

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710199

研究課題名（和文） サンゴ-褐虫藻共生体の分子メカニズム～白化現象解明を目指して～

研究課題名（英文） A study of molecular mechanisms of coral-algae symbiosis

研究代表者

新里 宙也（SHINZATO CHUYA）

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号：70524726

研究成果の概要（和文）：

サンゴと褐虫藻の共生システムの分子メカニズムを、次世代シーケンサーを用いて網羅的・ゲノム科学的に明らかにすることを目的とする。トランスクリプトームとゲノムの情報を用いて、サンゴ（コユビミドリイシ *Acropora digitifera*）の全遺伝子を網羅したcDNAマイクロアレイを作成し、ストレス下での遺伝子発現変化を解析した。さらにサンゴのゲノム情報から、ストレス応答に関わっているとされる遺伝子について、ゲノム科学的な解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to reveal the molecular mechanisms of coral-algae symbiosis using next-generation sequencing technologies. I designed cDNA oligo microarrays based on assembled transcriptome and genome data from a coral, *Acropora digitifera*. Using these microarrays, transcriptome changes under stress conditions were analyzed. In addition, I surveyed the genes possibly involved in stress-response in the coral genome data.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：サンゴ・褐虫藻・共生・白化現象・遺伝子発現応答

## 1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁には海洋生物のおよそ30%にも及ぶ多種多様な生物が棲息し、「海の熱帯雨林」と称される美しく豊かな生態系が存在する。しかし1998年の夏に、エルニーニョ現象による海水温上昇が原因とされる世界的なサンゴの白化現象が確認され、広範囲にわたってサンゴ礁が大打撃を受けた。その後白化現象が確認される回数が、以前と比べて増加していることが報告されている。そのためサンゴ礁保全の観点から、サンゴの生物

学的研究の重要性が年々増してきている。一方でサンゴを用いた生物学的研究は生態学が中心で、遺伝子レベルでの知見は限られており、詳細なメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。

いわゆる「次世代シーケンサー」と呼ばれる新型のDNA解読装置が登場し、塩基解読のスピードが劇的に向上した。それまでサンゴの遺伝子情報は限られていたが、新しいテクノロジーにより遺伝子研究の基盤整備が飛躍的に進歩することが期待された。

## 2. 研究の目的

サンゴは「褐虫藻」と呼ばれる微細藻類と共生している。わずかなストレスにより共生システムが崩壊し、サンゴから褐虫藻が抜け出す「白化現象」が起こる。最悪の場合サンゴの死に繋がる。しかしその詳細なメカニズムは未だに明らかでない。

サンゴが直面する危機、「白化現象」を生物学的に深く理解するためには、サンゴ-褐虫藻の共生機構とストレス応答メカニズムの分子レベルでの知見は欠かせない。本研究では「サンゴ-褐虫藻共生体」を一つの「生命体」として考え、次世代シーケンサーを用いて、サンゴのストレス時の遺伝子発現応答を、これまでに無いレベルで網羅的に解析する。そして(1)ホスト(サンゴ)の分子レベルでのストレス応答、と(2)サンゴ-褐虫藻生命体の共生メカニズムの分子機構、を明らかにする事を目的としている。その研究基盤として、cDNA マイクロアレイの開発と、ストレス応答に関わっている遺伝子の解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスクリプトーム・シーケンシ

網羅的な遺伝子解析の基盤情報となる、サンゴの遺伝子レパートリーの情報を得るために、サンゴのトランスクリプトーム・シーケンシを行った。実験材料としては、沖縄県に普通に見られるサンゴ、コユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を用いた。出来るだけ数多くの遺伝子を網羅するために、様々な初期幼生ステージ(卵、胞胚期、原腸胚期、プラヌラ幼生、初期ポリプ)と成体から、Trizol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。成体については液体窒素により急速冷凍してから粉碎し、パウダー状にしてから RNA を抽出した。

全てのサンプルの RNA を等量ずつ混ぜて、二種類の次世代シーケンサー、454 FLX (Roche) と Genome Analyzer IIx (GA IIx, Illumina) を用いてトランスクリプトーム・シーケンシを行った。454 FLX に関してはシングルエンドシーケンシ、GA IIx に関しては 34bp のペアエンドシーケンシを行った。

### (2) トランスクリプトーム・アセンブリ

二種類の次世代シーケンサーで得られた配列データの *de novo* アセンブリを行った。454 FLX のデータは blastclust で類似配列をクラスタリングし、CAP3 でアセンブリを行った。この 454 でのアセンブリのデータと GA IIx のデータを Velvet/Oases ソフトによりアセンブリを行った。

### (3) cDNA オリゴマイクロアレイの開発

本研究により得られたコユビミドリイシのトランスクリプトーム・アセンブルと、ゲノムプロジェクトによる遺伝子モデルの結果から、cDNA オリゴマイクロアレイの設計を行った。Agilent 社の eArray によりアレイを設計した。Swissprot データベースに相同性を示す (blastp か blastx で  $1e-5$  以下の e-value)、遺伝子機能の予測がつく遺伝子については 2 つずつスポットを作成するようにした。

## 4. 研究成果

### (1) トランスクリプトーム・アセンブリ

初期幼生ステージと成体から抽出した RNA を、454 と Illumina により塩基解読を行った。それぞれの塩基の Quality Value が 15 以上のもののみを解析に使用した。454 のシングルエンドシーケンシによって約 81Mbp (平均長 241bp)、Illumina のペアエンドシーケンシによって約 3Gbp の塩基配列を得た。

これら全てを Velvet/Oases ソフトを用いてアセンブリを行った。その結果、36,780 個の 100bp 以上の contig (総塩基数 29.3Mbp) を得た。N50 size は 1,575bp で、最も長いものでは 19kbp を超えている。これらの数値は、それまでに報告されていたサンゴのトランスクリプトーム・アセンブリのデータと比較して、圧倒的に質の良いアセンブルが得られたことを示している。このうち 91% の配列が、コユビミドリイシのゲノムにマッピングされた。本研究で得られたトランスクリプトーム・シーケンシとアセンブリのデータは、コユビミドリイシ・ゲノムプロジェクトの遺伝子モデル設計にも用いられた。

### (2) cDNA オリゴマイクロアレイの設計

上で述べたトランスクリプトーム・アセンブルと、コユビミドリイシのゲノムプロジェクトで得られた遺伝子モデルを用いて、二種類のマイクロアレイを設計した。

研究期間中にゲノム配列から作成した遺伝子モデルの質が向上したこともあり、108k x 2 プラットフォームから 44k x 4 プラットフォームへデザインを移行することが出来た。これにより、2 サンプル/マイクロアレイスライドだったのが 4 サンプル同時解析可能になり、研究コストを約半分に下げることができた。

一方で褐虫藻の遺伝子を搭載したマイクロアレイの作成も検討したが、トランスクリプトーム・アセンブルには褐虫藻由来の遺伝子が予想よりも少なかったこと、褐虫藻の遺伝子情報込みのマイクロアレイだとスポット数が多くなり、一枚のスライドあたりの解析可能なサンプル数が少なくなるとコストが高くなる、などの理由からコユビミドリ

イシの遺伝子のみを搭載したマイクロアレイを作成することにした。サンゴと褐虫藻の遺伝子変化の同時検出のための手法開発は、今後の課題となる。

### (3) サンゴのストレスへの遺伝子発現応答の網羅的解析

コユビミドリイシのトランスクリプトーム・アッセンブルと遺伝子モデルのデータを基に作成した cDNA オリゴマイクロアレイの性能を、実際に遺伝子発現の変化を調べることで比較した。コユビミドリイシを 24 時間、通常状態 (27°C) よりも 2°C 高い海水温で飼育し、同一サンプルを用いて遺伝子発現の変化を解析した。トランスクリプトームのマイクロアレイでは約 1.1%、遺伝子モデルでのアレイでは約 4.9% の遺伝子の発現変化が検出された。このことから、トランスクリプトームよりも遺伝子モデルから設計されたマイクロアレイの方が、より多くの遺伝子の発現変動を検出することが確認された。その他にも紫外線ストレス、低塩分ストレスを与えたサンゴの遺伝子発現を、現在マイクロアレイにより解析中である。このように本研究で開発されたマイクロアレイは、サンゴの遺伝子発現の変化を効率的・網羅的に検出可能なので、今後様々な研究への応用が期待される。

### (4) ストレス応答に関わる遺伝子のゲノム解析

これまでの様々な動物での先行研究において、動物細胞でのストレス応答に関わっているとされる遺伝子群が報告されている。サンゴのストレス応答を研究するにあたって、細胞のストレス応答に関わっている遺伝子の情報を得るのは、遺伝子発現解析で得られた結果を解釈する上で重要である。そこで我々は、解読されたコユビミドリイシのゲノム情報から、ストレス関連遺伝子の解析を行った。

#### ① chemical defensome

一般的な細胞レベルでのストレス応答、特に化学物質などへの応答を行う遺伝子群は、chemical defensome と称されている。そこで我々は defensome 遺伝子をサンゴゲノムから特定した。ほとんど全ての遺伝子をサンゴはゲノム上に持っていた。一方でサンゴ独自に遺伝子重複し、ゲノム上にタンデムに並んでいる例もいくつか発見した。これらはおそらくサンゴ独自のストレス応答に関わっていると考えられる。

#### ② 蛍光タンパク質

サンゴ由来の蛍光タンパク質は、現在では広く生物学研究で用いられている。一方でサンゴにおいては、ストレスを受けると非常に

大きく遺伝子発現変動が起こる遺伝子として知られており、ストレスマーカーとして認知されつつある。そこで我々は蛍光タンパク質の遺伝子をゲノムから探索した。我々は 10 個の候補遺伝子を発見し、そのうち 6 個がゲノム上にタンデムに並んでいることを発見した。そして本研究課題で得られた Illumina RNA-seq の情報を用いて、初期発生段階と成体でのこれら遺伝子の発現レベルも調べた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Shinzato C, Shoguchi E, Kawashima T, Hamada M, Hisata K, Tanaka M, Fujie M, Fujiwara M, Koyanagi R, Ikuta T, Fujiyama A, Miller DJ, Satoh N. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*, 2011, 476, 320-323、査読有、10.1038/nature10249.
- ② Shinzato C, Hamada M, Shoguchi E, Kawashima T, Satoh N. The repertoire of chemical defense genes in the coral *Acropora digitifera* genome *Zoological Science*, 2012, In press、査読有
- ③ Shinzato C, Shoguchi E, Tanaka M, Satoh N. Fluorescent Protein Candidate Genes in the Coral *Acropora digitifera* Genome. *Zoological Science*, 2012, 29, 260-264、査読有、<http://dx.doi.org/10.2108/zsj.29.260>
- ④ Iguchi A, Shinzato C, Forêt S, Miller DJ. Identification of fast-evolving genes in the scleractinian coral *Acropora* using comparative EST analysis. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e20140、査読有、10.1371/journal.pone.0020140

[学会発表] (計 12 件)

- ① Shinzato C, Genome sequencing of the coral *Acropora digitifera*, Workshop on Marine Evolutionary and Environmental Genomics, 2011 年 12 月 5 日, Taipei, Taiwan

- ② 新里宙也、佐藤矩行、コユビミドリイシの全ゲノム解読とサンゴの環境変動への応答の理解, 共同利用研究集会「バイオミネラリゼーションと石灰化 - 遺伝子から地球環境まで-」、2011年11月18日、東京大学大気海洋研究所
- ③ 新里宙也、コユビミドリイシ・ゲノムの解読、日本サンゴ礁学会、2011年11月5日、沖縄県那覇市
- ④ Shinzato C, Genome sequencing of the coral *Acropora digitifera*, The International Workshop “Searching for Eve: basal metazoans and the evolution of multicellular complexity ”, 2011年9月12日, Tutzing, Germany
- ⑤ Shinzato C, Genome sequencing of the coral *Acropora digitifera*. ARC CoE Boden Conference - Genome Biology of Corals and their Relatives, 2011年3月7日, Townsville, Australia
- ⑥ 新里宙也、コユビミドリイシのマイクロアレイの開発, 日本サンゴ礁学会, 2010年12月2日, つくばカピオ
- ⑦ 新里宙也、造礁サンゴ、コユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) のゲノム解読、日本動物学会 2010年9月23日、東京大学
- ⑧ Shinzato C, The coral *Acropora digitifera* genome project, International Workshop: The evolution of multicellularity, 2009年9月14日, Tutzing, Germany

[その他]

ホームページ等

<http://www.irp.oist.jp/satoh/index.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新里 宙也 (SHINZATO CHUYA)

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクス

ユニット・研究員

研究者番号：70524726