

研究ノート

造礁性イシサンゴ染色体研究

田口尚弘

要 旨

造礁性サンゴ（イシサンゴ）の分子データは文献的にも急速に蓄積されつつあるが、その染色体については、ほとんど情報がない。染色体核型を調べることで相当の情報が得られる；例えば、形態学的に分化する性染色体の有無で多くの場合性決定がなされること、異なる種で染色体を比較することでこれらの生物の体制と進化について推測できること、またサンゴの進化の歴史や後生動物のこのグループのゲノム進化を形作る構造変化の理解を深めることができる。そこで、イシサンゴの一種であるエンタクミドリイシを使って分子細胞遺伝学的手法である蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）法で解析した。その結果、サンゴの暫定核型を提示および染色体数が30本であることを突き止めた。また、rRNA遺伝子のマッピング、テロメアーとセントロメアーの可視化に成功し、さらに性染色体の存在の可能性を示した。

キーワード：造礁性サンゴ、染色体、FISH、核型、エンタクミドリイシ

1. はじめに

造礁性サンゴ（イシサンゴ）類は熱帯から温帯に広く生息し、6亜目・25科・246属・約750種が報告されている（Vernon, 1984; 1995; 2000）。近年、温暖化によるこれらサンゴの減少・死滅が問題となっている。過去30年で11%以上が死滅しており、現在も80%強がその危機にあり、その保護・繁殖が注目されている。このような危機的状況にあるサンゴの保護のため、多方面から研究が行われている。

サンゴの保護・繁殖にあたり、サンゴの系統分類が、その生態を知る上で重要である。最近、イシサンゴの主要メンバーの1つであるミドリイシ属で、形態の類縁性と遺伝的系統関係に相関がないと報告され（Van Oppen, 2001）、その後、他のサンゴ研究でも形態と分子的方法に基づいた系統関係に不一致が見られている（Fukami, 2008）。また、実験的な異種間雑種形成の結果からも、イシサンゴ類の系統分類に疑義が生じている（Suzuki and Fukami, 2010）。

サンゴ染色体研究は、上記の問題に対する重要な情報を提供できる。一般に、染色体は種により構成が異なり、類縁関係・系統分類・染色体変異（進化）・性

分化に重要な情報を提供する上に、近年の分子細胞遺伝学的解析法の進歩で、形態と分子レベルの研究を有機的に繋ぐ役割を担っている。そのため染色体研究が遅れているサンゴを含めた海洋性無脊椎動物での染色体研究の必要性が増大している。

昨年、サンゴの1種、コユビミドリイシの全ゲノム塩基配列が報告され（Shinzato *et al.*, 2012）、ゲノム研究の画期的進展を見た。しかるに、サンゴ類の染色体研究は極めて乏しい。主要メンバーの1つ、ミドリイシ属サンゴ染色体の論文で、主だったものは、世界中で過去に2報（Heyward, 1985; Kenyon, 1997）、国際学会の報告が1報（Flot *et al.*, 2006）である。サンゴの分子データは文献的にも急速に蓄積されつつあるが、染色体については構成本数以外ほとんど情報がないのが現状である。ここでは、本研究室で進めているサンゴ染色体研究における最新の知見を紹介する。

2. サンゴ染色体

サンゴの染色体研究には受精後約12時間の高頻度の分裂像が観察できる胚を用いる。サンゴ類の産卵は年に一度なので、実験室内での受精卵を使った細胞分裂・細胞遺伝学（染色体）の研究は時間的に限定されるが、染色体の核型karyotypeを調べるには、分裂期の細胞を固定し、長期保存したものを利用できるので、いつでも可能となる。ここで核型という言葉の説

2013年3月4日受理；2013年3月6日受理
高知大学総合科学系黒潮圏科学部門・海洋健康医科学分野
〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮
*連絡責任者 e-mail address: ttaguchi@kochi-u.ac.jp

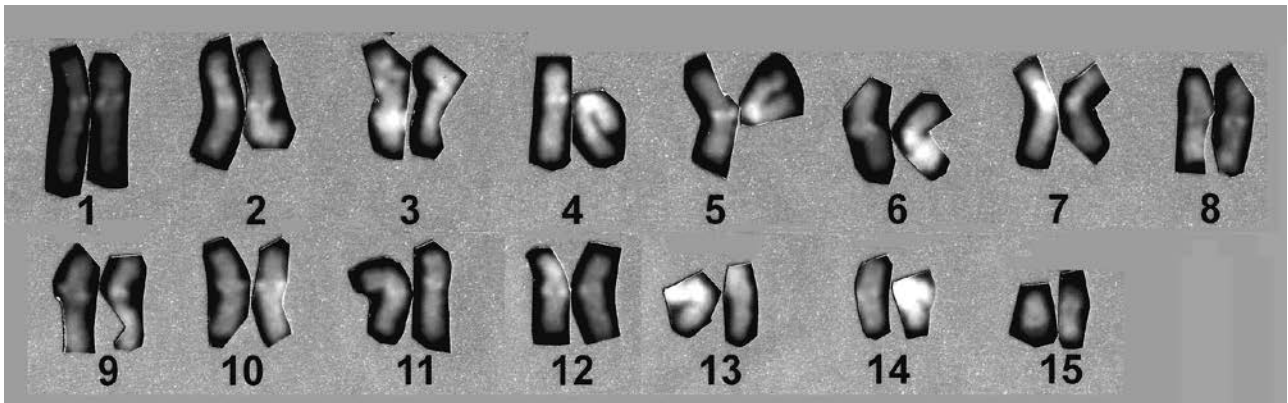


図1. エンタクミドリイシ核型像

明しておく、核型とは染色体構成の記述であり、核型像karyogramは核型とほぼ同じ意味だが、構成する各染色体を同定し、大きさ順に並べた染色体全体像、もしあれば性染色体を加えた像、を意味する。

サンゴ生息域は、温暖化により北上しつつあり、高知県の沿岸海域でも日本全国で有数のイシサンゴ群落が見られる。高知県大月町にある黒潮生物研究所（財団法人）では、サンゴ保全研究を全国の研究者を受け入れて実施しており、本研究には、サンゴ形態分類のエキスパートである、黒潮生物研究所の岩瀬文人所長、目崎拓真博士に協力をいただき、材料であるサンゴ卵・精巣塊を、産卵時に形態学的特徴に従って分類・収集をお願いしている。

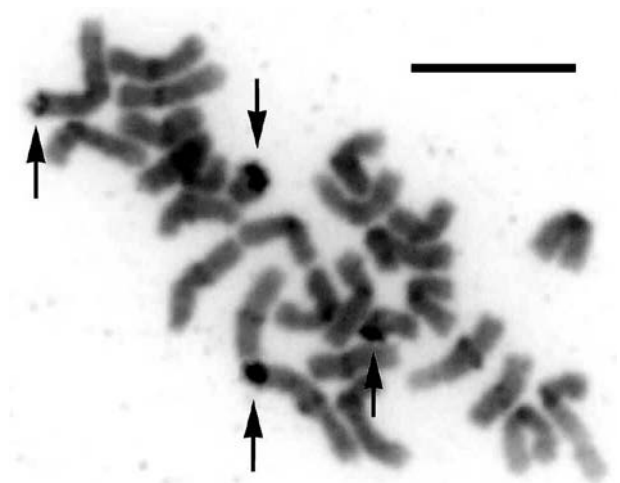
一般に、無脊椎動物の染色体は哺乳類に比べて、5 μm 以下とサイズが小さく、哺乳類で見られるような、染色体バンディングを得ることは難しい。小さな染色体を持つサンゴの核型および核型像の確立を行うため、蛍光観察法による分子細胞遺伝学的手法を用いた。分子細胞遺伝学的手法で中心となる手技は核酸の蛍光雑種法（Fluorescence *in situ* hybridization: FISH）である。

まず、FISH法を使って、エンタクミドリイシ染色体で、コピー数の多いrRNA遺伝子の染色体上の座位（遺伝子マッピング）を調べた。rRNA 遺伝子は、従来から、その塩基配列の類似性をもとに系統分類に利用されている（Marquez, 2003; Coleman, 2008）。コユビミドリイシの全ゲノムが解読（Shinzato, 2012）されたが、染色体レベルからも特異的塩基配列（単一遺伝子および繰り返し配列DNA）のシンテニックな関係（遺伝子座位配列順序の保存性）を探ることができれば、各種サンゴの染色体・ゲノム構成の関係を知らることが可能となり、コユビミドリイシの全ゲノムデータ

との連関を俯瞰できる。

エンタクミドリイシの染色体標本作製し、FISH法後に蛍光観察して得られた核型像（karyogram）が図1である（ $2n=30$ ）。3–14番染色体は完全な識別はできないので、大まかな長さ順に並べてある。

既に他の研究者により報告されているrRNA遺伝子のプライマーを利用し、PCRでその産物（100–3000bp）を得て、ランダムプライム法で蛍光ラベルを行い、FISH用プローブを作製して、エンタクミドリイシ染色体標本にプローブをハイブリダイズした。その結果、図2の様に、染色体上に蛍光シグナルを得ることができた。4本の染色体、すなわち2本の2番染色体の短腕端部と2本の15番染色体端部に遺伝子座があることが明らかとなった。この実験ではいくつかのプライマーを試したが、面白いことに、その中の1つのPCR産物はrRNA遺伝子ではなく、全ての動原体にハイブリダイズすることが判明した（図3）。このこ

図2. エンタクミドリイシrRNA遺伝子。矢印がrDNA遺伝子座位を示す。線は5 μm を示す。

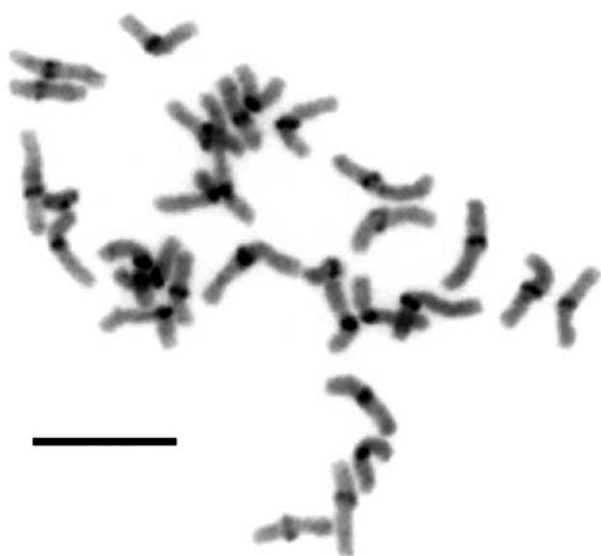


図3. エンタクミドリイシ中期像。動原体が黒く見える。横線は5 μ mを示す。

とは動原体特有のDNA繰り返し配列が得られたわけであるが、哺乳類では α -サテライトと呼ばれている繰り返し配列に相当する。rRNA遺伝子と α -サテライト様のDNAが近傍に存在する、または、近い関係にあることの証拠ではないかと思われる。

さらに、テロメアー配列のFISHを行った。保守的な染色体の特徴の一つはテロメアーの分子構造である：脊椎動物同様にサンゴを含む基本的な後生動物のテロメアーは高度の保守的なテロメアー繰り返しモチーフからなる。テロメアーは生物の染色体維持に必須の構造であり、染色体の両末端に必ず存在する。また、細胞分裂ごとに短縮していき、細胞の寿命と関連することで有名である。その構造は、4～7塩基の繰り返し配列であり、通常10000回前後繰り返しているといわれる。興味あることに、このテロメアー配列は種により少しずつ異なっていることが分かっているが、サンゴはヒトと同じTTAGGGの6塩基の繰り返し配列である。このテロメアープローブをエンタクミドリイシ染色体にハイブリダイズを行うと、そのシグナルが染色体の両末端に観察できる（図4）。分子的方法では、サンゴのテロメアーがヒトと同じ配列を持つことは知られていた（Sinclair, 2007）が、実際に染色体上で可視化し、その存在を証明できたのは本研究が初である。

さらに、サンゴの性染色体の存在の可能性を調べた。エンタクミドリイシの精子と卵子からそれぞれ別々にDNAを抽出し、それぞれ緑色蛍光、赤色蛍光

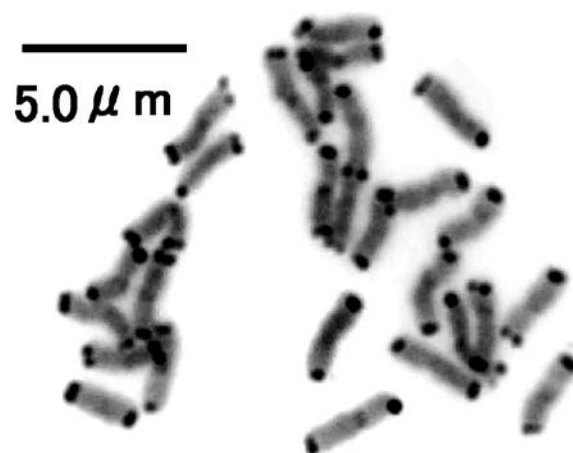


図4. エンタクミドリイシのテロメアーの可視化。各染色体の両端に黒い点としてシグナルが見える。

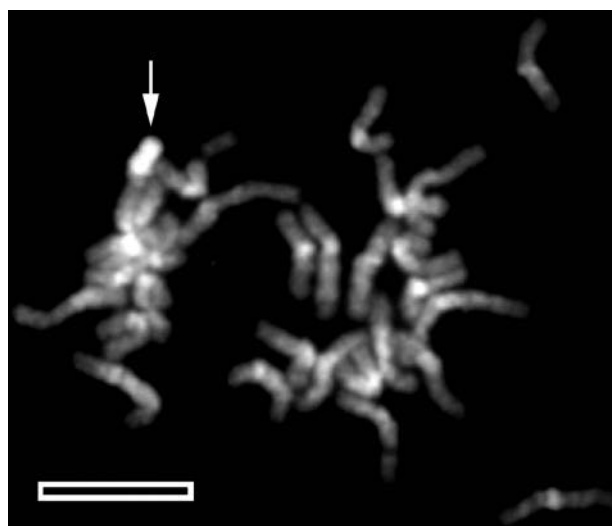


図5. エンタクミドリイシY染色体と思われる。矢印の白い部分が精子特異的DNAを示す。横線は5 μ mを示す。

でDNAをラベルした。この両者のDNAを等量混ぜて、エンタクミドリイシ染色体にハイブリダイズして、解析したところ1番染色体の長腕の一部に緑色の蛍光が強く表れた（図5）。この緑色蛍光部は精子特異的DNAを示唆し、観察した細胞の約14%で観察された。この手技は競合雑種法（Comparative genomic hybridization: CGH）と呼ばれ、比較するDNA間の過剰または不足を調べるものである。すなわち、精子DNAと卵子DNAは同じ種から得られたものであれば、基本的に同じ配列である。従って、CGHでは均等にハイブリダイズして、染色体は緑と赤の中間色である黄色っぽい色となる。もし違いがある場合には、緑、または赤色が強く表れる。この場合、緑色が強く見られ

たので、精子由来のDNAが過剰に存在することを示している。つまり性染色体の存在が示唆されたこととなる。さらに、その割合が約14%であり、通常の性比(50%)より偏ったものとなっていることは興味深い。環境の影響であろうか？温帯域の影響なのか、生息密度なのか、熱帯を含めた他の地域のサンゴについて調べる必要があるだろう。性分化（進化）の観点から興味深い。

3. まとめ

これまで述べたように、ミドリイシ属では約22種で核型研究がなされている (Kenyon, 1977)。ほとんどの場合、核型のデータは染色体数および染色体長に限られている。以前の、古典的な細胞遺伝学に基づく特異的な染色技術方法ではサンゴ染色体のバンディングパターンを得ることができない。本研究で示したように、これまで困難であったミドリイシ属サンゴの分子細胞遺伝学的解析法 (FISH) を確立できた。その結果、サンゴrRNA遺伝子座位決定でき、続いて、“脊椎動物”のテロメアーモチーフ (TTAGGG)_nがサンゴ染色体の各端部に保存されていることを可視化できた。また、性染色体の存在の可能性を示した。今後、イシサンゴ目の類縁関係および系統分類、ゲノム解析 (染色体地図作成)、染色体変異 (進化)、性分化のより詳細な知見を得ること、さらに、他の無脊椎モデル生物でその応用が期待できる。染色体研究が雑種形成のダイナミズムに重要であることは、小麦 (Heyne, 1987) や哺乳類、特にゲッ歯類 (Baverstock *et al.*, 1977)、類人猿 (Hirai *et al.*, 2012) 等から明らかである。将来、サンゴの雑種形成のダイナミズムに迫り、ひいては、サンゴの繁殖・保全に繋がるものと思われる。

謝辞

原稿作製に励まし議論をいただいた、黒潮圏科学部門・富永明教授に、感謝します。サンゴの卵・精子塊の採取・受精にあたり、黒潮生物研究所の岩瀬文人所長、目崎拓真博士にご協力いただいたことを感謝します。

文献

- Veron JEN, Wallace CC (1984) Scleractinia of eastern Australia V, Family *Acroporidae*. Aust Inst Mar Sci Monogr Ser 6: 1-485
- Vernon JEN (1995) Corals in Space and Time: In: The Biogeography and Evolution of the Scleractinia (Comstock Book), Cornell Univ Pr; First Edition
- Veron JEN (2000) Corals of the World. Australian Institute of Marine Science, Townsville.
- Van Oppen MJ, McDonald BJ, Willis B, Miller DJ (2001) The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and a nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence? *Mol Biol Evol* 18: 1315-1329.
- Fukami H (2008) Short review: molecular phylogenetic analyses of reef corals. *Galaxea* 10: 47-55.
- Shinzato C, Shoguchi E, Kawashima T, Hamada M, Hisata K, Tanaka M, Fujie M, Fujiwara M, Koyanagi R, Ikuta T, Fujiyama A, Miller DJ, Satoh N. (2012) Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* 24: 476: 320-323
- Heyward (1985) Chromosomes of the coral *Goniopora lobata* (Anthozoa: Scleractinia). *Heredity* 55: 269-271.
- Kenyon JC. (1997) Models of reticulate evolution in the coral genus *Acropora* based on chromosome numbers: parallels with plants. *Evolution* 51: 756-767.
- Flot JF, Ozouf-Costaz C, Tsuchiya M, van Woesik R (2006) Comparative coral cytogenetics. *Pro 10th Int Coral Reef Sympo*; 48.
- Márquez LM, Miller DJ, MacKenzie JB, Van Oppen MJ (2003) Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*. *Mol Biol Evol* 20: 1077-1086.
- Coleman AW, van Oppen MJ (2008) Secondary structure of the rRNA ITS2 region reveals key evolutionary patterns in acroporid corals. *J Mol Evol* 67: 389-396.
- Sinclair CS, Richmond RH, Ostrander GK (2007) Characterization of the telomere regions of scleractinian coral, *Acropora surculosa*. *Genetica* 129: 227-233.
- Heyne EG (ed) (1987). Wheat and wheat improvement. Madison, Wis: American Society of Agronomy.

- Baverstock PR, Watts CH, Hogarth J.T. (1977)
Chromosome evolution in Australian rodents. I. The
Pseudomyinae, the Hydromyinae and the Uromys/
Melomys group.
- Hirai H, Imai H, Go Y (2012) Post-Genome Biology of
Primates, Primatology Monograph, Springer.

Molecular cytogenetic study on scleractinian coral,
Acropora solitaryensis

Takahiro Taguchi
Kuroshio Science Unit, Multidisciplinary
Science Cluster, Kochi University
Nankoku, Kochi 783-8505, Japan

Abstract

Molecular cytogenetic study on the scleractinian coral, *Acropora solitaryensis*, was performed. Analysis using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was successfully carried out for karyotyping and gene mapping. Although it was still difficult to distinguish completely each chromosome of this coral ($2n=30$) due to the similar length and centromere location of their chromosomes, we successfully mapped the rRNA gene separated from PCR products using rRNA gene primers by FISH. Furthermore, we visualized coral telomere and centromere sequences of all chromosomes by FISH. We proposed the tentative karyotype of this coral based on both 4, 6-diamidine-2- phenylindole (DAPI) C-band and FISH results. By comparative genomic hybridization (CGH) using sperm and unfertilized egg DNAs of this coral, we offer the evidence that there is a possible existence of sex chromosomes. These molecular cytogenetic approaches will help to establish the more precise karyotype of corals and to promote coral genetics.

Key word:

scleractinian coral, chromosome, FISH, karyotype,
Acropora solitaryensis