

第4回「理想の追求」研究報告

研究期間:2013年4月1日～2016年3月31日

環境を記録する造礁サンゴの骨格成長メカニズムの解明

プロジェクトリーダー

井上麻夕里 岡山大学大学院 自然科学研究科

プロジェクトメンバー

横山祐典・日下部 誠 東京大学 大気海洋研究所

新里宙也 沖縄科学技術大学院大学

中村 崇 琉球大学理学部

井口 亮 沖縄工業高等専門学校

菅 浩伸 九州大学大学院 地球社会統合科学府

鈴木 淳 産業技術総合研究所 地質情報研究部門



写真（上）：ハマサンゴおよびミドリイシを採取し、飼育実験を実施した瀬底島の遠景（中央右手に見えるのが瀬底島）

写真（下）：室内でのハマサンゴ・ミドリイシの長期飼育実験の様子

1. 研究の背景と達成目標

高い生物多様性を誇り、人々の暮らしを支えているサンゴ礁の礎は、生き物である造礁サンゴ(以下、サンゴと表記)の骨格成長により築かれている。しかし、サンゴの骨格成長メカニズムは未だに解明されていない。さらに、サンゴの骨格には、彼らが生きてきた当時の海水温や塩分などの環境が記録されているため、地質学的試料としても有用である。よって、サンゴの骨格成長メカニズムを解明することは、サンゴを用いた気候変動の復元精度の向上にも繋がる。そこで我々は、インド・太平洋域において卓越する枝状のミドリイシサンゴと塊状のハマサンゴを研究対象とし、形態も異なるこの2種の骨格成長を比較検討することで、その多様性も含めた骨格成長メカニズムの解明を目指す。

特にハマサンゴは地球化学的分析が進んでいるものの生物学的研究は遅れており、その骨格成長とその際に取り込まれる元素の分配は Ca^{2+} -ATPase の働きのみによって解釈されている部分が多い。一方ミドリイシはゲノム解析も行われるなど生物学的知見が多く得られているが、骨格の化学分析はほとんど行われていない。そこで本研究ではハマサンゴの生理学的・遺伝子学的研究とミドリイシの骨格分析といった世界でも新しい研究課題に取組み、総合的に骨格の成長メカニズムについて考察を行う。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ ミドリイシとハマサンゴで温度に対する骨格成長パターンが異なること
酸性化実験などで複数種のサンゴについて飼育実験が行われることがあるが、より基礎的環境パラメータである温度に対する2種のサンゴの長期飼育実験はほとんど行われおらず、今回新しい結果を得ることができた。これは、今後の温暖化に対するサンゴの成長予測にも貢献できるデータである。
- ・ ミドリイシとハマサンゴの骨格中の化学成分にオフセットがあること
これまで、サンゴの種類によって骨格中の重金属元素などに差があることは報告されていたが、類似した温度依存性を持ちながら両方でオフセット(濃度のずれ)があることを酸素・炭素同位体比について発見したのは新しく、古気候復元において複数種を混同して分析することが危険であることを示した。
- ・ ミドリイシについてもその骨格中の化学成分、特に酸素同位体比が良好な温度指標となり得ること
化石ではミドリイシが採取されることが多々あるが、ハマサンゴだけではなくミドリイシも古気候復元に有効に使えることを示した。
- ・ ハマサンゴからの良質な RNA の採取およびゲノム解析に成功したこと
これまでハマサンゴの生物学的研究が進んでいない要因の一つにミドリイシなど他のサンゴの RNA 抽出法をなぜかハマサンゴに適用できない、という難点があったのだが、今回初めて良質な RNA を取得することができ、さらに全ゲノム解読にも成功した。今後のハマサンゴの生物学的研究の発展に大きく貢献するものと考えられる。
- ・ ハマサンゴと褐虫藻の遺伝子を明確に区別でき、サンゴ共生体の宿主と褐虫藻の共生関係を、遺伝子レベルで初めて明らかにしたこと。
共生体としてのサンゴのトランスクリプトーム解析はサンゴの研究分野にインパクトがあった。
- ・ Ca^{2+} -ATPase 遺伝子の発現が骨格成長に影響する最重要因子ではないこと
これまでは Ca^{2+} -ATPase の働きを前提として骨格中の化学成分が変動することが国際的にも盛んに議論されていたが、今回の結果はその前提から見直す必要があることを示唆している。
- ・ ハマサンゴの細胞の活性が必ずしも骨格成長とリンクしていないこと
生物活動を維持するための細胞の活性が骨格成長に単純には影響していないことが示された。これは骨格成長に関して、サンゴの生物活動を介して骨格が成長している、という現在の考え方を根本から考え直す必要があることを示唆する結果である。

3. 研究成果

これまで、ハマサンゴから RNA を抽出することが困難であったが、本研究ではまず沖縄県瀬底島より採取されたハマサンゴについて、高品質の RNA の抽出に成功した。それを次世代シーケンサーで解読したところ、ハマサンゴと褐虫藻の両方の遺伝子の同時解析に成功した。その結果、ハマサンゴからは 35% もの褐虫藻由来の遺伝子配列が検出され (図 1)、さらに、ハマサンゴと褐虫藻の共生体全体では全てのアミノ酸を合成することが可能で、ハマサンゴが合成できないアミノ酸は褐虫藻が供給している可能性が示唆された。

また、褐虫藻が含まれないハマサンゴの精子から DNA を抽出し、ハマサンゴの全ゲノム解読にも成功した。ハマサンゴは約 6 億塩基から構成されており、そこから約 3 万の遺伝子を同定した。これら遺伝子解析に関

連して、これまでの研究でサンゴの骨格成長に関して、重要な働きをしていると考えられている Ca^{2+} -ATPase 遺伝子に着目した。本研究では、褐虫藻由来と考えられるものも含め、9 種のハマサンゴ Ca^{2+} -ATPase の発現解析を行った。試料は以前に 21, 25, 29°C の温度制御下で飼育した 3 群体のハマサンゴを用い群体毎に解析を行った。その結果、 Ca^{2+} -ATPase の発現量とそれぞれの群体の骨格成長量に明瞭かつ系統的な関係

は見られず、これまで骨格形成に深く関与していると考えられていた Ca^{2+} -ATPase 遺伝子は必ずしも骨格成長の最重要因子ではないことが示唆された。

次に、ハマサンゴとミドリイシの骨格成長メカニズムの違いの有無や、異なる場合、どのように異なるかを検証するために、ハマサンゴとミドリイシの温度コントロール飼育実験を実施した (図 2)。サンゴ試料はそれぞれ沖縄県瀬底島周辺海域の同一海域より 3 群体ずつ採取し、採取後のサンゴ試料はアクリル板に水中ボン드로固定し、屋外水槽にて約 5 週間の養生を行った。その後、室内実験室において温度を 5 段階 (18, 21, 24, 27, 30°C) に設定した水槽で長期飼育実験を約 80 日間実施した。海水は瀬底周辺のサンゴ礁の海水をろ過したものを掛け流し、光は 12 時間の On/Off により制御した。飼育期間中、定期的な水中重量測定と光合成活性の指標となる F_v/F_m 値の測定を行い、サンゴの成長や光合成

の度合いを見積もった。実験の結果、18°C 区では飼育期間 30 日を過ぎた頃から両種のサンゴの白化および斃死していると思われるサンゴが出現し、30°C 区では特にハマサンゴに白化や斃死の兆候が見られた。一般的にサンゴは 18°C 以上の暖かい海水に生息することが知られているが、本研究において、実験的にも 18°C 以下では少なくとも 1 ヶ月以上は生息できない事が明らかにされた。さらに興味深いことに、温度と骨格の成長パターンおよび光合成活性の挙動はハマサンゴとミドリイシで異なっており、同じ造礁サンゴでも骨格の成長プロセスが異なることが明らかになった (図 3)。特にハマサンゴは群体毎で成長率に変化があるものの、ミドリイシには明瞭な群体差は見られないこと、ハマサンゴは光合成活性と成長率に正の相関が認められるが、ミドリイシにはそれが見られないことなどが特徴として挙げられる。

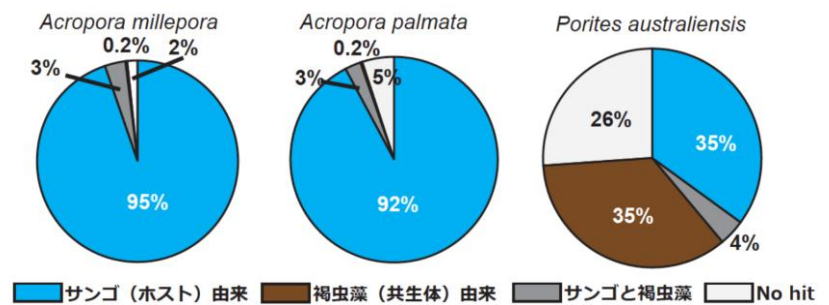


図 1. ミドリイシ (*Acropora* spp.) とハマサンゴ (*Porites australiensis*) のトランスクリプトーム解析結果



図 2. 同一水槽内でのハマサンゴとミドリイシの同時飼育実験

この温度飼育実験のハマサンゴについては、成長に群体差も見られたため、群体毎のメタボローム解析を実施した。解析に供した試料は、24°C区から3群体と27°C区から2群体である(図3の赤と青群体)。解析の結果、まずハマサンゴからは核酸類の多くが検出されないなど、一般的な生物のデータとは大きく異なっていることが分かった。これは前述のようにハマサンゴのRNA合成に関しては共生藻である褐虫藻が関与していることが要因の一つとして考えられる。さらに、アミノ酸値は骨格成長が低い群体(図3の黒群体)や、24°Cに比べ27°Cで骨格成長が低下している青群体の27°Cの方がより多くのアミノ酸値が高いことが示され、ハマサンゴ共生体としての細胞状態が良い状態と、サンゴの骨格成長は必ずしもリンクしていないことが示唆された(図4)。

これら飼育サンゴについて、ミドリイシも含め、骨格の化学成分分析も実施した。骨格分析は、飼育期間中に成長した骨格のみを慎重に採取し、微量元素および酸素・炭素同位体比を測定した。測定の結果、温度指標としてよく用いられている酸素同位体比($\delta^{18}\text{O}$)に関しては、ミドリイシ、ハマサンゴとも温度と明瞭な逆相関関係が見られ、温度依存性もこれまでにハマサンゴで報告されている範囲と整合的であった(図5)。また、成長率と同様にミドリイシには化学成分の変動に群体差は見られなかったが、ハマサンゴは群体毎で異なる変動パターンが見られた。よって、ミドリイシはハマサンゴに比べて骨格成長や化学成分の取り込み方において群体差が小さく、比較的一様に反応することが示唆され、今後の古気候復元の研究に有効に利用できるサンゴ種であることが示された。面白いことに、図5に見られるように、ハマサンゴとミドリイシでは $\delta^{18}\text{O}$ にオフセットが見られ、同様に $\delta^{13}\text{C}$ においてもオフセットが認められた(両者ともミドリイシの方が高い方向にシフト)。両者のオフセットを光合成や石灰化の素過程を考慮して解釈すると、ミドリイシの方がハマサンゴに比べ光合成が活発で体内pHが高いことが推察される。これは、平均的な光合成活性や成長率がミドリイシの方が高いこととも整合的であり(図3)、骨格の化学成分をもとに、サンゴ体内の微小環境の違いを評価できることを示している。ただし、元の母液の組成が異なっても、そこから形成されるあられ石(CaCO_3)の温度依存性は両種で類似しており、さらに無機的に求められた温度依存性ともほぼ一致することが分かった。これにより、古気候研究において過去の海水温などを復元するときは、種を混同することは絶対値がずれるため危険であるが、それぞれの値の差分からおおよその温度変化率を求めることは可能と考えられる。

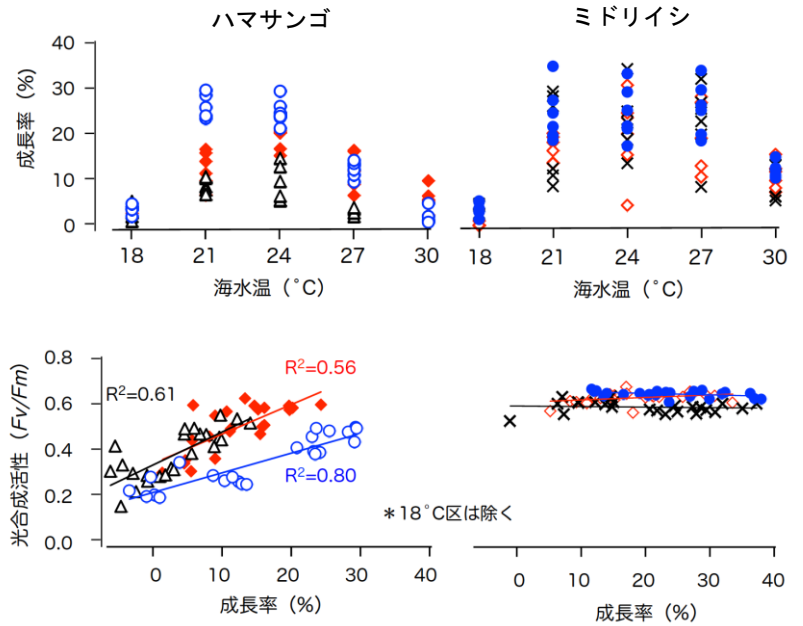


図3. ハマサンゴとミドリイシの海水温に対する成長率の変動(上)と、それぞれの成長率と光合成活性との関係(下)。色の違いは群体の違いを示す。

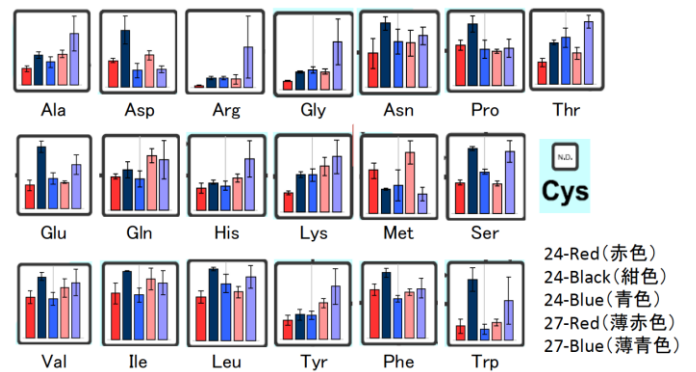


図4. 80日間の温度飼育実験直後のハマサンゴのメタボローム解析におけるアミノ酸値の比較

本研究では、生物学的研究により、ハマサンゴがいかに複雑な生物で、ミドリイシとも遺伝子学的に大きく異なるということが分かった。さらに、骨格成長パターンや群体依存性なども両種で異なることが明らかになった。しかし不思議なことに、その骨格の $\delta^{18}\text{O}$ は無機的に沈積したあられ石の温度依存性と類似しており、外界の環境を的確に記録していることも確認された。以上の結果を総合的に考えると、サンゴ宿主は能動的に外骨格を形成しているわけではないかもしれず、光合成を含む褐虫藻と宿主の共生関係も含めたサンゴの生物活動を維持する結果として、副産物的に骨格成長が行われている可能性があることが示唆された。

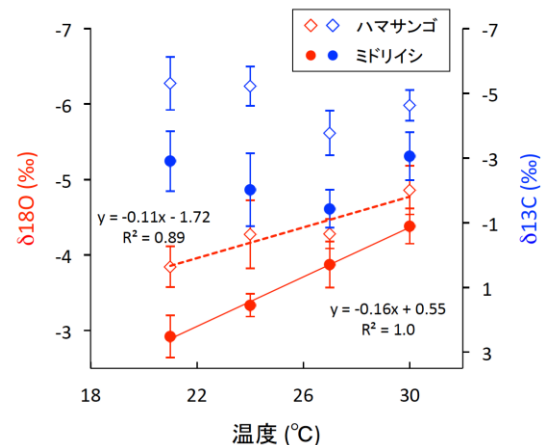


図 5. 温度飼育実験後のサンゴ骨格中の酸素（赤）・炭素（青）同位体比測定結果。酸素同位体比のそれぞれの一次式の傾きは温度依存性を示す。

4. 今後の展開

石灰化生物はサンゴのみに限らず、数多くの海洋生物が炭酸カルシウムの殻を形成するが、その生物鉱化作用には不明な点が多い。このバイオミネラリゼーションの研究分野に今回得られた知見が生かせると考えられる。今回の研究では、サンゴの生物活動と骨格成長が直接的にはリンクしていない可能性が考えられたが、この仮説が本当であれば、サンゴの健全度を骨格から推察するのは危険であるため、今後の評価手法にも影響を与える可能性がある。ただし、本研究で議論しているのは骨格成長であり、初期の骨格形成とは異なる点は注意が必要である。

5. 発表実績

【査読付き国際誌】

M. Inoue, N. Gussone, Y. Koga, A. Iwase, A. Suzuki, K. Sakai, H. Kawahata Controlling factors of Ca isotope fractionation in scleractinian corals evaluated by temperature, pH and light controlled culture experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 167, 80–92, 2015

K. Nishida, K. Ishikawa, A. Iguchi, Y. Tanaka, M. Sato, T. Ishimura, M. Inoue, T. Nakamura, K. Sakai and A. Suzuki, Skeletal oxygen and carbon isotope compositions of *Acropora* coral primary polyps experimentally cultured at different temperatures. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 15, doi:10.1002/2014GC005322, 2014

Y. Tanaka, A. Iguchi, K. Nishida, M. Inoue, T. Nakamura, A. Suzuki and K. Sakai, Nutrient availability affects the response of juvenile corals and the endosymbionts to ocean acidification. *Limnology and Oceanography*, 59, 1468-1476, 2014

C. Shinzato, M. Inoue, M. Kusakabe, A Snapshot of a Coral ‘‘Holobiont’’: A Transcriptome Assembly of the Scleractinian Coral, *Porites*, Captures a Wide Variety of Genes from Both the Host and Symbiotic Zooxanthellae. *PLoS ONE* 9(1): e85182. doi:10.1371/journal.pone.0085182, 2014

【学会発表】

Bell, T., Y. Yokoyama A. Iguchi, A. Suzuki ,Using *Acropora digitifera* to bridge the gap between genome biology and geochemistry, 2014 Japan Geoscience Union Meeting (Yokohama, Japan, 2014.5.1) Oral. 学生優秀発表賞

新里宙也、井上麻夕里、日下部誠 造礁サンゴ(ハマサンゴ、*Porites australiensis*) “holobiont”のトランスクリプトーム解析. マリンバイオテクノロジー学会, 2014年5月31日, 三重

阪田祥子, 井上麻夕里, 田中泰章, 中村崇, 酒井一彦, 池原実, 鈴木淳. コユビミドリイシ(*Acropora digitifera*) 骨格中化学成分の温度指標としての評価. 2015年度日本地球惑星科学連合大会(一般講演), 2015年5月24-28日, 千葉

井上麻夕里, Nikolaus Gussone, 古賀奏子, 岩瀬晃啓, 鈴木 淳, 酒井一彦, 川幡穂高, サンゴ骨格のカルシウム同位体分別の変動要因について. 2015年度日本地球化学会年会(一般講演), 2015年9月16-18日, 横浜

Tomoko Bell, Akira Iguchi, Atsushi Suzuki, Arisa Seki, Yusuke Yokoyama. Coral genes related to elements in seawater and their potential influence on variations in skeletal climate proxies. *INQUA 2015* (Nagoya, Japan, 2015.7.29) oral

大野 良和、井上 麻夕里、 新里 宙也、 鈴木 淳、中村崇、蛍光色素 Calcein によるサンゴ初期ポリプの石灰化イメージング、第18回日本サンゴ礁学会、2015年11月29日、慶應義塾大学(最優秀ポスター賞)