

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570093

研究課題名（和文） 刺胞動物の生活史の多様性に関する研究

研究課題名（英文） Studies on diverse life cycle of cnidarians

研究代表者

日高 道雄 (HIDAKA MICHIO)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：00128498

研究成果の概要（和文）：

本研究では、刺胞動物の生活史を、①クラゲ世代とポリプ世代の老化と寿命、②単体性および群体性イシサンゴの群体やポリプの年齢について、そして③イシサンゴ幼生における共生成立機構について解明することを目的とした。サンゴやサカサクラゲの体細胞組織がテロメラーゼ活性をもつことを示すとともに、サンゴやクラゲで特定染色体のテロメア長を測定する方法を開発した。テロメア長によりサンゴの年齢を推定できる可能性が示唆された。サンゴ幼生は、様々な遺伝子型の褐虫藻を選択せずに獲得することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to investigate (i) mechanisms of different lifespans between polyp and medusa stages of a jellyfish, (ii) age estimation of coral polyps and colonies, (iii) establishment of symbiosis with zooxanthellae in coral larvae. Somatic tissues of a coral and a jellyfish exhibited telomerase activity. We applied the single telomere length assay (STELA) developed for humans to cnidarians. Our results suggest the possibility to estimate coral's age based on telomere length. Coral larvae can acquire different genotypes of zooxanthellae indicating less specificity compared to adult.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生物多様性・分類

キーワード：サンゴ、刺胞動物、生活史、寿命、老化、テロメア、共生

1. 研究開始当初の背景

刺胞動物では、クラゲ世代とポリプ世代をもつものが多く、有性生殖を行うクラゲ世代は短命であるのに比べ、無性生殖を行うポリプ世代は長命であると考えられている。しか

し、寿命が異なる機構は不明であった。造礁サンゴには、破片化によって群体を分散させ増える種が多くあり、群体のサイズと年齢は単純な関係にはない。組織からサンゴの年齢を推定できるようになれば、サンゴの生活史、

個体群動態の解明のための有力なツールになると考えられる。サンゴは再生能力が高く、小さな破片からでも再生して群体を形成するので、一見細胞分裂回数に限界がないように見える。そのため、サンゴの体細胞にはテロメラーゼ活性があり、テロメア長が維持されるため、細胞分裂を半永久的に行える可能性が考えられた。当時サンゴのテロメラーゼ活性に関する報告はなく、テロメアの配列も調べられていなかった。サンゴと褐虫藻の共生に関しては、サンゴ幼生が浮遊期間中に褐虫藻を獲得できるのかについてまだ議論が分かれていた。幼生と成体とで共生する褐虫藻タイプが異なるという報告はあったが、褐虫藻タイプに対する選択性を、幼生と成体で比較した研究はまだ無かった。

2. 研究の目的

本研究では、花虫綱のイシサンゴ類と鉢虫綱のサカサクラゲを材料とし、刺胞動物の顕著な再生能力や際限の無い無性生殖を可能にするメカニズム、有性生殖と老化や寿命との関係など、刺胞動物の生活史特性を分子生物学的手法を用いて解明することを目的とした。具体的には、①サカサクラゲにおいてクラゲ世代とポリプ世代の寿命が異なるメカニズムを解明すること、②単体性および群体性イシサンゴの群体やポリプの年齢をテロメア長に基づいて推定する方法を確立すること、そして③イシサンゴ幼生における共生成立の時期や褐虫藻タイプに対する選択性について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

サンゴやクラゲのテロメラーゼ活性は、Stretch PCR 法を用いて測定した。

サンゴやサカサクラゲなどゲノム情報のない非モデル生物において、テロメアの隣接配列を決定し、テロメア 2 本鎖部を PCR 増幅することにより、特定染色体のテロメア長を測定する方法を開発した。この方法はヒトで開発された STELA 法 (Baird et al. 2003) を応用したものであるが、テロメア隣接領域の塩基配列を決定する方法では、Dual Suppression PCR 法を応用した。

サンゴ幼生への褐虫藻感染実験を、異なる発生ステージで行い、褐虫藻感染が可能になる時期、幼生内での褐虫藻の増殖、褐虫藻タイプの影響などを調べた。

4. 研究成果

(1) サンゴやクラゲの体細胞組織のテロメラーゼ活性

アザミサンゴとサカサクラゲの両者において、テロメアは脊椎動物と同様 TTAGGG の繰り返し配列よりなること、そして体細

胞組織がテロメラーゼ活性を有することが分かった。

アザミサンゴの生殖巣のない外壁組織にもテロメラーゼ活性が確認できたこと、生殖巣の発達段階に関わらず年間を通してアザミサンゴポリプにテロメラーゼ活性が見られたことから、生殖細胞や生殖系列幹細胞だけでなく、体細胞がテロメラーゼ活性を有することが示された。

(2) サカサクラゲのポリプ世代、クラゲ世代のテロメラーゼ活性、テロメア長の比較

サカサクラゲにおいて、無性生殖を行い寿命の長いポリプ世代と有性生殖を行い寿命の短いクラゲ世代とで、テロメラーゼ活性に有意な差がないことを見いだした。この結果は、両世代の寿命の差が体細胞組織のテロメラーゼ活性の差によっては説明できないことを示唆する (Ojimi et al. 2009)。

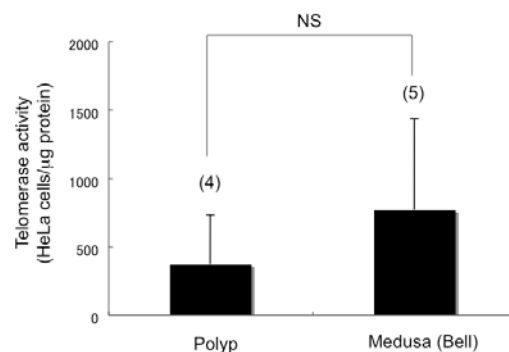


図1. サカサクラゲのポリプとクラゲのテロメラーゼ活性の比較

また、クラゲ世代は、ポリプ世代よりもテロメア長が長い傾向を示すことから、ポリプが横分体形成によりクラゲ体を形成する際にテロメア長の回復が起こる可能性が示唆された (Ojimi et al. 2010)。ただし、組織内の生殖幹細胞や体細胞性幹細胞の頻度や分布により、テロメア長の差が生じる可能性もあり、これら幹細胞の分布密度を解析することが今後必要である。

(3) サンゴやサカサクラゲのテロメア長測定

テロメアの隣接領域の塩基配列を決定することで、ヒトで開発された特定染色体のテロメア長を測定する STELA 法をサンゴやサカサクラゲに適用することに成功した。

単体サンゴのトゲクサビラインにおいて、個体のサイズとテロメア長が負の相関関係を示すことから、テロメア長に基づきサンゴの年齢を推定できる可能性が示唆された。

今回の方法は、ヒトで開発された STELA 法を、非モデル生物へ応用した初めての例である。PCR 産物 (STELA 産物) の長さを決定する際には、テロメアプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行うことが必要であった。非特異増幅を起こさないようなプライマーの設計、テロメアを無傷のまま DNA を抽出する方法、テロメア長を測定した染色体の *in situ* hybridization による同定など、今後の課題点も明らかになった。

(4) 群体サンゴであるアザミサンゴのテロメア長測定

単体性サンゴであるトゲクサビライシに加えて、群体性サンゴであるアザミサンゴにおいても、テロメア長を測定することに成功した。アザミサンゴでは、単体サンゴのトゲクサビライシと異なり、プラヌラ幼生と精子間でテロメア長に差が見られず、初期発生過程でテロメラーゼ活性が発現している可能性が示唆された。組織内の生殖幹細胞や体細胞性幹細胞の分布密度により、組織のテロメア長の差が生じる可能性もあり、今後、これら幹細胞の分布密度を解析することが課題である。

(5) サンゴの初期生活史における褐虫藻取り込みと共生樹立

サンゴの初期生活史における共生成立機構については不明な点が多い。外界より褐虫藻を獲得する水平伝搬型サンゴ幼生や定着後の初期ポリプについて、室内・野外実験を行い、褐虫藻を獲得するかどうか、その場合、どの褐虫藻遺伝子型 (タイプ) を取り込んでいるか等を明らかにした。

室内実験では、サンゴ幼生に胃腔と口が形成されると褐虫藻の取り込みが可能になること、内部構造が発達するとともにより多くの褐虫藻を獲得することがわかった (図)。さらに、幼生期にも褐虫藻との共生開始が可能であることを数種のサンゴ種で明らかにした (雑誌論文③)。

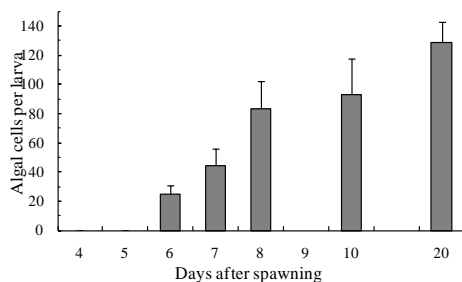


図 2 サンゴ幼生が獲得した褐虫藻数の時系列変化

また、これまでに野外では、サンゴ幼生は浮遊期間中に褐虫藻と共生するかどうかはわかっていなかった。本研究では、幼生がサンゴ礁海域で褐虫藻を取り込むことを実証し (写真)、成体サンゴとは異なりこれらの幼生や初期ポリプは様々な褐虫藻タイプを選択せずに獲得することを明らかにした。

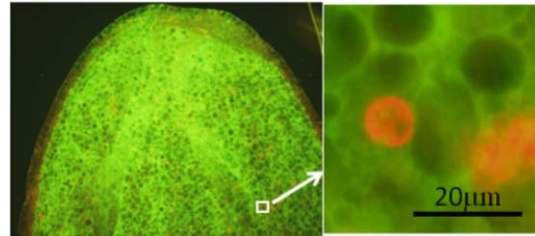


写真 サンゴ幼生内 (緑色の部分) にみられた褐虫藻 (右図、赤く見える部分) (蛍光顕微鏡観察)

このことは、サンゴが生活史初期において海洋環境中で利用できる褐虫藻と先ず共生を成立させ、当面必要なエネルギーを得て生存率を高めている可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Ojimi M.C., Hidaka M., 2010. Comparison of telomere length among different life cycle stages of the jellyfish *Cassiopea andromeda*. *Mar Biol* 157: 2279-2287

② Ojimi M.C., Isomura N., Hidaka M., 2009. Telomerase activity is not related to life history stage in the jellyfish *Cassiopea* sp. *Comp Biochem Physiol Part A* 152: 240-244

③ Harii S., Yasuda N., Lodoriguez-Lanetty M., Irie T., Hidaka M., 2009. Onset of symbiosis and distribution patterns of symbiotic dinoflagellates in the larvae of scleractinian corals. *Mar Biol* 156: 1203-1212

[学会発表] (計 16 件)

① Harii S., Sampayo E., Yorifuji M., Sinniger F., Hidaka M., 2010, 25 Dec. Do coral larvae acquire symbionts in nature? European International Society for Reef Studies, Netherland

② 波利井佐紀・Eugenia Sampayo・依藤実樹子・Frederic Sinniger・日高道雄 (2010年10月10日) 造礁サンゴの初期生活史における褐虫藻獲得. 日本プランクトン学会・日

本ベントス学会合同大会．東京大学大気海洋
研究所

③Ojimi M.C., Loya Y., Hidaka M., 2010, 24
June. Telomere length reflects senescence
of the solitary coral *Ctenactis echinata*.
2nd Asia Pacific Coral Reef Symposium,
Phuket, Thailand

④Tsuta H., Hidaka M., 2010, 21-23 June.
Attempt to estimate telomere length of the
colonial coral *Galaxea fascicularis*. 2nd
Asia Pacific Coral Reef Symposium,
Phuket, Thailand

⑤ Ojimi M.C., Hidaka M., 2009, 16-17 Dec.
Telomerase activity and telomere length of
the upside-down jellyfish *Cassiopea
andromeda* at different life cycle stages.
International Symposium on Marine
Genomics 2009, Okinawa

⑥ Hidaka M., 2009, 29 Nov. Life History of
Corals and *Cassiopea* Jellyfish: Senescence
and Possible Rejuvenation 日本サンゴ礁学
会第 12 回大会 沖縄県本部町

⑦ 波利井佐紀・日高道雄（2008 年 11 月 22
日）ミドリイシ属幼生は野外で褐虫藻を獲得
するか？—その特異性と柔軟性. 日本サンゴ
礁学会第 11 回大会. 静岡

⑧ Hidaka M. 2008, 13 Sept. Diverse life
history and symbiosis in corals and
Cassiopea jellyfish. Omics in the Ocean
(Taiwan)

⑨ 波利井佐紀・安田直子・Mauricio
Rodriguez-Lanetty・日高道雄（2008 年 9 月
5 日）造礁サンゴは発生段階のどの時期に褐
虫藻を獲得するか？ 第 79 回日本動物学会.
福岡

〔図書〕（計 1 件）

日高道雄（2009）造礁サンゴ-楽園を作った
偉大な建築家- 2 造礁サンゴのからだ
(p6-9)、5 造礁サンゴのライフスタイル
(p14-20) 沖縄県立博物館・美術館 56 ペー
ジ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.u-ryukyu.ac.jp/~hidakom/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 道雄 (HIDAKA MICHIO)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：00128498

(2) 研究分担者

波利井 佐紀 (HARII SAKI)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・
准教授

研究者番号：30334535