



サンゴ礁科学研究-III
—喜界島サンゴ礁科学研究所設立記念号—

ハマサンゴの 局所的環境適応

Kaho Hoshino Tisthamemr

(星野夏帆)

Robert H. Richmond

Local adaptation of the lobe coral, *Porites lobata*

Kaho Hoshino Tisthamemr • Robert H. Richmond

Kaho Hoshino Tisthamemr : University of Hawaii at Manoa
Robert H. Richmond : University of Hawaii at Manoa

気候・環境が急速に変動している現在、今後のサンゴ礁の応答の予測や保全のために、サンゴの短期間における適応能力の理解が必要とされている。ハワイのマウナルア湾のハマサンゴを使い、サンゴの局所的適応について遺伝学と移植実験を用いて調べた結果を報告する。

1. はじめに

世界中のサンゴ礁は、気候変動や様々な人類活動による環境変動により存続の危機に瀕している。世界のサンゴの被覆率は、過去100年間で50%以上も減少し、今後も衰退が懸念される状態だ (Hughes *et al.* 2010; Richmond and Wolanski 2011; Graham 2014)。気候変動に伴う海水温上昇や海洋酸性化など地球規模の環境ストレスが、サンゴ礁衰退の一番の要因とみられがちだが、海水汚染や魚の乱獲、富栄養化などの地域的ストレスも深刻な影響を及ぼすことがわかっている (Aswani *et al.* 2015; Morgan *et al.* 2016)。また、複数のストレス要因に直面しているサンゴ礁はレジリエンスが低いと報告されており (West and Salm 2003; Richmond and Wolanski 2011; Kennedy *et al.* 2013)，気候変動が加速している今、サンゴ礁への地域的ストレスの影響、及びサンゴの短期適応・順応能力をよく理解する必要がある。

複数ある地域的なストレス要因の中でも、水質汚染は特に深刻な問題で、ハワイ諸島のサンゴが直面している一番のストレス要因と言える。例えば、オアフ島のマウナルア湾(図1)のサンゴ礁は前世紀から始まった大規模な都市化に伴う海水汚染や浮泥の堆積等により、著しく健康状態が悪化してしまった (Wolanski *et al.* 2009; Richmond 2011)。特に、湾内エリアでは、土壤流入により透明度が著しく低い上、様々な汚染物質や毒性物質も流入するため (Richmond 2011)，そこに生息しているサンゴは、慢性的に高ストレス下にあると言える。湾内エリアのサンゴの被覆率は5%弱まで減少し、外来の藻類に覆われている状況だ (Wolanski *et al.* 2009)。しかし、そのような悪状況でも、いくつかのサンゴのコロニーは存続して

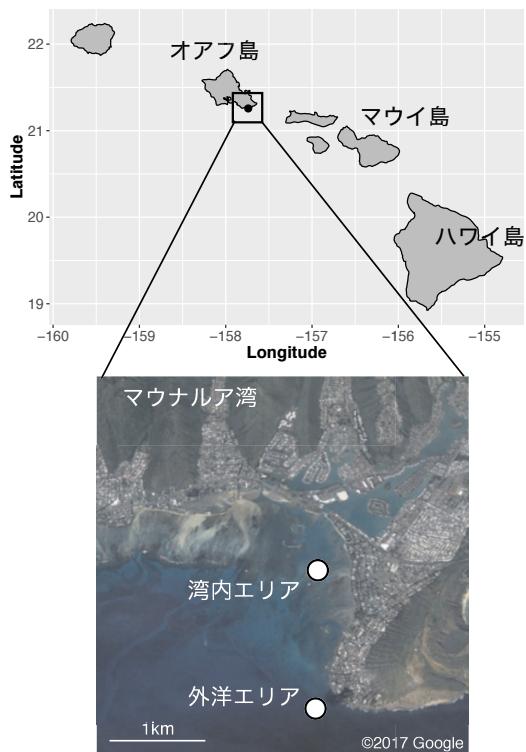


図 1 サンゴ試料の採取地点。

おり、高ストレスの湾内エリアの環境に適応している可能性を示唆している。マウナルア湾では河口に近い湾内エリアから沖に向けて、汚染物質や濁度等の明らかな環境勾配があり (Storlazzi *et al.* 2010; Richmond 2011)，その環境勾配に沿ってハマサンゴ (*Porites lobata*) の細胞内のストレスレベルが上昇していることが、近年行われたサンゴの生態毒性学 (ecotoxicology) に基づいた調査により明らかになっている (Richmond 2011)。従来サンゴ礁の生態調査は、被覆率減少や個体、種の喪失などのモータリティー (死亡率) に焦点が置かれた基準が用いられていた。しかし、それでは保全の対応には遅すぎることが多いため、分子バイオマーカーを用いた亜致死的影響を測定することができる生態毒性学に基づいた調査が適用されるようになってきている (Richmond 2008; Rich-

mond and Wolanski 2011)。例えばマウナルア湾の調査からは、異物解毒に関わるマルチゼノバイオティック・レジスタンス・プロテイン (多生体異物耐性タンパク質) やシトクロム P450、及び熱ショックタンパク質などの細胞内ストレスタンパク質が、外洋のサンゴの体内に比べて湾内のサンゴ体内で上昇していたことがわかっている (Richmond 2011)。高ストレス下の湾内エリアのサンゴは一体どうやって、生存に困難な環境下で存続することができるのだろうか。このような生理的応答の違いは、湾内エリアのハマサンゴが遺伝的にその場の環境に適応しているためであろうか (局所的適応)、それとも表現型可塑性により順応しているためであろうか。マウナルア湾の開発の歴史は比較的よく記録されているため、短期間で起こり得る局所的適応を調べるために適しており、著者は、遺伝学と相互移植実験を用いて湾のハマサンゴの短期局所的適応について研究し、本稿ではその結果の一部を紹介する。

2. マウナルア湾のハマサンゴの集団遺伝学

環境の大きく異なるマウナルア湾の湾内エリアと外洋エリアのハマサンゴの集団間で、遺伝的分化が見られるかを検討するため、ハマサンゴの小さい破片を各地域より採取後 (図 1)，DNA を抽出し、遺伝的集団構造解析を行った。遺伝統計分析 (AMOVA: Analysis of Molecular Variance) の結果、複数の核 DNA マーカーによって湾内エリアと外洋エリア間で明らかな分化が見つかった (表 1, Tisthammer *et al.* in prep[a])。変動性の多い非コード領域の ITS 領域 (Internal Transcribed Spacer region) では遺伝的分化指数 (F_{ST}) は 0.1918、コード領域を含むヒストンマーカー (H2) でも有意な F_{ST} (0.0695) が得られた (表 1)。遺伝的多様性は外洋エリアの方が高かった (Tisthammer *et al.* in prep[a])。ハマサンゴは雌雄異体の放卵放精型であり、多くの海洋無脊椎動物と同様にプランクトン幼生期を持つため (Richmond and Hunter 1990)，これまで近距離間では遺伝的分化はない

Source of Variation		Variance components	% Variance	FST
ITS領域 (n=70)	Between sites	2.27	19.18	0.1918***
	Within sites	9.56	80.82	
ヒストン (H2) (n=43)	Between sites	0.25	5.85	
	Within sites	1.41	33.57	0.0695***
	Within individuals	2.55	60.58	

と一般に考えられてきていた。しかし近年、サンゴのような固着性の動物でも比較的近距離で遺伝的分化が見られることが報告されてきており（例：Barshis *et al.* 2010; Bongaerts *et al.* 2011; Kenkel *et al.* 2013），海洋無脊椎動物の局所的適応が思ったより遍在していることがわかってきてている（Sanford and Kelly 2011; Bond *et al.* 2014）。マウナルア湾の湾内エリアと外洋エリアとの距離は2km以下であり、このような近距離でのサンゴの分化は今まで報告されていない。湾内エリアから外洋エリアにかけては海流による地理的障壁はないため（Storlazzi *et al.* 2010; Presto *et al.* 2012），ここで見られた遺伝的分化は、自然選択により適応した結果だと考えられた。次に、それを証明するために、湾内遺伝子型と外洋遺伝子型のサンゴ片を用いて、どのような表現型の違いが見られるかを相互移植実験、及びコモンガーデン実験（同一環境下における飼育実験）により検証した。ただし、湾内エリアの遺伝的多様性が外洋エリアより低かったことから、多様性と引き換えに適応していることが示唆された。

3. 相互移植実験

生体応答が遺伝子型による適応によるものか、または、環境への順応によるものかを見分けるのは難しいが、相互移植実験を用いることによって、遺伝子型と環境の相対的重要性を知ることができる。マウナルア湾の湾内遺伝子型と外洋遺伝子型のハマサンゴの間で、水質汚染に対する応答に違いはあるか、相互移植実験を行い試した。湾内エリアと外洋エリアの各地点から、遺伝子型分

表1 マウナルア湾の湾内エリアと外洋エリア間のハマサンゴのAMOVA解析結果。（Tisthammer *et al.* in prep[a]を改変）。

析が行われているコロニー5体を選択し、そのコロニーからサンゴ片を8個づつ採取し、半分は外洋エリアへ、残り半分は湾内エリアへ30日間の移植実験を行った（図2）。ちなみにこの採取した各地点5コロニーのみでも、遺伝的集団構造解析の結果から有意な遺伝的分化が認められ、マウナルア湾の湾内エリアと外洋エリアのハマサンゴがはっきりと分化していることが、改めて明らかになった。実験最終日に、サンゴ片の半分はZ-fixを用いて固定し、残り半分は液体窒素を用いて急速冷凍し、タンパク質分析を行うまで-80°Cで保存した。生理的ストレス応答として組織層の厚さと組織内脂質率の測定し、細胞レベルでの応答としてストレスに関わるタンパク質の発現をウェスタンプロット法を用いて比較した。

ハマサンゴの組織層は、懸濁物などの環境ストレスによって薄くなるため、組織層がサンゴのエネルギー貯蔵の役割をし、その厚さが逆境下での生存能力に比例すると考えられている（Barnes and Lough 1999; Rotmann and Thomas 2012）。移植実験の結果、遺伝子型により明らかな応答の違いが見られた。湾内エリアに移植された外洋遺伝子型のサンゴの組織層の厚さのみが、他のトリートメントに比べて著しく減少していた（図3A）。湾内遺伝子型のサンゴには、組織層の厚さの違いは移植場所に因らず見られなかったため、湾内遺伝子型が懸濁物の多い環境に適応していることが示唆された。

組織内脂質率でも、外洋遺伝子型にのみ応答の違いが見られ、湾内エリアに移植された外洋遺伝子型の脂質率が、他に比べて上昇していた（図3B）。

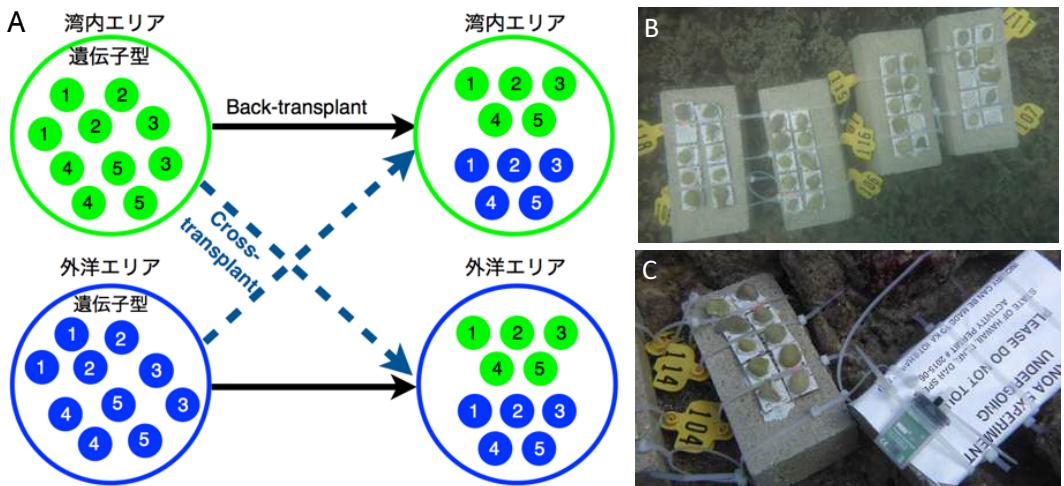


図2 相互移植実験の略図(A)と湾内エリア(B)と外洋エリア(C)の写真。

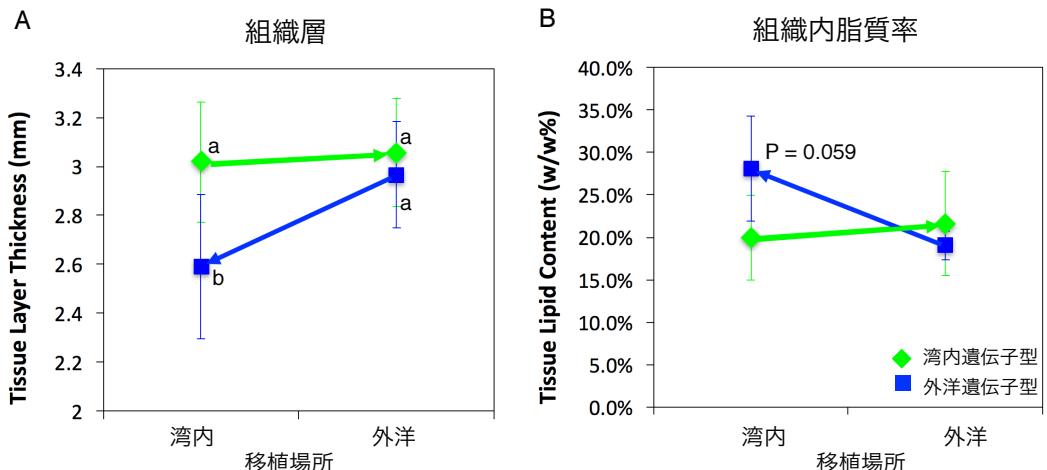


図3 ハマサンゴの組織層の厚さ(A)と組織内脂質率(B)の相互移植実験の結果。緑色は湾内遺伝子型、青色は外洋遺伝子型を、矢印は移植の方向を示す。矢先の原点が採取地に移植されていることを表す。アルファベットは統計的有意な違いを示す(Tisthammer *et al.* in prep[b]より改変)。

脂質はストレス下での固定炭素の供給源となるため、ストレスレジリアンスの指標になり (Towle *et al.* 2015)，また、白化等のストレスによりサンゴの脂質率が減少することが報告されているため (Grottoli *et al.* 2004; Grottoli *et al.* 2006; Rodrigues and Grottoli 2007; Anthony *et al.* 2009)，湾内エリア

の高ストレス環境下では脂質率は減少するのではないかと予測された。しかし、逆に脂質率は湾内エリアにて増加している結果となった。造礁サンゴの脂質源は通常の従属栄養生物とは異なり、共生している褐虫藻の光合成産物と従属栄養摂食からの2通りがある。そのためサンゴの脂質貯蔵の

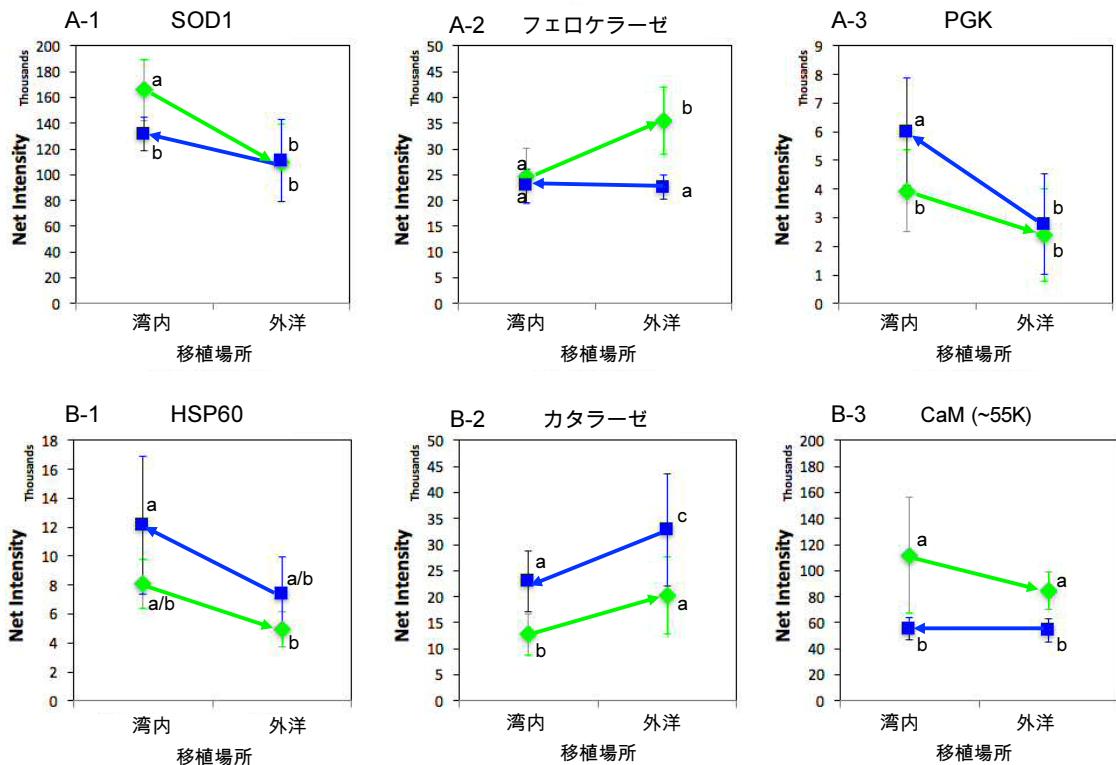


図4 ストレス応答に関わるタンパク質発現レベルの相互移植実験結果。発現レベルはウエスタンプロット法で得られたバンドの強度にて表記。色等の詳細は図3と同様 (Tisthammer *et al.* in prep[b]より改変)。

パターンは、一般の従属栄養生物とは大きく異なる可能性がある。富栄養環境下の沿岸地域に移植されたサンゴの脂質率が増加した例もあるため (Seemann *et al.* 2012), マウナルア湾内エリアでも類似の現象が起きた可能性がある。また、野外実験の場合は数多くの環境因子が関わる上に、サンゴの種によっても脂質率増減の応答が異なることが報告されているため (Towle *et al.* 2015), 一概にサンゴの細胞脂質率の変動が環境やストレスによりどう変化するか、またそれがどうレジリアンスにつながるかを判断するのは難しかったようである。ただし本実験の目的は遺伝子型による応答の違いを探ることであったため、遺伝子型間にて明らかな反応の違いが見られたことは望ましい結果である。

ストレス応答に関わるタンパク質発現レベルでも、湾内遺伝子型と外洋遺伝子型による違いがはっきりと見られ、その応答パターンは2つに分類された。一つ目のパターンは、どちらかの遺伝子型にのみ移植の影響が見られたもので、スーパーオキシド・ジスマターゼ1 (活性酸素分解酵素1, SOD1), フェロケラーゼ, 及びホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) にこの傾向が見られた (図4A)。応答を示した遺伝子型、及びその応答方向は各タンパク質により異なり、SOD1は湾内遺伝子型にのみ湾内エリアにおいて著しい上方調節が見られた (図4A-1)。フェロケラーゼは反対に外洋エリアにおいて湾内遺伝子型による上方調節が見られ (図4A-2), PGKでは、外洋遺伝子型にのみ湾内エリアにおいて上方調節が見られた

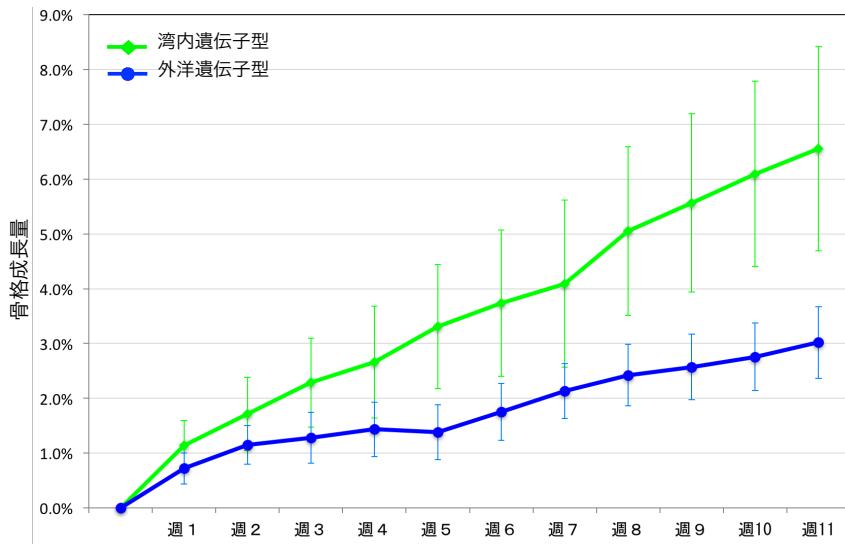


図 5 短期におけるハマサンゴの骨格成長量(開始時重量に対しての増加率%) (Tisthammer *et al.* in prep[b]より改変).

(図 4A-3). 2つ目のパターンは、タンパク質の発現レベルが遺伝子型により一貫して異なるもので、熱ショックタンパク 60 (Hsp60), カタラーゼ、及びカルモジュリン結合タンパク (CaM) にこの傾向が見られた (図 4B). Hsp60 は、両方の遺伝子型に外洋エリアにて上方調節が見られたが、その発現レベルは一貫して外洋遺伝子型の方が高かった (図 4B-1). 似たようにカタラーゼでも発現レベルは一貫して外洋遺伝子型の方が高かったが、外洋エリアに移植されたサンゴの方が両遺伝子型ともに発現レベルは高かった (図 4B-2). CaM では逆に湾内遺伝子型の方が一貫して高い発現レベルが見られたが、移植場所の影響は見られなかった (図 4B-3). 詳しい各タンパク質の機能とその応答の解釈は Tisthammer *et al.* (in prep [b]) を参照してほしいが、例えば湾内エリアにて見られた、湾内遺伝子型の SOD1 の上方調節能力などが、湾内遺伝子型のレジリアンスに関わっていると考えられる。その後、著者は液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いて同サンプルのプロテオミック解析を行い、その予備分析結果から上記のバイオマーカータンパク質の発現パターンに、同じ傾向が見られ

ることを確認している。前回の調査で違いの見られた解毒に関するシトクロム P450 には、遺伝子型及び移植場所間での違いは見られなかった。この結果は意外ではあったが、実験期間中の降雨量は最小限であったため、汚染物質の流入も少なかったためと考えられる。ローディング・コントロールとして用いたアクチンも遺伝子型及び移植場所による違いは見られなかった。

4. コモンガーデン実験

湾内遺伝子型と外洋遺伝子型のサンゴの成長速度がどう違うかをコモンガーデン実験を用いて比較した。ケワロ海洋研究所 (Kewalo Marine Laboratory) の流水式タンクを用いて、11週間、水中重量法によりサンゴ片の骨格成長量を測定したところ、遺伝子型によりその成長率に 2 倍以上の違いが見られた。湾内遺伝子型は 11 週間で平均 5.6% 重量が増加したところ、外洋遺伝子型は平均 2.6% しか増えなかった (図 5)。実験期間中、タンクへの海水はケワロ湾から取り込まれていたが、マリーナからのボート燃料の混入や土壤流出等によりその水質状態は比較的悪いため、実験中の水質はマウナルア湾の湾内エリアのものに近い

ものだったと思われる。そのような環境下で成長量が著しく高かったことは、湾内遺伝子型のハマサンゴが、水質汚染に対する高いレジリアンスを持ち、そのような環境下での生存力が強いとこを更に示唆している。相互移植実験とコモンガーデン実験の結果、遺伝子型による表現型の違いが明らかになり、マウナルア湾で見られた遺伝的分化は、自然選択により局所的適応によるものであることが証明された。

5. おわりに

本研究の結果、湾内レベルという短距離間においてもサンゴの局所的適応が見られることがわかった。また、生理的応答や細胞レベルの応答等の亜致死的影響を見ることにより、より微妙な形質の違いを捉えることができ、湾内遺伝子型サンゴがその場所のストレスに対して高いレジリアンスがあることが示された。マウナルア湾の開発が始まり環境が悪化し始めたは過去100年ほどであり、ここで見られた適応は、現存の遺伝的変異への自然選択によるものとみなされ、サンゴが比較的短期間に適応できることを示唆している。しかし、その適応は遺伝的多様性と引き換えにしておきたようで、湾内エリアのサンゴの遺伝的多様性が失われていることが危惧される。なぜなら短期適応能力は遺伝的多様性が供給源であり、その多様性が失われることは、今後の海水温上昇や海洋酸性化への適応能力が減少することを意味するからである。サンゴが気候変動にどう対応していくかを予期することが難しい理由の一つは、短期の適応能力の燃料となる群衆レベルの遺伝的多様性がまだまだ知られていないためで、今後の理解が望まれる。

謝辞：渡邊剛氏（北海道大学）に、本稿を執筆する機会を与えて頂き、訳を手伝って下さったことに深く感謝します。また、Z. Forsman氏、F. Seneca氏をはじめ本研究に携わって頂いた方々、及び研究助成組織（Hawaii Department of Health, NOAA, NFWF）にお礼を申し上げます。

参考文献

- [1] Anthony KRN, Hoogenboom MO, Maynard JA, et al (2009) Energetics approach to predicting mortality risk from environmental stress: a case study of coral bleaching. *Functional Ecology* 23:539-550.
- [2] Aswani S, Mumby PJ, Baker AC, et al (2015) Scientific frontiers in the management of coral reefs. *Front Mar Sci.* 2:50. doi: 10.3389/fmars.2015.00050.
- [3] Barnes DJ, Lough JM (1999) Porites growth characteristics in a changed environment: Misima Island, Papua New Guinea. *Coral Reefs* 18:213-218.
- [4] Barshis DJ, Stillman JH, Gates RD, et al (2010) Protein expression and genetic structure of the coral *Porites lobata* in an environmentally extreme Samoan back reef: does host genotype limit phenotypic plasticity? *Molecular Ecology* 19:140297-140297.
- [5] Bond MH, Crane PA, Larson WA, Quinn TP (2014) Is isolation by adaptation driving genetic divergence among proximate Dolly Varden char populations? *Ecol Evol* 4:2515-2532.
- [6] Bongaerts P, Riginos C, Hay KB, et al (2011) Adaptive divergence in a scleractinian coral: physiological adaptation of *Seriatopora hystrix* to shallow and deep reef habitats. *BMC Evol Biol* 11:303.
- [7] Graham NAJ (2014) Habitat Complexity: Coral Structural Loss Leads to Fisheries Declines. *Current Biology* 24:R359-R361.
- [8] Grottoli AG, Rodrigues LJ, Juarez C (2004) Lipids and stable carbon isotopes in two species of Hawaiian corals, *Porites compressa* and *Montipora verrucosa*, following a bleaching event. *Marine Biology* 145:621-631.
- [9] Grottoli AG, Rodrigues LJ, Palardy JE (2006) Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature* 440:1186-1189.
- [10] Hughes TP, Graham NAJ, Jackson JBC, et al (2010) Rising to the challenge of sustaining coral reef resilience. *Trends in Ecology & Evolution* 25:633-642.
- [11] Kenkel CD, Goodbody-Gringley G, Caillaud D, et al (2013) Evidence for a host role in thermotolerance divergence between populations of the mustard hill coral (*Porites astreoides*) from different reef environments. *Molecular Ecology* 22:4335-4348.
- [12] Kennedy EV, Perry CT, Halloran PR, et al (2013) Avoiding Coral Reef Functional Collapse Requires Local and Global Action. *Current Biology* 23:912-918.
- [13] Morgan KM, Perry CT, Smithers SG, et al (2016) Evidence of extensive reef development and high coral cover in nearshore environments: implications for understanding coral adaptation in turbid settings. *Sci Rep* 1-10.
- [14] Presto KM, Storlazzi CD, Logan JB, et al (2012) Coastal Circulation and Potential Coral-larval Dispersal in Maunalua Bay, Oahu, Hawaii -Measurements of waves, Currents, Temperature, and salinity June-September 2010.

- U.S. Geological Survey Open-File Report 2012-1040.
- [15] Richmond RH (2011) Watersheds impacts on coral reefs in Maunalua Bay, Oahu, Hawaii (Progress Report FY 2010) . HCRI Project Report.
- [16] Richmond RH (2008) Environmental protection: applying the precautionary principle and proactive regulation to biotechnology. Trends in Biotechnology 26:460-467.
- [17] Richmond RH, Hunter CL (1990) Reproduction and recruitment of corals: Comparisons among the Caribbean, the Tropical Pacific, and the Red Sea. Marine Ecology Progress Series 60:185-203.
- [18] Richmond RH, Wolanski E (2011) Coral research: past efforts and future horizons. In: Dubinsky Z, Stambler N (eds) Corals Reefs: An Ecosystem in Transition. Coral Reefs: An ecosystem in transition, Springer Science, pp 3-12
- [19] Rodrigues LJ, Grottoli AG (2007) Energy reserves and metabolism as indicators of coral recovery from bleaching. Limnology and Oceanography 52:1874-1882.
- [20] Rotmann S, Thomas S (2012) Coral Tissue Thickness as a Bioindicator of Mine-Related Turbidity Stress on Coral Reefs at Lihir Island, Papua New Guinea. Oceanography 25:52-63.
- [21] Sanford E, Kelly MW (2011) Local Adaptation in Marine Invertebrates. Annu Rev Marine Sci 3:509-535.
- [22] Seemann J, Sawall Y, Auel H, Richter C (2012) The Use of Lipids and Fatty Acids to Measure the Trophic Plasticity of the Coral *Stylophora subseriata*. Lipids 48:275-286.
- [23] Storlazzi CD, Presto KM, Logan JB, Field ME (2010) Coastal Circulation and Sediment Dynamics in Maunalua Bay, Oahu, Hawaii. USGS Open-File Report 2010-1217.
- [24] Tisthammer, K, Forsman Z, Richmond R. (in prep[a]) . Isolation by adaption? Genetic structure is stronger across habitats than islands in the coral *Porites lobata* from Oahu and Maui.
- [25] Tisthammer, K, Seneca, F, Richmond R. (in prep[b]) . Physiological and molecular responses show local adaptation of the lobe coral *Porites lobata* to reduced water quality.
- [26] Towle EK, Carlton R, Langdon C, Manzello DP (2015) Accepted Manuscript. Regional Studies in Marine Science 2:145-153.
- [27] West JM, Salm RV (2003) Resistance and resilience to coral bleaching: implications for coral reef conservation and management. Conservation Biology 17:956-967.
- [28] Wolanski E, Martinez JA, Richmond RH (2009) Quantifying the impact of watershed urbanization on a coral reef: Maunalua Bay, Hawaii. Estuarine, Coastal and Shelf Science 84:259-268.

