

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(B)（海外学術調査）

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05621

研究課題名（和文）海洋景観遺伝学・ゲノム学アプローチによる黒潮圏のサンゴ個体群の維持機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the maintenance mechanism of coral populations in the Kuroshio region by seascape genetics and genomics

研究代表者

中島 祐一（NAKAJIMA, Yuichi）

沖縄科学技術大学院大学・海洋生態物理学ユニット・研究員

研究者番号：50581708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,200,000円

研究成果の概要（和文）：サンゴ礁を形成する造礁サンゴの個体群の減少や消失が世界各地で報告されている。日本には分布域北限付近の個体群として生息している種が多く、小規模の攪乱でもサンゴ個体群が消失することが懸念される。日本を含む北西太平洋域を主な対象として、景観遺伝学・ゲノム学的解析によりサンゴ個体群の維持機構の解明を試みた。小規模スケールでの繁殖特性および遺伝子型と表現型の関連性を明らかにした。RAD-Seqにより分子系統樹を作成して種多様性の評価を行い、分類の再検討の必要性を示した。また、集団ゲノム解析を行い地域間の集団遺伝構造を明らかにし、海流シミュレーションの結果とも比較してサンゴ幼生の加入パターンを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では人為的攪乱によりサンゴの消失が懸念されている北西太平洋域において、サンゴの集団遺伝学、集団ゲノム学解析を中心に研究を進めた。異なる空間的、時間的スケールに着目したことで、サンゴの集団遺伝学に留まらず、繁殖生態学、分類学、海洋物理学など、多岐にわたる分野に関連する成果を得ることができた。これらの成果はサンゴ個体群の動向を予測する上で重要であることから、沿岸生態系において喫緊の課題となっているサンゴの保全にも貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Degradation of reef-building coral populations has been reported in various regions of the world. In Japan, several coral species inhabit the northern limit of the coral-distribution area. Therefore, even slight environmental disturbances can cause the local extinction of coral populations. Here, we conducted seascape genetic and genomic analyses of coral populations in the Northwest Pacific region, including Japan, to understand the mechanism of coral population maintenance. We focused on reproductive characteristics and the relationship between genotypes and phenotypes at small geographic scales. We constructed a molecular phylogenetic tree using the RAD-Seq data to assess species diversity and proposed the necessity for further research on coral taxonomy. Furthermore, we conducted a population genomic analysis to clarify the population genetic structure among the regions and elucidated the recruitment patterns of coral larvae with the results of ocean current simulation analysis.

研究分野：集団遺伝学

キーワード：海洋生態 海洋保全 環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱帯・亜熱帯域の沿岸生態系では、マングローブ林や海草藻場とともにサンゴ礁が生物相豊かな景観を保持している。サンゴ礁は海底で構造物となるため魚類などの有用水産資源種の生息場所にもなっている。しかし、沿岸海域は外洋や深海に比べて人為的攪乱や環境変動の影響を受けやすく、実際に各地の沿岸海域でサンゴ礁を形成する造礁サンゴの個体群の減少や消失が報告されている(e.g., Hoegh-Guldberg et al., 2011)。海水温の急激な上昇が原因とされる 1998 年に起こった世界的規模のサンゴの白化以降、複合的かつ継続的な攪乱により今もサンゴの被度が回復していない海域が日本の南西諸島をはじめとする北西太平洋の沿岸海域にも存在する。特に日本には 400 種以上ものサンゴが生息して種多様性豊かなサンゴ礁を形成しているが、分布域北限付近の個体群として生息している種が多く、熱帯の分布域中心に比べて個体群サイズが小さいために、小規模の人為的攪乱でもサンゴ個体群が消失することが懸念される。浮遊幼生期間にしか長距離移動できないサンゴの個体群の動向を予測するためには、遺伝的多様性と集団遺伝構造からサンゴ個体群の維持機構を科学的に評価する必要がある。特にサンゴはサンゴ礁生態系の主要構成種であり、サンゴ礁を取り巻く環境要因を考慮して複数サンゴ種を対象にした統合的な保全遺伝学的研究が必要とされてきた。

2. 研究の目的

研究を開始した 2016 年も日本の南西諸島を含む世界各地で大規模なサンゴの白化が報告された。本研究では、生物多様性が高く観光資源としての価値が高いものの、攪乱によるサンゴ礁の消失が懸念されている日本を含む北西太平洋域を主な対象として、景観遺伝学・ゲノム学的解析によりサンゴ個体群の維持機構を解明することを目的とした。DNA マーカーの開発を行い、地域スケールでの繁殖特性と、遺伝子型と表現型の関連性について調べ、さらに RAD-Seq を用いた分子系統解析により種多様性の評価を行い、広範囲に及ぶ集団ゲノム解析を行い海流シミュレーションの結果とも比較することで、統合的なアプローチにより異なる空間的、時間的スケールに着目して様々な角度からサンゴ個体群の維持機構を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 無性生殖様式と表現型

次世代シーケンサーを用いて、アザミサンゴ属とハナヤサイサンゴ属のマイクロサテライト DNA マーカーの開発を試みた。アザミサンゴ属では、新規に 9 座開発し、以前開発した既存の 11 座と合わせて計 20 座が利用可能となった。ハナヤサイサンゴ属でも 13 座開発したが、これまでに報告されていた既存のマイクロサテライトマーカーのうち日本の個体群には 14 座有効であることが判明したため、計 27 座が利用可能となった。

サンゴを飼育していた屋外水槽内部壁面にハナヤサイサンゴ属と思われる稚サンゴ群体を複数発見した。これらの稚サンゴ群体がどのような特徴を持つかを調べるために、25 の稚サンゴ群体を採取し、DNA 抽出後、ミトコンドリア DNA の ORF 領域 (mtORF) および開発したマイクロサテライトマーカー 13 座のうち 9 座を用いて、着目する種の遺伝子型と表現型の特徴を理解するために、水槽内のハナヤサイサンゴ属の親子関係を解析した。稚サンゴ群体の種同定およびクローンの有無の検証を行った。

また、琉球列島 (奄美・沖縄・宮古・西表) の 4 地点で、GPS による位置情報の記録とデジタルカメラでの撮影を行いながら、アザミサンゴの枝片を計 289 群体から採取した。沖縄では生殖細胞の観察用にも枝片を採取した。枝片から DNA を抽出した後、ミトコンドリア DNA の *nad2-cytb* 間領域のフラグメント解析を行った。ミトコンドリア DNA タイプ内の群体識別によるクローン群体数および近縁度の評価には、開発済みの 8 遺伝子座と、新規に開発した 7 座の計 15 座のマイクロサテライトマーカーを用いた。組織観察用枝片はブアン液に浸して脱灰して切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色後、顕微鏡下で生殖細胞の有無と雌雄を判別した。

(2) 分子系統解析

アザミサンゴはインド洋から西太平洋域の熱帯の沿岸海域を中心に生息する、雌雄異体の放卵受精型サンゴである。北西太平洋域ではミトコンドリア DNA から少なくとも 3 タイプ (mt-L・mt-S・mt-L+) が存在し、それぞれ別種と考えられる。しかし、形態に基づくこれまでの分類が分子系統解析結果と一致するかどうか未知であったため、アザミサンゴ属でミトコンドリア DNA タイプの解析および RAD-Seq による一塩基多型 (SNPs) 解析を行った。着目した形態に基づく種はアザミサンゴ、チビアザミサンゴ、エダアザミサンゴ、*Galaxea cryptoramosa*、*Galaxea paucisepta* の 5 種類で、採取地域は北西太平洋域である日本 (南西諸島・小笠原諸島) 台湾、グアム、タイに加え、南西太平洋域である東オーストラリア、サモア、インド洋域である西オーストラリア、モルディブ、サウジアラビア、チャゴス諸島も加えた。これらの地域に由来する 150 群体の DNA を制限酵素処理し、ライブラリーを構築した後、次世代シーケンサーである HiSeq でシーケンシングを行った。ReFuGe2020 Consortium (Voolstra et al., 2015; Liew et al., 2016) が公開しているアザミサンゴゲノムを参照配列としてアセンブルを行った後、ブートストラップ法による分子系統樹の作成を行った。その際、外群としてアザミサンゴ属と近縁のナガラハナサンゴ属のデータも加えた。

(3) 海流シミュレーションモデル

広域での海流による幼生分散が集団遺伝構造にどのような影響を与えるかを理解するために、Regional Ocean Modelling System (ROMS; Shchepetkin and McWilliams, 2005) による分散モデルを開発した。海表面上の仮想粒子をサンゴ幼生と見立て、サンゴ幼生の初期生活史を考慮した。ROMS のモデル化は Mitarai et al. (2016) に基づいて行われ、幼生分散は逆方向粒子追跡法により評価した。2008 年から 2017 年の間に 1 日 1 個の仮想粒子を対象のサンゴ礁域 (種子島・伊平屋島・宮古島・南大東島・母島・グアム) のグリッドの中心点から放出した。仮想粒子は 6 時間ごとに 60 日間遡ることで追跡を行い、サンゴ幼生の死亡率を 1 日 5% と仮定して、仮想粒子の供給源とグリッドを通過するまでの日数を求めた。

(4) 集団ゲノム解析

上記(2)と同様の方法で、アザミサンゴ属の集団遺伝解析を行った。対象を南西諸島 (大隅諸島・琉球列島・大東諸島) 小笠原諸島、グアムとしてアザミサンゴ属の mt-L タイプ 108 群体でゲノムワイドな一塩基多型 (SNPs) 解析である RAD-Seq を行い、ソフトウェア Admixture で遺伝的クラスター数を 2 から 4 と仮定したときの集団遺伝構造を評価した。さらに、過去の移住パターンの推定にソフトウェア BayesAss と dadi を用いた。この結果を、上記(3)の ROMS による海流シミュレーションの結果と比較した。

4. 研究成果

(1) 無性生殖様式と表現型

親候補となるハナヤサイサンゴ属のサンゴを複数種飼育していたものの、稚サンゴ 25 群体はホソエダハナヤサイサンゴに由来し、さらに稚サンゴは無性生殖に由来するクローンであることが判明した。ハナヤサイサンゴ属のクローンは物理的な破片分散だけでなく、他の地域でも報告されている無性的なプラヌラ幼生の放出でも起こりうる。一方、人工的な飼育環境によるストレスでポリプの抜け出しが起こった可能性も考えられる。別の種では無性生殖は見られなかったことから、同じ属でも種によって無性生殖のプロセスに大きな違いがある可能性も示唆された。

奄美で採取したアザミサンゴ属のサンゴ群体は全ての遺伝子型が互いに異なっていたが、他の 3 地点では距離が近いと近縁度が高い傾向にあり、破片分散により局所的に遺伝子型分布が偏ることがわかった。生殖腺を観察した沖縄の群体の多くは成熟しており、また、遺伝子型と性は一致していた。しかし、性比に大きな偏りが見られたため、成熟群体が多い個体群でも有性生殖由来の群体は見かけより少なく、他地点への幼生供給源となっていない可能性がある。アザミサンゴ属の mt-L、mt-S タイプ両方で、同所的に生息している個体群の色彩型はマイクロサテライト遺伝子型と一致した。つまり、無性生殖により生じたと思われるクローン群体は同じ色彩型を示すことが判明した。データからクローン群体により重複した遺伝子型を除いた場合でも色彩型と近縁度に相関が見られたことから、同所的に生息する群体間の色彩型の違いは遺伝子型の影響による部分が大きいことがうかがえる。

(2) 分子系統解析

ミトコンドリア DNA タイプ (mt-L・mt-S・mt-L+) と SNPs による分子系統解析との比較では、基本的に結果が一致していたが、例外も見られた。このようなミトコンドリア DNA と核 DNA の遺伝子型の不一致には、過去の種間交雑の影響があるかもしれない。また、南西諸島ではミトコンドリア DNA タイプと遺伝的な種は一致しており、ミトコンドリア DNA タイプが種判別の指標になっていたが、形態がエダアザミサンゴの群体は mt-L タイプでも分子系統樹上では通常の mt-L タイプとやや離れた位置に独立したクラスターとなった。従来からサンゴのミトコンドリア DNA 領域の進化速度は遅いことが知られており (Shearer et al., 2002) 正確な種判別を簡便に行うためには、従来とは異なる DNA マーカーの開発が必要であろう。このエダアザミサンゴを除いては、形態と遺伝的クラスターの一致は見られず、これまで分類の基準となっていた形態の違いは同種内の表現型可塑性によるものかもしれない。また、チャゴス諸島の一部の群体は mt-L、mt-S、mt-L+ の外側に位置したため、アザミサンゴ属の祖先に近い遺伝的背景を持つ未記載種と思われる。サンゴの種多様性や個体群維持機構を適切に評価するためにも、アザミサンゴ属の分類については今後、再検討する必要がある。

(3) 集団遺伝構造と幼生加入

8162 座の選択圧のない中立な SNPs データを用いて集団遺伝構造を評価したところ、大東諸島 (南西諸島東部) が南西諸島の他の地域とは異なるクラスターを示した。また、小笠原諸島は南西諸島や大東諸島とは異なるクラスターを示した。南西諸島内では地点間の遺伝的な類似性が高いこと、小笠原諸島は他の地域との類似性が低く長期にわたるタイムスケールでも移住がほとんどないことが示唆された。このことは、地理的距離が遺伝的なつながりを維持することに大きく影響を及ぼすこと、飛び石状の生息地がない場合には幼生分散や分布拡大が制限されることを意味する。グアムに関しては大東諸島、小笠原諸島と共通のクラスターを示し、独立したクラスターは検出されなかったが、グアムの解析数は 3 群体のみのため、今後、解析規模の拡充が必要となる。沖縄周辺海域で定着基盤を用いた実験では放卵放精型サンゴの大部分の幼生の分散

距離は 20km 以内と推定されたが、海流シミュレーションでは多くの場合 50 日以内で幼生が他海域へ到達可能であった。また、南西諸島では南北に仮想粒子の移動が多く見られたため、黒潮とその周辺の海流の影響が大きいと思われる。仮想粒子の移動パターンから、産卵時に大量に産出された幼生の一部が長距離分散できれば地域間連結性を維持できるが、通常は地域間の幼生加入は低頻度であるという結果になった。この結果は、南西諸島(大東諸島を除く)、大東諸島、小笠原諸島で見られた集団遺伝構造とも一致する。ただ、過去の地域間移住パターンはソフトウェア *dadi* において南西諸島から小笠原諸島へ方向が示されたが、海流シミュレーションではその地域間で直接的な移住は見られず、黒潮を介して南西諸島から本州南部を経由した小笠原諸島への移住があるのみだった。アザミサンゴ属の幼生が温帯域で生存しながら浮遊できるかは不明だが、アザミサンゴ属の遺伝的背景は複数世代による歴史的かつ複雑な移住パターンにより成り立っている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakajima Y, Wepfer PH, Suzuki S, Zayasu Y, Shinzato C, Satoh N, Mitarai S	4. 巻 7
2. 論文標題 Microsatellite markers for multiple Pocillopora genetic lineages offer new insights about coral populations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-06776-x	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 Nakajima Y, Chuang P-S, Ueda N, Mitarai S	4. 巻 6
2. 論文標題 First evidence of asexual recruitment of Pocillopora acuta in Okinawa Island using genotypic identification	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e5915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.5915	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 Wepfer PH, Nakajima Y, Hui FKC, Mitarai S, Economo EP	4. 巻 633
2. 論文標題 Metacommunity ecology of Symbiodiniaceae hosted by the coral <i>Galaxea fascicularis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Ecology Progress Series	6. 最初と最後の頁 71-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3354/meps13177	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Wepfer PH, Nakajima Y, Economo EP, Mitarai S
2. 発表標題 Fine-scale variation in the Symbiodinium community composition between <i>Galaxea fascicularis</i> colonies
3. 学会等名 European Coral Reef Symposium 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura M, Sakai K, Nakajima Y, Mitarai S, Kohno H, Mezaki T, Nomura K, Yokochi H
2. 発表標題 Coral recruitment in subtropical and temperate coral communities in Japan: implications for community sustainability
3. 学会等名 European Coral Reef Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wepfer PH, Nakajima Y, Economo EP, Mikheyev A, Mitarai S
2. 発表標題 Dispersal patterns of the coral <i>Galaxea fascicularis</i> across the northwestern Pacific Ocean
3. 学会等名 2018 Ocean Science Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wepfer PH, Nakajima Y, Sutthacheep M, Radice V, Richards Z, Ang P, Fujimura A, Sudek M, Reimer J, Chen A, Teraneo TI, Toonen R, Mikheyev AS, Economo EP, Mitarai S
2. 発表標題 The phylogeography of <i>Galaxea</i>
3. 学会等名 4th Asia-Pacific Coral Reef Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sano S, Nakajima Y, Mezaki T, Nakamura M
2. 発表標題 Species composition of pocilloporid recruitment in the southwestern coast of Shikoku island, Japan: the first step for estimating local connectivity relationship
3. 学会等名 4th Asia-Pacific Coral Reef Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島祐一・Chuang P-S・上田延朗・御手洗哲司
2. 発表標題 屋外水槽で飼育されたホソエダハナヤサイサンゴ <i>Pocillopora acuta</i> の繁殖特性
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第21回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島祐一・Wepfer PH・御手洗哲司
2. 発表標題 琉球列島のアザミサンゴ属の局所集団遺伝構造
3. 学会等名 日本生態学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島祐一・Wepfer PH・御手洗哲司
2. 発表標題 琉球列島のアザミサンゴの遺伝子型と表現型の関連性
3. 学会等名 沖縄生物学会第56回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村雅子・福崎扶美・佐野聡・中島祐一・御手洗哲司・目崎拓真
2. 発表標題 高緯度域サンゴ群集の現状と維持機構の検討
3. 学会等名 2019年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島祐一・Wepfer PH・御手洗哲司
2. 発表標題 琉球列島のアザミサンゴ属の局所的空間遺伝構造と表現型
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第22回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajima Y, Wepfer PH, Mitarai S
2. 発表標題 Spatial genetic structure and phenotypes of Galaxea corals in the Ryukyu Archipelago
3. 学会等名 2020 Ocean Sciences Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島祐一・Wepfer PH・御手洗哲司
2. 発表標題 琉球列島のアザミサンゴ属の遺伝子型と表現型の関連性
3. 学会等名 日本生態学会第67回大会
4. 発表年 2020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	中村 雅子 (NAKAMURA Masako) (50580156)	東海大学・海洋学部・准教授 (32644)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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	御手洗 哲司 (MITARAI Satoshi) (80567769)	沖縄科学技術大学院大学・海洋生態物理学ユニット・准教授 (38005)	
研究協力者	ウェプファー パトリシア (WEPFER Patricia)	沖縄科学技術大学院大学・海洋生態物理学ユニット・博士課程学生	