

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：36403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05734

研究課題名(和文) ゲノムハイブリダイゼーションによるミドリイシ属イシサンゴの簡便な種判別法の開発

研究課題名(英文) Development of a simplified method for species identification of *Acropora* corals by genomic hybridization

研究代表者

田口 尚弘 (Taguchi, Takahiro)

高知学園大学・健康科学部・教授

研究者番号：80127943

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)： 私たちは、形態観察やDNA解析による分子分類では種判別が困難な場合、分子細胞遺伝学的手法による染色体解析が第3の判別手段として有効である可能性について明らかにしてきた。

本研究では、長期冷凍保存された胚の有用性を確認し、ゲノムハイブリダイゼーション法によるクシハダミドリイシとスギノキミドリイシまたはエンタクミドリイシの差の検出を試みた。保存胚については、3年から4年の保存後も、染色体像の鮮明さや、その長さなどの品質が保たれており、解析において全く問題ないことが示された。比較したそれぞれの2種の染色像において、繰り返し配列に起因すると思われる種間差を示すシグナルが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な生物の生息場所を提供するサンゴ礁を形成する造礁性サンゴは、世界中で約800種に上る多様性を示す。その分類には、形態分類やDNA配列分子が用いられているが、種数が多く、広く観察されるミドリイシ属サンゴについては、水流や日照の強さなどの環境により、著しく異なる形状を示し、種同定を困難にしている。この属のサンゴは、環境保全目的の移植に高頻度で用いられるなど注目度が高いが、無計画な移植活動が取り返しのつかない遺伝的かく乱を招くとの指摘も多い。

本研究でゲノムハイブリダイゼーション法の有効性が示されたことから、より効果的な保全手法への改善が期待される。

研究成果の概要(英文)： We have been clarifying the possibility that chromosome analysis by molecular cytogenetics may be effective as a third means of discrimination when molecular classification by morphological observation and DNA analysis makes it difficult to discriminate species.

In this study, we confirmed the usefulness of long-term cryopreserved embryos and attempted to detect differences between *Acropora hyacinthus* and either *A. muricata* or *A. sp. Entaku* by genomic hybridization. The quality of the preserved embryos, such as the clarity and length of the chromosome images, was maintained after 3 to 4 years of preservation, indicating no problems in the analysis. In each of the two stained images compared, signals indicating interspecific differences, possibly due to repetitive sequences, were detected.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：FISH

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な生物の生息域を提供するサンゴ礁を形成する造礁性サンゴは、世界中で約 800 種に上る多様性を示す(環境省, 日本のサンゴ礁, 2004)。古典的な形態分類に代わり, 1990 年代後半からは DNA 配列データの蓄積による分子分類の報告が激増した。しかしながら, 骨格形態の観察なしに安易な種同定を行う調査者や研究者が増え, 誤った種同定が横行した(深見, 日本サンゴ礁学会総説, 2010)。従来の, 図鑑や同定ガイドとの安易な組み合わせで種同定を行うことの問題点を克服し, 種同定を行う際に注目・観察すべき生時の様子や骨格形態に加え, 分子系統学的研究の進展に伴う多くの分類群の学名や分類学的位置の変更を周知する目的で造礁性サンゴの新しい Web 図鑑が公表されたが(国立環境研究所生物・生態系環境研究センター, 日本の有藻性造礁性サンゴ, 2015), 掲載された全 173 種のうち約半数について「要再検討項目」と記載されており, 造礁性サンゴの種は現在も頻繁に変更され続けている。

(2) ミドリイシ属サンゴは, 熱帯, 亜熱帯および温帯の造礁性サンゴの中で最も種数が多いグループを形成しており(世界で約 150 種), サンゴ礁生態系の基盤構成生物として極めて重要な役割を果たしている。上述の新しい Web 図鑑では, 種子島で確認された約 30 種類が記載されているが, 全体を上回る約 2/3 の種で「要再検討項目」とされている。その一因として, 塩基配列による分子分類により同種とされた場合でも, 水流や日照の強さなどの環境により, 著しく異なる形状を示す場合が少なくないことが挙げられる。

(3) ミドリイシ属サンゴは, 環境保全目的の移植に高頻度で用いられる。市民への啓発には有用である一方, 無計画な移植活動が取り返しのつかない遺伝的かく乱を招くとの指摘も多く, 2004 年には日本サンゴ礁学会により「移植に関するガイドライン」が公表された。そこでは「遺伝的攪乱に最大限注意する」ことが勧められているものの, 種の同定が困難であるためそれをコントロールする具体的な方策はなく, 簡便な種の判別方法の開発が急務である(日本サンゴ礁学会サンゴ礁保全委員会, 2008)。

(4) 申請者らは, 生息環境の違いによる種内変動が同定を困難にする形態分類とゲノム全体のわずか 0.0001%しか解析対象としない分子分類の各々の欠点を補う第 3 の分類指標として, 染色体解析の有用性の立証を試み, プローブの選択により, 多彩な染色体解析パターンを示すことに成功した。これらの研究成果から, 申請者はこの手法が上述の簡便な種の判別方法の開発に応用できると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) ミドリイシ属サンゴの簡便な種の判別方法の開発において想定される問題点のうち, 最大の課題はミドリイシ種間の類似性の高さである。申請者らは FISH 法の一種である「ゲノムハイブリダイゼーション」の適用が種間特異性の高いプローブ開発に有効であると考えた。この手法では等量の「2つのゲノム間の差異」をプローブとする。この場合の差異は「性差(性染色体)」であり明確なシグナルが観察される。この応用として基準種のミドリイシ属サンゴと未知種の蛍光プローブ, 染色体標本 3 者の組合せにより, 基準種のゲノムから調製したプローブの蛍光のみが観察される部位として, その「差異(主に種間)」が検出できると期待される。

(2) この手法のもう一つの利点として, 染色体観察用の標本作製に必要な胚が未知種については分析時に不要なことが挙げられる。造礁性サンゴの分子細胞遺伝学的研究においては, 産卵期にバンドルを採取し, それを壊して受精させ, 細胞分裂が盛んな発生時期の胚の採取が必要である。問題点としては, 採取のチャンスが毎年 1 回もしくは 2 回しかなく, 天候によりしばしばその貴重な機会も失われてしまい, 試料が採取できないということが挙げられる。その他, 観察に最適な(染色体の多い)M 期の細胞を生じる受精後の最適な発生ステージの特定を種ごとに行なう必要があること, 多量に作製した染色体標本の長期保存条件のデータがないことや現場での応用を考慮した高価な蛍光顕微鏡の代替法の開発など, 様々な課題が残されている。本研究では, 分子細胞遺伝学的研究における長期冷凍保存された胚の有用性とそれをゲノムハイブリダイゼーション法によるミドリイシ属間の差の検出可能性について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究で使用したミドリイシ属サンゴを, 高知県幡多郡大月町西泊や徳島県海部郡海陽町で採集した。2007 年からの再冷凍保存胚に加え, 2021 年および 2022 年にも採取した。2023 年は, 天候不順のため, 産卵が予想されたすべての時期に試料採取ができなかった。この期間に高知県幡多郡大月町西泊や徳島県海部郡海陽町で採集されたミドリイシ属 11 種の胚および精子を使用した(表)。

異なる 2 つの群体から卵と精子を内包するバ

表 有効性を確認した胚

種名	採取期間	試料数
クシハタミドリイシ	2013-2022	17
スギノキミドリイシ	2014-2021	9
ヒメエタミドリイシ	2012-2016	5
ニホンミドリイシ	2010-2019	3
エンタクミドリイシ	2007-2016	14
コユビミドリイシ	2016-2018	3
ウスエタミドリイシ	2018	1
エタミドリイシ	2017-2020	8
ホソエタミドリイシ	2013	1
ミドリイシ	2013-2020	6
ヤスリミドリイシ	2021	1

種名は採取時のものを記載(一部後年分類変更)

ンドルを採集した。それぞれのバンドルを濾過海水の入ったピーカーに移した後に、穏やかにかき混ぜることでバンドルを破壊し人工授精を行った。全ての卵が受精するまで 30 分間静置した。静置している間にピーカーの底付近で観察された精子を含む白濁液 15 ml を 50 ml チューブに回収し、100%エタノールを 50 ml まで加えて固定した。受精卵は濾過海水で数度洗浄し、12 時間室温で培養することで胚まで発生させた。胚からは染色体標本作製し、精子からは DNA 抽出を行った。

(2) 少量の胚を濾過海水とともに、15 ml チューブにし、コルヒチンを添加し、胚が壊れないように穏やかにかき混ぜ、静置後に蒸留水を加えて膨潤させた。その後数回のカルノア溶液(酢酸:メタノール=1:3)処理で固定した。ジエチルエーテルを用いて脱脂し、再びカルノア溶液に浸し、胚を-20℃で保管した。

(3) 固定した 30 個程度の胚をチューブに移し、細胞を分離させるために細かく破壊し、カルノア溶液で洗浄後、スライドグラスに滴下して乾燥させて、スライド標本作製した。

(4) 基準染色体標本作成のために、観察に適した胚の選択を行なった。表 1 に記載した各試料について、観察される染色体像の質と冷凍保存された胚の量の観点でスクリーニングを行なった。Comparative Genomic Hybridization (CGH) で観察されるシグナルは、染色体の長さが短すぎるとシグナルが圧縮されてしまい正しく観察できない可能性がある一方で、染色体の長さが長すぎると染色体同士の重なりが増えるため分析が困難になる。そのため、染色体像の長さが CGH を行うのに適してかどうかを基に 4 段階で各染色体像を評価した。さらに、多くの群体試料を用いてスクリーニングをするために、十分な試料量が必要なため、調製できた胚の量が少ないものを排除し、基準染色体標本として使用した。

(5) 精子および群体から、Protein precipitation solution (プロメガ社)を用いて、DNA を調製し、2 種のゲノムを別の蛍光物質で標識してプローブとして用いる CGH に用いた。

(6) CGH 用スライド標本は、変性溶液 (70%ホルムアミド/2×SSC) への浸漬に続き、4℃に冷却した 70%、90%および 100%エタノールへ連続的に 2 分ずつ浸し、室温で乾燥させて作製した。Hybridization solution (SIGMA) に Cyanine3(Cy3)で標識したプローブ(赤色シグナル)と Digoxigenin (DIG)で標識したプローブ(緑色シグナル)を等量加え、染色体標本上に全量乗せてカバーグラスで封入して 37℃一晩静置した。42℃での洗浄溶液 (50%ホルムアミド/2×SSC) に浸漬後、2×SSC 溶液で洗浄し、最終的に PBD 溶液 (4×SSC/0.05%Tween 20) に浸漬した。染色体標本に緑色蛍光色素を結合した Anti-DIG-FITC 溶液を一滴滴下して 30 分間程度静置した。Vector shield (Vector Laboratories) を滴下しカバーグラスで封入した。

(7) 染色体標本は蛍光顕微鏡 (Olympus DP70)を用いて観察した。染色体像は cellSense Standard (Olympus) で、Cy3 で標識したプローブのシグナルと DIG で標識したプローブのシグナルをそれぞれ撮影し、観察した後に、ソフトウェア上で 2 つシグナルを合成した。撮影した画像は Photoshop (Adobe) で色彩の調整を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 染色体像の観察像により冷凍保存した胚のスクリーニングを行った結果、2019 年 7 月 24 日に固定されたクシハダミドリイシ (*Acropora hyacinthus*) の胚と 2021 年 8 月 30 日に固定されたヤスリミドリイシ (*Acropora robust*) の染色体像が CGH での観察に適していた。量の観点では 2019 年 7 月 24 日に固定されたクシハダミドリイシの胚、2019 年 7 月 31 日と 2020 年 8 月 19 日に固定されたエダミドリイシ (*Acropora tumida*) の胚が、豊富に胚が冷凍保存してあった。この 2 つの観点をどちらも満たしていたのは、2019 年 7 月 24 日に固定されたクシハダの胚のみであったため、本研究では、このクシハダの胚から得られる染色体像を基準染色体標本とした。また、比較種としてスギノキミドリイシ (*Acropora muricata*) とエンタクミドリイシ (*Acropora sp. ENTAKU*) (以下エンタク) を選択した。

(2) この結果から、これまでに冷凍保存された胚も染色体標本として使用できることが明らかになった。このことから、産卵にほとんど依存することなく染色体標本作製することが可能になった。しかしながら、比較的きれいな染色体像が観察された試料は 2019 年以降に採取されたものであることから、概ね 5 年を超えると保存中に劣化している可能性が示唆された。以上の結果から、冷凍保存された胚を用いることで、これまでの方法では困難であった種間の染色体の比較を行うことなどが期待される。

(3) 基準染色体標本に対してクシハダミドリイシ (赤色) およびスギノキミドリイシ (緑色) プローブで CGH を行なった結果、全ての染色体の動原体で黄色のシグナルが観察された。観察が予想された種間差を示す赤色のシグナルは観察されなかったが、観察した約 20%の細

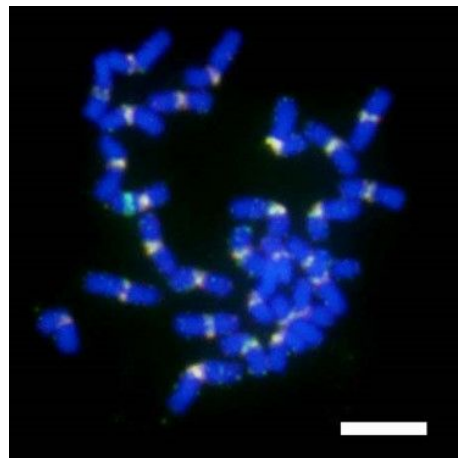


図 1 基準染色体標本に対するクシハダミドリイシ (赤色) およびスギノキミドリイシ (緑色) プローブの CGH 像

胞で、一本の染色体の長腕の中央付近のみで緑色のシグナルが観察された。

(4) 基準染色体標本に対してクシハダミドリイシ（赤色）およびエンタクミドリイシ（緑色）プローブで CGH を行なった結果、スギノキミドリイシとの組み合わせ時と同様に、全ての染色体の動原体で黄色のシグナルが観察されたとともに、観察した約 20%の細胞で、一本の染色体の長腕の中央付近でエンタクプローブ（緑色）のシグナルが観察された（図 1）。

(5) 基準染色体標本上に対して 4 群体のクシハダミドリイシからそれぞれ得られた 4 つのクシハダミドリイシ群体プローブ（赤色）と精子から得たエンタクミドリイシプローブ（緑色）で CGH を行った結果、4 つ全ての組み合わせで、全ての染色体の動原体で黄色のシグナルが観察された（図 2）。観察が予想されたクシハダミドリイシ群体プローブ（赤色）のシグナルは観察されなかったが、観察した約 20%の細胞で、一本の染色体の長腕の中央付近でエンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルが観察された（図 1）。

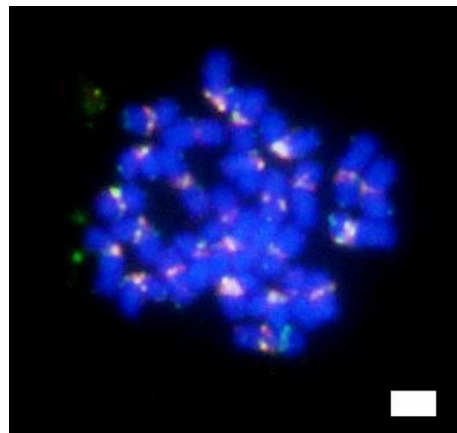


図 2 基準染色体標本に対するクシハダミドリイシ群体（赤色）およびエンタクミドリイシ精子（緑色）プローブの CGH 像

(6) 本研究では、基準染色体標本で予想していなかったエンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルが一本の染色体でのみ観察された。ゲノム DNA プローブにすることで、繰り返し配列がある場所でシグナルが観察されることが知られている（Taguchi et al, 2017）。全ての染色体の動原体で観察された黄色のシグナルについては、両者のプローブが等量結合している時に観察されることから、動原体に存在する繰り返し配列は 2 種の間で似ていることが推測される。エンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルが観察された繰り返し配列についても、どちらのシグナルも観察されているためことから、この繰り返し配列も 2 種間で似ていることが予想される。しかし、エンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルの方が非常に強く観察されたことから、そのコピー数はエンタクミドリイシの方が多き可能性がある。また、比較染色体標本で、クシハダミドリイシ（赤色）とエンタクミドリイシ（緑色）プローブで CGH を行ったところ、観察した一部の細胞の一本の染色体でエンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルが観察された。そのエンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルについても、どちらのシグナルも観察されているが、エンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルの方が非常に強く観察された。これらのことから、このエンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルが観察された繰り返し配列は、2 種間で似ているが、そのコピー数についてはエンタクミドリイシの方が非常に多いことが示唆された。

(7) 一本の染色体でのみエンタクミドリイシプローブ（緑色）のシグナルが観察されたことについては、CGH でシグナルが検出されない程コピー数の少ない繰り返し配列が、重複などが相同染色体の片方でのみコピー数が増加した結果と予想され、種の特徴である可能性が示された。

#### < 引用文献 >

環境省．日本のサンゴ礁，総ページ数 370，2004

国立環境研究所生物・生態系環境研究センター．日本の有藻性造礁性サンゴ，2015

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 巻, 2017, 73-81

日本サンゴ礁学会サンゴ礁保全委員会．造礁サンゴ移植の現状と課題，10 巻，2008，73-84

深見 裕伸，立川 浩之，鈴木 豪，永田 俊輔，杉原 薫．日本における造礁性イシサンゴ類の同定の現状とその分類学的問題点，*日本サンゴ礁学会*，12 巻，2010，17-31



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rei Kawakami, Takahiro Taguchi, Joshua Vacarizas, Masumi Ito, Takuma Mezaki, Akira Tominaga, Satoshi Kubota	4. 巻 16
2. 論文標題 Karyotypic analysis and isolation of four DNA markers of the scleractinian coral <i>Favites pentagona</i> (Esper, 1795) (Scleractinia, Anthozoa, Cnidaria)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Comparative Cytogenetics	6. 最初と最後の頁 77-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/compcytogen.v16.i1.79953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Vacarizas Joshua, Taguchi Takahiro, Mezaki Takuma, Manalili Sam Edward, Kawakami Rei, Kubota Satoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Cytogenetic evidence and dmrt linkage indicate male heterogamety in a non-bilaterian animal	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0285851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0285851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Joshua Vacarizas, Sam Edward Manalili, Takuma Mezaki, Takahiro Taguchi and Satoshi Kubota	4. 巻 1
2. 論文標題 Studies on Coral Diversity and Biology Using Emerging Cytogenetic and Molecular Approaches	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Interdisciplinary Studies for Integrated Coastal Zone Management in the Region along the Kuroshio: Problem-Based Approach by Kuroshio Science (書籍)	6. 最初と最後の頁 151-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Joshua Vacarizas, Takahiro Taguchi, Takuma Mezaki, Rei Kawakami, Satoshi Kubota
2. 発表標題 Coral chromosome variations and their potential sexual characteristics using molecular cytogenetic analysis
3. 学会等名 第14回黒潮圏科学国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 玲, 田口 尚弘, 目崎 拓真, Joshua Vacarizas, 伊藤 真澄, 久保田 賢
2. 発表標題 ゴカクキクメイシ染色体における新たなFISH マーカーの開発
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第24回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Joshua Vacarizas, Takahiro Taguchi, Takuma Mezaki, Sam Edward Manalili, Satoshi Kubota
2. 発表標題 Molecular cytogenetic analysis of seven Acropora species reveals chromosome number variations and polyploidy formation
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第24回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Joshua VACARIZAS, Takahiro TAGUCHI, Takuma MEZAKI, Sam Edward MANALILI, Rei KAWAKAMI, Satoshi KUBOTA
2. 発表標題 Identification of sex chromosomes in gonochoric stony coral reveals XX/XY sex-determination system
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会 第25回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上 玲, 田口 尚弘, 目崎 拓真, Joshua Vacarizas, 久保田 賢
2. 発表標題 CGH法を用いた染色体観察によるゲノムDNA間の相違の検出
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第25回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口尚弘, 伊藤真澄, 川上玲, Joshua VACARIZAS, 目崎拓真, 久保田賢
2. 発表標題 アマクサオトゲキクメイシの染色体マッピング
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第25回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rei Kawakami, Takahiro Taguchi, Takuma Mezaki, Joshua Vacarizas and Satoshi Kubota
2. 発表標題 Possible interspecies differences of repetitive sequences number in specific regions of the Acropora genome
3. 学会等名 第15回黒潮圏科学国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口 尚弘, 齋藤 滉海, 川上 玲, 目崎 拓真, 久保田 賢
2. 発表標題 クシハダミドリイシの分子細胞遺伝学的研究
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会 第26回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	久保田 賢	高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・教授	
	(Kubota Satoshi)		
	(00314980)	(16401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	目崎 拓真  (Mezaki Takuma)  (20840482)	公益財団法人黒潮生物研究所・研究部局・研究所長    (86404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関