

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430197

研究課題名(和文) サンゴ群体上で繁茂するシアノバクテリア等の成長維持機構の解明

研究課題名(英文) Evaluation of on growth mechanism of cyanobacteria on coral colonies

## 研究代表者

山城 秀之 (Yamashiro, Hideyuki)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：80341676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアや付着珪藻等がイシサンゴへ及ぼす影響を調査した。座間味村でアミメヒラヤギにからむシアノバクテリアを *Moorea bouillonii* と同定した。共生テッポウエビの存在が繁茂を促進し、またシアノバクテリア自体に穿孔能力があることを明らかにした。同じくシアノバクテリアが原因のブラックバンド病を瀬底島で調査した結果、97%で罹患が確認された。被覆状のコモンサンゴ類が最も感染しやすく、進行速度は1日あたり2mmであった。宮崎県南郷町沖でサンゴの病気が拡大し、調査した結果ホワイトシンドロームであった。ミドリイシ類に10%以上の罹患が確認された。付着珪藻はアオサンゴ群体で周年確認された。

研究成果の概要(英文)：Effect of bacteria and attached diatoms etc. on corals have been studied. In Zamami Is, filamentous cyanobacterium that cause necrosis of sea fan was identified as *Moorea bouillonii*. Associated shrimp facilitating the formation of cyanobacterial mat was suggested. In addition, the cyanobacterium can bore into coral skeleton with thick terminal end as an anchor in the coral skeleton was observed. Black band disease (BBD, caused by bacterial consortium) was surveyed around Sesoko Is. Of 35 sites studied, 34 sites showed infection. Most susceptible coral was *Montipora* (especially encrusting type) with mean infection rate of 7%. Outbreak of white syndrome was observed around Ohshima Island in Miyazaki prefecture, infected corals were mostly *Acropora*. In a blue coral *Heliopora*, attached diatoms (*Licmophora* spp.) was observed through a year. These findings show that those tiny organisms are growing threats to recent and future coral reef ecosystem.

研究分野：サンゴ礁生物学

キーワード：サンゴ 細菌 病気 ホワイトシンドローム ブラックバンド病

## 1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁は地球温暖化による白化現象や海洋酸性化により、今後数十年で壊滅的に減少し、海藻社会に置き換わると予測されている(Hoegh-Guldberg 他, 2007)。加えて、1990年代以降、サンゴには病気が数多く発生し、細菌類を始めとした感染生物によるサンゴへの日和見感染が拡大している(Harvell 他, 2011)。

本研究は、サンゴ礁の崩壊過程における過度的現象として、藻類や細菌(シアノバクテリアを含む)がサンゴ類へ波状的に攻撃しつつある現象を記載し、また実験的に再現・検証することを目的とした。現実にサンゴ礁で起きている現象を科学的に記載し、内外へ発信することによって、サンゴ礁研究関係者をはじめ広く一般に警鐘を鳴らし、今後の国内のサンゴ礁保全に繋げていく。

サンゴ礁の形成に寄与する造礁性イシサンゴ類(以下「サンゴ」と称する)は、刺胞動物門イシサンゴ目に属し、日本では約400種が確認されている(Veron, 1992)。水産資源、観光資源、学術資源等多様な価値を持つが、オニヒトデによる食害や水温上昇による白化現象により、近年、日本を含め世界中で急速に減少しつつある。

更に1990年代以降、世界中のサンゴ礁で様々なサンゴの病気の発症が見られ(Sutherland他, 2004)、サンゴの病気もサンゴ礁への大きな脅威になってきた(Harvell 他, 2011)。

報告者は、国内で最初にサンゴの病気(腫瘍)について報告し(Yamashiro 他, 2000)、国内におけるサンゴの病気についてのレビューも行った(Yamashiro, 2004)。また、宮崎県のオオスリバチサンゴのみに特異的に見られる病的現象を日本初の病気、ホワイトスポットシンドロームとして記載した(Yamashiro & Fukuda, 2009)(科研費研究成果)。

このように過去10年余に渡ってサンゴ礁の観察を続けてきたが、事態は深刻度を増してきている。将来のサンゴ礁崩壊に先立つ形でそれ以前に既に、サンゴと縁のなかった常在生物(細菌や藻類など)がサンゴに日和見感染する現象が波状的に起きていると確信するに至った。

大発生(アウトブレイク/ブルーム)の前には小規模の感染や被覆が見られることから初期の異変を記載することは極めて重要である。実際、この数年に限っても細菌(シアノバクテリアを含む)のサンゴ類へ負の関与があった。2009年の9月に、慶良間諸島阿嘉島のサンゴ礁において糸状のシアノバクテリアが八放サンゴに絡みサンゴを死に至らしめる現象が確認された(読売新聞、朝日新聞に掲載)。

また、2011年2月には、本部町瀬底島のサンゴ礁において付着性珪藻がサンゴ群体

上に大量に繁茂しコモンサンゴ類が大量死する現象が確認された(Yamashiro 他, 2012)。シアノバクテリアや珪藻のサンゴへの付着については、付着あるいは成長維持機構が未解明であり本格的な調査が必要である。

上記の現象を含め、サンゴ礁域ではサンゴ群体表面上に異質な現象(細菌による攻撃に対するサンゴ側の応答としての斑点や剥離)が時折見られる。これらのわずかな異変をサンゴからのSOSとして捉え、観察法や分析法を定型化すべく本格的調査を実施する時期にきている。すなわち、長期的なサンゴ礁の崩壊過程に現れる初期症状の解明は、今後のサンゴ礁保全に有用な研究テーマである。

## 2. 研究の目的

微小な細菌や珪藻などがイシサンゴひいてはサンゴ礁への脅威となりつつあり、サンゴ礁域では様々な異変となって観察されるようになってきた。それらの現況を記載し、また因果関係を明らかにすべく、研究期間内に下記の事象等を解明することを目的として研究を実施した。

### (1)シアノバクテリアがサンゴ上に繁茂するメカニズムの解明

慶良間諸島でソフトコーラル群体上に繁茂するシアノバクテリアが形態から *Lyngbya polychroa* ではないかとされていたが、本研究では遺伝子解析による分子同定を実施し本種を確定する。本種はサンゴ礁の浅場にも生息し、季節的な消長がある。一方、テッポウエビと共生した際には、大形になり周年繁茂することが知られている。今回は共生による成長促進機構を解明する。シアノバクテリアによる共生エビから排泄されるアンモニウム吸収、および細胞成長促進効果を明らかにする。すなわち相利共生の視点から、未だ未解明の繁茂のメカニズムを探る。

### (2)シアノバクテリアを主とした感染症、ブラックバンド病の調査

なお、本研究の開始と同時平行で、シアノバクテリアを始めとする細菌集団が原因のブラックバンド病(BBD)の大量発症を確認したため(沖縄県瀬底島)、BBDについての分布調査(瀬底島周辺海域および鹿児島県沖永良部島)、罹患率、進行速度などの測定も合わせて行う。ブラックバンド病は、大西洋で1960年代に確認され、その後世界中のサンゴ礁に拡大した感染症であり、罹患部がシアノバクテリアの黒い帯となるのでその名称がついている。

### (3)付着性珪藻がサンゴ群体上で繁茂するメカニズムの解明

2009年に沖縄島北部大浦湾のアオサンゴに珪藻が大量付着する事例が報告されて

いる(日本自然保護協会).更に2011年2月に沖縄島北部瀬底島のコモンサンゴ類でも珪藻被覆がありコモンサンゴ類が大量に死亡した(Yamashiro 他,2012).今後,同様の現象が再発することを想定して,アオサンゴに付着する珪藻の野外調査および年間を通じた野外のサンゴの観察を行った.

#### (4)サンゴ群体上で観察される異質な現象の記述

サンゴ群体上に現れる様々の異質な現象(白斑,紅斑など)の記載や年変動などを記録する.本研究の途中の2014年,宮崎県日向灘でサンゴの大量死亡が起こったため(ホワイトシンドロームと同定された)罹患サンゴの種類組成,罹患率など状況の把握を急遽実施した.

### 3.研究の方法

#### 採取場所

シアノバクテリアについては沖縄県座間味村阿嘉島および本部町瀬底島,アオサンゴは沖縄県名護市大浦湾・国頭村奥・うるま市勝連・伊平屋村,感染症のホワイトシンドロームについては宮崎県日向灘の大島周辺,同じく感染症のブラックバンド病については沖縄県瀬底島他において実施した.なお,イシサンゴ類の採取にあたっては,それぞれの県の規則に則って,事前に採捕許可を取得してから実施した.

#### 研究協力体制

採集,分析,観察等については基本的に研究代表者が単独で行った.ただし深場のアオサンゴの採取についてはダイビングチームの協力を得て実施した.また付着珪藻の同定は東京海洋大藻類研究室に依頼した.宮崎県のサンゴの病気の調査の際は,宮崎大学農学部と共同で実施した.

#### シアノバクテリアの同定

形態観察および遺伝子解析によってシアノバクテリアの同定を行った.形態観察は光学顕微鏡およびデジタルマイクロスコプ(Keyence VHX-1000)で実施した.遺伝子解析はシアノバクテリアの16rRNAに特異的なプライマー(CYA359F,CYA781R)を使用して増幅し,得られた塩基配列をblast検索によって同定した.

#### 細菌叢の解析

ブラックバンド病やホワイトシンドロームに罹患した部位をエアフロス法(少量の海水を高圧で吹き付けてサンゴ組織を剥離する手法,Phillips Co.)で採取後,100%エタノールに保管,DNAを抽出,今後,細菌の16SrRNAのプライマーを鋳型に増幅し,必要量のDNAサンプルを得て,次世代シーケンサ(MiSeq,イリミナ社)に

よる解析を実施する計画である.

### 4.研究成果

#### (1)シアノバクテリアがサンゴ上に繁茂するメカニズムの解明

沖縄県座間味村阿嘉島沖のアミメヒラヤギ(八放サンゴ *Annella reticulata*)群体上で繁茂し,群体を壊死させるシアノバクテリアを形態および分子同定によって特定した(*Moorea bouillonii*),またその付着の機構および繁茂を促進する要因を解明した.貧栄養のサンゴ礁海域で,シアノバクテリアが八放サンゴを酸欠死させる世界初の症例となった.

シアノバクテリアがアミメヒラヤギ群体上で繁茂する現象は,年間を通して確認された.罹患率は約26%であり,様々なサンゴのサイズにまんべんなくとりついていて,5mごとの水深で栄養塩類(アンモニウム,亜硝酸,硝酸,リン酸)を測定したが,いずれも低い濃度であり,富栄養化によって成長繁茂している訳ではなかった.一方,多くのシアノバクテリアの塊の中にはシアノバクテリアを餌として摂食しかつ糸状のシアノバクテリアを材料として筒状に営巣するツノナシテッポウエビ(*Alpheus frontalis*)がいたことから,シアノバクテリアをアミメヒラヤギに結わえる行動をとるテッポウエビの存在が重要であることが示唆された.テッポウエビはアンモニウムを排泄していたことから,これがシアノバクテリアの成長を促進する栄養源になっていることも考えられる.

営巣している巣からテッポウエビのみを除去すると,シアノバクテリアの色素(フィコエリスリン等のピリン系色素)が急速に減少し,巣の形状も崩壊していくことからテッポウエビによる栄養供給あるいは管理(適切な摂食,あるいは移動や編み込みなどの物理的刺激)が巣の維持に重要であることが示唆された.

一方のシアノバクテリアもアミメヒラヤギなどからまるあるいはテッポウエビによって編み込まれるなどの受動的な付着に限らず,積極的に付着することが今回明らかとなった.シアノバクテリアの細胞はシース(鞘)と呼ばれる筒状の多糖類の中に一列に整列しており,その外側でアミメヒラヤギに付着していることがあり,シースには弱い接着力があることがわかった.加えて,数は少ないもののアミメヒラヤギに穿孔している事例が観察された.先端が中軸の方まで達しており,先端が膨らみアンカーのように抜けにくくなっていた.その箇所は複数の層になっておりシースが何層にも重なった結果,毛根のように肥大していることを明らかにした.

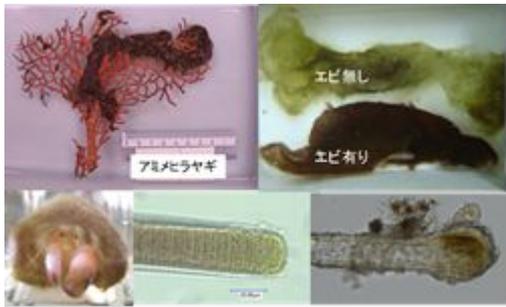


図 シアノバクテリア *Moorea bouillonii* , アミメヒラヤギ *Annella reticulata* およびツノナシテッポウエビ *Alpheus frontalis*. 左上, アミメヒラヤギにからむシアノバクテリア. 右上, 共生テッポウエビを除去して1週間後の差異. 左下, シアノバクテリアの巣の中のテッポウエビ. 左中, 鞘(シース)の中に重なって配置するシアノバクテリアの細胞. 右下, アミメヒラヤギ骨格に穿孔したシアノバクテリアの末端(肥大してアンカーの役割を担っている).

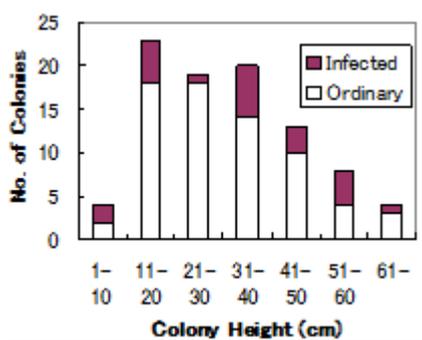


図 罹患率(N=91,水深 18m) .

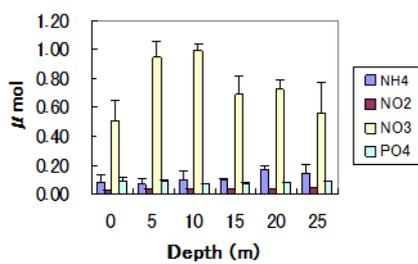


図 栄養塩の濃度(N=3, mean ± se).

## (2)シアノバクテリアを中心とするブラックバンド病の解明

イシサンゴ(六放サンゴ)の病気の原点と呼ばれ,カリブ海から世界中のサンゴ礁に拡大しつつあるブラックバンド病(BBD)が瀬底島で確認されたため,その分布状況,罹患率,罹患サンゴ,罹患速度他を観察・測定した.その結果,瀬底島全域で確認されること,被覆状のコモンサンゴ類(*Montipora* spp.)に多発すること,その罹患率が約7%に達すること,夏場は1日約2mmの速度で拡がることなどを明らかにした. BBDは約10年前に国内に侵入

したものと予想され,琉球列島の多くの海域でサンゴに脅威となりつつある.国内のBBDを詳細に研究した事例となった.

BBDは瀬底島,更に伊江島との間の離礁,本部町山川沖,伊是名島沖の離礁,沖永良部島で観察された.瀬底島の周囲35箇所で1箇所あたり約100群体の被覆状コモンサンゴ類を調べたところ,そのうち34箇所でBBDを確認した.罹患率は,最も高い場所は24%で平均6.9%であった.罹患していたものはほとんどが被覆状コモンサンゴ *Montipora* であったが,葉状および枝状のものでも観察された.コモンサンゴ以外にテーブル状のミドリイシ *Acropora*,塊状アナサンゴ *Astreopora* でも罹患が確認されたが数は少なかった.岸近くの浅瀬で罹患率が高く,沖合では低かった,また冬場は減少した.

感染したBBD片を他種のサンゴに接触させて感染させたところ,コモンサンゴ類(枝状,葉状,被覆状)の罹患が高く,一方,ハマサンゴ,リュウモンサンゴ,ヒドロサンゴ,アオサンゴはほとんど感染しなかった.野外で被覆状コモンサンゴを標識して,罹患速度を測定し,1.9mm/dの速度を得た.この結果は海外における報告とほぼ同様であった.また,アナサンゴ1.9mm/d,テーブル状ハナバチミドリイシでは4.0mm/dであった.

インターバル録画の結果,昼間にBBDは伸張肥大し,夜間は縮小し停止することが明らかとなった.また,枝状のコモンサンゴを観察した結果,光の当たる上面は日中に進行し,光の当たらない下面では夜間に進行することも明らかとなった.

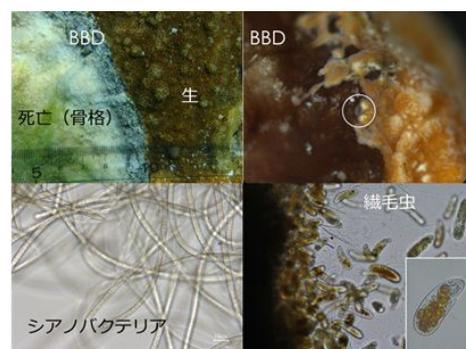


図 ブラックバンド病(BBD,沖縄県瀬底島). 右上,中央のBBDが右側のサンゴを分解しながら進行している様子. 右上,境界の拡大. 円で囲まれた内部の右側はサンゴのポリプの触手が一部残っていることがわかる. 左下,糸状のシアノバクテリア. 右下, BBD部分に群がる繊毛虫,サンゴの褐虫藻を捕食し細胞内に保持していることがわかる(同定依頼中).

## (3)付着珪藻とサンゴ

これまでサンゴ礁域ではあまり注目されてこなかった珪藻に着目し、サンゴ礁における珪藻の繁茂についての調査を行った。名護市大浦湾のアオサンゴ(八放サンゴ)から珪藻を採取し、これがオウギケイソウ(*Licmophora* sp.)であることがわかった。専門家に種の同定を依頼したが、優占種 *L. flabellata* ではないことがわかり、まだ同定には至っていない。

アオサンゴ上の珪藻類は大浦湾のみならず、国頭村奥、伊平屋村、うるま市勝連沖でも観察されたことから、アオサンゴの分泌する粘液シートが付着珪藻にとって好適な基質となっているのかもしれない。一方のアオサンゴはシートによって付着生物から防御し、一方で適宜脱ぎ落とすことにより更新を行っているものと考えられる。

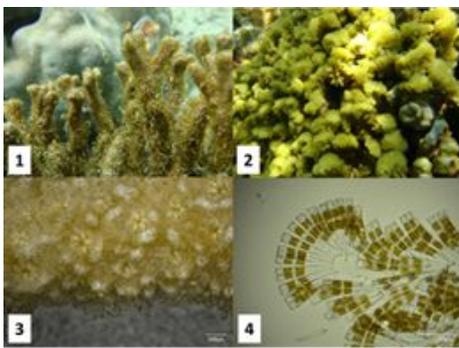


図 付着珪藻とサンゴ. 1, 枝状コモンサンゴに付着した珪藻. 2, アオサンゴに付着し繁茂した珪藻. 3, コモンサンゴ枝の拡大写真. 4, オウギケイソウ *Licmophora flabellata*.

冬期の水温が低く夜間に干出する状況にさらされた浅場のサンゴに付着珪藻が付き、サンゴの成長に悪影響を及ぼすことがある。この現象は、瀬底島、伊平屋島他で広く確認することができた。珪藻の付着によってその下のサンゴの軟組織の回復が阻害され、その後の緑藻への置換により、春先には浅瀬のサンゴが死亡して緑色になることがある。瀬底島南岸や伊平屋島南海岸で同様の現象を確認した。

#### (4) ホワイトシンドロームのブルーム

2014年の夏、宮崎県南郷町大島沖のサンゴに病気の拡がりがあるとの情報を得て、現地調査を行った。その結果、感染症のホワイトシンドロームと同定した。その理由として、感染速度が1日あたり数cmと早く、途中で止まることもなかったためである。感染の見られたサンゴ種は、ミドリイシ *Acropora japonica*, *A. solitaryensis*, コモンサンゴ *Montipora* sp., リュウキュウキッカサンゴ *Echinopora* sp. であった。ニホンミドリイシ *A. japonica* に限れば、感染率は10%以上に達した(Yamashiro

他,2015)。

平年と比較して水温は低かったものの、台風の襲来が多く、濁りがホワイトシンドロームを促進するという説に類似する事象であった。水温の低下する冬期もあまり減少せず温度依存性がなかった。罹患部からDNAサンプルを採取したが、予想に反してピブリオ菌は少なく、まだ詳細な細菌叢の解析には至っていない。なお、罹患したサンゴ群体の数は少ないものの、宮崎より北の和歌山県串本でもホワイトシンドロームが確認された。罹患サンゴは同じくミドリイシ類であった。



図 ホワイトシンドローム(宮崎県大島沖,2014年11月).右は4日後の様子。(写真提供:福田道喜).中央部分はもともとサンゴ組織がなかった箇所であり、病気とは関連性がない。

#### その他

本研究の調査中、大潮の干潮時に干出した非造礁性サンゴの一種のイボヤギ *Tubastraea* sp.のポリプが垂れ下がる事象を発見し記載した(Yamashiro, 2015)。水位の低下によって干出した当初、ポリプは収縮しているものの、時間が経過するにつれて1つあるいは複数のポリプが海水を含みつつ次第に垂れ下がってきた。骨格内あるいは付着していた岩などからの海水を保持していると考えられる。潮が満ちて海水がポリプに触れた時、あるいは指などで触れた際は、口から水を吐き出し瞬時に収縮した。この大潮時のポリプの伸張は夏場に限らず真冬の深夜の大潮時にも観察された。

季節や昼夜を問わず大潮の干潮時に観察されたことから、干出イボヤギのポリプの伸張は普遍的現象であることが示唆された。海水の保持は水への執着を示すものであり、結果として乾燥対策に繋がっていることが考えられる。

イボヤギは共生藻を持たず光合成には依存しないため、他の造礁サンゴが進出できない日陰に棲息することができる、その場所は同時に紫外線や乾燥の影響も小さいことから、イボヤギの潮間帯上方への進出を可能にしたものと考えられる。



図 イボヤギのポリプの垂れ下がり現象(沖縄県瀬底島)。左,干出した岩陰のイボヤギ。中,海水を含んで垂れ下がるポリプ。右,底質まで到達した垂れ下がりポリプ。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

山城秀之. 2016. イシサンゴ類の脂質, その特徴と役割. オレオサイエンス, 16(1): 21-24. (総説)(査読誌)

Yamashiro, H., M. Fukuda, H. Fukami.

2015. Outbreak of white syndrome in *Acropora* spp., temperate region of Japan. Marine Biodiversity, 45: 1-2 (査読誌)

Yamashiro, H. 2015. Dangling polyp from *Tubastraea* during low tide. Galaxea, JCRS. 17:17-18. (査読誌)

Yamashiro, H., N. Isomura and K. Sakai.

2014. Bloom of the cyanobacterium *Moorea bouillonii* on the gorgonian coral *Annella reticulata* in Japan. Scientific Reports. 4,6032, (査読誌)

山城秀之. 2013. 蔓延するサンゴの病気. 科学. Vol.83.No.7 pp.0800-0801. 岩波書店. (査読誌)

〔学会発表〕(計 14 件)

山城秀之. 2016.2.6. 名護市大浦湾のアオサンゴ群落の保全に向けた生殖等の基礎調査. 自然保護助成基金沖縄発表会. (沖縄県立博物館講堂)

山城秀之. 2015.11.27. ブラックバンド病後の骨格に残る蛍光性日輪の解明. 日本サンゴ礁学会(第18回大会, 慶応大学, 東京)

具志 美香子・井口 亮・山城 秀之・竹内 一郎. 2015.11.27. ワイパー式メモリー水中カメラを使用したサンゴ産卵・病気進行の観察. 日本サンゴ礁学会(第18回大会, 慶応大学, 東京)

山城秀之. 2015.5.30. 非造礁性サンゴ, イボヤギ(*Tubastraea*)の垂れ下がりポリプ. 沖縄生物学会(第52回大会, 沖縄大, 沖縄)

村田輝・山喜邦次・森郁晃・和田実・山城秀之. 2015.3. コモンサンゴの Black band disease に関わる繊毛虫の多様性解析. 日本水産学会(東京海洋大, 東京)

Passarelli, C, H. Yamasaki and H. Yamashiro. 2014.12.18. Interaction between biofilms and corals in a changing environment. TBRC Intern. Symp. "Coral disease and conservation". (Ryukyu.U, Okinawa, Japan)

Yamashiro, H. 2014.12.18. Coral disease in Japan. TBRC Intern. Symp. "Coral disease and conservation". (Ryukyu.U, Okinawa, Japan)

Yamashiro, H. 2014.12.5. Coral diseases in

Japan. 2<sup>nd</sup> Intern. JAMBIO Symp. Aquatic ecosystems, past-present-future. (Tsukuba U. Tokyo campus, Tokyo, Japan)

山城秀之・磯村直子・酒井一彦. 2014.11.27. アミメヒラヤギ群体上で大量繁殖するシアノバクテリアについて. 日本サンゴ礁学会(第17回大会, 高知城ホール, 高知)

Yamashiro, H. 2014.6. Black band disease in Sesoko Island, Japan. 2nd APCRS meeting (Kenting, Taiwan)

山城秀之. 2014.5.25. 瀬底島におけるサンゴのブラックバンド病(Black Band Disease)の蔓延. 沖縄生物学会(第51回大会, 三学会合同大会, 琉球大, 沖縄)

山城秀之. 2013.12.13. 瀬底島における Black Band Disease の分布と感染の状況. 日本サンゴ礁学会(第16回大会, OIST, 沖縄)

三瓶ゆりか・鈴木秀和・山城秀之・南雲 保・田中次郎. 2013.11.16. Morphology of two araphid diatom species on the coral from Nago, Okinawa. 日本珪藻学会.(第33回大会, 本部町, 沖縄)

山城秀之・平良淳誠. 2013.9.27. キクメイシ模ドキ *Oulastrea crispata* の骨格内色素について. 日本動物学会(第84回大会, 岡山大学)

〔その他〕

ホームページ等

科学技術振興機構 サイエンスポータル

[http://scienceportal.jp/news/newsflash\\_review/newsflash/2014/08/20140815\\_02.html](http://scienceportal.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/08/20140815_02.html)

琉球大学 広報

[http://www.u-ryukyu.ac.jp/univ\\_info/announcement/data/press2014081301.pdf](http://www.u-ryukyu.ac.jp/univ_info/announcement/data/press2014081301.pdf)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 秀之 (YAMASHIRO, Hideyuki)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号: 80341676