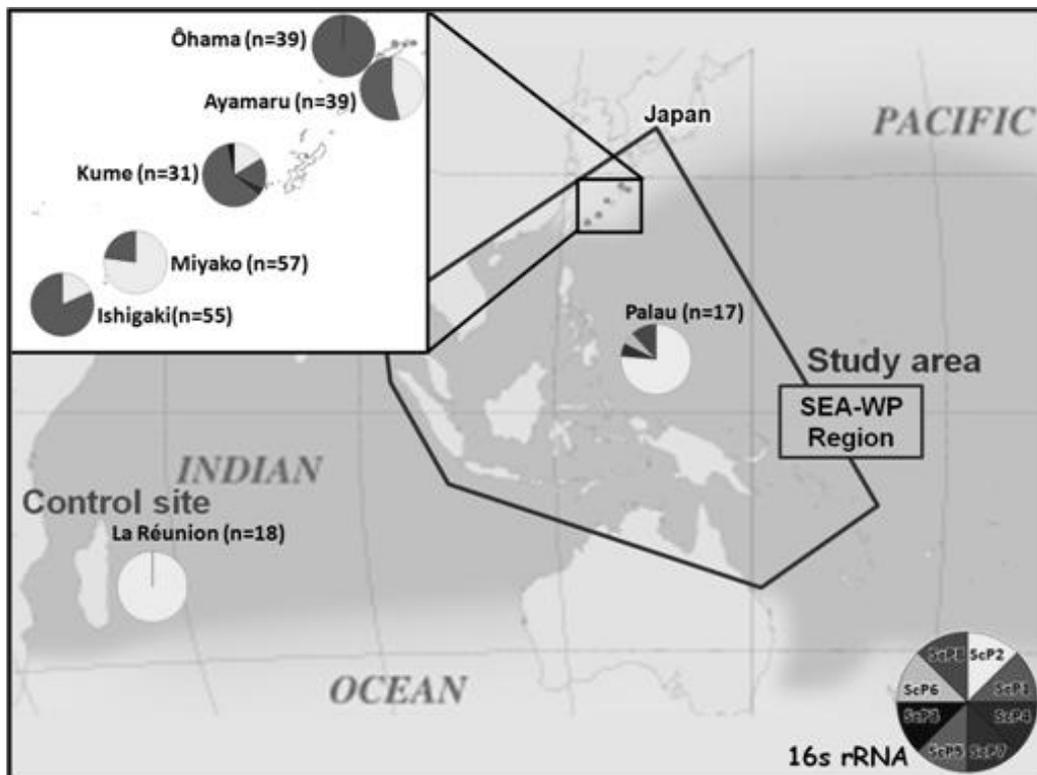


図18 シカクナマコのミトコンドリア16S-rDNA領域の解析によるハプロタイプの地理分布

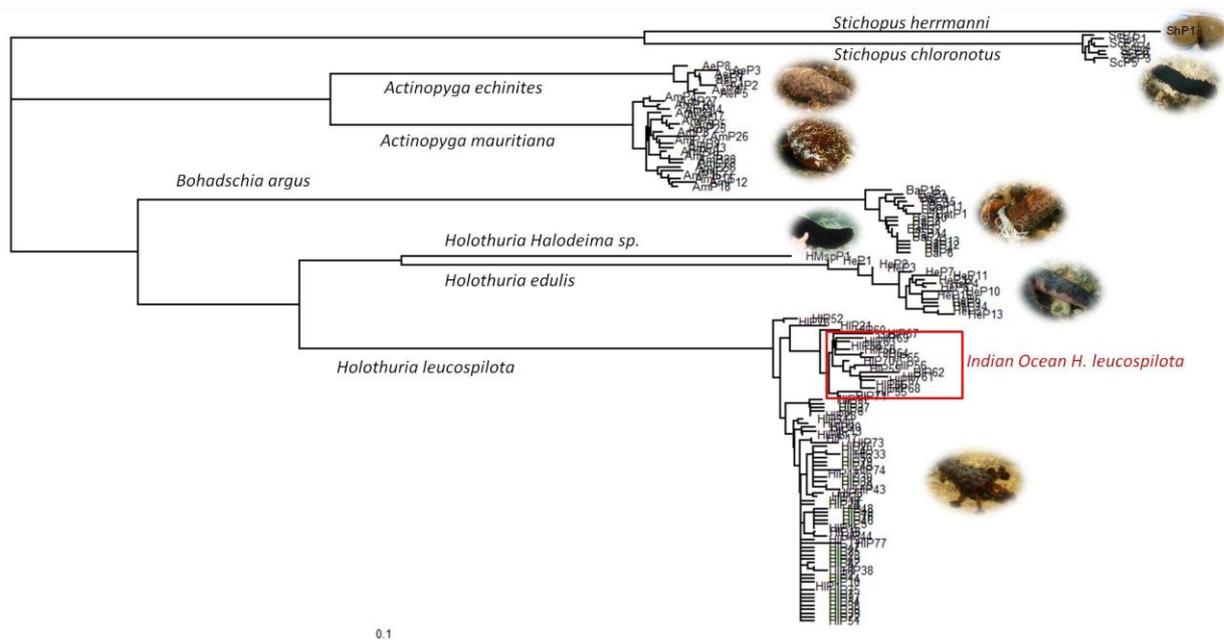


図19 熱帯性ナマコ類のミトコンドリア16S-rDNA配列による分子系統解析。
熱帯性ナマコは単系統を示し、種ごとに明瞭なクレードを形成、*Stichopus*属種が他の属より遺伝的に少し離れることを示す。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) SEA-WP海域における遺伝的多様性・遺伝子流動の種間比較

本研究は、生態学的に異なるヒトデ5種ナマコ9種を対象にSEA-WP海域間で遺伝的多様性及び・遺伝子流動に関して比較することが出来た。ヒトデに関して、核マイクロサテライト遺伝子を用いてオニヒトデ及びアオヒトデ、ゴマフヒトデの集団解析を行った結果、遺伝的多様性はオニヒトデ・アオヒトデともに非常に高かった。オニヒトデでは、マイクロサテライトの解像度は素晴らしく高く、黒潮流軸に分布する集団は、フィリピン、沖縄、鹿児島、串本までが遺伝的にほぼ均一な集団として捉えることができた一方で、SEA-WPを含む太平洋のサンゴ礁海域では明瞭な集団遺伝構造、すなわち集団分化が検出され、幼生分散を介したconnectivityの存在が海流構造とよく一致することを明らかにすることができた^{1, 2, 3*)} (*論文一査読ありの3番目)。一方、アオサンゴでは、これまで1種の存在だけが知られていたが、本研究により、アオサンゴは形態によって判別できる葉状形態と小枝状形態の2種の存在が示唆された。両種(集団)ともに、基本的に浮遊幼生期間が極端に短く、幼生として浮遊後、数時間程度で着底することが知られており、集団遺伝構造はこの性質を反映した著しい集団分化を示すことが明らかとなった。また、その生態の特徴により分布域も異なることが示唆された。なお、遺伝子流動が特に大きかったのはアオヒトデで、オニヒトデ、ゴマフヒトデの順に続いた。これは、幼生分散期間が長ければ長いほど遺伝子流動が大きくなるという仮説に対し、アオヒトデはオニヒトデよりもやや浮遊幼生期間が長いとされる事実では一致するが、オニヒトデよりも浮遊幼生期の長いゴマフヒトデにおいてゴマフヒトデの方が大きな遺伝距離が見られたことにおいては予想と反する。ゴマフヒトデは成体が頻繁に無性生殖を行うことが知られており、無性生殖の影響で創始者効果が長引くために、一見して遺伝構造を強く持つように見えるという理由が推察される。ジャノメナマコ、アカミシキリ、ニセクロナマコ集団の遺伝子流動に関しては、オニヒトデ集団と同様、幼生が広域分散型である可能性が高く、日本、台湾およびフィリピンの集団間で大きな遺伝子流動の存在が示唆され、熱帯性ナマコの集団構造について、新たな知見を得た。

2) 同一綱における同一遺伝子座上の進化速度の違いについて

熱帯亜熱帯のナマコ類9種に関して、同じミトコンドリア16S-rDNA遺伝子を用いた場合でも進化速度が著しく異なることが判明した。これは、同じナマコ綱であったとしても種分化後に同じ遺伝子領域においても進化速度が異なるため、分子時計を適応する際には注意が必要であることが明らかとなった。ゴマフヒトデとアオヒトデは従来種判別に適するとされるミトコンドリアC01遺伝子では同種でかつ大きく2つのクレードに分かれると判定されたが、新規開発した核マイクロサテライトマーカーにより、別種であることが示された。このことからヒトデ綱に関しても、種によっては、ミトコンドリア遺伝子の進化速度が核遺伝子(マイクロサテライト領域)より著しく遅い科学的に珍しいデータを得ることができた。これらのデータは今後、遺伝的多様性の評価や遺伝子種判別の基準を作っていく上で重要な知見であるといえる。

3) 遺伝子解析による種分化に関して

現在遺伝子を使った種判別において、DNA バーコーディングという部分ミトコンドリアCO1、16S-rDNA領域の配列を使った種同定が主流となり、動物・植物を問わず、様々な生物種において国際的なDNAバーコーディングプロジェクトが進んでいる。特に動物では刺胞動物を除くほとんどの生物に有効である。しかし、本研究で扱ったアオヒトデとゴマフヒトデは形態・生殖・生息域ともに明らかに異なるにも関わらず、DNAバーコーディングで最も頻繁に使われるCO1領域・16S-rDNA領域において種同定が不可能であり遺伝的には同一種であることが疑われてきた。しかし、今回、新規開発したマイクロサテライト遺伝子座を用いることで、2種間で生殖隔離が成立しており、別種であることを示すことができた。これは科学的にも極めてまれな例であり、今後の遺伝子を用いた種同定の分野において、非常に価値のあるデータであると言える。また、マンジュウヒトデに関しても、インド洋側と太平洋側で大きな遺伝距離が見られ、形態では判別のつかない隠ぺい種の可能性も示された。ヒトデ綱に関してはオニヒトデでも類似のミトコンドリア遺伝構造が検出されている。オニヒトデではSEA-WP海域を含む全生息域の解析をした結果、インド洋と太平洋のオニヒトデは別種であると結論付けている²⁰⁾。極めて酷似したマンジュウヒトデに関しても今後、より幅広い分布域でのサンプリングや核遺伝子を用いた解析を行い、これらの不明な点を解明する必要がある。

熱帯・亜熱帯のナマコに関しては世界各地で漁獲過剰が問題になっているにも関わらず、熱帯亜熱帯において未記載種が多く、種内の集団遺伝学的構造はおろか種判別・種系統すら十分に解明されていない状況である。今回、共通の遺伝子領域である16S-rDNA領域の配列を使った解析をしたことで、それぞれの種の多型性や、種内での遺伝構造を明らかにすることができた。シカクナマコに関しては、1集団の形成の多くを無性生殖に頼っている可能性が示唆されたと同時に、集団間の遺伝的な分化が大きいことがわかり、無性生殖・限られた幼生分散範囲といった、今まで不明であった当種の生殖戦略に関する知見も得ることもできた。また、形態（体色・小骨）の異なるジャノメナマコを解析し、両者が遺伝的に近いことを明らかにした。今後、ターゲット種の解析個体数を増やした本格的な分子系統解析・集団解析を行うことで、種間のconnectivityの違いや、対応すべき保全策の違いが明確になるものと考えられる。

（2）地球環境政策への貢献

1) 遺伝的多様性・生物多様性の評価に関して

生態系保全を行っていく上で、遺伝的多様性の保全は極めて重要な課題であるため、遺伝的多様性を正確に評価することは不可欠である。特にSEA-WP海域は、Coral Triangleとして生物多様性が最も高い海域であることに加え、同一種とされる種内でも氷河期に海水面の下降上昇を繰り返したことによる生息域分断などの地質学的要因などから、種内の複雑な遺伝構造や生殖隔離による隠ぺい種の存在なども想像にたやすい。このような状況にも関わらず、これまでSEA-WP海域の海洋無脊椎動物に関する遺伝的多様性の情報は他の海域と比べると数少ない。

本研究では、アオサンゴ、マンジュウヒトデ、及びアオヒトデとゴマフヒトデに関して、遺伝的多様性を評価すると同時に、これまで知られていなかった生殖隔離の存在・隠ぺい種なども明らかにし、種多様性及び遺伝的多様性を正しく評価することができた。特に絶滅危惧種であるアオサンゴに関しては、本研究により、同じ国内の大群落（たとえば白保大群落と大浦湾大群落）であっても遺伝的多様性及び生態学的特性（浮遊幼生の分散距離）は全く異なり、群集の維持構

造も異なっていることが分かった。これらの知見は今後のアオサンゴの保全上極めて重要な知見である。

シカクナマコに関しては、琉球列島5地点、パラオ1地点、リユニオン1地点の合計7地点256個体において8個のハプロタイプしか検出されず、集団ごとに遺伝的多様性が極めて低い値を示した。地理的距離が非常に近い（20Km程度）集団間（奄美の大浜とアヤマル岬）で同じハプロタイプが検出されなかった。このことから、シカクナマコのconnectivityは極めてローカルで限られること、さらに無性生殖による繁殖を繰り返してきた結果、集団の遺伝的多様性が極めて低くなるという現象を捉えることに成功した。本研究により、これらの集団遺伝構造を考慮した保全政策を取る必要があることを示すことができた。

2) Reef-connectivityとMPAの設定に関して

アオヒトデという比較的浮遊幼生期間の長いサンゴ礁無脊椎動物に関して、SEA-WP海域内での遺伝子流動は大きいことが分かった。特にインドネシアの中央南に位置するSekotongはインドネシアスルーフローを通じてフィリピン琉球列島などの北半球黒潮海域およびGBR、西オーストラリアなどの南半球東西の集団とも大きな遺伝子流動がみられ、それらの海域の遺伝的多様性の保持に重要な地点となっていることが考えられる。造礁サンゴの捕食者であるオニヒトデのマイクロサテライト解析の結果、SEA-WP海域の中心分であるインドネシア海域ではCelbes海域でconnectivityが強く、2次的大量発生が起こる危険性の高いことが判明し、早期駆除が有効であることが分かった。以上のように、浮遊幼生が広域分散型であるアオヒトデ、ゴマフヒトデやジャノメナマコ、アカミシキリ、ニセクロナマコなどの広域分散型で大きな遺伝子流動が観察される種類では、幼生のソース海域もしくは着底する海域にMPAを設定して、source-sink海域を保全することが重要となり、一方で、アオサンゴのように、浮遊幼生期間が極端に短く、遺伝子流動が大きく制限され、地点間で遺伝構造が大きく異なるような種類については、個々の海域にMPAを設定し、保全策を講じる必要がある。また、漁獲圧の高い海域における効率的・効果的な保全は実質上困難であり、ダイビングスポットなどの普段から生態系の保全や景観の管理努力が払われている海域にMPAを設定して、より集中した管理を行うことで、効果的な保全が可能になると考えられる。

3) インドネシア・フィリピンにおけるナマコの過剰漁獲圧に関して

さらに、インドネシア・フィリピンなど発展途上国各地のナマコのサンプリングを通じて、数多くの熱帯性ナマコ種が乱獲と環境悪化のために激減しており、危機的な状況にあることがわかった。発展途上国の漁師にとって、ナマコは貴重な海産資源であることから、現在のナマコの分布状況とともに遺伝子解析から得られるconnectivityの情報やこれまで抜け落ちていた産卵期などの基礎的な生物学的知見を現地へ還元し、保全策に役立てていきたい。また学術的にもこれらの情報の一部はナマコの国際専門誌であるBMD bulletinなどに投稿し受理された。

6. 引用文献

- 1) Yasuda, N., S. Nagai, M. Hamaguchi, K. Okaji, K. Gerard and K. Nadaoka (2009): Gene flow of *Acanthaster planci* (L.) in relation to ocean currents revealed by microsatellite analysis. Mol

- Ecol 18 (8): 1574-1590.
- 2) Yasuda, N., S. Nagai, M. Hamaguchi, et al (2006): Development of microsatellite markers for the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*. Mol Ecol Notes 6: 141-143.
 - 3) Raymond, M., F. Rousset (1995): GENEPOP (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism, Journal of Heredity 86: 248-249.
 - 4) Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider S (2005): Arlequin ver. 3.0, An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1: 47-50.
 - 5) Rice, W. R. (1989): Analyzing tables of statistical data, Evolution 43: 223-225.
 - 6) Nei, M., T. Maruyama and C. I. Wu (1983): Models of evolution of reproductive isolation, Genetics, 103: 557-579.
 - 7) Langella, O. (2001): Populations 1.2.24. Population genetic structure (individuals or population distances, phylogenetic trees).
<http://www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/populations/>
 - 8) Peakall, R and P.E. Smouse (2006): GenAlEx6: genetic analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6: 288-295.
 - 9) Williams, S.T. and J.A.H. Benzie (1997): Indo-West Pacific patterns of differentiation in the high-dispersal starfish *Linckia laevigata*. Mol Ecol, 6: 559-573.
 - 10) Arndt, A., C. Marquez, P. Lambert and M. J. Smith (1996): Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. Mol. Phylogenet. Evol, 6: 425-437.
 - 11) Lian, C.L., M.A. Wadud, Q.F. Geng, K. Shimatani and T. Hogetsu (2006): An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. J. Plant Res, 119: 415-417.
 - 12) Fu, F.X. (1997): Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147: 915-925.
 - 13) Rogers, A.R. (1995): Genetic evidence for Pleistocene population expansion. Evolution, 49: 608-615.
 - 14) Excoffier, L., P.E. Smouse and J.M. Quattro (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131 (2): 479-491.
 - 15) Crandall, E.D., M.E. Jones, M.M. Muñoz, B. Akinronbi, M.V. Erdmann and P.H. Barber (2008): Comparative phylogeography of two seastars and their ectosymbionts within the Coral Triangle. Mol Ecol, 17: 5276-5290.
 - 16) Yasuda, N., S. Nagai, C.L. Lian, et al (2008): Development of twelve compound microsatellite markers in the blue coral *Helipora coerulea* (Alcyonaria: Coenothecalia). Conservation genetics, 9: 1011-1013.
 - 17) Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. J. Mol. Ecol., 14:2611-2620.

- 18) Kerr, A. M., D.A. Janies, R.M. Clouse, Y. Samyn, J. Kuszak and J. Kim (2005): Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence. *Marine biotechnology*, 7: 53-60.
- 19) Williams, S.T (2000): Species boundaries in the starfish genus *Linckia*. *Marine Biol*, 136: 137-148.
- 20) Vogler, C., J. Benzie, H. Lessios, P. Barber and G. Wörheide (2008): A threat to coral reefs multiplied? Four species of crown-of-thorns starfish. *Biology Letters*, 4: 696-69.
- 21) Tajima, F (1989): Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 123: 585-595.
- 22) Tajima, F. (1993): Simple methods for testing molecular clock hypothesis. *Genetics*, 135: 599-607.

7. 国際共同研究等の状況

(1) アオヒトデ・コブヒトデに関して、アメリカのオールドドミニオン大学のDr. Crandall、カルフォルニア大学のProf. Barberらのグループと共同研究で、インドネシア周辺の詳細な集団解析を行った。

(2) レユニオン島のProf. Chantal CONAND、オーストラリア国立海洋研究所のDr. Sven Uthickeらとの共同研究でナマコサンプルの採集を依頼した。

(3) ドイツLudwig-Maximilians-Universität (LMU) MünchenでGert Woeheide、Catherine Voglerらとの共同研究により、本プロジェクトに携わるポストクの一人が7ヶ月間ドイツに滞在し、SEA-WP海域を中心とするインド洋太平洋のアオヒトデ・ゴマフヒトデの集団遺伝構造の解析を行ってきた。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Ohta, K., N. Yasuda, S. Nagai, K. Oki, C. Taquet and K. Nadaoka (2011): Observation of *Culcita novaeguineae* spawning events, *Galaxea* (in press).
- 2) Yasuda, N., C. Taquet, S. Nagai, Suharsono and K. Nadaoka (2011): Reef-connectivity of *Acanthaster* sp. in Coral Triangle region, *DNA Polymorphism*, 19: 134-138.
- 3) Takino, T., A. Watanabe, M. Shunsuke, N. Yasuda and K. Nadaoka (2010): Discovery of a large population of *Heliopora coerulea* at Akaishi Reef, Ishigaki Island, southwest Japan, *Galaxea*, 12 (2): 85-86.
- 4) Yasuda, N., Abe, M., Takino, T., Kimura, M., C.L. Lian, S. Nagai, Y. Nakano and K. Nadaoka (2011): Did the large population of the reef-building coral *Heliopora coerulea* in Oocura Bay, Japan originate from a single larva. *Marine Genomics* (in press).
- 5) Taquet, C., S. Nagai, N. Yasuda and K. Nadaoka (2010): First report of the development of microsatellite markers for a tropical sea cucumber (*Stichopus chloronotus*), *Conservation Genetics Resources*, 3 (2): 201-203.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) Taquet C., F. Setiawan, N. Yasuda, Suharsono and K. Nadaoka (2011): Observation of a wild juvenile of *Holothuria scabra*, SPC Beche-de-mer Information Bulletin, 31: 58.
- 2) Taquet, C., F. Setiawan, N. Yasuda, Suharsono and K. Nadaoka (2011): First observation of a large group of sea cucumber juveniles of *Holothuria leucospilota*: the nursery of Manado (North Sulawesi, Indonesia), SPC eche-de-mer Information Bulletin, 31: 30-34.

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) Kartadikaria, A.R., C. Taquet, K. Nadaoka, Y. Sasai, Y. Miyazawa, S. Nagai and N. Yasuda (2008): Introduction of a new project: "Conservation strategies based on regional reef connectivity and environmental load assessment in the SEA-WP region, The 4th ICRI East Asia Regional Workshop.
- 2) Takino, T., N. Yasuda, K. Nadaoka, M. Kimura, C. Taquet, A. Watanabe, S. Motooka, M. Abe, C.L. Lian and M. Taira (2008): 石垣島東海岸と本島大浦湾におけるアオサンゴ群集の地形的・遺伝的特性の把握, 第11回日本サンゴ礁学会
- 3) Taquet, C., K. Nadaoka, Y. Sasai, Y. Miyazawa, S. Nagai, N. Yasuda and A.R. Kartadikaria (2009): Introduction to the SEA-WP project: Biodiversity conservation strategies based on regional reef connectivity and environmental load assessment in the South-East Asia - Western Pacific (SEA-WP) region, 11th Pacific Science Inter-Congress.
- 4) Taquet, C., K. Nadaoka, Y. Sasai, Y. Miyazawa, S. Nagai, N. Yasuda and A.R. Kartadikaria (2008): Introduction of a new project "Conservation strategy based on regional reef connectivity and environmental load assessment in SEA-WP region, 第11回日本サンゴ礁学会.
- 5) Taquet, C., A.R. Kartadikaria, K. Nadaoka, Y. Sasai, Y. Miyazawa, S. Nagai and N. Yasuda (2008): Introduction of a new project: Conservation strategies based on regional reef connectivity and environmental load assessment in the SEA-WP region, The 4th ICRI East Asia Regional Workshop.
- 6) Kartadikaria, A. R., K. Nadaoka, C. Taquet, N. Yasuda, Y. Miyazawa, Y. Sasai and S. Nagai (2009): Introducing a Regional Project on Reef Connectivity in the South-East Asia and Western Pacific Region: The SEA-WP Connectivity Project, The Coral Reef Management Symposium on Coral Triangle.
- 7) Taquet, C., K. Nadaoka, Y. Sasai, Y. Miyazawa, S. Nagai, N. Yasuda and A.R. Kartadikaria (2009): Genetic and ecological approaches of regional reef connectivity in the South-East Asia and West Pacific region: the SEA-WP project, Australian Marine Sciences Association 46 the Annual Conference.
- 8) Yasuda, N., K. Nadaoka, Y. Miyazawa, Y. Sasai, S. Nagai, C. Taquet, A.R. Kartadikaria, C. Vogler and G. Woeheide (2009): Introducing a regional project on reef connectivity in the South-East Asia and Western Pacific region: The SEA-WP Project, Southeast Asia

Gateway Evolution.

- 9) Nadaoka, K., C. Taquet, A. R. Kartadikaria, Y. Sasai, Y. Miyazawa, S. Nagai and N. Yasuda (2009): Introducing a regional project on reef connectivity in the South-East Asia and Western Pacific region: the SEA-WP Connectivity Project, 5th ICRI East Asia Regional Workshop.
- 10) Yasuda, N., C. Taquet, S. Nagai, G. Worheide, C. Vogler and K. Nadaoka (2010): SEA-WP 海域におけるサンゴ礁海洋無脊椎動物の系統解析および集団遺伝構造, The Joint Symposium Front Line studies on wide-area dynamics of coastal marine organisms.
- 11) Yasuda, N., S. Nagai, C. Taquet and K. Nadaoka (2010): Strong structuring in reef-building octocoral *Heliopora coerulea* along Southeast Asia and West Pacific region revealed by microsatellite analysis, 2nd Asia Pacific Coral Reef Symposium.
- 12) Yasuda, N., S. Nagai, C. Taquet, K. Nadaoka, C. Vogler and G. Worheide (2010): Species boundary of *Linckia laevigata* and *L. multifora* across Indo-Pacific, 2nd Asia Pacific Coral Reef Symposium.
- 13) Taquet, C., S. Nagai, N. Yasuda, T-Y. Fan, M.D. Fortes and K. Nadaoka (2010): Study of phylogeny and population genetic structure of holothurian species in SEA-WP region using mitochondrial markers (SEA-WP Connectivity Project, 2nd Asia Pacific Coral Reef Symposium).
- 14) Nadaoka, K., Y. Miyazawa, Y. Sasai, S. Nagai, C. Taquet, N. Yasuda and A. R. Kartadikaria (2010): Introducing a regional project on reef connectivity in the South-East Asia and Western Pacific region: the SEA-WP Project, ICRI East Asia Regional Workshop.
- 15) 灘岡和夫, 安田仁奈(2010): サンゴ礁海産生物のリーフ・コネクティビティー. プランクトン・ベントス合同大会公開シンポジウム, プランクトンとして見るベントスの研究.
- 16) 安田仁奈, Coralie Taquet, 長井敏, 灘岡和夫, John Benzie, Catherine Vogler, Gert Worhide (2010): サンゴ礁ヒトデ類の種分化と幼生分散, 日本ベントス・プランクトン学会合同大会.

(3) 出願特許

特に特記すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に特記すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に特記すべき事項はない。

(6) その他

特に特記すべき事項はない。