

機関番号：12611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20570201

研究課題名（和文） ミドリイシサンゴの変態の環境応答性と環境シグナル

研究課題名（英文） Environmental signals and responses in metamorphosis of the coral
Acropora

研究代表者 服田 昌之（HATTA MASAYUKI）

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：00249947

研究成果の概要（和文）：ミドリイシサンゴのプラヌラ幼生は発生停止状態にあり、着生基盤上からの環境シグナルを受容して初めて変態を開始する。本研究では、変態誘導ホルモンへの反応性は反口側 1/3 領域に限定されているいっぽう、体外からの変態信号は全身で受容されることが明らかになった。反口組織からホルモンの下流シグナルが分泌されて全身性の変態反応を引き起こすこと、口側には別の変態情報カスケードが存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The planula larva of acroporid coral is arrested in development, and starts metamorphosis after receiving environmental signals from the substrate to settle on. In this study, experiments using dissected larvae revealed that responsiveness to a metamorphosis-inducing hormone is restricted within the aboral 1/3 region while responsiveness to external metamorphic cues is distributed along the whole body. These results suggest downstream internal signals secreted from aboral tissues to achieve metamorphic reactions throughout the whole body following the hormone, and an alternative metamorphic signaling cascade beside the hormone in the oral region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：進化発生学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生態発生、進化発生、サンゴ、変態

1. 研究開始当初の背景

ミドリイシ属サンゴは、太平洋のサンゴ礁に優占する生態的に重要な種類である。一斉産卵によって生じた受精卵は、浮遊性のプラヌラ幼生となった後、海底の岩盤上に着生しつつポリプへと変態する。この着生変態の開始には、特定の環境シグナルが必要であり、シグナルに出会わなければいつまでも幼生のままにとどまりやがて死滅する。すなわち、変態という大きな発生過程が、環境に依存し

ているのである。ミドリイシサンゴ幼生の変態を制御する環境シグナルの解明と、シグナルに対する幼生の応答機構の解明は、生態発生における好例のひとつとなる。しかし生態発生は国内ではわずかしが行われていない。サンゴの着生変態機構の研究については、国内でサンゴ研究が最も活発な琉球大学においてさえ、全く行われていない。サンゴ研究を国策として推進しているオーストラリアにおいても、発生分野では EST と形態形成

遺伝子の解析が中心になってきており、変態制御は研究される方向にない。

ミドリイシサンゴ幼生の着生変態を誘導する環境シグナル源として、石灰藻(Morse et al. 1996)、バクテリア 1 種(Negri et al. 2001)、バイオフィーム(Webster et al. 2004)が報告されている。石灰藻の活性物質は構造決定がなされている。さらなるバクテリアの探索は行われていない。着生変態におけるサンゴ幼生の体内の分子機構については、申請者らが変態を開始させ得る神経ペプチドホルモンを見つけたのみで(Iwao et al. 2002)、国内外いずれでも研究は行われていない。

ミドリイシサンゴは刺胞動物の中でも祖先的な発生形質を持っており、変態とともに固着生活に転換する。また神経の機能は、幼生では変態制御、成体では運動制御と、変態を境に入れ替わり、神経の発生分化と機能の側面から神経系の起源に重要な知見を与える。これらのことから、サンゴの変態制御の研究は進化発生においても重要である。また発生研究にとどまらず、サンゴの着生を人工的に制御することによるサンゴ増殖とサンゴ礁修復への応用発展の基盤を与える。

2. 研究の目的

本研究では、次の 5 点を目的とする。(1) 環境シグナルとしてミドリイシサンゴ幼生の変態を高い効率で誘導できるバクテリアの株の安定的な維持・供給を確立する。(2) 着生変態として不可分とされてきた一連の複合的過程を詳細に記録して素過程に分け、環境シグナルに対する反応を行動レベルで整理する。(3) 基盤からの変態誘引シグナルの受容経路と部域性、その下流にある変態誘導ホルモンの作動経路と部域性を明らかにし、着生行動との対応を明確にする。(4) 変態誘導ホルモンの遺伝子構造を明らかにし、構造—活性相関の特異性と刺胞動物における分子多様性の知見を得る。(5) 以上を総合して、ミドリイシサンゴ幼生の着生変態の環境応答性のスキームを確立する。

3. 研究の方法

(1) ミドリイシサンゴ幼生の確保：年に一度の産卵が予想される期間に沖縄・慶良間の阿嘉島に滞在し、産卵があるまで毎晩海に潜って待つ。産卵の徴候があれば採卵装置を設置し、放出された配偶子を非侵襲的に採取する。複数群体から採取した配偶子を混合して受精させ、大型水槽で幼生にまで育成する。(2) 着生用基盤に幼生を投入し、タイムラプス撮影によって着生行動を記録し、動画化して解析する。(3) 変態誘引バクテリアの凍結保存と継代培養を行い、幼生に対する変態誘引活

性の維持を確認する。(4) 幼生を微細ガラス針で切断し、変態誘引バクテリアと変態誘導ホルモンそれぞれに対する断片の変態反応性を調べる。(5) 幼生から DNA と RNA を抽出し、PCR によって変態誘導ホルモンの遺伝子をクローニングする。

4. 研究成果

まず、ミドリイシサンゴ幼生の変態を誘導できるバクテリアの安定供給を確立した。多様な種類のバクテリア群集を混合状態のままフィルターに染み込ませて寒天培地の上に置いて培養する新規手法により、ミドリイシサンゴ幼生の着生を誘引するバクテリア群集を得ていた。この混合培養フィルターの中にどのような種類のバクテリアが優占しているかを調べるため、2種類のアプローチを採用した。ひとつめは、混合培養フィルターから単離培養を行って、得られた株の種類をリボソーム遺伝子塩基配列によって調べることである。ふたつめは、混合培養フィルターから DNA を抽出し、バクテリア群集のリボソーム遺伝子を PCR によって増幅し、得られた DNA 断片をクローン化して塩基配列を決定して種類を調べることである。いずれも優占する種類が把握できるはずである。2系列についてそれぞれ 20 クローンの塩基配列を決定したところ、ふたつの手法では得られる種類が異なり、単離培養によって得ることが難しい種類が、混合培養で維持されることが示唆された。また、変態誘導株として単離された種類と同じものは得られず、活性株は群集中で少数を占めることが推測された。また、培養後のフィルターを凍結保存してから植え継ぎを再開し、変態誘導活性を検定した。その結果、バクテリア群集の凍結は安定的に活性を再現した。フィルターを用いた混合培養によって、バクテリア群集を混合状態のままに培養・植え継ぎそして凍結保存ができることがわかった。この手法は従来にない画期的なものである。サンゴの変態誘導のみならず、環境中のバクテリアの研究全般に有効な新手法として確立することができた。

着生基盤上でのミドリイシ幼生の行動を連続的に観察し、従来は一連の複合的過程と見なされてきた着生変態を、2 段階の着生行動と変態過程の 3 つに明確に区分することができた。微生物に覆われた基盤の上をミドリイシ幼生は全身で接するように這い回り、数時間後には基盤上の特定の狭い範囲内を這い回る個体が複数現れた。それらの個体はしばらくすると、一箇所にとどまって反口端で基盤に接して体を立ち上げ、ロ-反口軸方向に伸縮を繰り返した後、着生変態に至った。これらのことから、ミドリイシ幼生の環境シグナル受容には 2 段階あり、第 1 段階は全身で、第 2 段階は反口端のみで受容している可

能性が考えられた。

そこで、ミドリイシ幼生をガラス針で半分
に切り分け、幼生断片の環境シグナル応答性
を調べた。インタクトなミドリイシ幼生の変
態を高率で誘導できるバクテリア混合試料
に対して、口側・反口側断片は共に変態した。
次に、ミドリイシ幼生断片の神経ペプチド
Hym-248 に対する応答性を調べた。ミドリイ
シは Hym-248 類似ペプチドを変態ホルモン
として使っており、そのためにヒドラ由来の
Hym-248 がミドリイシ幼生の変態を誘導で
きると考えられている。Hym-248 添加によ
って、反口側 1/3 断片は変態したが、口側 2/3
断片は変態しなかった。これらの結果から、
ミドリイシ幼生の変態ホルモン応答性は体
の反口側 1/3 部分に局在していることが明ら
かとなった。インタクトなミドリイシ幼生は
Hym-248 添加によって全身が変態すること
から、Hym-248 類似ホルモンの下流には更なる
シグナルが存在し、Hym-248 類似ホルモ
ンに反応して下流シグナルを分泌する組織が
反口側 1/3 部分に局在していると推定される。
また口側断片は、Hym-248 添加によって変態
しなかったが、バクテリアによっては変態し
たことから、ミドリイシ幼生の口側には
Hym-248 による変態誘導シグナル経路とは
別の誘導経路があると考えられる。サンゴの
変態制御機構としての情報伝達経路の概要
を明らかにしたのは本研究が初めてである。

さらに、切断された幼生断片は時間経過と
ともに再生することも明らかになった。サン
ゴ幼生の再生能力が示されたのは初めてで
あり、刺胞動物の再生力。

Hym-248 類似の変態誘導ペプチドのクロー
ニングを進める前に、類似配列を含む遺伝
子が EST データベースに公開されたため、
予想されるペプチドを合成して検定したと
ころ、変態誘導活性は皆無であった。構造活
性相関の結果からも、活性を有するアミノ
酸配列ではないことが示された。しかしなが
ら変態後のポリプに対しては、触手の特異な収
縮運動を引き起したことから、これはヒドラ
の場合と同様に運動制御を担う神経ペプ
チドである可能性が考えられる。幼生にお
ける機能は未知のままである。またゲノム
DNA からのクローニングによって、この遺
伝子にはイントロンが無いことが明らかにな
った。変態誘導ペプチドホルモンは分子的に多
様性のあることが推察される。

本研究から、ミドリイシ幼生の着生変態は
次のように着生変態を制御されていると推
定される。着生前行動の第 1 段階として、ミ
ドリイシ幼生は全身で基盤に接しながら着
生場所の探索を行う。このとき、基盤上に付
着生息するバクテリアを環境シグナルとし
て全身で受容すると、着生前行動の第 2 段階
として、ミドリイシ幼生は基盤上の特定の箇

所で伸縮運動をし始める。このとき、基盤に
接している反口端でさらなる環境シグナル
を受容する。受容されたシグナルは体内シ
グナルに変換される。このときの体内シグ
ナルの 1 つとして Hym-248 類似ペプチドが使
われている。ミドリイシ幼生の変態反応はこれら
の変態誘導体内シグナルの総和が閾値に達
したときにのみ開始される。変態反応の一部
として反口端に接着組織が分化することと、
反口端で基盤に接する行動とが両立して初
めて基盤への着生が成功する。

本研究により、ミドリイシ幼生の環境応
答性着生変態機構の全体像が提示され、これ
まで考えられてきたものよりはるかに複雑で
あることが明らかになった。

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 7 件)

- ① Matsushima K, Kiyomoto M, Hatta M
Aboral localization of responsiveness to a
metamorphic neuropeptide in the planula larva
of *Acropora tenuis*. *Galaxea*, JCRS 査読有り
12: 77-81 (2010)
- ② Matsushima K, Fujiwara E, Hatta M An
unidentified species of acoel flatworm
associated with the coral genus *Acropora*
from the field of Japan. *Galaxea*, JCRS 査読
有り 12: 51 (2010)
- ③ Hatta M Unidirectional circulation in each
coelenteron compartment in a primary polyp
of *Acropora tenuis*. *Galaxea*, JCRS 査読有り
12: 45 (2010)
- ④ Fujiwara E, Matsushima K, Hatta M A
sequential observation of basal skeleton
formation in the primary polyp of *Acropora*.
Galaxea, JCRS 査読有り 11: 35 (2009)
- ⑤ Hatta M A Hanging life of acroporids in
success after COT outbreaks.
Galaxea, JCRS 査読有り 11: 33 (2009)
- ⑥ Hatta M, Matsushima K Presumed natural
hybrids between *Acropora donei* and
Acropora tenuis. *Galaxea*, JCRS 査読有り
10: 91 (2008)
- ⑦ 岩尾研二、服田昌之 「造礁サンゴ幼生の
着生・変態機構とシグナル」 月刊海洋査読
無し 41: 334-342 (2009)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Matsushima K, Hatta M 「Efficient
Isolation of Bacteria That Induce
Settlement and Metamorphosis of
Acropora Larvae」 11th International Coral
Reef Symposium (平成 20 年 7 月 7-11 日・

- フロリダ)
- ② Hatta M., Horikoshi A, Sasaki C, Furuta Y 「Metamorphosis Decision of *Acropora* Larvae in Response to Mixtures of Exclusive Cues from Environments」 11th International Coral Reef Symposium (平成 20 年 7 月 7-11 日・フロリダ)
 - ③ Hayashibara T, Suzuki G, Iwao K, Taniguchi H, Hatta M., Shimizu H, Katoh M 「Coral recruitment can be enhanced by larval seeding: An *in situ* demonstration.」 5th World Fisheries Congress (平成 20 年 10 月 20-24 日・横浜)
 - ④ Matsushima K, Kiyomoto M, Hatta M 「Bacteria as environmental signals and a second internal signal to provoke metamorphosis in the coral *Acropora*」 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (平成 22 年 6 月 20-23 日・京都)
 - ⑤ 服田昌之、佐々木千枝、古田好美、照井宏子 「ミドリイシサンゴの変態を阻害する環境シグナルと体内シグナル」 日本動物学会第 79 回大会 (平成 20 年 9 月 5-7 日・福岡)
 - ⑥ 松島夏苗、服田昌之 「ミドリイシ属サンゴ幼生の着生変態を誘導する環境バクテリアとその多様性」 日本動物学会第 79 回大会 (平成 20 年 9 月 5-7 日・福岡)
 - ⑦ 松島夏苗、服田昌之 「ミドリイシ幼生の着生変態を誘導するバクテリアの効率的単離」 日本サンゴ礁学会第 11 回大会 (平成 20 年 11 月 22-24 日・静岡)
 - ⑧ 松島夏苗、服田昌之、清本正人、鈴木豪、林原毅 「ミドリイシサンゴ幼生の変態ホルモンに対する部域応答性」 日本動物学会第 80 回大会 (平成 21 年 9 月 17-20 日・静岡)

- ⑨ 松島夏苗、服田昌之、清本正人、鈴木豪、林原毅、目崎拓真 「ミドリイシサンゴ幼生の変態シグナル経路の部域性」 日本サンゴ礁学会第 11 回大会 (平成 21 年 11 月 27-29 日・沖縄)
- ⑩ 松島夏苗、清本正人、服田昌之 「ミドリイシサンゴ幼生の変態応答カスケードは反口側組織に局在する」 (口頭) 日本動物学会第 81 回大会 (平成 22 年 9 月 23-25 日・東京)
- ⑪ 服田昌之、松島夏苗 「ミドリイシサンゴにおける変態誘導ペプチドのパラログス遺伝子」 (ポスター) 日本サンゴ礁学会第 12 回大会 (平成 22 年 12 月 2-4 日・つくば)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服田 昌之 (HATTA MASAYUKI)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：00249947

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者