

F-5 サンゴ礁における生物多様性構造の解明とその保全に関する研究

(1) サンゴ礁生態系の生物多様性構造の解明に関する研究

③ サンゴの遺伝的多様性の解明に関する研究

研究代表者 琉球大学理学部海洋自然科学科 日高道雄

琉球大学

理学部海洋自然科学科

H高道雄・傳田哲郎

遺伝子実験施設

中島裕美子

平成9～11年度合計予算額 7,236千円
(平成11年度予算額 2,291千円)

[要旨]

サンゴ精子より抽出したDNAを用いて、7種のサンゴについてrRNA遺伝子のITS領域の塩基配列を決定した。ITSの長さはインサンゴの代表的な種間で異なっており、ITS塩基配列は属以下のレベルでの系統解析に有効であった。

沖縄のサンゴの多くは、SSUrRNA遺伝子のRFLP解析によるタイプ分けでタイプCとされる褐虫藻を共生させているが、今回タイプAの褐虫藻も見つかった。LSUrRNA遺伝子のSSCP解析により、9種のサンゴから15の異なる遺伝子型の褐虫藻が見つかった。サンゴ1群体が少なくとも2～3種類の褐虫藻を共生させていると考えられる。同一群体由来の枝を異なる光条件で飼育した場合に、SSCPパターンが異なる場合があり、光条件により褐虫藻の遺伝子型組成が変化することが示唆された。

沖縄、ハワイ、タイの3地域より採集したサンゴに共生する褐虫藻間の系統解析を、褐虫藻を親から受け継ぐサンゴと毎世代外界から獲得するサンゴ間の違いに着目して行った。得られた52のrRNA遺伝子ITS1配列について解析した結果、一部のサンゴの褐虫藻はクラスターを形成し、種特異的あるいは地域特異的であるように見えたが、多くの褐虫藻は多分岐を示した。褐虫藻のITSは系統解析に十分な情報を与えるほど変異がないと考えられる。褐虫藻を親から受け継ぐサンゴにおいても褐虫藻の系統関係が宿主の系統を反映していないことから、これらのサンゴも成群体になるまでの間に外界から新たな褐虫藻を受け入れている可能性が示唆された。

クサビライシ属の個体ゲノムDNAから単離したマリナー様配列をシーケンスした結果、与那国蚕のマリナー様配列と非常に高い相同性を示した。今回のサンゴから単離された配列は、転移に必要な酵素(トランスポゼース)の完全なORFをもっていることから、転移可能な活性型配列であることが強く示唆された。

[キーワード] サンゴ、褐虫藻、共生、多様性、トランスポゾン

1. 序

サンゴの成長型は生息環境によって変化するため、同一種が生息場所によって異なる形をとっ

たり、異なる種が似た環境で類似した成長型を示すことがある。1970年代にオーストラリアの Veron らにより、生息環境による成長型の変異を考慮したサンゴ分類の改訂がなされ、成長型が連続的に変異する場合は、同一種としてまとめられた。しかし、1990年代にアイソザイムや DNA の分析により、今まで種内変異とされていたものが実は別種であると示される例が出始めた。サンゴの交雑実験では、異種とされるサンゴ間の交雑が成功したり、同種の変異型間でも受精しなかったりする例が報告されている。このことも、今まで別種と考えられていたサンゴが同種であったり、種内変異と考えられていたものが別種であったりする可能性を示し、分子的方法によるサンゴの分類研究の重要性を示している¹⁾。

褐虫藻については、海産無脊椎動物に共生する褐虫藻は全て同種と考えられてきたが、ここ 10 数年間で、褐虫藻には様々な種が存在することが明らかになってきた。1987 年に培養褐虫藻のサイズ測定および TEM による染色体解析により、4 宿主由来の褐虫藻がそれぞれ別種であることが示された。しかしその後、TEM の連続切片観察による染色体数の測定法に疑義が出された²⁾。他の宿主由来の褐虫藻について形態学的に種を記載することはまだ試みられていない。一方 SSUrRNA 遺伝子の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析および塩基配列解析により、様々な宿主由来の褐虫藻は A, B, C の 3 タイプに分かれることが示された。しかし DNA レベルのタイプ分けと形態に基づく分類との対応関係はまだ明らかでない。

同一種のサンゴでも、さらには同一群體でも、複数のタイプの褐虫藻を含む場合があることが報告された。サンゴのもつ褐虫藻のタイプ組成は、環境条件、主に光条件により変化し、異なるタイプの褐虫藻では、最適な光条件、ストレスに対する感受性などが異なっている。サンゴのもつ褐虫藻の多様性は、宿主であるサンゴのストレス抵抗性などに大きく影響する。一方で、環境ストレスでサンゴが褐虫藻を失う白化現象も、サンゴにとっては、より環境に適応した褐虫藻を獲得するための機会であるという考えも提唱されている。サンゴのもつ褐虫藻の多様性は、サンゴが褐虫藻を獲得する方法や選択性 (宿主-褐虫藻間の特異性) によって決定されると考えられるがその機構はまだ明らかでない。

2. 研究目的

(1) サンゴの種多様性の解析

サンゴの rRNA 遺伝子の ITS 領域の長さが種により異なるという報告はあるものの^{2), 3)}、ITS 塩基配列に基づくサンゴの系統解析は、今まで、*Porites* および *Acropora* 属内の関係を調べた例があるだけである^{4), 5)}。Medina *et al.* (1999) は、*Montastraea annularis* 種群の別種であるとされた 3 種間で、ITS の配列に種固有の変異が見られないことから、これらは同種であるとした⁶⁾。最近サンゴの rRNA 遺伝子のスペーサー (ITS) 領域を PCR 増幅するためのサンゴ特異的プライマー (A18S) が開発された⁷⁾。しかし、このプライマーは数種のサンゴで ITS 増幅に有効であることが確認されているものの、どのサンゴでも使えるわけではないようである。

今回、サンゴの ITS 領域の塩基配列解析を行い、ITS に基づく系統解析がどの程度有効か、特に近縁種間の識別や種内変異の解析に有効かを調べることを目的とした。将来的には *Pocillopora* (ハナヤサイサンゴ属)、*Galaxea* (アザミサンゴ属)、*Fungia* (クサビライシ属) など種内変異あるいは中間型があって、同種内の変異型か別種であるのか分類の難しいグループでの種識別に利用することを試みる。

(2) 褐虫藻の種多様性の解析

SSUrRNA および LSUrRNA 遺伝子の RFLP を行い、タイプ (遺伝子型) の識別を行う。また ITS 領域の RFLP および塩基配列解析により、より詳細なタイプ分けが可能か検討する。

最近 Darius et al. (1998) は、7 種のサンゴに共生する褐虫藻の SSUrRNA を 3 種の制限酵素を組み合わせた RFLP 解析により、5 パターンに分類した⁹⁾。その結果 5 種のサンゴはそれぞれ 1 種類の褐虫藻を、2 種のサンゴは 2 種類以上の褐虫藻を共生させていると考えられた。彼らはまた、複数の遺伝子型の褐虫藻を含むサンプルを PCR、クローニングすると、アーティファクトにより予想外の配列が得られることがあることを報告している。一方 SSUrRNA よりも LSUrRNA や ITS 領域の方が変異が多いと考えられているが、褐虫藻の LSUrRNA や ITS の塩基配列を解析した例は少ない^{10, 9)}。

今回、サンゴ数種について 1 群体内に複数の褐虫藻が棲む可能性および光条件によって褐虫藻の組成が変化する可能性を調べることを目的として、SSUrRNA 遺伝子および ITS の RFLP、および LSUrRNA の SSCP を行った。

イシサンゴのうち、褐虫藻を親から受け継ぐタイプと毎世代外界から獲得するタイプとの間で、褐虫藻の系統関係を比べることを試みた。親から褐虫藻を受け継ぐグループ (コモンサンゴ、ハマサンゴ、ハナヤサイサンゴなど) では、おそらくそれぞれ種に特異的な褐虫藻を共生させており、毎世代外界から新たに褐虫藻を獲得するグループ (アザミサンゴ、シコロサンゴなど) では、同じ地域に棲むサンゴ同士は種を越えて類似した褐虫藻を共生させていることが予想される。沖縄、ハワイ、およびタイのサンゴより、褐虫藻の rRNA 遺伝子の ITS 領域を PCR 増幅し、ITS の塩基配列に基づく系統樹を作成することにより、この仮説を検証することを試みる。

イシサンゴ由来の褐虫藻の染色体数については、イボコモンサンゴの 26 本という報告があるだけである¹¹⁾。他のイシサンゴ由来の褐虫藻でも、染色体数および染色体の核容積に占める割合に差があるか予備的に調べる。また光学顕微鏡で染色体数を数えることが可能か試みた。

(3) サンゴ褐虫藻の転移因子の探索

転移因子 (トランスポゾン) マリナーは、広く多くの生物に存在していることがわかっており、水平伝播 (Horizontal transfer) すると考えられている。マリナーは、全長が約 1.2kb、転移に必要な酵素 (transposase: TP) をコードする領域をもち、両端には DNA binding protein である TP が認識して結合する逆位繰返し配列 (Inverted terminal repeat: IR) を有する。この中にコンセンサスなアミノ酸配列が 2 箇所存在し、これらをプライマーとして PCR 増幅することにより出現する約 500bp のバンドの有無によってマリナーの存否を判定する方法が報告されている¹²⁾。マリナーの全塩基配列、IR の配列や長さは生物種によって、また同じ種においてもマリナーのタイプによっていくつかのパターンが存在している。またこれまで単離されているマリナーは転移に必要な酵素 (transposase: TP) をコードする領域が不完全で、転移する能力がないと考えられる不活性型のもので始どである。

本研究では、サンゴおよび褐虫藻の遺伝的マーカーとしての利用、およびサンゴと褐虫藻の共生関係を解析する一つの手段として、トランスポゾン、マリナーの解析を試みた。

3. 研究方法

(1) サンゴおよび褐虫藻の DNA 抽出は下記の 4 通りの方法で行った。

- ① WaterPik を用いて ZB を噴射することにより凍結サンゴより組織をはぎ取る。遠心によりサンゴと褐虫藻を分離した後、DNA を抽出する。
 - ②凍結サンゴを DNAB をつけた歯ブラシでこすり、組織をはぎ取る。サンゴと褐虫藻を分離せずに DNA を抽出。
 - ③エアブラシを用いて生サンゴより組織をはがす。サンゴと褐虫藻を分離せずに DNA を抽出。
 - ④生サンゴを guanidine isothiocyanate (GITC) を含む抽出液につける。
- ①～④のそれぞれの処理をした後は、通常の方法により DNA 抽出を行った。

(2) PCR による増幅

サンゴについては、精子あるいは精巣から抽出した DNA を用いて、ITS 用ユニバーサルプライマー (ITS5/ITS4) を用いて ITS 領域を増幅した。サンゴ体細胞から抽出した DNA を用いる場合は、サンゴ特異的 ITS プライマー (A18S/ITS4) を用いて増幅した。

褐虫藻 ITS については、サンゴ体細胞より抽出した DNA を用い、褐虫藻特異的プライマー (ss3z*/ITS4) を用いて増幅した。PCR 条件は、94 °C : 50 °C : 72 °C = 1 分 : 2 分 : 3 分、30 サイクル後、72 °C で 8 分保持。

(3) 塩基配列解析

PCR 産物を精製し、ALFexpress とサイクルシーケンスキットを用いて ITS 領域の塩基配列を解析した。サンゴ ITS については、ITS5/ITS3、ITS3/ITS4 プライマーを用いて配列を両方向から読んだ。褐虫藻 ITS については、ITS 2 の 5.8S 側に新たに褐虫藻特異的プライマー (Z58S1R) を設定し、ss3z*/Z58S1R のプライマーペアを用い ITS1 の配列を両方向から読んだ。

(4) SSCP

PCR 産物 20 μ l を等量の loading buffer (95 % formamide, 10 mM NaOH, 0.25 % bromophenol blue, 0.25 % xylene cyanol) と混合し、95 °C、5 分間変性した後、直ちに氷冷し、電気泳動にかけた。

(5) マリナーの探索

クサビライシ属サンゴの 1 個体全体 (褐虫藻を含む) からゲノム DNA を抽出し、マリナーのコンセンサスなアミノ酸配列を degenerate primer として PCR を行った。さらに鱗シ目昆虫の 1 種、セクロピア蚕のマリナー様配列の IR 38bp を用いて long-PCR を行った。さらにクサビライシ属サンゴの 1 個体全体から抽出したゲノム DNA に対してセクロピア蚕マリナー様配列における逆位繰り返し配列 (IR) をプライマーとして PCR をし、得られた約 1.2 kb バンドをクローニングしてシーケンスした。

平成 11 年 7 月、瀬底実験所においてコモンサンゴ属いくつかの群体ごとに卵と精子 (褐虫藻フリーのもの) を分離してそれぞれから DNA を抽出し、マリナーのコンセンサス領域約 500bp を増幅する系、および全長 1.2kb を増幅する系それぞれ PCR 反応を行い電気泳動によってバンドの有無、位置を確認し、褐虫藻フリーの精子と褐虫藻が混在していると考えられる親個体およ

び卵の間に差があるかどうかをみた。また本島で採集されたクサビライシ、イボヤギ数個体について(2)と同様にして種、個体間にマリナー様配列に差があるかどうかをみた。

4. 結果と考察

(1) サンゴの種多様性の解析

ITS 領域の長さはサンゴの種により異なっていた(表1)。ほぼ 600-750 の範囲の長さの ITS をもつサンゴが多いが、アザミサンゴやミドリイシのようにこの範囲からかけ離れた長さの ITS をもつものもあった。また同属のサンゴ間では、ITS の長さは比較的類似している傾向が見られた。ちなみに ITS1 の長さは、*Porites* 属の 5 種で 236-256、*Tubastrea* で 266、*Balanophyllia* で 257、褐虫藻では宿主により 253-274 とばらついている(Hunter et al. 1997)。*Acropora* 属では、70-80 と短く、また同一群体から複数の配列が得られる。*Acropora* 5 種間で比較した場合の塩基一致率は 36-100 % である(Odorico and Miller 1997)。

7 種のサンゴで今回 ITS 領域の配列が決定できた。今回精子または精巢の得られたサンゴより DNA を抽出したため、必ずしも近縁の分類群や種識別の難しい分類群について配列を決定することはできなかった。そこで、データベースに登録されている近縁なサンゴの ITS 塩基配列を利用して、ITS 塩基配列が属内の系統関係を調べるのに有効なことを確かめた(図1)。

ミドリイシで開発されたサンゴ特異的 ITS プライマー(A18S)を用いた場合、PCR 増幅産物が得られたのは、今回は *Porites lutea*, *Pocillopora damicornis* の 2 種のみであった。

(2) 褐虫藻の多様性

従来太平洋のイシサンゴと共生する褐虫藻は rRNA の RFLP 解析によるタイプ分けでは、タイプ C のみとされていた。*Stylophora pistillata* (n=3)、*Seriatopora hystrix* (n=1)、*Seriatopora caliendrum* (n=4)、*Pocillopora damicornis* (n=1) の採集したばかりの群体内の褐虫藻は C タイプであった。8% および 95% 光条件(PAR) 下で 3 か月飼育した *S. hystrix* および *S. pistillata* の枝内の褐虫藻についても調べたが、*S. hystrix* の 1 枝のみが、C タイプの他に A タイプを含んでいた。ヒドロサンゴである *Millepora intricata* の群体は A タイプと C タイプの両方の褐虫藻を含んでいた。また 3 種の 2 枚貝から単離した培養褐虫藻はいずれも A タイプであった(図2)。

ITS の RFLP(Taq I) では、*M. intricata* および A、C 両タイプをもつ *S. hystrix* が他と異なるパターンを示した(図2)。

LSUrDNA の SSCP 解析の結果、9 種のサンゴから 15 の異なる SSCP パターンが得られた(図3, 表2)。SSCP では、同一遺伝子型の褐虫藻からセンス鎖、アンチセンス鎖の 2 本のバンドがでることが予想されるが、今回 1 つのサンプルから 3-5 本のバンドが現れた。従って 1 種類のサンゴは少なくとも 2-3 種類の遺伝子型の褐虫藻を共生させていると考えられる。1 種類の褐虫藻が、多型性の rRNA 遺伝子をもつ可能性もあるが、もしそうであれば、常に同一サンプルからは同一のバンドパターンが得られるはずである。しかし異なる光条件で飼育した同一群体由来の枝が、異なる SSCP パターンを示す場合があり、この可能性は低いと考えられる。むしろ今回の結果は、1 群体が複数の遺伝子型の褐虫藻を含み、さらに光条件により褐虫藻遺伝子型の組成が変化することを示すと考えられる。

分子的な方法によるタイプ分けとともに、形態学的に褐虫藻の分類ができないか試みた。褐虫

表 1. 各種サンゴの rRNA 遺伝子の ITS 領域の長さ

	PCR (ITS5/ITS4)	ITS1	5.8S	ITS2	total	Ref.
Pocilloporidae						
<i>Pocillopora verrucosa</i>	1240	410	156	371	937	1
<i>Stylophora pistillata</i>	750, 700					3, 4
<i>Seriatopora hystrix</i>	690, 640					3, 4
Acroporidae						
<i>Montipora digitata</i>	630	206	161	181	548	1
<i>M. venosa</i>	630		161			1
<i>M. aequituberculata</i>	630		161			1
<i>Acropora longicyathus</i>		70-73	156-8	100-4	326-355	5
<i>A. valida</i>		76-80	155	106	337-41	5
<i>A. hyacinthus</i>		72-75	156	110-2	338-43	5
<i>A. cytherea</i>		73-75	156	110-2	339-43	5
<i>A. formosa</i>		73-74	155	104-7	332-36	5
Poritidae						
<i>Porites cylindrica</i>	690	218	158	219	595	1
<i>P. evermanni</i>		250	168	221	639	2
<i>P. compressa</i>		254	168	219	641	2
<i>P. lobata</i>	660, 610					3, 4
<i>Goniopora tenuidens</i>	710, 660					3, 4
Faviidae						
<i>Goniastrea aspera</i>	670	202	157	222	581	1
<i>Favites chinensis</i>	770	257	158	240	655	1
Fungiidae						
<i>Fungia</i> sp.	650	203	158	195	556	1
<i>Heliofungia actiniformis</i>	640, 590					3, 4
Oculinidae						
<i>Galaxea fascicularis</i>	750	285	160	249	694	1

References: 1, Present study; 2, Hunter et al. 1997; 3, Takabayashi et al. 1998a; 4, Takabayashi et al. 1998b; 5, Odorico and Miller 1997

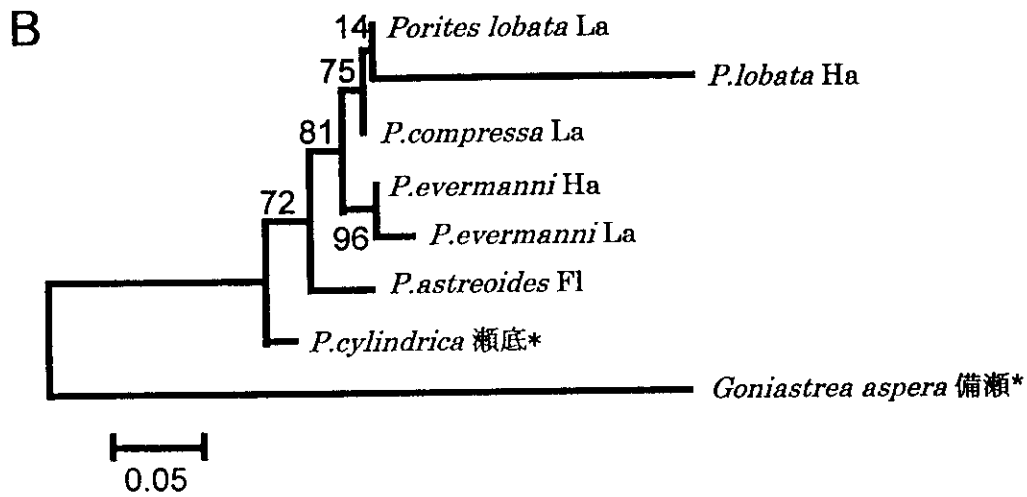
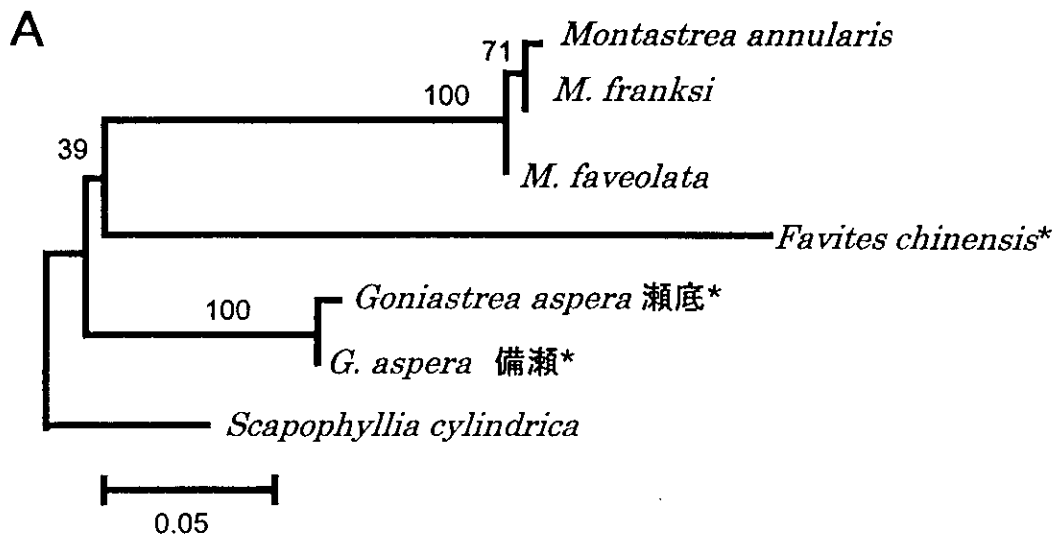
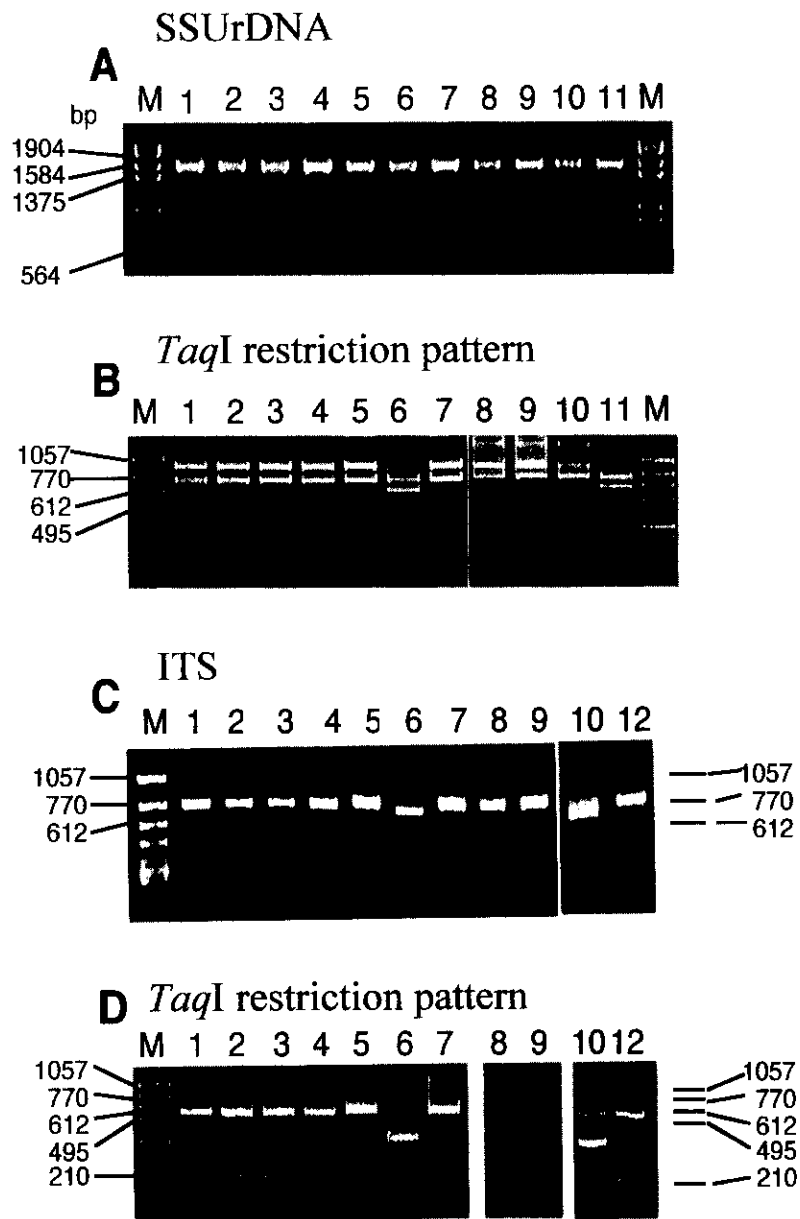


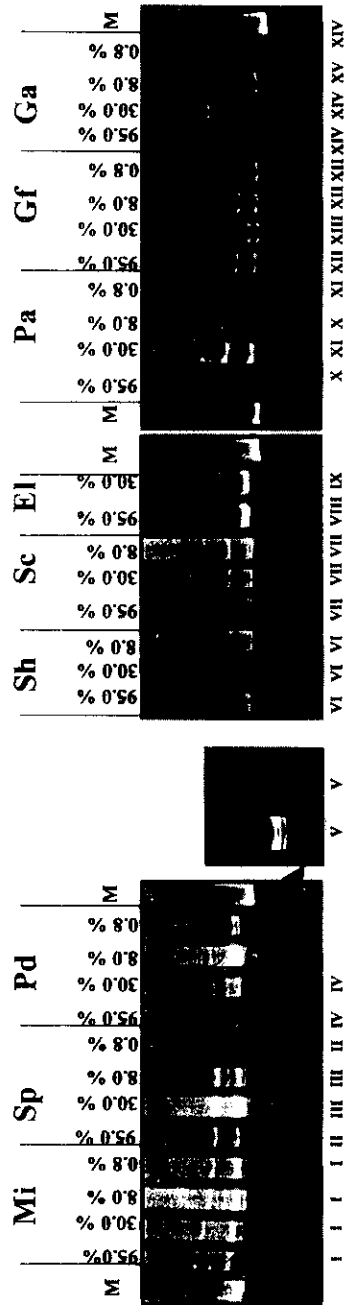
図1. A、Faviidae 科6種および Merulinidae 科1種の ITS 領域塩基配列に基づく近隣結合系統樹。B、*Porites* 属5種の ITS 領域塩基配列に基づく近隣結合系統樹。



1-4 *S. pistillata*; 5-7 *S. hystrix*; 8, 9 *S. caliendrum*
10 *M. intricata*; 11 *H. hippopus*

図2. 様々な宿主由来の褐虫藻の比較。A、SSUrRNA 遺伝子の PCR 増幅産物。B、SSUrRNA 遺伝子を制限酵素 *TaqI* で消化したときの電気泳動パターン。C、rRNA 遺伝子の ITS 領域の PCR 増幅産物。D、ITS を制限酵素 *TaqI* で消化したときの電気泳動パターン。レーン1-4、ショウガサンゴ；5-7 トゲサンゴ；8-9、フトトゲサンゴ；10、ホソエダアナサンゴモドキ；11、シャゴウ；12、オオヒシガイ。

(a)



(b)

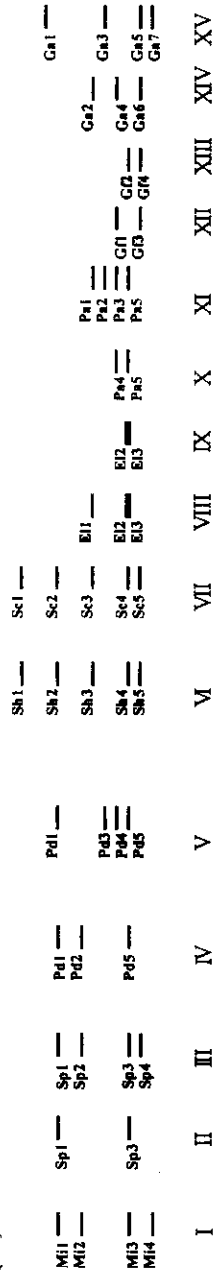


図3 褐虫藻 1SUrRNA 遺伝子の SSCP パターン。A、イソサンゴ 8 種、ヒドロサンゴ 1 種の褐虫藻 1SUrRNA 遺伝子の SSCP パターン。B、SSCP パターンの模式図。同一群体由来の枝を 2 ヶ月間異なる光条件下で飼育した。Mi、*Millepora intricata* ホノエダアササンゴモドキ；Sp、*Stylophora pistillata* ショウガサンゴ；Pd、*Pocillopora damicornis* ハナヤサイサンゴ；Sh、*Seriatopora hystrix* トゲサンゴ；Sc、*Seriatopora calandrum* フトゲサンゴ；El、*Echinopora lamellina* リュウキユウキサンゴ；Pa、*Porites attenuata* ベルベットエダハマサンゴ；Gf、*Galaxea fascicularis* アザミサンゴ；Ga、*Goniastrea aspera* パリカメノコキクメイン。

表 2. SSCP 法により検出された褐虫藻の遺伝的多様性

Host species	Light	SSCP pattern	Type	No. of genotypes
<i>Millepora intricata</i>	95%	Mi1, Mi2, Mi3, Mi4	I	2
	30%	Mi1, Mi2, Mi3, Mi4	I	
	8%	Mi1, Mi2, Mi3, Mi4	I	
	0.8%	Mi1, Mi2, Mi3, Mi4	I	
<i>Stylophora pistillata</i>	95%	Sp1, Sp3	II	1
	30%	Sp1, Sp2, Sp3, Sp4	III	
	8%	Sp1, Sp2, Sp3, Sp4	III	
	95%	Sp1, Sp3	II	
<i>Pocillopora damicornis</i>	95%	Pd1, Pd2, Pd5	IV	2
	30%	Pd1, Pd2, Pd5	IV	
	8%	Pd1, Pd3, Pd4, Pd5	V	
	0.8%	Pd1, Pd3, Pd4, Pd5	V	
<i>Seriatopora hystrix</i>	95%	Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, Sh5	VI	3
	30%	Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, Sh5	VI	
	8%	Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, Sh5	VI	
<i>S. caliendrum</i>	95%	Sc1, Sc2, Sc3, Sc4, Sc5	VII	3
	30%	Sc1, Sc2, Sc3, Sc4, Sc5	VII	
	8%	Sc1, Sc2, Sc3, Sc4, Sc5	VII	
<i>Echinopora lamellosa</i>	95%	E1, E2, E3	VIII	2
	30%	E2, E3	IX	
<i>Porites attenuata</i>	95%	Pa4, Pa5	X	1
	30%	Pa1, Pa2, Pa3, Pa5, Pa6	XI	
	8%	Pa4, Pa5	X	
	0.8%	Pa1, Pa2, Pa3, Pa5, Pa6	XI	
<i>Galaxea fascicularis</i>	95%	Gf1, Gf3	XII	1
	30%	Gf2, Gf4	XIII	
	8%	Gf1, Gf3	XII	
	0.8%	Gf1, Gf3	XII	
<i>Goniastrea aspera</i>	95%	Ga2, Ga4, Ga6	XIV	2
	30%	Ga2, Ga4, Ga6	XIV	
	8%	Ga1, Ga3, Ga5, Ga7	XV	
	0.8%	Ga2, Ga4, Ga6	XIV	

藻の核の中で染色体の占める面積の割合を電子顕微鏡写真で測定した。その結果、*Pocillopora verrucosa* では、*Montipora venosa* や *Galaxea fascicularis* よりも染色体の占める面積割合が有意に低かった。このことは、イシサンゴを宿主とする褐虫藻の間でも、染色体数に違いがあることを示唆する。ただし褐虫藻では、染色体のように見える凝縮した部分と他の凝縮した部分とが DNA の系により連結されていることがあり、電子顕微鏡で連続切片を観察したり、DNA を蛍光染色して光学顕微鏡下で染色体を数えるという方法では正確に染色体数を決定することが困難であり、染色体数は褐虫藻の分類形質としては使えないという指摘がある¹²⁾。

(3) 褐虫藻の種特異性、地域特異性：獲得機構との関わり

親から褐虫藻を受け継ぐサンゴは、それぞれ種に特異的な褐虫藻を共生させており、毎世代外界から新たに褐虫藻を獲得するサンゴでは、同じ地域に棲むサンゴ同士は種を越えて類似した褐虫藻を共生させていることが予想される。この仮説を検証するため、沖縄、ハワイ、タイの3地域より採集したサンゴに共生する褐虫藻間の系統解析を、褐虫藻を親から受け継ぐサンゴと毎世代外界から獲得するサンゴ間の違いに着目して行った。得られた 52 の rRNA 遺伝子 ITS1 配列について解析した結果、一部のサンゴの褐虫藻はクラスターを形成し地域特異的であるように見えたが、多くの褐虫藻は多分岐を示した(図4)。褐虫藻の ITS は系統解析に十分な情報を与えるほど変異がないと考えられる。褐虫藻を親から受け継ぐサンゴにおいても褐虫藻の系統関係が宿主の系統を反映していないことから、親から褐虫藻を受け継ぐサンゴも外界から新たな褐虫藻を取り込み、生息環境に適した褐虫藻と共生関係を結んでいると考えられる。

(4) サンゴ、褐虫藻における転移因子マリナーの探索

クサビライシ属の1個体より抽出した DNA を用いて、マリナーのコンセンサスなアミノ酸配列を degenerate primer として PCR を行った結果、予測される約 500bp のバンドが1本検出されたことから、この個体のゲノム中にはマリナーが(おそらく1タイプ)存在することがわかった(図5 A)。次に同じ個体の DNA に対して既にその構造が明らかにされている鱗日昆虫の1種、セクロピア蚕のマリナー様配列の IR38bp を用いて long-PCR を行ったところ、マリナーの全長に匹敵する約 1.2kb のシングルバンドの増幅がみられた(図5 B)。このことはセクロピアタイプに属するヒトヤプラナリアで単離されているマリナー様配列と同じグループに、サンゴのマリナーが分類されることを示唆している。セクロピア蚕のマリナー様配列の IR をプライマーとして PCR をした場合、他の生物においては何種類かのバンドが見られるのに対して、サンゴの場合明瞭な1本のバンドしか見られなかった。

次に、クサビライシ属の他の種についても同様に DNA を抽出し、セクロピア蚕のマリナー様配列の IR 38bp を用いて long-PCR を行ったところ、用いた全ての個体において 1.2kb の明瞭なバンド1本しか得られなかった。このこと、及び前出のコンセンサスなアミノ酸配列をプライマーとして PCR を行った結果において1本のバンドしか増幅されなかったことは、サンゴあるいはその褐虫藻においては1タイプのごくノーマルなマリナーのみが存在している可能性を示唆している。

クサビライシ属の個体ゲノム DNA から単離したマリナー様配列をシーケンスした結果、既に同様の方法にて単離された与那国産のマリナー様配列と非常に高い相同性を示した。与那国産

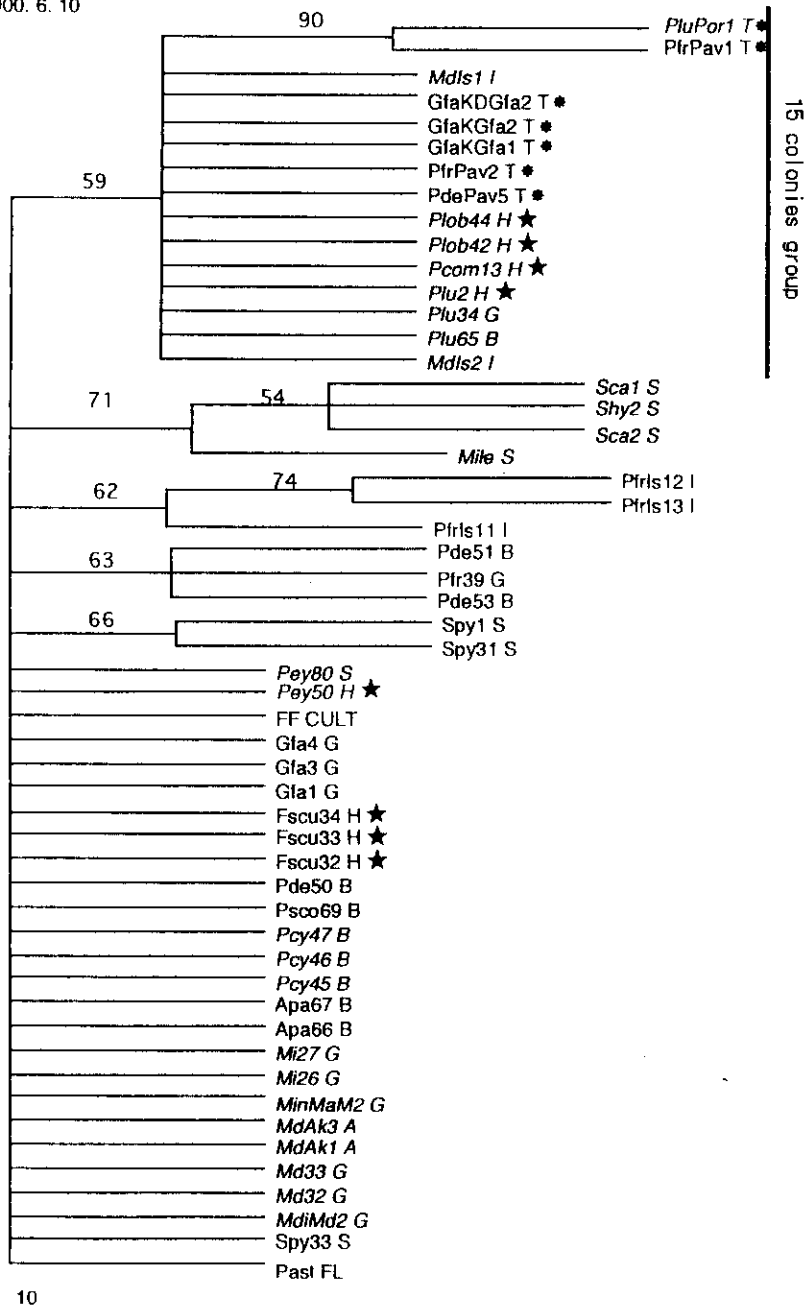


図4. 核リボソーム遺伝子の ITS1 の塩基配列に基づく褐虫藻の系統樹 (近隣結合法)。英文字は、宿主のサンゴ種名と場所を示す。H、ハワイ (★) ; T、タイ (*); I、石垣; 他のアルファベットは沖縄島、FL、フロリダのデータは Hunter et al. (1997)より。数字はブートストラップ値を示す。ブートストラップ値が 50 以下のものは多分岐とした。Apa, *Acropora palifera*; Fscu, *Fungia scutaria*; Gla, *Galaxea fascicularis*; Md, *Montipora digitata*; Mile, *Millepora intricata*; Min, *Montipora informis*; Past, *Porites astreata*; Pcom, *Porites compressa*; Pcy, *Porites cylindrica*; Pde, *Pavona decussata*; Pey, *Pocillopora eydouxi*; Pfr, *Pavona frondifera*; Plo, *Porites lobata*; Plu, *Porites lutea*; Psco, *Psammocora contigua*; Sca, *Seriatopora caliendrum*; Shy, *Seriatopora hystrix*; Spy, *Stylophora pistillata*.

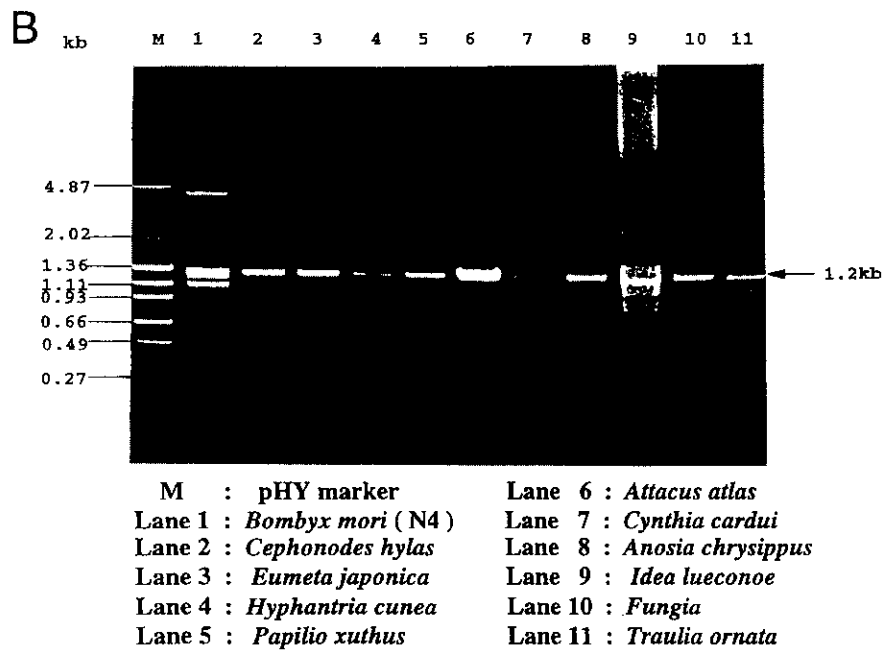
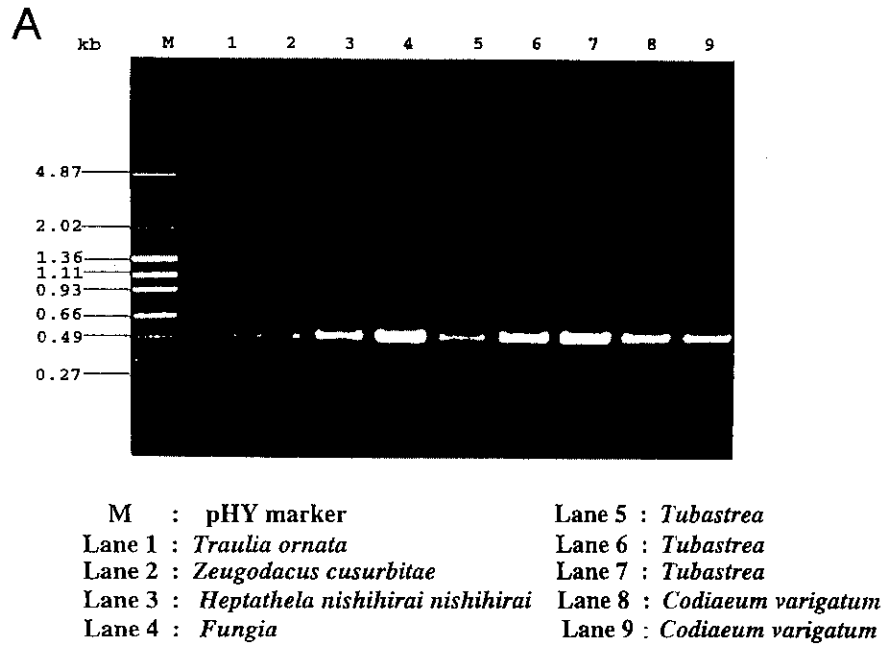


図5. A、マリナー様配列(MLE)のコンセンサス領域約500 bpを増幅するプライマーを用いてPCRをした結果。レーン1、クサビライシ属のサンゴ、5-7イボヤギ(褐虫藻を含まない非造礁性のサンゴ)。B、マリナー様配列(MLE)の全長1.2 kbを増幅するためにセクロピア蚕MLEの末端逆位繰り返し配列をプライマーにしてLong PCRをした結果。レーン10のみサンゴ(クサビライシ属)。

において単離された配列および今回のサンゴから単離された配列ともに転移に必要とされる酵素（トランスポゼース）の完全な ORF をもっている（図6）ことからこれらは転移可能な活性型配列であることが強く示唆され、トランスフォーメーションベクターとしての可能性を秘めている。

コモンサンゴ属サンゴ数個体の精子 DNA に対する PCR の結果、供試した全てにおいて親個体と同じタイプと考えられるマリナー様配列全長が存在することがわかった。従ってこれについては、褐虫藻ではなくサンゴ自体がマリナー様配列を持っていることを示している。しかし褐虫藻を単離して比較してはいないので褐虫藻単独については今後さらに調べる必要がある。

沖縄本島で採集された個体全体（褐虫藻も込みで）におけるマリナー様配列を示す電気泳動パターンに個体間、種間の差は見られず、同じタイプが存在することがわかった。現在他の地域に生息する同種のサンゴでは異なるマリナー様配列の存在が判明しつつあり、マリナー様配列が地域を象徴するものであることがうかがえた。

5. 本研究により得られた成果

(1) ITS の長さはイシサンゴの代表的な種間で異なっており、ITS 塩基配列は属以下のレベルでの系統解析に有効であった。

(2) 沖縄のサンゴの多くは、SSUrRNA 遺伝子の RFLP 解析によるタイプ分けでタイプCとされる褐虫藻を共生させているが、今回タイプAの褐虫藻も見つかった。

(3) LSUrRNA 遺伝子の SSCP 解析によれば、1種類のサンゴ群体が少なくとも2-3種類の褐虫藻を共生させていると考えられる。同一群体由来の枝を異なる光条件で飼育した場合に、SSCP パターンが異なる場合があり、光条件により褐虫藻の遺伝子型組成が変化することが示唆された。

(4) 褐虫藻 rRNA 遺伝子 ITS1 配列について解析した結果、多くの褐虫藻は多分岐を示した。褐虫藻の ITS は系統解析に十分な情報を与えるほど変異がないと考えられる。

(5) クサビライシ属の個体から単離したマリナー様配列は、与那国産のマリナー様配列と非常に高い相同性を示し、転移に必要とされる酵素（トランスポゼース）の完全な ORF をもっていることから、転移可能な活性型配列であることが強く示唆された。

6. 参考文献

- 1) Lopez JV, R Kersanach, SA Rehner and N Knowlton (1999) Molecular determination of species boundaries in corals: genetic analysis of the *Montastraea annularis* complex using amplified fragment length polymorphisms and a microsatellite marker. Biol Bull 196: 80-93
- 2) Smith C, CA Chen, H-P Yang and DJ Miller (1997) A PCR-based method for assaying molecular variation in corals based on RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer region. Mol Ecol 6: 683-685
- 3) Takabayashi M, D Carter, S Ward, and O Hoegh-Guldberg (1997) Inter- and intra-specific variability in ribosomal DNA sequence in the internal transcribed spacer region of corals. Proceedings of the Australian Coral Reef Society 75th Anniversary Conference 237-244
- 4) Hunter CL, CW Morden and CM Smith (1997) The utility of ITS sequences in assessing relationships among zooxanthellae and corals. Proc 8th Int Coral Reef Sym 2: 1599-1602

```

DNASIS      Translation Editor [sanngoA[TPC ORF ]]      2000.06.12
  1 ATGGAAACTTGAAATATCGCGTTATTTACGAGTATGAGTCCACCGTGGCACCAGTGCT      60
 1 M E N L K Y R V I Y E Y E F H R G T S A      20

 61 GCAGAAACGGCTCGAAGGATTAATGATGTGTATGGCGGCGGTGTGACAAAAGAAAACACA      120
21 A E T A R R I N D V Y G G G V T K E N T      40

121 GTGCGTTTTTTGGTCCAAACGTTTTTCGTTCTGGAAATTTTCGACCTCCGAAACAAGCCCCGT      180
41 V R F W F Q R F R S G N F D L R N K P R      60

181 GGACGGCCGGATACCAAAGTTGATAATGAAGAATTGAAGGCTATTGTGGAAGCGGATCCA      240
61 G R P D T K V D N E E L K A I V E A D P      80

241 TCGCAAACCACGCCCGAGTTAGCTGCAGGCTGCGGTGTTAGTGACAAAATTGITTAAATC      300
81 S Q T T P E L A A G C G V S D K I V L I      100

301 CATTGGAAGCAAACCTGGGAAGGTTAAAAAGCTCGAAAGGTGGGTACCTCATGAATTAAGT      360
101 H L K Q T G K V K K L E R W V P H E L S      120

361 GAAACAAACCGACAAACGCGTGTGACTGTTGCGTTACATTACTCAACCGGCACAACAAT      420
121 E T N R Q T R V D C C V T L L N R H N N      140

421 GAAGGGATTTTAAATCGAATCATTACGTGTGATGAAAAATGGATCCTGTACGATAATCGG      480
141 E G I L N R I I T C D E K W I L Y D N R      160

481 AAACGCTCATCGCAATGGCTGAACCCCTGGCGAACCAGCCAAATCCTGCCCTAAGCGAAAA      540
161 K R S S Q W L N P G E P A K S C P K R K      180

541 TTGACTCAAAAAAAGTTACTTGTGAGCGTTTGGTGGACTAGTGCCGGTGTGTCCTCACTAC      600
181 L T Q K K L L V S V W W T S A G V V H Y      200

601 AGCTTTCTTAAATCCGGCTGACAATTACGGCAGATGTCTATTGTCAACAACGCAAGTC      660
201 S F L K S G L T I T A D V Y C Q Q L Q V      220

661 ATGATGGAAAAGCTAGCTGCTAAACAACCGAGGCTGATCAATCGCTCTAGGCCACTACTG      720
221 M M E K L A A K Q P R L I N R S R P L L      240

721 CTTGATGACAATGCTAGACCACACTGCACAACAGACGGCTACTAAATTAGGGGAGCTT      780
241 L H D N A R P H T A Q Q T A T K L G E L      260

781 CAATTGGAATGTCTAAGACATCCACCGTATCCCCGGATCTTGCTCCAACCTGATTACCAC      840
261 Q L E C L R H P P Y S P D L A P T D Y H      280

841 TTTTTTCGTAATTTGGATAACTTTTTGCAAGGAAAAAATCAACTCCGATGGGGCAGTC      900
281 F F R N L D N F L Q G K K F N S D G A V      300

 901 CAAACCGCCTTCAAAGATTTTATTGATCCCGTCCGAATAGTTTTTTTAG      951
301 Q T A F K D F I D S R P N S F F *      317

```

図6. クサビライシ属サンゴから単離したマリナー様配列(MLE)のトランスポーズをコードする領域の塩基およびアミノ酸配列。メチオニン (M) からストップコドン (*) まで完全なオープンリーディングフレーム (ORF) が得られた。

- 5) Odorico DM and DJ Miller (1997) Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution. *Mol Biol Evol* 14: 465-473
- 6) Medina M, E Weil and AM Szmant (1999) Examination of the *Montastraea annularis* species complex (Cnidaria: Scleractinia) using ITS and COI sequences. *Mar Biotechnol* 1: 89-97
- 7) Takabayashi M, DA Carter, WKW Loh, and O Hoegh-Guldberg (1997) A coral-specific primer for PCR amplification of the internal transcribed spacer region in ribosomal DNA. *Mol Ecol* 7: 925-931
- 8) Darius HT, C Dauga, PAD Grimont, E Chungue, and PMV Martin (1998) Diversity in symbiotic dinoflagellates (Pyrrhophyta) from seven scleractinian coral species: restriction enzyme analysis of small subunit ribosomal RNA genes. *J Euk Microbiol* 45: 619-627
- 9) Wilcox T (1998) Large-subunit ribosomal RNA systematics of symbiotic dinoflagellates: morphology does not recapitulate phylogeny. *Mol Phylogen Evol* 10: 436-448
- 10) Blank RJ and RK Trench (1985) Speciation and symbiotic dinoflagellates. *Science* 229: 656-658
- 11) Robertson HM (1993) The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature* 362: 241-245
- 12) Udy JW, R Hinde, and M Vesk (1993) Chromosomes and DNA in *Symbiodinium* from Australian hosts. *J Phycol* 29: 314-320

7. 研究成果の発表状況

(1) 口頭発表

- ① 伊藤慎美子、RA Kinzie III、日高道雄 (1998) 造礁サンゴ卵母細胞による共生藻の取り込みと初期発生における共生藻の分布パターン。日本動物学会第 69 回大会 (広島)
- ② 伊藤慎美子、RA Kinzie III、日高道雄 (1998) 卵母細胞内に共生藻をもつ造礁サンゴの初期発生と共生藻の分布パターンの変化について。日本サンゴ礁学会第 1 回大会 (東京)
- ③ 中島裕美子、根岸務、日高道雄、他 (1999) 沖縄に生息するサンゴマリナー様配列 (MLS) の比較。日本サンゴ礁学会第 2 回大会 (沖縄)
- ④ 廣瀬慎美子、日高道雄 (1999) 沖縄島における造礁サンゴ 2 種 (*Pocillopora verrucosa*, *Montipora digitata*) の白化前後の繁殖について。日本サンゴ礁学会第 2 回大会 (沖縄)
- ⑤ 日高道雄、金元久巳 (1999) mini-PAM を用いた造礁サンゴの光合成測定: 高温ストレスと強光ストレスの影響。日本サンゴ礁学会第 2 回大会 (沖縄)
- ⑥ 中島裕美子、根岸務、日高道雄、他 (1999) 沖縄に生息するサンゴおよび節足動物のマリナー様配列 (MLS) の比較。日本分子生物学会 (福岡)
- ⑦ Hirose M and M Hidaka (2000) Early development of zooxanthella-containing eggs of scleractinian corals: does the presence of zooxanthellae affect the development? 9th International Coral Reef Symposium (発表予定)
- ⑧ Hidaka M and M Hirose (2000) A phylogenetic comparison of zooxanthellae from reef corals with different modes of symbiont acquisition. 9th International Coral Reef Symposium (発表予定)
- ⑨ Bhagooli R, H Kanemoto and M Hidaka (2000) Difference in stress susceptibility among

zooxanthellae isolated from different coral hosts. 9th International Coral Reef Symposium (発表予定)

(2) 論文発表

- ①○ Hirose M, RA Kinzie III and M Hidaka (2000) Early development of zooxanthella-containing eggs of the coral *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi* with special reference to the distribution of zooxanthellae. Biol Bull (in press)
- ②○ Titlyanov EA, TV Titlyanova, NV Zhukova, W Loh, M Hirose, M Hidaka, A Amat and K Yamazato (2000) Morphological and biochemical variations of symbiotic dinoflagellates of hermatypic corals from a fringing reef at Sesoko Island, Ryukyu Archipelago, Japan. (submitted to Galaxea, JCRS)
- ③○ Hirose M, RA Kinzie III and M Hidaka (2000) Timing and process of entry of zooxanthellae into oocytes of hermatypic corals. (submitted to Coral Reefs)