

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770013
 研究課題名 (和文)
 温帯域イシサンゴ類の総合的な生態調査および遺伝子バーコード化計画
 研究課題名 (英文)
 Barcoding project and total ecological studies of the temperate living scleractinian corals
 研究代表者
 深見 裕伸 (FUKAMI HIRONOBU)
 京都大学・フィールド科学教育研究センター瀬戸臨海実験所・助教
 研究者番号：50402756

研究成果の概要：和歌山県白浜を中心にイシサンゴ類の分布、生殖、および水温変動を調査した。結果、白浜に優占していたのは12科27属47種で、そのうち、21種の産卵を観察することができた。産卵は水温が25度以上になった後の7-8月に観察された。一方、白化現象が冬季に見られ、低水温が白化を引き起こしていることが示唆された。また、交配実験および遺伝子解析の結果、特定の種間での交雑や、隠蔽種の存在が明らかとなった。さらに、遺伝子解析により遺伝子バーコードに使用可能となりうる遺伝子データを調査地点で見つけた全47種から得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	300,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 生態・環境

キーワード：サンゴ、分子生態、COI、地理的分化、生殖、交雑、隠蔽種

1. 研究開始当初の背景

近年、世界中のサンゴ礁が減少しており、その原因や回復に向けて生態調査・遺伝子解析など様々な研究が行われている。白浜周辺では、2005年の2～3月にかけて、ここ数年で最も低い水温を記録し、多くのイシサンゴ類が死滅した。その一方で、まったく影響を受けていない種も多数見られた。そのため、今後のイシサンゴ類の回復状況や環境との関わりを調査する上で今が絶好の機会であり、この研究が他の温帯域のイシサンゴ研究に将来的に役立つはずで

ある。

熱帯・亜熱帯域では、イシサンゴ類数種の生殖に関する研究が行われており、交配実験や産卵時間の調査から、交雑が頻繁に起こっている可能性や、その一方で、同種とされていた形態多型が産卵時間の違いにより別種とされるということが分かってきている。また、申請者を含むグループの最近の研究によって、多くのイシサンゴ類では科レベルで分子系統解析と古典的形態分類がまったく一致しないことが明らかとなった。このように、イシサンゴ類

では近年、生殖、形態それに分子解析の研究によって次々に新しい発見がなされている。今後、本研究で行うようなこれらを総合した多角的解析がイシサンゴ類の研究および分類や進化など様々な問題の解決に必須になるとと思われる。

2. 研究の目的

白浜を中心とした和歌山県の温帯域に生息するイシサンゴ類の(1) 詳細な分布調査、(2) 生殖についての研究、(3) 水温変動や光量に対する成熟度や成長もしくは死亡などの影響を長期的に調査する。

(1) - (3) を総合し、温帯域に生息するイシサンゴ類の生態的特長を明らかにするとともに、これらサンゴ類が温帯域でどのように適応し進化してきたのかを推察する。また、これら生態的な研究に加え、最近海外で実施されてきている遺伝子バーコード(遺伝子からの他の形質や地域特性の検索や比較)という新しい概念を導入し、上記の調査地点を主体に白浜周辺のイシサンゴ類のデータベースの構築を行う。同時に白浜周辺のイシサンゴ類の遺伝的多様度や近縁種間の遺伝的差異も明らかにする。さらに、上記の生態的特徴との組み合わせにより、混乱しているイシサンゴ類の分類体系の改革を試みる。

3. 研究の方法

まず、白浜周辺の様々な環境(沿岸、湾奥、外湾、島の周囲など)でスキューバダイビングにより潜水調査を行い、どのような場所にどのような種がどれくらいいるのかというのを観察する。その中で特に興味深い場所を定期調査する地点と定める。

産卵調査では、まず、調査地点で全ての種について成熟の有無を肉眼で確認し、成熟している群体の内、1種あたり3~5群体を研究室に設置してある屋外水槽に持ち帰り産卵するのを待つ。産卵までの間は毎日観察を行い、産卵した全群体の産卵日時を記録する。ミドリイシ属サンゴとキクメイシ科サンゴについては、特に産卵時に群体ごとに別々のバケツに産卵させ、卵と精子を採集した後、種間や群体間もしくは属間など様々な組み合わせで交配実験を行う。その後、受精率および死亡率を調べ、形態の解析を上記と同様に行った後、交雑の有無や同種内の形態多様性(種の境界)を明らかにする。

データベースの構築では、白浜の調査地点を中心に、観察することができた全てのイシサンゴ類の採集を行う。採集にあたっては、生態写真、生息深度、および簡単な環境(岩陰にいるのかなど)を記録し、1種につき可能な限りにおいて3群体を採集する。形態解析用に群体の一部(約30cm³)を採集し、そ

の小片(1cm³)を遺伝子解析用としてグアニジン溶液に入れる。形態解析用の群体は生態写真を撮った後、漂泊し骨格標本にする。骨格標本は上記と同様に実体顕微鏡および走査電子顕微鏡にて解析する。グアニジン溶液に入れた組織は数日で溶解するため、その溶液からフェノール/クロロフォルム抽出によりDNAを抽出する。そのDNAを用いて、それぞれの試料からミトコンドリア遺伝子(COIと非翻訳領域)の塩基配列を決定する。

4. 研究成果

① 白浜におけるイシサンゴ類の種組成と分布

白浜での潜水調査の結果、種の多様性と、天候にかかわらず調査ができるという点を重視し、地点を決定した。その地点は、水深が最大で7mであった。種組成を調べたところ、ミドリイシ科(ミドリイシ属6種、コモンサンゴ属1種、アワサンゴ属1種)、ハマサンゴ科(ハマサンゴ属1種、ハナガササンゴ属2種)、キササンゴ科(スリバチサンゴ属1種)、ヤスリサンゴ科(アミメサンゴ属2種、ヤスリサンゴ属1種)、ハナヤサイサンゴ科(ハナヤサイサンゴ属1種)、ムカシサンゴ科(ムカシサンゴ属1種)、ヒラフキササンゴ科(シコロサンゴ属2種)、クサビライシ科(カワラサンゴ属1種)、サザナミサンゴ科(イボサンゴ属1種)、キクメイシ科(マルキクメイシ属2種、コマルキクメイシ属1種、カメノコキクメイシ属2種、コカメノコキクメイシ属4種、ノウサンゴ属1種、キクメイシ属4種、キクメイシモドキ属1種、トゲキクメイシ属2種、タバネサンゴ属1種、ルリサンゴ属2種)、オオトゲサンゴ科(*Micromussa*属1種、オオトゲサンゴ属3種、ダイノウサンゴ属1種)、ウミバラ科(キッカサンゴ属1種)の計12科27属47種が確認された。白浜全域では1群体しかいないような稀種20種を含めて70種程度であると報告されているため、この地点だけで、白浜のほぼ主要な種類を網羅しているといえる。

また、種ごとの環境の違いを見たところ、ミドリイシ属(*Acropora*)では、全6種のうち、種によってある程度分布に差が見られた。まず、*Acropora japonica*と*A. hyacinthus*が水深1-2mあたりから5mまで分布しており、特に浅い場所では他の種がみられなかった。一方、他の4種は水深5m付近に出現した。他属のサンゴは基本的に水深5mより深い場所でみられ、特にキクメイシ科は6-7mで優占していた。ただ、例外的にトゲキクメイシ属とルリサンゴ属は2m付近から出現していた。冬季の調査では、水深1-2mの表層付近で、これらイシサンゴの生育限界である14度以下になることが稀に観察された。それにも関わらず、これらの種類が死滅せず

に生存していることから、これらの種類では低水温にかなり耐性があると思われる。ただし、そのような日々が 2、3 日連続して続くと、共生藻を失い群体が白くなる白化現象が見られ、中には死亡する群体も見られた。一般的には熱帯方面では夏季の高温によりサンゴの白化が見られるが、冬季の白化はほとんど報告がなく、温帯では夏季に水温があまり上昇しない一方で、冬季の低水温がサンゴの生存に深く関わっていることが明らかとなってきた。

②産卵様式と交雑

産卵調査の結果、ミドリイシ属の全 6 種(表 1 A)、キクメイシ科ではキクメイシ属、マルキクメイシ属、カメノコキクメイシ属、コカメノコキクメイシ属、トゲキクメイシ属の全 20 種中 15 種、オオトゲサンゴ属の 3 種、キッカサンゴ属 1 種の計 25 種の産卵を観察することができた。他の種については観察はしていたものの、その産卵を確認することができなかった。産卵ではなく、体内で幼生保育している可能性もある。

多くの場合で交雑は見られなかったが、ミドリイシ属とキクメイシ属にて交雑が見られた。

まず、ミドリイシ属では、産卵時間の違いにより大まかに 3 つのグループに分かれた(表 1 A)。グループ間では産卵時間が 30 分以上異なっていた。また、全 6 種の掛け合わせの結果、*Acropora solitaryensis* と *A. pruinosa* の間でのみ交雑が見られ、高い受精率を示した(表 1 B)。しかし、これら 2 種間の産卵時間は約 70 分異なっていた(106 vs 179、表 1 A)。自然界では 30 分以内に受精しないと精子濃度が薄まるために受精できないといわれていることから、実際にこれら 2 種が自然界で交雑する可能性は低いと考えられる。このように沖縄などの亜熱帯域で交雑が頻繁に起こっていると考えられているが、温帯においては種類数も少ないことから、交雑は起こっていないだろう。今回実験的に交雑の見られた 2 種について、*A. pruinosa* は温帯固有種で、一方、*A. solitaryensis* は広範囲に分布しているといわれている。おそらく *A. solitaryensis* が熱帯域から温帯域に進出してきたために、温帯固有種である *A. pruinosa* と偶然受精が可能になったのかもしれない。同様の例はカリブ海で示唆されており、今回のこの結果は、それを支持するものである。

表 1. ミドリイシの産卵時間と交配

A			
種	N	産卵時間 日没後(分)	種内受精率 (%)
<i>A. pruinosa</i>	10	106	73
<i>A. valida</i>	6	112	93
<i>A. hyacinthus</i>	10	141	96
<i>A. glauca</i>	8	161	33
<i>A. solitaryensis</i>	7	179	85
<i>A. japonica</i>	4	220	84

B 交雑			
卵		精子	受精率 (%)
<i>A. solitaryensis</i>	x	<i>A. pruinosa</i>	88
<i>A. pruinosa</i>	x	<i>A. solitaryensis</i>	49

次にキクメイシ属では白浜産 3 種で産卵が観察された。興味深いことに、これら 3 種間では、10 分から最大で 30 分程度の産卵時間のずれしか見られなかった(図 1)。また、比較として行った沖縄での近縁種および同種の産卵時間調査では、白浜の *F. rotumana* と沖縄の *F. palida* の産卵時間が類似していた。これら 2 種は形態的に明確な違いがなく、地域的な違いによって分けられているだけであるため、同種という可能性も考えられる。一方、同種である *F. lizardensis* については、白浜産が日没後 90–110 分で産卵したのに対して、沖縄産は 130 分以降であり、主な群体は 160 分後に産卵していた。形態もわずかに異なることから、別種である可能性も考えられる。

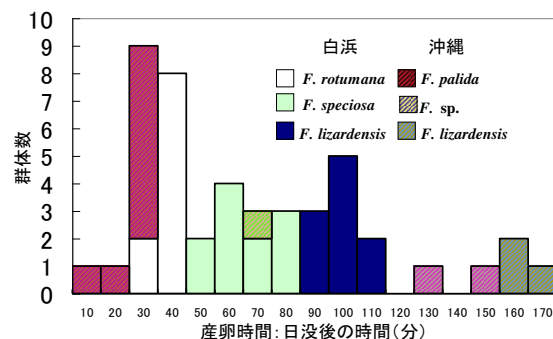


図 1. キクメイシ属 (*Favia*) の産卵時間

さらに、白浜産キクメイシ属 3 種の交配実験の結果、交雑が見られた。しかし、種内では 70% 以上の高い受精率を示したのに対して、種間では、最大でも *F. speciosa* と *F. rotumana* の組み合わせで 43% とそれほど高い受精率を示さなかった(表 2)。ただ、産卵時間がそれぞれの種間で 30 分程度しかずれておらず、産卵自体が群体ごとに約 20–30 分続くことを考慮すると、自然界でもまれに交雑の起こる可能性はあるだろう。実際、同定が困難である中間形態を持つ群体も自然界で見られる。以上の結果から、これら 3 種は現在、産卵時間をずらすことで生殖隔離を進行させている種分化の過程か、もしくは交

雑をするようになったことで、同化へのプロセスを辿っているという2つの可能性が考えられる。

表2. キクメイシ属の交配

種内	N	受精率 (%)
<i>F. rotumana</i>	20	87
<i>F. speciosa</i>	12	87
<i>F. lizardensis</i>	36	76
交雑 卵 x 精子		
<i>F. rotumana</i> x <i>F. speciosa</i>	13	15
<i>F. speciosa</i> x <i>F. rotumana</i>	15	43
<i>F. speciosa</i> x <i>F. lizardensis</i>	4	13
<i>F. lizardensis</i> x <i>F. speciosa</i>	4	28

③分子系統解析

ミドリイシ属とキクメイシ属については、COI 解析では種間の違いが見られなかったため、ミトコンドリアの非翻訳領域を用いて、より詳細な解析を行った。

まず、ミドリイシ属では、非常に興味ある結果が得られた。白浜を含め温帯域の *A. hyacinthus* という種類が遺伝的に大きく3グループ(図2. HyaA, B, C)に分かれた。一方、沖縄産の *A. hyacinthus* も大きく2グループ(図2. HyaC, D)に分かれた。グループHyaCでは、どちらの産地の群体も混ざっていたが、その他のグループでは、ほぼ温帯と沖縄で明確に区別された。しかし、これらの骨格形態を精査したものの、グループ間もしくは温帯と沖縄間において違いを見つけることができなかった。さらに、これらのグループ間では互いに90%程度の受精率が見られたため、遺伝的には離れているが、これらは同種内の変異であると結論付けられた。一方、他種については、このような種内での遺伝的な違いは見られず、種ごとに遺伝的にまとまった。このように、種内での遺伝的に大きく異なる多型の存在は *A. hyacinthus* でのみ見られる特徴であることが分かる。なぜこのような特徴を持ったかはまだ明らかにできていないが、一つの仮説が立てられる。この種は現在、世界中の熱帯から温帯に分布しているが、おそらく温帯域で過去(氷河期など)に一度熱帯・亜熱帯域から隔離されたのであろう。その期間、温帯域のサンゴはほぼ絶滅したが、唯一 *A. hyacinthus* だけが生き残り、独自の遺伝的な変異を蓄積したと思われる。そして、氷河期が終わり、徐々に熱帯域と温帯域が黒潮によって再び交流を持ったことで、温帯特異的な遺伝型(HyaA,B)と熱帯・亜熱帯特異的な遺伝型(HyaD)、さらには両方の地域で見られる遺伝型(HyaC)が見つかるようになったと推察される。このように、この種は

温帯域のイシサンゴ類の進化を見る上でモデルとなりうる種類である。さらに、温帯特異的な遺伝型を持っているため、今後温暖化などの影響を見るのに有効に使用できるだろう。

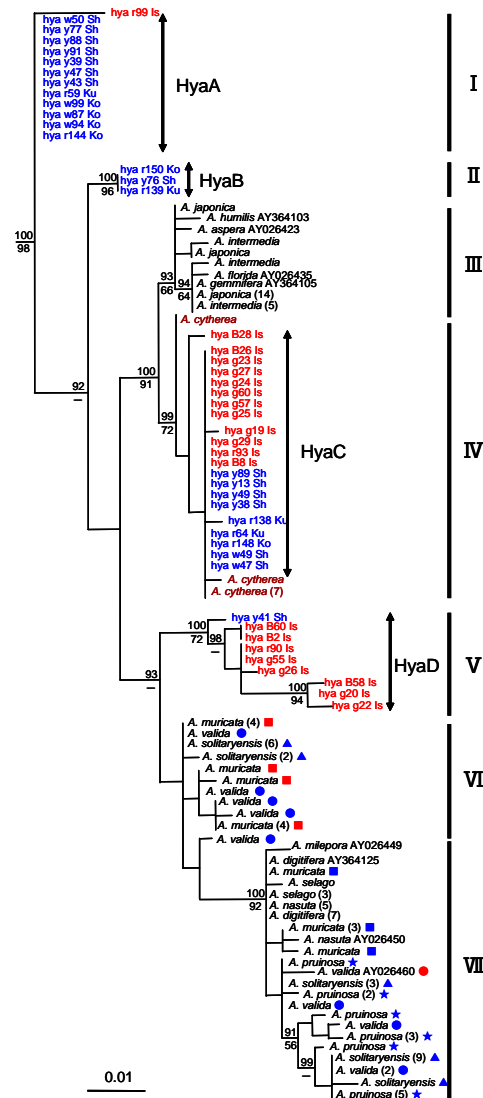


図2. ミトコンドリア非翻訳領域から推定されたミドリイシ属の系統関係。青の文字と記号が温帯産、赤の文字と記号が沖縄産を示す。

次にキクメイシ属では、上述した産卵事件や交配実験に用いた種類(白浜3種、沖縄3種)が遺伝的に区別することができなかった(図3. 緑枠)。ただ、沖縄産の *F. palida* の数群体が遺伝的に離れているのみである。一方、他種では、それぞれ種ごとと遺伝的にまとまっていた(図3. 灰色枠)。これらのことから、上記の6種は産卵時間の違いによって多少なりとも区別できるが、遺伝的に区別するのはまだ困難なほど近縁であることが分かる。形態を見ても、これらの種では、それほど明確な違いがあるわけでもない。このように、交雑し、遺伝的にも区別できない近

縁種では、種複合体として扱ったほうが妥当かもしれない。

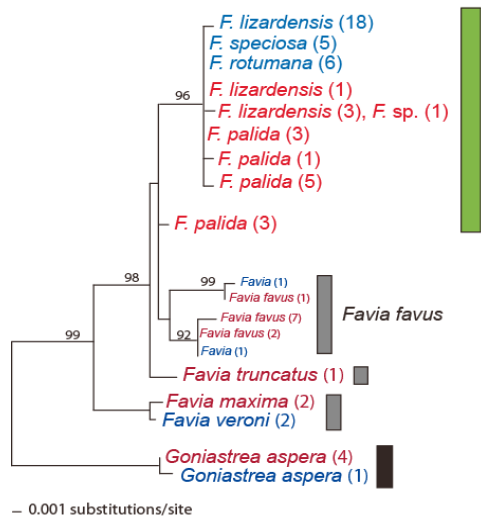


図3. ミトコンドリア非翻訳領域から推定されたキクメイシ属の系統関係。青が温帯産、赤が沖縄産を示す。

ミドリイシ属のデータの一部は、Marine Ecology Progress Series (Suzuki et al. 2008) で発表された。また残りのデータおよびキクメイシ属のデータは現在、論文作成中である。

④隠蔽種の存在

交配実験および遺伝子解析、さらには形態解析を総合した結果、マルキクメイシ属の1種、およびミドリイシ属の1種で、それぞれ隠蔽種の存在が確認された。どちらも現在分類に用いられている形態形質では区別することは不可能であるが、互いに全く受精せず、遺伝的に離れており、しかもこれまで分類形質に使用されていない形質で区別できるという点で共通であった。今後、タイプ標本との比較を行い、どちらが本当の種なのかを確認する必要があるものの、少なくともそれぞれ2種の混合であることは間違いないだろう。例として図4にマルキクメイシ属（タカクキクメイシ）の形態の違いを示す。

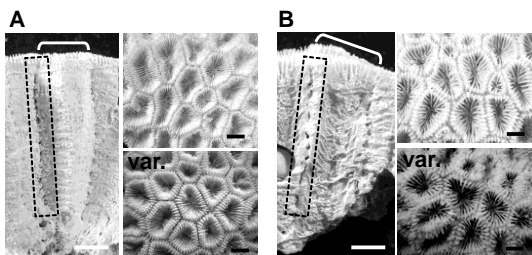


図4. タカクキクメイシの形態の2型 (AとB)。左図は群体の縦面、右図は群体の上面の通常形態と形態多型 (var.) 示す。

図4のAとBの形態的な違いは、サンゴ個体が入っているポリプ間の接着度合いのみで、Aではポリプごとがバラバラになりやすいのに対し、Bではポリプ間の接着が非常に強固で互いに離れることがなかった。このように、わずかな違いでも種として区別できることが確認でき、今後の調査で温帯域でさらなる隠蔽種の存在が明らかになるだろう。

この結果は、現在、日本サンゴ礁学会誌に投稿中である。

⑤データベース解析

白浜で見つけられた全47種のCOI遺伝子を解析した。それらの一部はイシサンゴ科全体の系統関係を推定した結果に使用し、電子ジャーナルのPlosOne (Fukami et al. 2008) で発表されている。また、現在、これまで採集した骨格標本については、JSTデータベースでの登録が終了した。現在も継続して、この形態データベースとリンクできるように遺伝子データを組み合わせているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Fukami H, Chen CA, Budd AF, Collins A, Wallace C, Chuang Y-Y, Chen C, Dai CF, Iwao F, Sheppard C, Knowlton N, Mitochondrial and nuclear genes suggest that stony corals are monophyletic but most families of stony corals are not (order Scleractinia, class Anthozoa, phylum Cnidaria). PlosOne 3: e3222, (2008), 査読有
- ② Fukami H, Short review: Molecular phylogenetic analyses of reef corals. Galaxea, Journal of Coral Reef Studies 10: 47-55, (2008), 査読有
- ③ Suzuki G, Hayashibara T, Shirayama Y, Fukami H, Evidence of species-specific habitat selectivity of *Acropora* corals based on identification of new recruits by two molecular markers. Marine Ecology Progress Series 355: 149-159, (2008), 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 深見裕伸・鈴木 豪 (2008) 分子から見た日本温帯域の造礁性イシサンゴ類の特異性.
日本サンゴ礁学会第 11 回大会. 11 月 24 日 静岡
- ② 座安佑奈・野村恵一・深見裕伸 (2008) 温帯域のオオトゲキクメイシ属の種の実態調査. 日本サンゴ礁学会第 11 回大会. 11 月 24 日 静岡
- ③ Suzuki G, Hayashibara T, Shirayama Y, Fukami H (2008) Species specific habitat selectivity of *Acropora* larvae in subtropical reefs. 11th International Coral Reef Conference. 7 月 7 日 Florida, USA
- ④ Suzuki G, Hayashibara T, Shirayama Y, Fukami H (2008) Strong genetic structure of the widespread coral *Acropora hyacinthus* in the peripheral region of Indo-Pacific reefs. 11th International Coral Reef Conference. 7 月 7 日 Florida, USA
- ⑤ Fukami H, Nomura K, Iwao K, Hayashibara T, Suzuki G, Iwase F, Knowlton N (2008) Regional specific relationships of species in the genus *Favia*. 11th International Coral Reef Conference. 7 月 7 日 Florida, USA
- ⑥ Huang D, Meier R, Todd A, Fukami H, Chou LM (2008) Phylogeny of Faviidae Corals Based on Molecular and Morphological Data. 11th International Coral Reef Conference. 7 月 8 日 Florida, USA
- ⑦ Knowlton N, Fukami H, Chen A, Budd A (2008) Mitochondrial and Nuclear Genes Suggest that Stony Corals Are Monophyletic but Most Families of Stony Corals Are Not. 11th International Coral Reef Conference. 7 月 9 日 Florida, USA
- ⑧ 深見裕伸 (2007) 造礁サンゴ類の分子系統. 日本サンゴ礁学会. 11 月 23 日 沖縄
- ⑨ 深見裕伸 (2006) 高次分類群に対する分子系統解析-形態分類の見直しへ. 日本サンゴ礁学会第 9 回大会. 11 月 26 日 仙台
- ⑩ Fukami H, Chen CA, Knowlton N (2006) Chaos of the scleractinian coral family. 1st Asia Pacific Coral Reef Symposium. 6 月 20 日 Hong Kong
- ⑪ Chen C, Dai C, Fukami H, Knowlton N, Chen CA (2006) Evolutionary mitogenomics of Pocilloporid corals: ATP8 gene loss, a novel open reading frame (ORF) and phylogenetic utility. 1st Asia Pacific Coral Reef Symposium 6 月 20 日 Hong Kong

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深見裕伸 (FUKAMI HIRONOBU)

京都大学フィールド科学教育研究センター
瀬戸臨海実験所・助教