

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00653

研究課題名（和文）サンゴ体外分解系に着目したサンゴ礁生態系フェーズシフトのメカニズム解明

研究課題名（英文）Unveiling the mechanism of phase-shift in coral reef ecosystem focusing on extracellular degradation system in corals

研究代表者

井口 亮（Iguchi, Akira）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

研究者番号：50547502

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、サンゴ礁生態系のフェーズシフトに焦点を当てて、消化酵素の活性と存在量を評価し、その関連性を明らかにすることを目的とした。野外調査、飼育実験、生化学実験、遺伝子解析を組み合わせたアプローチを用いて、サンゴとその周辺環境の微生物由来の酵素の発現量・存在量、そしてその活性評価を試みた。その結果、サンゴ被度とバクテリア由来の酵素存在量の関係が地域間で大きくばらつくことが示唆された。また、遺伝子発現解析から、ストレス暴露やストレス耐性の違いによって、各種酵素の発現パターンが異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴ礁生態系におけるサンゴから藻類等へのフェーズシフトは、生態系の回復・保全を考える上で重要な課題であるが、その詳細なメカニズムの理解は、ミクロレベルではほとんど進んでいない。そのため、サンゴ及びその周辺環境のマイクロバイオームの消化酵素に着目してその詳細解明に初めて踏み込んだ本研究は、学術的意義がある。また、本研究が進展すれば、フェーズシフトを事前に探知するなどのマーカー開発につながるなど、社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to evaluate the activity and abundance of digestive enzymes and their relevance to coral reef ecosystems, with a focus on phase shifts. Using a combined approach of field studies, rearing experiments, biochemical experiments and genetic analysis, we attempted to evaluate the expression and abundance of microbiota-derived enzymes and their activity in corals and the surrounding environment. The results suggest that the relationship between coral cover and the abundance of bacteria-derived enzymes varied widely among regions. Gene expression analysis also revealed that the expression patterns of the various enzymes varied according to stress exposure and stress tolerance.

研究分野：分子生態学

キーワード：サンゴ フェーズシフト 消化酵素 マイクロバイオーム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁生態系は、地球規模(地球温暖化や海洋酸性化)・地域規模(栄養塩負荷など)での種々の環境変化によって、その基盤構成種である造礁サンゴ(以下、サンゴ)の減少により、世界的に衰退の一途にあると危惧されている。その中で、サンゴ礁生態系がサンゴ卓越時の状態から、短期的には成長速度に勝る海藻類が卓越する状態へと変化するフェーズシフトが長年研究されている。フェーズシフトは世界各地で報告されており、国内においても芝状藻類の卓越によってサンゴの生育が阻害されることが報告されている。また、サンゴは浮遊幼生期を通じて、周辺の岩盤などに着底するが、芝状藻類によってサンゴ幼生の加入・着底が阻害されることが指摘されている。しかし、環境悪化前のサンゴ卓越時に海藻類の繁茂がどう抑えられているのか、また環境悪化後の海藻卓越時にサンゴの加入・着底が阻害されるのかについては、詳細なメカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、各種消化酵素に注目して、サンゴ及びその周辺環境の微生物由来の酵素活性・酵素遺伝子の発現量・存在量を評価し、フェーズシフトとの関連を明らかにすることを目的とした。目的達成のため、野外調査・飼育実験・生化学実験・遺伝子解析による統合的なアプローチによって研究を進めた。

3. 研究の方法

野外におけるサンゴの被度に差がある場所間において、潜水調査による野外調査で基本的なサンゴ・藻類分布を確認した後に、海水等の環境サンプルを採取した。また、沖縄県のサンゴ採捕許可を取得して、飼育実験用のサンゴ片を採取した。環境サンプルは、酵素遺伝子存在量把握のために RNAlater を加えて冷蔵保存、または冷凍保存した。飼育実験に関しては、親サンゴ片は流水条件で飼育し、冷凍保存した。稚サンゴは、サンゴ一斉産卵時に配偶子を集めてプラヌラ幼生を作成し、変態ペプチドでプラスチックプレートに着底させて実験に用いた。稚サンゴは、止水条件でストレス暴露を行い、1サンプルあたり 100 個体程度を目処にして冷凍保存した。キチナーゼ部分精製に関しては、予備的に多糖類除去などの最適な精製条件を検討した後に、得られた粗酵素液を HiTrap Butyl FF カラムに供して溶出して分画した。キチナーゼ活性測定に関しては、波長 280 nm の吸光度が高くタンパク質量の多い画分を選択し、Chitinase Assay Kit などを用いて、3 種類の基質を用いて測定を行った。飼育実験に用いたサンゴ片は、ハイスループットシーケンサーを用いて一塩基多型データを取得し、分子集団遺伝学的解析を実施した。また、ユニバーサルプライマーを用いたメタバーコーディング解析を実施し、サンゴ片の微生物組成の把握を行った。

4. 研究成果

環境サンプルを用いて、細菌叢を対象としたメタバーコーディング解析を行った結果、Proteobacteria 門が多く見られ、続いて Cyanobacteria 門、Bacteroidota 門が優占していた。PICRUSt2 を用いて細菌叢から酵素組成データを取得し解析した結果、セルラーゼに関しては、サンゴ被度の違いで酵素存在量の違いが有意に異なっていることが確認された。有意差は見られなかったが、キチナーゼの存在量に関しても、サンゴ被度が低いところで低下する傾向が見られた。沖縄県瀬底島近傍で、サンゴ被度が異なる場所において、画像解析で定量的な評価を行った場所では、環境サンプルの酵素存在量に関しては、違いは見られず、地域間でサンゴ被度と酵素存在量の関係は大きくばらつくことが示唆された。

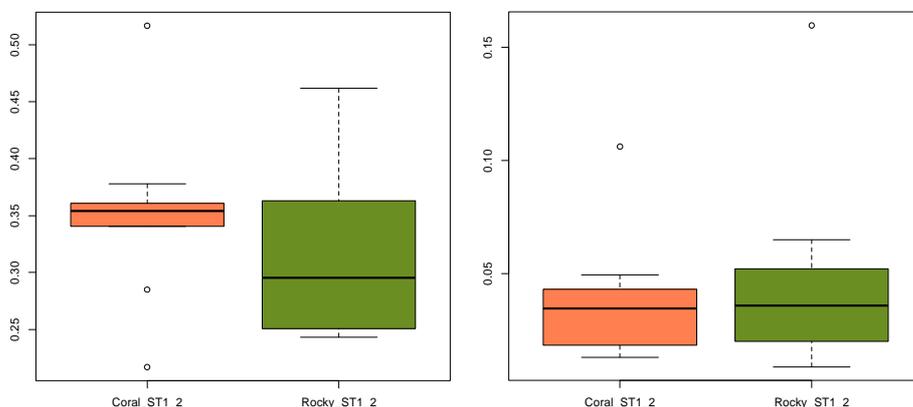


図1. サンゴ被度の異なる場所で採取した環境サンプルのバクテリアから推定した酵素存在量の比較。左はセルラーゼ、右はキチナーゼを示す。

高水温耐性の異なるサンゴ片の網羅的遺伝子発現解析を行い、各種酵素の発現量の定量化と比較を行った。その結果、セルラーゼに関しては、2種類の遺伝子でストレス耐性の高いサンゴ片で高く発現している傾向が見られたが、キチナーゼに関しては、遺伝子の種類で発現パターンが異なり、同様の傾向はフコシダーゼでも確認された。

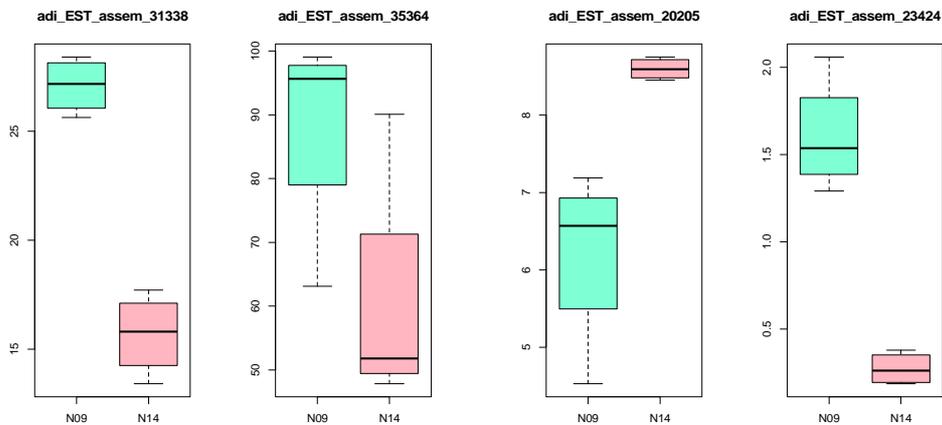


図2. 高水温ストレス耐性の異なるコビミドリイシのサンゴ系統間での親サンゴ片の酵素遺伝子発現量 (TPM 値)。左の2パネルはセルラーゼ、右の2パネルはキチナーゼを示す。

酸性化海水に暴露した稚サンゴの網羅的遺伝子発現解析を行い、各種酵素の発現量の定量化と比較を行った。その結果、セルラーゼに関しては、発現量の変化は見られなかったが、キチナーゼに関しては、遺伝子の種類で発現パターンが異なっていた。フコシダーゼに関しては、酸性化海水暴露区で発現量が低下する傾向が見られた。

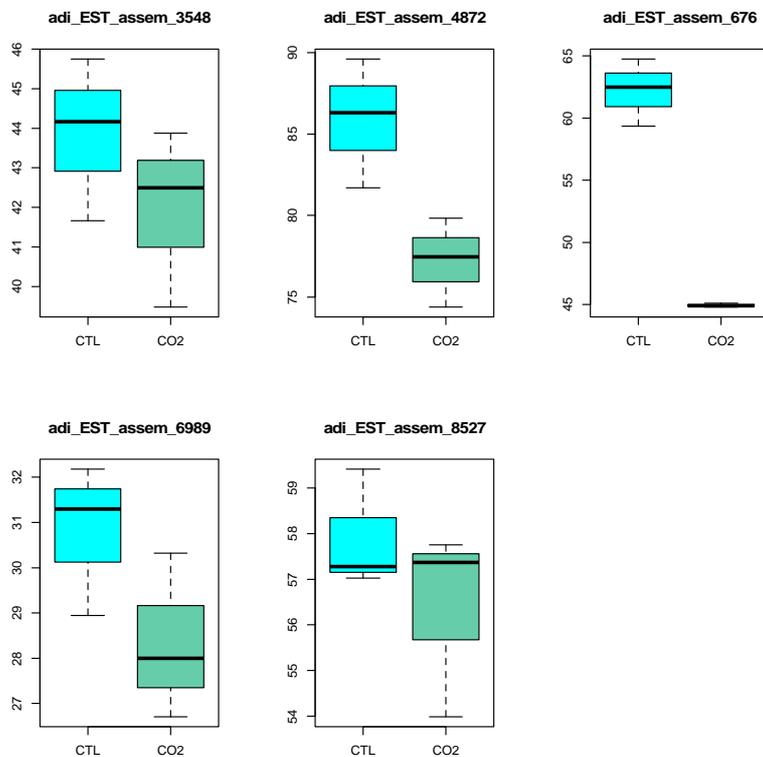


図3. コビミドリイシの稚サンゴを用いて酸性化海水に暴露したサンプルでのフコシダーゼ酵素遺伝子の発現量 (TPM 値)。

サンゴ片を用いた生化学実験では、キチナーゼを部分精製することができ、どの基質でも活性を確認できた。2糖のエキソ型キチナーゼは比較的活性が高かったが、エンド型キチナーゼは全体的に活性が低いことが示された。

高水温ストレス耐性の異なるサンゴ片のメタバーコーディング解析を行った結果、褐虫藻組成及びバクテリア組成には、枝片間で異なる傾向は見られなかった。また、一塩基多型解析では、実験で用いたサンゴ片はクローンの関係でないことが確認された。

これまでに得られた成果は、学会大会や査読付国際誌で発表を行い、現在も複数の論文としてまとめている段階にある。日本サンゴ礁学会第26回大会においては、メタゲノム解析やネットワーク解析等のバイオインフォマティクスの内容も交えた集会を企画・実施し、本研究課題で得られた知見と適用された解析手法の紹介を行い、活発な議論を進めることができた。今後もサンゴ礁のフェーズシフトに関する分野横断的研究を進めて、その詳細解明を行う予定である。

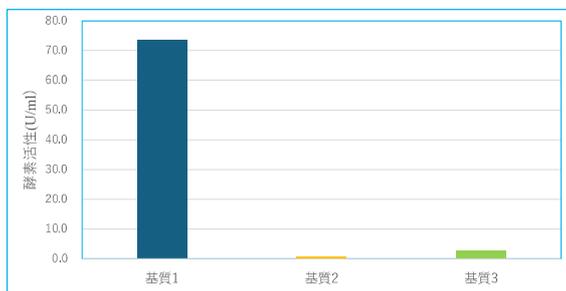


図4. 各基質におけるサンゴ片由来のキチナーゼ酵素活性量。

■ 基質1 : 73.6U/ml ■ 基質2 : 0.889U/ml ■ 基質3 : 2.80U/ml

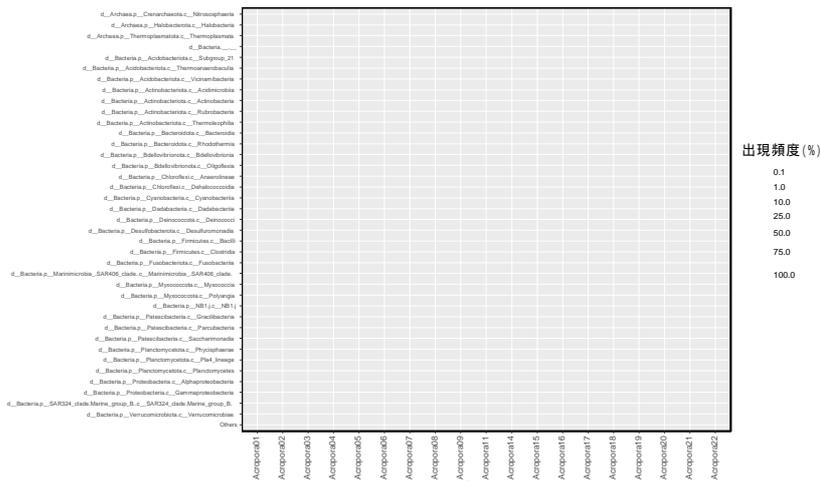


図5. ストレス耐性の異なるサンゴ片間でのバクテリア組成図の比較。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamakita T, Sodeyama F, Iguchi A, Kitano YF, Teshima KM, Shimura A, Nakabayashi A, Nagai S, Nakamura T, Aizawa H, Yasuda N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Consideration of Genetic Structure in the Ecologically and Biologically Significant Marine Areas (EBSA) Criteria: A Review of Convention on Biological Diversity (CBD) Regional Workshops and A Case Study of Coral Reef Conservation Planning.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 823009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2022.823009	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 Gibu K, Ikeuchi E, Bell T, Nakamura T, Yoshioka Y, Suzuki A, Iguchi A.	4. 巻 49
2. 論文標題 Calcification rates of a massive and a branching coral species were unrelated to diversity of endosymbiotic dinoflagellates.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 9101_9106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-07702-9	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 Singh T, Sakai K, Ishida J, Iguchi A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Short-term improvement of heat tolerance in naturally growing <i>Acropora</i> corals in Okinawa	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e14629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.14629	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 Bell Tomoko, Manullang Cristiana, Sakai Kazuhiko, Suzuki Atsushi, Iguchi Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 Near-future levels of pCO ₂ impact skeletal growth of coral primary polyps (<i>Acropora digitifera</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Galaxea, Journal of Coral Reef Studies	6. 最初と最後の頁 63~68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3755/galaxea.G2020_S1N	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 Bell Tomoko, Manullang Cristiana, Kumagai Naoki H., Sakai Kazuhiko, Suzuki Atsushi, Iguchi Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 Calcification responses of subtropical corals to ocean acidification: a case study from Sesoko Island, Okinawa, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Galaxea, Journal of Coral Reef Studies	6. 最初と最後の頁 51~61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3755/galaxea.G2020_S20	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10件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井口亮・鈴木淳・飯島真理子(産総研・地質情報)・安元純(琉大・農)・中村崇(琉大理・琉大熱生研)・酒井一彦(琉大熱生研)・安元剛(北里大・海洋生命)・水澤奈々美(北里大・海洋生命)・熊谷直喜(国環研)
2. 発表標題 高CO2時代に対応したサンゴ礁保全に資するローカルな環境負荷の閾値設定に向けた研究
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山北剛久(海洋研究開発機構)・袖山文彰(浦和大)・井口亮(産総研・地質情報)・北野裕子(自然研)・手島康介(九大)・志村晶史・中林朗(宮崎大)・長井敏(水研機構)・中村隆志・相澤浩明(東工大)・安田仁奈(東大)
2. 発表標題 遺伝的指標による重要海域指標の提案と既存報告のレビュー、サンゴ海域での評価例を踏まえたベントスでの活用可能性
3. 学会等名 2022年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口亮(産総研・地質情報)
2. 発表標題 遺伝子解析で沖縄島沿岸の生物多様性を俯瞰し統合解析を行う先に何が見えるか
3. 学会等名 第39回地質調査総合センターシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水山克・水落裕樹・山本聡・岩男弘毅・井口亮（産総研・地質情報）
2. 発表標題 沿岸域における生物多様性と環境の統合的評価手法の開発
3. 学会等名 第39回地質調査総合センターシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池内絵里（産総研・地質情報、宮大・農）・儀武滉大（産総研・地質情報）・中村崇（琉大・理）・鈴木淳（産総研・地質情報）・井口亮（産総研・地質情報、産総研・E-code）・安田仁奈（宮大・農）
2. 発表標題 褐虫藻の多様性はサンゴ石灰化速度に影響するか
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会（ESJ69）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口亮（産総研・地質情報、産総研・E-code）・財津桂（名大・医）
2. 発表標題 環境応答におけるサンゴ種内変異をマルチオミックス解析で明らかにする
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会（ESJ69）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口亮（産総研）・飯島真理子（産総研）・ベル智子（グアム大）・西島美由紀（産総研）・中村崇（琉大・理）・酒井一彦（琉大・熱生研究）・鈴木 淳（産総研）・安元純（琉大・農）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・安元剛（北里大・海洋生命）
2. 発表標題 底質リン酸塩によるサンゴ石灰化阻害とそのメカニズム解明
3. 学会等名 2020年度日本プランクトン・ベントス学会合同大会オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井口亮（産総研・地質情報）・飯島真理子（産総研・地質情報）・ベル智子（ Guam 大学・環境）・西島美由紀（産総研・地質情報）・中村崇（琉大理・琉大熱生研）・酒井一彦（琉大熱生研）・鈴木淳（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・安元剛（北里大・海洋生命）・熊谷直喜（国環研）
2. 発表標題 地球的規模・地域的規模の環境変化がサンゴ石灰化に及ぼす影響－サンゴポリプ実験系による検証－
3. 学会等名 第15回バイオネラリゼーションワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村崇（琉大・理）・塚本陸（琉大・理）・徳田侑大（琉大・理）・石田潤一郎（琉大・理）・池田香菜（琉大・理）・Mariam Shidha Afzal（琉大・理）・井口亮（産総研・地質情報）
2. 発表標題 琉球列島海域での造礁サンゴ群集比較
3. 学会等名 2020年度日本サンゴ礁学会大会第23回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯瀬水葵・安元剛・水澤奈々美（北里大・海洋生命）・飯島真理子（産総研・地質情報）・安元純（琉大・農）・井口亮（産総研・地質情報）・廣瀬美奈（トロピカルテクノプラス）・天野春奈・神保充・渡部終五（北里大・海洋生命）
2. 発表標題 コユビミドリイシの共生細菌に関する研究
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔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	安田 仁奈 (Yasuda Nina) (00617251)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	田邊 俊朗 (Tanabe Toshiaki) (50378915)	沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・准教授 (58001)	
研究分担者	高橋 俊一 (Takahashi Shunichi) (80620153)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授 (18001)	
研究分担者	酒井 一彦 (Sakai Kazuhiko) (50153838)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授 (18001)	
研究分担者	豊原 治彦 (Toyohara Haruhiko) (90183079)	摂南大学・農学部・教授 (34428)	削除：2023年2月16日

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