

令和2年度水産学奨励賞

イシサンゴの配偶子形成に関する研究

識 名 信 也

國立台灣海洋大學 海洋環境與生態研究所

Study on gametogenesis in stony corals

SHINYA SHIKINA

Institute of Marine Environment and Ecology, National Taiwan Ocean University, 2 Pei-Ning Rd., Keelung 20224, Taiwan

1. はじめに

イシサンゴ（以下、サンゴと略）は熱帯、亜熱帯域の水産業の基盤をなす「サンゴ礁生態系」を構築する主要な生物である。近年、サンゴ礁の世界的な衰退に際し、サンゴ礁の再生を目的としたサンゴの増殖事業が世界中で展開されている。^{1,2)} 現在広く用いられているサンゴの増殖法は、母群体から数センチ程度の断片を調整し、屋内外の飼育施設でサンゴの無性生殖能を利用して増やすという手法である。¹⁾ 植物の栽培方法にも似た本手法は、様々なサンゴ種に応用できるだけでなく、季節を問わず比較的容易にサンゴを増やせるという利点をもつ。しかし、母群体の一部をもとにそのクローン個体(群体)を数多く作り出す手法であるため、飼育スペース、コストおよび労力に限りがある増殖の現場では、本手法を用いて生み出された個体群の遺伝的多様性の低さが問題視されている。近年ではこの問題を克服するための手法として、野外のサンゴから受精卵や幼生を採取し目的のサイズまで育てる「有性生殖能を利用した増殖技術」も一部の種で確立されている。²⁾ 将来のサンゴの増殖事業においては、環境変化への高い適応力や病気に対する耐性などの有用形質を持つ個体(群体)を選び育てることが重要視されると考えられる。したがって、遺伝的に多様なサンゴを作り出すことのできる有性生殖能を利用した増殖技術をさらに発展させていくことが重要であると考えられる。

多くのサンゴは約半年から1年かけてゆっくりとその体内で配偶子を形成し、ある特定のタイミングで配偶子(種によっては幼生)を放出する。³⁾ 現在、人工飼育下でサンゴの配偶子形成を安定的に誘導することは容易ではなく、一部の水族館などの例外を除いて、未だ成功例が少ない。1980年代からサンゴの有性生殖に関する

生態学的な知見が数多く蓄積されており、^{3,4)} 配偶子形成は水温や月光などの外的要因と個体(群体)の年齢や大きさなどの内在性の要因の影響を受けることが報告されている。^{3,4)} しかし、有性生殖の根底にある分子機構や内在性機構については知見が乏しい。サンゴの配偶子形成を制御する外的要因と内在性因子(例: ホルモン等)をより詳細に特定することができれば、それらを複合的に取り入れた飼育方法を確立することで、人工飼育下で安定的に有性生殖を誘導することが可能になると期待される。将来的には、有性生殖の回数やタイミングを制御できるようになり、サンゴの種苗生産を効率化することも可能になるかもしれない。そこで私は配偶子形成過程に注目し、それを支える分子機構や内在性機構に関する基礎的知見を集積すると同時に、配偶子形成を促すホルモンや増殖因子などの内在性因子を同定することを目的とした研究を開始した。具体的な戦略として、1) サンゴの配偶子形成過程を初期から成熟期まで細胞組織学的に明らかにすること、2) 卵形成の過程の主要なイベントの1つ、卵黄形成に着目し、ポリプ内における卵黄タンパク質の合成部位を特定すること、3) 生殖巣のトランスクリプトーム解析を行い、配偶子形成過程に関与する分子を網羅的に調べること、4) ホルモンや増殖因子が生殖細胞に与える影響を調べるためのプラットフォームとして、生殖巣の組織培養技術の開発すること、5) 構築した生殖巣の *in vitro* 培養系を用いて配偶子形成を促す内在性因子の同定すること、の5点を立てた。本稿では、これまでの一連の研究において得られた第4点目までの成果と今後の展望について紹介する。

2. ナガレハナサンゴの配偶子形成のタイミングおよびプロセス

サンゴの配偶子形成を研究するにあたり、太平洋・インド洋に広く分布するサンゴの一種、ナガレハナサンゴをモデルとして用いた。本種は雌雄異体であるため、精子形成・卵形成をそれぞれ分けて観察できるだけでなく、雌雄特異的な遺伝子発現解析を行うことが可能であるという利点を有していた。さらに、本種のポリプは他のサンゴ（例：ミドリイシ）に比べ直径にして約10～20倍大きいので、ポリプを構成する異なる組織（例：触手、隔膜糸、生殖巣）を顕微鏡下で単離し、組織特異的な遺伝子発現解析を行うことも可能であった。

先の調査によりナガレハナサンゴは台湾の南湾海域において毎年5月に放精・放卵することが明らかとなっていた。そこで、台湾の南湾海域において大型のコロニーを複数標識した後に、その一部を非繁殖期（6月）から翌年の繁殖期（5月）まで月一回採取し、生殖巣の位置、配偶子形成のタイミングおよびプロセスを組織学的に調べた。その結果、生殖巣はポリプ胃腔側組織の特定領域に小さな膨らみとして存在しており、繁殖期である5月が近づくとつれ明瞭にそのサイズが大きくなる様子が観察された。^{5,6)} 卵巣では放卵の約10–11ヶ月前（6, 7月）から直径20 μm 程度の卵母細胞が見られはじめ、その後、卵黄の蓄積ならびに卵径の増大を伴いながら放卵の月（5月）まで成長する様子が観察された。精巣では放精の約半年前（12月）に、精原細胞がクラスターを形成する様子が組織学的に観察された。その後精原細胞は、3月から4月に減数分裂期に入り、放精の数週間前には成熟した精子が見られた。^{5,6)}

3. 生殖細胞のマーカー分子の同定

生殖巣の位置および配偶子形成のタイミングに関しては組織学的に明らかにすることができたが、そのプロセスに関してはいくつか不明な点があった。例えば、1) 配偶子形成の初期段階に見られる卵原細胞や精原細胞の分布、2) 卵母細胞の発達段階の詳細な差異、3) 精子の変態（鞭毛形成）過程などは、一般的に組織学的解析に用いられるヘマトキシリンエオシン染色等では、明瞭に観察することができなかった。そこで、サンゴの生殖細胞に局在する分子をマーカーに用いることで、配偶子形成過程の詳細を観察することを試みた。具体的には、まず、脊椎動物または無脊椎動物の生殖細胞で発現していることが報告されている種々の分子を文献をもとに選抜し、ナガレハナサンゴから該当遺伝子をクローニングした。その後、それらの分子に対する特異抗体を作成し、免疫染色法を用いてサンゴの生殖細胞におけるそれらの分子の発現、ならびにマーカーとしての有用性を確認した。その結果、配偶子形成初期の生殖細胞で発現す

る分子（*vasa*, *piwi*）や卵黄タンパク質分子（*vitellogenin* 等）、および精子の鞭毛で発現する分子（*acetylated alpha tubulin*）など、サンゴの生殖細胞の局在や発達段階を示すマーカー分子を数多く同定することに成功した。^{5–12)} これにより配偶子形成を初期段階から成熟期まで詳細に調べることが可能となった。

4. サンゴの卵黄形成：卵黄タンパク質の合成部位の特定

卵黄形成は、卵形成過程の主要なイベントの1つである。卵黄タンパク質は、胚発生過程における胚のエネルギーおよび栄養源であり、特に *vitellogenin* (以下 *Vg*) は、卵黄タンパク質の前駆体として脊椎動物および無脊椎動物に普遍的に見られる進化的に保存された分子の1つである。先行研究により、サンゴの卵内には、*Vg* と *egg protein* (サンゴの新規卵黄タンパク質、以下 *Ep*) の2種の卵黄タンパク質が存在していることが報告されていたが、^{13–15)} 体内のどこでどの細胞がそれらを合成しているかは不明であった。そこでナガレハナサンゴからそれら2種の卵黄タンパク質をコードする遺伝子の完全長 cDNA をクローニングし、その発現解析を行った。¹⁶⁾ 実体顕微鏡下で雌雄のコロニーからそれぞれ触手、隔膜糸、精巣、卵巣を単離し、RT-PCR法を用いてそれら2種の卵黄タンパク質遺伝子を発現する部位を調べた結果、いずれも卵巣において高発現していることが示された。続いて、mRNA *in situ* hybridization 法ならびに免疫組織化学染色法を用いて mRNA とタンパク質の両者の発現パターンを調べた結果、*Vg* および *Ep* は、いずれも卵母細胞を取り囲む卵巣体細胞により合成されていることが示された。¹⁶⁾ 卵巣体細胞から卵母細胞への卵黄タンパク質の輸送機構の詳細は未だ不明であるが、卵黄タンパク質の受容体が卵母細胞の表面に発現していると考えられる。

5. ナガレハナサンゴの生殖巣トランスクリプトーム解析

サンゴの配偶子形成に関与する分子を網羅的に解析することを目的として、生殖巣のトランスクリプトーム解析を行なった。¹⁷⁾ 異なる発達段階（初期、中期、後期、成熟期の4ステージ）にある精巣または卵巣から RNA をそれぞれ調整し、RNA-seq 解析により発現遺伝子群の比較を行なった結果、精巣または卵巣で特異的に発現する分子、ならびに各発達段階で高発現する分子を同定することに成功した。成熟精巣、または成熟卵巣で有意に高発現する分子に注目して詳細な解析を行なったところ、脊椎動物や無脊椎動物において配偶子の成熟や精子の運動能、受精に関与することが報告されている種々の分子が同定された。同時に、ヒト SWISS-PROT デー

タベース内の配列とは相同性を示さない配列も数多く同定された。これらの結果から、サンゴの配偶子形成には、進化的に保存された分子とサンゴまたは刺胞動物が進化の過程で生み出した分子の両者が関与していることが強く示唆された。また、本解析の結果から本種の配偶子形成に神経ペプチド、生体アミン、ステロイド等が関与している可能性が示唆された。

6. ナガレハナサンゴ生殖巣の *in vitro* 培養技術の開発

トランスクリプトーム解析により配偶子形成に関与する可能性のある内在性因子を選抜することに成功した。そこで、それら候補分子の配偶子形成への関与を検証するためのプラットフォームとして、生殖巣の *in vitro* 培養技術の開発を行なった（識名ら、未発表）。まず、魚類の生殖巣の器官培養法¹⁸⁾を参考に単離した生殖巣をアガロースの上で培養することを試みたが、培養1日目で組織の立体構造が崩れるという結果に至った。失敗の原因としては、単離時の生殖巣への機械的ダメージやサンゴの生殖巣が有する特性（例：組織の柔らかさ）などが考えられた。そこで、生殖巣とその周辺組織を含む隔膜組織を単離し、アガロースを用いずにそのまま培養へと供することにした。生殖細胞の健全性および生殖巣の立体構造の状態を指標に培養条件の最適化を行なった結果、生殖細胞の生存を維持したまま、卵巣および精巣を培養下で一週間程度維持することが可能となった。また、培養した卵巣における卵黄タンパク質 Vg の発現量や精巣における雄の生殖細胞の増殖活性を検出する手法を確立することにも成功した。

7. おわりに

本研究で集積された基礎的知見および確立されたツールは、将来的に人工飼育下でサンゴの配偶子形成を促す技術を開発するための重要な基盤となるであろう。今後は、トランスクリプトーム解析の結果をもとに選抜した候補因子を、生殖巣の *in vitro* 培養の系に加え、卵黄タンパク質分子の発現量の変化や精原細胞の増殖活性の変化を指標に配偶子形成を促す因子を同定していく。これらの実験を通して有用な内在性因子が同定された場合には、水槽で飼育しているサンゴを用いてその効果を再度検証し、最終的にはサンゴの増殖の現場へと応用していく予定である。

謝 辞

この度水産学奨励賞に私をご推薦くださいました東京海洋大学 学長 竹内 俊郎先生に厚く感謝申し上げます。また、学部・大学院時代の主指導教員である東京海洋大学 教授 吉崎悟朗先生には、終始心のこもった温かいご指導を賜りましたことに深く感謝致します。受賞

対象となった一連の研究を遂行するにあたり、公私ともに多大なご支援、ご協力を賜りました台湾海洋大学 教授 張清風先生、ならびに学生の指導を行うにあたり丁寧なご助言をくださいました国際基督教大学 教授 小林牧人先生に心から感謝致します。さらに、トランスクリプトーム解析についてご指導を賜りました東京大学 准教授 新里宙也先生に深く感謝致します。最後に、私の10年以上にわたる台湾での生活を温かく支えてくださった台湾海洋大学の職員の方々、研究を遂行する中で苦楽を共にしてくださった研究支援職員と邱顥陵を始めとする学生の皆様一人一人に感謝致します。

文 献

- 1) Leal MC, Ferrier-Pages C, Petersen D, Osinga R. Coral aquaculture: applying scientific knowledge to ex situ production. *Rev. Aquac.* 2014; **6**: 1–18.
- 2) Omori M. Coral restoration research and technical developments: what we have learned so far. *Mar. Biol. Res.* 2019; **15**: 377–409.
- 3) Harrison PL, Wallace CC. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. In: Dubinsky Z (ed). *Ecosystems of the world 25, Coral reefs*. Elsevier, Amsterdam. 1990; 133–207.
- 4) Harrison PL. Sexual reproduction in scleractinian corals. In: Dubinsky Z, Stambler N (eds). *Coral reefs: an ecosystem in transition*. Springer, Dordrecht. 2011; 59–85.
- 5) Shikina S, Chen CJ, Liou JY, Shao ZF, Chung YJ, Lee YH, Chang CF. Germ cell development in the scleractinian coral *Euphyllia ancora* (Cnidaria, Anthozoa). *PLoS ONE* 2012; **7**: e41569.
- 6) Shikina S, Chung YJ, Wang HM, Chiu YL, Shao ZF, Lee YH, Chang CF. Immunohistochemical localization of early germ cells in a stony coral, *Euphyllia ancora*: potential implications for a germline stem cell system in coral gametogenesis. *Coral Reefs* 2015; **34**: 639–653.
- 7) Shikina S, Chiu YL, Chen CJ, Yang SH, Yao JI, Chen CC, Wei JD, Shao ZF, Chang CF. Immunodetection of acetylated alpha-tubulin in stony corals: Evidence for the existence of flagella in coral male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 2017; **84**: 1285–1295.
- 8) Shikina S, Chiu YL, Ye MR, Yao IC, Chung YJ, Chen CJ, Chang CF. Molecular cloning and characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA); a potential involvement of PCNA in germ cell development of stony corals. *Fish. Sci.* 2018; **84**: 765–775.
- 9) Shikina S, Chiu YL, Lee YH, Chang CF. From somatic cells to oocytes: a novel yolk protein produced by ovarian somatic cells in a stony coral, *Euphyllia ancora*. *Biol. Reprod.* 2015; **93**: 57, 1–10.
- 10) Chen CJ, Shikina S, Chen WJ, Chung YJ, Chiu YL, Bertrand JAM, Lee YH, Chang CF. A novel female-specific and sexual reproduction associated Dmrt gene discovered from a stony coral, *Euphyllia ancora* (Cnidaria, Anthozoa). *Biol. Reprod.* 2016; **94**: 40, 1–13.
- 11) Shikina S, Chiu YL, Chung YJ, Chen CJ, Lee YH, Chang CF. Oocytes express an endogenous red fluorescent protein in a stony coral, *Euphyllia ancora*: a potential involvement in coral oogenesis. *Sci. Rep.* 2016; **6**: 25868.
- 12) Zhang Y, Chiu YL, Chen CJ, Ho YY, Shinzato C, Shikina

- S, Chang CF. Discovery of a receptor guanylate cyclase expressed in the sperm flagella of stony corals. *Sci. Rep.* 2019; **9**: 14652.
- 13) Hayakawa H, Nakano Y, Andoh T, Watanabe T. Sex-dependent expression of mRNA encoding a major egg protein in the gonochoric coral *Galaxea fascicularis*. *Coral Reefs* 2005; **24**: 488–494.
 - 14) Hayakawa H, Andoh T, Watanabe T. Precursor structure of egg proteins in the coral *Galaxea fascicularis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; **344**: 173–180.
 - 15) Hayakawa H, Andoh T, Watanabe T. Identification of a novel yolk protein in the hermatypic coral *Galaxea fascicularis*. *Zool. Sci.* 2007; **24**: 249–255.
 - 16) Shikina S, Chen CJ, Chung YJ, Shao ZF, Liou JY, Tseng HP, Lee YH, Chang CF. Yolk formation in a stony coral *Euphyllia ancora* (Cnidaria, Anthozoa): insight into the evolution of vitellogenesis in non-bilaterian animals. *Endocrinology* 2013; **154**: 3447–3459.
 - 17) Chiu YL, Shikina S, Yoshioka Y, Shinzato C, Chang CF. *De novo* transcriptome assembly from the gonads of a scleractinian coral, *Euphyllia ancora*: molecular mechanisms underlying scleractinian gametogenesis. *BMC Genomics* 2020; **21**: 732.
 - 18) Leal MC, De Waal PP, García-López A, Chen SX, Bogerd J, Schulz RW. Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function *ex vivo*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009; **162**: 134–138.