

アザミサンゴは単一の種か？ —形態型とDNA配列多型

渡辺 俊樹
東京大学海洋研究所

Is *Galaxea fascicularis* a single species? – Morphotypes and DNA sequence polymorphism

T. Watanabe

アザミサンゴは太平洋、インド洋、紅海にかけて広く分布しており、英のサイズが大きいことから生理学などの研究にしばしば用いられてきた。環境の悪化にも耐性を示し、平成10年（1998年）の大規模な白化が起こった後も沖縄本島周辺で多くの個体が生き残った。また、筆者が那覇港の防波堤の内側で潜った時も、ハマサンゴと共にアザミサンゴの数個体の生存が確認でき、驚いた記憶がある。

筆者は動物の骨格に含まれる様々なタンパク質が石灰化においてどのような機能を持っているかに興味を持っており、琉球大学の伊佐英信教授、東京大学の長澤寛道教授と共同で、アザミサンゴの骨格に含まれるgalaxinというタンパク質の解析を行った（Fukuda et al. 2003）。サンプルを集めるため、平成11-12年（1999-2000年）に、琉球大学熱帯生物圏研究センターのある沖縄県瀬底島の南側のリーフでアザミサンゴの採取を行った。これが筆者とサンゴの最初の出会いであったが、その際に非常に気になったのは、瀬底島周辺に棲息していたアザミサンゴの多数の個体を、同じ種とみなして良いかどうかということであった。

瀬底島周辺のアザミサンゴについては、琉球大学の山里 清名誉教授、日高道雄教授らによる研究が進んでおり、5つの色彩型が存在すること（Hidaka and Yamazato 1985）やコロニーの構造および刺胞の形態からハードタイプおよびソフトタイプ（またはノーマルタイプ）と呼ばれる2つの形態型（morpho-type）に分けられること（Hidaka 1992、山里 1991）が知られていた。2つの形態型は生殖時期にもずれがあり、1987年にはソフトタイプの放精放卵が6月および7月に見られたのに対し、ハードタイプは7月および8月（おもに8月）であった（山里 1991）。これらの観察結果から、山里は2つのタイプを別種とすべきであると提唱した（山里 1991）。

瀬底島周辺に棲息するアザミサンゴの殆どがソフトタイプであることから、筆者はソフトタイプの個体のみをgalaxinの研究に用いた。しかし、ソフトタイプは本当に単一種なのか、そしてハードタイプとソフトタイプは別種とみなせるのか、という疑問がいつも頭を離れなかった。そこで、galaxinの研究と並行して、アザミサンゴのミトコンドリアDNA配列の解析を行い、アザミサンゴと呼ばれる種の中でどのような配列の多型が見られるか、および多型と形態型・色彩型の間で何らかの対応がみられるかどうかを調べた。

●ミトコンドリアDNAの分析

実験の詳細はMarine Biotechnology誌に発表した論文（Watanabe et al. 2004）に譲り、ここでは概略を述べる。まず、アザミサンゴのソフトタイプの個体の全ミトコンドリアDNAをロングレンジPCR法により増幅した後、種々の制限酵素を用いて断片化し、いくつかの断片のDNA配列を決定した。そのうちの一つの断片（約1.5 kb）は、*cyt b*と*ND2*遺伝子の一部を含んでおり、その間に826 bpの配列が見られた。この配列はデータベース中の既知の遺伝子配列のいずれとも類似性を示さなかったことから、タンパク質やリボゾームRNA、トランスファーRNAをコードしない遺伝子間配列であると考えられた。造礁サンゴの一種ウスエダミドリイシのミトコンドリアDNAでも*cyt b*と*ND2*遺伝子の間に同様なnon coding配列が見られた。このようなnon codingの配列では高いレベルの多型が見られることが期待されることから、この配列の一部（625 bp）を解析に用いることにした。

瀬底島、沖縄島の残波、および八重山諸島の石西礁湖の7地点で採取した計95個体において上記のnon coding配列を決定したところ、8タイプの配

表1. アザミサンゴのミトコンドリア遺伝子間領域におけるDNA配列多型

Haplotype	Sequence variation (in comparison to haplotype LA)
LA	G ⁴⁹² -C ¹¹¹⁶ in DDBJ accession no. AB109376
LB	C ⁶¹⁹ → G
LC	C ⁷⁸⁷ → T
LD	A ⁵⁹² → G
LE	Insertion of GGT between T ⁷³⁴ and G ⁷³⁵
SA	Deletion of T ⁵¹⁸ -A ⁸⁰⁸ , A ⁸⁵⁹ → C
SB	Deletion of T ⁵¹⁸ -A ⁸⁰⁸ , A ⁸⁵⁹ → C, C ⁸²¹ → G
SC	Deletion of T ⁵¹⁸ -A ⁸⁰⁸ , A ⁸⁵⁹ → C, A ⁸⁵⁸ → G

矢印は塩基置換を示す。

列が見られた (表1)。このうちの3タイプ(SA-SC、Sはshortの略)では290 bpの欠失が見られ、残る5タイプ(LA-LE、Lはlongの略)に比べて配列が短くなっていた。瀬底島周辺の個体の大半はlongの配列を持っており、一方残波で採取された個体の大部分はshortの配列を持っていた。

●DNA配列と形態型の相関

瀬底島周辺で見られるアザミサンゴの殆どが、ソフトタイプであることが知られており、また残波で採取された個体の多くがハードタイプであったこと

から、ソフトタイプ = longの配列、ハードタイプ = shortの配列という風に形態型とDNA配列の間に相関があることが予想された。そこで、瀬底島、残波、石西礁湖で採取された個体に阿嘉島のマジノハマで採取した20個体を加えて、計108個体においてミトコンドリアDNAの配列型(long/short)と、形態型(ソフト/ハード)を決定した。なお形態型の決定には、最も信頼性の高い指標である刺胞(macrobasic p-mastigophore)の形態(Hidaka 1992)を用いた。

表2に示すように、配列型と形態型の間には明ら

表2. 地域毎の形態型とミトコンドリアDNA配列型の関係

形態型/ DNA配列型	瀬底	残波	阿嘉	石西	計
ソフト/long	29	0	13	14	56
ソフト/short	0	0	0	1	1
ハード/long	2	0	1	0	3
ハード/short	4	20	6	17	47
中間型/long	0	1	0	0	1
中間型/short	0	0	0	0	0
計	35	21	20	32	108

中間型は、刺胞の形態からは、ソフトタイプとハードタイプの混ざったものを指す。

かな相関があった。この高い相関は、瀬底や残波のように1つの形態型が優先して見られる地点だけではなく、阿嘉島や石西礁湖のように2つの形態型が混在しているところでも見られた。このことは、2つの形態型が遺伝的に分化していること、すなわち2つの形態型間の交雑の頻度が低いことを強く示唆する結果となった。このことは上に述べた山里らの提唱した説とも良く合致している。なお、Wt（またはFt）と呼ばれる色彩型の個体の大半はshortの配列を持っていたが、他の4つ（B、GS、BG、Gt）の色彩型は、longとshortのいずれとも特に高い相関を示さなかった。

●終わりに：サンゴを実験動物として用いることの困難

筆者は現在モナコに滞在してこの原稿を書いている。モナコには世界的に有名な水族館があり、ここでは様々な造礁サンゴ類の大規模な人工飼育を行っている。この水族館に併設されたAllemand教授の研究室では、このサンゴを生理学および分子生物学の研究に使用している。ここでは断片化したサンゴを成長させることにより増殖を行っているため、実験サンプルは単一のコロニーに由来しており、実験の再現性を高める点で有利である。

一方、こうした大規模な飼育設備を持たない筆者の研究室の場合は、野外から採取した複数の個体を用いざるを得ず、そのために問題が起り得る。例えば、筆者は阿嘉島で採取した枝状コモンサンゴを用いて有機スズの影響を調べる実験を行っているが、ある個体由来のサンプルは白化するのに、別の個体由来のものは白化せずにサンゴ組織が骨格から剥離して死ぬという風に、結果の再現性の悪さに悩まされている。マジャノハマに棲息する枝状コモンサンゴの形態を見ると、実に様々なバリエーションが存在しており、図鑑に記載されている種との対応をつけることは難しい。また、アザミサンゴに見られたように、1つの種とされているものの中にも遺伝的に分かれたグループが存在する可能性も十分ある。こうした問題の解決に、上で述べたようなDNA配列多型の解析は有効であるかも知れない。

アザミサンゴとミドリイシのミトコンドリアDNAの配列を比べると、遺伝子の配置は良く保存されており、ともに *cyt b* と *ND2* 遺伝子の間に長い non coding配列が見られることから、他の多くのイシサンゴ類でも同じ場所にそうした配列が存在する可能性が高い。*cyt b* と *ND2* 遺伝子で種を超えて保存された配列をPCRプライマーとして用いれば、多くの種で non coding配列が簡単にクローニングでき、上に述べたような問題の解決に利用できることが期待される。

●謝辞

この研究の遂行にご協力・ご助言をいただいた、日高道雄教授および中野義勝氏（琉球大学）、渡辺勝敏助教授（京都大学）、西田 睦教授（東京大学）、岡本峰夫助教授（東京海洋大学）、野島 哲助教授（九州大学）、ならびに阿嘉島臨海研究所の大森 信所長および岩尾研二氏にこの場を借りて御礼申し上げます。

●参考文献

- Fukuda, I., S. Ooki, T. Fujita, E. Murayama, H. Nagasawa, Y. Ima and T. Watanabe 2003. Molecular cloning of a soluble protein in the coral exoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304: 11-17.
- Hidaka, M. and K. Yamazato 1985. Color morphs of *Galaxea fascicularis* found in the reef around the Sesoko Marine Science Center. *Galaxea*, 4: 33-35.
- Hidaka, M. 1992. Use of nematocyst morphology for taxonomy of some related species of scleractinian corals. *Galaxea*, 11: 21-28.
- 山里 清 1991 サンゴの生物学. 東京大学出版会, 東京. 150 pp.
- Watanabe, T. M. Nishida, K. Watanabe, D. S. Wewengkang, and M. Hidaka, 2004. Polymorphism in the nucleotide sequence of a mitochondrial intergenic region in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Mar. Biotechnol.*, in press.