

氏 名 仮屋園 志帆

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2020 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命共生体進化学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The genetic basis of fluorescence in the stony coral,
Acropora digitifera

論文審査委員 主 査 准教授 田辺 秀之
教授 颯田 葉子
助教 寺井 洋平
教授 服田 昌之 お茶の水女子大学 大学
院 人間文化創成科学研究科

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Coral reefs harbor the most biologically diverse ecosystems in warm shallow water. Coral reefs are the calcium carbonate structures built by mainly stony corals (Scleractinia), and corals belong to the genus *Acropora* are major components of coral reef in the Indo-Pacific. The algal symbionts in stony corals allow corals to build extensive structures in oligotrophic environments. However, the symbiotic relationship between corals and algal symbionts is sensitive to climate changes and local stressors. One of the candidate molecules associated with stresses of corals is fluorescent protein (FP). Many biological roles of FPs including stress response such as photo-protection had been proposed.

When I started my doctoral thesis, the fluorescence of corals and its genetic determinants, *FP* genes have been one of the enigmatic problems in corals. Coral FPs have been studied since the discovery of the homologs of jellyfish GFP (green fluorescent protein) in corals, but the biological role remained unclear. One of the main factors making the difficulty to analyze the role of FPs was missing information of the genetic basis of FPs in stony corals.

In chapter 2, I described the multi-*FP* gene family in *Acropora digitifera*. In previous studies, many *FP* genes were cloned from anthozoan species and it was suggested that multi-copies of these genes are present in their genomes. However, the full complement of *FP* genes in any single coral species remained unidentified. In chapter 2, I analyzed the *FP* genes in two stony coral species, *A. digitifera* and *A. tenuis*. *FP* cDNA sequences from the two species revealed the presence of a multi-gene family with an unexpectedly large number of genes, separated into short-to-middle-wavelength emission (S/MWE), middle-to-long-wavelength emission (M/LWE), and chromoprotein (CP) clades. *FP* gene copy numbers in the genomes of four *A. digitifera* individuals were estimated as 16–22 in the S/MWE, 3–6 in the M/LWE, and 8–12 in the CP clades, and, in total, 35, 31, 33, and 33 *FP* gene copies per individual shown by quantitative PCR. These are the largest sets of *FP* genes per genome among organisms that the *FP* genes were isolated in their genomes. The fluorescent light produced by recombinant protein products encoded by the newly isolated genes explained the fluorescent range of live *A. digitifera*, suggesting that the high copy multi-*FP* gene family generates coral fluorescence. The functionally diverse multi-*FP* gene family must have existed in the ancestor of *Acropora* species, as suggested by molecular phylogenetic and evolutionary analyses. The persistence of a diverse function and high copy number multi-*FP* gene family may indicate the biological importance of diverse fluorescence emission and light absorption in *Acropora* species.

In chapter 3, I reported the genetic mechanism underlying fluorescent polymorphisms in *A. digitifera*. Despite the biological roles of FPs have been proposed based on natural variation in fluorescence in corals, their roles and the genetic basis of FP-mediated color polymorphisms in *Acropora* remain unclear. Using a high-throughput sequencing approach, I found that *FP* gene sequences in the multi-gene family exhibit presence–absence polymorphism among individuals. A few particular sequences in S/MWE and M/LWE clades were highly expressed in adults, and

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

different sequences were highly expressed in larvae. These highly expressed sequences were absent in the genomes of individuals with low total *FP* gene expression. In adults, presence–absence differences of the highly expressed *FP* sequences in the genome were consistent with measurements of emission spectra of corals, suggesting that presence–absence polymorphisms of these *FP* sequences contribute to the fluorescent polymorphisms. In a functional analysis of recombinant FPs that were highly expressed in larval and adult stages, I found that adults utilize UV to short wavelength light and larvae utilize middle-to-long wavelength light via FPs. The highly expressed *FP* sequences exhibited presence–absence polymorphisms in four populations with geographical separation, suggesting that the presence–absence status was maintained during the evolution of *A. digitifera* populations.

In chapter 2 and 3, I documented the genetic basis of fluorescence and fluorescent polymorphisms in *A. digitifera*. The difference in FPs between adults and larvae, and the polymorphisms of highly expressed *FP* sequences may provide key insight into the biological roles of FPs in corals.

In addition, I reported genetic variation and expression differences among individuals of *A. digitifera* in chapter 4. Despite the importance of characterizing genetic variation among coral individuals for the conservation of coral reefs, the correlation between genetic and functional variation is still poorly understood. In chapter 4, I detected a high frequency of genes showing presence–absence polymorphisms (PAPs) for single-copy genes in *A. digitifera*. Among single-copy genes, some proportion exhibited PAPs, including transposable element (TE)-related genes. Among genes showing PAPs (PAP genes), more than half were expressed in adults and/or larvae, and the PAP status was associated with differential expression among individuals. Although most of PAP genes were uncharacterized or had ambiguous annotations, these genes were specifically distributed in cnidarian lineages, suggesting that these genes have functional roles related to traits specific to cnidarians or the genus *Acropora*. Some proportion of *A. digitifera* PAP genes were also PAPs in other *Acropora* species, indicating that PAPs were shared among species in *Acropora*. Expression differences caused by a high frequency of PAP genes may be a novel genomic feature in the genus *Acropora*.

In this thesis, I documented the genetic mechanisms of coral fluorescence, fluorescent polymorphisms, and gene expression differences among individuals of *A. digitifera*. These findings will contribute to coral conservation by improving our understanding of the genetic basis of individual differences in stony corals.

博士論文審査結果の要旨
Summary of the results of the doctoral thesis screening

【論文審査結果】[2018年2月2日実施]

サンゴ礁の主要構成生物である造礁サンゴ（以下サンゴ）は、共生する藻類が作る光合成産物を栄養源としている。この共生藻を介したサンゴの光利用がサンゴ礁生態系の基盤であり、その理解は生態系全体の理解に繋がる。サンゴの光利用には、光を吸収して蛍光を発する蛍光タンパク質（fluorescent proteins: FPs）と光を吸収し蛍光を出さない色素タンパク質（chromoprotein: CP）の両者が関係すると考えられているが、FPs や CP の遺伝的基盤が明らかにされていないために、生体内での詳しい役割は不明であった。

このような背景の下、出願者は FP 遺伝子族の遺伝的基盤を解明することを目的として、DNA、RNA、タンパク質の解析、および次世代シーケンシングによる FP 遺伝子族解析、トランスクリプトーム解析を行い、本論文にて、以下に記すような結果と考察を論じている（第 2、3、4 章に対応）。

1) ゲノム解読が行われているコユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を用いて、複数の FP 遺伝子の単離を行った。その結果、これまで 1 種から知られている FP 遺伝子数としては最大の 36FP 遺伝子が存在し、それらが 3 つの単系統群に分類される多重遺伝子族を形成することを明らかにした。3 つの単系統群は、①短中波長を放射する FPs、②中長波長を放射する FPs、および③光を吸収する CP に分類された。*Acropora* 属のウスエダミドリイシ (*A. tenuis*) を用いて同様な解析を行った結果、FP 遺伝子が多重遺伝子族を形成し、同様に 3 つの単系統群に分類され、さらに chromophore のタイプ別に分岐されることを明らかにした。このことから FP 遺伝子族は *Acropora* 属の共通祖先で既に存在し、この属で維持されてきたものと考えられた[出願者を筆頭著者として国際学術誌 *Genome Biology and Evolution* (DOI: 10.1093/gbe/evw265) に掲載]。

2) 同一環境（沖縄県瀬底島）に生息するコユビミドリイシ 11 個体を採集し、FP 遺伝子の塩基配列を解析したところ、個体間での FP 遺伝子の数と配列の多様性が大きいことが示唆された。次世代シーケンシングによる RNA 配列解析により、特定の高発現 FP 遺伝子が FP 遺伝子の総発現量の個体差を生じさせていることを明らかにした。このような高発現 FP 遺伝子は、ゲノム中での配列の有無の多型 (presence-absence polymorphisms: PAPs) として存在し、これらの FP 遺伝子の高い発現と個体が放射する蛍光が一致することを示した。また PAPs の多くは地理的に離れた同種の集団、もしくは遺伝的に離れた他の種でも多型として存在していた。つまりサンゴの FP 遺伝子の PAPs の起源は古く、蛍光の多型がサンゴ FPs の役割において重要な意味を持つ可能性が示唆された。さらに成体と幼生では、配列と機能の異なる FP 遺伝子が発現しており、幼生では中長波長を放射する FPs および CP が主として発現しているのに対し、成体では短中波長および中長波長を放射する FPs が大部分を占めていることを明らかにした。このことから成体と幼生では、FPs を介して利用する光波長が異なるものと考えられた。これらの研究は、コユビミドリイシの蛍光の遺伝的基盤を示した初めての研究である。

3) PAPs の特性を明らかにするために、コユビミドリイシゲノム上の約 12,000 の単一コピー遺伝子の種類と発現状態を解析した。その結果、単一コピー遺伝子の約 8% が PAPs を示

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

した。これらの遺伝子の半数以上が他の生物に相同遺伝子をもち、また半数以上で遺伝子の発現が見られることから、PAPsを示す遺伝子の多くは機能を持つことが予想された。これらの結果から、コユビミドリイシにおけるPAPsの特性とその進化的な起源を考察することにより、今まで知られていない個体間の違いを作る仕組みを明らかにした。

以上のように、本論文には、コユビミドリイシを中心としたミドリイシ属サンゴにおけるFP遺伝子族とその遺伝的基盤に関する多数の重要な新知見が盛り込まれており、本論文は、博士（理学）に十分値するものであると判断した。なお、FP遺伝子のゲノム構造と多様性解析に関する内容も、出願者を筆頭著者として国際学術誌 *Zoological Letters* (DOI: 10.1186/s40851-015-0020-5) に掲載済みである。

【試験結果】 [2018年2月2日実施]

公開論文発表会では、コユビミドリイシを中心としたミドリイシ属サンゴにおける蛍光タンパク質 (FPs) の遺伝的基盤に関して、その塩基配列と機能の概要、蛍光の個体差を作り出す機構の詳細、FPsの生体内での役割の可能性、単一遺伝子における遺伝子有無の多型 (PAPs) 等について、それらの研究の結果と考察を出願論文の内容に沿って英語で発表が行われた。特にFP遺伝子族の全貌を示し、個体間のPAPsを解明したことは、今後のFPsに関する研究の発展を支える学術的基盤となると考えられ、高く評価された。質疑応答においては、FP遺伝子族の系統解析や成体と幼生における機能の違い、PAPsに関する質問がなされたが、それらに対し、適切に応答した。

口頭試問では、審査員による基礎的知識から専門分野の質問に対して、適確に応答し、専門知識を十分に持っていることが示された。質の高い研究成果を上げている点は、出願者の研究資質の高さを示すものである。これまでに、出願者が主体的に多くの実験手法を学び、それらを実行、修得して多くの考察を施してきた研究態度から今後さらなる発展の可能性を窺うことができた。

語学力に関しては、出願者を筆頭著者とした論文が国際学術誌に受理されており、本論文が英文で適確に書かれている点、さらに公開論文発表会における英語による発表と質疑応答などから優れていると判断された。

以上より、出願者は総合研究大学院大学 先端科学研究科の課程博士（理学）としての要件を満たし、学位授与に相応しいと判断された。