

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430195

研究課題名(和文)北マリアナ海域における熱水性生物の個体群動態および幼生分散過程の研究

研究課題名(英文) Study of population dynamics and larval dispersion of hydrothermal vent animals in northern Mariana Arc.

## 研究代表者

三宅 裕志 (Miyake, Hiroshi)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：00373465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱水鉱床の海底資源開発は、化学合成生態系の保全を考慮しつつ開発を進める必要がある。そのためには熱水性生物の幼生加入の解析が必要であるが、個体群解析を年齢ごとに解析されたことはない。そこで、加齢色素であるリポフスシンを年齢指標として、遺伝子解析も含めてサツマハオリムシの個体群解析をおこなった。その結果、同じ体サイズ組成であっても、年齢の異なる個体群があり、時期によって加入する遺伝子構成も異なることが分かった。また、人工化学合成生態系水槽の微生物相を調べたところ、深海の鯨骨生物群集に似た微生物相をもつことがわかり、今後熱水性生物の着生と変態の観察に有効であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Deep-sea resource development at submarine hydrothermal deposit is important for us in our future. However, it is needed to conserve chemosynthetic ecosystems. Deep-sea resource development at submarine hydrothermal deposit is important for us in our future. However, it is needed to conserve chemosynthetic ecosystems around hydrothermal vent for development of deep-sea mining. In this study, population analysis of vestimentiferan tube worm, *Lamellibrachia satsuma*, using lipofuscin, age pigment, as an age indicator and genetic analysis of COI gene. As a result, there were different age structure between two populations with same body size. Moreover, genetic structure changed by age structure. On the other hand, microbiota in an artificial chemosynthetic ecosystem tank (ACET) was analysed. It was cleared that the microbiota in ACET was resembled to the microbiota at the deep-sea whale-fall. The ACET was found to be effective in the observation of settlement of vent animal larvae.

研究分野：海洋生物学

キーワード：サツマハオリムシ リポフスシン 年齢 微生物相

### 1. 研究開始当初の背景

熱水鉱床を形成する熱水噴出域周辺には、多くの固有種からなる特殊な化学合成生態系が形成されている。現在、国策の海底資源開発の1つとして熱水鉱床の開発が盛んになってきており、伊豆小笠原～マリアナにかけての熱水域と沖縄トラフの熱水域が我が国の熱水鉱床開発のターゲットになっている。現在、沖縄トラフにおいて試錘などがされているが、伊豆・小笠原～北マリアナにかけてはレアメタル、金などの鉱床があり、今後も注目される場所である。しかし、開発の反面、特殊な化学合成生態系の破壊にも繋がり、その環境配慮については十分になさなくてはならない。そのためには熱水噴出域周辺の化学合成生態系のみで生息する熱水性生物が唯一分布拡大できる幼生分散に関わる遺伝子フローのソースとなるべき所を見つけ、保護するなどの対策が必要となる。

これまでの研究では、複数の海山において、幼生と成体個体を同時に採集し、それらを飼育して、幼生分散を考察した研究は全く無い。さらには、幼生の着底には、そのときの現場の潮流に大きく影響される。そのため、幼生の出現した時期により、個体群の年齢階級における遺伝子構成が変化するはずである。しかし、個体群解析を年齢ごとサイズ階級群ごとに解析されたことがなく、これに遺伝子による個体群解析を加えた研究も皆無である。

### 2. 研究の目的

熱水鉱床の海底資源開発は、そこに形成される特殊な化学合成生態系の破壊にも繋がるため、その保全を考慮しつつ開発を進める必要がある。伊豆・小笠原からマリアナにかけての熱水域列における熱水生態系の保全に関する幼生分散研究は国際協力研究関係が構築されており、我々は北マリアナ以南の海域を担当する。この生態系の保全で重要な生態的イベントは熱水性生物の幼生がいつ発生し、どのくらいの浮遊期間を持ち、どう成長し、どのように着底し、他の熱水域とどう繋がっているのかという幼生の分散と加入である。本研究では、熱水性生物を飼育し、数多くの幼生を得て報告してきた実績を活かし、幼生分散から着底に至る過程を総合的に解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 年齢指標としてリポフスチンを用いた個体群解析

これまでのサツマハオリムシの遺伝的集団解析による研究では、様々な場所で採集された個体を全てまとめて1つの鹿児島湾の個体群として扱われてきた。しかし、採集されるサツマハオリムシはほとんどサイズが揃っており、同じ時期に加入してきた個体群であると考えられる。このことは、幼生の発生する時期の潮流が違えば、加入してくる幼生の遺

伝子構成も異なってくることとなり、それぞれの個体群において、遺伝子構造も異なってくると考えられる。そこで、神経細胞の加齢色素としてしられるリポフスチンをもちいて、サツマハオリムシの年齢を考慮した個体群動態の解析を行った。

材料はマリアナ海域への深海調査航海が得られなかったため、鹿児島湾からマリアナ海域まで生息するサツマハオリムシを鹿児島大学および鹿児島水族館の協力の下「南星丸」に搭載された生物グラブを用いて鹿児島湾において採集を行った。サツマハオリムシの採集においては、採集日や採集地点の異なるサンプルはそれぞれ別の集団として扱い、合計233個体を用いた。リポフスチン分析では、サツマハオリムシの体からハオリ部を切り出し、ハオリ部の縦の長さ(mm)、横幅(mm)、湿重量(g)を測定した後、冷凍保存した。解凍したハオリ部からリポフスチン溶液を抽出し、分光蛍光光度計を用いてリポフスチン濃度( $\mu\text{g}/\text{l}$ )を測定した。DNA解析では、リポフスチン抽出個体のハオリムシの鰓からtotal DNAを抽出し、ミトコンドリアDNA COI領域について部分塩基配列を解析した。

#### (2) 熱水性生物の幼生分散

##### ① サツマハオリムシの幼生飼育

材料は、リポフスチンおよび遺伝子解析の個体を解剖する際に、雌の卵嚢から受精卵を得て、飼育を行った。また、自然界における幼生の採集はいまだ行われていないため、「南星丸」航海に於いて、CTD付プランクトンネットを電動リールで曳網することでサツマハオリムシ幼生の採集を試みた。サンプルはホルマリン固定とアルコール固定を行った。ホルマリン固定標本では実体顕微鏡下で観察し、アルコール固定標本は遺伝子によるサツマハオリムシ幼生の検出を行った。

##### ② タギリカクレエビの幼生飼育

本種はサツマハオリムシの生息地に出現するテナガエビの仲間であり、マリアナ海域にも出現する種である。本研究では、「なつしま」NT15-14航海でハイパードルフィンによって得られた個体を新江ノ島水族館で飼育中に得られた幼生及び「南星丸」による採集個体から得られた幼生を用いた。幼生飼育においては、クラゲ飼育用水槽を用いて飼育し、随時幼生を固定して、形態変化を観察した。

##### ③ ニシノシマホウキガニの遺伝子解析

ニシノシマホウキガニはマリアナ海域の海底温泉周辺に生息する熱水性カニ類である。本研究では、伊豆大島付近に発見された大室だしにおいて採集されたニシノシマホウキガニの遺伝子解析を行った。

#### (3) 化学合成生態系生物の生息環境把握(環境解析)

熱水性生物の生息場所においては、通常海底とは出現する微生物相が異なり、熱水性生

物生物の着底に関わるキーとなると思われる。これまでの研究では、サツマハオリムシは沈設した鯨骨に付着することが知られており、鯨骨に付着したサツマハオリムシを飼育していたところ、水槽内においても新たに付着したと思われる個体が出現している。しかしこのときに水槽内の他の部分には付着していなかった。サツマハオリムシの幼生の着生と変態を知る上では、飼育下において着生と変態を行うための環境作りが必要になる。本研究では、サツマハオリムシの幼生の着生環境を知るために、サツマハオリムシの飼育環境における微生物相の解析とサツマハオリムシのルート部分の硫化水素濃度に対する走性に付いての解析を行った。また、平行してシロウリガイ類を飼育する水槽の微生物相解析も行った。

微生物相のサンプリングは北里大学のチューブワーム飼育水槽（以下、北里水槽）と新江ノ島水族館にある化学合成生態系再現シロウリガイ飼育水槽（CG水槽）、また同チューブワーム飼育水槽（TW水槽）の計3つの水槽からサンプリングを行った。鯨骨におけるハオリムシのルート伸長と硫化水素濃度に関しては、鯨骨およびアクリルプレートにハオリムシの成体を移植し、棲管末端から伸びるルートの伸長を観察し、周辺環境の硫化水素を硫化水素センサーを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 年齢指標としてリポフスチンを用いた個体群解析

ハオリムシのハオリ部の幅とリポフスチン量の関係を見ると、サイズが大きくなるとリポフスチンも多くなる傾向が見られ、年齢とサイズはほぼ比例すると考えられた。しかし、同じようなサイズでもリポフスチン濃度が高い個体と低い個体があった（図1）。この

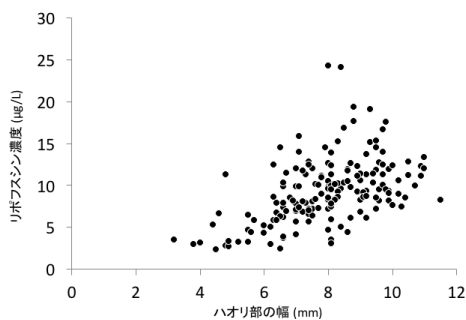


図1 サツマハオリムシのハオリ部の幅とリポフスチン濃度の関係

ことは、リポフスチン濃度の低い個体は成長の早い若い個体で、逆にリポフスチン濃度の高い個体は成長の遅い齢を重ねた個体であることが推定された。おそらく、ハオリムシのエネルギー源である硫化水素の環境濃度の差がハオリムシの成長を左右したことによるものと思われる。

また、採取された集団ごとでハオリ部幅のサイズ頻度分布とリポフスチン濃度の頻度分

布にハプロタイプを照らし合わせた（図2，3）。

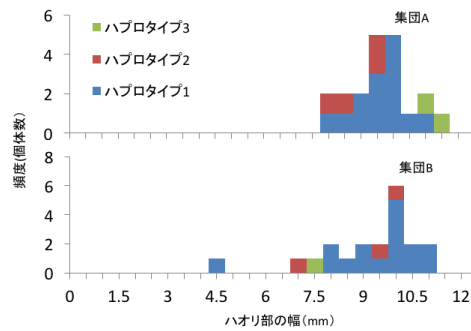


図2 ハプロタイプを考慮した採集集団A, Bにおけるサツマハオリムシのハオリ部幅の頻度分布

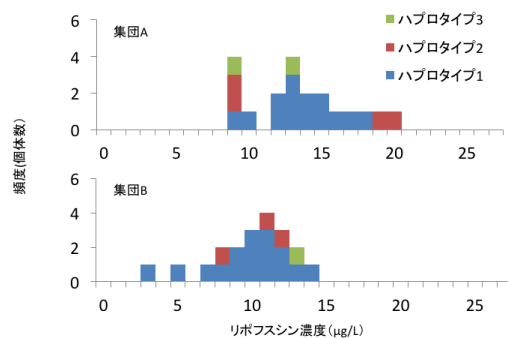


図3 ハプロタイプを考慮した採集集団A, Bにおけるサツマハオリムシのリポフスチン濃度頻度分布

図2および図3から集団Aと集団Bを比較すると、ハオリ部の幅ではほぼ同じ階級に最頻値が現れたが、リポフスチン濃度をみると集団Aでは値が高齢側に偏り、集団Bでは若い方に偏っていた。これらのことから、集団Aと集団Bは体のサイズで見るとかなり似た特徴を持つ集団であるといえるが、実際の年齢組成は異なっていることが推測できた。また、ハプロタイプ3に注目すると、ハオリ部幅を見ると集団Aの中ではハプロタイプ3はサイズが大きいが、リポフスチンを見ると集団の中では若いことがわかり、集団Bの中では逆のことが言えた。このように、寿命が長く、年齢指標の無いハオリムシなどの深海生物において、大きさによる個体群動態の解析は困難であることを示しており、リポフスチンによる加齢を考慮した個体群解析が有効であることが示唆された。

しかし、本研究では、リポフスチンを指標としたサツマハオリムシの年齢査定は個体間および集団間の相対的な年齢の推定に留まっている。本研究期間内に沈設した鯨骨に付着しているハオリムシを採集することが出来ず、絶対的な年齢指標の検量線を作成することが出来なかった。今後これらを改修して、絶対的な年齢指標の確定を行いたい。

##### (2) 熱水生物の幼生分散

サツマハオリムシの受精卵はサンプリングの際に得られたが、いずれも過去の研究を上回るステージまではいかず、トロコフォア幼生で全て死滅し、着生および変態に至ることは無かった。

タギリカクレエビについては、幼生は約1ヶ月飼育することが出来たが、着底にまでは至らなかった。幼生が得られた時期が最終年度の11月であったため、現在サンプルのスケッチを行い、記載論文の作成中である。

ニシノシマホウキガニについては、大室だしにはニシノシマホウキガニの台湾に生息するニシノシマホウキガニの近縁種が含まれている可能性が見られ、黒潮にのって分散してきていると思われた。

### (3) 化学合成生態系生物の生息環境把握(環境解析)

北里水槽のサンプルにおいて、バクテリアでは底泥サンプルからイオウ酸化細菌(SOx)の存在が確認された。アーキアについては、底泥サンプルの特に嫌気層において大量の嫌氣的メタン酸化菌(ANME-3)グループの存在を確認した。一般的に深海底の湧水域においてその存在が主流となっている近縁のANME-1やANME-2グループは確認されなかったことから、これらのANME-3グループの存在は水槽環境に特有な、嫌氣的にメタンを酸化する微生物群集であると考えられた。

一方、TW水槽サンプルにおいては、水槽の底に入れられている小石とその上に存在している微生物マットのサンプルから、εプロテオバクテリアに属するイオウ酸化細菌SOxの存在が確認され、これらは硫化水素の酸化に関連していると思われる。またこの水槽ではチューブワームが飼育されていることから、小石上のサンプルからγプロテオバクテリアに属するチューブワーム共生細菌の存在も確認された。

新江ノ島水族館CG水槽サンプルにおいては、水槽底泥中には、バクテリアでは、硫化水素の供給に必須であると考えられる硫酸還元菌群(SRB)とイオウ酸化細菌群が確認された。アーキアでは低温環境に適応したメタン菌群が優占していた。また嫌氣的メタン酸化の役割を担う可能性がある微生物群(ANME)が見い出され、ANMEとSRBによる硫酸還元コンソーシアムで硫化水素の供給を行う微生物系の存在が示唆された。しかしながら、それらは天然の湧水域である相模湾の環境中で見られる微生物群とは系統的に異なっていた。このことから、水槽底泥中では自然環境中とは異なるANME/SRBコンソーシアムによって硫化水素供給が行われていると考えられた。このANME/SRBの組み合わせにはいまだに不明な点も多く、水槽環境に独自の組み合わせが存在する可能性も考えられる。またこれら水槽底泥中微生物群集構造は、深海で発見された鯨骨直下の堆積物中で確認されたものと類似点が見られた。これは、水槽内の環境がより有機的な物質を出発点とする生態系に近い状態である可能性を示唆している。

ハオリムシのルート形成と硫化水素濃度との関連については、ルートが直線的に伸長している場所に於いては硫化水素濃度が低く、

ルート部分が渦巻状になっているところでは、硫化水素濃度が高い事が明らかになった。また、ルートの厚さに関しては硫化水素濃度の少ない部分において薄く、多いところでは熱い傾向が見られた。このことは厚さによって硫化水素の取り込みを効率よくすると共に、硫化水素濃度が高くなりすぎないようにする工夫であると思われた。

### 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 Sekine, D., Ohishi, K., Nakamura, Y., Kusaka C., Tame, A., Inoue, K., Nakazawa, M., Miyake, H., Yoshida, T., & Maruyama, T. (2016). Monoclonal antibodies to hemocytes of the deep-sea symbiotic mussel, *Bathymodiolus japonicas*. *JAMSTEC Report of Research and Development* (Accepted), 23, 1-15 査読有
- ② Lindsay, D., Umetsu, M., Grossmann, M., Miyake, H., & Yamamoto, H. (2015). The Gelatinous Macroplankton Community at the Hatoma Knoll Hydrothermal Vent. In *Subseafloor Biosphere Linked to Hydrothermal Systems* (pp. 639-666). Springer Japan 査読有 DOI 10.1007/978-4-4-431-54865-2\_51
- ③ Shibata, H., Miyake, H., Goto, T., Adachi, A., & Toshino, S. (2015). Wild polyps of the blooming jellyfish *Aurelia limbata* (Brandt, 1838) (Cnidaria: Scyphozoa) found on deep-sea debris off Sanriku, Japan. *Plankton and Benthos Research*, 10(3), 133-140. 査読有 <http://doi.org/10.3800/pbr.10.133>

[学会発表] (計 12 件)

- ① 吉成麻有、根本卓、三宅裕志、加藤千明、人工化学合成生態系水槽中の微生物相解析、ブルーアース 2016、2016年3月8日(東京海洋大学:東京都港区)
- ② 吉成麻有、根本卓、三宅裕志、加藤千明、深海性化学合成生態系生物飼育用水槽における微生物相の解析と評価、第16回極限環境生物学会年会、2015年11月8日(東京海洋大学:東京都港区)
- ③ 志村豪大・三宅裕志・八巻鮎太、サツマハオリムシ *Lamellibrachia satsuma* 集団における年齢査定を試みと遺伝的解

析、2015年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会、2015年9月2～5日（北海道大学：北海道札幌市）

- ④ 吉成麻有、根本卓、三宅裕志、加藤千明、シロウリガイ類飼育水槽底泥中の微生物相解析、第17回マリンバイオテクノロジー学会大会2015年5月30日（東京海洋大学：東京都港区）
- ⑤ 吉成麻有・三宅裕志・根本卓・杉村誠・加藤千明、シロウリガイ飼育水槽中の底泥環境における微生物相解析、ブルーアース2015、2015年3月19日～20日（東京海洋大学：東京都港区）
- ⑥ 根本卓・杉村誠・北嶋円・井上広滋・今井さくら・三宅裕志・吉成麻有・加藤千明・小糸智子、硫化ナトリウムを用いた化学合成生態系生物の飼育方法、ブルーアース2015、2015年3月19日～20日（東京海洋大学：東京都港区）
- ⑦ 吉成麻有・根本卓・三宅裕志・加藤千明、化学合成生態系水槽中の微生物学的多様性解析と硫黄関連微生物の分離、第15回極限環境生物学会年会、2014年11月2日（沖縄県今帰仁コミュニティーセンター：沖縄県郡国頭郡）
- ⑧ 吉成麻有・根本卓・三宅裕志・加藤千明、化学合成生態系水槽中の微生物学的多様性解析と微生物の分離、特殊環境微生物セミナー2014、2014年10月1日（名古屋大学：愛知県名古屋市）
- ⑨ 土田真二・駒井智幸・雨宮健太郎・根本卓・北嶋円・三宅裕志・滋野修一・河戸勝・藤原義弘・藤倉克則、大室ダシにおいて発見された浅海性熱水噴出孔生物群集、ブルーアース2014、2014年2月19日～20日（東京海洋大学：東京都港区）
- ⑩ 吉成麻有・根本卓・三宅裕志・加藤千明、化学合成生態系再現水槽中の微生物学的多様性解析、ブルーアース2014、2014年2月19日～20日（東京海洋大学：東京都港区）
- ⑪ 吉成麻有・根本卓、三宅裕志、加藤千明、化学合成生態系水槽中の微生物学的多様性解析、第14回極限環境生物学会、2013年10月26日～27日（明治大学：川崎市多摩区）
- ⑫ 吉成麻有・根本卓・三宅裕志・加藤千明、化学合成生態系水槽中の微生物相の変遷、特殊環境生物セミナー2013、2013年10月11日（広島大学：広島県東

広島市）

〔図書〕（計 3件）

- ① 三宅裕志 (2016) 科学技術館春休み特別企画展「海！！未来をひらく！海からの贈り物」図録（分担執筆）40pp
- ② 三宅裕志 (2014). 「巨大深海生物の謎を解く」 C&R 研究所 215pp.
- ③ 三宅裕志 (2014) 科学技術館夏休み特別企画展、「海！！—出航！ふしぎな世界へ—」図録（分担執筆）51pp

〔その他〕

- ① 科学技術館開館 春休み特別企画展「海！！未来をひらく！海からの贈り物」2016年3月19日(土)～4月7日(木)、日本科学技術館（東京）
- ② 科学技術館開館 50周年イベント 夏休み特別企画展、「海！！—出航！ふしぎな世界へ—」（日本科学技術振興財団、科学技術館 主催）2014年8月9日(土)～25日(月)、日本科学技術館（東京）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三宅 裕志 (Miyake, Hiroshi)  
北里大学・海洋生命科学部・准教授  
研究者番号：00373465

### (3) 連携研究者

リンズィー ドゥーグル (Lindsay, Dhugal)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏研究領域・技術研究副主幹  
研究者番号：80344282

阿見彌 典子 (Amiya, Noriko)  
北里大学・海洋生命科学部・講師  
研究者番号：20588503

高橋 明義 (Takahashi, Akiyoshi)  
北里大学・海洋生命科学部・教授  
研究者番号：10183849

加藤 千明 (Kato, Chiaki)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏研究領域・上席研究員  
研究者番号：90360750

古島 靖夫 (Furushima, Yasuo)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏研究領域・技術研究主任  
研究者番号：90359159