

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：32649

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710275

研究課題名(和文) 骨の形成に関連する遺伝子をマーカーに用いたサンゴ礁のリスク管理

研究課題名(英文) Risk assessment for coral reefs using a marker of calcification

研究代表者

大久保 奈弥 (Okubo, Nami)

東京経済大学・経済学部・准教授

研究者番号：50401576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋酸性化や人為的攪乱によりサンゴ礁が受ける影響を調べるため、骨格の成長率測定といった生態学的・地質学的レベルでの観察が行われている。骨格ができる以前の、幼生における骨の形成を調べれば、各海域でのサンゴのストレスをいち早く発見し、サンゴ礁の予防的管理を行うことが出来ると考え、幼生におけるカルシウム形成量を測定した。その結果、後期プラナラにおいてカルシウム量が上がり、骨片のようなものが既につくられているのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to find the effect of natural and anthropogenic disturbances on coral reefs, the studies on the calcification of corals were enormously conducted. However, it is basically unknown about how mineralization starts from the settled polyp, so I studied the calcification of coral larvae. As a result of this study, the possible calcification occur in coral planula larvae.

研究分野：海洋生物学

キーワード：サンゴ 幼生 石灰化

1. 研究開始当初の背景

さんご礁は、温暖化や海洋酸性化、オニヒトデ食害や沿岸工事等の人為的破壊を受けて環境の衰退が著しく、日本は、人為的影響による海洋環境の破壊が最も大きい地域の1つとして報告された(図1, Halpern et al. 2008, Science)。

現在、このような人為的攪乱や、地球規模での変動による環境要因の変化が、サンゴにどのような影響を与えるのかという観点から、サンゴの生態や生理に関する研究が数多く行われている。特に、海洋酸性化や温暖化等の影響によってサンゴの成長率が低下するといった報告がそうである(e.g. Cohen 2009)。しかし、サンゴの成長は年に0.1mm - 1cmと大変遅く(Okubo et al. 2005, unpublished)、生態学的な観察で成長率が低下しているのに気づいた時には、既に相当のダメージを受けており、その海域を保護するにも手遅れである。ならば、環境ストレスにより、骨を造る遺伝子の発現量が減少している、といった成長率として現れるよりもっと手前のmRNAレベルでの研究を行えば、サンゴにかかる負荷をいち早く発見でき、原因の究明や生息場所の保全を行うことができる。しかし、骨の形成に関わる可能性が高い遺伝子は、アザミサンゴという種で見つかった *galaxin* (Fukuda et al. 2003) という1種のみで、他の遺伝子は未だに発見されていない(Reyes-Bermudez et al. 2009)。なぜなら、現在まで行われてきた、成体サンゴ(表1)の骨付近にあるタンパク質をすりつぶして手当たり次第に抽出 アミノ酸配列決定

cDNA クローニング 免疫染色、という方法は、候補遺伝子を探すのに大変な労力と時間がかかる上、結果的に違う機能を持つ遺伝子だったということが多々あるからだ。

2. 研究の目的

そこで私は、幼生が着底変態して骨を造り

始める「稚サンゴ」の時期に着目した。もし、骨を造る前の幼生と造り始めた稚サンゴ(図1)で発現する全ての遺伝子情報を比較すれば、成体と違って年齢差もほぼないので、稚サンゴで新たに発現した遺伝子をデータベースとして、実際に骨の部分から採れたタンパク質の配列を検索し、骨形成に関連する遺伝子を効率良く見つけられる。

そこでまずは、サンゴの幼生から解析を始めることにした。沖縄でククメイシとクサビライシという2種のサンゴの幼生を採取し、サンゴの遺伝子発現を世界で唯一研究している豪国立大学に留学して、CITESの許可のもと日本から上記のサンゴ幼生を輸出し、各成長段階に発現する全ての遺伝子のデータベースを構築し始めた(表1, Okubo et al. 2010)。2009年度から1年間、mRNAの採取から次世代シーケンサーの利用による全発現遺伝子の採取、そのデータ解析までを行った結果、サンゴが幼生の時期に発現する遺伝子を2万種以上採ることに成功した(表1)。

次は、稚サンゴで発現する遺伝子を採取する番である。私が注目したのは、沖縄県慶良間諸島に在る(財)阿嘉島臨海研究所の稚サンゴ生産技術である。阿嘉島臨海研究所は、ミドリイシの数種において胚を死亡させずに幼生へと育て、適した基盤に着底・変態させ、稚サンゴを大量作出することに世界で初めて成功した。サンゴの完全養殖にも唯一成功している(Iwao et al. in press)。私は、修士から約8年間、この阿嘉島臨海研究所でサンゴの保全と繁殖生態に関する研究を行ってきた(業績)。その関係を活かし、予備実験としてクサビライシの幼生を阿嘉島臨海研究所に送り、稚サンゴの生産を試みた。その結果、今年度、幼生の着底変態に初めて成功した(図2)。ついに、ミドリイシ以外で稚サンゴ大量生産の道が開けたのである。

そこで、本申請課題では「骨の形成に関連する遺伝子をマーカーに用いたさんご礁の

リスク管理」を目的として、幼生と稚サンゴにおける骨の形成に関する遺伝子の探索と、幼生におけるカルシウム形成についての研究を行う。

3. 研究の方法

キクメイシとクサビライシの2種で配偶子を採取し、稚サンゴを作出する。育った稚サンゴから mRNA を採取し、cDNA クローニングを行い、アダプタープライマーをつけ、次世代シーケンサーにかけることで、稚サンゴの時期に発現する全ての遺伝子を採取する。その発現遺伝子情報を既に持つ幼生の遺伝子情報と比較し、稚サンゴで新規に発現した遺伝子をデータベース化する。そのデータから、サンゴの骨格部分から採取したタンパク質のアミノ酸配列を探索し、骨形成遺伝子の候補を複数見つけ、水温や pH を変えた飼育化の稚サンゴや、各種海域のサンゴを用いて発現量や発現パターンを解析し、環境ストレスに応答するマーカー遺伝子を決定し、実用化する。

4. 研究成果

キクメイシとクサビライシサンゴの配偶子採取・媒精・発生過程の観察を行い、幼生と稚サンゴを生産した。そして、幼生から mRNA 採取 逆転写酵素による cDNA 合成 アダプターの付加 稚サンゴにおける発現遺伝子の取得を行い、total RNA を採取し、そこから mRNA のみを採取した。逆転写酵素により mRNA から cDNA を合成したら、様々な役割を持つアダプターを遺伝子配列の両端につけて、次世代シーケンサー (Macrogen 社) へと送り、サンプルの配列を読み取らせた。幼生の発現遺伝子から、キクメイシとクサビライシにおける骨の形成に関わる遺伝子配列を特定することが出来た。参考までに、クサビライシの galaxin-like 遺伝子を載せる。

```
>|c|comp28834_c0_seq1len=306
path=[986:0-228 170:229-261 713:262-263
715:264-305]
CTTTTAATTTTTACGTGAGCAATGTTACAACCTGATATCA
CACATAAGGTTGTTTGAAGTGCCCAATGCTTGTGTGA
TCAATGAGTTGTAACCTCGCTAACCAACTATTGGTGTACA
AATAGCATACTTTTGAATAACACGACGATAGCAACATTT
GTGGGTCAATGGATTGTAGGTGACTAAACCGCATTTAGG
TCGGCCGAGAGGGAAAGTTTTGGGATGACTTTACCATA
GCAGCACTTGTGGGTCAATGGGTTGTAGGAGACTAAACC
GCATCTGGGTCCGCAGATAGAAAGCTTTGGGAC
```

さらに、当初の目的にあった、遺伝子発現のレベルを調べるという実験だが、例えば、サンゴによる個体差が大きい、朝晩で特定の遺伝子の発現に差が出てしまうといった理由から、定量的・定性的に測定することが難しいということが明らかになった。そこで、全く発想を変えて、サンゴが受精後から稚サンゴになるまで、どのように骨形成を行うかを調べ、その量的な差によって、その海域のストレス測定を行うこととした。

その結果、当初の予想とは異なり、サンゴの幼生期に、既に何らかの形で骨が形成されはじめていることを発見した。現在論文を作成中である。

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 4 件)

1. N. Okubo, A. Onuma, An economic and ecological consideration of commercial coral transplantation to restore the marine ecosystem in Okinawa, Japan. Ecosystem Services, 2014, 11:39-44
2. Y. Zayasu, K. Miyazaki, YT. Lien, N.

Okubo, Direct evidence of sexual reproduction in the zebra coral, *Oulastrea crispata* (Anthozoa, Scleractinia), in Japan. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2014, 1-5

3. 大久保奈弥 サンゴ礁の保全における移植の現状と展望 *環境経済・政策研究*, 2014, 7:54-58
4. N. Okubo, T. Mezaki, Y. Nozawa, Y. Nakano, Y.T. Lien, H. Fukami, D.C. Hayward, E.E. Ball, *Comparative Embryology of Eleven Species of Stony Corals (Scleractinia)*, 2013, *PLoS One* 8(12)

〔学会発表〕(計 2 件)

大久保奈弥

サンゴの移植に関する現状と考察

2014年9月4日 7日

ベントス・プランクトン学会

広島大学

大久保奈弥・目崎拓真・野澤洋耕・YT Lien・

中野義勝・David Hayward・Eldon Ball

イシサンゴ目の発生様式は1種の例外を除いて大きく2つのグループに分かれる

2013年6月8-9日

日本動物分類学会

宮城教育大学

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

大久保 奈弥 (OKUBO, Nami)

東京経済大学・経済学部・准教授

研究者番号: 50401576

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: