

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14032

研究課題名（和文）イシサンゴの概日リズムから読み解く成長線形成メカニズム

研究課題名（英文）Are symbiotic relationships with zooxanthellae recorded in coral fossils?

研究代表者

千徳 明日香（SENTOKU, ASUKA）

琉球大学・理学部・助教

研究者番号：00722802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、無藻性単体イシサンゴのセンスガイ科サンゴの2属3種14個体の軟体部の挙動をモニタリングし、生体の概日リズムを明らかにするため、飼育実験を行った。

軟体部の挙動をカイ2条ピリオドグラム解析した結果、LD・DDのいずれの個体でも、おおよそ24時間の概日リズムが見られた。骨格成長様式の分析においては、隔壁は同心円状に弧を描くように成長しているがそれらは均一ではなく、スポット的に起こっているなど、深海性サンゴの一日単位の具体的な石灰化部位が明らかとなった。今回の軟体部の挙動実験で認められた内因性の自律振動が、骨格形成の周期性に直接的に関連している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古生物学・鉱物結晶学的な視点だけでなく、それらと独立的に行われてきた分子生物学、時間生物学、細胞学などの方法論を取り入れた無藻性サンゴの体系的な研究によって、細胞活動の概日リズムに相当する短時間スケールの「石灰化プロセス」とそれらの「周期構造形成様式」の解明し、サンゴ骨格のバイオミネラリゼーションと古環境指標の新たな意義を提示する。

研究成果の概要（英文）：In this study, I monitored the behavior of the soft body parts of 14 individuals of two genera and three species of the asexual solitary coral family Flabellidae, and conducted rearing experiments to clarify the circadian rhythms of the organisms. Chi-2 periodogram analysis of soft parts behavior revealed an approximate 24-hour circadian rhythm in both LD and DD individuals. Analysis of skeletal growth patterns revealed specific daily calcification sites in deep-sea corals, such as concentric arcs of septal growth, which were not uniform, but occurred in spots. It is possible that the endogenous autonomous oscillations observed in this soft-body behavior experiment are directly related to the periodicity of skeletal development.

研究分野：進化古生物

キーワード：無藻性イシサンゴ 概日リズム ライブイメージング バイオミネラリゼーション 炭酸カルシウム

1. 研究開始当初の背景

生物は地球の日周運動や公転運動に伴い、日や年といった単位の周期的な環境変動に影響を受けつつ生命を維持している。特に有殻生物の場合、それらの周期性は、成長線に代表される『骨格周期構造』に顕著に表出すると考えられてきた (Risk & Pearce, 1992)。代表的な炭酸塩骨格生物である造礁性(有藻性)サンゴでは、成長線とサンゴ骨格中に取り込まれた微量元素や同位体変動パターンを相互的に読み取ることで、長期の気候変動や海洋環境変動の再構築を可能としている (e.g., Smith et al., 1979; Hathorne et al., 2011)。特に、分析装置の発展とともに、「炭酸塩骨格の構造解析や化学分析」を、超空間分解能 ($\mu\text{m} \sim \text{nm}$ スケール)で行えるようになり、サンゴ骨格中に日輪に相当する短周期の成長線が存在することが明らかとなってきた (Domart-Coulon et al., 2014)。このような微小スケールで認められる短周期構造は、浅海域で大きく変動する1日単位の水温や日射量などを記録している可能性が高く、超高精度の古環境復元に大きな寄与をもたらすと考えられる。その一方で、微小な骨格周期構造は、年輪といった長周期の構造に比較し、短時間スケールで周期的に発現する生物の内因的な細胞生理現象をより強く反映していると予想される。従って、このような骨格構造から環境情報のみを正確に抽出するためには、石灰化時の細胞現象の理解が不可欠である。しかし従来の研究のほとんどは、共生藻の光合成活動量と骨格形成が密接に関連する造礁性サンゴが用いられてきており、サンゴの内因的な骨格形成過程のみを抽出・解析するのが難しく、細胞生理現象の周期性が如何に成長線の形成に影響を与えるのかは全く分かっていない。その中で、近年になり、造礁性サンゴの日輪に相当するような骨格短周期構造が、共生藻を持たない「深海に生息する非造礁性(無藻性)サンゴ」にも形成されていることが明らかとなってきた (Janiszewska et al., 2010; Tokuda & Ezaki, 2020)。これらは、1日の環境変動が極めて小さい深海環境に生息しており、短周期の成長線形成(図1)に内因的な細胞生理現象の周期性が直接的に影響を与えていると予想される。そこで、本研究では、無藻性サンゴに着目し石灰化時の細胞現象の周期性が如何に骨格の短周期構造を形成するのかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、これまで注目されてこなかった無藻性サンゴの生体と骨格を用いた学際的研究によりサンゴ骨格中に、概日リズム、概日時計遺伝子、石灰化過程によって裏付けられた、正確な「1日刻みの目盛り」をサンゴ骨格に設定することを目的とする。これにより、骨格構造と各時間リズムとの正確な対応関係を明らかにし、極微小領域での「アラゴナイト結晶構造の仕組み」、「化学組成の不均質性」、「石灰化の分子機構、有機基質の役割」を考慮した「生体鉱化作用の解明」を目指す。本研究は日輪といった微小スケールの成長線が、実は石灰化における造骨細胞などの日周活動と対応可能であることに注目し、微細な骨格構造から骨格形成時の細胞活動履歴を読み解く点に高い独自性がある。さらには、従来の化石を用いた古環境解析と本研究成果を組み合わせることで、温暖化や酸性化など、様々な海洋環境変動に伴う、サンゴ自身の生物学的応答を過去に遡って理解できる可能性が高い。これにより初めて、環境変動への生物の適応を地質学的時間スケールで詳細に理解することができる。さらに骨格構造と各時間リズムとの正確

な対応関係や、その原理や方法論は、サンゴ以外での「石灰化プロセス」にも適用可能であり、それらの形態形成の基本となる骨格の構造的・発生学的な知見は、骨格生物の「形づくりの仕組み」の解明に直結している。このように、本研究が遂行されれば、地質学と生物学が有機的に融合した学際的分野である地球生命科学の飛躍的な発展につながると考えられる

3. 研究の方法

本研究では、無藻性イシサンゴのセンスガイ科(単体性)やキシサンゴ科(群体性)を検討試料として、(1)超空間分解能の骨格構造解析(古生物学・鉱物学)、(2)概日リズムの検証(時間生物学)、(3)骨格形成遺伝子のクローニング・発現パターンの解析(分子生物学)、(4)発生・石灰化プロセス(細胞生物学)などの諸データを統合し、体系的な骨格成長線解析手法を確立する。

(1) 超空間分解能の骨格構造解析(古生物学・鉱物学)

成長軸とそれに直交する断面で、「骨格内部構造」を走査型電子顕微鏡によりアラゴナイト結晶の構造を詳細に分析し、サンゴ骨格の基本要素である「粒状結晶と繊維状結晶の存在様式(大きさ、分布パターン)」を理解する。その上で、「成長線のパターン解析(本数・強弱)」を行い(mm~ μ m スケール)、さらにウェーブレット解析等を用いて、成長線形成の日・月・年周期を解析する。また、飼育生体については、1日・1月単位で通常の2倍の濃度のSrが含有された海水により骨格の標識を行い、nano-SIMS(高知コアセンター)を用いて、成長線形成速度を求める。

(2) 概日リズムの検証(時間生物学)

濾過海水を一定温度(13℃)、暗黒(赤外線照射)の恒常条件下でサンゴを飼育する。そして、「ポリプの膨縮の周期」を、高感度 CCD カメラ(本申請備品)を用い長期間にわたって撮影、記録する。次に一定温度、明暗のサイクルを与えて、ポリプの状態を記録する。上記と同様の分析を行い、周期性の同調に光が関与するかどうかを調べる。「概日リズムにおける自由継続周期」や「環境に同調した日周性」といった、ポリプの膨縮における「時間的な要素」を解析する。

(3) 遺伝子発現の周期性解析(分子生物学的手法)

骨格形成に関与する遺伝子のクローニングを行う。骨格形成に関与する遺伝子として「炭酸脱水酵素」、サンゴ骨格中に存在が確認されている「ガラクシン」、概日リズムをもたらす「概日時計遺伝子(cry1,2 など)」に着目する。また、一斉放卵に関与すると考えられる光受容分子「クリプトクロム」(Levy et al., 2007)にも着目する。次に「造骨細胞を含む組織片を数時間おきに採集」し、RNA を抽出し(一定温度・明暗サイクル下/一定温度・暗黒条件下)、「リアルタイム PCR 装置」を用いて上記「各遺伝子の発現パターン」から、これらの分子が周期的に発現しているかどうか解析し、時間情報の分子的な背景を検討する。これにより「遺伝子発現」と「骨格形成」ならびに「リズム解析」との対応関係を明らかにする。

(4) 発生・石灰化プロセス解析(細胞生物学)

イシサンゴの石灰化時の細胞内小器官(ミトコンドリアおよび細胞内骨格)と細胞内のストロンチウム、マグネシウムの局在、pH の分布を共焦点レーザー顕微鏡(琉球大学)を用いて観察する。サンゴは石灰化時のどのタイミングでストロンチウムを取り込み、pH を変化させるのかを観察し、細胞生物学的に石灰化過程を解明する。さらに、骨

格サンプルや生体試料で薄片及び未固定非脱灰凍結切片を作成し、骨格と軟体部の相互関係や各時計遺伝子の発現パターンと骨格形成（周期性・成長線）の対応関係を明らかにする。

（５）無藻性イシサンゴの骨格形成様式及び形態多様化の時空間解析

「遺伝子の発現」、「リズムの発振機構」、「石灰化過程」の解析結果をもとに、骨格中に記録された「１日～１年単位の目盛り」を設定し、骨格構造と各時間リズムとの正確な対応関係や、極微小領域での「アラゴナイト結晶構造の仕組み」、「化学組成の不均質性」、「石灰化の分子機構、有機基質の役割」を考慮した「生体鉱化作用の解明」を試みる。

４．研究成果

本研究で使用したサンプルは、鹿児島県本土近海のヒゲナガエビ漁などの底引き網で混獲された無藻性単体イシサンゴのセンスガイ科 *Flabellum (Ulocyathus) deludens*（１個体）、*Flabellum (Ulocyathus) japonicum*（５個体）、*Flabellum (Flabellum) magnificum*（８個体）である（図１）。まず、軟体部の挙動をモニタリングし、生体の概日リズムを明らかにするため、飼育実験を行った（表１）。実験は１２時間毎にライトを点灯した状態とライトを点灯しない状態（LD）と、ライトを点灯しない状態（DD）の環境を人工的に作り出した。撮影のため、赤外線ライトを常時点灯した。赤外線を撮影できるようにしたカメラを用いて１０分間隔で写真を撮影し、得られた写真を画像解析ソフト ImageJ を用いて計測、ActogramJ を用いてカイ２条ピリオイドグラム解析を行った。さらに、骨格部分の実験では、蛍光物質（カルセイン）とストロンチウムを海水に溶解し、この海水でサンゴを１日間飼育した（表１）。石灰化マーカーを取り込ませた骨格の成長様式の観察のため、サンプルを固定し、骨格を切断・樹脂包埋し、必要に応じて蛍光実体顕微鏡や SEM・EDS を用いて観察を行った。

軟体部の挙動をカイ２条ピリオイドグラム解析した結果、LD・DD のいずれの個体でも、おおよそ２４時間の概日リズムが見られた。実験や個体によっては、約１２時間ほどの周期を示すものや、約３０時間の周期を示すものもあった（表２）。骨格成長様式の分析においては、カルセイン海水で１日間飼育した個体の骨格表面では軟体部がついている骨格部分に沿って帯状に蛍光がみられ、隔壁の断面では骨格壁側に近い内側が局所的に蛍光し、側面では層状に発光しており、一日単位での石灰化部位が確認された（図２）。さらに、SEM EDS による観察結果、ストロンチウムが骨格全体にほぼ一様に取り込まれていることが確認された。

飼育実験の結果より、*Flabellum (Ulocyathus) japonicum* と *Flabellum (Flabellum) magnificum* は光を感じ取り約２４時間のリズムを持ち、このリズムは光のない状態でも保たれる。すなわち、体内時計（概日リズム）によって軟体部の挙動リズムが保たれていることから、内因性の自律振動と考えられる。約１２時間のリズムに関しては、約２４時間の１／２倍の周期である。このことから、これは本来の周期ではなく、本来の周期の整数分の１、整数倍で現れる可能性のある周期である、ハーモニクスの可能性がある。約１０時間、約３０時間で現れる周期に関しては、ヒトで体内時計の周期に個人差が見られるように（Hida et al., 2020）、サンゴでも体内時計の周期に個体差がみられる可能性が示唆される。

蛍光実体顕微鏡での観察結果では、隔壁は同心円状に弧を描くように成長しているがそれらは均一ではなく、スポット的に起こっているなど、深海性サンゴの一日単位の具体的

な石灰化部位が明らかとなった．今回の軟体部の拳動実験で認められた内因性の自律振動が，骨格形成の周期性に直接的に関与している可能性がある．

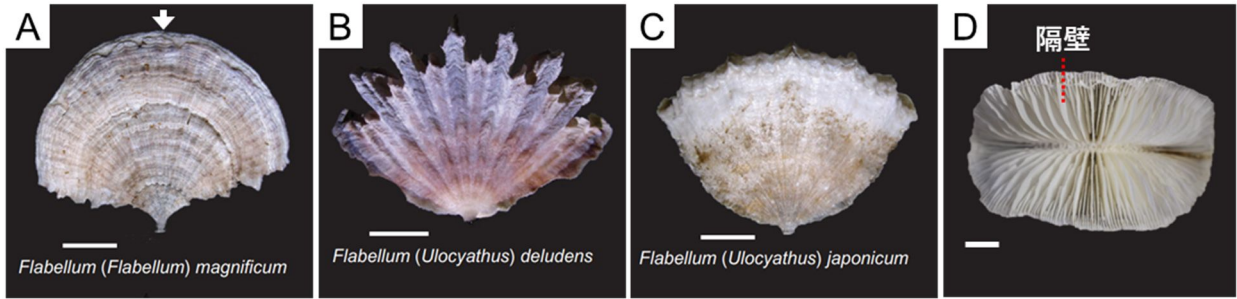


図1. 研究試料. A, *Flabellum (Flabellum) magnificentum*. 矢印はDの撮影方向を示す. B, *F. (Ulocyathus) deludens*. C, *F. (Ulocyathus) japonicum*. D, 口方向 (Aの矢印参照) から撮影した*F. (F.) magnificentum*. スケールは1cmを示す. A-D Tokuda et al. (2010) を一部改変.

表1. 実験内容と個体番号の一覧. A-Pは実験に用いた個体番号, LD1-3は12時間暗期, 12時間明期, DD1-3は前半はLDと同じく, 後半は恒暗条件での飼育実験. ストロンチウム1-3はストロンチウム, カルセインは蛍光物質であるカルセインを海水に溶解させて24時間飼育し骨格マーキングを行った. ※1-10は実験中に死亡した個体を示す. A, *F. (U.) deludens*, B-E, *F. (U.) japonicum*, G-P, *F. (F.) magnificentum*

実験		個体番号														
内容	日数	A	B	C	D	E	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
LD1	10		●	●	●	●	●	●		●		●	●		●	●
ストロンチウム1	1	●	※1	※2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	※3	●
LD2	10				●	●	●	●	●	●		●	●			●
ストロンチウム2	1	●			●	※4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
LD3	10				●		●	●	●	●		●	●			●
ストロンチウム3	1	●			●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
DD1	14				●		●	●	●	●		●	●			●
カルセイン	1	※5							※6		●					
DD2	14				●		●	●		●	※7	●	※8			●
DD3	14				●	※10	●	●		●		●		※9		●

表2. 生体の概日リズム実験のカイ2条ピリオドグラム解析の結果. 数字は確定周期(h)である. 検定線 ($\alpha=0.05$) を超えない周期を*, ハーモニクスの可能性のあるものは†で示した.

	H	G	J	P	L	D
LD1	12.5†	30.7	24.0	25.7	24.0	23.3
LD2	15.2†	10.7*	23.3	23.5	24.0	23.8
LD3	12.3†	23.8	12.0†	23.8	12.3†*	24.0
DD1	24.2	25.7	24.0	23.3	24.2	14.0†*
DD2	20.5	17.8	23.2	18.8	23.8	28.7*
Av.	22.9	23.9	23.7	23.0	24.1	25.6
Me.	15.2	23.8	23.3	23.5	24.0	23.8

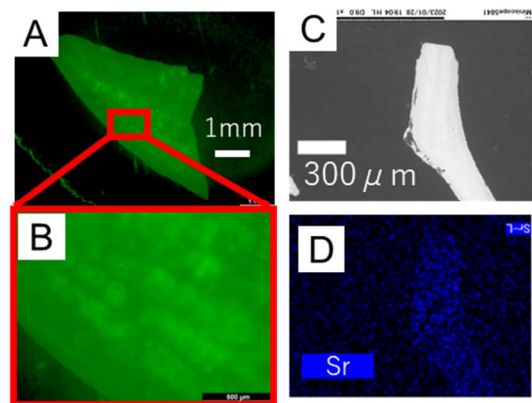


図2. 骨格成長観察結果. A, B, 蛍光顕微鏡によるカルセインマーキング後の隔壁. C, SEMによるSrマーキング後の隔壁断面. D, EDSによるマッピング分析

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sentoku Asuka, Shimizu Keisuke, Naka Tsubasa, Tokuda Yuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Dimorphic life cycle through transverse division in burrowing hard coral <i>Deltocyathoides orientalis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-13347-2	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 該当する

1. 著者名 鈴木 克明, 板木 拓也, 片山 肇, 兼子 尚知, 山崎 誠, 徳田 悠希, 千徳 明日香	4. 巻 73
2. 論文標題 宝島及び諏訪之瀬島周辺海域の底質分布とその制御要因	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 地質調査研究報告	6. 最初と最後の頁 275-299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.9795/bullgsj.73.5-6_275	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sentoku Asuka, Tokuda Yuki	4. 巻 39
2. 論文標題 New Records of Azooxanthellate Scleractinian Corals (Cnidaria: Anthozoa) from Sagami Bay and Suruga Bay, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 52-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs210056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千徳明日香, 稲葉直哉, 大塚光, 徳田悠希
2. 発表標題 沖縄県浜比嘉島に分布する島尻層群から産出したイシサンゴ化石
3. 学会等名 日本古生物学会 2022 年年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中如樹, 千徳明日香, 清水啓介, 徳田悠希, 黒木拓実, 藤井琢磨, 中口和光, 山口修平, 近藤裕介, 大塚攻
2. 発表標題 ホシムシ共生型イシサンゴ類の系統分類学的研究
3. 学会等名 日本古生物学会 2022 年年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千徳明日香, 徳田悠希
2. 発表標題 無藻性単体イシサンゴの無性生殖が沖合軟底質上での個体数増加に与える影響
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千徳明日香, 清水啓介, 名嘉翼, 徳田悠希
2. 発表標題 砂に潜るタマサンゴに認められる横分裂による世代交代
3. 学会等名 日本地質学会第129年学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千徳明日香
2. 発表標題 美ら海の深海まで広がるサンゴの世界
3. 学会等名 産総研第38回地質調査総合センターシンポジウム・美ら海から知る美ら島の歴史ー500万年間の地史を求めて . (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口麻菜・徳田悠希・千徳明日香・江崎洋一・板木拓也・兼子尚知・片山 肇・杉崎彩子・鈴木 淳.
2. 発表標題 奄美大島周辺海域における無藻性イシサンゴの多様性の解明
3. 学会等名 日本古生物学会 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千徳明日香・名嘉 翼・徳田悠希・同前万由子・鈴木 淳
2. 発表標題 形態解析及び分子系統解析による無藻性イシサンゴ <i>Deltocyathoides orientalis</i> の生活様式の解明
3. 学会等名 日本古生物学会 2021 年年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 京都大学フィールド科学教育研究センター瀬戸臨海実験所創立100周年記念出版編集委員会、朝倉 彰、下村 通誉、中野 智之、後藤 龍太郎、山守 瑠奈	4. 発行年 2022年
2. 出版社 京都大学学術出版会	5. 総ページ数 706
3. 書名 海産無脊椎動物多様性学	

1. 著者名 日本古生物学会、西 弘嗣	4. 発行年 2023年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 790
3. 書名 古生物学の百科事典	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------