

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

遺伝子流動解析に基づくサンゴ礁生物北上予測を踏まえた海洋保護区の検討
(4RF-1501)

平成27年度～平成29年度

Examination of Marine Protected Areas Based on the Prediction of Northward Migration of
Coral Reef Organisms Using Gene Flow Analysis

<研究代表機関>

宮崎大学

<研究分担機関>

独立行政法人国立高等専門学校機構沖縄工業高等専門学校

国立研究開発法人海洋研究開発機構

<研究協力機関>

東京工業大学

平成30年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	16
II-1 中立遺伝子を用いた北上生物の遺伝子流動解析 （国立大学法人 宮崎大学） 要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	

- 6. 国際共同研究等の状況
- 7. 研究成果の発表状況
- 8. 引用文献

II-2 北上生物における非中立遺伝子領域での適応可能性評価 ・・・・・・ 45

(独立行政法人国立高等専門学校機構沖縄工業高等専門学校)

要旨

- 1. はじめに
- 2. 研究開発目的
- 3. 研究開発方法
- 4. 結果及び考察
- 5. 本研究により得られた成果
- 6. 国際共同研究等の状況
- 7. 研究成果の発表状況
- 8. 引用文献

II-3 統計モデリングによる北上生物の空間分布推定 ・・・・・・ 60

(国立研究開発法人海洋研究開発機構)

要旨

- 1. はじめに
- 2. 研究開発目的
- 3. 研究開発方法
- 4. 結果及び考察
- 5. 本研究により得られた成果
- 6. 国際共同研究等の状況
- 7. 研究成果の発表状況
- 8. 引用文献

III. 英文Abstract ・・・・・・ 74

I. 成果の概要

課題名 4RF-1501 遺伝子流動解析に基づくサンゴ礁生物北上予測を踏まえた海洋保護区の検討

課題代表者名 安田 仁奈 (国立大学法人宮崎大学 テニユアトラック推進機構 准教授)

研究実施期間 平成27～29年度

累計予算額 33,808千円 (うち平成29年度: 11,441千円)

予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード サンゴ礁生態系、北上、海洋保護区、遺伝子流動、生物空間統計モデル、温暖化、遺伝的多様性、集団遺伝解析、幼生分散

研究体制

(1) 中立遺伝子を用いた北上生物の遺伝子流動解析 (国立大学法人 宮崎大学)

(2) 北上生物における非中立遺伝子領域での適応可能性評価 (独立行政法人 国立高等専門学校機構 沖縄工業高等専門学校)

(3) 統計モデリングによる北上生物の空間分布推定 (国立研究開発法人海洋研究開発機構)

研究協力機関

国立大学法人 東京工業大学

1. はじめに (研究背景等)

世界の海洋生物多様性の約30%が集中するサンゴ礁生態系をはじめとする多くの生態系は様々な人為ストレスにより壊滅の一途を辿っている。生物多様性条約第10回締結国会議 (CBD・COP10) 生物多様性国家戦略 (2012) では、気候変動に対して脆弱なサンゴ礁生態系などの重要海域を管理・保全してネットワーク化することが目標として掲げられている。すなわち、海洋生物に多く見られるような生活史初期の幼生分散による海域間移動(ネットワーク)を踏まえた上で、気候変動後も多様性を保持していけるような海洋保護区の設定が国際的な急務となっている。このような中、サンゴの最北限に位置する日本沿岸では、近年の温暖化に伴い、沿岸生態系における海洋生物の北上が報告されている。特にサンゴ礁生物の北上は、文献・現地調査で2011年に明らかになって以来ここ数年急速に知見を増やしている。北上の見られたサンゴはどれも熱帯・亜熱帯域で世界規模の高水温による白化が原因で、絶滅危惧種に登録されている。これは、比較的低温が保たれる高緯度海域はサンゴ礁生物のレフュージア(避難場所)として機能している可能性を意味する。一方、生物の分布境界に位置する集団は、低い遺伝的多様性を持つなど脆弱性を秘めていることが理論的に考えられ、環境変化に脆弱な可能性もある。今後の沿岸生態系保全を考える際には、北上や分布拡大の進む温帯域のサンゴ群集も含めた総括的な幼生分散ネットワーク解明と遺伝的多様性などの環境変化への脆弱性を明らかにする必要がある。しかし、これまで特に温帯域を含めたサンゴ礁生物の幼生分散や北上集団の安定性の指標となる遺伝的多様性、熱帯性の遺伝子型を持つ生物の北上後の適応の可能性などに関する知見はなく、これらを踏まえたサンゴ礁生物の分布拡大や北上予測に関する知見がない状況である。さらには、造礁サンゴは普通種や優占種であっても野外での形態識別が困難な上、隠蔽種等が普通種にも数多く含まれることが近年次々とわかってきており、正確な生物多様性評価のためには、そうした隠蔽系統を遺伝子解析で確かめる必要がある。

2. 研究開発目的

上記のような背景を踏まえ、本研究では、北上傾向が見られた絶滅危惧種とされている種および生態学的に重要であると考えられる優占種やサンゴ食害種など複数種について、1)遺伝的多様性を評価するため、適宜新規遺伝子マーカーを作成し、亜熱帯の南西諸島から本州・九州の温帯高緯度海域における生物集団の種の境界を確認しながら、各種内における各集団の遺伝的多様性を調べる。2)同時に集団ゲ

ノム解析を行い、高緯度特有の適応遺伝子の有無や頻度を調べ高緯度集団の適応性・脆弱性・安定性を明らかにする。3)黒潮流域の集団に対し中立遺伝子を用いた遺伝子流動解析を行い、北上に関わる幼生分散の実態と北上する際の幼生が供給される海域を明らかにする。同時に、海水流動解析も含めて物理的なソースシンクの関係や中心性の高い重要海域を絞り込む。4)さらに、空間的な環境情報に基づく種の分布適地推定を現在、将来にわたり実施する。これらの結果を全て統合し、分布に重要な環境要因の特定と、変遷しうる新たな沿岸生態系を考慮した海域の相対的重要性についてEBSA(Ecologically or Biologically Significant marine Area=生態学的、生物学的に重要な海域)の基準に照らし合わせながら提示する。さらに現状の保護区とサンゴ海域のカバー率のgap解析を行い、保護区が不足している海域を提示する。それにより、生物多様性条約第10回締結国会議で愛知目標として掲げられた、既知の絶滅危惧種の絶滅を防止すること、また、新たに海洋保護区を設定する際に重要となる科学的知見を与えることを目標とする。

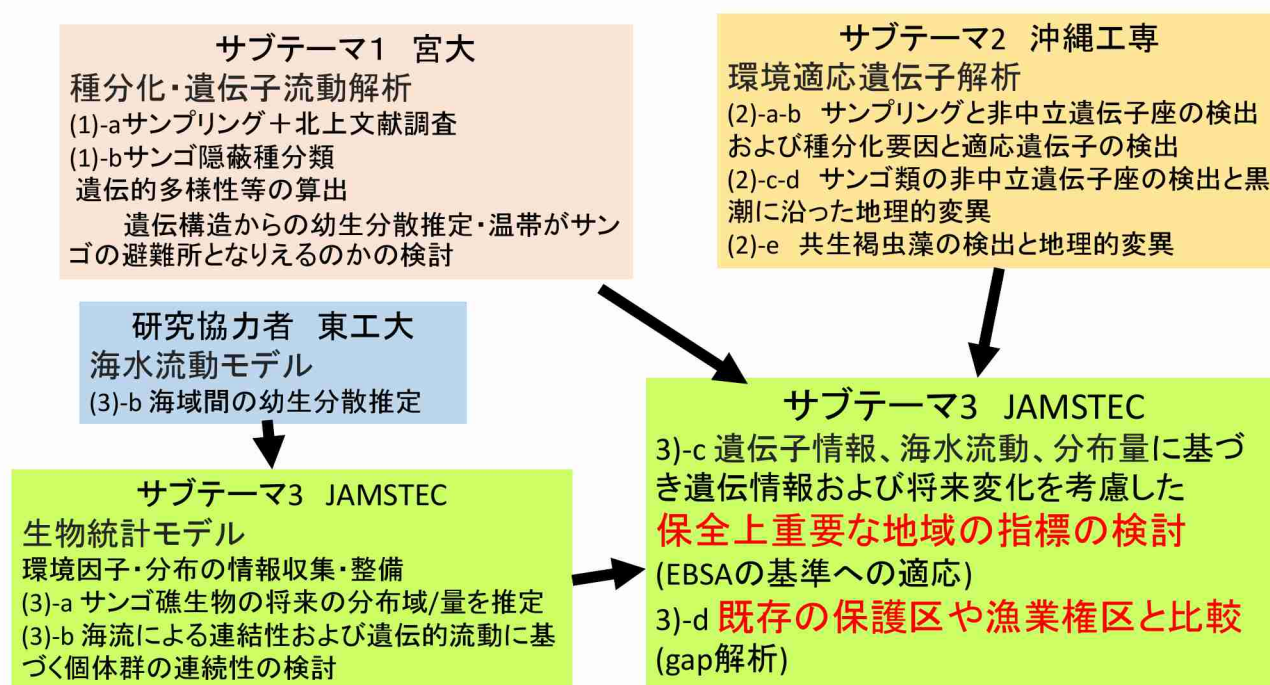


図1 本研究の枠組みと構成。各番号は、報告書詳細の番号と一致

*EBSA(Ecologically or Biologically Significant marine Areas identified by Japan)生物多様性の観点から重要度の高い海域)の基準。生物多様性条約第9回締約国会議において定められた生態学的、生物学的に重要な海域を決める下記の7つの基準のこと

1. 希少性、2. 生活史における重要性、3. 絶滅危惧種の生育・生息地、4. 脆弱性、5. 生物学的生産性、6. 生物学的多様性、7. 自然性

3. 研究開発の方法

(1) 中立遺伝子を用いた北上生物の遺伝子流動解析

a) 対象種と遺伝子解析用サンプルング

本研究では、サブテーマ2と共同で、日本全国の31地点から1地点あたり30サンプルを目安にサンゴを採集した。対象種は温帯域のサンゴ群集として優占し、温帯サンゴ面積の約5割を占める種(クシハダミドリイシ類・エンタクミドリイシ類・ヒメエダミドリイシ類・ハナヤサイサンゴ類)およびこれらの種とは少し異なる環境・生息域を示すハナガササンゴ類、亜熱帯に多いアオサンゴ類を対象種とした。サンゴはスキューバダイビングにより徒手またはタガネ/ハンマーを用いて解析に必要な最低限の量を採取し、遺伝子解析用のサンプルは99.5%のエタノールに保存した。

b) サンゴ類の種境界とその分布および集団遺伝構造

エタノール保存したサンプルはゲノムDNAを抽出し、主に次の3つの方法で中立遺伝子の解析を行った。

1) ミトコンドリアDNAによる多型解析（ハナヤサイサンゴ類）、2) 核の高度多型マーカーであるマイクロサテライト解析（ハナヤサイ・ミドリイシ類）、3) マイクロサテライトの周辺領域を次世代シーケンサーで解析するMIG-seq解析（エンタクミドリイシ類）、また適切なマーカーが存在しなかったハナガササンゴに関しては集団遺伝解析用のマーカー開発と既存の形態種とあうかについて調べた。

主に核のマイクロサテライト遺伝子座を複数使った集団遺伝解析の結果から遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度やアレル多様度、集団内の無性生殖の割合の指標となるクローン率、ある集団にしか現れないプライベートアレル数、集団間の幼生分散の大きさの指標となる遺伝分化係数 F_{ST} を算出した。

c) 統計モデルに向けた遺伝解析情報のまとめ：隠蔽系統の種数と境界・遺伝分化係数・遺伝的多様性・アレル多様度・プライベートアレル数から見た相対的な海域重要度の算出

上記で明らかになった隠蔽系統の数、遺伝的多様性・アレル多様度、プライベートアレル数をそれぞれの海域において算出したものを海域の相対的重要度の算出に用いるように補正を行った。補正して種間比較できるようになったデータを用いて、各海域の平均値を算出したのち、3段階にデータを振り分け、統計モデルに適用した。また別途、本研究で対象とした全ての種の遺伝構造に共通する海域の区分を明らかにするため、遺伝的にも地理的にも近い集団同士を階層的遺伝構造解析であるAnalysis of Molecular Variance (AMOVA)のグループ間遺伝構造が最大になるような海域分けを算出した。

（2）北上生物における非中立遺伝子領域での適応可能性評価

サブテーマ（1）と協力して得られたサンゴ礁生物の集団サンプルを対象に、SNPデータの取得の手法の確立と集団遺伝解析を進めた。手法としては、次世代シーケンサーを用いて、制限酵素切断部位周辺の遺伝子配列をゲノムワイドに決定し、集団遺伝解析する手法である、RAD-seq（Restriction site Associated DNA sequencing）を用いて、一塩基多型（SNP：Single Nucleotide Polymorphisms；塩基配列における1塩基置換のこと）データの取得を行って、分子集団遺伝解析の実施を進めた。サンゴの場合、体内に共生藻類が多く存在しているため、ホストであるサンゴのみのSNPを抽出するために、サンゴのゲノム情報又はトランスクリプトーム情報をリファレンスとして解析する手法開発も試みた。また、サンゴは形態的に判別できない隠蔽種の存在がよく報告されているため、RAD-seqによる隠蔽種検出も試みた。サンゴに関しては、既に環境要因と関連する一塩基多型の遺伝子座も報告されているため、それらの情報を踏まえて、日本のサンゴ種での新規マーカーの開発と適用も進めた。更に、サンゴの共生藻類の遺伝子型の差異が環境応答と関連しているとの報告もあるので、今回得られたサンゴサンプルを対象に、褐虫藻のメタバーコーディング解析も実施した。

（3）統計モデリングによる北上生物の空間分布推定

a) まず、気候変動による海洋生物の潜在的な北上可能性を検討するため、次の3つのタイプの生物の分布情報を収集し、海水温を主として分布と量の推定モデルを作成した。まず、環境要因から考えられるサンゴ種の潜在分布域について推定を行い、将来の潜在分布域の北上を推定した。次に、現在のサンゴ礁の面積について種を問わずに環境との関係から得られる潜在的な分布面積の推定を行ない、現在と将来の潜在的な分布面積増加の範囲と程度の推定を行った。最後に、サンゴ礁に影響を与える要因のうち、特にサンゴを捕食し時に大量発生するオニヒトデの分布域の北上可能性についても、将来の潜在分布域と到達可能性の推定を行った。次に到達可能性と分布拡大経路における各地域の重要性を考慮するため、海流による分散の連結性と、遺伝的流動に基づく個体群の連続性を評価し、個体群の過去の分散・定着の帰結と、将来の潜在的な分散のハブを特定した。

上記の結果と、サブテーマ1、2で得られた隠ぺい系統の発見を含む種の遺伝情報を中心として保全上重要な地域を選定する指標を検討した。それらの指標を海洋の生物多様性にとって重要な海域の選定の基準として用いられているEBSAの基準に当てはめ、指標の統合と評価を行った。EBSAの基準にお

る評価について、特にサンゴの面積は近年の情報に基づく評価と2050年時点の値による評価との2つを平均することで、将来の検討に資するものとした。最後に保護区や自然再生事業の分布と、重要海域、潜在分布面積とのギャップを解析し、海域公園地域などの、保全の強い枠組みのある場所の割合や、保全と人為活動との関わり合いの潜在性が高い場所を、抽出した。

4. 結果及び考察

(1) 中立遺伝子を用いた北上生物の遺伝子流動解析

a) 遺伝子解析用のサンプル採集

計31地点、合計約4000群体の採集に成功した。対象海域としては、これまでサンゴ等のコネクティビティについて知見がほとんどなかった温帯域からは18地点からサンゴ採集し、そのうち8地点は、近年にサンゴが北上して形成したと考えられる集団を含む。なお、本研究のサンプリングを通じて、新規にサンゴの北上も発見し、報告することが出来た：屋久島における最北限アオサンゴ群体の発見（下記、Nakabayashi et al. 2017業績の2）、およびクシハダミドリイシの式根島での発見(Nakabayashi et al. 現在国際学術誌に集団遺伝解析の結果とともに投稿・リバイス中)。

b) サンゴ類の種境界とその分布および集団遺伝構造

クシハダミドリイシ類とエンタクミドリイシ類はテーブル上のイシサンゴでインド太平洋に分布する優占種である。特に温帯では、両種あわせて平均的に50%、被度の高いところでは90%以上をこれらの種が占有する。両種共に近年北上が観察されており、現在は、九州西の五島列島（クシハダ）や対馬（エンタク類）、太平洋側でも式根島（クシハダ：本研究で発見）や館山（エンタク類）まで分布している。クシハダミドリイシ類のSTRUCTUREを用いたクラスタリング解析では、日本国内で遺伝的に異なる隠蔽系統として最低3系統が分布していること、そのうち2系統は屋久島を最北限としていて、温帯域には主に1系統のみが分布しており、この緑で示される系統が北上および分布拡大をしていることがわかった（図2）。逆に、石西礁湖では温帯にいる緑の系統を除く2系統（赤と青）が主に分布していた。これらのことから、温帯まで分布できている遺伝系統は3つの隠蔽系統のうちひとつだけであること、温帯域で北上・分布拡大しているのもその系統であることがわかった。エンタクミドリイシ類では、同種かどうかを以前議論されていたエンタクミドリイシとミドリイシは完全に別種であることが核ゲノムからも証明できた。クシハダの温帯にも分布する系統では遺伝的多様性は、亜熱帯域から徐々に遺伝的多様性が低下し、近年北上した集団では遺伝的多様性がやや低い傾向にあり、環境変化に対する脆弱性を秘めている。エンタクミドリイシもまた、最北限海域の館山と対馬でやや遺伝的多様性が低下した（図3）。しかし、ミドリイシではこうした北限域の遺伝的多様性の低下は見られなかった。最北限域ではこのように遺伝的多様性の低下がしばしば見られる一方、もともとサンゴがいる温帯生息域では亜熱帯ほどではないものの比較的高い遺伝的多様性が保持されていること、より北の集団の幼生ソースとなっていること（図2）、温暖化でサンゴ面積の増加が見込まれること（サブテーマ3で後述）から、こうした集団は温暖化後に際してサンゴの避難所となりえることが示唆された。

ヒメエダミドリイシ類とハナヤサイサンゴ類は北上が観察されていない種である。前者は温帯種の絶滅危惧種で、ハナヤサイサンゴ類は既存の形態識別と一致しなかった。本研究のミトコンドリア解析で新たに見つけた未記載種4種を含め、基本的に屋久島以南のみに分布する亜熱帯種であるが、ハナヤサイサンゴ(*Pocillopora damicornis*)の1種のみは温帯域まで分布していることが分かった。本研究により、絶滅危惧種であるヒメエダミドリイシ類は遺伝的にさらに異なる2系統に分かれること、他のテーブル状サンゴと比較して枝状のヒメエダミドリイシ類は集団内のクローン率が高く、無性生殖を頻繁に行っていることがわかった。ヒメエダミドリイシ類、ハナヤサイサンゴ、ホソエダハナヤサイ、イボハダハナヤサイの順に遺伝子流動が大きくなることが分かった。これらの種の幼生分散能力の低さないし分散後の異なる環境への適応度の低さが北上や分布拡大を制限していると考えられた。

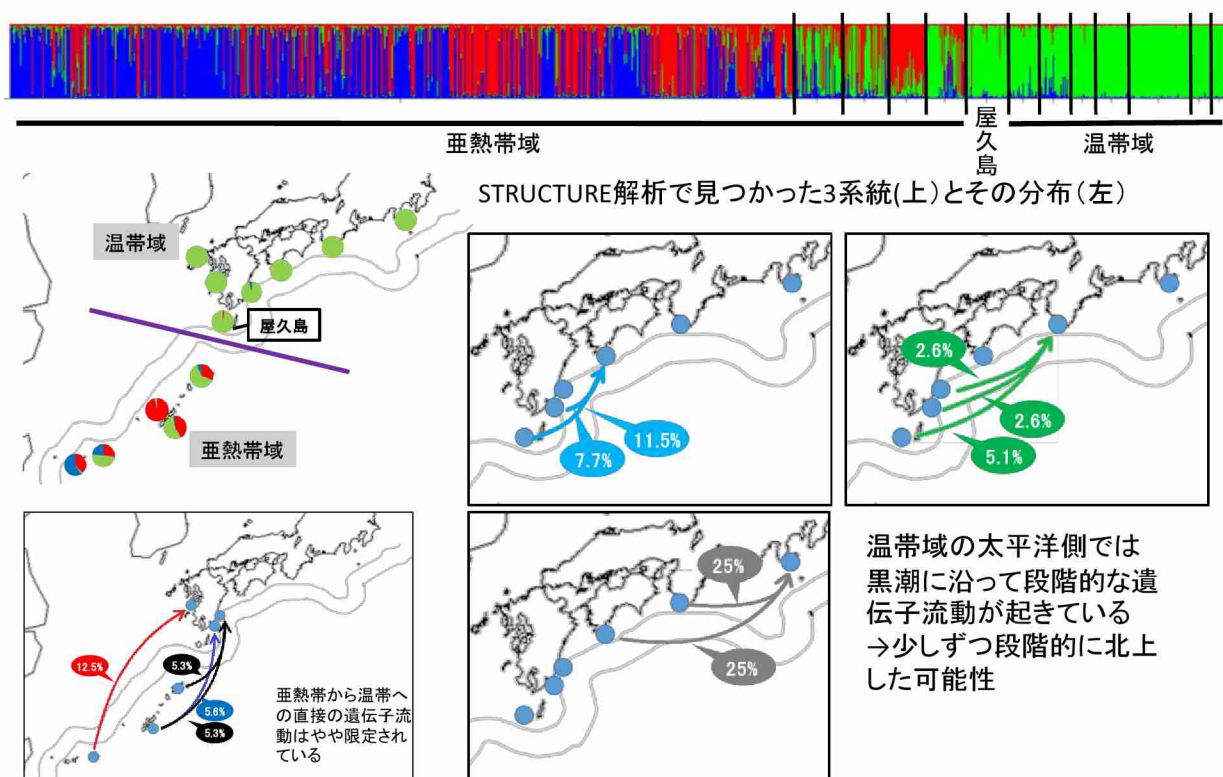


図2 日本国内におけるクシハダミドリイシの3つの隠蔽系統の分布（上、左上）。と遺伝子流動解析結果（下4つの四角枠内）。上では核の8遺伝子座を用いてSTRUCTUREでクラスタリング解析を行った結果で、横軸が各個体、縦軸が3つの異なる遺伝系統のうちどの遺伝系統を祖先として持つかが異なる色の割合によって示されている。下の地図は3系統の各海域における組成を示す。

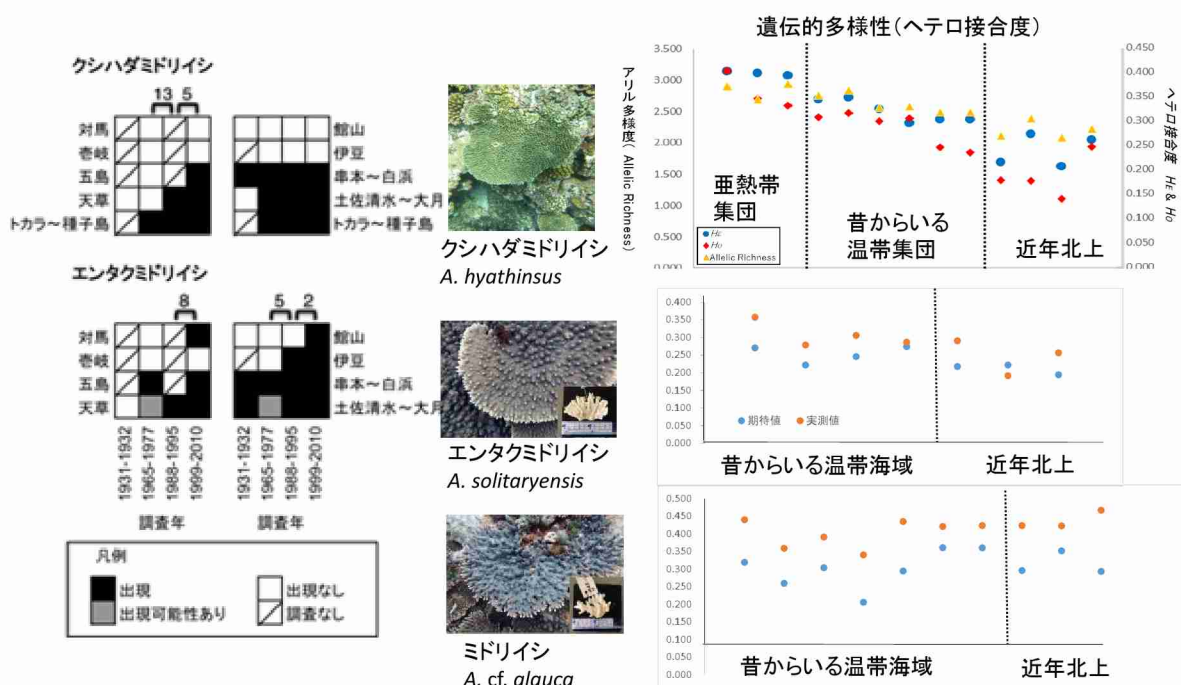


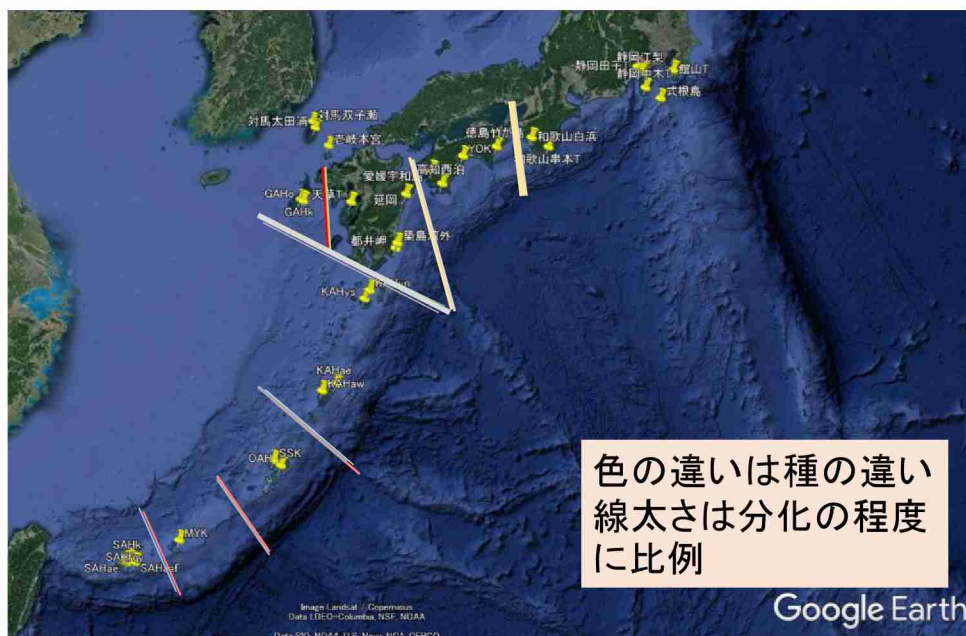
図3 クシハダミドリイシの遺伝的多様性は北限に近づくほど低下傾向にあり、近年北上した集団では最も低いため、これらは環境変化に対する脆弱性を秘めている可能性がある。一方エンタクミドリイシでは最北限の集団のみが低く、ミドリイシではどの集団も高い遺伝的多様性が維持されていた。

アオサンゴ類では、隠蔽種間で産卵期が異なっており(谷中ら2018業績4)、高水温を好む隠蔽種では分布が沖縄本島に限られている一方、比較的低温を好む種では北上している可能性が示された。どちらの種も強い遺伝構造を持っていて幼生分散が制限されていると考えられたが、遺伝的多様性は北限域にかけて小さくなる傾向は見られなかった。ハナガササンゴ類は新規に8本のマイクロサテライトマーカー開発に成功し、遺伝的多様性やクローン構造、種の境界などを調べるためのツールを作成できた。形態識別を行ったサンプルで解析したところ、従来の種の境界と全く関わりのない遺伝構造を持つことが分かり、今後さらなる種境界の精査が必要になると考えられた。

c) 統計モデルに向けた遺伝解析情報のまとめ：隠蔽系統の種数と境界・遺伝分化係数・遺伝的多様性・アレル多様度・プライベートアレル数から見た相対的な海域重要度

以上で得られた遺伝子関連データを統計モデルに入れるべく、EBSAの基準の“1.唯一性、又は希少性”については、プライベートな対立遺伝子を持つ個体の数、“4.脆弱性・感受性・低回復性”に関しては、各集団のクローン率、“6. 生物学的多様性”に関しては、遺伝解析で発見した隠蔽種数および生物多様性の基盤アレル多様性を適応し、3段階の振り分けをした。これにより従来見えなかった、遺伝的な多様性や、集団の中に存在する脆弱性などを評価することに成功した。

また一方、4属10種のサンゴ類を総じて空間的な遺伝構造を明らかにした図-4。和歌山と四国の間、五島列島とそのほか、屋久島の南北、南西諸島の各島間で2種以上のサンゴ種の分化がみられたことから、線で区切られた海域間の1世代での幼生分散は限られると考えられる。そのため、個々の線で区切られた海域内に必ずひとつは海洋保護区を設置し、それぞれの海域でサンゴが再生産できる状態であることが重要であると考えられた。



* 2種以上で共通に有意な遺伝分化が見られた場所に線

図4 今回の4属10種（遺伝系統）の種内遺伝構造から見つかった遺伝的分化の大きい場所 海洋保護区を配置する際のユニットとして使える（ユニット内には自己再生できるだけの保護区が必要）

（2）北上生物における非中立遺伝子領域での適応可能性評価

日本周辺4地点及びアウトグループとしてフレンチポリネシアの5地域集団から採取されたオニヒトデ100個体中、十分なリード数が確認された96個体から取得されたRAD-seqデータを、オニヒトデのゲノム配列及びトランスクリプトームデータにマッピングして解析した。その結果、数千個以上のSNP遺伝

子座が絞り込まれた。そのうち、多くのSNP遺伝子座(DNA配列における1塩基多型)を共有する4地域集団(フレンチポリネシア、宮崎北限集団、沖縄、石垣)からの個体に絞って解析を進めた。多型が見られるbiallelicな遺伝子座(2種類のアリルしかない1塩基多型)のみを抽出すると、数百個のSNP遺伝子座が抽出された。これらSNP遺伝子座から、日本の4地域集団のうち、温帯集団である宮崎集団を含めるとハーディ・ワインバーグ平衡から逸脱するが、宮崎を除いた場合には、ハーディ・ワインバーグ平衡の逸脱($p < 0.001$)が見られなくなり自由交配していると考えられる遺伝子座の絞り込みを、PLINKを用いて行った。その結果、5個のSNP遺伝子座が絞り込まれた。絞り込まれたSNP遺伝子座を含む配列の近傍に見られた遺伝子のアノテーション情報を取得した結果、Apolipoprotein B-100と高い相同性を示す遺伝子などが含まれていた。PLINKによって絞り込まれた遺伝子座のうち、中立性が確認された数百個のSNP遺伝子座を用いて、Genalexによる分子集団遺伝学的解析を行った。その結果、フレンチポリネシアの集団は日本の集団とは遺伝的に分化している傾向が見られるが、1970年代以降に北上したと考えられる宮崎のオニヒトデ集団は、沖縄・石垣などの集団と遺伝的組成と酷似していた。この結果は、先行研究のマイクロサテライトマーカーやミトコンドリア遺伝子解析での解析結果と基本的には一致しており、中立な遺伝子座に絞ったRAD-seqによる解析の有効性が確認されているといえる。

アオサンゴで知られる2種、AタイプとBタイプの集団サンプルを用いて、アオサンゴのトランスクリプトームデータを活用したezRAD解析を行った。その結果、数千個のbiallelic SNP遺伝子座の絞り込みに成功した。また、得られたSNP情報を用いて系統解析及び2タイプ間での共有されている遺伝子型数の比較を行った結果、アオサンゴのAタイプとBタイプは遺伝的に明確に区別された。よって、アオサンゴのAタイプとBタイプは区別されること、2タイプ間での遺伝子流動は制限されていることが示された。また、A・Bタイプ間でそれぞれに固定されたSNP遺伝子座を探索した結果、数百個の遺伝子座が絞り込まれた。これらのSNPを含む配列を、アオサンゴのトランスクリプトームデータにマッピングしてアノテーション情報を取得した結果、生物時計に関わるCryochromeなどの、アオサンゴの2タイプの産卵期の違いなどの特徴と関連する可能性のあるSNP遺伝子座候補を複数絞り込むことに成功した。

オーストラリアのハイマツミドリイシを対象に報告されている、環境要因と相関が見られるSNP遺伝子座を対象としたマーカーを開発するために、日本に多く見られるミドリイシ属サンゴのゲノム情報から、対象とするSNPを含む遺伝子配列情報からエキソ領域を絞り込んで、あらたに遺伝子マーカーとして使えるプライマーセットを作成した。開発されたプライマーセットを用いて、コユビミドリイシ・クシハダミドリイシ類を対象に適用した結果、SNPマーカーC29226S281に関しては、対象とするSNPの遺伝子型決定が簡便に行えるようになった。開発されたSNPマーカーを用いて、南北広範囲に渡ってサンプリングされたクシハダミドリイシ類の集団サンプルの遺伝子型決定を行った結果、地域間で遺伝子型組成に変異が見られた。一方で、琉球列島全域から採取されたコユビミドリイシの集団サンプルを対象に、同じマーカーで遺伝子型決定を行った結果、全て同じ遺伝子型のみが検出され、地理的変異は見られなかった。ハナヤサイサンゴに関しては、オーストラリアでの先行研究において、温度や水質と相関のあるSNPマーカーが報告されている。そこで、既存のハナヤサイサンゴのデータベースを探索し、SNPマーカーContig_24に関しては、対象とするSNPの遺伝子型決定が簡便に行えるように遺伝子マーカーを新規開発した。Contig_24を対象に、八重山、奄美大島、高知から採集されたハナヤサイサンゴ類のサンプルを用いて遺伝子型決定を行った結果、琉球列島側で遺伝子型組成の地理的変異が見られた。上記で得られたミドリイシ属サンゴ、ハナヤサイサンゴ類を対象に、褐虫藻遺伝子型決定でよく用いられている核のITS2領域によるメタバーコーディング解析を行った結果、日本周辺にはクレードCの遺伝子型が卓越していることが明らかとなった。クレードCのサブタイプ組成に着目すると、一部地理的変異が見られはするものの、基本的にはほぼ均一な遺伝子型組成であることが示唆された。

上記の中で得られたデータのうち、比較的多くのSNP遺伝子座データが取得されたクシハダミドリイシ類について、緯度に沿った水温等に関連する適応遺伝子の頻度勾配を、温暖化後の集団適応度としてEBSAの基準の(4)の脆弱性・感受性・低回復性の項目に適応させるためのデータセットを構築した。

(3) 統計モデリングによる北上生物の空間分布推定

a) 生物の分布と量の推定のための情報の収集とモデルの作成。

サンゴ類の分布について、クシハダミドリイシ類326地点、エンタクミドリイシ159地点の分布データが作成された。これらのデータを用いて、サンゴの分布と量の推定を行った結果、潜在分布域の検討では、エンタクミドリイシ、クシハダミドリイシ類ともに冬季最低水温の寄与が40%以上のモデルが作成され、北上は30km程度が2050年の気象で起こりうることを示した。また、サンゴ礁面積についても冬季の海水温を変数として現在の面積との相関係数が0.63のモデルが作成され、海水温上昇による潜在的な増加を推定できた。さらにオニヒトデについては36地点についての1945年以前からの時系列の大量発生・不在データを、既存のデータベース、各種文献および現地調査の記録から収集でき、時系列的に分布と大量発生の北上傾向を示した。オニヒトデの発生の予測については水温のアノマリーが16%の寄与した一方で、大量発生に対しては、56%の寄与が見られた。しかし、オニヒトデの分布と大量発生の分布拡大または同調範囲を検討した結果、100km以上の離れた海域にオニヒトデが成熟するまでの2-3年間で大量発生が伝播することがわかり、一度大量発生した海域から別の海域に大量発生が広がる2次的大量発生が100km程度の範囲で頻繁に起きる可能性が示された。さらに、頻度はやや低いものの300km程度離れた海域にも2次的大量発生が起こりうることも示された。

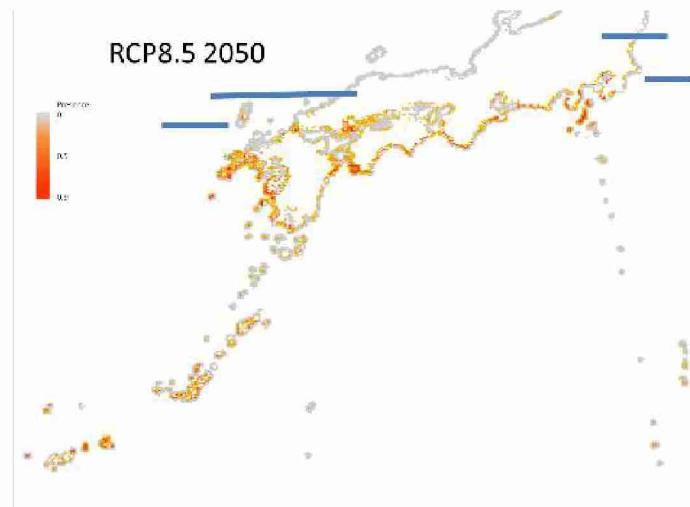


図5、エンタクミドリイシについての、分布推定モデルの結果の表示。南側の線は現在の分布ポテンシャルの北限、北側の線は将来のポテンシャルの北限を示す。

b) 海流による連結性および遺伝的流動に基づく個体群の連続性の検討

遺伝的距離と海流による分散頻度を比較した結果、種子島・屋久島と九州本土との間の亜熱帯と温帯の境界に分散の障壁があることが示された。しかし、そのほかの沖縄から本州にかけての遺伝的な差は必ずしも海流分散と対応しておらず、遺伝子解析の結果が、より長い時間の蓄積によるものであり、海水流動計算結果よりも過去の歴史を反映していることが考えられた。そのため、生態学的時間スケールでの幼生分散における海域の重要性の評価のため、海流による連結性をネットワーク解析における中心性等で比較することにより、各海域の幼生分散拠点としての重要性の評価を行ない、EBSAの指標に反映した。

c) 遺伝情報と流動および将来変化を考慮した保全上重要な地域の指標の検討。

遺伝的データおよび将来変化を考慮したEBSAの指標を検討し、それに基づき保全優先度を検討した。EBSAの各基準については、主に本課題で抽出した以下の指標が適切であると考えられた。基準1) 唯一性、又は希少性（固有種など）：ユニークアリル（プライベートアリル）数、基準2) 生活史における重要性（産卵場など）：海流による連結性の中心、基準3) 絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地：絶滅危惧種とされるサンゴの生息域数、基準4) 脆弱性・感受性・低回復性：クローン率および環境適応遺伝子の有無、基準5) 生物学的生産性：現在および将来のサンゴ面積、基準6) 生物学的多様性：

隠ぺい種数、アリル多様性、基準7) 自然性：1次メッシュ内の自然海岸率。
これらの基準の分布を比較した結果、熱帯域を含めた検討では温帯域の重要海域を認識することは難しかったが、温帯域のみで検討することで温帯域の中での相対的な重要性が明らかになった。

1. 唯一性、又は希少性

プライベートアリル(遺伝子)の存在 S1

2. 生活史における重要性

海流連結の中心性が高い海域 S3

3. 絶滅危惧種の生育・生息地

絶滅危惧種の分布域

4. 脆弱性・感受性・低回復性

クローン率、環境適応遺伝子 S1,2

5. 生物学的生産性

サンゴ面積 S3

現在
将来

6. 生物学的多様性

遺伝解析で発見した隠蔽種数 S1

生物多様性の基盤アリル多様性 S1

7. 自然性

自然海岸率

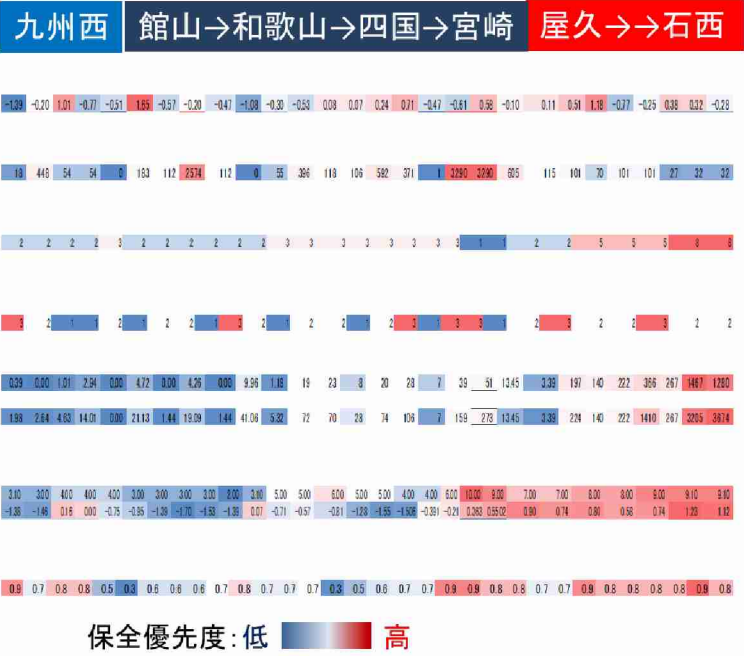


図6本研究において遺伝子解析・海水流動解析・サンゴ面積予測の結果をEBSAの基準にどのように当てはめたかを示したものの。左がEBSAの7の基準で、右が実際に計算した優先度を示す

d) 将来の分布域、および重要な地域の実地保護区や自然再生の取り組みとの一致とギャップの検討。

本研究によって得られた、サンゴ礁にとっての重要海域の結果を現在の保護区と比較した結果、国立公園・国定公園とサンゴ礁との一致性から、現在サンゴは普通地域で多くカバーされており、海域公園での保護は多くの場所で1割程度であることが分かった。特に保護区によるカバー率が低い千葉県や静岡県は、今後、サンゴ礁が増えて保護のギャップが広がる可能性が高い。また、上記の保全優先度の結果から、重要度が高い地域であったが保護割合が低い県に高知、和歌山、長崎、宮崎が指摘できた。

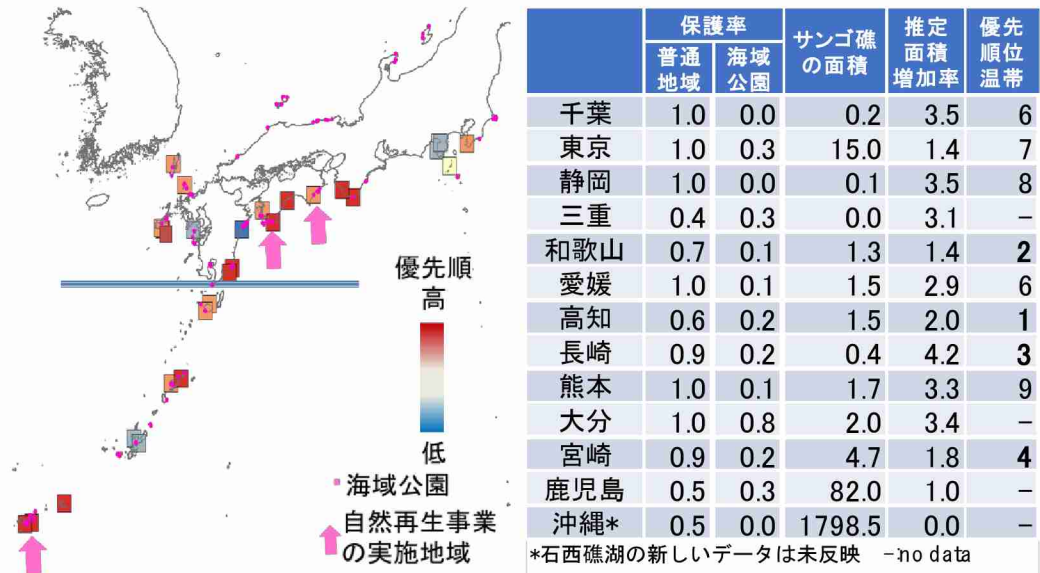


図7 保全優先度（線を境に温帯、熱帯について別に評価した高評価基準数の図を重ねた）と海域公園、自然再生の重ね合わせ（左）、保護区カバー率（保護率）、サンゴ礁分布面積、サンゴ礁の増加率、都道府県で平均した優先度の順位の比較（右）。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- 1) 海流モデルと遺伝データにより、亜熱帯と温帯の間・および亜熱帯集団間の幼生分散は従来想定されていたよりも小さく、亜熱帯から温帯への1世代の幼生分散による北上は限られており、数世代に渡って飛び石的におきるであろうことが新たに分かった。海流構造と遺伝データの両方から統合的に黒潮に沿った幼生分散の可能性を調べた研究としては初めてのことであり、今後、造礁サンゴに限らず、日本沿岸の海洋生物の移動・分散を考える上で重要な知見が得られた。
- 2) 新規遺伝子マーカー開発に成功しただけではなく、4属のサンゴの集団遺伝解析により、複数サンゴ（絶滅危惧種を含む）の隠蔽種の存在とその分布を明らかにすることに成功した。従来気がついていなかった隠蔽種を発見ないし、再確認できたことで生物多様性を正しく評価するための基礎知見が得られたとともに、サンゴ礁生物の種分化や各隠蔽種内での分布拡大が温暖化とともにどのように生じてきたのかという生態学的・進化学的な発見をするための新たな知見が得られた。
- 3) これまで、北上して新規にできたサンゴ集団を集団遺伝解析した前例がなく、実際に亜熱帯から温帯域、最北限の新規集団に行くに従って遺伝的多様性が他よりも低くなっていることを示せたことは科学的な意味が大きい。新規集団を含めると集団遺伝学的な平衡状態に達していないために、地理的距離と遺伝的距離の関係が崩れるが、新規集団を除くと地理的距離と遺伝的距離の間に相関が見られることも、集団遺伝学的に非常に興味深い結果である。
- 4) 本研究で得られたような、日本沿岸域のサンゴ礁生物を対象としたゲノムワイドレベルでの遺伝的多型データを基にした解析はほとんど例がなく、新規性が高い。特に環境要因と関連のある遺伝的変異のサンゴ集団での解析は初であり、大きな意義がある。今後、サンゴ礁生物に加えて、日本沿岸域の海洋生態系における海洋生物の遺伝的多型データ解析を実施していく上での模範としても、波及効果が高い。
- 5) 本研究でアオサンゴやクシハダミドリイシなどの新たな北上集団を発見できたと共に、オニヒトデの過去100年の文献調査を行い、オニヒトデ自身も北上してきていることが分かった。また、温暖化とともに温帯域での大量発生も確実に増えて規模を増していることを明らかにできた。このようなサンゴおよびサンゴ礁キーストーン種について温暖化による影響を直接的に明示できたことは、温暖化進行に際し、サンゴ礁生態系全体の維持・保全を考える上でも意義が大きい。

(2) 環境政策への貢献

- 1) 絶滅危惧種である造礁サンゴに関して、遺伝子によりさらなる隠蔽種を発見、リストを改良するための重要知見を得た。具体的には、ヒメエダミドリイシは想定外の四国を中心に東西に大きく遺伝クレードが見つかり、形態での識別は困難でありながらも遺伝系統としては異なるものが存在していた。別種であるかどうかのさらなる検証は必要なものの、いずれにしても進化系統の大きく異なる集団であるため、遺伝的多様性保全の観点からも、個々に保全する必要があることが分かった。
- 2) 愛知目標を達成するための科学的基礎知見となる、海流構造や遺伝構造を踏まえた幼生分散ネットワークに基づく保全優先度の高いEBSA海域、特にこれまで注目されていなかった温帯域の重要海域の提示することができた。特に、温帯域では一部のサンゴ種にとっての避難所となることが示され、遺伝データと統計モデルの統合により、温帯域を含む各海域のEBSAの基準に照らし合わせた相対的な重要性を明らかにできることが分かった。具体的には、これまでサンゴ保全のうえで軽視されていた温帯サンゴ群集のうち、高知、和歌山、長崎、宮崎の順に保全の優先度が高かった。また、千葉や静岡などの海域は温暖化により増えるものの、保護区とのカバー率のギャップが大きく、今後海洋保護区を拡大していくと良い海域であることが分かった。
- 3) これまでになかった遺伝子解析・海流モデル・生物分布推定モデルによる将来変化の情報を加味した統合的な重要海域の指標により、保全の優先度を提示することが出来た。特に重要海域の選定が遅れている海洋生態系において、これまで不足していた海洋保護区設に定際し、科学的根拠に基づく配置

のための情報を提供できた。

- 4) 日本国内のオニヒトデが2次的大量発生によって拡散していることは以前から遺伝解析や海流モデルで指摘されてはいたものの、幼生分散量が大きすぎるために遺伝子解析ではどの集団もほぼ均一の組成となってしまう、どの程度の距離を拡散しているかは分からなかった。本研究で日本国内全域にわたる、過去100年近くの文献調査をあつめ、統計解析を行うことで、約100km程度の空間範囲で2次的大量発生が頻繁に起きる可能性があることが分かった。またそれよりは頻度が少ないものの、300km程度でも2次大量発生が起これることもわかった。オニヒトデの大量発生は、しばしば駆除費用がついたときには後手に回ってしまうことが多い。本研究で得た知見は、一度大量発生が生じたときに、海流情報などで2次大量発生が生じる空間範囲や海域を絞り込み、モニタリングを強めたり予測したり、オニヒトデ対策の初動を早めることに役立つと考えられる。

<行政が既に活用した成果>

- 1) IPBES Deliverable 2(b)Regional/subregional assessments on biodiversity and ecosystem services, Asia-Pacific regional assessmentのLead Authorとして本研究において収集した情報に基づき、サンゴ礁に関するアセスメントの文章の節や引用資料作成等に貢献した。文書は2018年3月のIPBESにおいて内部公表された。
- 2) AP-BONの委員としてAP-BONの会合において、本課題で収集した情報を含めた発表を行い、AP-Marine BONの可能性についてや、今後の方針についての、議論を行うことで貢献した。議論を踏まえて2018年のGEOSSにおける提案文書の案を作成中である。
- 3) 本課題で収集した情報および特にサンゴ礁の面積の推定結果について、環境省推進費S15においてサンゴ礁の変化の簡易的な変化として利用者の将来変化の推定などに活用された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) レッドデータリストを作成する際のサンゴ類の絶滅危惧種選定における科学的裏づけを与えた。特にすでに絶滅危惧種として扱われているヒメエダミドリイシ*Acropora pruinosa*は四国を境に東西で、異なる隠蔽種の可能性もあることが明らかになったため、両方の遺伝系統を保全していく必要があることが分かった。また当該種が野外において大きな集団を形成している場合においてもほとんどがクローンで出来ていることが本研究により新たにわかった。すなわち、一度の環境変化で地域絶滅しやすいことを科学的に裏付けた（実際、ヒメエダミドリイシは宮崎など一部の海域で過去に地域絶滅しており、温暖化が起きている過去100年に全く分布拡大等が見られていない）。この絶滅危惧種の詳細な生態と遺伝的多様性に関する新たな知見は、生物多様性条約第10回締結国会議（CBD・COP10）生物多様性国家戦略（2012）で掲げられた愛知目標12 「2020年までに、既知の絶滅危惧種の絶滅が防止され、また、それらのうち、特に最も減少している種に対する保全状況の改善が達成、維持される。」という目標達成に貢献する科学的知見である。
- 2) これまで温暖化に際して避難所を保全していくという考え方は科学論文では提唱されていたものの、実際に避難所としての機能を遺伝的・海洋物理学的な統合的視点により科学的に示した例はほとんどない。Keppel et al. (2012)²⁰⁾によると、“レフュージア（避難所）とは、生物多様性の一部が逃げ込むことができ、集団を維持することができて、温暖化等で環境が変わったとしても広がっていくことができそうであるために、環境変動下でも種の保全に役立つ海域”とされる。本研究により、亜熱帯にいる全てのサンゴ礁種について温帯域を避難所として保全することはできないため、依然石西礁湖などの亜熱帯サンゴ礁海域が遺伝的多様性の観点からも重要であることは示しながらも、一部のサンゴ種では温帯域のうち、100年以上前から存在していて十分に高い遺伝的多様性を維持している海域が避難所として十分に機能しうることを示した。具体的には、宮崎から四国、和歌山までの海域はサンゴが亜熱帯から稀な幼生分散によって逃げ込むことが出来て、かつそれぞれが十分に高い遺伝的多様性をもって安定しており、今後も温暖化による分布拡大が見込まれる海域であることが証明できた。そのため、これまで軽視されてきていた温帯域のサンゴを保全する意義(温帯

域の海洋保護区の保全の一部に入れ込む必然性)に関する科学的裏づけを提供することが出来た。特に温帯域の中では、五島、宮崎、横浪、和歌山はEBSAの基準と照らし合わせても保全優先度が高い海域であることがわかった。これらは、戦略目標Eの愛知目標19「2020年までに、生物多様性、その価値や機能、その現状や傾向、その損失の結果に関連する知識、科学的基盤及び技術が向上し、広く共有され、移転され、適用される。」ことに貢献するとともに、戦略目標C「生態系、種及び遺伝子の多様性を保護することにより、生物多様性の状況を改善する」を達成するために重要な知見である。

- 3) 本研究により、4属10種のサンゴの遺伝構造をもとに琉球列島から本州・九州までの日本全国にわたるサンゴ海域全体のコネクティビティを調べた。それにより、個々に独立して保全管理することで有効であると考えられる海域の区分（保全管理ユニット）を明らかにした(図(1)–3)。これに加え、遺伝的な孤立性の高い場所の同定とその海域の遺伝的多様性や唯一性を求めることで、従来わからなかった遺伝的多様性やコネクティビティを踏まえた上での海域の相対的重要度も示すことができた。さらに、個々の海域内におけるサンゴ産卵期における海流構造からソースシンクの関係も明らかにした。これらを全て踏まえた上で、これまでサンゴ保全のうえで軽視されていた温帯サンゴ群集のうち、高知、和歌山、長崎、宮崎は、この順番に保全の優先度が高かった。また、千葉や静岡などの海域は温暖化により増えるものの、保護区とのカバー率のギャップが大きいく、今後海洋保護区を拡大していくと良い海域であることが分かった。以上の知見は、愛知目標11「沿岸域の重要海域10%を効果的均平に管理・保全してネットワーク化する」ために不可欠な知見であり、海洋保護区を増やす際に重要な情報であるといえる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) H Yuasa, Y Higashimura, K Nomura, **N Yasuda***: Bulletin of Marine Science, 93, 4:1009-1010 (2017)
Diet of *Acanthaster brevispinus*, sibling species of the coral-eating crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* sensu lato.
- 2). A Nakabayashi, T Matsumoto, YF Kitano, S Nagai, **N Yasuda***: Galaxea, Journal of Coral Reef Studies. 18, 1-2 (2017).
Discovery of the northernmost habitat of the blue coral *Heliopora coerulea*: possible range expansion due to climate change?
- 3). **N Yasuda***. Coral reef studies in Japan, A Iguchi and C Hongo eds. Springer Book 2018.
Distribution expansion and historical population outbreak patterns of crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci* sensu lato, in Japan from 1912 to 2015
- 4) 谷中純貴*, 波利井佐紀, 香川浩彦, 上野光弘, 北野裕子, 斎藤佑太, 長井敏, **安田仁奈*** 日本サンゴ礁学会誌 (受理済み) 石西礁湖周辺における遺伝的に異なる2タイプのアオサンゴ *Heliopora coerulea* (Pallas, 1766) の生殖時期推定

上記に加え現在3報が現在リバイス中。

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) **T Yamakita**, 2018. Cultural ecosystem services of temperate coastal areas of Japan: Uses of tidal flats, sandy beaches, and rocky/coral areas. 8th Asian Wetland Symposium 2017 Proceedings, p.290-293.(査読なし)

(2) 主な口頭発表(学会等) 太字は研究協力者、下線はサブテーマ分担者

平成30年度(発表が受理決定しているものを含む)

- 0) Akifumi Shimura, **Hiroaki Aizawa**, **Takashi Nakamura**, **Takehisa Yamakita**, **Yuko F. Kitano**, **Akira**

Iguchi, Hiroya Yamano, Masato Kiyomoto, Satoshi Nagai, and **Nina Yasuda**, 4th Asia Pacific Coral Reef Symposium), Cebu, Philippines, Jun 4-8 2018 (accepted)
Population Genetic Structure of *Acropora solitaryensis* and *A. cf. glauca*, Including the Northernmost Colonies Settled Recently 【予定】

- 1) **Nina Yasuda** Genetic connectivity and speciation of coral reef benthos. Academia Sinica, Apr 26th 2018. Academia Sinica, Taiwan. **Invited talk** 招待講演

平成29年度

- 2) Hiroki Taninaka, Saki Harii, Mitsuhiro Ueno, **Yuko F Kitano**, Yuta Saito, Satoshi Nagai, **Nina Yasuda**, Different reproductive timing as a cause of cryptic speciation of blue coral (*Heliopora coerulea*, Pallas 1766) with limited larval dispersal potential, European Coral Reef Symposium, Dec.13rd - Dec.15th 2017, Oxford University, England, Oxford, Poster
- 3) **Nina Yasuda**, Yukihiro Higashimura, Coralie Taquet, Satoshi Nagai, Handoko Adi Susanto, Miguel Fortes, Suharsono, Niphoon Phongsuwan, Kazuo Nadaoka, Yoshihisa Suyama, Chika Mitsuyuki, Hideaki Yuasa, Genomic Consequences of the Indo-Pacific Vicariance in Coral Reef benthic organisms, Gert Wörhde European Coral Reef Symposium, Dec 15th 2017, Oxford University, Oxford, England, Oral
- 3) **安田仁奈**, サンゴ礁無脊椎動物の初期生態と集団進化に関する研究, 川口奨励賞受賞記念講演, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月25日, 東京, 東京工業大学
- 4) 谷中絢貴, Zoe Richards, 陶山佳久, 満行知花, 菊地泰生, 吉田朱美, 湯浅英知, **安田仁奈**, アオサンゴ集団ゲノム解析 ~ 黒潮流域と西オーストラリアの隠蔽系統比較, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-25日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 口頭発表
- 5) 志村晶史, 相澤浩明, 中村隆志, **山北剛久**, 北野裕子, **井口亮**, 山野博哉, **安田仁奈**, 温帯ミドリイシサンゴの集団遺伝解析 ~ 最新集団遺伝解析 MIG-seq によるアプローチ ~, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-25日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 口頭発表
- 6) 松田太樹, 北野裕子, **井口亮**, **山北剛久**, **安田仁奈**, 環境グラディエントマーカーを用いたハナヤサイサンゴの集団遺伝解析, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-25日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, ポスター発表
- 7) 相澤浩明, 中村隆志, **安田仁奈**, **山北剛久**, 低緯度~高緯度にわたる広域に適用可能なクシハダミドリイシの一斉産卵日予測のための有効積算水温の再検討, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-26日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 口頭発表
- 8) 野口七海, Frederic Sinniger, 波利井佐紀, 長井敏, 上野光弘, **安田仁奈**, 八重山諸島周辺における稚サンゴを含むトゲサンゴの遺伝構造, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-26日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, ポスター発表
- 9) Sota Ishizu, Hironobu Fukami, Hiroyuki Yokochi, **Nina Yasuda**, Hironobu Fukami, Molecular study of the temperate coral *Acropora pruinosa* in Japan, The Third Asia Marine Biology Symposium, Nov. 3rd to Nov. 5th 2017, Prefectural University of Kumamoto, Japan, Kumamoto Prefecture, Poster
- 10) **安田仁奈**, 造礁サンゴの遺伝学的解析による種分化とコネクティビティ解析, JpGU-AGU Joint Meeting 2017, 2017年5月20日-25日, 千葉県 幕張メッセ国際会議場, 国際展示場, 招待講演
- 11) **T Yamakita** (2017) From biodiversity prediction to ecosystem service evaluation: Marine case studies in Japan, The 9th GEOSS Asia-Pacific Symposium, Tokyo, Japan.

平成28年度

- 1) 志村晶史, 中林朗, Frederic Sinniger, **井口亮**, 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 深見裕伸, 山野博哉, **安田仁奈**, ミドリイシサンゴ属におけるマイクロサテライトマーカーを用いた集団解析, 第64回日本生態学会大会, 2017年3月14日-18日, 早稲田大学 早稲田キャンパス, ポスター発表
- 2) **Yuko F. Kitano**, **Akira Iguchi**, Mitsuhiro Ueno, Satoshi Nagai, **Nina Yasuda** Species and genotype

distribution of Pocillopora damicornis-like coral across subtropical to temperate region in Japan.

13th International Conference of Coral Reefs、2016年6月23日、ハワイ、アメリカ

- 3) Nina Yasuda, Takehisa Yamakita, Akiara Iguchi, Eiji Yamakawa, Ken Okaji Distribution and patterns of population outbreak of crown of thorns starfish in Japan over 100 years in association with global warming and larval dispersal 13th International Conference of Coral Reefs、2016年6月24日、ハワイ、アメリカ
- 4) Aki Nakabayashi, Akira Iguchi, Soyoka Muko, Satoshi Nagai, Mitsuhiro Ueno, Takehisa Yamakita, Yuko Kitano, Yumi Yamamoto, Nina Yasuda. Distribution and Gene Flow Analysis of sibling coral species, *Acropora hyacinthus* and *Acropora spicifera* in the north peripheral region. 14–19 November, 2016. Joint Events of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan. Okinawa, Japan.
- 5) 志村晶史, 中林朗, Frederic Sinniger, 井口亮, 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 深見裕伸, 山野博哉, 安田仁奈, 北上が報告されているミドリイシサンゴ属における遺伝クレード解析, 第19回大会日本サンゴ礁学会, 2016年12月1日 - 4日, 沖縄タイムスビル
- 6) 山北剛久 IPBESとそこで活用される生物多様性情報, GBIFワークショップ2016年12月3日(土) 国立科学博物館 上野
- 7) 山北剛久 受け手に着目した沿岸生態系サービスの変遷: 潮干狩り, 海水浴, ダイビング, 第22回野生生物と社会学会大会. 2016年11月5日東京農工大学農学部・農学府府中キャンパス
- 8) Takehisa Yamakita, Nina Yasuda, Masahiro Tsujino, Naoki Kumagai, Hiroya Yamano (2016) Gap between future distribution of corals and marine use / Spatial planning around Japanese archipelago, 13th international Coral Reef Symposium 2016年6月24日、ハワイ、アメリカ

平成27年度

- 1) 安田仁奈, 長井敏, 山川英治, 岡地賢. オニヒトデの遺伝子流動とconnectivity推定. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス(東京) 口頭発表
- 2) 齊藤佑太, 長井敏, 灘岡和夫, 波利井佐紀, 上野光弘, 北野裕子, 安田仁奈. 石西礁湖周辺海域におけるアオサンゴ2種の遺伝構造の比較. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス(東京)
- 3) 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 安田仁奈. 八重山におけるハナヤサイサンゴ属の分布. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス(東京)
- 4) 野口七海, 北野裕子, 上野光弘, 鈴木豪, 長井敏, 安田仁奈. 石西礁湖周辺海域における着定稚サンゴの種組成と遺伝子型分布. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス(東京)
- 5) 中林朗, 井口亮, 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 安田仁奈. 黒潮流域におけるクシハダミドリイシおよびナンヨウミドリイシの遺伝子流動解析. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス(東京)
- 6) 中村隆志, Lawrence Patrick C. BERNARDO, 天野慎也, 渡邊敦, Ratino SITH, 草世香, 福岡弘紀, 鈴木豪, 安田仁奈, 長井敏, 灘岡和夫. オニヒトデの生活史のモデル化と発生予測の試み. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス(東京)

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 安田仁奈 大量発生するオニヒトデの生態 海を拓く 一般市民講座 2015年9月7日, 南延岡 口頭発表
- 2) 安田仁奈 サンゴ礁生態系の不思議～大量発生するオニヒトデの謎2015年10月・東急ハンズ渋谷店 ハンズカフェ(東京渋谷) 一般向け講演
- 3) 安田仁奈 シンポジウム「身近な海が温まったらどうなるの? 魚は? サンゴは?」 2016年3月12日

TKP品川カンファレンスセンター カンファレンスルーム5C 品川 一般向け講演

4) 安田仁奈 オニヒトデ総合対策事業シンポジウム オニヒトデ大量発生メカニズムとその対策

2017年11月5日 沖縄県立博物館・美術館 沖縄 一般向け講演

5) 安田仁奈 沖縄におけるサンゴ礁について 私立桐蔭学園高等学校 2017年11月21日 神奈川 高校生130人対象

(5) マスコミ等への公表・報道等

1) 平成28年8月23日 毎日新聞 夕刊 2頁 「サンゴの恵み 保全・啓発を」 温帯域のサンゴやオニヒトデについて紹介

2) 地球温暖化番組【宮崎のサンゴ2】 環境省「地球温暖化番組#7」【サンゴの危機】120”

【テレビ宮崎】No1 宮崎のサンゴの温暖化への影響とオニヒトデの大量発生について紹介 2017年1月17日に取材

3) 平成29年3月15日毎日新聞 3月15日(木) [宮崎のサンゴに関心を！]

(6) その他

1) 優秀ポスター賞 安田仁奈

九州・沖縄女性研究者支援シンポジウム「サンゴ礁生態系の初期生態と保全に関する研究」

平成27年9月11日 鹿児島大学

2) 川口奨励賞受賞 (日本サンゴ礁学会) 安田仁奈

サンゴ礁無脊椎動物の初期生態と集団進化に関する研究

2017年11月25日, 東京, 東京工業大学

3) **A full student travel award (Asia Pacific Coral Reef Symposium) Akifumi Shimura, Hiroaki Aizawa, Takashi Nakamura, Takehisa Yamakita, Yuko F. Kitano, Akira Iguchi, Hiroya Yamano, Masato Kiyomoto, Satoshi Nagai, and Nina Yasuda**

Population Genetic Structure of *Acropora solitaria* and *A. cf. glauca*, Including the Northernmost Colonies Settled Recently

7. 研究者略歴

研究代表者

安田 仁奈

早稲田大学理工学部応用科学科卒業、東京工業大学情報理工学研究科情報環境学専攻修了。学術博士。日本学術振興会特別研究員DC, PDを経て宮崎大学農学部海洋生物環境学科助教を経て、現在、宮崎大学テニユアトラック推進機構 准教授

研究分担者

1) 井口 亮

京都大学総合人間学部卒業、James Cook UniversityでPhDを取得、沖縄工業高等専門学校 生物資源工学科助教を経て、現在、産業技術総合研究所 主任研究員。

2) 山北 剛久

千葉大学理学部卒業、千葉大学大学院理学研究科地球生命圏科学専攻博士後期課程修了。理学博士、森林総合研究所 非常勤研究員、東京大学特任研究員などを経て、現在、海洋研究開発機構 研究員。

II. 成果の詳細

II-1 中立遺伝子を用いた北上生物の遺伝子流動解析

国立大学法人 宮崎大学

テニユアトラック推進機構

安田 仁奈

平成27～29年度累計予算額：23,020千円（うち平成29年度：7,941千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

近年の温暖化に伴い、沿岸生態系において特にサンゴ礁生物が北上している。北上したサンゴ数種は熱帯域では高水温による白化で大量斃死することにより絶滅危惧種に登録された経緯がある。一方海水温の低い、高緯度温帯海域はサンゴのレフュージア(避難場所)として機能する可能性もある。今後の沿岸生態系保全を考える際には、亜熱帯海域から温帯域にかけて広域幼生分散量を推定し、北上集団の遺伝的安定性を明らかにする必要がある。しかし、これまで北上の直接的な原因であるサンゴ礁生物の生活史初期の幼生分散や北上集団の遺伝的多様性等、温帯域のサンゴがどれだけ避難所としての機能を持ちえるかについての知見が全くない。それどころかサンゴ類ではしばしば隠蔽系統が存在していて、そもその種の境界が不明瞭であり、正確な生物多様性の評価ができていない状況である。そこで本研究は、北上傾向にあるサンゴ礁生物(造礁サンゴ類4属)を南西諸島から温帯域にかけて採集し、適宜新規中立遺伝子マーカーを開発して集団遺伝解析を行い、隠蔽系統の解明と、各集団の遺伝的多様性の評価、集団間の遺伝子流動の推定を行った。まず、形態では識別のできない隠蔽種を、クシハダミドリイシ、ヒメエダミドリイシ、ハナヤサイサンゴ、アオサンゴについて発見した。これまで同一種であるかどうか議論されていたエンタクミドリイシとミドリイシの間にはっきりとした生殖隔離の証拠を核遺伝的からも得た。一方これまで形態から別種とみなされていたハナガササンゴ7種について新規作成したマイクロサテライトマーカーを用いたところ、形態種とは関連のない2系統にわかれることが分かった。概ね、亜熱帯から温帯域にかけて隠蔽種の種数は屋久島を境として一気に減少する傾向が分かった。次に、4属10種におけるこうした隠蔽系統内の集団遺伝構造について調べるべく、日本の亜熱帯域から温帯域にかけてマイクロサテライトマーカーおよびMIG-seq法を用いた中立遺伝子による集団遺伝解析を行った。環境変化に対する脆弱性の指標として各集団の遺伝的多様性を推定した結果、概ねミドリイシ類では亜熱帯で最も高く、もともと存在していた温帯域から北上集団にかけて徐々に遺伝的多様性が低くなることが分かった。例外的に昔から館山や対馬まで高緯度まで分布しているヒメエダミドリイシに関しては、クローン率、遺伝的多様性ともに最南端から最北限まで殆ど変化がなかった。種ごとに幼生分散の程度は異なっているものの、クシハダミドリイシ類を用いた各集団における個体の帰属推定の結果から、概して、温帯域では黒潮に沿って比較的近場の海域に段階的に幼生分散が起きていることが分かった。温帯種で大きな遺伝子流動が推定されたミドリイシやイボハダハナヤサイなどの一部の種を除いて異なる島間、海域間で幼生分散はある程度限られることが分かった。本研究により、屋久島以南の亜熱帯地域が依然として高い種多様性および遺伝的多様性を有していて温帯域のサンゴ群集のみでは完全に補完することはできない、重要なサンゴ群集であることが明らかになった。一方、本研究は、今まで軽視されてきた温帯域のサンゴ群集のうち、100年以上前から存在している集団は遺伝的多様性が比較的高く集団が安定していること、より北の集団の重要な幼生ソースとなっていること、さらなる温暖化にともなって集団が大きくなりやすく維持しやすいことなどから、亜熱帯域で絶滅の危機にある一部のサンゴの避難所として機能を有し、保全する価値があることを初めて示した。

[キーワード]

サンゴ、オニヒトデ、マイクロサテライト解析、種分化、集団遺伝解析

1. はじめに

近年の温暖化に伴い、沿岸生態系、特にサンゴ礁生物が北上・分布拡大していることが文献調査によりわかっている¹⁻³⁾。北上したサンゴ数種は熱帯域では高水温による白化が見られ、大量に斃死したことにより絶滅危惧種に登録された経緯がある。このような状況下、高緯度海域は高温白化による斃死の危険性は低く、サンゴにとってのレフュージア(避難場所)として機能している可能性もある¹⁾。一方、生物の分布境界に位置する集団は、脆弱性を秘めていることが知られ、北上は一過性の現象である可能性もある。今後の沿岸生態系保全を考える際には、南方海域からの幼生分散量を推定しどこが幼生のソース海域として重要であるのか、また、北上している温帯集団を含めた遺伝的な集団の安定性を明らかにすることで、今後の気候変動や環境変化に耐えうるかどうかを調べる必要がある。これまで、保全が重視されている亜熱帯海域ではサンゴの幼生分散や遺伝構造について数多くの研究がなされているものの、そもそも世界で温帯サンゴを含めた亜熱帯から温帯までの集団遺伝構造を調べた例は極めて少なく、日本国内では全くない状況である。さらに温暖化によって新たに分布拡大してきたサンゴ集団を集団遺伝解析した例は世界でも前例がない。温帯域に限らず、亜熱帯域を含めた日本のサンゴ海域全体の遺伝的多様性や幼生分散の推定をすることは、沿岸生態系を保全するための有効手段である海洋保護区をどこに設定するとよいかについての知見も与える。

一方、多くの造礁サンゴは形態による野外での種の識別が困難な上に、一部では種分化していからの時間が短く、異種間の交雑もしばしば起きているために種の同定が非常に難しい⁴⁾。そのため、まず、大量かつ広域から採集されたサンプルを用いて多遺伝子座による集団遺伝解析や系統地理解析することが種の境界を推定し、生物多様性を正確に評価していく上で欠かせない^{5,6)}。

2. 研究開発目的

本研究では、温帯域の優占種について4属のサンゴ類を対象に3点について明らかにする。

- a) より正確な生物多様性評価のためのサンゴ4属の種の境界の遺伝的推定
- b) 保全重要海域同定の基礎データを与えるための、分布の最北限や近年加入したことが分かっている集団を含む各集団の遺伝的多様性の評価
- c) 集団遺伝解析による集団間のコネクティビティの推定と温帯域がサンゴの避難所になるかの検討

上記により、日本国内のサンゴ海域の中でEBSAの基準に照らし合わせたときに、今後保全をしていく上で、特にどの海域が重要になるかを明らかにするための知見を与える。具体的には、隠蔽種数や遺伝的多様性(EBSAにおける生物学的多様性の豊かさの指標)やプライベートアリアル数(その集団しかもっていない遺伝子型のことで、EBSAにおける唯一性や希少性の指標)、無性生殖によるクローンの割合(EBSAにおける環境変化に対する脆弱性・感受性・低回復性の指標)を海域ごとに算出した。

また同時に、これまでほとんど注目されていなかった温帯域のサンゴ群集が十分な遺伝的多様性を保持しているのか、周辺の集団とコネクティビティを持っていて、温暖化にともなって失われつつあるサンゴの避難所としての役割を果たしえるのか、を明らかにする。

3. 研究開発方法

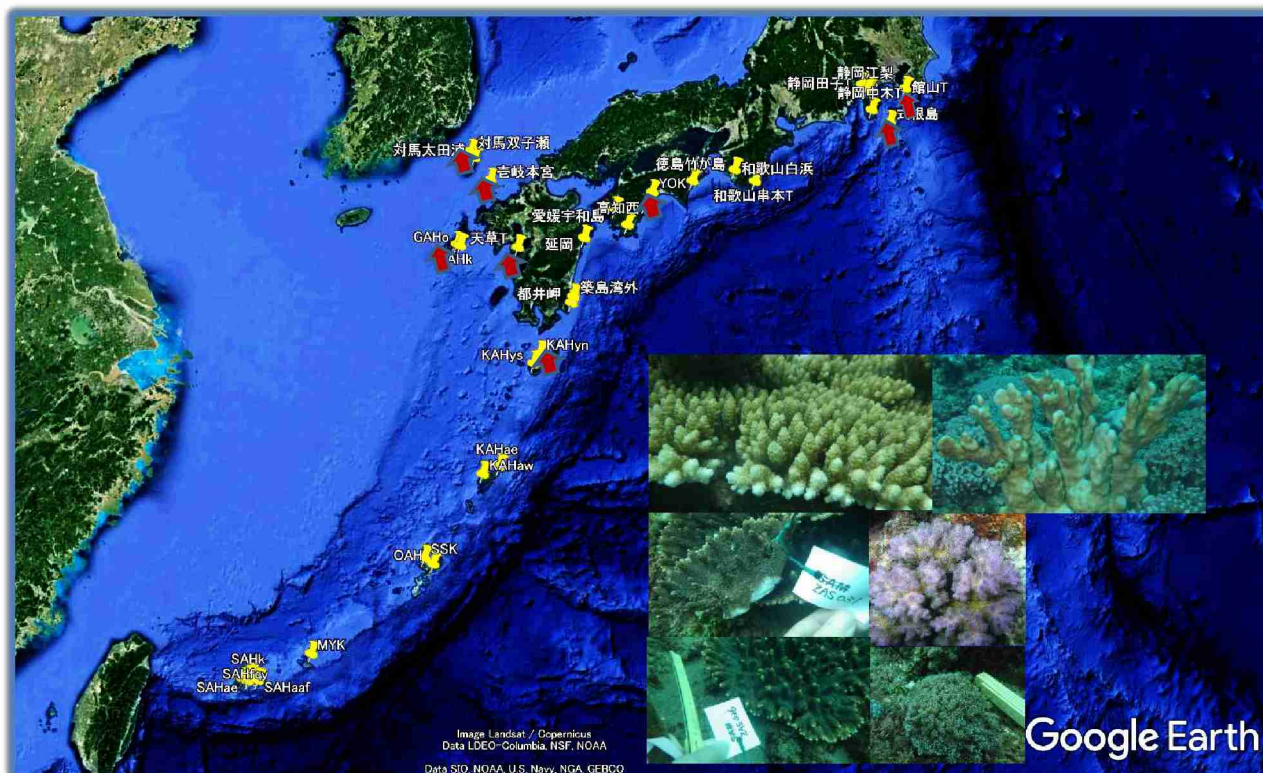
a) 対象種と遺伝子解析用サンプリング

対象種は、温帯域で平均的に約50%、多いところでは90%以上のサンゴ被度面積を占めるクシハダミドリイシ、エンタクミドリイシ⁷⁾に加え、普通種であるハナヤサイサンゴ類、亜熱帯のみに属するアオサンゴ類、温帯域で他の普通種サンゴとは生息域・環境が少し異なるハナガササンゴを対象とした。

サンプリングした採集海域は各種について日本国内での現在の分布を出来るだけほぼ網羅するように採集を試みた(図(1)-1の黄色で示した地点)。特に温帯域では、過去100年の間に新規に北上ないし、分布拡大して出来たサンゴ8集団を含む。館山(エンタクミドリイシ類で近年北上した集団・現在の最北限)、式根(クシハダミドリイシ類で近年北上した集団・現在の最北限)、対馬(エンタクミドリイシ類で近年北上した集団)、天草・五島(クシハダミドリイシ類で近年北上した集団)、横浪(以前藻場だ

った海域で、近年サンゴ群集になった集団)、屋久島(アオサンゴ類で近年北上した集団・現在の最北限)(図(1)-1における赤矢印)を含む。

サンゴの採集と個々のサンゴや環境要因に関する記録については、サンプル名・サンプルNo・時間・種・色・群体の大きさ・周辺の種・水深・温度・緯度/経度・地質・周辺の種・形状の項目を防水ノートに記載した。1地点あたり可能な限り、30個体を目標に採集を行った。個々のサンプルは採集後に遺伝子解析用に99.5%のエタノールに保存した。サンプリングはサブテーマ(2)と共同で行った。



図(1)-1 本研究のサンプリング地点。黄色がサンプリング地点を示し、赤矢印は対象種のいずれかで新規にサンゴ北上により形成された海域を示す。

b) サンゴ類の種境界と集団遺伝解析

b)-1 クシハダミドリイシ類の種境界と集団遺伝解析

クシハダミドリイシ類では約1200の亜熱帯から温帯域の最北限を含む集団のサンプルの解析を行った。8本のマイクロサテライトマーカを用いて、ジェノタイピングを行った。石西礁湖についてはサンプル数が多かったため、他の海域とバランスが取れるように間引きして最終的には表(1)-1に示すサンプルの解析結果を利用した。まず、STRUCTURE解析⁸⁾により、クレード古典的なF統計量に基づく集団遺伝解析で集団間の遺伝分化係数を求め、統計的な集団分化および遺伝的距離と地理的距離の相関性を検定した。また、最近起きた幼生分散に関連する遺伝子流動を明らかにするため、アサイメントテスト(GeneClass2)⁹⁾による個々の群体の起源となる集団の特定を行った。また、温帯域、熱帯域それぞれの集団の遺伝的多様性、クローン構造を定量的に明らかにし、集団の安定性を明らかにした。

表(1)-1 クシハダミドリイシ類で最終的に解析に使用したサンプル

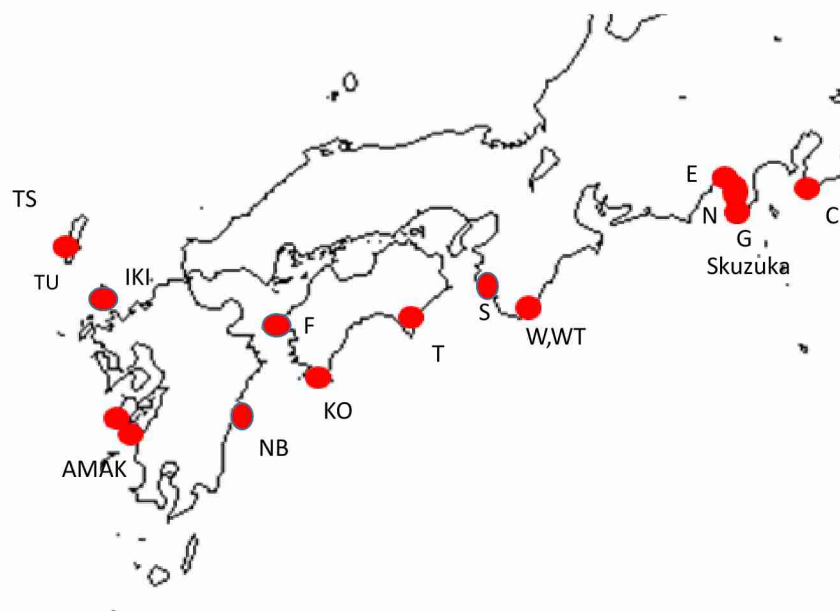
	地域	サンプル採集地点	Code	N	水深 (m)	緯度経度		非クローン 個体数 Ng	クローン率 (%)	温帯を 含む系統	亜熱帯 系統
北上して出来た集団	Goto Islands	Oushima	GAHo	19	0.3~6.0	32° 33' 55.47" N	128° 53' 56.57" E	9	0.526	9	0
		Kuroshima	GAHk	13	4.1~5.6	32° 35' 56.18" N	128° 50' 04.05" E	10	0.231	10	0
	Kumamoto	Amakusa	AMK	25		32° 33' 16.16" N	129° 59' 59.91" E	23	0.080	23	0
	Izu Islands	Shikinejima	ZAH	18	0.8~6.6	34° 21' 36.44" N	139° 12' 02.39" E	18	0.000	17	1
昔からいる温帯集団	Wakayama	Kushimoto	WAHk	34	2.4~5.5	33° 28' 27.36" N	135° 44' 26.92" E	29	0.147	29	0
		Shirahama	WAHs	18	0.7~9.4	33° 40' 59.81" N	135° 20' 11.41" E	18	0.000	18	0
	Kochi	Tatsukushi	KOC	32	1.0~6.0	32° 45' 49.33" N	132° 51' 38.39" E	31	0.031	30	1
	Miyazaki	Tsukijima	TUK	46		31° 28' 39.18" N	131° 23' 14.67" E	30	0.348	23	7
		Toimisaki	TOI	29		31° 21' 00.47" N	131° 16' 59.92" E	28	0.034	25	3
	Yakushima	Around of Tsukasaki	KAHyn	30	4.4~6.3	30° 25' 55.50" N	130° 34' 34.46" E	29	0.033	24	5
		Nanase	KAHys	14	5.6~7.7	30° 14' 42.24" N	130° 25' 31.24" E	9	0.357	8	1
亜熱帯集団	Amami Ohshima	Around of Saneku	KAHaw	22	1.5~4.8	28° 11' 33.24" N	129° 11' 30.78" E	22	0.000	0	22
		Sakibaru	KAHae	16		28° 19' 54.83" N	129° 33' 19.76" E	16	0.000	14	2
	Okinawa Island	Sesokojima	SSK	35		26° 37' 51.43" N	127° 51' 23.57" E	35	0.000	0	35
		Ourawan	OA	42		26° 30' 21.70" N	128° 02' 28.84" E	42	0.000	9	33
	Miyakojima	Yoshino	MYK	47		24° 47' 57.72" N	125° 20' 59.22" E	47	0.000	9	38
		Uro	SAHaaf	36	1.8~4.2	24° 15' 28.63" N	124° 10' 39.49" E	36	0.000	0	36
	Sekisei Lagoon	East of Hanari	SAHd	49	1.0~6.6	24° 13' 20.22" N	123° 56' 16.41" E	1	0.020	1	47
		Yonara Chanel	SAHfy	65	1.0~3.8	24° 22' 00.32" N	123° 57' 03.14" E	65	0.000	0	65
		East of Kohamajima	SAHk	44	0.5~2.8	24° 21' 06.98" N	124° 00' 41.96" E	44	0.000	0	44
		South of Haimi	SAHt	28	2.2~4.8	24° 16' 06.23" N	123° 50' 06.66" E	28	0.000	1	27
		East of Aragusuku	SAHae	28	2.8~4.7	24° 15' 07.03" N	123° 58' 25.77" E	28	0.000	2	26

b)-2 エンタクミドリイシ類の種境界と集団遺伝解析

エンタクミドリイシ類に関しては、これまで同一種であるかどうかが議論されていたエンタクミドリイシとミドリイシの両方について、6遺伝子座のマイクロサテライトマーカー^{10,11)}でジェノタイピングを行った。その後、形態が少し異なるエンタクミドリイシとミドリイシの間で生殖隔離が起きているかどうかを調べるためにSTRUCTURE解析を行った。またそれぞれの形態種において、クローン構造、遺伝的多様性、集団間の遺伝分化係数、各集団におけるプライベートアليل数を算出し、比較を行った。次に、エンタクミドリイシ類に関しては、最新の集団ゲノム解析であるMIG-seq解析¹²⁾も行った。この方法は2回のユニバーサルプライマーを使ってマイクロサテライトの周辺領域を増幅させ、次世代シーケンサーで大量に配列を読む方法で、理論的には中立な遺伝子を大量に得ることができる。Suyama and Matsuki (2015)¹²⁾を少し改良したプロトコルを用いて次世代シーケンサーMiSeqを用いて配列を得た後、ソフトウェアStacksをデフォルトのセッティングを用いてリードをまとめ、SNPを検出した。これらのデータはジェノタイピングデータとして扱い、遺伝的多様性（ヘテロ接合度）、ペア集団間の遺伝構造、主座標分析を行った。

b)-3 ヒメエダミドリイシ類の集団遺伝構造

100年以上前から温帯域に幅広く分布していて分布が過去から現在に渡って殆ど変化のない温帯種ヒメエダミドリイシ類に関しては、表(1)–2にあるように、分布域を網羅する計17地点から採集された493サンプルの解析を行った(図(1)–2)。増幅効率のよい7遺伝子座を用いてジェノタイピングを行った。



図(1)－2 ヒメエダミドリイシのサンプリング地点 アルファベットの記号は表(1)－2に対応。温帯種で昔から分布域に変化はない。分布域のほぼ全域を網羅したサンプリングとなっている。

表(1)－2ヒメエダミドリイシの解析サンプル

地点	個体数	水深帯(m)	ラベル
千葉県館山 沖の島	13	3-5	C
静岡県沼津市久連(クヅラ)	30	5-6	Ku
静岡県沼津市江梨来海(クルマ)	35	5-7	E
静岡県西伊豆町田子(タコ)	36	8-12	G
静岡県南伊豆町中木(ナギ)	35	2-7	N
和歌山県白浜町	16	3-4	S
和歌山県串本町高富(タトミ)	35	4-5	W
和歌山県串本町 袋湾(フクロ湾)	30	5-6	WT
徳島県海陽町 竹が島(阿波竹が島海中公園2号)	30	2-5	T
高知県大月町西泊(ニシトマリ)	30	3-7	Ko
長崎県対馬 綱島(ツナシマ) 双子瀬(フタゴセ)	30	1-7	TS
長崎県対馬 太田浦(オオタウ)	30	2-5	TU
長崎県壱岐 勝本町本宮(ホングウ)・筒方(ツツガタ)	30	1-8	I
長崎県壱岐 神瀬(コウゼ)	30	2-5	IK
熊本県天草 春這(ハルハエ)	30	2-4	AMA
	30		A
愛媛県宇和島市津島町田之浜	23	3-5	F

b)-4 ハナヤサイサング類の種境界と集団遺伝解析

ハナヤサイサング類は、亜熱帯域から最北限の温帯生息域和歌山にかけて11地点から1655サンプルを解析した(図(1)－3)。ハナヤサイサング類に関しては、まずミトコンドリアのOpen Reading Frame (ORF)領域¹³⁾の配列を決定し、系統樹を作成した。また、6遺伝子座のマイクロサテライト領域を用いて、ジェノタイピングを行った。まず、異なる形態種全てを用いてSTRUCTURE解析⁸⁾を行うことで、ミトコンドリアのORFで推定された種の境界と一致するかを確認した。さらに異なる種と考えられた系統のうち、1集団あたりの個体数が十分にある系統について(ハナヤサイサング、イボハダハナヤサイ、ホソエダハナヤサイ)、それぞれの黒潮流域に沿った集団の集団遺伝解析を行い、遺伝的多様性、集団間の遺伝分化係数、プライベートアリアル数を算出した。



図(1)－3 ハナヤサイサンゴのサンプリング地点。昔から分布に変化はないものの、最北限域の和歌山及び天草周辺を含む。

b)-5 アオサンゴ類の種境界と集団遺伝解析

アオサンゴについては、これまで採集していた石西礁湖から奄美大島にかけてのサンプルに加え、本研究によって新規に分布最北限として発見した屋久島のサンプル(図(1)-4)を用いてマイクロサテライト遺伝子座5遺伝子座を用いてSTRUCTURE解析⁸⁾を行い2系統の黒潮に沿った頻度分布を明らかにした。また、1集団あたり9個体以上ある海域について、遺伝的多様性および遺伝分化係数を算出した。



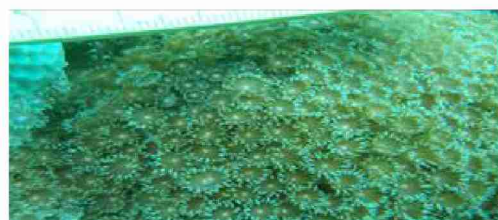
図(1)－4 アオサンゴのサンプリング地点。最北限の屋久島を含めて日本国内の生息域をほぼ全域を網羅する。

b)-1 ハナガササンゴの集団遺伝解析用のマーカー開発と形態種との比較

マイクロサテライト領域を特定するために用いたゲノムDNAはハナガササンゴ属のクレード9(北野未発表データ)に属する形態5種(表(1)-3 図(1)-5)を用いて行った。

表(1)-3 ゲノムDNA抽出に用いたサンプルリスト

species	sample No.	ND5-COI	ITS	ITS clade	北緯	東経	locality	locality	country
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	TS2		yes	IX	34.414	129.277	瀬ノ浦	対馬市	長崎県
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	IK6		yes	IX	33.809	129.668	黒崎	苓岐島	長崎県
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	KS9		AB748695	IX	33.452	135.748	住崎	串本町	和歌山県
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	OT30	AB748775	AB748697	IX	32.797	132.709	尻貝	大月町	高知県
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	MO32		yes	IX	31.518	131.409	五本松	大島	宮崎県
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	TR25		yes	IX	29.843	129.897	七ツ山ビーチ	中之島	鹿児島県
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	AO220		yes	IX	28.226	129.219	花天東	奄美大島	鹿児島県
<i>Goniopora djiboutiensis</i>	OU1		yes	IX	26.543	128.041	大浦湾	名護市	沖縄県
<i>Goniopora cf. djiboutiensis</i>	TS18		yes	IX	34.414	129.277	瀬ノ浦	対馬市	長崎県
<i>Goniopora cf. djiboutiensis</i>	IR3		AB748740	IX	24.320	123.707	網取湾	西表島	沖縄県
<i>Goniopora lobata</i>	TS14		yes	IX	34.414	129.277	瀬ノ浦	対馬市	長崎県
<i>Goniopora lobata</i>	TR22		yes	IX	29.843	129.897	七ツ山ビーチ	中之島	鹿児島県
<i>Goniopora lobata</i>	IR42	AB748791	AB748750	IX	24.320	123.707	網取湾	西表島	沖縄県
<i>Goniopora cf. lobata</i>	AM24		yes	IX	32.171	130.034	砂月	天草市	熊本県
<i>Goniopora cf. lobata</i>	SS25		yes	IX	26.635	127.865	実験所前ビーチ	瀬底島	沖縄県
<i>Goniopora cf. lobata</i>	IS20		AB748753	IX	24.342	124.073	竹富島北	竹富島	沖縄県
<i>Goniopora norfolkensis</i>	KS42		yes	IX	33.479	135.746	錆浦	串本町	和歌山県
<i>Goniopora norfolkensis</i>	IS12		yes	IX			マークバンサー	石垣島	沖縄県
<i>Goniopora cf. norfolkensis</i>	SR116	yes	yes	IX	33.718	135.325	沖ノ島	白浜町	和歌山県
<i>Goniopora pendulus</i>	AM39		yes	IX	32.171	130.034	砂月	天草市	熊本県
<i>Goniopora pendulus</i>	KS17		yes	IX	33.452	135.749	住崎	串本町	和歌山県
<i>Goniopora pendulus</i>	TN36		yes	IX	30.578	131.035	馬立	種子島	鹿児島県
<i>Goniopora tenuidens</i>	AM105		yes	IX	32.161	130.056	柱状節理前	天草市	熊本県
<i>Goniopora tenuidens</i>	KK21		yes	IX	28.318	130.000	嘉純	喜界島	鹿児島県

***G. djiboutiensis******G. norfolkensis******G. lobata******G. pendulus******G. tenuidens***

図(1)-5 今回使用したハナガササンゴ形態種5種 (撮影: 北野 裕子)

DNA抽出はフェノールクロロホルム法¹⁴⁾およびDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った。抽出されたDNAは超音波で物理的に断片化して300~800bp長にし、アダプター配列をフラグメントの各末端に連結した。得られたDNA情報を次世代シーケンサーRoche GS FLX 454を用いて配列を決定し、合計603,951の配列が306Mbの全塩基で得られた。これらのシークエンシング読み取りは、Newbler Assembler software ver. 2.6 (Roche) を用いて行った。サブシークエンスは、Tandem Repeats Finder ver. 4.0.4¹⁵⁾とPRIMER 3 ver. 2.2.2 beta¹⁶⁾を用いてマイクロサテライト遺伝子座の周辺領域にプライマーを設計した。2塩基、3塩基、4塩基のヌクレオチドモチーフマイクロサテライト遺伝子座を有する計1136領域のプライマーが設計された。

設計したプライマーを発注し、届いたプライマーを用いてスクリーニングPCRを行った。ハナガササン

ゴは褐虫藻と共生しており、設計した1136領域のプライマーは褐虫藻のプライマーも含まれている。そのため、ハナガササンゴ5種 (*G. djiboutiensis*, *G. norfolkensis*, *G. lobate*, *G. pendulus*, *G. tenuidens*)、褐虫藻4種 (AJIS2-C2, CCMP2466, CCMP2556, ウラソコ5-A10) と比較的褐虫藻が少ないハナガササンゴの卵を用いて、スクリーニングPCRを行った。

PCRカクテルは、1サンプルあたりDW 3 μ l、KAPA 5 μ l、DNAサンプル 1 μ lにした。PCR条件は、95 $^{\circ}$ Cで2分、(95 $^{\circ}$ Cで30秒、55 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで30秒)を35サイクル、72 $^{\circ}$ Cで5分、12 $^{\circ}$ Cで ∞ の条件でPCRを行った。KAPAを使用したPCRで綺麗なバンドがでたプライマーを選別し、そのプライマーの蛍光マーカを発注した。粉末状で届いた蛍光マーカー(20 μ mol)に200 μ lのTEを加え、100 μ Mに希釈した。その後100 μ Mの蛍光プライマーに100 μ lのTEを加え50 μ Mに希釈した。50 μ Mのプライマーを使用し、PCRを行った。PCRカクテルは、1サンプルあたりDW 3.86 μ l、goTaq 5.0 μ l、Fプライマー 0.03 μ l、Rプライマー 0.07 μ l、F蛍光プライマー 0.04 μ lにした。PCR条件は、94 $^{\circ}$ Cで3分、(94 $^{\circ}$ Cで30秒、50 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで30秒)を40サイクル、72 $^{\circ}$ Cで5分、16 $^{\circ}$ C ∞ の条件でPCRを行った。このPCRで綺麗なバンドが出たものを80倍(212のみ100倍)希釈して、中央水研の長井敏博士に郵送し、配列を読み取っていただいた後に、ジェノタイピングを行い、波形を観察した。綺麗な波形が出ていないものや、マルチバンドになっているものを除外し、マイクロサテライトマーカーとした。

マイクロサテライトマーカーの検証は、5種類で合計150サンプルPCRを行い、全マーカーで共通してPCRを行ってかつPCR増幅のうまくいったハナガササンゴ86サンプルを用いてヘテロ接合度および近交係数の算出を行った。この際、形態種としては、*G. djiboutiensis* が35サンプル、*G. norfolkensis* が4サンプル、*G. lobate* が19サンプル、*G. pendulus* が8サンプル、*G. tenuidens*が2サンプル、完全な同定ができなかった*G. djiboutiensis* cfは12サンプル、*G. lobate* cfは6サンプルを解析した。

まず、シーケンサーから得られたAbiファイルをGeneMapper ver5を用いてジェノタイピングを行い、GeneAlex6 ver 6.5¹⁷⁾を用いて、ヘテロ接合度の観察値HO、期待値HEおよび近交係数FISを算出した。

さらに、クレード9内の形態種5種とマイクロサテライトで得られた遺伝構造の関連性を調べるため、STRUCTURE解析⁸⁾を行った。解析ではMCMCを200,000、Burn-in 200,000としてK=1~10を仮定して、5回ずつ異なる初期値を用いて、事前情報なしでAdmixtureモデルを用いた。

c) 統計モデルに向けた遺伝解析情報のまとめ：隠蔽系統の種数と境界・遺伝分化係数・遺伝的多様性・アليل多様度・プライベートアليل数から見た相対的な海域重要度の算出

上記で明らかになった隠蔽系統の数、遺伝的多様性・アليل多様度、プライベートアليل数をそれぞれの海域において算出したものを海域の相対的重要度の算出に用いるように補正を行った。遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度に関しては、種間で直接の比較が可能になるように、最大値が1、最小値が0になるように正規化して補正した。プライベートアليل数は各集団の採集体数に依存するため、それぞれの地点におけるプライベートアليل数を各集団の採集体数で割って補正した。

補正して種間比較できるようになったデータを用いて、各海域の平均値を算出したのち、3段階にデータを振り分け、統計モデルに適用した。

また別途、本研究で対象とした全ての種の遺伝構造に共通する海域の区分を明らかにするため、遺伝的にも地理的にも近い集団同士を階層的遺伝構造解析であるAnalysis of Molecular Variance (AMOVA)のグループ間遺伝構造が最大になるような海域分けを算出した。

4. 結果及び考察

a) 対象種と遺伝子解析用サンプリング

計31地点、合計約4,000群体の採集に成功した。対象海域としては、これまでサンゴ等のコネクティビティについて知見がほとんどなかった温帯域からは18地点からサンゴ採集し、そのうち8地点は、近年にサンゴが北上して形成したと考えられる集団を含む。なお、本研究のサンプリングを通じて、新規にサンゴの北上も発見し、報告することが出来た：屋久島における最北限アオサンゴ群体の発見(下記、Nakabayashi et al. 2017業績の2)、およびクシハダミドリイシの式根島での発見(Nakabayashi et al. 現在国際

学術誌に集団遺伝解析の結果とともに投稿・リバイス中)。

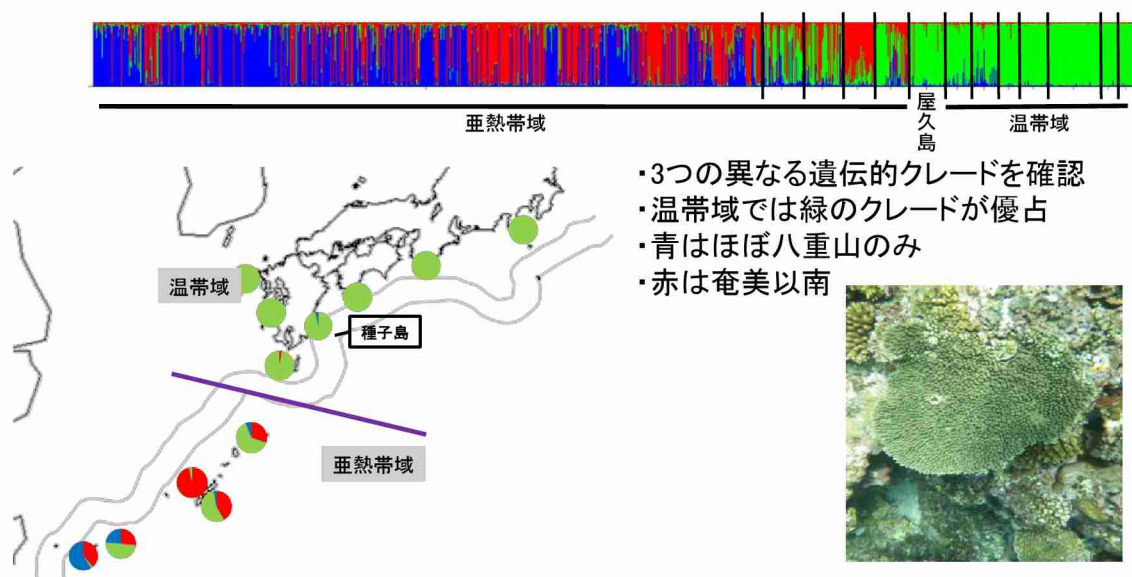
b) サンゴ類の種境界と集団遺伝解析

b)-1 クシハダミドリイシ類の種境界と集団遺伝解析

まず、クシハダミドリイシ類全体でSTRUCTURE解析を行った結果、3つの異なる遺伝系統が存在していることが示唆された(図(1)－6)。このことから屋久島以北は1系統のみが分布しており、近年の温暖化で温帯域において分布拡大や北上しているのはこの緑の系統であることが分かった。一方残りの2系統のうち青の系統は主に石西礁湖などの南方に主に分布しており、赤系統は奄美大島以南に分布していることが分かった。このことからクシハダミドリイシ類において、温帯域が避難所として役割を果たせるのは3つのうちの1系統のみであることが分かった。

Analysis of Molecular Variance Analysis(AMOVA)により、さまざまなシナリオ下で遺伝構造をもつかどうかの検定を行った結果、亜熱帯域と温帯域の間には有意な遺伝構造が存在していたが、温帯域内において、北上した集団と昔からいる温帯域集団、対馬海流に沿った集団と黒潮本流に沿った温帯域集団のいずれも遺伝構造はもっておらず、温帯域の中では遺伝構造が弱いことが示唆された(表(1)-4)。

ペア集団間の遺伝距離について解析を行ったところ、特に少ない個体数においても厳しい検定が可能であるFisher's exact testの結果では、多くの温帯域と亜熱帯域の間のペア集団では統計学的に有意な遺伝分化が見られ、AMOVA同様に温帯域から亜熱帯域への直接の幼生分散はやや少ないことが推定された(表(1)-5)。そこで、遺伝分化係数 F_{ST} 、 D_{EST} のように長い時間スケールでの集団遺伝構造を検出する方法とは対照的に、近年起きた遺伝子流動を推定する個体ごとの帰属解析(アサイメントテスト)を行ったところ、温帯域の集団における個体のいくつかは、近年亜熱帯域から移住してきた可能性が高いことが示された(表(1)-6)。



図(1)－6 クシハダミドリイシ類についてSTRUCTURE解析によって見つかった3系統とその分布。

さらに、ほとんどのプライベートアリル(ある1個体しか持っていないユニークなアリル)は亜熱帯域で多く見つかったものの、温帯域においても発見された(表(1)-7)。このことから、温帯域と亜熱帯域には稀な幼生分散によるコネクティビティは存在するが、基本的には温帯域は独自の進化をしつつあることが示唆された。今回調べた温帯域集団のような辺境域でかつ遺伝的に分化の見られる遺伝集団は、多くの生物にとって、新たな生物種が生じる可能性の高い生物多様性の源として重要な場所であり、進化的な意味がからも温帯域のサンゴを保全していくことが重要であることが明らかとなった。また、亜熱帯域の遺伝系統全ては温帯域で見つからなかったものの、一部の遺伝系統は実際に温帯域に移住していることから、温暖化が進んで亜熱帯海域が危機的状況になる上で、温帯域が避難所としての役割も果たしうることが明らかになった。この亜熱帯から温帯域への遺伝子流動を妨げる原因としては、サブテーマ3で後述するように、数値シミュレーションの結果と照らし合わせた結果、黒潮の流路が屋久島と奄

美大島の間にあることに起因すると考えられた。亜熱帯から温帯域へ種が避難できるかどうかはこの黒潮バリアを抜けて北上できるかどうか大きな意味を持つことが分かった。

さらに、ペア集団の遺伝構造では、五島列島の黄島（GAHo）、および宮崎の築島（TUK）の集団が他の集団と遺伝的に分化していることが分かった。築島（TUK）は人口港の閉鎖性の強い場所の集団であるため、外部との遺伝交流がかなり限られていること、そうした特殊な環境下で遺伝的に分化した可能性がある。一方五島列島の黄島は最北限集団の一つであり、近年北上してできた集団である。サンゴの生存は、冬季水温、濁度、アラゴナイト飽和度などが大きく影響するが、表(1)-8に示されるように、五島列島はそうした環境パラメーターが最も厳しい環境にある。温帯域全般のなかでも、五島は特に集団の孤立性や、無性生殖クローンが多いことなどから、進化学的な視点でも重要な集団であると考えられた。

表(1)-4 異なるシナリオにおける、AMOVAを用いた遺伝構造の検出。太字は有意な遺伝構造を持つもの。温帯域と亜熱帯では少し遺伝構造に違いがあり幼生分散が限られると考えられるが、北上集団ともともという集団、温帯の黒潮系の集団と対馬海流の集団の間では遺伝構造が無いことが分かる。

グループ分けのシナリオ	分散の源	自由度	% var	F 値	P
全集団	全集団間	12	5.07	F_{ST}	0.051
	集団内	467	94.93		
温帯域 vs 亜熱帯域	グループ間	1	4.09	F_{CT}	0.041
	グループの中の集団間	11	3.88	F_{SC}	0.040
	集団内	467	92.03	F_{ST}	0.080
温帯で昔からいる集団 vs 亜熱帯域	グループ間	1	3.53	F_{CT}	0.035
	グループの中の集団間	7	2.41	F_{SC}	0.025
	集団内	353	94.07	F_{ST}	0.059
北上した集団 vs 温帯で昔からいる集団	グループ間	1	-0.21	F_{CT}	-0.002
	グループの中の集団間	8	4.44	F_{SC}	0.044
	集団内	406	95.76	F_{ST}	0.042
温帯の黒潮集団 vs 対馬海流の集団	グループ間	1	0.44	F_{CT}	0.004
	グループの中の集団間	8	4.17	F_{SC}	0.042
	集団内	406	95.39	F_{ST}	0.046

表(1)-5 遺伝距離の指標である遺伝分化係数 (F_{ST} と D_{EST}) および集団分化の P 値。太字で示されたものが統計学的に有意な遺伝分化を示すペア。五島列島の黄島 (GAHo) が特に他の海域と遺伝的に離れて孤立している可能性がある

F_{ST} P value		北上した集団				昔からの温帯集団					亜熱帯集団			
		GAHo	GAHk	AMK	ZAH	WAHk	WAHs	KOC	TUK	TOI	KAHyn	KAHae	OAH	MYK
北上した集団	GAHo		0.124	0.168	0.286	0.215	0.182	0.155	0.119	0.089	0.128	0.127	0.127	0.185
	GAHk	0.035		0.087	0.062	0.070	0.013	0.004	0.051	0.008	0.014	0.079	0.076	0.112
	AMK	0.002	0.041		0.052	0.027	0.004	0.055	-0.003	0.022	0.081	0.081	0.098	0.067
	ZAH	<0.001	0.096	0.072		0.054	0.006	0.026	0.056	0.044	0.041	0.103	0.162	0.098
昔からの温帯集団	WAHk	<0.001	0.027	0.109	0.025		-0.005	0.045	0.020	0.045	0.086	0.111	0.106	0.073
	WAHs	<0.001	0.394	0.534	0.413	0.655		-0.008	0.002	-0.010	0.013	0.048	0.071	0.021
	KOC	<0.001	0.333	0.004	0.048	0.001	0.680		0.025	-0.002	0.009	0.068	0.051	0.064
	TUK	0.002	0.058	0.701	0.024	0.120	0.499	0.026		0.005	0.055	0.081	0.058	0.041
	TOI	0.004	0.413	0.154	0.028	0.005	0.825	0.527	0.372		0.018	0.053	0.040	0.049
	KAHyn	<0.001	0.301	0.001	0.020	<0.001	0.213	0.131	0.001	0.090		0.018	0.035	0.054
亜熱帯集団	KAHae	0.001	0.014	0.007	0.001	<0.001	0.024	<0.001	0.001	0.004	0.160		0.024	0.034
	OAH	0.004	0.041	0.010	<0.001	0.001	0.022	0.008	0.020	0.051	0.078	0.209		0.009
	MYK	<0.001	0.003	0.042	0.010	0.007	0.212	0.002	0.068	0.022	0.011	0.096	0.388	
D_{EST} Fisher's exact test		北上した集団				昔からの温帯集団					亜熱帯集団			
		GAHo	GAHk	AMK	ZAH	WAHk	WAHs	KOC	TUK	TOI	KAHyn	KAHae	OAH	MYK
北上した集団	GAHo		0.022	0.024	0.040	0.022	0.039	0.030	0.046	0.009	0.038	0.079	0.054	0.034
	GAHk	0.061		0.025	0.021	0.023	0.025	0.004	0.045	0.009	0.014	0.062	0.039	0.042
	AMK	<0.001	0.011		0.013	0.004	0.009	0.012	0.012	0.010	0.030	0.064	0.050	0.013
	ZAH	<0.001	0.024	0.032		0.011	0.003	0.012	0.032	0.022	0.005	0.029	0.026	0.016
昔からの温帯集団	WAHk	<0.001	0.050	0.018	0.082		0.000	0.016	0.016	0.016	0.026	0.056	0.032	0.004
	WAHs	<0.001	0.002	0.003	0.485	0.127		0.011	0.021	0.012	0.007	0.021	0.017	0.000
	KOC	<0.001	0.271	0.001	0.030	<0.001	<0.001		0.024	0.000	0.009	0.044	0.031	0.019
	TUK	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		0.011	0.035	0.044	0.041	0.025
	TOI	0.025	0.141	0.026	0.004	<0.001	<0.001	0.209	<0.001		0.013	0.039	0.024	0.022
	KAHyn	<0.001	0.009	<0.001	0.016	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001		0.009	0.009	0.018
亜熱帯集団	KAHae	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.024		0.022	0.014
	OAH	0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	<0.001	<0.001	0.001	0.126	0.056		0.011
	MYK	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.005	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	0.154	

表(1)-6 それぞれの個体ごとの帰属解析 (アサイメントテスト) の結果。縦がソース集団、横がシンク集団を示す。セルフシーディングが卓越するが、比較的近い海域で幼生分散が生じている。

アサイメントテストの結果		北上した集団				昔からいる集団					亜熱帯集団		
		GAHo	GAHk	AMK	ZAH	WAH	KOC	TUK	TOI	KAHyn	KAHae	OAH	MYK
北上した集団	GAHo	5	1					3					
	GAHk		2	1		2			1				
	AMK			2			1						
	ZAH			1	1	2							
昔からいる温帯集団	WAH		1	1	2	12							
	KOC						1			1			1
	TUK					1		13	2				
	TOI							2	3				
亜熱帯集団	KAHyn						1			2			
	KAHae						1			1	6		
	OAH										2	2	
アサイメントされない個体		4	6	17	14	30	25	5	19	20	6	7	6

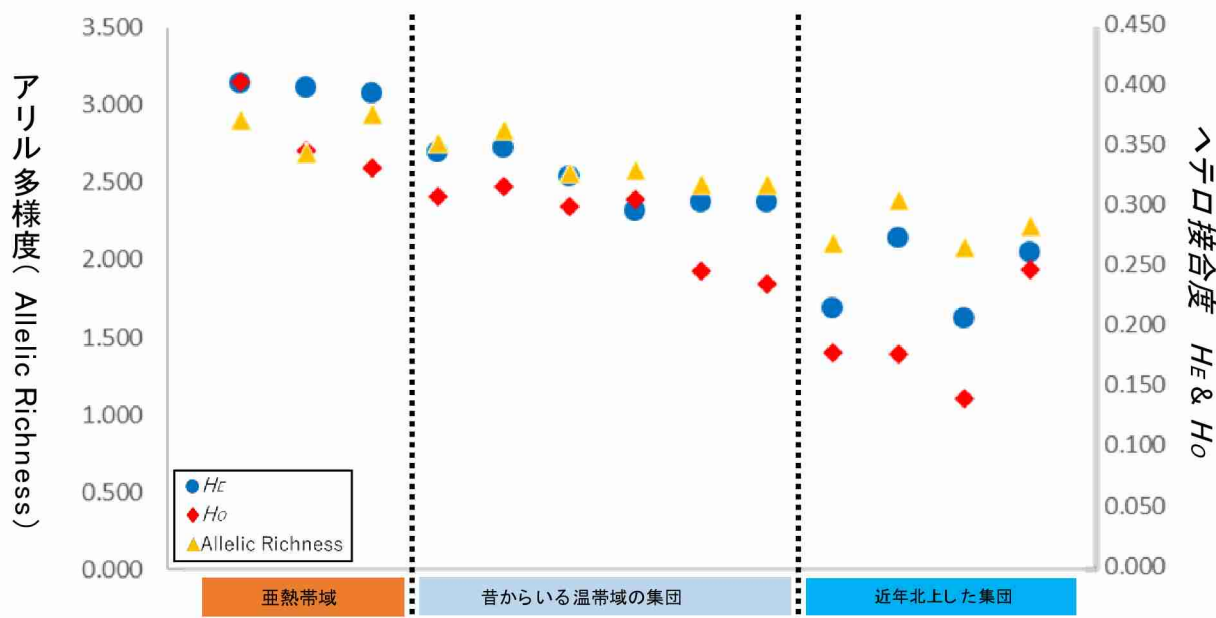
表(1)-7 遺伝的多様性・ボトルネック検定の結果。多様性は亜熱帯ほど高い。式根のみでボトルネックが起きた可能性が示された。

集団の情報					遺伝的多様性					ボトルネック
	海域	Sam pling site	略語	N	H_o	H_E	アリル多 様性	プライ ベート アリル	F_E	W LCOXON TEST
近年北上し た 集 団	五島列島	黄島	GAHo	9	0.248	0.264	2.223	2	0.129	1.000
		黒島	GAHk	10	0.141	0.209	2.084	0	0.378	0.188
	熊本	天草	AMK	23	0.178	0.276	2.391	1	0.376	1.000
	伊豆	式根島	ZAH	17	0.179	0.218	2.107	0	0.215	0.016
昔からいる 温 帯 集 団	和歌山	串本	WAHk	29	0.236	0.305	2.491	0	0.242	1.000
		白浜	WAHs	18	0.247	0.305	2.485	2	0.221	0.688
	高知	竜串	KOC	30	0.307	0.298	2.581	1	-0.013	0.078
	宮崎	築島	TUK	23	0.300	0.326	2.567	0	0.103	0.563
		都井岬	TOI	25	0.317	0.351	2.840	6	0.12	0.297
	屋久島	塚崎	KAHyn	24	0.309	0.347	2.753	1	0.135	0.074
亜 熱 帯	奄美大島	崎原	KAHae	14	0.333	0.396	2.944	4	0.195	0.742
	沖縄本島	大浦湾	OAH	9	0.347	0.400	2.691	0	0.195	0.578
	宮古島	吉野	MYK	9	0.405	0.403	2.905	2	0.06	0.688

表(1)-8 サンゴの生存に関する環境パラメーター

	水温最低月の平均	クロロフィル	POC	アラゴナイト飽和度
	(°C)	平均 (μL/L)	平均 (mg/m³)	Ω-平均
沖縄本島	21.98	0.17	54.24	3.30
屋久島	19.56	0.26	76.30	3.10
式根島	15.85	0.43	101.75	2.60
天草-五島	15.47	0.64	174.91	2.90

亜熱帯域から温帯域までの集団の遺伝的多様性について、アリル多様度、ヘテロ接合度の観察値および期待値によって推定した。その結果、亜熱帯域がもっとも高く、昔からいる温帯域、近年北上した集団の順に徐々に低くなることが分かった。遺伝的多様性の低下は環境変動が生じたときに集団が生存しうるかどうかの指標となる。温帯域のサンゴ集団は遺伝的多様性が全体的に低いため、温暖化で今後サンゴにとって生きやすい環境になっていったとしても、特に近年できた再北限集団などは遺伝的多様性が少ないため、人為影響などの急激な環境改変によるダメージは亜熱帯域よりも受けやすい可能性があることが分かった。



図(1)-7 緯度による遺伝的多様性の違い。亜熱帯から温帯域、北上した集団の順に遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度の観察値および期待値、アレル多様性が低下する。

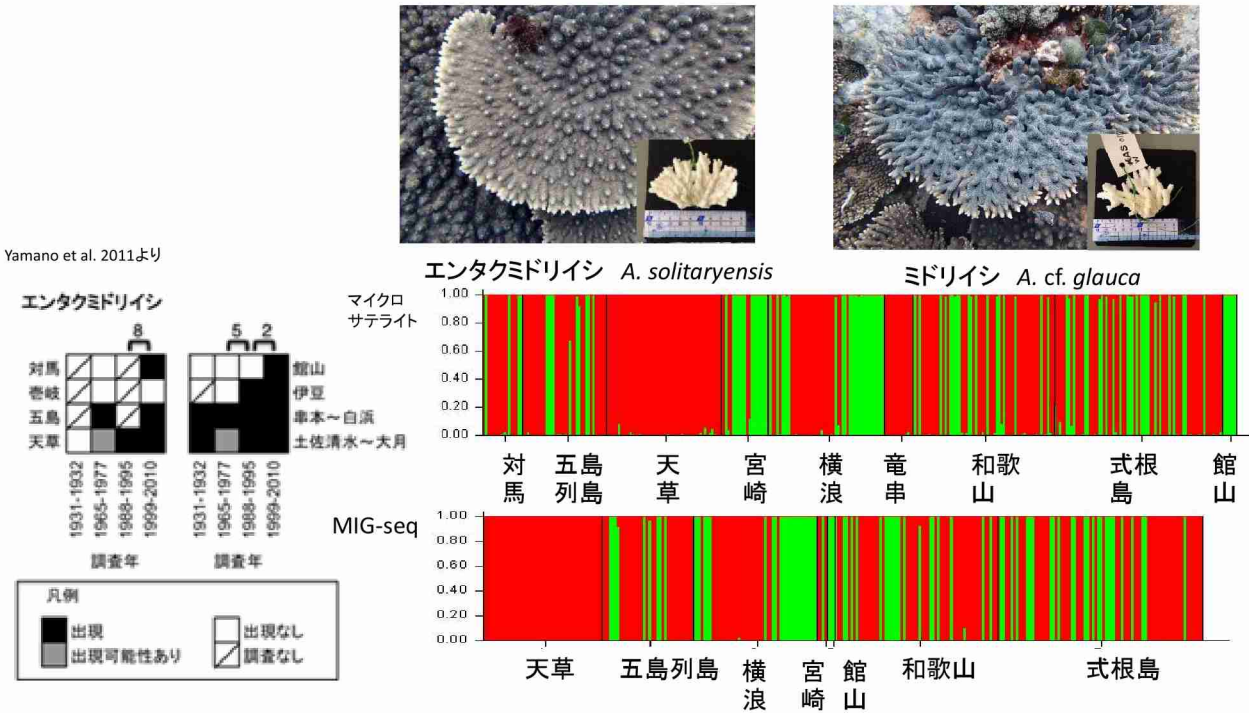
最後に、地理的距離が離れるほど遺伝的距離が離れるかどうか(Isolation by distance、IBDパターン)についてマンテルテストを用いて統計学的解析を行った。遺伝集団はそれぞれの集団内で生殖を繰り返すと、遺伝的組成が、変異と遺伝的浮動により徐々に変化していくが、地理的に近い集団同士であると遺伝子流動が起こるために、遺伝的に近くなる傾向が多く、自然集団においてみられる。どの地理的距離を用いた場合においても、IBDの解析において、近年北上した集団を入れて解析した場合は、統計学的に有意な結果が得られなかったが、近年北上した集団を除いて解析を行うと統計学的に有意なIBDを検出することができた。このことから、近年北上した集団は、集団が若いために、まだ集団が移住と遺伝的浮動の平衡に達していないため、IBDの関係の相関を乱してしまっていることが推定された。実際、図(1)-7においても、近年北上した集団ではヘテロ接合度の観察値と期待値(ハーディワインベルグ平衡を仮定したもの)の間に大きなずれが見られることが分かった。こうした結果からも近年北上した集団は、まだ集団構造自体が平衡になく、遺伝的多様性も低いいため、相対的に絶滅のリスクが大きいことがわかった。

b)-2 エンタクミドリイシ類の種境界と集団遺伝解析

エンタクミドリイシ類はクシハダミドリイシ類とならび、温帯域で優占種となる種である。この種の屋久島以南の亜熱帯域での分布は不明であるが、温帯域ではエンタクミドリイシ類が特に九州の西側および太平洋側の伊豆と館山で過去80年の間に北上し、分布拡大していることがわかっている。エンタクミドリイシ類はこれまで、エンタクミドリイシ(*Acropora solitaryensis*)とミドリイシ(*Acropora cf. glauca*)の総称となっており、この2つが同種か別種かについて議論されてきていた。両種共通のマイクロサテライト遺伝子座およびMIG-seqの両方で両種の遺伝構造をクラスタリング解析で推定した結果、エンタクミドリイシとミドリイシは遺伝的に大きく異なっており、別種であることが示された(図(1)-8)。

次に、両種を分けて、各集団における遺伝的多様性(ヘテロ接合度の観察値および期待値)、プライベートアレル数を算出し、それぞれの集団の遺伝的安定性を推定した。その結果、全体として、エンタクミドリイシの方がミドリイシよりも遺伝的多様性が低い傾向にあった(表(1)-9)。また、MIG-seq解析では最北限の集団で解析できた個体数が少ないために傾向が分らなかったが、マイクロサテライト解析では、エンタクミドリイシは最も近年北上した対馬および館山において他の海域よりもやや低い遺伝的多様性が見られるのに対し、ミドリイシでは最北限の集団まで遺伝的多様性はほぼ均一であることが分かった(表(1)-10)。

両種それぞれの集団間のコネクティビティの強さは、全サンプルを用いて全遺伝分化係数 F_{ST} を算出すると、マイクロサテライト解析において、エンタクミドリイシでは $0.046(P=0.001)$ となり強く有意な遺伝構造を持つのに対し、ミドリイシは $0.013(P=0.167)$ となり、集団間で遺伝的に分化していないことがわかった。これはMIG-seqからも同様のことが裏付けられた。このことから、ミドリイシでは集団間の幼生分散による移住量が多いために最北限の比較的新しい集団まで高い遺伝的多様性がおぎなわれているのに対し、エンタクミドリイシではミドリイシよりも集団間の幼生分散量は少ないと推定されるため、最北限の近年できた集団ではまだ遺伝的多様性が十分に高くなっていない可能性がある。



図(1)－8 エンタクミドリイシとミドリイシのSTRUCTURE解析の結果 形態が異なる2種は遺伝的にも大きく異なっており、エンタクミドリイシの形態のものが緑で、ミドリイシの形態のものが赤の系統に属することが分かった

表(1)－9 エンタクミドリイシおよびミドリイシの遺伝的多様性（マイクロサテライト解析結果）

サンプル採集地点		緯度経度		総解析数		ユニークな 遺伝子型数Ng		クローン率(%)		遺伝的多様性(ヘテロ接合度)				プライベートアليل数	
		緯度	経度	エンタク	ミドリ	エンタク	ミドリ	エンタク	ミドリ	期待値		実測値		エンタク	ミドリ
対馬	対馬	34° 25' 17.74″	129° 16' 09.23″	4	11	4	11	0.000	0.000	0.222	0.192	0.293	0.467	0	3
五島	黄島	32° 33' 55.47″	128° 53' 56.57″	8	20	8	20	0.000	0.000	0.246	0.306	0.295	0.435	2	6
	黒島	32° 35' 56.18″	128° 50' 04.05″	1	6	1	6	0.000	0.000			0.361	0.421		0
長崎	天草	32° 33' 16.16″	129° 59' 59.91″	0	49	0	49		0.000			0.296	0.424		11
宮崎	大島	31° 31' 05.14″	131° 24' 36.07″	16	4	16	4	0.000	0.000	0.271	0.357	0.319	0.440	3	1
千葉	館山	34° 59' 30″	139° 49' 34″	6	0	6	0	0.000		0.194	0.257			3	
伊豆	式根	34° 21' 36.44″	139° 12' 02.39″	28	45	27	45	0.036	0.000	0.218	0.291	0.352	0.423	3	2
和歌山	串本	33° 28' 27.36″	135° 44' 26.92″	15	26	15	26	0.000	0.000	0.222	0.279	0.304	0.392	0	2
	白浜	33° 40' 59.81″	135° 20' 11.41″	3	17	3	17	0.000	0.000			0.206	0.341		1
高知	竜串	32° 45' 49.33″	132° 51' 38.39″	0	12	0	12		0.000			0.260	0.359		1
	横浪	33° 22' 46.38″	133° 22' 4.82″	25	25	24	23	0.040	0.080	0.274	0.287	0.360	0.424	1	2
		合計		106	215	104	213								

表(1)－10エンタクミドリイシおよびミドリイシの遺伝的多様性 (MIG-seq解析結果)

サンプル採集地点		総解析数		遺伝的多様性(ヘテロ接合度)					
				エンタク			ミドリ		
		エンタク	ミドリ	実測値	期待値	近交係数	実測値	期待値	近交係数
対馬	対馬								
五島	黄島	9	26	0.029	0.061	0.530	0.014	0.043	0.609
	黒島								
長崎	天草		45				0.027	0.052	0.505
宮崎	大島		3				0.014	0.019	0.244
千葉	館山	3		0.021	0.016	-0.307			
伊豆	式根	29	49	0.031	0.099	0.712	0.026	0.053	0.478
和歌山	串本	20	24	0.027	0.050	0.477	0.033	0.057	0.371
	白浜		18				0.023	0.054	0.478
高知	竜串								
	横浪	23	24	0.027	0.046	0.492	0.027	0.053	0.546

エンタクミドリイシとミドリイシについて、ペア集団間の遺伝構造を調べてみると、全遺伝分化係数から推定されたように、エンタクミドリイシでミドリイシよりも集団間の遺伝構造は大きくなった(表(1)-11)。ミドリイシでは近年できた集団である五島列島の黄島がやや遺伝的に離れている以外、ほとんど有意な集団分化が見られてなかった。五島列島の集団は、クシハダミドリイシの解析でも同様に集団が他の集団からやや隔離される傾向があり、2種に共通する海水流動などの物理的な要因が五島列島の集団の孤立性に関与している可能性がある。

エンタクミドリイシでは、ミドリイシよりも強い遺伝構造をもち、館山や式根のような近年形成された集団が他の集団と遺伝的に離れる傾向があった。これは、近年、温暖化で新規に加入して出来た集団はソースの集団からコンスタントに幼生が供給されているのではなく、非定常的に遺伝的な頻度の偏りをもったまとまった幼生集団が加入することで集団が形成されている可能性が考えられた。

表(1)-11 エンタクミドリイシとミドリイシのペア集団間の遺伝分化係数(表の下側)。それぞれMIG-seqの結果が上、マイクロサテライトの結果が下に示されている。太字になっている数字は相対的に高い遺伝分化係数が検出されたペアで幼生分散が限られていると推定される組み合わせを示す。

エンタク	エンタク・MIG	五島	高知	館山	和歌山	式根						
MIG-seq	五島											
	高知	0.226										
	館山	0.582	0.632									
	和歌山	0.158	0.148	0.570								
	式根	0.102	0.091	0.372	0.062							
エンタク	エンタク・マイクロ	対馬	五島	宮崎	館山	式根	和歌山	高知				
マイクロ	対馬											
サテライト	五島	-0.017										
	宮崎	0.060	0.057									
	館山	0.197	0.210	0.076								
	式根	0.156	0.135	0.015	0.073							
	和歌山	0.088	0.015	0.026	0.146	0.061						
	高知	0.016	0.029	0.021	0.077	0.061	0.005					
ミドリイシ	ミドリイシ・MIG	天草	五島	竜串	串本	白浜	式根					
MIG-seq	天草											
	五島	0.025										
	竜串	0.035	0.044									
	串本	0.026	0.040	0.030								
	白浜	0.029	0.044	0.042	0.033							
	式根	0.018	0.026	0.024	0.023	0.031						
ミドリイシ	ミドリ・マイクロ	宮崎	五島黄島	五島黒島	天草	宮崎	式根	串本	白浜	竜串	横浪	
マイクロ	宮崎											
サテライト	五島黄島	0.002										
	五島黒島	-0.002	0.035									
	天草	-0.002	0.024	0.006								
	宮崎	0.062	0.007	0.005	0.009							
	式根	0.002	0.021	0.020	0.011	0.003						
	串本	0.009	0.025	0.015	0.008	0.031	0.015					
	白浜	0.006	0.000	0.045	0.010	0.045	0.008	0.005				
	竜串	0.010	0.014	0.034	0.024	0.062	0.031	0.032	-0.007			
	横浪	0.010	0.014	0.015	0.006	0.028	-0.012	0.008	0.002	0.032		

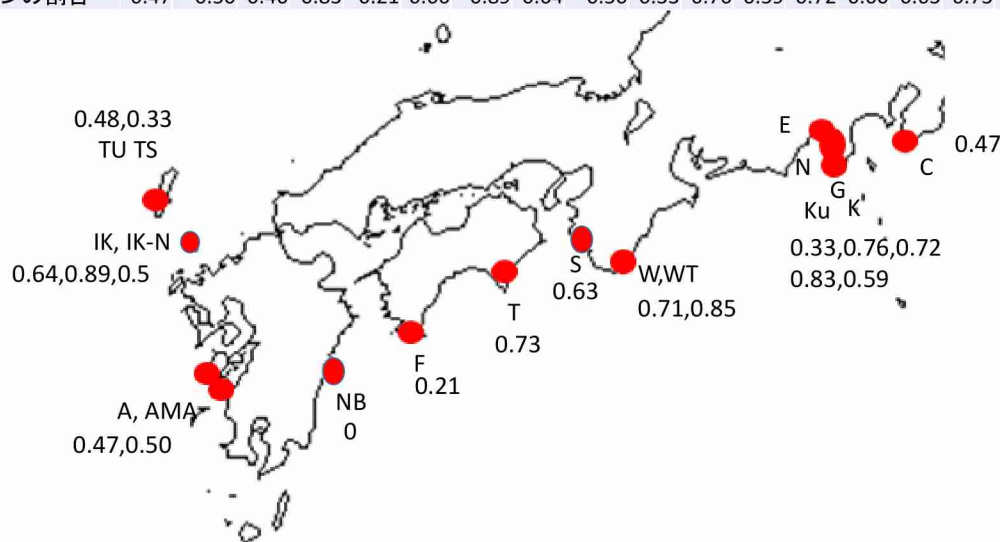
b)-3 ヒメエダミドリイシ類の隠蔽系統と集団遺伝構造

ヒメエダミドリイシ類は、枝状のミドリイシで、100年以上前から館山・対馬などの最北限域まで分布している一方、温暖化による分布拡大は現時点では見られていない種である。

ヒメエダミドリイシ類に関して、まず、ジェノタイピングした遺伝子型からクローン率を算出した結果、他のテーブル上のミドリイシ類とは対照的に、生息域全域において高いクローン率を持つことが分かった(図(1)－9)。そのため、最北限から分布中心にかけてクローン率に偏りはなかった。ヒメエダミドリイシは一気に地域絶滅するような傾向も野外でみられるが、そのひとつの原因としてクローン率が高いことが関係しているかもしれない。次に、重複するクローンの個体を除き、STRUCTUREを用いたクラスタリング解析を行った。その結果、日本に分布するヒメエダミドリイシは2つの大きく異なる遺伝系統に分かれることが分かった(図(1)－10)。これらは形態では識別できないものの、四国の西で2系統が同所的に分布している以外は地理的に東西に分布が分かれていた。類似する隠蔽系統分布をもつサザエでは、過去の気候変動の際に2系統に分岐したと考えられ¹⁸⁾、現在では別種とみなされていることから今後、同所海域での生殖が自然状態で妨げられている別種かどうかを精査する必要がある。いずれにしても、進化的に異なる遺伝系統が見つかったため、両方の遺伝系統が残るように保全していく必要があると考えられる。

さらに、クローンをぬいた集団を用いて、各地点の遺伝的多様性を算出した。その結果、やはり遺伝的多様性は分布域全域にわたって高く、特に北限海域の集団で低くはなっていなかった(表(1)－12)。このことから温帯域100年以上前から分布している集団はクシハダミドリイシ類、エンタクミドリイシ類、後述するハナヤサイサングと同様に最北限域であっても高い遺伝的多様性を有していることが分かった。

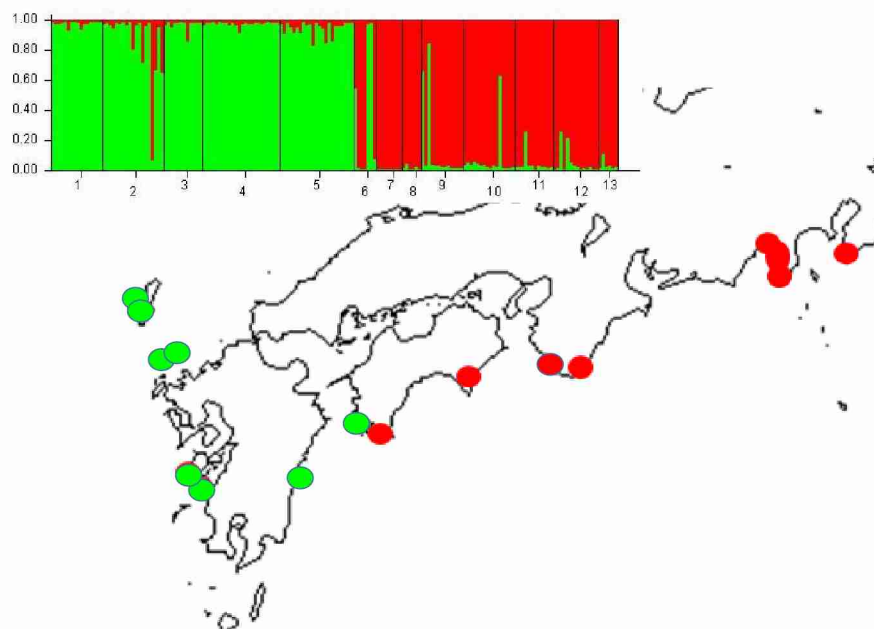
	A	AMA	C	E	F	G	I	IK	IKN	K	KO	Ku	N	NB	S	T	TS	TU	W	WT
個体数	17	30	13	35	29	35	27	28	4	3	29	27	32	3	16	30	27	21	35	26
遺伝子型数 (MLG)	9	15	7	6	23	12	3	10	2	2	7	11	9	3	6	8	14	14	10	4
MLGの割合	0.53	0.50	0.54	0.17	0.79	0.34	0.11	0.36	0.50	0.67	0.24	0.41	0.28	1.00	0.38	0.27	0.52	0.67	0.29	0.15
クローンの割合	0.47	0.50	0.46	0.83	0.21	0.66	0.89	0.64	0.50	0.33	0.76	0.59	0.72	0.00	0.63	0.73	0.48	0.33	0.71	0.85



図(1)－9 ヒメエダミドリイシの無性クローン構造 地図上の数字は各地点のクローン率。分布域全体を通じて無性生殖の割合が大きく、かつ北限域も他海域と同定であることがわかる。

表(1)－12 ヒメエダミドリイシ類の遺伝的多様性(Hoヘテロ接合度観察値、Heヘテロ接合度期待値)。青地は最北限の集団

集団	個体数	Ho	He	F
対馬西	13	0.622	0.447	-0.332
対馬東	14	0.582	0.414	-0.306
杵岐	10	0.419	0.372	-0.092
天草	20	0.413	0.416	0.043
愛媛	18	0.424	0.427	-0.004
高知	6	0.384	0.344	-0.149
徳島	7	0.464	0.298	-0.555
白浜	5	0.533	0.459	-0.107
和歌山	11	0.302	0.281	0.010
静岡1	14	0.638	0.432	-0.404
静岡2	11	0.192	0.202	0.182
静岡3	12	0.299	0.326	0.018
館山	6	0.581	0.330	-0.721
平均	11	0.450	0.365	-0.172



図(1)－10 ヒメエダミドリイシのSTRUCTURE解析 東西で異なる色でしめされた異なる遺伝系統が分布しており、これらは異なる隠蔽種である可能性があり、今後同所海域での検証が必要。

ヒメエダミドリイシの遺伝構造を2集団間の遺伝分化係数（ペア F_{ST} ）によって推定した結果、異なる遺伝系統をもつ集団間で遺伝分化が見られたほか、同一遺伝系統内でも有意に分化する集団ペアが存在しており、集団間の幼生分散は比較的限られていることが推定された（表(1)-12）。

表(1)－13 ヒメエダミドリイシのペア F_{ST} （下）とP値。太字が特に強く分化しているペア ペア集団間の遺伝分化係数が大きいほどペア集団間で遺伝的に離れており、P値が小さいペアは有意に分化してい

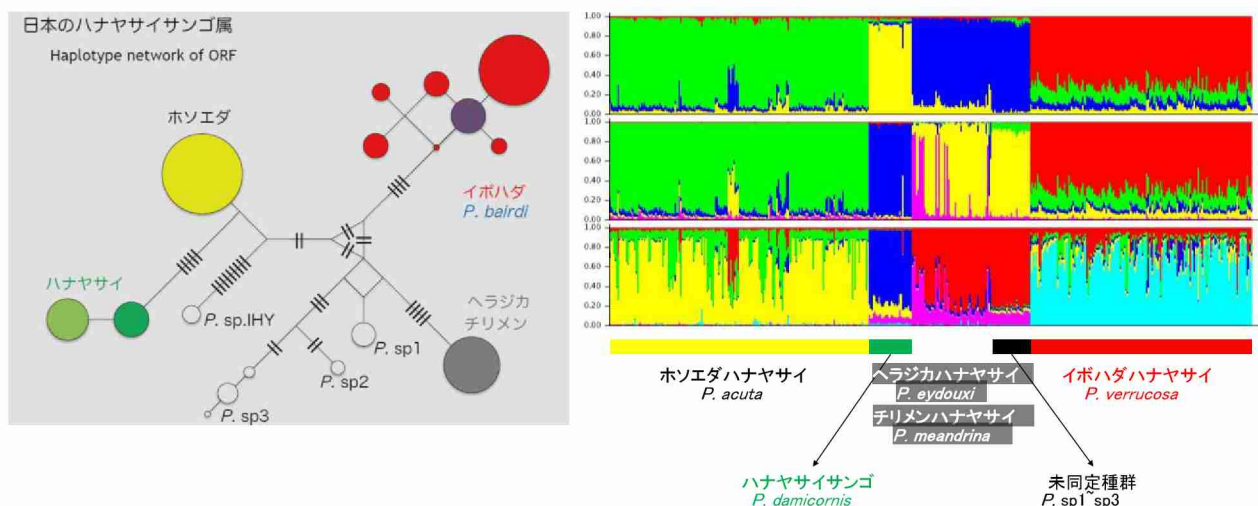
る

	天草	杵岐	対馬S	対馬U	愛媛	高知	徳島	白浜	和歌山	静岡1	静岡2	静岡3	館山
天草		0.427	0.015	0.013	<0.001	<0.001	<0.001	0.051	0.165	0.687	0.005	0.017	0.049
杵岐	-0.008		0.054	0.004	<0.001	0.003	0.008	0.077	0.028	0.228	0.035	0.027	0.286
対馬S	0.026	0.034		0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.009	0.019	0.083	0.001	0.001	0.001
対馬U	0.025	0.086	0.036		<0.001	<0.001	<0.001	0.008	0.078	0.039	<0.001	<0.001	<0.001
愛媛	0.164	0.262	0.178	0.185		0.232	<0.001	0.735	0.026	<0.001	0.455	0.261	0.007
高知	0.237	0.383	0.276	0.284	0.024		<0.001	0.087	0.012	<0.001	0.642	0.055	0.005
徳島	0.309	0.288	0.347	0.414	0.663	0.938		0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
白浜	0.061	0.157	0.077	0.059	-0.023	0.091	0.683		0.549	0.113	0.598	0.794	0.094
和歌山	0.005	0.101	0.034	0.000	0.062	0.212	0.570	-0.039		0.316	0.109	0.337	0.011
静岡1	-0.021	0.002	0.001	0.001	0.138	0.254	0.407	0.026	-0.020		0.013	0.038	0.016
静岡2	0.110	0.191	0.162	0.170	0.005	0.023	0.689	-0.009	0.058	0.102		0.594	0.189
静岡3	0.048	0.113	0.087	0.087	0.009	0.085	0.583	-0.045	-0.015	0.034	-0.019		0.060
館山	0.041	0.017	0.108	0.165	0.186	0.324	0.591	0.123	0.117	0.064	0.080	0.061	

b)-4 ハナヤサイサンゴ類の種境界と集団遺伝解析

日本各地から採集したハナヤサイサンゴ類をミトコンドリアのORFとマイクロサテライト遺伝子座で解析した結果、形態と遺伝子の多くは一致しないものの、ミトコンドリアORFと核遺伝子座解析の結果は一致していることが分かった(図(1)–11)。ハナヤサイサンゴとホソエダハナヤサイは形態で全く区別がつかないものの遺伝系統としては核でもミトコンドリアORFにおいても異なっていることが示された。また、イボハダハナヤサイも核およびミトコンドリアORFで単系統を示していた。しかし、形態的には異なっているヘラジカハナヤサイとチリメンハナヤサイは両者ともで同一の遺伝系統としてまとまった。また、本研究で見つかった未記載種4系統についてもヘラジカハナヤサイおよびチリメンハナヤサイと類似する系統としてまとまった。

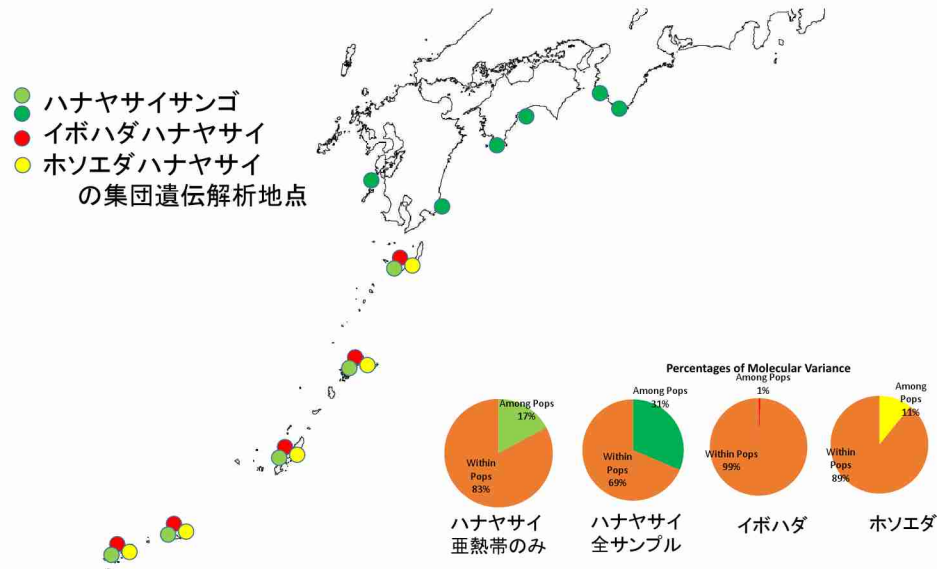
これらハナヤサイサンゴ類の分布としては、温帯域にはハナヤサイサンゴのみが分布しており、屋久島以南にその他の全ての遺伝系統が分布していた。このことからクシハダミドリイシで3系統中1系統のみが温帯に分布していたことと類似して、温帯域が現時点で避難所としての役割を果たせることが分かっているのはハナヤサイサンゴのみであることが分かった。



図(1)–11 ハナヤサイサンゴのミトコンドリアORFのハプロタイプネットワーク図(左)およびマイクロサテライト6遺伝子座のSTRUCTURE解析(右)。ハプロタイプネットワーク図において、大きな円はより多くの個体で見つかったハプロタイプであることを示し、線の長さが長いほど遺伝系統が離れることを示す。

次に十分な解析数が得られたハナヤサイサンゴ、イボハダハナヤサイ、ホソエダハナヤサイに関して、マイクロサテライトを用いた集団遺伝解析を行った結果、集団間の遺伝構造は最も空間的に幅広く分布するハナヤサイサンゴで最も大きく ($F_{ST}=0.31$)、次にホソエダハナヤサイ ($F_{ST}=0.11$)、最も遺伝構造が小さいのはイボハダハナヤサイ ($F_{ST}=0.01$) であることが分かった(図(1)–12)。この傾向はハナヤサイサン

ゴのサンプルのうち、イボハダハナヤサイやホソエダハナヤサイと全く同じ空間範囲（亜熱帯の八重山から屋久島まで）で解析した場合も全く同じであった（ $F_{ST}=0.17$ ）。このことから、日本国内で、最も幼生分散による遺伝子流動が小さいのはハナヤサイサンゴであり、次にホソエダハナヤサイ、イボハダハナヤサイと続くことがわかった。イボハダハナヤサイは日本国内では有意な遺伝構造をもたないため、地点間の遺伝的なつながりが大きいことが分かった。ハナヤサイサンゴに関しては、近年の温暖化に伴った分布拡大や北上はとくに報告されていない。このひとつの原因として、最も北まで分布するハナヤサイサンゴは、強い遺伝構造から推定されるように、移動分散能力が乏しく、あまり遠くの海域まで加入していないからである可能性が考えられた。一方、イボハダハナヤサイは遺伝構造が弱く、近隣の海域間で強い遺伝子流動がおきていると考えられることから、今後温暖化に伴って北上が見られるかどうかについて留意する必要がある。



図(1)－12 集団遺伝解析を行ったハナヤサイサンゴ3種の地点とAMOVA解析の結果（右下）

表(1)－14 ハナヤサイサンゴ類3種の遺伝的多様性および近交係数（マイクロサテライト解析）

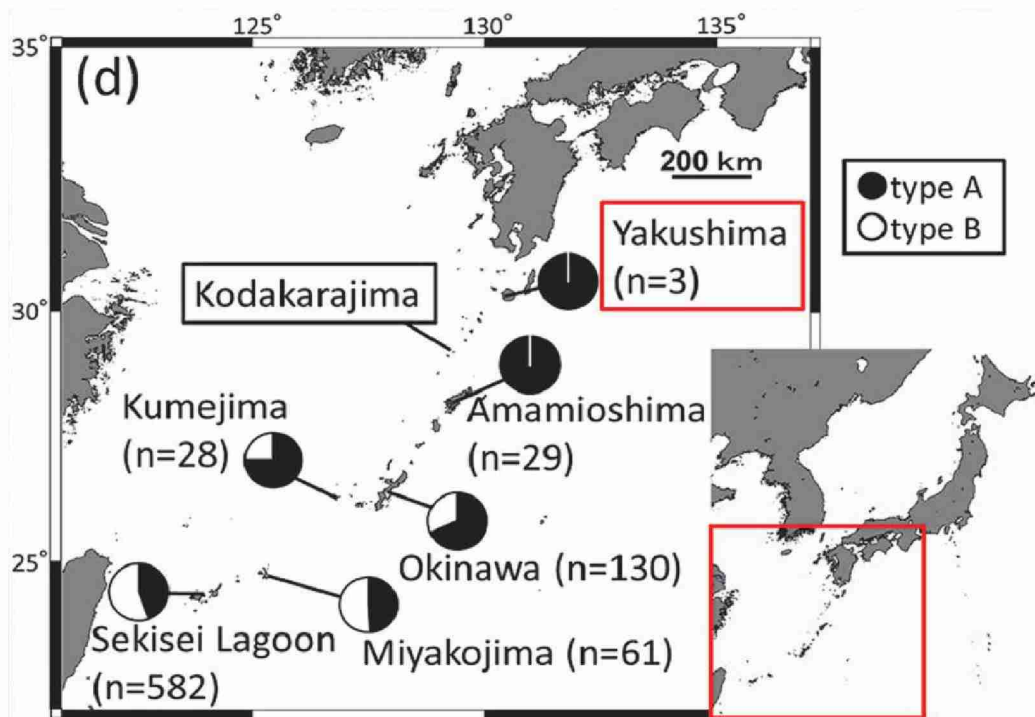
ハナヤサイサンゴ						ホソエダハナヤサイ						イボハダハナヤサイ					
Pop	解析数	アリル数	Ho	He	近交係数	解析数	アリル数	Ho	He	近交係数	解析数	アリル数	Ho	He	近交係数	解析数	アリル数
八重山	34	7.000	0.605	0.698	0.155	372	8.000	0.526	0.633	0.184	36	8.250	0.604	0.658	0.100		
宮古	3	3.400	0.533	0.556	0.044	35	5.500	0.599	0.645	0.077	8	4.250	0.366	0.505	0.257		
沖縄	15	2.800	0.733	0.471	-0.608	128	4.833	0.564	0.576	0.111	62	9.500	0.651	0.675	0.039		
奄美	47	7.000	0.521	0.566	0.060	77	5.667	0.480	0.653	0.268	8	5.250	0.611	0.627	0.046		
屋久島	10	4.000	0.660	0.606	-0.070	7	2.500	0.667	0.463	-0.355	47	10.250	0.656	0.724	0.105		
天草	29	2.400	0.986	0.506	-0.948												
日南	11	3.800	0.794	0.589	-0.372												
延岡	7	2.600	0.429	0.378	-0.142												
高知	21	3.400	0.579	0.413	-0.102												
横浪	24	2.400	0.864	0.521	-0.651												
串本	37	3.800	0.583	0.525	-0.009												
白浜	56	4.200	0.664	0.569	-0.129												

ハナヤサイサンゴ3種に関しては、本研究の最南端の八重山海域から最北限の屋久島（ハナヤサイサンゴに関しては和歌山の白浜）まで、遺伝的多様性には大きな違いがなかった(表(1)－14)。このことから分布最北限も含め比較的高い遺伝的多様性が維持されていることが分かった。

b)-5 アオサンゴ類の種境界と集団遺伝解析

アオサンゴは8放サンゴの一種であるが例外的に硬い骨格を持つ造礁サンゴの一種である。白亜紀からほとんど形態を変えないで反映してきた生きる化石でもある亜熱帯種である。本研究により、アオサンゴは従来のトカラ列島ではなく、1990年代以降には屋久島まで加入しており、北上した可能性もあることが明らかとなった(Nakabayasiら2017年, 業績2)。近年、アオサンゴには少なくとも2種、産卵期が異なり(谷中ら2018年, 業績4)、遺伝的にも異なる遺伝系統が黒潮海域に分布していることが分かっている¹⁹⁾。黒潮海域に沿って2種の分布を調べてみたところ、サンゴ礁のリーフスロープ等に良くみられるA種は奄

美と屋久島に分布している一方、サンゴ礁のリーフ内でよく見られるB種は沖縄島を最北限としていることが分かった(図(1)－13)。遺伝的多様性・遺伝構造については、すでに発表済みのマイクロサテライト遺伝子座6座で集団遺伝解析を行った結果(Yasuda et al. 2014)¹⁹⁾を統計モデル解析に用いた。



図(1)－13 アオサンゴの分布と2つの隠蔽種の頻度分布。白で示されるタイプBは沖縄本島を北限としているのに対し、タイプAは従来の分布域である小宝島よりも北の屋久島で新たにみつき、北上している可能性が示された。

b)-6 ハナガササンゴの集団遺伝解析用のマーカー開発と形態種との比較

これら8領域のマイクロサテライトマーカーは全てのマーカーで多型が認められた(表(1)-14)。この結果は現在国際誌に論文投稿を行いリバイス中である。

STURCTURE解析を行った結果、最適なクラスター数はK=5と推定されたが、形態種と遺伝子型は全く一致せず、また異なる系統間で複数の遺伝系統や中間的な系統が見つかったことから、異なる遺伝クレードのうちどこに属するかを示している。横軸下の数字は異なる形態種を示す。種内で異なる色が混ざっていることから、形態種と遺伝子が一致しないことがわかった。

今後は、さらにサンプル数を増やし、より詳細な解析を行っていく必要がある。ハナガササンゴはマーカー開発が予定よりも時間を要したため、対象種の中で唯一集団遺伝解析結果を用いることが出来なかった。

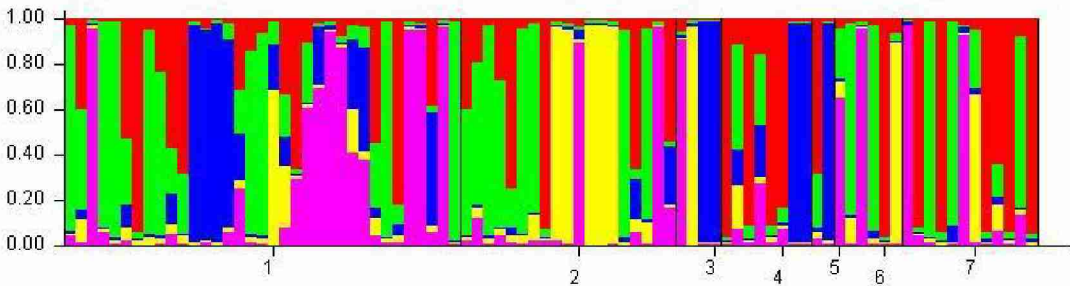
表(1)-14 8つのマイクロサテライトマーカーの性質(上)と5形態種におけるマイクロサテライトの増幅長(下)

8領域マイクロサテライトマーカーの性質

種名	サンプル数		G113	G205	G217	G328	G329	G392	G315	G212
<i>G. djiboutiensis</i>	35	PCRかかった割合	0.97	0.97	1.00	1.00	0.91	0.89	0.89	0.97
		アリル数	4	14	6	5	7	9	22	6
		ヘテロ接合度(観察値)	0.382	0.559	0.286	0.429	0.219	0.548	0.710	0.529
		ヘテロ接合度(期待値)	0.591	0.893	0.304	0.505	0.354	0.715	0.929	0.679
		近交係数	0.353	0.374	0.062	0.152	0.381	0.233	0.236	0.220
<i>G. norfolkensis</i>	19	PCRかかった割合	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.47	0.95
		アリル数	3	12	3	4	5	6	9	9
		ヘテロ接合度(観察値)	0.368	0.474	0.263	0.316	0.158	0.526	0.667	0.611
		ヘテロ接合度(期待値)	0.492	0.880	0.237	0.350	0.284	0.673	0.870	0.772
		近交係数	0.251	0.461	-0.111	0.099	0.444	0.218	0.234	0.208
<i>G. lobata</i>	4	PCRかかった割合	1.00	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00
		アリル数	2	3	2	2	4	2	0	3
		ヘテロ接合度(観察値)	0.500	0.500	0.500	0.000	0.250	0.500	0.000	0.000
		ヘテロ接合度(期待値)	0.375	0.625	0.375	0.500	0.656	0.500	0.000	0.625
		近交係数	-0.333	0.200	-0.333	1.000	0.619	0.000		1.000
<i>G. pendulus</i>	8	PCRかかった割合	1.00	0.75	0.88	1.00	0.88	0.75	0.38	1.00
		アリル数	3	6	3	4	4	4	5	5
		ヘテロ接合度(観察値)	0.625	0.500	0.429	0.500	0.286	0.333	1.000	0.625
		ヘテロ接合度(期待値)	0.461	0.792	0.622	0.563	0.602	0.694	0.778	0.719
		近交係数	-0.356	0.368	0.311	0.111	0.525	0.520	-0.286	0.130
<i>G. tenuidens</i>	2	PCRかかった割合	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00
		アリル数	3	3	2	3	2	3	0	2
		ヘテロ接合度(観察値)	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.500
		ヘテロ接合度(期待値)	0.625	0.625	0.500	0.625	0.500	0.625	0.000	0.375
		近交係数	0.200	0.200	1.000	-0.600	1.000	-0.600		-0.333
<i>G. lobata cf</i>	6	PCRかかった割合	1.00	0.83	0.83	1.00	0.83	0.67	0.33	0.67
		アリル数	3	6	2	3	2	5	3	4
		ヘテロ接合度(観察値)	0.333	0.400	0.200	0.333	0.200	0.500	0.500	0.750
		ヘテロ接合度(期待値)	0.486	0.800	0.180	0.486	0.420	0.750	0.625	0.688
		近交係数	0.314	0.500	-0.111	0.314	0.524	0.333	0.200	-0.091
<i>G. djiboutiensis cf</i>	12	PCRかかった割合	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.92	1.00
		アリル数	4	11	3	4	5	6	15	6
		ヘテロ接合度(観察値)	0.500	0.500	0.500	0.417	0.417	0.667	1.000	0.417
		ヘテロ接合度(期待値)	0.406	0.865	0.403	0.517	0.521	0.757	0.909	0.715
		近交係数	-0.231	0.422	-0.241	0.195	0.200	0.119	-0.100	0.417
全サンプル平均	86	PCRかかった割合	0.988	0.930	0.953	1.000	0.942	0.907	0.651	0.953
		アリル数	3.143	7.857	3.000	3.571	4.143	5.000	7.714	5.000
		ヘテロ接合度(観察値)	0.458	0.490	0.311	0.428	0.218	0.582	0.554	0.490
		ヘテロ接合度(期待値)	0.491	0.783	0.375	0.507	0.477	0.674	0.587	0.653
		近交係数	0.028	0.361	0.082	0.182	0.528	0.118	0.057	0.222

ハナガササンゴ5形態種におけるマイクロサテライトマーカー増幅長

プライマー名	Repeat type	Primer sequences (5'-3')	Size range of alleles(bp)							
			<i>G. djiboutiensis</i>	<i>G. norfolkensis</i>	<i>G. lobata</i>	<i>G. pendulus</i>	<i>G. tenuidens</i>	<i>G. lobata cf</i>	<i>G. djiboutiensis cf</i>	
G113	(TCA)9	attctcatcaccgtccttcaact aatgcaggttcaagcttaaat	110-119	113-116	110-116	110-116	113-119	113-119	107-122	
G205	(TTA)8	gctcaggtagcttttcttcaaa ttgtggtacaaacgacgactac	187-226	187-209	186-227	187-220	119-209	186-211	186-220	
G217	(TTG)9	tgaagagttgaagacagcaaa ttattcatctaatggtgctgctc	191-215	209-215	209-215	209-212	209-219	209-212	209-215	
G328	(AAC)9	atcaccaacctcaatcatacc attgtcatagcaggcgacttt	286-330	328-334	317-334	317-334	323-334	317-334	317-334	
G329	(GAT)8	ttaggaaagc aaaatctctggtc ctttccaggttaactgacagg	281-330	325-351	324-331	325-347	325-351	325-328	324-330	
G392	(TAT)9	gagtgcttaattccctaccctt agtgaagctgctcaggtagatag	382-405	393-396	384-399	387-399	390-396	387-402	387-399	
G315	(AAT)8	cgcaagccagatttagtagt tgaaggc aaaggttgtaaaa	293-347	×	314-334	310-328	×	290-334	299-338	
G212	(TATT)8	cctgtgacaccaattttaca ttcacaggatttagtaacagca	179-210	197-205	196-210	179-210	202-205	197-209	202-214	



図(1)-14 STRUCTURE解析結果 事前情報無し($K=5$) 横軸がそれぞれの個体をしめており、縦軸が5種類

c) 統計モデルに向けた遺伝解析情報のまとめ：隠蔽系統の種数と境界・遺伝分化係数・遺伝的多様性・アレル多様度・プライベートアレル数から見た相対的な海域重要度の算出

統計モデルに入れるべく、EBSAの基準の1.唯一性、又は希少性については、プライベートアレル(遺伝子)の数、4.脆弱性・感受性・低回復性に関しては、各集団のクローン率、6. 生物学的多様性に関しては、遺伝解析で発見した隠蔽種数および生物多様性の基盤アレル多様性を適応し、3段階の振り分けをしたのが下記である(表(1)-15)。これにより従来見えなかった、遺伝的な多様性や、集団の中に存在する脆弱性などを評価することに成功した。

また一方、4属10種のサンゴ類を総じて空間的な遺伝構造を示したのが図(1)-15である。和歌山と四国の間、五島列島とそのほか、屋久島の南北、南西諸島の各島間で2種以上のサンゴ種の分化がみられたことから、線で区切られた海域間の幼生分散は限られると考えられる。そのため、個々の海域内に必ずひとつは海洋保護区を設置し、それぞれの海域でサンゴが再生産できる状態であることが重要であると考えられた。

表(1)-15 サブテーマ1で得たデータから統計モデルに組み込んだ情報 1から3になるにつれ保全優先度がより高いことを示す

- 1)これまで、適切な高度多型分子マーカーがなかったために遺伝的多様性を評価することができなかったハナガササンゴに関して、マーカーの開発に成功するとともに、従来の形態識別は実際の種の境界と一致していないことを明らかにすることが出来た。これは造礁サンゴ類の集団遺伝解析・クローン解析への可能性を広げると共に、ハナガササンゴ類の分子系統が現在の形態識別とは異なることを示唆した。
- 2)これまで、温暖化で近年に新たに形成されたサンゴ集団の遺伝構造は全く調べられてこなかった。本研究はここ80年間の間に、新規に加入して形成された複数のサンゴ類の複数の遺伝構造を世界で初めて調べた。その結果、一部の例外を除き、実際にごく新しい最北限の集団では遺伝的多様性が低くなること、80年以上前から分布が変わっていないサンゴ種については、分布域全域で遺伝的多様性はほとんど同じであることなどを明らかにした。これは集団遺伝学的にも興味深い結果であり科学的波及効果は大きい。
- 3)本研究の一部の種で用いたMIG-seq解析は手法として新しいものであるが、従来のマイクロサテライトマーカーと比較することで、手法としてもマイクロサテライトとほぼ同様の結果が得られ、手法の有効性を示すと共に、多遺伝子座での検証によりさらなる科学的裏づけをすることができた。
- 4)これまで、文献調査でサンゴ礁生物の北上は示されていたものの、亜熱帯域から温帯域までのコネクティビティがどの程度あったかについては情報がほとんどなかった。本研究は、亜熱帯から温帯へのコネクティビティは比較的限られること、屋久島以南と以北で遺伝構造が見られることをサンゴ礁生物に関してははっきりと示すことができ、それが後述する海水流動による幼生分散の制限であることを新たに示すことができた。
- 5)本研究はクシハダミドリイシ、エンタクミドリイシ、ハナヤサイサンゴなど、他の研究でも良く使われる普通種について日本国内の隠蔽系統の有無やその分布を初めて示すことができた。これらは、今後生物多様性のより正確な評価や、今後の温暖化で起こるかもしれない見えない北上の実態を明らかにする上でも重要な知見を与えることができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) レッドデータリストを作成する際のサンゴ類の絶滅危惧種選定における科学的裏づけを与えた。特にすでに絶滅危惧種として扱われているヒメエダミドリイシ *Acropora pruinosa* は四国を境に東西で、異なる隠蔽種の可能性もあることが明らかになったため、両方の遺伝系統を保全していく必要があることが分かった。また当該種が野外において大きな集団を形成している場合においてもほとんどがクローンで出来ていることが本研究により新たにわかった。すなわち、一度の環境変化で地域絶滅しやすいことを科学的に裏付けた（実際、ヒメエダミドリイシは宮崎など一部の海域で過去に地域絶滅しており、温暖化が起きている過去100年に全く分布拡大等が見られていない）。この絶滅危惧種の詳細な生態と遺伝的多様性に関する新たな知見は、生物多様性条約第10回締結国会議（CBD・COP10）生物多様性国家戦略（2012）で掲げられた愛知目標12 「2020年までに、既知の絶滅危惧種の絶滅が防止され、また、それらのうち、特に最も減少している種に対する保全状況の改善が達成、維持される。」という目標達成に貢献する科学的知見である。
- 2) これまで温暖化に際して避難所を保全していくという考え方は科学論文では提唱されていたものの、実際に避難所としての機能を遺伝的・海洋物理学的な統合的視点により科学的に示した例はない。Keppel et al. (2012)²⁰⁾によると“レフュージア（避難所）とは、生物多様性の一部が逃げ込むことができ、集団を維持することができて、温暖化等で環境が変わったとしても広がっていくことができそうであるために、環境変動下でも種の保全に役立つ海域”とされる。本研究により、亜熱帯にいる全てのサンゴ礁種について温帯域を避難所として保全することはできないため、依然石西礁湖など

の亜熱帯サンゴ礁海域が遺伝的多様性の観点からも重要であることは示しながらも、一部のサンゴ種では温帯域のうち、100年以上前から存在していて十分に高い遺伝的多様性を維持している海域が避難所として十分に機能していることを示した。具体的には、宮崎から四国、和歌山までの海域はサンゴが亜熱帯から稀な幼生分散によって逃げ込むことが出来て、かつそれぞれが十分に高い遺伝的多様性をもって安定しており、今後も温暖化による分布拡大が見込まれる海域であることが証明できた。そのため、これまで軽視されてきていた温帯域のサンゴを保全する意義(温帯域の海洋保護区の保全の一部に入れ込む必然性)に関する科学的裏づけを提供することが出来た。これらは、サブテーマ3でサブテーマ2の情報と併せてさらにEBSAの基準と照合して裏付けることで、戦略目標Eの愛知目標19「2020年までに、生物多様性、その価値や機能、その現状や傾向、その損失の結果に関連する知識、科学的基盤及び技術が向上し、広く共有され、移転され、適用される。」ことに貢献するとともに、戦略目標C「生態系、種及び遺伝子の多様性を保護することにより、生物多様性の状況を改善する」を達成するために重要な知見を提供できた。

- 3) 本研究により、4属10種のサンゴの遺伝構造をもとに琉球列島から本州・九州までの日本全国にわたるサンゴ海域全体のコネクティビティを調べた。それにより、個々に独立して保全管理することで有効であると考えられる海域の区分（保全管理ユニット）を明らかにした(図(1)－(15))。さらに遺伝的な孤立性の高い場所とその海域の遺伝的多様性や唯一性を求めることで、相対的重要度も示すことができた。これらの知見は、愛知目標11「沿岸域の重要海域10%を効果的均平に管理・保全してネットワーク化する」ために不可欠な知見であり、海洋保護区を増やす際に重要な情報を提供できた。

6. 国際共同研究等の状況

- 1) 本研究において行っているアオサンゴの集団ゲノム解析について、技術提供してもらう目的で、アメリカハワイ大学のHawaiian Institute of Marine ScienceのDr. Robert ToonenおよびDr. Zac Forsmanと共同研究を行った。それによりアオサンゴの隠蔽種を多遺伝子座により裏付けることに成功した。現在Iguchi et alとして論文をまとめサブテーマ2とともに査読修正を行っているところである。
- 2) 上記の研究に関連してインドのCSIR-Central Salt and Marine Chemicals Research Institute (CSMCRI)に所属するDr. Gaurav G. Shimpiを別予算で招へいし、アオサンゴの種分化関連するストレス遺伝子や生殖時期を決定する遺伝子の発現についての研究を進め、現在国際誌への論文をまとめているところである。
- 3) クシハダミドリイシのRADseq解析をボストン大学のSarah Davis博士と行っている。残念ながら今回の結果には間に合わなかったが、温帯域と亜熱帯域の集団を比較することで、低温・高温ストレス応答遺伝子が取れてくる見込みである。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) H Yuasa, Y Higashimura, K Nomura, **N Yasuda***: Bulletin of Marine Science, 93, 4:1009-1010 (2017)
Diet of *Acanthaster brevispinus*, sibling species of the coral-eating crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* sensu lato.
- 2). A Nakabayashi., T Matsumoto, **YF Kitano**, S Nagai, **N Yasuda***: Galaxea, Journal of Coral Reef Studies. 18, 1-2 (2017).
Discovery of the northernmost habitat of the blue coral *Heliopora coerulea*: possible range expansion due to climate change?
- 3). **N Yasuda***. Coral reef studies in Japan, A Iguchi and C Hongo eds. Springer Book 2018.
Distribution expansion and historical population outbreak patterns of crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci* sensu lato, in Japan from 1912 to 2015

- 4) 谷中絢貴*, 波利井佐紀, 香川浩彦, 上野光弘, 北野裕子, 斎藤佑太, 長井敏, 安田仁奈* 日本サンゴ礁学会誌 (受理済み) 石西礁湖周辺における遺伝的に異なる2タイプのアオサンゴ *Heliopora coerulea* (Pallas, 1766) の生殖時期推定

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表 (学会等)

平成30年度(発表が受理決定しているもの)

- 2) Akifumi Shimura, Hiroaki Aizawa, Takashi Nakamura, Takehisa Yamakita, Yuko F. Kitano, Akira Iguchi, Hiroya Yamano, Masato Kiyomoto, Satoshi Nagai, and Nina Yasuda, 4th Asia Pacific Coral Reef Symposium, Cebu, Philippines, Jun 4-8 2018 (accepted, awarded student travel award from Asia Pacific Coral Reef Symposium based on extended abstract)
Population Genetic Structure of *Acropora solitaryensis* and *A. cf. glauca*, Including the Northernmost Colonies Settled Recently
- 3) Nina Yasuda Genetic connectivity and speciation of coral reef benthos. Academia Sinica, Apr 26th 2018. Academia Sinica, Taiwan. **Invited talk**

平成29年度

- 2) Hiroki Taninaka, Saki Harii, Mitsuhiro Ueno, Yuko F Kitano, Yuta Saito, Satoshi Nagai, Nina Yasuda, Different reproductive timing as a cause of cryptic speciation of blue coral (*Heliopora coerulea*, Pallas 1766) with limited larval dispersal potential, European Coral Reef Symposium, Dec.13rd - Dec.15th 2017, Oxford University, England, Oxford, Poster
- 3) Nina Yasuda, Yukihiro Higashimura, Coralie Taquet, Satoshi Nagai, Handoko Adi Susanto, Miguel Fortes, Suharsono, Nippon Phongsuwan, Kazuo Nadaoka, Yoshihisa Suyama, Chika Mitsuyuki, Hideaki Yuasa, Genomic Consequences of the Indo-Pacific Vicariance in Coral Reef benthic organisms, Gert Wörhde European Coral Reef Symposium, Dec 15th 2017, Oxford University, Oxford, England, Oral
- 4) 安田仁奈, サンゴ礁無脊椎動物の初期生態と集団進化に関する研究, 川口奨励賞受賞記念講演, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月25日, 東京, 東京工業大学
- 5) 谷中絢貴, Zoe Richards, 陶山佳久, 満行知花, 菊地泰生, 吉田朱美, 湯浅英知, 安田仁奈, アオサンゴ集団ゲノム解析 ~ 黒潮流域と西オーストラリアの隠蔽系統比較, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-25日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 口頭発表
- 6) 志村晶史, 相澤浩明, 中村隆志, 山北剛久, 北野裕子, 井口亮, 山野博哉, 安田仁奈, 温帯ミドリイシサンゴの集団遺伝解析 ~ 最新集団遺伝解析 MIG-seq によるアプローチ ~, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-25日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 口頭発表
- 7) 松田太樹, 北野裕子, 井口亮, 山北剛久, 安田仁奈, 環境グラディエントマーカーを用いたハナヤサイサンゴの集団遺伝解析, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-25日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, ポスター発表
- 8) 相澤浩明, 中村隆志, 安田仁奈, 山北剛久, 低緯度~高緯度にわたる広域に適用可能なクシハダミドリイシの一斉産卵日予測のための有効積算水温の再検討, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-26日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 口頭発表
- 9) 野口七海, Frederic Sinniger, 波利井佐紀, 長井敏, 上野光弘, 安田仁奈, 八重山諸島周辺における稚サンゴを含むトゲサンゴの遺伝構造, 第20回日本サンゴ礁学会, 2017年11月23日-26日, 東京工業大学 大岡山キャンパス, ポスター発表
- 10) Sota Ishizu, Hironobu Fukami, Hiroyuki Yokochi, Nina Yasuda, Hironobu Fukami, Molecular study of the temperate coral *Acropora pruinosa* in Japan, The Third Asia Marine Biology Symposium, Nov. 3rd to Nov. 5th 2017, Prefectural University of Kumamoto, Japan, Kumamoto Prefecture, Poster

- 11) 安田仁奈, 造礁サンゴの遺伝学的解析による種分化とコネクティビティ解析, JpGU-AGU Joint Meeting 2017, 2017年5月20日-25日, 千葉県 幕張メッセ国際会議場, 国際展示場, 招待講演

平成28年度

- 12) 志村晶史, 中林朗, Frederic Siniger, 井口亮, 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 深見裕伸, 山野博哉, 安田仁奈, ミドリイシサンゴ属におけるマイクロサテライトマーカーを用いた集団解析, 第64回日本生態学会大会, 2017年3月14日-18日, 早稲田大学 早稲田キャンパス, ポスター発表
- 13) Yuko F. Kitano, Akira Iguchi, Mitsuhiro Ueno, Satoshi Nagai, Nina Yasuda Species and genotype distribution of Pocillopora damicornis-like coral across subtropical to temperate region in Japan. 13th International Conference of Coral Reefs, 2016年6月23日、ハワイ、アメリカ
- 14) Nina Yasuda, Takehisa Yamakita, Akiara Iguchi, Eiji Yamakawa, Ken Okaji Distribution and patterns of population outbreak of crown of thorns starfish in Japan over 100 years in association with global warming and larval dispersal 13th International Conference of Coral Reefs, 2016年6月24日、ハワイ、アメリカ
- 15) Aki Nakabayashi, Akira Iguchi, Soyoka Muko, Satoshi Nagai, Mitsuhiro Ueno, Takehisa Yamakita, Yuko Kitano, Yumi Yamamoto, Nina Yasuda. Distribution and Gene Flow Analysis of sibling coral species, Acropora hyacinthus and Acropora spicifera in the north peripheral region. 14-19 November, 2016. Joint Events of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan. Okinawa, Japan.
- 16) 志村晶史, 中林朗, Frederic Sinniger, 井口亮, 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 深見裕伸, 山野博哉, 安田仁奈, 北上が報告されているミドリイシサンゴ属における遺伝クレード解析, 第19回大会日本サンゴ礁学会, 2016年12月1日-4日, 沖縄タイムスビル, ポスター発表

平成27年度

- 17) 安田 仁奈, 長井 敏, 山川 英治, 岡地 賢, オニヒトデの遺伝子流動とconnectivity 推定. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス (東京) 口頭発表
- 18) 齊藤佑太, 長井敏, 灘岡和夫, 波利井佐紀, 上野光弘, 北野裕子, 安田 仁奈. 石西礁湖周辺海域におけるアオサンゴ2種の遺伝構造の比較. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス (東京)
- 19) 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 安田 仁奈. 八重山におけるハナヤサイサンゴ属の分布. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス (東京)
- 20) 野口七海, 北野裕子, 上野光弘, 鈴木豪, 長井敏, 安田仁奈 石西礁湖周辺海域における着定稚サンゴの種組成と遺伝子型分布. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス (東京)
- 21) 中林朗, 井口亮, 北野裕子, 上野光弘, 長井敏, 安田 仁奈. 黒潮流域におけるクシハダミドリイシおよびナンヨウミドリイシの遺伝子流動解析. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス (東京)
- 22) 中村隆志, Lawrence Patrick C. BERNARDO, 天野 慎也, 渡邊 敦, Ratino SITH, 草世香, 福岡 弘紀, 鈴木 豪, 安田 仁奈, 長井 敏, 灘岡 和夫. オニヒトデの生活史のモデル化と発生予測の試み. 2015年11月26日-11月30日. 慶應大学三田キャンパス (東京)

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) オニヒトデの遺伝子流動とサンゴの北上に関する研究 2015年10月 [活動区分 : 依頼講演、市民シンポジウムや市民講座への出演]
- 2) サンゴ礁生態系の不思議～大量発生するオニヒトデの謎2015年10月
・東急ハンズ渋谷店 ハンズカフェ (東京) 一般向け講演

- 3) オニヒトデ総合対策事業シンポジウム オニヒトデ大量発生メカニズムとその対策 2017年11月5日 沖縄県立博物館・美術館 一般向け講演
- 4) 沖縄におけるサンゴ礁について 私立桐蔭学園高等学校 2017年11月21日 高校生130人対象

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 平成27年7月21日 宮崎日日新聞 海の日の特集で本研究にも関わる温帯域である宮崎のサンゴ及びオニヒトデの状況に関して専門家として取材を受け、記事となった。
- 2) 平成28年3月15日 毎日新聞 北上しているサンゴおよびオニヒトデについて一般向けのコラムを執筆

(6) その他

- 1) 優秀ポスター賞 安田仁奈
九州・沖縄女性研究者支援シンポジウム
平成27年9月11日 鹿児島大学
- 4) 川口奨励賞受賞 (日本サンゴ礁学会) 安田仁奈
サンゴ礁無脊椎動物の初期生態と集団進化に関する研究
2017年11月25日, 東京, 東京工業大学
- 5) **A full student travel award** (Asia Pacific Coral Reef Symposium) **Akifumi Shimura**, Hiroaki Aizawa, Takashi Nakamura, Takehisa Yamakita, Yuko F. Kitano, Akira Iguchi, Hiroya Yamano, Masato Kiyomoto, Satoshi Nagai, and Nina Yasuda
Population Genetic Structure of *Acropora solitaryensis* and *A. cf. glauca*, Including the Northernmost Colonies Settled Recently

8. 引用文献

- 1) Yamano H, Sugihara K, Nomura K: Geophysical Research Letters 38. (2011) Rapid poleward range expansion of tropical reef corals in response to rising sea surface temperatures)
- 2) Yasuda N In: Iguchi A, Hongo C, editors. Coral Reef Studies of Japan) Singapore: Springer Singapore. pp. 125-148. (2018) Distribution Expansion and Historical Population Outbreak Patterns of Crown-of-Thorns Starfish, *Acanthaster planci* sensu lato, in Japan from 1912 to 2015)
- 3) van Oppen M, Willis B, van Rheede T, Miller D: Mol Ecol 11: 1363-1376. (2002) Spawning times, reproductive compatibilities and genetic structuring in the *Acropora aspera* group: evidence for natural hybridization and semi-permeable species boundaries in corals.
- 4) Yasuda N, Taquet C, Nagai S, Fortes M, Fan T-Y, et al.: Molecular Phylogenetics and Evolution 93: 161-171. (2015) Genetic diversity, paraphyly and incomplete lineage sorting of mtDNA, ITS2 and microsatellite flanking region in closely related *Heliopora* species (Octocorallia).
- 5) Nakajima Y, Shinzato C, Satoh N, Mitarai S: PLoS ONE 10 (2015) Novel Polymorphic Microsatellite Markers Reveal Genetic Differentiation between Two Sympatric Types of *Galaxea fascicularis*.
- 6) Nakabayashi A, Matsumoto T, Kitano YF, Nagai S, Yasuda N: Galaxea, Journal of Coral Reef Studies 18: 1-2. (2016) Discovery of the northernmost habitat of the blue coral *Heliopora coerulea*: possible range expansion due to climate change?
- 7) Denis V, Mezaki T, Tanaka K, Kuo C-Y, De Palmas S, et al.: PLoS ONE 8: e54330. (2013) Coverage, Diversity, and Functionality of a High-Latitude Coral Community (Tatsukushi, Shikoku Island, Japan).
- 8) Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: Genetics 155. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data)
- 9) Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, et al.: J Hered 95: 536-539. (2004)

GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection)

- 10) Van Oppen MJH, Underwood JN, Muirhead AN, Peplow L: Molecular Ecology Notes 7: 436-438. (2007) Ten microsatellite loci for the reef-building coral *Acropora millepora* (Cnidaria, Scleractinia) from the Great Barrier Reef, Australia.
- 11) Shinzato C, Yasuoka Y, Mungpakdee S, Arakaki N, Fujie M, et al.: Frontiers in Marine Science 1 (2014) Development of novel, cross-species microsatellite markers for *Acropora* corals using next-generation sequencing technology).
- 12) Suyama Y, Matsuki Y: Scientific Reports 5: 16963. (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform.
- 13) Schmidt-Roach S, Miller KJ, Lundgren P, Andreakis N: Zoological Journal of the Linnean Society 170: 1-33. (2014) With eyes wide open: a revision of species within and closely related to the *Pocillopora damicornis* species complex (Scleractinia; Pocilloporidae) using morphology and genetics)
- 14) Fukami H, Budd A, Levitan D, Jara J, Kersanach R, et al.: Evolution 58: 234 - 337. (2004) Geographic differences in species boundaries among members of the *Montastrea annularis* complex based on molecular and morphological markers.
- 15) Benson G: Nucleic Acids Res 27: 573-580. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.
- 16) Rozen S, Skaletsky H: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers)
- 17) Peakall R, Smouse P: Bioinformatics. (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update.
- 18) Kojima S: Mar Ecol Prog Ser 150: 149-155. (1997) Genetic differentiation among populations of the Japanese turban shell Turbo (Batillus) cornutus corresponding to warm currents.
- 19) Yasuda N, Taquet C, Nagai S, Fortes M, Fan T, et al.: Bulletin of Marine Science 90: 233-255. (2014) Genetic structure and cryptic speciation in the threatened reef-building coral *Heliopora coerulea* along Kuroshio Current.
- 20) Keppel, G. , Van Niel, K. P., Wardell - Johnson, G. W., Yates, C. J., Byrne, M. et al. Global Ecology and Biogeography, 21: 393-404. (2012), Refugia: identifying and understanding safe havens for biodiversity under climate change.

Ⅱ－２北上生物における非中立遺伝子領域での適応可能性評価

独立行政法人国立高等専門学校機構 沖縄工業高等専門学校 生物資源工学科 井口亮

平成27～29年度累計予算額：5,942千円（うち平成29年度：1,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

サブテーマ（２）では、地球温暖化進行とともに分布拡大が予想される熱帯性海洋生物を対象に、今後の環境変化に対する生物集団の適応パターン的一端を明らかにすることを目的とした。具体的には、各生物種のゲノム情報に見られる一塩基多型（SNP）に着目し、環境要因と関連のあるSNP遺伝子座の抽出を行うための解析手法の確立を目指した。そして得られたSNPマーカーを用いて、遺伝子型決定及び地理的変異の把握を行った。また、サンゴに関しては、体内に共生する褐虫藻の遺伝子型決定も行った。その結果、主にRAD-seq解析をベースに、対象生物の中立又は非中立なSNP遺伝子座抽出手法の確立に成功した。得られたSNPマーカーを用いて遺伝子型決定を進めた結果、クシハダミドリイシ類とハナヤサイサンゴ類で、緯度傾斜に沿った遺伝子型組成の地理的変異の検出に成功した。褐虫藻に関しては、今回対象としたサンゴ集団では、主にクレードCが卓越し、その組成は場所によらず比較的均一なパターンであることが明らかとなった。比較的多くのデータが取得されたクシハダミドリイシ類に関しては、サブテーマ（３）の統計モデリングに用いるためのデータセット構築を行った。

〔キーワード〕

一塩基多型、RAD-seq、適応、地理的変異、褐虫藻

１．はじめに

サブテーマ（１）で主に扱ってきたミトコンドリアDNAや核DNAのマイクロサテライト領域は、自然選択に対して中立な遺伝的変異を扱っており、基本的な集団構造の把握に多く用いられている。その一方で、生物が保有するゲノム情報には、自然選択に対して中立的に振る舞う遺伝的変異に加えて、ある環境への適応に関連する場合に、非中立的に固定されるような変異も見られることがよく知られている。近年のシーケンサー技術の発展により、非中立な遺伝的変異を検出できる技術も普及が進んでいる。本研究課題のように、今後の地球温暖化進行と、それに伴う生物分布の拡大パターンを集団レベルで考慮する場合、非中立な遺伝的変異の分布パターンを把握することで、今後の環境変化に対する適応プロセスの一端を把握できる可能性がある。

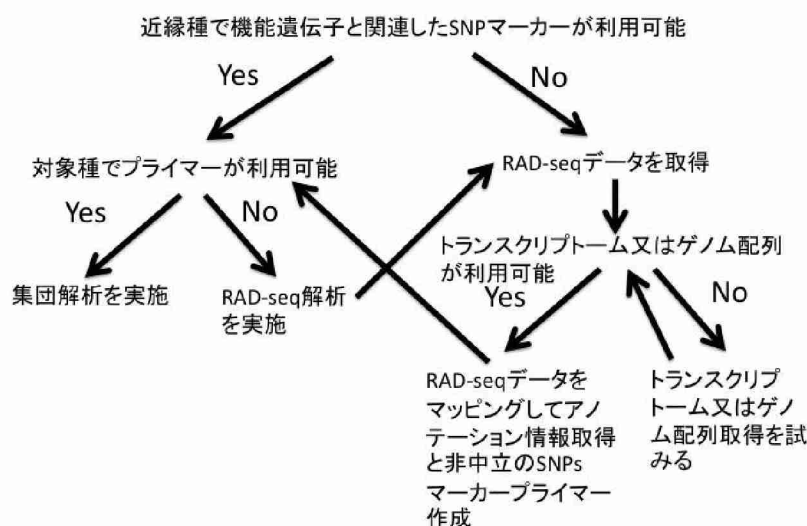
２．研究開発目的

上記の背景を踏まえて、サブテーマ（２）では、日本沿岸域から採取されたサンゴ礁生物複数種を対象に集団ゲノム解析を行い、高緯度特有の適応遺伝子の有無や遺伝子型頻度とその地理的変異を調べることで、高緯度集団の適応性・脆弱性・安定性を明らかにすることを目的とした。具体的には、サブテーマ（１）と協力して得られた、オニヒトデ、アオサンゴ、ミドリイシ属サンゴ、ハナヤサイサンゴ類を対象に、RAD-seqまたはSNPマーカーを用いて、一塩基多型の地理的変異を調べ、緯度傾斜に沿った環境変化との関連の把握を試みた。

３．研究開発方法

サブテーマ（１）と協力して得られたサンゴ礁生物の集団サンプルを対象に、SNPデータの取得の手法の確立と集団遺伝解析を進めた。手法としては、次世代シーケンサーを用いて、制限酵素切断部位周辺の遺伝子配列をゲノムワイドに決定し、集団遺伝解析する手法である、RAD-seq（Restriction site Associated DNA sequencing）を用いて、一塩基多型（SNP：Single Nucleotide Polymorphisms；塩基配列に

おける1塩基置換のこと)データの取得を行って、分子集団遺伝解析の実施を進めた。サンゴの場合、体内に共生藻類が多く存在していることを考慮し、ホストであるサンゴのみのSNPを抽出するために、サンゴのゲノム情報又はトランスクリプトーム情報をリファレンスとして解析する手法開発も試みた。また、サンゴは形態的に判別できない隠蔽種の存在がよく報告されているため、RAD-seqによる隠蔽種検出も試みた。また、サンゴに関しては、既に環境要因と関連する一塩基多型の遺伝子座も報告されているため、それらの情報を踏まえて、日本のサンゴ種での新規マーカーの開発と適用も進めた。具体的には、主に図(2)-1のような流れで研究を実施した。また、サンゴの共生藻類の遺伝子型の差異が、サンゴの環境応答と関連していることも報告されているので、今回得られたサンゴサンプルを対象に、褐虫藻のメタバーコーディング解析も実施した。



図(2)-1 サブテーマ(2)で実施したSNP解析における研究の流れ

以下、具体的な手法について述べる。

a) オニヒトデのRAD-seq解析による遺伝子流動パターンと非中立遺伝子座の検出

サブテーマ(1)と協力して得られた各地域のオニヒトデのDNAサンプル及びRAD-seqデータを用いて、RAD-seqデータの解析手法の確立を進めた。今回の解析には、日本周辺やフレンチポリネシアなどの5地域集団から採取されたオニヒトデ100個体から取得されたRAD-seqデータを用いた。ソフトウェアStacks¹⁾を用いて、予備的にSNP遺伝子座の絞り込みを行った結果、全部で数万個以上のSNP遺伝子座が確認された。しかし全個体で共有されているSNP遺伝子座の数が限られていた。そこでこの問題を解決するために、2017年に公開されたオニヒトデのトランスクリプトームデータ及びゲノム配列データ²⁾をリファレンスとして、Bowtie 2³⁾によるマッピングを行い、StacksによるSNP遺伝子座の絞り込みを行った。また、北限集団特有のSNP遺伝子座抽出を行うために、Bayescan⁴⁾とPLINK⁵⁾を用いて解析した。PLINKの設定条件は、ハーディ・ワインバーク平衡の逸脱の閾値を $p < 0.001$ 、損失率の閾値を1%、MAF (Minor Allele Frequency) の閾値を2%、連鎖不平衡は $r^2 = 0.2$ 、window: 50 kbとした。また、PLINKで絞り込まれた中立なSNP遺伝子座を用いて、Genalex⁶⁾による分子集団遺伝学的解析を行った。

b) アオサンゴのezRAD-seq解析による種分化要因と適応遺伝子の検出

サブテーマ(1)と協力して得られた、水温条件の異なる環境に生息していることが示唆されているアオサンゴ(Aタイプ・Bタイプ)の石西礁湖のサンプルを用いて、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNA抽出を行った。抽出されたDNAサンプルを、Bioanalyzer (Agilent Technologies) とQubit kit

(Invitrogen)を用いて品質確認を行った。また、次世代シーケンサーMiSeqを稼働させ、ezRAD法⁷⁾を基に、ショートリードを取得するための基本的プロトコルを確立した。サンゴの体内には共生藻類が多く存在するため、ホストであるサンゴのSNPのみを抽出するために、得られたショートリードを用いて、アオサンゴのトランスクリプトームデータ⁸⁾をリファレンスとして、Bowtie 2によるマッピングを行い、得られたsamファイルを用いてStacksによるSNP遺伝子座の絞り込みを行った。

c) ミドリイシ属サンゴの非中立遺伝子座の検出と地理的変異

日本沿岸域に広域に分布するミドリイシ属サンゴを対象に、サブテーマ（1）と協力して、日本沿岸における対象生物のサンプリングを実施した。得られたサンプルから、b)と同様にDNA抽出を行った。サンプルの一部には、先行研究⁹⁾で得られたサンプルも使用した。ミドリイシ属サンゴに関しては、オーストラリアの先行研究¹⁰⁾において、ハイマツミドリイシを対象とした温度や水質と相関のあるSNPマーカーが報告されている。そこで、日本周辺に多く見られるコユビミドリイシとクシハダミドリイシの遺伝子データベースを用いて、ホモログとなる遺伝子配列の抽出、SNPマーカーの作成、遺伝子型決定を行った。

d) ハナヤサイサンゴ類の非中立遺伝子座の検出と地理的変異

日本沿岸域に広域に分布するハナヤサイサンゴ類を対象に、c)と同様に、日本沿岸におけるサンプリングとDNA抽出を行った。ハナヤサイサンゴに関しては、オーストラリアの先行研究¹⁰⁾において、ハイマツミドリイシと同様に、温度や水質と相関のあるSNPマーカーが報告されている。その情報を参考に、ハナヤサイサンゴの遺伝子データベースを用いて、ホモログとなる遺伝子配列の抽出、SNPマーカーの作成、遺伝子型決定を行った。

e) 共生褐虫藻の検出と地理的変異

サンゴの環境応答に関しては、体内に共生する褐虫藻の遺伝子型の違いによっても変異が生じることが知られている¹¹⁾。そこで、上記で得られたミドリイシ属サンゴ、ハナヤサイサンゴ類を対象に、次世代シーケンサーMiSeqを用いた、核DNAのInternal transcribed spacer 2（ITS2）領域によるメタバーコーディング解析を用いて¹²⁾、褐虫藻の遺伝子型決定を実施した。

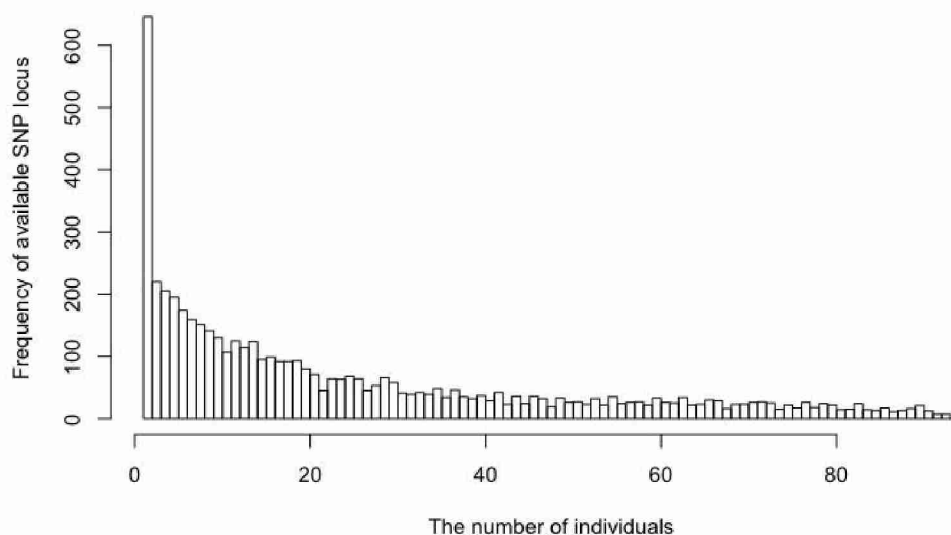
f) 統計モデリングに向けた適応関連遺伝子座データのまとめ

上記で得られたSNPデータのうち、広範囲から十分な変異を示すデータが取得できたクシハダミドリイシの温度耐性に関するSNPデータに絞って、サブテーマ（3）の統計モデリングに用いるためのデータセットを構築した。

4. 結果及び考察

a) オニヒトデのRAD-seq解析による遺伝子流動パターンと非中立遺伝子座の検出

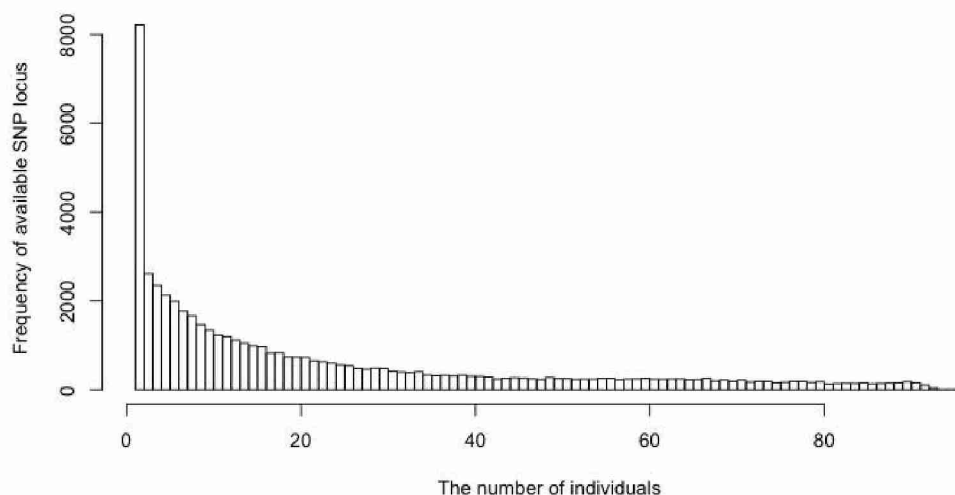
日本周辺4地点及びフレンチポリネシアの5地域集団から採取されたオニヒトデ100個体中、十分なリード数が確認された96個体から取得されたRAD-seqデータを、オニヒトデのトランスクリプトームデータにマッピングして解析した結果、5,261個のSNP(1塩基多型)遺伝子座が絞り込まれた（図(2)-2）。



図(2)-2 トランスクリプトームデータを活用して96個体分のオニヒトデサンプルから抽出された、SNP遺伝子座の頻度分布：縦軸がSNP遺伝子座の数、横軸が個体数。

上記で得られたデータのうち、多くのSNP遺伝子座を共有する4地域集団（MT：フレンチポリネシア、KK：宮崎北限集団、OK：沖縄、IS：石垣）からの52個体に絞って解析を進めた。そして、多型が見られるbiallelicな遺伝子座(対立遺伝子が2種類しかない1塩基多型領域のこと)のみを抽出すると、95個のSNP遺伝子座が抽出された。これら95個のSNP遺伝子座から、BayescanによるOutlier遺伝子座の抽出を試みたが、今回のデータセットからは検出されなかった。そこで、4地域集団（MT：フレンチポリネシア、OK：沖縄島、IS：石垣島、KK：宮崎）のうち、北限集団であるKKを含めない場合に、ハーディ・ワインバーク平衡の逸脱（ $p < 0.001$ ）が見られなくなる遺伝子座の絞り込みを、PLINKを用いて行った。その結果、1個の遺伝子座が絞り込まれた。絞り込まれた遺伝子座のSNPを含む遺伝子配列のアノテーション情報を取得した結果、Apolipoprotein B-100（アクセッション番号：Q7TMA5）と高い相同性を示した。

上記のトランスクリプトームデータを用いた解析と同様に、5地域集団から採取されたオニヒトデ100個体中、十分なリード数が確認された95個体から取得されたRAD-seqデータを、オニヒトデのゲノム配列データにマッピングして解析した結果、53,149個のSNP遺伝子座の絞り込みに成功した（図(2)-3）。



図(2)-3 ゲノム配列データを活用して96個体分のオニヒトデサンプルから抽出された、SNP遺伝子座の頻度分布：縦軸がSNP遺伝子座の数、横軸が個体数

上記で得られたデータのうち、多くのSNP遺伝子座を共有する4地域集団（MT：フレンチポリネシア、KK：宮崎北限集団、OK：沖縄、IS：石垣）からの49個体に絞り込んで解析した。そして、多型が見られるbiallelicな遺伝子座のみを抽出すると、596個のSNP遺伝子座が抽出された。これら596個のSNP遺伝子座から、BayescanによるOutlier遺伝子座の抽出を試みたが、検出されなかった。そこで4地域集団のうち、北限集団（KK）を含めない場合に、ハーディ・ワインバーク平衡の逸脱（ $p < 0.001$ ）が見られなくなる遺伝子座の絞り込みを、PLINKを用いて行った。その結果、5個のSNP遺伝子座が絞り込まれた。絞り込まれたSNP遺伝子座を含む配列の近傍に見られた遺伝子のアノテーション情報を取得した結果が表(2)-1である。リストの中には、トランスクリプトームデータでも確認されたApolipoprotein B-100（アクセッション番号：Q7TMA5）と高い相同性を示す遺伝子も含まれていた。

表(2)-1 オニヒトデの縁辺集団の適応に関わる可能性がある遺伝子リスト

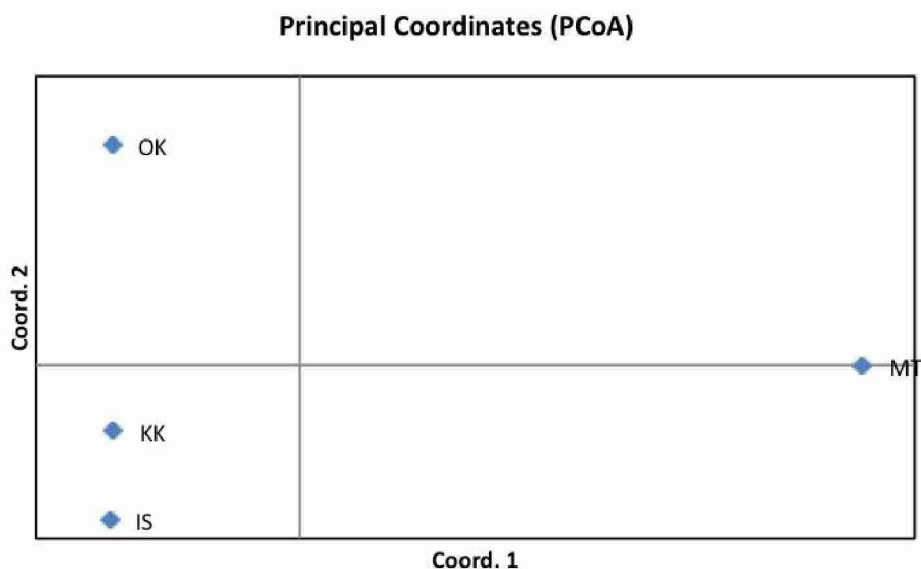
Scaffold ID	Annotate description	Accession number
oki_scaffold106	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 4	Q6W3E5
oki_scaffold106	Cytoplasmic protein NCK2	O43639
oki_scaffold135	NA	NA
oki_scaffold136	Apolipoprotein B-100	Q7TMA5
oki_scaffold147	Beta-parvin	Q9HBI1
oki_scaffold204	NA	NA

PLINKによって絞り込まれた遺伝子座のうち、中立性が確認された391個のSNP遺伝子座を用いて、Genalexによる分子集団遺伝学的解析を行った。その結果、表(2)-2のような遺伝的分化係数と統計的有意性が確認された。主座標分析により、地点間の遺伝的分化のパターンを可視化したのが図(2)-4・5である。フレンチポリネシアの集団は日本の集団とは遺伝的に分化している傾向が見られるが、1970年代以

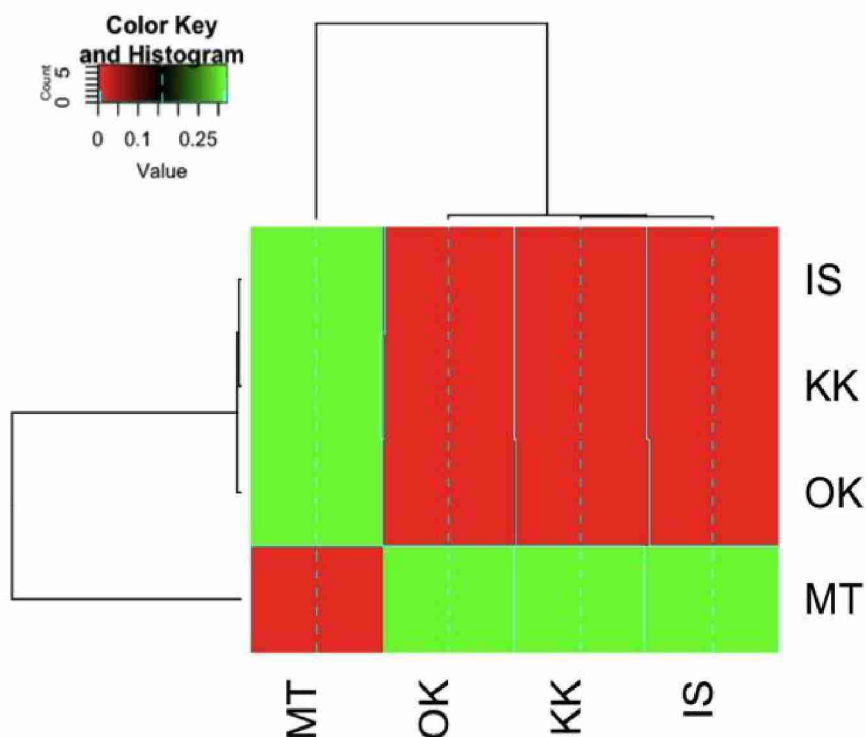
降に北上したと考えられる宮崎のオニヒトデ集団は、沖縄・石垣などの集団と遺伝的組成と酷似している。この結果は、先行研究のマイクロサテライトマーカーやミトコンドリア遺伝子解析での解析結果と基本的には一致しており、中立な遺伝子座に絞ったRAD-seqによる解析の有効性が確認されているといえる。また、サブテーマ（3）で後述する、オニヒトデの大量発生履歴や分布拡大の結果から生態学的時間スケールで琉球列島および温帯域にかけて幼生分散が海域間で頻繁に起きているという結果と一致する。

表(2)-2 各地点間でのAMOVA Fstの値（左下）とp値（右上）MT:フレンチポリネシア、KK:宮崎、OK:沖縄、IS:石垣。フレンチポリネシアのみがFstが大きく遺伝的に大きく分かれていることが分かる。

MT	KK	OK	IS	
0.000	0.001	0.001	0.001	MT
0.315	0.000	0.252	0.404	KK
0.319	0.004	0.000	0.146	OK
0.320	0.000	0.007	0.000	IS



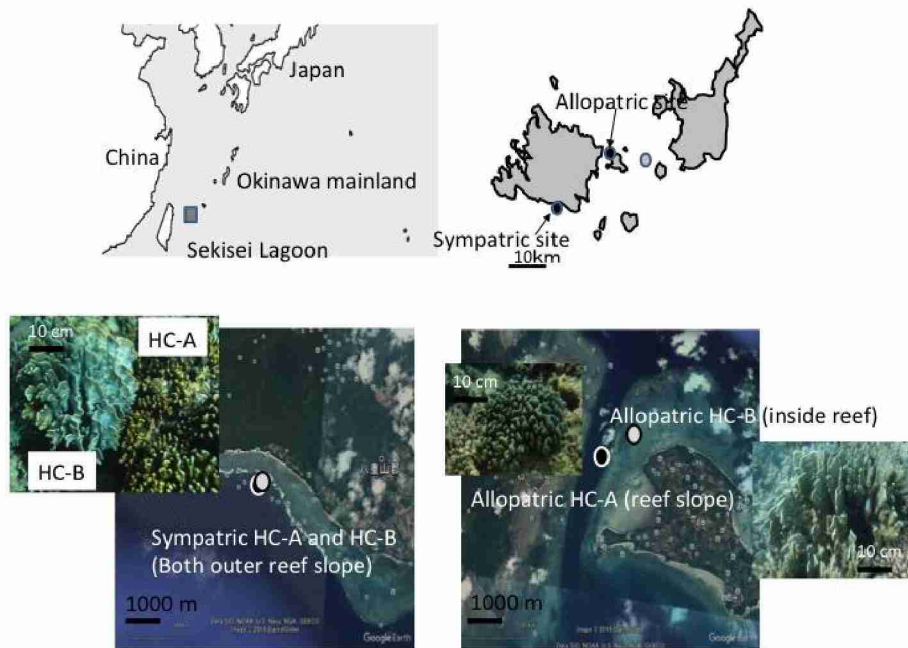
図(2)-4 AMOVA Fstによる主座標分析の結果。MT:フレンチポリネシア、KK:宮崎、OK:沖縄、IS:石垣。フレンチポリネシアのみが第一象限にて大きく分かれていることが分かる。



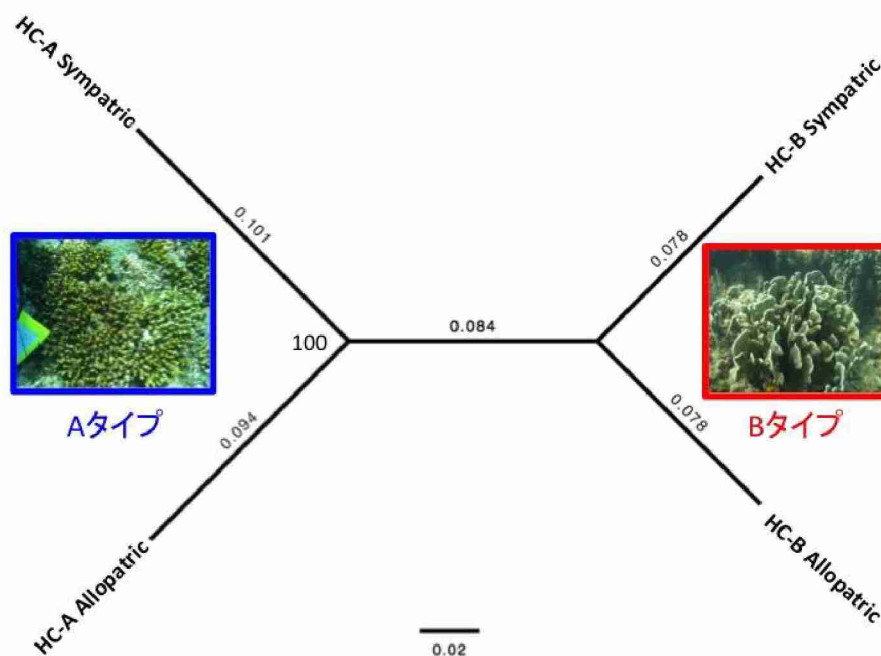
図(2)-5 オニヒトデ4集団間のAMOVA F_{st} のヒートマップ図 MT:フレンチポリネシア、KK:宮崎、OK:沖縄、IS:石垣。 F_{st} が大きくなるにつれ、緑色になる。琉球列島から宮崎までは遺伝的に均一で、フレンチポリネシアのみが遺伝的に離れている。

b) アオサンゴのezRAD-seq解析による種分化要因と適応遺伝子の検出

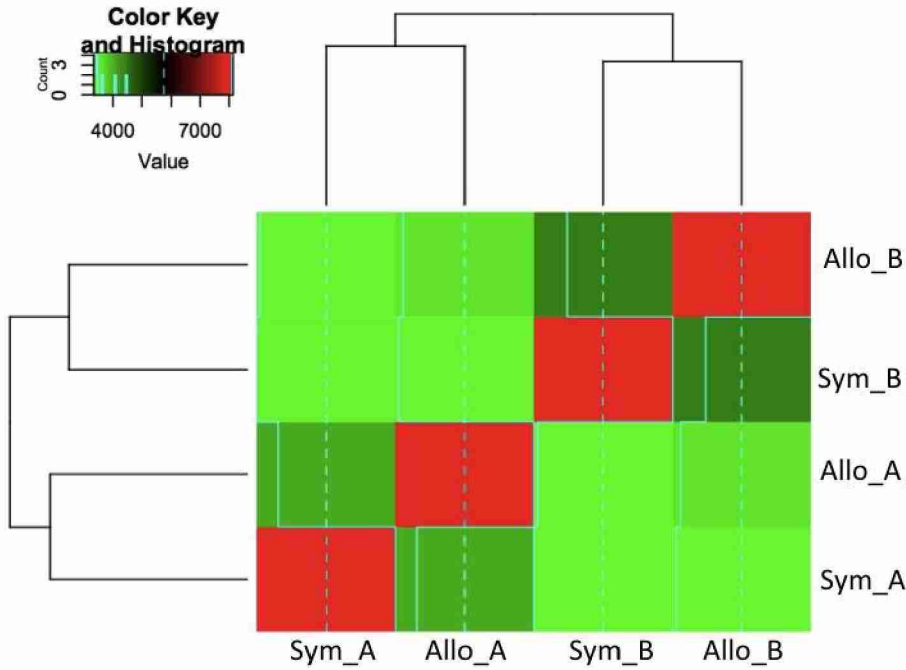
アオサンゴのAタイプとBタイプの集団サンプル(図(2)-6)を用いて、アオサンゴのトランスクリプトームデータ⁸⁾を活用したezRAD解析を行った。その結果、6,742個のbiallelic SNP遺伝子座の絞り込みに成功した。また、得られたSNP情報を用いて系統解析を行った結果、アオサンゴのAタイプとBタイプは遺伝的に明確に区別された(図(2)-7)。SNP情報を用いてアオサンゴ4集団において共有している遺伝子型数の比較を行った結果においても、アオサンゴのAタイプとBタイプは区別されること、2タイプ間での遺伝子流動は制限されていることが示された(図(2)-8)。



図(2)-6 解析に用いた、石西礁湖のアオサンゴ集団サンプルの詳細。HC-A：アオサンゴAタイプ。HC-B：アオサンゴBタイプ。各タイプを12群体ずつ異所（Allopatric）、同所（Sympatric）で採集（計4地点から計48群体）



図(2)-7 6,742個のbiallelic SNPを用いたアオサンゴ4集団の最尤系統樹。数値はブートストラップ確率（1000回試行）従来のマイクロサテライトの解析結果と同様に、別種であると考えられるAタイプとBタイプの間で大きな遺伝距離があることが分かる。



図(2)-8 アオサンゴ4集団において共有している遺伝子型数のヒートマップ図。Allo_A：異所で採集されたAタイプ集団。Allo_B：異所で採集されたBタイプ集団。Sym_A：同所で採集されたAタイプ集団。Sym_B：同所で採集されたBタイプ集団。今回4つの集団において、AとBにまず大きくわかれるものの、地理的に少しはなれたA同士、B同士も遺伝的に少し異なることが分かる。

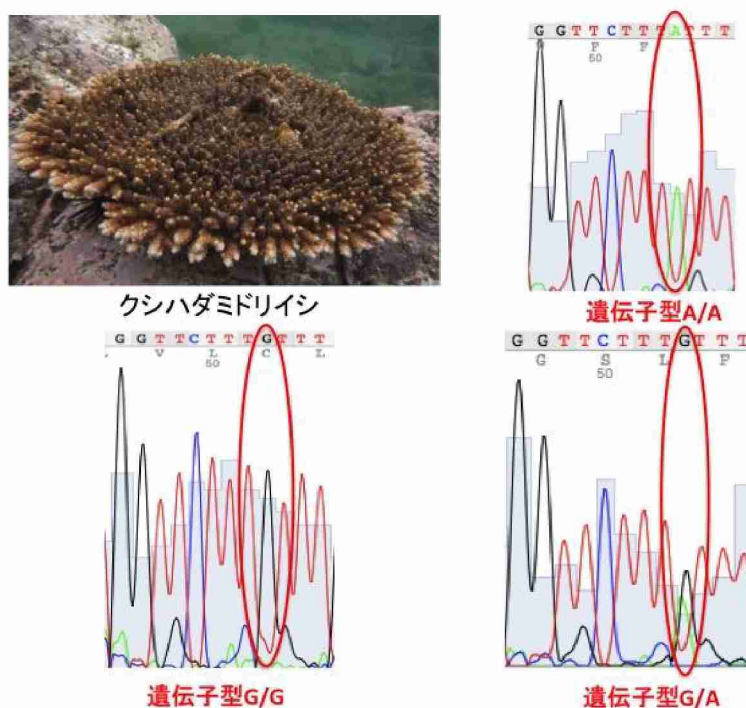
A・Bタイプ間でそれぞれに固定されたSNP遺伝子座を探索した結果、410個の遺伝子座が絞り込まれた。これらのSNPを含む配列を、アオサンゴのトランスクリプトームデータにマッピングしてアノテーション情報を取得した結果、アオサンゴの2タイプの生態的特徴と関連する可能性のあるSNP遺伝子座候補を複数絞り込むことに成功した（表(2)-3）。

表(2)-3 アオサンゴ各タイプ間で固定されたSNP周辺遺伝子のアノテーション情報

Contig ID	Accession number	Annotate description
c101459_g1_i1	IABP01085089	PREDICTED: dopamine receptor 2-like
c114522_g1_i1	IABP01089331	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: E3 ubiquitin-protein ligase RNF103-like
c31599_g1_i1	IABP01025317	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3
c41722_g1_i2	IABP01039277	Thioredoxin domain-containing protein 11
c48657_g1_i1	IABP01053308	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase UBR5-like isoform X8
c52917_g1_i2	IABP01067449	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase RNF213
c53121_g2_i3	IABP01068253	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP
c61162_g1_i1	IABP01071449	Cryptochrome-1

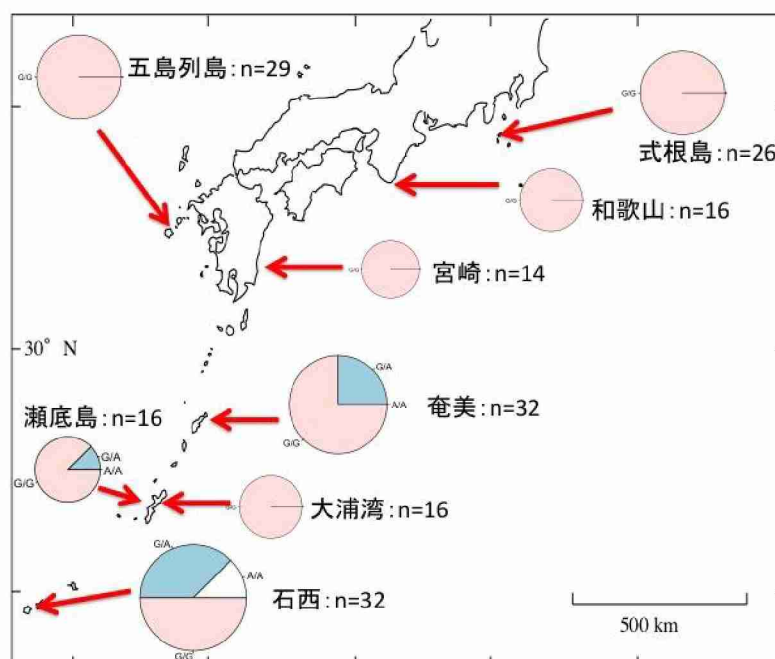
c) ミドリイシ属サンゴの非中立遺伝子座の検出と地理的変異

オーストラリアのハイマツミドリイシを対象に報告されている、環境要因と相関が見られるSNP遺伝子座¹³⁾を対象としたマーカーを開発するために、コユビミドリイシのゲノム情報¹⁴⁾から、対象とするSNPを含む遺伝子配列情報からエキソン領域を絞り込んで、あらたにプライマーセットを作成してダイレクトシーケンスを行った。開発されたプライマーセットを用いて、コユビミドリイシ・クシハダミドリイシ類を対象に適用した結果、SNPマーカーC29226S281に関しては、対象とするSNPの遺伝子型決定が簡便に行えるようになった（図(2)-9）。

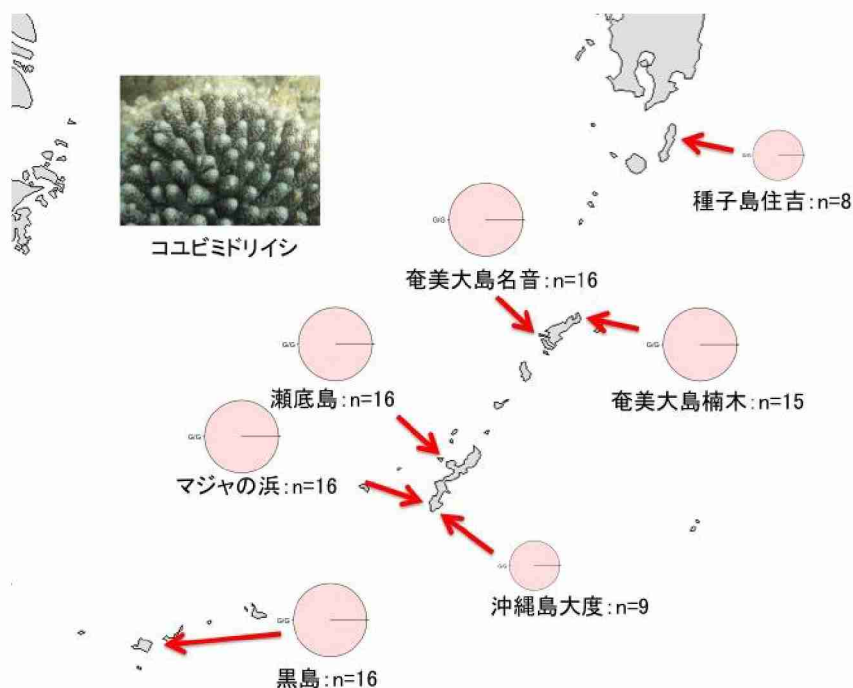


図(2)-9 クシハダミドリイシにおけるSNPマーカーC29226S281の遺伝子型タイプ

SNPマーカーC29226S281を用いて、南北広範囲に渡ってサンプリングされたクシハダミドリイシ類の集団サンプルの遺伝子型決定を行った結果、地域間で遺伝子型組成に変異が見られた(図(2)-10)。北方の集団ほど、G/Gの遺伝子型が卓越する傾向が見られた。これらの結果は、オーストラリアにて同じSNP遺伝子座でハイマツミドリイシ集団の遺伝子型決定を行った、先行研究¹³⁾の結果と同様の傾向(南半球では、南方の集団ほどG/Gの遺伝子型が卓越)であった。一方で、琉球列島全域から採取されたコユビミドリイシの集団サンプルを対象に、同じマーカーで遺伝子型決定を行った結果、全てG/Gの遺伝子型のみが検出され、地理的変異は見られなかった(図(2)-11)。



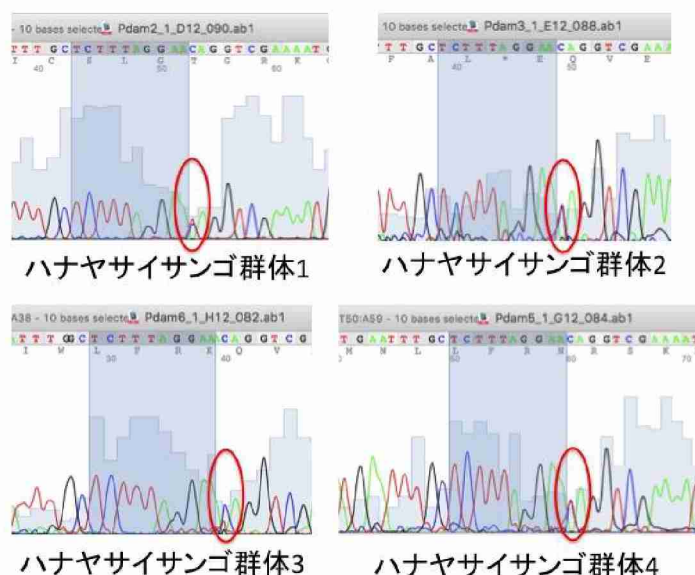
図(2)-10 クシハダミドリイシ類におけるSNPマーカーC29226S281の遺伝子型の地理的変異



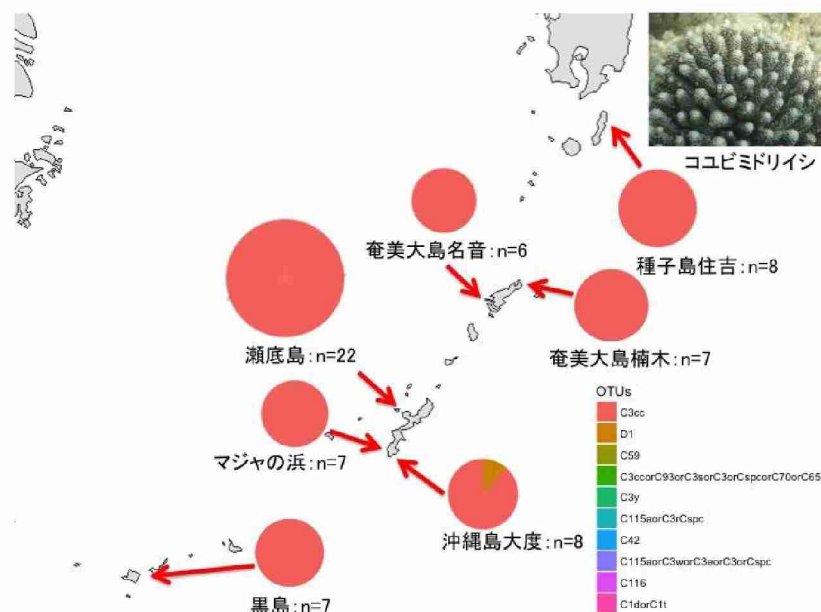
図(2)-11 コユビミドリイシにおけるSNPマーカーC29226S281の遺伝子型の地理的変異

d) ハナヤサイサンゴ類の非中立遺伝子座の検出と地理的変異

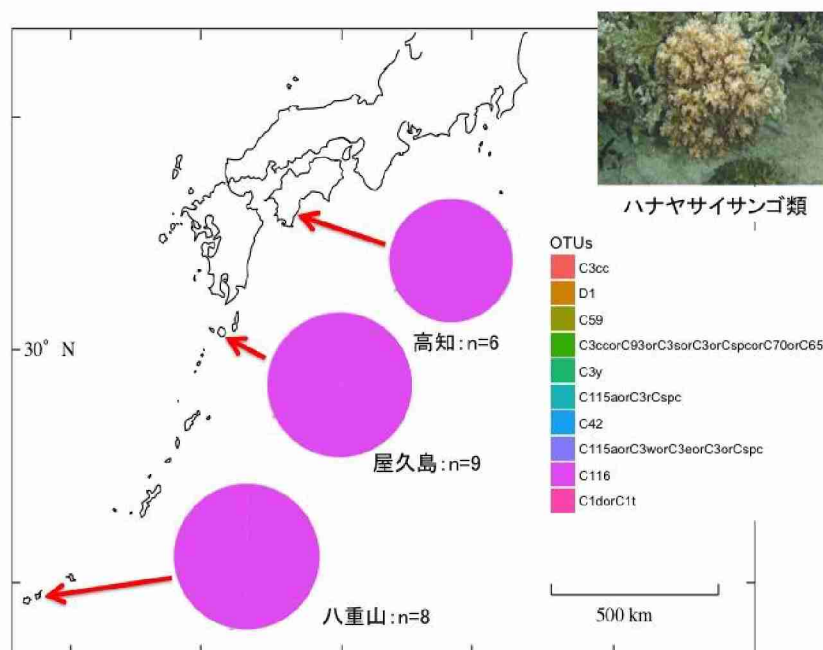
先行研究¹⁰⁾において、ハナヤサイサンゴを対象とした、温度や水質と相関のあるSNPマーカーが報告されている。そこで、既存のデータベース¹⁵⁾を探索して、目的となるSNPマーカーのプライマー作成とダイレクトシーケンスによる遺伝子型決定を行った。その結果、SNPマーカーContig_24に関しては、対象とするSNPの遺伝子型決定が簡便に行えるようになった(図(2)-12)。Contig_24を対象に、八重山、奄美大島、高知から採集されたハナヤサイサンゴ類のサンプルを用いて遺伝子型決定を行った結果、琉球列島側で遺伝子型組成の地理的変異が見られた(図(2)-13)。



図(2)-12 沖縄島周辺から採集されたハナヤサイサンゴ4群体のSNPマーカーContig_24の遺伝子型タイプ



図(2)-15 コユビミドリイシにおける褐虫藻遺伝子型の地理的変異



図(2)-16 ハナヤサイサンゴ類における褐虫藻遺伝子型の地理的変異

f) 統計モデリングに向けた適応関連遺伝子座データのまとめ

上記の中で、比較的多くのSNP遺伝子座データが取得されたクシハダミドリイシ類について、緯度に沿った水温等に関連する適応遺伝子の頻度勾配を、温暖化後の集団適応度としてEBSAの基準の(4)の脆弱性・感受性・低回復性の項目に適応させるためのデータセットを構築した。解析の詳細はサブテーマ(3)にて報告がある。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究課題での成果のような、日本沿岸域のサンゴ礁生物を対象にゲノムワイドレベルでの遺伝的多型データを基にした解析はほとんど例がない。特に環境要因と関連のある遺伝的変異のサンゴ集団での地理的変異の解析は初であり、新規性がある。本研究の成果は、今後サンゴ礁生物のみならず、日本沿

岸域の様々な海洋生態系における海洋生物の遺伝的多型データ解析を実施していく上での模範としても、その波及効果が高い。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

現時点では特になし。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

今回得られた成果は、サンゴ集団において環境要因と関連のある遺伝的変異データとして活用できる。そのため、サンゴ群集を対象とした海洋保護区設置の高度化のための統計モデリングを行う、サブテーマ（３）のデータセット構築に寄与することが見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

RAD-seq解析に関しては、サンゴの種分化研究の専門家である、Western Australian MuseumのZoe Richards博士と議論を重ねて、日本国内で得られた本研究の結果を、海外での事例と比較しながら解釈を進めている段階にある。

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

現時点ではなし。査読中が1報

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

現時点ではなし。

＜その他誌上発表（査読なし）＞

現時点ではなし。

（２）口頭発表（学会等）

善岡祐輝（沖縄高専・生物資源）・鈴木淳（産総研・地質情報）・酒井一彦（琉球大・熱生研）・井口亮（沖縄高専・生物資源）「褐虫藻に依存しないコユビミドリイシのストレス耐性」，2017年度日本サンゴ礁学会大会，2017年11月，東京工業大学，発表番号O-04.

（３）出願特許

現時点ではなし。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

現時点ではなし。

（５）マスコミ等への公表・報道等

現時点ではなし。

（６）その他

現時点ではなし。

8. 引用文献

- 1) Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, genomes, genetics*, 1(3), 171-182.
- 2) Hall, M. R., Kocot, K. M., Baughman, K. W., Fernandez-Valverde, S. L., Gauthier, M. E., Hatleberg, W. L., et al. (2017). The crown-of-thorns starfish genome as a guide for biocontrol of this coral reef pest. *Nature*, 544(7649), 231.
- 3) Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357.
- 4) Foll, M., & Gaggiotti, O. (2008). A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics*, 180(2), 977-993.
- 5) Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559-575.
- 6) Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 6(1), 288-295.
- 7) Toonen, R. J., Puritz, J. B., Forsman, Z. H., Whitney, J. L., Fernandez-Silva, I., Andrews, K. R., & Bird, C. E. (2013). ezRAD: a simplified method for genomic genotyping in non-model organisms. *PeerJ*, 1, e203.
- 8) Hongo, Y., Yasuda, N., & Nagai, S. (2017). Identification of Genes for Synthesis of the Blue Pigment, Biliverdin IX α , in the Blue Coral *Heliopora coerulea*. *The Biological Bulletin*, 232(2), 71-81.
- 9) Nakajima, Y., Nishikawa, A., Iguchi, A., & Sakai, K. (2010). Gene flow and genetic diversity of a broadcast-spawning coral in northern peripheral populations. *PLoS One*, 5(6), e11149.
- 10) Lundgren, P., Vera, J. C., Peplow, L., Manel, S., & van Oppen, M. J. (2013). Genotype–environment correlations in corals from the Great Barrier Reef. *BMC genetics*, 14(1), 9.
- 11) Baker, A. C. (2003). Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 661-689.
- 12) Ziegler, M., Arif, C., Burt, J. A., Dobretsov, S., Roder, C., LaJeunesse, T. C., & Voolstra, C. R. (2017). Biogeography and molecular diversity of coral symbionts in the genus *Symbiodinium* around the Arabian Peninsula. *Journal of biogeography*, 44(3), 674-686.
- 13) Jin, Y. K., Lundgren, P., Lutz, A., Raina, J. B., Howells, E. J., Paley, A. S., et al. (2016). Genetic markers for antioxidant capacity in a reef-building coral. *Science advances*, 2(5), e1500842.
- 14) Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., et al. (2011). Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*, 476(7360), 320.
- 15) Traylor-Knowles, N., Granger, B. R., Lubinski, T. J., Parikh, J. R., Garamszegi, S., Xia, Y., et al. (2011). Production of a reference transcriptome and transcriptomic database (PocilloporaBase) for the cauliflower coral, *Pocillopora damicornis*. *BMC genomics*, 12(1), 585.

Ⅱ－３統計モデリングによる北上生物の空間分布推定

国立研究開発法人海洋研究開発機構 山北剛久

平成 27～29 年度累計予算額：5,156 千円（うち平成 29 年度：2,000 千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

サブテーマ（３）では、地球温暖化の進行とともに分布拡大が予想される海洋生物のうち、温帯にも存在する主な造礁サンゴやオニヒトデの分布と量の情報、および環境の変数とを収集し、空間的な分布の推定を行った。その結果、サンゴの分布範囲、サンゴの分布範囲、サンゴとオニヒトデの量とが海水温と強く関係していた。特にサンゴ礁については冬季の海水温上昇による潜在的な分布範囲拡大と面積の増加を推定した。次に、遺伝的距離と地理的距離および海流による分散頻度の距離行列の特性と一致性について検討した。その結果、熱帯と温帯の境界に分散障壁があることが明示された。しかし、こうした地域をまたがない遺伝的差は必ずしも海流による分散可能性と対応しておらず、遺伝子解析の結果が長い時間スケールでの分散をより強く反映していることが考えられた。そのため、今日起きている幼生分散を推定するために、海流による分散は潜在的な連結性の指標として活用し、ネットワークの中心性など、各海域の幼生分散の拠点としての重要度についての評価を行った。最後に上記の結果および各サブテーマからの遺伝的多様性に関する情報をEBSAの基準に対応した重要海域の指標とし、保全優先度を検討した。その結果熱帯域を含めた検討では温帯域の重要海域を認識することは難しかったが、温帯域のみで検討することで温帯域内での各地域の相対的な重要性が明らかになった。得られた、サンゴ礁にとっての重要海域の結果を現在の保護区と比較した結果、現在保護区に入っていない海域かつ重要度が高い地域と、その海域でどの程度、海水温上昇に伴いサンゴ礁が増加しうるのかを示した。

【キーワード】

生物学的生態学的重要海域（EBSA）、種の分布推定モデル（SDMs）、粒子追跡、気候変動

１．はじめに

近年、海水温上昇をはじめとする気候変動の影響により、熱帯域の造礁サンゴ類は白化などの危機が指摘される一方、温帯域では北上による造礁サンゴ類の分布域の拡大が観測されている。温暖化とともに変遷するサンゴ礁を中心とした沿岸生態系を保全していくことを是とするならば、北上の実態を踏まえて海洋保護区などの海域利用施策のあり方の検討が必要となる。日本近海における、造礁サンゴ類の北上自体については、他の環境省プロジェクト（S9など）で本研究の開始以前に一定の進展があった¹⁾。しかし、定量的な変化の推定や、分散のソースとしての遺伝的多様性の評価、直接的な北上のプロセスである分散の実態を明らかにするための遺伝的流動あるいは海流については未だ考慮されていない。そのため、分布を定量的に推定するモデルの作成や、これから北上する集団が高い遺伝的多様性を維持する安定的な集団であるか、将来的に幼生分散によって分布が変化する場合はどこかといった点を考慮にいたした保全の優先度の検討が必要である。特に生物多様性条約（CBD）では生物学的生態学的重要海域（EBSA）の基準によって選定された海域の登録を進めており^{2,3)}、こうした統合的な指標に将来予測や遺伝的多様性の情報を取り入れた保全の優先度の評価を行うことが必要である。

２．研究開発目的

上記の背景を踏まえて、サブテーマ（３）では、まず主な造礁サンゴ類、同時に北上するだろう捕食者についての出現データを収集すること、各種の分布にかかわる環境要因を空間的に整備すること、を行い、GISのデータベースを作成することとする。収集した環境要因と分布との関係については、統計解析を実施することで、分布を推定可能とするモデルを作成すること、さらに海水温上昇のシナリ

オに基づく将来の分布適地推定図を作成することを目的とした。次に、他のサブテーマで得られた集団遺伝解析の結果や文献に基づく遺伝的差異について、集団間の遺伝的距離の変数として整備し、地理的な距離との比較、および、分布の適地と推定された地域への移動可能性について、海流を考慮した分散距離の検討の実施によって、個体群の分断と距離を適切に把握することを目的とした。最後に、上記と、ほかのサブテーマの結果を反映して、遺伝的な結果に基づく重要な海域の検討を行なうことによる、サンゴの保全優先度を作成、および保全優先度の結果と既存の保護区の配置と比較し、保護区の特管理レベルや再生事業の有無等との一致性を比較することを目的とした。

3. 研究開発方法

サブテーマ(3)では特に以下の点について実施した。

a)まず、気候変動による海洋生物の潜在的な北上可能性を検討するため、次の3つのタイプの生物の分布情報を収集し、海水温を主とした分布と量の推定モデルを作成した。a-1)まず、環境要因から考えられる温帯性サンゴ種の潜在分布域について推定をおこない、将来の潜在分布域の北上を推定した。a-2)次に、現在のサンゴ礁の面積について種を問わずに環境との関係から得られる潜在的な分布面積の推定を行ない、現在と将来の潜在的な分布面積増加の範囲と程度の推定を行った。a-3)最後に、サンゴ礁に影響を与える要因のうち、特にサンゴを捕食し、特に大量発生するオニヒトデの分布域の北上可能性についても、将来の潜在分布域と到達可能性の推定を行った。b)次に到達可能性と分布拡大経路における重要性を考慮するため、海流による分散の連結性と、遺伝的流動に基づく個体群の連続性を評価し、個体群の現在の分散範囲と、将来の潜在的な分散のハブを特定した。

c)上記の結果と、サブテーマ(1)、(2)で得られた隠ぺい系統の発見を含む種の遺伝情報を中心として保全上重要な地域を選定する指標を検討した。それらの指標を海洋の生物多様性にとって重要な海域の選定の基準として用いられているEBSAの基準に当てはめ、指標の統合と評価を行った。EBSAの基準における評価について、特にサンゴの面積は近年の情報に基づく評価と2050年時点の値による評価との2つを平均することで、将来の検討に資するものとした。d)最後に保護区や自然再生事業の分布と、重要海域、潜在分布面積とのギャップを解析し、海域公園地域などの、保全の強い枠組みのある場所の割合や、保全と人為活動との関わり合いの潜在性が高い場所を、抽出した。

以下に、具体的な手法について述べる。

a) 生物の分布と量の推定のための情報の収集とモデルの作成。

a-1)環境要因から考えられる温帯性サンゴ種の潜在分布域および将来の分布の北上の推定。

日本沿岸のサンゴの分布範囲の広域的な将来予測について、これまでは主に温度の閾値による推定が主なものであった。そこで、本課題では分布推定の応答変数となるサンゴ類、捕食者であるオニヒトデについての出現データを収集し、複数の環境要因に基づく定量的な推定を行った。特に、ここでは、温帯域にも広く分布する種群である、(クシハダミドリイシ類、それらをまたぐ未発表のクレード)、およびエンタクミドリイシの2群を対象とし、分布情報を収集した(山野ら、沖縄県・環境省、OWSら、安田ら、私信を含む)。また、各種の分布にかかわる環境要因を空間的に整備しGISのデータベースに格納した。環境の変数のうち、特にクロロフィルa量、水深、海岸線長、濁度、波高、潮汐高、冬季最低水温を用いた。これらの環境要因を説明変数として分布との関係について、最大エントロピー法による種の分布推定モデルを適用し、分布に重要な環境要因の特定と、空間的な分布可能範囲の現在および将来の予測を実施した。

a-2)サンゴ礁の潜在的な分布面積の推定と増加の程度の推定。

現在のサンゴ礁の面積について種を問わずに環境との関係から、潜在的な分布面積の推定を行ない、個体群増加の範囲と程度の推定を行った。ここでも、クロロフィルa、水深、海岸線長、濁度、波の高さ、

潮汐幅、最低水温を環境の変数として、サンゴ礁の面積を環境変数との関係についての一般化線形モデルを作成することによって推定した。得られた面積の推定式については、変数に対する線形的な増加を仮定しており過大評価になると考えられたため、現在の藻場の範囲が最大値となるように制約を設けた。

a-3)サンゴ礁に影響を与える、オニヒトデの分布域の推定。

サンゴ礁に影響を与える要因のうち、特にオニヒトデの分布域について検討するため、まずオニヒトデの大量発生・在不在の記録を収集した。得られた分布および、大量発生の記録について上記同様の変数を用いて分布推定を実施した。また大量発生の記録は長期にわたること、および特定の時期のみであるため、過去の時系列データの解析を試みた。そのために時系列の水温データを気象庁の水温アノマリーによってオフセットして作成するとともに、海上保安庁による8月の黒潮流軸の位置と海岸解析を行った線から黒潮流軸までの距離を抽出したデータセットを作成し環境の変数に加えた。また、時系列の解析については環境要因との関係だけでなく、新たな分布域への出現や大量発生が1～3年前の出現・大量発生場所からどのくらいの距離拡散または同調してきたのかについても検討し、分散可能性を示した。

b) 海流による連結性および遺伝的流動に基づく個体群の連続性の検討。

b-1)産卵時期の推定

イシサンゴ類の繁殖（成熟）時期は古くから水温が影響するとされるが、典型的に同調するオーストラリアの例と比べ、水温のみでは合わない事例も多い。日本では22度以上の積算水温がよく用いられ、海外においても基準水温を23～24℃として計算した積算水温が1,000℃前後に達する日の前後約6日の水温の月上昇率が適合するとの指摘もある。そのほかに、日照の変化、月齢、風、潮流、降水などが検討されている。ここでは、これらの変数のうち特に積算水温の基準温度を操作する検討、および月齢を考慮した。各サイトの産卵時期を推定するための海面温度の時系列データは、Global HYCOM 解析/再解析製品から抽出して得た。

b-2)粒子追跡シミュレーション

海流によるサイト間の幼生の分散確率を推定するために、海流の再解析データである HYCOM (Hybrid Coordinate Ocean Modeling) を利用し、連結モデリングシステム (CMS) を用いたラグランジュ粒子追跡シミュレーションを行った。粒子追跡モデルでは、幼生は表層の水平成分によって受動的に運ばれるものとし、海岸線に沿って、およそ100km間隔および、調査点に近い2次メッシュ（約10km²）を選定した111の放出点から一定量放出させた。その結果得られた、1993年から2016年の合計24年分のコネクティビティマトリックスは、さらに平均値として用いた。また、長い世代の分散の繰り返しを想定して、平均の粒子分散を値が安定する1,000世代繰り返す作業も行った。

c) 遺伝情報と流動および将来変化を考慮した保全上重要な地域の指標の検討。

上記および各サブテーマからの遺伝的な情報を統合して保護の優先度を示し、サンゴを対象とした新たな保護区の検討へつなげるために、まず EBSA（生物学的生態学的重要海域）の7つの基準とこれらのデータとの適合性について検討した。得られた基準を評価に当てはめ、現在での推定結果、将来の推定結果、温帯と熱帯を遺伝的な情報に基づく別に評価した場合、一緒に評価した場合のそれぞれについて、重要海域を評価した。

d) 将来の分布域、および重要な地域の保護区や自然再生の取り組みとの一致とギャップの検討。

得られた重要地域とサンゴ礁の分布域、将来の増加について、現在の国立公園、国定公園とその管理区分、およびサンゴについての自然再生の実施地域との比較をGIS上で行った。結果は都道府県別に集計した。

4. 結果及び考察

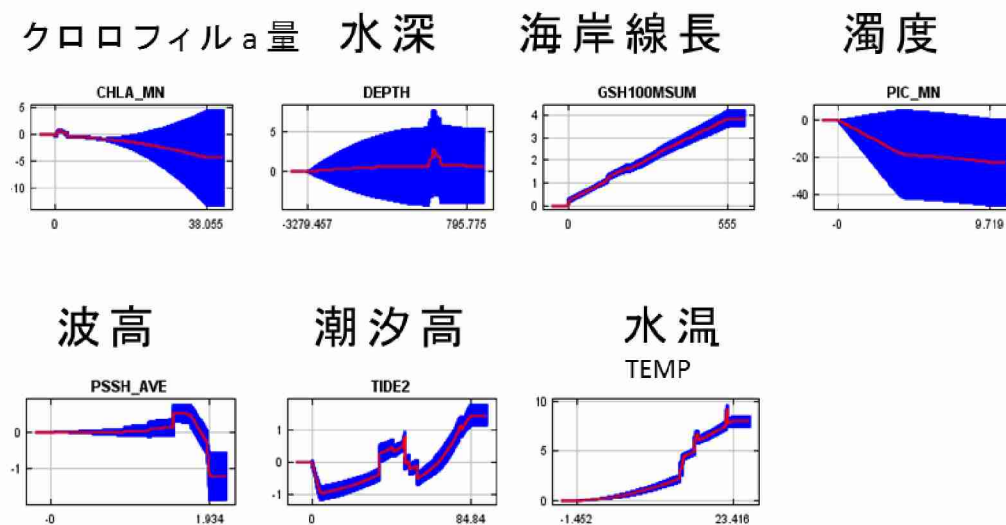
a) 生物の分布推定の情報の収集とモデルの作成。

a-1) 環境要因から考えられる温帯性サンゴ種の潜在分布域および将来の分布の北上の推定。

まずサンゴ類の分布について、クシハダミドリイシ類(*Acropora hyacinthus*)を含む3つのクレード) 326地点、エンタクミドリイシ159地点の分布データが作成された。

各種の分布にかかわる環境要因については、MODISによる平年値のクロロフィルa量、濁度、CMIP5のモデルのうちMIROCによる現在気候・将来予測の水温のほか、水深、海岸線長、波高、潮汐高をGIS上に集積し、高解像度な予測を可能とするため、逆距離加重補間により3次メッシュの重心点に内挿した。

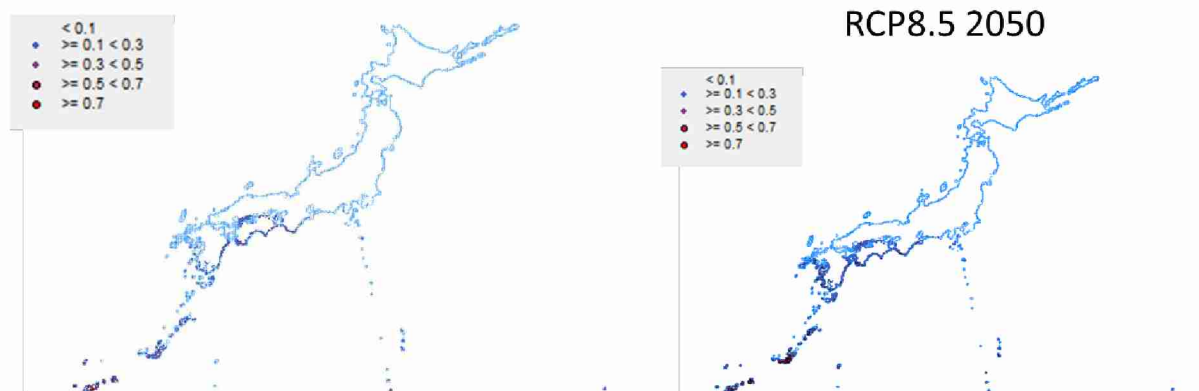
得られたデータを用いてmaxentを用いた分布ポテンシャルの推定を行った結果、クシハダミドリイシ類、エンタクミドリイシともに、水温が最も高い寄与を示した。しかし前者が70%の寄与であった一方、後者は43%であり、28%は海岸線長（複雑性）が寄与していた。結果の一致性を示すAUCはいずれも0.7以上（ただし背景に全国分の海岸が入っている）であった。将来の分布可能域を予測した結果、造礁性サンゴの分布可能域を水温による閾値で推定したYara ら2012と同様に30km程度の北上が予測された。



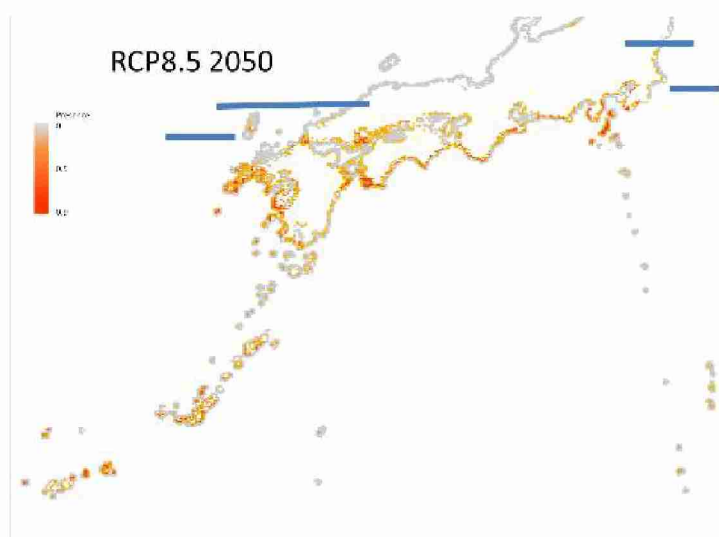
図(3)-1 平年値の時間解像度で解析したクシハダミドリイシ類の分布モデル

表(3)-1、各変数の分布確率に対する%寄与

	クシハダミドリ イシ類	エンタクミド リイシ
水温（冬季）	69.7	42.8
水深	12.1	6.8
海岸線長	7.1	27.8
潮汐高	4.9	15.4
クロロフィル	3.8	2.7
波当たり	1.5	1.6
濁度	0.9	2.8



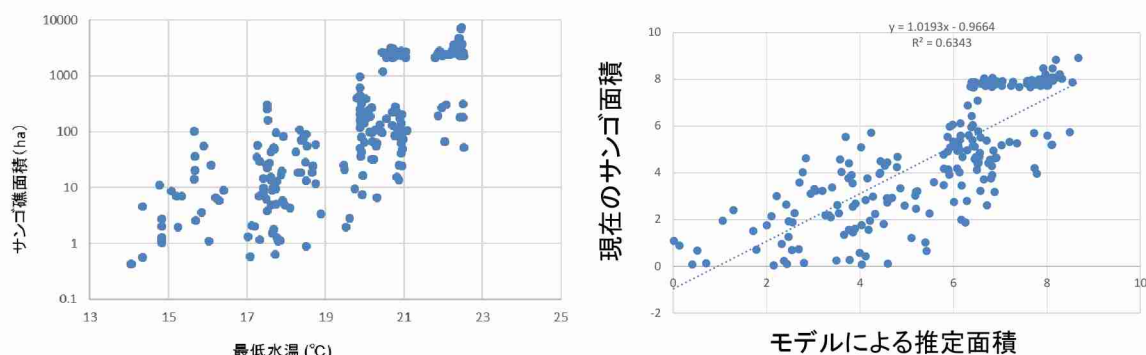
図(3)-2 クシハダミドリイシ類について現在の気候による分布推定結果（左）とRCP8.5 2050年の水温を用いた分布推定結果（右）



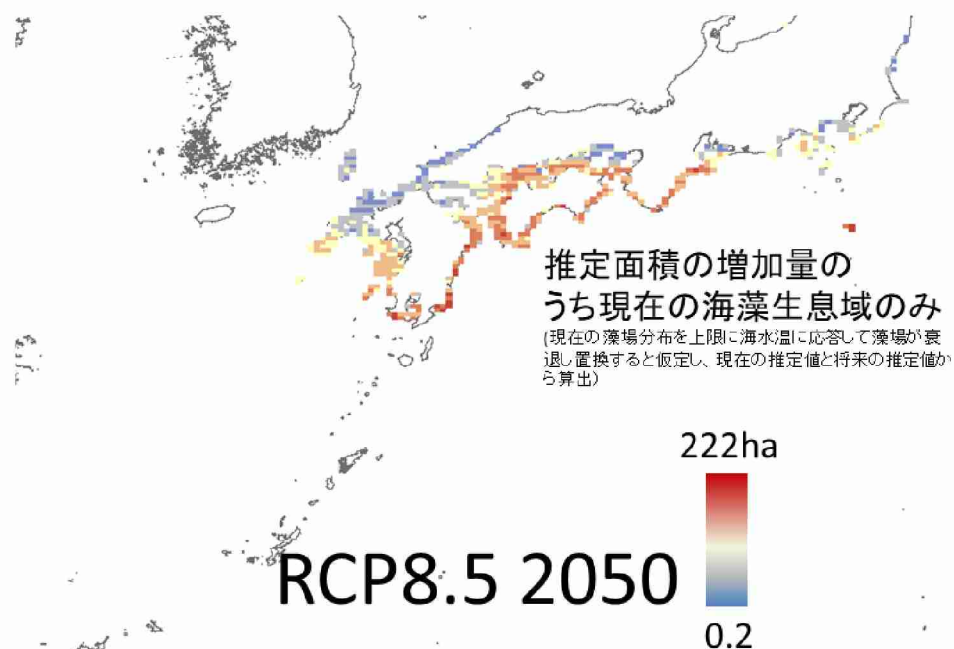
図(3)-3、エンタクミドリイシについての、分布推定モデルの結果の表示。南側の線は現在の分布ポテンシャルの北限、北側の線は将来のポテンシャルの北限を示す。

a-2)サンゴ礁の潜在的な分布面積の推定と増加の程度の推定。

面積の推定のために作成されたモデルの推定面積は、散布図から潜在的な面積の最大値の推定には適しているように見えた（モデルと実際の相関係数は0.63）。しかし、場所によっては現在の推定値についても残差が大きかったため、現在より増加できる範囲は現在の海藻生息域のみで増加するとした（現在の藻場分布を上限に海水温に応答して藻場が衰退し置換すると仮定した）。そのうえで、モデルによる現在のサンゴ礁面積の推定値と、将来潜在的に増加可能な面積（ポテンシャル）を算出した。



図(3)-4、最低水温とサンゴ礁面積の散布図、およびモデルの推定と現在のデータとの比較



図(3)-5、推定された2次メッシュごとの面積増加量

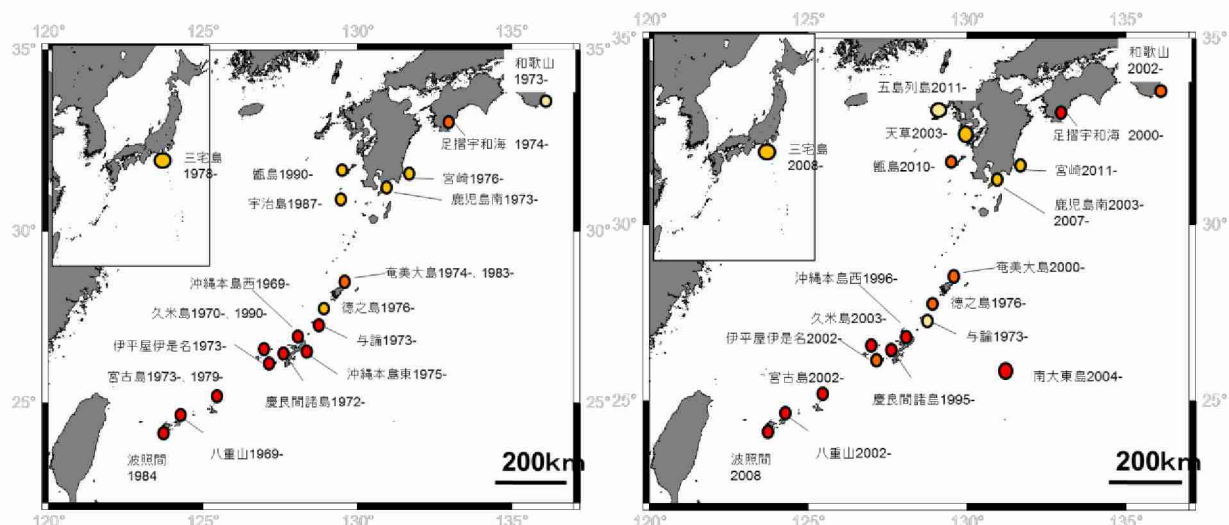
a-3)サンゴ礁に影響を与える、オニヒトデの分布域の推定

サンゴ礁に影響を与える要因のうち、オニヒトデの分布域について検討した結果、まずオニヒトデの時系列の大量発生・在不在データ36地点を既存のデータベース、各種文献および現地調査の記録から収集できた。主な記録のソースはモニタリングサイト1000、駆除データ（ボランティア・環境庁・県・奄美群島サンゴ礁保全対策事業のオニヒトデ駆除とりまとめ資料など）、県・省庁の調査報告書（自然環境保全基礎調査・サンゴ礁資源情報整備事業など）、新聞、教育・研究機関の発行する科学ニュースレター（博物館、水族館、海中公園、研究所）、大学紀要など和文の過去論文、紀行文、論文（Yamaguchi 1986, 1987^{4,5)}、動物学雑誌など）、ウェブサイト・ブログ（八重山環境ネットワーク、個人の写真のついたブログ）、聞き取り調査（漁協・ダイバー）である。

オニヒトデは1945年以前には最北限域が奄美大島として確認されており、世界大戦後に増加し、分布拡大したとされる。1953年にはトカラ（小宝島・中ノ島）で発見され、1959年足摺宇和海および串本、1962年に鹿児島佐多岬、1968年に小笠原父島、1972,73年に宮崎・大分、1975年に伊豆八丈島、1977年に伊豆三宅島と徐々に太平洋側の北方で発見された。以降は、1987年宇治島で、1990年甕島、1994年天草など太平洋側以外でも記録が得られるようになったことが分かった。

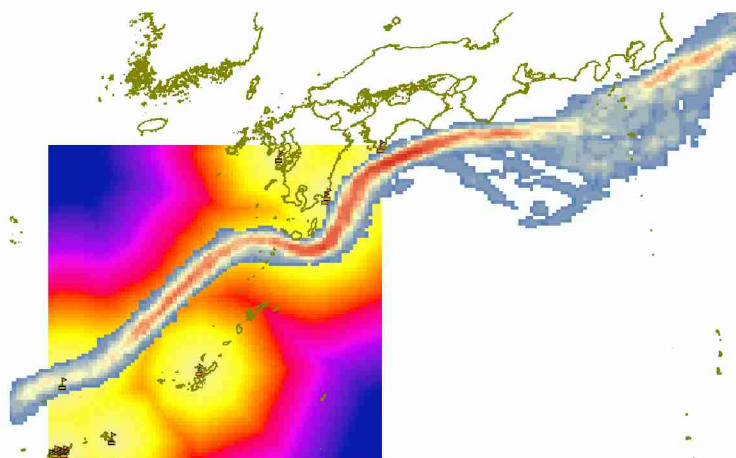
また、オニヒトデの大量発生については、1939年から45年にかけて本島から喜界島で大量発生がみられているものの、高緯度では分布さえ記録されていなかった。しかし、従来指摘されているとおり1970年代から80年代後半にかけて琉球列島から九州、四国にかけて、および、1995年以降から近年まで琉球

列島から和歌山にかけて、広範囲で大量発生が起こっていることが分かった。



図(3)-6 オニヒトデの大量発生：1969年から1994年（上）、1995年代後半以降（下）

オニヒトデの分布推定については、サンゴに対して用いた変数に加えて、時系列の水温データを気象庁の水温アノマリーによってオフセットして作成するとともに、海上保安庁による8月の黒潮流軸の位置と黒潮流軸までの距離を抽出した。

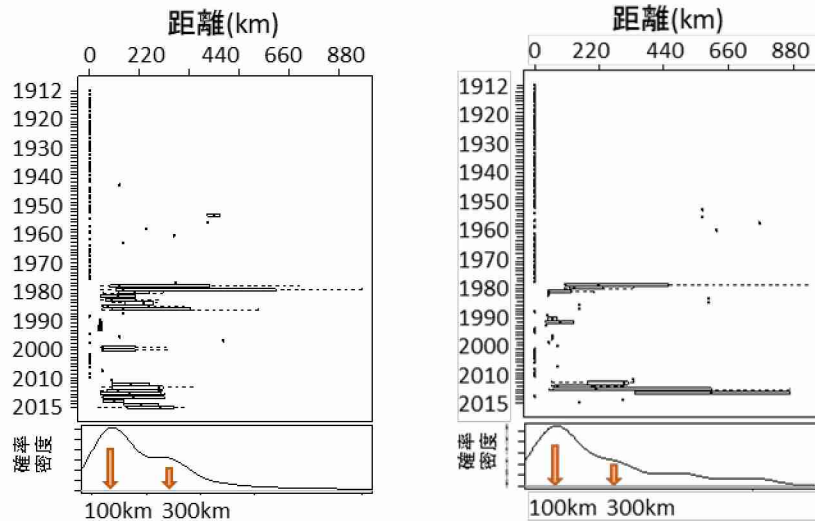


図(3)-7 作成された1960から2015までの黒潮流軸位置データの積算値（赤＞青）、背景図はサンプリング地点間のコスト距離の試行結果

これらのデータを用いたオニヒトデの発生の予測については水温のアノマリーが16%の寄与のみが見られた一方で、大量発生に対しては、56%の寄与が見られた。いずれの推定においても地形の複雑性と浅海域の広さと複雑さの指標である海岸線長が15%以上影響していた。また今回作成した黒潮位置を指標するデータとの関係は相対的に弱く、時間遅れの効果やデータの解像度、指標の作成方法などの検討が今後も必要であることがわかった。

次に、海水温上昇による大量発生が起こる位置について検討するために2年前の出現もしくは大量発生した地点から2年後に新たに観測された地点まで最短距離を計算した結果、1960年代、1990年代の分布拡大時期の出現地点は300kmを超える距離の飛躍が見られ、未発見の地点があるとしても広範囲に拡散しうることが明らかになった。また、大量発生についても、1980年代および2010年代にはかなり離れた範囲においてほぼ1年ごとに同調するように発生しており、幼生の遠方からの供給があったのか、環境要因が同調していた効果なのかは定かではないが、少なくとも個体群としての分断や分散の明瞭な制約を確認することはできなかった。これは、サブテーマ（2）のオニヒトデRAD-seq解析の結果で宮崎・沖

縄・石垣の間で遺伝的な差が見られなかった結果と一致する。



図(3)-8、2年前のオニヒトデの出現（左）・大量発生（右）記録位置からの拡散距離の Boxplot

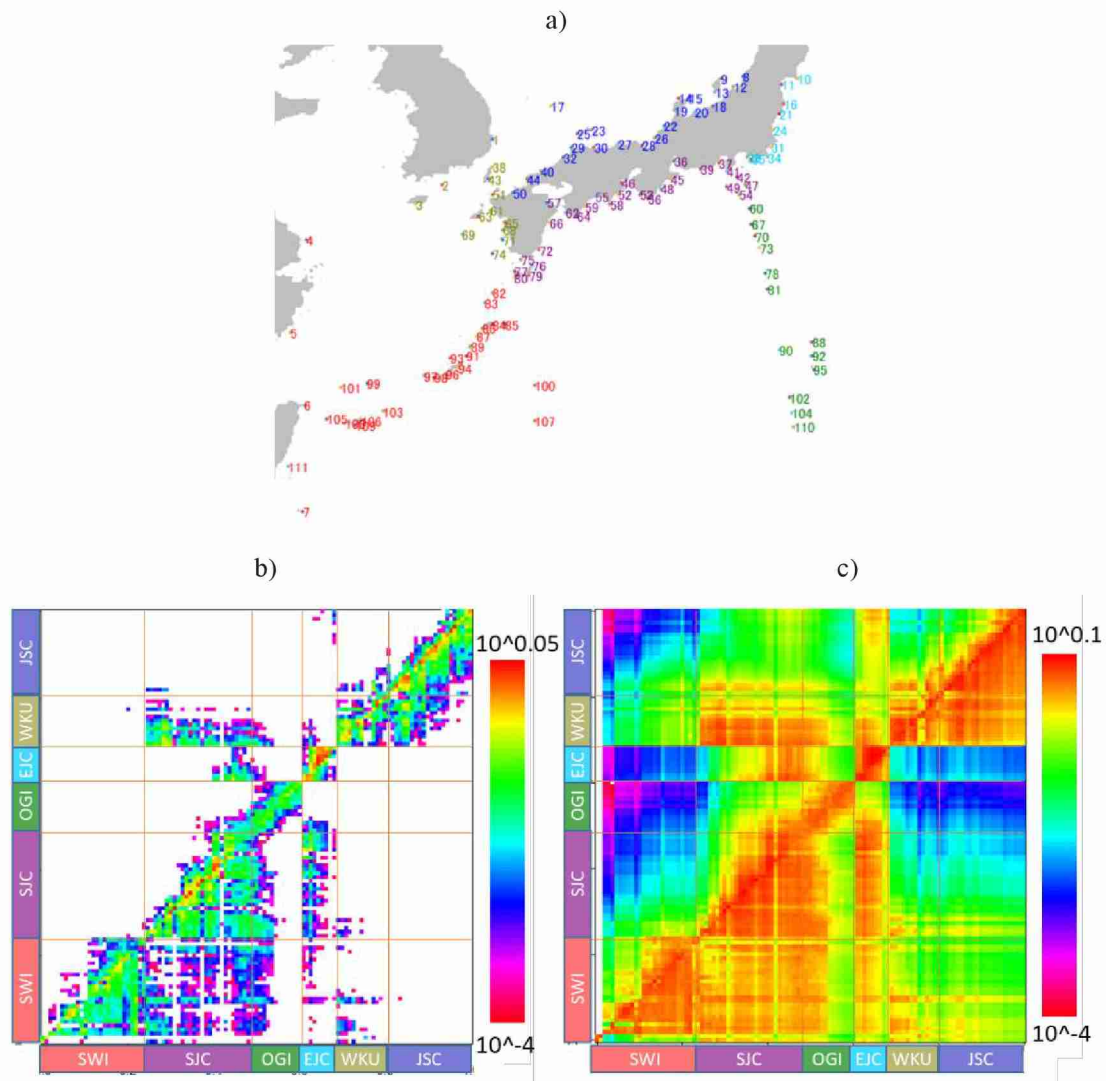
b) 海流による連結性および遺伝的流動に基づく個体群の連続性の検討。

b-1)産卵時期の推定

積算水温の基準温度と積算温度とを操作して産卵時期との一致性を比較した結果、月齢と13度以上の積算水温が1,000度に達したときに複数の種の産卵をよく説明できることがわかり、この値を使用した。この指標は日本の過去の *Acropora* の産卵記録とよく一致していた (Aizawa et al. unpub)。そのため、産卵イベントは、積算温度が基準に達したのちの満月の3日前から始まり10日間続くと仮定して以下のシミュレーションの条件としている。各放出サイトのグリッドから、1日に50個の粒子が放出され、合計500個の粒子が放出された。幼生の分散期間は7日間と42日間とを設定した。

b-2)粒子追跡シミュレーション

粒子追跡によって、一度でも通過したグリッドについて通過粒子数を数え上げその分散可能性を検討した。その結果、以下の図に示すように到達可能性という観点からは、屋久島、種子島付近で分断があることが明らかになった。遺伝的データにおいてもこの分断は見られた。一方で、ここで注目する沖縄から本州沿岸にかけての他の海域間に関しては、距離が近い範囲は一定の交流の可能性があることがわかり、遺伝データによる遺伝的距離との相関は低かった。世代を重ねた場合の到達可能性についても定着可能性を考慮せずに検討した結果、到達可能性の濃淡は場所により大きく異なるものの、かなり広範囲に広がりうることがわかり、遺伝的背景と全体をプールした結果で相関がみられない点は、上記で指摘できる大きな障壁以外については、単純な到達可能性以外の歴史的な要因もその分布に強く影響していると考えられた。一方で将来の分散可能性自体の指標として、確認された地理的障壁中での分散について本結果をそのまま用いることとした。その結果、ネットワークの中心性による分散におけるハブの指標を最終的な重要な海域の評価に活用した。



図(3)-9 a) 幼生に見立てた粒子の到達の計算地点。色は図 b, c と対応する。b) 7 日間 1 回分の分散量の計算結果、X 軸が幼生受け取り海域、Y 軸は幼生供給側を示す。c) 世代を繰り返して安定状態になった結果の分散量。

c) 遺伝情報と流動および将来変化を考慮した保全上重要な地域の指標の検討

まず、EBSA の各基準に適合する指標となりうるものデータを検討した結果、以下のものが適切な指標として得られた (図(3)-10)。

- ・基準 1) 唯一性、又は希少性 (固有種など) : ユニークアリル (プライベートアリル) 数

対立遺伝子を規定する個々の遺伝子であるアリルは同じ遺伝子座に複数タイプがある。これは場所により特異的な物が見つかることは比較的多く、個体群が固有であるかどうかの指標になりやすい。なお、アリル数は場所により異なり、サンプルサイズの影響は受けるがここでは補正できるほどの数がないことは今後の課題であった。

- ・基準 2) 生活史における重要性 (産卵場など) : 海流による連結性の中心

幼生供給とそれともなう遺伝的多様性のハブとしての重要性を評価するために、粒子追跡によるコネクティビティ行列の値から、ネットワークの中心性の指標を算出して用いた。コネクティビティそのものを評価するために、ここでは複数世代繰り返さないものを用いた。ここで、遺伝子データでも海流データでも別れた熱帯と温帯の間は異なるマネジメントユニットとして、分けた解析と一緒にした解析を行うこととした。また、ソースシンク関係も同様に重要と考えられたが、熱帯の効果が圧倒的であるために温帯域の評価を主とした、ここでは検討の対象としなかった。

- ・基準 3) 絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地 : 絶滅危惧種とされるサンゴの生息域数

環境省の絶滅危惧種とされるサンゴの分布範囲について地図化し、生息域の重複数とした。なお、対立遺伝子のアリのヘテロ接合度や、隠蔽種数で評価とすることなども検討した結果、精度やサンプル数に課題があったため、採用しなかった。

- ・基準4) 脆弱性・感受性・低回復性：クローン率および環境適応遺伝子

遺伝的多様性が低く、ストレスが多く、サンゴ面積が小さく、集団の孤立性が高い（中心性が低い）集団が該当すると考えられた。そのうち特にサンゴのクローン率（クシハダミドリイシ、ヒメエダミドリイシそれぞれのクローン率を標準化後に平均した値）及び、クシハダミドリイシにおいて環境耐性との関係が指摘される機能遺伝子を持っている頻度をここでは採用した。

- ・基準5) 生物学的生産性：サンゴ面積

前述の計算で作成した潜在的なサンゴ面積の推定値について、現在および、将来の推定値を用いた。

- ・基準6) 生物学的多様性：隠ぺい種数、アリル多様性

本課題で発見したクレードを含む隠蔽種数、および遺伝的多様性の基盤であるアリル多様性を用いた、サンゴの種数そのものも用いることができるが、調査努力の偏りや種判別の精度の点から正確な推定が難しいことや、本課題は遺伝的観点を重視した試みであるとの趣旨から用いなかった。

- ・基準7) 自然性：1次メッシュ内の自然海岸率。

基準自体が遺伝的観点と合致しにくいと考え、推進費 S9 で作成された 1 次メッシュ内の自然海岸率の値を用いて地域の自然性を代表させた。

1. 唯一性、又は希少性

プライベートアリル(遺伝子)の存在 S1

2. 生活史における重要性

海流連結の中心性が高い海域 S3

3. 絶滅危惧種の生育・生息地

絶滅危惧種の分布域

4. 脆弱性・感受性・低回復性

クローン率、環境適応遺伝子 S1,2

5. 生物学的生産性

サンゴ面積 S3

6. 生物学的多様性

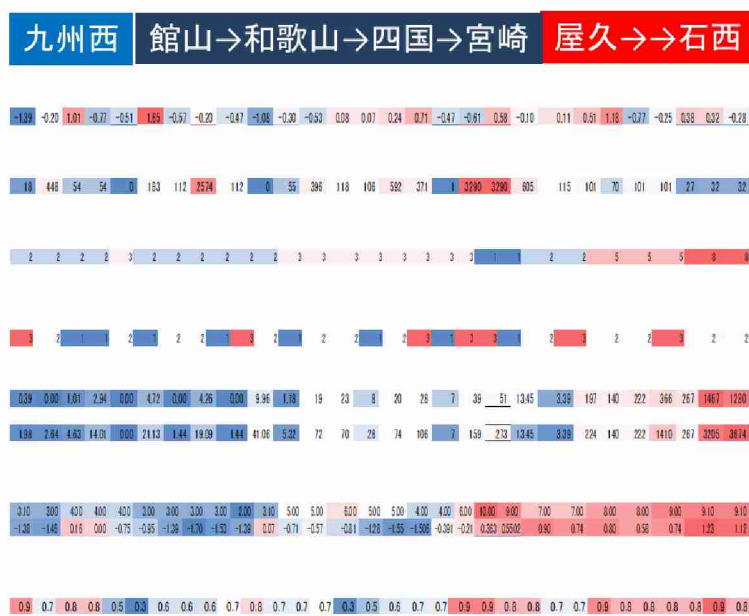
遺伝解析で発見した隠蔽種数 S1

生物多様性の基盤アリル多様性 S1

7. 自然性

自然海岸率

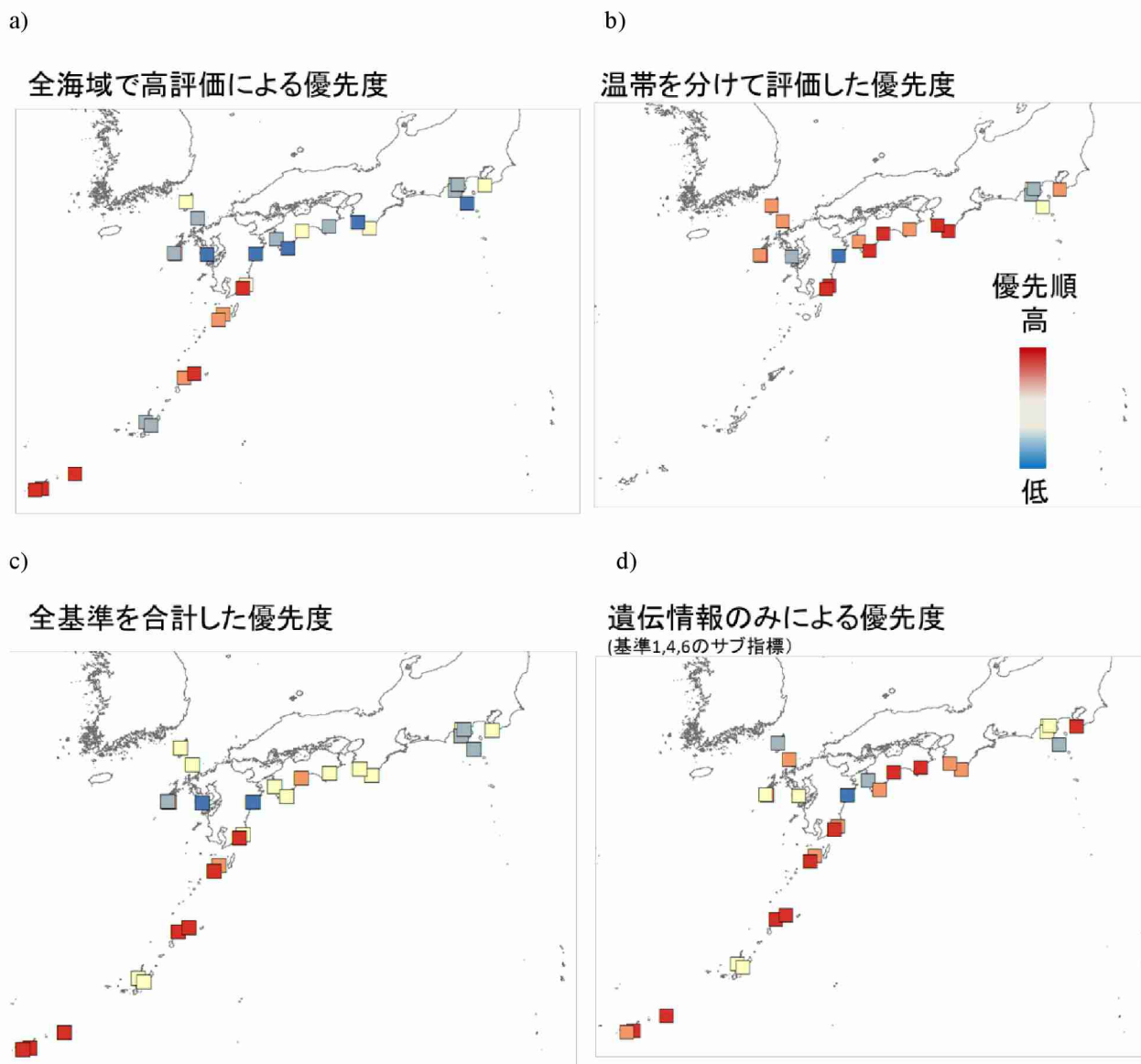
現在
将来



保全優先度: 低 高

図(3)-10 本研究において遺伝子解析・海水流動解析・サンゴ面積予測の結果をEBSAの基準にどのように当てはめたかを示したもの。左がEBSAの7の基準で、右が実際に計算した優先度を示す

CBDのEBSAの原義からはこれらの指標に基づき、ひとつでも高いと認められればEBSAに登録してもよい重要性が高い場所とされる。しかし、現実的には全ての基準の高い場所で広範囲を評価すると、かなりの面積がEBSAの対象となるため、複数の指標の重複がある場所を優先するように、高い値を示した基準の数や、基準の平均値、高い場所の重複が稀な基準も均等に含むように相補性や種成分分析を行う例がある。ここでは、簡易的にそれぞれを指標化した上で3段階に分け、高い値（3）のものだけを足したものについて、5段階で重要度を示した（図(3)-10）。



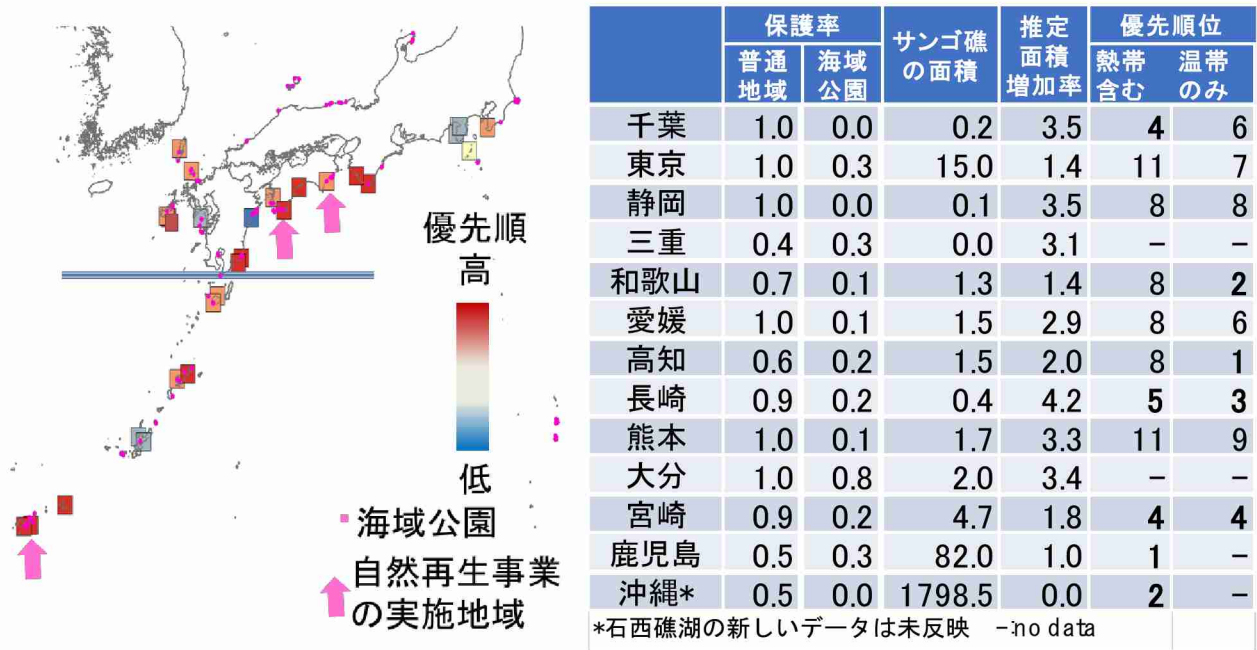
図(3)-11 a)高評価された基準の数による保全優先度（全海域）、b) 高評価された基準の数による保全優先度（温帯のみ）、c)全基準の評価ランクを合計した保全優先度、d) 遺伝情報の基準の評価ランクを合計した保全優先度

d) 将来の分布域、および重要な地域の保護区や自然再生の取り組みとの一致とギャップの検討。

現況について、国立公園・国定公園とサンゴ礁との一致性を比較した結果、現在サンゴは普通地域で多くカバーされており、海域公園での保護は多くの場所で1割程度であった。多くの普通地域は陸域の国立公園の自動的な延長であるため国立公園の管理に沿岸の要素が必ずしも十分に考慮されていないと考えられる。特に重要度が上記で高く評価された地域について、海域公園によるカバー率が低い場合には、対応する普通地域を含む公園について海域も一定の考慮を促すための根拠になると考えられる。そのため、海域公園とサンゴ礁との分布を比較した結果、サンゴ礁の面積が多いほとんどの海域では一定の割合がすでに海域公園に指定されていた。そのためサンゴ礁の面積としては沖縄を除き比較的均等に保全が行われていると判断された。

各地域における将来のサンゴ礁の増加率を比較すると、面積が少ない地域でも急速に広がる可能性が指摘される。特に、保護区によるカバー率が低い千葉県や静岡県は、今後、サンゴ礁が増えて保護のギ

マップが広がる可能性が高い。また、上記の保全優先度の結果から、重要度が高い地域であったが保護割合が低い県に高知、和歌山、長崎、宮崎が指摘できた。



図(3)-12 保全優先度（線を境に温帯、熱帯の高評価基準数を重ねた）と海域公園、自然再生の重ね合わせ（左）、保護区カバー率（保護率）、サンゴ礁分布面積、サンゴ礁の増加率、都道府県で平均した優先度の順位の比較（右）

5. 本研究により得られた成果

（1）科学的意義

- 1) 遺伝的データに基づく重要海域の検討例はまれであり、少なくともアジアにおいて広い緯度にまたがった検討結果は初めてであり、高い新規性がある。また、その結果、温帯域についてもサンゴ礁にとって重要な海域があることを全国評価で定量的に示した。
- 2) サンゴ礁およびオニヒトデについて、全国の広い範囲で等温線以上の変数と解像度をもって分布と量の推定を実施し、分布を説明する要因における冬季の海水温の定量的な重要性を示した。
- 3) 主要な造礁サンゴの産卵時期の推定にあたり、従来の研究よりもより低い海水温時期から考慮する必要性を示すとともに、日本沿岸における適切な産卵時期のモデルを作成した。

（2）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- 1) IPBES Deliverable 2(b)Regional/subregional assessments on biodiversity and ecosystem services, Asia-Pacific regional assessmentのLead Authorとして本研究において収集した情報に基づき、サンゴ礁に関するアセスメントの文章の節や引用資料作成等に貢献した。文書は2018年3月のIPBESにおいて内部公表された。
- 2) AP-BONの委員としてAP-BONの会合において、本課題で収集した情報を含めた発表を行い、AP-Marine BONの可能性について、議論を行うことで貢献した。議論を踏まえて2018年のGEOSSにおける提案文書の案を作成中である。
- 3) 本課題で収集した情報および特にサンゴ礁の面積の推定結果について、環境省推進費S15に提供されサンゴ礁の変化の予測の変数として活用され、ダイビング利用者の将来変化の推定が行われた⁶⁾。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) 今回得られた成果は、重要海域選定を更新する際の検討や、海域公園の拡張、新設、そのほかの保

全活動の際の取り組みの根拠として活用できる。

- 2) 遺伝的データの類似性と海流による分散可能性が示されたことで、移植などを検討する際のガイドラインに本結果を反映させることができると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

現時点ではなし。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

現時点ではなし。

<査読付論文に準ずる成果発表>

現時点ではなし。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) T. Yamakita, (2018) Cultural ecosystem services of temperate coastal areas of Japan: Uses of tidal flats, sandy beaches, and rocky/coral areas. 8th Asian Wetland Symposium 2017 Proceedings, 290-293.

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) **T. Yamakita, N. Yasuda**, M. Tsujino, N. Kumagai, H. Yamano (2016) Gap between future distribution of corals and marine use / Spatial planning around Japanese archipelago, 13th international Coral Reef Symposium 2016.
- 2) **山北剛久** (2016) 干潟・砂浜・サンゴ礁, 多様な沿岸景観ごとの文化的サービスの分布とその変動, 第17回東京湾シンポジウム～沿岸域の生態系サービスの定量化～.
- 3) **山北剛久** (2016) IPBESとそこで活用される生物多様性情報, GBIFワークショップ.
- 4) **山北剛久, 安田仁奈, 山野博哉** (2017) 自然資本分布の将来予測とマリンレジャー利用の変遷: サンゴ礁を例に, 第64回日本生態学会大会.
- 5) **T. Yamakita** (2017) From biodiversity prediction to ecosystem service evaluation: Marine case studies in Japan, The 9th GEOSS Asia-Pacific Symposium (Tokyo, Japan)..
- 6) **T. Yamakita** (2017) Cultural ecosystem services of temperate coastal area of Japan: from the visitors of tidal flat, sandy beach, and rocky/coral area Asian Wetland Symposium 2017, AWS Saga 2017

(3) 出願特許

現時点ではなし。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

現時点ではなし。

(5) マスコミ等への公表・報道等

現時点ではなし。

(6) その他

現時点ではなし。

8. 引用文献

- 1) Yara, Y., Vogt, M., Fujii, M., Yamano, H., Hauri, C., Steinacher, M., Gruber, N., & Yamanaka, Y. (2012) Ocean acidification limits temperature-induced poleward expansion of coral habitats around Japan. *Biogeosciences*, 9(12): 4955–4968.
- 2) Yamakita, T., Sudo, K., Jintsu-Uchifune, Y., Yamamoto, H., & Shirayama, Y. (2017) Identification of important marine areas using ecologically or biologically significant areas (EBSAs) criteria in the East to Southeast Asia region and comparison with existing registered areas for the purpose of conservation. *Marine Policy*, 81: 273–284.
- 3) 山北剛久. (2017) アジアの海洋生物多様性 評価, 海の生態系サービス評価の現状. *農村計画学会誌*, 36(1): 25-28.
- 4) Yamaguchi M. (1986) *Acanthaster planci* infestations of reefs and coral assemblages in Japan: a retrospective analysis of control efforts. *Coral Reefs*, 5, 23-30
- 5) Yamaguchi M. (1987) Occurrences and persistency of *Acanthaster planci* pseudo-population in relation to oceanographic conditions along the Pacific coast of Japan. *Galaxea*, 6, 277
- 6) Yamakita, T., (2018) Cultural ecosystem services of temperate coastal areas of Japan: Uses of tidal flats, sandy beaches, and rocky - coral areas. *Proceedings of 8th Asian Wetland Symposium 2017*, pp. 290-293.

Examination of Marine Protected Areas based on the Prediction of Northward Migration of Coral Reef Organisms using Gene Flow Analysis

Principal Investigator: Nina Yasuda

Institution: Organization for Promotion of Tenure Track
1-1 Gakuenkibanadai Nishi, Miyazaki-City, Miyazaki
889-2192, JAPAN
Tel: +81-985-58-7233/ Fax: +81-985-58-7233
E-mail: nina27@cc.miyazaki-u.ac.jp

Cooperated by: National Institute of Technology, Okinawa College, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

[Abstract]

Key Words: Coral reef ecosystems, Poleward migration, Marine Protected Areas, Gene flow, Spatial statistical modeling, Climate change, Genetic diversity, Population genetic analysis, larval dispersal

While corals in subtropical regions are highly degraded, they are expanding northward in temperate areas due to climate change. However, no studies have yet to reveal coral connectivity and genetic diversity including recently colonized temperate areas to examine a possible role of temperate habitats as coral refugia. In this study we aimed to identify important areas for designing Marine Protected Areas all across the coral areas in Japan including temperate areas by taking genetic structure and habitat change into consideration.

In subtheme 1, nearly 4000 coral samples in total were collected along with 4 coral genera together with subtheme 2. First, species boundaries of the target genera were delimited using multiple genetic markers and cryptic reproductive boundaries in each target genera were found. Only a limited number of cryptic species were distributed in temperate areas possibly due to dispersal barriers between sub-tropic and temperate areas as indicated by oceanographic modelling. While recently colonized coral populations in general have lower genetic diversity, pre-existing temperate habitats have relatively high genetic diversity. Together with the expected increase of coral areas in the future as predicted by the model by subtheme 3, pre-existing temperate coral habitats will play a role as coral refugia.

In subtheme 2, the aim was to clarify the adaptive potential of tropical marine organisms around Japan according to the progress of climate change. In order to achieve this, methods for detecting SNP loci related to environmental factors and understand the geographic variation of SNP frequencies of our target organisms around Japan were established. By mainly using RAD-seq, the detection of neutral and non-neutral SNP loci of our target organisms was successful. By focusing on detected SNPs, geographic variations of environmentally related SNP frequencies along latitude in *Pocillopora damicornis* and *Acropora hyacinthus* groups were detected.

In subtheme 3, spatially statistical modelling of coral reef areas and distribution, both of which were strongly related to winter seawater temperature, were conducted. Then the genetic data obtained from subtheme 1 and 2 and connectivity matrix results simulated by oceanographic modelling were integrated into the statistical modeling. By applying the 7 EBSA

(Ecologically Biologically Significant area) criteria into the model, the relative importance of coral habitats of Japan were identified. This study provided scientific knowledge for preventing the extinction of threatened coral species and designing effective measures for Marine Protected Areas listed in the Aichi Targets of the Conference of the Parties 10.