

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14789

研究課題名(和文)造礁サンゴ培養細胞の分裂を促進する藻類成分の探索

研究課題名(英文) Screening of mitogenic algal components for scleractinian coral cells

研究代表者

田口 尚弘 (TAGUCHI, TAKAHIRO)

高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・准教授

研究者番号：80127943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋の生物多様性を支える重要な役割を果たす造礁サンゴの培養細胞の作成を促す藻類成分の探索を試みた。胚の電子顕微鏡観察により、電子密度の高い粒子が集まった領域、油分の多い領域や核が明確に観察される領域が観察され、分離して培養するとそれぞれ壁様構造を持つ細胞、油滴に満ちた細胞や付着細胞になると推測された。付着細胞を用いて藻類抽出液等の分裂促進作用を検討したが、適切なものは見出されなかった。造礁サンゴ胚の採取の機会が毎年1,2回しかないことから、胚の長期保存を試みたところ、20前後に維持した海水中であれば半年以上生存すること、その胚からも付着細胞が分離できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, screening of mitogenic algal components for scleractinian coral cells was performed. By transmission electron microscopy, there were three kinds of regions: with high density particles, with oil rich, and with clear nuclear structure and these will be cells with cell wall, cell with oil droplet, and adhesive cell, respectively. Although many kinds of extracts and reagents have been tested for the mitogenic activities, but no functional extract was found. By long time preservation of coral embryo in filtered sea water, embryo can be kept more than 6 months around 20 degree centigrade and adhesive cells can be separated from the embryo.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：細胞培養 イシサンゴ胚 単離細胞 レクチン 海藻抽出物 分裂誘発物質 上皮性細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋の生物多様性を支える重要な役割を果たす造礁サンゴは、古くから骨格形態等による分類が盛んであり、極めて多様な種の存在が確認されている。近年は DNA 配列に基づく分子分類の進展が著しいが、形態分類との矛盾が顕在化している。分子分類と関連する骨格形態形質の再検索による新たな分類体系の構築が試みられているが (日本サンゴ礁学会誌 2013 他), 生物にとって重要な DNA 配列以外の細胞自体の特徴に関して注目される形質については多くなかった。

(2) 研究代表者らは、造礁サンゴ胚の解像度の高い染色体観察に世界で初めて成功した (Chromosome Sci., 2013)。現在は種間比較を進めており、染色体数が異なること (Zool. Sci., 2014)、蛍光雑種法 (Fluorescence in situ hybridization 法) による遺伝子マッピングにより、特定遺伝子の座位が異なることなどを見出し、骨格形態や DNA 配列以外の新たな分類指標として期待された。

(3) 染色体観察には活発に細胞分裂する組織が不可欠である。胚はこの点で優れているが、年間 1,2 度しか産卵しない、産卵直前の群体に海中で網をかけるなど収集が困難であり、分類指標として活用する上での障壁となっている。増殖の速い培養細胞も染色体観察の候補となるが、1990 年代から続く造礁サンゴの成体組織や胚から細胞分離の挑戦では、培養液中での維持は実現したが、活発に分裂する培養細胞は得られていなかった (「サンゴ礁学」, 2012: Cytotechnol., 2013 他)。そこで、胚からの細胞の分離を試みたところ、サンゴの種類によって、多少細胞の大きさが異なること (図 1A,B)、一部の細胞は分裂する可能性があること (図 1B,C) が明らかとなったものの、すでに報告されているとおりの著しい増殖は認められなかった。

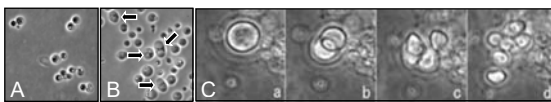


図 1 造礁サンゴ胚から分離した培養細胞

A: ホネガダミドリイシ (受精 22 日後の胚から細胞を分離後 3 日目)。B: アツキクメイシ (受精 18 日後、分離後 3 日目、一部分裂しているように見える細胞がある→)。C: クシハダミドリイシ。8 分割まで観察され、数ヶ月の維持が可能であった

(4) 一方、研究代表者らは藻類の健康機能性成分の分離も手掛け、一部の多糖成分が哺乳類細胞に対してアレルギー抑制やガンの抑制効果を示すことを見出していた (Immunopharmacol., 2013 Microbiol. Immunol., 2013 他)。この効果は、免疫細胞の膜に局在し、自然免疫反応において不可欠な "Toll 様受容体 (TLR)" ファミリータンパク質のうち TLR4 を藻類の多糖が刺激し、転写因子 NF- κ B が活性化される経路で生じることを細胞およびマウスの TLR4 突然変異体を用いた解析により突き止めた。NF- κ B の活性化は、増殖因子

や接着分子等の遺伝子発現を促進する。2011 年に報告された造礁サンゴの全ゲノム配列には、TLR4 を含む 6 種の TLR や NF- κ B の相同遺伝子が見出され、TLR 系の免疫システムの存在が示唆されていた (Nature, 2011)、TLR4 を刺激する成分を添加することにより、造礁サンゴ細胞の増殖が誘発される可能性があった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、造礁サンゴから分離した培養細胞の分裂を促進する藻類成分の探索を目的とする。造礁サンゴは海洋の生物多様性を支える主役であるため保全や増殖などへの関心が高く、その生態や生理の解明が急がれている。生殖、ストレス応答や骨格形成といった造礁サンゴ特有の細胞動態を知るため、20 年以上にわたる培養細胞の樹立への挑戦が行われてきたが、未だに成功事例は報告されていない。研究代表者らは、特定の藻類中に Toll 様受容体-NF κ B 系を活性化する成分を見出した。造礁サンゴのゲノムには、この系に関わる相同遺伝子が含まれており、特定の藻類成分が造礁サンゴ細胞の分裂を促進する可能性が高い。本研究の成果により、生理・生化学的な *In vitro* 解析が可能になり、自然環境への負荷が軽減されると期待された。

3. 研究の方法

(1) 細胞の分離、培養と細胞増殖活性のスクリーニング: 分裂能が高いと予想される受精卵 (胚)、固定基盤への着底直後や組織切断後の再生時等の細胞を培養細胞の分離用の主な材料とした。また、胚の各ステージ、着底直後のプラヌラ幼生および群体を形成するポリプも対象とした。細胞培養用の胚や群体については、高知県幡多郡大月町で採取し、造礁サンゴの小片を海水タンク中で維持しながら、培養施設のある高知県南国市の研究室に持ち帰った。抗真菌剤の入りの抗生物質で処理後、滅菌海水、滅菌海水と一般的に用いられる細胞培養用培地との混合液、哺乳類細胞用の培養液等を用いて培養した。様々な試料 (胚、群体) から分離した細胞の形態、生存期間等の基礎的性質を調べ、生存期間が長く、形質の安定した細胞を分離可能な組織の選別を図った。細胞増殖活性のスクリーニングに用いる抽出液については、以前、哺乳類細胞に対する健康機能性を検証したハバノリやクロメ等の大型藻類やその配偶体、スピルリナ等の微細藻類から得た粗抽出画分を用いた。発がん誘導剤なども含め、種々の粗抽出液を培養液に添加し、細胞増殖活性について検討した。形態について詳細に観察するとともに、増殖の有無について対照 (生理食塩水) 添加の培養細胞と比較した。

(2) 染色体観察: 様々な種の造礁サンゴについて、群体を構成する細胞、刺激物質を添加

した細胞および増殖が認められた細胞について、染色体数や形態の観察を試みた。造礁サンゴに関しては、受精後 12 時間前後が染色体観察に適していることは確認しているが、その他の発生段階について現在まで不明であった。そこで、様々なステージの細胞中の染色体観察を行なうための蛍光雑種法に用いるプローブの作成も試みた。

(3) 胚 (プラヌラ) の長期保存法の検討: 本研究の背景・目的で述べた年間 1,2 度しか産卵しないという特徴は、染色体観察をする場合の障壁になるだけではなく、細胞培養方法の確立を目指した実験機会を制限することにもつながっている。そこで、造礁サンゴが大量に産卵した場合に、プラスチックチューブに胚を分注し、様々な培養温度で胚の長期保存が可能かについて検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞の分離、培養と細胞増殖活性のスクリーニング: 本研究の開始前の予備実験で観察されて数種の造礁サンゴの培養細胞は、細胞壁様構造があるものや油滴が大部分を占めるように見えるものなど、多様な形態を示したが (図 1)、微細構造は不明であった。そこで、細胞壁様構造が認められた細胞の好調処理を行ない細胞壁様構造の存在を確認するとともに、電子顕微鏡で微細構造が観察された (図 2)。この壁様構造を構成する主成分

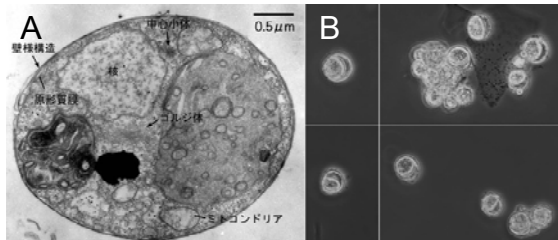


図 2 胚から分離した細胞の微細構造と高張処理
A: 電子顕微鏡像。壁様構造が観察された。B: 高張処理。原形質分離の様子が観察された。

を推測するため、細胞に対する様々な酵素処理を行なった。タンパク質分解酵素については種類によるものの効果を示したが、セルラーゼ処理では細胞壁様構造は、顕著な変化は認められなかった (図 3: G)。

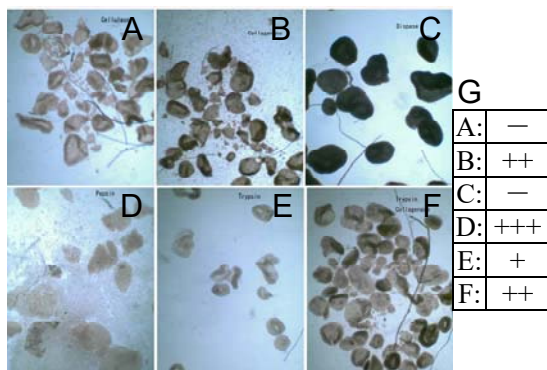


図 3 細胞の酵素処理
A: セルラーゼ, B: コラゲナーゼ, C: ディスパーゼ, D: ペプシン, E: トリプシン, F: トリプシン+コラゲナーゼ, G: 酵素処理効果

一方で細胞壁様構造の認められない細胞についても様々な造礁サンゴから分離されたことから (図 1)、正常に発生している胚の微細構造も観察したところ、細胞内に電子密度の高い構造体が見られる層、核が明確に認められる層、大きな油滴が観察される層に分かれていることが示された。(図 4)。この結果

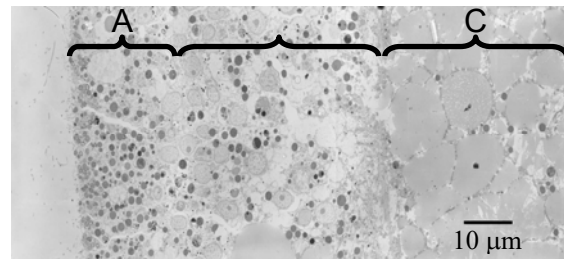


図 4 正常に発生している胚の微細構造
表層 (図左側) から、A: 細胞内に電子密度の高い構造体が見られる層。B: 核が明確に認められる層。C: 大きな油滴が観察される層。

から、図 1 や図 2 で観察された細胞壁様構造を有する細胞は A 層に、油滴を多く含む細胞は C 層に由来する可能性が示唆された。このことは、細胞数は少ないながらも核を明確に有する B 層由来の細胞からも異なる性質を有する培養細胞を分離できる可能性も示していた。そこで、培養時に浮遊性の細胞を除き、付着細胞を探したところ、哺乳類細胞同様の形態を示す細胞も認められた (図 5A)。この

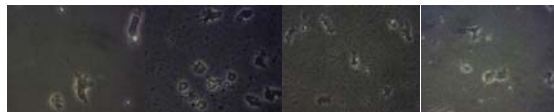


図 5 付着細胞の形態と抽出液の添加効果
A: 対照。B: ハバノリ抽出液添加。C: スピルリナ抽出液添加。D: 今コンカナバリン A 添加

細胞を用いて、藻類粗抽出液や発がん誘導剤の添加効果について検討した (図 5 B-D)。しかしながら、様々な濃度で添加し、1 ヶ月以上培養を継続したものの、顕著な分裂を示すものは認められなかった。

(2) 染色体観察: 特に海中で卵、精子やバンドルを採取する際、単一の種でない可能性がある。したがって、分離した培養細胞の種を同定する必要がある場合が想定される。その際の判断材料の一つとして、染色体の性質も候補として挙げられる。種ごとに染色体を認識する FISH プローブを分離するとともに、性染色体等、網羅的に解析した (表 1)。

表 1 リボソーム DNA プローブ作成,

種	rDNA		hsr*	Y 染色体
	18S & 28S	5S		
エンタクミドリイシ	1, 番 15 番	6 番	-	+
ヒメエタミドリイシ	10 番	5 番	-	+
キッカサンゴ	13 番	未分析	+	-
パルカメノコキクメイシ	11 番	未分析	+	-
ミダレノウサンゴ	12 番	11 番	+	未分析

*hsr: 均一に染色される部位のパターン, rDNA 欄の数字は染色体番号

(3) 胚の長期保存法の検討: 平成 29 年 8 月 20 日に採取したエダミドリイシの受精卵を細胞培養液や濾過滅菌海水中で保持したところ、濾過滅菌海水中のものが培養温度によつ

表2 エダミドリイシのプラヌラ生存数

15°C	18°C	21°C	25°C	37°C
25%	55%	75%	0%	0%

て平成30年3月31日時点でも生存していた(表2)。25°C以上の場合は、全て死滅したものの20°C前後で長期間保持できること、15°Cまで温度が低下すると生存率が減少することが明らかとなった。これらの生存したプラヌラを観察すると、受精後約1週間程度のもものと比較しても、顕著な形態的な差異は認められなかった。また、長期間保存後の細胞から培養細胞の分離を試みたところ、付着細胞が確認された(図6)。

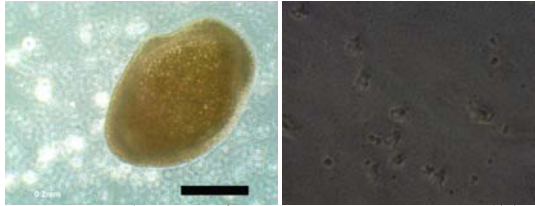


図6 長期保存したエダミドリイシのプラヌラと付着細胞
A: 半年以上維持したエダミドリイシの付着細胞. B: 長期保存したプラヌラから分離した付着細胞

(4) 成果の概要: 本研究で当初目的としていた海藻抽出液による造礁サンゴ細胞の分裂を促す物質は見出すことができなかった。しかしながら、培養細胞の分離において最も有用と思われる胚を安定的に得ることができ、胚の長期保存に適した温度帯が明らかとなった。今後は培養細胞株の樹立について、通年でできることとなった。

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 3件)

- ① Takahiro Taguchi, Erika Tagami, Takuma Mezaki, Satoko Sekida, Yalan Chou, Keryea Soong, Kazuo Okuda, Akira Tominaga, Satoshi Kubota. Recent progress of molecular cytogenetic study on scleractinian (stony) corals. *Kuroshio Science*, 11-1, 73-81 (2017)
- ② Takahiro Taguchi, Satoshi Kubota, Erika Tagami, Takuma Mezaki, Satoko Sekida, Kazuo Okuda, Akira Tominaga. Molecular Cytogenetic Analysis and Isolation of a 5S rRNA-Related Marker in the Scleractinian Coral *Platygyra contorta* Veron 1990 (Hexacorallia, Anthozoa, Cnidaria). *Cytologia*, 82, 2, 205-212 (2017)
- ③ Takahiro Taguchi, Satoshi Kubota, Takuma Mezaki, Erika Tagami, Satoko Sekida, Shu Nakachi, Kazuo Okuda, Akira Tominaga. Identification of homogeneously staining regions by G-banding and chromosome microdissection, and FISH marker selection using human *Alu* sequence primers in a

scleractinian coral *Coelastrea aspera* Verrill, 1866. *Comparative Cytogenetics*, 10, 61-75 (2016)

[学会発表] (計10件)

- ① 造礁サンゴ染色体研究の進展. 田口尚弘, 目崎拓真, 富永明, 久保田賢. 日本サンゴ礁学会第20回大会. 東京, 平成29年11月 (2017).
- ② パリカメノコキクメイシの染色体解析 (G-band, 染色体顕微切片, FISH) およびリボソーム RNA 遺伝子のマッピング. 田口尚弘, 目崎拓真, 富永明, 久保田賢. 一般社団法人染色体学会第68回 (2017年度) 年会. 広島, 平成29年10月 (2017).
- ③ New Approach for Scleractinian Coral Analysis. Satoshi Kubota. Research Proposal Write-shop and RDE Management Forum, Bicol University, Tabaco, Albay, Philippines, Aug. (2017).
- ④ Analysis of stony coral with advanced life science technologies. Satoshi Kubota. Bicol University, Tabaco, Albay, Philippines, Mar. (2017).
- ⑤ 特定のパリカメノコキクメイシ (*Coelastrea aspera*) 染色体を認識する U2 snRNA-5S rRNA プロブの作成. 久保田賢, 田上恵里香, 目崎拓真, 関田諭子, 奥田一雄, 富永明, 田口尚弘. 日本サンゴ礁学会第19回大会. 沖縄, 平成28年12月 (2016).
- ⑥ ミダレノウサングの核型分析と FISH マーカーの分離. 田口尚弘, 久保田賢, 田上恵里香, 目崎拓真, 関田諭子, 奥田一雄, 富永明. 日本サンゴ礁学会第19回大会. 沖縄, 平成28年12月 (2016).
- ⑦ ヒメエダミドリイシの分子細胞遺伝学的研究. 田上恵里香, 田口尚弘, 久保田賢, 目崎拓真, 富永明. 日本サンゴ礁学会第19回大会. 沖縄, 平成28年12月 (2016).
- ⑧ 有藻性イシサンゴ群体および胚における Toll 様受容体タンパク質の発現. 久保田賢, 関田諭子, 目崎拓真, 田口尚弘, 奥田一雄, 小西裕子, 富永明. 日本サンゴ礁学会第18回大会. 東京, 平成27年11月 (2015).
- ⑨ パリカメノコキクメイシの分子細胞遺伝学的研究. 田口尚弘, 久保田賢, 目崎拓真, 田上恵里香, 関田諭子, 奥田一雄, 富永明. 日本サンゴ礁学会第18回大会. 東京, 平成27年11月 (2015).
- ⑩ 2種類のミドリイシサンゴの動原体指標を用いた染色体解析. 田上恵里香, 田口尚弘,

久保田賢, 目崎拓真, 富永明. 日本サンゴ
礁学会第18回大会. 東京, 平成27年11月
(2015).

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

なし

○取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 尚弘 (TAGUCHI Takahiro)

高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学
部門・准教授

研究者番号: 80127943

(2) 研究分担者

久保田 賢 (KUBOTA Satoshi)

高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学
部門・教授

研究者番号: 00314980

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

目崎 拓真 (MEZAKI Takuma)

公益財団法人黒潮生物研究所・主任研究員