

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07949

研究課題名（和文）環境DNA技術を用いたサンゴ礁生態系モニタリング手法の開発

研究課題名（英文）Development of coral reef monitoring method using environmental DNA technology

研究代表者

新里 宙也（Shinzato, Chuya）

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：70524726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：気候変動などの影響によりサンゴ礁の状況は刻々と深刻化しており、そのきめ細かいモニタリングは重要である。本研究は、海水中に存在する環境DNAに注目し、海水を汲むだけでサンゴの検出を可能にする、新たなモニタリング手法の開発を目指した。サンゴと共生藻類を海水から検出できるのか確認するために水槽実験を行った結果、海水中の環境DNAは近傍に存在するサンゴの状況を良く反映していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海水中の環境DNAは近傍に存在するサンゴの状況を反映しているのか、太平洋・インド洋の代表的な造礁サンゴであるミドリイシ属を用いて、水槽実験を行い検証した。実験に使用した全てのサンゴ、共生している共生藻類のDNA配列タイプを、海水中から検出することができた。水槽飼育したサンゴ由来の環境DNAは、それぞれのサンゴの水中重量・種組成と相関していることから、環境DNAを用いたサンゴのモニタリングは可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The situation of coral reefs is becoming more serious due to climate change etc., and it is important to monitor them closely. In this study, we focused on environmental DNA in seawater and aimed to develop a new monitoring method that would enable us to detect corals simply by pumping seawater. Tank experiments were conducted to confirm whether corals and symbiotic algae could be detected in seawater, and the results showed that environmental DNA in seawater reflects well the status of corals in the vicinity

研究分野：サンゴ礁生物学

キーワード：サンゴ 環境DNA 褐虫藻

### 1. 研究開始当初の背景

全海洋生物種の25%が生息するとも言われるサンゴ礁は、地球上で最も生物多様性の豊かな生態系の一つである(Knowlton et al., 2010)。その一方で、温暖化などの地球規模の環境変動や、環境汚染などの地域レベルでの影響により、サンゴ礁は危機に瀕しており(Hoegh-Guldberg et al., 2007 など)、世界の造礁サンゴの約三分の一の種が絶滅の危機にあるとされる(Carpenter et al., 2008)。サンゴは褐虫藻と呼ばれる微細藻類を細胞内に共生させているが、その共生関係の崩壊、すなわち白化現象は約10年毎に地球規模で起こっており、2016年にも沖縄を含む世界中で報告された(Nakamura, 2017 など)。サンゴ被度が平均50%を超えていた地域が、数年で5%未満になるなど劇的に変化しているうえに、隣接した場所でも回復が早い場所と遅い場所が存在する(Hongo & Yamano, 2013 など)。現在進行形で刻々と状況が変化するサンゴ礁生態系は、きめ細かいモニタリングが重要となる。サンゴ礁生態系のモニタリングは主に潜水作業により行われるので、調査可能な範囲が限られる。さらにサンゴの種判別は、骨格の微細構造の観察が必要で、かなりの熟練を要し、生態モニタリングを行える人材も限られる。そのため、サンゴ礁を広範囲に渡って、効率的かつ正確にモニタリングする技術が切望されている。

### 2. 研究の目的

近年水や土壌などに含まれるDNA、環境DNAを解析することで、その環境下に生息する生物種を検出し、生態系のモニタリングが行われている。実際に海洋環境でも、魚類の生物相のモニタリングなどが報告されている(Miya et al., 2015 など)。魚類などと異なり、サンゴは遊泳せずに海底に固着しているため、環境DNAはサンゴの生態を忠実に反映していることが期待される。海水中に存在するサンゴと褐虫藻のDNAを利用し、海水を汲むだけでその海域に生息するサンゴ種を特定し、褐虫藻も同時に検出できる、環境DNA技術を用いたサンゴ礁生態系の新たなモニタリング手法の開発を目指した。そのために、以下の2点について研究を進めた。

- (1) 海水中の環境DNAから、共生している褐虫藻を含む近傍のサンゴのDNAが実際に検出されるのか、水槽実験により検証した。
- (2) ミトコンドリアDNAの変異しやすい特徴を利用して、ミトコンドリアDNAは様々な動物の種判別に広く使用されているが、造礁サンゴを含む刺胞動物は、ミトコンドリアゲノムの進化速度が極めて遅く(Shearer et al., 2002)、種間でのDNAの変異の程度が低い。例えば太平洋・インド洋で最も普遍的なサンゴであり、種数が最も多い仲間であるミドリイシ属サンゴにおいては、ミトコンドリアゲノムの全長の塩基配列を使用しても、種判別を行うことはできない。そこで、ミドリイシサンゴの種判別が可能な、新規のDNAマーカーの開発を目指した。

### 3. 研究の方法

- (1) 海水中の環境DNAからサンゴと共生褐虫藻は検出できるのか、水槽実験による検証

ミドリイシ属サンゴ19種(60個体)を石西礁湖で採取し、2つのオーバーフロー水槽で2日間飼育した(図1)。実際に水槽実験に使用したサンゴ由来のDNAが、環境DNAに含まれているのか調べるため、実験に使用した全てのサンゴ個体において、a)水中重量、b)ミトコンドリアゲノム全長、c)共生している褐虫藻のタイプ、を明らかにした。

2日間の水槽飼育後に、飼育しているサンゴ由来の環境DNAが含まれていると考えられる出水口と、サンゴに触れる前の入水口から3Lの海水をフィルター濾過し、そこから環境DNAを抽出した。サンゴと褐虫藻のDNAの検出には、これまでの先行研究で種・タイプ判別に使用されている、ミドリイシサンゴのミトコンドリア(調節領域)と褐虫藻のITS領域を、環境DNAからPCR法でそれぞれ増幅した。増幅したPCR産物は、Illumina社MiSeqによりDNA配列を網羅的に解

読し、既知のデータベースと比較することで、タイプの判別を行った。環境DNA解析結果と、水中重量や共生褐虫藻タイプなど、実験に使用したサンゴの事前に調べた情報と比較し、環境DNAが水槽中のサンゴをどの程度反映しているのか確認した。

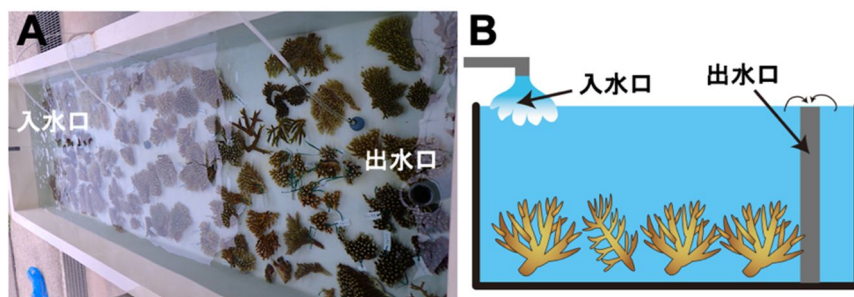


図1 本研究で行った、ミドリイシ属サンゴを用いた水槽実験の例。(A)実際の実験の様子。(B)その概念図。2日間飼育した後に、入水口と出水口両方から3Lの水を濾過し、海水中の環境DNAを解析した。

- (2) 新規ミドリイシサンゴ種判別遺伝子マーカーの開発

我々が解読した 15 種のミドリイシ属サンゴのゲノムの全遺伝子を比較し、それぞれの種のゲノム上に 1 つしか存在しない single copy gene を特定した。これらから、ミドリイシ種間で DNA 配列の変異が大きく、種判別に利用できる可能性がある遺伝子を探索した。これらを増幅するための PCR プライマーを作成し、実際にミドリイシ属サンゴ、複数種から複数個体の DNA サンプルを使用して、目的の遺伝子領域を実際に PCR 法で増幅し、DNA 配列を解読した。実際に種判別が可能なのか、15 種のゲノム解読で得られた DNA 配列情報と比較し、判断した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 水槽実験の結果

水槽実験に使用したミドリイシ属サンゴ 19 種、60 個体のミトコンドリアゲノムの全長の特定に成功した。さらに、個々のサンゴに共生している褐虫藻のタイプについても明らかにし、これらの結果を環境 DNA の結果との比較に使用した。

ミドリイシサンゴの飼育水槽の出水口から抽出した環境 DNA から、ミドリイシサンゴと褐虫藻、両方の DNA を PCR で増幅することができた。飼育しているサンゴと触れる前の入水口からも、ミドリイシサンゴの DNA が僅かながら検出された。おそらくこれは、外部に生息しているミドリイシサンゴ由来の DNA だと考えられる。一方で、出水口から単離した環境 DNA からは、それぞれの水槽に存在する全てのミドリイシ属サンゴの DNA タイプ(ミトコンドリアの調節領域)の配列を検出することができた。さらに出水口のサンゴ由来の環境 DNA は、それぞれのサンゴの水中重量・種組成と相関していることも確認された(図 2)。つまり、海水中の環境 DNA を解析することで、その海域でのサンゴの状況を把握することが可能であることが示唆された。

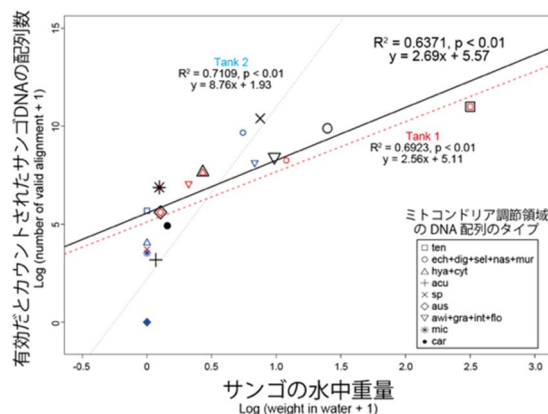


図2 水槽実験に使用したサンゴの水中重量と、有効だとカウントされた出水口の環境DNA中のサンゴ由来DNAの配列数の対応を示した散佈図。

褐虫藻については、実験に使用したサンゴに共生していた、ほぼ全ての褐虫藻タイプを検出することができた。一方で、実験に使用したサンゴからは検出されなかった、おそらく自由生活型の褐虫藻タイプも、海水から多く検出された。環境 DNA による褐虫藻の検出については、実際にサンゴに共生しているタイプや、自由遊泳型のタイプの情報が不足しているため、実際にどの褐虫藻がサンゴ由来なのかの判断が難しく、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

##### (2) 新規ミドリイシサンゴの種判別マーカー開発の試み

我々は、ミドリイシ属を含むミドリイシ科 18 種の全ゲノムを解読した。ミドリイシ属は 15 種解読し、それぞれの種が持つ約 23,000 個の遺伝子の中から、single copy gene を約 4,000 個特定した。これらの DNA 配列をミドリイシ属 15 種で比較し、全ての種で DNA 配列が異なる遺伝子候補を選別した。これまでに約 50 箇所の遺伝子領域について、実際に PCR プライマーを作成し、複数種のミドリイシ属サンゴ、複数個体の DNA サンプルを使用して個々の DNA 配列を解読し、解析を行った。

これまでに試した全ての遺伝子領域について、同種内での DNA の配列変異(個体差)が予想よりも大きかった。しばしば種間の差よりも大きくなるケースが頻発するなど、現在までにミドリイシの種判別に適した遺伝子領域を特定することは出来なかった。ミドリイシ属はテーブル状や枝状など、多様な形態を持っており、それぞれの形態によって生態系に果たす役割が異なると考えられる。造礁サンゴの環境 DNA 解析で現状使用されている DNA マーカーには、種判別が不可能なミトコンドリアのマーカー等しか存在しないので、種レベルでのサンゴの環境 DNA モニタリングは実現していない。そのため、サンゴ礁の生態調査という点では物足りないということになる。種判別マーカーの確立は、環境 DNA による詳細なサンゴ礁のモニタリングの実現に必須だと考えられるので、今後もマーカーの開発を継続したいと考えている。

#### < 引用文献 >

- Carpenter, K. E., et al. (2008). *Science*, 321 (5888), 560-563.  
 Hoegh-Guldberg, O., et al. (2007). *Science*, 318 (5857), 1737-1742.  
 Hongo, C., & Yamano, H. (2013). *PLoS One*, 8 (4), e60952.  
 Knowlton, N., et al. (2010). In McIntyre AD (ed.). *Life in the World's Oceans: Diversity, Distribution, and Abundance* (pp. 65-79).  
 Miya, M., et al. (2015). *R Soc Open Sci*, 2 (7), 150088.  
 Nakamura, T. (2017). *Journal of the Japanese Coral Reef Society*, 19 (1), 29-40.  
 Shearer, T. L., et al. (2002). *Mol Ecol*, 11 (12), 2475-2487.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shinzato Chuya, Khalturin Konstantin, Inoue Jun, Zayasu Yuna, Kanda Miyuki, Kawamitsu Mayumi, Yoshioka Yuki, Yamashita Hiroshi, Suzuki Go, Satoh Noriyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Eighteen Coral Genomes Reveal the Evolutionary Origin of Acropora Strategies to Accommodate Environmental Changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 16～30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msaa216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinzato C, Zayasu Y, Kanda M, Kawamitsu M, Satoh N, Yamashita H and Suzuki G	4. 巻 5
2. 論文標題 Using Seawater to Document Coral-Zooxanthella Diversity: A New Approach to Coral Reef Monitoring Using Environmental DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2018.00028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 7件/うち国際学会 5件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 豪  (Suzuki Go)  (30533319)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(長崎)・主任研究員    (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------