

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870563

研究課題名(和文)大量発生予察に向けたオニヒトデ集団の広域受精遺伝子解析

研究課題名(英文) Extensive fertilization gene analysis for the prediction of population outbreak of *Acanthaster planci*

研究代表者

安田 仁奈 (Yasuda, Nina)

宮崎大学・テニュアトラック推進機構・准教授

研究者番号：00617251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：室内実験による受精掛け合わせ実験により、異なる個体間の受精率が、精子濃度によって異なるかどうかについて調べた。その結果、精子濃度が高いほど受精率が低くなるのに対し、別の個体では同一の卵に対して全く逆の傾向を示した。受精に最適な精子濃度が個体ごとに異なることがわかった。

一方、オニヒトデにおいて精子が卵を認識する受精遺伝子Bindinの配列を決定した。オニヒトデのBindin遺伝子は、個体ごとに異なるリピート配列を含み、配列自体にもアミノ酸の置換をともなう変異が個体間で起こっていた。オニヒトデには大量発生時に有利な遺伝子を持つ個体と低密度時に有利な遺伝子を持つ個体がいることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fertilization experiments were carried out in order to examine variability of fertilization success rate depending on different male and different sperm concentration in Okinawa and Miyazaki. While sperm of 4 males showed higher fertilization success rate at higher sperm concentration, other 2 males showed the opposite trend, implying that best sperm concentration for high fertilization success rate is different depending on individuals.

On the other hand, we identified bindin gene sequence of *Acanthaster planci* which is the egg recognized protein on sperm. Bindin gene included repetitive regions whose lengths are different depending on individuals. Besides, those regions have much more nonsynonymous substitutions than other genomic regions.

These data implied some male have genotypes that have advantage in fertilization under outbreak condition while the others have genotypes that have advantage under low population density.

研究分野：海洋分子生態学

キーワード：Bindin 受精遺伝子 オニヒトデ 大量発生

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁生態系は生物多様性が非常に高く、世界人口の2割の食糧を供給する重要な沿岸生態系である。近年、サンゴを食べるオニヒトデが特に西太平洋において頻りに大量発生(1500個体/km²以上)し、サンゴ礁生態系における最大の脅威となっている。オニヒトデの大量発生を効果的に駆除するには、早期モニタリングが重要とされる。しかし、現状では大量発生の原因が不明であるため予察が不可能である。オニヒトデは通常は低密度で生息するが、何十年かに一度、通常の10万倍以上の個体数になる1次大量発生を起こす。その後、大量の幼生が海流によって他海域に伝播する2次大量発生が起こる。すでに、オニヒトデの高度多型遺伝子マーカーにより、インド洋・太平洋広域における2次大量発生の範囲は同定されている[Yasuda et al. 2009]。したがって本研究では、まだ不明点が多い1次大量発生の機構を解明する。オニヒトデはもともと産卵数が多いため、何らかの形で受精率が高く、かつ幼生の生存率が高いと大量発生がおこると考えられている[Birkeland & Lucas 1990]。近年、栄養塩濃度の上昇により幼生生残率が8倍以上となることが示された。しかし時に100万倍以上に増える大量発生現象までは説明できない。1次大量発生が起きるためには、栄養塩濃度の上昇による幼生生残率上昇に加え、非大量発生時のオニヒトデが大量の幼生を生産することが必須[Babcock 1994]だが、野外におけるオニヒトデの受精成功率に関する知見はほとんどない。

近年、オニヒトデと類似した繁殖生態をもち大量発生を繰り返すウニに関して、精子上にある卵を認識する受精関連遺伝子のひとつバインディングのアミノ酸配列が異なることで、精子の受精効率が劇的に変化することが分かり、受精効率の高い受精関連遺伝子の存在がウニの大量発生メカニズムの一因であ

るが示された[Levitan et al. 2012]。すなわち、集団密度の低い時に、受精効率の高い遺伝子を持つ個体の割合が多いと、集団における受精率が高まり、次世代において大量発生が起こりやすいというものである。受精関連遺伝子の集団遺伝構造に関する知見はオニヒトデのみならず、ヒトデ類においてもこれまで全くない。だが、同じ棘皮動物であるオニヒトデに関してもウニと同様に、受精関連遺伝子のアミノ酸配列の違いで生じる受精効率の違いが大量発生機構に関わっている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、サンゴ礁保全にむけたオニヒトデ大量発生の予察ができるようになることを最終目的とする。具体的には、集団における受精関連遺伝子型と大量発生の関連性を解明するべく、そこで本研究では以下の2点を明らかにすることを目的とした。

1) 受精関連遺伝子の網羅的同定: 次世代シーケンサーを用いて精巣及び卵巣、受精卵のcDNAライブラリーを網羅解析し、オニヒトデのバインディングを含む受精関連遺伝子を網羅解析する。

2) 室内実験による受精遺伝子と受精効率・1次大量発生の関係解明: 異なる受精関連遺伝子配列(アミノ酸配列)と受精効率との関係を室内受精実験および野外の非大量発生集団と大量発生集団の遺伝子型を比較することで明らかにする。

3. 研究の方法

1) オニヒトデの受精遺伝子バインディングの同定

産卵期のオニヒトデの卵巣及び受精卵から、受精関連遺伝子のcDNAライブラリーを作成した。

沖縄のオニヒトデは水温28度以上になると産卵ピークに達することを踏まえ、7月に沖縄本島から近い瀬底島から雄のオニヒトデ

を採集した。生殖巣を切り出して 1-メチルアデニンを加え減数分裂を開始させ、精子を回収した。組織からトータル RNA を抽出し、そこからさらに mRNA を抽出してテンプレート RNA を調整した。

抽出したトータル RNA は Roshe454 用に GS FLX + ラピッドライブラリ調整を行い、Roche454 で 40 万リード分の配列を決定し、de novo アセンブルを行った。ウニとヒトデで既存配列のある Bindin に関しては、de novo アセンブルした配列に対して in house BLAST 検索を行い、バインディン全長配列を同定した。その他の受精関連遺伝子に関しては、GenBank でアミノ酸相同配列検索を行い、他生物の受精関連遺伝子との類似性から遺伝子を同定した。またそれぞれの受精関連遺伝子配列上にプライマーを設計し、ゲノム DNA から各遺伝子を簡易増幅できる遺伝子マーカーを開発した。

2) 室内実験による受精率の検証

成熟したオニヒトデを、沖縄県恩納村で 2015 年 7 月 6 日に (雄 6 個体、雌 4 個体)、宮崎県大島では 2015 年 8 月 10 日に (雄 12 個体、雌 2 個体) をそれぞれ大量発生している集団から採集した。受精実験では、精巣・卵巣を解剖によって取り出し、受精可能になるよう 1-メチルアデニンによって処理した。その後、精子は濃度を約 1.0×10^8 個/ml から段階的に 10 倍ずつ 4 段階まで希釈し、卵を入れた容器に添加した。精子濃度は血球計算版を用いてカウントを行い、正確な濃度を算出した。1 個体の雌に対し、3 個体の雄を別々のウェル内で受精させた。繰り返し実験として、卵濃度を変えた実験をそれぞれ 2 回行った。各精子濃度において、受精直後 2 時間以内に受精膜が形成されていた卵の割合 (= 受精率) および 24 時間後に正常発生が進み、元気に泳いでいる幼生の割合 (= 正常発生率) を実体顕微鏡で観察した。なお卵濃度は受精率に影響しないとの報告があったため、本研究では

精子濃度のみを変えて受精率の変化を調べた。

4. 研究成果

1) オニヒトデの受精遺伝子バインディンの同定

トランスクリプトームにより得られたデータにより Bindin のメイン領域の構造を同定することに成功した (図 1)。オニヒトデの Bindin は 3 つのエクソンと 2 つのイントロンから構成されており、第 2 エクソン内にはリピート構造を有していた。このことは Pisaster 属のヒトデで報告のあった Bindin の構造に類似していた。Bindin 領域の全長は構造的な要因により多少の個体差はあるが約 5,500bp であり、第 1 エクソンは約 180bp、第 1 イントロンは 760bp、第 2 エクソンは約 3700bp、第 2 イントロンは 640bp、第 3 エクソンは 190bp であった。

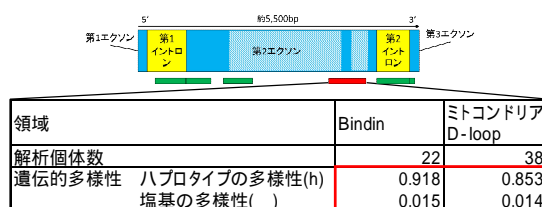


図 1 Bindin のメイン領域の構造と Bindin の遺伝的多様性

Bindin 領域の遺伝的多様性を調べたところ、特にリピート領域を含む領域で多くのアミノ酸の置換を伴う変異が個体間に起きていた。Bindin 領域は、変異速度の速い中立遺伝子であるミトコンドリア遺伝子と比較してもより大きな多型性を持っていた (図 1)。このことから、Bindin は受精において同種を識別するために重要な遺伝子であるにも関わらず、種内に大きな多型性を持つことが明らかとなった。この事実は個体群動態と受精遺伝子に関連があることが知られるウニと類似している。

2) 室内実験による受精率の検証

Bindin 配列の個体内における多型性を踏まえ、実際に個体間において受精率の違いがあるかどうかを調べるために受精実験を行った。沖縄で採集した雄 6 個体のうち、3~4 時間後に受精率を測定した結果、全ての個体において受精率の差は見られなかった。しかし、19 時間後に正常発生率を観察下結果、雄の 2 個体では精子濃度が低くなるにしたがって正常発生率が高くなり、残り 4 個体は精子濃度が高いほど正常発生率が高くなる傾向にあった。

受精率が高かったにも関わらず、正常発生率が低下していた原因は多精受精などによる奇形が原因と考えられた。

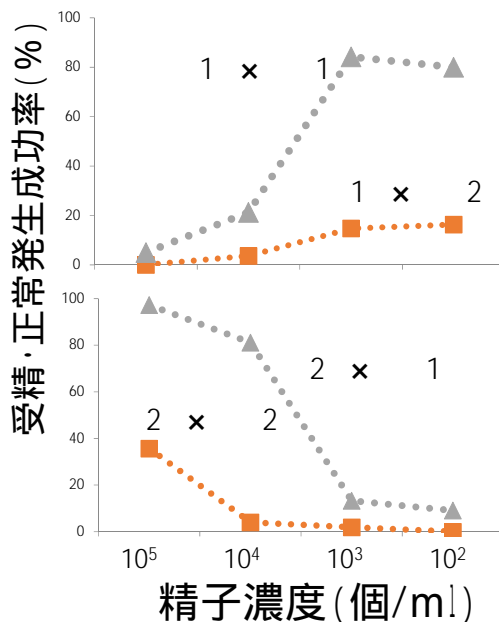


図2 異なる精子濃度において2個体のオスを受精させた時の受精成功率

♂1(上)は精子濃度が低いほど受精率が高く(沖縄の2個体の雄が示した傾向)

♂2(下)は精子濃度が高いほど受精率が高い(沖縄の4個体の雄が示した傾向)

一方、宮崎で採集した雄個体によって得た受精卵は、翌日にすべて死亡してしまったため正常発生率は確認できなかったが、受

精率のカウントはすることが出来た。宮崎で採集した雄 12 個体のうち、8 個体において精子濃度が高いほど受精率が高くなる傾向を持つ個体が見つかった。

また、沖縄で採集した個体について、雌 1 個体と複数の雄個体との受精率の比較を行った結果、異なる雄との組み合わせにおいて受精率が異なった傾向を示した。

宮崎において、翌日死亡してしまった理由については、飼育温度が低く幼生の発生・生存に適さなかったことによるものと考えられた。

本研究の結果により、精子濃度が高いとき(大量発生時になりやすいと考えられる)に優位になる精子をもつ雄個体と、精子濃度が低いとき(平常時に起こりやすいと考えられる)に優位になる精子をもつ雄個体が存在することが示唆された。さらに、雌 1 個体と複数の雄個体とのそれぞれの受精率の比較したところ、組み合わせによっても受精率が異なり、受精相性が存在することが示唆された。

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 1 件)

- 1) Yasuda N, Taquet C, Nagai S, Yoshida T, Adjeroud M. Genetic connectivity of the coral-eating sea star *Acanthaster planci* during the severe outbreak of 2006–2009 in the Society Islands, French Polynesia. *Marine Ecology*. 2014:n/a-n/a. doi: 10.1111/maec.12175 査読有り

[学会発表](計 3 件)

- 1) 湯浅英知, 安田仁奈, 小椋義俊, 林哲, 長井, Christopher Bird, Michael Hart, Rob Toonen オニヒトデの受精関連遺伝子を用いた系統地理解析, 日本サンゴ礁学会 2014 年 11 月

24日 高知大学 (高知県高知市)

2) 東村 幸浩 , 湯淺 英知 , 長井 敏 , 岡地 賢 , **安田 仁奈** オニヒトデにおける精子濃度の受精成功への影響の可能性、日本サンゴ礁学会、2015年11月27日 慶応大学三田キャンパス (東京都港区)

3) Hideaki Yuasa, **Nina Yasuda**, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Dai Yoshimura, Rei Kajitani, Takehiko Ito, Zac Forsman, Niphorn Phongsuwan, Nalinee Thongtham (2016) Preliminary result of whole genome sequencing of *Acanthaster planci* in Japan, Hawaii and Thailand.

13th International Conference of Coral Reefs 、
2016年6月23日、ハワイ (アメリカ)
(発表予定)

[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

安田 仁奈 (YASUDA, NINA)

宮崎大学・テニユアトラック推進機構・准教授

研究者番号 : 00617251