

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03028

研究課題名（和文）著しく分散能力の高い幼生期を有する水産ベントスのコネクティビティ解析手法の開発

研究課題名（英文）Methodological developments of the connectivity analysis in marine benthos with an extremely dispersible planktonic larval stage

研究代表者

入江 貴博（Irie, Takahiro）

東京大学・大気海洋研究所・助教

研究者番号：30549332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：海産ベントスの加入量変動を決定する要因として重要となる浮遊幼生期の移流拡散履歴を、個体情報から推定するための技術確立することを目指している。幼生殻の化学組成は、個体が着底までに経験した温度履歴を復元する上で必要不可欠な情報となる。本研究では、酸素安定同位体比に比べて低いコストで分析可能な元素比(Sr/Ca)が、遺伝子型種内変異の影響を大きく受けることを実証することに成功した。また、EPMAを用いた炭酸塩中のSr/Caの定量において、系統誤差の影響を排除するための検量線を確立した。さらに、集団ゲノミクスによる個体群間での接合性を推定するために必要となる、核ゲノム情報の取得を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産生物の加入量変動を決定する要因や原理の理解は、資源量評価や資源管理を進める上で、極めて重要な要素である。浮遊幼生期を持つ多くの水産生物では、個体発生初期の動態に関するデータを取得することが難しく、炭酸塩硬組織やゲノム情報の利用が必要不可欠である。また、生物起源の炭酸塩に含まれる元素比を左右する要因を定量的に理解することは、基礎科学における意義も大きい。炭酸塩中の元素比は、これまで熱力学的な過程が支配的であるというモデルで理解されてきた。今回、遺伝子型の個体差による影響が無視できない規模であることを実証できたことは、この分野でなされる今後の研究の方向性に一定の影響があるだろう。

研究成果の概要（英文）：The goal of this project is to establish a technique for estimating the dispersal history of marine benthos during the planktonic larval stage, which is an important factor for understanding the recruitment dynamics from individual-derived information. The chemical composition of larval shells provides essential information for reconstructing the temperature history experienced by individuals prior to their settlement onto the benthic habitat. In this study, we succeeded in demonstrating that the elemental ratio (Sr/Ca), which can be analyzed at a lower cost than the oxygen stable isotope ratio, is significantly affected by intraspecific genotypic variation. We also established a calibration line to eliminate the influence of systematic errors in the determination of Sr/Ca in carbonate using EPMA. Furthermore, we proceeded to obtain nuclear genome information, which is necessary to estimate the connectivity among populations from the viewpoint of population genomics.

研究分野：水産科学

キーワード：浮遊幼生 海産ベントス 貝殻 石灰化 一塩基多型 種内変異 分散

1. 研究開始当初の背景

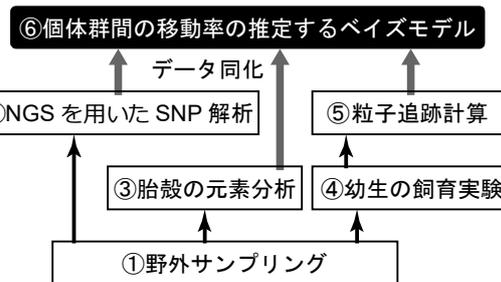
加入量の変動は、水産生物の資源量を決める重要な決定因子である。しかしながら、個体群間での個体の移動は定量が難しく、このことが加入量の推定精度を著しく下げているのが現状である。資源量変動のメカニズムは小型浮魚類で詳しく研究され、多くの魚種で、その年の加入量を決める仔魚期の生残率が最も重要な要素であることが知られている。小型浮魚類においては、耳石の化学組成を分析することで、個体が経験した成長と温度の履歴を高精度に再現するための技術が確立しつつある。その一方で、貝類・棘皮動物・甲殻類などの海産ベントスの資源量変動に関する研究は、魚類と比較して明らかに遅れており、浮魚の研究から得られた知見がどの程度あてはまるのかもよくわからない。本研究では、魚類における耳石の代替物として、貝類の幼生が持つ殻を利用することで、個体の経験環境に関する情報を得るための技術の確立を目指す。

2. 研究の目的

数ヶ月にわたる長期の浮遊幼生期を伴う海産ベントスを対象として、海流による搬送の結果として生じる幼生個体の移流拡散履歴の推定と、底生個体群間での交流パターン（集団遺伝学におけるコネクティビティー）の定量を可能にする技術的枠組みの確立を目指す。

3. 研究の方法

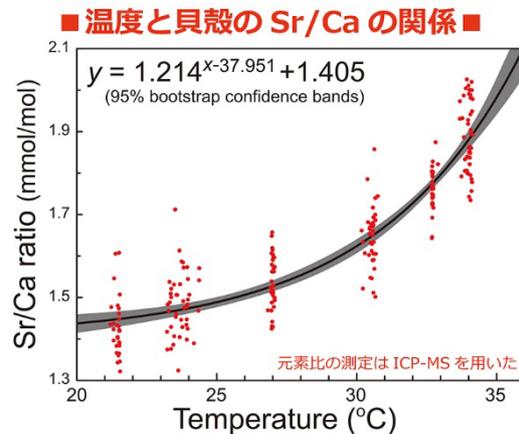
本研究では、西太平洋の熱帯～温帯域に広く分布する潮間帯棲腹足類を対象とした。①野外個体群でのサンプリング、②NGSを用いた核ゲノム一塩基多型(SNP)のジェノタイピングとドライ解析、③胎殻の元素組成分析、④幼生の飼育実験、⑤大型計算機を用いた粒子追跡シミュレーション、⑥ベイズモデルを用いた統計的推定から構成されるアプローチを



構想した。しかしながら、2020年1月頃から約2年間にわたって続いた新型コロナウイルスの世界的流行で、サンプリングのための海外渡航や飼育実験のための長期出張が難しくなった。その結果として、2019年までに採集した貝殻標本を用いた炭酸塩の元素組成分析に割り当てるエフォートを相対的に大きくせざるをえなくなった。幼生殻を含む炭酸塩硬組織の化学分析は、東京大学大気海洋研究所に設置された日本電子製 EPMA（電子プローブマイクロアナライザー）JXA-8230に加え、産業総合研究所地質情報研究部門が所有する誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)および炭酸塩自動前処理装置付質量分析計を用いて進められた。また腹足類の飼育実験は、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設において実施された。

4. 研究成果

(1) Sr/Ca の温度依存性と種内変異：着底後の複数の個体を21～34°Cの異なる温度区に無作為に割り振り、成長させた貝殻について、ストロンチウム(Sr)のカルシウム(Ca)に対する濃度をICP-MSで測定した。貝殻のSr/Caは温度に対して指数関数的な増加関数を示したが、同一の温度区で飼育された個体間で、Sr/Caのばらつきが非常に大きくなること示された。このこと



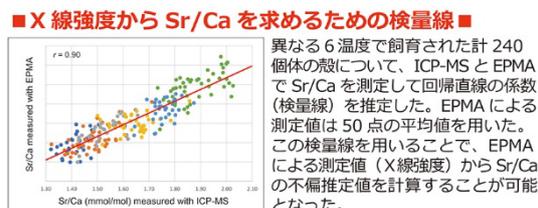
↑着底後の個体を用いた飼育実験から得られた殻のSr/Caの温度依存性。Sr/Caは温度に対して正の関数関係を描くため、理論的には、貝殻のSr/Caがわかれば石灰化時の温度を復元することができる。しかしながら、実際には同じ温度で飼育された個体間でのSr/Caのばらつきが非常に大きいため、現在は安定酸素同位体の値と併用することで推定の精度を担保している。Irie and Suzuki (2020) GCA 288: 1-15.

は、野外で採集された個体から得られた貝殻の Sr/Ca の測定値から、その個体が経験した温度の絶対値を正しく推定することが原理的に難しいことを意味する。ただし、別の独立した指標と組み合わせることでこの問題を回避できる可能性があり、現在そのような手法の開発に有効な情報を収集している。この成果は、2020年に地球化学の専門誌に発表された(Geochimica et Cosmochimica Acta 288:1-15)。以上は腹足類(ハナビラダカラ *Monetaria annulus*)に関する結果だが、同様の知見を頭足類(ヤリイカ *Heterololigo bleekeri*)の平衡石からも得ることができたため、その成果を2022年に海洋生物学の専門誌に発表した(Journal of the Marine Biological Association UK 102:315-321)。

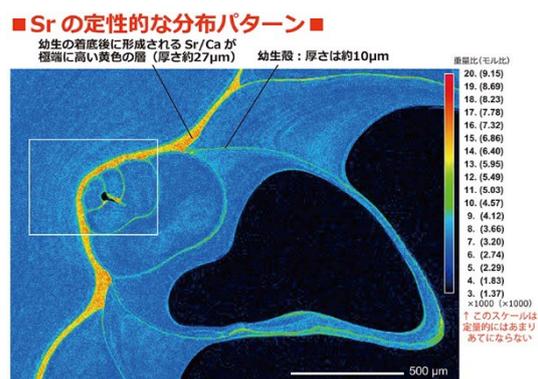
(2) EPMAによる Sr/Ca の定量：上で報告したアプローチでは、貝殻の粉末を ICP-MS で測定することによって Sr/Ca を定量した。測定精度はかなり劣るものの、炭酸塩硬組織の Sr/Ca は ICP-MS ではなく、EPMA によっても定量が可能である。EPMA は非破壊の表面分析装置であり、1 μm の空間解像度での定量が可能であるという利点がある。特に、幼生殻のように微小な硬組織では、EPMA による定量が極めて有効である。



しかしながら、非破壊の表面分析手法である WDS では、標本に含まれる元素の濃度が X 線強度として出力されるため、元素比の真値を知るためには換算式が必要となる。これまでは、CaO や SrO といった標準物質の測定に ZAF 補正を組み合わせた近似的手法が用いられてきたが、(用途によるが) 推定値には無視できない規模のバイアスが生じていた。このような測定バイアスの発生を回避するためには、検量線の確立と利用が必須となる。本研究では、貝殻の交差板構造(結晶多型としてはアラゴナイト)を構成する Sr/Ca に関して、X 線強度比から Sr/Ca の真値を直接換算する推定式(検量線)を確立した。現在、この成果を論文として発表するための原稿を執筆準備中である。



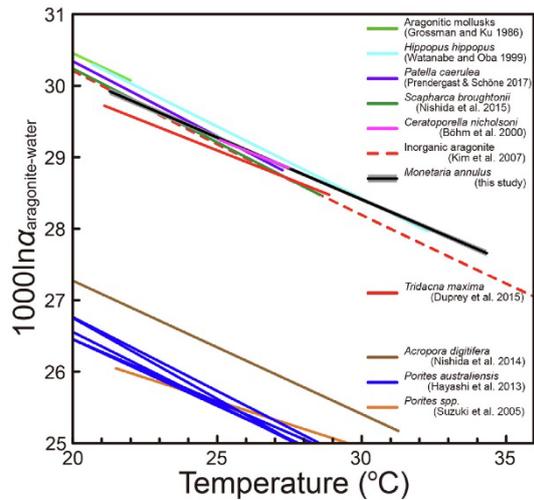
(3) 幼生殻に含まれる Sr/Ca の定量：野外で採集されたハナビラダカラの貝殻縦断面を削り出し、幼生殻の Sr/Ca をマッピングした。幼生殻の断面にあたる部位の Sr/Ca を X 線強度として測定した上で、上述の検量線にあてはめて換算したところ、平均値(±標準誤差)が 2.89 (±0.04) mmol/mol となった。この値を着底後に形成された貝殻のデータから推定された温度と Sr/Ca の関係式(GCA 288:1-15 に発表)にあてはめると、幼生の経験水温は本種が耐える温度の上限(約 35°C)を大きく上回ることが判明した。このことから、温度と Sr/Ca の関係式は、幼生の着底の前後で大きく変化する可能性が非常に高いという結論に至った。従って、浮遊幼生を異なる温度条件で飼育して、幼生殻を得るための飼育実験を最優先で実施する必要性があらためて再認識された。



(4) 酸素安定同位体比による温度計の再検討：2020年にGCAに掲載された論文では、貝殻の酸素安定同位体比が温度に対して示す依存性を直線関数のパラメータとして推定した。その結果として、無機的に合成されたアラゴナイト結晶に対して推定された回帰直線と比較した際に、ハナビラダカラの直線は $1000 \ln \alpha_{\text{aragonite-water}}$ で $0.04/^{\circ}\text{C}$ だけ傾きが浅いことが判明した。この差が

真のパターンなのか、あるいは artifact による系統誤差であるのかを確かめるために、異なる2温度区での飼育実験を追試として実施した。特に低温区の水温は室温よりも低くなる日が多く、エアレーションによる気泡に含まれる水蒸気が飼育水に取り込まれることで、飼育水の $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ が低くなる現象が起こっているという懸念に気づくことができた。この飼育実験で得られた貝殻や飼育水の酸素安定同位体比は、まだ測定できていない。可能な限り早い時期に測定を行い、結果を論文として公表する予定である。

(5) NGS を用いた集団遺伝解析：黒潮流域の5産地で採集された個体から DNA を抽出した上で、次世代シーケンサー(NGS)を用いてゲノムワイドなジェノタイピングを行うことで、核ゲノムの遺伝的多型に関するビッグデータを集積している。本課題を進めるにあたり、ジェノタイピングエラーや類似性の高い配列を選り分けて、「真の一塩基多型」を正しく抽出するためのアルゴリズムの完成に時間を要している。一塩基多型の洗い出しと集計、集団遺伝モデルに基づくベイズ推定のためのプログラミング作業は、今後も引き続き取り組むべき課題として持ち越しとなっている。また、核ゲノムの全配列については公表の準備を進めているが、論文文化に値する規準を満たす情報がまだ揃っていない。



↑ Irie and Suzuki (2020) Geochimica et Cosmochimica Acta 288: 1-15 (Fig. 5)の転載。X軸は飼育時の水温。Y軸は飼育水の $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ の影響を差し引いた貝殻の $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 。黒色の回帰直線がこの論文で新規に報告したハナピラダカラ（カルス）の測定値。赤色の破線は、Kim et al. (2007)が発表した無機的に合成されたアラゴナイト結晶に関する回帰直線。

本課題を進めるにあたり、ジェノタイピングエラーや類似性の高い配列を選り分けて、「真の一塩基多型」を正しく抽出するためのアルゴリズムの完成に時間を要している。一塩基多型の洗い出しと集計、集団遺伝モデルに基づくベイズ推定のためのプログラミング作業は、今後も引き続き取り組むべき課題として持ち越しとなっている。また、核ゲノムの全配列については公表の準備を進めているが、論文文化に値する規準を満たす情報がまだ揃っていない。

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 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shota Hosono, Takahiro Irie, Jun Yamamoto, Mitsuhiro Nakaya, Yasunori Sakurai, Tomohiko Kawamura and Yoko Iwata	4. 巻 102
2. 論文標題 Negative temperature dependence of statolith Sr/Ca and its intraspecific variability in experimentally maintained spear squid <i>Heterololigo bleekeri</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Marine Biological Association UK	6. 最初と最後の頁 315-321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0025315422000546	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 Inoue Karin, Yahagi Takuya, Kimura Taeko, Kano Yasunori	4. 巻 17
2. 論文標題 Population differentiation of the endangered salt-marsh snail <i>Ellobium chinense</i> in Japan (Gastropoda: Ellobiidae)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plankton and Benthos Research	6. 最初と最後の頁 66-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3800/pbr.17.66	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 Yamashiro Hideyuki, Fukumori Hiroaki, Aini Siti Nurul, Hirose Yurika	4. 巻 11
2. 論文標題 Snails associated with the coral-killing sponge <i>Terpios hoshinota</i> in Okinawa Island, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00185-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 該当する
1. 著者名 Irie Takahiro, Suzuki Atsushi	4. 巻 288
2. 論文標題 High temperature stress does not distort the geochemical thermometers based on biogenic calcium carbonate: Stable oxygen isotope values and Sr/Ca ratios of gastropod shells in response to rearing temperature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geochimica et Cosmochimica Acta	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gca.2020.07.044	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 Murase Iki, Kawamoto Tatsuhiko, Akizawa Norikatsu, Irie Takahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Rearing in strontium-enriched water induces vaterite otoliths in the Japanese rice fish, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.230410	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 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Takahiro Irie and Seiji Arakaki
2. 発表標題 Protandrous hermaphroditism with male regression: An explanation based on evolutionarily stable mixed strategies.
3. 学会等名 SEB Annual Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Irie and Seiji Arakaki
2. 発表標題 Multidimensional extension of the Fisher's principle explains the evolutionary stability of gender-role alternation in simultaneous hermaphrodites.
3. 学会等名 日本生態学会第70回全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 入江貴博
2. 発表標題 炭酸塩酸素安定同位体比の温度依存性：気づいたこと・気をつけたいこと
3. 学会等名 第17回バイオミネラリゼーションワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Hosono, Takahiro Irie, Jun Yamamoto, Mitsuhiro Nakaya, Yasunori Sakurai, Tomohiko Kawamura, Yoko Iwata
2. 発表標題 Evaluation of statolith Sr/Ca as a thermometer by rearing experiments in spear squid <i>Heterololigo bleekeri</i>.
3. 学会等名 Cephalopod International Advisory Council 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Hosono, Takahiro Irie, Jun Yamamoto, Mitsuhiro Nakaya, Yasunori Sakurai, Tomohiko Kawamura, Yoko Iwata
2. 発表標題 Evaluation of statolith Sr/Ca as a thermometer by rearing experiments in spear squid <i>Heterololigo bleekeri</i>.
3. 学会等名 Cephalopod International Advisory Council 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro IRIE and Seiji Arakaki
2. 発表標題 Protandrous hermaphroditism with male regression: Is it evolutionarily stable or suboptimal exempt from natural selection?
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Irie, Atsushi Suzuki
2. 発表標題 Estimation of the variance component due to the temperature-size rule in wild populations of an intertidal gastropod with determinate growth.
3. 学会等名 SEB 2019 Annual Meeting. Satellite Symposium: Is global warming causing animals to shrink? Evidence, Mechanisms and Models. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Irie
2. 発表標題 Dispersal footprint on water: Availability of Sr concentration of larval shells in widely distributed gastropods.
3. 学会等名 54th European Marine Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江貴博・村瀬偉紀
2. 発表標題 経緯温度の復元を目的としたWDS検量線法の確立と腹足類幼生殻の元素比測定
3. 学会等名 日本生態学会第71回全国大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Iki Murase, Takahiro Irie
2. 発表標題 Statistical properties of X-ray intensity output for strontium in the analysis of aragonitic shells using EPMA with WDS.
3. 学会等名 SEB Annual Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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	狩野 泰則 (Kano Yasunori) (20381056)	東京大学・大気海洋研究所・准教授 (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	福森 啓晶 (Fukumori Hiroaki) (60746569)	東北大学・生命科学研究科・助教 (11301)	

	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
研究協力者	鈴木 淳 (Suzuki Atsushi)		
研究協力者	村瀬 偉紀 (Murase Iki)		
研究協力者	小川 展弘 (Ogawa Nobuhiro)		

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