平成２７年度（通算第７回）
石西礁湖自然再生協議会学術調査ワーキンググループ

陸域からの環境負荷とサンゴの病気の関係

カサレト・ベアトリス・鈴木　利幸・鈴木　款（静岡大学創造科学技術大学院）

１：サンゴ礁の多様な生物群集と高い生産量

サンゴ礁の多様な生物群集と高い有機物生産量を支えているのは、海水以外の場所に豊富に蓄えられた栄養塩が、絶え間なく循環しているのが理由である。貧栄養海域にあるには、栄養塩濃度が低ければ、海水中の植物プランクトンの増殖は抑えられ、その透明度は維持される。そのため、サンゴや砂地に生息している植物プランクトンが光を必要な量だけ受け取ることを可能にしている。サンゴ礁の生物生産システムは、非常に巧妙に構築されている。この絶妙な生態系維持システムが、地球温暖化や海洋酸性化により､まず影響を受けるのは､サンゴの白化や病気である。特に、サンゴに共生している褐虫藻の光合成活動は低下する 。光合成活動（有機物生産）が低下すれば、サンゴ礁生態系を支えている有機物の循環に大きな影響を与える。

２．陸起源バクテリアとサンゴの病気

過去 10 年間サンゴの病気は世界的に急速に拡大している。カリブ海、インド洋、グレートバリアリーフからは多くのサンゴの病気が報告されている。サンゴの病気を引き起こしている直接的な原因は、バクテリア、シアノバクテリア、かび等の病原菌である。間接的な原因としては、海水温の上昇、環境ホルモン等の汚染物質、高濃度栄養塩、強い紫外線等の非生物的要因、原生動物や魚によるサンゴの浸食、藻類の過剰な繁殖等の生物的要因が複雑に関係していると報告されている。そのためサンゴの病気のメカニズム解明は非常に難しい。サンゴが病気になると、サンゴの組織は損傷するだけでなく溶解し、再生が不可能になる。サンゴが死滅することにより、サンゴ礁に生息する多くの生物もダメージを受ける。病気の症状はカリブ海ではホワイトプラーグやイエローバンドが多く見られるが、日本やグレートバリアリーフではブブラックバンドやホワイトシンドロームが主である。同じサンゴの病気でも、場所により、季節により違いがある。この違いが、環境要因の違いか、サンゴの種類とその生理学的条件の違いか、病原菌の種の違いかは、現在はまだ不明である。サンゴの病気は世界的に急速に拡大している。

サンゴの病気に対する緊急の対策を進めるためにはどのサンゴがどのような病気の症状を示しているのか早急に実態調査し、病気の原因とメカニズムの解明が必要である。サンゴの病気は海水温の上昇により、サンゴの免疫力が低下し、病原菌の増殖と侵入が容易になるために引き起こされると報告されている(Casareto,2008,

Casareto and Nakano, 2011, Irikawa et al., 2011, Weil et al., 2012)。病原菌の起源としてカサレトらは沖縄の瀬底や西石礁湖の病気のサンゴ組織から海洋性起源のバクテリアと同時に、陸域の河川や赤土、生活排水中に生息しているバクテリアを見つけている（Casareto,2008, Casareto and Nakano, 2011, Higuchi et al, 2013）。陸域起源のバクテリアとして、*Paracoccus carotinifaciens*、*Treponema lecithinolyticum*、*Ralstonia pickettii*　等が同定された。*Parcacoccus carotinifacience* は，高温ストレス下でエダコモンサンゴ *Montipora digitata* に組織剥離を起こすことを検証した (Casareto et al., 2011)。これらのバクテリアは病気のサンゴの組織中には検出されるが、海水中には検出されていない。海水中には検出されないが、病気のサンゴには検出されるという事実は、陸域起源の病原菌が、どのように健全なサンゴに侵入するのかは重要な課題と考えられる。

現在、病原菌として確定できているのは以下の３種である。健全なサンゴを用いた感染実験により、カサレトらはプロテアーゼ活性、バクテリア群集の遺伝子解析結果から、*Vibrio coralliilyticus*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Treponema lecithinolyticum* の３種が特に病原菌として働くこと、*Vibrio coralliilyticus* は主に褐虫藻に強い影響を与え、*Paracoccus carotinifaciens* と *Treponema lecithinolyticum* はサンゴ組織に致死的な影響を与えること見出した。このように、サンゴの病気に関与する病原菌の正体は次第に明らかになりつつあるが、そのメカニズムや病気を引き起こす条件因子についてはまだ手探りの状態である。

2007 年に沖縄島の備瀬の礁池から新たな病原菌として分離特定された *Parcacoccus carotinifacience* は，高温ストレス下でエダコモンサンゴ *Montipora digitata* に白化と組織剥離を起こすことが認められた．備瀬の調査では，ハマサンゴにハマサンゴ類紅斑病に症状のよく似た色素沈着を示す，感染力はごく弱いが致死性の病気も確認されている．さらに，沖縄県慶良間島や那覇の市街に近い宜野湾市での調査で，ハマサンゴ類潰瘍性白斑，紅帯病（Pink line disease），石灰藻ホワイトシンドローム（Crustose coralline white syndrome），　と茶帯病が確認された．また，慶良間諸島の阿嘉島では藍藻 *Lyngbya polychroa* によるウミウチワの仲間 *Annella reticulata* の被覆が観察されている．サンゴ礁の発達しない宮崎県からもオオスリバチサンゴ *Turbinaria peltata* に致死性のオオスリバチサンゴ白斑症候群（*Turbinaria* White spot syndrome, TWSS）が観察された．2010 年～2011 年には沖縄県瀬底で、サンゴの病気であるピンクスポットが観察された（沖縄タイムス、2012, 9）．また沖縄での病気の調査の詳細も最近報告されている。

国内ではサンゴの病気に関して琉球大学の山城らがフィールド調査を中心に、サンゴの病気の症状の分布や季節変化、環境因子との違いを研究しているが、カサレトらのような感染実験等のメカニズムの研究はほとんど行っていない。国内での研究例はほとんどない。ただ、環境省の石垣島国際サンゴ礁モニタリングセンターでは、石西礁湖で、サンゴの保全に関する定期的なモニタリングを行っている。海外では、オーストラリアのグレートバリアリーフにおいてオーストラリア海洋研究所の Borne 博士らが Black Band Disease のメカニズムン研究を進めている。特にイオ

ウ細菌に注目し研究している。カリブ海では多くの米国と中南米の研究者が、サンゴの病気について研究している。米国の NOAA やマイアミの大学が中心で、主にサハラ砂漠由来のかび（*Aspergillus* sp）がサンゴの病気を引き起こすことを報告した。イスラエルのテルアビブ大学のグループもサンゴの病気の研究を紅海において行っている。彼らはサンゴの病気の感染メカニズムの研究では“Holobiont” (サンゴ・褐虫藻・バクテリア・ウイルス等の相互の共生システムによりサンゴの生命が維持されている仕組み)という概念の重要性を示した (Rosenberg et al., 2007)。カサレトらは、サンゴ胃腔内の栄養塩やバクテリアを世界で初めて研究をし、サンゴ内には周りの海水に比べて 2 ケタ高い濃度のバクテリアが存在していること、”Holobiont”の重要性を明確にした（Agostini, et al 2012）。

サンゴの病気のメカニズム解明の課題は、（１）サンゴの病気の症状・特徴と病原菌との関係の明確化、（２）病気のサンゴの感染状況と様々な環境因子(水温、栄養塩濃度、紫外線、塩分等)と相互関係の定量化、（３）病原菌の感染ルートとサンゴへ侵入するメカニズムの解明、（４）病原菌に対するサンゴの応答・防御機構の把握（Hobiont の役割の解明）、（５）サンゴの防御・応答の状況を把握できる抗菌成分の探索（Sato et al., 2013, Kodani et al., 2013）が主である。

これら多くの病気や障害については詳細な発病の機構などについてはまだ限られた観察しか成されていない。環境ストレスが造礁サンゴの健康に影響を与えることはよく知られている．増加し続ける人口とともに，陸域からは汚染物質，栄養塩，シルト，病原菌の沿岸生態系への放出が発生する．これらの環境ストレスが，沿岸に生息する多くの分類群の底生生物の生命活動の維持・成長・生殖に影響をおよぼすことが報告されている．さらに，造礁サンゴの病気は，おもに富栄養化と懸濁物の堆積といった水質の悪化に促進されている．とくに，富栄養化は病気の進行を助長する点で憂慮されている.

３．陸起源バクテリアのキャリアとして捕食者の役割

陸起源バクテリアがサンゴに感染するルートは河川あるいは排水、赤土の流入等が考えられる。赤土１ｇには１０^{8}程度のバクテリアが存在している。特にパラコカス、ラストニア（人間の尿にも存在）、テレポネマ（虫歯菌）等多くの病原菌が存在する。ところが、海水中にはほとんど検出されない。さらに病気のサンゴには検出される。この不明の感染ルートを明らかにするため、その検証方法として陸域起源のバクテリアがサンゴ捕食生物を媒介してサンゴに感染しているかどうかを検証する。これにより石西礁湖で蔓延するサンゴの病気が陸域からの排水・赤土等に由来する可能性がある。

現在までの調査結果の要約

○ 石西礁湖で深刻化するサンゴの病気蔓延に陸域由来、生物寄生性など、本来の生息域が海域でない細菌（バクテリア）群集が関与していることが確かめられた。

○ TOC、栄養塩、褐虫藻密度、光合成活性、クロロフィル濃度、プロテアーゼ活性、およびDGGEによるバクテリア群集の解析結果から、*Vibrio coralliilyticus*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Treponema lecithinolyticum* の３種が特に病気に深く関与している可能性が高いことが明らかになった。

○ 細菌が病気に関与するプロセスは種によって異なり、*Vibrio coralliilyticus* は主に褐虫藻に強い影響を与え、*Paracoccus carotinifaciens* と *Treponema lecithinolyticum* はサンゴ組織に致死的な影響を与えることが明らかになった。

○ また、細菌感染によってサンゴ・褐虫藻の健康状態を損ない、致死的なダメージを受けるまでに要する時間も、細菌の種類によって異なることが明らかになった。*Vibrio coralliilyticus* は感染後 1 日で強い影響が現れるのに対して、*Treponema lecithinolyticum* は感染後数日から 1 週間かけて徐々に影響が強くなる傾向が見られた。また *Paracoccus carotinifaciens* は感染直後から、1 週間以上と、より長期間にわたって、サンゴの健康状態を低下させ続ける効をもつことが明らかになった。

○ 陸域に生息する細菌がサンゴの病気に関与するケースがあることが確かめられた。

電気泳動の結果、捕食者と被捕食者の間に共通して見られるバクテリアが多数存在した。特にオニヒトデとオニヒトデに捕食されたサンゴ、貝類と貝類に捕食されたサンゴに多くのバクテリアが存在したことから、捕食によりサンゴ体内へのバクテリアの感染が起こっていることが明らかになった。捕食者と捕食者により感染してサンゴに共通に認められたバクテリアの塩基配列分析の結果から、*Pseudomonas pachastrellae*、*Gemmatimonas* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Geobacter* sp.、*Agromyces* sp.、*Zoogloea* sp.、*Propionibacterium acnes* が捕食によってサンゴ体内に感染あるいは移行していることが明らかになった。健康なサンゴのバクテリアの種と比較検討すると、健康なサンゴには存在しないバクテリアが、捕食者により感染していることが明らかである。また捕食されたサンゴは健康なサンゴと比べて保有バクテリア種が多く、捕食者にも見られないバクテリアも存在したことから、捕食により外部からのさらなるバクテリアの侵入があったと考えられる。魚類の捕食によっても少ないながら同様の傾向が見られた。ヨナラ水道と竹富島ではバクテリアの種数に違いがみられ、海域によってもバクテリアの感染の程度が異なることが明らかになった。

○

同定されたバクテリアの特徴
Pseudomonas pachastrellae
2005 年に深海のカイメンから単離されたガンマプロテオバクテリアの一種。サンゴに対する病気の報告はない。
Gemmatimonas aurantiaca
下水処理場の汚泥から発見されたゲンマティモナス門のバクテリアの一種。最近発見されたため、病原菌として振る舞うという報告はまだない。
***Pseudomonas* sp.**
シュードモナス（プセウドモナス）属のバクテリアはガンマプロテオバクテリアで、土壌、淡水、海水、植物、動物といった多様な環境で生息している。シュードモナスは様々な有機化合物を分解する能力があり、自然界の重要な分解者である。タンパク質分解酵素を細胞外に分泌することで組織への感染を行い、多くの種で人間、動物、植物に対して病気を引き起こすという報告がある。

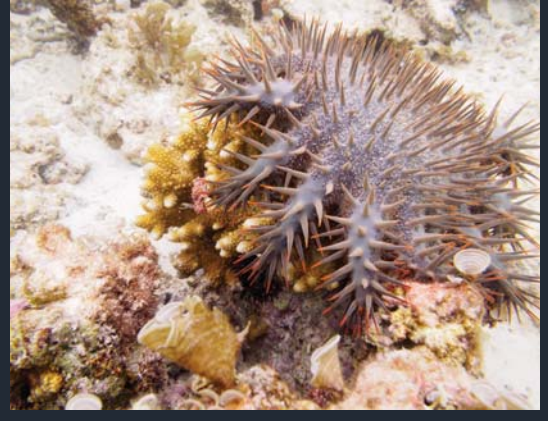
***Geobacter* sp.**
ジオバクター属のバクテリアはデルタプロテオバクテリアで、1987 年に河川水から発見され、その後土壌からも発見された。嫌気的な環境を好むバクテリアで、バイオレメディエーションに利用されている。サンゴに対する病気の報告はない。
***Agromyces* sp.**
アグロマイセス属は陸上に生息する放線菌。サンゴに対する病気の報告はない。
***Zoogloea* sp.**
ズーグロエア属のバクテリアはベータプロテオバクテリアで、汚水処理に利用されている。サンゴに対する病気の報告はない。
Propionibacterium acnes
放線菌の一種で、人間の皮膚に常在し、プロピオン酸を産生する。ニキビの原因となる。サンゴに対する病気の報告はない。

オニヒトデや貝類による捕食により、捕食者から被捕食者へバクテリアの感染が起こっていることから、病気の拡散においてこれらの生物がバクテリアのベクターとして働いている可能性がある。これまでの調査結果より、陸域起源のバクテリアが病気のサンゴ体内にみられるが周囲の海水中やフロックの粒子中には見られず、陸域からのバクテリアの運搬には他の要素が関係していることが示唆されていた。今回見つかったバクテリアの多くは土壌や汚泥に棲んでいるという特徴があり、これらのバクテリアが媒介されることで、オニヒトデや貝類がサンゴの病気の発生・拡散に影響している可能性が示唆された。

これらの結果から、排水等に含まれる、人間活動や赤土等からのバクテリアが、オニヒトデ、貝類、魚等の輸送者を通じてサンゴの病気を引き越したり、拡散させたりする可能性が明らかになりつつある。下水道の整備によるできるだけ処理した排水を流すように対策が必要である。またオニヒトデや貝類を削除することやこれらの生物が近づきにくい浮き型の移植等を含めた対策が重要である。通常、バクテリアはそれそのものが病原菌ではない。病原菌として振る舞うには、そこに水温上昇とか人間活動によるストレスにより、サンゴが粘液等のバクテリアの増殖を増加させる有機物やアンモニアの存在が必要である。水質環境の管理には、有機物、バクテリア、アンモニアのデータは欠かせない、重要な要素である。

メタゲノム解析を用いた石西礁湖における捕食者－被捕食者間のバクテリア感染と微生物群集の変化の解析

○鈴木 利幸[1]，Beatriz E. CASARETO[1,2]，藤原 秀一[3]，鈴木 款[1]
[1]静岡大・創造科学，[2]静岡大・グリーン研，[3]いであ株式会社



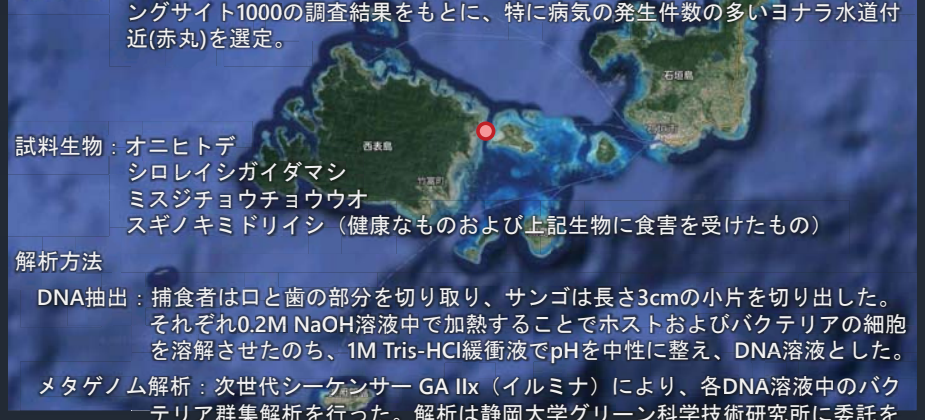
Introduction

沖縄県八重山群島の石垣島と西表島の間には，わが国最大規模のサンゴ礁が発達する広大な浅い海域，石西礁湖が形成されている．近年，サンゴの病気が石西礁湖内各地で観察されており，サンゴ群集への影響が懸念されている．2003年度以降，特にホワイトシンドロームの分布が急速に拡大しており，2009年度には石西礁湖内調査地点の約90%の地点で罹患群体が確認されている．サンゴの病気は原因及び感染経路が不明なものや，症状の分類が曖昧なものなどが少なくないため，対策を検討することが難しい状況にある．また生活排水等に含まれているバクテリア等がサンゴの病気の要因となる学説もあり，人為的な要因がサンゴの病気を蔓延させている可能性も指摘されている．

これまでの調査により，**サンゴの病気には**周辺海域のバクテリアだけでなく**遠く離れた陸域のバクテリアも関わっている**ことが示唆された．しかしその間の海域ではこれらのバクテリアは見られないことから，サンゴに接触し，感染するために，**キャリアとなる生物の存在が示唆**されていた．またこれまでサンゴを捕食する生物のサンゴに対する傷害がサンゴへ悪影響を与えることは予想されているが，どのような悪影響があるかは明らかになっていなかった．そこで病気の原因の解明と対策のため，捕食生物と，それらによって食害を受けたサンゴのバクテリア群集解析を行い，**食害によりどの程度のバクテリアの感染が起こっているか，どのようなバクテリアが感染しているか**を明らかにした．

Materials and Methods

調査地点：沖縄県石垣市および八重山郡竹富町周辺海域（石西礁湖）において、モニタリングサイト1000の調査結果をもとに、特に病気の発生件数の多いヨナラ水道付近(赤丸)を選定。



試料生物：オニヒトデ
シロレイシガイダマシ
ミスジチョウチョウウオ
スギノキミドリイシ（健康なものおよび上記生物に食害を受けたもの）

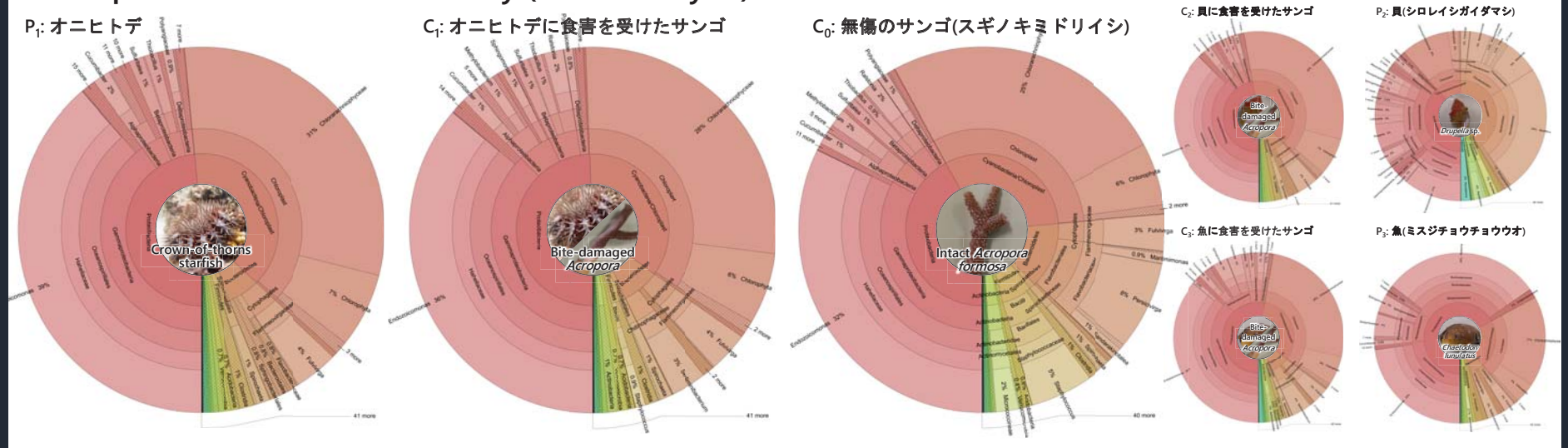
解析方法

DNA抽出：捕食者は口と歯の部分を切り取り、サンゴは長さ3cmの小片を切り出した。それぞれ0.2M NaOH溶液中で加熱することでホストおよびバクテリアの細胞を溶解させたのち、1M Tris-HCl緩衝液でpHを中性に整え、DNA溶液とした。

メタゲノム解析：次世代シーケンサー GA IIx（イルミナ）により、各DNA溶液中のバクテリア群集解析を行った。解析は静岡大学グリーン科学技術研究所に委託をした。

Results and Discussion

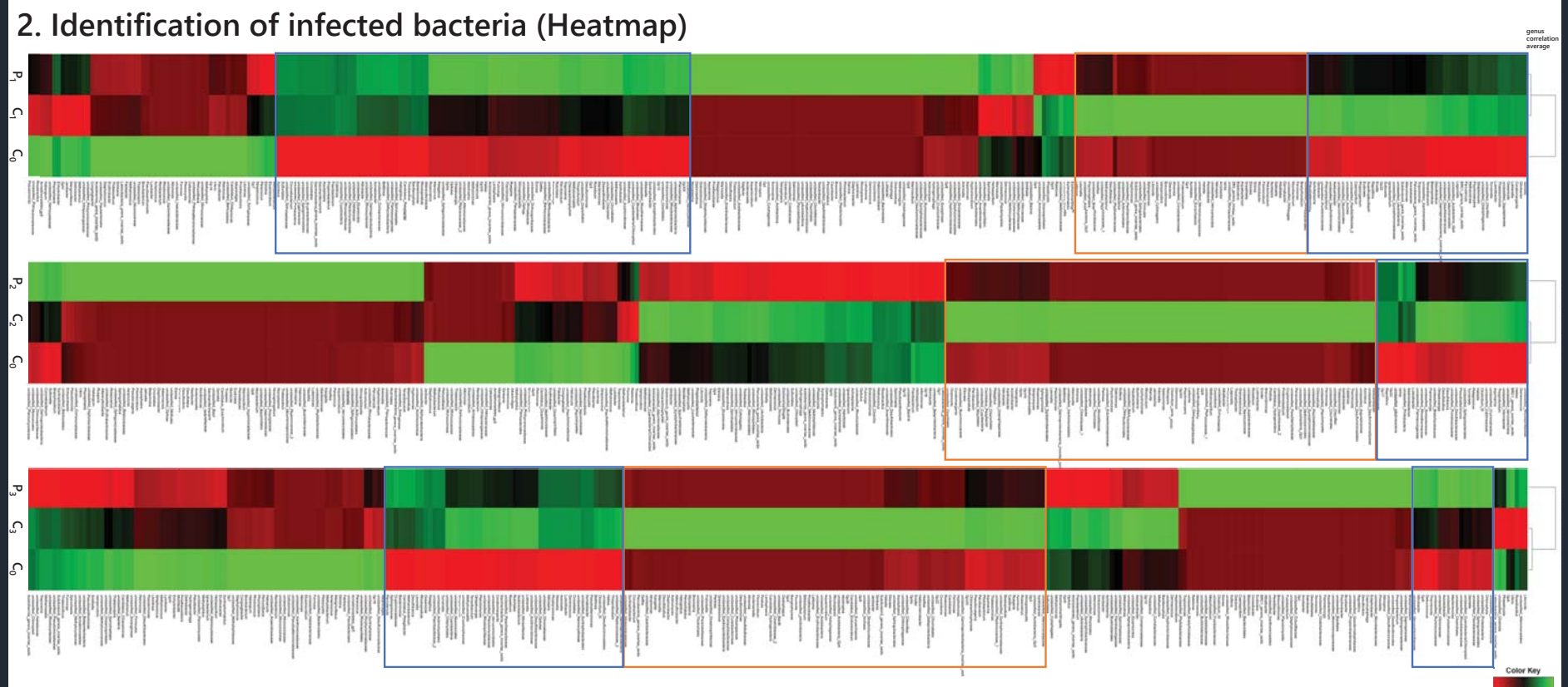
1. Comparison of bacterial diversity (Krona analysis)



次世代シーケンサーからC_0で約12万、その他の試料は17~18万カウントの塩基配列情報が得られた。これらをBLAST検索により種の同定を行い、Krona[*1]により各属の割合を表した。各捕食者・捕食者に食害を受けたサンゴ・無傷のサンゴを比較すると、食害を受けたサンゴの微生物群集構造は無傷のものと異なり、食害により微生物の移動があることが明らかになった。特にオニヒトデによる食害では影響が大きく、サンゴ組織内の微生物群集はオニヒトデのものに非常に近づいた。

[*1] Ondov et al. BMC Bioinformatics 2011, 12:385

2. Identification of infected bacteria (Heatmap)



捕食者(P_x)・食害を受けたサンゴ(C_x)・無傷のサンゴ(C_0)間の微生物群集に含まれる各微生物の数のHeatmapによる比較。 P_xとC_xに共通する微生物(青枠)は食害により捕食者からサンゴへ感染したものと考えられる。またC_xのみに多く見られる微生物(橙枠)は、食害により傷口で増加したものと推測される。

オニヒトデ($P_1 \rightarrow C_1$)では150種の微生物がサンゴへ感染が見られた。シロレイシガイダマシ($P_2 \rightarrow C_2$)では35種、ミスジチョウチョウウオ($P_3 \rightarrow C_3$)では75種であり、オニヒトデの食害が最も影響が大きかった。更にgenus correlation-average(Heatmap右端に示す)はオニヒトデのみ捕食者と捕食されたサンゴが相同性が高いという結果が示された。

3. Identification table

Infected bacteria

C_1 (オニヒトデによる食害)	C_2 (シロレイシガイダマシによる食害)	C_3 (ミスジチョウチョウウオによる食害)
Chitinophagaceae	Chitinophagaceae	*Caulobacter* sp.
Bradyrhizobium sp.	*Sphingomonas* sp.	Chitinophagaceae
Sphingomonas sp.	Cyanobacteria	*Sphingomonas* sp.
Verrucomicrobiales		*Corynebacterium* sp.
Sediminibacterium sp.		*Sediminibacterium* sp.

特に影響の大きい微生物を決定するため、捕食されたサンゴから検出された微生物から、以下の条件を満たすものを抽出した。

1) 捕食者にも存在する (但し0.01%(約18カウント)以下のものは除外)
2) 無傷のサンゴに比べて10倍以上に増えている

いずれの生物における食害においても、Chitinophagaceaeおよび*Sphingomonas* sp.が検出された。

Conclusion

食害により捕食者からサンゴへの微生物の感染が起こっていることが明らかになった。オニヒトデで150種、シロレイシガイダマシで35種、ミスジチョウチョウウオで75種の感染が起こっており、そのうち特に影響が大きいと判断された微生物がそれぞれ5種、3種、5種判明、これらのうち2種は全ての捕食者による食害で感染が認められた。また食害による微生物の感染は特にオニヒトデによる影響が最も大きく、捕食されたサンゴ体内の微生物群集はオニヒトデのものと相同性が高くなっていた。今回検出された微生物がサンゴの病気の病原菌であるかどうかは断言できないが、今回の結果より、食害により陸域の微生物がサンゴ体内にもたらされる可能性が強く示唆された。また病気を罹患したサンゴから捕食者へ感染し、新たなサンゴへ病原菌が移動する可能性も示唆された。

※本研究は一部環境省の石西礁湖サンゴ礁撹乱要因モニタリング調査により行った。

2015.11 日本サンゴ礁学会第18回大会＠慶應