

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292107

研究課題名(和文) 造礁サンゴの新たな生体分類指標の探索 - 骨格形態とDNA配列の間のGapを埋める -

研究課題名(英文) Searching of a new classification method for scleractinian coral

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：温帯域に生息するミドリイシ属、キッカサンゴ属、パリカメノコキクメイシ属およびノウサンゴ属の造礁性サンゴを対象に蛍光in situハイブリダイゼーション法を用いた染色体解析などを行なった。均質染色領域、ヘテロクロマチン、リボソームRNA遺伝子、比較ゲノムハイブリダイゼーション法による性染色体、反復配列であるAluなどの検出に成功した。また、軟組織からのタンパク質抽出液のゲル電気泳動解析により発現タンパク質パターンや特定のタンパク質の網羅的同定を行なった。本研究の結果より、染色体解析を主とする分子細胞生物学的手法やプロテオーム解析は、新たな分類指標の候補になると期待された。

研究成果の概要(英文)：Molecular cytogenetical analysis with fluorescent in situ hybridization techniques and other molecular experiments on *Acropora*, *Echinophyllia*, *Coelastrea* and *Platygra* corals in temperate area were performed. Detection of homogenously staining region (hsr), heterochromatin, ribosomal RNA genes, sex chromosome by comparative genomic hybridization and Alu region (repetitive element) were successfully carried out. In addition, protein expression patterns and comprehensive identification of protein extracted from soft tissue of corals were analyzed. Together with these results, molecular cytogenetics and proteome analysis will be a good classification method for scleractinian corals.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：染色体分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上の全海域のわずか 1% に満たないサンゴ礁は、全海洋生物の 25% の種を育てていると言われていた。この最も生物多様性の豊かな海中空間は、刺胞動物である造礁サンゴが創り出す石灰質の骨格により形成されている。

(2) その多様な骨格形状に着目した様々な造礁サンゴの記載研究の歴史は古く、スキューバが普及した 1970 年代以降は記載は広範囲かつ詳細になり、1990 年代には形態解析に基づく造礁サンゴの同定や分類を概説した書籍等が出版されている。これらは、現在に至るまで広く参考にされていた。

(3) 1990 年代半ば頃からは、遺伝子配列をターゲットとした系統解析が積極的に導入されている。初期の研究で、750 種に上る造礁サンゴが、ミトコンドリア 16S rDNA (mt16SrDNA) 配列の解析により大きく 2 系統に分類できることが提唱されて注目を集めた (Romano と Palumbi, Science, 1996)。比較的簡便に着手できることや結果が明解であることなどから、分子分類の報告は激増していた。

(4) このように、形態分類と分子分類は造礁サンゴ研究の 2 大潮流となったが、必ずしも両者の結果が一致しないケースが散見された。環境や地域により骨格形態が変動すること、分類基準となる塩基配列が確定していないことなど、それぞれが多くの問題点を抱えており、造礁サンゴの生理・生態学的特徴を分類の要素に加えることの必要性が指摘されていたが (深見, 日本動物分類学会誌, 2007), これらに代わる各造礁サンゴ種を特徴づける生体指標は現在のところ見出されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者が長年携わってきた分子細胞遺伝学的解析手法を適用し、造礁サンゴの染色体について予備的解析を進めていた。土佐湾沿岸では、多くの造礁サンゴ種の産卵が観察され、染色体研究に最適な受精直後の細胞分裂が盛んな胚細胞を入手できる地理的

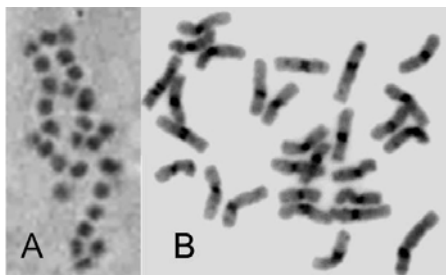


図 1. 造礁サンゴ染色体像

A: 既存法 (Proc. 10th Int. Coral Reef Symp, 2006)
 B: 研究代表者らが確立していた鮮明な染色体像の観察法
 染色体中央部の黒い部分はヘテロクロマチン

な利点を最大限に活かすとともに、観察試料調製に工夫を加えることによって鮮明な染色体像の観察することに成功していた (図 1)。

(2) また、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) を用い、ヘテロクロマチンの分布様式を調べたところ、動原体型 (図 2A)、テロメア型 (図 2B) および分散型 (図 2C) が造礁サンゴ種ごとに異なることを見出した。造礁サンゴ細胞の特徴を示す染色体の性質が種で大きく異なっていたことは、細胞中の高分子成分組成や構造の詳細な観察により、新たな生体分類指標を見出せる可能性を示していた。

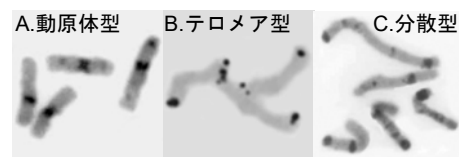


図 2. ヘテロクロマチン分布様式の違い

(3) そこで染色体解析を中心とし、プロテオーム解析、微細構造観察や免疫組織の手法による造礁サンゴ細胞自体の性質に基づく指標を探索し、取得されたデータのライブラリ化を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、海岸近傍に 100 種以上の造礁サンゴが生息し、多種の受精卵採取が可能な地理的優位性を活用し、染色体解析を中心都市、プロテオーム解析および微細構造観察・免疫組織という 3 つの視点で「新たな生体分類指標」の探索を試みた。

(2) 各受精卵染色体のヘテロクロマチンの分布様式を観察するとともに、各ペイントプローブにより観察されるヘテロクロマチン分布様式の種間比較を行ない、分類に効果的なプローブの選別を図った。

(3) 受精卵抽出液の二次元電気泳動、MALDI/TOF-MS (既存機器使用) による質量分析やゲノム DB との照合により得られたタンパク質の解析を試みた。

4. 研究成果

(1) hsr (homogenously staining region; 均質染色領域) の発見。hsr は染色体異常の一つとして知られており、最初はチャイニースハムスターの培養細胞をメトトレキセート (葉酸代謝阻害剤) で継続的に処理したときに、耐性細胞が出現したが、その染色体を分析すると hsr が出現していた (図 3)。その後の解析で、耐性遺伝子の増幅により hsr ができていることが分かった。そのうち、哺乳類、特にヒトやげっ歯類の細胞にも hsr が発見され、ガン遺伝子が増幅していることが確かめられた。

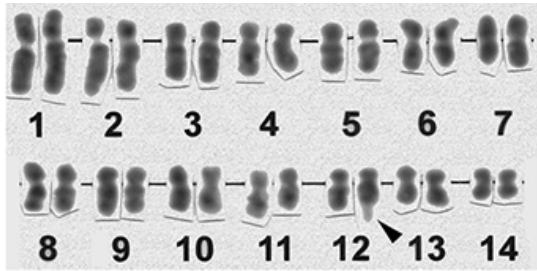


図2. 核型および hsr の存在
矢頭の位置に hsr が観察される。

イシサンゴでは、ミドリイシ属以外、例えばコカメノキクメイシ属、ノウザンゴ属、キッカサンゴ属、シコロサンゴ属、ハナガタサンゴ属の染色体にこの hsr の存在を見出した。分子レベルではイシサンゴの rRNA 遺伝子の多様性が知られていたが、hsr の存在と関連している可能性がある。サンゴのこのことはサンゴの染色体分析に重要である。下の 12 番染色体の矢頭のように hsr があると相同染色体同士の長さが異なり、通常の染色では同じ相同染色体とは区別がつかないため、核型の作製が困難となる。核型は通常、バンディング (G-,C-band など) を施して各染色体の同定を行うが、一般に無性脊椎動物は哺乳類に比べ、染色体サイズが約半分で、バンド法の適応が困難であったが、本研究では、G-, C-band を得ることに成功している。

(2) ヘテロクロマチンの分布様式がサンゴ種により異なることを見出し、種の分類の手助けになることを見出した。ヘテロクロマチンの分析には全ゲノム DNA を蛍光ラベルし、同種のサンゴ染色体で FISH を行って検出した (表 1)。

表 1 ヘテロクロマチン分布型.

属	種	分布型	共通配列
ミドリイシ科	エンタク	動原型型	N/C *2
	ミドリイシ		
ウミバラ科	キッカサンゴ	末端型	(TTCCA)n
オオトゲ	アマクサオオトゲ	分散型*1	N/C
サンゴ科	キクメイシ		
ヒュサンゴ科	ヒュサンゴ	分散型	N/C

*1 分散型: 動原型型と末端型の混合型、*2 N/C: 未決定

(3) 各 rRNA 遺伝子 (5S, 18S, 28S) の染色体上のマッピングに成功した (表 2)。サンゴゲノム解析の第一歩となる

表 2 5S, 18S and 28S rDNAs の座位.

種	18S&28S 座位	5S 座位
<i>A. solitariaensis</i>	1 & 15	6 *3, 4
<i>A. pruinosa</i>	10	5 *3, 4
<i>E. aspera</i>	13	N/D
<i>C. aspera</i>	11	N/D
<i>P. contorta</i>	12	11

N/D: 未確認、*1 hsr: 均一染色領域 (homogeneously staining region)、*2 Y: Y染色体 (chromosome Y)、*3 未発表、*4 Some cells 一部の細胞にはやや長い rDNA が FISH で観察された。

(4) ミドリイシ属サンゴで性染色体の存在を示す証拠を提示できた。イシサンゴの性染

色体に関する情報は皆無であったが、今回、CGH (comparative genomic hybridization) 法を取り入れてその存在を明らかにした。

(5) サンゴの分類に役立つ FISH マーカーの分離に成功した。本研究ではヒトの繰返し配列との共通性を明らかにしている。ヒトサテライト DNA、Alu 配列をイシサンゴで探索し、FISH マーカーとして利用できることを見出した。

(6) 炭酸カルシウム骨格が多くを占める造礁サンゴから軟組織の抽出液を調製し、明瞭な 2 次元電気泳動像を得ることに成功した (図 3)。

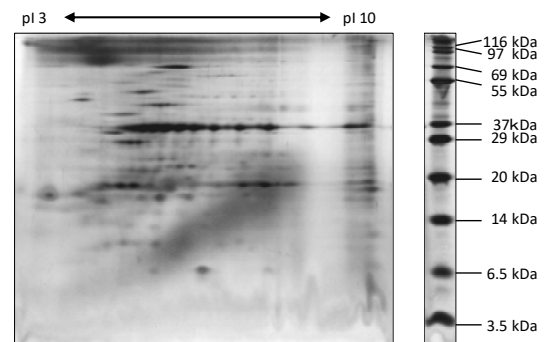


図 3. 造礁サンゴ軟組織の抽出液の 2 次元電気泳動像

(7) ゲル電気泳動により分離されたバンドの質量分析とゲノム解析やトランスクリプトーム解析により得られた造礁サンゴのアミノ酸配列が登録された公共データベース情報との照合により、多くのタンパク質の同定が可能となった (図 4) また、ここで得られた配列に基づき、縮合プライマーを設計して PCR 増幅が可能なることを確認した。

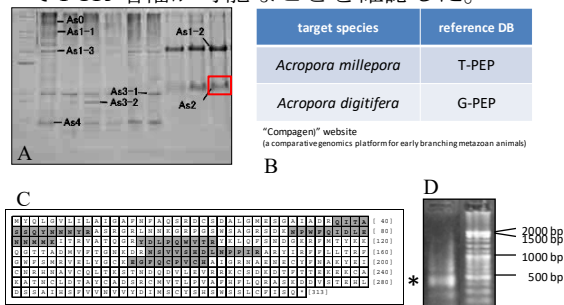


図 4. 質量分析によるアミノ酸決定

- A:ゲル電気泳動による分離
- B:照合した公共データベース
- C:推定されたアミノ酸配列 (網掛け部分)
- D:縮合プライマーによる PCR 増幅断片

(8) 本研究により、1.分子細胞遺伝学的手法を用いた染色体解析は、造礁サンゴの新たな分類指標として有用であること、2.硬組織が多くを占める造礁サンゴでは解析が遅れていた軟組織の抽出液中のタンパク質の分析やその分析結果に基づく発現タンパク質をコードする mRNA データの蓄積により、新たな分類指標となり得ることが明らかとなった。

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, Satoshi Kubota, Erika Tagami, Takuma Mezaki, Satoko Sekida, Kazuo Okuda and 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*, 査読有, 82(2), 1-8 (2017).
- ② 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*, 査読有, 10, 61-75 (2016).
- ③ Takahiro Taguchi, Takuma Mezaki, Fumihito Iwase, Satoko Sekida, Satoshi Kubota, Hironobu Fukami, Kazuo Okuda, Teruyuki Shinbo, Syun-ichirou Oshima, Yoshiaki Iiguni, Joseph R Testa, and Akira Tominaga. Molecular Cytogenetic Analysis of the Scleractinian Coral *Acropora solitaryensis* Veron & Wallace 1984. *Zool. Sci.*, 査読有, 31, 89-94 (2014).

[学会発表] (計 9 件)

- ① 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. ミダレノウサンゴの核型分析と FISH マーカーの分離. 日本サンゴ礁学会第 19 回大会. 沖縄. 平成 28 年 12 月
- ② 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. 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 プローブの作成. 日本サンゴ礁学会第 19 回大会. 沖縄. 平成 28 年 12 月
- ③ 田上 恵里香, 田口 尚弘, 久保田 賢, 目崎 拓真, 富永 明. ヒメエダミドリイシの分子細胞遺伝学的研究. 日本サンゴ礁学会第 19 回大会. 沖縄. 平成 28 年 12 月
- ④ 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. パリカメノコキクメイシの分子細胞遺伝学的研究. 日本サンゴ礁学会第 18 回大会 東京 平成 27 年 11 月
- ⑤ 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.

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. 日本サンゴ礁学会第 18 回大会 東京 平成 27 年 11 月

- ⑥ 田上 恵里香, 田口 尚弘, 久保田 賢, 目崎 拓真, 富永 明. 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. 日本サンゴ礁学会第 18 回大会 東京 平成 27 年 11 月
- ⑦ 田口 尚弘, 関田 諭子, 久保田 賢. 造礁性サンゴの細胞機能解明-細胞遺伝・微細構造・構成分子解析によるアプローチ. 日本サンゴ礁学会第 17 回大会 公開シンポジウム 高知 平成 26 年 11 月
- ⑧ 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. キッカサンゴの分子細胞遺伝学的研究. 日本サンゴ礁学会第 17 回大会 高知 平成 26 年 11 月
- ⑨ 久保田 賢, 目崎拓真, 小西裕子, 田口 尚弘, 富永明. エンタクミドリイシの主要発現タンパク質解析の試み. 日本サンゴ礁学会第 17 回大会 高知 平成 26 年 11 月

[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
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

奥田 一雄 (OKUDA Kazuo)
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：40152417

富永 明 (TOMINAGA Akira)
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：50172193

関田 諭子 (SEKIDA Satoko)
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：70314979

(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