

高知大学学位授与記録

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総黒博第62号	Manalili Sam Edward Narvasa	A Multi-Omics Characterization of the Temperate Coral <i>Acropora hyacinthus</i> (温帯性サンゴ <i>Acropora hyacinthus</i> のマルチオミクスによる特性解明)	1
乙総黒博第15号	美濃 厚志	高知県における干潟の絶滅危惧甲殻類シオマネキの生態学的研究	5

フリガナ	マナリリ サム エドワート ナルヴァサ
氏名 (本籍)	Manalili Sam Edward Narvasa (フィリピン共和国)
学位の種類	博士 (学術)
学位記番号	甲総黒博第 62 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位授与年月日	令和 8 年 3 月 23 日
学位論文題目	A Multi-Omics Characterization of the Temperate Coral <i>Acropora hyacinthus</i> (温帯性サンゴ <i>Acropora hyacinthus</i> のマルチオミクスによる特性解明)
参 考 論 文	(1) Sam Edward N. Manalili , Dan Anthony U. Bataan, Dana Ulanova, Tetsuya Sakurai, Satoko Sekida, Shashank Keshavmurthy, Takuma Mezaki & Satoshi Kubota (2025). Short-term recovery responses in <i>Acropora hyacinthus</i> exposed to moderate-term thermal stress. <i>Marine Biology</i> , 172:76. DOI: 10.1007/s00227-025-04636-1.
	<p style="text-align: center;"> 審査委員 主査 教 授 久保田 賢 副査 准 教 授 難波 卓司 副査 准 教 授 幸 篤武 </p>

論文の内容の要旨

本研究では、温帯域の造礁性サンゴ *Acropora hyacinthus* を対象に、トランスクリプトーム解析、長鎖リード法を用いたゲノム解析、比較系統解析およびオーソログ解析に基づくプロテオーム解析を統合した「multi-omics」の枠組みにより、これまでに報告が認められない高緯度地域の造礁性サンゴにおける配列情報の整備に加え、分布北限個体群の環境適応や他の海域との系統関係の解析等を目的とした研究である。

高知はインド太平洋海域における造礁性サンゴの北限域に位置し、黒潮の影響を強く受ける温暖水域と、より北方の冷水域の境界にあるため、海面水温に地域勾配が生じる。さらに、同じ地理条件により季節的な水温変動が大きく、熱ストレスに対する耐性や回復過程を検証する自然条件が整っている。加えて、黒潮および分岐流は分散・遺伝子流動の主要経路となり得る一方、海峡・地形的ギャップを介して交換が制限される可能性も示唆され、分布縁辺集団の孤立と連結性を同時に考える必要がある。

造礁性サンゴは、熱帯・亜熱帯の浅海域に広く分布していることから、RNA-seq 解析や比較解析は沖縄・パラオなど熱帯・亜熱帯のゲノムに依存することが多い。しかし温帯系統には、局所適応に関与し得る「熱帯・亜熱帯のそれと異なる配列 (divergent sequences)」が含まれると想定されるが、熱帯・亜熱帯の造礁性サンゴの参照配列へのマッピングでは脱落する可能性が高く、保存的な遺伝子のみが残ると、遺伝子ファミリーの構造、近縁パラログの配置、重複・欠失等を欠いたまま

議論されることとなってしまいます。結果として、分布縁辺集団に固有の分子基盤が不明確になる「分子学的盲点 (Molecular Blind Spot)」が生じる可能性が示唆されている。そこで本研究は、この盲点を、①温帯個体群自身の長鎖リード参照ゲノム構築 (long assemblies), ②その参照に基づく遺伝子カタログ整備 (annotation), ③タンパク質レベルでの独自特徴の検証 (proteomics) 等を順次解消していく戦略を取っている。

このようは背景の元、まずトランスクリプトーム解析を適用した熱ストレスおよびその後の回復過程における遺伝子発現の網羅的解析に取り組んだ。実験は4コロニー (計60フラグメント) を用い、26°C から31.5°C へ段階的に昇温する thermal ramping を実施した。設計は、順化 (5日)、白化 (23日)、回復 (26°C への復帰7日) の3相とし、各相で共生藻 (Symbiodiniaceae) 密度やクロロフィル a などの生理指標と、宿主 RNA-seq による遺伝子発現を対にして評価した。熱ストレスで共生藻密度は基準の約55%まで低下し、回復期間の7日間でも生理指標はなお低下傾向を示したことから、本研究の短期回復実験期間では生理学的回復が不十分であることが示された。一方、白化期に9,925だった差次的発現 (DE) 遺伝子が回復期には急限したものの、生理学的回復が不十分である中で640の遺伝子については発現の上昇が示された。このような生理条件のもとにおいても、代謝再編成やゴルジ体関連など保存的経路での可塑的調整 (resilience) に関連する一部の遺伝子転写応答はより速く基準状態へ戻る傾向を示した。一方で、この解析では熱帯・亜熱帯の造礁性サンゴで解読される参照ゲノムに依存した解析ではアラインメント率が21%にとどまり、未マップリードが真の遺伝子欠失なのか、高い配列乖離なのか、あるいはホロロビオント (褐虫藻や細菌などの微生物と共生してあたかも一つの生物のように機能している状態) 由来混入なのか判別できなかった。これに該当するオーソログが DE 解析から除外されるため、温帯個体群のストレス応答像は現時点では部分的にしか描けない、という方法論的限界が明示された。この成果については、Marine Biology 誌に掲載されている。(Short-term recovery responses in *Acropora hyacinthus* exposed to moderate-term thermal stress. Manalili et al., 172, 5, 2025)

上記限界を解消する一つの方法として、分解を可能な限り抑えて精製した高品質ゲノム DNA を用いた PacBio HiFi 長鎖リード配列について、hifiasm プログラムを用いた高精度かつ反復配列や複雑な遺伝子クラスターを解像可能な *A. hyacinthus* ゲノムを *de novo* で構築した。アセンブリの連続性は Contig N50=6.99 Mb を示し、沖縄の同種のゲノム解析で生じた短鎖リード (N50 約 1.56 Mb) に対し約 4.5 倍の改善を達成し、パラオの同種のそれ (Contig N50=2.16 Mb) も上回った。遺伝子予測と注釈付けは BRAKER3 プログラムを用いた。一次アイソフォーム集合として 20,636 個のタンパク質コード遺伝子を予測し、アセンブリの網羅性を評価する BUSCO ("metazoa_odb10" データベース使用) で 93.4% の完全性 (うち単一コピー 91.7%) を得た。長いコンティグは、コンティグ切断に起因する遺伝子分断・欠落・末端近傍のモデル誤り (edge effects) を低減し、ヘテロ接合性と回復に富むサンゴゲノムで、パラログ識別や遺伝子クラスター境界の推定を改善する結果となった。本アセンブリ等の配列データは、DDBJ の WGS accession (JBMUIC000000000) として登録されている。

高品質のゲノムアセンブリ配列データが得られたことから、高知 (本研究)、沖縄、パラオの *A. hyacinthus* ゲノム配列より得られた遺伝子から推測されたアミノ酸配列を用いた系統解析を実施した。この解析では、加の *Acropora* 属および刺胞動物アウトグループを加えている。その結果、高知で採取された *A. hyacinthus* は地理的に中間に位置する沖縄ではなく、熱帯パラオで得られたそれと類似していた。一方、沖縄集団は *A. cytherea* とクラスターを形成し、亜熱帯で遺伝子移入 (introgression) の可能性が示された。これらは、高知集団が亜熱帯からの一方向的な幼生供給 (sink)

ではなく、独立に進化してきたことを示唆していた。

独立系統である可能性が示されたため、環境応答に関わりやすい遺伝子を中心に OrthoFinder でオーソグループ化中心に内容の差（重複・欠失）に注目し、沖縄の *A. hyacinthus* のものと比較した高知のコピー数変動を統計的にスキャンした。比較集合に対して高知で有意にサイズが変動するオーソグループが 1,683 検出された。例として、自然免疫に関与する C 型レクチンが高知で強く拡張（例：9 コピー）していた。これは、病原体認識レパートリーの多様化と整合することが確認された。また、Forkhead box (FOX) 転写因子ファミリーを精査したところ、沖縄の *A. hyacinthus* から得られたゲノムでは 1 コピーしか見当たらなかった一方で、高知のものでは 2 つの FOX パラログ (FOX-Conserved, FOX-Divergent) が同一コンティグ上に局在し、約 45 kb 離れて配置されていた。FOX-Conserved は典型的な Forkhead DNA 結合ドメインを保持していたが、FOX-Divergent は N 末端にアンモニウムトランスポーター (AMT) 様モチーフを有し、さらに Forkhead の DNA 結合に関わる helix-3 で Gly→Glu 置換 (437 位) が認められた。これは DNA 結合特異性の違いをもたらす構造である可能性が示唆された。AlphaFold 3 プログラムによる構造予測では、FOX-Divergent は膜貫通型輸送体に期待される構造ではなく、可溶性の球状タンパク質が示され、Ammonium Transporter motif 様モチーフは輸送チャネルではなくリガンド相互作用ポケットとして“再利用 (neofunctionalization)”された可能性が示唆された。以上から、FOX-Divergent が窒素代謝（例：アンモニウム等）をシグナルとして転写制御へ結びつける代謝センサーとして機能する可能性が示唆された。ゲノム上でのこの両遺伝子の存在は、パラログ特異的プライマーで各座位をゲノム DNA から増幅することにより実証された。

ゲノムおよび系統解析で示された FOX パラログの差を、タンパク質レベルで検証するため、大腸菌発現系を用いた組換え FOX-Conserved および FOX-Divergent タンパク質を生産した。両タンパク質は非変性条件では凝集が強く、安定回収には 2 M 尿素を要した。精製物の検証として LC-MS/MS により各タンパク質に特異的なペプチドを検出し、目的タンパク質の単離を確認した。さらに、組換えタンパク質を抗原として作製したウサギポリクローナル抗血清は高力価 (>1:128,000) を示し、ウェスタンブロットで両パラログの検出が可能であった。

本研究では、温帯に生息する造礁性サンゴ *A. hyacinthus* の熱ストレス条件下での遺伝子の網羅的発現変動を明らかにしただけでなく、高品質のゲノム配列を得ることに成功している。従来は、それぞれ主に熱帯・亜熱帯の造礁性サンゴでしか解析されていなかったことから、配列の比較で、熱帯・亜熱帯のそれを参照せざるを得なかった現状を改善した。また、比較系統ゲノミクスにより、高知で得られた群体のパラオのそれとの類似性を示した。さらに系統特異的に拡張・分化した候補 (FOX) をタンパク質科学的に解析するとともに、ゲノム上での存在を確認した。このようなトランスクリプトミクス、ゲノミクスおよびプロテオミクスのデータを統合的に扱えるようになったことから、今後の温帯域の造礁性サンゴの総合的な理解が進むものと期待される。例として、高品質ゲノムデータを活用し、必ずしも高くなかった RNA-seq データの参照配列を用いたアラインメント率を 21% から 80% 以上へと引き上げることに成功し、温帯域の造礁性サンゴの網羅的な遺伝子発現を俯瞰できる基盤構築に寄与した。

このように本研究は、トランスクリプトミクス、ゲノミクスおよびプロテオミクスという様々な分野の手法を組み合わせることにより、世界でも黒潮流域圏においてのみ例外的に高緯度で広い生息範囲を示す造礁性サンゴを網羅的に理解する基盤を構築した。このような多分野の融合を図った本研究は、黒潮圏科学の理念に適合していると評価できる。

審査の結果の要旨

令和 8 年 1 月 28 日（水）に物部キャンパスで開催した公開審査会に引き続き、最終試験を口頭試問により実施した。

「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要項」第 10 条に定められた「公開審査会」が令和 8 年 1 月 28 日（水）に物部キャンパスで開催され、Manalili 氏により学位研究内容が発表された。内容の説明ならびに質疑応答が適切に行なわれた。

「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要領」第 11 条に定められた「最終試験」を令和 8 年 1 月 28 日（水）物部キャンパスで実施した。口頭試問において、Manalili 氏はそれぞれの質問に対して的確に回答した。

学位論文審査委員会で「公開審査会」および「最終試験」の説明や回答等に基づき Manalili 氏の学位論文に関する学識や研究遂行能力について総合的に検討し、博士（学術）の学位授与に相当するものと判断し、合格と判定した。

ふりがな	みのう あつし
氏名（本籍）	美濃 厚志 (高知県)
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	乙総黒博第15号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和8年3月23日
学位論文題目	高知県における干潟の絶滅危惧甲殻類シオマネキの生態学的研究
参 考 論 文	<p>(1) 美濃厚志(2016) 高知県で焼失したスナガニ科シオマネキ(<i>Ura arcuata</i>)の生息地. 四国自然史科学研究 9, 9-11</p> <p>(2) 美濃厚志・伊谷行(2024) ヤマトオサガニとヒメヤマトオサガニの未成熟固体における鉗脚と腹部の相対成長. <i>La mer</i> 62: 43-50</p> <p>(3) 美濃厚志・伊谷行・比嘉基紀, ハクセンシオマネキ <i>Austruca lactea</i> 生息地の環境要因 (応用生態工学投稿中) .</p>
	審査委員 主査 教 授 伊谷 行 副査 教 授 三浦 収 副査 准 教 授 比嘉 基紀

論文の内容の要旨

環境省レッドリストおよび海洋生物レッドリストには、干潟域に生息する多数のベントス（底生生物）が掲載されている。これは干潟域が古くより環境改変の影響を受けており、1945年以降に限っても、その40%が埋め立てにより失われていることに起因している。大規模な埋め立て工事は減少しつつあるが、ダム建設や砂利採集などによる底質の改変や水質汚染、富栄養化に加え、外来種の侵入など、干潟域の生物の生存を脅かす要因は継続して作用している。近年では、2011年の東日本大震災をきっかけに、被災地をはじめ全国各地で護岸の補強や耐震化、防潮堤の設置や浚渫などが行われており、更なる干潟環境の喪失が懸念される。絶滅危惧干潟生物の保全で重要な観点として、干潟の環境特性を十分に把握することとともに、対象となる種の分布状況や生活史など、生物学的な特性とあわせて評価検証することが必要不可欠である。

論文は、研究の背景と目的を示した第1章と総合考察を行った第7章をのぞき、異なる視点から研究された5つに分けられる。第2章では本研究で対象としたスナガニ科シオマネキ *Tubuca arcuata* の高知県内における主要な生息地の環境特性を解明した。第3章ではスナガニ科ハクセンシオマネキ *Austruca lactea* についても2章と同様の手法にて調査解析を行った。第4章では高知市浦戸湾内の多年にわたるシオマネキの個体数推移と増減の要因を解明するとともに、公共工事により影響を受ける個体群保全のために人工干潟を造成し、その効果を検証した。第5章と第6章では、干潟の減少により絶滅の恐れがある他のカニ類にも視野を広げ、オサガニ科のヤマトオサガニ *Macrophthalmus japonicus* とヒメヤマトオサガニ *M. banzai*、および、ムツハアリアケガニ科のカワスナガニ *Deiratonotus japonicus* を対象に、形態計測により成熟個体と非成熟個体を分類するとともに二次性徴に関する形質の相対成長解析を行った。以下に、第2章から6章の詳細を述べる。

第2章では、シオマネキが干潟を利用するために必要な環境要因を把握するために、高知県内の3ヶ

所の生息地において、干潟地盤高・水質・底質硬度・粒度組成の物理的環境条件と生息孔密度の関係性を検討した。GLMM 解析の結果、地盤高と含泥率が本種の生息に高い影響を与えることが明らかになった。本種の生息適地について、地盤高は TP（東京湾平均海面）50cm 以上、含泥率が 40%以上で特に生息密度が高まるという、定量的な記述をすることができた。

第 3 章では、ハクセンシオマネキの生息適地を把握するために、高知県内で最大の個体群である浦戸湾内の生息地において、前章と同様の調査を行なった。GLM 解析の結果、地盤高と底質硬度、表面の細れき含有率が本種の生息に高い影響を与えることが明らかになった。地盤高は TP30cm 前後 (20~40cm)、底質硬度は 200kN/m²以下、細れき含有率は 10%以下で特に生息密度が高まるという、定量的な記述をすることができた。本章の内容は、以下の参考論文として、応用生態工学にて改訂稿を査読中である。

美濃厚志・伊谷 行・比嘉基紀「高知市浦戸湾におけるハクセンシオマネキ *Austruca lactea* 生息地に関連する環境要因」

第 4 章では、浦戸湾内の 23 ヶ所の干潟において、1998 年から 2025 年までシオマネキの個体数変動を明らかにした。毎年 2 度、双眼鏡を用いた目視により個体数調査を実施した結果、2008 年に 184 個体のピークを迎えた後、100 個体前後で変動していた。しかし、2024 年に 192 個体、2025 年に 230 個体と近年、増加傾向にあることが観察された。湾内の個体数の大きな増減は、主に 3 つの地区の増減と関係していた。なかでも、公共工事による効果で偶発的に創出された干潟（仁井田地区）は、現在、浦戸湾内で主要な生息地であった。次いで主要な生息地は公共工事により影響を受ける個体群の保全を目的とした干潟の造成と移植を行った干潟（新堀川地区）であった。造成した干潟では、移植個体の 80%以上の高い水準の生残率が確認されるとともに、交尾個体や抱卵個体、新規着底個体など継続した生息を確認され、適切な条件の干潟造成は効果が継続することが示唆された。

第 5 章では、日本ベントス学会や複数の都道府県でレッドリストに掲載されているヒメヤマトオサガニ *Macrophthalmus banzai* と近縁種のヤマトオサガニ *M. japonicus* の二次性徴開始前の未成熟個体を雄の鉗脚と雌の腹部の相対成長解析により比較した。その結果は 2 種の生活史の相違を明らかにするばかりでなく、小型個体の同定のうえでも有用なデータとなった。本章の内容は、以下の参考論文として、日仏海洋学会誌に掲載された。

美濃厚志・伊谷行(2024)「ヤマトオサガニとヒメヤマトオサガニの未成熟個体における鉗脚と腹部の相対成長」 *La mer*, 62: 43-50.

第 6 章では、環境省レッドリストに掲載されているカワスナガニ *Deiratonotus japonicus* の生活史特性を明らかにするため、高知県土佐湾の標本を用いて雄の鉗脚と雌の腹部の形態計測を行い、相対成長の解析を行った。その結果、本種の形態学的成熟時の大きさを明らかにすることができた。また、成熟した雄個体は鉗脚が大型で剛毛が密生するトンダカワスナガニの鉗脚の特徴を示した。このことから、「トンダカワスナガニ」はカワスナガニのシノニムであり、特異な鉗脚の形状は成熟個体のアロメトリーによることが示唆された。

以上、黒潮圏の海岸に広く存在する干潟域に焦点をあて、絶滅危惧種の分布条件や生活史形質を明らかにした美濃氏の提出論文は博士論文として申し分ない。とくに、地域の干潟環境を網羅して長期変動を明らかにする申請者の姿勢は、高知県の自然史科学をリードする存在としての活躍が期待される。したがって、本論文は黒潮圏総合科学専攻における学位論文にふさわしいと認められる。

審査の結果の要旨

令和 8 年 1 月 28 日に公開審査会が開催され、学位論文提出者によって研究内容が発表された。質疑応答を含めた約 1 時間で、本学位論文の内容が説明され、質問やコメントに対し、学位論文提出者から相応

の回答がなされた。

同日、実施した最終試験では、「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要領」にしたがって、専門性や学術性に関する口頭試問を行った。学位論文提出者はいずれの質問に対しても、的確に回答し、学位に値する専攻学術の能力を有していることが認められた。

すでに予備審査で確認されている通り、筆頭著者として参考論文 1 編を学会誌 *La mer* (日仏海洋学会誌) に公表し、もう 1 編が応用生態工学にて minor revision で修正中となっていること、国際学会での発表も行っていることから、その学識は博士(学術)として研究を遂行していくうえで備わっているものと認め、審査委員全員で合格と判定した。