

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570080

研究課題名(和文)造礁サンゴの無性生殖・再生能力の細胞学的基盤

研究課題名(英文) Cellular mechanisms of high capacity of asexual reproduction and regeneration of reef-building corals

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イシサンゴの高い再生能力や長寿命の細胞学的基盤を解明することを目的とした。(1) コクビミドリイシでは、TRF法で測定したテロメア長が、精子、プラヌラ幼生、群体と発生が進むにつれ短縮することを見出した。成長速度が速く寿命の比較的短いコクビミドリイシでは、テロメア長に基づく群体の年齢推定が可能なが示唆された。(2) 一方アザミサンゴでは、テロメア長の有意な短縮が検出されず、体細胞組織に高いテロメラーゼ活性が認められた。テロメア短縮速度がサンゴ種間で異なることが示唆された。サンゴ群体の年齢や老化を理解するためには、群体各部における幹細胞様細胞の自己増殖や分化などの理解が必要である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand the basic mechanisms of high capacity of asexual reproduction and long life spans of corals. The major findings are; (1) Telomere length of the coral *Acropora digitifera* shortens during development. This suggests that estimation of coral age is possible at least in some fast growing corals. (2) However, significant difference in the telomere length could not be detected among different developmental stages of *Galaxea fascicularis*. Somatic tissues of *G. fascicularis* exhibited high telomerase activities. The present results suggest that telomere rate of change might be different among coral species. Self-renewal and differentiation of stem-like cells in coral should be studied if we want to understand aging of coral.

研究分野：サンゴ礁生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：サンゴ 年齢 老化 テロメア 群体 寿命

1. 研究開始当初の背景

群体性サンゴでは、群体から切り離された破片も、再生して新たな群体を形成することができる。このように無性的に増殖した群体がもとの群体の年齢を受け継ぐのか、再生時に若返りのような現象が起こるのか不明である。自然界で破片からの群体再生を行うサンゴは多く、そのようなサンゴでは群体のサイズと年齢との間に単純な関係が成り立たないと考えられる。また群体内のポリプはすべて同じ年齢なのか、ポリプの性成熟はポリプの年齢によるのかなどもよく分かっていない。サンゴの老化や寿命などの生活史研究、そして個体群動態の研究には、サンゴの軟組織から年齢推定ができることが望まれている。

染色体の末端にあるテロメアという構造は、細胞分裂ごとに短縮し、体細胞がこれまでに何回分裂したか(細胞としての年齢)の指標となると一般的には考えられている。サンゴのテロメア長が TRF 法などによって推定されているが (Sinclair et al. 2007, Zielke and Bodnar 2010)、群体性サンゴにおけるテロメア長とサンゴ年齢の関係の研究は十分に行われていない。サンゴにおいても、テロメア長が発生すなわち年齢とともに短縮するのかなどについては知見がなく、テロメア長に基づくサンゴの年齢推定の可能性が確かめられれば、サンゴの生活史研究、個体群動態研究にとって有効な研究ツールとなる。

2. 研究の目的

イシサンゴなどの刺胞動物は、高い再生能力や無性生殖能を示し、長寿命をもつものも多い。本研究では、イシサンゴの高い再生能力や長寿命の細胞学的基盤を解明することを目的とした。

本研究では、(1)テロメア長に基づいて群体サンゴの年齢を推定することは可能か?(2)群体内のポリプの年齢は同一なのか、出芽時に幹細胞様細胞が体細胞に分化することが年齢の開始点になるのか?を目的とし、群体サンゴにおいて、テロメア長が発生とともに短縮するのか、群体中の部位によりテロメア長に差が見られるかについて研究を行った。さらに、サンゴの体細胞組織が短縮したテロメアを回復させるテロメラーゼ活性を持つかについても調べた。また、サンゴの腫瘍状構造(成長異常部)では、細胞が無限増殖している可能性があるため、細胞動態の解析も行った

3. 研究の方法

群体サンゴ2種(アザミサンゴとココビミドリイシ)より、卵と精子を採取し、人工授精によりプラヌラ幼生を得た。精子、プラヌラ幼生、成群体という異なる発生段階のサンゴのテロメア長を測定した。テロメア長の測定は、通常用いられている TRF 法と特定染色体のテロメア長を測定する STELA 法を用

いた。

テロメア長測定の標準的方法である TRF 法は、多くの DNA 量を必要とすることや、テロメア長を過大評価しやすいなどの欠点がある。そこで今回 PCR を用いて特定の染色体のテロメア長を測定することができる STELA (single telomere length analysis) 法によるテロメア長測定をサンゴに適用することを試みた。STELA 法は Baird et al. (2003) によって開発された、特定の染色体のテロメア長を測る方法で、PCR 増幅を用いることにより少量のサンプルからでも、特定染色体のテロメア長を知ることができる。しかしこの方法は各染色体のテロメア隣接領域の配列情報を必要とするため、本来はヒトなどのゲノムが既知の生物にしか用いることができず、ゲノムの読まれていないサンゴではそのまま適用することができない。そこでまず、アザミサンゴを対象として、マイクロサテライト領域のプライマー設計を行なうために開発された Dual-suppression PCR (Lian and Hogetsu 2002) 法を応用して、テロメアの隣接領域の配列を決定した。それによって隣接領域からプライマーを設計し、アザミサンゴのテロメアを増幅してテロメア長を測定することが可能となった。

アザミサンゴの体細胞組織のテロメラーゼ活性の測定は、stretch PCR 法に基づくテロメラーゼ活性測定キット (Telochaser) を用いて行った。

サンゴの腫瘍状構造(成長異常部)の細胞動態の研究は、ハマサンゴの組織切片を作成し、アポトーシス細胞の頻度および増殖細胞の頻度をそれぞれ TUNEL 法、BrdU 法を用いて求めた。

4. 研究成果

(1)サンゴのテロメア長は発生とともに短縮するか?

ココビミドリイシのテロメア長を TRF 法で測定したところ、精子、プラヌラ幼生、成群体のポリプ間で有意な差が見られ、発生に伴ってテロメア長が短縮することを見出した (Tsuta et al. 2014)。少なくとも成長速度の速いミドリイシ類では、テロメア長に基づいて群体の年齢測定が可能なが示唆された。

一方、アザミサンゴの異なる発生段階(精子、プラヌラ幼生、成ポリプ)でテロメア長を TRF 法により比較したところ、ポリプで若干短くなる傾向が見られたが、有意差は見られなかった (Tsuta and Hidaka 2013)。この結果は、アザミサンゴの体細胞組織が高いテロメラーゼ活性を示すことと関連する可能性がある (Nakamichi et al. 2012)。サンゴ種によって、発生過程におけるテロメア長短縮の速度が異なることが示唆された。

また、ココビミドリイシ群体の中央部と周辺部のテロメア長を比較したところ、群体中央部のテロメア長の方が周辺部のテロメア

長よりも長い傾向を示した。この結果は、群体サンゴのテロメア長は、ポリプ形成からの時間のみによって決まるのではなく、その部位の細胞分裂頻度によっても影響を受けることを示唆する。

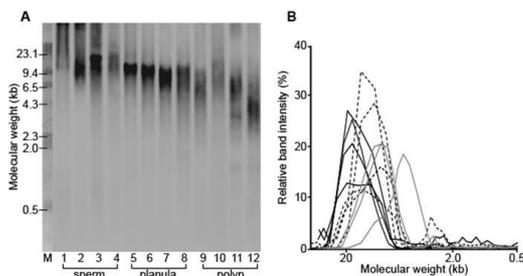


図1. コクビミドリイシの精子、プラヌラ幼生、成群体ポリプのTRFパターン。

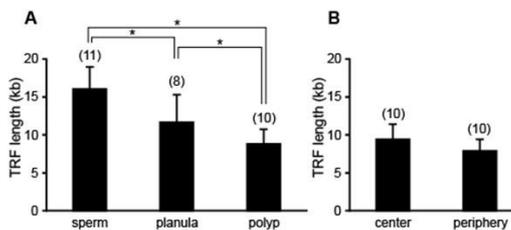


図2. コクビミドリイシの精子、プラヌラ幼生、成群体ポリプのTRF長(テロメア長)の比較。右は群体中央部と周辺部間のテロメア長の比較。

サンゴ群体各部の細胞の年齢を、様々な体細胞に分化するもとなる細胞、すなわち幹細胞様細胞 stem-like cells の分布や体細胞への分化などの動態により説明できるようになることが今後望まれる。出芽時の幹細胞様細胞の動態を調べ、「ポリプ出芽時に幹細胞様細胞から体細胞への分化が起こり、その時点がポリプの年齢の開始点となる」という仮説を検証することを将来試みたい。出芽や再生によって生じるポリプの年齢や性成熟は、幹細胞から体細胞あるいは生殖細胞への分化のタイミングによって決定される、すなわち出芽ポリプや再生ポリプの年齢は親ポリプの年齢を引き継がない可能性を今後検証したい。

サンゴの腫瘍状構造(成長異常部)において、アポトーシスによる細胞死が抑制され、細胞増殖が増大することを発見した(Yasuda and Hidaka 2012)。成長異常部では、アポトーシスによる細胞死と細胞増殖のバランスが崩れ、組織恒常性が制御不能になっていることが示唆された。

(2) STELA 法の評価について

アザミサンゴのテロメア隣接領域(subtelomeric region)の塩基配列を決定し、STELA 法を群体サンゴに適用することに成

功した。アザミサンゴでは4つの特定染色体のテロメア長を測定することに成功したが、異なる発生段階の間でテロメア長に有意差は検出されなかった(Tsuta and Hidaka 2013)。一方、単体サンゴのトゲクサビライシのテロメア長を、STELA 法を用いて測定したところ、精子のテロメア長は体細胞のテロメア長より有意に長かった(Ojimi et al. 2012)。ゲノム情報のあるコクビミドリイシについては、OIST 佐藤ユニットの協力を得て、テロメア隣接領域と思われる配列をゲノムより探索し、STELA 用プライマーを設計した。これらのプライマーを用いて STELA 産物を増幅できることを確認した。ただし、どの染色体のテロメアを増幅しているのか、本当に単一のテロメアのみを増幅しているのかなどについては今後 FISH などの方法を用いて確認することが必要である。

単一テロメア長測定法(STELA 法)は、PCR を用いる方法であるため感度が高く微量の DNA 量でも測定可能である一方、操作が複雑であり、種ごとにテロメア隣接領域の塩基配列を求める必要がある。また短いテロメアをより効率的に増幅してしまう(テロメア長を過小評価する)危険性がある。一方、制限酵素により切断した染色体末端部をサザンハイブリダイゼーションにより検出する TRF 法は、種ごとにプライマーを設計する必要がなく、様々な種に適用可能である。サンゴなど新しい生物に STELA 法を適用する際には、やはり従来の標準的な方法である TRF 法を用いた測定も並行して行うことで実験の信頼性を高めることができる。

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 6 件)

Tsuta H., Shinzato C., Satoh N., M. Hidaka (2014) Telomere shortening in the colonial coral *Acropora digitifera* during development. *Zoological Science* 31: 129-134 査読有
DOI: 10.2108/zsj.31.129

Tsuta H. and M. Hidaka (2013) Telomere length of the colonial coral *Galaxea fascicularis* at different developmental stages. *Coral Reefs* 32: 495-502 査読有
DOI: 10.1007/s00338-012-0997-6

Ojimi M.C., Loya Y., M. Hidaka (2012) Sperm of the solitary coral *Ctenactis echinata* exhibit a longer telomere than that of somatic tissue. *Zoological Studies* 51: 1475-1480 査読有
<http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/51.8/1475.pdf>

Yasuda, N., M. Hidaka (2012) Cellular kinetics

in growth anomalies of scleractinian corals, *Porites australiensis* and *Montipora informis*. Diseases of Aquatic Organisms 102: 1-11 査読有

DOI: 10.3354/dao02530

Yasuda, N., Nakano, Y., Yamashiro, H., M. Hidaka (2012) Skeletal structure and progression of growth anomalies in *Porites australiensis* in Okinawa, Japan. Diseases of Aquatic Organisms 97: 237-247 査読有

DOI: 10.3354/dao02408

Nakamichi, H., Ojimi, M. C., Isomura, N., Hidaka, M. (2012) Somatic tissues of the coral *Galaxea fascicularis* possess telomerase activity. Galaxea, Journal of Coral Reef Studies 14: 53-59 査読有

DOI: <http://dx.doi.org/10.3755/galaxea.14.53>

〔学会発表〕(計 8 件)

蔦宏興・日高道雄 (2013) 造礁サンゴココピミドリイシのテロメア長は発生とともに短縮する. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山.

Hidaka, M. (2012) Stress response and life history trait of reef-building corals. The 9th Okazaki Biology Conference “Marine Biology II”, 岡崎・沖縄 (招待講演)

Tsuta, H., M. Hidaka (2012) Telomere lengths of different developmental stages of a colonial coral. 12th Int. Coral Reef Symp., Cairns, Australia.

Reyes-Bermudez, A., Hidaka, M., Watanabe, Y., Brooks, D., A. Mikheyev (2012) Molecular mechanisms regulating tissue homeostasis and cell lineage differentiation in Scleractinian corals. 12th Int. Coral Reef Symp., Cairns, Australia.

蔦宏興・日高道雄 (2012) アザミサンゴの精子、幼生、成群体のテロメア長について. 第 15 回日本サンゴ礁学会大会, 東京.

安田直子・日高道雄 (2012) 造礁サンゴの病気-成長異常-の進行過程について. 第 83 回日本動物学会大会, 大阪.

蔦宏興・日高道雄 (2011) アザミサンゴの特定染色体のテロメア長の測定. 日本動物学会第 82 回大会, 旭川.

安田直子・日高道雄 (2011) 造礁サンゴの成長異常部における細胞増殖と細胞死について. 日本動物学会第 82 回大会, 旭川.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：