

学際連携研究報告書

平成24年度

東京大学 大気海洋研究所

はじめに

学際連携研究は、平成23年度より開始した公募型の共同研究事業である。本共同研究では、全国の個人またはグループの研究者と本研究所の教員が協力して、海洋や大気に関わる基礎的研究および地球表層圏の統合的理解の深化につながる研究を実施する。特に、複数の学問分野の連携による学際的な共同研究の推進を目指すことから、「学際連携研究」と名付けられた。本共同研究には以下の二つの形態がある。

(1) 特定共同研究

本研究所が提案し、地球表層圏変動研究センターが中心となって計画的に推進する特定共同研究課題について、所内の研究グループと所外の研究者が協力して進める共同研究。

(2) 一般共同研究

全国の個人またはグループが提案する研究テーマについて、所外と所内の研究者が協力して進める共同研究で、本所の研究目的に貢献が期待できるもの。新しい研究の展開のきっかけとなるポテンシャルを秘めた萌芽的あるいは試行的研究を歓迎する。また、新規プロジェクトの立案にむけてのフィージビリティ研究（打ち合わせ会議や予備調査の実施などを含む）も審査の対象とする。

平成24年度の実績は、特定共同研究の応募数が4件（同採択数4件）、一般共同研究の応募数が15件（同採択数10件）であった。

本冊子は、平成24年度採択課題の成果報告をまとめたものである。関連分野の研究者の皆様に有効にご活用いただけると幸いである。

東京大学大気海洋研究所
共同利用運営委員会
学際連携研究部会

平成24年度学際連携研究 一覧

【特定共同研究】

番号	申込者氏名	所属機関	役職	研究課題	大気海洋研究所 共同研究教員
1	三宅 陽一	長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科	助教	シマイセエビの個体群維持機構に関する研究	伊藤 幸彦 木村 伸吾
2	森 宙史	東京工業大学大学院生命理工学研究科	助教	海洋の環境要因が細菌群集に与える影響を推定するためのメタゲノム解析手法の開発	岩崎 渉
3	奥野 淳一	国立極地研究所	特任研究員	粘弾性地球変形モデルを用いた第四紀海水準変動の理論研究	横山 祐典
4	高見 英人	海洋研究開発機構	上席研究員	微生物多様性に呼応するメタゲノム情報を取り入れた海洋環境評価への方法論の検討	木暮 一啓 浜崎 恒二

【一般共同研究】

番号	申込者氏名	所属機関	役職	研究課題	大気海洋研究所 共同研究教員
1	上野 洋路	北海道大学大学院水産科学研究院	助教	アリューシャン・ベーリング海域における渦・潮汐混合過程を通じた物質循環に関する研究	安田 一郎
2	宮 正樹	千葉県立中央博物館	上席研究員	海洋生物多様性理解を加速するための大量ミトゲノム情報の収集と処理システムの構築	馬淵 浩司 岩崎 渉
3	北野 潤	国立遺伝学研究所	特任准教授	多様な塩分環境への魚類の適応遺伝機構	日下部 誠
4	中村 将	沖縄美ら島財団美ら島研究センター	教授	広塩性板鰐類オオメジロザメの生殖・適応生理学研究：次世代シーケンサーによる遺伝子情報基盤の整備	兵藤 晋
5	横川 太一	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	助教	細菌生物量・生産量の超広域高解像度空間分布データを基にした有機物分解機構の解明	永田 俊 羽角 博康
6	藤井 千春	岩手県立博物館	主任専門学芸調査員	アオメエソ属魚類の発光器の機能に関する繁殖生態学的研究	大竹 二雄 猿渡 敏郎
7	大久保 綾子	日本原子力研究開発機構	研究員	天然放射性核種トリウムの3次元モデルの開発とその挙動解明に関する研究	岡 顕 小畑 元
8	田副 博文	弘前大学被ばく医療総合研究所	助教	二枚貝中の放射性ストロンチウム分析による放出プロセスの復元と沿岸環境中における移行過程に関する研究	白井 厚太郎 小畑 元
9	関口 美保	東京海洋大学海洋工学部	准教授	全球非静力学モデル及び衛星シミュレータ用の放射コード開発	中島 映至 佐藤 正樹
10	上村 了美	国土技術政策総合研究所	研究官	ウミナシ類のSSRマーカー開発と集団解析における有効性の検証	小島 茂明

目次

学際連携研究報告書

【特定共同研究】

1. シマイセエビの個体群維持機構に関する研究 . . . 1
2. 海洋の環境要因が細菌群集に与える影響を推定するためのメタゲノム解析手法の開発 . . . 3
3. 粘弾性地球変形モデルを用いた第四紀海水準変動の理論研究 . . . 5
4. 微生物多様性に呼応するメタゲノム情報を取り入れた海洋環境評価への方法論の検討 . . . 7

【一般共同研究】

1. アリューシャン・ベーリング海域における渦・潮汐混合過程を通じた物質循環に関する研究 . . . 9
2. 海洋生物多様性理解を加速するための大量ミトゲノム情報の収集と処理システムの構築 . . . 11
3. 多様な塩分環境への魚類の適応遺伝機構 . . . 13
4. 広塩性板鰐類オオメジロザメの生殖・適応生理学研究：次世代シーケンサーによる遺伝子情報基盤の整備 . . . 15
5. 細菌生物量・生産量の超広域高解像度空間分布データを基にした有機物分解機構の解明 . . . 17
6. アオメエソ属魚類の発光器の機能に関する繁殖生態学的研究 . . . 19
7. 天然放射性核種トリウムの3次元モデルの開発とその挙動解明に関する研究 . . . 21
8. 二枚貝中の放射性ストロンチウム分析による放出プロセスの復元と沿岸環境中における移行過程に関する研究 . . . 23
9. 全球非静力学モデル及び衛星シミュレータ用の放射コード開発 . . . 25
10. ウミナナ類のSSRマーカー開発と集団解析における有効性の検証 . . . 27

シマイセエビの個体群維持機構に関する研究

A study on the population-sustaining mechanism of pronghorn spiny lobster *Panulirus penicillatus*

三宅 陽一, 長大院・水環, E-mail: miyakey(at)nagasaki-u.ac.jp
伊藤 幸彦, 東大・大気海洋研, E-mail: itohsach(at)aori.u-tokyo.ac.jp
木村 伸吾, 東大・新領域, E-mail: s-kimura(at)aori.u-tokyo.ac.jp
中田 英昭, 長大院・水環, E-mail: nakata(at)net.nagasaki-u.ac.jp

Yoichi Miyake, Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University
Sachihiko Itoh, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Shingo Kimura, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo
Hideaki Nakata, Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University

Abstract

Pronghorn spiny lobster *Panulirus penicillatus* is the most widely distributed species among spiny lobsters. Genetic isolation was recently found to exist between the central/western and eastern Pacific populations. The ocean between these populations is known as the East Pacific Barrier, which is thought to be an impassable barrier for coastal marine species. In this study, we aimed to elucidate the mechanisms that facilitate the sustainability of populations as well as the mechanisms that separate two Pacific populations. Larval transport was simulated from areas near habitats located on either side of the EPB, using particles with three different behaviors (passive, and two types of diurnal vertical migration). The variance and distribution patterns of particle positions at the end of the simulations were significantly different among the behavior groups. These results indicate that the vertical distribution of phyllosoma larvae influences their transport ranges and is the mechanism that sustains the local populations and isolates two Pacific populations.

1. はじめに

シマイセエビ *Panulirus penicillatus* は、アフリカ東部から中米太平洋沿岸域までの熱帯や温帯の岩礁域に生息し、イセエビ類の中で最も広範囲に分布する種である¹。イセエビ類は、生活史初期にフィロソーマ幼生として1年間近く海洋を浮遊する²。この幼生期における水平遊泳能力は低く、幼生輸送により確立される個体群の連結性は、海洋の物理環境に大きく影響を受けるものと考えられる。そのため、幼生の行動や流動環境など生物と海洋物理の両側面を考慮した学際的なアプローチがシマイセエビ個体群の維持機構を明らかにする上で重要となる。

2. 問題設定・方法

太平洋東部には East Pacific Barrier (EPB) と呼ばれる島の無い海域が存在する。チャールズ・ダーウィンはこの海域を沿岸性生物にとっての impassable barrier と言い表しており³、フカアナハマサンゴ *Porites lobata* では本海域の東西で遺伝的隔離が起きていることが報告されている⁴。シマイセエビでも EPB に隔てられた太平洋の中・西部と東部の集団間に遺伝的差異が発見されているが⁵、これらの集団を隔離している要因は明らかにされていない。野外での幼生分布調査は行われているものの、このような手法のみから幼生の輸送経路・環境を包括的に明らかにすることは困難であるため、個体群がどのように連結して維持されているのかについては分かっていない。そのため、本研究では、数値モデルを用いて、シマイセエビの個体群維持機構を検討した。さらに、その一環として太平洋個体群の遺伝的隔離要因の解明を試みた。

シマイセエビ太平洋個体群の連結性を検討するため、海洋大循環モデル (OFES; JAMSTEC) のデータおよび粒子追跡モデルを用いて幼生輸送シミュレーションを行った。本種の産卵は通年行われているため^{6,7}、1970–2007 年を対象に粒子 1,000 個を EPB 東西の海域 (太平洋中部: ハワイ諸島、トゥアモトゥ諸島、太平洋東部: ガラパゴス諸島の周辺海域) に月一回

投入した。また、飼育環境下における本種の幼生期間は 8–11 ヶ月であることが報告されているため⁸、粒子の追跡期間を 1 年間に設定した。イセエビ類のフィロソーマ幼生は主に 100m 以浅に分布し⁹、幼生の成長段階が進むにつれて分布が深くなることが指摘されている^{9,10,11}。イセエビ *P. japonicus* の初期幼生は水深 80m 以浅、中期幼生は昼に 50–100m、夜に 0–50m に分布する¹⁰。このため、幼生輸送シミュレーションの粒子の鉛直分布には、水深 1 m に投入後、流れに受動的に輸送される「Passive」、25 m および 75 m を半日周期で移動する「DVM1」、追跡期間前期 (粒子投入後 6 ヶ月間) は DVM1 と同様に移動し、その後は分布を深化させて 50 m および 100 m を移動する「DVM2」の三群を設けた。なお、鉛直分布による輸送への影響を明らかにするため、粒子追跡期間終了時における粒子の位置 (緯度・経度) について、鉛直分布群間の等分散性を Levene 検定、各群の有意差をクラスカル・ウォリス検定と Bonferroni 法による多重比較 (MATLAB R2012b; MathWorks) により検討した。

3. 結果と考察

EPB 西部のハワイ諸島周辺に投入した粒子は、西方に輸送される傾向が強く、シミュレーション終了時の粒子の位置は最東で西経 126.9° であった。同じく EPB 西部のトゥアモトゥ諸島からの粒子は、EPB を越えて他の成体生息域 (ガラパゴス諸島等) に到達するほどの輸送は認められなかった。一方、EPB 東部のガラパゴス諸島周辺に投入した粒子は、分布水深が深いほど東寄り赤道近くに分布する傾向が認められた (Fig. 1)。

いずれの粒子投入域でも粒子の水平分布は鉛直分布群間で等分散性を示さず ($p < 0.001$)、さらに各群間に有意差が認められた ($p < 0.001$) (Fig. 2)。多くのイセエビ類の幼生は日周鉛直移動を行うことから⁹、本研究の結果は、幼生の鉛直分布が水平方向の輸送過程に影響を及ぼして EPB を越えた連結性を妨げると共に、太平洋東部と中・西部の個体群が遺伝的に隔離していること⁵を支持していた。輸送範囲が限られるこ

とは自己加入を増大させ、各個体群の維持につながっているものと考えられる。

特にガラパゴス諸島周辺に投入した粒子の経度方向の輸送範囲が鉛直分布群間で顕著に異なっていた。これは、本海域に西向きの南赤道海流や北赤道海流と共に、水深 50 m 以深には東向きの赤道潜流が存在するため、幼生の鉛直分布がその輸送範囲に大きく影響を及ぼしたものと考えられる。

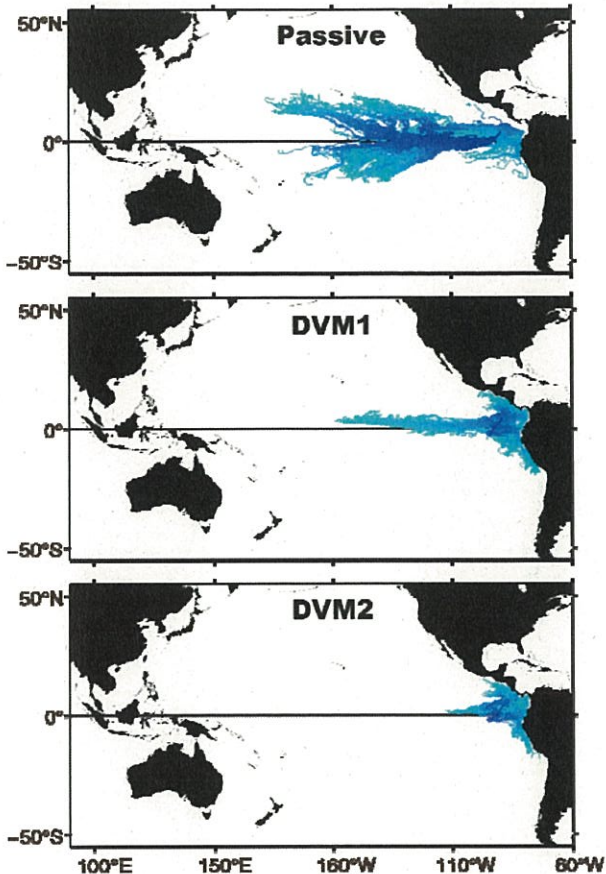


Fig. 1 Trajectories of particles released in the vicinity of the Galapagos Islands in December 1984. The results of Passive, DVM1 and DVM2 simulations are shown in the upper, middle, and lower panels, respectively. The colors of trajectories are lighter toward the end of the simulation period.

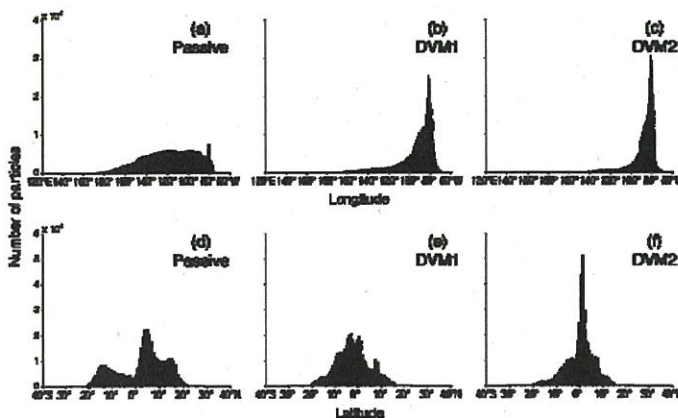


Fig. 2 Histograms of longitudinal (a, b, c) and latitudinal (d, e, f) distribution of particles, released in the vicinity of the Galapagos Islands, at the end of the 1970-2007 simulations. The histograms of particle distribution for Passive, DVM1 and DVM2 simulations are shown in the left (a, d), middle (b, e) and right panels (c, f), respectively.

4. まとめと今後の展望

本研究の結果から、EPB の東西に存在するシマイセエビ個体群では、幼生の鉛直分布が輸送範囲に影響を与えることにより各個体群が維持され、さらに、これが太平洋個体群の遺伝的隔離のメカニズムになっていることが示唆された。今後は、野外での幼生採集による分布域の把握、成長・生残による個体群連結性への影響から個体群維持機構を検討する。

参考文献

- (1) Holthuis, L.B., 1991: "FAO species catalogue. Vol. 13. Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date" Rome: FAO.
- (2) Johnson, M.W., 1974: "On the dispersal of lobster larvae into the East Pacific Barrier (Decapoda, Palinuridea)", Fishery Bulletin, 72, 639-647.
- (3) Darwin, C.R., 1872: "The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life" London: John Murray.
- (4) Baums, I.B., J.N. Boulay, N.R. Polato and M.E. Hellberg, 2012: "No gene flow across the Eastern Pacific Barrier in the reef-building coral *Porites lobata*", Molecular Ecology, 21, 5418-5433.
- (5) Chow, S., A. Jeffs, Y. Miyake, K. Konishi, M. Okazaki, N. Suzuki, M. F. Abdullah, H. Imai, T. Wakabayashi, and M. Sakai, 2011: "Genetic isolation between the western and eastern pacific populations of pronghorn spiny lobster *Panulirus penicillatus*", PLoS ONE, 6(12), e29280.
- (6) Juinio, M.A.R., 1987: "Some Aspects of the Reproduction of *Panulirus penicillatus* (Decapoda: Palinuridae)", Bulletin of Marine Science, 41, 242-252.
- (7) Hearn, A. and M.V. Toral-Granda, 2007: "Reproductive biology of the red spiny lobster, *Panulirus penicillatus* and the Galapagos slipper lobster, *Scyllarides astori* in the Galapagos Islands", Crustaceana, 80, 297-312.
- (8) Matsuda, H., T. Takenouchi and J.S. Goldstein, 2006: "The complete larval development of the Pronghorn spiny lobster *Panulirus penicillatus* (Decapoda: Palinuridae) in culture", Journal of Crustacean Biology, 26, 579-600.
- (9) Bradford, R.W., B.D. Bruce, S.M. Chiswell, J.D. Booth, A. Jeffs, and S. Wotherspoon, 2005: "Vertical distribution and diurnal migration patterns of *Jasus edwardsii* phyllosomas off the east coast of the North Island, New Zealand", New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 39, 593-604.
- (10) 農林水産省農林水産技術会議事務局, 2010: "イセエビの種苗生産技術の開発" 東京: 農林水産省農林水産技術会議事務局
- (11) Rimmer, D.W. and B.F. Phillips, 1979: "Diurnal migration and vertical distribution of phyllosoma larvae of the western rock lobster *Panulirus cygnus*", Marine Biology, 54, 109-124.

海洋の環境要因が細菌群集に与える影響を推定するためのメタゲノム解析手法の

開発

Development of a metagenome analysis pipeline to infer the environmental parameters that affect compositions of microbial communities in the ocean

森 宙史, 東工大・生命理工, E-mail: hmori(at)bio.titech.ac.jp

岩崎 渉, 東大・大気海洋研, E-mail: iwasaki(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Hiroshi Mori, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

Wataru Iwasaki, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Microbes inhabit everywhere on earth, and they are responsible for global biogeochemical cycles. Most of them are difficult to culture, and therefore the metagenome analysis revolutionized our understanding of microbial communities by allowing the taxonomic and functional characterization of the uncultured majority. Especially, the comparative analysis of many metagenomic data will be a powerful strategy to infer the environmental parameters that affect taxonomic and functional compositions of microbial communities. In this study, we developed a metagenome analysis pipeline that can handle several thousands of metagenomic data. Applying our analysis pipeline against the metagenomic data in the public DNA sequence database, we can obtain basic information of taxonomic and functional compositions of each microbial community that can be used to an input data for several correlation analyses between community compositions and environmental parameters.

1. はじめに

海洋を含めた地球環境中には多種多様な細菌が群集を形成して生息し、地球上の物質循環の基盤を形成している。それらの群集を構成する細菌の多くは培養することが困難であるため、各細菌の地球上での地理的分布や生態など、未解明な部分が多い。近年の新型シーケンサーの普及によって、環境中から得られた DNA をまるごとシーケンスするメタゲノム解析や、16S rRNA 遺伝子などの系統マーカー遺伝子のみを特異的にシーケンスする群集多様性解析が盛んに行われるようになり、その結果としてそれらの解析データが公共の配列データベース中に既に数万サンプル以上蓄積されている。森らは、それらの解析の結果の配列データと、サンプルが由来した環境のデータであるメタデータを整理したデータベース(DB)を構築中であり(森 et al. 2012) (2)、この DB を利用することによって、どのような環境中にどのような機能遺伝子を所持した細菌が生息しているのかを、配列レベルで明らかに出来る。この DB を利用して様々な環境由来の細菌群集のメタゲノムデータを比較解析することによって、どのような環境要因が細菌群集の系統組成や遺伝子機能組成に影響を与えているのかを、推定することが可能になると期待できる。

2. 問題設定・方法

公共 DB から取得出来るメタゲノムデータは、個別の配列断片(リード)が大量に記述されたテキストデータであり、各リードがどのような系統のどのような機能を持った遺伝子に由来しているかは、既知の配列 DB 相手の配列相同性検索等を行い、個別に推定する必要がある。さらに、代謝パスウェイやシグナル伝達経路等、ほとんどの生物機能は単一の機能遺伝子で担われているわけではなく、複数の機能遺伝子が連携して働くことによって担われており、細菌群集が各機能遺伝子をどれくらい所持しているかを単純に集計しただけでは、ある生物機能がどの程度その環境中で豊富に存在する、つまりは重要であるかを推定することは困難である。メタゲノム解析の結果からある環境中の細菌群集の機能的な特徴を明らかにするためには、まず各リードのアノテーション付けを行っ

た後、遺伝子ごとにその群集中での存在量をリード数として集計した後、関連する複数の機能遺伝子を含めてひとまとまりの機能単位としてまとめ、各遺伝子機能群がその細菌群集からどれくらい見つかるのかを、他の細菌群集と比較解析する必要がある。

本研究では、大量のメタゲノム解析の配列データについて、リードごとにアノテーション付けを行った後、複数の機能遺伝子を機能群ごとにまとめてサンプル間で比較解析することを可能にするパイオインフォマティクスの解析手法を開発した。

3. 結果と考察

新型シーケンサーのデータが蓄積されている公共の塩基配列 DB である Sequence Read Archive から取得した約 24,000 サンプルの配列データについて、高精度なリードのみを抽出した後、各サンプルのデータをメタゲノムデータ・メタトランスクリプトームデータ・16S rRNA 遺伝子等を用いた群集多様性解析のデータの 3 つに自動的に分類した。そのうちのメタゲノムデータ約 20TB について、サンプルごとに既知のゲノム配列相手に全リードを配列相同性検索し、各ゲノムの各遺伝子にどれくらいリードがアサインされたか、つまりはその遺伝子とそのメタゲノムデータ中にどの程度存在するのか、を集計する解析パイプラインを開発した (Figure 1)。メタゲノムデータを対象とした配列相同性検索に必要とされる機能として、データサイズが大量であること、および、環境中の細菌の多くが未だ近縁なゲノムがシーケンスされていないために、メタゲノムデータ由来のリードと検索対象のゲノム配列間では一般的に低い配列相同性しか存在しない場合が多いことが挙げられる。これらのメタゲノムデータの特徴のため、解析に用いる配列相同性検索のソフトウェアとして、BLAST では速度的に現実的ではなく、リシーケンス解析等に用いられている高速なマッピングソフトウェアの多くは、低い配列相同性を検出することが困難であるため適用困難である。そこで、本研究においては、森らが開発中の GPU を用いた高速配列相同性検索ツールを用いることで、大量データに対して

高速で感度および精度が高い配列相同性検索を実現した。上記のツールを用いたメタゲノムデータの既知のゲノム配列相手の配列相同性検索の結果として得られた、サンプルごとの系統組成と遺伝子機能組成の情報について、KEGG Pathway や KEGG Module 等の、生物が持つ代謝経路やシグナル伝達経路などのパスウェイが遺伝子レベルで整理された DB (3) の情報と組み合わせることによって、複数の機能遺伝子をパスウェイごとにまとめてサンプル間で存在量を比較解析可能な解析パイプラインを開発した。

4. まとめと今後の展望

本研究で開発した解析パイプラインを用いて既存のメタゲノムデータを全て解析することによって、様々な環境由来の細菌群集のメタゲノムデータを比較解析し、どのような環境要因が細菌群集の系統組成や遺伝子機能組成に影響を与えているのかを、推定することが可能になると期待出来る。現在公共 DB に登録されている既存のメタゲノムデータ全てに対してこの解析パイプラインをいくつかのスーパーコンピュータ上で走らせている最中であり、解析結果が揃い次第、特に海洋の細菌群集について、地理的な位置や深さ、水温等のメタデータとの相関解析や、多変量解析を行い、海洋の細菌群集の組成に影響を与える環境要因を解明していきたいと考えている。

参考文献・Web サイト

- (1) 森宙史, 山田拓司, 黒川顕, 2012 “メタゲノム解析の現状と将来 知識データベースの開発” 情報管理, 55, 167-175.
- (2) <http://microbedb.jp/MDBdemo/>
- (3) <http://www.genome.jp/kegg/>

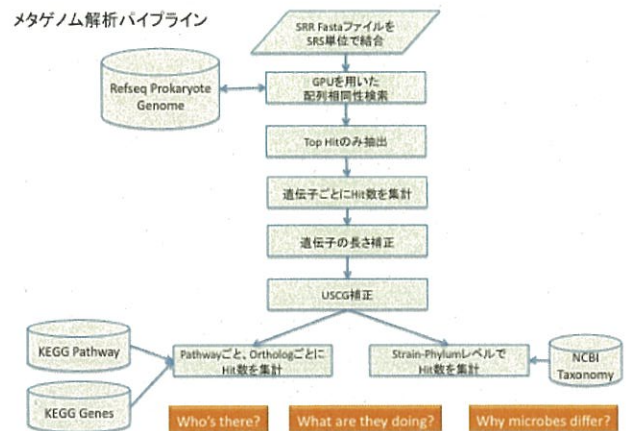


Figure 1. Workflow of our metagenome analysis pipeline.

粘弾性地球変形モデルを用いた第四紀海水準変動の研究

Theoretical Quaternary sea-level reconstructions using the viscoelastic earth deformation model

奥野 淳一, 極地研, E-mail: okuno(at)nipr.ac.jp

横山 祐典, 東大・大気海洋研, E-mail: yokoyama(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Jun'ichi Okuno, National Institute of Polar Research

Yusuke Yokoyama, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

We apply the glacio hydro isostasy model to the relative sea-level (RSL) observations obtained in Tahiti Island and Shimokita Peninsula, northern Japan, in order to evaluate the temporal change of meltwater volume. We indicate the timing and magnitude of two melting events in about 14000 yrBP and mid-Holocene in comparison with observations and numerical predictions. The RSL reconstruction based on the glacio hydro isostasy is a powerful tool to investigate the temporal change of meltwater volume during the last deglaciation.

1. はじめに

(現在は氷期と氷期の間、いわゆる間氷期に相当し、第四紀の中では海水準が高い時期にあたる。一方で、今から約 2 万年前の最終氷期最盛期 (Last Glacial Maximum: LGM) には、地球の両極域および高緯度の陸域には大規模な氷床が発達し、海水準は現在よりも 120-130 m 低下していたと考えられている (たとえば Yokoyama *et al.*, 2000)。この LGM 以降、北アメリカやヨーロッパ、南極などの氷床が融解することで海水量は増加し、グローバルな海水準は現在のレベルまで上昇した。しかし、退氷期の海面上昇速度 (特に約 14000 年前の急激な海面上昇期) やローレンタイド氷床やフェノスカンジア氷床が融解完了したと考えられている約 6000 年前以降の氷床融解については、融解源の氷床やその時間変化について、現在も議論されている問題である。

本研究課題では、上記の 2 つの時代に注目し、海水準変動の観測値と粘弾性地球変形モデルより計算される理論値との比較検討を行うことで、氷床融解史についての考察を行った。

最初に、最終退氷期に起こったとされる急激な海水準上昇イベントである「メルトウォーターパルス 1a (MWP-1a)」と呼ばれる時代についてとりあげる。このイベントは、海水準の急激な上昇イベントであるが、氷期から間氷期へ移行する際の最大の温暖化である「ベーリングイベント」は同調しておらず、600 年のずれがあるといわれ、古気候学の大きな問題となっている (Deschamps *et al.*, 2012)。このような背景から、南太平洋に位置するタヒチ島において、水面下に眠るサンゴ礁堆積物を掘削し、過去 2 万年間の海水準変動曲線を高精度で抽出することを目的とする統合国際深海掘削計画 (IODP) 第 310 次航海が実施された。サンゴ礁堆積物コアの解析から明らかにされた最終氷期以降の海水準変動より、グローバルな氷床量変動を推定するためには、氷床の融解や海水の増加によって引き起こされる地球の変形を精度良く見積もることが必要不可欠である。そこで、本研究課題にて開発している、グレイシオハイドロアイソスタシー (Glacio hydro isostasy: Fig. 1 に概念図を示す) のモデルを適用し、海水準変動の理論値とコアの解析結果と比較することで、約 14000 年前の MWP-1a イベントにおける北半球、南極両氷床の寄与やその規模について考察した (Deschamps *et al.*, 2012)。

次に、完新世中期以降の海水準変動の観測値より、ローレンタイド氷床やフェノスカンジア氷床が融解完了したと考えられている約 6000 年前以降の氷床融解について、そのタイミングと規模について定量的に検討した。今回は、青森県下北半島の海水準変動を対象とし、完新世の海水準を沖積層中の堆積物中の珪藻分析や地形によって求め、またそれらの年代

を、貝化石等の放射性炭素年代測定により正確に求めた。この観測値とグレイシオハイドロアイソスタシーの理論計算を比較することで、完新世中期の氷床融解量を見積もった (Yokoyama *et al.*, 2012)。今回の対象地域は、LGM 以降の氷床融解に伴って、海洋全体に分散されたおよそ 120-130m の厚みをもつ海水荷重の増加により、ゆっくりとした地殻変動がおこり、完新世中期の海水準が現在の海水準より高いところに現れる地域である (Fig. 1)。

2. 問題設定・方法

過去の海水準の規模とタイミングを正確にとらえるためには、氷床から遠い場所 (熱帯域や中緯度地域) のデータが、信頼度は高い。これは、氷床の融解に伴うアイソスタティックな地殻変動が少ない場所であるからである (Fig. 1)。さらに、サンゴ礁をつくるサンゴは、海面近くに生息していることから海水準の指標になり、かつ、サンゴが形成する炭酸カルシウムの骨格には、ウラン系列核種がとりこまれ、年代を正確に決定できる。一方で、サンゴが生息しない地域では、沖積層のボーリングコアより得られた珪藻化石から海成層の上限を決定し、その地層中から得られる貝化石を用いて、放射性炭素年代測定を行い、過去の海水準の高度と年代を決定した。

グレイシオハイドロアイソスタシーのモデルによる理論的海水準曲線の再現については、Lambeck *et al.* (2003) の定式化に基づき、海水荷重の空間的な不均質をモデル化する手法を導入した。このようにして得られる過去の海水準について、

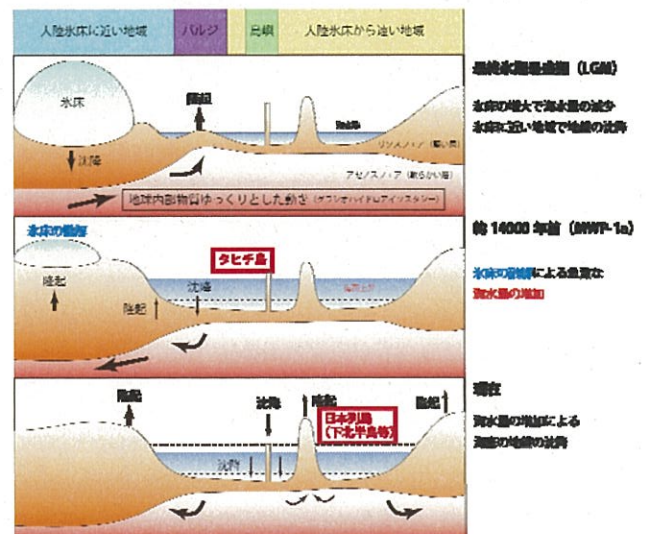


Fig. 1 グレイシオハイドロアイソスタシーの概念図

観測値と理論値を比較することで、本研究で対象とした氷床融解イベントについて考察した。

3. 結果と考察

3-1 タヒチの海水準

これまでのタヒチやバルバドスの海水準変動より報告されていた MWP-1a における海面上昇量は、「25 m/500 年」であったが、Deschamps *et al.* (2012) では、この値が過大評価であったことを明らかにし、その規模は「14-18 m/350 年」であり、上昇速度は 40mm/年にも及ぶことが示された。また、海水準上昇のタイミングについても、珊瑚礁の正確な年代測定より、これまでの定説より約 500 年早いことが指摘され、14600 年前に上昇が始まったことが明らかになった。この結果は、グリーンランド氷床の温度記録に見られる急上昇期と同調することを示している。さらに、グレイシオハイドロアイソスタシーのモデル計算結果は、南北両極氷床の寄与の割合や地球内部粘性構造などについて、いくつかのシナリオが成り立つ可能性を示唆するものである (Fig. 2)。

3-2 青森県下北半島の海水準

完新世の氷床融解の時間変化を考察する上で、以下の 3 つのモデルを検討した (Fig. 3)。(1) およそ 1 万 9 千年前の氷期の終焉から引き続き現在まで融解が続いているとするモデル (赤)、(2) 北米や北欧氷床が融解し終わった 6000 年前までに融解し終え、その後は海水量の変化がないモデル (緑)、そして、(3) その間の 3000-4000 年前までに融解し終え、その後は海水量の変化がないモデル (青)、である。その結果、氷期から現在まで融解しているモデル(1)は、現在よりもおよそ 2m 高い位置にある 3000-4000 年前の海水準の観測値の存在を説明することができず、モデル(2)あるいは(3)が妥当である (Fig. 3)。この結果は、氷期終焉後の主な氷床融解は、数 1000 年前、おそらく 3000-4000 年前までに完了していたことが推察される。したがって、現在、リモートセンシング技術等で観測されている氷床融解の加速は、近年に特徴的な現象であり、現在の温暖化にともなって引き起こされた可能性が示唆される。

4. まとめと今後の展望

本研究課題では、時代の異なる 2 つの時期、場所についての海水準の観測値を、グレイシオハイドロアイソスタシーの

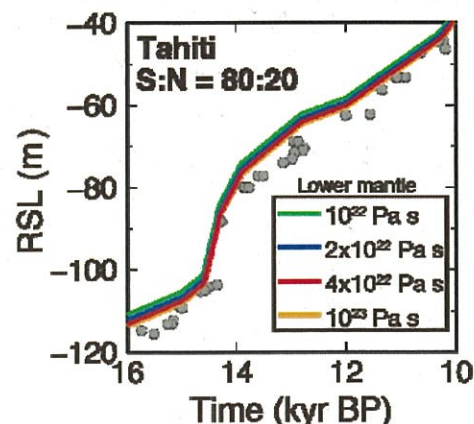


Fig. 2 タヒチにおける海水準変動の観測値(●)とグレイシオハイドロアイソスタシーのモデルより再現された理論曲線。曲線の色は使用した下部マントルの粘性率の違いである。MWP-1a イベントにおける南北氷床の寄与の割合が 80:20 のモデルを使用した。このシナリオでも、タヒチの観測値は説明可能である。

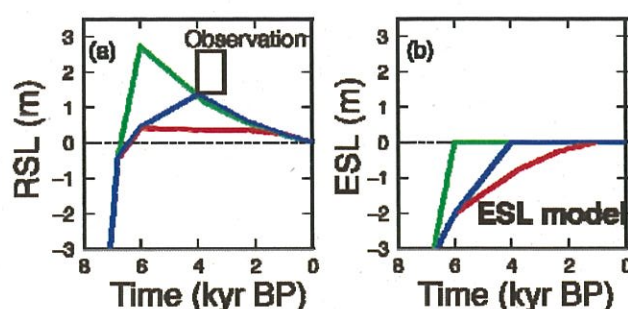


Fig. 3 青森県下北半島のグレイシオハイドロアイソスタシーのモデルによって再現された海水準変動曲線。(a) 3 つの融解史モデルに基づいた理論的海水準変動曲線と観測値(□)。(b) 3 つの融解史モデル。

モデル結果と比較検討することで、過去の氷床融解について考察した。タヒチの海水準変動は、古気候学的にも議論が盛んである MWP-1a の実態について、詳細な年代決定に基づき、より正確な海面上昇量を規定できた。また、青森県下北半島の海水準変動は、ハイドロアイソスタシーによる地殻変動を示すことを明らかにし、観測値とモデル計算の比較より、間氷期の比較的安定な環境における氷床融解を実証した。本研究の意義は、退氷期と氷期終焉後の氷床融解について、地形地質学的観測と、詳細な年代測定、そして、固体地球の変形を計算するモデルを組み合わせて、気候変動の大きな要素である氷床融解現象にアプローチしている点である。このような研究による成果は、地球温暖化予測のための気候モデルを制約する境界条件や、極めて短期間の人工衛星や測地学的データに基づく氷床融解のシグナルが、自然現象なのか人為的起源によるものなのかと言った問題について検討するための重要な資料となる。地球システムの理解にはこのような研究成果の蓄積が必要不可欠であり、今後は、東大気海洋研等が取得した、オーストラリア・グレートバリアリーフのサンゴ礁コアの解析とモデル計算の比較検討を進め、最終氷期終焉期の海水準や、MWP-1a イベントの詳細な過程を考察していく予定である。

参考文献

- (1) Yokoyama, Y., K. Lambeck, P. De Deckker, P. Johnston, and L. K. Fifield, 2000: "Timing of the Last Glacial Maximum from observed sea-level minima", *Nature*, 406, 6797, 713-716.
- (2) Deschamps, P., N. Durand, E. Bard, B. Hamelin, G. Camoin, A. L. Thomas, G. M. Henderson, J. Okuno, and Y. Yokoyama, 2012: "Ice-sheet collapse and sea-level rise at the Bølling warming 14,600 years ago", *Nature*, 483, 7391, 559-564.
- (3) Yokoyama, Y., J. Okuno, Y. Miyairi, S. Obrochta, N. Demboya, Y. Makino, and H. Kawahata, 2012: "Holocene sea-level change and Antarctic melting history derived from geological observations and geophysical modeling along the Shimokita Peninsula, northern Japan", *Geophys. Res. Lett.*, 39, L13502, doi:10.1029/2012GL051983.
- (4) Lambeck, K., A. Purcell, P. Johnston, M. Nakada, and Y. Yokoyama, 2003: "Water-load definition in the glacio-hydro-isostatic sea-level equation", *Quat. Sci. Rev.*, 22, 309-318.

微生物多様性に呼応するメタゲノム情報を取り入れた海洋環境評価への方法論の検討

A study on evaluation method using metagenomic data for ocean environments corresponding to microbial diversity

高見 英人, 海洋研究開発機構・環境メタゲノム解析研究チーム, e-mail: takamih@jamstec.go.jp
河合 幹彦, 同 環境メタゲノム解析研究チーム, e-mail: kawaim@jamstec.go.jp
高木 善弘, 同 環境メタゲノム解析研究チーム, e-mail: takakiy@jamstec.go.jp
荒井 渉, 同 環境メタゲノム解析研究チーム, e-mail: w-arai@jamstec.go.jp
木暮 一啓, 東大・大気海洋研究所, 微生物分野, e-mail: kogure@aori.u-tokyo.ac.jp
浜崎 恒二, 同 微生物分野, e-mail: hamasaki@aori.u-tokyo.ac.jp
吉澤 晋, 同 地球表層圏変動研究センター, e-mail: yoshizawa@aori.u-tokyo.ac.jp

Hideto Takami, Mikihiro Kawai, Yoshihiro Takaki, Wataru Arai, Microbial Genome Research Group, JAMSTEC

Kazuhiro Kogure, Koji Hamasaki, Marine Microbiology, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Susumu Yoshizawa, Center for Earth Surface System Dynamics, The University of Tokyo

Abstract

We sequenced additional metagenomic libraries of 4 seawater samples collected at S1 and K2 sites in autumn and spring by means of 454 GS FLX⁺ DNA sequencer. After a series of standard data treatment such as assembling, gene finding, we evaluated the functional potentials harbored in microbial communities of seawater samples based on a module completion ratio of the KEGG functional modules. We also analyzed 16S rDNA sequences in the metagenomic libraries to figure out microbial diversity and richness of seasonally different seawater samples. Our analyses are still in progress but we found that seasonal difference in microbial populations within two phyla, *Cyanobacteria* and *Bacteroidetes* so far.

1. はじめに

海洋における物質循環や食物連鎖などに微生物群集が大きく関わっていることが、昨今広く指摘されるようになったが、微生物群集の機能的な動態を可視化する術がないことから、微生物の環境への関与は長くブラックボックスとして扱われてきた。海洋における微生物多様性を把握する有効な手段として、16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析が広く行われてきたが、16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析だけでは、微生物の多様性と海洋環境の相関関係を理解するのに必要な代謝能や様々な生理・生態に関与する遺伝子情報を得ることはできない。また、環境における様々な物理・化学的情報がなければ、殆どが難培養性微生物由来の代謝や生理、生態に関与する遺伝子レパートリーとその多様性の解釈が極めて難しい。

この問題を解決する方法の一つとして、環境に存在する微生物群集のゲノムを網羅的に解析するホールコミュニティメタゲノミクスが用いられ、難培養性微生物を包括した様々な遺伝子情報の収集には非常に有効な手段となっている。しかしその一方で、膨大な配列情報から微生物群集が持つ潜在的代謝機能の推測には、代謝経路を正確に再構築するための方法論の開発が必要である。また、それにより予測された代謝機能と環境で生じている

イベントとの相関を考えるには、フィールドワークやその後の実験で得られた環境データが非常に重要で、ゲノムデータだけでなく、環境データをあわせた総合的な解析に必要な方法論の開発も重要な課題である。本研究では、これらの背景を踏まえ、JAMSTECが開発した潜在的代謝機能評価法(1)と東大海洋研の蓄積した海洋サンプルや環境データを用いた総合的な解析法の確立を目指し、その第1歩として、海洋観測船“みらい”の定点観測地で得られた海水サンプルの季節変化における微生物群集の潜在的機能の違いをメタゲノム解析から明らかにすることを主な目的とした。

2. 問題設定・方法

本研究課題では、海洋研究開発機構がこれまで海洋堆積物を中心に行ってきたメタゲノミクスのノウハウと東大・大気海洋研、木暮研究室で培われてきた様々な海洋微生物研究法や蓄積された海洋環境情報などを融合させ、微生物多様性の理解とその環境における意義付けに有効な方法論の確立を目指すものである。

昨年度までに、“みらい”の航海で採取した亜寒帯域の観測点 K2 の夏期、冬期の海水サンプル、亜熱帯域の観測点 S1 の夏期、冬期の海水サンプル全4点から抽出したDNAを用いてメタゲノム

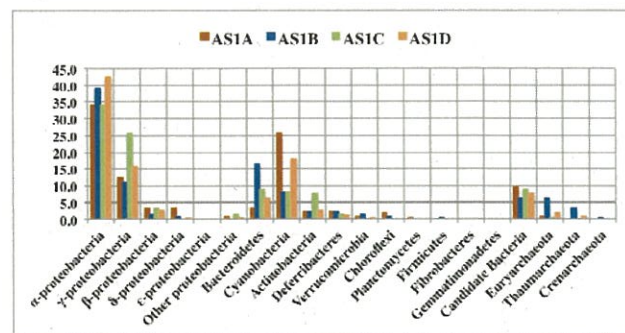
ライブラリーを作製し、次世代シーケンサー・ロッシュ 454 GS FLX⁺ によるシーケンシングを行った。そこで、今年と同地点で春期、秋期に採取された海水を用いて同様にシーケンシングを行った。シーケンシングについては予備的にまず 1/4 ランを行い、予備解析を行った後さらに 1/4 ランを行って最終的に昨年度シーケンシングを実施した秋期、冬期についても 1/4 ランを追加で行った。最終的には K2, S1 の四季サンプルを 1/2 ランずつ行ったことになるが、まず、これらのサンプルのメタゲノム配列中に含まれる 16S rDNA 配列断片の Blast サーチを基に、各サンプルの生物種の内訳を Phylum レベルで整理した。

次に、メタゲノム配列に見いだされた遺伝子配列で、30 アミノ酸以上の配列(塩基数にして 90 base 以上)を KEGG で 開発された KAAS を用いて KEGG Genes に対してサーチを行い、オーソログ ID (KO)を各遺伝子にアサインした。KO がアサインされた遺伝子は、JAMSTEC で開発した MCR-evaluator を用いて KEGG module に対する充足率を計算し、潜在的機能を評価した。

3. 結果と考察

メタゲノム中に含まれる 16S rDNA 断片は全配列の約 0.1%で、300 弱の配列が各サンプルから見いだされた。これらの 16S rDNA 断片配列を Blast により、ribosomal RNA 遺伝子のデータベースである Silva に対してサーチし、既知の配列と優位にヒットするものを phylum レベルの生物種で整理し、その内訳を S1, K2 の 2 地点、季節間での比較を行った。その結果、K2 地点では Proteobacteria の割合には殆ど季節を通して変化が見られなかったが、S1 地点では Gammaproteobacteria に優位な違いが見られ、春における比率が他の季節に比べ 10-15%ほど高くなっていることがわかった。Cyanobacteria については、K2 地点では殆ど検出されていないのに対し、S1 地点では秋と夏に優位に見られ、全体の 18-26%が Cyanobacteria で占められていた。一方、Bacteroidetes については、K2, S1 の両地点とも季節間による違いが見られた。K2 では特に夏にその比率が高く、全体の約 30%近くを占めており、次いで夏では全体の 18%を占めていた。S1 では、秋と夏に高い傾向が見られ、秋が 25%、夏が 18%と K2 とほぼ同じ値であった。これらの菌叢の違いがどのような機能の違いとして反映されているかを

調べるため、MCR-evaluator を用いた潜在的機能を評価した。現在その結果をまとめつつあり、リジン合成、スフィンゴシン分解、クレアチンパスイウェイなど多くの機能モジュールの充足率に季節変化が見られることが分かっている。



16S rDNA 配列に基づく菌叢の内訳の一例。(S1 地点) AS1A: 秋, AS1B: 冬, AS1C: 春, AS1D: 夏

4. まとめと今後の展望

本年度は、昨年度に引き続き亜熱帯および亜寒帯域の定点観測地点(K2, S1)から採取された海水サンプルのメタゲノム解析を昨年行った夏、冬のサンプルに加え、春、秋のサンプルも同様にを行った。これらの塩基配列データをもとに、16S rDNA の解析を行い、サンプル中に含まれるメタゲノムの由来生物種の内訳を調べ、各地点、季節間での差異を調べたところ、Bacteroidetes, Cyanobacteria に違いが見られ、S1 地点については Gammaproteobacteria にも違いが見られた。これらの違いがどのような機能的違いとして反映されているかを現在調べているが、これまでのところ、リジン合成、スフィンゴシン分解、クレアチンパスイウェイなど多くの機能モジュールの充足率に季節変化が見られている。KEGG module の充足率に基づく機能評価は、これまでの方法とは異なり、個別の代謝、輸送、環境応答などに関与する反応単位で評価を行うことができ、またその反応に寄与する生物種情報も合わせて取得できるので、16S rDNA に基づく菌叢変化と機能変化との間に何らかの関係性が見いだせるものと期待される。今後とも継続して解析を行う予定である。

参考文献

- (1) Takami H, Taniguchi T, Moriya Y, Kuwahara T, Kanehisa M, Goto S. (2012) Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. *BMC Genomics*. 13, 69

アリューシャン・ベーリング海域における 渦・潮汐混合過程を通じた物質循環に関する研究 A study on biogeochemical cycle through eddy and tidal mixing in the Bering Sea and around the Aleutian Islands

上野 洋路, 北大・水産, E-mail: ueno(at)fish.hokudai.ac.jp
大西 広二, 北大・水産, E-mail: onishi(at)fish.hokudai.ac.jp
久万 健志, 北大・水産, E-mail: kuma(at)fish.hokudai.ac.jp
西岡 純, 北大・低温研, E-mail: nishioka(at)lowtem.hokudai.ac.jp
安田 一郎, 東大・大気海洋研, E-mail: ichiro(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Hiromichi Ueno, Faculty of Fisheries Science, Hokkaido University
Hiroji Onishi, Faculty of Fisheries Science, Hokkaido University
Kenshi Kuma, Faculty of Fisheries Science, Hokkaido University
Jun Nishioka, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University
Ichiro Yasuda, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

The Green Belt is marked by summertime high phytoplankton density along the shelf break in the southeastern Bering Sea that separates the shallow shelf and the deep basin. The high productivity in the Green Belt has been attributed to nutrients input through eddy-induced horizontal mixing between nitrate-rich surface basin water and iron-rich shelf water along the Bering Slope Current. Although the vertical mixing has also been recognized as an important process to sustain the Green Belt, there have been few supporting observational data on turbulence in this region. In this study we conducted 24-hour shipboard turbulence (VMP2000), temperature, salinity, pressure and oxygen (CTDO) observations as well as turbulence and CTD observations with glider along the Green Belt. As the result, large vertical diffusivity was observed, supporting the hypothesis by Tanaka et al. (2002).

1. はじめに

ベーリング海南東部には、東側の浅い陸棚域と西側の深い海盆域を隔てる陸棚斜面に沿って持続的な高い低次生産帯が存在し、グリーンベルトと呼ばれている。グリーンベルトでの夏まで続く高い低次生産は、その海域の豊かな高次生態系維持に重要な役割を担っていると考えられている (Springer et al., 1996)。しかし、鉄が枯渇し生産が停止することが一般的である北太平洋亜寒帯海域の中で何故夏季に生産が維持されるのか、充分には理解されていない。近年の観測結果から、陸棚堆積物起源の鉄がグリーンベルトへの主要な鉄供給源の一つである事が認識されるようになったが、陸棚堆積物由来の鉄がどのように、グリーンベルト表層へ輸送されるかは明らかにはなっていない。加えて、そもそもグリーンベルトを構成する水塊がどのように形成されるかも完全には明らかにはなっていない。

最近の研究で、アリューシャン海峡域や陸棚縁辺域において強い潮汐混合が存在し、鉄の鉛直拡散と長期間持続する渦による水平拡散が周辺海域の高い生物生産に寄与していることが示唆されている (例えば, Tanaka et al., 2012)。しかし、鉛直拡散と栄養塩鉛直輸送の持続性や渦による栄養物質の水平輸送過程の詳細は未解明であり、観測による実証が不可欠である。

北太平洋亜寒帯域は沿岸域において生物生産が盛んであるが、外洋域は栄養塩濃度が高いにもかかわらずクロロフィル濃度が低くなっており、high nutrient low chlorophyll (HNLC) 海域として知られている。この外洋域の生物生産に関しては鉄が制限要因となっていると考えられており、外洋域への鉄の輸送の担い手として、沿岸域で発生して外洋域へ伝播する中規模渦が注目を集めている (Johnson et al., 2005;

Ueno et al., 2010)。この中規模渦は鉄を輸送するだけでなく、アラスカストリームなど沿岸に沿った境界流によって妨げられている沿岸域と外洋域の海水交換に重要な役割を果たしており、北太平洋亜寒帯域の熱・物質輸送を理解する上で重要な存在である。しかし、北太平洋亜寒帯域における渦研究は東部のアラスカ湾に関するものが大部分であり、中西部海域の中規模渦に関しては調べられてこなかった。

そこで本研究では、グリーンベルトにおいて詳細な乱流観測を実施し、また、アリューシャン列島南岸域に存在する海洋中規模渦の横断観測を実施することにより、グリーンベルトおよび海洋中規模渦のさらなる理解を目指した。

2. 問題設定・方法

北海道大学附属練習船おしよ丸 2012 年度 60 日航海レグ 1 (2012 年 6 月 8 日函館出航、6 月 28 日ダッチハーバー入港: 図 1) にて、CTDO (水温・塩分・圧力・酸素)、ADCP (流速)、乱流 (VMP2000 を使用)、栄養塩、植物プランクトン観測、さらに自走式グライダーを用いた CTDO (水温・塩分・酸素) 観測を実施した。

おしよ丸航海ではまず、海洋中規模渦の内部構造の把握を目的として、海洋中規模渦を横断する CTDO (水温・塩分・酸素)、ADCP (流速)、乱流、栄養塩、植物プランクトン観測を実施した (図 1: OS12032~OS12038)。

さらに、陸棚斜面域においては (図 1 ☆YAS1, ☆YAS2)、24 時間繰り返し乱流観測を行うとともに、乱流計を搭載した自走式グライダー観測を実施した。観測点 YAS1 における 24 時間繰り返し乱流観測は荒天のため途中で終了せざるを得なかったが、YAS2 では、24 時間全ての観測を実施した。

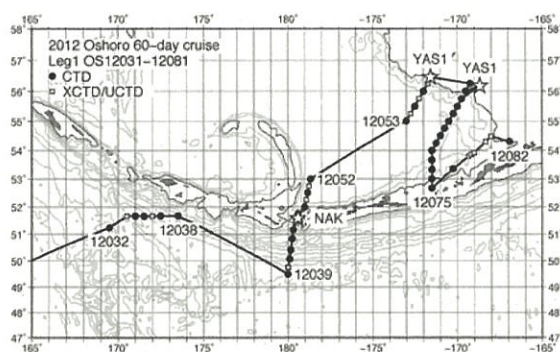


図1：2012年度おしよ丸60日航海レグ1観測点図。番号はおしよ丸観測点番号。

3. 結果と考察

西部亜寒帯海域で横断観測が実施された海洋中規模渦は、高気圧性渦の特徴である下に凸の構造をしていることが示された。また、衛星海面高度データ解析により、この渦は、2011年6月にアリューシャン列島南岸で形成されたアリューシャン渦であることが示された。

アリューシャン列島太平洋側の渦、およびベーリング海東部陸棚縁辺域において詳細な海洋観測を実施した。陸棚縁辺での繰り返し乱流観測から、潮汐流による強い鉛直混合が1日2回観測され、グリーンベルトの高い生物生産の維持に潮汐流に伴う鉛直混合が重要な役割を果たしているというTanaka et al. (2012)の仮説を支持する結果が得られた。

4. まとめと今後の展望

北海道大学附属練習船おしよ丸2012年度60日航海レグ1で、海洋中規模渦の横断観測、グリーンベルト乱流観測を実施した。両観測データともに、現在、詳細な解析を実施しているところである。今後、解析を進め、海洋中規模渦周辺、グリーンベルトにおける生物生産の維持メカニズムのさらなる理解を目指す計画である。

参考文献

- (1) Johnson, W. K., L. A. Miller, N. E. Sutherland and C. S. Wong (2005): Iron transport by mesoscale Haida eddies in the Gulf of Alaska. *Deep Sea Res. Part II*, 52, 933–953.
- (2) Springer, A. M., C. P. McRoy, and M. V. Flint (1996), The Bering Sea Green Belt: Shelf-edge processes and ecosystem production, *Fish. Oceanogr.*, 5, 205–223, doi:10.1111/j.1365-2419.1996.tb00118.x.
- (3) Tanaka, T., I. Yasuda, K. Kuma, and J. Nishioka, 2012: Vertical turbulent iron flux sustains the Green Belt along the shelf break in the southeastern Bering Sea, *Geophys. Res. Lett.*, 39, L08603, doi:10.1029/2012GL051164.
- (4) Ueno, H., W. R. Crawford and H. Onishi (2010): Impact of Alaskan Stream eddies on chlorophyll a distribution in the western and central subarctic North Pacific, *J. Oceanogr.* 66, 319–328.
- (5) 上野洋路, 大西広二, 2012: “おしよ丸北洋航海における海洋物理観測” 月刊海洋, 44(12), 668–672.

海洋生物多様性理解を加速するための大量ミトゲノム情報の 収集と処理システムの構築

Construction of novel systems for assembling and processing massive mitogenomic sequences: Towards a better understanding of the marine biodiversity

宮 正樹, 千葉県立中央博物館・動物学研究科, E-mail: miya(at)chiba-muse.or.jp

馬淵浩司, 東大・大気海洋研, E-mail: mabuchi(at)aori.u-tokyo.ac.jp

岩崎 渉, 東大・大気海洋研, E-mail: iwasaki(at)aori.u-tokyo.ac.jp

武島弘彦, 東大・農学生命科学研究科, E-mail: takeshima(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Masaki Miya, Department of Zoology, Natural History Museum and Institute, Chiba
Kohji Mabuchi and Wataru Iwasaki, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Hirohiko Takeshima, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Abstract

With the advent of next-generation sequencing (NGS) technologies, which process hundreds of thousands to millions of DNA templates in parallel, genomic approaches are becoming feasible even in the basic biological researches, such as 1) molecular identification of species and 2) reconstruction of phylogenetic relationships among those species. For simultaneous and efficient resolutions of the two issues, we employed whole mt genome sequences (ca. 16,500 bp) that have been proven useful molecular markers for both studies by our research group. Preliminary experiments demonstrated that 20 whole mt genomes from various fish species were reasonably assembled from templates enriched by a long PCR technique and subsequent parallel sequencings using a NGS system. Also the resulting concatenated novel sequences were efficiently annotated using a newly developed web service called MitoAnnotation (available from <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/annotation/input.html>).

1. はじめに

我々の研究グループは、30,000 種あまりにのぼる現生魚類の進化史解明を目的に、これまでミトコンドリアゲノム（ミトゲノム）全塩基配列データを精力的に収集し（>1,000 種）、詳細な系統解析を行ってきた。その成果は 100 篇近い論文にまとめられ（近年のものについては[1-7]を参照）、被引用件数は 5,000 件を超えている（Google Scholar 調べ）。

一方、現生魚種の全種を網羅し進化史の全体像を把握するという究極の目的を達成するためには、二つの技術的な制約があることが明らかとなってきた。一つは、塩基配列データの収集速度の問題で、もう一つはデータのアノテーション速度の問題である。

従来のサンガー法を用いてミトゲノム全周配列を収集すると、魚類全種のデータを取得するのに 100 年以上かかる計算となることがわかった。また、データのアノテーションは、現在大部分を人力に頼っており、非常に手間と時間（1 種につき約 1 時間）を要していた。

そこで本研究では、塩基配列の大規模な並列決定を可能にする次世代シーケンサを利用することにより、ミトゲノムデータの大量一斉取得を試みると共に、データのアノテーションを自動化し、ウェットの実験作業からドライのデータ処理までを迅速に行うパイプラインを構築することを目的として研究を行った。

2. 方法

次世代シーケンサを用いたミトゲノム全周配列の並列決定については、① ロング PCR によるミトゲノムを精製；② ロング PCR 産物の等量混合；③ ライブラリーの作成；④ テンプレートの調整；⑤ 並列シーケンス；⑥ データのアセンブルというプロセスを経て行った。

一方、データのアノテーションのパイプラインは、専門家による入念なチェックを経た魚類 250 種のアノテーション済みのデータを参照することにより、自動化を図った。

3. 結果と考察

ロング PCR 産物が得られた 20 種の魚類は以下の通りである：*Schismatogobius roxias* エソハゼ；*Osteobrama* sp. *Sebastes ventricosus* クロメバル；*Paralichthys olivaceus* ヒラメ；*Entomacrodus striatus* スジギンポ；*Xenoccephalus elongatus* アオミシマ；*Takifugu niphobles* クサフグ；*Rhinobatos schlegelii* サカタザメ；*Stephanolepis cirrhifer* カワハギ；*Cociella crocodila* イネゴチ；*Brachyhypopomus pinnicaudatus* サンドリーフナイフフィッシュ；*Tetrosomus concatenatus* ハマフグ；*Pristiglenys nipponia* クルマダイ；*Pterocaesio marri* ニセタカサゴ；*Epinephelus akaara* キジハタ；*Lutjanus ophuysenii* ヨコスジフエダイ；*Cynoglossus abbreviatus* コウライアカシタビラメ；*Theragra chalcogramma* スケトウダラ；*Hapalogenys nigripinnis* ヒゲソリダイ；*Inimicus japonicus* オニオコゼ。

これら 20 種から得られたロング PCR 産物を、上記の方法に従いシーケンスのテンプレートを調整し、二回の並列シーケンシングを行った。その結果、2 種の配列（エソハゼとヒゲソリダイ）がまったく得られなかったものの、その他の 18 種については被覆率 50% から 100%（平均 76%）の配列が得られ、本手法の実用化の目処がたった。

データのアノテーションのパイプラインについてはすでにその開発を終え、データベース MitoFish に搭載している。魚類 1 種のミトゲノムを FASTA 形式で読み込むと、計 37 個の遺

伝子のアノテーションがわずか5分で出来上がり、その結果はそのままDDBJへ登録できる。本成果はIwasaki et al. [8]にまとめて投稿中である。

また、MitoFishは大幅に改訂され、魚類の生物学的情報が容易に得られるようになった。そのインターフェースをFig. 1に示す。



Fig.1. An example of the interface of MitoFish, with biological information on Japanese freshwater eel (*Anguilla japonica*) shown.

4. まとめと今後の展望

本研究により、次世代シーケンサを用いた魚類ミトゲノム全長配列の並列決定の実用化の目処がたつと同時に、研究の進展の大きな障害の一つとなっていたデータのアノテーションが自動化された。今後、前者の実験的手法をさらに洗練

されたものにすると同時に、本格的な実用化に向けてさらに実験手法の微調整が必要となろう。

参考文献

1. Mabuchi K, Song H (2013) The complete mitochondrial genome of the Japanese ornamental koi carp (*Cyprinus carpio*) and its implication for the history of koi. Mitochondr DNA (in press).
2. Song H, Mabuchi K (2013) Complete mitochondrial genome sequence of the thorny seahorse *Hippocampus histrix* (Gasterosteiformes: Syngnathidae). Mitochondr DNA (online first).
3. Song H, Satoh TP, Mabuchi K (2012) Complete mitochondrial genome sequence of the dragonet *Callionymus curvicornis* (Perciformes: Callionymidae). Mitochondr DNA 23: 290–292.
4. Johnson GD, Ida H, Skaue J, Sado T, Asahida T, et al. (2012) A 'living fossil' eel (Anguilliformes: Protanguillidae, fam. nov.) from an undersea cave in Palau. Proc R Soc B 279: 934–943.
5. Lavoué S, Miya M, Arnegard ME, Sullivan JP, Hopkins CD, et al. (2012) Comparable ages for the independent origins of electrogenesis in African and South American weakly electric fishes. PLoS ONE 7: e36287.
6. Nakatani M, Miya M, Mabuchi K, Saitoh K, Nishida M (2011) Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. BMC Evol Biol 11: 177.
7. Inoue JG, Miya M, Miller MJ, Sado T, Hanel R, et al. (2010) Deep-ocean origin of the freshwater eels. Biol Lett 6: 363–366.
8. Iwasaki W, Fukunata T, Isagozawa R, Yamada K, Maeda Y, Sato T, Sado T, Mabuchi K, Takeshima H, Miya M, Nishida M (Submitted). Mitofish and MitoAnnotation: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline.

多様な塩分環境への魚類の適応遺伝機構

Genetic mechanisms for adaptation to diverse salinity environments in fishes

北野 潤, 国立遺伝学研究所・生態遺伝, E-mail: jkitano(at)lab.nig.ac.jp

日下部誠, 東大・大気海洋研, E-mail: kusakabe(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Ecological Genetics Lab, National Institute of Genetics

Makoto Kusakabe, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

1. はじめに

魚類は多様な環境へ適応放散を遂げた分類群であり、生物多様性研究の格好のモデル生物である。なかでもトゲウオ科魚類（イトヨやトミヨなど）は、海や淡水などの多様な塩分環境に適応した近縁種や種内変異が多く存在すること（eg. Kitano *et al.* 2007 *Biol J Linn Soc*; Kitano *et al.* 2008, 2010 *Current Biology*）、ゲノム配列が解読され遺伝解析方法が確立されていること（eg. Kitano *et al.* 2009 *Nature*; Kitano *et al.* 2010 *Current Biology*）から、異なる塩分環境への適応能力の進化機構を解明するのに最適のモデル系である。

申請者はこれまでに、海に生息するイトヨと淡水に生息するイトヨの集団間で浸透圧調節に重要なホルモン量に違いがあること（Kitano *et al.* 2010 *Current Biology*）、海に生息するイトヨ集団と淡水に生息するイトヨ集団がナトリウム調節能に大きな遺伝的な違いがあることなどを明らかにしてきた（Kitano *et al.* 未発表, Ishikawa *et al.* *J Evol Biol*）。

2. 問題設定・方法

魚類は、いかなる遺伝機構でこのような多様な塩分環境へ適応進化して来たのであろうか。本課題では、この問いに対して、多様な塩分環境に適応進化したイトヨ集団を用いて迫る。これら集団は、種内多型であり交配可能なことから雑種を交配して QTL マッピングが可能である。また、ゲノム配列も解読されていることからマイクロアレイ等による遺伝子発現解析も可能である。

多様な塩分環境への適応放散過程を明らかにするためには、生理学的な実験手法とゲノミックスの手法を融合させて学際的なアプローチをとることが必要不可欠である。そこで、本研究ではこれらの実験技術を駆使して、海のイトヨ集団と淡水のイトヨ集団の塩分耐性能の違いがどのような遺伝的変異によって進化したのか、その遺伝機構を解明する。

3. 結果と考察

まず、カナダのリトルキャンベル川の海のイトヨと淡水のイトヨをかけ合わせた F2 世代の雑種を作出し、400 個体あまりについて海水チャレンジのタスクを行い、血漿や脳、鰓組織等をサンプリングした。海水チャレンジの実験では、24 時間以内に死亡する個体や生存する個体等が観察でき、この F2 交配家系内に十分な変異が存在していることが確認できた。

ついで、親個体のジェノタイプを決定するために次世代シーケンサーで両系統のシーケンスリードを行った。これら二集団間には多くの SNP が存在し、これらの SNP 情報を元に、2013 年度には連鎖地図を作製し、塩分耐性の原因遺伝子

座を同定することが可能であることが分かった。

また、純系交配個体について、塩分刺激下での脳内での遺伝子発現の変化をマイクロアレイによって解析し、いくつかの神経ペプチドが、集団間で異なる反応を示すことを見いだした。また、F1 雑種では、これらの一部の応答が純系の親よりも極端な反応を示す遺伝子も複数見つかった。

4. まとめと今後の展望

適応進化に関わる候補遺伝子探索の基盤を作ることに成功した。まず、2013 年度には QTL 解析によって原因遺伝子座を特定する。さらに、マイクロアレイの結果と合わせて、塩分耐性の違いを生み出す原因候補遺伝子を探る。これらのいくつかについては、トランスジェニック法やノックアウト法を利用して候補遺伝子が適応的な意味を持つかを明らかにして行きたい。また、原因候補遺伝子のゲノム配列を比較することによって、そのシス領域の変異等を特定したい。マイクロアレイの結果については、早々に論文としてまとめたい。

参考文献

- (1) Kitano, J., S. Mori, and C. L. Peichel (2007). Phenotypic divergence and reproductive isolation between sympatric forms of Japanese threespine stickleback. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 671-685.
- (2) Kitano, J., D. I. Bolnick, D. A. Beauchamp, M. M. Mazur, S. Mori, T. Nakano, and C. L. Peichel (2008). Reverse evolution of armor plates in threespine stickleback. *Current Biology* 18: 769-774.
- (3) Kitano, J., J. A. Ross, S. Mori, M. Kume, F. C. Jones, Y. F. Chan, D. M. Absher, J. Grimwood, J. Schmutz, R. M. Myers, D. M. Kingsley, and C. L. Peichel (2009). A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature (Article)* 461: 1079-1083.
- (4) Kitano, J., S. C. Lema, J. A. Luckenbach, S. Mori, Y. Kawagishi, M. Kusakabe, P. Swanson, and C. L. Peichel (2010). Adaptive divergence in the thyroid hormone signaling pathway in the stickleback radiation. *Current Biology* 20: 2124-2130.
- (5) Ishikawa, A., Takeuchi, N., Kusakabe, M., Kume, M., Mori, S., Takahashi, H., and Kitano, J. (2013) Speciation in ninespine sticklebacks: reproductive isolation and phenotypic divergence among cryptic species of Japanese ninespine stickleback. *Journal of Evolutionary Biology* in press

広塩性板鰐類オオメジロザメの生殖・適応生理学研究 次世代シーケンサーによる遺伝子情報基盤の整備

Physiological researches on reproduction and environmental adaptation of euryhaline bull shark:
Improvement of genetic information of elasmobranchs using a next generation sequencer

中村 将, 沖縄美ら島財団, E-mail: m-nakamura(at)okichura.jp
兵藤 晋, 東大・大気海洋研, E-mail: hyodo(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Masaru Nakamura, General Research Center, Okinawa Churashima Foundation
Susumu Hyodo, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

The cartilaginous fish is the earliest extant group of jawed vertebrates, and represent an important group in evolutionally, physiological, ecological, and resource aspects. The present study aimed to improve the genetic information in elasmobranchs to facilitate physiological researches. We conducted a seawater (SW) to freshwater (FW) transfer experiment of euryhaline bull shark, *Carcharhinus leucas*, and analyzed the transcriptome of the kidney and gill samples using a next generation sequencer (Roche 454 GS junior). We found that the expression of a solute carrier (Slc) mRNA was significantly increased by FW transfer in both the kidney and gill. In the kidney, the Slc mRNA was intensely localized in the late distal tubule of the nephron in FW fish but not in SW fish, suggesting that this segment is crucial for euryhalinity of bull shark.

1. はじめに

軟骨魚類は海洋生態系の食物連鎖の上位に位置し、尿素による環境適応や体内受精による卵生から胎生までの多様な繁殖戦略など、進化・生理・生態・資源といった様々な観点から重要な動物群である。しかしながらその研究はきわめて遅れており、その大きな原因は飼育実験の難しさと遺伝子をはじめとする分子基盤の欠如にある。軟骨魚類の多くは大型で外洋性のため、研究室レベルでの飼育実験はほとんど不可能である。また、軟骨魚類のゲノムサイズは一般に他の魚類と比べて大きい。ライフサイクルが長いということも、遺伝学的なアプローチを困難なものとしている。

ほとんどの軟骨魚類は海洋環境でしか生存できない狭塩性種であるが、オオメジロザメ *Carcharhinus leucas* は海水と淡水の両環境に適応できる数少ない種である。これまでの研究から、親魚は河口等の汽水域で出産し、生まれた幼魚は汽水域あるいは川を遡上して淡水域に入り、成長の後に海に下ると考えられてきた(谷内, 1997)。このような特徴的な生理・生態ゆえに、オオメジロザメは環境適応や繁殖生理学、生態学の良い研究モデルとなり得る種であり、多くの研究者が興味を持ってきた。しかしながら大型で危険なサメであることから、ほとんどが記載的な研究にとどまっていた。

2. 問題設定・方法

代表者はこれまでに、魚類の性成熟機構研究に多くの実績を持ち、瀬底実験所ならびに美ら島財団(美ら海水族館)においてオオメジロザメの飼育も可能な大型海水飼育実験設備が利用できる。また、美ら海水族館と協力することで、飼育下のオオメジロザメを研究に使用することができることがわかった。そこで、琉球大学の瀬底実験所、美ら島財団、大気海洋研究所が連携することで、オオメジロザメの生殖・環境適応に関わる様々な組織の EST データベースを、次世代シーケンサーを用いて構築することを考えた。さらには、飼育実験を行い、性成熟あるいは生息環境の違いに基づくトランスクリプトーム解析を行うことで、その生殖・適応生理学研究

に向けての遺伝子情報基盤を整備することを目的とした。

具体的には、オオメジロザメを使用する飼育実験、ならびに生殖に関わる組織学的解析を中村が中心となって沖縄で行う。一方で、採取した組織からの核酸調整、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析、同定した遺伝子の機能解析を共同研究者である大気海洋研究所の兵藤、渡邊を中心として行うこととした。

3. 結果と考察

本研究開始前には、オオメジロザメ 1 尾を用いて、麻酔方法ならびに安全かつ適切なサンプリング手法の確立を行った。その後、オオメジロザメ 6 尾を用いて環境適応実験を行った。予備実験魚を含めて 4 尾は海水飼育個体として水族館の畜養水槽で飼育し、3 尾を約 20 トンの濾過槽付き実験水槽で飼育しながら徐々に環境水の淡水化を行った。麻酔した後に血液と尿、さまざまな組織を採取した。血液と尿からはイオンや尿素、浸透圧、グルコース等さまざまなパラメータを測定し、オオメジロザメが淡水中でも高い体液中のイオンと尿素を維持しながら適応するという、これまでに知見を確認した。

これまでに、環境適応に中心的な役割を担うと考えられる鰓と腎臓について、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。大気海洋研究所が所有する 454 GS Junior を用い、リード数約 15 万、平均リード長 400 塩基程度の安定したデータが得られた。コンティグ作成の後、singletonを含めて Blast2Go ソフトウェアを用いるアノテーションを行った。腎臓については、特に solute carrier family (Slc) と呼ばれる膜輸送タンパク質群に注目して解析を進めたところ、多数の Slc タンパク質をコードする遺伝子が得られ、淡水移行により発現が高まる遺伝子と弱まる遺伝子が多数得られた。その中でも、12a3 と呼ばれる遺伝子の発現が、淡水移行によって顕著に高まることがトランスクリプトーム解析によって示された。このタンパク質は NaCl の再吸収に関わることが哺乳類や真骨魚類で示されている分子であることから、オオメジロザメがなぜ淡水環境において生存できるの

か、その鍵を握るタンパク質のひとつであることが予想された。そこで、このタンパク質をコードする mRNA の全長をクローニングし、発現量を定量的に解析するためのリアルタイム定量 PCR 系ならびに、組織切片上で発現部位を明らかにするための *in situ* hybridization 法を確立した。

その結果、12a3 は淡水移行により 10 倍程度発現量が増加することがわかった。また、狭塩性のドチザメでもこの遺伝子の発現を調べたところ、オオメジロザメの腎臓ではドチザメと比べて 12a3 の発現量が 100 倍程度高いこともわかった。

腎臓は尿を生成し、老廃物や不要なイオンなどを排出する器官であり、軟骨魚類の腎臓ネフロン（腎小体）の構造は、あらゆる動物の中で最も複雑な構成をしていることがわかってきている（Hyodo et al., 2004）。腎臓ネフロンのどこで発現しているのかを調べたところ、第 4 ループを構成する後部遠位細尿管であることがわかった。海水個体では発現は微かにみられる程度であるのに対し、淡水個体では後部遠位細尿管全体に強く発現していた。一方、ドチザメでは、12a3 の発現は後部遠位細尿管の一部のみにみられるだけで、後部遠位細尿管の大部分には NKCC2 という異なる NaCl 輸送タンパク質が塩分環境にかかわらず発現していることもわかった。以上のことから、オオメジロザメは、海水中で後部遠位細尿管をほとんど機能させておらず、淡水環境に入ると NaCl の再吸収がより必要になると、後部遠位細尿管に 12a3 を発現させて NaCl を原尿から再吸収し、体内のイオン濃度を保つのだと考えられた。このように、海水中では腎臓での NaCl 回収能力に余裕を持たせていることが、オオメジロザメが淡水に入っても体内のホメオスタシスを維持しながら生存できるひとつの要因であることが明らかとなった。

また、鰓でも 12a3 の発現が淡水環境で上昇することが明らかとなった。鰓では 12a3 はミトコンドリアリッチ細胞（塩細胞）に存在しており、外環境から NaCl を取り込むことに重要であることが示された。

生殖腺に関しては、卵巣、精巣、輸卵管、輸精管、子宮、卵殻腺などを切り分け、組織学的観察を進めてきた。軟骨魚類の生殖腺はきわめて大型で、真骨魚類のものと大きく異なっていることから、トランスクリプトーム解析のために用いる組織を精査することが必要不可欠である。光学顕微鏡レベルでの組織学的構成はほぼ判明させることができたため、今後は電子顕微鏡も用いながらトランスクリプトーム解析に用いるべき組織を決定する。

4. まとめと今後の展望

以上の通り、オオメジロザメの腎臓と鰓でトランスクリプトーム解析を行い、オオメジロザメの広塩性を可能にする重要な分子の同定に成功した。今回詳細に解析した遺伝子の他にも海水環境と淡水環境で発現が変化する遺伝子を複数見出し、今後はそれらの遺伝子についても解析を進めていく。また、生殖腺についても今後トランスクリプトーム解析を開始する予定である。環境適応や繁殖は多くのホルモンによって制御されていることが予想される。腎臓や鰓、生殖腺といった末梢器官以外にも、脳の視床下部や脳下垂体といっ

た、ホルモン産生の中核器官のトランスクリプトーム解析についても行っていく予定である。

オオメジロザメは広塩性という環境適応能力を研究するための貴重な種である一方で、さまざまな繁殖ステージを追跡する研究目的などには最適とは言えない。そこで今後は、オオメジロザメ以外にもトラザメなど他の板鰓類を対象に加えていく。トラザメは海水でしか生きられない狭塩性の卵生種あり、広塩性の胎生種であるオオメジロザメとの比較は、広塩性と狭塩性という環境適応能力の比較に加え、卵生と胎生の繁殖生理学研究にとっても重要である。幸運にも引き続き 25 年度も学際連携研究を継続できることになり、25 年度の申請ではトラザメを加えることとなっている。

国内外を問わず、軟骨魚類の生理学研究を行う研究者・研究グループは少ない。冒頭でも述べたとおり、軟骨魚類の重要性は広く認識されているものの、研究環境や分子基盤の問題から研究が進まない状況であった。本学際連携研究で得られたトランスクリプトーム情報については、我々だけでなく、情報を必要とする研究者に対してオープンにすることで、軟骨魚類の研究、ひいては海洋生命科学の研究の発展に寄与したいと考えている。すでに、宮崎大学や岡山大学の研究グループとは共同研究を開始しており、本研究で得られた EST 情報を共有していこうと考えている。このように、板鰓類研究コミュニティに対しても本研究は有用で、大気海洋研究所が中心となった学際連携研究の意義は極めて高いものだと考えている。

発表業績

- 1) 中村将、松本瑠偉、植田啓一、佐藤圭一、兵藤晋。オオメジロザメの成熟卵巣の組織学的特性-硬骨魚の卵巣との比較-。日本板鰓類研究会シンポジウム、大阪海遊館、2012 年 12 月 8 日。
- 2) 若林翠、高部宗一郎、渡邊太郎、角村佳吾、植田啓一、松本葉介、松本瑠偉、村雲清美、中村将、兵藤晋。オオメジロザメはなぜ淡水にも適応できるのか？日本板鰓類研究会シンポジウム、大阪海遊館、2012 年 12 月 8 日。
- 3) 渡邊太郎、若林翠、高部宗一郎、高木互、植田啓一、松本葉介、松本瑠偉、村雲清美、田中宏典、角村佳吾、長谷川久美、伊藤愛、中村将、兵藤晋。板鰓類研究における卓上型次世代シーケンサー（GS junior）の導入例。日本板鰓類研究会シンポジウム、大阪海遊館、2012 年 12 月 8 日。
- 4) 若林翠、高部宗一郎、渡邊太郎、角村佳吾、植田啓一、松本葉介、松本瑠偉、村雲清美、中村将、兵藤晋。オオメジロザメが淡水環境に適応するための仕組み。日本水産学会春季大会、東京海洋大学、2013 年 3 月 28 日。

参考文献

- (1) 谷内透、1997: “サメの自然史” 東京大学出版会、東京。
- (2) Hyodo, S., F. Kato, T. Kaneko, and Y. Takei, 2004: “A facilitative urea transporter is located in the renal collecting tubule of the dogfish *Triakis scyllia*”, J. Exp. Biol., 207, 347-56

細菌生物量・生産量の超広域高解像度空間分布データを基にした 有機物分解機構の解明

Large-scale, high-resolution geographical variation in prokaryotic abundance and production:
A new assessment of organic matter degradation process in the pelagic system.

横川 太一, 愛媛大・沿岸環境科学研究センター, E-mail: taichi.yokokawa(at)ehime-u.ac.jp

永田 俊, 東大・大気海洋研, E-mail: nagata(at)aori.u-tokyo.ac.jp

羽角 博康, 東大・大気海洋研, E-mail: hasumi(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Gerhard J. Herndl, University of Vienna, Austria, E-mail: gerhard.herndl(at)univie.ac.at

Taichi Yokokawa, Center for Marine Environmental Studies, Ehime University

Toshi Nagata, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Hiroyasu Hasumi, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Gerhard J. Herndl, University of Vienna, Austria

Abstract

Heterotrophic prokaryotes (bacteria and archaea) play important roles in major biogeochemical processes, such as nutrient cycling and organic matter fluxes in the oceans. However the processes mediated by heterotrophic prokaryotes have yet to be incorporated explicitly in global biogeochemical models. Incorporation of prokaryote processes to global biogeochemical models have been partly hampered due to the paucity of large-scale, high-resolution geographical variation data regarding prokaryotic abundance and production distributions in the oceans. In this study, we examined our own as well as the published data regarding the variation in prokaryotic production and carbon balance (the ratio of sinking POC flux and prokaryote carbon consumption) across oceanic regions (including Pacific, Southern and Atlantic Oceans). Our results showed that prokaryote abundance and production distributions in the mesopelagic zone (depth layer, 100 – 1,000 m) generally displayed consistent vertical patterns among distant locations and generally reflect the POC flux regime over large scale. In contrast, production distributions in the bathypelagic zone (depth layer, 1,000 – 5,000 m) were complex, which might indicate the presence of links between regional hydrographic features and organic carbon delivery in deep waters.

1. はじめに

申請者および共同研究者のグループの先駆的な研究により、有機物分解過程において中心的機能を果たす細菌および古細菌群集（以下細菌）の海洋中深層における広域的な分布の様子が明らかになってきている。とくに、太平洋では、Nagata et al. (2000) が、中深層における細菌生物量および生産量が粒子態有機炭素 (POC) フラックスとの強い共役関係にあることを明らかにした。また、申請者は白鳳丸航海調査 (KH03-2; KH04-2; KH05-4, 永田教授ほかとの共同研究) に参加し、細菌生物量および生産量の広域高解像度空間分布を明らかにした。これらの結果により、中層での細菌分布には POC フラックスが大きく影響していること、POC として表層から運ばれる炭素量に匹敵する量の炭素を細菌が利用していることが明らかとなってきた。

一方で、大西洋において、細菌生物量および生産量の分布は、水塊構造によるところが大きい (Teira et al. 2006)。細菌生物量と生産量と POC フラックスとの共役関係が弱く、中深層へ運ばれる POC 量を大幅に上回る量 (10 から 100 倍) の炭素を細菌群集が利用しているとの報告がある (Reintaler et al. 2006)。さらに申請者が行った北部大西洋調査のデータでは、大西洋の北部高緯度域 (北緯 65 度から 45 度) 深層で、太平洋深層と比べて、非常に高い細菌生産量 (太平洋の 100 倍程度) が観測された (De Corte et al. 2012)。この高い生産量の要因としては、大西洋表層水の深層への沈み込みによって運ばれた新鮮な有機物に対する細菌の応答だとみることができる。

これらの研究結果をあわせると、太平洋、大西洋間では、水塊構造および基礎生産分布の特徴によって、異なった有機物場が形成されること、そして、それぞれの有機物場に応答して、細菌生物量および生産量の時空間分布が大きく異なる

っている事が予想される。細菌生物量および生産量の時空間変動パターンとその要因の大洋間比較を行う事は、全球規模での有機物分解機構の理解に重要な過程である。

2. 問題設定・方法

本共同研究では、太平洋、大西洋における細菌生産および生物量分布の広域高解像度空間分布データセット (世界唯一のデータセット) の比較、精査により、太平洋、大西洋の両洋における細菌分布パターンの抽出、および有機物分解モデルの構築を行った。また、これらの知見を、生物地球化学—物理結合モデルに取り込み、全海洋規模での微生物量の分布の再現と定量的評価を行うための研究を進めた。

3. 結果と考察

①細菌生物量・生産量の太平洋広域高解像度観測データをもとに、それらの分布パターンおよびその変動要因の一部を明らかにした。細菌生物量・生産量の空間分布パターン解析から、緯度方向に細菌生物量および生産量に大きな勾配が存在すること、中層の細菌動態が POC フラックスに大きく支配されていること、また、深層において、細菌動態に及ぼす POC フラックスの影響が弱いことを明らかにした。この内容を論文として発表した (Yokokawa et al. 2013)。本論文のデータは先行研究で得られたものであるが、投稿にあたってのデータの再解析などにおいて本学際連携研究の成果が生かされた。

②本研究に関わる研究者ミーティング (東大大気海洋研究所, University of Vienna, Austria)

ミーティングでは、横川らが太平洋および大西洋で得た細菌生物量・生産量の実測値の広域的な空間分布パターンと、羽角らが構築を進めている全球物理—生物地球化学結合モデル

で再現された分布パターンの比較を行った。この比較に基づく議論の結果、大洋スケールでの分布パターンを精度高くモデル化するためには、細菌を介した POC の鉛直方向の分解過程を考慮に入れる事の重要性が明らかになった。また、観測結果から、細菌生物量・生産量の分布は経時的にも大きく変動する事が報告された。このミーティングでの議論をさらに深め、総説を執筆することを計画している。University of Vienna における Herndl 教授およびその研究室メンバーとのミーティングでは、横川が保有する太平洋における細菌に関する観測値および Herndl の研究グループが保有する大西洋における観測値を統合し、二大洋広域解像度細菌生物量・生産量のデータベースの作成を行った。

4. まとめと今後の展望

全球規模の物質循環過程の解明と予測には、最適な手法を用いた現場観測による現状の把握、その変動機構を理解するための観測と実験、および得られた観測値を用いたモデルでの高精度な再現が必要である。

本研究グループは、保有する広域高解像度細菌生物量・生産量の観測値（総試料数約 3000）を用いて全球規模での大洋間比較や分布パターン解析を行なった。このパターン解析の結果は、海洋有機物分解系の普遍的なモデルの構築に資するものだと考えられる（Yokokawa et al. 2013）。

今後の展望としては、「溶存態有機物循環の全球モデル」における細菌動態のパターンと観測値から得られたパターンとの比較から、1) モデルの調整、そして、2) モデルの再現性・定量性向上に必要なパラメータの選考を行う。さらに、3) 選択されたパラメータを今後行われる航海において重点項目

として設定する。このモデルと観測の相互補完のサイクルにより、細菌動態および溶存有機物循環に関するより深い理解が得られる。本研究成果は、海洋物質循環研究の方向性の確定に強く貢献することができると考えられる。

参考文献

- (1) Nagata, T., Fukuda, H., Fukuda, R., and I. Koike, 2000: "Bacterioplankton distribution and production in deep Pacific waters: Large-scale geographic variations and possible coupling with sinking particle fluxes", *Limnol. Oceanogr.*, 45, 426-435
- (2) Yokokawa, T., Yanhui, Y., Motegi, C., and T. Nagata, 2013: "Large-scale geographical variation in prokaryotic abundance and production in meso- and bathypelagic zones of the central Pacific and Southern Ocean", *Limnol. Oceanogr.*, 58, 61-73
- (3) Teira, E., Lebaron, P., van Aken, H., and G. J. Herndl, 2006: "Distribution and activity of Bacteria and Archaea in the deep water masses of the North Atlantic", *Limnol. Oceanogr.*, 51, 2131-2144
- (4) Reinthaler, T., van Aken, H., Veth, C., Aristegui, J., Robinson, C., Williams, P. J. le B., Lebaron, P., and G. J. Herndl, 2006: "Prokaryotic respiration and production in the meso- and bathypelagic realm of the eastern and western North Atlantic basin", *Limnol. Oceanogr.*, 51, 1262-1273
- (5) De Corte, D., Sintes, E., Yokokawa, T., Reinthaler, T., and G. J. Herndl, 2012: "Links between viruses and prokaryotes throughout the water column along a North Atlantic latitudinal transect", *The ISME journal*, 6, 1566-1577

アオメエソ属魚類の発光器の機能に関する繁殖生態学的研究

Reproductive ecological study on function of the luminous organ of *Chlorophthalmus*

大竹 二雄, 東大・大気海洋研, E-mail: otake(at)aori.u-tokyo.ac.jp
猿渡 敏郎, 東大・大気海洋研, E-mail: tsaruwat(at)aori.u-tokyo.ac.jp
岩田 恵理, いわき明星大学, E-mail: asealion(at)iwakimu.ac.jp
倉石 信・山内 信弥・春本 宜範, ふくしま海洋科学館, E-mail: amf(at)marine.fks.ed.jp
藤井 千春, 岩手県立博物館, E-mail: chi-fujii (at)iwapmus.jp
Tsuguo Otake, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Toshiro Saruwatari, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Eri Iwata, Iwaki Meisei University
Makoto Kuraishi・Shiya Yamauchi・Yoshinori Harumoto, Marine Science Museum, Fukushima Prefecture
Chiharu Fujii, Iwate Prefectural Museum

Abstract

In this study, the museum, the university, the aquarium work together, through the study on the luminous organ of *Chlorophthalmus*. We have the purpose of it is to support the development of marine biology, the reconstruction of the areas devastated by the Great East Japan Earthquake. This study was conducted from four perspectives. In the physiological analysis, we were administered ATP (adenosine triphosphate) into the luminous organ around the anus. However, the muscle contraction was not observed. In the histological analysis, we did not detect the luminescent bacteria and sexually mature individuals by HE (hematoxylin-eosin) staining and TN (Ziehl-Neelsen) staining. In the morphological description, we have observed an interesting trait from a sample of larvae and juveniles. The trait was melanophore saddle which there is prominent at the top front of the abdominal cavity. In addition, the lower abdominal wall was transparent. In the Community awareness activities, we have published lectures and symposia, such a result.

1. はじめに

東日本大震災で被災した福島県いわき市は、マルアオメエソ、*Chlorophthalmus borealis* (通称メヒカリ) を市の魚と制定し、水産業振興のシンボルとして活用してきた。これは、投棄されていた未利用水産資源が地域的な有用水産資源として注目され、成功した好例である。しかし、アオメエソ属魚類は、肛門付近の発光器に発光バクテリアを共生させ、発光することが知られているが、その繁殖をはじめとする生態は断片的にしか解明されていない。

本研究では、岩手県立博物館、東京大学、地元のいわき明星大学、ふくしま海洋科学館が連携して、発光魚マルアオメエソを含むアオメエソ属の発光機構の解明を通して、海洋生物学の進展と被災地の復興の一助となることを目的とする。

2. 問題設定・方法

(1) 発光器の生理学的機能解析

本魚の肛門周辺の発光器は、肛門の筋肉運動と密接な関係が示唆されている。本若魚の肛門周辺にアデノシン3リン酸(ATP)を注射及び滴下し、顕微鏡下で処理前後の発光器外部形態を観察・記録した。

(2) 発光器・生殖腺の組織学的な分析

駿河湾で漁獲された本若魚を漁獲後、すぐさまブアン液で固定を行った。体重、生殖重量を測定し、生殖腺指数(GSI)を算出した。発光器と生殖腺を摘出し、透徹・パラフィン包埋を行い、薄切切片を作製し、ヘマトキシリンエオシン(HE)で染色したのち鏡検を行った。発光器の組織切片は、さらにチールネルゼン(TN)染色により発光バクテリアの検出を試みた。

駿河湾で漁獲された本若魚、冷蔵した。発光器にスパーテルを挿入し、バクテリアを掻出し、スライドガラス上に薄く塗り広げて乾固させ、TN染色により発光バクテリアの検出を試みた。

(3) 個体発生に伴う発光器の形成過程の記載

静岡県沼津市戸田を基地にする底引き網漁船に乗船し、定

期的に本若魚を採集した。また、宮崎県延岡市産本若魚の冷凍標本を入手し、比較標本とした。さらに、既存の仔稚魚標本も活用し、浮遊期から着底後までの、本若魚の発光器の形成過程を、形態学的手法を用いて観察し記載した。

(4) 社会啓発活動

本研究に関わる博物館、大学、水族館が連携して、講演会・シンポジウム・展示において研究成果を発信した。

3. 結果と考察

(1) 発光器の生理学的機能解析

-70℃で冷凍保管しておいた2010年11月に駿河湾で漁獲された本若魚の肛門周辺にリン酸緩衝液でpH7.0に調整した0.5~2.0% ATP水溶液を注射及び滴下し、顕微鏡下で注射前後の発光器外部形態を観察・記録した。その結果、どのATP濃度においても処理前後の収縮等の変化は見られなかった。個体からのドリップの状況から、採集後の氷蔵に近い低温保存では、筋小胞体のCa²⁺取り込み能の低下に伴う筋原線維上のCa²⁺濃度の上昇によって、MF Mg²⁺-ATPase 活性が賦活化され、筋収縮率が加速される低温硬直現象がおこっていたと考えられた。そのため、冷蔵庫で徐々に解凍させ、2日間-5℃に冷凍しATPを消失させることを試みたが、硬直を解くことができなかったと考えられる。これらのことが一因となり、収縮等の変化が顕著に現れなかった可能性がある。

(2) 発光器・生殖腺の組織学的な分析

2011年9月、11月、12月、2012年2月、4月、5月、10月に駿河湾で漁獲された本若魚の体重とGSIは、いずれも低い値で推移した。生殖腺のHE染色では、検索したすべての個体の卵巣部分は周辺仁期の卵母細胞に占められ、精巣内は減数分裂前の精母細胞が精小嚢内に多く認められた。5月漁獲個体において、内腔に少数の精子を確認できる個体が数例認められた。

発光器は、多数の襞を持つ嚢状の構造物が肛門周囲を取り巻くように存在し(Fig.1A)、HE染色により内部に少数のバクテリアが検出された。しかし、このバクテリアはTN染色陰性

であり(Fig.1B)、発光バクテリアではないと判断された。また、2012年4月、5月、10月に採取した冷蔵個体の発光器より採取したバクテリアもTN染色陰性であり、今回用いた検体すべてより発光バクテリアを検出できなかった。

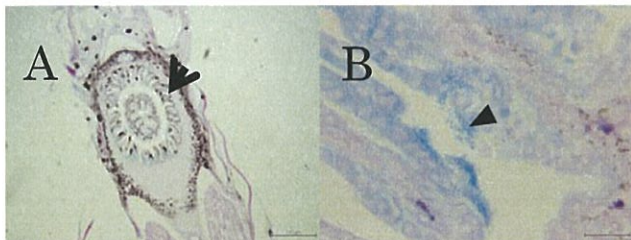


Fig. 1 Light micrographs showing the structure of the perianal light organ of *C. albatrossis*; (A) the perianal light organ with many wrinkled structures(arrow,scale bar=500 μm) and (B) Ziehl-Neelsen negative bacteria between the wrinkled structures (arrowhead, scale bar=100 μm)

以上の結果より、今回組織学的検索を行った本魚の駿河漁獲個体からは、従来さ指摘されていたように、性成熟個体を見出すことはできなかった。また、TN染色陽性を指標とした発光バクテリアの検出も、今回検索を行った個体からは検出することができなかった。

熊野灘で漁獲された本魚では、発光器の発光が確認され、発光器の中にTN染色陽性の発光バクテリアが多数検出されたと報告されている(宗宮, 1977)。今回用いた検体に発光バクテリアが検出されなかった理由として、漁獲場所が異なるため個体が性的に未成熟であり、まだバクテリアが共生していなかった可能性が考えられた。また、今回の漁法は底引き網漁であり、漁獲の際に魚が暴れるなどして、発光バクテリアが体外に放出されてしまった可能性も考えられた。

(3) 個体発生に伴うアオメエソの発光器の形成過程の記載
静岡県沼津市及び宮崎県延岡市産本若魚と既存の仔稚魚標本を精査した結果、興味深い形態学的形質が観察された。腹腔部前方背側面に顕著な鞍状黒色素胞が存在し、その下部の腹腔壁が透明であった(猿渡, 2008: Fig. 2)。

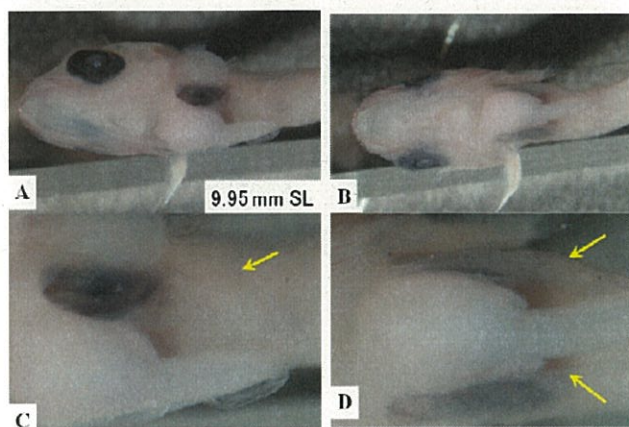


Fig. 2 Transparent window-like structures observed in larval fish of *C. albatrossis*; (A) lower left abdominal side shot. (B) taken from the belly side. (C) A of the enlarged image. (D) B of the enlarged image. Arrow indicating the position of the window structure.

アオメエソが発光魚であることから推察すると、腹腔前方背側面を覆うように存在する鞍状斑が遮光板として機能し、発光バクテリアの発する光が腹腔の後部下方へと漏れることが示唆された。

(4) 社会啓発活動

① 延岡市漁業協同組合特別講演会：猿渡により、2012年6月28日に、延岡市漁業協同組合会議室において、漁業関係者を対象に、特別講演「メヒカリの生態 この10年で分かったこと」を行った。この講演は、延岡の地元新聞、夕刊デイリー 2012年(平成24年)7月6日に紹介された。

② 科学技術館サイエンスライブショー ユニバース：猿渡により、2012年7月21日に、科学技術館において、「メヒカリの謎に迫る」というタイトルで、アオメエソ類の研究を紹介する講演を行った。

URL:<http://universe.chimons.org/weekly/000534.html>

③ 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会：猿渡・岩田・藤井がコンビーナーとして、2012年10月30-31日に、東京大学大気海洋研究所講堂において、東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会「底魚の生物学 現状、課題、そして将来展望。」を開催した。

また、山内が発表を行った底魚類の生態をはじめとして分類、系統に関する18の講演が行われた。プログラムなどはURL:http://www.aori.u-tokyo.ac.jp/aori_news/meeting/2012/20121030.htmlを参照。合計79名の参加者が、活発な討論、情報交換を行った。

4. まとめと今後の展望

本研究により、アオメエソ属魚類の発光器は、仔稚魚の時期に下方照射できる構造へと形態形成され、*Photobacterium phosphoreum*をはじめとする数種の発光バクテリアの共生が開始されると考えられる。(Paul V. Dunlap* and Jennifer C. Ast, 2005) その後、若魚の段階で性的成熟に伴い選択的な前種や*Photobacterium kishitanii*の共生の増減が示唆される。一般に発光は、夜間や深海でのコミュニケーション手段として機能し、特に求愛行動に重要な意味を持つと考えられているが、本属での役割については、不明である。

本研究で使用する試料が、東日本大震災による福島原子力発電所からの放射能漏れ被害で新鮮な個体を得ることが難しく、ふくしま海洋科学館での飼育個体も数個体となってしまった。そのため、当初予定していた生理学的実験や遺伝子解析ができなかった部分があった。

今後は、ふくしま海洋科学館でのメヒカリ類の飼育を継続し、飼育下で性成熟魚を得ることによって、飼育下での発光現象を確認した上で生理学的・組織学的・微生物学的検索を行う必要がある。また、本仔稚魚の透明な窓状構造の機能を調べるべく、現在組織学的研究を準備中である。以上のように、発光器の形成過程と生息環境の変化に着目した発光と生態・生殖モデルの構築を目指していきたい。2013年に岩手県立博物館で開催する企画展「いわての光る生きもの展」においても本研究成果を発信することが決定している。

参考文献

- (1) H. Somiya, 1977: "Bacterial bioluminescence in chlorophthalmid deep-sea fish -a possible interrelation-ship between the light organ and the eyes-", *Experientia*, 33, 906-909.
- (2) 猿渡敏郎, 2008: "メヒカリ(アオメエソ属魚類)の仔稚魚 小さな体が明かす大回遊" 海洋と生物, 30(6), 733-739.
- (3) Paul V. Dunlap*, and Jennifer C. Ast, 2005: "Genomic and Phylogenetic Characterization of Luminous Bacteria Symbiotic with the Deep-Sea Fish *Chlorophthalmus albatrossis*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2), 930-939.

天然放射性核種トリウムの3次元モデルの開発とその挙動解明に関する研究

A study on 3-d modeling of natural radioisotope Thorium and its behavior in the ocean

大久保 綾子, 原研・放射化学, E-mail: okubo.ayako(at)jaea.go.jp

岡 顕, 東大・大気海洋研, E-mail: akira(at)aori.u-tokyo.ac.jp

小畑 元, 東大・大気海洋研, E-mail: obata(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Ayako Okubo, Japan Atomic Energy Agency, Group for Radiochemistry

Akira Oka, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Hajime Obata, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

We conducted numerical simulations of ^{230}Th distributions in open ocean using an ocean general circulation model. Considering the “particle concentration effect”, the simulation reproduced more identical ^{230}Th vertical distribution. The relationship between particle concentration and partition coefficient of ^{230}Th (Ap/Ad) between particle and seawater was different among each particle type. We also established a novel method of recovery of iron hydroxides coprecipitated with Th isotopes using a chelating resin for determination of Th isotopes in seawater.

1. はじめに

天然放射性核種の ^{230}Th は、全海洋に一定濃度で存在する ^{234}U の放射壊変により海水中に生成される。その結果、 ^{230}Th の海洋中への供給量と供給速度を正確に把握することができるといふ、トレーサーとしての優れた特質をもっており、これまで、海洋の物質循環についての速度情報を得る目的で研究が行われてきた。しかし、現段階においては、水平輸送を含めた物理過程が ^{230}Th 分布に与える影響については不明な点が多い。そこで本研究では、 ^{230}Th の3次元モデルを確立し、物理過程を考慮した分布の解析に取り組む。トリウムは粒子吸着性が高く、海水中から除かれやすい性質を持っており、その平均滞留時間は主に表層の生物生産量によってコントロールされている。 ^{230}Th の挙動を詳細に記述することは、粒子吸着性の高い他の元素に関する挙動解析のテストケースと位置付けることができる。本研究では、 ^{230}Th について精度の高いモデルを確立し、その他の元素のモデル化の基盤を整備することを目指す。

2. 方法

① ^{230}Th の3次元モデルの確立

これまでにも海洋大循環モデルを用いて ^{230}Th の3次元分布を再現した先行研究は行われており、共同研究者（岡）によってそれを希土類元素分布の再現に適用したモデルも既に存在している。しかしながら、外洋域の ^{230}Th の観測データは必ずしも十分ではなく、これまでのモデル化に関する妥当性を新しく得られたデータ（後述③）を用いて検証する必要がある。本計画では、Th の粒子吸着性の取扱いに関するパラメータ調整および定式化の再検討を行い、より実測に近い分布の再現を目指す。

② 境界領域における3次元モデルの適用

海底直上や熱水噴出域の境界領域においては、粒子濃度が高くなるなどの理由から、通常の外洋海水中とは異なる除去過程が存在する。この過程について3次元モデルによる解析を展開し、除去過程についての定量的な見積もりを行う。

③ データの蓄積

上記のモデル解析と合わせ、白鳳丸で採取した試料を用いてデータの蓄積を進める。

3. 結果と考察

① ^{230}Th の3次元モデルの確立

海洋大循環モデルを用いて ^{230}Th の3次元分布の再現を行ったところ、深層の ^{230}Th 濃度に比べて表層の濃度が極端に低くなる傾向が見られた。粒子の沈降と共に下層へと除かれる Th の量は、粒子濃度と粒子-海水間の Th の分配比 (Ap/Ad) によって決められていることから、このパラメータの再調整を検討した。沿岸域の ^{234}Th と粒子濃度の観測結果から、粒子濃度の増加に伴い Ap/Ad が減少する傾向（粒子濃度効果）が報告されている。この効果をモデルに組み込んだところ、表層でみられた極端な低濃度の Th の再現結果は改善された。さらに、粒子の種類 (POC, CaCO_3 , SiO_2 , Dust) によって Th の吸着性が異なることを定式化するために、モデルの境界条件として用いている各粒子濃度分布と実測による Ap/Ad の関係を調べた。その結果、POC と SiO_2 については、粒子濃度の上昇に伴い Ap/Ad が減少する傾向が見られた。一方で、 CaCO_3 と Dust については、粒子濃度の上昇に伴い Ap/Ad も上昇する傾向が見られた。

② 境界領域における3次元モデルの適用

外洋海域の海底直上においても、通常よりも低い ^{230}Th 濃度が観測されている。3次元モデル解析において、物理パラメータの調整のみでは、この低濃度の ^{230}Th を再現することはできなかったが、海底直上の粒子濃度を高く設定したところ、観測結果に近い分布が得られた。

③ データの蓄積

本研究計画内においては、新規に ^{230}Th のデータを蓄積することはできなかったが、分析法の改良を行い、操作時間を大幅に短縮することに成功した。具体的には、鉄共沈法によるトリウムの回収にキレート濃縮法を併用し、これまで3～6日間かかっていた回収時間を8時間にまで短縮した。

4. まとめと今後の展望

外洋海域の ^{230}Th 分布について、3次元モデルによる再現を試みた。粒子濃度効果をモデルに組み込んだ結果、より観測に近い再現結果が得られた。今後は、粒子の種類による Th の吸着性の違いを定式化しモデルに組み込むことを検討していく。境界領域における3次元モデルの適用については、bottom scavenging の効果を含めたモデル解析を検討していく。また、新規に開発した試料処理法を用いて、さらに海洋におけるデータを集積していく。

二枚貝中の放射性ストロンチウム分析による放出プロセスの復元と沿岸環境中における移行過程に関する研究

The investigation of the impact and temporal variation of radioactive strontium from the Fukushima Daiichi nuclear power plant using the growth rings of bivalve shellfishes

田副 博文, 弘前大・被ばく医研, E-mail: tazoe (at) cc.hirosaki-u.ac.jp
白井 厚太朗, 東大・大気海洋研, E-mail: kshirai(at)aori.u-tokyo.ac.jp
小畑 元, 東大・大気海洋研, E-mail: obata(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Hirofumi Tazoe, Institute of Radiation Emergency Medicine, Hirosaki University
Kotaro Shirai, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Hajime Obata, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Impact and temporal variation of radionuclides originated from the accidents of the Fukushima Daiichi nuclear power plant were investigated using the bivalve shellfishes, Margaritifera in the Ukedo River and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the coast of the Fukushima prefecture. The drainage of the Ukedo River is highly contaminated region ($>30\mu\text{Gy/h}$) and can be affected to the river water, sediments and inhabitant in the Ukedo River. Imaging plate was examined for radiocaesium distribution in the mytilus samples, although the radiocaesium concentrations were under detection limit for coastal samples. Therefore, it was speculated that radiostrontium concentrations were as same as radiocaesium, which requires the sensitive detection for determine the radiostrontium in the growth ring of shell. Rapid and robust separation technique for the radiostrontium using DGA chelating resin was developed. In the future, Margaritifera from the Ukedo River will be examined by imaging plate and radiostrontium distribution using the ultra-sensitive analysis, such as the accelerator mass spectrometry.

1. はじめに

東京電力福島第一原子力発電所事故によって多くの人工放射性核種が大気中および海洋へと放出される原子力災害が発生した。全国の大学・研究機関の協力体制のもとに放射性Csの土壌・水質汚染に関する広範囲の環境モニタリングが行われ、汚染状況が明らかになってきた。これらの結果をもとに生活圏、農地、森林における放射性核種の除染が検討されている。一方で環境試料の分析が困難とされるSr-90やPuに関してはデータが非常に限られている上、Csとは物理的・化学的性質が異なるため、土壌中の地理的分布も異なることが報告されている。また、原子炉内の汚染水の流出によって、高濃度のSr-90が海洋に放出された可能性が高く、環境負荷の観点からも重大な問題となる。そして、海洋沿岸環境では、河川を経由した土壌流出による放射性核種の放出も今後重要な意味を持つ。例えば、福島第一原子力発電所から北へ45kmに位置する相馬市の沿岸堆積物に関するCs-137濃度は東京電力によるモニタリング開始以降66 Bq/kg(8月10日)であったが、9月の台風15号通過後(10月11日)の結果では1300 Bq/kgまで上昇がみられた。海底に堆積した汚染土壌からSr-90も同様な過程を経て溶出する可能性があり、河川・沿岸環境に生息する生物への影響、特に生体の骨格へのSr-90の取り込みに関して正しく評価する必要がある。

骨格中に周囲の水圏環境の情報を記録している二枚貝は、環境変化の有用な指標として利用されている。二枚貝の貝殻中のCs-137およびSr-90濃度を調べることで、骨格への取り込み過程の解明や環境中の放射性核種の時系列変化を復元できると期待される。水産資源として重要なアサリなどの二枚貝も、可食部への放射性核種の移行を正確に把握することも重要になる。アサリは堆積物中から伸ばした水管より直上水を取り込み、粒状有機物をろ過することで摂餌を行う。そのため、汚染陸上土壌の海底堆積により、可食部の放射能が上昇する可能性もあり、生育環境の違いが放射性物質濃集に与える影響を評価することは、水産学的にも重要である。

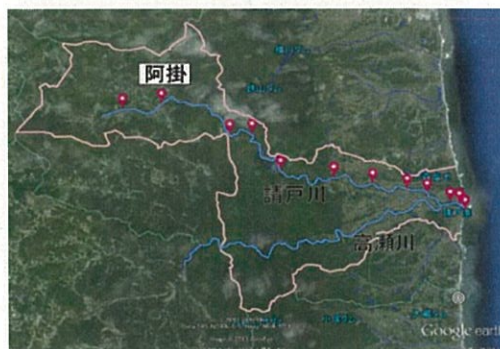


図1 福島県浪江町における請戸川流域の試料採取地点
上流域の阿掛においてカワシシユガイを採捕

2. 問題設定・方法

【分析試料の採取】

2012年3月福島県浪江町を流れる請戸川の表層河川堆積物および河川水の採取を行った。また、河口域および下流域において約30cmの柱状コア試料を採取した。また、2012年6月には河川水に加え、請戸川(阿掛)および新田川上流域(長泥)において群生する淡水性



図2 ムラサキガイ採取地点

二枚貝 カワシンジュガイを採取した。NaI(Tl)シンチレーション式サーベイメーターによる河川周辺の空間線量率(地表1 m)は請戸川では $>30 \mu\text{Gy/h}$ 、新田川で $6 \mu\text{Gy/h}$ であり、どちらも周辺土壌には放射性 Cs を代表とする放射性核種が存在する高濃度汚染地域であった。

請戸川河口域および沿岸ではアサリなどの二枚貝は採捕できなかった。福島県では津波により河口付近の砂州が完全に除去、その後再形成しつつあり、地形が大きく変化している。この影響により砂州とともに河口付近および沿岸の貝類が生息できる環境になかった。しかし、被害の小さい請戸漁港内の岸壁を中心に試料の採取を試みたところ、ムラサキガイが生存・採捕することができた。そこで東京電力福島原発の南北に位置する湾港の岸壁に生育するムラサキガイを採捕した。

研究船淡青丸 KT13-1 および白鳳丸 KH12-4 次航海による福島沖の海水試料の化学処理を行った。海水試料 20L にシュウ酸を添加し、シュウ酸塩共沈による濃縮を行った。本試料は弘前大学へ持ち帰り、化学分離操作を行ったのち、東京大学大気海洋研究所の低バックグランドベータ線検出器を用いて Sr-90 の定量を行った。

【ストロンチウム-90 分析法の開発】

貝や骨などの生体硬組織や海水は Ca を主要成分とするため、同族元素である Sr との化学分離はイオン交換法を用いても困難であり、多くの手間と時間を要し、ルーチ的な分析の障害となっている。また、Sr Resin と呼ばれる市販の Sr 選択性キレート樹脂を用いた場合にも高 Ca 濃度による収率の低下や他のベータ放出核種との分離が不十分となることが報告されている。そこで本研究では娘核種であるイットリウム-90 (Y-90) を分離、そのベータ線を測定することによる Sr-90 の定量を検討した。貝や魚類の骨および海水から前濃縮したシュウ酸塩沈殿をそれぞれ 550°C で灰化し、塩酸中に溶解する。これに Y 担体 1mg、Fe 担体 3mg を加え、アンモニア水で水酸化鉄共沈を行った。この沈殿を濾別し、濃塩酸 5mL に再溶解する。この溶液をイオンイオン交換樹脂(3mL)及び DGA Resin (2mL) を連結したカラムに導入し、8M HCl 20mL を流す。この際、水酸化鉄共沈により 99%以上の Sr および Ca は溶液中に残留するため沈殿中の Y とは分離され、さらにカラムには吸着しないため 8M HCl にて効率的に除去することができる。また、ベータ放出核種を含む Bi は陰イ

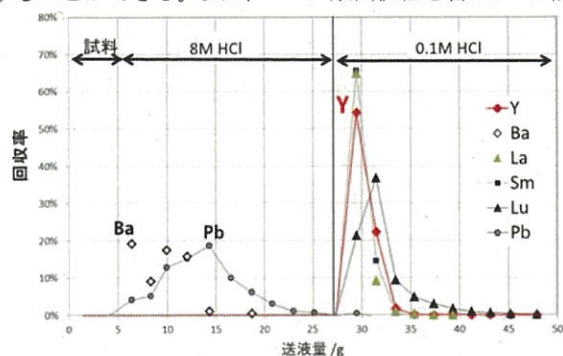


図3 キレート樹脂 DGA Resin による Y の分離曲線

オン交換樹脂に捕集され、Pb, Ba は 8M HCl に除去することができた。Y は 8M HCl では DGA Resin に強く吸着し、0.1M HCl を流すことで容易に回収することができる。この時の回収率は 98% ($\pm 3\%$, $n=10$) であった。

Y-90 のベータ線測定は東京大学大気海洋研究所の低バックグランドガスフロー型比例計数管 (Canberra LB-4100) を用いたが、長期に渡り使用実績が無かったため、ソフトウェアの更新およびバックグランドの計測を行った。装置内の 4 つの検出器のシステムバックグランドは $0.4 \sim 0.6 \text{ cpm}$ であり、約 5 mBq/sample の高感度な分析を行うことが可能であることが確認された。

3. 結果と考察

【イメージングプレートを用いたムラサキガイ中の放射性 Cs の分析】



図4 イメージングプレートを用いたムラサキガイ試料の放射能分布

湾港部に採捕したムラサキガイ試料から成長輪を横断する方向に分析試料を切削し、イメージングプレート用分析試料を作成した(図4左)。これを KC1 試薬とともにイメージングプレートにより分析を行った。その結果、すべての試料で放射性 Cs による寄与は見られなかった。分析に供した試料はすべて海水中に棲息するため、海洋への Cs の放出量や炭酸カルシウム殻への Cs の濃縮が極めて低いためであると考えられる。Sr に関しては Ca の化学的挙動の類似性から生物濃縮による効果が大きいと考えられるため、Sr-90 に関しても放射化学分析を行う。今後、淡水で採取を行ったカワシンジュガイに関してもイメージングプレートを作成し、分析を継続する。

4. まとめと今後の展望

原子力発電所事故による放射性核種の環境影響を調べるため、請戸川流域の淡水性二枚貝カワシンジュガイおよび湾口部に棲息するムラサキガイを採取した。イメージングプレートによるムラサキガイの結果では、放射性 Cs による影響が非常に小さく、濃縮係数の高い Sr-90 に関しても非常に低濃度であることが予想される。Sr-90 に関しては海水や貝類など高濃度に Ca を含む試料に関しても用できるキレート樹脂濃縮分離法を開発し、1 試料あたり 5 mBq の高感度で測定することが可能となった。今後、淡水性の二枚貝の分析を継続するとともにさらに高感度の分析法の確立を目指す必要がある。そのため、超高感度分析が可能な加速器質量分析計による Sr-90 の分析法の開発と貝類の成長輪構造の解析を行う。

全球非静力学モデル及び衛星シミュレータ用の放射コード開発

A development of a radiation code for global nonhydrostatic atmosphere models and satellite simulators

関口 美保, 海洋大・工, E-mail: miho@kaiyodai.ac.jp

齊藤 秀太郎, 海洋大・院, E-mail: m113040@kaiyodai.ac.jp

深澤 剛太, 海洋大・院, E-mail: m123028@kaiyodai.ac.jp

近藤 歩, 海洋大・院, E-mail: m123043@kaiyodai.ac.jp

中島 映至, 東京大学大気海洋研究所, E-mail: teruyuki.nakajima@aori.u-tokyo.ac.jp

佐藤 正樹, 東京大学大気海洋研究所, E-mail: satoh@aori.u-tokyo.ac.jp

Miho Sekiguchi, Tokyo University of Marine Science and Technology

Shutaro Saito, Tokyo University of Marine Science and Technology

Takahiro Fukazawa, Tokyo University of Marine Science and Technology

Ayumu Kondo, Tokyo University of Marine Science and Technology

Teruyuki Nakajima, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Masaki Satoh, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

We introduce single-scattering properties of non-spherical particles into atmospheric radiation models. Data libraries of a spheroid and an aggregate particles are converted to a suitable format and applied to the models. Moreover, the scattering tables contained the models are updated. These developments are useful for global climate models and satellite simulators.

1. はじめに

地球上の気候・気象を予測する上で、数値シミュレーションはいまや必要不可欠なものとなり、天気予報から温暖化予測まで、我々の生活に役立てられている。シミュレーションに用いられている大気大循環モデル(Global Circulation Model; GCM)は海洋モデルや陸面モデルなどと結合して気候モデルとしても用いられる。近年の必要性の高まりとコンピュータの高速化に伴い、GCM 中の様々な過程でモデルの精緻化に取り組んでいる。中でも、全球で雲を解像出来る程の解像度を持つモデル、全球雲解像モデルの開発が進められている。

GCM は地球全体を格子で区切り、各格子における温度や水蒸気などの代表値を、流体力学にしたがって時間方向に数値積分している。雲を再現できる程度に細かい格子を持つ全球モデルを全球雲解像モデル(Global Cloud Resolving Model; GCRM)という。また、GCRM は従来の GCM とは異なり、静力学近似を用いることができないため、非静力学方程式系を用いている。よって、GCRM は非静力学モデルとも呼ばれる。我が国では、海洋研究開発機構・東京大学大気海洋研究所の研究グループが世界に先駆けて開発した[Tomita et al., 2001]。この非静力学正 20 面体格子大気モデルは NICAM (Nonhydrostatic ICosahedral Atmospheric Model) と呼ばれ、様々な成果を出している[Miura et al., 2007]。

また、モデルの再現性を向上させるため、観測との比較、特に衛星観測との比較が重要であるが、そこで近年注目を集めているのが衛星データ・シミュレータである[Masunaga et al., 2010]。衛星データ・シミュレータとは前述の CRM や GCM などから出力される気温や水蒸気などの分布を用いて放射伝達計算を行い、GCM などでも再現された気象場を衛星で測定したとして値を導出するプログラムのことである。衛星で測定されたデータを現実の気象場の値に変換するには、いわゆる逆問題を解くことになり、再解析アルゴリズムに大きく左右される。GCM などの出力結果を衛星データ・シミュレータを介して衛星で測定された値と比較することができ、逆問題を

解いた後の衛星の再解析データと比較するよりも精度の良い比較が可能であると考えられている。我が国では、日欧合同衛星計画 EarthCARE に向けた開発研究の一部として、日本の研究者が中心となり J-Simulator という独自のシミュレータの開発が進められている[Hashino et al., 2013]。衛星データ・シミュレータは数値モデル検証の強力なツールになるであろうと期待されている。

GCM や GCRM において、エネルギーバランスを考慮する上で大気放射モデルは重要な役割を担っている。大気放射モデルもその他の過程のモデルと同様に開発・研究が進められているが、近年特に注目されているのが非球形粒子の散乱過程である。これまでの大気放射モデルにおいては、氷雲などの非球形粒子の効果は、計算負荷が大きいために、無視されるか大幅に簡略化した形で計算されてきた。近年の計算機性能の向上に伴い、非球形粒子の散乱の効果について世界的に研究が盛んになりつつある一方、我が国の大気放射モデルにはこれらの効果が取り入れられておらず、雲の影響をより正確に評価するためにも、研究を進める必要がある。

ある物質に入射した光線の方法が変化することを散乱と呼ぶが、波長と物質の大きさの比で散乱の特性が異なる。球形の物質の場合、光線と比較して物質が非常に小さい場合はレイリー散乱、同程度の場合はミー散乱、大きい場合は幾何光学近似に従う。レイリー散乱とミー散乱は解析的に解が求められるが、物質が球形ではない場合、入射角によって散乱の確率が異なるなど散乱は複雑なものとなる。これを精度よく計算するため、様々な数値解法が開発されている[e.g., Mischenko et al., 1999]。

本研究の目的は、非球形粒子の散乱の効果を導入した衛星解析用大気放射モデル、および、気候モデル用大気放射モデルを開発することである。この研究により、衛星観測を通じた雲のより深い理解、および、気候予測の最大の不確実要素の一つとされる雲の放射への影響のより高精度な評価が可能となると期待できる。本研究で開発する放射モデルは、気候

問題における雲の不確実性を減らす上でも重要な役割を果たすことが期待される。

2. 問題設定・方法

NICAMには広帯域放射伝達モデル *mstrnX* が導入されている。*mstrnX*は、他にも東京大学大気海洋研究所・国立環境研究所・海洋研究開発機構が共同で開発している大気大循環モデル (AORI/NIES/FRCGC AGCM) や名古屋大学と高度情報科学技術研究機構による領域雲解像モデル (CReSS) など様々なモデルに採用されており、筆者らが開発を主導している。

また、衛星データ・シミュレータでも放射伝達計算を行うため精度の良い放射伝達モデルは必要不可欠である。前述の EarthCARE は雲プロファイリングレーダ、大気ライダー、多波長イメージャーおよび広帯域放射収支計という4つのセンサを搭載した衛星であり、J-Simulator ではそれぞれのセンサに対応した放射モデルを導入している。可視から赤外域までの放射伝達過程が計算可能な狭帯域放射伝達モデル *Rstar6b* が多波長イメージャーに、広帯域の放射収支が計算可能な *mstrnX* が広帯域放射収支計にそれぞれ対応している。狭帯域放射伝達モデル *Rstar6b* は、主に地球観測衛星の再解析に広く用いられており、雲・エアロゾルの解析においても成果を挙げている [Sekiguchi et al., 2003]。

Rstar6b の散乱過程は、計算の高速化のためあらかじめ散乱特性を計算し、テーブル化されている。ミー散乱はサイズパラメータ (物質を球形とした場合の円周と入射波の波長の比) 73 種類 ($0.1 - 1000$)、複素屈折率の実部 n と虚部 k を合わせて 198 種類 ($1.0 \leq n \leq 2.7$, $10^{-9} \leq k \leq 10^0$)、散乱角 112 点である。氷粒子は複素屈折率のテーブルを必要としないため、六角柱のテーブルは波長と等価体積半径、散乱角のテーブルになっている。散乱角の格子点は球形と同一である。テーブルは太陽放射域と赤外放射域の二つから成り、格子点は太陽放射域テーブルは波長 56 種類 ($0.225 \leq \lambda \leq 4.9 \mu\text{m}$)、粒子サイズ 24 点 ($3 \leq x \leq 3500 \mu\text{m}$)、赤外放射域テーブルは波長 49 点 ($3.08 \leq x \leq 999.9 \mu\text{m}$)、粒子サイズ 45 点 ($2 \leq \lambda \leq 9500 \mu\text{m}$) となっている。入射角はランダムに計算され、アスペクト比は一定である。なお、*mstrnX* の散乱過程は、粒径分布をあらかじめ仮定し 8 種類のモード半径について散乱特性を計算した、*Rstar6b* の散乱過程をさらに高速化したものとなっている。

これらの二つのモデルに非球形粒子による散乱過程を導入する。これらのモデルには、既にテキサス A&M 大学の Ping Yang 教授から提供を受けた、六角柱の氷粒子の散乱データが導入されている [Yang et al., 2000; Yang et al., 2005]。これに加え、リール大学の Dubovik 博士から提供を受けた回転楕円体の散乱データ [Dubovik et al., 2002] を導入する。このデータは AERONET を対象に作成されたもので、計算手法は T-Matrix 法と改良型幾何光学近似が用いられている。アスペクト比 25 種類 ($0.3349 - 2.986$)、サイズパラメータ 41 種類 ($0.012 - 626$) について、複素屈折率の実部 n と虚部 k それぞれ 15 種類ずつ ($1.33 \leq n \leq 1.6$; $0.0005 \leq k \leq 0.5$) 計算されている。

また、六角柱は氷粒子の代表例であるが、実際の観測ではいくつかの氷粒子が凝集した粒子 (Aggregate) がよく観測されるため、六角柱との比較を行ったうえで Aggregate 粒子についても導入する。その際、放射モデルとデータを双方整備することで高速かつ精度のよい計算が出来るよう開発を行う。さらに、最新の雲・エアロゾルの光学特性を導入することで、

より現実的な散乱場を想定することを可能とする。これらのモデルの散乱過程の更新を同時に行う。

3. 結果と考察

まず、回転楕円体の散乱特性を *Rstar* に導入した。球形や六角柱と同様、あらかじめ散乱特性をテーブル化した。角度の格子点については他の粒子と共通に設定し、サイズパラメータと複素屈折率はオリジナルデータと同じ範囲、格子点を用いた。回転楕円体の粒子は砂塵や氷粒子を想定しているが、複素屈折率やサイズパラメータが範囲外となるときは球形で近似するようにコードを変更した。

次に、凝集粒子の散乱特性を六角柱のものと比較した。ここでは非等方性因子について述べる。太陽放射域全体で数値平均したそれぞれの非等方因子を比較すると、六角柱粒子で 0.8435、凝集粒子で 0.8599 であり形状による非等方因子の差が 1.9% 程度生じている。地球放射域での非等方因子の平均値は、六角柱粒子は 0.8709、凝集粒子は 0.8527 であり、六角柱粒子の前方散乱が 2.1% 程度強いことがわかった。凝集粒子の散乱特性を *Rstar* に導入し、太陽天頂角 60 度、高度 6km から 8km に光学的厚さ 7.4 の巻雲が存在すると仮定して計算すると、雲頂における上向き太陽放射フラックスの差は 0.7% 程度であることがわかった。

さらに、氷粒子の複素屈折率のデータベースが更新された [Warren and Brandt, 2008] ことに伴い、複素屈折率の格子点を 324 点に増加させ、範囲も $0.9 \leq n \leq 3.0$; $10^{-11} \leq k \leq 10^0$ に拡張した。また、様々な光学特性を持つ粒子についてテーブル化を行い、雲やエアロゾルの種類を増加させた [e.g., d'Almeida et al., 1991; Hess et al., 1998]。

4. まとめと今後の展望

今回の開発に寄って *Rstar6b* は *Rstar7* に更新され、国内外の研究者に幅広く提供されている。また、衛星データ・シミュレータの J-Simulator にも導入され、非球形散乱の計算が可能となった。今後は他の非球形散乱の数値手法と比較・評価を行う。また、Yang 教授からより精密かつ太陽放射域と地球放射域が統一された散乱データの提供を受けたので、これへの更新を行う予定である。

参考文献

- Tomita, H., Tsugawa, M., Satoh, M., & Goto, K. (2001). Shallow water model on a modified icosahedral geodesic grid by using spring dynamics. *J. Comp. Phys.*, 174(2), 579-613.
- Miura, H., Satoh, M., Nasuno, T., Noda, A. T. Oouchi, A. Madden-Julian oscillation event realistically simulated by a global cloud-resolving model. *Science*, 318(5857), 1763-1765.
- Mishchenko, M. I., Hovenier, J. W., & Travis, L. D. (Eds.). (1999). *Light scattering by nonspherical particles: theory, measurements, and applications*. Academic press.
- Sekiguchi, M., Nakajima, T., Suzuki, K., Kawamoto, K., Higurashi, A., Rosenfeld, D., ... & Mukai, S. (2003). A study of the direct and indirect effects of aerosols using global satellite data sets of aerosol and cloud parameters. *J. Geophys. Res.*, 108(D22).
- Yang, P., Liou, K. N., Wyser, K., & Mitchell, D. (2000). Parameterization of the scattering and absorption properties of individual ice crystals. *J. Geophys. Res.*, 105(D4), 4699-4718.
- Yang, P., Wei, H., Huang, H. L., Baum, B. A., Hu, Y. X., Kattawar, G. W., ... & Fu, Q. (2005). Scattering and absorption property database for nonspherical ice particles in the near-through far-infrared spectral region. *Appl. opt.*, 44(26), 5512-5523.
- Warren, S. G., & Brandt, R. E. (2008). Optical constants of ice from the ultraviolet to the microwave: A revised compilation. *J. Geophys. Res.*, 113(D14).

ウミニナ類の SSR マーカー開発と集団解析における有効性の検証

Using next-generation sequencing approaches to development simple sequence repeat (SSR) markers in Batillariidae species

上村了美¹⁾、国土技術政策総合研究所, E-mail: kamimura-s92y2@ysk.nilim.go.jp

伊藤萌²⁾、東大・大気海洋研, E-mail: hitou@aori.u-tokyo.ac.jp

小島茂明²⁾、東大・大気海洋研, E-mail: kojima@aori.u-tokyo.ac.jp

¹⁾National Institute for Land and Infrastructure Management Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism, Japan.

²⁾Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo.

In this study, simple sequence repeat (SSR) markers in *Batillaria cumingii* were developed. New methods, namely, next-generation sequencing, universal primers for fluorescent labeling, and multiplex PCR were used for efficient analysis. 9 loci were amplified with the highest success in multiplex PCR, and 6 markers fitted Hardy-Weinberg equilibrium for Togawa population. These markers detected the genetic difference which could not detect with mitochondrial COI gene between the populations around Tokyo bay.

1. はじめに

海洋生物の形成するメタ個体群構造を解明することは、最近の生態学において注目されている課題であると同時に、沿岸域の自然再生・管理を行う際の基礎データとしても重要である。ウミニナ類は日本沿岸の干潟に優占する巻貝であり、遺伝的特性を明らかにした研究が行われてきた (Kojima et al. 2004 など)。特にホソウミニナでは、ミトコンドリア COI 遺伝子の解析から、日本沿岸スケールにおいて黒潮型と対馬暖流型に分かれることが示されたが、より小さいスケール (例えば湾スケール) におけるメタ個体群構造の解明には至っていない。このことを明らかにするためには、より精度の高い SSR マーカー (マイクロサテライトマーカー) を使った集団解析による検証が必要であると考えられた。そこで本研究では、1) ホソウミニナについて COI 領域より精度の高い SSR マーカーを開発すること、2) 各マーカーの有効性の検証、および 3) それらを用いた複数の個体群についての集団解析、を行うことを目的とした。

2. 問題設定・方法

効率的に SSR マーカーを開発するため、次世代シーケンサーを用いた大量配列情報の取得、汎用蛍光プライマー法、およびマルチプレックス PCR など、近年注目されている新しい方法を積極的に取り入れた。

次世代シーケンサーを用いた大量配列情報取得用のホソウミニナは、宮城県山田湾および千葉県外川河口から各 1 個体ずつ計 2 個体とした。DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使ってプロトコル通りに行った。本研究ではショットガン法を採用し、2 種類の MID アダプターにより各リードがどの個体由来なのかを識別した。その他の次世代シーケンサーにアプライするための前処理は、GS Junior タイタンシリーズのプロトコル通りに行った。得られた配列情報からの SSR を含む配列の抽出およびプライマー設計には、

GS Run Browser および QDD2 Beta (Meglécz et al. 2010) を用いた。北海道から宮城県までの計 10 か所で採集した個体をテンプレートとして、プライマー設計したフラグメントの PCR を行った。増幅効率の良いものを選んで、汎用蛍光プライマー法 (Blacket et al. 2012) を用いてプライマーを再設計した。これらについて、Multiplex Manager 1.0 (Holleley and Geerts 2009) によりマルチプレックス PCR の組み合わせを決定し、Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を使用してプロトコルをもとに PCR を行った。PCR 産物は AB3130x1 で泳動し、Peak scanner や Gene Mapper を使用してフラグメントを解析した。増幅効率の悪いマーカーは排除し、マルチプレックス PCR の組み合わせを再考した。この結果をもとに、各マーカーがハーディーワインバーグ平衡 (HWE) から逸脱していないかを検討した。検討の対象は、千葉県外川の集団とし、GENEPOP (Rousset 2008) を使用して確認した。さらに、東京湾内および湾外の複数の集団についても解析を行い、遺伝的分化係数を求めた。

3. 結果と考察

得られたホソウミニナのライブラリーは、2.1 万と 5.3 万リードで、このうち SSR を含むものは約 20% であった。それらについて consensus sequences (contig 後のシーケンス) と singleton (contig できないシーケンス) に分けてプライマー設計を行ったが、プライマー設計できたのは約 35% であった。

PCR 増幅の確認では、シングル PCR では増幅が可能でも、マルチプレックス PCR を行うと増幅されないマーカーは除外した。この結果をもとにマルチプレックスの組み合わせを再考し、最終的に 9 マーカーが残った (表 1)。千葉県外川の集団についてこれらのマーカーの有効性を検討したところ、Loc_gr296 は HWE から有意に外れており ($P < 0.05$)、Loc23 と Loc_14 については、多型が確認できなかった。

東京湾内と東京湾外のホソウミナナ集団について比較したところ、各集団間の遺伝的分化係数 (Fst) は東京湾内の集団間の方が低かった。また、湾外の集団間での Fst 値よりも湾外-湾内集団間の Fst 値のほうが低い傾向にあった。遺伝的分化と地理的距離は必ずしも一致せず、例えば湾外の小網代湾と湾内の野島水路間では遺伝的分化は検出されなかったが、外川と犬吠崎のように地理的に非常に近い集団間で大きな遺伝的分化が見られた。本研究の複数の集団解析の結果を COI 遺伝子の結果と比較すると、COI 遺伝子で遺伝的分化が検出されなかったが、SSR マーカーでは検出された集団間もあった。

4. まとめと今後の展望

本研究では、ウミナナ類に関する小スケールのメタ個体群構造を解明するための SSR マーカーの開発を行った。マーカー開発と集団解析の効率化を図るため、次世代シーケンサーによる大量配列情報の取得、汎用蛍光プライマー法、およびマルチプレックス PCR など、近年注目されている新しい方法を積極的に取り入れた。シングル PCR では増幅が可能でも、マルチプレックス PCR では増幅されないマーカーがいくつかみられたが、次世代シーケンサーによって作成したライブラリーが豊富にあったので、取捨選択は容易であった。また、汎用蛍光プライマー法では、必要な蛍光プライマーは 4 タイプのみあったため、限られた研究費の中でも多くのプライマーを試すことができた。

SSR マーカーは従来用いられてきた COI 遺伝子などと比べて、進化速度が速く、解像度が高いといわれていたが、本研究においてもこのことが支持された。COI 遺伝子で遺伝的分化が検出できなかった集団間でも、本研究から得られた SSR マーカーで解析すれば多くの集団間で差異が検出できたことから、これらの SSR マーカーはより詳細な遺伝的集団構造を

明らかにするのに有用であると考えられる。

今後は、SSR マーカーを用いることにより、空間的な解像度だけでなく、時間的な解像度の上がることを利用した研究の展開が期待される。例えば、今昔の試料を解析することにより、環境変動による分布拡大、人為的移入、津波等による集団の縮小・分断と回復など、従来困難だった短い時間スケールで遺伝的变化を追跡することが可能になると考えられる。このような研究成果が蓄積されることは、メタ個体群研究の進展をもたらすという学術的な意義に加えて、沿岸域の自然再生・管理において効果的な施策のためのデータを蓄積し、提供するという社会的な意義も大きいものと考えられる。

参考文献

- (1) Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12:456-463
- (2) Holleley CE and Geerts PG (2009) Multiplex Manager 1.0: a crossplatform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques*, Vol 46, No 7, pp 511-517
- (3) Kojima S, Hayashi I, Kim D, Iijima A, Furota T (2004) Phylogeography of an intertidal direct-developing gastropod, *Batillaria cumingi*, around the Japanese Islands. *Mar Ecol Prog Ser* 276:161-172
- (4) Megléc, E., Costedoat C, Dubut V, Gilles A, MALAUSA T, PECH N, MARTIN JF (2010). QDD: A user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* (Oxford, England) 26 : 403 - 404 .
- (5) Rousset, F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106

表 1. ホソウミナナの SSR マーカーの概要.

Locus	motife	n	アリル数	アリル サイズ レンジ	He	Ho	Ho/He	P value	Universal primer
Loc_gr296	TAAGA	20	5	114-134	12.26	7.00	0.57	0.00	TailC
Loc_30	CAGTT	20	2	177-182	8.62	8.00	0.93	1.00	
Loc_29	CAATA	17	3	184-194	4.52	3.00	0.66	0.28	
Loc_23	CACT	20	1	130	-	-	-	-	TailB
Loc_14	TCA	19	1	247	-	-	-	-	
Loc_gr316	GTTT	20	3	155-167	9.67	12.00	1.24	0.57	TailA
Loc_gr431	ATT	20	2	221-227	10.23	11.00	1.08	1.00	
Loc_13	ACAA	20	3	172-193	7.36	7.00	0.95	1.00	TailD
Loc_19	AAAC	20	5	209-225	15.49	12.00	0.77	0.21	