

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03861

研究課題名(和文) 造礁サンゴ「種分類」の新機軸とその体系化 - 分子細胞遺伝学的アプローチ -

研究課題名(英文) New approach for classification of scleractinian coral by molecular cytogenetics

研究代表者

田口 尚弘 (Taguchi, Takahiro)

高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・短期研究員

研究者番号：80127943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：形態分類や分子分類では同種か異種かの区別が付いていなかったヒメエダミドリイシ(*Acropora pruinosa*)とエダミドリイシ(*Acropora tumida*)を対象として、研究代表者らが世界で初めて開発した造礁サンゴの染色体解析のための有用遺伝子プローブやその他の染色体観察方法等の分子細胞遺伝学的手法を駆使することにより、リボソームRNA遺伝子の遺伝子座の違いや性染色体候補の有無の違いを見出すことにより、異種であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造礁サンゴの種の同定には、主に形態およびDNA配列が広く用いられてきたが、種レベルでは形態的に異なっているにも関わらず遺伝的にはほぼ同じという例や、形態的に同じであるにもかかわらず遺伝的に離れている例が多く見られ、種の同定は容易ではなかった。本研究では、染色体解析(核型分析)や蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法を適用した分子細胞遺伝学的解析により、造礁サンゴの種判別における染色体解析の有効性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we mainly focused *Acropora pruinosa* and *Acropora tumida*, which had no distinction between morphological classification and molecular classification. Molecular cytogenetic techniques which were developed by our laboratory were applied for chromosome analysis of scleractinian corals. It was revealed that they are heterogeneous by finding differences in the loci of ribosomal RNA genes and the presence or absence of sex chromosome candidates.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：分類・形態 分子細胞遺伝学 FISH

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋の生物多様性を支えるサンゴ礁の重要性が広く知られており、温暖化や海洋酸性化などによる劣化が著しいことから、効率的な保全を実現するための調査や保全行われてきた。このような取り組みにおいて生理・生態の異なる数百種に上る様々な造礁サンゴの分類が不可欠であるが、生息域内および地理的領域間での形態学的変動が大きいことから、種の同定は容易ではないことが知られている。

(2) 造礁サンゴの群体重量の大部分を占めるカルシウム骨格形態による造礁サンゴの分類は18世紀半ばに遡り、その他の形態形質を含め現在に至るまで系統分類に用いられてきた。一方、1990年代よりリボソームDNAやミトコンドリアDNA塩基配列解析の結果が蓄積され、分子系統学的研究が進展した。その結果、サンゴの高次分類群(科や属)の分類体系は大きく改変され、概ね整理が終わるに至っている。一方で、種レベルでは形態的に異なっているにも関わらず遺伝的にほぼ同じという例や、形態的に同じであるにもかかわらず遺伝的に離れている例が多く見られる。そのため、形態観察と分子系統学的手法だけでは、いまだに種レベルでサンゴを区別することができない種や亜種が少なくない。

(3) 染色体解析(核型分析)を中心とする分子細胞遺伝学的解析は、系統分類、品種改良のみならず、遺伝病、腫瘍発生や不妊など、染色体異常により起こる病気の診断などに有効である。造礁サンゴへの適用は1960年代に遡るが、染色体観察に適した受精卵の採取や培養細胞の樹立が困難であったことなどから、21世紀初頭まで染色体観察手法の進展は見られなかった。

(4) 研究代表者らは、標本作製過程で最も重要な細胞固定・破壊技術の革新を図り、極めて鮮明な染色体像を得ることに成功した。この技術を活用し、分子細胞遺伝学的手法の適用がその解決の一助となると考え、「造礁サンゴの新たな生体指標の探索 - 骨格形態とDNA配列の間のGapを埋める(H26-28, 基盤研究B)」において、造礁サンゴの染色体解析手法の充実を図ってきた。その結果、ギムザ染色一種であるG-band法(プロテアーゼ処理による染色体観察像上のパターン形成法)やC-band法(アルカリ処理によるパターン形成法)により染色体数や縞模様のパターンを鮮明に観察することに成功した。また、短鎖反復配列由来の均一染色領域であるhsr(Homogenously Staining Region)も明確に観察できた。以上のとおり、従来法では困難であった光学顕微鏡レベルにおいても鮮明な核型分析が可能であることが確認された。

(5) また、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法の適用により、高感度かつ特異性の高いDNA塩基配列を基にした染色体解析も実現した。具体的には、ゲノムに散在する短鎖散在性繰返し塩基配列の検出パターン、動原体、テロメア、18Sおよび5SリボソームRNA遺伝子の局在を検出することに成功した。これらの手法は、分子細胞遺伝学的解析を適用した造礁サンゴの「種分類」の解析における強力なツールとなり、これまで不可能であった造礁サンゴの各染色体の同定を可能とした。

(6) 以上のとおり、分子細胞遺伝学的手法を駆使した染色体解析の手法が整ったことから、形態観察と分子系統学的手法だけでは十分に分類することが困難な造礁サンゴにおいても、染色体の特徴を解明することにより、種判別が可能となっていた。

2. 研究の目的

研究代表者らが世界で初めて開発した造礁サンゴの染色体解析のための分子細胞遺伝学的手法を用いた有用遺伝子プローブの開発を通じて、造礁サンゴの種判別における染色体解析の有効性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 当初の予定では、黒潮の流路に阻まれた台湾、沖縄、高知で共通して試料採取が可能なパカメノコキクメイシまたはハマサンゴを研究対象として想定していたが、2017年の台湾東沙諸島、2018年の墾丁および沖縄瀬底島での試料採取において、担当者の異動や施設の改築等の問題に加え、産卵時期の天候不順による試料採取の不安定さが想定されたため、温帯域に生息し、従来は別種とされてきたが、分子系統解析により同種である可能性が指摘されていたヒメエダミドリイシ(*Acropora pruinosa*)とエダミドリイシ(*Acropora tumida*)等を対象とした。

(2) ヒメエダミドリイシ(*A. pruinosa*)は高知県幡多郡大月町において、エダミドリイシ(*A. tumida*)徳島県海部郡海陽町において、それぞれ7月または8月の産卵時期に胚を採取した。潜水により産卵予想時間の前に、群体上にプラスチックのカップを裏向きにして固定し、海域の産卵状況を確認した後、産卵後1時間以内に資料を回収した。それぞれ、産卵時間はおおむね20時台の後半から21時台の半ばまでの間であった。

(3) 10種を超える造礁サンゴの標本作成の経験から、有糸分裂細胞が豊富であった受精後約12時間前後の胚(囊胚期造礁サンゴでは「Prawn chip」と呼ばれる)が、両種の染色体標本の作

成においても適していることが確認された。0.01% コルヒチンを含む濾過海水中で胚を 30 分間処理した後、2 倍希釈海水による低張処理を行なった。無水メタノールと氷酢酸 (3:1) の混液 (カルノア固定液) で固定し、ジエチルエーテルに一晩浸漬して細胞内脂質を除去した後、標本作成に持いた。

(4) G-band 法および C-band 法は、他の動物でも用いられている一般的な方法で実施した。FISH については、標本スライドを 70%ホルムアミド/2xSSC(生理食塩水-クエン酸ナトリウム) で変性させた後、全精子 DNA を使用した全ゲノムハイブリダイゼーション (WGH)、シアニン-3-dUTP (Cy3-dUTP)、ジゴキシゲニン-dUTP (DIG-dUTP) およびフルオレセイン-12-dUTP (F-dUTP) を使用したランダムプライミングにより作成された蛍光プローブを用いて行なった。

(5) すでにプローブとして用いていた 18S リボソーム RNA、テロメアや *Alu* 繰り返し配列に加え、5S リボソーム RNA、ヒストン、ポリペプチド鎖伸長因子 1 α 等のゲノム配列の可能性について PCR 増幅後に FISH 観察して検討し、ポジティブなシグナルが得られた配列については、組換え DNA 法を用いてサブクローニング、配列決定および Blastn 検索を行なった。

4. 研究成果

(1) 従来のギムザ染色を使用して核型分析では、ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) の分裂中期の 100 細胞あたり、染色体数は 28 および 29 ($2n = 28$ および 29) であり、モザイク現象を示した。一方で、エダミドリイシ (*A. tumida*) は 28 ($2n = 28$) のみであった。両種とも染色体のほぼ中央に動原体が位置するメタセントリックおよび動原体の位置が中央からややずれているサブメタセントリックの染色体のいずれかを示した。個々の染色体は、G-band 法により明確なパターンが得られなかったことや長さや動原体の位置が染色体間で類似しているため、長さの違いにより各染色体を正確に同定することが困難であった。哺乳類と比較すると C-band 法によるパターンは不明瞭であったが、すべての染色体のセントロメアとヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) の対を形成しない 15 番目の不對染色体に特徴的なパターンが出現した一方で、相同染色体間での非対称性も一部観察された。

(2) ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) で第 4 染色体のセントロメア (中間) の近くで観察された 5S リボソーム RNA や第 2 染色体 (中間) の短腕のテロメア部分で観察された 18S リボソーム DNA 遺伝子座については、エダミドリイシ (*A. tumida*) と異なっていた。

(3) 全ゲノムハイブリダイゼーション (WGH) により、FISH シグナルは、ほとんどの染色体の動原体だけでなく、ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) で特有に観察された不對染色体 (15 番目のもの) が全長に沿って FISH シグナルを示すとともに C-band 法と同様のパターンを示した。ヒト染色体の動原体と Y ヘテロクロマチン (性染色体) も C-band 法で陽性であることが知られており、比較のためにヒト精子 DNA およびヒト染色体の組み合わせで WGH を行なったところ、Y ヘテロクロマチンにも明確な赤いシグナルが見られたことから、ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) で観察された全長に沿って赤いシグナルを示した染色体は性染色体の可能性が示唆された。

(4) 「性染色体候補 (呼称要検討: 15 番不對染色体)」(性染色体と考えられる 29 本目の不對染色体) を有する細胞の比率を評価するために、ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) とエダミドリイシ (*A. tumida*) の胚 (各 60 個) を対象として分裂中期の核における存在比を調べたところ、エダミドリイシ (*A. tumida*) では全く観察されなかった一方でヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) では、その存在比が 0% から 100% 近くの胚までバラつきがあったものの、全体として約 51% の胚に性染色体候補が観察された。

(5) 「性染色体候補」について、精子と受精していない卵の DNA を用いた比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) でさらに比較した。精子 (FITC で緑色にラベル) および卵 (Cy-3 で赤色にラベル) DNA を使用した結果、「性染色体候補」全体で緑色のシグナルが観察された。これは性染色体であることを示唆する観察結果である。

(6) 特定の染色体上にシグナルが観察されたリボソーム DNA 遺伝子に加え、ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) の「性染色体候補」を特異的に認識するプローブの DNA 配列分析および Blastn 法により類似した登録配列の検索を行なった。18S / 28S リボソーム DNA としていた配列は、18S リボソーム DNA 領域をカバーしていること、5S リボソーム DNA としていた配列は、U2 snRNA を含む 5S rDNA クラスターの一部であるが明らかとなった。また、「性染色体候補」を特異的に認識した配列は増幅プライマーを除き 629 塩基対であり、64.6% という高い AT 比を示した。また、エダミドリイシ (*A. tumida*) の染色体標本を用いた FISH では、このプローブによるシグナルは検出されなかった。

(7) 「性染色体候補」は、ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) でのみ観察されたこと、WGH 法

では、ヒトの Y 染色体の特徴である赤いシグナルが同様に観察されたこと、分裂中期の核の約半数で存在していたこと、CGH により精子 DNA 由来の緑色のシグナルが全体に観察されたことに加え、この染色体を特異的に認識する FISH プローブがエダミドリイシ (*A. tumida*) の染色体ではシグナルを示さなかったことなどから、ヒメエダミドリイシ (*A. pruinosa*) で観察された「性染色体候補」は性染色体を示すとともに、この染色体が観察されなかったエダミドリイシ (*A. tumida*) とは別種である可能性が極めて高いことが、分子細胞遺伝学的解析により明らかにできた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takahiro Taguchi, Satoshi Kubota, Erika Tagami, Takuma Mezaki, Satoko Sekida, Kazuo Okuda, Akira Tominaga | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Molecular Cytogenetic Analysis and Isolation of a 5S rRNA-Related Marker in the Scleractinian Coral <i>Platygyra contorta</i> Veron 1990 (Hexacorallia, Anthozoa, Cnidaria) | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cytologia | 6. 最初と最後の頁 205-212 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Takahiro Taguchi, Erika Tagami, Takuma Mezaki, Satoko Sekida, Yalan Chou, Keryea Soong, Kazuo Okuda, Akira Tominaga, Satoshi Kubota | 4. 巻 11-1 |
| 2. 論文標題 Recent Progress of Molecular Cytogenetic Study on Scleractinian (Stony) Corals. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Kuroshio Science | 6. 最初と最後の頁 73-81 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 田口尚弘、目崎拓真、奥村正俊、久保田賢 |
| 2. 発表標題 エダミドリイシとヒメエダミドリイシの染色体比較解析 |
| 3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第19回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 田口尚弘、目崎拓真、富永明、久保田賢 |
| 2. 発表標題 造礁サンゴ染色体研究の進展 |
| 3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第20回大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田口尚弘, 目崎拓真, 富永明, 久保田賢 |
| 2. 発表標題 造礁性サンゴ、ヒメエダミドリイシの核型およびrRNAと精子特異的DNAの解析 |
| 3. 学会等名 第70回年会染色体学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 ヒメエダミドリイシの分類に関わる染色体の特徴と特異的マーカー作 製 |
| 2. 発表標題 田口尚弘, 目崎拓真, 富永明, 久保田賢 |
| 3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第21回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 久保田 賢 (Kubota Satoshi) (00314980) | 高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・教授 (16401) | |
| 研究分担者 | 目崎 拓真 (Mezaki Takuma) (20840482) | 公益財団法人黒潮生物研究所・研究部局・研究所長 (86404) | |
| 研究分担者 | 深見 裕伸 (Fukami Hironobu) (50402756) | 宮崎大学・農学部・准教授 (17601) | |

