

研究助成 平成20年度 報告書

財団法人 黒潮生物研究財団
理事長 深田 純子 殿

作成日のみ記入して下さい
作成日 平成21年 2月 17日
受領日 平成21年 2月 17日

貴財団の研究助成により、下記の成果を上げましたので報告いたします

助成者対象者氏名(ふりがな)	山下 洋 (やました ひろし)
----------------	-----------------

学生の方はこちらに記入してください

学校名	広島大学大学院	学部 学科 講座 等	生物圏科学研究科
学 年	博士後期課程2年	区 分	卒研・修研 <input checked="" type="radio"/> 博研 <input type="radio"/> その他 ()
指導教官 氏 名	小池一彦	指導教官の所属・職	広島大学大学院生物圏科学研究科 准教

一般の研究者の方はこちらに記入してください

所属		職名	
最終学歴		学位等	

研究課題名	四国サンゴ礁における褐虫藻検出に関する研究 ～サンゴ内及び周辺環境からの検出～
<small>助成を受けた研究内容について、学会等での発表、学術誌等への公表を行った場合には、下欄にその内容（講演の場合：学会名、期日、タイトル、発表者名等、著作の場合：著者、発行年月、タイトル、雑誌名等）を記入して下さい</small>	
<p>日本サンゴ礁学会第11回大会 2008年11月22日～24日</p> <p>環境中に出現する褐虫藻の系統解析</p> <p>山下 洋¹, 小池一彦¹, 林原 毅², 大塚 攻¹ (1. 広大院生物圏, 2. 西海区水研石垣).</p>	

研究の内容(研究成果)報告書の作成要領

- ・研究成果をA4の用紙1枚にまとめて下さい。
- ・言語は日本語とします
- ・1行目に研究課題名、2行目に研究の実施者名(助成対象者名に○印をつける)を記入してください
- ・以下は図表、テキスト等、自由にレイアウトして結構です
- ・報告書は、一太郎2007、花子2007、MS-Word 2007、MS-Excel 2007、MS-PowerPoint 2007、Adobe-Photoshop CS2、Adobe-Illustrator CS2、Adobe-Acrobat 8.0で表示可能なファイル形式で作成してください
- ・特殊なフォントを使用される場合は、埋め込んで下さい
- ・成果報告書は当財団のホームページ等に公表しますので、著作権やデータの取り扱い等には十分ご注意下さい
- ・報告書(この紙と成果報告書の2枚)は、出力したものを郵送した上で、ファイルを電子メールまたはCD等の媒体に納めてお送り下さい
- ・電子メールでお送りの場合、添付ファイルのサイズは数100KB程度までにしてください

・提出期限は平成20年2月17日とする

四国サンゴ礁における褐虫藻検出に関する研究 ～サンゴ内及び周辺環境からの検出～

○山下 洋¹, 由良顕子², 小池一彦¹ (1.広島大学大学院生物圏科学研究科, 2.広島大学生物生産学部)

【目的】 近年, サンゴの大量死につながる『サンゴの白化』現象が問題となっている。白化はサンゴに共生する褐虫藻と呼ばれる渦鞭毛藻 *Symbiodinium* を, サンゴが何らかの原因により失うことである。成長に必要な栄養のほとんどを褐虫藻に頼っているサンゴは, 白化状態が長く続くとやがて死に至る。褐虫藻には clade と呼ばれる遺伝的タイプが存在し, clade ごとに生理的特徴が異なることが示唆され, これが宿主であるサンゴの環境耐性をも左右するとされる。このようにサンゴにとって重要なパートナーである褐虫藻を, サンゴのほとんどの種は環境中から獲得することが知られる。しかし, サンゴを取り巻く環境中には, どのような clade の褐虫藻がどのぐらいの量存在しているのか, 情報は断片的である。本研究では, 高緯度ではあるが豊かなサンゴ礁が広がる高知県の海水中に出現する褐虫藻の clade 及びその細胞密度を明らかにし, さらにこれらの系統的位置を解析した。

【方法】 高知県幡多郡大月町, 黒潮生物研究所前の海水 2.5 L を採取し, 目合い 20 μm のふるいで夾雑物を取り除いた後, 海水中の粒子を孔径 0.8 μm のポリカーボネートフィルター上に捕集した。フィルター上の粒子から TE 煮沸法(Koike Yamashita et al., 2007)により DNA を抽出した。得られた DNA は褐虫藻を clade ごとに検出・定量が可能な定量 PCR システムに供し, 海水中に存在する褐虫藻の clade 及び細胞数を見積もった。また, 同一の DNA 試料を用いて全ての clade の褐虫藻の ITS 領域(ITS1 – 5.8S – ITS2)を増幅可能な PCR プライマーを用いて PCR 増幅を行い, 増幅産物の塩基配列を決定した。得られた配列は, 既存の配列と共に系統樹を構築し, 海水中に出現した褐虫藻の系統的位置を明らかにした。さらに, 黒潮生物研究所前で *Acropora* sp. 2 群体, *Pavona* sp., *Montipora* sp. 各 1 群体ずつを採取し, これらに共生する褐虫藻の clade を調べ, 海水中に出現した褐虫藻 clade と比較した。

【結果と考察】 clade 別定量 PCR の結果, 黒潮生物研究所前の海水中には clade A, C, D の褐虫藻が出現し, その細胞数は海水 1 L あたり clade A が約 12,000 細胞, clade C が約 4,500 細胞, clade D が約 100 細胞であった。図 1 に示す系統解析の結果, clade A のものは高知県室戸岬の *Acropora* sp. から我々が分離した培養株と近縁であった。しかし, これらは黒潮生物研究所前の石の表面から分離した褐虫藻を含む, 多くの free-living 褐虫藻から構成されるグループとは, 異なるグループに属した。定量 PCR では検出された clade D の褐虫藻塩基配列は, 海水中から決定することはできなかった。これは, 海水中に出現する clade D 褐虫藻が clade A や C のものに比べ, 低密度であったことが原因であると考えられる。一方, サンゴ内に目を向けると今回調査した全てのサンゴに clade C が共生していたが, *Acropora* sp. では 2 群体とも clade C と共に clade F も共生していた。現在, サンゴ内に共生する clade C 褐虫藻が海水中に出現する clade C 褐虫藻と同様のものであるか, 詳しく調査中である。

本研究により高緯度サンゴ礁海域において初めて, サンゴを取り巻く環境中に出現する褐虫藻の clade 及び細胞数が明らかとなった。今後, これら環境中の褐虫藻が単にサンゴから放出されたものなのか, 新たに別のサンゴの共生ソースとなり得るか, 興味を持たれる。また, 低緯度海域においても同様の調査を行い, 結果を比較することで, 高緯度サンゴ礁海域の特色についての理解がより深まることが期待される。

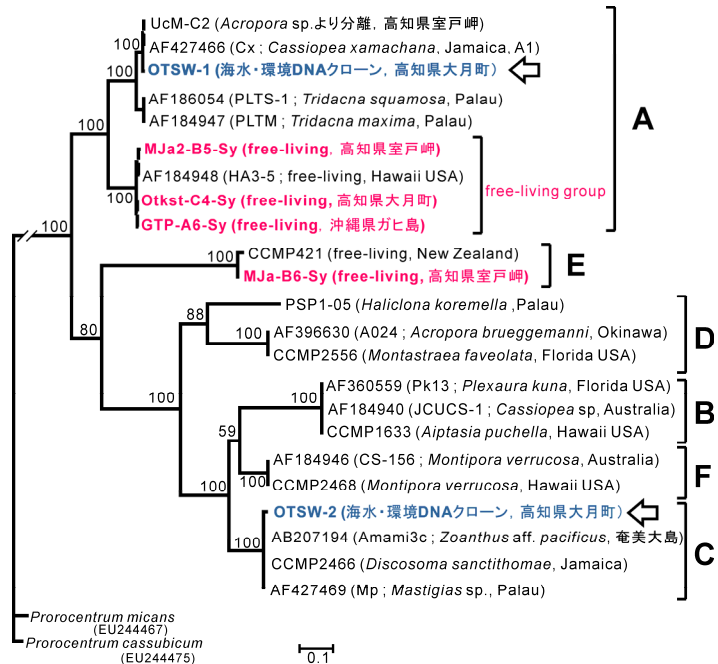


図1. ITS1-5.8S-ITS2領域の塩基配列に基づく最尤系統樹
OTUの色はfree-living褐虫藻培養株・海水中に存在する褐虫藻のDNAクローンで右端のアルファベットはcladeを示す。研究所前海水中に出現した褐虫藻はclade A及びclade Cに属した(矢印)。数字はブーストラップ確率(100回計算)。GTR+I+Gモデルを使用。