

八重山周辺海域におけるサンゴの病気調査業務

いであ株式会社

アドバイザー： 鈴木 款*
ベアトリス カサレト*
(*：静岡大学)

1. 目的

サンゴの病気は海水温の上昇と深く関わっているとされているが、病気の多様な症状や白化の進行状況を海水温の上昇だけで説明することはできない。サンゴの病気には、細菌、ウイルス、シアノバクテリア、あるいは菌類など微生物の関与が報告されている。

しかしながら、どの微生物が病原体として働いているか、どこから侵入するのか、どのような条件で増殖するのか、媒介者はいるのか、病気の拡大要因は何か、回復・免疫手段はあり得るか、等についてほとんど明らかにされていないのが現状である。

細菌、菌類、ウイルス性の病気の蔓延には人為的な環境影響が関与している可能性が極めて高く、カサレト (2009, Lagoon No. 11) は石西礁湖の病気罹患サンゴから *Vibrio harveyi* や *Ralstonia pickettii* 等、病原性の高い細菌を検出している。これらの細菌類は土壌中や、生活排水、人間の尿、あるいは赤土中に普通に存在する種である。

国内において種の多様性が高いサンゴ礁生態系である石西礁湖では近年、サンゴの病気が拡大傾向にあるが、その実態や人為的環境影響は明らかにされておらず、早急に調査を実施し、対策を講じる必要がある。

本業務は、サンゴの病気拡大の実態把握、人為的環境影響の把握を目的とし、期待される成果として生活排水を含む水質汚濁対策の提言（特にサンゴ礁海域への生活排水・廃水の栄養塩と微生物の流入対策に関する提言）に資する基礎資料を得ることができる。

2. 調査方法

(1) サンゴ・海水・河川水の試料採取

調査地点から、病気に罹患しているサンゴ切片及び健全なサンゴ切片 (1片は 100cm² 程度) を合計 10 片、これらのサンゴ周辺の海水試料、石西礁湖に流入する河川水 (西表島仲間川河口、宮良川、新川川、モニタリングセンター前排水路) の 4 点及び黒島沿岸の海水を採取した。

(2) 細菌類の同定および全菌数のカウント

サンゴ組織から単離された細菌、海水・河川水中から得られた細菌類についてマイクロアレイ法および DGGE 法等を用いて種の同定を行った。また、サンゴの組織、河川水・海水中の細菌について、蛍光染色法を用いた全菌数のカウントを行った。

(3) 病気発生状況の把握

石西礁湖内および西表島沿岸域で設定された 35 地点において各地点 100m² (50m x 2m) における有病率の調査、造礁サンゴ類の被度、生サンゴ群体数、死サンゴ群体数の調査を行った。

(4) マイクロアレイ法と DGGE 法の両方の特徴の比較

今回 10~12 検体 (サンゴ・海水・河川水) に関しては両方を併用する。マイクロアレイ法は迅速で網羅的であるが、既知の遺伝情報がない場合は病原性が疑われる細菌を見逃す可能性がある。それに対して、DGGE 法は PCR/DNA 解析と組み合わせることで、手間と時間がかかるが未知の細菌に関する情報も得ることができる。病原性が疑われる細菌類の情報をより確実に得るために、また、マイクロアレイ法の適性を検証するために、本業務ではマイクロアレイ法と DGGE 法を併用して微生物分類群の同定・比較を行った。

3. 現在までに得られた調査結果

現在、マイクロアレイ法および DGGE 法により微生物群集の分析同定作業中である。また、細菌の全菌数カウントについても実施中である。サンゴの病気拡大状況についても分析中であるが、今回の調査で確認された代表的な 3 つの病気について、最も確認頻度の高かった地点の罹患対象種と 100m²における有病率を表 1 に、病気に罹患したサンゴの写真を図 1 に示した。また、各調査地点の被度の概略、各種病気の観察結果を図 2 に、オニヒトデ等の食痕について図 3 にそれぞれ示した。

表 1 サンゴの病気と有病率

調査地点	病名	対象サンゴ	有病率(%)
St.89	Brown Band Disease	スギノキミドリイシ	7.80
St.54	Brown Band Disease	クシハダミドリイシ	9.38
St.95	Growth Anomaly	ノリコモンサンゴ	20.62
St.64	White Syndrome	コエダミドリイシ	3.13

参考資料1：病気サンゴの写真



図 1(1) Brown Band Disease



図 1(2) White Syndrome

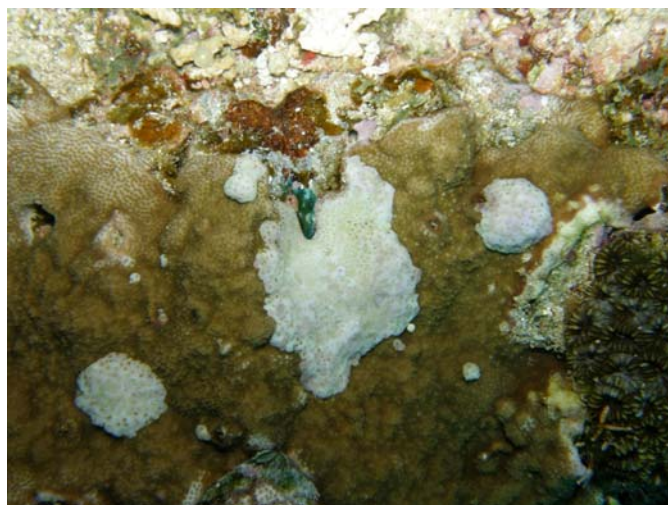


図 1(3) Growth Anomaly

参考資料 2 : マイクロアレイ法と DGGE 法について

○マイクロアレイ法

マイクロアレイ法は、予め準備した遺伝子の断片（プローブ）を用い、検体の特定遺伝子部位に反応させることで、効率的に検体の遺伝子配列を特定する方法である。

プローブとして固定する遺伝子数を増やすことにより、より網羅的な遺伝子発現の解析が高感度で可能となる。逆に、マイクロアレイ法はプローブとして固定された遺伝子以外の遺伝子の発現に関する情報は得られない。

マイクロアレイ技術は1回の実験で膨大な量の遺伝子発現データを得られる画期的な技術であるのに加えて、遺伝子単離技術として使うことができる。マイクロアレイ法を一次スクリーニングの手段として用い、得られた個々の遺伝子情報について、以下に示す DGGE 法で分析を行うことで、確かな情報をより多く得ることができる。

○DGGE 法

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE; 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法は、同じ長さの二本鎖 DNA 断片を塩基配列の違いに基づいて分離する電気泳動法である。16S rRNA 遺伝子（全細菌に普遍的に存在し、DNA 多型の解析をすることができて、種の推定が可能な遺伝子）を標的とした PCR 法を組み合わせることで（PCR-DGGE 法）、試料中に含まれるすべての細菌を対象とした群集構造解析を行うことができる。

電気泳動の結果得られたバンドの数は存在する細菌の種類数に相当し、泳動停止位置は細菌種に固有のものであることから、電気泳動のバンドパターンを比較することで試料中の細菌群集構造の変化・相違を追跡することができる。マイクロアレイ法に比べると検出感度が低い。

参考資料 3 : 調査地点における造礁サンゴ類被度と病気の状況

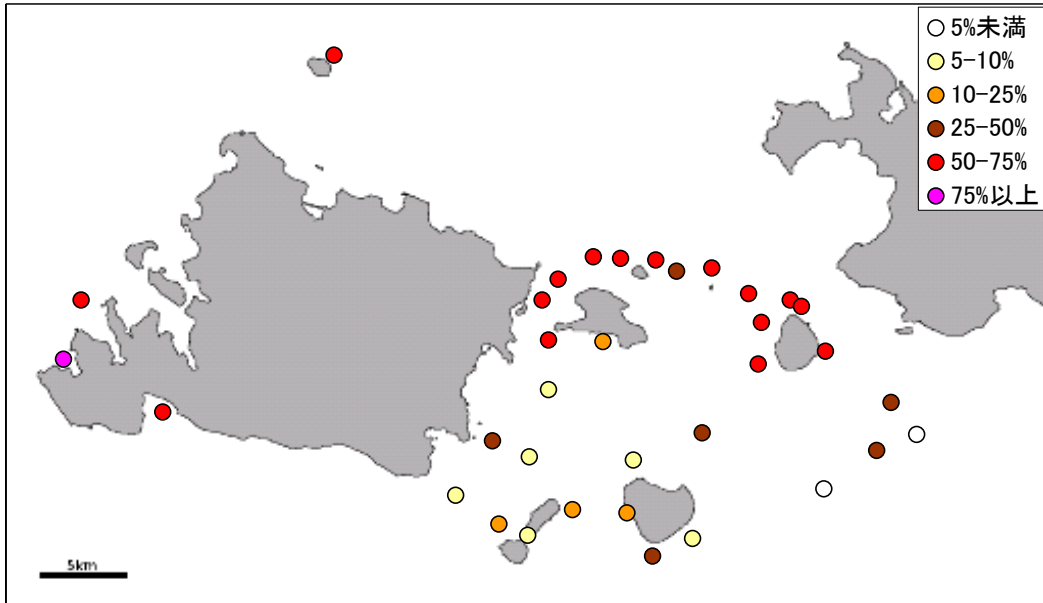


図 2(1) サンゴ被度の水平分布

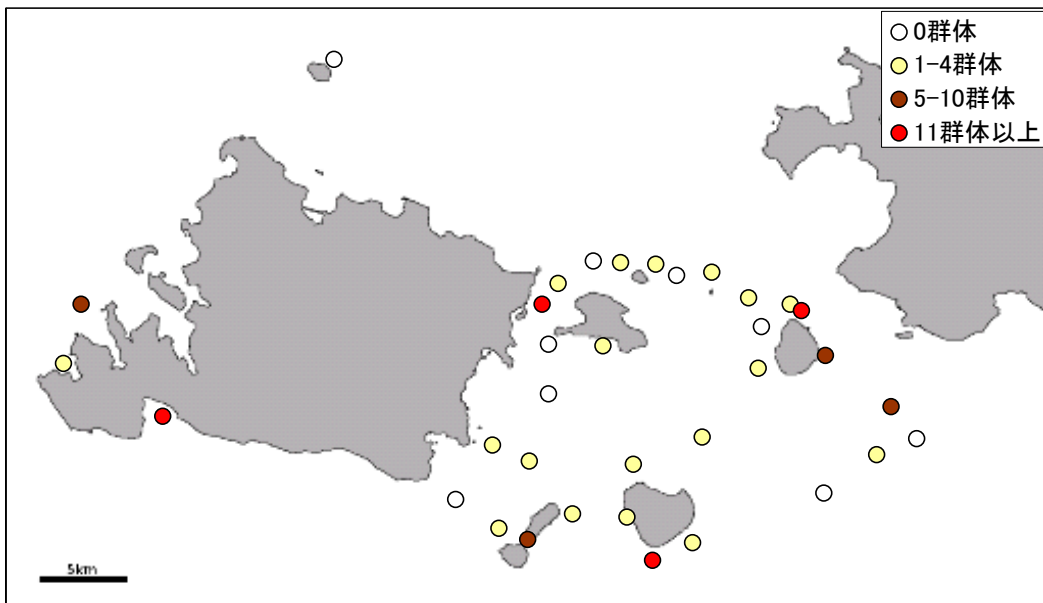


図 2(2) 罹患サンゴの水平分布 (罹患群体総数)

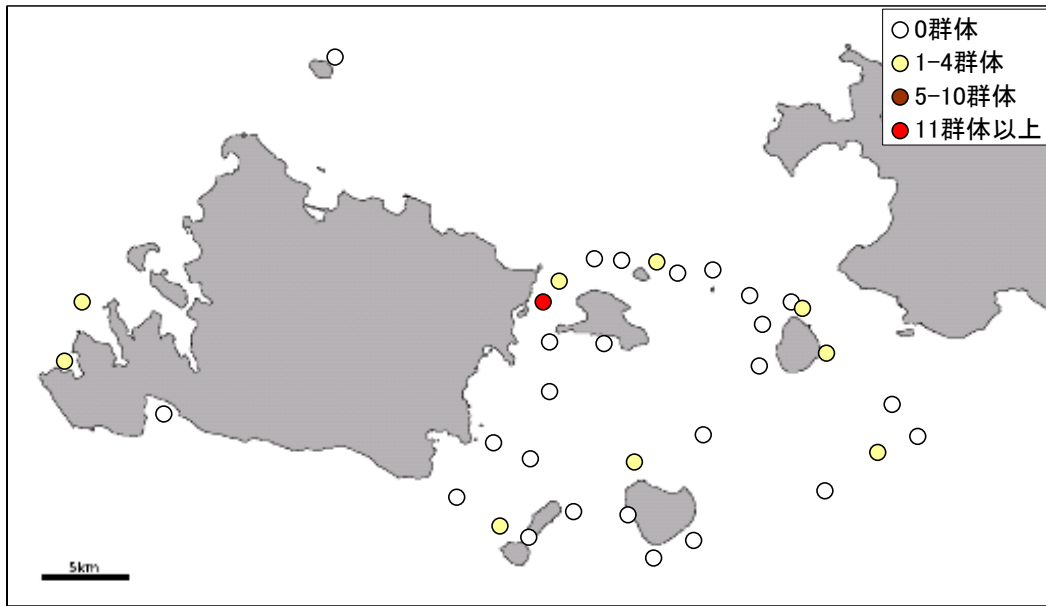


図 2(3) 罹患サンゴの水平分布 (White Syndrome)

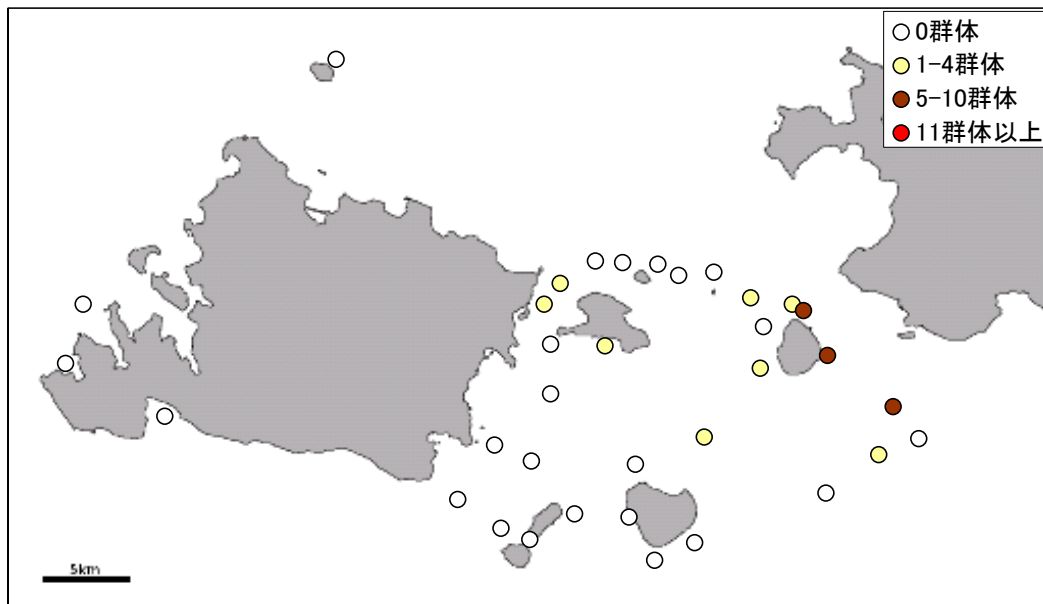


図 2(4) 罹患サンゴの水平分布 (Black Band Disease)

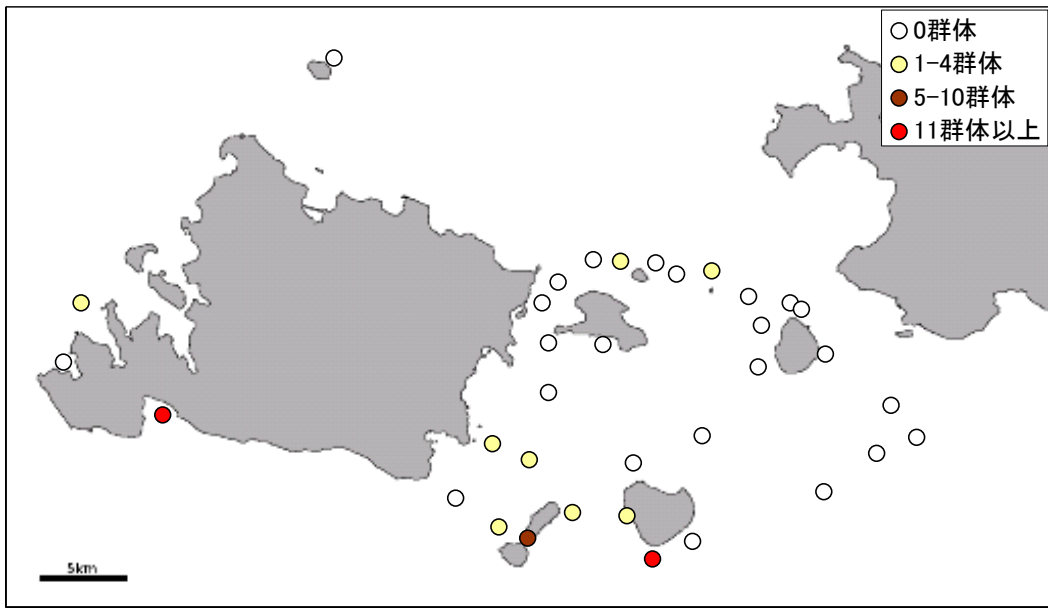
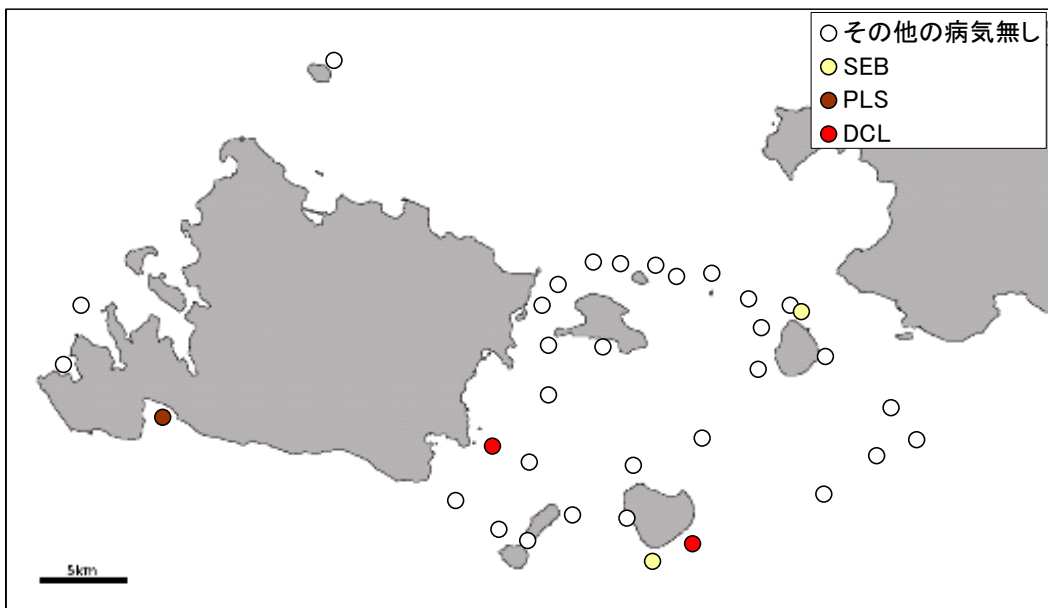


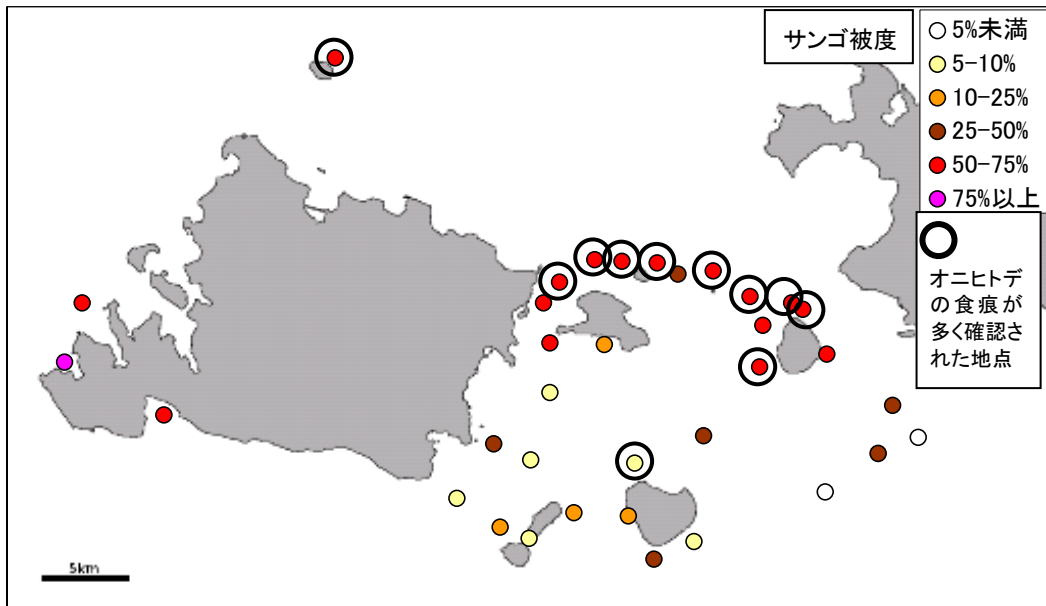
図 2(5) 罹患サンゴの水平分布 (Growth Anomaly)



※SEB: Skeletal Eroding Band, PLS: Pink Line Syndrome, DCL: Discoloration

図 2(6) 罹患サンゴの水平分布 (その他)

参考資料4：オニヒトデの食痕が多く見られた調査地点



※黒色の丸で囲われた地点でオニヒトデの食痕が多く観察された

図3 オニヒトデが多く見られた調査地点