

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82706

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06908

研究課題名(和文) 貝殻形成メカニズムから探る酸性化影響の実態と環境適応の可能性

研究課題名(英文) Effect of ocean acidification on molluscs shell formation

研究代表者

清水 啓介 (SHIMIZU, Keisuke)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・ポスドクトラル研究員

研究者番号：00757776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：北太平洋の5地点から軟体動物翼足類(*Limacina helicina*)を採集し、ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子の塩基配列を決定し、集団解析を行った結果、北大西洋の集団と遺伝的交流がほとんどないことを明らかにした。また、100年後に予想されるような大気二酸化炭素濃度の高い海水で10日間の飼育実験を行った結果、貝殻への大きな影響は見られなかったが、いくつかの貝殻形成関連遺伝子の発現が促進されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We corrected pelagic snail *Limacina helicina* from the subarctic western North Pacific and analyzed partial nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (COI). The data show clear genetic differentiation between populations in the North Pacific Ocean and North Atlantic Ocean. We then cultured them under the high pCO₂ sea water for 10 days. We did not observe the clearly phenotypic effect, on the other hand, we found some shell-related genes were up-regulated by the high pCO₂ environment.

研究分野：進化生物学

キーワード：海洋酸性化 貝殻形成 進化

1. 研究開始当初の背景

産業革命以後、温暖化や海洋酸性化といった人類がもたらした環境変化による生物への影響は深刻な問題である。そのため、水圏環境の変化に対する生物応答とその進化の理解は将来の水圏生態系動態の予測に重要であり、温暖化対策に有益な知見をもたらす。近年着目されている海洋酸性化は人間活動による大気二酸化炭素濃度の上昇により、海水へ二酸化炭素の溶け込みが生じ、海水の pH が低下する減少である。これにより、炭酸カルシウムの骨格を持つ生物(サンゴ、ウニ、貝類など)の骨格が海水に溶出してしまう現象がすでに報告されており、海洋生態系への影響が懸念されている。このような環境変化に対する生物の応答パターンは種間だけでなく同一種内の集団間においても異なることが知られている。このことは、対象とする生物の集団構造や遺伝的背景を明らかにした上で、生物影響についての議論を行うことの重要性を示している。それにもかかわらず、表現型への影響に関する研究が多く行われている一方で、遺伝子発現への影響や集団構造を考慮した研究は数が少なく、環境変化に対する生物影響の理解はまだまだ多くの課題を残している状況である。

2. 研究の目的

すでに野外集団にて貝殻の溶出が報告されている軟体動物・翼足類ミジンウキマイマイ (*Limacina helicina*) の生息実態と集団構造を明らかにし、海洋酸性化による遺伝子発現への影響を明らかにすることで、本種の酸性化環境への適応進化の可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野外採集と集団構造の解析

本種は亜寒帯域の外洋に生息する巻貝であるため、研究船を用いた海洋調査の際にブラ

ンクトンネット(NORPAC)を用いて採集を行った。採集は以下に示す西部北太平洋の5地点で行った(図1)。

Tsugaru (北緯 41.83 度 東経 141.22 度)

KNOT (北緯 43.18 度 東経 153.32 度)

K2 (北緯 47.00 度 東経 160.00 度)

ESM (北緯 44.18 度 東経 170.40 度)

NWP (北緯 41.00 度 東経 159.95 度)

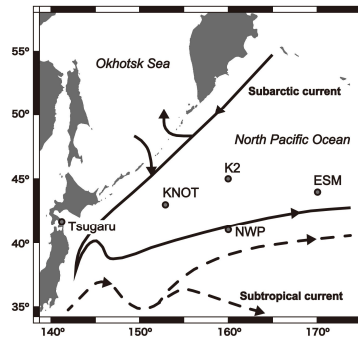


図1. ミジンウキマイマイの採集地点

上述した5地点で採集したミジンウキマイマイのDNAからPCRによりミトコンドリアDNAのチトクロムc酸化酵素サブユニットI(COI)遺伝子の部分配列を増幅した。その後、DNAシーケンサー(サンガー法)を用いて塩基配列を決定した。今回決定した塩基配列と、データベース上にすでに登録されている北大西洋で採集された個体の配列とを合わせて最節約法を用いたハプロタイプネットワーク解析と F_{st} による集団間の遺伝的分化の程度を解析した。

(2) 酸性化環境での飼育実験と影響の解析

飼育実験には K2 (北緯 47.00 度 東経 160.00 度)にて採水した表層海水(pH8.07)と水深 300m 海水(pH7.75)をもちいて 10 日間実施した。飼育実験による生物への影響について、以下の解析を実施した。

表現型への影響の解析

海洋酸性化による貝殻の溶出の程度を明らかにするため、走査型電子顕微鏡(SEM)による表面構造の観察と、マイクロX線CTによる貝殻内の炭酸カルシウム結晶の密度測定

を行った。

遺伝子発現への影響の解析

表層海水と水深 300m 海水での飼育後 24 時間の個体をそれぞれ 3 個体解析にもちいた。全組織から RNA を抽出し、発現している全ての mRNA の配列を次世代シーケンサー (HiSeq2500, illumina) をもちいた RNAseq を行った。得られた配列は Trinity による *de novo* アセンブリ後、Bowtie2 によるマッピングを行った。さらにそれらを正規化した後、遺伝子発現量の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) 野外採集と集団構造の解析

北太平洋の 5 地点から合計 101 個体のミジンウキマイマイを採集した。各個体の DNA から COI 遺伝子の部分配列(503bp)を決定し、北大西洋で採集された個体(67 個体)の配列と合わせてハプロタイプネットワークの解析を行った。その結果、北太平洋と北大西洋のサンプルの多くは地域の差を反映するような 2 つのハプロタイプに分かれることが明らかとなった。この 2 つのハプロタイプの間は 503 塩基のうち 2 箇所の置換によって生じていた。また、 F_{st} を算出したところ、北太平洋の集団と北大西洋の集団の間で遺伝的分化が生じていることが明らかとなった ($F_{st}=0.4747-0.5257, p < 0.001$)。さらに、北太平洋の集団は北大西洋の集団に比べ、塩基多様度(π)が低いことが明らかとなった。また、実際に今回解析に用いた個体は北大西洋で報告されている個体に比べて殻高が高く、先行研究にて分類された亜種(北大西洋: *Limacina helicina helicina*, 西部北太平洋: *Limacina helicina acuta*)の形態的特徴と一致していた。今回、新たに形態のデータに加え、分子データからも、これらの 2 亜種の存在が支持された。これらの結果は、海洋酸性化による翼足類への影響を評価する際に北大西洋と北太平洋で同等に扱ってはならないことを示し

ている。

(2) 酸性化環境での飼育実験と影響の解析

表現型への影響の解析

表層海水と 300m 海水を用いた飼育実験を開始後、1 日、5 日、10 日後の個体の貝殻を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて表面構造の観察を行った。その結果、これまで先行研究で報告されていたような顕著な貝殻の溶出は観察されなかった。

次に飼育後 1 日、10 日後の貝殻をマイクロ X 線 CT を用いて炭酸カルシウム結晶の密度の測定を行った。その結果、2 種類の海水の間で大きな差は見られなかった。

これらの結果から、西部北太平洋に生息するミジンウキマイマイは少なくとも 10 日間の低 pH(高い大気二酸化炭素濃度海水)ストレスにより、貝殻への深刻な影響は見られないことが明らかとなった。

遺伝子発現への影響の解析

上述したように、貝殻そのものへの影響は観察されなかったが、遺伝子発現レベルでの影響を評価するため、RNAseq を行った。その結果、約 140,000 個の遺伝子が発現していることが明らかとなった。これらの配列を相同性検索プログラム(BLAST)を用いて解析したところ、80%以上の遺伝子が既存のデータベースに登録されている配列との相同性が得られなかった。

次に、飼育海水間での遺伝子発現量の比較を行った結果、低 pH の海水で飼育した個体において 200 以上の遺伝子の発現が促進され、170 程度の遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになり、その多くは代謝系に関わる遺伝子であった。さらに、貝殻形成への関与が予想される遺伝子に着目したところ、発現が抑制された遺伝子よりも発現が促進された遺伝子の中から多く見つかった。この結果は貝殻形成に不適な環境ストレスを受けると、貝殻形成を促進するような遺伝的な基

盤が存在する可能性を示唆している。また、表現型(貝殻そのもの)に顕著な影響が見られなかったこととも整合的である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Noshita, K., Shimizu, K., Sasaki, T. 2016.

Geometric analysis and estimation of the growth rate gradient on gastropod shells.

Journal of Theoretical Biology, 389:11-19.

(doi: 10.1016/j.jtbi.2015.10.011) (査読有)

(2) Shimizu, K., Endo, K. 2015. *Evo-devo* of spiral shell growth in gastropods. *Proceeding 3rd International Symposium on Biological Shape Analysis*.

(doi:10.1142/9789814704199_0009) (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

(1) Harada N., Kimoto K., Shimizu K., Onodera J. Ocean acidification in the western Arctic Ocean -its impact on the marine planktons-. Polar Gordon Research Conference, California, USA.

(2017年3月28日) (招待講演)

(2) 清水啓介, 木元克典. 海洋酸性化による軟体動物・翼足類の貝殻形成への影響. 日本生態学会第64回大会, 早稲田大学 (東京都新宿区). (2017年3月16日) (ポスター発表)

(3) Harada N., Kimoto K., Wakita M., Fuhiki T., Shimizu K., Onodera J. Ocean acidification in the western Arctic Ocean and sub-arctic North Pacific -its impact on the marine calcifiers. The Third Xiamen Symposium on Marine Environmental Science, Xiamen, China. (2017年1月9日) (招待講演)

(4) Harada N., Kimoto K., Wakita M., Fujiki T., Shimizu K., Onodera J. Quantitative assessment scheme on calcifier's OA response. ICES/PICES Workshop on Understanding the Impacts and Consequences of Ocean Acidification for Commercial Species and End-users, Copenhagen,

Denmark. (2016年12月6日) (口頭発表)

(5) Harada N., Kimoto K., Wakita M., Fujiki T., Shimizu K., Onodera J. Potential environmental changes in the western Arctic and the western North Pacific: their impacts on lower trophic level organisms. North Pacific Marine Science Organization (PICES), San Diego, USA. (2016年11月7日) (招待講演)

(6) 清水啓介, 貝殻形成メカニズムから探る貝殻の起源, 進化学会シンポジウム S4「進化における発生の役割」, 第18回日本進化学会, 東京工業大学 (東京都目黒区). (2016年8月26日) (招待講演)

(7) Shimizu K., Kimoto K. The effects of ocean acidification in gastropod shell development. 4th International Symposium on the Ocean in a High-CO₂ world, Tasmania, Australia. (2016年5月4日)

(8) 清水啓介, 木元克典. 海洋酸性化による貝殻形成への影響. 日本生態学会第63回大会, 仙台国際センター (宮城県仙台市). (2016年3月24日) (ポスター発表)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

清水 啓介 (SHIMIZU, Keisuke)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・ポスドクトラル研究員

研究者番号 : 00757776